

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐々木 建吾

近年、生ごみ等の有機性廃棄物が増加するとともに、石油に代わる代替エネルギーが求められている。固定床式メタン発酵は、生ごみ等の固形分を多く含む有機物を高効率に分解する事ができると同時に、複雑な有機物をメタンに変換する事で燃料ガスとしての回収が可能であるために注目を集めている。しかしながら、固定床式発酵槽内で有機物の分解を担っている微生物群集構造については知見が得られていない。固定床式発酵槽は槽内に炭素繊維製不織布担体を充填するという特徴を有しており、担体上の微生物について興味を持たれる。本論文では、固定床式発酵槽内の微生物群集構造について分子生物学的手法を用いて解析し、固定床式発酵の特性である 1)固形分を含む基質の分解が可能、2)高負荷での運転が可能である事の 2 点について、微生物群集の機能との因果関係を明らかにする事を目的とした。

第一章では、固形分を多く含む模擬生ごみを基質として負荷量を変動させて連続的に固定床式発酵槽を運転した。メタン発酵の最終過程を担うメタン菌を含む古細菌叢について、担体上と循環液中で比較し解析を進めた。ベンジル・クロライド法を用いて核酸を抽出し、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し PCR-DGGE 解析に供した。その結果、*Methanoculleus* 属、*Methanosarcina* 属、*Methanothermobacter* 属が得られた。次にこれらのメタン菌を含むグループ特異的なプローブを用いて dot blot hybridization 法による定量的解析を行った。その結果、負荷量の高い時期に酢酸資化性メタン菌 *Methanosarcina* 属が担体上で増加している事が分かり、この現象は固定床式発酵槽に特徴的であった。また水素資化性メタン菌 *Methanoculleus* 属および *Methanothermobacter* 属が負荷量の高い時期に共存しており、固定床を採用していない完全混合型発酵槽と異なる知見が得られた。水素からメタンへの経路に関わるメタン菌を複数有する事も固定床式発酵槽が特性を示す理由の一つであると考えられる。

第二章では、固形分を多く含む模擬生ごみを基質として高負荷で固定床式発酵槽を運転した。Clone library 法を用いて担体上の微生物群集構造を詳細に解析した。細菌叢については 28 種類と多くの配列が得られ、これらは *Firmicutes* 属、*Bacteroidetes* 属、*Chloroflexi* 属、*Thermotogae* 属、*Planctomycetes* 属に属し、中にはどの属にも属さない配列も得られた。*Firmicutes* 属の中には *Clostridium* 属や Municipal solid waste cluster に属する配列が得られた。古細菌叢は一章と同様なメタン菌のみが得られ、これらのメタン菌を dot blot hybridization 法により定量した結果、循環液に比べて担体上でメタン菌量が多く、担体上にメタン菌を保持する事は固定床式発酵槽の安定に運転できる理由の一つであると考えられる。付着物を含む担体について超薄切片を作成し菌の空間分布を調べた。菌全体を染色し

共焦点顕微鏡で観察した結果、担体上には菌だけでなく基質由来の固形分も多く含まれていた。細菌の中で clone 数として多く得られた菌とメタン菌の空間的關係について FISH 法を用いて解析した結果、混在している様子が観察された。固定床式発酵槽は担体上に固形分を保持し、さらに固形分の分解に関わる多種類の菌体を保持する事で、固定床式発酵は他と異なる特性を示したと考えられる。

第三章では固形分を含まない低級脂肪酸を炭素源とした液体培地を基質として非常に短い滞留時間かつ高い負荷量で固定床式発酵槽を安定に運転した。循環液内の微生物群集構造を clone library 法で解析した結果、細菌の中には *Anaerobaculum* 属や古細菌の中には *Methanosarcina* 属や *Methanothermobacter* 属が検出された。しかし、これらの菌について報告されている世代時間は滞留時間よりも極めて長く、担体上に保持されている事が強く推察された。担体がなければ wash-out されてしまう菌を担体上に保持する事で、固定床式発酵槽が短い滞留時間もしくは高い負荷量での運転が可能となっていると考えられる。

以上、本論文は固定床式発酵槽内の微生物群集構造を明らかにした初めてのものである。その結果、分解に関わる微生物群集を形成するのみならず、これらを槽内に保持する事は重要な要素である事が明らかとなった。この点を工夫して、例えば基質に応じて担体の種類を変える、もしくは一度使用した担体を使用するという工夫を凝らせば、固定床式発酵槽で分解できる基質の種類が広がり、スタートアップを省略して迅速な運転が可能となるでしょう。本論文での知見がリサイクル社会実現の一助になると期待できる。

以上、本論文の知見は学術上ならびに応用上貢献するところ大である。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あるものと認めた。