

(82) DHSリアクターによる溶存メタンの 生物学的酸化分解処理

幡本 将史^{1*}・山本 弘毅²・金田一 智規¹・尾崎 則篤¹・大橋 晶良¹

¹広島大学大学院工学研究科 社会環境システム専攻(〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1)

²広島大学工学部 社会基盤環境工学プログラム(〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1)

* E-mail: hatamoto@hiroshima-u.ac.jp

嫌気性の処理水・浸出水などに含まれる溶存メタンの大気への拡散防止を目的として、スポンジ担体を用いた密閉型バイオリアクターを開発し、溶存メタンの処理実験を行った。溶存メタン酸化リアクターの立ち上がりは早く、その後メタン除去速度 $0.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ でメタン除去率95%、メタン除去速度 $1.5 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ でメタン除去率90%を安定して維持した。最大メタン除去速度は $2.2 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ であった。また、メタン酸化はアンモニア酸化よりも酸素に対する親和性が高く、メタン酸化の方が優先して起こる事が分った。

リアクター保持汚泥の微生物叢解析を行ったところ、本リアクターでは γ -*proteobacteria*に属するtype 1と呼ばれるメタン酸化細菌が優占して存在していた。また、酸素供給量が少ない条件ではメタノール酸化性細菌が比較的多く検出されたことから、メタン酸化反応の過程で何らかの中間代謝物が生成している事が示唆された。

Key Words : dissolved methane, anaerobic process effluent, methane oxidizing bacteria

1. はじめに

メタンは地球温暖化に及ぼす影響が CO_2 に次いで2番目に大きいとされている温室効果ガスの1つであり、その排出削減は非常に重要な課題である¹⁾。人間活動に由来するメタン放出源の1つとして廃水・廃棄物の処理がある。特に嫌気性埋立地から放出されるメタンは、地球上の全メタン放出量の6.7%を占める²⁾ほど多量であることから、その回収利用や微生物分解による放出防止技術等が盛んに研究されている。嫌気性廃水処理は消費エネルギーが少ない、メタンガスを回収できる等、近年では温室効果ガスの排出量削減の観点からも注目され、その開発が進められている。しかしながら、これら嫌気性処理プロセスから排出される浸出水もしくは処理水などに含まれる“溶存メタン”に関してはあまり注目されていないのが現状である。とりわけ低濃度の排水を嫌気性処理する場合には、処理水に含まれる溶存メタンによる CO_2 排出当量を考慮すると、エネルギー消費を含めた活性汚泥法による処理全体から排出される CO_2 当量よりも、嫌気性処理法で処理した際に放出される CO_2 当量の方が多いという報告もある³⁾。しかしながら、これら溶存メタンの処理は筆者らの知る限りほとんど行われていないのが現状である。

メタンを酸化分解し大気への放出を防止するため、メタン酸

化細菌を利用したバイオフィルターの研究は既に行われている。これらは土壌やプラスチック製チップ等をメタン酸化細菌の保持担体として用いたバイオフィルターであり、埋立地や家畜排泄物の貯留タンクから発生するメタンの除去^{4,5,6)}、さらには炭坑内のメタン濃度の低減^{7,8)}を目的として研究開発が進められている。これらバイオフィルターは、そのいずれもが空気中のメタン除去を目的としているため、担体の種類やガス流量(ガス滞留時間)等の検討が行われる一方で、水の流入は検討されていない。

溶存メタンを含む嫌気性処理水は溶存メタン以外にもアンモニアや硫化物、有機物といった好気条件下で酸化される還元状態の物質を数多く含んでいる。したがって、溶存メタンの除去を行う場合には、これら共存物質の濃度とともに、アンモニア酸化細菌や従属栄養細菌等の微生物とメタン酸化細菌との競合関係を明らかにした上でなければ、適切な水理学的滞留時間(HRT)や酸素供給量等を設定する事は困難である。これらメタン酸化細菌と競合するであろう微生物やメタン酸化に影響を及ぼす物質については、土壌や底泥などにおいて盛んに研究されている^{9,10,11)}。しかし、自然環境下での知見をそのまま廃水処理系に適用できるのか、など不明な点は数多い。

そこで本研究では、嫌気性処理水・浸出水の溶存メタン除

去システムの構築の端緒として、散水ろ床型リアクターであるDHS (downflow hanging sponge: 下向流懸垂型スポンジ) リアクター¹²⁾を作成し、下水の嫌気性処理水を想定したアンモニアと溶存メタンを含むシミュレーション排水を用いて、メタン酸化とアンモニア酸化に着目し、メタン除去率などの基礎データの収集を行った。また、メタン酸化とアンモニア酸化の競合関係を調査し、溶存メタン酸化に関わる微生物群集を明らかにした。

2. 実験方法

(1) 実験装置および運転条件

実験には直径7 cm、高さ110 cmの円筒形の密閉カラム内に2 cm角のポリウレタン製のスポンジ担体 (容積 248 cm³) をリアクター上部よりひもで吊るした密閉型の懸垂型スポンジ担体リアクターを用いた (図-1)。植種として活性汚泥を水で10倍程度に希釈したものをスポンジ担体にしみ込ませた。メタン

表-1 無機人工排水の組成 (mg/l)

KH ₂ PO ₄	11	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.04
CaCl ₂ ・2H ₂ O	5	CuCl ₂ ・2H ₂ O	0.027
MgCl ₂ ・6H ₂ O	33	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.025
KCl	16	AlCl ₃	0.013
NH ₄ Cl	150	NiCl ₂ ・6H ₂ O	0.024
FeSO ₄ ・7H ₂ O	5.49	Na ₂ SeO ₄	0.002
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.17	Na ₂ WO ₄ ・H ₂ O	0.003
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.15	NaHCO ₃	400
H ₃ BO ₃	0.06		

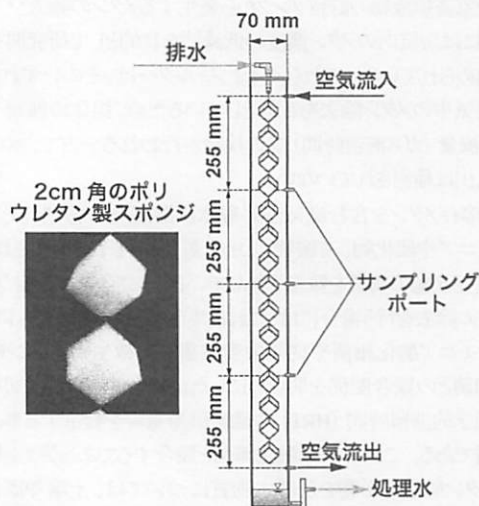


図-1 実験に用いた密閉型の懸垂型スポンジ担体リアクター (密閉型DHSリアクター) の概要

ガス (100%) でバージを行い、メタンを飽和させた無機人工排水 (表-1) をリアクター上部より流下させ、同時にリアクター上部より空気供給を行い、排水中に含まれる溶存メタンの酸化分解を行った。リアクターの運転は、phase 1 (day 0-60): HRT 2時間 (スポンジ担体の体積を基に計算)、空気供給量 0.95 l・day⁻¹, phase 2 (day 61-128): HRT 2時間、空気供給量 2.5 l・day⁻¹, phase 3 (day 129-204): HRT 1時間、空気供給量 2.5 l・day⁻¹, phase 4 (day 205-225): HRT 0.5時間、空気供給量 2.5 l・day⁻¹、の条件で20°Cで行った。

(2) 分析方法

溶存メタン除去性能を調査するため、リアクターの流入・流出の溶存メタン濃度、ガス量・組成などの分析を定期的に行った。溶存メタンの定量には、ヘッドスペースガスクロマトグラフ法を用いた。まず、122 mlのバイアル瓶に処理水を静かにサンプリングし、オーバーフローさせた後、生物学的なメタン酸化を防ぐために20 mMのHgCl₂を1 ml添加しブチルゴム栓で密封した。その後、バイアル瓶内のサンプルをシリンジを用いて20 ml引き抜き窒素ガスと交換し、ヘッドスペースを設けた。バイアル瓶を振とうし、気液平衡状態とした後、ヘッドスペース中のメタン濃度を測定した。リアクター内気相部のガス組成は、サンプリングポートよりガスタイトシリンジを用いて直接ガスを採取し分析した。メタン濃度の測定にはTCD検出器を装備したガスクロマトグラフ (GC-14BPT, SHIMADZU)、酸素濃度の測定にはTCD検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-8A, SHIMADZU) を用いた。また、リアクターの流入水および処理水の各態窒素濃度 (NH₄⁺-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N) は、サンプルを0.2 μmのフィルターでろ過した後、イオンクロマトグラフ (LC-10A, SHIMADZU) を用いて測定した。

リアクターのメタン除去率・除去速度は、流入溶存メタン量とリアクターから排出されるガス中のメタン濃度および流出水中の溶存メタン濃度から計算した。

(3) 汚泥の採取

汚泥のサンプリングはリアクター運転開始後、60日目 (phase 1)、128日目 (phase 2)、177日目 (phase 3)、および225日目 (phase 4) に行った。ひもで吊るしたスポンジ担体全体をリアクターから取り出し、リアクター上部、中部、下部に位置するスポンジそれぞれ1個もしくは2個をPBSバッファーに浸漬し、ピンセットを用いてスポンジから汚泥が出てこなくなるまで採取した。採取した汚泥はPBSバッファーを用いて洗浄し、DNA抽出または汚泥濃度の測定に用いた。

(4) 16S rRNA遺伝子に基づく微生物群集解析

微生物群集解析は60日目と128日目のサンプルについて行った。汚泥からのDNA抽出は、FastDNA SPIN Kit for Soil (QBiogene) を用いて、添付されているプロトコールに従って

行った。抽出したDNAをテンプレートとして、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたプライマーセット (EUB338F/1492R)¹³⁾および、ONE Shot LA PCR MIX (タカラバイオ) を用いて、細菌の16S rRNA遺伝子のPCR増幅を行った。PCR反応は、初期変性を94℃で5分間行い、増幅反応94℃ - 30秒、50℃ - 30秒、72℃ - 1分20秒のサイクルを20サイクル行った後、最後に72℃で4分間の条件で行った。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した後、TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて添付のプロトコールに従ってクローニングを行い、各サンプルのクローンライブラリを作成した。

各クローンの塩基配列はタカラバイオ (株) に解析を委託した。得られた塩基配列は相同性97%以上のものを同一のOTU (Operational Taxonomic Unit) として分類し、各OTUの代表配列を分子系統解析に用いた。分子系統解析にはARBプログラム¹⁴⁾を使用し、アライメントを行った後、近隣結合法を用いて系統樹の推定を行った。系統樹の樹形の確かめは1000回のブートストラップ解析により検証した。

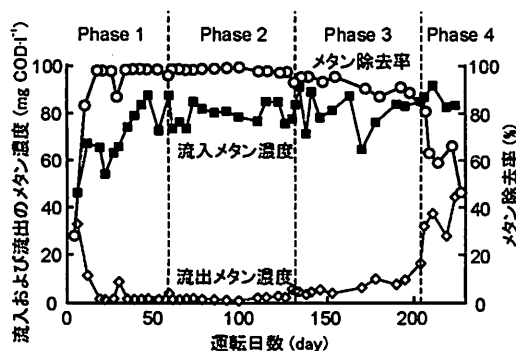


図-2 流入および流出のメタン濃度とメタン除去率。(流出メタン濃度は、処理水中の溶存メタン量とリアクターから排出される空気中のメタン量を合計し、処理水量で除したもの)

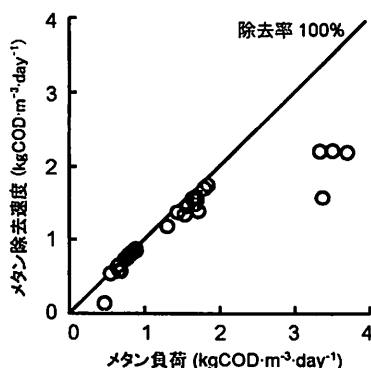


図-3 密閉型DHSリアクターの流入メタン負荷とメタン除去速度

3. 実験結果および考察

(1) 溶存メタンの処理性能

活性汚泥を植種した密閉型DHSリアクターに、溶存メタンのみを炭素源とした模擬嫌気性処理水をHRT2時間、空気を0.95 l day⁻¹ (スポンジ体積当りの空気供給量は3.8 m³·m⁻³·day⁻¹) でそれぞれ供給しリアクターの運転を開始した。その結果、運転開始から3週間程度でメタン除去率97%以上に到達し、その後、phase 1では平均して95%以上の高いメタン除去を安定して達成できた (図-2)。空気供給量を増加 (スポンジ体積当りの空気供給量は10 m³·m⁻³·day⁻¹) させたphase 2でもphase 1とほぼ同等のメタン除去が達成できた。そこで、HRTを短縮し流入メタン負荷を上昇させていったところ、HRT1時間のphase 3でメタン除去率は約90%、HRTを30分にしたphase 4では平均メタン除去率が約60%へ低下した (図-2)。実験で用いたリアクターの単位スポンジ体積当りの流入メタン負荷とメタン除去速度の関係をプロットした結果、本リアクターの最大メタン除去速度はおおよそ2 kgCOD·m⁻³·day⁻¹ (メタンをCOD換算して表示) である事がわかった (図-3)。

本研究で用いた密閉型DHSリアクターはスポンジを担体として用いた固定床型の水処理装置であり、最大負荷時でも顕著な汚泥のウォッシュアウトは観察されず、十分な汚泥を保持していた (運転225日目 [実験終了時] の保持汚泥量はスポンジ担体の体積当り7100 - 11000 mg-VSS l⁻¹)。また、負荷を増加させたphase 3, 4における処理水のpHも7-7.5程度であり、微生物に阻害をもたらすものではないと考えられた。したがって、メタン除去速度が2 kgCOD·m⁻³·day⁻¹程度で頭打ちになった原因は他にあると考えられた (後述)。

(2) DHSリアクターのアンモニア酸化

Phase 1ではアンモニア酸化はほとんど進行しなかった (図-4)。しかし、phase 2では空気供給量を増加させた直後からアンモニア酸化が進行し、硝酸が生成した (データ非提示)。Phase 2でのアンモニア除去速度は期間を通して安定しており、スポンジ体積当り約0.3 kg-N·m⁻³·day⁻¹であった (図-4)。しかし

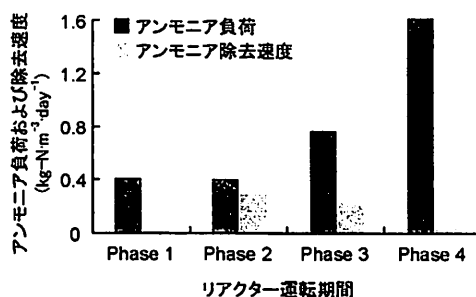


図-4 実験の各phaseにおける流入アンモニア負荷とアンモニア除去速度

ながら、HRTを短縮し負荷を増加させていったphase 3, 4ではアンモニア除去速度は減少し、最終的にphase 4ではほとんど硝化反応は起こらなくなった(図4)。なお、実験期間を通して亜硝酸はほとんど生成しなかった(データ非提示)。一方で、メタン酸化反応は実験開始当初から速やかに進行し、phase 3では負荷の増加に伴ってメタン除去速度が上昇した。さらにphase 4においてもメタン除去速度の多少の増加が確認できた(図2, 3)。これらDHSリアクターにおける硝化とメタン酸化の挙動は、メタン酸化の方が硝化よりも優先して進行する事を示している。アンモニア酸化細菌とメタン酸化細菌は酸素をめぐる競合関係にあり、メタン酸化細菌の方が酸素に対する親和性が高い事から、酸素制限下ではメタン酸化細菌の方が優占するという報告もある¹⁹⁾。したがって、本実験でも酸素が硝化とメタン酸化の制限要因の1つであると考えられる。

本実験では流入排水の組成は実験期間を通じて変更しなかったため、メタンとアンモニアの濃度比は一定であった。実排水の溶存メタン濃度が本実験で用いたメタンで飽和させた人工排水より高濃度になる事はあまり考えられないが、一方でより高濃度のアンモニアを含む嫌気性処理水は多数存在する。したがって、アンモニア濃度を変化させた場合の、メタン酸化に対する影響は今後の検討課題である。

(3) DHSリアクターの酸素消費

メタンおよびアンモニアの酸化速度から計算したDHSリアクターの酸素消費速度を表2に示す。メタンおよびアンモニアの酸化に由来する酸素消費を合計した酸素消費速度は負荷の上昇にともなってphase 3で最大となったが、さらに負荷を増加させたphase 4では逆に低下した。このとき、メタン酸化に起因する酸素消費はリアクターの負荷上昇にあわせて増加している(表2)。その一方でアンモニア酸化分の酸素消費速度はphase 2以降減少していつている。この事からも、上述のようにメタン酸化細菌の方が優先的に酸素を消費している事がわかる。

生物反応器における酸素消費は一般に式(1)で表される。

$$\frac{dC}{dt} = K_L a(C_s - C) - R_r \tag{1}$$

ここで、 $K_L a$:総括酸素移動容量係数 (h^{-1})、 C_s :飽和溶存酸素濃度 ($mg l^{-1}$)、 C :溶存酸素濃度 ($mg l^{-1}$)、 R_r :微生物による酸素消費速度 ($mg l^{-1} h^{-1}$)

式(1)を用いて、最大酸素消費速度を示したphase 3における酸素消費速度 $2.55 \text{ kg O}_2 \cdot m^{-3} \cdot day^{-1}$ からDHSリアクターの総括酸素移動容量係数 ($K_L a$) を計算すると、 38.9 h^{-1} となる(ただし、リアクターを定常状態と仮定し、リアクター内気相部の酸素濃度を流入・流出の酸素濃度の平均値14.5%、および溶存酸素濃度を 3.4 mg l^{-1} [リアクターからの排出空気の実測値より算出] の各数値を使用し計算)。大浦らは、我々のDHSリアク

ターとほぼ同じ形状のスポンジを用いたDHSリアクターの溶存酸素濃度を実測し、 $K_L a$ を算出してその値を $152-84 \text{ h}^{-1}$ と報告している¹⁹⁾。我々の実験におけるメタンとアンモニア酸化に由来する酸素消費速度から算出した $K_L a$ 値も、彼らの報告とほぼ同等の値を示している。すなわち、本実験では酸素消費速度がDHSリアクターの酸素供給速度と同等程度にまで増加したため、酸素供給律速により最大メタン除去速度が $2 \text{ kg COD} \cdot m^{-3} \cdot day^{-1}$ 程度に制限されたものと考えられる。したがって、空気供給量を増加させリアクター気相中の酸素濃度を高める事でメタン除去速度をさらに上昇できると考えられる。しかしながら、空気供給量を増加させると溶存メタンが気相中に放散し、リアクター外に放出される量が増加して、メタン除去率が低下する恐れがある。そこで、今後は空気供給量の最適化だけではなく担体形状を工夫し、比表面積を大きくする事で酸素供給速度の改善を試みるなどの、複合的なアプローチが高いメタン除去率を維持しながらのメタン除去速度の更なる向上には必要であると考えられる。

(4) メタン分解に関与する細菌群集

リアクター保持汚泥の微生物群集の解析は、60日目(phase 1)および128日目(phase 2)のサンプルについて行った。その結果得られたメタン酸化細菌と考えられるクローンの内、3クローン以上を代表するOUTの分子系統解析の結果を図5に示す。クローン解析の結果、phase 1ではリアクターの上部と中部には *Methylobacter*、下部には *Methylocaldum* 属に近縁なtype Iとよばれる γ -*Proteobacteria* に属する細菌が主要なメタン酸化細菌として検出された(図5)。また、リアクター下部ではtype IIのメタン酸化細菌である *Methylocystis* も全クローンに対し4%ほど検出された。しかしながら、全クローンに占めるメタン酸化細菌の割合はいずれの箇所においても30%程度であった。一方、メタノール資化性細菌である *Methylophilus* がリアクター上部では特に多く検出された(全クローンの20%)。酸素濃度制限下ではメタン酸化細菌はメタノールを中間代謝物として産生する事が知られている¹⁷⁾。また、ギ酸やホルムアルデヒドなどメタノール以外の物質が中

表2 メタン酸化およびアンモニア酸化速度から計算したDHSリアクターの酸素消費量

	酸素消費速度 ($kg \cdot O_2 \cdot m^{-3} \cdot day^{-1}$)		
	メタン酸化	アンモニア酸化	合計
Phase 1	0.66 (0.11)	0.25 (0.11)	0.90 (0.18)
Phase 2	0.79 (0.04)	1.35 (0.08)	2.14 (0.11)
Phase 3	1.48 (0.16)	1.07 (0.30)	2.55 (0.37)
Phase 4	2.04 (0.31)	0.19 (0.23)	2.23 (0.40)

*) 内は標準偏差

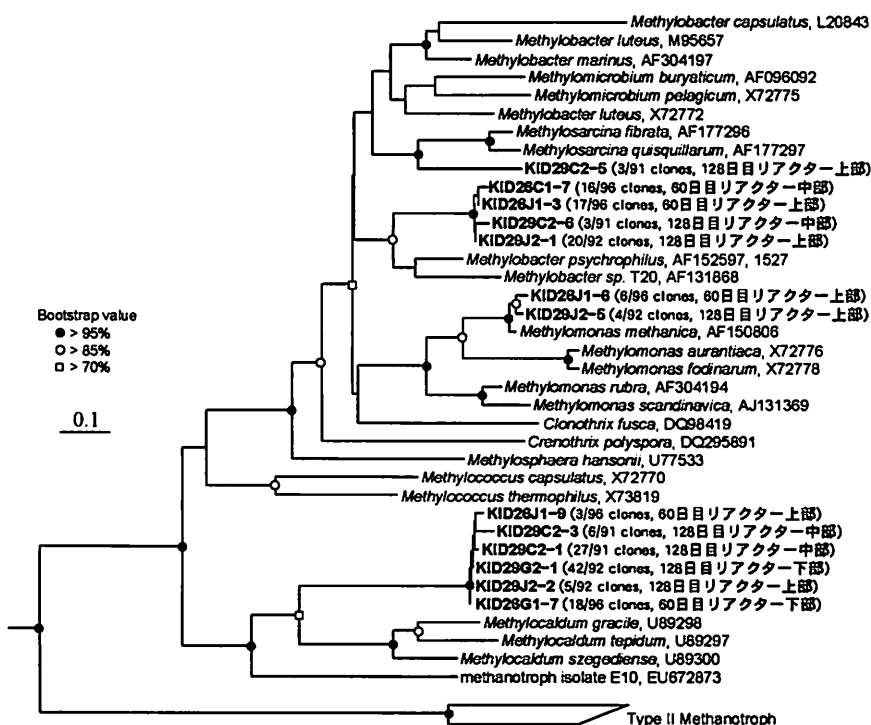


図-5 16S rRNA遺伝子配列に基づく密閉型DHSリアクター保持汚泥内のメタン酸化細菌の分子系統解析結果。Type I およびType IIのメタン酸化細菌に属すると考えられるOUTのうち、3クローン以上を代表するものを示している。系統樹中のKID26~, KID29~が本研究で得られたクローン。カッコ内はクローンの検出率とクローンが検出された汚泥の採取日時およびリアクター内の部位。

間代謝物であるという報告もある³⁹。これらの事から、空気供給量の少ないphase 1においては、メタノールなど何らかの物質がメタン酸化の中間代謝物として生成しているのではないかと推察された。しかしながら、実験期間中において数回測定した処理水のCODはいずれもほぼゼロであったことから、中間代謝産物の詳細な分析は行わなかった。空気供給量を増加させたphase 2ではメタン酸化細菌の割合は増加し、全クローンに対し40 - 50%程度を占めた。また、その構成も変化し上部では *Methylosarcina* の割合が増加した。中部および下部では *Methylocaldum* 属に近縁な細菌が主要なメタン酸化細菌であった(図-5)。さらにphase 2ではリアクター下部において、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌が比較的多く検出されるようになった(全クローンに対して合計で約10%)。この事は、phase 1ではほとんど硝化は進行していなかったのに対し、phase 2では流入アンモニア(約40 mg-N/l)の約70%程度が完全に硝化されていた事からも妥当な結果であろうと考えられる。

4. まとめ

本研究では密閉型DHSリアクターを使用し、アンモニアと溶

存メタンを含むシンプルな模擬廃水を用いて溶存メタン除去実験を行った。その結果、メタン酸化はリアクター運転開始後速やかに立ち上がり、その後安定して進行する事や、メタン酸化はアンモニア酸化よりも酸素に対する親和性が高く、優先して起こる事が分った。また、リアクター内でメタン除去を主に担っているのは γ -Proteobacteriaに属するtype Iのメタン酸化細菌である事がわかった。今後は、実際の嫌気性処理水に含まれているであろう、硫化物や有機物を含んだ排水での処理実験を行い、メタン酸化とこれら物質との酸化反応の競合関係を明らかにし、高いメタン除去率と除去速度を達成しうる運転条件(HRTおよび空気供給量)やリアクター形状等を検討していく必要がある。

謝辞：本研究は、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の“微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発”プロジェクトの一環として実施した。

参考文献

- Forster P, Ramaswamy V., Artaxo P., Bernsten T., Betts R., Fahey D. W., Haywood J., Lean J., Lowe D. C., Myhre G., Nganga J., Pinn R., Raga G., Schulz M., and Van Dorland R: Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing. In Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z,

- Marquis M., Averyt K. B., Tignor M., and Miller H. L. (ed.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA., 2007.
- 2) Lelieveld J., Crutzen P. J., and Dentener F. J.: Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane, *Tellus*, vol. 50, No. 2, pp. 128-150, 1998.
 - 3) Cakir F. Y., and Stenstrom M. K.: Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology, *Water Research*, Vol. 39, No. 17, pp. 4197-4203, 2005.
 - 4) Park S., Lee C.-H., Ryu C.-R., and Sung K.: Biofiltration for Reducing Methane Emissions from Modern Sanitary Landfills at the Low Methane Generation Stage, *Water, Air, & Soil Pollution*, Vol. 196, No. 1, pp. 19-27, 2009.
 - 5) Melse R. W., and vanderWerf A. W.: Biofiltration for Mitigation of Methane Emission from Animal Husbandry, *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 14, pp. 5460-5468, 2005.
 - 6) Gebert J., and Gröngöft A.: Performance of a passively vented field-scale biofilter for the microbial oxidation of landfill methane, *Waste Management*, Vol. 26, No. 4, pp. 399-407, 2006.
 - 7) Plessis C. A. d., Strauss J. M., Sebapalo E. M. T., and Riedel K.-H. J.: Empirical model for methane oxidation using a composted pine bark biofilter, *Fuel*, Vol. 82, No. 11, pp. 1359-1365, 2003.
 - 8) Sly L. L., Bryant L. J., Cox J. M., and Anderson J. M.: Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, No. 3, pp. 400-404, 1993.
 - 9) Hanson R. S., and Hanson T. E.: Methanotrophic bacteria, *Microbiological Reviews*, Vol. 60, No. 2, pp. 439-471, 1996.
 - 10) Bodélier P. L. E., and Laanbroek H. J.: Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 47, No. 3, pp. 265-277, 2004.
 - 11) van Bodegom P., Stams A. J. M., Mollema L., Boeke S., and Leffelaar P.: Methane Oxidation and the Competition for Oxygen in the Rice Rhizosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 8, pp. 3586-3597, 2001.
 - 12) Machdar I., Harada H., Ohashi A., Sekiguchi Y., Okui H., and Ueki K.: A novel and cost-effective sewage treatment system consisting of UASB pre-treatment and aerobic post-treatment units for developing countries, *Water Science and Technology*, Vol. 36, No. 12, pp. 189-197, 1997.
 - 13) Hatamoto M., Imachi H., Ohashi A., and Harada H.: Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 4, pp. 1332-1340, 2007.
 - 14) Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadukumar A. Buchner, Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske L., Gerber S., Ginhart A. W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Villig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A. and Schleifer K. H.: ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32 No. 4, pp. 1363-71, 2004.
 - 15) Megnien, S. R., and R. Knowles: Active methanotrophs suppress nitrification in a humisol, *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 4, No. 4, pp. 205-212, 1987.
 - 16) 大浦一恵, 渡辺悠介, 久保田健吾, 李玉友, 原田秀樹, 松永健吾, 山口隆司: DHS リアクター-の酸素移動特性, 第 43 回日本水環境学会年会講演集, pp. 343, 2009.
 - 17) J. H. Harwood, S. J. P.: Quantitative Aspects of Growth of the Methane Oxidizing Bacterium *Methylococcus capsulatus* on Methane in Shake Flask and Continuous Chemostat Culture, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 35, No. 4, pp. 597-607, 1972.
 - 18) Costa C., Dijkema C., Friedrich M., García-Encina P., Fernández-Polanco F., and Stams A. J. M.: Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 53 No. 6, pp. 754-762, 2000.

(2009.5.22 受付)

Microbial Oxidation of Dissolved Methane from Anaerobic Waste/Wastewater Treatment Plant Using Closed DHS Reactor

Masashi HATAMOTO¹, Hiroki YAMAMOTO², Tomonori KINDAICHI¹, Noriatsu OZAKI¹ and Akiyoshi OHASHI¹

¹Dept. of Social and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

²Civil & Environmental Engineering Program, Faculty of Engineering, Hiroshima University.

To prevent emissions of greenhouse gas of methane, which is dissolved in process effluent from anaerobic waste/wastewater treatment plant, we applied a down-flow hanging sponge reactor as post-treatment to biologically oxidize the dissolved methane. Within 3 weeks after the reactor start up, methane concentration in exhaust air from the reactor reduced to below 1% and methane removal efficiencies achieved 95% with methane removal rate of $0.8 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$. After increasing methane-loading rate, methane removal rate increased to $1.5 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{day}^{-1}$ with 90% removal efficiency. On the other hand, only about 10% of influent ammonium was oxidized to nitrate during the first period. When airflow increased to $2.5 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}$, nitrification efficiency also increased to approximately 70%. These results indicated that methane oxidation could outcompete ammonium oxidation under limited oxygen availability.

16S rRNA gene targeted cloning and phylogenetic analysis revealed that type I methanotroph was dominant methane oxidizer, whereas type II methanotroph was detected in minor portion in the reactor. Methylotrophic bacterium of *Methylophilus* was also dominantly detected under reduced airflow rate, which suggests that some C1 compounds were intermediately formed during methane oxidation.