

嫌気, 好気微生物の混合培養による効率的有機物分解

Combination of Anaerobic and Aerobic Microorganisms for Effective Bio-Degradation of Organic Substances

春田 伸*, 加藤創一郎, 崔 宗均

SHIN HARUTA*, SOUICHIRO KATO, ZONG JUN CUI

石井 正治, 五十嵐泰夫

MASAHARU ISHII and YASUO IGARASHI

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒263-0022 千葉市稲毛区弥生町1-8

* TEL: 043-251-8312 (ext. 421) FAX: 03-5841-5272

* E-mail: aharuta@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-8 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-0022, Japan

キーワード: 微生物集団, 微生物分解, リグノセルロース

Key words: microbial community, microbial degradation, lignocellulosic materials

(原稿受付 2005年8月31日/原稿受理 2005年10月24日)

1. はじめに

様々な環境から好氣的代謝能をもつ微生物に混じって嫌気性微生物が見つかる。また効率的に固体有機物を分解処理している堆肥化過程からも好気性微生物だけでなく、嫌気性微生物も検出されている (e.g., Pedro et al.¹⁰)。さらに強制的な通気条件で処理を行う液肥化過程でも好気、嫌気両微生物群が検出されている (D. Hanajima, personal communication)。また実験室内での共培養実験では、*Clostridium* 属細菌によるセルロース分解が非セルロース分解性の嫌気性細菌との共培養により促進されるばかりでなく^{9,13}、カビによるセルロース分解が嫌気性細菌の共存で促進される報告もあり¹²、これら代謝の組合せに興味をもたれている。我々は堆肥化過程を植種源として好気、嫌気の両環境が混在する液体静置条件で継代培養を繰り返し、リグノセルロースを効率的に分解する安定な微生物集団を得ている^{2,3}。本稿では、その微生物集団のセルロース分解の効率性に注目し、各微生物の役割を解析した結果を紹介する。

2. 好気静置条件における微生物集団による効率的な稲わら分解²⁾

構築した微生物集団は固体リグノセルロース基質 (稲わら) のほかにペプトンや酵母エキスを含む液体培地を用いて、図1に示すように三角フラスコで静置培養を繰り返している。フラスコには密栓をせずアルミホイルを被せただけであり、気相は大気と通じている。しかし植菌後、数時間で培養液中の酸化還元電位は -400 mV 以

下まで低下し、培養過程を通して還元状態が維持されている (図2)。稲わらを基質とした例では、4日間の培養で添加した稲わらの50%以上を分解するが、強制通気による好気条件や気相ガス置換による無酸素条件で培養すると、分解率は著しく低下する (data not shown)。またフラスコ内の培養液量を減らしても分解率は低下することから、大気に接する液面部の面積と深さのバランスも重要である。ろ紙の分解を観察した例では、気液界面部分から最初に分解が起こり、ろ紙が分断される様子が見



図1. 稲わら分解微生物集団の培養。

用いた培地組成は、0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% CaCO₃, 1% rice straw. 50°C で静置培養し、4日から1週間で継代培養を繰り返している。右は微生物集団接種, 左は未接種。

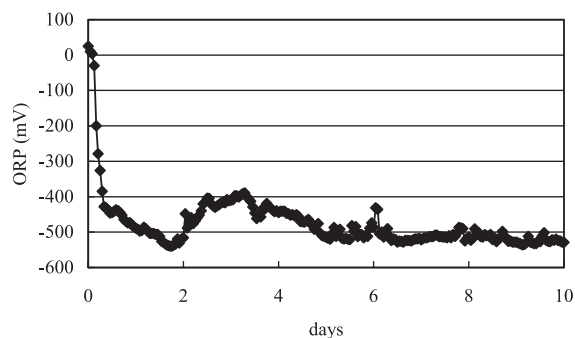


図2. 培養液の酸化還元電位 (ORP) の変化。

て取れる。これらのことから効率的分解において好気、嫌気の両代謝の重要性が示唆される。

3. 構成微生物種の解析^{2,4-6)}

構成微生物種を PCR-DGGE 法および培養法により解析したところ、数十回継代培養を繰り返しても表1に示す7種の細菌が変わらず検出されている。これらのうちセルロース分解性を示したのは CSK1 株のみであった。本株は既知セルロース分解菌である *Clostridium thermocellum* に近縁であるが、各種の系統分類学試験によりいくつかの点において相違点が見られたことから、*Clostridium* 属細菌の新種として *Clostridium straminisolvens* と名づけた⁴⁾。*C. thermocellum* と比較し、特に酸素耐性に優れていたことは本培養系を考える上で興味深い。また分解中の稲わらを対象に FISH 解析したところ、CSK1 株だけでなく非セルロース分解性の *Clostridium* sp. FG4 株も付着していることが明らかとなっている (data not shown)。ただしこれら *Clostridium* 属細菌は大気相下、静置条件では増殖できないことから、微生物集団内では他細菌による酸素消費が重要であると考えられる。

4. 効率的分解のための微生物の組合せの検討⁵⁾

まず CSK1 株に他の細菌を混合し、2種混合培養系でのセルロース分解を検証した。好気条件で生育可能な分離株のうち、M1-3, M1-5 または M1-6 株との共培養でろ紙分解が観察された (S3, S5 および S6, 図3)。しかし分解率を元の微生物集団 (original community, 図3) と比較すると70~90%と低かった (図3)。そこでさらにこれら効果の見られた3種の細菌を組合せた M1-3, M1-5, M1-6 および CSK1 株から成る4種混合培養系 S356 を構築したところ、元の微生物集団と同等のろ紙分解率を示した。ただしこの4種混合系も嫌気条件で培養すると、分解率は大きく低下することから好氣的代謝の重要性を示唆している (S356 (AN), 図3)。さらにこの4種混合系に M1-1 または M1-4 株を添加すると分解率は低下した。同様にセルロース付着性のある FG4 株の添加も分解率には抑制的に働いた。以上からセルロースの効率的分解に関して CSK1, M1-3, M1-5, M1-6 株の4種の組合せが有効であることが分かった。

CSK1 株の嫌気条件での純粋培養によるろ紙分解

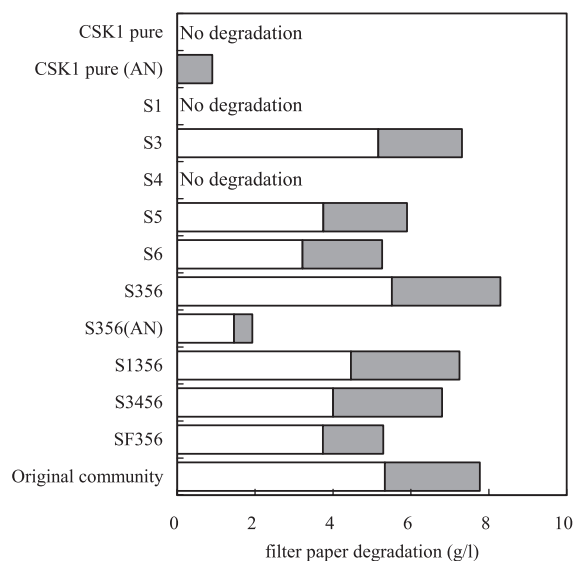


図3. 純粋培養または混合培養によるろ紙分解率の比較。

棒グラフの白色部は培養4日目までの分解率、灰色部は4日から8日目での分解率を示す。括弧内に AN と示したのは気相を窒素置換した嫌気条件での培養結果であるが、それ以外はすべて好気静置培養である。使用した培地は図1と同様であるがここでは稲わらの代わりにろ紙を用いている。分離株の略称は表1を参照。

を4種混合系と比較した (図4)。ここでは図3と異なり、CSK1 株については至適増殖培地を用いている。ろ紙分解の経時変化をみると CSK1 株単独でも培養初期は混合系と同様の分解速度を示しているが、培養が進むにつれ分解量に差が見られている (図4A)。また CSK1 株単独では酸性 pH からの回復がみられず、セルロース分解産物であるセロオリゴ糖や酢酸が蓄積する傾向にあることが分かる (図4B, C, D)。これら酸性 pH やオリゴ糖の蓄積はセルロース分解細菌の生育やセルラーゼ活性に対して抑制効果があることから⁴⁾、混合系に共存する他細菌は嫌気環境の形成だけでなく、分解産物の消費を通して CSK1 株によるろ紙の効率的分解に寄与していると考えられる。一方、M1-1 株や M1-4 株にはオリゴ糖または酢酸の利用能が確認されているが (表1)、これら細菌の添加は混合系におけるろ紙分解に抑制的に働くため、その他の寄与やそのバランスも重要なものかもしれない。

5. 混合培養系を用いた各微生物種の役割解析⁶⁾

上記4種混合系 (S356) は高い分解効率を示したが、継代培養を20回以上繰り返すと M1-5 株が検出されなくなり、集団の構造維持に関しては不十分な混合系であった⁹⁾。一方、この4種混合系に FG4 株を追加した5種混合系 (SF356) では分解率はやや劣るものの構成微生物種の安定な共存が可能であった。そこでこの5種微生物のそれぞれの役割を解析した。各構成微生物種の純粋培養条件での主な有機物 (CSK1 株によるセルロース分解産物) の利用性を表1にまとめた。一部の細菌にこれら有機物の利用性が検出されているものの、M1-3 や M1-6 株の役割は不明である。また純粋培養条件での性質が

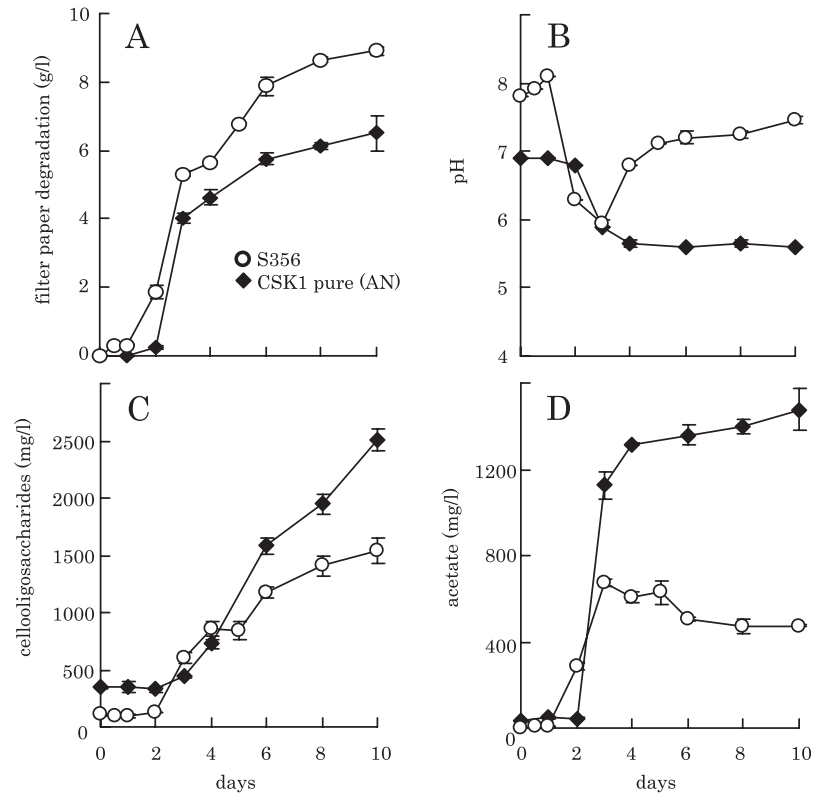


図4. 4種混合培養系 (S356) と CSK1 株単独 (CSK1 pure) の培養過程の比較。

混合系は図3と同様の培地を用いた好気静置培養であるが, CSK1 株単独は本菌の増殖至適培地 (DSM122 medium, <http://www.dsmz.de/>) で嫌氣的に培養した。A, ろ紙分解量; B, pH; C, セロオリゴ糖濃度; D, 酢酸濃度。

集団内の挙動を反映しているとは限らないため (e.g., Nakamura et al.⁸⁾), 5種混合系とそこから1種のみを除いた4種混合系を比較し, 各微生物の役割を推定した。ここでは除いた微生物に着目するため, 各混合系を ΔX と表記する (例 ΔF は S, 3, 5, 6 から成る4種混合系)。

ΔS を除き, すべての混合系でろ紙分解が観察された (図5A)。直接の分解細菌である CSK1 株以外は分解に必須ではないが, 混合系の組合せの違いによって分解率に差が見られた。図3でも示したように S356 (ΔF) が最も高い分解率を示したが, その他の4種混合系と5種混合系には大きな違いは見られなかった。次に培養液の

pH の変化を見ると, ΔS では酸性化が見られないが, ろ紙分解性を持つ混合系では培養初期に pH が低下していた (図5B)。ただし ΔF では培養後期中性へと回復しており, この変化は元の微生物集団と類似している²⁾。さらに主要なセルロース分解産物であるセロオリゴ糖, 酢酸, エタノールの培養8日目の各濃度を測定し, ろ紙分解量当たりの値で比較した (図5C, D, E)。 $\Delta 3$ や $\Delta 6$ でオリゴ糖生成は5種混合系よりも抑制されていたが, ΔF や $\Delta 5$ では増加していた。この結果は FG4 株および M1-5 株のオリゴ糖消費活性を示唆しており, 表1の純粋培養の結果と一致する。酢酸量について

表1. 稲わら分解集団の構成微生物種。

| Strain ^a | Closest relative | Growth | | Utilization ^b | | | | |
|---------------------|---|-----------|---------|--------------------------|------------|---------|---------|---------|
| | | anaerobic | aerobic | cellulose | cellobiose | glucose | acetate | ethanol |
| CSK1 (S) | <i>Clostridium straminisolvans</i> ^c | + | - | + | + | - | nt | nt |
| FG4 (F) | <i>Clostridium thermosuccinogenes</i> | + | - | - | + | + | nt | nt |
| M1-1 (1) | <i>Bacillus licheniformis</i> | + | + | - | + | + | + | nt |
| M1-3 (3) | <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| M1-4 (4) | <i>Virgibacillus panthothenicus</i> | - | + | - | - | - | + | nt |
| M1-5 (5) | <i>Brevibacillus agri</i> | - | + | - | - | + | - | + |
| M1-6 (6) | <i>Bordetella petrii</i> | - | + | - | - | - | - | - |

a 括弧内は本論文で使用している略称。

b CSK1 株および FG4 株は目的の有機物を唯一の炭素源とする培地で嫌氣的に培養し酸生成の有無により判定した。M1-3, M1-5, M1-6 株については Biolog システムを用いて, 好気条件で培養し利用性を判定した。ただしエタノール利用性は液体培養によるエタノール濃度の減少を直接測定した。+, positive; -, negative; nt, not tested.

c 我々が同定, 命名した新種⁹⁾。

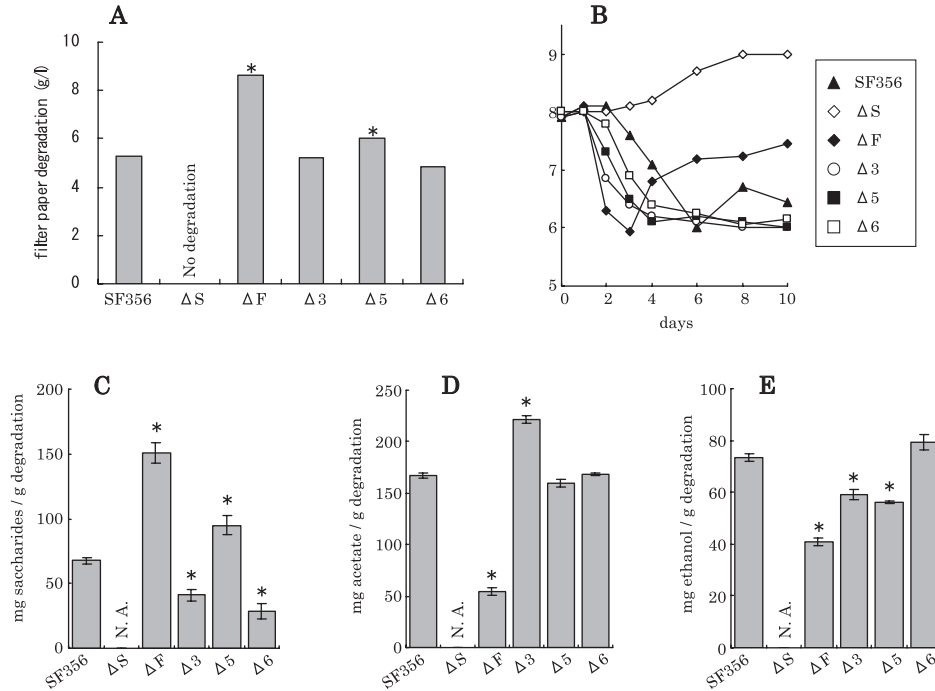


図5. 5種混合培養系 (SF356) と1種ずつを除いた4種混合培養系の比較。
 A, 8日培養でのろ紙分解量; B, pH; C, セロオリゴ糖量; D, 酢酸量; E, エタノール量。代謝物の量 (mg) は8日間培養でのろ紙分解量 (g) あたりの値で示した。ろ紙分解が検出されない混合系の代謝物量には N.A. (not applicable) と示した。5種混合系 SF356 と有意な差が見られているもの (P<0.05) には※を付した。

は ΔF での生成抑制または消費が顕著であり、これは図5Bで示した pH 回復の一因と考えられる。以上から FG4 株は糖を消費し、酢酸を生成していると考えられる。また Δ3 の酢酸量の上昇結果は、M1-3 株の酢酸消費を示唆するものであるが、純粋培養試験ではその利用性は検出されていない (表1)。エタノールの生成量は FG4, M1-3 または M1-5 株の存在により促進されるが、中でも FG4 株による生成促進が顕著であり、糖消費によるエタノール生成が示唆される。以上の結果を図6にまとめた。セルロースの一次分解者である CSK1 株の生成物は主にオリゴ糖、酢酸、エタノールであるが⁴⁾、糖か

らの酢酸生成には FG4 株も関与している。また FG4 株は酢酸に加え、エタノール、グルコースを生成する。糖消費はセルロース分解を促進することが知られているが、過剰に生成される酢酸は培養液の酸性化等 CSK1 株の活性を低下させるため、結果として SF356 のろ紙分解率は低く、ΔF が高い分解率を示したと考えられる。また M1-5 株によるグルコースやエタノールの消費に加え、M1-3 株による酢酸消費が効率的な分解産物除去につながっており、還元的環境の提供だけでなく、これらの好氣的代謝の重要性が示された。一方、M1-6 株はセルロース由来の有機物でなく、酵母エキスやペプトンといった他の培地成分の利用が考えられるが、その集団内での寄与は明らかではない。ただし M1-3, M1-5, M1-6 株の培養上清には CSK1 株の生育促進効果が見られており (unpublished data), 代謝フローだけでは説明できない関係性もあると考えられる。

これまでの結果は継代培養第2世代目を用いた実験であり、どの混合系でも混合したすべての細菌の残存性を確認している (表2)。しかし継代培養を繰り返すと、いくつかの混合系で細菌の脱落が観察された。ΔF では前述のように M1-5 株が検出されなくなっており、M1-5 株が FG4 株の代謝物に依存するという図6に示した関係性を支持する結果である。一方、Δ5 では CSK1 株および FG4 株が脱落しており、これら細菌は相互に影響を与え合っているのではないだろうか。また ΔS では継代培養によって他細菌すべてが排除され M1-6 株のみになっており、明確な役割を特定することのできなかった M1-6 株を含む安定共存の機構に興味ももたれる。

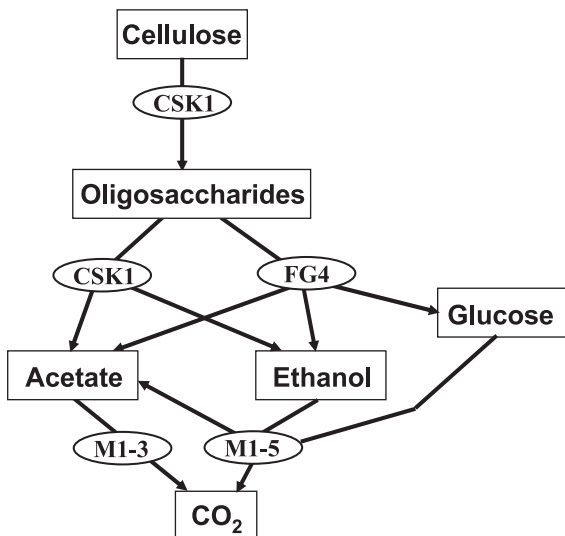


図6. セルロース分解のフローモデル。

表 2. 混合培養系における構成微生物種の安定性。

| mixed-culture ^a | 2nd generation | | | | | 22nd generation | | | | |
|----------------------------|----------------|------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|
| | S | F | 3 | 5 | 6 | S | F | 3 | 5 | 6 |
| SF356 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ΔS | n.i. | + | + | (+) | + | n.i. | - | - | - | + |
| ΔF | + | n.i. | + | + | + | + | n.i. | + | - | + |
| Δ3 | + | + | n.i. | + | + | + | + | n.i. | + | + |
| Δ5 | + | + | + | n.i. | + | - | - | + | n.i. | + |
| Δ6 | + | + | + | + | n.i. | + | + | + | + | n.i. |

分離株の混合した世代を第 1 世代とし, 8 日目の培養液を新鮮な培地に 1% 接種して継代培養を繰り返した。第 2 世代と第 22 世代の培養 8 日目について培養系全体から DNA を抽出し, 各細菌の 16S rRNA gene に特異的なプライマーを用いて PCR 法で検出した。

a 混合培養系の構成微生物種については本文参照。各細菌の一字略称は表 1 を参照。

+, positive; (+), weakly positive; -, negative; ni, not included in the mixed-culture.

6. おわりに

我々はセルロース分解の効率性およびその安定性を指標に集積培養を繰り返し, 微生物集団を得ている。また培地成分には自然界や堆肥化過程のようにセルロース以外の有機物も含まれており, 液体静置という培養法も含め, 多様な微生物の共存を許容する条件であった。それゆえに特定の代謝のみに集約する選択性が低く, 代謝特性の異なる複数種の微生物からなる集団が得られたのではないだろうか。好気静置という嫌気・好気状態が混在する培養条件は厳密な制御を考える実験室では特異であるが, 自然界では至る所で見られる環境である。このようにして集積した微生物集団では, 嫌気条件で特に効率の悪い有機酸の分解を好気代謝によって補うことで嫌気性細菌によるセルロース分解を強力に促進していることが明らかとなった。さらに酸素除去による嫌気性細菌の増殖, セルロース分解物を利用した好気性細菌を含む他細菌の生育, また分解物除去による一次分解者の活性化, という見事なネットワークが複数微生物種の安定な共存も可能にしていると考えられた。加えて, セルロースの分解フロー以外の代謝による生育促進や抑制作用も示唆されており, 集団としてのバランスを保っていると考えられる。

既知微生物の混合ではなく, 自然に習った微生物集団の構築・育種によって新たな微生物機能の開発も期待される。近年, 自然界からの集積培養により機能性集団を取得する試みが多数報告されるようになってきているが¹¹⁾, 集団機能を安定に維持することは困難であり, 安定化機構の解明は今後の集団開発・利用における重要な課題である。

文 献

- Carvalho, M.F., C.C.T. Alves, M.I.M. Ferreira, P. de Marco, and P.M.L. Castro. 2002. Isolation and initial characterization of a bacteria consortium able to mineralize fluorobenzen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 102–105.
- Haruta, S., Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 529–534.
- 春田 伸, 五十嵐泰夫. 2004. 有機性廃棄物を分解・再資源化する微生物集団機能の解析と開発. *J. Environ. Biotechnol.* 4: 29–39.
- Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, A. Yokota, and Y. Igarashi. 2004. *Clostridium straminisolvans* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2043–2047.
- Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2004. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 133–142.
- Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7099–7106.
- Ljungdahl, L.G., and K.E. Erikson. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation, pp. 237–299. In K.C. Marshall (ed.), *Advances in microbial ecology*, vol. 8. Plenum Press, New York.
- Nakamura, K., S. Haruta, H.L. Nguyen, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2004. Enzyme production-approach for determining the function of microorganisms within a community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3329–3337.
- Ng, T.K., A. Ben-Bassat, and J.G. Zeikus. 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1337–1343.
- Pedro, M.S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 159–165.
- Smith, D., S. Alvey, and D.E. Crowley. 2005. Cooperative catabolite pathways within an antrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 265–273.
- Veal, D.A. and J.M. Lynch. 1984. Associative cellulolysis and dinitrogen fixation by cocultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butylicum*. *Nature* 310: 695–696.
- Weimer, P.J. and J.G. Zeikus. 1977. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 289–297.