

## 下水汚泥のメタン発酵向上化のための細菌間相互作用の解明

### Understanding Bacterial Interaction to Enhance Methane Fermentation Using Waste Sewage Sludge

前 田 憲 成 \*  
TOSHINARI MAEDA\*

九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能応用工学専攻 〒 808-0196 福岡県北九州市若松区ひびきの 2-4

\* TEL: 093-695-6064 FAX: 093-695-6005

\* E-mail: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

Department of Biological Functions Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu  
Institute of Technology, 2-4, Hibikino, Wakamatsu, Kitakyushu, Fukuoka 808-0196, Japan

キーワード：下水汚泥, メタン発酵, 抗生物質, 細菌活性変化, 細菌間相互作用

Key words: sewage sludge, methane fermentation, antibiotic, change of bacterial activity, bacterial interaction

(原稿受付 2016年9月3日 / 原稿受理 2016年9月10日)

#### 1. はじめに

活性汚泥法は、好気性細菌の分解活性を活用して、家庭排水などに含まれる有機物などの汚れを分解処理する手法であり、主に都市部で社会実装されている環境バイオテクノロジーの一つである<sup>4)</sup>。一方で、微生物分解が好気条件下で行われる曝気槽では、排水中の有機物が微生物により分解されていく反応と同時にその有機物を利用して同化する反応、すなわち微生物のバイオマスが増加する現象も起こる。この増加したバイオマスは、下水処理の過程から発生する余剰汚泥となり、一部は曝気槽へ返送されるが、大部分は産業廃棄物として処理されている<sup>15)</sup>。この下水処理過程における余剰汚泥の廃棄物処理は、全体のコストの25–60%<sup>21)</sup>ともいわれ、現在従来の排水処理のパフォーマンスを維持しつつ、余剰汚泥の発生を削減するアプローチ、ならびに発生した余剰汚泥を効果的に減容するアプローチに関する研究が主に進められている。前者のアプローチは、テトラクロロサリチルアニリドなどを用いた化学処理法があり、細菌群が有機物を利用して同化する反応を抑制し、細菌群の増殖を抑え、汚泥のバイオマスが増加しないようにする手法である<sup>22)</sup>。後者のアプローチは、発生した余剰汚泥を超音波破碎などの物理学的な処理<sup>3)</sup>、アルカリ剤などの化学的処理<sup>13)</sup>、嫌気消化<sup>15)</sup>、高温好気処理<sup>7)</sup>などの生物学的な処理に大別され、これらの手法により汚泥を減容することを目的とした手法である。特に、下水汚泥からメタンガスへと変換する嫌気消化は、古くから利用されている汚泥の資源化手法であるが、プロセスが不安定である点やメタン生成までの時間がかかる点などの課題がある<sup>18)</sup>。

下水汚泥からのメタン生成プロセスは、大きく分けると3段階に区別でき、はじめのステップは加水分解プロ

セスであり、加水分解反応により下水汚泥中の高分子物質が低分子物質へと変換される。次のステップは、酸生成プロセスであり、低分子化された物質からメタンの基質となる酢酸などを代表とした有機酸が生成される。最後のステップは、メタン生成プロセスであり、酢酸などの有機酸からメタンが生成される<sup>19)</sup>。下水汚泥中には様々な微生物群が存在しており、これらの微生物群が複雑に関わることにより、下水汚泥からメタンが生成されるという反応が完了する。具体的には、加水分解プロセスでは、汚泥中に豊富に存在しているタンパク質を分解するプロテアーゼなどの酵素を筆頭に、セルロースの分解に関わるセルラーゼ、デンプンの分解に関わるアミラーゼ、脂質の分解に関わるリパーゼという様々な酵素を生成できる微生物群が加水分解反応を担っている。また、有機酸生成プロセスでは、低分子化されて生成したアミノ酸、糖、脂質などから、有機酸を生成できる微生物群が働く。最後に、メタン生成プロセスでは、メタン菌などの微生物群が働き、酢酸などの有機酸からメタンを生成する。

このように、下水汚泥からのメタン生成は、分解反応、変換反応、エネルギー生成反応という様々な反応が統合されたシステムとなっており、このシステムを動かしているのは、本特集のテーマである「複合系微生物」である。それぞれの反応にどのような微生物群が関わっているのかというこれまでの知見を超えて、それぞれの反応、ならびに統合システムにおける効率化という視点で、複合系微生物の機能を深く理解することで、下水汚泥の嫌気消化の課題を改善できる可能性がある。本論文では、上記の考え方に基づいて、下水汚泥からのメタン発酵の向上化に取り組んだ筆者の研究成果を紹介する。

## 2. 下水汚泥の廃棄物として魅力と汚泥中細菌相互作用のコンセプト

下水汚泥は、生ごみなどの廃棄物とは異なり、下水処理場から排出される集積型のバイオマスである。また、都市部ではこの下水汚泥が日々大量に発生しており、この廃棄物を不変なバイオマスとして捉え、有効に利活用することにより、次世代エネルギー資源の鉱山としての魅力を秘めた原料となる<sup>16)</sup>。

下水汚泥からのメタン生成のプロセスは、上述のとおりであるが、汚泥中には多くの種類の細菌が存在しており、複雑な相互作用を受けながら、それぞれのプロセスにおける反応が進行しているものと考えられる。例えば、メタン菌に対する相互作用を考えた場合、メタン生成に関わる菌群に対して、阻害または抑制を示すもの、逆に依存または促進作用を示す菌などが存在するものと考えた。つまり、メタン生成を促進するという視点において、阻害または抑制作用を及ぼす菌群を抑え、逆に依存または促進作用をもたらす菌群を活性化させる条件を整えることで、メタン生成が促進・高速化するものと考えられる。同様に、加水分解反応および酸生成反応においても、加水分解に関わる菌群と酸生成に関わる菌群の活性が増加することで、メタンの基質となる原料が増え、メタン生成速度が向上することも考えられる。このように、下水汚泥における菌群による相互作用は複雑であるが、その細菌間相互作用の理解を深めることで、下水汚泥からのメタン生成を高めることができる可能性がある。

### 3. アジスロマイシンによるメタン生成の向上化

下水汚泥の中には、多くの種類および数の微生物群が存在しており、それぞれの菌群の複雑な相互作用の中で、均衡が保たれている。近年、クォーラムセンシングという、細菌から生成され、放出されるシグナル物質を介して、その環境中の菌密度（菌の多さ）を認識して、遺伝子発現を促し、毒素などの物質生産を活性化させる機構が注目を浴びている<sup>2)</sup>。その一方で、このクォーラムセンシングに関する研究は、ほとんどが単一菌を用いたものであり、下水汚泥という複雑な細菌が集まった系での研究はほとんどなされていない。そのような背景の中、筆者のはじめのアイデアは、緑膿菌に対してクォーラムセンシング阻害効果を示す抗生物質を用いて、下水汚泥におけるメタン発酵への影響を調べることであった。クォーラムセンシング阻害効果を示す抗生物質としては、アジスロマイシン、セフトラジウム、シプロフロキサシンが報告されている<sup>17)</sup>。福岡県北九州市小倉北区西港町にある日明浄化センターから採取した下水汚泥（20 g）を50 mLの発酵バイアルに入れ、さらに抗生物質を任意の最終濃度になるように添加し、窒素ガスを用いて嫌気条件下にして37°C、120 rpmにて発酵処理を行った。その際に生成されたメタンガスを経時的にガスクロマトグラフィーを用いて測定したところ、緑膿菌に対して阻害効果を示す0.5 µg/mLという低濃度においてはメタン発生量に差はなかったものの、5 µg/mLの濃度以上のアジスロマイシンを添加した際に、顕著にメタンガスの発生が増加していることを見出した（図1）。このアジス

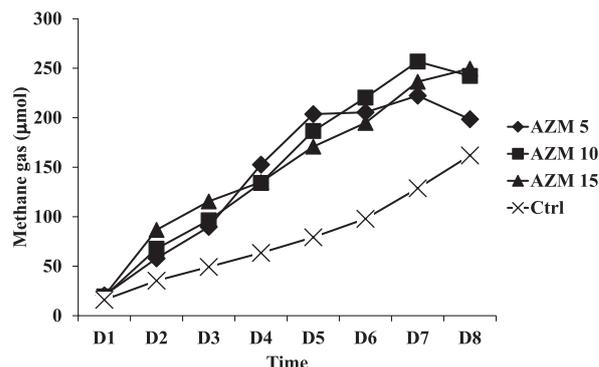


図1. アジスロマイシンを添加した下水汚泥を用いたメタン生成 (37°C, 120 rpm, 嫌気発酵)

AZM5: 5 µg/mL のアジスロマイシンを添加した下水汚泥  
 AZM10: 10 µg/mL のアジスロマイシンを添加した下水汚泥  
 AZM15: 15 µg/mL のアジスロマイシンを添加した下水汚泥  
 Ctrl: アジスロマイシン未添加の下水汚泥

ロマイシンによるメタン生成の向上化の原因を調べるため、アジスロマイシン添加および未添加の汚泥から RNA を抽出し、これらの RNA を鋳型として、メタン発酵プロセスで実際に活動している菌群を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) により調べたところ、図2に示すように、3種の *Clostridium* 属の活性が増加していることがわかった。これらの *Clostridium* 属細菌群が下水汚泥の加水分解反応を促進し、その結果メタン生成が向上したことが示唆された。この活性化現象は、50 µg/mL 以上のアジスロマイシンでは見られなかった<sup>14)</sup>。これは、高濃度のアジスロマイシンでは、下水汚泥中の細菌活性が低下したものと考えられる。

### 4. メタン発酵におけるその他の抗生物質の影響検証

下水汚泥からのメタン生成がアジスロマイシンによって向上したため、その他の抗生物質の効果を調べた。アジスロマイシンは、リボソーム阻害作用を示すマクロライド系の抗生物質<sup>20)</sup>であり、試験した抗生物質はリボソーム阻害作用を持つものを選び、5 µg/mL の濃度を用いて、メタン発酵への影響を試験した。最終的に、下水汚泥のメタン発酵において、アジスロマイシンは促進効果、およびクロラムフェニコールは抑制効果を示し、カナマイシンは発酵に影響を及ぼさなかった（図3）。メタン発酵におけるこれらの抗生物質の影響を3つのパターンに分類し、加水分解プロセスおよび酸生成プロセスにおける違いを検証した。

はじめに、それぞれの抗生物質添加時における加水分解反応を調べるため、発酵初期段階における上澄み液におけるタンパク質濃度をLowry法<sup>9)</sup>により測定した。また、プロテアーゼ活性は以前報告した手法に準じて測定した<sup>9)</sup>。下水汚泥は、タンパク質が豊富なバイオマスであるため、タンパク質の量を調べることで下水汚泥の低分子化の度合いを、プロテアーゼ活性を調べることで低分子化を担う酵素活性を評価できる。その結果、図4-Aに示したように、アジスロマイシンとクロラムフェニコールを添加した場合には、顕著にタンパク質濃度が増加していた。また、カナマイシン添加条件でも僅かな

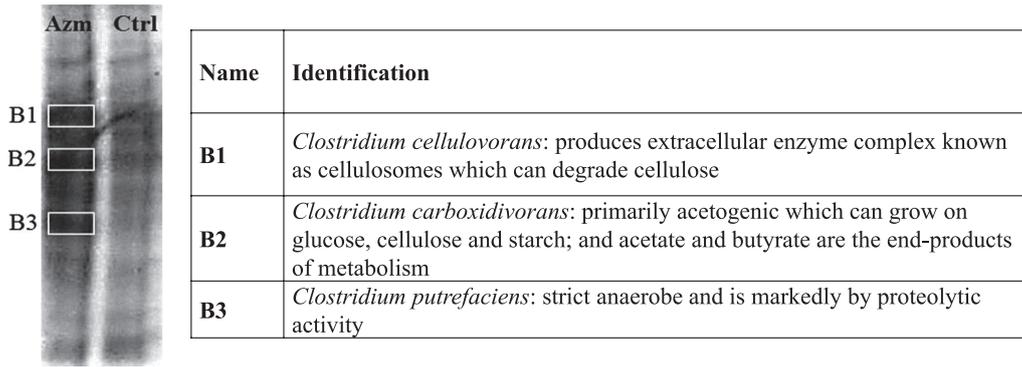


図2. アジスロマイシン含有下水汚泥によるメタン発酵中にサンプルを用いた DGGE 解析 (3種の菌群の活性化が見られ、いずれも *Clostridium* 属の菌種であった)

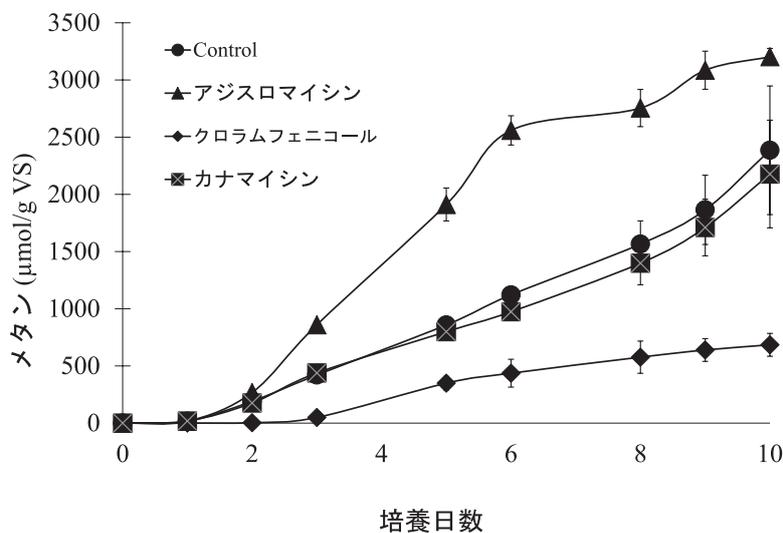


図3. アジスロマイシン、クロラムフェニコール、カナマイシンを添加した下水汚泥を用いたメタン生成 (37°C, 120 rpm, 嫌気発酵; 濃度はいずれも 15 μg/mL)

がらもタンパク質濃度の上昇が見られた。これらの結果と相関して、プロテアーゼ活性もアジスロマイシンとクロラムフェニコール存在下において向上していた (図4-B)。クロラムフェニコールにおいては、メタン生成が抑制されたが、加水分解反応には影響がないことがわかった。

次に酸生成プロセスを比較するため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてそれぞれの条件で生成された有機酸を測定した<sup>10)</sup>。図5は、それぞれの抗生物質添加の条件で生成された酢酸、プロピオン酸、酪酸の濃度を示している。酢酸の生成は、アジスロマイシン添加の初期では低いものの、10日目には顕著に増加していた。クロラムフェニコール添加汚泥においても10日目に酢酸の蓄積が見られた。一方、アジスロマイシンとクロラムフェニコールにおいては、発酵後期 (10日目) において酪酸の濃度が増加していた。メタン生成を抑制するクロラムフェニコールにおいては、メタンの基質となる酢酸の生成が見られることから、メタン生成経路がクロラムフェニコールにより阻害されていることが示唆された。

最後に、抗生物質添加時における細菌活性と古細菌活

性を評価するため、それぞれの汚泥から RNA を抽出し、その RNA を鋳型として TaqMan リアルタイム PCR を行った。細菌ならびに古細菌を標的としたプライマーおよび TaqMan プロブは、文献で報告されているものを使用した<sup>6,12)</sup>。結果として、細菌の活性においては、抗生物質の添加の有無で大きな差はなかったものの、古細菌の活性はアジスロマイシン添加した汚泥では増加傾向であり、クロラムフェニコール添加汚泥では顕著に抑制されていた。このように、クロラムフェニコールによるメタン生成の抑制効果は、メタン菌の活性が低下したことが要因であることが明らかとなった。

## 5. 次世代シーケンサー MiSeq を用いた細菌群集構造解析

最後に、それぞれの抗生物質を添加した汚泥から抽出した RNA を使い、次世代シーケンサー MiSeq による細菌群集構造解析を行った。表1は、それぞれの抗生物質を添加した汚泥における操作的分類群 (OTU)、生物種の種数 (Chao 1)、および多様度 (Shannon Index) を示した結果である。抗生物質を添加した下水汚泥では、活

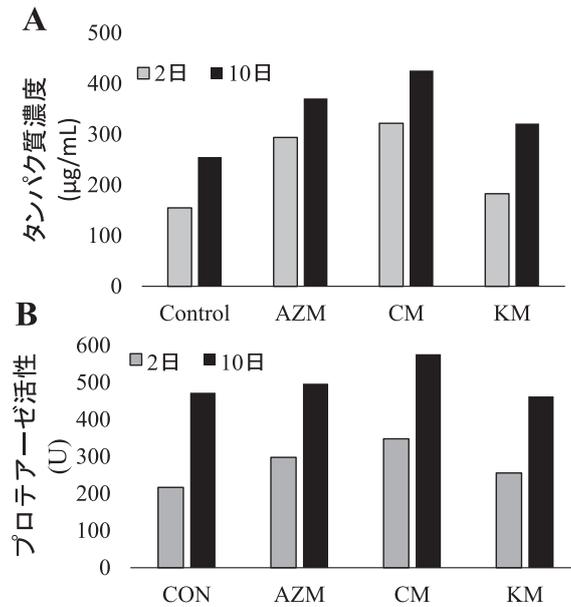


図4. 抗生物質を添加した下水汚泥を用いたメタン発酵中におけるタンパク質濃度 (A) およびプロテアーゼ活性 (B) の変化  
Control: 抗生物質添加なし, AZM: アジスロマイシン, CM: クロラムフェニコール, KM: カナマイシン  
プロテアーゼ活性の1ユニット (U) は, 1 mL の試料中で1時間に生成されるチロシン量 (µg) として算出されている。

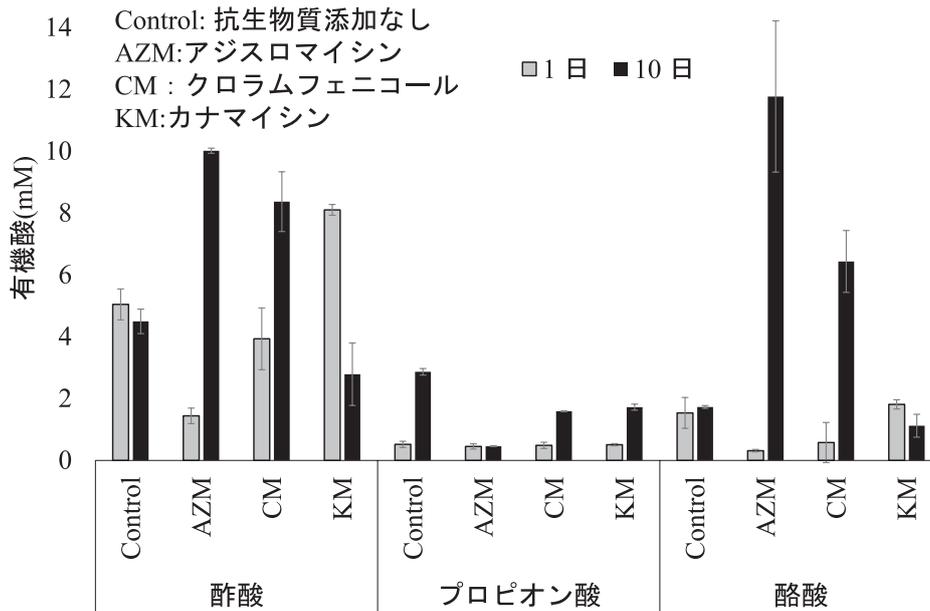


図5. 抗生物質を添加した下水汚泥を用いたメタン発酵中に生成された有機酸濃度の変化

動できる菌群の種類が低下することが考えられたが、2日目においてアジスロマイシンおよびクロラムフェニコール存在下で、OTU 値および生物種の種数ともに僅かながら増加していた。また、多様度も抗生物質添加なしのものと同程度であった。7日目になると、アジスロマイシンを添加した汚泥における OTU 値および生物種の種数が顕著に減少した。このように、抗生物質添加によって、初期のメタン発酵に関わる菌群が減少することなく、むしろ増加していた。具体的な細菌群集構造解析の結果は、筆者らの最近の公表論文にまとめられている<sup>11)</sup>。総括をすると、アジスロマイシンを添加した汚泥

においては、従来の報告と同様に、*Clostridium* 属の細菌群の活性が増加しているとともに、メタン生成菌である *Methanosarcina* 属の活性が見られた。また、アジスロマイシンとクロラムフェニコールを添加した汚泥においては、*Flavobacterium* 属の活性化が見られ、これが酪酸などの蓄積に寄与していることが示唆された。一方、*Caldilinea* 属は、クロラムフェニコール添加汚泥においては低く、アジスロマイシン添加汚泥では高い割合で検出されており、メタン生成の度合と相関性の高い菌群であった。

表1. アジスロマイシン, クロラムフェニコール, カナマイシンを添加した下水汚泥を用いたメタン発酵プロセス(2日目および7日目)の細菌群集構造の多様性解析

日数	抗生物質	OTUs*	Chao1*	Shannon Index*
2	AZM	9365	45777	12.49
	CM	9374	45808	12.49
	KAN	8873	42312	12.247
	CTRL	9254	43306	12.5
7	AZM	8580	39248	12.23
	CM	9689	47732	12.61
	KAN	9210	43487	12.44
	CTRL	9499	47806	12.48

\* Values were defined at a dissimilarity level of 0.03

AZM: アジスロマイシン, CM: クロラムフェニコール, KAN: カナマイシン, CTRL: 抗生物質添加なし

## 6. ま と め

本研究は、下水汚泥のメタン発酵における抗生物質添加の影響を調べた成果である。具体的には、アジスロマイシンを添加した汚泥では、メタン生成が向上し、これが加水分解反応の促進と古細菌活性が増加したことが要因であることを明らかにした。また、クロラムフェニコールを添加した汚泥では、メタン生成が抑制されるが、加水分解反応と酸生成反応には影響がないことがわかった。加えて、クロラムフェニコール存在下では、古細菌活性が低下しており、これがメタン生成の抑制の原因であることがわかった。最後に、メタン生成の増減に鍵となる菌群が数種類明らかとなり、これらの細菌群がどのように下水汚泥のメタン生成に寄与しているのかをさらに詳細に調べることが次の課題である。これらの取組みを進めることで、複合系微生物の機能の総括的な理解とともに、下水汚泥の嫌気消化の高速化が期待できる。

## 謝 辞

本研究は、北九州市学術・研究振興事業調査研究助成金の支援を受けて実施した。また、本研究を精力的に実施していただいた、当研究室の Minh Tuan NGUYEN 博士, Nurul Asyifah MUSTAPHA 博士院生, および平田由真修士院生に感謝の意を表したいと思います。また、本研究を進めるにあたり、ご助言いただいた九州大学の酒井謙二教授にも深謝いたします。

## 文 献

- Bougrier, C., H. Carrère, and J.P. Delgenès. 2005. Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal*. 106: 163–169.
- Castillo-Juárez, I., T. Maeda, E.A. Mandujano-Tinoco, M. Tomás, B. Pérez-Eretza, S.J. García-Contreras, T.K. Wood, and R. García-Contreras. 2015. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases*. 3: 575–598.
- Dewil, R., J. Baeyens, and R. Goutvrind. 2006. Ultrasonic treatment of waste activated sludge. *Environ. Progress*. 25: 121–128.
- Ganczarzyk, J.J. 1983. *Activated sludge process*, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
- Huang, X., P. Liang, and Y. Qian. 2007. Excess sludge reduction induced by *Tubifex tubifex* in a recycled sludge reactor. *J. Biotechnol.* 127: 443–451.
- Lee, C., J. Kim, S.G. Shin, and S. Hwang. 2008. Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65: 544–554.
- Li, X., H. Ma, Q. Wang, S. Matsumoto, T. Maeda, and H.I. Ogawa. 2009. Isolation, identification of sludge-lysing strain and its utilization in thermophilic aerobic digestion for waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* 100: 2475–2481.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Maeda, T., T. Yoshimura, R. García-Contreras, and H.I. Ogawa. 2011. Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp. KH3 for reducing waste activated sludge and biofilm formation. *Bioresour. Technol.* 102: 10650–10656.
- Maeda, T., T. Yoshimura, T. Shimazu, Y. Shirai, and H.I. Ogawa. 2009. Enhanced production of lactic acid with reducing excess sludge by lactate fermentation. *J. Hazard. Mater.* 168: 656–663.
- Mustapha, N.A., K. Sakai, Y. Shirai, and T. Maeda. 2016. Impact of different antibiotics on methane production using waste-activated sludge: mechanisms and microbial community dynamics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s00253-016-7767-2
- Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 148: 257–266.
- Neyens, E., J. Baeyens, and C. Creemers. 2003. Alkaline thermal sludge hydrolysis. *J. Hazard. Mater.* 97: 295–314.
- Nguyen, M.T., T. Maeda, M.Z. Mohd Yusoff, and H.I. Ogawa. 2014. Effect of azithromycin on enhancement of methane production from waste activated sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 1051–1059.
- Nguyen, M.T., N.H. Mohd Yasin, T. Miyazaki, and T. Maeda. 2014. Enhancement of sludge reduction and methane production by removing extracellular polymeric substances from waste activated sludge. *Chemosphere*. 117: 552–558.
- Schettler, T. 2002. Sewage sludge—looking upstream: the precautionary principle. *New Solut.* 12: 355–358.
- Skindersoe, M.E., M. Alhede, R. Phipps, L. Yang, P.O. Jensen, T.B. Rasmussen, T. Bjarnsholt, T. Tolker-Nielsen, N. Hoiby, and M. Givskov. 2008. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3648–3663.
- Spinoso, L. 2004. From sludge to resources through biosolids. *Water Sci. Technol.* 50: 1–8.
- Wang, Q., G. Jiang, L. Ye, and Z. Yuan. 2014. Enhancing methane production from waste activated sludge using combined free nitrous acid and heat pre-treatment. *Water Res.* 63: 71–80.
- Williams, J.D. 1991. Spectrum of activity of azithromycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 813–820.
- Yan, S., K. Miyanaga, X.-H. Xing, and Y. Tanji. 2008. Succession of bacterial community and enzymatic activities of activated sludge by heat-treatment for reduction of excess sludge. *Biochem. Eng. J.* 39: 598–603.
- Ye, F.X. and Y. Li. 2005. Reduction of excess sludge production by 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide in an activated sludge process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 269–274.