

# 高温環境下での好熱性細菌による 有機廃棄物の分解

大島泰郎<sup>\*1</sup>, 森屋利幸<sup>\*2</sup>, 吉井貴宏<sup>\*3</sup>

- \*1 共和化工(株) 環境微生物学研究所 所長; 東京工業大学 名誉教授;  
東京薬科大学 名誉教授
- \*2 共和化工(株) 環境微生物学研究所 研究員
- \*3 共和化工(株) 環境微生物学研究所 研究員

『極限環境生物の産業展開』  
2012年8月 シーエムシー出版刊 抜刷

## 4 高温環境下での好熱性細菌による有機廃棄物の分解

大島泰郎\*<sup>1</sup>, 森屋利幸\*<sup>2</sup>, 吉井貴宏\*<sup>3</sup>

### 4.1 堆肥と有機廃棄物処理

堆肥は古来からの有機廃棄物処理法であるが、現在、我が国の主流となっている焼却に比べ、いくつかの利点を持っている。第一は、焼却が余分の燃料を必要とするのに対し、堆肥は化学的には同じように酸化分解であるが、微生物を利用するため余分の燃料を必要としない。このため、安価であり、また余分なCO<sub>2</sub>の放出といった環境に負担をかけることがない。第二に、堆肥化は高度な設備を必要としないので、設備の保守にも操作にも費用がかからない。この点からも堆肥は安価である。

さらに、環境中にダイオキシンやNO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>などの有害物質を放出することもない。最終製品は、肥料として農地に還元し、炭素のリサイクルに寄与する。しかも、しばしば堆肥は農地の改良に寄与する効果が報告されている。

このような利点があるため、また、一方では焼却に伴う環境汚染の問題が大きくクローズアップされてきたために、多くの地方自治体が生活廃棄物を中心に有機廃棄物を堆肥化して処理しようとする動きが強まっている。

しかし、堆肥にも欠点がある。第一はプロセスが遅く、処理に長時間を必要とする。たとえば、一般の有機廃棄物（食品残骸や糞尿、雑草など）の場合、分解の終了までには3～4ヶ月程度の時間が必要である。さらに、焼却に比べ広大な面積を必要としている。今後、環境問題がより重要になり、より多くの有機廃棄物を堆肥化したいという要望が出てくることは必須であるが、現状ですら処理場のためのスペースは深刻な問題となっており、堆肥化の技術革新による高効率の堆肥化プロセスへの社会的要望は強い。そのためには、堆肥化の生化学的、分子生物学的および微生物化学的な解析を深め、堆肥化プロセスの効率化や堆肥化場の高層ビル化など、堆肥化へ近代工学的手法を導入するなどの必要がある。

近年、堆肥化への関心が高まり、大規模な集積型堆肥化工場が盛んになると、従来より内部の温度の高い高温型堆肥が知られるようになった。これらの高温型堆肥では、しばしば内部の温度が100℃を超える。このような従来知られていなかった高温発酵は、新たな微生物による新規発酵のためか、または単にサイズが大きく内部の保温効果が高まって高温化したかは明らかでない。本稿では、堆肥に関わる好熱菌について述べたのち、特に高温好気型堆肥に関する解析結果<sup>1)</sup>を中心に、堆肥化過程と好熱菌の関係を概観する。

---

\* 1 Tairo Oshima 共和化工(株) 環境微生物学研究所 所長；東京工業大学 名誉教授；  
東京薬科大学 名誉教授

\* 2 Toshiyuki Moriya 共和化工(株) 環境微生物学研究所 研究員

\* 3 Takahiro Yoshii 共和化工(株) 環境微生物学研究所 研究員

## 4.2 好熱菌と堆肥

堆肥化は無数の土壤微生物の共同作業であるが、その間に微生物の代謝に伴って放出される熱が内部に溜まり、次第に内部が高温となる。通常、24時間以内に6~80℃に達する。当初、通常の土壤細菌による有機物の分解が始まるが、堆肥の中心部は次第に高温環境の下で生育可能な菌に交代し、最終的には好熱菌を主体とする菌叢に変化していく。これまでも堆肥の微生物学的な解析は行われてきたが、遺伝子工学的な手法を欠いているため、また難培養性の細菌の存在に気づいていないため全貌を明らかにするにはほど遠い状況である<sup>2~4)</sup>。また、20世紀前半の好熱菌の研究では、堆肥を分離源とする好熱菌の研究が行われてきたが、この場合も同様な欠陥がある。堆肥中から単離されてきた好熱菌は、主に、*Bacillus*属、*Geobacillus*属等Firmicutes門に属する好気性菌、それに嫌気性の*Clostridium*属とアーキアに属するメタン菌類に分類される好熱菌で、生育上限温度が75~80℃以下の中等度好熱菌であった。また、常温菌もFirmicutes門に分類される孢子形成能を持つ細菌が主体で、高温期には孢子を作って堆肥中で生き延びている。

最もよく知られている堆肥中の好熱菌は*G. stearothermophilus* (かつて*Bacillus stearothermophilus*と呼ばれていたが、数年前に新属*Geobacillus*が設けられた)。この菌は75℃付近を生育可能な温度の上限とし、孢子形成能を持つグラム陽性の桿菌である。堆肥中にはどんな堆肥にも普遍的に、また堆肥化過程のすべてのstageに存在する。

菌叢の解析は、古典的には寒天培地上のコロニー数を数え、近年はDNA解析を用いる。古典的な「生菌数」解析は、土壤や堆肥中の大部分の細菌は難培養性であるので、本来堆肥中に存在するはずの細菌類のほんの数パーセントを数えているに過ぎないが、その点を念頭に置いた上で、大まかな傾向を知ることはできる。また、DNA解析と違い、生育してきた細菌の同定は改めてコロニーからDNAを抽出しないと簡単には決められない。さらに、中等度好熱菌の中には、生菌数を数えるために希釈し、室温に置いておくと死滅していくものがあるので、注意が必要である(多くの文献ではこの点に注意を払っていないので、報告されている好熱菌生菌数はかなり低めに出ている可能性が高い)。

たとえば、一例を示すと、家畜糞尿を原料とした堆肥で、発酵開始直後は中心部の温度は20℃、25℃で生育する「常温菌」は1g当たり $10^9$ オーダーを数え、55℃で生育する中等度好熱菌は $10^6$ オーダーで、常温菌の1/1000以下に過ぎないが、2日後には内部は70℃を超え、常温菌は1/100以下に減少し(しかも、数えているのは大部分が孢子と思われる)、一方、好熱菌は $10^8$ オーダーに増加して人口比で常温菌の10倍になり、かなり速やかに菌叢の主役は好熱菌に置き換わることがわかる。過去に多くの類似の結果が報告されているが、上述のように数値そのものには意味がない。大まかな傾向をつかむにとどめるべきである。なお、大腸菌はほぼ正確に数えられていると思われる(厳密には用いた選択培地、多くはデオキシコール酸を含む栄養培地に生育可能な常温菌を数えている)、堆肥化開始とともに急激に減少し、2日後には事実上滅菌(検出されてもg当たり数百個以下)されていることが多い。

### 4.3 好気性高温型堆肥化プロセスの概要

高温型堆肥の代表例として、(株)山有が開発した鹿児島市の下水処理場における堆肥を解析した<sup>1)</sup>。この堆肥は堆積型で規模が大きく、床面積は80~100平米に達する。開始時の高さは約3メートル、高さは発酵が進行するに伴い全体の容積が減少するので、次第に低下する。

床下から通気するので好気発酵であり、通常、発酵分解が順調に推移している限り嫌気性菌、メタン菌は検出されない。発酵に伴い、全炭素量、全窒素量が減少していくが、窒素はほとんどがアンモニアとして放出され、従来の堆肥と異なり硝酸態窒素はほとんど検出されない。温度は混合後、1~2日後にピークに達し、中心部はしばしば100℃を超える。表層から数センチ下で、約70℃あるので、ほぼ全ての部分が70℃以上の高温となるが、2~3日後に温度は低下し始める。1週間ごとに切り返しが行われ、堆肥発酵は通常、10週間程度行われる。この間、pHはほとんど変化しない。EC（電気伝導度、塩濃度の指標である）は僅かに上昇する。これらの解析結果の詳細は、文献1を参照されたい。

いわゆる「難分解性」有機廃棄物の分解活性は高く、われわれは実験室内用のモデルコンポスターを作製し、強制的に内部を保温して堆積型堆肥過程の再現を試みたが、ラットの死骸が、最速では1日のうちに目視できる骨、皮膚がない状態にまで分解が進む<sup>1)</sup>。野外の堆積型でも、500kg程度の牛の遺骸が4週間程度で同様に骨、皮膚など肉眼では認められない状態まで分解される。

### 4.4 高温好気型堆肥から単離された新規高度好熱菌 *Calditerricola satsumensis* YMO81株及び *C. yamamurae* YMO722株

高温好気型堆肥は、中心付近が100℃程度と従来の堆肥よりも高温で発酵する。従って、この高温好気堆肥には新規の高度好熱菌が生育しており、発酵に関与していると推定できる。そこで、著者らは高温好気型堆肥から新規の高度好熱菌の単離を試み、YMO81株、YMO722株の単離に成功した<sup>5)</sup>。この株は長桿菌(0.2×3 μm)、グラム陰性、芽胞の形成が見られず、運動性も観察されない。80℃で生育可能な高度好熱菌である(図1)。YMO81株のゲノムDNAのG+C含量は70.0%であった。16S rDNA塩基配列約1500 bpに基づくBLAST相同性検索からは、*Planifilum yunnanense* LA5<sup>T</sup>株と最も高い相同性を示したが、その相同性は91%であった<sup>6)</sup>。図2にYMO81株及びYMO722株、さらにBacillaceae科の微生物の16S rDNAに基づく近隣結合系統樹を示す。系統学的な解析及び微生物学的な特徴を考慮し、YMO81株及びYMO722株は新しい属の高度好熱菌と判定し、属名を *Calditerricola* と命名し、国際規約に従って正式に記載登録された<sup>5)</sup>。DNA-DNAハイブリダイゼーションの結果、YMO81株とYMO722

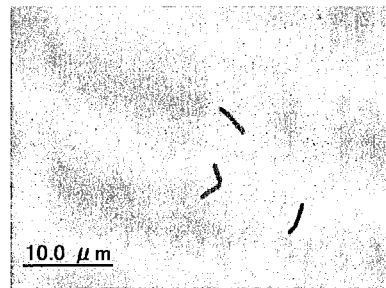


図1 *C. satsumensis* YMO81<sup>T</sup>の位相差顕微鏡像

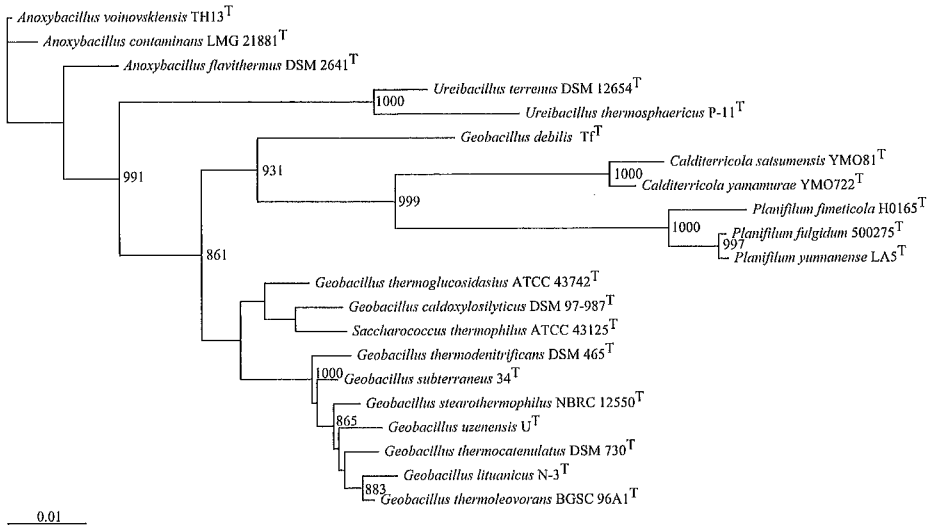


図2 16S rDNA塩基配列 (1409 nt) に基づく近隣結合系統樹

株の相同性は51%であり、この結果から、YMO81とYMO722は別種であると判定され、それぞれ、*C. satsumensis* YMO81<sup>T</sup>及び*C. yamamurae* YMO722<sup>T</sup>と命名した。また*Calditerricola*属の標準種を*C. satsumensis*、*C. satsumensis*の標準株を*C. satsumensis* YMO81株、*C. yamamurae*の標準株を*C. yamamurae* YMO722株とした。これらの株は理化学研究所 Bioresource Center Japan Collection of Microorganisms (JCM), German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), American Type Culture Collection (ATCC) にそれぞれ寄託されている。

#### 4.5 *Calditerricola*属細菌の特異的な性質

これらの新規好熱菌は、生育には必須アミノ酸や比較的高濃度の金属イオンを要求したり、コロニー形成能が著しく低いなど、従来の好熱菌とは異なった細菌学的な性質を持っている。上記の微生物の培養に用いたCYS培地1リットル当たりの組成は以下の通りである。NZ case (和光純薬工業株), 3.0 g; Yeast Extract (BD, Sparks, Maryland), 2.0 g; 可溶性デンプン (BD, Sparks, Maryland), 1.0 g; NaCl, 30.0 g; MgCl<sub>2</sub>, 0.125 g; CaCl<sub>2</sub>, 0.025 g。さらに以下の組成の金属溶液を培地1リットルに対して100 μl添加し、室温でpHを7.5に調製した。金属溶液1リットル当たりの組成は以下の通り。Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 12 g; VOSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 1 g; MnCl<sub>2</sub>, 5 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.6 g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.15 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8 g; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2 g。培地組成が示すように、弱好塩性細菌である。

平板培地にコロニーを形成させることができるが、コロニー形成率は異常に低い。10<sup>8</sup>/ml程度の菌体懸濁液であれば、希釈しなくても孤立したコロニーが得られるほどである。寒天は80℃でゲルを維持できないのでゲランガムをゲル化剤として使用した。ゲランガムのゲル化には、二価

のカチオンが必要であるため、上記の培地組成に加え、終濃度が1 mmol/lになるようにCaCl<sub>2</sub>を添加した培地で平板培地を調製した。YMO722の培養には上記CYS培地のNaClの濃度を30 g/lから3.0 g/lに変更したものを使用した。YMO81やYMO722の倍加時間は、至適環境下でおよそ30分。また、CYS培地で2日間、80°Cで培養すると継代できなくなるため、継代には24時間ごとに行う必要がある。CYS培地に100 μg/lのFeSO<sub>4</sub>と2 mg/lのVOSO<sub>4</sub>を加えた培地を調製するとコロニー形成効率が1000倍程度上昇するが理由は不明である。Calditerricola属細菌は堆肥中では安定に存在し、長期間野積みで放置された堆肥試料中からでも分離できる。

*C. satsumensis* YMO81はLysogeny BrothやSoybean-Casein Digest Mediumに代表されるような栄養豊富な培地では増殖することができない。しかし、この菌は70°C以上の高温で培養する際にGln, Met, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, TrpおよびValの計10種の必須アミノ酸を要求する。堆肥は、蛋白質が分解しアミノ酸を容易に手に入れることができるため、これらアミノ酸の生合成経路を失ったと思われる、事実、ロイシン生合成系の酵素は耐熱性が低く、少なくともロイシンは高温下においてのみ必須アミノ酸のメンバーである。

*C. satsumensis* YMO81<sup>T</sup>と*C. yamamurae* YMO722<sup>T</sup>のポリアミン組成も特異的である。分岐型であるN<sup>4</sup>-aminopropylspermine (NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)が主要ポリアミンであり、1,3-diaminopropane, Putrescine, Agmatineなどが微量成分として検出された。細胞の培養温度とN<sup>4</sup>-aminopropylspermineの細胞内濃度は相関があり、高温になるほどその濃度が上がり、低温側の60°Cでの培養では検出限界以下となった。このことはN<sup>4</sup>-aminopropylspermineが、*Calditerricola*の高温環境下での生育にとってカギとなる重要な物質であることを示唆している。

*Calditerricola*属細菌の保存法も、通常の凍結乾燥などの手法が使えない。単離株はグリセロールを保護剤として添加して-80°Cで凍結保存しても、しばしば保存に失敗していることがあった。そこで、*Calditerricola*の保存ではこの手法を用いず、以下の二つの方法で保存している。長期保存ではL乾燥法を採用している<sup>7)</sup>。分散媒はSodium glutamate 3.0 g, Adonitol 1.5 g, Cysteic acid 0.005 g, 0.1 mol/l Potassium phosphate (pH 7.0) 100 mlの組成である。通常のL乾燥では、分散媒で再懸濁された細胞をアンプルに入れ、真空ポンプで減圧して、細胞を乾燥させるが、*Calditerricola*ではアンプル中に濾紙を入れ、濾紙に再懸濁液を染み込ませて減圧した方が、高い生存率が得られた。簡便な短期保存用として、Microbank<sup>®</sup> Bacterial and Fungal Preservation System (Pro-Lab Diagnostics Inc, Round Rock, TX)を用いることができる。これは、ビーズと保存用溶媒が含まれたプラスチックチューブの形で販売されている。保存アンプルの調製には、培養液をチューブに添加し、懸濁後、液を取り除き、-80°Cで保存する。細胞は、ビーズ表面に付着している。復元には、チューブからビーズを一つ無菌的に摘みとり、新しい培地に移して培養する。

#### 4.6 高温好気型堆肥発酵における微生物群集構造

土壌や堆肥などの環境の微生物のほとんどは培養ができない、もしくは培養が困難であることが知られている<sup>8,9)</sup>。すなわち、環境中の培養できる微生物だけを解析しても、そこにどんな微生物が生息し、どんな酵素反応が行われているのか、それら全体像を捉えることはできない。このため、最近では遺伝子を標的とした方法、例えば変性濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE法)<sup>10)</sup>やメタゲノムシーケンシング法などを用いた解析が行われている<sup>11)</sup>。

原理の詳細は省略するが、DGGE法を用いて例えば環境中の微生物群集構造を解析する場合、全細菌の16S rDNAをPCRで増幅したのち、PCR産物中の各16S rDNAの塩基配列の差異を電気泳動により分離・検出する。DGGE法の利点は微生物集団や機能遺伝子の構成をバンドパターンとして視覚的に比較できることであり、またバンドが帰属する微生物を塩基配列解析により推定することもできる。一方で死菌のDNAをも検出してしまうなど本手法の欠点も報告されているが<sup>12,13)</sup>、ここではDGGE法を用いた高温好気型堆肥発酵の微生物群集構造の解析例について述べる。

高温好気型堆肥から発酵の時系列ごとに試料を採取して、16S rDNAのV3-V5領域を標的としたPCR-DGGEを実施した (図3)。発酵開始から菌叢のダイナミックな変化が観察され、前述の*C. satsumensis*は発酵の初期にかけて最も多く、発酵初期の優占種の一つと示唆された。発酵の中盤では*Thermus thermophilus*が多数を占めるようになり、発酵後半期に入ると*Sphaerobacter thermophilus*や*Saccharomonospora viridis*、*Planifilum*属細菌と相同性の高い菌が多く出現した。*Thermaerobacter*属 (*T. composti*または*T. marianensis*の近縁種)は発酵期間全体を通じて検出された。このような時系列における菌叢の変化は、蒸発による堆肥水分の低下や微生物が利用可

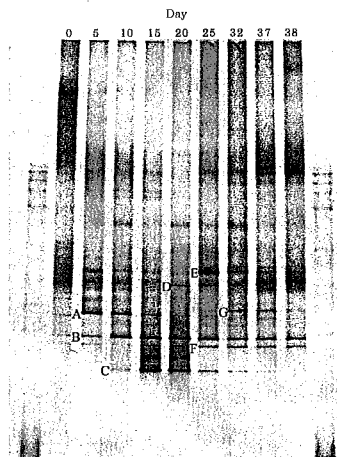


図3 高温好気型堆肥発酵における時系列ごとの微生物群集構造と主要な好熱菌群 *Calditerricola satsumensis* (A), *Thermaerobacter* sp. (B), *Thermus thermophilus* (C), *Planifilum* sp. (D, E), *Sphaerobacter thermophilus* (F), *Saccharomonospora viridis* (G)

能な有機物の枯渇などが影響していると推測される。

一方、高温好気型堆肥は高さ3 mに達するほどの大きさがあり、空間的位置の差異がもたらす影響も少なからず存在する<sup>1)</sup>。発酵中の堆肥を切り崩して断面を作製し、底面から上に向かって高さの異なる試料を採取して解析した結果、微生物群集の多様性は高温の中心部で減少する傾向が見られたが、天頂や底面付近では多様性に富んでいた。一方、温度は堆肥の中心部分に近いほど高く100℃近くに達するが、天頂部や底面では約80℃とやや低いことがわかった。堆肥の天頂部は外気と接しており、また底面は床下から通気されているため、これらは中心部分よりも好気的な環境である。空間的位置の違い、すなわち温度や酸素濃度の違いも微生物群集の多様性に多大な影響を与えている。

#### 4.7 堆肥中の酵素

環境中の酵素活性に関する研究でも DGGE やメタゲノム解析が活かされており、例えばアンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA* を指標とした DGGE 法は窒素循環に関与する微生物群集構造の解析に用いられている<sup>14)</sup>。一方、古典的ではあるが、酵素活性の強さおよび酵素の種類を網羅的に解析することができる活性染色法（ザイモグラフィとも呼ばれる）も有効な手法の一つである<sup>15-17)</sup>。活性染色法の原理は酵素の基質を染み込ませたポリアクリルアミドゲルでタンパク質を電気泳動し、ゲル上で酵素反応を行い、基質を染色することにより酵素活性を有するタンパク質のみを検出する。本方法の利点は目的とする酵素を活性により直接検出するため、遺伝情報が全く未知のタンパク質であっても見落とすことなく解析できることである。

高温好気型堆肥発酵の時系列ごとに試料から酵素を抽出し、酵素反応温度を70℃と設定した活性染色法により耐熱性の有機物加水分解酵素の活性を解析した（図4）。ゼラチンを分解するゼラチナーゼは分子量の大きい種類のいくつかが発酵前半に検出されたのに対し、分子量がより小さいタイプは発酵期間全体を通じて検出された。一方、カルボキシメチルセルラーゼは発酵前半よりも後半に活性が強く、種類も多い傾向が見られた。油脂の分解に関与するエステラーゼは発酵の中期にかけて強く検出され、発酵初期や発酵終盤ではほとんど検出されなかった。*T. thermophilus*が発酵中期において優勢となる好熱菌の一種であることは上述したが、本菌はエステラーゼの一種であるリパーゼを多く産生することが報告されている<sup>18,19)</sup>。*T. thermophilus*は堆肥発酵における油脂分解に関与する可能性がある。

しかしながら現段階の活性染色法では、検出された酵素全ての由来を推測することは非常に困難である。中村ら<sup>17)</sup>は堆肥から分離した好熱菌のゼラチナーゼと堆肥から直接精製したゼラチナーゼのN末端アミノ酸配列を解析し、二つがほぼ同一であることを示したが、アミラーゼに関しては由来を明らかにするには至らなかった。環境中の微生物群集と酵素活性の関連性をより詳細に解明するには、環境からの効率的な酵素の精製方法やアミノ酸配列解析の改良に加えて、難培養性微生物群のゲノムデータベースの充実が必要である。



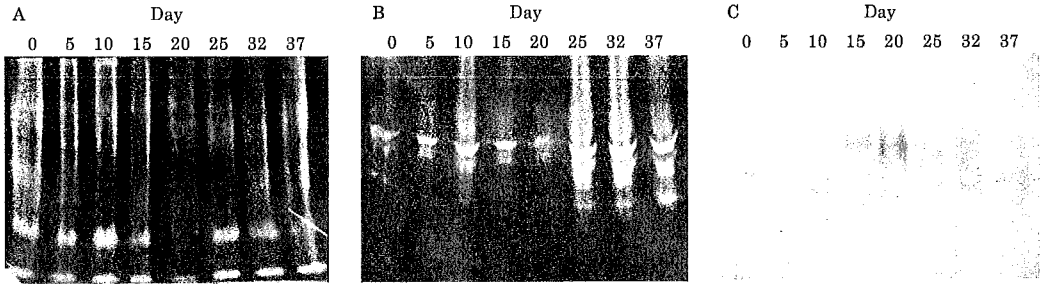


図4 活性染色法による堆肥発酵過程における酵素活性の変遷  
ゼラチナーゼ (A), カルボキシメチルセルラーゼ (B) 及びエステラーゼ (C)

文 献

- 1) T. Oshima and T. Moriya, *Ann. New York Acad. Sci.*, **1125**, 338-344 (2008)
- 2) M. S. Finstein and M. L. Morris, *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**, 113-151 (1975)
- 3) C. G. Golueke, *Composting: A Study of the Process and its Principles*, Rodale Press Inc., Emmaus, Pennsylvania (1972)
- 4) R. P. Poincelot, *Conn. Agric. Exp. Sta. Bull.*, **754**, New Haven (1975)
- 5) T. Moriya *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 631-636 (2011)
- 6) Z. Yan, D. Chen and B. Shen, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 1851-1854 (2007)
- 7) K. A. Malik, *J. Microbiol. Methods*, **12**, 125-132 (1990)
- 8) V. Torsvik *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 776-781 (1990)
- 9) J. D. van Elsas, J. T. Trevors and E. M. H. Wellington ed., "Modern Soil Microbiology", Marcel Dekker, New York (1997)
- 10) B. M. Duineveld *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 172-178 (2001)
- 11) H. Suenaga, *Environ. Microbiol.*, **14**, 13-22 (2012)
- 12) K. L. Josephson *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (10), 3513-3515 (1993)
- 13) F. von Wintzingerode, U. B. Göbel and E. Stackebrandt, *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 213-229 (1997)
- 14) M. H. Nicolaisen and N. B. Ramsing, *J. Microbiol. Methods.*, **50**, 189-203 (2002)
- 15) P. Béguin, *Anal. Biochem.*, **131**, 333-336 (1983)
- 16) R. B. Miller and R. C. Karn, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **3**, 345-354 (1980)
- 17) K. Nakamura *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3329-3337 (2004)
- 18) T. Beffa *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1723-1727 (1996)
- 19) P. Fuciños *et al.*, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1198-205 (2005)