

論文内容の要旨

論文題目 Microbiological studies on the degradation process of organic wastes
(有機性廃棄物の分解に関する微生物学的研究)

氏 名 Mannix Salvador Pedro

都市部における廃棄物の排出量は急速に増加しており、世界中で重大な環境問題となっている。本研究では様々な都市ゴミの中でも有機性廃棄物に注目した。現在、有機性廃棄物は埋め立てや焼却処分に加え、その一部は微生物処理されている。微生物処理は環境への負荷が少なく、廃棄物を有機資源またはエネルギー源として再利用可能であることから注目されている。本研究の最終目的は都市廃棄物を効率的に分解・再利用するための微生物処理技術を確立することである。しかし微生物の集団機能を利用したそのような処理過程に関わる微生物叢はほとんど解明されていない。そこで、(i) 高温運転しているコンポスターから培養法で検出される微生物種の同定・性質解析、(ii) 分子生物学的手法による家庭用生ゴミ処理機の微生物集団構造の解析、(iii) 大規模堆肥化施設の微生物集団構造の解析およびそこで検出される優占微生物種の定量・単離・性質解析、を行った。

(i) 高温運転しているコンポスターから培養法で検出される微生物種の同定・性質解析¹⁾
解析した TG コンポスターは加温装置により 50–60°C に制御されており、毎日生ゴミを添加している連続処理機である。処理している生ゴミは東京ガス(株)社員食堂から排出される厨房調理くずで、野菜くずが中心である。微生物数を平板培養法で求めたところ、 10^3 – 10^5 cfu/g of waste と少ない値であった。単離した 10 株はすべてグラム陽性桿菌であり、主要呼吸鎖キノン(MK-7)、リン脂質脂肪酸(i-15:0、i-17:0、ai-17:0、n-16:0)、細胞壁アミノ酸(*meso*-A₂pm)

は、*Bacillus* 属細菌の特徴を示した。16S rDNA の塩基配列解析から、10 株の単離株のうち 5 株が *B. licheniformis*、1 株が *B. subtilis*、2 株が *B. thermoamylovorans* と推定されたが、残りの 2 株については新種と考えられた。同時に Biolog システムを用いた有機物資化プロファイルによる同定も行い、すべての単離株が *Bacillus* 属であったが、種レベルではいくつかの株について 16S rDNA 解析と異なる結果が得られた。これは Biolog システムのデータベースに近縁の微生物が含まれていない場合もあるが、培養条件による資化能の変化といった Biolog プロファイルの不安定性も原因となりうる。

次に TG コンポスター内の微生物集団の安定性を評価した。1997 年 12 月、1998 年 4 月、1998 年 6 月の 3 回サンプリングを行い、それぞれから 28、49、42 株ずつ単離し Biolog システムを用いて同定した。その結果サンプリング時期により異なる微生物種もわずかに検出されるが、すべての単離株は *Bacillus* 属細菌で、なかでも特に *B. coagulans*、*B. megaterium*、*B. brevis* および *B. pasteurii* はその単離頻度も高く、またすべてのサンプリング時期から検出された。よって TG コンポスター内の微生物叢は安定であり、それは高温での温度制御および連続的かつ比較的均一な組成のゴミの添加が大きく関連していると考えられる。特に高温での運転が *Bacillus* 属細菌を中心とする微生物集団の形成・維持に寄与していると考えられる。

(ii) 分子生物学的手法による家庭用生ゴミ処理機の微生物集団構造の解析²⁾

一般自然環境では培養困難な微生物が全体の 99%以上を占めていると報告されている。そこで培養を介さない手法である分子生物学的手法を用いて、家庭用生ゴミ処理機内の微生物集団を解析した。生ゴミ処理物から直接抽出した DNA を用いて PCR 増幅した 16S rDNA の V3 領域を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 解析した。市販の電動攪拌式の生ゴミ処理機に生ゴミを連続的に添加したが、ここでは特に標準的な組成の生ゴミに 1%または 3%の油を添加し、油負荷の条件における微生物集団を解析した。処理槽内の温度は室温とほとんど変わらず、また pH は処理開始すぐに 4.5 以下になり、その後低い値を保っていたが、2 週間処理が進行すると徐々に上昇する傾向にあった。しかし pH6 を上回ることはなく、運転を終えた 22 日目には pH は再び約 5 に低下した。

DGGE プロファイルから処理過程で微生物集団が変遷していることが示された。また DGGE バンドの塩基配列解析の結果、油の添加量に関わらず主要バンドは乳酸菌由来であった。1%油添加ゴミの系では、*Lactobacillus* および *Lactococcus* 属細菌が検出され、なかでも *Lb. reuterii* が処理過程を通して検出された。処理が続き pH が上昇してくると *Lb. fermentum* などの *Lactobacillus* 属細菌や *Lc. lactis* といった *Lactococcus* 属細菌が検出されなくなり、*Staphylococcus* 属細菌が現れてきた。3%油添加ゴミの系では、全てのバンドは *Lactobacillus* 属細菌由来であり、*Lb. fermentum* と *Lb. reuterii* 以外に 1%油添加ゴミの系では見られなかった種、すなわち *Lb. plantarum*、*Lb. pentosus*、*Lb. alimentarius* および *Lb. pontis* が検出された。これらの違いは油濃度によって槽内の通気性が異なったためと考

えられる。

またこれらの運転で検出された微生物はどれも乳酸生成能があり、処理槽内の pH を低く保つことで他微生物の増殖を抑制していると考えられる。さらに両方の運転で *Lb. fermentum* のバンド強度が減少した時、DGGE プロファイルが大きく変化していることから、乳酸菌が主要微生物となるこのような処理過程では *Lb. fermentum* が微生物集団を維持するための鍵微生物と考えられる。

(iii) 大規模堆肥化施設の解析—優占微生物種の定量・単離・性質解析—^{3) 4)}

ハザカ堆肥化施設は毎日約 20m³ の有機性廃棄物を安定に処理・堆肥化している。その堆肥化過程は約 1 ヶ月にわたり、初～中期には発酵熱により 60～76℃になり、後期には約 45℃まで低下する。また pH は 7.8 から 8.1 で、水分は初め 48.8%あったところから低下し最後には 25.1%になる。1 ヶ月にわたる処理過程の微生物叢を DGGE 解析したところ、*Propionibacterium* sp.、*Methylobacterium* sp.、*Bacillus* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Bradyrhizobium* sp. が処理を通して検出された。また高温期と中温期ではそれぞれ *Bacillus* 属の異なる種が検出され、*Clostridium* sp. は初期のみ、*Staphylococcus* sp.、*Caulobacter* sp. および *Brevundimonas* sp. は後期のみを検出された。バンド強度から判断すると、これらのうち *Propionibacterium acnes*、*Methylobacterium* sp.、*Bacillus thermocloacae* が主要微生物であると考えられた。

次にこれら主要と考えられる微生物の単離を試みた。いくつかの選択培地を用いて堆肥化過程から単離株 MSP09A (*P. acnes*) と MSP06G (*B. thermocloacae*) を得た。堆肥化過程における各微生物の DNA 量をリアルタイム PCR で定量した結果、MSP09A は温度の低下する後期に向かって増加するのに対し、MSP06G は高温期に多数存在すると考えられた。これはこれら単離株の増殖温度プロファイルとよく一致していた。高分子化合物の分解についてみると MSP09A 株は脂質およびタンパク質を分解し、MSP06G 株にもタンパク質分解活性が検出された。さらに Biolog システムを用いて解析したところ、これら 2 株の有機物資化プロファイルは異なっており、多くの有機物に対して相補的であった。ただし培養条件、特に酸素濃度によってそのプロファイルは大きく変動することから実際の堆肥化過程でも各環境によって様々な代謝能を示していると予想される。

微生物処理技術を効率化するには、主役となる微生物を現場から単離して利用する方法が考えられる。そのような候補として、①高温下での機能が期待される *Bacillus* 属細菌、② *Lactobacillus fermentum* を中心とする乳酸菌、③ 2 種の組み合わせが有効と考えられる単離株 MSP09A と MSP06G、が本研究で見出された。またこれら主役微生物の至適増殖プロファイル（温度、pH、酸素濃度等）に発酵槽を最適化することで、効率的でかつ安定な処理が達成されると期待できる。本論文は微生物叢解析の結果を微生物処理の改良に活かせる可能性を示した先導的研究である。

集団中の各微生物の役割を理解するための手法としては、(iii) で用いたように、集団構成メンバーの検出およびそれぞれの変遷→主要微生物の特定・単離→各微生物の解析、といった系統だった解析手段が有効であった。また各種有機性廃棄物の分解過程の解析から、どのような微生物がその処理過程で主要な機能を果たしているのかが明らかになってきた。上述したように主役微生物の添加は処理過程の効率化に効果的であると考えられるが、それと同時にそのような微生物が安定に存在し機能しうる環境要因や微生物集団を知ることも重要である。

発表論文

- 1) Pedro, M. S., N. R. Hayashi, T. Mukai, M. Ishii, A. Yokota, and Y. Igarashi. Physiological and chemotaxonomical studies on microflora within a composter operated at high temperature. *J. Biosci. Bioeng.*, vol.88, pp.92-97 (1999).
- 2) Pedro, M. S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii, and Y. Igarashi. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.*, vol.91, pp.159-165, (2001).
- 3) Aoshima, M., M. S. Pedro, S. Haruta, L. Ding, T. Fukada, A. Kigawa, T. Kodama, M. Ishii, and Y. Igarashi. Analyses of microbial community within a composter operated using household garbage with special reference of the addition of soybean oil. *J. Biosci. Bioeng.*, vol.91, pp.456-461, (2001).
- 4) Pedro, M. S., S. Haruta, K. Nakamura, M. Hazaka, M. Ishii, and Y. Igarashi. Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.*, (2003) accepted.