

## 博士学位論文審査報告書

申請者氏名	銭 軍 (せん ぐん)
学位の種類	博士 (環境科学)
論文題目	Techniques for mass-culturing microalgae using anaerobic digestion effluent from over-growing and invasive aquatic macrophytes (過剰繁茂する水草と外来水草による嫌気発酵消化液を使った微細藻類大量培養技術)
学籍番号	1756001
学歴	2013年9月1日 海南大学(中国)海洋学院海洋生物学専攻博士前期課程入学 2016年6月30日 同上修了 2017年4月1日 滋賀県立大学環境動態学専攻博士後期課程入学
論文審査委員会	委員長 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 伴 修平 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 丸尾 雅啓 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 准教授 後藤 直成

### 論文の内容の要旨

近年、水生植物(水草)の過剰繁茂による環境問題が世界各地で報告されるようになり、日本国内でも社会問題となって久しい。琵琶湖もその例外ではなく、1990年代後半以降、過剰繁茂した沈水植物は船舶の航行障害、漁業活動の阻害、周辺住民への悪臭被害など複合的な環境問題を引き起こしている。また、最近では外来性の水草の大量繁茂が同様の問題を引き起こすと共に在来種を駆逐することが危惧されている。この問題を解決するために、水草を嫌気発酵によって分解処理し、得られたメタンからエネルギーを取り出し、さらに発酵液分残渣(消化液)を用いて微細藻類を生産することによって、増えすぎた水草を循環利用するための基礎技術開発が進められている。これまでの研究において、消化液には微細藻類培養に窒素やリン等の栄養塩が充分含まれることが分かっている。しかし、水草を材料に行った嫌気発酵の消化液では、微細藻類培養においてマグネシウム(Mg)不足が観察された。しかし、実際には消化液中のMg含有量はそれほど低くないことから、消化液中のMgは微細藻類が利用しにくい化学形態で存在していることが推測された。本研究では、Mgの生物利用能を高め、微細藻類の生産性を向上させるための基礎技術として、消化液のpH調整と硝化处理の効果について検討した。

本論文は、General introductionに続く4章によって構成される。第1章では、まず消化液を用いた培養に適した藻類種を選定するため、アンモニア耐性の高い緑藻3種を選び培養実験を行った。第2章では選定された微細藻類種を用い、Mgの生物利用能を高めて藻類生産を向上させるために、消化液の至適pH条件および連続培養方法の検討を行った。第3章では、Mgの生物利用能低下が溶存有機物(DOM)との錯生成による可能性を明らかにするため、紫外線照射によってDOMの光分解を促すことで、藻類成長量が増加するか確かめた。さらに、DOMの分子量分布を調べ、Mgと結合しているDOMの分子量画分を特定した。第4章では、硝化处理によってアンモニア態窒素を硝酸態窒素に変換するこ

とで、消化液の希釈と Mg 添加が不要になることを示した。

第 1 章:アンモニア耐性の高い緑藻 3 種、*Chlorella sorokiniana*、*Chlamydomonas reinhardtii*、そして *Botryococcus braunii* を用いて、琵琶湖南湖から採取した沈水植物と外来水生植物(オオバナミズキンバイ) *Ludwigia grandiflora* を材料とした消化液で培養し、その成長特性を比較した。最も低い希釈倍率で培養できたのは、*C. sorokiniana* であり高いアンモニア耐性を有し、収量の最も高くなることが分かった。従って、以下の実験では主に本種を用いて実験を行った。また、いずれの消化液を使った場合でもやはり微細藻類の最大収量を得るためには Mg が不足しており、高い DOM 濃度が関係していると推測された。

第 2 章:沈水植物を材料としたメタン発酵消化液を用い、これの pH 調整と連続培養を併用することで、Mg の生物利用能を高め、微細藻類収量および栄養塩除去率を向上させるための至適 pH を求めた。消化液を pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 に調整した培養液がフロースルー装置に流入するよう設定し、*C. sorokiniana* を培養した。微細藻類収量および栄養塩除去率は、pH 6.5 のとき最も高く、pH 6.0 では培養槽中の pH が著しく低下して収量は減少した。これは pH 6.5 を下回ると培養液中の無機炭素 (DIC) のほとんどが  $\text{CO}_2$  となり、DIC 濃度が低下することによって光合成が阻害されることに起因した。また、pH 6.5 または 7.0 に調整した消化液では、溶液中の Mg 濃度が藻類収量の増加に伴って減少し、藻類 1 g に対して Mg が 7.0 mg 消費されることが分かった。これらのことから、連続培養装置を使い、消化液の pH を 6.5 とすれば、Mg を添加しなくても、微細藻類収量が向上することを明らかにした。

第 3 章:消化液中で Mg の生物利用能が低い理由として、消化液中に存在する DOM との結合による吸収阻害が推測された。そこで、紫外線 (UVC) 照射を行ったところ、DOM が光分解されることにより、Mg の生物利用能が向上し、微細藻類収量が促進されることを確認した。あらかじめ UVC を 0~9 時間照射した消化液、UVC を照射せずに Mg を追加した消化液 (対照区)、そして藻類培養液 (C 培地) のそれぞれで *C. sorokiniana* を培養した。UVC を 3 時間以上照射した実験区での微細藻類収量と、対照区あるいは C 培地で培養したときの値に有意差は認められなかった。培養期間中の Mg 濃度の低下は藻類収量に依存しており、また UVC 照射による溶存有機炭素 (DOC) 濃度の低下にも依存していた。これらの結果は、UVC 照射によって光分解された 1 mg の DOC から 0.09 mg の Mg が遊離して微細藻類に利用されたことを示した。さらに、サイズ排除型液体クロマトグラフィーを用いて、消化液中の DOM の分子量分布を調べ、Mg がどの分子量画分に結合しているのか調べた。結果は、Mg 初期濃度のおよそ 6 割が 400~1170 Da の比較的小さい分子量画分に結合していることを明らかにした。残りの 4 割は 240 Da 以下の画分であり、1170 Da 以上の画分には結合していなかった。

第 4 章:消化液を硝化処理することによって、アンモニア態窒素を硝酸態窒素に変換し、希釈することなく消化液を藻類培養に利用する方法について検討した。実験は、第 1 章と同じ 3 種の緑藻を用い、バッチ培養と連続培養にて行った。いずれの藻類でも希釈しないとき最も高い収量が得られ、*C. sorokiniana* の収量が最も高かった。本種を用いた連続培養では、滞留時間が 14 日のとき最も高い生産速度 (110 mg/L/d) が得られたものの、栄養塩除去率は 50%を大きく下回った。これは用いた光量あるいは水温によるものと考えられ、光量あるいは水温の増加によって、より高い収量の得られる可能性が考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

論文審査委員会は、銭軍が提出した学位申請論文が博士（環境科学）を授与するに値すると判定した。審査過程と審査結果の概要は以下の通りである。

令和2年7月16日開催の環境科学研究科会議において、申請者が提出した学位申請を受け、生態系保全研究部門の伴修平教授、丸尾雅啓教授、後藤直成准教授を委員とする論文審査委員会の設置が承認された。同委員会において、学位申請論文の査読を行うと共に論文審査委員会を開催し、論文の内容について審議した。さらに、学位論文審査報告会において最終試験を実施し、試験終了後、再度委員会を開催し学位論文の審査を行った。

水草の異常繁茂は、いまや日本国内のみならず世界各地で生じている環境問題の一つと云える。メタン発酵を利用した水草バイオマスの処理は、最も効率よく安価にできる方法の一つと期待される。さらに、排出される消化液を微細藻類培養に用いることで利益還元が可能となる。しかし、消化液中には利用可能な形態のMgが不足しており、最大収量を得るにはこれを添加する必要があることが分かっている。本研究は、Mgを添加することなく、pH調整と硝化処理によって生物利用能を高めることで微細藻類収量を高めるための重要な基礎的知見を与えた。

Mgの添加は高いコストを要するが、連続培養装置を用いたpH調整では、pHを僅か0.5低下させるだけで藻類収量を増加させることができた。一方で、pHの低下はDICの低下を招くため、pH 6.0以下では培養が不可能となることも明らかにした。実験結果は、pH 6.5のときMgの生物利用能が高く、DICが閾値以下にならない最適な条件であることを示しており、これは極めて興味深い発見と云える。

次に、このMgの生物利用能の低さが消化液中に多量に存在するDOMとの結合によることを、UVC照射を用いた光分解によって証明した。実験により、UVCによってDOMの一部が分解され、そこから遊離したMgが藻類に利用されることで、藻類収量が増加することを明らかにした。さらに、DOMの分子量分布を調べ、Mgが400~1170 Daの比較的分子画分のDOMと結合していることを明らかにした。これは、今後、Mg利用性を向上させる更なる方法を考えるときに極めて重要な知見を与えるものと期待できる。

最後に、消化液の硝化処理とこれを用いた微細藻類培養を試みた。実験に使用した緑藻はいずれもアンモニア耐性が高いものだったが、培養には淡水による希釈が不可欠であり、これは本技術の実用化にとって大きな弱点だった。しかし、硝化処理によってアンモニア態窒素を硝酸態窒素に変換することで、消化液は希釈することなく藻類培養に使用できることを明らかにした。これらの研究成果は当該分野の研究に必須の知見を提供し、また今後、実用化技術を検討する際には重要な基礎技術となるものと期待できる。これらの一部（第2章）はすでに以下の論文として出版済みであり、第3章についても出版準備を進めているところである。

以上のことを総合し、審査委員会は本論文が博士（環境科学）の学位を授与するに値するものと認めた。

- 1) Qian, J, X. Liu, S. Ban, M. Fujiwara, T. Kōdera, S. Akizuki and T. Toda (2020)  
pH treatments in continuous cultivation to maximize microalgal production and nutrient removal from anaerobic digestion effluent of aquatic macrophytes. *Journal of Applied Phycology*, <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02196-z>.