

# 各種嫌気性汚泥から検出される未培養系統分類群 WWE1 門に属する微生物の集積培養と分離の試み

水圏土壌環境研究室 星丈弘  
指導教員 幡本将史 山口隆司

## 1. はじめに

上昇流嫌気性汚泥床 (Upflow Anaerobic Sludge Blanket : UASB) 法をはじめとする嫌気性廃水処理法は、好気性廃水処理法と比較して余剰汚泥の排出及び処理に係るエネルギーを抑えることが可能であり、様々な廃水種に適応されている技術である。近年では、次世代シーケンサーの発達に伴い、UASB のグラニュール汚泥を対象とした微生物群集構造解析が行われている。この微生物群集構造解析により、UASB 内での嫌気性処理に関与する微生物の推定、経時的な細菌叢の変化、汚泥間の微生物群集構造の比較を行うことが可能となっている。

しかしながら UASB のグラニュール汚泥をはじめとする嫌気性汚泥内には、未培養系統分類群と呼ばれる現在までに分離培養がなされていない系統分類群に属する微生物が存在していることが明らかとなっている。この嫌気 (メタン生成) 環境下に存在する未培養系統分類群の生理学的特性の把握は、嫌気処理プロセスでの物質分解過程を理解する上で非常に重要である。Chouari らにより *Bacteria* の新門候補として提唱された WWE1 門細菌は、次世代シーケンサーを利用した様々なバイオリクター内の微生物群集構造解析の結果から様々な嫌気性汚泥内に普

遍的に存在していることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。また、代謝機能に関しても、WWE1 門細菌の一種である” *Candidates Cloacimonas*” 属のゲノム解析の結果から水素資化性のメタン生成古細菌と共生してプロピオン酸酸化を行うこと<sup>2)</sup>や、セルロース由来の中間代謝産物の分解に寄与していることが示唆されている<sup>3)</sup>。しかしながら、WWE1 門細菌は現在までに分離報告がないためその代謝経路は推定の域を出ていない。本研究では、WWE1 門細菌の生理学的特性の把握を目的とし、様々な嫌気性汚泥を用いて WWE1 門細菌の集積培養及び分離を試みた。

## 2. 実験方法

### 2.1. WWE1 門細菌の集積培養

培養条件を Table. 1 に示す。植種汚泥には、下水処理を行っていた Up-flow UASB リアクターのグラニュール汚泥、中温嫌気性消化汚泥、エチレングリコール含有廃水処理 UASB リアクターの中温グラニュール汚泥を用いた。植種汚泥を対象とした微生物群集構造解析には、Univ515F - Univ806R のプライマーセットを用い、DNA シーケンシングには MiSeq (Illumina) を用いた。WWE1 門細菌の集積培養には、Widdel 培地にプロピオン酸 (10 mM)、アミノ酸混合

Table. 1 Cultivation condition

Seed sludge	Medium	Temp. (°C)	Substrate		
			Propionate	Amino acid mixture	Cellulose
Digestive sludge			+	-	-
			-	+	-
			+	+	-
			-	-	+
			-	+	+
Granuler sludge from UASB reactor treating municipal sewage	Widdel medium	37	+	-	-
			-	+	-
			+	+	-
			-	-	+
			-	+	+
Granuler sludge from UASB reactor treating wastewater contained EG			+	-	-
			-	+	-
			+	+	-
			-	-	+
			-	+	+

液 (リジン (2.5 mM), ロイシン, イソロイシン, バリン, スレオニン, メチオニン, プロリン, アルギニン, ヒスチジン, フェニルアラニン, システイン (各 0.1 mM), トリプトファン (20 μM)), プロピオン酸とアミノ酸混合液, セルロース (4.75 mg/ml), セルロースとアミノ酸混合液を基質として用いた。培養は, 37°Cで嫌気的に行った。バイアル瓶内のガスの組成は, TCD 検出器付きのガスクロマトグラフを用いた。培養は容量 70 ml の血清バイアル瓶を用いた。培地容量は 20 ml (pH=7.0) とし, バイアル瓶中の気相部を N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (80/20, vol/vol) で置換した後, ブチルゴム栓とアルミシールにより密閉した。用意した培地は, 120°C, 20 分のオートクレーブの後, 使用前に培養基質をシリンジを用いて所定濃度添加した。継代培養は, メタンガスの発生量から検出した基質の消費量が 50%以上になったことを確認後に行った。FISH 法は WWE1 門細菌 (WWE1\_1181-Cy3) 及び *Bacteria* (EUB338mix - Alexa488) に特異的なプローブを用いた。継代量は培地液量の 10%で行った。

## 2.2. 集積培養系内の WWE1 門細菌を対象とした分子系統解析

16S rRNA 遺伝子配列に基づいた分子系統解析には, 集積培養液中から DNA を抽出後, WWE1 門細菌に特異的な, Pla46F - WWE1\_1181R のプライマーセットを用いた PCR 産物を用いた。PCR 産物は, TOPO Cloning Kit (Invitrogen) によってクローン化した。クローンは, 抗生物質 (Ampicillin) を含む LB 培地上で形成したコロニーからランダムに 96 個選択し, プラスミドから単一の 16S rRNA 遺伝子断片を回収した。16S rRNA 遺伝子配列の全長は, 6 種 (M13F, M13R, EUB338f, UNIV519F, UNIV530R, Pla46F) のプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行うことで決定した。分子系統解析は, the program package ARB を用いて 16S rRNA 遺伝子配列のアライメントを行い, 近接結合法を用いて系統樹の推定を行った。系統樹の樹形の確からしさは 1000 回のブートストラップ解析により検証した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1. 植種汚泥を対象とした微生物群集構造解析結果

植種汚泥を対象とした微生物群集構造解析の結果

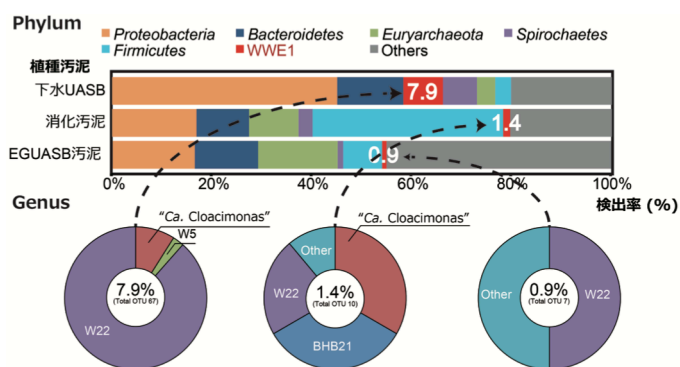


Fig. 1 Result of microbial community of seed sludges

果を Fig. 1 に示す。WWE1 門細菌の検出率は, 下水処理 UASB リアクターのグラニュール汚泥, 中温嫌気性消化汚泥, エチレングリコール含有廃水処理 UASB リアクターの中温グラニュール汚泥でそれぞれ全微生物に対し, 7.9%, 1.4%, 0.9%であった。各種植種汚泥内で検出された WWE1 門細菌は, "Ca. Cloacimonas" 属, W22 グループ, W5 グループ, BHB21 グループに属する系統分類群であった。特に, これらの汚泥の中で最も優占していた WWE1 門細菌は, W22 グループに属する未培養系統分類群であり, その割合は中温嫌気性消化汚泥, 下水処理 UASB リアクターのグラニュール汚泥, エチレングリコール含有廃水処理 UASB リアクターの中温グラニュール汚泥でそれぞれ, 30%, 69%, 50%であった。また, 全ての植種汚泥内で検出された WWE1 門細菌に属する未培養系統分類群は, 計 84OTU 検出された。その中で, "Candidatus Cloacimonas acidaminovorans" に近い相同性であったのは計 81OTU であり, 植種汚泥内で検出された WWE1 門細菌のうち 96%が "Candidatus Cloacimonas acidaminovorans" 属であった。これらの植種汚泥内では, 全古細菌中 *Methanosaeta* 属が優占しており, その検出率は 2.0%程度であった。

### 3.2. 各種基質を用いた WWE1 門細菌の集積培養

WWE1 門細菌の選択的な培養を試みるために上述した 5 種の基質と 3 種類の嫌気性汚泥を用いた計 15 種類の集積培養を行った。その結果, プロピオン酸, プロピオン酸とアミノ酸混合液, セルロースとアミノ酸混合液を添加した培養系のみ FISH 法により, WWE1 門細菌を培養系内で観察できた。そこで, これらの培養系に対して継代培養を繰り返すことにより, WWE1 門細菌の集積を試みた。その結果, プロピオン酸とアミノ酸混合液を添加した培養系では,

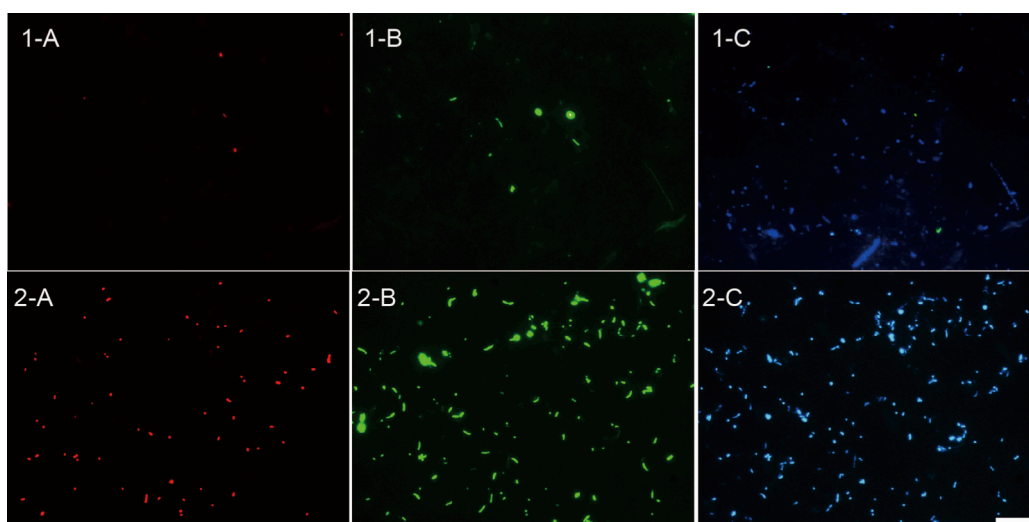


Fig. 2 In situ hybridization of enrichment culture of propionate and amino acid mixture (1 : enrichment culture, 2 : subculture 2<sup>nd</sup> gen., A : WWE1\_1181-Cy3, B : EUB338mix-Alexa488, C : DAPI). Seed sludge is granular sludge from UASB reactor treating municipal sewage. Scale bar indicates 10  $\mu$ m.

植種汚泥に依らず継代培養系内で WWE1 門細菌が維持でき、2 回の継代培養で WWE1 門細菌の集積率は、全 *Bacteria* に対して 44% となり、WWE1 門細菌の集積培養に成功した (Fig. 2) . プロピオン酸とアミノ酸混合液を基質とした培養系は継代培養後も WWE1 門細菌の集積を確認できた。培養系内ではメタンが生成されており (Fig.3) , 集積培養系内を観察した結果、メタン生成古細菌に特有な F<sub>420</sub> 様の自家蛍光を持つ球形及び桿形の *Methanoculleus* 様または *Methanobacterium* 様の微生物が確認された。

以上の培養結果より、WWE1 門細菌は、培養系内で水素資化性のメタン生成古細菌と共生関係を構築することでプロピオン酸を異化代謝していることが考えられた。また、WWE1 門細菌は、自身の増殖のためにアミノ酸が必要であることが示唆された。

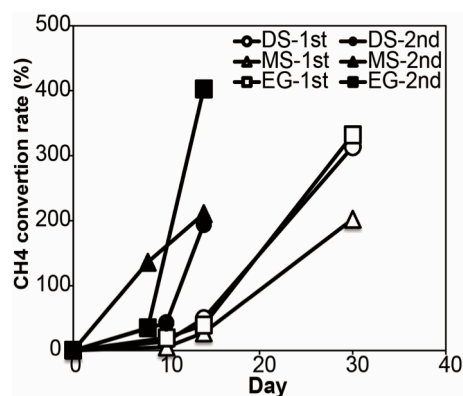


Fig. 3 Time course of methane conversion rate of enrichment culture and subculture using propionate and amino acid mixture.

一方、セルロースを基質とした培養系においては、WWE1 門細菌の培養に失敗した。嫌気環境下においてセルロースはグルコースに加水分解された後、酸生成細菌により脂肪酸に分解される。一般的にグルコースからの生成される脂肪酸は、ホモ乳酸発酵 (グルコースから乳酸)、ヘテロ発酵 (グルコースから酪酸)、ヘテロ乳酸発酵 (グルコースから乳酸及びエタノール)、ビフィダム経路 (グルコースから乳酸及び酢酸) などの経路を通り生成される。また、これらの代謝産物のうち、乳酸は電子供与体として鉄及び硫酸塩還元に使われ、最終的に酢酸及びプロピオン酸に還元される。しかしながら、Widdel 培地には硫酸イオンが存在せず、基質にも硫酸塩を添加していないため、本培養系では硫酸塩還元が起こるとは考えにくい。よって、あくまでも推定ではあるが、セルロースとアミノ酸を基質とした培養系内でメタン生成を担っているのは、WWE1 門細菌と水素資化性のメタン生成古細菌ではなく酢酸及びエタノールを利用する微生物であると考えられた。

### 3.3. 集積培養系内で検出された WWE1 門細菌の分子系統解析

WWE1 門細菌が検出されたプロピオン酸とアミノ酸を基質とした集積培養系とセルロースとアミノ酸を基質とした集積培養系を対象に計 15 クローン選択し、系統解析を行った。プロピオン酸とアミノ酸を基質とした集積培養系及びセルロースとアミノ酸を基質とした集積培養系の両集積培養系内で、WWE1 門細菌に近縁なクローン (セルロースとアミ

Table. 2 Result of clone analysis. (Yellow : clone which retrieve from enrichment culture of cellulose + amino acid, Blue : clone which retrieve from enrichment culture of propionate + amino acid)

Sample name	Sequence number	Identity (%)	Related species	Accession No.
A3	1214	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
A5	1263	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
B4	1208	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
B5	1212	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
C3	1208	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
C5	1262	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
D3	1208	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
D4	1211	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
E4	1215	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
E5	1211	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
F3	1214	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
G3	1212	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
G4	1265	94	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
H3	1190	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1
H4	1129	95	Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry	NR_102986.1

ノ酸を基質とした集積培養系；6 クローン，プロピオン酸とアミノ酸を基質とした集積培養系；9 クローン) を得ることに成功した。得られたクローンは”*Candidates Cloacimonas acidaminovorans*”に相同性が94%以上で近縁であった (Table. 2) 。 Fig.3 に各培養系から得られた WWE1 門細菌の16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析結果を示す。両培養系内で検出された WWE1 門細菌のクローンは系統学的位置に大きな違いはなく，Liman らによって報告されたセルロース培養系内で検出された WWE1 門細菌のクローン (Cellulose BFE081, Cellulose BFG011, Cellulose BFC111)<sup>3)</sup>とは遠縁であった (Fig. 4)。

これより，両集積培養系内で検出された WWE1 門細菌はプロピオン酸酸化を担っていることが示唆された。

WWE1 門細菌はプロピオン酸酸化を担っているとすれば，プロピオン酸酸化反応を進行させるために，水素資化性の微生物と共生しなければならない。故に，共生細菌の分離培養においては，この共生系を構築することが必要不可欠である。WWE1 門細菌の分離に供するメタン生成古細菌は，*M. beijingense*, *M. palmolei* を選択し，希釈培養を行うことで，WWE1 門細菌を共生系として分離することが可能であると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では，様々な嫌気性汚泥からアミノ酸とプロピオン酸を基質とすることにより，WWE1 門細菌の集積培養に成功した。また，プロピオン酸酸化を担っていると考えられる WWE1 門細菌は水素資化性のメタン生成古細菌を用いることで，希釈培養法並びに Roll tube 法により分離可能であることが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Nobu, M. K., et al., *ISME J.* (2015)
- 2) Pelletier, E., et al., *J. Bacteriol.* (2008)
- 3) Liman, D., et al., *MicrobiologyOpen* (2014)

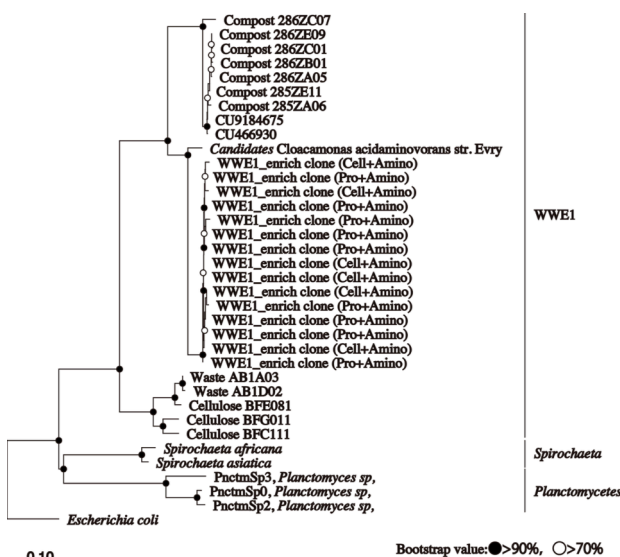


Fig. 4 Phylogenetic tree of clones obtained in this study and selected bacteria. The scale bar indicates the number of changes of nucleotides.