

浸出水処理過程に見られる未培養微生物群の分離・培養の試み

東北大学 学生会員 ○久野 真莉子 正会員 久保田 健吾
学生会員 石川 愛弓 学生会員 渋谷 幸子
正会員 原田 秀樹
産業技術総合研究所 玉木 秀幸

1. はじめに

生物学的排水処理など微生物は人間生活や環境保全において重要であることは周知であり、今後有益な機能を有する微生物が新たに発見される可能性は大きい。そのような微生物の機能を明らかにし利用する方法として、メタゲノム解析などが行われているが、微生物の分離・培養は未だ重要である。しかし、16S rRNA 遺伝子解析などに基づく解析などにより、我々が分離・培養できている微生物は地球上に存在する微生物の数%にも満たないことが示唆されている。生物学的排水処理汚泥は、バイオマス量や微生物活性など、分子生物学的な手法を用いて微生物を解析するのに適しているサンプルであるだけでなく、未だ分離・培養されていない微生物が多数存在している。このような環境中から採取した未培養微生物を新たに分離・培養することが可能となれば、排水処理過程における微生物の機能の解明にも有利である。

我々の研究グループでは、埋立処分場の浸出水処理過程における接触酸化槽の微生物群集構造解析を行い、その中には TM7 や OD1 など門レベルでの未知な微生物が多く存在していることを明らかにした¹⁾。Candidate division TM7 は、分離・培養されていないが、現在クローン解析により門レベルの系統を構成することがわかっている細菌群であり、土壌や水中、活性汚泥中など様々な環境中から検出されている²⁾。日本の埋立処分場の浸出水は、諸外国と異なり、焼却残渣を多く含む埋立地から排出されるものであり特異的であることも、このような未培養微生物群が多数存在している事の一因として考えられた。また、季節変動により未培養微生物群の存在率が左右されたことから、反応槽の温度も重要である可能性が示唆された。対象としている埋立処分場の浸出水処理施設は、第 1 凝集沈殿処理、生物処理 (接触酸化槽を含む)、第 2 凝集沈殿処理、砂ろ過処理、活性炭吸着処理、滅菌処理で構成されている。そこで本研究では、この埋立地浸出水処理課程に見られる未培養微生物群の分離・培養を試みた。

2. 実験方法

埋立地浸出水処理課程における第一凝集沈殿処理後の沈殿池の水をサンプリングし、はじめにこのサンプルから *Bacteria* を標的としたクローン解析を行った。91 クローンについて、16S rRNA 遺伝子の一部を決定し、Ribosomal Database Project の Classifier を用いて分子系統学的分類を行った。クローン解析の結果より TM7 に着目し、FISH 法や集積培養法などの実験を行い、TM7 の培養を試みた。

次に、FISH 法によりサンプル中の *Bacteria*、*Archaea*、TM7 の検出を行った。プローブには、Eub338、Arc915、TM7905 を用い、それぞれのプローブの両末端には Cy3 あるいは Cy5 を標識した。TM7905 プローブのホルムアミド濃度は clone-FISH 法と TM7905 プローブの塩基配列に 1 塩基ミスマッチの細菌である *Arthrobacter creatinolyticus* および 2 塩基ミスマッチの細菌である *Micrococcus luteus* の純菌を用いたより FISH 法により決定し、プローブの特異性を検証した。

また、埋立処分場の原水槽の水を基質とした連続運転リアクターにて、埋立地浸出水を処理する微生物群集を集積した。反応槽温度は 25°C とし、HRT を変化させながら曝気し未培養微生物群の集積を試みた。反応槽内の微生物量とその微生物による生分解性を確認するため、TOC 値と OD 値を継続的に計測しモニタリングした。集積培養汚泥は FISH 法などで顕微鏡観察を行い、適宜寒天培地による分離・培養に供した。集積培養汚泥の他、埋立処分場の浸出水処理プロセスの原水槽、第一凝集沈殿処理後の沈殿池、生物処理過程の硝化槽からサンプリングを行い、植種源とした。培地には原水槽あるいは凝集沈殿後沈殿池の水に寒天を添加し、オートクレーブしたものを用いた。分離したコロニーは、同一の培地に継代培養し、コロニーの形成の確認された分離株についてコロニー PCR を行い、16S rRNA 遺伝子のシ

キーワード：未培養微生物、分離・培養、埋立地浸出水、FISH 法

連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 TEL 022-795-7465

ーケンスを行った。

3. 実験結果と考察

3.1. 沈殿地の微生物群集構造

沈殿地から採取した水の微生物群集構造を解析したところ、門レベルの未培養微生物として TM7 がクローン全体の 14% (13 クローン) 存在していた。沈殿地に入る水は、原水槽から送られた水がカルシウム沈殿を経ただけのものであり、原水槽を出てから沈殿地に入るまでの時間は短い。そのため、この未培養微生物群は原水槽にて既に存在している可能性が考えられ、埋立地浸出水処理過程において、普遍的に存在する重要な微生物群である可能性が示唆された。

3.2. FISH 法による検出

クローンライブラリーで見られる存在率は、バイアスにより実際の存在率を反映していないことが知られている。そこで FISH 法により、未培養微生物群の検出を試みた。*Bacteria* と *Archaea* を標的とした FISH 法を行ったところ、シグナルが弱く、検出率が低かった。そこで、プローブの両末端に蛍光物質を標識する DOPE-FISH 法を適用したところ、十分なシグナルが得られ、浸出水処理過程においては *Bacteria* が優占している事が明らかになった。次に TM7 に特異的なプローブを用いて TM7 の検出を試みた。まず、ホルムアミド濃度 5% でハイブリダイゼーションを行ったところ、DAPI による全菌染色で観察した微生物の数に対して高い割合の蛍光シグナルが観察されたため、プローブが非特異的にハイブリダイズされ、標的微生物以外の微生物が検出されていると考えられた。両末端に蛍光を付加するとプローブの乖離挙動が変化することが知られているため、

clone-FISH 法により TM7905 プローブのストリンジェンシーを決定した。その結果、サンプル中からの TM7 を検出することが出来た。図 1 は、浸出水処理過程の硝化槽内のサンプルを FISH 法で TM7905 プローブを用いて観察したものである。このとき桿菌と球菌のような形態が検出され、このサンプル内に多様な形態の TM7 が存在していることが考えられた。

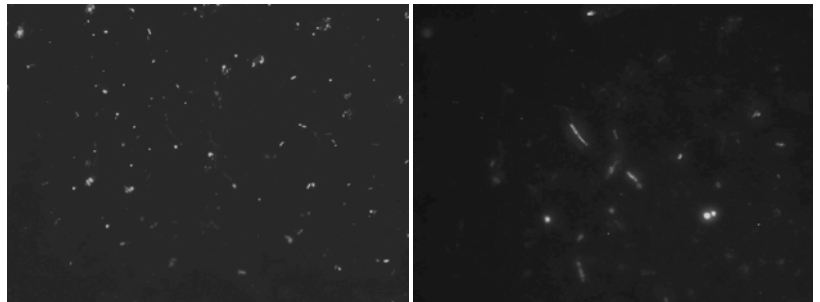


図 1 TM7 の特異的検出

左 : DAPI による全菌染色 右 : TM7905 プローブ由来の蛍光

3.3. 分離・培養

埋立処分場の浸出水のサンプルからこれまでに分離・培養された 86 株のシーケンス解析を行ったところ、すべて既知の *Bacteria* に 97% 以上の相同性を示すものであった。*Roseovarius sp.* に近縁な菌が 16% であり、最も多かった。これまでに解析を行ったものは、培養日数が 3 日から 13 日までの比較的増殖速度の速い微生物群であったことも一因であると考えられ、引き続き培養を継続し、増殖速度の遅い分離株の同定を行っていく。

リアクターの稼働前の反応槽内の TOC 値は 81.7 mg/L であったが、25°C のインキュベーター内で曝気が続けたところ、TOC 値は 54.9 mg/L まで低下したため、有機物が反応槽内の微生物により分解されていることが確認できたと考え、リアクターの連続運転を HRT1 日で開始した。今後は HRT をさらに変化させ連続培養を行って行く。また、反応槽内の集積培養汚泥を FISH 法で観察し TM7 の存在量の変化を調べるとともにこのサンプルからの分離・培養を行う予定である。さらに、反応槽の底面にバイオマスの層のような沈殿が形成されたため、この沈殿内にどのような微生物が存在しているのかを顕微鏡観察により確認する予定である。

参考文献

- 1) 石川ら (2012) 土木学会論文集 G (環境), Vol.68, No.7, III_21-III_30
- 2) Hugenholtz et al., (2001) AEM, 67:411-419.