

嫌気性汚泥における脂肪酸分解細菌の 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 大橋 晶良

東北大学 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 1 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。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。これら背景のもと我々は、高級脂肪酸の分解を担う微生物の基礎的情報を得るために、分子生物学的手法を併用しながらそれらの分離を試みてきたが、それら細菌の分離培養は極めて困難であった (1,2)。

そこで本研究では、分離培養が困難な嫌気性高級脂肪酸分解細菌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、分離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 4 種類の嫌気性汚泥に適用し、高級脂肪酸の分解を担う細菌の推定を行った。さらに本研究では、酪酸を用いた SIP 法を同じ汚泥に適用し、高級脂肪酸を用いた結果との比較を行う事で、高級脂肪酸の分解にのみ関与する細菌、高級脂肪酸と酪酸の両方の分解に関与する細菌、そして酪酸分解に関与し高級脂肪酸の分解には関与しない細菌の推定を試みた。これら一連の実験結果より脂肪酸分解細菌としてひとまとめにされていた高級脂肪酸分解細菌と短鎖脂肪酸分解細菌について、それら微生物群の特定とその役割の解明を目指した。

2. 実験方法

実験には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) の嫌気性グラニュール汚泥 (MP および TP 汚泥)、同種の廃水処理を行っていた中温性 (35°C) の消化汚泥 (MBF 汚泥)、および都市廃棄物の処理を行っていた高温性 (55°C) 消化汚泥 (JET 汚泥) の 4 種類を使用した。培養には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 ([1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$] palmitic acid potassium salt; 1mM) と全ての炭素を ^{13}C で標識した酪酸 ([$^{13}\text{C}_4$] sodium butyrate; 1mM) を用いた。グラニュール汚泥はリアクターから採取してから長期間冷蔵保存していたため、実験の前にパルミチン酸もしくは酪酸を用いて前培養を行った。培養系より抽出した RNA は Cesium 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 量は細菌および古細菌の 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) 解析により 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および酪酸を利用した細菌を推定した。

3. 実験結果・考察

SIP 法を用いて高級脂肪酸および酪酸分解細菌の多様性を調べるため、上記の 4 種類の嫌気性汚泥と ^{13}C で標識されたパルミチン酸および酪酸を用いて培養を行った。酪酸は 2~7 日で、パルミチン酸は 4~11 日でほぼ全てメタンへ転換した。その時点で汚泥より RNA の抽出を行い、その後バイアル気層部を N_2/CO_2 でページし、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。2 回目の培養では酪酸は 2~4 日で、パルミチン酸は 2~8 日でほぼ全てメタンへ転換した。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 量を定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。その結果、 ^{13}C で標識された基質で培養を行うことにより

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)

り密度の大きい RNA が増加していることが確認できた。この RNA の密度増加は ^{13}C で標識された基質で 2 回培養することで、より顕著になった。この RNA の密度の増加は基質として使用した ^{13}C で標識されたパルミチン酸もしくは酪酸を細菌が分解し、RNA 合成に ^{13}C を利用したためであろうと考えられた。次に、パルミチン酸および酪酸を基質として使用した細菌の推定を行うために、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、例えば MBF 汚泥を植種源とした実験では、パルミチン酸を使用した培養系で 248 bp および 208 bp の T-RF を示す細菌が、一方、同じ MBF 汚泥を酪酸で培養した場合には 208 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.1)。これら、酪酸およびパルミチン酸を利用したと考えられる細菌を特定するため、“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作成した (Fig.2)。そして、T-RFLP 解析とクローン解析の結果からそれぞれの実験系において脂肪酸の分解に関与しているであろうと考えられる細菌の推定を行った。その結果、MP 汚泥ではパルミチン酸で培養した場合、*Clostridium* cluster III に属する配列が優占して検出された (phylotype MP16_A)。一方、酪酸で培養を行った汚泥からは *Clostridium* cluster IV に属する配列が優占して回収された (phylotype MP4_A)。これら優占して回収された配列は T-RFLP 解析の結果とも一致した。TP 汚泥では *Anaerobaculum* sp. (phylotype TP16_B)、*Tepidanaerobacter* sp. (phylotype TP4_A)、*Thermotoga* sp. (phylotype TP16_A)、*Syntrophomonadaceae* 科 (phylotype TP16_K) に属する配列や *Deltaproteobacteria* 綱のクローングループ (Clone MST group) (phylotype TP16_H) 等多様な配列がパルミチン酸または酪酸培養で検出された。これら配列の中で、系統解析結果や T-RFLP 解析の結果をふまえ、TP 汚泥では Clone MST group (phylotype TP16_H) と *Syntrophomonadaceae* 科の細菌 (phylotype TP16_K) がパルミチン酸の分解に、また *Tepidanaerobacter* sp. (phylotype TP4_A) が酪酸の分解に関与していると推定した。MBF 汚泥では上述の 248 bp T-RF を示す細菌は Clone MST group 由来であった (phylotype MBF16_B,C)。また 208 bp T-RF を示す細菌は *Syntrophaceae* 科細菌のものであった (phylotype MBF4_A)。これら配列はクローン解析でも優占して回収されたことから、これら細菌がパルミチン酸および酪酸の分解に関与していると判断した。JET 汚泥でも *Anaerobaculum* sp. (phylotype JET16_E, JET4_D)、*Coprothermobacter* sp. (phylotype JET16_A, JET4_A)、*Clostridiales* 目 (phylotype JET16_B,D, JET4_C,F) 等種々の配列が主に回収された。これらの中で系統解析結果や T-RFLP 解析の結果から *Clostridiales* 目に属する細菌がパルミチン酸と酪酸の分解に関与している可能性が高いと判断した。

以上の事から、現在知られている脂肪酸分解細菌群である *Syntrophomonadaceae* 科細菌だけではなく、今までに全く知られていない細菌が高級脂肪酸や酪酸の分解に関与している可能性が示された。

参考文献

- (1) Hatamoto, M., et al. (2007) *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1332-1340.
- (2) Hatamoto, M., et al. (2007) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (In press)

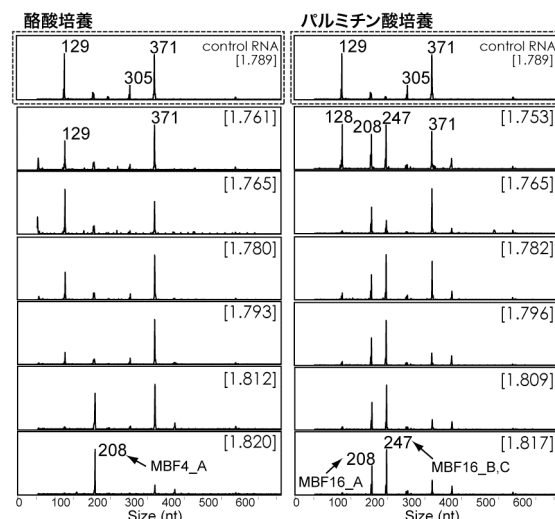


Fig. 1 Bacterial T-RFLP fingerprinting of density-resolved RNA from representative "heavy" and "light" fractions of sludge MBF. Dashed box showing T-RFLP fingerprints of density-resolved unlabeled control RNA. CsTFA BDs (g·ml⁻¹) of gradient fractions are given in brackets. The numbers at the T-RF peaks indicate the T-RF lengths. Representing phylotypes of T-RFs expected as butyrate or palmitate oxidizers are indicated in parenthesis.

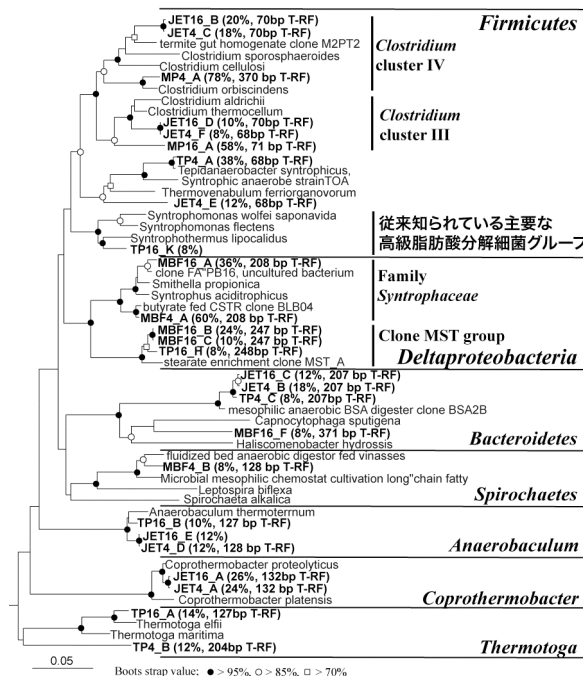


Fig.2 Phylogenetic placement of representative bacterial 16S rRNA phylotypes from "heavy" RNA fractions. The measured T-RFs length of phylotypes digested with *MspI* is shown in brackets. The scale bar represents the number of changes of nucleotide per sequence position. The symbols at each branch point show the bootstrap values obtained with 1,000 resampling analysis.