

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	Exploring Thermotolerant Anaerobic Digestion: Metagenomics Analysis and Biogas Production in Temperature Shift Scenario (耐熱性嫌気性消化の探究：温度シフトシナリオにおけるメタゲノム解析とバイオガス生産)
氏 名 (Name)	Gede Adi Wiguna Sudiartha
<p>一次処理（沈殿処理）法や活性汚泥法などのプロセスによる廃水処理施設における汚泥発生が増大が世界的な問題となっている。嫌気性消化は、下水汚泥、嫌気性汚泥、農業廃棄物、食品廃棄物などの様々なバイオマス残渣をバイオエネルギーやバイオ肥料へと変換することにより、有望な解決策を提供できる。嫌気性消化プロセスでは、揮発性脂肪酸（VFA）や、バイオガス（主にメタン（CH₄）（50～70%）と二酸化炭素（CO₂）（30～50%）からなり、少量の硫化水素とアンモニアを含む）といった価値のある副産物が生産される。嫌気性消化は、埋立や焼却のような従来の廃棄物処理方法と比較して、消費エネルギーが少なく、二酸化炭素排出量も少ないため、カーボンニュートラルへの取り組みに役立つことから、その費用対効果と環境上の利点から支持されている。</p> <p>嫌気性消化におけるメタン生産の効率は、加水分解、酸生成、酢酸生成、メタン生成を担う多様な微生物群に依存する。温度は、代謝の安定性を維持し、バイオガス発生量を最大化する上で極めて重要なファクターである。嫌気性消化は通常、低温域（20℃ 前後）、中温域（20～43℃）、高温域（50～60℃）の 3 つの温度範囲が主で、商業的には中温域と高温域の条件が採用されている。これらの従来の温度範囲に関する研究は広範に行われているにもかかわらず、中温域と高温域の中間温度範囲（40～45℃：耐熱域）に関する研究はほとんど行われていない。それゆえにこの耐熱域で増殖する微生物群集とその適応性についての理解は、まだ十分に進んでいない。45℃ でメタン生産量が増加する可能性を示唆する研究もあるが、これらの研究は安定した温度条件下で行われたものである。下水汚泥を耐熱域で処理することで、既存の消化槽における現実の温度変動をシミュレートし、メタン生産量を向上させることができる可能性がある。</p> <p>本研究では、嫌気性消化された下水汚泥を植種源とし、グルコースを基質とするバッチ式実験により、バイオガス生産に及ぼす温度シフトの影響を調査した。温度変化は少なくとも 3－5℃ のステップで実施した。最初のシナリオでは温度を 42℃ から 48℃ に上昇（アップシフト）させ、次のシナリオでは 55℃ から 45℃ に下降（ダウンシフト）させた。どちらのシナリオでも、特に 45℃ でバイオガス生産量が減少した。アップシフトシナリオではバイオガス生産量が最大 83% 減少し、ダウンシフトシナリオではメタン生産量が 16～33% 減少した 16S rRNA 次世代シーケンサーを用いた解析により、アップシフトシナリオでは <i>Methanoculleus</i> が優勢であることが明らかになったが、その存在はバイオガス生産量と強い相関はなく、水素資化性経路の阻害を示唆した。逆に、ダウンシフトシナリオでは、酢酸資化性の <i>Methanosaeta</i> が優占し、硫酸還元菌の存在量が低かったため、バイオガス生産量が向上した。これらの</p>	

結果は、温度変化が微生物群集とバイオガス生産に与える影響を示している。

さらに、機能解析や微生物間相互作用を含むメタゲノミクスを検討しつつ、アップシフトシナリオに注目した。嫌気性消化された下水汚泥を植種源とし、1.5 g/L のグルコースと微量元素を含む基質を用いて、温度を 37℃ から 45℃ まで 2℃ ステップで徐々に上昇させた。その結果、37℃ では 298 mL CH₄/g COD、39℃ では 309 mL CH₄/g COD のメタン生成量を示したが、41℃ では減少した。しかし、温度を 43℃ まで上げると、メタン生産量は 260 mL CH₄/g COD まで回復し、二酸化炭素発生量は低下した。45℃ では、メタン生産量と二酸化炭素発生量の差が拡大し、高温持続によるメタン生成活性の向上を示した。*Methanothrix* (旧 *Methanosaeta*) が優勢なメタン生成菌であり、*Methanobacterium* の活性は 43℃ と 45℃ で上昇し、主要な水素化経路酵素 (fwd, ftr, mch) がアップレギュレート (増加) された。*Acetomicrobium* と *Defluviitoga* の存在が、これらの酵素をサポートしたと考えられる。これらの知見は、温度変化に対する微生物群集の適応性と潜在的な共生関係を浮き彫りにし、嫌気性消化プロセスが様々な条件下でも回復力を維持できることを示している。メタン生成菌が少ない状態でメタン生産量が多いということは、メタン生成菌が温度上昇圧力を受けた後にメタン生産能力とその効率を向上させる可能性があることを示す手がかりを示すものと考えられる。

グルコース濃度を 10 g/L に上げると、異なる結果が得られた。37～41℃ の温度域では、酢酸菌とメタン生成菌のバランスが乱れ、メタン生成量が著しく減少した。しかし、温度がさらに上昇すると、酢酸資化性メタン生成菌の活性が上昇し、メタンと二酸化炭素の生成量が増加した。*Methanothrix* は引き続き優勢であり、これは酢酸経路によるメタン生成が優勢であることを反映している。機能解析の結果、酢酸脱炭酸酵素は 43℃ および 45℃ で回復傾向を示したが、水素化経路酵素は阻害を受けた。グルコース濃度が高いほど酢酸経路によるメタン生成には有利であったが、一方、水素化経路はより限定的であった。これらの知見は、嫌気性消化プロセスにおける酢酸経路のメタン生成の安定した性質を明らかにし、たとえ温度変化があった場合でも、バイオガス生産の最適化のための貴重な知見を提供するものである。将来的には、連続式リアクターに温度シフトシナリオを組み入れることで、研究の方向性が改善される可能性がある。このアプローチは、多様な環境条件下における微生物群集の動態とバイオガス生産に関するより深い洞察を行い、嫌気性消化プロセスの理解をさらに深めることが期待される。

学 位 論 文 要 旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	Exploring Thermotolerant Anaerobic Digestion: Metagenomics Analysis and Biogas Production in Temperature Shift Scenario (耐熱性嫌気性消化の探究：温度シフトシナリオにおけるメタゲノム解析とバイオガス生産)
氏 名 (Name)	Gede Adi Wiguna Sudiartha

The increasing issue of sludge accumulation in wastewater treatment plants (WWTPs) from processes such as primary sedimentation (PS) and activated sludge (AS) has become a global concern. Anaerobic digestion (AD) offers a promising solution by transforming various residual biomasses, including sewage sludge, anaerobic sludge, agricultural waste, and food waste, into bioenergy and bio-fertilizer. This process produces valuable by-products like volatile fatty acids (VFAs) and biogas, which mainly consists of methane (CH₄) (50–70%) and carbon dioxide (CO₂) (30–50%), with minor amounts of hydrogen sulfide and ammonia. AD is favored for its cost-effectiveness and environmental benefits, as it consumes less energy and results in a smaller carbon footprint compared to traditional waste disposal methods like landfilling and incineration, thereby aiding carbon neutrality efforts.

The efficiency of CH₄ production in AD depends on the diverse microbial communities responsible for hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. Temperature is a crucial factor in maintaining metabolic stability and maximizing biogas output. AD is typically carried out at three temperature ranges: psychrophilic (around 20°C), mesophilic (20–43°C), and thermophilic (50–60°C), with commercial operations favoring mesophilic and thermophilic conditions. Despite extensive research on these conventional temperature ranges, there is limited exploration of the intermediate range between mesophilic and thermophilic (40–45°C). Understanding the microbial communities that thrive at these intermediate temperatures and their adaptability is still underdeveloped. Some studies suggest that CH₄ production could increase at 45°C, but these studies were conducted under stable temperature conditions. Processing WWTP sludge at intermediate temperatures might simulate real-world temperature fluctuations in existing digesters and improve CH₄ production.

The current study investigated the effects of temperature shifts on biogas production using fed-batch mode with anaerobically digested sewage sludge as the inoculum and a glucose-based substrate. Temperature changes were implemented in steps of at least

5°C. The first scenario involved increasing the temperature from 42°C to 48°C, while the second involved decreasing it from 55°C to 45°C. Both scenarios resulted in decreased biogas production, particularly at 45°C. The upshift scenario led to a maximum 83% reduction in biogas production, while the downshift scenario showed a 16-33% decrease in CH₄ output. Analysis using next-generation 16S rRNA sequencing revealed that *Methanoculleus* dominated in the upshifted scenario, but its presence did not strongly correlate with biogas production, suggesting inhibition of the hydrogenotrophic pathway. Conversely, the downshift scenario showed better biogas production due to the dominance of acetoclastic *Methanosaeta* and lower levels of sulfate-reducing bacteria. These results emphasize how temperature changes impact microbial communities and biogas production.

The study then concentrated on the upshift scenario, examining metagenomics aspects including functional analysis and microbial interactions. Using digested sewage sludge as the inoculum and a substrate with 1.5 g/l glucose and trace elements, the temperature was gradually increased from 37°C to 45°C in 2°C steps. The results showed CH₄ production of 298 and 309 mL CH₄/g COD_{fed} at 37°C and 39°C, respectively, but a decrease at 41°C. However, increasing the temperature to 43°C restored CH₄ production to 260 mL CH₄/g COD_{fed}, with a lower CO₂ output. At 45°C, the gap between CH₄ and CO₂ production widened, indicating enhanced methanogenic activity due to sustained high temperatures. *Methanothrix* (formerly *Methanosaeta*) was the predominant methanogen, with *Methanobacterium* activity rising at 43°C and 45°C, and key hydrogenotrophic pathway enzymes (*fwd*, *ftt*, *mch*) were upregulated. The presence of *Acetomicrobium* and *Deffluviitoga* likely supported these enzymes. These findings highlight the adaptability of microbial communities and potential syntrophic relationships in response to temperature changes, showing that AD processes can remain resilient under varying conditions. Higher CH₄ production with lower methanogen abundance may provide a clue that methanogens have the potential to increase capabilities and efficiency in CH₄ production after being given a temperature pressure.

When the glucose concentration was increased to 10 g/l, different results emerged. At temperatures of 37–41°C, disturbances in acetogenic bacteria and methanogen populations led to significant reductions in CH₄ production. However, as the temperature rose further, the activity of acetogens and methanogens increased, correlating with higher CH₄ and CO₂ production. *Methanothrix* continued to dominate, reflecting the acetoclastic pathway's predominance. Functional analysis showed that acetate decarboxylation enzymes were resilient at 43°C and 45°C, whereas hydrogenotrophic pathway enzymes were more susceptible to inhibition. Higher

glucose levels favored the acetoclastic pathway for CH₄ production, while the hydrogenotrophic pathway was more limited, indicating that increased glucose concentrations enhance acetoclastic CH₄ production and restrict hydrogenotrophic activity. These findings illuminate the steadfast nature of acetoclastic methanogenesis in AD processes, even amidst temperature shifts, providing valuable insights for the optimization of biogas production. Looking ahead, future research trajectories could benefit from integrating temperature shift scenarios into continuous reactors. This approach holds the promise of unravelling deeper insights into microbial community dynamics and biogas production across diverse environmental conditions, further enhancing our understanding of AD processes.

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	Gede Adi Wiguna Sudiarta
審 査 委 員	主 査： 今 井 剛
	副 査： 新 苗 正 和
	副 査： 樋 口 隆 哉
	副 査： 山 本 浩 一
	副 査： 通 阪 栄 一
論 文 題 目	Exploring Thermotolerant Anaerobic Digestion: Metagenomics Analysis and Biogas Production in Temperature Shift Scenario (耐熱性嫌気性消化の探究：温度シフトシナリオにおけるメタゲノム解析とバイオガス生産)

【論文審査の結果及び最終試験の結果】

嫌気性消化におけるメタン生成の効率は、加水分解、酸生成、酢酸生成、メタン生成を担う多様な微生物群に依存する。温度は、代謝の安定性を維持し、メタン生成量を最大化する上で極めて重要なファクターである。嫌気性消化は通常、低温域 (20℃前後)、中温域 (20～43℃)、高温域 (50～60℃) の3つの温度範囲が主で、商業的には中温域と高温域の条件が採用されている。これらの従来の温度範囲に関する研究は広範に行われているにもかかわらず、中温域と高温域の中間温度範囲 (40～45℃：耐熱域) に関する研究はほとんど行われていない。それゆえにこの耐熱域で増殖する微生物群集とその適応性についての理解は、まだ十分に進んでいない。

そこで本研究では、嫌気性消化された下水汚泥を植種源とし、グルコースを基質とするバッチ実験により、メタン生成に及ぼす温度シフトの影響を調査した。

まず、3-5℃程度のステップの温度の上昇と下降の両方についての実験を行った。これらの実験結果から、45℃でメタン生成量が減少し、また、温度上昇の方がそのメタン生成量の減少が顕著であることがわかった。

次に、機能解析や微生物間相互作用を含むメタゲノミクスを検討しつつ、温度のアップシフトに注目して実験を行った。すなわち、先の実験より細かい温度シフト (2℃おき) により実験を行った。その結果、37℃、39℃と温度の上昇に伴いメタン生成量は増加した。しかしながら、41℃ではメタン生成量は減少したが、43℃と 45℃でメタン生成量は回復した。その時に *Methanothrix* が優勢なメタン生成菌であり、同様にメタン生成菌である *Methanobacterium* の活性が上昇し、主要な水素化経路酵素 (fwd, ftr, mch) がアップレギュレート (増加) されることが確認できた。これらの結果は、温度変化が微生物群集とメタン生成量に与える影響を与えることを示し、その温度変化に対する微生物群集の適応性と潜在的な共生関係を浮き彫りに

し、嫌気性消化プロセスが様々な条件下でも回復力を維持できることを示すものと考えられる。さらに基質濃度を上昇させて実験を行った結果は異なる傾向を示した。すなわち温度が上昇するほどメタン生成活性が上昇した。この場合にも *Methanothrix* が優勢であり、酢酸経路のメタン生成が主であることが確認された。

これらの知見は、嫌気性消化プロセスにおける酢酸経路のメタン生成の安定した性質を明らかにし、温度変化があった場合にもメタン生成の最適化のための貴重な知見を提供するものと考えられる。

以上から本研究の有用性が明らかとなった。

公聴会（対面とオンラインの同時開催）には国内外から 41 名の参加があり、活発な質疑応答がなされた。公聴会での主な質問内容は、①メタン生成速度の面からみてどこが最適と判断できるか、②酪酸とプロピオン酸のどちらの経路が重要か、③メタン生成速度はどのように計算しているか、メタン生成速度を図示するにあたって累積値で表していないか、④5 章では酢酸経由のメタン生成が優勢だが、4 章とどのように違うのか、⑤将来こういった方向性をもってこの研究を続けるか、など多数であった。

以上のいずれの質問に対しても発表者からの的確で具体的な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに非常に優れ、博士（学術）の学位論文に十分値するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記の通りである（関連論文：5 編）。

- 1) Sudiartha, G.A.W., Imai, T., Hung, Y.-T., 2022. Effects of Stepwise Temperature Shifts in Anaerobic Digestion for Treating Municipal Wastewater Sludge: A Genomic Study. *International Journal of Environment Research and Public Health* 19, 5728.
- 2) Sudiartha, G.A.W., Imai, T., 2022. An Investigation of Temperature Downshift Influences on Anaerobic Digestion in the Treatment of Municipal Wastewater Sludge. *Journal of Water and Environment Technology* 20, 154–167.
- 3) Sudiartha, G.A.W., Imai, T., Mamimin, C., Reungsang, A., 2023. Effects of Temperature Shifts on Microbial Communities and Biogas Production: An In-Depth Comparison. *Fermentation*, 642.
- 4) Sudiartha, G.A.W., Imai, T., Chairattananokorn, P., Reungsang, A., 2024. Unveiling the impact of temperature shift on microbial community dynamics and metabolic pathways in anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection* 186, 1505–1515.
- 5) Sudiartha, G.A.W., Imai, T., Reungsang, A. 2024. Syntrophic Relationship Among Microbial Communities Enhance Methane Production During Temperature Transition from Mesophilic to Thermotolerant Conditions. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 12, 114903.