

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12246

研究課題名(和文)メタン発酵消化液中での藻類と硝化菌共培養による硝酸化成の促進および肥料化への展開

研究課題名(英文)Promotion of nitrification by co-culture of algae and nitrifying bacteria in biogas digestate and its conversion into fertilizer

研究代表者

北宅 善昭 (Kitaya, Yoshiaki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：60169886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：メタン発酵消化液を用いてユーグレナを育成するとともに、硝化菌でアンモニアを硝酸に変換し、その液を用いて同時に植物を養液栽培するシステムの技術的可能性を検討した。ユーグレナは過硝化消化液で正常に増殖し、硝化消化液中の要素濃度は、商用標準培養液と同程度であった。このことから、ろ過硝化消化液を培養液として同時育成をユーグレナの定常増殖期まで行うことは技術的に可能であることがわかった。生ごみ由来のメタン発酵消化液は硝化に伴いリン酸およびカルシウムイオン濃度が増加し、不足するマグネシウム、鉄およびマンガンを補充すれば、養液栽培用の標準的な培養液として利用できる。

研究成果の概要(英文)：Growth performances of *E. gracilis* and *L. sativa* co-cultured using a biogas digestate were investigated. This solution simulated the filtrate of nitrified biogas digestate derived from the organic fraction of municipal solid waste but was supplemented with insufficient plant nutrients (Mg, Fe and Mn). The specific growth rate of the co-cultured *E. gracilis* was the same rate that *E. gracilis* achieved when grown as a sole culture. There were no significant differences between *L. sativa* cultured with *E. gracilis* until the stationary growth phase of *E. gracilis* was reached and those cultured alone relative to biomass. These results suggest that *E. gracilis* and *L. sativa* could be co-cultured with the biogas digestate after being nitrified and filtered. In addition, considering concentrations of plant macronutrients in the residual solution after the co-culturing *E. gracilis* and *L. sativa*, it could be re-used as the nutrient solution for co-culturing *E. gracilis* and *L. sativa*.

研究分野：生態工学

キーワード：メタン発酵消化液

1. 研究開始当初の背景

近年、廃棄物バイオマスを資源として有効利用するためのメタン発酵処理が推進されつつある。メタン発酵における副産物としての消化液の多くは利用されず、廃水としてエネルギーやコストを要する処理を経て放流される。メタン発酵消化液は、肥料成分を多く含むことから、農業における液肥利用が試みられているが、その利用量はまだ少ない。なぜなら、メタン発酵消化液原液に含まれる窒素成分のほとんどが $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (濃度約 1 g L^{-1}) で高等植物にとって有害となる濃度を大きく超えているためである。植物用肥料として用いるためには、アンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) から硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) への変換が最重要課題であるが、低コストで高効率な変換方法は未確立である。他方、ユーグレナなど一部の単細胞藻 (以下、藻) は高濃度 NH_4^+ でも培養可能であり、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を積極的に吸収するが、増殖最適濃度は 0.5 g L^{-1} であり、藻培養においても原液の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を $\text{NO}_3^-\text{-N}$ に変換する必要がある。そこで硝化菌 (硝酸菌・亜硝酸菌) を用いた結果、硝化菌の代謝に必要な O_2 の濃度を一定レベルに制御できれば、効率よく $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を $\text{NO}_3^-\text{-N}$ に変換できることが確認できた。そこで本課題では、藻と硝化菌を消化液で共培養し、藻の光合成で生じる O_2 で消化液の溶存 O_2 濃度を高めることにより、硝化菌の代謝、ひいては $\text{NH}_4^+\text{-N}$ から $\text{NO}_3^-\text{-N}$ への変換を促進できることを仮説として、それを実証し実用技術につなげる。

2. 研究の目的

メタン発酵による有機性廃棄物処理技術普及の足かせとなっていた消化液処理問題を解決するため、消化液に高濃度で含まれ、高等植物にとって有害なアンモニア態窒素 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) を、高等植物が好む硝酸態窒素 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) へ変換 (硝酸化成) して、植物養液栽培用肥料とすることを目的とする。高濃度 NH_4^+ でも培養でき $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を積極的に吸収する微細藻類を用い、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度を下げるとともに、硝化菌 (硝酸菌・亜硝酸菌) を共培養して、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を $\text{NO}_3^-\text{-N}$ に変換する。藻類の光合成で生成される O_2 で、硝化菌の呼吸・代謝に必要な O_2 濃度を一定レベルに制御する。共培養によるこれら微生物種の協働作用で、効率的・高速でメタン発酵消化液を肥料へと転換

する方法を提案する。

3. 研究の方法

(1)メタン発酵消化液を養液栽培用培養液として利用する場合、過剰に含まれるアンモニウムイオンが問題となる。一般に植物の根にとって、高濃度アンモニウムイオンは有害である。また植物は窒素肥料成分として、アンモニウムイオンより硝酸イオンを好む。そこで、養液栽培に利用する前に硝化細菌を使って消化液中のアンモニウムイオンを硝酸イオンに酸化 (硝化) する必要がある。また窒素肥料濃度の変動のみならず、他の消化液中無機栄養素濃度について、硝化による pH 低下などに伴う変動を把握する必要があるが、その先行研究は見当たらない。そこで、生ごみのメタン発酵消化液を硝化した場合の無機栄養素濃度の変動について調べた。特に、硝化後さらにろ過された消化液 (ろ過硝化消化液) について、pH の変化が液中の無機栄養素濃度に与える影響を解析した。

(2)メタン発酵消化液を硝化 (生物酸化) およびろ過し、さらにマグネシウムイオンを補充すれば、ロックウール栽培の培養液として利用できるとの仮説を立てた。そこで、マグネシウムを補充したろ過硝化消化液および補充していないろ過硝化消化液を用いてキクのロックウール栽培を行い、その生長パフォーマンスを研究した。また、ろ過硝化消化液中に沈めたロックウールからの無機栄養素の溶出についても調べた。

(3)メタン発酵消化液を用いた、ユーグレナと植物のカスケード育成システム (ろ過硝化消化液を用いてユーグレナを培養し、その残液を用いて植物を養液栽培で育成するシステム) の構築を目標とした。このシステムは養液栽培で育成された植物に加え、商用的価値の高い機能性物質を含むユーグレナを生産でき、また植物に有害な過剰アンモニウムイオンをユーグレナの吸収により減少させ、その後の植物生産性を向上させられる可能性がある。そこで、ろ過硝化消化液を用いてユーグレナを培養し、その増殖速度、およびろ過硝化消化液中の多量要素濃度の変化を調べた。

(4)メタン発酵消化液を用いたユーグレナとレタスの同時生産の可能性について検討した。同時生産システムは前章のカスケードシステムに比べて、育成に要する時間や空間を削減できる。ここでは、模擬ろ過硝化消化液を用いて湛液水耕したレタス根域培地中でユーグレナを培養し、それぞれ単独培養した場合と比較した。模擬ろ過硝化消化液として、商用標準培養液 (OAT Agrio-A) のアンモニウムイオン濃度を、ろ過硝化消化液の値に修正したものをを用いた。

4. 研究成果

(1)メタン発酵消化液の硝化に伴い、液中のリン酸とカルシウムイオンの濃度が増加することがわかった。これは、硝化過程での pH の低下 (5.9-6.1 から 4.0-4.2) により、懸濁物質等からの両イオンの溶出速度が他の反応 (微生物による摂取、吸着等) 速度に比べて大きいことが原因と考えられる。ろ過硝化消化液中の多量要素濃度はマグネシウムを除き養液栽培用標準培養液 (園試処方) 濃度と同程度であった。マグネシウム濃度は園試処方濃度を下回っていた。加えて、ろ過硝化消化液の pH を通常の養液栽培用培養液の範囲内に上昇させても、液中の多量要素濃度はマグネシウムを除き園試処方と同程度であった。以上、メタン発酵消化液を養液栽培用培養液として利用するためには、硝化は窒素成分のみならず、他の無機成分も有効利用できる前処理方法である。

(2)ろ過硝化消化液で育成したキクは商用の標準培養液である OAT Agrio-A で育成したものに比べて、シュート長、葉の葉緑素濃度、開花日数および最大花径では有意差を示さなかったが、シュートの生体重は 33 %低下、花数は 35%低下した。これに対して、マグネシウムを補充したろ過硝化消化液を用いた場合のキクの生長は、OAT Agrio-A と有意差を示さなかった。以上から、ろ過硝化消化液はマグネシウムを補充すればロックウール栽培の培養液として使用できることが実証できた。ろ過硝化消化液中に 24 時間浸漬したロックウールからは、鉄の溶出 (0.33 mg L^{-1}) が認められ、このことが、鉄不足緩和の主因と考察した。

(3) 10%-75%の希釈ろ過硝化消化液および無希釈 (100%) のろ過硝化消化液で培養したユーグレナの比増殖速度に有意差はなく、 $0.925 \pm 0.033 \text{ d}^{-1}$ (平均 \pm 標準誤差) であった。この値は、標準培養液 (Cramer-Myers 培養液) を用いて独立栄養培養した時の比増殖速度と同等であった。ユーグレナを減速増殖期 (培養開始後 6 日、細胞密度 1.9×10^5 個体 L^{-1}) まで増殖させた後のろ過硝化消化液培地中に含まれる硝酸、カルシウム、マグネシウム、カリウムおよびリン酸の各イオン濃度は、培養開始時からやや低下したが、有意差はなかった。アンモニウムイオン濃度は 10.5%減少した。以上から、メタン発酵消化液を用いたユーグレナと植物のカスケード生産システムの実現可能性が明らかとなった。

(4)同時生産した時のユーグレナの細胞密度は、単独で培養した時とほぼ同様に推移し、比増殖速度も同等であった。同時生産した時のレタスの生体重および乾物重、相対生長速度および葉の葉緑素濃度は、単独育成した時と同程度であった。同時生産をユーグレナの定常増殖期 (同時生産開始後 12 日、細胞密度 3.4×10^5 個体 L^{-1}) まで行った後の培養残液中の硝酸、カルシウム、マグネシウム、カリウムおよびリン酸の各イオン濃度は同時生産開始時と同程度であった。アンモニウムイオン濃度は 23%減少した。残液中の多量要素濃度はいずれも園試処方と同程度であった。以上から、ろ過硝化消化液を培養液としてユーグレナとレタスを同時生産することは技術的に可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Takemura, K., Endo, R., Shibuya, T., Kitaya, Y., Growth performances and changes of macronutrient ion concentrations in the culture medium when *Euglena gracilis* was cultured with nitrified digestate, *Environmental Technology*, 査読有, 38,2273-2279, 2017.

北宅善昭, 植物機能を活用した物質循環型社会の構築、アグリバイオ、査読無し、44、59-61、2017.

Takemura, K., Endo, R., Shibuya, T., Kitaya, Y., Modifications of concentrations of plant macronutrient ions in digestate from anaerobic digestion during nitrification processes, Journal of Residuals Science and Technology, 査読有, 13(3), 207-214, 2016.

Endo, R., Yamashita, K., Shibuya, T., Kitaya, Y., Use of methane fermentation digestate for hydroponic culture: analysis of potential inhibitors in digestate to cucumber seedling. Eco-Engineering, 査読有, 28(3), 67-72, 2016.

Khanh, N., Kitaya, Y., Xiao, L., Endo, R., Shibuya, T., Microalgae culture with digestate from methane fermentation -Effects of digestate concentrations and pH on the growth of Euglena gracilis. Eco-Engineering, 査読有, 27 (1), 7-11, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

遠藤良輔ら、異なる栄養塩濃度で生育したアゾラを基質としたメタン発酵特性、日本農業気象学会 2018 年全国大会

遠藤良輔ら、メタン発酵を導入した資源循環型トマト養液栽培の検討 エネルギー・物質の収支および LCCO₂ の解析、日本農業気象学会 2016 年全国大会

遠藤良輔ら、メタン発酵消化液を養液栽培に適用するための改質処理の検討 - 炭酸カルシウム投入によるアンモニアの硝化促進 -、2016 生態工学会年次大会

遠藤良輔ら、トマト養液栽培で発生する植物残渣のメタン発酵による再資源化の検討、2015 生態工学会年次大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北宅 善昭 (KITAYA, Yoshiaki)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号 : 60169886

(2) 研究分担者

遠藤 良輔 (ENDO, Ryosuke)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究

科・講師

研究者番号 : 10409146