

高温メタン発酵リアクターにおける PET 樹脂分解に関与する微生物群の集積・同定

新潟薬科大学 正会員 井口 晃徳 非会員 島田 昌幸
非会員 堀 沙織里 非会員 重松 亨

1. 目的

ポリエチレンテレフタレート (PET) 樹脂に代表されるプラスチックは、石油を原料とする高分子の有機化合物であり、耐久性や加工の容易さから世界中で製造・利用されている。一方で難分解性という性質から、自然環境中に流出後、海洋汚染等の環境問題も引き起こしている。近年、PET 樹脂分解細菌として大阪府堺市ペットボトルリサイクル施設から真正細菌の一種である *Ideonella sakaiensis* 201-F6 株が分離培養された (1)。この分離株から、高分子の PET を低分子のテレフタル酸ヒドロキシエチルに分解する酵素「PETase」の分子構造・機能が明らかにされ、微生物による PET 樹脂分解の可能性が示された。また Furukawa らは、微量の界面活性剤を用いることで PETase による PET 分解反応速度を約 100 倍に増加できることを示している (2)。

PET 樹脂は可塑性を有しており、界面活性剤を添加したり、高温にしたりすることで PET の高分子構造を変性させた方が、酵素/基質の接触性、また酵素自体の活性を高める点で分解に有利であるものの、高濃度の界面活性剤や高温下では、常温で活性を持つ酵素の多くは失活してしまう。PET 分解菌 201-F6 株の至適生育温度は 30°C であり、この株由来の PETase も 30-37°C といった低い温度帯が至適とされる。

高温メタン発酵プロセスは、通常メタン発酵 (35°C) よりも高い温度帯 (55°C) で生育可能な、多様な嫌気性細菌群によって有機物をメタンと二酸化炭素に分解プロセスである。そこで我々は、PET 樹脂を供給した高温メタン発酵プロセスには、高温域を至適温度帯とする PET 分解酵素を発現する細菌群が集積されると考えた。本研究では、生物分解による高効率な PET 樹脂分解メカニズムの解明を目的に、ラボスケール高温メタン発酵リアクターを構築し、PET 樹脂を基質として供給することで PET 樹脂を高効率に分解可能な微生物群の集積化を試みた。

2. 実験方法

2-1. 高温メタン発酵リアクターの構築と運転

高温メタン発酵リアクター (55°C) は、実容積 1 L の完全混合型リアクター (CSTR) を用いて行った。植種には、新潟市舞平清掃センター内の生ゴミおよびし尿・浄化槽汚泥を処理する高温メタン発酵槽から採取した高温メタン発酵汚泥を使用した。メタン生成を伴う嫌氣的分解反応の律速段階となるメタン生成古細菌を安定的に保持・集積することを目的に、酢酸を主たる基質とした無機塩含有合成廃水 (21,400 mg-COD/L) を供給し、さらに PET 樹脂片 (15×15×0.2 mm) を総計 50 g 添加して運転を行った。水理的滞留時間 (HRT) は 20 d とし、ウォーターバスに浸漬することでリアクター温度を 55°C に保持した。水質測定項目は pH、全 COD_{Cr}、可溶性 COD_{Cr} (孔径 0.45 μm フィルター透過液)、TS、VTS とし、またメタン生成古細菌に特異的な F₄₂₀ 補酵素を有する微生物の蛍光観察、バイオガスガス生成量を経時的に測定した。これらの測定方法は既往の報告 (3) に準拠して行った。投入した PET 樹脂片は経時的にリアクターから取り出し、PET 樹脂付着汚泥の採取およびマイクロメーターを用いて樹脂片の厚みを測定した。

2-2. 微生物群集構造解析

リアクター内および PET 樹脂に付着している微生物群構造の把握を目的に、原核生物の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的とした次世代シーケンズ法を適用した。DNA シーケンサーは MiSeq (Illumina, USA) を使用し、得られたシーケンズリードは QIIME2 pipeline を利用して解析を行った。

キーワード Polyethylene terephthalate, 高温メタン発酵, 微生物群集構造解析

連絡先 〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島 265-1 新潟薬科大学 応用生命科学部 TEL 0250-25-5145

3. 結果および考察

3-1. 高温メタン発酵リアクターの運転状況と PET 樹脂の分解

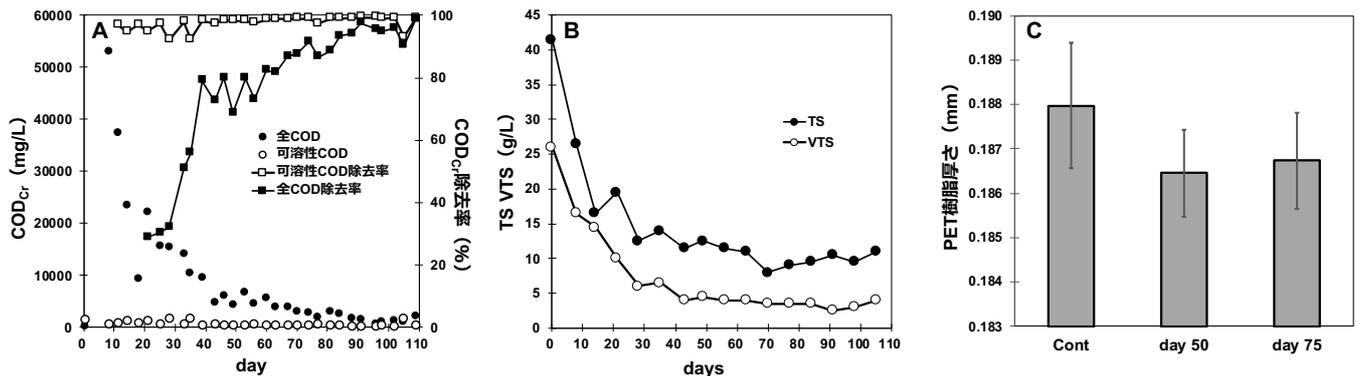


図 1. 高温メタン発酵リアクターにおける槽内液 COD, COD 除去率の推移(A), TS, VTS の推移(B), PET 樹脂片の厚み(C)

図 1 に高温メタン発酵リアクターにおける槽内液 COD_{Cr}, COD_{Cr} 除去率の推移 (A), TS, VTS の推移 (B) を示す. リアクター運転開始直後は植種汚泥からの持ち込みの有機物量が多かったことにより, 運転開始直後の槽内液中の全 COD_{Cr} は高い数値を示したものの, リアクターの運転が継続されると共に減少し, 合わせて全 COD_{Cr} 除去率も向上した. 可溶性 COD_{Cr} は運転開始直後から低い値を推移しており, 供給液に含まれる酢酸を良好に処理していたものと考えられた. TS および VTS もほぼ同様な傾向が確認され, 運転開始 50 日 (day 50) で槽内液の汚泥量はほぼ安定した推移を見せた. また F₄₂₀ 自家蛍光観察およびバイオガス発生量からも良好なメタン生成環境が構築されていることが確認できた (データ非提示). リアクター内に投入した PET 樹脂片の厚みを測定した結果, day 50 において Cont (未処理) と比較して有意に厚みの減少が確認されたことから(図 1C), PET 樹脂を分解する微生物群がリアクター内で優占しているものと考えた.

3-2. 微生物群集構造解析

図 2 および表 1 に day 102 におけるリアクター内汚泥および PET 樹脂付着汚泥の微生物群集構造解析結果 (検出頻度順位) を示す. リアクター内汚泥, PET 付着汚泥共に *Coprothermobacter* 属細菌やメタン生成古細菌である *Methanosarcina* 属古細菌が高い頻度で検出された. *Clostridia* 綱 DTU014 細菌 (順位 5) は PET 樹脂付着汚泥において検出頻度が高く, リアクター内汚泥においては比較的検出頻度が低かったことより, PET 樹脂の分解に何かしら関与する可能性が示唆された.

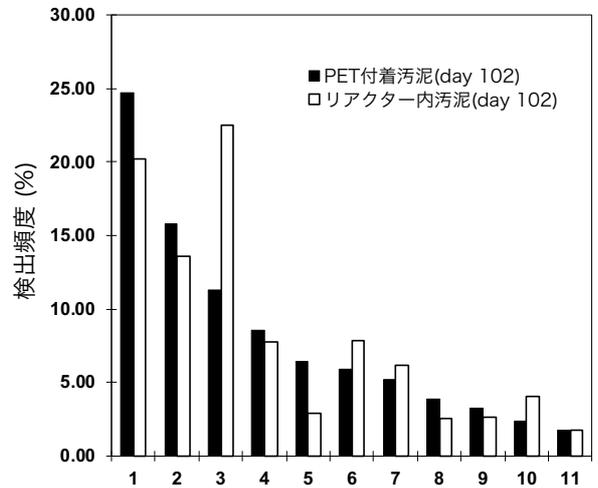


図 2. day 102 におけるリアクター槽内液および PET 付着汚泥から検出された原核生物 (属レベル) の相対検出頻度順位 (検出頻度 1%以上のみ表示)

表 1. day 102 における槽内液および PET 付着汚泥から検出された原核生物 (属レベル) と検出頻度

検出頻度順位 (図2)	属レベルでの分類	PET付着汚泥 (PET) %	リアクター汚泥 (Reactor) %	PET/Reactor
1	<i>Coprothermobacter</i> 属	24.72	20.18	1.2
2	<i>Lentimicrobiaceae</i> 科	15.84	13.63	1.2
3	<i>Methanosarcina</i> 属	11.31	22.53	0.5
4	<i>Acetomicrobium</i> 属	8.54	7.78	1.1
5	<i>Clostridia</i> 綱 DTU014	6.45	2.88	2.2
6	<i>Clostridia</i> 綱 MBA03	5.89	7.87	0.7
7	<i>Ruminococcaceae</i> 科	5.23	6.19	0.8
8	<i>Tepidiphilus</i> 属	3.85	2.54	1.5
9	<i>Calcicoprobacter</i> 属	3.23	2.60	1.2
10	<i>Clostridia</i> 綱 MBA03	2.36	4.09	0.6
11	<i>Aminicenantes</i> 属	1.79	1.74	1.0

4. 今後の予定

今回検出されたこれらの微生物群が実際に PET を分解可能な酵素遺伝子を保有するのかを調査すると共に, さらにリアクターにおける PET 樹脂の分解速度の向上を目指す.

参考文献 1. Yoshida *et al.*, (2016), vol. 351, pp. 1196-1199, Science. 2. Furukawa *et al.*, (2018), vol. 11, pp. 4018-4025, ChemSusChem. 3. 井口ら, (2019), vol. 75, pp. III_145-III_151 土木学会論文集 G (環境)