
 総合論文

メタン発酵プロセスに関する微生物群集

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 Sciences*¹; *Department of Energy and Resources, College of Engineering, Peking University, P. R. China*²; *Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto-City, Kumamoto 860-8555*³)
 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 non-aceticlastic 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

1. はじめに

メタン発酵は、多くの微生物の共生により有機物を嫌氣的に分解し、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、機械攪拌やガス攪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尿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、②NH₄⁺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共に、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、

プロピオン酸、酪酸、脂質、グリセロール、タンパク質、ペンペン質系）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*Clostridium 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	ΔG° (kJ/reaction)
(1) Aceticlastic methanogen $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(2) Acetate-oxidizing bacteria $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	+104.6
(3) Hydrogenotrophic methanogen $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135.6
(4) Reaction (2) + (3) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0
(5) Propionate-oxidizing bacteria $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 3\text{H}_2 + \text{H}^+$	+76.0
(6) Reaction (3) \times 3 + (5) \times 4 $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-100.8
(7) Reaction (6) + (1) \times 4 $4\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7\text{CH}_4 + 5\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-224.8

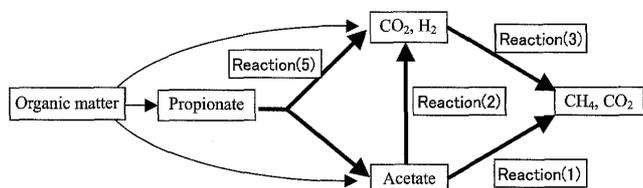


Fig. 1. Metabolic pathway of acetate and propionate in methane fermentation. Reaction 1, 2, 3 and 5 correspond to reaction 1, 2, 3 and 5 described in Table 1.

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、さらに還元されメチル基、メチレン基を経てメチル基となり、methyl 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、嫌氣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。

3. 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攪拌した。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 (Methanotrix 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,

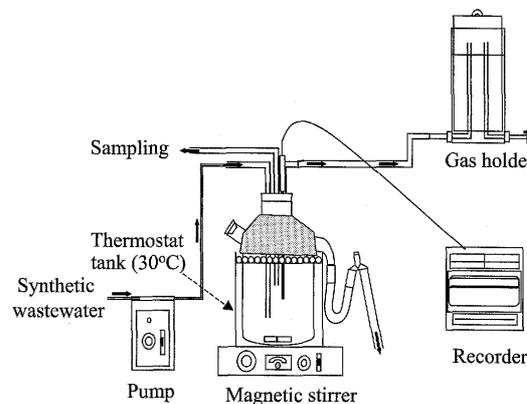


Fig. 2. Schematic diagram of completely stirred tank reactor (CSTR).

Table 2. Synthetic wastewaters used in this study.

	Synthetic wastewater (in 1 l)								Long-chain fatty acid (LFA)	Glycerol	
	Acetate	Propionate	Acetate-Propionate	Butyrate	Protein	Glucose	Starch				
Substrate											
Acetic acid	16.0 g	—	10.72 g	—	—	—	—	—	—	—	
Sodium acetate	5.46 g	—	3.34 g	—	—	—	—	—	—	—	
Propionic acid	—	13.16 g	4.38 g	—	—	—	—	—	—	—	
Sodium propionate	—	4.27 g	1.40 g	—	—	—	—	—	—	—	
Butyric acid	—	—	—	11.74 g	—	—	—	—	—	—	
Sodium butyrate	—	—	—	3.67 g	—	—	—	—	—	—	
Bovine serum albumin (BSA)	—	—	—	—	17.0 g	—	—	—	—	—	
D-Glucose	—	—	—	—	—	21.0 g	—	—	—	—	
Starch	—	—	—	—	—	—	25.6 g	—	—	—	
Oleic acid	—	—	—	—	—	—	—	0.495 g	—	—	
Palmitic acid	—	—	—	—	—	—	—	0.450 g	—	—	
Sodium alginate	—	—	—	—	—	—	—	0.1 g	—	—	
Glycerol	—	—	—	—	—	—	—	—	2.610 g	—	
Other compound											
KH ₂ PO ₄				0.30 g					20 mg		
KHCO ₃				4.00 g					—		
NH ₄ Cl				1.00 g					80 mg		
NaCl				0.60 g					125 mg		
MgCl ₂ · 6H ₂ O				0.82 g					45 mg		
CaCl ₂ · 2H ₂ O				0.08 g					100 mg		
Cystein-HCl · H ₂ O				0.10 g					—		
NiCl ₂ · 6H ₂ O				21.3 mg					21.3 mg		
CoCl ₂ · 6H ₂ O				24.7 mg					24.7 mg		
Na ₂ S · 9H ₂ O				—					20 mg		
FeSO ₄ · 6H ₂ O				—					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 vitamin solution of DSMZ318 (in 1 l): biotin, 2.0 mg; folic acid, 2.0 mg; pyridoxine-HCl, 10.0 mg; thiamine-HCl · 2H₂O, 5.0 mg; riboflavin, 5.0 mg; nicotinic acid, 5.0 mg; 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攪拌した. 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 F₄₂₀ の分析^{9,10)} F₄₂₀ 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って行った。

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、単位菌体当たりの比 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 μmol/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 μmol/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 サイクル) に関する 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

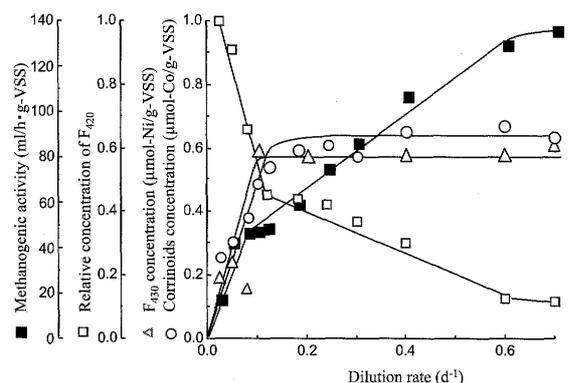


Fig. 3. Effect of dilution rate on the methanogenic activity and concentrations of coenzyme F₄₃₀, corrinoids and F₄₂₀.

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 (<i>Methanosaeta</i>)	3 ~ 7 d	1.4 d
Hydrogenotrophic methanogen (<i>Methanobacterium</i>)	2 ~ 4 h	
Acetate-oxidizing bacteria	Approx. 30 d	20 ~ 40 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 ($D = 0.6 \text{ d}^{-1}$) で50.7%、低希釈率 ($D = 0.025 \text{ d}^{-1}$) 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の二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。

① Ni^{2+} および Co^{2+} を十分量添加し、かつ希釈率を上げる、すなわち仕事量が高めることにより、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 F_{430} 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。

4. 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、 Ni^{2+} および Co^{2+} 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 Ni^{2+} および Co^{2+} 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 Ni^{2+} および Co^{2+} 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 $3 \mu\text{l}$ 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 (*Methanococcaceae* 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 (fluorescein-isothiocyanate) 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 $1 \times \text{PBS}$ 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 $100 \mu\text{l}$ (低希釈率培養液) または $300 \mu\text{l}$ (高希釈率培養液) に懸濁させて $100 \mu\text{l}$ を用いて DNA および RNA を抽出した。試料の粉碎には 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/TaqMan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SAE761TAQ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 μ l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領域をターゲットとして、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(Ni^{2+} , Co^{2+})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。

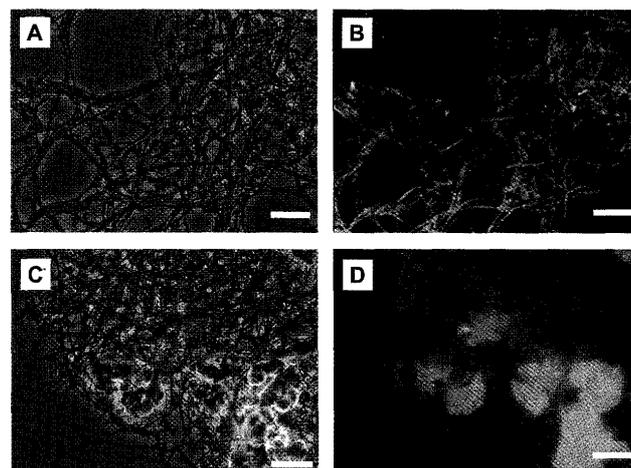


Fig. 4. Photomicrographs of phase contrast views (A, C) and FISH results (B, D) for the acetate-degrading methanogenic communities. Panels A and B are for the cells cultivated at the dilution rate of 0.025 d^{-1} and panels C and D are for the cells at 0.6 d^{-1} . The fluorescent probes utilized were the combination of ARC915 (green) and EUB338 (red) (for panels B, D). Bar represents 10 μ 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($D = 0.025 \text{ d}^{-1}$)においても高希釈率条件($D = 0.6 \text{ d}^{-1}$)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

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

Taxon (Phylum)	0.025 (ALU library)		0.6 (AHU library)	
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
<i>Archaea</i>				
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanosarcina</i>	4	23	5	47
<i>Methanosaeta</i>	5	20	2	19
<i>Bacteria</i>				
<i>Firmicutes</i>	16	36	12	15
<i>Cytophagales</i>	8	9	5	7
Candidate division OP12	5	5	3	3
<i>Chloroflexi</i>	3	6	—	—
<i>Proteobacteria</i>	—	—	1	1
Unclassified	1	1	—	—
Total	42	100	28	92

OTU, operational taxonomic unit.

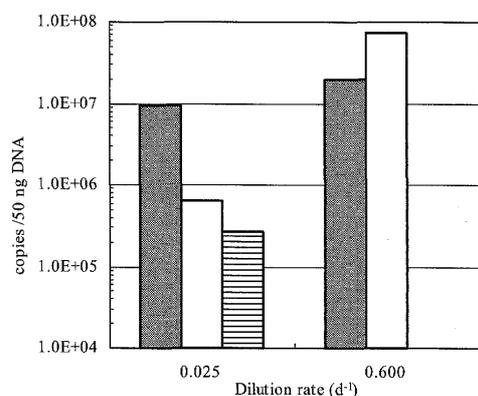


Fig. 5. Quantification of 16S rRNA genes of *Methanosaeta*, *Methanosarcina* and *Methanoculleus* (*Methanoculleus* was not detected at the dilution rate of 0.6 d⁻¹). ■, *Methanosaeta*; □, *Methanosarcina*; ▨, *Methanoculleus*.

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* 遺伝子の発現解析¹³⁾ メタン生成反応を触媒する methyl 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 *Methanosaeta* 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 *Methanoculleus* 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.

Phylogenetic affiliation	No. of clones	Dilution rate (d ⁻¹)	
		0.025	0.6
<i>Methanosaeta</i> spp. <i>mcrA</i>	4	ND	1
<i>Methanosarcina</i> spp. <i>mcrA</i>	0	ND	20
<i>Methanoculleus</i> spp. <i>mcrA</i>	17	9.06 × 10 ⁶	0
		Quantitative RT-PCR (copies/mg total RNA)	Quantitative RT-PCR (copies/mg total RNA)

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 of CH₄ and CO₂ produced from ¹³C-labeled acetate.GC-MS analysis of CH₄ produced from ¹³C-labeled acetate.

Dilution rate (d ⁻¹)	Substrate	Peak intensities			CH ₄ from carboxyl-base / total CH ₄	CH ₄ from methyl-base / total CH ₄
		m/z 15 (¹² CH ₄)		m/z 17 (¹³ CH ₄)		
		Actual	Background subtracted ^a	Actual		
0.025	¹³ CH ₃ ¹² COONa	2,695	2,695	5,474	0.33	0.67
	¹² CH ₃ ¹³ COONa	1,139	1,139	928	0.45	0.55
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	0		1,361		
0.6	¹³ CH ₃ ¹² COONa	81,973	14,066	614,114	0.022	0.98
	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 CO₂ produced from ¹³C-labeled acetate.

Dilution rate (d ⁻¹)	Substrate	Peak intensities			CO ₂ from methyl-base / total CO ₂	CO ₂ from carboxyl- base / total CO ₂
		m/z 44 (¹² CO ₂)		m/z 45 (¹³ CO ₂)		
		Actual	Background subtracted ^a	Actual		
0.025	¹³ CH ₃ ¹² COONa	4,041	2,635	1,196	0.31	0.69
	¹² CH ₃ ¹³ COONa	3,424	2,018	4,296	0.32	0.68
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	1,406		3,380		
0.6	¹³ CH ₃ ¹² COONa	87,919	79,915	5,302	0.062	0.94
	¹² CH ₃ ¹³ COONa	12,951	4,947	80,702	0.058	0.94
	¹³ CH ₃ ¹³ COONa	8,004		73,096		

^a Peak intensities at m/z values of 44 from ¹³CH₃¹³COONa 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 K_m 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

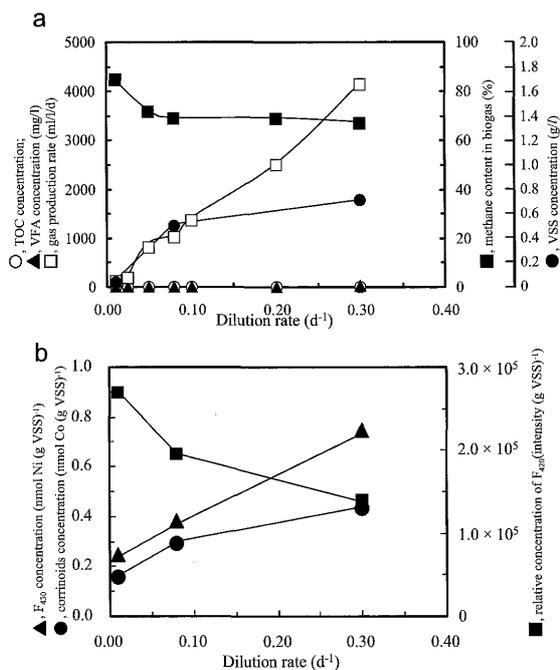


Fig. 6. (a) Effect of dilution rate on concentrations of TOC and volatile fatty acids (VFA), gas production rates, methane content in biogas and volatile suspended solid (VSS) concentration under steady-state conditions at each dilution rate. (b) Effect of dilution rate on concentrations of coenzymes 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 $D = 0.01 \sim 0.3 \text{ d}^{-1}$ 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 F₄₃₀ およびコリノイド含量は増加した。一方、補酵素 F₄₂₀ 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 ($D = 0.01 \text{ d}^{-1}$) で 84.0%，中希釈率条件 ($D = 0.08 \text{ d}^{-1}$) で 66.5%，高希釈率条件 ($D = 0.3 \text{ d}^{-1}$) 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しており、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ことが考えられる。

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 ($D = 0.025 \text{ d}^{-1}$) 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。

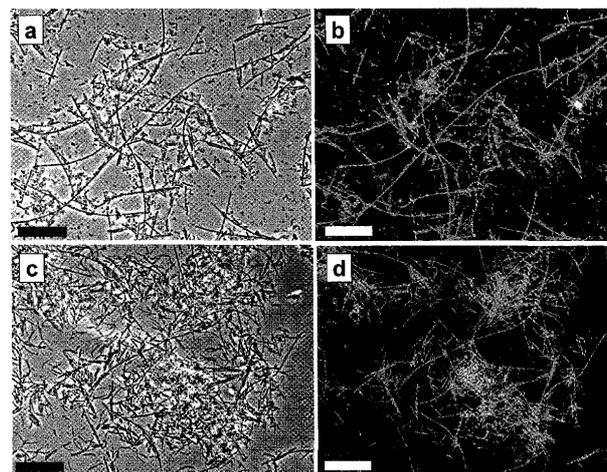


Fig. 7. Phase-contrast photomicrographs (a, c) and results of FISH (b, d) for microorganisms in propionate-fed chemostat at dilution rates of 0.01 d^{-1} (a, b) and 0.3 d^{-1} (c, d). Fluorescent probes were combination of ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents $20 \mu\text{m}$.

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 *Methanomicrobiaceae* 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 culture broth of propionate-fed chemostats.

Taxon	Dilution rate (d ⁻¹)					
	0.01		0.08		0.3	
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
<i>Archaea</i>	PLA library		PMA library		PHA library	
<i>Euryarchaeota</i>						
<i>Methanoculleus</i>	5	15	3	6	1	1
<i>Methanospirillum</i>	—	—	2	3	2	16
<i>Methanosaeta</i>	1	2	1	2	—	—
Total (<i>Archaea</i>)	6	17	6	11	3	17
<i>Bacteria</i>	PLB library		PMB library		PHB library	
<i>Firmicutes</i>	4	5	6	10	5	7
<i>Proteobacteria</i>						
<i>Deltaproteobacteria</i>	1	10	—	—	1	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	—	—	1	1	—	—
Candidate division OP3	1	3	1	2	1	3
Total (<i>Bacteria</i>)	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、*Methanospirillum* 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 まで段階的に上げて運転した。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//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 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 (TaqMan probe)	Target organism	Dilution rate (d ⁻¹)		
		0.01	0.08	0.3
Ar28F/ARC915	<i>Archaea</i>	1.61 × 10 ⁷	NT	1.13 × 10 ⁷
EU27F/Eu518R	<i>Bacteria</i>	8.48 × 10 ⁶	NT	6.30 × 10 ⁶
MS1b/SAE835R (SAE761TAQ)	<i>Methanosaeta</i> spp.	1.26 × 10 ⁷	3.49 × 10 ⁷	1.95 × 10 ⁶
MB1b/SAR835R (SAR761TAQ)	<i>Methanosarcina</i> spp.	ND	ND	ND
AR934F/MG1200b (MCU1023TAQ)	<i>Methanoculleus</i> spp.	1.68 × 10 ⁶	3.51 × 10 ⁷	2.94 × 10 ⁶
AR934F/MG1200b (MSP1025TAQ)	<i>Methanospirillum</i> spp.	ND	5.27 × 10 ⁵	6.71 × 10 ⁵

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

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

Taxon	Dilution rate (d ⁻¹)			
	0.025 (c)		0.45 (a)	
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
<i>Archaea</i>	BLA library		BHA library	
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanosaeta</i>	5	45	5	38
<i>Methanosarcina</i>	—	—	2	2
<i>Methanoculleus</i>	2	2	1	5
<i>Methanospirillum</i>	—	—	3	5
Total (<i>Archaea</i>)	7	47	11	50
<i>Bacteria</i>	BLB library		BHB library	
<i>Firmicutes</i>	2	2	17	26
<i>Proteobacteria</i>	3	46	2	2
Candidate division OP3	—	—	4	18
<i>Spirochaetes</i>	—	—	2	2
<i>Deferribacteres</i>	—	—	1	1
<i>Chloroflexi</i>	2	2	—	—
Total (<i>Bacteria</i>)	7	50	26	49

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β酸化経路を有するプロピオン酸化細菌である *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

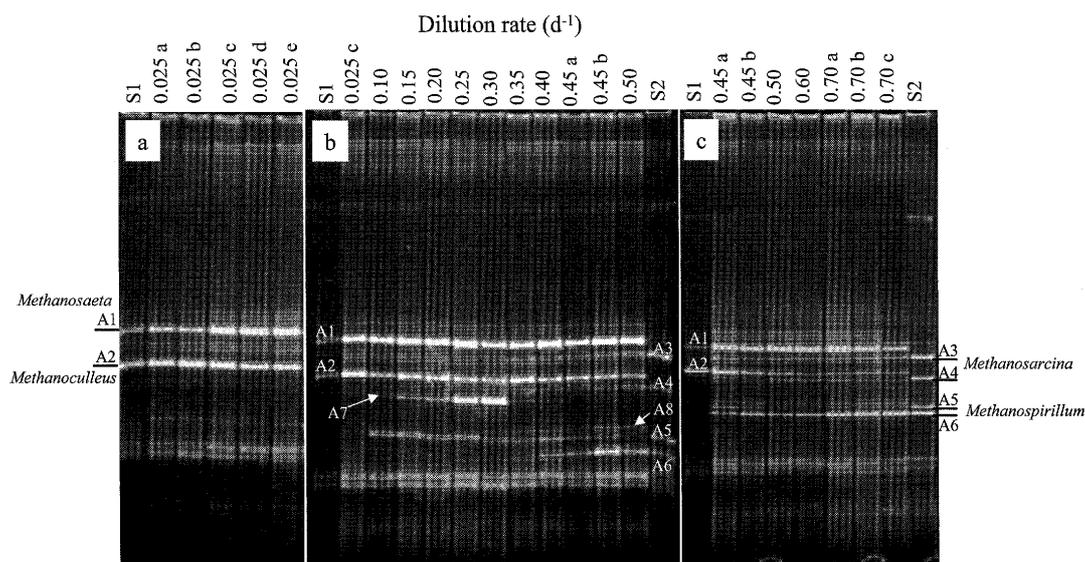


Fig. 8. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of archaeal-16S rRNA gene fragments derived from community DNA extracted from the butyrate-fed chemostats and fragments derived from clones used as standards (S1 and S2). Community DNA from the chemostat at dilution rates of 0.025 to 0.7 d⁻¹ were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

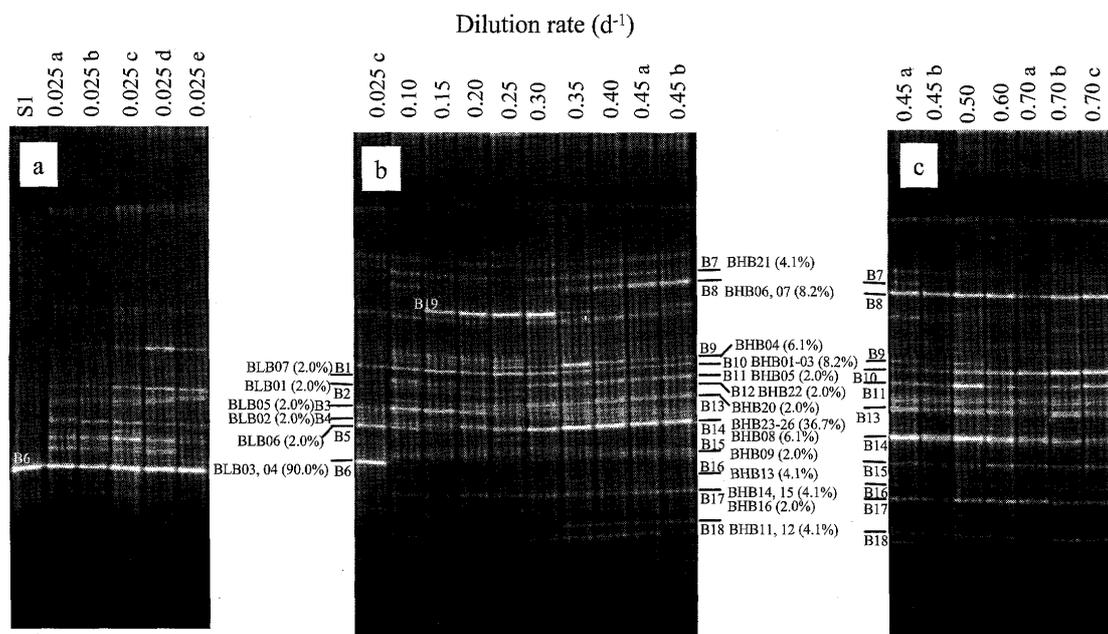


Fig. 9. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of bacterial-16S rRNA gene fragments derived from community DNA extracted from the butyrate-fed chemostats. Community DNA from the chemostat at dilution rates of 0.025 to 0.7 d^{-1} were used as templates. Lane S1 was the fragment derived from OTU 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 Candidate 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。

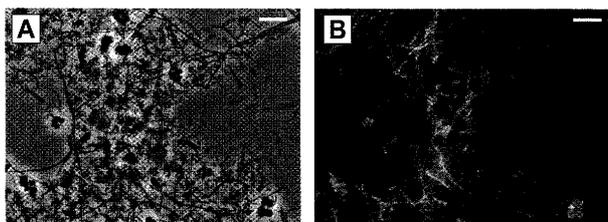


Fig. 10. Phase-contrast photomicrograph (A) and results of FISH (B) of microorganisms in chemostat with long chain fatty acid (LCFA) introduced at dilution rate of 0.4 d⁻¹. The fluorescent probes used were ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents 20 μm.

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
<i>Archaea</i> LCFA-A library		
<i>Euryarchaeota</i>		
<i>Methanosaeta</i>	2	15
<i>Methanospirillum</i>	1	3
Total (<i>Archaea</i>)	3	18
<i>Bacteria</i> LCFA-B library		
<i>Bacteroidetes</i>	4	10
<i>Spirochaetes</i>	2	6
<i>Firmicutes</i>	3	3
<i>Proteobacteria</i>	1	1
Total (<i>Bacteria</i>)	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、 $\Delta G^0 = -135.6$ 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 ΔG 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*

属^{55,56,63)} に近縁なクローンが 2 クローン得られた。報告されている高級脂肪酸の β -酸化細菌は *Firmicutes* 門に属するものが多いが、今回のクローン解析では *Spirochaetes* 門および *Bacteroidetes* 門に分類されるクローンが多く検出された。これらの門に分類される *Bacteria* も、高級脂肪酸の分解に関与している可能性があると思われる。

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えた。

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

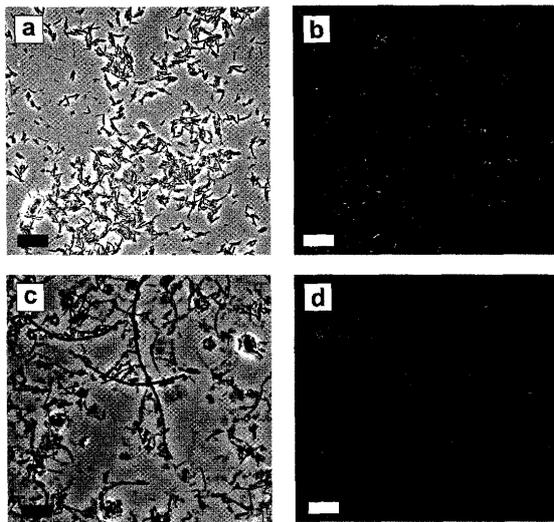


Fig. 11. A Phase-contrast photomicrograph (a, c) and a result of FISH (b, d) for microorganisms in Glycerol-fed chemostat without (a, b) and with (c, d) Ni^{2+} and Co^{2+} addition at a dilution rate of 0.1 d^{-1} . Fluorescent probes were combination of ARC915 (green) and EUB338 (red). Bar represents $10 \mu\text{m}$.

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、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 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。 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 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) Ni^{2+} と Co^{2+} 添加・無添加での連続培養での微生物群集の比較 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 無添加合成廃水の嫌気性処理プロセスにおいて、 $D=0.1 \text{ d}^{-1}$ 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 the culture broth of the glycerol-fed chemostats.

Taxon	Chemostat 1 (without Ni^{2+} and Co^{2+})		Chemostat 2 (with Ni^{2+} and Co^{2+})	
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
<i>Archaea</i>	GLY 1A library		GLY 2A library	
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanosarcina</i>	1	7		
<i>Methanosaeta</i>	—	—	1	5
<i>Methanobrevibacter</i>	1	9	—	—
<i>Methanospirillum</i>	—	—	1	16
Total (<i>Archaea</i>)	2	16	2	21
<i>Bacteria</i>	GLY 1B library		GLY 2B library	
<i>Firmicutes</i>				
<i>Acidaminococcaceae</i>	1	11	—	—
<i>Eubacteriaceae</i>	1	9	—	—
<i>Clostridiaceae</i>	1	1	—	—
<i>Actinobacteria</i>	—	—		
<i>Propionibacteriaceae</i>	—	—	1	16
<i>Proteobacteria</i>	—	—		
<i>Desulfovibrionaceae</i>	—	—	2	2
<i>Syntrophobacteraceae</i>	—	—	1	1
Total (<i>Bacteria</i>)	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*門に属するものが多く、今回構築したり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 hippei*⁽⁶⁵⁾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、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 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、 $D=0.1 \text{ d}^{-1}$ 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 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 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。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16S rRNA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続培養 リアクター1は微量元素(Ni²⁺およびCo²⁺)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。

2) 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

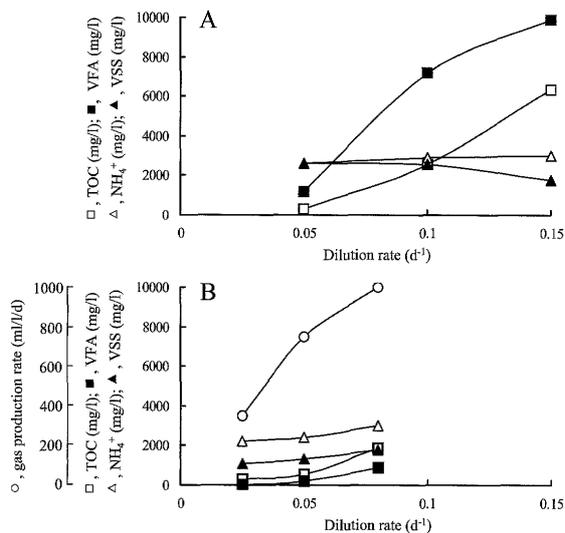


Fig. 12. Effect of dilution rate on TOC, VFA, NH₄⁺, and VSS concentrations and gas production rate in chemostat 1 (A) and chemostat 2 (B).

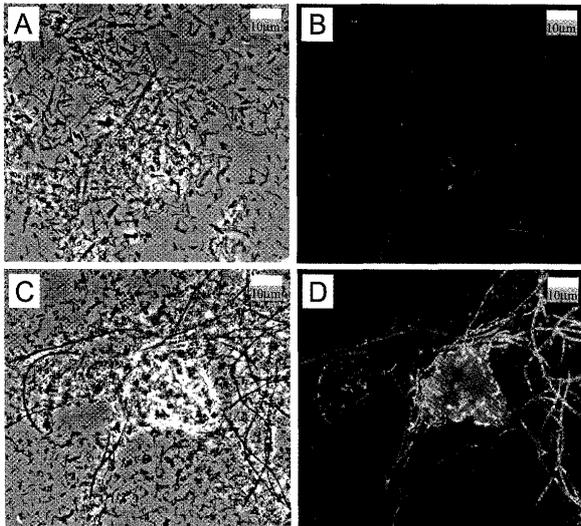


Fig. 13. Phase-contrast photomicrographs (A, C) and results of FISH (B, D) for microorganisms among the mesophilic anaerobic bovine serum albumin (BSA) digesters. a and b show cells grown in chemostat 1. c and d show cells grown in chemostat 2. The florescent probes used were a combination of ARC915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

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

Taxon	Chemostat 1 (without Ni ²⁺ and Co ²⁺)		Chemostat 2 (with Ni ²⁺ and Co ²⁺)	
	No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
<i>Archaea</i>	BSA-1A library		BSA-2A library	
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanoculleus</i>	9	22	5	10
<i>Methanospirillum</i>	1	1	1	1
<i>Methanosaeta</i>	—	—	3	28
Total (<i>Archaea</i>)	10	23	9	39
<i>Bacteria</i>	BSA-1B library		BSA-2B library	
<i>Firmicutes</i>	11	19	10	17
<i>Bacteroidetes</i>	5	22	3	6
<i>Proteobacteria</i>	2	3	4	7
Unclassified	—	—	4	24
Total (<i>Bacteria</i>)	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16S rRNA 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	Target organism	Chemostat 1	Chemostat 2
		0.15 d ⁻¹	0.08 d ⁻¹
MS1b/SAE835R/SAE761TAQ	<i>Methanosaeta</i> spp.	N. D.	2.36 × 10 ⁶
MB1b/SAR835R/SAR761TAQ	<i>Methanosarcina</i> spp.	N. D.	1.39 × 10 ⁵
AR934F/MG1200b/MCU1023TAQ	<i>Methanoculleus</i> spp.	1.51 × 10 ⁶	2.77 × 10 ⁶
AR934F/MG1200b/MSP1025TAQ	<i>Methanospirillum</i> 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、 $D = 0.1 \text{ d}^{-1}$ 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、多くの反応に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 ($0.025 \sim 0.05 \text{ d}^{-1}$) では水素資化性メタン生成古細菌である*Methanoculleus*属および酢酸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 ($0.08 \sim 0.1 \text{ d}^{-1}$) 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 chemostats.

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
<i>Archaea</i>				
<i>Euryarchaeota</i>				
<i>Methanoculleus</i>	18	—	—	—
<i>Methanosarcina</i>	4	23	—	1
<i>Methanosaeta</i>	—	—	27	25
Total (<i>Archaea</i>)	22	23	27	26
<i>Bacteria</i>				
<i>Bacteroidetes</i>	3	1	2	1
<i>Chlamydiae</i>	—	—	—	—
<i>Spirochaetes</i>	—	—	18	4
<i>Firmicutes</i>	16	21	1	13
Total (<i>Bacteria</i>)	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*属による酢酸経路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⁾ Ni^{2+} 、 Co^{2+} および Fe^{2+} を供給液に微量添加することにより、生ごみの

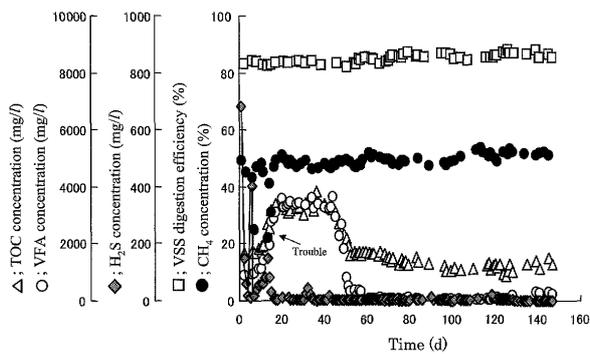


Fig. 14. Effect of aeration on effluent quality, VSS degradation efficiency, gas evolution rate, and concentrations of CH_4 and H_2S .

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 6 g/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もので、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

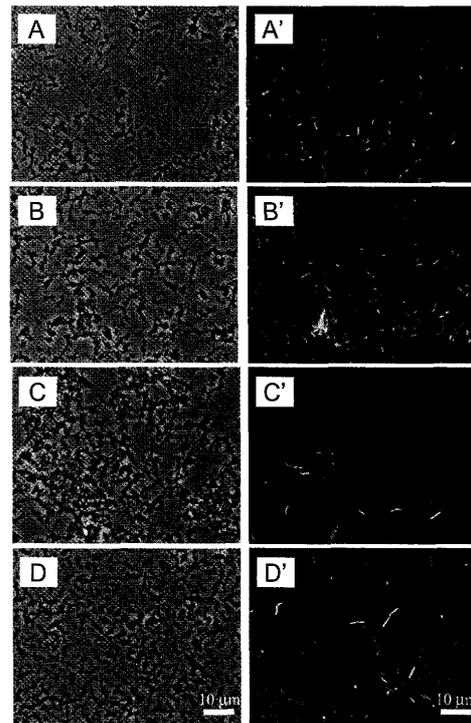


Fig. 15. Phase-contrast photomicrographs (A-D) and results of FISH (A'-D') for the methanogenic communities in the municipal solid waste (MSW) digester. A, A', C and C' show cells grown without aeration. B, B', D and D' show cells grown under micro-aeration conditions. The fluorescent probes utilized 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 μm .

気してもその比率は変わらず、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ため、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 non-aeration and micro-aeration conditions.

Library	Aeration conditions Phylum	No aeration		Micro-aeration	
		No. of OTUs	No. of clones	No. of OTUs	No. of clones
Archaeal (MANA, MAA)	<i>Methanosarcina</i>	1	7		
	<i>Methanoculleus</i>	1	8	8	19
Bacterial (MBNA, MBA)	<i>Firmicutes</i>	8	22	9	18
Universal (MUNA, MUA)	<i>Firmicutes</i>	6	14	9	18
	<i>Thermotogae</i>	2	2	0	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, グラム陽性で孢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,

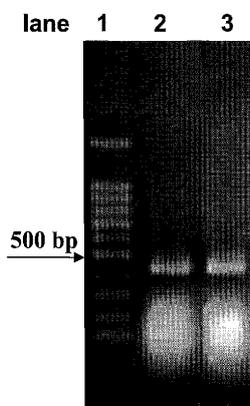


Fig. 16. The results of electrophoresis on a 1.5% agarose gel of products of RT-PCR for determination of the expression of the *dsr* gene during cultivation under non-aeration conditions (lane 2) and micro-aeration conditions (lane 3). Lane 1, 100 bp DNA ladder (size markers); lanes 2 and 3, products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

6. 超高温領域でのメタン生成反応に関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攪拌型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°C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°C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

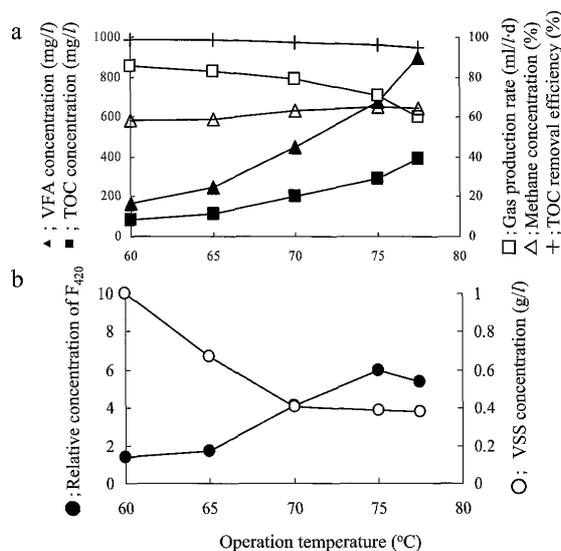


Fig. 17. Effect of operation temperature on TOC and VFA concentrations, gas production rate, and methane concentration (a), and VSS concentration and relative concentration of F₄₂₀ (b).

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

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

OTU, operational taxonomic unit.

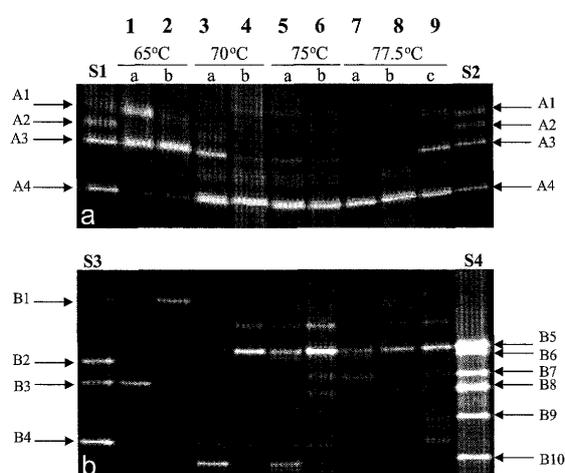


Fig. 18. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of archaeal and bacterial 16S rRNA gene fragments derived from community DNAs extracted from glucose-fed chemostat (lane 1-9) and fragments derived from clones used as standards (lane S1, S2, S3 and S4). Standard bands are numbered A1 to A4 and B1 to B10. Bands represent related organisms as follows: A1, *Methanosarcina thermophila*; A2, *Methanoculleus* sp. Z3; A3 and A4, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*; 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°C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°C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°C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路すなわち 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 phaeum*²⁷⁾ 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 margaritifera*⁷⁸⁾ と *Petrobacter succinatimandens*⁷⁹⁾ に高い相同性を示した。77.5°Cの解析結果は75°C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。

7. 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 5 mm×5 mm×5 mm 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°C でキューブから厚さ 20 μm 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 (COD_{Cr} 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

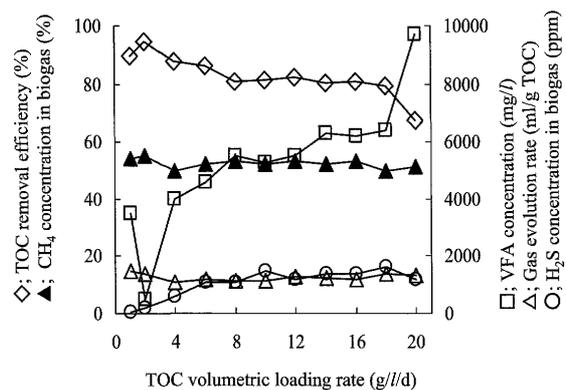


Fig. 19. Effect of TOC volumetric loading rate on treatment efficiency of non-diluted *awamori* distillery wastewater during thermophilic anaerobic digestion.

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 *Tepidanaerobacter*⁸¹⁾ と高温酢酸酸化細菌である *Thermacetogenium phaeum*²⁷⁾ 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に採取し、クライ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 3 mm 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 1 mm 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。

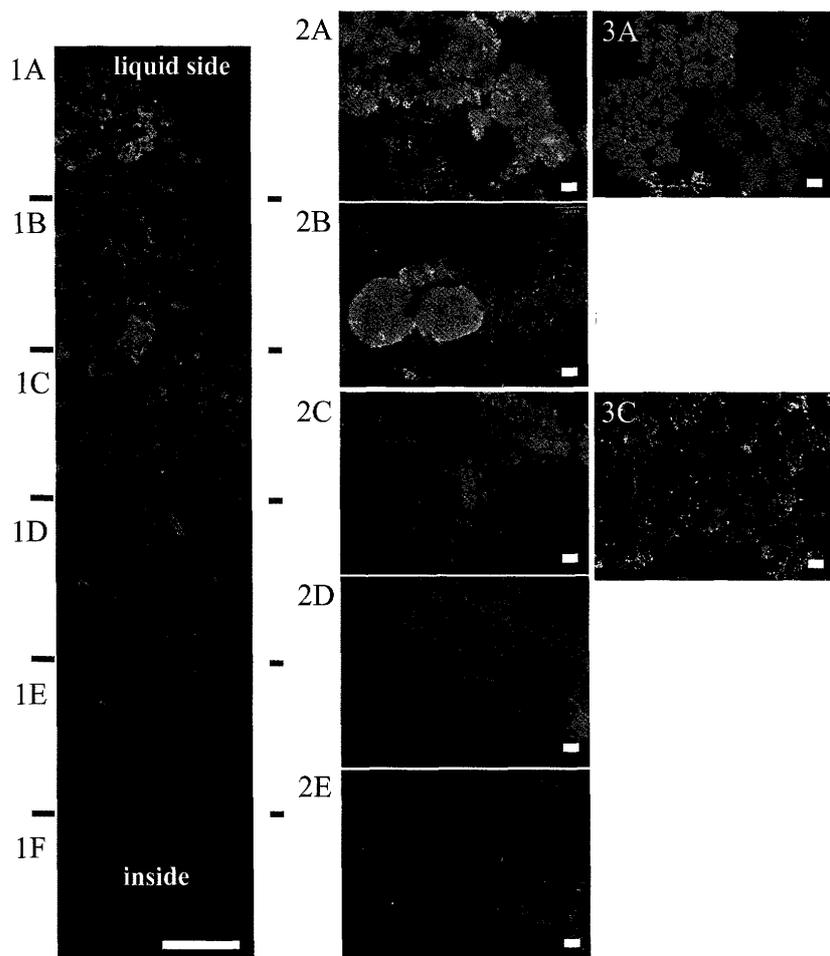


Fig. 20. Support slice stained with a combination of ARC915 probe (*Archaea*, green) and EUB338 (*Bacteria*, red) probe (panel 1 and 2) and with a combination of ARC915 probe and MG1200 (order *Methanomicrobiales*, red) probe (panel 3). 1, Transect combined from six images taken down through the support. The white bar at the bottom right corner corresponds to 500 μm . 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 μm .

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 1 g 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 6 g/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 16S rRNA 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 *Methanoculleus* 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 microorganisms collected from the support.

Taxon	Number of OTUs	Number of clones
<i>Archaea</i>		
<i>Euryarchaeota</i>		
<i>Methanosarcina</i>	2	4
<i>Methanoculleus</i>	6	14
Total (<i>Archaea</i>)	8	18
<i>Bacteria</i>		
<i>Firmicutes</i>	15	20
<i>Candidate division OP9</i>	1	1
Total (<i>Bacteria</i>)	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 個のクローンは *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 uncultured clone に近縁し、現在純粋培養ができていない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ームを槽内からそのままの状態に採取し、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 の薄いバイオフィー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、バイオフィー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⁸⁾。

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 NH_4^+ 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 NH_4^+ 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°C から 42°C 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。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

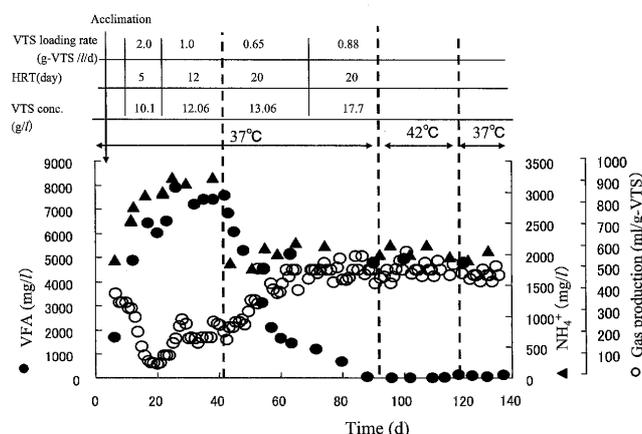


Fig. 21. Treatment performance of mesophilic anaerobic digestion (37°C) of the mixture of human manure and thermophilic liquefied garbage and septic tank sludge. After acclimation, human manure was treated for the first 40 days, and subsequently the mixture of human manure and thermophilic liquefied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

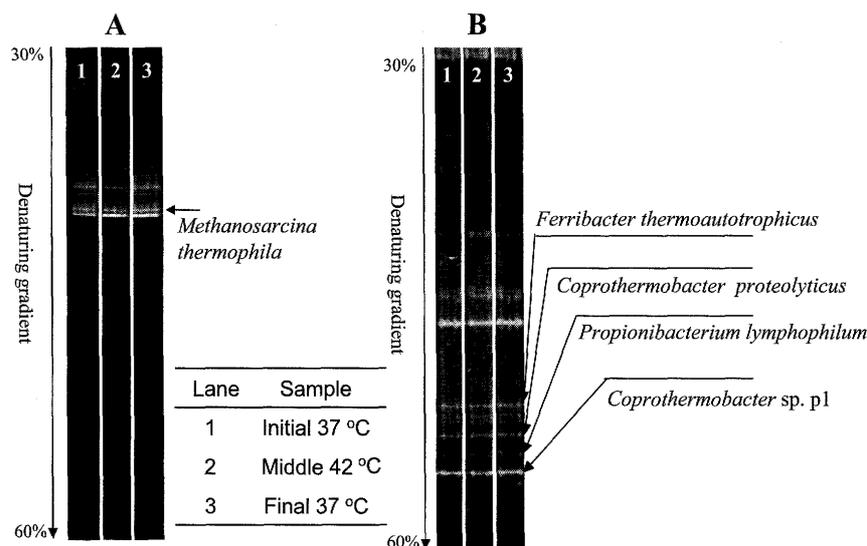


Fig. 22. Results of DGGE for fragments of 16S rRNA gene of *Archaea* (A) and *Bacteria* (B) in the completely stirred tank reactors.

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、16S rRNA 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 NH_4^+ の効率的処理技術、さらに③反応速度への Ni^{2+} および Co^{2+} 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、 Ni^{2+} および Co^{2+} 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、 Ni^{2+} および Co^{2+} 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

してメタン発酵ができる最高温度は77-77.5°C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にするとともに、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

- 1) 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）。
- 15) 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) Ikbai 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）。
- 27) 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, (Ak-kermans, 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 Wiley & 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）。
- 43) Zinder, S. H.: Methanogenesis: Ecology, 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).
- 65) 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).
- 69) 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) Ikbali *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. Microbiol.*, **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).
- 81) Sekiguchi, Y. *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **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).