

令和 5 年 9 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04366

研究課題名(和文)嫌気性細菌群の高度利用による有害化学物質を含有する電子産業廃水のグリーン処理

研究課題名(英文)Green treatment of electronic industrial wastewater containing toxic chemicals by advanced utilization of anaerobic bacterial consortium

研究代表者

珠坪 一晃 (SYUTSUBO, KAZUAKI)

国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・副領域長

研究者番号：80293257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、メタン発酵処理が容易な有機物(糖、低級脂肪酸)を供給しつつ、段階的に有機化学物質(IPA、TMAH、MEA)を廃水に混合させ汚泥を順化させる事で、常温条件下における電子産業廃水のメタン発酵処理が可能になる事が分かった。最終的にUASB法は、18-19℃温度条件下で約8.6 kgCOD/m³/dayの有機物負荷と96%の高いCOD除去率を達成した。また、廃水のTMAHの含有量の増加は保持汚泥の物性悪化を招くこと、MEAの含有量の増加は汚泥物性の改善に効果的であることなど、運転管理の上で重要な知見も得られた。さらに、UASBの早期立ち上げに有効なTMAH分解細菌の取得にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、省・創エネルギー型の廃水処理技術であるUASB法の適用がなされていない有機化学物質を含有する電子産業廃水に対しての同手法の適用手段の基礎を確立したもので、産業廃水の低炭素化、資源循環に貢献するものである。また、当該廃水に含まれる有機化学物質(IPA、TMAH、MEA)の嫌気分解特性や分解細菌群についての新たな基礎知見は、学術的に大きな意義を持つ。新たに取得したTMAH分解古細菌は、TMAHを含む廃水の嫌気性処理における植種菌やバイオレメディエーションにも応用可能で産業利用上も有用である。

研究成果の概要(英文)：As a result of this research, while supplying easy degradable organic substances (sugars, volatile fatty acids), organic chemicals (iso-propyl alcohol:IPA, tetramethylammonium hydroxide:TMAH, monoethanolamine:MEA) are gradually mixed with wastewater to acclimatize the sludge resulted successful methanogenic treatment of synthetic electronics industrial wastewater at ambient temperature. Finally, the UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) achieved an organic load of 8.6 kgCOD/m³/day and a high COD removal efficiency of 96% under the ambient temperature. Also, important findings for operation management of the UASB were obtained, such as that an increase in the content of TMAH in wastewater leads to deterioration of the physical properties of retained sludge, and that an increase in the content of MEA is effective in improving the physical properties. Furthermore, we succeeded in obtaining novel TMAH-degrading methanogenic strain that is effective for the early start-up of the UASB.

研究分野：環境工学

キーワード：メタン発酵 有機化学物質 常温処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、急速に普及したスマートフォンや、人工知能 (AI) の進化に伴って、半導体等の電子機器の需要が高まっている。電子機器の製造、例えばフォトリソグラフィーによる電子回路の形成や洗浄工程等では有機化学物質が使用されるが、半導体の需要増大 (製造数の増加) と高性能化 (工程の複雑化) が相まって廃水の排出量も増大している。半導体等を製造する電子産業において普遍的に使用されている有機化学物質は、水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH)、モノエタノールアミン (MEA) およびイソプロピルアルコール (IPA) であり、製造工程から常温で排出される廃水に高濃度に含まれている。TMAH、MEA はそれぞれ毒物、PRTR 法における届け出対象物質にも指定されており適切な処理が必要である。現状では、他工程から排出される低濃度廃水と混合し、活性汚泥法 (好気性処理) により処理する事で水質と安全性を確保しているが、多大な曝気電力の消費と余剰汚泥の大量発生が要因となっている。難分解性の有機化学物質を含み、常温で排出されるこれらの高濃度廃水の省・創エネルギー処理を目指したメタン発酵処理技術の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究課題では、有機化学物質を含む電子産業廃水を常温域で処理可能なメタン発酵技術の開発を行う事を目的とする。

具体的には、(1) TMAH、MEA、IPA を含有する廃水の UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) 法による連続処理試験を 18~19 温度条件下で行い、各有機化学物質の処理特性、装置の安定運転の鍵となるグラニューク汚泥の物理性状 (粒径、沈降性など) を評価する。(2) 回分試験による保持汚泥のメタン生成活性の測定を行い、各有機化学物質の代謝特性を評価する。保持汚泥の微生物群集構造の解析を行い、各有機化学物質の分解に係わる細菌を同定する。(3) TMAH 分解菌の集積培養・単離を行い、その生理学的特性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題で用いた UASB の概要を図 1 に示す。連続処理試験には、有効容積 2 L の UASB リアクターを用いた。植種汚泥には、糖および低級脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸) を常温 (18~19) で処理する UASB リアクターから採取したグラニューク汚泥を用いた。保持汚泥は、まず IPA (および糖、低級脂肪酸) を含む廃水を供給して、馴致を行った (Run 1)。次いで、IPA に加え TMAH を添加した廃水により馴致を実施した (Run 2)。最終的に、IPA 0.15 gCOD/L、TMAH 0.7 gCOD/L、MEA 0.55 gCOD/L、および酵母エキス 0.1 gCOD/L、合計 1.5 gCOD/L 相当を含む廃水を供給した (Run 3)。UASB の温度を 18~19 に維持し、HRT を 4 hours (容積負荷 9.0 kgCOD/m³/day) に設定して、処理性能を評価した。また、UASB リアクターから汚泥を経時的に採取し、汚泥容量指標 (SVI) および平均粒子径 (解析粒子数基準) を測定した。

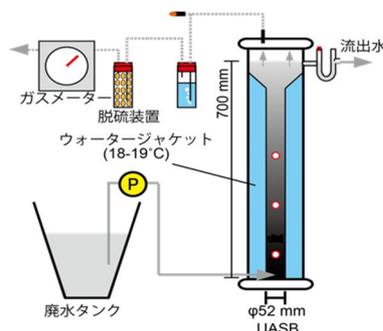


図 1 連続処理試験に用いた UASB の概要

(2) 各有機化学物質の分解特性を評価するため、保持汚泥のメタン生成活性を 20 条件下において測定した。供与基質として、IPA、TMAH、MEA を用いた。また、植種汚泥、IPA、TMAH、MEA で集積した汚泥について、16S rRNA 遺伝子を標的とした次世代シーケンサーによる微生物群集構造解析を実施した。

(3) TMAH 分解メタン生成古細菌の単離には、TMAH および IPA を含む廃水を常温条件下 (18~19) で処理する UASB 汚泥を用いた (Run 2)。分離培養は、TMAH (1 gCOD/L) を主たる炭素源とし、さらに微量の Yeast Extract (0.04 COD/L) を添加した Widdel 培地を用い、限界希釈と継代培養を繰り返すことを行った。

4. 研究成果

(1) 各運転条件 (Run) における COD 除去率、メタン回収率を表 1 に示した。

馴致期間の後、IPA の流入を開始させたところ (Run 1) IPA の分解開始までに約 2~3 週間を要した。一方、TMAH については、分解の開始までに 2 ヶ月以上の長期間を要した事から、植種汚泥中に TMAH 分解細菌が殆ど存在せず、また、その増殖も比較的遅いことが明らかになった。MEA については、Run 3 開始後、1 週間程度で分解が認められたため分解細菌がある程度

表 1 UASB 法の各運転条件における処理性能

運転条件	運転日数	廃水有機物組成	有機物負荷 (kgCOD/m ³ /day)	COD 除去率 (%)	メタン回収率 (%)
馴致期間	0-104	sucrose, VFAs	5.6 ± 0.8	94 ± 5	81 ± 13
Run 1	105-441	IPA (& sucrose, VFAs)	8.4 ± 0.4	97 ± 1	88 ± 3
Run 2	442-767	IPA & TMAH	7.5 ± 0.8	96 ± 1	85 ± 9
Run 3	768-1185	IPA, TMAH & MEA	8.6 ± 0.8	96 ± 1	85 ± 4

普遍的にメタン発酵汚泥に存在する事が示唆された。Run 1~3におけるCOD除去率は96~97%と高く、処理水中のIPA、TMAH、MEA濃度は検出限界以下にまで分解された。

馴致期間の後、IPAの流入を開始させたところ（Run 1）IPAの分解開始までに約2~3週間を要した。一方、TMAHについては、分解の開始までに2ヶ月以上の長期間を要した事から、植種汚泥中にTMAH分解細菌が殆ど存在せず、また、その増殖も比較的遅いことが明らかになった。MEAについては、Run 3開始後、1週間程度で分解が認められたため分解細菌がある程度普遍的にメタン発酵汚泥に存在する事が示唆された。Run 1~3におけるCOD除去率は96~97%と高く、処理水中のIPA、TMAH、MEA濃度は検出限界以下にまで分解された。またメタン回収率も85~88%と高く維持された。これより、常温条件下（18~19℃）においてもUASB法はIPA、TMAH、およびMEAを含む電子産業廃水のメタン発酵処理に適用可能である事が示唆された。

表2に各運転条件下におけるUASB保持汚泥の物理的性状を示した。IPA含有廃水を供給したRun 1（IPA馴化期間）後半における保持汚泥の平均直径は1.8mmだった。TMAHの供給を行ったRun 2の後半には粒径は1.2mmに減少し、さらに沈降性の低下も確認された。これより、特にTMAHの流入が保持汚泥の物性悪化に影響を及ぼした事が推測された。Run 2の初期段階（TMAHの供給開始から90日後）では、UASB保持汚泥量の大幅な減少も確認された（その後230日後には汚泥量が回復）。Run 3の流入TMAH濃度はRun 2と同じ（0.7 gCOD/L）であったが、廃水にMEAを混合する事で平均直径が1.5mmに増加した。また、保持汚泥量も増加し、500日運転後には50 gVSSに達した。以上の結果から、MEAの供給はグラニュール汚泥の物理的性状維持に効果的である事が明らかになった。

表2 UASB保持汚泥の物理的性状

運転条件	平均粒径 (mm)	SVI (mL/gTSS)	保持汚泥量 (gVSS)	(Note)
馴致期間	1.8	18	37	
Run 1	2.1	17	38	IPA, 全CODの6割
	1.8	21	41	IPA, 全CODの9割供給後170日
Run 2	1.7	21	20	TMAH供給後90日
	1.2	23	41	TMAH供給後230日
Run 3	1.4	19	49	MEA供給後100日
	1.5	21	43	MEA供給後200日
	1.6	19	51	MEA供給後500日

(2) 保持汚泥への各有機化学物質の分解に係わる細菌群集の集積化度合いを評価するためメタン生成活性の測定を行った。また、メタン生成細菌の特異的な阻害物質であるクロロホルムを添加することで、各有機化学物質の分解に係わる細菌群、代謝物質の同定を行った。20℃条件下におけるメタン生成活性（Run 3）は、IPA、TMAH、およびMEAに対して、それぞれ0.12、0.20、および0.45 gCOD/gVSS/dayとなった。MEAのメタン生成活性が最も高く、それに対してIPAのメタン生成活性は1/4程度と低かった。TMAH分解細菌の馴致には長期間が必要であったが、メタン生成速度はIPAの2倍程度となった。IPAおよびTMAHのメタン生成活性試験においてクロロホルムを添加したところ、IPA、TMAHの分解が停止し、メタンの生成も確認されなかった。これより、IPA、TMAHは、メタン生成細菌により直接資化される事が明らかになった。一方、MEAについては、クロロホルムの添加を行っても分解の進行が認められ、分解の初期段階には真正細菌が関与する事が分かった。またIPAの分解代謝産物としてアセトンが、MEAの分解代謝産物として酢酸、プロピオン酸が検出された。

図2に各運転条件下における保持汚泥の微生物群集構造を示した。古細菌は属レベルで、細菌群集は門レベルで図中にその割合を示した。古細菌（主にメタン生成細菌）の総存在量は、馴致期間（Start up）の29.1%からRun 3には38.8%にまで増加した。本研究ではUASBの運転温度を18~19℃と低く設定した事でメタン生成細菌の自己分解が抑制され存在割合が高く維持されたと推測される。植種汚泥の主要なメタン生成細菌は、酢酸資化性の*Methanosaeta*属と水素資化性の*Methanobacterium*属であったが、IPAを供給したRun 1では*Methanospirillum*属の増加が確認された。TMAHを供給したRun 2ではメタノールおよびメチルアミンを利用する古細菌である*Methanomethylivorans*属の顕著な割合の増加（優占化）が確認され、*Methanomethylivorans*属がTMAHの分解に関与している事が強く示唆された。また保持汚泥の電子顕微鏡観察の結果、TMAHの供給に伴いグラニュール汚泥の表面に*Methanomethylivorans*属の特徴的なcoccoid状（球状）の細胞の集積化が確認された（結果示さず）。この*Methanomethylivorans*属の優占化が

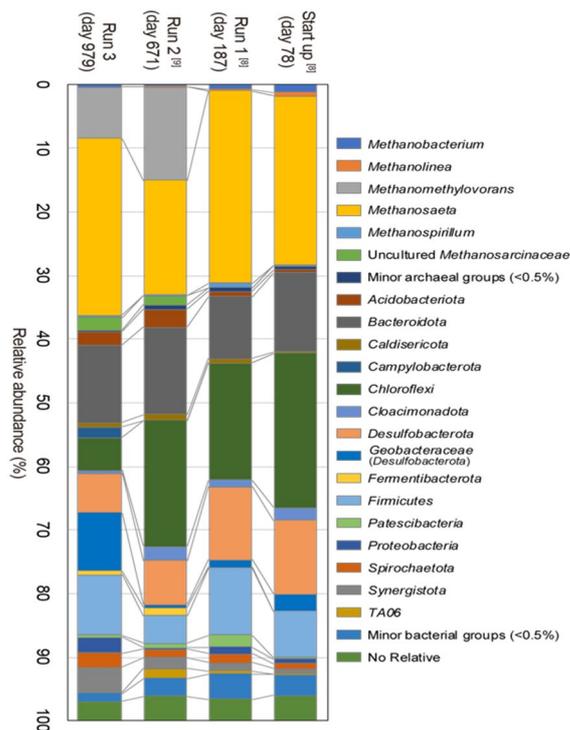


図2 保持汚泥の微生物群集構造(16S rRNA 遺伝子)

保持汚泥の粒径減少に繋がったと考えられる。MEAの供給を開始したRun 3では、*Methanosaeta*属細菌の割合が増加し、それに伴い保持汚泥の物性が安定化した。したがって、MEAおよびIPAの分解によって生じる酢酸を利用する*Methanosaeta*属細菌は、IPA、TMAH、およびMEAを含有する電子産業廃水のUASB法によるメタン発酵処理において保持汚泥の物理的性状を維持する上で重要な役割を果たす事が明らかになった。

(3) 現在まで、TMAHの分解能を持ち、メタン発酵細菌群集で定着可能な細菌の報告はない。本研究でもTMAHの分解細菌の保持汚泥への集積には長期間を有しており、植種細菌の確保と詳細な増殖特性の評価を目的としてIPA、TMAHを含む廃水で馴致したグラニュール汚泥(Run 2)よりTMAH分解細菌の単離を行った。TMAHを主たる炭素源としたWiddel培地を用いてTMAH分解菌の単離培養を行った結果、限界希釈法と5回の継代培養を繰り返すことで*Methanomethylovorans*属に属する新種の新細菌NY-STAYD株の単離培養に成功した(図3)。

単離したNY-STAYD株の16S rRNA遺伝子配列のほぼ全長を決定し、*Methanomethylovorans*属の3種の既存種(*M. uponensis* *M. hollandica* および *M. thermophila*)との相同性を確認したところ、97.8~99.3%と近縁であった。一方でこれら既存種はTMAHを基質として培養を行っても増殖が見られなかったことから、NY-STAYD株は*Methanomethylovorans*属に分類される初めてのTMAH分解古細菌単離株であることが示された。生理学的性質として、グラム染色および最適増殖温度について検討した。結果、NY-STAYDは3種の既存種と同様にグラム陰性であった。培養温度の検討については、25°C~37°Cの範囲で増殖を確認した。最大比増殖速度は37°Cが最も高かったものの、継続して培養を行うと1ヶ月ほどで溶菌を確認した。一方、25°Cでは、増殖速度は37°Cには劣るものの、菌体収量が検討したすべての条件中で最大値を示し、また37°Cと比較して数ヶ月の長時間培養でも溶菌が見られなかった。このことから、NY-STAYD株は常温条件下でのUASBの運転においてニッチを獲得し、TMAHの分解に寄与していたものと考えられる。本単離株を植種することで、UASBにおけるTMAH分解能が早期に獲得される事も確認され、本株の植種細菌としての有効性が示された(結果示さず)。

本研究の結果、予めメタン発酵処理が容易な有機物(糖、低級脂肪酸)を供給しつつ、段階的にIPA、TMAH、MEAなどの有機化学物質を混合させ汚泥を順化させる事で、常温条件下における電子産業廃水のメタン発酵処理が可能である事が明らかになった。最終的にUASB法は、IPA、TMAH、MEAを含む廃水に対して18~19°C温度条件下で約8.6 kgCOD/m³/dayの有機物負荷と96%の高いCOD除去率を達成した。また保持グラニュール汚泥の物性も良好(粒径1.5 mm、SVI 20 mL/gTSS)に維持されており、本結果より、UASB法が常温条件下での電子産業廃水の処理に適用可能である事が示された。加えて、TMAHの含有量の増加は保持汚泥の物性悪化を招くこと、MEAの含有量の増加は汚泥物性の改善に効果的であることなど、運転管理の上で重要な知見も得られた。加えて、UASBの早期立ち上げに有効なTMAH分解細菌の取得にも成功した。本研究成果は、電子産業廃水処理の省・創エネルギー化に寄与するものである。

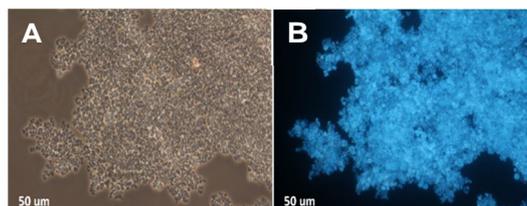


図3 単離株(NY-STAYD)の顕微鏡観察結果

A:位相差 B:DAPI染色(UV)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemura Yasuyuki, Aoki Masataka, Danshita Tsuyoshi, Iguchi Akinori, Ikeda Shoji, Miyaoka Yuma, Sumino Haruhiko, Syutsubo Kazuaki	4. 巻 440
2. 論文標題 Effects of sulfate concentration on anaerobic treatment of wastewater containing monoethanolamine using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hazardous Materials	6. 最初と最後の頁 129764 ~ 129764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhazmat.2022.129764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iguchi Akinori, Takemura Yasuyuki, Danshita Tsuyoshi, Kurihara Takuya, Aoki Masataka, Hori Saori, Shigematsu Toru, Syutsubo Kazuaki	4. 巻 107
2. 論文標題 Isolation and physiological properties of methanogenic archaea that degrade tetramethylammonium hydroxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3047 ~ 3056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-023-12488-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 段下 剛志, 竹村泰幸, 珠坪 一晃	4. 巻 64(8)
2. 論文標題 電子産業排水に対する常温メタン発酵処理適用への展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 用水と廃水	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 角野晴彦, 大石裕翔, 川上周司, 竹村泰幸, 珠坪一晃	4. 巻 64(9)
2. 論文標題 2-プロパノール・硫酸塩含有排水を処理するUASBの運転方法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 用水と廃水	6. 最初と最後の頁 655 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Syutsubo Kazuaki, Danshita Tsuyoshi, Sumino Haruhiko, Iguchi Akinori, Takemura Yasuyuki	4. 巻 March 3
2. 論文標題 Microbial properties of the granular sludge in a psychrophilic UASB reactor fed with electronics industry wastewater containing organic chemicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Science and Health, Part A	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10934529.2021.1890960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 井口晃徳, 栗原拓也, 堀沙織里, 山口利男, 重松亨, 段下剛志, 竹村泰幸, 青木仁孝, 珠坪一晃
2. 発表標題 低温メタン発酵プロセスから分離されたTMAH分解メタン生成古細菌の遺伝的・生理的機能解析
3. 学会等名 第25回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemura Y., Syutsubo K., Aoki M., Danshita T., Iguchi A.
2. 発表標題 Effects of sulfate concentration on anaerobic treatment of monoethanolamine containing wastewater by UASB under psychrophilic conditions
3. 学会等名 The 2021 International Conference on the "Challenges in Environmental Science and Engineering" (CESE-2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井口晃徳, 栗原拓也, 上石唯, 堀沙織里, 山口利男, 重松亨, 段下剛志, 竹村泰幸, 青木仁孝, 珠坪一晃
2. 発表標題 有害化学物質を処理する嫌気性廃水処理プロセス内の重要微生物の分離培養と遺伝学的・表現型の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河村将和, 谷口由将, 松尾和龍, 角野晴彦, 川上周司, 幡本将史, 珠坪一晃
2. 発表標題 2-プロパノールを用いた硝酸塩・硫酸塩含有排水の脱窒処理の最適化
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石裕翔, 加藤博士, 角野晴彦, 川上周司, 珠坪一晃
2. 発表標題 2-プロパノールと硫酸塩を含む電子産業排水のメタン発酵による連続処理と機構解明
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurihara T., Kurashima Y., Danshita T., Takemura Y., Hori S., Shigematsu T., Syutsubo K., Iguchi A.
2. 発表標題 Isolation and Characteristics Properties of a Methanogenic Archaeon Decomposing Hazardous Chemicals in Electronics Industrial Wastewater
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原拓也, 倉島優仁, 堀沙織里, 井口晃徳, 重松亨, 段下剛志, 竹村泰幸, 珠坪一晃
2. 発表標題 電子産業廃水中の有害化学物質を分解するメタン生成古細菌の生理学的性質および分解機構の解明
3. 学会等名 第38回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村将和, 角野晴彦, 珠坪一晃
2. 発表標題 IPAを電子供与体としたNO3-・SO42-を含む電子産業排水の脱窒処理
3. 学会等名 第57回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗原拓也, 倉島優仁, 堀沙織里, 井口晃徳, 重松亨, 段下剛志, 竹村泰幸, 珠坪一晃
2. 発表標題 電子産業廃水中の有害化学物質を分解するメタン古細菌の生理学的性質および分解経路の解明
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 水酸化テトラメチルアンモニウム分解能を有するメタン生成古細菌	発明者 井口晃徳、珠坪一晃	権利者 学校法人新潟科学技術学園、国立研究開発法人
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-040752	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹村 泰幸 (Takemura Yasuyuki) (10837199)	国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・特別研究員 (82101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	井口 晃徳 (Iguchi Akinori) (60599786)	新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授 (33101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------