



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

廃棄物埋立地におけるメタン生成菌を中心とした嫌氣的微生物生態系の解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 浩二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2546

氏 名 (国籍)	森 浩 二 (岐 阜 県)		
学 位 の 種 類	博士 (農学)		
学 位 記 番 号	農博甲第205号		
学 位 授 与 年 月 日	平成12年9月8日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当		
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学 位 論 文 題 目	廃棄物埋立地におけるメタン生成菌を中心とした 嫌氣的微生物生態系の解析		
審 査 委 員	主査	岐阜大学 教授	高見澤 一 裕
	副査	静岡大学 教授	田 原 康 孝
	副査	信州大学 教授	入 江 鏡 三
	副査	岐阜大学 助教授	発 正 浩

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、ゴミ処理問題がクローズアップされ、また、埋立処分場は増加の一途をたどっている。廃棄物の安定化（有機物→無機化）では、微生物が大いに関与する。しかし、埋立地の表層・ガス抜き用（又はエアレーション用）パイプ付近を除けば、常時、嫌氣的な環境が保たれており、有機物は嫌氣的生態系により無機化されていくと考えられる。嫌氣的生態系は、いくつかの種類される生理的に異なった細菌で構成されており、有機物の分解は、各代謝グループの細菌の機能が組み合わさることにより進行し、最終的にメタン生成菌群によって CH_4 と CO_2 へと変換される。本論文では、大阪市北港廃棄物海面埋立地をフィールドとし、メタン生成菌量を定量するとともに、メタン生成菌を単離し、諸性質の検討を行った。さらに、重金属存在下における硫酸塩還元菌との共生系について検討し、廃棄物埋立地での廃棄物安定化への嫌氣的微生物群の役割を研究した。

1999年11月に廃棄物埋立地において、サンプリング及び調査を行った。浸出水に関して、分子生物学的な手法によるメタン生成菌数及び優占種の特定を試みた。Archaeaの16S rRNA遺伝子に特異的なプライマー（ARC344F primer、ARC915R primer）を使用した定量的PCR法により、浸出水から抽出したDNA当たりに含まれるArchaeaの割合を概算した。この結果、浸出水1L当たり3-7 μg のDNAが抽出され、このうち2-3%がArchaeaに相当することが判明した。2つの浸出水サンプル（99-G、99-H）から抽出したDNAについてクローニング解析を行い、それぞれ、65と46クローンについて配列を決定し、種の特特定を行った。サンプル99-G中に存在するArchaeaの多くはメタン生成菌であった。サンプル99-Hについては46クローン中9クローンがCrenarchaeotaに属し、全Archaea中の約半分がメタン生成菌であった。

分子生物学的方法によって確認されたメタン生成菌について、抗生物質を用いた連続的希釈法により単離を行った。アンピシリン (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用い、30 又は 37°C にて連続希釈を行った結果、中温性の水素資化性メタン生成菌、MHT-1^T 株を単離した。また、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用い、70°C にて連続希釈を行った結果、高温性の水素資化性メタン生成菌、KHT-2 株を単離した。それぞれのメタン生成菌について諸性質を検討し、16S rRNA 遺伝子による系統解析を行うことにより同定を行った。KHT-2 株は *Methanothermobacter* sp. KHT-2 とした。MHT-1^T 株は、*Methanocaldococcus* 属の新種、*M. pumilus* MHT-1^T と命名できた。

単離したメタン生成菌について重金属感受性の検討を行った。MHT-1^T 株について、1 mM の CdCl_2 、 K_2CrO_4 、 CuSO_4 をそれぞれ添加して培養した結果、 CdCl_2 、 CuSO_4 については、増殖した。一方、KHT-2 株については、同濃度の重金属存在下において増殖は全く見られなかった。埋立地より溶出すると考えられる重金属は、嫌気的環境下に生育する硫酸塩還元菌の H_2S 生成によって不溶化することが明らかとなっている。このことから、埋立処分地では、硫酸塩還元菌による重金属不溶化がメタン生成菌の存在に寄与していることが示唆された。浸出水中より単離された硫酸塩還元菌 *Desulfotomaculum* sp. RHT-3 を重金属存在下においてメタン生成菌 KHT-2 株と共生培養した。この結果、3 mM 以下の CdCl_2 、又は 2 mM 以下の CuSO_4 存在下で、*Desulfotomaculum* sp. RHT-3 の重金属不溶化に伴って重金属感受性のメタン生成菌 KHT-2 株の増殖が確認された。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は廃棄物埋立地におけるメタン生成菌を中心とした嫌気的微生物生態系を解析したもので、1) 廃棄物埋立地におけるメタン生成菌の分子生物学的解析、2) 廃棄物埋立地からの新規メタン生成菌と硫酸塩還元菌の単離、3) 硫酸塩還元菌共存下でのメタン生成菌に対する重金属の影響、から成り、主として、廃棄物埋立地中の重金属類の安定化への嫌気性微生物の役割を研究したものである。

1) では 1996 年 6 月と 1999 年 11 月の調査に基づいて、廃棄物埋立地に存在するメタン生成菌数及び優占種の特定を分子生物学的な手法によって行った。Archaea の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを使用した定量的 PCR 法により、浸出水中から抽出した DNA 当たりに含まれる Archaea の割合を概算した。この結果、浸出水 1 L 当たり 3 - 7 μg の DNA が抽出され、このうち 2 - 3% が Archaea に相当することを明らかにした。次に、2 つの浸出水サンプル (99-G、99-H) から抽出した DNA についてクローニング解析を行い、それぞれ、65 と 46 クローンについて配列を決定し、種の特定を行った。この結果、サンプル 99-G 中に存在する Archaea の多くはメタン生成菌であることが判明した。サンプル 99-G において、ほとんどが *Methanosaeta* 属に近縁であり、これらは酢酸資化性のメタン生成菌と考えられるクローンであった。サンプル 99-H については 46 クローン中 9 クローンが Crenarchaeota に属し、全 Archaea 中の約半分がメタン生成菌であることが示された。

2) では、メタン生成菌について、抗生物質を用いた連続的希釈法により単離を行った。アンピシリン (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用い、30 又は 37°C にて連続希釈を行った結果、中温性の水素資化性メタン生成菌、MHT-1^T 株を単離した。また、ストレプト

マイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用い、70°C にて連続希釈を行った結果、高温性の水素酸化性メタン生成菌、KHT-2 株を単離した。各メタン生成菌について諸性質を検討し、16S rRNA 遺伝子による系統解析で同定を行った。KHT-2 株は利用基質が H_2/CO_2 とギ酸塩であり、至適増殖条件が 65°C、初期 pH 7.5、NaCl 濃度 2% であった。16S rRNA 遺伝子は、1,327 bp 決定し、*Methanothermobacter* sp. KHT-2 とした。MHT-1^T 株は、利用基質が H_2/CO_2 とギ酸塩であり、至適増殖条件が 35°C、初期 pH 7.5、NaCl 濃度 1% であった。本株の形状は不定型であり、細胞膜外に S-layer を有していた。16S rRNA 遺伝子の系統解析の結果、MHT-1^T 株は *Methanocalculus* 属の新種とし、*M. pumilus* MHT-1^T と命名した。

3) では、単離したメタン生成菌について重金属感受性の検討を行った。MHT-1^T 株について、1 mM の CdCl_2 、 K_2CrO_4 、 CuSO_4 をそれぞれ添加して培養した結果、 CdCl_2 、 CuSO_4 については増殖した。一方、KHT-2 株については、増殖は全く見られなかった。埋立地より溶出すると考えられる重金属は、硫酸塩還元菌の H_2S 生成によって不溶化することが明らかとなっている。このことから、埋立処分地では、硫酸塩還元菌による重金属不溶化がメタン生成菌の存在に寄与していることが示唆された。浸出水中より単離された硫酸塩還元菌 *Desulfotomaculum* sp. RHT-3 を重金属存在下においてメタン生成菌 KHT-2 株と共生培養した。そして、3 mM 以下の CdCl_2 、又は 2 mM 以下の CuSO_4 存在下で、*Desulfotomaculum* sp. RHT-3 による重金属不溶化と共に、KHT-2 株の増殖を確認した。

本論文では、廃棄物の最終的安定化に対して極めて重要な役割を果たしているメタン生成菌を中心に研究をすすめ、廃棄物処分場のメタン生成菌量及び存在種についてはじめて明らかにした。

審査委員会は、本論文について、研究の進め方、論文の構成、内容、図表並びに引用文献などについて慎重に審議すると共に、公表されている論文についても検討した。その結果、審査委員一同は、本論文を岐阜大学大学院連合農学研究科の博士論文として価値あるものと認め、「合格」と判定した。

基礎となる論文

1. K. Mori, H. Yamamoto, Y. Kamagata, M. Hatsu, and K. Takamizawa: *Methanocalculus pumilus* sp. nov., a heavy metal tolerant methanogen isolated from a waste disposal site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (in press)
2. K. Mori, M. Hatsu, R. Kimura, and K. Takamizawa: Effect of heavy metals on the growth of a methanogen in pure culture and coculture with a sulfate-reducing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (in press).