

(23) 高温メタン発酵系における酢酸酸化・水素生成経由の
メタン生成経路の生態学的意義

**Ecological Significance of Methanogenesis via Acetate Oxidation to Hydrogen
Formation in Thermophilic Methane Fermentation Processes**

珠坪一晃、原田秀樹、大橋晶良

Kazuaki SYUTSUBO*, Hideki HARADA*, Akiyoshi OHASHI*

ABSTRACT; In a thermophilically-grown anaerobic sludge consortium acetate degradation can be performed either by acetate splitting reaction by acetate-utilizing methanogens (A-MPB), or by a symbiosis between acetate-oxidizing bacteria (AOB) and hydrogen-utilizing methanogens (H-MPB). The contribution of acetate consumption via hydrogen formation by the symbiosis between AOB and H-MPB was experimentally estimated using a sludge consortium grown in a thermophilic (55°C) UASB reactor operated over 20 months on a mixture of sucrose and volatile fatty acids. Acetate-fed and H₂/CO₂-fed methanogenic activities of the retained sludge increased with increasing vial-test temperature, exhibiting optima at 65°C.

Acetate degradation vial tests were conducted at 45, 55 and 65°C by varying hydrogen partial pressure of headspace of individual vials so as to arbitrarily set at different $\Delta G'$ values for acetate oxidizing (hydrogen forming) reaction. Acetoclastic cleavage by A-MPB entirely dominated methanogenesis at 45°C. At higher temperatures the symbiotic methanogenesis through hydrogen formation became prominent: electron distribution to the symbiotic methanogenesis was accounted for by 42% at 55°C, and 74% at 65°C. These results suggest that the syntrophic association of AOB and H-MPB becomes significant in acetate conversion to methane under thermophilic conditions.

KEY WORDS; Acetate oxidizing bacteria, Acetoclastic methanogen, Hydrogenotrophic methanogen, Thermophilic methane fermentation, Symbiosis

1. はじめに

嫌気的な有機物分解は、Fig.1に示すようにいくつかの異なるトロフィック・グループでの物質変換反応の連携プレーによって最終的なメタン生成が完遂される生態学的な場である。通常（中温域もしくは低温域）の嫌気性消化においては、最終的に電子フローペースで約60-70%の有機物が酢酸を経由してメタンへと転換されており、それは酢酸開裂反応（メチル基はメタンへ、カルボキシル基は炭酸へと転換される）によるものであることがよく理解されている（Table 1: メカニズム I）。一方、高温メタン発酵プロセスは、汚泥のメタン生成活性が中温プロセスと比較して数倍高く維持出来ることから注目を集めているが、近年、高温メタン発酵系特有の微生物生態学的構造についていくつかの報告がなされている。

すなわち、Zinder and Koch¹⁾は、60°C温度条件下で酢酸を水素と炭酸ガスへと転換することによりエネルギーを得る酢酸酸化細菌（Acetate Oxidizing Rod-shaped bacterium, AOR）と、生じた水素をエネルギー源とする高温性水素酸化性メタン生成細菌（*Methanobacterium* sp. strain THF）のco-cultureを高温（55°C）嫌気性消化汚泥から得ている。また Lee and Zinder²⁾はエチレングリコールを培養基質として酢酸酸化細菌（AOR）を単離する

* 長岡技術科学大学工学部 環境システム工学系

(Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

ことに成功している。さらに Petersen and Ahring³⁾らは、この酢酸酸化・水素生成反応が高温メタン発酵系においてより低酢酸濃度条件下で進行しやすいことを、 $2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-sodium acetate}$ トレーサー実験により見いだしている。

このように、高温メタン発酵系で特異的に見いだされた酢酸酸化・水素生成経由のメタン生成 (Table 1 のメカニズム II) は、酢酸酸化反応 (2) を担う AOB (Acetate Oxidizing Bacteria) と、水素からのメタン生成反応 (3) を担う H-MPB (Hydrogen-utilizing Methane Producing Bacteria) との共生系によって遂行される (Fig.1)。しかし、高温メタン発酵系における、全酢酸消費 (酢酸からのメタン生成) に対する酢酸酸化・水素生成経由のメタン生成反応の寄与度については、詳しい知見が得られていない。そこで本研究では、高温 UASBリアクターで培養された嫌気性グラニュール汚泥を用いた酢酸分解バイアル実験によって、酢酸からのメタン生成に対する酢酸酸化・水素生成経由反応の寄与度とその温度依存性を評価した。

2. 実験条件と方法

2. 1 供試汚泥

高温培養汚泥は、全容積12.8ℓ (反応部 11.9ℓ +GSS部 0.9ℓ) の高温UASBリアクターより採取した。反応器内の温度は、ウォータージャケットにより55℃に制御し、供給廃水には、ショ糖、酢酸、プロピオン酸、酵母エキス (COD比で 4.5 : 2.25 : 2.25 : 1) を炭素源とする人工廃水 (流入COD濃度4000mgCOD・ℓ⁻¹) を用いた。反応器は容積負荷23kgCOD・m⁻³・d⁻¹、COD除去率95%以上で600日以上安定的に運転された。詳細な運転条件及び汚泥性状については、既報⁴⁾において報告したのでここでは省略する。

2. 2 メタン生成活性試験

メタン生成活性は、運転開始後270日目 (23kgCOD・m⁻³・d⁻¹)、600日目 (23kgCOD・m⁻³・d⁻¹) の保持汚泥について45℃から75℃の範囲内の異なる温度条件下で測定した。また、対照系として本実験と同様の基質で長期間培養した中温グラニュール汚泥 (培養温度35℃、容積負荷15kgCOD・m⁻³・d⁻¹) についても活性の測定を行った (試験温度35℃)。バイアルの振とうにはロータリーシェーカー (130rpm,振とう半径5cm) を使い、各温度につき2

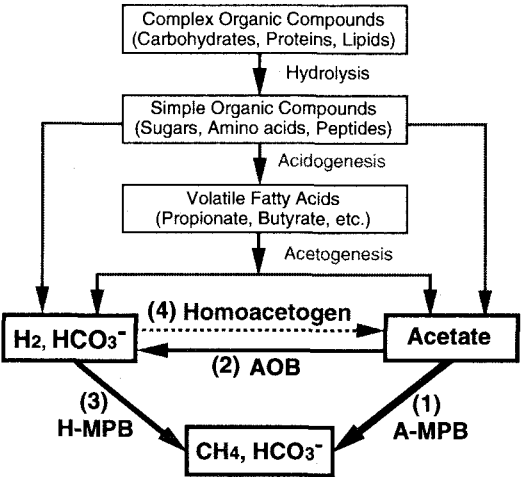


Fig.1 Schematic diagram for anaerobic digestion of organic compounds. The numbers in parentheses correspond to the numbers of reactions in Table 1.

Table 1 ΔG^0 (standard condition) for methanogenesis either from acetate splitting or from a symbiosis between acetate oxidizers and hydrogenotrophic methanogens.

Reaction	ΔG^0 (kJ・reaction ⁻¹)
Mechanism I :Acetate"splitting"	
(1) $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0
Mechanism II :Acetate"oxidation"	
(2) $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+$	+ 104.6
(3) $4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	- 135.6
Sum (2) and (3)	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31.0

$\Delta G'$ value (pH 7.0) was calculated for reaction (2).

$$(5) \Delta G', \text{AOR}(\text{kJ} \cdot \text{reaction}^{-1}) = +104.6 + 2.303RT \log[\text{HCO}_3^-][\text{PH}_2]^4 / [\text{Ac}^-]$$

本つつ測定を行った。以下に記す各操作は、全て完全に酸素を除いた窒素気流下で行った。バイアルには、あらかじめ煮沸、脱酸素操作を行い、試験温度に設定した無機塩類 (NH_4Cl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) を含むリン酸緩衝液 (バイアル内最終濃度25mM) とリアクター (port NO.3、高さ24cm) から採取したグラニュール汚泥 (ホモジナイズ処理したもの) を投入した。ブチルゴム栓とアルミキャップでシールを施した後、気相部を窒素ガスでパージし、レサズリン (バイアル内最終濃度 $1\text{mg} \cdot \ell^{-1}$)、還元剤 ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, バイアル内最終濃度 $250\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) を加えた。30~40分程度シェーカー内で振とうし、バイアル内の温度が安定したところで酢酸、水素 ($\text{H}_2 : \text{CO}_2 = 80 : 20, 1.4\text{atm}$) の各基質を供給し、12~15時間 (水素基質については、5~8時間) の試験時間中にバイアル内の気相部に蓄積するメタン量を、経時的に5~7点測定する事により活性を求めた。なお、バイアル液相部の初期COD濃度は $2000\text{mgCOD} \cdot \ell^{-1}$ とした。

2. 3 酢酸分解バイアル実験

2. 3. 1 酢酸酸化反応の自由エネルギー変化量の算定

Fig.1に嫌気条件下での有機物分解過程の概要を示す (図中の括弧内の1から3の数字はTable1の反応式の数字に対応)。高温メタン発酵における酢酸からのメタン生成反応は、酢酸資化性メタン生成細菌 (A-MPB) によるもの (1) と、酢酸酸化細菌 (2) と水素資化性メタン生成細菌 (H-MPB) (3) の共役反応によるもの、の2つの経路が考えられる。酢酸酸化反応 (Fig.1(2)) は、標準状態では標準自由エネルギー変化量 ΔG^0 が正であるため自発的に進行しない (Table 1 参照)。しかしながら実際の反応系では、生成された水素が、H-MPB (反応(3)) により反応系内から直ちに除去されるという、異種間水素伝達の働きにより、(2)式は進行する。すなわち、AOBによる酢酸酸化反応の進行の自発性は、系の水素分圧に大きく依存するので、酢酸分解実験中のバイアル・気相部の水素分圧を意図的にコントロールする事により、AOBとH-MPBの共役系による酢酸消費速度を定量化することが出来る。

ここで、AOBによる酢酸酸化反応 (反応(2)) の自由エネルギー値 $\Delta G'$ は、Table1(5)式から算出した ([]内は濃度 ($\text{mole} \cdot \ell^{-1}$) を表す)。なお、本実験系では活量係数=1とした。また、酢酸イオン濃度 $[\text{Ac}^-]$ 、炭酸イオン濃度 $[\text{HCO}_3^-]$ については、それぞれバイアル内総量をガスクロマトグラフにより経時的に実測し、Van't Hoff 式⁵⁾により温度補正した解離定数より、バイアル内での $[\text{Ac}^-]$ 、 $[\text{HCO}_3^-]$ を算出した (なおpHの補正も考慮した)⁶⁾。

2. 3. 2 酢酸分解バイアル実験手順

酢酸分解バイアル実験は45℃、55℃および65℃の3つの温度条件下で、Table 2 に示す環境条件に設定したV1からV4の4本のバイアルについて行った。

V1 (低水素分圧系) : 必要に応じ、実験中にバイアル気相部を窒素ガスでフラッシングし、水素分圧を低く抑え、Table 1 のメカニズム I および II の同時進行を行う (Condition 1)。V2 (高水素分圧系) : 実験開始時に気相部を水素ガスで置換 ($101\text{k} \sim 118\text{kPa}$) し、メカニズム II の進行を停止させる (Condition 2)。V3 (水素分圧変化系) : 実験中盤において低水素分圧系から高水素分圧系への移行を行う (Condition 1 から2への移行)。V4 (高水素分圧、 CHCl_3 添加系) : 実験開始時に気相部を水素ガスで置換、同時に CHCl_3 を添加し ($10\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) メタン生成反応を停止させ、ホモ酢酸生成量の評価を行う (Condition 3)。

実験には容量720mlのセルムバイアル瓶 (液相部100ml、気相部620ml) を使い、バイアルの振とうは、水素ガスのバイアル液相部への供給が律速とならないよう、ロータリーシェーカー (130 rpm、回転半径5cm) で行った。嫌気的条件下でグラニュールを分散⁴⁾、希釈後、試験温度 (45、55、65℃) に設定した培地 (リン酸緩衝液、無機塩、酸化還元指示薬等を含む、詳細はメタン生成活性試験と同様) の入ったバイアル (V1~V4) に分注し (最

Table 2 Conditions of acetate degradation test.

Condition	1	2	3
Acetate	○	○	×
N ₂	○	×	×
H ₂	×	○	○
CHCl ₃	×	×	○

Symbols : ○, presence ; ×, absence

終濃度 $1000\text{mgVSS}\cdot\ell^{-1}$ ）、気相部を窒素ガスで置換後、シェーカー内で40～60分間、温度が安定するまで振とうを行う。その後、各バイアルごとに環境条件の調整(Condition1～3)を行い、酢酸(初期濃度 $600\text{mgCOD}\cdot\ell^{-1}$)を供給して実験を開始した。

バイアル気相部のガスの組成は、TCD型ガスクロマトグラフで測定した。酢酸濃度の測定は、FID型ガスクロマトグラフによった。

3. 実験結果及び考察

3. 1 供試汚泥の培養状況とメタン生成活性の温度依存性

Fig.2 に高温UASBリアクターの運転状況を示した。容積負荷の上昇は、流入COD濃度の増加とHRTの短縮により行った。保持汚泥のグラニュレーションが進行した運転開始後200日目以降では、順調に負荷上昇を行うことが可能であった。その結果、運転開始後300日目には容積負荷(反応器全容積基準) $45\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 、COD除去率85%以上を達成することが出来た。実験の後半期間では、流入COD濃度 $4000\text{mgCOD}\cdot\ell^{-1}$ 、容積負荷 $23\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ で運転を継続した。この期間のCOD除去率は、常時95%以上であり、良好な処理性能を示した。培養600日目に高温UASBリアクターからグラニュール汚泥を採取し、後述の酢酸分解バイアル実験に供試した。この汚泥コンソーシアムは、長期間一定の運転条件で培養され、十分に安定した生態学的構造を獲得しているものと判断される。

Fig.3に、高温グラニュール汚泥のメタン生成活性の温度依存性を示した。試験基質には、酢酸(a)及び H_2/CO_2 (b)を用いた。培養270日目には酢酸供与メタン生成活性(A-MA)は、 55°C で最大値を示した。その後、培養600日目にはA-MAの至適温度は高温側 65°C にシフトし、その活性値は270日目の最大活性値の約3倍にまで増加した。既報(アルコール廃水)⁷⁾やUemura and Harada⁸⁾、J. B. van Lier⁹⁾等の実験においても、高温UASB

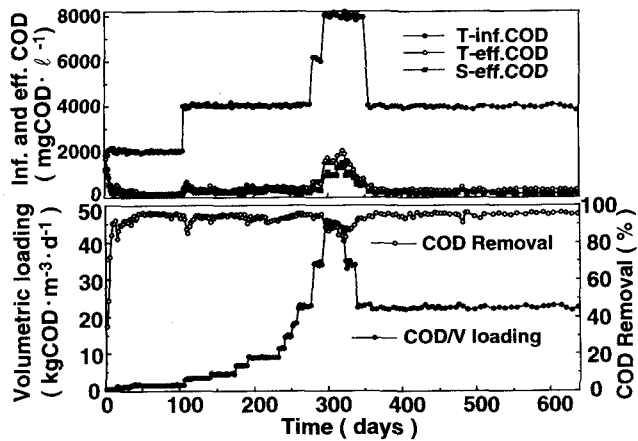


Fig.2 Process performance of a thermophilic (55°C) UASB reactor receiving a synthetic wastewater composed of sucrose and VFA.

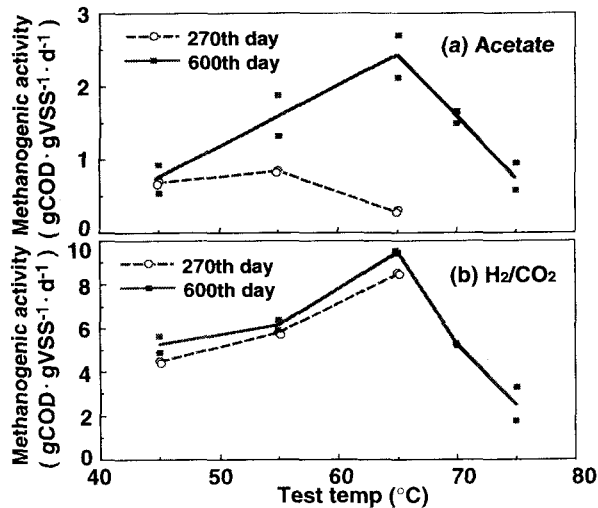


Fig.3 Temperature dependency of methanogenic activities of the thermophilically-grown granular sludge. Vial test substrate: (a) acetate, (b) H_2/CO_2

Table 3 Comparison of methanogenic activities of granular sludge.

Growth substrate	Operation temp.(°C)	Test temp.(°C)	Methanogenic activity (gCH ₄ -COD·gVSS ⁻¹ ·d ⁻¹)		H-MA/A-MA	References
			A-MA	H-MA		
Sucrose+VFA	55	55	1.60	6.12	3.8	this study
	55	65	2.40	9.50	4.0	
	55	70	1.59	5.25	3.3	
Alcohol distillery waste water	55	45	0.64	3.51	5.5	Syutsubo & Harada ⁷⁾
	55	55	1.21	5.49	4.5	
	55	65	1.54	5.92	3.8	
Acetate	*55	60	0.54	1.62	3.0	Uemura & Harada ¹³⁾
	*65	60	0.16	1.55	9.7	
Sucrose+VFA	35	35	2.4	2.7	1.1	this study
Sucrose	30	35	0.62	1.37	2.2	Harada <i>et al.</i> ¹⁴⁾
Sugar waste		30	0.92	0.92	1.0	Dolfing & Bloemen ¹⁵⁾
Sugar waste		30	0.38	0.78	2.1	Dolfing & Mulder ¹⁶⁾
Acetate	35	35	2.1	0.11	0.1	Harada <i>et al.</i> ¹⁴⁾
Acetate		30	1.16	0.18	0.2	Dolfing & Mulder ¹⁶⁾

* : non-granular sludge

培養汚泥のA-MP（酢酸消費活性）の至適温度は65℃を示している。高温性A-MPBの至適温度は、*Methanosarcina*が50～58℃の範囲にあるのに対して、*Methanosaeta*（*Methanothrix*）はそれよりも若干高い55～65℃であることが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。SEMによる精細な観察でも、本実験系の高温グラニュール汚泥中では*Methanosaeta*が優占菌種であった。一方、*Methanosarcina*に関しては、そのライフサイクル内のいずれの形態も目立った存在量としては観察されなかった。H₂/CO₂からのメタン生成活性（H-MA）は、培養270日目で最適温度65℃を示し、さらなる運転の継続によっても至適温度、最大活性値ともに大きく変化しなかった。したがってH-MPBは、A-MPBと比較してより短期間でポピュレーション・シフトが完了していたものと考えられる。高温性の代表的なH-MPBである *Methanobacterium thermoautotrophicum* は、その至適温度が65～70℃にあることが報告されている¹²⁾。ルーチンでのSEMおよび蛍光顕微鏡観察により、保持汚泥内部において*M. thermoautotrophicum*様の桿菌が優占メタン生成細菌種（水素資化性）であったことから、65℃付近で最大活性値を示す傾向が現れたものと考えられる。

Table 3 に本実験系でのH-MA、A-MA、およびその活性比（H-MA/A-MA）を示した。表中には、本実験と同一の基質で長期間培養した中温グラニュール汚泥、及びその他の文献からの活性値も参照として併載した。H-MA/A-MA比について注目してみると、全体的傾向として、高温培養汚泥の方が大きなH-MA/A-MA値を示していることが分かる。さらに、表中の酢酸基質培養の高温汚泥と中温汚泥のH-MA/A-MA値について着目してみる。Uemura and Haradaは、酢酸を基質に用いた高温UASB実験を行っている¹³⁾。この実験では、酢酸を培養基質に用いたにも関わらず、H-MA/A-MA値が非常に大きくなっており、反応器保持汚泥のH-MAが非常に卓越していることが分かる。一方酢酸基質培養の中温汚泥¹⁴⁾¹⁶⁾では、H-MAが著しく低くなっていることから、H-MA/A-MA値は、高温培養汚泥に対して1オーダー低くなっている。これらの観察結果を総合すると、高温メタン発酵系では酢酸を消費するポピュレーション・サイズに対して、相対的に大きなポピュレーション・サイズの水素消費者が生育している可能性が示された。

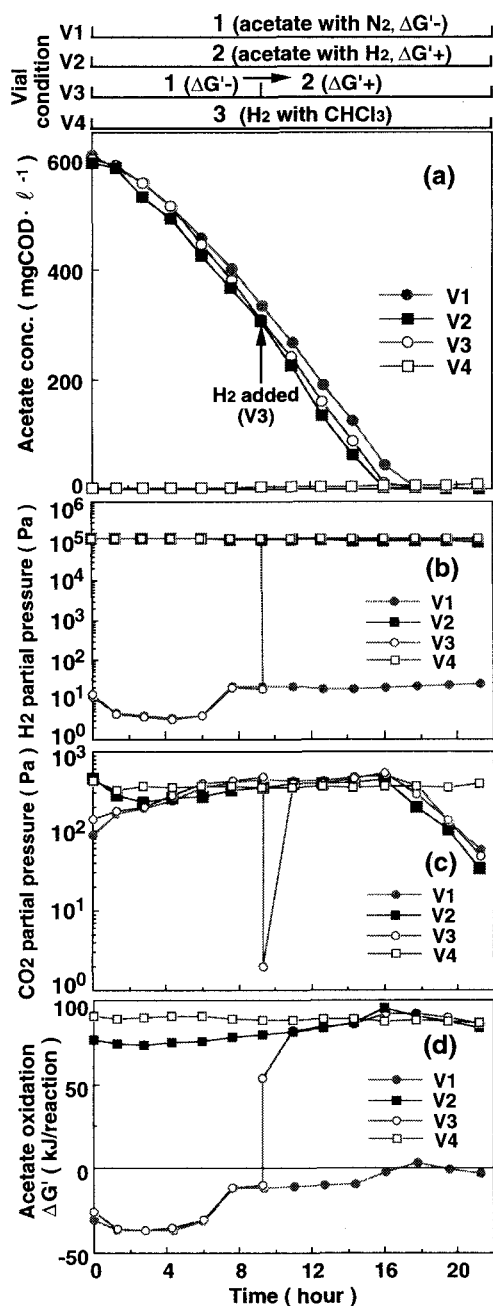


Fig. 4 Acetate degradation vial-test at 45°C by disintegrated granular sludge grown in thermophilic (55°C) UASB reactor.

(a): acetate, (b): H₂ partial pressure in head space, (c): CO₂ partial pressure in head space, (d): Free energy change for acetate oxidation to hydrogen.

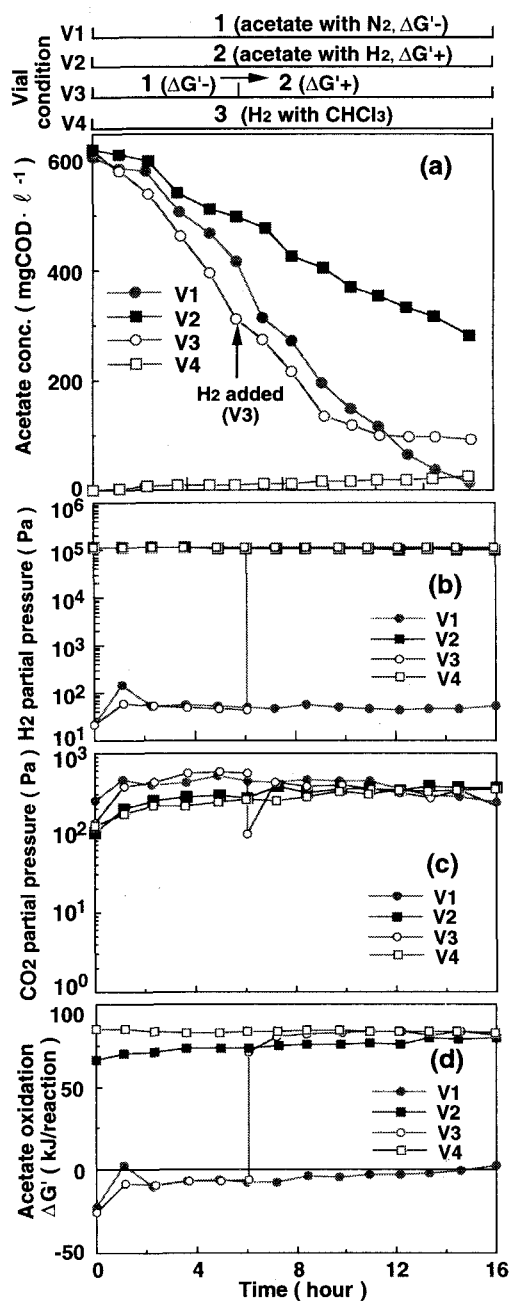


Fig. 5 Acetate degradation vial-test at 55°C by disintegrated granular sludge grown in thermophilic (55°C) UASB reactor.

(a): acetate, (b): H₂ partial pressure in head space, (c): CO₂ partial pressure in head space, (d): Free energy change for acetate oxidation to hydrogen.

3. 2 酢酸分解バイアル実験

Figs.4、5、6に、45℃、55℃、65℃温度条件下における酢酸分解バイアル実験結果を示した。(a) 図には酢酸濃度、(b) 図には気相部水素分圧、(c) 図には気相部炭酸分圧、(d) 図には酢酸酸化反応の $\Delta G'$ の経時変化を示した。なお(d) 図の酢酸酸化反応の自由エネルギー変化 $\Delta G'$ は、経時的に実測した液相部酢酸濃度(a)、気相部水素分圧(b)、気相部炭酸分圧(c)を用いてTable1 (5) 式から算出した(pH、及び試験温度の影響も考慮してある)。

V1では、実験期間を通じて低水素分圧(3.4~100Pa-H₂、Condition 1)を保った(Fig.(b))。その結果、酢酸酸化反応の $\Delta G'$ は負に保たれ(Fig.(d))、いずれの温度条件においても良好に酢酸の消費が行われた(Fig.(a))。この時の酢酸消費活性は、45℃、55℃、65℃においてそれぞれ0.83、1.0、1.7gCOD・gVSS⁻¹・d⁻¹であった。V2では、気相部を水素ガスで置換(Condition 2)することにより、常時高水素分圧(101~118kPa-H₂)を保った(Fig.(b))。その結果、実験期間を通じて酢酸酸化反応の $\Delta G'$ 値は正に保たれた(Fig.(d))。このようにV2ではAOBとH-MPBの共生系による酢酸消費反応(Table 1、メカニズムII)の停止を行ったが、45℃ではV1と同様に酢酸消費が順調に進行し、酢酸消費活性の低下は認められなかった(Fig.4)。これに対して55℃、65℃ではV2の酢酸消費速度は、明らかにV1よりも低下しており、実験終了時にはそれぞれ280mgCOD・ℓ⁻¹、440mgCOD・ℓ⁻¹の酢酸が残存した(Fig.5、6)。V3では、低水素分圧(Condition 1)でスタートし、酢酸が半減した時点で気相部を水素ガスで置換することにより高水素分圧(Condition 2)へと移行させた。気相部への水素ガス注入後、酢酸酸化反応の $\Delta G'$ 値が負から正へと変化し、実験期間途中での酢酸酸化反応を停止した。Condition 1 からCondition 2 への移行後、45℃では酢酸消費速度に変化は見られなかったが、55℃、65℃においては約3~4時間のタイムラグのちに酢酸消費速度が抑制される傾向を示した。V4(Condition3)では、高水素分圧、クロロホルム添加という条件下でCondition2(V2及びV3の後半)におけるホモ酢酸生成量の評価を行った。しかしながら、ホモ酢酸生成活性値はCondition 2(V2及びV3)での酢酸消費速度の減少には、影響のないレベルであった。

以上の実験結果より、55℃及び65℃条件下で、バイアル内の水素分圧を高く保ち、酢酸酸化反応の $\Delta G'$ を

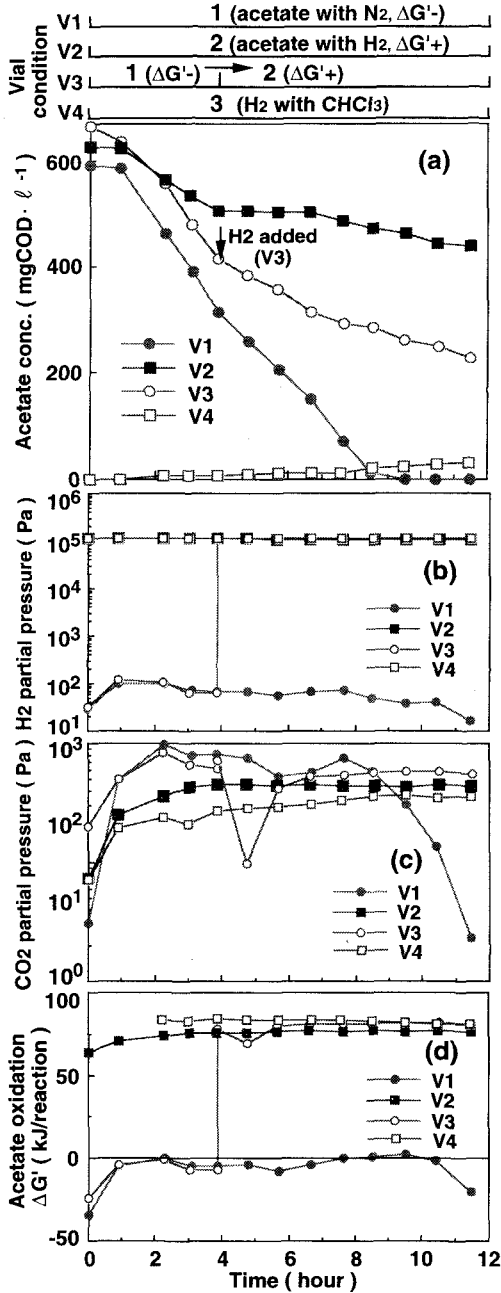


Fig. 6 Acetate degradation vial-test at 65°C by disintegrated granular sludge grown in thermophilic (55°C) UASB reactor.

(a): acetate, (b): H₂ partial pressure in head space, (c): CO₂ partial pressure in head space, (d): Free energy change for acetate oxidation to hydrogen.

正に保った系 (V2, V3) では、V1よりも明らかに酢酸消費速度が低下しており、酢酸酸化・水素生成経路による酢酸消費反応が進行していることが示唆された。Fig.7 に V1 と V2 の酢酸消費活性の差 (V1-(V2+V4)) から求めた AOB と H-MPB の共役による酢酸消費活性、および A-MPB による酢酸消費活性 (V2+V4) の全酢酸消費活性に占める割合とその活性値を示した (なお、気相部の水素分圧を高く保った V2 では V4 と同等のホモ酢酸生成があると仮定した)。45℃では、酢酸消費の全てを A-MPB が担っており、AOB と H-MPB の共役による酢酸消費は起こっていないことが分かる。一方、試験温度が上昇すると、AOB と H-MPB の共役反応への寄与度は、55℃では全酢酸消費の約42%、65℃では約74%と飛躍的に大きくなった。

一般に、A-MPB のうち、*Methanosarcina* 属は水素気下で酢酸からのメタン生成反応が阻害されていることが知られている¹⁷⁾。その一方、*Methanosaeta* 属による酢酸の分解速度は水素の有無に依存しない¹⁸⁾。本実験で供試した高温グラニュール汚泥は、1) SEM と蛍光顕微鏡による精細な形態学的観察からは *Methanosarcina* の目立った存在量が確認されなかったこと、2) 65℃では、*Methanosarcina* が完全に活性低下する¹⁰⁾ にも関わらず、本実験系では A-MA が最大値を示している。これらの根拠に基づいて、供試高温汚泥中では *Methanosarcina* 属は有意な酢酸消費者ではないと考えられる。しかしながら、仮に供試汚泥中に *Methanosarcina* が存在しており、水素存在下では酢酸よりも水素を選択的に資化する事により酢酸消費速度が低下し、その結果として酢酸酸化反応の寄与を過大評価している可能性も完全には棄却できない。それゆえ、酢酸酸化反応の寄与度評価の精度向上は今後の課題といえる。

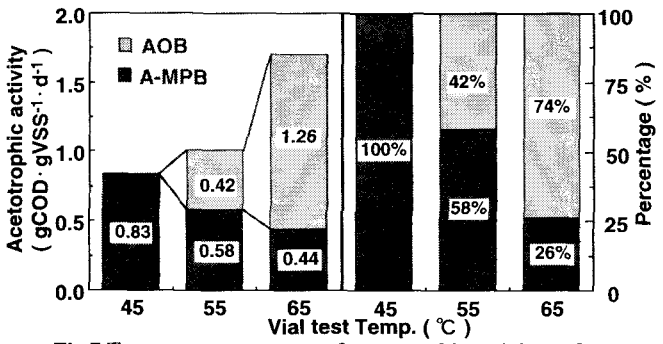


Fig.7 Temperature response of acetotrophic activity and distribution of electrons to acetate-utilizing MPB and to acetate oxidizing bacteria (AOB).

3. 3 熱力学的考察による検証

A-MPB による酢酸からのメタン生成反応 (Table1(1)式)、AOR による酢酸酸化反応 ((2)式)、および H-MPB による H₂/CO₂ からのメタン生成反応 (3)式) に及ぼす水素分圧と温度の影響を考察した。なお、反応(1)~(3)の $\Delta G'$ 算出には、酢酸分解実験時の代表的なバイアル内環境条件を適用した (pH=7.0, Acetate conc. = 500mg · ℓ^{-1} , P-CO₂=405 Pa, P-CH₄=405 Pa と仮定)。Fig.8 に 25℃、55℃、65℃温度条件下における反応(1)~(3)の $\Delta G'$ に対する水素分圧の影響を示した。これより、酢酸酸化反応(2)と水素からのメタン生成反応(3)の両方が進行し得る臨界水素分圧 (反応の $\Delta G'$ が負に保たれる水

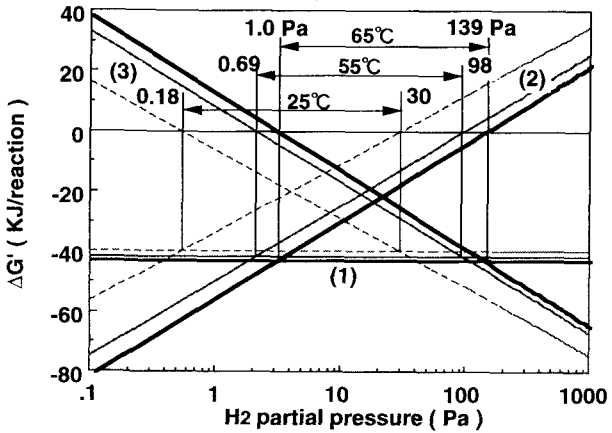


Fig.8 Free energy changes with regard to (1) Acetoclastic methane production, (2) Acetate-oxidation, (3) Hydrogen-oxidation as a function of hydrogen partial pressure at 25,55,65℃. $\Delta G'$ were calculated for pH 7.0, 500mg · ℓ^{-1} acetate, 405Pa CO₂, and 405Pa CH₄.

素分圧)は、温度の上昇に伴って徐々に増加する傾向にある。したがって、同一の水素分圧条件下では試験温度が高い方が熱力学的に酢酸酸化反応が進行しやすい状況にあるといえる。このことは、本実験結果の傾向をよく説明しうる。本実験では、酢酸消費におけるAOBとH-MPBの共生系による寄与度を、反応系の水素分圧を操作することによって評価した。同様な手法はパルミチン酸¹⁹⁾、エタノール²⁰⁾、酪酸²¹⁾の分解過程における水素生成酢酸生成菌の寄与度を推定しようとする実験系で用いられている。また、Lee and Zinder²²⁾は、AORとH-MPB (*M.bacterium thermoautotrophicum* ΔH) のco-cultureによるエタノール分解実験を行い、エタノール分解により生成された酢酸の分解が進行したのは、酢酸酸化反応の $\Delta G'$ が負となる水素分圧以下までに、水素が消費された後であることを報告している。このように熱力学的手法を適用して高温メタン発酵系での酢酸酸化反応の寄与度を評価し、酢酸酸化菌 (AOB) と水素資化性メタン生成菌 (H-MPB) の共生系の生態学的役割を明らかにしたのは本研究が初めてである。

4. 結論

本研究の結果、以下のような知見が得られた。

- 1) 供試高温培養グラニュール汚泥は、55℃で培養を行ったにも関わらず、酢酸及びH₂/CO₂からのメタン生成活性は65℃で最大値を示した。
- 2) 酢酸分解実験より、高温度条件下における酢酸消費反応は、水素により阻害されることが分かった。酢酸酸化・水素生成経路による酢酸分解反応の全酢酸消費に対する寄与率は、45℃では0%、55℃では42%、65℃では74%と試験温度の上昇に伴って増加する傾向を示した。
- 3) 熱力学的考察より、同一水素分圧条件下では、試験温度の上昇に伴って、酢酸酸化・水素生成経路による酢酸分解反応が進行し易くなることが検証された。

以上の結果より、高温メタン発酵系における酢酸分解は、高温性の酢酸資化性メタン生成細菌及び、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成細菌の共生系の両者が担っており、温度の上昇に伴い共生系への寄与度が大きくなることが明らかになった。

参考文献

- 1) Zinder S. H., Koch, M., Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture, Arch. Microbiol., 138, 263-272, 1984.
- 2) Lee M. J., Zinder, S.H., Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen which grows acetogenically on H₂-CO₂, Appl. Environ. Microbiol., 54, NO.1, 124-129, 1988, Jan.
- 3) Petersen S. P., Ahring, B. K., Acetate oxidation in a thermophilic anaerobic sewage-sludge digester: the importance of non-aceticlastic methanogenesis from acetate, FEMS Microbiol. Ecol., 86, 149-158, 1991.
- 4) 珠坪一晃、原田秀樹、曾怡禎、桃井清至、高温UASBリアクター保持汚泥のグラニュール形成過程における構造的特性とメタン生成活性の推移、環境工学研究論文集、第31巻、57-67, 1994.
- 5) Snoeyink, V. L. and Jenkins, D., Water chemistry, John Wiley & Sons Ltd., 1980.

- 6) Thauer R. K., Jungermann, K., Decker, K., Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, *Bacteriol. Rev.*, 41, 100-180, 1977.
- 7) 珠坪一晃、原田秀樹、鈴木宏誌、桃井清至、大橋晶良、高温UASBリアクターによるアルコール蒸留廃水処理特性と保持微生物群の生態学的挙動、環境工学研究論文集、第32巻、201-212, 1995.
- 8) Uemura S., Harada, H., Inorganic composition and microbial characteristics of methanogenic granular sludge grown in a thermophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 358-364, 1995.
- 9) van Lier J. B., Grolle, K. C. F., Stams, A. J. M., de Macario, E. C., Lettinga, G., Start-up of a thermophilic upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor with mesophilic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 1992, 1992.
- 10) Zinder S. H., Anguish, T., Cardwell, C., Effects of temperature on methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 808-813, 1984.
- 11) Zinder S. H., Cardwell, S. C., Anguish, T., Lee, M. and Koch, M., Methanogenesis in a thermophilic anaerobic digester: *Methanothrix* sp. as an important acetoclastic methanogen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 796-807, 1984.
- 12) Balch, W. E. *et al.*, Methanogens: reevaluation of a unique biological group, *Microbiol. Rev.*, 43, 260-296, 1979.
- 13) Uemura S., Harada, H., Microbial characteristics of methanogenic sludge consortia developed in thermophilic UASB reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 654-660, 1993.
- 14) Harada H., Endo, G., Tohya, Y. and Momonoi, K., High rate performance and its related characteristics of granulated sludge in UASB reactor treating various type wastewaters, *Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic digestion*, Bologna, Italy, 22-26 May, 1988, Monduzzi Editore S.P.A., 1011-1020, 1988.
- 15) Dolfing J., Bloemen, W. G. B., Activity measurements as a tool to characterize microbial composition of methanogenic environments, *J. Microbiol. Meth.*, 4, 1-12, 1985.
- 16) Dolfing J., Mulder, J. W., Comparison of methane production rate and coenzyme F420 content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1142-1145, 1985.
- 17) Hutten T. J., Bongaerts, H. C. M., van der Drift, C. and Vogels, G. D., Acetate, methanol and carbon dioxide as substrates for growth of *Methanosarcinabarkeri*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 46, 601-610, 1980.
- 18) Kamagata Y., Mikami, E., Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 191-196, 1991.
- 19) 山口隆司、原田秀樹、桃井清至、曾怡禎、高級脂肪酸の嫌氣的分解過程における硫酸塩還元菌の生態学的役割、水環境学会誌、第18巻、第6号、1995.
- 20) Thiele, J. H., Zeikus, J. G., Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: Significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 20-29, 1988.
- 21) Dwyer D. F., Weeg-Aerssens, E., Shelton, D. R. and Tiedje, J. M., Bioenergetic conditions of butyrate metabolism by a syntrophic anaerobic bacterium in coculture with hydrogen-oxidizing methanogenic and sulfidogenic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1354-1359, 1988.
- 22) Lee M. J., Zinder, S. H., Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1457-1461, 1988.