

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K04673

研究課題名（和文）嫌気性廃水処理プロセスに生息する未培養微生物の分離培養

研究課題名（英文）Isolation of uncultured microorganisms residing in anaerobic wastewater treatment processes

研究代表者

井口 晃徳 (Iguchi, Akinori)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

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）：嫌気性廃水処理プロセスに生息する機能上重要と考えられる未培養微生物の分離培養とその生理学的諸性質の調査を実施した。具体的には、申請者らによって分離培養を行ったCloacimonetes候補門細菌とCryoseri-cota候補門細菌の生理学的諸性質の調査と、水酸化テトラメチルアンモニウム分解メタン生成古細菌およびモノエタノールアミン分解細菌の分離培養を行い、その菌学的な特徴づけを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタン発酵プロセスに代表される嫌気性廃水処理プロセスは省エネ・低炭素な廃水処理方法として認知されている一方、多様な未知の嫌気性細菌群によって遂行されていることから、その詳細なメカニズムは不明のままである。本研究は、嫌気性廃水処理プロセスにおいても機能上特に重要と考えられる、これまで全く分離例の存在しない微生物を分離培養し、その性質を明らかにしている。本研究の成果は将来的に嫌気性廃水処理プロセスの効率化や高度化に資するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：We have isolated uncultured microorganisms of functional importance in anaerobic wastewater treatment processes and investigated their physiological properties. Specifically, we investigated the physiological properties of new isolates of candidate Cloacimonetes and Cryoseri-cota. In addition, we isolated and characterized physiologically TMAH-degrading methanogenic archaea and monoethanolamine-degrading bacteria.

研究分野：環境微生物学

キーワード：嫌気性廃水処理 未培養微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロバイーム解析および環境ゲノム解析といった培養を伴わない分子生物学的手法による研究アプローチは、現代の環境微生物学研究において最も注目度の高い研究トピックのひとつとなっている。一方、微生物の構成比率やゲノム情報のみでは本来微生物の有する機能を完全に掌握することは、現時点においては極めて困難とされる。ゲノム情報から微生物の機能を推定するロジックの根幹は、既知の遺伝子との相同性によって、環境中から検出された遺伝子の機能を推定するところにある。未だに培養されていない微生物の遺伝子が多くの機能未知の遺伝情報を有していると考えるのはごく自然であり、すなわち比較対象となる遺伝子の機能や役割が明確にならない限り、未知の遺伝情報から機能を推定することは事実上不可能である。未培養微生物を生きた状態で分離培養し、その表現型を詳細に解明することの重要性は、環境ゲノム解析が適用されるほど大きくなりつつある。

一方で、廃水処理プロセスを含む、地球上に生息する大部分の微生物は人為的に培養することが極めて困難とされ、環境微生物の真の実体は未だに不明であるという過言ではない。これら未知の微生物(未培養微生物)を分離培養し、知られざる機能を解明し、さらにそれを引き出すことができれば、これまでとは全く異なるアプローチで廃水処理の効率化や最適化につなげることができる可能性がある。

しかし、環境ゲノム情報は飛躍的に蓄積されていく一方、嫌気性廃水処理プロセスに生息する未培養微生物の可培養化は、1. そもそも培養自体に高度なハンドリング技術が必要であり、形式知のみならず「暗黙知」も含めたノウハウを要する場合が多いこと、2. 嫌気性細菌の多くは発酵でわずかなエネルギーを獲得する代謝系を有するものがほとんどであることから、増殖速度が極めて遅いこと、3. 研究成果のアウトプットのスピードや、研究内容そのものの新規性を重視する昨今の研究事情から、時間のかかる研究トピックに現代の研究者は手を出さないといった理由から、ほとんど進展を見せないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記に挙げた問題点を克服し、嫌気性廃水処理プロセスに生息する機能上重要と考えられる未培養微生物を分離し、生理学的な性質を明らかにすることである。最終的な目標は、ゲノム情報だけでは引き出すことのできなかった未培養微生物の新たな可能性を見出し、微生物学的なアプローチによる全く新しい嫌気性廃水処理プロセスの確立することである。

具体的に、本研究では、以下の細菌についての生理学的性質および分離培養を実施した。

- (1) 新規 Cloacimonetes 候補門細菌および新規 Cryosericota 候補門細菌の生理学的性質
- (2) 水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) を分解可能なメタン生成古細菌の分離培養と生理学的性質
- (3) モノエタノールアミン (MEA) 分解細菌の分離培養

3. 研究の方法

(1) 分離培養

TMAH および MEA 分解細菌の分離培養源には、電子産業排水を模した人工排水を処理するラボスケールサイズの低温 UASB リアクターのグラニューロ汚泥を使用した。分離に用いた培地は、Widdel 無機塩培地に各種有機物を添加したものをを使用した。分離培養は、6-well plate method によるシングルコロニーアイソレーションおよび限界希釈法と継代培養を繰り返すことで実施した。

(2) 生理学的性質調査

分離株の生理学的性質は、基質利用能、生育温度、生育 pH、電子受容体の利用能について実施した。また Cloacimonetes 候補門細菌および新規 Cryosericota 候補門細菌については、水素資化性メタン生成古細菌との 2 者培養を実施することで、有機酸の利用能について調査した。

4. 研究成果

(1) Cloacimonetes 候補門細菌および Cryosericota 候補門細菌の生理学的性質

a) 各種分離株の生理学的性質

本課題の以前における研究成果において、我々は門レベルの新規真正細菌である Cloacimonetes 候補門細菌 NY-MAS 株および Cryosericota 候補門細菌 NY-SETRAS の分離培養に成功している。はじめにこれらの細菌群の単独培養における基質利用能を調査した。具体的には、acetate, butyrate, formate, fumarate, glutamate, lactate, malate, propionate, pyruvate, succinate, L-arginine, L-cysteine, arabinose, fructose, galactose, glucose, inositol, lactose, mannose, raffinose, sucrose, xylose, CH₄, methanol, ethanol, 2-propanol, starch, casamino acids, polypeptone, yeast extract について利用能を調査し

た。結果、NY-MAS 株では yeast extract が、NY-SETRAS では pyruvate を基質とした培養系で明確な増殖を確認できた一方、プロピオン酸や酢酸といったメタン発酵系で蓄積しやすい揮発性脂肪酸については単独での分解は見られなかった。

b) メタン生成古細菌との共生による生育能の変化

一方、これらの細菌は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法によるグラニューール汚泥内の空間分布や、当該微生物を含む汚泥短時間培養と rRNA 遺伝子発現解析により、プロピオン酸や酢酸などの揮発性脂肪酸をメタン生成古細菌との共生によって分解する可能性が示唆されていた。そのため、上記 2 種の分離株を用い、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanospillirum hungatei* JF1 株と人為的な 2 者培養系を構築し、酢酸もしくはプロピオン酸を基質として培養を実施した。培養の前後で NY-MAS および NY-SETRAS の増殖が行われたかを確認するため、リアルタイム PCR 法による各細菌の定量を実施した結果、NY-MAS においてはプロピオン酸 (10 mM) を添加した系で、NY-SETRAS は酢酸 (10 mM および 30 mM) を添加した系で増殖が確認された。このことより、NY-MAS および NY-SETRAS はメタン発酵リアクター内では、水素資化性メタン生成古細菌との共生により、メタン発酵において分解の律速になる揮発性脂肪酸の分解に関与している可能性が示唆された。

(2) TMAH を分解可能なメタン生成古細菌の分離培養

a) 分離培養

TMAH/IPA 含有廃水を処理する UASB 汚泥を汚泥を植種として、TMAH を含むゲランガム Widdel 固体培地を用いて限界希釈法による分離培養を試みた。継代 3 回目の集積培養系において、*Methanomethylovorans* 属古細菌様の形態を示す細胞が多数確認され、また F₄₂₀ 自家蛍光観察結果からそれらがメタン生成古細菌であることが示された。培養 58 days における Image J を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析の結果では、原核生物に対する *Methanomethylovorans* 属古細菌の割合は 92.1% と高い割合で存在していることが判明した一方で、*Methanomethylovorans* 属古細菌とは明らかに異なる真正細菌も検出されていることから、純粋培養には至っていないと考えられた。この集積培養液を継代し、さらに真正細菌の抗生物質である Vancomycin (40 µg/ml) を添加して培養を行い (継代 4 回目)、再度継代培養を行った (継代 5 回目)。位相差顕微鏡観察においては、*Methanomethylovorans* 属古細菌と思われる形状を有する細胞のみが大半を占めており、それとは異なる形状の細胞は認められなかった。F₄₂₀ 自家蛍光観察結果においては、検出されるすべての細胞から自家蛍光が確認されたことから、これらはすべてメタン生成古細菌であると判断できた。次世代シーケンス解析の結果では、検出されたすべての 16S rRNA 遺伝子のリードは *Methanomethylovorans* 属古細菌に分類された。以上の結果から、継代 5 回目において標的とする *Methanomethylovorans* 属古細菌 NY-STAYD 株の分離培養に成功したと判断した。

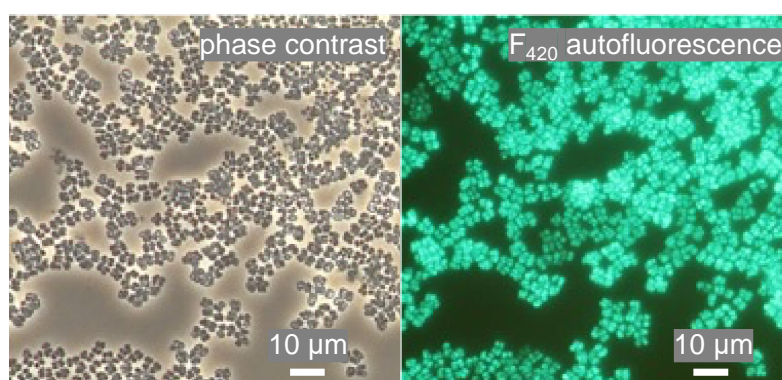


図-1 NY-SETRAS 株の位相差観察および F₄₂₀ 自家蛍光観察結果

b) 分離株の生理学的性質

NY-STAYD 株の生育温度調査結果を図-2 に示す。結果、分離株は 15 から 37 の範囲で増殖が認められた。最大比増殖速度は 37 が最も高かったものの、継続して培養を行うと 1 ヶ月ほどで溶菌することが認められた。一方、培養温度 25 では、比増殖速度は 37 には劣るものの、1 ヶ月における菌体収量が検討したすべての条件中で最大値を示し、また 37 と比較して数ヶ月の長時間培養でも溶菌が認められなかった。このことから、

NY-STAYD 株は低温条件下での UASB リアクターにおいてニッチを獲得し、TMAH の分解に寄与していたものと考えられる。

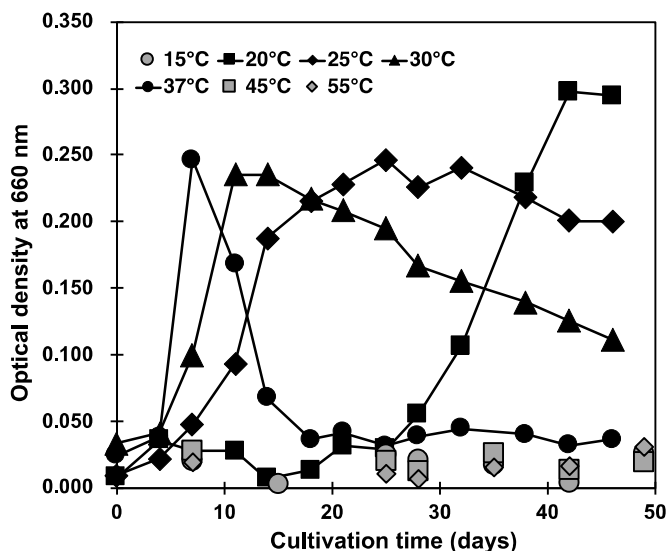


図-2 NY-STAYD 株の 15 ~55 における増殖挙動

NY-STAYD 株の生理学的性質を調査し、同じ *Methanomethylovorans* 属の既知株 3 つの生理学的性質と併せて表-1 にまとめた。

表-1 NY-STAYD 株および既知株 3 つの生理学的性質

Characteristic	<i>Methanomethylovorans</i> sp. NY-STAYD (This study)	<i>Methanomethylovorans. uponensis</i> EK1 ^T (Cha <i>et al.</i> , 2013)	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DMS1 ^T (Lomans <i>et al.</i> , 1999)	<i>Methanomethylovorans thermophila</i> L2FAWT ^T (Jiang <i>et al.</i> , 2005)
Habitat	UASB reactor	Wetland	Eutrophic lake	UASB reactor
Growth Temp. (°C)	15-37	25-40	12-40	42-58
Growth pH	6.5-7.0	5.5-7.5	6.0-8.0	5.5-7.5
NaCl conc. (M)	0	0-0.1	0-0.3	0-0.2
Utilization of:				
TMAH	+	-	-	-
Trimethylamine	+	+	+	+
Dimethylamine	+	+	+	+
Monomethylamine	+	+	+	+
Methanol	+	+	+	+
Dimethyl sulfide	+	+	+	-
Methanethiol	+	+	+	-
2-propanol	W	-	-	-
Formate	-	-	-	-
Acetate	-	-	-	-
SDS sensitivity (w/v) (%)	Not lysed at 1	Not lysed at 0.1	Not lysed at 1	Not lysed at 0.1
G+C content Mol%	44.7	39.2	34.4 ^a	37.6

これらの結果から、NY-STAYD を含めたすべての *Methanomethylovorans* 属メタン生成古細菌は、モノメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミンを分解・メタン化することが可能である一方、*Methanomethylovorans* 属の分離株なかでは唯一 NY-STAYD 株のみが 4 級アミンである TMAH を分解可能であることが判明した。このことから、TMAH を分解可能な *Methanomethylovorans* 属古細菌としては初めての分離株であった。

c) グラニュール汚泥中の空間分布

分離培養した NY-STAYD 株が実際の UASB グラニュール汚泥内でどのような形態で存在しているかを明らかにするため、分離源に利用したグラニュール汚泥の切片を作成し、レーザー共焦点顕微鏡を用いた切片 FISH 法を適用し、空間分布の把握を実施した。NY-STAYD 株をはじめとする *Methanomethylovorans* 属古細菌を検出するための DNA プロブ Mmv667-IGC を Arb software を用いて設計した。真正細菌を検出する EUB338-Cy5 プロブと Mmv667-Cy3 プロブを用いて 2 重染色を実施した結果を図- に示す。

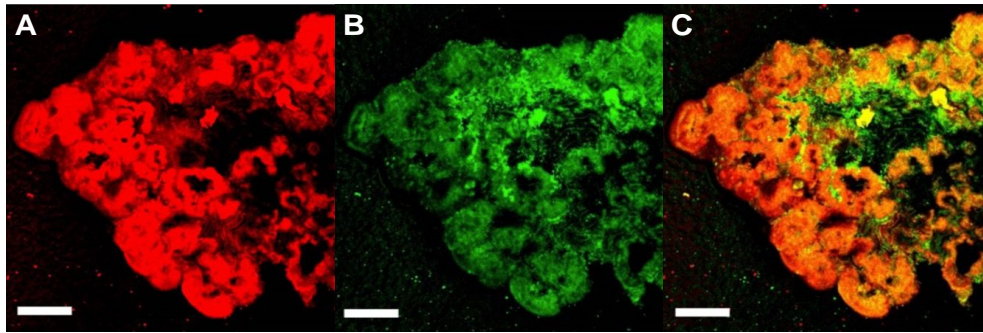


図- 切片 FISH 法による蛍光観察. A; Mmv667-Cy3 由来の蛍光 (赤), B; EUB338-Cy5 由来の蛍光 (緑), C; A と B の重ね合わせ. A~C はすべて同一視野による観察. スケールバーは 200 μm .

Mmv667 プローブで陽性となる細胞はグラニュールの表面側に位置し、EUB338 で陽性となる細胞はそのやや内側に存在していた。NY-STAYD 株は共生関係と伴わず、排水に含まれる TMAH をダイレクトに利用するため、グラニュールの表面側に位置していたものと思われる。糖類を主成分とする排水を処理する UASB グラニュール汚泥は、多様な微生物をグラニュール汚泥内に内包し、さらにそれらが共生関係を構築することでグラニュールの形状を保つとされる。一方、NY-STAYD 株は単独で TMAH をメタンにまで分解できることから、これらの古細菌が優占することによって、グラニュールの微細化や崩壊のリスクが想定される。将来的に本分離株の詳細な特性が理解されることにより、最適な TMAH 処理 UASB リアクターの運転方法にフィードバックできると思われる。

(3) MEA を分解可能な真正細菌の分離培養

MEA を含む電子産業廃水を模擬した合成廃水を良好に処理する低温 (18-19°C) UASB リアクターのグラニュール汚泥を分離源に、MEA 分解細菌の分離培養を試みた。嫌気コロニー形成法である 6-well plate method によるシングルコロニーアイソレーションと、液体培養による限界希釈法で行った。培地は Widdel 無機塩培地に微量の Yeast Extract と MEA を 300~1500 mg-COD/L 添加したものをを使用した。培養から 17 day 後、形成されたコロニーをランダムに 24 個選択し、液体培地に個別に植菌し、25°C での液体培養を開始した。培養開始から 13 day 後の微生物群集構造を調べた結果、*Sporomusaceae* 科に属する未培養細菌が培養されていることが示唆された。さらに液体培養に基づく限界希釈法を実施したところ、5 回の限界希釈と継代培養により、*Sporomusaceae* 科未培養細菌と *Williamwhitmaniaceae* 科未培養細菌の分離培養に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 井口 晃徳, 加納 佑也, 五十嵐 祐希, 貝沼 朱夏, 堀 沙織里, 野村 一樹, 山口 利男, 小瀬 知洋, 重松 亨	4. 巻 75(7)
2. 論文標題 メタン発酵プロセスにおいてオクタデカンの分解に直接的に関与する嫌気性微生物群の探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 土木学会論文集G (環境)	6. 最初と最後の頁 145-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscej.75.7_III_145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iguchi Akinori, Takemura Yasuyuki, Danshita Tsuyoshi, Kurihara Takuya, Aoki Masataka, Hori Saori, Shigematsu Toru, Syutsubo Kazuaki	4. 巻 107
2. 論文標題 Isolation and physiological properties of methanogenic archaea that degrade tetramethylammonium hydroxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3047 ~ 3056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-023-12488-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井口 晃徳, 竹村 泰幸, 青木 仁孝, 段下 剛志, 上石 唯, 栗原 拓也, 堀 沙織里, 重松 亨, 珠坪 一晃
2. 発表標題 有害化学物質を処理する嫌気性廃水処理プロセス内の重要微生物の分離培養と遺伝学的・表現型の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口 晃徳
2. 発表標題 微生物叢解析からアプローチする新たな食品産業技術 -腸内細菌から排水処理まで-
3. 学会等名 新潟県新たな米産業創出技術研究会 シーズ検討会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原 拓也, 倉島 優仁, 堀 沙織里, 井口 晃徳, 重松 亨, 段下 剛志, 竹村 泰幸, 珠坪 一晃
2. 発表標題 電子産業廃水中の有害化学物質を分解するメタン生成古細菌の生理学的性質および分解経路の解明
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会 (2020年度)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 拓也, 倉島 優仁, 堀 沙織里, 井口 晃徳, 重松 亨, 段下 剛志, 竹村 泰幸, 珠坪 一晃
2. 発表標題 電子産業廃水中の有害化学物質を分解するメタン生成古細菌の生理学的性質および分解機構の解明
3. 学会等名 土木学会関東支部新潟会 第38回研究調査発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井口 晃徳, 島田 昌幸, 堀 沙織里, 重松 亨
2. 発表標題 高温メタン発酵リアクターにおけるPET樹脂分解に関与する微生物群の集積・同定
3. 学会等名 土木学会関東支部新潟会 第38回研究調査発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Kurihara, Yuto Kurashima, Tsuyoshi Danshita, Yasuyuki Takemura, Saori Hori, Toru Shigematsu, Kazuaki Syutsubo, Akinori Iguchi
2. 発表標題 Isolation and Characteristics Properties of a Methanogenic Archaeon Decomposing Hazardous Chemicals in Electronics Industrial Wastewater.
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference online 2020 (WET2020-online) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuaki Syutsubo, Tsuyoshi Danshita, Haruhiko Sumino, Akinori Iguchi, Yasuyuki Takemura, Hideaki Sonaka, Takashi Yamaguchi
2. 発表標題 Evaluation of microbial properties of the granular sludge developed in the psychrophilic UASB reactor fed with an electronics industry wastewater.
3. 学会等名 16th IWA World Conference on Anaerobic digestion proceedings (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井口 晃徳
2. 発表標題 微生物叢(マイクロバイオーム)解析の実際 -方法論と適用例について-
3. 学会等名 米及び加工食品の新市場創出に向けたマッチングフォーラム in にいがた 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 拓也、倉島 優仁、段下 剛志、竹村 泰幸、惣中 英章、堀 沙織里、重松 亨、井口 晃徳、珠坪 一晃
2. 発表標題 水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) 分解能を有するMethanomethylorans属古細菌の分離培養
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 拓也、段下 剛志、倉島 優仁、堀 沙織里、重松 亨、惣中 英章、竹村 泰幸、井口 晃徳、珠坪 一晃
2. 発表標題 電子産業廃水に含まれるTMAHおよびIPA分解能をもつメタン生成古細菌の分離培養
3. 学会等名 土木学会関東支部新潟会 第37回研究調査発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井口 晃徳
2. 発表標題 メタン発酵による電子産業廃水処理と重要微生物の分離培養
3. 学会等名 第9回新潟産学官連携フォーラム 『令和の事業展開 SDGs でビジネスチャンスを広げる 』
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 拓也, 倉島 優仁, 堀 沙織里, 井口 晃徳, 重松 亨, 段下 剛志, 惣中 英章, 竹村 泰幸, 珠坪 一晃
2. 発表標題 電子産業廃水に含まれる有害化学物質を分解するメタン生成古細菌の分離培養および生理学的性質の検討
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会 (2019年度)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井口 晃徳
2. 発表標題 大規模遺伝子解析時代において微生物を分離培養する意義
3. 学会等名 日本畜産環境学会第20回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口 晃徳, 栗原 拓也, 堀 沙織里, 山口 利男, 重松 亨, 段下 剛志, 竹村 泰幸, 青木 仁孝, 珠坪 一晃
2. 発表標題 低温メタン発酵プロセスから分離されたTMAH分解メタン生成古細菌の遺伝的・生理的機能解析
3. 学会等名 第25回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中原望, 延優, 関口勇地, 井口晃徳
2. 発表標題 嫌気性プロピオン酸化と複合微生物系の関係
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口 晃徳
2. 発表標題 嫌気性廃水処理プロセスに生息する門レベルの未培養系統群に属する真正細菌の分離培養
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 水酸化テトラメチルアンモニウム分解能を有するメタン生成古細菌	発明者 井口晃徳, 珠坪一晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-040752	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------