

博士 (工 学) ヘルト ドゥイ アリエスヤディ

学 位 論 文 題 名

Ecophysiological Studies on Biodiversity of
Fatty Acids-Utilizing Bacteria and Archaea in
Anaerobic Digester Treating Domestic Wastewater
Analyzed by Molecular Biological Techniques

(分子生物学的手法を用いた都市下水汚泥の嫌気性消化における
有機酸分解微生物の多様性と生態学的構造解析)

学位論文内容の要旨

我が国の総消費電力量に占める下水処理場消費電力量の割合は約 1% に達し、その約 30~50% が汚泥処理・処分に使用されている。発生汚泥のうち有効利用されているものは約 50% にすぎず、残りの 50% は海面埋立や陸上埋立処分される。このような現状を鑑み、エネルギーと廃棄物問題の両面から、エネルギー消費量および発生汚泥量が少なく、かつエネルギー回収が見込まれる嫌気性汚泥処理 (嫌気性消化) が極めて有効であり、これを高効率かつ安定的なバイオプロセスとして実現するための制御技術の確立が望まれる。嫌気性消化における有機物分解の特徴は、特定の微生物が単独で有機物分解を担う好気条件下とは対照的に、異なる機能を持つ多種多様な微生物の分業により段階的に進行するということである。そのため、各々の分解反応はその上流および下流の分解反応と密接に関与している。これまでの嫌気性消化の微生物学的研究はメタン生成反応に主に焦点が当てられていたが、安定的に有機物分解を進め効率的にメタンを回収するには、酸生成反応、酸分解反応など各分解反応に関与する微生物についても把握する必要がある。特に有機酸分解はメタン生成反応の上流に位置すること及び反応律速になりやすいことから重要度が高い。しかしながら、有機酸分解反応に関与する微生物は培養困難であるため、各有機酸分解反応に関与する微生物全体を捉えて多様性 (何種いるのか、それぞれの特徴は何か) およびポピュレーション (どの程度いるのか、それによってどの程度の分解速度を示すのか) について議論した研究はほとんどない。これらの問題にアプローチするためには、分離培養によらず、複合微生物系において微生物の系統分類学的情報と微生物機能を関連づけて高感度に解析できる手法が必須であり、放射性同位体元素を用いるマイクロオートラジオグラフィ (MAR) と FISH 法を組み合わせた MAR-FISH 法は極めて有効な手法である。そこで、本学位論文では、MAR-FISH 法に放射性同位体炭素で標識された有機酸を用い、MAR-FISH 法を中心とする一連の 16S rRNA アプローチを嫌気性消化汚泥に適用することにより、有機酸分解微生物の多様性とポピュレーションの解析を行い、さらに基質濃度が微生物群集構造に与える影響について考察した。本論文は、5 章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章は、緒言であり、嫌気性消化プロセスと嫌気性消化における従来の微生物学的知見をレ

ビューし、研究の背景と目的、本論文の構成について述べた。また、本論文で用い、嫌気性消化汚泥内の微生物解析に極めて有効であった分子生物学的機能解析手法について概説した。

第2章では、都市下水汚泥の嫌気性消化を行う実処理プラントの消化汚泥を対象に、グルコース、プロピオン酸、酢酸、酪酸の分解に関与する微生物群集の多様性の解析と各微生物ポピュレーションの定量的解析を行った。また、MAR-FISH法を用いた本解析結果の妥当性を検討する目的で、放射性同位体炭素で標識された基質のクロスフィード(二次代謝物の利用による擬陽性)を調査し、本解析に対するMAR-FISH法の実験条件の最適化を行った。有機酸分解を担う微生物群集のポピュレーションと多様性は、いずれもグルコース分解に関与する微生物群集に比べて低いという結果を得、多様性とポピュレーションの側面から有機酸分解が糖分解に比べて律速しやすいことが示唆された。グルコース、プロピオン酸、酪酸、酢酸の分解において主要な微生物はそれぞれ *Chloroflexi*、*Smithella*、*Syntrophomonas*、*Methanosaeta* であることを明らかにした。さらに、従来の嫌気性消化の研究では重要視されていなかった未分離の *Betaproteobacteria* グループが、嫌気性消化汚泥における有機酸分解に貢献していることをはじめて指摘した。

第3章では、嫌気性消化汚泥内の微生物群集構造が投与する基質組成が変化するときどのように影響を受けて安定化していくのかについて、基質組成が変化した前後の微生物群集構造を反応槽内の水質変化とあわせて比較解析を行った。基質組成の変化とは実際の都市下水汚泥から溶解性の人工複合基質(タンパク質、糖、脂質を含有)への切り替えである。その結果、基質組成の変化は、種や属レベルでは主要微生物の多様性に变化をもたらすが、門や綱レベルでは変化を与えないということが実験的に示された。但し、有機酸分解微生物の多様性については、基質組成の変化の前後で大きな違いは認められず、多様性は低いままであった。また、基質組成を変化させたときに有機酸が高濃度に蓄積する現象が見られたが、この間に酢酸資化性メタン生成古細菌とその他の有機酸分解微生物のポピュレーションと活性が著しく減少したことから、嫌気性消化反応の安定的進行のためにはこれら多様性の低い微生物に対し特に注意を払う必要があることが推察された。

第4章では、有機酸分解の中でも特に律速反応として指摘されているプロピオン酸分解について、嫌気性消化汚泥内の多様性とポピュレーションを解析し、基質濃度の影響を調査した。その結果、プロピオン酸分解微生物には *Smithella* などの4種が関与することを明らかにした。各微生物の基質親和性はそれぞれ異なり、その結果、プロピオン酸濃度の違いにより活躍する微生物種のポピュレーションおよび種構成が変化すると考えられた。これは同時に各微生物のプロピオン酸分解への寄与が基質濃度の影響を受けて変化するということも示している。反応槽内のプロピオン酸濃度は0.20 mMの範囲で変動していたため、このことが嫌気性消化汚泥内に基質親和性の異なるプロピオン酸分解微生物を共存させることに繋がったと思われる。基質分解に基質親和性の異なる複数種の微生物が関与することは、基質濃度の変化への対応を容易にし、処理の安定性に繋がる可能性があるとして推察された。

第5章は、総括であり各章のまとめと今後の課題、展望について述べている。

以上を要すると、本学位論文は、これまで培養が困難なため嫌気性消化汚泥内における多様性およびポピュレーションに関する情報が極めて乏しかった有機酸分解微生物について、分離培養に依らないMAR-FISH法を本解析に最適化することによりはじめて詳細を明らかにしたものである。本研究は、嫌気性消化汚泥内における有機酸分解菌は系統分類学的にも生理機能学的にも多様性に乏しいことを示し、安定的なメタン生成のためには個々の有機酸分解微生物をバイオマーカーとして多様性とポピュレーションの維持に特に着目する必要があること、また反応槽内の基質濃度が有機酸分解微生物の群集構造と多様性に与える影響が大きいことを指摘した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 義 公

副 査 教 授 船 水 尚 行

副 査 教 授 高 橋 正 宏

副 査 助 教 授 岡 部 聡

学 位 論 文 題 名

Ecophysiological Studies on Biodiversity of Fatty Acids-Utilizing Bacteria and Archaea in Anaerobic Digester Treating Domestic Wastewater Analyzed by Molecular Biological Techniques

(分子生物学的手法を用いた都市下水汚泥の嫌気性消化における
有機酸分解微生物の多様性と生態学的構造解析)

嫌気性消化は様々な有機性廃棄物からバイオガスであるメタンをエネルギーとして回収できる有効な生物学的过程である。今後のエネルギー問題と廃棄物問題の両面から、嫌気性消化プロセスを高効率化・安定化するための制御技術の確立が望まれている。嫌気性消化における有機物分解は、特定の微生物が単独で有機物分解を担う好気条件下とは対照的に、異なる機能を持つ多種多様な微生物群の分業により段階的に進行する。一般的に、嫌気性消化プロセスでは、有機物の可溶化、酸生成反応が分解反応律速となる場合が多く、特にプロピオン酸などが反応槽内に蓄積し、プロセス全体を破綻させるケースが多く報告されている。これまでの研究は、主にメタン生成反応およびメタン生成古細菌に焦点を当て行われてきたが、安定的に有機物分解を進め効率的にメタンを回収するには、酸生成反応、酸分解反応に関与する微生物群に関する基礎的知見を集積・整備することが極めて重要である。しかしながら、有機酸生成、分解反応に関与する微生物は培養困難であるため、微生物群集構造(サイズおよび多様性)や機能に関する情報は限られている。これらの問題にアプローチするためには分離培養に頼らず、複合微生物系において微生物の系統分類学的情報と機能を直接関連づけて、高感度に解析できる手法の開発が必須であり、放射性同位体元素を用いるマイクロオートラジオグラフィー(MAR)とFISH法を組み合わせたMAR-FISH法は、極めて有効な手法であると考えられる。そこで、本学位論文では、放射性同位体炭素で標識された各種有機酸を用いたMAR-FISH法を中心とする一連の16S rRNAアプローチを嫌気性消化汚泥に適用することにより、有機酸生成・分解微生物の群集構造と機能を細胞レベルで解析している。さらに、基質濃度が微生物群集構造に与える影響について詳細に検討し、効率的かつ安定的な嫌気性消化を達成・維持するための制御因子の探索を行っている。

本論文は、5章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第1章は、緒言であり、嫌気性消化プロセスと嫌気性消化における従来の微生物学的知見をレビューし、研究の背景と目的、本論文の構成について述べている。また、本論文において、嫌気性消化汚泥内の微生物群集解析に極めて有効であった MAR-FISH 法を中心とする一連の分子生物学的機能解析手法について概説している。

第2章では、都市下水汚泥の嫌気性消化を行う実処理プラントの消化汚泥を対象に、グルコース、プロピオン酸、酢酸、酪酸の分解に関与する微生物群集の多様性の解析と各微生物群集の定量的解析を行っている。また、MAR-FISH 法を用いた本解析結果の妥当性を検討するために、放射性同位体炭素で標識された基質のクロスフィード (二次代謝物の利用による擬陽性) を調査し、MAR-FISH の実験条件の最適化を図っている。有機酸分解を担う微生物群集のサイズと多様性は、いずれもグルコース分解に関与する微生物群集に比べて小さく、有機酸分解が糖分解に比べて律速しやすいことを明らかにしている。さらに、グルコース、プロピオン酸、酪酸、酢酸の分解において主要な微生物はそれぞれ *Chloroflexi*、*Smithella*、*Syntrophomonas*、*Methanosaeta* であることを明らかにしている。

第3章では、嫌気性消化汚泥内の微生物群集構造が投与する基質組成が変化した時、どのように微生物群集構造が安定化していくかについて、基質組成が変化した前後の微生物群集構造を反応槽内の水質変化とあわせて比較検討している。その結果、基質組成の変化は、種や属レベルでは主要微生物の多様性に変化をもたらすが、門や綱レベルでは変化を与えないということを実験的に明らかにした。また、基質組成を変化させた時に、有機酸が高濃度に蓄積する現象が見られたが、この間に酢酸資化性メタン生成古細菌とその他の有機酸分解微生物群の多様性と活性が著しく低下したことから、嫌気性消化反応の安定的進行のためには、これら多様性の低い微生物群の制御が重要となることを明らかにしている。

第4章では、有機酸分解の中でも特に律速反応として指摘されているプロピオン酸分解について、嫌気性消化汚泥内の多様性とポピュレーションを解析し、基質濃度の影響を調査している。その結果、プロピオン酸分解微生物には *Smithella* などの4種類の微生物が関与することを明らかにした。さらに、これらの微生物のプロピオン酸に対する基質親和性はそれぞれ異なり、プロピオン酸濃度の違いにより活躍する微生物種の構成が変化することを明らかにしている。基質分解に基質親和性の異なる複数種の微生物が関与することは、基質濃度の変化への対応を容易にし、処理の安定性に繋がることを示唆するものである。

第5章は、総括であり各章のまとめと今後の課題、展望について述べている。

以上を要するに著者は、これまで培養が困難であり情報が極めて乏しかった嫌気性消化汚泥内の有機酸生成、分解微生物群集の系統分類学的構造と生理機能を、分離培養に依らない MAR-FISH 法を軸とする分子生物学的手法を用いて詳細に解析した。その結果、有機酸分解微生物の群集構造と多様性に与える環境要因を明らかにするとともに、効率的かつ安定的な嫌気性消化を達成・維持するために重要となる有機酸分解微生物群を明らかにしたものであり、水環境工学および環境微生物工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。