

微細藻類を用いた下水からの効率的窒素回収技術の開発 -栄養塩欠乏下で蓄積する細胞内有機物の利用-

Development of A New Nitrogen Recovery Method from Municipal Wastewater Using Microalgae
- Utilization of Intracellular Organic Substances Accumulated Under Nutrient-Deficient Condition -

○乙幡雄介¹, 齋藤利晃², 小沼晋²

*Yusuke Oppata¹, Toshiaki Saito², Susumu Konuma²

Abstract: This research proposes a new nitrogen recovery method with microalgae utilizing the intracellular organic substances. For this purpose, first, the effect of media types on accumulation and, then, the effect on subsequent growth in complete nutrient media were evaluated. During accumulation process, three types of culture media, i.e. MC+ without P, MC+ 100-fold dilution media without P and saline+KNO₃ and two types incubation time, i.e. 96h and 120h, were used. As we expected, the increases of cell size were obtained for all P-deficient cases with limited cell growth as compared with control. Next, the cultivated fat cells were exposed to complete nutrient media. Then, we observed the faster growth and larger nitrate uptake in case of fat cells as compared with control. As a result, we concluded that the exposure to nutrient deficient media result in larger accumulation and improvement in growth rate and nitrogen recovery.

1. 研究背景及び目的

近年, 人為的な温室効果ガスの排出により, 地球の気温が上昇する地球温暖化問題への対策が, 世界共通の課題である。温室効果ガス排出の1%を占めているのが, 空気中の窒素を固定するハーバー・ボッシュ法であり, 固定された窒素は主に肥料や飼料として利用されている。一方で, 生産もしくは輸入される食料, 肥料に含まれる窒素の約30%が下水処理場に集約している。集約した窒素は, 主に硝化脱窒工程にて空気中に戻しておりその処理過程でも温室効果ガスは排出されている。そこで, 我々は下水処理場で窒素を除去ではなく回収し, 肥料や飼料として再利用することで, 無駄なエネルギー消費を削減できると考えている。また, 微細藻類は光合成機能を有し, CO₂や窒素, リンを増殖に利用する。そして生物全体を利用できることから, 高度処理への利用や健康食品として着目されている。ただ, 微細藻類の窒素回収速度は工業的利用をするには遅い。

そこで我々は, 微細藻類を用いて下水に含まれる窒素を回収しコンポストとして活用させることで, 温室効果ガスの排出抑制を試みる。窒素回収速度の改善方法として, 今回栄養塩欠乏下で蓄積する細胞内有機物を利用し, 微細藻類の窒素回収速度の改善を行うと共に, 蓄積工程の培養時間や栄養塩欠乏種類の違いによる窒素回収速度の改善を行った。

2. 実験方法

供試微細藻類に *Chlorella* sp. MK201^[1]を, 培地に MC⁺^[2]を用いた。継代培養は 30°Cの恒温槽内で白色蛍光灯にて約 30μmol/m²/sの光を与え, 明期のみで無希釈の培地を用いて静置し2週間毎に植え継いだ。Fig 1. に実験フロー図を示す。実験は二段階に分けて行い蓄積工程, 利用工程の順に行った。蓄積工程では, 三種類の栄養塩欠乏系を作成し細胞内に有機物を蓄積させ, 利用工程では, 蓄積した細胞を完全栄養培地に移行し実験を行った。どちらの工程にも対照系を作成した。Table 1. に各系の培養時間及び使用培地の説明を示す。微細藻類を試験系に移動させる際には遠心分離及び洗浄を行った。使用微細藻類は継代培養系から抽出した。遠心分離は, 3000rpmで10分行い, 洗浄は生理食塩水で一回行った。培養環境は恒温槽内で, 温度 30°C, 曝気有り(0.1L/min程度), 光条件は明期のみ, 光強度は 30μmol/m²/s, 液量 200mL,

Table 1. Experimental Conditions

Series name	Accumulation process		Utilization process	
	Incubation time(h)	Culture media	culture time [measurement](h)	Culture media
A ₉₆ pU	96	MC ⁺ (-P)	168 [48, 72, 168]	MC ⁺ 5-fold Dilution
A ₉₆ P×100U	96	MC ⁺ (-P) 100-fold Dilution		
A ₉₆ SalineU	96	Saline, KNO ₃ (200mg/L)		
U _{Control} _A ₉₆	-	-	168 [24, 120, 168]	
A ₁₂₀ pU	120	MC ⁺ (-P)		
A ₁₂₀ P×100U	120	MC ⁺ (-P) 100-fold Dilution		
A ₁₂₀ SalineU	120	Saline, KNO ₃ (200mg/L)	-	
A ₁₂₀ Control	120	MC ⁺		
U _{Control} _A ₁₂₀	-	-	168 [24, 120, 168]	MC ⁺ 5-fold Dilution

1 : 日大理工・院 (前期)・土木 2 : 日大理工・教員・土木

初期培地のpHは6.0±0.15である。初期細胞密度は、蓄積工程で7×10⁵ cells/mL, 利用工程で2×10⁵ cells/mLである。また、測定項目は蓄積工程では、細胞径のみ、利用工程では、細胞密度、細胞径、硝酸イオン濃度である。細胞径は ImageJ, 細胞密度は Thoma 式血球計算盤, 硝酸イオン濃度は濾液を採取し、後日 HPLC にて測定及び解析を行った。

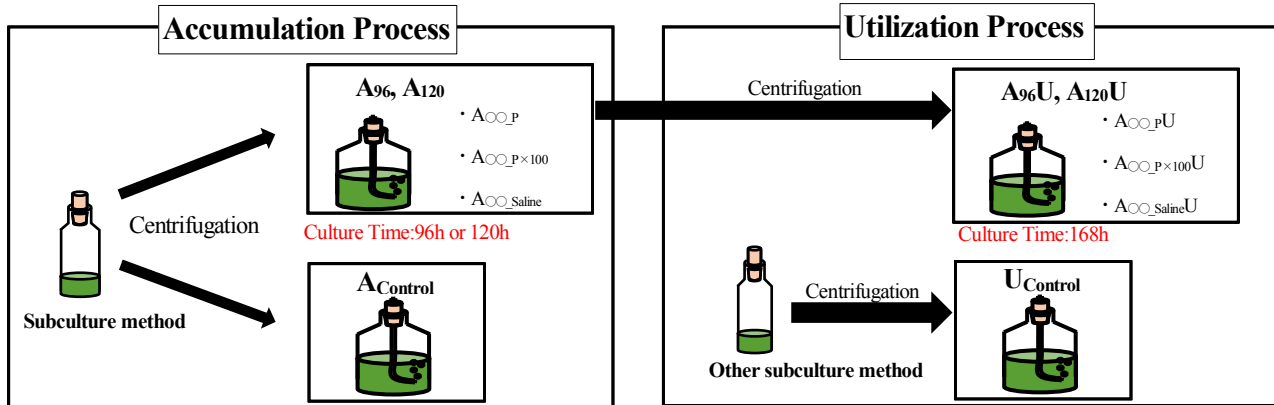


Fig 1. Experiment flow chart

3. 実験結果及び考察

Fig 2. は細胞増殖量, Fig 3. は比増殖速度, Table 2. は初期平均細胞径 (0h) と 24 時間後 (24h) の細胞径の比較, Fig. 4 は窒素回収速度と平均細胞径の相関図である。Table 2. より, 対照系と比較すると, 欠乏

させた系の方が大きくなっている。このことから栄養塩を欠乏させた方が蓄積することが示された。Fig 2. より, A_{120_pU}, A_{120_p×100U} では, 対照系と比較してより増殖した。反対に A_{120_SalineU} では, 対照系より増殖しなかった。つまり, 欠乏状態の差によって, その後の増殖に影響を及ぼすことが示された。Fig 3. より, 24時間までであれば, 全ての欠乏系において比増殖速度が対照系よりも上回る。また, Table 2. より欠乏系において24時間後では, 初期平均細胞径に比べて1~3μmほど小さくなった。このことから, 欠乏させることで初期期間にて細胞分裂に特化して増殖していることが示唆された。Fig 4. より, 蓄積させることで窒素回収速度が改善し, そして蓄積時の欠乏種類, 培養期間によっても窒素回収速度に違いが現れた。また, 栄養塩欠乏期間が長い方がより回収した。このことから, 細胞内蓄積物を利用することで窒素回収速度が改善し, かつ蓄積時間が長い方がより回収することが示された。

4. 総括

本研究では, 栄養塩欠乏時の蓄積有機物を利用することで増殖速度の改善とそれに伴う窒素回収速度の改善を試みた。結果, 栄養塩欠乏期間が長い方がより増殖をし, かつ窒素を回収した。また, 特に初期増殖速度の改善が顕著であった。今後は, 再現性を確かめつつ, より回収速度を改善する運転方法の確立を目指したいと考えている。

参考文献

[1] 村上仁一, 特開 2000 78966 (2000)
 [2] 瀧本善之, 特開平 10-155478 (1998)
 [3] Danesh *et al.*, Biochemical Engineering Journal, 125, 56-64, 2017

Table 2. Changes of average cell size during utilization process(μm)

Time (hour)	A _{120_pU}	A _{120_p×100U}	A _{120_SalineU}	A _{120_Control}
0	6.39	5.72	7.47	3.76
24	4.39	4.75	4.94	-

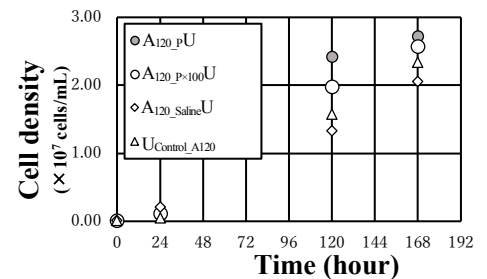


Fig. 2 Changes of cell density during utilization

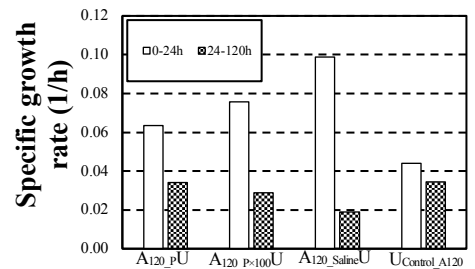


Fig 3. Specific growth rate during utilization

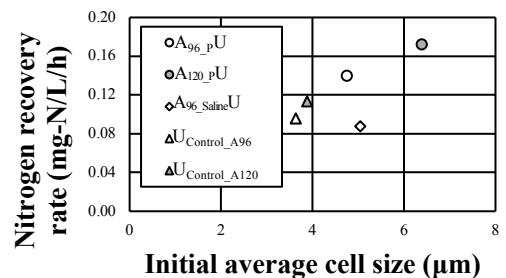


Fig 4. Correlation between nitrogen recovery rate and initial cell size (Legend : A_{120U}₁₆₈ is the results until 72 h, A_{120U}₁₆₈ is until 120 h.)