



「ダンゴムシの腸内セルロース分解菌の単離」

福島県立会津学鳳高等学校 S S H 探求部  
 3年 藤巻雄成、小林知暉、川口莉子、  
 上野綾華  
 2年 星淳志、武田京介

### 1. 研究の動機・背景

木材や落ち葉は、リグニンという非常に硬い物質と、セルロースという植物繊維を構成する物質からなる。シロアリやフナクイムシなどといった木材を主食とする動物の腸内には木材成分分解菌が共生しており、通常は動物が分解することのできないセルロースを分解することで、栄養となるグルコースを獲得する。昨年度の研究では、落ち葉を主食とするダンゴムシの腸内に共生する木材成分分解菌の発見を試みた。その結果、リグニン分解菌はダンゴムシの腸内に常在しないが、セルロース分解菌は腸内に常在することがわかった。そこで今年度の研究では、栄養分の獲得に関するセルロース分解菌に着目し、ダンゴムシの腸内に常在するセルロース分解菌を単離して培養し、種類の特典、分解能力の高い株の発見を試みた。その際にダンゴムシに与えるエサとして、落ち葉の代わりに純粋なセルロースを用いることで、腸内でセルロース分解菌がより増殖し、効率よく分解能力の高い分解菌を発見できると考えた。

セルロース分解能力の高い分解菌を取り出して培養することができれば、現在豊富に存在するセルロースを含む木材から効率的にバイオエタノールを製造できるなど、環境に配慮したエネルギーの提供が可能となる。なお、従来のバイオエタノール製造の問題点と木材成分分解菌を用いたバイオエタノール製造の長所をまとめると、図1のようになり、木材成分分解菌を用いることにより環境への負荷を削減できることがわかる。

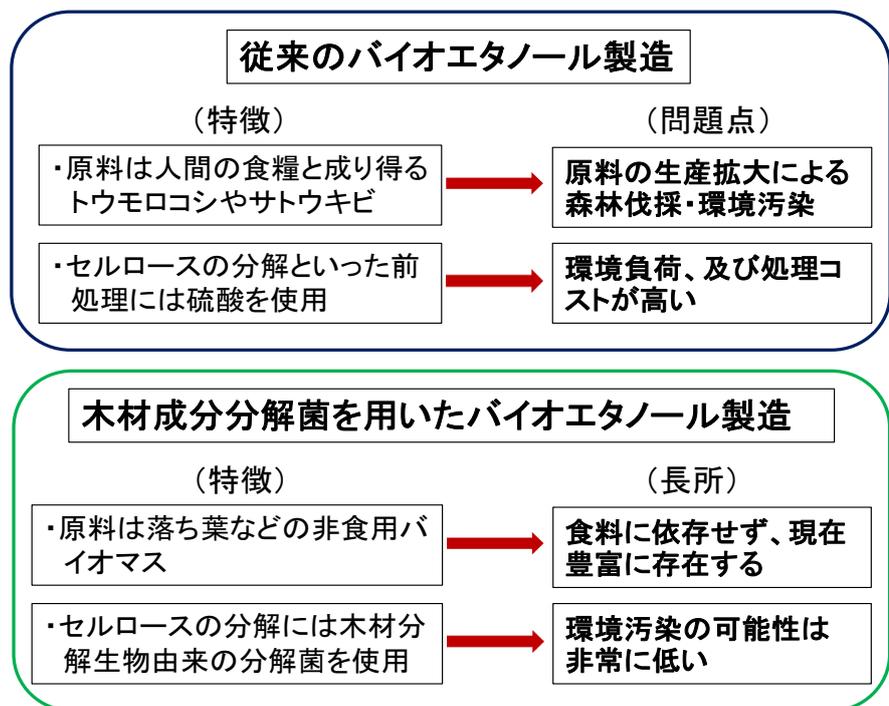


図1 バイオエタノール製造法の比較

## 2. 仮説

ダンゴムシのエサとして純粋なセルロースを用いることで効率よく分解能力の高いセルロース分解菌を発見できる。また、分解菌の成長速度の測定と、糖の生成量の測定という2つの方法により、セルロース分解能力の高い菌を発見できる、とした。なお、この2つの実験方法は先行研究にはない、私たち独自の実験方法である。

## 3. 実験方法

### ①ダンゴムシのエサの比較

ダンゴムシのエサとして、滅菌した落ち葉（ダンゴムシ採取地点のケヤキの落ち葉）を与えるグループ【以下、落ち葉グループ】と、滅菌した純粋なセルロース（セルロース粉末を加熱滅菌し固めたもの）を与えるグループ【以下、セルロースグループ】の2つに分けて実験を行った。なお、セルロースを与えるとダンゴムシのフンは白くなった（図2）。

### ②ダンゴムシのフンの回収方法

図3のような装置を考案し、作成した。虫かごにネットをはさみ、その上でダンゴムシを飼育することで、フンのみが落下し回収できる。なお、この装置のダンゴムシ以外のものはすべて滅菌して使用した。この装置をクリーンベンチ内に設置することで、フンに雑菌が付着することなく回収することができる。



図2 セルロースグループの白いフン

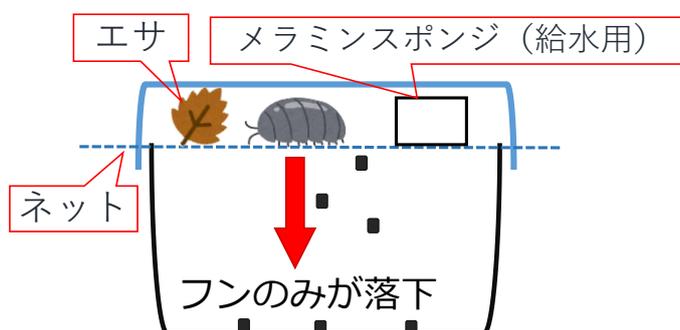


図3 フンを採取する装置

### ③実験に用いた培地について

次の2種類の寒天培地を作製した。

#### (i) CMC培地（セルロース分解菌検出用）

水溶性のセルロースであるカルボキシメチルセルロース(4.0g)と寒天(8.0g)を純水(400mL)に溶かして滅菌し、シャーレに分注した。

この培地で分解菌を培養し、セルロースを赤く染める色素である1%コンゴアレッド溶液で染色することで、セルロースが分解された箇所は染色されず白く抜け、セルロース分解菌の存在が確認できる（図4）。

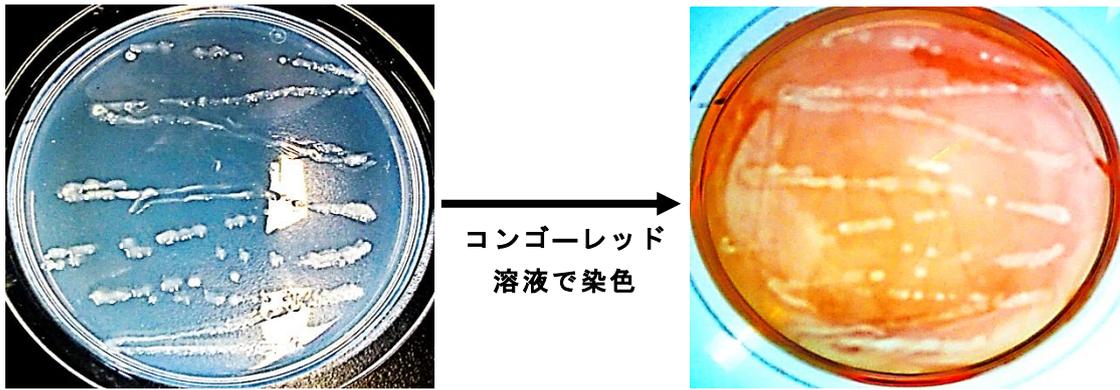


図4 コンゴレッド溶液で染色前（左）と染色後（右）

(ii) 普通寒天培地(細菌類の一般的な培地)

メルク社の「普通寒天培地」(2.0g)を純水(100mL)に溶かして滅菌し、シャーレに分注した。

この培地を用いると、細菌類をすばやく大量に培養することができる。

④フンからの分解菌の採取

実験方法②のようにして回収したフンをすりつぶし、滅菌水にて50倍に希釈したあと、CMC培地に塗布し、恒温器を用いて30℃で7日間培養した。コンゴレッド溶液で培地を染色し、白く抜けた箇所(=セルロース分解菌が存在する箇所)から白金耳を用いて釣菌し、新たなCMC培地に植菌した。

⑤菌の単離

実験方法④で採取したものには複数種類のセルロース分解菌が混在すると考え、1種類の菌を単独で培養するために菌の単離操作を行った。

- (1) 実験方法④の方法でCMC培地上に分解菌のコロニーが出現するようにした。
- (2) 培地上のコロニーから白金耳を用いて釣菌し、細菌類の一般的な培地である普通寒天培地に植菌した。
- (3) 植菌した普通寒天培地上には図5のようにさまざまなセルロース分解菌のコロニーが出現した。これらのコロニーを図6のような手順で、1つずつ別々に釣菌し、新しいCMC培地に植菌した。

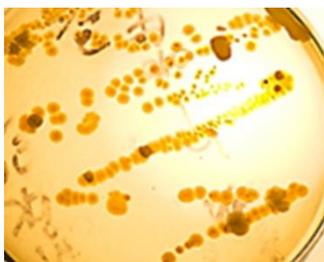


図5  
普通寒天培地上に見られる  
さまざまなコロニー

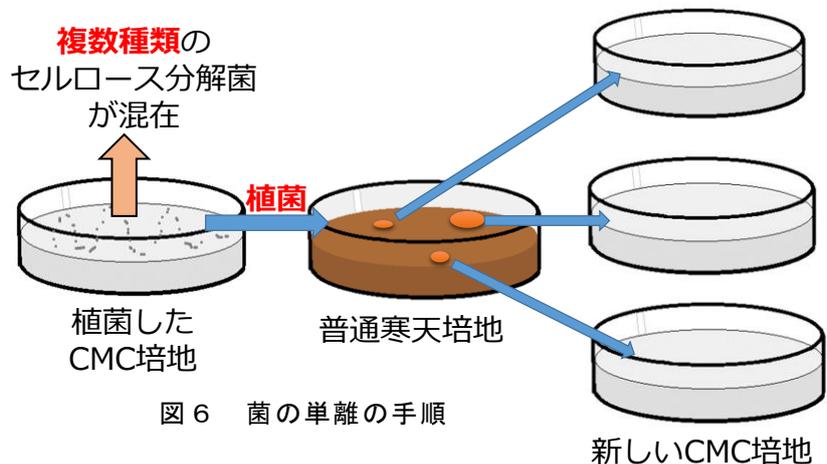


図6 菌の単離の手順

## ⑥ グラム染色

グラム染色は、細菌類を大きく陽性と陰性の2種類に分類する染色方法である。今回は日水社のグラム染色キット（フェイバーG）を使用した。グラム染色によりダンゴムシのフンに含まれるセルロース分解菌の種類の判断材料を得ることを目的としている。

- (1) 単離したコロニーから釣菌し、ビクトリアブルー染色液で染色した。この操作によりグラム陽性菌は青色に染色される。
- (2) 脱色液を用いて余分な染色液を脱色した。
- (3) フクシン染色液で染色した。この操作によりグラム陰性菌は赤色に染色される。

## ⑦ コロニーの大きさの測定

CMC培地には栄養源としてセルロースしか添加していない。そのためセルロース分解能力の高い菌は、分解能力の低い菌に比べて、培地中で唯一栄養分として利用できるセルロースを分解しながらより速く増殖するため、コロニーが大きくなりやすい。つまり、コロニーの大きさが分解能力の高さを表すと考えた（図7）。

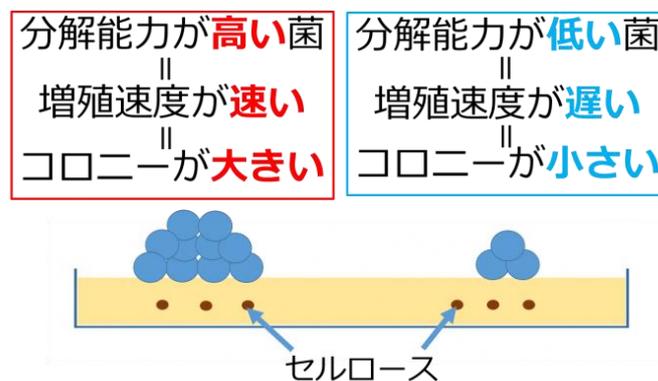


図7 分解菌の増殖速度とコロニーの大きさの関係

単離したCMC培地上のコロニーについて、植菌後7日目と14日目の培地の写真を一定倍率で撮影し、それぞれのコロニーの大きさを測定した。

## ⑧ 糖の生成量の測定

分解菌が、主成分がセルロースであるろ紙を分解すると糖が生成されることから、糖の生成量を測定することで、菌の分解能力が測定できると考えた。

滅菌チューブに滅菌した生理食塩水(10mL)と、セルロースを99%以上含むろ紙(5mm×50mm)を入れ、そこに白金耳1つ分の単離した菌を混濁し、30℃で振とう培養した。菌を加えた直後(0日目)と培養21日目のチューブ内の糖の量をフェノール硫酸法を用いて490nmの吸光度で測定し、糖の増加量を求めた。

以上が実験の手順であるが、実験方法の⑦と⑧は先行研究にはない、私たち独自の方法である。

#### 4. 結果

##### ① グラム染色

##### (i) セルロースグループで検出された菌

セルロースグループについて普通寒天培地上のコロニーを観察した。培地を蛍光灯にかざすと透明なコロニーと不透明なコロニーの2種類が確認された。この2種類のコロニーからそれぞれ釣菌し、グラム染色したのち観察すると、長さの異なる2種類のグラム陽性の桿菌が確認された(図8)。

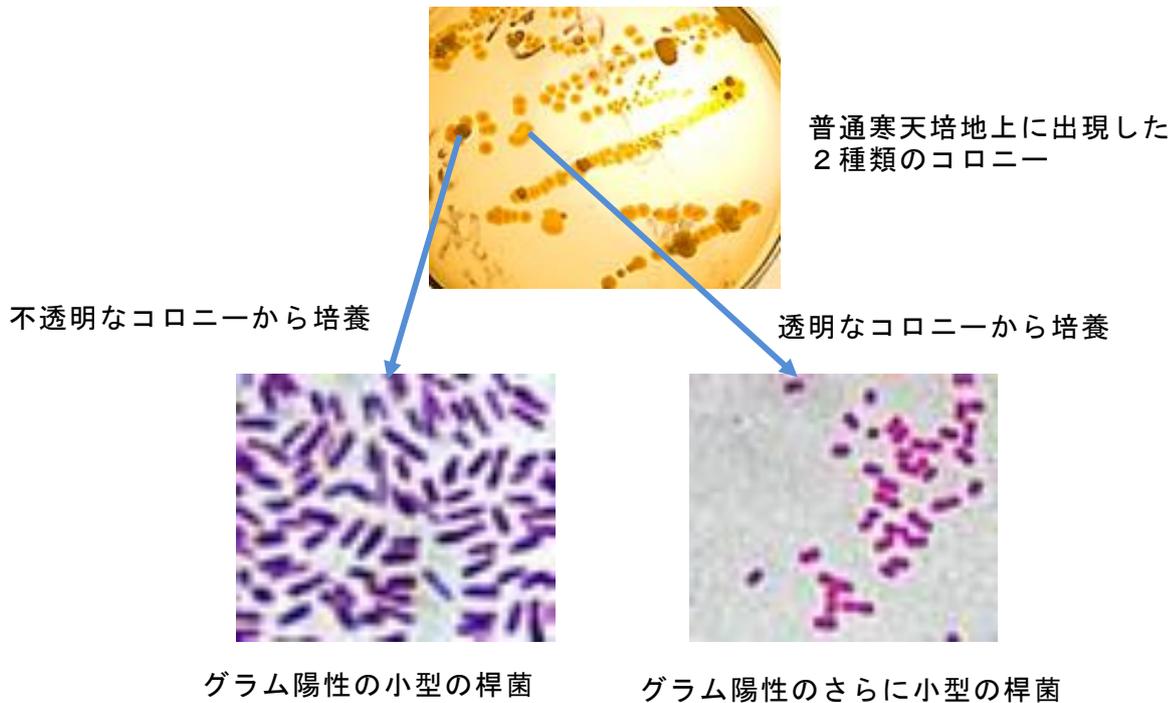


図8 セルロースグループで検出された菌

##### (ii) 落ち葉グループで検出された菌

落ち葉グループについて、普通寒天培地上のコロニーから釣菌し、グラム染色したのち観察すると、共にグラム陽性で小型の桿菌と、長く連鎖した大型の桿菌などが確認された(図9)。

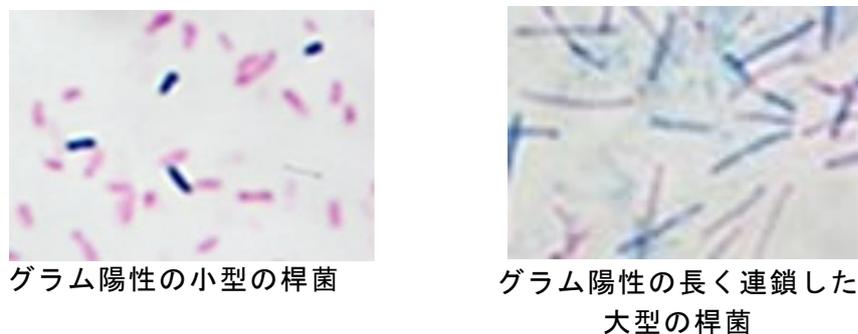
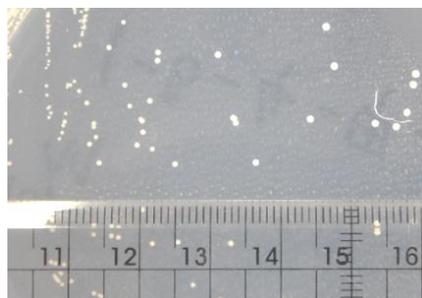


図9 落ち葉グループで検出された菌

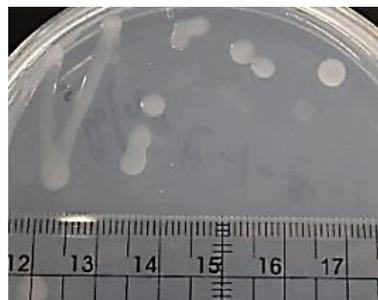
(i)と(ii)より、ダンゴムシの腸内には多様なセルロース分解菌が常在することが確認された。

## ②コロニーの大きさの測定

落ち葉グループとセルロースグループについて、単離した菌の植菌7日目のコロニーの大きさを比較した。落ち葉グループは、コロニーの直径の平均が1.8mmであるのに対して、セルロースグループでは、3.7mm だった（図 10）。このようにセルロースグループでは、大きなコロニーをつくる菌を数多く発見することに成功した。



【落ち葉グループ 7日目】  
コロニーの直径の平均=1.8mm



【セルロースグループ7日目】  
コロニーの直径の平均=3.7mm

図 10 コロニーの大きさの比較

そこでセルロースグループにおいて、菌の単離に成功した 12 株について、それぞれのコロニーの大きさの平均値を植菌7日目と14日目で比較すると、図 11 のグラフのようになった。7日目～14日目の間のコロニーの成長量が多い株は赤枠で囲んだ「せ1乙1」と「せ1乙3」の2つであった。

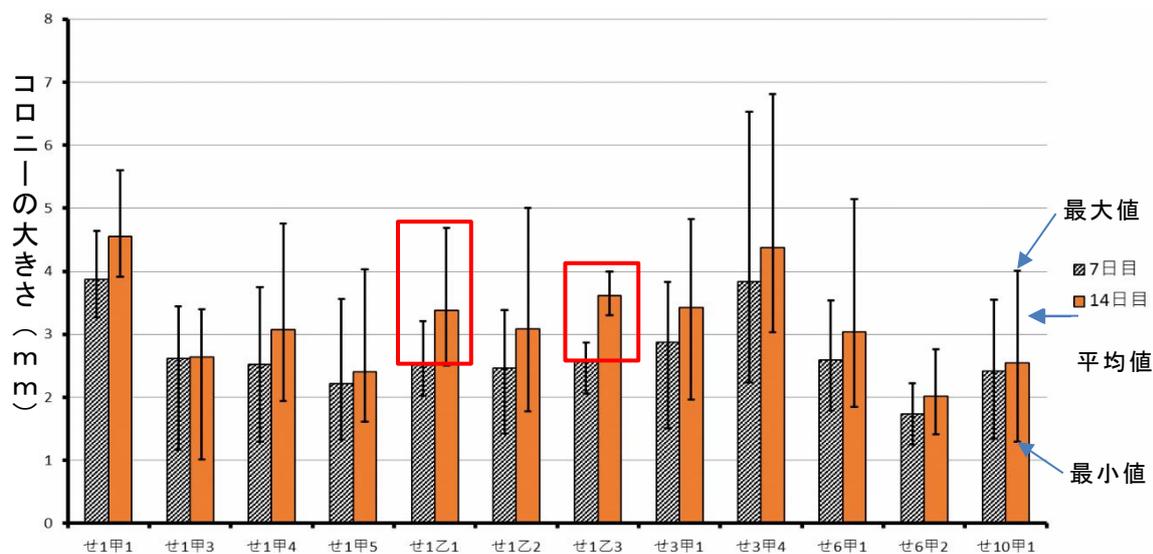


図 11 7日目と14日目のコロニーの大きさの比較

## ③糖の生成量

セルロースグループにおいて、菌の単離に成功した 12 株について0日目と21日目に、フェノール硫酸法を用いて吸光度を測定すると図 12 のようになった。この間の糖の生成量の多い株は、赤枠で囲んだ「せ1乙1」と「せ1乙3」の2つであった。

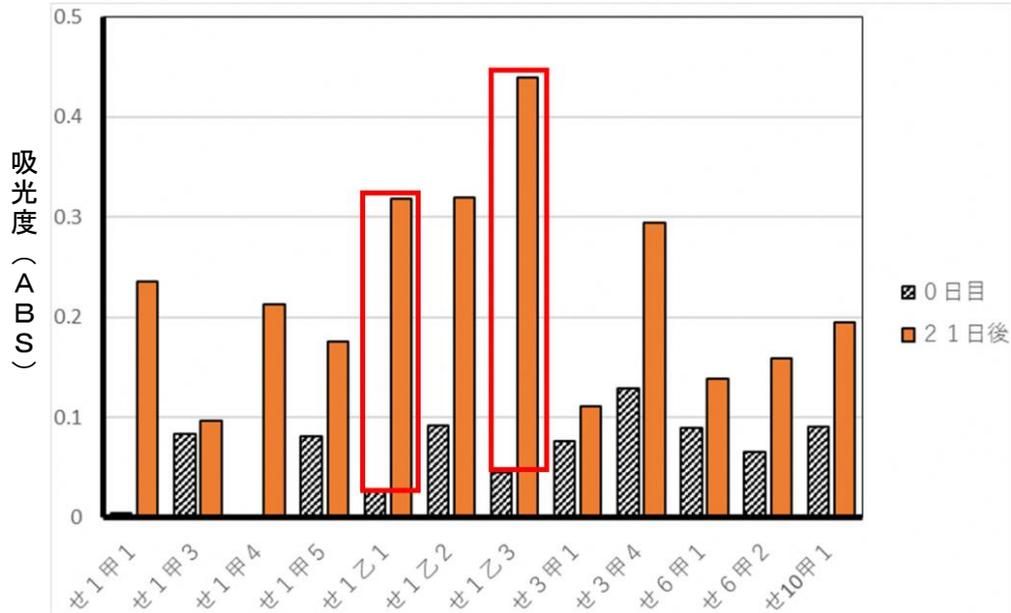


図 12 0日目と21日目の糖の生成量の比較

さらに、7日目～14日目の間のコロニーの成長量を横軸に、0日目～21日目の間の糖の増加量を縦軸にとってこれらの関係をグラフにすると、図 13 のようになった。赤丸で囲んだ「せ1乙1」と「せ1乙3」の2つの株が、コロニーの成長量と糖の増加量の両方が比較的大きい株である。

このグラフにおいて、コロニーの成長量と糖の増加量の相関係数を求めると、0.85 と強い相関が見られた。

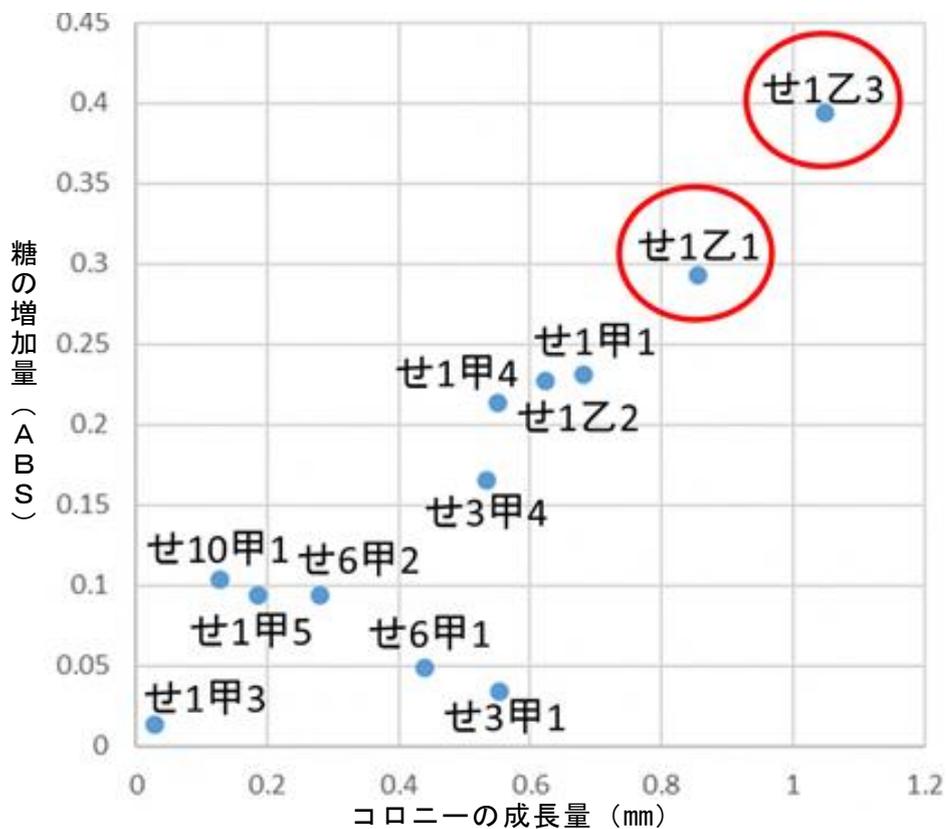


図 13 コロニーの成長量と糖の増加量の関係

## 5. 考察

セルロースグループの菌は、落ち葉グループの菌と比べ、栄養源としてセルロースのみを添加したCMC培地上でコロニーがより大きく成長する菌が多かった。このことから、セルロースをエサとして与えた方が、セルロース分解能力が高いと思われる分解菌を効率よく発見できることがわかった。

また図 13 より、コロニーの成長量と糖の増加量には強い相関関係が見られたことから、私たちが独自に考えたこの 2 つの実験方法は分解能力の高い菌の発見に有効であると言え、現時点では「せ 1 乙 1」、「せ 1 乙 3」の 2 つの株が分解能力の高い菌だと考えられる。

## 6. 結論

- (1) ダンゴムシの腸内には、複数種類のセルロース分解菌が存在した。
- (2) ダンゴムシのエサとして、落ち葉の代わりにセルロースを与えることにより、ダンゴムシの腸内からより分解能力の高いセルロース分解菌を取り出すことに成功した。
- (3) 単離したセルロース分解菌 12 株について、その分解能力を調べるために、栄養源としてセルロースのみを含む培地上でのコロニーの成長量と、ろ紙を分解した際にできる糖の量の測定という、2 つの実験方法を考案し、実施した。その結果、この 2 つの量の間には相関係数が 0.85 と強い相関が見られたことから、この 2 つの実験方法は、分解能力の測定方法として有効であると言える。
- (4) 前述の実験方法により、分解能力が高いと考えられる 2 つの株の発見に成功した。

## 7. 今後の課題

コロニーの成長量と糖の増加量のデータをさらに多く集め、その関係性を精査していきたい。またダンゴムシ以外の、シロアリやフナクイムシなどといった木材成分分解菌が腸内に常在する動物のセルロース分解菌の分解能力を測定し、ダンゴムシのセルロース分解菌と比較することで、より強いセルロース分解能力をもつ分解菌を発見し、効率的で環境負荷の少ないバイオエタノール製造の応用につなげたい。

## 8. 参考文献

- ・井上徹志(2014), 「フナクイムシ由来のセルロース分解菌の探索」, 『木材保存』 Vol. 40-6:261 - 268
- ・福島県立会津学鳳高等学校 S S H 探求部生物班  
藤巻雄成 小林知暉 吉田光希 兼子康文 渡部勇人 根本拓真(2018),  
「ダンゴムシの腸内共生細菌の研究 ～木材成分分解菌について～」