

(18) 活性汚泥からの生分解性プラスチック生成に関する研究
— 窒素制限基質におけるPHBの生成と高蓄積化条件の検討 —

STUDIES ON BIO-DEGRADABLE PLASTIC FROM ACTIVATED SLUDGE
- EXPERIMENTS OF PHB PRODUCTION UNDER NITROGEN LIMITED CONDITION -

斎藤 祐二*・友沢 孝*

Yuji SAITO*, Takashi TOMOZAWA*

ABSTRACT; We studied on the optimum condition for micro-organism to produce bio-degradable plastic (PHB) in activated sludge. The first experiment was made to confirm the production of PHB under nitrogen limited condition. Carbon content of dried activated sludge had risen rapidly after nitrogen in medium was completely consumed, white precipitate was extracted from dried activated sludge with hot chloroform and n-hexane after another 48 hours. We identified it was PHB by use of X-ray diffraction, DTA and CHNS-elemental analyzer. The second experiment was made to investigate the effect of carbon sources and cultivation period on PHB content under nitrogen limited condition. Consequently, CH_3COONa was better than glucose as carbon source for production of PHB. Content of PHB was stabilized to its maximum stage around 250 hours by continuous process and it was achieved to 12% of dried sludge weight basis. The third experiment was performed to grasp the difference of production rate of PHB and carbohydrate. PHB was slowly accumulated than carbohydrate. Consumption of PHB, observed with decrease of TOC in medium was also slow.

KEYWORDS; activated sludge, bio-degradable plastic, PHB, nitrogen limited condition

1.はじめに

近年、活性汚泥におけるリン酸の吸・脱着現象や、バルキング現象の抑制に関して、微生物の細胞内に蓄積されるエネルギー貯蔵物質が着目されている^{*1),*2)}。このエネルギー貯蔵物質としては、グリコーゲン、ポリリン酸さらにPoly- β -hydroxybutyrate (PHB)等が報告されている^{*3)}。一方、土肥らは、水素細菌(*A. eutrophus*)を用いた実験で微生物への増殖ストレスをコントロールすることによって、乾燥菌体重量当たり70(wt%)以上にまでPHBを蓄積できることを報告している^{*4)}。

PHBは熱可塑性ポリエステルであると同時に、圧電性、光学活性、生体適合性を持ち、さらに従来の合成高分子が持ち得なかった微生物分解性を有することから、今後自然環境と生態系を守るクリーンプラスチックの素材として大いに注目されている^{*4)}。

以上の背景から筆者らは、活性汚泥に多く存在するPHB生成菌の特性を利用し、従来、埋め立て・焼却処分されていた余剰汚泥から、有価資源であるPHBを生産・回収する研究に着手した。

本報は、微生物の増殖抑制因子として窒素を取り上げ、活性汚泥によるPHB生成を確認し、また通常、乾燥汚泥当たり0.2(wt%)程度とされる活性汚泥のPHB含有率^{*6)}の向上を目的に、基質炭素源および馴養窒素源、さらに窒素制限のストレス継続期間の影響について検討した。さらに回分培養によってPHBと炭水化物との蓄積速度について検討した。

*大成建設(株) 技術研究所 (Techni.Res.Inst., Taisei Corp. Engineering & Construction)

2.実験装置および実験方法

2.1 実験装置

活性汚泥によるPHB生成確認実験およびPHBの高濃度蓄積化実験ではFig.-1に示す実験装置を用いた。容量3(L)の曝気槽を用い、各実験系に示す馴養汚泥の回分培養を行った。その後PHBの蓄積を促進させるためにマイクロチューブポンプおよびタイマーによって窒素源を制限した人工基質を曝気槽へ供給した。またpHは10(%)NaOHおよび10(%)HClを用い、pHコントローラーによって6.9~7.1に制御した。なお通気強度は1.0(L/L/min.)とした。炭水化物およびPHBの貯蔵実験では、ロータリー式振盪培養機を用いた回分培養を行った。培養は30(°C)に設定した恒温室内で行い、振盪条件は200r.p.m.×35mmとした。

2.2 実験方法

(1). 活性汚泥によるPHB生成確認実験

N市都市下水処理場から採取した返送汚泥を1(mm)開孔メッシュのスクリーンで濾過し、得られた透過液を実験用の活性汚泥として用いた。これを遠心分離機(3,000rpm×10min.)および純水を用いて2度洗浄し、Table-1に示す酢酸系基質(No.1)でMLSS 5,000 (mg/L)に調整した。これをFig.-1の曝気槽へ1.5(L)投入した後通気培養を開始した。培養開始48時間後からTable-1に示す窒素制限の酢酸系基質(No.2)を2(g-C/hr)の条件で供給し、培養液中のC/N比を徐々に上昇させていった。経時的な汚泥内炭素、窒素、水素含有量および培養液中のアンモニア濃度を分析した。

(2). PHBの高濃度蓄積化実験

本実験ではPHB含有率に及ぼす馴養時の基質窒素源(NH₄-N, NO₃-N)の影響、窒素制限条件下での基質炭素源(糖、VFA)の影響を検討した。N市都市下水処理場から採取した返送汚泥を(1)の実験同様に洗浄処理し、0.1Mリン酸緩衝液で各々MLSS 5,000 (mg/L)に調整した。さらにTable-2のグルコース・アンモニア系基質(No.1)、グルコース・硝酸系

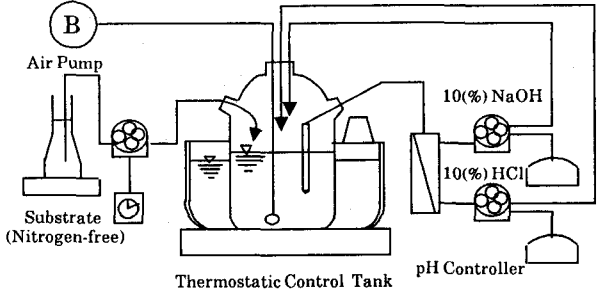


Fig.1 Schematic diagram of experimental apparatus.

Table 1 Substrate composition of main-culture.

No.	Carbon sources / (g/L)	Nitrogen sources / (mg/L)	Phosphorus sources / (mL/L)	Inorganic / (mg/L)
1	CH ₃ COONa 22	(NH ₄) ₂ SO ₄ 7000	H ₃ PO ₄ (1.1M) 12	MgSO ₄ ·7H ₂ O 37.5
2	CH ₃ COONa 200	—		FeSO ₄ ·7H ₂ O 2.5
3	C ₆ H ₁₂ O ₆ 22	(NH ₄) ₂ SO ₄ 7000		CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.5
4	C ₆ H ₁₂ O ₆ 200	—		ZnSO ₄ ·6H ₂ O 2.5
				MnSO ₄ ·4H ₂ O 2.5
				CaCl ₂ ·2H ₂ O 5.5

Table 2 Substrate composition of pre-culture.

No.	C-sources / (g/L)	N-sources / (mg/L)	P-sources / (mL/L)	Inorganic / (mg/L)
1	C ₆ H ₁₂ O ₆ 12.5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 3535	H ₃ PO ₄ (1.1M) 12	MgSO ₄ ·7H ₂ O 37.5
2		NaNO ₃ 4553		FeSO ₄ ·7H ₂ O 2.5
				CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.5
				ZnSO ₄ ·6H ₂ O 2.5
				MnSO ₄ ·4H ₂ O 2.5
				CaCl ₂ ·2H ₂ O 5.5

Table 3 Operational condition of the second experiment.

No.	Pre-culture		Main-culture	
	N-sources	Culture period	C-sources	Culture period
I	NO ₃ -N	20 days	CH ₃ COONa	48 hours
II	NO ₃ -N		C ₆ H ₁₂ O ₆	
III	NH ₄ -N		CH ₃ COONa	
IV	NH ₄ -N		C ₆ H ₁₂ O ₆	

基質(No.2)で各々活性汚泥の馴養を行った。基質供給は23時間培養後、1時間曝気を停止し、沈殿分離された上澄水と入れ替え供給した。また前述した実験(1)の運転方法に従い、外部から各曝気槽へTable-1の窒素制限基質(No.2、No.4)を供給することによって培養液中のC/N比を徐々に上昇させていった。各培養液中の窒素の欠乏が確認された時点から48時間経過後に培養を停止し、各培養汚泥を遠心分離機(3,000rpm×10min.)および0.1Mリン酸緩衝液で回収・洗浄した後PHBおよび炭水化物を抽出した。

(3). 回分培養における

炭水化物およびPHBの生成

2ヶ月間Table-2 No.2の硝酸態窒素を窒素源とする人工基質で馴養した活性汚泥を、遠心分離機(3,500rpm×10min.)および0.1Mリン酸緩衝液を用いて洗浄した。これを同様の緩衝液で作成したTable-4の酢酸系基質でMLSS 4,000 (mg/L)に調整し500(mL)三角フラスコにセットした後振盪培養を開始した。経過時間にしたがって培養液中の全有機炭素(TOC)、酢酸態炭素、 NH_4 、 NO_3 、さらに汚泥内炭素、窒素、水素含有量、PHBおよび炭水化物含有率を分析した。

2.3 分析方法

全有機炭素(TOC)はTOC分析計で測定した。 NH_4 、 NO_3 はイオンクロマトグラフィーで、酢酸態炭素は液体クロマトグラフィーで測定した。汚泥内炭素、窒素、水素含量はCHNSコーダーで分析した。汚泥内PHBは、凍結乾燥後の汚泥からクロロホルムによって抽出し、ヘキサン添加によって回収した後、MLSSとの重量比で評価した。また微量分析においては、WardとDawesの示したDisk assay法を改良した河野の方法によった*7)。炭水化物は凍結乾燥汚泥から30(%)KOHによって抽出した後(100℃×3 hr)、アンスロン法によって比色定量し乾燥汚泥との重量比で算定した。なおアルカリ抽出炭水化物の炭素量はTOC分析計で測定し算定した。汚泥内へのPHB貯蔵の様子は、スーダンブラックBを用いたBurdonの染色法によって処理し光学顕微鏡で観察した。またPHBの同定はX線回折法および示差熱分析計(DTA)による融点測定で行った。

Table 4 Substrate composition of the third experiment.

Carbon sources/(g/L)	Nitrogen sources/(mg/L)	Phosphorus sources/(mL/L)	Inorganic/(mg/L)
CH_3COONa 17.1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 94	H_3PO_4 (1.1M) 12	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 37.5 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5

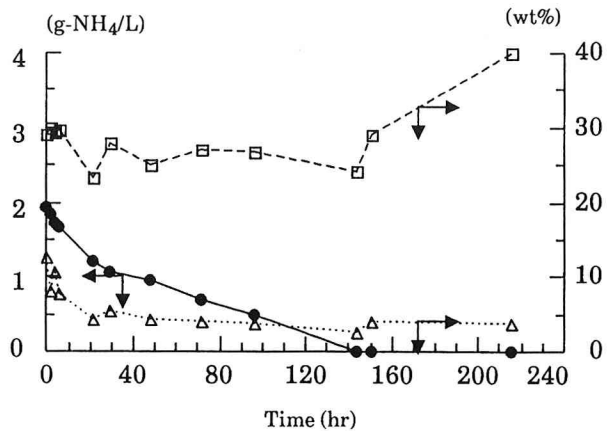
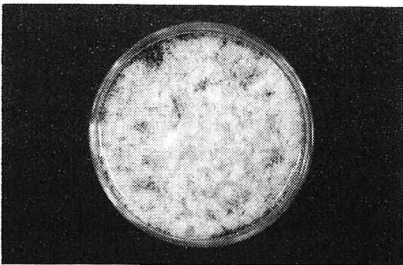


Fig. 2 Transition of carbon and nitrogen contents in dried sludge and concentration of NH_4 . ●, concentration of NH_4 ; □, carbon content; △, nitrogen-content.



Phot. 1 Precipitated material from activated sludge.

3. 実験結果と考察

3.1 活性汚泥によるPHB生成確認実験

培養液中のC/N比を上昇させることによる、経時的な汚泥内炭素、窒素、水素含有量の変化を分析した。Fig-2に培養液中のアンモニア態窒素および汚泥内炭素、窒素含有量の経時変化を示す。アンモニアは初期濃度1.9(g-NH₄/L)であったが増殖によって資化され、培養150時間経過後に欠乏した。一方、汚泥内炭素含有量は培養開始時に25(%)であったが、アンモニアが欠乏した時から急激に上昇し、216時間後には乾燥汚泥重量当たり40(%)に達した。しかし汚泥内窒素含有量には著しい変化は見られなかった。培養液中の窒素素源の欠乏によって増殖が抑制され、細胞内になんらかの炭素化合物が蓄積したと推察された。そこで220時間経過後に培養を停止し貯蔵物質の抽出を行った。凍結乾燥処理した汚泥をソックスレー抽出器にセットし、ホットクロロホルムによる還流抽出(70℃×24hr)を行った。抽出液をガラスフィルターGF/Aで濾過した後、濾過液にヘキサンを添加し再沈させた。Fig-3に抽出物質のX線回折結果を示す。各結晶化面の面間隔距離は0.659 nm (2θ=13.42 No.1ピーク)、0.525 nm (2θ=16.88 No.2ピーク)、0.296 nm (2θ=30.11 No.9ピーク)となり、これらは既知のPHBデータ*8)と合致する。Table-5には抽出物質とPHBの炭素、酸素、水素含有率を示す。またFig-4にDTAによる分析結果を示す。本抽出物質の炭素および水素含有率はPHB(C₄H₆O₂)と一致しており、さらに抽出物質の吸熱ピーク(172.1℃)はPHBの融点と一致する*8)。以上の結果、本抽出物質はPHBであることが確認された。なお本実験でのPHB含有率は乾燥汚泥重量当たり0.5(wt%)であった。

3.2 PHBの高濃度蓄積化実験

Table-6に、各条件における乾燥汚泥重量当たりのPHBおよびアルカリ抽出炭水化合物の含有率を示す。炭水化合物含有率は、硝酸態窒素系基質による馴養汚泥(No. I, II)がア

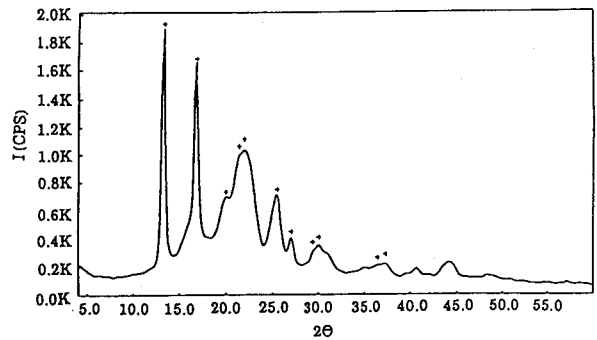


Fig. 3 X-ray diffraction pattern of precipitated material.

Table 5 Carbon, hydrogen and oxygen contents of precipitated material and PHB.

Material	Carbon (mol%)	Hydrogen (mol%)	Oxygen (mol%)
Extracted material	55.46	6.84	—
PHB	55.81	6.97	37.23

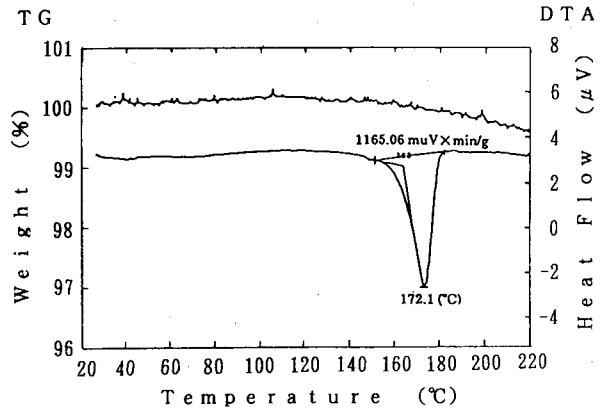


Fig. 4 DTA curves of precipitated material.

Table 6 Effect of pre-culture's nitrogen sources and main-culture's carbon sources on PHB and CH content.

No.	N-sources of Pre-culture	C-sources of Main-culture	PHB - content ^{a)} (wt%)	CH - content ^{b)} (wt%)
I	NO ₃ -N	CH ₃ COONa	1.45	7.50
II	NO ₃ -N	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.12	21.4
III	NH ₄ -N	CH ₃ COONa	1.07	6.80
IV	NH ₄ -N	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.50	20.2

a), b); The mounts of PHB and CH(Carbohydrate) are given as percentage of the dried sludge weight.

ンモノア態窒素系基質によるもの(No.Ⅲ,Ⅳ)より高い結果となったが、PHB含有率では明確な差異は確認されなかった。

窒素制限下でのグルコース系基質による培養汚泥(No.Ⅱ,Ⅳ)は、乾燥汚泥重量当たり20(wt%)以上の炭水化物含有率となり、酢酸系基質による培養汚泥(No.Ⅰ,Ⅲ)の約3倍となった。一方、PHB含有率は両条件ともに低く1(wt%)前後であったが、酢酸系基質では、グルコース系基質の約14倍の収率となった。PHBの生成には前駆体として過剰のアセチルCoAが必須である*3)ことから、アセチルCoAを生成しやすい酢酸系基質による培養汚泥が高い結果を示したと考えられる。さらにPHB含有

率を向上させるために、窒素制限のストレス継続期間の影響を検討した。25日間、硝酸態窒素系基質(Table-2, No.2)で馴養した活性汚泥を、窒素制限の酢酸系基質(Table-1, No.2)で長時間に渡り培養し、経時的なPHB含有率の変化を分析した。Fig-5に培養液中の窒素濃度および乾燥汚泥重量当たりのPHB含有率の経時変化を示す。培養液中の窒素は培養開始75時間経過後に欠乏した。またPHB含有率は窒素欠乏時から急激に上昇し、240時間経過後には定常となり300時間経過後には乾燥汚泥重量当たり12(wt%)に達した。

3.3 回分培養における

炭水化物およびPHBの生成

Fig-6に培養液中のTOCおよび酢酸態炭素の経時変化を示す。またFig-7には汚泥内炭素および炭水化物(CH)、PHB濃度の経時変化を示す。TOCおよび酢酸態炭素は指数的に消費され、培養144時間後には酢酸態炭素は完全に消費された。また炭水化物およびPHB

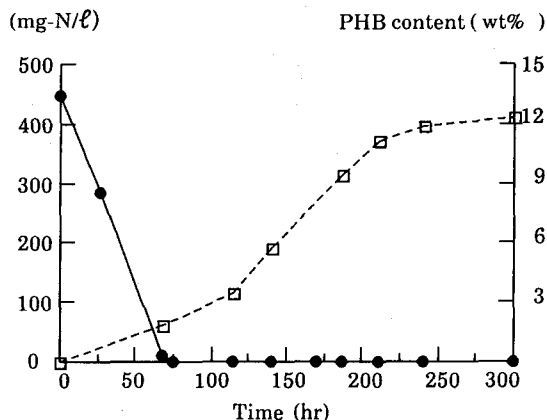


Fig.5 Transition of PHB content and $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration. ●, concentration of $\text{NH}_4\text{-N}$; □, PHB-content of dried sludge weight basis.

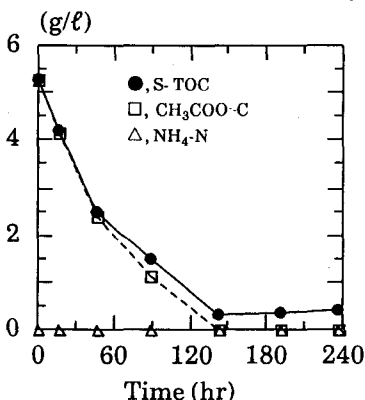


Fig.6 Transition of each parameters in batch culture.

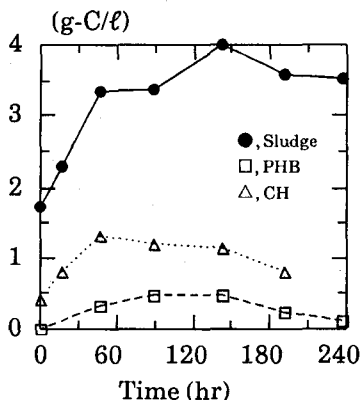


Fig. 7 Transition of carbon species of sludge, PHB and CH.

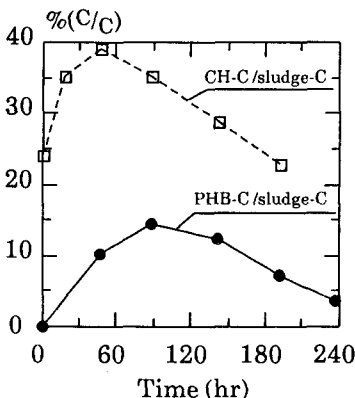


Fig.8 Transition of CH-C/sludge-C and PHB-C/sludge-C .

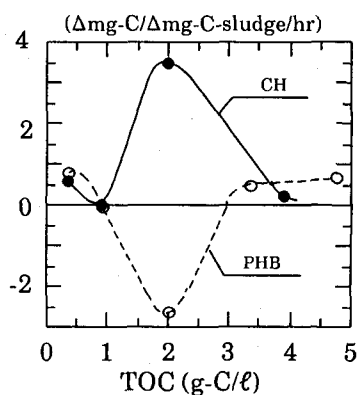
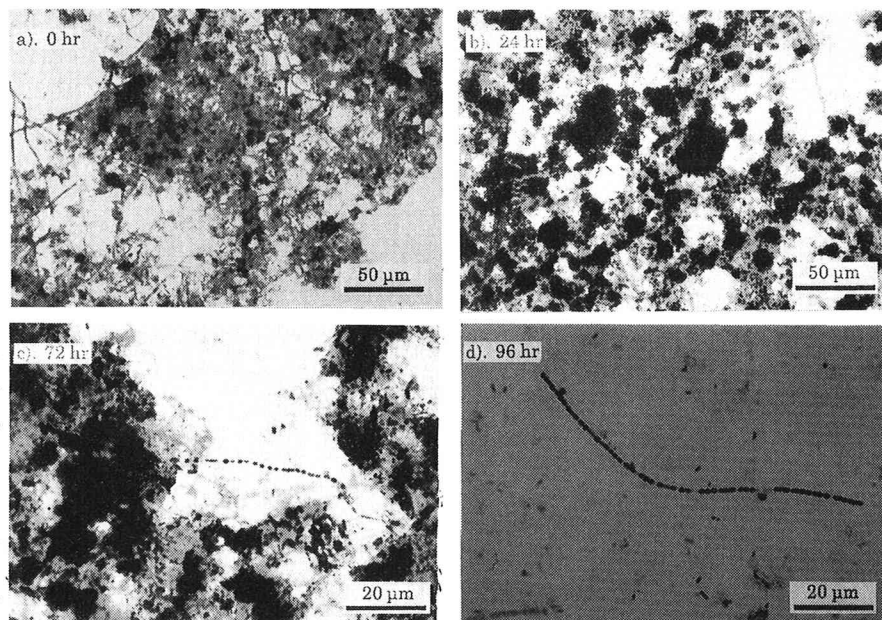


Fig.9 Relationship between S-TOC and production rate of CH and PHB.

は培養直後から直ちに生成されたが、培養48時間後(TOC濃度; 2.5 g/L, TOC負荷; 0.32 g-TOC / g-MLSS)に炭水化物が、89時間後(TOC濃度; 1.5 g/L, TOC負荷; 0.17 g-TOC / g-MLSS)にはPHBの減少が確認された。

Fig-8には汚泥内炭素に対する炭水化物およびPHBの炭素重量比の経時変化を



Phot. 2 Transition of sudanophilic inclusions.

示す。炭水化物は初期に汚泥内炭素重量の24%(C/C_0)であったが、経過時間にしたがって急激に上昇し48時間後には40%(C/C_0)に達した。しかしTOC除去速度の低下に伴って直線的に減少した。一方PHB含有率は培養開始から徐々に上昇し89時間経過後に最大14%(C/C_0)を示した後、酢酸が欠乏した144時間から徐々に低下した。このように窒素制限下でのPHBおよび炭水化物の生成・分解の挙動には速度的な差異が見られる。

Fig-9に単位時間当たりの汚泥内炭素量の増減(ΔC -MLSS)に対する両物質炭素量の変化(ΔC -PHB, ΔC -CH)と、基質炭素濃度(各サンプリング間の平均値)との関係を示す。PHBはTOCの全範囲で正となり、汚泥内炭素の増減に追従している。しかし炭水化物はTOC濃度2(g-C/L)で負の値を示し、汚泥内炭素量の増加に反して減少する結果となった。培養液中の炭素源の減少に従って、生成された各エネルギー貯蔵物質がエネルギー源または炭素源として利用されるが、本実験結果から、グリコーゲン等炭水化物はPHBよりも優先的に利用されたと推察される。また、Fig-9に示したTOC濃度2(g-C/L)におけるPHBのピークは、炭水化物の利用によって相対的に上昇したものと考えられる。

Phot.-2には各培養時間時にサンプリングした活性汚泥のスーダングラックBによる染色結果を示す。培養開始時(Phot.-2 a)にはスーダングラックBによる染色部分はほとんど観察されないが、培養時間にしたがってフロックを形成する箇所に染色部分が斑点状に広がった。さらに72時間(Phot.-2 c)、96時間経過後(Phot.-2 d)には、糸状性細菌にも顆粒の蓄積が観察された。PHB、グリコーゲンなどのエネルギー貯蔵物質の生成・分解速度や、窒素制限下でのストレス耐性は微生物種によって異なる。また活性汚泥はこれらの様々な微生物によって構成されるバイオマスであるため、PHBの高蓄積化を図るには、活性汚泥構成菌の特性を把握するとともに最適培養条件を検討する必要がある。

4. 結 論

有機廃棄物である活性汚泥からの有価物質回収を目的に、生分解性プラスチックであるPHBの生成を、窒素制限の基質を用いて検討した結果、以下のような結論を得た。

・窒素制限基質による培養によって活性汚泥からPHBの生成が確認された。

- ・窒素制限基質における炭素源としてグルコースおよび酢酸を用いて培養したところ、酢酸はPHBの生成に、グルコースは炭水化物の生成に適する結果が得られた。
- ・窒素制限による増殖ストレスを250時間以上継続した結果、通常乾燥汚泥重量当たり0.2(wt%)前後のPHB含有率が12(wt%)にまで上昇した。
- ・窒素制限下での回分培養の結果、PHBの生成は炭水化物より遅く、かつ基質炭素源の減少に伴う分解も炭水化物より遅い傾向が得られた。

5. おわりに

地球レベルでの環境問題が深刻化している現在、人間活動と自然界の物質循環の再構築が急務である。今後、自然界への排出負荷を極力低減させるために、廃棄物のリサイクル化および有価物質の回収・資源化を積極的に推し進める必要がある。

本研究は有機廃棄物である余剰活性汚泥から、生分解性プラスチックとしての利用が期待される微生物エネルギー貯蔵物質PHBの回収生産を試みたものである。今後さらにPHB含有率の向上を検討すると共に、有価資源回収型排水処理システムの構築を目指したいと考えている。

【参考文献】

- *1). F.F.Dias and J.V.Bhat, " Microbial Ecology of Activated Sludge. I.Dominant Bacteria " , Applied Microbiology, 12, pp 412-417(1964)
- *2). K.Cabtree,W.Boyle, E.McCoy and G.A.Rublish, "A Mechanism of Floc Formation by *Zoogloea ramigera* "J.WPCF, 38, (1966)
- *3).Dawes E.A. and Senior P.J. " The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms in Advances in Microbial physiology " , 10,edited by Rose A.H. and Tempest D.W. , pp135-266(1973)
- *4). 土肥 , 国岡, 川口, "バクテリア ポリエステル" , 紙パ技協誌, 43, pp 23-37 (1989)
- *5). Y.Doï , "Production of Copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from Butyric and Pentanoic acid " , Applied Microbiology , 28 , pp330-334(1988)
- *6). L.L.Wallen and W.K.Rohwedder, "Poly- β -hydroxyalkanoate from Activated Sludge " , Environmental Science and Technology, 8, pp 576-579 (1974)
- *7). 河野, 佐藤, " 活性汚泥微生物の細胞内貯蔵物質 (PHB) の測定方法 " , 用水と廃水 , 29, pp32-35 (1987)
- *8). 土肥 , " 微生物ポリエステルの新しい展開 " , 工業技術会講習会テキスト , 2, pp1-16(1989)