

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17906

研究課題名（和文）メタン発酵の有機物負荷変動に対する微生物の応答ならびに適応力の解明

研究課題名（英文）Dynamics and adaptations of the microbiome in methane fermentation in response to organic load shocks

研究代表者

小山 光彦 (Koyama, Mitsuhiko)

東京工業大学・環境・社会理工学院・助教

研究者番号：50794038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、有機物負荷ショックに強いメタン発酵システムの開発を目指して、繰り返される負荷ショックに対するメタン発酵微生物叢の応答と適応の解明を目的とした。複雑な基質に馴化した種菌では、有機物負荷が高くても微生物の多様性は安定でメタン収量への影響も小さいことから、負荷ショックに対するレジリエンスが高まることが明らかとなった。一方、負荷ショックの頻度が低いほど、微生物ネットワーク構造が崩壊し、最終的にメタン生産性が損なわれた。そこで、より高い有機物負荷に馴化させた種菌を接種したところ、負荷ショックを繰り返してもメタン生産性が維持され、微生物ネットワークも安定であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、メタン発酵技術は処理対象が通年定量排出されることから、一定の有機物負荷条件においてプロセスの高効率化やメカニズムの解明が取り組まれてきた。一方で近年増加傾向の「突発的に発生する有機性固形廃棄物」へのメタン発酵の応用が考えられるが、負荷変動がメタン発酵の安定性に及ぼす影響に関する知見は乏しい。本研究は、負荷変動に対するメタン発酵の動態と安定化を初めて明らかにしたものである。変動に強い装置は、すなわち安全係数の低い小型装置を作ることができるようになるため、メタン発酵技術を、供給量の日変動が大きい小規模装置が望まれる過疎地域や船舶、果ては宇宙船などにも導入できるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the response and adaptation of the methane fermentation microbial community to repeated loading shocks to develop a resilient system for methane fermentation to organic loading shocks. It was found that inoculum acclimated to complex substrates showed greater resilience to loading shocks, as microbial diversity was stable and methane yield was less affected, even at high organic loadings. On the other hand, less frequent loading shocks severely disrupted the microbial network structure and ultimately impacted methane productivity. We therefore inoculated the seedlings acclimated to higher organic loadings and found that methane productivity was maintained and the microbial network was stable, even after repeated load shocks.

研究分野：環境生物学

キーワード：メタン発酵 有機物負荷ショック 微生物叢 微生物ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

メタン発酵技術が従来処理対象としてきた下水汚泥や家畜糞、食品工場残渣などの有機性固形廃棄物は、排出量の通年変化が比較的小さいため、当該分野では一定の有機物負荷条件においてプロセスの高効率化やメカニズムの解明が取り組まれてきた。近年、突発的に発生する有機性固形廃棄物が増加傾向にある。これらの有機性廃棄物の多くはメタン発酵の処理対象として適していると考えられるが、突発的に発生する有機性廃棄物をメタン発酵施設で受け入れることは、装置の有機物負荷量が大きく変動することになる。負荷変動がメタン発酵の安定性に及ぼす影響に関する知見は乏しく、突発的に発生する有機性廃棄物の受け入れが実用化しない技術的要因の一つとなっている。

メタン発酵において基質供給が過負荷になると分解中間体である有機酸が蓄積して pH が低下し、メタン発酵が不可逆的に阻害される(=破綻)。一方で、中間体濃度が閾値に達しない程度の高負荷供給であれば、運転時間の経過に伴い中間体蓄積のダメージから徐々に回復すると考えられる。先行研究において、有機物負荷を段階的に増加させることにより、メタン発酵プロセスが高負荷条件に対応可能になり、その過程で微生物の種組成が変化することが知られている [1-2]。その一方で、負荷量が一定ではなく変動する場合の研究事例は非常に少ない。最近の研究では、突発的に負荷量を 1 回増加させる操作において、負荷増加のわずか 2 日後に特定の菌の相対存在度の急激な増加を報告している [3]。これまで、嫌気性微生物を用いるメタン発酵では、微生物の増殖速度が遅いために菌叢の急激な変化は小さいと考えられてきたが、この研究から、負荷変動するメタン発酵においても頻繁な種組成の変化(攪乱や種選択)が起きる可能性があるかと着想した。しかしながら、これらの先行研究からは、微生物叢は突発的な高負荷に対して変化してその後の通常負荷において元の微生物叢に戻るのか、菌叢変化に伴う負荷変動への耐性が変わるのか、といった微生物叢の応答は明らかにされていない。

2. 研究の目的

メタン発酵微生物の負荷変動への応答ならびに適応力を明らかにすることを目的として、バイオインフォマティクスを用いた微生物の種類と機能ポテンシャルの網羅的解析に取り組んだ。突発的な高負荷条件に対する微生物叢の遷移とその可逆/不可逆性、ならびに負荷変動の繰り返しによる微生物叢の負荷変動へのレジリエンス(復元性)を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

メタン発酵における基質負荷変動に対する微生物叢の遷移ならびに負荷変動の繰り返しによる微生物叢の負荷変動への耐性を明らかにするために、負荷変動を与えたメタン発酵装置のプロセス安定性(メタン生成量ならびに有機酸の蓄積量)をモニターするとともに、DNA を抽出し、それぞれ 16S rRNA 菌叢解析、機能予測解析(PICRUSt)を実施した。微生物の種類と機能ポテンシャルの観点から負荷変動がメタン発酵の処理性能に影響を及ぼすメカニズムを解明することにより、負荷変動するメタン発酵に有用な微生物を特定するとともにその高濃度化/高活性化に寄与する操作の推定を試みた。

はじめに、基質の高負荷供給がメタン発酵微生物に短期的に及ぼす影響を明らかにするため、有機物負荷ショックに対する短期的な微生物叢の応答の違いを、種菌を馴化する基質の複雑さの違いで解明することを試みた。異なる有機物負荷量の基質をそれぞれ一度だけ添加する回分実験をおこない、人工基質の添加量(=負荷量)の違いに伴って、バイオガス/中間体の動態(物質収支)、ならびに微生物の種類・能力の変化を詳細に解析することにより、メタン発酵微生物が耐えられる最大の負荷量と、負荷量の増加に伴う微生物の短期的な応答を評価した。

続いて、基質を高負荷で間欠的に繰り返し供給する操作がメタン発酵微生物に及ぼす影響を明らかにするため、基質を 1 日 1 回投入する半回分実験をおこなった。パルス的に高負荷量となる基質を供給し、そのインターバルには通常負荷量を供給し続ける操作を実施した。この実験より、高負荷のダメージから回復する速さならびに微生物叢が、負荷ショックの頻度の違いによって中長期的にどのように変化して対応するかを評価した。

4. 研究成果

有機物負荷ショックに対する短期的なメタン発酵微生物叢の応答が、種菌に使用する馴化基質の複雑さによって大きく異なった。単純な基質に馴化した種菌では、有機物負荷量の増加とともに微生物多様性が低下し、それに伴いメタン収量も減少した。一方、複雑な基質に馴化した種菌では、有機物負荷が高くても微生物の多様性は安定であり、メタン収量への影響も小さいことから、有機物負荷ショックに対するレジリエンスが高まることが明らかとなった。さらに、酵素遺伝子予測解析により、複雑な基質に馴化した種菌では、有機物負荷ショックに対応して、微生物叢が主要基質を分解する能力が向上することが示された。単純な基質に馴化した種菌ではピルビン酸分解の 3 経路のうち酢酸生成経路のみが有機物負荷量の増加にともなってアップレギ

ユレートされて経路が画一化されたのに対し、複雑な基質に馴化した種菌ではピルビン酸分解の3経路すべてが有機物負荷量の増加にともなってアップレギュレートされて経路が多様化した(図1)。この結果から、複雑な基質で馴化すると、より多様で柔軟性の高い代謝経路を構築して負荷ショックに対応した可能性が考えられた。

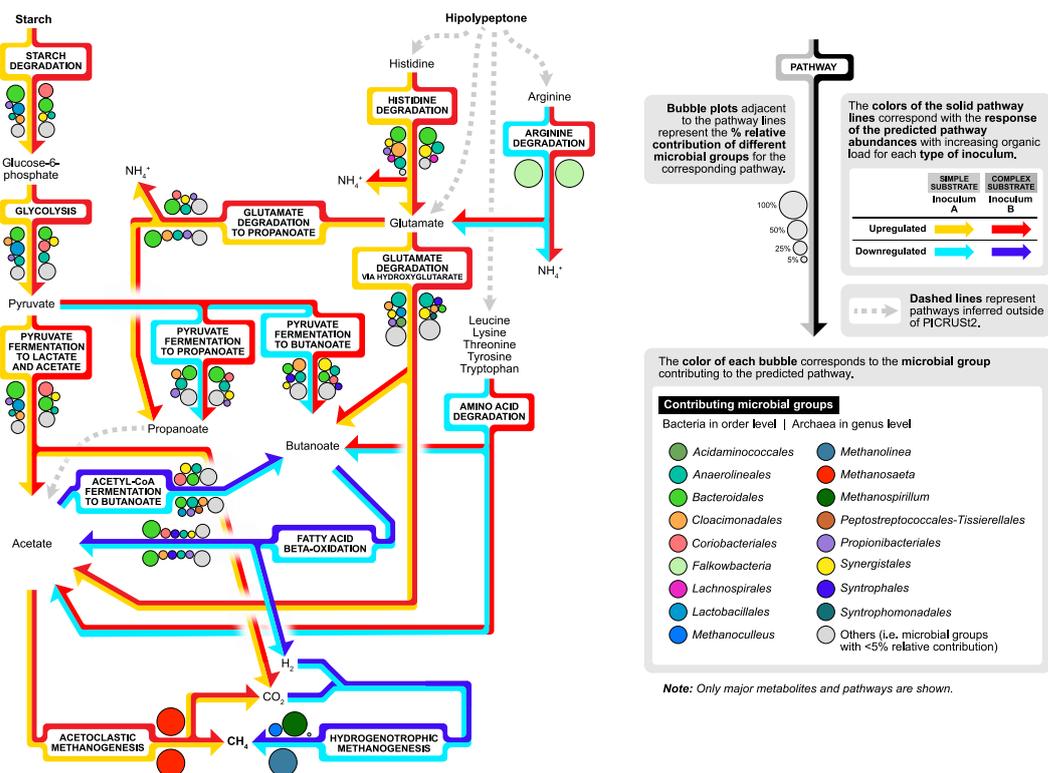


図1. PICRUSt2で予測された、異なる有機物負荷条件の回分メタン発酵におけるデンプンおよびハイポリペプトンの分解経路ならびに各経路に寄与する微生物叢。

続いて、明らかにした一回の有機物負荷ショックに対するメタン発酵微生物叢の短期応答が、有機物負荷ショックが繰り返される実プロセスに近い半連続運転においてどのように異なるかを評価した。その結果、有機物負荷ショックの頻度が低いほど、微生物叢への影響が大きいことが明らかとなった(図2)。メタン発酵の安定を維持するために必要な微生物ネットワーク構造が崩壊し、最終的にメタン生産性が損なわれた。さらに、メタン収量が減少した一方で中間代謝物である有機酸は蓄積していないことから、微生物叢の活動がメタン生成に寄与しない他の代謝物の生産にシフトしたと考えられた。

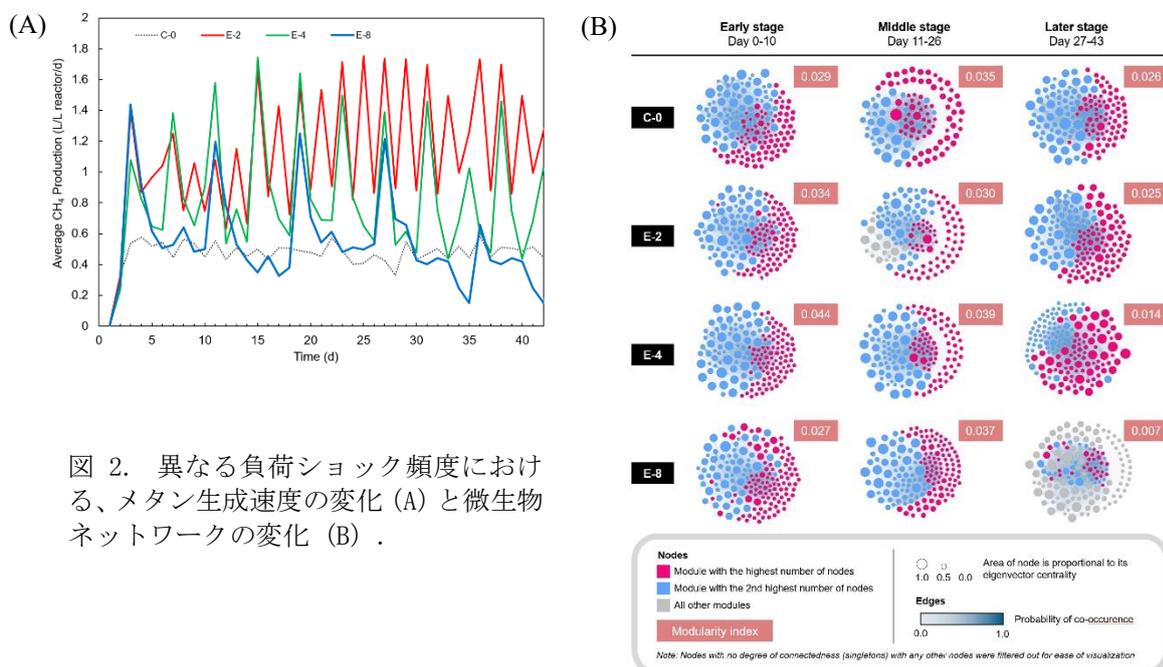


図2. 異なる負荷ショック頻度における、メタン生成速度の変化(A)と微生物ネットワークの変化(B)。

馴化したメタン発酵微生物叢が繰り返しの有機物負荷ショックに耐えられないことが判明したことに基いて、複雑な基質による馴化に加えて、より高い有機物負荷による馴化が有機物負荷ショックに対する微生物叢のレジリエンス向上に必要であるという仮説を立てた。そこで、異なる有機物負荷で種菌を馴化させ、8日に1回の有機物負荷ショックを与える半回分メタン発酵実験を実施し、微生物叢のメタン生成能、微生物叢の遷移、ならびに微生物ネットワーク構造の変化を解析した。その結果、高負荷に馴化させた種菌を接種したメタン発酵槽では、有機物負荷ショックを繰り返してもメタン生産性が維持され(図 3A)、微生物ネットワークも安定である(図 3B)ことを明らかにした。高い有機物負荷で馴化させることで、微生物ネットワークが強固になり、その結果、高有機物負荷ショックに対して微生物叢が高いレジリエンスを獲得すると推察した。これらの一連の結果から、複雑な基質と高有機物負荷条件を用いてメタン発酵の微生物叢を馴化させることで、有機物負荷ショックに対して非常に堅牢性の高いメタン発酵システムを構築することができると結論づけた。

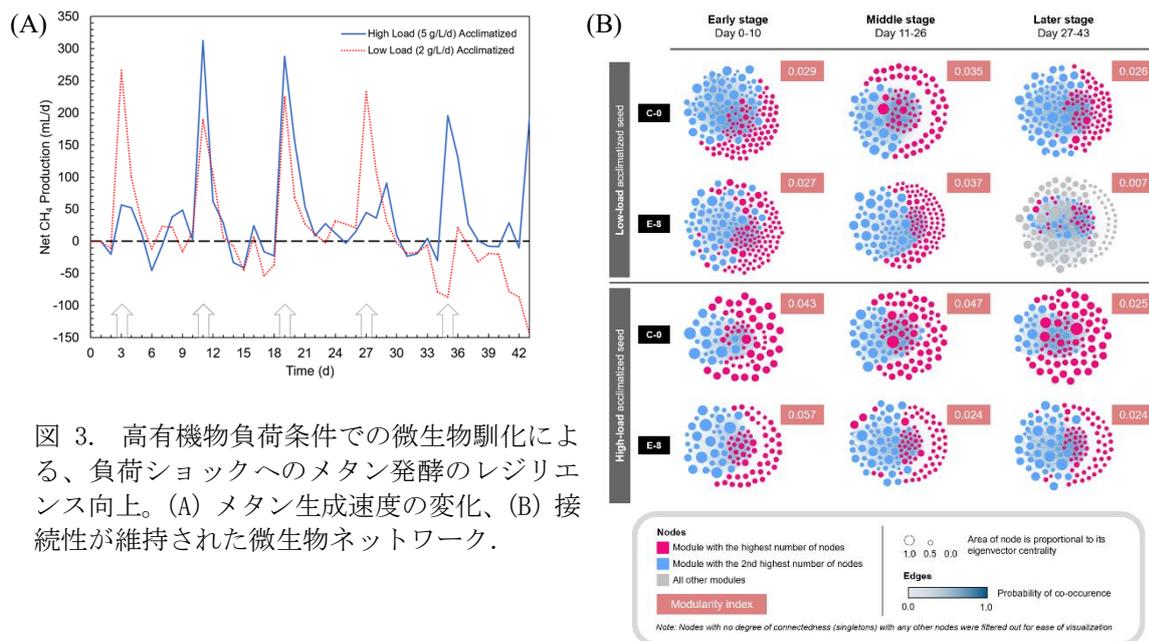


図 3. 高有機物負荷条件での微生物馴化による、負荷ショックへのメタン発酵のレジリエンス向上。(A) メタン生成速度の変化、(B) 継続性が維持された微生物ネットワーク。

引用文献

- [1] Zhang et al. (2018). *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12(4), 4.
- [2] He et al. (2018). *AMB Express*, 8(1), 1-11.
- [3] Braz et al. (2018). *Applied microbiology and biotechnology*, 102(23), 10285-10297.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mercado Jericho Victor、Koyama Mitsuhiro、Nakasaki Kiyohiko	4. 巻 813
2. 論文標題 Short-term changes in the anaerobic digestion microbiome and biochemical pathways with changes in organic load	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 152585 ~ 152585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2021.152585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mercado Jericho Victor、Koyama Mitsuhiro、Nakasaki Kiyohiko	4. 巻 216
2. 論文標題 Complexity of acclimatization substrate affects anaerobic digester microbial community response to organic load shocks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 114722 ~ 114722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envres.2022.114722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mercado Jericho Victor、Koyama Mitsuhiro、Nakasaki Kiyohiko	4. 巻 221
2. 論文標題 Co-occurrence network analysis reveals loss of microbial interactions in anaerobic digester subjected to repeated organic load shocks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 118754 ~ 118754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2022.118754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mercado Jericho Victor
2. 発表標題 Microbial Community Response to Changing Organic Load Varies with Acclimatization Substrate of Anaerobic Digestion Sludge
3. 学会等名 8th International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorisation（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------