

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00970

研究課題名(和文)メタン発酵を利用した化学・生物領域が連携した化学教育教材の開発研究

研究課題名(英文) Development and Research of Chemistry Education Materials Using Methane Fermentation in Cooperation between the Chemical and Biological Domains

研究代表者

大橋 淳史(Ohashi, Atsushi)

愛媛大学・教育学部・准教授

研究者番号：50407136

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)：クリーンエネルギー源として期待されるメタンを生成する、メタン発酵菌を探索する教育教材の開発に成功した。資源の採掘・確保には大きな環境変化を伴う。そのため、持続可能な開発を可能にする科学技術としてメタン発酵菌が注目されている。メタン発酵菌は、土壌に普遍的に存在し、有機物からメタンを生成する菌群である。土壌菌は、移動範囲が狭いことが知られており、たとえば大村智名誉教授の発見した放射菌のように特殊な能力をもつ菌が身近に存在する可能性がある。そこで本研究では、簡易で安価な手法でメタン発酵菌を探索できる教材を開発し、小学生による実証試験でメタンの発生と燃焼に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、誰でも行える手法を開発したこと、また探究を通して持続可能な開発目標(SDGs)への意識を高めることができることの2点である。

土壌菌は環境依存性が高いため、身近な地域から大きな発見が生まれる可能性がある。教材を用いて探索を行うことで、子どもであっても資源問題を解決する高性能なメタン発酵菌を発見する可能性がある。そこで1サンプル50円程度で探索が可能な教材を開発した。保温装置も含めて、学校現場や家庭で購入可能であるため、本手法で誰でも探索を行うことが可能になった。また、クリーンエネルギーの確保の研究を行うことで、SDGsについて意識し、科学技術の発展と生活の関係性を理解できる。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in developing educational materials to search for methane fermentation bacteria that produce methane, which is expected to be a clean energy source. Mining and securing resources involves major environmental changes. Therefore, methane fermentation bacteria are attracting attention as a science and technology enabling sustainable development. Methanogens are a ubiquitous group of soil organisms that produce methane from organic matter. Soil bacteria are known to have a narrow range of movement, and it is possible that bacteria with special abilities, such as the actinomycete discovered by Professor Emeritus Satoshi Omura, may be around us. In this study, we developed a simple and inexpensive method to search for methane fermentation bacteria, and succeeded in the generation and combustion of methane in a demonstration test by elementary school students.

研究分野：化学教育

キーワード：環境科学 メタン発酵 クリーンエネルギー 科学教育 グリーンケミストリー 教材

1. 研究開始当初の背景

2015年度全国学力・学習状況調査の結果、理科の得点率には改善が見られた一方、中学校第3学年の理科の勉強が好きという回答は、小学校第6学年時の81.5%から61.9%へと大幅な減少が起こっていることが明らかとなった。好感度の低下は、実験・観察を踏まえた考察や説明の正答率が低いことと無縁ではないだろう。生徒は、実験とは教科書の『正解』を追認するために行うものであるという認識が強いため、効率良く『正解』に辿り着くためにそれ以外の考えを排除していく。その結果、『正解は知っている』が『なぜそうなるのか』という考察や記述を苦手とする傾向が生まれる。また、この傾向は原理・原則を、『正解を得るツール』として日常から分離するため、学んだ内容を実生活に応用する力が育っておらず、理論と実践の往還について実感できていない。これが理科を暗記科目だと誤解させ、好感度の大幅な低下を招いているのだろう。

そのため、生徒に実験とそれに伴う考察の必要性を感じさせる素材として、生徒の日常生活に密接に関係しており、興味・関心を抱きやすい持続可能な開発目標(SDGs)に注目した。OECDの試算によると2050年までに人口が120億に達すると見込まれている地球において、開発に伴う環境問題の解決は喫緊の課題である。そのため、必ずしも理科が好きとは言えない生徒も、環境浄化やグリーンエネルギーについては高い興味・関心を持っている。環境浄化・グリーンエネルギー教材を日常生活と科学理論との架け橋として用いることで、喫緊の課題を解決しうる『理科』という教科への興味・関心を高めることが期待される。

そこで本計画では、土壌に普遍的に存在するメタン発酵菌に注目し、安価で簡易なメタン発酵菌の探索研究を通じて、理科への興味関心を高める教材の開発を計画した。具体的には、生物領域であるメタン発酵菌が、化学領域となる有機物からメタンを含む混合気体を生成する過程を理解することで、理科で学習する知識が生活に活かされることに気づき、理科への意識が改善することが期待される。

本計画で注目したメタン発酵菌は、土壌に普遍的に存在しており、酸生成菌とメタン生成菌を含む微生物叢である。土壌菌は一般に移動範囲が狭く、環境依存性が高いことが知られている。そのため、身近な環境に未発見の性質をもつ菌が存在する可能性があると考えられる。一方で、メタンはPET樹脂などの手に入りやすい素材を透過する性質があることから、教材化が進んでおらず、汚泥や汚水処理場で自然発生する菌の利用以外には簡易な培養が難しかった。

2. 研究の目的

メタン発酵菌の探索研究を行うための、安価で簡易な実験装置の開発と実践。

3. 研究の方法

採取場所、容器、保温、栄養剤、水、検知の6つの観点で検討を行った。

(1) 採取場所

好気条件下の表層土と嫌気条件下の川底などの泥、ウサギ・モルモットのフンで検討した。メタン発酵菌は土壌に一般的に存在するとされるが、微生物叢のうちメタン生成菌は嫌気性発酵菌である。また、し尿汚泥からもメタン発酵が行われることが知られている(本多, 1980)。そこで、好気条件の表層土と嫌気条件の川底、ウサギ・モルモットのフンなど14地点で比較を行った。

(2) 容器

気体透過性のあるペットボトルとガスバリア能力の高いガラスバイアル瓶、アルミバッグで検討した。

培養容器に必要な条件は以下の通りである。(1)生成するメタンが透過しない。(2)嫌気性条件を保つために酸素が透過しない。(3)安価である。(4)土壌や泥を内部に入れるため開口部が大きい。(5)破裂・破断による怪我がない。

以上の条件を満たす容器を検討した。

(3) 保温発酵器

発泡スチロール箱に爬虫類用保温ヒーターで保温する装置を検討した。

メタン発酵菌は、最適育成温度によって中温菌(20~25℃, 30~40℃)と高温菌(40~65℃, 80℃)に分けられる(古賀, 1988)。発酵温度が30℃以下になると、発酵速度が低下するとされている(松永, 1991)ことから、発見例が多く、産業的に利用されているメタン発酵菌は生育温度30~40℃の中温菌である。そこで40℃前後で一定温度に保温する安価な装置を検討した。

(4) 栄養剤

炭水化物と液体肥料を検討した。

メタン発酵は、大きく酸生成菌による有機物から有機酸(酢酸やプロピオン酸)が生成する過程と、メタン生成菌による有機酸からメタンと二酸化炭素が生成する過程にわけることができる。

表1 メタン発酵の反応過程

| 工程 | 反応                  | 菌      |
|----|---------------------|--------|
| 消化 | 有機物から有機酸を生成する       | 酸生成菌   |
| 発酵 | 有機酸からメタンと二酸化炭素を生成する | メタン生成菌 |

これらは化学工学では、消化工程(酸生成菌の活動)と発酵工程(メタン生成菌の活動)とよばれている(表1)。この反応には多数の菌が関与するとされており、反応効率や消化・発酵の反応経路は菌群の種類によって多様に変化する。また、最終的に得られる気体はメタンと二酸化炭素の混合気体であり、 $CH_4/CO_2$ 比が60%以上であるとき、混合気体は燃焼するとされている。気体の生成比は、菌群のメタン生成能に依存することが知られている。そのため、効率よくメタン発酵菌を活動させる栄養源が重要となる。この栄養源となる培地に関しては、微生物培養として一般的なLB培地や、GAM培地、BHI培地の他に、微量金属元素(ニッケル、コバルト、鉄)を加えた合成培地(黒須, 1997)など多様な手法が提案されている。一方で、教材としての利用を考慮すると、試薬の購入貯蔵、培地調整、培養の3つの課題がある。培地調整のための多様な試薬を購入し、貯蔵管理するためには、管理者や保管場所の確保が必要になる。また、培地調整は習熟が必要であり、不慣れな生徒などが調整した場合、一定の品質を保つことがむずかしい。そして、培地の品質が安定しない場合、結果のバラつきが大きくなる。

そこで本研究では、安価に入手できる微生物栄養源として利用されるコーンスティプリカー(コーンスターチの副生成物)を検討した。また、メタン発酵の培地には、金属イオンが必要であるとされており、なかでも微量ミネラルとして塩化ニッケルや塩化コバルトが重要であるとされる(本多, 1980)。しかしながら、試薬としての塩化ニッケルや塩化コバルトは簡易に利用することはむずかしい。そこで、Ni および Co イオンを含む入手が容易で利用しやすい液体肥料(大菊液肥, 国華園)について検討した。

#### (5) 水

蒸留水とミネラルウォーターを検討した。

黒須ら(1997)によれば、メタン発酵の培地には、塩化ニッケル、塩化コバルトの他に、塩化カリウムや塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化鉄などが必要であるとされる。そこで培地の代わりになるものとして、硬水のミネラルウォーターを検討した。硬水は、マグネシウムイオンを多く含むものがあり、また鉄イオンやカリウムイオンなども含まれている。また、比較のために蒸留水で検討した。

#### (6) 検知

ガスクロマトグラフィー(GC)と気体検知管で検討した。

得られる気体は、メタンと二酸化炭素の混合気体であるため、その成分比の決定が必要になる。混合気体が燃焼するためには、メタンの生成比が60%以上であることが必要であるとされている。そのため、気体中のメタン濃度を測定したいが、安価な手法でメタン濃度を定量することはできない。そこで、GCで得られた気体の生成比を測定した。

一方、教材として活用する場合、おおよそ200万円のGCと稼働に必要なHeボンベやラインを用意できる環境は稀である。そこで、気体検知管を使って二酸化炭素濃度を測定し、擬似的にメタン濃度を測定する手法を検討した。気体検知管の利用は、燃焼試験と組み合わせることで、気体検知管で定量された二酸化炭素濃度を加算して100%から引くことで擬似的なメタン濃度とした。

$$\text{疑似メタン濃度(vol\%)} = 100 - \text{二酸化炭素濃度(vol\%)}$$

### 4. 研究成果

#### (1) 採取場所

以下、14地点で採取を行った。

表層土 松山城西側斜面2地点、松山城東側斜面1地点、愛媛大学1地点、道後公園2地点、上林森林公園1地点

泥など 重信川(菖蒲堰)2地点、親水公園(ひよこたん池公園、福德泉公園、杖ノ淵公園)3地点

フン 飼育ウサギのフン、飼育モルモットのフン

1ヶ月の発酵の結果、親水公園の泥から生成した気体で燃焼試験に成功した。また、松山城西側斜面から得られた表層土は、混合気体の二酸化炭素を中和によって潰すことで燃焼試験に成功した。表層土およびフンは、基本的にメタンは生成しないか、ごく少なく、生成した二酸化炭素を中和によってつぶしても燃焼しなかった。もっとも発酵が速かったのは道後公園1地点の5日であったが、二酸化炭素優位に生成し、中和後も燃焼しなかった。一方、泥は反応が非常に遅く、燃焼試験に成功したサンプルでも、生成した混合気体は表層土の半分程度であった。

また、メタン発酵では酸素の存在が反応を遅くすると言われている(本多, 1980)。そこで、燃焼試験に成功した泥に水を加えず、酸素吸収剤でバッグ内の酸素を潰したが、1ヶ月後に気体は発生しなかった。泥に含まれる若干の水分だけではメタン発酵には十分ではなく、発酵の条件が整っていても反応は進行しないか、極めて遅いことが明らかになった。

これらの結果から、メタン発酵には溶媒である水が不可欠なこと、1ヶ月程度の反応時間が必要であること、生成量ではなく得られた気体の成分比の検証が重要であることが明らかになった。また、栄養剤がなくとも土壌中の栄養分を用いてメタン発酵が進むこともあった。

## (2) 容器

ペットボトル、バイアル瓶、アルミバッグについて検討し、アルミバッグを採用した。

### アルミバッグ

設定した条件 1~5,すべてを満たすものとしてアルミバッグを採用した。GC を販売する GLサイエンスをはじめとして、メタンが透過しない分析用アルミバッグは複数販売されている。一方で、これらのバッグは 5000 円/個と極めて効果であるばかりか、口径は 5 mm 程度であって採取物を投入することができない。そこで、GL サイエンスに別途投入口をもつバッグを特注したところ 10000 円にもなった上、気体漏れが起こり、使用に耐えなかった。そこで、業務用のアルミバッグに注目した(図 1)。いわゆるシャンプーなどの詰替えバッグに使われる業務用アルミバッグは、スカートを広げると自立し、液体や半固体を投入するための大きな開口が上部にあることが特徴である。開口部は投入後に専用治具(25000 円)で圧着することで、高いガスバリア性を保つことができる。



図 1 業務用アルミバッグ(ヤナギ, DPA-0500)

また、業務用であることから、内容量 500 mL で 38 円/個、1000 mL で 50 円/個と極めて安価であり、コストを抑えて大量の試行を行うことが可能となった。念の為、開口部を圧着した後、純メタンを吹き込んでネジ式プラキャップを閉じて漏出試験を行った。1 週間後でも漏出は確認されず、使用に問題ないと判断した。メタン発酵の結果の一例を図 2 に示す。

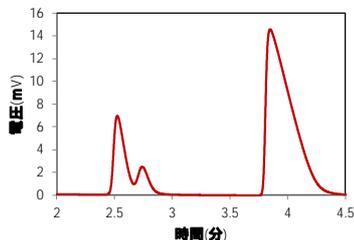


図 2 アルミバッグのメタン発酵で得られた混合気体の GC 結果

図 2 より、リテンションタイム(時間)が 3 分以前のピークが二酸化炭素であり、4 分前後のピークがメタンである。メタン優位に反応が進行したことが示された。

### ペットボトル

安価である(条件 3)、破裂・破断による危険性がない(条件 5)点で優れるが、酸素が透過することから好気発酵が進行して二酸化炭素のみが生成し、メタンは生成しなかった。ペットボトルを利用したメタン発酵槽は鈴木(2016)で報告されているが、本手法は培養されたメタン発酵菌を添加する手法であるため探索に用いる用途ではなかった。また、ペットボトルは一般に酸素が若干透過し、メタンも透過することが知られている。本研究では、メーカーや炭酸、非炭酸など複数のペットボトルで再現を試みたが、GC でメタンの発生を確認することはできなかった。また、検討の過程で開口部が狭いため、メタン発酵菌などを投入しづらいことから大量のサンプル調製は時間を要した。メタン発生が確認できないことから利用に適さないと判断した(図 3)。

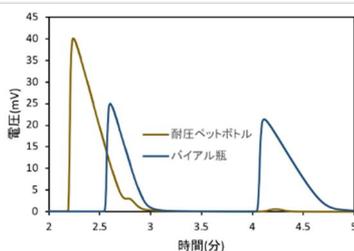


図 3 ペットボトルとバイアル瓶で得られた混合気体の GC 結果

図 2 で 3 分までのリテンションタイムが早いピークが二酸化炭素、4 分以降の遅いピークがメタンである。バイアル瓶(後述)では発生するメタンのピークが観測されない。

### バイアル瓶

メタンを透過しない(条件 1), 酸素が透過しない(条件 2), 比較的安価である(条件 3)に優れるが, 開口部が小さく投入がむずかしいこと, 破裂・破断による危険性が高いことから使用には注意が必要であると判断した。バイアル瓶は鹿島建設でもメタン発酵菌の探索に用いられる手法である。容量 100 mL のコストは 260 円/個であり, これに使い捨てのセプタム 20 円程度が加算される。セプタムの圧着には専用治具(約 2 万円)が必要となるが, 初期コストのみであるためトータルコストは大きくない。一方で, 口径は 12.5 mm と小さく採取物の投入が非常にむずかしい。また, ガラス製容器内で気体が生成するため, 傷や内圧による破裂・破断の危険性が常に伴う。メタン発酵は反応時間が 1 ヶ月程度と長いため, 教材としては測定間隔を長くせざるを得ない。とくに学校での利用においては, 発酵中の爆発の可能性が高いことに懸念がある。

### (3) 保温発酵器

発泡スチロール箱内で爬虫類用の保温ヒーターで加温する装置を開発した。密閉容器内で加温する場合, 気体の膨張による容器の破断や電源コードの取り回しに課題がある。そこで, 野菜保存用の発泡箱(Ti-800VK)に注目した(図 4)。



図 4 発泡箱(石山サイトより)

本容器は蓋と本体の間に通気口になる隙間があるため, 隙間からコードを差し込むことができること, また加熱によって膨張した気体が排出されることから, 工作せずに保温装置を内部に置くことができる。容量には小(35 L), 中(65 L), 大(80 L)の三種類があるが, 本研究では保温装置内にできるだけ多くのサンプルを置けること, ヒーターとサンプルの距離をできるだけ大きくすることを目的に, 80 L の発泡箱(石山, 約 2000 円)を利用した。

また, 保温ヒーターとしては, 爬虫類用のヒーターを利用した。爬虫類用ヒーターは, アクアリウム用と異なり, 空気中で利用できること, 発熱量が大きいことが特徴である。本研究では, 暖突 M(みどり商会, 約 6000 円)を利用した。

本装置でサンプル数 40 個程度までを 40~42 °C に保温することができた。内部温度は室外用の端子がついたデジタル温度計(クレセル, 1300 円)で測定した。測定精度は $\pm 1$  °C である。

いずれも, インターネットなど入手可能で, 総計 1 万円前後であった。

以上の手法により, 恒温器(3~4 万円)を用いない安価な保温発酵器を開発した。

### (4) 栄養剤

栄養剤として大菊液肥(国華園)を用いた。

液肥は調整が不要であること, 投入量を体積で管理しやすいこと, 比較的扱いやすい単位(1 kg)で扱われており, 安価(1600 円)であることから利用しやすい。なかでも大菊液肥-V(国華園)は, メタン発酵菌培地に必要とされる塩化アンモニウム(2.5vol%), リン酸アンモニウム(5.0vol%), 塩化カリウム(5.0vol%), 塩化マグネシウム(1.00vol%), EDTA-鉄(0.21vol%), 塩化ニッケル(0.01vol%), 塩化コバルト(0.01vol%)などを含んでいる。そこで本研究では, この大菊液肥-V と対照となる大菊液肥-アミノ(微量金属元素を含まない)を検討した。その結果, 燃焼試験に成功したサンプルの栄養剤は大菊液肥-V であり, 大菊液肥-アミノを用いた場合には同じ採取場所であっても燃焼試験には成功しなかった。また, 液肥を大過剰に加えた場合には, 気体生成量が少ない傾向を示した。

コーンスティプリカーはトウモロコシからデンプンをつくる工程で得られる可溶性成分を化膿したものであり, 微生物の培養に用いられている。価格は安価だが, 農業資材用は 20 L 単位であり, 少量での購入は釣り餌(500 mL, 972 円, ユーロカーブ)か, 中国からの輸入(Alibaba.com)になる。

### (5) 水

硬水であるヴィッテル(仏)と軟水である南アルプス天然水, 蒸留水を比較した結果, ヴィッテルでメタン生成比がもっとも高くなった。

表 2 ミネラルウォーター成分表

| 商品名      | 硬度  | pH | 成分(1 L あたり)  | 生産国  |
|----------|-----|----|--|------|
| ヴィッテル    | 300 | 7  | Ca <sup>2+</sup> (9 mg), Mg <sup>2+</sup> (2 mg),<br>K <sup>+</sup> (0.5 mg), Na <sup>+</sup> (0.7 mg)                     | フランス |
| 南アルプス天然水 | 30  | 7  | Ca <sup>2+</sup> (0.6~1.5 mg), Mg <sup>2+</sup> (0.1~0.3 mg),<br>K <sup>+</sup> (0.1~0.5 mg), Na <sup>+</sup> (0.4~1.0 mg) | 日本   |

前述の通り, メタン発酵菌の培養にはミネラルが必要であることがわかっている。一方で, 微量ミネラルの役割については完全に解明されていないこと, ミネラル比が変わることで, これ

までは培養できなかった菌が発見される可能性がある。そこでミネラルウォーターを用いることで、微量ミネラルを調整することを計画した。用いたミネラルウォーターの金属元素量は以下の通りである(表2)。ウィッテルを用いた場合に燃焼試験に成功した。一方で、南アルプス天然水および蒸留水では、メタン生成比が少なく燃焼に十分なメタンを得ることができなかった。

#### (6) 検知

混合気体の成分比を初期はGCで行い、実践では気体検知管で行った。

気体検知管ではメタンを直接測定することはできない。一方で、表1より生成する気体はメタンと二酸化炭素の混合気体であることがわかっている。そこで、生成気体の二酸化炭素比を決めることで、擬似的にメタン生成比を決定した。気体検知管 2HT は二酸化炭素の体積率を 10 ~ 100%の範囲で測定することができる。一方で、2HT は通常とは異なる送込方式による検知を行う。通常は、気体を直接検知管に送込するが、送込方式では別の注射筒(20 mL)に気体を吸引したあと、注射筒から気体検知管に気体を送込する。

本研究ではアルミバッグ内に発生する気体の生成比を決定するため、アルミバッグにシリンジ針を刺して注射筒に気体を吸引したあと、気体検知管に送込する方式は利用しやすいこと、また混合気体の二酸化炭素比が高くなる可能性があることから、本手法を採用した。

気体検知管で二酸化炭素比が 40%以上、つまりメタン生成比が 60%未満のとき、混合気体は燃焼しなかった。一方で、得られた混合気体を 2M 水酸化ナトリウム水溶液(20 mL)で中和した後、再び燃焼試験を行ったところ、二酸化炭素比が 40%前後のとき燃焼試験に成功することがあった。

燃焼試験に成功したのは、ひよこたん池公園(泥)であり、中和後に燃焼試験に成功したのは、松山城西側斜面(表層土)、福德泉公園(泥)であった。表層土は気体の生成量が大きく、泥は気体生成量が少ない傾向を示したが、二酸化炭素比は場所依存性が高いことが明らかになった。また、アルミバッグ内に「N や S 臭が強い」場合に燃焼しやすいようだ。活性菌による代謝物との関係性が推測される。そうした異臭の強い泥や土を採取する検討を続けたい。

#### (7) その他

受託者が、別途受託している小中学生人材育成事業「ジュニアドクター育成塾」の受講生を対象に実践を行った。小学校 6 年生でも実験にはとくに課題は存在しない。一方で、GC の操作は不可能であること、GC は気体検知管より多くの気体量(200 mL 程度)を必要とすることから気体検知管と燃焼試験を併用することで、メタン生成比についての理解が可能であった。本成果は、日本生物教育学会四国支部研究大会ジュニアセッションで発表し、奨励賞を得た。

#### 引用文献

古賀洋介,「古細菌」,東京大学出版,1988.

黒須和代,前川孝昭,阿部充,“低温馴養メタン菌を用いたプラグフロー型 2 相式メタン 発酵装置のスタートアップと適正有機物負荷”,農業施設,20(1),3-11,1997.

本多淳裕,「廃棄物のメタン発酵:理論と実用化技術」,1980.

松永旭,島崎弘志,松山英俊,泉和雄,“固定化嫌気性菌を用いた低温メタン発酵”用水と廃水,33(2),36-42,1991.

野池達也,「メタン発酵」,技報堂出版,2006.

鈴木高広,“ペットボトルメタン発酵槽を用いたイモメタンガス製造プロセス”,化学装置,58(12),67-73,2016.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. メタン発酵菌の探索研究,大橋廉太郎,大橋淳史,日本生物教育学会四国支部研究大会ジュニアセッション,2019年3月9日
2. メタン発酵の教材化研究,大橋淳史,富田享,日本化学会第98回春季年会,2018年3月20日
3. メタン発酵を用いた科学教材の開発と評価,富田享,大橋淳史,日本化学会中国四国支部大会2017,2017年11月12日
4. メタン発酵によるクリーンエネルギー教育教材の開発,富田享,大橋淳史,日本化学会第97回春季年会,2017年3月17日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究など情報発信 <https://ジュニアドクター育成塾.jp>

中学生の研究最新 [https://youtu.be/\\_XdDtldcfvw](https://youtu.be/_XdDtldcfvw)

ジュニアドクター育成塾 2018 年度最終成果報告会 <https://youtu.be/7RhHxwXiDQI>

科研究費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。