メタン発酵の酸生成過程における有用菌株の特定

○日大生産工（院）木科　大介　　日大生産工　　大木　宜章
日大生産工　　小森谷　友絵　日大生産工　　神野　英毅

１．序文

メタン発酵は，有機性廃棄物（下水汚泥や生ごみ等）を嫌気性細菌の活動により分解しメタン（CH_4）を生産する生物化学変換技術の一つである。近年，化石燃料に起因する地球温暖化，また生活レベルの向上に伴う廃棄物量の増加等の環境問題が深刻化するなか，メタン発酵によるバイオマス資源の積極的なエネルギー化は資源循環型社会に即した新エネルギーとして注目されている。廃棄物の回収システムが整備されている下水汚泥では，回収先である下水処理場での大規模利用が可能である。しかし，各家庭や施設等から排出される生ごみは他の可燃ごみと区別されずに扱われており，資源として回収しようとすればコストの上昇がまぬがれない。したがって，本研究は小規模コミュニティー（施設，家庭等）において排出される生ごみを発生現場でエネルギー化するメタン発酵システムの構築を図るものである。

このメタン発酵の有機物分解過程は，大きく酸生成とメタン生成の 2 段階に分けられる。先ず，高分子有機物である炭水化物，タンパク質，脂質等は加水分解によって単糖類やアミノ酸といった構成単位にまで分解された後，酸生成菌により高級脂肪酸およびエタノール等の中間物を生成する。その後，中間物は酢酸生成菌により低級脂肪酸に変換され，メタン生成古細菌により CH_4 および CO_2 へと変換される。ここで，各過程は複合微生物系によるものであり，多様な細菌群が競合により複数の分解経路を経由しガス化する。なかでも，酸生成過程における細菌群の生態バランスは生成する中間物の割合を変化し，これがメタン生成過程における分解経路を決定する。

そこで本研究は，2段階メタン発酵の1段階目である酸生成槽から菌株を分離培養し，塩基配列の解読結果から分離菌株の同定および保存を行った。また，同定精度が600bp以上(相同性99％以上)と高かった分離菌株は純培養した後，バッチ実験による増殖能力および代謝能力の結果から，酸生成過程における有用菌株の特定を行った。

２．実験概略

実験手順を図-1に示す。本実験では2段階メタン発酵の第1槽である酸生成槽の汚泥を用いた。これをサンプルとしてLB，GYP，BHI（和光）およびGAMブイヨン(ニッスイ)の寒天プレート培地に塗布し36℃の恒温槽で3，4日嫌気培養した。培地の組成を表-1に示す。次に，コロニーの形態的特徴から菌株を選別し分離培養を行った。この作業を3～4回繰り返し行い菌株の分離を行った。

分離した菌株はDNA Isolation Kitを用いて

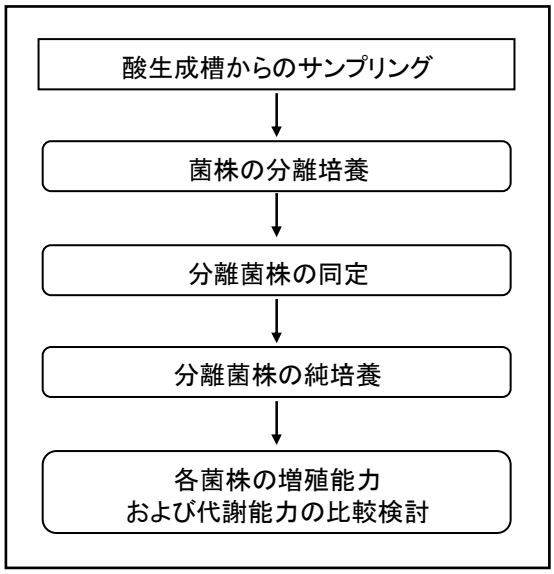


図-1　実験手順

Study on Identification of Efficient Bacterial Strain
In an Acid Product Process of the Two Step Methane Fermentation
Daisuke KISHINA, Takaaki OHKI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

DNAを抽出し，これをサンプルとしてプログラムテンプコントロールシステムによりDNAの増幅を行った。PCRに用いたプライマーは全細菌に共通の16S rRNAユニバーサルプライマー27fおよび800rを用いた。なお，このプライマーの組み合わせは16S領域の中で600 bp以上の増幅を目的とするものである。プライマーの塩基配列を表-2に示す。PCRの条件は94℃5min＋（94℃30sec－50℃30sec－72℃60sec）×35サイクル＋72℃6minとした。これにより得られたPCR産物は，1.5 %アガロースゲルを用いて電気泳動を行い，単一のDNAバンドを確認した後，遺伝子解析システムによりシークエンシング作業を行った。その後，解読した塩基配列は相同性検索プログラムDDBJ:BLASTにより，相同性の高い既知種を検索し同定した。なお，本研究では既知種との相同性が99%以上の菌株を微生物分類上の同種とした。

次に，分離培養により種までの同定が行えた菌株は比較実験を行うための菌量を確保するため，15mlGAMブイヨン液体培地にて前培養を行った。その後，200ml液体培地を用いて菌株を本培養し，培養液の吸光度（測定波長：600nm）を分光光度計により測定し増殖曲線を作成した。増殖度合いを確かめた後，各菌株は求められた最適期間で植え継ぎし，大量培養した。

図-2 にバッチ実験装置図を示す。実験は大量培養によって増殖した菌株をメディウム瓶に入れた 200ml GAM ブイヨン液体培地に添加し，気相部はアルゴンガス置換により嫌気状態に保持した状態で行なった。本試料は 12 時間おきに培養液のサンプリングとガス発生量の測定を行った。なお，サンプリングした培養液は高速液体クロマトグラフィーを用いて，有機酸生成量の測定を行った。

3．実験結果

(1)酸生成槽からの菌株の分離および分離菌株の同定結果

酸生成槽をサンプルとして培養を行ったところ，3 日目には培地上に複数種のコロニー形成が確認された。図-3 にコロニーの顕微鏡写真を示す。コロニーの形態的特徴として，色は白色もしくは淡黄色を示し，その形状は外形が点状，円状および不規則なもの，または辺縁が円形，波状および葉状のものが確認された。従って，これらのコロニーを形態的特徴から選別し，分離培養することにより，計 27 株（分離 No.1～No.27）の分離菌株を得た。分離菌株の形態的特徴および同定結果一覧を**表-3** に示す。そこで，分離した 27 株においてシークエンシング作業を行った結果，塩基配列解読が 600 bp 以上の菌株は 18 であり，さらに，既知種との相同性が 99%以上となったのは 12 株であった。この 12 株の近縁種は表-4 に示すように

表-1　培地組成

LB（g/L）	
Tripton	10
Yeast extract	5
NaCl	10
pH	7.0

GYP（g/L）	
Glucose	10
Yeast extract	10
Bacto Pepton	10
Sodium acetate	10
$MgSO_4$	0.01
$MnSO_4 \cdot nH_2O$	0.01
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
NaCl	0.01
pH	7.2

表-2　PCR に用いたプライマー

Primer	Sequence (5'-3')
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
800r	TACCAGGGTATCTAATCC

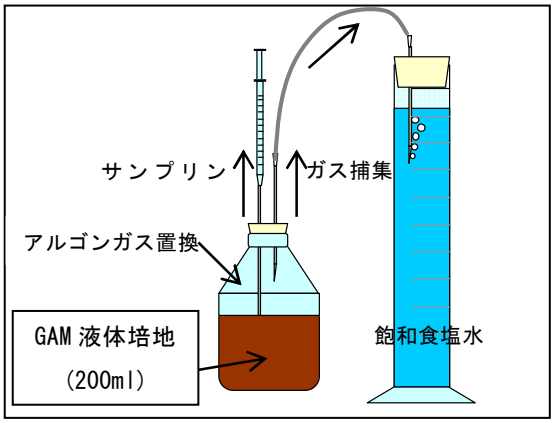
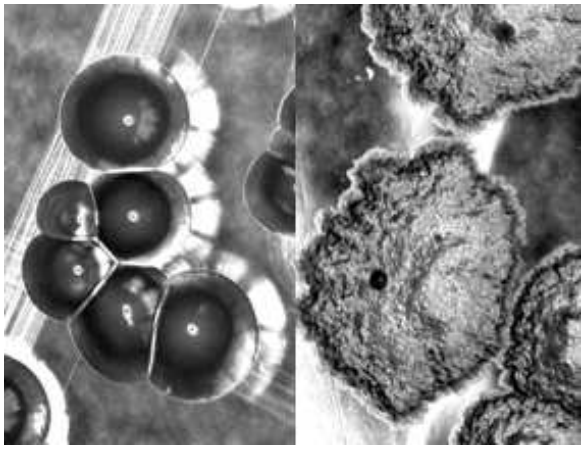


図-2　バッチ実験装置図

Clostridium bifermentans，*Clostridium butyricum*，*Clostridium sartagoformum*，*Clostridium cadaveris* および *Staphylococcus epidermidis* の計 5 種類の名前が挙げられた。本実験はこれら 5 株を試験菌株としてバッチ実験に用いた。なお，分離した 12 株で最も多かった *Clostridium butyricum*（分離 No.3, 5, 7, 10, 12, 14）においてコロニー形成の違いがみられた。これは，培地および植え継ぎ時期や植え継ぎ時における菌株の塗布量に起因するといえる。次に，600 bp 以上の塩基解読数で，近縁種に対し相同性が 99 %未満の 6 株（分離 No. 1，6，11，15，16，18）は，*Clostridium* 属の未知種である可能性が示唆される。また，分離 No.2 は塩基解読数が 229 bp と低いものの *Clostridium glycolicum*（相同性は 100 %）であると特定できた。しかし，他の菌株においては，塩基配列数が 600 bp 未満のであると，種までの特定は困難であった。



（円形状）　　（波形状）

図-3　菌体のコロニー顕微鏡写真

表-3　酸生成槽における分離菌株の同定結果

分離No.	生育培地	コロニー形状			菌名	解読数(bp)	相同数(bp)	相同性(%)
		全体像	辺縁	側面像				
1	LB	点状	波状	台形	*Clostridium glycolicum*	640	617	96
2	LB	点状	波状	凸状	*Clostridium glycolicum*	229	229	100
3	GAM	円状	波状	凸状	*Clostridium butyricum*	677	674	100
4	GAM	不規則	波状	凸状	*Clostridium butyricum*	456	456	100
5	BHI	点状	波状	凸状	*Clostridium butyricum*	712	709	100
6	BHI	円状	波状	凸状	*Clostridium cadaveris*	731	717	98
7	GYP	不規則	円状	凸状	*Clostridium butyricum*	716	714	100
8	GYP	不規則	波状	凸状	N.D.	222	―	―
9	LB	不規則	波状	凸状	*Clostridium glycolicum*	701	695	99
10	LB	不規則	波状	台形	*Clostridium butyricum*	720	717	100
11	GAM	円状	円状	凸状	*Clostridium butyricum*	696	684	98
12	BHI	円状	波状	台形	*Clostridium butyricum*	705	696	99
13	GYP	円状	波状	台形	*Clostridium roseum* ※他3種	419	419	100
14	GYP	点状	波状	台形	*Clostridium butyricum*	704	695	99
15	GAM	円状	波状	凸状	*Clostridium sartagoformum*	683	671	98
16	GAM	円状	葉状	凸状	*Clostridium bifermentans*	703	684	97
17	GYP	点状	波状	台形	*Clostridium butyricum*	586	573	98
18	GYP	点状	波状	台形	*Clostridium butyricum*	707	696	98
19	BHI	点状	葉状	台形	*Clostridium sartagoformum*	629	626	100
20	BHI	点状	円状	台形	*Clostridium cadaveris*	721	711	99
21	LB	円状	波状	台形	N.D.	201	―	―
22	LB	円状	円状	台形	*Clostridium bifermentans*	717	709	99
23	GAM	円状	円状	台形	N.D.	204	―	―
24	GAM	円状	円状	台形	*Staphylococcus epidermidis*	739	734	99
25	GYP	点状	円状	凸状	*Staphylococcus epidermidis*	748	747	100
26	BHI	点状	波状	台形	N.D.	240	―	―
27	LB	点状	円状	凸状	N.D.	220	―	―

(2)増殖代謝特性の比較

図-4 に増殖曲線を示す。結果より，*Clostridium bifermentans* は他に比し増殖が早く植菌直後から増殖し，6 時間経過時には定常期になった。*Clostridium butyricum* および *Clostridium cadaveris* は 15 時間目をピークに，*Staphylococcus epidermidis* は増殖期の時間が最も長く，27 時間後にピークに達し，その後定常期となった。また，*Clostridium sartagoformum* は誘導期が最も長く 15 時間費やしたが，増殖期は 6 時間で，他の菌株に比し最も短かった。この結果から，各菌は 24 時間後に増殖を終え定常期に入ったといえる。

図-5に各分離菌培養液の有機酸濃度の経時変化を示す。結果より，初期段階より有機酸生成が見られたのは *Clostridium cadaveris* ，*Clostridium bifermentans* および *Staphylococcus epidermidis* であった。それに対し *Clostridium butyricum*は12時間後から，*Clostridium sartagoformum*は24時間後から増加がみられた。有機酸の総生成量は *Clostridium bifermentans*が他の菌株に比し0.445mol/l と最も多く，*Clostridium sartagoformum*が0.122mol/lと最も少なかった。また，有機酸の生成割合は菌株によって違いがみられた。*Clostridium bifermentans*および *Staphylococcus epidermidis*は主に酢酸，プロピオン酸を生成し，その他にギ酸，酪酸，リンゴ酸を生成した。*Clostridium sartagoformum* は主にギ酸，酪酸，酢酸を生成した。また，*Clostridium butyricum* および *Clostridium cadaveris*はギ酸，酢酸，プロピオン酸，酪酸以外にクエン酸，リンゴ酸等の計7種類を生成した。

4．まとめ

1) 酸生成過程において分離培養を行った結果，培地の組成および形態的特徴から異なる 27 株の分離菌が得られた。この 27 株について塩基配列を解読したところ，600 bp(相同性 99 %)以上で同定が行えた菌種は *Clostridium bifermentans* ，*Clostridium sartagoformum*, *Clostridium cadaveris* *Clostridium butyricum* ，および *Staphylococcus epidermidis* の 5 種類であった。

表-4　増殖能力および代謝能力の比較に使用した分離菌株

分離 No.	近縁種	解読した塩基数と近縁種の相同性
No. 5	*Clostridium butyricum*	709/712 (99 %)
No. 19	*Clostridium sartagoformum*	626/631 (99 %)
No. 20	*Clostridium cadaveris*	711/721 (99 %)
No. 22	*Clostridium bifermentans*	709/718 (99 %)
No. 25	*Staphylococcus epidermidis*	747/748 (100 %)

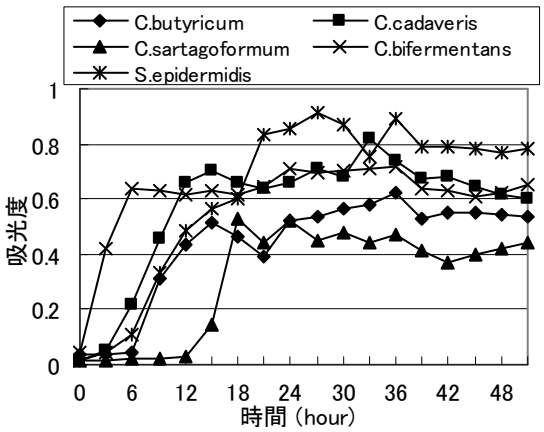


図-4　増殖曲線

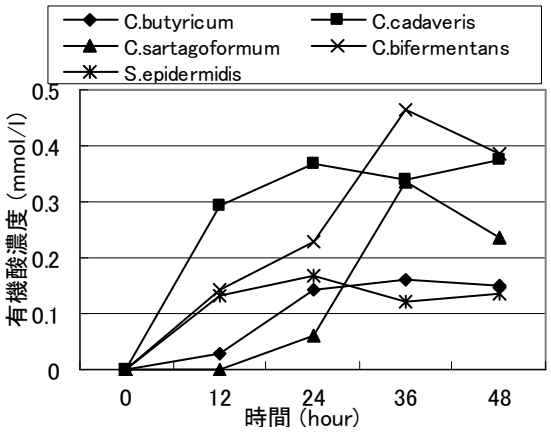


図-5　有機酸濃度の経時変化

2) バッチ実験による比較結果より，各菌株には増殖能力および代謝能力に差異がみられた。その中で *Clostridium bifermentans* は他の菌株に比し増殖能力および代謝による有機酸生成量において優れていることから酸生成過程における効率的有用菌株とし得ることが分かった。