

B-10 同位体多相解析による嫌気複合系機能の解析

○伊藤 司^{1*}・アリエヤティヘルト²・吉口 和美²・長壁 妃呂子¹・渡邊 智秀¹・岡部 聡²

¹群馬大学工学部建設工学科 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1)

²北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: t.ito@ce.gunma-u.ac.jp

1. 研究背景と目的

嫌気性消化は様々な有機性廃棄物の処理によりバイオガスであるメタンをエネルギーとして回収することができる有効な生物学的プロセスである。特定の微生物が単独で有機物分解を担う好気条件下とは対照的に、嫌気性消化における有機物分解は異なる機能を持つ多種多様な微生物の分業により段階的に進行するため、各々の分解反応はその上流および下流の分解反応と密接に関与している。これまではメタン生成反応に焦点を当てた研究が中心であったが、安定的に有機物分解を進め効率的にメタンを回収するには、酸生成反応、酸分解反応など各分解反応関与する微生物についても把握する必要がある。しかしながら、これらの反応に関与する微生物は培養困難であるため、反応に関与する微生物全体を捉えて多様性（何種いるのか、それぞれの特徴は何か）および菌体量（どの程度いるのか、それによってどの程度の分解速度を示すのか）を議論した研究はほとんどない。

本研究では、分離培養によらず複合微生物系において微生物群集と機能を関連づけて高感度に調査できる炭素同位体を用いた複数の機能解析手法を嫌気性消化汚泥に適用して、嫌気性消化における酢酸およびプロピオン酸の分解に焦点を当て、分解微生物の多様性および菌体量調査を行った。さらに、基質濃度が各基質分解に関与する微生物群集構造に与える影響について調査を行った。

2. 実験方法

実験には、都市下水濃縮汚泥の嫌気性消化槽汚泥を種汚泥とし、複合基質として育児用粉ミルクを使用して2年以上安定した運転で馴養されたラボスケール嫌気性消化リアクターの汚泥を用いた。また、微生物群集構造を代謝機能に関連付けて解析するた

め、本研究では炭素同位体を利用した2つの手法（RNA-SIP法とMAR-FISH法）を用いた。RNA-SIP法により機能を示す微生物をスクリーニングした後、RNA-SIP法の結果に基づき選定あるいは設計したFISHプローブを用いMAR-FISH法を行い定量化した。

RNA-SIP法は、採取した汚泥を¹³C標識のグルコースまたはプロピオン酸を用いて振盪回分培養を行い、培養後の汚泥よりRNAを抽出、セシウムトリフルオロ酢酸を用いた密度勾配超遠心法により¹³C-RNAを回収し、16S rRNA系統解析を行った。グルコースとプロピオン酸についてそれぞれ46、45クローン解析した。

MAR-FISH法は、採取した汚泥に対し¹⁴Cで標識されたグルコース、プロピオン酸、酢酸を各々基質として振盪回分培養を行い、FISH、続いてマイクロオートラジオグラフィを行った。RNA-SIP法とMAR-FISH法における基質濃度と培養時間はTable 1に示した。基質濃度の影響は酢酸濃度 0.5、1、2.5、5、10 mM、プロピオン酸濃度 0.5、2.5、5、15 mMの条件下でMAR-FISH法を行い、プロピオン酸、酢酸由来の放射性同位体炭素を同化した微生物細胞数を定量することにより評価した。

一方、MAR-FISH法で特定できなかった微生物の系統的位置を特定するため、RNA-SIP法とマイクロマニピュレーションを行った。このRNA-SIP法には¹³C[Propionate]を用い0.5 mMで約50時間回分培養した汚泥を用いた。培養後の汚泥よりRNAを抽出、セシウムトリフルオロ酢酸を用いた密度勾配超遠心法により¹³C-RNAを回収し、16S rRNA系統解析を行った。マイクロマニピュレーションは、*Bacteria*を対象とするFISHプローブEUB338でFISHを施したサンプルに対して行い細胞を採取し、続いてPCR、クローニング、系統解析を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 プロピオン酸分解菌の多様性と機能解析

16S rRNA遺伝子を対象とした微生物群集の系統解析の結果、*Deltaproteobacteria*綱に属し互いに相溶性が97%以下のクローンクラスター(OTU)が5つ得られた。この5 OTUに対して特異的なFISHプローブを設計した。MAR-FISH法を行ったところ、*Syntrophobacter*およびshort rod状の*Smithella* (以後*Smithella* sp. SR)がそれぞれ $[^{14}\text{C}]$ Propionateを取り込みMARポジティブとして現れた。一方で、特徴的な形態(long rod状、球状)の細菌がFISHプローブでは検出されなかったが、 $[^{14}\text{C}]$ Propionateを取り込み強くMARポジティブとして現れた。異なるプロピオン酸濃度(0.5, 2.5, 5, 15 mM)条件下でプロピオン酸分解菌の群集構造を調査すると、プロピオン酸濃度の違いによりプロピオン酸分解菌の微生物構成は異なる結果を示した(Fig. 1)。Long rod状のプロピオン酸分解菌(long rod POB)はプロピオン酸濃度の増加に伴い活性菌数は減少したが、0.5 mMの低濃度条件下ではMARの銀粒子数で示される炭素同化量の多さを考慮するとプロピオン酸を利用した最優勢種であると考えられた。一方、*Smithella* sp. SRは広い濃度範囲で活性を示したが、2.5 mM以上でより活性化された。*Syntrophobacter*は0.5 mMの低濃度下ではプロピオン酸を利用した細胞数は非常に少なく、2.5 mM以上の濃度から顕著に認められるようになった。しかしながら、*Syntrophobacter*はMARの銀粒子数で示される炭素同化量が*Smithella* sp. SRおよびlong rod POBに比較して少なく、プロピオン酸分解への関与は低いと考えられた。球状の形態の細菌は、プロピオン酸濃度の増加に伴い活性を現した。

MAR-FISH法の結果よりlong rod POBはプロピオン酸濃度0.5, 2.5, 5 mMで検出され、個々の細胞の活性の高いプロピオン酸分解菌であったが、MAR-FISH法のみでその系統を明らかにすることはできなかった。そこで、long rod POBが最も活性を示したプロピオン酸濃度0.5 mMの条件でRNA-SIP法を行った。その結果、解析したクローンの約40%を占めるOTUが得られた。このOTUはプロピオン酸分解菌である*Smithella propionica*に約95%の相溶性を有したが、メタン生成環境下で得られた環境クローンと高い相溶性(99%)を示した(*Smithella*属の新種である可能性が高く、以後*Smithella* sp. LRとよぶ)。*Smithella* sp. LR以外にはプロピオン酸分解菌と相溶性を有するクローンは得られなかった。RNA-SIP法で得られた*Smithella* sp. LRの16S rRNAの塩基配列は、顕鏡下においてマイクロマニピュレ

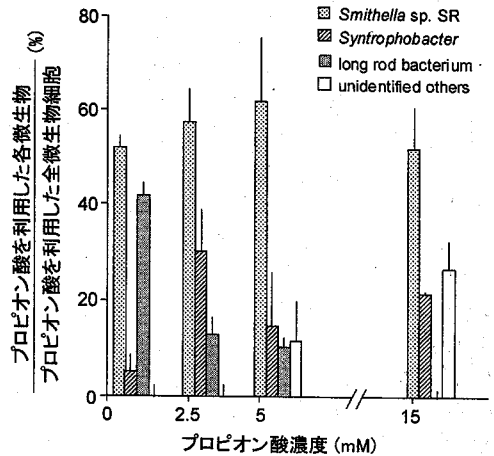


Fig. 1 異なるプロピオン酸濃度条件下における各プロピオン酸分解菌の活性評価

Table 1 RNA-SIP 法および MAR-FISH 法における培養条件と各培養系で検出された主な微生物

RNA-SIP*	
Glucose	<i>Actinobacteria</i>
2.5 mM, 48 h	(<i>Propionibacterium</i> (20%), <i>Olsenella</i> (22%)) <i>Synergistesgroup 4</i> (13%) <i>Smithella</i> sp. LR (2%), <i>Syntrophobacter</i> (2%)
Propionate	<i>Smithella</i> sp. LR (42%),
0.5 mM, 58 h	<i>Synergistesgroup 4</i> (22%)
MAR-FISH*	
Glucose	<i>Actinobacteria</i>
2.5 mM, 1 h	
Propionate	<i>Smithella</i> sp. LR, <i>Smithella</i> sp. SR,
1.5 mM, 2 h	<i>Syntrophobacter</i>
Acetate	<i>Methanosaeta</i> <i>Synergistesgroup 4</i>
0.5 mM, 2 h	
Glucose	<i>Actinobacteria</i> <i>Smithella</i> sp. LR,
2.5 mM, 36 h	<i>Smithella</i> sp. SR, <i>Syntrophobacter</i> <i>Methanosaeta</i> <i>Synergistesgroup 4</i>

* は用いた手法、下は培養に用いた基質と基質濃度および培養時間
() の値は検出頻度

ーションにより採取したlong rod状の細胞の系統とも一致した。*Smithella* sp. LRを対象にFISHプローブを設計しMAR-FISH法を行うと、long rod状の細菌が特異的に検出され、プロピオン酸を利用することが確認できた。

以上より、本嫌気性消化汚泥内にはプロピオン酸分解菌は、*Smithella* sp. LR、*Syntrophobacter*、*Smithella* sp. SR、未同定のグループと少なくとも4種類が存在することが明らかとなった。

3.2 酢酸分解菌の多様性と機能解析

酢酸分解は糖分解やプロピオン酸分解の下位に位置する分解反応であるため、安定同位体炭素で標識されたグルコースおよびプロピオン酸を用いたRNA-SIP法の結果を基に酢酸分解に関与する微生物を推定し、推定した微生物を対象としたFISHプローブを用いて、放射性同位体炭素で標識された酢酸を用いたMAR-FISH法により確認を行った。RNA-SIP法とMAR-FISH法により得られた結果はまとめてTable 1に示した。RNA-SIP法の結果、グルコースを基質とした系では*Actionobacteria*門に属する*Propionibacterium*と*Olsenella*に近縁なクローンの検出率が最も高かったため（各々検出頻度 20%、22%）、これらはグルコース分解に関与していることが推定され、MAR-FISH法で確認できた。続いて検出率が高かったのは*Synergistes* group4であった（検出頻度 13%）。また、プロピオン酸を基質とした系でプロピオン酸分解菌の*Smithella* sp. LRに続いて検出率が高かったのは*Synergistes* group4であった（検出頻度 22%）。*Synergistes*は門レベルと推定されるグループであり、嫌気消化汚泥や腸、土壤などの嫌気環境からしばしば検出されるが、分離菌株が少なく現在のところ系統分類が明確ではない。機能についても分離菌株の情報に限られており、ほとんど機能未知である。本研究ではグルコースおよびプロピオン酸を基質としたRNA-SIP法の結果のいずれから比較的高頻度で検出されたためグルコースあるいはプロピオン酸の分解を直接担うと考え、グルコース分解菌およびプロピオン酸分解菌を検出する条件でMAR-FISH法を行ったが検出できなかった。そこでそれらの分解の下位に位置する酢酸分解を想定し、酢酸分解菌を検出する条件でMAR-FISH法を行った結果、*Synergistes* group4を酢酸分解菌として検出できた。酢酸分解菌には*Synergistes* group4の他、メタン生成古細菌の*Methanosaeta*も検出された。

以上、嫌気性消化汚泥内における酢酸分解菌は2種存在することが確認された。続いて、酢酸濃度がその分解に関与する微生物の群集構造や活性にどのように影響するかについて定量的に評価を行った。酢酸を基質とした場合、基質濃度0.5 mMにおいて酢酸を利用した*Methanosaeta*は*Synergistes* group 4の約2倍存在したのに対し、2.5 mM以上では酢酸を利用した*Synergistes* group 4は*Methanosaeta*を上回る結果となった（Fig. 2）。これより、特に酢酸濃度2.5 mM以上では*Synergistes* group 4は*Methanosaeta*と基質を競合することによりメタン生成効率に影響を与える可能性が示唆された。上述のようにプロピオン酸を基質とした場合においても、基質濃度により活

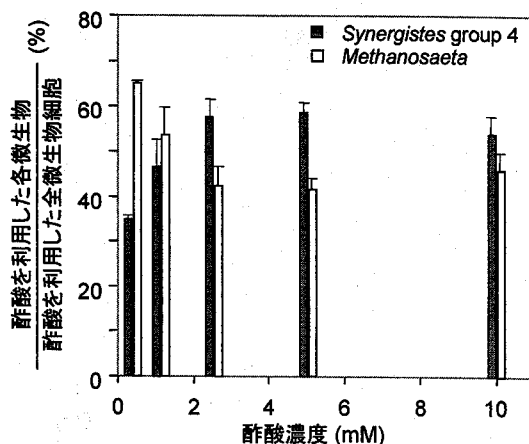


Fig. 2 異なる酢酸濃度における *Methanosaeta* および *Synergistes* group 4 の活性評価

性を示した微生物の構成種が変化する結果が得られ、これらの現象は、各微生物の基質親和性が異なることから生じたものであると考えられ、基質濃度は微生物の群集構造および活性に影響を与えると推察された。

4. まとめ

本研究では嫌気複合微生物系である嫌気性消化汚泥内の酸生成および酸分解反応に関与する微生物を炭素同位体を用いた手法の併用により解析し、プロピオン酸には*Smithella*など4種、酢酸には*Methanosaeta*および*Synergistes* group 4が関与することを明らかにした。これらの微生物の基質親和性はそれぞれ異なり、その結果、プロピオン酸や酢酸濃度の違いにより活躍する微生物種の菌体数および構成が変化したと考えられた。これは同時に各微生物のプロピオン酸および酢酸分解への寄与が基質濃度の影響を受けて変化するということも示している。本嫌気性消化リアクターの酢酸、プロピオン酸濃度は0-20 mMの範囲で変動していた。このことが嫌気性消化汚泥内に基質親和性の異なる機能微生物群を共存させることに繋がったと思われる。各基質分解に基質親和性の異なる複数種の微生物が関与することは、基質濃度の変化への対応を容易にし、処理の安定性に繋がる可能性がある。本研究で用いた同位体解析をベースとする手法はいずれも対象物質の微生物への同化を利用した手法であるが、今後は微生物からの反応生成物を標的にし、質量分析計（MS）により検出する方法と組み合わせることで複合微生物系の機能がより明らかになるとと思われる。