

# 汚泥の嫌気性消化におけるメタン菌 およびその活性の定量

東北大学工学部 正会員 ○李 玉友  
東北大学工学部 学生員 足利伸行  
東北大学工学部 正会員 野池達也

## 1. は じ め に

汚泥の嫌気性消化プロセスは加水分解反応、酸生成反応、Acetogenic反応およびメタン生成反応という多段階的過程より構成されており、関与する微生物が加水分解細菌（あるいは酸生成細菌）、水素生成性酢酸生成菌、ホモ酢酸生成菌およびメタン菌の4グループに分けられている。演者らはこのプロセスを解明する一環として、生物化学および反応動力学的見地から有機物の分解特性について研究を進めてきた<sup>1)</sup>。しかし、汚泥消化の場合には、有機基質と嫌気性細菌とを別々に測定することは難しく、各細菌群の分布、相互作用およびそれぞれの働きを定量的に把握することは重要でありながらも定量方法がまだ確立されていないために、いままで余り研究されなかった。そこで、本研究においては嫌気性細菌の分類定量および活性の測定について検討し研究してみた。ここで重要なグループ一つであるメタン菌について報告する。

## 2. 実 験 材 料 お よ び 方 法

2.1 メタン菌の計数：メタン菌の計数法としてはロール・チューブ法 (Roll tube method) とMPN (Most Probable Number) 法の二つがあるが、ここでMPN法を用いた。嫌気性操作法はHungateのガス噴射法を用い、噴射ガスは350℃で還元銅カラムによって還元されたCO<sub>2</sub>ガスを用いた。トータルメタン菌および水素利用性メタン菌の計数に用いた培地はTable 1に示した。希釈水の組成は蒸留水1000mlにあたり：NH<sub>4</sub>Cl, 1.0g; MgCl<sub>2</sub>, 0.1g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4g; 酵母エキス, 0.01g; NaHCO<sub>3</sub>, 4.36g; 0.1%レサズリン, 2ml; Cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O, 0.5g; NaS·9H<sub>2</sub>O, 0.25gである。5本シリーズで接種して36℃の恒温槽に置いて培養する。メタン菌の生育した試験管の本数はガス組成をチェックすることによって決定した。

2.2 メタン生成活性PMA (Potential Methanogenic Activity) の測定：125mlのバイアル瓶を用い、65% N<sub>2</sub>+35% CO<sub>2</sub>の混合ガスを噴射しながら、40mlの基質（還元剤：NaS·9H<sub>2</sub>Oおよび緩衝液を含む）および供試サンプル40mlをそれぞれ注入し、気相部を十分換気してから蓋をしめて36℃の恒温水槽に入れて、培養する。メタンガスの生成量はガス生成量とガス組成を測ることによって算出した。

2.3 汚泥消化槽：連続流ケモスタット反応槽を用

Table 1 Composition of the media used for enumeration of methanogenic bacteria (per liter)

| Components                                  | Total   | H <sub>2</sub> -utilizing |
|---------------------------------------------|---------|---------------------------|
| Sodium formate                              | 5.0g    | —                         |
| Sodium acetate                              | 5.0g    | —                         |
| Methanol                                    | 5.0ml   | —                         |
| H <sub>2</sub> (80%)+ CO <sub>2</sub> (20%) | a)      | a)                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | 0.4g    | 0.4g                      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>             | 0.4g    | 0.4g                      |
| NH <sub>4</sub> Cl                          | 1.0g    | 1.0g                      |
| MgCl <sub>2</sub>                           | 0.1g    | 0.1g                      |
| Mineral solution <sup>b)</sup>              | 10ml    | 10ml                      |
| Vitamin solution <sup>c)</sup>              | 10ml    | 10ml                      |
| Yeast extrat                                | 2.0g    | 2.0g                      |
| Digester supernatant liquor                 | 200ml   | —                         |
| NaHCO <sub>3</sub>                          | 6.0g    | 6.0g                      |
| Cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O               | 0.5g    | 0.5g                      |
| NaS <sub>2</sub> ·9H <sub>2</sub> O         | 0.5g    | 0.5g                      |
| Resazurine                                  | 0.002g  | 0.002g                    |
| pH                                          | 7.0~7.2 | 7.0~7.2                   |

a), The final gas phase of tubed medium being an 80% H<sub>2</sub>+20% CO<sub>2</sub> gas mixtere at 2 atmospheres pressure.

b), Contains, in grams per liter of distilled water: nitrilotriacetic acid, 4.5; FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.40; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.12; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.01; NaCl, 1.0; CaCl<sub>2</sub>, 0.02; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.01; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.10; ZnCl<sub>2</sub>, 0.10; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.01; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.02.

c), Contains, in milligrams per liter of distilled water: biotin, 2; folic acid, 2; pyridoxine HCl, 10; thiamine HCl, 5; riboflavin, 5; nicotinic acid, 5; DL-calcium pantothenate, 5; vitamin B<sub>12</sub>, 0.1; p-aminobenzoic acid, 5; lipoic acid, 5.

い、170℃で熱処理した余剰汚泥を基質とした。滞留時間3日に設定し、定常状態に達してから菌の計数および活性の測定を行った。また、定常状態における5回の水質分析結果を平均して消化槽の定常データとした。

3. 結果 および 考 察

3・1 メタン菌の計数：上記の培地を用いて、消化槽中のトータルメタン菌および水素利用性メタン菌をMPN法で計数した例をFig.1に示す。試験管でのメタン菌の生育過程をみると、低希釈倍率で接種した試験管は早くメタンの生成が検出されるが、高希釈倍率で接種した試験管はメタンの生成が遅く、生育した試験管の本数コードは一定になるのには3週間ほどかった。通常、メタン菌を計数するには2週間以上の培養時間が必要とされているが、Fig.1によれば、3週間以上培養すればメタン菌のMPNは一定の値になることが分る。

3・2 メタン生成活性（PMA）の決定：Monod式によると、基質濃度が十分高ければ反応速度は最大になって菌体に比例する。この原理に基づき、適切な初期濃度で回分培養をやることによって各基質条件での最大メタン生成速度が決定される。この最大メタン生成速度をPMAとする。酢酸を基質にして消化槽中のPMAを測定した例をFig.2に示している。これによれば、酢酸の初期濃度：1250～5000mg/lの範囲で最大メタン生成速度は変わらないが、初期濃度：10000mg/lの場合には抑制作用が見られた。また、ギ酸、メタン菌の混合基質（酢酸+ギ酸+メタノール）および混合有機酸基質（C<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>）を用いて測定した結果はTable 2にまとめた。

3・3 汚泥消化槽のパフォーマンス：Table 3には定常状態における物質分解の状況を示している。3日の滞留時間でCODの除去率は64%と高く、これは熱処理したことによって余剰汚泥の分解性が改善されたことを示唆している。滞留時間が短いにもかかわらず、VFAがほとんど蓄積しなかった。これはTable 2に示したように、消化槽におけるメタン菌の数が通常の消化槽と同じ程度であったためと考えられる。

4. おわり 今後細菌の定量法を活用して研究を進めていく予定である。

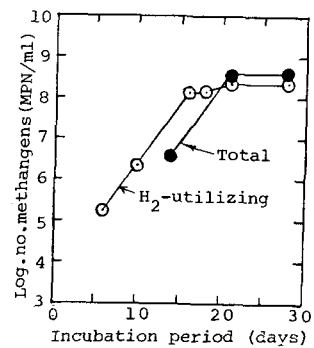


Fig.1 Effect of incubation period on the number of methanogenic bacteria

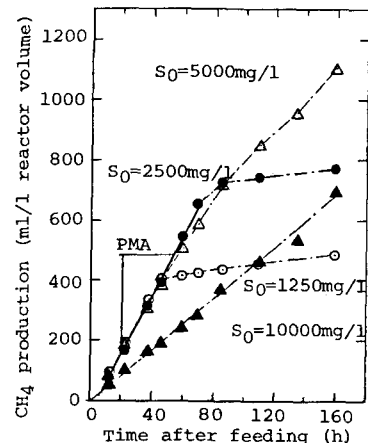


Fig.2 Determination of PMA using acetate as substrate

Table 2 MPN and PMA of methanogenic bacteria in the digester<sup>a)</sup>

| MPN<br>(5 tube)   | Metabolic group                                                        | No./ml of digester content                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                   | Total methanogen<br>H <sub>2</sub> -utilizing<br>Methanogenic bacteria | $3.0 \times 10^6$<br>$2.5 \times 10^6$        |
| PMA <sup>b)</sup> | Substrate                                                              | ml-CH <sub>4</sub> /day.1 of digester content |
|                   | Acetate                                                                | 456                                           |
|                   | Formate                                                                | 384                                           |
|                   | Ace.+For.+Methanol                                                     | 480                                           |
|                   | Mixture acid of C <sub>3</sub> ~C <sub>6</sub>                         | 624                                           |

Table 3 Performance of digester<sup>a)</sup>

|                                |                  |
|--------------------------------|------------------|
| COD <sub>cr</sub> removal      | 64.0%            |
| VSS removal                    | 36.4%            |
| Soluble COD <sub>cr</sub>      | 2180mg/l         |
| VSS                            | 2080mg/l         |
| Hydrolytic rate                | 1453mg-COD/l.day |
| Acedogenic rate                | 2490mg-COD/l.day |
| COD <sub>cr</sub> removal rate | 3404mg-COD/l.day |
| Methanogenic rate              | 1740mg-COD/l.day |

a). Digester were fed at 3 days retention time

a). Digester were fed at 3 days retention time

b). PMA = Potential Methanogenic Activity