

竹炭上における酢酸資化性メタン生成菌の固定化と増殖

Immobilization and Growth of Aceticlastic Methanogen on Bamboo Charcoal

徳本 勇人*, 作田 伸彰, 長尾 孝徳, 吉原 章仙, 野村 俊之

HAYATO TOKUMOTO, NOBUAKI SAKUDA, TAKANORI NAGAO, AKINORI YOSHIHARA and TOSHIYUKI NOMURA

大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻 〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

* TEL/FAX: 072-254-9301

* E-mail: tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho,
Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

(原稿受付 2012年9月28日 / 原稿受理 2012年10月17日)

The aim of this study was to investigate the adhesion and growth behavior of aceticlastic methanogens, which produce approximately 70% of the methane yield in anaerobic digestion reactors. Support material and acetic acid were introduced to the anaerobic sludge and cultivated by batch operation to enable attachment of the bacteria to the support material. The support material was then added to the substrate solution and cultivated long-term by fed-batch operation. High and low concentrations of acetic acid as substrate favored growth of the chain coccus archaeon and the filamentous archaeon, respectively. Thus, the adhesion and growth behavior of both species adhered to the support material could be investigated and quantified. The study makes a useful assessment of the density growth of aceticlastic methanogen which is thermodynamically difficult to autoagglutinate. Furthermore, coexistence and growth of Methanogen, such as chain coccus and filamentous archaeon, and rod-shaped bacterium providing acetic acid could be revealed even using the simulate wastewater including many kinds of organisms as substrate solution.

キーワード: 嫌気発酵, メタン生成菌, 固定化担体, 竹炭, バイオフィーム

Key words: Anaerobic fermentation, Methanogen, Support material, Bamboo charcoal, Biofilm

1. 諸 言

現在, 日本では年間約4億トン以上の有機性廃棄物が排出されている。その内, 下水処理場での活性汚泥処理で生じる余剰汚泥(含水率約99%)は半分以上の割合を占める。これらは焼却や溶融スラグ化など, 大量のエネルギーとコストを使って処理されている¹⁾。筆者らは, 余剰汚泥を高温・高圧状態の水で可溶化処理し, その処理液を基質に用いてメタン発酵を行うと, 高効率にエネルギー化できることを明らかにしている²⁾。

メタン発酵プロセスは, 嫌気微生物によって, 有機物を分解しメタンを生成させるバイオプロセスである。この処理方法はスタートアップに2~12ヶ月程度³⁾, 滞留時間も30日以上必要で, これはメタン生成菌の増殖速度が遅いことが原因である。一般的には, メタン発酵プラントで発生するメタンの約70%は酢酸由来であると言われており⁴⁾。酢酸資化性メタン生成菌がよく知られている, *Methanosarcina barkeri* は世代交代時間が12時間, *Methanosaeta concilii* は220時間である⁵⁾。一般的な細菌の世代交代時間が10~60分, 酵母では2~4時間であることから, メタン生成菌の増殖速度が極端に遅

いことがわかる。さらに, 増殖速度が極端に遅い微生物を用いて, 連続処理する場合, 滞留時間を短くすると発酵槽内から菌が流出し, 菌体濃度が低下する。従って, メタン発酵プロセスでは, 発酵槽内で, メタン生成菌をいかに高い濃度で維持できるかが重要な課題である。

これまで, メタン発酵の高効率化の検討として, 多孔質の担体上に菌を固定化し, 発酵槽のメタン生成菌濃度を高く保つ方法が検討されてきた。使用する担体の事例として, 岩石, プラスチックろ材, 焼結ガラス, 石炭ガラ, 鉄製ワイヤーメッシュ, レンガ, 粘土等⁶⁾がある。これら既往の研究では, 担体を発酵槽に投入し, 担体を投入しなかった場合とのバイオガス発生量の違いを評価している。そこで, 筆者らは, 複合菌叢に担体を投入した場合における, 担体上でのメタン生成菌の挙動を直接観察し, メタン生成量との関連性を解析することを目的とした。

本研究では, 発酵槽中に投入した担体(竹炭)を一定時間後に取り出し, 担体上に付着した微生物だけを培養した。このとき, 酢酸を基質に用いて, 担体に付着した酢酸資化性メタン生成菌の増殖挙動を調べた。これらは, 逐次添加で長期間の培養試験も行い, 電子顕微鏡

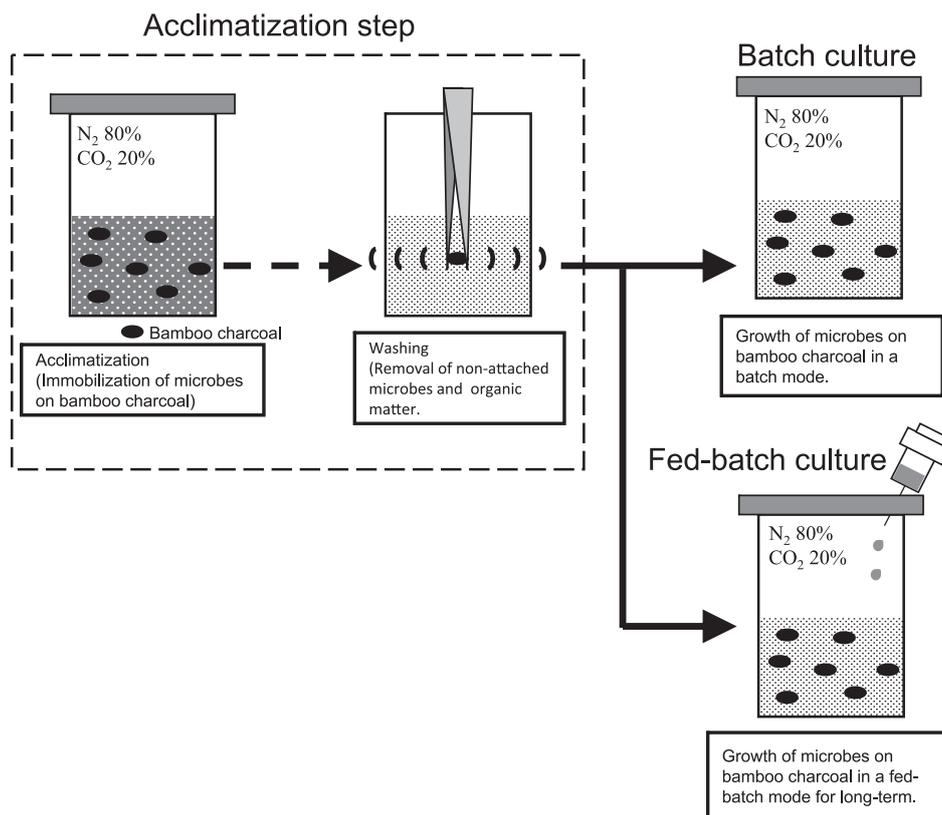


Fig. 1. Immobilization of microbes in anaerobic sludge and methane fermentation by immobilized microbes on bamboo charcoal.

(SEM) を用いて、担体上の微生物の直接観察も行った。さらに、下水汚泥を高温・高圧で可溶化処理した際の処理液の模擬廃水を投与し、担体に付着したメタン生成菌の増殖挙動についても検討を加えた。このような検討は、担体上にメタン生成菌の高密度なバイオフィルムを形成させる上で、重要な知見を与えらるゝと考えられる。

2. 材料及び方法

2.1. 複合菌叢と固定化担体

実験に用いた複合菌叢はメタン発酵プラント（京都府八木町）の消化発酵汚泥を八木バイオエコロジーセンターから購入した。この汚泥は、購入時点では未発酵の有機物が含まれている為、メタンガスが発生する。そこで、発生するメタンガス量を定期的に測定し、消化発酵汚泥 1 ml 当たりメタン発生量が 1 ml 以下になるまで室温で約 2~3 か月静置してから実験に用いた⁷⁾。固定化担体に用いた竹炭（コーナン商事株式会社）は、破碎後、ふるいを用いて粒径 4.75~5.60 mm とした。

2.2. 固定化担体に菌を付着させる馴養方法

菌体の固定化方法を Fig. 1 に示した。ミニバイアル（パーキンエルマー 20-CV；容積 20.6 ml）へ、消化発酵汚泥（含水率 99.5%）を 4 ml、所望の濃度に調製した酢酸水溶液（特級、和光純薬）を 1 ml、竹炭 1 g を投入した。容器はブチルゴム栓とアルミシールで封入し完全密閉系とした。バイアルのヘッドスペースはガス置換装置（SANSHIN MODEL GR-8）によって、混合ガス

（窒素 80%、二酸化炭素 20%）に置換した。その後、37°C に保った恒温槽で静置培養した。実験は、投与する酢酸濃度、植菌率、培養時間を変化させて馴養条件の検討を行った。植菌率は、消化発酵汚泥を遠心分離（3000 rpm, 10 min）して得られる上澄み液を希釈液に用い、消化発酵汚泥を所望の濃度に希釈して培養器に仕込んだ。

2.3. 担体に付着したメタン生成菌の回分培養

2.2. で馴養した竹炭は、所定時間経過後、バイアルから一旦取り出し、0.01 M の酢酸水溶液で共洗いすることで、竹炭に付着していない菌体や、不純物を取り除いた。次に、この竹炭を 0.01 M の酢酸水溶液 5 ml と共にバイアルへ投入し、気相成分を混合ガスで置換後、37°C で静置培養を行った。

2.4. 担体に付着したメタン生成菌の逐次添加による長期培養実験

竹炭に付着したメタン生成菌の逐次添加による培養方法を Fig. 1 に示した。2.3. と同様に、馴養後に竹炭を取り出し、培養時に使用する基質溶液で共洗った。次に、この竹炭を基質溶液 5 ml を仕込んであるバイアルへ投入し、ブチルゴム栓とアルミシールで封入した。続いて、混合ガスで気相成分を置換後、37°C で静置培養した。実験は基質として酢酸を投与したものが 2 種類と、模擬廃水を投与したものが 1 種類の計 3 種類行った。酢酸投与では、培養器内の初期酢酸濃度が 0.002 M, 0.1 M となるように仕込み、その後はそれぞれ 1 M と

Table 1. Components of synthetic substrate for waste water generated by sub-critical water treatment of sewage sludge.

	Concentration (mM)
Acetic acid	5.0
Formic acid	1.3
Phosphoric acid	2.3
Pyroglutamic acid	3.6
Alanine	0.3
Glycine	0.2

5 M の酢酸水溶液を微量ずつ定期的に投与し、逐次添加で培養した。模擬廃水は、下水汚泥（含水率 99.7%）を密封した金属製容器内で、高温で加熱処理（180°C, 10 min）した際の処理液と同じ組成（Table 1）の模擬液を作製した。基質としてバイアルに投与するときは、処理液の組成より 57 倍の高濃度の模擬廃水を作製し、1 回の逐次添加時に 100 μ l を投与した。

2.5. 気相成分の分析

ガスタイトシリンジ（伊藤製作所）を用いて、ミニバイアルのヘッドスペースから 0.5 ml の試料ガスを採取した。試料ガスの分析はガスクロマトグラフィー（島津製作所 GC-8A, TCD）で行った。キャリアガスにはアルゴンガスを用い、流速は 20 ml/min, 注入器, カラムオープン, 検出器の温度はそれぞれ 100°C, 70°C, 100°C とした。カラムは Porapak Q (3 m \times 3.0 mm)（信和化工株式会社）を用いた。

2.6. 電子顕微鏡（SEM）観察

竹炭に付着した微生物を直接観察するために、既報⁸⁾の方法により前処理を行った。まず、微生物の付着した竹炭を 0.1 M のリン酸バッファー（pH 7.0）に浸した。続いて 1~2% グルタルアルデヒド溶液に 1 時間程度浸し、蛋白質を固定化した後、アセトン（50, 70, 80, 90, 100 vol%）各濃度に 30 分ずつ浸し脱水を行った。その後、アセトンを除去するために、t-ブチルアルコールに 15 分間浸透させるという工程を 4 回繰り返し、凍結乾燥器で竹炭を乾燥させた。竹炭は金属コーティング装置で白金コーティングを施し、SEM（JSM-6700F, JEOL 製）観察を行った。

3. 結果と考察

3.1. 回分培養による馴養処理条件の最適化

消化発酵汚泥 4 ml, 竹炭 1 g をバイアルへ投入し、馴養期間, 植菌率, 投与する基質（酢酸）濃度を変化させ、馴養条件の最適化を行った。

まず、馴養時の酢酸濃度を 0.1 M, 植菌率 80% とし、馴養期間を 1~30 日の範囲で変化させ、最適な馴養期間を探索した。馴養後、取り出した竹炭は 0.01 M の酢酸溶液と共にバイアルへ投入し、メタン発生量を測定した。その結果、馴養期間 4 日以上で、竹炭に付着したメタン生成菌による、安定したメタン発生が見られることがわかった（Fig. 2）。そこで、馴養期間は最少の 4 日間

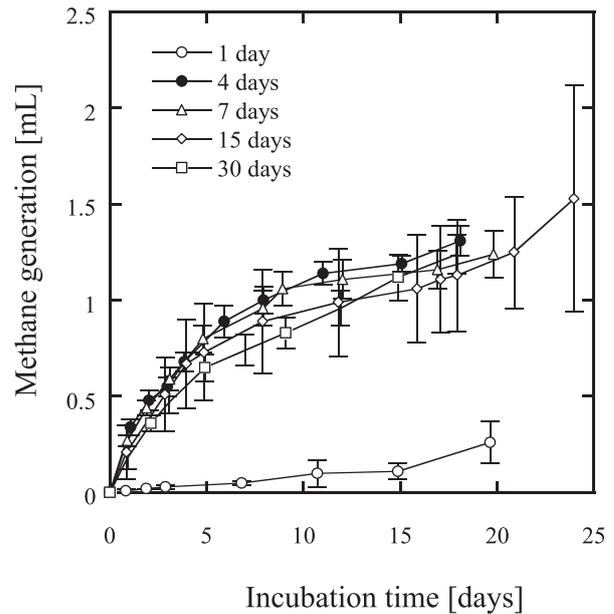


Fig. 2. Methane production from acetic acid under anaerobic conditions by immobilized methanogens on bamboo charcoal. During the acclimatization step (1–30 days), bamboo charcoal placed into seed sludge was incubated with 0.1 M acetic acid at 310 K. In the batch culture step (20 days), immobilized methanogen on bamboo charcoal was incubated in 0.01 M acetic acid at 310 K. Plot shows methane production during batch culture. Acclimatization period is (○) 1 day, (●) 4 days, (△) 7 days, (◇) 15 days and (□) 30 days. Data are means \pm standard deviations of three independent samples.

とした。

次に、菌体濃度を植菌率 8~80%（消化発酵汚泥をバイアルへ 0.4~4 ml 投入）の範囲で変化させ実験を行った（Fig. 3）。消化発酵汚泥を 80% 以下の植菌率に調整する場合は、消化発酵汚泥を遠心分離（3000 rpm, 10 min）して得られる上澄み液を希釈液として用いた。この上澄み液は、基質として酢酸を投与し、嫌気培養を行ってもメタン生成は見られなかったが、遠心分離した沈殿物は、酢酸の投与によって顕著なメタン生成が確認できた。そこで、この上澄み液を消化発酵汚泥の菌体量を調節する希釈液として使用した。馴養時の酢酸濃度は 0.1 M, 馴養期間は 4 日間とした。馴養及び洗浄後、竹炭は 0.01 M の酢酸水溶液中に投入し、嫌気培養を行い、メタン発生量を測定した。その結果、馴養時の菌体濃度が高くなるにつれ、メタン発生量が増加した。そこで、出来るだけ多くのメタン生成菌を竹炭に付着させる為に、馴養時の植菌率は最大の 80% とした。

最後に、0.01~0.2 M の範囲で馴養時の酢酸濃度を変化させた。植菌率 80%, 馴養期間は 4 日間とし、馴養及び洗浄後、竹炭は 0.01 M の酢酸水溶液中に投入して嫌気培養し、メタン発生量を測定した（Fig. 4）。この時のメタン発生量は、馴養時の酢酸濃度が 0.01~0.1 M までの範囲では、酢酸濃度が高いほど、その後の回分培養でメタンの発生量が増加した。他方、0.2 M での馴養では、培養約 20 日頃までは、0.1 M の馴養の場合よりメタン発生量は低かった。これは、酢酸濃度が高くなると pH が低下し、メタン生成菌の活性が下がったためであ

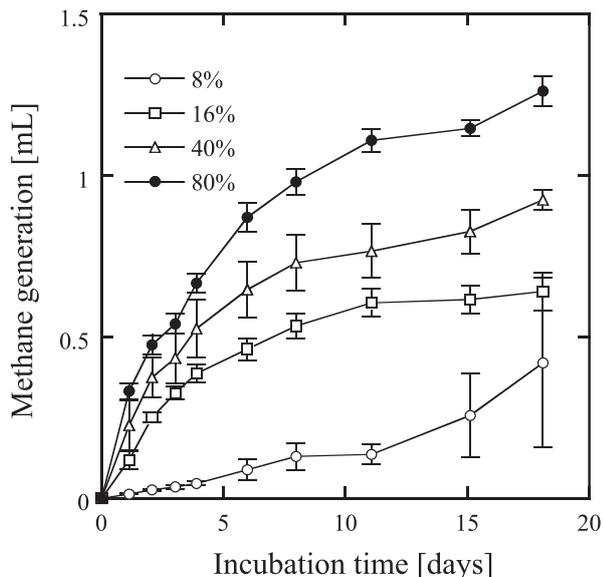


Fig. 3. Methane production under anaerobic fermentation with acetic acid as substrate for three different inoculation ratios of seed sludge. 0.4–4 ml of seed sludge (inoculation ratio 8–80%) and 1 ml of substrate solution were incubated under anaerobic conditions. In the acclimatization step (4 days), bamboo charcoal placed into seed sludge was incubated with 0.1 M acetic acid at 310 K. In the batch culture step (17 days), immobilized methanogen on bamboo charcoal was incubated in 0.01 M acetic acid at 310 K. Seed sludge inoculation ratio (○) 8%, (□) 16%, (△) 40% and (●) 80%. The anaerobic sludge was incubated in 0.01 M acetic acid at 310 K for 3 days. Data are means \pm standard deviations from three independent samples.

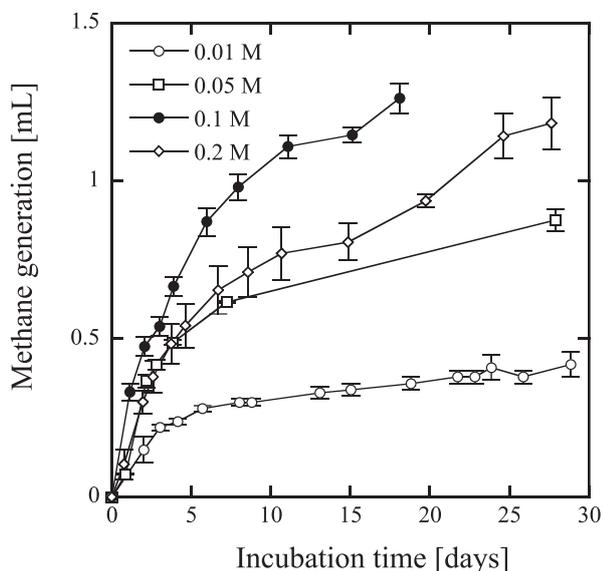


Fig. 4. Methane production under anaerobic fermentation acclimatized under different concentrations of acetic acid as substrate. In the acclimatization step (4 days), bamboo charcoal placed into seed sludge was incubated with 0.01–0.1 M acetic acid at 310 K. In the batch culture step (28 days), immobilized methanogen on bamboo charcoal was incubated in 0.01 M acetic acid at 310 K. Seed sludge concentration (○) 0.01 M, (□) 0.05 M, (△) 0.1 M and (●) 0.2 M. The anaerobic sludge was incubated in 0.01 M acetic acid at 310 K for 3 days. Data are means \pm standard deviations from three independent samples.

ると考えられる。

本研究で用いた消化発酵汚泥(種菌)は2.1.で述べたように、購入時に含まれる有機物を分解して発生するメタンガスが、消化発酵汚泥1 ml 当たり1 ml 以下のメタン発生量になるよう種菌を調整し、竹炭を投入する際の内生のメタン生成活性を同一条件としている。ゆえに、馴養時の酢酸濃度が、0.01 M から0.1 M の範囲では、投与する酢酸濃度に比例して消化発酵汚泥中のメタン生成菌が増殖し、その結果竹炭に付着したメタン生成菌量が増大したためであると言える。以上を総括すると、馴養処理では、消化発酵汚泥4 ml, 竹炭1 g, 0.01 M から0.1 M の酢酸水溶液1 ml を培養器に仕込み、培養期間は4日間とすると、竹炭に付着したメタン生成菌の挙動を解析できることが明らかとなった。そこで、竹炭上に付着するメタン生成菌が、投与する酢酸濃度に依存して、どのように増殖するのかを調べるために、逐次添加により長期培養を行った。

3.2. 逐次添加による竹炭に付着した菌の連続培養

メタン生成菌が竹炭上で増殖できるかどうかを調べるために、馴養(馴養時間4日間、植菌率80%)後、逐次添加によって連続培養した。使用する発酵基質は酢酸と模擬廃水(Table 1)で、酢酸の投与量は3.1.の結果を踏まえ、0.1 M で馴養するもの(高酢酸濃度)と、0.002 M で馴養する(低酢酸濃度)場合の2種類を行った。

3.2.1. 高酢酸濃度での逐次添加による連続培養

馴養時における酢酸濃度を0.1 M, 馴養時間を4日間、植菌率を80%とし、竹炭を0.1 M の酢酸濃度で逐次添加し、5 M の酢酸水溶液を実験初期(0–70日間)は10 μ l, 実験後期(70–110日間)は15 μ l ずつ投与した時のメタンガス発生量をFig. 5に示す。縦軸は発生したメタンガス量と投与した酢酸量を炭素量の積算値で示している。培養開始後20日後まではメタンの発生量は低い。20–50日後にかけて、徐々にメタン発生量は増加し、60日目を越えると、メタン発生量は直線的に増加した。このときのメタン発生速度は0.77 ml-CH₄/day で安定であった。また、竹炭細孔内にはFig. 5右のSEM写真のように、連鎖球菌が見られた。これは、形状と基質特性から*Methanosarcina sp.* と推察される。

3.2.2. 低酢酸濃度での逐次添加による連続培養

3.1.の結果で、低酢酸濃度側の馴養は0.01 M で行っているが、逐次添加では連続して酢酸を投与するので、実験開始初期で、十分に微生物が増殖していない段階で、基質の蓄積によって高酢酸濃度環境になることを避ける為、逐次添加による連続培養では、1/5の0.002 M で検討を開始した。

馴養時における酢酸濃度を0.002 M, 馴養時間を4日間、植菌率を80%とし、竹炭を0.002 M の酢酸濃度で逐次添加し、1 M の酢酸水溶液を10 μ l ずつ定期的に投与した時のメタンガス発生量をFig. 6に示す。培養開始から約80日前後までは、7回酢酸を追加投与したにも関わらず、投与した酢酸からのメタンへの転化が見られなかった。しかし、その後、急激にメタンの発生が始まり、培養開始後約100日目頃には、安定的に0.058 ml-CH₄/day のメタンを発生するようになった。また、竹炭細孔

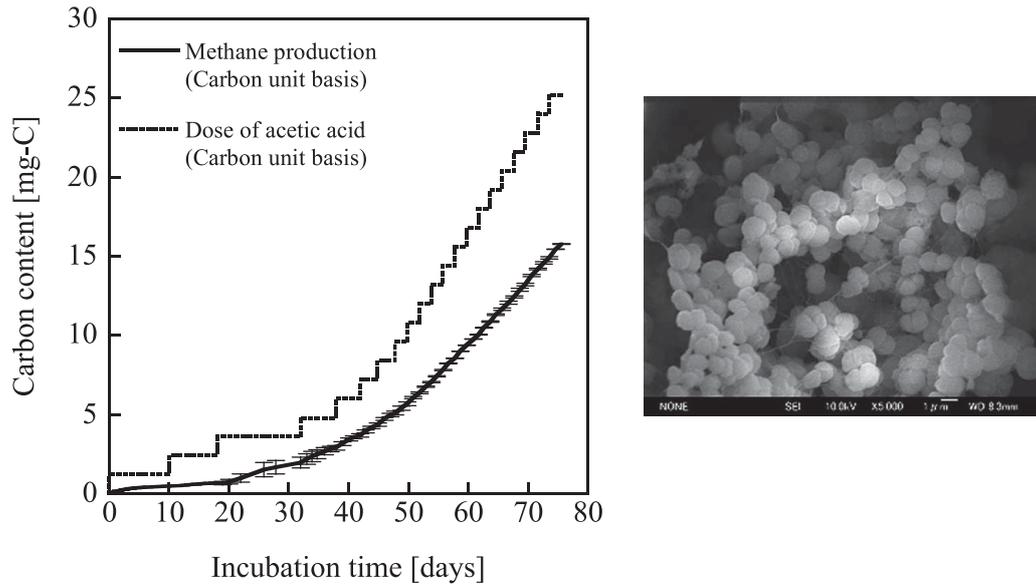


Fig. 5. Methane production by fed-batch culture on bamboo charcoal under anaerobic conditions at high acetic acid concentration. Methane production quantifies carbon content. SEM images of *Methanosarcina*-like cells on support material.

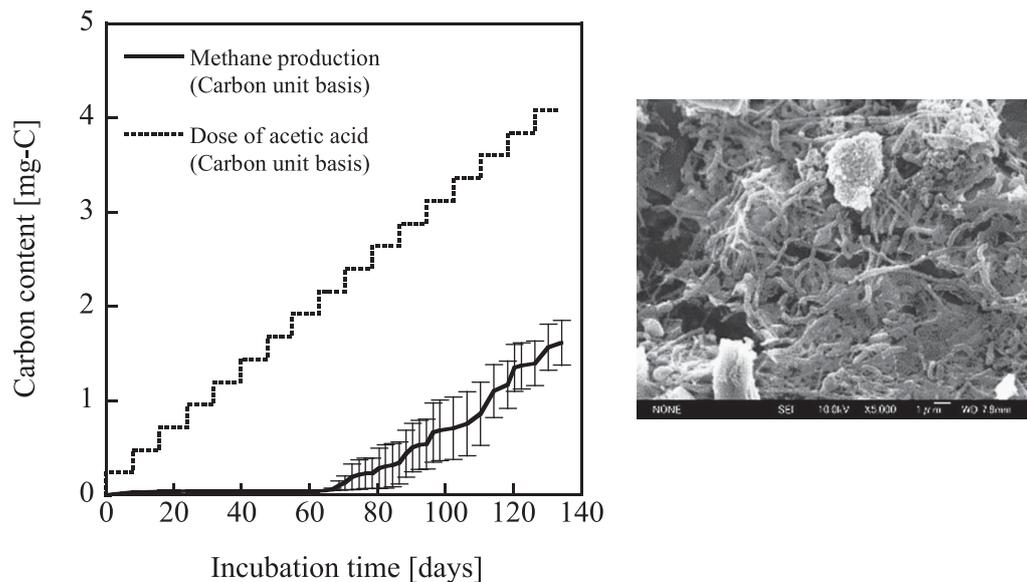


Fig. 6. Methane production by fed-batch culture on bamboo charcoal under anaerobic conditions at low acetic acid concentration. Methane production quantifies carbon content. SEM images of *Methanosaeta*-like cells on support material.

内には Fig. 6 右の SEM 写真のように、糸状菌が見られた。これは、形状と基質特異性から *Methanosaeta sp.* と推察される。

Methanosarcina sp. と *Methanosaeta sp.* は、わずかに 2 属しか報告されていない酢酸を資化するメタン生成菌である⁹⁾。*Methanosarcina sp.* は酢酸に対する嗜好性は低い (酢酸に対する親和定数: 350 mg-COD/L)^{10,11)}。一方、*Methanosaeta sp.* は酢酸に対する嗜好性が高い (酢酸に対する親和定数: 45 mg-COD/L)^{10,11)}。ここで、COD (Chemical Oxygen Demand) は化学的酸素要求量を指す。この嗜好性の違いは、酢酸が低濃度であっても、*Methanosaeta sp.* は能動的に酢酸を細胞内に輸送することが出来る機構を備えているためであると言われて

いる¹¹⁾。これに対し、*Methanosarcina sp.* は酢酸を受動的にしか取り込めない為、細胞内外の濃度差で細胞内に拡散してきた酢酸を利用するだけであると言われている¹⁰⁾。このため、*Methanosarcina sp.* が速い速度で増殖するためには、培養液中の酢酸濃度を高くすることが必要となる。本研究においても、投与する酢酸濃度が高い場合は糸状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が優勢で、メタン生成速度が高く、投与する酢酸濃度が低い場合は球菌状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が優勢で、メタン生成速度が低いという、既報の基質資化性と類似する結果が得られた。さらに、竹炭という固定化担体が介在しても、属によって酢酸に対する濃度依存性が違うという、これまでの報告と一致した傾向が新たに確

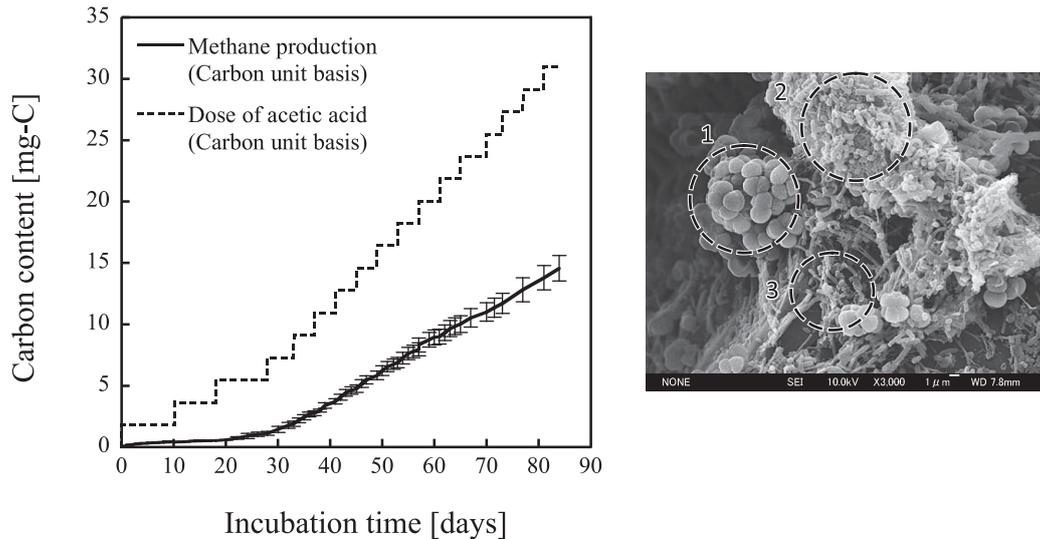


Fig. 7. Methane production by fed-batch culture on bamboo charcoal under anaerobic conditions on synthetic substrate. Methane production quantifies carbon content. SEM images of methanogens on support material. Circles 1, 2, 3 show *Methanosarcina*-like cells, *Methanosaeta*-like cells and acidogens, respectively.

認できた^{10,11)}。これまでの結果は、竹炭上で酢酸を巡る競合があり、酢酸濃度により、同じ基質を資化するメタン生成菌の棲み分けが、竹炭上でも良好に行われる可能性を示唆している。

Jianqing ら¹²⁾ は、上向流式嫌気性汚泥ブランケット法 (UASB 法) で、下水汚泥を発酵槽へ投入し運転する際に、粒子径が 0.15–0.20 mm の 4 種類の担体 (カキ貝殻、活性炭、石英砂、ゼオライト) を投入すると、カキ貝殻、活性炭の投入において、高い COD の除去効果が見られ、このとき、粒子径が 0.9 mm 以上のグラニュール (微生物が凝集した顆粒状の汚泥) が全グラニュールの 28.8–41.5% の割合で形成されたことを報告している。

本研究で用いた竹炭では、基質として用いる酢酸の濃度に依存して、酢酸資化性メタン生成菌が、特異的に担体表面で増殖することができた。野村ら¹³⁾ は、微生物を「生きたコロイド」と捉え、微生物の付着・凝集を解析するという新しいアングルでの解析を行っている。それによると、*Methanosaeta sp.* の接触角の実測値より推算した表面張力を用いて見積もった、自己凝集するときの自由エネルギー変化が正であることから、*Methanosaeta sp.* は、熱力学的に自己凝集し難い微生物であることを報告している¹³⁾。このように、自己凝集しにくい糸状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が竹炭上での増殖挙動を示したことは、高密度化を検討する上で有意な結果であり、今後の工学的応用が期待できる。

3.3.3. 模擬廃水を投与した逐次添加による連続培養

模擬廃水を用いて、馴養後、逐次添加による培養を行った時のバイオガス量の結果を Fig. 7 に示した。調製した高濃度基質溶液は、1 回の逐次添加時に 100 μ l を投与した。逐次添加による培養開始後、30 日頃からメタン発生量に直線性が見られた。このときの SEM 写真には円 1 で連鎖球菌、円 2 で桿菌、円 3 で糸状菌が確認できたが、これはメタン生成菌 (糸状菌、球菌) と他の酸生成菌 (桿菌) であると予想される。このように、実際の投入原料に近い、複合的な基質を投与しても、竹炭上

で菌叢の適切な共存関係が構築されていると推察される。

このとき、模擬廃水中の酢酸濃度は 5 mM である。模擬廃水を基質として用いた Fig. 7 のメタン生成速度は、0.47 ml-CH₄/day であった。Fig. 6 の低濃度酢酸投与の場合よりもメタン生成速度は約 8 倍高く、Fig. 5 の高濃度酢酸投与の場合の 3/5 のメタン生成速度であった。これは、酢酸以外の有機物であるピログルタミン酸、アラニン、グリシンが、竹炭上に共存する酸生成菌により酢酸へ変換された結果、酢酸の嗜好性が異なる 2 種の酢酸資化性メタン生成菌と共に、竹炭上で共存できたのではないかと考えられる。これにより、糸状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が生育可能な上、他の有機物が酸生成菌により酢酸に変換され、一過的な高濃度の酢酸環境では、球菌状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が増殖し、球菌状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌が資化できない低濃度の酢酸環境の場合は、糸状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌によりメタン化されていると推察される。

これまでの 3 種類の長期培養実験における炭素基準のメタン収率を Fig. 8 に示した。高濃度の酢酸を基質として投与した場合、メタンの収率は約 60% で一定化していた。一般に、メタン発酵のメタン収率は 60% であるとされ、竹炭に固定化した微生物でも、同等の収率を示すことが分かった。また、低濃度の酢酸を基質として投与した場合では、140 日にも及ぶ培養期間ながら、収率が一定化しなかった。しかし、高濃度の酢酸を基質として投与した場合の培養初期の傾きから推察すると、培養を続けていけば、高濃度の酢酸を基質として投与した場合と同じ収率に収束するのではないかと予想される。一方、模擬廃水を投与した場合では、収率は約 45% で一定化していた。模擬廃水にはメタンに転化しない炭素も含まれる為、高濃度の酢酸投与の 60% に比べ、低い収率を示したものと考えられる。以上より、複数の基質を含む模擬廃水であっても、竹炭に固定化した微生物によ

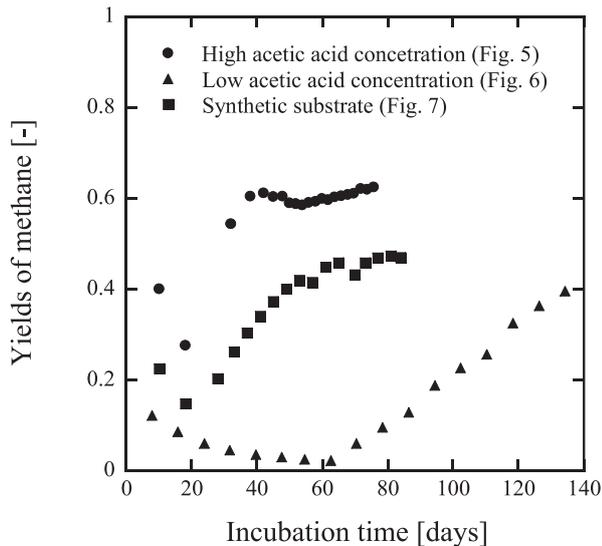


Fig. 8. Methane yields from result of Figs 5, 6, 7. Plot shows (○) high acetic acid concentration, (△) synthetic substrate and (●) low acetic acid concentration, respectively.

る、安定したメタン化が起こることが明らかとなった。

SEM 観察による菌の形状と、酢酸を中心としたメタン生成による増殖挙動より、竹炭上の糸状菌、球菌は酢酸資化性メタン生成菌であると予想される。一方、桿菌はこれら 2 種のメタン生成菌と竹炭上で共存している酸生成菌の一種ではないかと考えられる。今後は、模擬廃水の投与により観察された竹炭上の微生物の菌叢解析や、単離、同定が必要であると考えている。

このような球菌状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌、及び糸状の形状を持つ酢酸資化性メタン生成菌の酢酸を巡る競争・棲み分けは、発酵槽内の酢酸を余すことなくメタン化する上で重要な課題である。連続培養において、リアクターを完全混合型にすると、酢酸資化性メタン生成菌の協調状態が崩れるとの報告がある¹³⁾。しかし、糸状菌は他の微生物を物理的に抱き込むことができ、菌の高密度化に貢献することが広く知られている。竹炭のように糸状菌が固定化できる担体を導入し、投入原料に応じた菌叢の形成と 2 種類のメタン生成菌の適切な共存関係が構築され、竹炭上で高密度なバイオフィルムとして定着できれば、プロセスの高効率化が達成できると考えられる。また、本研究で考案した培養手法は、溶液中では培養の難しい菌の固定化担体を用いた集積培

養法として、また、未同定のメタン生成菌の単離も期待できると考えている。

謝 辞

本研究は大阪府立大学 COE プログラムによって行われたものの一部である。記して謝意を表する。

文 献

- 1) 石井宏幸, 山口裕司. 2010. 下水汚泥資源利用の動向と今後の課題について, 再生と利用. (社) 日本下水道協会. 34(127): 58-67.
- 2) Yoshida, H., H. Tokumoto, K. Ishii, and R. Ishii. 2009. Efficient, High-speed methane fermentation for sewage sludge using subcritical water hydrolysis as pretreatment. *Bioresour. Technol.* 100: 2933-2939.
- 3) Henze, M. and P. Harremoës. 1982. Anaerobic Treatment of Wastewater in Fixed Film Reactors. *Water Sci. Technol.* 15: 1-101.
- 4) Boone, D.R. 1982. Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 57-64.
- 5) 今中忠行, 松沢 洋. 1991. 極限環境微生物ハンドブック, p. 292. サイエンスフォーラム.
- 6) Kennedy, K.J. and M. Hamoda. 1994. Long-term effluent variability from an anaerobic fixed film reactor. *J. Environ. Sci. Health. A Environ. Sci. Eng. Toxic. Hazard. Subst. Control.* 29: 1663-1682.
- 7) Tokumoto, H. and M. Tanaka. 2012. Novel anaerobic digestion induced by bacterial components for value-added byproducts from high-loading glycerol. *Bioresour. Technol.* 107: 327-332.
- 8) Nomura, T., A. Yoshihara, T. Nagao, H. Tokumoto, and Y. Konishi. 2007. Effect of the surface characteristics of *Methanosarcina barkeri* on immobilization to support materials. *Adv. Powder Technol.* 18 (5): 489-501.
- 9) Koga, Y. 1988. Kosaikin, p. 17. Tokyo Daigaku Shuppan.
- 10) Speece, R.E. 1996. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters, pp. 54-56. Archae Press, Tennessee, USA.
- 11) 野池達也. 2009. メタン発酵, pp. 65-66. 技法堂出版.
- 12) Jianqing, L., F. Hongda, W. Jingjing, L. Linting, L. Jinmei, and C. Linjie. 2011. Study on microorganisms' immobilization by different support materials in the UASB system. *Adv. Materials Research (295-297)* 323-329.
- 13) 野村俊之, 吉原章仙, 徳本勇人, 小西康裕. 2012. 酢酸資化性メタン生成菌の付着・凝集特性の評価. 粉体工学会誌. 49: 11-17.
- 14) McMahon, K.D., P.G. Stroot, R.I. Mackie, and L. Raskin. 2001. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions-II: Microbial population dynamics. *Water Res.* 7: 1817-1827.