

有機性廃棄物を分解・再資源化する微生物集団機能の解析と開発

Bio-Degradation and Re-Utilization of Organic Solid Wastes — Functional Analysis and Development of Microbial Community —

春田 伸*, 五十嵐泰夫

SHIN HARUTA and YASUO IGARASHI

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

* TEL: 03-5841-5145 * FAX: 03-5841-5272

* E-mail: aharuta@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

キーワード：微生物集団, 微生物生態学, 有機性廃棄物, 堆肥, リグノセルロース

Key words: microbial community, microbial ecology, organic solid waste, compost, lignocellulose

(原稿受付 2004年3月30日 / 原稿受理 2004年6月16日)

1. はじめに

微生物の単離・培養・組換え技術の開発により、アミノ酸や抗生物質生産といった発酵産業は大きな発展を遂げてきた。それらは1種の微生物を完全な制御の下、純粋培養することによって達成されている。一方で伝統的な発酵食品のように単離や純粋培養とは全く異なる技術を基に発展してきたバイオプロセスもある。そのようなプロセスでは1種の微生物の役割に還元できないような効率または機能が観察されており、多種微生物の共存系の有用性を示している。また生ゴミのように多様な基質を含む有機性廃棄物を分解・再資源化するためにも多様な微生物（機能）が要求され、またリグノセルロースのような複雑な化合物の分解にも複数種からなる集団としての微生物機能が有効である。さらにこれら廃棄物を減菌することなく処理するためには、他菌の混入にも機能的に抵抗性を示す複雑微生物系の利用が望まれる。実際、伝統的な醸造技術では十分な無菌操作を行うことなく微生物を集団として扱っており、その発酵は長年にわたって見事に安定に進行している。堆肥化やメタン発酵といった廃棄物処理技術もまた過去の経験をもとに運用されているが、その安定的制御や効率化にはまだ開発の余地が残されている。プロセスの開発・改良を目指す第一歩として、そのような多様な微生物代謝が絡み合っているバイオプロセスに関わる複雑微生物系を理解し、その集団としての機能発現を明らかにすることが重要である。

しかし自然界の微生物集団の解析同様、我々が扱うバイオリクター内の複雑微生物系の理解においても、培養困難微生物の存在、微生物間または微生物・固体基質間の相互作用など様々な問題が立ちはだかっている。近年、微生物叢の解析において従来の培養法だけでな

く、多くの分子生物学的手法が開発・導入されてきている^{1,2)}。その一例として16S rRNA 遺伝子に基づく denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), 定量 PCR, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) などが挙げられる。これらは微生物を培養することなく迅速に解析できる手法であるが、核酸抽出, PCR や細胞固定などの際に生じるバイアスは常に考慮しなければならず、各種手法を組み合わせ多角的に解析する必要がある。またこれら微生物集団の構成メンバー（構造）を知るだけでなく、それぞれの集団内・環境中での機能と役割を明らかにしなければならない。

本稿では有機性廃棄物の主に分解過程に関わる微生物集団の構造と機能に関する解析結果を紹介し、その解析過程で見えてきた複雑微生物系の性質を議論するとともに、新たな微生物集団の開発やその利用性について検討する。

2. 堆肥化に関わる微生物集団～実規模での有機物分解～

2.1. 堆肥化の意義

堆肥化は古くから行われている有機性廃棄物の分解処理技術であり、有機資源の再利用技術である。近年、循環型社会形成推進基本法およびその関連法（資源有効利用促進法や食品リサイクル法）の整備、また「バイオマス・ニッポン総合戦略」により未利用有機物のリサイクルが推進されるようになったのに加え、有機農法への注目から有機質肥料・土壌改良剤としての堆肥の需要が増加している。また堆肥化処理は有機物分解に伴い高温になることで原料由来の病原微生物、寄生虫の卵、雑草の種子の不活化にも有効であるばかりでなく、農業や環境汚染物質などの化学物質の分解法としても期待されている。

2.2. ハザカシステムの概要

国内外で数多くの堆肥化処理施設が開発、建築されている。我々はハザカシステム（県南衛生工業（株）、宮城県）の微生物叢を解析してきた。ハザカシステムは、生ゴミをはじめ食肉処理場や水産加工場の雑廃物、下水処理場やし尿処理場の汚泥類、枯れ草などを対象として、毎日約 20 m³ の廃棄物を15年以上にわたって安定に処理・堆肥化している。長い箱形の発酵槽（長さ 100 m、幅 3 m、深さ 2 m）の端に投入された処理物はスクーパーにより切り返されながら 2 m ずつ先へ送られ（1日2回、4 m/日）、約1ヶ月で処理が終了する（図1）。

1回に投入された有機物の変遷を解析するため、毎日4 m ずつ先の地点から試料を採取した。処理物の温度は2日後には 60°C を超え、60~76°C の高温状態が約3週間続いた。その後は低下し約 45°C となり発酵終了に至る。また pH は処理過程を通して約 8 で一定であった。

2.3. 微生物叢解析¹⁰⁾

処理過程から随時採取した処理物より直接 DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象に PCR-DGGE 解析を行った（図2）。バンドパターンの変遷を見ると、いくつかのバンドの消長は見られるものの大きなパターンの変化はなかった。ここで検出されているバンドの多くは1年以上の歳月を経ても再現的に検出されている。解放系でかつ毎日異なる多様な無殺菌有機物が添加されているにもかかわらず、微生物叢は安定であると考えられた。その要因の1つとして、堆肥化処理が終了した最終生産物を廃棄物と混合し最初に投入していることが考えられる。

各 DGGE バンドの塩基配列を決定し相同性検索を行った。処理過程を通して *Propionibacterium* sp. (band A), *Methylobacterium* sp. (band F), *Bacillus* sp. (band G), *Pseudomonas* sp. (band K), *Bradyrhizobium* sp. (band E)

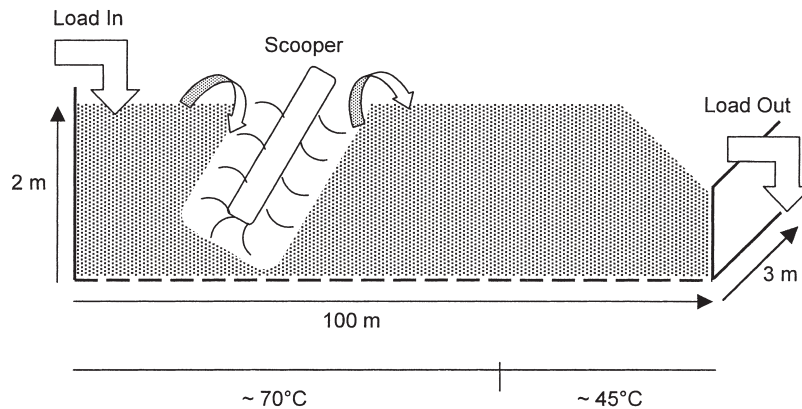


図1. 実規模での堆肥化施設（ハザカシステム）。

投入された廃棄物はスクーパーにより切り返されながら少しずつ送られ、約1ヶ月かけて 100 m 移動する。その初期から中期は 70°C 前後まで温度は上昇し、処理後期には 45°C 程度となる。

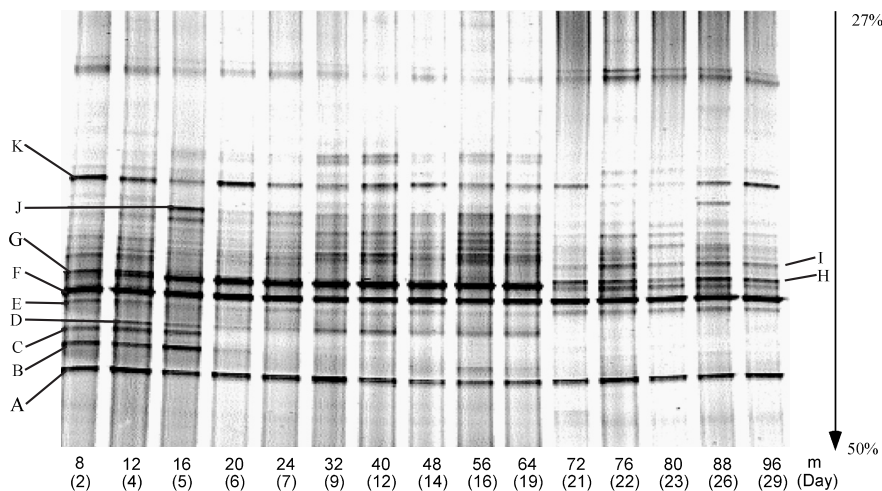


図2. ハザカシステムの PCR-DGGE プロファイル。

一回に投入された有機物の処理過程を発酵終了まで解析した。各レーンには試料を採取した地点を廃棄物投入部からの距離 (m) で示すとともに、対応する処理日数 (day) を付記した。各バンドの遺伝子塩基配列に対応する近縁種は以下の通り。Bands A; *Propionibacterium acnes*, B; *Clostridium sticklandii*, C; *Clostridium ultunense*, D; *Bacillus infernus*, E; *Bradyrhizobium elkanii*, F; *Methylobacterium radiotolerans*, G; *Bacillus thermocloacae*, H; *Caulobacter bacteroides*, I, J; *B. licheniformis*, K; *Pseudomonas stutzeri*。矢印は泳動方向および変性剤濃度勾配の方向（数字は変性剤濃度）を示す。

といった多様な細菌が検出された。また各時期に特徴的なバンドとしては、高温期 (band D, J) と中温期 (band I) ではそれぞれ *Bacillus* 属の異なる種が検出され、*Clostridium* sp. は初期のみ (band B, C), *Caulobacter* sp. or *Brevundimonas* sp. (band H) は後期のみを検出された。これら微生物の既報の代謝特性等 (糖分解, アンモニア生成など) から本処理過程を特徴付けることができる。しかし高温アルカリ環境での生育に関して報告がない細菌も検出されており, 実際にこの処理過程から微生物を単離・培養しその性質を調べることは必須である。

2.4. 単離微生物の解析¹⁾

そこで次にこれら DGGE バンドのうち処理過程を通して検出されるバンドに着目し, 対応する微生物の単離を試みた。推定される微生物の性質を基にいくつかの選択培地を用いた。単離微生物について DGGE およびその塩基配列の解析から, 目的のバンドに対応していることを確認した。band A および band G に対応する単離株 MSP09A および MSP06G が得られ, その 16S rDNA の配列相同性からそれぞれ *Propionibacterium acnes* および *Bacillus thermocloacae* と考えられた (相同性

99.5%以上)。ただし同様に処理過程の温度に関わらず検出された *Methylobacterium* 属細菌の単離も試みたが得られていない。既報の *Methylobacterium* 属細菌とは異なる生理性状を示す新規な細菌の可能性もある。

単離できた細菌の処理過程での推移を解析した。決定した各細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づき特異的プライマーを作製し, 各微生物の DNA 量をリアルタイム PCR 法で定量した。全 DNA に対する割合で評価すると MSP09A 株は温度の低下する後期に向かって増加するのに対し, MSP06G 株は高温期に多数存在すると考えられた。MSP09A および MSP06G 株の増殖温度は, それぞれ 30–45°C (至適 37–45°C), 37–60°C (至適 60°C) でありそれぞれの数が増加した時期の処理物の温度とよく一致する。また MSP09A 株には 65°C までの耐熱性もあり処理システム内での残存性も説明しうる。高分子化合物の分解についてみても MSP09A 株は脂質およびタンパク質を分解し, MSP06G 株にもタンパク質分解活性が検出された。さらに BiOLOG システムを用いて解析したところ, これら 2 株の有機物資化プロファイルは異なっており, 興味深いことに多くの有機物に対して相補的であった (表 1)。また MSP09A 株によって

表 1. *Propionibacterium* sp. MSP09A および *Bacillus* sp. MSP06G の炭素源資化プロファイル。

Substrates	MSP09A				MSP06G			
	Aerobic		Anaerobic		Aerobic		Anaerobic	
	BIF	BIF+A	BIF	BIF+A	BIF	BIF+A	BIF	BIF+A
Dextrin	-	+	+	+	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	+	-	-	-	-
Tween 40	-	-	+	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	+	-	-	-	-
Arbutin	-	-	-	+	-	-	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	-	-	+	+
D-Galactose	-	-	+	-	-	-	-	-
α -D-Glucose	+	+	+	-	-	-	-	-
α -D-Lactose	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	-	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	-	+	+	+	-
Sucrose	-	-	-	+	-	-	-	-
Acetic acid	-	-	-	+	-	-	+	+
α -Ketoglutaric acid	+	+	+	+	-	-	+	+
D-Lactic acid methyl ester	-	-	-	-	-	-	+	+
L-Lactic acid	+	+	+	-	-	-	+	+
Propionic acid	-	-	-	-	-	+	+	+
Succinamic acid	-	-	-	+	-	+	+	+
Succinic acid	+	+	+	-	-	-	-	-
N-Acetyl-L-Glutamic acid	-	-	-	+	-	-	-	-
L-Asparagine	-	-	+	+	-	+	-	-
L-Glutamic acid	-	-	-	+	-	-	+	-
Glycerol	+	+	+	-	-	-	-	-
Adenosine	-	-	+	-	-	-	-	+
Glucose-1-phosphate	-	-	-	+	-	-	+	+

BiOLOG システムによる解析結果 (一部抜粋)。好気条件および嫌気条件で行い, また被検菌の接種には, BiOLOG inoculating fluid (表中 BIF と表示) および 0.18% agar を添加した BIF (表中 BIF+A と表示) を用いた。

生産されるプロピオン酸は MSP06G 株が利用可能で、代謝物を介した両株の関連性が示唆される。ただしこれら細菌の代謝プロファイルは、気相の嫌気化や0.18%寒天添加による培地の流動性減少によって大きく変化した(表1)。実際の堆肥化過程でも、特に酸素濃度は処理システムの深さや切返しによって変化していると考えられ、各環境によって異なる代謝能を示していると予想される。微生物種の多様性だけでなく、このような微生物の多面性が多様な固形有機物を基質とするバイオプロセスに効果的に関与していると考えられる。

3. 有機物分解に関わる微生物集団

—実験室モデルシステム—

3.1. 生ゴミ分解システム

生ゴミや多くの農産廃棄物のように有機性廃棄物の多くは固体として排出される。それらの利用にあたり従来の廃水処理技術のような液状物を扱う技術は適用できず、また全く異なる微生物学的知見が要求されると考えられる。これら有機物の分解・堆肥化について実際の現場の解析は古くから広く行われているが、細部にわたり再現的な研究をするには限界があった。そこで有機物の好気分解を行う固体培養システムを設計し、一定の組成の生ゴミを基質として連続運転を行った。発酵槽部は各

家庭に広く普及しているいわゆる「バイオ式」といわれる生ゴミ処理機を基に設計した。用いた発酵槽(コンポスター、内容量約30L)およびその周辺装置の概要を図3に示す。通気量、通気温度および攪拌羽による攪拌を制御し、処理物温度および排気される二酸化炭素濃度をモニタリングするとともに、添加した生ゴミの重量減少および排気中のアンモニアガス量を測定し、生ゴミ分解過程を評価した。

各種統計資料を参考にして設定した標準的な組成の生ゴミを調製し、毎日1kgずつ添加した(半連続式運転)。また処理基材としてはおが屑を用いているが、種菌は一切添加していない。分解率は処理開始後数日間は低かったものの、その後上昇していった。またその過程で温度、二酸化炭素排出量およびアンモニア排出量が上昇し、約2週間安定運転が続いた。安定運転期において温度および二酸化炭素排出量は1日の中で変化しており、基質(生ゴミ)添加後すぐに上昇して約12時間で最大値を示し、その後減少するといった変化を繰り返した。温度は高いところで55°C前後まで上昇しており、また処理物のpHはpH8-9のアルカリ性であった。

3.2. 微生物叢の変遷³⁾

生ゴミ添加12時間後に処理物を採取し解析に用いた。PCR-DGGE 解析の結果、運転開始から一週間が過ぎて

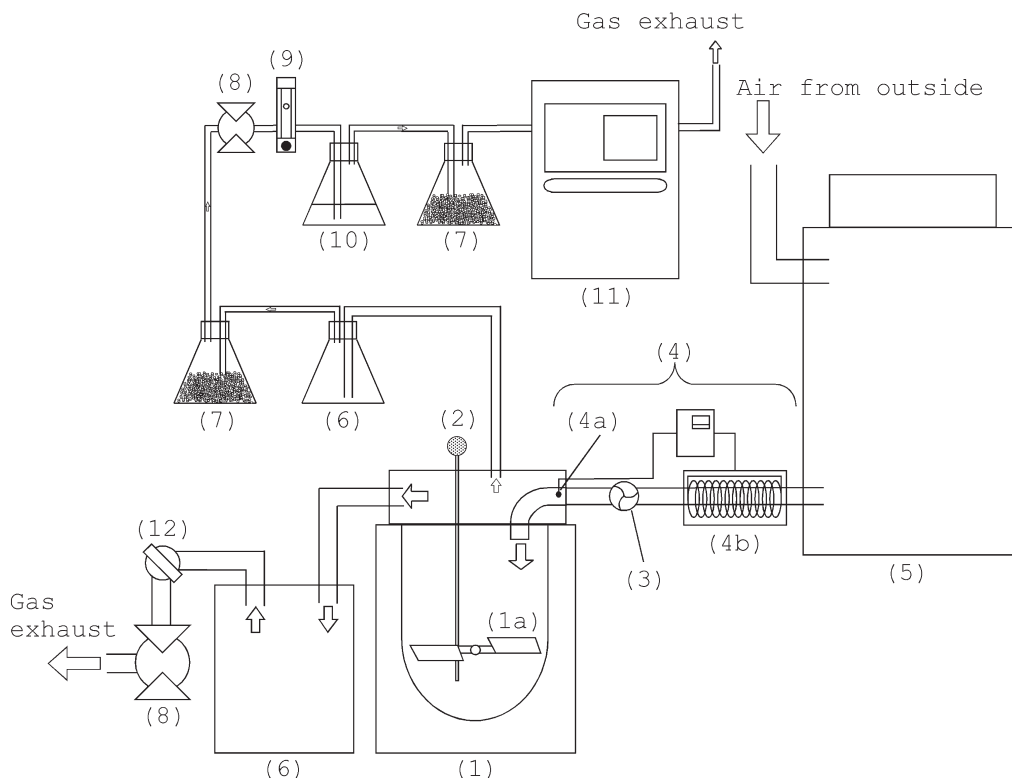


図3. 生ゴミ分解システムの概要。

コンポスター内の処理物は攪拌羽(1a)によって定期的に攪拌される。リアルタイムで計測・記録できる温度計が常に処理物中心部に達するよう挿入してある。また通年で一定温度の空気を通気するため、外気をCooling chamber(5)で冷やした後、コンポスター前段の温度コントロール部(4)で温度調整している。排気ガスはサンプリング管から一部吸引し、硫酸溶液(10)でアンモニアをトラップした後、赤外線式ガス濃度測定装置(11)で二酸化炭素濃度をモニタリングした。

1; Composter, 1a; Agitation wing, 2; Thermometer, 3; Gas flow meter (mass flow type), 4; Air temperature controller unit, 4a; Sensor, 4b; Heater, 5; Cooling chamber, 6; Water trap, 7; Water trap with silica gel, 8; Pump, 9; Gas flow meter (float type), 10; NH₃ gas trap, 11; CO₂ gas analyzer, 12; Vent valve.

生ゴミ分解率が上昇すると微生物叢は変化するが、その後の安定運転期では変化していないことが分かった(図4)。外気を除菌フィルター無しに通気する開放系に無殺菌基質を毎日添加しているにもかかわらず、その微生物叢は安定していると考えられた。また同様の運転を繰り返し行っても検出されるバンドパターンは類似しており、この系に自然に構築される微生物叢には再現性が見られた。

3.3. 微生物の単離とその性質⁹⁾

安定分解期に再現的に検出される主要バンド(図4, 黒丸)の塩基配列を解析したところ、その最近縁種は *Bacillus licheniformis* であったが相同性は97%以下と低かった。また興味深いことに類似の配列が他の有機性廃棄物処理システムからも検出されている。本菌の生理学的性質を解析するため、その単離を試みた。しかし一般的な栄養培地で検出されるコロニーのほとんど全てはその16S rDNAの配列から *Bacillus thermoamylovorans* であると考えられた。数百を超えるスクリーニングを続けた結果、DGGEバンドに相当する配列を持った微生物の単離に成功した。その16S rRNA遺伝子および各種生理・生化学的性状、化学分類学的解析の結果、本菌は *Bacillaceae* 科の新属新種であり、*Cerasibacillus quisquiliarum* strain BLx と提唱した(図5)。BLx株の生育的溫度(50°C)およびpH(pH 8-9)は、生ゴミ分解過程とよく一致していた。生ゴミ分解という比較的身近な環境にもかかわらず、このような新属に分類される微生物が検出できたのは遺伝子レベルでの検出に基づいた単

離・培養法の成果である。

単離したBLx株の16S rDNA配列を基に特異的プローブおよびプライマーを設計し、FISH法および定量PCR法により生ゴミ分解過程における本菌の推移を解析した。ただしここで生ゴミのような多量の有機物を含む系からの蛍光シグナルの検出には工夫が必要であり、またDNAに関しては腐植質等の酵素反応阻害剤を除くため多段階にわたる精製を行っている。定量解析の結果、BLx株は安定分解期にかけて急増し全細菌数の30-50%を占めることが明らかとなった^{3,9)}。しかし本菌の最適培養条件で数百コロニーをスクリーニングしても2株しか得られておらず、難培養ではないが培養法での検出が難しい微生物であると言える。

このように生ゴミ分解過程から再現的に検出され、その数も多く、さらに他の有機性廃棄物処理システムからも類似の塩基配列が検出されていることから、本菌の有機物分解における重要性が示唆された。

3.4. 単離微生物の集団内での機能⁹⁾

生ゴミ分解過程で優占微生物の一種として検出されたBLx株についてBiOLOG GP2 plateでその炭素源利用性を調べたところ、資化能を示したのは95種の有機物のうちリボースや一部の有機酸など9種のみであった。またセルロース、ヘミセルロース、脂質、デンプン、カゼイン等の高分子物質に対する分解能は検出されず、ゼラチンに対してのみ分解活性が見られた。これらの性質は培養条件を変えても同様であり、BLx株が利用できる有機物は予想に反してごく限られていることが分かった。

単離した微生物の性質・活性が環境中や微生物集団内で発現していない例が多く報告されている。そこで生ゴミ分解過程におけるBLx株のゼラチン分解活性(ゼラチナーゼ)の発現の有無を検証した。まずBLx株のポピュレーションの変化と生ゴミ分解過程から検出されるゼラチナーゼ活性の推移を解析したところ、その変化は同調しており、BLx株の増加に対応したゼラチナーゼ活性の上昇が確認された。さらにBLx株が優占種として検出された生ゴミ処理物からゼラチナーゼを部分精製し、純粋培養したBLx株由来の酵素と比較した(図6)。SDS-PAGEおよびゼラチナーゼ活性染色のバンドはよく一致していることが分かった。また図6で鋳マークで示したタンパク質バンドについてそのN末端アミノ酸配列を決定・比較し、同一であることを確認している。以上から、BLx株の産生するゼラチナーゼが実際に発酵槽内で発現していることが明らかとなった。またこの酵素のN末端アミノ酸配列は既知ゼラチナーゼではなく、他のセリンプロテアーゼと相同性が高いことからゼラチン以外のタンパク質分解活性も有すると予想される。さらに処理物からのゼラチナーゼの精製過程でBLx株由来以外のゼラチナーゼ活性を示すタンパク質は検出されおらず、生ゴミ分解過程におけるゼラチン(タンパク質)分解においてBLx株の寄与は大きいと推測された。

一方、平板培養法で数多く単離された *B. thermoamylovorans* 株は、高分子物質の分解試験においてアミラーゼ活性を示した。しかしその産生するアミラーゼは処理物中の酵素とは異なっており、本菌が純粋培養で示す活性は発酵槽内では発現していないと考えられた。これは

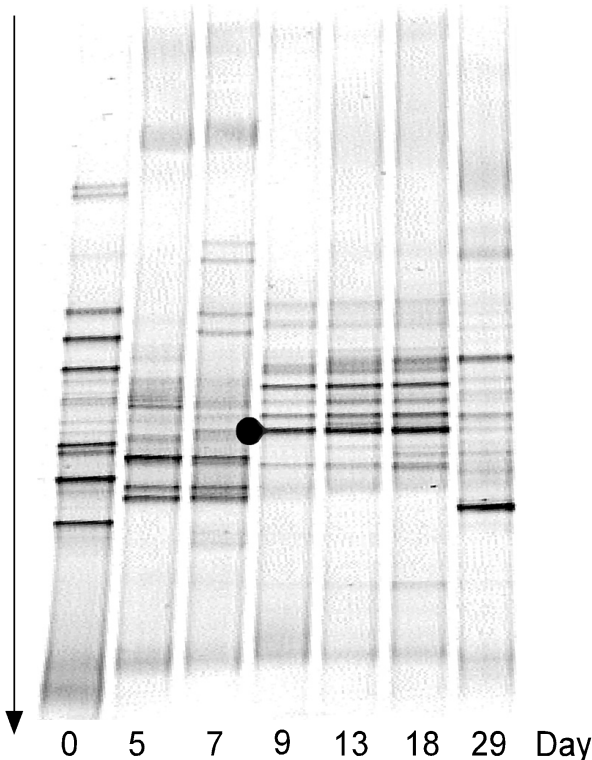


図4. 生ゴミ分解過程のPCR-DGGE プロファイル。
約一ヶ月の処理過程を解析した。黒丸で示したバンドは安定分解過程で再現的に検出される。矢印は泳動方向を示す。

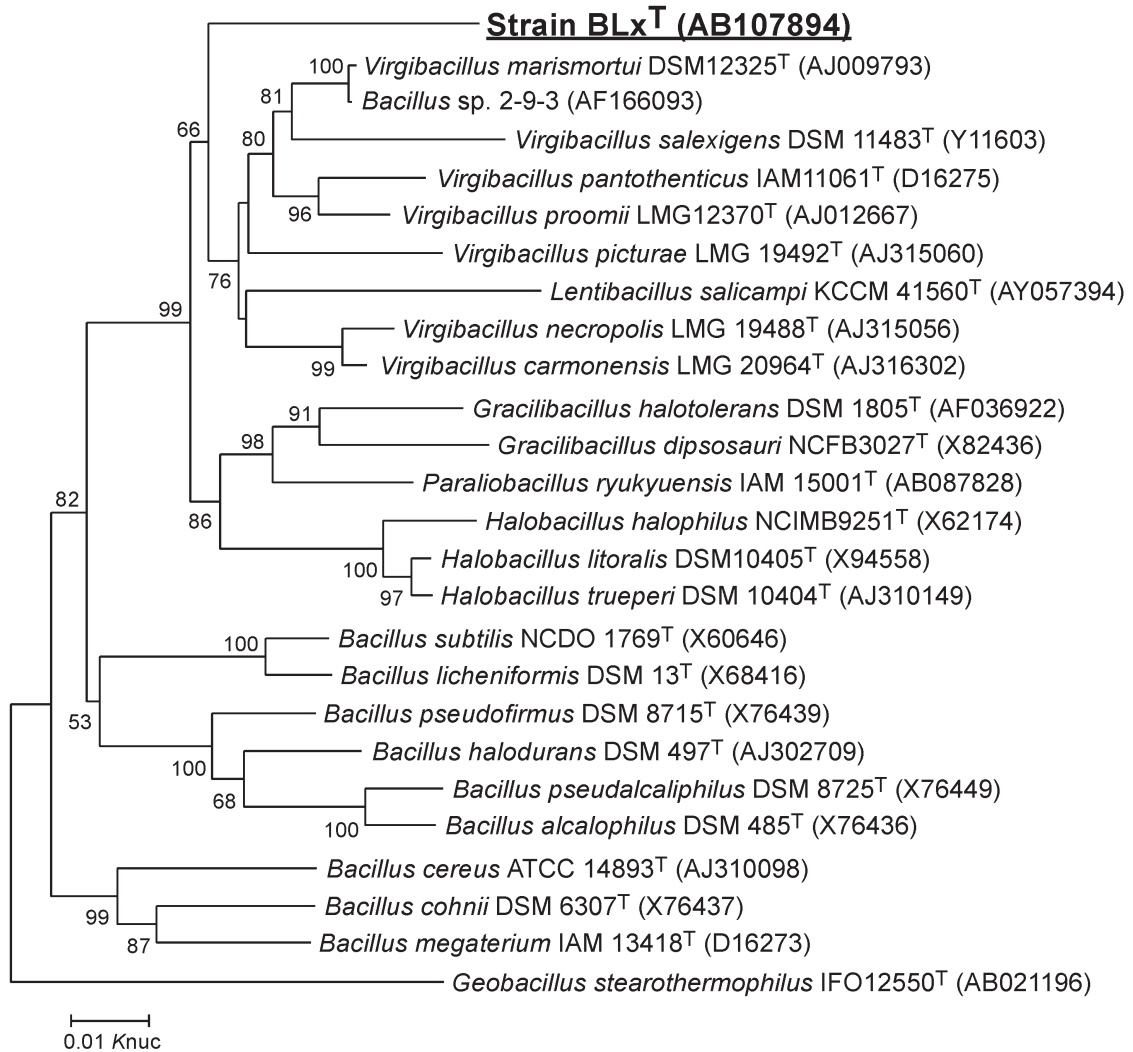


図 5. BLx 株およびその近縁種の 16S rDNA に基づく系統樹。

Geobacillus stearothermophilus をアウトグループとして近隣結合法により作成した。50%以上の bootstrap 値を示している。

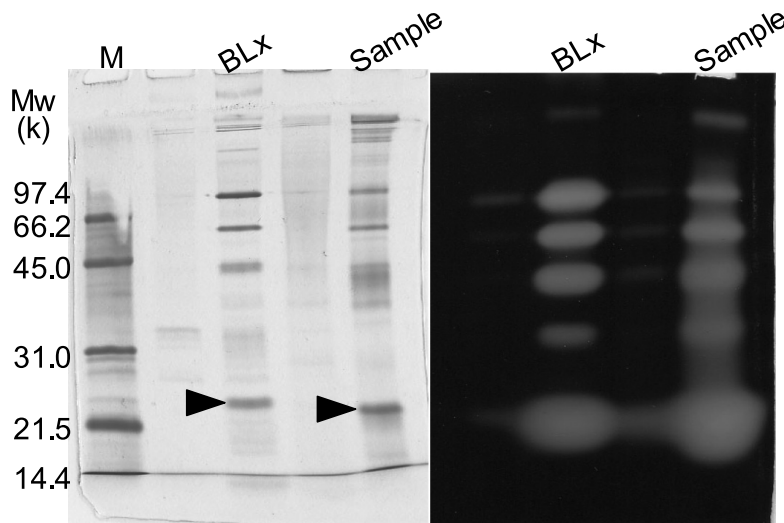


図 6. BLx 株および生ゴミ処理物から部分精製したゼラチナーゼの比較。

SDS-PAGE 後, CBB 染色したゲル(左図)および SDS 除去後ゼラチンゲルを重層して検出したゼラチナーゼ活性染色ゲル(右図)。
 M は分子量マーカー。鋏マークで示したバンドについて N 末端アミノ酸配列を決定した。

純粋培養条件と環境中での微生物の性質が異なる例の一つであり、培地組成、固体基質、他微生物の影響、酸素濃度等、多くの要因が考えられる。

3.5. その他の微生物

優占化している微生物の性質だけでは生ゴミ分解全体を理解することはできない。そこで PCR-DGGE 解析や栄養培地での単離培養法では検出されていない微生物の探索を行った。まずキノプロファイル解析を行い DGGE 法の結果と比較した。しかし両手法で検出される微生物やその処理過程での変遷は類似していた (data not shown)。さらに 16S rDNA を対象にクローンライブラリーを作成し、300クローンを解析したところ、BLx 株以外の配列が多種見つかった (表 2)。それらはすべて *Bacillaceae* 科に属する細菌由来と考えられた。しかし既知細菌との相性は低いものが多く、BLx 株以外にも新属新種に分類されるような未単離の細菌が多数存在していると考えられた。また BLx 株と高い相性を示すクローンでもその相性が 95% 程度と低いものもあり、単離できた BLx 株以外にも類似の細菌が存在している可能性も考えられる。一方、セルロース、タンパク質、脂質、デンプンの分解能を指標に集積培養を行い、それらの活性を持つ微生物の単離を行ったところ、さらに多様な細菌が検出された (表 2)。それらには *Bacilli* 目だけでなく、*Actinobacteria* や *Proteobacteria* に属する細菌も含まれていた。これら細菌は BLx 株に比べるとその数は非常に少ないと予想されるが (全体の 1% 以下)、生ゴミ分解の一部を担っている可能性が考えられる。このように生ゴミ分解過程において高い多様性を持った微生物集団が形成されていることが分かった。微生物集団の機能を理解するためには、遺伝子解析等で検

出できる微生物だけでなく、その活性等に注目し、少ない割合で存在する微生物の多様性も解析していく必要がある。

3.6. 添加微生物の挙動

生ゴミ分解過程では油分の蓄積による分解効率の低下がしばしば問題となっている。そこで油脂分解活性の高い外来微生物 (*Bacillus subtilis* str. BN1001) を全菌数の約 1% となるよう添加し、その残存性を検証した。添加後数日間の微生物叢を DGGE 法により解析したところ、添加微生物は一日後には強いバンドとして検出されているものの、三日後には検出されなくなった (図 7)。また既存の微生物集団の変化もなかった。このように添加微生物の効果が一時的であることは、廃水処理リアクター、地下水や土壌汚染現場などでも多く報告されている (e.g., Watanabe et al.¹³⁾)。外来微生物の添加にあたっては様々な物理化学的パラメーターなどの環境因子とともに既存の微生物集団を理解することが必要ではないだろうか。一方この現象は有害微生物の排除という点で微生物集団利用の利点の一つと考えられる。

4. 稲わら分解微生物集団の構築

4.1. 集積培養系の確立⁴⁾

機能的に優れた安定な微生物集団を構築することはできないだろうか。これまでにも二種の微生物の混合培養による微生物機能の促進は報告されているが、その多くは安定性が低くごく限られた条件でのみ観察される共生系である。我々は自然界に存在している微生物集団を植種源として、集積培養および微生物集団同士の混合を繰り返して、安定でかつ自然界での機能をより効率化した微

表 2. 各手法により生ゴミ処理槽内から検出された微生物。

Phylogenetic group	Closest relative	DGGE	Clone library	Isolation
<i>Bacilli</i>	Strain BLx	○	○	○
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	○		○
	<i>Bacillus licheniformis</i>			○
	<i>Bacillus subtilis</i>			○
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			○
	<i>Bacillus coagulans</i>			○
	<i>Bacillus thermocloacae</i>		○	
	<i>Bacillus halodurans</i>		○	
	<i>Bacillus smithii</i>		○	
	<i>Bacillus</i> sp.		○	
	<i>Gracilibacillus halotorelans</i>		○	
	<i>Amphibacillus</i> sp.		○	
	<i>Salibacillus</i> sp.		○	
	<i>Staphylococcus xylosus</i>			○
<i>Actinobacteria</i>	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>			○
	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>			○
<i>Flavobacteria</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp.			○
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			○
	<i>Acinetobacter</i> sp.			○

16S rDNA 塩基配列解析の結果、遺伝子データベース内の最近縁種を示す。ただしここでクローンライブラリーの解析は、安定分解期についてのみの結果である。

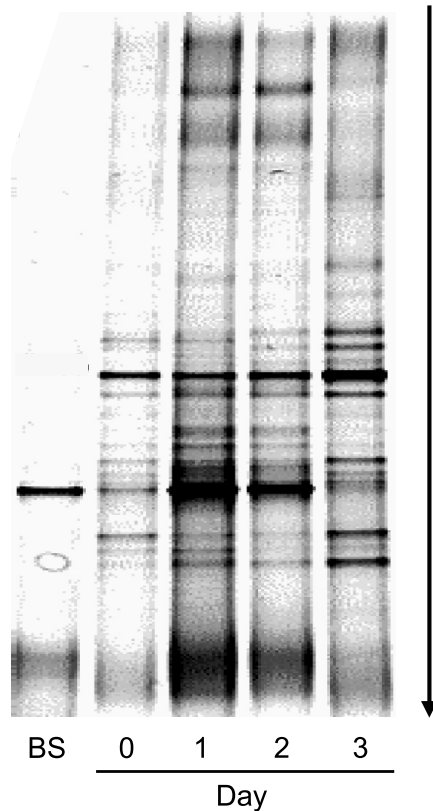


図7. 外来微生物を添加した生ゴミ処理過程の PCR-DGGE プロファイル。
外来微生物として *Bacillus subtilis* を全菌数の約1%添加し、菌叢の変化を PCR-DGGE 法で解析した。BS は添加微生物の DNA のみ、0日は添加前のサンプル。

生物集団の構築を目指した。ここで対象とした機能はリグノセルロース分解である。リグノセルロースは植物バイオマスの大部分を占め、地球上の炭素サイクルを考える上でもその分解・再利用の重要性は大きい。

リグノセルロース基質として農産廃棄物の一つである

稲わらを選択した。稲わら分解微生物集団の構築にあたり、まず発酵原料の異なるいくつもの堆肥化処理過程を微生物集団源として、ろ紙を含む液体培地に接種し、ろ紙に対する分解性を観察しながら継代培養を繰り返した。また性質の異なる集積培養系を混合し、さらに継代培養を繰り返していった(図8)。これらの操作を2年間にわたって繰り返し 50°C の液体静置培養で4日以内に添加した稲わらの半分以上を、また8日目には80%以上を可溶化できる微生物集団を得た(図9)。稲わら同様、綿や新聞紙、印刷紙も効率的に分解した。また滅菌していない稲わらに対しても効果的であった。この微生物集団は3年以上にわたる植え継ぎ後も安定にその機能を維持しており、セルロース基質なしの栄養培地での植え継ぎも可能であった。さらに培地の pH にも非感受性で、pH 5 から9の培地を用いて培養を始めても数日でどれも同様の pH を示し分解活性も変わらなかった(図10)。図11には二種の異なる培地を用いた時の稲わら分解に伴う培養液中の生産物の推移を示している。栄養分が豊富な培地では、分解初期に酢酸や乳酸などの有機酸の一時的な蓄積が見られ、また分解後期にはエタノールの生成がみられている(図11A)。一方、培地濃度を減少させるとこれら生成物の組成は大きく変化し最終産物として酢酸が蓄積していった(図11B)。培養条件の最適化によりこの微生物集団の稲わら分解による生産物を特定の物質に集約できる可能性が示された。

4.2. 微生物叢解析⁴⁾

培養液中の微生物叢を PCR-DGGE 法で解析した(図12)。バンドパターンは分解に伴って変化していたが、同様の変化は植え継ぎ後も観察された。つまり構成メンバーを変えることなく、そのポピュレーションを変えていくことで効率的な分解を達成していると考えられた。また機能だけでなく微生物集団構造も安定であることが示された。DGGE 法で検出される各バンドの塩基配列の解析から、嫌気性細菌である *Clostridium* 属細菌 (band A) と好気性細菌 (band B-F) が共存していることが示唆

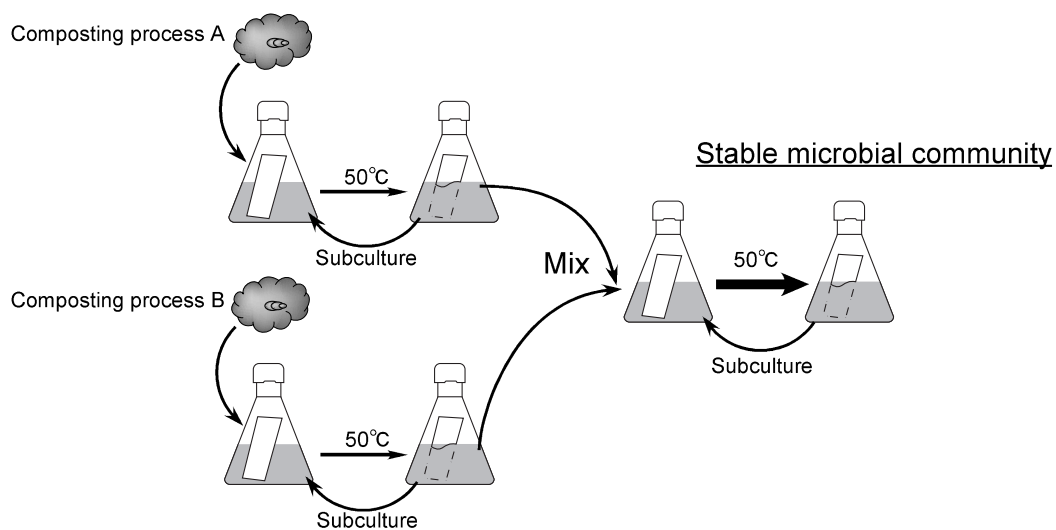


図8. 安定なセルロース分解集積培養系の構築戦略。

いくつかの堆肥化処理物を植種源としてフラスコで培養し、ろ紙の分解を観察。それらの継代培養を繰り返すとともに、いくつか由来の異なる集積系を混合した。

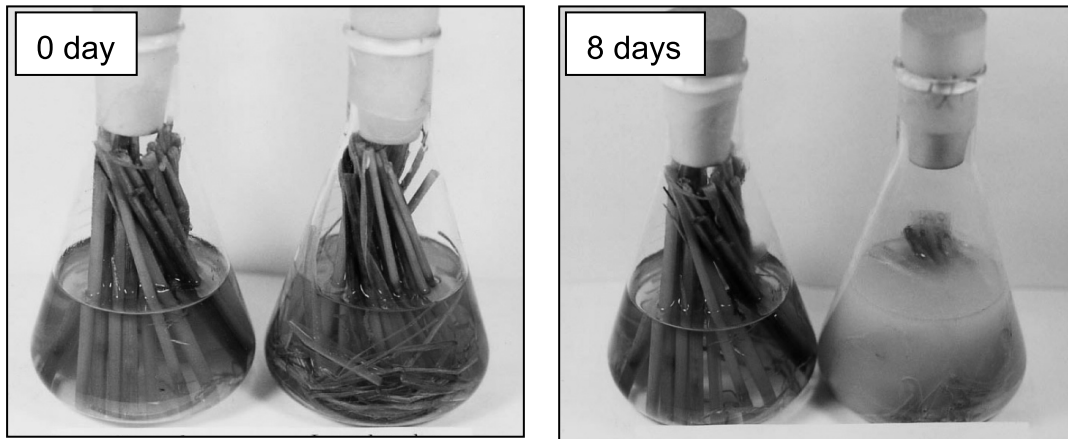


図 9. 構築した微生物集団による稲わらの分解。

培養 0 日目および 8 日目の稲わら分解の様子。写真の左のフラスコは微生物非添加のコントロール、右は微生物集団添加。用いた培地組成は、0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% CaCO₃, 2% rice straw.

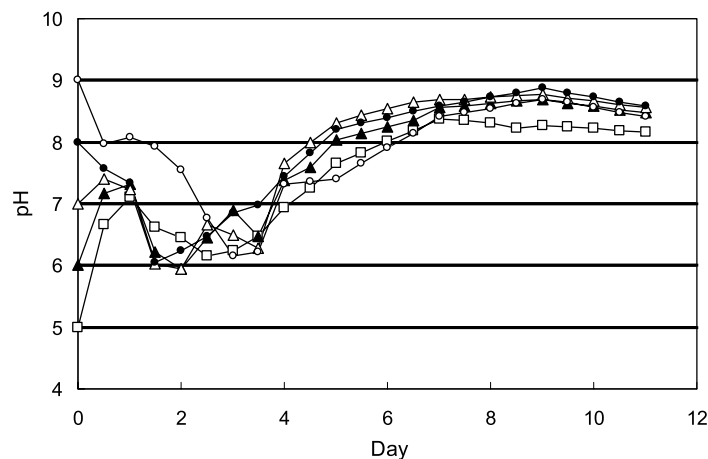


図10. 初期 pH の違いによる培養過程での pH の推移。

pH が 5 から 9 までの異なる 5 種の培地を用いて、培養過程における pH 変化を観察。

された。本培養系は密栓等により酸素を遮断していないにも関わらず、培養液の酸化還元電位は培養開始数時間で -400 mV 以下にまで低下しており、好気性細菌により酸素が活発に消費され嫌気環境が構築されていると考えられる。

4.3. 微生物の単離⁷⁾

微生物の単離の結果、DGGE 解析で検出された *Brevibacillus* sp., *Bordetella* sp., *Pseudoxanthomonas* sp. と共に *Bacillus licheniformis* や *Virgibacillus* sp. が再現的に得られており、DGGE 法では検出されないこれら細菌種も安定に存在していると考えられる。しかしこれら細菌にセルロース分解性はなく、分解産物の消費等により稲わら分解に間接的に関与していると予想される。また分解過程の稲わらに付着する微生物集団を DGGE 解析すると主に二種の *Clostridium* 属細菌、*C. thermosuccinogenes* および *C. thermocellum* 近縁種、が検出され稲わら分解の第 1 段階を担っている可能性が考えられた。ただし培養液からも検出された *C. thermosuccinogenes* (図12, band A) にはセルロース分解活性は報告されて

いない。一方、*C. thermocellum* はセルロース分解菌として良く知られており、セルロース結合能も見られている。そこでセルロースへの吸着性をもとに嫌気条件下でセルロース分解菌の単離を行い、DGGE バンドに対応する *Clostridium* 属細菌を得た。本菌は各種の系統分類学試験によりいくつかの点において、既知 *C. thermocellum* との相違点が見られることから、*Clostridium* 属細菌の新種として *C. straminisolvens* CSK1 と名づけた。*C. thermocellum* と比較し、特に酸素耐性に優れていたことは本培養系を考える上で興味深い。

4.4. 再構成系の確立⁸⁾

C. straminisolvens CSK1 株を中心に、他の単離した好気性細菌との混合培養による再構成系の構築を試みている。CSK1 株に好気性細菌を混合した 2 種培養により CSK1 株の非嫌気下での生育が見られるようになる組み合わせがあった。またさらに、効果的であった 3 種の好気性細菌を組み合わせた 4 種混合培養系では、元の微生物集団と同等のセルロース分解活性を示し、その活性は 20 代以上の植え継ぎ後も安定に維持されていた。この混

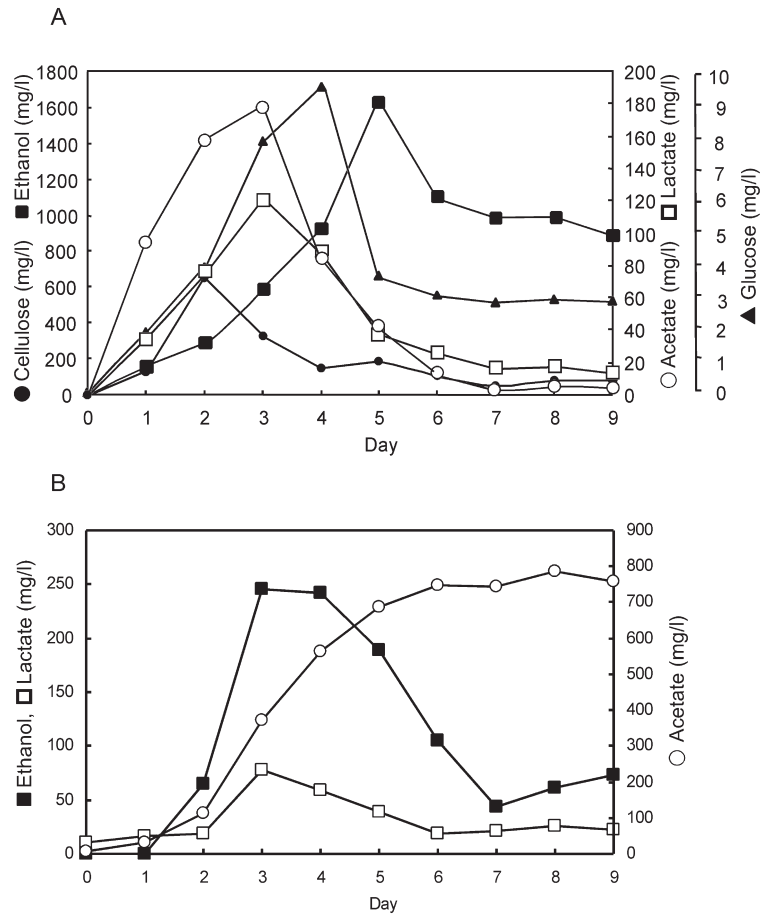


図11. 培養過程における生産物の推移。

2種の異なる培地を用いて、稲わら分解過程で検出される培養液中の生産物を定量した。各培地組成は以下の通り。A, 0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.5% CaCO₃, 1% rice straw; B, 0.05% peptone, 0.01% yeast extract, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCO₃, 0.2% NaCl, 1% rice straw.

合培養系を基にして各細菌の集団内での役割・機能解析を進めており、特定生産物の集約といった微生物集団機能制御への可能性も開けている。このような安定な数種（三種以上）混合培養系は他に例がなく、複雑微生物系における微生物間ネットワーク等に関する理論体系を構築していくうえでのモデル生態系として非常に有用であると考えている。

5. おわりに

現在、大量に廃棄処分されている有機性廃棄物は、わが国におけるこれからのエネルギー生産、物質生産にとって重要な有機資源である。その有効利用において微生物の集団機能の利用は最も効果的かつ有望な技術の一つである。本稿で示したように固形有機物を代謝する微生物集団について、その性質や各微生物の挙動が明らかになりつつある。しかし生ゴミ分解系の解析が示すように、系全体の機能を理解するためには、分子生態学的手法による微生物叢解析だけでなく、従来の単離培養法や酵素活性等の生化学的アプローチも併用し、微生物集団の多様性や各微生物の役割を明らかにしていかなければならない。

微生物集団機能の増強や新たな機能の付加において

は、特定の能力を持つ微生物の添加が考えられる。しかし生ゴミ分解系における *B. thermoamylovorans* 株のアミラーゼ活性のように、純粋培養での活性が集団内で発現していない例もあり、微生物添加によって必ずしも期待通りの効果が得られるわけではない。また外来微生物を既存の微生物集団に安定に共存させるのは容易ではなく、添加する微生物の性質とともにその環境や既存の微生物集団を充分理解することが必要である。ただし BLx 株のように系内で優占化し、その酵素の発現も認められる微生物を改変して利用すれば、系内に新たな機能を安定に組み込むことができるのではないだろうか。また安定運転は BLx 株の推移によって特徴づけられることから運転指標微生物と捉えられる。生ゴミ分解処理における BLx 株のように、微生物叢解析により各バイオプロセスにおいて指標微生物を見出すことはその運転制御において有用である。

メタン発酵や他の生ゴミ処理過程における機能的に安定な微生物集団では、必ずしもその集団構造が安定であるのではなく、変化に対応して構造を変化させる柔軟性が観察されている²⁵⁾。しかし本総説で紹介した堆肥化処理施設や生ゴミ分解システムの微生物叢は、他微生物の侵入に対して開放的であるにもかかわらず、集団構造を変えずにその機能を安定に維持していた。これら

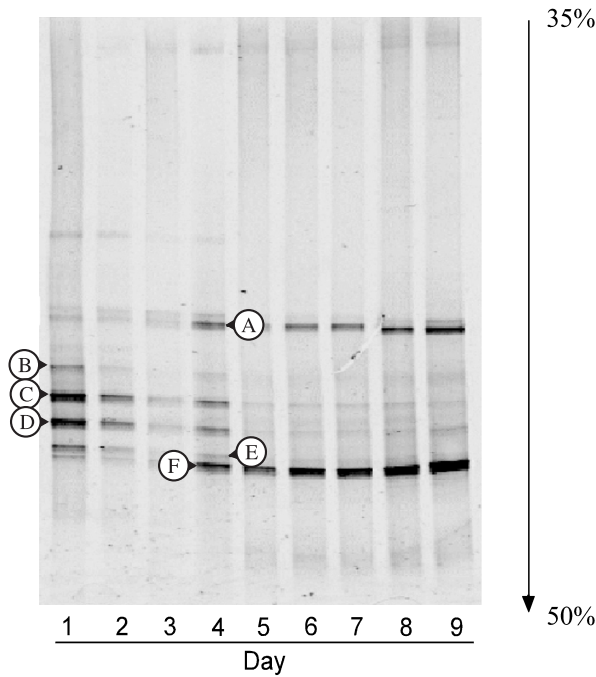


図12. 稲わら分解過程のPCR-DGGE プロファイル。

矢印は変性剤濃度勾配と泳動方向を示す（数字は変性剤濃度）。各バンドの遺伝子塩基配列に対応する近縁種は以下の通り。Bands A; *Clostridium thermosuccinogenes*, B; *Bordetella avium*, C; *Brevibacillus* sp., D; *Brevibacillus* sp., E; *Brevibacillus* sp., F; *Pseudoxanthomonas taiwanensis*.

の微生物集団内には強固なネットワークが形成されているのかも知れない。またこのような安定な微生物集団は自然界からの集積・混合培養を繰り返すことでフラスコ内に構築することも可能であった。さらに単離微生物の混合による安定な再構成系が確立されつつある。再構成系の解析は、集団機能の更なる効率化やエタノールや乳酸といった有機物の回収に結びつくものである。このような微生物集団の育種は、これまでの微生物育種、植物育種と同様に微生物を利用した重要なバイオプロセスの開発技術になっていくであろう。また微生物集団の組織化や安定性のメカニズムの解明は再構成系の解析により進むと期待され、今後、新たな微生物集団機能の開発に有用な情報を与えるものと考えられる。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室において行ったものであり、多くの共同研究者の協力によって推進された。ここに心から感謝いたします。

文 献

- 1) Akkermans, A.D.L., J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (ed.) 1999. Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 2) Fernandez, A.S., S.A. Hashsham, S.L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F.B. Dazzo, R.F. Hickey, C.S. Criddle, and J.M. Tiedje. 2000. Flexible Community Structure Correlates with Stable Community Function in Methanogenic Bioreactor Communities Perturbed by Glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4058–4067.
- 3) Haruta, S., M. Kondo, K. Nakamura, H. Aiba, S. Ueno, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2002. Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 224–231.
- 4) Haruta, S., Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 529–534.
- 5) Haruta, S., M. Kondo, K. Nakamura, C. Chanchitpricha, H. Aiba, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2004. Succession of microbial community during a stable operation of a semi-continuous garbage-decomposing system. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 20–27.
- 6) Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2004. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* in press.
- 7) Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, A. Yokota, and Y. Igarashi. 2004. *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* in press.
- 8) Nakamura, K., S. Haruta, S. Ueno, M. Ishii, A. Yokota and Y. Igarashi. 2004. *Cerasibacillus quisquiliarum* gen. nov., sp. nov., isolated from a semi-continuous decomposing system of kitchen refuse. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1063–1069.
- 9) Nakamura, K., S. Haruta, H.L. Nguyen, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2004. Enzyme production-approach for determining the function of microorganisms within a community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3329–3337.
- 10) Pedro, M.S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 159–165.
- 11) Pedro, M.S., S. Haruta, K. Nakamura, M. Hazaka, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2003. Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 368–373.
- 12) Rochelle, P.A. (ed.) 2001. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications. Horizon Scientific Press, Norfolk.
- 13) Watanabe, K., M. Miyashita, and S. Harayama. 2000. Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3905–3910.