

オゾンを用いた下水中微細藻類へマトコッカス優占培養法の検討

Ozonation for the dominant culture of microalgae *Haematococcus lacustris* in wastewater

○永禮英明^{*}、石川 千遥^{**、†}、柘田 隆広^{**、††}、Huynh Tan Nhut^{**}

^{*}:岡山大学 学術研究院環境生命自然科学学域、^{**}:岡山大学 大学院環境生命科学研究科、

[†]: 現 (株)クボタ、^{††}: 現 水 ing エンジニアリング(株)

論文要旨

下水に含まれるリンを回収し再利用するための処理プロセスとして微細藻類 *Haematococcus lacustris* (以下、へマトコッカスと呼ぶ) 優占培養にオゾンの利用を検討している。へマトコッカスは 3 つの細胞形態によって異なるオゾン耐性を有し、中でもシストと呼ばれる状態では強い耐性を示した。オゾン耐性の違いは細胞壁の構造の違いによると考えられた。細胞形態を適切に制御した後にオゾン処理を行うことで、下水中に存在する多種多様な微生物を不活化しつつへマトコッカスのみを生残させることが可能と考えられる。

We are investigating the use of ozone for dominant cultures of the microalga *Haematococcus lacustris* as a treatment process for recovering and reusing phosphorus contained in wastewater. *H. lacustris* showed different tolerance to ozone depending on the three cell types, in which cyst showed the strongest tolerance. It is thought that ozone treatment after appropriate control of cell type can inactivate a wide variety of microorganisms in wastewater while leaving only *Haematococcus* alive.

キーワード：下水処理、微細藻類、資源回収

1. はじめに

リンは肥料の主成分の一つであり、食料生産に欠かせない元素である。リンは鉱石として一部の国・地域でのみ採掘されている。その地域性ならびに資源量から、ヨーロッパ諸国では食料安全保障上の重要元素として認識され、使用後のリン、すなわち下水中に含まれるリンを回収し再利用するための施設の建設が進んでいる。

日本においても 1990 年代後半から下水処理場でのリン回収設備導入が始まった。しかし、販売による利益は建設費の減価償却費・運転費を大きく下回っており、事業者がリン回収設備を導入しようとするインセンティブに欠けている。このような状況から、日本ではリン回収施設が広く普及する状況にはない。

筆者らは、リン回収技術の「自発的」な普及を実現させ、リンが循環利用される社会を実現するために、リン回収と同時に高付加価値な物質を生産する下水処理プロセスを開発している。このプロセスでは、下水中で微細藻類を培養しリンを吸収・除去させながら、高値で取引されるアスタキサンチン (AX) を藻類に生産させる。リン回収コストを上回る AX の売却益を生み出すことで、処理事業者が積極的にリン回収をしたがるような状況を実現することを目標としている。

しかし、本目標を達成するためには課題がある。微細藻類へマトコッカスは細胞中に AX を高濃度で蓄積する性質があり、AX の商業生産に利用されている。ただし、増殖速度が遅く、培養時に他の微生物が混入することで培養が阻害されてしまうという問題がある。また、AX の収量を高めるためにはへマトコッカスの優占培養が求められる。多種多様な微生物が混在する下水中において、いかにへマトコッカスの優占培養を実現するかが課題である。

優占培養実現のためにオゾンに注目している。へマトコッカスはストレス環境下で発生する ROSs から細

胞を保護する目的で抗酸化性の AX を生産すると言われている¹²⁾。であるなら、細胞外部からオゾンを追加しても、細胞内部に対する影響が小さいのではないかと仮説を立て、研究を開始した。本稿では、ヘマトコッカスのオゾン耐性評価実験の結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 ヘマトコッカスの培養

国立環境研究所から分譲されたヘマトコッカス (NIES-144) を実験までの間 C 培地にて継代培養したものを使用した。実験の際には細胞を 0.05% NaCl 溶液で 3 回繰り返し洗浄し、0.05% NaCl に再懸濁させた。

ヘマトコッカスは、培養環境により大きく 3 つの形態に変化する (図-1)。当初、AX を蓄積したシストのみがオゾンへの耐性を有すると考えていたが、実験を進める過程でシスト以外の緑色細胞において耐性が大きくばらついた。このばらつきの原因が、緑色細胞である遊泳型とパルメロイドにおいてもオゾン耐性が異なるからではないかと考えた。そこで、形態ごとにオゾン耐性を評価することとした。遊泳型は、鞭毛を使い遊泳する。一方、パルメロイドは鞭毛がなく沈殿する。そこで、緑色の培養液に関し、沈殿のみを取り出したものをパルメロイド、沈殿以外の部分を遊泳型とした。また、強光を照射することで細胞に AX を蓄積させ、赤色に変化した細胞をシストとした。これら 3 種類の細胞を使い、各々実験を実施した。

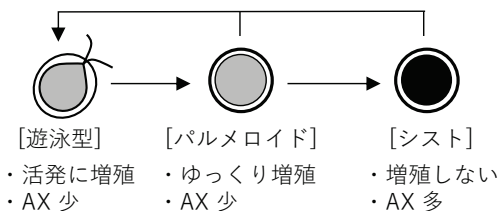


図-1 ヘマトコッカスの細胞形態変化

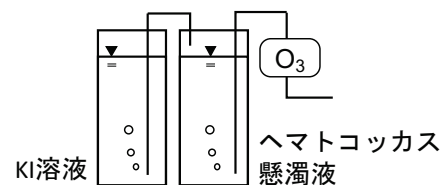


図-2 オゾン暴露実験装置

2.2 オゾン暴露実験

オゾン発生器 (オーニット SEG-1210M) により発生させたオゾンを、ヘマトコッカスを懸濁させた液に吹き込み反応させた。吹き込んだオゾンの一部は未反応のまま液から排出されるため、別途、KI 溶液で排出ガス中のオゾンを吸収させ未反応量を測定し、吹き込んだオゾン量と排オゾン量の差としてヘマトコッカスと反応したオゾン量 (以下、オゾン暴露量という) を求めた (図-2 を参照)。

2.3 活性度の測定

本研究では、活性度喪失の程度でヘマトコッカスのオゾン耐性を評価した。ヘマトコッカスについては光合成に伴う酸素発生速度を測定し活性度とした。50 倍濃縮の C 培地を 2 mL とり、フラン瓶に入れた。そこにオゾン処理したヘマトコッカス懸濁液 100 mL を入れた。このフラン瓶に窒素ガスを 3 分間流し酸素を除去した後、一定強度の光を照射し、フラン瓶中の DO 濃度の変化を測定し平均変化速度 ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{min}$) を算出した。さらに、測定後の液について浮遊物質 (SS) 濃度を測定し、この値を使い DO 濃度平均変化速度を除することで、単位質量細胞当たりの DO 生成速度 ($\text{mgO}_2/\text{gSS}/\text{min}$) を算出した。この値を、オゾンに暴露していないヘマトコッカス細胞について同様に測定した DO 生成速度で除したものを相対活性度とし、これを用いて活性度喪失の程度を評価した。相対活性度は、オゾンに暴露されていない状態での活性度を 1 とし、どれだけの活性度が残存しているのかを表す。

3. 結果および考察

3.1 オゾン暴露実験

図-3 にオゾン暴露実験の結果を示す。3 つの形態によって傾向は異なっていた。遊泳型では少量のオゾン

暴露において活性度は急激に低下し、オゾンによって大きく影響を受けていた。パルメロイドでは活性度変化の傾向が遊泳型よりも緩やかであった。オゾンへの曝露量が増加するに従い活性度が低下し、細胞が損傷を受けるが、その程度は遊泳型よりも小さいと言える。シストでは活性度の低下は観察されず、極めて強い耐性を示すことが明らかとなった。

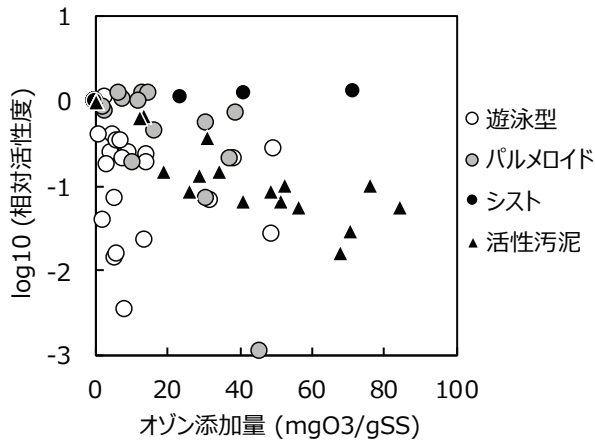


図-3 相対活性度変化の比較

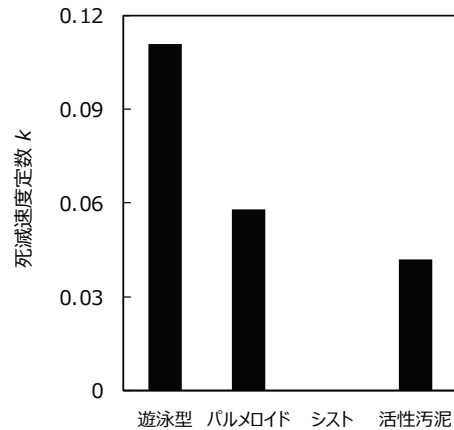


図-4 死滅速度定数 k の比較

消毒過程での微生物の不活化の程度を表す理論式 Chick-Watson 式において $n=1$ として式を積分すると、次式が得られる。

$$\ln \frac{N(t)}{N(0)} = -kCt \quad (1)$$

ここで、 N は活性を有する微生物数、 t は消毒時間、 C は消毒剤濃度。また、 k は死滅速度定数である。本来なら C にはオゾン処理過程で測定した溶存オゾン濃度を用いるべきであるが、本研究では上述の通りリアクターへの流入、流出オゾン量の差をオゾン曝露量とみなし、これを式中の Ct に置き換え死滅速度定数 k を求めることとした。そのため、本研究でいう曝露量にはオゾンの自己分解等も含まれた値となっている。

図-4にこの図から求めた死滅速度定数 k の値を示す。なお、図中には、過去に筆者らが実施した活性汚泥に関する結果もあわせて示している。活性汚泥は主に細菌から構成されることから、細菌の指標として考えることができる。シストでは死滅速度定数 k の値は負 (<0)となり、オゾンの影響を受けない結果となった。これに対し、遊泳型、パルメロイド、活性汚泥ではそれぞれ 0.111 、 0.058 、 0.042 となり、オゾンによって不活化が進行すること、パルメロイドのオゾン耐性は活性汚泥と同程度かやや小さい、遊泳型はオゾンによって活性汚泥以上に不活化されやすいことがわかった。

3.2 細胞形態によりオゾン耐性が異なる理由

ヘマトコッカスの不活化反応は、細胞最外部にある細胞壁あるいは細胞外マトリクス (ECM) と呼ばれるゼラチン状物質とオゾンとの接触から始まる。そこで、細胞壁と ECM の構造と組成に着目しヘマトコッカスのオゾン耐性が形態により変化する理由について考察した。

ヘマトコッカスの細胞壁/ECM の構造は細胞形態によって異なる。遊泳型では細胞壁がなく厚さ $0.8 \mu\text{m}$ の ECM が細胞を保護している。ECM は 19%の炭水化物、75%のタンパク質で構成されている³。遊泳型からパルメロイドに変化するにつれ ECM が失われ、厚さ 0.4 nm の硬い細胞壁が形成される。パルメロイドの細胞壁組成は、炭水化物 70%、タンパク質 6%である⁴。遊泳型と異なり、タンパク質が少なく炭水化物が多い。これらを構成する成分についても調査を行ったが、オゾンと反応しやすいものは見当たらなかった。

オゾン処理実験の際に実施した顕微鏡観察において、遊泳型細胞ではオゾン処理後に細胞が膨張する様子

が観察された。一方、パルメロイドでは、オゾン処理後に細胞内の色が濃緑色から黄緑に部分的に変化しているもの、細胞壁と細胞膜の間に空間ができているような細胞が観察された。遊泳型の際には ECM を通過したオゾンが細胞膜を損傷し、その結果細胞質が細胞外へ漏出した、パルメロイドにおいては細胞壁がオゾンの侵入をある程度阻止するが、徐々に細胞内部への侵入を許し酸化による不活化が進行すると考えられる。

大きなオゾン耐性を示したシストでは、パルメロイドよりもさらに強固な 400~700 nm の厚さの細胞壁が形成されている。オゾンの侵入をより一層困難にする一方、侵入したオゾンを抗酸化性物質である AX により解毒しているものと思われる。

3.3 優占培養のためのシステム検討

上述のようにヘマトコッカスは細胞の形態によりオゾンへの耐性が異なり、シストにおいては活性汚泥に比較し極めて強いオゾン耐性を有していた。そのため、細菌をはじめとするヘマトコッカス以外の微生物が培養槽に侵入した場合には、ヘマトコッカスをシストの状態にし、その上でオゾンを添加することで優占培養を実現できると考えられる。

このような操作を実現するためには、現在の細胞の形態を認識する技術、細胞の形態を変化させる技術が必要である。筆者らは、AI を用いた画像認識により細胞形態を認識し、培養時に照射する光の波長と強度とを制御する技術を開発し、下水中でヘマトコッカスを優占培養する見通しを得た。

謝辞：本研究は八雲環境科学振興財団および公益信託下水道振興基金の補助を受けて実施した。

参考文献

- 1 Han, D., Li, Y. & Hu, Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae* 28, 131-147 (2013).
- 2 Boussiba, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* 108, 111-117 (2000).
- 3 Baudalet, P. H., Ricochon, G., Linder, M. et al. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research* 25, 333-371 (2017).
- 4 Hagen, C., Siegmund, S. & Braune, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology* 37, 217-226 (2002).