

酸性成過程における効率的有機酸生成菌株の分離培養

NPO 法人環境文明 2 1 正会員 ○木科 大介
 日本大学 正会員 大沢 吉範
 日本大学 正会員 高橋 岩仁
 日本大学 正木 留里

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。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。

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目指し、酸生成槽およびメタン生成槽より構成される 2 段階メタン発酵の効率化を図るものである。これまでの研究では、2 段階メタン発酵の 1 段階目である酸生成槽から酸生成菌株を分離培養し、増殖能力および代謝による有機酸生成特性から *Clostridium bifermentans* を効率的酸生成菌株とした。しかし、*Clostridium bifermentans* の導入による 2 段階メタン発酵システムの稼働実験の結果では、有用菌株による効果がみられなかった。この要因は、酸生成槽の環境と分離培養条件が大きく異なっていたためといえる。

したがって本研究は、酸生成槽における効率的酸生成菌株の特定を目的とした。このため、模擬生ごみと成分を合わせた生ごみ培地を作製し、菌株の分離培養を行なった。さらに、分離培養により得られた各菌株を酸生成槽の環境下(pH4)で純培養し、増殖能力および代謝による有機酸生成特性の比較検討を行った。

2. 実験概略

分離培養に使用した培地は、模擬生ごみと成分を合わせた生ごみ培地(pH4, 7)および GAM ブイヨン培地(pH4)とした。表-1 に使用した培地組成を示す。こ

表-1 使用した培地組成

GAMブイヨン培地(g/L)		生ごみ培地(g/L)	
Pepton	10	グルコース	24.9
大豆 Pepton	3	ペプトン	10.7
ブテオースPepton	10	脂肪酸グリセリンエステル	3.16
消化血清末	13		
Yeast extract	5		
Meat extract	2.2		
肝臓エキス末	1.2		
グルコース	3		
リン酸二水素ナトリウム	2.5		
NaCl	3		
可溶性でんぷん	5		
L-システイン塩酸塩	0.3		
チオグリコール酸ナトリウム	0.3		

これらの培地は炭水化物、タンパク質および脂質といった有機物を主成分としており、酸生成菌の増殖を図るのに適した培地である。なお、培地は 2%寒天によりシャーレに固定化し、これを寒天プレート培地として使用した。分離培養の手順として、まず試料を寒天プレート培地に塗布し、36°Cで 3、4 日間培養した。なお、培養は通性好気および通性嫌気の 2 方法で行った。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、菌株を分離した。分離した菌株は、光学顕微鏡によりコロニーおよび菌形の観察を行った。

分離培養により得られた菌株は、増殖能力および有機酸生成特性を比較検討すべくバッチ実験を行った。バッチ実験には消化工程を想定し、生ごみ液体培地(pH4)を用いた。測定は、各菌株の継代時を 0 時間目として、適時培養液をサンプリングし、分光光度計により吸光度および HPLC により有機酸濃度の測定を行った。

3. 実験結果および検討

培養の結果、4 日目には培地表面に菌が増殖しコロニーの形成が確認できた。形態的特徴として、コロニーは白色、淡黄色および茶色等であり透明性のあるものが確認できた。形状も辺縁、断面、大きさ等

キーワード メタン発酵、分離培養、効率的酸生成菌株、有機酸

連絡先 〒145-0071 東京都大田区田園調布 2-24-23-301 NPO 法人環境文明 2 1 TEL03-5483-8455

表-2 純培養により増殖のみられた分離菌株の培養条件および形態的特徴

分離No.	培養条件			コロニーの形態的特徴							菌の形態的特徴			
	培地	pH	好気・嫌気	大きさ	色	透明性	辺縁	光沢	断面	芯	大きさ	形状		
19	GAM	4	嫌気	極小	淡黄茶	無	波状	無	平面	無	小	球		
22	生ごみ	7	好気	中	淡黄茶	無	なめらか	有	凸状	無	大	球		
23				大	淡黄茶	無	波状	無	凸状	無	大	長球		
24				小	淡黄	無	なめらか	有	平面	無	小	球		
25				小	淡黄	無	なめらか	有	凸状	無	小	球		
28				嫌気	極小	茶	有	葉状	無	平面	無	小	球	
31			極小		茶	有	葉状	無	平面	無	大	球		
33			4		好気	小	淡黄茶	無	波状	有	平面	無	小	球
34						小	淡黄茶	無	波状	無	凸状	無	小	球
35						小	淡黄茶	無	なめらか	有	凸状	無	大	球
36				小		淡黄茶	無	なめらか	無	凸状	無	大	球	
37		極小		茶		無	なめらか	無	平面	無	小	球		
38		小		淡黄茶		無	なめらか	無	凸状	無	小	球		

に個体差があり、分離培養前の段階では複数種の菌株の存在が確認できた。そこで、コロニーの形態的特徴から菌株を選別し、分離培養を行なった。

分離培養の結果、本実験では計 38 の菌株を分離した。培養条件別にみると、最も多く分離したのは GAM ブイヨン(pH4)培地で 21 株、次に生ごみ(pH7)培地で 10 株、生ごみ(pH4)培地で 9 株となった。したがって、これらの分離菌株および *C.bifermentans* を試験菌株として純培養を行った。

純培養の結果、増殖のみられた菌株は 39 株中 12 株であった。なお、*C.bifermentans* は pH4 の環境下では増殖がみられなかった。図-1 に純培養により増殖のみられた菌株の増殖度合の経時変化を、表-2 に菌株の培養条件および形態的特徴を示す。表-2 より、今回の条件で増殖がみられた菌株は生ごみ培地で分離培養されたものが多かった。また、生ごみ(pH7)培地で分離培養した菌株にも増殖がみられたことから、酸生成菌は pH の変化に対する対応能力を持っていることが分かる。図-1 より、pH4 の環境下における増殖能力は各菌株により差異が生じた。増殖期への移行が最も早かった菌株は No.24 であった。No.24 は培養 12 時間後には増殖がみられ、72 時間目にピークとなった。他の菌株は平均的に 48 時間目に増殖期へ移行し、培養 120 時間目においても増殖は続いた。また、No.37 は最も遅く 72 時間目に増殖がみられた。

図-2 に純培養 120 時間後の有機酸濃度を示す。なお、酸生成槽は有機酸生成量の多い菌株が有用であるといえる。結果より、No.22 および No.28 の有機酸生成量は、16.21mmol/L および 17.03mmol/L と高い値であった。一方、増殖の優れた No.24 の有機酸生成量は 11.75mmol/L と平均的な値であった。

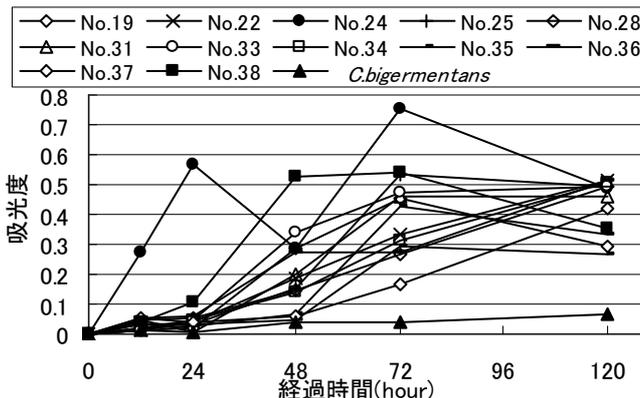


図-1 分離菌の増殖度合の経時変化

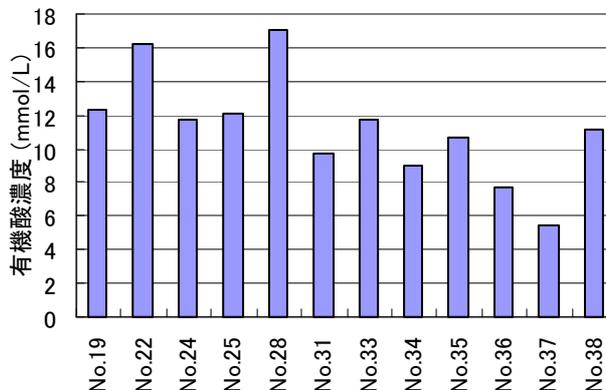


図-2 分離菌株120時間後の有機酸濃度

4. まとめ

本研究により得られた知見を以下に示す。

- 1) 分離培養の結果、培地の組成および形態的特徴から異なる 38 株の分離菌株が得られた。
 - 2) 得られた 38 株の分離菌株と *C.bifermentans* を用いて酸生成槽と同様の環境下により純培養を行った結果、増殖能力および代謝能力には差異がみられた。このなかで、増殖能力が優れていた菌株は分離 No.24 であり、代謝による有機酸生成能力のすぐれた菌株は No.22 および No.28 であった。
- 以上の結果より、分離 No.22, No.24 および No.28 は酸生成槽の有用菌株となり得ることが分かった。