総合論文

メタン発酵プロセスに関与する微生物群集

重松 亨¹•湯 岳琴²•木田 建次³*

¹新潟薬科大学応用生命科学部食品科学科,²北京大学工学院エネルギー与資源工程系, ³熊本大学大学院自然科学研究科

Microbial Communities Related to Methane Fermentation Processes — Monograph—

Toru Shigematsu¹, Yue-Qin Tang², and Kenji Kida^{3*} (Department of Food Science, Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences¹; Department of Energy and Resources, College of Engineering, Peking University, P. R. China²; Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto-City, Kumamoto 860-8555³) Seibutsu-kogaku **87**: 570–596, 2009.

Methane fermentation, consisting of anaerobic degradation of organic matters and subsequent methanogenesis, is one of potentially attractive technologies for treatment of wastewater and biological wastes. Because methane fermentation is a cost-effective energy-yielding process, produces far less excess sludge than aerobic wastewater treatment systems, and a large part of the energy stored within organic matters can be recovered as biogas. However, it also has disadvantages, such as poor treating rate, low digestion efficiency and instability in reactor operation. These disadvantages are caused by the difficulty of monitoring in situ microbial community structure and metabolic functions in bioreactors. Methane fermentation is based on a complex community of microorganisms of wide phylogenetic diversities with different metabolic functions. Moreover, only poor proportion of microorganisms have been isolated and cultivated and analyzed. One possible approach to solve these disadvantages and achieve high rate and high efficient methane fermentation processes with stable reactor operation is, thus, to accumulate knowledge of the microbial communities and to use them as landmarks responsible for specific degradation pathways in methane fermentation. Therefore, we constructed continuous anaerobic methane fermentation processes using completely stirred tank reactors (CSTR) fed by specific substrates, such as acetate, propionate, butyrate, long-chain fatty acids, glycerol, protein (bovine serum albumin) and starch, to achieve the chemostat cultivations of microbial communities related to degradation of these substrates. For each microbial community under steady state conditions, we analyzed the structures and metabolic functions by mainly using molecular biological techniques, such as fluorescent in situ hybridization, 16S rRNA gene clone library analyses, quantitative real-time PCR techniques, quantitative RT-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Even feeding the same substrates, the microbial communities were remarkably different by different dilution rates. For acetate-degrading communities, dilution rate effected the change in community structure, as well as shift of pathway between aceticlastic and nonaceticlastic methanogenesis. Additional Ni²⁺ and Co²⁺ in the wastewater fed into the reactors and operation temperature also affected on the community structure, as well as the reactor performance. Based on the fundamental knowledge in the landmarks of microbial communities for specific degradation pathways of organic matters, we subsequently evaluated the relationship between reactor performance and microbial community structures in bioreactors treating actual wastewaters and biological wastes, such as municipal solid wastes, awamori distillery wastewater, livestock manure and surplus sludge of a wastewater treating plant. Our research results would provide a significant milestone for achievement of stable operational methane fermentation process with high rate and efficiency.

[Key words: methane fermentation, microbial community, phylogenetic analysis]

*連絡先 熊本大学大学院自然科学研究科産業創造工学専攻(教授) E-mail: kida@gpo.kumamoto-u.ac.jp

メタン発酵は、多くの微生物の共生により有機物を嫌 気的に分解し、その過程で生成する有機酸などをメタン に還元する方法である. 自然界において可燃性ガス (バ イオガス)を生成するメタン発酵現象は18世紀に観察さ れていたが、これが廃棄物処理に利用され始めたのは19 世紀末である.そして、20世紀初めに英国で下水汚泥の 減容化法として採用されたが、当初、発酵槽は無加温で 発生ガスの回収利用も行われず、処理日数も30~60日 を要していた、その後、反応速度の向上を図るために加 温され、機械撹拌やガス撹拌されるようになり処理日数 も10~15日まで短縮されるようになった¹⁾. このメタン 発酵法は、有機物濃度の高い産業廃水や屎尿などの処理 にも採用されるようになったが、反応部の解明はまった くなされずにブラックボックスとされてきた. そのため に、①限られた廃水に対する処理技術である、② NH4+ が増加する、③反応速度が遅い、④不安定な処理技術で あるなどの問題点を抱えていた²⁾.

しかし、1973年の石油ショックを契機としてメタン発 酵法は大きく注目されるようになった. なぜならメタン 発酵法は、好気性処理法の代表である活性汚泥法に比べ て曝気動力を必要としないこと、および燃料ガスが回収 できることから、省エネルギー型廃水処理法としてだけ でなく石油代替燃料の生産手段として見直され、研究開 発が積極的に行われるようになった、その結果、反応速 度の向上を目指した新規のリアクターによる嫌気性処理 法³⁾が開発され、またメタン発酵により増加した NH₄+ と残存したプロピオン酸などの有機酸との効率的同時除 去プロセスの開発4,5)がなされ、さらにNi²⁺やCo²⁺の添 加により反応速度が大幅に向上することが明らかにな り6)、種々の有機性廃水・廃棄物の処理・利活用法とし て採用されるようになった7.しかし、依然としてメタ ン発酵は不安定な処理技術であるといった不名誉な汚名 を払拭することはできなかったが、分子生物学の発展に 伴い、メタン発酵に関与する微生物の生態学や、メタン 生成経路の解明など生化学や分子生物学の分野において も、目を見張る成果が得られるようになった8).

そこで、メタン発酵による有機物からのメタン生成に 関して概略した後、著者らが研究してきたメタン生成反 応と代謝変換に伴う微生物群集の挙動に関して紹介す る.研究は連続培養装置を用いて行い、Ni²⁺やCo²⁺の 添加効果を補酵素レベルで明らかにすると伴に、この過 程でNi²⁺やCo²⁺の添加・無添加によりメタン生成反応 を制御(メタンを生成あるいは有機酸で止める)するこ とができた^{9,10}.この制御系を利用して、各種基質(酢酸、

デンプン質系)を炭素源として連続培養を行い、槽内の 微生物群集を解析 (FISH, クローン解析, 定量 PCR, RT-PCR, DGGE)し、メタン生成経路とそれに関与す る微生物群集の構造と機能を明らかにしてきた11-17)。こ れによりメタン発酵を外部から制御することが可能とな り、安定化を図ることができた、これらの成果に基づき、 バイオガス中の硫化水素抑制のための空気供給の微生物 群集への影響18,19) 超高温領域でのメタン生成反応に関 与する微生物群集の解明20)、さらには廃棄物系バイオマ ス(泡盛蒸留廃液、糞尿や生ごみなどの混合物)のメタ ン発酵によるサーマルリサイクルに関与する微生物達を 明らかにし^{21,22)}、メタン発酵の安定化に大きく貢献して きた.本総合論文では、これらの研究成果に関して紹介 していく. 2. メタン発酵の機構 メタン発酵による有機物からガスへの分解は3段階で

プロピオン酸, 酪酸, 脂質, グリセロール, タンパク質,

進行する²³⁾. 複雑な有機物は, 第1段階の酸生成過程(液 化過程)で酸生成細菌群の作用により, 単糖類, アミノ 酸などの分子量の小さい物質を経て, 酢酸およびプロピ オン酸, 酪酸などの低級脂肪酸, そして乳酸やエタノー ルになる. 第2段階においては酢酸以外の低級脂肪酸, 乳 酸およびエタノールは, 水素生成細菌により水素と酢酸 に変換され, 最後の第3段階において基質特異性の強い メタン生成古細菌群により, メタン, 二酸化炭素などに 分解される.

酢酸およびプロピオン酸や酪酸などの低級脂肪酸は、 メタン発酵プロセスにおける主要な中間代謝物である. 生成されるメタンの約70~80%が酢酸由来であり、6~ 35%がプロピオン酸由来であると報告されている^{9,12)}. 酢酸、特にプロピオン酸の分解反応はメタン発酵プロセ スの律速段階と考えられており、高負荷条件でメタン発 酵処理する場合や、発酵槽のトラブルなどが生じると、 主としてこの2種類の有機酸が発酵槽内に蓄積される. また、廃水に乳酸が多く存在するとメタン発酵でプロピ オン酸が生成されやすいとの報告もある²⁴⁾.

酢酸からのメタン生成反応には①酢酸資化性メタン生 成古細菌による反応(Table 1(1), Fig. 1(1)),および② 酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌による熱力 学的共生反応(Table 1(4))の2種類の経路が考えられ ている²⁵⁾.①の反応を行うことのできる酢酸資化性メタ ン生成古細菌として, Methanosaeta 属およびMethanosarcina 属の2属が報告されている²⁶⁾.②の反応に従事する酢 酸酸化細菌としては, AOR株, Thermacetogenium phaeum, そしてClostiridum ultunense が報告されている^{25,27)}.一方,

Table 1. Degradation reactions of acetate and propionate under methanogenic conditions.

Reaction	⊿G ⁰ ' (kJ/reaction)
(1) Aceticlastic methanogen	
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0
(2) Acetate-oxidizing bacteria	
$CH_3COO^- + 4H_2O \rightarrow 2HCO_3^- + 4H_2 + H^+$	+104.6
(3) Hydrogenotrophic methanogen	
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6
(4) Reaction $(2) + (3)$	
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0
(5) Propionate-oxidizing bacteria	
$\mathrm{CH_3CH_2COO^-} + \mathrm{3H_2O} \rightarrow \mathrm{CH_3COO^-} + \mathrm{HCO_3^-} + \mathrm{3H_2} + \mathrm{H^+}$	+76.0
(6) Reaction (3) \times 3 + (5) \times 4	
$4CH_{3}CH_{2}COO^{-} + 3H_{2}O \rightarrow 4CH_{3}COO^{-} + 3CH_{4} + HCO_{3}^{-} + H^{-}$	+ -100.8
(7) Reaction (6) + (1) \times 4	
$4CH_3CH_2COO^- + 7H_2O \rightarrow 7CH_4 + 5HCO_3^- + H^+$	-224.8



Fig. 1. Metabolic pathway of acetate and propionate in methane fermentation. Reaction 1, 2, 3 and 5 correspond to reaction 1, 2, 3 and 5 described in Table 1.

プロピオン酸からの酢酸への分解反応は、プロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の熱力学的共生反応(Table 1(7))によって進行する.プロピオン酸酸化能を持つ細菌としてはSyntrophobacter属, Smithella属や一部の硫酸塩還元細菌が報告されている^{25,28}.

水素資化性メタン生成古細菌によるメタン生成反応 は、主として第2段階で生成される水素がC1サイクル⁹⁾ により二酸化炭素を還元し、ホルミルメタノフラン (formyl-MFR) になる、ホルミル基は、さらに還元され メテニル基、メチレン基を経てメチル基となり、metyl coenzyme M methylreductase system によりメタンに還 元されサイクルは終結することになるが、このとき二酸 化炭素のホルミル-MFRになる反応が誘起され、C1サイ クルが循環することになる。

この C1 サイクルおよび酢酸からのメタン生成経路に 関与する補酵素 F430 およびメチルコバラミンは、それぞ れ Ni²⁺ および Co²⁺ を含んでいる²⁹⁾.したがって、Ni²⁺ や Co²⁺ などの金属イオンにより C1 サイクルが加速され れば、前述した Syntrophobacter 属と水素資化性メタン生 成古細菌との共生は熱力学的に容易となり、その結果、 嫌気的に最も分解されにくいプロピオン酸の分解も促進 され、反応速度の向上につながるものと期待される.

メタン生成反応を制御するNi²⁺およびCo²⁺ (微量金属イオン)とそれに伴う補酵素の挙動^{9,10)}

固形物を除去した焼酎蒸留廃液に Ni²⁺ および Co²⁺ を 微量添加した後, AFBR (anaerobic fluidized-bed reactor) による嫌気性処理試験を行った.その結果,高温メタン 発酵,中温メタン発酵それぞれの最大 TOC 容積負荷は 42,24 g/l/d (BOD 容積負荷で 68,39 g/l/d) となり, Ni²⁺および Co²⁺ 無添加に比較して4~5倍向上した⁶⁾.

そこで, 酢酸資化性メタン生成古細菌の連続培養^{9,10)} を行い, Ni²⁺ および Co²⁺ の添加効果を菌体レベルおよ び酵素活性レベルで明らかにすることを試みた. また研 究結果に基づき, 代謝変換に関しても言及した.

3.1 実験方法

1)連続培養 本研究における嫌気性連続培養系に は Fig. 2 に示した完全混合型リアクター(CSTR, completely stirred-tank reactor)を用いた.リアクターはガ ラス製で、その実容積は1.8 *l*であり、恒温水槽に浸漬す ることによって槽内温度を 37°C に制御した.当研究室 で濃縮余剰汚泥を用いて馴養している馴養消化汚泥 (VSS濃度 7.46 g/l) 386 mlを採取し、窒素置換した無機 塩培地で2回洗浄後、窒素置換した酢酸合成廃水(Table 2) に懸濁した後、CSTRに移して槽内液をマグネチック スターラーで連続撹拌した.1日後に合成廃水をポンプ でリアクターに供給し、連続培養を開始した.

本論文で使用した合成廃水は、Table 2に示した酢酸や プロピオン酸を唯一の炭素源とする合成廃水 9 種類であ る. たとえば酢酸合成廃水は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 334 培地 (Methanothrix培地)(DSMZ: Catalogue of Strains 2001; http://www.dsmz.de/dsmzhome.htm)を基本とし、TOC 濃度 8000 mg/l となるように以下の組成で調製した(1 *l* あたり):酢酸ナトリウム, 5.46 g; 酢酸, 16.0 g; KH₂PO₄,



Fig. 2. Schematic diagram of completely stirred tank reactor (CSTR).

Table 2. Synthetic wastewaters used in this study.

	Synthetic wastewater (in 1 <i>l</i>)								
	Acetate	Propionate	Acetate- Propionate	Butyrate	Protein	Glucose	Starch	Long-chain fatty acid (LFA)	Glycerol
Substrate									
Acetic acid	$16.0 \mathrm{~g}$		$10.72 \mathrm{~g}$	_	_	_	_	—	_
Sodium acetate	$5.46~{ m g}$		$3.34~{ m g}$	—	—	_		—	_
Propionic acid	—	13.16 g	$4.38~{ m g}$	_	_	_	_	—	_
Sodium propionate	—	$4.27~{ m g}$	$1.40~{ m g}$	—	_	_		—	
Butyric acid	—		_	$11.74~{ m g}$	_	_	_	—	_
Sodium butyrate	—		—	$3.67~{ m g}$	_	_	_	—	_
Bovine serum albumin (BSA)	—		—	—	$17.0~{\rm g}$	_		—	
D-Glucose	—		—	_	_	$21.0~{ m g}$	_	—	_
Starch	—		—	—	_	_	$25.6~{ m g}$	—	_
Oleic acid	—		—	—	—	—		$0.495~{ m g}$	
Palmitic acid	—		—	—	—	—		$0.450~{ m g}$	
Sodium alginate	—		—	—	—	—		0.1 g	—
Glycerol	—	—	—	—	—	—	—	—	$2.610~{ m g}$
Other compound									
KH ₂ PO ₄				0.30 g				20	mg
KHCO3				4.00 g				_	-
NH ₄ Cl				1.00 g				80	mg
NaCl				0.60 g				125	mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$				$0.82~{ m g}$				45	mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$				$0.08~{ m g}$				100	mg
Cystein-HCl · H ₂ O				0.10 g				_	-
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$				21.3 mg				21	.3 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$				24.7 mg				24	.7 mg
$Na_2S \cdot 9H_2O$				_				20	mg
$FeSO_4 \cdot 6H_2O$				_				0	.1 mg
Trace element solution ^a				10 ml				0	.3 ml
Vitamin solution ^b				10 ml				10	ml

^a Modified trace element solution of DSMZ318 (in 1 *l*): FeCl₃ · 6H₂O, 1.35 g; MnCl₂ · 4H₂O, 0.10 g; CaCl₂ · 2H₂O, 0.10 g; ZnCl₂, 0.10 g; CuCl₂ · 2H₂O, 0.025 g; H₃BO₃, 0.01 g; Na₂MoM₄ · 2H₂O, 0.024 g; NaCl, 1.0 g; Na₂SeO₃ · 5H₂O, 0.026 g; nitrilotriacetic acid (NTA), 12.8 g.

^b Modified vitamine solution of DSMZ318 (in 1 *l*): biotin, 2.0 mg; folic acid, 2.0 mg; pyridoxine-HCl, 10.0 mg; thiamine-HCl · 2H₂O, 5.0mg; riboflavin, 5.0mg; nicotinic acid, 5.0mg; DL-calcium pantothenate, 5.0 mg; *p*-aminobenzoic acid, 5.0 mg; lipoic acid, 5.0 mg.

0.3 g; KHCO₃, 4.0 g; NH₄Cl, 1.0 g; NaCl, of 0.6 g; MgCl₂·6H₂O, 0.82 g; CaCl₂·2H₂O, 0.08 g; cystein-HCl·H₂O, 0.1 g; trace element 溶液, 10 ml; vitamin 溶 液 (B₁₂を除いたもの), 10 ml. なお trace element 溶液 については、3節(3. メタン生成反応を制御する・・・・) の実験では DSMZ318 培地の trace element solution に Ni²⁺およびCo²⁺ 濃度がそれぞれ0.5および0.2 mg/l とな るように NiCl₂·6H₂O と CoCl₂·6H₂O を添加した.また 4節(4. 各基質からのメタン生成経路・・・・) 以降の実験 では、NiCl₂·6H₂O として21.3 mg/l; CoCl₂·6H₂O とし て24.7 mg/lになるように添加した.

2) 回分式ガス発生試験¹⁰⁾ 簡易型ガス発生装置を 用いて各希釈率での菌体活性を求めた.装置は 15 ml バ イアル瓶 (SVG-15, 日電理科硝子)の反応槽と3 ml メス ピペットのガスホルダーからなり,両者を塩化ビニル チューブで連結したものである.各希釈率での培養液10 mlを酢酸ナトリウム溶液0.2 mlを含有するバイアル瓶に 採取し(最終酢酸濃度,100 mM),37°Cの恒温槽に浸 漬し,マグネチックスターラーで常時撹拌した.また, ガスホルダー内を飽和食塩水で満たした.浸漬1時間後 からのガス発生量を読み取り,その傾きから単位菌体あ たりのガス発生速度(以後,菌体活性と呼ぶ)を算出した.

3)補酵素コリノイドおよびF430の分析^{9,10)}補酵素 コリノイドおよびF430の定量は、抽出、精製後、ポルフィ リン環に配位するNi²⁺およびCo²⁺を原子吸光光度計を 用いてファーネス(フレームレス)法で測定した.連続 培養の各条件で定常状態に達した培養液を採取し、この 培養菌体からコリノイドを加熱抽出し、遠心分離後の上 澄液をアンバーライト樹脂を充填したカラムに通液し、 吸着させた.蒸留水で洗浄後、メタノールで脱着させ、 この溶液からメタノールを留去した後,蒸留水に溶解させた.この液中のコバルトを原子吸光法により定量し, コリノイド含量とした.補酵素 F₄₃₀についてもほぼ同様 にして行った.

4) 補酵素 F_{420} の分析 $^{9,10)}$ F_{420} は強い蛍光を有す る酵素であるので、培養菌体から熱抽出した抽出液の蛍 光強度を直接蛍光分光光度計を用いて測定した. このと きの励起波長は425 nm、測定波長は460 nm である. な お、酢酸合成廃水を $D = 0.025 d^{-1}$ の条件で連続培養を行 い安定した後、単位菌体当たりの蛍光強度を測定し、こ の値を1.0として相対値で示した.

5) その他の分析方法 pH, volatile fatty acids (VFA), volatile suspended solid (VSS), total organic carbon (TOC), 発生ガス中のメタン含量の測定は常法に従い 行った.

3.2 Ni²⁺およびCo²⁺の添加による酢酸分解速度の向上

Ni²⁺および Co²⁺の添加効果を菌体レベルおよび酵素 活性レベルで明らかにするために、CSTRと酢酸合成廃水 (TOC 濃度 8000 mg/l, Table 2) を用いて酢酸資化性メ タン生成古細菌の連続培養を行った. Ni²⁺ および Co²⁺ を添加しない場合には、希釈率D=0.05 d-1 でも wash out したが、Ni²⁺および Co²⁺ を合成培地に添加することに より、D=0.7 d-1 といった大きな希釈率においても残存 有機酸濃度は増加することなく安定して連続培養を行う ことができた. 添加系での D=0.6 d-1 の条件での連続培 養結果を用いて、単位菌体あたりの比TOC除去速度を算 出すると 5.3 g/g/d であった(Table 3). CSTR を用いた 連続培養で得られた比TOC除去速度は、AFBRで達成し た値の2.5倍も高く、硫化水素などによる阻害のない系 で処理試験を行えば、中温メタン発酵においてもさらに 高い負荷,たとえば焼酎蒸留廃液の処理ではTOC容積負 荷60 g/l/d (BOD容積負荷97 g/l/d) を達成できることに なる.この値は、固形物を除去した焼酎蒸留廃液(たと えばTOC, 40,000 mg/l; BOD, 65,000 mg/l) を16時間と いう短時間で中温メタン発酵処理できることになり、驚 異的な反応速度を達成できることになる.

3.3 メタン生成補酵素含量に基づく, 酢酸分解経路の変換の可能性 処理試験および連続培養の結果, 処理性能に対して Ni²⁺ および Co²⁺ の添加効果が明らかになったので, これらの添加効果を菌体レベルおよび酵素活性

レベルで明らかにする実験を行った. Co²⁺ および Ni²⁺ 添加酢酸合成廃水を使用した連続培養系において, 各希 釈率で安定した槽内液を用いて菌体中の補酵素含量と菌 体活性の測定を行った.

Fig. 3 に示したように、コリノイド含量は希釈率 D= 0.1 d⁻¹までは希釈率とともに直線的に増加し、それ以上 の希釈率ではほぼ一定となり、その最大値は約 0.67 μ mol/g VSSであった.また、F₄₃₀含量もコリノイド含量 と同様に希釈率 D=0.1 d⁻¹まで希釈率とともに直線的に 増加し、それ以上の希釈率においてほぼ一定となり、そ の最大値は約 0.62 μ mol/g VSS であった.一方、水素資 化性メタン生成古細菌によるメタン生成反応 (C1 サイク ν) に関与する F₄₂₀相対活性は、希釈率を上げていくと 逆に大きく減少した.

コリノイドと F₄₃₀の増加傾向と菌体活性を比較する と、菌体活性が急激に増加する希釈率0.1 d⁻¹までの範囲 で補酵素含量も増加し、その後菌体活性が緩やかに増加 する希釈率0.1 d⁻¹ 以上では補酵素含量は一定していた. このことから、酢酸資化性メタン生成古細菌の能力は補 酵素含量により影響を受け、補酵素含量が一定した時点 で能力100(潜在能力)を有するものと思われる.しか し、酢酸資化性メタン生成古細菌は、潜在能力を100% 発現するのではなく、希釈率すなわち与えられた仕事量 (=希釈率×基質濃度)に応じてその潜在能力の発現を制 御しているものと思われる.

一方,希釈率の低い条件では,F₄₂₀相対活性が大きく 増加していた.これは低希釈率条件においてC1サイクル



Fig. 3. Effect of dilution rate on the methanogenic activity and concentrations of coenzyme F_{430} , corrinoids and F_{420} .

Table 3. Performance of continuous cultivation using completely stirred tank reactor (CSTR).

Reactor (mesophilic)	Maximum volumetric loading rate of TOC (g/l/d)	TOC removal efficiency (%)	VSS (g/l)	Specific TOC removal rate (g/g/d)
CSTR	4.8	96.9	0.91	5.3
AFBR	24	86	10	2.1

Table 4. Generation times of microorganisms related to methanogenesis.

	Average generation time				
	Reported ²⁴⁾	Experimental			
Aceticlastic methanogen (Methanosaeta)	$3\sim 7~{ m d}$	1.4 d			
Hydrogenotrophic methanogen (Methanobacterium)	$2\sim 4~{ m h}$				
Acetate-oxidizing bacteria	Approx. 30 d	$20 \sim 40 \ \rm d$			

による水素および二酸化炭素からのメタン生成活性が高いことを示す結果である。発生バイオガス中のメタン含量を測定したところ、高希釈率 ($D = 0.6 d^{-1}$) で50.7%、低希釈率 ($D = 0.025 d^{-1}$) で57.2%であった。酢酸資化性メタン生成古細菌は 1 mol の酢酸から 1 mol のメタンと1 molの2酸化炭素を生成する (Table 1(1)) ので、低希釈率条件における高いメタン含量は、水素資化性メタン生成古細菌の強い関与を示唆するものである。これらのことから、低希釈率条件では酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生により酢酸が分解される反応(Table 1(4)) の占める割合が高いと考えられる。

3.4 代謝変換 上述結果とTable 4 に示すメタン生成 反応に関与する微生物の増殖速度から以下のことが言え る.

Ni²⁺およびCo²⁺を十分量添加し、かつ希釈率を上げる、すなわち仕事量を高めることにより、酢酸資化性メタン生成古細菌は能力を最大限に発揮する.また、希釈率を上げることにより増殖速度の遅い酢酸酸化細菌³⁰⁾
 (Table 4)はwash outされる.その結果、酢酸は acetyl-CoAmethyl-CoMを経てメタンに変換される⁹⁾.

② 酢酸資化性メタン生成古細菌の能力を下げ,かつ希釈 率を0.05 d⁻¹以下にすることにより酢酸酸化細菌がリア クター内で増殖できるようになる.その結果,酢酸の一 部は,酢酸酸化細菌により二酸化炭素と水素に酸化分解 された後,C1サイクルによりメタンに変換される.

以上, 酢酸資化性メタン生成古細菌中の補酵素メチル コバラミンやF430含量を調節することにより,本菌の潜 在能力の発現を制御できることがわかった.また,酢酸 資化性メタン生成古細菌の能力に関係なく希釈率を0.05 d⁻¹以下に下げることにより,微生物群集構造の変化とそ れに伴う代謝変換が起こっていると考えられた.

各基質からのメタン生成経路と それに関与する微生物群集

メタン生成反応は、Ni²⁺および Co²⁺の添加により大 きく促進されることが分かった.また、希釈率の大小に よりメタン生成経路が変換することが示唆された.そこ で、各種基質を炭素源として Ni²⁺ および Co²⁺ を添加し た合成培地 (Table 2) を用いて CST リアクターで連続培 養を行い、異なる希釈率で微生物群集解析を行い、代謝 経路の変換とそれに関与する微生物群集を明らかにする ことを試みた.なお、グリセロールやタンパク質を基質 とするときは Ni²⁺ および Co²⁺ の添加・無添加の合成廃 水を用いて検討した.

4.1 実験方法

1) Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法

Amannの方法³¹⁾に基づきFISH実験を行った.連続培 養液 1.5 ml を遠心した沈殿を用いて細胞を固定した後, 固定化細胞懸濁液 3 µl をスライドガラスに付着させ,そ の後脱水した.

合成 DNA プローブとしては、2種の domain-specific プローブ EUB338 (*Bacteria* 検出用)³²⁾ および ARC915 (*Archaea* 検出用)³³⁾, 3種類の group-specific プローブ MB1174(*Methanobacteriaceae* 検出用), MC1109 (*Methanococcuceae* 検出用) および MG1200 (*Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanoplanaceae* 検出用), および 2種の genus-specific プローブ MS5 (*Methanosaeta* 検出用) および MB4 (*Methanosarcina* 検出用)³⁴⁾の合計7種類 を用いた. プローブ EUB338 および MS5 は5' 末端を Rhodamine でラベルし, ARC915, MB1174, MC1109, MG1200 および MB4 は5' 末端を FITC (fluoresceinisothiocyanate) でラベルした.

2) 発酵槽からのDNAおよびRNAの抽出¹¹⁾ 発酵 槽内液 30 ml を採取し、遠心分離(4°C, 10,000 rpm, 15 min)した沈殿物を1×PBS 30 ml で2回洗浄した.洗浄 後遠心分離した沈殿物を滅菌水100 µl (低希釈率培養液) または 300 µl (高希釈率培養液) に懸濁させて100 µl を 用いて DNA および RNA を抽出した. 試料の粉砕には Multi-Beads-Shocker (安井器械)を使用した.

3) 16S rRNA遺伝子クローンライブラリの作製と塩基 配列に基づく系統解析¹¹⁾ DNA サンプル 100 ng を鋳 型DNAとしてPCR反応による 16S rRNA遺伝子の増幅を 行った. PCR プライマーには 530F および 1490R(ユニ バーサルライブラリ用), EU27F および 1490R(*Bacteria* ライブラリ用), AR28F および 1490R(*Archaea* ライブラ リ用)¹⁹⁾ をそれぞれ用いた.

得られた PCR 増幅断片は、プラスミド pT7-Blue (Novagen) に連結し大腸菌 JM109 を用いてクローン 化した. 形質転換体から Wizard SV miniprep system (Promega) を用いてプラスミドを抽出し、挿入断片の 塩基配列を決定した. 得られた各プラスミド由来の塩基 配列を、それぞれ GENETYX ver. 5.1 ソフトウェアを用 いて編集後、BLASTNプログラムを用いて最近縁種を決 定した.

4) TaqManプローブを用いた定量 PCR¹¹⁾ 抽出した DNA 50 ng を鋳型とし反応には GeneAmp 5700 sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用 した. 定量 PCR に使用したプライマー/TagMan プロー ブは以下のように設計した. Methanosaeta 定量用には、プ ライマー MS1b, SAE835R およびプローブ SAE761 TAQ を用いた. Methanosarcina 定量用には、プライマーMB1b, SAR835RおよびプローブSAR761TAQを用いた. Methanoculleus 定量用には、プライマーAR934F, MG1200bお よびプローブMCU1023TAQを用いた. Methanospirillum 定量用には、プライマーAR934F, MG1200b およびプ ローブMSP1025TAQ¹⁵⁾を用いた. TaqManプローブは5' 末端をFAM (5-carboxyfluorescein) で、3'末端をTAMRA (N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine) で標識し たものを使用した.

5)連続培養液からの RNA の抽出と RT-PCR 実験¹³⁾ 抽出した total RNA を鋳型としてメタン生成関連遺伝 子 mcrA を標的とした RT-PCR 実験を行った. total RNA 100 ngを鋳型としてプライマーME2を用いてGene Amp Gold RNA PCR Reagent Kit (Applied Biosystems) によ る reverse transcription (RT) 反応を行った. 得られた 反応液20 µ1を鋳型として、プライマーセット ME1, ME2 および Ampli Taq (Applied Biosystems) を用いた PCR 反応を行い, 増幅産物をアガロースゲル電気泳動により 解析した.

6) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法による微生物叢の解析¹⁹⁾ 16S rRNA遺伝子のV3領 域をターゲットして, DGGE 法を用いて Archaea および Bacteria の diversity を解析した. Bacteria の増幅にはプラ イマー PRBA338Fおよび PRUN518Rを用いた. Archaea の増幅には nested PCR法を用いた. 1回目の増幅にはプ ライマー PRA46Fおよび PREA1100R, 2回目の増幅には プライマー PARCH340Fおよび PARCH519R をそれぞれ 使用した. PCR 産物の電気泳動には, DCode Universal Mutation Detection System (BioRad Laboratories) を用 いた.

4.2 酢酸を分解する微生物群集の構造と機能¹¹⁻¹³⁾

酢酸はメタン発酵プロセスにおいて量的に最も多い中 間代謝物と考えられている³⁵⁾. そこで,酢酸を唯一の基 質とする合成廃水を供給することにより,酢酸を分解す る微生物群集の連続培養を行った.微量元素(Ni²⁺, Co²⁺)を添加することにより,最大希釈率0.7 d⁻¹を達成 できたので(3.2参照),希釈率0.025 d⁻¹(低希釈率)と 0.6 d⁻¹(高希釈率)の2つの条件での微生物群集の構造 と機能を解析した.



Fig. 4. Photomicrographs of phase contrast views (A, C) and FISH results (B, D) for the acetate-degrading methanogenic communities. Panels A and B are for the cells cultivated at the dilution rate of 0.025 d^{-1} and panels C and D are for the cells at 0.6 d^{-1} . The fluorescent probes utilized were the combination of ARC915 (green) and EUB338 (red) (for panels B, D). Bar represents $10 \,\mu$ m.

1) 酢酸を分解する微生物群集の構造¹¹⁾ 槽内液を 採取し, FISH実験を行った (Fig. 4). その結果, 低希釈 率条件 (D = 0.025 d⁻¹) においても高希釈率条件 (D = 0.6 d⁻¹) においても*Archaea* が優占していた. *Archaea* の 細胞の形状には両希釈率で優占していた糸状のものと 高希釈率で優占していた房型の2種類が検出された. Genus-specific プローブを用いて FISH を行ったところ, それぞれ*Methanosaeta*属と*Methanosarcina*属であることが 示された. *Archaea* と *Bacteria* の比率は, 高希釈率条件に 比べて低希釈率条件の方が *Bacteria* の比率が高いことが 判明した.

希釈率0.025 d⁻¹(低希釈率)と0.6 d⁻¹(高希釈率)の 2つの条件での槽内液から DNAを抽出し, 16S rRNA遺 伝子のユニバーサルライブラリを構築した.塩基配列に 基づく系統分類を行った結果,低希釈率条件では全体の 43%が,高希釈率条件では72%が Archaea であった.両 希釈率条件ともに, Archaea では酢酸資化性の Methanosaeta 属および Methanosarcina 属に分類されるクローンが検出 された.また, Bacteria では Firmicutes 門に分類されるク ローンが多くを占めていた(Table 5).

メタン生成古細菌に対する定量 PCR 実験を行った結 果,両希釈率条件で,Methanosaeta 属の16S rRNA遺伝子 量には有意な差が認められず,Methanosarcina 属は高希 釈率条件の方が多く(約100倍)検出された(Fig. 5).ま た,水素資化性のMethanoculleus 属が低希釈率条件での み検出された.以上のことから,高希釈率条件では Methanosarcina 属の酢酸資化性メタン生成古細菌が優占 して酢酸の分解に関与することが示された.低希釈率条

Dilution rate (d ⁻¹)	0.025 (AL	0.025 (ALU library)		J library)
Taxon (Phylum)	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
Archaea				
Euryarchaeota				
Methanosarcina	4	23	5	47
Methanosaeta	5	20	2	19
Bacteria				
Firmicutes	16	36	12	15
Cytophagales	8	9	5	7
Candidate division OP12	5	5	3	3
Chloroflexi	3	6	_	_
Proteobacteria	_	_	1	1
Unclassified	1	1	—	_
Total	42	100	28	92

Table 5. Distribution of 16S rRNA gene clones detected in culture broth of acetate-fed chemostats.

OTU, operational taxonomic unit.



Fig. 5. Quantification of 16S rRNA genes of Methanosaeta, Methanosarcina and Methanoculleus (Methanoculleus was not detected at the dilution rate of 0.6 d⁻¹.) □, Methanosaeta; □, Methanosarcina; □, Methanoculleus.

件でのみ検出された Methanoculleus 属の水素資化性メタン生成古細菌の酢酸分解に関する役割は,酢酸酸化細菌との共生分解であると考えられる.既知の酢酸酸化細菌はすべてFirmicutes門に分類されている³⁶⁻³⁸⁾ので,クローン解析によって検出されたこのグループに分類された

Bacteriaが、低希釈率条件で酢酸酸化に関与している可能 性が高い.なぜなら、酢酸酸化細菌の比増殖速度は約 0.027-0.035 d⁻¹と非常に低いからである³⁹⁾.

 2) 酢酸分解に関与するメタン生成古細菌のmcrA遺伝 メタン生成反応を触媒する methyl 子の発現解析¹³⁾ coenzyme M reductase 遺伝子 (mcr) は, 研究されたすべ てのメタン生成古細菌において存在が確認されている40). 発酵槽内から RNA を抽出し, mcrA 遺伝子を標的とした RT-PCR を行い、転写産物を解析した(Table 6)¹³⁾. 高 希釈率由来のライブラリを解析したところ、21クローン 中20クローンが Methanosarcina 属の mcrA 遺伝子であり、 1クローンが Methanosaeta 属の mcrA 遺伝子であった. 一 方、低希釈率では、解析した21クローン中、4クローン がMethanosaetaa属のmcrAであり、17クローンがMethanoculleus 属のmcrA遺伝子であった. この結果は、定量 RT-PCR実験の結果からも支持された.低希釈率条件におい ては、高希釈率条件に比べて水素資化性メタン生成古細 菌である Methnoculleus 属のメタン生成活性が高いことが 示唆された.

3) 安定同位体標識した基質を用いた酢酸分解経路の 解析¹³⁾ 酢酸資化性メタン生成古細菌は, 酢酸のメチ ル基をメタンに、カルボキシル基を二酸化炭素に変換す る.一方.酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌 の共生による経路を経由する場合, 酢酸の2個の炭素が いったん2個の二酸化炭素に変換されてから、そのうち 1個がメタンに変換される.したがって、もしこの共生 経路のみで酢酸が分解されるとすると、酢酸のメチル 基由来のメタンとカルボキシル基由来のメタンが 1/2 ず つ生じ、酢酸のメチル基由来の二酸化炭素とカルボキシ ル基由来の二酸化炭素が1/2ずつ生じることになる。そ こで、両希釈率の発酵槽内液を採取し、簡易型ガス発生 装置(3.1,2)参照)を用いて、安定同位体標識した基質 を用いたトレーサー試験を以下のように行った13). 槽内 液 10 ml を洗浄後バイアル瓶に採取し、¹³CH₃¹³COONa, CH₃¹³COONa, または¹³CH₃COONaの3種類の基質 を添加した後,発生ガスのGC/MS分析を行った.

Table 6. Composition of and quantification of *mcrA* transcripts of three taxonomic groups.

P ¹ (11)		0.00 ×		
Dilution rate (d^{-1})		0.025		0.6
Phylogenetic affiliation	No. of clones	Quantitative RT-PCR (copies/mg total RNA)	No. of clones	Quantitative RT-PCR (copies/mg total RNA)
Methanosaeta spp. mcrA	4	ND	1	ND
Methanosarcina spp. mcrA	0	ND	20	$4.15 imes 10^7$
Methanoculleus spp. mcrA	17	$9.06 imes 10^6$	0	ND

ND, not detected. The primers ME1 and ME2 used in this study were reported not to be suitable for amplification of the *mcrAs* of the genus *Methanosaeta*.

The values for quantitative RT-PCR are the average of duplicated experiments.

Table 7.	GC-MS analysis o	f CH ₄ and CO ₂	produced from	¹³ C-labeled acetate.
----------	------------------	---------------------------------------	---------------	----------------------------------

			Peak intensities			
Dilution rate (d ⁻¹)	Substrate	m/z 15	5 (¹² CH ₄)	m/z 17 (¹³ CH ₄)	CH4 from carboxyl-base /	CH ₄ from
		Actual	Background subtracted ^a	Actual	total CH ₄	total CH ₄
	¹³ CH ₃ ¹² COONa	2,695	2,695	5,474	0.33	0.67
0.025	¹² CH ₃ ¹³ COONa	1,139	1,139	928	0.45	0.55
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	0		1,361		
	¹³ CH ₃ ¹² COONa	81,973	14,066	614,114	0.022	0.98
0.6	¹² CH ₃ ¹³ COONa	636,401	562,089	13,860	0.024	0.98
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	74,312		588,433		

GC-MS analysis of CH₄ produced from ¹³C-labeled acetate.

GC-MS analysis of CO₂ produced from ¹³C-labeled acetate.

			Peak intensities	CO ₂ from methyl-base /	CO ₂ from carboxyl- base /	
Dilution rate (d ⁻¹)	Substrate	m/z 44	m/z 44 (¹² CO ₂)			
		Actual	Background subtracted ^a	Actual	total CO ₂	total CO ₂
	¹³ CH ₃ ¹² COONa	4,041	2,635	1,196	0.31	0.69
0.025	¹² CH ₃ ¹³ COONa	3,424	2,018	4,296	0.32	0.68
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	1,406		3,380		
	¹³ CH ₃ ¹² COONa	87,919	79,915	5,302	0.062	0.94
0.6	¹² CH ₃ ¹³ COONa	12,951	4,947	80,702	0.058	0.94
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	8,004		73,096		

 $^{\rm a}$ Peak intensities at m/z values of 44 from $^{13}{\rm CH_3^{13}COONa}$ were regarded as the background.

All values are the average of duplicated experiments.

CH₃¹³COONa を基質とした場合に発生する¹³CH₄ およ び¹³CH₃COONa を基質とした場合に発生する¹³CO₂ を 酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生によ る経路(Table 1 (4)) 由来のガスと判断し,メタン生成 反応全体に対する共生経路の割合を算出した(Table 7).

その結果、メタン、二酸化炭素いずれの物質を指標と しても、メタン生成反応全体に占める共生経路の割合が、 高希釈率 (D=0.6 d⁻¹) に比べて低希釈率 (D=0.025 d⁻¹) において高い結果となった. 共生経路の寄与率を計算し たところ、高希釈率条件では1~5%であり、低希釈率条 件では62~90%であった. このことから, 高希釈率条件 では酢酸資化性メタン生成古細菌による経路が、低希釈 率条件では共生経路が、それぞれ主要な酢酸分解経路で あることが判明した. 酢酸資化性メタン生成古細菌 Methanosarcina 属, Methanosaeta 属, そして酢酸酸化細菌 (水素資化性メタン生成古細菌との共生)の比増殖速度は それぞれ 0.98 d⁻¹, 0.24-0.26 d⁻¹, 0.027-0.035 d⁻¹ と報 告されている^{39,41)}.したがって、本実験の高希釈率条件 は、増殖速度の高い酢酸資化性メタン生成古細菌、特に Methanosarcina 属に有利な環境と考えられる.一方,酢 酸に対する Km 値は、それぞれ 3-5 mM, 0.8-0.9 mM, 0.65 mMであり^{42,43)}. 酢酸酸化細菌が最も酢酸に対する

基質親和性が高い.本実験の低希釈率条件では,増殖速 度の上ではこれらの3種の酢酸代謝微生物は十分細胞数 を維持できるが,基質親和性の差により酢酸酸化細菌に 有利な環境となったと考えられる.

4.3 プロピオン酸を分解する微生物群集の構造と機 能^{12,15)} プロピオン酸は、酢酸と並んでメタン発酵の 主要な中間産物とされている⁴⁴⁾.プロピオン酸の分解反 応はメタン発酵プロセスの律速段階と考えられており, 高負荷条件でメタン発酵処理する場合や、発酵槽のトラ ブルなどが生じると、主としてこの有機酸が発酵槽内に 蓄積する.そこで、プロピオン酸を唯一の基質とする合 成廃水を供給することにより分解に関与する微生物群集 の連続培養を行った¹⁵⁾.

1) プロピオン酸分解メタン発酵プロセスの構築

リアクター中の種汚泥に対して、プロピオン酸合成廃水 を連続供給したところ、プロピオン酸の分解は見られず、 連続培養系の立ち上げに失敗した.次に、酢酸とプロピ オン酸をモル比で3:1になるように調整した酢酸・プロ ピオン酸合成廃水(Table 2)を希釈率0.01 d⁻¹で供給し たところ、運転開始から30日後に槽内のプロピオン酸濃 度が検出限界以下まで低下した.そこで、運転開始後70 日目に酢酸を含まないプロピオン酸合成廃水に切り換え



Fig. 6. (a) Effect of dilution rate on concentrations of TOC and volatile fatty acids (VFA), gas production rates, methane content in biogas and volatile suspended solid (VSS) concentration under steady-state conditions at each dilution rate.
(b) Effect of dilution rate on concentrations of coenzymes related to methanogenesis F₄₃₀, corrinoids, and F₄₂₀.

たが、プロピオン酸は完全に分解されていたので、希釈 率を段階的に上げた、プロピオン酸を単独基質とする連 続培養系においても希釈率 $D = 0.01 \sim 0.3 d^{-1}$ の間で安 定しており、供給するプロピオン酸をほぼ完全に無機化 していた(Fig. 6).

槽内のメタン生成関連補酵素量を測定した結果,希釈 率の増加に伴い補酵素 F_{430} およびコリノイド含量は増加 した.一方,補酵素 F_{420} 相対活性は希釈率の増加に伴い 減少した.また,バイオガス中のメタン含量も低希釈率 条件 ($D = 0.01 d^{-1}$)で84.0%,中希釈率条件 ($D = 0.08 d^{-1}$)で66.5%,高希釈率条件 ($D = 0.3 d^{-1}$)で63.8%と 希釈率の増加に伴い減少した.これらの結果は,酢酸を 分解する発酵槽での結果と一致ており,プロピオン酸を 分解する発酵槽内においても,低希釈率条件下では,高 希釈率条件に比べてプロピオン酸から生成した酢酸が, 主として酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の 共生経路によりメタンに変換されると考えられる.

また、F420相対活性およびバイオガス中のメタン含量 は、解析したいずれの希釈率条件でも酢酸合成廃水を供 給するメタン発酵槽(D = 0.025 d⁻¹)に比べて高かった. この結果は、プロピオン酸の共生分解に水素資化性メタ ン生成古細菌が必要であるため、槽内の微生物全体に占 める水素資化性メタン生成古細菌の割合が酢酸を基質と した場合に比べて大きいことを示唆するものである.



Fig. 7. Phase-contrast photomicrographs (a, c) and results of FISH (b, d) for microorganisms in propionate-fed chemostat at dilution rates of 0.01 d⁻¹ (a, b) and 0.3 d⁻¹ (c, d). Fluorescent probes were combination of ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents $20 \,\mu$ m.

2) プロピオン酸を分解する微生物群集の構造 2種 類のdomain-specific probesを用いて,FISH実験を行っ た(Fig. 7).希釈率にかかわらず,Archaeaが優占して存 在し,形状は糸状のものが多く検出された.Bacteriaは希 釈率を上げるにつれ生成される微生物群の塊状部分に局 在していた.また,水素資化性メタン生成古細菌の各分 類グループに特異的なプローブを用いてFISH実験を 行った結果,槽内に優占している水素資化性メタン生成 古細菌はMathanomicrobiaceae科に近縁なArchaeaであるこ とがわかった.

希釈率0.01 d⁻¹ (低希釈率), 0.08 d⁻¹ (中希釈率), 0.3 d⁻¹(高希釈率)の条件の槽内液からそれぞれ DNA を抽 出し, 16S rRNA遺伝子クローンライブラリを構築し, 塩 基配列に基づく系統解析を行った(Table 8). 低希釈率 および中希釈率条件では酢酸資化性メタン生成古細菌で ある Methanosaeta concilii に近縁なクローンおよび水素資 化性メタン生成古細菌である Methanoculleus 属に分類さ れるクローンが検出された. 中希釈率および高希釈率条 件においては Methanospirillum 属に分類されるクローン も検出された.一方, Bacteria ライブラリの解析結果か ら,低希釈率条件では,Deltaproteobacteria 綱に属するプ ロピオン酸酸化細菌である Syntrophobacter 属⁴⁵⁻⁴⁸⁾ に近縁 なクローンが多く検出されたが、中希釈率および高希釈 率条件では Firmicutes 門に属するプロピオン酸酸化細菌 である Pelotomaculum 属^{49,50)} に近縁なクローンが多く検 出された.

次にメタン生成古細菌に対する定量 PCR 実験を行った. その結果,希釈率にかかわらず*Methanosaeta* 属の16S rRNA遺伝子量に有意な差は認められなかった(Table 9).

Table 8.	Distribution	of $16S$	rRNA	gene	clones	detected	in
cultu	re broth of pi	ropiona	te-fed c	hemo	stats.		

	Dilution rate (d ⁻¹)						
	0.	01	0.	0.08		.3	
Taxon	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	
Archaea	PLA	brary	PMA l	ibrary	PHA l	ibrary	
Euryarchaeota							
Methanoculleus	5	15	3	6	1	1	
Methanospirillum	_	_	2	3	2	16	
Methanosaeta	1	2	1	2	—	—	
Total (Archaea)	6	17	6	11	3	17	
Bacteria	PLB 1	ibrary	PMB library		PHB library		
Firmicutes	4	5	6	10	5	7	
Proteobacteria							
Deltaproteobacteria	1	10	_	_	1	1	
Alphaproteobacteria	_	_	1	1	_	_	
Candidate division OP3	1	3	1	2	1	3	
Total (Bacteria)	6	18	8	13	7	11	

OTU, operational taxonomic unit.

また、希釈率にかかわらず Methanosarcina 属は検出され なかった.一方、Methanoculleus 属は低希釈率および中希 釈率条件でのみ検出され、Methanaospirillum 属は中希釈 率および高希釈率条件でのみ検出された.これらの結果 から、希釈率の違いによりプロピオン酸分解に関与する 主要な微生物の種類が異なっていることがわかった.

以上の結果から、プロピオン酸の分解に主要に関与す る微生物の種類が、希釈率条件により差異が見られるこ とが明らかになった. 低希釈率条件では、プロピオン酸 は Syntrophobacter 属などのプロピオン酸酸化細菌により 酢酸と水素、二酸化炭素に分解される. しかし、高希釈 率条件では、Pelotomaculum 属に近縁な Bacteria が主とし てプロピオン酸の分解に従事する.プロピオン酸の分解反 応により生じた水素および二酸化炭素は、低希釈率条件 ではMethanoculleus属により、高希釈率条件ではMethanoculleus属およびMethanospirillum属によりメタンに変換さ れると考えられる. また、プロピオン酸の分解により生じた酢酸は、低 希釈率条件では Methanosaeta 属および酢酸酸化細菌と Methanoculleus 属水素資化性メタン生成古細菌によりメ タンに変換され、高希釈率条件では Methanosaeta 属、特 に Methanosarcina 属によりメタンに変換されると考えら れる。

4.4 酪酸系を分解する微生物群集の構造と機能¹⁷⁾

1)連続培養による酪酸分解メタン発酵プロセスの構築 酪酸はプロピオン酸同様,脂肪酸酸化細菌と水素 資化性メタン生成古細菌による熱力学的共生反応により 進行する.しかし,酪酸を単一炭素源とする合成廃水を 連続供給したところ,プロピオン酸とは異なり簡単に連 続培養を立ちあげることができたので,希釈率Dを0.025 d⁻¹から0.7 d⁻¹まで段階的上げて運転した.Dを0.5 d⁻¹ 以上に上げると有機酸は徐々に残存したが,連続培養は D=0.7 d⁻¹まで安定しており,たとえば D=0.45 d⁻¹ (TOC 容積負荷 3.6g/l/d に相当)の条件においてもTOC 除去率は96%であった.

2) 希釈率による微生物群集構造の変化 クローン 解析とDGGE法により, D=0.025 d⁻¹から0.7 d⁻¹までの 微生物叢を解析し, 酪酸のメタン発酵に関与する微生物 および希釈率の微生物群集への影響を調べた.

低希釈率として0.025 d⁻¹, 高希釈率として0.45 d⁻¹で の 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリを構築し, ク ローンの系統分類をTable 10に示した. また, 希釈率に よる微生物叢の変遷を DGGE 法で調べたところ, Fig. 8 および Fig. 9に示したように Archaea および Bacteria はと もに希釈率により大きく変化した.

Archaeaに関しては、すべての希釈率で酢酸資化性メタン生成古細菌である Methanosaeta 属と水素資化性メタン 生成古細菌である Methanoculleus 属が検出された.しかし 希釈率を高めていくと、水素資化性メタン生成古細菌で ある Methanospirillum 属は希釈率0.2 d⁻¹以上で, Methanogenium 属は希釈率0.1 d⁻¹から0.4 d⁻¹の範囲で検出され た.これはそれぞれの属の生育速度と基質に対する親和

Table 9. Quantification of 16S rRNA genes in culture broth of propionate-fed chemostat. (Unit, 16S rRNA gene copies/ 50 ng-DNA)

Primers (TagMan proha)	Tangat anganiam	Dilution rate (d ⁻¹)			
rimers (raqman probe)	Target organism	0.01	0.08	0.3	
Ar28F/ARC915	Archaea	$1.61 imes 10^7$	NT	$1.13 imes 10^7$	
EU27F/Eu518R	Bacteria	8.48×10^{6}	NT	$6.30 imes 10^6$	
MS1b/SAE835R (SAE761TAQ)	Methanosaeta spp.	$1.26 imes 10^7$	$3.49 imes 10^7$	$1.95 imes 10^6$	
MB1b/SAR835R (SAR761TAQ)	Methanosarcina spp.	ND	ND	ND	
AR934F/MG1200b (MCU1023TAQ)	Methanoculleus spp.	1.68×10^6	$3.51 imes 10^7$	2.94×10^6	
AR934F/MG1200b (MSP1025TAQ)	Methanospirillum spp.	ND	$5.27 imes 10^5$	6.71×10^5	

NT, not tested. ND, not detected. All values are averages of duplicate experiments.

	Dilution rate (d ⁻¹)						
Taxon	0.02	5 (c)	0.43	5 (a)			
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones			
Archaea	BLA l	ibrary	BHA	library			
Euryarchaeota							
Methanosaeta	5	45	5	38			
Methanosarcina	_	_	2	2			
Methanoculleus	2	2	1	5			
Methanospirillum	_	_	3	5			
Total (Archaea)	7	47	11	50			
Bacteria	BLB 1	ibrary	BHB	BHB library			
Firmicutes	2	2	17	26			
Proteobacteria	3	46	2	2			
Candidate division OP3	_	_	4	18			
Spirochaetes	_	_	2	2			
Deferribacteres	_	_	1	1			
Chloroflexi	2	2	—	—			
Total (Bacteria)	7	50	26	49			

Table 10. Distribution of 16S rRNA gene clones detected in culture broth of butyrate-fed chemostats

OTU, operational taxonomic unit.

性に差があると考えられる^{43,51-53)}.また,酢酸資化性メ タン生成古細菌である*Methanosarcina*属は希釈率0.35 d⁻¹ 以上で検出された.*Methanosaeta*属の最大生育速度は0.3 d⁻¹と報告されているが⁴¹⁾,集団生育により0.3 d⁻¹より 高い希釈率でも生育したと考えられる.*Methanosarcina* 属が低希釈率で少なかった原因は,*Methanosarcina*属の 基質に対する親和性は*Methanosaeta*属より低いためと考 えられる43).

Bacteria については、低希釈率 0.025 d-1 での群集構造 はそれ以外の希釈率の群集構造と明確に異なっていた. 検出された微生物のほとんどは Proteobacteria 門に属して おり、近縁な微生物に *B* 酸化経路を有するプロピオン酸 酸化細菌である Smithella propionica がいる. 希釈率の増加 とともにFirmicutes 門とCandidate division OP3に分類さ れる Bacteria が優占種になった. Firmicutes 門に分類され た微生物の一部は、脂肪酸β酸化細菌である Syntrophomonas 属と Clostridium 属に近縁であった. Syntrophomonas 属 に属する微生物は数種類おり、それぞれが出現する希釈 率の範囲に違いがあったが、傾向として希釈率が高くな るほどその比率は高くなった. Syntrophomonas 属の株は 水素資化性メタン生成古細菌と共存すると、比増殖速度 は 0.19 d-1 から 0.6 d-1 まで向上すると報告されている が54-57).研究結果によると水素資化性メタン生成古細菌 だけでなく酢酸資化性メタン生成古細菌と共存すると、 増殖速度は向上すると考えられる^{54,58)}. Firmicutes 門に分 類されたその他の微生物は、すでに培養されている微生 物とは系統的に離れており、本研究の酢酸とプロピオン 酸のメタン発酵リアクターから得られたクローンと新 規なクラスターを形成した. DGGEではこれらの微生物 の割合は高くないが、ほとんどの希釈率で検出されたの で、酪酸の分解にとって重要な微生物群集と考えられる. 一方, Candidate division OP3 に分類された微生物はす べての希釈率(0.25 d-1~0.7 d-1)で検出され、しかも Bacteriaの中で高い割合を占めた.しかし、近縁な塩基配



Fig. 8. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of archaeal-16S rRNA gene fragments derived from community DNA extracted from the butyrate-fed chemostats and fragments derived from clones used as standards (S1 and S2). Community DNA from the chemostat at dilution rates of 0.025 to 0.7 d⁻¹ were used as templates. Major bands are numbered A1 to A8. Letters beside the dilution rate refer to different samples under the same dilution rate.



Fig. 9. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of bacterial-16S rRNA gene fragments derived from community DNA extracted from the butyrate-fed chemostats. Community DNA from the chemostat at dilution rates of 0.025 to 0.7 d⁻¹ were used as templates. Lane S1 was the fragment derived from OTU BLB03 (*Syntrophaceae, Deltaproteobacteria*). Major bands are numbered B1 to B19. The fragments of representative clones with approximate migratory positions in the DGGE profile are schematically illustrated beside the result of DNA samples and the ratio of the clone in its library is shown in parenthesis. Letters beside the dilution rate refer to different samples under the same dilution rate.

列はすべて環境サンプルから取ったクローンであるの で、これらの Candidate division OP3 に分類された微生 物の発酵槽内での役割を推測することは困難であった. 最も近縁なクローンは Clone GIF10で、クロルベンゼン を処理するリアクターから得られたもので、中間代謝物 安息香酸の芳香環を分解した後、β酸化経路によって酢 酸まで分解すると考えられている⁵⁹.

以上, 酪酸は希釈率にかかわらず β 酸化経路を経て酢酸と水素に分解された後、メタンに変換されるが、希釈率によりそれぞれの反応に関与する微生物群集構造は異なっていた.高希釈率では、酪酸はFirmicutes 門のSyntrophomonas属およびCandiate division OP3門のBacteriaにより β 酸化経路を経て酢酸と水素に分解され、酢酸はMethanosarcinaとMethanosaetaによりメタンに、生成された水素と二酸化炭素はMethanoculleusとMethanospirillumによりC1サイクルを経てメタンに変換される.低希釈率では、酪酸はProteobacteria 門のSmithella propionicaに近縁のBacteria により β 酸化経路を経て酢酸と水素に分解される.生成された酢酸の一部は、Methanosaeta により直接メタンに変換されるが、残りの酢酸は酢酸酸化細菌により水素と二酸化炭素に分解され、MethanoculleusによりC1サイクルを経てメタンに変換される.

4.5 脂質系(高級脂肪酸)を分解する微生物群集の構造 と機能¹⁶⁾ 脂質を多く含む廃水や廃棄物は,理論的に はメタンの高収率を生むためにメタン発酵の基質として 有用と考えられている.しかし、実際には脂質の加水分 解により高濃度の高級脂肪酸が蓄積し、これらがメタン 発酵槽内の微生物に毒性を示すことから、脂質を高濃度 含有する廃水などのメタン発酵は困難であるとされてい る⁶⁰⁻⁶²⁾.そこで、高級脂肪酸のメタン発酵プロセスを構 築し、微生物群集を解析した¹⁶⁾.また、脂質の加水分解 で生成されるグリセロールについては**4.6**に後述した.

1) 高級脂肪酸の分解のためのメタン発酵プロセスの 構築 高級脂肪酸を供給するメタン発酵処理では、D (希釈率) =0.2~0.4 d⁻¹まで安定した処理が行えた. 高 級脂肪酸の分解によって残存する有機酸は酢酸とプロピ オン酸であり、最大希釈率 D=0.4 d⁻¹におけるそれぞれ の値は30 mg/l, 15 mg/lであった. また供給した高級脂肪 酸は直接分析で検出されず、処理水 TOC 濃度も100 mg/ l以下, さらに発生バイオガス中のメタン含量が70~80 %であり、ほぼ完全にガス化していた.

2) 高級脂肪酸を分解する微生物群集の構造と機能

 $D=0.4 d^{-1}$ で定常状態に達した高級脂肪酸 CSTR 槽内 液を用いて FISH 実験を行った(Fig.10). その結果,発 酵槽内には*Bacteria* が優占して存在することがわかった. これらが,高級脂肪酸の β -酸化に関与する *Bacteria* であ ると考えられる. メタン生成を担うメタン生成古細菌も わずかではあるが検出された.



Fig. 10. Phase-contrast photomicrograph (A) and results of FISH (B) of microorganisms in chemostat with long chain fatty acid (LCFA) introduced at dilution rate of 0.4 d⁻¹. The fluorescent probes used were ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents $20 \,\mu$ m.

Table 11. Distribution of 16S rRNA gene clones detected in culture broth of chemostats fed with long-chain fatty acids (LCFA).

Taxon	No. of OTUs	No. of clones			
Archaea	LCFA-A library				
Euryarchaeota					
Methanosaeta	2	15			
Methanospirillum	1	3			
Total (Archaea)	3	18			
Bacteria	LCFA-B library				
Bacteroidetes	4	10			
Spirochaetes	2	6			
Firmicutes	3	3			
Proteobacteria	1	1			
Total (Bacteria)	10	20			

OTU, Operational taxonomic unit.

槽内液由来の Archaea 16S rRNA 遺伝子ライブラリか ら 18 クローン, Bacteria 16S rRNA 遺伝子ライブラリか ら20クローンの全塩基配列(約1.5 kb)をそれぞれ決定 した.得られた配列に基づいて系統分類を行った.Table 11に示したようにArchaea ライブラリから得られた18ク ローンのうち, 15クローンはMethanosaeta conciliiに近縁 であり,残り3クローンはMethanospirillum hungateiに近縁 であった. M. concilii は中温で生育する酢酸資化性メタン 生成古細菌であり, M. hungatei は水素資化性メタン生成 古細菌である.水素からメタンへの反応は、ΔG⁰=-135.6 kJ(Table 1)と発熱反応であるために熱力学的にも進み やすい反応である.一方,高級脂肪酸が低分子化する反応 は吸熱反応であるために一般的には進みにくい反応であ る.しかし、水素資化性メタン生成古細菌の働きにより、 totalの反応の AG が負となることで反応が進行する²⁵⁾. 一方, Bacteria ライブラリから得られた20クローンのう ち,10クローンがBacteroidetes 門,6クローンがSpirochaetes 門, 3クローンがFirmicutes門, 1クローンがProteobacteria 門に分類された. Firmicutes 門に分類されたクローンの 中で, 既知の脂肪酸のβ-酸化細菌である Syntrophomonas

希釈率0.4 d⁻¹の抽出DNAを鋳型としてArchaeaの16S rRNA遺伝子を標的としたDGGE解析を行った.データ を示さなかったがArchaeaについては、高級脂肪酸のメタ ン発酵槽内にはMethanosaeta属とMethanospirillum属が優 占しており, BacteriaについてはBacteroidetes門, Spirochaetes 門, Firmicutes門が優占していることがわかった. これら の結果はクローン解析の結果とほぼ一致するものであっ た.

以上、高級脂肪酸の CSTR によるメタン発酵処理を 行った結果、希釈率D=0.4d⁻¹で安定した処理が行え、発 酵槽内に Bacteria が優占することが分かった. Bacteria の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析では既知の高級脂肪酸 の β -酸化細菌である Syntrophomonas 属(Firmicutes 門)に 近縁なクローンが 1 クローンしか検出されなかったが、 Firmicutes 門以外の Bacteroidetes 門、Spirochaetes 門に属す微 生物が多く検出され、これらの微生物も高級脂肪酸の分 解に関与しているものと思われた. また、DGGE におい ても同様の結果が得られた. Archaea については、水素資 化性である Methanospirillum と酢酸資化性である Methanosaeta が検出された. このことから、高級脂肪酸の分解は、 水素資化性メタン生成古細菌との共生で進行し、生成さ れた酢酸は酢酸資化性メタン生成古細菌によりメタンに 還元されるものと考察した.

4.6 グリセロールを分解する微生物群集の構造と機能⁶⁴⁾

グリセロールを分解する微生物群集の解析については 以下のように行った.まず有機酸への分解過程および それに関与する微生物叢を明らかにするために, Ni²⁺, Co²⁺無添加の合成廃水の連続処理試験(酸生成過程)を 行った.その後, Ni²⁺, Co²⁺添加の合成廃水のメタン発 酵処理試験を行い,酸生成過程で停止させた時およびメ タン生成過程まで行わせた時の槽内微生物叢の変化を明 らかにした.

1) Ni²⁺およびCo²⁺添加・無添加合成廃水を用いた連 続培養 Ni²⁺, Co²⁺ 無添加合成廃水の嫌気性処理で は、D(希釈率)=0.05~0.1 d⁻¹まで安定した処理が行 えた.グリセロールの分解によって生じる有機酸は酢酸 とプロピオン酸であり、希釈率 D=0.1 d⁻¹においてそれ ぞれ347 mg/l, 1012 mg/lが発酵槽内より検出された.ま た、供給したグリセロールは直接分析により検出されな かった.しかし希釈率 Dを0.2 d⁻¹に上げると、有機酸お



Fig. 11. A Phase-contrast photomicrograph (**a**, **c**) and a result of FISH (**b**, **d**) for microorganisms in Glycerol-fed chemostat without (**a**, **b**) and with (**c**, **d**) Ni²⁺ and Co²⁺ addition at a dilution rate of 0.1 d⁻¹. Fluorescent probes were combination of ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents 10 μ m.

よびVSSが減少しグリセロールが残存したのでwash out したと判断し,最大希釈率Dを0.1 d⁻¹とした.

一方, Ni²⁺, Co²⁺ を添加したグリセロール合成廃水を 供給するメタン発酵プロセスは, 希釈率0.1 d⁻¹(滞留時 間10日)の条件で安定した処理が行えた. この希釈率に おいてグリセロールの分解率は約100%, 処理水 TOC 5 mg/l, 槽内VSS 305 mg/lであり, バイオガス中のメタン 含量は65.8%であった. Ni²⁺, Co²⁺を添加することによ り, 有機酸で止まることなくメタンにまで変換されるこ とが分かった.

2)Ni²⁺とCo²⁺添加・無添加での連続培養での微生物 Ni²⁺, Co²⁺無添加合成廃水の嫌気性処理 群集の比較 プロセスにおいて, D=0.1 d-1 で定常状態に達した槽内 液を用いて微生物群集の解析を行った. FISH 実験の結 果, Bacteria が優占して存在することがわかった (Fig. 11 a, b). しかし、メタン生成を担うメタン生成古細菌もNi, Co 無添加にもかかわらず、わずかではあるが観察され た. Table 12 は, 16S rRNA 遺伝子のクローン解析の結 果を示している.リアクター内培養液由来のArchaea ライ ブラリから 16 クローン, Bacteria ライブラリから 21 ク ローンの全塩基配列をそれぞれ決定した. Archaea ライブ ラリから得られた16クローンのうち、7クローンは Methanosarcina barkeriに近縁であり,残りの9クローンは, Methanobrevibacter arboriphilus に近縁であった. M. barkeri は中温で生育する酢酸・水素資化性メタン生成古細菌と して知られているが、高水素分圧の条件下でのみ生育す る微生物であると認識されていた.しかし、今回グリセ

Table 12.	Distribution of 16S rRNA gene clones detected in	ı
the cu	ture broth of the glycerol-fed chemostats.	

Town	Chemostat Ni ²⁺ an	1 (without d Co ²⁺)	Chemostat 2 (with Ni ²⁺ and Co ²⁺)		
Taxon	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No.of clones	
Archaea	GLY 1A	library	GLY 2A	library	
Euryarchaeota					
Methanosarcina	1	7			
Methanosaeta	_	_	1	5	
Methanobrevibacter	1	9	_	_	
Methanospirillum	—	—	1	16	
Total (Arcahea)	2	16	2	21	
Bacteria	GLY 1P	library	GLY 2B library		
Firmicutes			—	—	
A cidamino coccacea e	1	11	—	—	
Eubacteriaceae	1	9	—	—	
Clostridiaceae	1	1	_	_	
Actinobacteria	_	_			
Propionibacteriaceae	_	_	1	16	
Proteobacteria	_	_			
Desulfovibrionaceae	_	_	2	2	
Syntrophobacteraceae	—	—	1	1	
Total (Bacteria)	3	21	4	19	

OTU, operational taxonomic unit.

ロールの発酵槽から検出されたことは水素分圧が高くな くても生存できることが分かった. Bacteria ライブラリか ら得られた 21 クローンは、すべて Firmicutes 門に分類さ れた.報告されているグリセロール分解菌もFirmicutes門 に属すものが多く、今回構築したリアクター内でこれら の微生物がグリセロールを分解していたものと考えられ る. 特に, Acidaminococcaceae 科に属する Propionispora hippei⁶⁵⁾ に近縁なクローンが 11 クローン得られた. P. hippei はグリセロールをプロピオン酸と酢酸に分解する 機能を有しており、その生成する酸のモル比も今回の 発酵槽で生成した酸と同等であった.次に多く検出され たのはEubacterium属に分類される微生物であった.これ らの微生物についてのグリセロール分解に関する論文は 現在発表されていないが, Eubacteriumに関する研究もあ まりなされていないのでクローン数から考えてグリセ ロールを分解できる可能性も考えられる. また, Archaea および Bacteria の DGGE 解析も実施したところ、概ねク ローン解析の結果を支持するものであった.

一方、Ni²⁺, Co²⁺を添加したグリセロール合成廃水を 供給するメタン発酵プロセスにおいては、D=0.1 d⁻¹ で 定常状態に達した槽内液を用いて微生物群集解析を行っ た.FISH 実験の結果、発酵槽内には*Archaea* と *Bacteria* がほぼ同数存在することがわかった (Fig. 11 c, d). すな わち Ni²⁺, Co²⁺の添加により *Archaea* のポピュレーショ ンが増加し、反応がメタン生成まで進行することがわ

かった. Table12は、16SrRNA遺伝子のクローン解析の 結果を示している. リアクター槽内液由来のArchaea ライ ブラリから 21 クローン, Bacteria ライブラリから 19 ク ローンの全塩基配列をそれぞれ決定した.得られた配列 をデータベースに照合し、既知の微生物の16SrRNA遺 伝子の配列との相同性から分類を行った. Table 12に併記 したようにArchaeaの21クローンのうち、16クローンは M. hungateiに近縁であり、残りの5クローンは、M. concilii に近縁であった. M. hungateiは中温で生育する水素資化 性メタン生成古細菌として, M. concilii は酢酸資化性メタ ン生成古細菌として知られている。Bacteriaの19クロー ンはActinobacteria 門およびProteobacteria 門に分類された. Actinobacteria 門に属する Propionibacterium 属にグリセ ロール分解菌の報告例があり66,67)、今回構築したリアク ター内から得られたクローンは、このPropionibacterium属 に比較的近縁であったので、本属に近縁な Bacteria がグ リセロールを分解している可能性が高いと考えられる.

また、Archaea およびBacteriaのDGGE 電気泳動解析を 行った。ArchaeaのDGGE 電気泳動解析において、Ni²⁺, Co²⁺ 無添加系ではMethanobrevibacter 属とMethanosarcina 属が優占したが、Ni²⁺,Co²⁺ 添加系ではMethanosaeta 属と Methanospirillum 属が優占していた。Bacteria についても 無添加系、添加系においてバンドパターンに明確な差が 見られた。無添加系ではFirmicutes 門に分類される微生物 が多く、16S rRNA 遺伝子断片はゲルの上部で解離が起 こっていた。逆に、添加系ではActinobacteria 門に分類さ れる微生物が多く、ゲルの中程でDNAの解離が起きてい た。これらの結果 (Archaea およびBacteria) は、Ni²⁺,Co²⁺ 無添加系、添加系の 16S rRNA 遺伝子クローン解析結果 と概ね一致した. すなわち微量元素の添加の有無により、 発酵槽内に生息する微生物群集構造 (Archaea および Bacteria) が変化することが示された。

以上、Ni²⁺, Co²⁺を添加しない場合、グリセロールは 既知のグリセロール分解菌 Propionispora hippei に近縁な Bacteria によりプロピオン酸と酢酸に分解され、水素資化 性メタン生成古細菌であるMethanobrevibacter属との共生 によりプロピオン酸の一部は酢酸に、酢酸の一部はMethanosarcina 属によりメタンに還元されるものと考察され た.しかし、Ni²⁺, Co²⁺ 無添加ではグリセロールの大部 分はプロピオン酸と酢酸に分解される、すなわち酸生成 過程で反応が停止することが分かった.

一方, グリセロール合成廃水に Ni²⁺,Co²⁺ を添加する ことにより, Actinobacteria が優占し, グリセロールは酢 酸とプロピオン酸に分解されるが, Ni²⁺,Co²⁺ 無添加時 と異なり槽内にはメタン生成古細菌が Bacteria と同程度 生息しており, 有機酸でとどまることなくメタンまで還 元された. このときのメタン生成古細菌は, 無添加時と ことなり Methanosaeta 属と Methanospirillum 属が優占して いた. Ni²⁺, Co²⁺ を添加することにより, 発酵槽内の Archaea だけでなく Bacteria までが門レベルで生息する種 が異なる結果となった.

4.7 タンパク質系を分解する微生物群集の構造と機能¹⁴⁾

タンパク質は、嫌気条件下では加水分解されアミノ酸 になった後、アミノ酸分解細菌によって有機酸になるが、 現時点で2つの分解経路が報告されている. その1つは Stickland 反応で、単独のアミノ酸分解菌によって2つの アミノ酸を分解する経路である^{68,69)}. もう1つの経路は、 アミノ酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生 でアミノ酸を分解する経路である^{70,71)}. ただし、この2 つの分解経路は単離された微生物を用いて明らかにされ たもので、微生物のコンソーシアムで反応が進んでいる メタン発酵槽内でこの2つのアミノ酸分解経路がどのよ うに働いているか、ほとんど研究されていない. 本研究 では、牛血清アルブミン(BSA)を単一炭素源として、2 つの中温嫌気性処理リアクターを構築し、嫌気性処理槽 内でのタンパク質分解経路を検討した.

1) Ni²⁺およびCo²⁺添加・無添加合成廃水を用いた連 リアクター1は微量元素 (Ni²⁺およびCo²⁺) 続培養 を添加していない BSA を単一炭素源とする合成廃水 (Table 2) を供給することによりタンパク質を有機酸に 変換するもので、リアクター2は微量元素を添加した合成 廃水を供給することによりタンパク質をメタンにまで変 換するものである. Fig. 12 は、リアクター1とリアク ター2の各希釈率での処理結果を示している. 有機酸生 成を目標としたリアクター1は、希釈率0.025 d-1から0.2 d-1まで運転したが、安定して運転できた最高の希釈率は 0.15 d-1 であった. この時のタンパク質分解率は約75% で、生産物は酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ吉草酸と アンモニアであった.メタン生成を目標としたリアク ター2は、安定して運転できた最高の希釈率は 0.08 d-1 で. この時のタンパク質の分解率は90%以上であり、主 要生産物はメタン、二酸化炭素およびNH4+であった.

 Ni²⁺とCo²⁺添加・無添加での連続培養での微生物 叢の比較 リアクター1では希釈率 0.15 h⁻¹, リアク ター2では希釈率 0.08 h⁻¹の条件で運転している槽内液 を採取し、微生物叢の解析を行うことによりタンパク質 分解に関与する微生物叢を比較した。

Fig. 13は, FISH 実験の結果を示している. リアクター 1 (無添加) では赤を示す Bacteria がほとんどで, 緑を示 す Archaea はほとんど見られなかった. 一方, リアクター 2 では Bacteria は優占していたが, Archaea も多く存在し ていた. このことから微量元素を添加したリアクター2



Fig. 12. Effect of dilution rate on TOC, VFA, NH_4^+ , and VSS concentrations and gas production rate in chemostat 1 (A) and chemostat 2 (B).



Fig. 13. Phase-contrast photomicrographs (A, C) and results of FISH (B, D) for microorganisms among the mesophilic anaerobic bovine serum albumin (BSA) digesters. a and b show cells grown in chemostat 1. c and d show cells grown in chemostat 2. The florescent probes used were a combination of ARC915 (*Archaea*, green) and EUB338 (*Bacteria*, red). Bar represents 10 μ m.

Table 13. Distribution of 16S rRNA gene clones detected in culture broth of the bovine serum albumin (BSA) -fed chemostats.

Tourse	Chemostat Ni ²⁺ an	t 1 (without id Co ²⁺)	Chemostat 2 (with Ni ²⁺ and Co ²⁺)		
Taxon	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	
Archaea	BSA-1A	A library	BSA-2A	library	
Eury archaeota					
Methanoculleus	9	22	5	10	
Methanospirillum	1	1	1	1	
Methanosaeta	—	—	3	28	
Total (Archaea)	10	23	9	39	
Bacteria	BSA-1F	3 library	BSA-2B library		
Firmicutes	11	19	10	17	
Bacteroidetes	5	22	3	6	
Proteobacteria	2	3	4	7	
Unclassified	_	_	4	24	
Total (Bacteria)	18	44	21	54	

OTU, operational taxonomic unit.

(添加)ではじめて反応がメタン生成まで進むことがわ かった.

そこで、クローン解析により微生物群集構造を比較し、 その結果をTable 13に示した. Archaea については、リア クター1のクローンのほとんどはMethanoculleus属に近縁 であり、リアクター2のクローンのほとんどはMethanosaeta 属と Methanoculleus 属に近縁なものであった. この 結果に基づいて、4属のメタン生成古細菌の定量 PCR を 行った (Table 14). リアクター 1 では Methanoculleus の 16S rRNA 遺伝子しか検出されなかったが、リアクター 2ではMethanosaeta および Methanoculleus の 16S rRNA 遺 伝子が多く検出され, Methanosarcinaの16SrRNA遺伝子 は一桁低く検出された. Bacteria については、リアクター 1ではFirmicutesおよびBacteroidetes門に近縁なクローン がほとんどで、リアクター2では54クローン中24クロー ンは分類できなかったが、他のクローンはFirmicutes、 Bacteroidetes および Proteobacteria 門に分類された. リアク ター1とリアクター2ともにFirmicutes 門に分類されたク

Table 14. Quantification of 16S rRNA gene of methanogens in the culture broth of the BSA-fed chemostats. (Unit, 16S rRNA gene copies/50 ng-DNA)

Primer/probe set	Targat arganism	Chemostat 1	Chemostat 2
rimer/probe set	Target organism	$0.15 \ d^{-1}$	$0.08 \ d^{-1}$
MS1b/SAE835R/SAE761TAQ	Methanosaeta spp.	N. D.	2.36×10^6
MB1b/SAR835R/SAR761TAQ	Methanosarcina spp.	N. D.	$1.39 imes 10^5$
AR934F/MG1200b/MCU1023TAQ	Methanoculleus spp.	$1.51 imes 10^6$	2.77×10^6
AR934F/MG1200b/MSP1025TAQ	Methanospirillum spp.	N. D.	N. D.

N. D., Not detected.

The values represent the averages of experiments conducted in duplicates.

ローンが多かったが、リアクター1のクローンのほとん どが*Clostridium* cluster XIIおよびXIIIに属し⁷²⁾、近縁の *Sporanaerobacter* 属と *Sedimentibacter* 属の微生物は Stickland 反応を行うと報告されており^{68,69)}、リアクター2の クローンに近縁な微生物は *Aminobacterium* 属のもので、 水素資化性微生物と共生することによりアミノ酸を分解 する *Bacteria* と報告されている^{70,71)}.

以上、タンパク質およびアミノ酸分解に関与する微生 物は、リアクター1ではStickland反応型の微生物と Bacteroidetes門に属する微生物が、リアクター2では共生 反応型の微生物とBacteroidetes門に属する微生物が生息 していた。リアクター2での有機酸から酢酸までの分解 経路に関与する微生物は門レベルで新規な微生物であ り、水素と酢酸からメタン生成までの経路に関与する微 生物はそれぞれMethanoculleus属とMethanosaeta属の微生 物であると考えられる。メタン発酵条件下でのタンパク 質の分解は共生で分解する経路が優占であり、メタン発 酵でない嫌気条件ではStickland反応型の分解経路が優 占と考えられる。

4.8 デンプン質系を分解する微生物群集の構造と機能

糖質は多くの廃水・廃棄物の主要成分であり,嫌気分 解微生物が多く単離されているが,これらの Bacteria の メタン発酵槽における動態を解析した例は少ない.本研 究では,糖質のモデルとしてデンプンを単一炭素源とす る合成廃水を供給するメタン発酵プロセスを構築し,糖 質の嫌気分解に関与する微生物群集および分解経路を分 子生物学的手法により解析した.

中温CSTRに嫌気性中温消化汚泥を微生物源として添加した後、デンプン合成廃水を連続的に供給した.希釈率を段階的に上げたところ, D = 0.1 d⁻¹まで安定した運転ができ、デンプンはほぼ完全にメタンと二酸化炭素に変換された.しかし、タンパク質同様使用する基質の分子量が大きくなるほど、多くの反応が関与するためか安定して連続培養できる最大の希釈率は低下した.

そこで、各希釈率での微生物叢をクローン解析法によ り解析した. Archaeaについては、Table 15に示したよう に低希釈率(0.025~0.05 d⁻¹)では水素資化性メタン生 成古細菌である Methanosarcina 属に近縁なクローンが 検出され、高希釈率(0.08~0.1d⁻¹)では酢酸資化性メ タン生成古細菌である Methanosaeta 属に近縁なクローン が優占した. Bacteria については、各希釈率でBacteroidetes 門が検出されたが、希釈率0.08 d⁻¹以外ではFirmicutes 門 に属するクローンが優占した.ただし、Firmicutes 門に属 する微生物でも希釈率の変化によりその微生物種が異な ることが系統解析によりわかった。0.08 d⁻¹の希釈率に

Table 15.	Distribution	of 16S	rRNA	gene	clones	in	culture
broth	of starch-fed	chemos	tats.	0			

Dilution rate	$0.025 \ d^{-1}$	$0.05 \ d^{-1}$	$0.08 \ d^{-1}$	$0.10 \ d^{-1}$
Taxon	No. of clones	No. of clones	No. of clones	No. of clones
Archaea				
Eury archaeota				
Methanoculleus	18	_	_	_
Methanosarcina	4	23	_	1
Methanosaeta	_	—	27	25
Total (Archaea)	22	23	27	26
Bacteria				
Bacteroidetes	3	1	2	1
Chlamydiae	_	_	_	_
Spirochaetes	_	_	18	4
Firmicutes	16	21	1	13
Total (Bacteria)	19	22	21	18

だけSpirochaetes 門に近縁なクローンが、なぜ優占したの か不明であるが、デンプンを基質とする場合、希釈率の わずかな変化が微生物叢に顕著な影響を与えていること が分かった。デンプン分解細菌とグルコース発酵細菌は 数多く単離されているが、今回のリアクターから検出さ れた微生物の多くは uncultured clone に最も近縁であ り、このことから自然界では新規なデンプン分解細菌と グルコース発酵細菌が働いているように思えた。

以上、デンプンを基質とした場合、低希釈率では水素 資化性メタン生成古細菌である Methanoculleus が活性化 されC1サイクルでメタンが生成、中希釈率になると群集 構造が変化し Methanosarcina 属の酢酸資化性メタン生成 古細菌が活性化され、高希釈率ではさらに群集構造は変 化し、同じ酢酸資化性メタン生成古細菌である Methanosaeta 属による酢酸経由でのメタン発酵が優勢になること が分かった.デンプンの分解に多種類の Bacteria が関与 することから、Bacteria 群集の安定性は弱く、希釈率のわ ずかな変化で群集構造が大きく変化した.

5. 生ごみの高温嫌気性処理における微通気による 硫化水素の抑制および通気の微生物群集への影響

メタン発酵の副産物である硫化水素は、メタン発酵に 関与する微生物にも毒性を示し、高濃度になるとメタン 発酵を阻害すると報告されている⁷³⁾.本研究では、生ご みの高温メタン発酵プロセスを用いて、硫化水素による 阻害を軽減するために、空気を微量供給することによる 硫化水素の発生抑制と微通気による微生物群集への影響 を調べた.

5.1 微通気による硫化水素の抑制¹⁸⁾ Ni²⁺, Co²⁺および Fe²⁺ を供給液に微量添加することにより,生ごみの



Fig. 14. Effect of aeration on effluent quality, VSS degradation efficiency, gas evolution rate, and concentrations of CH_4 and H_2S .

高温メタン発酵の最大有機物(VTS)容積負荷として8 g/l/d を達成することができ, 各負荷で VTS 消化率 80% 以上を維持できた.しかし,容積負荷を段階的に上げて いくと発生ガス中の硫化水素濃度は高くなり、容積負荷 8 g/l/d で約 1000 ppm に達していた. 硫化水素発生を抑 制するために、有機物容積負荷6g/l/dの条件でメタン発 酵槽内に空気を微量供給しその効果を調べた. Fig. 14に 示したように、通気しない条件では硫化水素濃度は約 700 ppmであったが、空気を発生バイオガス量に対して 10%供給すると、3日間で硫化水素濃度は5 ppm 以下に 減少し,再度通気を止めると2日間で700 ppmに戻った. 生成したバイオガス量の7.5%の空気を供給することに より,硫化水素濃度を1 ppm以下に低減できた.メタン 発酵は、絶対嫌気条件で起こる反応とされていたが、通 気しても処理性能から判断してメタン発酵に影響を及ぼ さないことが分かった.

5.2 微通気による微生物群集の変化¹⁹⁾処理試験で は微通気の影響は見られなかったので,通気・無通気で の微生物群集を解析し,微通気の影響を調べた.Fig.15 はFISH実験結果を示している.A'とB'の写真から分か るように通気前後でのBacteriaとArchaeaとの比率は変わ らずBacteriaが優占していた.また,C'とD'から分かる ようにBacteriaに占める硫酸還元細菌の菌数は少なく,通



Fig. 15. Phase-contrast photomicrographs (A-D) and results of FISH (A'-D') for the methanogenic communities in the municipal solid waste (MSW) digester. A, A', C and C' show cells grown without aeration. B, B', D and D' show cells grown under micro-aeration conditions. The fluorescent probes utilized were a combination of ARC915 (green) and EUB338 (red) (for A' and B') and the combination of EUB338 (red) and SRB385 (green) (for C' and D'). The bar represents $10 \ \mu$ m.

気してもその比率は変わらなく、微生物群集構造に及ぼ す通気の影響はほとんど見られなかった. Table 16 は通 気・無通気での 16S rRNA 遺伝子解析によるクローンの 系統分類である. Archaea については、無通気条件では Methanosarcina と Methanoculleus に近縁なクローンが約半 分ずつ占めた. 通気条件では Methanoculleus に近縁なク ローンしか得られなかったので、定量 PCR を行ったとこ ろ Methanosarcina は通気により半分に減少していたが、 Methanoculleus は 100 倍以上増加していた. Bacteria につ

Table 16. Distribution of 16S rRNA gene clones detected in a municipal solid waste (MSW) digester under nonaeration and micro-aeration conditions.

	Aeration conditions	No ae	No aeration		Micro-aeration		
Library	Phylum	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones		
Archaeal (MANA, MAA)	Methanosarcina Methanoculleus	1 1	7 8	8	19		
Bacterial (MBNA, MBA)	Firmicutes	8	22	9	18		
Universal (MUNA, MUA)	Firmicutes Thermotogae	6 2	14 2	9 0	18 0		

OTU, operational taxonomic unit.

いては、通気に関わらず*Firmicutes*門に近縁なクローンが 優占していた. クローン解析と DGGE の結果によると、 通気と無通気での *Bacteria* の群集構造に顕著な差がな かった.

5.3 硫化水素抑制機構の解明¹⁹⁾ 硫酸還元経路に最 も重要な酵素, dissimilatory sulfite reductase (dsr)をター ゲットとして、硫酸還元細菌のクローン解析を行った. 無通気条件で2つのOTUが得られたが、通気条件では1 つしか得られなかったことから、通気により硫酸還元細 菌の種類は減少していることが示唆された.2つのOTU は今まで単離できた硫酸還元細菌とは異なり、グラム陽 性で胞子形成性硫酸還元細菌とクラスターを形成した. FISHの結果および硫酸還元菌dsr遺伝子のクローン解析 結果から、通気下でもある硫酸還元菌はリアクター内に 存在した、そこで、これらの硫酸還元細菌は、通気下で も硫酸イオンを還元しているかを確認するために dsr 遺 伝子の転写を調べた. Fig. 16に示したように, 通気・無 通気条件での逆転写 PCR 結果から通気しても dsr 遺伝子 は転写されていた. すなわち、通気しても硫酸イオンは 硫酸還元細菌により硫化水素に還元されることから、通 気による硫化水素発生の抑制メカニズムは、生成された 硫化水素は酸素により化学的に酸化されるか、イオウ酸 化細菌により再度イオウあるいは硫酸イオンに酸化され たと考えられる.実際、通気下でのバイオガスをCSTR の外部に設けた水槽に導入すると、水溶液は白濁し、し かも液中の硫酸イオンは時間とともに増加した.

以上, 微通気による微生物群集への影響は, Archaea に ついては Methanosarcina に近縁な Archaea は減少するが Methanoculleus に近縁な Archaea は大きく増加した. 一方, 優占した Bacteria と硫酸還元細菌にはあまり変化はなく,



Fig. 16. The results of electrophoresis on a 1.5% agarose gel of products of RT-PCR for determination of the expression of the *dsr* gene during cultivation under non-aeration conditions (lane 2) and micro-aeration conditions (lane 3). Lane 1, 100 bp DNA ladder (size markers); lanes 2 and 3, products of RT-PCR.

硫酸還元経路に重要な酵素 dsr 遺伝子は通気にもかかわ らず転写されていたので, 硫化水素に還元された後, 化 学的あるいは微生物学的に再度, イオウあるいは硫酸イ オンに酸化されることがわかった.

超高温領域でのメタン生成反応に関与する 微生物群集の変化²⁰⁾

高温でのメタン発酵速度は中温より速いので,高温条件をさらに超える温度でのメタン発酵が可能になれば処理速度のさらなる向上が期待できる.そこで,本研究では高温嫌気性消化汚泥を微生物源とし,グルコース合成廃水と機械撹拌型 CSTR を用いて 60°C 以上の高温域でのメタン発酵試験を行い,各温度における微生物叢の解析を行った.

6.1 各温度での処理結果 TOC 負荷 0.2 g/l/d の条件 で、運転温度を60°Cから80°Cまで段階的に上げて運転 した.安定してメタン発酵できた最高温度は77.5°C で、 80°Cでは有機酸が急激に蓄積した.Fig. 17は温度域60°C から77.5℃での処理結果を示しており、温度の増加とと もにTOCとVFAは徐々に増加するが、TOC除去率は95 %以上で、グルコースのほとんどはガス化していた.

6.2 処理温度の微生物群集への影響 処理温度の微生 物群集構造への影響を調べるために,各温度での微生物 群集構造を16S rRNA遺伝子のクローン解析 (Table 17) およびDGGE (Fig. 18) により解析した. Archaeaについ ては,65℃では酢酸資化性メタン生成古細菌である Methanosarcina,水素資化性メタン生成古細菌である Methanoculleus と Methanothermobacter に近縁なメタン生



Fig. 17. Effect of operation temperature on TOC and VFA concentrations, gas production rate, and methane concentration (a), and VSS concentration and relative concentration of F_{420} (b).

Taxon	$65^{\circ}C$ (sample b)		70°C (sample b)		75°C (sample a)		77.5°C (sample <i>c</i>)	
Taxon	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
Archaea	HTA1 library		HTA2 library		HTA3 library		HTA4 library	
Euryarchaeota								
Methanosarcina	2	16	—	—	—	—	—	—
Methanoculleus	1	1	—	—	—	—	—	_
Methanothermobacter	1	3	2	20	2	20	2	20
Total (Archaea)	4	20	2	20	2	20	2	20
Bacteria	HTB1 library		HTB2 library		HTB3 library		HTB4 libary	
Firmicutes	13	50	12	50	9	31	8	22
Proteobacteria	_	—	_	—	2	19	5	28
Total (Bacteria)	13	50	12	50	11	50	13	50

Table 17. Distribution of 16S rRNA gene clones in culture broth of hyperthermophilic CSTR.

OTU, operational taxonomic unit.



Fig. 18. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of archaeal and bacterial 16S rRNA gene fragments derived from community DNAs extracted from glucose-fed chemostat (*lane 1-9*) and fragments derived from clones used as standards (*lane S1, S2, S3* and S4). Standard bands are numbered A1 to A4 and B1 to B10. Bands represent related organisms as follows: A1, *Methanosarcina thermophila*; A2, *Methanoculleus* sp. Z3; A3 and A4, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; B1, *Clostridium stercorarium*; B2 and B3, *Coprothermobacter* sp. P1; B4, *Bacillus asahii*; B5 and B8, *Thermoanaerobacter*; B6 and B10, *Symbiobacterium*; B7 and B9, *Tepidiphilus* and *Petrobacter*.

成古細菌が検出された.しかし,温度を70℃以上に上げ ると,Methanothermobacterに近縁なメタン生成古細菌し か検出されなくなった.これらの結果から,65℃ではメ タンは酢酸から直接および水素から生成されている が,70℃以上では水素資化性メタン生成古細菌である Methanothermobacter 属により主として水素経由すなわち C1サイクルで生成されていることが分かった.

Bacteria については、65°Cと70°Cでは*Firmicutes* 門のク ローンのみが検出され、75°Cと77.5°Cでは*Firmicutes*と *Proteobacteria* 門のクローンが得られた、65°Cで得られた

クローンの64%はClostridium属のグルコース分解細菌⁷⁴⁾ と近縁で、残りのクローンは uncultured clone と近縁で あった. 70°Cで検出されたクローンの66%は. 65°Cで 優占した Clostridium 属のクローンとは異なり、主産物が 酢酸であるグルコース分解細菌である Thermoanaerobacter 属 75,76) と高い相同性を有していた.また,残りの クローンのほとんどは高温酢酸酸化細菌である Thermoacetogenium phaeum²⁷⁾と近縁であった. 75°C で検出され たFirmicutes 門に分類されるクローンは、グルコース分解 細菌である Thermoanaerobacter 属 (42%), 酢酸酸化細菌 である Thermoacetogenium phaeum (12%) および脂肪酸 分解細菌である Bacillus asahii (4%)⁷⁷⁾に近縁であった. Proteobacteria 門に分類されたクローンのすべては、高温 脂肪酸分解細菌である Tepidiphilus margaritifer⁷⁸⁾と Petrobacter succinatimandens⁷⁹⁾ に高い相同性を示した. 77.5°C の解析結果は75℃の結果に類似しているが. グルコース 分解細菌に近縁なクローンの割合は減り、その代わりに 脂肪酸分解細菌に近縁なクローンの割合が増えていた.

以上、65°CではグルコースはClostridium 属の Bacteria により低級脂肪酸を経由して酢酸、水素および二酸化炭 素まで分解される.生成した酢酸と水素はMethanosarcina 属とMethanoculleus 属およびMethanothermobacter 属のメ タン生成古細菌によりメタンになる.70°Cではグルコー スはThermoanaerobacter 属のBacteria により酢酸まで分解 され、生成された酢酸はThermoacetogenium 属に近縁な Bacteria により水素と二酸化炭素に分解され、最終的に Methanothermobacter 属のメタン生成古細菌によりメタン に変換される.75°Cと77.5°Cでは、70°Cと異なる点は 生成された酢酸がTepidiphilus 属とPetrobacter 属に近縁な Bacteria により水素と二酸化炭素に分解されることで あった.65°C以上の超高温条件になると、酢酸資化性メ タン生成古細菌の増殖が困難となり、さらに80°Cになる と酢酸酸化細菌の増殖が完全に抑えられることが分かった.これらの実験結果に基づくと、固形物を有する廃液のメタン発酵では二相式を採用し、70°C以上で可溶化・酸生成を行い、55~60°Cでメタン生成反応を行うのが消化率向上につながると考えられる.

廃棄物系バイオマスのメタン発酵による サーマルリサイクルに関する微生物群集

グルコース1 mol をメタン発酵すると3 mol のメタン と二酸化炭素が生成されるので、グルコースの有するエ ネルギーの約 98%がバイオガスに変換されることにな る.また、菌体収率を考慮してもエネルギー回収率は約 95%にも達し、メタン発酵のエネルギー生産プロセスと しての優位性を確認することができる⁸⁰⁾.そこで、高濃 度有機性廃水や廃棄物系バイオマスのメタン発酵による サーマルリサイクルの検討と微生物群集の解析を行うこ とにより安定化を目指した.

7.1 担体のFISH実験 リアクターに充填した不織 布担体から5mm×5mm×5mmのキューブを取り出し、 容器(クライオクリオモルド; Tissue-Tek) に置いた後, 抱埋剤 (O.C.T.Compound; Tissue-Tek) をキューブ全 体が隠れるようにかけ、その後液体窒素の蒸気により抱 埋したキューブを凍らせた. Cryostat-CM3000 Ⅱ (クラ イオスタット; ライカ)を用いて-21℃でキューブから 厚さ20µmの切片を削ぎ取り、ゼラチンでコートしたス ライドガラスに貼り付けた. FISH 実験は前述した Amann の方法³¹⁾ に従って行った. 合成 DNA プローブ としては、domain-specificプローブEUB338 (Bacteria 検 出用;5'末端をCy3で標識)およびARC915 (Archaea 検 出用:5'末端をCy5で標識)を用いた.染色後,共焦点 レーザー顕微鏡 (Fluoview FV300, Olympus) を用いて 観察し、平面状の輝度値(鳥瞰図)から微生物の比率を 数値化した.

7.2 泡盛蒸留廃液のメタン発酵での不織布担体に付着 する微生物群集²¹⁾ 固形分を遠心分離により除去し た泡盛蒸留廃液(CODcr 56,000 mg/l; TOC 28,330 mg/l; pH 3.65)を高温固定床型リアクターに供給し、メタン 発酵処理試験を行った.供給量を段階的に上げることに より TOC 容積負荷の検討を行ったところ、Fig. 19 に示 したように最大TOC容積負荷18 g/l/dを達成することが できた.TOC容積負荷2 g/l/dから18 g/l/dでの範囲では、 TOC除去率は80%以上、ガス発生量は除去されたTOC 1 gあたり約1.4 *l*であった.

泡盛蒸留廃液をTOC 容積負荷 12.0 g/l/d の条件での槽 内の不織布担体に付着した菌の 16S rRNA 遺伝子のク ローン解析を行った. Archaea については,得られたク



Fig. 19. Effect of TOC volumetric loading rate on treatment efficiency of non-diluted *awamori* distillery wastewater during thermophilic anaerobic digestion.

ローンは Methanoculleus 属と Methanosarcina 属に近縁で, Methanoculleus 属が優占であった.バクテリアについて は、得られたクローンは diversity が高く、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門に分類され、半分以上はその他の廃棄物を 処理するメタン発酵槽から得られた uncultured clone と近縁であった.Firmicutes 門に分類されたクローンの 中に、高温でアルコール類と乳酸を分解する Tepidanaerobacter⁸¹⁾ と高温酢酸酸化細菌である Thermacetogenium phaeum²⁷⁾に近縁なクローンも得られた.しかし今回解析 したクローン数は少なく、泡盛蒸留廃液のメタン発酵に 関与する微生物群集を全面的に現わしていなかった.

不織布担体の中に吸着している菌および不織布担体 表面に形成されたバイオフィルムを槽内からそのまま の状態で採取し、クリオスタットにより切片を作製した 後, これをFISH法により染めて顕微鏡観察を行った. な お, サンプルを採取したのは TOC 容積負荷 12.0 g/l/d (HRT=2.6 d), 培養日数430日目の担体であった. Fig. 20 は共焦点レーザー顕微鏡写真を示しており,列1と列2は Archaea (緑)とBacteria (赤)の二重染色結果で、列3は Archaea (緑)と Methanoculleus (黄色)の二重染色結果 である.列1と列2の上側が液面に接している部分で,頂 上に約0.5 mmの薄いバイオフィルムを形成しており, そ れ以外は不織布担体で下側に行くほど担体の内部にな る. 菌の分布としてはバイオフィルム側(上から3mm 以内)にArchaea が多く存在し、担体内部に行くほど Bacteria が多く存在していた. バイオフィルム側で群を形 成しているArchaeaは、その房型の形状からMethanosarcina と考えられ、特に上から1mm以内に見られたArchaeaの 大半は*Methanosarcina* (2A, 2B, 3A) であった. また, 担 体内部に移行するにつれ、Archaeaは群を形成するのでは なくBacteriaと混在しており(2C, 2D),列3の担体内部 に見受けられたArchaeaはMethanoculleus (3C) であるこ とが分かった.



Fig. 20. Support slice stained with a combination of ARC915 probe (*Archaea*, green) and EUB338 (*Bacteria*, red) probe (panel 1 and 2) and with a combination of ARC915 probe and MG1200 (order *Methanomicrobiales*, red) probe (panel 3). 1, Transect combined from six images taken down through the support. The white bar at the bottom right corner corresponds to 500 μ m. 2, Close-up of the fluorescence in panel 1 at different depths. 3, Detection of *Methanomicrobiales* at the uppermost part (0-1mm depth) and the inner part (2-3mm depth) of the support. All bars in panels 2 and 3 correspond to 50 μ m.

以上,不織布担体に付着したメタン生成古細菌は,担 体表層に*Methanosarcina*属が,担体内部に*Methanoculleus* 属が定着する傾向が見られた.一方,*Bacteria* は担体全体 に見られた.したがって,担体表層部では酢酸が直接メ タンに,担体内部では酢酸を含む低級脂肪酸が酸化分解 された後,C1サイクルによりメタンに変換されていると 考察できる.

本研究に使用した不織布担体は, ピリジニウム基を導入したもので, FISH 実験結果からも微生物の吸着性に おいて優れていたと思われる⁸²⁾. 今後, 不織布担体ある いはピリジニウム基を導入した不織布担体を充填した固 定床型リアクターによるメタン発酵処理が普及していく ものと期待している.

7.3 家畜糞尿と生ごみのメタン発酵での担体に付着す る微生物群集²²⁾ 熊本県は農業県でもあり畜産県で もあるので、家畜糞尿の処理といった問題点を抱えてい る.そこで、阿蘇地域を想定し、豚糞尿搾汁液、乳牛糞 尿搾汁液および生ごみの混合物(容積比 19:12:1)の 高温メタン発酵処理試験を行った.有機物濃度(VTS) が約50 g/lと高かったが,粘度が280 cpと低かったので, 不織布担体を充填した固定床型リアクターを用いて,有 機物負荷を2.0 g/l/dから10.0 g/l/dまで段階的に上げるこ とにより処理した.有機物1gあたりのバイオガス発生 量は,容積負荷6 g/l/dで580 mlであったが,有機物負荷 10 g/l/dでは420 ml/g-VTSまで低下した.しかし,この 条件でVTS消化率は45%で,槽内の有機酸濃度(VFA) は1000 mg/l 以下と安定しており,過負荷というより安 定な運転ができていたと判断した.

有機物負荷6g/l/dの条件でのメタン発酵槽内の不織布 担体に付着した微生物の系統解析を16SrRNA遺伝子の クローン解析で行った. Table 18に示したように,解析 したArchaeaの19個のクローンは、すべてEuryarchaeota 門に属した.16クローンは高い相同性でMethanoculles属 に近縁であり、3つのクローンはMethanosarcina属に近縁

Table	18.	Distribution	of	16S	rRNA	gene	clones	of
m	icroo	rganisms collee	cted	from	the supp	port.		

Taxon	Number of OTUs	Number of clones
Archaea		
Euryarchaeota		
Methanosarcina	2	4
Methanoculleus	6	14
Total (Archaea)	8	18
Bacteria		
Firmicutes	15	20
Candidate division OP9	1	1
Total (Bacteria)	16	21

OTU, operational taxonomic unit.

であった.一方, Bacteria ライブラリーの21 個のクロー ンを解析したところ, 19 個のクローン(15 OTUs)は Firmicutes 門に分類され, 1 つのクローンは Candidate division OP9に分類された. Firmicutes 門に分類されたク ローンのほとんどはは uncultured clone に近縁し, 現在 純粋培養ができている微生物と系統的に離れていたが, 一つのクローンは酢酸酸化細菌である Clostridium ultunae に近縁であった.

したがって, 酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古 細菌の共生で酢酸からメタンを生成する C1 サイクルが 主要経路であると推察された.

不織布担体の中に吸着している微生物および不織布担 体表面に形成されたバイオフィルムを槽内からそのまま の状態で採取し、クリオスタットにより切片を作製した 後, FISH 法により染色して顕微鏡観察を行った. 泡盛 蒸留廃液と同様に担体の上面に約 0.5 mm の薄いバイオ フィルムを形成している部分があった. それ以外は不織 布担体になっている. 担体表面ではArchaeaとBacteriaが 混在したが,内部に行くほどバクテリアが多く存在する 傾向を示した. Archaeaの中でも、バイオフィルム側に多 く存在して群を成している菌は、その房型の形状から Methanosarcina と考えられた. すなわち上から1 mm以内 に見られたArchaeaの大半は、形状的にMethanosarcinaで あり、担体内部に移行するにつれてArchaeaはBacteriaと 混在していた. 担体内部のArchaeaは、クローン解析およ び泡盛蒸留廃液の結果と併せ考えると、水素資化性メタ ン生成古細菌と考えられる.

以上,泡盛蒸留廃液同様,不織布担体表面では酢酸資 化性メタン生成古細菌が,担体内部ではプロピオン酸酸 化細菌や酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌に より低級脂肪酸からメタンが生成されているものと考察 できた. 7.4 高温可溶化を伴う二段消化変法での温度シフトに 伴う微生物の挙動 福岡県大木町で排出される廃棄物 バイオマス量を、生し尿 7.8 kl/d、浄化槽汚泥 27.4 kl/d、 生ごみ 2.5 ton/dと想定し、これら廃棄物系バイオマスの 効率的メタン発酵処理プロセスの開発を行った.浄化槽 汚泥を固液分離した重液 5.5 kl/dと生ごみ 2.5 ton/dを先 に高温可溶化(60°C)し、その可溶化物となまし尿を中 温メタン発酵処理(37°C)する二段消化変法を提案し、 本プロセスの研究開発を実験室規模で実施した⁷⁾.なお、 二段消化変法は下水汚泥の嫌気性処理で開発したもので ある⁸³⁾.

Fig. 21に示したように、実験室規模で生し尿だけを中 温嫌気性処理すると NH4+ が高くなり有機酸が残存し、 ガス発生量も220 ml/g-VTSと低かった. この中温消化槽 に、浄化槽汚泥と生ごみ混合物を処理した高温可溶化液 を供給していくとNH4+濃度の低下とともに有機酸も低 下し、その結果、ガス発生量は510~570 ml/g-VTSに向 上した. このガス発生量は、3 種類の廃棄物系バイオマ スを個々に処理したときの1.2倍と高く、先に高温可溶 化する、また廃棄物系バイオマスを混合する効果が明ら かとなった.しかし、夏場には生し尿の温度が高くなる ことから、100日間にわたって中温消化処理してきた温 度を37℃から42℃に上げ、温度シフトの嫌気性消化処 理性能に及ぼす影響を調べた。42°C で 20 日間処理試験 を継続したが、ガス発生量や消化率にまったく影響が見 られなかったので、37℃に処理温度を下げたが、やはり 影響は見られなかった.この原因を明らかにするために、 中温嫌気性消化槽の各処理温度(37°C→42°C→37°C) での微生物群集構造をクローン解析およびDGGE法で調



Fig. 21. Treatment performance of mesophilic anaerobic digestion(37°C) of the mixture of human manure and thermophilic liquefied garbage and septic tank sludge. After acclimation, human manure was treated for the first 40 days, and subsequently the mixture of human manure and thermophilic liquefied solution was treated in the same manner.



Fig. 22. Results of DGGE for fragments of 16S rRNA gene of *Archaea* (A) and *Bacteria* (B) in the completely stirred tank reactors.

べた. 生し尿とほぼ等量の高温可溶化物を嫌気性処理槽 に入れたためか, 処理温度に関わらず検出されたArchaea は Methanosarcina 属の酢酸資化性メタン生成古細菌のク ローンだけで、その中でも Methanosarcina thermophila が 優先していた. Bacteria については高温菌 Coprothermobacter sp.P1 および Coprothermobacter proteolyticus を最近縁 種とするクローンが多く検出され, Firmicutes 門に近縁の clone が優占していた. Fig. 22は DGGE の結果を示して おり,バンドパターンから判断すると温度シフトをしても Archaea と Bacteria の群集構造は変化していなかった. Archaea に関しては、16S rRNA遺伝子のDGGE 電気泳動 のメジャーバンドが高温菌 Methanosarcina thermophila の バンドと一致した. また Bacteria に関しても、16SrRNA遺 伝子のDGGE電気泳動のメジャーバンドが高温菌Coprothermobacter sp. P1 および Coprothermobacter proteolyticus の バンドと一致した.

以上、本プロセスで採用した二段消化変法、すなわち 高温可溶化槽の処理液を中温消化槽に供給していく方法 では、メタン発酵処理試験を開始した早い時期に中温消 化槽内のArchaeaおよびBacteriaともに高温菌が優占種と なり、その結果、温度シフトの影響を受けることなく安 定した処理ができた.

8. おわりに

著者らは、メタン発酵法を有機性廃水の汎用的処理技術とするために、実廃水を用いて工学的に研究を進め、 ①種々の廃水に適した処理プロセスの開発、また②増加 した NH4⁺の効率的処理技術、さらに③反応速度への Ni²⁺および Co²⁺ 添加効果を明らかにし、廃水処理技術 としてのメタン発酵の普及に貢献してきた.しかし、メ タン発酵法をエネルギー生産技術とするためには、不安 定な処理技術であるという汚名を払拭しなければならな かった.

そこで著者らは、酢酸を単一炭素源とする連続培養系 を構築し、Ni²⁺ および Co²⁺ 添加効果を補酵素レベルお よび菌体活性から明らかにするとともに、Ni²⁺および Co²⁺添加・無添加によりメタン生成反応を制御すること に成功した.また、連続培養において希釈率によりメタ ン生成に関与する代謝経路が変換する可能性を示した. 代謝経路の変換を明らかにするために、各種基質を炭素 源とする連続培養系を構築し、槽内の微生物群集を解析 し、メタン生成経路とそれに関与する微生物群集の構造 と機能を明らかにした. すなわち, 中間代謝産物である 低級脂肪酸は、低希釈率ではプロピオン酸や酢酸酸化細 菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生反応と、酢酸資 化性古細菌による反応, この2つの経路でメタンに変換 される.一方,高希釈率では低級脂肪酸の酸化細菌の増 殖速度が遅いことから、酢酸資化性古細菌による反応が 優占した.また、基質の分子量が大きくなるほど、連続 培養で達成できる最大希釈率が小さくなることを明らか にした.

これらの研究成果に基づき,廃棄物系バイオマスのバ イオガス化によるサーマルリサイクルをより普及させる ために,①バイオガス中の硫化水素抑制のための空気供 給の影響を微生物群集から解析し,通気下でも硫酸還元 細菌により硫酸イオンは硫化水素に還元され,その後, イオウや硫酸イオンに再度酸化されること,また②グル コースを基質として超高温域での連続培養を行い,安定

594

してメタン発酵ができる最高温度は77-77.5℃で,この 温度領域でメタン生成反応に関与する微生物群集を明ら かするとともに、本結果から汚泥の消化率向上策を提案 した.さらに、廃棄物系バイオマス(泡盛蒸留廃液、糞 尿や生ごみなどの混合物)を取り上げ、③リアクター内 に低級脂肪酸酸化菌を維持するための固定床型リアク ターの優位性や担体に付着した微生物群集を解析すると ともに担体内でどの経路でメタン生成が起こっているの か、また④生ごみ・糞尿などの混合物を二段消化変法で 処理しガス発生量の向上だけでなく、中温消化槽に生息 する微生物群集は全て高温菌であり、温度シフトの影響 を受けることなく安定して運転できることを明らかにし てきた.

わが国において現在,廃棄物系バイオマスは年間約3 億トン排出されており,バイオマス・ニッポン総合戦略 では循環型社会の形成や農村漁村の活性化のために,こ れらバイオマスのメタン発酵によるサーマルリサイクル を推進している.著者らが実施してきたメタン発酵の高 速度化・安定化に関する研究成果が,廃棄物系バイオマ スのメタン発酵に活かされ,農村漁村を含む地方のバイ オマスタウン構想に少しでも貢献できるように尽力して いきたい.

文 献

- 園田頼和:廃水の生物処理(高原義昌編著), p.167, 地 球社 (1980).
- 2) 木田建次ら: 生物工学, 74, 381 (1996).
- 3) 木田建次, 園田頼和: Bio Industry, 7, 79 (1990).
- 4) Kida, K. et al.: J. Ferment. Bioeng., **75**, 304 (1993).
- 5) Kida, K. et al.: Process Biochem., **34**, 567 (1999).
- 6) Kida, K., and Sonoda, Y.: J. Ferment. Bioeng., **75**, 235 (1993).
- 7) 木田建次: 食品と技術, 8, 1 (2006).
- 8) Hofman-Bang, J. et al.: Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 81, 151 (2003).
- 9) 木田建次:環境管理,35,539 (1999).
- 10) Kida, K. et al.: J. Biosci. Bioeng., 91, 590 (2001).
- 11) Shigematsu, T. et al.: J. Biosci. Bioeng., 96, 547 (2003).
- 12) 重松 亨ら: 用水と廃水, 45, 866 (2003).
- 13) Shigematsu, T. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **70**, 4048 (2004).
- 14) Tang, Y. Q. et al.: J. Biosci. Bioeng., 99, 150 (2005).
- Shigematsu, T. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 72, 401 (2006).
- 16) Shigematsu, T. et al.: J. Biosci. Bioeng., 102, 535 (2006).
- 17) Tang, Y. Q. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **75**, 451 (2007).
- 18) Ikbal et al.: Japanese J. Wat. Treat. Biol., 39, 17 (2003).
- 19) Tang, Y. Q. et al.: Water Research, 38, 2537 (2004).
- 20) Tang, Y. Q. et al.: J. Biosci. Bioeng., 106, 180 (2008).
- 21) Tang, Y. Q. et al.: J. Biosci. Bioeng., 104, 281 (2007).
- 22) Liu, K. et al.: J. Biosci. Bioeng., 107, 54 (2009).

- 23) McCarty, P. L.: Anaerobic Digestion 1981, One Hundred Years of Anaerobic Treatment, p.3, Elsevier Biomedical Press B.V., Amsterdam (1982).
- 24) Kida, K. et al.: J. Ferment. Bioeng., 75, 213 (1993).
- 25) Schink, B.: Microbiol. Mol. Biol. Rev., 61, 262 (1997).
- 26) Ferry, J. G.: Methanogenesis-Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics, Fermentation of Acetate (Ferry, J. G.), p.304, Chapman & Hall, New York (1993).
- Hattori, S. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1601 (2000).
- 28) Liu, Y. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 545 (1999).
- 29) Thauer, R. K. et al.: Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics, (Ferry, J. G.), p.209, Chapman & Hall, New York. (1993).
- 30) 鎌形洋一:嫌気性微生物学(上木勝司,永井史郎編著), p.95,養賢堂(1993).
- 31) Amann, R. I.: *Molecular Microbial Ecology Manual*, (Akkermans, A. D. L. *et al.*), Section 3.3.6, p. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1995).
- 32) Amann, R. I. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 56, 1919 (1990).
- 33) Stahl, D. A. and Amann, R. I.: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.), p. 205, John Willey & Sons, New York (1991).
- 34) Rocheleau, S. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **65**, 2222 (1999).
- 35) Speece, R. E.: Environ. Sci. Technol., 17, 416 (1983).
- 36) Hattori, S. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1601 (2000).
- 37) Lee, M. J. and Zinder, S. H.: Appl. Environ. Microbiol., 54, 124 (1988).
- 38) Schnürer, A. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 1145 (1996).
- 39) Schnürer, A. et al.: FEMS Microbiol. Lett., 154, 331 (1997).
- 40) Hales, B. A. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 62, 668 (1996).
- 41) Boone, D. R. et al.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1, Order III. (Boone, D. R. and Castenholz, R. W.), p. 268, Springer-Verlag, New York (2001).
- 42) Petersen, S. P. and Ahring, B. K.: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **86**, 149 (1991).
- Zinder, S. H.: Methnaogenesis: Eology, Physiology, Biochemistry and Genetics, (Ferry, J. G.), p.128, Chapman & Hall, New York (1993).
- 44) Koch, M. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 45, 1411 (1983).
- 45) Harmsen, H. J. M. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1383 (1998).
- 46) Boone, D. R. and Bryant, M. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*,
 40, 626 (1980).
- 47) Wallrabenstein, C. et al.: Arch. Microbiol., 164, 346 (1995).
- 48) Chen, S. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 1319 (2005).
- 49) de Bok, F. A. M. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 1697 (2005).
- 50) Imachi, H. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **52**, 1729 (2002)
- 51) Mikucki, J. A. et al.: Appl. Environ. Microbiol., 69, 3311 (2003).
- 52) Chong, S. C. et al.: Antonie van Leeuwenhoek, 81, 263 (2002).
- 53) Franzmann, P. D. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1068

(1997).

- 54) Beaty, P. S. and McInerney, M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 977 (1989).
- 55) McInerney, M. J. et al.: Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1029 (1981).
- 56) Roy, F. et al.: Arch. Microbiol., 145, 142 (1986).
- 57) Stieb, M. and Schink, B.: Arch. Microbiol., 140, 387 (1985).
- 58) Lawrence, A. W. and McCarty, P. L.: *J. Water. Pollut. Control. Fed.*, **41**, **R1** (1969).
- 59) Alfreider, A. et al.: Syst. Appl. Microbiol., 25, 232 (2002).
- 60) Angelidaki, I. and Ahring, B. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 808 (1992).
- 61) Pereira, M. A. et al.: Biotechnol. Bioeng., 88, 502 (2004).
- 62) Novak, J. T. and Carlson, D. A.: J. Water Pollut. Control Fed., 42, 1932 (1970).
- 63) Lorowitz, W. H. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., **39**, 122 (1989).
- 64) 重松 亨ら: バイオディーゼルのすべて(坂志朗編著), p.140, アイピーシー (2006).
- Abou-Zeid, D. M. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 951 (2004).
- 66) Himmi, E. H. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **53**, 435 (2000).
- 67) Toraya, T. et al.: J. Bacteriol., 141, 1439 (1980).
- 68) Hernandez-Eugenio, G. et al.: Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.,
 52, 1217 (2002).

- Breitenstein, A. et al.: Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 801 (2002).
- 70) Baena, S. et al.: Anaerobe, 4, 241 (1998).
- 71) Baena, S. et al.: Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 259 (2000).
- 72) Collins, M. D. et al.: Inter. J. Syst. Bacteriol., 44, 812 (1994)
- 73) Ikbal et al.: Japanese J. Water Treat. Biol., 39, 189 (2003).
- 74) Fardeau, M.-L. *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1127 (2001).
- 75) Fardeau, M.-L. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 2141 (2000).
- 76) Xue, Y. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1335 (2001).
- 77) Yumoto, I. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 1997 (2004).
- 78) Manaia, C. M. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbil., 53, 1405 (2003).
- 79) Salinas, M. B. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 645 (2004).
- 80) 木田建次:バイオマス・エネルギー・環境(坂志朗編
 著), p.356, アイピーシー (2001).
- Sekiguchi, Y. et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbial., 56, 1621 (2006).
- 82) Morimura, S. et al.: J. Jpn. Soc. Waste Management Experts, 17, 135 (2006).
- 83) 木田建次, イクバル:水環境学会誌, 18, 215 (1995).