

N-4 膨張軟化前処理稲わらと下水汚泥の混合消化によるメタンガス回収と微生物叢

○中出 貴大¹・大月 紳司¹・西田 裕之¹・池本 良子^{2*}
中木原 江利²・高野 典礼³

¹金沢大学大学院自然科学研究科 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

²金沢大学理工学域 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)

³石川工業高等専門学校 (〒929-0392 石川県河北郡津幡町北中条タ1)

* E-mail: rikemoto@t.kanazawa-u.ac.jp

1. はじめに

下水処理場で行われている嫌気性消化がバイオマス中の有機物を追加的に受け入れられる可能性が高いことが報告されており、バイオマスを下水処理場に集約することによって、バイオガス回収を行う混合メタン発酵が注目されている。植物系バイオマスである稲わらは、約920万トンの賦存量があるにもかかわらず、そのほとんどが水田に鋤き込みされており、水田土壌内のメタン生成古細菌による大気中へのメタンガス放出が懸念されている¹⁾。稲わらを下水処理場へ集約して混合メタン発酵を行うことにより農地からの温暖化ガス排出抑制とバイオガス生成量増大が期待できる。しかし、稲わらのような植物系バイオマスはセルロースやヘミセルロースがリグニンにより固く覆われているため^{2,3)}、微生物による分解が難しく、嫌気性消化には利用されにくい。また、これらのバイオマスは吸水性が悪く、沈降しないため、均一な混合状態の維持が困難である。

筆者らは、稲わらのメタン発酵前処理方法として、膨張軟化処理を取り上げ、実験的検討を行ってきた。膨張軟化処理とは、原料に水分を与え、機械的に圧縮加圧した後、大気中へ放出する方法であり、原料の軟化、吸水性の向上、容量の減少等が期待できる。回分実験により稲わらの膨張軟化前処理によるメタンガス発生量を比較した結果、未処理に比べメタン生成量が約1.5倍に増加することを報告した。そこで、本研究では下水汚泥と稲わらの連続式混合消化実験を行い、メタンガス回収と、微生物叢の変化について検討を行った。

2. 実験方法

Fig. 1 に示す 1L のセパラブルフラスコ内に、種汚泥として金沢市城北水質管理センターから採取した消化汚

泥を投入し、同センターから採取した生汚泥（終沈汚泥と初沈汚泥の混合生汚泥）および稲わらを SRT25 日になるように 1 日 1 回投入した。装置は 35℃ の恒温室内に設置し、マグネチックスターラーで常時攪拌を行った。実験条件を Table 1 に示す。Exp. 1 では膨張軟化処理を施した稲わらを用いて、生汚泥と稲わらの TS 負荷比を 1:0.2 (Run 1), 1:0.5 (Run 2), 1:1 (Run 3) と変化させ、最適な混合比について検討した。Exp. 2 では、生汚泥と稲わらの TS 負荷比 12:0.6 の条件の下、破碎のみを行った稲わらと (Run 5) と膨張軟化前処理 (Run 6) を行ったものの比較を行った。適宜ガス発生量を測定するとともに週 1 回汚泥脱離液の分析を行った。また、反応に関与している微生物叢を解析するために、各装置内の汚泥から抽出した DNA を用いて、古細菌及び真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法を行った。PCR-DGGE 法に用いたプライマーは Table 2 に示す。

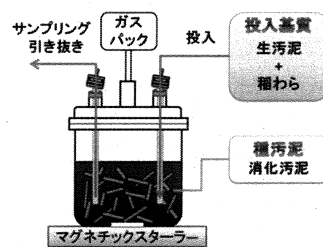


Fig. 1 実験装置の概要

Table 1 実験条件

条件	生汚泥 TS (g/L)	稲わら投入量 (g)	生汚泥と稲わらの TS 負荷 (kgTS/m ³ ・day)	稲わらの前処理
Exp. 1	25	5	1:0.2	膨張軟化処理
		12.5	1:0.5	
		25	1:1	
Exp. 2	30	0	1:2.0	— 破碎 (2~3mm) 膨張軟化処理
		15	1:0.6	
		15	1:0.6	

Table 2 本研究に用いたプライマー

Application	Primer	Specificity	Sequence 5'→3'	Annealing (°C)	Reference
PCR-DGGE	Primer2	Bacteria	ATT CCG CGG CTG CTG G	53	Muyzer <i>et al.</i> 1993
	Primer3	Bacteria	CCT ACG GGA GGC AGC AG	53	Muyzer <i>et al.</i> 1993
	ARC357fGC	Archaea	CCC TAC GGG GCG CAG CAG	48	Watanabe <i>et al.</i> 2004
	ARC691r	Archaea	GGA TTA CAR GAT TTC AC	48	Watanabe <i>et al.</i> 2004

3. 実験結果

(1) メタンガス回収

Run 1-3の累積ガス発生量をFig. 2に示す。Run 1-3を比較すると、基質 TS 比 1 : 0.2 の Run 1 と基質 TS 比 1 : 0.5 の Run 2 は安定したガス生成が進行しており、また、メタン濃度も 60% 程度であった。しかし、最も添加量の多い Run 3 では 4 週目以降から有機酸の蓄積と pH の低下によりガス生成が抑制された。そこで 5 週目に NaOH を添加、7 週目に 6 日間、基質投入を停止するなどの pH 調整を行ったが、メタン発酵の回復は認められなかった。以上のことから、稲わらの混合比は汚泥に対し 0.5 (TS 比) 以下が適切であると判断した。

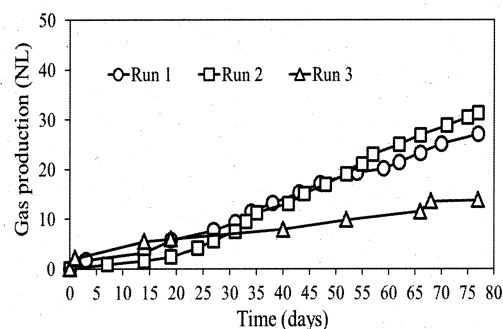


Fig. 2 Exp.1 (Run 1-3) における累積ガス発生量

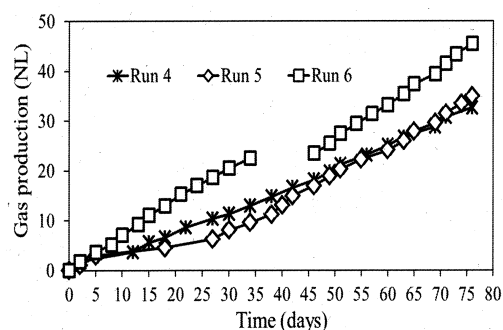


Fig. 3 Exp.2 (Run 4-6) における累積ガス発生量

Run 4-6の累積ガス発生量をFig. 3に示す。汚泥のみのRun 4では、有機酸の蓄積は認められず良好なメタン発酵が進行した。Run 5では13日目から有機酸の蓄積によるpHの低下がみられたが、22日目にNaOHを投入したことによりpHが7付近に回復し、60日目以降は有機酸

の蓄積はほとんど認められなくなった。Run 6では34-45日目の間、装置のトラブルでガス捕集ができなかったが、46日目以降は安定してガス回収を行うことができた。Run 4-Run 6の系列では、膨張軟化処理を施した稲わらを用いたRun 6でメタンガス発生量が最も増加した。

Exp. 1 (Run 1-3) では 30 日目以降、Exp. 2 (Run 4-6) では 60 日目以降のデータから算出したバイオガス及び流出汚泥の性状をTable 3に示す。過剰に稲わらを添加したRun 3を除けば、基質 VS1g から 0.22-0.30mL のメタンガスを回収することができた。Run 5, 6 において汚泥から発生するメタンガス量がRun 4と同じであったと仮定して、稲わら 1g から発生したメタンガス量を推定した結果、破碎のみのもので稲わら VS1g 当たり 0.20L に対し、膨張軟化処理したもので 0.28L と約 1.4 倍に増加し、VS 除去率も向上したことがわかる。回分実験で得られた稲わら VS 1g からのメタンガス発生量は、未処理で 0.20 (L/g) , 膨張軟化処理で 0.29 (L/g) であり、本実験結果とおおよそ一致した。

Table 3 各系列のバイオガスおよび流出汚泥の性状

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6
1日当たりのメタンガス発生量 (L/day)	0.25	0.37	0.11	0.56	0.75	0.79
平均メタン濃度 (%)	60.3	63.4	39.3	58.9	58.7	58.6
平均VS除去率 (%)	47.8	52.3	29.4	63.9	53.0	56.4
基質VS1g当たりのメタン発生量 (L)	0.22	0.26	0.04	0.30	0.27	0.30
生汚泥VS1g当たりのメタン発生量 (L)	—	—	—	0.31	—	—
稲わらVS1g当たりのメタン発生量 (L)	—	—	—	—	0.20	0.28
平均pH	7.0	7.1	5.8	7.2	7.2	7.3

(2) 装置内の微生物叢

真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法の結果をFig. 4に示す。Run 1-3では経日的にバンドパターンが変化し、当初見られなかったバンドも検出された。Run 4-6ではBlankであるRun 4と稲わらを添加したRun 5, 6ではバンドパターンに差異がみられる。Fig. 5はShannon-Wienerの多様性指数を示したものであるが、経日的に多様性指数が増加傾向にあり、Run 4と比べ、Run 6で多様性指数が高い値を示していることがわかる。稲わらを投入することにより稲わらの分解に関与する細菌が増殖し、細菌の多様性が増したものと推定される。

各系列における古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法の結果をFig. 6に、古細菌の系統解析結果をTable 4に示す。稲わらを不添加のRun 4では酢酸資化性の *Methanosaeta* 属古細菌と水素資化性の

Methanoculleus 属古細菌が検出された。これは Chouari, R. らの研究報告と一致している⁹⁾。一方、稲わらを添加した系列では生汚泥のみでは検出されなかった *Methanosarcina* 属古細菌が検出された。通常, *Methanosaeta* 属古細菌は低濃度の酢酸を資化するが, 酢酸濃度が 70mg/L を超える場合, 高濃度条件下でも活動可能な *Methanosarcina* 属古細菌が主として活動すると報告されている⁹⁾。本実験では稲わらの投入により酢酸が生成されたため, 稲わらを添加した系列で *Methanosarcina* 属古細菌が検出されたと考えられる。

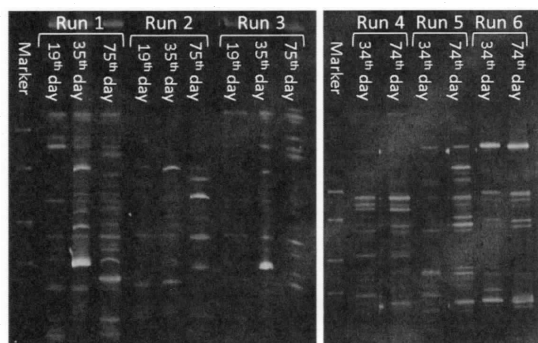


Fig. 4 各系列における真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法の結果

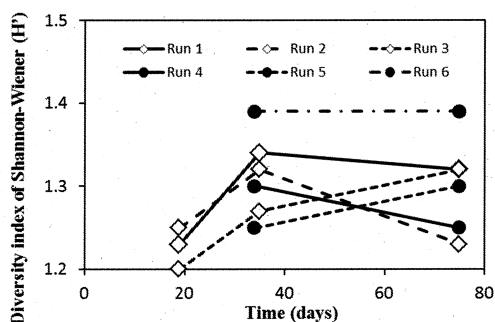


Fig. 5 真正細菌における Shannon-Wiener の多様性指数

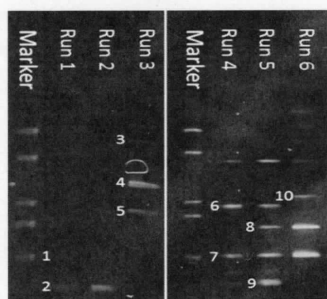


Fig. 6 各系列における古細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法の結果

Table 4 Run 1-6 における古細菌の系統解析結果

	Band No.	species	Accession No.	Identity (%)
Run 1	1	<i>Methanomicrobiaceae</i> archaeon	GU129104	95.7
	2	<i>Methanosarcina</i> sp.	AB300208	95.4
Run 2	2	<i>Methanosarcina</i> sp.	AB300208	95.4
Run 3	3	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AF028692	94.5
	4	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AY196682	97.7
	5	<i>Methanosarcina barkeri</i> str. <i>Fusaro</i>	CP000099	96.3
	Band No.	species	Accession No.	Identity (%)
Run 4	6	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR028242	97.4
	7	<i>Methanospirillum hungatei</i>	AY196683	95.7
	9	<i>Methanolinea tarda</i>	AB162774	92.8
Run 5	6	<i>Methanosaeta concilii</i>	NR028242	97.4
	7	<i>Methanospirillum hungatei</i>	AY196683	95.7
	8	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AJ012094	97.3
	9	<i>Methanolinea tarda</i>	AB162774	92.8
Run 6	7	<i>Methanospirillum hungatei</i>	AY196683	100
	8	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AJ012094	97.5
	10	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AJ012094	98.9

4. 結言

生汚泥と稲わらの連続式混合消化実験を行った結果, 以下のことが分かった。

- (1) 混合比を TS 負荷比 0.5 以下にすることで安定したメタン発酵ができた。
- (2) 膨張軟化処理を行うことでメタンガス生成量および VS 除去率が向上した。
- (3) 細菌叢の解析を行った結果, 稲わらの添加による真正細菌の多様性が増す傾向にあった。
- (4) 生汚泥のみの系列では *Methanosaeta* 属および *Methanoculleus* 属のメタン生成古細菌が検出されたのに対し, 稲わら添加系列ではそれらに加え *Methanosarcina* 属古細菌が検出された。

参考文献

- 1) A. Watanabe, Y. Satoh and M. Kimura: Estimation of the Increase in CH₄ Emission from Paddy Soils by Rice Straw Application, *Plant Soil*, 173, 225-231, 1995
- 2) B. J. Fergus and D. A. I. Goring: The Location of Guaiacyl and Syringyl Lignins in Birch Xylem Tissue, *Holzforschung*, Bd. 24, H. 4, 113-117, 1970
- 3) B. J. Fergus and D. A. I. Goring: The Distribution of Lignins in Birch Wood as Determined by Ultraviolet Microscopy, *Holzforschung*, Bd. 24, H. 4, 118-124, 1970
- 4) Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A.: Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester, *Environ. Microbiol.*, 7, 1104-1115, 2005.
- 5) R.E. Speece 原著, 松井三郎, 高島正信監訳: 産業排水処理のための嫌気性バイオテクノロジー, pp.55-57, 技報堂出版, 東京, 1999.