

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

久保智子*, 松浦真也*, 前川明弘*, 橋本典嗣**, 甲斐穂高***, 徳本勇人****

Fundamental Study on Immobilization and Fermentation of Methanogen Using Bamboo-Charcoal and Oyster-Shell Carrier

Tomoko KUBO, Shinya MATSUURA, Akihiro MAEGAWA, Noritsugu HASHIMOTO,
Hodaka KAI and Hayato TOKUMOTO

In this study, for the purpose of improving the efficiency of methane fermentation using food waste, we studied immobilization of methanogen using carrier. Bamboo-charcoal or oyster-shell was used as a carrier, and was mixed with methane fermented liquid and milk, respectively. As a result, various kinds of biogases were produced, and all of these gases contained methane. In addition, the amount of methane generated was not significantly different from the blank mixture, i.e., the mixture containing no carrier, and no influence such as fermentation inhibition due to putting the carrier was observed. Furthermore, microbial adhesion was observed on the surface of fermented bamboo charcoal and oyster shell.

Keywords: Methane fermentation, Methanogen, Carrier, Immobilization, Bamboo-Charcoal, Oyster-Shell

1. はじめに

バイオガス発電は、天候などに左右されず電力を安定的に得ることができ、さらに発酵残さを液肥として利用できるなど優れた特徴を有しており、地球温暖化への対策技術として関心が集まっている。食品や畜産系廃棄物を使用したメタン発酵によるバイオガス発電施設は全国で42に上り¹⁾、三重県内でも建設が増加傾向にある。メタン発酵に関する技術に関しては、これまでに多くの検討がなされているが、未解決な課題や要望も多く残されている。要望の一つとして、メタン発酵の高効率化が挙げられる。

メタン発酵では、消化液を排出する際に、メタン

菌が流出する。メタン菌は一般的な加水分解に関わる菌群よりも増殖速度が遅いため²⁾、メタン菌を発酵槽内へ保持することが発酵の高効率化につながる。そこで本研究では、食品廃棄物を対象としたメタン発酵の高効率化を目指し、主に県内で発生する廃棄物を担体として使用し、メタン菌の挙動を把握することで担体としての有効性の評価を行った。

2. 実験方法

2. 1 材料

担体の素材として、鳥羽市で生産される的矢牡蠣の殻と、県内事業者より入手した竹炭を用いた。また、発酵材料として、県内で廃棄処理されている牛乳を使用した。発酵には、県内のバイオガス発電所から排出される消化液を用いた。

2. 2 発酵試験

担体を投入したメタン発酵試験を行い、担体の使

* ものづくり研究課

** 窯業研究室

*** 鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科

**** 大阪府立大学大学院理学系研究科

用がバイオガスの発生に与える影響について確認した。発酵液は、牛乳約 42 g (絶乾質量で 5 g) に蒸留水を約 58 g 添加して質量が 100 g となるよう調整した発酵原料に消化液 400 g を混合して調整し、2.36~4.00 mm メッシュのふるいを通過させた担体 10 g (または 100 ml) とともに三角フラスコに投入した。その後、前報同様に^{3,4)}ゴム栓を付け、内部を窒素ガスに置換することで嫌気状態にした。これにガスバッグを付けて 37 °C に静置し、発生するガスを採取した。実験対照として、担体を投入しないものを用い、同様の条件で発生するガスを採取した(ブランク 1)。発生したガスはアルキメデス法により測定した。発酵試験は、新たなガスの発生がなくなった時点で終了とした。

2. 3 担体への微生物付着量評価

担体への微生物付着量を推定するために、次の操作を行った。まず、前節の発酵試験後の担体 100 ml を発酵液から取り出し、20 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した。洗浄後の担体を、牛乳を約 8 g (絶乾質量で 1 g) 含む 20 mM リン酸緩衝液 500 g に投入し、37 °C に静置し、発生するガスを採取した。実験対照には、消化液 100 ml と牛乳を約 8 g (絶乾質量で 1 g) 含む 20 mM リン酸緩衝液 500 g に混合したものを用いた (ブランク 2)。前節と同様に、試験終了は新たなガスの発生がなくなった時点とした。

2. 4 バイオガスの分析

ガスの分析は、ガスクロマトグラフィー ((株)島津製作所 GC-2014) を用いた。カラムはパックドカラム (信和化工(株)製 SHINCARBON ST) を、キャリアガスにはアルゴンガスを、検出器には熱伝導度検出器 (TCD) を使用した。

2. 5 担体の電子顕微鏡観察と比表面積測定

発酵後の担体を蒸留水で 2 回洗浄後、約 2 % グルタルアルデヒド溶液に 30 分間浸漬した。浸漬後、蒸留水で 2 回洗浄し、35, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100 vol % の上昇エタノール系列で脱水を行った。脱水後、t-ブタノールに 10 分間浸漬する操作を 2 回行い、冷凍処理後に凍結乾燥機で乾燥させた。乾燥後の担体は、白金蒸着し、電子顕微鏡 (日本電子(株)JSM-7001F) で観察した。また、担体の比表面積は、水銀圧入ポロシメーターを用いて測定した。

2. 6 消化液及び担体に付着した微生物菌叢解析

発酵液から担体を取り出し、蒸留水で 2 回洗浄した。発酵液及び洗浄後の担体から、MORA-EXTRACT キットを用いて DNA を抽出した。この DNA を鋳型とし、16sRNA の保存領域である V3-V4 領域を標的とした PCR を行った。増幅された断片と Nextera XT index kit を使用して 8 cycle PCR でアダプター配列を付加した。PCR 増幅産物の配列は、次世代シーケンサー (Illumina Miseq) を用いて決定し、担体上に付着した微生物種の推定及び構成割合を解析した。

3 結果と考察

3. 1 担体がバイオガスの発生に及ぼす影響

担体 10 g を投入した場合のバイオガスとメタン発生量を図 1 に示す。メタン発酵の最適 pH は 6.8 ~ 7.6⁵⁾ であるが、担体 10 g を蒸留水に投入した場合には pH が 9~10 と高い値を示したことから、バイオガスの発生抑制が予想されたが、消化液と牛乳の混合液に担体を投入した場合は pH が 7.9 程度と最適条件に近く、消化液の持つ緩衝能の範囲であることが分かった。また、ブランクと比較してバイオガスとメタン発生量に違いが見られなかった。このことから、発酵液の 2 % 質量の担体を投入しても、バイオガスの発生に影響がないことが確認できた。しかしながら、竹炭と牡蠣殻では、担体 10 g の容量が大きく異なる。メタン発酵プラントにおいては、発酵槽の消化液に占める担体容積の割合が大きければ、相対的に廃棄物投入量が減るため廃棄物の処理効率が低下する。そこで、担体の投入容積を発酵液容量の 1/5 である 100 ml に揃えた追加実験を行った。担体を投入した後の pH は 7.9 程度であり、100 ml の担体を投入した場合も消化液の持つ緩衝能の範囲であった。担体 100 ml (竹炭で 10 g, 牡蠣殻で 91 g) を投入した場合のバイオガスとメタン発生量を図 2 に示す。今回の測定結果から、バイオガスとメタンの発生量に多少の差が認められたがその差は小さく、顕著なバイオガス発生抑制効果は見られなかった。

3. 2 担体への微生物付着量評価

実験対照 (ブランク 2) と、担体を投入したのから発生したバイオガスとメタン量を図 3 に示す。

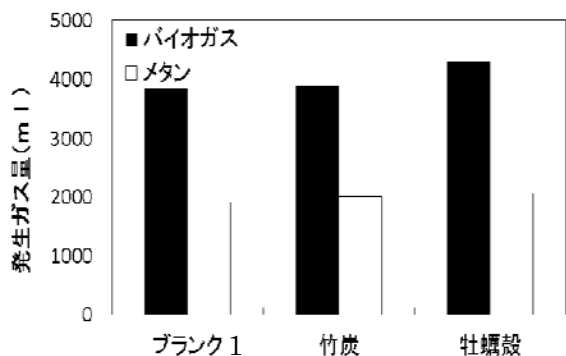


図1 バイオガスとメタン発生量：担体 10 g を投入した場合

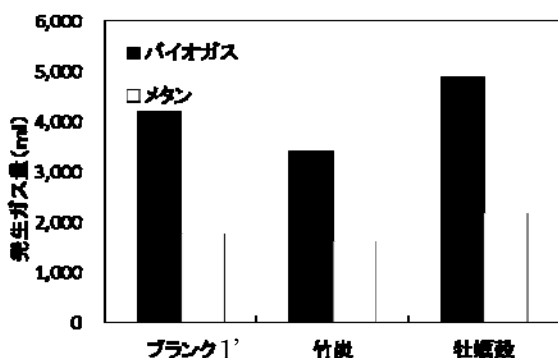


図2 バイオガスとメタン発生量：担体 100 ml (竹炭 10 g, 牡蠣殻 91 g) を投入した場合

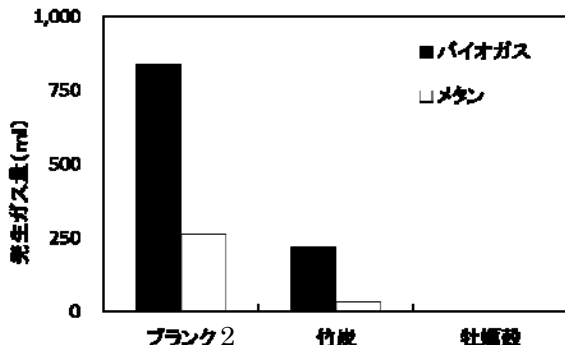


図3 バイオガスとメタン発生量：発酵試験で用いた担体 100 ml を投入した場合

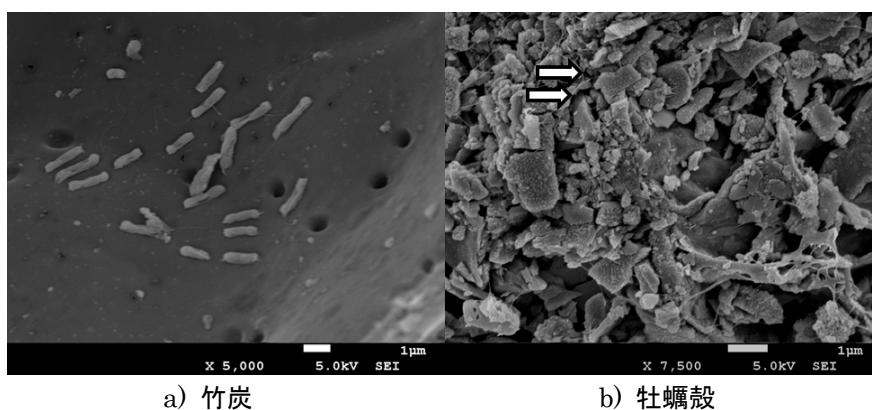
表1 担体の比表面積

サンプル名	m ² /100 ml
竹炭	826
牡蠣殻	291

同図より、ブランク 2 と竹炭からはバイオガスが発生したが、牡蠣殻からはバイオガスが発生しなかった。バイオガス中のメタン量は、竹炭ではブランク 2 の 10%程度発生しており、加水分解に関わる細菌とメタン菌群が付着していることが示唆された。電子顕微鏡観察の結果を図 4 に示す。竹炭と牡蠣殻ともに担体表面に微生物の付着を確認することができた。次に担体 100 ml あたりの面積(m²)を表 1 に示す。竹炭は牡蠣殻の約 2.8 倍の面積を有していた。竹炭は約 200 ml のガスが捕集できたことから、牡蠣殻の微生物吸着能が竹炭と同様であれば、70 ml 程度のバイオガスが捕集できると思われたが、牡蠣殻ではガスが捕集できなかった。牡蠣殻を用いた発酵液からのフラスコ気相部分のガスを分析したところ、少量のメタンが検出されたことから、一部の原料は発酵によりメタン化していることが分かった。また、竹炭の pH は発酵前後で 7.4 から 6.9 になったのに対し、牡蠣殻では発酵前後で 7.4 から 6.5 まで下がっていた。これは、竹炭に比べて有機酸の蓄積量が多く、pH が下がった可能性が考えられた。

3. 3 消化液及び担体に付着した菌叢解析

発酵液及び担体に付着した菌叢の構成菌種の存在割合を図 5 に示す。発酵液及び担体からは Clostrisium 属近縁種, Bacteroides 属近縁種, Lactobacillus 属近縁種, Ruminococcus 属近縁種, Syntrophomonas 属, Candidatus Cloacamonas 属,



a) 竹炭

b) 牡蠣殻

図4 担体表面の電子顕微鏡画像

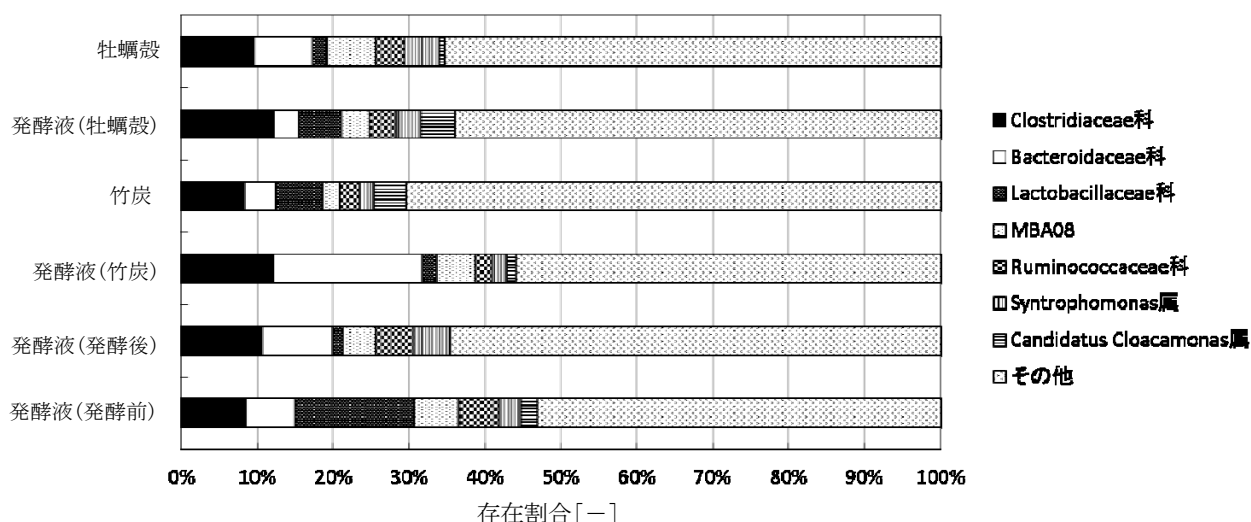


図5 発酵液及び担体上の菌叢の構成菌種と存在割合

表2 担体上の古細菌中に占める Methanoculleus 及び Methanosarcina の存在比(%)

細菌の種類	竹炭	牡蠣殻
Methanoculleus	3	43
Methanosarcina	36	29

MBA08 目など加水分解に関わる微生物^{2,6)}が3割から5割ほど検出された。また、メタン菌の存在比はいずれも1%程度であった。表2に示した担体に付着した微生物で、メタン菌が属する古細菌の中で、主に酢酸を資化する Methanosarcina と、主に水素を資化する Methanoculleus の存在比を示す。各単体に付着した酢酸資化性メタン菌と水素資化性菌の存在比(酢酸資化性メタン菌/水素資化性菌)に着目すると、竹炭は10倍以上と酢酸資化性メタン菌の方が多かったが、牡蠣殻では0.7倍と水素資化性菌の方が多く、担体によって付着する菌が異なることが確認された。竹炭のpHは発酵前後で7.4から6.9に変化したのに対し、牡蠣殻の場合は7.4から6.5であったことから、牡蠣殻上に存在する酢酸資化性菌の割合が低く、酢酸などの有機酸が蓄積していた可能性が認められる。

4. 結論

本結果より以下の知見が得られた。

- 1) 竹炭と牡蠣殻を投入することでバイオガス発生抑制などの悪影響は見られなかった。
- 2) 担体洗浄後の発酵試験では竹炭の方がメタン発生量が多かったことから、メタン発酵における微

生物担体には竹炭の方が適している。

- 3) 発酵液及び担体からは、加水分解に関わる菌群が3割から5割ほど検出された。
- 4) 担体上に付着したメタン菌のみ着目すると、竹炭では酢酸資化性メタン菌が優占していたのに対し、牡蠣殻では水素資化性メタン菌の方が存在比が大きく、付着する菌が異なることが示唆された。
- 5) 牡蠣殻では有機酸の蓄積に起因すると思われるpH低下が発生していたが、これは酢酸資化性菌が少なかったことに起因することが考えられる。

謝辞

本研究は、平成30年度岡三加藤文化振興財団の研究助成によった。ここに付記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 環境省 HP : <http://www.env.go.jp/recycle/waste/biomass/watisbiogass.html>
- 2) 上木勝司ほか：“嫌気微生物学” 養賢堂 (1993)
- 3) 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, 41, p54-59 (2017)
- 4) 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)
- 5) 野池達也: “メタン発酵” 技報堂出版 (2009)
- 6) 千 智勲: “生ごみを対象とした高温メタン発酵槽における微生物群集解析”. 環境工学研究論文集, 44, p625-632 (2007)