

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04663

研究課題名（和文）エネルギー作物の栽培とそのバイオガス化を導入した下水処理場のリ・デザイン

研究課題名（英文）Redesign of sewage treatment plant by using energy-crops cultivation and biogas production from their biomass

研究代表者

遠山 忠 (Toyama, Tadashi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60431392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：下水資源を利用してウキクサと微細藻類を栽培し、そのバイオマスの有効利用を検討した。ウキクサ種の中で*Spirodela polyrhiza*が、微細藻類種の中で*Chlamydomonas reinhardtii*と*Euglena gracilis*が下水や下水処理水を利用した培養において高いバイオマス生産性を示した。また、それらのバイオマス生産性を2倍以上高める独自の培養法（成長促進細菌利用培養）を開発した。ウキクサバイオマスは嫌気性消化（バイオガス化）してエネルギー源として、微細藻類バイオマスは化石資源代替となる油脂や多糖を抽出して、それらを有効利用できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウキクサや微細藻類培養を利用することによって、未利用の下水資源からエネルギー、燃料やバイオプラスチック原料を生産できることを実証した。ここで生産されたエネルギー・資源を化石燃料代替として利用することによって、脱炭素化（カーボンニュートラル）に大きく貢献することができる。また、下水資源を利用した培養に適するウキクサ種と微細藻類種を選抜し、それらの成長やバイオマス生産を2倍以上高めることができる共生促進細菌を発見し、その促進メカニズムを解明することができた。これは生物工学や微生物生態工学の分野において有用な知見である。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study was to produce duckweed and microalgal biomass using sewage resource and to utilize their biomass. As a result, *Spirodela polyrhiza* among duckweeds, and *Chlamydomonas reinhardtii* and *Euglena gracilis* among microalgae showed higher biomass productivity in sewage- and treated sewage-based cultivation. This study developed the cultivation technique (growth-promoting bacteria co-cultivation method) that can increase duckweed and microalgal biomass productivity by two-times. This study demonstrated that duckweed biomass can be utilized efficiently to bio-gas via anaerobic digestion and microalgal biomass can be utilized efficiently to sources of lipids (biofuels) and polysaccharide (bioplastics).

研究分野：生物環境工学

キーワード：下水 バイオマス 資源生産 創エネルギー ウキクサ 微細藻類 脱炭素化 再生可能エネルギー

1. 研究開始当初の背景

下水処理場に集約した下水資源からエネルギーを生産する技術は、持続可能な低炭素・循環型社会の実現に向けて重要である。その中で、下水汚泥の嫌気性消化で発生する消化ガスを利用したバイオガス発電は、最も有効な手段の一つとして普及が進められている。現在、全国で年間190万トン排出されている下水汚泥の12%がバイオガス化され、1.8億kWhの電力が生産されている。これにより、下水分野では28億円の電力と9万トンのCO₂排出量が削減されている(H30年国土交通省)。新下水道ビジョン加速戦略(H29年国土交通省)や第5次エネルギー基本計画(H30年閣議決定)などにより、下水処理場でのエネルギー生産量をさらに増やすことが強く求められているが、新たなエネルギー開発に難航している。研究代表者は、その打開策として下水処理場内の大量な未利用資源(下水、処理水と消化液)に着目し、これらを利用して栽培したエネルギー作物をバイオガス化することを構想した。研究代表者は、このシステムに導入するエネルギー作物として、油脂を高含有する微細藻類とデンプンを高含有するウキクサに着目した。このシステムによって、窒素・リンを含む下水、処理水と消化液をエネルギー作物栽培に利用する新しい資源利用・循環の道を処理場内に創出して窒素・リン除去の軽減(省エネルギー)とエネルギー生産を両立させ、最終的に下水処理場内のエネルギー生産量を増大させる。

2. 研究の目的

本研究は、未利用下水資源(下水、処理水、消化液)を用いてウキクサや微細藻類を培養し、デンプンや油脂を高含有して化石燃料代替のバイオ燃料生産に活用できるバイオマスを生産するシステムを確立することを目的とした。また、ウキクサや微細藻類の増殖を促進する共生細菌を分離して、その増殖促進細菌を利用してバイオマス生産性を高めることも目指した。さらに、ウキクサと微細藻類のバイオマス生産と、それらのバイオマスの有効利用を一体的に最適化し、エネルギー・資源生産を最大化した下水処理場の新しいデザインを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、第一に、下水処理場内の未利用資源を用いたウキクサと微細藻類のバイオマス生産ポテンシャルを理解し、第二に、ウキクサと微細藻類の増殖促進細菌を分離し、科学的知見に基づいた増殖促進細菌利用技術を確立して、第三に、未利用下水資源を用いたウキクサと微細藻類のバイオマス生産の実証試験を行い、エネルギー生産を最大化した下水処理場の新しいデザインを示すことに取り組んだ。

具体的には、課題1『未利用下水資源を用いたウキクサと微細藻類のバイオマス生産の評価』、課題2『ウキクサと微細藻類の増殖促進細菌のスクリーニング』、課題3『増殖促進細菌のバイオマス生産促進メカニズムの解明と利用技術の確立』、課題4『実証実験とエネルギー生産を最大化した下水処理場デザインの提案』の4つの課題に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 未利用下水資源を用いたウキクサと微細藻類のバイオマス生産の評価

複数のウキクサと微細藻類を対象とし、下水処理場から採取した下水、処理水と消化液を用いて栽培実験を行い、窒素・リンの除去速度とバイオマス生産速度を定量した。この結果、実験に供したウキクサ種(*Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Landoltia punctata*)の中で *S. polyrhiza* が最も高い窒素・リン除去速度とバイオマス生産速度(0.19 kg-乾燥重量/m³/日)を示した。一方、今回の実験に供した微細藻類(*Auxenochlorella protothecoides*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp., *Euglena gracilis*)の中では、*C. reinhardtii* と *E. gracilis* が最も高いバイオマス生産速度を示した。以上のことから、未利用下水資源培養でのバイオエネルギー生産性の高いウキクサとして *S. polyrhiza* と微細藻類として *C. reinhardtii* と *E. gracilis* を選抜した。

(2) ウキクサと微細藻類の増殖促進細菌のスクリーニング

ウキクサ *S. polyrhiza* と微細藻類 *C. reinhardtii*, *E. gracilis* を下水処理水中の細菌群や環境水中の細菌群と培養し、それぞれの体表面に付着・共生する細菌群を多数分離した。分離した共生細菌をそれぞれの宿主(*S. polyrhiza*, *C. reinhardtii*, *E. gracilis*)に個々に接種して培養し、共生細菌が宿主の増殖に及ぼす影響を評価した。その結果、それぞれの宿主の増殖を2倍以上促進する細菌(増殖促進細菌)を複数ずつ選抜・獲得することに成功した。

(3) 増殖促進細菌のバイオマス生産促進メカニズムの解明と利用技術の確立

(2)の課題で獲得した増殖促進細菌が宿主のバイオマス生産を促進するメカニズムを調べた。*S. polyrhiza*, *C. reinhardtii* および *E. gracilis* の増殖促進細菌の多くは、植物成長ホルモンであるオーキシン(インドール-3-酢酸 [IAA])を生産し、そのIAA生産能が宿主のバイオマス生産の促進に寄与しているものと考えられた。

S. polyrhiza の増殖促進細菌の一種は、窒素化合物（主にグルタミン酸）を分泌し、それが宿主 *S. polyrhiza* に取り込まれて光合成に関する活性（クロロフィル合成、CO₂ 固定速度、Rubisco 酵素活性）が高まり、その結果としてバイオマス生産が促進するメカニズムを解明することができた。

また、*E. gracilis* の増殖促進細菌のいくつかは、宿主 *E. gracilis* の細胞表面、特に鞭毛付近に付着し、培養液にグルコースなどの有機物が存在している混合栄養条件において増殖促進効果を発揮すること、さらに、pH が中性と酸性の条件では増殖促進を発揮する増殖促進細菌の種類が異なることを明らかにすることができた。

さらに、増殖促進細菌がその効果を最大限発揮する接種濃度を特定することができた。その条件で増殖促進細菌と宿主（*S. polyrhiza*, *C. reinhardtii*, *E. gracilis*）を共培養することによって、宿主のバイオマス生産速度が 2 倍以上に高まり、その効果が 1 週間以上持続することを実際の下水処理水を利用した培養試験において実証することができた。

さらに、当初の計画にはなかったが、下水処理水を利用した微細藻類のバイオマス生産を高める新しい方法を検討し、下水処理水に農・食品系有機廃棄物（トウモロコシ澱粉廃棄物や廃糖蜜など）を混合した排水を利用した培養によって、バイオマスと油脂の生産性を向上させることに成功した。有機廃棄物中の糖、アミノ酸、有機酸やアルコールなどが微細藻類の炭素・エネルギー源となり、混合栄養（光独立と従属栄養を併せたもの）的に微細藻類が増殖したため、そのバイオマスと油脂の生産性が促進したものと考えられた。また、培養した微細藻類に短時間の塩ストレスをかけることによって、油脂合成遺伝子群の発現が高まり、油脂の生産性をさらに高めることにも成功した。

（４）実証実験とエネルギー生産を最大化した下水処理場デザインの提案

下水資源を利用したウキクサ *S. polyrhiza* のバイオマス生産と、生産されたバイオマスの嫌気性消化によるバイオガス生産を一体化したシステムを構築して実証試験を行った。山梨県内の下水処理場の下水（最初沈殿池越流水）および下水処理水（活性汚泥プロセス後の処理水）を用いて *S. polyrhiza* を培養した結果、下水からは有機物と窒素が効率的に除去され、また、下水処理水からは窒素が効率的に除去された。同時に、*S. polyrhiza* のバイオマスが効率的に生産された。下水処理水に比べて、下水を用いた場合の方が窒素除去速度とバイオマス生産速度が高くなった。下水での *S. polyrhiza* のバイオマス生産速度は約 0.2kg-乾燥重量/m³/日、下水処理水での *S. polyrhiza* のバイオマス生産速度は約 0.1kg-乾燥重量/m³/日であった。このことから比較的高濃度の窒素を含む下水の方が *S. polyrhiza* の培養には適しているものと考えられた。また、*S. polyrhiza* などのウキクサは、活性汚泥後の高度処理（窒素除去）としての利用だけでなく、最初沈殿池越流水を対象とした二次処理（有機物除去）としても利用可能であることが明らかとなった。続いて、生産されたバイオマスを回収して嫌気性消化を行ったところ、非常に高い収率でメタンガスが発生した。具体的には 2 週間の滞留時間で分解率が 70%を上回り、発生したバイオガス中のメタン濃度は 65%、メタン生産収率は約 450 NL-CH₄/kg-ウキクサ乾燥重量となった。これらの結果から、下水処理場においてウキクサを培養してそのバイオマスを有効利用することは、二次処理（活性汚泥プロセス）と高度処理の一部を代替することによる消費エネルギーの削減（省エネルギー）と、生産されたウキクサバイオマスの嫌気性消化によるエネルギーの生産（創エネルギー）の両方の面から脱炭素化に貢献できると結論づけられた。

一方、下水処理水を利用した微細藻類 *C. reinhardtii* と *E. gracilis* のバイオマス生産と、生産されたバイオマスの有効利用（油脂あるいは多糖抽出・精製）を一体化したシステムを構築して実証試験を行った。山梨県内の下水処理場の下水処理水を用いて培養試験を行ったところ、*C. reinhardtii* は 0.05kg-乾燥重量/m³/日、*E. gracilis* は 0.03kg-乾燥重量/m³/日のバイオマス生産速度を示した。続いて、生産されたバイオマスの有効利用を検討した。下水処理水を用いて培養した *C. reinhardtii* バイオマスには 25～30%の油脂が含まれており、それを効率的に抽出できた。このことから、下水処理場での *C. reinhardtii* 培養では、化石燃料代替となるバイオディーゼル原料（油脂）の生産が可能であり、これを通じて脱炭素化に貢献できるものと結論づけられた。一方、下水処理水を用いて培養した *E. gracilis* バイオマスには、30%の油脂と 25%の多糖（1,3-β グルカン）が含まれており、それらを効率的に抽出でき、この多糖はバイオプラスチックの原料にもなり得る。このことから、下水処理場での *E. gracilis* 培養では化石燃料代替となるバイオディーゼル原料（油脂）と、化石資源由来のプラスチックの代替となるバイオプラスチック原料（多糖）の生産が可能であり、これを通じて脱炭素化に貢献できるものと結論づけられた。また、地域の農・食品系バイオマスを下水処理水と混合した培養においては、*C. reinhardtii* と *E. gracilis* のバイオマス生産速度が 1.5～2 倍に向上した。このことから、将来的に下水処理場が下水に加えて地域バイオマスも集約して処理する拠点になった場合には、より多くの微細藻類バイオマス、すなわち化石資源代替エネルギー・資源の生産が可能であるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hang LT, Mori K, Toyama T	4. 巻 56
2. 論文標題 Enhanced biomass and lipid production capacity of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> under mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste molasses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Water Treatment Biology	6. 最初と最後の頁 57-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2521/jswtb.56.57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rubiyatno, Matsui T, Mori K, Toyama T	4. 巻 15
2. 論文標題 Paramylon production by <i>Euglena gracilis</i> via mixotrophic cultivation using sewage effluent and waste organic compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioresource Technology Reports	6. 最初と最後の頁 100735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biiteb.2021.100735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rubiyatno, Mori K, Inoue D, Kim S, Yu J, Lee T, Ike M, Toyama T	4. 巻 9
2. 論文標題 Isolation and Characterization of <i>Euglena gracilis</i> -Associated Bacteria, <i>Enterobacter</i> sp. CA3 and <i>Emeticia</i> sp. CN5, Capable of Promoting the Growth and Paramylon Production of <i>E. gracilis</i> under Mixotrophic Cultivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9071496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 遠山忠	4. 巻 45
2. 論文標題 ウキクサを利用した排水処理とバイオエネルギー生産	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 137-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyama T, Mori K, Tanaka Y, Ike M, Morikawa M	4. 巻 35
2. 論文標題 Growth Promotion of Giant Duckweed Spirodela polyrhiza (Lemnaceae) by Ensifer sp. SP4 Through Enhancement of Nitrogen Metabolism and Photosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 28-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-06-21-0157-R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 遠山忠、Rubiyatno、松井拓也、Le Thai Hang、森一博
2. 発表標題 下水処理水と農・食品系有機廃棄物を利用した微細藻類の混合栄養培養による有価物生産
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadashi Toyama, Naoki Nomura, Ren Yamaguchi, Yasuhiro Tanaka, Kazuhiro Mori
2. 発表標題 Duckweed culture as a second treatment for municipal wastewater: Capabilities of duckweed to remove organic compounds, nitrogen and coliform from wastewater, and to produce biomass
3. 学会等名 8th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠山忠、山田悠、森一博
2. 発表標題 ウキクサを用いた下水処理とウキクサバイオマスからのバイオガス生産の特徴
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠山忠、松井拓也、Rubiyatno、森一博
2. 発表標題 下水処理水と有機性廃棄物を利用した 微細藻類培養による有価物の生産
3. 学会等名 日本水処理生物学会第58回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠山忠、森一博
2. 発表標題 ウキクサ培養による下水および農・食品系廃棄物中の窒素の高付加価値タンパク資源への変換
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 環境保全研究室 https://51lab.yamanashi.ac.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森 一博 (Mori Kazuhiro) (90294040)	山梨大学・工学域・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------