

微細藻類と余剰汚泥中の PHA 蓄積菌を活用した下水処理場における 高付加価値バイオマス生産システムの確立

Establishment of value-added biomass production system in municipal wastewater treatment plants using microalgae and PHA-accumulating bacteria in waste activated sludge

大阪大学大学院工学研究科 准教授 井上大介

(研究計画ないし研究手法の概略)

【研究背景・目的・計画】

低炭素・脱炭素社会の構築に向けて、下水処理場においては、下水汚泥を活用した資源・エネルギー生産の促進が強く求められている。我々は、下水処理場に流入する下排水に含まれる汚濁成分（炭素（C）・窒素（N）・リン（P））、及び下水処理で発生する余剰汚泥を活用して高付加価値な資源を生産するための技術開発に関する研究を進めてきた。特に、余剰汚泥のバイオマスとしての特性を生かした有効利用促進の可能性の一つとして、余剰汚泥を生物触媒の集合体とみなし、下排水中の溶存性有機物を余剰汚泥によってポリヒドロキシアルカン酸（PHA）に変換・高蓄積させるため、余剰汚泥中に生息する PHA 蓄積菌を優占化させる手法について検討してきた。PHA は微生物が合成する脂肪族ポリエステルであり、バイオプラスチック原料として利用できるほか、嫌気性消化の良好な基質となることが知られている。他方、下水中の N・P を有価バイオマスに転換する方策として、微細藻類の一種であり、燃料や飼料等に有望なバイオマス資源であるユーグレナに着目し、下排水中におけるユーグレナバイオマス生産の可能性を明らかにし、その培養条件等について検討を進めてきた。これらの先行研究における知見を踏まえ、本研究では、ユーグレナと余剰汚泥中の PHA 蓄積菌を活用し、下水汚濁成分（C・N・P）を高付加価値バイオマスに最大限転換する新規システム（図1）の確立を目指し、本システムの各要素技術を確立し、提案システムの有用性を検証することを目的とする。

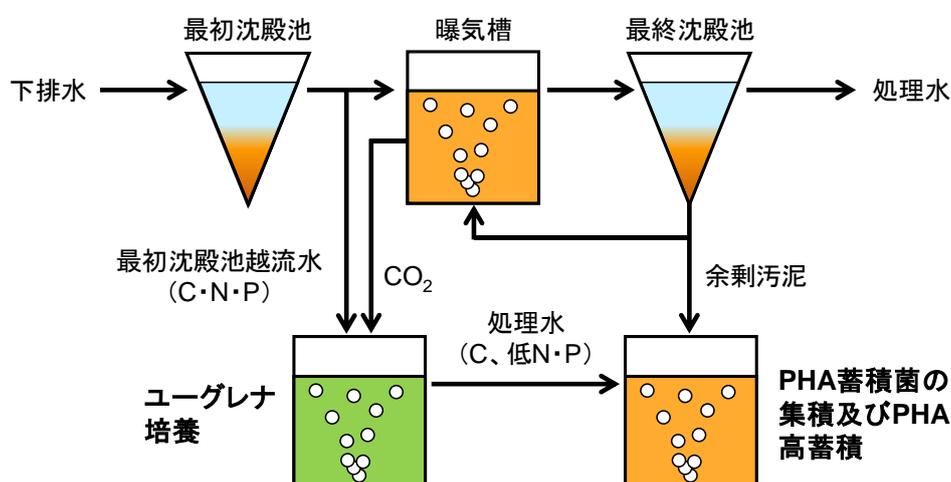


図1 提案する下排水及び余剰汚泥を活用した高付加価値バイオマス生産システム

【実験方法】

①下水を基質としたユーグレナバイオマス生産に係る検討

本実験には、無菌のユーグレナ (*Euglena gracilis* NIES-48) を用いた。特に記載がない限り、ユーグレナは、人工気象器内 (温度: 25°C、光量: 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、光照射時間: 16 時間/日) において回転振盪 (110 rpm) して培養を行った。

まず、下水を用いたユーグレナの最適な培養条件を明らかにするため、都市下水処理場より採取した最初沈殿池越流水を用いて、光照射 (光照射時間を 24 時間/日、16 時間/日、0 時間/日に設定)、CO₂ 供給 (5% CO₂ ガスあるいは空気で曝気; 培養器は静置)、下水希釈率 (下水濃度が 100%、50%、0% になるように二次処理水を用いて希釈) による影響について検討した。なお、下水中における浮遊物質 (SS) の存在は事前検討にてユーグレナ培養に特に影響しないことを確認していることから、下水は SS を除去せずに実験に供した。

また、ユーグレナ培養による下水中の C・N 除去の特長を明らかにするため、カツオエキス、ペプトン、尿素を主成分とする合成下水及び微細藻類培養に汎用される合成培地である CYT 培地を用いてユーグレナを培養し、ユーグレナバイオマス、有機物 (COD_{Cr}) 濃度、全窒素 (T-N)、pH の経時変化を調査した。

さらに、ユーグレナが蓄積する代表的な高付加価値成分であるパラミロンの合成に有利な光照射なし (光照射 0 時間/日) の従属栄養培養条件下において、下排水中に含まれ、バイオマス合成の基質として利用される可能性のある有機酸及び糖類からのバイオマス及びパラミロンの生産性について検討した。

②余剰汚泥による PHA 生産に係る検討

都市下水処理場から採取した余剰汚泥から PHA 蓄積菌を集積したものを実験に用いた。PHA 蓄積菌の集積は、4 L 容の円筒形リアクターを用いて (図 2)、以前の研究において確立した連続回分培養による PHA 蓄積菌集積法により、酢酸を基質に用い、2 日間で集積培養を行った。PHA 生産に用いる基質には、①における検討の結果を踏まえ、下排水そのもの、あるいは合成下水ではなく、ユーグレナ培養処理水として供給される可能性のある各種有機物 (有機酸、糖類、アルコールなど) を用いることとした。PHA 生産試験は、事前に行った検討の結果等を踏まえ、500 mL 容フラスコ内 (培養液量 300 mL、汚泥濃度 2000 mg/L、初期有機物濃度 2000 mg-C/L) において、回分培養 (22°C、120 rpm) で実施した。pH は、実験開始時に 8.0±0.2 に調整し、実験中の制御は行わなかった。実験中は、培養液中の有機物濃度、及び汚泥中の PHA (ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 及びポリヒドロキシ吉草酸 (PHV)) の蓄積量を継時的に測定した。

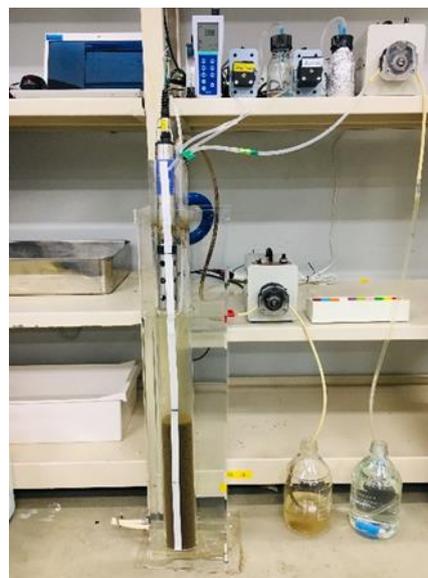


図 2 余剰汚泥からの PHA 蓄積菌集積に用いたリアクターの概観

（実験調査によって得られた新しい知見）

【下水中における最適なユーグレナ培養条件】

下水を用い、光照射、CO₂ 供給、下水希釈率の条件を変更して行ったユーグレナ培養実験の結果、光照射：16 時間／日、CO₂ 供給：あり、下水希釈率：0%がユーグレナバイオマス生産に最適であることが明らかとなった。すなわち、下水は希釈せずに用いることができ、ある程度の光照射を行うことによりバイオマス生産性を高めることが可能である。また、活性汚泥処理工程で発生する CO₂ を含む排ガスをユーグレナ培養への活用は、バイオマス生産性を高める有望なオプションになり得ることが見出された。

【下排水を基質と下ユーグレナバイオマス生産の可能性】

合成下水及び CYT 培地を用いたユーグレナ培養実験の結果、合成下水では、CYT 培地には劣るものの、顕著なバイオマス生産が可能であることが確認された（図 3）。また、そのバイオマス生産量の差と同様に、COD 及び T-N 濃度の低下は合成下水においては CYT 培地よりも小さく、特に T-N 濃度の低下は 7 日間で約 16 mg/L にとどまった。提案システムではユーグレナ培養後の処理水を PHA 生産に用いることを想定しており、高効率な PHA 生産のためには窒素を制限し（C/N 比を高くし）、微生物の増殖を抑制することが必要となる。そのため、ユーグレナ培養後の処理水を PHA 生産に用いるためには、ユーグレナ培養時に有機物は消費させず（C 源には CO₂ を利用させ）、かつ、窒素濃度を低減させる手法を検討することが必要である。

そこで、新たに得られた知見を踏まえ、ユーグレナによる各種有機物の利用性を調査することにより、逆に利用しにくい有機物について知見を得ることとした。下排水に含まれる可能性のある脂肪酸及び糖類を対象に検討した結果、実験に使用したユーグレナは、脂肪酸ではクエン酸、リンゴ酸、糖類ではラクトース、トレハロース、マンニトールの利用

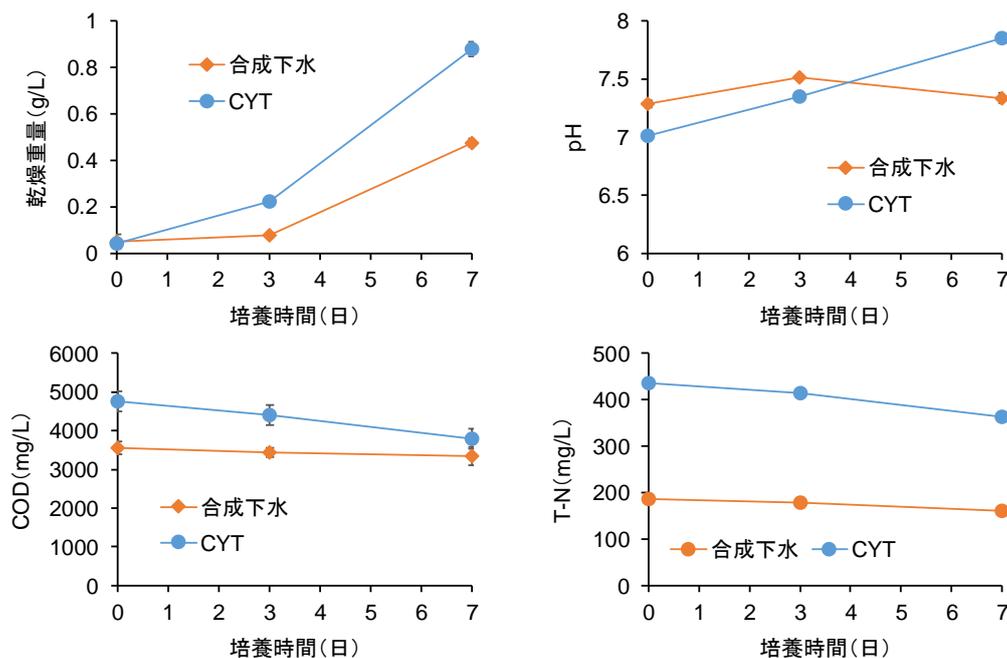


図 3 合成下水及び CYT 培地を用いたユーグレナ培養におけるバイオマス生産量（乾燥重量）及び水質（pH、COD、T-N）の時間変化

性が低いことが明らかとなった。すなわち、これらの有機物が主成分となる下排水であれば、有機物濃度を低減させることなく、窒素濃度を低減させ、高 C/N 比の処理水を得ることができる可能性があると考えられた。

【下排水中の各種有機物を基質とした PHA 生産、及び提案システムの可能性】

有機酸 7 種、糖類 3 種、アルコール 2 種を基質に用いて PHA 生産の可能性について検討した結果、余剰汚泥由来の PHA 蓄積菌集積系にとっては、酢酸、酪酸、乳酸、ピルビン酸、エタノールが PHA 生産に特に有望な基質であり、糖類は PHA 生産の基質にはあまり適さないことが明らかとなった (図 4)。また、上述の検討においてユーグレナに利用されにくいことが確認されたクエン酸とリンゴ酸は、余剰汚泥による PHA 生産にも利用されにくいことが明らかとなり、ユーグレナバイオマス生産と余剰汚泥による PHA 生産において、下排水中に含まれる異なる基質を利用するという構想を実現することは容易ではないことが示唆された。そのため、PHA 生産を行うためには、ここで有望な基質とみなされた有機物を高濃度に含む下排水を用い、ユーグレナによる消費を可能な限り抑制することが必要であると考えられた。

他方、本研究で PHA 生産に用いた PHA 蓄積菌集積系は、酢酸を基質に使用して構築したものである。PHA 蓄積菌集積系にとって PHA 生産に利用しやすい基質のスペクトルは集積段階で使用する基質に依存している可能性がある。すなわち、集積段階で使用する基質の種類を変更することにより、集積される PHA 蓄積菌の種類が異なる可能性があると考えられ、例えばユーグレナに利用されにくい有機物を基質に使用して PHA 蓄積菌を集積することにより、その基質を PHA 生産にも良好に利用できる可能性がある。そこで、本研究の継続として、酢酸以外の基質を用いた PHA 蓄積菌集積法を確立することを新たな課題として計画している。

本研究の限りでは、目標として掲げたユーグレナバイオマス生産及び PHA 生産を両立する有望システムを確立には至らなかったが、各要素技術の確立に向けて考慮すべきいくつか

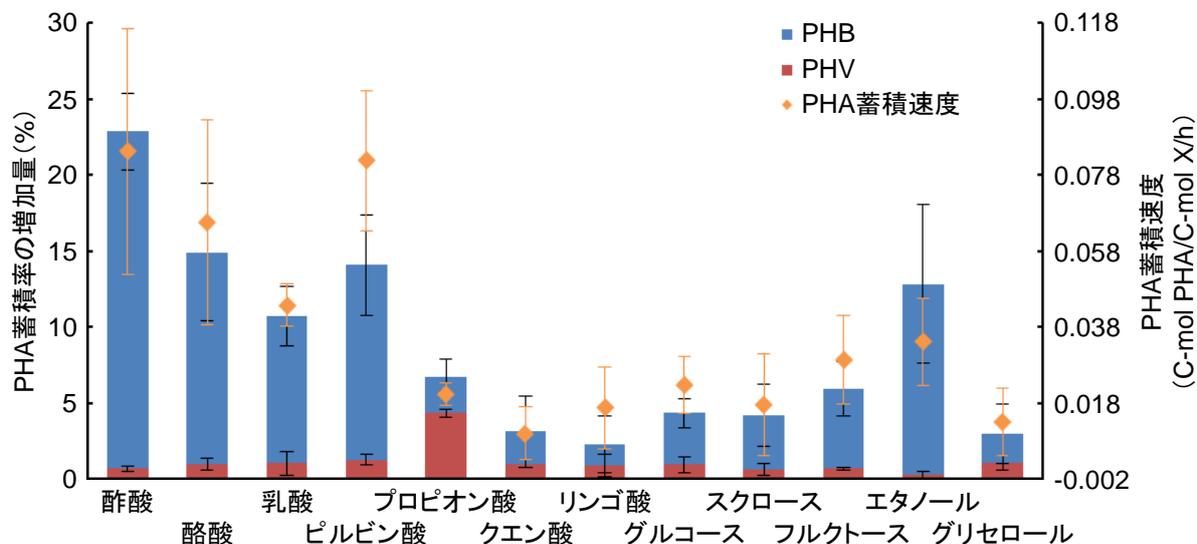


図 4 酢酸を用いて集積した PHA 蓄積菌集積系による様々な有機物からの PHA 生産性の評価

かの重要なポイントを明確にすることができ、今後の研究開発推進にとって有意義な知見を得ることができた。特に、上に記した仮説が正しいことが証明され、ユーグレナバイオマス生産と PHA 生産に異なる基質を用いることができれば、提案システムの確立に一步近づくことが可能になるものと考えられる。

(発 表 論 文)

- ・ 内畠雅希, 井上大介, 池道彦. (2021) 様々な有機物が *Euglera gracilis* のバイオマス・パラミロン生産に及ぼす影響. 第 55 回日本水環境学会年会.
- ・ 第 58 回下水道研究発表会において成果の一部を公表予定.