

下水処理中無機態窒素濃度変化に対する土着藻類細胞内有機物の蓄積・分解

鳥取大学 学生会員 ○日野 佳城
鳥取大学 正会員 高部 祐剛
鳥取大学 非会員 上村 拓海

1. 背景および目的

化石燃料枯渇や温室効果ガスによる地球温暖化を背景として下水処理場のエネルギー供給拠点化の実現が求められる中、国土交通省が2015年に策定した下水道技術ビジョンにおいて、微細藻類培養・エネルギー化技術が、下水処理場のエネルギー供給拠点化実現に向けた中核技術として位置づけられている。下水道システムが広く普及した日本のような国では、下水処理場から放流される下水処理水を用いた微細藻類培養が考えられる。下水処理水を用いて微細藻類を培養することの利点として、下水処理水には窒素、リン、CO₂といった微細藻類の培養に必要な物質が含まれるため、微細藻類培養にかかるコストを大幅に削減することが可能となること、培養により下水処理水から窒素、リンが除去されること等が挙げられる。

微細藻類の燃料化について、特に、微細藻類に含まれる脂質や炭水化物といった有機物を利用したオイルやバイオエタノール生産に期待が寄せられている。このことから脂質や炭水化物を豊富に含有する微細藻類の培養に関する研究が各所でなされている。この微細藻類の培養は、培養する微細藻類の違いから「特定微細藻類の培養」と「土着藻類の培養」に大別される。「特定微細藻類の培養」とは脂質や炭水化物を豊富に含む特定の微細藻類種を下水処理水に植種し、培養を行うことである。しかし、下水処理水を直接利用した特定微細藻類の培養は、意図しない他の微細藻類の成長による増殖の阻害が報告されているため、下水処理水に前処理を施さなくてはならなくなり、実用化が厳しいことが報告されている¹⁾。一方、「土着藻類の培養」は下水処理水に含まれる複合微細藻類(土着藻類)を与えられた環境で培養することである。この土着藻類の培養では下水処理水の前処理が不要であり、下水処理場への将来的な培養システム導入が期待される²⁾。

土着藻類培養の課題は、土着藻類に含まれる脂質・炭水化物含有量が低い傾向にあることである。このことから、土着藻類において、脂質や炭水化物の蓄積を促進する培養手法の探求が必要である。近年、特定の微細藻類種において、培養液中の窒素が減少・枯渇したストレス条件下で脂質や炭水化物の蓄積が促進されることが明らかとなってきた³⁾。この窒素の減少・枯渇を利用した脂質・炭水化物の蓄積促進という現象が、土着藻類においても生じれば、脂質・炭水化物をより豊富に含有する土着藻類の培養が可能となるものと期待されるが、研究事例は少ない。一方で、下水処理水中の窒素濃度は日々変動しており、下水処理水を土着藻類培養に用いる場合、何の対策も講じなければ、下水処理水中の窒素濃度の変動に応じて、培養液中窒素濃度が上昇することが予想される。この窒素濃度の上昇が、仮に、土着藻類での脂質や炭水化物の分解を誘発することがあれば、高い脂質・炭水化物含有率を有する土着藻類を培養する上で障害となるため、窒素濃度の上昇に対する脂質・炭水化物の蓄積・分解の応答も把握する必要がある。しかし、特定微細藻類も含め、窒素濃度の上昇に対する脂質・炭水化物の蓄積・分解の応答を報告した研究事例は極めて少ない。

本研究では、実際の下水処理場から採取した下水処理水で土着藻類を培養した上で、無機態窒素(Inorganic nitrogen: IN)濃度の減少・上昇に対する脂質・炭水化物を含む有機物の蓄積・分解の応答について実験的考察を行う。その上で、高い脂質・炭水化物含有率を有する土着藻類を安定して培養可能とし得る培養手法を検討する。

キーワード 土着藻類, 下水処理水, 無機態窒素, 有機物, ストレス

連絡先 〒680-8552 鳥取市湖山町南 4-101 鳥取大学工学部

TEL : 0857-31-5337

2. 実験方法

鳥取市の下水処理場で、標準活性汚泥法で処理された塩素添加前の下水処理水を最終沈殿池から採取し、培養実験に用いた。実験に際して、下水処理水に特定の微細藻類種の接種は行わなかった。

培養には、縦 30 cm, 横 30 cm, 容量 30 L の円筒型の容器を使用し、容器の周辺には光量子束密度 $160 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の蛍光灯を 12 本立て、ラボタイマー（ラボタイマーH 型 田中精機）を用い、明暗周期を 12 時間に設定した。培養中は、炭素源の添加および培養液中 pH を 8.0 に調整²⁾することを目的に、pH コントローラー（NPH-660 日伸理化）とペリスタルテックポンプ（Thermo Fisher Scientific）を用いて CO_2 ガスを間欠的に添加した。また、培養装置内の水質を均一化するため攪拌機（SM-101 AS ONE）を用いて培養液を攪拌した。培養は、室温平均 30°C の条件下で実施した。

実験は、実験 1 と実験 2 から構成され、両実験共に回分式で計 13 日間ずつ行った。実験 1 では IN 減少に対する土着藻類中有機物蓄積・分解の応答の把握を目的に行い、培養期間中 IN の添加は実施しなかった。実験 2 では IN 上昇に対する土着藻類有機物蓄積・分解の応答の把握を行い、培養液中の IN が枯渇した培養 9 日目に NH_4Cl 試薬 137.5 mg と NaNO_3 試薬 582.8 mg をそれぞれ培養装置に添加し、培養液中 IN 濃度を意図的に上昇させた。

実験 1, 2 共に、実験期間中定期的に培養液を採取した。採取した培養液の一部は、GF/B ろ紙（Whatman）でろ過し、浮遊性物質（Suspended solids : SS）濃度を測定した。また、ろ液を対象に、 NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} をイオンクロマトグラフ（10A Series, 島津製作所）で測定し、IN は NO_3^- -N, NO_2^- -N および NH_4^+ -N の合計値とした。さらに、培養液の一部を GF/C ろ紙（Whatman）でろ過し、クロロフィル *a* を測定し、クロロフィル *a* 濃度を SS 濃度で除した単位 SS 当たりのクロロフィル *a* 含量を算出した。残りの培養液を遠心分離し（3000 g, 10 分）、沈降した土着藻類を回収後、凍結乾燥（DC801, ヤマト科学）を行った。凍結乾燥した土着藻類試料を対象に、脂質、炭水化物、タンパク質、活性酸素の分解酵素である SOD（Superoxide dismutase）を測定した。

3. 結果および考察

表 1 に培養に用いた下水処理水の水質を示す。下水処理水中の窒素：リンのモル比は 3.8 : 1 であり、微細藻類細胞での窒素：リンのモル比（16 : 1）⁴⁾であることから、土着藻類培養の観点で、下水処理水に含まれる窒素がリンに比べ少ないことが分かった。

図 1 に実験 1 での各パラメータの経時変化を示す。SS は培養 4 日目から培養 8 日目までにかけて 52 mg/L から 192 mg/L にまで増加した。一方で、培養 8 日目以降増加が停滞した。これは、培養液中の IN が枯渇し、土着藻類の増殖が抑制されたためと考えられる。

クロロフィル *a* は、培養 6 日目以降減少した。窒素が枯渇した条件下においては、微細藻類は最低限の代謝機能を維持するために必要となる窒素を得るため、クロロフィル *a* を分解することが報告されており⁵⁾、IN の減少・枯渇がクロロフィル *a* の分解を誘発したものと考えられる。

脂質は培養 4 日目から 8 日目にかけて 7.46% から 14.5% に、炭水化物は培養 4 日目から 7 日目にかけて 13.3% から 19.9% にまでそれぞれ上昇し、その間、SOD は培養 4 日目から 8 日目にかけて 4.29 U/mg から 12.1 U/mg に増加した。緑藻 *Dunaliella salina* において、光合成に由来し細胞内で発生した電子の一部がストレス条件で

表 1 下水処理水の水質 (n=5, 平均値 ± 標準偏差)

NO_3^- (mg-N/L)	NO_2^- (mg-N/L)	NH_4^+ (mg-N/L)	PO_4^{3-} (mg-P/L)	SS (mg/L)	クロロフィル <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)	pH (-)	溶存酸素 (mg- O_2 /L)
5.73 ± 2.72	0.71 ± 1.21	5.00 ± 5.72	6.64 ± 2.20	1.6 ± 1.0	<10	6.81 ± 0.39	4.57 ± 1.22

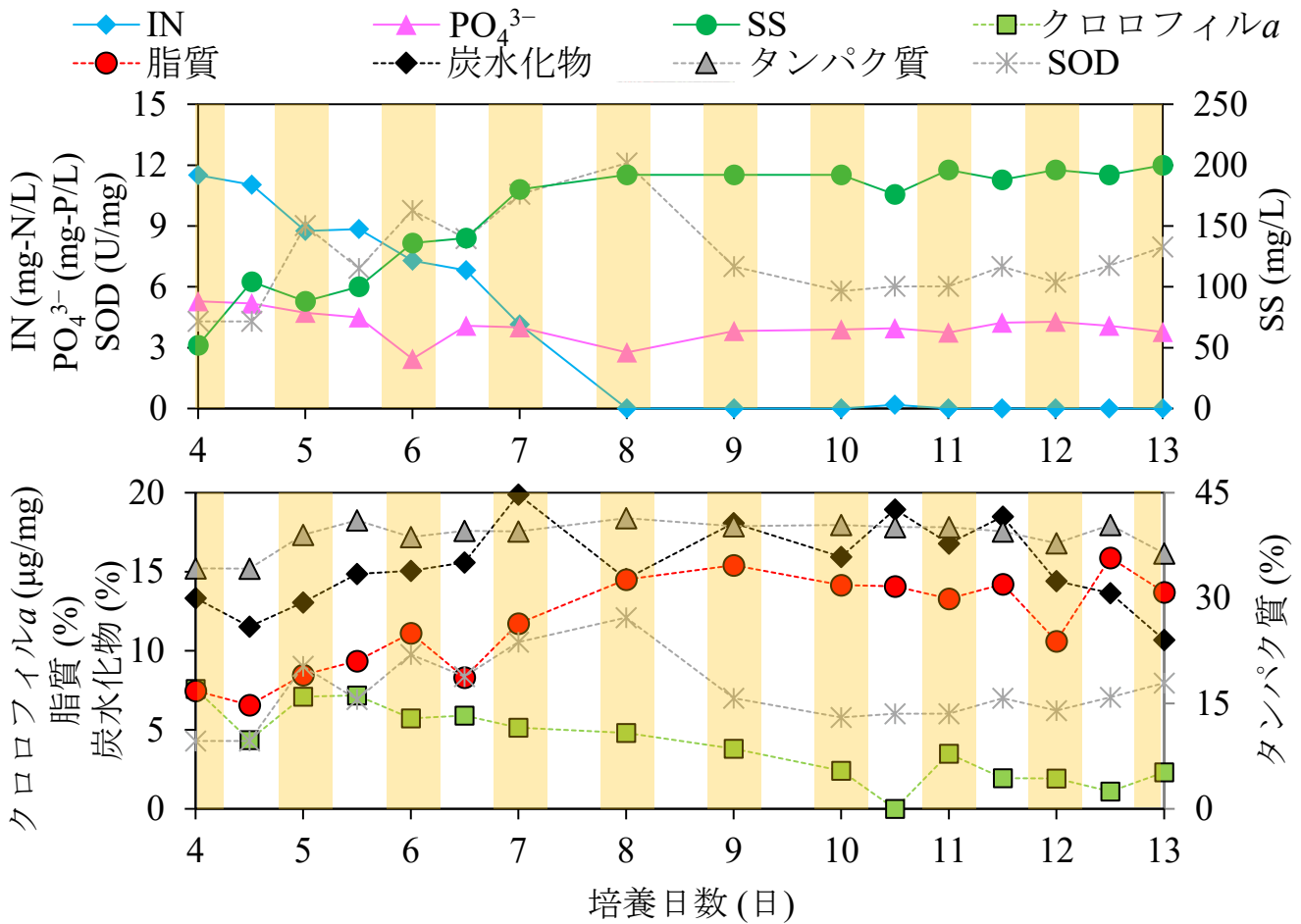


図1 実験1での各パラメータの経時変化（色有部：明条件，色無部：暗条件）

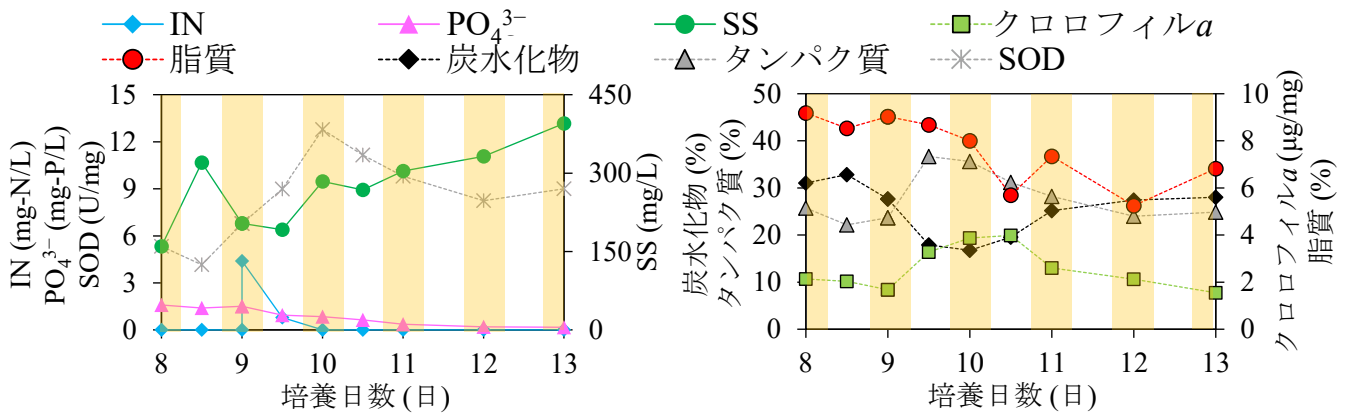


図2 実験2での各パラメータの経時変化（色有部：明条件，色無部：暗条件）

余剰となり，その結果，活性酸素を生成すること，この活性酸素が細胞内での脂質，炭水化物蓄積を誘発することが報告されている⁶⁾。SODは活性酸素生成の指標であることから，INの減少に伴って土着藻類の細胞内で活性酸素が生成し，脂質，炭水化物蓄積が誘発されたものと推察される。一方で，培養8日目以降，SODが減少し，脂質，炭水化物の蓄積が確認されなかった。この期間，クロロフィル*a*が減少しており，光合成効率が減少したことが示唆される³⁾。そのため，活性酸素を生成させる余剰電子の量が減少し，結果，細胞内での活性酸素発生量ならびに脂質，炭水化物蓄積の抑制が生じた可能性が考えられる。

図2に実験2での各パラメータの経時変化を示す。INを添加した培養9日目から13日目までにかけてSS

が 204 mg/L から 395 mg/L に増加し、土着藻類増殖の律速因子である IN を添加することで土着藻類が再増殖した。添加した IN は土着藻類に吸収され減少し、培養 10 日目には検出下限値以下となった。

クロロフィル *a* は、IN を添加した培養 9 日目から 10.5 日目までにかけて 1.68 $\mu\text{g}/\text{mg}$ から 3.99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ まで増加し、その後減少した。タンパク質は、IN 添加直後から 0.5 日間で 23.7 %から 36.7 %まで増加し、その後減少した。培養液中に窒素が豊富に存在する場合、微細藻類は細胞内に窒素を過剰に取り込むためにクロロフィル *a* を蓄積することが報告されている⁷⁾。IN 添加により光合成を担うクロロフィル *a* および微細藻類の増殖に必須なタンパク質を蓄積することで、土着藻類の再増殖が生じたものと考えられる。

炭水化物は、IN 添加直後から急激に減少し、培養 9 日目から培養 9.5 日目にかけて 27.7 %から 17.9 %にまで減少した。微細藻類中の炭水化物は、増殖に必要な炭素・エネルギー源としての利用が可能であることが報告されている⁸⁾ことから、IN 添加後の土着藻類増殖のために、蓄積された炭水化物が速やかに分解され、分解された炭水化物の一部は、クロロフィル *a* およびタンパク質の合成に利用された可能性が考えられる。一方で、脂質は、培養 9 日目から培養 12 日目にかけて 9.03 %から 5.25 %にまで緩やかに減少した。脂質は、膜脂質の合成の際必要となる脂肪酸の生成に利用されており⁹⁾、炭水化物と脂質の微細藻類が生存する上での役割の違いが、炭水化物と脂質の分解の違いを生じた可能性が考えられる。SOD は、IN を添加した培養 9 日目から培養 10 日目にかけて 6.79 U/mg から 12.8 U/mg にまで増加した。このことから、IN 添加後、活性酸素生成により脂質と炭水化物の蓄積が誘発された一方で、脂質と炭水化物の蓄積量が、上述した脂質および炭水化物の分解量を下回り、結果として、IN 添加直後から脂質と炭水化物の分解が確認されたものと判断された。IN 添加後培養を継続すると、炭水化物が蓄積された。その間、SOD は減少していたことから、実験 1 での活性酸素生成より誘発された炭水化物の蓄積とは異なるメカニズムで炭水化物が蓄積されたものと推察される。炭水化物が蓄積された理由の一つとして、IN 添加後にクロロフィル *a* が蓄積しており、光合成によって炭水化物が合成・蓄積された可能性が考えられる。

4. 結論

本研究により、IN の減少に伴って脂質や炭水化物が蓄積されることが確認され、脂質・炭水化物をより豊富に含有する土着藻類の獲得が可能であることが示された。一方で、IN 濃度の上昇が脂質や炭水化物の分解を引き起こしたことから、高い炭水化物および脂質含有率を有する土着藻類を安定して培養するためには、培養液での IN 濃度上昇を防ぐ必要があることが提案された。

参考文献

- 1) Cho *et al.*, 2017. *Bioresour. Technol.* 228, 290-297.
- 2) Okazaki *et al.*, 2019. *Bioresour. Technol.* 280, 118-126.
- 3) Zhang *et al.*, 2019. *Bioresour. Technol.* 287, 121414.
- 4) Redfield *et al.*, 1963. Interscience, New York.
- 5) Fields *et al.*, 2014. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (11), 4805-4816.
- 6) Zheng *et al.*, 2017. *Algal Res.*, 26, 402-408.
- 7) Lv *et al.*, 2010. *Bioresour. Technol.* 101 (17), 6797-6804.
- 8) Fernandes *et al.*, 2013. *Bioresour. Technol.* 144, 268-274.
- 9) Zhu *et al.*, 2018. *Bioresour. Technol.* 247, 58-65.