

(6) 微生物コミュニティレベルでみる 高級脂肪酸阻害メカニズム

射手園 章吾^{1,2}・久保田 健吾^{1*}・谷川 大輔^{1,3}・珠坪 一晃⁴
関口 勇地⁵・山口 隆司³・原田 秀樹¹

¹ 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6-6-06)

² 鹿児島県庁 (〒890-8577 鹿児島県鹿児島市鴨池新町10-1)

³ 長岡技術科学大学 工学部 環境・建設系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

⁴ (独) 国立環境研究所 地域環境研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

⁵ (独) 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1)

* E-mail: kengok@epl1.civil.tohoku.ac.jp

高級脂肪酸阻害メカニズムについて、微生物群集レベルでの解明を試みた。高級脂肪酸に馴致した汚泥としていない汚泥をメタン生成活性試験により評価したところ、オレイン酸の阻害耐性に差は見られなかったが、パルミチン酸の阻害耐性には顕著な差が見られた。群集構造解析の結果、パルミチン酸阻害耐性は、水素酸化メタン生成古細菌は属レベルで、酢酸酸化メタン生成古細菌は株レベルで異なることが示唆された。遺伝子定量結果は、高級脂肪酸阻害がArchaeaの溶菌によるものではないことを示唆していた。一方、高濃度オレイン酸に曝露された場合、Bacteriaの溶菌が見られるコミュニティが存在した。そのため、高濃度のオレイン酸はメタン生成プロセスより酸生成プロセスに影響する可能性が示唆された。

Key Words : Archaea, Bacteria, LCFA inhibition and resistance, Syntrophomonas

1. はじめに

UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) 法を代表として知られている嫌気性廃水処理技術は、好気性処理に比べて、1) 曝気が不要で省エネルギーである、2) 余剰汚泥の発生量が少ない、3) 最終生成物であるメタンガスを回収利用できる点から、様々な廃水種に導入されている¹⁾。しかしながら、乳製品製造工場、パームオイル製造工場などの食品工場廃水などの脂質を多く含む廃水への適応は遅れている²⁾。その理由として、脂質の加水分解によって生成する高級脂肪酸が、1) 熱力学的に難分解性であること、2) 汚泥へ吸着し、汚泥がウォッシュアウトしてしまうこと、3) 微生物の働きに阻害性を有することから、メタン発酵処理プロセスを困難にさせているためである²⁾。特に、高級脂肪酸の阻害特性は、既往の研究により、飽和高级脂肪酸に比べ、不飽和高级脂肪酸の方が阻害を受けやすく、水素酸化性メタン生成菌より、酢酸酸化性メタン生成古細菌の方が阻害を受けやすいことが知られている^{3,4)}。しかしながら、高級脂肪酸の馴致あるいは耐性に関する知見や、高級脂肪酸が特定の微生物群に及ぼす影響は、不明な点が多い。

そこで本研究では、高級脂肪酸の馴致あるいは耐性に関する知見を取得するために、高級脂肪酸が、高級脂肪酸の分解に馴致した汚泥と馴致していない汚泥のメタン生成活性に及ぼす影響を、メタン生成活性試験によって評価した。そして、メタン生成活性試験で用いた汚泥の16S rRNA遺伝子クローンライブラリーを作成し、微生物コミュニティの比較を行った。また、高級脂肪酸が微生物コミュニティに及ぼす影響を、メタン生成活性試験中に採取した汚泥の定量real-time PCRを行うことによって、高級脂肪酸の影響による微生物コミュニティの変化を把握し、阻害特性を考察した。

2. 実験方法

(1) メタン生成活性試験による高級脂肪酸の影響評価

本研究で用いた汚泥は、高級脂肪酸の分解に馴致していない汚泥としてT市に位置する下水処理場の余剰汚泥処理中温消化汚泥(余剰汚泥処理消化汚泥)と、マレーシア国内の実規模(容量3,100 m³×4基)で稼働しているパームオイル圧搾廃液(POME: Palm Oil Mill Effluent)を処理している消化槽内の中温汚泥(POME処理消化汚泥)を用い

表-1 定量 real-time PCR の解析を行ったサンプルの汚泥採取条件

余剰汚泥処理消化汚泥 (単位: gCOD-LCFA/gVSS)			POME処理消化汚泥 (単位: gCOD-LCFA/gVSS)		
メタン生成活性の種類	水素資化性メタン生成活性	酢酸資化性メタン生成活性	メタン生成活性の種類	水素資化性メタン生成活性	酢酸資化性メタン生成活性
汚泥採取時間	(試験開始後12時間経過)	(試験開始後24時間経過)	汚泥採取時間	(試験開始後12時間経過)	(試験開始後24時間経過)
供試高級脂肪酸	高級脂肪酸汚泥比	高級脂肪酸汚泥比	供試高級脂肪酸	高級脂肪酸汚泥比	高級脂肪酸汚泥比
パルミチン酸	0.0, 0.2, 2.1	0.0, 0.2, 2.1	パルミチン酸	0.0, 1.0, 10.0	0.0, 1.0, 8.0
オレイン酸	0.0, 0.1, 1.0	0.0, 0.1, 1.0	オレイン酸	0.0, 0.1, 2.0	0.0, 0.1, 1.5

た。POMEは、パルミチン酸を結合状態で約5,400 mgCOD/l,あるいはオレイン酸を結合状態で約3,500 mgCOD/l含む廃液であるため、POMEを処理している消化槽内の汚泥は、高級脂肪酸の分解に馴致していると考えられる。

阻害試験には、飽和高级脂肪酸としてパルミチン酸 (C16:0)、不飽和高级脂肪酸としてオレイン酸 (C18:1) を用いた。メタン生成活性試験において、供試汚泥試料と培地を含むバイアル内に高級脂肪酸 (パルミチン酸 800~40,000 mgCOD/l [高級脂肪酸汚泥比 0~10]、オレイン酸 400~8,000 mgCOD/l [高級脂肪酸汚泥比 0~2]) と酢酸 (最終濃度 2,000 mgCOD/l) を添加することで、酢酸資化性メタン生成活性への高級脂肪酸の影響を評価した。また、高級脂肪酸と水素/二酸化炭素 (1.4 atm-80/20-v/v) を加えることで、水素資化性メタン生成活性への影響を評価した。高級脂肪酸の負荷調整は、バイアル内の汚泥量を一定 (4,000 mgVSS/l) にし、高級脂肪酸の添加量を調整することで行った。

高級脂肪酸存在下でのメタン生成活性の測定は、セラムバイアル (容量122 ml, 反応液量 50 ml) に嫌気的条件下 (N₂ガス噴射法) で供試汚泥、試験基質、高級脂肪酸ナトリウム塩、無機塩類、還元剤、酸化還元指示薬 (レサズリン) を投入後、pH 6.8に調整し、中温 (35°C) 条件下で振盪培養を行った。活性の測定は、水素資化性メタン生成活性において約 0.8 日間、酢酸資化性メタン生成活性において約 2 日間行い、その間に定期的にガス発生量とガス組成 (メタン含有率) をTCD型検出器ガスクロマトグラフ (GC-8A, SHIMADZU社) を測定することで単位汚泥濃度当たりのメタン生成活性を算出した⁹⁾。また、各高級脂肪酸汚泥比、基質条件の中で、表-1に示す条件下については、試験中に遺伝子解析を行うための汚泥の採取を行った。なお、実験は一条件あたり二回行った。

(2) 16S rRNA遺伝子のクローンライブラリーの作成

クローニングを行ったサンプルは、メタン生成活性試験に用いた余剰汚泥処理消化汚泥とPOME処理消化汚泥である。汚泥からのDNA抽出は、UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio社) を用いて行い、DNA濃度は、Quant-iTTM PicoGreen dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen社) で染色し、蛍光スペクトロメーター (NanoDrop3300, Thermo Scientific社) によって測定した。Bacterialは、Bac8F (5'-AGA GTT

TGA TCM TGG CTC AG-3')⁹⁾とUNI1500R (5'-GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')⁹⁾、Archaealは、Arc109F (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3')⁷⁾とUNI1500Rを用いてPCR増幅を行った後、PCR産物をMinElute PCR Purification kit (QIAGEN社) に従って精製した。クローニングは、TOPO TA cloning Kit 2.1 (Invitrogen社) に従って行った。各クローンの塩基配列の取得は、タカラバイオ社に委託して行った。塩基配列は、系統解析ソフトARB[®]およびNCBIのBLAST相同性検索ツール (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて近縁種の推定を行った。

(3) 定量real-time PCRによる微生物群の挙動の把握

供試汚泥の採取は、メタン生成活性試験中に行い、表-1に定量real-time PCRの解析を行ったサンプルの汚泥採取条件を示す。定量real-time PCRで標的とした微生物群は、BacteriaとArchaeaで、PCR増幅に用いたプライマーは、BacterialはEUB338mix-F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3', 5'-ACT CCT ACG GGA GGC TGC-3', 5'-ACA CCT ACG GGT GGC TGC-3', 5'-ACA CCT ACG GGT GGC AGC-3'を等量で混合)⁹⁾とUN530IR (5'-CCG CGG CTG CTG GCA C-3')¹⁰⁾を用いて、ArchaealはArc109F (5'-AHD GCT CAG TAA CAC RT-3')⁹⁾とArc912R (5'-CCC CCG CCA ATT CCT TTA A-3')⁹⁾を用いた。定量real-time PCRは、SYBR Premix Ex TaqTM II (タカラバイオ社) を用い、最終濃度でプライマー濃度をBacterialは250 nM, Archaealは500 nMに調整し、Archaealの定量には、既存のMg濃度に加えMgCl₂を最終濃度で2mM添加した。PCR増幅は、初期変性95°C 30秒の後、Bacterialは変性95°C 5秒、アニーリング64°C 20秒、伸張72°C 10秒を40サイクル行い、Archaealは変性95°C 5秒、アニーリング50°C 30秒、伸張72°C 90秒を45サイクル行った。

3. 実験結果

(1) メタン生成活性試験結果

図-1に相対メタン生成活性 (図-1-a: 水素資化性メタン生成活性、図-1-b: 酢酸資化性メタン生成活性) に及ぼす高級脂肪酸汚泥負荷 (汚泥比) の影響を示す。実験の初期におけるメタン生成量は、直線的に増加するため、直線の傾きをメタン生成活性値と定義した^{4,9)}。高級脂肪酸の影響を定量的に評価するために、相対メタン生成活性を高級脂肪酸を添加したときのメタン生成活性値を高

級脂肪酸を添加していない系のメタン生成活性値で割ることによって算出した⁴⁾。高級脂肪酸を添加していない系で、余剰汚泥消化汚泥における水素資化性メタン生成活性は、 0.191 ± 0.009 gCOD/gVSSd、酢酸資化性メタン生成活性は、 0.179 ± 0.009 gCOD/gVSSdであり、POME処理消化汚泥における水素資化性メタン生成活性は、 0.512 ± 0.217 gCOD/gVSSd、酢酸資化性メタン生成活性は、 0.430 ± 0.074 gCOD/gVSSdであった。

相対メタン生成活性値は、高級脂肪酸を添加することによって1.0から上下した。1.0を下回る場合は、供与試験基質を資化しメタン生成を担うメタン生成古細菌が高級脂肪酸による阻害を受け活性が低下していると考えられる。一方、1.0を上回る場合は、高級脂肪酸添加によりメタン生成活性が上昇したことを意味している。メタン生成活性試験には、水素、酢酸共に基質過剰に加えられており、速度論である活性値の測定において基質供給が律速となっているとは考えづらい。そこで、高級脂肪酸がβ酸化によって分解される際に生成される水素あるいは酢酸³⁾が、メタン生成活性に寄与した可能性が考えられる。すなわち、水素資化性メタン生成活性測定時には、β酸化により生成された酢酸が資化されることによるメタン生成が、酢酸資化性メタン生成活性測定時にはその逆により、相対メタン生成活性が上昇しているという事である。標準状態における高級脂肪酸分解反応の自由エネルギー変化はプラスであり、高水素分圧下でβ酸化による高級脂肪酸分解が進行したかは不明であるが、定量real-time PCRによる結果はそれを示唆するものであった(後述)ことから、考えられる1つの理由として挙げられる。

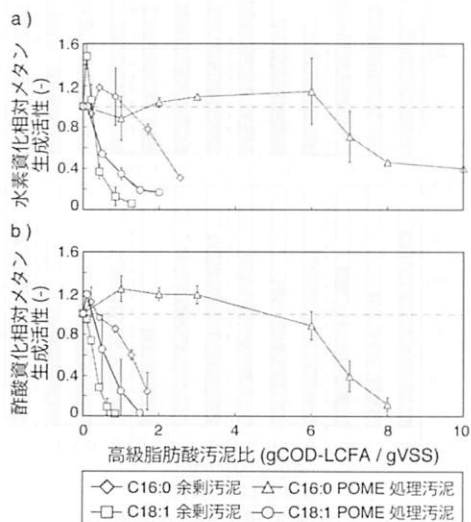
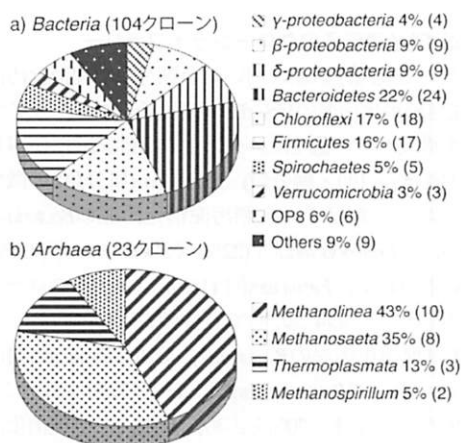


図-1 相対メタン生成活性に及ぼす高級脂肪酸汚泥負荷の影響。a：水素資化性メタン生成活性への影響、b：酢酸資化性メタン生成活性への影響

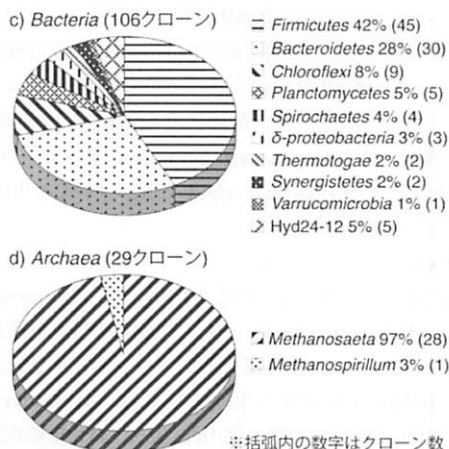
相対メタン生成活性から評価した高級脂肪酸が水素資化性および酢酸資化性メタン生成活性に及ぼす影響は、酢酸資化性メタン生成活性の方が、より低い高級脂肪酸負荷(汚泥比)で低下しているため、酢酸資化性メタン生成古細菌の方が水素資化性メタン生成古細菌に比べ阻害を受けやすいという既往の知見と一致した^{3,4)}。

高級脂肪酸の種類で比べると、オレイン酸の方が、明らかにパルミチン酸よりも低い高級脂肪酸汚泥負荷においてメタン生成活性の低下が生じており、阻害性が高いことが分かる。なお両汚泥において、同程度のオレイン酸負荷でメタン生成反応が阻害を受けたため、両汚泥においてほとんど阻害耐性に違いはないと推察される。一方、パルミチン酸については、POME処理消化汚泥が余剰汚泥処理消化汚泥に比べ、高濃度のパルミチン酸負荷

余剰汚泥処理消化汚泥



POME 処理消化汚泥



※括弧内の数字はクローン数

図-2 メタン生成活性試験に使用した汚泥の Bacteria (門・綱分類) と Archaea (属分類) の微生物コミュニティ構造 a：余剰汚泥処理消化汚泥の Bacteria, b：余剰汚泥処理消化汚泥の Archaea, c：POME 処理消化汚泥の Bacteria, d：POME 処理消化汚泥の Archaea

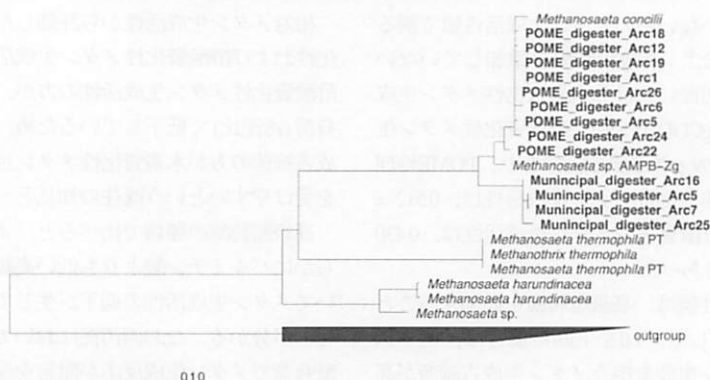


図3 16S rRNA 遺伝子配列に基づく両汚泥から検出された *Methanoseta* の分子系統解析結果

でもメタン生成反応が破綻せず、パルミチン酸に対する阻害耐性を獲得していると考えられた。

(2) 16S rRNA遺伝子のクローンライブラリー

メタン生成活性試験に用いた余剰汚泥処理消化汚泥とPOME処理消化汚泥の16S rRNA遺伝子クローンライブラリーを構築した。図-2にメタン生成活性試験に使用した汚泥の *Bacteria* (門・綱分類) と *Archaea* (属分類) の微生物コミュニティを示す。余剰汚泥処理消化汚泥の *Bacteria* の群集構造は、*Proteobacteria* 門 (22%) や *Bacteroidetes* 門 (22%), *Chloflexi* 門 (17%), *Firmicutes* 門 (16%) に属するクローンが多く得られ、この4つの門で全体の77%を占めた。一方、POME処理消化汚泥の *Bacteria* は、42%が *Firmicutes* 門に分類され、次いで *Bacteroidetes* 門に28%が分類され、この2つの門だけで全体の70%を占め、余剰汚泥処理消化汚泥とは門レベルで見ても全く異なる微生物群集構造をしていた。また、脂肪酸を分解するとされる *Syntrophomonadaceae* 科のクローンはPOME処理消化汚泥からは7クローン検出されたが、余剰汚泥処理消化汚泥からは検出されなかった。POME処理消化汚泥から得られたクローンの内4クローンはオレイン酸のような不飽和高級脂肪酸まで分解可能な *Syntrophomonas sapovorans*^[1] (2クローン、相溶性99%) や *Syntrophomonas zehnderi*^[2] (2クローン、相溶性97%) に近縁であった。

Archaea のコミュニティとして、水素酸化性メタン生成古細菌は、余剰汚泥処理消化汚泥に *Methanolinea* 属 (43%), *Methanospirillum* 属 (5%), POME処理消化汚泥に *Methanospirillum* 属 (3%) に属するクローンが検出され、両汚泥の酢酸酸化性メタン生成古細菌は、*Methanoseta* 属に属した (余剰汚泥処理消化汚泥: 35%, POME処理消化汚泥: 97%)。両汚泥から得られた *Methanoseta* 属に属するクローン同士の相溶性は、98%程度であった。そこで全長を決定し、ARBIによって系統解析を行った結果、余剰汚泥処理消化汚泥のクローンとPOME処理消化汚泥のク

ローンは、それぞれクラスターを組み、分枝された (図-3)。

(3) 定量real-time PCRによる微生物群の挙動の変化

高級脂肪酸の添加が嫌気微生物群の挙動に与える影響を把握するために、メタン生成活性試験の際に採取した汚泥試料について定量real-time PCRによる16S rRNA遺伝子の定量を行った。図-4に高級脂肪酸の添加が *Bacteria* と *Archaea* の定量結果に及ぼす影響を示す (図-4-a: 余剰汚泥処理消化汚泥, 図-4-b: POME処理消化汚泥)。定量結果の評価に関しては、高級脂肪酸の存在等が汚泥から

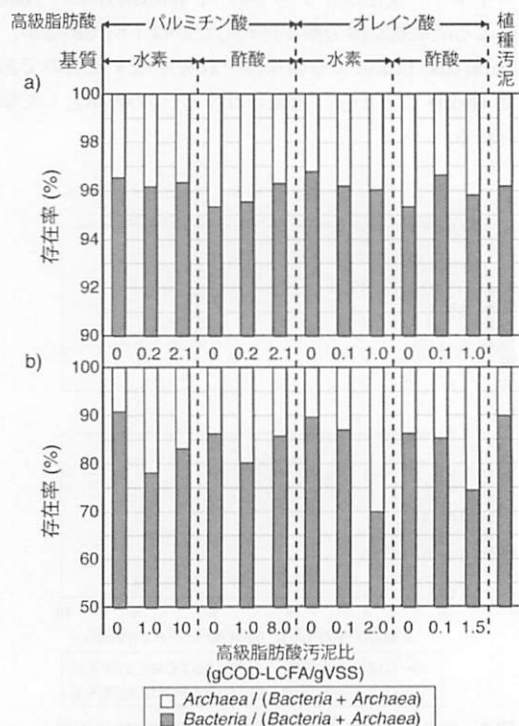


図4 異なる高級脂肪酸濃度における *Bacteria* と *Archaea* の定量結果。a: 余剰汚泥処理消化汚泥, b: POME 処理消化汚泥

のDNA抽出効率に影響を及ぼす可能性があるため、絶対量による評価とせず、*Bacteria*および*Archaea*の1 ng抽出DNAあたりのコピー数を求め、*Bacteria* + *Archaea*を100%と仮定して(これを全菌とする)両者の割合を算出し、相対的に評価した。

植種汚泥における*Archaea*の存在率は、余剰汚泥処理消化汚泥が約4%であったのに対し、POME処理消化汚泥は約10%と*Archaea*の占める割合が大きかった。

高級脂肪酸添加後の*Bacteria*と*Archaea*の存在率は、余剰汚泥処理消化汚泥においてそれぞれ95-97%と3-5%であり、メタン生成活性に阻害が見られる状況下においても、大きな変化が見られなかった。それに対して、POME処理消化汚泥に高級脂肪酸を添加した系において、*Archaea*の存在率に比較的大きな変動(10-20%の増加)が見られた。

まずPOME処理消化汚泥では、高級脂肪酸を添加しない条件(高級脂肪酸汚泥比0)でも、酢酸基質による約24時間の培養により*Archaea*の存在率が5%ほど増加しており、微生物増殖の影響が考えられる¹³⁾。それに対し、水素基質においては、*Archaea*の存在率の変化を確認できなかった(約12時間の培養後)。

次にパルミチン酸を添加した水素基質の系では、高級脂肪酸汚泥比が1の時、全菌に占める*Archaea*の割合が10%ほど増加した。水素資化性メタン生成古細菌がパルミチン酸添加により増加した可能性があるが、クローン解析結果から水素資化性メタン生成古細菌の割合は、*Archaea*の中においてさほど大きくないと推察されるため、相対的割合を10%も増加させるほど水素資化性メタン生成古細菌が増殖したとは考えにくい。一方、パルミチン酸のβ酸化進行により、酢酸が供給されることで、酢酸資化性メタン生成古細菌が増殖し、相対メタン生成活性の増加に寄与した可能性がある。これと同じ高級脂肪酸汚泥比1の酢酸基質の系においても、*Archaea*の相対的割合は10%ほど増加しており、パルミチン酸を添加しない系に比べ5%ほど*Archaea*の相対的割合が増加した。また供試汚泥の相対メタン生成活性は、12とパルミチン酸を添加しない系よりも高かった。これよりPOME処理消化汚泥は、高級脂肪酸の分解に馴致しており、低濃度のパルミチン酸負荷ではそれを速やかに分解し、メタンへ転換していることが示唆された。また、興味深い可能性として、水素分圧が比較的高い環境下でも、高級脂肪酸のβ酸化反応の進行が示唆された。

一方で、より高い高級脂肪酸汚泥比(8, 10)のときには、*Archaea*の相対的割合の増加幅は小さくなる、あるいは未添加系と同様であった(変化無し)。この時の相対メタン生成活性は、0.4(水素基質)あるいは0.1未満(酢酸基質)であった。水素基質の場合に*Archaea*の相対的割合が5%弱も増加した理由は不明であるが、この結果は、低パル

ミチン酸汚泥比での*Archaea*の相対的割合の増加が、高級脂肪酸による*Bacteria*細胞の溶菌・減少に依るものではないことを示唆するものであった。

POME処理消化汚泥に高濃度のオレイン酸を添加した系では、*Bacteria*と*Archaea*の存在率への影響の様相がパルミチン酸添加系と異なった。オレイン酸汚泥比0.1の時、*Archaea*の存在率は殆ど変化しなかったのに対し、高オレイン酸汚泥比時(1.5, 2)には、水素基質、酢酸基質共に全菌に占める*Bacteria*の相対的割合が12~20%近く減少した。相対メタン生成活性が非常に小さく、メタン生成反応が阻害でほぼ停止している汚泥試料(図-1参照)で*Archaea*の相対的割合が増加していることから、1) *Bacteria*のみが減少、2) *Archaea*が増加、3) 全菌が減少する中で*Bacteria*が特に減少した、3つの可能性のうち、2)の*Archaea*の増加によるものでないと推察される。そのため、POME処理消化汚泥において高濃度のオレイン酸が存在することによって、*Archaea*よりも*Bacteria*が溶菌などの影響を受けやすいことが考えられた。

4. 考察

(1) メタン生成古細菌の高級脂肪酸の阻害耐性

これまでに知られている高級脂肪酸の阻害耐性に関する知見は、メタン生成活性試験を基に、高級脂肪酸の影響が汚泥の形状(グラニュー汚泥あるいは浮遊汚泥)や温度に依存するなど物理化学的な観点から指摘されていたため、高級脂肪酸の阻害耐性は、微生物コミュニティレベルで議論されていなかった^{2, 3, 4, 14)}。本研究において、メタン生成活性試験の結果から、POME処理消化汚泥内に生息する水素資化性メタン生成古細菌と酢酸資化性メタン生成古細菌には、余剰汚泥処理消化汚泥内に存在するそれらに比べて、パルミチン酸に対する阻害耐性があることがわかり、微生物群集構造により高級脂肪酸阻害耐性が異なることが分かった。

両汚泥の*Archaea*のコミュニティを比較すると、水素資化性メタン生成古細菌は、余剰汚泥処理消化汚泥では*Methanolinea*属が、POME処理消化汚泥では*Methanospirillum*属が優占していた。そのため*Methanolinea*属は、*Methanospirillum*属に比べパルミチン酸の影響を受けやすいことが考えられ、水素資化性のメタン生成古細菌のパルミチン酸に対する阻害耐性は、属レベルで異なると考えられる。

一方、酢酸資化性メタン生成古細菌は、パルミチン酸の阻害耐性には違いがあるものの、両汚泥とも*Methanoseta*属が優占し、両汚泥から得られたクローンの相同性は98%以上あり、近縁かつ同種であると推察された。しかしながら、ARBプログラムによる詳細な系統解析結果は、POME処理消化汚泥と余剰汚泥処理消化汚泥のクローンは、それぞれクラスターを組み、かつお互

いのクラスターが分枝した。そのため、*Methanosaeta*属のパルミチン酸の阻害耐性は、rRNA遺伝子配列で分類分けした場合、株レベルで異なることが示唆された。

(2) 微生物コミュニティに及ぼす高級脂肪酸の影響

これまでに報告されている高級脂肪酸の影響は、メタン生成活性によって評価されていたため、汚泥のような*Bacteria*と*Archaea*が存在する中で、両者の関係を定量的に解析した例はない。また高級脂肪酸の影響として、吸着することによってメタンが生成されなくなるのか、あるいは溶菌してメタンが生成されなくなるのか不明な点が多くあった^{2, 3, 4, 14, 15, 16, 17}。そこで、高級脂肪酸を添加したメタン生成活性試験中に採取した汚泥の定量real-time PCRを行うことで、メタン生成活性と微生物コミュニティの変化を観察した。余剰汚泥処理消化汚泥の系とパルミチン酸添加POME処理汚泥の系において、メタン生成が阻害されている条件で採取したサンプルでも、全菌に占める*Bacteria*及び*Archaea*の相対的割合に大きな変化は見られなかった。そのため、高級脂肪酸の影響によってメタンが生成されなくなった要因として、特定の微生物群(メタン生成古細菌)が溶菌によって微生物コミュニティを変化させ、メタン生成プロセスが破綻したというよりは、吸着等の他の因子によってメタン生成が阻害されていた可能性が高いことが推察された。

しかしながら、POME処理消化汚泥のオレイン酸添加系においては、メタン生成活性が見られなくなるレベルの暴露で全菌に占める*Bacteria*の存在比が著しく減少した。これは、オレイン酸の影響によって*Archaea*以上に*Bacteria*の方が溶菌し、それにより抽出DNA中の*Bacteria*の存在割合が減少したためだと考えられる。これらの両汚泥に及ぼすオレイン酸の影響の違いは、*Bacteria*のコミュニティ構造が関係していたと考えられる。高級脂肪酸の影響は、グラム陰性菌に比べ、グラム陽性菌のほうを受けやすいことが報告されている¹⁷。本実験において、POME処理消化汚泥の*Bacteria*は、グラム陽性菌である*Firmicutes*門に40%以上属したのに対して、余剰汚泥処理消化汚泥は16%であった。また、オレイン酸等の高級脂肪酸を分解する*Syntrophomonadaceae*科の微生物群は*Firmicutes*門に属する。*Firmicutes*門に属するグループが溶菌したかは定量を行っていないため不明であるが、このような微生物群集構造の違いが高級脂肪酸への阻害耐性に効いていると考えられる。

これまで高級脂肪酸阻害については、嫌気性処理においてメタン生成古細菌が阻害を受けるために、共生関係が崩壊し、処理プロセスが破綻するという考えに基づき、メタン生成活性(すなわちメタン生成古細菌)に着目した研究が行われてきたが、本研究で得られたオレイン酸に対する阻害耐性実験の結果は、メタン生成活性が失われ

るのが先か、*Bacteria*の溶菌などにより酸生成プロセスが影響を受けるのが先か、高級脂肪酸が微生物コミュニティに与える影響を評価し直す必要があることを示唆するものであった。

5. 結論

高級脂肪酸が、高級脂肪酸の分解に馴致した汚泥と馴致していない汚泥のメタン生成活性に及ぼす影響をメタン生成活性試験によって評価した。また、その時の微生物群集構造解析を行うことでコミュニティレベルでの高級脂肪酸阻害特性の把握を試み、得られた知見を以下に示す。

- 1) 本研究で用いた高級脂肪酸に馴致していると考えられる汚泥とそうでない汚泥では、パルミチン酸への耐性が異なった。また両汚泥の*Bacteria*および*Archaea*の群集構造は全く異なるものであった。
- 2) パルミチン酸に対する阻害耐性は、水素資化性のメタン生成古細菌においては属レベルで、酢酸資化性のメタン生成古細菌では株レベルで異なった。
- 3) メタン生成活性で見るパルミチン酸およびオレイン酸による高級脂肪酸阻害は*Archaea*の溶菌によって引き起こされるものではないと推察された。しかし、高濃度のオレイン酸に暴露された場合には、*Bacteria*の溶菌が見られるコミュニティが存在した。そのため、高濃度のオレイン酸による溶菌の影響は、メタン生成プロセスより酸生成プロセスに影響する可能性があることが示唆された。

謝辞：本研究は、環境省 環境研究総合推進費(S2-03)、科学研究費補助金および科学技術振興機構 戦略的国際科学技術協力推進事業から支援を受けた。

参考文献

- 1) Frankin R.J.: Full-scale experiences with anaerobic treatment of industrial wastewater, *Water Science and Technology*, Vol.44(8), pp.1-6, 2001.
- 2) Hwu C.S., Donlon B. and Lettinga G.: Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins, *Water Science and Technology*, Vol.34(5-6), pp.351-358, 1996.
- 3) Hanaki K., Nagase M. and Matsuo T.: Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.23, pp.1591-1610, 1981.
- 4) チュウ春鳳, 李玉友, 宮原高志, 野池達也: 中温および高温メタン発酵に及ぼす高級脂肪酸の阻害効果の比較, 土木学会論文集, Vol.559/VII-2, pp.31-38, 1997.
- 5) 亀井昌敏, 桃井清至, 原田秀樹, 滝沢智, 津恵直美: 上昇流嫌気性スラッジヘッド反応器による脂質含有廃水の嫌気性処理, 水処理技術, Vol.30, pp.17-25, 1989.
- 6) Weisburg W.G., Barn S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J.:

- 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, Vol.173, pp.697-703, 1991.
- 7) 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, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.64, pp.960-969, 1998.
 - 8) Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jöbb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüssmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A. and Schleifer K.H.: ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol.32, pp.1363-1371, 2004.
 - 9) Miyashita, A., Mochimaru H., Kazama H., Ohashi A., Yamaguchi T., Nunoura T., Horikoshi K., Takai K. and Imachi H.: Development of 16S rRNA gene-targeted primers for detection of archaeal anaerobic methanotrophs (ANMEs), *FEMS Microbiology Letters*, Vol.297, pp.31-37, 2009.
 - 10) Lane, D.J.: 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackbrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp.115-175, 1991.
 - 11) Roy F., Samain E., Dubourguier H.C. and Albagnac G.: *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *Archives of Microbiology*, Vol.145, pp.142-147, 1986.
 - 12) Sousa D.Z., Smidt H., Alves M.M. and Stams A.J.M.: *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.57, pp.609-615, 2007.
 - 13) Patel G.B.: Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen, *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.30, pp.1383-1396, 1984.
 - 14) Shin H.S., Kim S.H., Lee C.Y. and Nam S.Y.: Inhibitory effects of long-chain fatty acids on VFA degradation and β -oxidation, *Water Science and Technology*, Vol.47(10), pp.139-146, 2003.
 - 15) Pereira M.A., Pires O.C., Mota M. and Alves M.M.: Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: Evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.92, pp.15-23, 2005.
 - 16) Angelidaki I. and Ahring B.K.: Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.37, pp.808-812, 1992.
 - 17) Galbraith H., Miller T.B., Paton A.M. and Thompson J.K.: Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.34, pp.803-813, 1971.

(2011.5.30 受付)

Characteristic of LCFA inhibition as revealed by microbial community structure analysis

Shogo ITEZONO^{1,2}, Kengo KUBOTA¹, Daisuke TANIKAWA^{1,3}, Kazuaki SYUTSUBO⁴
Yuji SEKIGUCHI⁵, Takashi YAMAGUCHI³ and Hideki HARADA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Kagoshima Prefecture

³Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

⁴Center for Regional Environmental Research, NIES

⁵Biomedical Research Institute, AIST

Inhibition of long-chain fatty acids (LCFA) was investigated using LCFA-acclimated sludge and non-LCFA-acclimated sludge. Resistance against saturated LCFA such as palmitate (C16:0) differed between the sludges unlike unsaturated LCFA such as oleate (C18:1). After construction of rRNA gene clone libraries and quantification of *Bacteria* and *Archaea*, it was found that resistibility against LCFA depends on community structure of *Archaea* even at strain level. Furthermore, it was suggested that lytic effect of LCFA first appears on *Bacteria*, not *Archaea*, in complex microbial communities when sludge was exposed to high concentration of oleate.