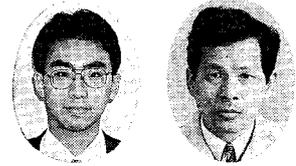


# 嫌気性処理におけるメタン生成菌活性と 補酵素 F<sub>420</sub> との相関

## Relationship between the Activity of Methanogenic Microorganisms and Coenzyme F<sub>420</sub> in Anaerobic Treatment



技術開発本部 第2研究室  
横山 英樹  
Hideki Yokoyama  
堀口 真  
Makoto Horiguchi

Coenzyme F<sub>420</sub> is a fluorescent substance which is present in all methanogens and is closely related to enzyme reactions of methane production by anaerobic digestion. We studied the relationship of F<sub>420</sub> content in mixed anaerobic microbial populations and the metabolic activity of methanogens to determine the operating conditions of anaerobic reactors by using F<sub>420</sub>. As a result, it was found that F<sub>420</sub> content was correlated with the metabolic activity of anaerobic sludge, and we were able to estimate the number of methanogenic bacteria in anaerobic sludge by measuring the amount of F<sub>420</sub>. It was also made clear that F<sub>420</sub> content in the anaerobic sludge of actual reactors was 5 times higher than that in digested sewage sludge and that methanogenic bacteria were dominant organisms in actual reactors. Further, it was found that the reactors containing a high value of F<sub>420</sub> sludge were stably operated with a high TOC removal rate.

### まえがき

有機性廃水は通常生物処理で処理されるが、この生物処理には活性汚泥法に代表される好気性処理とメタン発酵に代表される嫌気性処理の二つの方式がある。現在の生物処理の主流は活性汚泥法であるが、曝気のために大きな動力を要し、多量に発生する余剰汚泥の処分に費用がかかるため、経済性の改善が強く望まれ続けている。これに対して、メタン発酵は、廃水中の有機物を最終的に燃料に利用出来るメタンガスへと変換でき、また活性汚泥法に比べて所要動力が約1/5、余剰汚泥の発生量が1/5~1/10と少ない利点を有している。そのため、最近ではバイオガス回収・省エネルギー型の処理方式であるメタン発酵が広く利用されてきている。

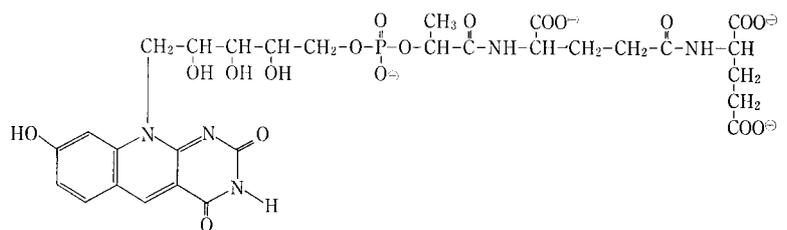
メタン発酵プロセスは、多種多様な微生物が関与する混合培養系であり、大別すると三つの嫌気性微生物群すなわち、加水分解菌群、酸生成菌群及びメタン生成菌群から成っている。このなかで、メタン生成菌は他の嫌気性菌に比べ増殖速度が非常に遅く、環境変化に対して敏感であるため、これらの活性が低下することによりプロセス全体の成否を左右することも多い。したがって、メタン発酵プロセスの適正管理には、メタン生成菌濃度の計測監視が重要になってくる。しかし、生物量の測定方法として現在用いられている光透過式<sup>1,2)</sup>等の方法では、メタン生成菌だけを選択的に計測することは出来ない。そこで、メタン生成菌固有の蛍光性補酵素 F<sub>420</sub>に着目し、蛍光測定によるメタン生成菌濃度及び活性の評価に関する報告が数多くみられるようになってきており<sup>3~7)</sup>、F<sub>420</sub>がメタン発酵プロセスの管理指標の一つになりつつある。

本報では、嫌気性処理装置の運転状況の把握や嫌気性菌の保存の状態を把握する指標として

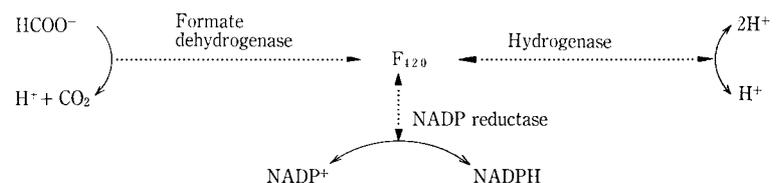
F<sub>420</sub>が利用出来るか否かを判断するために、実験室スケールでのメタン生成菌の活性と F<sub>420</sub>との相関性について検討した。さらに当社が納入した嫌気性リアクターより採取した嫌気性汚泥中の F<sub>420</sub>含有量と実際の運転状況との関係についての検討結果を報告する。

### 1. 補酵素 F<sub>420</sub> とは

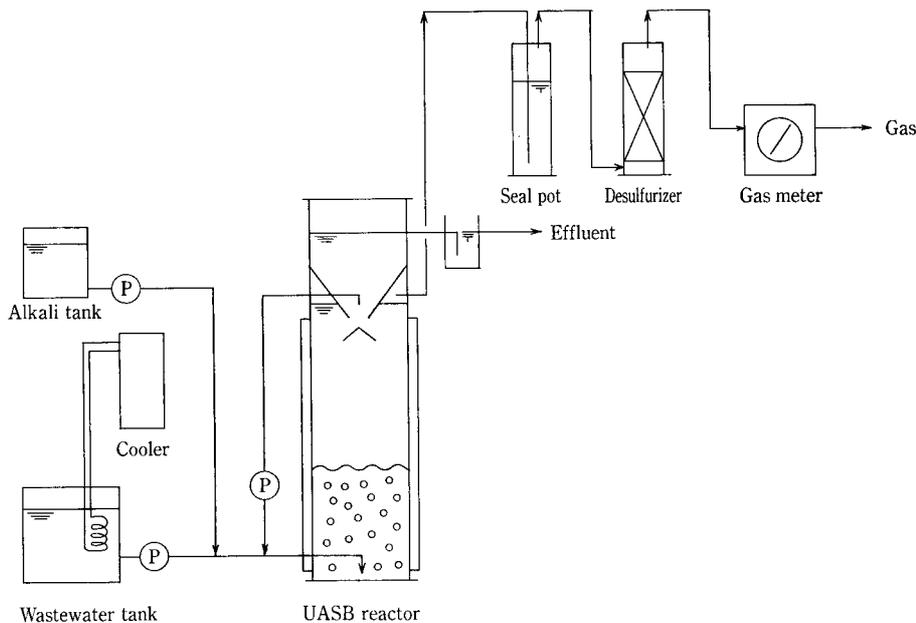
蛍光性補酵素 F<sub>420</sub> はメタン生成菌固有の物質で、波長 420 nm に吸収極大を示し、またその酸化型は 470 nm 付近に蛍光の極大ピークを示す。F<sub>420</sub> の化学的構造は、第 1 図に示すようにデアザフラビン誘導体であり<sup>8)</sup>、F<sub>420</sub> のメタン生成菌内での主な役割は第 2 図に示すように、ギ酸デヒドロゲナーゼ及びヒドロゲナーゼが関与する酸化還元反応において、NADP (ニコチンアミド・アデニンジヌク



第 1 図 F<sub>420</sub> の分子構造  
Fig. 1 Molecular structure of F<sub>420</sub>



第 2 図 F<sub>420</sub> のメタン生成菌内での役割  
Fig. 2 Role of F<sub>420</sub> in methanogen



第3図  
UASB式実験装置  
Fig. 3  
Flow diagram of UASB test reactor

レオチドリン酸)と共役して電子運搬体の役割を担っている<sup>9)</sup>。

したがって、 $F_{420}$  が全てのメタン生成菌に存在し、しかもメタン生成において重要な酵素反応と密接に関連していることを考えれば、 $F_{420}$  の蛍光強度を測定することにより、メタン発酵におけるメタン生成菌の活性及びメタン生成菌の濃度の指標になると考えられる。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験装置

実験には有効容量が約5.7ℓ容量のUASBリアクターを使用した。その概略の仕様を第1表に、またそのフローを第3図に示した。リアクターはその上部にガスと懸濁物質(SSと略す)を分離するGSS(Gas-Solid Separator)を有する円筒型リアクターである。リアクター内の液温はジャケットに恒温水を供給することにより $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。また、リアクター内のpHは合成原水中に含まれるアルカリ及びリアクターに添加する水酸化ナトリウムにより約7に制御した。

### 2.2 合成原水

実験に使用した合成原水の組成を第2表に示した。また、その水質を第3表に示した。本実験で使用した合成原水は、有機炭素源としてビール及びコーンステイブリーカー<sup>10)</sup>(CSL)を用いており、SSを含まない生分解されやすい成分で構成されている。

### 2.3 種汚泥

実験に使用した種汚泥には、下水処理場の嫌気性下水消化汚泥を使用し、リアクターの有効容量(リアクターの沈澱部を除いた容量)当たり、約10g/ℓとなるように投入した。

### 2.4 分析方法

pH, SS, TOC等は、JIS K0102に準拠して分析した。補酵素 $F_{420}$ の測定は、M. S. Switzenbaum法<sup>11)</sup>の変法にしたがって行った。そのフローチャートを第4図に示す。なお、 $F_{420}$ の純品が入手出来ないため、本報での $F_{420}$ 量は類似の発光パターンを持つ硫酸キニーネ量で代替

第1表 UASB式リアクターの仕様

Table 1 Specifications of laboratory-scale UASB type reactor

Item	Specification
Type	UASB type
Material	Transparent PVC
Shape	Cylindrical
Dimensions	100 dia. $\times$ 1100 <sup>TH</sup>
Reactor volume (except settling part volume)	5.7 ℓ
Water temperature in reactor	$37 \pm 1^\circ\text{C}$

第2表 合成原水の組成

Table 2 Composition of synthetic wastewater

Substance	Content (mg/ℓ)
Beer	25 000
CSL	3 000
Ca(OH) <sub>2</sub>	65
NaOH	70
CSL: Corn steep liquor	

第3表 合成原水の水質

Table 3 Quality of synthetic wastewater

Item	Value
pH (-)	4.0
SS (mg/ℓ)	30
TOC (〃)	1 010
BOD (〃)	2 000
T-N (〃)	103
T-P (〃)	22
Ca <sup>2+</sup> (〃)	37
Fe <sup>3+</sup> (〃)	0.5
Mg <sup>2+</sup> (〃)	20

表示<sup>12)</sup>した。このため、本報では $F_{420}$ を $F_{420q}$ と表示し、汚泥中の $F_{420q}$ 含有量はg $F_{420q}$ /g VSという単位で表示した。硫酸キニーネ量での代替表示の方法は、まず硫酸キニーネの数種類の濃度の標準液を作成し、その蛍光強度を測定し検量線を作成する。次に、各サンプルの $F_{420}$ の蛍光

Pour the sample into a centrifuge tube.  
 ↓  
 Centrifuge at 15 000 rpm for 10 minutes at 4 °C.  
 Add 40 ml of 3 % NaCl solution and resuspend the pellet.  
 ↓  
 Centrifuge at 15 000 rpm for 10 minutes at 4 °C. Repeat two times.  
 ↓  
 Resuspend the pellet in 50 ml of deionized water.  
 ↓  
 Adjust the pH to 8.5 with 0.1 N KOH.  
 ↓  
 Heat for 10 minutes at 100 °C.  
 ↓  
 Dilute the suspended solid to 100 ml.  
 ↓  
 Centrifuge at 15 000 rpm for 10 minutes at 4 °C.  
 ↓  
 Filtrate the supernatant with a 0.20 μm membrane filter.  
 ↓  
 Dilute the supernatant adequately  
 ↓  
 Add 4.5 ml of isopropanol and 0.6 ml of 1 N KOH to 1.5 ml of the diluted supernatant.  
 ↓  
 Determine the fluorescence using a fluorospectrophotometer.  
 [excitation wavelength : 420 nm, emission wavelength : 470 nm]

第4図 F<sub>420</sub> の測定方法  
 Fig. 4 F<sub>420</sub> measuring method

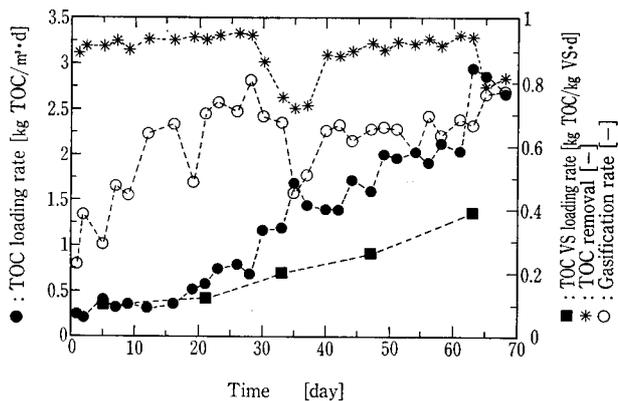
強度を測定し、先に求めた硫酸キニーネの検量線にその値を代入し F<sub>420</sub> を硫酸キニーネ量として求めた。

### 3. 実験結果

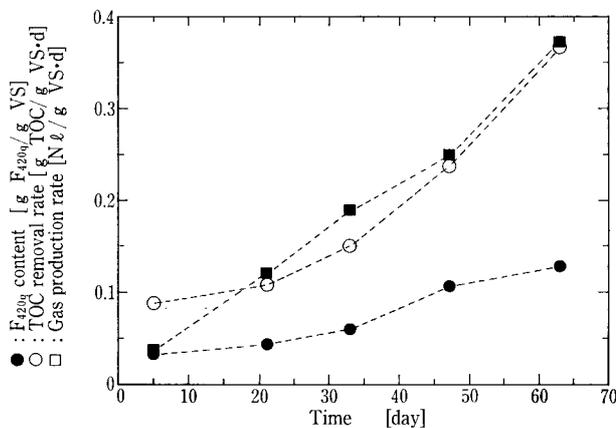
嫌気性リアクター中の汚泥の F<sub>420</sub>含有量とメタン生成菌の活性との関係を明らかにするために第3図に示したリアクターを用いて連続実験を行った。第5図に TOC 負荷、TOC 除去率及びガス化率の経時変化を示した。ガス化率とは流入水中の有機炭素がメタン及び二酸化炭素の炭素に変換された割合である。TOC 容積負荷 0.25 kg TOC/m<sup>3</sup>・d で運転を開始し、TOC 除去率は85%以上を維持するように運転し、約90%に達した時点で TOC 負荷を約20%上昇させた結果、60日後には TOC 負荷率が約2 kg/m<sup>3</sup>・d に至った。しかし、運転30日目及び60日目に TOC 除去率が急激に低下しているのは、その直前に原水ポンプの故障により原水の流入量が急激に増加したためで急激な負荷の増加が原因である。

第6図に VS 当たりのガス発生速度、TOC 除去速度及び F<sub>420q</sub> 含有量の経時変化を示した。VS 当たりのガス発生速度及び TOC 除去速度すなわち汚泥の活性が経時的に上昇し、0.38 Nℓ/g VS・d 及び 0.37 g TOC/g VS・d にまで達した。また、汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量も初期値の0.028から 0.125 g F<sub>420q</sub>/g VS に上昇した。

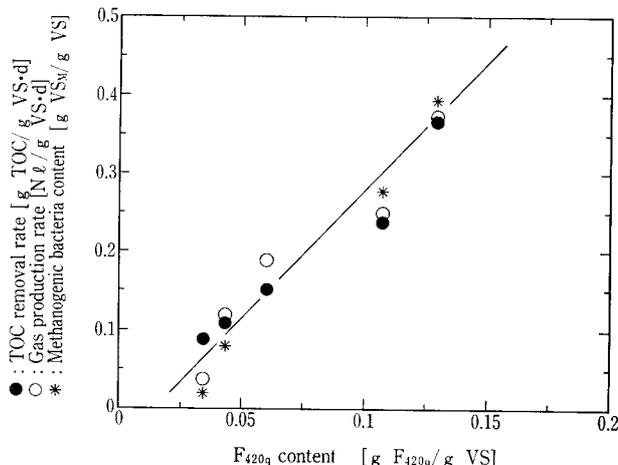
そこで、メタン生成菌の活性と F<sub>420q</sub> との相関性を調べるために F<sub>420q</sub> とガス発生速度及び TOC 除去速度との関係を第7図に示した。F<sub>420q</sub> とガス発生速度及び TOC 除去速度には、明らかに正の相関が認められる。そこで、汚泥中の推定メタン生成菌含有率を計算し、F<sub>420q</sub> との関係性を調べた。汚泥中のメタン生成菌含有率は、まず(1)式によりリアクター中のメタン生成菌量を計算し、それをリアクター中の全 VS 量で割ることにより算出した。



第5図 TOC 負荷、TOC 除去率及びガス化率の経時変化  
 Fig. 5 Changes of TOC loading rate, TOC removal, and gasification rate with time



第6図 汚泥の活性及び F<sub>420q</sub> 含有量の経時変化  
 Fig. 6 Changes in activity of sludge and F<sub>420q</sub> content with time



第7図 F<sub>420q</sub> 含有量と嫌気性汚泥の活性との関係  
 Fig. 7 Relationship between F<sub>420q</sub> content and activity of anaerobic sludge

$$M(n) = S(n) \cdot Y - M(n-1) \cdot b + M(n-1) \quad (1)$$

ここで、

- $M(n)$  :  $n$  日目のメタン生成菌量 (g VS<sub>M</sub>)
- $S(n)$  :  $n$  日目の TOC 除去量 (g TOC/day)
- $Y$  : メタン生成菌の収率係数 (g VS<sub>M</sub>/g 除去 TOC)
- $b$  : メタン生成菌の菌体減衰速度定数 (1/day)

条件として、水素資化性と酢酸資化性メタン生成菌の構成比が変化していないという前提のもとに、種汚泥として使用した嫌気性下水消化汚泥中のメタン生成菌含有率を 0.02 (g VS<sub>M</sub>/g VS)、メタン生成菌の収率係数及び菌体減衰速度定数については Hanze 等<sup>13)</sup>がそれぞれ 0.03 (g VS<sub>M</sub>/g 除去 COD) 及び 0.01~0.04 (1/d) と報告しており、収率係数  $Y=0.075$  (約 0.03 g VS<sub>M</sub>/g 除去 COD に相当)、減衰速度定数  $b=0.025$  と仮定した。また、本報ではメタン生成菌の VS は汚泥全体の VS と区別するために VS<sub>M</sub> と表示することにした。計算結果より、第 7 図に示したように F<sub>420q</sub> 含有量が求まれば、メタン生成菌含有率が推定出来ることが明らかとなった。

そこで第 7 図の直線は(2)式で表すことが出来る。

$$y = 3.2x - 0.05 \quad (2)$$

ここで、

- $y$  : TOC 除去速度 (g TOC/g VS·d),  
ガス発生速度 (Nℓ/g VS·d),  
メタン生成菌含有率 (g VS<sub>M</sub>/g VS)
- $x$  : F<sub>420q</sub> 含有量 (g F<sub>420q</sub>/g VS)

また、メタン生成菌含有率からメタン生成菌当たりの TOC 除去速度及びガス発生速度を計算すると、次のような値が得られた。

$$\text{TOC 除去速度} = 1 \text{ g TOC/g VS}_M \cdot \text{d}$$

$$\text{ガス発生速度} = 1 \text{ Nℓ/g VS}_M \cdot \text{d}$$

文献<sup>14)</sup>にみられるガス発生速度は、1~3 Nℓ/g VS<sub>M</sub>·d で

あり、前述の値もこの範囲に入り、(2)式は妥当なものであるといえる。

#### 4. 各種汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量及び実装置の運転状況

##### 4.1 各種汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量

第 4 表に各種汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量を示したが、嫌気性下水消化汚泥以外はおおよそ 0.2~0.3 g F<sub>420q</sub>/g VS の範囲にある。嫌気性下水消化汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量が低いのは、嫌気消化槽中では処理対象が下水汚泥という一般に不溶性及び難分解性物質であるため、メタン生成菌含有率が低いと考えられる。各種汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量に違いが生じるのは、廃水組成、培養条件等によって汚泥内の微生物相の構成が異なるからである。また、メタン生成菌単位菌体当たりの F<sub>420q</sub> 含有量が一定であるとする、グラニューールのメタン生成菌量は下水消化汚泥の約 10 倍量含まれていることになる。これらの値は、*Methanotrix* 属メタン生成菌のメタン生成活性から算出したグラニューール中のメタン生成菌含有量と消化汚泥中のそれとの差 (5~20 倍) の範囲<sup>14)</sup>にあり、本分析法が概ね妥当であることが分かる。

また、次の例のように F<sub>420q</sub> 量の時系列データだけでもその汚泥のメタン生成活性は評価できる。

第 4 表を例にして利用例を説明する。B 固定床汚泥の場合

第 4 表 嫌気性汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量  
Table 4 F<sub>420q</sub> content in anaerobic sludge

Sample (Wastewater)	F <sub>420q</sub> content (g F <sub>420q</sub> /g VS)
Digested sewage sludge	0.028
A granule sludge (Beer)	0.326
B fixed bed sludge (Starch)	0.208
C granule sludge (Beer)	0.228
B fixed bed sludge (stored at 4 °C for 1 month)	0.223
C granule sludge (stored at 4 °C for 1 week)	0.160
( / for 2 weeks)	0.168
( / for 3 weeks)	0.164

第 5 表 実装置の嫌気性汚泥中の F<sub>420q</sub> 含有量及び運転状況

Table 5 F<sub>420q</sub> content in anaerobic sludge and operation data on actual reactors

Sample (Wastewater)	F <sub>420q</sub> content (g F <sub>420q</sub> /g VS)	TOC loading rate (kg TOC/m <sup>3</sup> ·d)	TOC removal rate (kg TOC/m <sup>3</sup> ·d)	Gasification rate (%)
D fixed bed sludge (Chemical compound)	0.127	0.7	0.6	62
E fixed bed sludge (Starch)	0.301	1.6	1.1	52
F fixed bed sludge (Food)	0.310	4.4	2.1	27
G granule sludge (Beer)	0.397	3.8	3.4	64

合には、冷蔵保存でも1ヶ月間ならメタン生成菌活性には大きな低下は発生しないことが分かる。一方、Cグラニューールの場合には、冷蔵保存すると一週間で $F_{420q}$ 量が約30%減少するが、冷蔵期間中では大きな低下は認められない。 $F_{420q}$ 量を定量することによって低温で貯蔵する場合の活性の低下幅を推定出来る。また、このCグラニューールの活性度の測定結果では、サンプリング直後のグルコースの分解活性が1ヶ月後には約45%減少しており、 $F_{420q}$ 含有量の減少とほぼ一致する。

#### 4.2 実装置の嫌気性汚泥中の $F_{420q}$ と運転状況

実装置の嫌気性汚泥中の $F_{420q}$ 含有量が実際どのような値なのか把握するとともに運転監視の指標に使えるかどうか判断するために、実際に運転されている実装置の汚泥をサンプリングし、その汚泥中の $F_{420q}$ 含有量を測定した。その結果を第5表に示す。また、サンプリング時の有機物負荷等も第5表に示した。実際のメタン発酵リアクターの汚泥中の $F_{420q}$ 含有量は下水の嫌気性消化汚泥中の $F_{420q}$ 含有量の5倍以上の値を示し、メタン生成菌が優占種になっていることが確認された。ここでD固定床汚泥中の $F_{420q}$ 含有量が他の汚泥中の $F_{420q}$ 含有量に比べ低い値を示したのは、D固定床リアクターは立ち上げ運転中であり、メタン生成菌の馴養期間がまだ短いメタン生成菌が完全に優占種になっていないからである。今後メタン生成菌が優占種になりリアクターが立ち上がれば $F_{420q}$ 含有量も高くなると考えられる。このことより、 $F_{420q}$ が運転監視の指標に使用出来ると考えられる。

#### むすび

メタン生成菌活性と補酵素 $F_{420}$ との相関性を検討した結果、メタン生成菌の活性すなわちTOC除去速度及びガス発生速度と $F_{420q}$ 含有量との間に正の相関が認められた。

また、このときの汚泥中のメタン生成菌量を計算し $F_{420q}$ 含有量との関係を調べたところ、 $F_{420q}$ 含有量を求めれば、メタン生成菌含有率を推定出来ることが明らかとなった。また、実際のメタンリアクターの汚泥中の $F_{420q}$ 含有量は下水汚泥嫌気性消化汚泥中の $F_{420q}$ 含有量の5倍以上の値を示し、メタン生成菌が優占種になっていることが確認された。さらに、実際のメタン発酵リアクター中からサンプリングした汚泥は高い $F_{420q}$ 含有量を示し、リアクターは高いTOC除去速度を維持して安定した運転がなされているという結果が得られた。この事より、 $F_{420q}$ 量はメタン生成菌の活性の評価に使用出来ることが明らかとなった。

#### 〔参考文献〕

- 1) J I S K 0101 (1991)
- 2) 上下水道機材事典編集委員会：上下水道機材事典 (1976), p. 438
- 3) 田谷正仁ほか：ケミカル・エンジニアリング, No. 5, (1985), p. 679
- 4) 磯田 悟ほか：醗酵工学, Vol. 64, No. 3 (1986), p. 202
- 5) 磯田 悟：用水と廃水, Vol. 30, No. 10 (1988), p. 949
- 6) E. H. Dobbernack et al. : Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, No. 2 (1988), p. 454
- 7) A. Hogetsu et al. : Six International Symposium on Anaerobic Digestion, (1991), p. 331
- 8) L. D. Eirich et al. : Biochemistry, Vol. 17 (1978), p. 4583
- 9) J. G. Zeikus : Bacteriol. Rev., Vol. 41 (1977), p. 514
- 10) 堀口 真：神鋼パンテック技報, Vol. 37, No. 2 (1993) p. 42
- 11) M. S. Switzenbaum et al. : Biotechnol. Lett., Vol. 6 (1984), p. 77
- 12) アクアルネッサンス編集委員会：分離膜を複合した嫌気性廃水処理技術, (1991), アクアルネッサンス技術研究組合, p. 211
- 13) Hanze et al. : Wat. Sci. Tec., Vol. 15 (1983), p. 101
- 14) 須藤隆一ほか：微生物固定化法による廃水処理, 産業用水調査会, p. 220