

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2022-140097

(P2022-140097A)

(43)公開日

令和4年9月26日(2022.9.26)

(51)Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<i>C 1 2 N</i> 1/20 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/20	A Z N A 4 B 0 6 5
<i>C 0 2 F</i> 3/34 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/20	F 4 D 0 4 0
<i>C 0 2 F</i> 3/28 (2006.01)	<i>C 1 2 N</i> 1/20	D
<i>C 1 2 R</i> 1/01 (2006.01)	<i>C 0 2 F</i> 3/34	Z
	<i>C 0 2 F</i> 3/28	Z
	審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 17 頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願2021-40752(P2021-40752)

(22)出願日 令和3年3月12日(2021.3.12)

(71)出願人 505111982

学校法人 新潟科学技術学園
新潟県新潟市秋葉区東島字山居265番地
1

(71)出願人 501273886

国立研究開発法人国立環境研究所
茨城県つくば市小野川16-2

(74)代理人 100088155

弁理士 長谷川 芳樹

(74)代理人 100113435

弁理士 黒木 義樹

(72)発明者 井口 晃徳

新潟県新潟市秋葉区東島字山居265番地
1 学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬
科大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】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

(57)【要約】

【課題】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を提供すること。

【解決手段】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。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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。

【請求項 2】

メタノメチロボランズ (Methanomethylorans) 属に属するメタン生成古細菌である、請求項 1 に記載のメタン生成古細菌。

【請求項 3】

5 ~ 37 の温度で生育可能である、請求項 1 又は 2 に記載のメタン生成古細菌。

【請求項 4】

以下の (1) ~ (15) の生理学的性質を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のメタン生成古細菌：

- (1) グラム染色：陰性、
- (2) 生育温度：18 ~ 37、
- (3) 生育 pH：6.5 ~ 7.5、
- (4) 生育 NaCl 濃度：0.1 M 未満、
- (5) TMAH 資化性：陽性、
- (6) トリメチルアミン資化性：陽性、
- (7) ジメチルアミン資化性：陽性、
- (8) モノメチルアミン資化性：陽性、
- (9) メタノール資化性：陽性、
- (10) ジメチルスルフィド資化性：陽性、
- (11) メタンチオール資化性：陽性、
- (12) イソプロピルアルコール資化性：微陽性、
- (13) ギ酸塩資化性：陰性、
- (14) 酢酸塩資化性：陰性、及び
- (15) 1w/v% SDS 溶解性：陰性。

【請求項 5】

受領番号が NITE AP - 03370 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のメタン生成古細菌。

【請求項 6】

水酸化テトラメチルアンモニウムを含む排水に請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のメタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により排水中の水酸化テトラメチルアンモニウムを分解する工程を含む、排水を処理する方法。

【請求項 7】

水酸化テトラメチルアンモニウムで汚染された環境に請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のメタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により環境中の水酸化テトラメチルアンモニウムを分解する工程を含む、水酸化テトラメチルアンモニウムで汚染された環境を浄化する方法。

【請求項 8】

メタン発酵槽と、
メタン発酵槽に排水を供給する原水供給部と、
メタン発酵槽に請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のメタン生成古細菌を供給する、メタン生成古細菌供給部と、を備える、排水処理装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、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に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

半導体等の電子部品の製造工程では、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）など、毒性の強い有機化学物質を含む排水が排出される。従来、TMAHを含む産業排水は、活性汚泥法を用いた好気性処理で処理されていたが、好気性処理は、酸素の供給（曝気）に多大な電力が必要であり、かつ、多量の余剰汚泥が発生するため、環境負荷が高かった。

【0003】

一方、メタン発酵を利用する嫌気性処理によれば、好気性処理における上記問題を解決できるだけでなく、バイオエネルギーとして利用価値のあるメタンガスを回収できるという利点もある。非特許文献1には、TMAHを含む排水を嫌気性処理した例が報告されている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Hu, T H, et.al., Biological treatment of TMAH (tetra methyl ammonium hydroxide) in an full scale TFT LCD wastewater treatment plant, Bioresource Technology, 2012, 113, 303-310.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、メタン発酵処理を行うための植種汚泥中には、TMAHを分解可能な細菌が極少量しか存在しないため、予め汚泥をTMAHに長期間馴致する必要があり、効率的ではなかった。排水中のTMAHをメタン発酵により効率的かつ安定的に処理するためには、TMAHを分解可能なメタン生成古細菌の分離及び取得が不可欠であった。

20

【0006】

本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、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を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一側面に係るメタン生成古細菌は、水酸化テトラメチルアンモニウム分解能を有する。メタン生成古細菌は、メタノメチロボランス（Methanomethylovorans）属に属するメタン生成古細菌であってよく、5～37の温度で生育可能であってよい。メタン生成古細菌は、以下の（1）～（15）の生理学的性質を有してよい：

30

- （1）グラム染色：陰性、
- （2）生育温度：18～37、
- （3）生育pH：6.5～7.5、
- （4）生育NaCl濃度：0.1M未満、
- （5）TMAH資化性：陽性、
- （6）トリメチルアミン資化性：陽性、
- （7）ジメチルアミン資化性：陽性、
- （8）モノメチルアミン資化性：陽性、
- （9）メタノール資化性：陽性、
- （10）ジメチルスルフィド資化性：陽性、
- （11）メタンチオール資化性：陽性、
- （12）イソプロピルアルコール資化性：微陽性、
- （13）ギ酸塩資化性：陰性、
- （14）酢酸塩資化性：陰性、及び
- （15）1w/v% SDS溶解性：陰性。

40

メタン生成古細菌は、受領番号がNITE AP-03370であってよい。

【0008】

50

本発明の一側面に係る排水を処理する方法は、水酸化テトラメチルアンモニウムを含む排水に上記メタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により排水中の水酸化テトラメチルアンモニウムを分解する工程を含む。

【0009】

本発明の一側面に係る水酸化テトラメチルアンモニウムで汚染された環境を浄化する方法は、水酸化テトラメチルアンモニウムで汚染された環境に上記メタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により環境中の水酸化テトラメチルアンモニウムを分解する工程を含む。

【0010】

本発明の一側面に係る排水処理装置は、メタン発酵槽と、メタン発酵槽に排水を供給する原水供給部と、メタン発酵槽に上記メタン生成古細菌を供給するメタン生成古細菌供給部と、を備える。

10

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、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が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】一実施形態に係る排水処理装置の模式図である。

【図2】メタノメチロボランス属古細菌の分子系統樹である。

【図3】TMAH及び酵母エキスを含むW i d d e l培地で培養されたメタノメチロボランス属古細菌の増殖を示すグラフである。

20

【図4】(A)は、異なる温度でのNY - S T A Y D株の増殖を示すグラフであり、(B)は、異なる温度でのNY - S T A Y D株の比増殖速度(1/日)を示すグラフである。

【図5】(A)は、異なるpHでのNY - S T A Y D株の増殖を示すグラフであり、(B)は、異なるpHでのNY - S T A Y D株の比増殖速度(1/日)を示すグラフである。

【図6】メタン発酵排水処理装置にNY - S T A Y D株を添加した場合と、添加しなかった場合の、TMAHの分解を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

<メタン生成古細菌>

30

本発明の一側面に係るメタン生成古細菌は、TMAH分解能を有する。メタン生成古細菌は、メタノメチロボランス(Methanomethydrovora)属のメタン生成古細菌であってよい。

【0014】

メタン生成古細菌の生育温度は、例えば、5 以上、10 以上、15 以上、16 以上、17 以上、18 以上、19 以上、又は20 以上、かつ37 以下であってよく、18~37 又は20 ~37 であってよい。半導体等の電子部品の生産時に生じる排水は常温(一般的には20 前後)で排出されるが、メタン生成古細菌を含む嫌気性微生物を利用した従来の排水処理技術では、微生物の生育を維持するために30 以上の処理温度が必要であった。20 前後の低温で生育可能なメタン生成古細菌によれば、常温の排水を、加温せずに常温のまま処理することができ、排水処理装置の運転に係るエネルギーの削減が可能になる。

40

【0015】

メタン生成古細菌の生育pHは、例えば、6.0~9.0、6.0~8.0、又は6.5~7.5であってよい。公知のメタン生成古細菌は、一般的に、6.0~8.0の範囲で生育可能である。

【0016】

メタン生成古細菌の生育NaCl濃度は、特に限定されず、例えば、0.1M未満又は0Mであってよい。

【0017】

50

メタン生成古細菌は、トリメチルアミン、ジメチルアミン、モノメチルアミン、メタノール、ジメチルスルフィド、メタンチオール、及びイソプロピルアルコールからなる群より選ばれる少なくとも1以上の、好ましくはすべての物質の分解能（資化性）をさらに有してもよい。また、メタン生成古細菌は、ギ酸塩及び酢酸塩の分解能を有さなくてもよい。

【0018】

メタン生成古細菌は、1 w / v % 以上又は1 w / v % のSDSで溶解（溶菌）しないことが好ましい。

【0019】

メタン生成古細菌は、グラム陰性菌であってよい。

10

【0020】

メタン生成古細菌のゲノムのGC含量は、特に限定されないが、例えば、44.7 mol % 以上であってよい。

【0021】

メタン生成古細菌は、受領番号NITE AP - 03370（受領日：2021年1月28日）として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（NPM D）（郵便番号292 - 0818、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 5 - 8 122号室）に寄託された、NY - STAYD株であることが好ましい。NY - STAYD株は、配列番号1で示される塩基配列を含む、16S rRNA遺伝子配列を有する。また、NY - STAYD株は、以下の(1) ~ (15)の生理学的性質を有する：

20

- (1) グラム染色：陰性、
- (2) 生育温度：18 ~ 37 又は20 ~ 37（至適25 ~ 30）、
- (3) 生育pH：6.5 ~ 7.5（至適6.5 ~ 7.0）、
- (4) 生育NaCl濃度：0.1 M未満又は0 M、
- (5) TMAH資化性：陽性、
- (6) トリメチルアミン資化性：陽性、
- (7) ジメチルアミン資化性：陽性、
- (8) モノメチルアミン資化性：陽性、
- (9) メタノール資化性：陽性、
- (10) ジメチルスルフィド資化性：陽性、
- (11) メタンチオール資化性：陽性、
- (12) イソプロピルアルコール資化性：微陽性、
- (13) ギ酸塩資化性：陰性、
- (14) 酢酸塩資化性：陰性、及び
- (15) 1 w / v % SDS溶解性：陰性。

30

【0022】

本側面に係るメタン生成古細菌は、例えば、産業排水処理に用いられた汚泥（例えば、グラニユール汚泥）、水田土壌等を植種源として形成されたグラニユール汚泥にメタン生成古細菌を集積させた後、集積したメタン生成古細菌を分離培養することによって得ることができる。メタン生成古細菌の集積化及び分離培養は、例えば以下のように行うことができる。まず、本側面に係るメタン生成古細菌が生育可能な上述の温度（例えば、18 ~ 25 程度）で、植種源となる汚泥を含むメタン発酵排水処理装置にTMAHを含む排水を供給し、汚泥をTMAHに馴致させる。なお、TMAHへの馴致が十分に行われるまでの間、嫌気性微生物（メタン生成古細菌群等）の生育環境である低酸化還元電位環境（例えば - 250 mV 以下）を維持するために、他の易分解性有機物（低級脂肪酸、糖、タンパク質、アルコール類など）及び/又は還元剤（システイン塩酸、硫化ナトリウムなど）を同時に供給してもよい。汚泥によるTMAHの分解を確認した後、TMAHを加えた培地を用いて、汚泥中の細菌群の限界希釈及び継代培養を行う。細菌群中に本側面に係るメタン生成古細菌以外の細菌が存在しないことが確認できるまで限界希釈及び継代培養を繰り返すことで、本側面に係るメタン生成古細菌を分離することができる。

40

50

【 0 0 2 3 】

培養に用いる培地は、例えば、W i d d e l 培地であってよい。培地に添加される T M A H の濃度は、例えば、2 0 0 ~ 1 0 0 0 m g C O D / L であってよい。培地には、メタン生成古細菌の生育に有用な他の基質（有機物）及び還元剤、並びに / 又は他の菌種の増殖を抑制する物質を添加してもよい。他の基質としては、例えば、酵母エキスが挙げられる。酵母エキスの濃度は、例えば、4 0 m g C O D / L 以下であってよい。還元剤としては、例えば、システイン及び硫化ナトリウムが挙げられる。他の菌種の増殖を抑制する物質は、例えば、抗生物質であってよい。

【 0 0 2 4 】

培地及び培養液の温度、p H、及び N a C l 濃度は、本側面に係るメタン生成古細菌が生育可能な上述の温度、p H、及び N a C l 濃度であってよい。また、培養は、嫌気性条件下、例えば、8 0 % N₂ 及び 2 0 % C O₂ の混合ガス雰囲気下で行うことが好ましい。その他の培養条件は、公知のメタン生成古細菌を培養する際の条件に従うことができる。例えば、培地及び培養液の酸化還元電位は、- 2 5 0 m V 以下であってよい。

10

【 0 0 2 5 】

培養液中における本側面に係るメタン生成古細菌の存在は、メタン発酵による T M A H の分解を確認するとともに、例えば、メタン生成古細菌に特有の F 4 2 0 補酵素の自家蛍光を観察することにより、世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析により、及び / 又は蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（F I S H）法により、確認することができる。特に、本側面に係るメタン生成古細菌に特異的なプローブを用いた F I S H 法によれば、他のメタン生成古細菌との判別も可能である。

20

【 0 0 2 6 】

本側面に係るメタン生成古細菌は、メタン発酵により T M A H を分解することができるため、T M A H を含む電子産業排水の処理だけでなく、T M A H で汚染された土壌や地下水の浄化等、バイオオーグメンテーションにも利用することができる。

【 0 0 2 7 】

< 排水処理方法 >

本発明の一側面に係る排水を処理する方法は、T M A H を含む排水に本発明の上記側面に係るメタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により排水中の T M A H を分解する工程を含む。

30

【 0 0 2 8 】

T M A H を含む排水は、T M A H を含みさえすれば特に限定されず、例えば、電子産業排水であってよい。T M A H を含む排水には、モノエタノールアミン、イソプロピルアルコール等、他の有機物が含まれていてもよい。

【 0 0 2 9 】

T M A H を含む排水の温度、p H、及び N a C l 濃度は、本発明の上記側面に係るメタン生成古細菌が生育可能な上述の温度、p H、及び N a C l 濃度であることが好ましい。T M A H を含む排水の温度、p H、及び N a C l 濃度が上述の温度、p H、及び N a C l 濃度でない場合は、上述の温度、p H、及び N a C l 濃度となるように、排水の温度、p H、及び N a C l 濃度を調整する工程を行ってもよい。また、T M A H を含む排水の酸化還元電位は - 2 5 0 m V 以下であることが好ましい。T M A H を含む排水の酸化還元電位が - 2 5 0 m V 以下でない場合は、T M A H を含む排水の酸化還元電位を - 2 5 0 m V 以下に調節する工程を行ってもよい。T M A H を含む排水の酸化還元電位は、例えば、排水に有機物（低級脂肪酸、糖、タンパク質、アルコール類、酵母エキス等）及び / 又は還元剤（システイン塩酸、硫化ナトリウム等）を加えることで、- 2 5 0 m V 以下に調節することができる。

40

【 0 0 3 0 】

排水に加えるメタン生成古細菌は、培養液の形態であることが好ましい。したがって、本側面に係る排水を処理する方法は、該メタン生成古細菌を培養して、該メタン生成古細菌の培養液を得る工程をさらに備えてもよい。培養に用いる培地の組成、培地及び培養液

50

の温度、pH、及びNaCl濃度、並びにその他の培養条件は、上述のとおりである。

【0031】

本側面に係る排水を処理する方法は、上記側面に係るメタン生成古細菌の生育に有用な有機物及び/又は還元剤を排水に加える工程をさらに備えてよい。メタン生成古細菌の生育に有用な基質及び還元剤は、上述のとおりである。

【0032】

本側面に係る排水を処理する方法は、メタン発酵を利用する従来の排水処理装置に適用することができる。具体的には、メタン発酵を利用する従来の排水処理装置において、メタン発酵槽に供給される排水(原水)又はメタン発酵槽中の排水に本発明の上記側面に係るメタン生成古細菌を加えることで、排水中のTMAHを分解することができる。メタン発酵槽は、特に限定されず、上向流嫌気性汚泥床(UASB)法、膨張汚泥床(EGSB)法、流動床法、固定床法、流動担体法、嫌気性膜分離(AnMBR)法、CSTR法等の公知の手法のメタン発酵槽であってよい。メタン発酵槽には、グラニュール汚泥が保持されていることが好ましい。グラニュール汚泥は、特に限定されないが、例えば、産業排水処理に用いられたグラニュール汚泥又は水田土壌等を植種源として形成されたグラニュール汚泥であってよい。

10

【0033】

排水にメタン生成古細菌を加えるタイミングは、排水処理装置の立ち上げ時が好ましい。排水処理装置の立ち上げ時とは、排水処理装置の運転開始時(すなわち、TMAHを含む排水のメタン発酵槽への流入開始時)から、排水処理装置が安定的にTMAHを十分に分解できるようになった時点(例えば、流入するTMAHの約7~8割以上を安定的に分解できるようになった時点)までにおける任意の時点の意味する。メタン生成古細菌は、少なくとも排水処理装置の運転開始時に加えることが好ましい。メタン発酵を利用する従来の排水処理装置を用いてTMAHを含む排水を処理する場合、グラニュール汚泥をTMAHに馴致させるのに時間がかかるため、装置の運転開始から安定的にTMAHを十分に分解できるようになるまでの期間(すなわち、立ち上げ期間)が長期にわたる。排水処理装置の立ち上げ時に、本発明の上記側面に係るメタン生成古細菌を排水に加えることで、グラニュール汚泥にメタン生成古細菌が定着及び集積し、排水処理装置の立ち上げ期間を短縮することができる。

20

【0034】

<環境浄化方法>

本発明の一側面に係るTMAHで汚染された環境を浄化する方法は、TMAHで汚染された環境に本発明の上記側面に係るメタン生成古細菌を加えて、メタン発酵により環境中のTMAHを分解する工程を含む。

30

【0035】

TMAHで汚染された環境は、メタン生成古細菌が生育可能な環境(例えば、メタン生成古細菌が生育可能な上述の温度、pH、及びNaCl濃度を満たす環境)であれば特に限定されず、土壌、地下水、河川、湖沼、海洋等、あらゆる環境が挙げられる。また、TMAHで汚染された環境がメタン生成古細菌の生育に適した環境(無酸素及び低酸化還元電位)となるように、TMAHで汚染された環境に、還元剤及び/又は有機物の添加、並びに窒素ガスなどの不活性ガスの供給を行ってもよい。

40

【0036】

環境にメタン生成古細菌を加える方法は特に限定されず、自然圧での注入、圧力注入、かくはん注入、散布かくはん等、従来公知の方法を、環境に応じて適宜選択することができる。

【0037】

<排水処理装置>

本発明の一側面に係る排水処理装置は、メタン発酵槽と、原水供給部と、メタン生成古細菌供給部と、を備える。原水供給部は、TMAHを含む排水(原水)をメタン発酵槽に供給する。メタン生成古細菌供給部は、上記側面に係るメタン生成古細菌をメタン発酵槽

50

に供給する。メタン生成古細菌供給部は、メタン発酵槽に供給される排水にメタン生成古細菌を流入させることで、メタン発酵槽にメタン生成古細菌を供給してもよいし、排水の供給とは独立して、直接メタン発酵槽にメタン生成古細菌を供給してもよい。メタン発酵槽では、メタン発酵槽内（より具体的には、例えば、メタン発酵槽内の汚泥又は担体）に保持されたメタン生成古細菌が、排水中のTMAHを基質としたメタン発酵を行うことにより、排水中のTMAHが分解される。TMAHを含む排水及びメタン生成古細菌の詳細は、上述のとおりである。メタン発酵槽は、UASB反応槽、EGSB反応槽等、上述した公知のメタン発酵槽であってよい。

【0038】

以下、図1を参照して、一実施形態に係る排水処理装置を説明するが、本側面に係る排水処理装置は以下の実施形態に限定されない。

10

【0039】

図1に示す排水処理装置100は、原水供給部と、有機物及び還元剤供給部と、メタン生成古細菌供給部と、メタン発酵槽とを備える。原水供給部は、原水槽11と、原水供給ライン12とを備え、有機物及び還元剤供給部は、有機物及び還元剤貯槽21と、有機物及び還元剤供給ライン22とを備え、メタン生成古細菌供給部は、メタン生成古細菌貯槽31と、メタン生成古細菌供給ライン32とを備える。メタン発酵槽40には、処理水排出ライン41と、気固液分離部42と、バイオガス排出ライン43とが設けられている。

【0040】

原水槽11には、TMAHを含む排水が貯留されており、排水は、原水供給ライン12を通じて、UASB型のメタン発酵槽40の底部に供給される。メタン発酵槽40の底部に供給された排水は、上昇流によって上方向へ流れる。メタン発酵槽40の下部には、グラニユール汚泥が保持されており、グラニユール汚泥には、メタン生成古細菌が集積している（後述する）。排水中のTMAHは、グラニユール汚泥に集積したメタン生成古細菌により分解され、メタンガスが生成する。メタン発酵槽40の上部に設けられた気固液分離部42は、メタンガス、浮上グラニユール汚泥、及び処理水を分離する。メタンガスは、バイオガス排出ライン43を通じて排水処理装置100の外へと排出され、処理水は、処理水排出ライン41を通じて排水処理装置100の外へと排出される。浮上グラニユール汚泥は、再びメタン発酵槽40の下部へと沈降する。

20

【0041】

原水供給ライン12には、メタン生成古細菌供給ライン32を介してメタン生成古細菌貯槽31が接続しており、メタン生成古細菌貯槽31には、上記側面に係るメタン生成古細菌が貯留されている。メタン生成古細菌貯槽31中のメタン生成古細菌は、メタン生成古細菌供給ライン32及び原水供給ライン12を通じて、メタン発酵槽40へと供給され、メタン発酵槽40中のグラニユール汚泥に定着及び集積する。メタン生成古細菌の供給の開始及び停止は、いつ行ってもよい。例えば、メタン生成古細菌の供給は、排水処理装置100の運転中常に行ってもよく、排水処理装置100の立ち上げ時に行ってもよい。より具体的には、排水処理装置100の運転開始時にメタン生成古細菌の供給を開始し、TMAHの安定的な分解、又はグラニユール汚泥へのメタン生成古細菌の十分な定着及び集積が認められたときに、メタン生成古細菌の供給を停止してもよい。また、TMAHの分解が不安定化した場合には、適宜、メタン生成古細菌の供給を再開してもよい。

30

40

【0042】

原水供給ライン12には、有機物及び還元剤供給ライン22を介して有機物及び還元剤貯槽21がさらに接続している。有機物及び還元剤貯槽21には、メタン生成古細菌の生育に有用な上述の有機物及び還元剤、並びに低酸化還元電位を維持するための有機物及び還元剤が貯留されており、これら有機物及び還元剤は、有機物及び還元剤供給ライン22並びに原水供給ライン12を通じて、メタン発酵槽40へと供給される。

【0043】

排水処理装置100は、メタン生成古細菌供給部を備えることにより、排水処理装置100の立ち上げ時にメタン生成古細菌をメタン発酵槽40に供給することができるため、

50

短期間で立ち上げを完了することができる。

【 0 0 4 4 】

なお、排水処理装置 1 0 0 は一実施形態にすぎず、排水処理装置 1 0 0 の変形態様も、本側面に係る排水処理装置の範囲に包含される。例えば、原水供給部は、原水槽 1 1 からではなく、排水処理装置 1 0 0 の外から排水を供給してもよい。有機物及び還元剤供給部は、それぞれ独立した有機物供給部と還元剤供給部とに分けられていてもよい。有機物及び還元剤供給ライン 2 2 並びにメタン生成古細菌供給ライン 3 2 は、メタン発酵槽 4 0 に直接接続していてもよい。メタン発酵槽 4 0 は、U A S B 反応槽以外の他の公知のメタン発酵槽であってもよい。

【実施例】

【 0 0 4 5 】

< 実施例 1 . 分離培養 >

U A S B 型のメタン発酵槽に産業排水処理設備から採取したグラニューール汚泥を投入し、T M A H と、低級脂肪酸、イソプロピルアルコール等、メタン発酵細菌群の基質となる他の易分解性有機物とを含む排水を 1 8 ~ 1 9 で供給することで、グラニューール汚泥を T M A H で馴致させた。グラニューール汚泥による T M A H の分解を確認した後、基質 (T M A H 及び酵母エキス) 及び還元剤を添加した W i d d e l 培地 (p H 7 . 0) にグラニューール汚泥を加え、限界希釈を行った。実施例 1 ~ 4 で使用した W i d d e l 培地の組成、及び W i d d e l 培地に適宜添加した基質及び還元剤を表 1 に示す。W i d d e l 培地に含まれる微量元素溶液及びビタミン溶液の組成を、それぞれ表 2 及び表 3 に示す。

【 0 0 4 6 】

【表 1】

	試薬名	試薬量	濃度
Widdel 培地	NH ₄ Cl	0.535 g/L	10 mM
	KH ₂ PO ₄	0.136 g/L	1 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.204 g/L	1 mM
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.147 g/L	1 mM
	(10×) 微量元素溶液	0.1 mL/L	—
	(10×) ビタミン溶液	0.1 mL/L	—
	レサズリン	1.0 mg/L	—
還元剤	NaHCO ₃	2.52 g/L	30 mM
	Na ₂ S·9H ₂ O	0.3 g/L	—
基質	L-システイン	0.3 g/L	—
	酵母エキス	0.0452 g/L	40 mg COD/L
	TMAH	0.47 g/L	1000 mg COD/L

【表 2】

試薬名	試薬量 (g/L)	濃度 (mM)
FeCl ₂	1.27	10
CoCl ₂	0.13	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.198	1
ZnCl ₂	0.136	1
H ₃ BO ₃	0.0062	0.1
NiCl ₂	0.013	0.1
AlCl ₃	0.0133	0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0242	0.1
Na ₂ SeO ₃	0.0017	0.01
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.0033	0.01
CuCl ₂	0.0013	0.01

【表 3】

試薬名	試薬量 (mg/L)	濃度 (μM)
ビオチン	4.88	20
4-アミノ安息香酸	2.74	20
パントテン酸塩	9.54	20
ピリドキシン	4.12	20
ニコチンアミド	2.44	20
チアミン	6.74	20
リボ酸	4.12	20
葉酸	8.82	20
B12	27.1	20
リボフラビン	7.52	20

【0047】

基質 (TMAH 及び酵母エキス) 及び還元剤を添加した上記 W i d d e l 培地の 6 ウェルプレートに菌液を加え、20 で培養してコロニーを形成した (継代 1 回目)。コロニーを同様の W i d d e l 培地に植菌し、限界希釈と継代培養を 4 回繰り返した。2 回目の継代培養は 20 で行い、3 ~ 5 回目の継代培養は 37 で行った。4 回目の継代培養では、真正細菌の増殖抑制を目的として、40 μg / mL のバンコマイシンを培地に添加した。すべての培養は、N₂ / CO₂ ガス雰囲気で行った。次世代シーケンサー M i S e q (登録商標) システム (イルミナ社) を用いて微生物群集構造を解析したところ、3 回目の継代培養では全微生物の約 62% を占めていたメタノメチロボランス属古細菌の割合が、5 回目の継代培養では 100% となり、メタノメチロボランス属古細菌の分離培養に成功したことが確認された。分離株は NY - S T A Y D 株と命名した。

40

【0048】

< 実施例 2 . 分類学的性質の分析 >

NY - S T A Y D 株の培養液から DNA を抽出し、A R B S o f t w a r e p a c k a g e (Ludwig W, et al., ARB: a software environment for sequence data, Nucleic Acids Research, 2004, 32(4), 1363-1371.) を用いて、16S rRNA 遺伝子配列

50

(配列番号1)に基づく分子系統解析を行った。図2に分子系統樹を示す。図2中、Mm v _ i s o l a t e が NY - S T A Y D 株である。NY - S T A Y D 株は、メタノメチロポランス属の既知種である M . ユーポネシス (M . u p o n e n s i s)、M . ホーランドイカ (M . h o l l a n d i c a)、M . サーマフィラ (M . t h e r m o p h i l a) と、それぞれ 99.3%、98.8%、97.8%の相同性を示した。

【0049】

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (N B R C) から M . ユーポネシス、M . ホーランドイカ、及び M . サーマフィラを取り寄せた。M . ユーポネシス及び M . ホーランドイカはトリメチルアミン及び酵母エキスを基質として含む W i d d e l 培地で馴致させ、M . サーマフィラはメタノール及び酵母エキスを基質として含む W i d d e l 培地に馴致させた。NY - S T A Y D 株は、TMAH 及び酵母エキスを基質として含む W i d d e l 培地で培養した。これらメタノメチロポランス属古細菌を TMAH 及び酵母エキスを含む W i d d e l 培地に植菌し、37 °C 又は 50 °C で 40 日間静置培養した。各古細菌の増殖を、660 nm における培養液の光学密度 (O D ₆₆₀) を測定することにより調べた。結果を図3に示す。図3に示されるとおり、NY - S T A Y D 株のみ、培養開始から3週間で顕著な増殖が見られた。培地中の全基質に占める酵母エキスの割合は3.8%にしかならないことから、NY - S T A Y D 株は主に TMAH を基質として増殖したことが示された。一方、メタノメチロポランス属の既知種は、40日培養しても増殖傾向が見られなかったことから、これら既知種は TMAH 分解能を有さないことが示された。

【0050】

NY - S T A Y D 株は、TMAH 分解能を有するという点で、メタノメチロポランス属の既知種とは明確に異なる表現形質を有するため、NY - S T A Y D 株は新種であることが判明した。このため、NY - S T A Y D 株を、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した (受領番号 : N I T E A P - 03370、受領日 : 2021年1月28日)。

【0051】

< 実施例3 . 生理学的性質の分析 >

NY - S T A Y D 株の染色性、生育温度、生育 pH、生育 NaCl 濃度、基質資化性、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 溶解性、及び GC 含量を、以下のとおり分析した。

【0052】

染色性は、グラム染色キット (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製) を用いて調べた。ポジティブコントロールにはロドコッカス・エクイ (R h o d o c o c c u s e q u i) J C M 3 1 1 株を用い、ネガティブコントロールには大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) K 1 2 株を用いた。染色後の菌株は、400倍又は1000倍で、明視野観察法により観察した。結果を表4に示す。

【0053】

生育温度は、還元剤、TMAH、及び酵母エキスを添加した W i d d e l 培地 (ただし、レザスリン抜き) (pH 7.0) 中、N₂ / CO₂ 雰囲気下で、NY - S T A Y D 株を培養することにより調べた。培養は、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C、40 °C、45 °C、及び 55 °C の温度で行った。増殖は、分光光度計 V - 650 (日本分光株式会社製) を用いて、培養液の O D ₆₆₀ を測定することにより確認した。O D ₆₆₀ は、0 日目、4 日目、7 日目、11 日目 といったように、4 日に 1 回、次いで 3 日に 1 回測定することを繰り返して、約 50 日目まで測定した。結果を表4及び図4に示す。図4において、(A) は増殖速度を示し、(B) は比増殖速度 (1 / 日) を示す。

【0054】

生育 pH は、還元剤、TMAH、及び酵母エキスを添加した W i d d e l 培地 (ただし、レザスリン抜き) 中、37 °C、N₂ / CO₂ 雰囲気下で、NY - S T A Y D 株を培養することにより調べた。培地の pH は、NaCl を用いて、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、及び 9.0 に調整した。増殖は、分光光度計 V - 650 を

用いて、培養液のOD₆₀₀を測定することにより確認した。OD₆₀₀は、0日目、7日目、14日目、24日目、及び32日目に測定した。結果を表4及び図5に示す。図5において、(A)は増殖速度を示し、(B)は比増殖速度(1/日)を示す。

【0055】

生育NaCl濃度は、還元剤、TMAH、酵母エキスを、及びNaClを添加したWiddell培地(pH6.5~7.0)中、25℃、N₂/CO₂雰囲気下で、NY-STAYD株を培養することにより調べた。NaClの濃度は、0M、0.1M、0.2M、及び0.3Mに調整した。増殖は、1週間おきに、目視で又はメタン生成古細菌に特有のF420補酵素の自家蛍光を観察することにより、確認した。結果を表4に示す。

【0056】

基質資化性は、還元剤、酵母エキス、及び他の基質を添加したWiddell培地(pH6.5~7.0)中、25℃、N₂/CO₂雰囲気下で、NY-STAYD株を培養することにより調べた。他の基質としては、5mMのTMAH、5mMのトリメチルアミン、5mMのジメチルアミン、5mMのモノメチルアミン、5mMのメタノール、2mMのジメチルスルフィド、200µMのメタンチオール、5mMのイソプロピルアルコール、5mMのギ酸塩、及び5mMの酢酸塩を用いた。増殖は目視で確認した。結果を表4に示す。

【0057】

SDS溶解性は、NY-STAYD株の菌液を滴下及び風乾させたスライドガラスに対して、1%SDS及び0.1%SDSを滴下し、5~10分静置後に落射蛍光顕微鏡を用いて位相差観察を行うことにより調べた。結果を表4に示す。

【0058】

GC含量の解析は、株式会社テクノスルガ・ラボに委託した。結果を表4に示す。

【0059】

10

20

【表 4】

	NY-STAYD 株	M. ユーポネシス	M. ホーランドイカ	M. サーモフィラ
グラム染色	—	—	—	—
生育温度	20 ^{*1} —37°C (至適 25–30°C)	25—40°C	12—40°C	42—58°C
生育 pH	6.5—7.5 ^{*2} (至適 6.5–7.0°C)	5.5—7.5	6.0—8.0	5.5—7.5
生育 NaCl 濃度	0 M	0–0.1 M	0–0.3 M	0–0.2 M
基質資化性				
TMAH	+	—	—	—
トリメチルアミン	+	+	+	+
ジメチルアミン	+	+	+	+
モノメチルアミン	+	+	+	+
メタノール	+	+	+	+
ジメチルスルフィド	+	+	+	—
メタンチオール	+	+	+	—
IPA	W	—	ND	—
ギ酸塩	—	—	ND	—
酢酸塩	—	—	—	—
SDS 溶解性	— (1, 0.1 w/v%)	— (0.1 w/v%)	— (1 w/v%)	— (0.1 w/v%)
GC 含量	44.7 mol%	39.2 mol%	34.4 mol%	37.6 mol%

表中、+は陽性、Wは微陽性、—は陰性、NDは未定を示す。

*¹: 温度18~19°Cでも生育できると考えられる。

*²: pH8.0以上でも生育できる可能性あり。

【0060】

表4は、NY-STAYD株とメタノメチロボランス属の既知種の生理学的性質を比較した表である。

30

【0061】

表4及び図4に示すように、NY-STAYD株は、20~37の温度範囲で増殖した。培養温度が高いほど、比増殖速度が高かったが、溶菌も早かった。一方、培養温度が低いほど溶菌しにくく、菌体収量が高かった。比増殖速度及び菌体収量から、25~30、特に25がNY-STAYD株の至適生育温度であると判断された。NY-STAYD株は15では増殖しなかったが、実施例1に示されるように、NY-STAYD株は18~19のUASB反応槽から分離培養された菌株であるため、18~19でも生育可能であると考えられる。

【0062】

表4及び図5に示すように、NY-STAYD株は、6.5~7.5のpHで増殖した。これは、一般的なメタン生成古細菌の生育pH(6.0~8.0)と概ね一致する。至適生育pHは6.5~7.0であると考えられる。ただし、pHを8.0~9.0に調整するために用いたNaOHが、Widdel培地の調製時にpHを7.0にするために用いたHClと中和反応を起こし、培地中でNaClを形成しており、これがpH8.0~9.0での培養時に、NY-STAYD株の増殖を抑制した可能性もある。したがって、NY-STAYD株はpH8.0以上でも増殖できる可能性がある。

40

【0063】

NY-STAYD株のGC含量は既知種と比較して高いことから、既知種と差が見られた生理学的性質に関連する遺伝子(すなわち、生育温度及び基質資化性に関する遺伝子)

50

をコードしているDNAに、グアニン及びシトシンが多く含有されていると推察される。

【0064】

<実施例4．低温でのTMAH分解試験>

図1に示すようなUASB型のメタン発酵槽を備える排水処理装置を準備し、酢酸、プロピオン酸、イソプロピルアルコールの処理歴のあるグラニュール汚泥32gVSSを植種した。TMAHを600～700mgCOD/L含む排水を、原水槽からメタン発酵槽へ供給した。メタン発酵槽内の温度は18～19℃に維持した。また、排水処理装置内の還元度(-250mV以下)を維持するために、メタン発酵槽中のイソプロピルアルコール濃度が600～700mgCOD/Lとなるように、有機物及び還元剤供給ラインを通じて、イソプロピルアルコールを原水供給ラインへ流入させた。

10

【0065】

排水処理装置の運転開始から1日目及び2日目に、メタン生成古細菌供給ラインを通じて、メタン発酵槽中のグラニュール汚泥の0.63w/w%の量(合計1.26w/w%、0.403gVSS)のNY-STAYD株培養液を原水供給ラインへ流入させた。3日目以降は、NY-STAYD株培養液の供給を停止した。排水処理装置の運転期間中、処理水中のTMAH濃度を経時的に測定した。

【0066】

比較のために、上記排水処理装置と同様の排水処理装置を、NY-STAYD株を供給しなかったこと以外は上記と同様の条件で運転し、処理水中のTMAH濃度を経時的に測定した。

20

【0067】

結果を図6に示す。NY-STAYD株を添加しなかった排水処理装置では、50日経過後もTMAHの分解が生じず、処理水にTMAHが残存していた。一方、NY-STAYD株を添加した排水処理装置では、NY-STAYD株の添加により、15日目には処理水中のTMAH濃度が大きく減少し、20日目には検出限界(5mgCOD/L)以下の濃度にまでTMAH濃度が低下した。同時に、TMAHの分解に伴うメタンガス生成の増加を確認した。また、その後、NY-STAYD株を添加した排水処理装置は、200日以上安定的に運転が継続でき、電子顕微鏡観察及び16S rRNA遺伝子の解析により、グラニュール汚泥へのNY-STAYD株の定着及び集積も確認された。

【0068】

30

上記結果が示すように、排水処理設備等から採取した通常のグラニュール汚泥を用いて、TMAHを分解可能な排水処理装置を立ち上げる場合、実際にTMAHを分解可能になるまでグラニュール汚泥をTMAHに馴致させる期間が長期間(50日以上)必要である。一方、通常のグラニュール汚泥にNY-STAYD株を別途添加することで、必要な馴致期間が大幅に短縮され、短期間で排水処理装置を立ち上げることができることが示された。

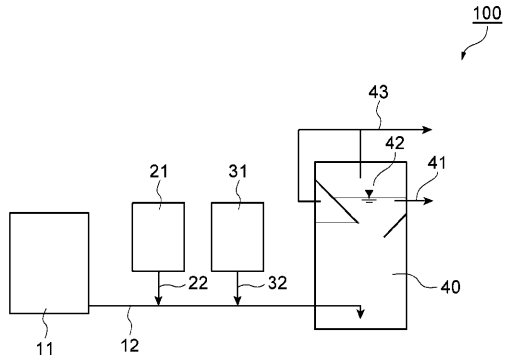
【符号の説明】

【0069】

11・・・原水槽、12・・・原水供給ライン、21・・・有機物及び還元剤貯槽、22・・・有機物及び還元剤供給ライン、31・・・メタン生成古細菌貯槽、32・・・メタン生成古細菌供給ライン、40・・・メタン発酵槽、41・・・処理水排出ライン、42・・・気固液分離部、43・・・バイオガス排出ライン、100・・・排水処理装置。

40

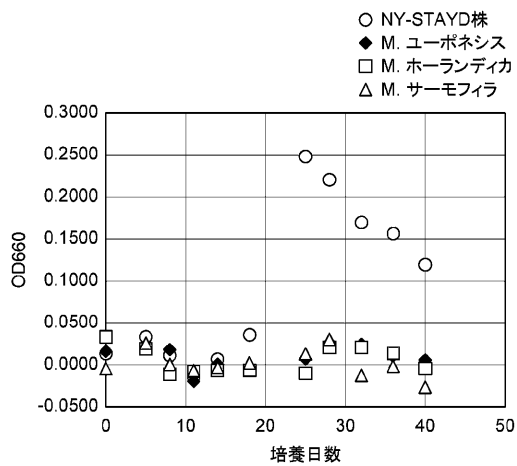
【 図 1 】



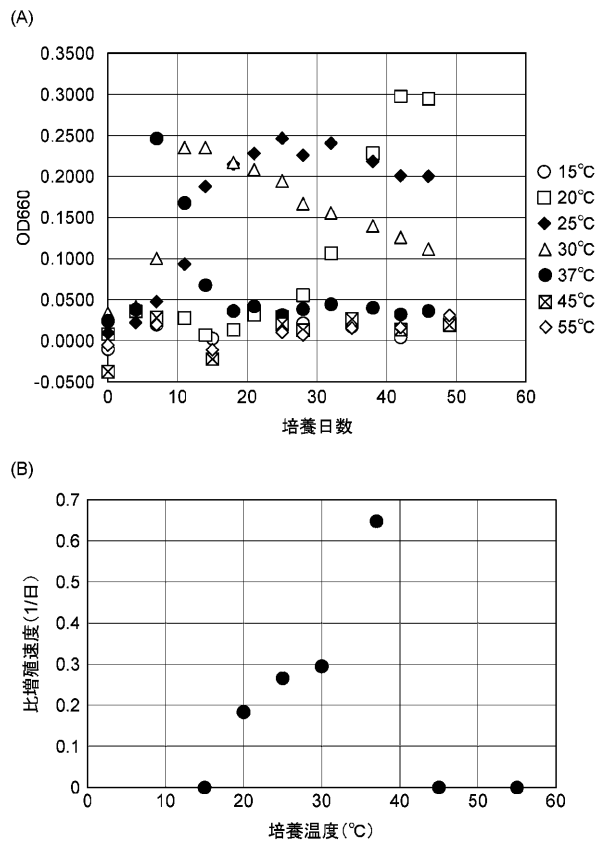
【 図 2 】



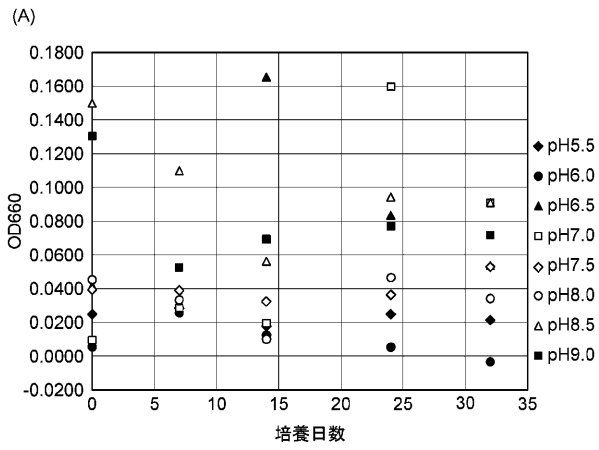
【 図 3 】



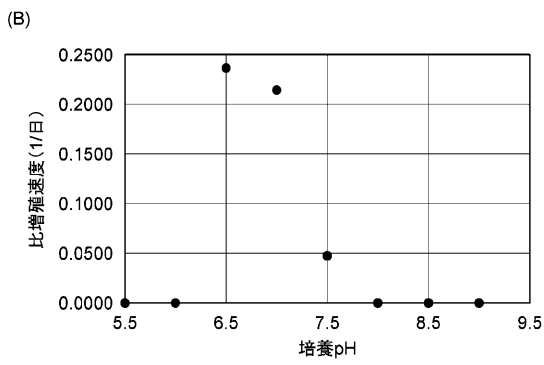
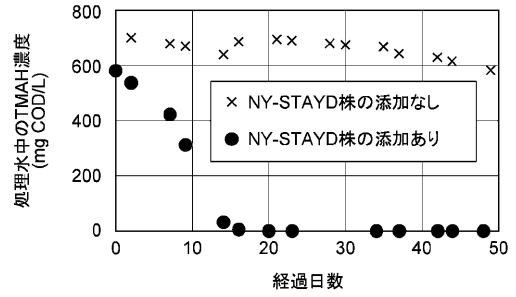
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

2022140097000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	C 0 2 F 3/28	A
	C 1 2 R 1:01	

特許法第30条第2項適用申請有り ウェブサイトの掲載日 令和2年3月16日 ウェブサイトのアドレス <https://www.jswe.or.jp/member/FileDownload.php> [刊行物等] ウェブサイトの掲載日 令和2年11月4日 ウェブサイトのアドレス <https://www.jswe.or.jp/extra/wet2020-online/pw/information.html> [刊行物等] 開催日 令和2年11月7日 集会名、開催場所 Water and Environment Technology Conference Online2020 (WET2020-online) (ウェブ発表会) [刊行物等] ウェブサイトの掲載日 令和2年11月17日~令和2年11月20日 ウェブサイトのアドレス <https://symposium.jsce-niigata.com/research/> [刊行物等] ウェブサイトの掲載日 令和2年11月17日~令和2年11月20日 ウェブサイトのアドレス <https://symposium.jsce-niigata.com/research/> [刊行物等] ウェブサイトの掲載日 令和3年3月4日 ウェブサイトのアドレス <https://www.jswe.or.jp/member/FileDownload.php> [刊行物等] 開催日 令和3年3月12日 集会名、開催場所 第55回日本水環境学会年会(ウェブ発表会)

(72)発明者 珠坪 一晃

茨城県つくば市小野川16-2 国立研究開発法人国立環境研究所内

Fターム(参考) 4B065 AA01X CA54 CA56

4D040 AA01 AA31 DD03 DD12 DD14