PCR-DGGE法を用いた廃棄物系バイオマスのメタン発酵槽における微生物群集構造の解析

大羽 美香¹・Sangsan TEEPYOBON²・安納 幸子³・李 玉友⁴・野池 達也⁵

¹工修 東北大学 大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)
E-mail:ohba@ep11.civil.tohoku.ac.jp

²工修 東北大学 大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)

³東北大学 大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)

⁴正会員 工博 東北大学助教授 大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06)

⁵正会員 工博 日本大学教授 大学院総合科学研究科 (〒102-0073 東京都千代田区九段北4-2-1)

廃棄物系バイオマスのメタン発酵反応槽における微生物の群集構造を把握することを目的として、基質(搾乳牛ふん尿、余剰汚泥およびジャガイモ加工廃棄物)、発酵温度、滞留時間が異なる反応槽についてPCR-DGGE法を用いた解析を行った。中温発酵と高温発酵の微生物群集構造は基本的に異なっている。同じ基質、同じ温度条件では、HRTの変化による真正細菌と古細菌への影響が少なかった。また、同じ高温種汚泥に対して異なるバイオマスで馴致した結果、真正細菌が基質に左右されたが、メタン生成古細菌は類似しており、高温性酢酸資化性メタン生成古細菌の*Methanosarcina thermophila*と高温性水素資化性メタン生成古細菌*Methanoculleus thermophilus*がよく存在した。

Key Words : PCR-DGGE, methane fermentation, microbial community, mesophilic, thermophilic

1. はじめに

「バイオマス・ニッポン」総合戦略に取り上げられている主要な廃棄物系バイオマスは、家畜排泄物(年間発生量は9,000万t)、下水汚泥(44,000万t)、および食品廃棄物(2000万t)等であり、資源としての利活用が求められている。このような背景の中、エネルギー回収・再資源化が可能であるメタン発酵がバイオマス利活用の有力な方法の一つとして注目されている。それぞれの廃棄物系バイオマスに適した高効率メタン発酵技術の確立が急務である^{1,2)}。

メタン発酵を担う微生物生態系は極めて複雑である。バイオマス中の炭水化物、タンパク質や脂質等の高分子物質は、まず単糖やアミノ酸等の単位構成物質に加水分解された後、酸生成段階において揮発性脂肪酸を含む有機酸、あるいはアルコール類、 H_2 、 CO_2 等に分解される。続いて、 H_2 生成酢酸生成段階において栄養共生細菌群により、 H_2 生成を伴って酢酸へと酸化分解される。生成された酢酸、 H_2 および CO_2 は最終段階においてメタン生成古細菌によって CH_4 に変換される³⁾。メタン発酵槽保持汚泥中の細菌種はプロセスの運転条件等により変化し、

微生物群集構造を把握することは、良好なメタン発酵を行う際の有用なモニタリング指標となることが考えられる。しかし、メタン発酵は、微生物の共生を必要とする特殊な環境で進行するため、そこに存在する微生物群集を従来の培養法で解析することは困難であった。

近年、土壌中や海水中等の自然環境、あるいは生物学的排水処理等の人工生態系に存在する微生物の大半が通常使用される培地上で生育しないことが明らかになった。Amannら⁴⁾は、自然界における培養可能な細菌の割合をまとめており、淡水、底泥および土壌で0.25~0.3%、活性汚泥で1~15%としている。このような難培養性の問題を解決するため、分子生物学的な手法による新たな解析技術が開発されている。分子生物学的な手法の一つであるPCR-DGGE法を用いた微生物群集構造解析は生物学的排水処理の分野において研究されつつある。特に微生物群集構造の経日変化をモニタリングする手段として様々なプロセスに対する研究が行われている^{5~11)}。

本研究では、廃棄物系バイオマスメタン発酵における微生物の群集構造を明らかにするため、基質、種汚泥、HRTおよび発酵温度による微生物菌叢の変化について、PCR-DGGE法を用いた解析を行った。

表-1 研究対象としたメタン発酵槽とその運転条件

	高温牛ふん尿系(CM)	中温余剰汚泥系(MW)	高温余剰汚泥系(TW)	中温ジャガイモ系(MMR)
基質	搾乳牛ふん尿	余剰汚泥	余剰汚泥	ジャガイモ加工廃棄物
温度	高温(55℃)	中温(35℃)	高温(55℃)	中温(36℃)
HRT	30日	10日,20日,30日	10日,20日,30日	20日(システム全体)
基質のTS濃度	TS 約10%	TS 約5%	TS 約5%	TS 約17%
COD負荷	5.09 g/L/d	6.57, 3.28, 2.19 g/L/d	6.57, 3.28, 2.19 g/L/d	11.5 g/L/d
種汚泥	汚泥と生ごみの高温メタン発酵汚泥と牛ふん尿の中温メタン発酵汚泥	下水処理場の嫌気消化汚泥	汚泥と生ごみの高温メタン発酵汚泥	生ごみの中温高濃度メタン発酵槽汚泥
有効容量	5 L	5 L	5 L	12 L
ガス生成速度	0.53 L/L/d	1.81, 0.88, 0.69 L/L/d	1.83, 0.98, 0.75 L/L/d	5.6 L/L/d
メタンガス組成	58%	62~64%	61~63%	58%
運転日数	66日	83日	83日	45日
プロセス	完全混合型	完全混合型	完全混合型	二相循環式

2. 実験方法

(1) 実験装置および実験材料

本研究では、表-1で示した運転条件下で制御したメタン発酵槽からサンプルを採取して実験を行った。基質としてI県K町一般畜産業者家畜排せつ物管理貯留槽より採取した搾乳牛ふん尿（以下牛ふん尿とする）、S下水処理施設における遠心分離濃縮機械で濃縮した下水余剰汚泥およびジャガイモ食品加工廃棄物にはフードプロセッサーで微破碎し、ペースト化したジャガイモを用いた。牛ふん尿系および余剰汚泥系は完全混合型のプロセスを採用し、温度制御は、牛ふん尿系は高温（55℃）条件、余剰汚泥系は、中温（35℃）および高温条件（55℃）とした。ジャガイモ系は、二相循環式メタン発酵システムを採用した。混合タンク（4℃）ではジャガイモペーストとメタン発酵廃液を重量比で1:1の割合により混合した。この混合物を高温酸発酵槽（55℃）に投入し、可溶化、水素生成および酸発酵を行った。次に高温酸発酵液を中温メタン発酵槽（36℃）に投入し、メタン発酵を行った。種汚泥は、高温の系の全てにおいて、汚泥と生ごみの高温メタン発酵汚泥を用いた。中温余剰汚泥系の種

汚泥は、下水処理場の嫌気性消化汚泥を用い、中温ジャガイモ系においては、生ごみの中温高濃度メタン発酵汚泥を用いた。HRTの制御はそれぞれ次の通りである。牛ふん尿系はHRT 30日の同一条件で4つの反応槽について運転を行い、余剰汚泥系は、HRT 10日、20日および30日で運転を行った。ジャガイモ系においてはシステム全体のHRTを20日として運転を行った。それぞれの反応槽のガス生成および代謝産物が一定となったときを定常状態とみなし、微生物群集構造の解析を行った。各反応槽のサンプルは表1に示した通り、それぞれの運転日数のものを用いた。

(2) 位相差顕微鏡による観察

各反応槽サンプル1.0 mlを採取し、PBS bufferにより3回洗浄後、位相差顕微鏡（Olympus BX50）を用いて観察した。

(3) PCR-DGGE法

各反応槽サンプル0.3 gを用いて、余剰汚泥系およびジャガイモ系はUltra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO)、牛ふん尿系はISOIL（ニッポンジーン）でDNA抽出を行った。キット付属のプロトコールに従い、DNAを抽出、

表-2 本研究で用いたプライマー

プライマー名	シークエンス	特異性	参考文献
Bac357fGC	5'-GC-clamp CCTACGGGAGGCAGCAG - 3'	真正細菌	12)
Bac518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'	真正細菌	12)
Arc357fGC	5'-GC-clamp CCCTACGGGGCGCAGCAG - 3'	古細菌	13)
Arc691r	5'-GGATTACARGAT TTCAC - 3'	古細菌	13)

GC-clamp : CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGG

図-1 位相差顕微鏡写真

精製を行った。真正細菌を対象とした場合、抽出したDNA抽出液を鋳型として16S rRNA遺伝子のV3領域をPCRによって増幅した。プライマーは357IGC (GCクランプ付)、518rを使用した¹²⁾(表-2)。PCRはTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (Model TP600)を用いて94℃、9 min→(94℃、30 s→53℃、30 s→72℃、30 s)×35サイクル→72℃、5 minの条件で行った。

また、古細菌(メタン生成古細菌等を含む)16S rRNA遺伝子の増幅はプライマーとしてARC357IGC、ARC691rを使用した¹³⁾(表-2)。PCRの条件は94℃、3 min→(94℃、1 min→53℃、1 min→72℃、2 min)×35サイクル→72℃、8 minで行った。

DGGEにはAE-6290レゾルマックス・二連スラブ電気泳動装置(ATTO)を用いた。8%ポリアクリルアミドゲル中の変性剤の濃度勾配は15～55% (ここで変性剤100%とは、7 M尿素、40%ホルムアミドに相当する。)に設定し、58℃、130 V、300 minの条件でPCR産物の電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイド水溶液に浸し、DNAバンドを染色した後、UVでDNAを可視化しChemiDoc XRS(BIO-RAD)によって画像解析を行った。

塩基配列読取のため、DGGEにより得られたDNAバンドを切り出し、ポリアクリルアミドゲルからのDNA抽出キットであるQIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNA溶液をPCRで再増幅し、再びDGGEを行い、DGGE上でターゲットのバンドが単一になるまで数回繰り返した。DNAバンドが単一になっていることを確認した後、塩基配列の決定を行った。シーケンシング作業にはBECKMAN COULTER CEQ8000を用いた。得られた塩基配列を相同性検索プログラムBLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast.html>)により既知の種から最も近縁な微生物を検索した。系統樹は

S: 基質の牛ふん尿

R1～R4: 牛ふん尿系高温メタン発酵槽

図-2 高温牛ふん系真正細菌DGGEバンドプロファイル

系統樹作成ソフトCLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>)による近隣結合法を用いて作成し、系統樹描画ソフトTree View (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)で描画した。

3. 実験結果および考察

(1) 位相差顕微鏡による観察

図-1にそれぞれの反応槽内を視察した位相差顕微鏡写真を示す。牛ふん尿系高温メタン発酵槽内(図-1 CM)

は、様々な大きさの桿菌や球菌が観察された。サルシナ状の細菌も見られた。また、処理困難であったと思われるワラの繊維がしばしばに観察された。

余剰汚泥系の位相差顕微鏡観察の結果（図-1 MW, TW）、中温メタン発酵槽（図-1 MW）には、糸状の細菌（矢印 a）が存在した。これは短桿菌が鞘構造の外壁に包まれ多数連なって糸状を呈する³特徴を持つ *Methanosaeta*属が存在していたと考えられる。高温メタン発酵槽（図-1 TW）にはサルシナ状（矢印 b）のものが観察された。

ジャガイモ系二相循環式メタン発酵槽の観察の結果、高温酸発酵槽（図-1 TAR）は全体的に桿菌が観察され、部分的にサルシナ状の細菌も観察された。中温メタン発酵槽（図-1 MMR）では大部分がサルシナ状の細菌が占め、巨大な集合体として観察された。また、この集合体が強い自家蛍光を発することは蛍光顕微鏡により確認した（データは示さず）。

(2) 真正細菌のPCR-DGGE解析

a) 牛ふん尿系高温メタン発酵槽について

牛ふん尿系高温メタン発酵槽の真正細菌の PCR-DGGE バンドプロファイルを図-2 に示す。HRT 30 日の同一条件の 4 つの反応槽は共に類似したバンドパターンとなった。基質である牛ふん尿は反応槽内バンドパターンと比較すると、やや複雑であり、乳酸球菌である *Lactococcus lactis* と推定されたバンド C2 等は反応槽では淘汰され、いくつかのバンド（C3, C9）は反応槽内に定着していることが見られた。牛ふん尿系真正細菌 DGGE バンドのシーケンス結果を表-3 に、DGGE バンドの系統解析結果を図-6 に示す。牛ふん尿系高温メタン発酵槽から高温性セルロース分解細菌（バンド C5, *Clostridium thermocellum*）の近縁種が検出された。また、高温性タンパク質分解細菌（バンド C9, *Coprophthermobacter* sp. P1）の近縁種が検出された。

b) 余剰汚泥系メタン発酵槽について

図-3のとおり、余剰汚泥系の真正細菌のPCR-DGGEは、

表-3 高温牛ふん尿系真正細菌DGGEバンドのシーケンス結果

バンド	相同性検索の結果	Accession No.	相同性	備考
C1	<i>Aerosphaera taetra</i>	AJ279038	158/163	96%
C2	<i>Lactococcus lactis</i>	AY78946	156/162	96%
C3	<i>Clostridium bifermentans</i>	X75906	128/132	96%
C4	<i>Spirochaeta</i> sp. Grapes	AF357917	149/156	95%
C5	<i>Clostridium thermocellum</i>	L09173	120/135	88%
C6	Uncultured eubacterium LKB80	AJ746483	153/167	91%
C7	Uncultured eubacterium LKB119	AJ746514	147/149	98%
C8	Uncultured bacterium clone:MBNA07	AR114326	131/137	95%
C9	<i>Coprophthermobacter</i> sp. P1	A13162803	137/140	97%
C10	Uncultured eubacterium LKB104	AJ746504	138/139	99%

表-4 余剰汚泥系真正細菌 DGGE バンドのシーケンス結果

反応槽	バンド	相同性検索の結果	Accession No.	相同性	備考
中温メタン発酵槽	W1	Uncultured bacterium clone:BSA2B-20	AB175392	156/157	99%
	W2	Uncultured Green Bay ferromanganous micronodulebacterium MNB2	AF293011	145/164	88%
	W3	Uncultured bacterium clone:BSA2B-13	AB175385	146/155	94%
	W4	Uncultured bacterium clone:TSBb19	AB186819	139/154	90%
	W5	Uncultured bacterium clone 012B10.B_SD.P15	CR933148	156/164	91%
	W6	Uncultured bacterium clone ZB31	AY327211	140/151	92%
高温メタン発酵槽	W7	<i>Coprophthermobacter</i> sp. P1	AB162803	131/140	93%
	W8	<i>Thermobacterium proteolyticus</i>	X69335	131/140	93%

表-5 ジャガイモ系真正細菌 DGGE バンドのシーケンス結果

バンド	相同性検索の結果	Accession No.	相同性	備考
P1	Uncultured eubacterium WJGRT-184	AF175663	156/158	99%
P2	Uncultured bacterium clone ZB18	AY327235	139/140	99%
P3	Uncultured eubacterium LKB22	AJ746433	157/160	98%
P4	Uncultured eubacterium LKB88	AJ746491	148/149	99%
P5	Uncultured bacterium TSI14	AB186815	149/158	94%
P6	Uncultured manure pit bacterium P316	AF261803	121/130	93%
P7	Uncultured bacterium clone GZKB8	AJ853503	145/149	97%

S:基質 (余剰汚泥), M10:中温 HRT10日,
M20:中温 HRT20日, M30: 中温 HRT30日,
T10:高温 HRT10日, T20:高温 HRT20日, T30: 高温 HRT30日

図-3 余剰汚泥系真正細菌DGGEバンドプロファイル

MT:混合タンク
TAR:高温酸発酵槽
MMR:中温メタン発酵槽

図-4 ジャガイモ系真正細菌DGGEバンドプロファイル

余剰汚泥 (基質) と HRT (HRT 10日, 20日および30日) を変化させた定常状態時の中温メタン発酵槽と高温メタン発酵槽のサンプルからDNAを抽出して解析を行った。中温発酵槽のHRTを変化させたものを比較してみると各HRT条件において同様なバンドパターンになる傾向がみられた。また、高温メタン発酵槽においてもHRTによる変化は少なく、類似したバンドパターンであった。中温メタン発酵槽と高温メタン発酵槽を比較するとバンドパターンは明らかに異なった。これは反応槽の温度の影響により反応槽内の微生物群集構造が変化することを示唆するものである。

余剰汚泥系真正細菌DGGEバンドのシーケンス結果を表-4に、DGGEバンドの系統解析結果を図-7に示す。中温メタン発酵槽においては最近縁だったのは、未だ分離命名されていない細菌に由来する遺伝子であり、表中にはUncultured bacteriumとして表記した。それぞれのバンドの最も近縁な既知の微生物種は表-4の備考に示した通り、らせん状の嫌気性細菌であるスピロヘーター¹⁴⁾、スフィンゴバクテリア、偏性嫌気性の栄養共生細菌である*Syntrophus* sp.³⁾、*Cytophaga Flavobacterium Bacteroides*および*Flavobacterium* sp.等、加水分解や酸生成をおこなうことで知られているものであった。また、高温メタン発酵槽においては、高温性タンパク質分解細菌である*Coprotthermabacter*に近縁の種が検出された。このように、

MW:余剰汚泥系中温メタン発酵槽
TW:余剰汚泥系高温メタン発酵槽
MMR:ジャガイモ系中温メタン発酵槽
CM:牛ふん尿系高温メタン発酵槽

図-5 古細菌DGGEバンドプロファイル

高温メタン発酵において数種の高温性タンパク質分解細菌に近縁の種が検出されたことは、高温のタンパク質の分解率が中温のそれより高い分解率であった結果 (データは示さず) と一致している。これらの結果は、中温と高温では異なる微生物群集が加水分解、酸発酵等を担っていることを示唆している。

図-6 高温牛ふん尿系真正細菌 DGGE バンドの塩基配列の系統解析結果

図-7 余剰汚泥系真正細菌 DGGE バンドの塩基配列の系統解析結果

図-8 ジャガイモ系真正細菌 DGGE バンドの塩基配列の系統解析結果

表6 古細菌DGGEバンドのシーケンス結果

バンド	相同性検索の結果	Accession No.	相同性	備考
中温余剰汚泥系	A1 Uncultured <i>Methanobrevibacter</i> sp. CSIRO3.02	AY351490	106/116 91%	水素資化性メタン生成細菌
	A2 <i>Methanoculleus palmaeoli</i>	Y16382	273/280 97%	水素資化性メタン生成細菌
	A3 Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp. clone D1A06	AY454763	278/286 97%	酢酸資化性メタン生成細菌
	A4 Uncultured <i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon MRR49	AY125724	269/279 96%	水素資化性メタン生成細菌
高温余剰汚泥系	A5 <i>Methanoculleus thermophilus</i>	AJ862839	277/277 100%	高温性水素資化性メタン生成細菌
	A6 <i>Methanosarcina thermophila</i>	M59140	272/276 98%	高温性酢酸資化性メタン生成細菌
中温ジャガイモ系	A7 <i>Methanosarcina siciliae</i>	U89773	298/307 97%	酢酸資化性メタン生成細菌
	A8 <i>Methanoculleus bourgensis</i>	AY196674	297/303 98%	水素資化性メタン生成細菌
高温牛ふん尿系	A9 <i>Methanoculleus thermophilus</i>	AJ862839	278/290 95%	高温性水素資化性メタン生成細菌
	A10 <i>Methanosarcina thermophila</i>	M59140		高温性酢酸資化性メタン生成細菌

図-9 古細菌 DGGE バンドの塩基配列の系統解析結果

c) ジャガイモ系二相循環式メタン発酵槽について

ジャガイモ系二相循環式メタン発酵槽の真正細菌のPCR-DGGEバンドプロファイルを図-4に示す。廃液循環型である当プロセスの定常時（HRT 20日）において、混合タンク、高温発酵槽および中温メタン発酵槽に共通なバンドがいくつか見られた（バンドP1とP8、バンドP3とP10等）。ジャガイモ系真正細菌DGGEバンドのシーケンス結果を表-5に、DGGEバンドの系統解析結果を図-8に示す。それぞれのバンドに最近縁だったのは、未だ分離命名されていない細菌に由来する遺伝子であり、表中にはUncultured eubacteriumおよびUncultured bacteriumとして表記した。バンドP1およびP3に最も近縁な既知の微生物種は酸生成偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *Bacteroides* sp.¹⁴⁾であった。

(3) 古細菌のPCR-DGGE解析

古細菌のDGGE解析は余剰汚泥系の中温メタン発酵槽（HRT 20日）、高温メタン発酵槽（HRT 20日）、ジャガイモ系中温メタン発酵槽および牛ふん尿系高温メタン発酵槽のサンプルについて行った。その結果を図-5に示す。余剰汚泥系においては真正細菌と同様、中温メタン発酵槽と高温メタン発酵槽では異なる古細菌のバンドパ

ターンが見られた。古細菌においても温度により異なる微生物種が存在しメタン発酵を担っていることがわかった。また、高温余剰汚泥系のバンドのうち高温牛ふん尿系のバンドと一致するものが見られ（A5とA9、A6とA10が共通）、中温余剰汚泥系のバンドは中温ジャガイモ系のバンドと異なるバンドパターンを示した。

古細菌の主要バンドの塩基配列解読後に相同性検索を行った結果を表-6に、古細菌DGGEバンドの系統解析結果を図-9に示す。余剰汚泥系の中温メタン発酵槽においては水素資化性メタン生成古細菌の *Methanobrevibacter*（バンドA1）、*Methanomicrobiaceae*（バンドA4）、および *Methanoculleus*（バンドA2）やメタン発酵消化汚泥の存在種として知られている酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosaeta*（バンドA3）等に近縁の種が検出された。高温メタン発酵槽保持汚泥中には、高温性水素資化性メタン生成古細菌の *Methanoculleus thermophilus*（バンドA5）や高温性酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosarcina thermophila*（バンドA6）等に近縁の種が検出された。牛ふん尿系高温メタン発酵槽においても、余剰汚泥系の高温メタン発酵槽と同様に、*Methanoculleus thermophilus*（バンドA9）に近縁の種が検出された。また、バンドA10はバンドA6の位置と同様な位置にバンドが出現ことから、

表-7 様々なメタン発酵槽内に見られた真正細菌のまとめ

処理対象物	温度	反応槽形式	推定種	解析手法等	文献
スターチ	55°C	CTSR	<i>Petrotoga mobilis</i>	DGGE	8)
プロテイン	55°C	CTSR	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i>		
牛ふん	55°C		<i>Bacillus thermoterrestris</i>	SSCP	15)
ビール排水		UASB	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Cytophaga</i> <i>Desulfovibrio</i>	DGGE	17)
豆腐製造排水	55°C	回分実験	<i>Thermobacter proteolyticus</i>	DGGE	19)
製紙工場排水		UASB	<i>Syntrophobacter</i> sp. <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Desulfobulbus elongatus</i>	DGGE	20)
グルコース	60°C	CFSTR	<i>Thermoanaerobacteroids proteolyticus</i> <i>Ruminococcus hydrogenotrophicus</i>	DGGE	22)
セルロース	60°C		<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium thermosuccinogenes</i>		
TCE	20°C	UASB	CFB group	DGGE	23)
TCE	20°C	CANOXIS	CFB group <i>Dechloromonas</i> sp.		
牛ふん尿	55°C	CTSR	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Coprothermobacter</i> sp.		
余剰汚泥	35°C	CTSR	Uncultured bacterium (<i>Spirochete</i> sp.) Uncultured bacterium (<i>Syntrophus</i> sp.) <i>Coprothermobacter</i> sp.	DGGE	本研究
ジャガイモ	55°C	CTSR	Uncultured eubacterium (<i>Bacteroides</i> sp.)		
	35°C	二相循環式			

表-8 様々なメタン発酵槽内に見られた古細菌のまとめ

処理対象物	温度	反応槽形式	推定種	解析手法等	文献
牛ふん	55°C		<i>Methanoculleus thermophilus</i> <i>Methanosarcina thermophila</i>	SSCP	15)
牛ふん	37°C	CSTR	<i>Methanosarcina siciliae</i>	TGGE	16)
ビール排水		UASB	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanobacterium formicum</i>	DGGE	17)
埋立地浸出液	35°C	UASB	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanoculleus</i> sp.	DGGE	18)
製紙工場排水		UASB	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanobacterium formicum</i>	DGGE	20)
セルロース	15°C 30°C		<i>Methanosaeta</i> <i>Methanosarcina</i>	FISH	21)
TCE	20°C	UASB	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanobacterium formicum</i>	DGGE	23)
TCE	20°C	CANOXIS	<i>Methanosaeta concilii</i>		
製薬排水	35°C	CSTR	<i>Methanosaeta concilii</i> <i>Methanobacterium formicum</i>	DGGE	24)
牛ふん尿	55°C	CTSR	<i>Methanoculleus thermophilus</i> <i>Methanosarcina thermophila</i>		
余剰汚泥	35°C	CTSR	<i>Methanoculleus palmaeoli</i> Uncultured <i>Methanosaeta</i> sp.	DGGE	本研究
	55°C	CTSR	<i>Methanoculleus thermophilus</i> <i>Methanosarcina thermophila</i>		
ジャガイモ	35°C	二相循環式	<i>Methanosarcina siciliae</i> <i>Methanoculleus bourgensis</i>		

高温性酢酸資化性メタン生成古細菌 *Methanosarcina thermophila* に近縁の種が検出された。ジャガイモ系中温メタン発酵槽における相同性検索を行った結果は、*Methanosarcina siciliae* (バンド A7) と *Methanoculleus bourgensis* (バンド A8) に近縁の種が検出された。

Methanosarcina 属と *Methanosaeta* 属は酢酸資化性メタン生成古細菌である。*Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属の酢酸利用性は、*Methanosarcina* 属の方が *Methanosaeta* 属よりも増殖速度が大きく、酢酸低濃度条件下では *Methanosaeta* 属、高濃度条件下では *Methanosarcina* 属が優占するとされている²⁵⁾。本研究の中温で運転した余剰汚泥系では *Methanosaeta* 属、ジャガイモ系では *Methanosarcina* 属の酢酸資化性メタン生成古細菌の存在が推定された。これは酢酸濃度が余剰汚泥系では低濃度、ジャガイモ系では高濃度であったためと考えられる。

4. 考察

(1) 本研究結果と既往のメタン発酵研究の微生物群集構造との比較

表-7に既知の文献と本研究において検出されたメタン発酵に関する真正細菌と本研究で推定した細菌のリストをまとめた。従来の研究によれば、処理対象物、反応槽温度および反応槽形式によって微生物菌叢が異なるが、代表的な真正細菌として糖やタンパク質を分解して酸、 H_2 および CO_2 等を生成する *Clostridium* sp.、および共生酢酸細菌の *Syntrophobacter* sp. や *Desulfovibrio* sp. 等が知られていた^{17), 20), 22)}。本研究においても加水分解、酸発酵等を担っている微生物種の *Clostridium* sp. や共生酢酸生成細菌

である*Syntrophus* sp.に近縁な種の存在が推定された。

既知の文献と本研究において検出されたメタン生成の古細菌のリストを表-8に示す。中温では、*Methanosaeta concilii*および*Methanobacterium formicum*が存在種であったが^{16)~20), 23), 24)}、高温では、*Methanosarcina thermophila*および*Methanoculleus thermophilus*が存在種として推定された¹⁵⁾。本研究においても高温の余剰汚泥系では高温性のメタン生成古細菌に近縁な種が検出され、既知の文献と同様な存在種が観察された。

(2) 同一基質におけるHRTおよび温度変化の影響

余剰汚泥系においてHRTを10日～30日に変化させたDGGEバンドを比較すると、中温または高温条件においてそれぞれ同様なバンドパターンを示したことから、温度と基質が同じであれば、少なくとも難分解性の余剰汚泥系ではHRT 10日～30日のHRT変化は微生物の群集構造に対する影響が少ないことがわかった。また、中温と高温のDGGEバンドを比較した結果、真正細菌および古細菌はいずれも異なる微生物群集を示した。これらの結果は、同一基質、同一種汚泥の場合、よく用いられるメタン発酵のHRT条件（HRT 10～30日）において、HRTによる微生物群集構造の影響が少ないが、中温発酵と高温発酵の群集構造は基本的に異なることを示唆している。

(3) 同一種汚泥に対する基質馴致の影響

高温牛ふん尿系および高温余剰汚泥系は同一の種汚泥を用いて連続運転を行い、基質馴致による影響を解析した。その結果、高温牛ふん尿系では*C. thermocellum*、*Coprothermobacter* sp.および*Peptostreptococcus* sp.等に近縁な種が検出され、高温余剰汚泥系においては、*Coprothermobacter* sp.に近縁な種が検出された。これより、同一の種汚泥を用いても基質馴致の違いによって真正細菌の群集構造が変化することが示された。一方、古細菌は、高温牛ふん尿系および高温余剰汚泥系のいずれにおいても*Methanosarcina thermophila*および*Methanoculleus thermophilus*のバンドが出現した。即ち、メタン発酵における真正細菌の群集構造は基質の種類により大きく異なるが、古細菌は比較的に類似した構造となることが示唆された。古細菌の菌叢に変化が少ないのは古細菌は真正細菌と比較して種類が少ないことや利用できる基質が酢酸、ギ酸、水素およびメタノール等に限定されていることが大きな要因と考えられる。

5. 結論

PCR-DGGE法を用いて廃棄物系バイオマス（搾乳牛ふん尿、余剰汚泥およびジャガイモ加工廃棄物）のメタン

発酵反応槽における微生物の群集構造について解析した結果、以下の結論を得た。

- 1) 余剰汚泥系の中温と高温のDGGEバンドを比較した結果、真正細菌および古細菌は温度条件の違いによって異なる微生物群集のバンドパターンとなることが示された。また、同一基質、同一種汚泥の場合、メタン発酵によく用いられるHRT条件（HRT 10～30日）において、HRTによる微生物群集構造の影響が少ないことがわかった。
- 2) 同一の種汚泥を用いても基質馴致の違いによりメタン発酵における真正細菌の群集構造は基質の種類により大きく異なるが、古細菌は比較的に似た構造となることが示唆された。
- 3) 本研究および既往の研究の文献調査の結果より高温メタン発酵において存在する古細菌は高温性酢酸資化性メタン生成古細菌の*Methanosarcina thermophila*と高温性水素資化性メタン生成古細菌*Methanoculleus thermophilus*に近縁な種であることが示唆された。
- 4) 中温メタン発酵において存在する古細菌のうち酢酸資化性メタン生成古細菌は酢酸低濃度である中温余剰汚泥系では*Methanosaeta*属に近縁な種が検出され、酢酸高濃度である中温ジャガイモ系においては、*Methanosarcina siciliae*に近縁な種が検出された。

謝辞：本研究の一部は、（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託研究プロジェクト「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発／有機物の分解促進による下水汚泥高効率嫌気性消化システムの開発」の一環として実施したものである。ここに記して関係者に感謝致します。

参考文献

- 1) 李玉友：メタン回収技術の応用現状と展望，水環境学会誌，Vol.27，No.7，pp.622-626，2004。
- 2) 澤山茂樹：新しいメタン発酵技術の動向，バイオサイエンスとインダストリー，Vol.63，No.1，pp.48-51，2005。
- 3) 上木勝司，永井史郎編：嫌気微生物学，養賢堂，1993。
- 4) Anann, R.L, Ludwig and W. Schleifer, K.H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol.Rev., Vol.59, No.1, pp.143-169, 1995。
- 5) 栗栖太，佐藤弘泰，味埜俊，松尾友矩：食用油を添加した高温接触酸化処理における FISH 法・キノプロファイル法・PCR-DGGE 法を用いた微生物群集の解析，土木学会論文集，No.636/VII-13，pp.22-23，1999。
- 6) 小貫元治，佐藤弘泰，味埜俊：PCR-DGGE 法による嫌気好気汚泥の微生物群集解析，環境工学論文集，Vol.37，pp.9-15，2000。
- 7) 岡本真由子，福島寿和，小貫元治，味埜俊：単一基質で運転した生物学的リン除去プロセスにおける PCR-DGGE 法を用いた微生物群集解析と FISH 法を用いた生物学的リン除去を

- 担う微生物の同定, 環境工学論文集, Vol.41, pp.301-309, 2004.
- 8) 谷川大輔, 山口隆司, 市坪誠, 荒木信夫, 高橋康晴, 珠坪一晃, 宮晶子, 長屋由亀, 原田秀樹: スターチとプロテインを炭素源とする高温メタン発酵槽における有機酸分解特性および微生物生態の評価, 環境工学論文集, Vol.41, pp.87-95, 2004.
- 9) 新田見匡, 山崎恵美, 佐藤弘泰, 味埜俊, 伊藤公夫, 三木理: Nitrite Reductase 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法によるコークス炉廃水処理活性汚泥中の脱窒細菌群集構造の解析, 水環境学会誌, Vol.27, No.4, pp.249-254, 2004.
- 10) 小野(伊津)恭子, 山本和夫, 中島典之: 光合成細菌を用いた廃水処理における紅色非硫黄細菌の選択的増殖のための諸条件の検討, 水環境学会誌, Vol.27, No.7, pp.261-266, 2004.
- 11) 登坂充博, 李玉友, 野池達也: PCR-DGGE 法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析, 土木学会論文集, Vol.79/VII-35, pp.1-13, 2005.
- 12) Mutyer, G., de Waal, E.C. and Unitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, No.3, pp.695-700, 1993.
- 13) Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K. and Kimura, M.: DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil, FEMS Microbiol. Letters, Vol.232, pp.153-163, 2004.
- 14) Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition, 1994.
- 15) Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, L., Dudaui, T. and Godon, J.J.: 16S rDNA characterization of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure, Bioresource Technology, Vol.93, pp.227-232, 2004.
- 16) Mladenovska, Z., Dabrowski, S. and Ahning, B.K.: Anaerobic digestion of manure and mixture of manure with lipids: biogas reactor performance and microbial community analysis, Water Science and Technology, Vol.48, No.6, pp.271-278, 2003.
- 17) Chan, O.C., Liu, W.-T. and Fang, H.H.P.: Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene, Water Science and Technology, Vol.43, No.1, pp.77-82, 2001.
- 18) Calli, B., Mertoglu, B., Tas, N., Inanc, B., Yenigun, O. and Ozturk I.: Investigation of variations in microbial diversity in anaerobic reactors treating landfill leachate, Water Science and Technology, Vol.48, No.4, pp.105-112, 2003.
- 19) ハオ リン ユン, 片岡直明, 宮晶子, 石田健一, 山田紀夫, 鈴木隆幸: 豆腐製造排水のメタン発酵特性と微生物群集解析, 水環境学会誌, Vol.27, No.5, pp.315-321, 2004.
- 20) Roest, K., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., de Vos, W.M., Stams, A.J.M. and Akkermans, A.D.L.: Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater, Systematic and Applied Microbiology, Vol.28, pp.175-185, 2005.
- 21) Wu, X.-L., Chin, K.-J., Stubner, S. and Conrad, R.: Functional patterns and temperature response of cellulose-fermenting microbial cultures containing different methanogenic communities, Appl. Microbiol. biotechnol., Vol.56, pp.212-219, 2001.
- 22) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. and Igarashi, Y.: Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor, Appl. Microbiol. biotechnol., Vol.57, pp.65-73, 2001.
- 23) Tresse, O., Mounier, F., Levesque, M.-J. and Guiot, S.: Comparison of the microbial population dynamics and phylogenetic characterization of a CANOXIS reactor and a UASB reactor degrading trichloroethene, Journal of Applied Microbiology, Vol.98, pp.440-449, 2005.
- 24) Akarsubasi, A.T., Ince and O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K.: Effect of wastewater composition on archaeal population diversity, Water Research, Vol.39, pp.1576-1584, 2005.
- 25) Specce, R. E.: 産業廃水処理のための嫌気性バイオテクノロジー, 技報堂出版, 1999.

(2005.5.31 受付)

ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY IN METHANE FERMENTATION OF SOLID WASTE BIOMASS BY PCR-DGGE METHOD

Mika OHBA, Sangsan TEEPYOBON, Sachiko ANNO, Yu-You LI
and Tatsuya NOIKE

The structure of microbial community in the methane fermentation of solid waste was investigated by using PCR-DGGE method. The experiments were conducted for a total of 12 reactors operated, respectively, at different substrates (including cow manure, waste activated sludge and potato processing waste), different temperatures (mesophilic and thermophilic) and different HRTs. It was found that the microbial communities during the mesophilic and thermophilic condition are basically different, but there was no significant change in the both of eubacteria and archaea for the HRT ranging from 10 to 30 days for the same substrate and the same temperature condition. In the thermophilic reactors acclimated with a same seed, the structure of eubacteria clearly depended on the acclimated substrate, but the archaea were similar each other. The analysis of 16S rDNA sequences indicated that the archaeal bands for thermophilic reactor were similar to that of *Methanosarcina thermophila* and *Methanoculleus thermophilus*. In the mesophilic reactors, *Methanosaeta* sp., *Methanobrevibacter* sp., *Methanomicrobiacea*, and *Methanoculleus palmaeoli* were found.