

高脂質含有廃水処理嫌気汚泥に生息する高級脂肪酸分解細菌の分離とその特異的検出

長岡技術科学大学 学生会員 幡本 将史
正会員 井町 寛之, 大橋 晶良, 原田 秀樹

1. はじめに

嫌気性廃水処理プロセスは比較的易分解で溶解性成分を主体とする中・高濃度の有機性廃水においてはすでに成功を収めている技術である。しかし有機性廃水種においても高濃度脂質含有廃水は依然として嫌気性廃水処理においてその処理が難しい廃水種の1つである。その原因は脂質の加水分解によって生ずる高級脂肪酸 (Long-Chain Fatty Acids: LCFA) であり、それが微生物に対して吸着阻害性を有していることや分解速度が遅くプロセス内に蓄積しやすいため、処理プロセス全体の操作や効率化を行う上で大きな支障をきたすためである。

嫌気 (メタン生成) 環境下において高級脂肪酸は高級脂肪酸分解細菌により 酸化反応を経て水素を生成しながら酢酸へと分解される。この反応は生成する水素が除去されなければ熱力学的に進行しない反応である。従って、高級脂肪酸分解細菌はメタン生成古細菌などの水素を利用する微生物との強固な共生関係が必要である。そのため高級脂肪酸分解細菌を分離し純粋培養を行うことは極めて難しく分離例が少ないのが現状であり、これらの細菌に関する情報は少ない。

そこで本研究では、嫌気性処理において高級脂肪酸を分解する微生物の基礎的な情報収集を目的とし、高濃度脂質含有廃水を処理していた嫌気性汚泥から高級脂肪酸の分解を担う微生物の分離と特異的検出を行うことを試みた。

2. 実験方法

植種源には脂質を多量に含むパームオイル製造廃水の処理を行っていた中温性 (35°C) と高温性 (55°C) の2種類の嫌気性グラニュール汚泥を使用した。高級脂肪酸分解細菌の集積培養には人工培地にパームオイル製造廃水中の主要な高級脂肪酸であるパルミチン酸 (C16), ステアリン酸 (C18), オレイン酸 (C18:1) およびリノール酸 (C18:2) の4種類を基質 (各 1 mM) として用いて嫌気的に培養を行った。高温性汚泥を植種源としたものは 55°C で、中温性汚泥を植種源としたものは 37°C で培養を行った。培地には基質と等量 (1 mM) の塩化カルシウムを添加し、高級脂肪酸との不溶性の塩を形成させることで高級脂肪酸による微生物への吸着阻害の防止を図った。

高級脂肪酸分解細菌の同定には 16S rRNA 遺伝子を分子マーカーとする分子生物学的手法を用いた。集積培養液中の菌体から DNA を抽出し、PCR により細菌 (*Bacteria*) 由来の 16S rRNA 遺伝子のみを増幅した。その増幅産物を大腸菌を介してクローン化し、ランダムに選択した 10 以上のクローンについて塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

高級脂肪酸分解細菌の特異的検出には FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いた。使用した DNA プローブは *Syntrophomonadaceae* 科を標的とする既存の S-F-Synn-700 (5'-ACTGGTRTTCCTCCTGATTTCTA-3') プローブおよび各集積培養系で最も高頻度に検出されたクローン配列に特異的になるよう新たに設計した数種のプローブである。

3. 実験結果・考察

高級脂肪酸分解細菌の選択的な培養を試みるために上記の中温と高温の2種類の嫌気汚泥と4つの基質を用いて計8個の集積培養系を作成した。これら集積培養の結果、高温パルミチン酸集積培養系では2週間程度で微生物の増殖が確認できるようになったが、その他の集積培養系では微生物の増殖を確認するのに1-3ヶ月以上を要し極めて増殖が遅かった。これら集積培養系内を顕微鏡観察したところ、全ての集積培養系において数種類の形態の異なる微生物が存在しており、その中にはメタン生成古細菌に特有なF₄₂₀様の自家蛍光を持つ微生物も含まれていた。また全ての集積培養系内では高級脂肪酸の分解に伴ってメタンが生成されていた。現在まで知られている嫌気性高級脂肪酸分解細菌は水素資化性のメタン生成古細菌と共生することで高級脂肪酸を分解することが知られている。これらのことから、本研究で得られた集積培養系においても高級脂肪酸は高級脂肪酸分解細菌とメタン生成古細菌との共生により分解が進行していると考えられた。

次に高級脂肪酸の分解に関与している細菌を同定するために3回以上継代培養を行った (培養が上手く行えなかった高温リノール酸集積培養系を除く) 7つの集積培養系について、細菌 (*Bacteria*) の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いてクローンライブラリーを作成した。その結果、高温ステアリン酸集積培養系と中温および高温のパル

キーワード：高級脂肪酸, LCFA, 嫌気性細菌, 16S rRNA 遺伝子

連絡先 〒940-2188 長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏環境制御工学研究室 TEL0258-47-1611-(6646)

ミチン酸集積培養系から最も高頻度に検出されたクローンは既知の高級脂肪酸分解細菌が属している *Syntrophomonadaceae* 科に属していたが、それらのクローンの遺伝子配列は既に分離されている細菌の 16S rRNA 遺伝子配列とは 92% 程度の相同性であった。また、高温オレイン酸培養系で最も高頻度に検出されたクローンは *Firmicutes* 門に属する科レベルで新しいグループに、中温リノール酸培養系では *Spirochaetaceae* 科に、そして中温ステアリン酸培養系では *Deltaproteobacteria* 綱に属するクローンが最も高頻度に検出された (Fig.1)。そこでこれら高頻度に検出されたクローン配列に特異的な DNA プローブを作成し、FISH 法による検出を行った。その結果集積培養系内においてもこれらの配列を持つ細菌が優先していることが確認できた (Fig.2)。以上の結果より本研究で得られた集積培養系内において高級脂肪酸の分解を担っている微生物は、現在までに分離培養のなされていない細菌である可能性が強く示唆された。

次に分子系統解析の結果から集積培養系において最も優先していた細菌を標的として分離を試みた。分離作業ではまず分子系統的に最も近縁な細菌の生理学的情報を基に、標的の細菌が単独で利用できるような基質を推定し、それを用いて集積培養を行った。そしてその集積培養系に対して標的細菌に特異的な DNA プローブを用いて増殖を確認し、その後分離操作を行った。このような手順を高温オレイン酸集積培養系に適用した。本培養系において最も優先していた細菌が単独で利用できるような基質を分子系統的に最も近縁な細菌である JE 株（最近、我々の研究グループが分離した嫌気性エタノール酸化共生細菌）より推定し、TOA1430 プローブを併用して集積培養を試みた。その結果、スクロースを基質として用いることにより TOA1430 プローブに反応する細菌 (TOA 株) を集積培養することに成功し、ロールチューブ法により TOA 株の純粋培養系を得ることが出来た。

この分離株が高級脂肪酸の分解能を有するかどうかを確かめるために TOA 株を水素資化性メタン生成古細菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* と再構成して培養を行ったところ、高級脂肪酸の分解に伴いメタンと酢酸が生成されることを確認した。

4. まとめ

高濃度脂質含有廃水処理していた嫌気性汚泥を植種源として高級脂肪酸を基質とした集積培養を行うことにより、高級脂肪酸の分解に伴ってメタンが生成される集積培養系を得ることができた。また、これら集積培養系内に生息する細菌を 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子生物学的手法により解析を行った結果、高級脂肪酸の分解を担っている細菌は、既知の高級脂肪酸分解細菌群として知られている *Syntrophomonadaceae* 科のみでなく、これらとは系統学的に全く異なるグループの細菌も関与している可能性が示された。さらに、分子生物学的手法により得られた結果とその過程で作成した DNA プローブを用いながら高級脂肪酸分解細菌の分離を試みた結果、新規な高温性嫌気高級脂肪酸分解細菌 TOA 株を分離することに成功した。

今後は更なる嫌気性高級脂肪酸分解細菌の分離およびの検出手法の開発を行っていくと同時に、それらの定量法の確立や分離株の詳細な菌学的特徴の調査を行っていく予定である。

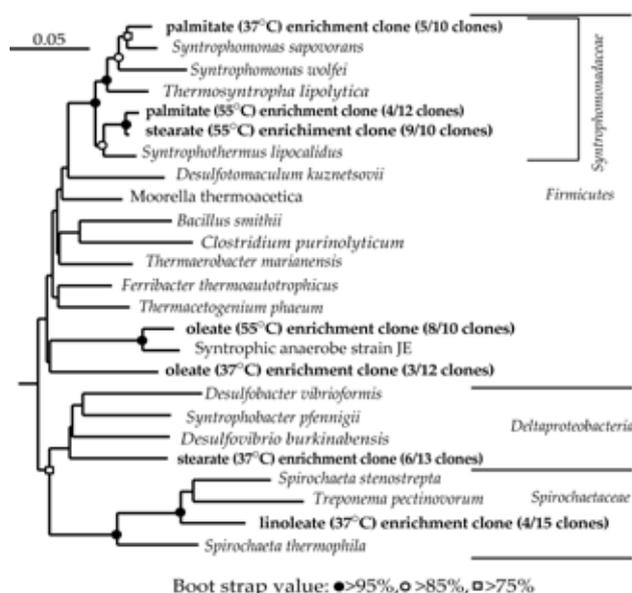


Fig.1 Phylogenetic tree of clones obtained in this study and selected bacteria. The clones represent the highest frequency of each sample. The scale bar indicates the number of changes of nucleotides per sequence position. Boot strap values above 75% are indicated at the branch point.

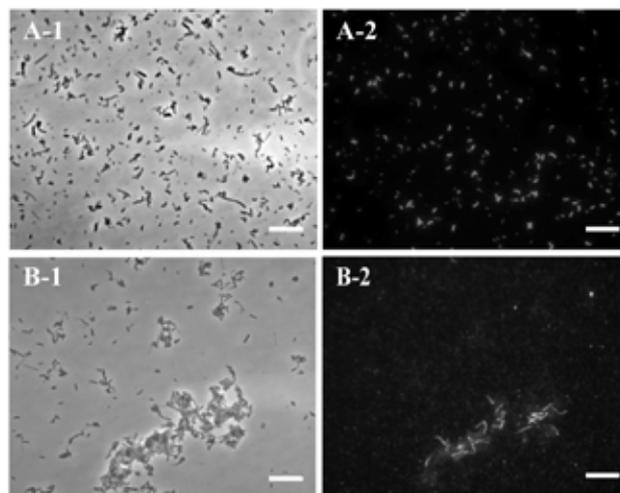


Fig. 2 In situ hybridization of long-chain fatty acid degrading enrichment cultures. Phase contrast micrographs (panel 1) and fluorescent micrographs of the same field (panel 2) are shown. (A) Methophilic palmitate-degrading enrichment culture hybridized with Cy3-labeled S-F-Synn-700 probe. (B) Thermophilic oleate-degrading enrichment culture hybridized with Cy3-labeled TOA1430 probe. Bars represent 10 μ m.