

氏 名	チヨ 千 智 フン 勲
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2636 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 都 市 環 境 工 学 専 攻
学位論文題目	CHARACTERIZATION AND MONITORING OF MICROBIAL DIVERSITY IN ANAEROBIC BIOREACTOR BASED ON 16S rDNA (16S rDNA に基づく嫌気性発酵槽の微生物群集解析およびモニタリングに 関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 津 野 洋 教 授 武 田 信 生 教 授 田 中 宏 明

論 文 内 容 の 要 旨

地球温暖化防止や循環型社会の構築の観点から、生ごみからエネルギーを回収するための嫌気性メタン発酵技術は重要な技術である。本論文は、生ごみの嫌気性発酵の効率的で安定な操作を行うため、分子生物学的手法を用いて、嫌気性発酵槽の微生物群集解析および重要微生物の定量ならびに発酵槽運転状況との関係の解明を試みた結果をまとめたものであって、7章からなっている。

第1章は序論であり、研究の位置付け、背景および目的について言及し、嫌気性発酵槽内の微生物相の解析と微生物群集と発酵槽状況との関係の把握は極めて重要であることを述べ、本論文の構成を示している。

第2章では、分子生物学的手法と嫌気性生物反応槽に関して文献考察を行っている。

第3章では、嫌気性メタン発酵槽の微生物相解析のために、分子生物学的手法である PCR-Random Clone Sequencing 法を用いた適切な解析手法について検討し確立した。様々な PCR プライマーを用いた最適化実験により、発酵槽の微生物群集解析では、Univ. 519F-1406R プライマーセットが 68°C のアニーリング温度で適切であることを明らかにした。そして PCR-Random Clone Sequencing 法の最適 Clone 数を確認する実験を行い、全体微生物種の 75% を把握するため必要な Clone 数は 72 個であることを明らかにした。6ヶ所の実プラントから採集したサンプルに対して、Univ. 519F-1406R プライマーセットを用いた PCR-Random Clone Sequencing 法による微生物群集解析実験を行い、この手法が嫌気性発酵槽の微生物群集解析に適切であり、その最大誤差は ±10% であることを実証した。また、この結果からは 55 種類の古細菌も検出され、この手法はメタン発酵で重要と考えられる古細菌の検出能力も持っていることが確認された。

第4章では、確立した分子生物学的解析手法を用いて、生ごみを用いた一相式および二相式高温嫌気性メタン発酵槽の微生物群集解析を行った。実験の結果、一相式メタン発酵槽では *Bacillus infernus* の全微生物に対する占有率が発酵槽のプロピオン酸濃度と、二相式発酵槽の酸発酵槽では *Bacillus coagulans* の占有率が乳酸濃度と関係があり、これらの微生物の特性が発酵槽の状況と一致していることを明らかにした。さらに一相式メタン発酵槽では酸発酵に関わる *Bacillus infernus* と、メタン発酵に関与していると考えられた *Uncultured bacterium tbr1-9*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* と *Methanothermobacter wolfeii* が、二相式発酵槽では酸発酵に *Bacillus coagulans* や *Clostridium* sp., メタン発酵には *Uncultured bacterium tbr1-9*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanoculleus thermophilus* と *Methanothermobacter wolfeii* が関与し、これらの微生物がそれぞれ発酵槽の重要微生物と考えられた。

第5章では、容積 1,100 トン規模の高温嫌気性メタン発酵実プラントの微生物群集解析およびその変化を分析した。運転初期は投入した種汚泥(下水汚泥の高温メタン発酵)と類似した微生物群が占めていたものの、約 1 年間の運転により、前述の生ごみの一相式高温嫌気性メタン発酵槽と類似した微生物群に変化した。すなわち、運転初期に主に検出された微生物は *Lactobacillus* sp. であったが、これは時間と共に *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp. に変化し、解析の最後には *Bacil-*

lus infernus, wolfeii が主に検出され、実験室規模の一相式発酵槽と同様な群集を示した。この結果、実験室規模発酵槽から検出され重要と判断された微生物が実プラントでも重要であり、今後、微生物解析技術が現場でも十分適用可能性があることを明らかにした。

第6章では、本研究での微生物解析の結果に基づき、嫌気性発酵槽の安定的な運転に関わる重要微生物の定量を Real-Time PCR 法を用いて試みた。*Bacillus infernus*, *Methanoculleus thermophilus*, *Methanosarcina thermophila* と *Methanothermobacter wolfeii* に対し、それぞれ4つのプライマーセットを16S rDNAに基づき開発し、その適用性を確認した上、全微生物を含む5種類に関して定量を行った。測定した全微生物量は、一相式メタン発酵槽では $5.5 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^{14}$ copies/L、実プラントでは $4 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ copies/L であり、従来の研究結果より一相式発酵槽は10倍高く、実プラントは同様の値であった。定量の結果からは、全微生物の平均約70%を4つの重要微生物が占めているのが明らかになった。メタン生成に関与していると考えられる3種類のメタン生成菌、*Methanoculleus thermophilus*, *Methanosarcina thermophila* および *Methanothermobacter wolfeii* は、全体の平均20%を占め、従来の研究結果の2倍を示した。一相式メタン発酵槽の微生物定量の結果からは、メタン生成菌の量が発酵槽の状況を反映していることが分かり、適切な *Methanosarcina thermophila* の量として 9×10^{11} copies/L が提示された。実プラントに必要な *Methanoculleus thermophilus*, *Methanosarcina thermophila* の16S rDNA 濃度はそれぞれ 2×10^9 copies/L, 9×10^9 copies/L 以上が提示された。

第7章は結論であり、本論文で得られた成果について要約するとともに、今後の研究課題を提示している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生ごみの嫌気性メタン発酵の効率的で安定な操作を行うため、分子生物学的手法を用いて嫌気性発酵槽の微生物群集解析および重要微生物の定量ならびに発酵槽運転状況との関係の解明を試みたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. PCR-Random Clone Sequencing 法を用いた解析手法の確立を試み、最適なプライマーとして Univ. 519F-1406R プライマーセットが68°Cのアニーリング温度で適切であることを明らかにし、全体微生物種の75%を把握するため必要な Clone 数は72個であることを明らかにした。そして6ヶ所の実プラントから採集したサンプルの微生物群集解析実験からこの手法が嫌気性発酵槽の微生物群集解析に適切であり、その最大誤差は±10%であることを示した。また、一相式メタン発酵槽では、*Bacillus infernus* の全微生物に対する占有率が発酵槽のプロピオン酸濃度と、二相式発酵槽の酸発酵槽では *Bacillus coagulans* の占有率が乳酸濃度と関係があり、これらの微生物の特性が発酵槽の状況と一致していることを明らかにした。

2. 実規模の高温嫌気性メタン発酵プラントの微生物群集解析では、運転初期は投入した種汚泥（下水汚泥の高温メタン発酵）と類似した微生物群が占めていたものの、約1年間の運転により、生ごみの高温嫌気性メタン発酵槽と類似した微生物群に変化した。これらの結果から、実験室規模の発酵槽で得られた知見や微生物解析技術が現場でも十分適用可能性があることを明らかにした。

3. 以上の結果から、発酵槽の安定的な運転に関わる重要微生物の定量を Real-Time PCR 法を用いて試みた。そのため *Bacillus infernus*, *Methanoculleus thermophilus*, *Methanosarcina thermophila* と *Methanothermobacter wolfeii* に対し、それぞれ4つのプライマーセットを16S rDNAに基づき開発し、その適用性を確認した上、全微生物を含む5種類に関して定量を行った。測定した全微生物量は、一相式メタン発酵槽では $5.5 \times 10^{12} \sim 1.0 \times 10^{14}$ copies/L、実プラントでは $4 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{13}$ copies/L であり、従来の研究結果より一相式発酵槽は10倍高く、実プラントは同様の値であった。定量の結果からは、全微生物の平均約70%を4つの重要微生物が占めているのが明らかになった。メタン生成に関与していると考えられる3種類のメタン生成菌、*Methanoculleus thermophilus*, *Methanosarcina thermophila* および *Methanothermobacter wolfeii* は、全体の平均20%を占め、従来の研究結果の2倍を示した。

以上要するに、本論文は、嫌気性発酵槽の微生物群集解析のための適切な解析手法を確立した後、一相式および二相式嫌気性発酵槽に関して、操作時間による微生物群集変化を解析し、安定的な発酵槽運転の指標になる重要微生物を把握し、重要微生物に対し、全微生物量とともに16S rDNAに基づく定量モニタリングを行ったものであり、学術上、實際上寄与す

るところが少ない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また平成18年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。