

令和元年6月12日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06554

研究課題名(和文) 余剰汚泥の肥料化過程で発生するMVOCsの生物脱臭に関する研究

研究課題名(英文) Research on biological deodorization of MVOCs during fertilization process of sewage sludge

研究代表者

西村 和之(Nishimura, Kazuyuki)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：00261595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥料化施設におけるMVOCsの挙動と生物脱臭の確立を目指して、肥料化過程でのMVOCs濃度と微生物叢とを把握し、生物脱臭塔内微生物を単離・同定した。MVOCsは、副資材による違いは認められないものの濃度に約2倍の差が生じた。微生物叢は、変化が小さい場合と大きく変化する場合があった。MVOCsの発生や微生物叢の変遷に影響を及ぼす要件は、有機物量や質と通気量であった。生物脱臭塔内から32株の微生物を単離した。取得した菌株の80%はFirmicutesであったが、次世代シーケンス解析ではProteobacteriaが53%でありMVOCsの除去は、単離が難しい微生物種が担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

余剰汚泥の肥料化において発生する臭気の効率的な除去を目指して、微生物が産生する臭気物質であるMVOCsの発生挙動と微生物叢との関係を調べた。また生物脱臭塔内から微生物を単離・同定し、生物脱臭に有効な微生物種を探索した。

肥料化過程で発生するMVOCsは発酵条件による違いは大きくないが、発生量は有機物量、質や通気量によって2倍程度の差が生じた。微生物叢の変遷は、これらの条件によって異なっていた。生物脱臭塔から単離された微生物の殆どは発酵菌門に属していたが、遺伝子解析ではプロテオバクテリア門が優占していたことから、MVOCsの除去に関する微生物種は単離が難しい微生物種が担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the behavior of MVOCs in an organic fertilizer plant and to establish the biological deodorization process. The relationship between MVOCs concentration and microflora in the process was analyzed. The microorganisms involved in the removal of MVOCs were isolated within the biological deodorization process. The MVOCs detected during the fermentation process did not differ significantly depending on the sub materials. However, when the sub materials differ, the MVOCs concentration has a difference of about 2 times. Changes in the microbiota in the fermenter were different depending on the fermentation conditions. In the fertilization process, the requirements for affecting the occurrence of MVOCs and the change of microflora were the quality and quantity of organic matter and the aeration volume. 32 strains of aerobic microorganisms were isolated from the biological deodorization tower. More than 80% of the obtained strains belonged to Firmicutes.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：バイオマスの利活用 適正処理 臭気除去

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の構築に向け、炭素換算で年間 3,484 万 Ct の賦存量があるとされるバイオマス資源の有効利用が進められている。様々な未利用バイオマスの有効利用の方策として、最も現実的な手法は、微生物発酵により有機性肥料に転換することがあげられる。微生物発酵に基づく肥料化は、適正な処理条件であれば安全で肥料としての品質の良い発酵産物が得られるものの、発酵状態が不適であれば、変異原性が高まったり、揮発性の有機化合物が臭い成分として発生したりして、利用環境や周辺環境に悪影響を及ぼす場合がある。特に、中山間地域の排水処理施設に付随する肥料化施設の様に小規模の肥料化施設では、肥料化過程の制御が困難な場合があり、悪臭の発生メカニズムの解明や安価な悪臭対策手法の確立が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、小規模な有機性肥料化施設における微生物由来の揮発性有機物質 MVOCs の発生に關与する微生物を分子生物学的手法により解析することで、悪臭発生のメカニズムに係る情報得るとともに、主として脱臭措置内に生息する MVOCs 分解に關与する微生物を単離・同定し、小規模施設で効率的な脱臭を行うための生物脱臭プロセスに利用可能な微生物の取得とその特性の解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、木質チップを副資材とする余剰汚泥の肥料化する発酵槽型の肥料化システムにおいて、経時的に発酵産物を採取して微生物叢の変遷と発酵過程で産生する MVOCs を測定や各種の腐熟度指標の分析を行った。

発酵条件は、標準的な杉チップを副資材として用いる場合、副資材を竹チップに変更した場合や竹チップを用いて有機物負荷条件を 1.25 倍から 1.5 倍に高めた場合とした。微生物叢は、研究開始時にクローン解析よりも大幅に多量の遺伝子情報が得られる次世代シーケンスの利用が可能になったことから、網羅的な微生物叢が把握できる 16SrRNA をターゲットとする次世代シーケンスによって発酵過程における変遷を把握することとした。MVOCs の測定は、高感度に MVOCs を測定できる SPME 法を用いた GC/MS/MS により 2008 ~ 2009 年度に実施した「水変異原性と MVOC を用いた堆肥の安全性評価手法の開発 (課題番号: 20651022)」で定めた 16 物質を対象とした。また、肥料化過程の腐熟度の変遷を調べるために、一般的な腐熟度指標である陽イオン交換容量 CEC とアンモニア性窒素の分析を行った。

生物脱臭に係る有用微生物の探索は、研究対象の施設に付随している生物脱臭塔内の担体を分取し、担体に付着している微生物の単離と遺伝子解析を行うとともに、単離菌株の MVOCs の分解特性を検討した。

4. 研究成果

4. 1 発酵条件と腐熟度の関係

本研究では、農村集落排水処理施設で発生する余剰汚泥の脱水ケーキを主原料とし、副資材として杉チップや竹チップを用いた発酵槽型の有機性肥料の肥料化プロセスにおいて、反応槽内内容物を経時的に採取して分析を行った。実験条件は、副資材として杉チップを用いた場合を標準 (Phase0) とし、副資材を竹チップに変えた条件 (Phase)、竹チップを副資材として原料である脱水ケーキの投入量を 1.5 倍に増やした条件 (Phase) と竹チップを副資材として脱水ケーキの投入量を 1.5 倍とすると共に通気量を 1.5 倍に増やした (Phase) の 4 条件を比較した。発酵槽内の性状は、一般的な腐熟度指標とされているアンモニア性窒素、塩基置換容量 (以下、CEC) により把握した。

CEC 分析により測定された発酵槽内容物の CEC 値の変化を図-1 に示す。

基本技術の副資材として杉チップを用いた Phase0 では、発酵初期から 4 カ月程度まで 60 ~ 70 cmol(+) kg - 1 (= meq/100g) であまり変化せず、最後の 2 カ月で 90 cmol(+) kg - 1 まで増加して発酵を終了していた。一方、副資材として竹チップを用いた Phase の場合、有機物負荷に関わらず発酵初期に 20 cmol(+) kg - 1 前後であった CEC は、発酵開始後 1 月間で急速に増加しその後、4 カ月目までの期間の増加が緩やかになり、最終段階の 2 カ月間は殆ど変化せずに 80 cmol(+) kg - 1 程度で発酵を終了した。しかしながら、竹チップを用いて有機物負荷に相当する脱水ケーキ投入量を 1.5 倍に増加させた Phase では、2 週間目以降の増加傾向が緩やかであり、CEC 値が凡そ 80 cmol(+) kg - 1 程度となり発酵終了とした 5 月目まで増加し続ける傾向にあり、有機物負荷によって CEC 値の増加傾向が異なることが示された。一方、同じ脱水ケーキ投入量ではあるものの、通気量を 1.5 倍に増やした Phase では、Phase と同様に 1 月目には 80 cmol(+) kg - 1 程度の一定値を示す定常状態となった。

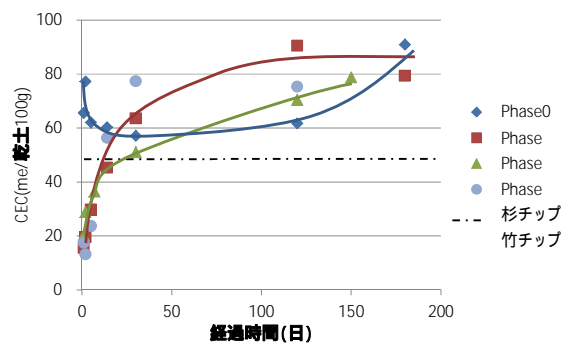


図-1 標準負荷における MVOCs の発生挙

以上の様に、本研究で用いた肥料化プロセスでは、発酵初期の CEC 値は用いる副資材に依存しており、そのために副資材の CEC 値が高い杉チップを用いた場合は、発酵過程における CEC 値の変化が小さく腐熟度の判定が利用し難いが、低い CEC 値を持つ竹チップを用いた場合は、CEC 値が 80 cmol(+) kg⁻¹ 程度になった段階を発酵の終了と判定することが可能であり、また、1 月目前後の CEC 値の増加傾向を比較することで腐熟度の適否を判定することが可能であると考えられた。また、単純に負荷量を増やした Phase は、発酵途中で CEC のアンモニア等の蓄積が起こり発酵不適と判断されたものの、Phase において通気量を増加させることにより正常な発酵処理が行われて良好な有機性肥料が製造されたと判断されたことから、適正な発酵には有機物負荷量に応じた適正な通気量が必要であることが確認された。

4.2 有機性肥料化施設における MVOCs の発生挙動の把握

微生物由来揮発性有機化合物 MVOCs の発生挙動を SPME-GC/MS/MS 分析によって把握した。

MVOCs の経時変化をみると、何れの発酵条件であっても発酵処理の期間中に一旦増加し、その後減少する MVOCs が複数種類計測された。特に処理期間中での発生増減量が顕著であった MVOCs は 2-Butanone であり、2-methyl-1-Propanol と 2-methyl-1-Butanol の発生増減量が次いで多かった。得られた結果の主成分分析を行うと、16 の主成分に分割整理できたが、それぞれの固有値と累積変動割合は第二主成分までで 65.5%、第三主成分までで 74.2% 説明できる結果となった。ここでは、第一主成分と第二主成分について得られた、試料毎の因子得点の関係を図 2 に示す。

図-1 に見る通り、杉チップを用いた Phase0 では第二主成分 F2 が時間と共に減少する傾向が示される一方、竹チップを用いた場合は、発酵処理の時間経過と共に一旦は第一主成分 F1 も第二主成分 F2 も共に一度は発酵の進行に伴って増加するが、発酵処理の終了時には、ほぼ初期状態に戻る傾向が示された。従って、副資材による挙動に違いはあるものの、MVOCs 濃度の増減の傾向を把握することができると判断された。MVOCs を総合的に見ると、竹チップを用いた場合の発酵初期の第一主成分と第二主成分の増減は、2-Butanone、2-methyl-1-Propanol や 2-methyl-1-Butanol の増減であり、発酵状態を表すシグナルとしてのこれらの MVOCs の動向を着目すれば発酵槽内の状態が発酵初期に關与する微生物種によって産生されるとともに、その後優先する微生物種が一旦発生した MVOCs の代謝分解に關与するものと考えられた。

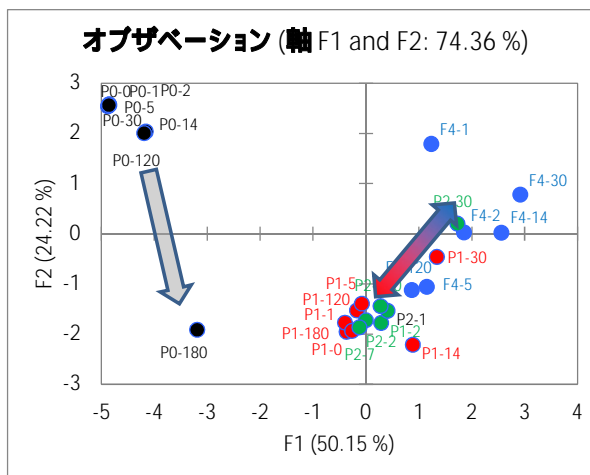


図-2 MVOCs の発生挙動

4.3 発酵槽内の微生物叢の変化

発酵槽内の微生物叢の変化を 16SrRNA の V3・V4 領域をターゲットとする次世代シーケンサーにより把握した。

得られた並列の Blast 検索を行ったところ、同定不能を含めて門レベルで 27 門、属レベルで 485 属に分類された。また、Phase0、Phase、Phase では、Plactomycetes が優占する傾向を示したが、Phase では初期に Proteobacteria が優占し、その後 Firmicutes に属する Bacillales が優占していた。従って、竹チップを用いた肥料化処理における発酵槽内の微生物叢の変化は、有機物負荷と通気量の影響を受け、通気量が多い場合では菌叢の変化の傾向に違いが出ることを確認ができた。また、有機物負荷が等しく通気量のみが違う Phase2 と Phase4 の結果の比較から、有機負荷量が増加した場合には、負荷量の増加に応じて通気量を増やすことで微生物叢が変化し、発酵が行うことができると考えられる。

門レベルの出現割合の変化について主成分分析を行ったところ、26 の主成分に分割整理できたが、第四主成分までの説明割合が 69%であったことから、発酵槽内の微生物叢の変化傾向は第四主成分までで説明できると判断された。第一主成分 F1 と第

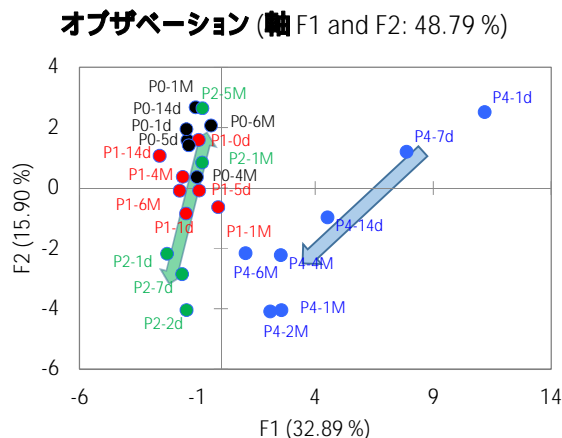


図-3 微生物叢の変化傾向

二主成分 F2 の結果を図-3 に示す。

主成分分析の結果、杉チップを用いた Phase0 では菌叢の変化が少ないことが確認できた。一方、竹チップを用いて負荷量が高く、発酵が良好に進行しなかったと判断された Phase の微生物叢では、発酵初期に第 2 主成分が大きく減少した後に、初期の微生物叢へと近づいていた。しかしながら、同様の負荷量であっても、通気量を高めた Phase では、発酵とともに第 1、第 2 主成分ともに減少一方方向に傾向が認められた。これらの主成分の関与する微生物種は、Planctomycetes、Firmicutes と Proteobacteria であり、通気量を高めた Phase における微生物叢の変遷が良好な変遷であると仮定すると、第二主成分に関する Planctomycetes の減少と Proteobacteria の増加が発酵状態を定める微生物群である可能性が示唆された。図-5 戻し肥料中から得た単離菌株の系統樹分析の結果

従って、これらの結果を総合すると、Phase の様な有機物負荷の増加に伴う発酵不適時に一時的かつ顕著に発生する MVOCs である 2-Butanone や 2-methyl-1-Propanol の増減には、上記の 2 門に属する微生物群が関与するものと考えられた。

4.4 生物脱臭に關する微生物種とその特性

本研究で対象とした肥料化施設には、生物脱臭塔が設置されていることから、生物脱臭塔の担体と加湿水の余水を採取して生物脱臭に關与している微生物群を次世代シーケンスによって把握した。得られた微生物群の門レベルと目レベルの出現割合を図-4 に示した。

図-4 に見る通り、担体に付着している微生物群は、Proteobacteria に属するものが半分以上を占めており、次いで優占度合いが高いものが Planctomycetes に属していた。一方、加湿水の余水中の微生物群は、Firmicutes に属する微生物が優占しており、Planctomycetes に次いで Chloroflexi に属する微生物の存在割合が高く、担体上の微生物叢とは異なる微生物群集で構成されていた。

次に、それぞれの微生物が MVOCs の消長に關与する状況を調べるために、発酵処理における種菌に相当する戻し肥料から標準寒天培地を用いて 60、1 日培養して生育したコロニーから、出来るだけ視覚的な形状が異なる 32 菌株を単離した。取得した菌株について 16SrRNA をターゲットとするシーケンス解析を行い得られた配列に基づく系統樹分析を行った。結果の一部を図-5 に例示する。

取得した菌株のシーケンス解析に基づく系統樹分析の結果は、図-5 に示したとおり、殆どが Bacillales に属する微生物であり、Actinobacteria に属する微生物種と Proteobacteria に属する微生物種が 1 株ずつであった。

得られた単離菌株をそれぞれ 1 日間目培養した後に、121、20 分間のオートクレーブ処理した仕込み物（肥料化原料）に殖菌し、60 で 24 時間培養した時に発生した MVOCs を測定した。なお、培養条件は、培養瓶をスポンジ栓で塞いで静置した準好気条件とブチルゴム栓で密栓した準嫌気の 2 種とした。

竹チップを用いた標準有機物負荷条件の仕込み物に殖菌した結果を図-6、7 に示す。図-6 に示した、スポンジ栓を用いることである程度の空気の入替わりが起こり得る準好気条件では、No. 9 から No.16 までの何れの菌株であっても殖菌をしていない対象区と比べて 2-butanone の発生量は低く、また、2-pentanol の発生量は、殖菌をしていない対象区と同程度であった。一方、バイアルのヘッドスペース層の酸素除去は行っていないものの、ブチルゴム栓で密栓することにより酸素の供給を遮断した条件で培養した場合、図-7 に示すとおり、殖

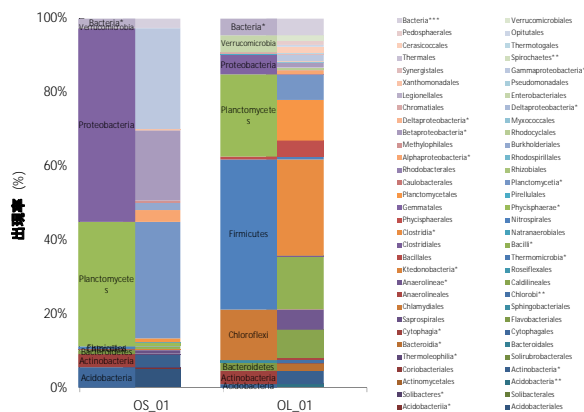


図-4 生物脱臭塔から得られた微生物叢

担体上の微生物の存在割合が高く、担体上の微生物叢とは異なる微生物群集で構成されていた。

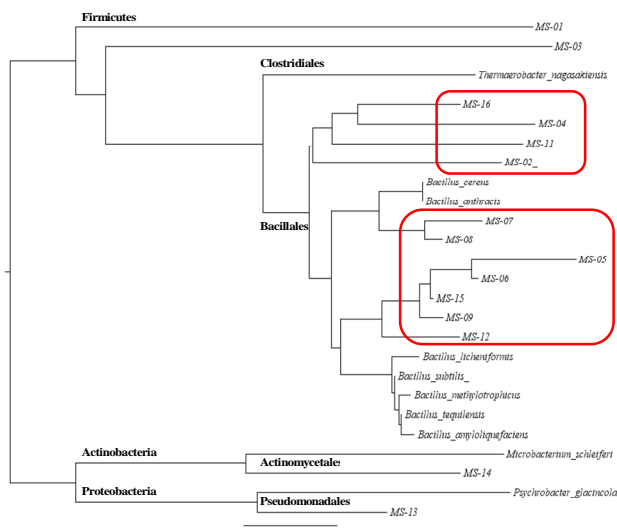


図-5 戻し肥料中から得た単離菌株の系統樹分析の結果

Actinobacteria に属する微生物種と Proteobacteria に属する微生物種が 1 株ずつであった。

菌をしていない対象区と比べて 2-butanone の発生量は多く、特に菌株 No. 11 において顕著であった。また、2-pentanol の発生量は、殆どの菌株において殖菌をしていない対象区と比較して同程度であった。本培養実験により新たに示唆されたこととして、1-propanol の発生量は、殆どの菌株において殖菌をしていない対象区と比較して同程度であったが、菌株 No.16 において高濃度の発生が認められた。

以上の結果から、空気、即ち酸素の供給が不十分であると Bacillales に属する微生物種が 2-pentanol や 1-propanol の発生に大きく関与していることが明らかとなった。一方、発酵過程の微生物叢の変遷と MVOCs の発生挙動において発酵の進行に伴う優占割合の増加と MVOCs の低減に関与していると考えられた Proteobacteria に属する微生物は、生物脱臭塔の担体に優先して付着している微生物種でもあることから、発酵槽内とともに生物脱臭塔内においても MVOCs の代謝分解には、Pseudomonadales などの Proteobacteria に属する微生物種が関与している可能性が示された。

4.5 まとめ

肥料化施設における MVOCs の挙動と生物脱臭の確立を目指して、肥料化過程での MVOCs 濃度と微生物叢とを把握し、生物脱臭塔内微生物を単離・同定した。MVOCs は、副資材による違いは認められないものの有機物負荷濃度に約 2 倍の差が生じた。微生物叢は、変化が小さい場合と大きく変化する場合があった。MVOCs の発生や微生物叢の変遷に影響を及ぼす要件は、有機物量や質と通気量であった。生物脱臭塔内から 32 株の微生物を単離した。取得した菌株の 80% は Firmicutes であったが、次世代シーケンス解析では Proteobacteria が 53% であり MVOCs の代謝分解は、単離が難しい Proteobacteria に属する微生物種が担ってい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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

河田梨早、松島亜耶、西村和之、崎田省吾、徳岡誠人、大森誠紀：余剰汚泥を原料とする肥料化過程で発生する MVOCs の挙動、第 51 回日本水環境学会年会 p763、熊本、2017 年 3 月

松島亜耶、西村和之、崎田省吾、徳岡誠人、大森誠紀：余剰汚泥を原料とする肥料化過程で発生する MVOCs と微生物叢に関する検討、第 28 回 廃棄物資源循環学会研究発表会 p243-244、東京、2017 年 9 月

井藤知里、西村和之、崎田省吾、國田丙午、伊藤純樹、原田美穂子、徳岡誠人、大森誠紀：余剰汚泥を原料とする有機性肥料の発酵条件に関する検討、第 29 回 廃棄物資源循環学会研究発表会 p251-252、名古屋、2018 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

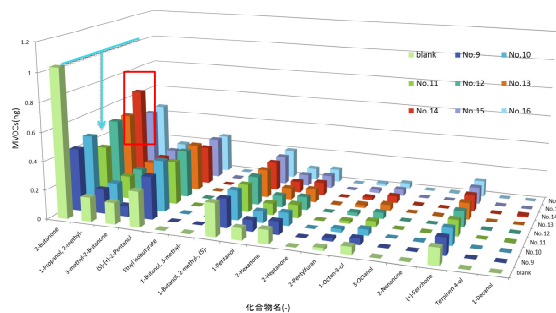


図-6 準好気条件下での MVOCs の産生挙動

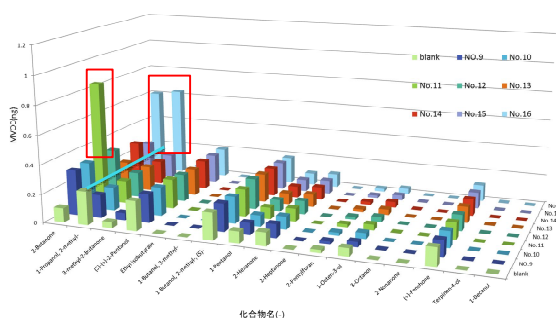


図-7 準嫌気条件下での MVOCs の産生挙動

6 . 研究組織

(1)研究分担者

崎田 省吾 (SHOGO SAKITA)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：80398099

(2)研究協力者