

## (83) 温度フェーズと中間オゾン処理を組合わせたプロセスによる余剰汚泥嫌気性消化の促進効果

小林 拓朗<sup>1</sup>・李 玉友<sup>1\*</sup>・原田 秀樹<sup>1</sup>・安井 英斉<sup>2</sup>・野池 達也<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579宮城県仙台市荒巻字青葉6-6-06)

<sup>2</sup>栗田工業株式会社 開発本部 (〒329-0105栃木県下都賀郡野木町川田五町山一番地一号)

<sup>3</sup>日本大学大学院総合科学研究科 (〒102-0073東京都千代田区九段北4-2-1)

\* E-mail: yyli@ep11.civil.tohoku.ac.jp

高温消化と中温消化を組合わせたTMプロセスと、高温消化、オゾン処理及び中温消化を組合わせたTOMプロセスを用いて、温度フェーズと中間オゾン処理による余剰汚泥嫌気性消化の促進効果を検討した。また、分子生物学的手法を用いて各プロセスの微生物群集構造を解析した。メタンガス生成収率、COD<sub>Cr</sub>分解率、消化汚泥凝集性はTOM>TMであり、脱水ろ液の性状は同等であった。温度フェーズの効果として高温消化の高い加水分解能力を持つと共に、後段の中温消化槽により残留溶解性成分が除去され凝集性及び脱水ろ液のCOD<sub>Cr</sub>が高温消化よりも改善された。TOMプロセスにおける中間オゾン処理の効果として、前処理と比較してオゾン添加量を節約でき、オゾン処理による高温消化槽由来の微生物群の死滅がTOMプロセスにおける固形性COD<sub>Cr</sub>分解促進に寄与したと考えられた。TOMプロセスでは温度フェーズと中間オゾン処理の総合効果により、COD<sub>Cr</sub>分解率は単槽中温消化の約1.36倍の数値を示した。

**Key Words :** anaerobic digestion, waste activated sludge, temperature-phase, intermediate ozonation

### 1. はじめに

下水汚泥の嫌気性消化は古くから適用されている汚泥安定化技術であるが、近年はバイオマスエネルギー回収技術として注目されている<sup>1)</sup>。下水汚泥は初沈汚泥と余剰汚泥で構成されるが、中温消化における余剰汚泥の分解率は40%程度と低く<sup>2)</sup>、分解率の向上が望まれている。嫌気性消化は加水分解・酸生成・水素酢酸生成・メタン生成の4段階からなる反応である。余剰汚泥の嫌気性消化は、加水分解段階が律速であると言われており<sup>3)</sup>、高温消化や、物理化学的前処理によって加水分解を促進する試みが近年注目されている<sup>3,4)</sup>。

高温消化は一般的に反応速度が速い反面、運転の不安定性や消化脱離液の水質悪化といった問題が指摘されている。しかし、近年になって高温消化と中温消化を組み合わせ、高温消化の利点を生かしつつ、安定性や脱離液の水質悪化といった欠点を中温消化で補う温度フェーズ嫌気性消化(TPAD)プロセスが開発され<sup>5)</sup>、TPADプロセスによる研究が行われている<sup>7,8)</sup>。余剰汚泥を単独の基質とした研究はまだ行われていない。

余剰汚泥を基質とする嫌気性消化において、高温消化は中温消化と比較してCOD分解率とVSS分解率が大い。しかし、溶解性COD成分が分解されずに残留するため消化汚泥の脱水性が悪化するという問題があった<sup>10)</sup>。高温消化で残留するのは主にタンパク質であるが、残留する溶解性タンパク質は中温消化において分解可能であることが示唆された<sup>11)</sup>。従って、高温消化の後段に中温消化を設置することにより、高温消化の高いVSS分解率を保持しつつ、中温消化で残留溶解性COD成分の分解を行うことで脱水性の改善が期待できる。

オゾン処理は余剰汚泥の嫌気性消化における前処理技術として検討されている。処理に際して添加するオゾン濃度については汚泥中の固形物濃度に応じて決定するのが一般的である。しかし、コスト面から考えた場合、オゾン添加量は可能な限り節約することが望ましい。Goelらは<sup>12)</sup>、消化槽投入前の基質汚泥ではなく、流出消化汚泥の半量に対してオゾン処理を行った後に返送し、基質汚泥と混合して再び嫌気性消化を行うオゾン後処理循環のフローを示した。後処理では、オゾン処理を行う対象が嫌気性消化で減量化された未消化成分となるため、消

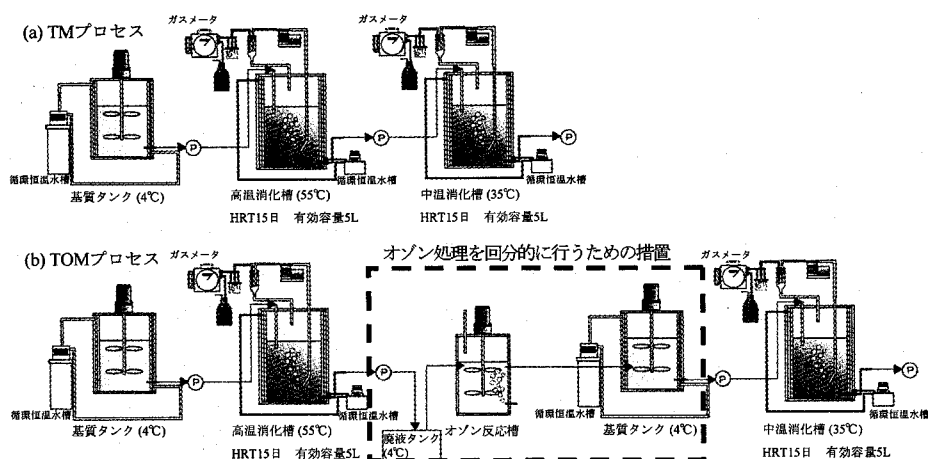


図-1 本研究に用いた実験装置の概略図

化槽において分解されにくい成分に対して少ないオゾン添加で効率よくオゾン反応が行えると考えられる。本研究では、2槽から構成される温度フェーズのプロセスの特徴を生かし、前段の消化槽の流出汚泥に対してオゾン処理を行う中間オゾン処理を新たに検討した。中間処理が後処理循環と異なる点は、後処理循環では流出汚泥の半分に対してオゾン処理を行い、残り半分はそのまま流出させてしまうのに対し、中間処理では前段の消化汚泥の全量に対してオゾン処理を行うことができる。

本研究では、容積比1:1で高温消化槽の後段に中温消化槽を設置したTMプロセスと、高温消化槽の廃液を中間オゾン処理してから中温消化槽に投入するTOMプロセスの2つのプロセスで余剰汚泥を基質とする連続運転を行った。また、両プロセスの微生物群集構造について分子生物学的解析を行い、両プロセスの分解メカニズムの違いを考察した。

## 2. 実験方法

### 2.1 消化槽運転条件

連続実験装置の概要を図-1に示す。消化槽は全て有効容量5Lのガス攪拌方式のCSTRである。(a)に示すTMプロセスは基質タンク(4°C)、HRT15日の高温消化槽(55°C)とHRT15日の中温消化槽(35°C)からなり、各消化槽への投入及び排出は、タイマー制御で2時間に1回ポンプで行った。(b)に示すTOMプロセスは、基質タンク(4°C)、HRT15日の高温消化槽(55°C)、廃液タンク(4°C)、オゾン反応槽、第2基質タンク(4°C)及びHRT15日の中温消化槽(35°C)からなり、各消化槽への投入排出は2時間に1回ポンプで行った。オゾン処理は、室内実験において1つの槽で連続的に行うことが難しいため、図-1において点線で囲んだ回分的にオゾン反応を行うための装置を作成し

表-1 基質余剰汚泥の平均性状

|                                 |      |           |
|---------------------------------|------|-----------|
| TS                              | g/L  | 45.9±0.7  |
| VS                              | g/L  | 34.6±0.6  |
| SS                              | g/L  | 39.4±1.1  |
| VSS                             | g/L  | 33.6±0.8  |
| T-COD <sub>Cr</sub>             | g/L  | 58.3±2.1  |
| T-タンパク質                         | g/L  | 17.1±1.8  |
| T-炭水化物                          | g/L  | 4.9±0.4   |
| 脂質                              | g/L  | 2.5±1.2   |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | mg/L | 770±19    |
| T-P                             | mg/L | 2260±122  |
| pH                              | -    | 6.00±0.04 |

た。装置は3つの槽に分かれる。まず、廃液タンクで高温消化槽の汚泥をオゾン処理の必要量に達するまで蓄えた。この汚泥をオゾン反応槽に移し、0.02g/g-TSの反応率で回分的に反応させ、第2基質タンクから中温消化槽へ投入した。種汚泥には余剰汚泥を基質として35°Cまたは55°Cで約1年間馴致したものを用いた。基質はM県流域浄化センターから3-4週間毎に採取した余剰汚泥を基質タンクで4°Cに保持した。基質の平均性状を表-1に示す。

### 2.2 水質分析方法

pH, TS, VS, SS, VSS, T-P, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Pの分析は下水試験方法に基づいて行った。COD<sub>Cr</sub>はStandard methodに準拠した。炭水化物の分析はフェノール-硫酸法、タンパク質の分析はLowry法、脂質の分析はBligh-Dyer法にそれぞれ準じて行った。Soluble成分は、試料を3000rpmで10分遠心分離した後の上澄み液と定義した。ガス組成はTCDガスクロマトグラフ(SHIMADZU GC-8A型)を用いて分析した。VFAの分析はFIDガスクロマトグラフ(Agilent 6890型)を用いた。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Nの分析にはキャピラリー電気泳動測定器(Photol, CAPI-3200, Otsuka)を用いた。汚泥の凝集性は、消化汚泥の脱水実験によく用いられる高カチオン系高分子凝集剤ポリアミジン(ハイモロック ZP-700, ハイモ)を用いて測定した<sup>1)</sup>。測定は、30mlの

表2 クローン解析及び Real-time PCR に用いたプライマー

| Application      | Primer               | Specificity                   | Sequence 5'→3'             | Annealing(°C) | Reference |
|------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------|-----------|
| (1)クローン解析        | EUB338-mix-F         | 真正細菌                          | ACW CCT ACG GGW GGC WGC    | 50            | 14,15     |
|                  | UNIV1500R            | Universal                     | GGT TAC CTT GTT ACG ACT T  | 50            | 16        |
|                  | A109F                | 古細菌                           | ACK GCT CAG TAA CAC GT     | 50            | 17        |
|                  | ARC1059R             | 古細菌                           | GCC ATG CAC CWC CTC T      | 50            | 18        |
| (2)Real-time PCR | S-D-Bact-0348-S-a-17 | 真正細菌                          | AGG CAG CAG TDR GGA AT     | 53            | 19        |
|                  | S-D-Bact-0786-A-a-20 | 真正細菌                          | GGA CTA CYV GGG TAT CTA AT | 53            | 19        |
|                  | COP1029f             | <i>Coprothermobacter</i> spp. | ACA GGT GTT GCA TGG CTG TC | 60            | 20        |
|                  | COP1179r             | <i>Coprothermobacter</i> spp. | CTC CCC TTC CTC TGG CTC TT | 60            | 20        |
|                  | S-G-Msar-0450-S-a-19 | <i>Methanosarcina</i> spp.    | TAG CAA GGG CCG GGC AAG A  | 55            | 21        |
|                  | S-G-Msar-0589-S-a-20 | <i>Methanosarcina</i> spp.    | ATC CCG GAG GAC TGA CCA AA | 55            | 21        |

消化汚泥に対して 0.5%ポリアミジンを滴下しながら攪拌し、ブロックの形成開始が目視で確認できた時点でのポリアミジン添加量を凝集性とした。

## 2.3 クローン解析及びReal-time PCRの分析方法

消化槽運転100日目のTMプロセス高温消化槽及び中温消化槽、TOMプロセス高温消化槽及び中温消化槽より採取した4種の消化汚泥について、それぞれUltra Clean Soil DNA Isolation Kit(MO-BIO)を用いて抽出したDNAをクローン解析に使用した。プライマーは真正細菌は表-2に示すEUB338-mix-F<sup>14)</sup>とUNIV1500R<sup>16)</sup>、古細菌はA109F<sup>17)</sup>とARC1059R<sup>18)</sup>の組み合わせでTaKaRa PCR Thermal Cycler DiceによりDNA増幅を行った。PCR条件は94℃、5分ー(94℃、30秒ー50℃、40秒ー72℃、2分)×30cycleー72℃、7分とした。PCR産物はS-300 (GEヘルスケア)を用いて精製し、TOPO TA Cloning kit(invitrogen)によりクローン化した。形成されたコロニーから無作為に釣菌し、16S rDNA断片を回収してCEQ8000(BECKMAN COULTER)を用いて塩基配列を決定した。OTUは制限酵素HaeIIIによる切断パターンに基づいて分類した。得られた塩基配列はBLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast.html>)により相同性検索を行った。

Real-time PCRに用いたDNAは、運転95, 100, 120日目のTMプロセス高温消化槽、TMプロセス中温消化槽、TOMプロセス高温消化槽、TOMプロセス中温消化槽より採取した消化汚泥から上記と同様に抽出したものを用いた。Real-time PCRはLight Cycler(Roche)により、Fast Start DNA Master SYBR GREEN I Kit(Roche)を用いて行った。表-2に示したプライマーを用いて真正細菌はS-D-Bact-0348-S-a-17<sup>19)</sup>とS-D-Bact-0786-A-a-20<sup>19)</sup>、*Coprothermobacter*属細菌はCOP1029fとCOP1179r<sup>20)</sup>、*Methanosarcina*属古細菌はS-G-Msar-0450-S-a-19とS-G-Msar-0589-S-a-20<sup>21)</sup>の組み合わせでPCRを行った。検量線作成のための標準DNAとして、真正細菌はTM高温槽消化汚泥から抽出したDNAをEUB338-mix-F&UNIV1500RでPCRしたものを、*Coprothermobacter*属細菌は以前の研究で得られた*Coprothermobacter*属細菌のクローンをEUB338-mix-F&UNIV1500RでPCRしたものを精製して使用した。*Methanosarcina*属古細菌は以前の研究で得られた*Methanosarcina*属のクローンをA109F&ARC1059RでPCRしたものを精製して用いた。

## 3. 実験結果

### 3.1 TM及びTOMプロセスの運転結果

#### a) プロセス運転経過

TM及びTOMプロセスは、HRT30日で123日間の運転を行った。図-2と図-3にそれぞれTM及びTOMプロセスの運転状況を示す。HRTの3倍である運転90日目以降はガス生成速度、pH、VFAそれぞれが安定したため、この時期を定常状態と定義した。

#### b) 定常状態における各消化槽の運転結果

表-3に各プロセス各消化槽の定常状態における分析データの平均値を示す。図-2、図-3と対応して、pHはTM及びTOMプロセスの各消化槽において、嫌気性消化の適正範囲である7~8の間で推移していた。消化槽のVFAは、TMプロセス高温消化槽で平均 $244 \pm 115 \text{mg-HAc/L}$ 、中温消化槽で平均 $27 \pm 54 \text{mg-HAc/L}$ であった。TOMプロセスでは高温消化槽で平均 $173 \pm 51 \text{mg-HAc/L}$ 、中温消化槽では平均 $0 \pm 0 \text{mg-HAc/L}$ であった。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度は各消化槽で2300~2400mg/L程度で顕著な差はなかった。ポリアミジン添加量でみた凝集性は、TM、TOMプロセスともに高温消化槽と比較して中温消化槽で改善した。消化槽単位容量あたりのメタンガス生成速度は、TMプロセスでは定常状態において高温消化槽で平均 $0.56 \pm 0.05 \text{L/Ld}$ 、中温消化槽で平均 $0.07 \pm 0.01 \text{L/Ld}$ となり、メタン生成は約9割が高温消化槽に由来していた。一方、TOMプロセスでは定常状態において高温消化槽で平均 $0.56 \pm 0.06 \text{L/Ld}$ 、中温消化槽で平均 $0.16 \pm 0.04$ であり、生成したメタンは約78%が高温消化槽、約22%が中温消化槽に由来していた。

### 3.2 TM及びTOMプロセスの処理性能比較

表-4に定常状態におけるTM及びTOMプロセスの処理性能を項目別にまとめて比較した。注目したのは、①ガス生成収率②有機物分解率③凝集性④脱水ろ液の水質の4点である。プロセス全体の投入基質VSあたりのメタンガス生成収率は、TMプロセスが $0.272 \pm 0.026 \text{L/g-VS}$ 、TOMプロセスが $0.307 \pm 0.029 \text{L/g-VS}$ となりTOMのメタン生成速度はTMの約1.13倍であった。

有機物分解率に注目すると、脂質以外の全ての項目で

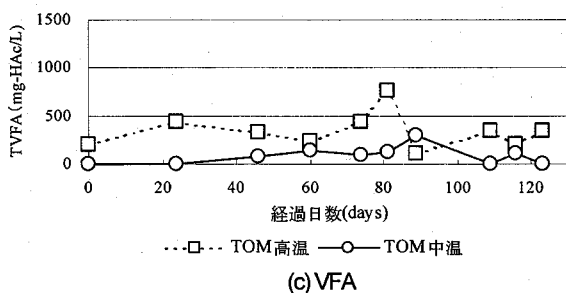
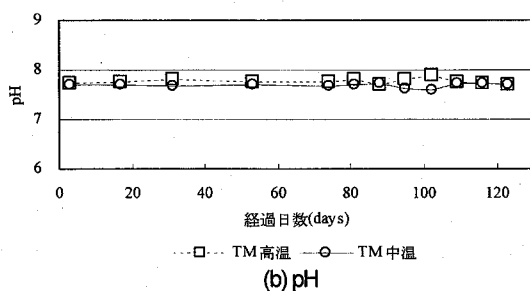
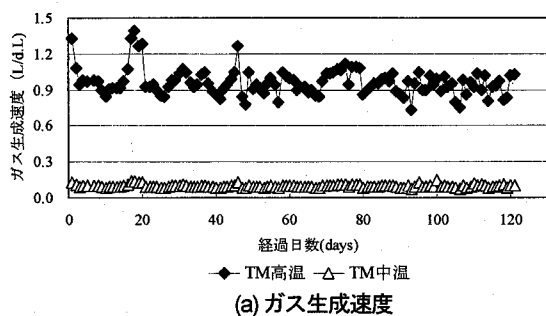


図2 TMプロセスの運転状況

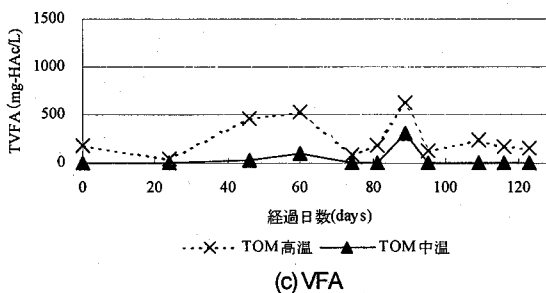
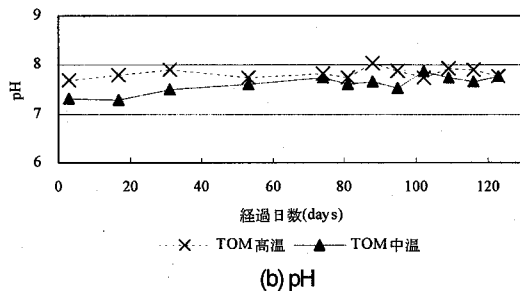
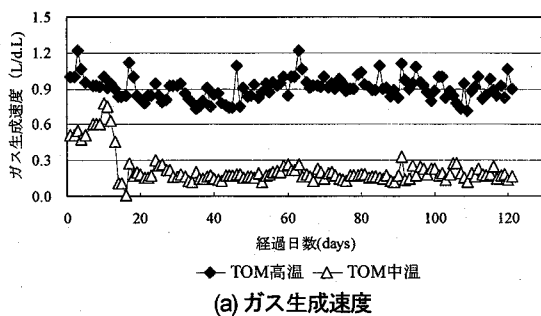


図3 TOMプロセスの運転状況

表-3 定常状態における各消化槽運転結果のまとめ

|       |                                 |                  | TMプロセス    |           | TOMプロセス   |           |          |
|-------|---------------------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
|       |                                 |                  | 高温        | 中温        | 高温        | 中温        |          |
| 消化汚泥  | TS                              | g/L              | 30.6±2.2  | 26.9±2.2  | 30.5±0.5  | 22.3±0.8  |          |
|       | VS                              | g/L              | 20.2±2.0  | 16.5±2.6  | 19.7±0.6  | 13.3±1.1  |          |
|       | SS                              | g/L              | 25.1±1.2  | 19.9±1.6  | 25.0±0.4  | 16.9±1.0  |          |
|       | VSS                             | g/L              | 14.9±1.0  | 13.6±1.4  | 15.2±1.4  | 12.1±1.1  |          |
|       | T-COD <sub>Cr</sub>             | g/L              | 33.0±0.9  | 26.3±1.6  | 32.7±1.9  | 21.4±1.4  |          |
|       | S-COD <sub>Cr</sub>             | g/L              | 13.7±2.0  | 9.0±0.8   | 13.6±0.4  | 7.5±0.5   |          |
|       | T-タンパク質                         | g/L              | 8.4±1.4   | 7.1±0.6   | 8.4±0.6   | 6.1±0.8   |          |
|       | T-炭水化物                          | g/L              | 3.5±1.0   | 3.0±0.7   | 4.0±1.0   | 2.3±0.7   |          |
|       | 脂質                              | g/L              | 1.1±0.1   | 1.2±0.2   | 1.0±0.2   | 1.2±0.1   |          |
|       | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N | mg/L             | 2410±64   | 2460±210  | 2320±51   | 2270±95   |          |
| pH    | -                               | 7.78±0.07        | 7.66±0.07 | 7.84±0.09 | 7.69±0.14 |           |          |
| TVFA  | mg-HAc/L                        | 244±115          | 27±54     | 173±51    | N.D.      |           |          |
| 凝集性   | g/L                             | 1.64±0.21        | 1.16±0.22 | 1.71±0.30 | 0.97±0.18 |           |          |
| バイオガス | ガス生成速度                          | L/L.d            | 0.93±0.10 | 0.09±0.02 | 0.91±0.09 | 0.20±0.05 |          |
|       | ガス組成                            | N <sub>2</sub>   | %         | 1.6±0.8   | 1.8±0.7   | 0.9±0.3   | 4.8±3.1  |
|       |                                 | CH <sub>4</sub>  | %         | 61.3±2.9  | 69.8±4.0  | 62.5±1.9  | 71.4±4.1 |
|       |                                 | CO <sub>2</sub>  | %         | 36.9±2.4  | 30.5±3.1  | 36.7±1.2  | 27.7±3.1 |
|       |                                 | H <sub>2</sub> S | ppm       | 740±141   | 140±57    | 600±30    | 250±71   |
|       |                                 | NH <sub>3</sub>  | ppm       | N.D.      | N.D.      | N.D.      | N.D.     |

表-4 定常状態における TM 及び TOM プロセスの処理性能のまとめ

| ①メタンガス生成収率 |                                  |          | TM        | TOM       |
|------------|----------------------------------|----------|-----------|-----------|
| ②有機物分解率    | CODCr                            | %        | 56.5±2.2  | 63.6±1.7  |
|            | VSS                              | %        | 58.2±5.3  | 62.5±3.3  |
|            | 炭水化物                             | %        | 51.8±5.4  | 58.7±4.4  |
|            | タンパク質                            | %        | 59.5±4.0  | 64.4±5.3  |
|            | 脂質                               | %        | 53.3±6.6  | 52.9±3.6  |
| ③凝集性       |                                  | g/L      | 1.16±0.22 | 0.97±0.18 |
| ④脱水ろ液の水質   | CODCr                            | g/L      | 4.2±0.1   | 4.3±0.1   |
|            | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N  | mg/L     | 2260±102  | 2120±87   |
|            | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P | mg/L     | 1150±42   | 1074±73   |
|            | TVFA                             | mg-HAc/L | N.D.      | N.D.      |

TOMプロセスにおける分解率がTMプロセスのそれを上回っていた。表-1に示したように余剰汚泥の主成分はタンパク質であるが、タンパク質の分解率はTOMプロセスにおいて64.4%、TMプロセスにおいて59.5%と特に高い値を示した。脂質の分解率はTOMプロセスで52.9%、TMプロセスの53.3%とほぼ同じであった。

消化汚泥の凝集性を示すポリアミジン添加量は、TOMプロセスで0.97g/L、TMプロセスで1.16 g/Lとなり、この結果はTOMプロセスの方が凝集性において優れていることを示している。

脱水ろ液は、凝集試験を行った後の汚泥を3000rpm、10分間遠心分離した後の上澄みを分析した。脱水ろ液の性状は、測定項目のCOD<sub>Cr</sub>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P、TVFAのいずれもTMプロセスとTOMプロセスで顕著な違いは見られなかった。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P濃度はどちらのプロセスも約1100mg/Lであり、松尾らが報告している<sup>29)</sup>下水汚泥の消化脱離液中のPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>濃度140～320mg/Lと比較して高かった。この理由は、本研究で基質として用いた余剰汚泥がA<sub>2</sub>O法の活性汚泥であり、TS濃度も約1.3倍であるためであると考えられる。その上、本研究では余剰汚泥単独での嫌気性消化であるため、基質のFe含有量が少なかった可能性も考えられる。VFAはTM、TOMの両脱水ろ液で残留が見られなかった。

以上の各分析項目からTM及びTOMプロセスの運転性能を総括すると、①メタンガス生成収率、②脂質以外の有機物分解率、③消化汚泥の凝集性においてTOMプロ

セスがTMプロセスを上回っていた。④脱水ろ液の性状については顕著な違いは見られなかった。

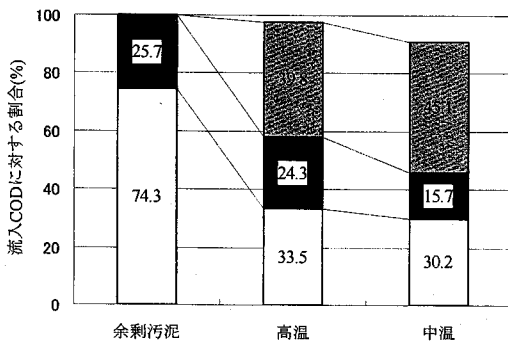
### 3.3 TM及びTOMプロセスのCOD物質収支

TM及びTOMプロセスの各消化槽における物質の流れを把握するため、COD物質収支を図-4に示す。TM、TOM両方の高温消化槽において、流入CODの約40%がメタン化した。TM中温消化槽では高温消化槽で残留したS-CODの約36%は除去されてメタン化した。P-CODの分解はほとんど進行しなかった。TOM中温消化槽では高温消化槽で残留したS-CODが約55%減少しただけでなく、高温消化汚泥のP-COD成分も約28%減少した。

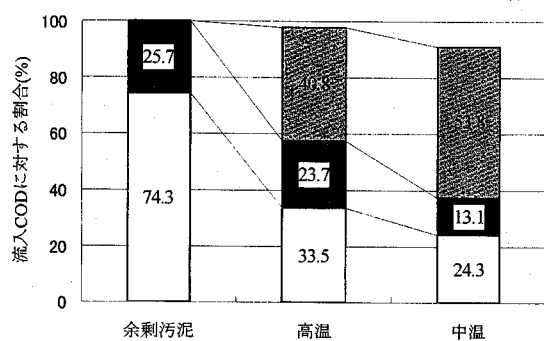
以上の結果から、TM及びTOMプロセスは高温消化槽において流入CODの約40%が除去される。TMプロセスの中温消化槽は高温消化槽で残留したS-CODを除去するのに対し、TOMプロセスの中温消化槽はTMプロセスよりも多くの残留S-COD成分を除去すると共に、P-COD成分の分解も進行した。

### 3.4 TM及びTOMプロセスの各消化槽微生物群集構造解析

TMプロセスとTOMプロセスは異なる2つの消化槽を連結した温度フェーズ消化プロセスである。これらのプロセスでは、前段の高温消化槽の消化汚泥が後段の中温消化槽へ流入する。流入消化汚泥は消化残渣と増殖した



□ P-COD ■ S-COD ▨ メタン  
(a) TM プロセス



□ P-COD ■ S-COD ▨ メタン  
(b) TOM プロセス

図-4 COD 物質収支からみた各プロセスにおける物質の変換

表-5 TM 及び TOM プロセス各消化槽におけるクローンライブラリ

| Library             |                                   | TMプロセス  |         | TOMプロセス |         |
|---------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                     |                                   | 高温      | 中温      | 高温      | 中温      |
| Bacteria            | <i>Firmicutes</i>                 | 95.2%   | 50.8%   | 91.3%   | 24.2%   |
|                     | <i>Coprothermobacter</i>          | (71.4%) | (15.3%) | (69.6%) | (0%)    |
|                     | <i>C.thermocellum</i> relatives   | (8.6%)  | (3.4%)  | (0%)    | (0%)    |
|                     | <i>B.thermocloaceae</i> relatives | (4.3%)  | (1.7%)  | (4.3%)  | (0%)    |
|                     | <i>Proteobacteria</i>             | 0%      | 3.4%    | 4.3%    | 16.7%   |
|                     | <i>Bacteroidetes</i>              | 4.8%    | 30.5%   | 4.3%    | 54.5%   |
|                     | Others                            | 0%      | 15.3%   | 0%      | 4.5%    |
| No. of total clones |                                   | 23      | 59      | 21      | 66      |
| Archaea             | <i>Methanosaeta</i>               | 0%      | 20.5%   | 0%      | 8.3%    |
|                     | <i>Methanosarcina</i>             | 55.0%   | 38.6%   | 39.0%   | 43.8%   |
|                     | <i>Ms.thermophila</i>             | (55.0%) | (38.6%) | (39.0%) | (43.8%) |
|                     | <i>Methanomicrobiales</i>         | 45.0%   | 29.5%   | 61.0%   | 39.6%   |
|                     | Others                            | 0%      | 18.2%   | 0%      | 8.3%    |
|                     | No. of total clones               | 20      | 44      | 23      | 48      |

嫌気性微生物で構成される。前段と後段で温度条件が異なる本プロセス群においては、後段では前段とは異なる微生物群集が増殖し機能している可能性が高い。そうした場合、前段から流入してくる微生物群が“難分解性成分”として残留することが考えられる。ここでは、TM 及び TOM プロセスにおいて、高温消化槽から中温消化槽に流入する高温嫌気性微生物群の挙動に注目した。高温消化槽の微生物がそのまま流入してくる TM 中温消化槽と、中間オゾン処理によって高温消化槽の微生物が死滅して流入してくると考えられる TOM 中温消化槽の微生物群集構造の違いに焦点を当てて解析を行った。

#### a) 16S rRNA 遺伝子クローン解析

TM, TOM プロセス各消化槽の真正細菌クローンライブラリの比較を表-5に示す。高温消化槽では、両プロセスともにライブラリにおける90%以上のクローンは *Firmicutes* に属しており、70%程度のクローンは、高温性タンパク質分解細菌の *Coprothermobacter* sp. P1 (AB162803) に98%の相同性を示した。

中温消化槽では、特徴的な傾向として TM プロセスでは高温消化槽由来と考えられる細菌のクローンが検出されたのに対し、TOM プロセスからは検出されなかった。TM 中温消化槽では高温消化槽で検出されたクローンと同じ塩基配列を持つ *Firmicutes* に属するクローンは3種類検出された。まず、ライブラリの15%にあたる9クローンは *Coprothermobacter* sp. P1 に98%の相同性を示した。また、2クローンは *Clostridium thermocellum* (L09173) に相同性92%であり、1クローンは *Bacillus thermocloaceae* (Z26939) に89%の相同性を示した。一方で、高温消化槽

で検出されたクローンと同じ塩基配列を持つクローンは検出されなかった。

TM, TOM プロセス各消化槽の古細菌クローンライブラリを表-5に示す。高温消化槽では、TM プロセスで55%、TOM プロセスで39%のクローンは酢酸資化性メタン生成古細菌である *Methanosarcina thermophila* (M59140) に98%の塩基配列の相同性を示した。

中温消化槽における特徴として、TM プロセスと TOM プロセスの両方において、高温消化槽由来と考えられる古細菌のクローンは約40%検出された。TM プロセスでは、約40%のクローンは高温性酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosarcina thermophila* に98%の相同性を示した。一方で、TOM プロセスでも43.8%のクローンは、高温性酢酸資化性メタン生成古細菌の *Methanosarcina thermophila* に98%の相同性であった。

以上の結果は、高温消化槽では両プロセスとも真正細菌は *Coprothermobacter* 属細菌、古細菌は *Methanosarcina thermophila* のクローンが主要な割合を占めていたことを示している。TM プロセス中温消化槽では真正細菌ライブラリの約20%にあたる *Firmicutes* の、*Coprothermobacter* 等の細菌のクローンは高温消化槽で検出されたものと同種の細菌のクローンであった。これに対し TOM プロセス中温消化槽では、真正細菌ライブラリにおいて高温消化槽で検出されたものと同種の細菌のクローンは検出されなかった。古細菌ライブラリでは、両プロセスとも、40%程度が高温消化槽で検出された *Methanosarcina thermophila* のクローンであった。

#### b) 16S rRNA 遺伝子の Real-time PCR による定量

表-6 TM 及び TOM プロセスにおける 16S rRNA 遺伝子の定量(copies/μg)

| Target   |                               | TMプロセス                      |                             | TOMプロセス                     |                             |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|          |                               | 高温                          | 中温                          | 高温                          | 中温                          |
| Bacteria | Bacteria                      | $(1.6 \pm 0.3) \times 10^8$ | $(6.4 \pm 0.7) \times 10^7$ | $(1.4 \pm 0.3) \times 10^8$ | $(4.1 \pm 0.5) \times 10^7$ |
|          | <i>Coprothermobacter</i> spp. | $(1.2 \pm 0.2) \times 10^8$ | $(2.9 \pm 0.1) \times 10^7$ | $(1.0 \pm 0.1) \times 10^8$ | $(6.2 \pm 0.2) \times 10^4$ |
| Archaea  | <i>Methanosarcina</i> spp.    | $(2.1 \pm 0.2) \times 10^7$ | $(1.4 \pm 0.1) \times 10^7$ | $(2.4 \pm 0.2) \times 10^7$ | $(1.9 \pm 0.1) \times 10^6$ |

表-7 余剰汚泥の嫌気性消化プロセス処理性能の比較

| 比較項目                 | 単位                               | 本研究       |           | 対照                   |                      |                            |                            |
|----------------------|----------------------------------|-----------|-----------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
|                      |                                  | TM        | TOM       | 中温消化 <sup>(10)</sup> | 高温消化 <sup>(10)</sup> | オゾン前処理中温消化 <sup>(10)</sup> | オゾン前処理高温消化 <sup>(10)</sup> |
| No.                  |                                  | 1         | 2         | 3                    | 4                    | 5                          | 6                          |
| HRT                  | 日                                | 30        | 30        | 30                   | 30                   | 30                         | 30                         |
| 流出汚泥VSS濃度            | g/L                              | 13.6±1.4  | 12.1±1.1  | 20.8±1.2             | 14.4±1.4             | 17.8±1.6                   | 15.2±1.1                   |
| COD <sub>C</sub> 分解率 | %                                | 56.5±2.2  | 63.6±1.7  | 46.8±2.8             | 50.3±6.5             | 50.3±2.3                   | 48.2±3.1                   |
| VSS分解率               | %                                | 58.2±5.3  | 62.5±3.3  | 40.6±3.0             | 58.9±5.2             | -                          | -                          |
| 凝集性(ポリアミン添加量)        | g/L                              | 1.16±0.22 | 0.97±0.18 | 0.65±0.06            | 1.85±0.37            | 0.73±0.10                  | 1.78±0.31                  |
| オゾン反応量               | g/L                              | -         | 0.61±0.01 | -                    | -                    | 1.16±0.01                  | 1.16±0.01                  |
| 脱水ろ液の性状              | COD <sub>Cr</sub>                | g/L       | 4.2±0.1   | 4.0±0.1              | 8.0±0.3              | -                          | -                          |
|                      | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N  | mg/L      | 2260±102  | 2120±87              | 1890±78              | 1820±102                   | -                          |
|                      | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P | mg/L      | 1050±42   | 1073±73              | -                    | -                          | -                          |
|                      | TVFA                             | mg-HAc/L  | N.D.      | N.D.                 | N.D.                 | N.D.                       | -                          |

前項a)では、中温消化槽のクローンライブラリにおける特徴として、TMプロセスでは高温消化槽のものと同じ*Coprothermobacter*属細菌と*Methanosarcina thermophila*のクローンが検出され、TOMプロセスでは高温消化槽のものと同じ*Methanosarcina thermophila*のクローンが検出された。そこで、Real-time PCRを用いて*Coprothermobacter*属細菌と*Methanosarcina*古細菌のrDNA濃度について、各プロセスの高温消化槽と中温消化槽で比較をおこなった。表-6にTM及びTOMプロセス各消化槽における16S rRNA遺伝子の濃度を、Real-time PCRによって測定した結果を示す。ここで示した結果は、運転95, 100, 120日目の3サンプルの測定値の平均値である。TM中温消化槽とTOM中温消化槽を比較すると、*Coprothermobacter*属細菌の16S rRNA遺伝子の濃度はTMプロセスで $2.9 \times 10^7$  copies/ $\mu$ gであるのに対して、TOMプロセスではそれより3オーダー低い $6.2 \times 10^4$  copies/ $\mu$ gであった。TMプロセスでは、中温消化槽の真正細菌rDNA濃度は高温消化槽の約1/2、*Coprothermobacter*属細菌のrDNA濃度は約1/4であった。TOMプロセスでは、中温消化槽の真正細菌rDNA濃度は高温消化槽の約1/3、*Coprothermobacter*属細菌のrDNA濃度は1/1000以下であった。*Ms.thermophila*のrDNA濃度は、TM中温消化槽において高温消化槽と同じオーダーの $1.4 \times 10^7$  copies/ $\mu$ gであり、TOM中温消化槽においては、高温消化槽及びTM中温消化槽より1オーダー低い $1.9 \times 10^6$  copies/ $\mu$ gであった。

これらの結果から、TOM中温消化槽ではTM中温消化槽より、*Coprothermobacter*属細菌のrDNAは3オーダー多く減少し、*Ms.thermophila*のrDNAは1オーダー多く減少していることが示された。

## 4. 考察

### 4.1 温度フェーズと中間オゾン処理の効果

TM及びTOMプロセスにおける、温度フェーズと中間オゾン処理の効果を明らかにするため、本研究と同じ浄化センターから採取した余剰汚泥を基質とし、同型のC

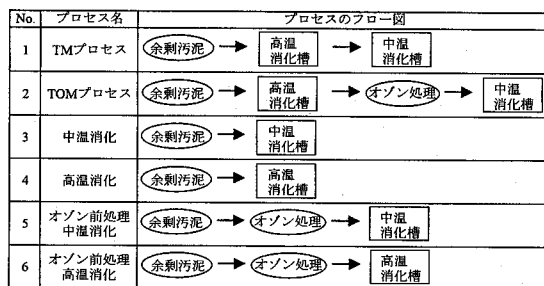


図-5 性能比較を行った各プロセスのフロー図

STR消化槽を用いて、HRT30日で実験を行った図-5に示す各種プロセスとの処理性能の比較を表-7にまとめた。ここで、①有機物分解率(COD<sub>C</sub>分解率、VSS分解率)②消化汚泥凝集性③オゾン反応量④脱水ろ液の性状の4つの指標で比較した。

COD<sub>C</sub>分解率はTOMプロセスが63.6±1.7%と最も高く、中温消化の約1.36倍の分解率であった。TMプロセスもそれに次いで高かった。VSS分解率は、TOMプロセスで最も高い62.5±3.3%であり、TOM>高温消化>TM>中温消化の順であった。従って、有機物分解率についてはTOMプロセスが最も優れた値を示した。

消化汚泥凝集性については、中温消化で0.65±0.06g/Lと最もよく、高温消化で1.85±0.37g/Lと最も悪い数値となった。TOMプロセスは両者の中間で0.97±0.18g/L、TMプロセスは1.16±0.22g/Lであった。高温消化で凝集性が悪化する原因は、溶解性タンパク質成分の残留である。TM及びTOMプロセスは前段が高温消化槽であるが、後段の中温消化槽において溶解性タンパク質成分が分解されるため、温度フェーズの効果により高温消化よりも凝集性が改善したと考えられる。

オゾン反応量は本研究及び対称のプロセスにおいて、余剰汚泥のTS1gあたり0.02gの反応量となるように設定したため、TOMプロセスにおけるオゾン反応量は、オゾン前処理中温及び高温消化と比較して約47%少ない値となった。このことから中間オゾン処理は、高温消化において残留した難分解成分に対し、より少ない反応量で効果的なオゾン反応が行うことができると考えられる。

脱水ろ液の性状は、 $COD_G$ に注目すると高温消化は中温消化の約2倍であった。TMとTOMの $COD_G$ 、 $NH_4^+-N$ 、 $PO_4^{3-}-P$ は同程度であり、 $COD_G$ の値は高温消化と比較して1/2程度であった。この結果は、TM、TOMプロセスは温度フェーズにより中温消化槽で溶解性成分が除去されたことに起因すると考えられる。

以上の比較結果をまとめると、温度フェーズの効果として、高温消化の高い加水分解能力が得られ、高温消化槽の残留溶解性成分が中温消化槽で除去される。その結果、脱水性及び脱水ろ液の $COD_G$ が高温消化よりも改善される。中間オゾン処理は、より少ないオゾン添加量で効果的な処理ができると考えられる。高温消化汚泥の固形性COD成分の分解が促進され、TOM中温消化槽におけるメタン化が進行した。この固形性COD成分の分解促進は、消化汚泥内の微生物の死滅に関係すると思われる。

#### 4.2 中間オゾン処理による微生物群集構造への影響と分解促進

TMプロセスとTOMプロセスの処理性能比較においてTOMプロセスではTMプロセスよりも固形性COD成分の分解が進行した。そのため、オゾン処理による高温消化汚泥の固形分分解促進の効果があったと考えられる。

真正細菌を対象としたクローン解析とReal-time PCRの結果から、TOM中温消化槽ではTM中温消化槽よりも、*Coprothermobacter*属細菌をはじめとする高温性の細菌及び高温性メタン生成古細菌の*Ms. thermophila*のDNA濃度がより大きく減少していることが示唆された。*Coprothermobacter*属細菌及び*Ms. thermophila*は、単槽の高温消化プロセスの真正細菌群集、古細菌群集において、それぞれ主要な構成種であった<sup>20</sup>。また、単槽の中温消化プロセスからは検出されていない<sup>20</sup>。それ故、これらの微生物は高温消化槽に由来すると考えられる。そのため、TOMプロセスでは高温消化槽由来の微生物がオゾンにより死滅し、中温消化槽で分解されたと考えられる。古細菌の*Ms. thermophila*はTOMプロセスにおいても比較的減少量が小さいが、*Methanosarcina*属古細菌には酸素耐性、活性酸素除去機構が報告されているものがある<sup>24,27</sup>ため、オゾンによる酸化作用に対して耐性があつた可能性がある。

これらの結果から、高温消化槽に由来する微生物群の挙動は次のように考えられる。TMプロセス中温消化槽では高温消化槽から流入してきた微生物群が残留するのに対し、TOMプロセス中温消化槽ではオゾン処理によって高温消化汚泥由来の微生物が死滅し、中温消化槽で分解された結果、DNA濃度が大きく減少している。

こうした高温消化槽由来の微生物群分解の可否が、

TMプロセスとTOMプロセスの処理性能の相違に影響を及ぼしていると考えられる。TM及びTOMプロセスの有機物分解機構を考えると、まず余剰汚泥は高温消化槽でメタン、消化残渣、増殖菌体へと転換される。このうち消化残渣と増殖菌体が中温消化槽へと投入され、メタン化された分は液相からのCOD除去となる。TM中温消化槽では高温消化で増殖した微生物群は一部残留するが、TOM中温消化槽ではオゾン処理により高温消化槽の微生物群が死滅し、分解が進行していると考えられる。従って、TMプロセス中温消化槽では、高温消化槽の消化残渣が一部メタンに転換され、消化残渣、中温で増殖した菌体、高温消化槽から流入した微生物群の主に3つが残留COD成分となる。一方、TOMプロセス中温消化槽では、消化残渣と中温で増殖した菌体の主に2つが残留COD成分になると想定される。従って、高温消化槽由来の微生物群がより大きく分解されるTOMプロセスは、固形性有機物分解率がTMプロセスよりも大きくなると推察される。

#### 5. 結論

余剰汚泥の嫌気性消化プロセスであるTMプロセス及びTOMプロセスの連続運転と微生物群集構造解析を行った結果、次の結論を得た。

- (1) TMおよびTOMプロセスにより余剰汚泥の嫌気性消化を行った結果、メタンガス生成収率、 $COD_G$ 分解率はTOM>TM、凝集性のよさはTOM>TMであった。脱水ろ液の性状はTMとTOMで同等であった。
- (2) 温度フェーズの効果として、高温消化の高い加水分解能力を持つと共に、後段の中温消化槽により残留溶解性成分が除去され凝集性及び脱水ろ液の $COD_G$ が高温消化よりも改善される。中間オゾン処理の効果として、前処理と比較してオゾン添加量を節約でき、オゾン処理による高温消化汚泥の固形性COD成分の分解促進効果があった。
- (3) 真正細菌を対象としたクローン解析とReal-time PCRの結果から、TM中温消化槽においてはライブラリの約20%が高温消化で検出されたものと同じクローンであり、*Coprothermobacter*属細菌の16S rRNA遺伝子は高温消化槽の約1/4の濃度で存在していた。これに対してTOM中温消化槽においては、高温消化槽で検出されたものと同じクローンは検出されず、*Coprothermobacter*属細菌の16S rRNA遺伝子は高温消化槽の1/1000以下の濃度であった。
- (4) 古細菌を対象としたクローン解析の結果から、TM及びTOM中温消化槽においてライブラリの約40%が高温消化で検出されたものと同じ*Ms. thermophila*のクローン



であった。Real-time PCRの解析結果からは、TM中温消化槽における*Ms.thermophila*のDNA濃度は高温消化槽と同じオーダーであり、TOM中温消化槽におけるそれは高温消化槽より1オーダー低かった。

謝辞：本研究の一部は、(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託研究プロジェクト「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発／有機物の分解促進による下水汚泥高効率嫌気性消化システムの開発」の一環として実施したものである。ここに記して関係者に感謝いたします。

#### 参考文献

- 李玉友：メタン回収技術の応用現状と展望，水環境学会誌，27，622-626，2007。
- Sangsan, T., 李玉友, 野池達也：濃縮余剰活性汚泥の中温嫌気性消化特性，環境技術，35，668-675，2007。
- Kim, J., C. Park, T. H. Kim, M. Lee, S. Kim, S. W. Kim, and J. Lee：Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge, *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 271-275, 2003。
- Weemaes, M., H. Grootaerd, F. Simoons, and W. Verstraete：Anaerobic digestion of ozonized biosolids, *Wat Res.*, 34, 2330-2336, 2000。
- Gavala, H. N., U. Yenal, I. V. Skiadas, P. Westermann, and B. K. Ahring：Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature, *Wat. Res.*, 37, 4561-4572, 2003。
- Streeter M.D., Dague R.R., Main R.E：Evaluation of a field application, temperature-phased anaerobic digestion, residuals and solids management. Proceedings of the Water Environment Federation 71st Annual Conference and Exposition, *Wat. Environ. Fed.*, Chicago, IL, pp. 181-90, 1997。
- Sung, S., and H. Santha：Performance of temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system treating dairy cattle wastes, *Wat. Res.*, 37, 1628-36, 2003。
- Vandenburgh, S. R., and T. G. Ellis：Effect of varying solids concentration and organic loading on the performance of temperature phased anaerobic digestion process, *Water Environ. Res.*, 74, 142-148, 2002。
- Schmit, K. H., and T. G. Ellis：Comparison of temperature-phased and two-phase anaerobic co-digestion of primary sludge and municipal solid waste, *Water Environ. Res.*, 73, 314-321, 2001。
- Sangsan, T.：濃縮余剰活性汚泥の嫌気性消化特性および前酸化処理による促進効果に関する研究，東北大学博士論文，pp.71-100, 2006。
- 小林拓朗, Sangsan, T., 李玉友, 野池達也：微生物群集構造からみた中温嫌気性消化と高温嫌気性消化の性能比較，第 43 回下水道研究発表会講演集，989-991, 2006。
- Goel, R., Yasui, H., Noike, T.：Closed Loop Anaerobic Digestion Using Pre/post Sludge Ozonation and Effect of Low Temperature on Process Performance, Conference Proceedings, *Anaerobic Digestion of Solid Wastes 2002 conference*, Munich, 18-20, 2002。
- 米本亮介, 坂野幸治：ポリアミジン系凝集剤の難脱水汚泥への応用開発，第 32 回下水道研究発表会講演集，736-738, 1995。
- Amann R. L., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A.：Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1919-1925, 1990。
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H. and Wagner M.：The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set, *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 434-444, 1999。
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.：16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J. Bacteriol.*, 173, 697-703, 1999。
- Grosskopf, R., Janssen, P.H. and Liesack, W.：Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 960-969, 1998。
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. and Hwang, S.：Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction, *Biotechnol. Bioeng.*, 89, 670-679, 2005。
- Takai, K., and Horikoshi, K.：Rapid detection and quantification of members of the Archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5066-5072, 2000。
- 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，30，369-375, 2007。
- Sawayama, S., K. Tsukahara, and T. Yagishita.：Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester, *Bioresour. Technol.*, 97, 69-76, 2006。
- 松尾吉高, 桐山光市：下水汚泥の嫌気性消化—高温消化と中温消化の比較実験，衛生工学研究討論会論文集，17，183-188, 1981。

- 23) 小林拓朗, 李玉友, 原田秀樹 : 濃縮余剰汚泥の中温消化と高温消化の比較—微生物群集構造の変化—, 下水道協会誌, 投稿中, 2007
- 24) Brioukhanov, A., A. Netrusov, M. Sordel, R. K. Thauer, and S. Shima : Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase, *Arch. Microbiol.*, 174, 213-216, 2000.
- 25) Zhang, W., D. E. Culley, L. Nie, and F. J. Brockman : DNA microarray analysis of anaerobic *Methanosarcina barkeri* reveals responses to heat shock and air exposure, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 784-90, 2006.
- 26) Brioukhanov, A. L., A. I. Netrusov, and R. I. Eggen : The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*, *Microbiology*, 152, 1671-1677, 2006.
- 27) Wu X.L, Conrad R : Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stress at two different temperatures, *Environ. Microbiol.*, 3, 355-362, 2001.

(2007.5.25受付)

Upgrading of the anaerobic digestion of waste activated sludge by combining  
temperature-phased anaerobic digestion and intermediate ozonation  
Takuro KOBAYASHI<sup>1</sup>, Yu-You LI<sup>1</sup>, Hideki HARADA<sup>1</sup>, Hidenari YASUI<sup>2</sup>  
and Tatsuya NOIKE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Civil Engineering, Tohoku University

<sup>2</sup>KURITA Water Industries Ltd.

<sup>3</sup>ARISH, Nihon University.

Upgrading of the anaerobic digestion of waste activated sludge (WAS) by the combination of temperature-phased two stage and intermediate ozonation was investigated by a continuous experiment with two processes, TM and TOM. The TM process is a temperature-phased two stage system which consists of a thermophilic digester with 5 liters of volume and mesophilic digester with 5 liters of volume in series. The TOM process is a temperature-phased two stage process with the intermediate ozonation. Two processes were operated at a hydraulic retention times of 30 days for over 123 days. Methane production rate, COD<sub>Cr</sub> removal efficiency and dewaterability of TOM process were superior to those of TM process. It is the effect of temperature-phase that enhancing hydrolysis at thermophilic temperature and degradation of remaining soluble organic matters at mesophilic temperature, which leads to the improvement of dewaterability and decreasing COD<sub>Cr</sub> in the supernatant effluent. The intermediate ozonation can save the ozone dose amount compared to the pretreatment and promote degradation of particle organic matters in the effluent from thermophilic reactor.

The effects of the temperature-phase and the intermediate ozonation resulted in increasing COD<sub>Cr</sub> removal efficiency of TOM process, 1.36 times higher than that of mesophilic anaerobic digestion..