

二段階メタン発酵における消化工程からの菌体の分離・同定

日本大学 (院) 学生会員 ○木科 大介 日本大学 正会員 大木 宜章
 日本大学 神野 英毅 日本大学 小森谷 友絵
 日本大学 (院) 源 佳子

1. 目的

現在、環境に対する問題は世界規模で高まりを見せている。なかでも化石燃料の使用は、発生する CO_2 が地球温暖化の主要因となっており、また有限な天然資源の枯渇化といった深刻な問題を引き起こしている。メタン発酵は廃棄物の有効利用によってエネルギーを生産することから、環境負荷の軽減策として、また資源循環型社会に則した新エネルギーとして注目されている。本研究は小規模コミュニティ(公共施設、家庭等)における生ごみからの効率的エネルギー回収を目指すべく、消化工程および発酵工程から構成される二段階メタン発酵システムを構築した。本報告では、効率的なシステムを目標とし、高速液クロマトグラフィー(以下、HPLC)を用いて消化・発酵工程の有機酸挙動についてバッチ式実験により解析と検討を行った。さらに、消化工程に参与する菌体の分離・同定を試み、この菌体の検討から能率的な有機酸の生成をも検討する。

2. 実験概要

本実験は消化および発酵の二段階システムで行った。

Fig.1 および Fig.2 に HPLC による各工程の有機酸挙動を示す。結果から、消化工程においては乳酸が多く生成されており、他の有機酸は微量であった。また発酵工程において、乳酸やプロピオン酸は初期段階から分解され、7 日目の段階では分解を終了しているが、酪酸は 10 日目でも残存した。また、酢酸は高分子の有機酸の分解によって一時的に増加傾向を示し、その後分解傾向を示した。これらのことから、消化工程で生成される各有機酸は、発酵工程において分解速度、すなわち発酵効率に相違をもたらす事が確認された。さらに、消化工程で生成される有機酸の割合は槽内の環境状態に影響される菌体バランスの変化に起因するといえる。したがって、消化槽内における菌体の生息状況を調べるべく、消化槽内より菌体の分離・同定を行った。

菌体同定のプロセスを Fig.3 に示す。本実験では消化工程における槽内の種汚泥をサンプルとした。このサンプルを滅菌シャーレに固定した寒天培地に塗布し、 36°C の恒温槽で 3、4 日嫌気培養した。培地には非選択性の LB、GAM、BHI、GYP を用いた。増殖した菌体は各々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、菌体の分離を行った。分離菌体の菌体集合群(以下、コロニー)は目視および光学顕微鏡により、またグラム染色

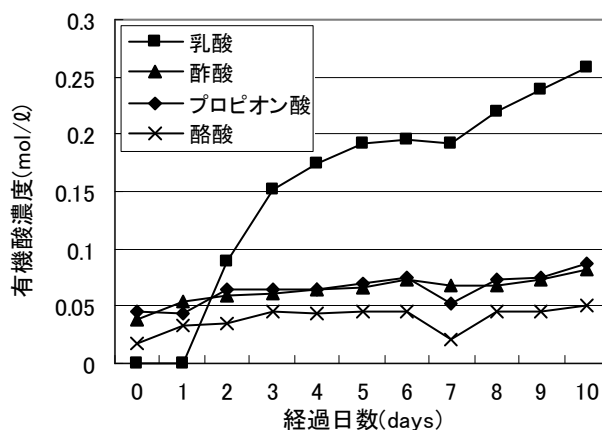


Fig.1 消化工程における有機酸挙動

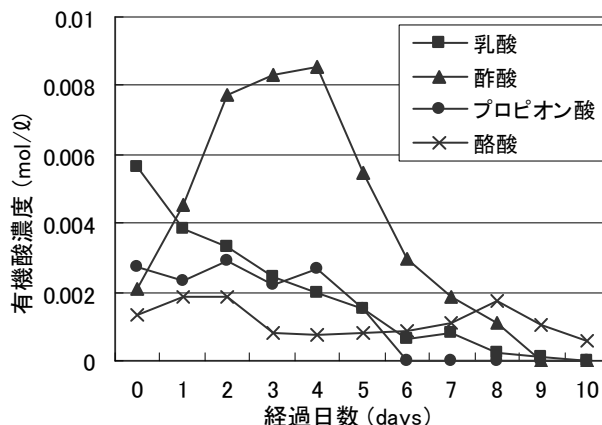


Fig.2 発酵工程における有機酸挙動

キーワード メタン発酵、有機酸、菌体、同定、PCR、HPLC

連絡先 〒275-8575 千葉県習志野市泉町1-2-1

日本大学 生産工学部 土木工学科 環境衛生工学研究室 Tel 047-474-2434 Fax 047-474-2449

後で菌形状を顕鏡観察で行った。

次に、単離した菌体はPCR法によりDNAの増幅を行った。PCR法では、まず分離した菌体をサンプルとして、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16SrRNAユニバーサルプライマー-27fおよび800rを用いた。PCR条件は94℃5min+(94℃30sec-50℃30sec-72℃60sec)×35サイクル+72℃6minとした。PCR産物はDNA増幅確認のため1.5%アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認した後、吸光度計を用いてDNA濃度を測定した。このPCR産物は遺伝子解析システム(SHIMADZU社製:CEQ8800)により塩基配列の解読を行った後、相同性検索プログラムBLASTを用いて、解読した塩基配列と相同性の高い既知種を検索し同定を行った。

3. 実験結果

スクリーニングにより分離した菌体のコロニーの顕微鏡写真をPhoto 1に、グラム染色後の顕微鏡写真をPhoto 2に示す。この写真から菌体は外形が円状および不規則なものが、またコロニー辺縁が円形状、波形状のものが確認された。また、菌形には、桿菌および球菌が確認された。

Table 1に解読した塩基配列と相同性の高い最近種を示す。16サンプルについて塩基配列の解読を行った結果、13サンプルから塩基配列が得られた。これらを相同性検索にかけたところ、確定した中で最も多く一致したのは*Clostridium butyricum*の8サンプルであり、次に*Clostridium glycolicum*の3サンプルが近縁種として確認された。また、残る2サンプルについては*C.beijerinckii*や*C.metallolevans*の細菌とも一致し、近縁種の特定をするに至らなかった。

4. まとめ

本研究は消化槽内における有機酸の挙動とその後の分解過程の確認を行った。これより、消化工程では乳酸が、発酵工程では酢酸の挙動がカギとなるものといえる。さらに、菌体の生息状況を調べるべく、槽内より菌体の分離・同定を行った。その結果2種類の菌体について同定が行えた。しかし、消化槽内においては更に数多くの菌が生息していると考えられ、この結果は当初予測していた数を大きく下回る結果となった。これらの結果を踏まえ、今後、培地選択や培養条件を変更し菌の分離を行い、また同定方法を考慮して消化槽内における菌体バランスの構造解析について検討を行っていく予定である。

なお、本研究は文部科学省学術フロンティア推進事業(平成17年度～平成21年度)による私学助成を得て行われた。

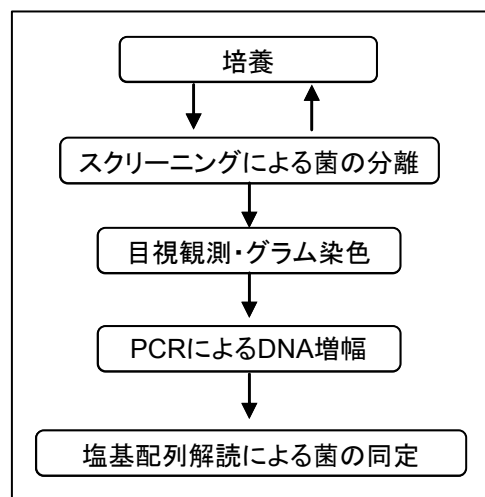


Fig.3 菌体の分離・同定プロセス

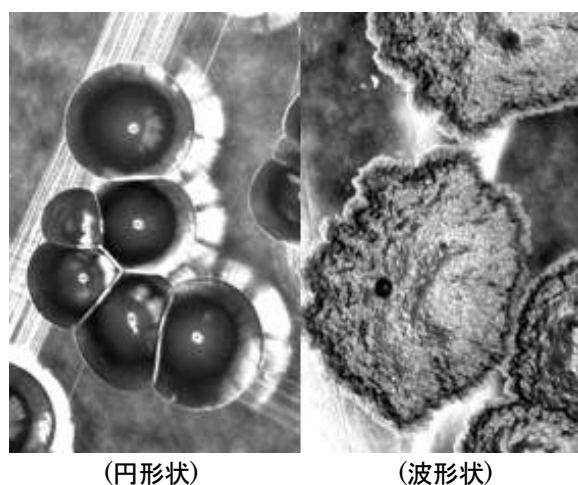


Photo 1 菌体のコロニー顕微鏡写真

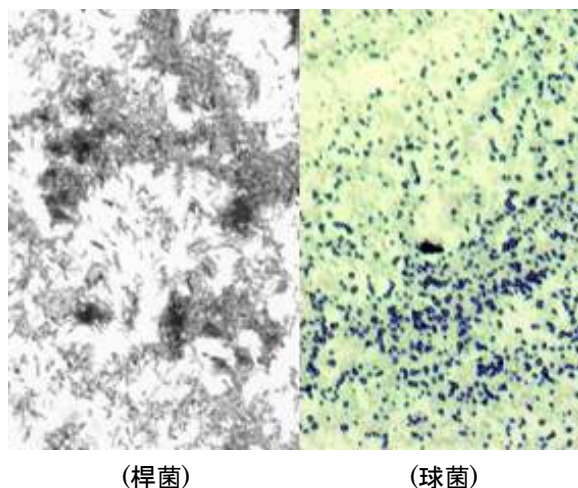


Photo 2 グラム染色後の菌形顕微鏡写真

Table 1 同定が行えた菌の種類

サンプル数	最近縁種	相同性の高かったサンプルの相同塩基数
8	<i>Clostridium butyricum</i>	515/515(100%)
3	<i>Clostridium glycolicum</i>	367/373(98%)