

# メタン発酵に関わる菌体の分離・同定

日大生産工（院）○木科 大介 日大生産工 大木 宜章  
日大生産工 神野 英毅 日大生産工 小森谷 友絵  
日大生産工（院） 吉田 晃洋

## 1 序文

化石燃料の依存によるエネルギー生産は、地球温暖化の主要因として挙げられる。また、経済の発展に伴い廃棄物量は年々増加傾向を示している。このうち日常の生活で発生する有機性廃棄物(家庭ごみ、下水汚泥、家畜糞尿)を生物分解により、エネルギー化を計った。この方法として、メタン発酵によるエネルギー生産は化石燃料に替わるものとして、また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。

メタン発酵における有機物の分解は大きく消化工程と発酵工程に分けられる。本研究はこのため消化槽・発酵槽とに分けた2段階メタン発酵を行った。消化工程は加水分解菌および酸生成菌により有機酸およびエタノール等の中間物を生成する。その後、発酵工程は消化工程で生成された中間物(消化試料)をメタン生成細菌が分解し  $\text{CH}_4$  および  $\text{CO}_2$  ガスを生成する。なお、メタン発酵に関わる菌体は多種存在するため、関与する菌体により発酵分解の経路は異なるとともにガス化効率も変化する。

本研究は、メタン発酵における優先菌および効率的分解経路の特定を目的に、消化工程における槽内の種汚泥から生物化学的実験手法により菌体の分離・同定を行った。

## 2 実験概略

菌体同定のプロセスを Fig. - 1 に示す。本実験では消化工程における槽中の種汚泥をサンプルとし、これを3種類の培地により培養した。その後、スクリーニングにより菌体を単離し、この純粋培養の菌を光学顕微鏡およびグラム染色による観測により菌体の特徴から属の確認を行った。なお、単離した菌体は塩基配列の解読による種の同定のため、菌体から抽出した核酸をサンプルとして、PCR法によりDNAの増幅を行った。

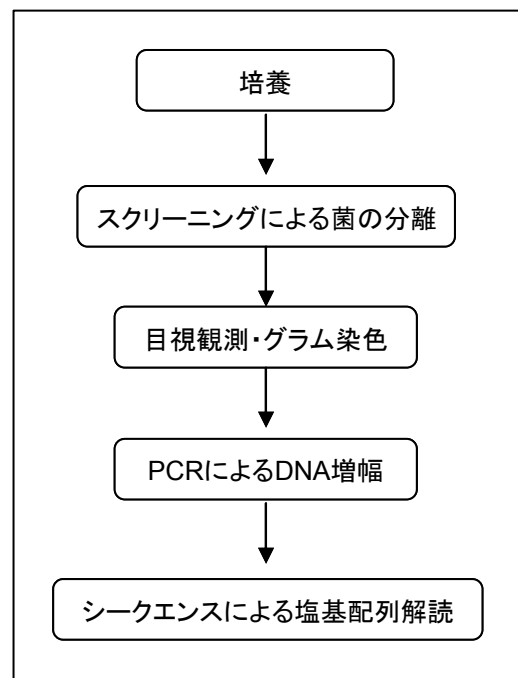


Fig. - 1 菌体同定のプロセス

さらに、消化工程で生成された有機酸の分析からも菌体の特定を行うため高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により有機酸割合の測定を行った。

## 2. 1 同定プロセスにおける菌体の培養・分離

培地には非選択性の LB、GAM、BHI 培地を用いた。Table-1 に培地組成を示す。滅菌シャーレに固定した寒天培地にサンプルを塗布し、35°C の恒温槽で 3、4 日嫌気培養した。その後、増殖した菌体毎に新たな培地に塗布し(スクリーニング)嫌気培養した。これを 3~4 回繰り返して、菌体の分離を行った。分離した菌体は目視および光学顕微鏡による菌体集合群(以後、コロニーと称す)の観察を、またグラム染色後で菌形状を顕微鏡観察で行った。

## 2. 2 PCR およびシーケンス

分離した菌体は PCR 法による DNA の増幅を行った。PCR 法の手順として、まず分離した菌体からボーリング法に核酸抽出を行った。抽出した核酸をサンプルとして、サーマルサイクラーにより DNA 増幅を行った。なお、増幅でのプライマーは全細菌に特異的な 357f に 40 塩基の GC clamp をつけたものと 518r を用いた。プライマーの塩基配列を Table-2 に示す。PCR の条件は 94°C 5 分 + (94°C 30 秒—53°C 30 秒—72°C 1 分) × 35 サイクル + 72°C 10 分である。得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動により DNA バンドの確認をおこない、シーケンスによる塩基配列の解読により同定を行った。

## 2. 3 液クロマトグラフによる有機酸測定

細菌群としての特徴を確認するため、槽内の培養液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により有機酸の測定を行った。

## 3 実験結果

### 3. 1 菌体の分離および視適観察

嫌気培養後の培地全体写真を Photo-1 に、顕微鏡写真を Photo-2 に示す。菌体塗布後、

Table-1 培地組成

| LB培地 (g/l)                       |     |
|----------------------------------|-----|
| Tripton                          | 10  |
| Yeast extract                    | 5   |
| NaCl                             | 5   |
| pH                               | 7.0 |
| GAM培地 (g/l)                      |     |
| Pepton                           | 10  |
| Soybean Peptone                  | 3   |
| Proteose Pepton                  | 10  |
| Digestive Serum powde            | 13  |
| Yeast extract                    | 5   |
| Meat extract                     | 2.2 |
| Liver extract powder             | 1.2 |
| Glucose                          | 3   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2.5 |
| NaCl                             | 3   |
| Soluble Starch                   | 5   |
| pH                               | 7.2 |
| BHI培地 (g/l)                      |     |
| Calf Brains                      | 7.7 |
| Beaf Heart                       | 9.8 |
| Proteose Pepton                  | 10  |
| Dextrose Phosphate               | 2   |
| Sodium Chloride                  | 5   |
| Disodium Phoshate                | 2.5 |
| pH                               | 7.4 |

Table-2 プライマーの塩基配列

| Primer | Sequence   |
|--------|--|
| 357fGC | 5'-CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCC<br>GGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCA<br>CAG-3' |
| 518r   | 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'  |

3 日目に培地表面には菌体が増殖しコロニーを形成した。Photo-2 から、コロニー外形は点状、円状および不規則な形状として確認された。すなわち、この段階では複数の菌体が存在しているといえる。

Photo-3 にスクリーニング後の顕微鏡写真を示す。スクリーニングを繰り返した後の培地には同一外形のコロニーが形成された。顕微鏡観察の結果円形状、波形状辺縁のコロニー

ーがみられた。また、スクリーニング後の菌体を染色しグラム染色反応を確認の後、顕微鏡により菌形の観察を行った。Photo-4にグラム染色後の顕微鏡写真を示す。その結果、菌形には桿菌および球菌が確認された。

Table-3に分離した菌体の特徴を示す。スクリーニングおよびコロニーの形状、グラ

ム染色後の顕微鏡による菌形観察の結果より消化工程種汚泥から異なる特徴を持つ12種類の菌体を分離したといえ、これらの菌体をサンプルA~Lとした。



Photo-1 3日間培養後

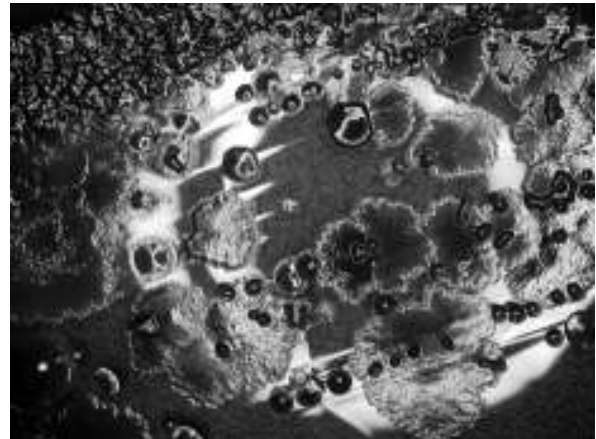


Photo-2 顕微鏡写真

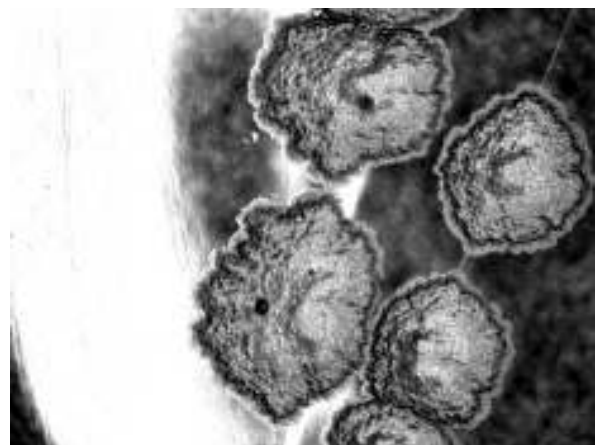
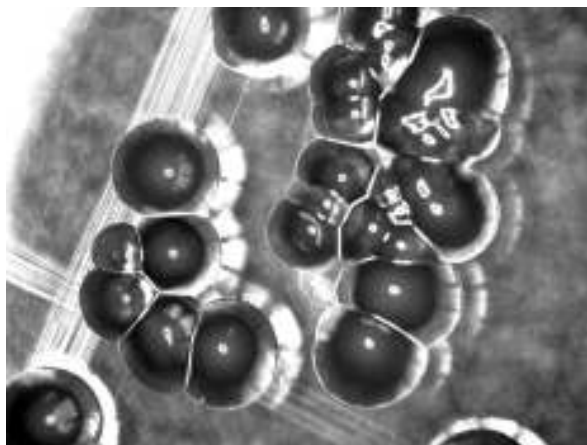


Photo-3 スクリーニング後の顕微鏡写真（左：円形状 右：波形状）

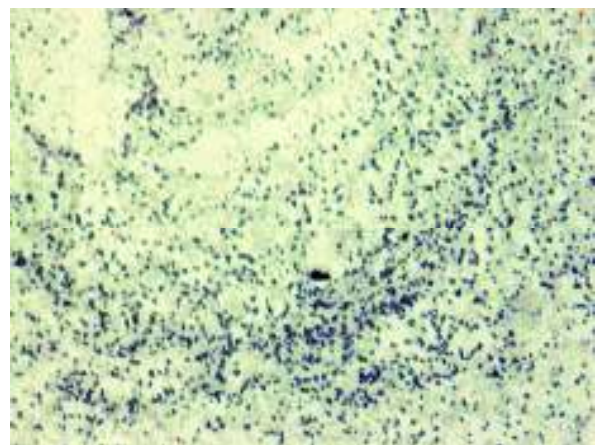
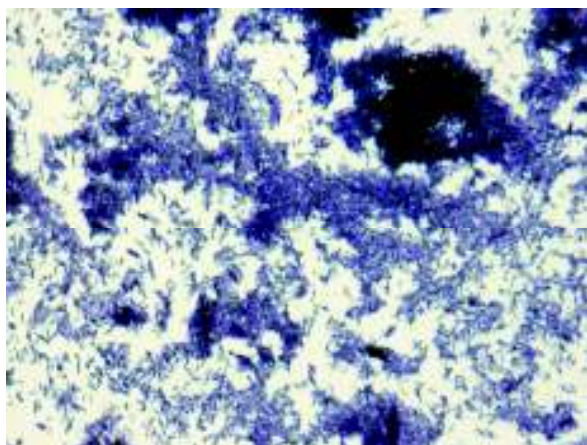


Photo-4 グラム染色後の顕微鏡写真（左：桿菌 右：球菌）

Table-3 分離した菌体の性状

| サンプル | 培地  | コロニーの形状 |     |      | 菌形    | グラム染色 |
|------|-----|---------|-----|------|-------|-------|
|      |     | 外形      | 辺縁  | 側面像  |       |       |
| A    | LB  | 点       | 波形状 | 台形   | 球菌    | —     |
| B    | LB  | 点       | 波形状 | 凸状   | —     | +     |
| C    | LB  | 円       | 波形状 | 凸状   | 球菌    | —     |
| D    | LB  | 不規則     | 波形状 | 凸状   | 球菌    | +     |
| E    | LB  | 点       | 波形状 | 凸状   | 球菌    | —     |
| F    | GAM | 円       | 波形状 | 凸状   | 桿菌    | +     |
| G    | GAM | 不規則     | 円形状 | 中央突出 | 球菌    | —     |
| H    | GAM | 不規則     | 波形状 | 凸状   | 球菌/桿菌 | —     |
| I    | GAM | 不規則     | 波形状 | 凸状   | 球菌/桿菌 | +     |
| J    | BHI | 不規則     | 波形状 | 台形   | 球菌    | +     |
| K    | BHI | 不規則     | 波形状 | 中央突出 | 球菌    | —     |
| L    | BHI | 円       | 円形状 | 凸状   | 球菌    | +     |

### 3. 2 PCRによるDNA増幅

Photo-5にPCR産物をアガロースゲル電気泳動により表われたDNAバンドの写真を示す。12種類のサンプル中11種類において281~300bpにバンドが検出された。したがって、PCRによるDNAの増幅が行われているといえる。今後、増幅したDNAをサンプルとしてシーケンスによりDNA塩基配列を解読し、分離した菌体の同定を行う予定である。



Photo-5 ゲル電気泳動により現れたDNAバンド

### 3. 3 槽内の有機酸

HPLCの結果からFig.-2に消化槽内の有機酸割合を示す。有機酸は乳酸が46%と最も多く、次いで酢酸、プロピオン酸、酪酸であった。このことより、消化工程においてはこれまで想定していなかった乳酸菌による乳酸生成の影響が大きいといえる。

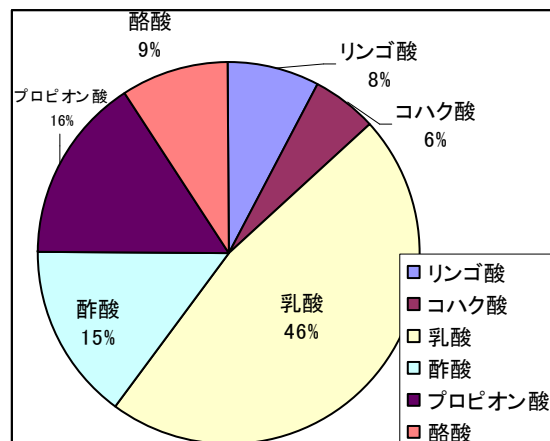


Fig.-2 有機酸割合

## 4 まとめ

本研究は、既存の二段階メタン発酵システムの効率化を目指すべくメタン発酵にける優先菌を特定するため、生物化学的実験手法により、消化槽内の種汚泥から菌体の分離・同定を行った。

その結果、消化槽内における種汚泥から異なる特徴を持った12種類の菌体の分離が行えた。分離した菌体の核酸をサンプルとしてPCR法によりDNAを増幅しアガロースゲル電気泳動により確認したところ、11種類のサ

ンプルで281~300bpにバンドが確認できたことから、シーケンスを行うことにより、分離した菌体の同定が行えるといえる。またHPLCによる有機酸測定の結果、乳酸の含有していることから、これまでは想定していなかった乳酸菌の影響が大きいといえる。