

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580377  
 研究課題名（和文） 酸性廃水及び高塩濃度廃水の効率的メタン発酵処理に向けた微生物群集の構築と制御  
 研究課題名（英文） Establishment and control of methanogenic microbial communities for the efficient treatment of acidic wastewater and saline wastewater  
 研究代表者  
 加来 伸夫（KAKU NOBUO）  
 山形大学・農学部・准教授  
 研究者番号：80359570

研究成果の概要（和文）： 酸性廃水や高塩濃度廃水といった難処理廃水を処理可能なメタン発酵微生物群集の構築とその制御、ならびに構築したメタン発酵系からの有用微生物の分離を目指して研究を行った。その結果、2.5～7.5%(w/v)までの NaCl を含む合成廃水を処理可能なメタン発酵系やバイオディーゼル燃料製造廃水（pH 10）を処理可能なメタン発酵系を構築することに成功した。また、高塩濃度廃水処理メタン発酵系からメタン生成古細菌を分離することに成功した。

研究成果の概要（英文）： The aims of this study were to establish and control of methanogenic microbial communities for the treatment of refractory wastewaters and to isolate some useful microorganisms from the established methanogenic systems. The results showed the methanogenic systems for artificial saline wastewaters containing 2.5 - 7.5%(w/v) of NaCl and a biodiesel facility's wastewater (an alkaline wastewater, pH 10 -11) were successfully established. In addition, some methanogens were isolated from the methanogenic systems of artificial saline wastewaters containing different concentrations of NaCl.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 境界農学・環境農学

キーワード： 応用微生物、環境技術、バイオマス、廃棄物再資源化、廃棄物処理

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、廃棄物による環境負荷の増大が深刻

化するなか、世界的な環境意識の高揚から廃棄物等の発生抑制や資源の循環的な利用を基

調とする循環型社会の構築がますます強く求められている。日本においても国が中心となり、各方面で環境基準の強化が実施されるようになってきており、廃水処理の分野においても、これまで問題にならなかった多種類の廃水の処理が必要になりつつある。

(2) 現在のところ、産業廃水の多くは活性汚泥法を初めとする好氣的廃水処理法により浄化処理されているが、好気処理は非常に浄化効率が良い反面、曝気費用がかかる、余剰汚泥が多い、広大な敷地を必要とするなど多くの問題がある。一方、嫌気処理（メタン発酵）を利用した廃水処理技術は、処理過程で発生したメタンをエネルギーとして使用できる、余剰汚泥が少ない、発酵槽の小型化が可能など多くの利点があり、処理コスト削減と資源循環型社会構築へのニーズに合った廃水処理技術として注目され、多種多様な廃水に適用されるようになってきている。

(3) メタン発酵による廃水処理プロセスは、多種多様な微生物群の協同作業により進行するため、効率のよいメタン発酵を実現するためにはこれらをバランスよく増殖させて発酵槽内に維持することが肝要である。しかし、個々の発酵槽内の微生物群集構造は、処理している廃水種の特性により大きく異なるため、必然的に処理する廃水種毎にその制御方法を開発する必要があるなど、実際には微生物群集をバランス良く安定した状態で維持することは容易ではなく、メタン発酵が不安定化してプロセスが崩壊してしまうケースが多々報告されている。このようなプロセスの崩壊は、pHが極端に高いあるいは低い廃水、有機酸が蓄積してpHが低下しやすい高有機物濃度廃水、難分解性有機物を含む廃水、あるいは漬物工場や海産物加工工場などからの高塩濃度廃水といった難処理廃水で特に起こりやすい。これらの難処理廃水の多くは、中和や希釈などによりメタン発酵の阻害要因の影響を小さく抑えることでメタン発酵処理できるようになるが、中和剤購入経費や希釈による受入れ廃水量の増加に伴った発酵槽の大型化によるコストの増大がネックとなっている。

## 2. 研究の目的

(1) 各種難処理廃水を処理可能なメタン発酵微生物群集を様々な微生物源を用いて確立することを試みるとともに、確立した発酵系の制御方法を開発する。

(2) 上記で確立した発酵系から有用微生物（メタン生成古細菌）の分離を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) メタン発酵系立ち上げのための微生物接種源

微生物接種源として、牛舎廃水メタン発酵槽汚泥（以下、牛舎廃水汚泥）、海洋底泥、水田土壌、酸性河川底泥、酸性火口湖底泥、温泉水を使用した。牛舎廃水汚泥は北海道別海資源循環施設の家畜（牛）排泄物中温メタン発酵槽から採取した。海洋底泥は山形県酒田市の酒田港新井田川河口付近より採取した。酸性河川の底泥として山形県山形市の須川より採取した。酸性火口湖底泥として宮城県大崎市の潟沼の底泥を採取した。いずれも使用するまでポリ袋で密閉して4°Cで保存した。高塩濃度温泉水（ナトリウム-塩化物強塩泉）は鶴岡市内の温泉から採取し、酸性温泉水（含硫化水素強酸性明ばん緑ばん泉）は蔵王温泉で採取し、使用するまでポリタンク中で密栓して4°Cで保存した。牛舎廃水メタン発酵槽汚泥、海洋底泥、水田土壌、酸性河川底泥、酸性火口湖底泥については、合成廃水（Table 1）と1:1の割合で混ぜ、ワーリングブレンダーを用いて冷却しながらN<sub>2</sub>気相下で1,000 rpmで10分間破碎してスラリー状にしたものを微生物接種源として使用した。

Table 1. 合成廃水 (1000 ml)

Glucose	0.8 g	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10 mg
Bacto Pepton	0.4 g	KI	10 mg
Bacto Yeast Extract	0.4 g	(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>	10 mg
0.1% Resazurin-Na	1.0 ml	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.5 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.5 mg
Na <sub>2</sub> S · 9H <sub>2</sub> O	0.3 g	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5 mg
L-Cysteine-HCl · H <sub>2</sub> O	0.01 g	ZnCl <sub>2</sub>	0.5 mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	400 mg	AlCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5 mg
NH <sub>4</sub> Cl	400 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5 mg
KCl	400 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mg	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.5 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	50 mg	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5 mg
FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	40 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.5 mg

※酸性の培地には NaHCO<sub>3</sub> を添加しなかった。

### (2) 各種接種源を用いたメタン発酵系の立ち上げと継代保温

微生物接種源 4 ml を 40% (v/v) になるように加圧培養試験管中の 6 ml の合成廃水に O<sub>2</sub> 除去 N<sub>2</sub> ガス気流下で嫌氣的に接種した。その後、直ちにブチル中栓とスクリュウキャップで封じて 55°C および 30°C で保温した。これらについてガスクロマトグラフで試験管気相中のガスを分析することでメタン生成の経過を追い、特に活発にメタン生成した培養を新鮮合成廃水に植え継いで継代した。実験はすべて 3 連で行った。なお、55°C で保温した場合と 30°C で保温した場合では、30°C で保温した方が安定した結果が得られたため、結果では 30°C で保温した結果のみを示す。

高塩濃度廃水のメタン発酵試験を行う場合は、合成廃水に 2.5%(w/v)、5%(w/v)、7.5%(w/v)および 10%(w/v)になるように添加して使用した。酸性廃水のメタン発酵試験を行う場合は、pH 2 および 3 になるように HCl を添加した合成廃水を使用した。アルカリ性廃水のメタン発酵試験を行う場合は、pH 11、12 および 13 になるように NaCl を添加した合成廃水を使用した。

強いアルカリ性を示すバイオディーゼル燃料 (BDF) 製造廃水 (pH 10~11) を処理するメタン発酵系の立ち上げについても研究を行った。近年、カーボンニュートラルなエネルギーへの関心が高まっており、その一つである BDF の製造量が年々増加しているが、その際に生じるアルカリ性廃水の処理が問題となっている。BDF 製造廃水を処理するメタン発酵系を立ち上げる場合は、8 ml の微生物接種源と 2 ml の無機塩類溶液 (Table 2) を混合し、これに最終濃度 1%(v/v)となるように BDF 製造廃水を加えたものを、試験管中で 10 ml ずつ 30 °C で嫌氣的に保温した。発酵系は、メタン生成が止まった時点で 8 ml の発酵液を 2 ml の無機塩類溶液の入っている試験管に植え継ぎ、最終濃度 1%(v/v)となるように BDF 製造廃水を加えて保温することで継代された。

Table 2. 嫌氣的無機塩類溶液(1000 ml)

NH <sub>4</sub> Cl	2.68 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.02 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.735 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	8.5 ng
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.5 ng
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6.35 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.65 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.99 mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.68 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31 ng
NiCl <sub>2</sub>	65 ng
AlCl <sub>3</sub>	66.5 ng
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.211 mg
CuCl <sub>2</sub>	6.5 ng
NaS·9H <sub>2</sub> O	1.8 g
Gas Phase	N <sub>2</sub>

### (3)揮発性脂肪酸 (VFA) 測定用試料及び DNA 抽出用試料の調製

培養液 2 ml を 2-ml マイクロチューブに取り、微量高速遠心機で 1,5000 rpm で 4 分間に 5 分間遠心分離した。この上清 0.5 ml とメタリン酸溶液 (5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中に 25% (w/v)メタリン酸を含む) 0.1 ml をバイアル瓶中で混合して一晩静置した。生じた沈殿を遠心分離で除去して VFA 分析用の試料とした。VFA 測定用試料と内部標準である 30 mM クロトン酸溶液を 1:1 の割合 (v/v) で混合し、この 1 μl をマイクロシリンジで採取して、炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフに注入することにより測定した。

### (4)ガス分析

30 °C で保温した試験管気相中のガスを分析するために、プチル中栓とスクリーキャップの上から PRESSURE LOCK シリンジを挿入して試験管内の気相を 1 ml 採取し、熱伝導度検出器を装着したガスクロマトグラフに注入することにより測定した。

### (5) pH の測定

保温前および保温終了後の各保温試料の pH を pH メーターで測定した。

## 4 . 研究成果

### (1)酸性廃水処理メタン発酵系

酸性廃水を処理可能なメタン発酵系を立ち上げるための微生物接種源として、酸性河川底泥、酸性湖底泥、酸性温泉水を使用した。いずれの接種源を用いた場合でも、pH 2 の合成廃水では安定したメタン発酵系を立ち上げることはできなかった。酸性温泉水を利用した場合には、pH 3 でもメタンは生成されなかったが、酸性河川底泥と酸性湖底泥を使用した場合には、比較的活発にメタン生成する系を立ち上げることができた。しかし、メタン生成は不安定だった。以上の結果から、これらの汚泥では酸性廃水を安定的に処理可能なメタン発酵系を立ち上げることは難しいことが分かった。

### (2)高塩濃度廃水処理メタン発酵系

高塩濃度廃水を処理可能なメタン発酵系を立ち上げるための微生物接種源として、水田土壌、高塩濃度温泉水、そして海洋底泥を使用した。水田土壌および高塩濃度温泉水を用いた場合は、ほとんどメタン生成が進行しなかったり、VFA が蓄積するなどして、高塩濃度廃水を処理可能なメタン発酵系を確立することはできなかった。

一方、海洋底泥を使用した場合には、2.5%(w/v)から 7.5%(w/v)までの NaCl を含む合成廃水で継代可能な比較的活発にメタン生成する系を確立することができた。PCR-DGGE 解析の結果、これらの系では比較的少ない種類のメタン生成古細菌がメタン生成に関与していることが示唆された。また、これらの各系からメタン生成古細菌を分離することができた。現在、7.5%(w/v)という非常に高い NaCl 濃度でも増殖可能なメタン生成古細菌を中心に特徴付けを進めている。

本研究により、高塩濃度廃水処理メタン発酵を実現するため基盤的情報を蓄積することができた。

### (3)アルカリ性廃水処理メタン発酵系

アルカリ性廃水を処理可能なメタン発酵

系を立ち上げるための微生物接種源として、水田土壌と牛舎廃水汚泥を使用した。水田土壌を用いた場合、pH 11~13 の合成廃水ではメタンはほとんど生成されず、VFA が蓄積した。牛舎廃水汚泥を用いた場合にも、pH 12 および 13 の合成廃水ではメタン生成量が低く、VFA が蓄積したが、pH 11 の合成廃水では継代可能な活発にメタン生成する系を立ち上げることができた。以上の結果から、牛舎廃水汚泥がアルカリ性廃水の処理に比較的向いていることが明らかになった。

#### (4) BDF 製造廃水

牛舎廃水汚泥を微生物接種源として使用することで、比較的安定した発酵系を立ち上げることができた。しかし、継代 13 代目でメタン生成量が減少し、VFA が蓄積して pH が低下するなど、メタン発酵が不安定化した。そこで、NaHCO<sub>3</sub> と牛舎廃水汚泥抽出液（オートクレープした汚泥の遠心上清）を添加して保温日数を変化させるなどしたところ、メタン発酵を再び安定化させることができた（Fig. 1）。このように、本研究では BDF 製造廃水のメタン発酵系を確立するとともに、その制御法（安定化法）に関する知見を得ることができた。

本研究では、その他のいくつかの安定化要因についても解析を行い、BDF 製造廃水処理メタン発酵実用化のための基盤的情報を蓄積することができた。

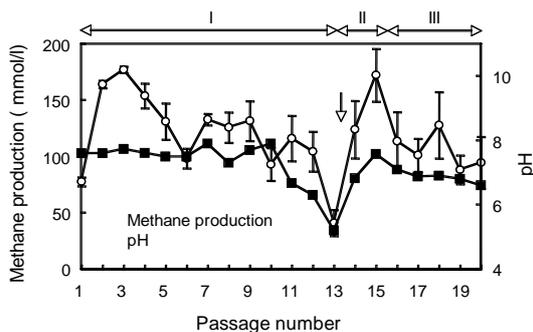


Fig. 1. BDF製造廃水処理メタン発酵系の継代培養におけるメタン生成と保温終了時のpH。  
I, 保温日数21の期間; II, 保温日数35日の期間; III, 保温日数28日の期間。太矢印はNaHCO<sub>3</sub>と汚泥抽出液を添加したことを示す。

#### (5) その他

本課題を実施する過程で、微生物接種源の一部には、発電性の微生物が生息していることが分かってきた。特に水田土壌は微生物燃料電池の微生物接種源として有望であることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計1件)

Nobuo Kaku, Natsuki Yonezawa, Yumiko Kodama and Kazuya Watanabe, Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79 (1), 査読有 2008, 43-49.

#### [学会発表](計4件)

太田恵理子、加来伸夫、上木厚子、上木勝司、バイオディーゼル燃料製造過程で生じる廃水のメタン発酵への適用、山形県・(社)山形県廃棄物協会主催「環境・循環型産業交流プラザ」、2009年2月4日、山形県高度技術研究開発センター(山形市)。  
加来伸夫、米澤夏岐、兒玉裕美子、上木勝司、上木厚子、渡邊一哉、微生物燃料電池による水田での発電実験、日本微生物生態学会24回大会、2008年11月26~27日、北海道大学。

Nobuo Kaku, Toshikazu Uttanai, Shino Hasegawa, Atsuko Ueki and Katsuji Ueki, Stabilization of propionate oxidation in methanogenic process in artificial wastewater by microbial community derived from anaerobic digester slurry of cattle waste, 12<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, 2008年8月19日, Australia.

打田内敏和、加来伸夫、長谷川史乃、上木厚子、上木勝司、各種種菌を用いて確立されたメタン発酵系の安定化要因の解析、日本微生物生態学会23回大会、2007年9月17日、愛媛大学。

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

加来 伸夫 (KAKU NOBUO)  
山形大学・農学部・准教授  
研究者番号：80359570

#### (2) 研究分担者

上木 勝司 (UEKI KATSUJI)  
山形大学・農学部・教授  
研究者番号：10111337  
(H19 H20：連携研究者)  
上木 厚子 (UEKI ATSUKO)  
山形大学・農学部・教授  
研究者番号：60143088  
(H19 H20：連携研究者)