

食用油を添加した高温接触酸化処理における FISH法・キノプロファイル法・PCR- DGGE法を用いた微生物群集の解析

栗栖 太¹・佐藤 弘泰²・味埜 俊³・松尾 友矩⁴

¹正会員 工博 東京大学助手 大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

²正会員 工博 東京大学助教授 大学院新領域創成科学研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

³正会員 工博 東京大学教授 大学院新領域創成科学研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

⁴正会員 工博 東京大学教授 大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

食用油を添加した高濃度有機性廃水の高温接触酸化処理における微生物群集を、FISH法・キノプロファイル法・PCR-DGGE法・DGGEバンドの塩基配列解読により解析した。運転初期の中温状態では、プロテオバクテリアが優占であった。それに対し運転後半の高温状態では、グラム陽性低GC群の細菌が優占となった。また同じ高温でも、分解率が高い時と油分が蓄積して分解率が低くなった時とでは、群集の構成種は大きく異なった。分解率が高いときに存在した微生物種より、良好な処理を行うための細菌種として *B.thermocloacae* や、好熱性 *Bacillus* の類縁種が候補としてあげられることがわかった。上述4種類の群集解析手法を組み合わせることは、群集を詳しく見ていく上で効果的で確実性のある方法であるといえる。

Key Words : *thermophilic contact oxidation process, microbial community analysis, quinone profile, FISH, PCR-DGGE*

1. はじめに

高温接触酸化処理法は、高濃度の有機性排水 (10^5 - 10^6 mgBOD/L程度) を処理する方法として近年開発され、「処理水が出ない、汚泥も出ない」¹⁾方法として注目を集めている。本法では、担体となる木片に排水を吸収させ保持し、木片間の空隙に送気することにより酸素を供給する。微生物による有機物の酸化分解によって放出される熱により、反応槽は45-65℃に保たれ分解反応が進行する。処理が高温で進行するので、適切な運転条件下では投入した水分をすべて水蒸気として系の外に排出させることができる。処理対象排水の有機物濃度がBODにして数万mg/L以下の場合、水分を蒸発させるために熱源が必要となる。これまでの研究では、直接加温する方法²⁾、熱量の高いもの(廃植物油など)を加える方法³⁾⁻⁵⁾が検討されてきている。

また本処理法の特徴として、高効率の有機物分解があげられる。劉らは食品工業廃水の処理実験を行い^{6),7)}、発生(=蓄積)汚泥量が非常に少ないことを

示した。また、劉ら³⁾は豚糞尿を、Cai *et al*⁴⁾は下水余剰汚泥を、池田ら⁵⁾は浄化槽汚泥を用い、いずれも熱源として廃食用油を加えて処理実験を行っている。これらの研究においても、投入有機分の80%-94%がCO₂等に分解されて反応槽外に排出されたと報告している。筆者ら²⁾が下水余剰汚泥のみを用い、反応槽を加温して行った分解実験でも、平均して投入有機分の9割がCO₂として排出されている。一般に廃水を微生物により好氣的に処理した場合、有機物のおよそ半分は菌体成分となり、活性汚泥法の場合は余剰汚泥となる。高温接触酸化処理法は、一般の好氣的な処理法に比べ、非常に大きな割合で有機物を無機化することができるプロセスであるといえる。

現時点において、本処理法における微生物群集に関する知見は非常に限られている。高効率の無機化の機構を説明する上で、また良好な処理を持続するための条件を調べるためにも、微生物群集についての詳しい知見が必要である。

従来、微生物群集を調べるためには、培養・単離してその形態学的な特徴から同定を行ってきた。しか

表-1 基質組成 (mg/L)

酵母エキス (極東)	5000
ペプトン (極東)	15000
CH ₃ COONa 3H ₂ O	10000
尿素	2000
NH ₄ Cl	4000
NaCl	4000
KH ₂ PO ₄	2000
MgSO ₄ 7H ₂ O	1000
MnSO ₄ 4H ₂ O	50
CaCl ₂ 2H ₂ O	100
FeCl ₂ 6H ₂ O	10

表-2 炭素含量

基質	9700mgC/L
コーン油	79.2%(w/w)

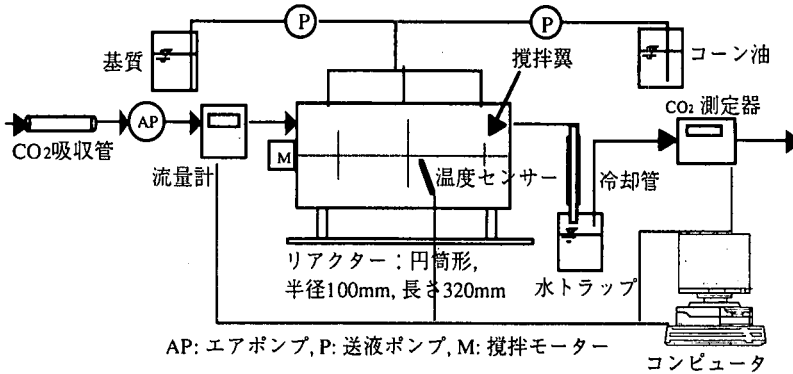


図-1 実験装置図 (リアクターにはウォータージャケットとウレタンフォームが巻かれている)

しながら、環境中や活性汚泥などに存在する細菌は、全体の0.1%~10%程度しか培養できない⁹⁾。したがって、群集の全体像を把握するためには、培養によらない群集解析の手法を用いる必要がある。

培養によらない群集解析の手法には、大きく分けて化学分類学的手法と分子生物学的手法がある。キノプロファイル法は化学分類学的手法であり、細胞膜に存在する呼吸鎖・光合成電子伝達鎖の必須成分であるキノンの分子種が、微生物種により異なることを用いて微生物種の存在割合を調べる手法である¹⁰⁾。分子生物学的手法は、微生物の持つ遺伝子情報に基づく手法であり、とくにrRNA塩基配列を利用した手法が近年注目されている。FISH(Fluorescent In Situ Hybridization)法はrRNAを標的とした蛍光DNAプローブを用いて顕微鏡下で微生物種を検出する方法である。rRNA塩基配列は部位によって多様性が大きく異なる、ということを用いていろいろな大きさの微生物群を標的とするプローブが設計されてきている⁹⁾。PCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法はDNAの特定領域のみをPCRで増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(=DGGE)で塩基配列の違いに基づきDNAを分離する手法である。PCRの標的をrRNA遺伝子(=rDNA)とすることにより、微生物種レベルでの解析が行われている^{11)~16)}。

しかしながら、これらの分子生物学的手法も、化学分類学的手法も万能ではなく、単一の手法では限界も多い。微生物群集をより確実に、より詳しく把握していくためには、複数の手法を組み合わせる必要がある。

そこで本研究では、高温接触酸化処理法のリアクターを運転し、処理性能をモニターをしながら、複数の手法を用いて微生物群集の構成、及び動態を把握

する実験を行った。群集全体をグループレベルで把握するため、キノプロファイル法、グループ特異的プローブによるFISH法を用いた。また、種レベルでの動態を解析するため、16SrDNA断片によるPCR-DGGE法を用いた。加えて存在菌種を調べるため、DGGEにより分離されたDNAの塩基配列を解読し、既知の微生物種との相同性解析を行った。

2. 実験方法

(1) リアクターの運転方法

実験装置を図-1に示す。反応槽は塩化ビニル製の円筒である。必要に応じて反応槽を加温できるように、反応槽外壁にウォータージャケットが巻いてあり、さらに保温のためにウレタンフォームを巻いてある。容積は10Lであり、槽内は常時攪拌翼により毎分約4回転で攪拌した。担体には2.4mm大の木片(桜)を用いた。1日に1回基質を投入することにより、1日周期のバッチ運転を繰り返した。投入した基質はし尿を模擬した人工基質(表-1)である。自然できる濃度(=投入した物質の持つ熱量で基質の水分が蒸発できる濃度)となるよう、基質と同時にコーン油を投入した。基質及びコーン油のTOC濃度及び炭素含量を表-2に示す。コーン油の投入量は基質の1/10程度とした(表-3)ものの、炭素量換算では9割以上がコーン油に由来する。反応槽への送気量は200L/m³(chip)/min(0.8L/min(Run1), 1.2L/min(Run2))とした。反応槽内から発生するCO₂を測定するため、ソーダライムを充填したCO₂吸収管を通した空気を反応槽に送り、排気中のCO₂濃度をCO₂測定器(LX-710, 飯島電子工業)で測定した。上記の条件で、Run1とし

表-3 運転条件の変更点 (Run1,2)

	Run1	Run2
保温材	1 巻き	2 巻き+発泡スチロール箱
熱損失係数	$16.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	$8.7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$
担体量	4L	6L
基質投入量	200mL/d	300mL/d
コーン油投入量	20mL/d	40mL/d

て36日間、その後20日間の運転休止期間を挟み、Run2として58日間運転した。運転休止期間では、担体は常温に放置した。Run2では、反応槽の保温を強化して熱損失を小さくし、また担体及び基質の投入量を1.5倍、油の投入量を2倍として反応槽当たりの熱の発生量が大きくなるようにした(表-3)。なお表-3中の熱損失係数は、反応槽に温水を入れ温度降下の勾配から算出したものである。Run2の運転条件で、投入炭素源の8割がCO₂まで分解すれば、温度は50℃までは上昇し、水分も蒸発する計算である。担体はRun1のものを継続して使用し、新たに未使用の木片を2L加えた。Run1の運転を開始する際に、人工基質で馴養された嫌気好気式活性汚泥(MLSS: 4000mg/L) 200mlと水800mlを加え、植種と含水率の調整をした。

(2) キノンプロファイル法

リアクターから取り出した担体とその付着物(以下、担体サンプルとする)約5g(湿重量)はそのまますぐに凍結したのち、凍結乾燥機にて水分を除去した。乾燥サンプルをクロロホルム:メタノール=2:1(v/v)にて抽出し、抽出分をロータリーエバポレータを用いて蒸発乾固させ、ヘキサンで再抽出した。この粗抽出物を胡らの方法¹⁷⁾により、固相抽出カートリッジ(Waters社, Sep-Pak Silica)にて精製し、かつメナキノン(MK)・ユビキノン(Q)画分を分取した。この画分を再び蒸発乾固させ、アセトンに溶媒置換した後にHPLC(Waters社, Module 1)を用いて分離・定量した。分析条件は以下の通り;移動相:メタノール:2-プロパノール=9:2, 流量:1mL/min, カラム:Waters Novapak C18 (3.9x150mm), カラム温度:45℃, 検出器:吸光度検出器(MK:270nm, Q:275nm)。メナキノンとユビキノンの濃度比は、各キノンのモル吸光度係数をもとに算出した。ユビキノンの標準物質としてはQ-10(Sigma社), メナキノンの標準物質としては純菌株 *Bacillus cereus* (MK-7), *Rhodococcus equi*(MK-8

表-4 FISH法に用いた遺伝子プローブと標的細菌群

プローブ	略号	標的細菌群	参考文献
Eub338	Eub	全(真正)細菌	19
Alf1b	Alf	プロテオバクテリアα群	20
Bet42a	Bet	プロテオバクテリアβ群	20
Gam42a	Gam	プロテオバクテリアγ群	20
CF319a	CF	Cytophaga-Flavobacterium群	21
HGC69a	HGC	グラム陽性高G C群	22
Tbcil832*	-	好熱性 <i>Bacillus</i>	23

* 参考文献中は S*-Tbcil-0832-a-A-18である。

(H2))を用い、分子鎖長がHPLCにおける保持時間の対数に比例する関係¹⁰⁾を用いて、分子種の同定を行った。

(3) FISH法

担体サンプル約0.5gに除菌水5mLを加え、超音波破砕器にて15W, 5分間分散した後、No.1の濾紙で濾過して濾液を菌体抽出サンプルとした。この菌体抽出サンプルを用い、Amannの方法¹⁸⁾によりスライドガラス上でFISHを行った。サンプルの固定は3%パラホルムアルデヒド溶液で行った。FISHに用いたDNAプローブは表-4の通りである。ハイブリダイゼーションの条件は表-4に示した参考文献に従った。各細菌群の全細菌に対する存在割合を定量するため、Eub338(以下Eub)以外の群特異的プローブは、Eubと同時に用いて二重染色した。ハイブリダイゼーション条件の異なるプローブの場合、まず条件の厳しいプローブをハイブリダイズしたあと、条件の緩いプローブをハイブリダイズさせた。群特異プローブの蛍光標識にはFITC(Fluorescein Isothiocyanate)もしくはXRITC(X-Rhodamine Isothiocyanate)を、EubにはCy5™(Amersham-Pharmacia社)を用いた。ハイブリダイズ操作が終了したあと、蛍光褪色防止剤Slow Fade Light(Molecular Probe社)を用いてプレパラートを作成した。

サンプルにプローブを加えずに同様の操作をし、顕微鏡観察を行ったところ、FITC, XRITC用のフィルターセットではかなりの自家蛍光が観察され、Cy5用のフィルターセットではほとんど自家蛍光が観察されなかった。そこで、Cy5は単色の励起光で取り込み、XRITCとFITCに関しては、それぞれFITC, XRITC用のフィルターセットも用いて二重励起をし、両方で光る部分を自家蛍光として判別した²⁴⁾。

各微生物群の定量は以下のように行った²⁴⁾。蛍光顕微鏡における同一視野で、群特異的プローブによる

来する蛍光の面積と Eub に由来する蛍光の面積を定量し、その比を当該群の存在割合とした。この操作を最低 5 視野について行い、その平均を取った。顕微鏡観察・撮像には共焦点レーザースキャン顕微鏡(Leica 社, TCS-NT)を用い、面積定量には画像解析システム Q600HR(Leica 社)を用いた。

(4) PCR-DGGE 法

(3)で述べた菌体抽出サンプルから、ベンジルクロライド法²⁵⁾により核酸抽出をおこない、抽出物を 1% アガロースゲル電気泳動で確認した。以下、PCR および DGGE については、Muyzer らによる方法¹¹⁾に基づき行った。抽出した核酸をテンプレートとし、16S rDNA の *E.coli* No. 341-534 を全細菌について PCR 増幅した。用いたプライマーは全細菌に特異的な 357f(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')に 40塩基の GC clamp をつけたもの(357fGC; 5'-CGCCGCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG GCCTACGGGAGGCAGCAG-3')と、全生物に共通な 518r(5'-ATTACCGCGTCTGCTGG-3')である。DNA ポリメラーゼには Taq Gold (Perkin-Elmer 社)を、サーマルサイクラーには TaKaRa Thermalcycler を用いた。PCR の条件は、94℃9分 + (94℃1分 - 53℃1分 - 72℃2分) × 35 サイクル + 72℃10分である。得られた PCR 産物を、4% アガロースゲル電気泳動で確認した後、DGGE 用のサンプルとした。なお、DGGE を行う前に、95℃5分 - 65℃60分 で熱変性を行い、その後室温になるまで放置して非特異的な 2 本鎖の形成をできるだけ排除した。DGGE は D code system (Bio Rad 社)を用いて行った。ゲルの変性剤には尿素 + ホルムアミドを用い、35%-50% の変性剤の濃度勾配を泳動方向にもつ 8% ポリアクリルアミドゲルで 130V, 300 分間電気泳動を行った。ゲル中の核酸染色には VistraGreen(Amasham-Pharmashia 社)を用い、蛍光イメージアナライザー(Fluorimager595, Molecular Dynamics 社)を用いて画像を得た。

DGGE バンドパターンの類似度解析は、以下のような方法によった。各レーン *a, b, ...* のバンドを横並びで比較し、目で見て同一位置に出ていると思われるものを同一バンドとして、全レーン共通のバンド番号 *k* を用いて *Bak, Bbk, ...* とした。また、1つのレーンにしか見られないバンドについても同様にバンド番号を付けた。次に、レーンごとに蛍光強度のプロファイルを取り、サンプルを流していないレーンの蛍光強度をバックグラウンドとして差し引いてバンド *Bak* の強度 *Iak* とした。なお、レーン中に存在しないバンド番号の強度 *Iak* は 0 である。各レーンごとの全バンド強度に対する当該バンド強度をバンドの存在割合

Pak とした。すなわち、

$$P_{ak} = \frac{I_{ak}}{\sum_k I_{ak}}$$

である。この *Pak* をもとに、全レーン間の非類似度係数 $D(a,b)$ ²⁶⁾ を算出した。すなわち、

$$D(a,b) = \frac{1}{2} \sum_k |P_{ak} - P_{bk}|$$

である。この非類似度係数をもとに、平均連鎖法によりクラスター解析を行った。

(5) DGGE バンドの塩基配列決定および系統解析

DGGE により得られたバンドをゲルから切り出し、滅菌水を加えて凍結融解法により DNA を回収した。回収した DNA に対し、プライマーに 357f, 518r を用いて(4)と同じ方法で再 PCR を行い、PCR 産物をシーケンシングした。シーケンシング反応には、*vistra* sequencing kit (Amersham-Pharmacia 社)を用い、オートシーケンサー SQ-5500(日立製作所)により塩基配列を解読した。BLAST(WU-BLAST2.0a, DNA Data Bank of Japan [DDBJ])を用い、解読した塩基配列と高い相同性を持つ既知種の塩基配列を検索した。ここで得られた情報をもとに、類縁種における当該領域の塩基配列を GeneBank から取得し、CLUSTAL W(DDBJ)により多重整列と類似度計算、樹形図作成を行った。樹形図の描画には TreeView²⁷⁾を用いた。

3. 実験結果

(1) リアクターの運転

a) リアクター内の温度

図 - 2 は、反応槽内の温度変化を示したものである。運転開始後 12 日目を経過しても温度が上昇しなかったため、以後 Run1 においては反応槽を加温し、50℃付近に保った。Run2 では反応槽外壁からの熱損失を Run1 の約半分にし、かつ発生する熱量を増やして、分解率が十分にあれば温度が上昇するよう設定した。ところが Run2 においては、攪拌モーターが保温用の発泡スチロールの箱の中に入ったため、モーターの発熱により熱が供給されてしまい、結果的に加温されていることとなった。つまり、Run1, Run2 を通して運転 13 日目以降は熱の形で外部からエネルギーが加えられ、ほぼ常に 45-50℃ 付近に保たれた運転となった。

b) 分解率

分解率を、1日に投入した有機物中の炭素量に対

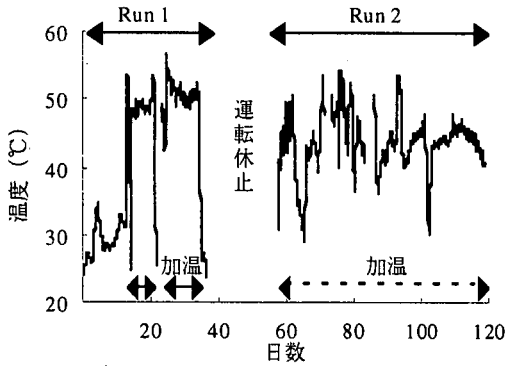


図-2 反応槽内の温度変化

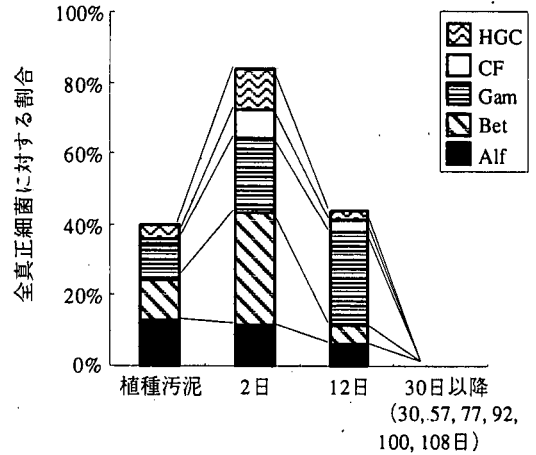


図-4 FISH法による各細菌群の存在割合の定量

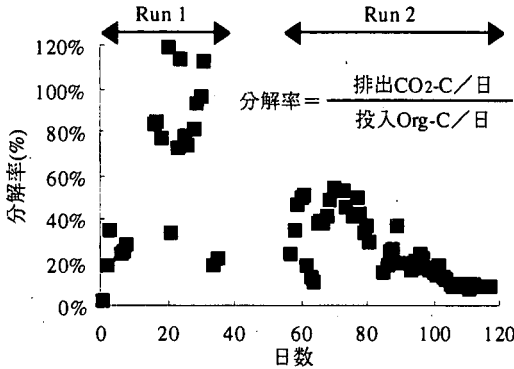


図-3 炭素ベースの分解率

する1日に排出されたCO₂の炭素量と定義し、経日変化を示したのが図-3である。100%を超える値については、前日までに反応槽に蓄積していた有機物の分解によるものといえる。なお、担体である木片も多少は分解を受けると考えられ、分解率は木片の分解産物由来のCO₂も含んだ値となっている。

Run1のうちで、反応槽が50℃に保たれている間は平均して投入炭素源の90%が排出され、良好な分解を示した。Run2においては、50日目を境に分解活性が落ちてゆき、投入した油や基質が反応槽内に蓄積していった。

(2) FISH法による群集解析

群特異的プローブを用いたFISH法による群集解析の結果をまとめたものが図-4である。2日後・12日後では、その組成に違いはあるものの、プロテオバクテリアが全体の大きな割合を占めていた。ところが、30日後以降のサンプル(30,57,77,92,100,108日後)においては、Eubプローブでは鮮明に検出できるにもかかわらず、残り5種類の群特異的プローブではその

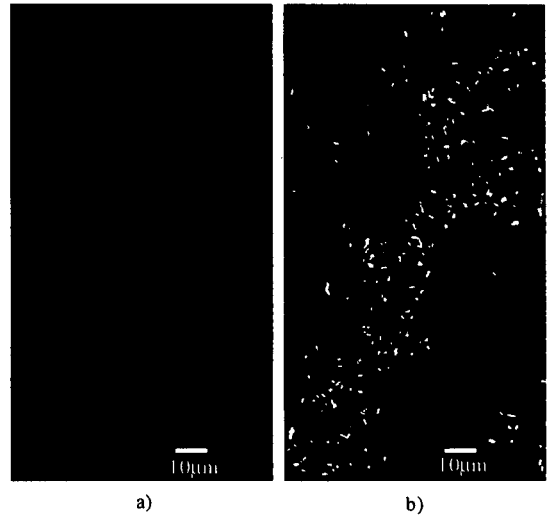


図-5 77日目のサンプルにおけるFISH写真。a): 5種類の群特異的プローブ(Alf, Bet, Gam, CF, HGC)すべてをハイブリダイズさせたもの。標識はすべてCy5。b): a)と同一視野をEubプローブでハイブリダイズさせたもの。FITC標識。

ほとんどが検出できなかった(図-5)。30日後以降においてEubのみで検出される菌の多くは、短径1µm弱、長径3µm程度の短桿菌であった。

(3) キノンプロファイル法による群集解析

Run2の57,77,92,100,108日目のサンプルについてキノンプロファイルをとったものが図-6である。57日目はRun2開始時であり、Run1終了後20日間室温で

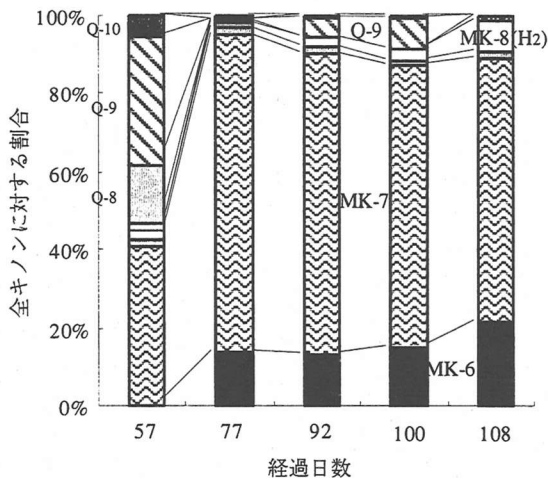


図-6 Run 2におけるキノプロファイル

放置したサンプルである。57日目から77日目まででプロファイルは大きく変化し、それ以降はほぼ一定であった。57日目はMK-7が4割でもっとも多く、6割弱がユビキノンであった。これに対し、77日目以降はMK-7が全体の7割以上を占めており、次いでMK-6(2割弱)であって、この2種のキノンで9割以上を占めていた。その他はMK-8(H₂)とQ-9が数%ずつ検出されたに過ぎなかった。

(4) PCR-DGGE 法による動態解析

抽出した核酸のPCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、すべてのサンプルにおいて予想される位置(194bp前後+GC clamp 40bp = 234bp付近)のみにバンドが確認され、非特異的な増幅はなかった。DGGEによる泳動結果を図-7に示す。植種汚泥と2日目、30日目のサンプルにおいてDNAバンドがゲル下端近くまで流れているものの、変性剤の濃度幅を35-55%と拡げて泳動した結果との比較により、これ以上流れているバンドはあっても無視できる程度であることがわかっている。また、4種類の純菌から得たDNAの混合サンプルは良く分離しており、塩基配列の違いによって分離が行われていることを示している。

純菌の対照サンプルを除いた7つのレーンについて、バンドパターン類似度解析を行ったものが図-8である。植種汚泥(=0日目)と2日目が比較的に似ていること、92-108日目がよく似ていること、12,30日目は他のどれとも大きく異なること、がいえる。

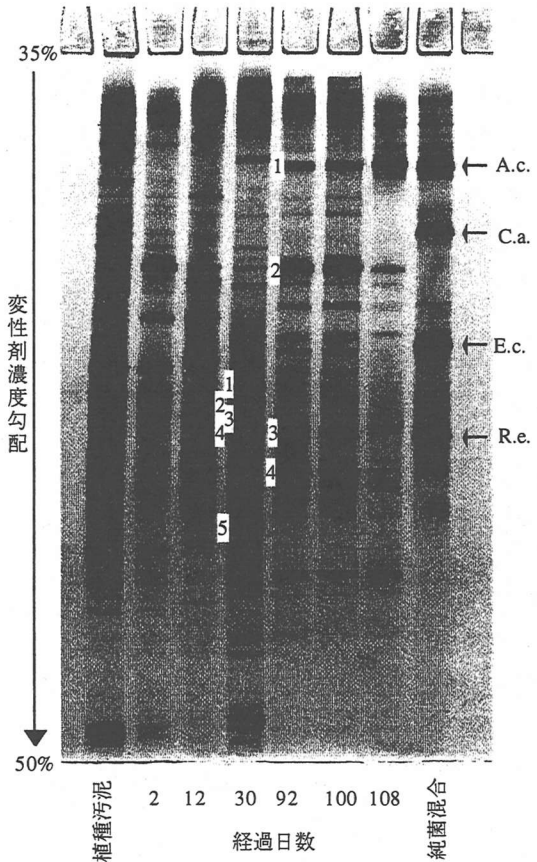


図-7 PCR-DGGE法による電気泳動結果のゲル写真。ゲル中に記した番号の右にあるバンドを切り出した。純菌混合のレーンで用いた純菌株は以下の通り；*Acinetobacter calcoaceticus* (A.c.; IAM12087), *Cytophaga aquatilis* (C.a.; IAM12365), *Escherichia coli* (E.c.; IAM12119) and *Ralstonia eutropha* (R.e.; IAM12368)(IAM: 東京大学分子細胞生物学研究所)。

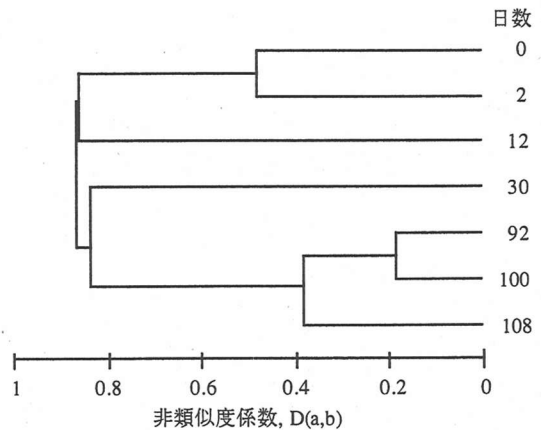


図-8 DGGEバンドパターン(図-7)のクラスター解析。0日目は植種汚泥。

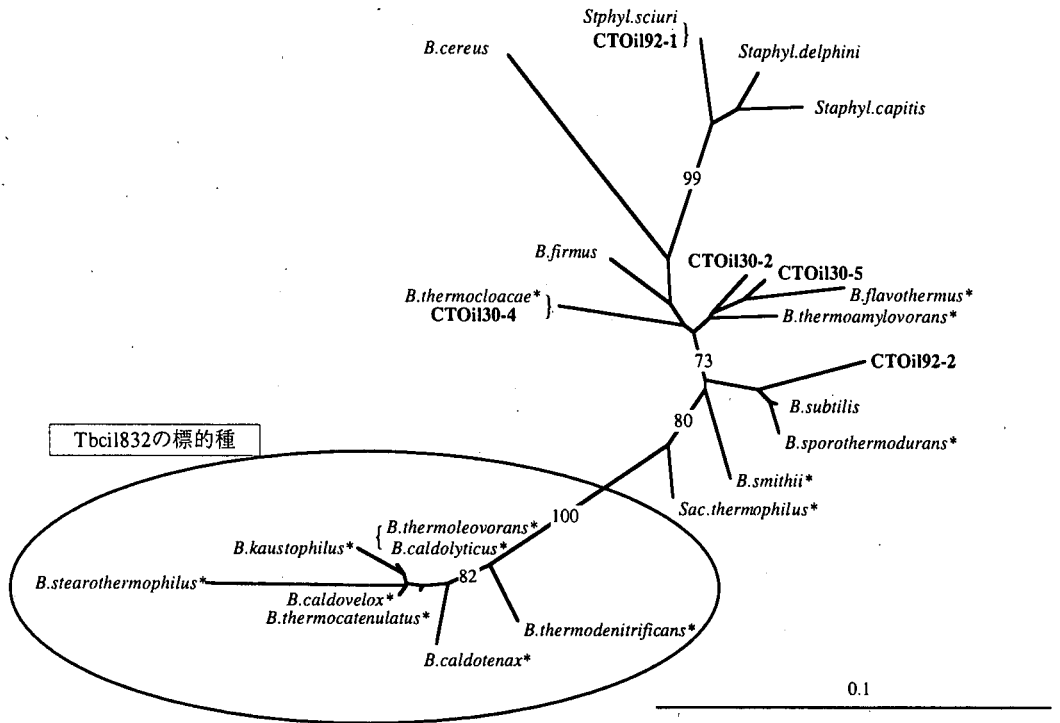


図-9 16S rDNAの一部(E. coli Position 341 - 534)の塩基配列における類似度に基づいた樹形図。図中、CTOi130-2, 4, 5およびCTOi192-1, 2はそれぞれ図-7における30日目および92日目の2, 4, 5および92日目の1, 2のバンドの塩基配列に対応する。種名の後ろに*があるものは好熱性の細菌である。枝上の数値はブートストラップ値(%)。右下の線は10%の相違を表す。B.=Bacillus, Staphyl.=Staphylococcus, Sac.=Saccharococcus。

(5) DGGE バンドの塩基配列解読結果

図-7の中で、高温で運転されていた30,92日目のバンドのうち9つを切り出し塩基配列の解読を行った。その結果、30日目の2番(以後CTOi130-2のように表す)、CTOi130-4,CTOi130-5,CTOi192-1,CTOi192-2の5つの全塩基配列(194bp前後)を読むことができた。残り4つのバンドについては、塩基配列解読において同位置に2種類以上の塩基が現れた。すなわち、バンドが2種類以上のDNAに由来していることがわかった。以後、解読が可能であった5つのバンドについて解析を行った。

DNA データベースを用いた相同性検索により、5つすべての塩基配列が、16S rDNAの当該領域におけるBacillus群の配列と高い相同性を持つことがわかった。高い相同性を持つ塩基配列はBacillus群の細菌のみであり、これら5つのバンドは、Bacillus群に由来するバンドであると同定できた。この中でも、CTOi130-4はBacillus thermocloacaeと、CTOi192-1はStaphylococcus sciuriと完全に一致した。それ以外のバンドについても、既知の種との相同性が最低でも

96%あった。

図-9は、対象配列領域における近縁の菌種との類似度を樹形図にしたものである。CTOi192-1を除く4つが好熱性のBacillusと相同性が高いことがわかる。CTOi130-4のB. thermocloacaeをはじめ、CTOi130-2, CTOi130-5はB. flavothermusやB. thermoamylovoransと相同性が高い。また、CTOi192-2はB. sporothermoduransと比較的相同性が高い。

(6) 好熱性 Bacillus をターゲットとした FISH

好熱性Bacillusの一部をターゲットとするプローブTbcil832を用い、高温状態におけるサンプル(30日目以降)すべてに対してFISHを行った。その結果、どのサンプルにおいてもプローブ由来の蛍光は全く観察されなかった。Tbcil832プローブが標的とするのは、図-9中の楕円で囲んだ菌種である。また、B. stearothermophilus純菌株に対してFISHを行った場合には十分な蛍光が観察され、このプローブが有効に働いていることは確認された。よって、30日目以降のサンプルにはTbcil832が標的とする好熱性

*Bacillus*は存在していなかったといえる。また図-9にあるように、解読を行った30,92日目のDGGEバンドの塩基配列には、プローブTbcil832が標的とする細菌と高い相同性を示すものはなかった。

4. 考察

(1) グループレベルの群集構造について

FISH法による解析結果より、運転開始後12日目までは、プロテオバクテリア主体の群集構造であったと言える。30日目以降は、Eubで検出され、表-4の残り5種類のプローブでは検出されない菌が優占であった。すなわち、細菌(=真正細菌)であって、プロテオバクテリアの α, β, γ 群、Cytophaga群、グラム陽性高GC群のいずれでもない、細菌である。加えて、57日目以降のサンプルに関しては、MK-7が優占キノン種であった。MK-7を持つ細菌として知られているもののほとんどは、グラム陽性低GC群の細菌か、Cytophaga群の細菌である²⁸⁾。ここで、FISH法によりCytophaga群の存在が認められなかったことをあわせて考えると、57日目以降の優占細菌種は、グラム陽性低GC群の細菌であると同定できる。また、顕微鏡観察により短桿菌が優占していたことも、*Bacillus*属(グラム陽性低GC群に含まれる)の細菌である可能性を示していた。

Run1の30日目に関してはキノンのデータがないために、はっきりとしたことは言えない。しかしながら、顕微鏡観察ではそれ以降のサンプルとの違いは見られなかったことから、グループレベルでは57日目以降と同様の細菌ではないかと考えられる。

なお、今回解読した30日目と92日目の塩基配列がすべてグラム陽性低GC群の細菌であると同定できたこともこれらの結論を支持しており、妥当なものといえることができる。

(2) 種レベルでの群集動態について

DGGE法で得られたデータの定量的解釈には注意が必要である。核酸抽出を行う際に、抽出されやすい菌種とされにくい菌種が存在する上に、PCRにより増幅されやすいものとされにくいものがあるからである。したがって、DGGEで得られたバンドの濃さは、サンプル全体に対するその種の存在量を反映していない。図-8のクラスター解析においても、バンドの濃さをパラメータとして類似度解析をしているからといって、解析結果がそのまま菌の存在割合の推移を表しているとはいえない。しかしながら、同一菌種における抽出効率と増幅効率についてはサン

ル間で一定であると仮定することには無理がない。これらのことを考慮に入れた上で、図-7について考察する。

接種菌のうちいくつかのバンドが、2日後で薄くなり12日目以降消滅しているのは、これらの菌種が衰退していったためと推論できる。また、92,100日目と108日目は、バンドの出現位置はほぼ同じでも濃さが異なっているものが多い。しかるに、92-108日目におけるキノンプロファイルには変化がなかった。ゆえに、92-100日目は種レベルでも群集構造の変化がなかったといえ、108日目はキノン分子種レベルでは追うことのできない変化が起こったといえる。

4.(1)において、30日目、92日目はグループレベルでの群集構造には差がないものと考えられたのに対し、PCR-DGGE法によるそれぞれのバンドパターンは完全に異なった。同じグループ内でも異なる種の細菌により群集が構成されていた、と考えることができる。

(3) 温度・分解率・基質と微生物群集

2,12日後の反応槽温度は30℃前後の中温状態であり、30,77,92,100,108日後は45-50℃付近の高温状態である。FISH法による解析で明らかになった群集構造の違いは、反応槽温度の違いによるものと思われる。すなわち、運転初期の中温状態では、プロテオバクテリアを主体とした菌相を形成しており、その後高温になった時に菌相が大きく変化し、グラム陽性低GC群の細菌が優占となったと考えることができる。高温状態での運転期間中のサンプルにおいて、5種類のうち4種が*Bacillus*属であると同定されたことから、*Bacillus*属が優占菌種としてもっとも有力である。特に、好気性の好熱性細菌が*Bacillus*属の中で多く知られており^{29),30)}、上記4種すべて好熱性*Bacillus*と近縁であったことから、優占菌種は好熱性*Bacillus*の既知の種、もしくは未知の類縁種である可能性が高い。ただし、プローブTbcil832をもちいたFISHの結果より、好熱性*Bacillus*の中でも、プローブTbcil832の標的種ではない。

高温状態下での優占種は好熱性*Bacillus*群であると推定されたものの、30日目と92日目以降では種レベルでの群集構造は全く異なっている(4.(2))。30日目は良好な分解を示していた期間であるのに対し、92日目以降は反応槽に油分が蓄積し、ほとんど分解が行われていない期間である。30日目の微生物群集は良好な分解を行う群集であり、92日目以降は油分が蓄積したあとの、分解をほとんど行わない群集であるといえることができる。したがって、30日目のサンプルのみに存在し、同定することのできた*B.thermo-*

表-5 各群集解析手法の長所と短所

群集解析手法	長所	短所
キノプロファイル法	・群集の構成を測定上のバイアスなく定量的に表現することができる	・微生物種を十数種に分けた表現しかできない ・各キノ分子種と系統学的な分類が1対1対応でない
FISH法	・系統学的な分類に基づいたさまざまなレベルの微生物群について、存在割合の定量を行うことができる	・現段階で利用可能なプローブの種類(=調べられる微生物群)が限られている ・プローブがなければ、その設計から行う必要がある ・群集についての情報が得られていない段階でやみくもに多くの種類のプローブを用いることは現実的でない
PCR-DGGE法	・種レベルでの群集構造や動態を把握することができる	・微生物種についての情報は得られない ・核酸抽出・PCRにはバイアスがかかるため、種の存在量/割合はわからない
DGGEバンドのシーケンシング	・存在種を同定できる	・種の存在量/割合についての情報は得られない

*cloacae*及び*B.flavothermus*,*B.thermoamylovorans*の近縁種は、良好な処理を行っている菌種の候補として挙げられることが分かる。

焼酎醸造廃水をもちいた処理実験において、森らは運転開始直後の中温状態ではユビキノが優占し、その後的高温状態ではMK-7が優占し、好熱性*Bacillus*が単離されたと報告している³¹⁾。また、多田らが豚糞尿と食用油で行った実験でも、運転初期はユビキノが多かったものの、その後安定してくるとMK-7が優占したと報告している³²⁾。今回の結果は、これらの結果と一致し、少なくともグループレベルでは群集構造に差がないことを示すものである。処理対象が異なる3つの実験において、同じ結果が得られていることは非常に興味深い。群集構造がどのレベルまで同じなのか、今後の研究が必要である。

ただし今回の実験のように食用油を添加した高温接触酸化処理においては、有機物炭素源のほとんどは油由来であり、油脂分解能を持つ細菌および油脂分解経路に関わる細菌が優占となっているはずである。油を添加する方法で運転する場合には、処理対象に関わらず微生物群集構造は類似している可能性がある。

好熱性細菌は、自己分解速度が中温菌に比べて1ケタおおい、という報告がある³³⁾。本実験において、良好な分解を示していた期間に優占していた種

に関しても、このことがいえるならば、高効率の有機物分解はこの自己分解速度の速さで説明することができる。優占種についてさらなる絞り込みを行う必要がある。

(4) 各群集解析手法の限界と複合利用の利点

本研究において、4種類の微生物群集解析手法を複合的に用いた。全く未知の微生物群集を解析するためには、単一の手法のみを用いたのでは得られる情報が限られており、不十分であるからである。具体的には、今回用いた4種類の群集解析手法について、その長所と短所を表-5にまとめた。手法を組み合わせることによって、どのように長所を活かし、またどのように短所を補うことができたかを以下に記す。

運転後期において、キノプロファイル法ではMK-7が優占であると分かった。MK-7を持つ細菌としては、主としてグラム陽性低GC群とCytophaga群の細菌が候補となるものの、FISH法による結果からグラム陽性低GC群に絞り込むことができた。また、運転初期においてプロテオバクテリアが優占であることがFISH法により明らかになったのに対し、PCR-DGGE法を用いることによりその構成種は大きく異なっていることがわかった。また、運転後期の微生物群集についてはキノプロファイル法・FISH法ではグループレベルでの優占種の同定しかできなかった

ところ、DGGEバンドのシーケンシングを行うことにより属・種レベルでの優占種の候補をあきらかにすることができた。

このように本研究で用いた組み合わせは、それぞれの手法で得られる情報を補完する意味で非常に優れているといえる。

5. まとめ

食用油添加の高温接触酸化処理法における微生物群集を、運転開始から約100日間において調べたところ、以下の点が明らかになった。

- ・運転初期における中温状態では、プロテオバクテリアが優占となった。
- ・運転後半の高温状態では、グラム陽性低GC群の細菌が優占となった。
- ・高温状態において優占群は同じであっても、良好な処理状態と油の蓄積によって処理不能になった状態とでは、群集の構成種は全く異なった。
- ・良好な処理を行うための細菌種として *B.thermocloacae* や、好熱性 *Bacillus* の類縁種が候補としてあげられる。
- ・キノンプロファイル法、FISH法、PCR-DGGE法、DGGEバンドのシーケンシングという4種類の手法を組み合わせることは微生物群集の解析手法として効果的で、確実性のある方法である。

今後は、優占となっている菌種の絞り込みを行い、その種の生態を調べることによって高温接触酸化処理の処理機構について明らかにしていくことが必要である。

参考文献

- 1) 森 忠洋：汚泥も水も出ない生物処理は可能か？ - 高温・好気法による高濃度有機排水処理 -, 用水と廃水, Vol. 37, pp. 818-822, 1995.
- 2) 栗栖 太, 味埜 俊, 松尾友矩：高温接触酸化処理法の下水余剰汚泥処理への適用に関する研究, 環境工学研究論文集, Vol. 33, pp. 39-46, 1996.
- 3) 劉 宝鋼, 蔡 惠良, 森 忠洋：高温・好気法による豚ふん尿の完全処理, 環境工学研究論文集, Vol. 31, pp. 209-214, 1994.
- 4) Cai, H. and Mori, T.: Treatment of Thickened Excess Sewage Sludge by Thermophilic Oxidic Process, 環境工学研究論文集, Vol. 32, pp. 371-378, 1995.
- 5) 池田亮子, 東 照雄, 稲森悠平, 岩見徳雄, 朴 炫建：高温好気発酵による有機廃棄物の分解能向上における最適操作条件の解析, 第32回日本水環境学会年会講演集, p. 464, 1998.
- 6) Liu, B., Noda, S. and Mori, T.: Complete Decomposition of Organic Matter in High BOD Wastewater by Thermophilic Oxidic Process, 環境工学研究論文集, Vol. 29, pp. 77-84, 1992.
- 7) Liu, B. and Mori, T.: Complete Treatment of Shochu Processed Wastewater by Thermophilic Oxidic Process, 環境工学研究論文集, Vol. 30, pp. 165-174, 1993.
- 8) 洞沢 勇：排水の生物学的処理, 技報堂出版, p. 139, 1976.
- 9) Amann, R. L., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation, *Microbiol. Rev.*, Vol. 59, pp. 143-169, 1995.
- 10) 駒形和男：微生物の化学分類実験法, 学会出版センター, pp. 143-155, 1982.
- 11) Muyzer, G., Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G.: Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 695-700, 1993.
- 12) Rolleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G. and Lubitz, W.: Identification of Bacteria in a Biodegraded Wall Painting by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, 2059-2065, 1996.
- 13) Ferris, M. J., Muyzer, G. and Ward, D. M.: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, 340-346, 1996.
- 14) Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. and Ramsing, N.: Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in a Stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as Evaluated by Most-Probable-Number Counts and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Ribosomal DNA Fragments, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, 1405-1415, 1996.
- 15) Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. and Woldendorp, J. W.: Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the β Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of 16S Ribosomal DNA Fragments, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 1489-1497, 1997.
- 16) Curtis, T. and Craine, N.: The comparison of the diversity of activated sludge plants, *Proc. of 2nd int. conf. on microorg. in activated sludge and biofilm process*, IAWQ specialist

- group on activated sludge population dynamics, Berkeley, pp. 65-72, 1997.
- 17) 胡 洪堂, 蔡 愛意, 藤江幸一, 浦野紘平: 菌体キノン分析手法及び多様性指標の検討, 第27回日本水環境学会年会講演集, pp. 606-607, 1993.
 - 18) Amann, R.: In Situ Identification of Micro-organisms by Whole Cell Hybridization with rRNA-Targeted Nucleic Acid Probes, *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, pp. 1-15, 1995.
 - 19) Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A. : Combination of 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial population, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56, pp. 1919-1925, 1990.
 - 20) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions, *System. Appl. Microbiol.*, Vol. 15, pp. 593-600, 1992.
 - 21) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M and Schleifer, K.-H.: Application of a Suite of 16S rRNA-specific Oligonucleotide Probes Designed to Investigate Bacteria of the Phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the Natural Environment, *Microbiology*, Vol. 142, pp. 1097-1106, 1996.
 - 22) Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.: In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides, *Microbiology*, Vol. 140, pp. 2849-2858, 1994.
 - 23) Harmsen, H. J. M., Prieur, D. and Jeanthon, C.: Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes to Identify Thermophilic Bacteria in Marine Hydrothermal Vents, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp. 4061-4068, 1997.
 - 24) 栗栖 太, 佐藤弘泰, 味埜 俊, 松尾友矩: 蛍光DNAプローブ法による微生物群集の定量的解析のための技術的検討, 第34回環境工学研究フォーラム講演集, pp. 138-140, 1997.
 - 25) Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L.-H.: Isolation of Genomic DNAs from Plants, Fungi and Bacteria Using Benzyl Chloride, *Nucleic Acid Res.*, Vol. 21, pp. 5279-5280, 1993.
 - 26) Hiraishi, A., Morishita, Y. and Takeuchi, J.: Numerical Analysis of Lipoquinone Patterns in Monitoring Bacterial Community Dynamics in Wastewater Treatment Systems, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Vol. 37, pp. 57-70, 1991.
 - 27) Page, R. D. M.: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Applications in the Biosciences*, Vol. 12, pp. 357-358, 1996.
 - 28) Collins, M. D. and Jones, D.: Distribution of Isoprenoid Quinone Structural Types in Bacteria and Their Taxonomic Implications, *Microbiol. Rev.*, Vol. 45, pp. 316-354, 1981.
 - 29) Zeikus, J. G.: Thermophilic Bacteria: Ecology, Physiology and Technology, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 1, pp. 243-252, 1979.
 - 30) Rainey, F., Fritze, D. and Stackebrandt, E.: The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 115, 205-212, 1994.
 - 31) 森 忠洋, 劉 宝鋼, 趙 敬淑: 高温・好気法による高濃度有機排水処理 - 有機物の完全酸化と蒸発 -, 化学工業, pp. 924-930, 1993.
 - 32) 多田千佳, 中井 裕, 李 贊雨, 千葉信男, 須藤隆一: 高温好気発酵法による豚舎廃棄物処理における微生物の挙動, 第32回日本水環境学会年会講演集, p. 462, 1998.
 - 33) Couillard, D., Gariépy, S. and Tran, F. T.: Slaughterhouse Effluent Treatment by Thermophilic Aerobic Process, *Wat. Res.*, Vol. 23, pp. 573-579, 1989.

(1998.11.9 受付)

MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS OF THERMOPHILIC CONTACT OXIDATION PROCESS TREATMENT WITH EDIBLE OIL BY USING FISH, QUINONE PROFILE AND PCR-DGGE METHOD

Futoshi KURISU, Hiroyasu SATOH, Takashi MINO and Tomonori MATSUO

Microbial community in thermophilic contact oxidation process treating high strength organic wastewater with edible oil was analyzed by FISH, quinone profile, PCR-DGGE and sequencing of DGGE bands. Proteobacteria was abundant during mesophilic phases and Gram positive bacteria with low G+C content predominated during thermophilic phases. Constituents of the community under excellent and poor degradation were completely different even during thermophilic phases. Sequences from samples under excellent degradation implied that possible species which contributed good performance could be neighbors of known thermophilic Bacilli, such as *Bacillus thermocloacae*. The combination of the four methods can effectively and certainly analyze community from group to species level.