

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 14 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760433

研究課題名(和文) 下水処理嫌気性プロセスに存在する未知微生物群の機能解析と最適運転条件の提案

研究課題名(英文) Ecophysiology of the uncultured microorganism reside in anaerobic sewage treatment process

研究代表者

井口 晃徳 (IGUCHI, Akinori)

新潟薬科大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：60599786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：下水処理メタン発酵プロセスにおいて高頻度に検出される未培養微生物OP5の機能解析および分離培養を試みた。実験室UASB反応槽による連続培養系で集積させた嫌気性グラニュール汚泥を使用し、未培養微生物OP5の空間分布およびrRNA量の増減に基づく基質利用推定を行なった結果、本微生物は酢酸などの有機酸を水素資性メタン生成古細菌との共生により酸化分解している可能性が示された。推定した基質による本微生物の回分培養による分離培養を試みた結果、酢酸添加系において本未培養微生物と水素資性メタン先生古細菌を高濃度に集積培養することができた。

研究成果の概要(英文)：Functions of the uncultured OP5 microorganisms frequently detected in sewage treatment methane fermentation processes were analyzed. The results of spatial distribution of the uncultured OP5 microorganism in sludge granules with fluorescence in situ hybridization and substrate estimation experiment based on rRNA expression, OP5 microorganisms may utilize organic acid (i.e. acetate and propionate) while symbiosis with hydrogen utilizing archaea. The result of attempting to isolate the uncultured OP5 microorganism, the OP5 microorganism and hydrogen utilizing archaea could be enriched with acetate as carbon source.

研究分野：環境微生物学

キーワード：未培養微生物 下水処理 メタン発酵プロセス 微生物群集構造解析

1. 研究開始当初の背景

Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) プロセスに代表される嫌気性の生物学的廃水処理法は、省エネルギー・低炭素型の廃水処理プロセスであり、主に中・高濃度の有機性廃水処理に活用されている。一方、昨今のエネルギー事情の観点から下水のような低濃度有機性廃水についてもそのプロセスを適用する試みがされている。しかし下水中の有機物濃度は低く、メタン発酵への適用は困難とされている。

既往の研究において、国内外の実下水を処理する Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) リアクターから採取した嫌気性汚泥の 16S rRNA 遺伝子クローン解析を行なったところ、*Caldiserica* 門 (Candidate division OP5) に属する未培養 phylotype が高頻度に検出された。このことから、この未培養 phylotype (以降、未培養微生物 OP5) は下水処理において重要な役割を担うと考えられる。従って未培養微生物 OP5 の機能・生態が解明できれば下水処理メタン発酵プロセスの課題である安定した運転や低濃度有機性廃水への適用範囲拡大に貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、下水処理メタン発酵プロセスの最適化および低濃度有機性廃水処理への適用拡大につながる重要な知見の収集を目標とし、下水処理 UASB プロセスにおいて高割合で存在する未培養微生物 OP5 の機能を明らかにすることを目的とした。本目的を達成するために以下の研究項目を設定・遂行した。

- (1) 模擬人工下水を供給するラボスケール UASB リアクターを構築し、連続培養系による未培養微生物 OP5 およびメタン発酵に関する微生物群の集積を行なった。
- (2) 構築した UASB リアクターからグラニュール汚泥を採取し、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法により未培養微生物 OP5 および真正細菌、古細菌、水素資化性メタン生成古細菌群のグラニュール汚泥内空間分布を把握した。
- (3) 未培養微生物 OP5 の 16S rRNA 遺伝子を PCR および qRT-PCR 法によって特異的に検出・定量可能なオリゴヌクレオチドプローブの設計および qRT-PCR の最適条件を検討した。
- (4) バイアルピン回分培養と qRT-PCR 法を組み合わせ、未培養微生物 OP5 の基質利用推定を行なった。
- (5) 推定した未培養微生物 OP5 の機能情報を基に、本未培養微生物の分離培養を試みた。

3. 研究の方法

- (1) UASB リアクターの構築と OP5 集積確認
ラボスケール UASB リアクターは、高さ 165 cm、内径 5.2 cm、有効容積 3.3 L で、槽内温度を 30 に制御した。供給液は下水を模

擬した合成廃水で、イーストエキスを主たる炭素源としており、一般的な下水と同程度の有機物濃度である 400 mg-COD_{Cr}/L に調製し、水理的滞留時間 (HRT) 8 時間で運転した。植種汚泥は、長岡中央浄化センター内に設置されている実下水処理 UASB リアクターから採取した UASB 汚泥を使用した。連続運転中は合成廃水および処理液の pH, COD_{Cr} (mg/L), リアクター内温度 (), pH, ORP (mV) について経時的に測定を行った。メタン発酵に関与する微生物群および未培養微生物 OP5 の集積は、水素資化性メタン生成古細菌の有する補酵素 F₄₂₀ 自家蛍光観察と、バクテリア、アーキア、未培養微生物 OP5 の 16S rRNA を検出する蛍光標識プローブを使用した FISH 法により確認を行った。

- (2) 未培養微生物 OP5 の 16S rRNA 遺伝子を特異的に検出可能な qRT-PCR 用オリゴヌクレオチドの設計と最適化

未培養微生物 OP5 の 16S rRNA 遺伝子を特異的に検出可能なオリゴヌクレオチドの設計は、分子系統解析ソフト Arb program package を使用した。設計した DNA プライマーの特異性および定量性の検討は、未培養微生物 OP5 の 16S rRNA クローン配列を使用し、LightCycler1.5 (Roche) にて行なった。

- (3) 各種微生物のグラニュール汚泥内空間分布

各微生物のグラニュール汚泥内空間分布の把握は切片 FISH 法にて行なった。グラニュール汚泥はパラホルムアルデヒドによる固定および凍結融解処理を行い、エタノール脱水を行った後、包埋剤に一晩以上浸漬した。その後凍結切片作製装置を使用して切片を作製し、切片に対して FISH 法を行った後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM 700, Carl Zeiss) で観察した。

- (4) 短時間培養と qRT-PCR 法を組み合わせた未培養微生物 OP5 の機能推定

短時間回分培養は、イーストエキスを含まれる主な炭素源を用い、UASB 汚泥をバイアルピンにて回分培養した。2 時間ないしは 3 時間毎に最長 24 時間まで培養液と汚泥のサンプリングを行い、汚泥試料から全 RNA を抽出し、未培養微生物 OP5 に特異的な PCR プライマーを利用したリアルタイム RT-PCR により OP5-16S rRNA を定量した。

- (5) 未培養微生物 OP5 の分離培養

未培養微生物 OP5 の分離培養は、OP5 が資化すると推定した基質および UASB リアクター汚泥を Widdel 培地に添加し、バイアルピン嫌気培養による限界希釈法により試みた。

4. 研究成果

- (1) UASB リアクターの構築と OP5 集積確認

UASBリアクター内のpHおよびORPは、平均して7.1, 485 mVと安定して推移していた。COD_{Cr}除去率は平均して90.0%であり、良好な有機物分解が行われていた。水素資化性メタン生成古細菌の有するF₄₂₀を蛍光顕微鏡で観察した結果、*Methanospirillum*様の糸状細胞や*Methanobacterium*様の桿状細胞、*Methanosarcina*様の球状細胞の存在が確認され、多様な水素資化性メタン生成古細菌がリアクター内に存在していると考えられた。バクテリア、アーキア、未培養微生物OP5に特異的な蛍光標識プローブを用い、UASB汚泥に対してFISH法を行った結果、バクテリアを標的としたFISH法では球状や桿状の細胞が、アーキアを標的としたFISH法では、糸状の細胞や桿状の細胞が多数検出され、リアクター内においてバクテリア及びアーキアが集積されていることが確認できた。また未培養微生物OP5を標的としたFISH法において、長さ1.5 μm, 幅0.5 μm程度の桿状細胞の蛍光シグナルが検出され、マイクロコロニーのように一部に集中して存在する様子が多数確認された。以上の結果から、未培養微生物OP5がイーストエキスを炭素源とした合成廃水を供給するラボスケールのUASBリアクターにおいて集積可能であることが確認された。

(2) 未培養微生物OP5の16S rRNA遺伝子を特異的に検出可能なqRT-PCR用オリゴヌクレオチドの設計と最適化

標的未培養微生物の16S rRNA遺伝子特異的プライマーセットを設計し、SYBR Green法によるreal-time PCR法による定量系を構築した。結果、10¹ copies/ulを定量限界値とするリアルタイムPCR実験系を構築することができた。

(3) 各種微生物のグラニュール汚泥内空間分布

メタン生成を伴う嫌気条件下での有機物分解において、グラニュール汚泥中のメタン発酵に関与する微生物群は、それぞれの機能に応じた空間分布をとると考えられる。このことから未培養微生物OP5のグラニュール汚泥における空間分布を把握することで、未培養微生物OP5の機能の推定ができると考えた。未培養微生物OP5を標的とした切片FISH法を適用した結果、未培養微生物OP5と思われる細胞は、グラニュール表面のやや内側でマイクロコロニーを形成して分布していた。また未培養微生物OP5と*Methanomicrobiales*に特異的な蛍光標識プローブの二重染色FISH法を適用した結果、両者と思われる細胞から発する2つの蛍光シグナルの重なりが確認された。このことから未培養微生物OP5は*Methanomicrobiales*に属する水素資化性メタン生成古細菌と共生し、アミノ酸や揮発性脂肪酸などの低分子の有機酸を分解している可能性が示された。

(4) 短時間培養とqRT-PCR法を組み合わせた未培養微生物OP5の機能推定

UASB汚泥を各種基質で回分培養後、汚泥からRNAを抽出し未培養微生物OP5を標的としたqRT-PCRを行なった。各種基質また培養時間ごとのOP5の16S rRNA発現量を調査し、培養0時間に対する相対発現量を求めた。結果、プロピオン酸および酢酸添加系において、他の基質を添加した系よりも未培養微生物OP5の16S rRNA発現量の増加がみられ、12時間後の酢酸添加系においておよそ4倍まで増加したことから、これらの基質は未培養微生物OP5の活性を促すか、OP5の基質としての利用可能性が示された。

(5) 未培養微生物OP5の分離培養

FISH法による汚泥内空間分布の把握および短時間培養とqRT-PCRの結果から、本未培養微生物が有機酸を資化する可能性が示されたことから、リアクター汚泥を植種源に、プロピオン酸および酢酸を主たる炭素源としたWiddel培地による限界希釈法を適用した。酢酸をCOD_{Cr}で400mg/Lの濃度となるよう添加した系において、培養82日目の培養菌体に対して未培養微生物OP5特異的プローブによるFISH法を適用した結果、OP5を高い濃度で集積することができた。またこの培養系には同時に多数の水素資化性メタン生成古細菌も集積されていることが明らかとなった。このことから未培養微生物OP5は水素資化性メタン生成古細菌と種間水素伝達することによって酢酸を酸化分解している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. 大久保努, 井口晃徳, 久保田健吾, 山口隆司, 上村繁樹, 原田秀樹, 「実証規模DHSリアクターの処理性能と硝化細菌群に及ぼすスポンジ担体の影響」下水道協会誌, 査読有り, Vol. 51, No. 623, 2014, 121-128.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020203429>
2. Kengo Kubota, Mikio Hayashi, Kengo Matsunaga, Akinori Iguchi, Akiyoshi Ohashi, Yu-You Li, Takashi Yamaguchi, Hideki Harada, 「Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal sewage」Bioresource Technology, 査読有り, Volume 151, 2014, 144-150.

doi:10.1016/j.biortech.2013.10.058

3. 井口晃徳, 大久保努, 立花真, 永井寛之, 上村繁樹, 山口隆司, 久保田健吾, 原田秀樹, 「実証規模 UASB-DHS システムにおける後段 DHS リアクターの微生物群集構造解析と脱窒細菌群の定量」土木学会論文集 G (環境), 査読有り, Vol.69, No.7, 2013, pp.III_539-III_546.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130004962580>

〔学会発表〕(計9件)

1. 千葉有紀, 佐藤江美, 井口晃徳, 林真由美, 山口隆司, 原田秀樹, 重松亨, 「下水処理 UASB 汚泥から高頻度に検出される未培養微生物の基質利用推定」第49回日本水環境学会年会, 3月16-18日, 2015年, 金沢市, 石川県.
2. 千葉有紀, 林真由美 新潟薬科大学, 佐藤江美, 井口晃徳, 重松亨, 「下水処理嫌気性汚泥から高頻度に検出される未培養微生物の基質利用推定」第32回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会, 11月5日, 2014年, 長岡市, 新潟県.
3. Yuki Chiba, Akinori Iguchi, Toru Shigematsu, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Masanobu Takahashi, Kengo Kubota, Hideki Harada, 「In situ ecophysiological analysis of uncultured *Caldiserica* phylotype reside in UASB sludge granules treating sewage」International Workshop on “UASB-DHS integrated system – a sustainable sewage treatment technology”, October 15-17, 2014, Delhi, India.
4. 井口晃徳, 千葉有紀, 林真由美, 山口隆司, 原田秀樹, 重松亨, 「下水処理 UASB プロセスのグラニュール汚泥内に存在する主要未培養微生物の空間分布と機能推定」第29回日本微生物生態学会大会, 11月22-24日, 2013年, 鹿児島市, 鹿児島県.
5. Akinori IGUCHI, Tsutomu Okubo, Masanobu Takahashi, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Shigeki Uemura, Kengo Kubota and Hideki Harada, 「Microbial community structure of practical-scale Down-flow Hanging Sponge reactor treating municipal wastewater in India」The 1st International Forum On Asian Water Environment Technology, December 12-18, 2013, Delhi, India.
6. 井口晃徳, 千葉有紀, 林真由美, 山口隆司, 原田秀樹, 重松亨, 「下水処理メタン発酵プロセスにおいて高頻度に検出される未培養微生物の集積化と機能推定」

第47回日本水環境学会年会, 3月11-13日, 2013年, 大阪市, 大阪府.

7. 井口晃徳 「下水処理メタン発酵プロセスにおいて高頻度に検出される未培養微生物の機能解析」第2回バイオマス&エネルギー expo in 新潟, 12月3日, 2012年, 新潟市, 新潟県.
8. Akinori IGUCHI, Tsutomu Okubo, Masanobu Takahashi, Kengo Kubota, Takashi Yamaguchi, Yuji Sekiguchi, Toru Shigematsu, Nobuo Araki, Hideki Harada, 「Microbial community and functions of low-strength methane fermentation process with no temperature control」28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology (JSME2012), September 20-22, 2012, Aichi, JAPAN.
9. 井口晃徳, 千葉有紀, 林真由美, 山口隆司, 原田秀樹, 重松亨, 「都市下水処理メタン発酵プロセスにおいて高頻度に検出される未培養微生物の視覚化と定量」日本農芸化学会2012年度関東支部大会 10月27-28日, 2012年, 新潟市, 新潟県.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
井口 晃徳 (IGUCHI Akinori)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号: 60599786

(2)研究分担者

該当なし()

研究者番号：

(3)連携研究者
該当なし()

研究者番号：