

## ノート

# コンソーシアム系を利用したバイオジーゼルオイル(BDF)製造機からの高濃度油分廃液の微生物分解について

加藤進, 佐藤邦彦, 吉村英基, 吉岡理,  
岩崎誠二, 高橋正昭

## Consortium microbial oil-degradation of highly oil-contained wastewater discharged from biodiesel generator

Susumu KATO, Kunihiko SATO, Hideki YOSHIMURA,  
Osamu YOSHIOKA, Seiji IWASAKI and Masaaki TAKAHASHI

石田農園(石田一幸氏)から提供された菌叢を利用して,実験室および現場で微生物による油分解を廃油およびオリーブ油(一部テンブラ油)に対して適用した.その結果,コンソーシアム系では単独菌よりも高い油分解能と安定した再現性が認められた.このコンソーシアム菌叢は保存・連続培養を1年実施しても,油分解能は失われなかった.コンソーシアム系で廃油の分解を連続的に実施するためには,窒素系の栄養(ポリペプトン等)の補給が重要であった.コンソーシアム系での油分分解に及ぼすpHおよび水温の影響を確認したところ,pHは中性付近,水温は25℃で最大の油分分解能を示した.イオシス(コマツ三重製)からの廃液処理にon-siteで適用し,約1年間にわたって廃液の分析を実施したが,本処理によって,pH,SS,BODおよび油分(n-ヘキサン抽出物質)は排出基準未満(水質汚濁防止法)であった.

キーワード: BDF, 微生物分解, 廃油, コンソーシアム系

### はじめに

レストラン,学校の給食設備から排出される廃油は,以前まではオイルトラップを経て公共用水域に放流されていた.しかし,一般にオイルトラップの油分離能はオイルトラップを定期的に清掃しても低く,そのため夏期には油の腐敗による悪臭,また冬季には油の固形化による流路の閉塞の原因となり,付近住民にとっても,経営者にとっても大きな問題であった.

最近,このような廃油は,国のエネルギー政策の見直しともあいまって,自治体等で回収され,環境に優しいバイオジーゼル油(BDF)として再利用されるに至った.このBDFを製造する工程は大きく2種類ある.この中の一つであるエステル化-水洗方式によるBDF製造工程から純度のよいBDFが得られるが,水洗によって多量の高濃度油含有廃液が排出される.BDFの大気汚染低減に係る利点はマスコミでも宣伝されているが,廃液の処理にまで突っ込ん

だ報道は極めて少なく,また学会でも殆ど報告例がない.

ところで,物理・化学的な手法による代表的な廃油の処理方法は,加圧浮上分離,上記に述べたオイルトラップおよびオイルスキ-マ等であり,BDFのように多量の油分を含む廃水には十分な方法とは言えない.また,代表的な水処理方法の活性汚泥法もせいぜい50~100mg/Lが油分を含む廃液への適用限界である.

このたび,石田農園(石田一幸氏)からコンソーシアム系ではあるが,強い油分解能を有する菌叢の提供を受け,油分分解能等を,実験室および現場でon-site適用・実施したところ,極めて有効であることが判明したのでその詳細について報告する.

### 実験査方法

#### 1 供資菌叢

使用細菌: 石田農園から供与されたコンソーシアム系の

菌叢（石田菌という）である。この菌叢を含む溶液に、リパーゼ生産能確認培地（表1）を10:1の割合で加え、25°Cで24時間前培養した。更に、油分分解に必要な液量（200-600ml）を取り、同割合で培地を加え、25°Cで24時間培養後、油（味の素テンブラ油あるいはオリーブオイル）を1-5ml添加し、好氣的（空気量：3-4L/min）に3-4日間微生物分解した。なお、実験室には石田菌は現在50Lの水槽で培養・保存中である。

表1 基本培地の組成

成分	濃度(g/L)
ペプトン	10
肉エキス	3
酵母エキス	3
NaCl	5
トリプトン	10
トリプチリン	10
寒天	20
pH	6

## 2 現場実験

コマツ三重株が製造したBDF製油機（商品名：イオシス）からの廃液（300L/day）を3m<sup>3</sup>の浄化槽に導入し、更に、地下水を希釈水として3-6L/minで添加し、プロアー2台でエアレーションし、廃液中に含まれる油分を微生物分解した。浄化槽には3槽の反応室があり、それぞれの体積は1m<sup>3</sup>である（図1）。各槽には石田菌を固定して3kgセラミック袋を3袋投入した。

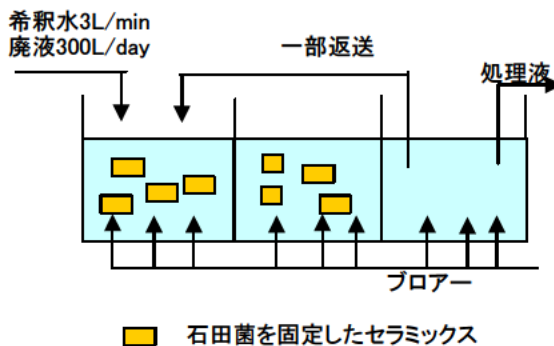


図1 廃液分解装置（コマツ三重）

## 3 廃油の分析方法

上記の方法で得られた処理液を取り、JIS-K0102の方法によってn-ヘキサンを利用して油分を抽出し、水洗、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>による脱水（24時間）後、80°Cでn-ヘキサンを飛散させ、アルミカップを利用した重量分析から油分を求めた。また、廃液中に含まれる内容成分の分析は、上記ヘキサン相をクリーンアップなしで注入した。GC/FID（島津：GC-8A）によって分析した。分析条件は表2のとおりである。

表2 GC/FIDの条件

device	Shimadzu 7A
colum	230C
inj	250C
Detector	FID
N2	40ml/min
air	0.6kg/cm <sup>2</sup>
H2	0.6kg/cm <sup>2</sup>
colum	Uni sole
	Uniport C80/100
	3.0mm φ × 3m

## 4 リパーゼ生産能試験

定法であるエマルジョン法によってリパーゼ生産能（37°C）を求めた。すなわち、基質としてオリーブ油を用い、リパーゼ作用によって遊離した脂肪酸をアルカリ（NaOH）滴定で定量し、その数値からリパーゼ活性を求めた。なお、反応停止液にはアセトン-エタノール混合液の代わりに、80%エタノールを利用した。

## 5 菌叢の簡易同定

定法によって、形態的特徴によって簡易同定を実施した。

## 結果と考察

### 1 菌叢と油分分解能

同定結果を表3に示した。この結果から、代表的な菌種は、バチルス、シュードモナスおよびアシネトバクターであった。表3には分離株単独での油分分解能（オリーブ油使用）も示した<sup>1, 2)</sup>。この結果をみると、菌株1が最高の分解能を示した。単独の菌株と複合菌株を利用してテンブラ油の分解を実施した結果を表4に示した。表4から、油分分解能

表4	コンソーシアム系の油分分解率		
	温度	分解率%	処理溶液
run1	25C	88.1	200ml
run2	25C	80.8	200ml
run3	25C	87.3	200ml
run4	25C	88.4	200ml
run5	25C	85.4	200ml
run6	25C	89.7	200ml
control	25C		200ml

温度: 20°C  
かくはん: エアレーション

は単独菌にくらべるとコンソーシアム系の方が再現性がよく、しかも分解率が高いことがわかった。このことから、実際の応用にあたっては、コンソーシアム系が有望と判断した。なお、油分を分解する菌類としてはバチルスやシュードモナスはこれまでによく知られており、報告があり、本研究の結果と一致する<sup>3,4)</sup>。けれどもアシネトバクターについては報告例がなく、極めて特異な種類と思われる。写真1はリパーゼ生産能確認培地で認められる油分分解

菌の典型的なコロニーである。写真1の不透明部分はトリブチリンが残留し、透明な阻止円はトリブチリンが微生物によって分解された結果である。



写真1 油分解菌

## 2 コンソーシアム菌叢による油分解能の安定性と菌数

6個の試料で、油分解を実施したが、比較的良好な、再現性で油分解が確認された(表4)。同時に、この菌叢を1年間、エアレーションを継続し、1ヶ月毎に保存液量の1/100の体積の培地を保存液に添加した。1年後に同様の油分解試験を実施したが、やや分解率が低いものの、油分の分解能力が保持されていることを確認した(表5)。また、油分解と菌数の関係であるが、図2に示した。油分解当初は、菌数は概ね $10^5 \sim 10^6$  cfu/mlであるが、1~2日間の分解率は低い。その後、菌数は変わらないが、油分解率は徐々に増加して概ね90%に達する。従って、油分を微生物分解するには菌数では $10^9$  cfu/ml以上必要であり、分解時間としては48時間以上かかると思われる。

表5 コンソーシアム系の安定性(液量600ml)

2002, April	温度	油分濃度	分解後濃度	分解率%
run1	25C	2331	672.33	71.2
run2	25C	2331	346.67	85.1
run3	25C	2331	874.33	62.5
2003, April				
Run1	20C	2400	870	63.76
Run2	20C	2400	654	72.73
Run3	20C	2400	884	63.15

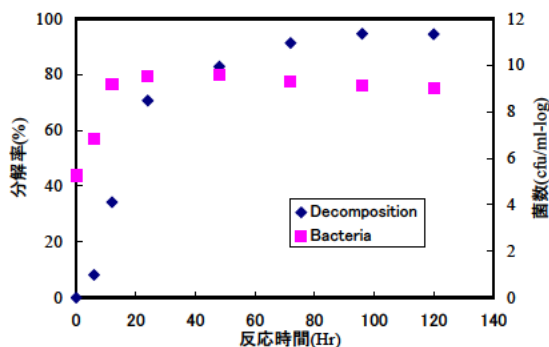


図2 反応時間、油分解率および菌数の関係

## 3 油分解能のpH依存性

イオシス廃液は、エステル化処理をしているのでpHの変動も考えられる。そこで、培養液のpHを4~10まで変化させて油分解能を評価した。その結果、pH4では油分解菌数がやや少ないものの、80%近い分解能を示した。通常の廃液はpH6~8であるが、60%以上の油分解能を確認した(図3)。これらの結果から、石田菌のコンソーシアムは比較的広範囲のpHに対して油分解活性を保持するものと考えられる。

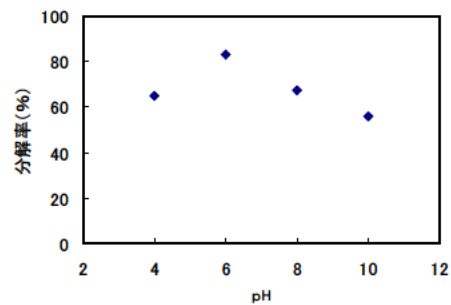


図3 pHと分解率の関係

## 4 油分解能の温度依存性

この微生物油分解槽は通常屋外に設置される。したがって、夏季に水温が高く微生物活性が高い時は問題がないが、冬季に水温が低下し、油分解活性が低下する可能性がある。10~40℃で油分解能を確認した。図4から、10℃でも比較的高い油分解能を示すことがわかった。なお、実際の装置でも冬季における油分解能は著しく低下しなかった。ちなみに、冬季の廃水温度は12-13℃であった。

## 5 油分解菌の栄養要求

異なった4種類の方法で3週間培養した。すなわち、Aシリーズ；前培養後は全く培地等栄養を供給しないで、3日間の油分解を繰り返して実施  
Bシリーズ；前培養後、1回(始めの実験)のみ培地を添加し、残りの油分解の場合には全く培地を供給しないで油分解を実施  
Cシリーズ；前培養後、油分解毎に培地を供給した場合である。油分解の時系列サイクルは、月曜日~木曜日、金曜日~翌週の月曜日である。その結果を図5に示した。なお、5回目(最終回)にはすべてのシリーズ(A,B,C)に培地1mlを再び供給した。結果をみると、Cでは比較的油分解率は高くしかも一定に保たれたが、AとBでは油分解回数が増加するにつれて、油分解率が低下した。しかし、5回目に、培地を添加すると、いずれの系列でも油分解能の上昇が見られ、基本培地に含まれる窒素源が油の分解には必要であることがうかがわれた。



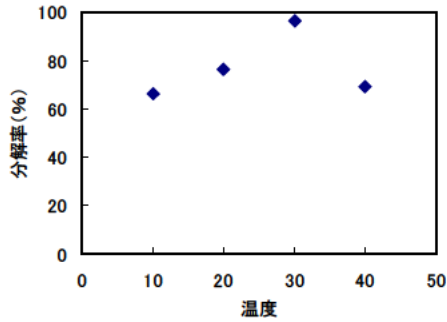


図4 温度と分解率の関係

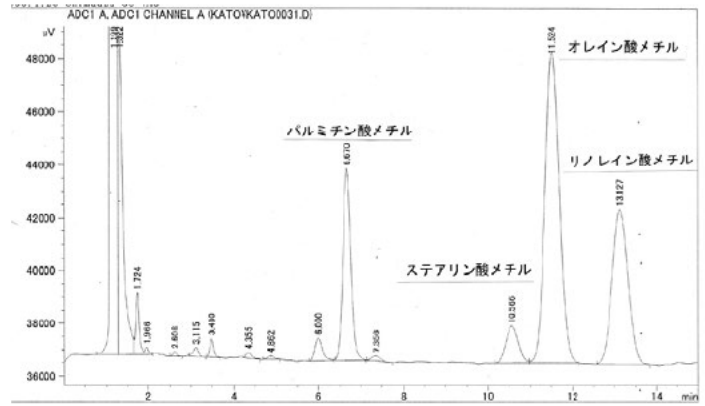


図6 BDFオイルのFIDチャート

## 6 イオシス廃液の分析結果

これまでに述べた結果は、閉鎖系における実験室的なバッチ試験の結果である。現場では、希釈水を3L/minで分解槽に導入し、300L/dayの廃油が回分的に第一分解槽に導入される。結果として、連続的に油分を処理している。上記にも述べたが、四季に応じて気温が異なり水温もこれに従属するので、夏期と冬季に油分解能を把握した。各槽の体積は1m<sup>3</sup>で、第1、第2槽および第3槽にそれぞれ石田菌を固定したゼオライト(6kg×3)が設置されている。ブローは各槽で実施されている。表6に夏季と冬季の分析結果を示した。この結果、油分を始めとする、SS、pH、BOD等の項目は水質汚濁防止法に決められた濃度未満であることが確認された。

なお、図6は廃油から精製したBDFオイルのFIDのガスクロマトグラムであり、ピークを同定するとステアリン酸メチル、パルミチン酸メチル、オレイン酸メチル、リノール酸メチルおよびリノレン酸メチルであり、GC/MSによりグリセリンおよびメタノールが残りの主成分であった。これらの、高級脂肪酸エステル類の消長をGC/FIDで考察したところ、微生物分解時間の経過とともにエステル類の濃度も低下していくことがわかった。なお、エマルジョン法で求めた本コンソーシアム系のリパーゼ活性は殆どゼロに近かった。したがって、生成したエステル類は、さらに何らかの作用を受けてコンソーシアム菌叢に資化されている可能性が示唆された。

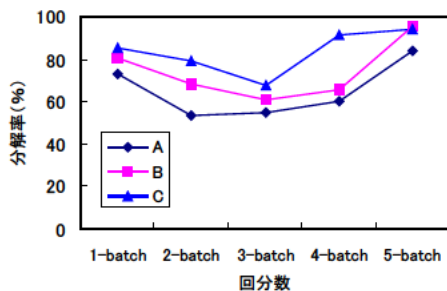


図5 回分試験において栄養基質添加が油分解率に及ぼす影響

## まとめ

石田氏から提供された菌叢を利用して、実験室的および現場で油分解を廃油およびオリーブ油(一部テンブラ油)に対して適用した。その結果、

- 1) コンソーシアム系では単独菌叢に比べて良好な油分解能と高い再現性を示した。
- 2) このコンソーシアム菌叢は保存・連続培養を1年実施しても、油分解能は失われなかった。
- 3) コンソーシアム系で廃油の分解を連続的に実施するためには、窒素系の栄養(ポリペプトン等)の補給が重要である。
- 4) コンソーシアム系で油分分解に及ぼすpH(4~10)および温度(10~40°C)の影響を確認したところ、pHは中性付近で、水温は25°Cで最大の油分分解能を示した。
- 5) イオシス(コマツ三重製)からの廃液処理にon-siteで適用し、約1年間にわたって廃液の分析を実施したが、本処理によって、pH、SS、BODおよび油分(n-ヘキサン抽出物質)は排出基準未満(水質汚濁防止法)であった。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり多大のご指導を賜った三重大学菅原庸名誉教授、生物資源学部栗冠真紀子先生、ならびに三重大学生物資源学部4年生、長谷川智子氏(当時)および焼山理氏(当時)に厚くお礼申し上げます。また、実験に協力していただいたコマツ三重(株)の土田課長、柴原正智氏、および菌叢を提供していただいた石田一幸氏にお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 長谷川智子: H14年度三重大学生物資源学部卒業論文
- 2) 焼山理: H15年度三重大学生物資源学部卒業論文
- 3) Akio Sugihara et.al: Purification and characterization of a

novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*,  
*J.Biochem.*,112,598-603(1992)

4)Eiko Fujii et. al.: Microbial treatment of oil contained  
wastewater discharged from industrial kitchen,*日本食品工  
学会誌* , 4,123-123(2003)

5)Naeem Rashid:Low-temperature lipase from Psychrotrophic  
*Psuedomonas* sp. strain KB700A, *Appl. Environ.  
Microbiol.*,67,4064-4069(2001)

表6 コマツイオシス廃液の分析結果

	源液	処理液		2003								
	6-Jun	10-Jun	19-Jun	17-Jul	6-Aug	2-Sep	11-Oct	12-Dec	17-Dec	6-Jan	7-Jan	8-Jan
気温												
水温								15	16	13	15	15
pH	-	6.6	6.64	6.41	6.42	6.32	6.52	6.87	7.1	6.68	6.6	6.71
EC	-	156	259	221	192	143	265	149	175.8	152	180	193
BOD	2640	94.8	288	57	18.4		71.6	29	16	9	7.6	9
COD	60000	2950	1300	1200	700		1700	100	430	70	395	650
SS	-	5	28.8	20.5	13			1.5	4	2	7.5	10
油分	144900	8	29	64	2.4	5.2	24.7	4.8	8.2	6.8	12.8	23.4

表3 分離菌の簡易同定

	Gram	Shape	Spore	Flagella	OF	Oxidase	Catalase	Starch	Gelatin	Casein		分解率(%)	
1	-	Rod	-	-	O	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>	85.9	
2	-	Rod	-	-	O	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>	73.2	
3	-	Rod	-	-	O	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>	64.1	
4	+	Rod	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>Bacillus</i>	64.9	
5	-	Rod	-	-	-	-	+	-	+	+	<i>Acinetobacter</i>	55.7	
7	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	53.3	
8	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	69.7	
9	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	63.5	
10	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	61.3	
11	-	Rod	-	Peri	-	+	+	-	-	-	<i>Alcaligen</i>	32.6	
12	+	S	-	-	F	-	+	-	-	+	<i>St</i>	80.3	
13	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	-	<i>Pseudomon</i>	32.8	
16	-	Rod	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>Acinetobacter</i>	59.8	
18	+	Rod	-	-	O	-	+	-	-	-	<i>Arthrobacter-Corynebacterium</i>	59.5	
												31.6	
19	-	Rod	-	Peri	-	+	+	-	-	-	<i>Alcaligen</i>	*	
21	-	Rod	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>	74.1	
25	+	Rod	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	47.8	
26	+	Rod	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	32.8	
29	+	Rod	+	-	O	+	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	36.6	
31	-	Rod	-	-	-	-	+	+	-	-	<i>Acinetobacter</i>	65.4	
36	+	Rod	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	80.8	
37	+	Rod	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	83.6	
38	+	Rod	+	-	-	-	+	-	-	-	<i>Bacillus</i>	76.4	
39	+	Rod	-	-	O	-	+	+	+	+	<i>Arthrobacter-Corynebacterium</i>	53.9	
42	-	Rod	-	-	O	+	+	-	-	-	<i>Moraxella</i>	42.6	
50	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	51.8	
51	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	67.9	
52	-	Rod	-	Po	O	+	+	-	+	+	<i>Pseudomon</i>	80.6	
												最小値	31.6
												平均値	60.1
												最大値	85.9

+:陽性      -:陰性  
 Rod:桿菌      S:球菌  
 Po:極鞭毛      Peri:周在性鞭毛

O:ブドウ糖を酸化的に分解する      F:ブドウ糖を発酵的に分解する