

嫌気性処理汚泥から分離した Synergistota 門 AY 株と メタン生成古細菌の共生代謝の解析

長岡技術科学大学・院工 (非)○舩木七海 (非)荒井優真 (正)渡利高大 (正)山口隆司 (正)幡本将史

1. はじめに

Synergistota 門は、16S rRNA 遺伝子配列に基づく培養非依存的な分子生物学的解析により、嫌気性処理における主要な細菌群の一つであることが明らかにされている¹⁾。

本研究は、独自の培養条件を用いて嫌気性処理汚泥に優占する Synergistota 門未培養系統群の分離培養を試みた。培養の結果、アミノ酸、元素硫黄 (電子受容体) と塩化ナトリウムを組み合わせた培養系で、本細菌門に属する新規細菌 (AY 株) の純粋分離に成功した²⁾。しかしながら、アルギニンを経質とした AY 株の培養には、メタン生成古細菌との共生が必要であった。我々は、本株のアミノ酸分解プロセスで発生する水素 (ギ酸) または電子をメタン生成古細菌が直接的に受容することで水素分圧制限を受けることなくメタン発酵が進行しているのではないかと考えた。

そこで本研究は、AY 株の電子受容体利用能の評価および水素 (ギ酸) 資化または直接的な電子受容が可能なメタン生成古細菌を用いて共生培養することによる、共生代謝機能の解析を目的とした。

2. 実験方法

AY 株の元素硫黄還元能を評価するため、元素硫黄を添加した培養を行い、還元先である硫化物の生成量をモニタリングした。硫化物はメチレンブルー法³⁾により測定した。Widdel 培地に基質としてカザミノ酸 20 g l⁻¹、電子受容体として元素硫黄 25 g l⁻¹を添加し、AY 株を培養した。対照系として、Widdel 培地にカザミノ酸を添加し、AY 株を培養した。元素硫黄は 500 ppm の Tween80 で懸濁したのちに間欠滅菌を行った。間欠滅菌は 105℃で 1 時間滅菌する手順を 2 日間行った。

AY 株がメタン生成古細菌と共生した際に資化で

きるアミノ酸を特定するため、13 種類のアミノ酸をそれぞれ別々に基質として用いた (表 1)。対照系は AY 株のみの純粋培養とした。AY 株と水素 (ギ酸) 資化性の *Methanoculleus palmolei* DSM 4237 または *Methanospirillum hungatei* DSM 864 を用いた純粋共生培養を行った。加えて直接的な電子受容できる可能性のある *Methanothrix soehngenii* DSM 2139 と共生培養した。その際、Widdel 培地に基質としてグルタミン酸 20 mM またはアルギニン 20 mM、*M. hungatei* や *M. soehngenii* との共生培養では、導電性材料として活性炭 12.5 g l⁻¹を添加し、35℃で嫌氣的に培養を行った。メタンの生成は TCD 検出器付きガスクロマトグラフ (GC-8A, 島津製作所) を用いて分析を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 AY 株の元素硫黄還元能力

AY 株の元素硫黄還元能の評価は、元素硫黄を添加した培養系で硫化物の増加の確認を指標とした。約 1 か月の培養で液相中の硫化物濃度は経日とともに増加が確認された (図 1)。培養開始から 21 日目の硫化物濃度が最も高く、1.22 mM 生成された。ガス組成の分析では、最も硫化物濃度が高かった 21 日目の測定で、水素が 0.0473 mM 検出された。このことから、AY 株が元素硫黄を電子受容体として利用し、アミノ酸を分解でき、一部は水素として代謝されたと考えられた。各培養液から DNA 抽出と濃度測定を行った結果、元素硫黄を添加しない対照系では検出限界未満、元素硫黄を添加したものでは 0.0136 mg l⁻¹となり、細菌が増殖したことを確認した。

3.2 AY 株とメタン生成古細菌の共生培養

AY 株とメタン生成古細菌の共生培養において、アミノ酸を添加した条件でガス組成を分析した結果、培養開始から 16 日目にグルタミン酸を添加した培養

表 1 AY 株の共生培養に用いたメタン生成古細菌と基質

共生パートナー	導電性材料	基質 (20 mM)
<i>Methanoculleus palmolei</i> DSM 4237	-	アラニン, バリン, ロイシン, イソロイシン, プロリン, グリシン, トリプトファン, セリン, システイン, アルギニン, ヒスチジン, アスパラギン酸, グルタミン酸
<i>Methanospirillum hungatei</i> DSM 864	活性炭 12.5 g l ⁻¹	グルタミン酸, アルギニン
<i>Methanothrix soehngenii</i> DSM 2139	活性炭 12.5 g l ⁻¹	グルタミン酸, アルギニン

でメタンの生成 (0.056 mM) を確認した. 純粋培養では気相中の水素濃度が上昇したが, 共生培養では水素が検出されず, メタンが生成された (図 2). 純粋培養では水素が蓄積することで反応が制限されるが, 共生培養では水素が資化され, メタンへと転換されたため, 分解が進行したと考えられる. したがって AY 株は *M. palmolei* の存在下で共生アミノ酸酸化細菌として機能した. AY 株はほか 12 種類のアミノ酸のうち, セリン, ヒスチジンでも同様の共生的なアミノ酸分解が確認された (表 2).

グルタミン酸を基質とした AY 株と *M. hungatei* との共生培養でも, 0.53 mM のメタン生成が確認され, 共生的なアミノ酸分解が確認された. また, 興味深いことにアルギニンまたはグルタミン酸を基質として用いた AY 株と *M. soehngenii* との共生培養では若干のメタン生成のピークが確認された. *M. soehngenii* は水素 (ギ酸) を基質として利用できないことから, 直接的な種間電子伝達によりアミノ酸の分解が進行する可能性が示された.

4. まとめと今後の展望

AY 株の代謝機能を解析するため, 元素硫黄還元能を評価するための培養, 13 種類のアミノ酸を基質として用いた培養, 3 種類のメタン生成古細菌との共生培養を行った. 結果として, AY 株は元素硫黄を還元できることが確認された. また, AY 株は 13 種のアミノ酸を添加した培養において, ヒスチジン, セリン, グルタミン酸を *M. palmolei* の存在下で分解し, メタンを生成することができた. AY 株は, *M. hungatei* との共生培養でも共生アミノ酸酸化細菌として機能した. また, AY 株と *M. soehngenii* の共培養結果から AY 株と *M. soehngenii* の間で直接種間電子伝達による共生の可能性が示された. 今後は, AY 株と *M. soehngenii* を共生培養させた際のメタン生成や中間代謝産物のモニタリングを引き続き行う予定である.

参考文献

- 1) Riviere et al., 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. The ISME Journal 3, 700-714
- 2) 荒井ら, 2026. 嫌気性処理汚泥に優占する未培養系統分類群 Synergistota 門に属する細菌の分離, 令和 8 年度土木学会全国大会年次学術講演会
- 3) Sugahara et al., 2016. Colorimetric Determination of Sulfide in Microsamples. Analytical Sciences 32, 1129-1131.

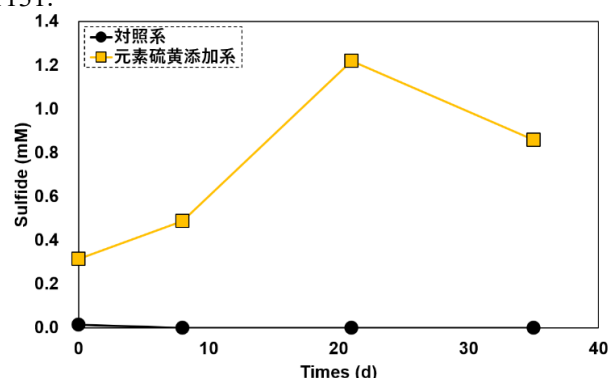


図 1 AY 株の培養中の硫化物濃度の推移

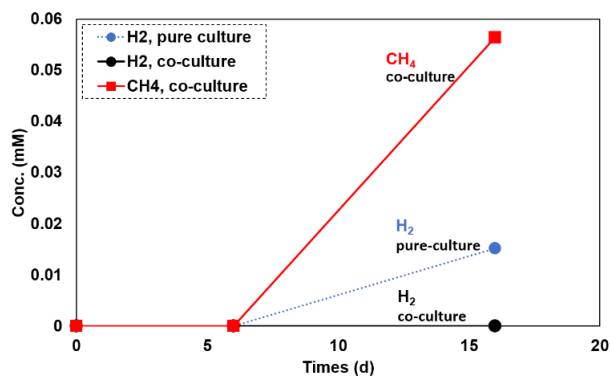
図 2 グルタミン酸を添加した AY 株と *M. palmolei* の共生培養における水素とメタン濃度の推移

表 2 AY 株の各アミノ酸分解能力

	pure culture	co-culture
アラニン	-	-
バリン	-	-
ロイシン	-	-
イソロイシン	-	-
プロリン	-	-
グリシン	-	-
トリプトファン	-	-
セリン	-	+
システイン	-	-
アルギニン	-	-
ヒスチジン	-	+
アスパラギン酸	-	-
グルタミン酸	-	+