

メタン発酵微生物群集の空気暴露による菌数の減衰特性

大成建設（株） 土木技術研究所	正会員	帆秋利洋，友沢 孝
大成建設（株） エンジニアリング本部		大原孝彦，小嶋令一
長岡技術科学大学	正会員	原田秀樹，大橋晶良
タックコンサルタント（株）		国井伸隆

1. はじめに

資源循環型社会への移行に伴い、家畜排泄物や生ゴミなどの有機性廃棄物を対象原料としたメタン発酵への適用が普及しつつある。メタン発酵のプラントを稼働するに当たっては、スタートアップ期間の短縮を目的として近隣で稼働している下水処理場等のメタン発酵施設より種菌を入手して植種する方法が採られている¹⁾。しかしながら、植種源を採取したり新規のメタン発酵槽へ投入する際、植種源が空気と接触する機会が生じる。ところが、メタン菌をはじめとして発酵を司る微生物群集は偏性嫌気性菌であるため、これらの微生物群集が空気中の酸素と接触することで失活する可能性がある。そこで、本研究ではメタン発酵植種源の酸素感受性について暴露試験を行い、空気存在下でのメタン菌群の死滅速度を解析して植種源の投入時の留意点を明確にすることを目的とした。

2. 実験材料と方法

(1)供試植種源と条件

メタン発酵の植種源として、平成13年3月28日にN市の下水処理場から採取した嫌気性消化汚泥を用いた。実験は、嫌気性微生物群集(消化汚泥)と空気の接触を図るための開放系容器を5 Lの恒温室内に設置した(写真-1)。消化汚泥を充填した容器の内部は、3月29日より15日間スターラーで混合攪拌し、メタン生成活性の変化を調べると共に空気暴露による嫌気性微生物群集の菌数減衰特性と菌相の時系列変化を追跡した。

(2)メタン生成活性試験

バイアルを用いたバッチ実験により、0日および15日目の酢酸資化性および水素資化性メタン菌の活性を比較測定した。活性測定は37℃の温度条件下で行い、GC-FIDを用いてメタン生成量の累積値をモニターした。

(3)全菌数測定

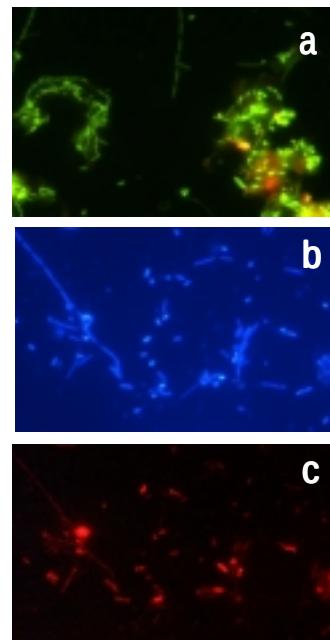
全菌数測定は、汚泥をサンプリング後アクリジンオレンジ染色液にて染色し、蛍光顕微鏡により直接計測した(AODC法)。

(4)FISH法による菌相解析

FISH法は、汚泥をサンプリング直後に4%パラホルムアルデヒドにより固定し、Ammanの手法^{2),3)}に準じて行った。バクテリア検出用としてローダミン蛍光標識を付加したEUB338プローブを、メタン菌を含むアーキア検出用としてARC915プローブをそれぞれ用いた。また、カウンター染色にはDAPI(励起波長365nm, 吸収波長390nm)を用い、観察は蛍光顕微鏡(OLYMPUS, BX60)により行った。菌相変化の解析は、実験開始より0, 3, 7, 11日目に行った。



写真-1 酸素暴露実験の状況

写真-2 AODCによる全菌像(a)とDAPI染色像(b)、メタン菌像(c)
(bとcは同一視野)

キーワード：メタン発酵、植種源、空気暴露、スタートアップ、FISH、死滅半減期

連絡先：〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町茜浜 344-1

大成建設（株）技術センター 土木技術研究所 生物環境研究室

TEL: 045-814-7226 FAX: 045-814-7257 e-mail: toshihiro.hoaki@sakura.taisei.co.jp

3. 実験結果と考察

写真-2にAODC法で観察した全菌像(a)を示す。供試植種源は形態の異なった種々の微生物群集から構成されていることが分かる。また、全菌を検出するDAPI染色像(b)と、メタン菌を検出するARC915プローブ像(c)は同一視野のものであることから、供試植種源はメタン菌の存在比率が高いことが分かる。

図-1に空気暴露によるメタン生成活性の低下特性について定量評価を行った結果を示す。水素資化性メタン菌は、11日間空気に暴露されてもメタン生成活性の低下は生じていない。これに対して、酢酸資化性メタン菌は空気暴露によって11日間で約40%メタン生成活性が低下していることが分かる。本結果より、供試植種源の水素資化性メタンよりも酢酸資化性メタン菌が酸素に対して影響を受け易いものと推察できる。

図-2に5℃条件下におけるAODC法による全菌数の変化(a)とFISH法で解析した全菌数に占めるメタン菌数の存在比率(b)の時系列変化を示す。本結果より、全菌数の減衰傾向を解析したところ、図中(a)に示した数式で表記できる。本式より、全菌数の死滅半減期を求めると約15日と見積もられる。すなわち、供試植種源の嫌気性微生物群集は空気と接触した環境下においても低温下では長期にわたって生存が可能であることが示唆された。

供試植種源の全菌数に占めるメタン菌の存在比率は約30%であることがわかる(b)。この比率は空気暴露時間とともに減少していく傾向が見られる。なお、この比率を加味して上述の数式より試算するとメタン菌の全滅期は約90日であると推定された。従って、メタン菌自体は酸素に対する感受性が、他の微生物群集に対して強いことが示唆された。図-1の結果と合わせて考察すると、この死滅し易いメタン菌は酢酸資化性メタン菌であることが想像できる。

4. まとめ

本研究で得られた知見を要約すると以下のようなものである。

- 1) 実験に供試した嫌気性消化汚泥にはさまざまな形態の微生物が棲息していた。
- 2) その菌相に占めるメタン菌数の存在比率は約30%と推定された。
- 3) 空気暴露(5℃条件下)によって全菌数の死滅半減期は約15日であり、メタン菌の全滅期は約90日と推定された。

以上より、植種源を実プラントのメタン発酵槽へ投入する際には、速やかに行うことが不可欠であり、可能であれば不活性ガスで置換する等の対策が必要である。

5. 参考文献

- 1) 帆秋利洋他、平成14年度土木学会年次学術講演会要旨集(第VII部門)。
- 2) Amann et al., (1995) *Microbiol. Rev.*, 59:143-169.
- 3) Amann et al., (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.

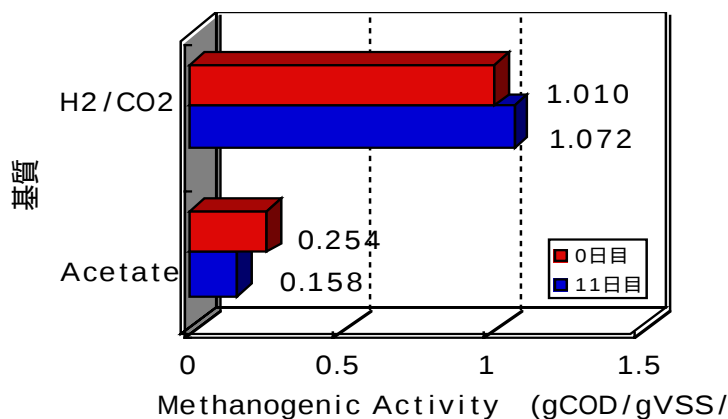


図-1 空気暴露による水素資化性(上)および酢酸資化性(下)メタン生成活性の変化 (赤:0日目、青:11日経過後)

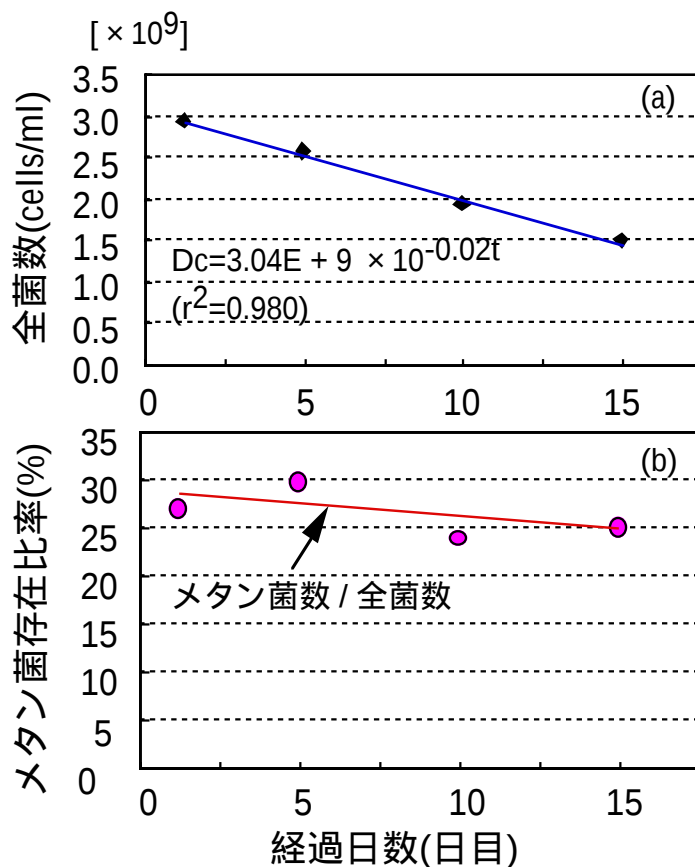


図-2 全菌数の減衰傾向(a)と全菌数に占めるメタン菌数の存在比率 (b)