

(67) 嫌気性廃水処理プロセスにおいて高級脂肪酸の分解を担う細菌の分離・培養と特異的検出

Cultivation, Identification and Specific Detection of Anaerobic Syntrophic Long-Chain Fatty Acids-degrading Microorganisms in Anaerobic Sludges

幡本 将史*, 井町 寛之*, 大橋 晶良*, 原田 秀樹*

Masashi HATAMOTO*, Hiroyuki IMACHI*, Akiyoshi OHASHI*, and Hideki HARADA*

ABSTRACT ; The anaerobic long-chain fatty acids (LCFA) degrading microorganisms were enriched and attempted at isolation of those microbes to address the fundamental information of microbes responsible for anaerobic degradation of LCFA. Primary enrichment cultures were made with each of four LCFA substrates (palmitate, stearate, oleate and linoleate as a sole energy source) at 55°C or 37°C with two sources of anaerobic granular sludge as the inoculum. After several successive transfers of these enrichments, we applied 16S rRNA gene-based molecular approaches for the enrichments to reveal the bacterial populations reside in. These results suggested that anaerobic degradation of LCFA may involve in not only microbes belonging to the family *Syntrophomonadaceae*, which contains all anaerobic syntrophic LCFA degrader isolated so far, but also phylogenetically different groups of bacteria. After several attempts were made to isolate these microbes, we obtained a highly purified culture which was able to degrade palmitate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens from the thermophilic palmitate-degrading enrichment culture. In addition, we successfully isolated strain TOL which was predominant population in the thermophilic oleate-degrading enrichment culture. However, strain TOL did not show oleate degradability under any cultivation conditions to date.

KEYWORDS ; anaerobic digestion, long-chain fatty acids (LCFA), 16S rRNA gene, fluorescence in situ hybridization (FISH)

1. はじめに

現在、嫌気性処理プロセスは食品加工系廃水などの比較的易分解性で溶解成分を主体とする、中・高濃度の有機性廃水において、すでに商業ベースで成功を収めている技術である¹⁾。また最近では、嫌気性処理プロセスは持続的に発展可能な循環型社会構築のための中核技術の1つとして再び注目を集めており、その適用範囲は易分解性のものからより難分解性のものへ、また低温から高温までのより幅広い運転温度へと広がりがつつある。しかしながら、高濃度に脂質を含有する廃水は依然として嫌気性廃水処理においてその処理が難しい廃水種の1つであるとされている^{2,3)}。

脂質含有廃水の処理が難しい原因の1つは、脂質の加水分解により生成する高級脂肪酸

*長岡技術科学大学 環境システム系

(Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

(Long-Chain Fatty Acids: LCFA) に起因している。廃水中の脂質はその多くが炭素数 16 個または 18 個の高級脂肪酸 (主にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸) により構成されている。これら高級脂肪酸は微生物に対して阻害作用を及ぼすことや分解速度が遅くプロセス内に蓄積しやすい事が知られている。これらの理由から高級脂肪酸は処理プロセス全体に悪影響を及ぼし、処理水質の悪化や、ひいては処理プロセスの破綻など大きな問題をもたらす^{2,3)}。従って、脂質含有廃水の効率的な処理には、脂質の主成分であるパルミチン酸やオレイン酸などの炭素数 16 以上の高級脂肪酸の迅速な分解が重要であり、それらの分解を担う微生物の詳細な特徴や、生態についての情報が不可欠であるといえる。

高級脂肪酸は嫌気 (メタン生成) 環境下において、高級脂肪酸分解細菌によりβ酸化反応を経て水素を生成しながら酢酸へと分解されることが知られている。この反応は生成する水素が除去されなければ熱力学的に進行しない反応である。従って、高級脂肪酸分解細菌はメタン生成古細菌などの水素を利用する微生物との強固な共生関係が必要である⁴⁾。そのため、高級脂肪酸分解細菌を分離し純粋培養を行うことは極めて難しく分離例が少ないのが現状であり、事実、現在までに正式に記載・命名までなされた高級脂肪酸分解細菌は *Syntrophomonadaceae* 科の 4 種のみである^{5,6,7,8)}。また、脂質含有廃水は脂質の性状などから高温条件下での処理が適していると考えられているが^{3,9)}、高温性の嫌気性処理プロセスにおいて高級脂肪酸の分解を担っている細菌に関しては、集積培養のみ報告されているだけである^{10,11)}。従って、メタン生成環境下において高級脂肪酸の分解に関わる細菌の知見は非常に乏しいのが現状であるといえる。

そこで本研究では、嫌気性処理プロセスにおいて高級脂肪酸の分解を担う微生物の基礎的な情報収集を目的として、高濃度脂質含有廃水を処理していた嫌気性グラニュール汚泥から、高級脂肪酸の分解を担う微生物の分離培養と特異的検出を行うことを試みた。

2. 実験方法

2. 1 汚泥を採取した嫌気性廃水処理装置

嫌気性高級脂肪酸分解微生物の集積培養に用いた植種汚泥は、パームオイル製造廃水処理を行っていた中温性 (35°C) と高温性 (55°C) の 2 種類のラボスケール (各容積 9.5 L) の多段型 Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクターより採取したグラニュール汚泥を使用した⁹⁾。両リアクターは高い脂質負荷 ($9.9 \pm 0.7 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ [高温性リアクター], $4.1 \pm 0.3 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ [中温性リアクター]) において良好な脂質除去能 (脂質の COD_{Cr} 除去率で 80%以上) を有していた。これらのことから両リアクターの汚泥内には高級脂肪酸を分解する微生物が十分量存在している事が示唆された⁹⁾。

2. 2 培養方法および分離株の純粋性の確認

高級脂肪酸分解微生物の選択的な培養を試みるために、脂質を高濃度に含む廃水の処理を行っていた中温 (35°C) と高温 (55°C) の 2 種類の嫌気グラニュール汚泥を植種源として用いた。集積培養には人工培地にパルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)、オレイン酸 (C18:1) およびリノール酸 (C18:2) の 4 種類を基質として用い (各 1 mM)、計 8 種類の集積培養を行った。人工培地の組成および、培養条件は既報に準じた¹²⁾。高温性汚泥を植種源とした培養系は 55°C で、中温性汚泥は 37°C で嫌気的に培養を行った。また高級脂肪酸は菌体に吸着し阻害を与えることが知られているため、予め植種前の培地に基質と等量 (1 mM) の塩化カルシウムを添加し、高級脂肪酸との不溶性の塩を形成させることで高級脂肪酸による細菌への阻害の防止を図った。

継代培養はガスクロマトグラフを用いてメタンガスの発生量を測定し、メタンガスの発生量から計算した基質の消費率がおおよそ 50%以上になったことを確認し、さらに顕微鏡を用いて細菌の増殖を確認した後に行った。継代培養時の植種量は培地液量の 5-10%で行った。

分離した微生物の純粋性は、AC medium (Difco)、thioglycolate medium (Difco)、およびピルビン酸、グ

Table 1 Fluorescently labeled oligonucleotide probes used in this study.

Probe name	Target group	Probe sequence (5' to 3')	FA (%) ^a	Reference
TOL1028	Strain TOL	GCTCCCTCAGTTTCCTC	20	This study
TSP436	Clone TPA, Clone TST and Clone JA2	CCTTCGTCCTTAGAACA	10	This study
MPA1446	Clone MPA	GGCTCTCTCTATTAAGT	5	This study
MST445	Clone MST	CCGCATCCCCTTTCTTC	15	This study
MSP1445	Clone MLI and Clone MOL2	ACGCAGGTACCCCAGIT	15	This study
Synm700	Mesophilic <i>Syntrophomonadaceae</i>	ACTGGTRTTCCTCTGATTCTA	15	21
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	10	14

^aPercent (vol/vol) formamide (FA) in hybridization buffer.

ルコース、酵母抽出液を添加した培地で 37°C および 55°C で培養し、顕微鏡観察を行うことで確認した。

2. 3 DNA 抽出、PCR、クローニングおよび分子系統解析

集積培養液中の菌体からの DNA 抽出はビーズビード法を用いて行なった¹³⁾。回収した DNA を用いて細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。その増幅には、細菌 (*Bacteria*) に特異的な EUB338F¹⁴⁾ および、細菌と古細菌 (*Archaea*) に特異的な UNIV1490R¹⁵⁾ のプライマーセットを用いた。PCR の反応条件は既報に準じた¹⁶⁾。増幅産物は精製後、TA cloning kit (Novagen) を用いてクローン化しクローンライブラリーを作製した。ランダムに選択した 10 クローンについて *Hae*III を用い制限断片長多型解析を行った。この解析により得られた電気泳動の断片長パターンに基づいてクローンのグルーピングを行い、各グループよりそれぞれ 1 つクローンを選択し、その全塩基配列を決定した。得られた塩基配列は Ribosomal Database Project (RDP) の CHIMERA_CHECK program によってキメラ DNA の判定を行い、BLAST search によって相同性検索を行った。その後 ARB プログラム (<http://www.arb-home.de/>) を使用して分子系統解析を行った。分子系統解析では、アライメントを行った後、近隣結合法を用いて系統樹の推定を行った。系統樹の樹形の確からしさは 1,000 回のブートストラップ解析により検証した。

2. 4 Fluorescence in situ hybridization 法

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は Amann の方法¹⁷⁾に準拠して行った。本研究で使った 16S rRNA 標的のオリゴヌクレオチドプローブ (DNA プローブ) を Table 1 に示す。DNA プローブの設計は ARB プログラムを用いて行い、標的とした 16S rRNA 遺伝子クローン配列に特異的となるように設計した。各 DNA プローブには Cy3 あるいは Alexa488 を蛍光標識として付加した。ハイブリダイゼーションの条件はハイブリダイゼーションバッファーにホルムアミドを添加することで調整した。

2. 5 顕微鏡観察および分析方法

微生物の観察には、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50F) および CCD カメラ (SenSys OL1401E-G1 および OLYMPUS DP70) を用いた。水素、メタン、高級脂肪酸および揮発性脂肪酸の測定は既報の方法に準じた^{2,9)}。

3. 結果および考察

3. 1 集積培養

高級脂肪酸分解細菌の選択的な培養を試みるために、脂質を高濃度に含むパームオイル製造廃水の処理を行っていた中温と高温の 2 種類の嫌気汚泥と、廃水中の主要な高級脂肪酸である 4 つ (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸) の基質をそれぞれ別々に用いて計 8 個の集積培養系を作成した。

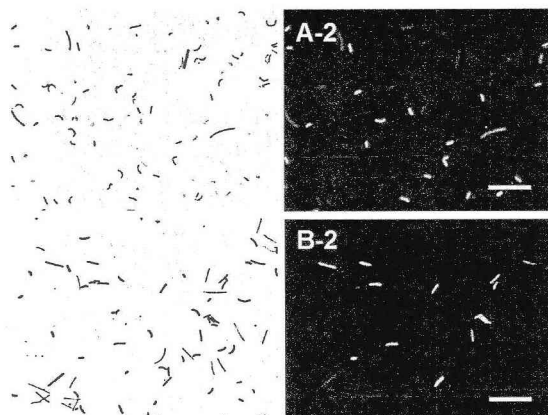


Fig.1 Photomicrographs of mesophilic palmitate-degrading enrichment culture (A) and thermophilic palmitate-degrading enrichment culture (B). Phase contrast micrographs (panel 1) and a fluorescent micrographs (panel 2) are showing same field. Microbes showing F420 autofluorescence indicate methanogens. Bars represent 10 μ m

られた。また、これら集積培養系は継代培養がうまくいかない場合がしばしば発生するなど、培養系は非常に不安定であることが観察された。特にその現象が顕著であったのは、リノール酸を基質として用いた中温および高温の集積培養系であった。とりわけ高温のリノール酸集積培養系は継代培養が上手く行えず、植種量を20%以上と多くしても3回以上の継代培養を行う事ができなかった。過去の報告によれば、高級脂肪酸は炭素数が増加するごとにあるいは不飽和結合の数が増加するにつれてその毒性が増加することが指摘されている¹⁸⁾。つまり本研究で用いた4つの高級脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸)の中ではリノール酸が最も微生物に対する阻害性が強い。またこの様な継代培養が突然出来なくなってしまう状況は、過去の高級脂肪酸を用いた集積培養においても報告されている¹⁰⁾。この他にも高級脂肪酸と同様に、メタン生成環境下において水素資化性のメタン生成古細菌との共生により分解が進行する基質(プロピオン酸やフタル酸等)を用いた集積培養においても継代培養ができなくなる現象が報告されている^{19,20)}。これらのことから、高級脂肪酸、特にリノール酸を用いた集積培養において培養が困難であった理由は、高級脂肪酸の毒性やメタン生成古細菌との水素を介した共生関係が必要である嫌気共生培養系によく観察される培養系の不安定さが影響していると推察された。

本研究においては、高温リノール酸集積培養系は継代培養が全くできなくなってしまったため、これ以降の解析はこの培養系を除く7つの集積培養系について行った。

3. 2 分子生物学的手法による集積培養系の解析

高級脂肪酸を用いた集積培養系において高級脂肪酸の分解に関与している細菌を同定するために、16S rRNA 遺伝子を分子マーカーとする分子生物学的手法を用いた。5回以上の継代培養を行った7つの集積培養系よりDNAを抽出し、細菌(*Bacteria*)の16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いてクローンライブラリーを作成した。各クローンライブラリーにおいて最も優先して回収されたクローン配列について分子系統解析を行い、系統樹の推定を行った。その結果、7つの集積培養系のうち5つの集積培養系(高温ステアリン酸集積培養系、中温および高温のパルミチン酸集積培養系、中温のオレイン酸およびリノール酸集積培養系)から最も高頻度に検出されたクローンは *Syntrophomonadaceae* 科に属した。*Syntrophomonadaceae* 科は現在までに知られている高級脂肪酸分解細菌が属しているグループであるが、

これら集積培養の結果、高温パルミチン酸集積培養系では2週間程度で微生物の増殖が確認できたが、その他の集積培養系での微生物の増殖は極めて遅く、植種から微生物の増殖を確認するまでに約1-3ヶ月以上を要した。これら集積培養系内を顕微鏡観察したところ、全ての集積培養系において数種類の形態の異なる微生物が存在しており、その中にはメタン生成古細菌に特有なF420様の自家蛍光を持つ微生物も含まれていた(Fig. 1)。これら全ての集積培養系内では高級脂肪酸の分解に伴ってメタンが生成されていた。現在までに報告されている嫌気性高級脂肪酸分解細菌は水素資化性のメタン生成古細菌と共生することで高級脂肪酸を分解することが知られている^{5,6,7,8)}。これらのことから、本研究で得られた集積培養系においても高級脂肪酸は高級脂肪酸分解細菌とメタン生成古細菌との共生により分解が進行していると考え

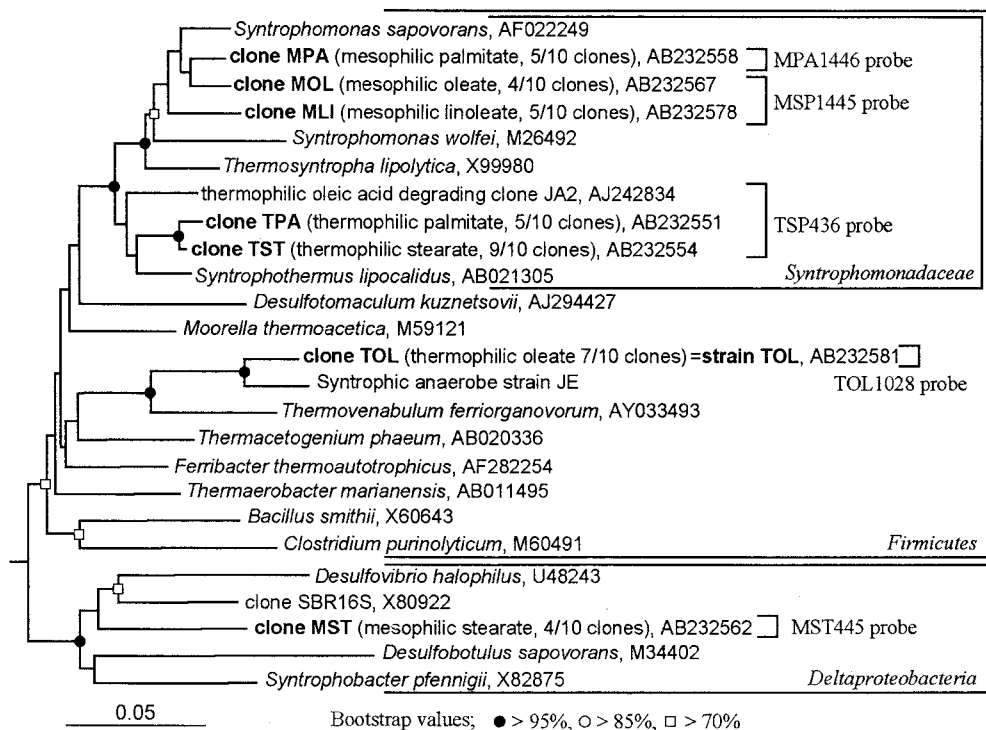


Fig.2 Phylogenetic tree of clones obtained in this study and selected relatives. The clones (bold text) represent the highest frequency of each clone libraries. The scale bar indicates the number of changes of nucleotides per sequence position. The symbols at nodes indicate the bootstrap values obtained with 1,000 resampling analyses.

本研究で得られたクローン配列は既に分離されている細菌の 16S rRNA 遺伝子配列とは 92%程度の相同性であった。また、高温オレイン酸集積培養系で最も高頻度に検出されたクローンは *Firmicutes* 門に属する科レベルで新しいグループに、また中温ステアリン酸集積培養系では *Deltaproteobacteria* 綱に属する目レベルで新規と思われるクローンが最も高頻度に検出された (Fig. 2)。次にこれら高頻度に検出されたクローン配列を持つ細菌が集積培養系内に確かに優占して存在しているかを確認するために、これらクローン配列に特異的な DNA プローブを作成し (Table 1)、各集積培養系に適用した。その結果、DNA プローブに反応した細菌は、各集積培養系において優占して存在している事が確かめられた (Fig. 3)。以上の結果より、本研究において構築した高級脂肪酸集積培養系には、脂肪酸分解共生細菌グループとして知られている *Syntrophomonadaceae* 科に属する新規な細菌だけでなく、これらとは分子系統学的に異なり、かつ全く分離株が近縁にない未知の細菌が高級脂肪酸の分解に関与している可能性が強く示唆された。

3. 3 高級脂肪酸分解細菌分離の試み

次に、各集積培養系から高級脂肪酸の分解を担っている細菌の分離を試みた。嫌気性の高級脂肪酸分解細菌は、水素資化性のメタン生成古細菌との強固な共生関係が必要な嫌気共生細菌であることから、その分離は非常に困難である事が知られている^{11,19,20}。これら嫌気共生細菌の分離をするために、筆者らの研究グループでは従来の培養法に加えて、分子生物学的手法を組み合わせることで分離・培養を行う方法論を適用し、嫌気共生細菌の分離に成功してきた^{19,20}。本研究でもそれら方法論を適用することにより高級脂肪酸の分解を担っている細菌の分離を試みた。具体的な戦略としては、(1) 高級脂肪酸以外の基質を用いた培養 (ここで用い

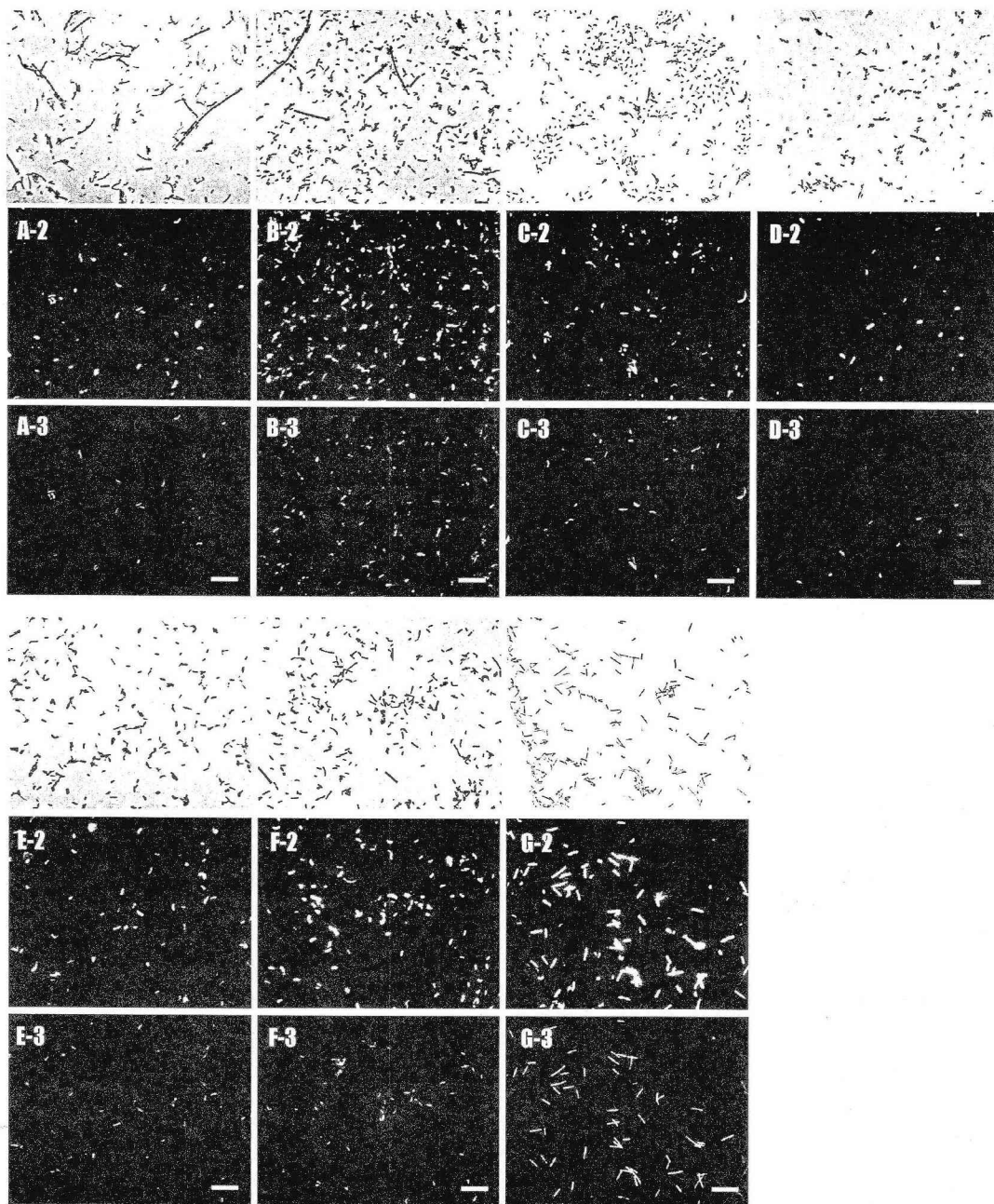


Fig.3 In situ hybridization of LCFA-degrading enrichment cultures. The enrichment cultures were simultaneously hybridized with Alexa488-labeled bacteria-specific probe EUB338 (panel 2) and Cy3-labeled clones-specific probes (panel 3). Phase contrast micrographs (panel 1) and fluorescence micrographs of the same fields (panel 2 and 3) are shown. (A) mesophilic palmitate-degrading culture hybridized with MPA1446 probe, (B) mesophilic stearate-degrading culture hybridized with MST445 probe, (C) mesophilic oleate-degrading culture hybridized with MSP1445, (D) mesophilic linoleate-degrading culture hybridized with MSP1445 probe, (E) thermophilic palmitate-degrading culture hybridized with TSP436 probe, (F) thermophilic stearate-degrading culture hybridized with TSP436 probe and (G) thermophilic oleate-degrading culture hybridized with TOL1028 probe. Bars represent 10 μ m.

た基質は、既知の高級脂肪酸分解細菌が属している *Syntrophomonadaceae* 科の細菌が単独で利用可能な基質、および標的とする細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統的な位置から、その配列に最も近縁な細菌が単独で利用可能な基質を使用)、(2) 希釈培養を繰り返すことによる標的細菌のさらなる集積培養、(3) ロールチューブ法、の 3 つの方法を同時にまたは繰り返し試みた。加えて、この分離操作の過程において増殖が確認された培養系については、先の解析で作成した DNA プローブを用いて標的としている細菌であるかの確認を行った。

3. 3. 1 *Syntrophomonadaceae* 科細菌の分離の試み

Syntrophomonadaceae 科の細菌が優占していた 5 つの集積培養系 (中温性パルミチン酸、中温性オレイン酸、中温性リノール酸、高温性パルミチン酸と高温性ステアリン酸培養系) については、すでに分離がなされている *Syntrophomonadaceae* 科に属する細菌の分離例を参考にして酪酸およびクロトン酸を用いて分離培養を試みた^{6,8)}。しかしながらこれらの基質を用いて増殖してきた細菌は、先の解析で作成した DNA プローブでは検出する事ができなかった。これら酪酸やクロトン酸を基質にして高級脂肪酸分解細菌を単独で培養することができなかった理由を我々は、(1) 高級脂肪酸分解細菌の高級脂肪酸代謝は酪酸分解細菌と同様にβ酸化によって行われているため、高級脂肪酸分解細菌も酪酸やクロトン酸を利用可能である^{5,6,7,8)}、(2) しかし酪酸分解細菌は高級脂肪酸を分解する事は出来ず、低級脂肪酸の分解にのみ特化している、(3) (1) および (2) から高級脂肪酸分解細菌と酪酸分解細菌とを比較した場合、酪酸に対する基質親和性は酪酸分解細菌の方が高く、その増殖速度は速いことが予測される等の理由から、これら酪酸およびクロトン酸を基質として培養されてきた細菌が高級脂肪酸分解細菌ではなく酪酸分解細菌 (酪酸を含む低級脂肪酸は分解できるが高級脂肪酸は分解できない細菌) であろうと推察した。そこで、中温性の酪酸およびクロトン酸を基質とした培養系に対して中温性の *Syntrophomonadaceae* 科の脂肪酸分解細菌を標的とする Synm700 プローブ²¹⁾ を適用したところ、増殖してきた細菌の大部分より蛍光シグナルを得る事ができた (データ省略)。このことから、酪酸およびクロトン酸を基質として使用した場合、高級脂肪酸分解細菌ではなく、元の高級脂肪酸集積培養系にごく小数存在していた酪酸分解細菌が優占して増殖してきたのであらうと考えられた。そこで元の高級脂肪酸を用いた集積培養系より、高級脂肪酸で希釈培養をさらに数十回繰り返し、標的とする細菌の優占度を更に高めた。その後、標的細菌が優占的に培養できたことを標的細菌に特異的なプローブと細菌に特異的な EUB338 プローブを用いた FISH 法による二重染色で確認した (標的の細菌が EUB338 プローブで検出される細菌に対して 90%程度)。その培養系を植種源として様々な培地へ植種し培養を行った。その結果、酪酸とペンテン酸を添加した培地⁸⁾を用いてロールチューブ法を行うことにより、高温性のパルミチン酸集積培養系に優占的に存在していた細菌のほぼ純粋な培養系 (TSP436 プローブで検出される細菌が EUB338 プローブで検出される細菌に対して約 98%以上を占める培養系) を得ることができた (Fig. 4)。

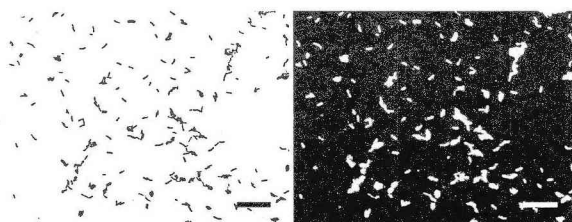


Fig.4 In situ hybridization of a highly purified thermophilic butyrate/pentanoate culture obtained from the thermophilic palmitate enrichment culture. The cells were hybridized with Cy3-labeled TPA436 probe designed in this study. Phase contrast micrograph (left) and epifluorescent micrograph (right) shows the same field. Bars ;10 μm.

この細菌の高級脂肪酸分解能を確認するために、高温性の水素資化性メタン生成古細菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus* type II を用いてパルミチン酸で培養を行なったところ、パルミチン酸の分解に伴ってメタンと酢酸が生成することを確認した (データ省略)。同様に他の *Syntrophomonadaceae* 科に属する細菌が優占していた集積培養系に対しても分離作業を繰り返し行った結果、高温性のステアリン酸および中温性のパルミチン酸集積培養系に優占して存在していた細菌も酪酸を用いた

培地で優占的に培養することができた（標的の細菌がEUB338プローブで検出される細菌に対して約90%）。

3. 3. 2 *Syntrophomonadaceae* 科以外の細菌の分離の試み

Syntrophomonadaceae 科以外の細菌が優占した培養系に関しても分離を試みた。高温性のオレイン酸集積培養系については *Firmicutes* 門に属する科レベルで新しいグループに属する細菌が優占して存在していた (Fig. 3G)。この細菌の分離を行うために、分子系統的に最も近縁な配列を持つ細菌 JE 株 (Fig. 2) (最近、我々の研究グループが分離した高温性嫌気エタノール酸化共生細菌) の情報を参考にして、スクロースを用いて単独培養を試みた。その結果ロールチューブ法を繰り返すことにより、集積系内に優占的に存在していた細菌を分離し、純粋培養することに成功した。この分離株 (TOL) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列のほぼ全長を決定したところ、その配列は高温オレイン酸集積培養系から最も高頻度に回収されたクローン配列 (Fig. 2, clone TOL) と同一であった。このことから、分離株 TOL は高温オレイン酸集積培養系に最も優占して存在していた細菌であると判断した。TOL 株の高級脂肪酸分解能を確認するために、オレイン酸を基質として高温性の水素資化性メタン生成古細菌と再構成し培養を行った。しかしながら、様々な培養条件、例えば酵母抽出液を加え微生物の増殖の促進を図る事や TOL 株を大量培養し、その後のその菌体を高濃度に濃縮し水素資化性のメタン生成古細菌と再構成するなどを行ったが、TOL 株は高級脂肪酸の分解能を全く示さなかった。TOL 株はオレイン酸集積培養系において常に優占 (Fig. 3G) して存在していたにも関わらず (10 回以上の継代培養の後にも優占して存在していたことを FISH で確認している)、分離した後に水素資化性のメタン生成古細菌と再構成しても高級脂肪酸の分解を確認できなかった理由は、今のところ不明である。

中温ステアリン酸集積培養系においては *Deltaproteobacteria* 綱に属する目レベルで新規と思われるクローンが最も高頻度に検出された。この配列をもつ細菌の分離培養を行うために、まず *Syntrophomonadaceae* 科に属する細菌が優占化した培養系と同様に酪酸やクロトン酸で培養を行った。しかし標的とする細菌を優占的に培養することはできなかった。また希釈培養を繰り返しても目的外の細菌が常に数種類存在し、優占的に培養する事はできなかった。そこで分子系統学的な情報に基づいて培養条件等を検討した。標的としている細菌に分子系統学的に近縁な配列を持つ分離株は存在していなかったことから、*Deltaproteobacteria* 綱に属する細菌に多く見られる性質である、硫酸塩などの電子受容体の利用性等を考慮して培養を行った。しかしながら、この中温ステアリン酸培養系に優占して存在した *Deltaproteobacteria* 綱に属する新規な細菌の分離には至らなかった。

4. まとめ

本研究では、嫌気性処理プロセスにおいて高級脂肪酸の分解を担う微生物の基礎的情報の収集を目的として、高濃度脂質含有廃水処理していた嫌気性汚泥より、その分離培養と特異的検出を試みた。まず、集積培養系を作成し、細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を行った。次に各集積培養系より最も高頻度に回収された配列に特異的な DNA プローブを作成し、各々の培養系に適用した。その結果、高級脂肪酸の嫌気的な分解には、既知の高級脂肪酸酸化共生細菌が属する *Syntrophomonadaceae* 科の細菌だけでなく、分子系統学的に全く異なるグループの細菌も高級脂肪酸の分解に関与している可能性が示された。続いて、これら分子生物学的手法による解析結果の情報を活用しながら、高級脂肪酸分解細菌の分離を試みた。その結果、高温パルミチン酸培養系より *Syntrophomonadaceae* 科に属する高級脂肪酸分解細菌のほぼ純粋な培養系を得ることに成功した。また、高温オレイン酸集積培養系内に優占して存在した *Firmicutes* 門に属する細菌 TOL 株 を分離することができた。しかしながら、TOL 株は高温オレイン酸集積培養系において常に優占して存在していたにも関わらず、この細菌が高級脂肪酸の分解能を示す結果を得る事ができなかった。また中温ステアリン酸集積培養系では、この培養系に優占して存在していた *Deltaproteobacteria* 綱に属する細菌の分離培養を成功するには至らなかった。このように高級脂肪酸分解細菌の分離・培養は、分子

生物学的手法から得られた情報を活用しても困難であった。従って、高級脂肪酸分解細菌を分離培養してその生理学的特徴を明らかにすることは現在の所全くできていない。今後もこれら高級脂肪酸分解細菌の分離培養を引き続き行い、その詳細な生理学的特徴を明らかにしたいと考えているが、分離培養が困難な嫌気性高級脂肪酸分解細菌の実態を明らかにしていくには、培養と 16S rRNA 遺伝子に基づいた手法のみでなく、Microautoradiography-FISH 法²²⁾や Stable isotope probing 法²³⁾等の、近年急速に開発が進められている培養に依らない微生物の機能推定法を適用していくことも必要であると考えられる。

謝辞

本研究は、NEDO（新エネルギー産業技術総合開発機構）の生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発プロジェクト、および 21 世紀 COE プログラム“グリーンエネルギー革命による環境再生”の助成を受けて行ったことをここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) Kleerebezem, R., and H. Macarie, 2003. Treating industrial wastewater: anaerobic digestion comes of age. *Chemical Engineering*, April:56-64.
- 2) 多川正, 原田秀樹, 高橋弘希, 大橋晶良, 関口勇地. 1999. 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温嫌気処理パイロットプラント実験. *環境工学論文集*, **36**: 431-441.
- 3) 李玉友, 佐々木宏, 山下耕司, 関廣二. 2003. 高濃度混合メタン発酵法による油脂含有食品廃棄物のメタン化処理. *用水と廃水*, **45**: 234-242.
- 4) Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 262-280.
- 5) Roy, F., E. Samain, H. C. Dubourguier, and G. Albagac. 1986. *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.* **145**: 142-147.
- 6) Lorowitz, W. H., h. Zhao, and M. P. Bryant. 1989. *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* subsp. nov., a long-chain fatty-acid -degrading, anaerobic, syntrophic bacterium; *syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* nov.; and emended descriptions of the genus and species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**: 122-126.
- 7) Svetlitsnyi, V., F. Rainey, and J. Wiegel. 1996. *Thermosyntropho lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1131-7.
- 8) Zhang, C., X. Liu, and X. Dong. 2004. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 969-73.
- 9) クーシヴィライ パイラヤ, 大橋晶良, 原田秀樹. 2003. 多段型 UASB による高濃度脂質・固形物含有パームオイル圧搾廃液 (POME) の高速処理と保持汚泥の変遷. *環境工学論文集*, **40**: 441-449.
- 10) Angelidaki, I., and B. K. Ahring. 1995. Establishment and characterization of an anaerobic thermophilic (55°C) enrichment culture degrading long-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2442-2445.
- 11) Menes, R. J., A. Fernandez, and L. Muxi. 2001. Physiological and molecular characterisation of an anaerobic thermophilic oleate-degrading enrichment culture. *Anaerobe* **7**: 17-24.
- 12) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. *Syntrophothermus*

- lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:771-779.
- 13) Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4715-24.
 - 14) Daims, H., A. Bruhl, R. Amann, K. H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:434-44.
 - 15) Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
 - 16) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada, and K. Nakamura. 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144 (Pt 9):2655-65.
 - 17) Amann, R.I. 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p.1-15. *In* A.D.C. Akkerman, J.D.v.Elsas, and F.J.d.Bruijn (ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
 - 18) Lalman, J. A., and I. Komjarova. 2004. Impact of long chain fatty acids on glucose fermentation under mesophilic conditions. *Environ. Technol.* 25:391-401.
 - 19) Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3608-15.
 - 20) Qiu, Y. L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I. C. Tseng, S. S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2004. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1617-26.
 - 21) Hansen, K. H., B. K. Ahring, and L. Raskin. 1999. Quantification of syntrophic fatty acid-beta-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4767-74.
 - 22) Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography—a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1289-1297.
 - 23) Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.