

分子生物学的手法を用いた嫌気性微生物生態の評価

呉高専 正 山口隆司 正 市坪 誠 長崎大学 学○ 浅沼淑子
高知高専 正 山崎慎一 長岡技科大 正 原田秀樹

1. はじめに

近年、嫌気性微生物群を利用した省エネルギー型の廃水処理プロセス（UASB 法など）が急速に普及している。また、一方で、分子生物学の発展により生物の遺伝子情報を分子レベルで解析することが可能となり、環境中に存在する微生物を直接的に検出する FISH 法が有効な方法として、微生物生態評価に用いられるようになってきた。しかし、FISH 法を用いて嫌気性排水処理プロセスの微生物生態を評価した知見は乏しい。そこで本研究では、FISH 法を用いて嫌気性微生物を検出すること、また、運転状況の異なる UASB 反応器内の微生物菌体の定量を行うこと目的として実験を行った。

2. 実験方法

2. 1 反応器

表 1 は、微生物培養に用いた 4 基の反応器の運転状況である。Run1 は、温度制御フリー（無加温）の UASB に実下水を供給した培養系である。Run2 は焼酎廃水を中温環境（35℃）で、Run3、Run4 は人工基質（糖・有機性脂肪酸）と食品工場廃水とを高温環境（55℃）で処理する系である。

2. 2 活性評価試験

培養汚泥に対して、メタン生成活性を評価した。培地中で嫌気的に分散処理し、バイアル瓶に分注し、pH7.0 ± 0.1 に調整した。バイアル瓶にテスト基質である酢酸と水素を添加し、恒温ロータリーシェーカー（Run1、2 は 35℃、Run3、4 は 55℃で評価した）に装着した。バイアル瓶中のガスの量と組成を経時的に測定した。

2. 3 in-situ hybridization 法

in-situ hybridization 法は、反応器から採取したグラニュール試料を十分分散させた後、100 倍希釈し、固定する。固定した微生物試料をゼラチンコーティングしたスライド表面に 10 μl 塗布し、乾燥、エタノール脱水した後、プローブを滴下し、hybridization を 46℃で 2 時間行った。その後、washing を 48℃で 20 分間行い、全菌検出のための DAPI 染色を行った。スライドは落射型蛍光顕微鏡（オリンパス BX-60）によって観察した。各スライドごとに 5 視野程度の写真撮影を行い、画像解析により、全菌数（DAPI カウント：青色発光）に対する標的菌数（in-situ hybridization によるカウント：赤、または緑色発光）で存在率を算出した。実験に用いたプローブは表 2 に示す 3 種類でそれぞれ標的の菌を検出した。

表 1 各 UASB 反応器の運転状況

基質	反応器の容積	運転温度 (℃)	HRT (時間)	CODcr 容積負荷 (kgCOD・m ⁻³ ・day ⁻¹)	COD 除去率 (%)		FISH に用いた 試料の VSS (mg・L ⁻¹)
					全	溶解性	
Run1 実下水	404L (D270 × H15000)	free	7.5	0.64	38.4	62.2	30600
Run2 焼酎廃水	10L (100 × 100 × 700)	35℃	3.5	14.7	70.0	85.0	42600
Run3 人工廃水	9.5L (100 × 100 × 700)	55℃	4.2	9.10	87.5	95.4	34100
Run4 食品廃水	9.5L (100 × 100 × 700)	55℃	7.1	8.43	60.6	61.9	37800

表2 実験に用いたDNAプローブ

probe name	target	sequence	temp. (℃)	FA (%)
ARC915	古細菌 (メタン生成細菌)	5'GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	46	30
MT757	Methanosacta 属 (酢酸資化性メタン生成細菌)	5'CCTAGCTTTTCGTCCCTTG	46	20
MB318	Methanobacter グループ (水素資化性メタン生成細菌)	5'GAACCTTGTCTCAGG'ITC	46	20

3. 実験結果、考察

3. 1 活性評価試験

図1は、各反応器に保持された汚泥のメタン生成活性を示す。酢酸資化性メタン生成活性および水素資化性メタン生成活性についての結果である。全ての反応器において、水素基質のメタン生成細菌の活性の方が、酢酸基質のメタン生成細菌より高くなった。

3. 2 FISH法による標的菌群の検出

写真1は、微生物試料にDNAプローブ (ARC915) を適用した例である。写真1-a)は、DAPI染色を写真1-b)は、同一視野でプローブを適用した。矢印の部分は2枚の写真両方で検出されているので、メタン菌であることが分かる。

3. 3 グラニュール内の標的菌群の存在率

図2は、各反応器内のグラニュールにFISH法を適用して求めた標的菌群の存在率を比較したものである。全ての反応器において、水素資化性メタン生成細菌 (MB318) の方が、酢酸資化性メタン生成細菌 (MT757) よりも、多く存在していることが分かった。このことは、活性試験の結果に対応しているといえる。また、Run1はメタン生成細菌の存在率が27%と最も低くなっている。これは、温度制御を行っていないことから、酢酸資化性メタン生成細菌の増殖が十分でないためと考えられる。一方、メタン発酵の卓越したRun2～4は、メタン菌存在率が40～57%にまで高まった (ただし、Run4の活性は培養初期に評価したため低レベルとなっている)。これは、嫌気性処理に有利な高濃度廃水を供給することで、メタン生成細菌の増殖が進んだことをよく示している。

4. まとめ

- (1) 活性試験結果とFISH法で求めた酢酸および水素資化性メタン生成細菌の存在率とが対応していることから、in-situ hybridizationによる菌体の特異的検出に有効であることがわかった。
- (2) メタン生成細菌の卓越した培養系では、メタン生成細菌 (ARC915) の全菌 (DAPI) に対する比率は、40～57%であった。

【謝辞】 研究の場を与えて下さいました呉市建設局下水道部および関係の皆様深く感謝致します。

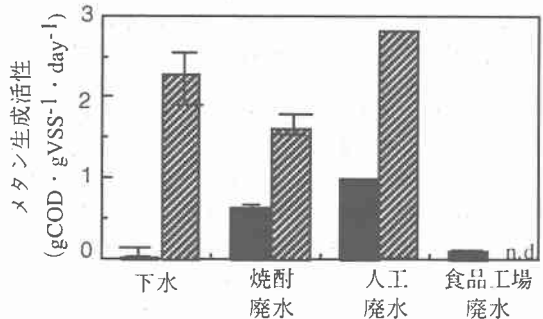


図1 各反応器の酢酸および水素基質供与メタン生成活性

■ : 酢酸資化性メタン生成活性
 ▨ : 水素資化性メタン生成活性

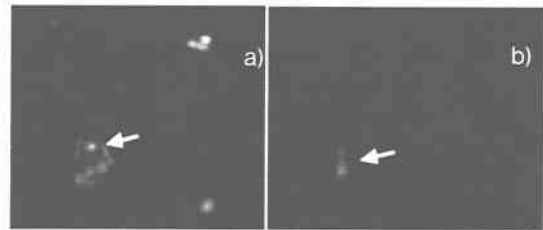


写真1 同一視野におけるDAPIとプローブARC915による蛍光顕微鏡写真(焼酎廃水)
 a)DAPI染色、b)ARC915によるFISH

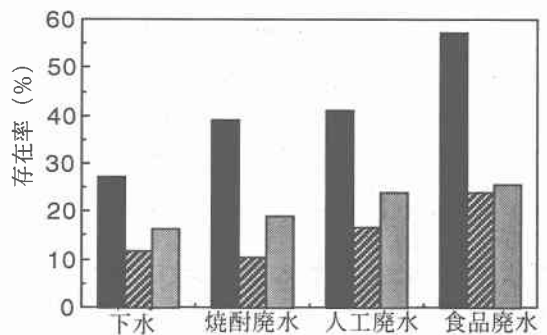


図2 FISH法による各グラニュール汚泥内の標的菌群の存在率

■ : ARC915 ▨ : MT757 ■ : MB318