

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5425680号
(P5425680)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int. Cl.	F 1	
C O 2 F 3/34 (2006.01)	C O 2 F 3/34	Z
C O 2 F 3/00 (2006.01)	C O 2 F 3/00	G
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 R 1/07 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 5 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-68726 (P2010-68726)	(73) 特許権者	000113067
(22) 出願日	平成22年3月24日(2010.3.24)		ブリマハム株式会社
(65) 公開番号	特開2011-200765 (P2011-200765A)		東京都品川区東大井3丁目17番4号
(43) 公開日	平成23年10月13日(2011.10.13)	(74) 代理人	100107984
審査請求日	平成25年2月15日(2013.2.15)		弁理士 廣田 雅紀
微生物の受託番号	FERM P-21940	(74) 代理人	100102255
微生物の受託番号	FERM P-21941		弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100123168
			弁理士 大▲高▼ とし子
		(74) 代理人	100120086
			弁理士 ▲高▼津 一也
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物を用いた排水処理方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

B O D 低下能を有する バチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) に属する2種以上の微生物の混合物を排水に添加・培養して排水中の生物化学的酸素要求量 (B O D) を低下させる排水の処理方法であって、
前記 バチルス・チューリンゲンシス に属する微生物が、該微生物のトリプトソイ培地での培養液を、以下の組成を有するモデル排水 [1] に対して 0 . 1 v/v% 添加し、25 で48時間培養後のモデル排水における B O D 低下率が 5 0 % 以上であり、かつトリプトソイ培地 (p H 7) において 1 0 ~ 1 5 で生育可能である微生物であり、
前記 バチルス・チューリンゲンシス に属する2種以上の微生物の混合物が、該微生物のトリプトソイ培地での個々の培養液の等量混合物を、モデル排水 [2] に対して合わせて 0 . 1 v/v% 添加し、15 で48時間培養後のモデル排水における B O D 低下率が 5 0 % 以上である2種以上の微生物の混合物である、
ことを特徴とする排水の処理方法。

(1) モデル排水 [1] 組成

- ・ 可溶性でん粉 ; 0 . 0 9 2 g / L
- ・ ペプトン ; 0 . 1 9 6 g / L
- ・ 酵母エキス ; 0 . 1 9 6 g / L
- ・ 肉エキス ; 0 . 2 2 4 g / L
- ・ 塩化ナトリウム ; 0 . 0 2 0 g / L

- ・ 硫酸マグネシウム7水和物；0.012 g / L
 - ・ リン酸二水素カリウム；0.056 g / L
 - ・ 塩化カリウム；0.040 g / L
 - ・ 塩化アンモニウム；0.060 g / L
- BOD；600 mg / L

(2) モデル排水 [2] 組成

- ・ ブドウ糖；0.60 g / L
 - ・ コラーゲンペプチド；1.20 g / L
 - ・ 酵母エキス；0.60 g / L
 - ・ ポークブイヨン；0.60 g / L
 - ・ 塩化ナトリウム；0.10 g / L
 - ・ 硫酸マグネシウム7水和物；0.28 g / L
 - ・ リン酸二水素カリウム；0.20 g / L
 - ・ 塩化カリウム；0.06 g / L
 - ・ 塩化アンモニウム；0.30 g / L
- BOD；2000 mg / L

10

【請求項2】

温調設備のない浄化槽内の排水に、BOD低下能を有するバチルス・チューリンゲンシスに属する2種以上の微生物の混合物を添加・培養することを特徴とする請求項1記載の排水の処理方法。

20

【請求項3】

バチルス・チューリンゲンシスが、バチルス・チューリンゲンシスHS-25 (FERM P-21940) 又はバチルス・チューリンゲンシスHS-41 (FERM P-21941) であることを特徴とする請求項2に記載の排水の処理方法。

【請求項4】

BOD低下能を有するバチルス・チューリンゲンシスであって、該バチルス・チューリンゲンシスのトリプトソイ培地での培養液を、以下の組成を有するモデル排水 [1] に対して0.1v/v%添加し、25℃で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上であり、かつトリプトソイ培地 (pH7) において10~15℃で生育可能であることを特徴とするバチルス・チューリンゲンシス。

30

(1) モデル排水 [1] 組成

- ・ 可溶性でん粉；0.092 g / L
 - ・ ペプトン；0.196 g / L
 - ・ 酵母エキス；0.196 g / L
 - ・ 肉エキス；0.224 g / L
 - ・ 塩化ナトリウム；0.020 g / L
 - ・ 硫酸マグネシウム7水和物；0.012 g / L
 - ・ リン酸二水素カリウム；0.056 g / L
 - ・ 塩化カリウム；0.040 g / L
 - ・ 塩化アンモニウム；0.060 g / L
- BOD；600 mg / L

40

【請求項5】

バチルス・チューリンゲンシスHS-25 (FERM P-21940) 又はバチルス・チューリンゲンシスHS-41 (FERM P-21941) であることを特徴とする請求項4記載のバチルス・チューリンゲンシス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バチルス属に属する2種以上の微生物を用いた排水処理方法や、かかる排水

50

処理方法に用いられる B O D 低下能を有するバチルス属に属する微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

工場又は事業場等からの排水は、河川や海洋への放流により水質汚濁を招くため、排水中の水質を評価する指標の一つである B O D (Biochemical Oxygen Demand、生物化学的酸素要求量) を指標とした排水基準により規制されている。例えば、一日当たり平均排水量が 50 m^3 以上の工場又は事業場排水については、B O D は、許容限度 160 mg/L 、日間平均 120 mg/L を限度とする排水基準が定められている。そこで、一般の工場又は事業場においては、基準を超える排水を防ぐために、施設に付帯して個別に設置された浄化槽で排水処理を行い排水の B O D を低減させて放流を行っている。

10

【0003】

浄化槽では一般に活性汚泥処理法による排水処理がなされており、微生物が分解処理の一工程を担っているが、微生物による分解処理は、気候による水温の変化、排水の性質、あるいは排水中の溶存酸素量などにより処理効率が変動する問題がある。そのため大型の浄化槽では、前段に調整槽などを設け、微生物処理槽の水質の変化をできるだけ均一に調整する等の処理効率の低下を防ぐ処置が採られている。その一方で、調整槽を設けることが難しい小規模な浄化槽では、処理槽の水質の変化を防ぐことが難しく、特に、浄化槽容積が小さいことに起因して季節変化による水温変化を受けやすいという問題がある。そのため、冬季に処理槽の水温が低下すると微生物による排水処理能力が低下して、排水の B O D を排水基準内に抑えることが困難となる。

20

【0004】

このような問題を解決し低温下においても効率よく排水処理を行うために、従来、浄化槽に温調を設けたり地中に埋設する等の処置が採られている。また、散気管に加熱手段を設け、加熱された空気を接触曝気槽内に供給して汚水温度を上昇させるようにした汚水浄化槽(特許文献1参照)や、嫌気性微生物の硫酸呼吸により排水中の有機物を分解し、嫌気性処理槽からの排水を好気性処理槽における好気性微生物により分解して、排水中の硫化水素や硫化物を酸化して硫酸イオンを得て、硫酸イオンを含む被処理水を嫌気性処理槽の排水流入側へ戻す上向流嫌気性汚泥床式嫌気性処理槽による排水処理方法(特許文献2参照)が知られている。しかしながら、浄化槽等の設備あるいは排水処理装置の改良では、新たに設備導入費や維持費がかかりコスト的に問題があった。

30

【0005】

他方、排水処理にバチルス属細菌を使用することも知られている。例えば、豆腐・凍り豆腐・油揚げ生地などを製造する過程で排出される「ゆ」を栄養源にして、強力曝気を行いつつ、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*)やバチルス・チューリンゲンシス(*B. thuringiensis*)を主体としたバチルス菌を主体とする微生物により分解させることを特徴とする「ゆ」の処理方法(特許文献3参照)や、バチルス種混合菌を優占種にした微生物フィルムが付着された網状回転式バチルス接触体を装着した網状形回転式バチルス接触槽に有機物質と栄養塩類を含有した下水を導入して生物処理を行う方法(特許文献4参照)などが提案されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平10-192875号公報

【特許文献2】特開2004-148242号公報

【特許文献3】特開2008-178841号広報

【特許文献4】特開2008-253948号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、高い B O D 値の排水を水温変化の影響を受けることなく効率よく処理

50

するための、低廉かつ簡便な排水処理方法や該排水処理方法に使用することができるパチルス属に属するBOD低下能を有する微生物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、前記の課題を解決するため、土壌や浄化槽等から微生物を単離した。土壌試料から単離した658株、浄化槽内の排水等の排水試料から単離した235株の計893株の微生物の中から、幅広い温度範囲で良好に発育し、かつ低温下で効率よく有機物を分解し低温排水のBODを大幅に低減させることができるパチルス属に属する微生物を見いだした。さらに、単離した2種のパチルス属に属する微生物菌株を組み合わせることで、排水の水温が変動しても安定して効率よく排水処理を行うことができることを見だし、本発明を完成するに至った。

10

【0009】

すなわち、本発明は、(1) BOD低下能を有するパチルス・チューリンゲンシス (*B. thuringiensis*) に属する2種以上の微生物の混合物を排水に添加・培養して排水中の生物化学的酸素要求量 (BOD) を低下させる排水の処理方法であって、前記パチルス・チューリンゲンシスに属する微生物が、該微生物のトリプトソイ培地での培養液を、以下の組成を有するモデル排水 [1] に対して0.1v/v%添加し、25℃で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上であり、かつトリプトソイ培地 (pH7) において10~15℃で生育可能である微生物であり、前記パチルス・チューリンゲンシスに属する2種以上の微生物の混合物が、該微生物のトリプトソイ培地での個々の培養液の等量混合物を、モデル排水 [2] に対して合わせて0.1v/v%添加し、15℃で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上である2種以上の微生物の混合物である、

20

ことを特徴とする排水の処理方法に関する。

(1) モデル排水 [1] 組成

- ・ 可溶性でん粉; 0.092 g / L
- ・ ペプトン; 0.196 g / L
- ・ 酵母エキス; 0.196 g / L
- ・ 肉エキス; 0.224 g / L
- ・ 塩化ナトリウム; 0.020 g / L
- ・ 硫酸マグネシウム7水和物; 0.012 g / L
- ・ リン酸二水素カリウム; 0.056 g / L
- ・ 塩化カリウム; 0.040 g / L
- ・ 塩化アンモニウム; 0.060 g / L

BOD; 600 mg / L

30

(2) モデル排水 [2] 組成

- ・ ブドウ糖; 0.60 g / L
- ・ コラーゲンペプチド; 1.20 g / L
- ・ 酵母エキス; 0.60 g / L
- ・ ポークブイヨン; 0.60 g / L
- ・ 塩化ナトリウム; 0.10 g / L
- ・ 硫酸マグネシウム7水和物; 0.28 g / L
- ・ リン酸二水素カリウム; 0.20 g / L
- ・ 塩化カリウム; 0.06 g / L
- ・ 塩化アンモニウム; 0.30 g / L

BOD; 2000 mg / L

40

【0010】

また本発明は、(2) 温調設備のない浄化槽内の排水に、BOD低下能を有するパチルス・チューリンゲンシスに属する2種以上の微生物の混合物を添加・培養することを特徴

50

とする上記(1)記載の排水の処理方法や、(3)パチルス・チューリングェンシスが、パチルス・チューリングェンシスHS-25(FERM P-21940)又はパチルス・チューリングェンシスHS-41(FERM P-21941)であることを特徴とする上記(2)に記載の排水の処理方法に関する。

【0011】

さらに本発明は、(4)BOD低下能を有するパチルス・チューリングェンシスであって、該パチルス・チューリングェンシスのトリプトソイ培地での培養液を、前記モデル排水[1]に対して0.1v/v%添加し、25で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上であり、かつトリプトソイ培地(pH7)において10~15で生育可能であることを特徴とするパチルス・チューリングェンシスや、(5)パチルス・チューリングェンシスHS-25(FERM P-21940)又はパチルス・チューリングェンシスHS-41(FERM P-21941)であることを特徴とする上記(4)記載のパチルス・チューリングェンシスに関する。

10

【発明の効果】

【0012】

本発明の方法によれば、大型設備の導入や装置の改良を行うことなく、低温の排水や水温が変動する排水を安定して効率よく処理し、BODを低下させることができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0013】

【図1】HS-25株、HS-41株をそれぞれ単独で添加した排水処理試験の結果を示す図である。

【図2】HS-25株及びHS-41株を混合添加した排水処理試験の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のパチルス属微生物としては、該微生物のトリプトソイ培地での培養液を、上記BODが600mg/Lのモデル排水[1]100容量部に対して0.1容量部添加し、25で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上であり、かつトリプトソイ培地(pH7)において10~15で生育可能であるパチルス属に属するBOD低下能を有する微生物であれば特に制限されず、また、本発明の排水の処理方法としては、トリプトソイ培地での個々の培養液の等量混合物を、BODが2000mg/Lの上記モデル排水[2]100容量部に対して0.1容量部添加し、15で48時間培養後のモデル排水におけるBOD低下率が50%以上である上記本発明のパチルス属微生物の2種以上の混合物を排水に添加・培養して排水中のBODを低下させる方法であれば特に制限されず、ここで上記トリプトソイ培地での培養液とは、トリプトソイ培地(日水製薬株式会社製「トリプトソーヤブイヨン」)により30で24時間培養し、培養液を吸光値0.2(波長660nm)に調整して得られた各菌の懸濁液をいう。

30

【0015】

40

本発明のパチルス属微生物としては、10~40、好ましくは10~50と、低温域から高温域までの広い温度範囲で生育可能なパチルス属微生物が好ましく、かかる低温域から高温域までの広い温度範囲で生育可能なパチルス属微生物は、温調設備のない屋内外の浄化槽、例えば容量500~3000Lの浄化槽内の排水処理に好適に用いることができる。本発明のパチルス属微生物は、トリプトソイ培地等での前培養物の混合物、好ましくは等量混合物として、排水100容量部当たり、0.05~0.5容量部、好ましくは0.1~0.2容量部を定期的に添加することが好ましい。

【0016】

本発明のパチルス属微生物として、パチルス・チューリングェンシス、パチルス・ズブチリス、パチルス・リヘニホルミス(B.licheniformis)等のパチルス属微生物を例示する

50

ことができ、より具体的にはバチルス・チューリングゲンシス H S - 2 5 (F E R M P - 2 1 9 4 0) やバチルス・チューリングゲンシス H S - 4 1 (F E R M P - 2 1 9 4 1) など、バチルス・チューリングゲンシスに属する微生物を好適に例示することができる。

【 0 0 1 7 】

また、本発明の排水の処理方法の対象となる排水が油脂を多量に含む場合には、本発明のバチルス属微生物に加えて、油脂分解能を有する微生物、例えばバークホルデリア (Burkholderia) 属に属する油脂分解能を有する微生物、特にバークホルデリア・マルチボランス (B.multivorans) S B - B 株 (受託番号 F E R M P - 2 1 7 8 2) やバークホルデリア・マルチボランス (B.multivorans) S B - H 株 (受託番号 F E R M P - 2 1 7 8 3) の他、バチルス属細菌 (Bacillus sp.)、シュードモナス属細菌 (Pseudomonas sp.)、マイクロコッカス属細菌 (Micrococcus sp.) 等の廃水処理に常用される公知の微生物を併用することもできる。

【 0 0 1 8 】

本発明の排水処理に際しては、必要に応じて、炭素源や窒素源等を配合することができるが、配合しないことが好ましい。連続分解処理の際には、散気管により、あるいは、処理槽内に設置された攪拌板を連続的あるいは間欠的に回転させることにより、処理槽内に空気を送り込むと同時に排気口により排気を行うことが好ましい。また分解処理温度や pH は、通常コントロールする必要はないが、必要に応じて、20 ~ 40 °C, pH 6 ~ 8 にコントロールすることができる。

【 実施例 】

【 0 0 1 9 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【 0 0 2 0 】

1 . 菌株のスクリーニング

広範な環境で生育し、安定した排水処理が可能な微生物を得るため直接分離法による菌株のスクリーニングを行った。日本各地の土壌、及び食品工場の浄化槽内の排水等 3 7 箇所から試料を採取し、滅菌蒸留水に懸濁して 1 0 倍に希釈した後、標準寒天培地 (肉エキス 5 . 0 g / L、ペプトン 1 0 . 0 g / L、塩化ナトリウム 5 . 0 g / L、カンテン 1 5 . 0 g / L、pH 7 . 0 : 日水製薬株式会社) に塗抹して、30 °C で 4 8 時間培養した。培養後、出現したコロニーの中から、土壌試料については 6 5 8 株、浄化槽内の排水等の排水試料については 2 3 5 株の計 8 9 3 株の微生物を分離した。

【 0 0 2 1 】

2 . 固形培地での有機物の分解能試験

得られた 8 9 3 株の微生物について、タンパク質又は脂肪の分解能を評価した。タンパク質については、豚肉タンパク質、乳タンパク質 (カゼイン)、ゼラチンを、脂肪については動物性油脂 (ラード) を基質として、以下の方法で分解能評価用の固形培地を作製した。

【 0 0 2 2 】

(1) 豚肉タンパク質を基質とした寒天培地の作製方法

豚ロース赤身挽肉を等量の滅菌生理食塩水で一晩浸漬後、6000 rpm で 2 0 分間遠心分離し、得られた上清を 8 0 °C で 3 0 分間加熱殺菌し、豚肉タンパク質懸濁液とした。0 . 1 M リン酸緩衝液 (pH 6 . 8) 1 L にカンテン 2 0 . 0 g を加え加温溶解し、120 °C で 1 5 分間滅菌を行い、上記豚肉タンパク質懸濁液 1 0 g を加えてよく攪拌した後、滅菌シャーレに分注し、固化させた。

【 0 0 2 3 】

(2) 乳タンパク質を基質とした寒天培地の作製方法

0 . 4 % クエン酸ナトリウム溶液 1 L に酵母エキス 2 . 5 g、トリプトン 5 . 0 g、グルコース 1 . 0 g、カンテン 1 5 . 0 g、1 M 塩化カルシウム溶液 2 0 . 0 m l、及びカ

10

20

30

40

50

ゼインナトリウム（和光純薬工業株式会社）10.0gを加え加温溶解し、120℃で15分間滅菌を行った後、滅菌シャーレに分注し、固化させた。

【0024】

(3)ゼラチンを基質とした培地の作製方法

滅菌蒸留水1.0Lに肉エキス1.0g、ポリペプトン10.0g、酵母エキス1.0g、及びゼラチン（和光純薬工業株式会社）200gを加え加温溶解し、小試験管に5mLずつ分注した後、120℃で15分間滅菌を行い、固化させた。

【0025】

(4)動物性油脂を基質とした寒天培地の作製方法

標準寒天培地（肉エキス5.0g/L、ペプトン10.0g/L、塩化ナトリウム5.0g/L、カンテン15.0g/L、pH7.0：日水製薬株式会社製）1Lに純製ラード（プリマハム株式会社）10.0gを加え加温溶解し、120℃で15分間滅菌を行った後、滅菌シャーレに分注し、固化させた。

【0026】

(5)分解能評価

豚肉タンパク質、乳タンパク質、及び動物性油脂を基質とした寒天培地については、作製された平板寒天培地上に直径5mmのウェルを無菌的にあけ、該ウェルに吸光値0.2（波長660nm）に調整した分離菌株の懸濁液30μLをそれぞれ注入して、32℃で5日間の培養を行った。分解能の評価は、培養後、各基質が分解されることにより形成されるクリアゾーンの大きさを指標とし、クリアゾーンを形成しなかったものを「-」、直径10mm未満を「+」、直径10mm以上20mm未満を「++」、直径20mm以上を「+++」の4段階で評価した。また、ゼラチンを基質とした高層培地については、分離菌株のコロニーを白金線で採取して培地の高層に穿刺し、32℃で5日間の培養を行った。分解能の評価は、培養後に小試験管を傾け、培地の液化状態の外観評価から、液化しなかったものを「-」、微量が液化したものを「+」、やや液化したものを「++」、完全に液化したものを「+++」の4段階で評価した。各基質に対する分解能の評価結果を表1に示した。

【0027】

【表1】

表1

分解程度	土壌(658株)				廃水(235株)			
	タンパク質			脂肪	タンパク質			脂肪
	豚肉	カゼイン	ゼラチン	ラード	豚肉	カゼイン	ゼラチン	ラード
+++	12株	28株	6株	6株	9株	6株	7株	2株
++	249株	290株	197株	35株	78株	96株	63株	19株
+	262株	202株	263株	240株	64株	84株	90株	69株
-	155株	158株	212株	408株	84株	49株	75株	145株
3種以上の基質で+++	12株				3株			

【0028】

豚肉タンパク質、乳タンパク質（カゼイン）、ゼラチン、動物性油脂（ラード）の4種の基質のうち、3種以上について分解程度が「+++」と評価される菌株計15株（土壌からの分離12株（菌株No. S-7、No. S-25、No. S-41、No. S-162、No. S-163、No. S-180、No. S-184、No. S-202、No. S-361、No. S-427、No. S-496、No. S-511）、排水からの分離3株（No. J-52、No. J-61、No. J-216））が得られた。分離菌株15株について形態学的性質及び生理学的性質から微生物分類の簡易判定を行った結果、15株中12株がバチルス属、2株がエンテロバクテリアシェ（Enterobacteriaceae）属、1株がフラボバクテリウム（Flavobacterium）属であった（表2）。

【0029】

(3)モデル排水によるBOD低下試験

得られた15株の微生物の排水処理能をモデル排水のBOD低下率に基づいて評価した。分離菌株15株をそれぞれトリプトソイ培地(ペプトン17.0g/L、ダイズペプトン3.0g/L、塩化ナトリウム5.0g/L、ブドウ糖2.5g/L、リン酸一水素カリウム2.5g/L:日水製薬株式会社製「トリプトソーヤブイヨン」)により30で24時間培養し、培養液を吸光値0.2(波長660nm)に調整して得られた各菌懸濁液400μLを、下記の組成からなるモデル排水[1](BOD:600mg/L)400mLに添加して25で48時間振とう培養を行った。

【0030】

<モデル排水[1]組成>

(g/L)

・ 可溶性でん粉 * 1	0.092	10
・ ペプトン(Bact Pepton) * 1	0.196	
・ 酵母エキス(Bact Yeast Extract) * 1	0.196	
・ 肉エキス(Beef Extract) * 1	0.224	
・ 塩化ナトリウム * 2	0.020	
・ 硫酸マグネシウム7水和物 * 2	0.012	
・ リン酸二水素カリウム * 2	0.056	
・ 塩化カリウム * 2	0.040	
・ 塩化アンモニウム * 2	0.060	

* 1 BD Difco製

* 2 和光純薬工業株式会社製

20

【0031】

モデル排水における培養が48時間経過した後、培養液中の菌数を計測し、各モデル排水のBODを定法(JIS K 0102 21及び32)に従い測定して排水の初期BOD(240mg/L)に対するBOD低下率を算出した。その結果を表2に示す。排水のBODは、添加した分離菌株によって22.5%~59.4%低下したため、特に排水処理能力が高い微生物菌株として、モデル排水中のBOD濃度を45.0%以上低減させた菌株、No. J-52、No. J-61、No. S-25、No. S-41、No. S-163、No. S-180の6菌株を選抜した。

【0032】

【表2】

30

表2

菌株No.	分離源	菌種(属)	BOD低下率(%)	処理後の菌数(logCFU/ml)
J-52	浄化槽	<i>Bacillus</i>	59.4	3.1×10^7
J-61	浄化槽	<i>Bacillus</i>	45.4	1.1×10^7
J-216	浄化槽	<i>Flavobacterium</i>	41.4	2.4×10^8
S-7	土壌	<i>Bacillus</i>	34.6	5.7×10^6
S-25	土壌	<i>Bacillus</i>	53.6	1.0×10^8
S-41	土壌	<i>Bacillus</i>	56.0	9.6×10^7
S-162	土壌	<i>Enterobacteriaceae</i>	22.5	3.8×10^7
S-163	土壌	<i>Bacillus</i>	47.4	7.2×10^7
S-180	土壌	<i>Bacillus</i>	49.4	3.5×10^7
S-184	土壌	<i>Enterobacteriaceae</i>	44.2	8.7×10^7
S-202	土壌	<i>Bacillus</i>	42.0	2.6×10^7
S-361	土壌	<i>Bacillus</i>	29.4	4.5×10^5
S-427	土壌	<i>Bacillus</i>	40.9	1.3×10^6
S-496	土壌	<i>Bacillus</i>	43.1	4.9×10^7
S-511	土壌	<i>Bacillus</i>	43.2	8.2×10^6

* BOD低下率45.0%以上を選抜

40

【0033】

(4) 発育特性の試験

選抜された6菌株について、pH及び温度に対する発育特性を評価した。pHをそれぞ

50

れ5、7、9に調整したトリプトソイ培地（日水製薬株式会社製「トリプトソーヤブイオン」）10 mLに、吸光値0.2（波長660 nm）に調整した分離菌株の懸濁液100 μ Lを添加して、10、15、40、50 でそれぞれ4日間の振とう培養を行った。発育特性の評価は、培養後の各菌株の発育程度を波長660 nmにおける吸光値を指標とし、0.0を発育なし「-」、0.1以上0.2未満を発育「+」、0.2以上を発育「++」の3段階で評価した。その結果を表3に示す。

【0034】

【表3】

表3

菌株No.			温度(°C)			
			10	15	40	50
J-52	pH	5	-	-	-	-
		7	-	++	++	-
		9	-	-	-	-
J-61	pH	5	-	-	-	-
		7	-	++	++	-
		9	-	-	++	-
S-25	pH	5	-	-	++	++
		7	++	++	-	-
		9	-	-	-	-
S-41	pH	5	-	-	-	-
		7	+	++	++	-
		9	-	-	-	-
S-163	pH	5	-	-	-	-
		7	-	++	-	-
		9	-	+	-	-
S-180	pH	5	-	-	-	-
		7	+	++	-	-
		9	-	-	-	-

* 発育温度が広い「S-25」および「S-41」の2株を最終的に選択

【0035】

10 での発育が認められた菌株No. S-25及びNo. S-41の2株を選択した。No. S-25株はpH7で10~15、pH5で40~50 の条件下においても発育し、No. S-41株はpH7で10~40 で発育する菌株であった。よって、No. S-25及びNo. S-41はトリプトソイ培地（pH7）において10 でも生育し、モデル排水[1]（BOD:600 mg/L）を25 で48時間処理することによりBODを50%低下する菌株であった。

【0036】

(5) 菌株の同定

選抜された分離菌株No. S-25及びNo. S-41の2株についてより正確な分類を行うため形態学的性質及び生理学的性質に基づく同定、並びに遺伝学的性質に基づく同定を行った。形態学的性質及び生理学的性質に基づく同定では、グラム染色性、形状、孢子形成能、カタラーゼ・オキシダーゼ活性、ブドウ糖分解性を確認した。また、遺伝学的性質に基づく同定では、No. S-25及びNo. S-41株からゲノムDNAを抽出し、常法に従い、16SrRNA遺伝子の塩基配列に基づく遺伝学的解析を行った。解析された分離菌株No. S-25の16SrRNA遺伝子配列を配列番号1に、分離菌株No. S-41の16SrRNA遺伝子配列を配列番号2にそれぞれ示す。相同性検索の結果、No. S-25及びNo. S-41は、バチルス・チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*）ATCC 10792株に対してそれぞれ99.2%、99.8%の最も高い相同性を示したことから、単離された両微生物はバチルス・チューリングエンシス（*B. thuringiensis*）に近い菌種であると同定された。同定の結果を表4に示した。

【0037】

【表 4】

表4

	S-25	S-41
グラム染色	+	+
形状	桿菌	桿菌
孢子形成	+	+
運動性	+	+
好気条件での発育	+	+
嫌気条件での発育	-	-
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
ブドウ糖分解性	+	+
遺伝学的(16SrDNA)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

10

【 0 0 3 8 】

上記の菌種の同定結果から、No. S - 25 株はバチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) HS - 25 株、No. S - 41 株はバチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*) HS - 41 株と命名した。HS - 25 株は、平成 22 年 3 月 16 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番地中央第 6）に受託番号 FERM P - 21940 として寄託され、HS - 41 株は、平成 22 年 3 月 16 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番地中央第 6）に受託番号 FERM P - 21941 として寄託された。

20

【 0 0 3 9 】

選抜された HS - 25 株及び HS - 41 株について、マウスを用いた急性経口毒性試験により安全性を確認した。5 週齢の ICR 系マウス（日本エスエルシー株式会社製）5 匹を、 23 ± 2 、照明時間 12 時間 / 日の環境下で飼育し、HS - 25 株及び HS - 41 株の菌懸濁液（ 10^8 CFU / mL）20 mL / kg を毎日、単回経口投与した。マウス検体を 14 日間に渡って観察し、観察期間経過後は剖検を行った。HS - 25 株及び HS - 41 株の菌懸濁液を投与したマウスは、非投与のマウスと比べ異常は認められず、LD50 値は 20 mL / kg 以上であり、安全性に問題は無かった。

30

【 0 0 4 0 】

(6) 排水処理実験装置によるモデル排水の BOD 低下試験

排水処理における HS - 25 株と HS - 41 株の実用性を確認するため、実際の排水処理工程に近い系として 700 L 容の排水処理実験装置を用いて、2 菌株の排水処理による BOD 低下率を測定した。

【 0 0 4 1 】

(6-1) 菌株単独添加

供試菌株として HS - 25 株、HS - 41 株のそれぞれを単独で用いた排水処理試験を行った。HS - 25 株又は HS - 41 株をそれぞれトリプトソイ培地（日水製薬株式会社製「トリプトソーヤブイオン」）により 30 で 24 時間培養し、培養液を吸光値 0.2（波長 660 nm）に調整して得られた菌懸濁液 700 mL を下記の組成からなるモデル排水 [2]（BOD：2000 mg / L）700 L に添加して、15 で 48 時間、散気管を用いた通気による培養処理を行った。

40

【 0 0 4 2 】

<モデル排水 [2] 組成>	(g / L)
・ ブドウ糖（グルファイナル） * 3	0.60
・ コラーゲンペプチド（CPB-5） * 4	1.20
・ 酵母エキス（スーパー酵母エキス） * 5	0.60
・ ポークブイオン（A-6521） * 6	0.60
・ 塩化ナトリウム * 2	0.10
・ 硫酸マグネシウム 7 水和物 * 2	0.28

50

- ・ リン酸二水素カリウム * 2 0 . 2 0
- ・ 塩化カリウム * 2 0 . 0 6
- ・ 塩化アンモニウム * 2 0 . 3 0
- * 2 和光純薬工業株式会社製
- * 3 サンエイ糖化株式会社製
- * 4 ゼライス株式会社製
- * 5 味の素株式会社製
- * 6 日研フード株式会社製

【 0 0 4 3 】

培養処理の各時点で採取したモデル排水のBODを定法（JIS K 0102 21 及び32）に従い測定して、排水の初期BOD（2000mg/L）に対するBOD低下率を算出した。その結果を図1に示した。15℃で48時間の処理により、HS-25株は53%、HS-41株は51%それぞれBODを低下させることが確認された。 10

【 0 0 4 4 】

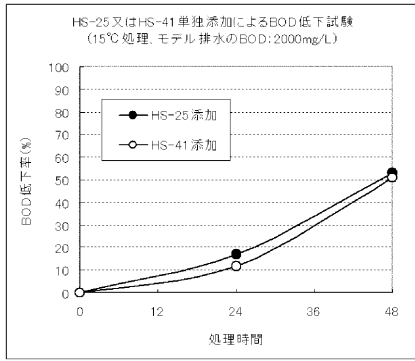
(6-2) 菌株混合添加

供試菌株としてHS-25株及びHS-41株を混合添加した排水処理試験を行った。HY-25株及びHY-41株をそれぞれトリプトソイ培地（日水製薬株式会社製「トリプトソーヤブイヨン」）により30℃で24時間培養し、培養液を吸光値0.2（波長660nm）に調整して得られた各菌の懸濁液を等量混合して、混合菌液700mLを上記の組成からなるモデル排水[2]（BOD：2000mg/L）700Lに添加して、15℃で48時間、散気管を用いた通気による培養処理を行った。また比較対照として、浄化槽用の市販菌を供試菌株として同様の条件で培養処理を行った。 20

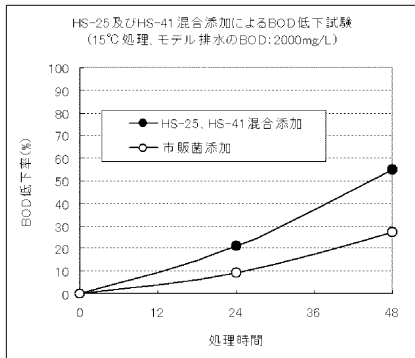
【 0 0 4 5 】

培養処理の各時点で採取したモデル排水のBODを定法（JIS K 0102 21 及び32）に従い測定して、排水の初期BOD（2000mg/L）に対するBOD低下率を算出した。その結果を図2に示した。HS-25株及びHS-41株を混合添加することにより、市販の従来菌による場合と比較して、低温（15℃）における排水処理が効果的に行えることが確認された。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

0005425680000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1:07

(72)発明者 岡田 幸男
茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
(72)発明者 山中 洋之
茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内

審査官 富永 正史

(56)参考文献 特開 2 0 0 9 - 1 4 2 7 8 6 (J P , A)
特開 2 0 0 8 - 1 7 8 8 4 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 2 F 3 / 0 0 - 3 / 3 4
C 1 2 N 1 / 2 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 1 2 R 1 / 0 7