

有機酸生成における効率的菌体の特定

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

1. はじめに

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（CH₄）を生産する生物化学変換技術の一つである。わが国において、本手法は主に汚泥処理での固形分減量方法として用いられていた。しかし、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、資源循環型社会に即した新エネルギーとしてバイオマス資源の積極的な利用が望まれる。ところで、下水汚泥では、廃棄物の回収システムが整備されており、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、現在のところ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、原料とし回収するには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（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。初めに含有される有機物の炭水化物、タンパク質、脂質等は加水分解菌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 CH₄ および CO₂ 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。したがって、酸生成槽内の微生物群集構造および各菌株の生態的特徴を把握することはメタン発酵の効率の向上を図るうえで有効な手段である。近年では、PCR-DGGE 法に代表されるように、複合微生物系に関与する細菌種の群集構造解析法が報告されている。これらの解析は、汚泥中に生息する菌体を分離培養することなく DNA を抽出し解析するため、分離培養が困難な菌株の特定が可能である。しかし、特定した菌株の増殖能力および代謝能力といった知見を得ることはできない。

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効率的菌株の特定を行った。さらには、この有用菌株により効率的な酸生成を図るものである。

2. 実験概要

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回繰り返して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

Identification of Efficient Bacterial Strain in an Acid Product Process.

Takaaki OHKI, Hideki KOUNO, Tomoe KOMORIYA and Daisuke KISHINA

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 (Beckman Coulter社製: CEQ 8800) によりシーケ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 [http://www.ddbj.nig.ac.jp/] 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、15ml GAM ブイオ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 (Molecular Device社製SPECTRAmax m2) 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 ブイオ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。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 (SHIMADZU社製LC-VP) を用いて、有機酸生成量の測定を行った。

3. 結果および検討

(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

表-1 培地組成

LB (g/L)		GYP (g/L)	
Tripton	10	Glucose	10
Yeast extract	5	Yeast extract	10
NaCl	10	Bacto Pepton	10
pH	7.0	Sodium acetate	10
		MgSO ₄	0.01
		MnSO ₄ ・nH ₂ O	0.01
		FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01
		NaCl	0.01
		pH	7.2

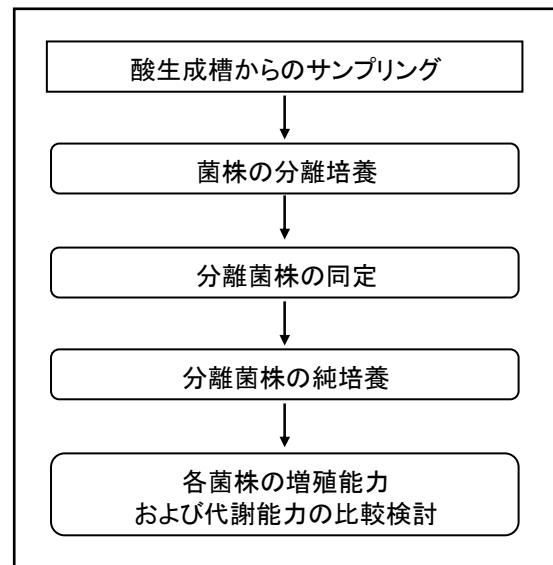


図-1 実験手順

表-2 PCR に用いたプライマー

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

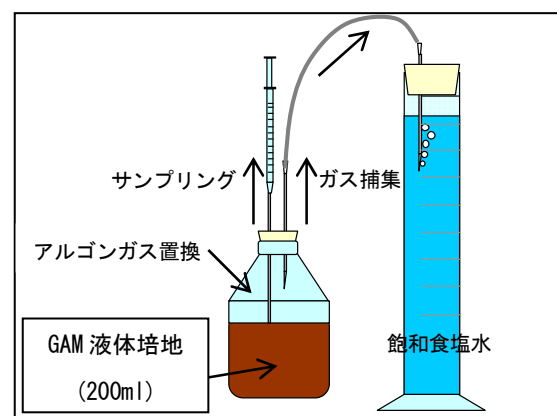


図-2 バッチ実験装置図

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。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-5に示す。そこで、分離した27株においてシーケ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11株であった。この11株の近縁種は表-4に示すように *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11株で最も多かった *Clostridium butyricum*（分離No.3, 5, 7, 10, 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7株（分離No. 1, 6, 11, 12, 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

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	<i>Clostridium glycolicum</i>	640	617	96
2	LB	点状	波状	凸状	<i>Clostridium glycolicum</i>	229	229	100
3	GAM	円状	波状	凸状	<i>Clostridium butyricum</i>	677	674	100
4	GAM	不規則	波状	凸状	<i>Clostridium butyricum</i>	456	456	100
5	BHI	点状	波状	凸状	<i>Clostridium butyricum</i>	712	709	100
6	BHI	円状	波状	凸状	<i>Clostridium cadaveris</i>	731	717	98
7	GYP	不規則	円状	凸状	<i>Clostridium butyricum</i>	716	714	100
8	GYP	不規則	波状	凸状	N.D.	222	—	—
9	LB	不規則	波状	凸状	<i>Clostridium glycolicum</i>	701	695	99
10	LB	不規則	波状	台形	<i>Clostridium butyricum</i>	720	717	100
11	GAM	円状	円状	凸状	<i>Clostridium butyricum</i>	696	684	98
12	BHI	円状	波状	台形	<i>Clostridium butyricum</i>	705	696	99
13	GYP	円状	波状	台形	<i>Clostridium roseum</i> ※他3種	419	419	100
14	GYP	点状	波状	台形	<i>Clostridium butyricum</i>	704	695	99
15	GAM	円状	波状	凸状	<i>Clostridium sartagoformum</i>	683	671	98
16	GAM	円状	葉状	凸状	<i>Clostridium bifermentans</i>	703	684	97
17	GYP	点状	波状	台形	<i>Clostridium butyricum</i>	586	573	98
18	GYP	点状	波状	台形	<i>Clostridium butyricum</i>	707	696	98
19	BHI	点状	葉状	台形	<i>Clostridium sartagoformum</i>	629	626	100
20	BHI	点状	円状	台形	<i>Clostridium cadaveris</i>	721	711	99
21	LB	円状	波状	台形	N.D.	201	—	—
22	LB	円状	円状	台形	<i>Clostridium bifermentans</i>	717	709	99
23	GAM	円状	円状	台形	N.D.	204	—	—
24	GAM	円状	円状	台形	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	739	734	99
25	GYP	点状	円状	凸状	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	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	—	—

と、種までの特定は困難であった。

(2) 分離菌株の純培養による増殖代謝特性の比較

図-3 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-4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。

2) 分離した 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

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	<i>Clostridium butyricum</i>	709/712 (99 %)
No. 19	<i>Clostridium sartagoformum</i>	626/631 (99 %)
No. 20	<i>Clostridium cadaveris</i>	711/721 (99 %)
No. 22	<i>Clostridium bifermentans</i>	709/718 (99 %)
No. 25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	747/748 (100 %)

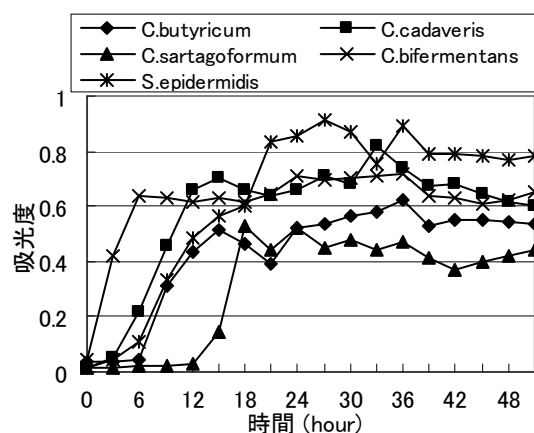


図-2 増殖曲線

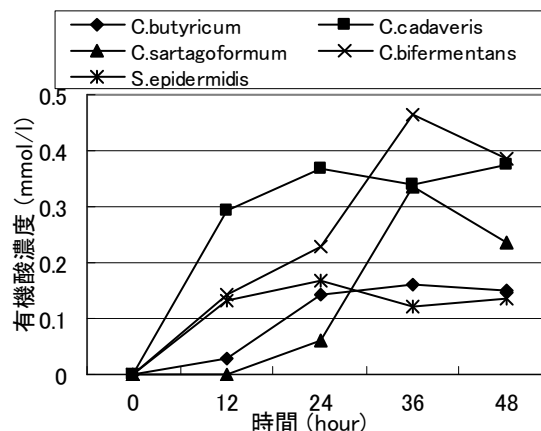


図-3 有機酸濃度の経時変化

菌種は *Clostridium bifermentans* , *Clostridium butyricum* , *Clostridium sartagoformum* , *Clostridium cadaveris* および *Staphylococcus epidermidis* の 5 種類であった。

3) 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本研究のメタン発酵槽の効率的有用菌株とし得ることが分かった。