

平成21年 6月12日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19510079
研究課題名 (和文) 多段連続培養を利用した嫌気性微生物叢の階層的共生機構の解明とメタン生成の高効率化
研究課題名 (英文) Examination of anaerobic microorganism community for improvement of methane production by using multiple continuous cultures
研究代表者
菊地 賢一 (KIKUCHI KEN-ICHI)
秋田大学・工学資源学部・環境応用化学科・教授
研究者番号：80108919

研究成果の概要：汚泥消化プロセスに関わる微生物叢を3段連続型バイオリアクターに大別して培養することによりそれぞれの共生関係を探り、高効率なメタン生成プロセスの設計を目的としたものである。全量2Lの3段直列連続培養を行った結果、CODおよびメタン発生量に関して並列培養に比べて効率が約50%上昇したが、16S rRNAのreal time PCR分析では各槽のバクテリアおよび種々メタン生成アーケアの分布に顕著な差は認められなかった。一方、200ml小型培養器の嫌気汚泥に対して増殖速度の速い外来のメタン生成アーケア *Methanothermococcus okinawensis* の移植を試み、T-RFLP分析による *M. okinawensis* の増殖とメタン蓄積量の増加が観測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術，環境材料

キーワード：環境負荷低減技術，エネルギー回収

1. 研究開始当初の背景

(1) 嫌気性微生物によるメタン生成の仕組みと問題点：下水処理によって大量発生する余剰汚泥や都市型生ゴミなどは主に焼却処理されてきたが、近年、これらを嫌気的な微生物群により分解して有機質の持つエネルギーをメタンガスとして回収する取り組みが積極的に行われてきている。嫌気的消化プロセスの有機物分解過程は、(I)加水分解細菌による高分子有機化合物の低分子化、(II)酸

生成細菌および水素生成酢酸生成細菌による有機酸やアルコールを経た酢酸、 H_2 、 CO_2 の生成、(III)水素資化性および酢酸資化性メタン生成アーケアによるメタン生成、の三つに大別することが出来る。しかし、このプロセス全体の分解効率は低く、中でも絶対嫌気性菌であるメタン生成アーケアの反応が律速となっている。そのため、大量の余剰汚泥や生ゴミを処理するためには大規模プラントが必要であり、建設コストも膨大である。

メタン生成アーケアは高度高熱菌に分類されるものが多く、温度 80-90℃において増殖とメタン生成が非常に高いものが知られている。したがって、高温度に制御した嫌氣的消化によってメタン生産速度の大幅な増加とこれに伴うプラント規模の縮小が期待できるが、他の加水分解細菌や酸生成細菌の熱耐性があまり高くないこと、微生物の共生関係が複雑で培養条件の変更による影響が不確実であること等の理由により、多くは経験的判断のもと 45℃ 前後で運転されている。

(2) 多段連続培養：特徴の大きく異なる複数の種が混在する複雑系微生物群の共生関係を明らかにしようとする場合、単一の培養槽ではなく、増殖特性が類似した微生物群（サブグループ）毎の培養槽に分けて簡素化してから解析するのが有効と思われる。一方、培養効率の観点からは単一微生物に関する理論的な解析が行われており、連続的な多段階培養は一段の培養に比べて単位時間あたりの処理量の増加や総運転体積の減少を可能にすることが明らかになっている。したがって、嫌氣的消化プロセスに多段連続培養を応用することは、微生物消化のメカニズムの解明とそれを元にしたプロセスの改善に有効であり、応用生物学的にも培養工学的にも極めて興味深い。

2. 研究の目的

本申請研究は、嫌氣的な汚泥消化・メタン生成プロセスに関わる複雑な微生物叢を階層的に特徴が類似している三つの微生物群（加水分解菌群、水素・酢酸生成菌群、メタン生成アーケア群）に大別し、これらの培養に多段連続型バイオリアクターを導入することによって嫌氣性微生物の共生関係を探り、高効率なメタン生成プロセスを設計することを目的とする。本目的を達成するために、外来のメタン生成アーケア優生種の移植の可能性も検討する。

3. 研究の方法

(1) 消化汚泥リアクター

内容積 3 L のリアクター 3 槽に、それぞれ嫌氣消化汚泥を 2.5 L 加え、各リアクターに余剰活性汚泥を滞留時間 15 d となるように 1 時間毎に間欠的な供給と攪拌 (60 rpm) を行いながら、40℃ で連続培養を開始した。運転開始から 1 ヶ月後、3 つのリアクターを直列に接続し、滞留時間 10 d で多段連続培養を行った (Fig. 1)。

(2) メタン生成アーケアの培養

① 単一培養：外来優生種として用いるメタン生成アーケアは、温泉から単離された淡水型の *Methanothermus fervidus* および海底の熱水

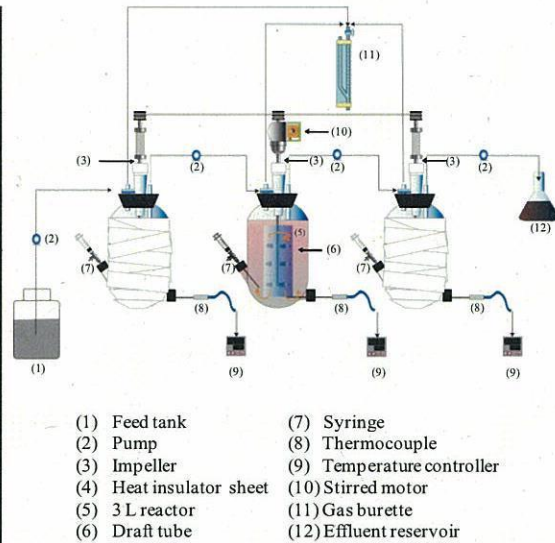


Fig. 1. Schematic diagram of anaerobic

噴出孔から単離された海水型の *Methanothermococcus okinawensis* である。Table 1 に示した組成の合成培地をガス噴射法により 120 ml 血清ビンに 40 ml ずつ分注し、プトルゴム栓で密封した。L-Cysteine · HCl · H₂O, Na₂S · 9H₂O を含む還元剤を加え、0.045% NaCl 存在下で *M. fervidus*, 1.8% NaCl 存在下で *M. okinawensis* を 2 日間それぞれ単一培養した。

Table 1 Compositions of mixed medium (pH 6.5) for methanogenic archaea

Components	Contents
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	3.0 mg
KH ₂ PO ₄	0.225 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.09 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.14 g
NaHCO ₃	2.0 g
NaCl	0.45-18 g
Na ₂ SO ₄	3.4 g
Resazurin	1.0 mg
Na ₂ S · 9H ₂ O	0.5 g
L-Cysteine · HCl · H ₂ O	0.5 g
Trace vitamins	58.1 mg
Trace minerals	6.44 g
Yeast extract	2.0 g
Polypeptone	2.0 g
Distilled water	1000.0 ml

② 混合培養：120 ml 血清ビンに 2 種類のアーケアの前培養液 2 ml を植菌し、H₂-CO₂ 混合ガス (4:1) を用いて気相を 0.2 MPa にパージした。所定温度で静置培養を行った。

③ 置換培養：120 ml 血清ビンを用いて *M. okinawensis* を 6 日間静置培養した培養液に 2 日間純粋培養した *M. fervidus* 前培養液を 2 ml 植菌し、混合培養と同様に培養を行った。

(3) 優生種移植培養

5 wet% (w/v) となるように余剰活性汚泥 (秋田市上下水道局八橋下水道終末処理場) を合成培地と混合し、脱気した後に 30 ml 試験管に 5 ml 加えた。さらに、嫌氣消化汚泥 (横浜

Table 2 Real-time PCR primer and probe sets.

Target	Forward primer	Reverse primer	Double dye probe
Bacteria	S-D-Bact-0348-S-a-17 (AGGCAGCAGTDRGGAAT)	S-D-Bact-0786-A-a-20 (GGACTACYVGGGTATCTAAT)	S-D-Bact-0515-A-a-25 (TGCCAGCAGCCGGTAACTACRDAG)
Methanogenic archaea	S-P-March-0348-S-a-17 (GYGCAGCAGGCGGAAA)	S-D-Arch-0786-A-a-20 (GGACTACVSGGGTATCTAAT)	S-P-March-0515-S-a-25 (TGCCAGCMGCCGGTAAAYACCGGC)
<i>Methanobacterium</i> sp.	S-F-Mbac-0398-S-a-20 (CCCAAGTGCCACTCTTAACG)	S-G-Mbac-0578-A-a-22 (AGACTTATCAARCCGGCTACGA)	S-G-Mbac-0526-A-a-33 (AAYGGCCACCCTTGAGCTGCCGGTGTACC GC)
<i>Methanosarcina</i> sp.	S-G-Msar-0450-S-a-19 (TAGCAAGGCGCCGCAAGA)	S-G-Msar-0589-S-a-20 (ATCCCGGAGGACTGACCAAAA)	S-P-Msar-0540-A-a-31 (AGACCCAATAATCAGATCACCCTCGGGCC)
<i>Methanothermococcus okinawensis</i> sp.	Arch21F (ITCCGGTGTATCTGCCGGA)	SeaN1R (CACCACCTGGGCCAAG)	

Table 3 Primers used for T-RFLP

Primers	name	Sequence (5'-3')
Forward	Hex-Arch-F08/04	hexachlorofluorescein-ACGGCTCAGTAACACGTGG
Reverse	Arch958R	TCCGGCGTTGACTCCAATT

市環境創造局北部汚泥資源化センター) を 5 ml 加え, 40°C で 6 時間前培養した。汚泥中の全アーケア DNA 量に対し *M. okinawensis* の DNA 量が 5% となるように植菌し, 所定温度で培養した。

(4) 分析方法

微生物量は DNA 量から求めた。採取した試料を遠心分離し, 菌体を Lysozyme, Protease K, SDS で処理し, エタノール沈殿法により DNA を抽出した。メタン生成アーケアの培養においては, 全 DNA 量を Hoechst 33258 による蛍光標識法で求め, *M. okinawensis* DNA はインタカレーター法による real-time PCR により求めた。*M. fervidus* DNA 量は全 DNA 量と *M. okinawensis* DNA 量の差より求めた。以上の分析に用いたプライマー及びプローブを Table 2 にまとめた。

バイオガスは TCD ガスクロマトグラフィーにより分析し, バイオガス量はガスビュレットにより分析した。COD は過マンガン酸カリウムによる滴定法により求めた。

優生種移植培養における微生物は末端制限酵素断片長多型 (T-RFLP) により分析した。5' 末端を蛍光標識した DNA プライマー (Table 3) を用いて real-time PCR により DNA を増幅し, 制限酵素 *Mse* I で処理した後, 3130/3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) および Gene Mapper v4.0 (Applied Biosystems) で分析した。

4. 研究成果

(1) 3 段連続消化汚泥リアクター

3 槽のリアクターに嫌気消化汚泥を加え, 温度 40°C, 滞留時間 15 d でそれぞれ並列で連続培養を開始した。30 日後にこれらを直列に接続し, 滞留時間を 10 d で多段連続培養を行った。Fig. 2 (A) はメタン生成とメタン濃

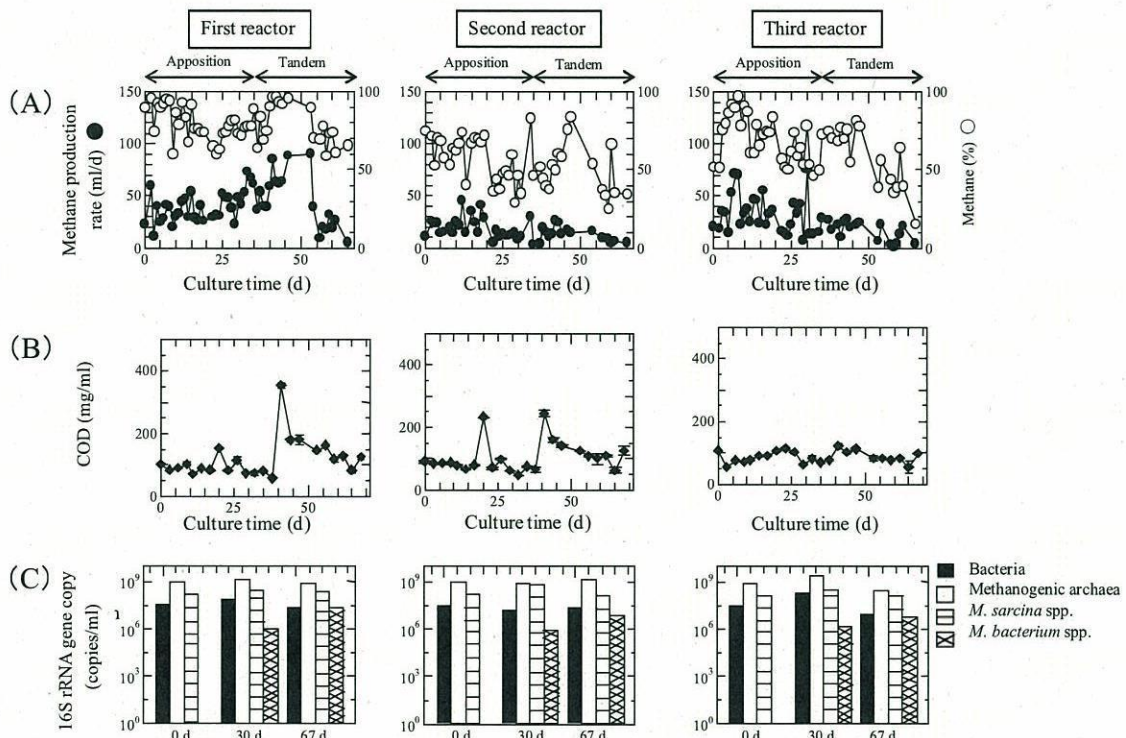


Fig. 2. Sequential behavior of anaerobic continuous tank fermentor. Aerobic waste sludge was intermittently supplied to the tanks once an hour at residence time of 10 d at 40°C. (A) Methane production rate and methane concentration, (B) COD, (C) 16S rRNA gene copy number.

度の挙動を調べた結果を示す。多段連続培養に変更した後、1段目のリアクターではメタン生成速度と濃度が上昇した後、メタン濃度は約70%で定常になる様子が確認された。2段目および3段目のリアクターにおけるメタン濃度は1段目より少し遅れてそれぞれ約45%と20%の定常値に漸近する様子が見られる。Fig. 2 (B) は各リアクター内の消化液のCODを調べた結果であるが、1段目から3段目にかけてCODの定常値は徐々に低下した。

Fig. 2 (C) は、運転開始前と運転開始後30, 67 dにおける嫌気消化汚泥のバクテリアおよび種々のメタン生成アーケアの分布を16S rRNA 遺伝子コピー数から調べた結果を示している。並列連続運転開始後のすべてのリアクターにおいて、実プラントではほとんど確認できなかった *M. bacterium* 種が増加していることが分かる。このような菌叢の多様性の増加は処理物の負荷変動に対する耐性が向上する上で有利と思われる。しかし、一段を3段連続に変更しても各リアクター間の菌叢に差はあまり見られず、今後、さらに培養を継続し菌叢の変化を調べていく必要がある。

(2) 2種メタン生成アーケアの混合培養

培養温度 55°C, 85°Cにおいて *M. fervidus* と *M. okinawensis* の混合培養を行い、増殖およびメタン蓄積の挙動を調べた結果を Fig. 3 と 4 に示す。55°C, 0.5~1.8% NaCl 存在下では海水型の *M. okinawensis* のみが増殖するが、85°Cにおいては、*M. okinawensis* は NaCl 濃度にかかわらずほとんど増殖せず、*M. fervidus* は 0.05~1.0% NaCl 存在下で増殖することが分かった。また、メタン蓄積量はメタン生成アーケアの増殖挙動にほぼ対応していた。

Fig. 5 は培養温度 85°C, 1.0% NaCl の条件で置換培養を行った結果を示している。*M. fervidus* に有利な条件に制御することにより、大過剰の *M. okinawensis* は減少し、*M. fervidus* の優先的な増殖が可能であることが分かった。

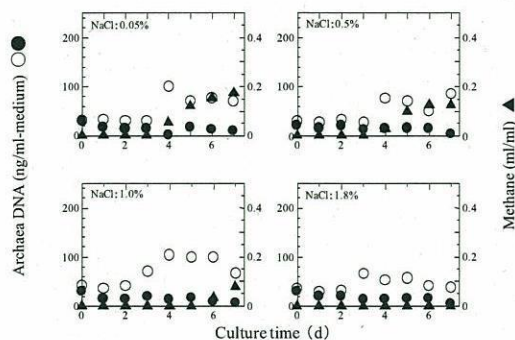


Fig. 3. Sequential profiles of growth of *M. fervidus* and *M. okinawensis* and methane accumulation in mixed cultures at 55°C
Symbols: ○, *M. fervidus*; ●, *M. okinawensis*

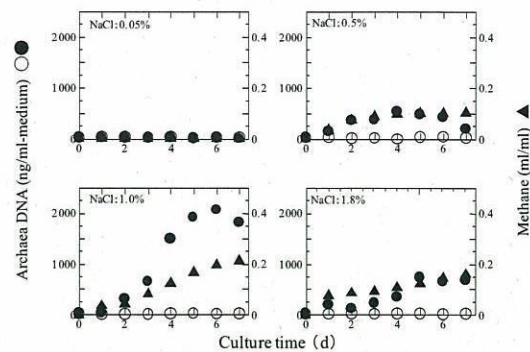


Fig. 4. Sequential profiles of growth of *M. fervidus* and *M. okinawensis* and methane accumulation in mixed cultures at 85°C
Symbols: ○, *M. fervidus*; ●, *M. okinawensis*

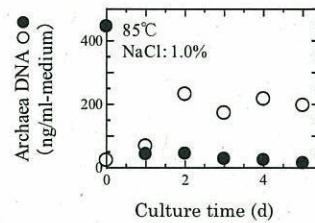


Fig. 5. Sequential profiles of growth of *M. fervidus* and *M. okinawensis* in mixed cultures in presence of 1.0% NaCl at 85°C
Symbols: ○, *M. fervidus*; ●, *M. okinawensis*

(3) 嫌気消化汚泥への優生種移植

嫌気消化汚泥にメタン生成アーケア優生種 *M. okinawensis* を移植して 40°C で培養した。Fig. 6 は、嫌気消化汚泥を 40°C または 55°C で培養し、培養 1 日目に *M. okinawensis* を 11.3 ng/ml で移植したときのメタン蓄積量を示している。40°C では培養開始直後からメタンが発生するが、*M. okinawensis* を移植しない場合には 1 日後に最大となるのに対し、移植した場合にはさらに増加して 3 日目に最大となった。また、どちらも培養後期にメタン量が低下しているが、これは基質の減少によるものと考えられる。一方、55°C では *M. okinawensis* の最適培養温度にも関わらずメタンはほとんど発生しなかった。これは、55°C では汚泥中の他の微生物群の活性が低下し、メタン生成アーケアに必要な水素や酢酸が供給されないためと考えられる。

Fig. 7 は菌叢の T-RFLP 分析を行った結果を示す。移植時における汚泥既存種 *M.*

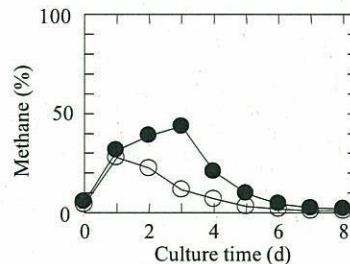


Fig. 6. Methane production of anaerobic sludge in transplantation cultures at 40°C.
Symbols: ○, control, ●, transplantation at 1 d.

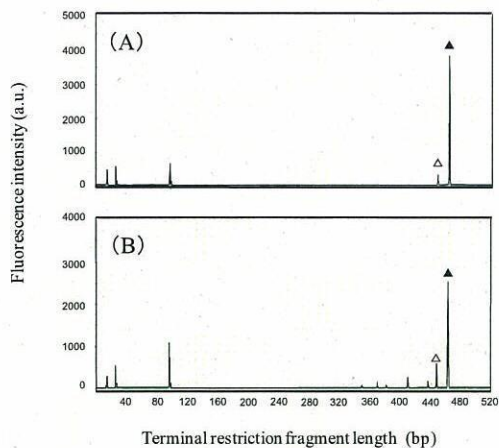


Fig. 7 T-RFLP analysis of archaeal 16S rRNA amplified from DNA extracts of anaerobic sludge in transplantation cultures at 40°C. (A) 0 d, (B) 5d. Symbols: \triangle , *M. okinawensis*; \blacktriangle , *M. sarcinaceae*

sarcinaceae に対する優生種 *M. okinawensis* の存在割合は 8%であったのに対し (Fig. 7A), 5 d では 23%に上昇している (Fig. 7B)。これより、嫌気消化プロセスへのメタン生成アーケア優生種の移植の可能性が示唆された。一方、*M. okinawensis* に最適な 55°C で移植培養を行った場合には、*M. okinawensis* はほとんど増殖しなかった。これは、高温では汚泥中の他の微生物群の活性が低下し共生が出来なかったためと考えられる。

以上の結果をもとにすると、3 段連続嫌気バイオリアクターを用いて嫌気消化プロセスの効率化を目指すためには、3 槽目を 55°C としてメタン生成アーケア優生種を移植し、1 槽目と 2 槽目は加水分解細菌と酸生成細菌および水素生成酢酸生成細菌にそれぞれ最適となるように温度を制御する方策が好ましいと考えられる。今後、その実験的検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 後藤 猛, 伊沢 匠, 菊地賢一, 「3 段連続プロセスにおける嫌気性消化特性と外来メタン生成アーケア移植の試み」, 化学工学会米沢大会, 米沢, 2009 年 8 月 10・11 日 (予定) .
- 2) 後藤 猛, 安和広乃, 日景翔輝, 菊地賢一, 高橋砂織, 「バキュロウイルス感染 Sf-9 昆虫細胞培養系におけるプロレニンプロセッシング酵素の動態とレニン生成に及ぼす影響」, 化学工学会第 74 年会, 横浜, 2009 年 3 月 18 日~20 日.
- 3) 安和広乃, 後藤 猛, 菊地賢一, 高橋砂織, 「昆虫細胞発現系におけるプロレニンプロセッシング酵素の特性解析」, 秋田応用

生命科学研究会, 秋田, 2008 年 11 月 14 日.

- 4) 伊沢 匠, 門間 研, 後藤 猛, 菊地賢一, 「二種混合培養におけるメタン生成アーケア *Methanothermobacter fervidus* と *Methanothermococcus okinawensis* の増殖挙動」, 化学工学会第 40 回秋季大会, 仙台, 2008 年 9 月 24 日~26 日.
- 5) 後藤 猛・菊地賢一, 「半回分培養による *Drosophila* S2 昆虫細胞の増殖と MT プロモーター制御タンパク質発現の挙動」, 化学系学協会東北地方大会, 山形, 2007 年 9 月 21 日~23 日.
- 6) Takeshi Gotoh, Masamichi Fukuhara, and Ken-Ichi Kikuchi, "Mathematical model for change in size distribution of baculovirus-infected Sf-9 insect cells" The 3rd WSEAS International Conference on Cellular and Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering, Vouliagmeni, Athens, Greece, Aug. 26-28, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 賢一 (KIKUCHI KEN-ICHI)
秋田大学・工学資源学部・教授
研究者番号: 80108919

(2) 研究分担者

後藤 猛 (GOTOH TAKESHI)
秋田大学・工学資源学部・准教授
研究者番号: 10215494