

Real-time PCR を用いたメタン生成古細菌の定量による 各種消化汚泥メタン生成活性の評価

水圏環境制御工学研究室 福田 江津子
指導教官 大橋晶良、原田 秀樹

1. はじめに

嫌気性消化による下・廃水・廃棄物処理を行う場合、微生物処理特性を評価する上で処理を担う微生物量を把握することは非常に重要な指標である。特に、嫌気性処理系においては、有機物を逐次分解する微生物群が相互に関わりながら共存している。

これら微生物群のメタン生成活性をバイアル瓶により測定する評価方法として「メタン生成活性試験」がある。本法は、多種多様な条件下で同時に大量に実験が行える利点をもつことから従来広く用いられてきたが、いくつかの欠点がある。

- ① 実験作業が繁雑で労力が不可避である。
- ② 実験操作や培養条件が活性に大きく影響を与えるほか、精度は測定頻度に依存する。
- ③ 算出されたメタン生成活性値は汚泥量(以下、VSS)に対するものであり、汚泥中のメタン菌の存在比を考慮していない。

そこで、本研究ではこれらの問題を解決するため Real-time PCR に着目した。メタン生成古細菌の定量を行い、DNA 量と活性との関係を明確にする。そして、メタン生成活性の新たな評価方法として提言することを目的とする。

2. 畜産廃棄物のメタン生成活性試験

2.1 背景

近年、資源循環型社会の構築が重要課題となっており、畜産廃棄物の適正な管理とバイオガス回収を目的としたメタン発酵処理法が着目されている。北海道では、牛ふん尿を野積み堆積もしくはラグーン処理（自然発酵）を行っているが、地下水汚染などの問題が懸念されている。又、平成 11 年には家畜排泄物の適正処理に係わる新たな法律が施行されている。このような背景から北海道開発局は、平成 13 年度に牛フンのメタン発酵試験プラントを建造しており、畜産廃棄物のメタン発酵処理を普及させる大きな試みとして、その効果が注目されている。

2.2 メタン発酵処理施設および処理性能

本施設のメタン発酵槽（容積 1500 m³）は、乳牛 1000 頭規模の処理能力を有し、中温 37℃、発酵期間 30 日で設計されている(Fig. 1)。植種源は、中温消化下水汚泥が入手困難であったため、経済性や環境面から実用的なラグーン汚泥を使用した(鳥村, 2000 ; 帆秋ら, 2001)。植種源を投入し、発酵槽を 37℃に昇温させた（運転 0 日目）のち、20~42 日目まではラグーン汚泥で馴養した。47~63 日目は原料の供給を行っていない。64~116 日目までは牛ふん尿 C を 50 t/day 投入した。147 日目まではふん尿 A+B+C 混合を 30~40 t/day、148 日目からはふん尿 A+B 混合を 40t/day 投入した。

発酵槽は、植種源投入後、DO=0、ORP=-350mV の嫌気的な環境が維持された。pH は減少傾向にあったが、運転 20 日目より（COD 容積負荷 3.5 kg-COD/m³/day）、徐々にメタンが発生し、運転 40 日目に急

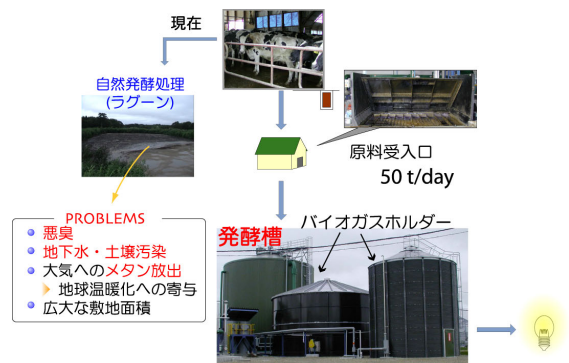


Fig. 1 Lagoon and Bekkai anaerobic digestion

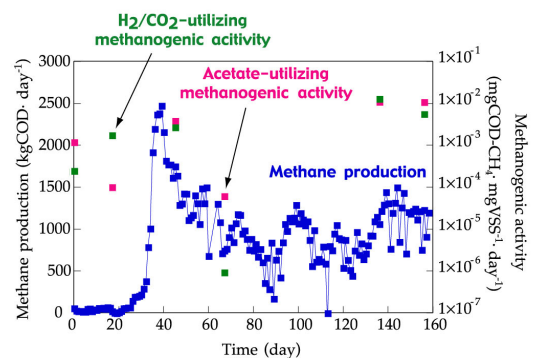


Fig. 2 Time course of methane production and methanogenic activity in anaerobic digestion

激に上昇した。これは、植種汚泥を発酵槽で加温したことでメタン菌が増殖し、好条件で牛ふん尿をメタンに転換できる環境になったためと考えられる。これに伴い、pHも上昇し、以後、pH=8.0を推移している。40日目を以降のCOD容積負荷は原料の濃度が希薄なため約1.5 m³-COD/m³/day程度であり、メタン発生率（日々の投入ふん尿量が異なるため、一日当たりの投入ふん尿量に対するメタン発生量）は0.26 m³-CH₄/m³-sludge/dayであった。S-COD及びVFAは発酵槽内にほとんど蓄積しておらず、速やかにバイオガスへ転換し、そのメタン転換率（（メタン発生量のCOD当量）÷[(前日の原料COD-当日の発酵槽COD)×投入量]より算出）は50~100%であった。

2.3 メタン生成活性試験

前述したメタン発酵槽の処理性能をメタン生成活性から評価するため、定期的にサンプリングし、メタン生成古細菌のメタン生成活性試験を行った。本試験は、Syutusbo,ら(1997)の活性試験に準じて行い、基質消費に伴って生成するメタンガス量として活性を評価した。全てのサンプルは、メタン生成が直線ではなく、指数関数的に増加しており、メタン生成活性値の算出は困難である。これは、汚泥中の菌体が非常に少ないために、菌体増殖しながら基質を消費していることが示唆される。しかし、メタン生成が活性化するまでの期間がサンプルによって異なり、非常に活性が低い中でも運転時期によりメタン生成活性が変化していることは推測できた。

3. 微生物の数学的増殖モデル

前述のような活性の低い汚泥の回分試験結果からでもメタン生成活性を評価できるよう、細菌が理論的に増殖すると仮定してメタン生成量から比増殖速度、さらにメタン生成活性が求められる数学的モデルを構築した。そして、回分培養での活性試験で得られるデータから活性値を評価する解析方法を提示すると共に、活性値評価の妥当性について検討した。

3.1 理論

前章の実験結果を Fig. 3 に示しているが、メタン生成活性が非常に低くて、図からでは全く算出することは不可能である。一方、(Fig. 1)には UASB グラニュール汚泥の水素利用のメタン生成活性データもプロット (■) しており、このような活性の高い汚泥の場合、直線の傾きから活性値を容易に求めることができる。牛フンのメタン発酵処理汚泥メタン生成回分試験結果は、活性が非常に低くて、数十日という長期の試験日数を要した。この試験日数は汚泥内のメタン生成細菌の世代時間よりも長く、この間に細菌が増殖することによってメタン生成量が経過時間と共に直線ではなく指数関数的に増加したことが容易に想像できる。

基質が十分に存在する回分培養試験の対数増殖期では、微生物の増殖速度は一般的に次式で表される。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

ここに、 X : 菌濃度 [mg cell·l⁻¹], t : 時間[day], μ : 菌体の比増殖速度[day⁻¹]。菌濃度の初期値を X_0 として式(1)を解くと

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

になる。一方、基質消費速度あるいはメタン生成速度は

$$-a \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \nu X \quad (3)$$

ここに、 S : 基質濃度 [mg COD·l⁻¹], P : メタン生成量[mg CH₄-COD·l⁻¹], a : 基質消費に対するメタン生成転換率 [mg CH₄-COD·mg COD⁻¹], ν : 比メタン生成速度[mg CH₄-COD·mg cell⁻¹·day⁻¹]である。式(3)の X

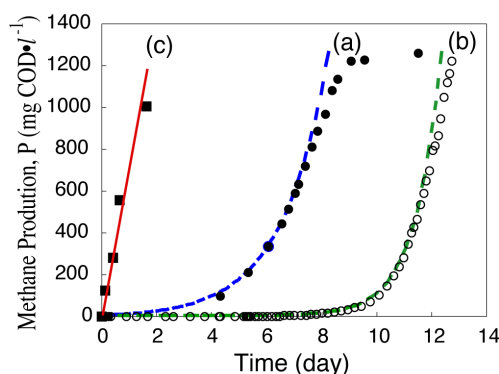


Fig.3 Methane productions in batch experiments for methane producing activity tests. (a): acetate utilization of a cow-manure treatment anaerobic sludge, ●; (b): hydrogen utilization of a cow-manure treatment anaerobic sludge, ○; (c): hydrogen utilization of a UASB granule sludge, ■. The broken lines are of theoretical simulation results based on the mathematical model proposed in this study using parameters determined.

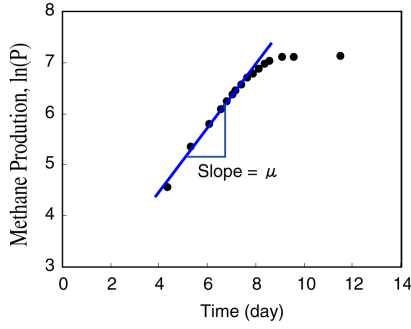


Fig. 4 Logarithm of methane production versus time of batch activity test on the data (a) in Fig. 1. The slope of regression line refers to specific growth rate, μ at around $\mu t > 3$.

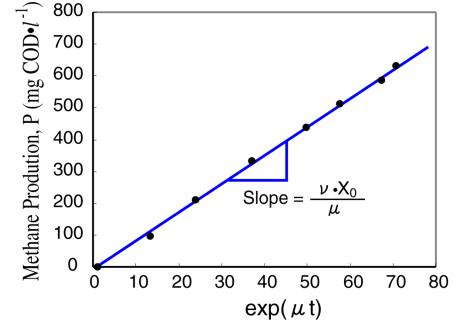


Fig. 5 Methane production versus $\exp(\mu t)$ on the data (a) in Fig. 1, using μ value estimated in Fig. 2. The slope of regression line represents vX_0/μ .

に式(2)を代入して積分すると、メタン生成量 P を時間の関数として導ける。

$$P = \int_0^t vX_0 e^{\mu t} dt = \frac{vX_0}{\mu} (e^{\mu t} - 1) \quad (4)$$

上式は3つの未知定数 v , μ , X_0 が含まれており、これからメタン生成活性を求めることは至難である。しかし幸いに、活性が低くて回分試験時間が世代時間 ($\ln 2 / \mu$) よりも非常に長いため、およそ

$\mu t > 3$ ならば $e^{\mu t} - 1 \cong e^{\mu t}$ より

$$P \cong \frac{vX_0}{\mu} e^{\mu t} \quad (5)$$

と簡略化できる。さらに、式(5)の両対数をとると

$$\ln P \cong \ln \frac{vX_0}{\mu} + \mu t \quad (6)$$

が成り立つ。従って $\ln P$ と t の関係をグラフ化すると $t > 3/\mu$ で対数増殖期の範囲内では線形となり、この直線の傾きが比増殖速度 μ である。Fig. 4 は一例として Fig. 3 の経日変化 (a : 酢酸利用メタン生成量, 凡例●印) を再プロットしたもので、図より μ を算定することができ、 0.66 day^{-1} の値を得る。この値より $\mu t > 3$ を満たす t は 4.5 日となり、およそ 4.5 日以降のデータを用いて回帰計算されている必要がある。Fig. 4 は 4.33 日のデータも含めて回帰計算してある。

次に、 μ が評価できたので、簡略化する前の式(4)のメタン生成量 P に戻って、 P と $e^{\mu t}$ の関係をグラフ化する (Fig. 5 : Fig. 3 の経日変化 a を再プロット)。対数増殖期の範囲で線形関係が成り立ち、直線の傾きおよび Y 軸との切片が vX_0/μ に匹敵する。 μ は既に求めているので、 vX_0 の値を得ることができる。

汚泥のメタン生成活性は回分試験の初期メタン生成速度を指し、一般的に菌数ではなく単位汚泥量 [mg VSS] に対するメタン生成速度を比活性値 v' [mg $\text{CH}_4\text{-COD} \cdot \text{mg VSS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$] として用いられている。すなわち、次式の関係がある。

$$\left. \frac{dP}{dt} \right|_{t=0} = vX_0 = v'X'_0 \quad (7)$$

ここに X'_0 : 初期汚泥濃度 [mg VSS $\cdot \text{l}^{-1}$] である。よって、メタン生成比活性値 v' は、メタン生成量の回分試験結果をグラフ化して vX_0 の値を求め、最終的に

$$v' = \frac{vX_0}{X'_0} \quad (8)$$

より算定できる。なお、菌濃度の初期値 X_0 と菌体当たりの基質消費速度またはメタン生成速度 v の各々が不明でも、通常回分活性試験からメタン生成比活性値 v' の評価は可能である。さらに、 X_0 を測定すれば v の値も求められる。

1.2 解析の考察

回分培養による活性試験において、理想的に菌体が増殖すると仮定した数学モデルを構築して、上述のように汚泥の比活性値を求めることが可能となったが、得られる比活性値の信頼性は定かでない。そこで、評価された比活性値の妥当性について検討する。

解析の過程で回分活性試験データから比増殖速度 μ を先ず最初に求めている。この μ の評価結果は後の比活性値の算出に大きく影響を及ぼすこととなる。そこで、下水消化汚泥および6種類の牛糞メタン発酵処理汚泥の酢酸あるいは水素を基質として供与したメタン生成活性試験を実施して上述の解析方法で比増殖速度 μ を求めると、酢酸基質で 0.31~0.75 (平均 0.48) [day^{-1}], 水素基質では 0.68~1.26 (平均 0.86) [day^{-1}] の範囲にあった。測定した下水消化汚泥と牛糞メタン発酵処理汚泥の DNA を抽出し、16S rDNA 遺伝子をクローン化して分子系統解析を行った結果、高頻度に検出されたメタン生成古細菌は酢酸資化性の *Methanosaeta concilii* (旧 *Methanothrix concilii*), 水素資化性の *Methanospirillum hungatei* (旧 *Methanospirillum hungatii*), *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter arbophilicum* (旧 *Methanobacterium arbophilicum*), *Methanobrevibacter oralis*, *Methanosphaera stadtmanii* および酢酸と水素を資化する *Methanosarcina mazei* に近縁な古細菌群であった (未発表)。活性試験と同じ温度 35°C 付近でのこれらメタン生成古細菌の μ 値 [day^{-1}] は、それぞれ 0.20-0.69, 0.98, 不明, 0.69-1.28, 1.10, 不明, 0.12-0.45 (酢酸) と 1.85 (水素) (Asakawa, Ferrari, Ferry, Liu, Patel, Patel *et al.*, Touzel *et al.*, Zeikus *et al.*) であり、活性試験から求めた μ の値とほぼ符合している。すなわち、回分培養活性試験において菌体は理論的に増殖しており、比増殖速度 μ は適切に評価できていると考えられる。

次に P vs. $e^{\mu t}$ のグラフ (Fig. 5) の傾きから求めた $\nu X_0 / \mu$ の値を使って、比活性値が算出されるため、直線の傾きの信頼性は重要である。実際のデータから求めてみると、サンプル汚泥全てにおいて強い線形関係 (相関係数 0.985 以上) が見られた。一方、この直線の理論的な x 軸 ($e^{\mu t}$) との切片の値は 1 であるが、回帰直線の切片は $-0.6 \pm \text{S.D. } 8.5$ と理論値に近い値ながらもバラツキが大きかった。しかし x 軸の切片が 1 を通る直線回帰式でも相関係数は 0.984 以上と高く、 νX_0 の値は普通の回帰計算で求めた値との差が 3.2% 以内と僅かであった。真実の ν と X_0 が不明なため比活性値が正しく評価できたかどうかを論じることはできないが、算定した μ および νX_0 の値を式(4)に代入して計算した理論的なメタン生成量 P の経日変化を Fig. 3 に破線で図化したところ、測定値は非常によくシミュレートされた。この解析方法で求めた前述したメタン発酵処理施設のメタン発酵汚泥のメタン生成比活性値 ν は、一般的な下水消化汚泥より数オーダーも低く、酢酸基質: $6.2 \times 10^{-5} \sim 1.1 \times 10^{-2}$, 水素基質: $9.4 \times 10^{-7} \sim 1.3 \times 10^{-2} \text{ mg CH}_4\text{-COD} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ VSS} \cdot \text{day}^{-1}$ の値を示した (Fig. 2)。従来の方法では算出困難であったこのような非常に活性の低い汚泥でも、本解析方法は明瞭に数値化でき、理論的に正当な値を得ることができると考えられる。ただし、本数学モデルは μ と ν が同一の分解菌群やメタン生成古細菌群からなる理想的な汚泥について構築されたものであり、 μ や ν の値が異なる細菌が混在する実際の系に対しては、その混在の影響を考慮する必要がある。

4. Real-time PCR によるメタン生成古細菌の至適定量条件

まず Real-time PCR による 16S rDNA コピー数の定量を精度よく求めるため、至適 PCR 条件を決定した。

4.1 実験装置及び方法

実験装置は、LightCycler (Roche, Germany) を用いての SYBR Green I による蛍光検出方法で PCR をモニタリングした。LightCycler を用いて定量する場合、より高感度に精度良く定量するにはプライマーセット毎に至適 PCR 条件下の検量線を作成する必要がある。そこで、標準物質(スタンダ

Table 1 Optimal real-time PCR condition

Primer set	Target group	Mg ²⁺ conc. (mM)	Annealing temp. (°C)
• Ar109f & Ar912r	Archaea	3	56
• Ar109f & MB1174	Methanobacteriaceae	3	50
• Ar109f & MC1109	Methanococcales	2	52
• Ar109f & MG1200	Methanomicrobiales	3	52
• Ar109f & MS821	Methanosarcina	2	54
• Ar109f & MX825	Methanosaeta	2	56

ード)に PCR 産物を用いて、定量条件の至適化を行った。

消化汚泥中に存在する中温性水素資化性および酢酸資化性メタン生成古細菌はすべて網羅するため、6 種類のプライマーセットを決定した。プライマーには改良型 Ar109f (TGCACAATGACTCGDMA)と Ar912r, MB1174, MC1109, MG1200, MS825, MS821 (Raskin, 1994)を用いた。決定したプライマーセットで増幅可能な *Methanobacterium bryantii* (DSM863), *Methanococcus vannielii* (DSM1224), *Methanoculleus bourgensis* (DSM3045), *Methanospirillum hungatei* (DSM864), *Methanosarcina barkeri* (DSM863), *Methanosaeta concilii* (DSM3671)の計 6 種類のメタン菌を培養し、*Proteinase K* による DNA 抽出を行った。そして Arch21F と UNI1490R により 16S rDNA をターゲットとした PCR 産を増幅させた後、copy 数を蛍光光度計で求め標準物質とした。

1.2 実験結果

16S rDNA 数を精度よく求めるため、3 種類のプライマーセットにおける最適な Real-time PCR 条件は、増幅効率が最も高かった Mg^{2+} 濃度は 2 あるいは 3mM、Annealing 温度は 50~56°C となり、広い濃度範囲 ($10^6 \sim 10^1$ copies/ μ l)で高精度の検量線が作成できた(Table 1.)。これにより、中温メタン生成古細菌を全て検出することが可能となった。

5. 純菌のメタン生成活性試験

Real-time PCR による 16S rDNA コピー数を定量するとメタン生成活性の評価が可能か検討するため、まず純菌のメタン生成活性試験と定量を行った。

5.1 実験方法

Methanosaeta concilii の活性試験結果を Fig. 6 に示す。菌体濃度を段階的に希釈して行ったそれぞれのメタン生成量プロファイル（図中に希釈率を記載）が描かれており、それぞれのプロファイル結果から数学的増殖モデルを用いて比増殖速度 μ を求めると平均 $0.186 \pm S.D. 0.007$ [day^{-1}]、すなわち倍加時間 3.7 日であった。この μ 値を使って、回分活性の初期菌体濃度を評価したところ、希釈した実際の菌体濃度とほぼ一致しており、数学的増殖モデルを用いた計算から適切に菌体濃度が評価できることが確認された。

数学的増殖モデルから菌体濃度が把握できることが分かったので、活性試験時における算出された菌体濃度と Real-time PCR 法で求めた 16S rDNA の copy 濃度の関係をプロットした(Fig. 7)。なお、植種源基準とした濃度で表している。菌体濃度、16S rDNA 濃度ともに測定誤差が含まれていても強い相関が見られ、オーダーレベルでの 16S rDNA 濃度から菌体濃度の評価、つまりメタン生成活性を間接的に求めることができることを示唆している。

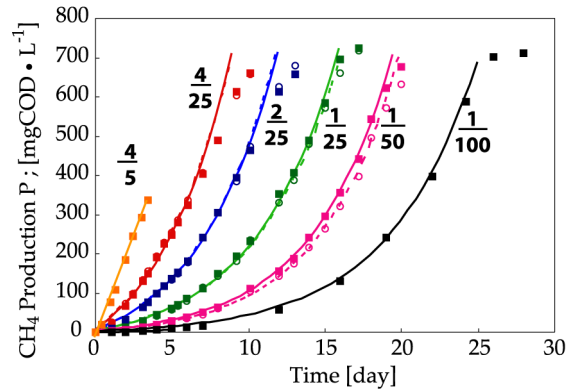


Fig. 6 Time course of methne production in case of *M. concilii*

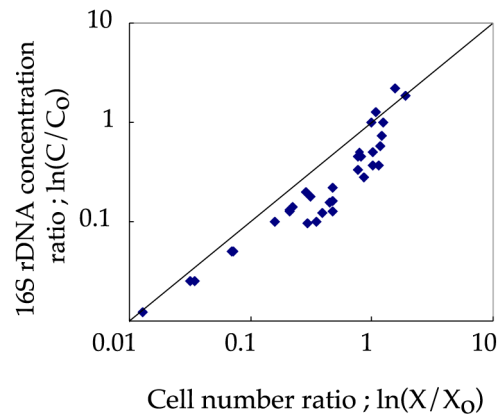


Fig. 7 Relation of cell number ratio calculated from Specific growth rate (μ) 16S rDNA concentration ratio

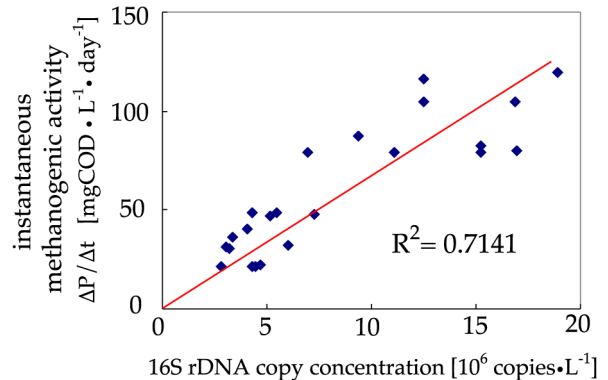


Fig.8 Relation of instantaneous methanogenic activity calculated from μ and 16S rDNA copy concentration by Real-time PCR

しかし、数倍の誤差を含んだ値であることに留意する必要がある。すると、今回のオーダーレベルの差が大きく見えていないことから、もっと希釈率を大きくして行う必要があった。

Fig. 6 の活性試験結果から、サンプリング時の瞬間メタン生成速度（生成量プロファイルの傾き）を求めることができる。このメタン生成速度と 16S rDNA 濃度の関係をプロットすると線形の関係が見られた(Fig. 8)。グラフの傾きは *M. concilii* の 16S rDNA copy 数当たりのメタン生成速度を表しており、 6.68×10^{-6} [mgCOD-CH₄ · copy⁻¹ · day⁻¹] の値が得られた。すなわち、Real-time PCR 法で 16S rDNA コピー数を測定すれば、活性試験を行わずともメタン生成活性が評価できることを示唆している。

6. まとめ

本研究より、純菌レベルでは 16S rDNA によるメタン生成活性評価は可能と示唆された。しかしながら、環境サンプルにおいても同様の結果が得られるかは未知である。実際に用いるためにはさらなる問題を解決していく必要があると推測する。

参考文献

- 鳥村修平(2001),「嫌気性消化による農畜産系バイオマスからの高効率エネルギー回収」,長岡技術科学大学 修士論文
- 帆秋 利洋 他(2001), 土木学会第 56 回年次学術後援会, pp. 350-351
- Asakawa, S. *et al.*(1993). Characterization of *Methanobrevibacter arboriphilicus* SA isolated from a paddy field soil and DNA-DNA hybridization among *M. arboriphilicus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 683-686.
- Ferrari, A. *et al.*(1994). Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Curr. Microbiol.* **29**, 7-12.
- Ferry, J. G., and Wolfe, R. S. (1977). Nutritional and biochemical characterization of *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 371-376.
- Liu, Y., *et al.*(1985). *Methanosarcina mazei* LYC, a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 608-613.
- Patel, G. B. (1984). Characterization and nutritional properties of *Methanotherx concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1383-1396.
- Patel, G. B., and Sprott, G. D. (1990). *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanotherx concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 79-82.
- Raskin, L. *et al.*(1994). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1232-1240.
- Syutusbo, K. *et al.* (1997). An Effective Start-up of Thermophilic UASB Reactor by Seeding Methophilically-grown Granular Sludge. *Wat. Sci. and Tech.* **36**, 391-398.
- Touzel, J. P., and Albagnac, G. (1983). Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**, 241-245.
- Zeikus, J. G., and D. L. Henning (1975). *Methanobacterium arbophilicum* sp. nov., an obligate anaerobe isolated from wetwood of living trees. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**, 543- 552.