

## 超高速メタン発酵バイオリアクターの開発と汚泥菌叢の 分子微生物生態解析

### Realization of Super High-Rate Methane Fermentation Bioreactor and rRNA-Based Molecular Analysis of Sludge Consortium

原田 秀樹\*, 大橋 晶良, 井町 寛之  
HIDEKI HARADA, AKIYOSHI OHASHI and HIROYUKI IMACHI

長岡技術科学大学・環境システム工学系 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1

\* TEL: 0258-47-9612 FAX: 0258-47-9612

\* E-mail: ecohara@vos.nagaokaut.ac.jp

Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

**キーワード:** メタン発酵, 高温 UASB プロセス, 多段型 UASB 反応器, 16S rRNA 遺伝子, rRNA アプローチ, 嫌気共生細菌

**Key words:** methane fermentation, thermophilic UASB reactor, multi-staged UASB reactor, 16S rRNA gene, rRNA approach, anaerobic syntrophic bacteria

(原稿受付 2004年5月11日/原稿受理 2004年6月16日)

#### 1. はじめに

メタン発酵による有機物分解プロセスを廃水・廃棄物処理に利用する技術自体は、すでに19世紀末までには実用化されており、活性汚泥法よりも長い歴史をもっている。有機物の嫌気的環境下での物質分解は、海底、湖沼・河川の底泥中や水田・湿地土壌などの水界生態系や反芻動物や昆虫まで、さまざまなスケールでの地球生物化学的な物質循環過程において重要な役割を担っている。20世紀は化石燃料をほとんど無制約に消費しながら巨大な使い捨て物質文明を築き上げてきた時代である。21世紀に突入した今、持続的に発展可能な循環型社会へのギア切り替えのための中核技術のひとつとして、嫌気性メタン発酵によるエネルギー回収技術の重要性が増してきている。

しかしながら、これまでのメタン発酵処理プロセスの設計と運転管理はもっぱら出入力の簡単なプロセス・パラメータにのみ基づいて行われており、反応器内に生息する微生物群はブラックボックス的に扱われてきた。確かに、メタン発酵プロセスはすでにいくつかの廃水種においては実用化がなされていて、反応器内の微生物群をブラックボックスとして扱っても廃水の処理はできているのだから良いのではないかと、という考え方もあるが、未だ、スタートアップに時間がかかること、プロセスが不安定なこと、適応できる廃水の種類が限られていること等、多くの問題を抱えているのが現実である。これらの問題点を少しでも解決し、合理的なメタン発酵プロセスの設計、運転管理方法を確立して広く普及を図っていくためには、工学的な装置 (Container: 容れ物) の開発

と同時に、処理を担う微生物群 (Contents: 中身) の科学的な把握・理解が不可欠である。これらメタン発酵プロセスに生息する微生物群すなわち「ブラックボックス」の中身を理解していくことは、いままで気づかなかった廃水処理プロセスの新たな可能性を引き出すこともありうる。つい十数年前までは、いざ微生物群を解析しようとしても、有効な方法論が存在しなかったが、幸いなことに近年、分子生物学的手法が急激に発達してきたことで、メタン発酵における複合微生物系を理解するための強力なツールが身近に揃ってきた。本稿では、筆者らの研究室で展開してきた超高速のメタン発酵プロセスの開発と、微生物叢の分子生物学的解析および分離された微生物についての最近の研究成果を中心に紹介する。

#### 2. メタン発酵技術の現状

嫌気性廃水処理技術は、好気性処理法と比較していくつかの卓越した利点 (エネルギー要求が小さい、汚泥生成量が少ない、あるいはメタンガスとしてエネルギー回収が可能である等) を有しており、これまでに大規模から小規模までさまざまな有機性廃水種に対して適用され、すでに100年以上の歴史を持っている。特に嫌気性廃水処理技術が飛躍的に発展したのは、1973年の石油危機を契機としてエネルギー回収技術として注目されてから、ここ20~30年ほどのごく短い期間 (廃水処理技術の歴史として見ると) によるものである。

それまでの嫌気性処理技術は容積効率の点から必ずしも経済的な方法とはいええず、下水汚泥、畜産廃棄物、一部の濃厚スラリー状産業廃液などに用いられてきたに過

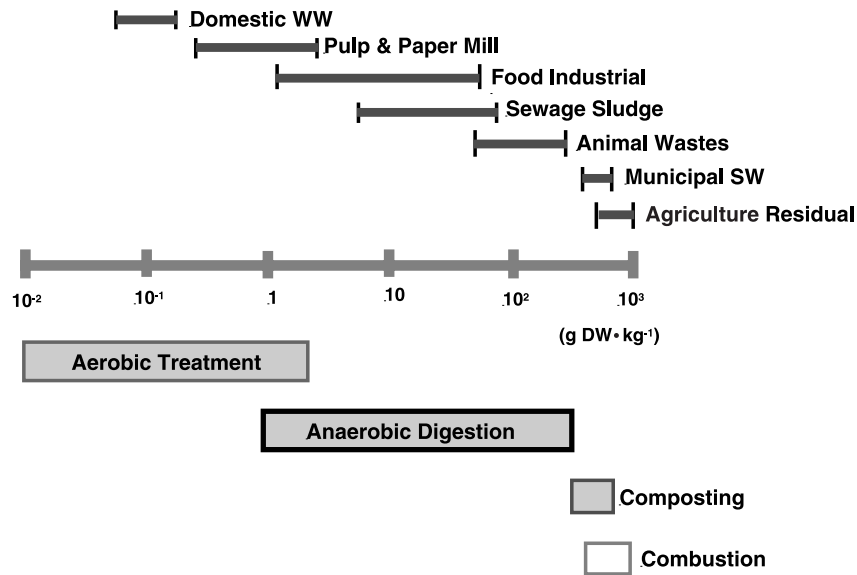


図1. 入り口有機物強度による分解技術オプションの分類。

ぎなかった。しかし80年代に入ってから、液滞留時間 (HRT) とは独立に汚泥滞留時間 (SRT) をコントロールし、高濃度の生物量を保持し、その結果高容積負荷を許容しようとする固定床方式、流動床方式、そして UASB (upflow anaerobic sludge blanket; 上昇流嫌気性ブランケット) 方式が出現し、嫌気性廃水処理技術は大きく進展した。なかでも、UASB プロセスは嫌気性処理技術の中核として普及発展し、易分解性で溶解性の産業廃水種に対しては、すでに成熟段階に達した技術と見なされている。2000年における上記の高速型と呼ばれる嫌気性廃水処理プロセスは、全世界で統計的に把握されているだけでも1,300基ほどが稼働していると云われている。そのうち、6割程度を UASB プロセスが占めている。わが国においても、食品産業廃水を中心に180基以上が稼働している。

しかし、現状の嫌気性廃水処理技術は、保持生物 (汚泥) の最大ポテンシャルを必ずしも引き出していない (さらに高速のリアクター開発の余地がある)、あるいは適用可能廃水種が狭い範囲に限定されている、などの技術的問題を有している。このような現状のなかで最近、より高速化・高負荷化を目指した次世代型の UASB プロセスが出現、あるいは開発されつつある。また、これまで適用対象外だった都市下水程度の低濃度廃水まで適用範囲を拡大しようとする技術開発も進展している。図1に、処理対象廃水・廃棄物の有機物強度による処理技術オプションの分類を示す<sup>33)</sup>。

### 3. 次世代型 UASB プロセスの開発

より高速化をめざした UASB プロセスとして、近年二つの新世代型の UASB 反応器方式が出現し、様々な廃水種に適用されはじめています。ひとつは、EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) 反応器<sup>46,47)</sup> と称し、もう一つは IC (Internal Circulation) 反応器<sup>9,25,26)</sup> と称すものである。両反応器とも反応器内の基質流体の線速度を従来型と比して5~10倍 (5~20 m/h) 程度増加させて、基質

と汚泥 (微生物) の接触効率をあげることによって、従来型の UASB 反応器よりも一段階上の処理性能 (20~35 kg COD·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>) を獲得している。EGSB 反応器は、処理水の循環と反応器高さ (あるいは (反応器高さ/反応器底面積) 比が大きい) によって、従来型 UASB よりも大きな液上昇線流速を確保して、反応器内にグラニューール汚泥を膨張床状態に維持している。一方、ICリアクターは、塔長 16~25 m 程度で、生成バイオガスによるガスリフト効果によって、反応器内に内部循環流を引き起こし、高接触効率、高容積負荷を許容している。

#### 3.1. 高温 UASB プロセスによる「超高速」化への挑戦

現在 UASB 法で処理されている廃水種には、アルコール蒸留、紙パルプ、食品加工廃水など、製造工程から高温 (70~80°C) で排出されるものが少なくない。これらの廃水種は BOD で数千~数十万 mg·l<sup>-1</sup> という高濃度の有機性廃水であるが、いずれもわざわざ中温域まで冷却されて中温 UASB 法で処理されている。現在稼働中の UASB プロセスはほとんど中温域 (30~38°C) もしくは無加温で操作されており、高温 (50~60°C) UASB プロセスの実機は国の内外を通じてわずかに4基のみ (ブラジルに1基、ギリシャに3基) 存在しているにすぎない<sup>44)</sup>。

高温メタン発酵槽に保持されるメタン生成古細菌は、中温性のメタン生成古細菌と比較して2~3倍高い活性を持つことが知られている。それゆえ、高温メタン発酵プロセスは中温プロセスの数倍の容積負荷を許容できると考えられる。しかしながら、何故これまで工業規模の高温 UASB プロセスが出現しなかったのだろうか? 高温 UASB 法の普及を妨げてきた要因は、中温グラニューールと比較して、高温グラニューール汚泥の形成はより困難で長時間を要し、また高温嫌気性汚泥は阻害性物質やショック・ロードなどの外的ストレスに対しても中温嫌気性汚泥よりも鋭敏に反応し、微生物生態系がより脆弱であるという経験的事実にある。

このような背景からわれわれの研究グループはこれま

でいくつかの高温 UASB プロセスの実験を行ってきた。下水処理場高温消化汚泥（消化槽温度 $53^{\circ}\text{C}$ ）を植種源として糖と揮発性脂肪酸（酢酸+プロピオン酸）の混合基質をフィードした高温（ $55^{\circ}\text{C}$ ）UASB 反応器では、最終的に容積負荷  $30\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  を許容し<sup>42)</sup>、CODcr 除去率 $85\sim 90\%$ の処理成績を示した。この実験系での許容汚泥負荷は  $3.7\text{ g CODcr}\cdot\text{gVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  を示し、同一人工排水を供給した中温 UASB 反応器で形成された中温グラニューク汚泥の許容汚泥負荷よりも2~3倍大きい値であった。すなわち、高温 UASB プロセスにおいても沈降性に優れたグラニューク汚泥が形成されれば、上記の許容汚泥負荷と反応器内の保持汚泥濃度の積として反応器容積基準の許容負荷で、まさしく  $100\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  という驚異的高負荷の達成が可能といえる。生物学的廃水処理の歴史が始まって以来、これまでいかなる装置でもなし得なかった容積負荷  $100\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  の壁を突き破る、まさに“夢の超高速”嫌気性処理（メタン発酵）プロセスの実現である。

### 3.2. 多段型高温 UASB プロセスの処理特性と装置開発

容積負荷  $100\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  の超高速リアクターの実現にはいくつかの解決すべき技術的課題がある。装置開発というハード面での課題は、高負荷運転時の過剰な生成バイオガスによる増殖菌体のウォッシュ・アウトの問題である。図2<sup>41)</sup>は、上述の糖・揮発性脂肪酸混合基質を用いた高温 UASB 反応器のスタートアップ期間の反応器内上昇線速度（流入廃水と生成バイオガスによる線速度（反応器断面積あたり）の合計）と保持汚泥の SRT（汚泥滞留時間）の関係を示したものである。容積負荷  $45\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  時（300日前後のトータル線速度  $2.2\text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$  に相当する期間）では、流出 VSS の増加（増殖菌体のウォッシュ・アウト）を招き、SRT は僅か6~7日程度にまで短縮された。容積負荷  $45\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  で除去率 $90\%$ の場合、リアクター単位容積当たりのガス生成量は  $20\text{ m}^3\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  に達し（：量論的なバイオガス生成量は概ね  $0.5\text{ Nm}^3\cdot\text{kg CODcr}^{-1}$  除去量である）、ほぼ標準活性汚泥法のエアレーション強度と同程度となる。このように、高負荷運転時には反応器内の保持汚泥は生成ガスによる過度のせん断力を受けることになり、ウォッシュアウト量が増殖菌体量を上まわり、結果的にプロセスが破綻することになる。すなわち、超高負荷・超高速 UASB を実現するためには、反応器内の生成ガスを速や

かに排除し、ベッド内の上昇ガスによるタービュランスを低減するようリアクター形状を開発する必要がある。

そこで、このようなコンセプトにしたがって反応器を多段化することによって気・固・液三相分離装置（gas solid separator; GSS）を反応器縦方向に複数個配置して、生成ガスを発生原位置のスラッジベッドからすみやかに引き抜けるような装置を開発し<sup>41,42)</sup>、アルコール蒸留実廃水を用いて長期連続実験を行った<sup>43)</sup>。図3に、その多段型高温 UASB 反応器の処理状況を示す。容積負荷の上昇は、HRTの短縮と流入 COD 濃度の増加により行ったが、約80日という短期間で  $6.7\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  から  $100\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  という高負荷にまで上昇させることが可能であった。流入有機物強度  $10,000\text{ mg CODcr}\cdot\text{l}^{-1}$  をわずか2.4時間という短い HRT で処理可能であった。同一アルコール蒸留廃液を供した従来型の高温 UASB 反応器では、最大許容容積負荷  $30\text{ kg CODcr}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  で流出 VSS 濃度は  $400\sim 600\text{ mg VSS}\cdot\text{l}^{-1}$  に達していた。多段型高温 UASB では、従来型 UASB 形状（高温）の3倍以上の超高負荷運転にもかかわらず、GSS の多段化複数配置による生成バイオガスの反応器系外への引き抜きによる上昇線速度の低減効果によって、同程度にまで流出 VSS 濃度の低減（汚泥保持能の強化）が可能であった。図4は、経産省の「地域コンソーシアム研究開発事業」として、われわれの研究室が開発中の多段型高温 UASB 実証プラントである。鹿児島県の焼酎メーカーに設置され、廃水（焼酎蒸留粕）からメタン・エネルギー回収する世界最高速のメタン発酵バイオリアクターとして実証試験中である。

### 3.3. 高温メタン発酵プロセスのボトルネック：プロピオン酸分解

アルコール蒸留廃水を流入原水とし、中温グラニューク汚泥を植種した高温 UASB 反応器のスタートアップ期間における保持汚泥のメタン生成活性（試験温度  $55^{\circ}\text{C}$ ）の推移を、図5に示す<sup>14)</sup>。培養日数の経過とともに、保持グラニューク中への高温性微生物の速やかな集積によって、高活性な高温グラニュークへとシフトしていく様相が把握できる。培養202日目の各活性を比較すると、プロピオン酸分解活性は、酢酸利用メタン生成活性の1/4であり、水素利用メタン生成活性のわずかに1/23の大きさであり、高温嫌気性汚泥ではプロピオン酸分解ス

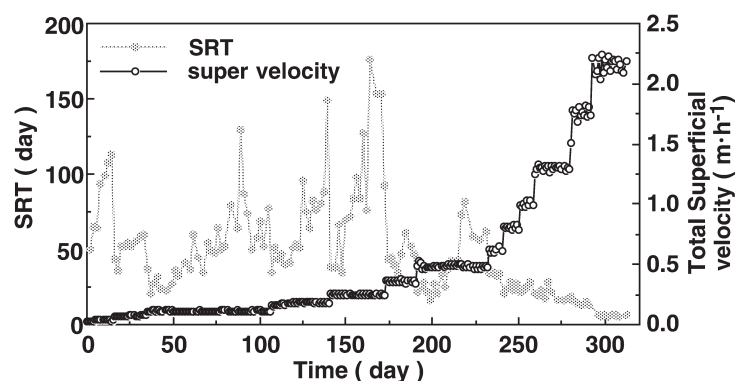


図2. 高温 UASB 反応器 ( $55^{\circ}\text{C}$ ) による（液+ガス）上昇線速度と SRT（汚泥滞留時間）の関係。



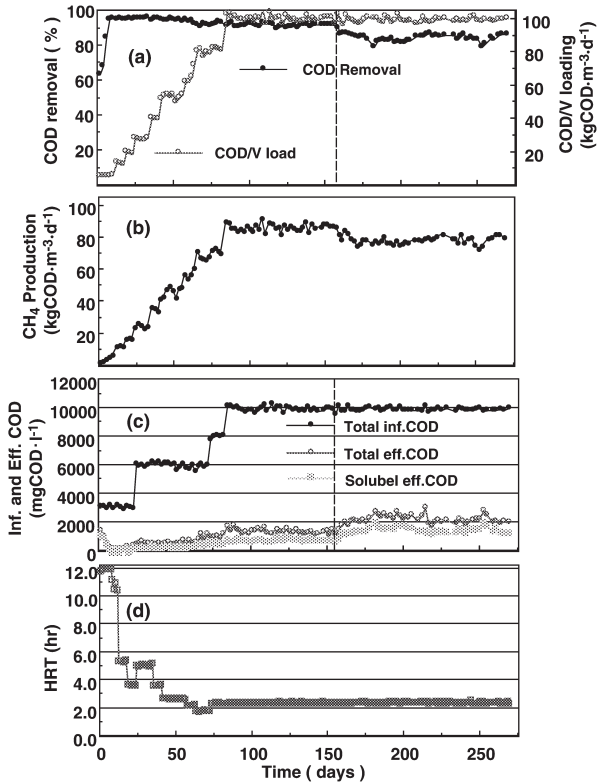


図3. 多段型高温 UASB 反応器 (55°C) によるアルコール蒸留廃液の超高速処理性能。



図4. 世界最高速度のメタン発酵バイオリクターのパイロットプラント。経産省「地域コンソーシアム研究開発事業」として、鹿児島県の焼酎メーカーに設置され、実証試験中。

トップが律速になりやすいことを示している。

図6に多段型高温 UASB 反応器のスラッジベッド高さ方向でのプロピオン酸分解(水素生成酢酸化)反応の自由エネルギー変化量 ( $\Delta G$ ) のプロファイルを示す<sup>14)</sup>。 $\Delta G$  値はスラッジベッド各部位での水素分圧、酢酸濃度等の実測値を用いて算出した。ベッド下部では生成バイオガス中の水素分圧が高いため  $\Delta G$  がポジティブ値をとっている。グラニュール内部はベッド部バルク液とは異なる環境条件になっており、この  $\Delta G$  値をもって即グラニュール内のプロピオン酸分解反応に当てはめ

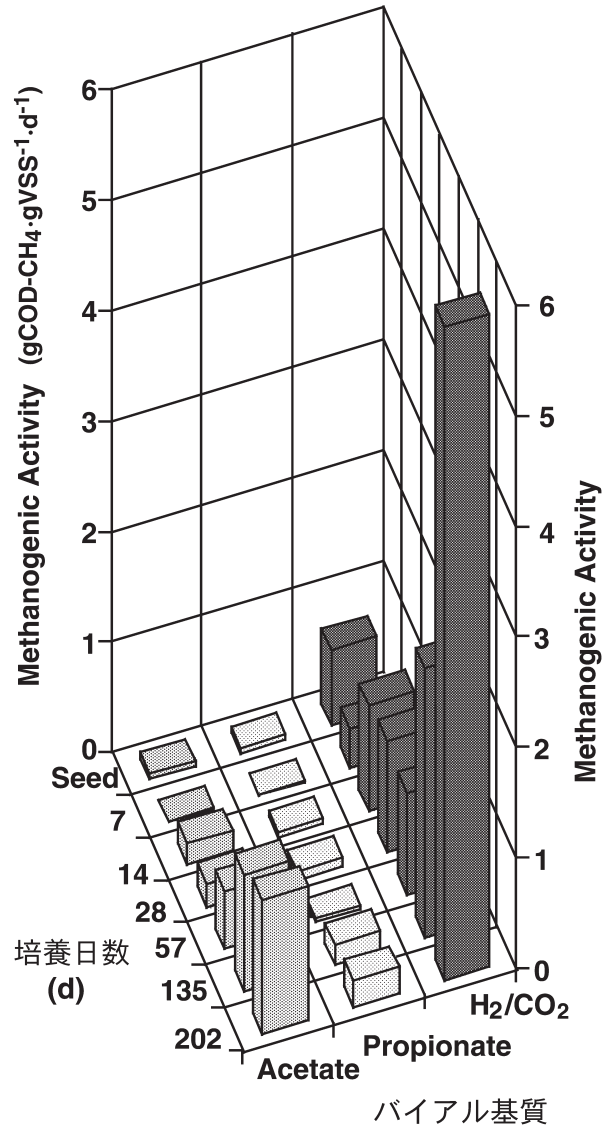
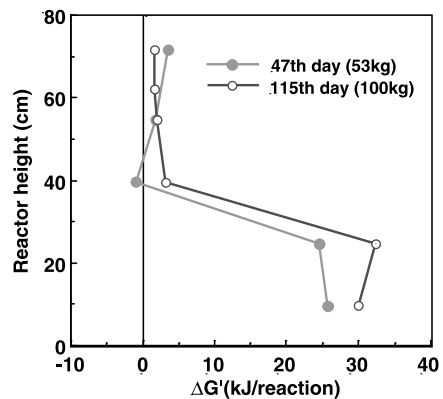


図5. 中温培養 (35°C) グラニュールを植種した高温 UASB 反応器 (55°C) の保持汚泥のメタン生成活性推移: バイアル活性試験温度 (55°C) (バイアル試験基質; 酢酸, プロピオン酸, 水素)。



$$\Delta G'(\text{kJ}\cdot\text{reaction}^{-1}) = +76.1 + 2.303RT \log \frac{[\text{Ac}^-][\text{HCO}_3^-]\{\text{PH}_2\}^3}{[\text{Pr}^-]}$$

図6. 多段型高温 UASB 反応器 (55°C) のプロピオン酸酸化反応の自由エネルギー変化量に関するスラッジベッド高さ方向プロファイル。

ることは出来ないが、高温 UASB プロセスでは反応器下部（流入端近く）ではプロピオン酸酸化反応が熱力学的に不利になっていることをよく示唆している。それゆえ、高温 UASB 反応器の機能を強化するためには、プロピオン酸分解に係わる共生系などの情報も含めて高温嫌気性グラニューールの微生物生態学的構造を精細に把握することが重要になってくる。

#### 4. rRNA アプローチとメタン発酵汚泥を構成している微生物群

1990年代に花開いた分子生物学的手法により、メタン発酵汚泥も含めた環境中の微生物群集が、実験室で培養されていた微生物よりも極めて複雑で多様であるということが徐々に明らかにされると同時に、機能が全く不明な微生物が我々の身の回りにあふれているということも明確に示された。特に、環境中の微生物群集を評価する際、特定の遺伝子が分子マーカーとして利用されており、多くの場合 16S rRNA 遺伝子が用いられている。この 16S rRNA 遺伝子に基づいた解析手法は rRNA アプローチと呼ばれ、Norman Pace らの研究グループによって提案されて以来<sup>23)</sup> 莫大な量の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列情報が GenBank などの国際的な公共のデータベースに蓄積され続けている。また、Ribosomal Database Project による rRNA に関する情報の整備<sup>19)</sup>、ARB などの分子系統解析や 16S rRNA を標的とした oligonucleotide probe (=DNA プローブ) の容易な設計のためのアプリケーションの普及<sup>18)</sup>、さらには rRNA アプローチにおいて微生物の検出や定量に広く用いられる DNA プローブのデータベースも構築されている<sup>11,17)</sup>。これに伴い、原核生物分類のバイブルともいべき Bergey's Manual の新版 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition においても rRNA 遺伝子の塩基配列などの情報を基盤とする分子系統分類を強く反映させたものへと移行している。このように rRNA アプローチが提唱されて以来、十数年で微生物に関する情報は過剰にさえ感じる程、すさまじい勢いで蓄積され、整備され、そして広く利用されている。この間には DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法<sup>22)</sup>、T-RFLP (terminal-restriction length polymorphisms) 法<sup>16)</sup> や FISH (fluorescence in situ hybridization) 法<sup>2,3,6)</sup> などの技術も開発され、微生物生態の新しい知見が次々と得られている。

このような背景からも分子生物学的手法を駆使した解析は、メタン発酵汚泥内に生息する複合微生物群集の生態解析にも積極的に取り入れられてきた。まず、16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析を用いることでメタン発酵汚泥中の微生物叢全体を眺めようとした初期の研究として1997年の Godon らと1998年の関口らの研究を挙げることができる<sup>8,38)</sup>。Godon らはワイン蒸留廃水を処理している中温性 (35°C) 嫌気汚泥を、関口らは酢酸、プロピオン酸とスクロースを主体とした人工合成廃水を処理している中温性 (35°C) および高温性 (55°C) の UASB 反応槽内のグラニューール汚泥に対して研究を行った。その結果、メタン発酵汚泥は古細菌 (Archaea) と細菌 (Bacteria) の両ドメインにまたがる多種多様な微生物から構成されており、検出された rRNA 遺伝子クロー

ンの解析によって既知の微生物と相同性が高いものから今までに全く人為的に培養されていない微生物が存在していることが明らかとなった。例えば、関口らの結果に着目し、回収された 16S rRNA 遺伝子クローン配列の相同性が97%以上であるものを既知のものと同種であると仮定した場合、中温性グラニューール汚泥では約60%、高温性グラニューール汚泥では約70%が未知の種となる<sup>37)</sup>。これは、人工廃水というシンプルな組成の廃水を処理している汚泥でさえ全く未知な微生物が多数存在していることを示していると同時に、嫌氣的有機物分解に関与している基礎的な微生物さえ十分に理解されていないということの意味している。これらの報告に続いていくつかのメタン発酵汚泥に対しても同様な解析が行われ、Fernandez らや Zumstein らは安定した廃水処理を行っているリアクター内の微生物叢は一定ではなくダイナミックに変動していることを報告している<sup>7,48)</sup>。さらに、最近ではメタン発酵プロセスへの適用廃水種の拡大の動きから、様々な廃水・固形性有機物を処理しているメタン発酵汚泥の解析も行われており、化学製造プラントからの廃水 (フタル酸類を高濃度で含有する廃水や薬品合成廃水)、高級脂肪酸含有廃水や畜産廃棄物を処理している汚泥の微生物群集構造解析が盛んに行われている<sup>4,15,27,45)</sup>。これらの解析においても、機能が不明で未知な微生物が多数存在していることが指摘されており、例えば、Wu ら<sup>45)</sup> はフタル酸製造廃水処理グラニューール汚泥を構成している微生物種の約90%は今までに人為的に全く培養のなされていないものであることを報告している。また、16S rRNA 遺伝子に基づいた解析によるデータが蓄積することにより、メタン発酵汚泥に生息するメタン生成古細菌の知見も広がってきている。以前の研究では *Methanobacterium* 属、*Methanothermobacter* 属、*Methanobrevibacter* 属、*Methanosarcina* 属や *Methanosaeta* 属に属するメタン生成古細菌が優占化していることが指摘されていた。しかし最近ではこれらのメタン生成古細菌以外にも *Methanocorpusculum* 属<sup>20)</sup> や *Methanomicrobiales* 目<sup>45)</sup> あるいは *Methanomicrobia* 綱に属する未だ培養がなされていないメタン生成古細菌<sup>5,21,24)</sup> が優占化している汚泥もあることが明らかとなっており、比較的メタン生成古細菌のパラエティールは少ないと考えられていたメタン発酵汚泥においても、様々な種類のメタン生成古細菌が存在していることも明らかにされている。

16S rRNA 遺伝子をクローン化して解析する微生物群集構造解析と同時に、DNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法による検出や定量も進められてきた。特に、グラニューール汚泥は球状の生物膜というユニークな形状を有しており、このグラニューール汚泥を薄片化し、FISH 法と共焦点レーザー走査顕微鏡を用いることで、特定の微生物群の空間分布を把握することができると報告されている<sup>10,11,13,30,31,36)</sup>。FISH 法と共焦点レーザー走査顕微鏡を用いてグラニューール汚泥内微生物の空間分布の解析を行うことにより、グラニューール汚泥内微生物の niche が視覚化でき、更には、その微生物の *in situ* での機能を推定することも可能である。この手法を用いた解析によって、メタン発酵において極めて重要な微生物群の1つであるプロピオン酸酸化共生細菌は水素資化性のメタン生成古細菌とお互いに非常に密接した集塊体を形成して存在

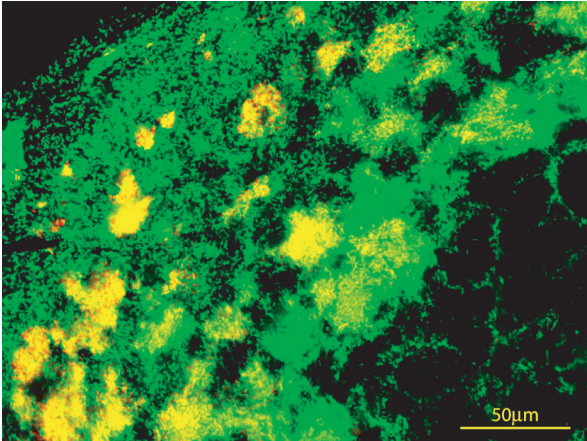


図7. グラニュール汚泥切片の FISH 画像。高温性プロピオン酸酸化共生細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* に特異的なプローブ TGP690 (赤色) と水素資化性メタン生成古細菌 *Methanobacteriaceae* に特異的なプローブ MB1174 (緑色) で2重染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

し、水素を介した種間電子伝達による共生系を構築しながらプロピオン酸の分解を担っていることが明らかにされている<sup>10,11,13,36</sup> (図7)。また、関口らは未培養微生物群である *Chloroflexi-I* 細菌 (以前の green non sulfur bacteria, subdivision I) に特異的な DNA プローブを用いることで、本細菌がグラニュール汚泥表面を完全に覆っていることから明らかにし、*Chloroflexi-I* 細菌群がグラニュール汚泥構造の形成と維持において重要な役割を持った微生物であることを指摘している<sup>39</sup>。

##### 5. 重要な機能が推定される未知な微生物にどのようにアプローチするか？

このように、分子生物学的手法を駆使した解析により、メタン発酵プロセス内に生息する微生物群集に関する基礎的情報が蓄積され続けている。その一方で、人為的な培養がされたことがなく、機能も不明な未知微生物がメ

タン発酵汚泥には未だ数多く存在しており、これらの培養がなされない微生物が実際に何を行っているか、という問いに対しては様々な分子生物学的手法を駆使しても直接答えることができないというのが現状である。従って、依然として微生物学の王道である、1つ1つの微生物を分離し、丹念にその生理学的特徴を調査するという地道な作業が、環境中での微生物の機能を推定する上で重要な課題となっている。

嫌気環境下での有機物分解・代謝にどのような微生物が関与しているかという点についてはすでに多くの良書や総説があるので、ここではごく簡単に述べるにとどまるが、有機物が最終的にメタンと二酸化炭素へと無機化されていく過程では、代謝能の異なる複数種の微生物が関与し、そしてお互いが共生関係を保つことでその分解反応が進んでいく、という分業体制が確立している。その中で、最たる微生物間の分業・共生関係は、中間代謝産物といわれている脂肪酸、アルコール類、および単純な芳香族化合物の分解に見ることができる<sup>32,34,35</sup>。これらの中間代謝産物の分解に関与する細菌群はメタン生成古細菌などと共生することのみ生育可能であることから、嫌気共生細菌と呼ばれている。プロピオン酸の分解を例にとって説明すると、プロピオン酸を分解する細菌は、プロピオン酸を酸化分解する過程で水素 (もしくはギ酸など) を生成するが、この反応自体は標準状態で吸エルゴン反応であり熱力学的に見れば反応は自発的に進行し得ない。しかしながら、生成される水素が速やかに除去され、系内の水素分圧が極めて低く維持されるような条件下においては自発的なプロピオン酸の酸化分解反応が認められる。従って、プロピオン酸酸化共生細菌がプロピオン酸を酸化分解する過程において、水素を除去する反応、すなわち水素利用性のメタン生成古細菌がプロピオン酸酸化共生細菌と共に存在し、両者の間に水素 (すなわち電子) の速やかな種間伝達が成り立つ場合のみ、プロピオン酸酸化共生細菌が生育できることとなる (図8)。事実、現在まで知られている嫌気プロピオン酸酸化共生細菌はすべて、水素利用性のメタン生成古細菌と共生することでプロピオン酸を分解する細菌であ

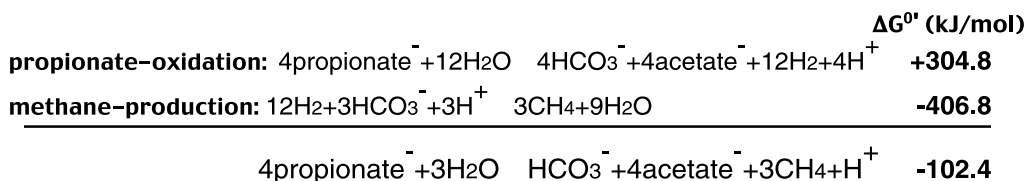
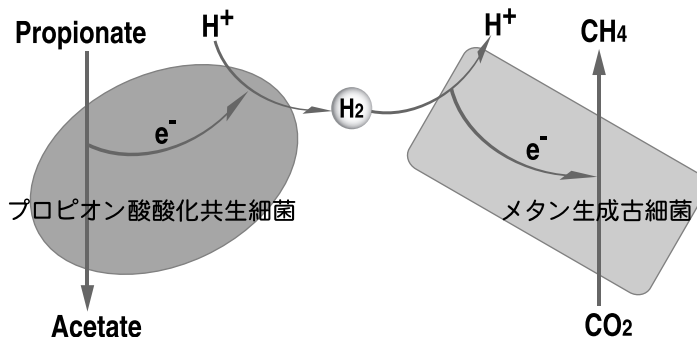


図8. 嫌気 (メタン生成) 環境下での微生物間共生によるプロピオン酸の分解。



る。このように、プロピオン酸酸化共生細菌をはじめとする嫌気共生細菌はメタン生成古細菌と強固な共生関係を構築しなければ生育できないという極めてユニークな生態を示す興味深い微生物である。それと同時に、中間代謝産物、特にプロピオン酸はメタン発酵プロセスにおいて頻繁にプロセス内に蓄積する物質であり、その酸化分解反応が律速になりやすいという理由から、様々な研究グループにより共生細菌の微生物の分離・培養が試みられてきた。しかしながら、その共生細菌を分離し純粋培養を行うことは極めて困難であるため分離例が少なく、未だその全容は解明されていない。

その共生細菌の分離・培養を阻むもっとも大きな原因の一つはその基質の分解において得られるエネルギーが極めて小さいため、場合によっては増殖速度（倍加時間）が1週間程度と極めて遅いことである。そこで、分離培養が困難で、かつメタン発酵において機能上極めて重要な嫌気共生細菌を分離するために、従来の嫌気培養法に加え、先に紹介した rRNA アプローチ等の分子生物学的手法を併用しながら分離・培養を行う方法論が適用されている。井町らは高温性のプロピオン酸酸化共生細菌の分離のために、微生物群集のクローン解析やそれに基づく *in situ hybridization* などの手法を用いて、標的微生物を絞り込みながら分離を試みる手法によりプロピオン酸酸化共生細菌を純粋培養することに成功している<sup>12,13</sup> (図9)。その方法論について以下に具体的に説明する。プロピオン酸酸化共生細菌を分離するためにプロピオン酸を唯一の炭素源として集積培養を行った。このプロピオン酸の集積培養系の増殖速度は倍加時間が約5日と極めて遅く約1ヶ月以上を要した。このプロピオン酸集積培養系からプロピオン酸酸化共生細菌を分離するために、希釈培養やロールチューブ法あるいはプロピオン酸以外の異なる基質で培養を行ったが、それらの試みはすべて不成功に終わった。その後、様々な分離の試みを行ったが、プロピオン酸集積培養系での共生細菌の増殖が極めて遅いため、プロピオン酸の酸化分解に関与しない微生物までもが生育してしまう。そのために、それらがプロピオン酸以外の基質による分離の際に他の微生物が優占的に増殖してしまい、共生細菌の単独培養を妨げた。そこで、本共生細菌を分離するための糸口をつか

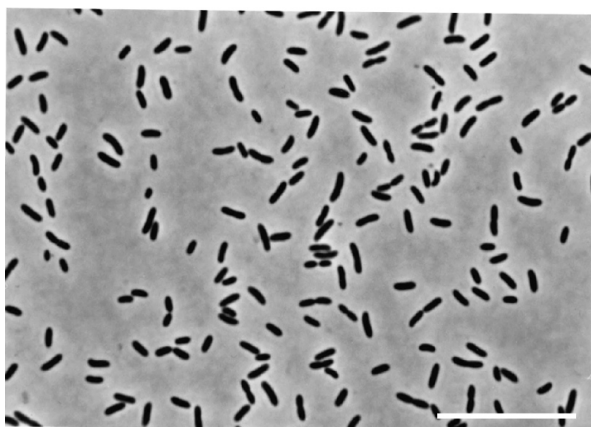


図9. 高温性プロピオン酸酸化共生細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum*。

むために、プロピオン酸集積培養系内の細菌群を分子遺伝学的に同定した。その結果、高温性プロピオン酸酸化共生細菌は *Desulfotomaculum* 属の新規の細菌であることが示唆された。この結果から、本共生細菌は *Desulfotomaculum* に属することから、孢子形成能を持ち、耐熱性があるのではないかと推察した。そこで、プロピオン酸集積培養系に 90°C で20分間の低温殺菌を行い、その後水素利用性のメタン生成古細菌の純菌 (*Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH) を添加した希釈培養操作を行った。数回この操作を繰り返すと、*Desulfotomaculum* 様の桿菌と *M. thermoautotrophicus* ΔH との純粋に近い共生系を得ることができた。そこで、この純粋な共生系に近いプロピオン酸集積系を植種源として、先の解析で得られた遺伝子情報を基に設計した DNA プローブを併用しながら、再び様々な基質による本共生細菌の単独培養を試みたところ、ピルビン酸によりプロピオン酸酸化共生細菌を純粋培養することに成功している。

最近、私たちの研究グループでは同様の方法論を用いて、グラニュール汚泥構造の形成に深く関与していると思われる *Chloroflexi-I* に属する糸状性細菌<sup>39,40</sup> やメタン生成を伴ってフタル酸分解するフタル酸酸化共生細菌を世界に先駆けて分離することに成功した<sup>28,29</sup>。今後、これらの微生物の詳細な生理学的特徴が調査されることによって、メタン発酵における諸問題を解決する糸口が見つかることが期待される。

しかしながら、依然として分子生物学的手法から得られてくる情報を活用しながら分離・培養を行っていく手法を用いても、これらの微生物を純粋に分離するには半年から長いもので3年以上時間がかかっている。従って、今までにない新しい視点に立った画期的な分離・培養手法の登場が強く望まれる。

## 6. おわりに

分子遺伝学的手法の導入により、メタン発酵に関与する微生物の理解は劇的に進んできたが、未だ全容の把握には至っていない。より効率的で、より安定で、より高い適用性を目指した新たな嫌気性メタン発酵技術のブレークスルーには、容器物 (Container) としてのプロセス工学的な装置開発のみならず、中身 (Contents) の科学的な理解、すなわち分子生物学的手法を駆使した解析技術と分離・培養から得られてくる情報の蓄積が重要になってくる。本稿では、超高速の高温 UASB プロセスの開発に絡んだ我々の一連の研究過程から、グラニュール汚泥内のプロピオン酸分解を担う共生系の把握と、その知見に基づく微生物生態系の機能開発が重要であることを例示しながら、容器物 (Container) のハード的 (あるいは工学的) 研究課題と同時に、中身 (Contents) のソフト的 (あるいは科学的) 研究課題が、車の両輪のごとく相互補完的に重要であることを示した。

## 謝 辞

本稿の内容の多くは、(独)産業総合技術研究所・生物資源情報基盤研究グループの鎌形洋一氏、関口勇地氏

との共同研究である。ここに記して、深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Alm, E.W., D.B. Oerther, N. Larsen, D.A. Stahl, and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3357–3559.
- 2) Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, and D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919–1925.
- 3) Amann, R.I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- 4) Chachkhiani, M., P. Dabert, T. Abzianidze, G. Partskhaladze, L. Tsiklauri, T. Dudauri, and J.-J. Godon. 2004. 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during strat-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresour. Technology* 93: 227–232.
- 5) Collins, G., A. Woods, S. McHugh, M.W. Carton, and V. O'Flaherty. 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during strat-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 159–170.
- 6) Delong, E.F., K.Y. Wu, B.B. Prezelin, and R.V.M. Jovine. 1989. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360–1363.
- 7) Fernabdez, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle, and J. Tiedje. 1999. How stable is stable? function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3697–3704.
- 8) Godon, J.-J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2802–2813.
- 9) Habets, L.H.A., A.J.H.H. Engelaar, and G.N. 1997. Anaerobic Treatment of Inuline effluent in an Internal Circulation (IC) reactor. *Wat. Sci. Tech.* 35: 189–197.
- 10) Harmsen, H.J.M., A.D.L. Akkermans, A.J.M. Stams, and W.M. de Vos. 1996a. Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2163–2468.
- 11) Harmsen, H.J.M., H.M.P. Kengen, A.D.L. Akkermans, and A.J.M. Stams. 1996b. Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1656–1663.
- 12) Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, S. Hanada, A. Ohashi, and H. Harada. 2002. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1729–1735.
- 13) Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3608–3615.
- 14) Kucivilize, P., T. Tagawa, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, and H. Harada. 2003. Super high rate treatment of alcohol distillery wastewater by thermophilic multi-staged UASB reactor. *Wat. Sci. Tech.* in press.
- 15) LaPara, T.M., C.H. Nakatsu, L. Pantea, and J.E. Alleman. 2000. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3951–3959.
- 16) Liu, W.-T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining by terminal restriction length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516–4522.
- 17) Loy, A., M. Horn, and M. Wagner. 2003. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 31: 514–516.
- 18) Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A.W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K.-H. Schleifer. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363–1371.
- 19) Maidak, B.L., N. Larsen, M.J. McCaughey, R. Overbeek, G.J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy, and C.R. Woese. 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* 22: 3485–3487.
- 20) McHugh, S., M. Carton, G. Collins, and V. O'Flaherty. 2004. Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16–37 °C. *FEMS Microbiol. Ecol.* in press.
- 21) McHugh, S., M. Carton, T. Mahony, and V. O'Flaherty. 2003. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 297–304.
- 22) Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denatured gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
- 23) Olsen, G.J., S.J. Giovannoni, and N.R. Pace. 1986. Microbiology ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 337–365.
- 24) Pender, S., M. Toomey, M. Carton, D. Eardly, J.W. Patching, E. Colleran, and V. O'Flaherty. 2004. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Wat. Res.* 38: 619–630.
- 25) Pereboom, J.H.F. 1994. Size distribution model for methanogenic granules from full-scale UASB and IC reactors. *Wat. Sci. Tech.* 30: 211–221.
- 26) Pereboom, J.H.F., and T.L.F.M. Vereijken. 1994. Methanogenic granule development in full-scale Internal Circulation (IC) reactors. *Wat. Sci. Tech.* 30: 9–21.
- 27) Pereira, M.A., K. Roest, A.J.M. Stams, M. Mota, M. Alves, and A.D.L. Akkermans. 2002. Molecular monitoring of microbial diversity in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors treating oleic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41: 95–103.
- 28) Qiu, Y.-L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I.-C. Tseng, S.-S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2004. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomers-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1617–1626.
- 29) Qiu, Y.-L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I.-C. Tseng, S.-S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2003. *Sporotomaculum syntrophicum* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic benzoate-degrading bacterium isolated from methanogenic nsludge treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Arch. Microbiol.* 179: 242–249.
- 30) Rocheleau, S., C.W. Greer, J.R. Lawrence, C. Cantin, L. Laramee, and S.R. Guiot. 1999. Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2222–2229.
- 31) Santegoeds, C.M., L.R. Damgaard, G. Hesselink, J. Zopfi,



- P. Lens, G. Muyzer, and D. de Beer. 1999. Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensors and molecular analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4618–4629.
- 32) Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. and Molec. Biol. Review* 61: 262–280.
- 33) Schink, B. 1988. Principles and Limits of Anaerobic Degradation: Environmental and Technological Aspects, p. 771–846. In A.J.B. Zehnder (ed.), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Wiley-Interscience.
- 34) Schink, B. 1991. Syntrophism among prokaryotes. In A. Balows, H.P. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- 35) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, and H. Harada. 2001a. Recent advances in methane fermentation technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 277–282.
- 36) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1280–1288.
- 37) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2002. Molecular and conventional analyses of microbial diversity in mesophilic and thermophilic upflow anaerobic sludge blanket granular sludges. *Wat. Sci. Tech.* 45: 19–25.
- 38) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutubo, A. Ohashi, H. Harada, and K. Nakamura. 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144: 2655–2665.
- 39) Sekiguchi, Y., H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2001b. In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5740–5749.
- 40) Sekiguchi, Y., T. Yamada, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata. 2003. *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov., and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1843–1851.
- 41) Syutubo, K., H. Harada, and A. Ohashi. 1998. Granulation and sludge retainment during start-up of a thermophilic UASB reactor. *Wat. Sci. Tech.* 38: 349–357.
- 42) Syutubo, K., H. Harada, A. Ohashi, and H. Suzuki. 1997. An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge. *Wat. Sci. Tech.* 36: 391–398.
- 43) Tagawa, T., H. Takahashi, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, and H. Harada. 2002. Pilot-plant study on anaerobic treatment of lipid- and protein-rich food industrial wastewater by a thermophilic multi-staged UASB reactor. *Wat. Sci. Tech.* 45: 225–230.
- 44) Wilkie, A.C., J.R. Kelly, and J.M. Owens. 2001. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass & Bioenergy* 19: 63–102.
- 45) Wu, J.-H., W.-T. Liu, I.-C. Tseng, and S.-S. Cheng. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology* 147: 373–382.
- 46) Zoutberg, G.R., and P. De Been. 1997. The Biobed (EGSB) systems covers shortcomings of the UASB in chemical industry. *Wat. Sci. Tech.* 35: 183–188.
- 47) Zoutberg, G.R., and R. Franklin. 1996. Anaerobic treatment of chemical and brewery wastewater with a new type of anaerobic reactor; the Biobed® EGSB reactor. *Wat. Sci. Tech.* 34: 375–381.
- 48) Zumstein, E., R. Moletta, and J.-J. Godon. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2: 69–78.