

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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。本研究では様々な廃棄物の中でも有機性廃棄物に注目し、これを効率的に分解・再利用するための微生物処理技術を確立することを最終目標として、様々な条件で運轉した有機性廃棄物処理装置中の微生物種の解析および優占微生物種の単離・定量および性質の解析を行った。

第1章では、有機性廃棄物の発生・処理状況、自然環境下の微生物集団の解析方法について概観した。

第2章および第3章に於いては、高温（50–60℃）に制御された厨房調理くず処理コンポスターについて、主要微生物の解析を行った。コンポスターから単離した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。また 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によっても、すべての単離株が *Bacillus* 属であることが示された。さらに季節を変えた3回のサンプリングにおける Biolog システムを用いての同定結果に大きな差はなく、本コンポスター内の微生物叢は安定であり、*Bacillus* 属細菌を中心とする微生物集団が維持されていると考えられた。

第4章に於いては、まず家庭用生ゴミ処理機内の微生物集団を主に分子生態学的手法を用いて解析した。この処理法に於いては、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、その後も低い値を保ち pH6 を上回ることはなかった。

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) で解析した結果では、処理過程で微生物集団が変遷していることが示されたが、主要バンドは常に乳酸菌であった。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. reuteri* 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。またいずれの場合にも、*Lb. fermentum* が集団の維持および機能発現に重要な役割を果たしていると考え

られた。

次に大規模堆肥化施設から採取したサンプルの菌叢解析を行った。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 50%程度であったところから徐々に低下し、最後には約 25%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。

さら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。

第 5 章では、総括と今後の方向性が討論された。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が、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それぞれ機能の異なる 2 種以上の微生物の組み合わせ、が有効と考えられる。第 4 章で議論された単離株 MSP09A と MSP06G の組み合わせは③の例である。今後、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された。

以上本論文は、様々な条件での有機性廃棄物の分解に働く微生物叢を様々な手法で解析し、その集団社会の構造の一部を明らかにした。さらにはその結果を微生物処理技術の改良に活かすことができる可能性を示した先導的研究であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。