

メタン発酵消化液中に含まれる窒素成分の低減化に関する研究

松浦真也*, 矢田喜大*, 前川明弘*, 川岡孝督**, 神寄康之**

Study on Reduction of Nitrogen Component in Methane Fermentation Digestive Liquid

Shinya MATSUURA, Yoshihiro YADA, Akihiro MAEGAWA, Takayoshi KAWAOKA
and Yasuyuki KANZAKI

Power plants that use biogas obtained by methane fermentation discharge a large amount of fermentation residue, i.e., the digestive liquid, containing nitrogen components. This study examined a way of removing nitrogen components in digestive liquid using adsorbents for effective utilization of digestive liquid and wastes. As a result, the concentration of ammonia nitrogen in the digestive liquid was decreased by using natural zeolite and bamboo charcoal as adsorbent. In addition, the bacterial flora in the digestive liquid was changed by the type of the adsorbent.

Keywords: Digestive Liquid, Absorbent, Fluid Fertilizer, Bacterial Flora Analysis, Biogas Power Plant

1. はじめに

持続可能で多様性と包摂性のある社会を実現するために、2015年の国連サミットでSDGs (Sustainable Development Goals; 持続可能な開発目標) が採択された。その目標7において、2030年までに再生可能エネルギーの割合を大幅に拡大させることが示されている¹⁾。日本では、2012年の再生可能エネルギーの固定価格買取制度(FIT)の開始や2014年に閣議決定されたエネルギー基本計画等を受けて、生ごみやし尿等の有機性廃棄物を嫌気性菌の働きでメタンを含むバイオガスに変換するメタン発酵技術に注目が集まっている²⁻⁵⁾。メタン発酵により回収されたバイオガスは、燃料として再資源化され、発電等に利用されている⁶⁻⁸⁾。

三重県では、平成30年度に県内で初めてバイオガス発電施設が稼働した。著者らは、この施設の稼働にあたり、事前検討として、県内で発生す

る食品系廃棄物を活用したメタン発酵技術の研究を進めてきた(9-16)。発電施設が安定稼働すると、発酵残渣(以下、消化液とする)が常に発生する。消化液は肥料として利用可能な窒素成分を含有しているため、一部は活用されるものの需要変動や臭気等の問題により、残りは排水処理されている。排水の際には基準値(アンモニア性窒素に0.4を乗じた値と亜硝酸性窒素及び硝酸性窒素の合計量で100 mg/L)以下に低減させる必要があり、生物処理による浄化で対応している。浄化処理にあたっては、窒素成分の濃度調整を目的とした薬品の投入が必要となり、多額の経費を要するため、運用上の課題となっている。そこで本研究では、生物処理の負担軽減を目的として、吸着材を用いた窒素成分濃度の低減化を試みた。ここでは、吸着材として、多孔性を有する天然鉱物や廃棄物(天然ゼオライト、活性白土、竹炭、コーヒーかす)を使用した。また、菌叢の変化と存在する菌種について確認するため、消化液中の菌叢解析も実施した。その結果、天然ゼオライト及び竹炭を用いたとき、消化液中に含まれるアンモニア性窒素の

* ものづくり研究課

** 株式会社大栄工業

濃度減少が見られたので以下に報告する。

2. 実験方法

2.1 使用材料

吸着材には、天然ゼオライト（モルデナイト、日東粉化工業株式会社）、活性白土（富士フィルム和光純薬株式会社）、竹炭及び室温で乾燥させたコーヒーかすを用いた。吸着材の様子を図 1a～d に示す。消化液については、図 2 に示した排水フローの各地点から採取して使用した。



図 1 吸着試験に用いた吸着材の様子

2.2 吸着試験

吸着試験は 2 実験行い、三角フラスコに図 2 の消化液原液 2000 mL と吸着材を入れ、24 時間スターラーで攪拌することにより実施した。実験 1 では、消化液中の固形分（約 1% (w/v)）に対して、固形分：吸着材=1：1 となるように、それぞれ 20 g の吸着材を投入し、実験 2 では、固形分：吸着材=1：5 となるように、吸着材を 100 g を投入した。また、吸着材を加えないブランク試験も併せて実施した。吸着試験終了後、消化液と吸着材の混合液を遠心分離（室温、3000 rpm、10 分）し、得られた沈殿を 105 °C で乾燥させた後、蛍光 X 線分析装置（XRF；株式会社リガク、ZSX Primus II）により半定量分析を行った。また、遠心分離による液体（以下、液体とする）は、点滴ろ紙に 100 μL 滴下した後、減圧乾燥したものを分析試料とし、XRF で半定量分析した。

次に、液体に残存する窒素成分（全窒素及び硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、アンモニア性窒素、有機体窒素）については、JIS K0102 に準拠して分析を行った。有機体窒素は、全窒素の分析値より硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素、アンモニア性窒素の値を差し引いたものである。ここでは、試験前後における濃度の変化を確認した。また、吸着材の投入前後及び吸着試験後における pH を測定し、吸着材による pH の変動を確認した。

2.3 菌叢解析

実験 2 終了後の液体及び図 2 に示した 4 か所から採取した消化液について、次世代シーケンサー Miseq (Illumina) による菌叢解析を実施した¹⁷⁾。排水処理工程ごとに採取した消化液とは、それぞれ、発酵槽より排出された時点の消化液（消化液原液）、遠心分離機で固形分が除去された消化液（固形分除去後）、生物処理プラントにおける処理前後の消化液（生物処理前及び生物処理後）である。まず、試料の前処理として、各試料に対して MORA-EXTRACT を用い、DNA を抽出した。ここでは、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を含む 460 塩基対を標的 DNA 配列として、抽出した DNA を鋳型とし、Amplicon Primer 及び KAPA HiFi HotStart Ready Mix を用い、Amplicon PCR (PCR：Polymerase Chain Reaction) を行うことで DNA を増幅した。また、目的 DNA 断片の増幅をアガロースゲル電気泳動により確認した

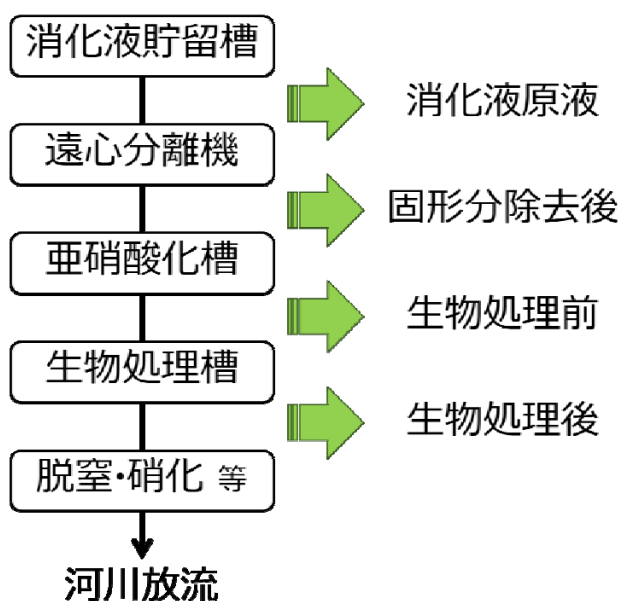


図 2 排水処理工程の概要と試料採取箇所

後、PCR産物に AMPure Beads XP (Beckman) を加え、80 %エタノールと Tris-HCl (pH 8.5) を用いて処理した上清を精製 DNA とした。次に、Nextera XT Index Kit v2 を使用し、Index PCR を行うことで DNA に塩基配列 (Index) を付加し、再度精製した。続いて、Qubit HS Assay kit により、DNA の濃度測定を行った。最後に、次世代シーケンサーにより微生物叢の塩基配列を読み取った。

読み取ったデータ塩基配列に対して、コンピュータ上での解析を行った。まず、データの预处理として、FastQC によるクオリティーチェックを行った後、解析に必要な Index の配列及びキメラリードを除去した。その後、MacQIIME を用いた Green Genes Database との照合による微生物群集解析 (属レベルでの菌種及びその存在比率の推定) を行い、3 %以上の存在比率を有する属を図示した。また、すべて属 (g : genus) レベルまでの解析を行ったが、データベースで同定できなかったものについては、同定できた科 (f : family) や目 (o : order) 等の上位分類で示した。

3. 結果と考察

3. 1 吸着試験

実験 1 の結果、すべての吸着材において、20 g 投入した試験では窒素成分の低減効果は見られなかった。実験 2 の吸着試験結果を表 1 に示す。本実験で用いた消化液の窒素成分は、アンモニア性窒素と有機体窒素が主であり、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素は定量下限値未満であった。ここでは、ブランク試験における窒素成分濃度の増減は誤差範囲として扱う。吸着材 100 g の場合では、ブランク試験と比較して、コーヒーかす以外でアンモ

ニア性窒素濃度が減少した。特に天然ゼオライトでは、有機体窒素濃度も減少した。天然ゼオライトは、アンモニアを選択的に吸着できるため¹⁸⁾、他の吸着材より多くのアンモニア性窒素を吸着したと考えられる。しかし、式(1)に示した排水基準値以下までに低減するためには、より多くの吸着材が必要となり、添加量の増加にともない消化液中の固形分も増加するため、100 g/ 2000 mL 以上の吸着材を添加すると消化液の攪拌が困難になるだけでなく、吸着後における消化液の処理において、遠心分離機にかかる負荷の増大が懸念される。コーヒーかすの場合、実験 2 においても効果は見られなかった。

$$C_{\text{NH}_3} \times 0.4 + C_{\text{NO}_2} + C_{\text{NO}_3} \leq 100 \quad (1)$$

C_{NH_3} はアンモニア性窒素濃度、 C_{NO_2} は亜硝酸性窒素濃度、 C_{NO_3} は硝酸性窒素濃度をそれぞれ示し、単位は mg/L である。

液体に関する XRF 測定の結果、ナトリウム、マグネシウム、ケイ素、リン、硫黄、塩素、カリウム、カルシウムがそれぞれの液体で検出された。ブランクと比較して、天然ゼオライト及び活性白土では、ケイ素、アルミニウム等が多く検出され、竹炭では、硫黄、塩素、カリウムが多く検出された。これらは、溶出等に起因すると考えられる。また、コーヒーかすの pH 測定結果は、ブランク試験と同様であり、無機元素の溶出等による影響が非常に小さいと考えられる。沈殿の XRF 測定結果では、消化液及び各吸着材に由来する炭素、ケイ素、マグネシウム、カリウム等が主に検出された。

吸着試験前における消化液の pH は 7.4 であり、各種吸着材を 20 g 加えた後も大きな変動はなかった。

表 1 各種吸着材 100 g を加えた吸着試験 (実験 2) 前後の各窒素成分濃度

試料名 \ 項目	全窒素	アンモニア性窒素	有機体窒素
消化液 (試験前)	2.9×10^3	2.4×10^3	5×10^2
ブランク	2.7×10^3 (2×10^2)	2.3×10^3 (1×10^2)	4×10^2 (1×10^2)
天然ゼオライト	2.0×10^3 (9×10^2)	1.8×10^3 (6×10^2)	2×10^2 (3×10^2)
竹炭	2.5×10^3 (4×10^2)	2.1×10^3 (3×10^2)	4×10^2 (1×10^2)
活性白土	2.6×10^3 (3×10^2)	2.2×10^3 (2×10^2)	4×10^2 (1×10^2)
コーヒーかす	2.8×10^3 (1×10^2)	2.3×10^3 (1×10^2)	5×10^2 (0)

単位 : mg/L、() : 試験前との差分、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素 : 定量下限値未満

実験 2 で 100 g 加えた場合，吸着後において竹炭が 8.4 まで上昇したが，ブランクと竹炭以外では 7.6 であった．液体の pH についても，竹炭は 8.2 とやや高かったが，ブランクを含む他の吸着材は 7.6 程度であり，変化は小さかった．

3. 2 菌叢解析結果

各排水処理工程において採取した消化液及び実験 2 終了後の液体に関する次世代シーケンサーによる菌叢解析結果を図 3 及び図 4 に示す．図 3 及び図 4 の横軸は相対比を示しており，上側には解

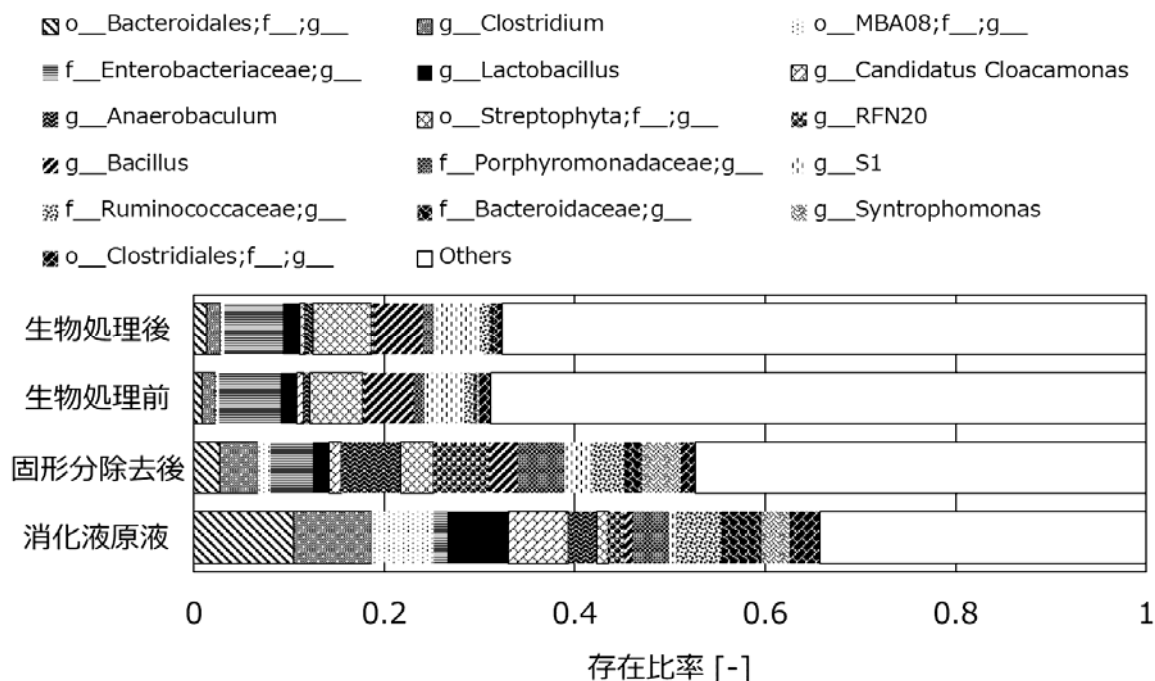


図 3 次世代シーケンサーによる各排水処理工程における消化液の菌叢解析結果

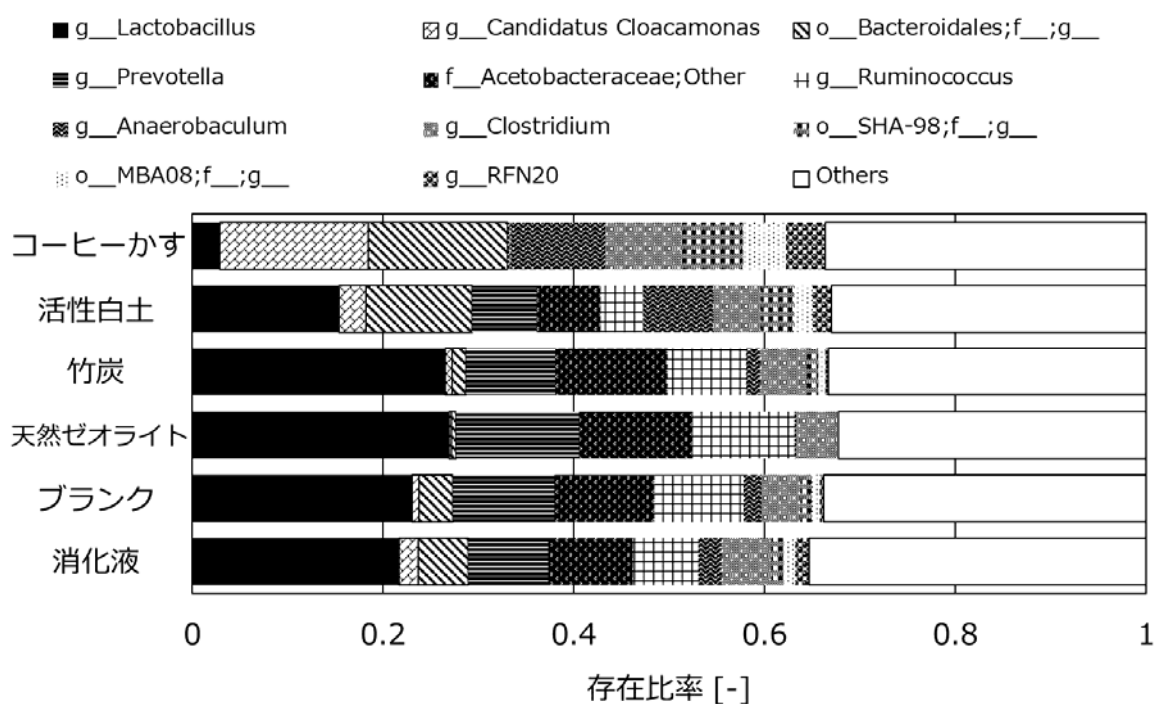


図 4 次世代シーケンサーによる実験 2 終了後（液体）の菌叢解析結果

析により得られた細菌の種類を記載した。

図 3 より、排水処理工程ごとで優占種を比較したところ、消化液中で存在比率の高かった Bacteroidales 目、Clostridium 属、MBA08 目、Lactobacillus 属、Candidatus Cloacamonas 属、Porphyromonadaceae 科、Ruminococcaceae 科、Bacteroidaceae 科、Syntrophomonas 科及び Clostridiales 目の存在比率は、生物処理までの工程で低下した。その一方で、Enterobacteriaceae 科、Bacillus 属及び S1 属の存在比率は上昇した。Bacteroidales 目、Porphyromonadaceae 科及び Bacteroidaceae 科等の Bacteroidates 門は、一般的にバイオガスリアクターで最も豊富な門の 1 つであり、嫌気性消化の加水分解に寄与する菌である¹⁹⁾。これらの結果より、発酵槽に豊富に存在する菌種の存在比率は、処理工程を経るごとに大きく減少していることが確認できた。このことは、消化液が嫌気性の発酵槽から酸素存在下の処理槽へ移送される実際の処理環境とよく一致している。

図 4 より、実験 2 終了後の液体に存在する優占種をブランクと比較したところ、天然ゼオライトでは、Lactobacillus 属及び Prevotella 属の存在比率が上昇し、Candidatus Cloacamonas 属、Bacteroidales 目及び Anaerobaculum 属の存在比率が低下した。竹炭では、Lactobacillus 属の存在比率が上昇し、Bacteroidales 目が低下したが、活性炭では、Lactobacillus 属の存在比率が低下し、Bacteroidales 門及び Anaerobaculum 属が上昇した。また、コーヒーかすは本研究で用いた他の吸着材と比較し、Lactobacillus 属、Prevotella 属、Acetobacteraceae 科及び Ruminococcus 属の存在比率が小さい一方で、Candidatus Cloacamonas 属、の存在比率が大きくなった。メタン発酵では、コーヒーかすに含まれるカフェインが発酵を阻害することが報告されている^{20,21)}。このことから、カフェイン等により消化液中の菌叢に変化が生じたと考えられる。したがって、コーヒーかすが他と大きく異なる菌叢を示した一因は、コーヒーかすから消化液へ溶出したカフェイン等の影響と推察される。吸着試験後の液体から検出された上述の菌は、既述のバイオガス発電所で原料として使用している野菜類、加工食品廃棄物等の有機性廃棄物を分解するもの

(Bacteroidales 目 , Ruminococcus 属 , Clostridium 属 , MBA08 目)²²⁻²⁸⁾や糖類や糖アルコールの酸化により有機酸を生成するもの (Lactobacillus 属 , Prevotella 属 , Acetobacteraceae 科 , Anaerobaculum 属及び RFN20 属)^{25,29-31)}、プロピオン酸酸化経路を有する Candidatus Cloacamonas 属³²⁾であった。投入した吸着材以外の実験条件は同じであることから、実験 2 の後における菌叢解析の結果 (図 4) の違いは、投入した各吸着材から溶出する物質に影響を受けたものであると考えられる。

4. まとめ

本研究により、以下の知見が得られた。

- 1) 天然ゼオライト、竹炭及び活性炭を吸着材として用いると、アンモニア性窒素濃度の減少が見られたが、排水基準値以下までに低減するためには、さらに吸着性能の高い吸着材、あるいは吸着方法の開発が必要である。コーヒーかすを吸着材として用いた場合、本研究では、消化液中に含まれる窒素成分の濃度減少は見られなかった。
- 2) 排水処理工程に応じて菌叢が変化する様子を確認できた。また、排水処理工程を経るごとに多く存在していた菌の比率が低くなり、多様性が見られるようになった。
- 3) 天然ゼオライト及び竹炭を投入した消化液で Lactobacillus 属の存在比率が増加し、コーヒーかすを投入した消化液では、コーヒーかすからのカフェイン等の溶出が一因であると推察される、存在比率の著しい低下が確認された。

謝辞

本研究の実施にあたり、大阪府立大学 理学系研究科 徳本 勇人 講師には菌叢解析に関するご助言をいただきました。また、三重県保健環境研究所 資源循環研究課 立野 雄也 研究員には、窒素成分の分析に関するご協力をいただきました。付記して謝意を表します。

参考文献

- 1) 外務省：“「持続可能な開発目標」(SDGs)について”。(2019)

- 2) 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構編：“バイオマスエネルギー地域自立システムの導入要件・技術指針【メタン発酵系バイオマス編】”。(2018)
- 3) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構編：“NEDO 再生可能エネルギー技術白書第 2 版 第 4 章バイオマスエネルギー”。(2014)
- 4) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構：“乾式メタン発酵技術における主要機器の低コスト化並びに効率的なバイオガス精製技術及びガス利用システムの実用化に関する研究開発成果報告書”。(2013)
- 5) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構：“新エネルギー等地域集中実証研究京都エコエネルギープロジェクト 平成 15～平成 19 年度成果報告書”。(2008)
- 6) 野池達也ほか：“メタン発酵”。技法堂出版 (2009)
- 7) 松井三郎ほか：“産業排水処理のための嫌気性バイオテクノロジー”。技法堂出版 (1999)
- 8) 上木勝司ほか：“嫌気微生物学”。養賢堂 (1993)
- 9) 前川明弘ほか：“有機系廃棄物を利用したメタン発酵に関する基礎的研究”。三重県工業研究所研究報告, 41, p54-59 (2017)
- 10) 西川奈緒美ほか：“中温メタン発酵技術を用いた食品廃棄物の有効利用に関する基礎的研究”。日本化学会第 98 春季年会, 2B5-14 (2018)
- 11) 久保智子ほか：“中温メタン発酵技術を用いた食品系廃棄物の有効利用に関する基礎的研究”。第 29 回廃棄物資源循環学会研究発表会, p263-264 (2018)
- 12) 久保智子ほか：“有機系廃棄物を利用したメタン発酵に関する基礎的研究 (第 2 報)”。三重県工業研究所研究報告, 42, p79-83 (2018)
- 13) 久保智子ほか：“メタン生成菌固定化のため担体に関する基礎的研究”。日本化学会第 99 春季年会, 3G2-11 (2019)
- 14) 久保智子ほか：“竹炭と牡蠣殻を担体として用いたメタン菌の固定化および増殖に関する基礎的研究”。三重県工業研究所研究報告, 43, p124-127 (2019)
- 15) 前川明弘ほか：“中温メタン発酵技術を用いた有機性廃棄物の有効利用”。三重県工業研究所研究報告, 43, p140-146 (2019)
- 16) 松浦真也ほか：“中温メタン発酵技術を用いた有機性廃棄物の有効利用における可溶性評価と菌叢解析”。第 30 回廃棄物資源循環学会研究発表会, p257-258 (2019)
- 17) 服部正平ほか：“メタゲノム解析実験プロトコール”。羊土社 (2016)
- 18) 富永博夫ほか：“ゼオライトの科学と技術—天然資源の開発利用への応用—”。資源・素材学会誌 107(1), p 2-7 (1991)
- 19) A. Fontana et al.: “Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes”. *Water Res.*, 134, p181-191 (2018)
- 20) S. R. Juliastuti et al.: “The effects of microorganism on coffee pulp pretreatment as a source of biogas production”. *MATEC Web of Conferences*, 156, 03010 (2018)
- 21) M. Fáberová et al.: “The influence of selected pharmaceuticals on biogas production from laboratory and real anaerobic sludge”. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26, p31846-31855 (2019)
- 22) A. Fontana et al.: “Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes”. *Water Res.*, 134, p181-191 (2018)
- 23) J. Hao et al.: “Volatile fatty acids productions by mesophilic and thermophilic sludge fermentation: Biological responses to fermentation temperature”. *Bioresour. Technol.*, 175 p367-373 (2015)
- 24) H. Lee et al.: “Amelioration of hyperglycemia by *Rubus occidentalis* (black raspberry) and increase in short-chain fatty acids producing bacteria”. *J. Funct. Foods*, 54, p433-439 (2019)
- 25) Ç. Akyol et al.: “Biological pretreatment with *Trametes versicolor* to enhance

- methane production from lignocellulosic biomass: A metagenomic approach”. *Ind. Crops Prod.*, 140, p111659 (2019)
- 26) P. G. Kougias et al.: “Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems”. *Bioresour. Technol.*, 225, p427-437 (2017)
- 27) B. Müller et al.: “Bacterial community composition and *fhs* profiles of low- and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria”. *Biotechnol. Biofuels*, 9:48 (2016)
- 28) L. Sun et al.: “Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure”. *Microb. Biotechnol.*, 8(5), p815-827 (2015)
- 29) 遠藤明仁ほか: “*Lactobacillus* 属乳酸菌の分類と非典型的な特徴”. *Jpn. J. Lactic Acid Bact.* 19, 3, p152-159 (2008)
- 30) P. Raspor et al.: “Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria”. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28, 2, p101-124 (2008)
- 31) D. Tegtmeier et al.: “*Breznakia blatticola* gen. nov. sp. nov. and *Breznakia pachnodae* sp. nov., two fermenting bacteria isolated from insect guts, and emended description of the family *Erysipelotrichaceae*”. *Syst. Appl. Microbiol.*, 39, p319-329 (2016)
- 32) E. Pelletier et al.: ““Candidatus *Cloacamonas Acidaminovorans*”: Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division”. *J. Bacteriol.*, 190, 7, p2572-2579 (2008)
- (本研究は、産業廃棄物抑制型産官共同研究推進事業において実施し、産業廃棄物税を財源としています。)