

パームオイル圧搾廃液処理嫌気性ラグーンの微生物群集構造解析

東北大学 (正) ○久保田 健吾, (非) 川内真, (非) 谷川大輔, (正) 原田秀樹
 国環研 (正) 珠坪一晃, 長岡技術科学大学 (正) 山口隆司, 産総研 (非) 関口勇地

1. 背景と目的

2008年には全世界で4300万トンのパームオイルが生産され、うち8割以上がマレーシアとインドネシアで生産されている。パームオイルは従来の食用や洗剤に加え、バイオディーゼルなどへも利用展開されており、パームオイル産業はそれらの国の重要な位置づけとなりつつある。しかしパームオイル製造工程で大量の廃液(Palm Oil Mill Effluent: POME)が排出される。ある試算によれば、2008年には10,800万m³のPOMEが排出され、その96%は嫌気性ラグーン法によって処理されている。嫌気性ラグーン法は、POMEの嫌氣的分解過程で発生するメタンなどの温室効果ガスを大量に大気中に放出していることから、近年クリーン開発メカニズム(CDM)事業の対象としても着目を集めている。我々は昨年の発表で、この嫌気性ラグーンから放出される温室効果ガス量を新規な手法により測定し、ラグーンから放出される温室効果ガス量の分布や総量を算出し、それを工場から排出されるPOME量や処理水質から想定される理論放出量と比較した。この嫌気性ラグーンはこのほかCOD 80,000 mg/L程度の高濃度含油廃水であるPOMEを良好に分解していることから、POMEの分解挙動を微生物学的見解から理解する対象としても有用である。そこで我々の研究グループではPOMEの微生物による分解に関する知見を収集するために、温室効果ガス発生量を測定した嫌気性ラグーンの微生物群集構造を解析し、そこから嫌気性ラグーン法におけるPOMEの分解挙動の把握を試みた。

2. 実験方法

2.1 サンプリング

対象嫌気性ラグーンはマレーシアにある中規模なパームオイル工場のものでした。この工場からは、毎日約400m³のPOMEが排出されている。工場から排出されたPOMEは、デオイリングタンクに貯蔵され、回収可能な油分を回収後、4つのラグーンによって処理されている。4つのラグーンは、前段2つが酸生成ラグーン(第1、第2ラグーン)、後段の2つがメタン生成ラグーン(第3、第4ラグーン)である。ガス発生量調査は、第2ラグーンおよび第3ラグーンについて行っている。ガス発生量調査において、ガス組成の他、pH、CODおよびVFAを測定した。微生物群集構造解析用のサンプルはそれらの情報から、第2、第3ラグーンの各2ヶ所(流入口付近、中央付近)、合計4ヶ所より汚泥を採取した。

2.2 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析は*Bacteria*および*Archaea*の16S rRNA遺伝子およびメタン生成古細菌が持つ*mcrA*遺伝子を対象としたクローンライブラリーを作成し、行った。PCR産物は精製後、インビトロジェン社のTOPO TA クローニングキットを用いてクローニングした。シーケンスはタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに外注した。シーケンスは97% sequence identity (16S rRNA 遺伝子)あるいは89% sequence identity (*mcrA* 遺伝子)でOTU (operational taxonomic unit) 分類した。サンプル間のコミュニティ構造の相同性(similarity)についてはオンラインツールUniFracを用いて解析した。系統解析は、Arbおよびsilvaデータベース release 89をベースに行った。

3. 実験結果

3.1 クローンライブラリーおよび統計解析

*Bacteria*の16S rRNA遺伝子については第2ラグーンの流入口付近、中央付近からそれぞれ68、74クローン

キーワード パームオイル圧搾廃液、嫌気性ラグーン、微生物群集構造

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 TEL 022-795-7466

を、第3ラグーンについては流入口付近、中央付近からそれぞれ111、104クローンを採取した。*Archaea*についてはそれぞれ20クローンずつ採取したが、シーケンスの結果、第2ラグーンのサンプルからは用いたプライマーセットでは*Archaea*以外に*Bacteria*のクローンを相当数検出されたため、解析対象から除いた。また*mcrA*遺伝子については、第2ラグーン流入口付近ではPCR増幅が適切なサイクル数で確認されなかったため、第2ラグーン中央付近、第3ラグーンの流入口付近、中央付近についてそれぞれ19、19、20クローン解析した。各解析において得られたOTU数は以下の通りである：*Bacteria* 16S rRNA 遺伝子、第2ラグーン流入口付近、14；第2ラグーン中央付近、13；第3ラグーン流入口付近、61；第3ラグーン中央付近、55；*Archaea* 16S rRNA 遺伝子、第3ラグーン流入口付近、5；第3ラグーン中央付近、6；*mcrA* 遺伝子、第2ラグーン中央付近、13；第3ラグーン流入口付近、61；第3ラグーン中央付近、55。*Bacteria*の16S rRNA 遺伝子については遺伝子配列をArbに入れ、そのデータを用いてUniFrac解析を行ったところ、第3ラグーンの流入口付近と中央付近では統計学的に有意な差がないことが分かった。一方で、第2ラグーンの流入口付近と中央付近および第3ラグーンは有意な差が見られた。

3.2 嫌気性ラグーンの微生物群集構造

第2ラグーンの流入口付近サンプリング場所は、pHが4.4程度、バイオガス生成速度が $1.22 \text{ Nm}^3/\text{d}\cdot\text{m}^2$ で、そのうちメタンが約5%、水素が約20%であった。ここでは糖を乳酸まで発酵することで知られる*Firmicutes*門の*Lactobacillus*属に近縁なクローンが多く得られた(6 OTU, 57クローン)。更に乳酸をプロピオン酸や酢酸にする*Propionibacterium acnes*に近縁なクローンも得られた(1 OTU, 4クローン)。糖から乳酸に発酵する過程では水素が出ないため、高濃度の水素が生成ガス中に含まれることは、今回の群集構造解析からだけでは推察しきれない微生物群集が隠れていることが推察された。

第2ラグーン中央付近サンプリング場所は、pHが4.6程度、バイオガス生成速度が $0.8 \text{ Nm}^3/\text{d}\cdot\text{m}^2$ で、そのうちメタンが約25%、水素が約7%であった。ここでは流入口付近と全く異なる微生物群集構造が見られ、近縁分離株としては*Bacteroidetes*門の*Prevotella*属に近縁なクローン(約92% identity程度)が多く得られた(3 OTU, 47クローン)。ここからは約20%程度のメタンが生成されている。*mcrA*遺伝子クローニングから、*Methanoculleus*と*Methanosphaera*に近縁なクローンが多く得られた。pH的にもメタン生成環境としては珍しく、メタン生成古細菌に関する興味深い知見が得られたと言える。

第3ラグーンは流入口付近と中央付近からサンプリングを行ったが、流入口付近はpHが6.4程度、バイオガス生成速度が $3.72 \text{ Nm}^3/\text{d}\cdot\text{m}^2$ で、そのうちメタンが約67%で水素は検出限界以下であった。中央付近はpHが7.6程度、バイオガス生成速度が $2.53 \text{ Nm}^3/\text{d}\cdot\text{m}^2$ で、そのうちメタンが約77%で水素は検出限界以下であった。第3ラグーンにおいては第2ラグーンに比べ多様性が高く、またラグーン内における大きな群集構造の変化は見られなかった。第3ラグーンにおいては*Firmicutes*門が優占していた。この中でも*Syntrophomonas*属に近縁なクローンが多く得られた。これらは脂質の加水分解によって生じる高級脂肪酸を分解するグループとして知られている。また、*Proteobacteria*門に属するクローンも多く得られ、そこにはプロピオン酸分解細菌として知られている*Smithella*属に近縁なクローンも含まれていた。*Archaea*については、酢酸資化性の*Methanosaeta*と水素資化性の*Methanobacterium*、*Methanolinea*、*Methanospirillum*に近縁なクローンが得られた。これは16S rRNA 遺伝子および*mcrA*遺伝子解析において比較的近い群集構造が得られ、嫌気性リアクターなどでよく見られる構造に近いメタン生成古細菌群集構造が得られた。

4. まとめ

以上のことから、酸生成ラグーンを経てメタン生成ラグーンを通過していく嫌気発酵において、POMEの炭水化物分は酸生成ラグーンにて乳酸を経由してプロピオン酸や酢酸などの低級脂肪酸を経て、メタン生成ラグーンにて無機化される、脂質などは酸生成ラグーンにおける微生物分解挙動は未解明であるものの、加水分解により生ずる高級脂肪酸はメタン生成ラグーンで分解され、無機化されていることが示唆された。