

B-1 メタン発酵における指標細菌の挙動について

○東森 敦嗣¹・矢口 淳^{2*}

¹八戸工業高等専門学校 専攻科 建設環境工学専攻 (〒031-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

²八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (〒031-1192青森県八戸市田面木字上野平16-1)

* E-mail: yaguchi-z@hachinohe-ct.ac.jp

1. はじめに

メタン発酵法は、下水汚泥や畜産糞尿などの廃棄物系バイオマスを嫌氣的に分解しメタンを生産する技術で、今後地球温暖化防止や低炭素社会の形成に非常に重要な役割を果たすことが期待されている。メタン発酵には病原性細菌を不活化させる効果もあるが、最近発酵後の消化液を貯蔵や脱水する過程で病原性細菌の濃度が増加するという報告があり、不活化効果に疑問が呈されている¹⁾²⁾。これは消化液を農地還元するうえで重大な脅威であり、メタン発酵を推進するにあたって大きな問題点となる。従来、病原性細菌や代替指標である大腸菌の検出は培養法によってきたため、生きているが培養できない状態 (Viable but non-culturable、VBNC)にある細菌は不活性と見なされ、汚泥や消化液の感染リスクを過少に評価してきた可能性も考えられる。VBNC状態を含む活性のある細菌のみを定量できる方法としてPMA-PCR法が研究開発されている³⁾。しかしこの方法は感度が低く、不活性な死滅した細菌が多く存在する環境中では適用することが難しい。そこで本研究では、PMA-PCR法の感度を向上させ、メタン発酵プロセスにおいてVBNC状態を含む活性のある大腸菌を計数し、従来法と比較しながら大腸菌の挙動を調査した。

2. 実験材料および方法

2-1 実験材料

理化学研究所系統保存施設から大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649^T) を購入して実験に用いた。全菌数測定用の細菌染色剤として、DAPI (4',6'-diamidino-2'-phenylindole、和光純薬)、活性

のある細菌と死滅した細菌を分別する試薬として、PMA (propidium monoazide、Biotium社)を使用した。

2-2 実験方法

2-2-1 大腸菌の培養

大腸菌をLB液体培地を使用して一晚37℃で振とう培養した。極少量の培養液を新しいLB液体培地に添加してさらに数時間培養した。培養液の全菌数はポリカーボネイトフィルター(Advantec製、孔径0.2μm)にろ過捕集後、蛍光染色剤DAPI溶液で染色し落射蛍光顕微鏡(オリンパス製BX41)で計数した。生菌数はLB寒天培地を使用して平板培養法で計測した。培養液中の生菌数と全菌数はほぼ一致しており、全ての大腸菌に活性があることを確認しながら実験を行った。大腸菌の不活化は熱処理(80℃、10分間)によって行い、LB寒天培地で処理液を1週間20℃で平板培養してコロニーが形成されないことを確認した。

2-2-2 PMA処理

サンプルを0.5mLの透明なマイクロチューブに準備し、PMAを添加後暗室で5分間放置した。その後、ハロゲン光源(アークライトサカモト社GTHT-500S、500W)を5分間照射した。照射中、チューブは氷の中で冷却した。

2-2-3 リアルタイムPCR

大腸菌の選択的検出に使用されるβ-グルクロニターゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、リアルタイムPCRをMiniOpticonシステム(Bio-rad社)で行った。PCRには、IQ

Supermix(Bio-rad社)を使用し、Frahm & Obst⁴⁾が用いたプライマーとプローブを使用して、Reverse Primerの濃度のみ300nMに変更した。

2-2-4 下水汚泥処理施設の調査

2012年8月6日に八戸市東部終末処理場汚泥処理プロセスの濃縮液、消化液、貯留液、脱水汚泥をサンプリングして大腸菌を計数した。嫌気性消化槽は容量3,981 m³で55℃の高温発酵である。大腸菌と糞便性大腸菌群の計数は、それぞれEC-MUG培地(Difco)によるMPN法とM-FC培地(Difco)によるメンブレンフィルタ法で行った⁵⁾。また、大腸菌の全菌数はPMAを添加しないリアルタイムPCRにより計数し、活性のある大腸菌はPMA処理とリアルタイムPCRを組み合わせたPMA-PCR法で測定した。

3. 結果および考察

3-1 PMA特性実験

無処理の大腸菌と熱処理した菌体の混合比率を表1のように変化させ、所定の濃度でPMA処理した後、リアルタイムPCRでDNA増幅が検出される閾値サイクル数に及ぼす添加濃度の影響を調査した。PMA濃度を50, 100, 200 μMに設定し、それぞれの濃度における混合比率と閾値サイクル数の関係を図1に示した。PMA濃度が50μMと200μMの場合は熱処理菌体の割合が混合比率Ⅲより大きくなると閾値サイクル数は増加しなかったが、100μMの場合では混合比率Ⅴまで無処理菌体の割合の減少に伴って閾値サイクル数も増加した。PMA濃度50μMと200μMの場合、混合比率Ⅲ~ⅤでPMAによる大腸菌の無処理菌体と熱処理菌体の分別効果が失われており、PMA濃度は100μMが有効であると考えられる。

表 1 無処理菌体と熱処理菌体の混合比率

混合比率	I	II	III	IV	V	VI
無処理菌体(μL)	1000	100	10	1	0.1	0
熱処理菌体(μL)	0	900	990	999	999.9	1000

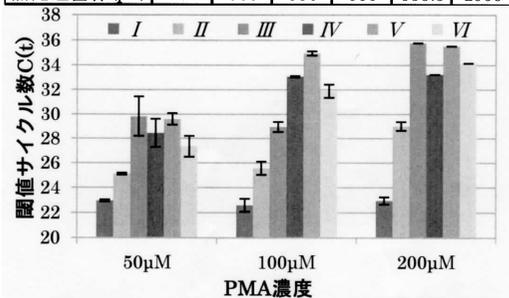


図 1 PMA 濃度と検出感度の関係

次にPMA添加濃度を50μMとし、添加回数を1, 2, 3回と増やしていき、熱処理菌体と無処理菌体の混合比率を表1のように変化させた場合のPMA添加回数と閾値サイクル数の関係を図4に示した。PMA試薬は累加的に添加し、図2に示した()内の数値はPMAの最終濃度であり、添加間隔は5分間である。添加回数が1回で最終濃度50μMの場合と添加回数が3回で最終濃度150μMの場合は、図1と同様に熱処理菌体の割合が混合比率Ⅲで閾値サイクル数がピークを迎え、それ以降は閾値サイクル数はあまり増加しなかった。添加回数2回の場合では無処理菌体の割合が実験条件Ⅴまで減少してもそれに伴って閾値サイクル数が増加したため、PMA添加回数は2回が適当であると考えられる。また図1のPMA濃度と図2の添加回数の結果は類似した傾向がみられ、PMA添加回数よりもPMA最終濃度の方が重要であるかもしれない。図1と図2より、PMAを2回繰り返し追加して、最終濃度を100μMにする方法が最も有効であると考えられた。

3-2 消化液添加実験

熱処理した一定量の熱処理菌体にオートクレーブ滅菌した八戸市東部終末処理場嫌気性消化槽の消化液を添加し、消化液中のSS濃度がPMA分別効果に及ぼす影響について検討した。実験結果を図3に示した。図中に示した(生菌)は、熱処理した一定量の大腸菌と同じ濃度で添加したSSを含まない無処理菌体のみの実験結果である。SS濃度が

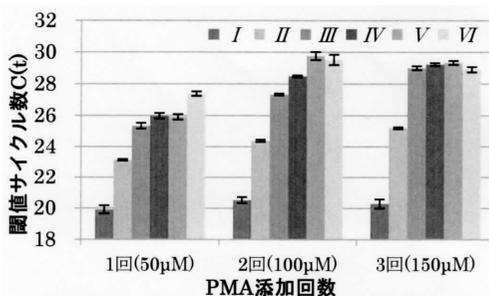


図 2 PMA 添加回数と検出感度の関係

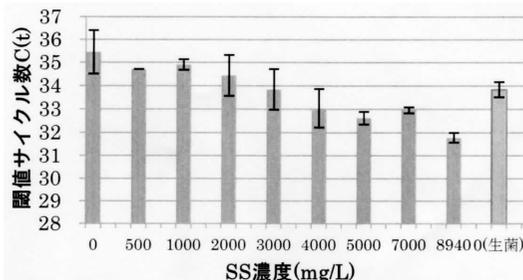


図 3 消化液中の SS 濃度と PMA 分別効果の関係

2000~3000 mg/L以上に上昇するにつれて、次第に閾値サイクル数が減少することが読み取れ、PMAの効果が低下していく様子がわかる。この図から、SS濃度が2000~3000 mg/L以下の場合PMA処理が有効であると考えられる。

3-3 大腸菌DNA定量実験

大腸菌が特異的にもっている *uidA* 遺伝子をターゲットにして検量線を作成した。理想的なPCRでは各サイクルでコピー数が2倍になり、これは増幅効率が2倍であることに相当してパーセンテージで表すと100%になる。本実験では、増幅効率(E)=1.939、%効率=93.9%、決定係数R²=0.9972という結果が得られた。本実験の増幅効率は100%に近く、またデータの変動も少ない精度の高い検量線となった。大腸菌の *uidA* 遺伝子は、1つの細胞あたりコピー数は1であるため、この検量線を用いることで閾値サイクル数から大腸菌の菌数を求めることができる。

3-4 下水汚泥処理施設の調査

八戸市東部終末処理場汚泥処理プロセスの調査を行い、濃縮液、消化液、貯留液および脱水汚泥中の大腸菌と糞便性大腸菌群をそれぞれ計数した。図4に濃縮液、消化液、貯留液の計数結果を個/mLで示した。濃縮液の大腸菌数はメタン発酵によって、メンブレンフィルタ法とMPN法では5オーダー以上も減少し、ほとんどの大腸菌が不活化しているようにみえる。しかしVBNC状態を考慮しているPMA-PCR法では1オーダー程度しか減少しておらず、まだ消化液中には活性のある状態で大腸菌が1.56×10⁶個/mLも存在していた。表2には、得られた大腸菌と糞便性大腸菌群の計数結果をSS1g当たりの菌数、個/gSS単位で示した。消化液に比べて貯留液と脱水汚泥では、MPN法とメンブレンフィルタ法で菌数が増加していた。これは八戸市東部処理場では貯留槽に最初沈澱池で沈殿分離された初沈汚泥が相当量流入してくるためである。小川ら⁶⁾の研究によると、畜産糞尿や食品残渣を対象としたメタン発酵槽で糞便性大腸菌群の除去率は中温発酵で99.70%、高温発酵で99.993%であったと報告されている。高温発酵の東部処理場消化槽でもメンブレンフィルタ法によって測定された糞便性大腸菌群は、除去率が99.999%まで減少している。しかしPMA-PCR法で計数されたVBNC状態を含む活性のある大腸菌の除去率は96.02%であった。これらのことから、大

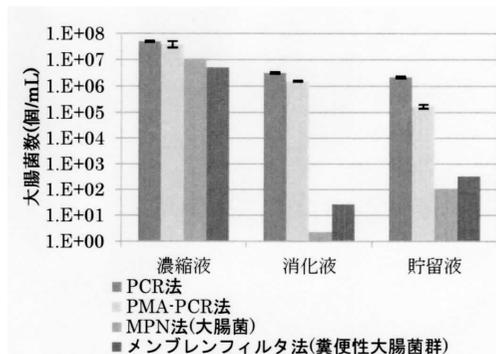


図4 八戸市東部終末処理場の大腸菌数

表2 SS 1g 当たり的大腸菌数

(個/gSS)	濃縮液	消化液	貯留液	脱水汚泥
PCR法	3.22×10 ⁹	3.10×10 ⁸	2.07×10 ⁸	4.68×10 ⁷
PMA-PCR法	2.51×10 ⁹	1.53×10 ⁸	1.62×10 ⁷	8.72×10 ⁶
MPN法	7.02×10 ⁸	2.24×10 ²	1.05×10 ⁴	2.03×10 ⁴
メンブレンフィルタ法(糞便性大腸菌群)	3.22×10 ⁸	2.59×10 ³	3.16×10 ⁴	5.88×10 ⁴

腸菌はメタン発酵によってすべての菌が不活化されるわけではなく、多くの大腸菌が培養法では検出されないVBNC状態に移行していることがわかる。

4. まとめ

PMA処理は、試薬を2回繰り返し添加し、最終濃度を100μMにする方法がPMA分別効果に最適と考えられる。また消化液中のSS濃度が2000~3000 mg/L以下においてPMA処理が有効であることがわかった。八戸市東部終末処理場汚泥処理プロセスの調査を行った結果、濃縮液中の大腸菌数はメタン発酵によって、メンブレンフィルタ法とMPN法では5オーダー以上も減少しほとんどの大腸菌が不活化しているようにみえるが、PMA-PCR法で計数した活性のある大腸菌は1オーダー程度しか減少しておらず、多数の大腸菌がVBNC状態で存在していることが分かった。

参考文献 1) Qi, Y., Dentel, S.K., and D.S. Herson, Water Research, Vol.41, pp.571-580, 2007. 2) Higgins, M.J., Chen, Y., Murthy, S.N., Hendrickson, Farrel, D., J. and Schafer, P., Water Research, Vol.41, pp.665-673, 2007. 3) 横町尚享, 矢口淳一, 土木学会論文集G(環境), Vol. 67, pp.643-650, 2011. 4) Frahm, E. and Obst, U., Journal of Microbiological Methods, Vol.52, pp.123-131, 2003. 5) 日本下水道協会: 下水試験法 上巻 1997, pp.721-725, 1997. 6) 小川幸正, 藤田正憲, 中川悦光, 廃棄物学会論文誌, Vol. 16, No.1, pp.44-54, 2005.