二相循環式水素・メタン発酵プロセスにおける微生物群集の構造解析

大羽 美香* 李 玉友* 野池 達也**

Analysis of Microbial Community in Two-Phase Circulating Process for Hydrogen and Methane Fermentation

Mika OHBA*, Yu-You LI* and Tatsuya NOIKE**

* Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 06 Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

** Advanced Research Institute for the Sciences and Humanities, Nihon University, 6F Ichigaya Tokyu Building, 2-1 Kudan-kita 4-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0073, Japan

Abstract

The structure of a microbial community during a two-phase circulating process for the hydrogen and methane fermentation of potato was investigated using a molecular biological approach. The process was performed using a mixing tank, a thermophilic acidogenic reactor (55 °C) and a mesophilic methanogenic reactor (36 °C) connected in series with the recirculation of methanogenic mixed liquor to the mixing tank. A continuous experiment was conducted by changing the process hydraulic retention time (HRT) stepwise from 56 days to 30 days, then 20 days and 15 days. A stable and high-rate hydrogen and methane fermentation was possible at a process HRT of 20 days with a hydrogen production rate of $3.6 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and a methane production rate of $3.4 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with 16S rRNA gene-targeted polymerase chain reaction (PCR) analysis was employed to identify the structure of a microbial community at various conditions for each reactor. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and *Clostridium sporosphaeroides* were considered to be the major hydrogen-producing bacteria in the thermophilic acidogenic reactor, whereas *Methanosarcina siciliae* and *Methanoculleus bourgensis* were considered, respectively, to be the acetate-utilizing and hydrogen-utilizing methanogenic archaea in the mesophilic methanogenic reactor.

Key words: two-phase, microbial community, hydrogen fermentation, methane fermentation, PCR-DGGE

1. はじめに

メタン発酵は、嫌気性微生物の作用により食品廃棄物、家畜排泄物、下水汚泥等の廃棄物系バイオマスからバイオガスを生産する技術として古くから知られている。近年、地球温暖化防止、循環型社会の形成、新エネルギーの開発、バイオマス利活用等の観点から、メタン発酵技術の有用性が再認識され、新技術の開発が注目されている¹⁻³⁾。

食品廃棄物等の高濃度有機性廃棄物を対象としたメタン発酵において、VFAの蓄積、高濃度アンモニアによるメタン生成阻害等、依然として多くの問題が残されている。このような問題の大半は加水分解細菌や酸生成細菌とメタン生成古細菌の最適生育条件が異なることから生じる。二相式メタン発酵プロセスは、発酵槽を二相に分離することによりそれぞれの微生物に対して最適な分解が可能となる。酸生成槽とメタン発酵槽の二相に分離したプロセスは様々な研究がなされている⁴⁻⁷⁾。また、酸生成と同時に水素が生成することが知られており⁸⁾、酸生成槽を水素発酵槽としてとらえた水素・メタン二相式プロセスの研究が始まったばかりである^{9,10)}。

嫌気性発酵による有機物の分解は、いくつかの代謝グループに類別できる生理的性質の異なった多様な細菌で構成されており、各種代謝グループの細菌の共同作用により進行する。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、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の揮発性脂肪酸や、乳酸やコハク酸、あるいはエタノール等のアルコール類、 H_2 、 CO_2 等に分解される。長鎖脂肪酸等は 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、最終段階のメタン生成古細菌により CH_4 に変換される¹¹⁾。

このように、メタン発酵プロセスは複合微生物系であり、共生を必要とする特殊な環境で進行するため複雑である。それゆえ、微生物の大半が通常使用される培地上での培養が困難である。この難培養性の問題をクリアするため、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。生物学的排水処理の分野においても環境中の複合微生物を対象とした群集構造解析に有用なPCR-DGGE法を用

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06

** 日本大学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

いた研究の報告^{13~20)}がみられる。メタン発酵分野においても報告があり^{21~24)}、真正細菌や古細菌を標的とした微生物群集構造解析の研究が行われている。

著者ら²⁵⁾は廃棄物系バイオマスを効率良く分解し、エネルギー変換を実現するため、高温酸発酵槽と中温メタン発酵槽からなる二相循環式水素・メタン発酵プロセスを提案し、異なるHRT条件での水素発酵特性およびメタン発酵特性を報告した。本研究では同プロセスにおける微生物群集構造の把握を目的として、分子生物学的な手法のPCR-DGGE法による解析を行った。

2. 方 法

2.1 実験材料

実験装置はFig. 1に示すとおり、二相循環式・水素メタン発酵プロセスを採用した。基質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(Po)を用いた。混合タンク(MT, 4°C)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の割合となるように混合した。この混合物を高温酸発酵槽(TAR; 有効容量3 l, 55°C)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(MMR; 有効容積12 l, 36°C)に投入し、メタン発酵を行った。

実験条件はプロセス全体のHRTを56日(RUN1)、30日(RUN2)、20日(RUN3)および15日(RUN4)と段階的に変化させて(高温酸発酵槽のHRTで5.6~1.5日、中温メタン発酵槽のHRTで22.4~6日)それぞれ、47日間、92日間、126日間および9日間(酸敗のため、長く運転できなかった)の連続運転を行った。本研究においては、水道水による希釈およびpH制御のための薬注を行わなかった。さらに、生ごみ等の高濃度有機性廃棄物では栄養塩(Fe, Co, Ni等)の不足が考えられ栄養塩の添加が必要であるという報告²⁶⁾があるが、本研究においてはそれらの添加も行わずに、連続運転を行った。高温酸発酵槽の種汚泥は生ごみと尿汚泥の混合物を処理した高温メタン発酵槽より採取したものを用いた。中温メタン発酵槽の種汚泥は、生ごみの中温高濃度メタン発酵槽より採取したものを用いた。

2.2 微生物群集構造解析

2.2.1 反応槽サンプルのDNA抽出

各反応槽のサンプルを0.3 g採取し、Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO)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、精製を行った。このDNA抽出液はPCR反応の鋳型として用いた。

2.2.2 PCR-DGGE法

抽出したDNA抽出液を鋳型として、真正細菌の場合、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357fGC (GCクランプ付)、518rを使用した²⁷⁾(Table 1)。PCRはPCR装置を用いて94°C, 9 min→(94°C, 30 s→53°C, 30 s→72°C, 30 s)×35サイクル→72°C, 5 minの条件で行った。また、古細菌(メタン生成細菌等を含む)16S rRNA遺伝子の増幅はプライマーとしてARC357fGC, ARC691rを使用した²⁸⁾(Table 1)。PCRの条件は94°C, 3 min→(94°C, 1 min→53°C, 1 min→72°C, 2 min)×35サイクル→72°C, 8 minで行った。

DGGEにはレゾルマックス・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

Fig.1 Schematic diagram of the two-phase circulating process for hydrogen and methane fermentation process

Table 1 Sequences of primers used in this study

Primer	Sequence	Specificity	Reference
Bac357fGC	5'-GC-clamp CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Bacteria	27)
Bac518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Bacteria	27)
Arc357fGC	5'-GC-clamp CCCTACGGGGCGCAGCAG-3'	Archaea	28)
Arc691r	5'-GGATTACARGAT TTCAC-3'	Archaea	28)

GC-clamp: CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGCA CGGGGG

剤の濃度勾配は15~55% (ここで変性剤100%とは、7M尿素、40%ホルムアミドに相当する。)に設定し、58°C, 130 V, 300分間の条件で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、イメージアナライザによって画像解析を行った。

塩基配列解読のため、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。シーケンサーには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-j.html>)により既知の種から最も近縁な微生物を検索した。

2.2.3 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。

2.3 分析方法

pH, TS, VS, SS, VSSおよびアルカリ度の測定は下水道試験法に従って行った。COD_{Cr}は米国のStandard Methodsにより測定した。有機酸(VFA, NVFA)濃度およびNH₄-N濃度はキャピラリー電気泳動装置(Photal, CAPI-3200, キャピラリーカラム(ID75 μm×805mm), 25°C, 220nm インダイレクトUV検出器)を用いて測定した。ガス生成量は湿式ガスメーターにより計量した。

Fig. 2 Operation performance of hydrogen and methane fermentation in the two-phase circulating process at a process HRT of 20days

水素ガスの割合はTCD-ガスクロマトグラフ Shimadzu GC-8A (2.0mステンレスカラム, UnibedC充填, 試料注入部温度100℃, カラム温度70℃, 検出器温度100℃, 窒素キャリアガス50ml・min⁻¹)により測定した。また、メタンと二酸化炭素は別のTCD-ガスクロマトグラフ Shimadzu GC-8A (2.0mステンレスカラム, PorapakT充填, 試料注入部温度140℃, カラム温度70℃, 検出器温度100℃, ヘリウムキャリアガス30ml・min⁻¹)により測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 プロセス全体のHRTが20日条件下の発酵特性

3.1.1 運転状況

前報²⁵⁾ではプロセス全体のHRT20日で長期間の安定運転が実現できたことを報告した。HRT20日条件下の定常データの平均値をFig. 2に示す。高温酸発酵槽においてメタンガスは検出されず、水素ガス組成が45%であり、水素ガス生成速度も3.6 l・l⁻¹・d⁻¹と高かった。また、中温メタン発酵槽のメタンガス組成は58%であり、メタンガス生成速度は3.4 l・l⁻¹・d⁻¹であった。これより、本プロセスは、水素生成とメタン生成を完全に分離することが可能であることが示された。

Table 2に有機酸濃度を示す。高温酸発酵槽 (TAR) の主要代謝産物は酢酸、酪酸およびカプロン酸であった。

3.1.2 COD物質収支

HRT20日の時のCOD物質収支はFig. 3に示す。有機物の存在態を固形物、溶解性物質およびバイオガス(水素ガスおよびメタンガス)に大別し、化学量論式から求めたCOD換算係数により各条件でのCOD物質収支を算出した³⁰⁾。高温酸発酵槽ではCOD成分の5.3%が水素ガス、中温メタン発酵槽では80.6%がメタンガスに転換され、バイオガスへの合計転換率は85.9%と高かった。

3.2 微生物群集の多様性解析

3.2.1 真正細菌を標的とした異なる反応槽におけるPCR-DGGE解析

Fig. 4に高温酸発酵槽の種汚泥と中温メタン発酵槽の種汚泥を比較したものとスタートアップ時 (運転17日目) および171日運転時の二相循環式プロセスの各反応槽 (混合

Table 2 VFAs concentrations at thermophilic acidogenic reactor (TAR) and mesophilic methanogenic reactor (MMR)

VFAs (mg・l ⁻¹)	TAR	MMR
Acetate	7830	1350
Propionate	480	177
Butyrate	2450	166
Valerate	320	0
Caproate	2470	7.2

Fig. 3 COD_{Cr} mass balance at a process HRT of 20days

タンク、高温酸発酵槽および中温メタン発酵槽)を比較した真正細菌のDGGEバンドプロファイルである。異なる種汚泥ではDGGEバンドパターンに違いがみられた。また、異なる反応槽における微生物の変化は、運転開始初期 (17日目, HRT56日) のバンドパターンにおいては多様性に富んでいたが、171日目 (HRT20日) では共通したバンドがいくつか出現した。このことは、本研究で用いたプロセスが中温メタン発酵廃液の一部を返送し、基質と混合を行う廃液循環型のプロセスであることから、それぞれの反応槽に同じ細菌が定着したことを示している。

SA: Seed sludge for TAR, SM: Seed sludge for MMR,
MT: Mixing tank, TAR: Thermophilic acidogenic reactor,
MMR: Mesophilic methanogenic reactor

Fig. 4 DGGE profiles for *Bacteria* in the Two-Phase circulating process

3. 2. 2 高温酸発酵槽における真正細菌の時系列のPCR-DGGE解析

Fig.5に高温酸発酵槽の時系列的な真正細菌を標的としたDGGEバンドパターンを示す。種汚泥およびスタートアップ時(17日目)は比較的多数のバンドがみられたが、次第に単純化された。メタンが生成されていたスタートアップ時(17日目)の頃とその後の水素生成期間(38日目以降)ではDGGEバンドパターンが異なった。また、HRT30日においてはバンドパターンが類似する傾向が見られ、HRT20日においてはバンドパターンが類似した。主要バンドのDNAを分離精製し、微生物種の塩基配列を推定した結果は**Table 3**に示したとおりである。

スタートアップ時に出現していたバンドA3は高温性タンパク質分解菌として知られている*Coprothermobacter* sp.と最も近縁であった。このバンドは次第に淘汰した。これは、本研究で使用した基質が炭水化物を主成分としたジャガイモであるので*Coprothermobacter* sp.に近縁な種が定着しなかったことが示唆された。乳酸球菌である*Vagococcus salmoninarum* (A11, 相溶性99%)が全期間に渡って検出された。さらに、安定的な水素生成が確認できたHRT20日に出現していたバンドA9およびA10は、水素生成細菌である*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (96%) および*Clostridium sporosphaeroides* (94%) に近縁な種であった。

また、Uncultured eubacterium のバンドA6およびA7の最も近縁な既知種は酢酸、プロピオン酸および乳酸等の酸を生成する嫌気性細菌の*Bacteroides* sp.³⁰⁾であり、HRT30日後半で淘汰したUncultured bacteriumのバンドA4の最も近縁な既知種は*Flavobacterium* sp.であった。

Fig.5 DGGE profiles for *Bacteria* in the thermophilic acidogenic reactor

Fig.6 DGGE profiles for *Bacteria* in the mesophilic methanogenic reactor

3. 2. 3 中温メタン発酵槽における真正細菌の時系列のPCR-DGGE解析

中温メタン発酵槽の時系列的な真正細菌を標的としたDGGEバンドパターンは**Fig.6**に示す。中温メタン発酵槽においても高温酸発酵槽と同様に、種汚泥およびスタートアップ時(17日目)は比較的多数のバンドがみられたが、次第に単純化された。いくつかの主要バンドの塩基配列の解読後に相溶性検索を行った果を**Table 4**に示す。高温酸発酵槽(バンドA6)でも確認されたUncultured eubacterium WJGRT-184 (バンドB1, 相溶性99%)は中温メタン発酵槽の主要バンドの一つとして検出された。このバンドの最も近縁な既知種は*Bacteroides* sp.であり、酸敗しガス生成が低下したHRT15日では淘汰した。同様にバンドB7 (Uncultured manure pit bacterium P316)もHRT15日で消失した。また、酸敗時も含めて常時出現していたバンドB14はUncultured eubacterium LKB86 (相溶性100%)であり、最も近縁な既知種は*Spirochete* sp.であった。その他、メタン生成細菌と共生細菌と考えられる*Desulfovibrio* sp.に近縁なバンドB8

Table 3 Affiliation of DGGE fragments determined by their 16S rDNA sequence in the thermophilic acidogenic reactor for *Bacteria*

Band	Sequence determined (bp)	Closest relative	Similarity	Accession no.	remarks
A1	159	Uncultured bacterium clone 060F05_B_SD_P93	98%	CR933305	<i>Petrogla mobilis</i>
A2	163	Uncultured bacterium clone 2-1	95%	AY883098	<i>Clostridium</i> sp.
A3	137	<i>Coprothermobacter</i> sp. P1	98%	AB162803	proteolytic thermophilic bacterium
A4	155	Uncultured bacterium clone GZKB8	98%	AJ853503	<i>Flavobacterium</i> sp.
A5	137	Uncultured bacterium clone AD-11	94%	AY609349	
A6	158	Uncultured eubacterium WJGRT-184	99%	AF175663	<i>Bacteroides</i> sp.
A7	158	Uncultured eubacterium LKB22	100%	AJ746433	<i>Bacteroides</i> sp.
A8	159	<i>Morganella</i> sp. JB-T11	96%	AJ781004	
A9	135	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	96%	AB059411	hydrogen production bacterium
A10	140	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	94%	X66002	hydrogen production bacterium
A11	163	<i>Vagococcus salmoninarum</i>	99%	AY577824	lactic acid bacterium
A12	158	Uncultured bacterium clone LC193	99%	AY816769	<i>Bacteroides</i> sp.
A13	164	Uncultured <i>Bacteroides</i> sp. LTUCFB09014	96%	AY144266	

Table 4 Affiliation of DGGE fragments determined by their 16S rDNA sequence in the mesophilic methanogenic reactor for *Bacteria*

Band	Sequence determined (bp)	Closest relative	Similarity	Accession no.	remarks
B1	158	Uncultured eubacterium WJGRT-184	99%	AF175663	<i>Bacteroides</i> sp.
B2	140	Uncultured bacterium clone ZB18	99%	AY327235	
B3	132	Uncultured bacterium clone AD-11	90%	AY609349	
B4	179	Uncultured eubacterium LKB144	88%	AJ746536	
B5	102	Uncultured eubacterium LKB152	94%	AJ746543	
B6	158	Uncultured bacterium TSI14	94%	AB186815	
B7	130	Uncultured manure pit bacterium P316	93%	AF261803	<i>Clostridium orbiscindens</i>
B8	93	Uncultured eubacterium LKB119	95%	AJ746514	<i>Desulfovibrio</i> sp.
B9	149	Uncultured bacterium clone GZKB8	97%	AJ853503	<i>Flavobacterium</i> sp.
B10	111	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone AKYH530	96%	AY921704	<i>Desulfovibrio</i> sp.
B11	160	Uncultured eubacterium LKB22	98%	AJ746433	<i>Bacteroides</i> sp.
B12	149	Uncultured eubacterium LKB88	99%	AJ746491	<i>Capnocytophaga sputigena</i>
B13	153	Uncultured bacterium clone 012E05_B_SD_P15	99%	CR933139	
B14	158	Uncultured eubacterium LKB86	100%	AJ746489	<i>Spirochete</i> sp.
B15	155	Uncultured <i>Bacteroides</i> sp. LTUCFB09014	96%	AY144266	

(Uncultured eubacterium LKB119) や B10 (Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone AKYH530) が検出された。Fig.6の中温メタン発酵槽における真正細菌のDGGEプロファイルより、メタン生成時にはバンドB1およびB7が定着するが酸敗時には淘汰することが示された。また、バンドB13およびB14はメタン生成時および酸敗時においても常に中温メタン発酵槽に定着していた。

3.2.4 中温メタン発酵槽における古細菌の時系列のPCR-DGGE解析

中温メタン発酵槽における古細菌の時系列的なDGGEバンドパターンをFig.7に示す。中温メタン発酵槽に出現していたDGGEバンドのシーケンス結果をTable 5に示す。種汚泥にも出現し、中温メタン発酵槽においても常時出現していたバンドM1は*Methanosarcina siciliae*と98%の相同性があった。同じく、常時出現していたバンドM2は、*Methanoculleus bourgensis*と97%の相同性があった。また、中温メタン発酵槽種汚泥由来以外のバンドM3も出現した。バンドM3はHRTを30日に変化させた後、淘汰した。このバンドを解析したところ、*Methanosarcina thermophila*と99%の相同性があった。これは高温酸発酵槽の種汚泥から検出されたバンドと一致した（データは示さず）。これらのことから、中温メタン発酵槽では高温性のメタン生成古細菌である*Methanosarcina thermophila*に近縁な種は定着しなかったが、*Methanosarcina siciliae*と*Methanoculleus bourgensis*に近縁な種が定着したことが示された。

3.2.5 位相差顕微鏡による観察

高温酸発酵槽および中温メタン発酵槽内の位相差顕微鏡による観察を行った (Fig.8)。高温酸発酵槽は全体的に

Fig.7 DGGE profiles for *Archaea* in the mesophilic methanogenic reactor**Table 5** Affiliation of DGGE fragments determined by their 16S rDNA sequence in the mesophilic methanogenic reactor for *Archaea*

Band	Sequence determined (bp)	Closest relative	Similarity	Accession no.
C1	307	<i>Methanosarcina siciliae</i>	97%	U89773
C2	303	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	98%	AY196674
C3	307	<i>Methanosarcina thermophila</i>	99%	M59140

桿菌が多く観察された。中温メタン発酵槽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、この集合体が高い自家蛍光を発することが蛍光顕微鏡により確認できた。

本研究で行ったPCR-DGGE法の解析および顕微鏡観察の観察により中温メタン発酵槽内に*Methanosarcina*属に近縁な種が広く分布していることが分かり、重要な役割を果たしていることが示唆された。

Fig.8 Photograph mixed liquor in a) thermophilic acidogenic reactor, b) mesophilic methanogenic reactor, c) *Methanosarcina*-like *Archaea* under fluorescent excitation in mesophilic methanogenic reactor

4. 考 察

4.1 二相循環式水素・メタン発酵槽の微生物群集構造

PCR-DGGE法による解析および顕微鏡観察により得られたHRT 20日で安定運転時の二相循環式水素・メタン発酵槽の微生物群集構造を (Fig.9) にまとめた。高温酸発酵槽では水素生成細菌の *T. thermosaccharolyticum*, *C.sporosphaeroides*および乳酸菌の *V.salmoninarum* に近縁な種が定着した。また, *Bacteroides*と *Flavobacterium*に近縁な種が高温酸発酵槽および中温メタン発酵槽から検出された。中温メタン発酵槽で検出された真正細菌は *Spirochete* sp.および *Capnocytophaga* sp.の近縁種であった。メタン生成を担う古細菌は酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosarcina siciliae*に近縁な種と水素資化性メタン生成古細菌の *Methanoculleus bourgensis*に近縁な種が検出された。

4.2 高温水素発酵と *T. thermosaccharolyticum* の関連

連続運転の発酵特性のデータ²⁵⁾と本研究の微生物群集の解析データ (Fig.5とTable 3) を比較すると, 高温酸発酵槽のHRT56日およびHRT30日においてPCR-DGGE解析のバンドパターンを経日的に観察した結果, 特に *T. thermosaccharolyticum*と近縁な種 (A-9) のバンドが不安定であったとき, バイオガス生成も不安定であった。また, *T. thermosaccharolyticum*と近縁な種のバンドが安定的に確認されたHRT20日において水素ガスの生成が安定したという結果が得られた。 *T. thermosaccharolyticum*は, 高温水

素発酵の微生物群集構造解析を行っているUenoら³¹⁾の報告やShinら³²⁾の報告でも優占種の一つであると挙げられている。本研究では, 安定した水素生成時に検出されたことから *T. thermosaccharolyticum*は高温水素発酵において重要な微生物種であることが推定される。

4.3 中温メタン発酵槽の古細菌の微生物群集構造

中温メタン発酵槽においても, HRT56日の初期はスタートアップの影響により, DGGEバンドパターンも不安定であったが, 次第にバンドが類似化し, 顕微鏡観察からサルシナ状の細菌が広く存在していたことも確認でき, メタンガス生成も安定していた。

3.2.4に示したとおり, 中温メタン発酵槽において近縁種として検出された *Methanoculleus* 属は, 水素資化性メタン生成細菌であり, 水素・炭酸ガスの他にギ酸を利用してメタンガスを生成することができる。細胞形態は不定形な球状, および最適温度は35℃~40℃である³³⁾。一方, *Methanosarcina* 属は酢酸資化性メタン生成細菌ということが知られており³⁴⁾, 酢酸の他にメタノール, 水素・炭酸ガス, メチル化合物 (トリメチルアミン, メタノール等) 等多種類の基質を利用してメタンを生成できる。細胞形態はサルシナ状であり, 中温性と高温性の *Methanosarcina* 属が分離されており, それぞれ30℃~40℃および50℃程度と最適温度が異なる。

酢酸資化性メタン生成細菌は *Methanosarcina* 属の他に酢酸のみを基質とする *Methanosaeta* 属が知られている。 *Methanosarcina* 属と *Methanosaeta* 属の酢酸利用性は,

Fig.9 Microbial community in the Two-Phase circulating process at a process HRT of 20days

*Methanosarcina*属の方が*Methanosaeta*属よりも増殖速度が大きく、酢酸低濃度 ($70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下) 条件下では*Methanosaeta*属、高濃度 ($70 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上) 条件下では*Methanosarcina*属が優占するとされている³⁵⁾。また、重松ら³⁵⁾はプロピオン酸を分解するメタン発酵槽内の微生物相を解析し、低希釈率条件の場合*Methanosaeta*属、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いう結果を得ている。

一般的に、メタン発酵プロセスにおいて生成するメタンガスは70%が酢酸由来で残りの30%は水素・炭酸ガス由来であるとされている³⁶⁾。本研究のジャガイモ加工廃棄物を用いた二相循環式水素・メタン発酵プロセスにおいて、水素資化性メタン生成細菌である*Methanoculleus*属と酢酸資化性メタン生成細菌である*Methanosarcina*属に近縁なバンドがPCR-DGGE解析により検出された。

5. ま と め

ジャガイモ加工廃棄物を処理した二相循環式水素・メタン発酵における微生物群集構造について解析を行った結果、以下のような知見が得られた。

1) プロセス全体のHRTが20日のとき、高温酸発酵槽において水素ガス生成速度が $3.6 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ と高かった。また、中温メタン発酵槽のメタンガス生成速度は $3.4 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ であった。これより、本プロセスは、水素生成とメタン生成を完全に分離することが可能であった。

2) 高温酸発酵槽の真正細菌の微生物群集構造の解析において、安定した水素生成の時に*T. thermosaccharolyticum*に近縁な種のバンドが検出されたことから、高温水素発酵において重要な微生物種であることが推定される。

3) 中温メタン発酵槽の古細菌の微生物群集構造の解析において、酢酸資化性メタン生成古細菌の*Methanosarcina siciliae*に近縁な種が検出され、ジャガイモ加工廃棄物のメタン発酵プロセスでは重要な役割を果たしていることが示唆された。また、水素資化性メタン古細菌は*Methanoculleus bourgensis*に近縁な種が検出された。

(原稿受付 2005年11月29日)

(原稿受理 2006年 5月 8日)

参 考 文 献

- 1) 李玉友 (2004) メタン回収技術の応用現状と展望, 水環境学会誌, 27(7), 622-626.
- 2) 澤山茂樹 (2005) 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, 63(1), 48-51.
- 3) 津野洋 (2004) 都市廃水・廃棄物からの資源回収システムの現状と展望, 水環境学会誌, 27(7), 618-621.
- 4) Bhattacharya, S. K., Madura, R.L., Walling, D.A. and Breure, A. M. (1996) Volatile solids reduction in two-phase and conventional anaerobic sludge digestion, *Wat. Res.*, 30(5), 1041-1048.
- 5) Shin, H. S., Han, S. K., Song Y. C. and Lee C. Y. (2001) Performance of uasb reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste, *Wat. Res.*, 35(14) 3441-3447.
- 6) von Sachs, J., Meyer, U., Rys, P. and Feitkenhauer, H. (2003) New approach to control the methanogenic reactor of a two-phase anaerobic digestion system, *Wat. Res.*, 37(5), 973-982.
- 7) 福間三喜, 武貞健太郎, 安西晟 (1993) セルロース系廃棄物の2相式嫌気性処理によるメタン生成, 化学工学論文集, 19(5), 885-892.
- 8) Cohen, A., Zoetemeyer, R. J., Deursen, A. V. and Andel, J.G.V. (1979) Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation, *Wat. Res.*, 13(7), 571-580.
- 9) 西尾尚道, 中島田豊 (2004) 各種廃水・廃棄物の水素・メタン発酵, 第7回水環境学会シンポジウム講演集, 163-164.
- 10) Nishio, N. and Nakashimada, Y. (2004) High rate production of hydrogen/methane from various substrates and wastes, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 90, 63-87.
- 11) 須藤隆一編著 (2004) 水環境保全のための生物学, 産業用水調査会, 東京.
- 12) Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol.Rev.*, 59(1), 143-169.
- 13) 栗栖太, 佐藤弘泰, 味埜俊 (1999) 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・キノンプロファイル法・PCR-DGGE法を用いた微生物群集の解析, 土木学会論文集, 636, 22-23.
- 14) 小貫元治, 佐藤弘泰, 味埜俊 (2000) 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, 37, 9-15.
- 15) 岡本真由子, 福島寿和, 小貫元治, 味埜俊 (2004) 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, **41**, 301-309.
- 16) 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 (2004) 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, **41**, 87-95.
 - 17) 新田見匡, 山崎恵美, 佐藤弘泰, 味埜俊, 伊藤公夫, 三木理 (2004) 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, **27**(4), 249-254.
 - 18) 小野(伊津)恭子, 山本和夫, 中島典之 (2004) 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, **27**(7), 261-266.
 - 19) 登坂充博, 李玉友, 野池達也 (2005) 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, **790** (VII-35), 1-13.
 - 20) 大羽美香, Teepyobon, S., 安納幸子, 李玉友, 野池達也 (2005) 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, 土木学会論文集, **804** (VII-37), 33-42.
 - 21) Akarsubasi, A.T., Ince and O., Kirdar, B., Oz, N.A., Orhon, D., Curtis, T.P., Head, I.M., Ince, B.K. (2005) Effect of wastewater composition on archaeal population diversity, *Water Research*, **39**, 1576-1584.
 - 22) Chan, O.C., Liu, W-T. and Fang H.H.P. (2001) Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16SrRNA gene, *Water Science and Technology*, **43**(1), 77-82.
 - 23) Roest, K., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., de Vos, W.M., Stams, A.J.M. and Akkermans, A.D.L. (2005) Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater, *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 175-185.
 - 24) 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 (2004) 豆腐製造排水のメタン発酵特性と微生物群解析, 水環境学会誌, **27**(5), 315-321.
 - 25) 大羽美香, 李玉友, 野池達也 (2005) 二相循環プロセスによるジャガイモ加工廃棄物の無希釈水素・メタン発酵の特性, 水環境学会誌, **28**(10), 629-636.
 - 26) 李玉友, 佐々木宏, 奥野芳男, 関廣二, 上垣内郁夫 (1998) 生ごみの高濃度メタン発酵に及ぼす投入濃度の影響, 環境工学研究論文集, **35**, 29-39.
 - 27) Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.(1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), 695-700.
 - 28) Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K. and Kimura, M. (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil, *FEMS Microbiol. Rev.*, **232**, 153-163.
 - 29) 李玉友, 野池達也 (1987) 嫌気性消化の酸生成相における余剰活性汚泥の分解特性, 水質汚濁研究, **10**(12), 729-740.
 - 30) Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition.
 - 31) Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2001) Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 555-562.
 - 32) Shin, H. and Youn, J.(2005) Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis, *Biodegradation*, **16**, 33-44.
 - 33) Asakawa, S. and Nagaoka, K.(2003) *methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms, *Int. J. of Syst. and Evol. Microb.*, **53**, 1551-1552.
 - 34) Ferry, J.G.(1992) Methane from acetate, *J. Bacteriol.*, **174**(17), 5489-5495.
 - 35) 重松亨, 湯岳琴, 森村茂, 木田健次 (2003) 「メタン発酵条件下で有機酸を分解する嫌気微生物群集解析と代謝経路」, 用水と廃水, **45**(9), 68-78.
 - 36) Speece, R. E. (1999) 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, 東京.