

UASB 汚泥中に存在する *Synergistetes* 門の未培養グループに属する微生物群の機能推定

東北大学工学部 ○大沼慶太

東北大学大学院工学研究科 井口晃徳

産業技術総合研究所 関口勇地

東北大学大学院工学研究科 原田秀樹

1. はじめに

上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB) 法などに代表される嫌気性廃水処理プロセスは、活性汚泥法に代表される好気処理プロセスと比較して、1. プロセスの運転・維持管理に必要なエネルギーが小さい、2. 余剰汚泥発生量が少ない、3. エネルギー資源 (メタンガス) の回収が可能といった利点を有しており、理想的な廃水処理技術として知られている。本技術による廃水処理においては、処理槽内に形成される様々な微生物群が重要な役割を担っている。これらの嫌気性微生物群に対し 16S rRNA 遺伝子を利用した分子生物学的手法を適用し、それらの機能を明らかにする試みが進められている。

既往の研究において、多様な食品工場廃水を処理する実規模 UASB 反応槽で形成されたグラニュール汚泥の微生物群集構造が明らかにされた[1]。未培養微生物群に着目したとき、*Synergistetes* 門の未培養グループに属する rRNA 遺伝子クローンが高い頻度で検出されている。*Synergistetes* 門は、2009 年に提案・記載されたばかりの新しい真正細菌門である。本真正細菌門は、他の門と比較して未だ分離報告例の少ない、典型的な難培養微生物門として知られている。

上記 UASB 汚泥におけるこの未培養微生物群に属するクローンの検出が高いことから、この未培養微生物群は UASB プロセスにおいて重要な機能を担っていると考えられる。

そこで本研究では、この未培養グループの UASB 汚泥内での実体・機能を明らかにすることを目的に、(1) 16S rRNA を標的とした FISH 法を適用し本未培養グループの視覚化を試みた。また (2) 16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム定量 PCR 法を行うことで標的微生物群の定量を行い、存在量を明らかにした。さらに (3) UASB 汚泥の短時間培養とリアルタイム逆転写 (RT) -PCR 法を組み合わせた、標的

微生物の基質利用推定技術を適用し、本未培養グループの基質利用性の調査を試みた。なお本研究では、*Synergistetes* 門の未培養グループのひとつである *Synergistetes*-Group10 (*Synergistetes*-G10) に着目して実験を行った。

2. 実験方法

2.1 UASB 汚泥

実験には、人工廃水を処理するラボスケール UASB 反応槽より採取したグラニュール汚泥を使用した。UASB 反応槽は、容積は 13.8 L, COD 負荷 4 kg-COD/L・day⁻¹, 中温条件下 (35℃) で運転されており、リアクターへの流入基質はスクロース: 800 mg/L, 酢酸ナトリウム: 600 mg/L, プロピオン酸ナトリウム: 300 mg/L, ペプトン: 200 mg/L となっている。

2.2 FISH 法による検出

Synergistetes-G10 を特異的に検出する DNA プローブは、GSY10-998 (5'-CATCTCCGTACCACGTGC-3') を使用し、蛍光標識 Cy3 を 5' 末端側に付加した。ハイブリダイゼーションにおけるホルムアミドは 15% の濃度で行った。

2.3 リアルタイム定量 PCR 法による定量

16S rRNA 遺伝子を標的とした定量 PCR は SYBR Premix Ex TaqII (TaKaRa) を使用したサイバークリーン I 法によるリアルタイム PCR 法を採用した。真正細菌、古細菌を特異的に検出するプライマーセットは既報を参照した [2]。*Synergistetes*-G10 の 16S rRNA 遺伝子を特異的に検出するプライマーセットは UNI519If: 5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3' / GSY10-998r: 5'-CATCTCCGTACCACGTGC-3' を用いた。

2.4 UASB 汚泥の短時間培養とリアルタイム RT-PCR 法による基質利用推定

キーワード: 未培養微生物, *Synergistetes* 門, 短時間培養, RT-PCR

東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

環境保全工学研究室 TEL: 022-795-3584 FAX: 022-795-7465

Synergistetes 門の未培養グループの基質利用評価は、以下の方法で行った。(1) 供試廃水に含まれる有機物から、本グループに属する細菌が利用できると考えられる基質を推定した。その後、(2) UASB 汚泥と共にその基質を人工培地へ添加し、短時間培養した。(3) 培養後、対象未培養グループに属する細菌由来の rRNA の挙動をリアルタイム RT-PCR 法で評価した。培養時間は投入基質がおおよそ半分程度まで分解された時間とし、その時点での培養汚泥を実験に供試した。

16S rRNA のリアルタイム RT-PCR には、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa) を使用し、抽出 RNA 中に占める標的微生物群由来の RNA 量を定量した。

結果

3.1 FISH 法による *Synergistetes*-G10 の検出

Synergistetes-G10 に特異的なプローブを利用し、UASB 汚泥に対して FISH 法を適用した結果、本標的微生物と思われる桿菌様の蛍光シグナルが多数検出された (図 1)。

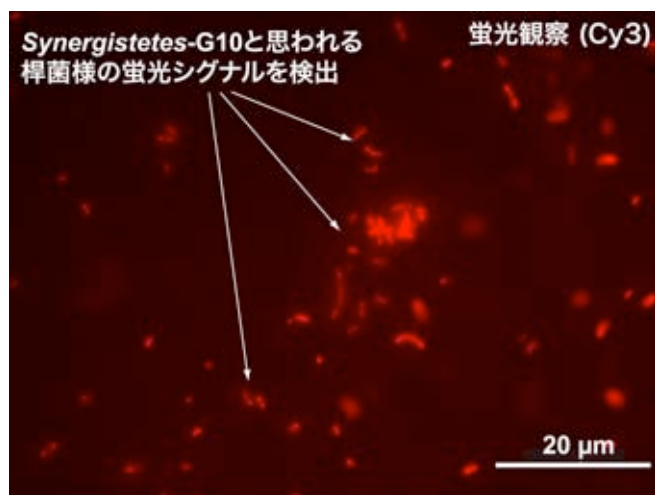


図1 16S rRNAを標的とした*Synergistetes*-G10のFISH法による検出

3.2 リアルタイム PCR 法による定量

リアルタイム PCR 法により、UASB 汚泥中の真正細菌、古細菌、*Synergistetes*-G10 に由来する 16S rRNA 遺伝子を定量した。その結果、原核生物由来の 16S rRNA 遺伝子に対する、*Synergistetes*-G10 由来の 16S rRNA 遺伝子の存在率は 1.4%程度と推定された。

3.3 基質利用推定における培養時間の決定

基質利用推定技術の適用に先立って、UASB 汚泥の培養時間を決定した。UASB 反応槽へ流入する各種基質を参考に 16 の培養系を構築し、それぞれの基質がおおよそ 50%分解されるまでに要する時間を決定した。各種培養系と培養時間を表 1 に示す。本技術の適用においては、ここで定めた時間を適用することとした。

3.3 リアルタイム RT-PCR 法による定量

表 1 における培養条件で培養を行った UASB 汚泥より全 RNA を抽出し、*Synergistetes*-G10 の rRNA の定量を試みた。結果、各種培養条件によって rRNA 量に変化が生じていることが判明し、本技術によって対象未培養微生物群の基質利用推定が可能であることが示唆された。現在これらの解析を進めているところである。

表1 培養に供した基質と培養時間

番号	培養系	基質濃度	培養時間(時間)
1	グルコース	2.2mM	1.5
2	フルクトース	2.2mM	1
3	カザミノ酸	0.02%	1
4	酢酸	7.32mM	1
5	スクロース	2.2mM	3.5
6	ペプトン(1/1)	0.02%	1.5
7	ペプトン(1/10)	0.002%	1.5
8	プロピオン酸	3.13mM	3
9	グルコース	2.2mM	1
10	フルクトース	2.2mM	1
11	カザミノ酸	0.02%	4
12	酢酸	7.32mM	6
13	スクロース	2.2mM	2
14	ペプトン(1/1)	0.02%	2
15	ペプトン(1/10)	0.002%	3
16	プロピオン酸	3.13mM	5

ただし番号9-16には上記基質に加えてイーストエキストラクトを0.02%となるように添加した。

4.まとめと今後の予定

Synergistetes-G10 を標的とした FISH 法を適用した結果、本標的微生物と思われる桿菌様の蛍光シグナルが多数検出された。またリアルタイム PCR 法により、本未培養グループの定量を行った結果、原核生物由来の 16S rRNA 遺伝子由来に対する本標的グループは 1.4%程度であることが判明した。今後の予定は、基質利用推定技術の結果を解析し本グループが利用可能と思われる基質推定を行う。本研究で得られた情報を組み合わせて本未培養グループのグラニュール汚泥内での機能を調査する。

参考文献

- [1] Narihiro et al., (2009) *Microbes. Environ.* vol. 24 (2) pp. 88-96.
- [2] Iguchi et al., (2009) *Microbes. Environ.* vol. 24 (2) pp. 97-104.