

(7) パームオイル圧搾廃液(POME)を処理する密閉型嫌気性消化槽の処理特性と微生物群集構造

渋谷 幸子¹・久保田 健吾^{1*}・谷川 大輔^{1,2}・射手園 章吾¹・珠坪 一見³
山口 隆司²・関口 勇地⁴・S. S. Chen⁵・M. F. M. Yunus⁶・原田 秀樹¹

¹東北大学 大学院工学研究科 土木工学専攻 (〒980-8579宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

²長岡技術科学大学 工学部 環境・建設系 (〒940-2188新潟県長岡市上富岡町1603-1)

³(独) 国立環境研究所 地域環境研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

⁴(独) 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1)

⁵SIRIM Bhd., Environmental Technology Research Centre (1, Persiaran Dato's Menteri, Sek 2, P.O. Box 7035, Shah Alam, Selangor 40911 Malaysia)

⁶Sime Darby Research Sdn. Bhd., R&D Centre (Lot2664, Jalan Pulau Carey, Kuala Langat, Selangor 42960 Malaysia)

* E-mail: kengok@epl1.civil.tohoku.ac.jp

パームオイル圧搾廃液 (POME) は脂質分や繊維分を多く含む高濃度有機性廃水 (50-80 gCOD/L) である。本研究では、マレーシアで稼働するPOME処理密閉型嫌気性消化槽を約2ヶ月間モニタリングし、その処理特性を調べた。消化槽のHRTは48日、有機物負荷は1.3 kgCOD/m³・dで、全COD除去率は73% (溶解性は93%) であった。流入で16-24 gCOD/Lあった脂質は、平均除去率85%と良好に処理されていた。消化槽内には *Bacteria* が73%, *Archaea* が27%存在していた。群集構造解析から、*Archaea* は *Methanosaeta* 属や *Methanospirillum* 属に近縁なクローンが、*Bacteria* は高級脂肪酸分解菌の *Syntrophomonas* 属の他、糖発酵やアミノ酸分解などを行う微生物に近縁なクローンが得られた。

Key Words : Anaerobic digester, lipid-containing wastewater, Microbial community structure, Palm oil mill effluent, *Syntrophomonas*

1. はじめに

アブラヤシの実から搾られるパームオイルは、世界で最も生産されている植物油であり、2009 年度には全世界で 4,500 万トン生産された¹⁾。パームオイルは従来の食用や洗剤への利用に加え、バイオディーゼルなどへも利用され始めているため、生産量は年々増加している。インドネシアとマレーシアは、パームオイルの主要生産国であり、この二カ国の生産量は世界生産量の 85%を占めると共に、両国においてパームオイル産業は重要な位置づけとなっている¹⁾。しかし、パームオイルを生産する過程で大量に発生する廃水、パームオイル圧搾廃液 (POME: Palm Oil Mill Effluent) の処理が、大きな問題となっている。1 トンのパームオイルを生産する過程で 2.5 m³ の POME が発生すると言われており²⁾、この値に基づけば、2009 年には 11,250 万 m³ の POME

が排出されたことになる。

POME は、排出時の温度が 70°C 近い高温で、pH が 4 程度かつ COD_C が 50-80 g/L の高濃度有機性廃水である。POME の特徴として、脂質および高級脂肪酸、特にパルミチン酸 (C16:0) とオレイン酸 (C18:1) の濃度が高い事が挙げられる。高級脂肪酸は脂質の加水分解によって生じ、嫌気環境下では水素資化性のメタン生成古細菌などの共生によってのみ分解が進行する。また、汚泥に吸着して、活性阻害や汚泥のウォッシュアウトを引き起こし、メタン発酵プロセスを破綻させることが知られている³⁾。そのため、POME の様に脂質含有率の高い廃水は、嫌気性メタン発酵処理が非常に難しい廃水種であると言える。

現在、マレーシアの工場の 85%以上が嫌気性ラグーン法で POME を処理している⁴⁾。嫌気性ラグーン

法は、極めて長い滞留時間（約 70 日）と広大な土地が必要（工場によっては 20 以上のラグーン）で、処理プロセスとしては、酸生成ラグーンとメタン生成ラグーンの組み合わせが基本である⁴⁾。嫌気性ラグーン法は、低コストで難しい技術を必要せず処理できる等のメリットがあるが、処理過程で多量のメタンを大気中に放出するなどのデメリットも抱えている。

近年、酸生成ラグーンの後段に開放型嫌気性消化槽を設置し、処理する方法が採用され始めている（マレーシアの 5-10%の工場）⁴⁾。しかしながらこの方法も、メタン生成ラグーンと同様に大量のメタンが大気中に放出されるため⁵⁾、最近ではメタンが大気放散されず、かつエネルギーとして利用可能な密閉型嫌気性消化槽が採用され始めている⁶⁾。その理由の 1 つとして POME 処理プロセスがクリーン開発メカニズム事業として注目されていることが挙げられる⁷⁾。Shirai らの式²⁾に基づけば、2009 年度に POME 処理プロセスから発生したメタンガス量は 147 万トンであり、この値を二酸化炭素量に換算すると 3,100 万トンである（メタンの温室効果係数を二酸化炭素の 21 倍として計算）。これは、日本の温室効果ガス削減目標量（鳩山コミットメント）の約 10%に相当する値である。しかしながら、密閉型嫌気性消化槽の処理特性に関する詳細な報告はまだない。加えて、密閉型嫌気性消化槽に限らず、脂質除去および酸生成を経た POME を処理するリアクターに関する知見は数件あるが、直接 POME を処理しているリアクターに関する知見はほとんどなく、実規模レベルでの POME の分解挙動に関しては不明な点が多い。

本研究では、マレーシアで稼働している POME を直接処理している密閉型嫌気性消化槽を約 2 ヶ月間モニタリングすることで、低 pH かつ高濃度脂質含有有機性廃水である POME の処理特性を把握した。また、消化槽内の汚泥の微生物群集構造解析を行い、POME の分解に携わる微生物群集を明らかにした。

2. 実験方法

(1) 嫌気性消化槽について

マレーシアにあるパームオイルプランテーション面積 465 km²、年間 Fresh Fruits Bunch 30 万トンを処理する Sime Darby Plantation 社 West Oil Mill にある嫌気性消化槽を調査対象とした。対象消化槽は、

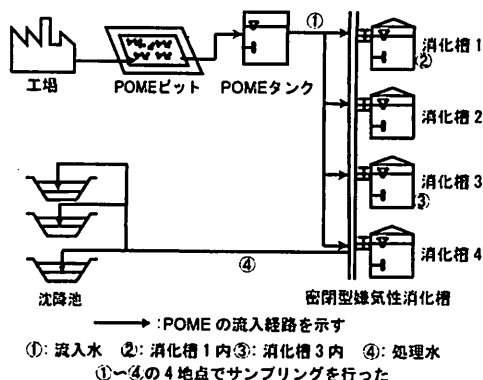


図-1 工場から排出された POME の処理フロー

密閉型嫌気性消化槽の形式にしてから 1 年以上は稼働している（詳細な稼働期間は不明）。調査期間中、工場稼働日には約 300-500 m³/d の POME が排出されていた。工場から排出された POME はまずピットに貯められ、次にタンクに一時的に貯蔵された後、4 つの嫌気性消化槽に流入し処理される（図-1）。嫌気性消化槽の 1 つ当たりの容量は 3,100 m³ である。各嫌気性消化槽は攪拌装置付きの完全混合型リアクターである。調査は 11 月と 12 月の 2 ヶ月間行い、嫌気性消化槽への流入水と処理水は週に 2 回、嫌気性消化槽内は調査期間中に 4 回採取した。

(2) 水質分析

採取した試料は、それぞれ pH、温度、COD_{Cr}（以下 COD と示す）（HACH）、SS、VSS（下水試験法）、タンパク質（ローリー法）、糖（フェノール硫酸法）、脂質（ヘキサン・イソプロパノール法）、VFA（ガスクロマトグラフ FID 型検出器）、LCFA（ガスクロマトグラフ）、をそれぞれプロトコルに従って測定した。また、タンパク質、糖、脂質の COD 換算値をそれぞれ 1.16、1.07、2.5 mgCOD/mg と仮定した。

(3) ガス組成

本研究で対象とした嫌気性消化槽にはガスサンプリングポートがなかったため、ガスの発生量を測定することができなかった。そこで、嫌気性消化槽中の汚泥をサンプリングし、バイアル実験を行うことで発生ガスの組成を調査した。実験は、バイアル瓶に汚泥を入れ、気相部に窒素を置換した後、35℃で静置した。経時的にガスをサンプリングし、ガスクロマトグラフでガスの組成を測定した。

(4) クローン解析

微生物群集構造解析については嫌気性消化槽中の汚泥を対象に *Bacteria* 及び *Archaea* の 16S rRNA 遺伝子

に基づいたクローン解析を行った。DNA抽出にはMobio社のUltraClean Soil DNA Isolation Kitを用いた。PCRは*Bacteria*に関してはEUB8FとUNIV1500Rを用い、*Archaea*に関してはArc109FとUNIV1500Rを用いた(表-1)。PCR反応試薬にはTaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (TaKaRa)を用いた。PCR反応は、*Bacteria*に関しては初期変性を95°Cで5分を行った後、変性95°C 30秒、アニーリング50°C 30秒、伸張反応72°C 2分を23サイクル行い、最後に伸張反応72°C 7分を行った。*Archaea*に関しては初期変性を95°C 5分で行った後、変性95°C 30秒、アニーリング52°C 30秒、伸張反応72°C 2分30秒を24サイクル行い、最後に伸張反応72°C 7分を行った。PCR産物の精製は、QIAGEN社のMinElute PCR Purification Kitを用いて行い、Invitrogen社のTOPO TA cloning kitを用いてクローニングを行った。*Bacteria*は106クローン、*Archaea*は29クローン採取し、約600塩基長の塩基配列を解説した。クローンはmothur¹¹⁾を用いて97% identityを閾値としたOperational Taxonomic Unit (OTU)に分類した。Chao 1, ACE, Shannon-Wiener

の算出にはEstimate S ver. 8.2.0 (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>)を用いた。Coverage¹²⁾およびEvenness¹³⁾は既報に従い算出した。また、各OTUの代表配列を用い、系統解析ソフトARB¹⁴⁾およびNCBIのBLAST相同性検索ツール(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いて近縁種の推定を行った。

(5) 定量real-time PCR

Bacteria, *Archaea*, *Methanosaeta* 属, *Methanospirillum* 属, *Syntrophomonas* 属を標的としたTaqMan probe法による定量real-time PCR法を行った。試薬はPremix Ex Taq™ (タカラバイオ社)を用いた。使用したプライマー及びプローブの塩基配列および条件は表1の通りである。PCR増幅は、初期変性95°C30秒の後、*Bacteria*: 変性95°C 5秒、アニーリング60°C 20秒、伸張72°C 10秒を45サイクル、*Archaea*: 変性95°C 5秒、アニーリング60°C 20秒、伸張72°C 10秒を50サイクル、*Methanosaeta*属: 変性95°C 5秒、アニーリング60°C 20秒、伸張72°C 10秒を50サイクル、

表-1 クローニングと定量 real-time PCR 時に使用したプライマーとプローブ

標的	名称	塩基配列 (5'-3') ^{*1}	参考文献
クローニング			
<i>Bacteria</i>	Bac8F	F primer	aga gtt tga tcm tgg ctc ag (8)
	UNIV1500R	R primer	ggh tac ctt gtt acg act t (8)
<i>Archaea</i>	ARC109F	F primer	ack gct cag taa cac gt (9)
	UNIV1500R	R primer	ggh tac ctt gtt acg act t (8)
定量real-time PCR			
<i>Bacteria</i>	Bac338F	F primer	act cct acg gga ggc ag (10)
	Bac516Fm	TaqMan	tgc cag cag ccg cgg taa kac (10)
	Bac805R	R primer	gac tac cag ggt atc taa tcc (10)
<i>Archaea</i>	Arc787F	F primer	att aga tac ccs bgt agt cc (10)
	Arc915F	TaqMan	agg aat tgg cgg ggg agc ac (10)
	Arc1059R	R primer	gcc atg cac cwc ctc t (10)
<i>Syntrophomonadaceae</i>	Synm653F	F primer	tga ggg cag gag agg dha g this study
	Synm736R	TaqMan	ctc agc gtC agg ghc agt cCa gdm a this study
	Synm1109aR ^{*2}	R primer	gtt agc aac taa tag car ggg ttg this study
	Synm1109bR ^{*2}	R primer	gtt agc aac taa tgg caa ggg ttg this study
	Synm1109cR ^{*2}	R primer	gtt agc aac taa cag caa ggg ttg this study
<i>Methanosaeta</i>	Mst702F	F primer	taa tcc tyg aag gac cac ca modified from (10)
	Mst753F	TaqMan	acg gyA agg gac gaA arc tag g modified from (10)
	Mst862R	R primer	cct acg gcr ccv acm ac modified from (10)
<i>Methanospirillum</i>	Mmb282F	F primer	atc grt acg ggt tgt ggg modified from (10)
	Msp402F	TaqMan	agt gcc agc aca ggc tgg ct this study
	Mmb832R	R primer	cac cta acg crc ath gtt tac modified from (10)

^{*1} LNAは大文字で表記

^{*2} Synm1109aR, Synm1109bR, Synm1109cRは2:1:1の割合で混合して使用

*Methanospirillum*属: 変性95℃ 5秒, アニール60℃ 20秒, 伸張72℃ 10秒を50サイクル,
*Syntrophomonas*属: 変性95℃ 5秒, アニール62℃ 20秒, 伸張72℃ 10秒を50サイクル行った。

3. 実験結果と考察

(1) 密閉型嫌気性消化槽内によるPOME処理

本研究では、11-12月の約2ヶ月間、POMEを処理する密閉型嫌気性消化槽のモニタリングを行った。消化槽への流入水と消化槽からの流出水（処理水）を週に2回、また消化槽内から調査期間内に4回サンプリングし、COD、SS、VSS、タンパク質、糖、脂質、VFA、高級脂肪酸を測定した。表-2に流入水と処理水と消化槽内の水質プロファイルを示す。また、図-2に調査期間中の流入水と処理水のCODの経時変化を示す。消化槽に流入するPOMEの全CODは49,800-71,800 mgCOD/Lと高濃度かつ大きな変動があり、また、全CODの約50%を固形性CODが占めていた。調査期間中の全COD除去率は73%、溶解性COD除去率は93%であり、安定した処理が行われていた。

嫌気性消化槽への調査期間中のPOMEの流入量は総量で13,200 m³であり、調査期間が53日であるので、約260 m³/dのPOMEが容量3100 m³×4の消化槽に流入すると考えると、水理学的滞留時間(HRT: Hydraulic Retention Time)は48日、有機物負荷(OLR: Organic Loading Rate)は1.3 kgCOD/m³・dと算出された。調査対象消化槽は実稼働しているため、HRTやOLRは工場の稼働状況に影響される。本工

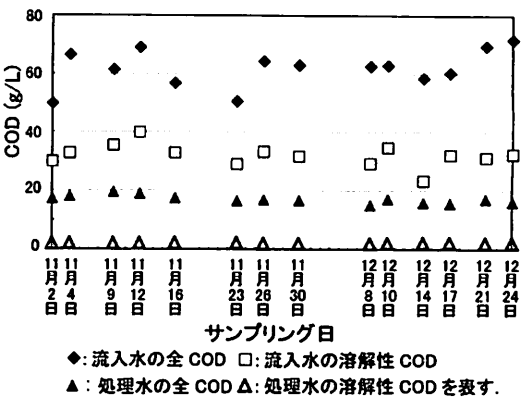


図-2 流入水と処理水のCOD経時変化

場では消化槽へのPOMEの流入は、多い時期(2~8月)とそうでない時期(9~1月)に分かれるが、今回の調査期間は、流入が少ない時期であった。年間の平均流入量は約300 m³/dであり、流入が多い時期には約340 m³/dと、流入が少ない時期の約1.3倍量流入している。流入POME濃度がほとんど変わらないとすれば、本研究で調査した嫌気性消化槽は、1.7 kgCOD/m³・d程度まで負荷が上昇すると推察される。

表-3にこれまでに報告されているPOMEを処理する実規模システムに関する知見をまとめた。これまでに実規模システムでは、嫌気性ラグーン¹⁵⁾、開放型嫌気性消化槽⁵⁾、密閉型嫌気性消化槽¹⁶⁾によるPOME処理が報告されている。POMEを処理する実規模システムのOLRは1.3-3.5 kgCOD/m³・dである。今日、多くのパームオイル工場が採用している嫌気性ラグーンシステムは、メタン生成ラグーンの前段に通常数個の酸生成ラグーンを設けている。また、

表-2 流入水、処理水、消化槽内の水質プロファイル

	流入水	処理水	消化槽内
pH	3.7-4.8	7.0-7.9	7.0-7.5
温度	47	35	35
COD _{Cr} (mgCOD/L)	49,800-71,800	15,100-19,500	10,400-20,100
溶解性	23,300-39,800	1,840-2,190	2,010-2,450
SS (mg/L)	16,200-26,200	11,100-16,300	10,400-13,700
VSS (mg/L)	14,100-22,100	8,100-10,100	8,300-9,800
VFA (mgCOD/L)	5,150-16,070	110-310	0-210
タンパク質 (mgCOD/L)	8,800-17,300	4,600-10,500	4,800-10,600
溶解性	1,900-6,100	700-1,300	600-1,200
糖 (mgCOD/L)	8,300-19,500	1,300-2,400	1,400-4,100
溶解性	4,200-12,100	170-270	180-210
脂質 (mgCOD/L)	16,000-23,800	1,300-5,800	500-3,000

表-3 実規模で稼働している POME 処理に関する既往の知見

処理システム	容量 (m ³)	期間 (日)	COD (g/L)	HRT (日)	OLR (kgCOD/m ³ ・d)	COD除去率 (%)	メタン含有率 (%)	参考文献
密閉型嫌気性消化槽	3,100×4	50	50-72	48	1.3	73	69	this study
密閉型嫌気性消化槽*	2,500×3	-	45-70	18	2.6-3.5	80-85	54-70	(16)
嫌気性ラグーン* (メタン生成ラグーンのみ)	7,500×4	364	56	40	1.4	98	35-70	(15)
開放型嫌気性消化槽	3,600×6	364	43	20	2.2	80	14-49	(5)

*前段に酸生成ラグーンあり。

既報の密閉型嫌気性消化槽の前段にも酸生成ラグーンが設けられている。酸生成ラグーン役は、酸生成の他、POME中の繊維分や脂質分をスカムとしてトラップする事で、メタン発酵の阻害因子（繊維質や脂質など）を減らすことであると考えられる。POMEを処理する様々なラボスケールリアクターでは、OLRが10 kgCOD/m³・d以上のものも多く存在し^{17,18,19)}、高いものでは40 kgCOD/m³・dという高負荷を達成した¹⁷⁾との報告がある。実験期間が短く、長期間運転した場合に起こりうる問題（繊維分の蓄積やスカムの発生）に対する議論が不十分なものも多いが、これらの報告では、POMEを希釈する前処理により脂質を除去するなどして^{17, 18)}、メタン発酵の阻害因子を減らしている。すなわちメタン発酵プロセスに入る前に、適切な前処理を行うことで、より安定的な処理を行うことが可能になると考えられる。

一方、論文として報告されている開放型嫌気性消化槽や本研究で調査した密閉型嫌気性消化槽は、POMEを直接消化槽に流入させている。POMEを直接流入させるメリットとして、酸生成ラグーンを設置しなくてもよくなるため、必要な面積が少なくすむことや、発生したスカムの処理が不要である一方で、繊維分や脂質など、メタン発酵処理の律速因子となりうる物質が高濃度に反応槽に流入することになる。そのため、このような反応槽におけるPOMEの各種成分の分解挙動を把握すること、またそこに存在する微生物群集構造を理解することは、本プロセスを理解する上で重要であると考えられる。

(2) POME の各成分分解挙動

これまでに、POMEを処理する実規模システムにおける各種成分の分解挙動を調査した報告はない。表-2 および図-3 に流入水と処理水と消化槽内の全CODの内訳を示す。完全混合型の消化槽であるため、消化槽内と処理水の各成分の水質分析結果はほぼ同じ値を示した。消化槽への流入水はpHが4.3と酸性であったが、嫌気性消化槽内が7.3、処理水

が7.2であり、消化槽内と処理水は中性に変移していた。温度は、流入水では47°Cと高温であったが、消化槽内と処理水は35°Cで、消化槽内でPOMEは中温処理されていた。流入水のタンパク質濃度は8,800-17,300 mgCOD/L、処理水のタンパク質濃度は4,600-10,500 mgCOD/Lで、タンパク質の除去率は60%であった。流入水の糖の全COD濃度は8,800-17,300 mgCOD/Lであった。処理水では、糖の全CODは87%、溶解性CODも97%除去されており、消化槽内で分解されていた。流入水の脂質の全CODは、16,000-23,800 mgCOD/Lであり、流入水のCODの33%を占め高濃度であったが、処理水では脂質の85%が除去されていた。流入水の高級脂肪酸濃度は、脂質濃度の80%を占めていた。パルミチン酸(C16:0)が8,500 mgCOD/L、オレイン酸(C18:1)が7,400 mgCOD/Lであり、高級脂肪酸濃度の53%がパルミチン酸、45%がオレイン酸であった。リノール酸(C18:2)もわずかではあるが含まれていた。処理水の高級脂肪酸濃度は、11 mgCOD/Lで、99%除去されており、消化槽内に高級脂肪酸の蓄積は見られなかった。流入水のVFA濃度は7,400 mgCOD/Lであり、酢酸が55%、プロピオン酸が17%、ノルマル酪酸が24%を占めていた。流出水では全VFAの94%が除去されていた。流入水のSS

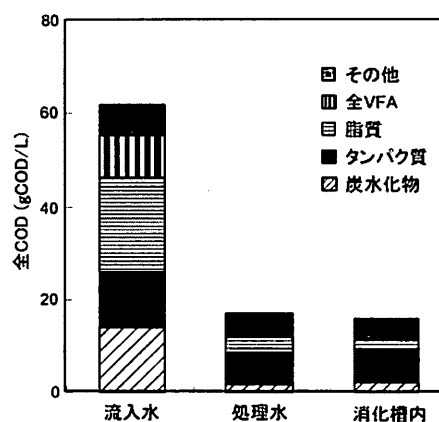


図-3 流入水、処理水、消化槽内の全COD組成

濃度は 16,200-26,200 mg/L, 流出水の SS 濃度は 11,000-16,300 mg/L で, SS 除去率は 33%と低かった。POME の SS 成分は, 主にアブラヤシの実由来のセルロース系物質と言われている⁴⁾。一方で, 1) セルロース系物質の影響が考えられる糖の COD 除去率が高かったこと, 2) 完全混合型の反応槽で攪拌されておりバッチ方式の運転で, 反応槽内と流出水の組成が類似していること, 3) タンパク質の除去率が比較的 low, これは処理水中に含まれる菌体由来のものである可能性が高いこと, などの理由から流出水の SS 成分は主に汚泥であると考えられる。後述するように, 繊維分を分解すると推察される微生物群集に近縁なクローンも多数得られていることから, POME 中のセルロース系物質主体の SS 成分は消化槽内で分解されていると考えられる。

また, 本研究の調査対象とした密閉型嫌気性消化槽にはガスサンプリングポートがなかったため, バイアル内培養によるガス組成率のみ測定をおこなった。その結果, 発生したガスの 69%がメタンであった。

(3) POMEを処理する微生物群集構造

POMEを処理する微生物群集に関しての知見は少なく, どのような微生物が存在していて, どのような働きをしているのかほとんどわかっていない。POMEを処理する密閉型嫌気性消化槽に関しては, *Archaea*の群集構造に関する報告があるものの²⁰⁾, 詳細な知見はなく, また*Bacteria*に関しては全くない。そこで, 嫌気性消化槽中の汚泥を対象に*Bacteria*及び*Archaea*の16S rRNA遺伝子に基づいたクローン解析を行った(表-4)。*Bacteria*に関しては106クローン, *Archaea*に関しては29クローンを解析した。シーケンスデータから97%相同性を閾値としたOTUに分類したところ, *Bacteria*は48, *Archaea*は2のOTUが得られた。Coverageは*Bacteria*が0.74, *Archaea*が0.97であり, 特に*Archaea*については非常に高い値となった。Chao1, ACEおよびEvennessから分かるように*Bacteria*は多様性に富んだ微生物群集構造であると考えられるが, *Archaea*は特定のOTUが優占しており, 単純な構造をしていると考えられた。

表-4に*Bacteria*および*Archaea*の門レベルおよび属レベルでの微生物群集構造を示す。*Bacteria*のクローンの42%が*Firmicutes*門に属し, その次に多い*Bacteroidetes*門と合わせると, この2門に属するクローンだけで全体の70%を占めた。最も割合の大きかったOTUは11% (12クローン) を占めていた。この

表-4 クローンライブラリー

	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>
クローン数	106	29
OTU	48	2
Chao1	92	2
ACE	86	2
Coverage	0.74	0.97
Evenness	0.91	0.22
<i>Bacteria</i> (門・網分類) クローン数 割合(%)		
<i>Firmicutes</i>	45	42
<i>Bacteroidetes</i>	30	28
<i>Chloroflexi</i>	9	8
<i>Planctomycetes</i>	5	5
<i>Spirochaetes</i>	4	4
<i>Deltaproteobacteria</i>	3	3
<i>Thermotogae</i>	2	2
<i>Synergistetes</i>	2	2
<i>Verrucomicrobia</i>	1	1
Hyd24-12	5	5
クローン数合計	106	100
<i>Archaea</i> (属分類) クローン数 割合(%)		
<i>Methanosaeta</i>	28	97
<i>Methanospirillum</i>	1	3
クローン数合計	29	100

OTUはクローンのみで構成されるクラスターに属していた。このクラスターには, 余剰汚泥処理嫌気性消化槽の他, 牧草などセルロースを多く含む廃水を処理しているリアクターから回収されたクローンが存在していた。また, このクラスターの近縁にもルーメンやセルロースパウダーを分解する微生物群から得られたクローンが存在していた。そのため, このOTUは, 嫌気性消化において重要なグループであるだけでなく, セルロースなど繊維分の分解に関与している可能性が示唆された。本研究で対象とした密閉型嫌気消化槽には, アブラヤシの実由来のセルロース系繊維が除去されずに流入しており, このOTUが繊維分の分解に関わっている可能性が示唆された。この他, アミノ酸をStickland反応により分解することで知られる*Sedimentibacter*²¹⁾に近縁なクローン(9クローン)や糖発酵をする*Petrimonas*属²²⁾に近縁なクローン(4クローン)が高頻度で得られた。これらの微生物群はPOMEに含まれる高濃度のタンパク質や, 繊維分の分解などによって発生する糖類の分解に関与していると考えられる。

また高級脂肪酸分解菌が存在する*Syntrophomonas*

属に近縁なクローンが4 OTU (合計7クローン) 得られた。 *Syntrophomonas*属の中でも高級脂肪酸を分解可能なものとそうでないものに分けられるが、本研究では、オレイン酸やパルミチン酸といったPOMEの主な高級脂肪酸を分解可能な*Syntrophomonas zehnderi*²³⁾や*S. sapovorans*²⁴⁾に近縁な2 OTU (2クローンずつ)、および低級脂肪酸のみ分解可能な*S. wolfei*²⁵⁾に近縁な2 OTU (1クローンと2クローン) が得られた。高級脂肪酸は、汚泥に吸着し、活性阻害や汚泥のウォッシュアウトを引き起こし、メタン発酵プロセスを破綻させることが知られているが、*Syntrophomonas*属が高級脂肪酸および低級脂肪酸を分解しメタン発酵プロセスを安定させていると考えられる。

*Archaea*は、97%が酢酸資化メタン生成細菌である*Methanosaeta*属に分類され(1 OTU, 28クローン)、3%が水素資化メタン生成古細菌である*Methanospirillum*属に分類された(1 OTU, 1クローン)。定量 real-time PCR の結果、*Bacteria*は 3.98×10^5 copies/ng、*Archaea*は 1.48×10^5 copies/ng存在していた。*Bacteria*と*Archaea*の合計を100%とすると、*Bacteria*は73%、*Archaea*は27%の割合で存在していた事になる。*Syntrophomonas*属は*Bacteria*の1%程存在しており、クローニングの結果と比べると若干低い存在率となった。また、*Methanosaeta*属は*Archaea*の50%、*Methanospirillum*属は0.2%を占めていた。この結果はクローニングの結果と同様、酢酸資化性のメタン生成古細菌の*Methanosaeta*属が*Archaea*の主要なグループであることを示していた。しかしながら、嫌気分解が進行するためには水素資化性メタン生成古細菌が不可欠であり、その存在量が極めて少ないという結果になった。定量PCR結果は*Archaea*のポピュレーションの50%が不明であることを示している。同じPOMEを処理する消化槽内の汚泥で行った活性試験の結果、水素資化性メタン生成活性が 0.512 ± 0.217 gCOD/gVSS・d、酢酸資化性メタン生成活性が 0.430 ± 0.074 gCOD/gVSS・dという値が得られている²⁶⁾。非常にポピュレーションの少ない*Methanospirillum*属のみでこれだけの水素資化性メタン生成活性を担っているのか、あるいはクローニングでは検出されず、定量PCRで不明なポピュレーションが水素資化に関わっていると推察される。

4. まとめ

本研究より、密閉型嫌気性消化槽で酸生成ラグーンなどにより脂質除去を行わなくても安定した処理

が行えることが明らかになった。これは、酸生成ラグーンで発生するスカムの処理を行う必要がなく、また、最低限の面積で処理が行えることを意味する。加えて、温室効果ガスのメタンの大気放出を抑制することができる。現在、主流となっている嫌気性ラグーン法や、開放型嫌気性消化槽よりも処理効率面や、環境面において利点があり今後、両システムに替わって普及する可能性があると考えられた。本研究のように高濃度脂質や難分解成分が流入する消化槽内において、微生物群集構造解析結果から、*Bacteria*は*Firmicutes*門、*Bacteroidetes*門の2つの門が全体の70%を占め、主要な微生物群集であることが明らかになった。*Archaea*の群集構造は*Methanosaeta*属が97%を占めた。POMEは、メタン発酵において阻害因子となる繊維分や高級脂肪酸などを多く含むが、本研究の消化槽内には、これらを分解している可能性がある菌が多数存在していた。このような群集構造が消化槽内で高濃度脂質の分解を許容し、安定した処理水質が得られる一因であると考えられた。

謝辞：本研究は、環境省の環境研究総合推進費 (S2-03) および科学技術振興機構 戦略的国際科学技術協力推進事業から支援を受けた。

参考文献

- 1) MPOB: MALAYSIAN OIL PALM STATICS 2009, http://econ.mpob.gov.my/economy/EID_web.htm
- 2) Shirai Y., Wakisaka M., Yacob S., Hassan M.A. and Suzuki S.: Reduction methane released from palm oil mill lagoon in Malaysia and its countermeasures, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, Vol.8, pp.237-252, 2003.
- 3) Hanaki K., Matsuo T. and Nagase M.: Mechanism of Inhibition Caused by Long-Chain Fatty Acids in Anaerobic Digestion Process, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.23, pp.1591-1610, 1981.
- 4) Ma A.N.: Treatment of Palm oil mill effluent, In Singh G., Huan L.K., Leng T. and Weng C.K. (ed.), *Sustainable production of palm oil: A Malaysian Perspective*, Malaysian Palm Oil Association, pp.235-247, 1999.
- 5) Yacob S., Hassan M.A., Shirai Y., Wakisaka M. and Subash S.: Baseline study of methane emission from open digesting tanks of palm oil mill effluent treatment, *Chemosphere*, Vol.59, pp.1575-1581, 2005.
- 6) 白井義人, モハメッド・アリ・ハッサン: マレーシアにおけるパームオイル産業のゼロエミッション化にむけての取り組み, *環境バイオテクノロジー学会誌*, Vol.9, pp.3-10, 2009.
- 7) Hassan M.A., Sulaiman A., Shirai Y. and Abd-Aziz S.: Methane capture and Clean Development Mechanism project for the sustainability of palm oil industry in Malaysia, *Journal of Applied Sciences Research*, Vol.5, pp.1568-1581, 2009.
- 8) Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D. J.:

- 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, Vol.173, pp.697-703, 1991.
- 9) 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, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.64, pp.960-969, 1998.
- 10) Yu Y., Lee C. and Hwang S.: Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method, *Water Science & Technology*, Vol.52(1-2), pp.85-91, 2005.
- 11) Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G. G., Van Horn D.J. and Weber C.F.: Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 7537-7541, 2009.
- 12) Good I.J.: The population frequencies of species and the estimation of population parameters, *Biometrika*, Vol.40, pp. 237-264, 1953.
- 13) Magurran A. E.: Measuring Biological Diversity, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2004.
- 14) Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost, A. König S., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A. s, Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., and Schleifer K.H.: ARB: a software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, pp. 1363-1371, 2004.
- 15) Yacob S., Hassan M.A., Shirai Y., Wakisaka M. and Subash S.: Baseline study of methane emission from anaerobic ponds of palm oil mill effluent treatment, *Science of the Total Environment*, Vol.366, pp.187-196, 2006.
- 16) Tong S.L. and Jaafar A.B.: POME biogas capture, upgrading and utilization, Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress, pp.328-336, 2005.
- 17) Borja R. and Banks C.J.: Comparison of an anaerobic filter and an anaerobic fluidized bed reactor treating palm oil mill effluent, *Process Biochemistry*, Vol.30, No.6, pp.511-521, 1995.
- 18) Borja R. and Banks C.J.: Anaerobic digestion of Palm Oil Mill Effluent using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor, *Biomass and Bioenergy*, Vol.6, No.5, pp.381-389, 1994.
- 19) Chaisri R., Boonsawang P., Prasertsan P. and Chairapat S.: Effect of organic loading rate on methane and volatile fatty acids productions from anaerobic treatment of palm oil mill effluent in UASB and UASF reactors, *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, Vol.29, pp.311-323, 2007.
- 20) Tabatabaei M., Zakaria M.R., Rahim R.A., Wright A.G., Shirai Y., Abdullah N., Sakai K., Ikeno S., Mori M., Nakamura K., Sulaiman A., and Hassan M.A.: PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.12, pp.1-12, 2009.
- 21) Breitenstein A., Wiegand J., Haertig C., Weiss N., Andreesen J.R. and Lechner U.: Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.52, pp.801-807, 2002.
- 22) Grabowski A., Tindall B.J., Bardin V., Blanchet D., and Jeanthon C.: *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.55, pp.1113-21, 2005.
- 23) Sousa D. Z., Smidt H., Alves M.M. and Stams A. J. M.: *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol.57, pp.609-615, 2007.
- 24) Roy F., Samain E., Dubourguier H.C. and Albagnac G.: *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids, *Archives of Microbiology*, Vol.145, pp.142-147, 1986.
- 25) McInerney, M. J., Bryant M. P., HESPELL R.B. and Costerton J.W.: *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.41, pp.1029-1039, 1981.
- 26) 射手園章吾, 久保田健吾, 谷川大輔, 珠坪一晃, 関口勇地, 山口隆司, 原田秀樹: 微生物コミュニティレベルでみる高級脂肪酸阻害メカニズム, 環境工学研究論文集, 印刷中.

(2011. 5. 30 受付)

Performance and microbial community of anaerobic closed digester
treating palm oil mill effluent (POME)

Sachiko SHIBUYA¹, Kengo KUBOTA¹, Daisuke TANIKAWA^{1,2}, Shogo ITEZONO¹
Kazuaki SYUTSUBO³, Takashi YAMAGUCHI², Yuji SEKIGUCHI⁴, S. S. CHEN⁵,
M. F. M. YUNUS⁶, and Hideki HARADA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

³Center for Regional Environmental Research, National Institute for Environmental Studies

⁴Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

⁵Environmental Technology Research Centre, SIRIM Bhd.,

⁶R&D Centre, Sime Darby Research Sdn. Bhd.

Palm Oil Mill Effluent (POME) is discharged during palm oil processing. POME is low pH and contains high concentration of COD with high lipid, protein, and carbohydrate concentrations; and therefore, POME is very recalcitrant wastewater for methane fermentation. In this study, we investigated the performance of commercial-scale anaerobic closed digesters treating POME in Malaysia for two months. POME was treated well in the anaerobic digesters in terms of total and soluble COD removal efficiencies (73% and 93%, respectively). Microbial community analysis revealed that archaeal community was predominated by *Methanosaeta* and microorganisms belonging to *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are major bacteria in this system. In addition to sugar and amino acid degraders, long-chain fatty acid oxidizers belonging to *Syntrophomonadaceae* were also present in the system.