

3F11-2 光照射によるメタン生成菌 *Methyl-coenzyme M reductase* 遺伝子転写量への影響

○出井 正道, 塚原 建一郎, 澤山 茂樹
(産総研)

【目的】我々は、メタン醗酵槽へ光を照射することでメタンガスの発生が促進されることを報告している。本研究では、その促進メカニズムを検討するために、メタン醗酵の最終段階でメタン生成に不可欠な *Methyl-coenzyme M reductase* 遺伝子 (*mcr*) に着目し、その転写量をリアルタイム PCR 法で解析した。【方法・結果】高温メタン醗酵槽由来の醗酵液を炭酸水素ナトリウムとともにガラスボトルに加えた後アルミホイルで遮光し、19日間置いてガス発生をほぼ停止させた。その一部を種汚泥として炭酸水素ナトリウムと H₂ ガスを加えて青色発光ダイオード (LED) 光源下に置き、定期的に醗酵液をサンプリングした。また、同条件で遮光したものをコントロールとした。新たに設計した *Methanothermobacter* 属の *mcr* 遺伝子配列に特異的なプライマーとプローブを用い、定量的リアルタイム RT-PCR 法による *mcr* 遺伝子転写量の測定を行った。分析の結果、青色 LED に照射してから 5 時間後の転写量は照射直前よりも多く、暗条件コントロールにおいては少ないという結果が得られた。さらに、5 時間後のそれぞれの醗酵液から DNA を抽出してリアルタイム PCR を行ったところ、*mcr* 遺伝子量は差は見られなかった。遺伝子量は個々の菌に一定量含まれていることから、菌数に差は無かったと考えられる。これらの結果から、青色 LED 光照射によって *mcr* 遺伝子の転写が促進されることが分かった。なお、本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) における委託業務「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発」の一環として報告する。

Influence of light on transcript level of *Methyl-coenzyme M reductase* gene in Methanogen

○Shodo IDEI, Kenichiro TSUKAHARA, Shigeki SAWAYAMA
(AIST)

Key words methane fermentation, *Methyl-coenzyme M reductase* gene, transcript level, light

3F11-4 アンモニアを除去した余剰脱水汚泥の長期乾式メタン発酵試験

○中島田 豊^{1,2}, 藪 宏典², 仙波 光一朗¹, 大島 康隆¹, 難波 祐三郎², 西尾 尚道^{1,2}
(¹広島大院・先端・生命機能, ²広島県産業科学技術研究所)

【目的】脱水余剰汚泥の乾式メタン発酵では生成されるアンモニアがメタン発酵の阻害要因となる。前回の報告 (1) で、脱水汚泥をアンモニア発酵後に脱アンモニア処理を行った汚泥単体での乾式メタン発酵が可能と判明したため、今回は安定的な長期処理を目指して実験を行った。【実験方法及び結果】広島県内の排水処理場から供試された消化脱水汚泥 (種汚泥) 及び余剰脱水混合汚泥 (処理汚泥) を使用し、種汚泥: 処理汚泥の混合比率を 1:4、初発 pH7 以上に調整し、55°C で嫌気培養しアンモニア生成を行った。アンモニアを高温、アルカリの条件下でガスとして放散・除去し、脱アンモニア汚泥を調整した。ラボリアクターを使用し、55°C、嫌気条件下で種汚泥 5kg に対して脱アンモニア汚泥を投入し、順次 Solid Retention Time (SRT) を上昇させて連続的なメタン発酵を行った。今回の実験において、バイオガスによる全有機炭素除去率は SRT40 日で 58%、SRT20 日で 52%、SRT17 日では 47% であった。また、アンモニア濃度は 2000mg-N/kg-ww 付近で推移し、負荷を変化させた直後にはプロピオン酸が蓄積したが、それ以外有機酸は不検出であった。さらに SRT20 日で 80 日間以上にわたり安定的な処理が可能であった。本研究は広島県産学官共同研究プロジェクトによる成果である。

1) 藪ら、日本生物工学会講演要旨集、p.203(2004)

Long-term dry methane fermentation of ammonia-stripped sludges

○Yutaka NAKASHIMADA^{1,2}, Hironori YABU², Kouichirou SENBA¹, Yasutaka OHSHIMA¹, Yuuzaburo NANBA², Naomichi NISHIO^{1,2}
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Hiroshima Pref. Ins. Ind. Sci. Tech.)

Key words dry methane fermentation, ammonia, sludge

3F11-3 ポリウレタンを担体材料とした円盤回転担体リアクタの嫌気性消化特性

○楊 英男, 塚原 建一郎, 澤山 茂樹
(産総研)

【目的】本研究では、ポリウレタン回転円盤リアクタに酢酸を供給し、回転数の変化によるリアクタのメタン発酵特性への影響を検討した。【方法及び結果】有機物負荷 (OLR) 2.69 g/l-reactor/d、HRT 2 日、回転数 5, 0, 30 と 60 rpm の条件において、メタンガス濃度、DOC 除去率、メタン生成速度を測定した。さらに、円盤上のメタン生成菌叢を解析した。ポリウレタン回転円盤リアクタは、スタートアップ後比較的短時間でメタン生成が安定した。各回転数を検討した結果、回転数 0, 5 と 60 rpm の条件に比べ、回転数 30 rpm の場合に最も優れたガス化特性を示した。このことから、回転円盤リアクタの回転速度は、メタン生成速度に関係していると考えられる。回転数 30 rpm において、回転円盤の外側、内側及び発酵液中の菌叢解析を行った。16S rRNA 遺伝子クローン解析によると、優占したメタン生成菌は、*Methanosarcina* 属であった。円盤外側では *Methanobacterium* 属も見られた。リアルタイム PCR によるメタン生成菌の定量解析の結果、円盤の外側、内側、発酵液の順に減少していくことが示唆された。嫌気性消化リアクタ内部に回転円盤担体を取付ることにより、増殖の遅いメタン生成菌が固定化され、さらに、円盤を適切な回転速度により回転させて、発酵液との接触効率を上げ、発酵効率を向上させる可能性が示唆された。

なお、本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) における委託業務「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発」の一環として報告する。

Performance of a rotating disk reactor packed with polyurethane during anaerobic digestion

○Yingnan YANG, Kenichiro TSUKAHARA, Shigeki SAWAYAMA
(AIST)

Key words anaerobic digestion, immobilization, real time PCR, rotating disk

3F11-5 乾式メタン発酵系の菌叢解析

○仙波 光一朗^{1,2}, 藪 宏典², 大島 康隆^{1,2}, 難波 祐三郎², 村上 克治³, 中島田 豊^{1,2}, 西尾 尚道^{1,2}
(¹広島大院・先端・生命機能, ²広島県産業科学技術研究所, ³産総研)

【目的】現在排水処理は活性汚泥法を用いて処理されているが、その際に年間 200 万トン (乾物基準) もの余剰汚泥が発生して問題になっていることから、我々は乾式メタン発酵技術による余剰汚泥の処理方法を検討している。本研究では乾式メタン発酵の効率化を目指し、分子生物学的手法を用いた乾式メタン発酵に関する微生物群の菌叢解析を行った。【方法】乾式メタン発酵リアクターを用いてメタン発酵を行ったサンプルから DNA を抽出し、Bacteria 及び Archaea 汎用プライマーを使用し PCR 増幅し、DGGE 解析、クローン解析及びリアルタイム PCR を行った。

【結果】Bacteria における菌叢解析の結果、汚泥滞留時間 (SRT) 20 日でメタン発酵が順調に進んでいる時期は共生プロピオン酸酸化性菌が検出されたが、SRT を 14 日とし、プロピオン酸が蓄積した時期ではそれらの菌が検出されなかった。また Archaea における菌叢解析の結果から、プロピオン酸蓄積後、酢酸酸化性メタン生成菌の割合が低下し、水素酸化性メタン生成菌の割合が増加した。以上の結果より SRT を短くすると、共生細菌による有機酸の分解が律速になり、徐々に有機酸が蓄積するとともに、酢酸酸化性メタン生成菌が減少して、メタン生成速度が低下することが示唆された。本研究は広島県産学官共同プロジェクトの一環として実施した。

Microbial community analysis of methane fermentation

○Kouichirou SENBA^{1,2}, Hironori YABU², Yasutaka OHSHIMA^{1,2}, Yuuzaburo NANBA², Katsuji MURAKAMI³, Yutaka NAKASHIMADA^{1,2}, Naomichi NISHIO^{1,2}
(¹Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., ²Hiroshima Pref. Ins. Ind. Sci. Tech., ³AIST)

Key words dry methane fermentation, PCR-DGGE, syntrophic bacteria