

嫌気性廃水処理において高級脂肪酸の分解を担う細菌の RNA-SIP 法を用いた多様性解析

長岡技術科学大学 学生会員 ○幡本 将史
海洋研究開発機構 井町 寛之
長岡技術科学大学 正会員 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分解性の良い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。しかしながら、これら有機性廃水種の中でも高濃度脂質含有廃水は依然として嫌気性処理が難しい廃水種の 1 つである。その原因の一つは脂質の加水分解に伴って生成する高級脂肪酸に起因している。特に廃水中の高級脂肪酸は炭素数 16 以上 (e.g.; パルミチン酸やオレイン酸等) のものがその大部分を占めることが知られていることから、これら炭素数 16 以上の高級脂肪酸の迅速な分解が効率的な嫌気性処理を行うためのキーポイントの一つであると考えられる。従って、脂質含有廃水処理において高級脂肪酸の分解を担っている微生物の情報は非常に重要である。しかしながら、メタン生成環境下において高級脂肪酸の分解を担う細菌は、水素資化性のメタン生成古細菌との強固な共生関係が必要な嫌気共生細菌であるため分離・培養が極めて困難であり、その知見は少ないのが現状である。これらの背景のもと我々は嫌気性高級脂肪酸分解微生物の基礎的知見を得るために、16S rRNA 遺伝子を分子マーカーとした分子生物学的手法を併用しながらそれらの分離培養を試みてきた。その結果、現在までに知られていない細菌が高級脂肪酸の分解に関与している可能性が示された。しかしながら、それら高級脂肪酸分解細菌の分離培養は極めて困難であり、今のところ純粋培養をして詳細な情報を得るまでには至っていない (1)。

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多様性を分子系統学的に明らかにすることを目的として、培養に依らない微生物の機能推定法である Stable-isotope probing (SIP) 法を使用し、高級脂肪酸の分解を担う微生物の推定を試みた。

2. 実験方法

実験には高濃度脂質含有廃水である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用いた。パルミチン酸 (C16; 1 mM) を用いた前培養の後、高級脂肪酸分解細菌が特異的に分解できる部分の炭素を ^{13}C で標識したパルミチン酸 (Palmitic acid-1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ potassium salt; 1 mM) を使用して培養を行った。高温性汚泥を植種源としたものは 55°C で、中温性汚泥は 37°C で嫌氣的に培養を行った。培養系より抽出した RNA は Caesium Trifluoroacetate (CsTFA) を使用した密度勾配遠心法により密度ごとに分離し各画分の分取を行った。それぞれの画分の RNA 量は細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いた定量的 RT-PCR 法により測定した。また細菌を標的としたプライマーセットを用いた Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法により CsTFA の密度変化に伴う菌叢の変遷を確認し、その後、16S rRNA 遺伝子を用いたクローンライブラリーを構築して高級脂肪酸を利用した細菌を推定した。

3. 実験結果・考察

嫌気性高級脂肪酸分解細菌の多様性を調べるため、上記の 2 種類の嫌気性グラニュール汚泥に対してパルミチン酸を用いた SIP 法を適用した。まず汚泥内の高級脂肪酸分解細菌の活性を高めるためにパルミチン酸で前培養を行った。前培養では高温・中温のどちらの培養系も約 1 ヶ月程度で投入したパルミチン酸が全てメタンへ転換した。その後バイアル気層部を N_2/CO_2 でパージし、 ^{13}C で標識されたパルミチン酸を用いて培養を行った。そして、投入した基質がほぼ全てメタンへ転換した時点で汚泥より RNA の抽出を行った。その後、さらにもう一度 ^{13}C で標識されたパルミチン酸で培養し RNA を抽出した。抽出した RNA を密度勾配遠心法により密度ごとに分離し、各画分における rRNA 量を RT-PCR 法を用いて測定した。その結果、高温・中温の両培養系ともに ^{13}C で標識されたパルミチン酸で培養を行うことにより密度の大きい RNA が増加している事が確認できた (Fig.1)。この密度の大きい RNA の増加は ^{13}C で標識され

キーワード：高級脂肪酸, SIP 法, 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 TEL:0258-47-1611-(6646)

たパルミチン酸で2回培養することにより、より顕著に確認できた (Fig.1)。この RNA の密度の増加は高級脂肪酸分解細菌が ^{13}C で標識されたパルミチン酸を基質として利用し、RNA 合成に ^{13}C を利用したためであろうと考えられた。そこで、パルミチン酸を基質として使用した細菌の推定を行うため、まず T-RFLP 法を用いて CsTFA の密度変化に伴う群集構造の変遷を確認した。その

結果、中温性汚泥を植種源とした中温培養系では 71 bp の T-RF を示す細菌が CsTFA の密度の増加に伴って優占していくことが分かった (Fig.2A)。また高温性汚泥を植種源とした高温培養系では 127 bp や 242 bp の T-RF を示す細菌が主に CsTFA の密度の増加に伴って優占していくことが分かった (Fig.2B)。次に、パルミチン酸を資化した細菌由来の RNA が優占していると考えられる“重い”RNA をテンプレートとして細菌のクローンライブラリーを構築し分子系統解析を行った。その結果、中温培養系由来の“重い”RNA (Buoyant density [BD] =1.82 g/ml) を用いたクローンライブラリーにおいては、現在までに嫌気性高級脂肪酸分解細菌グループとして知られている *Syntrophomonadaceae* 科ではなく別の *Clostridiales* 目に属するクローンが優占した (全 50 クローン中 28 クローン) (Fig.3)。このクローンは先の T-RFLP 解析で主要なピークであった 71 bp の T-RF を示した。一方、高温培養系由来の“重い”RNA (BD =1.82 g/ml) を用いたクローンライブラリーにおいても、127 bp や 242 bp の T-RF を示す、*Syntrophomonadaceae* 科に属さない未知の細菌由来のクローン配列であった。これら SIP 法による解析結果は、現在までに全く知られていない細菌が高級脂肪酸の分解に関与している可能性を示していた。

今後はさらに数種類の嫌気性汚泥に対してパルミチン酸を用いた SIP 法による解析を進め、高級脂肪酸の分解に関与している細菌の多様性の把握、そして SIP 法により得られた情報から高級脂肪酸分解細菌を検出・定量するための DNA プローブの設計、さらには分離株の取得を行うことで、高級脂肪酸分解細菌の詳細な基礎的情報の収集を行う予定である。

参考文献

(1) 幡本将史, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 嫌気性廃水処理プロセスにおいて高級脂肪酸の分解を担う細菌の分離・培養と特異的検出. 2006. 環境工学論文集. 42:609-618.

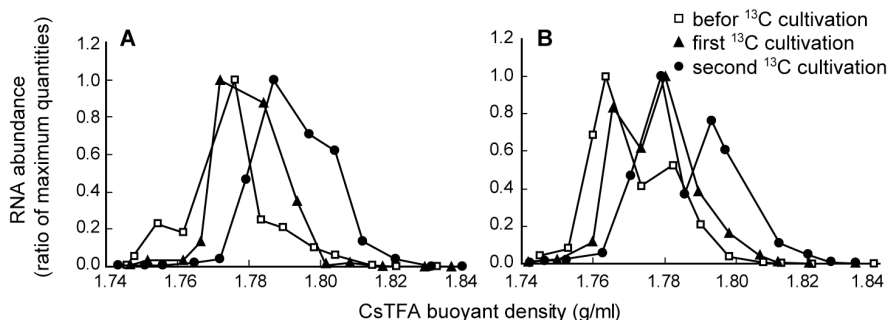


Fig.1 CsTFA density gradient centrifugation of rRNA extracted from mesophilic granular sludge incubated with ^{13}C -labeled palmitate at 37°C (A) and 55°C (B).

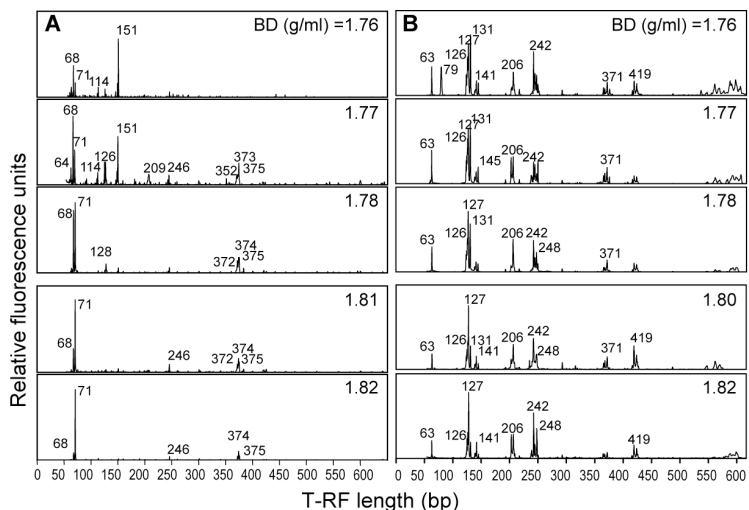


Fig.2 T-RFLP fingerprints of density-resolved bacterial communities generated from RNA which was extracted after second time cultivation with ^{13}C labeled palmitate at 37°C (A) and 55°C (B).

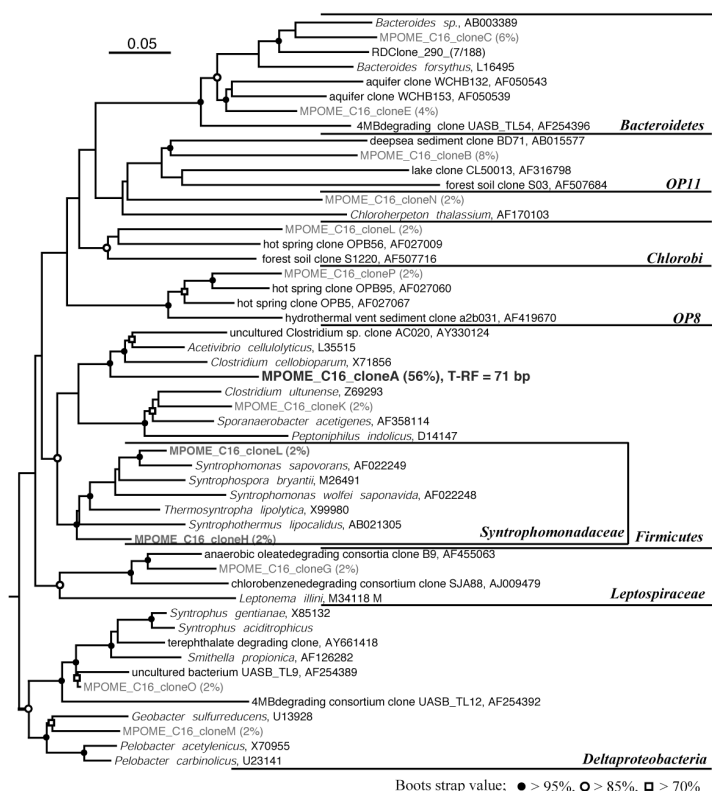


Fig.3 Phylogenetic tree of representative clones from density-resolved "heavy" RNA (BD=1.82 g/ml) from mesophilic culture. The in-silico T-RF size of the clone "MPOME_C16_cloneA" is calculated with 71bp. The scale bar represents 5% sequence divergence.