

# セルロース含有廃棄物の高温メタン発酵処理系における微生物群集の挙動解析

立澤 知子\* 郝 凌云\*\* 菖蒲 昌平\*\*  
片岡 直明\*\* 宮 晶子\*\*\*

## Behavior of Anaerobic Microbial Consortia in Thermophilic Methanogenic Sludge - Treating Cellulose-containing Wastes -

by Tomoko TATSUZAWA, Ling-yun HAO, Shohei AYAME, Naoaki KATAOKA, & Akiko MIYA

The behavior of acidogenic and methanogenic microbial consortia in cellulose-containing wastes was studied to collect physiological and ecological data for enhancing the degradation and methane gas yield of anaerobic digestion processes. In particular, the effect of HRT (Hydraulic Retention Time) on the profile of four acidogenic and three methanogenic anaerobic microorganisms in a thermophilic anaerobic digester, for treating toilet paper and organic wastes, was investigated by a quantitative PCR method. The methanogenic activity and population of microbial consortia was found to be stable under a run under an HRT of 35 days and an OLR (Organic Loading Rate) of 2.3 g-COD<sub>Cr</sub>/(L·d). The JC3 strain was found to be the predominant cellulose degrader while the reactor was undergoing stable operation. In the case of a run under an HRT of 23 days, the loss of methanogenic activity could not be recovered by stopping the feeding. However, VFA (Volatile Fatty Acids) accumulation, especially acetate and propionate, continued and the population of genus *Methanoculleus* could not be recovered.

**Keywords:** Anaerobic digestion, Cellulose-degrading bacteria, Methanogenesis, Thermophilic, Polymerase chain reaction (PCR), Quantitative PCR

### 1. はじめに

日常生活を営む過程で大量に発生する代表的な有機性廃棄物である生ごみ、紙ごみ、し尿・浄化槽汚泥は、水分を多く含む。このため、従来の焼却処分では大量の化石燃料を消費すると共に、多量の二酸化炭素を生成し、また、ダイオキシン等の有害物質の発生源ともなっている。更に、焼却灰を含めた廃棄物の埋め立て処分地の確保も困難になりつつある。一方、循環型社会基本法(2000年)の施行により、これらの含水率の高い有機性固形物を含む廃棄物の処理は、資源・エネルギー回収型の処理に移行することが求められている。

メタン発酵法を用いると、嫌気的な環境条件下で複数の嫌気性細菌群により、有機物をエネルギーとしてのメタンガスにまで転換することができる。特に下水余剰汚

泥や畜産廃棄物に対して、有用な生物学的処理・減容化方法として知られており、これまで焼却・埋め立て処理されてきた有機性廃棄物に対しても有効である。

メタン発酵は、炭水化物、たんぱく質、脂質、セルロースなどの有機物を、酸生成細菌(加水分解・酸生成細菌及び水素生成酢酸化細菌)が酢酸と水素に分解し、この酢酸と水素を、メタン生成古細菌がメタンに転換しメタンガスを得る反応である(図1)。

一般の有機性廃棄物中には分解速度が異なる、易分解性の炭水化物やたんぱく質と、難分解性のセルロースなどが混在している。従来普及してきた中温(35℃)メタン発酵では、難分解性のセルロースを多く含む廃棄物、例えば、下水汚泥、生ごみ、古紙・パルプ系又は茶・コーヒー抽出粕などは、セルロースの加水分解・酸発酵反応が律速となり、30から40日程度の長い処理時間を必要とした。しかも、その有機物分解率(セルロースのメタンへの転換率)が易分解性の廃水などと比較してかなり低いことが知られている<sup>1)</sup>。一方、高温(55℃)メタン発酵では、セルロースは比較的速やかに分解することが知られているが、易分解性有機物の割合が高い廃棄

\* (株)荏原総合研究所 生物研究室

\*\* 〃 〃 〃 医学博士

\*\* 荏原エンジニアリングサービス(株)

\*\* 環境事業カンパニー 水処理事業本部 環境開発統括部  
水環境開発室 第二グループ 博士(農学)

\*\*\* (株)荏原総合研究所 生物研究室 工学博士

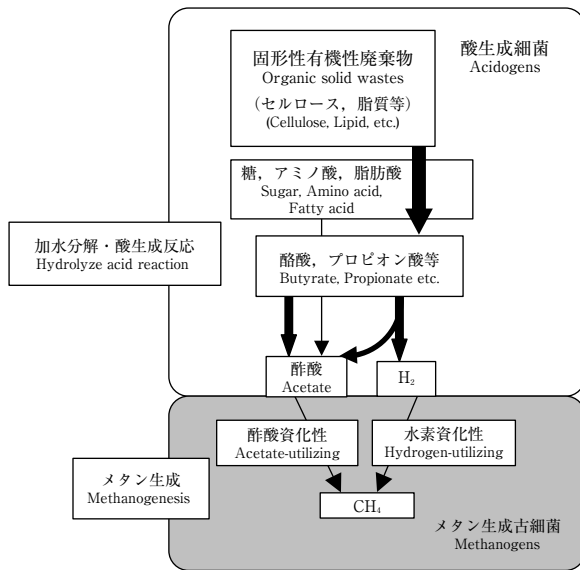


図1 メタン発酵処理の反応系

Fig. 1 The main degradation pathways in anaerobic digestion

物の場合は、原水投入により急激な酸生成が始まり、これと同時に水素ガスが多量に発生する。この水素をメタン発酵槽内では、主に水素資化性メタン生成古細菌が消費するが、原水投入初期にその消費能力以上の水素ガスが生成されるとプロピオン酸が蓄積しやすくなる<sup>2)</sup>。更に、酪酸やプロピオン酸などが蓄積することにより汚泥のpHの低下を引き起こし、メタン生成古細菌の活性を低下させ、メタン発酵処理性能や安定性の低下を引き起こす<sup>3)</sup>。

以上のように高温メタン発酵で処理を行う場合は、こ

のような急激な酸生成を制御し、有機性固形物を含む廃棄物から安定にエネルギー回収することが課題となっている。

我々は、高温メタン発酵処理において、難分解性セルロースを含む有機性固形性廃棄物を効率よく安定にメタンに転換することを目指し、様々な運転条件における酸生成細菌とメタン生成古細菌の挙動を調べてきた。これらの微生物群の挙動を把握することにより、メタン発酵系全体の活性維持にかかわる知見を収集し安定制御につなげていきたいと考えている。

これまでに、セルロース、グルコース、デンプン、大豆たんぱく質をそれぞれ単一基質として55℃、50～60日間集積培養を行い、その汚泥から、主要な有機物を分解する酸生成細菌を同定又は単離した(表1)。

また、これらの酸生成細菌及び代表的なメタン生成古細菌の16S rDNA<sup>\*1</sup>をターゲットとした定量PCR法<sup>\*2</sup>を確立し、固形性有機性廃棄物の連続処理系における挙動を調査したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1 連続処理実験装置及び方法

セルロース含有有機性模擬原水として、生ごみ(182 g/L)とトイレトペーパー(TP)(26 g/L)をミキサ(BLENDERLBC15, CB15, WARING COMMERCIAL)を用いて混合して調整した。原水の水質及び処理条件を図2に示した。連続処理実験は、有効容積3.5 Lの反応槽を三系列(R1, R2, R3)用いて、恒温槽(BWA1110, YAKOU SEISAKUSYO)の水を循環させ55℃で維持し、

表1 高温メタン発酵汚泥で優占化した酸生成細菌

Table 1 Dominant acidogenic bacteria in thermophilic anaerobic digesters

項目 Item	至的溫度 Optimum temp. (°C)	至的pH Optimum pH	基質 Growth sub.	グラム染色 Gram stain	運動性 Mobility	生産物質 Product	近縁株及び 16S rDNAの相関性 Similarity (%)
セルロース分解細菌JC3株 (AB93597) Cellulose-degrading bacterium	55 (45-65)	7.0 (5.3-8.0)	セルロース, セロビオース Cellulose, Cellobiose	-	+	水素, 酢酸, 乳酸 Hydrogen, Acetate, Lactate	<i>Clostridium thermocellum</i> 88%
セルロース分解細菌JC94株 Cellulose-degrading bacterium	55 (45-65)	7.0 (5.3-8.0)	セルロース, セロビオース Cellulose, Cellobiose	-	+	水素, 酢酸, 乳酸 Hydrogen, Acetate, Lactate	<i>Clostridium</i> str. JC3 94%
炭水化物分解細菌 S1株 Carbohydrate-degrading bacterium	60-65 (40-60)	5.5-6.0 (5.5-8.5)	グルコース でんぷん, Glucose, Starch	-	+	水素, 酢酸, エタノール Hydrogen, Acetate, Ethanol	<i>Petrotoga mobilis</i> str. 91%
タンパク質分解細菌P株 (AB162803) Protein-degrading bacterium	60-65 (35-70)	6.3 (5.6-8.5)	ペプトン, イースト Peptone, Yeast	-	-	水素, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸 Hydrogen, Acetate, Propionate, Butyrate	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> str. 91%

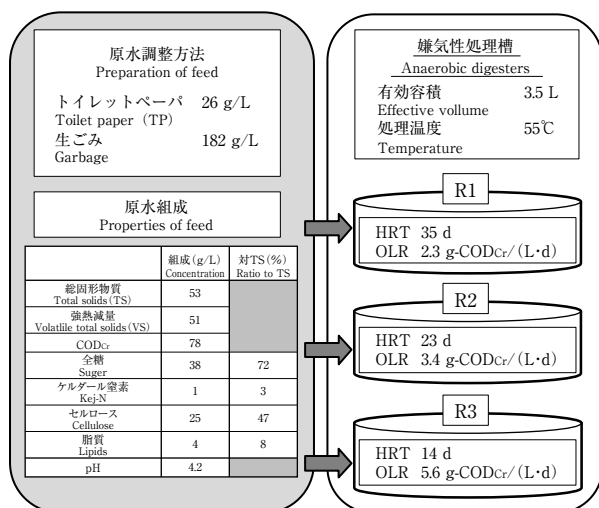


図2 実験条件

Fig. 2 Operational conditions

約168日間行った。上記原水を用いて、各処理条件で、各処理装置に1回/日で原水を投入し、連続処理実験を行った。

種汚泥には、同様の原水を用い、HRT35日、OLR 2.3 g-COD<sub>Cr</sub>/(L·d) 55°Cの条件で半年間馴致した高温メタン発酵汚泥を用いた。

### 2-2 処理状況の分析方法

各3系列の連続処理装置について、メタン発酵の活性をガス生成量で毎日把握し、ガス組成(1回/週)をTCDガスクロマトグラフィー [G.L. Science, model GC322, stainless-steel column of active carbon (30/60 mesh)] を用いて測定した。揮発性脂肪酸 (VFA: Volatile fatty acids) は、液体クロマトグラフィー (ERC-7515A, ERC, カラム OVENA0-30, Shodex) を用いて測定した。その他の分析項目として、全糖量は、フェノール硫酸法<sup>4)</sup>で、また、セルロースはソックスレー処理後に1.25%硫酸と1.25%水酸化ナトリウムで処理し、フェノール硫酸法で測定した。

### 2-3 菌相解析方法

各3系列の連続処理装置から、毎日汚泥を採取し菌相解析用試料とした。採取汚泥0.5 mLからphenol/chloroform法<sup>5)</sup>によりDNAを抽出した。汚泥中の菌の挙動は、酸生成細菌として、セルロース分解細菌JC3株<sup>6,7)</sup>及びその近縁株JC94株、たんぱく分解細菌P株<sup>8,9)</sup>、炭水化物分解細菌S1株を、またメタン生成古細菌として酢酸資化性 *Methanosarcina* 科 (Msar)、水素資化性 *Methanoculleus* 属 (Mcul)、*Methanobacteriaceae* 科 (Mtb) について LightCycler (Roche) と LightCycler FastStart DNA

Master SYBR I Kit (Roche) を用いて定量PCR法で調査した。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 各処理条件の発酵特性

各3系列の各処理状況を図3に示した。R1 (HRT35日) では、約6箇月間安定に連続処理を行うことができた。この間の揮発性脂肪酸量は0.5 g/L以下と、特に蓄積は認められず、良好にメタンガスを回収することができた。

これに対し、R2 (HRT24日) では、実験開始から約2週間後に揮発性脂肪酸が増加しpHが低下して、ガス生成量が減少した。処理性能を回復させるため、3日間の原水投入停止により、43日間連続処理をすることができた。しかし、その後は、約2週間の原水投入停止により処理を再開することができたが、pHが7.5から6まで低下し、再び揮発性脂肪酸が2.3 g/L程度蓄積している状態が続き、安定に処理することができなかった。

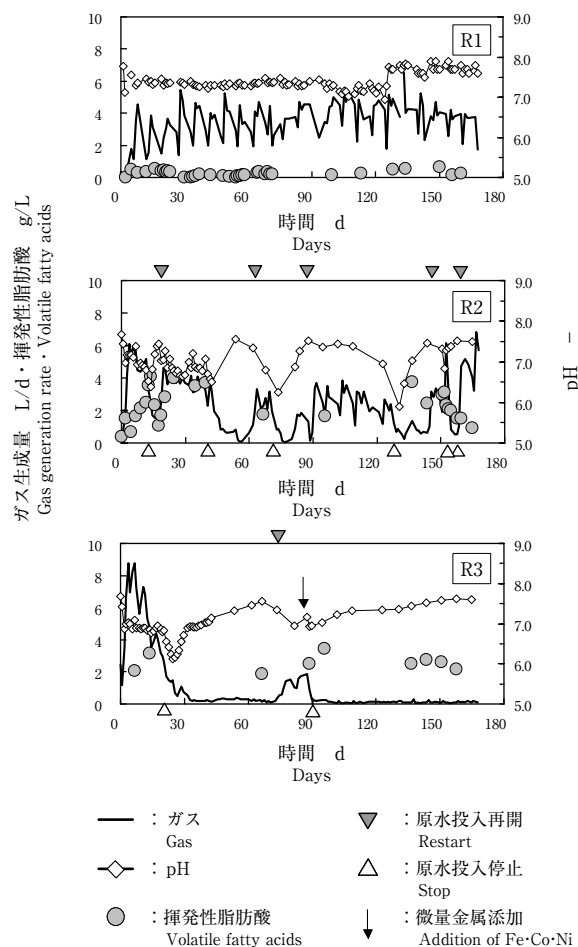


図3 R1, R2, R3の処理状況

Fig. 3 Results of gas generation rate, pH and concentration of volatile fatty acids (VFA) in the digester R1, R2, R3

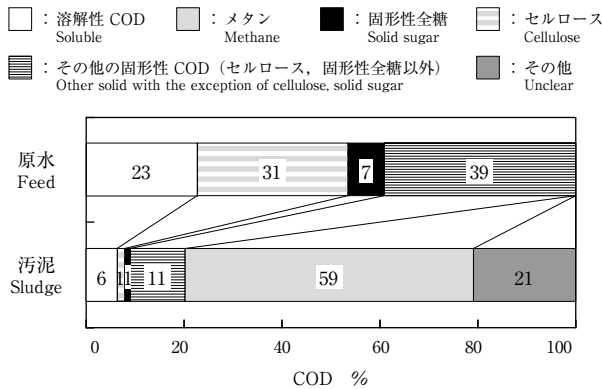


図4 R1の有機物CODの物質収支  
Fig. 4 Mass balance of COD in digester R1

R3 (HRT14日)の高負荷条件では、実験開始から2週間後に、ガス生成量の急激な減少が始まった。更に、その1週間後には、pHが低下し始め、連続処理不能となった。経時25日目に原水の投入を停止したところ、pHが7.6まで回復したので、原水投入を再開したが再度pHが低下した。鉄、コバルト、ニッケルを含む微量元素液を添加したが効果は確認されず、ガス生成活性を回復させることができなかった。

良好に約半年間安定に連続処理をすることができたR1について、有機物CODの物質収支を図4に示した。原水の合計CODを100%とし、これに対し污泥でのCOD除去率は約80%であった。このうち、約59%はメタンガスとして回収することができた。

### 3-2 微生物群集の挙動

R1に関しては運転全期間、R2とR3に関しては実験開始から43日間の処理運転期間中の発酵特性と污泥の微生物挙動解析を行い、処理開始から43日目までのR1, R2, R3の結果を図5に示した。

#### 3-2-1 酸生成細菌の挙動

図5からR1 (HRT35日)では、運転開始から43日目までセルロース分解菌群JC3株は、不安定ながらも菌濃度が増加し、同分解細菌JC94株よりも污泥内で優占化したことがわかる。炭水化物分解細菌S1株およびタンパク分解細菌P株は、ともに連続処理が進むにつれてそれぞれ約1オーダー増加したことが確認された。その後の40日目から160日目までの菌濃度は、JC3株、S1株、P株は約 $10^{12}$  copies/Lであり、JC94株は $10^{11}$  copies/Lから $10^9$  copies/Lに徐々に菌濃度が低下した。

R2 (HRT25日)では、連続処理をすることができた期間中では、R1同様にS1株、P株が増加することが確

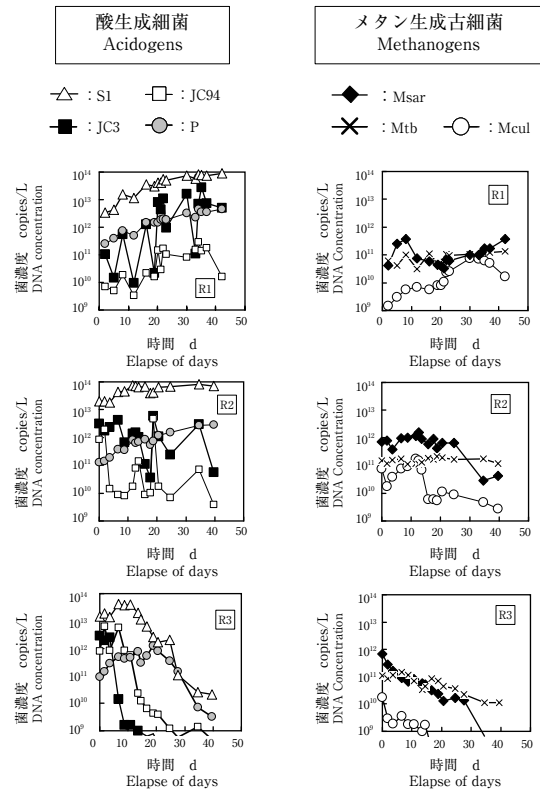


図5 メタン発酵処理微生物の挙動  
Fig. 5 Behavior of microbial consortia in digester R1, R2, R3

認された。また、JC3株は、原水投入停止期間中に約 $10^{12}$  copies/Lから $10^{10}$  copies/Lまで菌濃度が低下し、この期間中にJC3株とJC94株の菌濃度の入れ替わりが確認された。しかし、その後の原水投入再開とともにJC3株の菌濃度が増加し約 $10^{11}$  copies/Lから $10^{12}$  copies/Lを維持し、基質であるセルロースをめぐる競合関係にあるJC94株に対してJC3株が優占化したことを確認した。

R3 (HRT15日)について、ガス生成速度が9 L/dと高かった4日目までは、JC3株は約 $10^{12}$  copies/Lであったが、ガス生成量が急激に減少する前の運転開始から7日目に約2オーダー減少したことが確認された。その後ガス生成の低下とともにJC94株の菌濃度が低下した。これに対し、S1株及びP株は原水投入停止とともに菌濃度が約 $10^{12}$  copies/Lから約 $10^{10}$  copies/Lまで減少した。

R3の污泥中の固形性全糖とセルロースの蓄積量及びJC3株の菌濃度との関係を図6に示した。JC3株の菌濃度の減少とともに固形性全糖が19 g/Lまで増加し、セルロースも40g/L蓄積したことが認められた。43日間連続処理を行うことができたR2では、JC3株の菌濃度が原水投入停止時以外は約 $10^{12}$  copies/Lに維持され、この期間は固形性全糖1.6 g/L、セルロース0.8 g/Lと良好

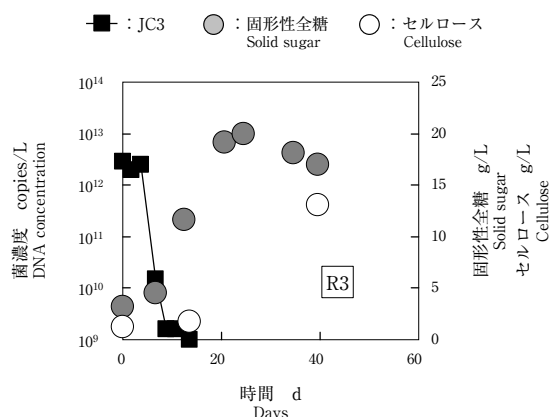


図6 セルロース分解細菌JC3の挙動と固形性全糖とセルロースの蓄積状況

Fig. 6 Concentration of cellulose-degrading bacterium strain JC3 and solid sugar, cellulose in digester R3

に処理されていることを確認している。

以上のことから、セルロース含有模擬原水の高温メタン発酵連続処理系では、セルロース分解細菌であるJC3株が優占化することが確認された。更に、セルロースを良好に分解し、安定に連続処理を行うための一要因として、セルロース分解細菌JC3株の菌濃度を維持することが重要であることが示唆された。

### 3-2-2 メタン生成古細菌の挙動

約6箇月間安定に連続処理を行うことができたR1 (HRT35日)において、その処理開始から43日間では、酢酸資化性Msar及び水素資化性Mtbの菌濃度は約 $10^{11}$  copies/Lで安定していた。これに対し、水素資化性Mculは、経時的に約 $10^9$  copies/Lから約 $10^{12}$  copies/Lまで増加したことを確認した。これらのメタン生成古細菌は、160日目まで約 $10^{10}$  copies/Lから $10^{11}$  copies/Lで菌濃度が維持されたことを確認している。

R2 (HRT25日)では処理開始当初のMcul菌濃度が約 $10^{11}$  copies/Lまで徐々に増加したが、原水投入停止により菌濃度が1オーダー減少し、処理を再開した後も菌濃度の回復が認められず徐々に減少傾向を示した。また、38日目にはMtbの菌濃度の減少が確認されており、その後40日目にはガス生成量が減少した。また、汚泥中の主な揮発性脂肪酸組成は、原水投入停止の前後で酢酸からプロピオン酸に変化した。

R3 (HRT15日)では、7日目まで9 L/dのガス生成が確認されているが、水素資化性Mtb及びMculは処理開始当初より減少傾向を示した。

以上の結果から、セルロース含有模擬原水の高温メ

タン発酵連続処理系では、水素資化性Mtb及びMculの菌濃度が約 $10^{10}$  copies/L以上で維持されることが好ましいと考えられる。

過剰な水素が生成されることで槽内の水素分圧が約10 Pa以上となると、プロピオン酸からの酢酸生成が阻害され、プロピオン酸や酪酸が蓄積する<sup>10)</sup>ことが知られている。一旦プロピオン酸が生成されるとメタンに転換可能な酢酸の生成量の低下を引き起こし、メタン回収率を低下させる。また、谷川らは、プロピオン酸の蓄積が高い水素分圧下のみで生じるのではなく、一時的にも高水素分圧状態に暴露されることにより、酸生成細菌が生成する揮発性脂肪酸組成が主にプロピオン酸となり、またメタン生成活性が低下することを報告している<sup>3)</sup>。更に、一時的な高水素分圧から分圧が低下しプロピオン酸の分解が促進される条件になった場合でも、汚泥中にプロピオン酸の蓄積が続くことも報告している。水素資化性Mculが増殖し約 $10^{10}$  copies/Lで安定に菌濃度が維持されているR1では、揮発性脂肪酸の蓄積濃度が平均0.3 g/Lであり、安定に処理することができたのに対し、R2では原水投入停止後にMculの菌濃度が1オーダー減少し、汚泥中の主な揮発性脂肪酸組成が酢酸からプロピオン酸に変化した。処理開始から14日目までに揮発性脂肪酸が4.0 g/Lまで蓄積したR2では、加水分解・酸生成時に水素も盛んに生成されていることが示唆される。汚泥内には、たんぱく質分解細菌P株のように酢酸やプロピオン酸を生成する酸生成細菌が存在することから、一時的な高い水素分圧の暴露により3日間の原水投入停止によって水素分圧が低下した後も、更に、原水投入停止後に水素資化性Mculの菌濃度も減少していることから、主な揮発性脂肪酸がプロピオン酸に変化したものと考えられる(図7)。

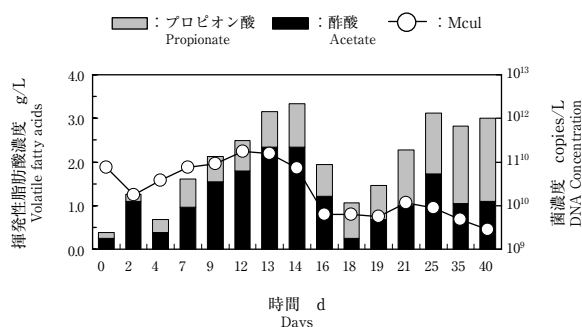


図7 R2における水素資化性Mculの菌濃度と汚泥中の揮発性脂肪酸組成変化

Fig. 7 Concentration of hydrogen-utilizing methanogen Mcul and VFA in digester R2

水素資化性 Mcul の菌濃度の維持がプロピオン酸の蓄積を回避するための一つの要因と考えられ、菌濃度の変化の少ない酢酸資化性 Msar や水素資化性 Mtb に対して、水素資化性 Mcul は本処理系の安定性を評価する菌として、有効であることが示唆された。

#### 4. おわりに

セルロース含有模擬原水の高温メタン発酵連続処理系では、OLR2.3 g-COD<sub>Cr</sub>/(L・d)、HRT35日 (R1) の条件で、約半年間は安定運転することができ、COD除去率は約80%、メタン回収率約59%であった。R1処理期間中のメタン発酵系微生物群の挙動を調査した結果、セルロース分解細菌 JC3株が優占化し、セルロースが良好に分解されていることがわかった。また、その他の酸生成細菌 (S1株, P株) 及びメタン生成古細菌 (Msar, Mtb, Mcul) の菌濃度は、一定に保持することができた。

本処理系で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、水素資化性 Mcul の菌濃度の維持が一つの要因と考える。また、菌濃度の変化の少ない酢酸資化性 Msar や水素資化性 Mtb に対して、水素資化性 Mcul は本処理系の安定性を評価する指標菌として有効であることが示唆された。

異なる分解速度の有機物を含む難分解性のセルロース含固形性廃棄物に対し、高効率かつ安定に処理を制御するためには、処理槽内の水素分圧とメタン発酵系微生物群の関係を明らかにすることが重要であると考えられ、

今後も検討を進めていく予定である。

なお、本研究開発は「生分解・制御メカニズムの解析と制御技術の開発」の一環として、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) から委託を受けて実施した。

※1 微生物に普遍的に存在する遺伝子で、一般的にその配列データの解析により、種の同定を行う。

※2 各微生物に特異的なDNAを用いて、遺伝子のポリメラーゼ連鎖複製反応 (PCR) を利用した定量方法。

#### 参考文献

- 1) De Baere L. : Anaerobic digestion of solid waste : state-of-the-art, *Water Science and Technology*, 41, 3, pp.283-90 (2000) .
- 2) 下水の嫌気処理に関する調査, (社)土木学会, 下水の嫌気性処理に関する調査報告書, pp.135-145 (1989).
- 3) 谷川大輔ら, 高温メタン発酵槽における溶解性・固形性有機物分解に及ぼす硫酸の影響評価, *環境工学論文集*, 42, pp.435-442 (2005) .
- 4) Saha. S. K. ,C.F.Brewer. : Determination of concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr Res.* 17: 254 : 157-67 (1994) .
- 5) Miller D. N. : Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples, *App.l. Environ. Microbiol.*, 65 pp.4715-4724 (1999) .
- 6) Syutsubo *et al.* : *Water Science and Technology*, 52, 1-2, pp.79-84 (2005) .
- 7) 長屋由亀ら, 第37回日本水環境学会年会, pp.282 (2003).
- 8) 長屋由亀ら, 第38回日本水環境学会年会, pp.187 (2004).
- 9) ハオリンユンら : 日本微生物生態学会第20回大会, pp.153 (2004) .
- 10) Harper SR, Pohl and FG : Recent developments in Hydrogen management During Anaerobic Biological Wastewater Treatment, *Biotechnol Bioeng.*, 128, pp.585-602 (1986).