

(74) 生ごみを対象とした高温メタン発酵槽における微生物群集解析

千 智勲¹・日高 平^{1*}・洪 鋒¹・越川博元²・岩崎大介³・津野 洋¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂C1)

²龍谷大学理工学部環境ソリューション工学科 (〒520-2194 大津市瀬田大江町横谷1-5)

³株式会社タクマ水処理技術部 (〒660-0806 兵庫県尼崎市金楽寺町2-2-33)

* E-mail: hidaka@water.env.kyoto-u.ac.jp

16S rDNAをターゲットとしたランダムクローニング法により、生ごみを対象とした、ラボスケールおよび実施設の高温メタン発酵槽における微生物群集解析を経目的に試みた。ラボスケール反応器から最も多く検出されたのは、*Bacillus infernus*, Uncultured bacterium clone g3C1, およびUncultured bacterium clone MBA08などに近縁な種であった。メタン発酵槽の運転で特に問題となるプロピオン酸蓄積と、*Bacillus infernus*に近縁な種の占有率の増減傾向が類似していることが示された。実施設反応器においては、種汚泥として下水汚泥発酵槽からの汚泥を投入しており、運転開始時に検出された*Coprothermobacter* spp.に近縁な種などは、運転開始後数ヶ月でほとんど検出されないようになり、次第に人工生ごみを対象としたラボスケール反応器と同様の菌相へと変化した。処理状況を反映する重要な微生物群が示され、今後、現場での運転管理に役立つ情報となるものと考えられる。

Key Words : methane fermentation, thermophilic, kitchen waste, 16S rDNA, random cloning, bacterial consortium

1. はじめに

石油、石炭や天然ガスなどの化石燃料の使用による大気中の二酸化炭素濃度の上昇に伴う地球規模の温暖化が懸念され、2005年に「京都議定書」が発効されている。その対策の一つとして、家庭一般ごみの処理においては、焼却の際の高含水率の問題から、生ごみを分離して効率的にメタン発酵しバイオガスを回収し、また乾燥可燃物の焼却によるエネルギー回収率の向上の目的から、焼却施設と生ごみメタン発酵施設の併設が推進されようとしている。このように、食品由来廃棄物のバイオマスとしての利用が期待され、その利用拡大の方向性が位置づけられ制度が整いつつある。また一元化下水道により、デイスポーザおよび下水道管を活用して生ごみを回収することも提案されている¹⁾。

生ごみの効率的メタン発酵技術を開発するために、高温(55℃)高濃度高負荷メタン発酵について、人工生ごみを用いたラボスケール実験による検討が、試みられてき

た^{2,3)}。1相式でのメタン発酵実験からは、一日一回の給餌で汚泥の返送を伴わない場合は10 kgCOD/(m³・d)までの有機物負荷率での運転が可能で、返送を伴う場合は20 kgCOD/(m³・d)まで上げられることが示され、また、生ごみ1 kgCOD当たり280 Lのメタンガス(乾燥生ごみ1 kg当たり435 L)が生成されることも示されている。

メタン発酵において主役をなす槽内の微生物量の指標としては、浮遊性固形物濃度やアデノシン三リン酸(ATP)濃度が用いられてきた。しかしながら、特にメタン発酵槽のように分解の各段階に関わる微生物のバランスが重要と考えられる場合には、全微生物の量を把握したとしても、発酵槽の微生物指標としての限界があり、微生物相の把握が重要となる。一方、微生物が有する遺伝子は、デオキシリボ核酸(DNA)での一定の領域の塩基配列により規定される遺伝の作用単位と定義され、遺伝子の特性はそれぞれの塩基配列の特異性により規定される。特に16S rDNAは微生物群集の系統解析のためにしばしばターゲットにされる遺伝子であり、また微生物細

胞あたりのコピー数が一定であることから、その測定により微生物の特定・検出・定量が可能である。さらに、メタン発酵で重要視される各段階の微生物のバランスも測定可能になると考えられる。近年PCR-DGGE法による発酵槽内の微生物群集解析例が多数報告されている^{4,9,10}。また、より手間や費用のかかるランダムクロニング法での解析例が見られるものの、代表的な条件下でのみの測定である^{7,8}。人工廃水を対象として90日程度の菌相変化の経日変化を、特定の細菌群を対象に測定した例⁹はみられるものの、生ごみを基質とした反応器や実施設を対としたより長期間の経日変化をランダムクロニング法で解析した例はほとんど見られない。

そこで本研究では、生ごみなどの高温・高負荷嫌気性メタン発酵槽内の微生物群集の解析を、ラボスケール反応器および実施設反応器を対象にしてランダムクロニング法により行った。数百日間の経日変化を、処理特性と合わせて解析し、それらの結果から発酵槽の効率的で安定的な運転のためのモニタリング指標の提示の可能性を検討し、鍵となる微生物の把握を試みた。

2. 実験方法

(1) ラボスケール反応器

反応器の概要を図1に示す。有効容積3.4 Lの完全混合型反応器で、ウォータージャケットにより55℃に維持した。実験に用いた生ごみの組成は、湿重ベースで野菜(キャベツ、ジャガイモ、ニンジン、大根、白菜)50%、果物(リンゴ、オレンジ皮、バナナ皮)20%、残飯類(ご飯、パン、麺類)20%、肉類2.5%、魚介類5%、および卵類2.5%である^{2,3}。食品の大分類および湿重量割合は、平成6年度の世帯別調査結果の平均値¹⁰をもとに決定し、各食品類別の細組成については、日本食品標準成分をもとに構成食品および湿重量割合を決定した。上記組成の人工生ごみを、実験に供するため、以下に示す手順で調整した。まず、各食品を1 cm角に切り、構成比にしたがって秤量、混合した。次に、ブレンダーにより破碎し、冷凍保存した。このようにして得られた人工生ごみの成分は表1に示す通りである。全COD_{cr}およびTSは、それぞれ292 g/kg-wetおよび189 g/kg-wetである。運転条件は表2にまとめたとおりである。人工生ごみを一日一回もしくは一日二回投入のfill-and-draw方式で運転し、汚泥は遠心分離後反応器に返送して運転した。有機物負荷率(OLR)は、20.5~35.9 kgCOD/(m³・d)の範囲で徐々に増加させた。

(2) 実施設反応器

図2に示すKOMPOGAS方式の実施設反応器についても

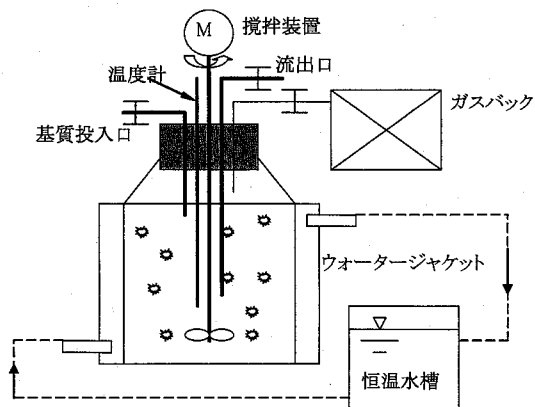


図-1 ラボスケール反応器

表-1 人工生ごみの成分

項目	値
TS(g/kg-wet)	189
VTS(g/kg-wet)	180
SS(g/kg-wet)	120
VSS(g/kg-wet)	118
全COD _{cr} (g/kg-wet)	292
溶解性COD _{cr} (g/kg-wet)	104
炭水化物/VTS(%)	60
タンパク質/VTS(%)	14
脂質/VTS(%)	10

表-2 ラボスケール反応器の運転条件

	I	II	III	IV	V
経過日数	0-50	51-119	120-157	158-207	208-251
基質投入	一日一回	一日二回			
OLR (kgCOD _{cr} /(m ³ ・d))	20.5	25.6	30.7	35.9	
HRT(d)	14.2	11.4	9.5	8.1	
温度(℃)	55				

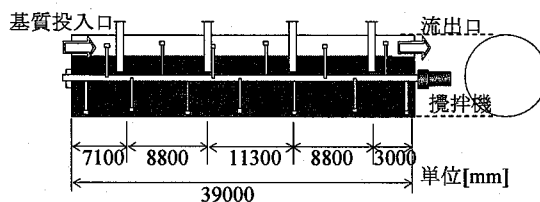


図-2 実施設反応器

同様に、立ち上げ期に着目して微生物群集解析を試みた。有効容積は約1,100 m³で、50 t/dの処理が可能である。高温発酵(約55℃)で運転されており、処理対象物は、厨芥ごみ、動植物性残渣、および木くずなどである。有機物の平均的な組成は、VTSIに対して、炭水化物41%、脂質

28%, タンパク質13%, およびその他の成分が19%であった。運転開始時には、発酵槽に下水汚泥の高温嫌気性発酵槽に由来する種汚泥投入を行い、約1週間後から基質投入を始め、種汚泥投入から約70日目より汚泥の引き抜きを始めた。設計上の負荷で運転を開始したのは種汚泥投入から約110日目である。280日目からは、生ごみと共に下水汚泥の投入も行っている。

(3) 分析方法

CODcrはDR-2400(Hach社)で、T-Nおよび $\text{NH}_4^+\text{-N}$ はAuto-analyzer (Bran+Luebbe社)で測定した。VFAsはHPLC(CDD-10Avp, 島津製作所)により定量し、その際にShim-pack SCR-102Hカラム(島津製作所)を用い、移動相は5mM p-トルエンスルホン酸とし、カラムの温度を43℃とした。pH, TS, VTS, SS, およびVSについては、下水試験方法(1997年)¹¹⁾に準拠して行った。発生ガスの生成量および組成については、赤外線式ガス濃度測定装置CGT-7000(島津製作所)を用いた。

反応器内の微生物群集の解析を、Cheonら¹²⁾と同様の分子生物学的手法で試みた。DNA抽出は、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN社)を用いて反応時間などを一部変更した¹³⁾Lysis法に基づいてサンプリング直後に行った。電気泳動によりDNAを確認した後、それを鋳型DNAとしてPCRを行った(PTC-200, MJ research)。PCRは、TaKaRaのpremix taq 酵素、ならびに大半の真正細菌・真核細菌・古細菌の16S rDNAを対象とするUniv.519F-Univ.1406Rプライマー¹⁰⁾を用いて94℃, 68℃, および72℃で各1分の、25サイクルを行い、900 bpの目的バンドを確認した。なおアニーリング温度は、事前の検討により最適と判断した68℃に設定した¹³⁾。回収・精製後、TA-cloningを行い、シーケンス解析(Univ.519Fプライマー)を行った。シーケンス解析は、タカラバイオのジェノミクスセンターのシーケンシングサービスを利用した。得られたデータを相同性検索プログラムBLASTにより解析した。

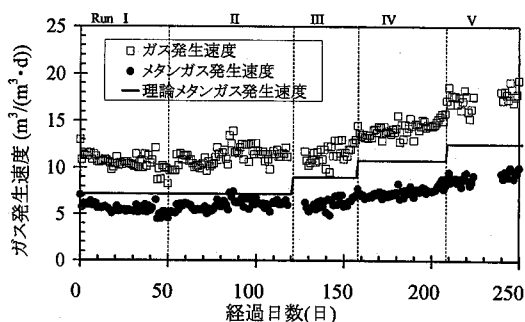


図3 ラボスケール反応器のガス発生速度

3. 結果および考察

(1) ラボスケール反応器

運転状況としてガス発生速度の経日変化を図3に示す。OLRを20.5 kgCOD/(m³·d)から35.6 kgCOD/(m³·d)まで増加させた結果、メタン生成速度は、OLRに応じて増加し、5~10 m³/(m³·d)の範囲であった。ほとんどの期間で反応器内のpHは7.5~8.0に維持されており、CODベースでのメタン転換率は0.8以上であった。しかし、OLRを上げたRun Vでは、VFAsの蓄積によりpHが7.2程度まで低下し、CODベースのメタン転換率も0.75以下まで低下した。一日一回の基質投入を行ったRun Iおよび一日二回の基質投入でもOLRを上げたRun Vにおいては、特にプロピオン酸の蓄積が観察されたものの酢酸は最大でも0.5 gCOD/L以下で特に蓄積が見られなかった(後述の図4参照)。実験期間を通じてT-N濃度は、3 gN/L程度、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は2.3 gN/L程度以下であり、アンモニア性窒素による阻害は特に見られなかった。これらより、一日二回の基質投入および汚泥の返送を行う条件下において、限界OLRは、30 kgCOD/(m³·d)程度と判断された。

クローニング結果の概要を表3にまとめて示す。8ヶ月の連続運転期間中に、16回分析を行い、毎回84クローン以上を分析し、平均で24の操作的分類単位(OTUs)が検出された。ゲノム上の16S rRNAのオペロンの数は、細菌種により大きく異なるため、クローン数の多い細菌が絶対数的に多いかどうかは不明である。しかしながら、ある

表-3 ラボスケール反応器のクローニング結果の概要

経過日数	6	21	43	49	70	82	144	167	172	187	196	203	209	216	224	241	平均
分析クローン数	97	94	90	91	91	86	91	90	91	91	84	89	91	93	94	92	91
OTUs数	26	22	23	24	23	30	36	29	19	17	21	20	17	21	32	24	24
BlastN平均スコア	742	958	947	982	892	963	891	907	969	819	877	860	935	945	819	894	900
古細菌クローン数	0	2	4	4	5	12	8	15	16	0	0	1	0	0	0	0	4
古細菌クローン数の割合(%)	0	2	4	4	5	14	9	17	18	0	0	1	0	0	0	0	5

表4 ラボスケール反応器のクローニング結果の経日変化

		OTU占有率(%)																			
	近縁種	Accession No.	平均 相同性(%)	経過日数																	平均
				6	21	43	49	70	82	144	167	172	187	196	203	209	216	224	241		
既知	<i>Bacillus infernus</i> TH-23	U20385	97	27	40	50	52	38	22	22	32	33	33	36	44	56	59	23	37	38	
	<i>Bacillus</i> spp. (<i>B. infernus</i> 以外)	AY608983他	97	3	9	2	5	5	2	3	9		7	6	10	3	5	6	1	5	
	<i>Clostridium</i> spp.	L09176他	95	6	1	11	4	10	7	8	2	2	14	10	11	8	6	7	5	7	
	<i>Methanoculleus</i> <i>thermophilus</i>	AJ862839	99				2	2	7		7	3							1	4	
	<i>Methanothermobacter</i> <i>wolfeii</i>	AB104858	99			4	2	3	2	2	6	9			1				2	4	
未知	archaeon clone: GZK24	AJ576219	99		2				3	7	4	5							1	4	
	bacterium clone: g3C1	AF401539	97	1	12	3	5	3		7	7	13	9	7	4	4	6	15	8	7	
	bacterium clone: GZKB39	AJ853533	96		1	1	1	2		1	3	5	7	5	3	4	2	6	11	4	
	bacterium clone: R6b7	AF482449	91	1						3	1		9							4	
	bacterium clone: MBA08	AB114318	94	2	2	6	5	7	3	3	4	10	4	6	1	2	2	4	2	4	
	bacterium clone: MBNA08	AB114327	99	2	9	1	2	3	8	7	1	1		2				1	2	3	
	bacterium clone: tbr1-1	AF280819	93	8	3	2	3	3		3			8		7	3	5		1	1	4
	その他			49	21	19	16	22	44	34	23	10	18	21	21	16	18	35	28	13	

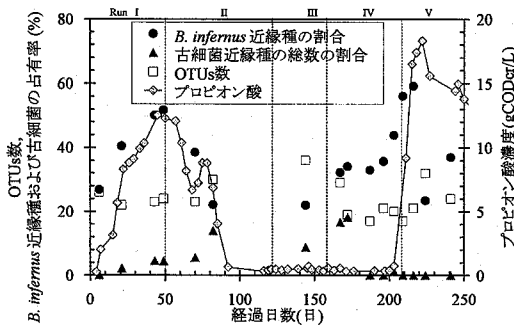


図4 ラボスケール反応器の運転状況および微生物群集

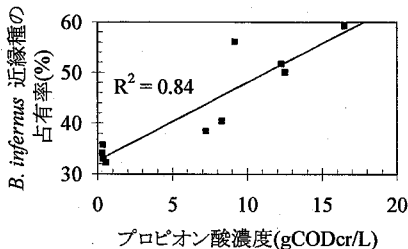


図5 ラボスケール反応器のプロピオン酸蓄積

種の細菌の全クローンに占める割合が増えれば、その細菌のポピュレーション増大が生じているという目安にはなると考えられるので、参考までに以下の解析ではクローン数の検出割合も算出して記した。古細菌クローン数の割合は、メタン発酵の安定していた82日目～172日目の間は10%以上検出されたのに対して、その他の期間で

は10%未満であった。メタン菌の割合としては10%程度の値が報告されており^{15, 16}、特に高負荷運転時にはメタン発酵の安定性と連動する指標となっていることが考えられる。

クローニング結果の経日変化を表4にまとめて示す。最も多く検出されたのは、*Bacillus infernus*に近縁な種であった。*Bacillus infernus*は、グルコースから酢酸、乳酸および酪酸を生成し、最適温度が61℃、最適pHが7.3～7.8の絶対嫌気性細菌であり¹⁷、これらの条件は炭水化物が主成分である人工生ごみを基質とした本反応器の運転状況に合致している。次に多く検出されたのは、Uncultured bacterium clone g3C1¹⁸やUncultured bacterium clone MBA08¹⁹などに近縁な種であり、その特性はUnculturedで不明であるものの、いずれも*Clostridium* spp.に近縁な種である。これらはいずれも、加水分解および酸発酵過程に関わる微生物と考えられる。また、メタン発酵に関わる古細菌では、主として、高温水素資化性メタン発酵細菌である*Methanoculleus thermophilus*および*Methanothermobacter wolfeii*²⁰に近縁な種が検出された。なお酢酸利用メタン生成細菌は今回検出されていないものの、古細菌のみを対象としたプライマーによる分析を別途行っており、その際には検出されることを確認している²¹。

*Bacillus infernus*に近縁な種の占有率および運転状況の経日変化を図4に、プロピオン酸濃度と*Bacillus infernus*に近縁な種の占有率の関係を図5に示す。メタン発酵槽の運転で特に問題となるプロピオン酸蓄積と、*Bacillus infernus*に近縁な種の占有率の傾向が類似している。本実験期間中、プロピオン酸濃度の増加は2度見られた。いずれも一日一回もしくは二回の基質投入運転条件下での

負荷率の限界が原因と考えられ、水素分圧が高まりプロピオン酸の分解が阻害された状態にあったと推定される。同時期に、古細菌近縁種の総数の検出割合も低下している。*Bacillus infernus*の比増殖速度は 1.15 h^{-1} と報告されており¹⁷⁾、メタン細菌よりも増殖速度が速い。高負荷条件下で、*Bacillus infernus*に近縁な種が優占的に増殖した結果と考えられる。

(2) 実施設

運転状況の経日変化および微生物群集分析結果を図6および図7に示す。メタンガスの発生速度は、投入量の変動により発酵槽の容積あたりに換算すると $0.24 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ から $3.23 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ であり、ラボスケールから得られたメタンガス生成速度($5 \sim 10 \text{ m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$)より少なかった。これは、立ち上げ期の運転であることや、OLRが低く設定されていたこと、投入基質成分に変動があること、そして投入日や投入量が一定でないことによるものと考えられる。また、単一の廃棄物が多量に投入された時などに、プロピオン酸濃度が 3 gCOD/L 程度まで増加している場合もあった。またラボスケール反応器とは異なり酢酸濃度も最大 2 gCOD/L 程度まで増加していた。しかしながら、全体としては、メタンガスが安定して発生していると考えられ、正常に稼働していると考えられる。

実施設の微生物群集変化を表5に示す。ここでは、占有率が2%以上となることがある微生物種についてのみ表示した。種汚泥中で最も多く検出された、*Coprothermobacter* spp.およびUnidentified bacterium clone: TUG22に近縁な種は、運転開始後数ヶ月でほとんど検出されなくなった。運転開始初期には炭水化物基質を用いる代表的な乳酸生成菌として知られている*Lactobacillus* spp.に近縁な種の増加が見られ、種汚泥であった下水汚泥から炭水化物中心の生ごみ基質に対応した微生物群集の変化がみられた。122日目には全クローンの25%を占めた*Clostridium* spp.に近縁な種は、前述したラボスケール実験でも頻繁に検出されたOTUで、酸発酵過程に関係がある微生物であることが知られている。ラボスケール実験からは酸の蓄積の時に占有率が増加した*Bacillus infernus*に近縁な種についても、95日目以降頻繁に検出され、最大25%を占めている。古細菌については、ラボスケール実験からも検出された水素酸化メタン生成菌である*Methanothermobacter wolfeii*に近縁な種が次第に検出されるようになった。特に、プロピオン酸濃度が $2 \sim 3 \text{ gCOD/L}$ 程度まで上昇した212日目あたりに20%まで占有率が増加し、水素濃度の増加による*Methanothermobacter wolfeii*の増殖、およびそれと共にプロピオン酸の増加が測定されたのではないかと考えられる。プロピオン酸蓄積時に古細菌近縁種の総数が減少したラボスケール反応

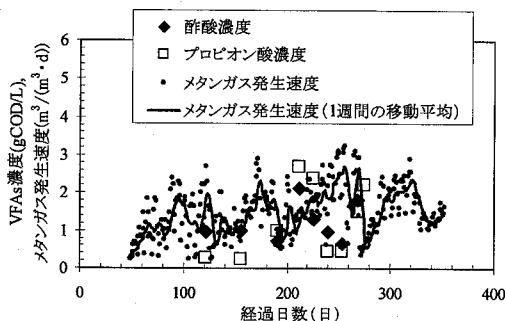


図-6 実施設反応器の運転状況

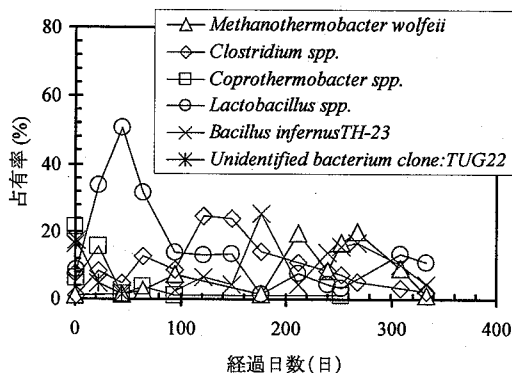


図-7 実施設反応器の微生物群集

器とは逆の状況である。ラボスケール反応器とは異なり、同一基質による高負荷条件下ではなく、単一の廃棄物が多量に投入された時などに不安定になりプロピオン酸蓄積が見られていることから、ラボスケール反応器とは状況が異なっているものと考えられる。それ以外でも、次第にラボスケール実験と類似した検出結果が得られるようになった。ラボスケール実験と同様の基質で運転を継続することで、微生物群集が、下水汚泥から次第にラボスケール実験と類似した状態に変遷した点が興味深い。

(3) 本技術の適用可能性

以上のように、本研究で検出された微生物群の状況と、反応器の処理状況の関連が示された。主として検出された微生物群は、PCR-DGGE法などによる検出結果とも類似しており⁹⁾、妥当なものであると考えられる。また、*Bacillus infernus*は、地下約2700 m から分離されていること、鉄やマンガンの還元能を有すること、好アルカリ性(pH 7.3~7.8)でありナトリウム存在下($\sim 0.6 \text{ M}$)で増殖が促進されることなどが報告されており¹⁷⁾、近縁な種が他の嫌気性反応器での研究例では検出例が見られないものの、本研究で検出されたことは興味深い。

表-5 実施設反応器のクローニング結果の経日変化

		OTU占有率 (%)																			
	近縁種	Accession No.	平均 相同性(%)	経過日数																	
				種汚泥	1	22	44	64	95	122	149	177	212	240	253	268	309	333			
既知	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	AB104858	99	1			2	3	7			1	20	8	17	20	9	1			
	<i>Streptococcus</i> spp.	AF396922他	100	1		1		29	32	23	1	3	2	1	1	1					
	<i>Clostridium</i> spp.	AB093546他	96	8	1	8	5	13	9	25	24	14	11	8	7	5	3	2			
	<i>Thermotoga</i> spp.	AF355615他	97	3	9	1	2														
	<i>Coprothermobacter</i> spp.	AB162803他	99	22	6	16	2	4	1						1						
	<i>Fervidobacterium</i> spp.	AY151268他	93	4	5	1															
	<i>Lactobacillus</i> spp.	AJ250074他	99		9	34	51	32	14	13	13	1	8	4	3		13	11			
	<i>Bacillus infernus</i> TH-23	U20385	97						2	7	4	25	4	14	16	17	10	4			
	<i>Bacillus</i> spp. (<i>B. infernus</i> 以外)	AF454298他	92		1		2	3	1	3					1		1				
	<i>Leuconostoc</i> spp.	AF468002他	99				3										1		1		
	<i>Pediococcus</i> spp.	AJ305322他	99		1	1	3														
未知	Unidentified bacterium clone: TUG22	AB011350	100	16	18	5	2														
	Uncultured crenarchaeote clone: 44a-A1-4	AY082455	98		13																
	Unidentified bacterium clone: TUG14	AB011342	98	4	6	7	2	1													
	Uncultured bacterium clone: p-2716-65A5	AF371473	99		5																
	Uncultured bacterium clone: BSA2B-18	AB175390	98	1	3	1	2	3													
	Uncultured bacterium clone: MBA08	AB114318	94	1				4	12	15	22	18	15	19	11	11	7	7			
	Uncultured bacterium clone: MBNA08	AB114327	99			1	2				7	6	4	2	3	2		2			
	Uncultured bacterium clone: g3C1	AF401539	99	1					1	2	1	10		2	4	1	2	3			
	Uncultured bacterium clone: GZKB101	AJ853594	92										2	4	1	7	1	1			
	Uncultured bacterium clone: GZKB39	AJ853533	96											3	7	3	7	8			
	Uncultured bacterium clone: R6b7	AF482449	92				3	3	4	2			1	1	2						
	Uncultured bacterium clone: BSA1B-03	AB175357	94				2	1	7	3	1	3	1			5	1	1			
	Uncultured bacterium clone: MBA09	AB114319	91										1				2	7			
	Uncultured bacterium: tbr1-9	AF280824	93									3	1				3	2			
	Unidentified bacterium clone: TUG13	AB011341	93										7	4	4	2	9	7			
		その他			38	24	23	22	6	9	8	24	15	23	28	21	24	31	43		

また、Horiほか⁹⁾はプロピオン酸蓄積時において、*Methanothermobacter*と*Methanoculleus*の菌数の増減が反対の応答を示すことを示している。本論文ではプライマーとしてUniv.519F-Univ.1406Rを用いており、酸生成に関わると考えられる細菌群が多数検出され、相対的にメタン生成細菌の検出割合が低下していた。このため、酢酸利用と水素利用のメタン生成菌の挙動など、古細菌の詳細な変動の把握は難しいと考えられ、ラボスケール反応器と実施設でプロピオン酸蓄積時の古細菌の検出傾向は異なっていた。古細菌のみを対象としたプライマーを用いることで、古細菌の挙動についてより詳細な検討が可能に

なると考えられる。

反応器の運転において、従来の処理状況の分析のみならず、微生物群集の分析も行うことで、より安定した運転の管理につながるものと考えられる。本研究では、ランダムクローニング法により微生物群集の解析を行っており、現場での運転管理に日常的に適用するのは難しい。しかしながら、本研究により、処理状況を反映する重要な微生物群は示されている。今後は、これらの微生物群のみの定量を行うことで対応可能である。例えば、これらの微生物群を特異的に検出するためのプライマーを設計し、Real Time PCR法により定量する場合、本研究のような手

間や費用はかからないので、現場での運転管理にも適用可能であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、ランダムクローニング法により、生ごみを対象とした、ラボスケールおよび実施設の高温メタン発酵槽における微生物群集解析を経目的に試みた。以下に得られた結論をまとめる。

- 1) ラボスケール反応器から最も多く検出されたのは、*Bacillus infernus*, Uncultured bacterium clone g3C1, および Uncultured bacterium clone MBA08などに近縁な種であった。これらはいずれも、加水分解および酸発酵過程に関わる微生物と考えられた。
- 2) ラボスケール反応器において、メタン発酵槽の運転で特に問題となるプロピオン酸蓄積と、*Bacillus infernus*に近縁な種の占有率の増減傾向の類似していることが示された。
- 3) 実施設反応器においては、種汚泥として下水汚泥発酵槽からの汚泥を投入しており、運転開始時に検出された *Coprothermobacter* spp. および Unidentified bacterium clone: TUG22 に近縁な種は、運転開始後数ヶ月でほとんど検出されないようになった。そして、次第に人工生ごみを対象としているラボスケール反応器と同様の菌相へと変化した。
- 4) 処理状況を反映する重要な微生物群が示されてたので、今後は、例えば、これらの微生物群を特異的に検出するためのプライマーを設計し、Real Time PCR法により定量することにより、これらの微生物群の定量が、現場でも適用可能であり、運転管理に役立つ情報となるものと考えられる。

謝辞：本研究は、科学技術振興機構の戦略的基礎研究推進事業(CREST)の一環で行った研究であり、関係各位に謝意を表します。

参考文献

- 1) 津野 洋, 永禮英明, 日高 平：資源回収型の都市廃水・廃棄物処理システム技術の開発, 計測と制御, Vol.45, No.10, pp.851-856, 2006.
- 2) 洪 鋒, 津野 洋, 日高 平, 千 智勲：1日1回給餌操作での高濃度高温メタン発酵の生ごみ処理への適用性と操作因子に関する研究, 環境工学研究論文集, Vol.40, pp.333-342, 2003.
- 3) 洪 鋒, 津野 洋, 日高 平, 千 智勲：1日1回給餌操作での生ごみの高温メタン発酵特性に関する研究, 廃棄物学会論文誌別冊, Vol.15, No.5, pp.381-388, 2004.
- 4) 坂本 勝, 鈴木昌治, 李 玉友, 野池 達也：好気性可溶化プロセスを適用した生ごみの二相式メタン発酵特性：好気性可溶化プロセスの評価, 廃棄物学会誌, Vol.16, No.5, pp.369-377, 2005.
- 5) 大羽美香, Sangsan TEEPYOBON, 安納幸子, 李 玉友, 野池達也：PCR-DGGE法を用いた廃棄物系バイオマスのメタン発酵槽における微生物群集構造の解析, 土木学会論文集, No.804, pp.33-42, 2005.
- 6) 大羽美香, 李 玉友, 野池達也：二相循環式水素・メタン発酵プロセスにおける微生物群集の構造解析, 水環境学会誌, Vol.29, No.7, pp.399-406, 2006.
- 7) Leven, L., Eriksson, A. R. B. and Schnurer, A.: Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste, *FEMS Microbiol Ecology*, Vol.59, pp.683-693, 2007.
- 8) 小林拓朗, 李 玉友, 原田秀樹：余剰活性汚泥の高温嫌気性消化における微生物群集の構造及び多様性の解析, 水環境学会誌 Vol.30, No.7, pp.369-375, 2007.
- 9) Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. and Igarashi Y.: Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.72, No. 2, pp.1623-1630, 2006.
- 10) 谷川 昇, 武本敏男, 大木秀男, 川崎照夫：生ごみの細組成, 都市清掃, Vol.50, No.217, pp.103-109, 1997.
- 11) 日本下水道協会：下水試験方法-1997年版-, 1997.
- 12) Cheon, J., Hong F., Hidaka, T., Koshikawa, H. and Tsuno, H.: Microbial population dynamics in a thermophilic methane digester fed with garbage, *Water Science and Technology*, Vol.55, No.10, pp.175-182, 2007.
- 13) Cheon, J.: Characterization and monitoring of microbial diversity in anaerobic bioreactor based on 16S rDNA, 京都大学博士学位論文, 2006.
- 14) Lane, D. J.: 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Chichester: Wiley, pp.115-175, 1991.
- 15) Griffin, M. E., McMahon, K. D., Mackie, R. I. and Raskin, L.: Methanogenic Population Dynamics during Start-Up of Anaerobic Digesters Treating Municipal Solid Waste and Biosolids, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.57, No.3, pp.342-355, 1998.
- 16) McMahon, K. D., Stroot, P. G., Mackie, R. I. and Raskin, L.: Anaerobic Codigestion of Municipal Solid Waste and Biosolids Under Various Mixing Conditions II: Microbial Population Dynamics, *Water Research*, Vol.35, No.7, pp.1817-1827, 2001.
- 17) Boone, D. R., Liu, Y., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O., and Aldrich, H. C.: *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Anaerobe from the Deep Terrestrial Subsurface, *International Journal of Systematic Bacteriology*, pp.441-448, 1995.
- 18) Van Dyke, M. I. and McCarthy, A. J.: Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.68, No.4, pp.2049-2053,

2002.

19) Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, M. S. and Kida, K. : The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water Research*, Vol.38, No.10, pp.2537-2550, 2004.

20) Garcia, J. L., Patel, B. K. C. and Ollivier, B. : Taxonomic, Phylogenetic,

and Ecology diversity of Methanogenic Archaea, *Anaerobe*, Vol.6, No.4, pp.205-226, 2000.

21) 朝平晃章 : 16S rDNAに基づく高温メタン発酵槽の同定微生物の定量に関する研究, 京都大学修士論文, 2006.

(2007. 5. 25 受付)

Microbial Community Analysis in Thermophilic Methane Fermenters of Kitchen Waste

Jihoon CHEON¹, Taira HIDAKA^{1*}, Feng HONG¹, Hiromoto KOSHIKAWA²,
Daisuke IWASAKI³, and Hiroshi TSUNO¹

¹ Dept. of Urban and Environmental Engineering, Kyoto University

² Dept. of Environmental Solution Technology, Ryukoku University

³ Sewerage Engineering Dept., Takuma Co. Ltd.

Microbial community in a thermophilic lab-scale methane digester and a full-scale methane digester for treatment of kitchen waste were analysed by random clone method. The lab-scale reactor was continuously operated with increasing organic loading ratio from 20.5 to 35.9 kgCOD/(m³·d). The most detected clone was closely related to *Bacillus infernus*. *Methanoculleus thermophilus* and *Methanothermobacter wolfeii* were the most detected Archaea. Propionate concentrations increased twice during the operation, and simultaneously the *B. infernus* occupying ratio also increased to 59 %. Increasing tendency of *B. infernus* occupying ratio can be used as a sign of propionate accumulation. The full-scale reactor was inoculated with digested sludge from a sewage treatment plant. After continuously operated with kitchen waste, the microbial diversity became similar to that in the lab-scale reactor fed with the artificial kitchen waste. These results proved the applicability of microbial diversity analysis to discuss the reactor operation.