

遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 26～平 28

担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）
水環境研究グループ（水質チーム）

研究担当者：植松龍二、對馬育夫、山崎廉予

【要旨】

近年、下水汚泥に地域から発生するバイオマスを加える集約混合嫌気性消化が増えている。投入バイオマス条件の複雑化により、適切な維持管理手法が求められてきている。本研究では、地域バイオマス等の集約混合消化が消化汚泥の菌叢に与える影響を明らかとするため、濃縮汚泥と生ゴミの混合消化実験を行い、投入バイオマスおよび消化汚泥の菌叢についての遺伝子解析を行った。その結果、投入バイオマスが消化槽内の菌叢に影響を与えていることが示された。また、アーキア（メタン生成菌）、細菌（酸生成菌）の菌叢の多様性とメタン生成に相関がみられ、菌叢解析により、メタン生成のモニタリングができる可能性が示された。

キーワード：嫌気性消化、地域バイオマス、次世代シーケンス、菌叢解析

1. はじめに

低炭素・循環型社会構築のため、都市や農村で発生するバイオマスを、資源やエネルギーとして地域で有効活用する技術開発が求められている¹⁾。有用なエネルギー資源の一つとして注目を集める下水汚泥が発生する下水処理場は、嫌気性消化槽といったバイオマスからのエネルギー回収を可能とする施設を有しており、下水処理場を地域の中で、エネルギーの集約・自立・供給拠点化することが目標として掲げられている²⁾。

下水処理場での嫌気性消化について、地域から発生するバイオマスを含めた集約混合嫌気性処理を想定した上で、下水汚泥に生ごみ、食品系廃棄物、間伐材等のバイオマスを加え、その消化特性の把握が試みられている³⁾。一方、集約混合嫌気性処理では、投入バイオマス条件が複雑になり、嫌気性消化槽の維持・管理について、これまで蓄積した現場の経験やノウハウでは対応できない懸念があり、適切な維持管理手法が求められている。

本研究では、集約嫌気性消化が消化汚泥の菌叢に与える影響を明らかとするため、濃縮汚泥と生ゴミの混合消化実験を行い、投入バイオマスおよび消化汚泥の菌叢についての遺伝子解析を行い、新たな維持管理手法の情報収集を試みた。また、実処理場において、汚泥以外の投入バイオマスを混合している消化汚泥、高温消化汚泥の菌叢についても遺伝子解析を行った。

2. 研究方法

2.1 生ゴミ混合消化実験

混合消化実験は、有効容積 2 L のリアクター計 6 系列で実施した。各リアクターでの運転条件を表-1 に示す。投入バイオマスとして、汚泥のみを投入する系、模擬生ゴミ (TS (固形物濃度)3%)のみを投入する系、濃縮汚泥と模擬生ゴミを混合して投入する系 2 種類、35°C で 1 週間発酵させた模擬生ゴミを混合する系 2 種類の、合計 6 種類を用いた。生ゴミは、発生後すぐに回収され、消化槽へ投入されるということではなく、発生から消化槽へ投入されるまでにブランクがある。これを考慮したのが、発酵生ゴミの系である。濃縮汚泥は A 下水処理場で採取し、固形物 (TS)濃度を 3% となるように調整した。生ゴミは、実生ゴミ組成に関する調査結果⁴⁾を参考に作成した。種汚泥は、土木研究所で運転している実験室レベルの中温嫌気性消化装置内消化汚泥を用いた。各リアクター内水理学的滞留時間 (HRT)が 20 日となるよう、汚泥の引き抜き、投入を随時行った。温度は 35°C 程度に制御し、運転期間は、2 か月間とした。各実験系におけるガス発生量の測定、各汚泥の 16SrRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集解析を定期的に測定した。

2.2 菌槽解析

DNA 抽出には、Extrap SoilDNAKit Plus ver.2 (日鉄住金環境)を用い、V3-V4 領域を対象としたプライマーセット (Bac341 および Bac850)⁵⁾を用い、PCR

表一 濃縮汚泥と生ゴミとの混合嫌気性消化実験

実験系名称 項目	汚泥のみ	生ゴミのみ	+生ゴミ 30	+生ゴミ 80	+発酵生ゴミ 30	+発酵生ゴミ 80
濃縮汚泥	3%	添加なし	3%	3%	3%	3%
生ゴミ(対汚泥 TS)	添加なし	100%	30%	80%	※発酵 30%	※発酵 80%
投入 TS(%)	3.0	3.3	3.8	5.6	3.9	5.7
VS/TS	0.78	0.93	0.81	0.86	0.82	0.86
投入 COD (g/L)	39	45	55	67	54	74

※発酵：35°Cで1週間保存

を行った。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル、Illumina)を用いて解析し、解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH⁶⁾を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking および PCoA 解析は QIIME⁷⁾を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 をリファレンスとした。

メタン生成に関わる菌種である、細菌（酸生成菌）とアーキア（メタン生成菌）のそれぞれにおいて、解析結果を用いて、Shannon 指数⁸⁾により菌種の多様性の統計解析を行った。

実処理場の消化汚泥は、生ゴミ、下水汚泥や農業集落排水、し尿を混合消化している消化汚泥、および投入バイオマス、畜産廃棄物を処理している消化汚泥、および投入バイオマス、高温消化を行っている2か所の処理場の消化汚泥について、菌叢解析を行った。2か所の処理場は、同地方に立地するが、消化の HRT がそれぞれ 42 日、22 日と倍近く異なっているという違いがある。また、比較として、土木研究所内で運転しているラボスケールの中温消化、高温消化汚泥の菌叢解析も行った。

3. 研究結果

3.1 菌叢解析結果

図-1 に、各消化汚泥と投入バイオマスの門レベルの細菌叢解析結果、図-2 に、各消化汚泥と投入バイオマスの属レベルのアーキア叢解析結果を示す。細菌叢解析結果より、中温消化では、*Bacteroidetes* 門が 15~30%、*Firmicutes* 門が 10~25%、*WWE1* 門が 10~25%程度と上位の占有率を占めていた。高温消化では、*Firmicutes* 門が 45~60%、*Thermotogae* 門が 15%、*Proteobacteria* 門が 10%程度と上位の占有率を占めていた。これらの結果は、他の知見と同等レベ

ルの占有率であった⁹⁾。また、中温消化では、種汚泥の消化汚泥よりも、投入バイオマスである濃縮汚泥の細菌叢の影響を強く受けていることがわかる。生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場の結果は、他の中温消化の結果と比較して、*Firmicutes* 門の占有率が高く、占有率の偏りが大きい一方、生ゴミ混合実処理場の結果は、種類が多く、占有率の偏りが少ない結果であった。生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場と比較して、生ゴミ混合実処理場では投入バイオマスの種類が多いため、このような結果になったと考えられる。しかし、投入バイオマスに存在する菌種の影響を受けているわけではなく、他の中温消化の細菌叢ではほとんど存在していない、*OP9* 門や *Actinobacteria* 門の存在割合も高かった。*OP9* 門は、家畜糞尿と生ごみのメタン発酵槽での存在が確認されている¹⁰⁾が、投入バイオマス中にはほぼ存在していなかった。一方、濃縮汚泥や、ラボスケールの高温消化で検出された。*Actinobacteria* 門では、*Corynebacterium* 属が 20%近くを占めており、3種類の投入バイオマス中にも同レベルで存在していた。*Corynebacterium* 属には、グリセロールを資化する種も含まれるが、検出された種が該当するかまではわからない。また、*WWE1* 門は、生ゴミ混合実処理場の消化槽中には存在するが、投入バイオマスにはほぼ存在していなかった。同様に、畜産廃棄物実処理場の消化槽内に存在するが、投入バイオマス中ではほぼ存在していない。近年、消化槽中での存在が明らかになり、アミノ酸分解やプロピオン酸酸化経路を有する *WWE1* 門¹¹⁾であるが、投入バイオマス中に存在しなくても、消化槽内で定着できる増殖力が強い細菌種であると考えられる。

アーキア叢解析結果を見ると、細菌叢解析結果と比較して、各汚泥における占有率のばらつきが大きいことがわかる。ほとんどの消化汚泥には酢酸資化

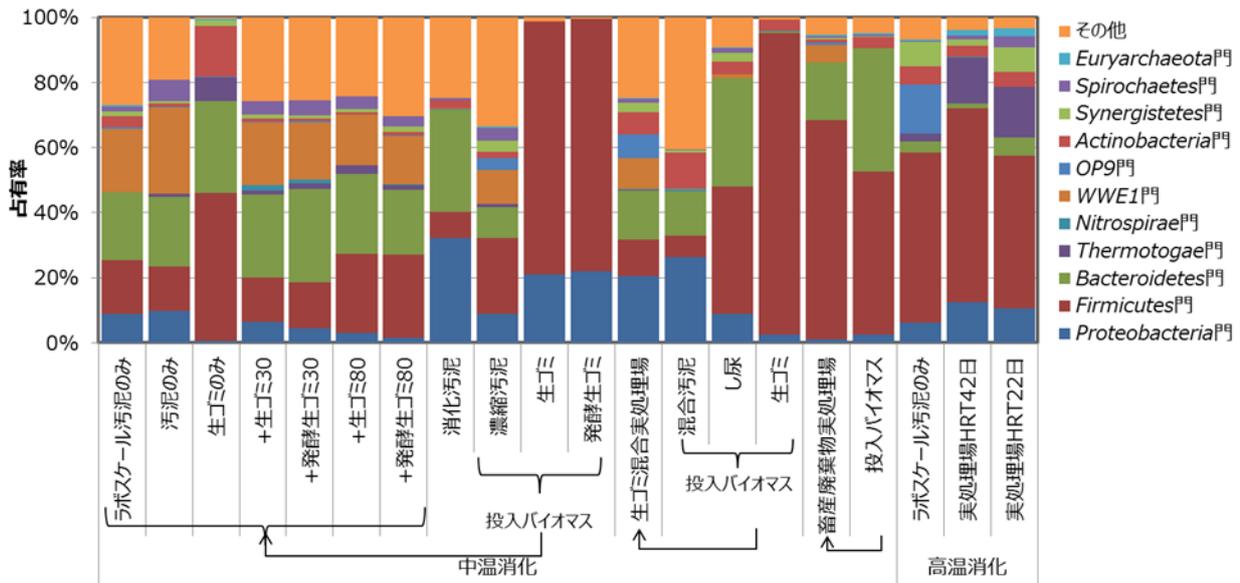


図-1 各消化汚泥と投入バイオマスの細菌叢解析（門レベル）

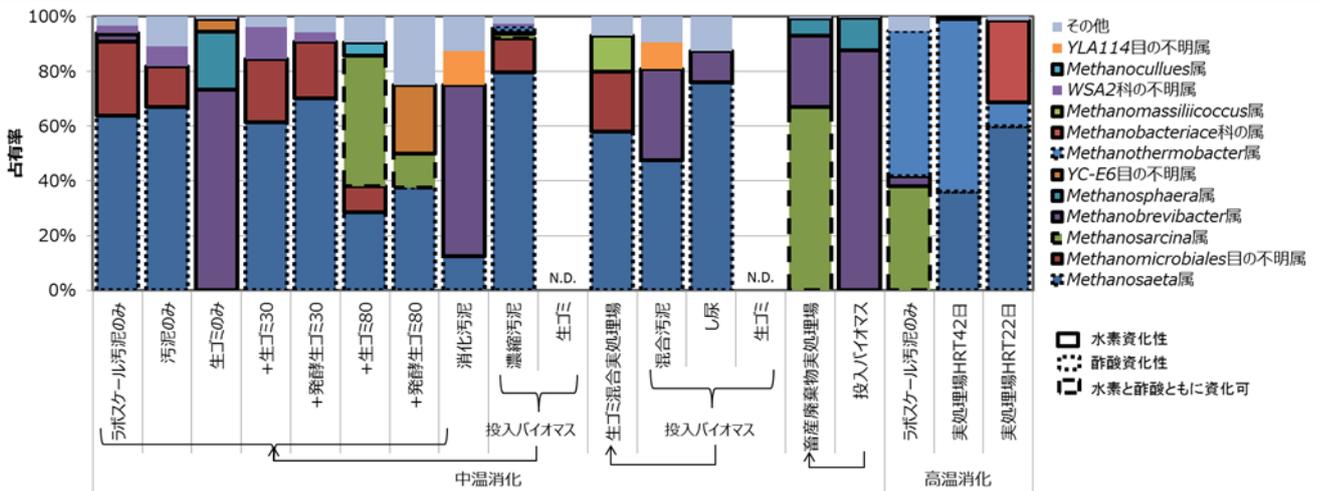


図-2 各消化汚泥と投入バイオマスのアーキア解析（属レベル）※N.D. : Not Detected

メタン細菌である *Methanosaeta* 属が存在していたが、30%~80%とその存在割合は大きく異なっていた。投入バイオマスである生ゴミには、アーキアは存在せず、生ゴミのみの消化槽では、アーキア叢が他と比較して全く種類が異なっていた。*Methanobrevibacter* 属、*Methanospaera* 属、YC-E6 目の不明属が存在しているが、いずれも種汚泥である消化汚泥には存在しない種であり、空气中に存在していた種が定着したと考えられる。また、+生ゴミ 80、+発酵生ゴミ 80 においても、生ゴミを 30% 投入した消化汚泥や、生ゴミのみを投入した消化汚泥とも異なり、それぞれ異なるアーキア叢であった。生ゴミ混合処理場の結果においても、*Methanomicrobiales* 属や *Methanomassiliicoccus* 属など、

投入バイオマスである混合汚泥やし尿に存在しない種類が存在しており、畜産廃棄物実処理場の消化汚泥においても、投入バイオマスに存在しない *Methanosarcina* 属が、投入バイオマスに存在する *Methanobrevibacter* 属や、*Methanospaera* 属よりも占有率が高い結果となった。これらの結果より、投入バイオマスに存在するアーキアの種類が、消化槽内のアーキア種になるわけではない可能性が考えられる。そこで、水素資化と酢酸資化の、どちらの経路でメタン生成を行う種であるかに着目した。その結果、生ゴミのみ、畜産廃棄物実処理場は、水素資化経路がほぼすべてであり、生ゴミ 80% 投入では、水素資化と酢酸資化が半分程度、生ゴミ混合実処理場では、酢酸：水素が 2：1 程度、汚泥を主に投入する

消化汚泥は、酢酸：水素が3：1程度、高温消化汚泥では、ほとんどが酢酸資化であることが示された。これらの結果より、生ゴミの投入割合、消化温度が、酢酸資化・水素資化のアーキア種の存在割合に大きく影響する可能性が示された。

3. 2 統計解析結果

図-3に、メタン発生が安定した運転開始30日後からの生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン転換率とメタン発生量の平均値を示す。汚泥のみでは、メタン転換率が4割程度であり、実処理場での平均的なメタン転換率である6割よりは、低い結果であった。汚泥のみと比較すると、生ゴミのみ、生ゴミ混合80%が高いメタン転換率であった。生ゴミ混合30%でも、メタン発生量は汚泥のみより多いが、転換率で見るとほぼ変わらない結果であった。次に、メタン発生量と、消化汚泥の菌叢の関係をみた。図-4において、各実験系における細菌、アーキアの多様性指数と、メタン発生量を比較した。細菌は、主要な13種の門 (*Acidobacteria* 門、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、*Nitrospirae* 門、OD1 門、OP9 門、*Proteobacteria* 門、*Spirochaetes* 門、*Synergistetes* 門、*Thermotogae* 門、WWE1 門) の多様性指数を解析した。アーキアは、主要な7種の属 (*Methanobrevibacter* 属、*Methanosphaera* 属、WSA2 科の不明属、*Methanomicrobiales* 目の不明属、*Methanosaeta* 属、*Methanosarcina* 属、YC-E6 目の不明属) の多様性指数を解析した。細菌は、その結果、アーキア多様性指数が高い方が、メタン発生量が多くなる結果が示された。一方、細菌の多様性においては、メタン発生量が高い方が、低くなる結果が示された。多様性指数は、各菌種の占有率の偏りが少ない方が高い値を示す。これらの結果より、アーキアは、様々な種類が同程度存在した方がメタン発生量が高く、細菌は、特定の菌種が多い方が、メタン発生量が高いと考えられる。

4. まとめ

嫌気性消化汚泥の菌叢解析を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 細菌叢解析の結果、投入バイオマスの種類が多いほど、消化槽内の細菌叢の種類が多く、占有率の偏りも少なくなることが示されたが、消化槽内の菌種が投入バイオマスの菌種に強く影響を受け

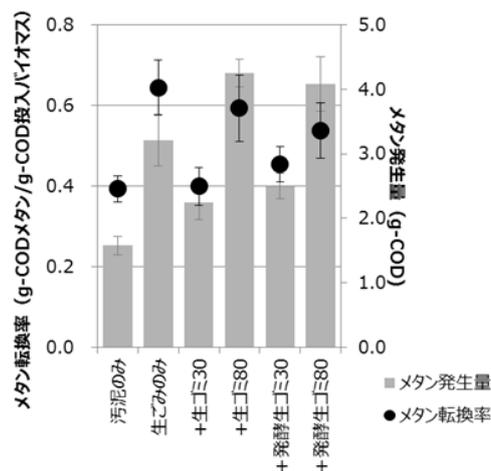


図-3 生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン転換率とメタン発生量

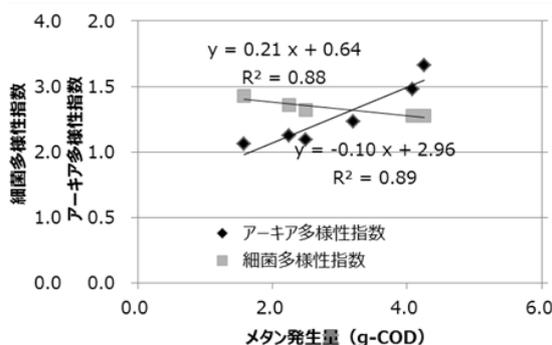


図-4 生ゴミ混合嫌気性消化実験の各消化汚泥におけるメタン発生量と菌叢多様性指数の関係

るわけではないことも明らかとなった。特にWWE1門は、投入バイオマス中に存在していても消化槽内に定着する種であることが示された。

- 2) アーキア叢解析の結果、菌種やその占有率は、消化汚泥ごとに大きく異なるが、メタン生成において、酢酸資化、水素資化のアーキア種の存在割合は、生ゴミ投入割合や消化の温度に大きく影響を受けることが示された。
- 3) 統計解析の結果、細菌の多様性とメタン発生量は、負の関係、アーキアの多様性とメタン発生量は、正の関係があることが示された。消化汚泥の菌叢を解析することで、メタン発生量のモニタリングが可能になる可能性が示された。

謝辞

下水処理場の方々には、汚泥試料採取にご協力頂きました。ここに記して、謝意を表します。

参考文献

- 1) 日高平ら：下水汚泥のリサイクルと小規模下水処理場向け高濃度混合メタン発酵技術、日本エネルギー学会誌、日本エネルギー学会、94、705-714、2015.
- 2) 国土交通省：新下水道ビジョン、3・17、2014.
- 3) 日高平ら：回分式実験による下水汚泥と有機性廃棄物の嫌気性消化特性調査、土木学会論文集 G (環境)、69、III_605-III_614、2013.
- 4) 谷川昇ら：生ごみの細組成、都市清掃、50、116-119、1997.
- 5) Klindworth A.ら：Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, 41, 1-11, 2013.
- 6) Edgar R.: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461, 2010.
- 7) Caporaso J.G.ら：QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature Methods*, 7, 335-336, 2010.
- 8) Shannon, C.E.ら：A mathematical theory of Communication. Uni. Press, Illinois. Urbana, 101- 107, 1949.
- 9) Goux X.ら：Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery, *Biotechnology for Biofuels*, 8(122), 1-18, 2015.
- 10) 重松 亨ら：メタン発酵プロセスに関与する微生物群集、*生物工学会誌*、87(12)、570-596、2009.
- 11) Pelletier E.ら：Candidatus Cloacamonas Acidaminovorans” : Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division, *Journal of Bacteriology*, 190, 2572-2579, 2008.