

嫌気性廃水処理汚泥に生息する WWE1 門細菌の利用基質の推定と分離の試み

長岡技大院・工 ○(学) 野沢和穂, 星丈弘, (正) 幡本将史, 牧慎也, (正) 山口隆司

1. はじめに

現在, 嫌気的な有機物の分解経路は, 主として化学的に推定されている. しかし, 嫌気性廃水処理リアクターや土壌中など実際の嫌気環境中において, それぞれの有機物分解にどの微生物が関与しているのか解明されていない場合が多く, そのため, 分解機構もブラックボックスとなっている.

近年の嫌気性廃水処理汚泥を対象とした微生物群集構造解析より, これらの分解プロセスに未培養系統分類群に属する微生物が関与していることが明らかになっている. その1つである WWE1 門細菌は, 2005 年に Chouari らによって提唱された門レベルでの未培養系統分類群であり¹⁾, 様々な都市下水処理または産業廃水処理リアクター中に存在していることが報告されている. また, 既往の研究によって, WWE1 門に属する “*Candidates Cloacamonas*” 属細菌は水素資化性のメタン生成古細菌と共生することでプロピオン酸やアミノ酸, グルコースなどの分解によりエネルギーを獲得している可能性が示唆された^{2), 3)}. これらの代謝機能は WWE1 門細菌のメタゲノム解析によって推定されたものであり, 実際に WWE1 門細菌がこのような機能を保持しているかは明らかになっていない.

そこで本研究では, WWE1 門細菌を分離培養することで, WWE1 門細菌群の嫌気性排水処理プロセスにおける役割を解明することとした. これまでの研究では, 無機塩培地に基質として 11 種類のアミノ酸, および, リジン, プロピオン酸を用い, 汚泥を植種して集積培養系を作成した. その結果, 都市下水処理汚泥を植種した試料において, WWE1 門細菌を全細菌に対

する割合で約 40%に集積することができた. 今回行った実験では, 培養の成果やゲノム解析情報をもとに, WWE1 門細菌の分離に最適な基質を検討し, また, 希釈培養法によって分離を試みた.

2. 実験概要

2.1. 実験内容

メタン生成古細菌を共培養として作成した希釈培養系を用いて WWE1 門細菌の分離を試みた. 共生させるメタン生成古細菌として, 水素資化性の *Methanoculleus palmolei* および *Methanobacterium beijingense* をそれぞれ別々に用いて培養系を作成した. 基質としては, 11 種類のアミノ酸, および, リジン, プロピオン酸を用いた. 植種源としては上述した集積培養系を用いた. 希釈倍率は $10^1 \sim 10^{10}$ とした.

2.2. 分析方法

WWE1 門細菌の培養には無機塩培地を用いた. 培地は血清バイアルまたは試験管に入れ, N_2/CO_2 ガスで気相部を置換して密封した. その後に滅菌処理し, 基質および植種源を添加した. 作成した培養系は $37^\circ C$ で静置して培養した.

WWE1 門細菌の検出には, FISH 法を用いた顕微鏡観察によって行った. 培養液の固定には 4%のバラホルムアルデヒドを用い, 固定時間は 4 時間とした. FISH 法に使用したプローブは EUB338, および, WWE1-1181 とした (表-1). プローブの交雑時間は Over night とし, プローブの洗浄時間は 20 分間とした. プローブ洗浄後に DAPI を滴下してカバーガラスをかけ, 観察に供した.

メタン発生量の測定には, TCD 付きのガスクロマトグラフ GC-08A (SHIMADZU) を用いた. 分析に供した

表-1 使用したプローブ

Probe name	Sequence (5' - 3')	Specificity	label	Reference
EUB338 (Bact338)	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	most Bacteria		
EUB338 II (SBACT P 338)	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Planctomycetales	Alexa 448	Amann et al., 1990
EUB338 III (SBACT V 338)	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Verrucomicrobiales		
WWE1-1181	CTT CCT CTG CGT TGT TAC	WWE1	Cy3	Chouari et al., 2005

キーワード: メタン発酵, 微生物, 未培養系統分類群, 分離培養, UASB

連絡先: 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境システム棟 5 階 水圏土壌環境研究室
TEL: 0258-47-1611

試料については、バイアル気相部から 100 μ L 採取した。培養液の成分分析には、キャピラリー電気泳動 (Agilent) を用いた。試料としては、培養液を 15000rpm で遠心分離した後に上澄みを採取し、0.2 μ m のフィルターでろ過したものを用いた。泳動液の調製は大塚電子株式会社が作成した泳動液調整マニュアルに従った。

3. 実験結果および考察

メタン生成古細菌を共培養した希釈培養の結果、両系列とも 10^7 の培養系までに微生物の増殖を確認した。 $10^5 \sim 10^7$ の培養系について、同基質を用いて継代培養した結果、*Methanobacterium beijingense* を共培養した培養系の 10^7 の試料を植種した系列のうち 2 本の試料において、培養開始から 215 日目に WWE1 門細菌がバクテリアに対して約 80% に集積されていることを、FISH 法を用いた顕微鏡観察によって確認した (図-1)。

そこで、この 2 本の試料を再び継代培養した。炭素源としてリジンとプロピオン酸を添加したもの (培養系 No.1, No.2)、および、リジンと酪酸を添加したもの (培養系 No.3, No.4) をそれぞれ作成した。各培養系 (No.1~4) の基質組成の経日変化を図-2 に示す。FISH 法を用いた顕微鏡観察によって、いずれの培養系でも培養開始から 16 日目に WWE1 門細菌が優占していることを確認した。図-2 より、プロピオン酸、および、酪酸の濃度には、多少の増減は見られたものの、分解されているような変化はなかった。その一方で、4~16 日目にかけてリジンの濃度が減少していた。WWE1 門細菌の増殖とリジンの減少の時期が一致していることから、本実験の培養系において WWE1 門細菌はリジンを資化していることが示唆された。

したがって、今後はリジンを単一の炭素源とし、希釈培養法、ロールチューブ法を用いて WWE1 門細菌の分離を引き続き試みる。

4. まとめ

プロピオン酸およびリジンを基質として用いた希釈培養によって WWE1 門細菌を約 80% に集積することができた。また、WWE1 門細菌はリジンを資化して増殖していることが示唆された。

5. 参考文献

- 1) Chouari *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* (2005), 71, 2145-2153
- 2) Pelletier *et al.*, *J. Bacteriol.* (2008), 190, 2572-2579
- 3) Stolze *et al.*, *Biotechnol. Biofuels* (2016), 9, 156

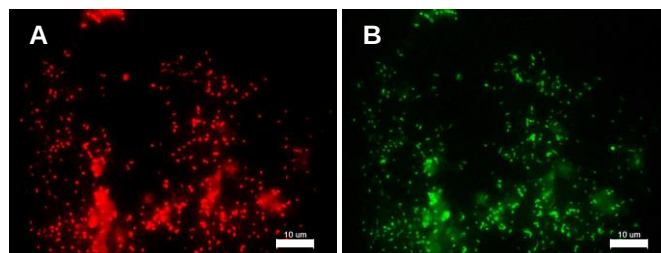


図-1 リジンおよびプロピオン酸を基質として用いた 10^7 希釈培養系の FISH 法による観察結果 (A : WWE1-1181, B : EUB338) ※スケールバーは 10 μ m を示す。

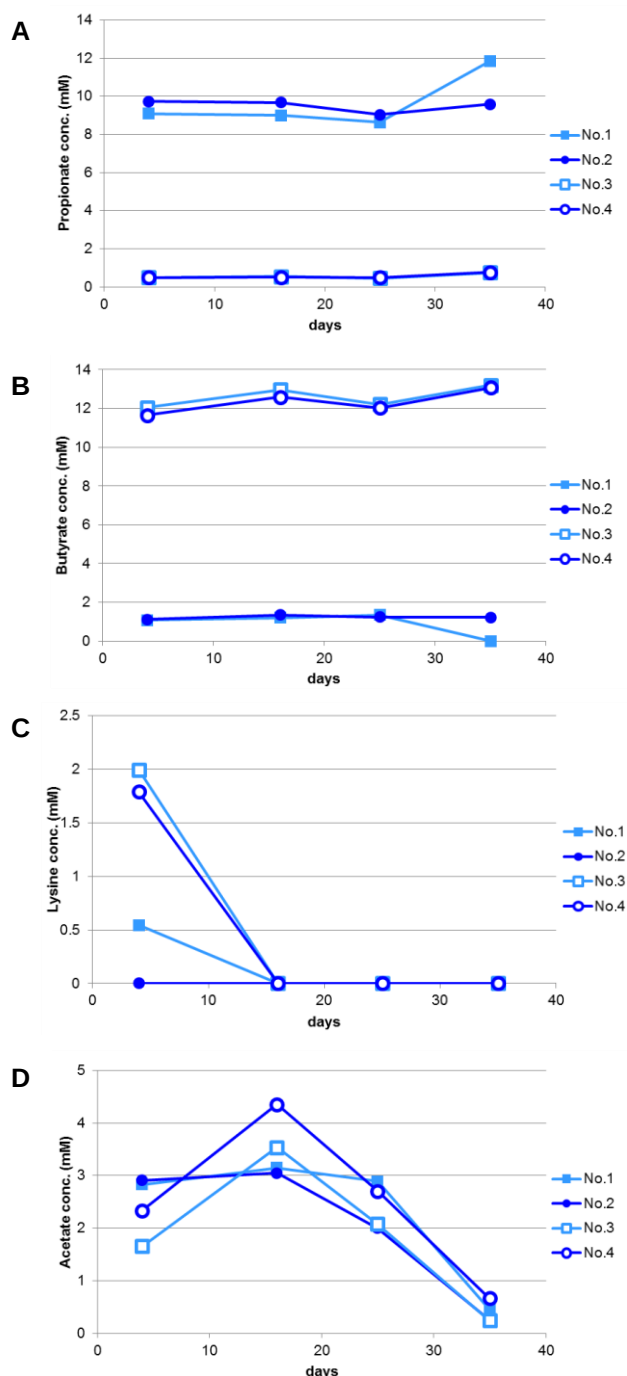


図-2 継代培養系の培養液組成の変化 (A : プロピオン酸, B : 酪酸, C : リジン, D : 酢酸)