

P-020

16S rRNA アプローチと SIP 法を用いた嫌気性消化污泥内における 酸生成および酸分解に関与する微生物群の構造解析

よしぐち かずみ いたうつかさ ヘルト ドウィ アリエスヤディ おかべ さとし
○吉口 和美、伊藤 司、Herto Dwi Ariesyady、岡部 聡

北海道大学大学院工学研究科

〔目的〕 都市下水污泥の嫌気性処理は、エネルギーとなるメタンの回収を見込める点など、有効な処理法であることから近年再び注目されている。嫌気性処理は複数の微生物群の共生関係から成り、複雑な分解経路を有する。そのため、メタンの効率的回収・安定化を図るには、実際の環境において有機物分解過程に関与する微生物群集を特定し、微生物間の相互作用について知る必要がある。本研究では、嫌気性消化プロセスにおいて律速段階と考えられているプロピオン酸分解経路に着目し、安定同位体元素 (^{13}C) で標識されたプロピオン酸を用いた SIP 法と 16S rRNA アプローチを組み合わせ、複合微生物系内におけるプロピオン酸分解に関与する微生物の特定を試みた。

〔方法〕 安定同位体を用いた培養は、基質として Sodium Propionate($^{13}\text{C}_3$, 99 %): 2.5 mM/day (污泥負荷: 0.024 mg/mg-MLSS/day) を用い、小型バイアル瓶で 37°C で回分振とう培養により行った。種污泥には複合基質として育児用ミルクを供給して培養した嫌気性消化污泥を用いた。培養開始 15 日目の污泥から DNA を抽出した後、塩化セシウム密度勾配遠心法により、 ^{12}C -DNA および ^{13}C -DNA に相当する DNA バンド (以降 ^{12}C -DNA、 ^{13}C -DNA) をそれぞれ回収し、*Bacteria* を対象としたプライマーセットにより PCR を行い、16S rRNA gene に基づく系統解析を行った。

〔結果と考察〕 ^{13}C -DNA と ^{12}C -DNA の解析結果から、属レベルでそれぞれ 9 OTU、16 OTU に分類することができた。 ^{13}C -DNA の系統解析の結果、分類した 9 OTU のうち最も検出頻度が高かった 1 OTU はプロピオン酸分解菌として知られる *Syntrophobacter wolinii* に 95 ~ 97% の相同性を持つクローンにより構成された (全 44 クローン解析中の 20 クローン検出)。一方、それ以外の 8 OTU からは既知のプロピオン酸分解菌に近縁なクローンは得られなかった。またこれらの 8 OTU は ^{12}C -DNA の解析からも同様に検出された。これは ^{13}C プロピオン酸を用いた 15 日間の培養の結果、プロピオン酸の ^{13}C がプロピオン酸分解に関与する微生物のみならず、下流の分解に関与する微生物 (酢酸分解菌など) の DNA にまで同化されたためであると考えられる。また、*Bacteroidetes*、*Nitrospira*、*Planctomycetes*、*Spirochaetales* に属する 6 OTU は、 ^{12}C -DNA の系統解析でのみ得られ、培養に用いた種污泥に由来する微生物であると考えられた。

本研究では、嫌気性消化プロセスに SIP 法を適用し、プロピオン酸分解に関与する微生物群を特異的に検出・同定することができた。本系内におけるプロピオン酸分解は主に *Syntrophobacter wolinii* に近縁な微生物により進行していたと推定されるが、他の微生物のプロピオン酸分解への関与および培養方法などさらに検討が必要である。

〔連絡先〕 e-mail: y-kazumi@eng.hokudai.ac.jp (吉口和美)