

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 14 年度博士課程 入学
氏名 佐々木 建吾
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目 固定床式メタン発酵槽における微生物群集構造に関する研究

1. 序論

近年、生ごみなどの有機性廃棄物処理技術として固定床式メタン発酵が注目されている。固定床式メタン発酵は槽内に微生物付着担体を充填することで、生ごみ等の固形分を含む有機性廃棄物に対しても高負荷での運転が可能となっている。しかし、その微生物群集構造、特に担体上に付着している微生物に関する知見は乏しい。

メタン発酵による有機物からメタンへの分解は、3段階で行われる。すなわち、分子量の大きな有機物は、第1段階の酸生成過程(液化過程)で酸生成細菌群の作用により、単糖類、アミノ酸などの分子量の小さい物質を経て、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低級脂肪酸、そして乳酸やエタノールになる。次の2段階においては酢酸以外の低級脂肪酸、乳酸およびエタノールは、水素生成細菌により水素と酢酸に変換され、最後の3段階において基質特異性の強いメタン生成菌により、メタン、二酸化炭素などに分解される。

本研究では模擬生ごみを基質として、高負荷での運転が達成された固定床式発酵槽について発酵液および担体付着物を採取し、その微生物叢を解析した。(1)どのような微生物種で構成されているかについて調べ、(2)メタン発酵の最終過程であるメタン生成過程に関わるメタン生成菌について定量的解析を行い、(3)担体への付着画分内における細菌と古細菌、メタン生成菌の関係を観察する事で、固定床式発酵を微生物学的に特徴付けることを目的とした。

2 . 負荷を増加させた固定床式発酵槽の菌叢解析

2 - 1 . 運転条件および物理化学的性状解析

固定床式発酵槽の微生物付着担体として炭素繊維製不織布をサポータに付け槽内に充填した。模擬生ごみとして4%ドックフードスラリーを使用し、5.0L容発酵槽に種汚泥を植種し55℃で連続運転をした。水理的滞留時間(HRT)を短くしていき、有機物負荷量(OLR)を段階的に上げていき、高い負荷量OLR12.2 kg/m³/dayでの70%以上のCOD(化学的酸素要求量)除去率および安定なメタン生成を確認した。また、負荷を上げることで数mM程度の酢酸、プロピオン酸の蓄積が観察された。直接サンプリングした付着担体より、槽内の単位面積当りの担体への付着物乾燥重量を求めた結果、運転期間とともに付着物量は増加していた。これより付着物は槽内に安定に残存している事が示唆された。

2 - 2 . PCR-DGGE法による古細菌の解析

OLRが2.9、4.4、7.3、12.2 kg/m³/day (HRT ; 15、10、6、3.6日)の時点で、担体上の付着物および発酵液をサンプリングした。ベンジルクロライド法を用いてDNAを抽出し古細菌について16S rRNA遺伝子のV3-4regionを対象にPCR-DGGE解析を行った。バンドについて切り出し精製後、その塩基配列を決定し、データベース内の最近縁種を決定した。その結果、酢酸資化性メタン生成菌である*Methanosarcina*属、水素資化性メタン生成菌である*Methanoculleus*属、*Methanothermobacter*属が検出された。その他にはメタン菌とは異なるクラスタ - であるRice cluster IIIに属する古細菌も検出されたが、この菌のメタン生成活性は不明である。高負荷OLR12.2 kg/m³/day時には担体上のみから*Methanosarcina*属のバンドが検出された。

2 - 3 . 個々のメタン菌の定量的解析

酸性フェノール法を用いて total RNA を抽出し 16S rRNA を対象として dot blot hybridization 法を用いて個々のメタン菌の定量的解析を行った。古細菌および得られたメタン菌に特異的なプローブを使用した。その結果、高負荷時には *Methanosarcina* 属が担体上で増加しており、PCR-DGGE 解析の結果と一致していた。

以上より、高負荷時に酢酸濃度増加に伴い、特に担体上で *Methanosarcina* 属について特徴的な増加が観察された。

3 . 高負荷で運転した固定床式メタン発酵槽の担体上に注目した菌叢解析

3 - 1 . 運転条件および物理化学的性状解析

OLRを高負荷 12.2 kg/m³/dayに上げてから安定に長期間(48 日)運転した固定床式メタン発酵槽の担体に付着している微生物叢について解析を行った。安定なメタン生成とともにCOD除去率は高く、pHも中性に保たれていた。ただし、酢酸、プロピオン酸、酪酸については数mM程度、検出されていた。特に酢酸については高い蓄積が観察された。

3 - 2 . 16S rRNA遺伝子のclone library法による微生物群集構造の解析

発酵槽から担体を一部、採取し、付着物を剥ぎ取り付着画分とした。ここで発酵液にも多くの固形分が含まれるために採取し、100 μm のフィルターでろ過して、100 μm 以下を浮遊画分、100 μm 以上を固形画分とした。PCR-DGGE 法により3画分の微生物叢の変遷を調べた結果、高負荷にしてから 48 日目を菌叢的に安定している点として解析した。

付着画分より抽出した DNA を用いて、細菌、古細菌について 16S rRNA 遺伝子を対象として clone library を作成した。細菌については、*Firmicutes* 属、*Bacteroidetes* 属、*Chloroflexi* 属、*Thermotogae* 属、*Planctomycetes* 属に属する配列や、どの属にも属さない配列が得られた。多くの配列は既報の単離菌に対して相同性は低いものの他のメタン生成環境から得られるクローンの配列に対して高い相同性を示した。古細菌については *Methanosarcina* 属、*Methanoculleus* 属、*Methanothermobacter* 属に加えて水素資化性メタン生成菌である *Methanobacterium* 属が得られた。中でも *Methanosarcina* 属および *Methanoculleus* 属が多く得られた。

3 - 3 . 古細菌および個々のメタン菌の定量的解析

発酵液中の浮遊画分、固形画分、担体上の付着画分について古細菌および個々のメタン菌について定量的解析を行った結果、総メタン菌の割合は浮遊画分、固形画分ともに1%以下と少ないものだった。また全古細菌に対して総メタン菌の割合は発酵液中では少なく、この差は Rice cluster III に属する菌に由来すると考えられる。一方、付着画分では総メタン菌の割合は高く約 6 %前後であり、全古細菌に対する割合も 86%と高く clone library 解析を反映していた。付着画分中では、*Methanosarcina* 属と *Methanoculleus* 属については同程度であったが、*Methanobacterium*、*Methanothermobacter* 属はやや少なかった。

3 - 4 . FISH法による担体上の微生物群集の空間解析

担体上について空間解析を行うことを目的として超薄切片を作成した。微生物の局在を調べるために、菌体を SYBR GreenI で染色して共焦点顕微鏡を用いて観察した。その

結果、担体に直接付着している微生物よりも、基質由来と予想される固形分、繊維分に付着している微生物が多数、存在した。次に細菌と古細菌の分布を明らかにするために、これらに特異的なプローブを用いて Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)解析を行った。その結果、付着画分の表層部から深部に至るまで、一様に細菌と古細菌が検出された。また、付着画分中で細菌と古細菌は近接して混在している事が分かった。さらに古細菌の中で多く得られた *Methanosarcina* 属、*Methanoculleus* 属について FISH 解析を行った結果、これらのメタン生成菌も同様に、多くは細菌に近接して混在していた。最後に、細菌の中でも clone library 解析で多く得られた *Firmicutes* 属中の Municipal solid waste (MSW) cluster に属する菌や *Bacteroidetes* 属に属する菌に加えて、*Clostridium* 属の cluster I に属する菌に特異的なプローブを用いて FISH 解析を行い、個々のメタン生成菌との関係を調べた。その結果、これらの細菌についてもメタン生成菌と近接して混在している様子が観察された。

4. まとめ

固形分を含む基質に対して高負荷での運転を達成した固定床式メタン発酵槽に、分子生物学的手法を導入して解析を行った。その結果、担体上には細菌や古細菌に加えて、基質中の固形分、繊維分も構成成分となっており、これらは担体上に残存していた。発酵液中に比べて担体上ではメタン生成菌の割合が高く、担体への付着画分を足場として安定に増殖している事が明らかとなった。また槽内には既報の単離菌とは異なる新規の細菌が多く存在しており、これらの細菌が固形分の分解に寄与していると考えられる。さらに、担体上では主要な細菌と個々のメタン生成菌が近接して混在していた。メタン生成菌は発酵液中の酢酸、もしくは細菌が産生する酢酸、水素を基質として生育しており、細菌に近接している状態が有利に働いたと考えられる。このように担体上には、基質の分解に関わる微生物群衆が wash-out される事なく保持される事によって、固定床式メタン発酵槽が固形分を含む基質に対しても高負荷での運転が可能となる事が示唆された。