

電子資化性細菌を用いた廃棄物処理・有価物生産プロセスの創出

呉工業高等専門学校 学生会員 ○栗山 大輝

呉工業高等専門学校 正会員 木村 善一郎

1. 目的

廃棄物系バイオマスからのエネルギー回収は、低炭素化社会の構築に必要な技術である。代表的な技術としては現在までにメタン発酵プロセスや微生物燃料電池 (MFC) プロセスがあり、多くの研究報告がなされている。化石エネルギーへの依存脱却に向け、これらの研究課題は今後ますます重要性を増していくと考えられるが、これらのエネルギー回収手法の更なる発展にはエネルギーの回収効率が高いこと。輸送・貯蔵・利用が容易な高付加価値物質を生産すること。この2点が重要である¹⁾。

このことは言い換えれば、今後の再生可能エネルギー資源の利活用の拡大のために「使いやすい」エネルギー貯蔵担体を選択する必要があるということを意味する。我々は上記2つの課題を解決しうる技術として、「電気化学的培養技術を用いた廃棄物系バイオマスからの有価物生産プロセス」の構築に取り組んでいる。このプロセスは電位制御装置を用いた培養装置であり、電流生産細菌と電子資化性細菌²⁾の二種類の微生物群が電極・導線を通じ電子をやり取りして物質生産を行う。図-1 にリアクターの概念図を示した。現在までにリアクター陽極槽内において微量の酢酸を生産することに成功している。

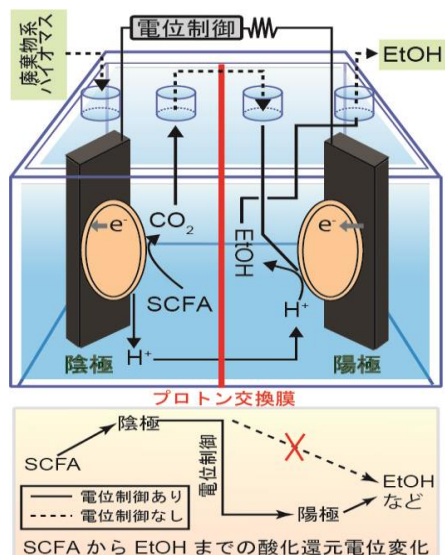


図-1 電気バイオリアクター概念図

酢酸は合成ゴム等の原料となる化学品であるが、単体での利用性は低く、また燃料としての性質も持たない。また、生産効率も極めて低い (<1%) ため今後本技術の実用化を考える上でより付加価値の高い物質生産キーワード 電子資化性細菌, 電気発酵, 固相電気培養, カーボンナノチューブ

が必要である。改善に向けては、リアクターの物理・化学的性状の改質および触媒となる電子資化性細菌の育種の両面での取り組みが必要である。本研究においては、触媒の育種に関連し環境中に存在する電子資化性細菌を網羅的に分離する技法の開発に取り組んだので報告する。

2. 実験手順

2.1 文献調査と分子系統樹作成による電子資化性細菌の系統分類の推定

電子資化性細菌の分離に向けては、ターゲットとなる細菌の系統分類を予め明らかとする必要がある。そのため Google Scholar による文献検索により、電子資化性及び水素資化性の炭酸還元細菌の発酵生産物及び分類学的系統を調査した。得られた配列データを用いて近隣結合法による系統樹作成を行った。

2.2 固相電気培養装置の開発

図-2 はカーボンナノチューブ (CNT) を塗布し、伝導性をもたせたシャーレによる培養装置である。電子資化性細菌は CNT を電子供与体として用いることが可能なため、シャーレに電位を印加し電流を流すことでシャーレ上に電子資化性細菌の生育が可能となると予想した。培養条件は、電圧印加、酸素の有無、抗生物質の有無、植種源の違い等、計 8 種類とし、計 8run を実施した。条件の詳細は表-1 に示した。培養後、得られたコロニーから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 V3 領域を標的とする変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を実施し、電圧の印加の有無による微生物群集構造の差異を調査した。

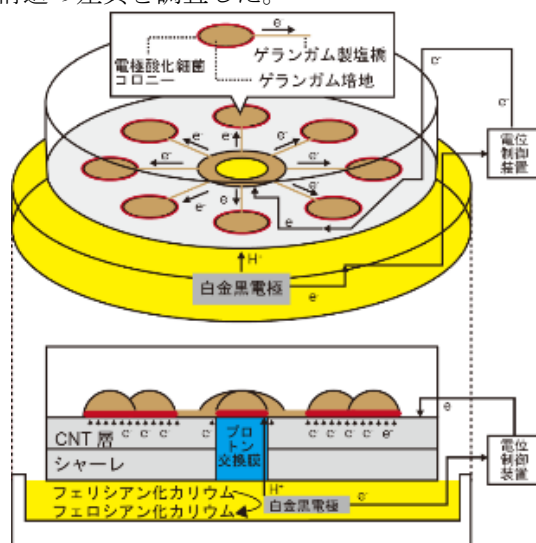


図-2 固相電気培養装置概念図

連絡先 〒739-8506 呉市阿賀南 2-2-11 呉工業高等専門学校環境都市工学分野木村研究室 TEL 0823-73-8486

表-1 固相電気培養実験条件

装置番号	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
電圧印加	○	×	○	×	○	○	○	×
酸素の有無	×	×	○	○	○	○	×	×
CNT含有量	2%	2%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
コロニー形成	△	△	○	×	○	-	-	-
糸状菌の発生	×	×	○	×	○	-	-	-
抗生物質の有無	×	×	×	×	×	○	○	○
植種源	10~10 ⁶ 希釈した消化汚泥を各スロットに添加		100倍希釈した消化汚泥をシャーレ全体に塗布		装置3からコロニーを分離		八橋油田サンプルを塗布	

3.実験結果および考察

3.1 電子資化性細菌の系統分類

表-2 に示す結果から、多くの電子資化性及び水素資化性炭酸還元細菌の主たる発酵産物を酢酸であることが示された。さらに、表-1 の細菌群の 16S rRNA 遺伝子を近隣接合系統樹で表した結果、過去に報告された全ての水素資化性炭酸還元細菌 (▲) 及び電子資化性炭酸還元細菌 (▲) が属する系統が広義の *Clostridia* 綱であった (図-3)。また、これらの形質が綱内に広く分布していることから同綱細菌の祖先の持つ形質が綱内に拡散したものであることが予想された。すなわち全ての *Clostridia* 綱細菌は電子資化性能を潜在していることが予想された。またこの結果から標的とするべき細菌が *Clostridia* 綱細菌であることが明らかとなった。

表-2 水素資化性・電子資化性炭酸還元細菌の発酵生産物と系統分類

種名	生産物	門	綱	目	科	電子資化性	水素資化性
<i>Sporomusa termidis</i>	酢酸、コクシジウム、ブドウ糖	Firmicutes	Clostridia	Selenomonadales	Sporomusaceae	未確認	○
<i>Acetomicrobium longum</i>	酢酸、乳酸、2-アミノブチレート	Firmicutes	Clostridia	Selenomonadales	Sporomusaceae	未確認	○
<i>Clostridium mayombae</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	未確認	○
<i>Ruminococcus hydrogenotrophicus</i>	酢酸、エタノール、乳酸、イソバネール	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	未確認	○
<i>Ruminococcus schinkii</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	未確認	○
<i>Acetogenium kivui</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	未確認	○
<i>Acetomicrobium ruminis</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	未確認	○
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	酢酸、エタノール、乳酸、ブタノール	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	未確認	○
<i>Moorella thermoacetica</i>	酢酸、エタノール、乳酸、ブタノール	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	○	○
<i>Acetobacterium woodii</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	○	○
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	酢酸、2-オキソグルタル酸、乳酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	○	○
<i>Clostridium acetum</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	○	○
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	酢酸、エタノール、ブタノール	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	未確認	○
<i>Clostridium ragdalei</i>	エタノール	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	未確認	○
<i>Clostridium fervens</i>	酢酸、エタノール、乳酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	未確認	○
<i>Thapidea bacter acetatolyticus</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	未確認	○
<i>Acetanaerobium noterae</i>	酢酸	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	未確認	○
<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	酢酸、イソバネール、イソバネール	Firmicutes	Clostridia	Tissierellales	Sporanaerobacter	未確認	○
<i>Natronococcus histidinovorans</i>	酢酸、アンモニア	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	未確認	○
<i>Treponema primitivum</i>	酢酸	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	未確認	○

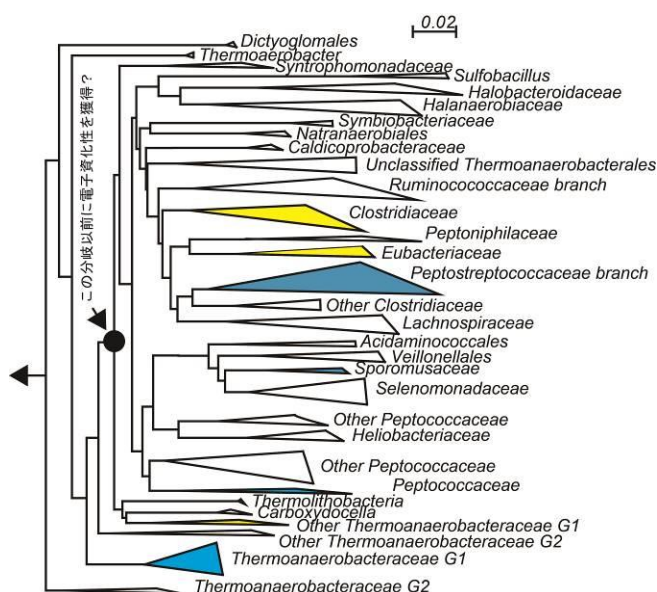


図-3 広義の *Clostridia* 綱全体の 16S rRNA 遺伝子近隣接合系統樹 (科レベルでクラスター表記)

3.2 固相電気培養装置

Run-1、Run-2 とともに 1 カ月の培養により、グララム上に目視可能なコロニーは形成されなかった。この結果から電子資化性細菌は環境中に希薄であると考えられる。また、コロニーの形成に至らなかったため、培地と CNT 混合し微生物がどの地点でも電子を利用できる Run-3、Run-4 を運用した。1 カ月の培養後、Run-3 のみ糸状菌及びバクテリアコロニーが形成された。Run-3 は低酸化還元電位条件で実施したが、糸状菌の生育が確認されたため微量の酸素供給があり、全体としては微好気条件であったと予想された。糸状菌の生育阻害のためにシクロヘキシミドを添加した培地を現在運用中である (Run-6)。また、嫌気環境であり、独立栄養細菌の多くの独立栄養細菌の分離実績のある八橋油田油層水を分離源とする装置運用についても現在実施中である (Run-7,8)。

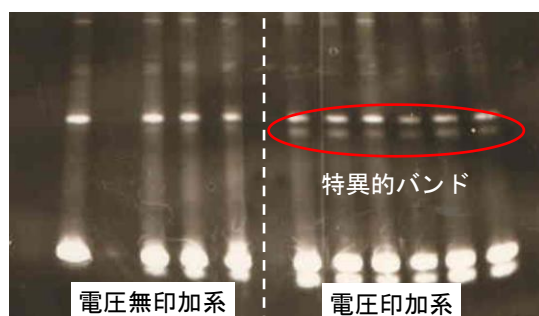


図-4 DGGE による微生物群衆構造解析

3.3 DGGE 法による系統解析

DGGE 法による群集構造解析の結果、図-4 に示すように Run-1 (電圧印加系)、Run-2 (電圧無印加系) のバンドプロファイルにわずかな違いが確認された。これにより電圧印加の有無により微生物の群集構造に違いが出る事が明らかとなった。Run-1 において形成されたコロニーの中に電極酸化細菌が存在する可能性は高い。したがって電圧印加した固相電気培養装置により電極酸化能力を有した独立栄養細菌の分離培養技術がほぼ成功したといえる。

4. 結論

成果を以下に示した。

1. 文献調査と分子系統学的解析から電子資化性細菌が *Clostridia* 綱に属することを実証した。
2. 電子資化性細菌の特異的分離装置の開発に取り組み、電圧印加と非印加時で異なる微生物群集構造が形成されることを解明した。

参考文献

- 1). Dutta, Suman, "A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource" *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20.4, 1148-56, 2014.
- 2). Nevin, Kelly P. et al. "Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms," *Applied and environ. microbiol.* vol.77, No.9, pp.2882-6, 2011,