

# VII-10

## 二相循環式メタン発酵プロセスにおけるPCR-DGGE法を用いた菌叢解析

東北大学工学部土木工学科 学生会員 ○小林拓朗  
 東北大学大学院工学研究科 大羽美香  
 東北大学大学院工学研究科 フェロー 野池達也

### 1. はじめに

現在、食品廃棄物は日本国内で排出される全廃棄物の約3割を占め、排出量は全国で年間2000万トンにのぼると言われている。食品廃棄物は多量の水分を含んでいるため、焼却処分の際に炉内の温度を下げ、ダイオキシン発生の原因となる可能性があることに加え、国内における最終処分場の逼迫などの理由から、減量や再利用の推進が急務となっている。そのため食品廃棄物を減量・資源化する技術としてメタン発酵が注目されている。本研究では、食品廃棄物から高濃度メタン発酵を行うため、二相循環式メタン発酵プロセスを採用し、ジャガイモを基質として連続運転を行い、水素及びメタンを回収した。そして、メタン発酵に関わる微生物群集の構造を解明するため、分子生物学的手法であるPCR-DGGE法を用いた反応槽の様々な条件下での微生物菌叢の挙動を考察した。

### 2. 実験条件

#### (1) 実験装置

実験に用いる反応槽は図1に示した二相循環式メタン発酵システムである。基質にはジャガイモをフードプロセッサでペースト化して用い、メタン発酵廃液と重量比1:1で混合して投入した。種汚泥には両反応槽それぞれ生ごみを処理していた高温メタン発酵汚泥及び中温メタン発酵汚泥を用いた。酸発酵槽、メタン発酵槽の容積比は1:4とした。0日目から119日目はHRT20日で運転を行い、119日目から127日目まではHRT15日で運転を行った。127日目でメタン発酵槽はpH低下を起こしガス生成が停止したので、147日目まで基質投入を停止した。147日目からはHRT20日のメタン発酵廃液に汚泥を入れ替えHRT100日で廃液循環を行わずに運転を再開した。201日目からはHRT50日とした。

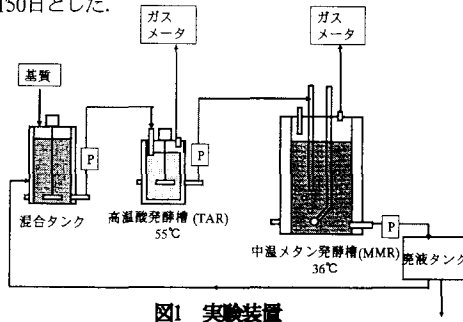


図1 実験装置

### (2) 分析方法

pH, TS, VS, SS, VSSの分析は下水試験法に従った。CODcrはStandard Methodにより測定した。有機酸濃度はキャピラリー電気泳動分析器で定量した。ガス生成量は湿式ガスメータで計量し、ガス割合はTCD-ガスクロマトグラフにより測定した。

PCRは、真正細菌の16SrDNAのV3領域をターゲットとして行った。プライマーには357fGC, 518rを使用した。PCR条件は94℃, 9min→(94℃, 30s-53℃, 30s-50℃, 30s-72℃, 30s)×35サイクル→72℃, 5minで行った。PCR-DGGEの電気泳動装置はD-Code (BIO-RAD)を用いた。8%アクリルアミドゲル中の変性剤の濃度勾配は15-55%とした。オートシーケンサーはCEQ8000(BECKMAN COULTER)を用いた。

### 3. 実験結果と考察

#### (1) 連続運転における運転結果

表1にHRT20日の定常状態における分析結果について示す。ガス組成は酸発酵槽で水素が平均44.6%, メタン発酵槽はメタンが平均57.5%で安定していた。酸発酵槽からはメタンの発生は見られず、水素収率は平均1.33mol/除去ヘキソースであった。VS分解率は86.4%, メタン転換率は81.3%であった。アンモニア濃度はメタン発酵槽で平均1,400ppmで安定しており、一般に生ごみからの高濃度メタン発酵で問題となりやすいアンモニア阻害が現れる濃度より低かった。図2に有機酸の経時変化を示した。酸発酵槽では酢酸>酪酸>カプロン酸>プロピオン酸であり、メタン発酵槽では蓄積は見られなかった。HRT100日以降は酸発酵槽で酪酸>酢酸>カプロン酸>プロピオン酸となった。

表1 HRT20日における分析結果

|                         | ジャガイモ | 混合タンク | TAR   | MMR   |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| ガス生成速度(L/L・d)           |       |       | 8.0   | 5.6   |
| ガス組成(%)                 |       |       |       |       |
| CH <sub>4</sub>         |       |       | 0.0   | 57.5  |
| CO <sub>2</sub>         |       |       | 51.7  | 41.2  |
| N <sub>2</sub>          |       |       | 2.4   | 1.6   |
| H <sub>2</sub>          |       |       | 44.6  | 0.0   |
| pH                      | 5.73  | 7.71  | 5.31  | 7.41  |
| アルカリ度(mg/L)             | 2460  | 7380  | 2880  | 9480  |
| NH <sub>4</sub> -N(ppm) | 50    | 1,250 | 1,040 | 1,400 |
| TS(g/L)                 | 174   | 90    | 83    | 23    |
| VS(g/L)                 | 165   | 80    | 73    | 13    |
| T-CODcr(g/L)            | 181   | 109   | 92    | 28    |
| S-CODcr(g/L)            | 40    | 18    | 31    | 6     |

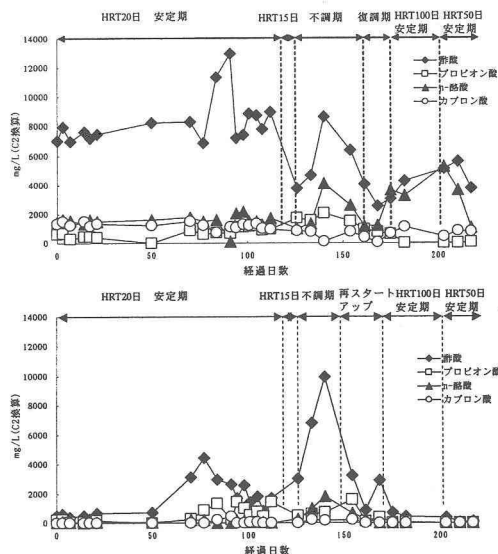


図2 酸発酵槽及びメタン発酵槽の有機酸

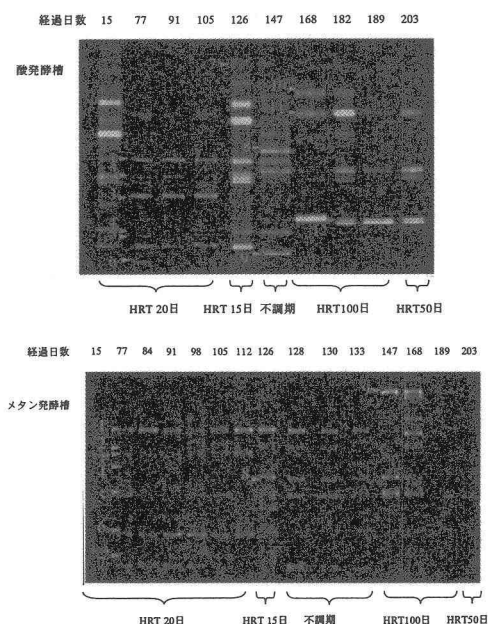


図3 酸発酵槽及びメタン発酵槽のDGGEバンド

## (2) PDR-DGGE法による微生物群集構造解析

連続運転中に両反応槽から採取したサンプルについてDNAを抽出し、PCR-DGGE法により得られたバンドパターンを図3に示す。酸発酵槽の水素生成は水素生成細菌の*Clostridium*属、*Enterobacter*属の細菌または遺伝的にそれに近い細菌が水素生成を担っていることがわかった。不調期になるとこれらのバンドは消失している。その代

表2 DGGEバンドの塩基配列と相同性の高い微生物種

| バンド名  | 相同性の高い種                                                | 特徴             | Identity(%) |
|-------|--------------------------------------------------------|----------------|-------------|
| TAR1  | <i>Yagococcus fassus</i>                               | 乳酸生成、通性嫌気性     | 98          |
| TAR2  | <i>Uncultured eubacterium clone LKB22</i>              | 偏性嫌気性          | 99          |
| TAR3  | <i>Enterobacter sp.</i>                                | 水素生成、通性嫌気性     | 83          |
| TAR4  | <i>Uncultured Bacteroidetes bacterium clone LKB193</i> | 偏性嫌気性、高温性      | 97          |
| TAR5  | <i>Enterobacter sakazakii</i>                          | 水素生成、通性嫌気性     | 93          |
| TAR6  | <i>Clostridium orbiscindens</i>                        | 水素生成、通性嫌気性     | 91          |
| TAR7  | <i>Uncultured bacterium clone B5</i>                   | 嫌気性            | 90          |
| TAR8  | <i>Bacteroidetes bacterium AN79285</i>                 | 偏性嫌気性、高温性      | 94          |
| TAR9  | <i>Pseudomonas stutzeri</i>                            | 通性嫌気性、脱窒素      | 97          |
| TAR10 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                         | 乳酸生成           | 98          |
| TAR11 | <i>Myroides odoratus</i>                               | 通性嫌気性          | 96          |
| TAR12 | <i>Uncultured bacterium DGGE band 2-k</i>              | 嫌気性            | 91          |
|       | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>                    | 偏性嫌気性、高温性      | 85          |
|       | <i>Clostridium thermoamylolyticum</i>                  | 水素生成、通性嫌気性、高温性 | 95          |

わりに酸発酵槽、メタン発酵槽共に乳酸菌のバンドが新たに出現していた。酸発酵槽は基質投入停止からまもなく水素生成が停止したが種汚泥として用いたメタン発酵槽を500mLほど加えたところ水素生成が再開した。これ以降強く現れたバンド12は*Clostridium*属の細菌で、これは廃液由来であると思われる。これはまた、廃液循環がプロセスの安定化に寄与する可能性があることを示す。

## (3) 顕微鏡による微生物群集の把握

図4には光学顕微鏡を用いたTDC法により、酸発酵槽の全菌数及び*Methanosarcina*のみの計数を行った結果を示す。廃液循環なしのHRT100日以降はサルシナは姿を消している。また、HRT20日運転前の循環ありの長HRTではメタンが発生していたことと比較すると、廃液循環を行った場合、廃液由来の*Methanosarcina*が酸発酵槽内で相当数生息を続けていることが分かった。

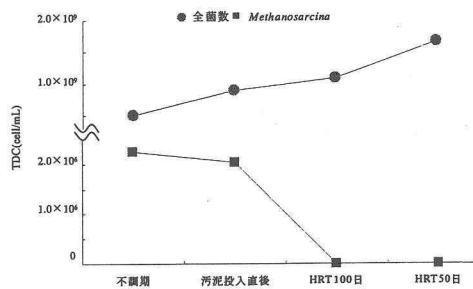


図4 光学顕微鏡による菌数の直接計測

## 4. まとめ

本研究から得られた結論を示す。

- ①酸発酵槽において水素生成を担っていると推定されるのは*Clostridium*属、*Enterobacter*属の細菌であった。
- ②反応槽不調期には水素生成細菌のバンドは消え、両反応槽とも乳酸菌のグループの菌が現れる傾向があった。
- ③廃液循環により水素、メタン生成に関わる微生物の数が補充されることがわかった。