

- (46) 嫌気性グラニュール汚泥からのrRNA遺伝子のクローニング
によって推定された未知な細菌の検出とその空間的分布
－16S rRNAから見た中温・高温グラニュール汚泥の微生物生態－

Detection and Spacial Distribution of Unknown Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules by 16S rRNA Approach.

関口勇地*, 大橋晶良*, 珠坪一晃**, 荒木信夫***, 原田秀樹*

Yuji SEKIGUCHI, Akiyoshi OHASHI, Kazuaki SYUTSUBO, Nobuo ARAKI, Hideki HARADA

ABSTRACT; In situ hybridization of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes was used to elucidate the spacial distribution of several microorganisms within two types of granular sludge, mesophilic (35°C) and thermophilic (55°C), in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors which have been adapted to the identical composition of artificial wastewater. To visualize the microbial distributions, sections of both granules were hybridized with fluorescent oligonucleotide probes, and viewed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Hybridization of oligonucleotide probes for *Archaea* and *Bacteria* with microbes in the granule sections clearly showed the layered structure of both granules, indicating that the outer layer of the granules harbors mainly bacterial cells, and the inward consists of mainly archaeal cells. *Methanosaeta*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, and *Methanosarcina*-like cells were detected and localized by the probes for several phylogenetic groups of methanogens, in which the most dominant methanogens in both granules were related with the genus *Methanosaeta*. For the detection of some unknown bacteria which were suggested to be present in the granules by 16S rDNA-based cloning analysis, we designed probes specific for clonal 16S rDNAs relative to the green non-sulfur bacteria, and clonal rDNAs which are relatives of the *Syntrophobacter* species. Hybridization of the probes for both granule sections showed particular locations of the targeted cells. The cells related with the green non-sulfur bacteria were detected as filamentous, and located in the most outer layer of the thermophilic granule sections. On the other hand, the cells related with *Syntrophobacter* species were coccoides, and located in the inward of only the mesophilic granules. These observations demonstrated a part of the layered structure, and revealed the overall microbial topography of both granules.

KEYWORDS; 16S rRNA, confocal laser scanning microscopy (CLSM), fluorescent in situ hybridization, methanogenic granular sludge, upflow anaerobic sludge blanket (UASB).

1. はじめに

UASB (upflow anaerobic sludge blanket) 反応槽内で見られる汚泥のグラニュール化は、本法の持つ高速処理性能を発揮する上で必須である重要な現象である¹⁾。そのグラニュール状汚泥は、嫌気環境下での有機物分解を担うさまざまな微生物で構成される”球状の生物膜”として反応槽内に存在する。そのため、グラニュール内部では生物膜特有のきわめて特徴のある生態学的構造が形成されていることが示唆されている。

嫌気性グラニュールで一般的に観察される現象は、その内部の層構造である²⁾。通常の有機性廃水処理UASB反

* 長岡技術科学大学工学部 環境システム工学系
(Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

** 海洋バイオテクノロジー研究所 (Marine Biotechnology Institute)

** 長岡工業高等専門学校 環境都市工学系 (Department of Civil Engineering, Nagaoka College of Technology)

応槽内に形成されるグラニユールでは、その外部は酸発酵等を担う細菌群により占められ、内部は主に酢酸資化性のメタン生成古細菌が占めるというモデルが提唱されており、それは顕微鏡観察や微小電極による基質濃度のプロファイル測定などで間接的に実証されている³⁾⁴⁾。また、Macarioらによるグラニユール切片に対する抗体法を用いた特定微生物の検出に関する一連の研究を始め⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾、最近のHarmsenらによるグラニユール切片への *in situ hybridization*法の適用により、その構造の、菌体レベルでの詳細が解明されつつある⁹⁾¹⁰⁾。しかしながら、グラニユール内部の微生物分布の全体像、特に高温処理UASBグラニユール内の微生物の空間的分布は、未だ十分に解明されているとはいえない。また、そのグラニユール内部構造の中でも、特に（真性）細菌に属する生物群の属、種レベルでの空間分布に関する知見はほとんどわかっていないといつてよい。その解明を阻む大きな原因の一つは、グラニユールを構成する微生物群の解明（同定）が十分になされていないことにある。我々は、中温・高温処理UASBグラニユール内の微生物群集構造を16S rDNAに基づき解析を行った結果、多くの未知な微生物の存在が示唆されたことを報告した¹¹⁾。それらの未だに培養・同定されていない微生物を含むグラニユール内部の微生物分布の解明は今後の課題である。

本研究では、スクロース等を主成分としたほぼ同一の人工廃水に適応した中温(35°C)及び高温(55°C)処理UASBグラニユール内の微生物空間分布を明らかにするため、各グラニユール切片に対し16S rRNAを標的としたDNAプローブによる *in situ hybridization*法を適用した。はじめに、グラニユール切片に対し、細菌に特異的なプローブと、古細菌、または各種メタン生成古細菌群に特異的なプローブによる二重染色を行い、その内部構造の全体像と各メタン生成古細菌の空間分布の解明を行った。次に、同じグラニユールに対して行った16S rDNAのクローニング解析により存在が予想された未知の細菌の検出、またそのグラニユール内部での空間分布の解明を行うため、検出された16S rDNAクローンの配列に特異的なプローブを作成し、各グラニユール切片に対する適用を試みた。

2. 実験方法

2. 1. グラニユール汚泥

実験に用いたグラニユールは、スクロース、酢酸、プロピオン酸が主成分である人工廃水を基質として用いたラボスケール中温 (35°C)、及び高温 (55°C) 処理UASBリアクター (13L) から採取した¹¹⁾。両リアクターともほぼ同一の人工廃水（スクロース、酢酸、プロピオン酸、yeast extractもしくはペプトン[4.5: 2.25: 2.25: 1, CODcr-base]）を2年以上にわたって処理を行っていた（流入CODcr濃度：中温UASB, 2,000 mgCOD l⁻¹；高温UASB, 4,000 mgCOD l⁻¹）。また、両リアクターとも良好な有機物除去能およびメタン生成能を示しており（CODcr除去率で95%以上）、直径1-3mm程度のグラニユールを安定的に保持していた。

2. 2. グラニユールの固定、切片の作成

各グラニユールはサンプリングの後、直ちにphosphate-buffered saline (PBS, pH7.2)により緩やかに洗浄、4%パラフォルムアルデヒドで固定（4°Cで6時間）、その後、50%エタノールでさらに4°Cで12時間固定した。高温グラニユールに対しては、プローブの浸透を促進するため、上記による固定の後5回の凍結融解（-80°C～60°C）を施した。その後、エタノール：キシレンシリーズによりグラニユールを脱水し（50%, 80%, 100%エタノール×3, 50: 50(v/v) エタノール：キシレン, 100%キシレン×3）、その後パラフィンに包埋した。マイクロトームにより、10～15μmの厚さを持つグラニユール切片を作成し、その後キシレン：エタノールシリーズ（100%キシレン×2, 100%エタノール×2）で脱パラフィンを行い、室温で乾燥させた。

2. 3. *in situ hybridization*法および走査型電子顕微鏡観察

*In situ hybridization*には、16S rRNAの一部を標的とした以下のプローブを利用した。(i) EUB338プローブ、細菌 (*Bacteria*) に特異的なプローブ¹²⁾；(ii) ARC915、古細菌 (*Archaea*) に特異的¹³⁾；(iii) MG1200, *Methanomicrobiales*に特異的¹⁴⁾；(iv) MB1174, *Methanobacteriaceae*に特異的¹⁴⁾；(v) MS1414, *Methanosarcinaceae*に特異的¹⁴⁾；(vi) MX825, *Methanosaeta*に対し特異的¹⁴⁾；(vii) D660, *Desulfobulbus*に対し特異的¹⁵⁾；(viii) SYB701, グラニユール内の16S rDNAクローニング解析により検出されたクローンMUG28 (*Syntrophobacter*に近縁、プローブ配列：5' AAATGCAGTTTCCAATGCAC 3', 701-720 *E. coli* position) に特異的；(ix) GNSB633, 高温グラニユールより多く検出された16S rDNAクローン群 (MUG9, TUG8, 9, 10, green

non-sulfur bacteriaに属する。5' TAGCCCGCCAGTCTTGAACG 3', 633-652 *E. coli* position) に特異的。グラニュール切片に対するin situ hybridizationは、hybridization buffer (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl [pH7.2], 0.01% SDS, 5 ng μl^{-1} プローブ) を用い、46°Cで10時間行った。また、そのstringencyは、hybridization bufferに () 内に示した濃度でホルムアミドを添加することで調整を行った (EUB338, 5% ; ARC915, 35% ; MG1200, 5%, MB1174, 35% ; MS1414, 35%, MX825, 20% ; D660, 20% ; SYB701, 15% ; GNSB633, 20%) 。プローブの洗浄はプローブを含まないhybridization buffer (ホルムアミドは同じ濃度含む) を用い、48°Cで30分を行った。グラニュール切片に対する2重染色では、Cy-5, またはローダミン (TRITC) を付加した異なる種類のプローブを同一切片に対し使用した。切片は、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FLUOVIEW BX50) により観察した。また走査型電子顕微鏡観察はHITACHI-S4500 SEM operatingを用い、そのためのグラニュールサンプルの調整はUemuraらの方法¹⁶⁾に従った。

2. 4. dot blot hybridization法

設計したプローブの特異性を確認するため、digoxigenin (DIG) を付加したSYB701, GNSB633プローブによるdot blot hybridizationを行った。その対象には、*Desulfovibrio vulgaris* Marburg (DSM2119), *Syntrophobacter wolnii* (DSM2245A), *Desulfohalobium propionicus* MUD (DSM6523)のrRNA, および各グラニュールからの16S rDNAのクローニング解析で検出されたrDNAを用いた。hybridizationには、whole cell in situ hybridization時と同じbufferを用い、同じ温度条件で行った。また、そのDIGを付加したプローブの検出には、DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いた。

3. 実験結果および考察

3. 1. グラニュール切片の作成とin situ hybridization法の適用。

In situ hybridizationに供するグラニュール切片の作成にはパラフィンを用いた。グラニュール汚泥を対象として組織学などで通常用いられる厚さ (5 μm 以下の厚さ) の切片を作成する場合、そのグラニュール断面の構造を破壊することが多く、グラニュール切片の作成には適切ではなかった。そのため本研究では、グラニュールを10 μm 以上の厚さでセクションングを行うことで、その内部構造をほぼそのままの状態で保持した切片を作成した。In situ hybridization後の切片は共焦点レーザー顕微鏡により観察することにより鮮明な画像を得た。

また、in situ hybridizationでしばしば問題となるプローブの浸透不足によって特定微生物の蛍光が得られない現象は、本研究でも特に高温グラニュールにおいて観察された。高温グラニュール内で水素資化性メタン生成古細菌群の検出を試みたところ、MS1414 (*Methanosarcina*等を検出する) プローブでわずかにその蛍光が確認できたが、それ以外のプローブによる菌体の検出は不可能であった。その後、水素を単一のエネルギー源として高温グラニュールから*Methanobacterium*に属するメタン生成古細菌の分離を行い、この分離株に対しhybridizationを適用したが、いずれのプローブ (ARC915プローブも含む) でもそのシグナルを検出することはできなかった。プローブの細胞への浸透が問題であると考えられたことから、hybridization buffer内のSDS濃度を増加するなどの改善を行ったが、シグナルは確認されなかった。そこで、パラフォルムアルデヒドで固定後の分離株菌体に対して凍結融解 (-80°C~60°C) を施し、プローブの細胞への浸透を促進させるという手法を採用した結果、3回から5回程度の分離株の凍結融解処理により、MB1174 (*Methanobacterium*等のメタン生成古細菌を検出する), ARC915プローブで分離菌体を検出することが可能となった (また*Methanosaeta*等の、プローブによる検出にこの様な前処理を必要としない菌体は、パラフォルムアルデヒドで固定後であれば、凍結融解処理による菌体の破壊は多くないことを確かめている)。この結果を受けて、高温グラニュール切片を作成する際は、パラフォルムアルデヒド、エタノールによるグラニュールの固定、5回の凍結融解を施した後パラフィンへの包埋を行い、MB1174等のプローブによる*Methanobacterium*等の菌体の検出を可能とした。

3. 2. グラニュール切片全体の微生物分布。

上記方法で、中温、高温グラニュールのほぼ中心の切片を作成し、はじめに細菌 (EUB338プローブ), 古細菌 (ARC915プローブ) をin situ hybridizationにより同一切片で検出した (EUB338プローブはCy-5, ARC915プローブはTRITCをそれぞれ付加し二重染色を行った)。その結果、中温、高温グラニュールともに、グラニュー

ル外層は細菌により占められ、グラニュール内部に進むにつれ古細菌が占める割合が高くなるという傾向が見られた (Fig.1) . また、比較的大きめのグラニュール (直径が $500\mu\text{m}$ 以上のグラニュール) では、その中心に、EUB338, ARC915プローブのどちらとも反応しない領域が常に存在した. SEMによる顕微鏡観察では、この領域

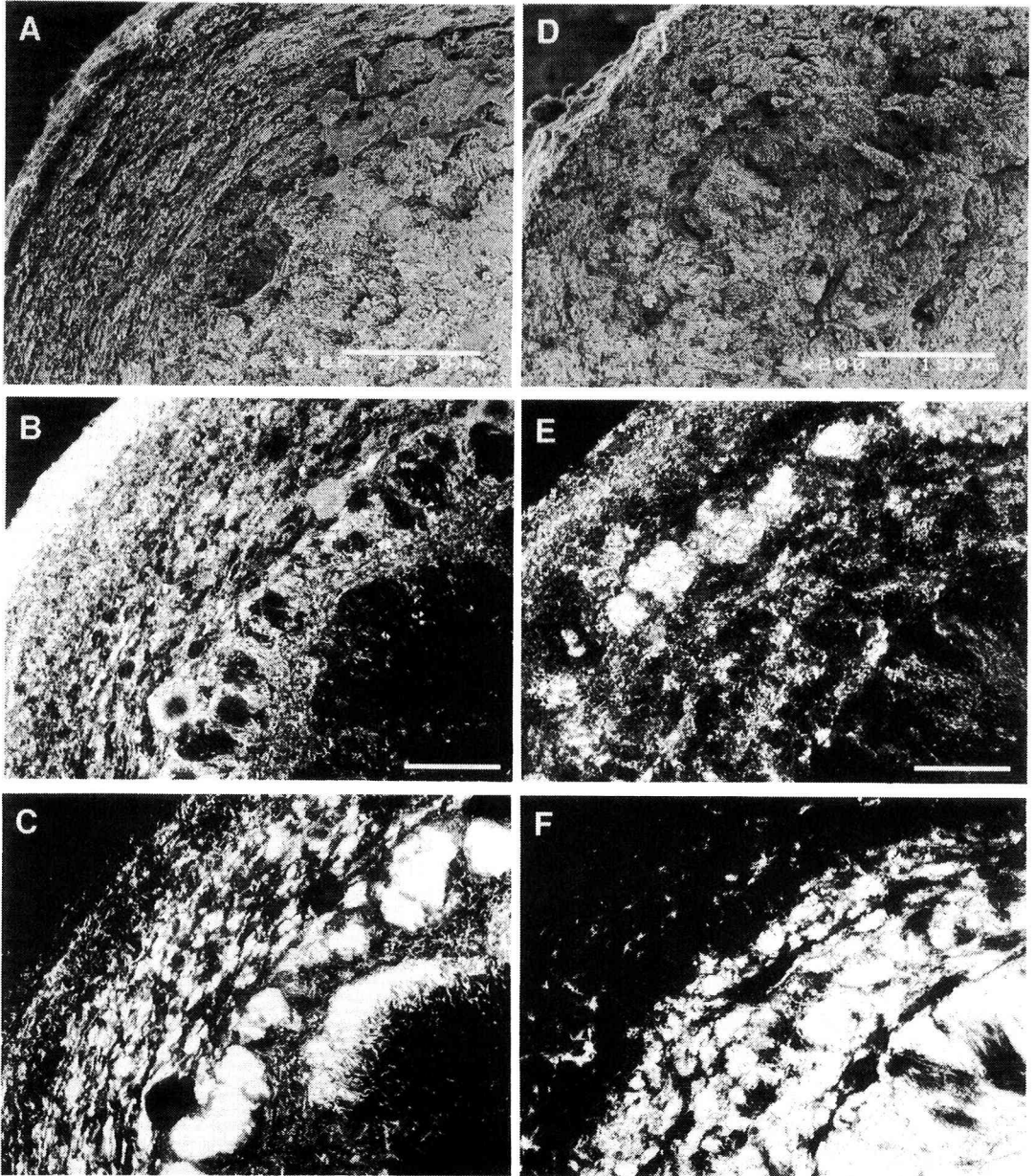


Fig.1 Scanning electron micrographs of mesophilic (35°C) and thermophilic (55°C) granule sections (A, D), and in situ hybridization of sections of both granules viewed by confocal laser scanning microscopy.

(A): SEM observation of a section of the mesophilic granular sludge (bar: $75\mu\text{m}$), (B, C): mesophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (B) and TRITC-labeled ARC915 (C) probes (bar: $50\mu\text{m}$), (D): SEM observation of a section of the thermophilic granular sludge (bar: $150\mu\text{m}$), (E, F): thermophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (E) and TRITC-labeled ARC915 (F) probes (bar: $50\mu\text{m}$).

にも菌体が確認できる場合もあるが、多くは無機塩類や菌体が消化された後のようなものが観察される。このプローブと反応しないグラニューールの中心の領域は、無機塩や死滅した菌体、もしくは、グラニューール内部まで基質が浸透しないことにより活性が低い菌体が存在している領域であろうと考えられる。また、特に中温グラニューールでは、細菌群と古細菌のマイクロコロニーが層状に分布しており、あたかも樹木の年輪のような様相を呈していた。これは、樹木の年輪と同様、そのグラニューールの成長の跡を示しているものかもしれない。

次に、存在が予想されるメタン生成古細菌群の検出のため、その各系統的グループを検出するプローブ（TRITCラベル）を、Cy-5でラベルしたEUB338プローブと共に両グラニューール切片に適用した。その結果、両グラニューールとも、古細菌として検出された菌体の多くがMX825プローブと反応し、それらが分子系統的に *Methanosaeta* ("*Methanothrix*")に属する古細菌であることが明らかとなった (Fig.2)。それら *Methanosaeta* に属する古細菌は、特にグラニューール内部で大きなコロニーを形成していた。 *Methanosaeta* に属するこれまでに知られている古細菌は、酢酸を唯一の基質としてメタンを生成するメタン生成菌であり¹⁷⁾¹⁸⁾、両グラニューール切

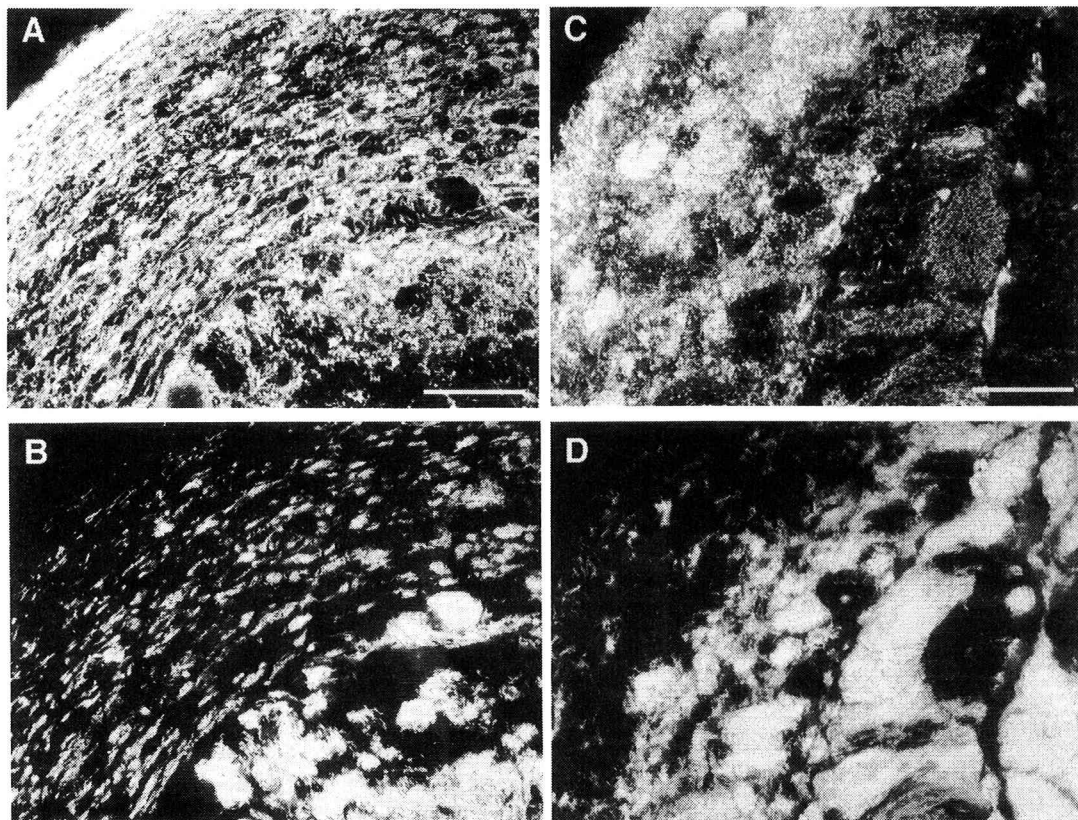


Fig.2 In situ hybridization of sections of both granules with Cy-5-labeled bacterial probe (EUB338) and TRITC-labeled probe (MX825) for the genus *Methanosaeta*.

(A, B): a mesophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (A) and TRITC-labeled MX825 (B) probes (bar: 50μm). (C, D): a thermophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (C) and TRITC-labeled ARC915 (D) probes (bar: 50μm).

片内でMX825プローブにより検出された菌体も、おそらく酢酸を基質としてメタンを生成しているものと思われる。その菌体が内部に多いということは、利用している基質が嫌気環境下での有機物分解の最終段階で生成してくるものであるということを反映している（それはすなわち酢酸であろう）。また嫌気環境下では、高い割合の有機物が酢酸を経由してメタンに転換されるが、MX825プローブで検出された菌体量が非常に多いこともこれら

が*Methanosaeta*に属することを裏付けている。

また、中温、高温グラニュール切片とも、MB1174プローブでロッド状の菌体が検出されたが、それは比較的高温グラニュールにおいて多く検出された (Fig.3) 。 MB1174プローブで検出されるメタン生成古細菌 (*Methanobacterium*など) は水素や酢酸、二酸化炭素からメタンを生成する菌群である。中温グラニュールではその菌体量は少なく、主にグラニュール内部の球状の細菌と近接して存在していた (Fig.3) 。 通常のプロピオン酸などの嫌気的な酸化反応は、プロピオン酸酸化細菌とメタン生成古細菌との共生関係で進行する。その際両者の共生関係を仲立ちするものは種間電子伝達であるが、そのプロピオン酸酸化細菌からメタン菌へと伝達される電子が水素という形を取った場合、プロピオン酸からメタンへの反応が進行するための自由エネルギー変化や生物膜内での水素の拡散速度などを考慮すると、プロピオン酸酸化菌と水素資化性メタン菌との物理的距離はおおよそ1 μ m以下に保たれている必要があるといわれている⁷⁾。中温グラニュール切片で観察された細菌と、MB1174プローブで検出されたメタン菌との近接した関係は、そのような共生関係を示していると思われる。

また写真は示さないが、中温グラニュールではMG1200プローブで*Methanospirillum*様のフィラメント状の菌体が検出されている。それはグラニュール内部全体に分布していた。一方、高温グラニュールからは、MG1200プローブによるシグナルは検出されなかった。高温グラニュールからは、MS1414 (*Methanosarcina*等のメタン生成細菌を検出する) プローブによりsarcina状の菌体 (*Methanosarcina*と思われる) のマイクロコロニーが所々に検出されたが、中温グラニュール切片では、それはほとんど確認されなかった。

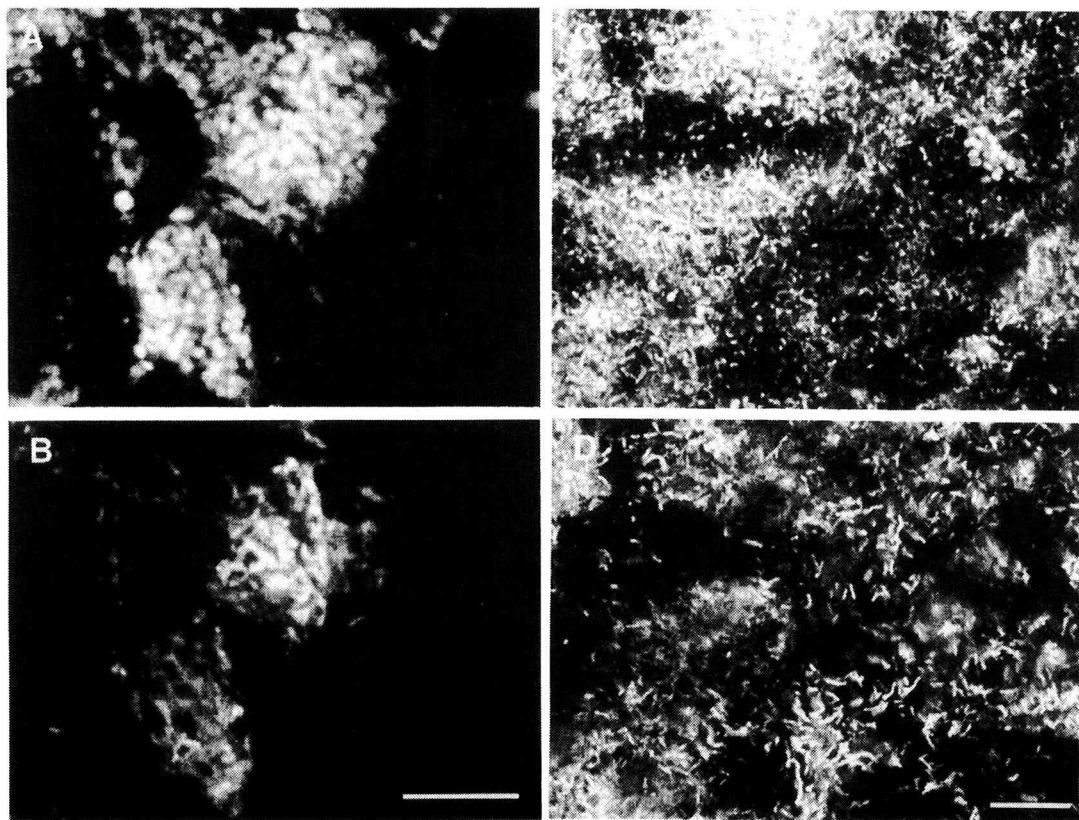


Fig.3 In situ hybridization of sections of both granules with Cy-5-labeled bacterial probe (EUB338) and TRITC-labeled MB1174 probe.

(A, B): a part of mesophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (A), and TRITC-labeled MB1174 (B) probes (bar: 10 μ m), indicating *Methanobacterium*-like rods. (C, D): a part of thermophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled EUB338 (C), and TRITC-labeled ARC915 (D) probes (bar: 10 μ m), showing a number of *Methanobacterium*-like cells.

3. 3. グラニュール内の未知な細菌の分布.

本実験に供した中温および高温グラニュールは、先に16S rDNAのクローニング解析¹⁴⁾を行ったグラニュールと同一である。その実験では、各グラニュール内微生物の16S rDNAをクローン化し、ランダムに選択したrDNAクローンの塩基配列の決定を行うことで、グラニュール内に存在する微生物を培養に寄らず同定した。その結果、多くの未知の（未だに培養・同定されていない）細菌の存在が示唆された。本研究では、それら検出された細菌の16S rDNA配列に特異的なプローブを用い、両グラニュール切片への適用を試みた。

まずはじめに、現在まで報告されているプローブで、上記クローニング解析で検出された配列と相同なものを検索した。その結果、*Desulfohalobus*属に特異的なプローブとして報告されているD660プローブが中温グラニュールから検出された*Desulfohalobus*の2種にごく近縁なrDNAクローンに対して相同であったため、TRITCでラベルした本プローブをCy-5でラベルしたARC915プローブと共に両グラニュールに適用した。その結果、中温グラニュール外側の細菌層で、D660プローブ由来のシグナルが検出された（Fig.5, A）。検出された細菌は、グラニュール外層の表面付近でマイクロコロニーを形成しており、典型的な*Desulfohalobus*様の形態を持っていた。両グラニュールが処理している廃水内には、わずかではあるが硫酸塩を含んでいる（除去される全CODcrの内の約3%程度が硫酸還元を伴い酸化されている）。従って、中温グラニュールで検出された*Desulfohalobus*に属すると思われる細菌は、*Desulfohalobus*属同様、硫酸還元を伴うプロピオン酸酸化を行っている可能性もある。また、*Desulfohalobus*属

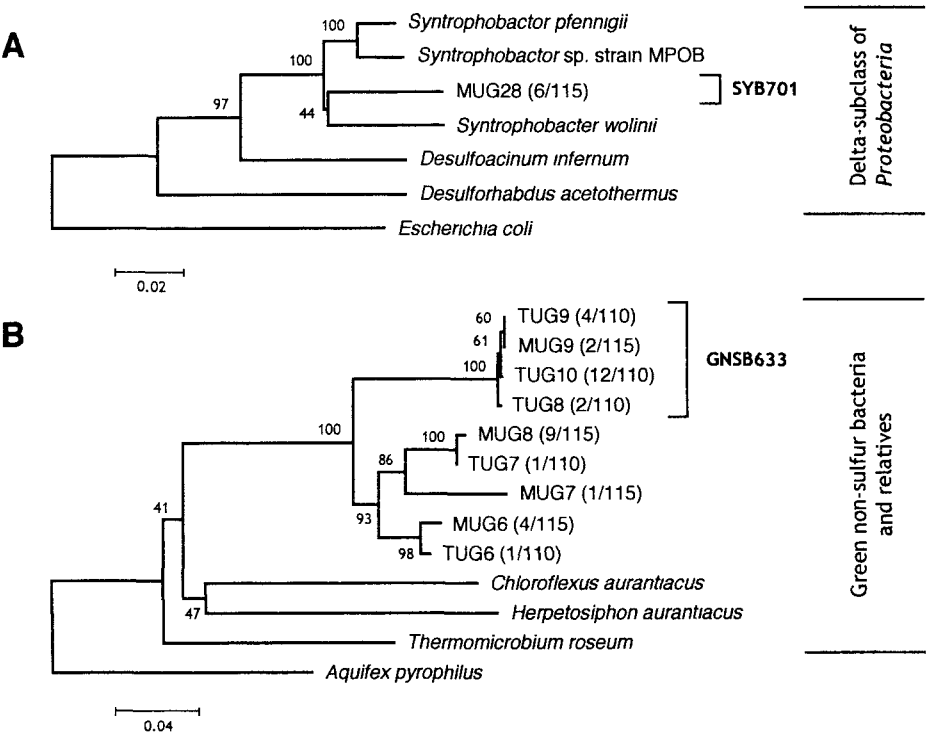


Fig.4 Phylogenetic trees of rDNA clones previously detected by community 16S rDNA cloning analysis for the mesophilic and thermophilic granular sludges. Targeted rRNA by the probes designed in this study were indicated by brackets. MUG represents the clones detected from the mesophilic granules, and TUG represents the clones detected from the thermophilic granules. Phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining analysis²²⁾. Number in parentheses indicate the frequency of appearance of the completely matched sequences (clones) in the total clones. Numbers at nodes represent bootstrap values by 100 times resampling. Scale bars at bottom indicate nucleotide substitution per sequence position.(A): 16S rDNA clones relative with *Syntrophobacter* species in the delta subclass of the Proteobacteria, and the target of the probe SYB701. (B): 16S rDNA clones among the green non-sulfur bacteria, and the target organisms for GNSB633 probe.

は、硫酸塩が存在しない環境下でもエタノールなどを基質として発酵的に生育できることから¹⁹⁾、これらの発酵を担っているのかもしれない。一方、高温グラニュール切片からはD660プローブによるシグナルは検出されなかった。

次に、中温グラニュールから高頻度で検出された*Syntrophobacter wolinii*に近縁なクローン (Fig.4, A) , また、高温グラニュールから比較的高頻度で検出されたgreen non-sulfur bacteriaに属するrDNAクローン群 (Fig.4, B) に対して特異的なDNAプローブをそれぞれ設計した。

3. 3. 1. *Syntrophobacter*に近縁なクローン群

先のクローニング解析において、中温グラニュール内で比較的高頻度で検出された*Syntrophobacter*に近縁なクローン群に着目した。*Syntrophobacter*に属する細菌は、中温嫌気環境下でプロピオン酸を酸化し、酢酸と水素（もしくはギ酸）等を生成する嫌気共生細菌であるが²⁰⁾²¹⁾、グラニュールから検出されたクローンは、その細菌と塩基配列の相同性で95%程度を示しており、それに近い生理的特性を有していると予想された。本研究では、そのクローンの配列に対してのみ特異的なプローブを作成した。本プローブは、現在まで知られている細菌の16S rRNAとは3塩基以上のミスマッチを持つものである。またターゲットと近縁な*Syntrophobacter wolinii*、また、*Desulfovibrio vulgaris*、*Desulfohalobus propionicus*に対しては、dot blot、およびin situ hybridizationでもこのプローブは反応しないことを確かめた。

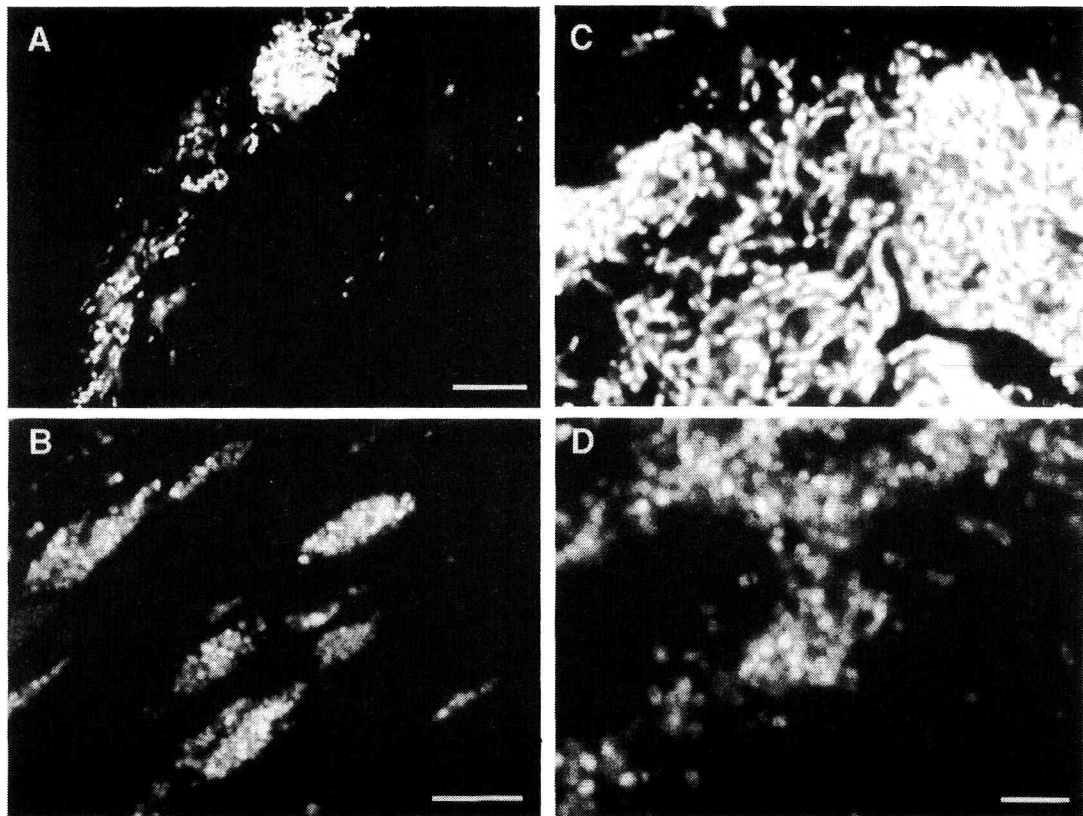


Fig.5 In situ hybridization of sections of the mesophilic granules.

(A): a part of mesophilic granule section hybridized with TRITC-labeled *Desulfohalobus* probe (D660). This photograph shows the outer layer of the granule section (bar: 10μm), (B) a mesophilic granule section hybridized with TRITC-labeled SYB701 probe, showing the inner layer of the section (bar: 10μm). (C, D): a mesophilic granule section simultaneously hybridized with Cy-5-labeled archaeal probe (ARC915) (C) and TRITC-labeled SYB701 (D) probe (bar: 5μm), showing that a number of coccoid cells (SYB701) were surrounded by archaeal cells morphologically similar to *Methanosaeta*.

このプローブを用いてグラニュール切片にin situ hybridizationを適用したところ、中温グラニュールのグラニュール内部で、球状の菌体が特異的に、かつ高頻度で検出された (Fig.5, B, D) . その検出された細菌は、グラニュール内部の深度の深い点で高頻度で存在することから、嫌気分解での最終的な中間生成物であるプロピオン酸などを利用していることが推察され、おそらく*Syntrophobacter*と同様の代謝特性を有する細菌であることが示唆された。なお、本プローブを高温グラニュールに適用したが、シグナルは全く検出されなかった。

3. 3. 2. Green non-sulfur bacteriaに属するクローン群

次に、先のクローニング解析において検出されたgreen non-sulfur bacteriaに系統的に属するクローン群の内、高温グラニュールのクローンライブラリ内で高頻度で検出されているグループに着目した (Fig.4, B) . この単系統群内のrDNAクローンは、現在まで知られている細菌とは系統的に大きく離れており、その配列を持つ菌体に関しては全く知見がない。そこで、このグループに特異的な塩基配列を元にプローブを作成した。本プローブは、現在まで知られている細菌の16S rRNAとは4塩基以上のミスマッチを持つものであるが、ターゲットの配列には完全に相同なものである。また、クローン化したrDNAを対象としたdot blot hybridizationでは、ターゲットとしたクローンのみしか検出しないことを確かめた。

このプローブを用いて分散状のグラニュール汚泥にin situ hybridizationを適用したところ、高温グラニュールでフィラメント状の菌体を検出した。ほぼ同一の形態を持つ菌体を検出していたことから、おそらく本プローブ

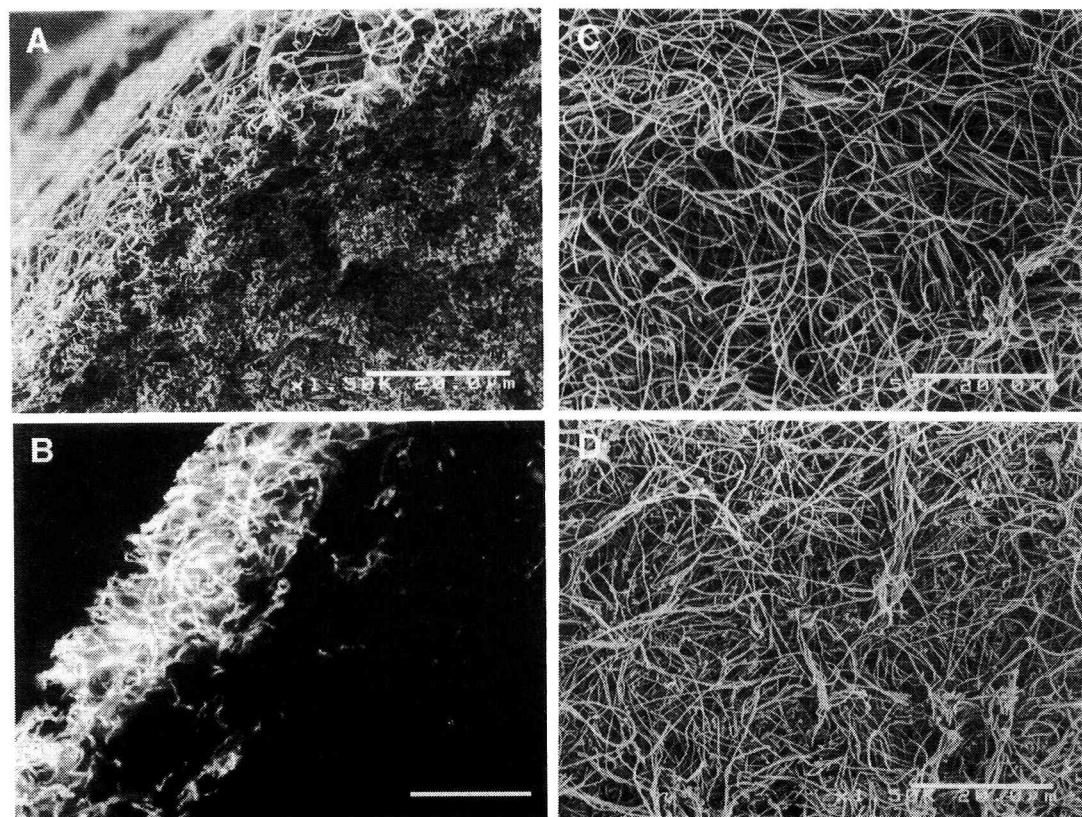


Fig.6 In situ hybridization of sections of the mesophilic granules, and SEM observation of both sludges.

(A): SEM photograph of a thermophilic granule section (the outer layer of the section) (bar: 20μm). (B) a thermophilic granule section hybridized with TRITC-labeled GNSB633 probe, showing the outer layer of the section similar to photograph A (bar: 20μm), (C, D): SEM observation of the surface of the mesophilic and thermophilic granules, (C) a mesophilic granule (bar: 20μm), (D): a thermophilic granule (bar: 20μm).

はターゲットである菌体の特異的に検出していると考えられる。一方、中温グラニュールに対して同様に本プローブを適用した結果、高温グラニュール汚泥で検出された菌体とほぼ同一の形態を持つ菌体が検出されたが、それは高温グラニュールから検出された菌体量に比べ非常にわずかであった。

次に、本プローブをグラニュール切片に対して適用したところ、高温グラニュールでは、その表層付近に存在するフィラメント状の菌体 (Fig.6, A) が蛍光を発していた (Fig.6, B)。以前より、特に高温グラニュールでは、その表面にフィラメント状の菌体が優先的に存在しグラニュール全体を覆っていることが報告されていたが¹⁶⁾、その細菌に関する知見は皆無であった。本結果は、その細菌の系統的位置を示唆するものである。一方、中温グラニュールの切片に対しても同様に *in situ hybridization* を行ったが、得られたシグナルはごくわずかであった。中温グラニュール表面も、高温グラニュール表面の菌体と同様な形態を持つ細菌に覆われているが、この菌体は本プローブでは蛍光を発しなかった。従って、中温グラニュール表面のフィラメント状の細菌は (Fig.6, C)、高温グラニュールのそれとは系統的に異なることが示唆された。

本プローブで検出された菌体は、そのグラニュール内での空間分布より、おそらく有機物の嫌気分解過程での初期の段階の基質である、人工廃水内のスクロースを発酵的に利用しているのではないかと予想される。そこで、スクロースを唯一のエネルギー源として高温グラニュールから細菌の分離を試みたが、現在までのところこの表層のフィラメント状の細菌の培養は成功しておらず、未だにこの特徴的な細菌に関する代謝特性は不明なままである。

4. 結論

スクロースおよび有機酸を主成分とした廃水処理する中温、高温処理UASB反応槽内で形成されたグラニュールの切片に対する *in situ hybridization* の適応を行い以下の知見を得た。

1. グラニュール切片の作成では、パラフィンに包埋した場合、その構造を保つためには10 μ m以上の厚さにセクションを行うことが望ましく、その切片は、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで容易に観察が可能であった。また、その切片の作成の際、特に高温グラニュールでは、固定後の凍結融解処理がプローブの浸透を向上させるのに効果的であった。
2. 中温、高温グラニュールとも、その外層は細菌で占められ、内側は古細菌で占められているという層構造が菌体レベルで明らかとなった。また、グラニュール内に存在する古細菌はほとんどメタン生成菌であり、中でも *Methanosaeta* に属する古細菌が多く存在した。
3. 中温グラニュール内に存在する水素酸化性メタン生成菌は、主に *Methanospirillum* 様の古細菌であり、それはグラニュール全体に分布していた。また、*Methanobacterium* (もしくは *Methanobrevibacter*) 様の古細菌がグラニュール内部に存在し、球状の細菌と密接して存在していたことが、MB1174プローブの適用の結果明らかとなった。一方、高温グラニュール内に検出される水素酸化性メタン生成菌は、主に *Methanobacterium* 様の古細菌であり、また一部には、*Methanosarcina* 様のマイクロコロニーも確認された。
4. 16S rDNAクローニング解析で存在が予想された細菌を検出するため、*Syntrophobacter* 属に近縁なクローンに特異的なSYB701、また *green non-sulfur bacteria* に属する未知なクローンに特異的なGNSB633プローブを設計し、両グラニュール切片に適用した結果、SYB701プローブは、中温グラニュール切片の内部に存在する球状の細菌、GNSB633プローブは、主に高温グラニュール切片の最も外側に存在するフィラメント状の細菌を検出した。このアプローチにより、それら未知な細菌群の形態を明らかにすると同時に、グラニュール内の物理的位置から推定される *in situ* での代謝特性を培養に依らず推定することが可能であった。

参考文献

- 1 Lettinga, G., Anaerobic digestion and wastewater treatment systems., *Antonie van Leeuwenhoek* 67, 97.3.28, 1995
- 2 MacLeod, F., Guiot, S. R. & Costerton, J. W., Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor., *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1598-1607, 1990
- 3 珠坪一晃, 関口勇地, 原田秀樹, 大橋晶良, 多川正, 大関弘和, 荒木信夫, 16S rRNA標的モレキュラープローブの In situ hybridizationによる嫌気性汚泥微生物叢の生態学的構造解析, *環境工学論文集*, 34, 51-60, 1997
- 4 大橋晶良, 渡辺亮, 原田秀樹, 微小電極と数学的モデルによる嫌気性微生物グラニュール内の基質濃度とpHプロファイルの評価, *環境工学論文集*, 33, 235-245, 1996
- 5 Grotenhuis, J. T. C., Smit, M., Plugge, C. M., Yuansheng, X., van Lammeren, A. A. M., Stams, A. J. M. & Zehnder, A. J. B., Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrate., *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1942-1949, 1991
- 6 Macario, A. J. L., Visser, F. A., van Lier, J. B. & Conway de Macario, E., Topography of methanogenic subpopulations in a microbial consortium adapting to thermophilic conditions., *J. Gen. Microbiol.* 137, 2179-2189, 1991
- 7 Stams, A. J. M., Grotenhuis, J. T. C. & Zehnder, A. J. B., Structure-function relationship in granular sludge., In *Recent Advances in Microbial Ecology*, 440-445, Edited by Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R. Y. & Uchida, A., Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1989
- 8 Visser, F. A., van Lier, J. B., Macario, A. J. L. & de Macario, E. C., Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium., *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1728-1734, 1991
- 9 Harmsen, H. J. M., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M. & de Vos, W. M., Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge., *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2163-2168, 1996
- 10 Harmsen, H. J. M., Kengen, K. M. P., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M. & de Vos, W. M., Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes., *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1656-1663, 1996
- 11 Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H. & Nakamura, K., Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology* 144, 2655-2665, 1998
- 12 Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations., *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925, 1990
- 13 Stahl, D. A. & Amann, R., Development and application of nucleic acid probes, In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 205-248, Edited by Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1991
- 14 Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E. & Stahl, D. A., Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens., *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1232-1240, 1994
- 15 Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J. & Stahl, D. A., Genus- and group specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria., *System. Appl. Microbiol.* 15, 601-609, 1992
- 16 Uemura, S. & Harada, H., Microbial characteristics of methanogenic sludge consortia developed in thermophilic UASB reactors., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 654-660, 1993
- 17 Patel, G. B. & Sprott, G. D., *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("*Methanothrix concilii*") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 79-82, 1990
- 18 Kamagata, Y., Kawasaki, H., Oyaizu, H., Nakamura, K., Mikami, E., Endo, G., Koga, Y. & Yamasato, K., Characterization of three thermophilic strains of *Methanothrix* ("*Methanosaeta*") *thermophila* sp. nov.

- and rejection of *Methanotherix* ("Methanosaeta") *thermoacetophila*., Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 463-468, 1992
- 19 Laanbroek, H. J. & Voogd, I. L., Alcohol conversions by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen., Arch. Microbiol. 133, 178-184, 1982
- 20 Boone, D. R. & Bryant, M. P., Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems., Appl. Environ. Microbiol. 40, 626-632, 1980
- 21 Schink, B., Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation., Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 61, 262-280, 1997
- 22 Saito, N. & Nei, M., The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees., Mol. Biol. Evol. 4, 406-425, 1987