

(16) 実下水処理活性汚泥の生分解性プラスチック生産能力調査 Survey on Capability of Biodegradable Plastic production in Activated Sludge Treating Real Wastewater

○*高畠 寛生, **佐藤 弘泰, **味埜 俊, *松尾 友矩

Hiroo TAKABATAKE, Hiroyasu SATOH, Takashi MINO and Tomonori MATSUO

Abstract; Recently, PHAs(Polyhydroxyalkanoates) are focused on as biodegradable plastics. In this research, the potential capabilities of PHA production in activated sludges treating real wastewater were surveyed. In this survey, conventional, anaerobic-aerobic and A2O activated sludges at 4 wastewater treatment plants in Tokyo were taken, and PHA production capability from acetate as carbon source in each activated sludge was investigated. As results, all activated sludges could accumulate PHA from acetate. This indicated that even conventional activated sludge can also accumulate PHA. The different capabilities of PHA production in activated sludges were different with dependent on the wastewater treatment plant, 20-30% PHA contents to MLSS were observed for 2 of 4 wastewater treatment plant. Throughout this survey, about 29.5% PHA contents was achieved at maximum.

Key Words; PHA, biodegradable plastics, activated sludge treating real wastewater

1.はじめに

PHA(Polyhydroxyalkanoate)は、微生物にとってエネルギー・炭素貯蔵物質であると同時に、微生物から抽出・精製すれば、生分解性プラスチックとなるバイオポリエステルである。様々な微生物がPHAを生産することは良く知られている^{1)~3)}が、その中でも*Ralstonia eutropha*の純粋培養系を利用したPHA生産システムは既に実用化されている¹⁾。

一方、活性汚泥（特に嫌気好気活性汚泥法で馴致された活性汚泥）がPHAを生産することは良く知られている。我々の研究グループは、活性汚泥を利用した生分解性プラスチック生産に注目し、研究を重ねてきた^{5)~10)}。我々が提唱している活性汚泥によるPHA生産システムはFig.1に示したようなものである¹⁰⁾。まず、PHA蓄積微生物集積リアクターでPHA生産能力の高い活性汚泥を馴致する。このリアクターは、実下水処理システムに改良を加えたものを想定しており、同時に下水を処理する必要がある。そして、ここで馴致された活性汚泥を次のPHA生産リアクターに移動させる。ここでは、PHAの原料となる脂肪酸を大量に含んだ工場廃水等を炭素源として投与し、実際に活性汚泥にPHAを効率よく蓄積させる。その後、生分解性プラスチックとして抽出・精製する。また、PHA蓄積微生物集積リアクターやPHA生産リアクターに用いる基質や炭素源には、一般的に低級脂肪酸が適していると考えられるので、必要に応じて酸生成槽を導入する。

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

** 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

活性汚泥によるPHA生産には、純粋培養系によるPHA生産に比べて次のような利点があると考えられる。第一に、余剰汚泥の再利用や廃棄物からの有価物の回収となる技術であること、第二に、PHAを安価に生産できる可能性があることである。

実験室内で馴致した嫌気好気活性汚泥にPHAを蓄積させると、乾燥汚泥重量（MLSS）に対して最大30

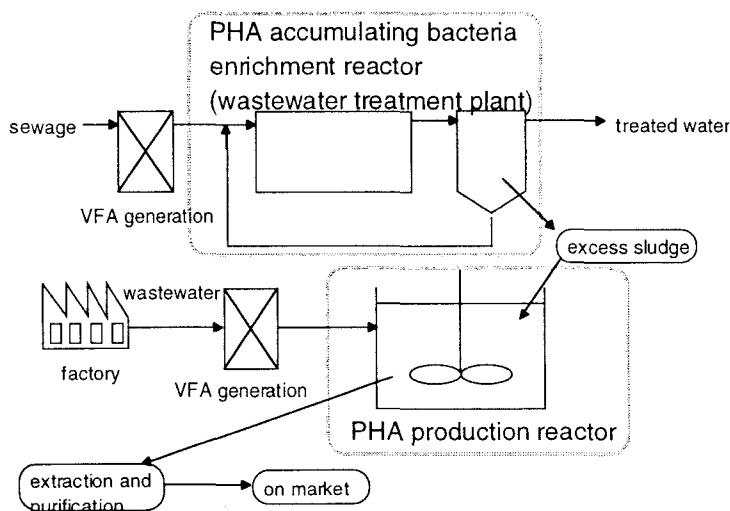


Fig.1 活性汚泥によるPHA生産システム

%程度のPHAを蓄積させることができる^{7), 11)}。また、岩本ら^{8), 9)}は、嫌気好気法の嫌気工程に微量の空気を供給する微好気好気法によって活性汚泥を培養し、MLSSに対して最大62%のPHA含有率が達成した。この値は、*Ralstonia eutropha* の純粋培養系での最大PHA含有率が70～80%であること^{11), 31)}と比較しても、遜色のない値である。

このように、実験室で培養された活性汚泥に関しては、酸素の制限条件が活性汚泥のPHA生産能力に影響を及ぼしていることが分かってきたが、実下水処理活性汚泥のPHA生産能力についての調査例は非常に少ない。実下水処理活性汚泥についてもその馴致条件がPHA生産能力に与える影響について、調査する必要がある。そこで、東京都内下水処理場の標準法、嫌気好気法、A2O法でそれぞれ馴致されている活性汚泥のPHA生産能力について調査を行い、PHA生産能力と活性汚泥の馴致条件の関係について考察した。

2.実験方法

2.1 調査対象とした活性汚泥

1998年11月から1999年5月にかけて、Table 1に示したように、東京都内の4下水処理場の活性汚泥に対してそのPHA生産能力を調査した。これらの活性汚泥は、標準法、嫌気好気法、A2O法のいずれかで馴致されている。試料は曝気槽末端から採取し、実験室まで運搬した後、PHA生産能力評価実験を行った。

2.2 PHA生産能力評価実験

実下水処理場はFig.1において、「PHA蓄積微生物集積リアクター」に相当し、このPHA生産能力評価実験は「PHA生産リアクター」に相当する。つまり、この実験では活性汚泥に実際に効率よくPHAを蓄積させる必要がある。

下水処理場から活性汚泥を採取した当日に、PHA生産能力調査実験を行った。この実験装置をFig.2に示す。実験装置の容量は2リットルで、試料は水道水によりMLSSが約500mg/lになるように希釈した。この実験は好気条件下で行い、炭素源として酢酸ナトリウムを用いた。pHはpHコントローラーを用いて7.0～7.2

Table1 調査対象とした実下水処理活性汚泥

サンプル No.	処理場名	処理法	採取日
1	M処理場	標準法	98.12.08
2			99.04.05
3		嫌気好気法	98.11.18
4			99.04.05
5	S処理場	標準法 A系列	98.12.16
6			99.05.11
7		標準法 B系列	99.05.11
8		標準法 C系列	99.05.11
9	N処理場	標準法	99.02.09
10			99.04.19
11		嫌気好気法	99.01.19
12			99.04.19
13		A2O法	99.04.27
14			99.04.19
15	K処理場	標準法	99.02.03
16			99.04.13
17		嫌気好気法	99.12.25
18			99.04.13

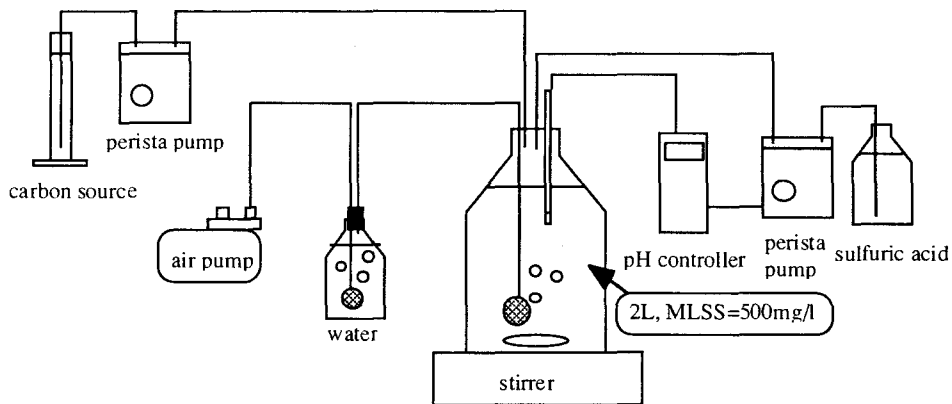


Fig.2 PHA生産能力評価実験装置

になるように調整した。

好気条件で実験を行ったのは、ある程度以上の酸素共存下で、活性汚泥は効率よくPHA生産を行うことが知られているからである。この好気条件はエアポンプを用いて空気供給することにより実現しているが、供給される空気を一度水道水に通気させることによって、蒸発による汚泥濃縮効果を軽減した。また、炭素源が枯渇すると蓄積されたPHAは分解され、炭素源濃度が高すぎると炭素源そのものが微生物活性の阻害になってしまう恐れがあるので、微生物にPHAを生産させ続けるためには、活性汚泥上澄水中の

炭素源濃度を一定に保つ必要がある。そこで、本実験では炭素源を連続的に投与し、その投与速度を調整することによって、上澄水中の炭素源濃度を約100mgC/lになるように調整した。なお、活性汚泥によって炭素源摂取速度が異なるので、炭素源濃度をモニターしながら、炭素源の投与量を調整した。

2.3 分析方法

本実験では、活性汚泥の蓄積物質としてPHAと汚泥内多糖類に注目し、上澄み水中の炭素源濃度の指標としてDOCを用いた。

PHAは佐藤ら¹²⁾の方法に従い分析した。硫酸酸性下で過剰のメタノールと加熱することによりPHAを分解し、構成モノマーのメチルエステルを生じさせ、これをガスクロマトグラフ（以下GC）により定性・定量した。使用したGCは島津GC-14A/FIDで、カラムはGLサイエンス社のNeutrabond-1（長さ30m、内径250μm、膜厚0.4μm）を使用した。分析中の設定温度は、検出器が250℃、注入口は180℃、カラムは初期設定温度60℃で4分保持し、その後12℃/分で220℃まで昇温し、220℃で6分間保持した。また、島津オートインジェクター-AOC-14Aを用いて、試料1mlをマイクロシリンジによりスプリット注入（スプリット比は1：20）する手法を取った。

また、TOC(DOC)は島津TOC-500により、汚泥内多糖類はフェノール硫酸還元法¹³⁾に、MLSSは下水試験法¹⁴⁾に従い定量を行った。

3.実験結果及び考察

Table1で示した18サンプルに対してPHA生産能力評価実験を行ったのだが、本著ではその代表としてサンプル2の炭素源の摂取状況をFig.3Aに、PHA・汚泥内多糖類の蓄積状況をFig.3Bに示す。Fig.3Aは、全炭素源投与量と残存DOCの経時変化だが、ある時間における全炭素源投与量と残存DOCの差が、その時間までの全炭素源摂取量に相当する。Fig.3Bより、時間の経過に伴いPHAが蓄積されていく様子が分かる。また、汚泥内多糖類の蓄積はほとんど観察されなかった。このような、炭素源の摂取及びPHA・汚泥内多糖類の蓄積に関しては全サンプルを通してほぼ同様な傾向が観察された。

各サンプルの24時間後の分析結果に対して、MLSSに対するPHA含有率[%mgPHA/mgMLSS*100]、単位初

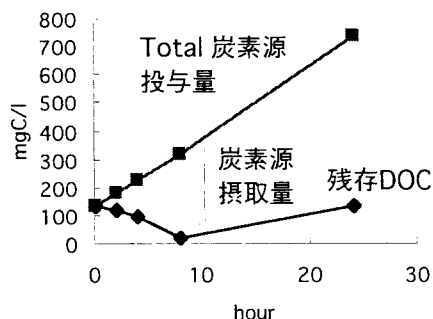


Fig.3A 炭素源の摂取状況

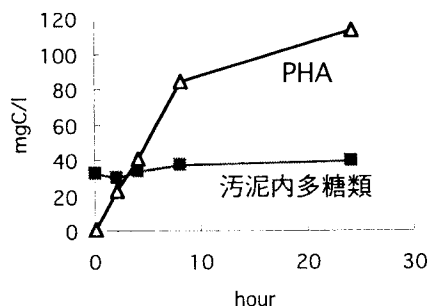


Fig.3B PHA・汚泥内多糖類の蓄積状況

Fig.3 サンプル2のPHA生産能力評価実験結果

Table2 実下水処理活性汚泥のPHA生産能力調査結果

サンプルNo.	処理場名	処理法	PHA含有率 [mgPHA/mgMLSS *100]	平均炭素源摂取速度 [mgC/gMLSS/hr]	PHA転換率 [mgC PHA/mgC *100]
1	M処理場	標準法	25.3	28.3*	23.9
2			27.6	43.2	19.0
3		嫌気好気法	18.2	23.5*	19.9
4			24.6	41.9	21.2
5	S処理場	標準法 A系列	29.5	26.6*	29.9
6			27.1	33.0	25.3
7		標準法 B系列	28.6	47.9	20.3
8		標準法 C系列	25.8	34.1	24.2
9	N処理場	標準法	17.1	23.0	17.8
10			14.4	23.1	17.2
11		嫌気好気法	15.8	16.1	23.1
12			10.7	16.2	17.0
13		A2O法	13.2	11.9	24.3
14			6.2	17.2	9.0
15	K処理場	標準法	15.5	14.7	22.8
16			7.0	14.2	21.9
17		嫌気好気法	18.0	17.0	24.0
18			10.3	22.4	22.3

* 8hr経過あたりで炭素源が枯渇してしまったので、他の値と単純に比較できない。

期MLSSあたりの平均炭素源摂取速度[mgC/gMLSS/hr]、炭素源のPHAへの転換率[%mgCPHA/mgC*100]を計算し、Table2にまとめた。

MLSSに対するPHA含有率は、活性汚泥のPHA蓄積能力を評価する点でも、PHAを抽出・精製する際の効率を上げるという点でも、他の様々な指標の中でも最も重要である。今回達成された最大PHA含有率はサンプル5で約30%である。この値は、実下水処理活性汚泥を用いた他の研究^{15)・16)}と比べても非常に高い値である。

また、サンプル2と4のように、同じ処理場内でのPHA含有率を比較すると、サンプル2は27.6%、サンプル4は24.6%と、これまでPHAを蓄積するとは考えられていなかった標準活性汚泥も嫌気好気活性汚泥と同レベルのPHA生産能力を示していることが分かる。M処理場やN処理場の活性汚泥に関しては、むしろ、標準活性汚泥の方が常に高いPHA生産能力を示していた。嫌気好気活性汚泥に関しては、嫌気条件下でポリリン酸の分解やグリコーゲンの解糖によってエネルギーを得て、炭素源を取り込みPHAとして蓄え、次の好気条件下での増殖のために備える¹⁷⁾という点で、PHA蓄積の意義は理解できる。しかし、標準活性汚泥の場合は、常に好気条件に曝されているわけだから、活性汚泥中の微生物は周囲の酸素を利用して、炭素源を摂取し増殖を行えばいいように思われる。従って、標準活性汚泥のPHA生産能力は嫌気好気活性汚泥に比べて低いだろうと予想できる。しかし、実際には標準活性汚泥も嫌気好気活性汚泥と同レベルのPHA生産能力を示している。これは、次のように考えられる。

好気条件下では、殆どの従属栄養細菌に周囲の炭素源を利用して炭素源を摂取して増殖する機会が与えられる。そのような状況下で細菌が競争に勝って生き残るためには、他の細菌より素早く炭素源を摂取する必要がある。微生物にとっては、摂取した炭素源をすぐに増殖に使うよりも、PHAとして蓄積した方が多量の炭素源を素早く摂取できる分有利なのである。そして、周囲の炭素源が枯渇した後、蓄積したPHAを分解してゆっくりと増殖すればいいのである。したがって、標準活性汚泥にとっても、PHA蓄積は他の細菌との競合という点で重要であると考えられる。

嫌気条件下では多少状況が異なる。嫌気という特殊な条件下では、微生物のポリリン酸蓄積能やグリコーゲン蓄積能など、ある特定の能力をもち、それを利用してエネルギーを生み出すことのできる微生物のみが基質を摂取することができる。つまり、嫌気条件下では、ある能力の有無が微生物間の生存競争に勝つための重要な要素なのである。これに対し、好気条件下では、基質摂取の活性の高さが重要な要素となる。

ただ、この見解は仮説に過ぎない。今後、これを検証する必要がある。

また、Table2のPHA含有率は、同じ処理場内での活性汚泥の馴致条件の違いよりも、処理場間での違いが大きいことが伺える。M処理場やS処理場のPHA生産能力は高いが、N処理場やK処理場のPHA生産能力は低い。どのような処理場間の違いがPHA生産能力に影響を与えているのか、明確なことは分からないが、流入下水組成、負荷量、SRT、処理場規模などがその要因の候補として考えられる。

S処理場の99.5.11に行った実験結果（サンプル6, 7, 8）に注目すると、B系列が最も高いPHA生産能力を示している。A～C系列の顕著な差は曝気槽の水深である。A, C系列は水深9mでB系列は4.1mである。通常、下水処理場の曝気槽の有効水深は4～6mとされ、これを越えると水流状態の不均等を招く恐れがあると考えられる^{1,8)}。少なくとも、A, C系列に比べてB系列が最も酸素を均等に供給できだろうと推測できる。酸素移動効率が大きい方が、微生物の炭素源を巡る競争がより激しくなると考えられ、このPHA含有率の差は前述した仮説を用いて説明できる。また、サンプル5が本実験で最も高いPHA含有率（29.5%）を示している。このサンプルを採取したとき、処理場の曝気槽のDOが約7.0と非常に高い値になっていた。これらのことを考慮すると、S処理場に関する実験結果は、前述した仮説を示唆していると考えられる。

Fig.4に酢酸からのPHA合成経路の略図を示した。平均炭素源摂取速度は酢酸からアセチルCoAへの経路の程度を、PHA転換率はアセチルCoAからPHA合成に利用される割合を示す指標である。嫌気条件下では、摂取された酢酸は、アセチルCoAに転換され、TCAサイクルに入ることなくPHAに転換されることが考えられる^{1,7)}。したがって、嫌気条件下ではPHA転換率は100%近い値を示す^{1,9), 2,9)}。しかし、酢酸の摂取に必要なATPやアセチルCoAからPHAへの転換に必要な還元力の供給が律速となり、PHA蓄積速度は遅くなる。一方、好気条件下では、摂取された酢酸は、アセチルCoAに転

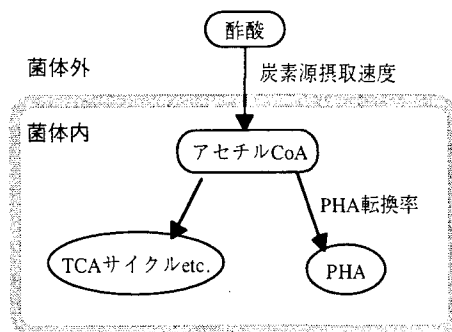


Fig.4 酢酸の代謝略図

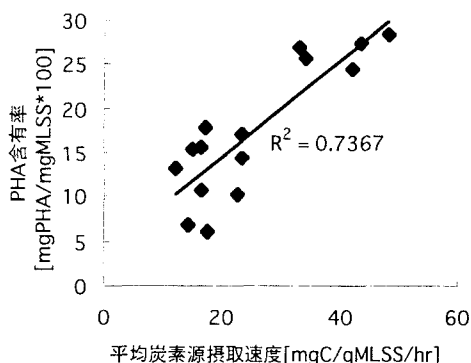


Fig.5 平均炭素源摂取速度とPHA含有率の関係

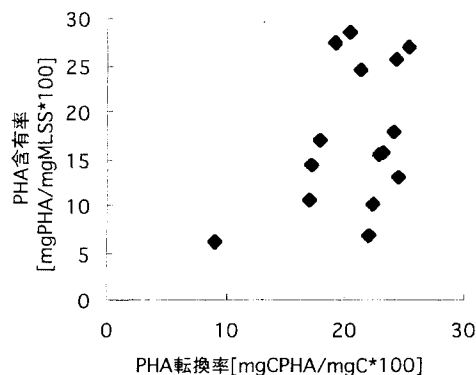


Fig.6 PHA転換率とPHA含有率の関係

換された後、一部はTCAサイクルに入り、一部はPHA合成に利用される。したがって、嫌気条件下に比べてPHA転換率は低くなる。しかし、アセチルCoAの一部がTCAサイクルに入ることによって、酢酸摂取に必要なATPやアセチルCoAからPHAへの転換に必要な還元力が生産されるために、嫌気条件下に比べてPHA生産速度、達成されるPHA含有率及び炭素源摂取速度が高い^{5)・7)}。つまり、好気条件下でPHA蓄積を行わせる場合、炭素源摂取速度やPHA転換率は、活性汚泥のPHA生産能を評価する上で重要な評価指標である。

ここで、Table2に示した平均炭素源摂取速度と炭素源のPHA転換率に注目し、平均炭素源摂取速度とPHA含有率の関係をFig.5に、PHA転換率とPHA含有率の関係をFig.6に示す。Fig.5より、平均炭素源摂取速度とPHA含有率はほぼ比例関係にあることが伺える。これに対し、Fig.6より、PHA転換率はPHA含有率にあまり依存せず、サンプル14を除いて17～25%の一定範囲に分布していることが分かる。したがって、活性汚泥のPHA生産能を支配しているのは、摂取した炭素源をいかに効率よくPHAに転換するか（PHA転換率）ではなく、いかに素早く炭素源を摂取するか（炭素源摂取速度）であると考えられる。これは、前述した仮説を支持するものである。

4.総括

今回の実下水処理活性汚泥のPHA生産能力調査の結果、次のようなことが明らかとなった。

- ・実下水処理活性汚泥を用いて、最大30%のPHA含有率が達成できた。
- ・嫌気好気活性汚泥だけでなく標準活性汚泥も高いPHA生産能力を備えている。
- ・下水処理場によって活性汚泥のPHA生産能力は大きく異なる。
- ・実下水処理活性汚泥のPHA生産能力を支配しているのは、炭素源のPHA転換率ではなく、炭素源摂取速度である。

また、微生物間の炭素源を巡る競争が、活性汚泥のPHA生産能力を支配しているという仮説が立てられた。そして、今回の実験結果はこの仮説を支持するものであった。この仮説は今後検証していく必要があるが、PHA生産能力の高い活性汚泥が馴致できる活性汚泥プロセスの開発に結びつくかもしれない。

謝辞

実下水処理活性汚泥のPHA生産能力調査を行う上で、東京都内各下水処理場スタッフ及び東京都下水道局技術開発課の方々には、試料や情報の提供など惜しめない協力を頂きました。ここで、感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Doi: Microbial Polyesters, VCH, New York.
- 2) Anderson, A. J., and Dawes, E. A.: Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Microbiological Reviews, pp. 450-472, Dec. 1990.
- 3) S. Y. Lee: Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, Vol.49, pp.1-14, 1996
- 4) Holmes, P. A.: Application of PHB: A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic, Physics in Technology, Vol.16, pp. 32-36, 1985.
- 5) H. Satoh, T. Mino, T Matsuo: PHA production by activated sludge, Biological Macromolecules (in press), 1999
- 6) 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩: 嫌気好気活性汚泥におけるPHAの生成, Polymer Preprints, Japan Vol.41, No.6, pp.2156-2158, 1992
- 7) 上野俊洋, 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩: 嫌気好気式活性汚泥による生分解性プラスチックPHAの好気的生産, Polymer Preprints, Japan, Vol. 42, No. 9, pp. 3673-3675, 1993.
- 8) 岩本友里奈, 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩: 微好気好気法で馴養された活性汚泥による生分解性プラスチック(Polyhydroxyalkanoate)の生産, 土木学会論文集, No.573/VII-4, pp. 19-26, 1997.
- 9) H. Satoh, Y. Iwamoto, T. Mino, T. Matsuo: Activated Sludge as a Possible Source of Biodegradable Plastic, Water Science and Technology, Vol.38, No.2, pp.103-109, 1998
- 10) 高島寛生, 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩: 活性汚泥による生分解性プラスチック生産における原料組成の影響, 土木学会論文集, No.622/VII-11, pp.87-94, 1999.5.
- 11) 友沢孝, 副島敬道: 嫌気好気活性汚泥によるPHBの生産, Polymer Preprints, Japan Vol.41, No.6, pp.2156-2158, 1992
- 12) 佐藤弘泰: PHAの測定とその意味, 環境微生物工学研究法, 土木学会衛生工学委員会編, 技報堂出版, pp. 67-70, 1993.
- 13) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解, 金原出版, 1990.
- 14) 社団法人 日本下水道協会: 下水試験方法, 1997
- 15) 斉藤祐二, 土肥義治: 各種活性汚泥からのポリヒドロキシアルカノエイトの生産と合成菌の探索, 土木学会論文集, No.473/II-24, pp.103-112, 1993
- 16) 常政典貴: 余剰汚泥を利用した生物分解性プラスチックの生成, 用水と廃水, Vol.40, No.11, pp.19-24, 1998
- 17) T. Mino, M. C. M. van Loosdrecht, J. J. Heijnen: Microbiology and Biochemistry of the Enhanced Biological Phosphate Removal Process, Water Science and Technology, Vol. 32, No.11, pp.3193-3207, 1998.
- 18) 社団法人 日本下水道協会: 下水道施設設計指針と解説
- 19) 斉藤祐二, 副島敬道, 友沢孝, 土肥義治, 紀谷文樹: 活性汚泥を用いる揮発性低級脂肪酸からの生分解性プラスチックの生産と評価, 土木学会論文集, No.521/II-32, pp.145-154, 1995