

高温メタン発酵菌群の集積と菌叢解析による変遷の評価

Enrichment of Thermophilic Methanogenic Microflora and Evaluation of Microbial Community Dynamics

中小路 董 多田羅 昌 浩

要 約

メタン発酵技術は、微生物機能によって有機性廃棄物を減容化し、カーボンニュートラルなエネルギーであるバイオガスを生成する。中でも高温メタン発酵は、高効率処理が可能であるが、種汚泥入手が困難なことが普及の妨げとなっている。そこで、世界中のどの地域でも入手が容易な廃水処理施設の余剰汚泥から高温メタン発酵菌群を集積し、処理性能を菌叢解析結果と関連付けて考察した。その結果、78日後には定常状態となり、メタン濃度約60%のバイオガスを生成、T-COD除去率は70%以上となった。また、菌叢解析の結果から、高温メタン生成菌である *Methanosarcina thermophila* と *Methanothermobacter thermoautotrophicus* の集積を確認した。これらのことから、余剰汚泥から高温メタン発酵菌群の集積が可能であることが明らかとなった。

目 次

- I. はじめに
- II. 実験条件, 方法
- III. 実験結果及び考察
- IV. まとめ
- V. おわりに

I. はじめに

2015年12月に採択されたパリ協定の長期目標では、世界の平均気温上昇を産業革命以前に比べ、2℃より低く保つことが合意された。参加各国は、この目標達成に向け様々な政策を打ち出し、対策を進めている。2050年の温室効果ガス（GHG）排出80%削減を実現するためには、エネルギー消費量の大幅削減、高効率化に加え、エネルギーシステムの大転換が必要になるとされている。これには、カーボンニュートラルな燃料、CO₂の循環利用が重要な役割を示すことを主張している¹⁾。

その一つの方策として挙げられているのがメタン発酵技術である。メタン発酵は、有機性廃棄物などのバイオマスを

減容化する過程で、カーボンニュートラルな燃料であるバイオガスを生成する。そのため、廃棄物問題とエネルギー問題を同時に解決できる技術である。しかし、反応速度が遅いため施設が大型になる、分解効率が悪いいため減量化率が低いといった課題がある。

筆者らは、上記課題を解決するため、活性の高い高温メタン生成菌と、菌をリアクタ内に高密度に保持する固定床を組み合わせた、固定床式高温メタン発酵技術を実用化している。メタン発酵に利用するメタン生成菌には、至適温度が35℃の中温菌と、55℃の高温菌が存在する。高温メタン生成菌は、中温メタン生成菌に比べ、2倍程度のメタン生成活性がある。また、固定床は、耐久性が高く、高温メタン発酵菌群が付着しやすい素材を選定している。これらの組み合わせにより、短期間で分解効率の高い高効率システムの構築が可能となる。ビール粕や生ごみを原料とした比較実験では、従来の中温メタン発酵に比べ、許容有機物負荷（リアクタ1m³あたりに投入できる有機物量）が、高温メタン発酵にすることの効果は2倍²⁾、固定床による効果は5倍であると報告されている³⁾。

キーワード: メタン発酵技術, 高温メタン生成菌, 菌叢解析, 廃水処理技術, 海外展開, 脱炭素, カーボンニュートラル
Keywords: anaerobic digestion, thermophilic methanogen, microbial community analysis, wastewater treatment, overseas expansion, decarbonization, carbon neutral

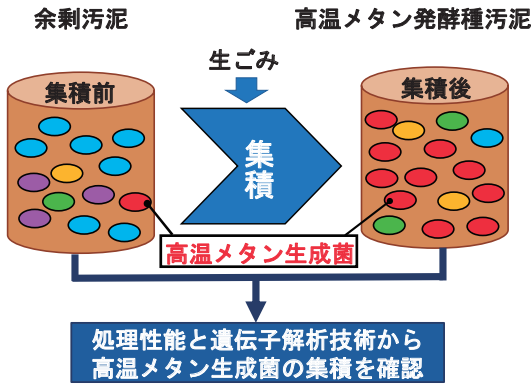


Fig. 1 高温メタン発酵菌濃縮技術のイメージ
(Image of Enrichment of Thermophilic Methanogens)

上記のように、固定床式高温メタン発酵は優れた技術であり、採用するメリットは大きいですが、課題もある。メタン発酵施設を建設後、機能を発揮させる（立ち上げ）には、高温メタン生成菌を含む種汚泥を投入する必要がある。すでに稼働している高温メタン発酵施設から種汚泥を採取、移送して立ち上げを行うことが一般的であるが、稼働している高温メタン発酵施設は限られており、輸送コスト、運搬時の安全面等が課題となっている。そのため、入手が容易な材料から高温メタン発酵菌群を集積可能な技術 (Fig.1) が確立すれば、普及が促進できると考えられる。この一つとして下水、工場廃水などの処理設備から排出される余剰汚泥があげられるが、余剰汚泥からの高温メタン発酵菌群の集積は、酢酸やグルコースなどの人工基質を使用し、バッチで行った実験は報告されているが^{4), 5)}、実廃棄物を連続供給した実験の報告や、集積過程における菌叢の変遷についての報告は、調査した限りではない。

このため、本報告では世界中のどの地域でも入手しやすい余剰汚泥から、実廃棄物である生ごみを原料として連続供給し、高温メタン発酵菌群の集積について検討した。また、菌叢解析により集積過程における菌叢の変遷を明らかにした。

II. 実験条件, 方法

1. 原料, 集積元汚泥

高温メタン発酵菌群の集積に使った元汚泥 (集積元汚泥) には、揮発性懸濁物質 (VSS) 濃度が 24,000mg/L, pH6.8 の食品工場の廃水処理施設から排出される余剰汚泥を用いた。原料は、一般家庭から収集した生ごみを加水後に粉碎、調整した生ごみスラリーを用いた。生ごみスラリーは、有機物負荷 (OLR ; Organic Loading Rate) の違いが高温メタン生成菌の集積に及ぼす影響を検討するため、2 種類の濃度に調整した。

高濃度スラリーの T-CODcr, VSS, pH 濃度はそれぞれ 30,000mg/L, 14,000mg/L, 4.8, 低濃度スラリーの T-CODcr, VSS, pH 濃度はそれぞれ 15,000mg/L, 7,000mg/L, 4.8 とした。なお、高濃度スラリーを供給したリアクタを RH, 低濃度スラリーを供給したリアクタを RL とした。

2. 実験装置, 運転方法

リアクタには、5L の連続完全攪拌混合型ジャーフェーメンタを 2 基使用し、集積元汚泥を 3.5L 投入した。内部温度が 55°C, pH が 7.0 以上になるように制御した (Fig.2)。pH の制御には、1N-NaOH を使用した。また、設定した水理学的滞留時間 (HRT) になるように原料ポンプと引き抜きポンプをタイマにより制御した。生成したバイオガス生成量は、ガス袋に捕集したものを水上置換法で、バイオガス中のメタン濃度は、赤外線式ガスモニタ (RI-557, RIKEN KEIKI Co.,Ltd, 東京) で計測した。

実験開始後 20 日目までは無負荷状態で運転した (バッチ期間)。揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度の低下を確認後、生ごみスラリーの連続投入を開始した (集積期間)。投入量は、1 週間に 1 回、段階的に投入量を増加させることで HRT を短縮し、HRT が 9.4 日となった時点で定格運転とした。さらに、ジャーフェーメンタ中の集積元汚泥残存率が 10% 以下となった時点から定常状態のデータを採取した。

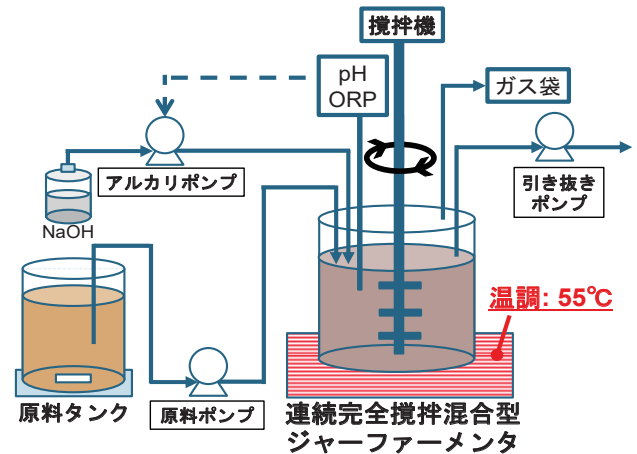


Fig. 2 実験装置の概略図
(Schematic Diagram of the Experimental Equipment)

3. 16rRNA アンプリコン解析による菌叢解析

生ごみスラリー, 集積元汚泥と定期的に採取した両ジャーフェーメンタから引き抜いた汚泥から An Ex Taq® DNA Polymerase kit (RR006A, TAKARA BIO INC, 滋賀) を用いて、遺伝子を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅するため、U515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') と U806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') のプライマーを用いて

PCR を行った。PCR 産物は、Illumina MiSeq sequencing platform を用いて解析した。解析したシーケンスデータは QIIME⁶⁾ で処理した。検出された 16SrRNA 遺伝子配列は、97%以上の類似性を示すものを独立する OTU (Operational taxonomic unit) として分類した。各 OTU は、EzBioCloud 1616 データベース (<https://www.ezbiocloud.net/>) と NCBI ヌクレオチドデータベースを元に分類し、BLAST 検索⁷⁾ によって、類似の配列との比較を行った。本実験で検出された各 OTU のヌクレオチド配列は、GSDB, DDBJ, EMBL, および NCBI ヌクレオチド配列データベースにアクセッション番号 DRA011717 で登録した。

5. リアルタイム PCR による高温メタン生成菌の定量

リアルタイム PCR 装置は Roter-Gene Q (QIAGEN, ドイツ), 試薬は TB Green PremixExTaq II (Tli RNaseH Plus, TAKARA BIO INC, 滋賀) を使用した。プライマーセットは、高温メタン生成菌である *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Mt2) および *Methanosarcina thermophila* (Ms) の *mcrA* 遺伝子を標的とする Mt2-F (5'-KGCHGASATCTGTCAGACCTCA-3') / Mt2-R (5'-GAAGCTCCAGTGGCAGTCCC-3'), Ms-F (5'-CAMTCTAYGGTATCGAGACM-3') / Ms-R (5'-TGGTAGGACAGAACRTTTGTR-3')⁸⁾ をそれぞれ使用した。反応物は、20ng のテンプレート DNA と 20μM の各プライマーを混合したものをを使用した。PCR 反応条件は、Mt2 の定量時は 95°C で 30 秒間変性後、95°C で 5 秒間、59°C で 40 秒間、72°C で 70 秒間の増幅反応を 35 サイクル行った。Ms の定量条件は、95°C で 30 秒間変性後、95°C で 10 秒間、54°C で 20 秒間、72°C で 50 秒間の増幅反応を 45 サイクル行った。濃度の定量には、人工的に合成した Mt2 および Ms の *mcrA* のオリゴヌクレオチド (Eurofins Genomics, 東京) をポジティブコントロールとした検量線を使用した。解析には、Melting Curve⁹⁾ を用いた。

III. 実験結果及び考察

1. リアクタパフォーマンス

RH と RL 両リアクタとも、バッチ運転の開始直後から VFA 濃度が急激に上昇し、6,600mg/L 程度で安定した (Fig.3)。生ごみスラリの投入を行っていないことから、集積汚泥に含まれる有機物が分解し、VFA が蓄積したと考えられる。20 日目以降、両リアクタに蓄積していた VFA が急激に減少した。また、バッチ期間の後半 (17~20 日目) から、バイオガス生成量が徐々に増加し (Fig.4), pH 維持のためのアルカリの添加は不要となった。これらのことから、バ

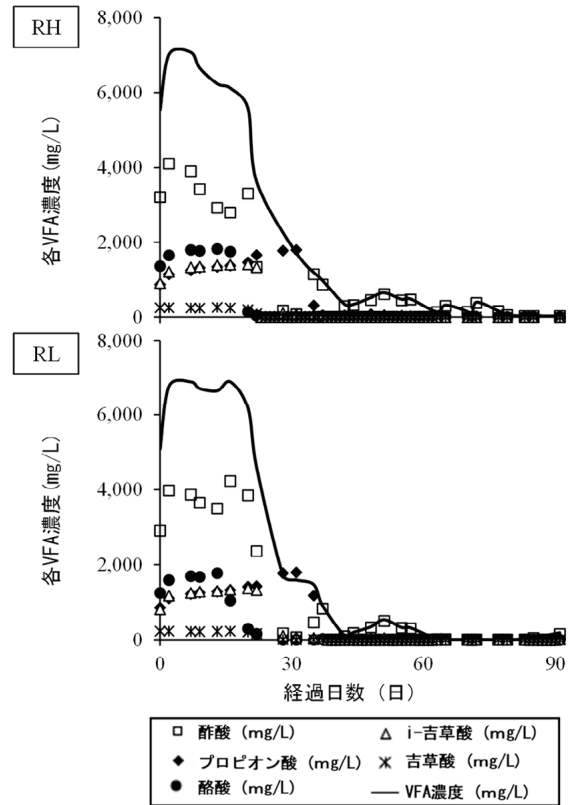


Fig. 3 VFA 濃度とその組成の変遷 (Time Course of the VFA Concentration)

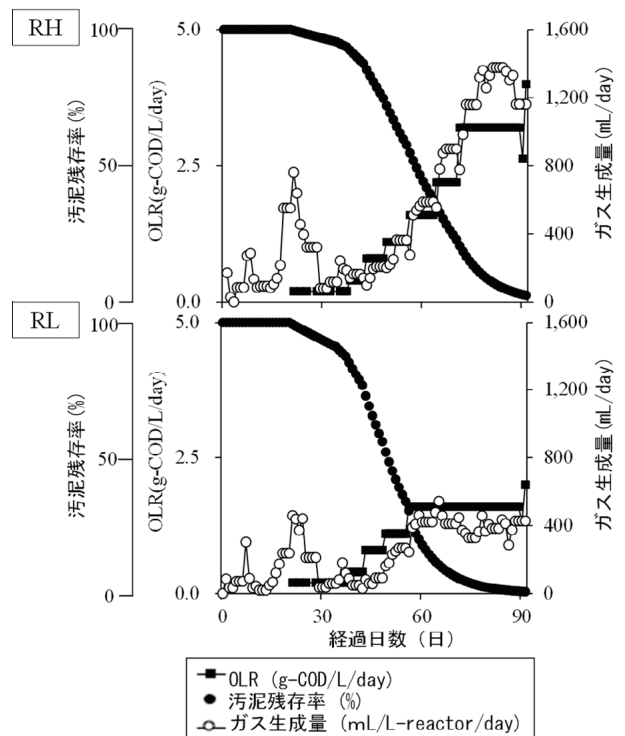


Fig. 4 集積汚泥残存率と OLR とガス生成量 (Time Course of the Sludge Residual Ratio, OLR and Biogas Production)

ッチ期間中から高温メタン発酵菌の活性化、増殖が始まり、VFAを代謝し、バイオガスを生成したと考察する。

VFA濃度の低下を確認後、20日目から生ごみスラリの投入を開始した。集積期間中は、OLRの増加に伴い、バイオガス生成量も増加した。また、VFA濃度は低値で安定していたことから、安定してメタン発酵が進行していたと考えられる。

RLは、56日目に定格負荷に到達し、66日目には定常状態となった。RHは、71日目に定格負荷に到達し、78日目には定常状態となった。RH、RL両方が定常状態であった78～91日目までの期間のリアクタパフォーマンスの結果をTable 1に示す。RHとRLのT-COD_{Cr}除去率は同等であり、どちらも約70%であった。しかし、T-COD_{Cr}除去量とバイオガス生成量から算出したRLのバイオガス生成率は、RHの6割であった。また、VSSが菌体濃度と仮定した場合、RLの除去T-COD_{Cr} 1gあたりの菌体生成率（汚泥転換率）は、RHの1.9倍であった。これらのことから、同じHRTでもOLRが異なると、リアクタパフォーマンスに影響を与えることが示唆された。これは、OLRが低いと、有機物が同化反応（菌体増殖）に使用される割合が高くなり、異化反応（バイオガス生成率）の割合が低くなるためであると推察する。

2. 16S rRNA アンプリコン解析による菌叢解析結果

集積元汚泥、生ごみスラリ、および両リアクタの引き抜き汚泥から合計4,092個のOTUが得られた。RHとRLの91日目の引き抜き汚泥中で、検出率が高かった上位20種以外の

OTUをOTHERSとしてまとめた（Fig. 5）。

生ごみスラリから検出されたOTUは、67%以上が*Lactobacillus*（43.5%）、*Bifidobacterium*（17.0%）と*Clostridium*（6.5%）に分類され、残りの33%はOTHERSであった。また、集積元汚泥から検出されたOTUは、中温好気性菌である*Alkialigenes*, *Rhodobacteriase*, *Pseudomonas*, *Luecobacter*の存在割合が高く、メタン生成菌は検出されなかった。

引き抜き汚泥の菌叢構造は、集積日数の経過とともに変化し、RHとRLで同様の傾向を示した。高温メタン生成菌である*Methanothermobacter*, *Methanosarcina*は、バッチ期間である13日目から検出され始め、20日目から急激に増加した。この結果は、バッチ期間中のVFA濃度の減少の考察を裏付けるものである。

高温メタン生成菌以外では、高温菌である*Hydrogenispora*, *Syntrophomonas*, *Coprothermobacter*などの存在割合が増加した。*Hydrogenispora*, *Syntrophomonas*は、グルコースや有機酸を分解し水素を生成する菌であるが、高温メタン発酵では、水素資化性メタン生成菌である*Methanothermobacter*と共生して代謝反応を行っていることが確認されている¹⁰⁾。本実験でも、これらの菌の存在割合が同調して増加していたことから、同様の共生関係が構築されていたと推察する。

また、集積期間の後半（83日目以降）に、糖類を分解して、酢酸を生成する*Coprothermobacter*の存在割合が増加し、そ

Table 1 高温メタン菌濃縮後の定常状態時でのリアクタパフォーマンスの比較
(Comparison of Reactor Performance at Steady State Operation by Thermophilic Methanogenic Microflora Enrichment)

		リアクタ名		RL/RH
		RH	RL	
運転負荷条件				
HRT	(day)	9.4	9.4	1
OLR	(g-COD/L/day)	3.2	1.6	0.5
測定結果				
ガス生成量	(mL/L-reactor/day)	1292.2 (±88.7)	399.4 (±40.8)	0.3
メタン濃度	(%)	69.6 (±0.7)	71.6 (±2.8)	1
VFA	(meq/L)	0.6 (±0.2)	1.1 (±1.2)	1.7
VSS	(mg/L)	4130.0 (±235.5)	2435.0 (±190.5)	0.6
T-COD _{Cr} 除去率	(%)	73.6 (±0.9)	71.6 (±2.8)	1
反応効率				
ガス生成率	Measured / Theoretical ^a	0.81 (±0.04)	0.52 (±0.07)	0.6
菌体生成率（汚泥転換率）	(g/g-COD removed) ^b	1.60 (±0.14)	2.99 (±0.17)	1.9

^a ガス生成率 = メタンガス生成量の実測値 / T-COD_{Cr}除去量から計算されたメタンガス生成量の理論値

^b 菌体生成率（汚泥転換率） = VSS / T-COD_{Cr} 除去量 (mg/L-reactor/day)

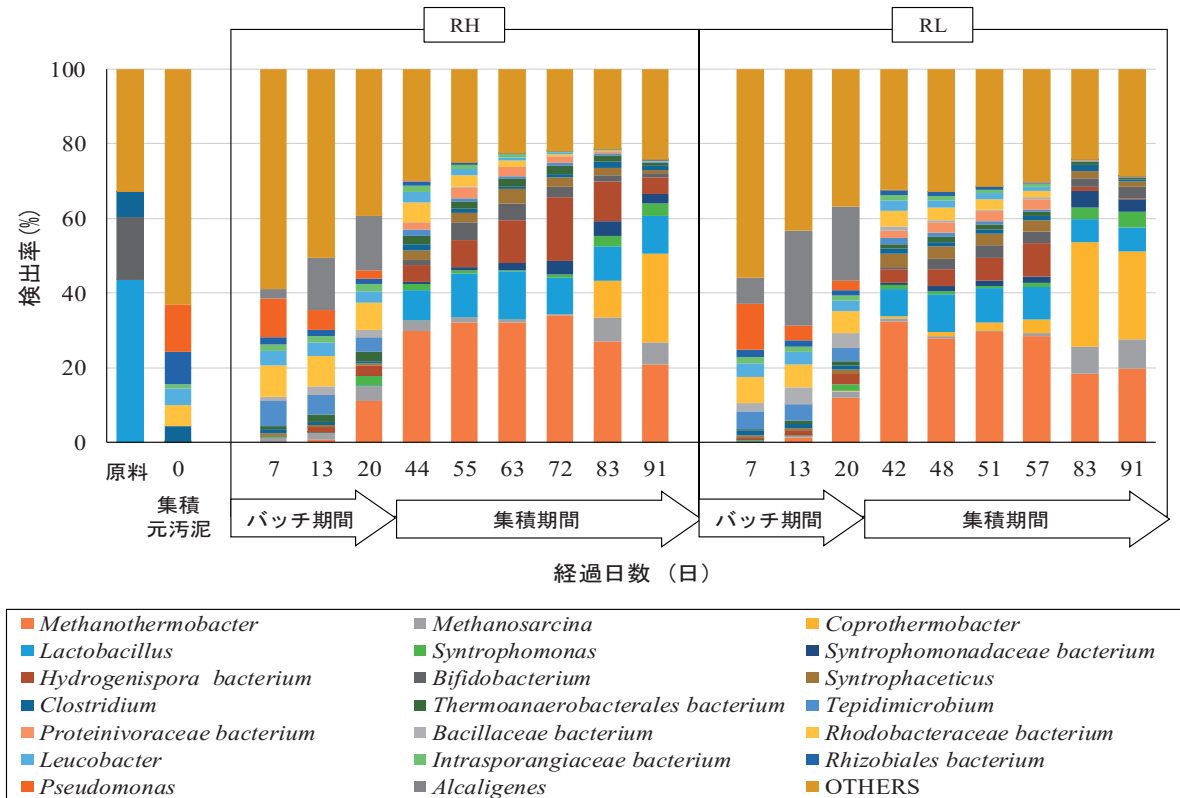


Fig. 5 集積期間中の菌叢の変遷 (属レベル) を 16S rRNA アンプリコン解析した結果
(Relative Abundance of Microbial Population Determined by
16SrRNA High-Throughput Sequencing Analysis at Genus Level)

れに伴って酢酸資化性メタン生成菌である *Methanosarcina* の存在割合も増加した。これは、*Coprothermobacter* により、酢酸濃度が高くなったことが *Methanosarcina* の増殖を促したためであると考察する。

3. リアルタイム PCR による高温メタン生成菌の定量

16S rRNA アンプリコン解析では、相対的な菌の割合が解析できるが、定量的な解析はできない。そのため、高温メタン生成菌である *Methanothermobacter*, *Methanosarcina* について、リアルタイム PCR による定量を行った (Fig. 6)。リアルタイム PCR の結果から、*Methanothermobacter* は、集積元汚泥および生ごみスラリーでも検出限界以下であった。また、*Methanosarcina* も集積元汚泥では 1.1×10^2 copies/ μ L 程度の存在量であった。しかし、どちらの高温メタン生成菌もバッチ期間中から増加が始まり、集積期間の初めには定常状態と同程度である 1.0×10^5 copies/ μ L 程度の菌体濃度まで増殖していることが確認された。これらのことから、リアルタイム PCR で高温メタン生成菌が検出限界以下の汚泥でも、集積が可能であることも明らかとなった。

IV. まとめ

余剰汚泥から高温メタン発酵菌群を集積し、処理性能を菌

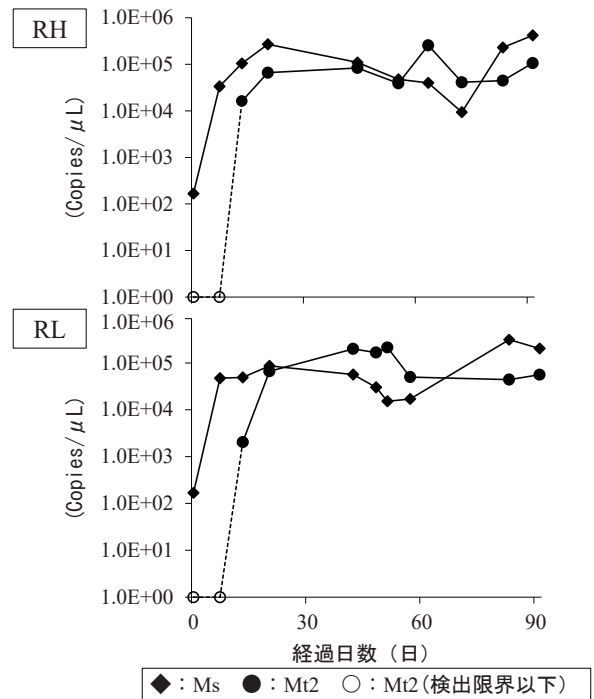


Fig. 6 リアルタイム PCR による高温メタン生成菌の存在量の変遷
(Time Course of the Quantity of Thermophilic Methanogens)

叢解析結果と関連付けて考察を行った。馴養開始 40 日以降は、バイオガス生成と COD 除去率が安定していたことから、メタン発酵リアクタとして機能していたと判断できる。菌叢解析結果からも、高温メタン発酵菌群が集積され、優占種となることが確認できた。これらのことから、廃水処理施設の余剰汚泥を集積元汚泥として、高温メタン発酵リアクタの立ち上げが可能であることが示された。

V. おわりに

世界中のどの地域でも入手が容易な廃水処理施設の余剰汚泥から、高温メタン発酵リアクタの立ち上げが可能であることを明らかとした。これにより、これまで課題であった種汚泥の調達が必要になり、高温メタン発酵施設の適用拡大が可能となる。

有機性廃棄物の適切な処理は、人類が地球上で生活するうえで欠かすことができない。これを処理することで、カーボンニュートラルなエネルギーを獲得できるメタン発酵技術は、脱炭素社会の形成にも貢献できる。中でも、短時間で高効率に処理可能な固定床式高温メタン発酵は、その一助になると考える。今後、国内外で適用試験を実施し、適用拡大を目指す。

謝 辞

本実験に推進に当たり、サポートしていただいた坂本育子氏、柴田晴佳氏、東條瑠美氏に謝意を表す。

参考文献

- 1) 国立研究開発法人科学技術振興機構；二酸化炭素資源化に関する調査報告書，2020.
- 2) 竹山春子ほか；微細藻類によるエネルギー生産と事業展望，シーエムシー出版，2012.
- 3) 石川一真ほか；ビール粕のメタン発酵処理—高温固定床式と中温固定床式の比較—，令和 2 年度土木学会全国大会第 75 回年次学術講演会，2020，VII-18.
- 4) Moonil Kim, and R.E. Speece ; Aerobic waste activated sludge (WAS) for start-up seed of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion., Water Research, 2012, 36(15), 3860–3866.
- 5) T. Benabdallah El-Hadj et al ; Start-up and HRT Influence in Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Digesters Seeded with Waste Activated Sludge., Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2007, 21(2), 145–150.
- 6) Caporaso, J. G. et al ; QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data., Nat. Methods. 7, 2010, pp.335–336.
- 7) Altschul, S. F. et al ; Basic local alignment search tool., J. Mol. Biol. 215, 1990, pp.403–410.
- 8) Kouzuma, A. et al ; Non-autotrophic methanogens dominate in anaerobic digesters., Sci. Rep. 7, 2017.
- 9) Takahashi, et al ; Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing, PLoS One. 9 e105592, 2014.
- 10) 上野嘉之ほか；嫌気性バイオリアクターの微生物叢，鹿島技術研究所年報，Vol.55, 2007, pp.127-132.

Enrichment of Thermophilic Methanogenic Microflora and Evaluation of Microbial Community Dynamics

Sumire Nakakoji and Masahiro Tatara

Anaerobic digestion technology has been recognized as a technology that can reduce the volume of organic waste with little energy and at the same time recover biogas as a renewable energy source by utilizing the functions of microorganisms. In particular, thermophilic anaerobic digestion is capable of highly efficient treatment, but its widespread use has been hindered by the difficulty of obtaining seed sludge. Therefore, we tried to accumulate thermophilic anaerobic digestion microflora from activated sludge, which is relatively easy to obtain in any region of the world, and investigated the treatment performance in relation to the results of microflora analysis. As a result, stable anaerobic digestion became possible after about 40 days, and operation at the prescribed load was possible after 70 days. The microflora analysis indicated the accumulation of *Methanosarcina thermophila* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, which are thermophilic methanogens. These results means that it is possible to enrich the content of thermophilic methanogens in activated sludge for anaerobic digestion.