

廃水処理汚泥中に存在する高次未培養系統分類群の生態調査

長岡技術科学大学 (学) ○黒田 恭平

長岡技術科学大学 (正) 幡本 将史, 中村 明靖, 阿部 憲一, (正) 山口 隆司

1. はじめに

生物学的廃水処理汚泥の微生物群集構造解析を行う際に 16S rRNA 遺伝子や機能遺伝子などをマーカー遺伝子として PCR-cloning 法, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法や Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism 法などが用いられてきた。しかしながら, 上記の手法では遺伝子解析深度が浅いことや、遺伝子配列が直接得られないなど微生物群集構造を理解するには不十分であった。近年, 次世代 DNA シークエンサーと呼ばれる超並列 DNA シークエンサーの開発により, 廃水処理汚泥の微生物群集構造を理解するために十分な深度で解析を行うことが可能となった¹⁾。一方で, 超並列 16S rRNA 遺伝子シークエンシングにより廃水処理汚泥には未だ数多くの高次未培養系統分類群が存在することが明らかとなった。廃水処理汚泥中に存在する高次未培養系統分類群を理解することは, 廃水処理技術発展のための基盤整備を行うために重要である。本研究では, 各種廃水処理汚泥中に存在する高次未培養系統分類群の生態把握を目的として, 17 種類の各種廃水処理槽から 54 個の廃水処理汚泥を採取し, 16S rRNA 遺伝子を対象とした超並列 DNA シークエンス解析を行った。得られた 16S rRNA 遺伝子配列データを解析し, 廃水処理汚泥中において高頻度に検出される高次未培養系統分類群に関する基礎的知見の収集を行った。

2. 実験方法

解析に用いた各種汚泥は表-1 に示す廃水処理槽から採取した。採取した汚泥は洗浄し, DNA 抽出まで-20℃ で保存した。DNA 抽出は, FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 社) を用いて行った。抽出 DNA を鋳型とし, 原核生物の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Univ515F-Univ806R のプライマーセットで PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅産物は, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。超並列 DNA シークエンシングには MiSeq reagent Kit v2 (500 サイクル, illumina 社) を用い, Caporaso らの方法¹⁾に従った。得られた全ての 16S rRNA 遺伝子配列のデータ解析には Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) ver. 1.7.0²⁾のパイプラインを用いた。

3. 実験結果および考察

(1) 各種廃水処理汚泥の微生物群集構造解析結果

本研究では, 17 種類の各種廃水処理槽から 54 サンプルの汚泥を採取し, 16S rRNA 遺伝子を対象とした超並列 DNA シークエンス解析を行った。その結果, 平均長 251 bp の 16S rRNA 遺伝子配列を 1,041,539 リード得た。各廃水処理汚泥あたりの 16S rRNA 遺伝子配列数は約 9,500–32,000 リードであった (表-1)。得られた遺伝子配列は相同性 97%以上を同一の operational taxonomic unit (OTU) としグルーピングを行った結果, 各種廃水処理汚泥あたりの得られた OTU 数は約 771–6534 であった。しかしながら, Chao1 Index を計算した結果, 各廃水処理汚泥中には本研究で得られた OTU 数の約 3–5 倍の OTU が存在する

表-1 本研究で解析に使用した汚泥サンプルと α 多様性解析結果

Sample No.	Reactor Type	Treatment Type	Temp. (°C)	Wastewater Type	Diversity Index ^a						
					No. of Sequence	No. of OTU	Chao1	Shannon	PD	Coverage	Simpson
1–16	UASB	Methanogenic	10–28	Sewage	17282±2472	6534±1030	30917±5670	9.82±0.49	435±56	0.69±0.03	0.98±0.01
17–20	CSTR	Methanogenic	35	Rice husk	20876±4713	1784±934	9409±7341	6.09±0.46	152±61	0.94±0.03	0.95±0.01
21–23	UASB	Methanogenic	35	Industrial rubber wastewater	15719±495	753±78	2595±439	4.84±0.14	90±9	0.97	0.86±0.01
24	MS-UASB	Methanogenic	55	High-strength alcohol distillation wastewater	22118	1030	4599	5.53	112	0.97	0.94
25	MS-UASB	Methanogenic	55	High-strength molasses	23007	771	3182	5.2	76	0.98	0.92
26	UASB	Methanogenic	30–35	Molasses	25466	1507	3744	7.07	153	0.97	0.97
27–28	UASB	Methanogenic	35	Industrial beer wastewater	16050±2131	974±177	2737±282	6.21±0.24	113±20	0.96	0.96
29–30	UASB	Methanogenic and Denitrification	35	Industrial beer wastewater	16453±472	1004±68	2709±283	6.63±0.12	122±5	0.96	0.97
31–36	A ₂ SBR	Nitrogen and phosphorus removal	10–28	Sewage (DHS eff.)	31764±7060	4410±1213	17630±4161	8.06±0.70	325±70	0.90±0.01	0.97±0.03
37	Sand filter	Nitrogen and coliform removal	10–28	Sewage (DHS eff.)	20512	2507	5423	8.00	236	0.93	0.98
38–45	USB	Nitrogen removal	26	Marine aquarium water	12558±2917	1322±486	4370±2044	6.79±0.90	145±35	0.93±0.02	0.96±0.03
46	UFB	Denitrifying methane oxidation	30	Nitrite and methane	39305	2971	21723	6.23	204	0.94	0.95
47	UFB	Denitrifying methane oxidation	30	Nitrate and methane	29222	2753	24131	6.27	202	0.92	0.95
48–49	DHS	Denitrifying methane oxidation	30	Nitrite, nitrate and methane	16698±39	1563±170	8524±998	6.73±0.13	131±17	0.93±0.01	0.96±0.02
50	UFB	Fe-reducing methane oxidation	30	Iron and methane	9548	799	2168	5.29	98	0.95	0.85
51–52	DHS	Nitrification and organic removal	35	Industrial rubber wastewater (UASB eff.)	13290±1326	1478±349	5928±72	7.23±0.01	148±27	0.92±0.01	0.97±0.01
53–54	DHS	Nitrification and organic removal	35	Molasses (UASB eff.)	24758±9837	1744±407	6022±4744	7.30±0.69	184±20	0.96±0.01	0.98±0.01

^aCalculations based on the operational taxonomic units determined at an evolutionary distance of 0.03.

キーワード 廃水処理汚泥, 微生物群集構造解析, 高次未培養系統分類群, 多様性解析

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 TEL.0258-47-9612 E-mail: s115043@stn.nagaokaut.ac.jp

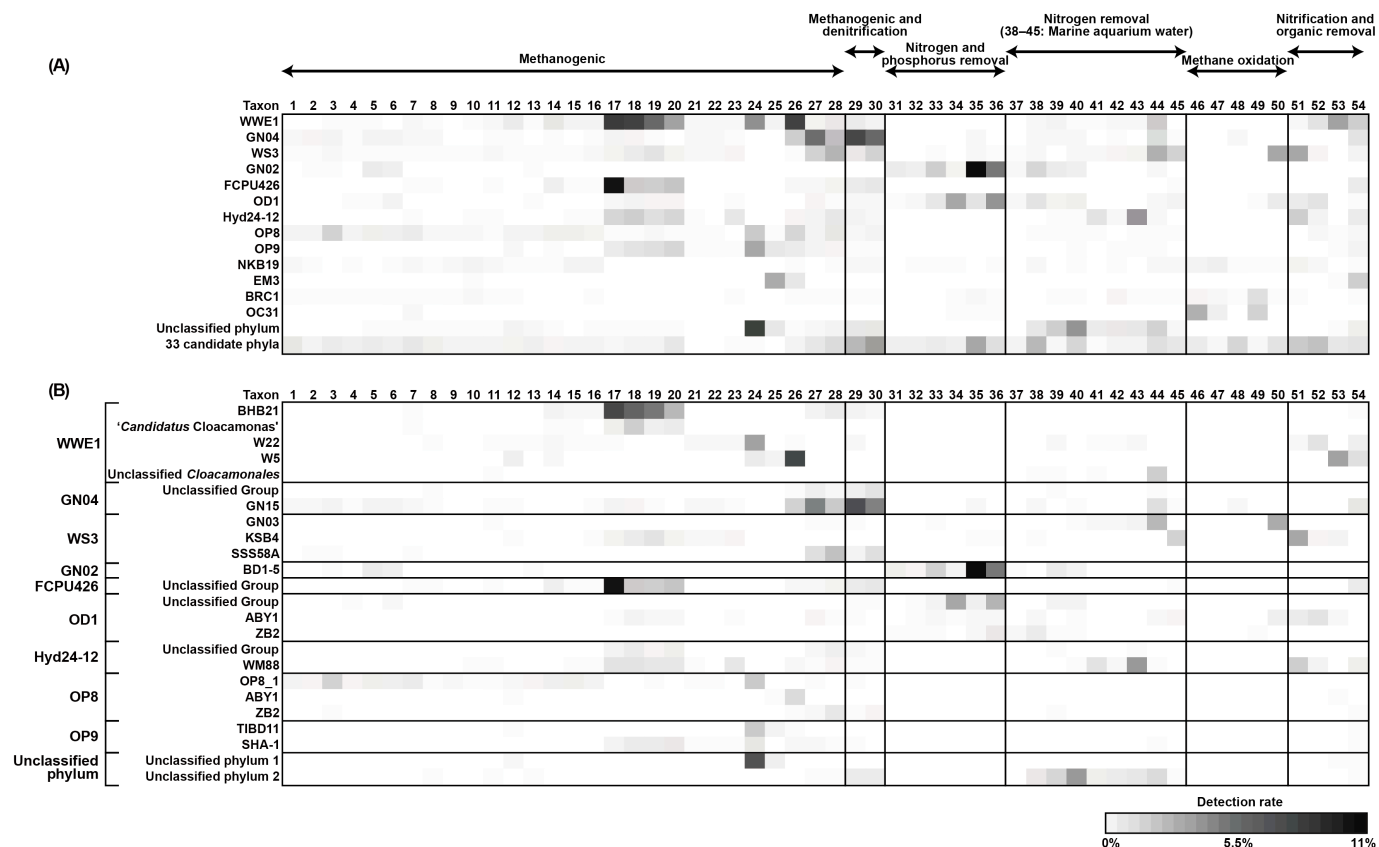


図-1 各種廃水処理汚泥において高頻度に検出された高次未培養系統分類群のヒートマップ (A: 門レベル, B: 属レベル)

ことが示唆された。また、無加温下水処理 UASB 汚泥 (サンプル 1-16) 以外の Good's coverage は 0.92 以上の値を示し、本研究で得た 16S rRNA 遺伝子配列数は各廃水処理汚泥の微生物群集構造を解析するために十分であることが示唆された。サンプル 1-16 について見ると、Chao1, Shannon, PD の値がそれぞれ 30917, 9.82, 435 と全汚泥サンプル中で最も高く、Simpson Index の値も 0.98 と高い evenness を示した。既往の研究により、下水処理汚泥は比較的高い多様性を示すことが報告されている³⁾。本研究のサンプル 1-16 は下水処理汚泥であるため多様性が高かったものと考えられた。一方、高温メタン発酵汚泥であるサンプル 24, 25 は他の汚泥サンプルと比較して低い多様性を示した。この原因の一つとして、高温条件下では、メタン生成古細菌等の種が限られることが挙げられる。本研究においても、サンプル 24, 25 に存在するメタン生成古細菌のうち 90%以上を *Methanothermobacter* 属に近縁な微生物が占めており、この結果は他の高温性メタン生成反応槽で得られた結果と同じであった⁴⁾。

(2) 高次未培養系統分類群の存在パターン

各種廃水処理汚泥中に高頻度に存在する門レベルで未培養な系統分類群の存在分布を図-1A, QIIME を用いて各種廃水処理汚泥中に高頻度に存在する門レベルで未培養な系統分類群 (WWE1, GN04, WS3, GN02, FCPU426, OD1, Hyd24-12, OP8, OP9, unclassified phylum) を属レベルで分類し、各種系統分類群の存在割合をヒートマップで表したものを図-1B に示す。

a) Candidate phylum WWE1

WWE1 は、糞殻を基質とした中温 CSTR 汚泥 (サンプル 17-20)、糖蜜廃水を処理する中温 UASB 汚泥 (サンプル 26) においてそれぞれ約 6.5%, 8.2%と高頻度に検出された (図-1A)。既往の報告においても、WWE1 は中温メタン消化汚泥において高頻度に検出されており、同様の結果が得られた⁵⁾。属レベルの解析において、'*Candidatus Cloacamonas*' 属⁶⁾に属する系統分類群は中温 CSTR 汚泥 (サンプル 18) でのみ 2.0%以上検出され、他の嫌気性廃水処理汚泥ではほとんど検出されなかった。近年のゲノム解析により、'*Candidatus Cloacamonas*' 属に属する系統分類群はプロピオン酸酸化経路を持つこと⁶⁾が明らかとなっており、廃水処理汚泥中で水素酸化性微生物群と共生して有機酸酸化を行っている可能性が示唆された。BHB21 グループに属する系統分類群は、糞殻を基質とした中温 CSTR 汚泥 (サンプル 17-20) で約 5.5%と高頻度に検出された (図-1B)。本グループの微生物は運転開始直後で約 7.8%存在していたが、運転 65 日目で約 2.8%まで減少した。本反応槽には食品工場廃水を処理する中温性嫌気性グラニュール汚泥を植種汚泥として用いていることから、BHB21 グループに属する系統分類群は食品工場廃水由来の基質を好む微生物群である可能性が考えられた。一方、WWE1 に属する他の未培養グループは高濃度焼酎蒸留廃水を処理する高温 MS-UASB 汚泥 (サンプル 24) に W22 グループ、海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 44) に Unclassified *Cloacamonales*、産業廃水を処理する UASB 槽の後段に設置した中温 DHS 汚泥 (サンプル 52-54) と糖蜜廃水を処理する中温 UASB 汚泥 (サンプル 26) に W5 グループが、それぞれ 3.5%, 2.0%, 約 2.6%, 8.0%と比較的多く検出された (図-1A, B)。これまで、WWE1 は主に中温嫌気性廃水処理汚泥から検出されており⁵⁾、高温 MS-UASB 汚泥 (サンプル 24)、中温 USB 汚泥 (サンプル 44)、中温 DHS 汚泥 (サンプル 52-54) で検出された WWE1 に属する系統分類群は嫌気性廃水処理汚泥で検出された系

統分類群と異なる生育条件を持つ可能性が考えられた。WWE1 に属する他の未培養グループが検出された生態パターンに着目すると、W22 グループに属する系統分類群は嫌気性かつ高温条件下で生育可能な微生物群である可能性が考えられた。W5 グループに属する系統分類群は嫌気性、中温性で生育可能かつ糖濃度の高い廃水種に生育する可能性が考えられた。

b) Candidate phylum GN04

GN04 はビール工場廃水を処理する実規模中温 UASB 汚泥 (サンプル 27-28)、同機のメタン生成脱窒汚泥 (サンプル 29-30) においてそれぞれ約 4.0%、約 6.9%と高頻度に検出された (図-1A)。特に GN15 グループに属する系統分類群はメタン生成脱窒汚泥 (サンプル 29, 30) において平均約 6.0%と高頻度に検出されたが、通常メタン生成汚泥 (サンプル 27, 28) においては、平均約 3.5%であった。これらの結果から、GN04 門の GN15 グループに属する系統分類群は中温性で生育し、処理槽内で窒素除去に関与している可能性が考えられた。これまで、GN04 に属する系統分類群は高濃度塩含有微生物マット、深海底メタン噴出口堆積物などで検出されている^{7), 8)}が、環境中で優占して検出された例は無く、さらにゲノム解析などによる代謝機能推定の情報も今のところ無い。高濃度塩含有微生物マットでは、GN15 グループに属する系統分類群が比較的多く検出 (最大約 2%) されており、微生物マットの深さ 49 mm (=深さ 1-49 mm の間で 10 地点を採取) の地点で最大の存在割合を示した⁸⁾。深さ 49 mm 地点は硫酸還元後の硫化物が存在する環境であることから、GN15 グループに属する系統分類群は嫌気性微生物である可能性が示唆されていた⁸⁾。

c) Candidate phylum WS3

WS3 はビール工場廃水を処理する実規模中温 UASB 汚泥 (サンプル 27-28)、同機のメタン生成脱窒汚泥 (サンプル 29-30)、海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 44-45)、鉄を電子受容体として添加したメタン酸化汚泥 (サンプル 50)、産業廃水を処理する好気性 DHS 汚泥 (サンプル 51) において広く検出された (図-1A)。またゲノム解析により、WS3 に属する系統分類群は糖類やアミノ酸を広く利用できることが明らかにされている⁹⁾。そのため、WS3 に属する系統分類群は好気/無酸素/嫌気性条件を問わず広く存在し、糖やアミノ酸などの分解を担っている可能性が考えられた。属レベルの解析結果において、GN03 グループに属する系統分類群は海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 44)、鉄を電子受容体として添加したメタン酸化汚泥 (サンプル 50) においてそれぞれ 2.7%、3.2%と比較的多く検出された (図-1B)。KSB4 グループに属する系統分類群は海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 45)、産業廃水を処理する好気性 DHS 汚泥 (サンプル 51) においてそれぞれ 1.7%、3.4%と比較的多く検出された。GN03 および KSB4 グループに属する系統分類群は嫌気性条件下ではほとんど検出されず、無酸素もしくは好気性廃水処理槽において検出されていることから、好気性もしくは無酸素性の微生物群である可能性が示唆された。GN03 グループに属する系統分類群は鉄を電子受容体として添加したメタン酸化汚泥 (サンプル 50) において高頻度に検出されていた。SSS58A グループに属する系統分類群はビール工場廃水処理メタン生成汚泥 (サンプル 27, 28) において約 1.9%と比較的多く検出された。処理水循環後のメタン生成脱窒汚泥 (サンプル 29, 30) では約 0.8%と存在割合が減少していることから、SSS58A グループに属する系統分類群は、嫌気性を好む微生物群である可能性が考えられた。

d) Candidate phylum GN02 and OD1

GN02 と OD1 は無加下水処理 DHS 槽の後段に設置した A₂SBR 汚泥 (サンプル 31-36) において高頻度に検出され、特にサンプル 35 と 36 でそれぞれ約 8.1% (GN02)、約 2.6% (OD1) と高頻度に検出された (図-1A)。GN02 と OD1 は A₂SBR の運転日数が長くなるにつれ、存在割合が増加していることから、この門に属する系統分類群は窒素もしくはリン除去に関与している可能性が考えられた。近年の研究により、GN02 と OD1 のシングルセルゲノム解析が行われ、代謝機能が推定された^{9), 10)}。GN02 の BD1-5 グループに属する系統分類群は 24%以下の低 GC 含量であったため、窒素ガスを利用できないことが示唆された⁹⁾。また、BD1-5 グループと OD1 に属する系統分類群は TCA 回路などのほとんどの電子伝達系複合体を欠いていることから、偏性嫌気性微生物群である可能性が示唆された¹⁰⁾。一方、ゲノム解析や検出される環境 (硫黄や硫化物が豊富な無酸素環境) から、OD1 に属する系統分類群は硫黄循環に関与していると予測されている¹⁰⁾。そのため、GN02 と OD1 は廃水中の有機物の発酵もしくは硫黄循環に関与している可能性が考えられた。

e) Candidate phyla FCPU426 and Hyd24-12

FCPU426 は、籾殻を基質とした中温 CSTR 汚泥 (サンプル 17-20) において、平均約 4.2%と高頻度に検出された (図-1A)。しかしながら、運転開始直後において 10%以上存在していた FCPU426 に属する系統分類群の存在割合は運転 65 日目で約 2.3%まで減少した。本反応槽には食品工場廃水を処理する中温性嫌気性グラニューール汚泥を植種汚泥として用いていることから、FCPU426 に属する系統分類群は中温性、嫌気性かつ食品工場廃水由来の基質を好む微生物群である可能性が考えられた。これまで、FCPU426 に属する系統分類群は泥炭層において高頻度に検出された報告がある¹¹⁾が、その代謝機能などについては未だ解明されていない。

Hyd24-12 はメタン生成汚泥、塩含有水中の窒素除去汚泥、好気性 DHS 汚泥において広く検出されたが、特に塩含有水中の窒素除去汚泥 (サンプル 43) において 4.0%と高頻度に検出された (図-1A)。これまで、Hyd24-12 は高濃度塩含有微生物マットや海綿などから検出されており^{9), 12)}、塩濃度の高い環境下で生育できる可能性が示唆された。しかしながら、Hyd24-12 の機能推定などに関する情報は今のところ報告されていない。

f) Candidate phyla OP8 and OP9

OP8, OP9 に属する系統分類群はメタン生成汚泥において広く検出され、特に焼酎蒸留廃水を処理する高温メタン生成汚泥中 (サンプル 24) でそれぞれ 2.2%、3.4%と高頻度に検出された (図-1A)。OP8 に属する系統分類群は中温もしくは高温性メタ

ン生成汚泥において広く検出され、高温性、高負荷の嫌気性廃水処理汚泥において比較的高頻度に検出されることが報告されている¹³⁾。本研究において、OP8 が比較的多く検出された汚泥は高濃度の焼酎蒸留廃水処理汚泥であることから、本研究での生態解析結果は既往の報告と同様の傾向であった。また、OP8 のシングルセルゲノム解析により、OP8_1 グループに属する系統分類群は多種のアミノ酸や糖類を利用できることが明らかとなり、さらに好気性条件下で芳香化合物の分解が可能であることが示唆された⁹⁾。OP9 に属する系統分類群においても、多種のアミノ酸や糖類を利用できることが明らかとなった⁹⁾。そのため、本研究で検出された OP8, OP9 に属する系統分類群は廃水中のアミノ酸や糖類の分解に関与している可能性が考えられた。

g) Unclassified phylum

Greengenes ver. 13_5 に基づき系統分類を行った結果、どの門にも属さない系統分類群が高温 MS-UASB 汚泥 (サンプル 24)、海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 40) でそれぞれ 8.4%, 4.0% と高頻度に検出された (図-1A)。属レベルでの解析の結果、Unclassified phylum として検出された未培養系統分類群は、2 種の系統に分類できることがわかった (図-1B)。Unclassified phylum 1 は高温 MS-UASB 汚泥 (サンプル 24) でのみ 7.1% と高頻度に検出された。BLAST による 16S rRNA 遺伝子の相溶性検索の結果、この系統分類群は *Dictyoglomi* 門に属する *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 (NR_043385) と相溶性が 84% (215/257 bp) であった。*Dictyoglomus* 属細菌は高温性、偏性嫌気性かつ化学有機栄養性などの特徴を持つことが知られている¹⁴⁾。Unclassified phylum 1 が検出された汚泥は高温嫌気性焼酎蒸留廃水処理汚泥であり、高温性、嫌気性かつ焼酎蒸留廃水由来の基質を処理している汚泥である。その環境条件は *Dictyoglomus* 属細菌の特徴と似通っており、Unclassified phylum 1 は 16S rRNA 遺伝子の相溶性は低いものの、*Dictyoglomus* 属細菌と類似した性質を持つのではないかと考えられた。Unclassified phylum 2 は海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥 (サンプル 39, 40, 44) で、それぞれ 1.6%, 3.9%, 1.5% と高頻度に検出された。BLAST による 16S rRNA 遺伝子の相溶性検索の結果、この系統分類群は *Firmicutes* 門に属する *Caldicoprobacter guelmensis* D2C22 (NR_109614) と相溶性が 87% (220/254 bp) であった。*Caldicoprobacter* 属細菌は高温性もしくは高度好熱性、嫌気性かつキシラン分解性であることが報告されている¹⁵⁾が、Unclassified phylum 2 が検出された環境は海洋生物飼育水を処理する中温 USB 汚泥であり、この系統分類群はこれまでに分離されている最近縁種とは生育条件が異なる可能性が考えられた。

4. おわりに

本研究では、嫌気性、無酸素性もしくは好気性の様々な廃水処理汚泥を採取し、超並列 16S rRNA 遺伝子シーケンシングによる高次未培養微生物群の生態把握を試みた。 α 多様性解析の結果、本研究で用いた超並列 DNA シーケンシングの解析深度は下水処理 UASB 汚泥の解析深度を除いて十分であった。ヒートマップを用いて高次未培養系統分類群の存在パターンを調査した結果、門レベルで未培養な WWE1, GN04, WS3, GN02, FCPU426, OD1, Hyd24-12, OP8, OP9, Unclassified phylum に属する高次未培養系統分類群の生態を把握することが可能であった。

参考文献

- 1) Caporaso *et al.*, Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms, *ISME J*, Vol. 6, No. 8, pp. 1621–1624, 2012.
- 2) Caporaso *et al.*, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat Methods*, Vol. 7, No. 5, pp. 335–336, 2010.
- 3) Sundberg *et al.*, 454-pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters, *FEMS Microbiol Ecol*, Vol. 85, No. 3, pp. 612–626, 2013.
- 4) Sekiguchi *et al.*, Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology*, Vol. 144, pp. 2655–2665, 1998.
- 5) Chouari *et al.*, Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 71, No. 4, pp. 2145–2153, 2005.
- 6) Pelletier *et al.*, “*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division, *J Bacteriol*, Vol. 190, No. 7, pp. 2572–2579, 2008.
- 7) Nunoura *et al.*, Microbial diversity in deep-sea methane seep sediments presented by SSU rRNA gene tag sequencing, *Microbes Environ*, Vol. 27, No. 4, pp. 382–390, 2012.
- 8) Harris *et al.*, Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat, *ISME J*, Vol. 7, No. 1, pp. 50–60, 2013.
- 9) Rinke *et al.*, Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter, *Nature*, Vol. 499, No. 7459, pp. 431–437, 2013.
- 10) Wrighton *et al.*, Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla, *Science*, Vol. 337, No. 6102, pp. 1661–1665, 2012.
- 11) Serkebaeva *et al.*, Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions, *PLoS One*, Vol. 8, No. 5, pp. 1–14, 2013.
- 12) Simister *et al.*, Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms, *Environ Microbiol*, Vol. 14, No. 2, pp. 517–524, 2012.
- 13) Sekiguchi, Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methane fermentation processes, *Microbes Environ*, Vol. 21, pp. 1–15, 2006.
- 14) Saiki *et al.*, *Dictyoglomus thermophilum* gen. nov., sp. nov., a chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium, *Int J Syst Bacteriol*, Vol. 35, No. 3, pp. 253–259, 1985.
- 15) Yokoyama *et al.*, *Caldicoprobacter oshimai* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, xylanolytic, extremely thermophilic bacterium isolated from sheep faeces, and proposal of *Caldicoprobacteraceae* fam. nov., *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol. 60, pp. 67–71, 2010.