

豚糞を基質とした高効率メタン発酵に関する研究

**Study on highly efficient methane fermentation  
using swine feces as substrate**

中村 嘉孝

**2020**

# 目次

|   | 頁  |
|---|----|
| 第1章 序論  |    |
| 第1節 研究背景  | 5  |
| 第2節 メタン発酵   | 8  |
| 第3節 本研究の目的  | 13 |
| 第2章 中温メタン発酵のメタン生成効率が、 <i>Salmonella enterica</i> の菌濃度に与える影響 |    |
| 第1節 目的  | 16 |
| 第2節 材料と方法   | 18 |
| 第3節 結果  | 25 |
| 第4節 考察  | 30 |
| 第3章 豚糞のメタン発酵における異なるメタン生成ポテンシャルを示す消化液の微生物群集構造解析              |    |
| 第1節 目的  | 35 |
| 第2節 材料と方法   | 37 |
| 第3節 結果  | 48 |
| 第4節 考察  | 64 |

## 第4章 メタン発酵消化液の保存性

第1節 目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 70

第2節 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

第3節 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

第4節 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 82

## 第5章 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 85

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 89

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90

# 第 1 章 序論

## 第1節 研究背景

20世紀、人類は便利で快適な暮らしを追求するため、工業製品を大量に生産、消費して、大きな繁栄をもたらした。その反面、産業廃棄物、一般廃棄物を大量に排出し、これらの不適切な処理により地球温暖化による気候変動や生物多様性の喪失、ダイオキシン等の化学物質による汚染などの「環境問題」を引き起こした [34, 49, 82]。また、化石燃料の消費量が増加し、2020年現在、利用可能な石炭、天然ガス、石油の水準は、それぞれ131年、49.6年、47.2年であると推定されており (<https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf> [accessed December 2019])、このまま使い続けるとエネルギー資源が枯渇するという「エネルギー問題」も発生した。すなわち、大量生産、大量消費、大量廃棄の社会から持続可能な循環型社会へのシフトチェンジが求められている。こうした背景を受け、2015年9月にアメリカのニューヨーク国連本部において、「国連持続可能な開発サミット」が開催された。その中で、2030年までに持続可能でより良い世界を目指す開発目標であるSDGs (Sustainable Development Goals) が採択された。SDGsは17のゴール・169のターゲットから構成され、発展途上国と先進国が一丸となって達成する目標が掲げられている

([https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/2001sdgs\\_gaiyou.pdf](https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/2001sdgs_gaiyou.pdf) [accessed February 2020])。近年、日本国内においても、人々の環境に対する関心が高まってきており、1993年に日本政府は環境基本法（平成5年法律第91号）を制

定、2001年に環境庁を環境省に昇格するなど、環境問題に真剣に取り組みはじめた。

鹿児島県は全国有数の農業・畜産県として知られており、畜産業、農業、酒造業および漁業などが盛んである。2016年に行われた農林水産省畜産統計調査 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001160843> [accessed December 2019]) の報告によると、鹿児島県の養豚飼育頭数は、全国1位(133万頭)を誇り、九州の約44%の規模を占めている。しかし、これに伴い年間における豚糞排出量が87万t、豚尿排出量が184万tにのぼり、これらの処理は鹿児島の大きな社会問題となっており、早急な対策が必要である。これまでの処理法としては素掘り、野積み、海洋投棄などといった自然界の土壌中の微生物や海洋中のプランクトンによる浄化作用により処理されていた [82]。しかし、過剰な排出量により土壌中および海洋中の有機体窒素が増加・蓄積し、土壌汚染や海洋汚染が発生する可能性が懸念された。また、酸素を定期的にすき込まず無造作に野積みをする事によって、糞尿が50°C以下となり、発酵が不十分になることからの悪臭発生など環境負荷を与えた [83]。こうした問題を受けて、「家畜排せつ物の管理の適正化と利用の促進に関する法律(平成11年法律第112号、略称「家畜排せつ物法」)」が施行され、現在では、適正な処理を施していない管理業者には罰則が科せられることとなった [77]。また、鹿児島県では、豚糞を含む家畜排せつ物のほとんどに対して、堆肥化処理を行うことで、法律に適合させる方針となった。平成26年度の鹿児島県の統計調査によれば、家畜排せつ物の約76%(約400万トン)が農業利用のために堆肥化処理さ

れた ([https://www.pref.kagoshima.jp/ag07/sangyo-rodo/nogyo/tikusan/kankyo/documents/24620\\_20160321013309-1.pdf](https://www.pref.kagoshima.jp/ag07/sangyo-rodo/nogyo/tikusan/kankyo/documents/24620_20160321013309-1.pdf) [accessed December 2019])。しかしながら、人間や動物に有害な微生物を含まない、安全な完熟堆肥を作成するためには、通常2～3ヶ月の期間を要する [78]。また、過剰な水分や金属、病原性細菌などを含まない高い品質の堆肥（全国農業協同組合中央会 [有機質肥料等推奨基準にかかる認証要領]）を作成するためには、堆肥内部に定期的に空気を供給し、堆肥化に働く好気性微生物の活性を高める必要がある。一般的に、堆肥化施設では、発酵槽の底部のコンクリート溝に設置した塩ビ管パイプから、送風機を用いて堆肥内部に空気を送り込んでいる。しかしながら、これにかかる消費電力が膨大であり、施設管理費のほとんどをこの電気料金が占めている [85]。

このような背景のもと、近年、農畜産業が盛んな地域を中心に、家畜排せつ物を安価かつ効率よく処理する方法として、メタン発酵法が徐々に浸透しつつある。メタン発酵法の最大の特徴は、その他の生物処理技術と比べ、運転に要するエネルギーコストが少ない点である。豚糞のような廃棄物系バイオマスを処理するとエネルギーとしてメタンガスの回収ができると同時に、N、P、Kなどの肥料用成分を含む、発酵残渣である「メタン発酵消化液」を獲得できる。また、比較的短期間（14～20日）で処理が行われること、汚泥発生の抑制、減量化が可能なことから省エネルギー廃棄物処理技術としても重要視されている。したがって、メタン発酵は「環境問題」、「エネルギー問題」の2つの面で地球環境に貢献できる技術として開発・普及が進められている。

## 第2節 メタン発酵

メタン発酵とは、家畜排せつ物や生ごみなどの廃棄物を発酵させ、発酵熱やメタンガスなどを回収し、エネルギーとして利用する方法である [75, 84]。この概要図を図 1-1 に示した。管理されたメタン発酵槽から得られるバイオガスは、約 55%~60%のメタン、35%~40%の二酸化炭素、2%の硫化水素、2%以下の窒素、2%以下の酸素、および 1%以下の水素で構成されている [7, 14]。EU Renewable Energy Directive 2009 の報告によると、湿式肥料または乾式肥料から排出されたメタンを使用することは、化石燃料を使用した場合と比較して、純炭素排出量をそれぞれ 84%および 86%削減することができる (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0028&from=EN> [accessed July 2019])。さらに、メタン発酵は、嫌気性条件を維持させるために、密閉されたタンク内で処理を行うため、悪臭の拡散を回避するという利点も持ち合わせている。

メタン発酵には、約 55°C で分解速度が高まる高温メタン発酵と約 35°C で分解速度が高まる中温メタン発酵の二種類がある。高温メタン発酵は、中温メタン発酵に比べて有機物の分解速度が速いため、中温処理の約 2~4 倍のバイオガスを獲得できるというメリットがある [24]。また、高温による病原性細菌の死滅効果も期待できるため、これまで、病原性細菌の死滅を目的とする研究では、ほとんどが高温処理を用いて行われてきた [87, 88]。しかし、施設維持に大きな熱エネルギーを要するデメリットがあるため [74]、現在多くのメタン発酵施設は、中温処理で管理されている



(<http://www.env.go.jp/recycle/waste/biomass/data/facilitylist.pdf> [accessed March 2018])。また、メタン発酵処理後に排出されるメタン発酵消化液（以下、消化液）は、無機態および有機態の N, P, K などの肥料成分を含んでいるため、作物栽培の液肥として利用できる可能性があるとして報告されている [40]。このように、低エネルギーで植物栽培にも用いることが可能で、臭気も妨げ、メタンによるエネルギーを得るなどの利点を持つメタン発酵は、国内外で広く実用化されつつある。

メタン発酵における排水中の有機物を微生物により分解する過程を図 1-2 に示す。以下の工程を経て進行する。1. タンパク質，炭水化物，脂質などの高分子有機物が，アミノ酸，糖類，脂肪酸などの低分子有機物にそれぞれ加水分解される；2. 加水分解された低分子有機物が，酸生成細菌の酸化作用により，プロピオン酸，酪酸，イソ酪酸などの揮発性脂肪酸（VFA：Volatile Fatty Acid）にまで分解される；3. 揮発性脂肪酸が共生酢酸生成細菌（Syntrophic acetogenic bacteria）により，水素や二酸化炭素，酢酸にまで分解される；4. 最後に，これら水素や酢酸をメタン生成古細菌がエネルギー源として利用し，メタンを生成する [2, 43, 58, 60]。すなわち，メタン発酵槽中の微生物群集は，高分子有機物を分解する細菌群集と，メタンを生成するメタン生成古細菌群から成っている。各分解過程では関与する微生物群集や生成する代謝物が異なることから，家庭用生ゴミ，下水汚泥，家畜糞尿などの主成分が異なる有機性排水中では成分組成や発酵環境条件が変化し，発酵速度やバイオガス生成量，ガス組成などの発酵特性に大きく影響する [73]。また，微生物組成の偏りにより，

分解過程で生成するアンモニアや揮発性脂肪酸の変換バランスの均衡が崩れることで、メタン生成古細菌の生育を阻害することが知られている [73]。そのことから、実際にメタン発酵処理施設を建設する際には、発酵特性と環境条件を決定するためにバッチ式実験により、発酵対象物の最適負荷量、環境条件などを検証し、発酵速度、バイオガス生成量、ガス組成、阻害要因の把握を行うことが一般的である。

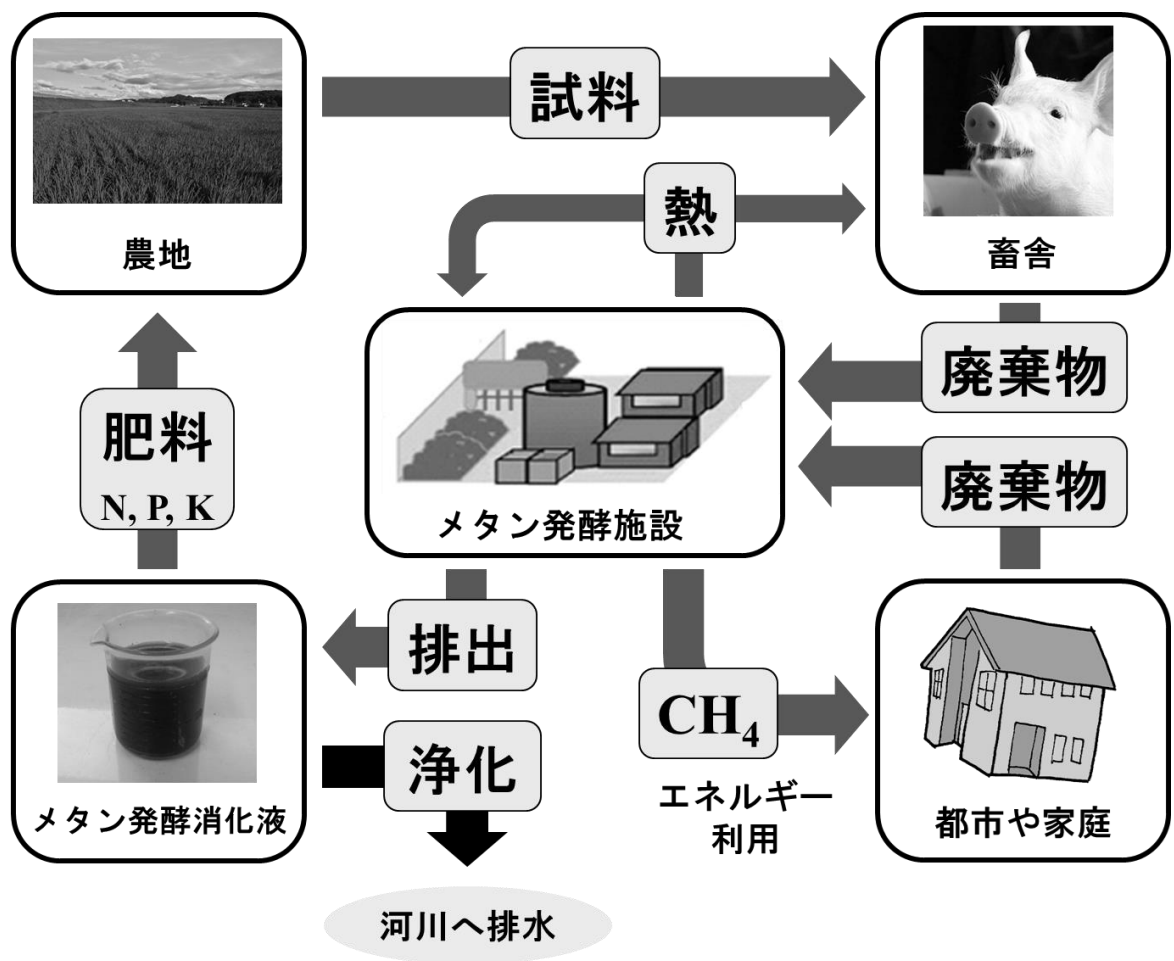


図 1-1 メタン発酵の概要図

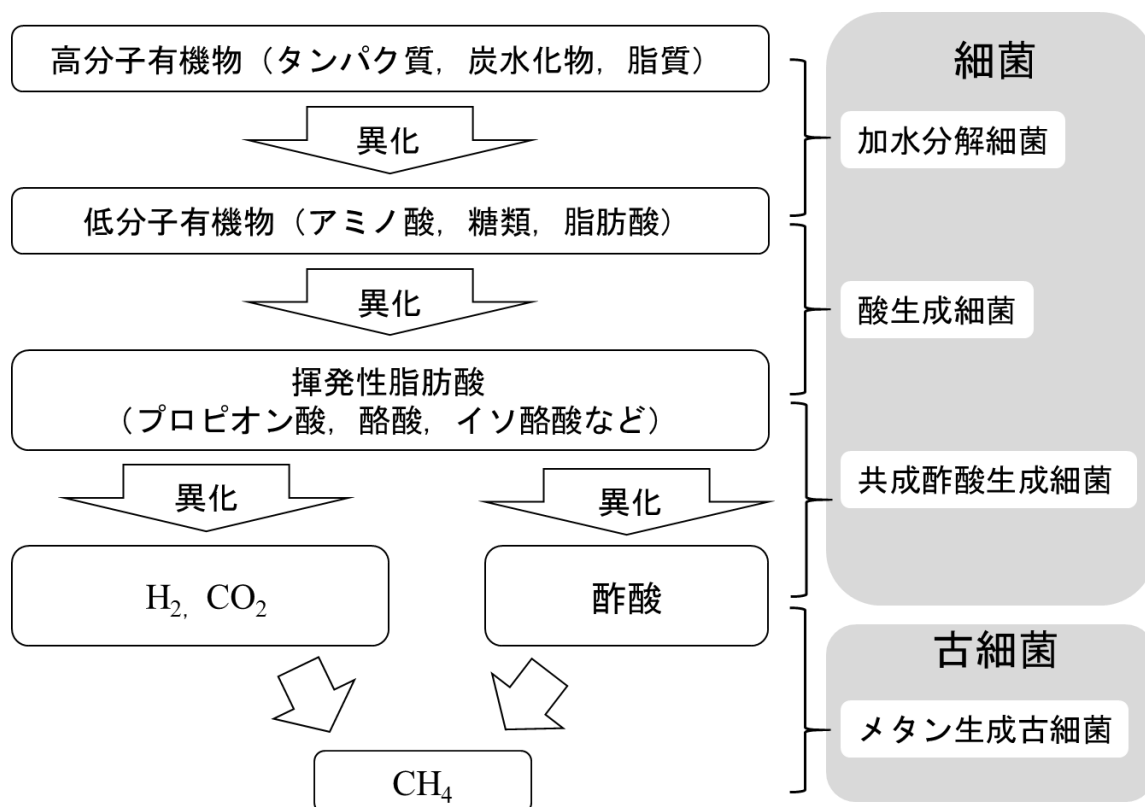


図 1-2 メタン生成までの微生物による分解過程

Niu et al. 2014, Tang et al. 2015, Vrieze et al. 2012 をもとに作成 [43, 58, 60]

### 第3節 本研究の目的

メタン発酵法では微生物の代謝を利用し、家畜排せつ物や生ごみなどの廃棄物からエネルギー回収を行いながら、排水処理を行うことが可能である。また、メタン発酵後に排出される消化液を肥料利用することで循環型農業を構築できる可能性がある。消化液を液肥として利用する場合、近年価格が高騰する化学肥料の代替となる可能性が考えられる。しかし、消化液は肥料利用の実績不足や情報不足、技術や手法が一般化されていないなどの理由から肥料利用は普及しているとは言いがたい。また、家畜糞尿由来の消化液は、作物栽培に利用した時、ヒトや動物に食中毒被害を引き起こす病原性細菌が混入している可能性が懸念される。本研究の構成をフローチャートで示した(図1-3)。本章を第1章として、第2章では、作物栽培の液肥として利用する消化液を選択する場合に、メタン生成ポテンシャルの違いが病原性細菌の消長にどう影響を与えるかを目的とした。現場のメタン発酵施設で安定的に高いメタンガス量を獲得するためには、安定的なメタン発酵を行う必要がある。そこで、第3章では、高いメタン生成ポテンシャルを示した消化液を獲得することを目的として、それにかかわる微生物群集構造を明らかにした。第4章では、第2章・第3章で明らかにした高いメタン生成ポテンシャルを示した消化液を、現場のメタン発酵施設で用いるための最適な保存方法の検討を目的とした。

# 研究の流れ

## 第1章 序論

## 第2章 中温メタン発酵のメタン生成効率が、 *Salmonella enterica*の菌濃度に与える影響

→メタン生成ポテンシャルの違いがサルモネラ属細菌の消長に与える影響を調査

## 第3章 豚糞のメタン発酵における異なるメタン生成 ポテンシャルを示す消化液の微生物群集構造解析

→高いメタン生成ポテンシャルに関わる微生物群集群集構造の調査

## 第4章 メタン発酵消化液の保存性

→高いメタン生成ポテンシャル示す微生物群集を含む消化液の最適な保存方法の検討

図 1-3 本研究の概要図

# 第 2 章

中温メタン発酵のメタン生成効率が、*Salmonella enterica* の  
菌濃度を与える影響

## 第1節 目的

メタン発酵残渣である消化液は、無機態の N, P, K などの肥料成分を含んでいるため、作物栽培の液肥として利用できる可能性がある [40]。しかしながら、豚糞尿を基質とする場合には、豚由来の食中毒被害を引き起こす病原性細菌が、消化液に混入する危険性が懸念される [72]。消化液中に混入する可能性がある病原性細菌には、主に、*Salmonella* 属細菌、*Listeria* 属細菌、*Escherichia coli*、*Campylobacter* 属細菌、*Mycobacteria* 属細菌、*Clostridia* 綱細菌、*Yersinia* 属細菌などがある [48]。

メタン発酵には、高温（約 55°C）処理と中温（約 35°C）処理の二種類がある。高温処理は、中温処理に比べて有機物の分解速度が速いため、中温処理の約 2~4 倍のバイオガスを獲得できるというメリットがある [24]。また、高温による病原性細菌の死滅効果も期待できるため、これまで、病原性細菌の死滅を目的とする研究では、ほとんどが高温処理を用いて行われてきた [87, 88]。しかし、施設維持に大きな加熱エネルギーを要するデメリットがあるため [74]、現在多くのメタン発酵施設は、中温処理で管理されている

(<http://www.env.go.jp/recycle/waste/biomass/data/facilitylist.pdf> [accessed March 2018])。高分子有機物を嫌氣的に分解するメタン発酵は、発酵槽中の微生物群集の活性が低く、メタン発酵槽中の微生物群集が順化するまでに時間がかかるので [32, 57]、高いメタン生成量を安定的に供給する状況になるまでに 3 週間以上かかることが報告されている [1, 25, 57]。また、メタン発酵が突然起こらなくなったりすることも報告されている [33]。私の知る限り、こうしたメタン



発酵槽中の微生物群集が順化するまでの間では、消化液中の病原性細菌濃度の消長について調べられた例はない。そこで、本研究では、ヒトや動物に病原性を引き起こす可能性のある *Salmonella* 属細菌を用いて、多くのメタン発酵施設で広く採用されている、中温メタン発酵消化液中のメタン生成効率が、*Salmonella* 属細菌濃度に与える影響を調査した。

## 第 2 節 材料と方法

### 2-2-1 豚糞上澄み溶液

鹿児島大学附属農場から排出された豚糞を使用した。豚糞を、先端にスクリー（SK11；藤原産業株式会社）を装着した電動ドリル（6311D；マキタ株式会社）を用いて破碎・攪拌し、10%の TS（Total solids, 全固形分率）となるように水分調整を行った。この豚糞溶液を、遠心分離（1662×g, 10 分）（RF-110+MC-110；株式会社コクサン）して、上澄み溶液を回収し、オートクレーブ滅菌した。こうして得た溶液を、豚糞上澄み溶液として用いた（表 2-1）。すなわち、豚糞上澄み溶液では、メタン生成に関わる微生物が死滅しており、下記の消化液を、種菌として接種しない限り、メタン発酵は起こらない。

### 2-2-2 消化液

メタン発酵を行うためには、基質とそれを利用する種菌が必要である。本研究では、基質として滅菌処理済みの豚糞上澄み溶液と、種菌として国内 3 か所のメタン発酵施設から採取した消化液を使用した（表 2-1）。これらの消化液は、使用するまで冷蔵（6°C）保存した。

表 2-1 メタン発酵消化液と豚糞の性状

| Sample name  | Sampling place                            | Substrate                                    | pH  | TS <sup>a</sup> (%) | COD (mg/l) |
|--------------|---|--|-----|---------------------|------------|
| Digestion a  | Fukuoka prefecture                        | Human waste, Raw garbage, Septic tank sludge | 7.5 | 8.4                 | 510        |
| Digestion b  | Hokkaido prefecture                       | The fluid pressed from the raw garbage       | 7.7 | 8.6                 | 502        |
| Digestion c  | Fukuoka prefecture                        | Raw garbage                                  | 7.8 | 8.2                 | 504        |
| Swine medium | Experimental farm<br>kagoshima university | Swine feces                                  | 8.3 | 10                  | 3120       |

<sup>a</sup> Total solid (%)

### 2-2-3 *Salmonella enterica* 接種菌液

*Salmonella* 属細菌は、9種類の有効種名があり、このうち *Salmonella enterica* は、*Salmonella* 属細菌の基準種である (<http://www.bacterio.net/ssalmonell.html>)。また、*S. enterica* は、世界中で、人や動物に病気を引き起こすことが知られており [9]、豚糞から検出されることが報告されている [17]。本研究では、この *S. enterica* に属する NBRC 3163 株を、接種菌液の材料として用いた。

コロニーの色と形で *Salmonella* 属細菌を同定できる培地であるドリガルスキー改良培地 Blue (栄研化学株式会社) を用いて、35-37°C で 24 時間、NBRC 3163 株を培養した。寒天培地上のシングルコロニーを、白金耳で採取し、10 ml の滅菌蒸留水に懸濁して、「*S. enterica* 接種菌液」として用いた。

### 2-2-4 メタン発酵

#### 実験概略

実験概略を、図 2-1 に示した。オートクレーブ滅菌した「豚糞上澄み溶液」に、国内 3 か所のメタン発酵施設から獲得した消化液を添加し、中温処理のメタン発酵を行った。2 回の前培養を行った後に、*S. enterica* 接種菌液を添加した 3 回目の培養を行い、メタン発酵槽ごとのメタン生成量と *S. enterica* の菌濃度を測定した。2 回の前培養を行った後に、*S. enterica* 接種菌液を添加していない区も用意した。これらは、メタン生成量が定常期に達したのを確認し、再度、継代培養した。

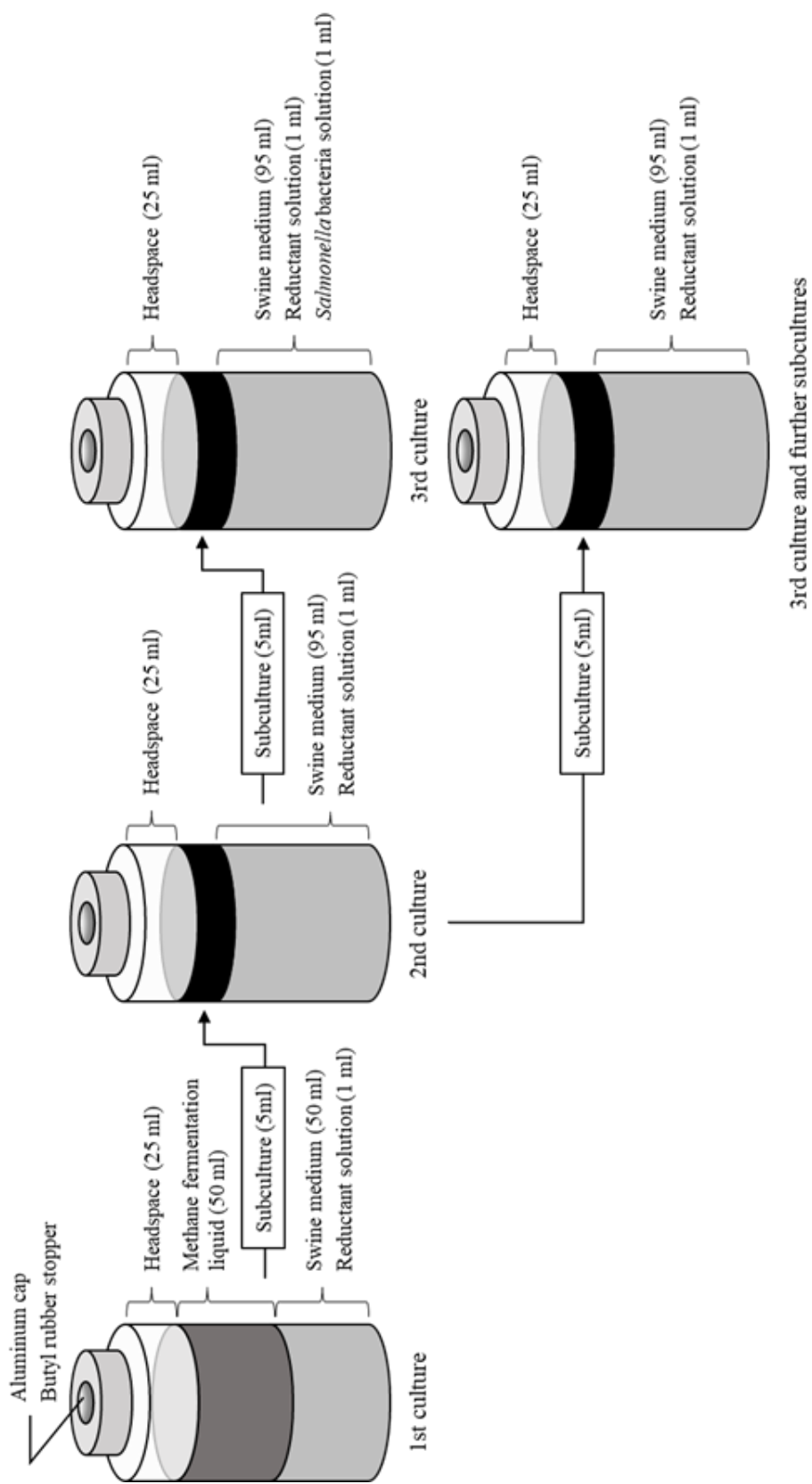


図 2-1 実験概要図

## a. 前培養

中温処理のメタン発酵槽中の微生物群集は、基質に順化するまでに時間がかかる。本研究では、*S. enterica* 接種菌液を添加したメタン発酵を行う前に、7日ごとに2回の前培養を行い、種菌として使用した消化液由来の微生物群集が、豚糞上澄み溶液に順化しているのか確認した。順化したかどうかは、培養7日目のメタン生成量を比較することで判断した。

前培養1回目は、125 ml のボトル（日電理化硝子株式会社）に、50 ml の消化液と 50 ml の豚糞上澄み溶液をそれぞれ添加した（ $n = 3$ ，図 2-1）。前培養2回目は、125 ml のボトル（日電理化硝子株式会社）に、5 ml の前培養1回目の消化液と 95 ml の豚糞上澄み溶液をそれぞれ添加した（ $n = 1$ ，図 2-1）。前培養1回目、前培養2回目ともに、嫌気培養を行うため、ボトルを、ブチルゴム栓とアルミキャップ（日電理化硝子株式会社）で密閉した。1 ml の還元剤溶液（3%  $N_2S \cdot 9H_2O$ ，3% L-Cysteine hydrochloride  $\cdot H_2O$ ）を添加し、インキュベーター（BNC-110，エスペック株式会社）を用いて 38°C で、7日間静置培養した。メタン発酵におけるバイオガス発生によってボトル内が陽圧になり破裂するのを防ぐため、1日1回ブチルゴム栓に23G針（テルモ株式会社）を刺し、試験区内の圧力を常圧に戻す作業を行った。また、試験区内の溶液を均一にするため、1日1回全てのボトルを転倒混和した。これらの圧力調整とボトルの攪拌は、以下の「b. *S. enterica* 接種菌液を添加した培養」と「c. *S. enterica* 接種菌液を添加しなかった培養（継代培養）」においても同様に行った。

#### **b. *S. enterica* 接種菌液を添加した培養**

125 ml のボトルに、5 ml の前培養液、1 ml の *S. enterica* 接種菌液、95 ml の豚糞上澄み溶液、1 ml の還元剤溶液をそれぞれ添加した ( $n=3$ , 図 2-1)。これを、ブチルゴム栓とアルミキャップを用いて密閉し、38°C で、18 日間静置培養した。前培養液を接種しなかった区を、対照区として用いた。すなわち、対照区は、1 ml の *S. enterica* 溶液、5 ml の滅菌蒸留水、95 ml の豚糞上澄み溶液、1 ml の還元剤溶液から成る。

#### **c. *S. enterica* 接種菌液を添加しなかった培養 (継代培養)**

2 回の前培養を終えた後、*S. enterica* 接種菌液を接種していない区も用意した。すなわち、125 ml のボトルに、5 ml の前培養 2 回目の消化液、95 ml の豚糞上澄み溶液、1 ml の還元剤溶液をそれぞれ添加した ( $n=1$ , 図 2-1)。これを、ブチルゴム栓とアルミキャップを用いて密閉し、38°C で、定常期に達するまで (43 日間) 静置培養した。これらを、再度、同じ条件で継代し、全てのメタン生成量が定常期に達するまで (17 日間) 培養した。

#### **2-2-5 *S. enterica* の菌濃度測定**

*S. enterica* 接種菌液を添加した培養 3 回目において、1 ml の培養液を、23G 針を用いて抜き取り、 $10^6$  倍まで段階希釈した。これらの希釈液を、ドリガルスキー改良培地 Blue に塗り広げ、35°C で 48 時間培養し、形成されたコロニー数を計測した。

### 2-2-6 ガス分析

25 ml の気相中のメタン生成量を，ガスクロマトグラフィー（GC-8A，株式会社島津製作所）を用いて測定した。検出器とカラムには，GW-100（GLサイエンス）と Thermal Conductivity Detector（TCD）を用いた。インジェクション，カラム，検出器の温度は，すべて 50°C に設定した。メタン生成量の有意差検定には，Tukey 検定を用いた。

### 2-2-7 Chemical Oxygen Demand (COD; 化学的酸素要求量)

COD は，COD 試薬（HACH4238，Hach Company）と COD リアクター（BOX389，Hach Company）を用いて測定した。測定は重クロム酸カリウム法（JIS-K-0102-2010）に基づいて行った（<http://kikakurui.com/k0/K0102-2013-01.html> [accessed June 2017]）。1 ml の試料を，9 ml の滅菌蒸留水に懸濁した。0.2 ml のこの懸濁液を，COD<sub>Cr</sub> 測定用バイアル（0～150000 mg/l レンジ；Hach Company）に添加した。0.2 ml の精製水を，ブランク試料として用いた。COD リアクター（BOX389，Hach Company）を用いて，これらの試料を 150°C で 2 時間加熱した。室温まで冷ました後，吸光度計（DR-4000，Hach Company）を用いて，COD（mg/l）を測定した。DR-4000 の測定プログラムは，2720（COD<sub>Cr</sub> 測定用）に設定した。COD の有意差検定には，Tukey 検定を用いた。



## 第3節 結果

### 2-3-1 前培養のメタン生成量

前培養1回目において三つの消化液 a, b, c のメタン生成量は、それぞれ平均値が 497  $\mu\text{mol}$ , 281  $\mu\text{mol}$ , 122  $\mu\text{mol}$  で、それぞれ有意に異なった ( $n=3, P<0.05$ ) (data not shown)。また、前培養2回目において三つの消化液 a, b, c のメタン生成量は、それぞれ 126  $\mu\text{mol}$ , 116  $\mu\text{mol}$ , 23  $\mu\text{mol}$  であった ( $n=1$ ) (data not shown)。

### 2-3-2 *S. enterica* 接種菌液を添加した培養のメタン生成量, *S. enterica* の菌濃度, COD

メタン生成量の経日変化を、図 2-2 に示した。三つの消化液 a, b, cのうち、消化液 c は、培養 18 日目までメタンが生成されなかった。消化液 a, b の培養 18 日目のメタン生成量は、それぞれ平均値が 16  $\mu\text{mol}$  と 10  $\mu\text{mol}$  であった。

メタン生成が起こらなかった対照区と消化液 c の培養 18 日目の *S. enterica* の菌濃度は、培養 2 日目のそれと比べて変化がなかった (対照区培養 18 日目  $7.2 \times 10^7$  cells/ml, 消化液 c 培養 18 日目  $7.1 \times 10^7$  cells/ml)。一方、消化液 a, b の培養 18 日目の *S. enterica* の菌濃度は、培養 2 日目のそれと比べて有意に減少していた (消化液 a 培養 18 日目  $3.8 \times 10^3$  cells/ml, 消化液 b 培養 18 日目  $4.2 \times 10^4$  cells/ml)。

培養 0 日目と培養 18 日目の COD (mg/l) を，図 2-3 に示した。18 日目の COD 濃度は，培養 0 日目のそれと比べて対照区を含む全ての処理区で約 50%程度，有意に減少していた。培養 18 日目の COD 量を全処理区間で比較した結果，有意な違いはなかった。

### 2-3-3 *S. enterica* 接種菌液を添加しなかった培養（継代培養）のメタン生成量

2 回の前培養を終えた後，*S. enterica* 接種菌液を添加せずに培養した 3 回目の培養と，それを再度継代した 4 回目の培養を行った。培養 3 回目では，43 日目に定常期に達し，この時の三つの消化液 a, b, c のメタン生成量は，それぞれ 135  $\mu\text{mol}$ ，208  $\mu\text{mol}$ ，89  $\mu\text{mol}$  であった ( $n=1$ ，図 2-4)。次の培養 4 回目では，17 日目に定常期に達し，この時の三つの消化液 a, b, c のメタン生成量は，それぞれ 708  $\mu\text{mol}$ ，712  $\mu\text{mol}$ ，779  $\mu\text{mol}$  であった ( $n=1$ ，図 2-4)。これらの結果は，全ての区でメタン生成古細菌が死滅せず継代培養できていることを示している。

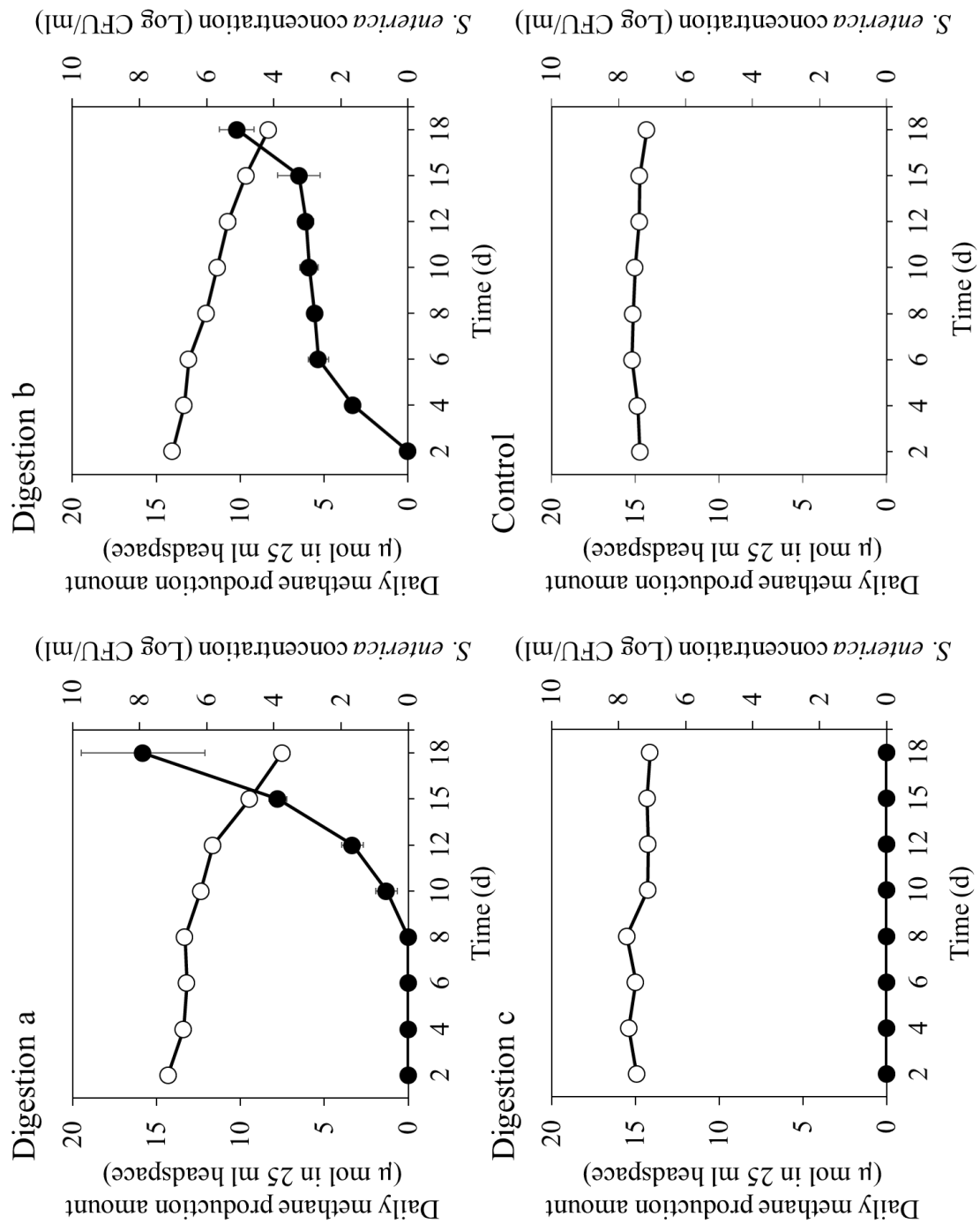


図 2-2 3 回目の培養におけるメタン生成量と *S. enterica* 菌濃度

黒丸 (●) と白丸 (○) はそれぞれ一日当たりのメタン生成量と *S. enterica* 菌濃度を示す。

エラーバーは標準誤差を示す ( $n=3$ )。

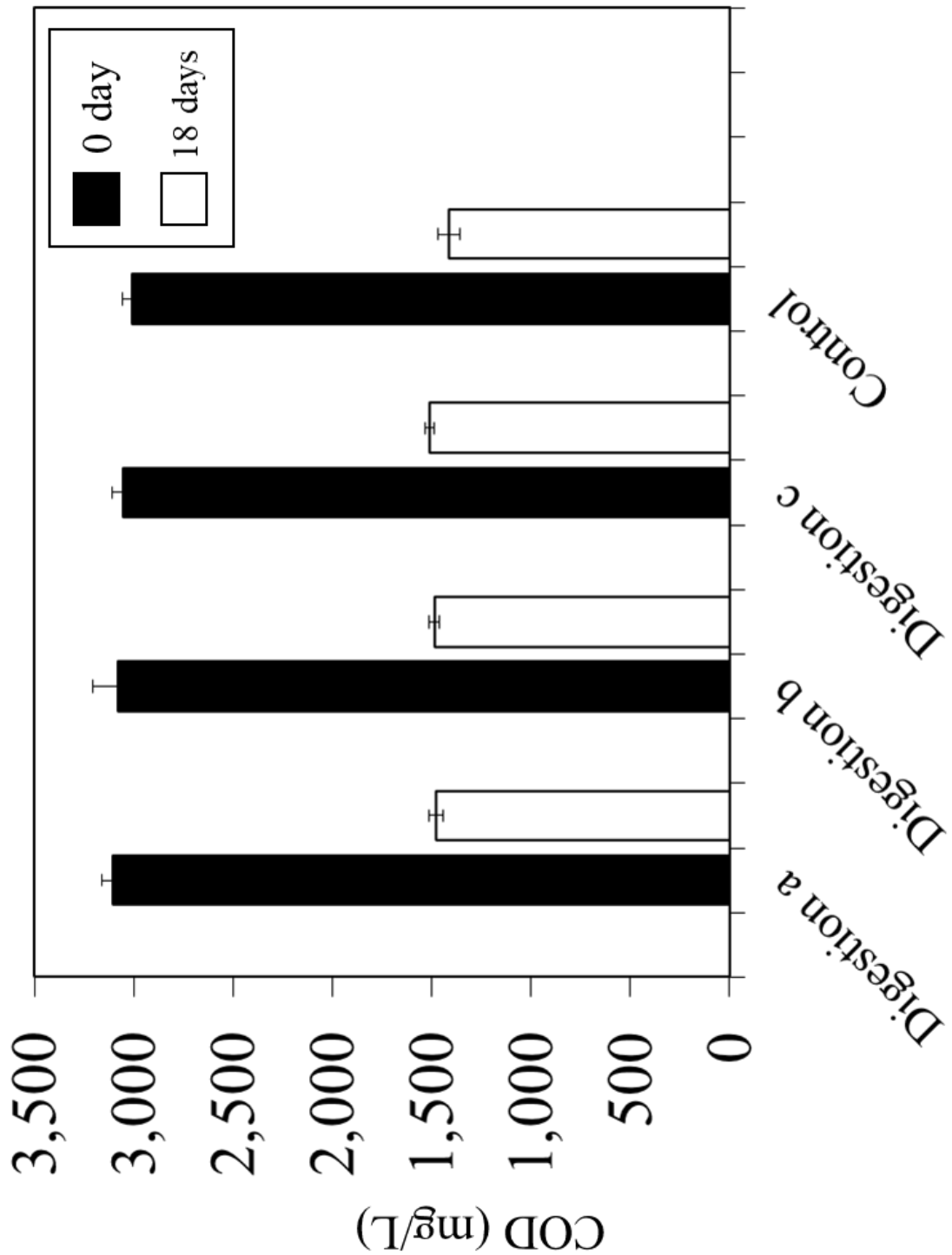


図 2-3 3 回目の培養における 0 日目と 18 日目の COD 濃度 (mg/l)  
 エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

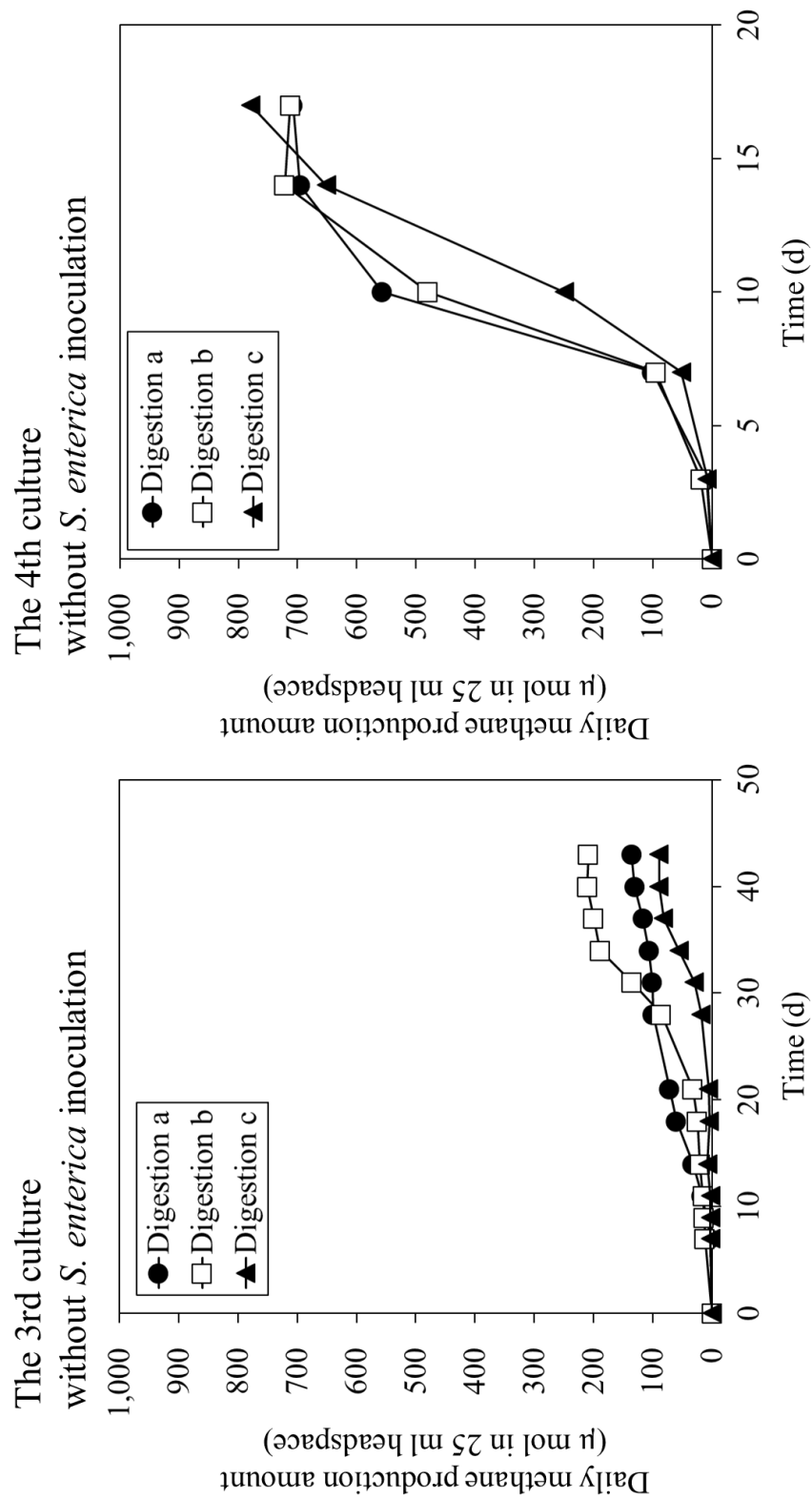


図 2-4 *S. enterica* を接種していない培養 3 回目と培養 4 回目のメタン生成量 ( $n = 1$ )

#### 第4節 考察

全ての処理区で、前培養1回目のメタン生成量に比べ、前培養2回目のメタン生成量が少なくなった。このことは、各消化液中に含まれていた微生物群集が豚糞上澄み溶液に対して、順化していないことを示している。*S. enterica* 接種菌液を添加していない培養3回目の消化液を、培養4回目へと継代培養した。この時、培養4回目の消化液 a, b, c の14日目のメタン生成量は、培養3回目の14日目のメタン生成量に比べて、それぞれ約21倍、36倍、85倍と高い値を示した。すなわち、培養3回目と培養4回目では、継代に使用した消化液量は同じであるにもかかわらず、培養4回目の方が高いメタン生成量を示した。このことは、前培養1回目と前培養2回目で、接種菌液量がそれぞれ異なっていたことが、メタン生成量の減少の理由ではないことも示している（前培養1回目は100 mlに50 ml、前培養2回目は100 mlに5 mlの接種菌液）。緒言で述べたように、中温処理のメタン発酵槽中の微生物群集は、基質に順化するまでに時間を要する。本研究では、こうした状況下の（メタン発酵槽中の微生物群集が順化するまでの間の）、消化液中の *S. enterica* の菌濃度の消長について調査した。

前培養2回目に比べて、*S. enterica* 添加区は、メタン生成量がさらに少なくなった（図2-2）。このことも、*S. enterica* 添加区では、安定的なメタン発酵が行われていないことを示している。*S. enterica* 添加区の、メタン生成量が培養日数に伴って増加する区では、*S. enterica* の菌濃度も減少していった（図2-2 Digestion a and b）。これらのことは、中温におけるメタン生成ポテンシャルが

消化液の *S. enterica* の菌濃度に影響を与えていることを示している。また、順化前のメタン発酵槽から排出される消化液や、メタン発酵が起こらなかったメタン発酵槽の消化液を液肥として利用することは、*S. enterica* が死滅していない可能性があることを示している。私の知る限り、ほとんどすべてのメタン発酵中の *Salmonella* 属細菌の菌濃度に関する研究は、効率的にかつ安定的に運用されたメタン発酵槽を用いて行われている [4, 13]。しかし、多くのメタン発酵処理施設では、pH の下降等によってメタン発酵が起こらないことがある [33]。こうした場合、発酵槽内の温度と pH を管理することで対処することが報告されている [80, 81]。本研究結果は、メタン発酵の活性が低下した場合に出された消化液は、*Salmonella* 属細菌が死滅していない可能性があるため、液肥利用は行わない方がよいことも示唆している。

メタン発酵中の COD は、対照区を含む全ての処理区で、18 日間の培養で減少していた (図 2-3)。メタンガスが生成しない対照区でも COD が減少することは、メタン発酵槽中で、豚糞中に含まれる有機物の低分子化が、*S. enterica* 単独でも起こることを示している。すなわち、メタン発酵が起きていないメタン発酵槽中では、豚糞中の成分を基質として利用して、*S. enterica* が繁殖できることを示している。Sahlström と Gadre らは、*Salmonella* 属細菌がメタン発酵槽中で 10~77 日生存できることをそれぞれ示しているが [19, 48]、本研究のように *Salmonella* 属細菌がメタン発酵中の COD 減少に寄与するほど生育していることは示されていなかった。一方で、メタンガスが生成し、*S. enterica* の菌濃度が減少する消化液 a と b (図 2-2) でも、COD 量が減少することは、消化

液 a と b に含まれる細菌群集が、添加した *S. enterica* 同様に豚糞中に含まれる高分子有機物の低分子化を行っていることを示している。これらのことは、消化液中に含まれていた細菌群集と、*S. enterica* が、豚糞中の基質の利用を競合している可能性を示している。

本研究においてメタン発酵が起きていない区（消化液 c, 対照区）では、培養 2 日目から培養 18 日目までの間に、*S. enterica* は増殖しなかった。このことは、培養 2 日目の時点で、*S. enterica* の菌濃度がすでに定常期に達していた可能性を示唆している。また、本研究では添加した消化液中に含まれていた可能性のある *Salmonella* 属細菌の測定を行っていなかったため、検出した *Salmonella* 属細菌が *S. enterica* のみであるとは限らない。今後は、*S. enterica* 接種菌液を添加した直後から短い期間までの消長についての調査や、添加した消化液に含まれる *Salmonella* 属細菌の種や、菌濃度についての調査が必要である。

本研究では、上述したように、培養 3 回目の *S. enterica* を添加した実験と同時に、*S. enterica* を添加していない 3 回目の培養も行った。この継代培養では、メタン生成曲線が定常期に達するのを待って、消化液を継代した。その結果、*S. enterica* を添加した消化液 c は、培養 18 日目でメタン生成が確認できなかったが、*S. enterica* を添加しなかった消化液 c は、継代培養 18 日目に 4.6  $\mu\text{mol}$ 、継代培養 43 日目には 89  $\mu\text{mol}$  のメタン生成量が確認された（図 2-4）。また、4 回目の継代培養を行った消化液 c では、培養 17 日目で定常期に達し、そのメタン生成は 779  $\mu\text{mol}$  であった（図 2-4）。すなわち、消化液 c は、メタン



生成古細菌が死滅しているのではなく、メタン生成に関わる微生物の活動が活発でないこと（消化液 c 由来の微生物群集が豚糞上澄み溶液に順化していないこと）から、培養 3 回目の *S. enterica* の菌濃度の減少が観察されなかったと考えられる。こうしたメタン発酵の順化や安定性に違いがみられるのは、そもそもメタン発酵施設から獲得した消化液中の細菌群集やメタン生成古細菌の種類が異なることが原因であると考えられる。

# 第 3 章

豚糞のメタン発酵における異なるメタン生成ポテンシャルを示す消化液の微生物群集構造解析

## 第1節 目的

これまで、豚糞を用いたメタン発酵の微生物群集に関して、以下に示すような多くの研究が行われてきた。例えば、豚糞を含む複数の基質（例：豚糞+稲わら、牛糞+稲わらなどの比較研究）を同時消化（co-digestion）させた研究 [37, 47, 54, 61, 69, 71]、メタン発酵過程で発酵阻害剤（例：borax）を添加させた研究 [64]、メタン発酵条件（有機物負荷率 [OLR : organic loading rate]、全蒸発残留物 [TS : total solids]、pH）を変化させた研究 [11, 39, 70] などがある。

上述した研究は、メタン発酵の初期（誘導期～対数増殖期）やピーク時（静止期）におけるメタン生成量や、それに関わる微生物群集について調査されてきた。しかしながら、これら豚糞を用いたメタン発酵においては、微生物群集間の共通性が無かった。Wang ら（2017）は、豚糞由来の1種類の消化液を複数種類の基質（トウモロコシの茎と豚糞の混合物、トウモロコシの茎単独、豚糞単独）にそれぞれ接種し、これらのメタン生成量や、それに関わる微生物群集を経時的に調査した。この結果、それぞれの基質を利用したメタン発酵のメタン生成曲線や、消化液中の微生物群集の相対存在比は大きく異なった [61]。

Meng ら（2018）は、豚糞由来の1種類の消化液を豚糞の TS（4%、8%、11%、14%）を調整した基質にそれぞれ接種し、これらのメタン生成量や、それに関わる微生物群集を経時的に調査した。この結果、Wang らの研究と同様に、それぞれの基質を利用したメタン発酵のメタン生成曲線や、消化液中の微生物群集の相対存在比は大きく異なった [39]。このように、高いメタン生成ポテンシャルを示している消化液中に優占化する微生物は、それぞれの研究にお

いて大きく異なる [11, 37, 47, 54, 61, 70, 71]。また、上述した研究のメタン生成量と微生物群集の違いは、基質由来の微生物と種汚泥由来の微生物のどちらにも影響を受けていることが推察される。そこで、これらの研究におけるメタン発酵の違いを明らかにするために、高いメタン生成ポテンシャルに寄与する微生物群集構造を明らかにすることが重要である。

私が知る限り、豚糞のメタン発酵において、複数のメタン発酵施設から集められた種汚泥を豚糞のみを基質として用いた培地に接種したメタン発酵のメタン生成ポテンシャルとそれに関連する微生物群集構造を調査した報告は無い。それゆえに、本研究では、6ヶ所のメタン発酵施設から種汚泥を獲得し、豚糞のメタン発酵におけるそれらのメタン生成ポテンシャルを評価し、それらの消化液中の微生物群集を分析した。

## 第 2 節 材料と方法

### 3-2-1 種汚泥

種汚泥は 6 つのメタン発酵施設から獲得し (表 3-1), メタン生成ポテンシャルを調査するための接種材料として使用した。サンプルは消化液 A-F と名付けられ, さらに使用するまで 4°C で保存された。

表 3-1 種汚泥の性状

| Seed sludge | Operating company of methane fermentation facility           | Substrate                                      |
|-------------|--|--|
| A           | "Ookijyumkan center Kururun", Fukuoka, Japan                 | Human waste, septic tank sludge, raw garbage   |
| B           | "Sanzo yuuki recycle" Co., Ltd., Hokkaido, Japan             | Press juice of raw garbage                     |
| C           | Mitsui E&S Environment Engineering Co., Ltd., Fukuoka, Japan | Press juice of raw garbage                     |
| D           | Mitsui E&S Environment Engineering Co., Ltd., Fukuoka, Japan | Press juice of raw garbage, septic tank sludge |
| E           | Mitsui E&S Environment Engineering Co., Ltd., Fukuoka, Japan | Raw garbage                                    |
| F           | "Misaki Youton" Corp., Kagoshima, Japan                      | Swine feces                                    |

### 3-2-2 豚糞培地

本研究では、「生豚糞培地」と「豚糞上澄み培地」と名付けた2つの培地を用いた。まず、生豚糞培地の調製は、以下のように行われた。鹿児島大学内の附属農場から獲得した豚糞は、電動ドリル（6311D；マキタ株式会社）とペイントミキサー（SK11；藤原産業株式会社）を組み合わせ粉砕および攪拌した。そのTS（Total solids）は、下水試験方法に従って測定された [28]。豚糞のTSは、水道水を使用して10%に調整された。合計95 mlのこの豚糞溶液を125 ml ボトル（84-0714；日電理化硝子株式会社）に加え、ブチルゴム栓とアルミキャップ（日電理化硝子株式会社）で密閉し、嫌気状態を維持した。ただし、還元剤（硫化ナトリウムやL-システイン塩酸塩など）はボトルに添加しなかった。次に、以下に記載するように、豚糞上澄み培地の調製を行った。上述した10% TSに調整した豚糞溶液は、JLA-8.1000 rotor（Beckman Coulter, CA, USA）を用いて10°Cで20分間、3,000 rpmでさらに遠心分離され、続いてこの上澄みを121°Cで20分間オートクレーブ滅菌した。合計95 mlのこの豚糞上澄み溶液を125 ml ボトル（84-0714；日電理化硝子株式会社）に加えた。生豚糞培地と同様に、還元剤（硫化ナトリウムやL-システイン塩酸塩など）をボトルに添加せず、このボトルもブチルゴム栓とアルミキャップ（日電理化硝子株式会社）で密閉した。

上述したように、豚糞上澄み培地は、生豚糞培地の遠心分離とオートクレーブ滅菌によって作成された。それゆえに、この培地は、種汚泥中の微生物群集の培養、シリンジを用いた消化液のサンプリング、また継代培養に適してい

る。豚糞中に土着の微生物を含んでいる生豚糞培地を用いた実験は、実際のメタン発酵施設に類似した適用条件下のメタン生成ポテンシャルを評価するために用いられた。

### 3-2-3 メタン発酵

本研究では、日本におけるメタン発酵の主要な方法である湿式メタン発酵を使用した (<http://www.env.go.jp/recycle/waste/biomass/data/facilitylist.pdf> [in Japanese; accessed July 2019])。異なる施設から獲得した種汚泥のメタン生成ポテンシャルを調査するために、5 ml の種汚泥を豚糞上澄み培地に接種した。培地は、メタン生成が定常期に達するまで 37°C に維持させた。培養中に 1 日 1 回、メタン発酵で発生したバイオガスによる高圧によって破裂することを防ぐため、ボトルを針 (23G ; テルモ株式会社) で大気圧まで換気した。培地を均一にするために、培養中にボトルを 1 日 1 回振った。メタン生成が定常期に達した後、5 ml の消化液をシリンジ (SS-05SZ ; テルモ株式会社) で新鮮な豚糞上澄み培地に継代培養した。種汚泥 A-F に由来する消化液も同じ文字を使用して名付けられた (例 : 消化液 A)。この継代培養は 3 連続のメタン生成曲線 (安定的なメタン生成曲線) が得られるまで、約 15 回続けられた ( $n = 1$ ) (図 3-1)。

15 回の継代培養間で、最も高いメタン生成ポテンシャルと最も低いメタン生成ポテンシャルを有する 2 つの消化液をさらに継代培養した (以下、H-DS および L-DS とそれぞれ称する)。本研究においては、メタン生成量の初期の急速

な立ち上がりとピーク時において高い値を示すことを「高いメタン生成ポテンシャル」として定義した。H-DS と L-DS の継代培養は、Tukey 検定による統計解析を行うために、4 連で 37°C の 10 日間行った。上述したようなボトルの振とうおよび換気は、この継代培養中においても行われた。培養 10 日目に消化液を採取し、以下のように化学分析 (COD, VFAs, 酢酸, pH, アンモニア態窒素) およびメタゲノム DNA 抽出を行った。化学分析のために消化液 (約 5 g) を、使用するまで -80°C で保存した。メタゲノム DNA 抽出用の消化液 (15 ml) を遠心分離し、沈殿物は使用するまで -80°C で保存した。

H-DS および L-DS は、また以下のようにさらなる調査のために使用した。L-DS の微生物群集がメタン発酵を阻害する微生物を含んでいるかどうかを決定するために、5 ml の H-DS および L-DS のサンプルを 90 ml の豚糞上澄み培地と共接種した ( $n=4$ )。また、実際の現場に近い条件においても H-DS をメタン生成ポテンシャルの高い種汚泥として使用できるかどうかを判断するために、5 ml の消化液を生豚糞培地に接種した ( $n=3$ )。対照区として使用するために、生豚糞培地に滅菌水を接種した。これらの実験は、37°C で 10 日間行った。培養中のボトルの振とうと換気、および化学分析のための培養 10 日目のサンプリングも上述のように行った。



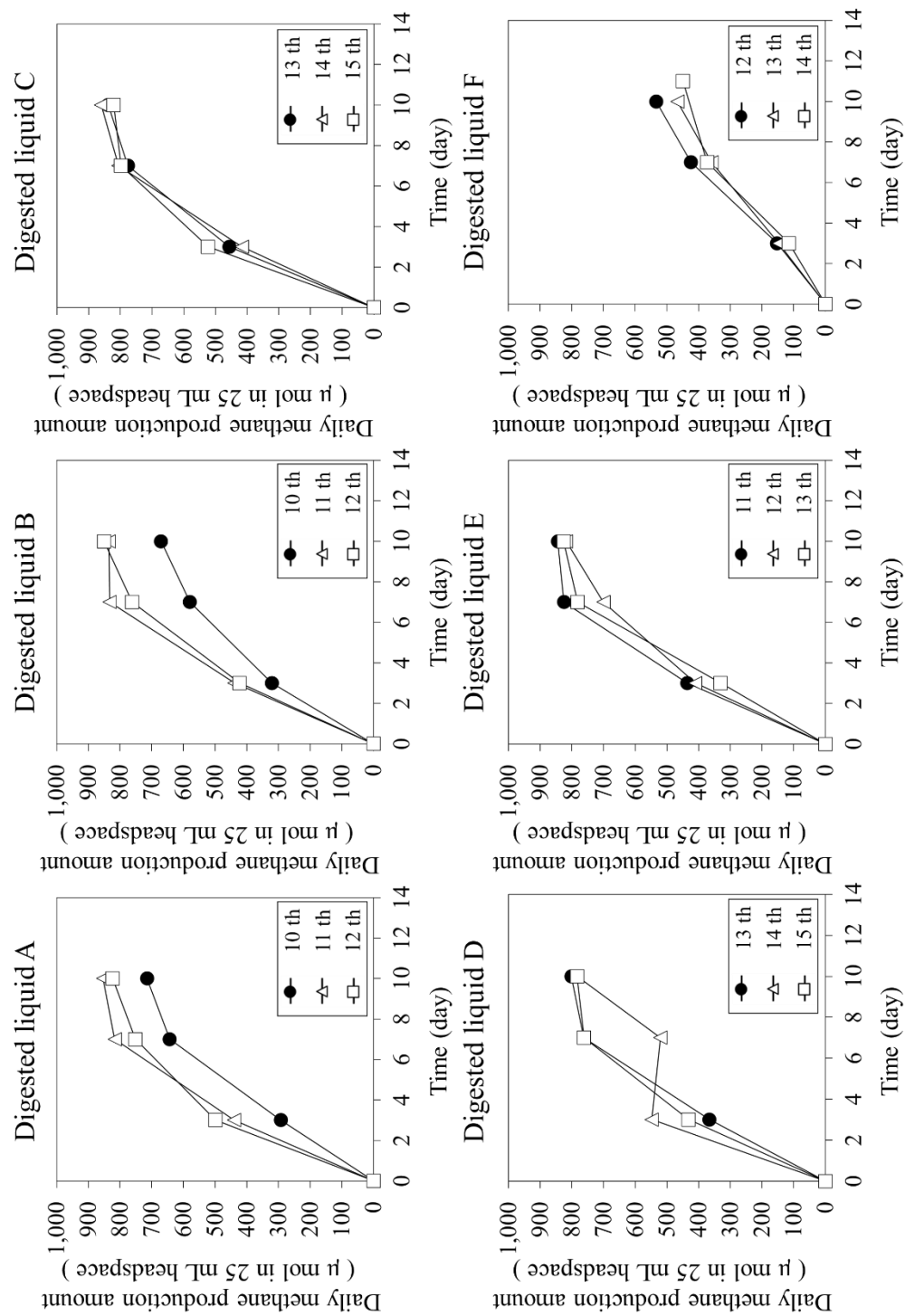


図 3-1 異なる種汚泥を用いた一日のメタン生成曲線

6 種のメタン発酵施設から種汚泥を採取し、15 回の継代培養を通して、豚糞上澄み培地でメタン生成ポテンシャルを評価した。これらの継代培養の間において、3 回連続の一日のメタン生成曲線が示されている。

#### 3-2-4 メタン生成量の測定

メタン発酵の気相 (25 ml) におけるメタン生成量は, GW-100 カラム (GL Science) と熱伝導度型検出器 (TCD) を装着したガスクロマトグラフィー (GC-8A ; 島津製作所株式会社) を用いて測定された。インジェクション, カラム, 検出器の温度は, 全て 50°C にした。キャリアガスはヘリウムで, 圧力は 1.0 kg / cm<sup>2</sup> (98.0 kPa) に設定した。

#### 3-2-5 化学分析 (COD, VFAs, 酢酸, pH, アンモニア態窒素)

消化液中の COD 濃度は, メーカーの手順書に従って, “200-15,000 mg / L COD (HR Plus)” (Hach company, Colorado, USA) および吸光光度計 DR3900 (Hach company) を使用して測定した。VFAs (プロピオン酸, *n*-酪酸, イソ酪酸) および酢酸の濃度は, ULTRON PS-80H カラム (島津製作所株式会社) と UV detector (日立製作所株式会社) を装着した HPLC (L-7100 ; 日立製作所株式会社) を用いて, 九州化工株式会社によって測定された。溶離液として, リン酸塩緩衝液 (pH 1.9) が使用された。消化液の pH は twin pH meter (AS-212 ; 堀場製作所株式会社) を用いて測定された。消化液中のアンモニア態窒素の濃度は, メーカーの手順書に従って, “2-47 mg/L NH<sub>3</sub>-N, high range kit” (Cat. TNT 832 ; Hach Company) および吸光光度計 DR3900 を使用して測定した。

### 3-2-6 消化液からのメタゲノム DNA 抽出

上述したように、メタゲノム DNA 抽出には、2つの消化液（H-DS および L-DS）由来の沈殿物（約 0.5 g）を用いた。この抽出は、Ikeda らのプロトコールに従って行った [27]。

### 3-2-7 16S rRNA 遺伝子の増幅とシーケンシング

PCR 増幅は、Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') primer set および Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3') primer set を用いて、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅した [56]。これらのプライマー配列は、2nd PCR プライマーのカップリング領域も含まれている [62] (表 3-2)。PCR 混合物 (10  $\mu$ l) は、2.0  $\mu$ l のメタゲノム DNA (0.5 ng /  $\mu$ l), 0.1  $\mu$ l の Ex Taq ポリメラーゼ (5U /  $\mu$ l; Takara Bio Inc., 滋賀, 日本), 1.0 $\mu$ l の 10 $\times$ 緩衝液, 0.8  $\mu$ l の dNTP 混合物 (2.5 mM), 0.5  $\mu$ l の各プライマー (10  $\mu$  M), および 5.1  $\mu$ l の二重蒸留水を含んでいる。これらのプライマー配列はまた、以下のようにして PCR 増幅のカップリング領域を含有した：最初に 98 $^{\circ}$ C で 2 分間; 10 サイクルのタッチダウンプログラム (98 $^{\circ}$ C で 10 秒, 65 $^{\circ}$ C 15 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 1 サイクルあたりのアニーリング温度が 1 $^{\circ}$ C 低下) を行った。98 $^{\circ}$ C で 10 秒間, 55 $^{\circ}$ C で 15 秒間, および 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間の 25 サイクル; 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の最終伸長を行った。これらのプライマー配列はまた、PCR アンプリコンのカップリング領域を含み、AMPure XP (Beckman Coulter) によって精製され、2 回目の PCR の鋳型として使用された。2 回目の PCR は、2ndF および 2ndR プライマーセットを用い

て実施した（表 3-2）。PCR 混合物（10  $\mu$ l）は、2.0  $\mu$ l の PCR 産物、0.1  $\mu$ l の Ex Taq, 1.0  $\mu$ l の 10 $\times$ 緩衝液, 0.8  $\mu$ l の dNTP 混合物, 0.5  $\mu$ l の各プライマー（10  $\mu$ M）, および 5.1  $\mu$ l の二重蒸留水を含んでいる。PCR 増幅は以下のようにして行った：最初に 94 $^{\circ}$ C で 2 分間; 続いて 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 60 $^{\circ}$ C で 30 秒間, および 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間の 10 サイクル; 次に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の最終伸長を行った。

PCR アンプリコンは、AMPure XP を用いて精製した。QuantiFluor dsDNA System（Promega Corporation, WI, USA）および Synergy H1 microplate reader（BioTek Instruments, Inc., VT, USA）を用いて精製 DNA を定量した。MiSeq Reagent Kit v3（Illumina KK, Tokyo, Japan）を使用して、MiSeq sequencer で PCR アンプリコンのペアエンド配列（2 $\times$ 300bp）を決定した。

表 3-2 本研究で使用した primer

| Primer                   | Sequence (5' → 3')   | Reference             |
|--------------------------|--|-----------------------|
| 1 <sup>st</sup> -Pro34IF | ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGG <b>NBGCASCAG</b>       | Takahashi et al. 2014 |
| 1 <sup>st</sup> -Pro805R | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTAC <b>GNVGGGTATCTAATCC</b> | Takahashi et al. 2014 |
| 2ndF for H-DS1           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACTCGACTAGACACTCTTTCCCTACACGACGC     | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for H-DS2           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACTTCTAGCTACACTCTTTCCCTACACGACGC     | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for H-DS3           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACCCCTAGAGTACACTCTTTCCCTACACGACGC    | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for H-DS4           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACGGCTAAGAACACTCTTTCCCTACACGACGC     | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for L-DS1           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACCTATTAAAGACACTCTTTCCCTACACGACGC    | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for L-DS2           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACAAGGCTATACACTCTTTCCCTACACGACGC     | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for L-DS3           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACGAGCCCTTAACACTCTTTCCCTACACGACGC    | Yabe et al. 2017      |
| 2ndF for L-DS4           | AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACTTATGCGAACACTCTTTCCCTACACGACGC     | Yabe et al. 2017      |
| 2ndR                     | CAAGCAGAAAGACGGCATAACGAGATTCCTCTACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG         | Yabe et al. 2017      |

The index sequence is underlined.

### 3-2-8 Bioinformatics

使用プライマーの配列と完全に一致した配列を含む生リードが Fastx toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) [accessed October 2018]) を用いて抽出され、さらに、抽出されたプライマーが除去された (表 3-3)。このリードは、sickle tools (<https://github.com/najoshi/sickle> [accessed May 2019]) を用いて除去 (クオリティ値が 20 未満の配列を取り除き、150 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列) された。最終的に、FLASH を用いてペアエンド配列を除去 (最低オーバーラップ長 10 塩基、除去後の断片長 420 塩基、リードの断片長 280 塩基) した [38]。それらの配列のキメラチェックは、USEARCH package の UCHIME algorithm [15, 16] を通して行った。これらの分析は、株式会社生物技研によって行われた。

これらの配列は、配列同一性 (97%) に基づく操作分類学的単位 (OTUs) に一団化され、それらの OTUs を分類学的に割り当て、また、Quantitative Insights into Microbial Ecology software (QIIME version 1.9.1) [10] を用いて、消化液中の微生物群集の alpha diversity (Good's coverage, observed OTUs, equitability, および Shannon index) の分析が行われた。当初、OTUs の分類学的割り当ては、属レベルで実施されたが、一部の OTU は科または目レベルで指定された。しかし、これは QIIME 分析の通常の実出力結果である。この分類学的割り当ては、微生物群集における相対存在比を表した Krona plot のために使用された (図 3-9)。さらに、微生物群集における 1%以上の相対存在比を持つ OTUs は、有効種名を含むデータベース (16S-based ID service in EZBioCloud

[<https://www.ezbiocloud.net/>] を用いて分類学的再割り当てされた [65]。この分類学的再割り当ては、H-DS と L-DS の微生物群集の相対存在比の違いを統計的に示すために使用された (図 3-10)。

### **3-2-9 DNA 配列の Accession number**

本研究で使用された Raw reads は、NCBI SRA データベースに寄託された (Accession number : PRJNA507714)。

## 第3節 結果

### 3-3-1 メタン生成曲線の特徴

6カ所のメタン発酵施設から採取した種汚泥を用いてメタン発酵を行い、15回継代した ( $n=1$ ) (図 3-1)。15回以内の継代培養において、Digested liquids A, B, C, E を使用したメタン生成曲線の特徴は、消化液 F と比較して、初期における急激上昇とピーク段階での高いメタン生成に関与していた。その後の実験において、Digested liquids C と F をそれぞれ「H-DS」, 「L-DS」とした。Digested liquids D のメタン生成曲線は15回の継代培養中において安定しなかった。

H-DS および L-DS のメタン生成曲線の特徴は、16回目の継代培養において4連でさらに調査した (図 3-2)。H-DS および L-DS の培養3日目 (初期の上昇期) における一日のメタン生成量の平均値と標準誤差は、それぞれ  $429 \pm 6 \mu\text{mol}$  および  $213 \pm 2 \mu\text{mol}$  であった。これに対応する培養10日目におけるメタン生成量は、それぞれ  $808 \pm 5 \mu\text{mol}$  および  $566 \pm 6 \mu\text{mol}$  であった。したがって、Digested liquids C は Digested liquids F に比べて種汚泥として優れていることが示唆された ( $n=4$ ,  $P < 0.05$ )。培養3日目および培養10日目の H-DS および L-DS の共接種時のメタン生成量は、それぞれ  $414 \pm 35 \mu\text{mol}$  および  $803 \pm 4 \mu\text{mol}$  であった。

16回目の継代培養では、生豚糞培地での実験も行った ( $n=3$ )。その結果、実際の発酵施設に近い条件下においても、H-DS 由来培養は L-DS 由来の培養より多くのメタンを生成した (図 3-3)。培養3日目において、H-DS 由来の培養



および L-DS 由来の培養におけるメタン生成量は、それぞれ  $336 \pm 10 \mu\text{mol}$  および  $214 \pm 11 \mu\text{mol}$  であった。培養 10 日目において、その対応する値はそれぞれ  $722 \pm 11 \mu\text{mol}$  および  $605 \pm 6 \mu\text{mol}$  であった。対照的に、消化液の代わりに滅菌水を用いた対照区では、培養 3 日目および 10 日目のメタン生成量が、それぞれ  $71 \pm 2 \mu\text{mol}$  および  $266 \pm 8 \mu\text{mol}$  であった。H-DS, L-DS, および対照区間のメタン生成には有意差があった ( $n = 3, P < 0.05$ )。

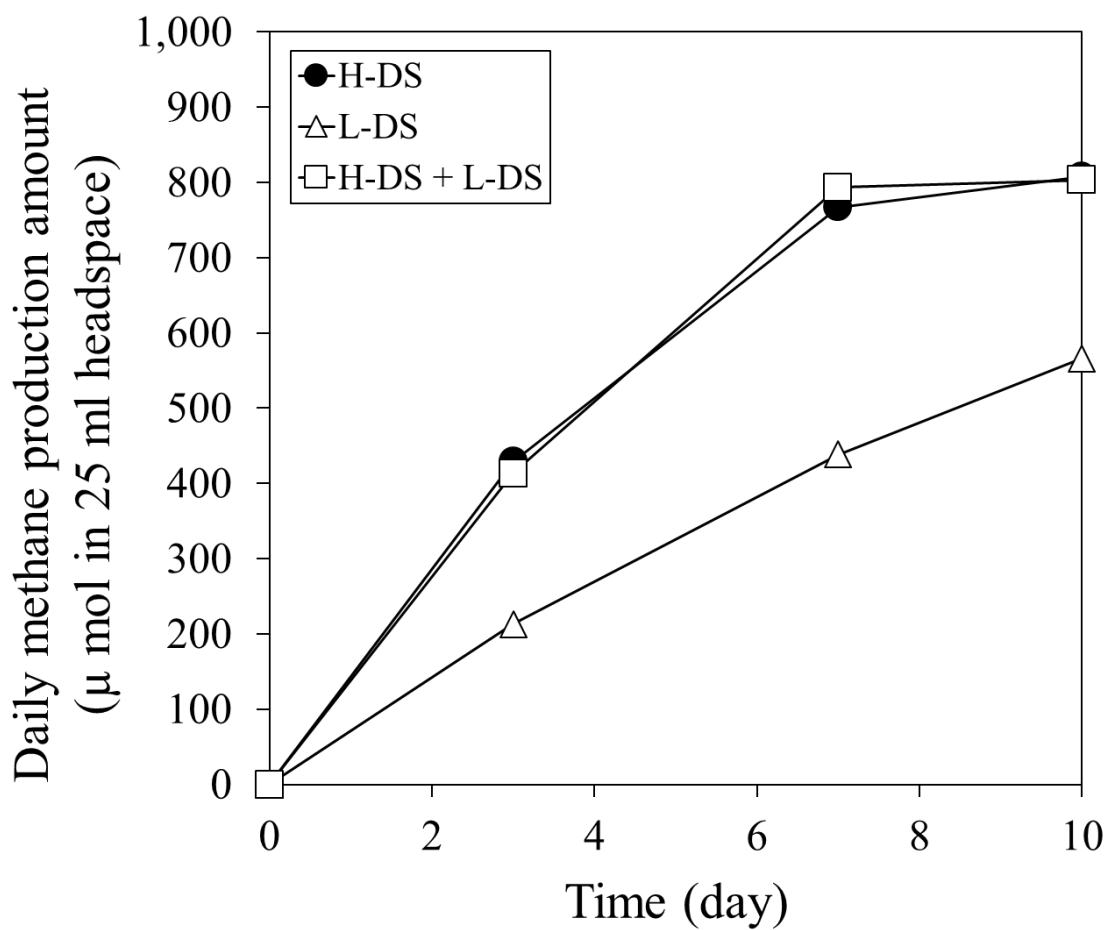


図 3-2 豚糞上澄み培地を使った時の一日あたりのメタン生成曲線

黒丸 (●), 白三角 (△), 白四角 (□) は, それぞれ H-DS, L-DS, H-DS+L-DS を示す。エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。H-DS と L-DS のメタン生成量の差はすべて有意である ( $n=4, P<0.05$ )。

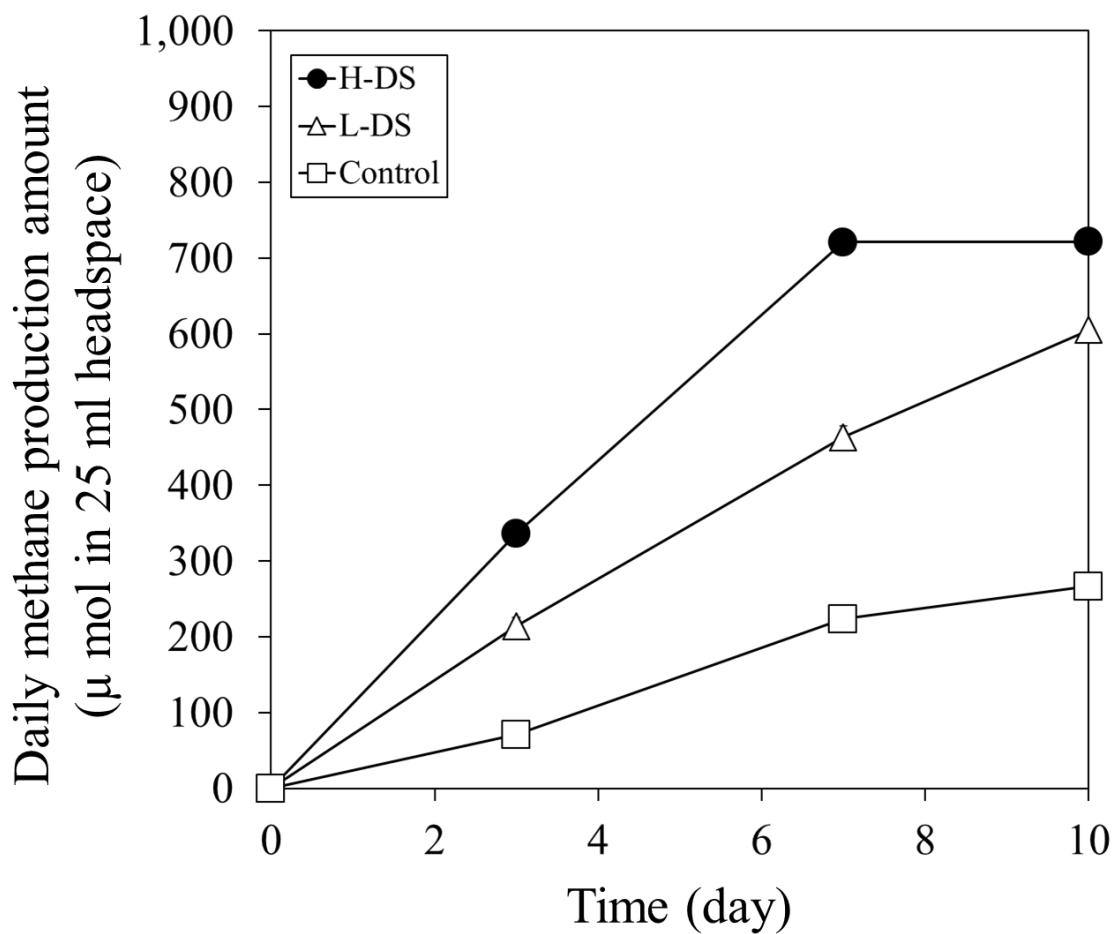


図 3-3 生豚糞培地を使った時の一日あたりのメタン生成曲線

黒丸 (●), 白三角 (△), 白四角 (□) は, それぞれ H-DS, L-DS, 対照区を示す。エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。H-DS と L-DS のメタン生成量の差はすべて有意である ( $n=4, P<0.05$ )。

### 3-3-2 H-DS と L-DS の化学分析

豚糞上澄み培地の COD は、 $2715 \pm 169 \text{mg/l}$  であった (図 3-4)。培養 10 日目において、H-DS と L-DS の COD 濃度は、それぞれ  $1891 \pm 182 \text{mg/l}$  および  $2806 \pm 107 \text{mg/l}$  であり (図 3-4)、これらには有意差があった ( $t$  検定,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。

豚糞上澄み培地のプロピオン酸濃度は、 $627 \pm 78 \text{mg/l}$  であった (図 3-5A)。培養 10 日目において、H-DS と L-DS のプロピオン酸濃度はそれぞれ  $1113 \pm 49 \text{mg/l}$  および  $993 \pm 28 \text{mg/l}$  であり (図 3-5A)、有意に異なった ( $t$  検定,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。豚糞上澄み培地の  $n$ -酪酸濃度は  $438 \pm 70 \text{mg/l}$  であった (図 3-5B)。培養 10 日目において、H-DS または L-DS においても  $n$ -酪酸は検出されなかった (図 3-5B)。豚糞上澄み培地のイソ酪酸濃度は  $219 \pm 33 \text{mg/l}$  であった (図 3-5C)。培養 10 日目において、H-DS におけるイソ酪酸は H-DS で検出されなかったが、L-DS でのそれは  $396 \pm 21 \text{mg/l}$  であった (図 3-5C)。豚糞上澄み培地の酢酸の濃度は、 $1478 \pm 133 \text{mg/l}$  であった (図 3-5D)。培養 10 日目において、H-DS と L-DS の酢酸濃度はそれぞれ  $1009 \pm 121 \text{mg/l}$  および  $2686 \pm 99 \text{mg/l}$  であり (図 3-5D)、有意に異なった ( $t$  検定,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。

豚糞上澄み培地の pH は  $7.25 \pm 0.09$  であった (図 3-6)。培養 10 日目において、H-DS と L-DS の pH はそれぞれ  $7.05 \pm 0.04$  および  $6.73 \pm 0.04$  であり (図 3-6)、有意に異なった ( $t$  検定,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。

豚糞上澄み培地のアンモニア態窒素濃度は、 $801 \pm 13.2 \text{mg/l}$  であった (図 3-7)。培養 10 日目において、H-DS と L-DS のアンモニア態窒素濃度はそれぞれ

1083 ± 10.9 mg / l および 1103 ± 8.29 mg / l であり (図 3-7), 有意に異なった ( $t$  検定,  $n = 4$ ,  $P = 0.0474$ )。メタン生成は 4.2 g / L を超えるレベルのアンモニア態窒素の蓄積によって阻害されることが報告されたが [29], 本研究の H-DS および L-DS の濃度はこのレベルに達しなかった。

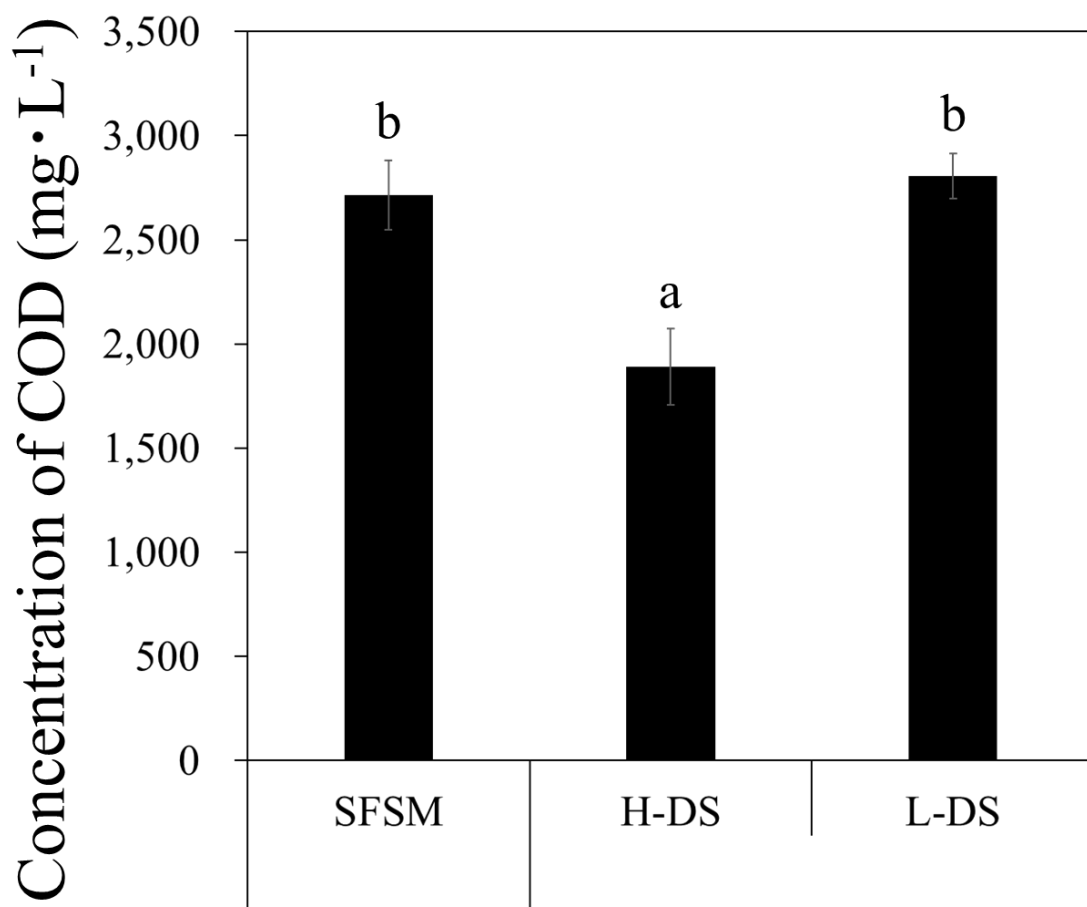


図 3-4 継代培養 16 回目の培養 10 日目の COD 濃度

豚糞上澄み培地は SFMS と略される。エラーバーとバーの上の異なる文字は、それぞれ標準誤差および有意差を示す ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) を示す。

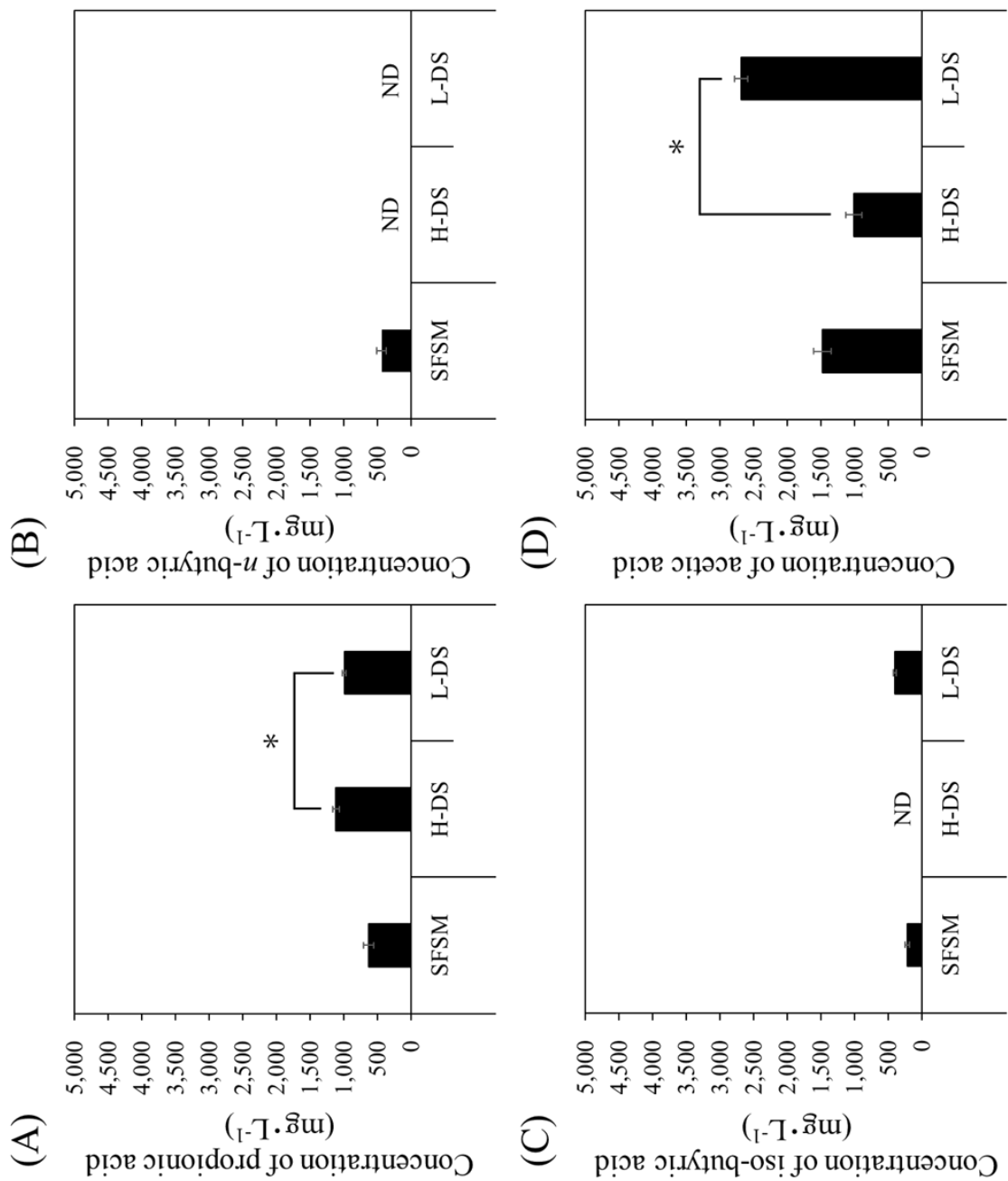


図 3-5 16 回目の継代培養における 10 日目の volatile fatty acids (VFAs) 濃度  
 パネル (A~D) はそれぞれプロピオン酸, *n*-酪酸, イソ酪酸および酢酸の濃度  
 を示す。豚糞上澄み培地は SFISM と略される。エラーバー, ND, およびアス  
 タリスクは, それぞれ標準誤差, 未検出, 有意差を示す。

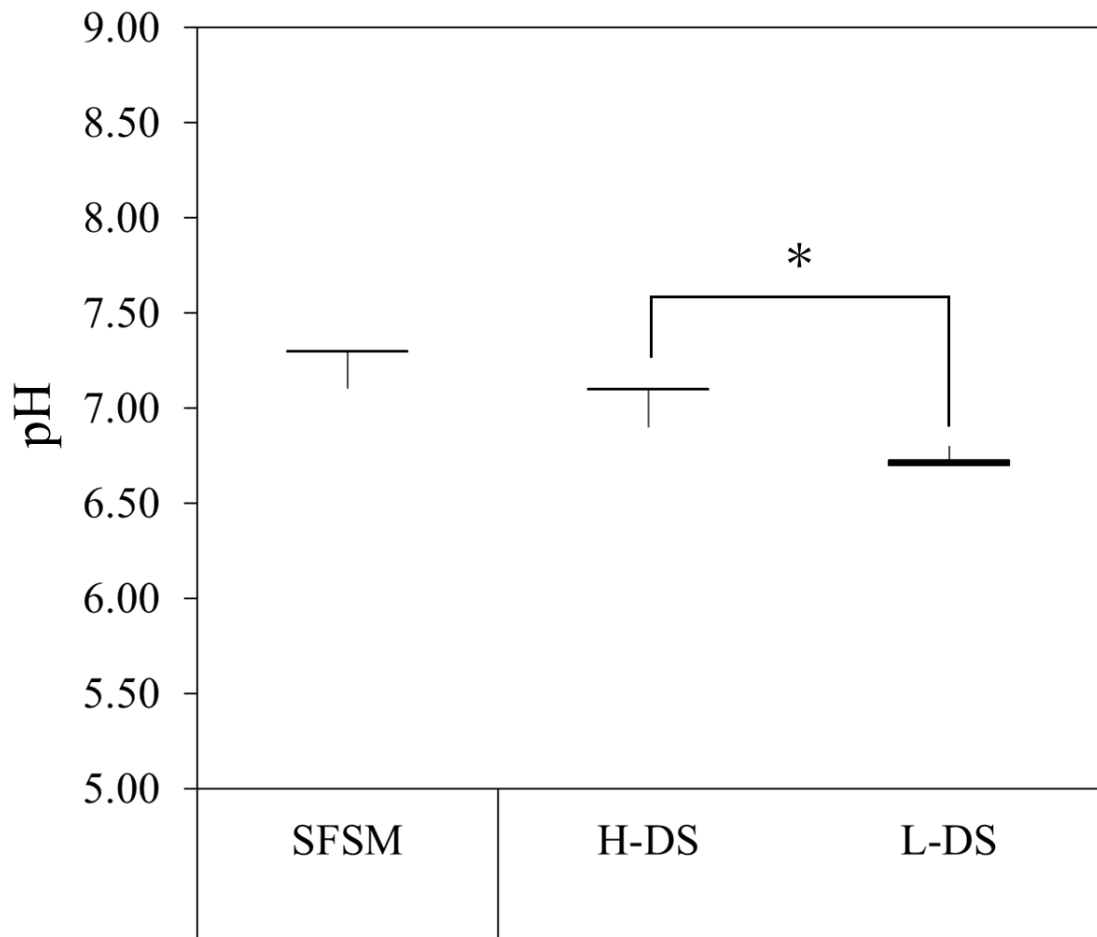


図 3-6 16 回目の継代培養での培養 10 日目の pH

豚糞上澄み培地は SFSM と略される。エラーバーおよびアスタリスクは、それぞれ標準誤差および有意差を示す。



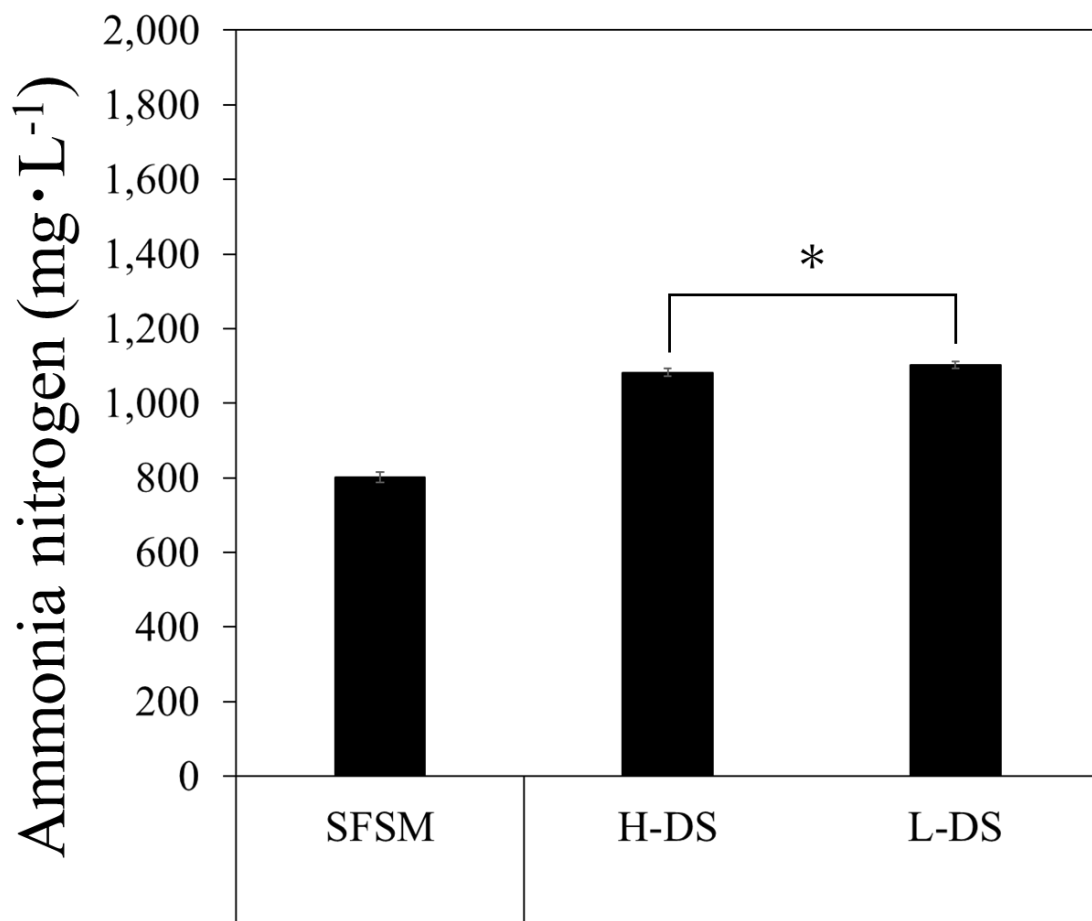


図 3-7 16 回目の継代培養における培養 10 日目のアンモニア態窒素の濃度  
 豚糞上澄み培地は SFSM と略される。エラーバーおよびアスタリスクは、それぞれ標準誤差および有意差を示す。

### 3-3-3 豚糞を基質としたメタン発酵における微生物群集

8つのサンプルから合計 405,299 の Raw reads が生成され、1 サンプルあたり平均 50,662 の読み取りが行われた (表 3-3)。H-DS および L-DS ( $n = 4$ ) における各サンプルのための配列の Good's coverage, observed OTUs, equitability, Shannon index は、図 3-8 に示された。Good's coverage と Shannon index は完全に平衡状態であった (図 3-8A および 3-8D)。これは、シーケンシングの深さが各サンプルの微生物多様性のすべてをカバーするのに十分であることを示している。合計 275 個の OTUs が検出され、属レベルで細菌または古細菌に割り当てられた。H-DS および L-DS の細菌の相対存在比は、それぞれ  $95.1 \pm 0.10\%$  および  $99.1 \pm 0.15\%$  であった ( $n = 4$ ) (表 3-3 および図 3-9)。H-DS ( $4.60 \pm 0.487\%$ ) における古細菌の相対存在比は、L-DS ( $0.618 \pm 0.25\%$ ) より有意に高かった ( $P < 0.05$ ) (図 3-9)。230 個の OTUs に関して、H-DS と L-DS の間の OTUs の相対存在比に有意差はなかった。これら 230 個の OTUs 間で、12 個が消化液の微生物群集中で 1%以上の相対存在比を持っていた (図 3-10A)。これら 12 個の OTUs 間で、最も高い相対存在比の微生物は、*Clostridium* 属細菌 (OTU denovo10 ; H-DS と L-DS の相対存在比の平均は 13.9%と 11.8% [ $n = 4$ ]) 以下、*Petrimonas* 属細菌 (denovo103 ; H-DS と L-DS の相対存在比の平均は 11.2%と 4.0% [ $n = 4$ ]), *Terrisporobacter* 属細菌 (denovo110 ; H-DS と L-DS の相対存在比の平均は 6.4%と 5.3% [ $n = 4$ ])。1%以上の相対存在比を持つ、その 12 個の OTUs のほとんど全ては、*Firmicutes* 門に属していた。H-DS と L-DS 間の

45 個の OTUs に関する OTUs の相対存在比には有意な違いがあった。これら 45 個の OTUs 間で、消化液の微生物群集中で 1%以上の相対存在比を持つそれらは、図 3-10B と 3-10C に示された。H-DS において、*Syntrophomonas* 属細菌 (denovo1003 ; 平均 = 6.76%)、*Methanosarcina* 属古細菌 (denovo1016 ; 平均 = 4.41%)、*Clostridium* 属古細菌 (denovo1005 ; 平均 = 4.23%) は、L-DS のそれらよりも有意に高かった (図 3-10B) ; L-DS におけるそれらは、それぞれ、0.58%、0.09%、1.07%であった。L-DS において、*Fermentimonas* 属細菌 (denovo1010 ; 平均 = 37.1%)、*Acholeplasma* 属細菌 (denovo1279 ; 平均 = 6.55%)、*Comamonas* 属古細菌 (denovo1091 ; 平均 = 2.98%) は、H-DS のそれらよりも有意に高かった (図 3-10C) ; H-DS におけるそれらは、それぞれ、17.0%、0.31%、0.53%であった。L-DS において、水素資化性メタン生成古細菌である *Methanobrevibacter* と *Methanoculleus* の相対存在比は、それぞれ 0.2%と 0.09%であった。

表 3-3 消化液の 16S rRNA のアンプリコン解析から得られたシーケンスリード数

| Sample        | Raw reads <sup>a</sup> | Nonchimera reads <sup>b</sup> | Bacterial content (%) <sup>c</sup> |
|---------------|------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| H-DS1         | 39,146                 | 18,086                        | 94.40                              |
| H-DS2         | 35,620                 | 18,786                        | 95.82                              |
| H-DS3         | 43,229                 | 19,851                        | 95.15                              |
| H-DS4         | 53,540                 | 18,137                        | 95.16                              |
| L-DS1         | 61,575                 | 22,490                        | 98.92                              |
| L-DS2         | 60,971                 | 22,575                        | 99.06                              |
| L-DS3         | 48,007                 | 20,674                        | 99.21                              |
| L-DS4         | 63,211                 | 26,669                        | 99.17                              |
| Mean $\pm$ SD | 50,662 $\pm$ 10,076    | 20,909 $\pm$ 2,734            | 97 $\pm$ 2                         |

<sup>a</sup>Total number of sequence reads.

<sup>b</sup>Number of sequence reads removed chimera reads from raw reads.

<sup>c</sup>This percentage is calculated by QIIME analysis.

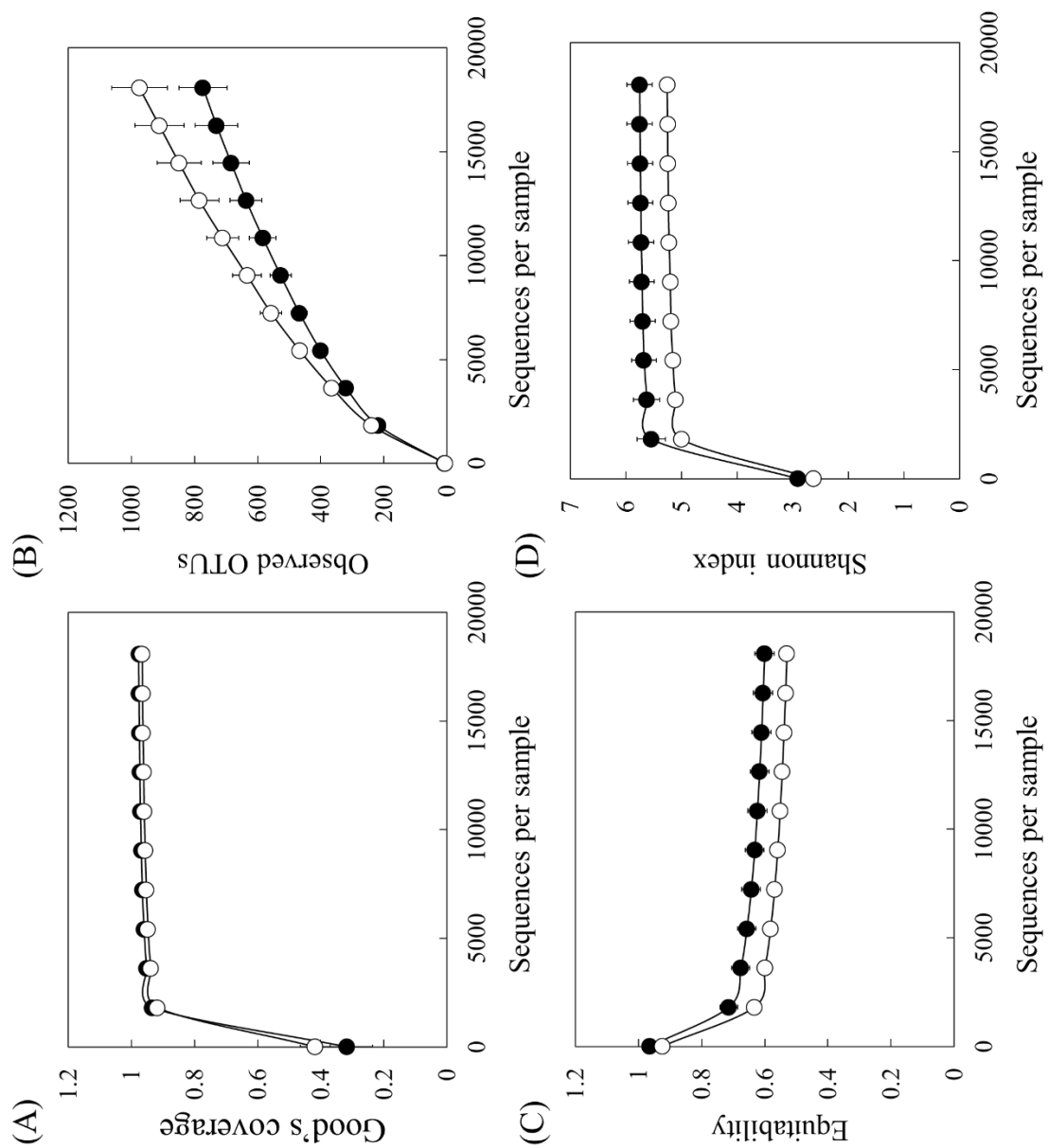


図 3-8 H-DS と L-DS の微生物群集における 97%の類似性を持った OTUs クラスターの Rarefaction curve

パネル (A~D) は, Good's coverage, observed OTUs, equitability, Shannon index をそれぞれ示す。

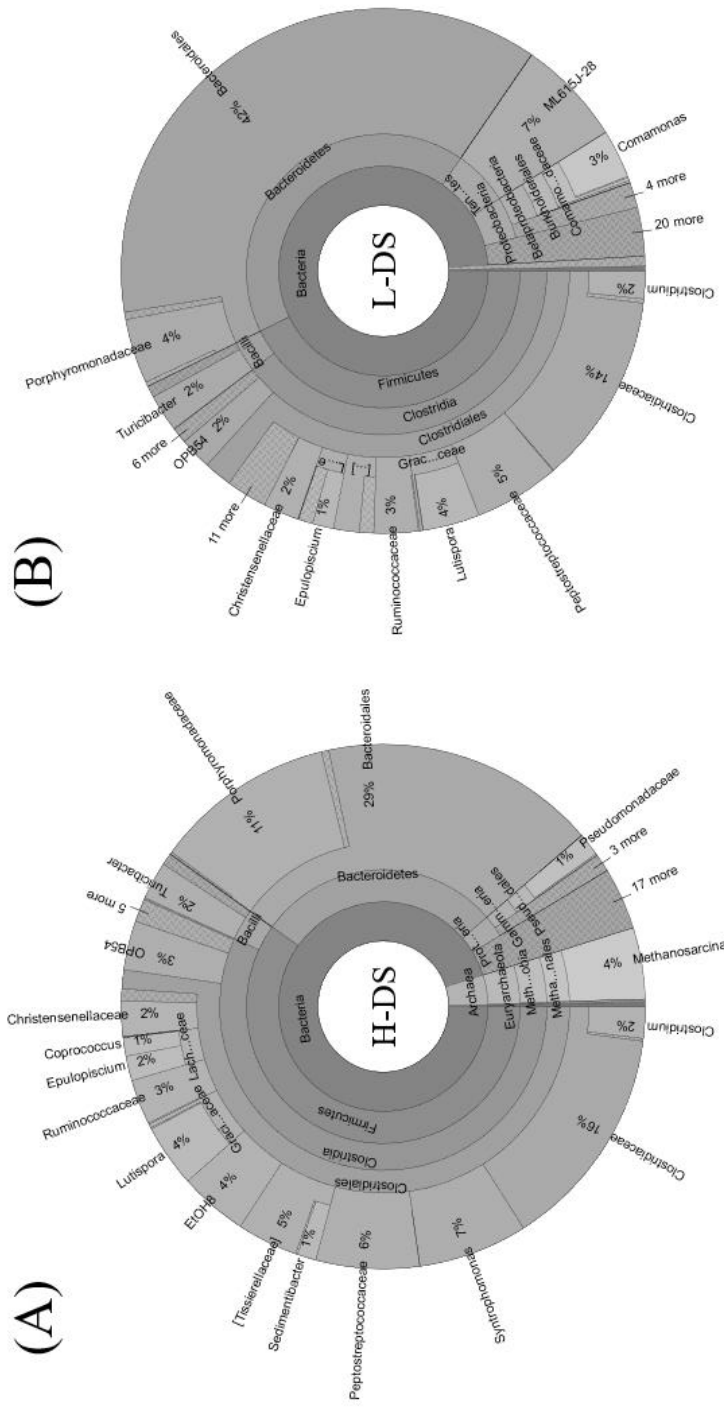


図 3-9 H-DS および L-DS における微生物群集の相対存在比および分類学的説明を示す Krona plot

パネル (A) および (B) は、それぞれ H-DS および L-DS におけるすべての配列の分布を示す。

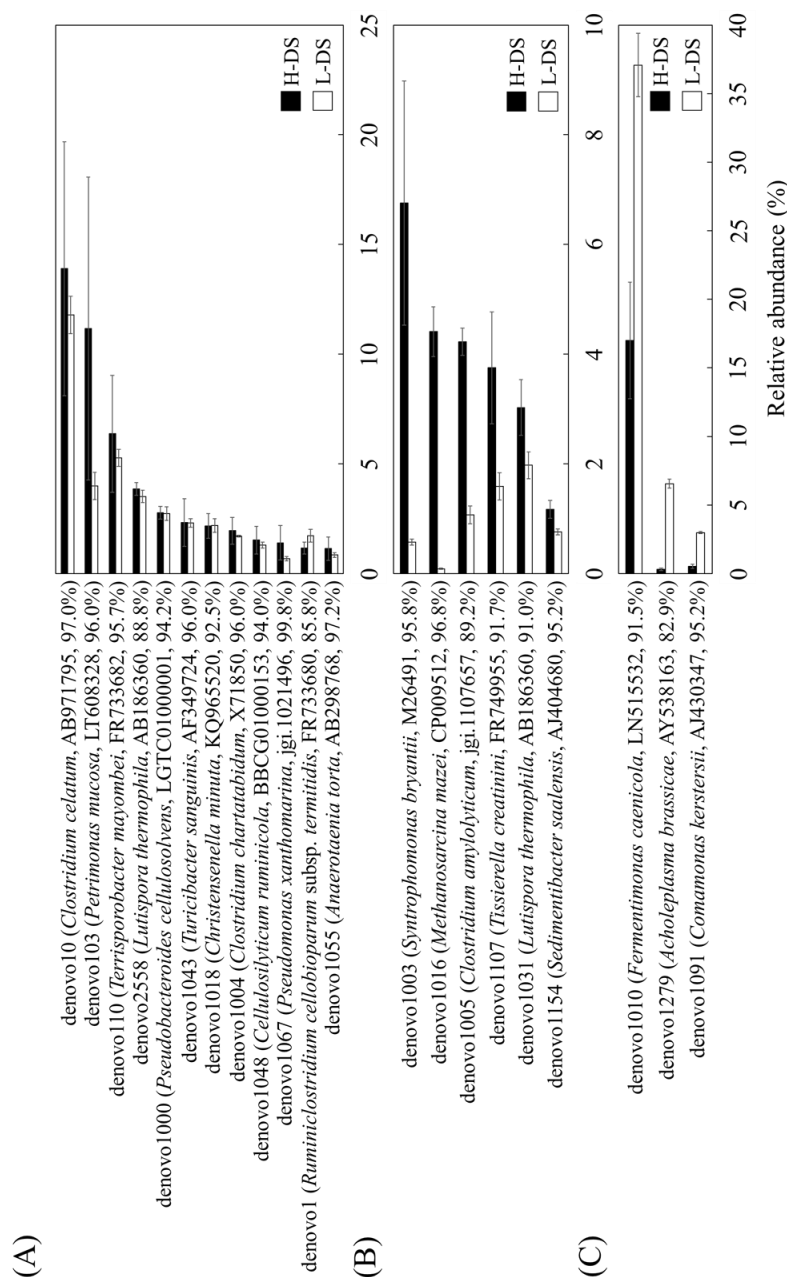


図 3-10 豚糞を基質としたメタン発酵における微生物群集の相対存在比

(A) H-DS と L-DS の相対存在比に有意差のない細菌。(B) L-DS に比べて、H-DS において有意に高い相対存在比を有する細菌および古細菌。(C) H-DS に比べて、L-DS において有意に高い相対存在比を有する細菌。H-DS および L-DS の両方において 1%を超える相対存在比を有する微生物がすべてのパネルに示されている。H-DS と L-DS の相対存在比の差は、 $t$  検定 ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) を用いて分析した。エラーバーは標準誤差を示す。

#### 第4節 考察

本研究では、6ヶ所のメタン発酵施設から種汚泥サンプルを獲得し、豚糞上澄み培地を用いてメタン生成ポテンシャルを評価した。シリンジを使用した移送によって、消化液を次の培地に容易に継代培養できた。その結果、メタン生成ポテンシャルが高い消化液と低い消化液が得られ、それぞれ H-DS および L-DS と名付けられた (図 3-2)。H-DS の高いメタン生成ポテンシャルは、実際のメタン発酵施設に似た状況の生豚糞培地を用いた時でさえも観測された (図 3-3)。H-DS と L-DS の共接種時のメタン生成量は、H-DS のみの接種時とほぼ同じであった (図 3-2)。これは、L-DS の低いメタン生成ポテンシャルが、メタン発酵を阻害する能力を持つ微生物によるものではないことを示している。本研究では、H-DS と L-DS の微生物群集間の多様性指数と相対存在比の違いを 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析によりさらに調査した。加えて、この分析で得られた特徴的な微生物が消化液中の VFA と酢酸に及ぼす影響についてもここで説明する。

H-DS における微生物群の多様性指数 (Shannon index) は、L-DS のそれよりも高かった (図 3-8D)。これは、L-DS における *Bacteroidales* 目の相対存在比が特に高い (37%) ことによるものだと考えられる (図 3-9)。したがって、L-DS における微生物群集の *equitability* は、H-DS におけるそれよりも有意に低かった (図 3-8C)。多様な微生物がメタン発酵プロセスのさまざまな段階に関与しているため、多様性指数の高い消化液は高いメタン生成ポテンシャルを示すことが合理的である。私の考えは、以前の研究報告の結果と一致していた [30,



31, 63]。加えて、Ozらによって述べられたように、ほとんどの研究で嫌気性リアクターにおいて微生物多様性の重要性を過小評価している [44]。

H-DS と L-DS 間の相対存在比に有意差のない微生物はすべて、細菌であることがわかった (図 3-10A)。これらの細菌に関連するものは、プロピオン酸、*n*-酪酸、イソ酪酸、または酢酸の生産に関与している [6, 8, 20, 21, 22, 26, 41, 46, 55, 59, 66]。例えば、*Clostridium* は *n*-酪酸や酢酸を生産することが報告されている [46]。*Petrimonas* は酢酸を生成することが報告されており [21]、*Terrisporobacter* はプロピオン酸、イソ酪酸、酢酸を生産することが報告されている [20]。これらの細菌の高い相対存在比は、豚糞のメタン発酵においても報告されている [39]。それゆえに、H-DS と L-DS におけるプロピオン酸の蓄積 (図 3-5) と L-DS における培養前のレベル (豚糞上澄み培地) に比べてイソ酪酸と酢酸が蓄積していること (図 3-5C, D) は、それらの微生物が原因であるかもしれない。L-DS に比べて H-DS のプロピオン酸の増加 (図 3-5A)、H-DS における *n*-酪酸とイソ酪酸の欠如 (図 3-5B, C)、H-DS における培養前 (豚糞上澄み培地) に比べて酢酸の減少していること (図 3-5D) は、L-DS に比べて H-DS における有意に高い相対存在比をもつ微生物群集の活動が原因であるかもしれない。同様に、L-DS における *n*-酪酸の未検出 (図 3-5B) は、H-DS に比べて L-DS における有意に高い相対存在比をもつ微生物群集の活動が原因であるかもしれない。H-DS と L-DS におけるそれぞれの微生物がプロピオン酸、*n*-酪酸、イソ酪酸、酢酸に与える影響については、以下に述べられた。

L-DS よりも H-DS において有意に高い相対存在比を持つ 6 つの異なる微生物を、図 3-10B に示した。それらのうち、最も豊富な微生物は *Syntrophomonas* 属細菌 (denovo1003) であった。H-DS における *Syntrophomonas* 属細菌の相対存在比は、L-DS のそれよりも 11.7 倍高かった。*Syntrophomonas* 属細菌はプロピオン酸を生産すると報告されている [52]。したがって、L-DS のレベルに比べて H-DS におけるプロピオン酸が増加した (図 3-5A) のは、H-DS における *Syntrophomonas* 属細菌が原因であるかもしれない。*Syntrophomonas* 属細菌は、嫌気性および中温条件下 (30°C~40°C) で水素資化性のメタン生成古細菌と共存する場合にのみ、基質として *n*-酪酸とイソ酪酸を利用して水素と酢酸を生成できる [52, 68]。酢酸を利用するメタン生成古細菌による酢酸のさらなる利用は、酪酸の分解を促進する [3]。2 番目に高い相対存在比を持つ微生物は *Methanosarcina* (denovo1016) であった。H-DS における *Methanosarcina* の相対存在比は、L-DS のそれよりも 49.0 倍高かった。*Methanosarcina* は中温条件下 (30°C~40°C) で水素や酢酸を利用するメタン生成古細菌であることが知られている [5]。したがって、H-DS の高いメタン生成ポテンシャルや H-DS における *n*-酪酸やイソ酪酸の欠如 (図 3-5B, C), L-DS に比べて H-DS における酢酸の減少 (図 3-5D) は、*Syntrophomonas* 属細菌と *Methanosarcina* の共存が原因である可能性がある。さらに、*Clostridium* 属細菌, *Tissierella* 属細菌, *Lutispora* 属細菌, *Sedimentibacter* 属細菌 (denovo1005, denovo1107, denovo1031, denovo1154) が豊富であった。H-DS におけるこれらの微生物の相対存在比は、L-DS のそれよりも、それぞれ、3.95 倍, 2.36 倍, 1.54 倍, 1.54 倍高かつ

た。これらの細菌は酢酸生成に関連し [35, 52, 53, 55], これらの細菌が *Syntrophomonas* 属細菌の生育と同様に *Methanosarcina* の生育もサポートしていることを示している。

H-DS よりも L-DS において有意に高い相対存在比を持つ 3 つの異なる微生物を、図 3-10C に示した。それらの全ては細菌であり、*Fermentimonas* 属細菌 (denovo1010) が最も優占していた。L-DS における *Fermentimonas* 属細菌の相対存在比は、H-DS のそれよりも 2.18 倍多かった。*Fermentimonas* 属細菌は豚糞を用いた中温性実験室の規模の完全攪拌タンクリアクターから分離され、酢酸、少量のプロピオン酸、微量の水素を生産することが報告されている [23]。2 番目に高い相対存在比を持つ微生物は *Acholeplasma* 属細菌 (denovo1279) であった。L-DS における *Acholeplasma* 属細菌の相対存在比は、H-DS のそれよりも 21.1 倍高かった。*Acholeplasma* 属細菌は基質の一つとして豚糞を含む嫌気性で中温性実験室規模のバイオガス発酵槽から分離され、酢酸を生成することが報告された [12]。したがって、*Acholeplasma* 属細菌はメタン発酵の酢酸生成ステップにかかわっていることが考えられる。3 番目に高い相対存在比を持つ微生物は *Comamonas* 属細菌 (denovo1091) であった。L-DS における *Comamonas* 属細菌の相対存在比は、H-DS のそれよりも 5.62 倍高かった。*Comamonas* 属細菌は嫌気性発酵槽から分離され [45, 67], プロピオン酸, *n*-酪酸, 酢酸を利用すると報告されている [42, 67]。したがって、L-DS における *n*-酪酸の欠如 (図 3-5B) は、L-DS における *Comamonas* 属細菌が原因であるかもしれない。上述したように、L-DS における古細菌の相対存在比が極端に低かったのは ( $0.62 \pm$

0.25%) (図 3-9), L-DS のメタン生成ポテンシャルが H-DS のメタン生成ポテンシャルよりも低い理由も説明する (図 3-2)。L-DS において, 水素資化性のメタン生成古細菌が原因であるだろう, 一日あたりのメタン生成量が明らかに観察された (図 3-2)。しかしながら, 驚くべきことに, L-DS における COD 濃度は, 培養 0 日目のそれに比べて, このメタン発酵による有意な変化はなかった (図 3-4)。この COD 除去の失敗は, 酢酸を利用しているメタン生成ステップが極端に遅いことが原因であると考えられる (図 3-5D)。

本研究では, L-DS のような低いメタン生成ポテンシャルを示す消化液に比べて, H-DS のような高いメタン生成ポテンシャルを示す消化液には, 酢酸生成に関連する細菌として *Syntrophomonas* 属細菌, *Clostridium* 属細菌, *Tissierella* 属細菌, *Lutispora* 属細菌, *Sedimentibacter* 属細菌, また, 酢酸利用に関連する古細菌として *Methanosarcina* 属の相対存在比が高く示された。このように, 本研究では, 高いメタン生成ポテンシャルを達成するためには, メタン発酵を促進させる微生物群集を示す種汚泥を選択することが重要であることを明らかにした。また, 継代培養を円滑にするために豚糞上澄み培地を用いたバッチメタン発酵を行ったが, 多くのメタン発酵施設では連続式リアクターシステムが用いられている [50]。将来においては, そのような状況下で H-DS を用いて生豚糞のメタン発酵を行う必要があるだろう。

# 第4章

## メタン発酵消化液の保存性

## 第1節 目的

第3章で獲得した高いメタン生成ポテンシャルを示す「H-DS」を現場のメタン発酵施設で利用する場合、高いメタン生成ポテンシャルを維持させて保存しておく必要がある。これまで、消化液の保存方法としてグリセロールストックが一般的であった [18, 36, 86]。これは、一般的に微生物を長期に保存する場合は、凍結による細胞構造の損傷を防ぐために、グリセロールを添加するからである。しかし、現場のメタン発酵施設においてこの作業を行うためには、嫌気的な作業が可能なグローブボックスやインキュベーターを備える実験室規模の施設を設置する必要がある。そこで、現場での作業に適した高いメタン発酵ポテンシャルを維持する消化液の最適な保存方法について検討する必要がある。私が知る限りでは、こうした研究について報告した例は無い。そこで、本研究では、異なる保存方法で保存させた消化液を用いてメタン発酵を行った場合の最適な保存方法について調査した。

## 第 2 節 材料と方法

### 4-2-1 豚糞培地

本研究で使用した培地は豚糞を使用し、調整方法は、上述した「3-2-2 豚糞培地」に記載した豚糞上澄み培地と同様の方法で行った。豚糞培地は、実験に使用するまで 4°C で保存した。

### 4-2-2 メタン発酵消化液

メタン発酵の種汚泥として使用した消化液は、第 3 章で獲得した、高いメタン生成ポテンシャルを示す消化液（以下、H-DS）を使用した。

### 4-2-3 メタン発酵消化液の保存方法

H-DS は、以下の 3 種類の的方法（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）を用いて保存した。各保存方法の条件は以下に記述した。

1 連で継代培養を行っていた 100 ml の H-DS から、シリンジを用いて、約 5 ml 採取した。この 5 ml の H-DS を 15 ml の遠心管に移し、1 ml の滅菌蒸留水を添加して「冷蔵保存」消化液とした。また、滅菌蒸留水の代わりにグリセリン濃度が 17%になるように、約 1 ml（約 1.26 g）のグリセリンを添加して「グリセロール入り冷凍保存」消化液とした。6 ml のこれら 2 種類の保存方法を用いた消化液は、蓋を閉めてそれぞれ約 10 秒間のボルテックス（試験管ミキサー、NS-80、株式会社井内盛栄堂）を行った。上述した作業は 4 連で行い、使用するまで -80°C で 90 日間保存した。「冷蔵保存」消化液と同様な方法

で、5 ml の H-DS と 1 ml の滅菌純水を 15 ml の遠心管に移し、「冷蔵保存」消化液とした。6 ml のこの保存方法を用いた消化液は、蓋を閉めて約 10 秒間のボルテックス（試験管ミキサー、NS-80、株式会社井内盛栄堂）を行った。上述した作業は 4 連で行い、使用するまで 4°C で 90 日間保存した。

上述した 3 種類の保存方法に対して、以下の 2 種類の対照区（長期培養、10 日植え継ぎ培養）を用いた。これらの対照区は、上述した 3 種類の保存方法のように、低温で保存させた消化液とのメタン生成ポテンシャルの違いを調査するために用意した。125 ml のボトルに 95 ml の豚糞上澄み培地を添加し、ブチルゴム栓とアルミキャップを用いて密閉した。1 連で継代培養を行い続けていた 100 ml の H-DS から、シリンジを用いて、約 5 ml 採取し、このボトルに接種した。これを「長期培養」消化液とした。メタン発酵は、4 連で 37°C で 90 日間行った。上述したボトルの振とうと換気も、この培養中に行われた。上述の「長期培養」消化液と同様な方法で、豚糞上澄み培地と H-DS を混合し、これを「10 日植え継ぎ培養」消化液とした。メタン発酵は、4 連で 37°C で 10 日間行い、10 日目に 5 ml の消化液を 95 ml の新鮮な豚糞上澄み培地に継代させた。この継代培養は 9 回（10 日ごとに継代させ 90 日間）行った。上述したボトルの振とうと換気も、この培養中に行われた。

#### 4-2-4 メタン発酵

上述した 3 種類の保存方法と 2 種類の対照区を用いた H-DS に対して、3 回のメタン発酵を行った。以下に、3 回のメタン発酵の手順を示した。1 回目の



メタン発酵は、3種類の保存方法と2種類の対照区を用いて90日間保存していたH-DSのメタン発酵の立ち上がりを調査した。15 mlの遠心管を用いて保存した3種類の保存方法（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）、125 mlのボトルを用いて培養した2種類の対照区（長期培養、10日植え継ぎ培養）を、それぞれ室温に戻した。125 mlのボトルに94 mlの豚糞上澄み培地を添加し、シリンジを用いて3種類の保存方法（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）を用いた6 mlのH-DSをそれぞれ接種した。また、125 mlのボトルに94 mlの豚糞上澄み培地を添加し、シリンジを用いて2種類の対照区（長期培養、10日植え継ぎ培養）を用いた5 mlのH-DS、1 mlの滅菌純水をそれぞれ接種した。これらのメタン発酵は、Tukey's検定による統計解析を可能にするために、4回繰り返し、37°Cで10日間行われた。2回目のメタン発酵は、1回目の消化液を継代培養させた場合のメタン生成曲線の挙動を調査した。5種類の消化液を用いて10日間のメタン発酵を行った1回目の消化液から、シリンジを用いてそれぞれ5 mlずつ採取した。これらの5 mlの消化液を、125 mlのボトルに95 mlの新鮮な豚糞上澄み培地を添加したボトルに、シリンジを用いてそれぞれ接種した ( $n=4$ )。また、メタン発酵は37°Cで行い、「グリセロール入り冷凍保存」を除く全ての保存方法を用いたメタン生成曲線が定常期に達する10日目まで行った。「グリセロール入り冷凍保存」を用いたメタン発酵は、メタン生成曲線が定常期に達する35日目まで行った。3回目のメタン発酵は、2回目のメタン発酵で有意に低いメタン生成ポテンシャルを示した「グリセロール入り冷凍保存」用消化液と、1連で継代培養を行って

た、H-DS を混合した場合のメタン生成曲線の挙動を調査した。2 回目の消化液から、シリンジを用いて 5 ml の「グリセロール入り冷凍保存」の消化液を採取した。また、1 連で 10 日ごとに植え継ぎ続けていた H-DS のボトルから、5 ml 採取した。これらの消化液を、125 ml のボトルに 95 ml の新鮮な豚糞上澄み培地を添加したボトルに、シリンジを用いてそれぞれ接種した ( $n=4$ )。これらのメタン発酵は 37°C で行い、全てのメタン生成曲線が定常期に達する 14 日目まで行った。

#### 4-2-5 メタン生成の測定

メタン発酵の気相 (25 ml) におけるメタン生成量は、GW-100 カラム (GL Science) と熱伝導度型検出器 (TCD) を装着したガスクロマトグラフィー (GC-8A ; 島津製作所株式会社) を用いて測定された。インジェクション、カラム、検出器の温度は、全て 50°C に設定した。キャリアガスはヘリウムで、圧力は  $1.0 \text{ kg/cm}^2$  (98.0 kPa) に設定した。

#### 4-2-6 溶存酸素量の測定

上述した「グリセロール入り冷凍保存」消化液は、グリセリンの高い粘性によってボルテックス時に酸素を多く含むため、消化液中の嫌気性微生物の働きを阻害する可能性が示唆される。そこで、これを検証するために、1 ml のグリセリンの代わりに 1 ml の滅菌純水を添加した「グリセロール入り冷凍保存」消化液とともに、作成直後と -80°C で保存した 24 時間後、48 時間後の溶存酸素量

(以下, DO 値) をそれぞれ測定した ( $n = 4$ )。DO 値は, 光学式溶存酸素計 (SG9-ELK ; Mettler Toledo 株式会社, 東京, 日本) を用いて測定した。

### 第3節 結果

#### 4-3-1 1回目のメタン発酵

3種類の保存方法と2種類の対照区で保存させた消化液を用いて行ったメタン発酵は、培養10日目に定常期に達した。この時のメタン生成量の平均及び標準誤差は、それぞれ、 $846 \pm 12 \mu\text{mol}$ 、 $13 \pm 11 \mu\text{mol}$ 、 $901 \pm 4 \mu\text{mol}$ 、 $820 \pm 4 \mu\text{mol}$ 、 $867 \pm 4 \mu\text{mol}$ で、冷蔵保存は、他の4つの保存方法に比べて有意に高かった (Tukey's test,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ) (図4-1)。対照的に、「グリセロール入り冷凍保存」は、他の4つに比べて有意に低かった (Tukey's test,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ) (図4-1)。

#### 4-3-2 2回目のメタン発酵

5種類の消化液を用いた1回目のメタン発酵において、10日目の消化液をそれぞれ採取し、新鮮な豚糞上澄み培地に継代培養させるとき、「グリセロール入り冷凍保存」を除いた4種類（冷凍保存、冷蔵保存、長期培養、10日植え継ぎ培養）の消化液を用いたメタン発酵は、培養10日目に定常期に達した。この時のメタン生成量（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存、長期培養、10日植え継ぎ培養）の平均及び標準誤差は、それぞれ、 $826 \pm 2 \mu\text{mol}$ 、 $57 \pm 36 \mu\text{mol}$ 、 $856 \pm 7 \mu\text{mol}$ 、 $867 \pm 13 \mu\text{mol}$ 、 $834 \pm 9 \mu\text{mol}$ で、「グリセロール入り冷凍保存」のメタン生成量は、他の4つに比べて有意に低かった (Tukey's test,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ) (図4-2)。また、「グリセロール入り冷凍保存」消化液を用いたメタン発酵は7日目にメタン発酵が立ち上がり始め、35日目に定常期に達し

た。この時のメタン生成量の、平均及び標準誤差は、 $572 \pm 100 \mu\text{mol}$ であった ( $n = 4$ ) (図 4-2)。

#### 4-3-3 3回目のメタン発酵

35日目に定常期に達した「グリセロール入り冷凍保存」由来の消化液と1連で継代培養を行っていた H-DS を、新鮮な豚糞上澄み培地に継代培養させるとき、このメタン生成量の平均及び標準誤差は、それぞれ  $393 \pm 19 \mu\text{mol}$ 、 $802 \pm 5 \mu\text{mol}$ であった ( $n = 4$ ) (図 4-3)。また、「グリセロール入り冷凍保存」由来の消化液のメタン生成ポテンシャルは、継代培養を行うごとに高くなる傾向を示した。しかしながら、高いメタン生成ポテンシャルを維持した H-DS と同等のメタン生成ポテンシャルまでに回復するためには、多くの時間を要することも示唆された。

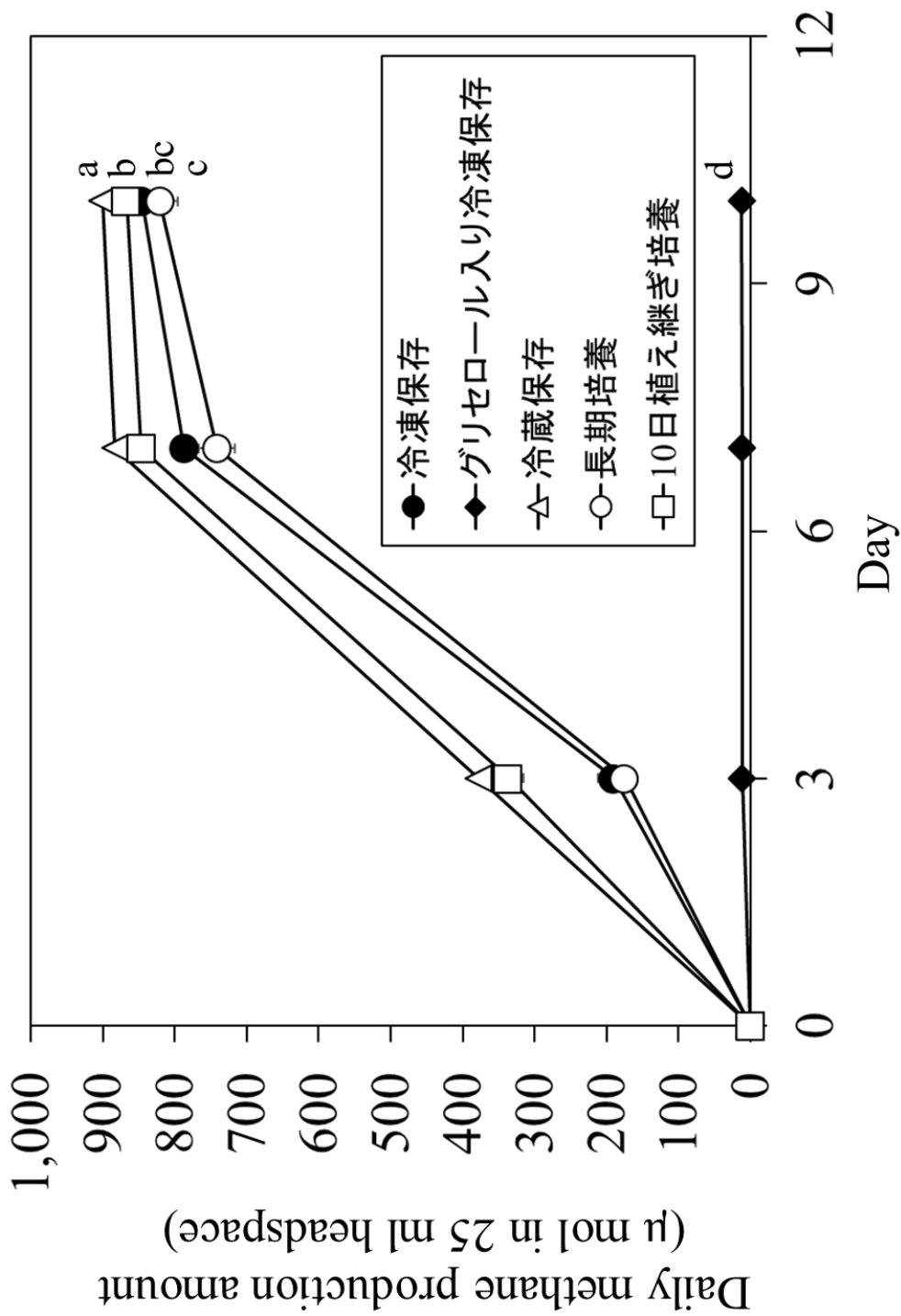


図 4-1 5 種類の消化液を用いた 1 回目のメタン生成曲線  
 エラーバーは標準誤差を示す (n=4)。異なるアルファベットは、10 日目のメタン生成量に有意差があることを示す (n=4, P<0.05)。

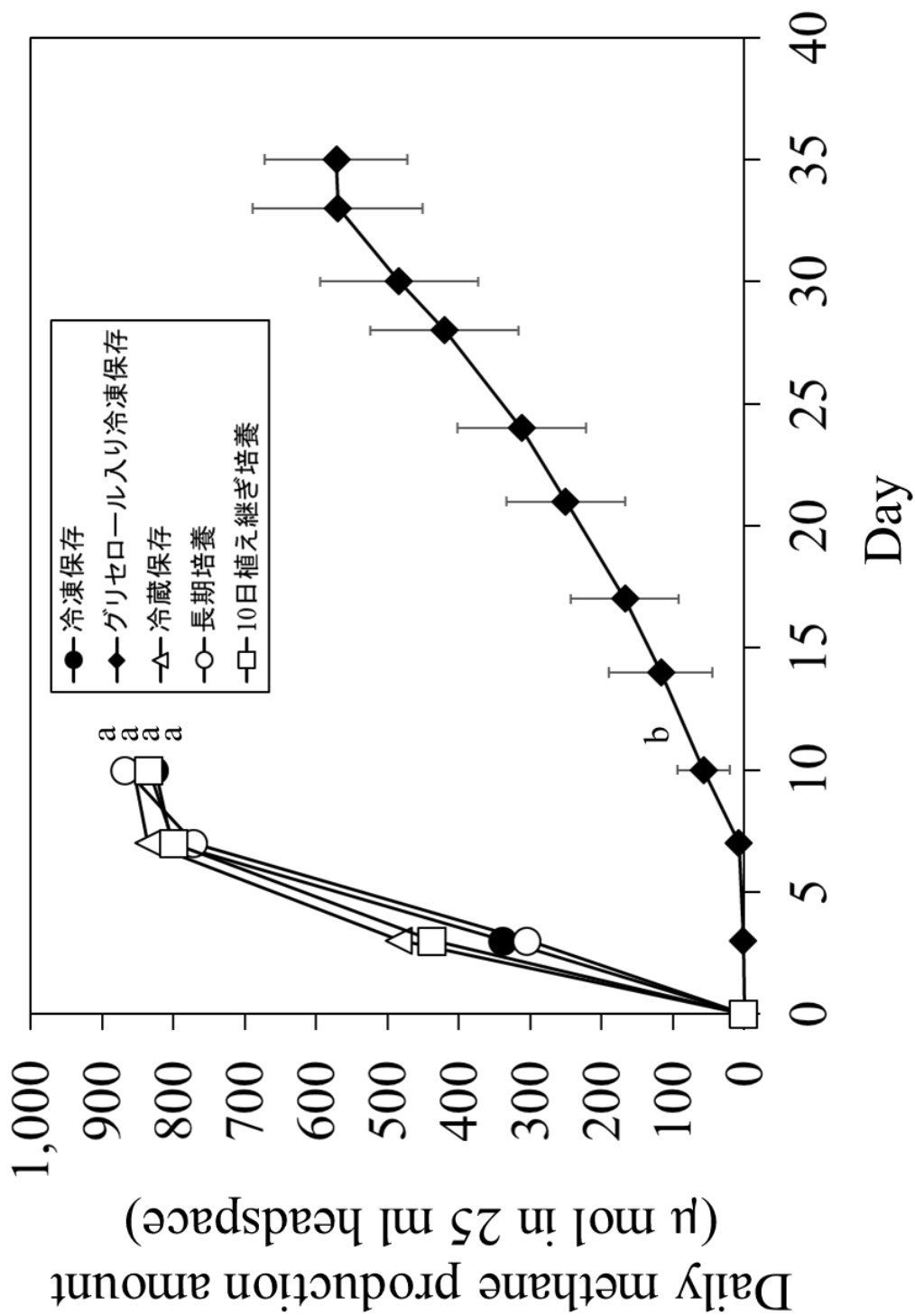


図 4-2 5 種類の消化液を用いた 2 回目のメタン生成曲線  
 エラーバーは標準誤差を示す (n=4)。異なるアルファベットは、10 日目のメタン生成量に有意差があることを示す (n=4, P<0.05)。

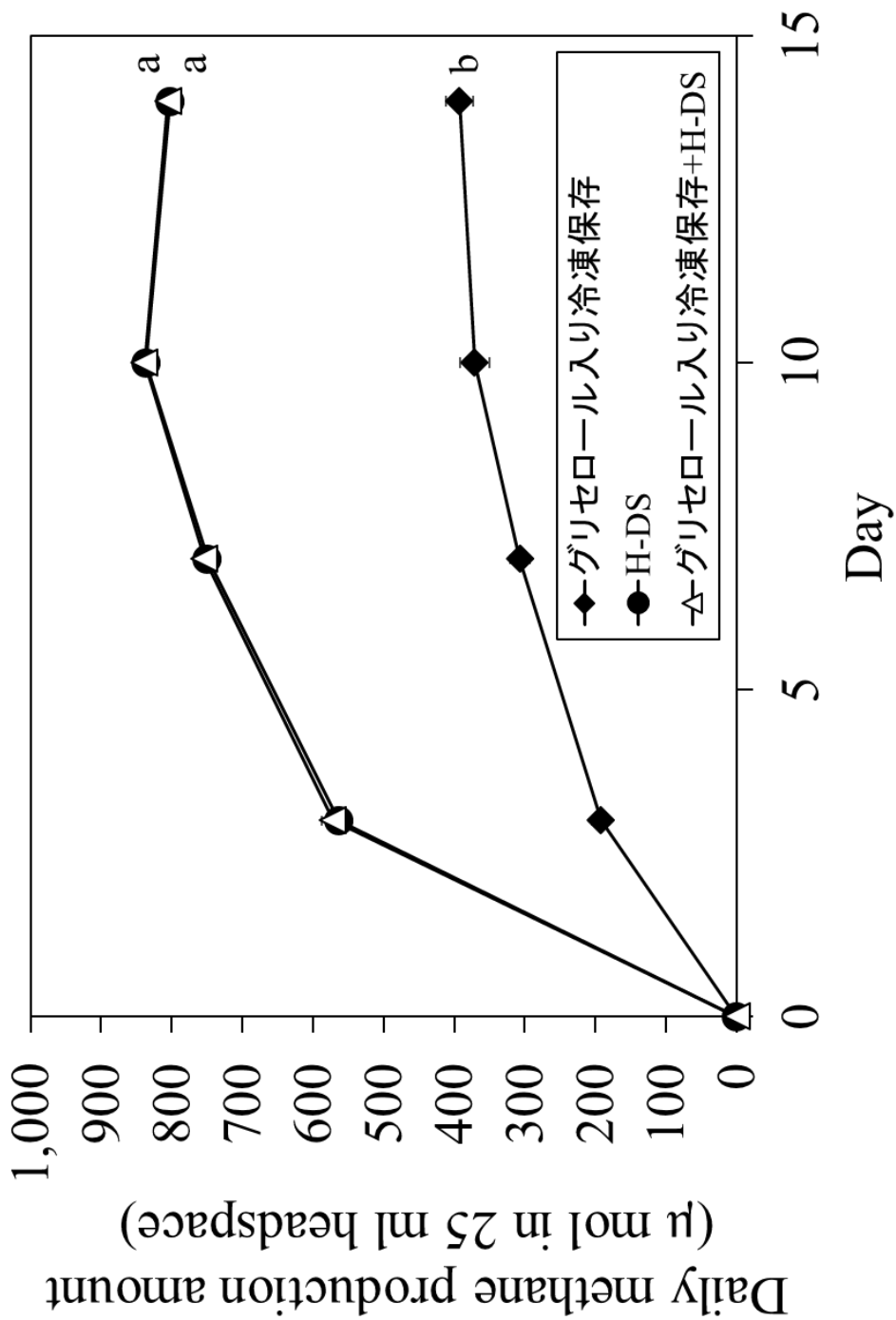


図 4-3 「グリセロール入り冷凍保存」用消化液と H-DS を混合した 3 回目のメタン生成曲線

エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。異なるアルファベットは、10 日目のメタン生成量に有意差があることを示す ( $n=4$ ,  $P<0.05$ )。



#### 4-3-4 溶存酸素量

「冷凍保存」と「グリセロール入り冷凍保存」の作成時の DO 値は、それぞれ  $1.22 \pm 0.55$  mg/l,  $3.14 \pm 0.12$  mg/l であった ( $n=4$ )。また、これらを  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した 24 時間後と 48 時間後の DO 値はそれぞれ,  $3.59 \pm 0.32$  mg/l,  $6.09 \pm 0.3$  mg/l と  $3.20 \pm 0.11$  mg/l,  $5.50 \pm 0.20$  mg/l であった ( $n=4$ )。これは、作成時 (0 時間), 24 時間後, 48 時間後のグリセロール入り冷凍保存の溶存酸素量は、冷凍保存に比べて、それぞれ約 2.57 倍, 1.70 倍, 1.72 倍高かった。

表 4-1 「冷凍保存」と「グリセロール入り冷凍保存」の溶存酸素量

|                  | DO (mg/l)       |                 |                 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  | 0 (h)           | 24 (h)          | 48 (h)          |
| 冷凍保存             | $1.22 \pm 0.55$ | $3.59 \pm 0.32$ | $3.20 \pm 0.11$ |
| グリセロール入り<br>冷凍保存 | $3.14 \pm 0.12$ | $6.09 \pm 0.30$ | $5.50 \pm 0.20$ |

#### 第4節 考察

本研究では、H-DS の高いメタン生成ポテンシャルを維持させて再度メタン発酵の種汚泥として利用するために、3種類の保存方法（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）と2種類の対照区（長期培養、10日植え継ぎ培養）を用いて最適保存方法の検討を行った。

嫌気性条件を維持したままで消化液を保存するためには、脱気処理や窒素充填などの設備を要するので、現場での保存方法には不適である。そこで、本研究における3種類の保存方法（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）は、全て脱気処理や窒素充填を行わなかった。これらの消化液を90日間保存させた後に、種汚泥として用いた時の微生物活性を調査した。この結果、冷凍保存、冷蔵保存の微生物活性は、グリセロール入り冷凍保存に比べて高い微生物活性を示した（図4-1）。つまり、グリセロールを用いた保存方法は、嫌気性細菌を含む消化液の保存方法として適していないことが示唆される。

上述した理由は、「グリセロール入り冷凍保存」において、グリセリンとH-DSを混合させるために行ったボルテックス作業で、酸素が多く混入した可能性が示唆される。一般的にグリセリンは、水に比べて高い粘度を持つ

（[https://www.satake.co.jp/small\\_mixers/sentei/img/nendo.pdf](https://www.satake.co.jp/small_mixers/sentei/img/nendo.pdf)）。また、温度や濃度によって、様々な粘度になることも報告されている [51]。本研究における「グリセロール入り冷凍保存」は、グリセリン濃度17%で保存した。室温20°Cの水の粘度が1.005 cPである場合、グリセリン濃度17%の「グリセロール入り冷凍保存」の粘度は約1.5 cPと計算できる [51]。このように、高い粘度を持つグ

リセリンをボルテックスした場合、酸素を含む気泡を多く含んだ可能性が示唆される。それゆえに、酸素に接触したメタン生成古細菌のほとんどが死滅したことが原因で、「グリセロール入り冷凍保存」のメタン生成ポテンシャルが低かったと考えられる。この推察を明らかにするために「冷凍保存」と「グリセロール入り冷凍保存」の溶存酸素量を測定した結果、「冷凍保存」における作成時（0時間）のDO値に比べて、「グリセロール入り冷凍保存」が高い値を示した（表4-1）。また、作成時（0時間）における「冷凍保存」と「グリセロール入り冷凍保存」に比べて、24時間後と48時間後のDO値がどちらも高い値を示した（表4-1）。これは、酸素のような低分子物質において、気体が固体や液体に比べて、他の分子と結合しない性質にある。すなわち、気体分子は、低温度で凝縮（液体や固体になる）することによって水に溶解する [76]。そのため、「冷凍保存」、「グリセロール入り冷凍保存」ともに24時間後と48時間後の溶存酸素量が増加したと考えられる。高いメタン生成ポテンシャルを示す消化液を保存する場合においては、「グリセロール入り冷凍保存」のように消化液中のメタン生成古細菌が酸素と多く接触する保存方法は適していないと考えられる。

本研究は、H-DSの高いメタン生成ポテンシャルを維持したままで最適に保存するための方法について調査した。この結果、嫌気性条件下で保存していない冷凍保存や冷蔵保存においても、嫌気性条件下の長期培養や10日植え継ぎ培養と同様に高いメタン生成ポテンシャルを維持できること、また、酸素に接

触する状況下でのグリセロール入り冷凍保存は、嫌気性微生物含む消化液の保存方法として不適であることがわかった。

# 第 5 章

## 総括

本研究は、鹿児島県の社会問題である豚糞の処理について、化学肥料の代替となる環境負荷低減の手法の一つであり、かつ化石燃料の代替となる再生可能エネルギー獲得手法の一つでもある、メタン発酵法を用いた。本研究では、第2章において、メタン発酵後の発酵残渣である消化液の安全性について考察した。第3章では、高効率にメタン発酵を行うための種汚泥の選択について考察した。第4章では、高効率の消化液を実際のメタン発酵現場に利用するため消化液の保存方法について考察した。

第2章では、メタン発酵活性の違いによる病原性細菌（本研究では *Salmonella enterica* を使用）の消長について調査した。メタン発酵立ち上げ時に排出される消化液は、メタン発酵の活性が弱いため、十分な発酵が行われないことがある。十分な発酵が行われていない消化液は病原性細菌が多く残っているため、肥料として利用する場合、安全性が懸念される。そこで、本実験では、高い活性の消化液と低い活性の消化液を比較した時の *Salmonella enterica* の消長について調査した。この時、メタン生成量が多い区において、*Salmonella enterica* の菌濃度の減少と正の相関を持つことを示した。この結果、安全な消化液を作成するためには、高いメタン発酵活性を持つ種汚泥を用いたメタン発酵を行う必要があると言えるだろう。

第3章では、異なるメタン発酵施設から集めた6種類の消化液を用いて、最も高いメタン生成ポテンシャルを持つ消化液（H-DS）と最も低いメタン生成ポテンシャルを持つ消化液（L-DS）を獲得した。そこで、これらのメタン生成ポテンシャルの違いを明らかにするために、それぞれの消化液中の微生物群集の

16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った。この結果、H-DS には、酢酸生成細菌および酢酸資化性のメタン生成古細菌の相対存在比が高く検出された。したがって、現場のメタン発酵施設においてメタン発酵を円滑に稼働させるためには、メタン発酵を促進させる微生物群集を示す種汚泥を用いることが重要であることがわかった。

第4章では、第3章で獲得した H-DS を現場のメタン発酵施設で利用するために、消化液の適切な保存方法について調査した。保存方法には3種類（冷凍保存、グリセロール入り冷凍保存、冷蔵保存）を用いた。この結果、嫌気性を維持していなくても、冷凍保存と冷蔵保存において高いメタン生成ポテンシャルを示したことで、グリセロールを用いた凍結保存は嫌気性細菌を含む消化液の保存方法として不適だということがわかった。

本研究は、「安全な消化液を獲得すること」、「高いメタン生成ポテンシャルを持つ消化液を獲得すること」、「高いメタン発酵ポテンシャルを示す消化液を最適に保存すること」を目的とした。この結果、高いメタン発酵ポテンシャルを示す消化液中にはメタン発酵を促進する微生物が多く存在し、その高いメタン生成ポテンシャルが消化液の安全性に寄与していることが明らかとなった。また、これらの嫌気性微生物を含む消化液は、グリセロールストックを用いた保存方法には適しておらず、嫌気性を維持せずに保存した冷凍保存や冷蔵保存でも十分に高いメタン生成ポテンシャルを示した。このことから、本研究で得られた結果は現場のメタン発酵槽で用いる消化液を選択する上で有用な情報となるだろう。そこで、今後、本研究の結果が現場のメタン発酵施設でも利用可

能か確かめるに、多くの現場のメタン発酵施設で利用されているような生豚糞を用いた連続式リアクターでこれを検証する必要があるだろう。



## 謝辞

本研究を進行するにあたり、ご多忙にも関わらず、有益な助言や御指導頂いたほか、研究に従事できるよう、数々のお力添えを頂いた石橋松二郎教授、田中宗浩教授、平良英三教授、紙谷喜則准教授、濱中大介准教授、大久津昌治准教授、鶴丸博人助教に深く感謝いたします。石橋松二郎教授、鶴丸博人助教には、博士課程から研究分野を変え、右も左もわからない私に、熱心な研究指導をして頂き、深く感謝いたします。紙谷喜則准教授には、学部時代から公私ともに親身に面倒を見ていただき、大変感謝しております。

有益かつ親身なご助力を頂いた、応用分子微生物学研究室、食料環境システム学研究室のOB・OGの皆様、また充実した研究生活を送るためにご協力頂いた、両研究室の同輩、後輩の皆様にご心から御礼申し上げます。また、私を今日まで支え続けてきて頂いた、家族にも感謝いたします。そして最後に、私に公私ともに関わって頂いた全ての方々に深く感謝致します。

本研究は、これら各位の多大なるご指導、ご協力のもとに進めることができたものであり、ここに改めて感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Abouelenien, F., Y. Namba, M.R. Kosseva, N. Nishio, and Y. Nakashimada. 2014. Enhancement of methane production from co-digestion of chicken manure with agricultural wastes. *Bioresour. Technol.* 159:80-87.
2. Batstone, D.J., J. Keller, I. Angelidaki, S.V. Kalyuzhnyi, S.G. Pavlostathis, A. Rozzi, W.T.M. Sanders, H. Siegrist, and V.A. Vavilin. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* 45:65-73.
3. Beaty, P.S., and McInerney, M.J. 1989. Effects of organic acid anions on the growth and metabolism of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture and in defined consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:977– 983.
4. Bień, J., and D. Nowak. 2014. Biological composition of sewage sludge in the aspect of threats to the natural environment. *Arch. Environ. Prot.* 40 (4):79-86.
5. Boone, D.R., and R.A. Mah. 2015. *Methanosarcina*. In *bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00519.
6. Bosshard, P.P. 2015. *Turicibacter*. In *bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00766.
7. Browne, J.D., and J.D. Murphy. 2013. Assessment of the resource associated with biomethane from food waste. *Appl. Energy.* 104:170-177.
8. Cai, S., and X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola* gen. nov., sp. nov., isolated from the rumen of yak, and reclassification of *Clostridium lentocellum* as *Cellulosilyticum lentocellum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (4):845-

849.

9. Cameron, V., K. Fraile, S. Napp, V. Garrido, M.J. Grillo, and G.L. Migura. 2018. Multidrug resistant *Salmonella enterica* isolated from conventional pig farms using antimicrobial agents in preventative medicine programmes. *The Veterinary Journal*. 234:36-42.
10. Caporaso, J.G., J. Kuczynski, and J. Stombaugh, *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7:335-336.
11. Cerrillo, M., M. Viñas, and A. Bonmatí. 2016. Overcoming organic and nitrogen overload in thermophilic anaerobic digestion of pig slurry by coupling a microbial electrolysis cell. *Bioresour. Technol.* 216:362-372.
12. Cibis K.G., A. Gneipel, H. König. 2016. Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *J. Biotechnol.* 220:51–63.
13. Conversano, G., G. Pizzolante, P. Alifano, and L. De Bellis. 2015. Characterization and Enhancement of Microbial Biodiversity in Digestate in the Agronomic Field. *J. Life Sci.* 9:139-151.
14. Edelmann, W. 2003. Products, impacts and economy of anaerobic digestion of OFMSW, p. 265-301. *In* J. Mata-Alvarez (ed.), *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes*. IWA publishing, London.
15. Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
16. Edgar, R.C., B.J. Haas, J.C. Clemente, C. Quince, and R. Knight. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194-2200.
17. Funk, J.A., P.R. Davies, and M.A. Nichols. 2000. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:412-

418.

18. Gaci, N., P.P. Chaudhary, W. Tottey, M. Alric, and J.F. Brugère. 2017. Functional amplification and preservation of human gut microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28:1.
19. Gadre, R.V., D.R. Ranade, and S.H. Godbole. 1986. A note on survival of salmonellas during anaerobic digestion of cattle dung. *J. Appl. Bacteriol.* 60:93-96.
20. Gerritsen, J., S. Fuentes, W. Grievink, L.V. Niftrik, B.J. Tindall, H.M. Timmerman, G.T. Rijkers, and H. Smidt. 2014. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:1600-1616.
21. Grabowski, A., B.J. Tindall, V. Bardin, D. Blanchet, and C. Jeanthon. 2005. *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 (3):1113-1121.
22. Guo, L., X.M. Li, X. Bo, Q. Yang, G.M. Zeng, D.X. Liao, and J.J. Liu. 2008. Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresour. Technol.* 99 (9):3651-3658.
23. Hahnke, S., T. Langer, D.E. Koeck, and M. Klocke. 2016. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:1466-1475.

24. Hashimoto, A.G., R.L. Prior, and Y.R. Chen. 1987. Methane and biomass production system for beef cattle manure, Paper presented at the Great Plains Extension Seminar on Methane Production from Livestock Manure, Liberal, Kansas.
25. Hegde, G., and P. Pullammanappallil. 2010. Comparison of Thermophilic and Mesophilic One-Stage, Batch, High-Solids Anaerobic Digestion. *Environ. Technol.* 219:361-369.
26. Horino, H., T. Fujita, and A. Tonouchi. 2014. Description of *Anaerobacterium chartisolvens* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from *Clostridium* rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvens* Murray et al. 1984 as *Pseudobacteroides cellulosolvens* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:1296-1303.
27. Ikeda, S., K.N. Watanabe, K. Minamisawa, and N. Ytow. 2004. Evaluation of soil DNA from arable land in Japan using a modified direct-extraction method. *Microbes Environ.* 19:301-309.
28. Japan Sewage Works Association. 1997. Japanese Standard Testing Methods for Sewage. Japan Sewage Works Association (in Japanese).
29. Jarrell, K.F., M. Saulnier, A. Ley. 1987. Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge. *Can. J. Microbiol.* 33:551-554.
30. Jiménez J., Y. Guardia-Puebla, O. Romero-Romero, M.E. Cisneros-Ortiz, G. Guerra, J.M. Morgan-Sagastume, A. Noyola. 2014. Methanogenic activity optimization using the response surface methodology, during the anaerobic co-

- digestion of agriculture and industrial wastes. Microbial community diversity. *Biomass Bioenergy*. 71:84–97.
31. Kim E., J. Lee, G. Han, and S. Hwang. 2018. Comprehensive analysis of microbial communities in full-scale mesophilic and thermophilic anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. *Bioresour. Technol.* 259:442-450.
  32. Kristensen, E., S.I. Ahmed, and A.H. Devol. 1995. Aerobic and anaerobic decomposition of organic matter in marine sediment: Which is fastest? *Limnol. Oceanogr.* 40:1430-1437.
  33. Kroeker, E.J., D.D. Schulte, A.B. Sparling, and H.M. Lapp. 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. *J. - Water Pollut. Control Fed.* 51:718-727.
  34. Kwietniewska, E., J. Tys. 2014. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 34:491-500.
  35. Lechner, U. 2015. *Sedimentibacter*. In *bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00718.
  36. Lee, S.M., and J.H. Lee. 2015. Effect of sludge treatment on biogas production from *Saccharina japonica* ethanol fermentation by-products. *J. Ind. Eng. Chem.* 21:711-716.
  37. Li, J., A.K. Jha, and T.R. Bajracharya. 2014. Dry anaerobic co-digestion of cow dung with pig manure for methane production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173 (6):1537-1552.
  38. Magoc, T., and S.L. Salzberg. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27:2957-2963.

39. Meng, X., Y. Zhang, Q. Sui, J. Zhang, R. Wang, D. Yu, Y. Wang. and Y. Wei. 2018. Biochemical conversion and microbial community in response to ternary pH buffer system during anaerobic digestion of swine manure. *Energies*, 11 (11):2991.
40. Möller, K., and T. Müller. 2012. Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: a review. *Eng. Life Sci.* 12 (3):242-257.
41. Morotomi, M., F. Nagai, and Y. Watanabe. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order *Clostridiales*, and proposal of *Christensenellaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (1):144-149.
42. Mumtaz, T., S. Abd-Aziz, P.L. Yee, W.M.Z.W. Yunus, Y. Shirai, and M.A. Hassan. 2010. Synthesis, characterization and structural properties of intracellular copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Comamonas* sp. EB172 from renewable resource. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* 15(6): 329–340.
43. Niu, Q., K. Kubota, W. Qiao, Z. Jing, Y. Zhang, and L. Yu-You. 2015. Effect of ammonia inhibition on microbial community dynamic and process functional resilience in mesophilic methane fermentation of chicken manure. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90:2161-2169.
44. Oz, N.A., O. Ince, G. Turker, and B.K. Ince. 2012. Effect of seed sludge microbial community and activity on the performance of anaerobic reactors during the start-up period. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2):637-647.
45. Peng X., Z. Zhang, W. Luo, X. Jia. 2013. Biodegradation of tetrabromobisphenol a by a novel *Comamonas* sp. strain, JXS-2-02, isolated from anaerobic sludge. *Bioresour. Technol.* 128:173-179.

46. Rainey, F.A., B.J. Hollen, and A.M. Small. 2015. *Clostridium*. In bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00619
47. Ren, J., X. Yuan, J. Li, X. Ma, Y. Zhao, W. Zhu, X. Wang, and Z. Cui. 2014. Performance and microbial community dynamics in a two-phase anaerobic co-digestion system using cassava dregs and pig manure. *Bioresour. Technol.* 155:342-351.
48. Sahlström, L. 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* 87 (2):161-166.
49. Sakalli, A., A. Cescatti, A. Dosio, M.U. Gücel. 2017. Impacts of 2°C global warming on primary production and soil carbon storage capacity at pan-European level. *Climate Services.* 7:64-77.
50. Schulz, H., and B. Eder. 2002. *Biogas Praxis* (Japanese translation edition by Y. Ukita), Ohmsha, Tokyo (in Japanese).
51. Segur, J.B., and H.E. Oberstar. 1951. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 43 (9):2117-2120.
52. Sekiguchi, Y., 2015. *Syntrophomonas*. In bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00682.
53. Shah, H.N., J.V. Hookey. 2015. *Tissierella*. In bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed). doi:10.1002/9781118960608.gbm00721.
54. Shen, P., H. Fei, S. Shuquan, Z. Junya, C. Zhineng, L. Junfang, G. Jiayi, F. Bin, and



- W. Bo. 2014. Using pig manure to promote fermentation of sugarcane molasses alcohol wastewater and its effects on microbial community structure. *Bioresour. Technol.* 155:323-329.
55. Shiratori-Takano, H., and K. Ueda. 2017. *Lutispora*. In *bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. In W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, and S. Dedysh (ed).  
doi:10.1002/9781118960608.gbm01393
56. Takahashi, S., J. Tomita, K. Nishioka, T. Hisada, and M. Nishijima. 2014. Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of *Bacteria* and *Archaea* Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 9 (8):e105592.
57. Takashima, M., K. Shimada, and E. Richard. 2011. Minimum Requirements for Trace Metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in Thermophilic and Mesophilic Methane Fermentation from Glucose. *Water Environ. Res.* 83:339-346.
58. Tang, Yue-Qin., T. Shigematsu, S. Morimura, and K. Kida. 2015. Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors. *J. Biosci. Bioeng.* 119:375-383.
59. Ueki, A., Y. Ohtaki, N. Kaku, and K. Ueki. 2016. Descriptions of *Anaerotaenia torta* gen. nov., sp. nov. and *Anaerocolumna cellulositytica* gen. nov., sp. nov. isolated from a methanogenic reactor of cattle waste and reclassification of *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium jejuense* and *Clostridium xylanovorans* as *Anaerocolumna* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (8):2936-2943.
60. Vrieze, J.D., T. Hennebel, N. Boon, and W. Verstraete. 2012. Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresour. Technol.*

112:1-9.

61. Wang, M., J. Zhou, Y.X. Yuan, Y.M. Dai, D. Li, Z.D. Li, X.F. Liu, X.Y. Zhang, and Z.Y. Yan. 2017. Methane production characteristics and microbial community dynamics of mono-digestion and co-digestion using corn stalk and pig manure. *Int. J. Hydrogen Energy*. 42 (8):4893-4901.
62. Yabe, S., Y. Sakai, K. Abe, and A. Yokota. 2017. Diversity of Ktedonobacteria with Actinomycetes-Like Morphology in Terrestrial Environments. *Microbes Environ.* 32:61-70.
63. Yang Z., W. Wang, Y. He, R. Zhang, and G. Liu. 2018. Effect of ammonia on methane production, methanogenesis pathway, microbial community and reactor performance under mesophilic and thermophilic conditions. *Renew. Energy*. 125:915-925.
64. Yokoyama, M.T., C. Spence, S.M. Hengemuehle, T.R. Whitehead, R. von Bernuth, and M. Cotta. 2016. Sodium Tetraborate Decahydrate Treatment Reduces Hydrogen Sulfide and the Sulfate-Reducing Bacteria Population of Swine Manure. *J. Environ. Qual.* 45 (6):1838-1846.
65. Yoon, S.H., S.M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, and J. Chun. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (5):1613-1617.
66. Yutin, N., and M.Y. Galperin. 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15 (10):2631-2641.
67. Zakaria M.R., S. Abd-Aziz, H. Ariffin, N.A.A. Rahman, and P. Lai. 2008.

- Comamonas sp. EB172 isolated from digester treating palm oil mill effluent as potential polyhydroxyalkanoate (PHA) producer. Afr. J. Biotechnol. 7:4118-4121.
68. Zhao, H., D. Yang, C.R. Woese, and M.P. Bryant. 1993. Assignment of fatty acid- $\beta$ -oxidizing syntrophic bacteria to *Syntrophomonadaceae* fam. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 43 (2):278-286.
69. Zhao, Y., X. Yuan, B. Wen, X. Wang, W. Zhu, and Z. Cui. 2017. Methane potential and microbial community dynamics in anaerobic digestion of silage and dry cornstalks: a substrate exchange study. Appl. Biochem. Biotechnol. 181 (1):91-111.
70. Zhou, J., R. Zhang, F. Liu, X. Yong, X. Wu, T. Zheng, M. Jiang, and H. Jia. 2016a. Biogas production and microbial community shift through neutral pH control during the anaerobic digestion of pig manure. Bioresour. Technol. 217:44-49.
71. Zhou, S., M. Nikolausz, J. Zhang, S. Riya, A. Terada, and M. Hosomi. 2016b. Variation of the microbial community in thermophilic anaerobic digestion of pig manure mixed with different ratios of rice straw. J. Biosci. Bioeng. 122 (3):334-340.
72. 梅津一孝. 1999. バイオガスプラントによる家畜糞尿の有効利用. 北海道草地研究会会報. 33:10-15.
73. 大野真穂, 東城清秀, 前田悠貴他. 2005. 乾式メタン発酵における発酵阻害とモニタリング手法の検討. 廃棄物学会研究発表会講演論文集. 16:509-511.
74. 小川幸正, 藤田正憲, 中川悦光. 2005. ふん尿・食品残渣の中温および高温メタン発酵の性能比較に関する研究. 廃棄物学会論文誌. 16 (1):44-54.
75. 奥野芳男, 李玉友, 佐々木宏, 関廣二, 上垣内郁夫. 2003. 生ごみと汚泥を混合処理する高温高濃度メタン発酵における汚泥比率の影響. 廃棄物学会論

- 文誌. 14 (1):27-35.
76. 国立天文台. 2019. 理科年表 2020. 丸善出版
77. 櫻井邦宜, 李玉友, 野池達也, 2005, 高濃度牛ふん尿の中温メタン発酵特性. 廃棄物学会論文誌. 16 (1):65-73.
78. 関平和, 小森友明. 1983. 堆肥化過程における熱移動. 農業気象. 39 (3):173-179.
79. 田瀬則雄. 2014. 環境中の窒素の流れと地下水の硝酸性窒素汚染. 畜産環境情報. 54:1-14.
80. 田中一裕. 1980. 微生物によるメタン生産. 燃料協会誌. 3:159-163.
81. 田村博, 山本勝也, 高松誠昇. 2008. メタン発酵と排水処理. 東芝レビュー. 63 (5):15-18.
82. 冨田洋三. 2011. 地球温暖化と環境ビジネス. 実践女子大学生生活科学部紀要. 48:75-93.
83. 藤田秀保. 1995. 家畜ふん尿処理の現状と今後を考える. 北海道家畜管理研究会報. 31:125-135.
84. 帆秋利洋, 天石文, 小嶋令一, 羽川富夫, 大原孝彦. 2005. メタン発酵の研究開発の現状と課題. 大成建設技術センター報. 38:24-1-24-4.
85. 宮竹史仁. 2015. 堆肥化施設の苦悩と現場ニーズに対応したシステム開発: System Development Corresponding to the Problem of Composting Facilities. 環境バイオテクノロジー学会誌. 15 (1):9-16
86. 森浩二. 2007. 極限環境微生物の長期保存法: 高度好塩性古細菌, 好熱性好

酸性古細菌, メタン生成古細菌. *Microbiology and Culture Collections: official publication of the Japan Society for Culture Collections*. 日本微生物資源学会誌. 23 (1):17-21.

87. 李玉友, 佐々木宏, 鳥居久倫, 奥野芳男, 関廣二, 上垣内郁夫. 1999. 生ごみの高濃度消化における中温と高温処理の比較. *環境工学研究論文集*. 36:413-421.
88. 李玉友, 水野修, 船石圭介, 山下耕司. 2003. 二相循環方式高濃度メタン発酵プロセスを用いた生ごみの高速メタン化処理. *環境工学研究論文集*. 40:321-332.