

Synergistota 門細菌新規分類群の集積培養および分離培養の試み

長岡技術科学大学・院工 (非)○荒井優真 (正)幡本将史 (正)渡利高大 (正)山口隆司

1. はじめに

嫌気性消化は、有機性廃棄物を最終代謝産物としてメタンへと変換する複雑な微生物共生系である¹⁾。本技術は、温室効果ガスの排出を削減するだけでなく、バイオ燃料の生成にも寄与する¹⁾²⁾。本研究で対象とした中温条件下の UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) リアクターは、化学工場排水を処理している。UASB リアクターの嫌気性グラニュール汚泥の微生物群集の長期モニタリングの結果、未培養の *Synergistota* 門細菌が継続的に優占していた。*Synergistota* 門は中温から高温のさまざまな嫌気性環境から検出されており、主にアミノ酸分解に関与するとされる嫌気性細菌群である³⁾。本細菌門は、嫌気性処理汚泥に優占的に存在する細菌門の一つであり、処理の重要な部分を担うと考えられるが、分離培養された例が少なく、その機能は未知な部分が多い。

そこで、本研究では既知の分離株の代謝特性に基づき、未培養の *Synergistota* 門細菌の集積培養および分離培養を試みた。

2. 実験方法

本研究では、中温 (35°C) の嫌気性グラニュール汚泥を植種汚泥として用いた。培養には Widdel 培地を用い、基質としてアルギニン (20mM)、グルタミン (20mM)、グルタミン酸 (20mM)、カザミノ酸 (2.0 g/l) をそれぞれ単一で用いた。また、硫黄 (10 g/l)、NaCl (25g/l) を添加した培養系も設定し (表 1)、35°C で嫌氣的に培養を行った。目視にて増殖の認められたサンプルは、位相差顕微鏡により培養された微生物の形態観察を行った。

植種汚泥および集積培養系から未培養 *Synergistota* 門細菌の検出には、16S rRNA 遺伝子を分子マーカーとする分子生物学的手法を用いた。本手法で得られた 16S rRNA 遺伝子配列の Blast search および分子系統樹作成より、系統学的位置を決定した。

3. 結果および考察

植種汚泥の微生物群集構造解析の結果、*Synergistota* 門では科レベルで未培養な JGI-00000079-D21 に分類される ASV1 (10%) および ASV3 (2%)、属レベルで未培養の ASV2 (5%) が優占群として存在していることが明らかとなった (図 1)。これらの未培養の *Synergistota* 門細菌の選択的な培養を試みるために 9 種類の集積培養系を作成した (表 1)。これらの集積培養の結果、ほとんどの培養系では、約 1 週間で微生物の増殖が目視で確認されたが、グルタミン・硫黄系のみ約 1 ヶ月を要した。

次に、16S rRNA 遺伝子解析および Blast search により、各培養系で集積培養された微生物の解析を行った。アルギニン単一系では既知分離株 *Aminomonas paucivorans* が約 65% 優占し、*Synergistota* 門細菌新規分類群 (ASV10) も 14% 検出された。ASV10 はグルタミン・硫黄系でも 61% 優占し、*Caenicola nitrireducens* と約 93% の相同性を示したことから、属レベルの未培養細菌である可能性が示唆される (図 2)。カザミノ酸・硫黄・NaCl 系およびグルタミン酸・硫黄・NaCl 系では *Synergistota* 門細菌新規分類群 (ASV18) が優占した。ASV18 は、SILVA データベース (SSUr138) において未培養細菌系統群「EBM-39」に分類され、既知分離株の *Aminithiophilus ramosus* と約 94% の相同性を示したことから、属レベルでの未培養細菌である可能性が示唆される。*A. ramosus* は嫌気性グラニュール汚泥中の主要な ASV1 と最も近縁であり、16S rRNA 遺伝子配列で約 89% の相同性を示した。ASV10 および ASV18 が優占した集積培養系を同条件で継代培養した結果、アルギニン単一系では ASV10 の優占度が 73% に上昇し、グルタミン・硫黄・NaCl 系およびカザミノ酸・硫黄・NaCl 系では ASV18 の優占度が約 91% に達した。両集積培養系の形態観察では、ASV10 優占系には短桿状 (図 3A)、ASV18 優占系にはやや湾曲した桿状の細胞が観察された (図 3B)。これらの結果は、*Synergistota* 門細菌新規分

Keyword : 嫌気性消化, *Synergistota*, 16S rRNA 遺伝子, Blast search

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境研究室

類群の集積培養に成功したことを示している。

4. まとめと今後の予定

未培養 *Synergistota* 門細菌の選択的培養を目的として、9 種類の培養系を用いて培養を行った。結果、*Synergistota* 門細菌新規分類群である ASV10 および ASV18 の集積系を得ることに成功した。これらの培養系をさらに継代培養したところ、ASV10 および ASV18 の相対存在量がそれぞれ 73%および91%優占した。ASV10 および ASV18 は、属レベルで未培養の細菌であるである可能性が示唆された。今後の分離培養および生理学的特性解析により、嫌気性消化における生態学的機能の解明を行う。

嫌気性消化プロセス中に主要に存在する ASV1、ASV2 および ASV3 の集積・分離培養には至っていない。今後は、NCBI データベース上の JGI-00000079-D21 の全長ゲノム配列から代謝機能を推定し、解析結果に基づいた集積培養系の構築と分離を進める。

参考文献

1) IEA Bioenergy Task 37. *Circular economy approaches to integration of anaerobic digestion with Power to X technologies*. Technology Collaboration Programme (2024).

2) Duan, Y. et al. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **208**, 114985 (2025).

3) McSweeney, C. S. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **91**, e00380-25 (2025).

表 1. 培養条件

植種汚泥	培地	添加物		
		基質	S	NaCl
嫌気性 グラニューール 汚泥	Widdel 培地	アルギニン	—	—
		グルタミン	—	—
		グルタミン	+	—
		グルタミン酸	—	—
		グルタミン酸	+	—
		グルタミン酸	+	+
		カザミノ酸	—	—
		カザミノ酸	+	—
		カザミノ酸	+	+

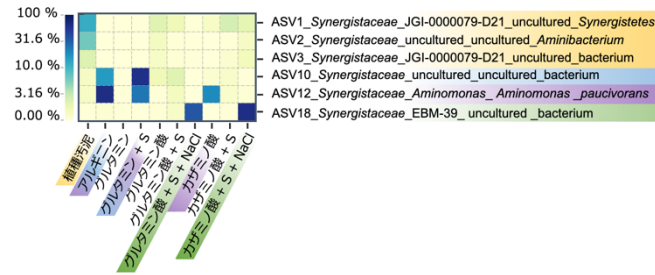


図 1. *Synergistota* 門細菌の各種基質に対する優占率を示すヒートマップ

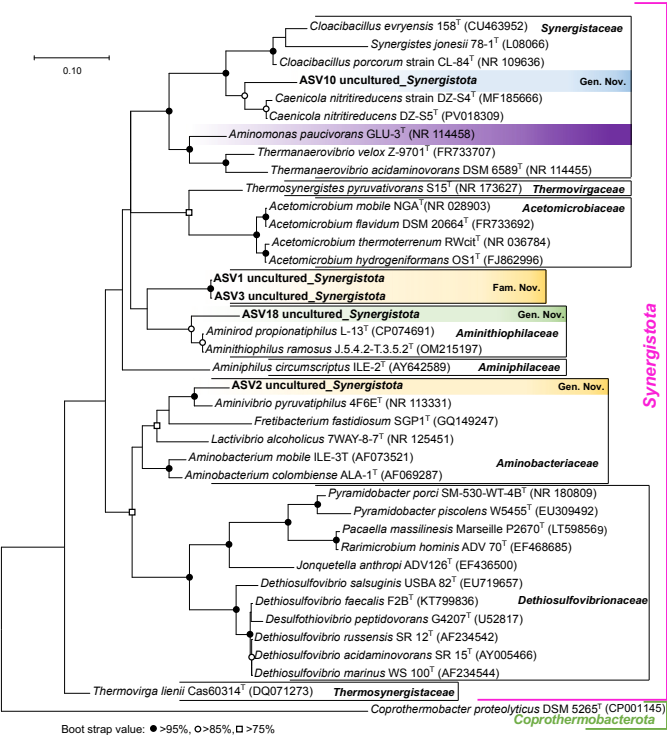


図 2. 16S rDNA 遺伝子配列に基づく *Synergistota* 門の系統樹 (NJ 法, MEGA12 使用). 未培養の *Synergistota* 門細菌 (ASV1, ASV2, ASV3, ASV10, ASV18) の系統学的位置を示す。節点は、1,000 回の複製に基づくブートストラップ値であり、75 %以上を表示している。

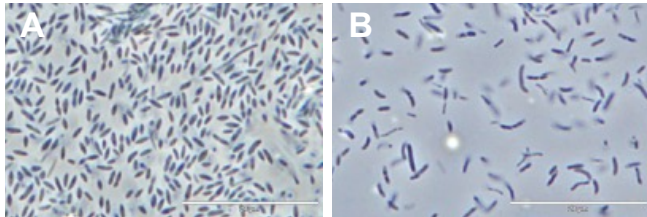


図 3. 3 回継代後の集積培養系の顕微鏡観察結果。(A) ASV10 優占培養系, (B) ASV18 優占培養系。スケールバー：20 μm。