

(47) 事業系食品廃棄物を対象とした中温無加水メタン発酵槽の微生物群集構造解析

中村明靖^{12*}・浅海博基³・泡渕宏美³・佐藤緑³・長谷部千人⁴・帆秋利洋⁵

¹大成建設株式会社 土木技術研究所 (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1)

²長岡技術科学大学大学院 エネルギー・環境工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

³大成サービス株式会社 テクノセンター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1)

⁴大成建設株式会社 エンジニアリング本部 (〒163-0606 東京都新宿区西新宿 1-25-1 新宿センタービル)

⁵大成建設株式会社 環境本部 (〒163-0606 東京都新宿区西新宿 1-25-1 新宿センタービル)

* E-mail: akinobu@sm.nagaoka.ac.jp

事業系食品廃棄物を対象とした無加水メタン発酵システムの実証試験において、その発酵状態の変化に伴う微生物叢の変動についての知見収集を行った。CODcr 容積負荷は、 $7\sim 8 \text{ kgCODcr} \cdot \text{m}^3\text{-digester} \cdot \text{day}^{-1}$ で安定運転が可能であった。バイオガス中の硫化水素濃度上昇と共にプロピオン酸の蓄積が確認されたが、硫化水素濃度を低減させた直後にプロピオン酸は速やかに分解された。その際のバクテリアの群集構造を DGGE 法にて解析した結果、プロピオン酸酸化促進に関わる菌 (*Proteiniphilum acetatigenes* strain TB107) に近縁なクローンが確認された。16S rRNA 遺伝子クローニング法を用い、メタン発酵槽内汚泥のアーキアの微生物群集構造解析を行った結果、水素資化性メタン生成古細菌が優占 (80%) しており、遺伝子定量的結果ではバクテリアがアーキアよりも1~3 オーダー高い存在量であった。

Key Words : non-dilution methane fermentation, hydrogen sulfide, propionate, microbial community

1. はじめに

新エネルギー等利用法 (RPS 法) や石油代替エネルギー法改正により再生可能バイオマスエネルギー資源の利用が進められている。なかでも、食品廃棄物は年間2,200万トン発生しているが、その利用率は20%程度と低いため、このバイオマスを対象とした再資源化技術の開発が急務となっている。

現在までにメタン発酵による生ごみの処理に関する研究は数多くなされている。しかし、発酵過程において生成されるアンモニアによるメタン発酵阻害が一つの問題となっている^{1,2,3}。中温でのメタン発酵ではアンモニア濃度が4,000mg/Lを超えるとメタン発酵阻害が生じるとの報告もある⁴。そのため、生ごみに対して加水やシュレッダー紙等を加えて、アンモニア生成の元となる窒素分の希釈を行った後にメタン発酵システムに投入を行う方式が一般的である。この方式では、アンモニア阻害の回避は可能であるが、加水等を行うことによるメタン発酵槽への投入量および発酵残渣発生量の増大につながる。また、シュレッダー紙の大量投入は、メタン発酵阻害を誘引することが確認されている⁵。投入原料の無希釈ではあるが、バイオガス化および水蒸気化に伴って損失する水分を加えてアンモニア濃度の調整を行っている研究もある⁶。一方、我々が行っている無加水方式のメタン発酵は、一切の水分添加を行わずに発生した生ごみ等のウェットバイオマスを直接処理するため、発酵残渣発生量の削減が期待できる。

無加水、無希釈のメタン発酵法は、乾式 (投入 TS 濃度

25%以上)、湿式 (10%以下)、半乾式 (TS10~20%) といった投入原料の TS 濃度により細かく分類されており、TS 濃度を固定した研究が行われている^{7,8}。

しかしながら、実際のプラント操作においては、管理性、人件費等の点で TS 濃度を操作しての操業は不可能なことであり、その日受け入れた生ごみを1日1回投入するといった操作因子の確立は意義が大きい。しかしながら、このような TS 濃度を調節しないで運転を行った際の基礎的知見の報告は無い。

そこで本研究では、事業系食品廃棄物処理に対して一切の水分を加えない無加水メタン発酵システムの実証試験を実施し、発酵状態の変化に伴う微生物叢の変動について解析することで、それらの関連性について考察した。

2. 実験方法

(1) 無加水メタン発酵

実証試験システムは、岩手県釜石市清掃工場敷地内に設置した。メタン発酵槽は、全容積35m³ (充填容積25m³) で、完全混合型、37°Cで運転を行った。メタン発酵槽の植種汚泥は、岩手県釜石市で稼働しているメタン発酵槽の汚泥を用いた。

投入原料は、岩手県釜石市内の11事業所 (スーパー、市場、病院、老人ホーム等) より事業系食品廃棄物を受け入れ、一日一回500kgを目標としメタン発酵槽へ投入した。原料投入時、加水は一切行わない無加水方式とした。投入

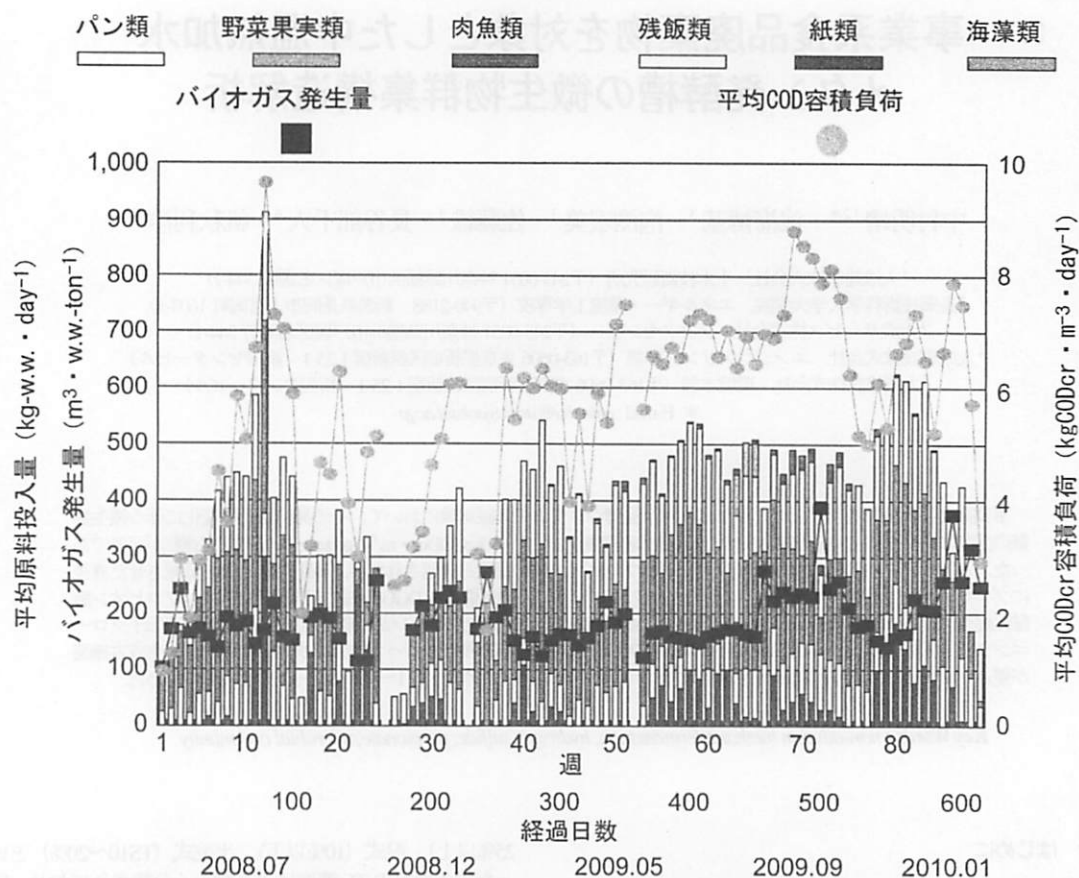


図-1 投入原料と生成バイオガス量およびCODcr容積負荷

原料の組成は、肉魚類、パン類、野菜果実類、残飯類、紙類、海藻類の6類に分類し、個別のCODcrを測定し、個々の投入量に測定値を乗じた値を日々の投入CODcr量とした。

また、メタン発酵槽内にプロピオン酸が高濃度に蓄積した際、硫化物イオンの吸着を目的としてゼオライト（Caタイプ）を投入した。

Total CODcrは下水道試験法に従った、ニクロム酸カリウム法、生成バイオガス組成はガスクロマトグラフィー（GC-14A TCD, Shimadzu）、アンモニウムイオンはイオンクロマトグラフィー（ICA-2000, 東亜 DKK）、およびVFAはガスクロマトグラフィー（GC-17A, Shimadzu）、カラムはDB-WAX（Agilent technologies）を用いそれぞれ測定した。生成バイオガス中の硫化水素およびアンモニアガス（NH₃）の濃度測定は、ガス検知管（GASTECH）を使用した。日々の発生バイオガス量は、ガスメーターでモニターし、投入CODcr量に対する発生バイオガス量より、処理性能を評価した。

(2) 微生物群集構造解析

微生物群集構造解析に用いるDNAはFast DNA spin kit for soil (Q bio gene)を用い抽出を行った。アーキアの解析に

は16S rRNA遺伝子を標的としたPCRクローニングを用い、1サンプルあたり48クローンの解析を行った。方法は既報に従った⁹⁾。バクテリアの解析にはDGGE法を用いた。増幅には341f and 534r (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' and 5'-ATTACCGGGCTGCTGG-3') with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCA CGGGGGG-3')プライマーを使用した⁹⁾。検出した遺伝子断片（約200bp）はABI PRISM 3730を用いて塩基配列の決定を行った後、BLASTによる相溶性検索を行った。

アーキアおよびバクテリアの遺伝子定量はReal-Time PCR (Roche)を用い、使用Primerおよび条件は既報に従った⁹⁾。

3. 実験結果

(1) 運転状況

図-1に中温無加水メタン発酵槽の連続処理運転結果を示す。投入原料量（kg-w.w.・day⁻¹）、生成バイオガス量（m³・w.w.⁻¹・ton）およびCOD容積負荷（kgCODcr・m³-digester・day⁻¹）の1週間の平均値のグラフとして表記した。生成バイオガス量は、生成量と投入原料1ton当りの発生量に換算した。

投入原料の個別の CODcr はパン類 0.814 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹, 野菜果実類 0.155 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹, 肉魚類 0.211 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹, 残飯類 0.229 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹, 紙類 1.118 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹ および海藻類 0.066 kg-CODcr・kg-w.w.⁻¹ であった。

投入原料は 400~500kg・day⁻¹ で投入した。投入原料の平均 TS は 25% であった。一日一回、リアクター下部より発酵済残渣として引き抜きを行い、原料投入後、発酵槽内が 25m³ になるよう調節した。バイオガスは平均 170m³・w.w.⁻¹・ton で生成された。HRT は 25~63 日であり、安定運転時は 50 日となった。メタン発酵槽における CODcr 容積負荷は、7~8 kgCODcr・m³・day⁻¹ で安定した運転が可能であった。pH は 7.8 前後で安定した (図-2)。バイオガス中のメタン濃度は、平均 62%、投入原料 CODcr のメタン転換率は、CODcr の理論メタン転換率と生成メタンガス量/投入 CODcr の比較により 90% と算出された (データ未掲載)。メタン発酵槽内の VS は 3~5% で推移し、平均 4% であった。また、メタン発酵槽内のアンモニウムイオン濃度は約 2,500mg/L であった。

図-2 にメタン発酵槽内のプロピオン酸濃度とバイオガス中の硫化水素濃度および pH の 100 日目から 250 日目までの関係を示す。スタートアップより徐々に生成バイオガス中の硫化水素濃度が上昇し、それに伴い槽内のプロピオン酸の蓄積および pH の低下が確認された。バイオガス中の硫化水素、メタン発酵槽内の硫化物イオンの減少を目的として、メタン発酵槽内へ槽内汚泥の 3% (w/v) のゼオライトを投入した。投入後、バイオガス中の硫化水素濃度の減少が確認され、191 日目以降プロピオン酸が速やかに減少された。同時に pH の上昇も確認された。最大で 5,300mg/L のプロピオン酸が約 10 日で 20mg/L 程度にまで減少した。また、ゼオライトの吸着効果により、発酵槽内のアンモニウムイオン濃度も約 2,000mg/L 減少した。

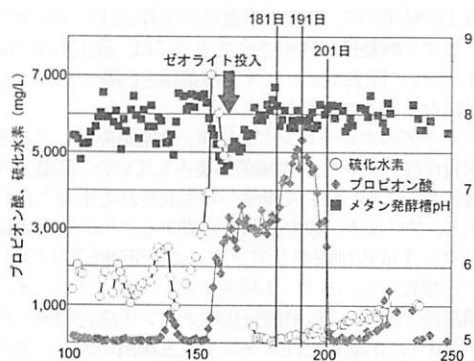


図-2 100-250 日目のメタン発酵槽内のプロピオン酸、硫化水素濃度およびメタン発酵槽内 pH

(2) 微生物群集構造解析

運転開始~459 日目のメタン発酵槽のアーキアのクローニング解析結果を図-3 に示す。処理性能が変動した特徴ある日を対象に各サンプルについてそれぞれ 48 クローンの採取を行い、クローンの塩基配列決定後、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性検索を

行った。相同性検索の結果を基に利用基質別にまとめ、さらに、メタン発酵槽内の酢酸およびプロピオン酸濃度をプロットしたものを図-3 に示す。

その結果、水素資化性メタン生成古細菌が運転期間を通して優占する傾向に見られた (約 80%)。しかしながら、発酵槽内に酢酸が蓄積した際は (99 日目, 9,000mg/L 前後)、酢酸資化性メタン生成古細菌が優占傾向に見られたが (約 85%), 酢酸の減少と共に速やかに水素資化性メタン生成古細菌と入れ替わる結果となった。

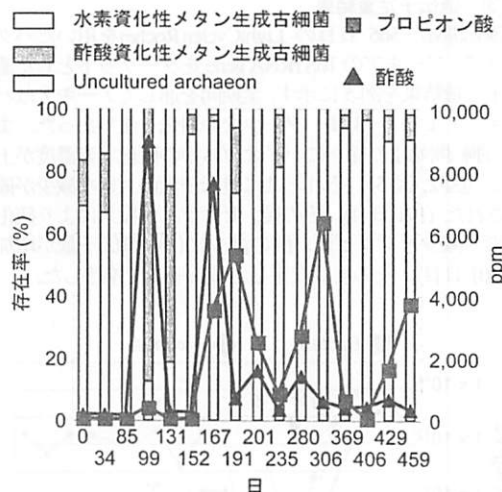


図-3 アーキアクローニング結果と酢酸、プロピオン酸濃度

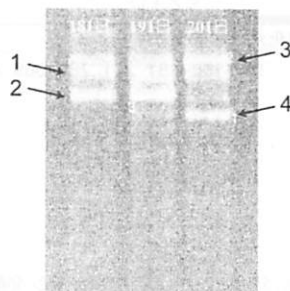


図-4 バクテリア DGGE 結果

バイオガス中の硫化水素減少に伴う発酵槽内のプロピオン酸蓄積・減少の前後、181, 191 および 201 日目 (図-2) でのメタン発酵槽内のバクテリアをターゲットとした DGGE 結果を図-4 に示す。発酵槽内にプロピオン酸が蓄積した時と、プロピオン酸の減少が顕著な時の、主に 4 つのバンド (微生物) の塩基配列決定を行った。これらバンドの塩基配列解析結果、バンド 1 は、*Bacteroides* sp. 22C に近縁なクローンで (相同性 95%)、この菌は、セルロース分解系から検出されている。バンド 2 は、*Enterococcaceae* に属する、*Vagococcus* sp. AC-1 に近縁であった (相同性 99%)。この菌は、乳酸菌群に属している。バンド 3 は、WWE1 candidate division に含まれるクローンに近縁であった (相同性 90%)。この candidate division は、*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* が含まれており、この細菌は、

メチルマロニル CoA を持っている」と報告されており、プロピオン酸分解に関与している可能性が示唆されている¹⁰⁾。またこのバンドは、リアクター運転開始後より確認されていた(データ未掲載)。バンド 4 は *Proteiniphilum acetatigenes* strain TB107 に近縁な細菌であった(相同性 97%)。この細菌は、ピルビン酸を酢酸、CO₂ に変換する¹¹⁾。また、プロピオン酸分解共生培養系でこの細菌の存在量の増加と共に、プロピオン酸の分解が促進されたと報告されている¹¹⁾。

(3) 遺伝子定量結果

運転開始～566 日目の LightCycler(Roche)を用いたバクテリア、アーキアの 16S rRNA gene をターゲットとした遺伝子定量結果を図-5 に示す。全期間を通してアーキアはバクテリアより 1～3 オーダー少ない遺伝子量であった。また、運転開始より徐々にバイオガス中の硫化水素濃度が上昇し(図-2、図-5)、それと共に遺伝子量の大きな減少が確認された(191 日目)。その後、ゼオライト投入により硫化水素の減少とプロピオン酸の減少に伴い遺伝子量が増加し(201 日目)、その後は安定した遺伝子量で推移した。

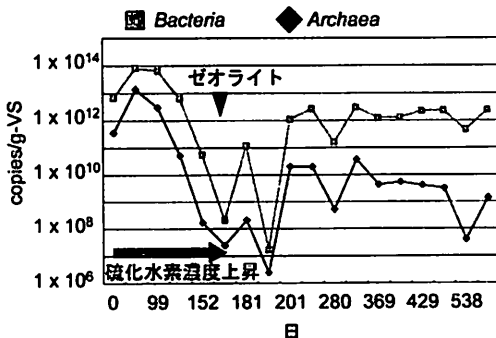


図-5 Real-Time PCR 結果

4. 考察

本研究で運転を行った中温無加水メタン発酵槽は、最大 102kgCODcr・m⁻³・digester・day⁻¹、平均で 7～8kgCODcr・m⁻³・digester・day⁻¹ で安定的な運転が可能であることが検証された。バイオガス中のメタン濃度(平均 62%)、投入 CODcr のメタン転換率(90%)の結果が、安定運転を裏付けている。生ごみのメタン発酵の阻害因子はアンモニウムイオン濃度が第一であるが、本研究におけるリアクター内のアンモニウムイオン濃度は平均 2,500mg/L で推移した。

運転開始より徐々にバイオガス中の硫化水素濃度が高くなり、それに伴い発酵槽内のプロピオン酸蓄積が確認された(図-2)。バイオガス中の硫化水素は発酵槽内での硫化物イオン由来であり、これは投入原料に含まれる肉魚系タンパク質成分由来であると推察された。

発酵槽内のプロピオン酸分解に関しては、リアクター運転開始後より確認されていた *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* に代表される、プロピオン酸分解に関与する微生物に近縁なクローンが担っていると推察された(図

4)。硫化水素(硫化物イオン)蓄積によりプロピオン酸分解の阻害が起きたと推察される。その後の、急激な発酵槽内のプロピオン酸減少時は *Proteiniphilum acetatigenes* strain TB107 に代表される、プロピオン酸の分解促進に関連する微生物に近縁なクローンの増殖が確認された。このクローンは硫化水素濃度上昇およびプロピオン酸蓄積中には確認されていない(図-4)。

このことから、プロピオン酸化に関与する微生物は、硫化水素(硫化物イオン)の阻害を受け易く、その結果としてプロピオン酸酸化を担えなかったものと推察される。また、プロピオン酸の速やかな分解を行うためには、*P. acetatigenes* strain TB107 の様に、分解促進を担う微生物が重要な役割を担っていると推察できる。

Millacheruvu and Parkin は、メタン生成古細菌、硫酸還元細菌とプロピオン酸酸化細菌のプロピオン酸代謝経路と硫化水素に対する耐性データ¹²⁾を示している。これによると、硫化水素(硫化物イオン)増加により、容易にプロピオン酸酸化細菌への阻害が、プロピオン酸蓄積が誘引されることが分かる。本研究においてもプロピオン酸の発酵槽内への蓄積が確認された。その際、硫化水素(硫化物イオン)の減少によるプロピオン酸酸化細菌への阻害改善とプロピオン酸の速やかな減少が確認された。

硫化水素は pH に大きく依存しており、pH のわずかな変化で発生量が変わってくる。しかし、本研究においては、安定運転が行われているにもかかわらず硫化水素濃度の上昇が確認された(図-2)。このことから、簡易に測定可能な硫化水素濃度測定が、水面下(見かけ上処理が上手く行っているとき)でのプロピオン酸蓄積発見の指標の一つになりうると考えられる。本研究において、プロピオン酸の蓄積は 3 回確認されている(図-3)。2、3 回目共に 1 回目と同様、バイオガス中の硫化水素濃度上昇とともにプロピオン酸の蓄積が確認され、硫化水素の減少によりプロピオン酸の速やかな減少が確認された。

以上の結果から、硫化水素濃度の上昇に伴い発酵槽内のプロピオン酸蓄積が誘引された場合には、硫化水素(硫化物イオン)の除去がプロピオン酸蓄積を回避するための一手段になり得ることが判明した。

アーキアのクローニングの結果、全期間を通してみると、水素酸化性メタン生成古細菌が優占していた。高温メタン発酵においても、酸生成細菌から生成される水素を良好に除去し、プロピオン酸の蓄積を回避するためにも水素酸化性メタン生成古細菌がリアクターの安定運転には欠かせないと報告している¹³⁾。本研究においても、プロピオン酸蓄積前後(図-3)では硫酸酸化性メタン生成古細菌の存在率が低下し、水素酸化性メタン生成古細菌が大きく優占した。我々が過去に行った生ごみを対象とした研究においても、水素酸化性メタン生成古細菌が優占していた⁹⁾。これらのことから、メタン発酵においては、水素酸化性メタン生成古細菌が重要な役割を担っていることが示唆される。

さらに、発酵槽内へ酢酸が蓄積した 99 日目は、酢酸酸化性メタン生成古細菌の優占が確認された。酢酸が高濃度に蓄積したのかは不明ではあるが、167 日目にも酢酸が蓄積した際には酢酸酸化性メタン生成古細菌の優占は確認されなかった。我々が過去行った、ラボスケールでの無加水メタン発酵システムの槽内の微生物群集構造解析では、

酢酸共生分解菌に近縁なクローンの存在が確認された⁹⁾。酢酸共生分解菌は酢酸の分解と同時に水素生成を行い、水素資化性メタン生成古細菌から水素利用細菌との共生で生育している。これらのことから、水素資化性メタン生成古細菌が優占するという現象は生ごみのメタン発酵に共通しているものと推察される。

Real-Time PCR を用いた遺伝子定量結果 (図-5) から、運転開始よりバイオガス中の硫化水素濃度上昇に伴い、バクテリア、アーキア共に遺伝子量の低下が見られた。しかしながら、バイオガス中の硫化水素濃度の減少とその後のプロピオン酸蓄積の解消に伴い発酵槽内の遺伝子量の増加が確認された。プロピオン酸酸化細菌の阻害をはじめ、発酵槽内に棲息する多くの微生物群に生育阻害を及ぼしたものと推測される。また本研究で得られた、安定運転時のバクテリアとアーキアの遺伝子量の差は、我々が行った実験と近い値であった⁹⁾。また立澤¹⁰⁾も、バクテリアである酸生成菌がメタン生成古細菌よりも存在量が多いと報告している¹⁰⁾。メタン生成には、まず加水分解を経る必要がある。その後生成される酸および水素を基質としメタン生成古細菌がメタンガスの生成を行う。これらのことから、メタン発酵において、このバクテリア>アーキアという遺伝子量が安定したメタン発酵を行う最も良い存在量であると推測する。

5. まとめ

事業系食品廃棄物を対象とした無加水メタン発酵槽の運転を行った結果、容積負荷 $7\sim 8 \text{ kgCODcr} \cdot \text{m}^{-3}\cdot\text{digester} \cdot \text{day}^{-1}$ で、生成バイオガスのメタン濃度は平均 62%、投入 CODcr のメタン転換率は 90% を達成し、500 日を超える安定運転を確認した。

発酵槽内のアーキアは水素資化性メタン生成古細菌が優占しており、安定した処理を担う重要な微生物であると推察された。

一方、発酵槽内にプロピオン酸が蓄積する予兆として、バイオガス中の硫化水素濃度の上昇が関係付けられた。プロピオン酸蓄積を回避する一手段として、バイオガス中の硫化水素 (発酵槽内の硫化物イオン) の吸着除去にゼオライト (3% w/v) が有効であることが検証された。

今後、本研究で得た知見を、バイオマス系廃棄物、とりわけ生ごみの無加水メタン発酵プロセスの安定化と高効率化のための運転管理手法にフィードバックする計画である。

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“地域バイオマス熱利用フィールドテスト”プロジェクトの一環として実施した。また、本研究遂行にあたり、岩手県金石市役所関係者の方々にご協力をいただきましたこと、深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Sawayama, S., Tada C., Tsukahara K. and Yagishita T.: Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *J. B. B.*, Vol. 97, pp. 65-70, 2004.
- 2) Hansen K. H., Angelidaki I. and Ahring B.K.: Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research*, Vol. 32, pp. 5-12, 1998.
- 3) Soubes M., Muxi L., Fernández A., Tarlera S. and Queirolo M.: Inhibition of methanogenesis from acetate by Cr^{3+} and ammonia. *Biotechnol. Letters*, Vol. 16, pp. 195-200, 1994.
- 4) Lay, J. J., Li Y.Y. and Noike T.: The influence of pH and ammonia concentration on the methane production in High-Solid digestion process. *Water Environ. Res.*, Vol. 70, pp. 1075-1082, 1998.
- 5) 中村明昭, 帆秋利洋, 谷川大輔, 片平智仁, 山口隆司, 井町寛之, 大橋品良, 原田秀樹: 微生物群集構造解析結果から診た無加水メタン発酵の阻害メカニズムに関する一考察, 廃棄物資源循環学会論文誌, Vol. 21, pp. 10-18, 2010.
- 6) 水野修, 李玉友, 奥野芳男, 関廣二, 一瀬正秋: 二相循環式メタン発酵プロセスによる食品加工廃棄物の無希釈処理, 環境工学研究論文集, Vol. 41, pp. 9-17, 2004.
- 7) 李玉友, 佐々木宏, 鳥居久倫, 奥野芳男, 関廣二, 上垣内郁夫: 生ごみの高濃度消化における中温と高温処理の比較, 環境工学研究論文集, Vol. 36, pp. 413-421, 1999.
- 8) 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.
- 9) Muyzer, G., Dewaal E.C. and Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 695-700, 1993.
- 10) Eric, P., Kreimeyer A., Bocs S., Rouy Z., Gyapay G., Chouari R., Rivière D., Ganesan A., Daegelen P., Sghir A., Cohen G.N., Médigue C., Weissenbach J. and Paslier D.L.: “*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *J. Bacteriol.*, Vol. 19, pp. 2572-2579, 2008.
- 11) Chen, S. and Dong X.: *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol.*, Vol. 55, pp. 2257-2261, 2005.
- 12) Maillacheruvu, K. Y. and Parkin G.F.: Kinetics of growth, substrate utilization and sulfide toxicity for propionate, acetate, and hydrogen utilizers in anaerobic systems. *Water Environ. Res.*, Vol. 68, pp. 1099-1106, 1996.
- 13) 立澤知子, 萩俊云, 菰蒲昌平, 片岡直明, 宮晶子: セルロース含有廃水の高濃度メタン発酵処理系における微生物群集の挙動解析, エンバ時報, No. 223, pp. 20-25, 2009.

(2010.5.21 受付)

Microbial Community Analysis in the Non-Dilution Methane Fermentation Reactor for Industrial Garbage

Akinobu NAKAMURA^{1,2}, Hiroki ASAMI³, Hiromi AWAUCHI³, Midori SATO³, Kazuto HASEBE⁴, Toshihiro HOAKI⁵

¹TAISEI Co. Technology Center

²Environ. Eng., Nagaoka University of Technology

³TAISEI Service Co. Techno-center

⁴TAISEI Co. Engineering division

⁵TAISEI Co. Environmental division

The non-dilution methane fermentation reactor was operated, and the microbial community was analyzed by molecular methods (PCR-cloning, DGGE, Real-Time PCR). The reactor was able to stability operation at 7 to 8 kgCODcr · m⁻³-digester · day⁻¹. The propionate accumulated in the reactor as the hydrogen sulfide increased in biogas, and propionate decreased in the reactor as the hydrogen sulfide removed from biogas by the zeolite add to the reactor (3% w/v). The *Bacteria* community structure of propionate decreased in the reactor was investigated by using PCR-DGGE. The clone closely related to *Proteiniphilum acetatigenes* strain TB 107 was detected. This bacterium (strain TB107) is reported to accelerated the propionate degradation rate. Hydrogenotrophic methanogen accounted for 80% as a result of analyzing the microbial community of *Archaea* in the reactor by PCR-cloning. *Bacteria* was 1 to 3 order more than *Archaea* as a result of measuring the 16S rRNA gene by Real-Time PCR. The hydrogen sulfide increase in biogas was suggested that the propionate accumulation was invited.