

(16) UASB 廃水処理プロセスでの嫌気性微生物群集の
分子生物学的手法による動態解析

Population Dynamics Analysis of Anaerobic Sludge Consortia Grown in
UASB Process by 16S rRNA Based Molecular Approach

多川 正^{***}、関口勇地^{*}、荒木信夫^{***}、大橋晶良^{*}、原田秀樹^{*}

Tadashi TAGAWA, Yuji SEKIGUCHI, Nobuo ARAKI, Akiyoshi OHASHI, Hideki HARADA

ABSTRACT; Microbial population shift of anaerobic sludge consortia in response to temperature change was investigated by using 16S rRNA molecular approach such as FISH (fluorescent in situ hybridization), PCR-RFLP-sequencing and T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). A bench scale UASB reactor maintained at 35°C for a long time period was subjected to abrupt temperature increase to 55°C. The mesophilic granular sludge exhibited the optimum methanogenic activity, opposed to our anticipation, at above 40°C, while the thermophilic granular sludge possesses the optimum methanogenic activity at different temperatures for each different substrate: 55°C for propionate-, 60°C for acetate-, and 65°C for hydrogen-fed methanogenic activity.

FISH analysis using our newly developed oligonucleotide probes, which are able to distinguish separately mesophilic and thermophilic acetate-utilizing methanogen, successfully provided an evidence that some extent of *Methanosaeta thermophila*, thermophilic acetate-utilizing methanogen, is present a priori in the mesophilic sludge consortium that have never experienced a thermophilic condition in the past.

The T-RFLP patterns of archaeal clones' 16S rDNA reflected distinctly the time-series population shift from mesophilic acetate-utilizing methanogen (*Methanosaeta concilii*) to thermophilic acetate-utilizing methanogen (*Methanosaeta thermophila*). The molecular approach methodology employed in this study proved to be powerful and useful tools to monitor the population dynamics of anaerobic sludge consortia for better understanding of anaerobic wastewater processes.

KEYWORDS; Microbial population dynamics, Thermophilic UASB process, 16S rRNA, *Archaea*, T-RFLP

1. はじめに

1980 年代前半に開発、実用化された UASB (上昇流嫌気性スラッジブランケット) 法による廃水処理プロセスは、アグロインダストリー系廃水等を中心に、この 20 年で全世界で 800 基以上導入、稼働されており、嫌気性廃水処理技術の中核を担う技術として高い信頼性を得ている^{1) 2)}。我々の研究グループでは、更なる高速処理プロセスの開発を目的として、高温 (55°C) UASB プロセスの開発に着手し、高温条件下におけるグラニュレーションメカニズムの解析^{3) 4) 5) 6)}を行い数多くの知見を収集してきた。また、ハード面においては新規の多段型 UASB 反応器の開発に成功し、容積負荷 100 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ の壁を破る超高負荷処理⁷⁾および適応廃水種 (高濃度脂質、タンパク質含有食品廃水) を飛躍的に拡大することが可能であること^{8) 9)}を実験的に証明してきた。その結果、これまでの見解では、高温 UASB プロセスは温度や基質組成などの環境変動に対して若干中温プロセスと比較すると脆弱であるという問題点も残しているが^{10) 11)}、一度高温グラニュールが形成さえすれば、易分解性の廃水種のみならず、これまでは中温高温ともに不得手とされていた廃水種についても中温の数倍高速の処理特性を約束される。つまり、高温グラニュール汚泥を、あらゆる種類の廃水種でもいかに速く確実に、かつ長期間崩壊させることなく維持していくことが一番の鍵となる。

* 長岡技術科学大学 環境システム工学系 (Dept. of Environ. Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

** 神鋼パテック株式会社 環境装置事業部 (Shinko Pantec Co., Ltd., Environmental Systems Division)

*** 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (Dept. of Civil Engineering, National Technical College of Nagaoka)

現在までの処、高温 UASB プロセスのスタートアップの方法として推奨されているのが、中温培養のグラニューール汚泥を植種源として用い、最初から高温条件でスタートアップを行うといった方法が、限られた条件の中ではあるが最も迅速で確実であると報告されている^{3) 12) 13)}。しかしながら、植種された中温グラニューール汚泥が高温条件下でどのようにして高活性な高温グラニューールへと変遷していくかについて、特に中温性微生物がどのように高温性微生物種に優占種が変遷していくかについての知見は未だに少ない。

そこで本研究では、中温グラニューールから高温グラニューール汚泥への微生物生態学的変遷の基礎データの収集を目的とし、中温 (35°C) で運転中の UASB 反応器を急激に高温 (55°C) にシフトさせ、温度変化後の中温性メタン生成細菌群から高温性メタン生成細菌群へのポピュレーションシフトの解析および定量化を分子生物学的手法 (FISH、T-RFLP 法) などを用いて追跡した。さらに、分子生物学的手法により得られた結果より、反応器の処理パフォーマンス、メタン生成活性の推移などの結果の考察を行った。

2. 実験方法

2.1 UASB 反応器及び供給基質

本研究では、有効液張容積 11.9L (GSS 容積 0.9L を含まず)、内径 10cm の従来型 UASB 反応器を用いた⁴⁾。リアクターにはウオータージャケットと温度センサーを装着しており、センサー出力より適温の温水を循環させることで反応器内の温度を中温 (35°C) 及び高温 (55°C) 条件に設定することが可能である。

培養基質は、シュクロース+VFA (酢酸およびプロピオン酸) を主成分とした人工廃水を用いた。有機物の COD 濃度はシュクロース：酢酸ナトリウム：プロピオン酸：ペプトン=1350：675：675：300 (mgCOD・L⁻¹) で、COD 濃度は実験期間を通じて 3,000mgCOD・L⁻¹ で一定とした。また、廃水には硫酸塩で 80mgSO₄²⁻・L⁻¹ 含有しているが、硫酸還元による有機物除去への寄与率は 3% 以下に抑えられていた。無機栄養塩類および微量元素濃度 (mg・L⁻¹) は、実験期間を通じて既報⁴⁾ と同等量添加した。

2.2 温度シフト

リアクターへの初期植種汚泥は、中温フルーツジュース培養グラニューール汚泥を反応器へ植種し (27.9gVSS・L⁻¹)、上記の組成の人工廃水にて反応器温度 35°C の中温条件下において約 1 年間、容積負荷 10kgCOD・m⁻³・d⁻¹、HRT 7.2 時間の条件で前培養を行った。前培養の期間の COD 除去率は常時 98% 以上を維持しており、反応器内には平均粒径 1.5mm 程度のグラニューール汚泥が安定的に保持されていた。その後、反応器の温度を短時間 (12 時間) の間に 35°C から 55°C の高温条件へシフトさせた。温度シフト後は処理状況に応じて HRT を操作することにより容積負荷を調節を行った。

2.3 メタン生成活性試験および汚泥性状解析

反応器保持汚泥のメタン生成活性の推移の追跡を、温度シフト前及びシフト後 3, 20, 36, 56 及び 97 日目において測定を行った。また、各基質におけるメタン生成活性の温度シフト及び温度依存性を測定するために、中温保持汚泥 (0 日目) と温度変化後 97 日目の保持汚泥について分析を行った。試験基質は酢酸、プロピオン酸、H₂/CO₂ (80:20, v/v) 及びシュクロース (基質濃度はいずれも 2000mgCOD・L⁻¹) を用い、試験温度は 35°C 及び 55°C の 2 つの温度域で測定を行い、温度依存性試験に関しては、中温保持汚泥：25~55°C；97 日目保持汚泥：35~70°C の間で測定を行った。詳細な手順については既報³⁾ に準拠した。反応器保持汚泥性状 (SVI、保持汚泥粒径) の解析は既報の方法に準じた⁴⁾。

2.4 In situ hybridization 法

温度シフト前の中温汚泥および温度シフト後、反応器内に保持された汚泥について Table 1 に示した 16S rRNA 標的蛍光遺伝子プローブを用い、各メタン生成古細菌の定量化及び空間分布の観察を行った。微生物叢の空間分布は 4%-パラフォルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋を施し、マイクロームによりグラニューール切片を作成し、FISH 法を施した。詳細なグラニューール切片の作成及び In situ hybridization

法における特定微生物の定量化は既報^{6) 14)}に準拠して行った。

Table 1 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Target group	Probe sequence (5'-3')	T [*] C*	%FA	Ref.
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	46	5	Amann 1990 ³²⁾
ARC915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAAATTCCT	46	35	Stahl <i>et al.</i> , 1991 ³³⁾
MX825	Methanosaetaceae	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	46	20	Raskin <i>et al.</i> , 1994 ³⁴⁾
MB1174	Methanobacteriaceae	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	46	35	Raskin <i>et al.</i> , 1994 ³⁴⁾
TMX745	Thermophilic Methanosaeta	CCCTTGCCGTCGGATCCG	46	35	Araki <i>et al.</i> , 2000 ³⁵⁾
MMX1273	Mesophilic Methanosaeta	TTTATAGGAGATTCCCGTC	46	10	Araki <i>et al.</i> , 2000 ³⁵⁾
GNSB633	green non-sulfur bacteria	TAGCCCGCCAGTCTTGAACG	46	20	Sekiguchi <i>et al.</i> , 1999 ⁶⁾

*: Hybridization Temperature, FA: Formamide concentration in hybridization buffer

2.5 グラニュール汚泥からの DNA 抽出

グラニュール汚泥からの DNA 抽出は、-80℃ にて凍結保存していたサンプルを氷中にて溶解し、無菌的にホモジナイズを施した汚泥 350mg、0.1mm 径 beads を 2g、300μL の phosphate buffer (100mM NaH₂PO₄, pH 8.0)、300μL の Lysis buffer (100mM NaCl, 500mM Tris-HCl[pH 8.0], 10% SDS) をチューブに順番に注ぎ、さらに縁までクロロフォルム溶液をいれ、ピーディング (3,800rpm、1 分間) を行った¹⁵⁾。続いて 60℃ で 10 分間保温し、遠心分離 (12,000g、4℃、10 分間) 後、上澄み液を 1.5mL のチューブに回収した。回収したサンプルについて、数回の PCI (25:24:1)、CIA (24:1) 処理の後、酢酸ナトリウムとイソプロピルアルコールを添加して核酸を凝集沈殿させ回収し、RNase 処理 (最終濃度: 50μg・mL⁻¹) を施し精製後、抽出 DNA を得た。

2.6 PCR 及びクローニング

Archaea (古細菌) 由来の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅には、前記の抽出 DNA をテンプレートとして用い、既報の反応液組成にて、古細菌に特異的なプライマー Arc111F (5'-GCTCAGTAACACGTGG-3', *Escherichia coli* position 112 to 127,^{16) 17)})、と細菌・古細菌に特異的なプライマー Univ1490R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', *E. coli* position 1491 to 1509,¹⁸⁾) のセットを使用して増幅を試みた。PCR 反応は、95℃、9 分の変性の後、95℃ 40 秒の変性、50℃ 30 秒のアニーリング、72℃ 2 分の伸長ステップを、25 サイクル行った。PCR 産物は、GeneClean II kit (BIO 101 Inc, USA) で精製し、TA cloning kit (Novagen) によって pUC 系のプラスミドにライゲーション後、大腸菌を用いてクローン化した。

2.7 RFLP 及び塩基配列決定

クローン化した rDNA は、目的プラスミドがインサートされている組換え体をランダムに 65-66 個ピックアップし、*Hae* III と *Hha* I の制限酵素を用いて RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析を行った。RFLP の電気泳動は、3% アガロースゲルで 50V、40 分間の泳動時間で行い、その泳動パターンの識別を行い、全てのパターンについて塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、Thermo SequenaseTM fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham pharmacia biotech) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、クローン化された 16S rDNA の約 1,350bp を塩基配列自動解析装置 (DSQ-1000L、島津製作所) を用いて解析を行った。その結果は、Ribosomal Database Project (RDP) の CHECK-CHIMERA program によってキメラ DNA の判定を行い、BLAST search¹⁹⁾ によってホモロジーサーチを行った。

2.8 Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP)

温度シフト後の微生物叢のポピュレーションシフトの解析に、本研究では T-RFLP 法^{20) 21)}を用いた。各グラニュール汚泥より抽出した DNA (10ng) をテンプレートに用い、古細菌に特異的なプライマー Arc344F-FITC (5'-ACGGGGIGCAGCAGGCGCGA-3', 5'末端を FITC で標識, *E. coli* position 344 to 363,²²⁾)

と、細菌・古細菌に特異的なプライマー Univ907R (5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3', *E. coli* position 907 to 928,²²⁾)を使用し、2.6節のPCR 反応条件(但し、PCR サイクルはバイアスを極力避けるため 20 サイクルに抑えた)により、古細菌由来の 16S rDNA を増幅した。増幅産物は PEG 沈殿法²³⁾により精製を行い、増幅断片を制限酵素 *Alu* I, *Taq* I により切断し、オートシーケンサー (DSQ-1000L, 島津製作所)により切断した 16S rDNA 断片 (T-RFs) の検出(変性ゲル: 8M-Urea, 6%-Super Reading DNA Sequence Solution, 1.2×TBE Buffer, 電気泳動条件: DSQ-1000L High-speed mode, 16hrs)を行った。その後、蛍光イメージャー (BioRad FX) により T-RFLP の electropherogram を解析し、メタン生成古細菌群のポピュレーションシフト解析を行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 温度シフト後のリアクター処理特性

Fig. 1 に温度シフト後のリアクターの処理特性を示した。運転温度を 35°C から 55°C へ、12 時間の間に上昇させ、高温条件での運転を開始した。容積負荷は HRT を長くすることで 10 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ から 3 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ まで低下させたが、1 週間程度経過しても COD 除去能は回復せず (Fig. 1-(a)) 35% まで低下し、処理水中に 600mgCOD・L⁻¹ もの高濃度のプロピオン酸の蓄積 (Fig. 1-(b)) が観察された。高温 UASB のスタートアップ初期にはプロピオン酸の蓄積が観察されており^{4) 12) 24)}、その後も全く減少せず、さらに 800mgCOD・L⁻¹ まで増加したため、容積負荷をさらに 1.6 kgCOD・m⁻³・d⁻¹ まで低下させて、COD 除去能の発現を促進した。その結果、COD 除去率は徐々に回復しはじめ、同時に負荷を上昇することができ、温度シフト後 43 日目で温度シフト前の容積負荷である 10kgCOD・m⁻³・d⁻¹ まで回復し、その後は常時 COD 除去率 98% 以上を維持することが可能であった。

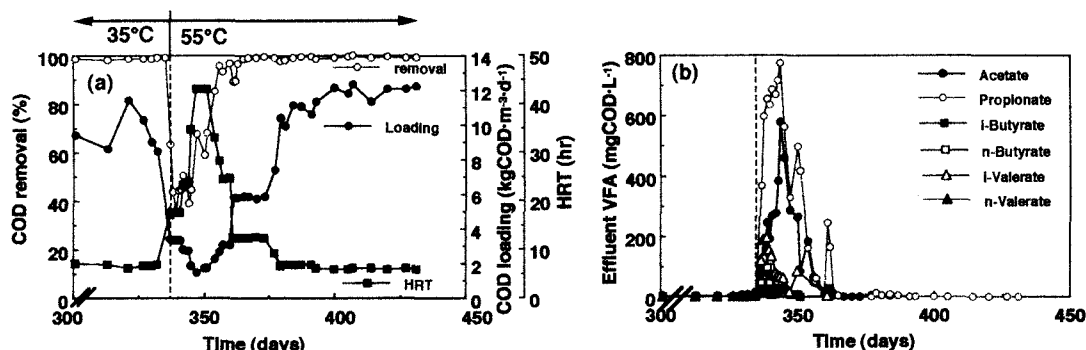


Fig.1 Process performance of temperature-shift UASB reactor.
(a) COD removal, COD loading and HRT (b) VFA conc. in the effluent

3.2 保持汚泥形態の変遷

温度シフト後、保持グラニュール汚泥の一部は温度ショックにて一部崩壊し、処理水の VSS 濃度が瞬間的に 300mg・L⁻¹ まで増加した。これより、反応器保持汚泥の平均粒径は 1.5mm から 0.6mm 程度まで急激に低下し、沈降性指標である SVI 値は 30~40mL・gVSS⁻¹ へと上昇傾向を示した。細かく分散したグラニュール汚泥は完全に崩壊するには至らずに核の部分は形態を保ちながら、グラニュールの表面が剥がれるような形で多く存在していた。これは、グラニュール汚泥の内部は、代謝産物である有機酸の消費により pH が上昇し^{25) 26)}、硫化鉄など FeS の ash が形成しやすい条件であり、本中温グラニュールにおいてもグラニュール内部において Fe の存在が EDX により確認された。この表面張力の大きな FeS は、疎水性の細胞壁を有する *Methanosaeta* 属 (中温グラニュール内部にて優占, Fig.7) と強固に付着することで²⁷⁾、グラニュールの内部は空隙が少なく表面よりも強度が高くなることから、温度変化後も崩壊せずに保持されたと考えられた。

3.3 メタン生成活性の推移と温度依存性

反応器保持汚泥の 55°C 条件での活性試験結果を Fig.2 に示した。中温培養期間でのメタン生成活性値はすべての基質において活性試験温度 35°C 条件の方が高かったが、温度シフト後 3 日目、20 日目まではどちらの活性試験温度 (35°C、55°C) においてもメタン生成活性はほとんど観察されなかった。しかしながら、容積負荷のコントロールにより温度シフト後 20 日目付近より COD 除去能が発現し、それに伴い 36 日目 (容積負荷 6 kgCOD・m⁻³・d⁻¹) の活性試験では、55°C 活性試験温度条件で測定した活性値が活性試験温度 35°C 条件の活性値を初めて上回って観察された。その後、負荷の上昇に伴い、高温性微生物の増殖を示すかのように 55°C 条件での活性値は指数関数的に増加し (Fig.3)、97 日目における 55°C 温度条件活性値は酢酸基質で 2.88gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹ (活性増加率 4 倍、対中温保持汚泥、以下同様)、プロピオン酸 0.22 gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹ (0.42 倍)、水素 6.5 gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹ (4.6 倍) と、同一基質、容積負荷条件でありながら数倍高い活性値が得られた。しかしながら、プロピオン酸基質に関しては、高温条件では中温汚泥の約 40% 程度の活性値しか保持していなかった。

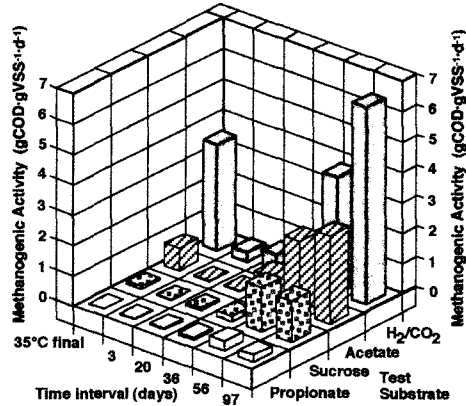


Fig.2 Time course of methanogenic activities of the retained sludge after cultivation temperature had changed from 35°C to 55°C. Test substrate: H₂/CO₂, Acetate, Sucrose and Propionate Vial test was conducted at thermophilic (55°C) condition.

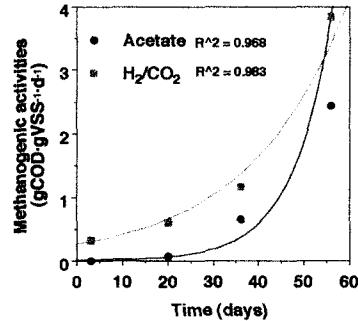


Fig. 3 Time course of methanogenic activities determined at 55°C. The curve fitting was made by the least square of an exponential curve.

Fig.4 に中温保持汚泥汚泥及び温度シフト後 97 日目の保持汚泥のメタン生成活性の温度依存性の推移を示した。中温汚泥はいずれの基質についても 45~50°C 付近に至適温度を有しているが、高温培養 97 日目には酢酸基質は至適温度 45°C から 60°C (活性値: 1.5 から 3.9 gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹へ上昇)、プロピオン酸基質は 45°C から 55°C (活性値: 0.88 から 0.22 gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹へ減少)へ、また水素基質は 50°C から 65°C (活性値: 5.8 から 9.9 gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹へ増加)と、至適温度が完全に高温側へとシフトしていた。本実験で用いたシュクロース (全流入有機物量の 45%を占める)は、中温嫌気性処理プロセスではプロピオン酸を代謝産物として生成するが、高温条件ではその代謝産物は主にエタノールと乳酸であり²⁸⁾、プロピオン酸を経由 (生成) しないメタン化への代謝経路がプロピオン酸からのメタン生成活性の低下を引き起こした要因の一つであると推察され、高温嫌気性処理プロセスにおけるプロピオン酸の蓄積現象が発生しやすいと考えられる。³⁾⁴⁾⁹⁾¹²⁾

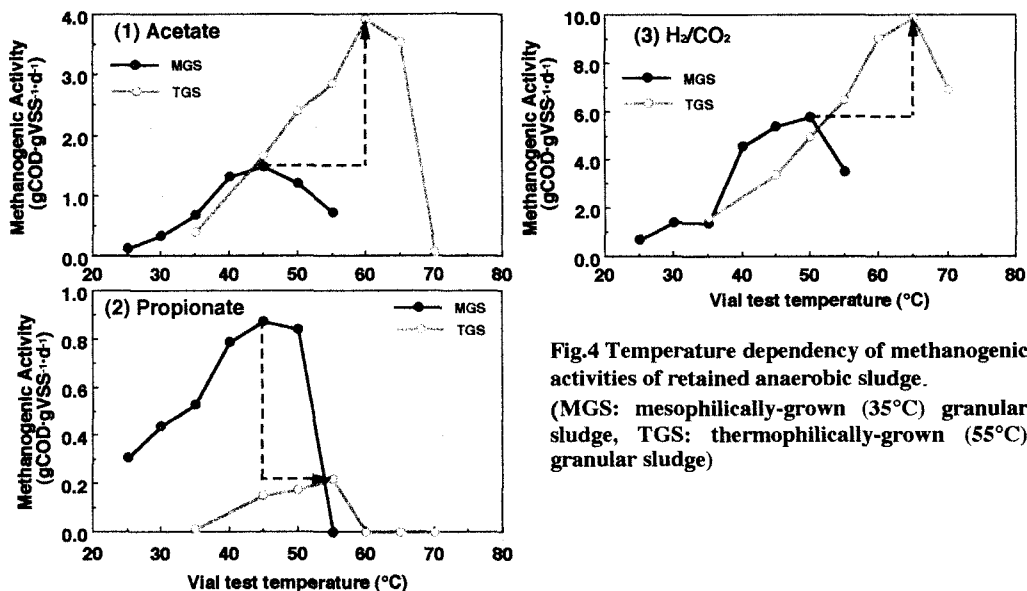


Fig.4 Temperature dependency of methanogenic activities of retained anaerobic sludge.
(MGS: mesophilically-grown (35°C) granular sludge, TGS: thermophilically-grown (55°C) granular sludge)

3.4 中温・高温性メタン生成古細菌の定量と空間的分布

温度シフト後の中温性 *Methanosaeta* 属 (MMX1273 プローブにより検出) 及び高温性 *Methanosaeta* 属 (TMX745) の DAPI 染色細胞に対する存在量の推移を Fig.5 に示した。中温性 *Methanosaeta* 属は温度上昇後約 3 週間で完全にシグナルが検出されなくなった。一方、高温性 *Methanosaeta* 属は全く高温条件を経験していない温度シフト前の中温汚泥中にもごく僅かながら存在が確認され、高温に温度シフト後はすみやかにこの高温性 *Methanosaeta* 属が増殖し、新たな高温グラニュール内で優占種となったものと推察された。また、温度シフト後の 55°C 条件においての酢酸基質からのメタン生成活性値 (Fig.2) と、高温性 *Methanosaeta* 属の単位汚泥当たりの存在菌数 (cells·gVSS⁻¹) とは、Fig.6 に示したように非常に良好な相関関係を示した。

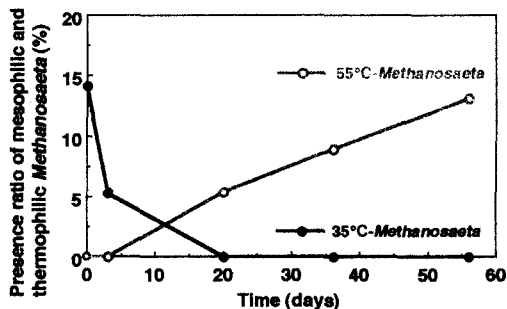


Fig.5 Time course of presence ratio of mesophilic and thermophilic *Methanosaeta*.

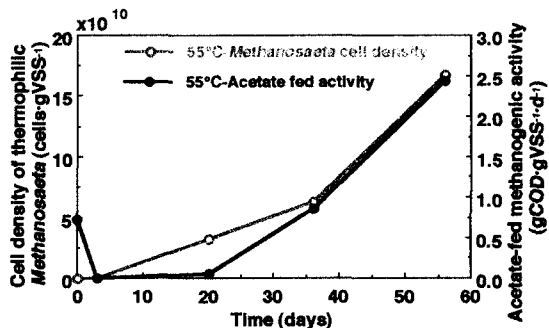


Fig.6 Time course of cell density of thermophilic *Methanosaeta* and acetate-fed methanogenic activity under 55°C.

Fig.7 に温度シフト前の中温グラニュール (A, B) と、温度シフト後 97 日目の高温グラニュール (C, D) 汚泥の、SEM 観察及びグラニュール切片を用いた FISH 観察結果を示した。中温グラニュールは、平均粒径 1.5mm 程度の形の整ったグラニュールで汚泥は占められており、その表面には高温のグラニュールに特徴的な繊維状細菌の存在はほとんど確認できなかった (A)。グラニュール切片での FISH 観察結果で

は、中温汚泥は内側にメタン生成古細菌 (*Archaea*) が優占し、その外側を酸生成細菌などの細菌 (*Bacteria*) が取り囲む 2 重の層構造を有しており、またメタン生成古細菌の多くは酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosaeta* であった (B)。高温グラニュールにおいて高頻度に検出される green nonsulfur bacteria に属する繊維状細菌の一部を特異的に検出できる GNSB633 プローブは、中温汚泥では全くシグナルを得られなかった。

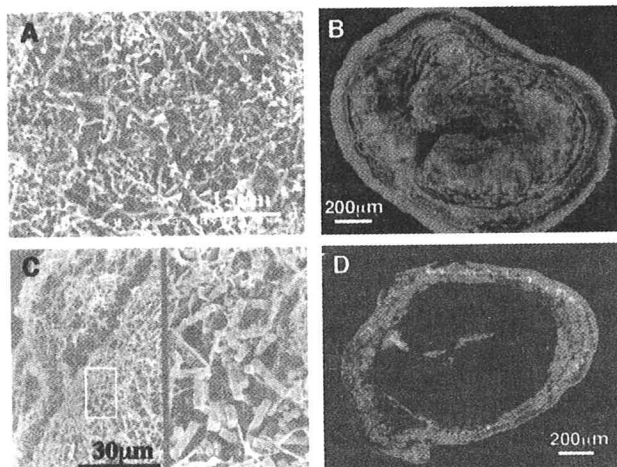


Fig.7 SEM and in situ hybridization of section mesophilic (A, B) and thermophilic (C, D) granular sludge
A: outer surface structure of granule
B: hybridized with the domain *Bacteria* probe (EUB338, green) and domain *Archaea* probe (ARC915, red)
C: cross sectional view around outer surface (magnification left: x1000 and right : x5000)
D: hybridized with the domain *Bacteria* probe (EUB338, green) and domain *Archaea* probe (ARC915, red)

一方、温度シフトから 97 日目の高温グラニュール汚泥は、非常に脆く、切片の作成作業自体も非常に困難を極めた。作業中、グラニュールの核の部分と表層 200~300μm の厚さの部分で非常に剥離しやすい傾向が多くのグラニュール汚泥で見られた。高温グラニュールの表面は、これまでの数基の高温 UASB 実験結果でも観察された^{3) 4) 6) 8)} 繊維状細菌がグラニュールの表面を厚く覆う形で優占しており、そのすぐ内側の層には酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosaeta* 様の形態が SEM 観察より確認できた (C)。グラニュール切片について *Bacteria* に特異的な EUB338 プローブと *Archaea* に特異的な ARC915 プローブを用いてハイブリダイズを行うと、グラニュールの内側部分はどちらのプローブにも反応しない領域が観察され (D)、表層を薄く酸生成細菌などの *Bacteria* が層を形成し、その内側にメタン生成細菌などの古細菌がプローブ無反応の部分の核にして取り囲むように層を形成して存在していた。この内側の層の古細菌は、酢酸資化性メタン菌 *Methanosaeta* 属に特異的な MX825 プローブによってほぼすべて検出された。また、高温汚泥表面の繊維状細菌は、GNSB633 プローブによって検出された。

これより、中温汚泥は温度シフトによりグラニュール汚泥の一部は崩壊するが、馴養がすすむにつれ崩壊したグラニュールが核として付着担体としての役割を果たし、ごくわずかながら存在する高温性 *Methanosaeta* 属がすみやかに増殖・固定化される。さらにグラニュール汚泥の表層を繊維状細菌が付着した菌体が剥がれないように覆うことで、比較的脆く崩壊しやすい高温グラニュール汚泥の形態が保たれていると推察され、今後は詳細な繊維状細菌の生態学的特性を調査することが必要であると考えられた。

3.5 PCR-クローニングによるグラニュール構成微生物のコミュニティ解析

中温グラニュール汚泥、及び高温グラニュール汚泥 (温度シフト後 97 日目) から抽出した DNA を PCR 増幅後、大腸菌を用いてクローニングを行った。最終的に中温グラニュール汚泥からは 65 クローン、高温グラニュール汚泥からは 66 クローンの古細菌の 16S rDNA クローンライブラリが得られた。これらを RFLP 解析により制限酵素断片のパターン解析によりクローンの系統分類を行った。その結果、Fig.8 に示したように、中温グラニュール汚泥の 65 クローンは 5 つの断片パターンに、高温グラニュール汚泥の 66

クローンは2つの断片パターンにそれぞれ分類可能であり、中温グラニュールでは65クローン中55クローン（85%）、高温グラニュールでは66クローン中63クローン（95%）が同じ断片パターンとして高頻度に認識された。続いてこれらのクローン群を代表として微生物種の同定を行った。

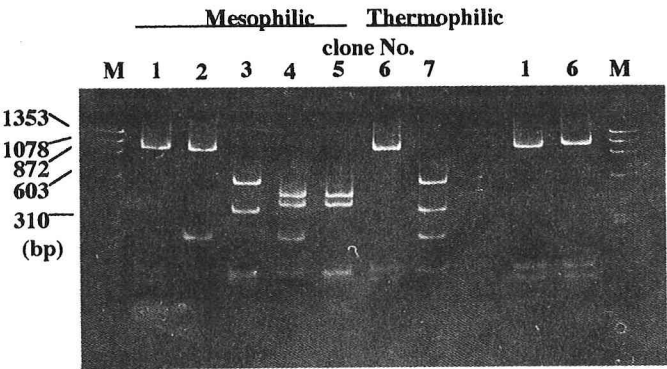


Fig.8 RFLP patterns of *Hha* I digested archaeal 16S rDNAs (1.4kbp) amplified and cloned from both of anaerobic granules.
clone 1-5 were obtained from mesophilic anaerobic granule, and clone 6, 7 were thermophilic anaerobic granule.

Table 2 に検出されたクローンの頻度、ホモロジーサーチの結果を示した。中温グラニュールで最も高頻度（clone 1, 55/全 65 クローン、以下同様）で検出されたクローンは、*Methanosaeta concilii* (“*Methanotherix soehngeni*”)の 16S rDNA に 97%の相同性で最も近縁な種であった。同様に、高温グラニュールで高頻度（clone 6, 63/66）で検出されたクローンは、高温性の酢酸資化性メタン生成細菌である、*Methanosaeta thermophila* (“*Methanotherix thermophila*”)の 16S rDNA に 95%の相同性を持つことが判明した。

その他中温汚泥からは、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanobacterium* 属の細菌に 95%の相同性をもつクローン (clone 3, 2 クローン/65)、*Methanospirillum hungatei* に 98%の相同性を持つクローン (clone 4,5、各 1 クローンずつ/65) らが検出された。高温グラニュールの残りのクローン (clone 7, 3/66) は高温性の水素資化性メタン生成古細菌である、*Methanothermobacter thermoautotrophicus* (“*Methanobacterium thermoautotrophicum*”)として検出された（99%の相同性）。

Table 2 The homologous analysis of detected in mesophilic or thermophilic clones.

granule source	clone no.	frequency	result of the most homologous microorganism	(%) Sequence similarity
mesophilic (day 0)	1	55/65 (total numbers of clone)	<i>Methanosaeta concilii</i>	97
	2	6/65	<i>Methanosaeta concilii</i>	97
	3	2/65	<i>Methanobacterium</i>	95
	4	1/65	<i>Methanospirillum hungatei</i>	98
	5	1/65	<i>Methanospirillum hungatei</i>	98
thermophilic (day 97)	6	63/66 (total numbers of clone)	<i>Methanosaeta thermophila</i>	95
	7	3/66	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	99

Archaea（メタン生成古細菌）に関しては中温・高温汚泥共に構成微生物叢及びそのポピュレーションサイズには差異はほとんど見られず、優占種も酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosaeta* 属で共通していた。また、高温汚泥に関してはすべてのクローンにおいて完全に高温性メタン生成古細菌として検出された。Chin *et al.*, (1999) ²⁹⁾ らは、温度の異なる（15℃、30℃）水田土壌の *Archaea* のポピュレーション

ン解析を行い、温度が低い方がその構成微生物叢の多様性は高いことを示したが、今回の実験では、(1) 基質が人工廃水でシンプルであった、(2) UASB グラニュールという自己固定生物集塊の特性より、固定されないマイナーな菌種は反応器系外へとウオッシュアウトされる、ことにより高温と中温汚泥で構成微生物叢はそう大きく異ならない結果が得られたと考えられる。

この *Archaea* のクローニングの結果は、メタン生成活性の温度依存性のシフト (Fig.4) の現象についてこれまでの形態的観察とは異なり、優占菌種を属・種レベルで同定できるため、中温メタン菌から高温メタン菌へのシフト、すなわち酢酸資化性メタン菌は中温性 *Methanosaeta concilii* から高温性 *Methanosaeta thermophila* (至適温度は 65℃程度³⁰⁾)へとシフトし、水素資化性メタン菌は中温性の *Methanobacterium* から、高温の *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (至適温度: 65~70℃³¹⁾)へとシフトしたため、活性の温度シフトに確実なる裏付けとなりうることを示した。

3.6 T-RFLP による中温、高温性メタン生成古細菌群のポピュレーションシフト解析

T-RFLP による解析の最適条件とデーターの信頼性のチェックのため、前 3.5 節のクローニング解析で用いた古細菌の 16S rDNA クローン群 (clone 1, 3, 4, 6, 7; Table 2) のシーケンスデーターを用い、各クローンにおいてそれぞれ異なった T-RFs が得られるような、プライマーセット及び制限酵素の選択を検討した (Table 3)。その結果、PCR 増幅には、古細菌に特異的な Arc344F プライマー (5'末端を FITC 標識) と、細菌・古細菌に特異的な Univ907R のセットが最も T-RFLP の解析に適していると判断した。制限酵素は、酢酸資化性メタン生成古細菌のポピュレーションシフト解析には、*Alu I* を用い、一方、水素資化性メタン生成古細菌に対しては、*Taq I* を用いることで、高温・中温性の *Methanosaeta* 属、*Methanobacterium* 属及び *Methanothermobacter* 属について、それぞれ異なった T-RFs が得られ、その精度は T-RFLP データ解析から算出した T-RFs (observed; Table 3) と理論値 (predicted; Table 3) は平均で±3 bp 程度 (最大 6 bp) で、高い精度で一致し、本実験手法はグラニュールなど、混合微生物叢のコミュニティー解析に適用できることが判明した。

Table 3 Predicted and observed T-RF lengths from the archaeal clones.

clone	No. of clones	Organisms (determined by sequencing)	Amplified fragment length ¹⁾	T-RF length after digestion with <i>Alu I</i>		T-RF length after digestion with <i>Taq I</i>	
				predicted	observed	predicted	observed
MG clone-1	55/66	<i>Methanosaeta concilii</i>	548	233	230	58	60
TG clone-6	63/66	<i>Methanosaeta thermophila</i>	547	386	388	58	59
MG clone-3	2/65	<i>Methanobacterium</i>	548	102	96	461	463
TG clone-7	3/66	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	546	102	98	270	264
MG clone-4	1/65	<i>Methanospirillum hungatei</i>	542	195	194	155	151

¹⁾ PCR amplification was conducted with primer set of ARC344F-FITC-labeled and Univ907R.

Fig.9 (1) は PCR 増幅された古細菌由来の 16S rDNA を *Alu I* にて切断し、Fig.9 (2) では *Taq I* にて増幅断片を切断し、T-RFLP 解析を行った結果を示した。(図中の数字は、各 T-RF のピークの bp を示している。) 中温汚泥 (0 日目) 内 (Fig.9 (1) -(a)) は酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosaeta concilii* の T-RF (230 bp) がメジャーピークとして観察され、高温性酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosaeta thermophila* の T-RF (386 bp) は観察されなかった。しかし、温度シフト後 36 日目の保持汚泥は高温酢酸資化性メタン生成古細菌 *M.thermophila* が観察され (Fig.9 (1) -(b))、97 日目には酢酸資化性メタン生成古細菌について、メジャーピークが完全に *M.thermophila* にシフトした (Fig.9 (1) -(c))。

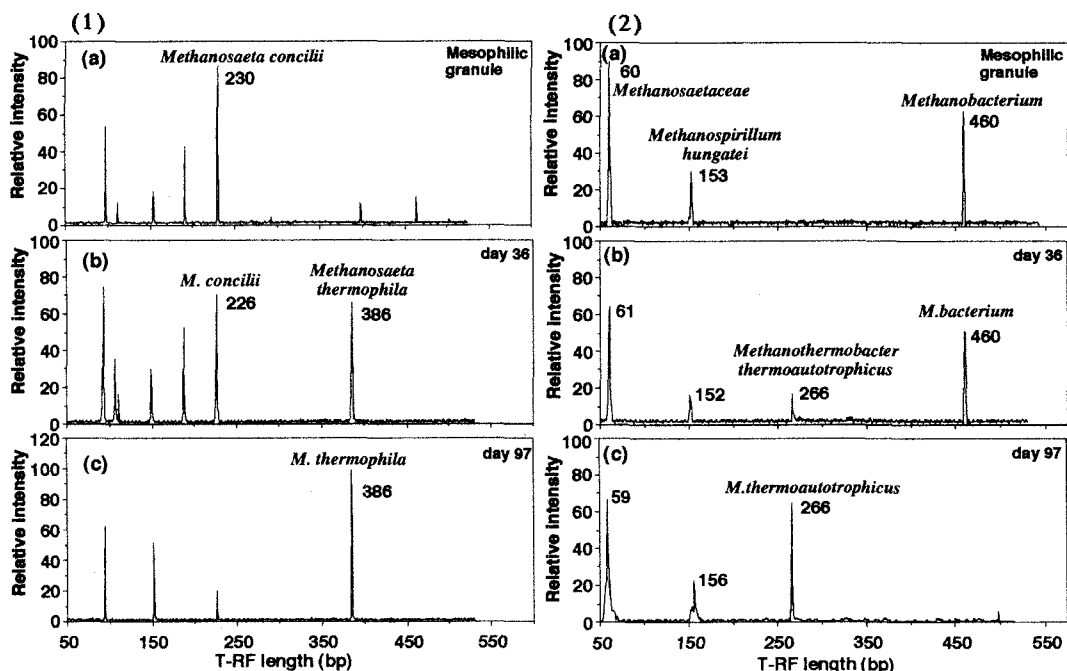


Fig.9 T-RFLP patterns of archaeal 16S rDNA amplified and digested with (1) *Alu* I and (2) *Taq* I from retained granular sludge. Primer set: Arc344F-FITC and Univ907R
(a) day 0 (mesophilic granules), (b) day 36 and (c) day 97 after temperature shift from 35°C to 55°C
The molecular size of T-RFs is shown at the top of each peak.

同様に、水素資化性メタン生成古細菌についても温度シフト後、高温条件で馴養がすすむにつれて、中温水素資化性メタン生成古細菌の *Methanobacterium* 属の T-RF(460 bp)のシグナルが消滅し (Fig.9 (2) (b),(C))、高温水素資化性メタン菌 *Methanothermobacter* 属の T-RF (266 bp) がメジャーピークとなり検出され、温度シフト後、高温条件での保持汚泥のメタン生成活性の増加が観察されるように (Fig.2)、すみやかに高温性微生物叢へのシフトが行われる様子を観察することが可能であった。

T-RFLP 法は、その結果のみでは 1 つのフラグメントが観察されるにすぎないが、クローニングなどにより構成微生物叢の 16S rDNA のデータベースが存在すれば、ある特異的な微生物種のための動態解析を容易に行うことができる。本研究では、クローニングから得たシーケンスデータを基に、中温及び高温のメタン生成古細菌の温度シフト後の挙動を明確にとらえることが可能であった。さらに本法は多くの微生物種に対する T-RFs のデータを利用することで、定期的に、もしくはまったく新たな廃水種に変化させた場合や、プロセスダウンが発生した場合の微生物群集構造を容易に把握していく手法として有用であることが示された。

4. まとめ

FISH 法や PCR-クローニングなどの分子生物学的手法を用い、構成微生物を種レベルで定量、観察することにより、微生物叢は環境変動 (温度) によってセレクションが強力な影響力で働き、温度シフト後はプロセス上は失活しているかの様子を呈しているが、内部では速やかに新しい微生物叢が構築されていく様子が、非常に限られた部分ではあるが観察することが可能であった。また、一度も高温条件を経験していない中温汚泥内にも高温性の酢酸資化性メタン生成古細菌が存在していることが示され、今後は更に様々な中温グラニュー汚泥内の高温性メタン生成古細菌の定量化などを調査し、高温 UASB スタートアップに最も適した汚泥の選択指針などを検索したい。

参考文献

- 1) Fang, H. H. P. and Liu, Y. : Anaerobic wastewater treatment in (sub-)tropical regions, *The international symposium of the COE*, Tokyo, 109-118, 2000
- 2) van Lier, J. B., Tilche, A., Ahring, B. K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L. W., Lens, P. and Verstraete, W.: New perspectives in anaerobic digestion, *Wat. Sci. Tech.*, 43, 1, 1-18, 2001
- 3) Syutsubo, K., Harada, H., Ohashi, A. and Suzuki, H. : An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge, *Wat. Sci. Tech.*, 36, 6-7, 391-398, 1997
- 4) Syutsubo, K., Harada, H. and Ohashi, A.: Granulation and sludge retainment during start-up of a thermophilic UASB reactor, *Wat. Sci. Tech.*, 38, 8-9, 349-357, 1998
- 5) Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Syutsubo, K., Ohashi, A., Harada, H. and Nakamura, K. : Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology*, 144, 2655-2665, 1998
- 6) Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H. : Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3, 1280-1288, 1999
- 7) 原田秀樹, 珠坪一晃, 大橋晶良, 関口勇地, 多川 正: 新規の多段型高温 UASB リアクターによる超高速廃水処理装置の実現化 ―アルコール蒸留廃水の高速処理特性と高濃度生物保持能の評価―, 環境工学研究論文集, 34, 327-336, 1997
- 8) 多川 正, 大橋晶良, 原田秀樹: 新規の多段型高温 UASB リアクターによる高濃度脂質含有廃水の嫌気性処理特性, 環境工学研究論文集, 35, 51-60, 1998
- 9) 多川 正, 原田秀樹, 高橋弘希, 大橋晶良, 関口勇地: 新規の多段型 UASB 反応器による脂質・タンパク質含有廃水の高濃度嫌気性処理パイロットプラント実験, 環境工学研究論文集, 36, 431-441, 1999
- 10) van Lier, J. B. : Limitations of thermophilic anaerobic wastewater treatment and the consequences for process design, *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 1-14, 1996
- 11) 原田秀樹, 大橋晶良: 高温条件下での嫌気性グラニュールの形成 ―“夢の超高速” 嫌気性廃水処理プロセスの実現化―, 水環境学会誌, 21, 10, 635-639, 1998.
- 12) van Lier, J.B., Grolle, K.C.F., Stams, A.J.M., de Macario, E.C., and Lettinga, G.: Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 130-135, 1992
- 13) Fang, H. H. P. and Lau, I. W. C.: Start-up of thermophilic (55°C) UASB reactors using different mesophilic seed sludges, *Wat. Sci. Tech.*, 34, 445-452, 1996
- 14) Tagawa, T., Syutsubo, K., Sekiguchi, Y., Ohashi, A. and Harada, H.: Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in-situ hybridization, *Wat. Sci. Tech.*, 42, 3-4, 77-82, 2000
- 15) Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W.C. : Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 11, 4715-4724, 1999
- 16) Großkopf, R., Janssen, P. H. and Liesack, W. : Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3, 960-969, 1998
- 17) Lueders, T. and Friedrich, M. : Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 7, 2732-2742, 2000
- 18) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. : 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.*, 173, 697-703, 1991
- 19) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.: Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, 1990
- 20) Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Forney, L. J.: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 11, 4516-4522, 1997
- 21) Hiraishi, A., Iwasaki, M. and Shinjo, H.: Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge, *J. Bioscience Bioengineering*, 90, 2, 148-156, 2000

- 22) Amann, R. I. : In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, In *Molecular microbial ecology manual*, pp. 97.1-15. Edited by A. D. L. Akkermans & J. D. van Elsas. London: Kluwer Academic Publishers, 1995
- 23) Hiraishi, A., Kamagata, Y. and Nakamura, K.: Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens, *J. Ferment. Bioengin.*, 79, 6, 523-529, 1995
- 24) Uemura, S., and Harada, H.: Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, 43, 358-364, 1995
- 25) Guiot, S. R., Pauss, A. and Costerton, J. W.: A structured model of the anaerobic granule consortium, *Wat. Sci. Tech.*, 25, 1-10, 1992
- 26) 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ール内の基質濃度と pH プロファイルの評価, 環境工学研究論文集, 33, 235-245, 1996
- 27) Dubourguier, H. C, Buisson, M. N., Tissier, J. P., Prensier, G. and Albagnac, G.: Structural characteristics and metabolic activities of granular methanogenic sludge on a mixed defined substrate, *Proc. Of GASMAT-Workshop*, Lunteren, Netherlands, 25-27, 1987
- 28) Stams, A. J. M. and Zehnder, A. J. B.: Ecological impact of syntrophic alcohol and fatty acid oxidation, In *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Hydrogen transfer.*, pp. 87-98, Edited by J.-P. Belaich, M. Bruschi and J.-L. Garcia, New York: Plenum press
- 29) Chin, K.-J., Lukow, T. and Conrad, R.: Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2341-2349, 1999
- 30) Nozhevnikova, A. N. and Chudina, V. I.: Morphology of the thermophilic acetate methane bacterium *Methanothrix thermophila* sp. Nov., *Microbiology*, 53, 618-624, 1984
- 31) Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. and Wolfe, R. S. :Methanogens reevaluation of a unique biological group, *Microbiol. Rev.*, 43, 260-296, 1979
- 32) Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D. A. : Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 6, 1919-1925, 1990
- 33) Stahl, D. A. and Amann, R. I.: Development and application of nucleic acid probes, In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 205-248. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow, New York: John Willey & Sons, Inc
- 34) Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A. : Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4, 1232-1240, 1994
- 35) 荒木信夫, 岩野安寿香, 長谷川航, 多川 正, 原田秀樹: 高温条件へのシフトアップによるグラニューール内の微生物構造の変化, 土木学会第 55 回年次学術講演会, VII-18, 2000