

高温メタン発酵系における中間生成物及び微生物生態の評価

呉工業高等専門学校専攻科	正	○谷川大輔
呉工業高等専門学校	正	山口隆司
	正	市坪 誠
(独) 国立環境研究所	正	珠坪一晃
(株) 荏原製作所	正	宮 晶子
	正	長屋由亀

1. はじめに

厨芥処理等に現在用いられている高温メタン発酵では、その中間代謝物であるプロピオン酸等の有機酸の蓄積がその発酵の妨げになるという問題点がある。しかし、この問題の適切な回避方法は未だ確立していない。そこで本研究では高温メタン発酵における最適運転条件を検討するために、5系列の完全混合型反応器を運転し、高温メタン発酵における発酵特性の評価を行うと共に、発酵に関わる微生物の生態評価を、微生物の代謝活性及び分子生物学的手法により行った。

2. 実験方法

2.1 集積培養

完全混合型反応器（液層容積 10L）を用い、高温消化汚泥を植種汚泥として、溶性スターチ炭素源とし、SRT25 日、55℃の条件で、5系列の運転を行った。系列は、培養 pH を 6、7、8 としたものそれぞれ S-6、S-7、S-8、硫酸塩添加系を S-S、高負荷系を S-H とした。容積負荷は S-H では 3.0、その他の系では 1.2 kgCOD/m³/d とし、硫酸塩濃度は S-S では 100、その他の系では 33 mgSO₄²⁻-S/L とした。

本実験における運転期間は基質の投入頻度により RUN1～RUN4 に分けられる。RUN1 では投入基質と同程度のメタン生成が確認されてから基質を投入し、RUN2 では週 5～7 回の基質投入を行った。RUN3 では蓄積した有機酸を分解させるため、酢酸濃度が 400 mgCODcr/L 以下となってから基質投入を行った。また、有機酸の蓄積阻害を緩和するため運転 133 日目に pH6、pH8、高基質系について無機培地を用い培養液を 2 倍希釈した。RUN4 では運転 193 日目に植種汚泥を新たに 2L ずつ添加し、3 日に 1 度の基質投入で SRT25 日となるように運転を行った。

2.2 PCR-DGGE 法

運転日数 20 日目 (D20)、41 日目 (D41) の培養汚泥を対象に PCR-DGGE 法を行った。DNA 抽出にはビーズビーダー法を適用し、フェノール・クロロホルム・エタノール沈澱をそれぞれ行った。その後、回収した DNA から細菌の 16SrDNA をターゲットとした PCR 増幅を行った。増幅には、

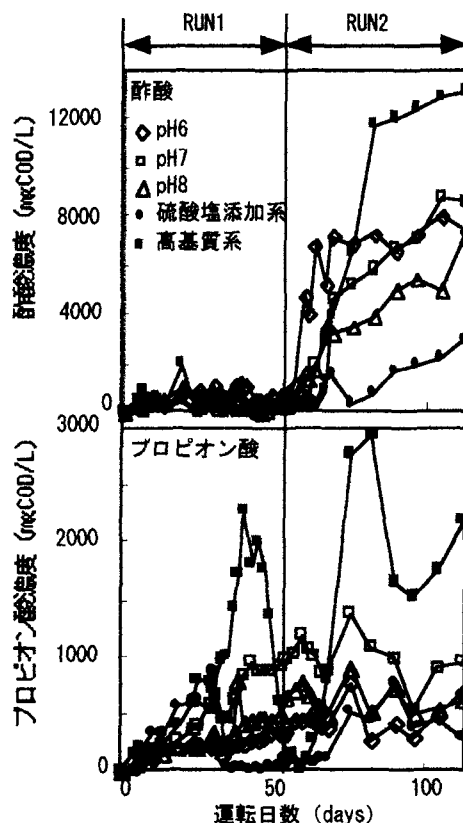


図-1 酢酸・プロピオン酸濃度の経日変化

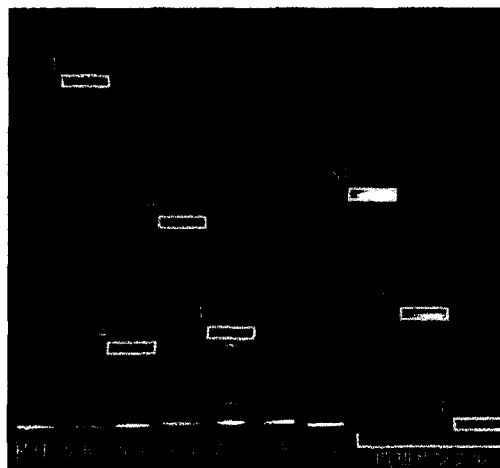


図-2 D20 の DGGE 結果

16SrDNA V3 region (341-534) のプライマーセットを用いた。PCR 産物を変性剤の濃度勾配を 35～55% に設定したポリアクリルアミドゲルを用いて、60℃、200V の条件下で DGGE を行った。その後 Vistra Green で染色し、バンドの回収を行った。回収したバンドは、オートシーケンサーマルチキャピラリー DNA 解析システム CEQ2000

(BECKMAN COULTER) を用いて塩基配列の決定を行った。菌の同定には、解読した塩基配列を NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の BLAST を使い、既知種の中から相同性の高い菌を検索した。

2.3 活性試験

培養汚泥を供試汚泥として、メタン生成活性を評価した。いずれも COD 換算として、gCOD/gVSS/d 単位で求めた。電子供与体には、酢酸（回分初期濃度、2000 mgCODcr/L）、H₂/CO₂（80%/20%、回分初期 140kPa）を用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 発酵特性

図-1 は、各反応器の RUN1、RUN2 期間における蓄積酢酸・プロピオン酸濃度の経日変化を示す。RUN1 の期間では酢酸・プロピオン酸共に高い蓄積は見られなかった。負荷を増大した RUN2 では主に酢酸の蓄積が観察された。

有機酸の蓄積に対する pH の影響（pH6、7、8 系）を比較すると、スターチ系では、pH7 の系 S-7 でプロピオン酸が蓄積しやすい傾向が見られた。高基質系 S-H は、酢酸・プロピオン酸共に蓄積しやすい傾向が見られた。

一方、硫酸塩添加系 S-S では、酢酸、プロピオン酸の蓄積は、ともに低レベルに抑えられた。この結果から硫酸塩添加操作により、酢酸、プロピオン酸の蓄積を抑制可能であることが分かった。

3.2 PCR-DGGE 法

図-2 に D20 の DGGE の結果を示す。図中の既知サンプル S1、S2 はスターチ分解酸生成菌、P はプロテイン分解酸生成菌をそれぞれ示すバンドである。全系列中に S1、P のバンドが確認されていることから、集積培養により、これらの酸生成菌が増殖したことが考えられる。また、今回の次実験では、図中の 1～4 のバンドを回収し、シークエンス解析を行ったところ、3、4 の 2 本のバンドの延期配列の決定に成功した。シークエンス結果より、バンド 3 と 4 は P と同様の *Thermo bacteriodes proteolyticus* に近いことが確認された。

3.3 活性試験

図-2 は、RUN1～2 の期間における S-S、S-H 系の代謝活性の変化を示す。両系列に共通して、運転 91 日目における酢酸資化性メタン生成活性が著しく低下していることが見受けられる。この向は、その他の系列についても確認された。この

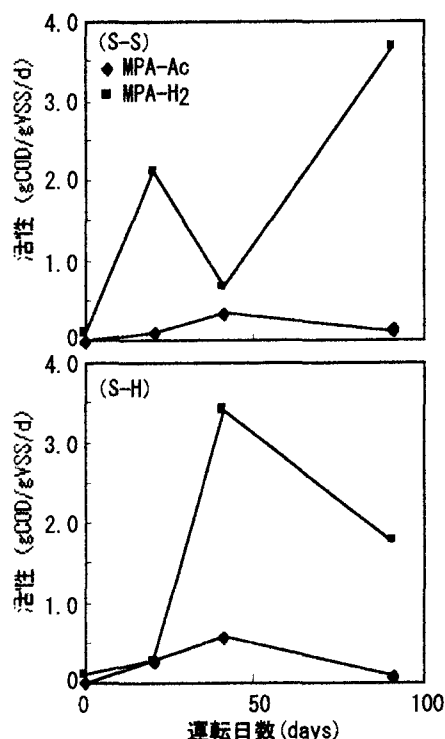


図-3 S-S、S-H 系の代謝活性変化

活性の低下に対応して酢酸の蓄積が見られたことから（図-1）、酢酸資化性メタン生成古細菌の活性の低下により、酢酸の蓄積がもたらされたと考えられる。この原因としては、負荷上昇により酢酸資化性メタン生成古細菌が酢酸を分解し終わる前に基質が投入され、酢酸が徐々に蓄積して、酢酸自体が阻害要因となったことが考えられる。

次に、図-1 において、S-S と S-H の系でプロピオン酸の分解が起きている期間の活性に注目すると、両系列共に水素資化性メタン生成活性が高くなっている（図-3）。このことから、プロピオン酸を効率的に分解するためには水素資化性メタン生成古細菌が水素除去者として高活性を有することが重要であることが分かった。

4. 結論

- (1) 硫酸塩の添加操作により、酢酸、プロピオン酸の蓄積を低く抑えることができた。
- (2) 全系列中にスターチ分解酸生成菌 S1、プロテイン分解菌 P が存在していた。
- (3) プロピオン酸を効率的に分解するためには水素資化性メタン生成古細菌が水素除去者として高活性を有することが重要であることが分かった。

【謝 辞】本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施しました。関係者各位に深謝致します。