

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19964

研究課題名（和文）機能ベースの環境微生物ネットワーク解析による選択的動態予測

研究課題名（英文）Function-based environmental microbial analysis to selectively predict microbial dynamics

研究代表者

青柳 智（Aoyagi, Tomo）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：10812761

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：人工廃水を用いて嫌気消化バイオリアクターを467日間運転した。微生物の環境応答をみるため、運転条件の変更を一時的に行った。消化汚泥に13C酢酸または13Cプロピオン酸を添加し、未知微生物の機能同定技術・高感度SIPを適用し、新規な酢酸、プロピオン酸の共生細菌およびメタン生成菌を同定した。リアクター運転期間を通して、同定した微生物の動態を追跡した結果、有機酸が蓄積したイベント時に、メタン生成菌の存在量は減少した。この時、ほとんどの酢酸酸化共生細菌の存在量は減少したが、プロピオン酸酸化細菌は必ずしも減少しなかった。これらの結果は、それぞれの共生細菌でメタン生成菌への依存度が異なることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工環境における微生物の仲介するプロセスとして最大の発展を遂げている汚泥を用いた廃水処理は、世界中で利用されている。しかし、汚泥を構成する微生物は、その実体を把握されないままに、現場の経験や勘に頼ったプロセスの運用がなされてきた。本研究では、創エネ型の廃水処理である「嫌気性廃水処理」をラボスケールで長期間実施し、安定処理と不安定化の際の各種データを蓄積した。その結果、プロセスの安定・高効率処理に重要な未知微生物群の同定とそれらの生育特性を見出した。本研究成果は廃水処理の高精度な性能予測および汚泥微生物の人為制御に向けた重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Anaerobic digester was fed with synthetic wastewater and operated for 467 days. The operating conditions were temporarily changed to observe the environmental response of the microorganisms. 13C-acetate or 13C-propionate was added to the sludge, and high-sensitivity rRNA-SIP (Stable Isotope Probing) were applied. As a result, novel acetate- and propionate-oxidizing bacteria and methanogens were identified. Dynamics data of the microorganisms identified by the high-sensitivity rRNA-SIP were extracted throughout the reactor operation period. The results showed that methanogens decreased in abundance during events when volatile fatty acids (VFAs) accumulated. Most of the acetate-oxidizing bacteria decreased in abundance at this time, while some propionate-oxidizing bacteria decreased in abundance while others did not. These results suggest that each VFAs-oxidizing bacterium has a different degree of association with methanogens.

研究分野：環境微生物

キーワード：廃水処理 汚泥微生物群集 嫌気消化 酢酸酸化 有機酸 共生細菌 メタン生成菌 高感度SIP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工環境における微生物の仲介するプロセスとして最大の発展を遂げている活性汚泥を用いた廃水処理は、世界中で利用されている。しかし、汚泥を構成する微生物は、その実体を把握されないまま、現場の経験や勘に頼ったプロセスの運用がなされてきた。そのため、過剰な曝気や薬剤を闇雲に投入する、あるいは処理不安定時にはプロセス自体を停止する事態がたびたび起こっている。汚泥中には数万種とも推定されるほど多様な微生物が存在しているが、その中の実に 99% は培養ができない・困難な未知微生物といわれている。

そのような未知微生物の種類や機能を培養を介さずに解明しようとするアプローチが、DNA や RNA を用いた分子生物学的・分子生態学的手法により大きな発展を遂げてきている。特に、2000 年代の次世代シーケンス技術の登場とその後のスピーディな技術進展はめざましく、環境中の DNA や RNA を網羅的に解読し、微生物生態系全体を解明しようとする環境ゲノム解析研究が欧米を中心に精力的に進められており、環境微生物分野はメガ、ギガという単位で塩基配列情報を扱う、まさにビックデータに基づいた環境ゲノム情報時代に突入している。

しかしながら、得られたビックデータは活性汚泥中の微生物生態系を理解し、水処理性能予測や制御に資するほどの適応性や信頼性は未だ有していない。なぜなら、既知の微生物であっても未だ機能不明な遺伝子が 10%~45% 存在し、塩基配列の情報だけでは決して微生物の有する重要な機能は見えてこないためである。

本研究は、高感度安定同位体追跡法(高感度 SIP [Stable Isotope Probing]) の適用により環境中で実際に働いている鍵微生物をあぶり出し、その動態データを微生物ビックデータに統合・融合させることで、廃水処理プロセスの高精度な処理性能予測・微生物動態制御という長年の課題に対する科学的基盤の構築を目指したものである。

2. 研究の目的

本研究は、提案者が従来法に比べて 500 倍の感度増強を実現した未知環境微生物の機能同定法「高感度 SIP」を適用し、1) 廃水処理プロセスにおける鍵微生物の同定すること、2) 廃水処理プロセスにおける処理性能と当該微生物の動態をモニタリングすることを目的とし、最大の目的は得られた結果を統合して新しい安定処理・高効率処理に向けた維持管理技術の基盤を構築することとした。なお本研究では、創エネ型の廃水処理技術「嫌気性廃水処理法(嫌気消化)」を対象とした。

3. 研究の方法

1) 高感度 SIP による嫌気消化プロセスの安定化・高効率化を担う微生物群の同定

嫌気消化プロセスの律速段階である有機酸の高効率処理のために、汚泥中の有機酸分解微生物群を「高感度 SIP」により同定する。本手法は、安定同位体基質を取り込んで重くなった微生物 RNA を超遠心で分離し、その塩基配列を次世代シーケンサーで決定することで、基質を分解・資化する未知微生物を従来法の約 500 倍高感度に特定するものである (Aoyagi *et al.*, *Environ Microbiol Rep* 2015)。以下の 2) で構築した嫌気消化汚泥に、¹³C 標識「酢酸」または「プロピオン酸」(嫌気消化バイオリクターの不安定化の際に蓄積が観察された有機酸) を添加培養し、培養物から RNA を抽出した。同位体標識 rRNA を密度勾配超遠心で「重い」密度画分へと移動させ、¹³C で標識された「重い」rRNA を回収・次世代シーケンサー解析をすることで、酢酸またはプロピオン酸由来の ¹³C を取り込んだ微生物(当該有機酸分解微生物)の同定を試みた。

2) 負荷変動型嫌気消化バイオリクターの長期間運転と環境微生物データの取得

10 L のバイオリクターを用いて、グルコースを主とした人工廃水で連続的に嫌気培養を行い、嫌気消化プロセスを構築した。未知微生物群の生理・性質の解析・考察に足るデータを取得するため、長期間(1 年程度)安定運転を継続した後に負荷を変動し人為的に不安定を誘導した。一定の不安定期間後には、負荷を元に戻し安定運転となるように設定した。リアクターの運転期間を通してメタンガス生成量や系内の有機酸蓄積濃度など物理・化学パラメータをモニタリングすることで、処理性能の安定性を評価した。汚泥中の微生物群集構造は、次世代シーケンサーによる大規模解析により変遷を明らかにした。

4. 研究成果

安定運転時の嫌気消化リアクターの消化汚泥試料を採取し、プロセスの律速段階である酢酸またはプロピオン酸の分解を担う微生物群を高感度 SIP で大規模に同定を試みた。その結果、酢酸またはプロピオン酸分解を担う微生物として、*Smithella* 属や *Syntrophobacter* 属の既知

共生細菌の近縁種を含め、酢酸とプロピオン酸の条件からそれぞれ 8 種同定された。また *Methanoregula* 属等のメタン生成菌による ^{13}C の取り込みも確認された。特に酢酸の分解（嫌気酢酸酸化）を担う微生物はそれによるエネルギー獲得効率が悪いと、環境中からの直接同定は極めて難しいものであるが、高感度 SIP 培養時に酢酸の添加方法を工夫すること（低濃度で複数回の添加）により解決することができた。同定した新規な分解細菌の系統学的な位置を解析したところ、ほとんどが未培養系統群に属したが、酢酸とプロピオン酸の分解細菌はそれぞれまとまったクラスターを形成した。

10L の嫌気バイオリクター装置において、合計で 460 日以上連続運転を行った。運転開始後、52 日目まではバイオガス発生量が不安定であり、低い TOC 除去率および有機酸の蓄積が観察された。その後、297 日目まで一定の運転条件で安定運転（安定な有機物処理・バイオガス生産）が達成された。その後、微生物の環境攪乱への応答をみるために、運転条件を変更（イベント 1：反応容積の増加、イベント 2：リアクター内への窒素曝気）を一時的に行うことで、人為的に不安定化を誘引した。それぞれのイベントで 30 日間以上の連続運転を行い、その後、通常の運転条件に戻すことで処理性能の回復を確認した。処理不安定化時には酢酸とプロピオン酸がそれぞれ最大で約 3 mM と 15 mM の濃度で蓄積され、嫌気消化プロセスの律速物質となっていた。バイオリクター運転期間を通して汚泥微生物を門や綱などの高次系統分類群で解析すると、運転開始後は Firmicutes 門（28%–55%）や Bacteroidetes 門（12%–17%）が優占していた。一方、安定運転時には Alphaproteobacteria 綱（4%–65%）が優占し、メタン生成菌として、Methanomicrobia 綱が 3%–4%、Methanobacteria 綱が 0.7%–8% の割合で存在していた。環境攪乱イベント前後において、微生物群集構造全体の大きな変化は観察されなかった。

高感度 SIP により同定した酢酸とプロピオン酸の分解を担う微生物およびメタン生成菌の個々のデータを、リアクター連続運転で得られた微生物群集構造データセット（180 ライブラリ、合計で約 600 万リード、平均で約 4 万リードの配列データ）の中から抽出し、バイオリクター運転期間における当該微生物群の動態情報を取得した。その結果、酢酸とプロピオン酸の蓄積が見られた環境攪乱イベントにおいて、メタン生成菌およびほとんどの酢酸分解細菌の存在量はメタン生成菌と同様に減少した。すなわち、ほとんどの酢酸分解細菌は酢酸を嫌気的に酸化する際の協力者であるメタン生成菌の動態と共通することが明らかになった。一方でこの時、プロピオン酸分解細菌の存在量は必ずしもメタン生成菌と同調した減少が観察されなかった。これらの事象は有機酸分解細菌の代謝様式の違いを反映していると考えられた。嫌気消化プロセスの安定・高効率処理のためには、これらの微生物代謝機能を維持・活性化が重要となるため、引き続きプロセス系内の網羅的な成分分析と微生物動態の相関解析等を実施し、当該微生物の活性化因子の検証を通して、高精度な処理性能予測・微生物動態制御に向けた科学的基盤の構築を進めてゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳 智
2. 発表標題 高感度rRNA-SIPで迫る嫌氣的酢酸異化代謝を担う微生物
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳 智
2. 発表標題 ユニークなフィールド試料の微生物生態を調べて活かす
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳 智、堀 知行
2. 発表標題 嫌気消化槽におけるメタン生成菌と共生細菌の環境攪乱への応答
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 青柳 智、堀 知行
2. 発表標題 有機酸酸化共生細菌の環境攪乱への応答
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 青柳 智、堀 知行
2. 発表標題 嫌気消化リアクターの環境応答から探る有機酸分解細菌の代謝特性
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	堀 知行 (Hori Tomoyuki) (20509533)		

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
---------	---------