

## 下水汚泥の嫌気性消化における余剰汚泥濃縮・加熱と微生物解析\*

高島 正信<sup>\*1</sup>, 矢口 淳一<sup>\*2</sup>, 中尾 総一<sup>\*3</sup>

### Thermal Pretreatment of Concentrated Waste Activated Sludge and Microbial Analysis in Anaerobic Digestion of Sewage Sludge

Masanobu TAKASHIMA<sup>\*1</sup>, Junichi YAGUCHI and Nobuichi NAKAO

<sup>\*1</sup> Faculty of Engineering, Department of Architecture and Civil Engineering

The objective of this study was to investigate the effects of pretreatment on anaerobic digestion of sewage sludge and to analyze related microbial consortia of digested sludge. The pretreatment employed concentration (8-9%) and thermal treatment (130°C, 1 hour) of the waste activated sludge portion. The experimental results showed that the pretreatment improve volatile solids destruction by 7% and gas production by 13%. The thermal treatment, however, produced more colored substances, and slightly deteriorated the dewaterability of digested sludge. The microbial analysis revealed that limited varieties of both bacteria and archaeal domain may be responsible for major metabolic pathways in the sludge digestion.

**Key Words :** Anaerobic Digestion, Concentration, Sewage Sludge, Thermal Pretreatment, Waste Activated Sludge

## 1. 緒 言

嫌気性消化は、嫌気性微生物の働きによって有機物を分解する処理プロセスである。好気性処理と違い、酸素を供給する必要がなく、その分運転費の節約が可能となる。嫌気性消化により得られるバイオガス（消化ガス）は、地球温暖化対策の面からバイオエタノール、バイオディーゼル燃料と並んで化石燃料代替となるバイオ燃料の一つとして注目されている。とくに、消化ガスは食糧原料と競合することがないため、優れたバイオ燃料と考えられている。

2017年において、下水道の普及率は78.3%、下水の処理過程で発生する下水汚泥量は乾燥重量で年間約234万トンに達する規模となっている<sup>(1)</sup>。このような中、下水汚泥の有効利用は順調に進展し、80%近くが有効利用されている。しかし、下水汚泥がバイオマス資源と位置付けられ、そのエネルギー活用が期待されているにも拘わらず、バイオガスや固形燃料等としてエネルギー利用されているのはわずか約16%と非常に低い状況にある。

下水汚泥は、分解率が60%程度に達する下水由来の「生汚泥」(primary sludge, PS)と、下水を処理した活性汚泥由来で分解率が40%程度にとどまる「余剰汚泥」(waste activated sludge, WAS)の2種類の汚泥から成る。前報<sup>(2)</sup>でも実施したように、分解性に劣る余剰汚泥に対して前処理を実施すると、全体の分解率が高まり効率化につながることになる。この余剰汚泥のみに前加熱処理を施す方法は、余剰汚泥の前処理に用いた熱を消化槽加温にもまわせるメリットもある<sup>(3)</sup>。また、流入下水汚泥を高濃度化すると、消化槽容量を小さくできることに加え加温用燃料の削減を可能にし、設備費および運転費の節約に役立つことになる<sup>(4)</sup>。

\* 原稿受付 2019年3月22日

<sup>\*1</sup> 工学部 建築土木工学科

<sup>\*2</sup> 八戸工業高等専門学校 産業システム工学科 環境都市・建築デザインコース (〒039-1192 青森県八戸市大字田面木字上野平16-1)

<sup>\*3</sup> 関西電力株式会社 研究開発室技術研究所 (〒661-0974 尼崎市若王子3丁目11-20)

E-mail: takasima@fukui-ut.ac.jp

以上のような背景から、前報に引き続き下水汚泥の嫌気性消化において、投入エネルギー量を節約しながら余剰汚泥の分解性を向上させる手段として汚泥濃縮と加熱処理に着目し、1) 前報と異なる余剰汚泥濃度、および2) 消化汚泥の微生物解析に重点をおいて研究を実施した。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験装置および運転方法

Fig. 1 に示すコントロール系と加熱処理系の実験装置を使用した。遠心濃縮により余剰汚泥を生汚泥の2倍程度に濃縮し、その後、加熱処理系では加熱処理を組み合わせた。実験条件を Table 1 に示す。

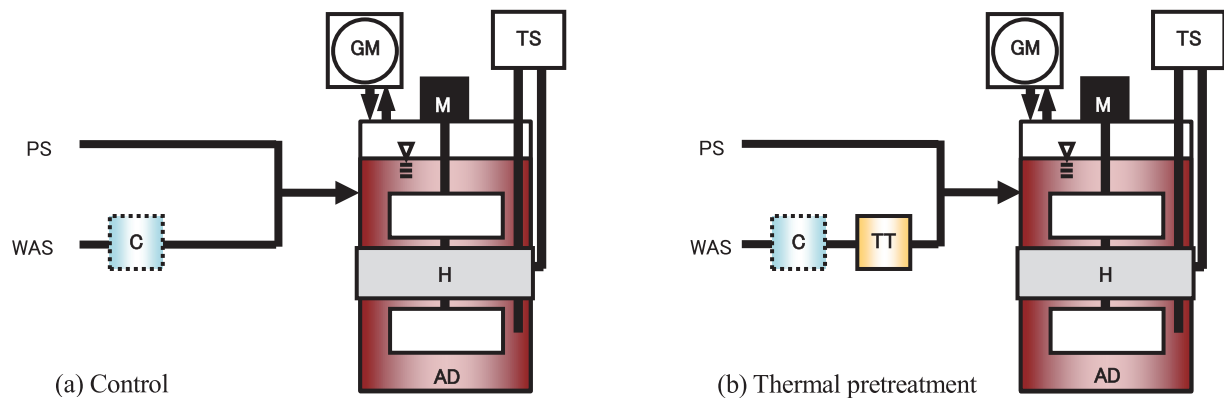


Fig. 1 Anaerobic digester systems.

AD: anaerobic digester, H: heater, M: motor, GM: gas meter, TS: thermo-stat, C: centrifuge, TT: thermal treatment, PS: primary sludge, WAS: waste activated sludge.

Table 1 Summary of experimental conditions

Influent	Total solids of PS	40~50 g/L
	Total solids of WAS	80~90 g/L
	Volume ratio (PS: WAS)	3:1
	Thermal pretreatment of WAS	130°C, 1 hour
Digester	Volume	2.0 L
	Temperature	35°C
	Hydraulic retention time (HRT)	15 days

嫌気性消化槽はアクリル樹脂製、有効容量 2.0 L の完全混合型で、攪拌機 (Z-1300, EYELA) と攪拌羽根によって約 100 rpm で槽内を攪拌した。消化槽の温度はサーモスタット (E5CSV, オムロン) とリボンヒーター (100 W, 野中理化器) によって約 35 °C に調節した。生成したバイオガスは、成分分析用サンプルコックと乾式脱硫カラムを経て湿式ガスメーター (WS-1A, シナガワ) で計量した。

下水汚泥の投入と消化汚泥の引き抜きは、流入汚泥濃度が高くなるとポンプ使用が困難となるため 1 日 1 回マニュアルで行った。滞留時間 (HRT) は 15 日で一定とし、投入・引き抜き量としては 133 mL/日であった。

### 2.2 下水汚泥と前処理

供試下水汚泥は、福井市日野川浄化センターから別々に採取した生汚泥と余剰汚泥である。生汚泥の方は、重力沈殿または遠心分離機 (約 5,000 rpm, 10 分; HD-30D, 平山製作所) により、TS (total solids) 濃度として 4~5% になるよう濃度調整した。余剰汚泥の方は、同じ遠心分離機とカチオン系高分子凝集剤 (TS 当り添加量約

0.8%；ダイヤブロック KP1200B，三菱レイヨン）を併用し，おおむね 8～9%になるように濃縮した．種汚泥は，元々は同じ浄化センターから採取した中温嫌気性消化汚泥であった．余剰汚泥に対する前加熱処理は，簡易型オートクレーブ（TEM-V1000，耐圧硝子工業（株））を用いて 130℃，1 時間，攪拌速度約 100 rpm の条件で行い，加熱処理後は自然放冷した．両系列とも，生汚泥と余剰汚泥を下水処理場とほぼ同じの固形物比約 3：2 と一致するように約 3:1 で混合した．

## 2.3 分析方法

### 2.3.1 一般分析

濃度分析は Standard Methods<sup>(5)</sup>に従った．溶解性液は，10,000rpm で 10 分間高速遠心した後，0.45 μm メンブレンフィルター（A045A047A，アドバンテック）でろ過して作成した．

汚泥溶解性液の色度は分光光度計（DR/4000U，Hach）を用いた ADMI 法（Standard Methods 2120E），汚泥脱水性は CST メーター（304B，Triton Electronics）を用いた CST 法（Capillary Suction Time，Standard Methods 2710 G），ガス成分（メタンおよび二酸化炭素）は TCD 検出器付きガスクロマトグラフ（GC-9A，島津製作所）で測定した．

### 2.3.2 微生物叢解析

消化汚泥からの DNA 抽出は，Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境）を用いて行った．シーケンス解析に必要な配列を含む塩基配列のプライマーとして U515F（GTGYCAGCMGCCGCGGTA，塩基長 18 mer）および 926R（CCGYCAATTCMTTTRAGTT，塩基長 19 mer）を用い，16S rRNA 遺伝子の V4-V5 領域を PCR 増幅した．PCR に使用した鋳型 DNA 量は，希釈倍率 10 倍，使用量 2 μL，16S rRNA 遺伝子コピー数 3.9E+06（コントロール）または 4.6E+06（加熱処理）であった．得られた PCR 増幅産物を精製後，2100 バイオアナライザ（Agilent Technologies）を用いて非特異的増幅産物の有無を確認し，PicoGreen dsDNA Assay Kit（Invitrogen）を用いて濃度を測定した．

上の結果をもとに PCR 増幅産物の濃度を調製し，MiSeq（Illumina）にてシーケンス解析を行った．PCR 増幅産物の両側から約 250 塩基ずつ解析（ペアエンド解析）を行い，2 つの配列解析データの末端をオーバーラップさせ，約 410 塩基の塩基配列情報を得た．

得られた配列データについて，QIIME（Quantitative Insights Into Microbial Ecology）パイプライン<sup>(6)</sup>を用いて以下のデータ解析を行った．塩基配列のチェックは，得られた配列データのクオリティ，キメラをチェックし，基準を満たした配列データのみをフィルタリングした．OTU（OTU; Operation Taxonomic Unit; 操作的分類単位）の選定・代表配列の決定は，上記のフィルタリング後の配列データについて，類似性の高い（相同性 97%以上の）配列データを 1 つのグループのクラスタとしてまとめた．各クラスタ配列の中で最も出現頻度の高い配列を代表 OTU 配列とし，Silva の Living Tree<sup>(7)</sup>の 16S rRNA 遺伝子データベースに対する相同性検索を行い，系統分類を推定した．

## 3. 結果および考察

### 3.1 汚泥分解およびガス発生

実験経過について，消化汚泥 VS（volatile solids）濃度，ガス発生量および消化汚泥全アンモニア性窒素（total ammonia nitrogen，TAN）濃度をとり上げ Fig. 2 に示す．また，全実験期間の平均値を用いて，流入汚泥および消化汚泥の性状を Table 2，処理成績のまとめを Table 3 に示す．

Fig. 2 より，加熱処理が施された系では，コントロール系よりも消化汚泥 VS 濃度は常に低く，ガス発生量と消化汚泥 TAN は高かった．消化汚泥 TAN は両系とも 700～1,400mg/L の範囲にあり，阻害濃度（3,000～4,000 mg/L 以上）<sup>(8),(9)</sup>より十分に低く，阻害を与える濃度には至っていなかった．

Table 2 に示す SS（suspended solids）および VSS（volatile suspended solids）で表される粒子状濃度は，流入余剰汚泥においては加熱処理により約 2/3 へと大幅に減少しており，加熱処理の粒子状物質を破壊する効果がみられた．結果として，加熱処理によって VS 分解率が約 7%，VSS 分解率が約 16%，メタン発生率が約 13%向上し，主要な評価指標からみると処理成績は改善したといえる．

一方では，加熱処理系の方が消化汚泥の溶解性 COD<sub>Cr</sub>が約 2.5 倍，色度が約 1.7 倍に上昇した．しかし，研究

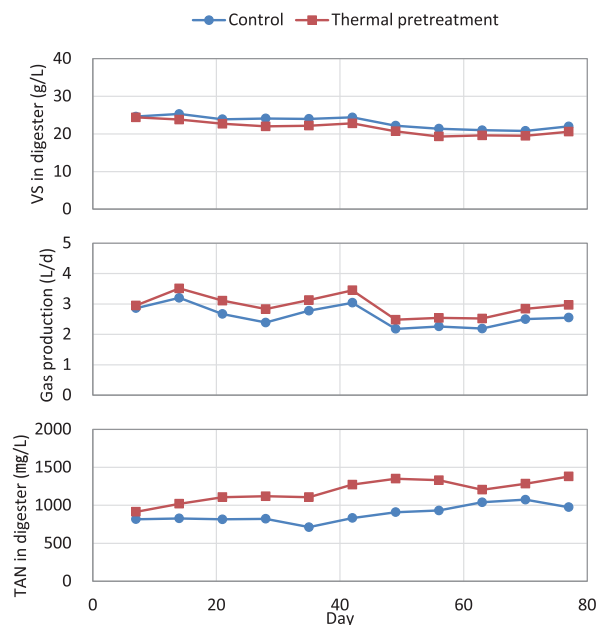


Fig. 2 Time course of major experimental results

Table 2 Summary of sludge characteristics

	Influent - primary sludge	Influent - WAS		Effluent - digested sludge	
		Control	Thermal treatment	Control	Thermal treatment
TS (g/L)	43.1	84.3	81.1	33.8	32.7
VS (g/L)	37.0	66.9	64.0	23.1	21.6
SS (g/L)	41.4	77.4	52.4	29.8	26.1
VSS (g/L)	34.5	61.0	39.2	20.8	17.6
S-CODCr (g/L)	—	—	—	0.61	1.56
TAN (mg/L)	—	—	—	887	1,190
Dewaterability (CST-sec/g-SS/L)	—	—	—	10.1	12.8
Color (ADMI)	—	—	—	705	1,220
pH	—	—	—	7.1	7.2

Table 3 Summary of digester performance

	Control	Thermal treatment
Gas production (NL/day)	2.60	2.94
CH <sub>4</sub> (%)	60.6	60.5
CO <sub>2</sub> (%)	37.3	37.1
VS loading rate (gVS/L-day)	2.96	2.91
VS destruction (%)	48.1	51.4
VSS destruction (%)	49.2	57.0
Gas production rate (NL/gVS)	0.410	0.463
CH <sub>4</sub> production rate (NL/gVS)	0.248	0.280

室の既往研究<sup>(10)</sup>では加熱処理温度 170 °Cで今回の 7 倍近くもの色度があったことを考慮すると、色度の差はかなり小さくなり改善されている。

消化汚泥の脱水性は、最終的な汚泥の含水率、容積や再利用などに影響を与えることから、実務上の重要因子である。今回、CST は加熱処理系の方がわずかに悪化していた。一般に、加熱処理は大幅な脱水性改善につながり、汚泥調質の目的で用いられた歴史的経緯がある<sup>(11)</sup>。温度 160～200℃程度の加熱処理は、汚泥の結合水の分離や細胞膜や細胞質に含まれる蛋白質等の熱変成により脱水性能を向上させる。同じ加熱処理温度だった前報<sup>(2)</sup>でも、濃度などの条件の違いにより脱水性の向上と悪化の両方が観察された。160～200℃より低温の加熱処理では、結合水の分離や熱変成が不完全になり、コロイド状物質の増加を招くなどによって汚泥脱水に悪影響を与えると考えられる。

### 3.2 微生物叢

消化汚泥微生物叢について、解析に関わる基礎データを Table 4 に示し、細菌ドメインと古細菌ドメインの解析結果をそれぞれ Table 5, Table 6 にリストする。なお、Table 5 および Table 6 では、リード数が各ドメイン総数の約 1%以上占めたものを取り上げた。両ドメインとも、同定されたレベルが門から種まで多岐にわたっており、また、コントロール系と加熱処理系の間では似通った結果となった。

Table 5 に示す細菌ドメインについては、unknown の細菌が総リード数の 45～48%と半分近くを占めていた。次いでリード数の多いのは Bacteroidetes 門の細菌種で、その門の多くはタンパク質や糖類を基質にして従属栄養的に増殖する<sup>(12)</sup>。Bacteroidetes 門には Bacteroidia 綱、Bacteroidales 目なども含み、他にも 3 種が同定されている。Proteobacteria 門の Deltaproteobacteria 目は 3 種同定されており、そのうち *Smithella propionica* や *Syntrophorhabdus aromaticivorans* は、種間水素／ギ酸移動を行う共生細菌で、プロピオン酸酸化して酢酸と少量の酪酸を生成する<sup>(13),(14)</sup>。Firmicutes 門は 4 種同定されており、中でも Clostridia 綱の Clostridiales 目は *Clostridium* 属および他の同様の属を含み、偏性嫌気性菌で芽胞形成する能力を有し、そのほとんどは環境中の多くの場所、特に土壌中に見いだされる腐生生物である<sup>(12)</sup>。また、*Sedimentibacter* 属は、主にスチックランド反応によりピルビン酸やアミノ酸を代謝し、水素は生成しないと言われている<sup>(12)</sup>。Spirochaetes 門の Spirochaetaceae 科も炭水化物とアミノ酸を炭素・エネルギー源として利用する、絶対または通性嫌気性の細菌である<sup>(12)</sup>。

Table 6 の古細菌ドメインについては、リード数 60%以上がメタン生成菌や高度好塩菌を中心とした Euryarchaeota 門の古細菌しか分類されなかった。これには、プライマー U515F の古細菌カバー率が 54.5%と低いことが影響している可能性がある<sup>(15)</sup>。同定された多くが Euryarchaeota 門 Methanomicrobia 綱と Methanobacteria 綱であった。そのうち、Methanobacteriaceae 科は H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> とギ酸を利用する代表的な科である<sup>(16)</sup>。

Methanomicrobiaceae 科 *Methanoculleus* 属はアルコールを利用できることで知られ<sup>(12)</sup>、*Methanobacterium* 属と *Methanolinea* 属は主にギ酸または水素＋二酸化炭素を代謝する<sup>(12),(17)</sup>。種レベルまで同定されたもののうち、*Methanomassiliicoccus luminyensis* はメタノールを還元し、水素を酸化するメタン生成菌として報告されている<sup>(18)</sup>。また、*Methanothrix soehngenii* は酢酸を利用する種として古くから知られている<sup>(12)</sup>。リード数 5 番目の Thermoprotei 綱は絶対嫌気性の高温を好む硫酸塩還元細菌で、種々の有機物質を利用する<sup>(12)</sup>。

一般に、嫌気性消化の分解過程は、炭水化物、タンパク質、脂質等の有機物→プロピオン酸、酪酸等の有機酸→水素および酢酸→メタンおよび二酸化炭素の順序で進行する。上記のように、リード数に基づけば、それぞれの分解経路は比較的限られた数の微生物種が主に担っていると考えられる。また、流入濃縮余剰汚泥への加熱の有無だけの違いでは、微生物叢に大きな差が出ないといえる。

Table 4 Fundamental data for microbial analysis.

		Control	Thermal Treatment
Number of Read		81,283	84,848
Relative abundance (%)	Archaea	0.5	0.5
	Bacteria	99.5	99.4
α-diversity	PD whole tree	49.8	39.0
	chao1	1,202	966
	observed species	641	516
DNA from Bacteria (copy numbers/mL)		7.4X10 <sup>9</sup>	8.6X10 <sup>9</sup>



Table 5 Bacteria species detected in digested sludge. Species with relative abundance of more than about 1% are shown based on the read number of Domain Bacteria.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Read %	
						Control	Thermal treatment
Bacteroidetes						23.4	13.7
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales				3.3	4.3
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidesgraminisolvens AB363973</i>	0.3	2.5
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae			0.9	1.2
Firmicutes						1.6	1.7
Firmicutes	Clostridia					3.8	4.0
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales				1.5	2.6
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales		<i>Sedimentibacter</i>		0.5	1.6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae			1.4	1.1
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	<i>Smithella</i>	<i>Smithellapropionica_AF126282</i>	5.4	4.5
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	UnnamedOrder	Syntrophorhabdaceae	<i>Syntrophorhabdus</i>	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans AB212873</i>	0.8	1.1
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae			1.4	1.6
unknown						44.6	48.1

Table 6 Archaea species detected in digested sludge. Species with relative abundance of more than about 1% are shown based on the read number of Domain Archaea.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Read %	
						Control	Thermal treatment
Crenarchaeota	Thermoprotei					1.9	1.3
Euryarchaeota						65.5	68.2
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae			1.2	0.4
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>		2.9	3.6
Euryarchaeota	Methanomicrobia			<i>Methanomassiliicoccus</i>	<i>Methanomassiliicoccusluminyensis_HQ896499</i>	15.2	12.9
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i>		7.2	8.7
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae	<i>Methanolinea</i>		1.2	0.7
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanotrichaceae	<i>Methanotrix</i>	<i>Methanotrixsoehngenii CP002565</i>	1.2	1.1

#### 4. 結 言

本研究では下水汚泥の嫌気性消化において、流入余剰汚泥に対する汚泥濃縮ならびに加熱処理の効果を検討した。混合汚泥の嫌気性消化において流入余剰汚泥に加熱処理を組み込むと、コントロールと比較して VS 分解率が約 7%、メタン発生率が約 13%改善され、その効果が確認された。一方、色度や溶解性 COD<sub>Cr</sub>は悪化し、これは従来、加熱処理の欠点として指摘されていたものである。一般に、加熱処理は脱水性を改善するといわれるが、今回は CST 値で見る限りわずかに悪化し、加熱処理温度や余剰汚泥濃度が影響すると考えられた。消化汚泥の微生物解析によって、比較的限られた種が分解経路を担っていると推察された。得られた知見を今後の研究に役立てていきたい。

#### 謝 辞

下水汚泥を提供してくださった福井市下水道部に感謝いたします。

#### 文 献

- (1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部，“下水汚泥エネルギー化技術ガイドラインー平成 29 年度版ー” (2018).
- (2) 高島正信, 中尾総一, “下水汚泥の嫌気性消化における余剰汚泥の濃縮・加熱効果”, 福井工業大学紀要, Vol. 48 (2018), pp. 45-49.

- (3) 日高平, 津森ジュン, “都市下水処理場の脱水汚泥の中温嫌気性消化に及ぼす固形物濃度の影響”, 土木学会論文集 G, Vol.70, No.7 (2014), pp. III\_433-III\_440.
- (4) 平岡正勝, 武田信生, 大隅欣一, 奥兼美, “下水汚泥の嫌気性消化システムに関する研究 (1)”, 環境技術, Vol. 10, No. 9 (1981), pp. 691-701.
- (5) APHA, AWWA and WEF, *Standard methods* (2000).
- (6) J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld and R. Knight, “QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data”, *Nat. Methods*, Vol. 7, No. 5 (2010), pp.335–336.
- (7) Living Tree, “Silva”, <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/> (参照日 2016 年 1 月 28 日)
- (8) P. L. McCarty, “Anaerobic waste treatment fundamentals, Part III: Toxic materials and their control”, *Public Works*, Vol. 95, November (1964), pp. 91-94.
- (9) Y. Y. Li, I. B. Ko, T. Noike, K. Funaishi and H. Sasaki, “Comparison of ammonia inhibition between the mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of municipal Solid Wastes”, *Proc. 10th World Congress on Anaerobic Digestion*, Vol.1 (2004), pp. 507-514.
- (10) 高島正信, 中木原江利, 池本良子, “下水汚泥の高負荷高温嫌気性消化における余剰汚泥加熱処理と微量金属の効果”, 土木学会論文集 G (環境), Vol. 68, No. 7 (2012), pp. III\_307-III\_315.
- (11) (公社) 日本下水道協会, 下水道施設計画・設計指針と解説 (2009).
- (12) Bergey's Manual Trust, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology of Archaea and Bacteria* (2015), John Wiley and Sons, New York.
- (13) Y. Liu et al., "Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*", *Int. J. Systemat. Bacteriol.*, Vol. 49 (2) (1999), pp.545–556.
- (14) M. K. Nobu et al., “The genome of *Syntrophorhabdus aromaticivorans* strain UI provides new insights for syntrophic aromatic compound metabolism and electron flow”, *Environ. Microbiol.*, Vol. 17 (2015), pp. 4861–4872.
- (15) University of Viena, “probase”, [http://131.130.66.201/probase\\_old/search.asp](http://131.130.66.201/probase_old/search.asp) (参照日 2018 年 7 月 24 日)
- (16) A. Oren, “The Family Methanobacteriaceae”, in *The Prokaryotes* (2014), Springer Nature, Switzerland.
- (17) A. Wasserfallen, “Phylogenetic analysis of 18 thermophilic Methanobacterium isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. Nov”, *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.*, Vol. 50 (2000), pp. 43–53.
- (18) A. Gorlas et al., “Complete genome sequence of *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the largest genome of a human-associated Archaea species”, *J. Bacteriol.*, Vol. 194 (2012), pp. 4745–4745.

(2019 年 4 月 26 日受理)