

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510078

研究課題名（和文）

バイオマス資源の効率的低温微生物変換システム創出のための技術基盤の確立

研究課題名（英文）

Research on the technical base for the development of the efficient system for microbial conversion of plant biomass to beneficial materials at low temperatures

研究代表者 上木 勝司 (UEKI KATSUJI)

山形大学・農学部・客員教授

研究者番号：10111337

研究成果の概要（和文）：植物バイオマスの有用物質への低温保温嫌気的微生物変換処理システムの開発に向けた基礎的な検討を行った。水田土壌では低温適応嫌気性微生物が中温性嫌気性微生物に匹敵する生息密度で MPN 計数され、16S rDNA による系統解析で、極地環境から分離された好冷性細菌などに最近縁に関係付けられた。低温保温 MPN 培養から純粋分離した 52 細菌株の全てが 5℃で増殖し、ほとんどが 0℃で増殖した。水田土壌微生物群集は低温(10℃)下で植物バイオマスのメタン生成分解過程を完結させるのに必要な微生物群を完備していた。水田土壌を微生物源にした低温保温植物バイオマス微生物変換システムの開発が可能であると思われた。

研究成果の概要（英文）：Basic research for the development of the efficient system for microbial conversion of unused plant biomass to beneficial materials at low temperatures was carried out. In the rice field soil, cold-adapted anaerobes were enumerated with MPN-cultures at 5°C or 10°C at the value comparable to that of mesophilic anaerobes enumerated at 30°C. The 16S rDNA phylogeny indicated that cold-adapted anaerobes growing in the cold MPN-cultures were most closely related to bacteria such as psychrophiles isolated from an Antarctic lake. All of 52 isolates from cold MPN-cultures grew well at 5°C, and most of them grew even at 0°C. The anaerobic microbial community in the rice field soil harbored a complete set of anaerobic microorganisms necessary for the degradation of plant biomass to methane at low temperatures, e.g., 10°C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：省エネルギー技術、廃棄物再資源化、低温バイオマス分解、低温適応嫌気性微生物

1. 研究開始当初の背景

大気中温室効果ガス濃度の上昇による気候変動や資源・エネルギー問題への対応が重要な課題となり、カーボンニュートラルな植

物バイオマスのエネルギー資源や化学原料物質などの有用物質への変換利用が益々重要性を増していた。バイオマスの有用物質へ

の変換処理法の一つに微生物作用による方法があり、嫌気性微生物による無酸素条件下での処理ではメタンや水素、有機酸、アルコールの回収が可能であり、各種排水や生ごみ等の処理が実用技術として広く普及していた。

バイオマスの微生物変換処理では、利用する微生物に応じて、適切な温度で処理槽を保温する必要があり、保温温度が 30-35°C の中温性処理と 50-55°C の高温性処理が一般的であった。保温温度を 20°C 以下にした低温性処理は一部研究が進められていたものの、実用技術としては確立されていなかった。

なお、バイオマスの低温保温微生物変換処理では、低温下で活動する好冷性や耐冷性の微生物、すなわち低温適応微生物を用いる。低温適応微生物の研究では主に極地や氷河等の恒久的な寒冷環境に生息する微生物や冷蔵食品汚染微生物が対象にされていた。

2. 研究の目的

本研究では、植物バイオマスのエネルギー資源等の有用物質への効率的な低温保温微生物変換処理技術の開発に向けた基礎的検討を行った。高温性や中温性の処理では、熱帯や地熱エネルギー等が利用可能な地域以外は、特に寒冷期には、微生物処理槽の保温に要する多大なコストが処理システムの稼働コストを引き上げ、その実用性を失わせる要因ともなっている。

バイオマスの変換処理は収集コストの問題からその産出地域で行う必要がある。我が国の東北地方のような寒冷地域の廃棄バイオマス量が 1 日当たり数 t レベルの小都市や農村地域では、地下水等の利用で実現可能なレベルの保温温度でも効率的に稼働する小型の低温性処理システムが開発できれば、未利用バイオマスの有効利用を通じた地域資源・エネルギー循環システムの構築を容易にし、資源循環・環境保全型地域社会の成立に

大いに貢献できると思われた。

本研究では、まず低温適応嫌気性微生物について水田土壌における生息密度と系統的多様性ととともに、それらを分離して、生理的、分類学的特性を調べた。さらに、水田土壌を微生物源にした低温保温植物バイオマス分解メタン生成微生物群集の集積を試み、植物バイオマスの嫌氣的低温保温微生物変換処理システム開発の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 水田土壌試料は山形県農研センター(鶴岡市)の試験水田から 2007 年 12 月から 2009 年 8 月までの間に 6 回採取した。コアサンプラーで土壌を深さ 10 cm まで採取し、ポリエチレン袋中に密封し、氷冷保存した。研究室に輸送後直ちに、土壌コアの中軸部の試料を分取し、 O_2 除去 N_2 気流下で、1/10 (PY4S) 培地での 1/10 (v/v) 倍希釈を繰り返した。 10^{-9} 希釈試料までの土壌試料希釈シリーズを 2 セット調製し、試料採取後 2 時間以内に、嫌気性微生物の最確値 (MPN) 計数培養に供した。

(2) 嫌気性微生物の計数と分離、培養には、無機塩類、トリプトケース (1 g/L) とイーストエキス (0.5 g/L)、システイン-HCl (還元剤) 及びレサズリン-Na (酸化還元指示薬) を含む 1/10PY 培地にブドウ糖、麦芽糖、セロビオース及び可溶性デンプンを各 0.025 g/L 加えた貧栄養性培地である 1/10 (PY4S) 培地を O_2 除去 N_2/CO_2 (95/5, v/v) 気相で使用した。

嫌気性微生物の MPN 計数は 3 連培養で行った。各土壌試料希釈シリーズについて調製した各希釈段階 3 連の培養からなる MPN 培養シリーズを 5、10、20 又は 30°C で保温し、微生物の増殖を調べ、MPN 計数値を求めた。微生物の増殖は培養液の 660nm の吸光度を測定して調べた。MPN 培養から微生物細胞を遠心回収し、16S rRNA 遺伝子配列 (16S rDNA) の PCR 増幅と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動

(DGGE)解析に用いた。5°Cと10°C保温のMPN培養から、ロールチューブ培養によるコロニー分離を繰り返し、嫌気性微生物を分離した。

(3) 植物バイオマス分解メタン生成微生物群集の集積培養は、水田土壌、稲ワラ残渣、又は水稲残根+根圏土壌を微生物源に、ロ紙又は稲ワラを0.3%(w/v)添加した無機塩培地(1/10PY培地からトリプチケースとイーストエキスを除いた)又は1/10(PY4S)培地を用いて、O₂除去N₂/CO₂気相下、10、20又は30°Cで保温して行った。

(4) 有機酸、アルコール及びガスはガスクロマトグラフィーで測定した。ゲノムDNAのG+C含量は、DNA-GCキット(ヤマサ醤油)を用い、ヌクレオチドの高速液体クロマトグラフィーで測定した。菌体脂肪酸はガスクロマトグラフィーで、細胞壁アミノ酸と呼吸鎖キノンは薄層クロマトグラフィーで分析した。

(5) 16S rDNAのPCR増幅は、V3領域には細菌特異的プライマー対B341fGC/534r又は古細菌特異的プライマー対ARC344fGC/533Irを、全長配列にはプライマー対27f/1492rを用いて行った。V3領域増幅産物のDGGEは、10%(w/v)アクリルアミドで、変性剤濃度勾配25%-55%[100%は7M尿素/40%(v/v)ホルムアミド]で行った。塩基配列決定はThermo Sequenase cycle sequencingキットと4000Lシーケンサーを用いて行った。

(6) 塩基配列決定した16S rDNAのV3領域と全長配列の類似性をBLASTで検索し、Clustal Wでアライメントし、配列間の類似性を1:1の比較で求めた。ギャップや不確定な塩基による配列位置は比較から除いた。

系統樹は、NJ plotを用いて、近隣結合法により1000ブートストラップサンプリングで作成した。多重アライメントした配列の内の1つにでもギャップや不確定な塩基が含まれた塩基位置は比較から除いた。

(7) 16S rDNAの全長とV3領域の塩基配列は

以下のアクセッションナンバーでDDBJ並びにGenBankデータベースに登録した。5°C保温MPN培養からの分離株の全長配列はAB539899-AB539907。MPN培養から回収された細菌性V3領域配列はAB541155-AB541189、AB541415-AB541427、AB541472、AB551166及びAB551167。10°C保温MPN培養からの分離株のV3領域配列はAB672665-AB672675。

4. 研究成果

(1) 水田土壌に生息する低温適応嫌気性微生物の計数と多様性解析

冬期の東北地方の水田は積雪に覆われ、土壌温度は低温ではあるが氷点を下回らないレベルに保たれる。一方で、水田には秋に散布された稲ワラが多量に存在し、極めて有機物に富んだ状態にあり、好冷性や耐冷性の微生物が活躍できる条件が備わっている。そこで水田土壌における低温適応嫌気性微生物の生息密度をMPN培養による計数で調べた。

2007年12月から2009年8月までの間の異なる時期に採取した6土壌試料についての5、10、20又は30°C保温MPN培養による嫌気性微生物の計数結果を図1に示した。土壌試料の採取季節に関わらず、5°Cや10°Cでも、30°Cでの計数値の約0.1-50%に相当する、10⁵-10⁷細胞/cm³湿土壌レベルで嫌気性微生物が計数された。5°Cや10°Cでの計数値は今回の培養

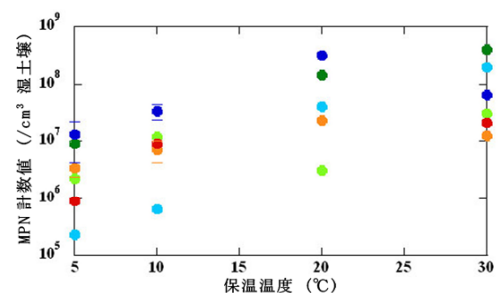


図1 水田土壌に生息する嫌気性微生物の各種保温温度でのMPN計数値
2007年12月(●)、2008年3月(●)、2008年6月(●)、2008年10月(●)、2009年1月(●)及び2009年8月(●)に採取した土壌試料について、嫌気性微生物を5、10、20又は30°C保温MPN培養で計数した。2つの土壌希釈シリーズから調製した2つ又は3つのMPN培養シリーズの結果を平均値で示した。3培養シリーズの平均値には標準偏差も示してある。

条件で増殖可能な低温適応嫌気性微生物の生息密度を表わしている。従って水田土壌に

は、今回の培養条件では増殖してこなかった個体群をも含めて、低温適応嫌気性微生物が高い密度で生息していると考えられた。

MPN 培養から微生物細胞を回収し、16S rDNA の V3 領域を PCR 増幅し、DGGE での分離プロファイルと比較するとともに、各バンドの塩基配列を決定し、系統解析した。古細菌用プライマー対では PCR 増幅産物は認められなかった。図 2 に 2009 年 1 月採取土壌試料の MPN 培養から回収された細菌 16S rDNA の V3 領域配列の DGGE プロファイルを示した。5°C 保温

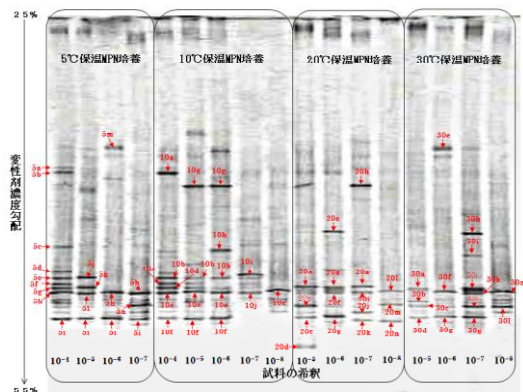


図2 MPN培養から回収された細菌性16S rDNA V3領域のPCR増幅産物のDGGEプロファイル
2009年1月13日採取土壌試料についての嫌気性微生物のMPN計数培養におけるDGGEプロファイルを示した。

10⁻⁴ 希釈試料接種培養では明確なバンドが少なくとも 15 本認められ、10⁻⁷ 希釈試料接種培養でも 6 本認められた。16S rDNA を複数コピー持つ細菌も多いことから、DGGE バンドの各一本が必ずしも別の系統の細菌を代表しているわけではないが、それでも以上の結果は水田土壌における多様な系統の低温適応嫌気性細菌の生息を強く示唆した。

なお、5°C と 10°C での培養とで多くのバンドが共通であり、また採取時期の異なる試料でも類似した DGGE プロファイルを示していたことから、多様な低温適応嫌気性細菌が季節を問わず生息していることが示唆された。

2009 年 1 月採取試料の 5°C、10°C、20°C 及び 30°C 保温の MPN 培養について、それぞれ、16、10、14 及び 13 の DGGE バンドの塩基配列を決定し、系統解析した。5°C 培養では、14 バンドが *Firmicutes* 門の *Clostridiaceae* 科

Clostridium 属の cluster I に配属され、その内の 7 バンドに南極の湖から分離された *C. frigoris* や *C. lacusfryxellense* 等やカナダ北極圏の永久凍土から分離された *C. tagluense* が最近縁であるなど、ほぼ全てが好冷性や耐冷性の細菌に関係づけられた。それぞれ *Gammaproteobacteria* 綱と *Fusobacteria* 門に属した残りの 2 バンドも最近縁種は好冷性や耐冷性であった。10°C 培養でも、4 バンドが *C. lacusfryxellense* 等の南極分離細菌に最近縁で、*Fusobacteria* 門と *Firmicutes* 門 *Acidaminococcaceae* 科配属の各 1 バンドも好冷性や耐冷性の細菌に関係づけられた。

(2) 低温適応嫌気性細菌の分離と特徴付け
5°C 保温と 10°C 保温の MPN 培養から分離した 52 分離株について、16S rDNA による系統と増殖温度を調べた。5°C 培養からの 20 分離株は、*Gammaproteobacteria* 綱 *Enterobacteriaceae* 科 *Serratia* 属に属した C5S9 株以外は、全て *Clostridium* 属の cluster I に属した。図 3 に代表 9 菌株の増殖温度特性を示した。*C. tagluense* や *C. lacusfryxellense* が最近縁の 3 菌株 (C5S3, C5S7, C5S18) は 15°C で最も速く増殖し、増殖温度域の上限が 20°C 前後、増殖収率 (最高 O. D. 値) も 5°C で最高と、好冷性であった。中温性細菌の *C. saccharobutylicum* と *C. puniceum* が最近縁の 6 菌株は、25°C で最も速く増殖し、増殖温度の上限

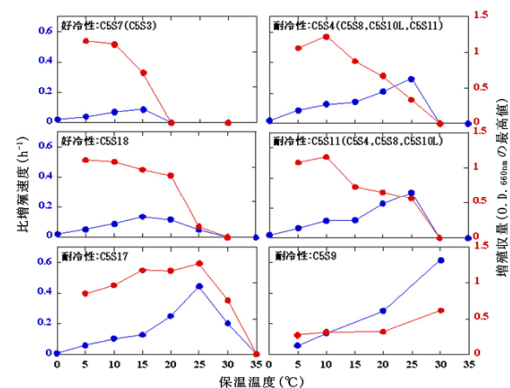


図3 5°CMPN培養から分離した菌株の増殖への温度の影響
代表菌株の比増殖速度(●)と増殖収量(最高O. D. 値)(●)を示した。

が 30°C 未満又は 35°C 未満であったが、増殖収率は低温域で高く、耐冷性であった。なお、

Clostridium 属の8菌株は0°Cでも増殖した。C5S9 株は中温性の特性が強かったが、5°Cでもよく増殖し、増殖収率が低温域で比較的高く、やはり耐冷性を有していると判断された。

10°C保温 MPN 培養からの32分離株の内、*C. lacusfryxellense* 等の南極分離細菌が最近縁の1菌株は $\leq 0^\circ\text{C}$ から $< 20^\circ\text{C}$ が増殖温度域で、増殖速度は15°Cで最高であった。同じく南極分離細菌に近縁の5菌株と *Clostridium gasigenes* に近縁の7菌株は増殖温度域が $\leq 0^\circ\text{C}$ から $< 25^\circ\text{C}$ で、増殖速度は20°Cで最高であった。*Gammaproteobacteria* 綱の *Aeromonas* 属関連の7菌株、*Firmicutes* 門、*Paenibacillaceae* 科 *Paenibacillus* 属の1菌株、及び '*C. favosporum*' と *C. puniceum* に近縁の3菌株は $\leq 0^\circ\text{C}$ から $30^\circ\text{C} \leq$ で増殖し、増殖速度は $30^\circ\text{C} \leq$ で最高であった。同じく '*C. favosporum*' と *C. puniceum* に近縁の8菌株は0°Cで増殖せず、 $\leq 5^\circ\text{C}$ から $30^\circ\text{C} \leq$ で増殖し、増殖速度は $30^\circ\text{C} \leq$ で最高であった。

3菌株(C5S7, C5S11, C5S18)を選んで、生理的特性と分類学的特性に併せて、化学分類学的特性(ゲノムDNA G+C含量、菌体脂肪酸組成、細胞壁アミノ酸、呼吸鎖キノン)を調べた。その結果、これらの菌株が新種の低温適応細菌を代表している可能性が示唆された。

(3) 低温活性植物バイオマス分解メタン生成嫌気性微生物群集の集積と特徴付け

水田から採取した各種試料を微生物源にして、植物バイオマス(稲ワラ又はロ紙)添加1/10(PY4S)培地又は無機塩培地での10、20又は30°C保温培養で、バイオマス分解とガス(CH_4 、 CO_2 、 H_2)生成を比較し、低温下でも活発に活動する植物バイオマス分解メタン生成嫌気性微生物群集の集積を試験した。

10°C保温では、稲ワラ添加1/10(PY4S)培地で稲ワラ分解メタン生成培養が得られたが、継代移植を繰り返すとメタン生成能が失われ、植物バイオマス分解能のみが維持された。

この10°C保温稲ワラ分解集積培養系を15、20又は30°Cで培養すると、15°C培養では、10°C培養と同様に、メタンは痕跡レベルしか生成されなかったが、20°Cと30°Cでの培養では顕著にメタンが生成された。二酸化炭素は10°Cと15°Cでの培養では、20°Cや30°Cでの培養に比べて、ゆっくり生成されたが、最終的には30°C培養に匹敵する生成量であった。なお、この培養系は10°Cでセルロース、ヘミセルロース、ペクチン及び植物貯蔵多糖であるデンプンとイヌリンを分解し、5°Cでも強いキシラン分解能を示した。

20°C保温と30°C保温の培養では、どの培地でも植物バイオマス分解メタン生成集積培養が得られたが、ロ紙添加無機塩培地での20°C保温培養は継代移植でメタン生成能を喪失した。30°C保温植物バイオマス分解メタン生成集積培養は安定して継代維持できた。

稲ワラ添加無機塩培地での20°C保温集積培養系は、15°C培養でもメタンと二酸化炭素を生成した。また、30°Cではメタンと二酸化炭素の生成が著しく活発化した。メタン生成能を喪失したロ紙添加無機塩培地での20°C保温集積培養系は、ロ紙分解(図4)に伴い、水素と二酸化炭素を生成した。水素と二酸化炭素は、それぞれ、最終的に30°C培養で約15 mmol/lと約26 mmol/l、20°C培養では約8 mmol/lと約22 mmol/l生成された。

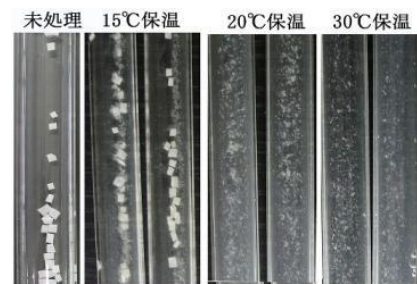


図4 20°C保温集積培養におけるロ紙分解
0.3% (w/v) ロ紙添加無機塩培地での20°C保温培養

2系統の30°C保温集積培養系(ロ紙添加無機塩培地とロ紙添加1/10(PY4S)培地での培養系)はどちらも18°Cではメタン生成が30°Cに比べて遅れて進行したが、最終的なメタン

生成量は30℃に匹敵していた。これらの2系統の30℃保温集積培養系に由来する18℃保温副培養系は、どちらもロ紙分解能とメタン生成能が安定して継代維持され、また10℃から30℃の温度域でキシラン、ペクチン、デンプン並びにイヌリンへの強い分解能を示した。なお、細菌16S rDNA V3領域のPCR-DGGE解析では、上記2系統の30℃保温集積培養系は、セルロース分解細菌群を含め、細菌群集の構成が互いにかなり異なっていることが示された。20℃保温と30℃保温の集積培養系から少なくとも3種類のセルロース分解細菌を計5菌株純粋分離し、生理的特性を調べた。

(4) 以上のように、本研究では、我が国の典型的な中温性土壌環境である水田土壌に、南極の湖や北極圏の永久凍土などの恒久的な低温環境に生息する好冷性や耐冷性の細菌に系統的に極めて近縁に関係づけられる細菌など、多様な系統の低温適応嫌気性細菌が高密度で生息していることを明らかにした。このことは、中温性土壌環境に生息する微生物群集のこれまで知られていなかった構造的、機能的な特性を明らかにした新規の知見であり、微生物生態学的な意義は大きい。

また、増殖温度の上限が20℃や25℃未満の細菌が夏期の増殖温度の上限を超える温度条件に生理的にどのように対応して生残しているのか、微生物生理学的にも大変興味を持たれる課題を提起している。

さらに本研究では、水田土壌嫌気性微生物群集は10℃程度の低温下で植物バイオマスのメタン生成分解過程を完結させるのに必要な低温適応微生物群が完備しており、水田土壌が植物バイオマスの低温保温微生物変換システムに用いる低温適応微生物群集の有望な集積源になることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 上木勝司, 嫌気性微生物群集とその資源工学的利活用, 環境資源工学, 査読無, 58巻, 2011, 170-175

[学会発表] (計6件)

- ① 上木勝司, 嫌気性微生物群集とその資源工学的利活用, 環境資源工学会第127回例会(招待講演), 2011年11月10日, 東北公益文科大学.
- ② 齋藤 幸, 上木 厚子, 加来 伸夫, 上木 勝司, 水田土壌から分離した好冷性*Clostridium* spp. の増殖特性と機能, 第26回日本微生物生態学会大会, 2010年11月24日, 筑波大学.
- ③ Katsuji Ueki, Kouki Suzuki, Akio Ichimura, Nobuo Kaku, and Atsuko Ueki, Diversity and phylogenetic diversity of culturable populations of cold-active anaerobes in the temperate soil environment of rice field in Japan, 13th International Symposium on Microbial Ecology, 2010年8月23日, Washington State Convention and Trade Center, Seattle, WA, USA.
- ④ 齋藤 幸, 市村明士, 鈴木浩毅, 加来伸夫, 上木厚子, 上木勝司, 好冷性嫌気性細菌の水田土壌からの分離とその系統および生理, 第25回日本微生物生態学会, 2009年11月21日, 広島大学.
- ⑤ 鈴木浩毅, 大戸 剛, 林あずさ, 加来伸夫, 上木厚子, 上木勝司, 水田土壌に生息する低温活性嫌気性微生物の計数と系統的多様性解析, 第25回日本微生物生態学会, 2009年11月21日, 広島大学.
- ⑥ 市村明士, 鈴木浩毅, 加来伸夫, 上木厚子, 上木勝司, 水田土壌に生息する低温活性嫌気性微生物の分離と多様性の解析, 日本農芸化学会東北支部第144回大会, 2009年10月31日, 岩手大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上木 勝司 (UEKI KATSUJI)
山形大学・農学部・客員教授
研究者番号: 10111337

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

上木 厚子 (UEKI ATSUKO)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 60143088
加来 伸夫 (KAKU NOBUO)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号: 80359570