<ノー ト>

バイアル実験によるメタン生成活性の測定手法に関する検討

久場隆広* 古米弘明** 楠田哲也***

Evaluation of Methanogenic Activity Test Using Glass Vials

Takahiro KUBA*, Hiroaki FURUMAI** and Tetuya KUSUDA***

* Dept. of Civil Eng. Hydraulics, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan

** Dept. of Civil Eng. Hydraulics, Kyunhu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan

*** Institute of Environmental Systems, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan

1. 緒 言

嫌気性廃水処理にかかわる菌群のメタン生成活性を測定するために、バイアルびんを用いた実験結果が報告されている^{1)~3)}。それらの実験手法は純粋培養系で使用されているもの^{4)~6)}を、混合培養系に適用したものである。バイアルびんによる活性テストは、種々の条件下で大量の実験を同時に、かつ簡単に行える利点を有する反面、その試験結果は実験時の操作や培地条件の影響を受ける欠点がある⁷⁾。特に絶対嫌気性メタン生成菌にこの手法を適用する場合、酸素の混入により菌が失活したり、培地条件により活性に違いが生じる。また、代謝産物であるメタンガスの発生量に関するデータは重要であるにもかかわらず余り報告されておらず、しかも、バイアル実験でのガス発生量の計算方法やバイアル内部でのCOD収支についての報告例も少ない。このように、廃水処理系でのメタン生成活性測定のためのバイアル実験手法は確立されているとは未だいえない状況にある。

本研究は、酢酸および混合酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)による集積培養菌を用いたバイアル実験に基づき、還元剤であるシステインと硫化ナトリウムの添加・無添加によるメタン生成活性への影響、実験結果の再現性およびそのCOD収支について検討を加えるものである。

2. 実験方法

2.1 供試培養汚泥

供試集積培養菌の培養条件および投入基質組成をTable 1に示す。培養基質として、酢酸分解菌について検討する場合には酢酸(HAc)を、水素生産性酢酸生成菌について検討する場合には、酢酸、プロピオン酸(HPr)およびn-酪酸(n-HBu)を混合した基質(Mix, HAc:HPr:n-HBu=2:1:1)を用いた。培養は有効体積850mlの完全混合槽を用い、下水処理場の嫌気性中温消化槽汚泥を植種汚泥として、60mlの基質を1日1回投入するfill&draw方式で長期間、35±1℃で行った。

2.2 バイアル実験条件

完全混合槽で長期間(600日間)培養を行って集積した培養菌を用いて、35℃の恒温振とう培養槽内で、バイアル(70ml容)回分実験を行った。基質は培養に用いたもの(Table 1)と同様である。バイアル回分実験の条件をTable 2に示す。HAc, Mix培養菌についてシステイン(塩酸塩, 250mg・l⁻¹)および硫化ナトリウム(9水塩, 250mg・l⁻¹)をそれぞれ添加したもの、硫化ナトリウムのみ添加したもの、いずれも添加しないものの3条件下で、1条件当り2本のバイアルを用いて実験を行った。

基質量5ml, 植種液量20ml, 後述する希釈水量25

* 九州大学大学院工学研究科水工土木学専攻 〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

** 九州大学工学部水工土木学科 〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

*** 九州大学工学部環境システム工学センター 〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

酵母エキスを添加しており、そのため集積培養液中には若干の酸生成菌や水素生産性酢酸生成菌が存在していると思われる。したがって、バイアル No. A1 では、アミノ酸の一種であるシステインがそれらの菌により分解され、その分解過程において水素が生成されたものと考えられる。**Fig. 2**の結果を求める際、メタン転換率の投入基質 COD 成分として HAc のみしか考慮していない。実験終了時における、上澄液のタンパク質分析の結果より判断してシステイン (165mg-COD・ l^{-1}) の約 5 ~ 6 割が分解されていると推定された。この分解されたシステインも投入された COD 成分として考え、メタン転換率を計算すると、約 0.96 程度となる。通常、純粋なメタン菌の培養あるいは実験において還元剤としてシステインが用いられているが、混合培養系での実験において還元剤としてシステインを用いる場合、その分解による影響を考慮する必要がある。

Mix で培養された菌群に Mix を投入した場合 (バイアル No. M1~M3) のメタン転換率と VFA の合計値の経時変化を **Fig. 3** に示す。HPr および n-HBu の分解過程において水素が生成されるため、Mix で培養された菌群中には水素消費菌群が存在している。した

がって、混合基質を投入した場合のいずれの条件下においても、著しい水素の蓄積は認められなかった。しかしながら、メタン転換率 ([メタンの COD]/[Mix の COD]) には違いが認められ、HAc 基質投入の実験結果と同様な傾向が伺える。即ち、システインを添加したバイアル No. M1 では、メタン転換率は 1.15 に達しており、システインが分解されたことを示している。

(2) 基質消費に対する影響

バイアル No. A1~A3 における HAc 濃度の経時変化を **Fig. 4** に示す。図中の実線と破線は同一条件下で行った 2 つの実験結果を示す。還元剤を添加しないもの (バイアル No. A3) において HAc 消費速度が一番速く、ついで硫化ナトリウムのみ添加したもの (バイアル No. A2)、両方の還元剤を添加したもの (バイアル No. A1) の順で速いという結果が得られた。

次式は著者らが用いている動力学的活性菌体量推定式である^{8)~10)}。

$$\mu_m \cdot t = \ln \frac{1 + X_0 / (S_0 \cdot Y) - S / S_0}{X_0 / (S_0 \cdot Y)} \quad \dots\dots\dots(1)$$

ここに、 μ_m : 最大比増殖速度 (h^{-1})、 t : 反応時間 (h)、 X : 菌体濃度 (mg-COD・ l^{-1})、 S : 基質濃度 (mg-COD・ l^{-1})、 Y : 増殖収率係数 (mg-COD・ mg^{-1} -COD)、添字 0: 初期濃度。

実験条件から、いずれのバイアル回分実験の初期菌体濃度 X_0 および初期基質濃度 S_0 も同じであるため、(1)式は基質濃度 S をある一定値にすることにより、以下のようなになる。

$$\mu_{mi} \cdot t_i = \text{constant} \quad \dots\dots\dots(2)$$

ここに、添字 i : バイアル No. ($i=A1, A2, A3$)。例えば、基質濃度 S が初期濃度の 1/2 となる反応時間 t_i をとると、(2)式から、 $\mu_{mA1} / \mu_{mA3} = t_{A3} / t_{A1} = 0.74$ 、 $\mu_{mA2} / \mu_{mA3} = t_{A3} / t_{A2} = 0.86$ となり、還元剤を添加した方が、最大比増殖速度が 2 ~ 3 割小さく見積もられる。前述のようにバイアル No. A1 では、システイン分解

Fig. 2 Changes of methane conversion and hydrogen concentration with time.

Fig. 3 Changes of methane conversion and volatile fatty acid concentration with time.

Fig. 4 Effect of Na_2S and cysteine addition on methanogenic activity.

にともない水素生成だけでなく、HAc も生成されたと考えられる。この HAc 生成により、システイン無添加のものと比較して、その最大比増殖速度は見かけ小さくなったものとも考えられるが、還元剤無添加のものと比較してメタン生成速度は遅いことから (Fig. 2), システイン添加によってなんらかの障害を受け、その最大比増殖速度は小さくなったものと思われる。

Karhadkar ら¹¹⁾は、硫化物によるメタン生成の阻害は気相中の硫化水素(H_2S)濃度に比例して大きくなることを報告している。彼らは、 H_2S 気相分圧が $10^{-1.9}$ atm で阻害が認められ、その時硫化物無添加のものに比べメタン生成活性は 2 割程度減少すると報告している。本実験においてはバイアル No. A1, A2 において、硫化ナトリウムを $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (1 mM) 添加しており、また、システイン分子中には硫黄が含まれている (システイン= $250\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}=1.5\text{mM}$)。さらに Table 1 に示すように投入基質中の硫酸マグネシウム (7 水塩) が硫酸還元作用により還元されていれば、バイアル No. A3 にも若干の硫化物 (0.1mM) が含まれている可能性がある。硫酸還元がすべて進行していると仮定し、上記の硫化物濃度をもとに、水中における H_2S の平衡式およびヘンリー定数 (35°C , $1.839\text{m}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$) から理論的に $\text{pH}=7.0$ での H_2S 気相分圧を求めると、硫化ナトリウムおよびシステインを添加した場合 (バイアル No. A1) は $10^{-1.5}$ atm, 硫化ナトリウムを添加した場合 (バイアル No. A2) は $10^{-2.0}$ atm, 無添加 (バイアル No. A3) の場合は $10^{-3.0}$ atm であった。したがって、本実験において、バイアル No. A1, A2 においては、 H_2S による酢酸消費・メタン生成の阻害が生じたと考えられる。

混合基質を投入した場合においても同様で、VFA の消費速度は還元剤を添加しないもの (バイアル No. M3) が一番速く、ついで硫化ナトリウムのみ添加したもの (バイアル No. M2), 両方の還元剤を添加したもの (バイアル No. M1) の順で速いという結果が得られた (Fig. 3)。

3.2 バイアル実験の再現性

Fig. 4 に示すように、同一条件で行ったバイアル実験の結果は非常に良く一致していることから、準備段階での酸素の混入等の実験的なミスはなく、本バイアル実験手法は非常に再現性の高い手法であると考えられる。3 人の異なる実験担当者が同じ完全混合槽で培養された HAc 分解菌を用いてそれぞれ別の日に、バイアルを用いた活性菌体量推定実験を本研究と全く同様の実験手順で行ったところ、推定された酢酸分解菌群の最大比増殖速度は $0.16^9)$, $0.15^{10)}$, $0.12^{12)}$ (d^{-1} , 35°C) となった。3 人の推定結果はほぼ一致しており、

Fig. 5 Methane conversion and decomposition of acetic, propionic and n-butyric acids in duplicate experiments.

本バイアル実験手法により高い再現性が得られることがわかる。また、Zehnder や Huser は純粋培養された酢酸資化性メタン細菌 (*Methanothrix soehngenii*) の最大比増殖速度は 0.11 (d^{-1} , 33°C)¹³⁾, 0.16 (d^{-1} , 37°C)¹⁴⁾ であると報告しており、本バイアル実験手法の推定結果とよく一致している。

混合基質を投入した場合の各VFA濃度とメタン転換率の経時変化を Fig. 5 に示す。図中の実線と破線は同一条件で行った 2 つの実験結果を示す。同一条件下での n-HBu の分解過程には、ほとんど違いが認められない。一方、HPr の分解過程には違いが認められ、その結果 HAc の分解過程にも違いが認められる。熱力学的考察より HPr や HBu の分解過程の進行には、それぞれ 10^{-4} , 10^{-3} atm 以下という低水素分圧の条件が必要であることが報告されている¹⁵⁾。このようにわずかな環境条件の違いにより、一旦水素の蓄積が起ると他の菌群の活性に大きな影響を及ぼすことになる。また、実験初期 (20 時間後) の水素が 10^{-4} atm のオーダーで検出されていたことより、本実験では HPr のみが分解の抑制を受けたものと考えられる。したがって、廃水処理のような数種の分解菌群が共生・競合して生存している系についてバイアル実験を行う際には、水素消費菌による水素分圧の変化に十分な注意が必要である。

3.3 COD 収支に関する検討

反応槽内に存在する微生物群の特性を知る上で、増殖収率係数は一つの重要な値である。メタン生成過程においては、投入された基質 (HAc) の COD 成分はメタンガスとなるか菌体に転換されることから、正確なメタン生成量を測定できれば、COD 収支から増殖収率係数を求めることができる。Fig. 2 に示すように HAc 分解菌を用いた還元剤無添加の場合のメタン転換率 ($[\text{メタンの COD}]/[\text{HAc の COD}]$) は 0.95 であることから、HAc 分解菌の増殖収率係数は、 0.05 ($[\text{菌体の$

Fig. 6 Relationship between consumed acetic acid and accumulated methane gas.

COD]/[HAc の COD]) 程度であると考えられる。

また、累積メタン生成量と消費基質濃度の関係を Fig. 6 に示す。両者は直線関係にあり、その勾配 ($0.332 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{COD}$) および理論的なメタン生成量 ($0.35 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{COD}$) から計算しても、HAc 分解菌群の増殖収率係数は 0.05 であった。したがって、増殖収率係数はメタン生成量から精度良く計算できる。特に、数種の分解菌群が生存している系については、総括的な菌体量指標である VSS あるいはタンパク質濃度を用いた場合、各基質分解菌群ごとの増殖収率係数を推定することはできないが、単一基質を用いたバイアル実験により、メタン生成量から各菌群の増殖収率係数を推定することは可能であると考えられる。

4. 結 言

本研究では集積培養したメタン生成菌を用いて、バイアル実験によるメタン生成活性の測定手法に関する検討を行い、次の結果を得た。

- (1) 還元剤である硫化ナトリウムとシステインの添加・無添加により、菌の活性に違いが認められた。また、有機系の還元剤であるシステインを用いると、その分解によりメタン転換率 ($[\text{メタンの COD}]/[\text{投入基質の COD}]$) は 1.0 を超える。
- (2) 菌が空気に触れないようにすべての操作にシリンジを用い、また、希釈水としてバイアル中で遠心分離した懸濁液の上澄水を用いることにより、還元剤を添加しなくても簡単に実装置内と同じ嫌気的環境の設定が可能となる。
- (3) 本バイアル実験手法はメタン生成活性の測定手法として有効で、かつ簡便な方法であり、その再現性も高い。ただし、水素生産性酢酸生成菌と水素消費菌が共生して存在している系についてバイアル実験を行う際には、水素分圧の変化に十分な注意が必要である。
- (4) 正確な生成メタンガス量を評価するには、サン

pling による気相体積の増減や溶存メタン量を考慮する必要がある。これにより、COD 収支からメタン菌の増殖収率係数を推定することが可能である。

(原稿受理 1989年11月6日)

引用文献

- 1) 丸山智裕, 松井三郎, 土屋之也 (1988) 嫌気性流動床によるキシロースの分解特性, 土木学会第43回年次学術講演会, 1000-1001.
- 2) 外村雅生, 原田秀樹, 桃井清至 (1988) UASB 反応器培養グラニュール生物のメタン生成活性と補酵素 F_{420} の関係, 土木学会第43回年次学術講演会, 1066-1067.
- 3) Kuba, T., Furumai, H. and Kusuda, T. (1988) A kinetic study on volatile fatty acid decomposition in anaerobic fluidized bed, Proceedings of IAWPRC's Asian Workshop on Anaerobic Treatment, 11(1)-(10).
- 4) Miller, T. L. and Wolin M. J. (1974) A serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes, *Applied Microbiology*, **27**, 985-987.
- 5) Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. and Wolfe, R. S. (1979) Methanogens: Reevaluation of a unique biological group, *Microbiological Reviews*, **43**, 260-296.
- 6) 古賀洋介, 森井宏幸, 西原正照 (1987) メタン生成菌の分離・培養法の実践, 醸酵工学, **65**, 419-430.
- 7) Yang, S. T. and Okos, M. R. (1987) Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure culture of methanogens, *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 661-667.
- 8) Furumai, H., Matsunaga, T., Futawatari, T. and Kusuda, T. (1988) Estimation of nitrification activity in a tidal river sediment, Proceedings of Second IAWPRC Asian Conference on Water Pollution Control, 81-87.
- 9) 古米弘明, 久場隆広, 張満良, 楠田哲也 (1989) 嫌気性微生物群の活性菌体量推定法とその応用, 第23回水質汚濁学会, 185-186.
- 10) 久場隆広, 今井剛, 古米弘明, 楠田哲也 (1989) 嫌気性混合培養系における活性菌体量の評価方法に関する検討, 第26回下水道研究発表会講演集, 553-555.
- 11) Karhadkar, P. P., Jean-Marc Audic, Faup, G. M. and Khanna, P. (1987) Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis, *Water Research*, **21**, 1061-1066.
- 12) 張満良, 古米弘明, 楠田哲也 (1989) 嫌気性消化における硫酸還元菌の基質消費活性に関する実験的研究, 第26回下水道研究発表会講演集, 556-558.
- 13) Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock T. D. and Wuhrmann, K. (1980) Characterization of an Acetate-Decarboxylating Non-Hydrogen-Oxidizing Methane Bacterium, *Archives of Microbiology*, **124**, 1-11.
- 14) Huser, B. A., Wuhrmann K. and Zehnder, A. J. B. (1982) *Methanotheroxobacterium* gen. nov. sp. nov. A New Acetotrophic Non-Hydrogen-Oxidizing Methane Bacterium, *Archives of Microbiology*, **132**, 1-9.
- 15) McCarty, P. L. (1981) One hundred years of anaerobic treatment. "Anaerobic Digestion 1981" (Ed. Hughes et al.), 3-22, Elsevier Biomedical Press B. V.

芳香族化合物のメタン発酵

小林 敏昭* 橋永 忠志** 三上 栄一** 中村 和憲**

* 三菱電機(株)中央研究所 ** 工業技術院微生物工業技術研究所

〈水質汚濁研究 Vol. 13 No. 2 (1990) pp.116~120〉

フェノールまたは安息香酸で馴養した4種類の汚泥を用いて、芳香族化合物の嫌気性分解を調べた。サリチル酸、*p*-クレゾール、ヒドロキノン、フロログルシノールはそれぞれ3種類の汚泥で分解が認められ、これらの物質は比較的嫌気性分解を受けやすいと考えられた。クレゾールの異性体ではパラ置換体のみ分解性を示し、メタおよびオルト置換体は全く分解されなかった。多価フェノールでは、ヒドロキノン、フロログルシノールの他に、カテコールとレゾルシノールの分解がそれぞれ1種類の汚泥で認められた。

芳香族化合物には、適切な馴養によって嫌氣的に分解される物質も少なくないと推定された。ビフェニルやナフタレン等の嫌気性分解が困難な物質は、はじめに好気性微生物によって、安息香酸やサリチル酸などに変換した後に嫌気性処理することによって、メタンへ分解するのが実際的と考えられた。

バイアル実験によるメタン生成活性の測定手法に関する検討

久場 隆広* 古米 弘明** 楠田 哲也***

* 九州大学大学院工学研究科水工土木学専攻 ** 九州大学工学部水工土木学科 *** 九州大学工学部環境システムセンター

〈水質汚濁研究 Vol. 13 No. 2 (1990) pp.121~125〉

バイアルびんによるメタン生成活性テストは、種々の条件下で大量の実験を同時に、かつ簡単に行える有効な試験法である。廃水処理プロセスのような純粋培養でない系のメタン生成活性は培地条件により違いが生じ、混合培養系のためのバイアル実験手法は確立されているとは言えない。本研究は、酢酸および混合酸による集積培養菌を用いてバイアル実験を行い、還元剤の添加・無添加によるメタン生成活性への影響、その実験の再現性およびCOD収支について検討した。その結果、混合培養系の菌を用いたバイアル実験においては、還元剤である $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ とのcysteineの添加・無添加により、菌の活性に違いが認められた。また、本バイアル実験手法により、還元剤を添加しなくても簡単に実装置内と同じ嫌気的環境の設定が可能であった。本バイアル実験手法はメタン生成活性の測定手法として有効で、かつ簡便な方法であり、その再現性の高いことが示された。