

メタン発酵汚泥からのセルロース・ヘミセルロース分解微生物の分離・培養

長岡技術科学大学 学生会員 ○金重真実

正会員 幡本将史、中村明靖、山口隆司

東北大学 正会員 高橋優信

1. はじめに

近年、メタン発酵による有機性廃棄物のバイオガス化の研究開発が進められている。メタン生成環境下における有機物分解は種々の異なる代謝機能を持った微生物の働きにより進行する。有機性廃棄物を構成している多糖類や脂質などの高分子化合物はまず加水分解を受けて、その後、酸発酵微生物によって酢酸などの低分子の有機酸や水素、二酸化炭素へと順次分解され、最後にメタン生成古細菌によりメタンに転換される。こうしたメタン発酵プロセスにおいて高分子化合物であるセルロース、ヘミセルロースなどの加水分解、酸生成が律速になる場合がある。セルロース分解微生物は土壌や草食動物消化器官(ルーメン)等から *Clostridium* 属、*Bacteroides* 属、*Ruminococcus* 属等が報告されている。セルロース分解微生物はメタン発酵汚泥中からも報告されているが、セルロースを基質とし、メタン発酵汚泥を植種源とした培養実験の報告は少なく、その知見は土壌やルーメンなどのほかの嫌気環境下における知見と比較して少ない。そこで本研究では、メタン発酵汚泥内におけるセルロース・ヘミセルロース分解微生物の基礎的知見の収集を目的として、メタン発酵汚泥よりセルロース、ヘミセルロースを分解する新規微生物の分離・培養を行った。

2. 実験方法

植種源には、生ごみを処理していた単槽式高温メタン発酵リアクター (55℃) の汚泥と都市下水を常温で処理していたUASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) リアクターのグラニュー汚泥を使用した。培養には無機塩培地をpHは7.0に調整したものを使用し、嫌気状態にしたのち120℃20分間オートクレーブを行い滅菌した。還元剤は植種源を接種する前に添加した。炭素源としてセルロース (3もしくは1.5g/L) またはキシラン (3もしくは1.5g/L) を添加し、さらに補助基質として酵母エキスを添加した培養系も作成した。高温メタン発酵リアクター汚泥を用いた培養系は55℃、都市下水処理UASBグラニュー汚泥を用いた培養系は20℃および37℃で培養した。集積培養後に、ロールチューブ法またはゲランガムを用いたプレート培養法を用いて目的の微生物の分離培養を試みた。分離に成功した微生物は培養後にDNAを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたプライマーセット (EUB338f, UNIV1500r) を用いてPCRをおこなった。その後、16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定した。

表1. メタン発酵汚泥より分離した微生物の培養条件と解析結果

植種源	無機塩培地		基質	補助基質	温度 (℃)	分離株	近縁種	相同性 (%)
	培地濃度(%)	ビタミン						
下水処理グラニュール	100	+	セルロース	酵母エキス	37	UasCy-1	<i>Bacteroides graminisolvens</i>	100
	100	+		酵母エキス		UasXy-3	<i>Bacteroides graminisolvens</i>	100
	100	+		酵母エキス		UasXy-6	<i>Bacteroides graminisolvens</i>	100
	100	+		-		UasXn-3	<i>Bacteroides sp.</i>	92
	100	+		酵母エキス		UasXy-2	<i>Bacteroides graminisolvens</i>	100
	100	+	キシラン	酵母エキス	20	UasXy-4	<i>Trichococcus flocculiformis</i>	100
	100	+		酵母エキス		UasXy-5	<i>Propionibacterium acnes</i>	100
	100	+		-		UasXn-1	<i>Clostridium sp.</i>	100
	100	+		-		UasXn-2	<i>Bacteroides sp.</i>	99
	10	+		酵母エキス+ペプトン		UasXpyW-1	<i>Porphyromonadaceae bacterium</i>	98
	10	-		酵母エキス+ペプトン		UasXpyWn-1	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	100
	高温メタン発酵汚泥	100		+		酵母エキス	55	DnXy-1

キーワード：微生物、嫌気性処理、メタン発酵

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学・環境建設系 TEL: 0258-47-9642

3. 結果と考察

培養には温度や基質の条件を振り分けて 30 種類の培養条件で実験を行った。培養の結果、高温メタン発酵汚泥を植種した 55℃のキシラン基質の培養系から 1 株分離した。都市下水処理グラニュール汚泥を植種源とした培養系では、37℃のセルロース基質の培養系から 1 株、37℃のキシラン基質の培養系から 2 株、20℃のキシラン基質の培養系から 6 株、37℃の低能度キシラン基質から 2 株分離することができた(表 1)。全分離株 12 株のうち、半数の 6 株が *Bacteroides* 属で、さらにそのうちの 4 株が *Bacteroides graminisolvens* と 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 100%であった。*B. graminisolvens* は稲わらを添加したメタン生成リアクターの汚泥より分離された微生物で、育成可能温度が 5-40℃(至適温度 30-35℃)であり、主な利用可能基質はフルクトース、グルコース等の単糖類、マルトース等の二糖類、ペクチン、スターチ等の多糖類でキシランは利用可能であるが、セルロース分解能力は示さなかったと報告されている¹⁾。本研究で分離した UasCy-1 株はセルロースを基質とした培養系から獲得した分離株であり、*B. graminisolvens* と 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 100%であった。そこで、*B. graminisolvens* と 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 100%を示した他の分離株とともにセルロースの基質利用性について調査したところ、UasCy-1 株、UasXy-2 株、UasXy-6 株からセルロース分解能力が示された。このことから *B. graminisolvens* はセルロースを分解しないと考えられてきたが、分解能力がある株が存在することが判明した。

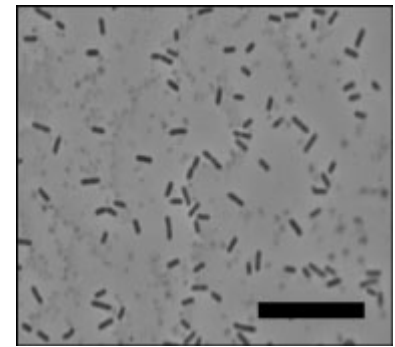


図 1 UASB グラニュール汚泥から分離した UasXn-3 株の顕微鏡写真(bar=10 μm)

キシランを基質としてグラニュール汚泥から分離した UasXn-3 株は、非運動性、非孢子形成の桿菌であった(図 1)。UasXn-3 株は近縁種との相同性が低く、最も近縁な分離株である *Bacterium strain 31285* との 16SrRNA 遺伝子配列の相同性は 92%であった。UasXn-3 株の分子系統解析の結果、本分離株は水田土壌等から検出されたクローンクラスタ²⁾に属していることが判明した(図 2)。また、利用基質についても調査したところグルコースやアラビノースといった単糖類の他、セルロースやキシランといった多糖類を分解することが示された。このことから分離株 UasXn-3 はメタン発酵汚泥に生息し、セルロース及びキシランを分解できる新規微生物だと考えられる。

4.まとめ

本研究では、現在までにセルロース・ヘミセルロースの分解を担う微生物を 12 株分離した。これまでの報告では *B. graminisolvens* はセルロースを分解しないとされていたが、本研究で分離した *B. graminisolvens* と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が 100%の分離株の内のいくつかはセルロースを分解することが分かった。また *Bacteroides* 属に属し、セルロース及びキシラン分解能力を有する新種と考えられる分離株 UasXn-3 を下水処理グラニュール汚泥より分離した。今後は新規の細菌の可能性のある分離株 UasXn-3 やその他の分離株についてその生理学的特徴を詳細に調査していく予定である。

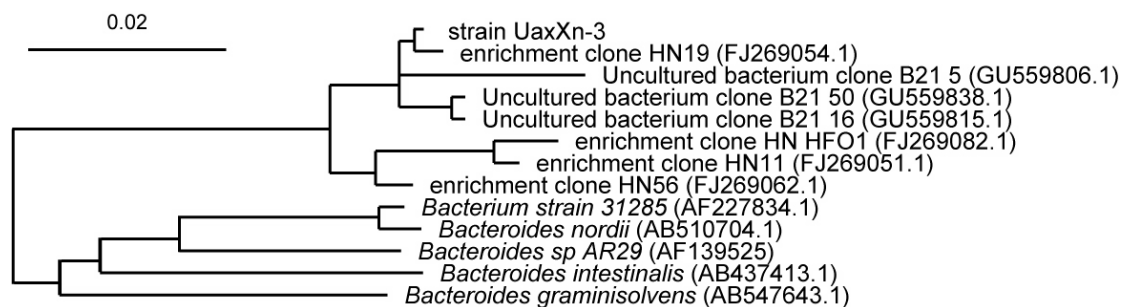


図2 UASBグラニュール汚泥から分離した分離株UasXn-3の16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析

参考文献

- 1) Nishiyama, T., et. al., (2009) Int J Syst Evol Microbiol 59 (8) , 1901-1907
- 2) Xin-Jun, W., et. al., (2009) J Soils Sediments 9:568-577