

固形性有機廃棄物の嫌気性消化加水分解段階に関する微生物群の多様性解析

Diversity Analysis of Hydrolysis Microbial Structure in Anaerobic Digested Organic Solid Wastes.

水圏土壌環境制御研究室 豊嶋 拓
指導教官 大橋晶良、原田秀樹

1. はじめに

産業革命以後、石油エネルギーの消費や発展に伴う廃棄物の大量発生により、世界を取り巻く環境はさまざまな点から悪化しつつある。日本では、島国ということから廃棄物の処分問題は埋め立てのための土地不足や水質・土壌環境への影響から年々深刻化しつつある。

現在、廃棄物処理には焼却・埋め立て投棄という手段が一般的に用いられている。しかしながら都市廃棄物（生ごみなど）や下水汚泥などは水分が多く、焼却に多くのエネルギー投入が必要になり、さらにはダイオキシンを発生する原因になるとされている。石油燃料が将来に望めなくなりつつあり、環境負荷、土地問題からの観点から、近年の廃棄物処理においてはリサイクルへの動きが強まった。現在までに各種廃棄物についてさまざまな方法での再資源化技術が開発されている。固形性有機廃棄物の再資源化技術としては成型加工・有機循環・エネルギー化などがあげられる。エネルギー化としては、メタン発酵と呼ばれる嫌気性消化法が注目されている。嫌気性消化法は有機物を複数種の微生物群の作用により最終的にメタンまで分解することができる。得られたメタンガスは良好なエネルギーとして利用可能であり、そのほかに汚泥の減量化、安定化が可能であり、前述のさまざまな問題点をクリアできるものとして期待されている。

しかしながら固形性の有機廃棄物の嫌気性消化には加水分解段階がプロセス全体の速度を率するものとされながら今までに画期的な打開策がないのが現状である。また、関与する微生物群についてもその多様性、代謝経路の複雑さから明らかになっていない部分が多い。また加水分解段階の多様性について報告した例もほとんどない。

本研究では、今までに微生物の多様性についてあまり報告されていない実処理場発生汚泥（生ゴミ・消化汚泥）を用いて嫌気性消化の加水分解に関与する微生物について分子生物学的手法を用いた微生物多様性解析を行った。

2. 研究目的

嫌気性消化は数種の微生物群の相互作用によって進行する。従来さまざまな角度からその多様性について研究がなされてきた。しかしながら固形性有機廃棄物では加水分解段階がプロセス全体に対し率速であるとされながら、その多様性についてはほとんど報告事例がない。

本研究では加水分解に関与する微生物についての多様性を調査する目的で分子生物学的手法を用いた実験を行った。

3. 実験試料

本研究で用いたサンプルは、上越汚泥リサイクルパークのメビウスリアクターより採取した。¹⁾ここでは分別収集した都市廃棄物と浄化槽汚泥を高温混合嫌気性消化する。サンプルは都市廃棄物を破碎し 45 時間貯留したもの（以下生ゴミ）と、高温消化汚泥（生ゴミ・し尿完全混合 15 日 55 高温嫌気性消化）である。生ゴミサンプルは貯留槽内にて加水分解・酸発酵が促進され pH4 程度であった。消化汚泥は pH7.2 程度であった。サンプルは採取後直ちにリン酸バッファによる基質洗浄を行った。

4. 実験方法

サンプルからの DNA の抽出はビーズビーターを用いて行った。²⁾³⁾抽出した DNA は RNase 処理し混在 RNA を分解し、フェノール抽出・エタノール沈殿によって精製した。抽出した DNA を鋳型とし 16SrDNA 遺伝子部分を PCR 増幅した。また、抽出 DNA はそのままでは PCR 反応への阻害物質を含んでいるため、キット（FUNAKOSHI Gene clean turbo kit）を用いて精製を行った。PCR 反応には細菌に特異的に結合する EUB341F と UNIV.1500R、古細菌に ARC111F と UNIV.1500R のプライマーセットを使用した（Table1）。PCR 反応は 95 分の変性後、95 秒の変性、50 秒のアニーリング、72 分伸長ステップを繰り返した。PCR 産物は GeneClean kit（BIO 101 Inc, USA）を用いて精製を行った。核酸は、1.2% アガロースゲル（EtBr 添加）に 100V・20 分間、TAE バッファ内で電気泳動を行い確認した。この増幅した 16SrDNA をプラスミドに組み込み大腸菌（コンピテントセル；*Echerichia coli*.JM109）によってクローン化し、目的プラスミドがインサートされたコロニーからランダムに釣菌した。採取したプラスミドは複数の制限酵素を用いて RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析を行い、異なる電気泳動パターンのクローンを選択しダイデオキシ法によるシーケンスを行い塩基配列を決した。シーケンスプライマーは Univ.907R を用いて部分解析とした。得られた塩基配列は BLAST search を行った。

Table 1 DNA primers used in this study.

probe	Target group	Primer seq	E.coli position
EUB 341F	<i>Eubacterium</i>	5'-GCTCAGTAACACGTGG-3'	341-357
ARC 111F	<i>Archaea</i>	5'CCTACGGGAGGCAGCAG3'	112-127
Univ. 1500R	<i>Universal (Eub&Arc)</i>	5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'	31491-1509

5. 実験結果

5.1 DNA 抽出

固形性サンプルからの DNA 抽出法として広く使用されているビーズビーター法とフェノール精製により良好に核酸を抽出することができた。RNase により RNA を除去し DNA 精製後、DNA の総回収量を吸光度で計測したところ、生ゴミからはサンプル量約 2.5g から 13,200 ng、消化汚泥サンプル約 1.5g から 11,439 ng 得られた。

5.2 PCR 反応

抽出した DNA について PCR を行ったところ、PCR 増幅を確認することができなかった。キットによる精製を行い始めて、阻害物質が除去され増幅が確認された。また生ゴミ中からは古細菌 DNA について増幅が確認されなかったため生ゴミについては細菌だけとした。サイクル数、濃度についてチェックのため PCR を行った。最終的に反復ステップを生ゴミ 25 回、消化汚泥細菌・古細菌ともに 20 回とし large scale で PCR を行った結果、増幅が確認された。

5.3 クローニング

無作為にクローン化した大腸菌コロニーを 70 ずつピックアップした。生ゴミ中から細菌の 22 クローン、消化汚泥細菌 54 クローン、古細菌 42 クローンを得ることができた。

5.4 RFLP・シーケンス

クローンから抽出した目標微生物 DNA のインサートされたプラスミドに DNA について RFLP 解析によってパターン分けを行った。そのうち、生ゴミバクテリアについては 22 クローンが 7 種に分けられ、消化汚泥ではバクテリア 54 クローンが 3 種、42 クローンが 2 種に分類された。複数の制限酵素によってパターン分けが可能であった。それぞれのパターンの中から代表クローンを選びシーケンスし、Blast search による相同性確認を行った。供した塩基配列はそれぞれ 500 塩基程度であった。

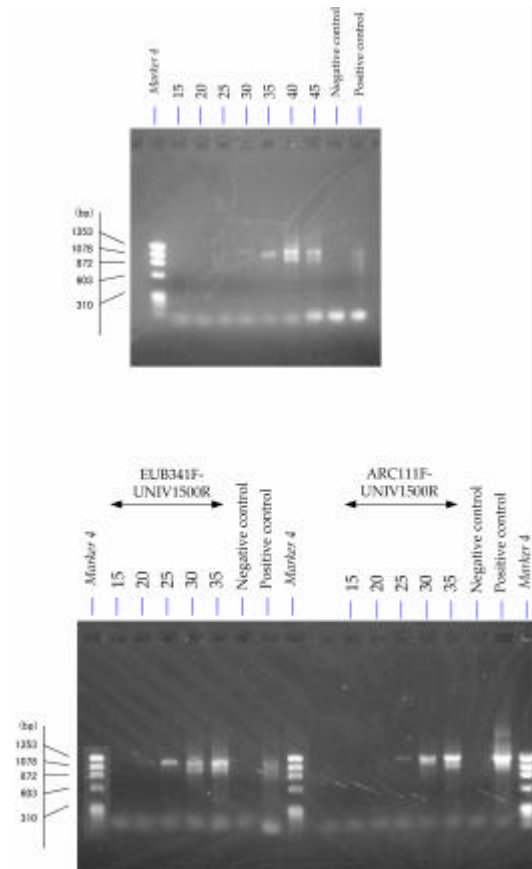


Fig2 . Cycle check PCR amplification.

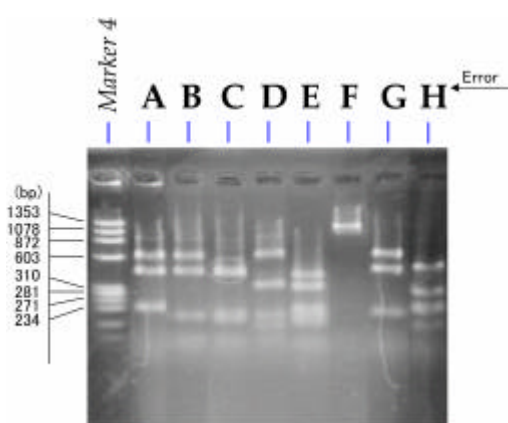


Fig3 . RFLP analysis for eubacterial 16SrDNA clones redovered from MSW sample, using Hae

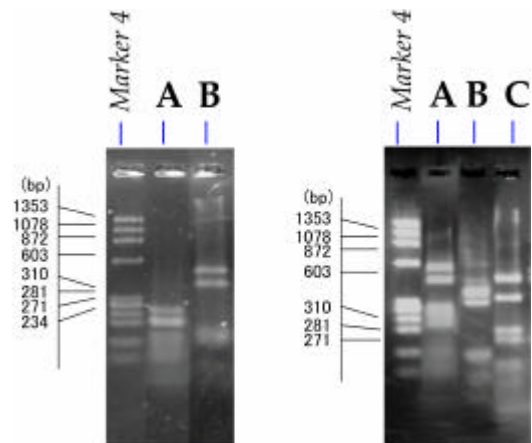


Fig4 . RFLP analysis for archaeal & eubacterial 16SrDNA clones redovered from Digested Sludge sample, using Hae (right; EUB, Left Archaea)

め

本研究では多様性解析として現在までにあまり報告事例のない生ゴミサンプルについての解析を行った。

Table 2 に多様性解析により得られた塩基配列からの分類結果を示す。

生ゴミサンプルについてはドミナント(22 クローン中 9)として *Lactobacillus casei* が検出された⁵⁾。相同性も 97%とときわめて高いものとなった。この菌は乳酸菌群に属し、この他にも C・D・F・G で乳酸菌群に属する菌であると推定された。また、次いで 5 クローンが 98%の相同性で高温タンパク質分解性の *Thermobacterium (Coprothermobacter) proteolyticus* であると推定された⁶⁾。また、クローン E については *Desulfotomaculum* に属する細菌と推定されたが相同性が 86%と低く、新種の微生物である可能性も示唆された。

消化汚泥サンプルからは、古細菌としては 98% の相同性で *Methanobacterium thermoautotrophicum* がドミナントであると推定された。

細菌では 54 クローン中 51 クローンが *Coprothermobacter proteolyticus* であると推定された。相同性は 98%であった。また、消化汚泥からの細菌のうち、クローン B,C とともに相同性 90%と非常に低かった。クローン B では”*unidentified eubacterium clone BSV81*”と現在

クローンレベルで確認されている細菌であると推定され、また新種の微生物である可能性も示唆された。

Table2. Result of sequencing.

生ゴミ 細菌			
Sample	Occupy rate	Clone genes & organism.	ID(%)
A	(9/22clone)	<i>Lactobacillus casei</i>	97
B	(5/22clone)	<i>T.proteolyticus</i>	98
C	(2/22clone)	<i>Leuconostoc citreum</i>	98
D	(1/22clone)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98
E	(1/22clone)	<i>Desulfotomaculum thermosapovorans.</i>	86
F	(1/22clone)	<i>Lactobacillus viridescens.</i>	98
G	(1/22clone)	<i>Rahnella genosp. 3</i>	99
H			
高温消化汚泥 古細菌			
Sample	Occupy rate	Clone genes & organism.	ID(%)
A	(39/42clone)	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	98
B	(3/42clone)	<i>Methanosarcina thermophila</i>	97
高温消化汚泥 細菌			
Sample	Occupy rate	Clone genes & organism.	ID(%)
A	(51/54clone)	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>	98
B	(2/54clone)	<i>unidentified eubacterium clone BSV81.</i>	90
C	(1/54clone)	<i>Desulfonisporea thiosulfatigenes</i>	90

参考文献

- 1)生物系廃棄物資源化・リサイクル技術. NTS. 2000
- 2)丸山康貴.2001.シベリア湿地帯におけるメタン放出に関する微生物群の把握及び定量化. 長岡技術科学大学修士論文
- 3)Raskin.L, Mackie.R, Anaerobic Codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-?microbial population dynamics. , Wat.Res. Vol35 No.7 1817-1827 .2002
- 4)S.J.W.H.Oude.Elferink , R.van Lis, Detection and quantification of micro organism in anaerobic bioreactors,Biodegradation 9.169-177.1998
- 5) SHINANO.H, KATSUMATA.M, Comparative sequence analysis of the genes coding for 16SrRNA of *Lactobacillus casei* related taxa. Int.Jor.of Sys.Bacter.1997.54-57
- 6)KERSTERS.I, G.M.MAESTROJUAN, Isolation of *Coprothermobacter proteolyticus* from an anaerobic digest and further characterization of the species. Sys.Appl.Microbiol.17. 289-295. 1995