

嫌気性油脂分解菌群の検索と優勢菌の機能解析

坂井智加子, 藤原朋子, 藪 宏典, 田中聖子, 角川幸治*

広島工業大学・情報学部・健康情報学科*

Search for anaerobic lipid-degrading bacteria, and functional analysis of the dominant bacteria

Chikako Sakai, Tomoko Fujiwara, Hironori Yabu, Seiko Tanaka and Koji Kakugawa*

Department of Health Science, Faculty of Applied Information Science, Hiroshima Institute of Technology*

Although food waste is generally treated under aerobic condition, this method requires a great amount of energy. On the other hand, anaerobic fermentation not only reduces treatment cost and generated sludge volume, it also generates useful biogas. However, since lipid degradation is extremely low under anaerobic condition, and since food waste contains a great amount of lipid, anaerobic fermentation is not appropriate for degradation treatment of food waste. In this study, we sought anaerobic lipid-degrading bacteria that could be used for degrading food waste under anaerobic condition. The bacteria were cultured in a medium containing triolein (4.0g/L) with a serum tube and a lab scale reactor at a temperature high enough to melt lipids. The group of bacteria collected from compost could degrade triolein (0.6g/L) to fatty acids (oleic acid, stearic acid and palmitic acid) in a serum tube in 10 days. In addition, biogas generation was also confirmed in a lab reactor. *Anaerobaculum mobile* comprised 71% of the microbial community of bacteria collected from compost, so was considered a dominant bacterium. However, regarding bacteria *Anaerobaculum* sp. and *Coprothermobacter* sp., which were isolated from the lipid-degrading bacterial group and incubated respectively in a triolein-containing medium, triolein degradation was not observed.

広島県において、平成12年度の推計で約42万トンの食品廃棄物が排出されているが、その多くが焼却処分等され、再利用・再資源化の対象となっていない。

生ゴミを処理する際、食品廃棄物に含有する油脂が問題となる。油脂を多く含んだ廃棄物を好氣的に微生物処理する方法として活性汚泥法があるが、油脂の分散性が悪いために処理槽内でスカムを形成することもあり、処理は困難を伴う。そのため、一般的には油脂を自然浮上装置や加圧浮上装置のような物理的方法により排水中からおおよそ80-90%を除去した後、好氣的に処理されている。しかし、好氣的処理は大量の酸素を必要とするため、エネルギー的には不利である¹⁾。一方で、嫌氣的処理は、汚泥発生量の低減やメタンガスの回収利用も可能である。特に、油脂は大部分が炭素と水素で構成されているため、炭水化物やタンパク質と比べ理論上多くのバイオガスを回収することができる。油脂のメタン発酵において、高級脂肪酸の分解反応が律速であり、高級脂肪酸の蓄積は種々の反応を阻害する。また、高級脂肪酸の分解は水素や低級脂肪酸の蓄積により阻害されやすいという問題がある¹⁾。

これまでに、油脂と細菌との接触効率を上げるためにスラリー状にして発酵させる方法やリパーゼを添加して発酵を促進する方法、界面活性剤を添加する方法などが報告されている¹⁾。

このような微生物処理における最適条件を検索するため

には、棲息する微生物の挙動を把握すると共に環境条件との関係を明らかにする必要があるが、一般に自然界に存在している微生物のうち99%以上が培養できないと言われており、培養法だけでは菌叢を把握しきれない。そのため、分子生物学的手法により発酵中の微生物の構成種を明らかにする研究が多く報告されている。

本研究では、油脂含有廃棄物の中の油脂を分解することを目的に、油脂が固化しない60℃以上の高温下で存在する好熱性嫌気性油脂分解菌群の検索を行い、培養条件の検討を行った。また、分子生物学的手法として、クローンライブラリー法およびPCR-DGGE法を用いて油脂分解に関与する菌の特定、さらに、取得した菌群から菌を単離し、諸性質について調べた。

実験方法

1. 嫌気性油脂分解菌群の取得

(1) 嫌気性油脂分解菌群の検索

i) 分離源

分離源として処理期間の異なるコンポスト (A: 2週間, B: 4~5ヶ月, C: 6ヶ月, D: 6ヶ月 (製品処理加工済み)) を用いた。

ii) 分離用培地

コンポストから嫌気性油脂分解菌群を取得する培地として、油脂分解菌選択培地³⁾に油脂としてトリオレインを添

加したものをを用いた。培地は以下の方法で調製した。油脂分解菌選択培地（ポリペプトン0.8%, 酵母エキス 0.4%, 塩化ナトリウム 0.3%, 硫化ナトリウム 0.05%, システイン 0.05%, レサズリン 0.1%）をレサズリンの赤色が消えるまで煮沸後、急冷しながら N_2 曝気を行った。トリオレインを加えたバイアル瓶に油脂分解菌選択培地を分注し、テフロンブチルゴム栓で密閉後121℃、20分間殺菌した。使用直前に還元剤として三塩化チタンを数滴添加した。

iii) 集積培養方法

12mL 容量のバイアル瓶にトリオレインを添加した油脂分解菌選択培地5mLと試料約5gを入れ、60℃、65℃で約14日間振とう培養を行った。その後、植え継ぎを繰り返すことにより菌群の集積、取得を行った。

(2) 油脂分解試験

油脂分解能は125mL 容量のバイアル瓶にトリオレインを0.4%添加した油脂分解菌選択培地40mLで10日間振とう培養を行い、ガス発生量、ガス組成、トリオレイン量及び脂肪酸組成により確認した。

i) ガス分析

ガス発生量は水上置換法により測定した。

ガス組成はガスクロマトグラフ GC-8A（島津製作所）で分析した。カラムはSHINCARBON ST(6.0m × 3.0mm, 島津 GLC), キャリアガスはアルゴンを用い、注入温度100℃, カラム温度を40℃から200℃まで10℃/minで昇温した。GCにはバイアル瓶のヘッドスペースを250 μ L注入した。検出器はTCDを使用した。

ii) トリオレイン量及び脂肪酸組成分析

トリオレイン量はメタノール-クロロホルム (Bligh-Dyer) 法⁴⁾により抽出し、薄層クロマトグラフ (TLC)により測定した。TLCはシリカゲル60, 展開溶媒はベンゼン:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=100:120:30:2:2, 検出にはオルシノール硫酸を用い、解析にはATTO Densitoを用いた。

脂肪酸組成分析は、抽出試料を基準油脂分析試験法⁵⁾に従ってメチルエステル溶液を調製した後、ガスクロマトグラフ GC-17A（島津製作所）により分析した。カラムはDB-23 (60m × 0.25mm)を用いた。カラム温度は140℃から240℃まで5℃/minで昇温し、5分間維持した。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリット比1:30とした。検出器はFIDを使用した。標準試料として脂肪酸メチルエステル標品 (SUPELCO) を使用した。

2. リアクターシステムの運転

(1) 装置

リアクターは全長130mm, 外径48mm, 内径27mmのガラス製（特注品）のリアクターを用いた。担体は発砲練石を充填率が約40%になるよう詰め、リアクターとボトルを循環させるリアクターシステムを図1のように組み立てた。リアクターの有効容積は63mLであった。

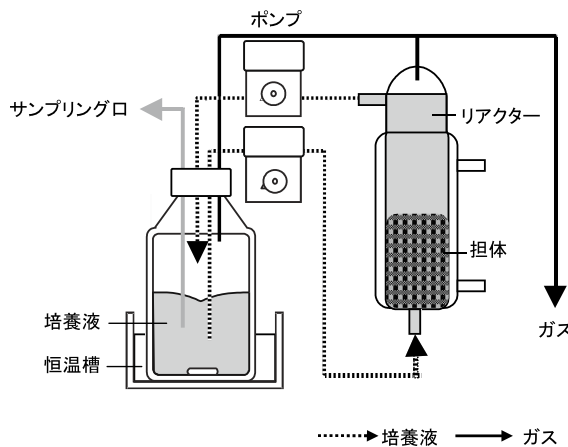


図1 リアクターシステム模式図

(2) 培地及び培養方法

1/10油脂分解菌選択培地（油脂分解菌選択培地のポリペプトンと酵母エキスを1/10量にした培地）にビタミン溶液（ニコチン酸50mg/L, 塩酸チアミン50mg/L, ビオチン500 μ g/L）を4%, トリオレインを0.4%になるよう添加したものをを用いた。担体9gと試料2gを混ぜ合わせたものをリアクターに詰めた後、窒素ガス置換し、油を分散させるために攪拌しながら培地を循環させ、65℃で培養した。2回目以降は、リアクターから培養液を除き抜き、新しい培地を加えて同様に培養した。

(3) 油脂分解試験

ガス発生量、ガス組成、脂肪酸組成、TOCを測定し、油脂分解能を判断した。TOC分析は、TOC-500（島津製作所）を用いた。

3. 優勢菌叢の特定

(1) DNAの抽出

培養液に存在する菌群のDNAは培養液400 μ LからFastDNA SPIN Kit for Soil (Qbiogene Inc.)を用いてプロトコールに従って抽出した。

(2) PCR-クローンライブラリー法⁶⁾による菌叢解析

抽出したDNAを鋳型とし、16S rDNAのV3-5領域を標的として341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')と907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3')をプライマーとしTaKaRa Ex Taq[®]（タカラバイオ）を用いて増幅した。PCRはタカラサーマルサイクラーTP3000（タカラバイオ）を用いた。PCR条件は、第1ステップとして94℃、2分インキュベートした。第2ステップは変性反応94℃、30秒、アニーリング反応56℃、30秒、伸長反応72℃、1分を30サイクル繰り返した。第3ステップは72℃、3分インキュベートした。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)で精製し、pGEM-T Easy Vector System (Promega)を用いてTAクローニングを行い、JM109コンピテントセル（タカラバイオ）へ導入した。ランダムに選んだ36コロニーを用いて、コロニーPCRを行った。プライ

マーは SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') と T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') を用いた。また、アニーリング反応温度を 52°C にした。PCR 産物を 1U の *Hae* III (TOYOBO) 及び *Rsa* I (TOYOBO) で 37°C, 3 時間個別に処理して、RFLP 解析を行った。その結果を基にグルーピングを行い、グループごとの塩基配列を決定した。シーケンス反応は Big Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) で行い、ABI PRISM 310 システム (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。菌の同定は、日本 DNA データバンクで公開されている BLAST サーチによる相同性検索により行った。

(3) 16S rDNA-PCR-DGGE 法⁷⁾ による菌叢解析

抽出した DNA を鋳型とし、16S rDNA の V3 領域を標的として GC-341F (5'-CGCCCGCCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGCCCTACGGGAGGCAGCA G-3') と 517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') をプライマーとし *TaKaRa Ex Taq*[®] を用いてタッチダウン PCR 法⁸⁾ により増幅した。PCR 条件は、第 1 ステップとして 94°C, 7 分インキュベートした。第 2 ステップは変性反応 94°C, 30 秒, アニーリング反応 67°C, 30 秒, 伸長反応 72°C, 1 分を 2 サイクルし、その後アニーリング反応温度を 2 サイクル毎に 1°C ずつ下げ、最終的にアニーリング温度が 58°C になるまで反応を繰り返した。第 3 ステップは、変性反応 94°C, 30 秒, アニーリング反応 57°C, 30 秒, 伸長反応 72°C, 1 分を 15 回行った。第 4 ステップは、再度第 3 ステップを繰り返し、伸長反応時間を 7 分とした。PCR 産物を D-code システム (Bio-Rad) を用いて DGGE 解析した。8% アクリルアミド, 変性剤 35~60%, 150V, 4 時間, 60°C の条件で泳動し、Sybr Gold で染色した後、Molecular Imaging Analyzer Fx (Bio-Rad) でバンド検出した。

4. 嫌気性油脂分解菌の解析

(1) 嫌気性油脂分解菌の単離

i) 単離方法

ロールチューブ培養⁹⁾ と液体培養を繰り返すことにより、菌の単離を行った。液体培地はトリオレインを含む油脂分解菌選択培地を使用した。ロールチューブ培地は油脂分解菌選択培地をトリオレイン 1%, 高温培養用寒天 2% を加えた 125mL 容量のバイアル瓶に 1 本あたり 30mL ずつ分注し、栓をして、121°C, 20 分間の殺菌後に冷却させながら回転させて作製した。培養は 60°C および 65°C で行った。菌の純化は DGGE により単一バンドになっているかで確認した。

ii) 単離菌の同定

菌の DNA は 3(1) と同様に抽出し、得られた DNA の塩基配列の決定は 3(2) と同様に行った。

(2) 単離菌の解析

i) トリオレイン分解能の確認

得られた 2 種の単離菌、A I 菌、A II 菌を 125mL 容量のバイアル瓶を用いて 0.4% あるいは 4% のトリオレインを添加した油脂分解菌選択培地 40mL で 14 日間培養を行い、ガス発生量、ガス組成、トリオレイン量及び脂肪酸組成を測定し、トリオレイン分解能を確認した。培養は A I 菌は 60°C, A II 菌は 65°C で行った。

ii) 単離菌と水素資化性メタン生成菌との共生培養

a) 共生菌

水素資化性メタン生成菌として *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH (以下、ΔH 菌と略す) を使用した。

b) 培養方法

脂肪酸分解能の確認には、モデル排水培地¹⁰⁾ (trace element solution 0.9%, 塩化ナトリウム 0.09%, 塩化アンモニウム 0.09%, リン酸二水素カリウム 0.075%, リン酸水素二カリウム 0.15%, システイン 0.05%, 硫化ナトリウム 0.05%, ビタミン溶液 4%, 酵母エキス 0.1%, ポリペプトン 0.1%, レサズリン 0.1%) を使用した。モデル排水培地にそれぞれ異なる基質を添加した培地を作成した。オレイン酸, ステアリン酸, ラウリン酸のいずれかを基質として使用する場合は、それぞれ 5mmol/L と 5mmol/L の塩化カルシウムを加えた。カプロン酸, 酪酸, プロピオン酸, 酢酸, グリセロール, グルコースのいずれかの基質は 10mmol/L 添加した。ΔH 菌と単離菌を培地量に対してそれぞれ 1/10 量植菌し、A I 菌は 60°C, A II 菌は 65°C で 20 日間培養した。

iii) 脂肪酸分解能の確認

基質を添加していないものをコントロールとし、資化能を有機酸増減量により判断し、脂肪酸分解能を確認した。有機酸量は液体クロマトグラフ LC-2000Plus (日本分光) を用いて測定した。カラムは Aminex HPX-87H (300×7.8mm, Bio-Rad), 検出器は RI を使用した。溶媒は 5mmol/L 硫酸を用い、流速 0.8mL/min, 温度 65°C で行った。

実験結果及び考察

1. 油脂分解能を有する菌群の検索

コンポストから集積培養を行ったところ、60°C で培養した B, C, D の試料で OD₅₅₀ の増加とガス発生が見られた。B, C, D の 3 試料の培養結果を表 1 に示した。各試料間でガス発生量の違いは見られなかったが、試料 C においてトリオレイン濃度が 0.6g/L 減少していた。また、図 2 に試料 C の培養後の脂肪酸組成を示した。遊離脂肪酸量として主としてオレイン酸量の増加がみられ、僅かにステアリン酸, パルミチン酸も見られた。そのため、試料 C に僅かながら油脂分解能があることが分かった。

しかし、継代培養を繰り返すとトリオレイン分解量は減少した。これは、継代培養する際に菌の存在比率の崩れや

表1 コンポストから分離した菌群のトリオレイン添加油脂分解菌選択培地での集積培養後のガス発生量, ガス組成およびトリオレイン減少量

試料	ガス発生量 (mL)	ガス組成 (mmol/L)			トリオレイン減少量 (g/L)
		H ₂	CH ₄	CO ₂	
B	74	0.0	29.9	46.4	0.1
C	68	1.7	31.4	36.0	0.6
D	84	0.0	36.7	53.1	0.2
植菌なし	8	0.0	0.0	0.0	0.0

試料B: コンポスト処理期間4~5ヶ月, 試料C: 同6ヶ月, 試料D: 同6ヶ月 (製品処理加工済み), バイアル容積125mL, 培地量40mL, 60℃, 10日間培養

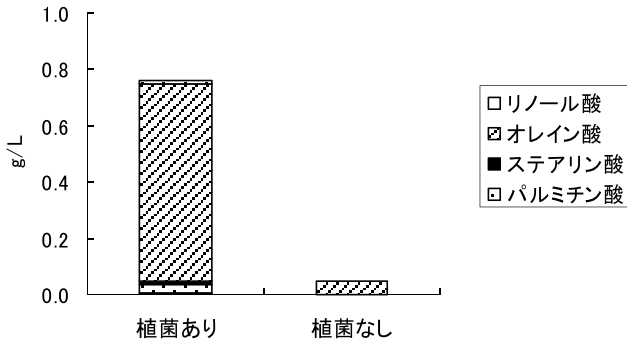


図2 試料Cのトリオレイン添加油脂分解菌選択培地での集積培養後の遊離脂肪酸量
バイアル容積125mL, 培地量40mL, 60℃, 10日間培養

分解物質による増殖阻害, 栄養成分の不足などが原因であると推察された。

2. リアクターシステムの運転

コンポストを種菌として作成したリアクターを用いて, 回分培養を3回実施した。回分培養の結果を図3に示す。回分培養を繰り返すことでガス発生量の増加がみられた。また, 培養液中の炭素収支を表2に示す。培養液中のガス化率は22%であり, 発生バイオガスのうちメタンが約67%,

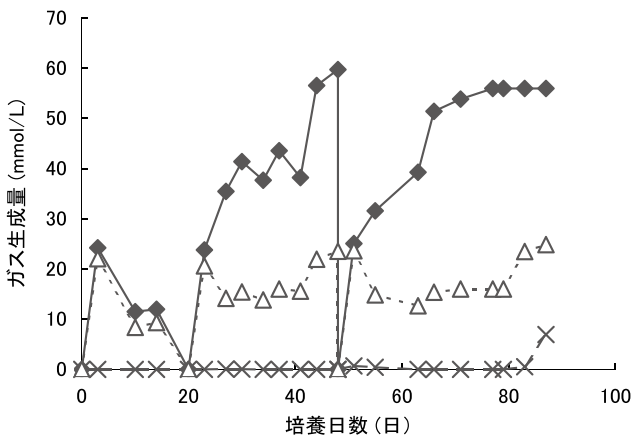


図3 バイオリクターのガス生成量の変化 (×: H₂, △: CO₂, ◆: CH₄)
1/10油脂分解菌選択培地にビタミン溶液とトリオレインを加えた培地300mL, リアクター有効容積63mL, 担体充填率40%, 65℃

表2 培養液中の炭素の物質収支およびガス化率

	総炭素量 (mg/L)	油脂 (mg/L)	有機酸 (mg/L)	ガス (mg/L)	ガス化率 (%)
培養前	3620	3080	141	0	-
培養後	測定不可*	測定不可*	260	789	22%

*: 槽内の油脂が均一に採取できないため

二酸化炭素が約33%であった。油脂が担体に付着するため, 培養液中の油脂分解率の変化は測定できなかったが, 培養液中にオレイン酸, ステアリン酸が検出された。また, 1/10油脂分解菌選択培地に由来する炭素以上のガス化率であったことから, 油脂を資化していると考えられた。回分培養を繰り返すことでガス発生量の増加が見られたことから, 菌体濃度を高めれば, ガス化効率が向上すると考えられる。ガス化率の向上には, 菌と基質の接触 (油脂の分散) や高級脂肪酸による阻害の防止, 分解菌の維持など更なる検討が必要である¹⁾。

3. 優勢菌の特定

試料Cの菌叢を明確にするために, クローンライブラリー法及びPCR-DGGE法により優勢菌の特定を行った。クローンライブラリー法の結果を図4に示す。Anaerobaculum mobileが71%の割合で存在し, 優勢菌であると考えられた。PCR-DGGE法により試料Cと試料B, Dを比較した結果を図5に示す。試料Cでは, 検出されたバンド数が少なく, 菌種があまり多くないと考えられた。また, 試料Cのバンドaには3種の菌の存在が確認された。それぞれをa-1, a-2, a-3とした。a-1はAnaerobaculum mobile (AJ243189)とa-2はThermoanaerobacter sp.とa-3はClostridium thermocopriaeといずれも99%の相同性があった。検出さ

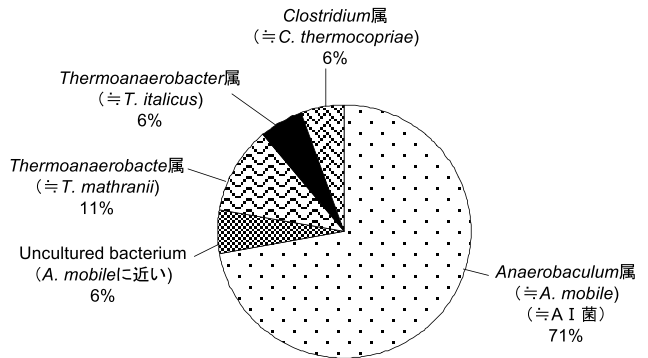


図4 PCR-クローンライブラリー法による試料Cにおける菌の存在比率



図5 16S rDNA-PCR-DGGE法による試料B, 試料C, 試料Dの比較

れた菌は、油田や油脂含有排水から単離された菌との報告があった。特に優勢菌である *Anaerobaculum mobile* は、ウール洗浄废水の嫌気処理槽から単離された菌¹¹⁾と報告されている。

4. 嫌気性油脂分解菌の単離と機能解析

PCR-DGGE 法による電気泳動結果から、バンド a に該当する菌が油脂分解に関与している可能性があった。そのため単離操作を行い、バンド a の位置に該当する2つの菌を単離培養し、A I 菌、A II 菌とした。それぞれの菌の機能解析を行い、油脂分解にどのように関与しているか調べた。培養を行ったときのガス発生量、ガス組成、トリオレイン量の結果を表3に示す。A I 菌はメタンを生成していたが、A II 菌は水素を生成していた。A I 菌においてトリオレイン濃度に関係なく一定のガス量の生成が見られたこと、トリオレイン濃度の減少が確認できなかったことから、トリオレイン分解能を有しないと推測された。A II 菌においてもトリオレイン濃度の減少は確認できなかった。

表3 単離菌のトリオレイン添加油脂分解菌選択培地で培養後のガス発生量、ガス組成およびトリオレイン減少量

	トリオレイン添加量 (%)	ガス発生量 (mL)	ガス組成 (mmol/L)			トリオレイン減少量 (g/L)
			H ₂	CH ₄	CO ₂	
	0	52	0.0	22.9	24.5	-
A I 菌	0.4	50	0.0	24.5	26.0	N.D.*
	4	52	0.0	24.5	27.5	-
A II 菌	0.4	23	6.0	0.0	12.1	0.2
植菌なし	0.4	8	0.0	0.0	0.0	N.D.*

バイアル容積125mL、培地量40mL、60℃ (A I 菌) および65℃ (A II 菌)、14日間培養 (*N.D.=0.1未満)

また、A I 菌は *Anaerobaculum* sp.、A II 菌は *Coprothermobacter* sp. と最も相同性が高く、近縁種であると推測された。 *Coprothermobacter* sp. は好熱嫌気消化プロセス中のタンパク質分解バクテリアと報告されている菌であり、油脂を分解する報告はなかった。また、*Anaerobaculum* sp. においても、上記で述べたように、油脂を分解する可能性はあるが油脂を分解するという報告はなかった。

5. 単離菌と水素資化性メタン生成菌との共生および単離菌の役割

A I 菌は、油脂分解菌選択培地での培養でメタンを生成するため、メタン菌との共生が継続していると考えられた。一方、A II 菌は水素を生成しているため、水素資化性メタン生成菌として Δ H 菌との共培養により、基質の分解を促進することが期待できた。A II 菌と Δ H 菌の共培養により、発生ガスが水素からメタンとなり、Δ H 菌が働くことを確認できた。

次に、Δ H 菌との共培養を行い、単離した2つの菌の油脂分解経路における役割について検討した。様々な基質を

添加したときの有機酸量を測定し、添加基質がない場合と比較した結果を図6に示した。A I 菌はラウリン酸により僅かに阻害を受け、グリセロール、グルコースを基質としたとき有機酸量の増加が見られたため、グリセロールとグルコースを資化することが分かった。A II 菌はオレイン酸、ラウリン酸による阻害があり、グルコースを資化することが分かった。

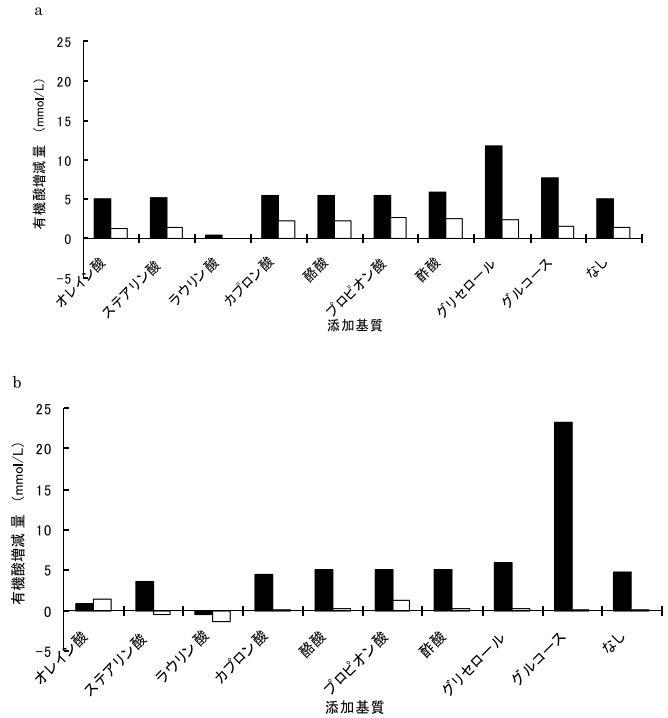


図6 単離菌と水素資化性メタン生成菌 (Δ H 菌) の共培養による有機酸量変化

a: A I 菌 + Δ H 菌, b: A II 菌 + Δ H 菌, モデル排水培地, バイアル容積125mL, 培地量40mL, A I 菌は60℃, A II 菌は65℃, 20日間培養 (■酢酸, □プロピオン酸)

これらの結果から、両菌とも脂肪酸の分解には関与してないことが認められた。

今回、油脂分解菌の検索を試みたが、菌と基質の接触、複合系における分解菌の維持が困難であることが分かった。今後、嫌気性油脂分解菌を検索する場合、培地の検討、複合菌の培養方法を検討する必要もあると考えられる。

要 約

コンポストから取得した菌群は、バイアル瓶中で10日間でトリオレイン (0.6g/L) を脂肪酸 (オレイン酸, ステアリン酸, パルミチン酸) まで分解した。さらに、リアクターにおいてもバイオガスの生成を確認できたが、菌の維持、ガス化率の向上を図ることはできなかった。

取得菌群は *Anaerobaculum mobile* が71%を占め優勢菌であった。

油脂分解菌群より単離した *Anaerobaculum* sp. および *Coprothermobacter* sp. によるトリオレインの分解は確認できなかった。

文 献

- 1) 食品産業における排水・汚泥低減化技術の未来を拓く, 初版, 食品産業環境保全技術研究組合編, (恒星社厚生閣, 東京) (2002)
- 2) 國弘忠生, 藤田昌史, 胡洪営, 藤江幸一, キノンプロフェイルと PCR-DGGE を併用した汚染修復細菌の特定と微生物群集の挙動解析, 統計数理 (2004)
- 3) 日本生化学会, 新生物化学実験講座 第17巻「微生物実験法」, 東京化学同人, p434-446 (1992)
- 4) 木村彰成, 久保幹, 油脂分解微生物を用いた油脂含有排水処理, オレオサイエンス, 第6巻10号, 501-506 (2006)
- 5) 社団法人日本油化学会, 基準油脂分析試験法
- 6) Wilson K.H., Blitchington R.B., Human colonic biota studies by ribosomal DNA sequence analysis. Appl Environ Microbiol, **62**, 2273-2278 (1996)
- 7) 石井浩介, 中川達功, 福井学, 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, Microbes and Envir., **15**, 59-73 (2000)
- 8) Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res., **19**, 4008 (1991)
- 9) 上木勝司, 永井史郎, 編性嫌気性細菌の分類と培養, 嫌気微生物学, 第1版 (養賢堂, 東京)p294-298 (1993)
- 10) 野中信一, 栢田耕平, 液状化廃棄物の高温メタン発酵処理について, 神鋼パンテック技報, **39**, 14-21 (1995)
- 11) Menes, R.J., Muxi, L., *Anaerobaculum mobile* sp.nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. Int. J. Systematic and Evol. Microbio., **52**, 157-164 (2002)
- 12) 中村浩平, 鎌形洋一, メタン生成にかかわる共生微生物系の研究と最新動向, 環境バイオテクノロジー学会誌, **5**, 81-89 (2006)