

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12650

研究課題名(和文)メタン細菌高集積汚泥で切り拓く生物学的二酸化炭素変換促進技術の開発

研究課題名(英文)Development of a Promoting Technology for Biological Conversion of Carbon Oxide using Enriched Methanogens

研究代表者

前田 憲成(MAEDA, Toshinari)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00470592

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、下水汚泥から作製した「メタン菌高集積汚泥」が二酸化炭素を効率良くメタンに変換するという「二酸化炭素を変換利用する能力」を活用して、バイオエネルギーなど、次世代に必要な有用物質を生産する技術を確立することを最終目的とした研究である。メタン菌高集積汚泥によって二酸化炭素から生成されたメタンが、炭素13を用いた実験により、二酸化炭素由来であることを明らかにした。また、水素ガスの供給なしで、二酸化炭素から有用物質を生成する取組みを行うため、消化汚泥を用いて検討したところ、消化汚泥が二酸化炭素から生成するメタンの85%が、二酸化炭素のみから生成されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):The final goal of this study is to develop a novel technology to produce beneficial compounds such as bioenergy by using enrich methanogens which was created from sewage sludge then is capable of utilizing carbon dioxide. By an experiment using carbon 13, methane produced was proved to be derived from carbon dioxide. In addition, to methane production without supplying hydrogen gas, digested sludge was used for the methane production from carbon dioxide; thereby, 85% of methane was produced from carbon dioxide without supplying hydrogen gas.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：メタン菌高集積汚泥 二酸化炭素 メタン 海水 消化汚泥

1. 研究開始当初の背景

産業革命以降に顕著に濃度が増加している二酸化炭素は、地球温暖化の原因の一つであり、問題解決に向けた取り組みが国内外で進んでいる。また、活性汚泥法により排水を処理する過程で発生する下水汚泥は産業廃棄物であり、環境負荷低減の視点で下水汚泥の効果的な処理・利用法の開発も急務な状況となっている。そのような背景の中、応募者はこれまで下水汚泥の減容を促進する汚泥溶解菌の分離 (Bioresour. Technol. 100:2475, 2009)、低温環境下での汚泥減容化促進 (Bioresour. Technol. 174:134, 2014)、また抗生物質投与による下水汚泥からのメタン生成の向上 (J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 41:1051, 2014) や細胞外高分子物質の除去によるメタン高度生産化 (Chemosphere 117:552, 2014) などに成功してきた。今回の挑戦的萌芽研究は、上記の研究成果を踏まえたテーマであり、下水汚泥中の微生物機能を利用して、下水汚泥の効果的な利活用法の開発と二酸化炭素の削減の一石二鳥を目指した新規なテーマとなっている。すなわち、下水汚泥という廃棄物を原料として、有効活用していくこと、ならびに下水汚泥中に存在している有用微生物群を活用して、環境負荷低減技術と地球温暖化防止技術の双方を確立することが現在求められている。

2. 研究の目的

本研究のコンセプトは、ゴミとして廃棄される下水汚泥を有効利用して、二酸化炭素を削減し、地球温暖化の抑制、低炭素化社会の実現、石油依存度の低減の3つを実現する新型バイオリファイナリー技術の礎を築くことが目的である。従来のバイオリファイナリーは、再生可能資源であるバイオマスを原料に、バイオ燃料や樹脂などを製造するプラントおよび技術のことであるが、本研究では、下水汚泥を微生物源として、二酸化炭素を変換することができるように調製し、潜在している二酸化炭素を物質変換できる微生物活性を活用した新型バイオリファイナリーの技術確立を目指している。

本研究期間においては、下水汚泥による二酸化炭素の変換利用の実証、二酸化炭素変換機構の解明、二酸化炭素変換効率の検討、二酸化炭素変換効率向上のための最適条件の探索、二酸化炭素変換に関わる微生物群の特定、微生物間相互作用の解明などを行った。特に、二酸化炭素は海水中にも、重炭酸イオンとして多く溶け込んでいるため、海水からの有用物質生産についても本研究で取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用した汚泥の調製

本研究で使用した下水汚泥および消化汚泥は、福岡県北九州市小倉北区西港町にある日明浄化センターから採取し、1週間以内に使用した。採取した各種汚泥は使用する直前まで冷温室(4℃)で保存した。汚泥の状態は季節や天候に大きく左右されるため、遠心分離後、汚泥ペレットを蒸留水で3回懸濁させ、洗浄させることで、比較的な均一な各種汚泥を調製した。

(2) メタン菌高集積汚泥の作製

10%(w/v)下水汚泥30mLを66mLバイアル瓶に取り、ゴム栓、アルミキャップで密閉し、バイアル内を窒素ガスで置換することで、嫌気条件とした。このバイアルを40日間37℃、120rpmで振とう培養していく中で、4日ごとに窒素ガスで置換した。メタンガスが生成されなくなる40日経過後、12日間は4日ごとに水素ガスをガス置換し、37℃で120rpmで振とう培養を行った。この長期培養で、下水汚泥からメタンガスが生成されなくなった汚泥を「メタン菌高集積汚泥」として、本研究で用いた。

(3) 発酵中生成したガスの測定

各種条件で反応させているバイアル中に発生したガスは、GC-3200により二酸化炭素およびメタンガスを、GC-6890Aシステムにより水素ガスを測定した。いずれも、バイアルの気相部位から、50μLをシリンジで取り分析した。

(4) RNA抽出

各種サンプル(4mL)から、RNeasy Mini Kit(キアゲン社)を用いて、RNAを抽出・精製した。RNA濃度をナノドロップで確認すると共に、RNA産物の有無は1.4%アガロースゲルを用いて、電気泳動により確認した。抽出したRNAにおいて、原核生物の23Sと16SのリボソームRNAの特徴的な産物が、純度良く抽出できていることを確認して、次のステップに進んだ。

(5) 抽出したRNAの逆転写

ナノドロップで測定したRNAの濃度をもとに、各種サンプルを全量5μL、5μg/μL未満となるように調製した。PrimeScript Reversetranscription Kitを用いて、RNAの逆転写をキットのプロトコールに従って行った。逆転写産物は、1.4%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い確認した。

(6) 次世代シーケンサーMiSeqサンプル調製

16S rRNAを活用した菌叢解析を行うため、Illumina Miseqを使用した。方法はIlluminaが提供しているプロトコールに従って行った。RNA逆転写産物を鋳型として、V3-V4領域を増幅するため、適切なプライマーを使用してPCRを行った。Duarl-Index1を用いて

DNA ライブラリを作成後 (Nextera XT、Illumina) ノーマライゼーションし 300 × 2 paired - end (PE) でシーケンスを行った (Miseq V3 kit 600 cycle)。

(7) 同位体比質量分析

炭素の安定同位体である炭素 13 は天然に存在する環境同位体の 1 つで、地球上の全炭素の約 1.1% を占める。炭素 13 は放射性を持たず、そのため半減期を持たない安全な同位体であるため、質量分析を用いた代謝経路や年代測定に利用される。メタン菌高集積汚泥および消化汚泥の二酸化炭素をメタンへ変換する効率を調査するため、汚泥に炭素 13 で標識された二酸化炭素を供給し、発生したメタンガスに含まれている炭素 13 の存在比をガス同位体比質量分析(IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometry)を用いて測定した。

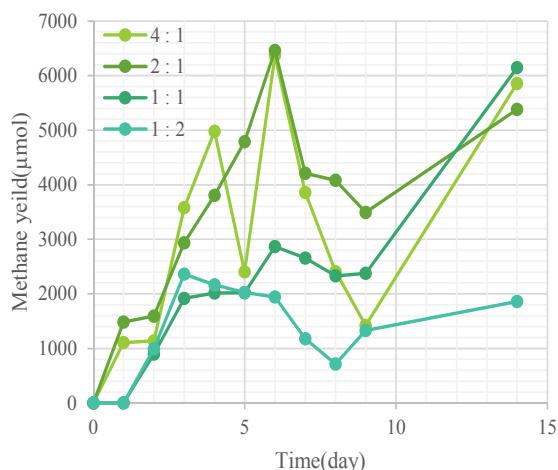


図 1 . メタン菌高集積汚泥による二酸化炭素からのメタン生成における水素ガス供給量の影響

4. 研究成果

(1) 二酸化炭素からのメタン変換における水素ガス供給の影響

化学等量的な考え方では、1 モルの二酸化炭素から 1 モルのメタンガスを生成するには、4 モルの水素ガスが必要である。水素ガスは、それ自身も次世代エネルギーとして期待されているバイオエネルギー源であるため、水素供給量を減らして、効率的に二酸化炭素を変換することが必要である。そこで、はじめに水素ガスと二酸化炭素の供給する割合を水素 4:二酸化炭素 1、水素 2:二酸化炭素 1、水素 1:二酸化炭素 1、水素 1:二酸化炭素 2 として、発酵を行った。その結果、14 日までは、水素 4:二酸化炭素 1、水素 2:二酸化炭素 1、水素 1:二酸化炭素 1 の条件では、いずれもほぼ同程度のメタンが生成されていることが分かった (図 1)。また、38 日間の長期培養においては、水素ガスの供給量が多い方が、多くメタンを生成していることがわかった。消費された二酸化炭素からメタンへの炭素変換率を求めたところ、水素 4:二酸化炭素 1 の場合は、111%と 100%を超える炭

素変換率となった。これは、長期に培養しているため、メタン菌高集積汚泥中の難分解性の炭素源がメタンの基質になったものと考えられる。水素 2:二酸化炭素 1 の条件では炭素変換率は 54%、水素 1:二酸化炭素 1 の条件では炭素変換率は 60%、水素 1:二酸化炭素 2 の条件では炭素変換率は 69%となっており、水素ガスの供給量が少ない条件では、二酸化炭素がメタン以外の別の炭素源へと変換されている可能性が示唆された。しかしながら、現在までの調査では、これらの条件で二酸化炭素からメタン以外のどのような物質に変換しているのかは究明できていない。

(2) メタン菌高集積汚泥による海水からのメタン生成

二酸化炭素は、海水中にも重炭酸イオンとして存在しており、近年の二酸化炭素濃度の増加は海水の酸性化 (二酸化炭素が水分子と反応することで、pH 低下をもたらす水素イオンを生成する) の要因にもなっていると報告されていることから、海水中に溶解している重炭酸イオンからも、メタン菌高集積汚泥によってメタンが生成されるのかを調べた。

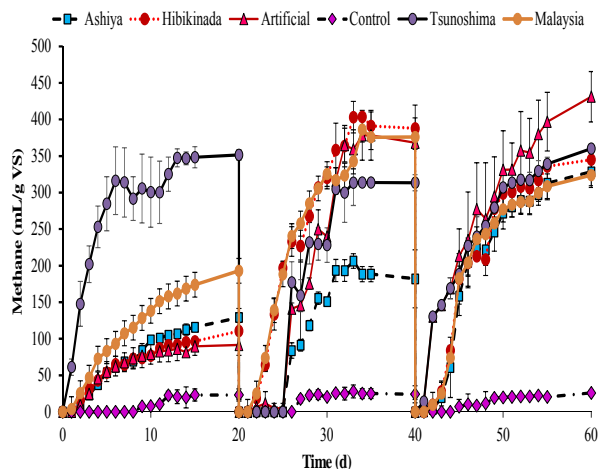


図 2 . メタン菌高集積汚泥による海水からのメタン生成 (海水は、北九州地区から芦屋、響灘、山口地区から津の島、マレーシア、および人工海水を用いた)

バイアル中にメタン菌高集積汚泥と各種海水を混合し、密閉した後、バイアル内を水素ガスで置換し、37、120 rpm で振とう培養を行った結果、図 2 に示したように、海水からメタンが生成されていることが明らかとなった。海水中には高濃度の塩分が含まれているため、メタン生成は海水中の塩分の影響を受け、メタン生成が阻害されている傾向が見られたため、20 日、40 日経過後に、再度水素ガスを供給していくことで、海水中の塩分に馴養したメタン菌高集積汚泥により、はじめ海水からのメタン生成が少なかった条件においても、次第にメタンが生成されることがわかった。調製したメタン菌高集積汚

泥が、塩分の多い海水においても、メタンを生成できる点は、学術的に興味深い結果であった。次に、生成されたメタンが、本当に重炭酸イオンから生成されているのかを明らかにするため、人工海水中で利用される通常の重炭酸ナトリウムに代わり、炭素 13 の重炭酸ナトリウムを添加し、上記と同様に培養を行った後に、生成されたメタンのうち、どの程度が炭素 13 のメタンであるのかを調べた。結果として、生成したメタンの 95%が、炭素 13 の重炭酸イオン由来であることが分かり、調製したメタン菌高集積汚泥は、高い効率で海水からメタンガスを生成できることが分かった。次に、水素ガスを供給しない条件においても、海水からメタンが生成されたが、生成されたメタンは全て炭素 12 のメタンであったことから、水素供給なしの条件では、海水からメタンを生成できなかった。

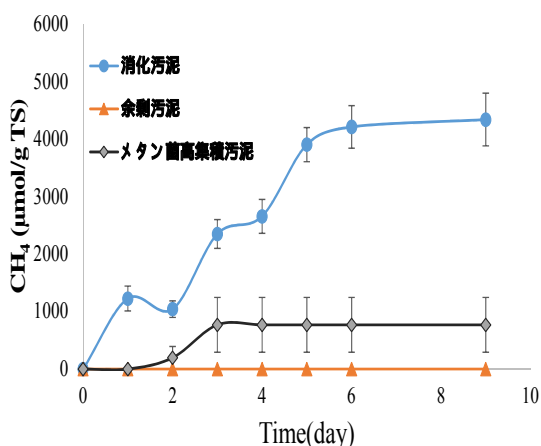


図3．二酸化炭素からのメタン生成における各種汚泥の活性比較（消化汚泥、下水汚泥、メタン菌高集積汚泥をバイアルに加え、水素と二酸化炭素の混合ガスを供給し、培養を行った）

（3）消化汚泥による二酸化炭素からのメタン生産

以上のように、本研究では下水汚泥から調製したメタン菌高集積汚泥が、効率的にメタンを二酸化炭素から生成できることを示してきた。しかし、本研究においては大きく二つの課題がある。一つ目は、メタン菌高集積汚泥を調製するのに、約2ヶ月間という時間を要することである。メタン菌高集積汚泥の代わりに、下水汚泥を用いても、二酸化炭素からほとんどメタンができないことから、下水汚泥をバイオマスとした場合、下水汚泥中に起こっている加水分解による低分子化、酸生成反応による有機酸生成、メタン菌による酢酸からのメタン生成、あるいは水素資化性の水素と二酸化炭素からのメタン生成などの複合的な反応が、水素と二酸化炭素からのメタン生成反応を抑制している可能性が考えられた。そのため、水素と二酸化炭素からのメタン生成反応を促進するためには、メタン菌が優占化させる必要がある。そこで、

下水処理場の消化汚泥に着眼した。消化汚泥の元の原料は生活污水という初沈汚泥と呼ばれるものであるが、これらの減容・資源化のために、嫌氣的に消化され、メタン発酵を行っているものが消化汚泥である。すなわち、このメタン発酵が進む中で、メタン菌高集積汚泥と同様に、バイオマスからの低分子化、酸生成などの反応が消化過程に収束し、よりメタン菌が集積されているのではないかと推察した。そこで、これらの仮説を検証するため、下水汚泥、メタン菌高集積汚泥、消化汚泥に対して、二酸化炭素と水素ガスを供給して、メタン生成を確認したところ、消化汚泥はメタン菌高集積汚泥よりも高効率にメタンを生成していることが分かった（図3）。その一方、下水汚泥を用いた場合は、推察通りにメタンガスは生成されなかった。また、炭素 13 の二酸化炭素と水素混合ガスを用いて、二酸化炭素のメタンへの変換効率をそれぞれの汚泥で比較したところ、メタン菌高集積汚泥は 75%と最も高く、次に消化汚泥（55%）最も変換効率が高いのは下水汚泥（8%）であった。

二つ目の課題は、水素ガスの供給である。これまでの全ての実験には、水素ガス供給なしでは、二酸化炭素は変換されなかった。水素ガスは、それ自身がバイオエネルギーとしても期待されているガスであるため、如何に水素ガスを供給することなく、二酸化炭素を変換できる仕組みを作るのが、本研究の実用化に向けた鍵となる。そこで、消化汚泥による二酸化炭素変換において、水素ガスを供給しない条件で、メタン生成を確認したところ、水素供給した条件と比較して、発生量が10倍程度低いものの、二酸化炭素を消費して、メタンを生成していることがわかった。そこで、二酸化炭素のメタン変換効率を調べたところ、85%のメタンが炭素 13 の二酸化炭素からできていることがわかった。この結果は、水素ガスの供給なしでの二酸化炭素を変換できることを示した有用な結果である。

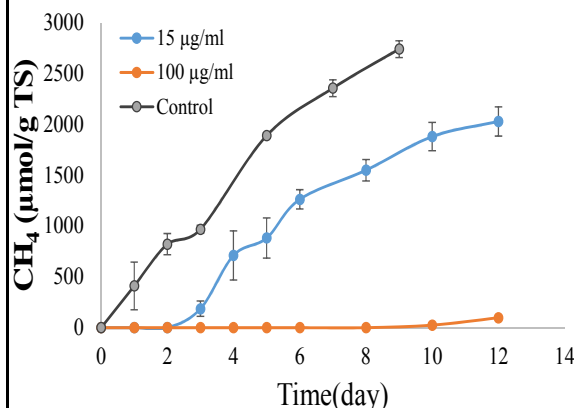


図4．クロラムフェニコール添加によるメタン生成経路阻害による消化汚泥からのメタン生成の抑制の確認

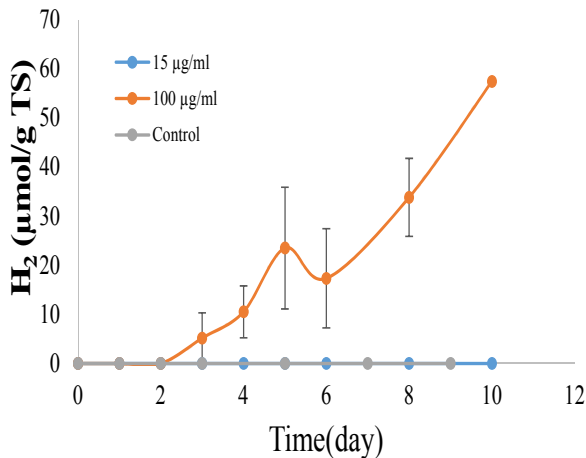


図5．クロラムフェニコール添加によるメタン生成経路阻害による消化汚泥からの水素ガス生成の確認

(4) 消化汚泥からメタンガスが生成されるメカニズムの解明

水素ガスを供給することなく、二酸化炭素からメタンが生成されたが、通常二酸化炭素からメタンが生成される反応には、水素源が不可欠であるため、どのようなメカニズムで水素ガスを供給することなく、二酸化炭素からメタンが生成されているのかを明らかにする必要がある。そこで、消化汚泥から生成される水素ガスが、二酸化炭素からのメタン生成に参与しているという仮説のもと、消化汚泥によるメタン生成経路を阻害した時に、水素ガスが生成されるのかを調べた。従来の報告より、クロラムフェニコールを添加するとメタン生成が抑制されるという知見に基づき、消化汚泥中にクロラムフェニコールを添加したところ、図4に示したように、クロラムフェニコールの添加によって、メタン生成が抑制されることがわかった。15 μg/mLのクロラムフェニコールでは、3日以降メタン生成が見られたが、100 μg/mLのクロラムフェニコールを添加した場合は、メタン生成が完全に阻害された。その際に、水素ガスの生成を確認したところ、時間経過で水素ガスの発生が確認された。このように、消化汚泥の発酵過程から生成される水素ガスが、二酸化炭素からのメタン生成に参与していることがわかった。

(5) 消化汚泥中の菌叢解析の比較

最後に、消化汚泥とメタン菌高集積汚泥中に存在している菌叢の比較を行った。はじめに、それぞれの汚泥中に存在する細菌叢の多様性をα多様性によって評価したところ、消化汚泥中に存在する細菌の方がより多様な菌群を持っていることが分かった(図6)。その一方、メタン菌高集積汚泥においては、多様性が低く、下水汚泥中での加水分解、酸生成、酢酸資化性のメタン生成のプロセスが終結していることが、低い細菌群の多様性の要因になったものと考えられる。

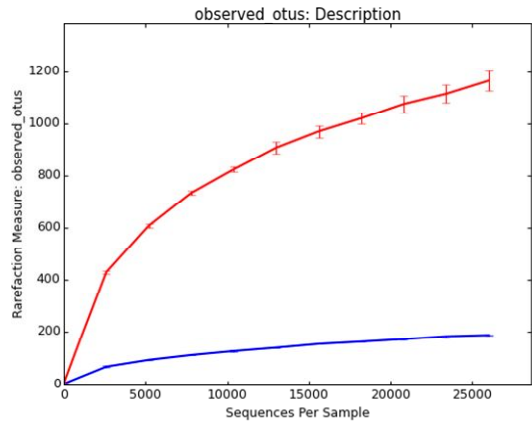


図6．消化汚泥およびメタン菌高集積汚泥中に存在している細菌群のα多様性の比較

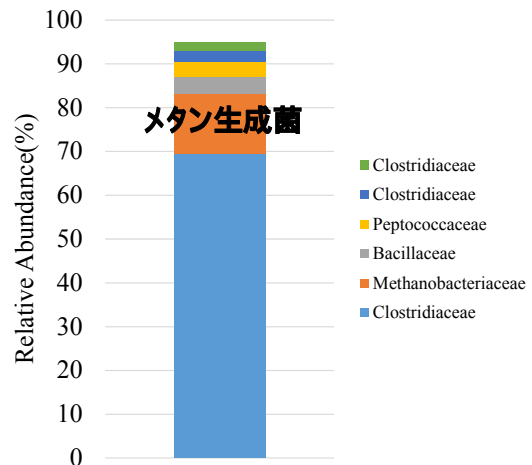


図7．メタン菌高集積汚泥中に存在している細菌叢の分布

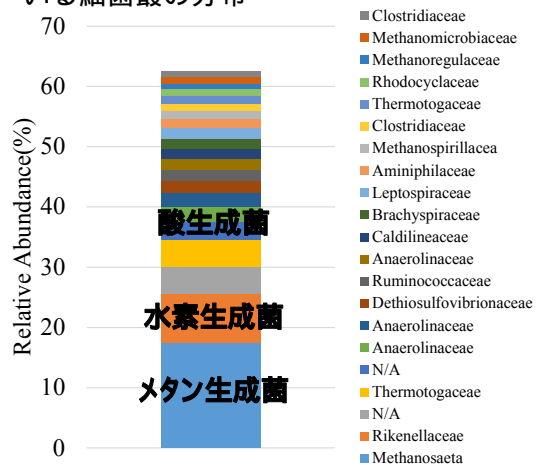


図8．消化汚泥中に存在している細菌叢の分布

次に、メタン菌高集積汚泥(図7)および消化汚泥(図8)の中に存在している細菌群の分類を比較したところ、メタン菌高集積汚泥中には、クロストリジウム属の菌が大部分を占め、その次にメタン生成菌が占めていた。その一方、消化汚泥中には、多様な菌群が存在していることが分かり、メタン生成菌の他

にも、水素生成菌や酸生成菌などが多様に存在していた。これらの細菌叢の多様性が、水素ガス供給なしで二酸化炭素のみからのメタン生成に寄与しているものと考えられる。

以上のように、本研究においては、下水汚泥を原料として、二酸化炭素を高効率に変換する手法の検討やその仕組みなどについて明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Toshinari Maeda, Kien Trang Tran, Ryota Yamasaki, Thomas K. Wood, Current State and perspectives in hydrogen production by *Escherichia coli*: roles of hydrogenases in glucose or glycerol metabolism, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 査読有、Vol. 102, 2018, pp. 2041-2050, DOI: 10.1007/s00253-018-8752-8.

Nazlina Haiza Mohd Yasin, Azusa Ikegami, Thomas K. Wood, Chang-Ping Yu, Tetusya Haruyama, Mohd Sobri Takriff, Toshinari Maeda, Oceans as bioenergy pools for methane production using activated methanogens in waste sewage sludge, **Applied Energy**, 査読有、Vol. 202, 2017, pp. 399-407, DOI: 10.1016/j.apenergy.2017.05.171

〔学会発表〕(計1件)

前田憲成、メタン細菌高集積汚泥を活用した海水からのバイオエネルギー生産の試み、環境バイオテクノロジー学会、2016年6月13日-14日、サテライトキャンパスひろしま(広島県民文化センター)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.kyutech.ac.jp/~toshi.maeda/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 憲成 (MAEDA, Toshinari)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00470592