

## 高濃度易分解有機性廃水の水素発酵に及ぼす硫酸塩および塩分の影響\*1

浅野憲哉\*2 山浦修一\*3 金田幸太\*4 長谷川大\*5 松本明人\*6 水野修\*7 野池達也\*8

## Effect of Salinity and Sulfate on Hydrogen Fermentation of Concentrated Degradable Wastewater

Kenya ASANO, Shyuichi YAMAURA, Kouta KANADA,  
Masaru HASEGAWA, Akito MATSUMOTO, Osamu MIZUNO and Tatsuya NOIKE

In this study, salinity and sulfate tolerance of hydrogen producing microbial flora was tested to investigate characteristics of hydrogen fermentation basically. Results from a CSTR (HRT 10 hours, influent sucrose COD 20,000 mg/l, 35°C) test of salinity, hydrogenic fermentation was affected by salinity and was stopped completely at 2.5% of NaCl concentration. As salinity increase, the COD removal efficiency was also decreased and washout of sucrose was increased. Results from batch and CSTR (HRT 10 hours, influent COD 20,000 mg/l, 20°C and 35°C, respectively) tests of sulfate, apparent inhibition was not observed and sulfide was not detected even at  $\text{SO}_4^{2-}$  content 3,000 mg/l in both cases.

キーワード：水素発酵，有機性廃水，エネルギー回収，硫酸塩，塩分

## 1. 序 論

## 1-1 エネルギー問題

人口の増加，都市の巨大化およびエネルギーの大量消費など，人類環境は大きな影響を受けて今日に至っている。これ程の資源・エネルギー消費量の増大は，地球の歴史上かつて例をみないものである。また，石油，天然ガスおよび石炭等の化石燃料の可採年数には限りがあるのにも関わらず，既存の化石燃料に代替するエネルギー源は現在のところほとんど考えられないのが実状である。

微生物を利用した有機性廃棄物からの水素生産は，これらの対策の一つとして期待されている。また，メタンなどと比べ，水素は燃焼の際に二酸化炭素を排出せず，航空燃料や燃料電池など，利用価値

が高いという利点がある。

1-2 水素発酵の概要<sup>1)</sup>

水素発酵は，嫌気性条件下で水素生成細菌群がニトロゲナーゼやヒドロゲナーゼの働きによって，グルコースなどの有機物を水素と二酸化炭素と揮発性脂肪酸とに分解して微生物の生活活動に必要なエネルギーを得ることである。このとき，水素資化性細菌群が共生していない場合には，水素はガスとして放出される。水素発生の機構は，基本的には解糖系で生じた還元力 NADH をフェレドキシン，ヒドロゲナーゼを介して生成する系（2モル生成）と，生じたピルビン酸を酸化して生じた還元型フェレドキシンをヒドロゲナーゼを介して生成する系（2モル生成）がある。

水素発生能を有する細菌の種類は多いが，水素発生の研究に使用されているのは主に嫌気性細菌である *Clostridium* 属の細菌であるが，ヒドロゲナーゼにより水素を生産する。これらの細菌はグルコースなどの有機物をよく資化し，水素発生速度も高い。しかし，光合成細菌とは異なり生育に必要なエネルギーおよび還元力双方をすべて有機物に依存するため，基質を完全に水素に変換できず，水素のほかに嫌気性代謝の最終産物である有機酸も生成する。*Clostridium* 属ではグルコースを基質にした場合，

\*1 平成 9 年土木学会東北支部技術発表会にて一部発表

\*2 環境都市工学科助手

\*3 長岡工業高等専門学校専攻科学生

\*4 小木曾建設

\*5 信州大学大学院工学研究科学生

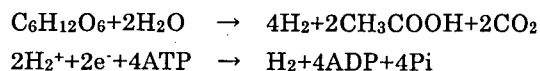
\*6 信州大学工学部助教授

\*7 元東北大学工学部助手

\*8 東北大学工学部教授

原稿受付 2001 年 9 月 28 日

次式に示すように、理論的には1 mol 当たり4 mol の水素発生が可能である。



ニトロゲナーゼによる水素発生の場合、グルコース1 mol 当たり0.5 mol の水素が理論収量であるが、その反応は、ATP を必要とし、*C. klebsiella* などでは嫌気発酵におけるATP生産量は少ないため、基質当たりの水素発生量は少ない。

高分子有機物の加水分解で生成された単糖やアミノ酸などは嫌気性細菌によって発酵分解される。酸生成過程には様々な代謝機能を有する多様な細菌が関与している。グルコースの発酵分解をみても、最終発酵産物は酢酸、酪酸、乳酸、コハク酸、エタノール、ブタノール、アセトンなどと多様で、細菌の種類によって発酵の様式は異なる。また、同じ細菌でも生育条件によって異なった発酵産物を生成したり、別種の細菌が異なった発酵反応で同じ発酵産物を生成したりする。発酵産物は通常その細菌がそれ以上分解できない物質であり、上記の物質のほかに $\text{CO}_2$ や $\text{H}_2$ も発酵産物として生成される。

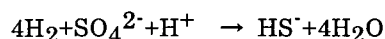
水素発酵には細菌叢を用いる方法と単離した微生物を用いる二つの方法がある。いずれも有機物の嫌気分解過程において生ずる余剰電子のはけ口として、水素が生成すると考えられるが、細菌叢を用いた場合には複雑な微生物群によって行われるメタン発酵やルーメン発酵などの発酵初期産物または中間体として水素を回収できないかという考え方で、単離菌法においては一種または数種の微生物群によって有機物を嫌気分解して有機酸などを生産する際、同時に生成する余剰電子を水素として回収する方法である。

Taguchi, F.らは、グルコースからデンプンまでのいろいろな糖類を用いてAM21B株菌の水素発生能を検討した。AM21B株菌は、ヘキソースやペントースなどのいろいろな糖から水素を生成する潜在能力があることを示した。具体的には、ヘキソースの単糖（グルコース、ガラクトース）、2糖（スクロース、ラクトース、セロビオース）、及び多糖（スターチ）、さらにペントース（アラビノース、キシロース）をも水素に変換できる。この中で特に重要なことは、AM21B株菌がアラビノースやキシロースなどのペントース、及びセロビオースとスターチを水素発酵の基質として使えることで、将来ヘミセルロースやセルロースなどからなる植物性廃棄物をAM21B株菌単独で水素に変換できる可能性を示唆している。

### 1-3 塩分および硫酸塩に関する知見<sup>2)-4)</sup>

有機性廃水を発酵・嫌気性消化等の生物処理するに当たって、問題となるのは塩分や硫酸塩による生物活性の阻害である。McCartyらの研究によれば、ナトリウムイオンやカリウムイオンはメタン発酵に対して強力な阻害効果を示した。しかしながら、絶対嫌気性のメタン生成細菌にも好塩性の株が見いだされてきた。微生物が高濃度の塩環境で増殖できるためには、まずその環境下で細胞内の溶質濃度が外界の濃度に適合するように調節されなければならない。すなわち、浸透圧調節が必要である。このような細胞内溶質濃度の調節は、好塩細菌に限らず増殖に塩類を特に必要としない非好塩細菌においても必要である。非好塩細菌の中には、高濃度塩類存在下でも増殖できるいわゆる耐塩細菌が多く存在し、耐塩性の上限は浸透圧調節能力と関係している。通常の培地（食塩濃度として約150mM）で培養した場合の細胞内カリウムイオン濃度を比較すると、グラム陰性細菌は約230mMであるのに、グラム陽性細菌は約600mMとかなり高い値を示す。このことは、グラム陽性細菌がグラム陰性細菌より耐塩性が高いのに関係があり、一般的に細胞内に高濃度のカリウムイオンを蓄積する能力のある細菌は高濃度の塩類存在下で増殖できる。培地の浸透圧を高くすると、脱水作用によって細胞内溶質濃度は上昇するが、カリウムイオンの過度の蓄積は細胞内代謝活性に悪影響を及ぼすことになる。

有機性廃水中に硫酸塩が高濃度に含まれる場合、水素資化性硫酸塩還元細菌の働きにより水素生成が阻害される可能性がある。水素資化性の硫酸塩還元反応は、次式のとおりである。



$$\Delta G^0 = -153 \text{ kJ/mol}$$

硫酸塩、硫化物およびチオ硫酸は、ある種の製造工程においてさまざまな形態で用いられており、その工程の廃水に含まれてくる。CODと硫酸塩の両者がともに高濃度の廃水を発生する製造工程として、糖蜜発酵、パルプ・紙製造、石油精製（その中の酸廃水）、クエン酸およびパーム油製造、アルコール蒸留、酵母合成剤製造、グルタミン酸ナトリウム製造などがあげられる。硫化水素は悪臭があり、金属を腐食し、水に可溶性である。硫化水素は比較的低濃度でもほとんど全ての細菌に対して毒性を示し、人体に対しては致命的な毒性を有し、わずか800~1,000ppmのガス相濃度でも30分以内に死亡させてしまう。さらに高濃度になると即死にいたる。

しかし、水素発酵における硫酸塩還元細菌の影響については今のところあまり研究がなされていない。以上のことから本研究では、水素発酵における塩分および硫酸塩の影響を調査した。

## 2. 実験方法

### 2-1 塩分濃度の実験装置および条件<sup>5)-8)</sup>

塩分濃度の影響を調べるために用いた種汚泥は、水素爆発を起こした大豆サイロより採取した細菌叢を東北大学大学院工学研究科土木工学専攻環境保全工学研究室で長年馴養してきたものである。この種汚泥は、ショ糖を 20,000mg/l 含む基質で中温(35℃)、水学的滞留時間(以下 HRT)10 時間で連続培養したところ、約 2 年間にわたり水素ガスを 35-40% 含むガスを、600-700ml/h の速度で発生し続けたものである。

今回の実験では表 1 に示す、炭素源としてショ糖 18,000mg/l (COD<sub>Cr</sub>20,000ppm)を含む人口廃水を基質として用いた。基質の NaCl 濃度は、0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5%と、ガス発生速度が安定するごとに段階的に添加量を増加させた。なお、基質中には栄養塩、微量元素および pH 緩衝剤が含まれるため、添加した NaCl 濃度が 0% のときでも、約 0.3% 相当の電解質を含んでいた。

表 1 基質組成

試薬名	濃度(mg/l)
Sucrose	18,000
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	3,800
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	130
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	282
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·10H <sub>2</sub> O	2,500
微量元素類	微量

本研究に用いた反応装置の模式図を図 1 に示す。反応槽には外気を遮断した容量 1l の三角フラスコを用いて、ガスポンプによりガス循環して連続攪拌し、インキュベーター内で 37℃ の中温域に保持し、連続実験した。HRT はマイクロチューブポンプにより 10 時間に設定した。基質タンクは、冷却器により水温を 4℃ 以下に保持した水槽内で、マグネチックスターラーにより成分が均一になるように攪拌し続けた。発生したガスは、メスシリンダーを逆さにしたガスホルダーに水上置換法で捕集した。このとき、メスシリンダーは二酸化炭素の溶出を防ぐため

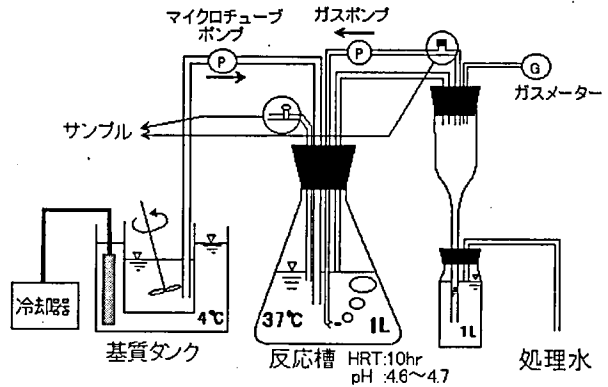


図 1 連続実験装置(塩分)

に硫酸により pH を 1 以下に調整した飽和食塩水に沈めた。サンプリングポートは、反応槽に取り付けた汚泥用のものと、ガス循環用チューブに取り付けた発生ガス用のものを用意した。

ガス生成速度は 1 時間あたりの捕集ガス増加体積を読み、測定した。ガス組成は TCD (Thermal Conductivity Detector) - ガスクロマトグラフ法 (Shimadzu GC-8A, Shimadzu C-R6A クロマトパック) により水素ガス濃度 (カラム: ステンレスカラム, 担体: 活性炭充てん, キャリアガス: 窒素ガス, キャリアガス圧力: 1 気圧, カラム温度: 70℃, 注入および検出温度: 100℃, 検出電圧: 80mA), 二酸化炭素およびメタンガス濃度 (カラム: ステンレスカラム, 担体: 活性炭充てん, キャリアガス: ヘリウムガス, キャリアガス圧力: 0.8 気圧, カラム温度: 70℃, 注入および検出温度: 100℃, 検出電圧: 80mA) を測定した。

ガス発生速度が安定したところで反応槽の汚泥を引き抜き、ポアサイズ 0.45 μm のろ紙でろ過した水溶性成分について、COD<sub>Cr</sub> (Standard Methods), たん白質 (牛血清アルブミンを標準とした Lowry 法), 炭水化物 (グルコースを標準としたフェノール硫酸法) の濃度を測定した。蛋白質濃度は汚泥をろ過しないものの濃度も測定した。

菌体量の指標として、VSS (揮発性懸濁固形物), DNA・RNA (デオキシリボ核酸, リボ核酸), ATP (アデノシン三リン酸) およびたんぱく質量などがあげられるが、本研究ではたんぱく質を含まない人工基質を用いたため、汚泥をろ過しないときの試料のたんぱく質濃度とろ過したときのたんぱく質濃度差である懸濁たんぱく質量を菌体量とした。

### 2-2 硫酸塩濃度の実験装置および条件<sup>5)-8)</sup>

#### 2-2-1 回分実験

図 2 に回分実験概要図を示す。回分実験の種汚泥

には、乳酸菌飲料、きな粉および酒かすを混合したものを塩分濃度の実験で用いたものと同様にショ糖(18,000mg/l)で信州大学工学部にて馴養し、得られた水素生成細菌群を使用した。種汚泥 30ml を 100ml のガラス製の血清瓶に、窒素曝気しながら注入した。嫌気条件にするため、その後 1 分間窒素曝気を続け、速やかにブチルゴム栓とアルミニウムキャップにより封印した。その後振とう培養槽で水温 37℃, 振とう数 90spm のもと振とう培養し、発生したガスを採取し、残留している基質を消費させた。

ガス発生が停止したのを確認し、各試験区に硫酸塩を 0, 1000, 2000 および 3000mg/l 添加した人口廃水を 30ml ずつ注入した。その後同じ温度と振とう数で培養しつつ、数時間おきに発生したガスを採取し、ガス生成量および組成を調べた。

ガス発生量はガラスシリンジを用いて測定した。また、水素ガス濃度は、TCD (Thermal Conductivity Detector) - ガスクロマトグラフ法 (Shimadzu GC-8A 型, Shimadzu C-R1A クロマトパック, カラム: ステンレスカラム, 担体: Molecular Sieve 5A, キャリアガス: アルゴンガス, キャリアガス圧力: 1 気圧, カラム温度: 70℃, 注入および検出温度: 100℃, 検出電圧: 80mA) により測定した。ガス発生が停止した後、液層部の COD<sub>Cr</sub> (HACH 社製 COD 分析試薬による吸光度法), 揮発性脂肪酸(以下 VFA) および pH を測定した。

## 2-2-2 連続実験

硫酸塩の影響を調べるための連続実験に用いた装置を図 3 に示す。本実験に用いた種汚泥は、回分実験と同じものである。連続実験は反応槽に外気を遮断した 800ml のガラスフラスコを用い、断続的にガス攪拌し、反応槽の温度を 20℃または 35℃に保った。基質は塩分濃度の実験と同様に、表 1 のとおり栄養塩類、微量元素および炭素源のショ糖を含む合成培地を用いた。流入水はマイクロチューブポンプにより流入し、滞留時間が 10 時間になるように流量を調整した。発生したガスは、メスシリンダーを逆さにしたガスホルダーに水上置換法で捕集し、ガス生成量を測定した。発生したガスの硫化水素濃度を、検知管法により測定した。水素ガス濃度, COD<sub>Cr</sub> および pH は回分実験と同じ手法により測定した。

## 3. 結果と考察

### 3-1 塩分濃度の影響

図 4 に塩化ナトリウム濃度を上昇させたときの全

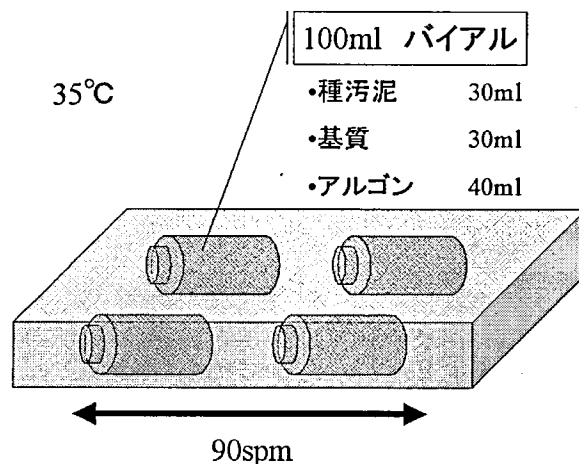


図 2 回分実験概要

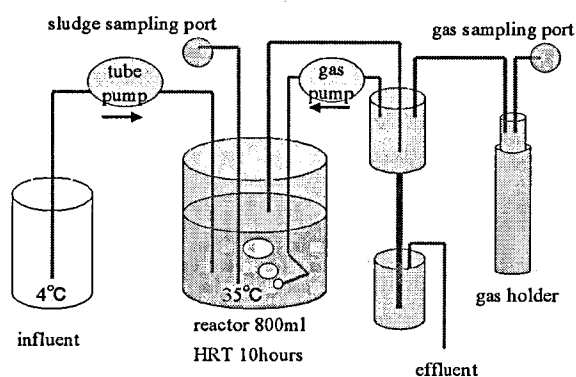


図 3 連続実験装置(硫酸塩)

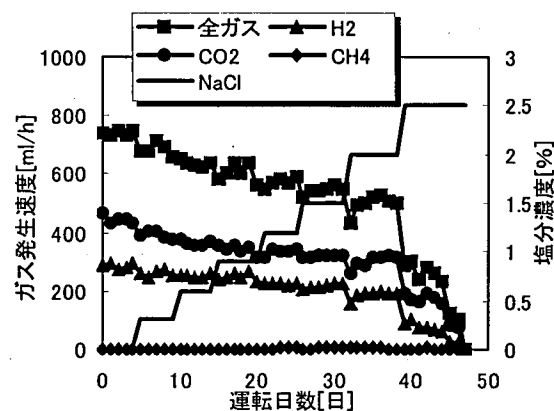


図 4 塩分濃度とガス発生

体のガス発生速度および水素、二酸化炭素、メタンガスの発生速度の変化を示した。全ガス、水素および二酸化炭素発生速度は、食塩濃度が 0% のときはそれぞれ約 720, 300, 420ml/h・l であったが、食塩濃度の上昇とともに徐々に減少していき、食塩濃度 2.0% のときはそれぞれ約 530, 210, 320ml/h・l となり、この濃度までは水素発酵が可能であった。ま

た、水素ガス濃度と二酸化炭素濃度との比はほぼ 2:3 で一定しており、これら二つのガスの占める割合がほぼ 99% 以上であり、メタンガス濃度は全体を通して 1% 以下であった。

食塩濃度が 2.5% になると、急激にガス発生速度が低下し、やがて完全に停止した。基質に元々含まれる電解質濃度を考慮すると、この細菌叢が水素生産可能である塩分濃度は約 2.3% までであると考えられる。ところで、食塩濃度を上昇させるとガス発生速度は一時的に急激に低下してから回復して安定したが、食塩濃度が高くなるほど回復して安定するのにかかる時間が延びた。このことから、食塩濃度が高くなると、細菌叢が環境変化等のストレスに対して弱くなると考えられる。また、pH は全体を通して 4.6 から 4.8 の間で安定しており、ガス生成が阻害されているにもかかわらず、あまり影響を受けていなかった。

NaCl 濃度が 0% のとき、溶解性 COD の除去率は約 30%、溶解性糖の除去率は約 75% であったが、NaCl 濃度が 2% のときの除去率はそれぞれ 23% と 58% であった。

食塩濃度が 0.0% から 2.0% に変化したとき、汚泥中の菌体量はわずかながら減少したものの 600~700mg/l の範囲内ではほぼ安定していた。これに対して、菌体たんぱく質 1mg あたりの水素発生速度は、食塩濃度 0% では約 0.4ml/h・mg・菌体たんぱく質であったのに対して食塩濃度 2% では約 0.3ml/h・mg・菌体たんぱく質であり、菌体量と比較して大きく変化した。このことから、食塩濃度により菌体の増殖よりも菌体のガス発生がより大きな阻害を受け

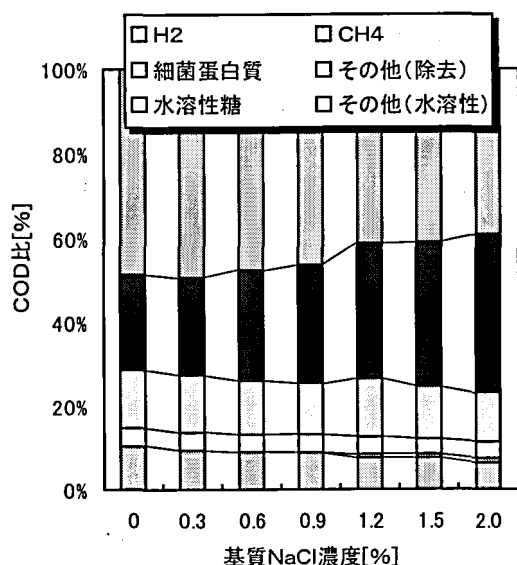


図5 塩分と COD 収支

たことが分かる。

図 5 に流入 COD に対する COD 物質収支を、添加した食塩濃度別に示した。食塩濃度を上げたとき、溶解性 COD の占める割合が増加したが、水溶性糖の割合が大きく上昇していることから、これは菌体の活性が低下したことによるものと考えられる。水素ガスの COD が占める割合は食塩濃度 0% では約 10% であったが、食塩濃度 2% では約 7% にまで減少した。細菌叢にはたんぱく質以外の成分も含まれるが、それらの成分は除去された溶解性 COD の「その他」の項目に含まれる。また、溶解性 COD の「その他」が非常に大きな割合を占めるが、この中には揮発性脂肪酸、アルコール類および乳酸が含まれていると考えられる。

### 3-2 硫酸塩濃度の影響

#### 3-2-1 回分実験

図 6 に回分実験の仕込み段階で試験区ごとの基質の硫酸塩濃度を 0, 1,000, 2,000 および 3,000mg/l としたときの、バイアル一本あたりの累積水素ガス生成量を示す。ガス発生は仕込み後約 120 時間ほどで停止し、最終的なガス生成量は 2.8~3.8ml/vial の範囲でばらつきが見られるものの、硫酸塩濃度差による目立った影響は見られなかった。

ガス発生停止後液層部の pH を測定したところ、仕込み段階では pH6.5~7.0 であったのに対し、いずれの試験区でも pH4.0~3.8 の範囲にあり、pH4.0 以下では水素発酵が起らないことから、ガス発生が停止したのは pH が低下したためであると考えられる。また、液層部の代謝産物は、酢酸が 350~440mg/l、酪酸が 530~640mg/l であったのに対してプロピオン酸は 10mg/l 以下と著しく少なかった。酢酸型の水素発酵以上に酪酸型の水素発酵も起きていたことがわかる。

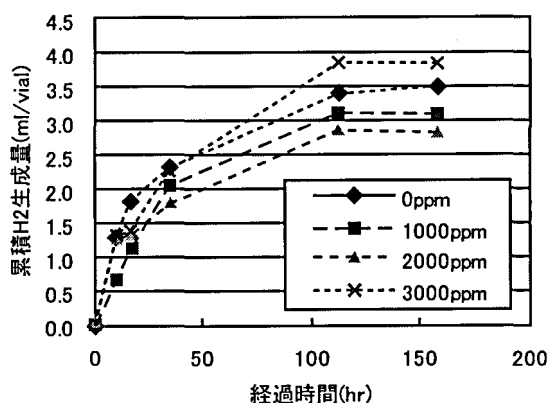


図6 硫酸塩の実験(回分)

## 3-2-2 連続実験

図7に、20℃および35℃における硫酸塩の連続実験の結果を示す。20℃の条件下で  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度 0～3,000mg/l の範囲で、水素生成速度は 50～70ml/h・l で安定しており、硫酸塩による著しい阻害は見られなかった。35℃の条件下でも同様に、 $\text{SO}_4^{2-}$  濃度 0 または 3,000mg/l で水素生成速度は 200ml/h・l 前後で安定していた。COD 除去率も硫酸塩濃度による目立った変化は見られなかった。また、いずれの条件下でも発生したガス中に硫化水素は含まれていなかったため、硫酸塩の還元は起こらなかったと思われる。このことより、硫酸塩濃度 3,000mg/l 以下では、水素発酵は硫酸塩による影響を受けないことがわかる。

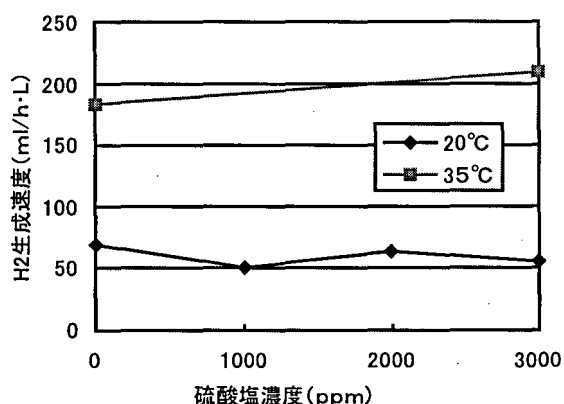


図7 20℃と35℃における  
硫酸塩の実験(連続)

## 4. 総括

本研究より、次の知見が得られた。

- a. 基質中の塩分濃度の上昇に伴い、水素生成速度、菌体量および全ガス生成速度が徐々に低下した。水素生産可能な塩分濃度の範囲は、約 2.3%までであった。

- b. HRT10時間、35℃でショ糖を基質としたとき、NaCl 濃度が 0 から 2.0%の範囲で、流入 COD の約 1 割程度を水素ガスに変換した。また、この条件では、基質が分解されたものの、ほとんどが残留 COD として流出した。
- c. ショ糖を基質とした水素発酵は、20℃でも 35℃でも  $\text{SO}_4^{2-}$  濃度が 3,000mg/l までは水素生成速度や COD 収率に変化が見られなかった。また、硫酸塩の還元も確認されなかった。

## 5. 参考文献

- 1) Taguchi, F., Chang, J.D.: Isolation of a hydrogen-producing bacterium *Clostridium beijerinckii* strain AM21B from termites. *Can. J. Microbiol.*, 39, 726-730, 1993.
- 2) P. L. McCarty and R. E. McKinney: Salt Toxicity In Anaerobic Digestion, *Journal WPCF*, 33, 4, 399-415, (April 1961)
- 3) R.E. Speece 原著, 松井三郎, 高島正信監訳: 「産業廃水処理のための嫌気性バイオテクノロジー」, 技報堂出版, 1999
- 4) Colleran, E., S. Finnegan and P. Lens, "Anaerobic Treatment of Sulfate-Containing Waste Streams," *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 67, p. 29-46, 1995.
- 5) American Public Health Association "APHA Standard methods for the examination of water and wastewater 15<sup>th</sup> edition" 1980.
- 6) 福井作蔵: 「還元糖の定量法」, 学会出版センター, p. 50-52, 1990
- 7) 菅原潔, 福島正美: 「たんぱく質の定量法」, 学会出版センター, p. 95-131, 1975
- 8) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修: 「下水試験方法上巻」, 日本下水道協会, 1997