

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18142

研究課題名(和文) 群体形成と浮揚性の制御を活用したアオコ除去技術の研究開発

研究課題名(英文) Development of algal blooms removal technique by controlling colony formation and buoyancy

研究代表者

天野 佳正 (Amano, Yoshimasa)

千葉大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：40517976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水溶液中の細胞外多糖類(EPS)濃度とともに金属カチオン(Ca<sup>2+</sup>)濃度を制御することで、高分散性ミクロキスティスの群体形成と群体サイズの拡大を試みた。また、群体サイズの拡大によって高まる浮揚性を利用した新たなアオコ捕集除去プロセス構築への可能性を検討した。その結果、ミクロキスティスは高濃度Ca<sup>2+</sup>(1000 mg/L)条件において小群体を形成し、さらにEPS(200 mg/L)を同時添加することで1群体当たりの平均細胞数を増大させることが明らかとなった。また、EPSおよびCa<sup>2+</sup>によって群体サイズを拡大したアオコの浮揚性は対照系と比較して顕著に強まることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to isolate extracellular polymeric substances (EPS) from algal blooms obtained in eutrophic lake, and to induce colony formation and expansion of colony size of highly dispersed monocellular Microcystis by controlling EPS and Ca<sup>2+</sup> concentrations in growth medium. This study also examined the possibility of the development of algal blooms removal technique using buoyancy enhanced by the colony formation and colony size expansion. The result showed that Microcystis formed small colonies under the high Ca<sup>2+</sup> concentration condition, and that the mean cell numbers per colony was increased by adjusting Ca<sup>2+</sup> (1000 mg/L) as well as EPS (200 mg/L) concentration in the medium. It was also revealed that the buoyancy of algal blooms was strengthened by expanding the colony size in the EPS and Ca<sup>2+</sup> added medium compared with the control medium (without addition of EPS and Ca<sup>2+</sup>).

研究分野：土木環境システム

キーワード：アオコ捕集除去 保全 ミクロキスティス 細胞外多糖類(EPS) 金属カチオン 群体形成 浮揚性 水環境

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化に伴う環境水の水温上昇により、水道水源における有毒藍藻類 (アオコ) の異常増殖頻度の高まりが世界各国で危惧されており、今後安全・安心な飲料水の確保が一層困難になるといわれている (Hallegraeff, *J. Phycol.*, 2010)。一般の浄水場では、原水中の主な懸濁微粒子を凝集剤によりフロック化させ、重力作用によって沈殿除去している。しかし、原水にアオコが含まれるとアオコ特有の浮揚性によりフロックの沈殿作用が低下し、フロックはもとよりアオコそのものが凝集沈殿池から流出するといった問題を引き起こす。このため、アオコにターゲットを当てた新たな浄水処理プロセスの構築が必要となる。

アオコ形成藍藻類の代表種であるマイクロキスティスは、粘質性の細胞外多糖類 (Extracellular Polymeric Substances; EPS) をまとう形で細胞を凝集させて群体を形成している。ガス胞とよばれる特殊な器官をもち、通常、比重が1よりも小さいマイクロキスティスは、群体サイズを拡大して浮揚性を高めているといわれている。しかし、細胞の活性状態や環境条件に応じて群体サイズおよび浮揚性は変化し、この不規則な性質が凝集沈殿池でのアオコにターゲットを当てた除去手法の構築の妨げとなっている。現在、世界各国の大学や研究機関においてアオコの除去方法が考案されているが、未だ有効な手法は確立されていないのが現状である。

アオコの効果的な除去方法を確立するため、マイクロキスティスの群体形成や浮揚性といったこの種に特有の性質を明らかにすることは重要である。これまでも多数の研究が行われているものの、それらの機構解明には至っていない。これは、室内培養条件にて群体形成能を有するマイクロキスティスを培養すると、EPS の分泌量の低下とともに単体化し、水溶液中で分散してしまうことに起因する (Brookes and Ganf, *J. Plankton Res.*, 2001)。さらに、単体化したマイクロキスティスに再び群体形成能を付与する実験も試みられているものの成功事例は極めて少ない。近年、我々の研究において、実湖沼のアオコから単離した EPS を利用し、分散性の極めて高いマイクロキスティス培養液中の EPS 濃度を制御することで、これまで困難とされてきた人為的なマイクロキスティスの群体形成に成功している (Amano *et al.*, *J. Jpn. Soc. Civil Eng. Ser. G (Environmental Research)*, 2013)。さらに、水溶液中に高濃度の金属カチオンが存在しない限り群体形成は進行しないことも見出している (細井ら, 第47回日本水環境学会年会講演集, 2013)。これらの研究成果を基に、マイクロキスティスの群体形成に関与する因子をつきとめ、群体サイズの拡大を促す条件を見出すことができれば、浮揚性をも制御できる可能性がある。多くの研究者がこれまで成し得てこなかった分散性のマイクロキスティ

スの浮揚性制御技術が確立できれば、群体形成能と浮揚性能を併せもつ実際のアオコに対しこれまでにない除去効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究は、実湖沼にて採取したアオコから EPS を単離し、水溶液中の EPS 濃度とともに金属カチオン濃度を制御することで、単体状かつ高分散性のマイクロキスティスの群体形成と群体サイズの拡大を試みた。また、群体形成と群体サイズの拡大によって高まる浮揚性を利用した新たなアオコ捕集除去プロセス構築への可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞外多糖類 (EPS) の単離および成分・化学分析

茨城県千波湖で採取したマイクロキスティス属を主体とするアオコを供試試料とした。EPS の単離には EDTA-NaOH 混合溶液による抽出法を用い、単離した EPS は凍結乾燥によって粉末体とした。

単離した EPS の表面化学・組成を明らかにするため、FT-IR 分析により表面官能基を、元素分析により炭素、水素、窒素および酸素の組成含有率を、また燃焼酸化-赤外線式 TOC 自動計測法を用いて、EPS 水溶液中の全有機体炭素濃度 (TOC) を測定した。

### (2) 高分散性マイクロキスティスの群体形成試験

アオコから単離した EPS および湖水中の主な金属カチオンである  $\text{Ca}^{2+}$  が、単体状かつ高分散性のマイクロキスティスの群体形成に及ぼす影響について調べた。

トリス緩衝液を基本培地とし、種々の EPS 濃度 (0 および 200 mg/L) および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (0 および 1000 mg/L) に調整した培地にてマイクロキスティスを培養した。培養後、マイクロキスティスの細胞密度および群体密度を計数し、各成分がマイクロキスティスの群体形成に及ぼす影響について検討した。

### (3) ミクロキスティスを主体とするアオコの浮揚性試験

マイクロキスティスの浮揚性は、群体サイズの拡大に伴って高まると予想されるため (ストークスの法則)、この性質を利用して新たな捕集除去手法の構築の可能性を検討した。

上述した茨城県千波湖で採取したマイクロキスティス属を主体とするアオコを供試試料とした。アオコ水溶液中の EPS (0 および 200 mg/L) および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (0 および 1000 mg/L) を変化させた条件にてアオコを培養し、その後、培養槽上層および下層の溶液を分取して、各実験系におけるクロロフィル a 濃度を測定した。得られた結果から、相対浮揚率 (RB, %) を算出し、EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  がマイクロキスティスの浮揚性に及ぼす影響について評価した。なお、マイクロキスティス細胞が上下

層に均一に分散している場合の RB 値は 50%となる。

#### 4. 研究成果

##### (1) EPS の成分・化学分析

EPS 試料の FT-IR スペクトルを図 1 に示す。観測された吸収は以下の振動によるものと考えられる。(i)  $1000\text{ cm}^{-1}$  (グリコシド結合に由来する C-O-C), (ii)  $1460\text{ cm}^{-1}$  (C-O 伸縮振動), (iii)  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O 伸縮振動), (iv)  $3430\text{ cm}^{-1}$  (OH 伸縮振動)。これらの結果から, EPS の主な表面官能基として, カルボキシ基, ラクトン基およびヒドロキシ基が存在することが示唆された。また元素分析結果より, EPS の炭素, 水素, 窒素および酸素含有率はそれぞれ, 17.12%, 1.12%, 1.51%および 80.25% であり, 特に酸素含有量が高いことがわかった。この結果は, EPS 中にカルボキシ基, ラクトン基およびヒドロキシ基等の酸素を有する官能基が多く含まれていることを示唆しており, 上述の FT-IR スペクトルの結果と一致している。さらに, EPS を  $200\text{ mg/L}$  に調整した水溶液中の TOC の濃度は  $7.4\text{ mg/L}$  となり, 2015 年 10 月における印旛沼 (千葉県) の TOC 値 ( $7.6\text{ mg/L}$ ) とほぼ同じ値であった。これらの結果から, EPS を  $200\text{ mg/L}$  に調整した溶液は, アオコが発生する実湖沼の溶存有機物濃度条件に近いことがわかった。

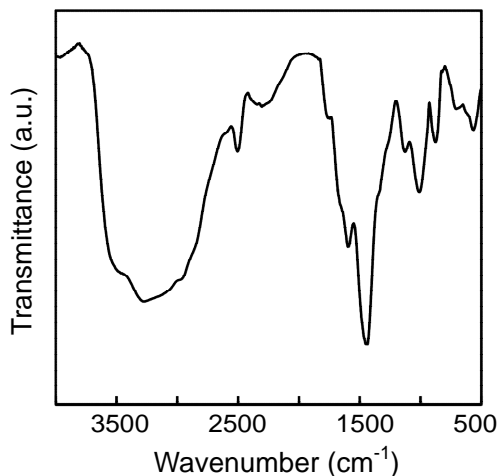


図 1 アオコから単離した EPS の FT-IR スペクトル

##### (2) 分散性マイクロシスティスの群体形成試験

種々の EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に調整した培養液にてマイクロシスティスを培養したときの群体密度, 全細胞密度および群体を除いた細胞密度を表 1 に示す。実験を通じ, マイクロシスティスは  $\text{Ca}^{2+}$  添加系および EPS +  $\text{Ca}^{2+}$  添加系でのみ群体を形成し, 群体密度は前者の方がおよそ 1.2 倍高い値を示した。また全細胞密度は, EPS を添加した系において増加する傾向が見られたことから, EPS 中にマイクロシスティスの増殖を促進させる成分が含有している可能性が示唆された。

表 1 EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  がマイクロシスティスの群体形成に及ぼす影響

培養系	群体密度 (colonies/mL)	全細胞密度 (cells/mL)	群体を除いた細胞密度 (cells/mL)	1群体当たりの細胞数 (cells/colony)
Control	0	$8.48 \times 10^5$	$8.48 \times 10^5$	0
EPS	0	$1.00 \times 10^6$	$1.00 \times 10^6$	0
Ca	$1.03 \times 10^4$	$9.53 \times 10^5$	$4.70 \times 10^5$	48.8
EPS + Ca	$8.92 \times 10^3$	$1.58 \times 10^6$	$5.46 \times 10^5$	127

これらの結果より, 群体形成が観測された  $\text{Ca}^{2+}$  添加系および EPS +  $\text{Ca}^{2+}$  添加系における 1 群体当たりの細胞数を算出したところ,  $\text{Ca}^{2+}$  添加系では  $48.8\text{ cells/colony}$  であったのに対し, EPS +  $\text{Ca}^{2+}$  添加系では  $127\text{ cells/colony}$  と, およそ 2.6 倍高い値を示したことから,  $\text{Ca}^{2+}$  存在下において EPS は群体形成を促進することが明らかとなった。この機構として,  $\text{Ca}^{2+}$  が高濃度 ( $1000\text{ mg/L}$ ) に存在するとき, 負に帯電している細胞表面の電荷が中和することにより細胞同士が引き合い群体を形成したものと予想された。また,  $\text{Ca}^{2+}$  の存在により形成された個々の小群体は, EPS 中の負に帯電したカルボキシ基と  $\text{Ca}^{2+}$  による架橋効果によって拡大し, 1 群体あたりの平均細胞数を増大させたと推察された。

##### (3) EPS と $\text{Ca}^{2+}$ がマイクロシスティス属を主体とするアオコの浮揚性に及ぼす影響

マイクロシスティス主体のアオコ水溶液中の EPS ( $0$  および  $200\text{ mg/L}$ ) および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $0$  および  $1000\text{ mg/L}$ ) を変化させてアオコを培養した結果, 各実験系の培養槽上層および下層のクロロフィル a 濃度に顕著な差が見られた (図 2)。アオコ細胞の多くは 1 より小さい比重を有し, かつ, 強い浮揚性を示すため, 培養槽上層部の細胞密度は全ての実験系で初期細胞密度 ( $1.00 \times 10^6\text{ cells/mL}$ ) より高まり, 逆に下層部の細胞密度は減少する傾向を示した。上層部の細胞密度は, EPS +  $\text{Ca}^{2+}$  添加系において最も高い値を示し, EPS ならびに  $\text{Ca}^{2+}$  を添加していない対照系と比べておよそ 1.6 倍高い値を示した。

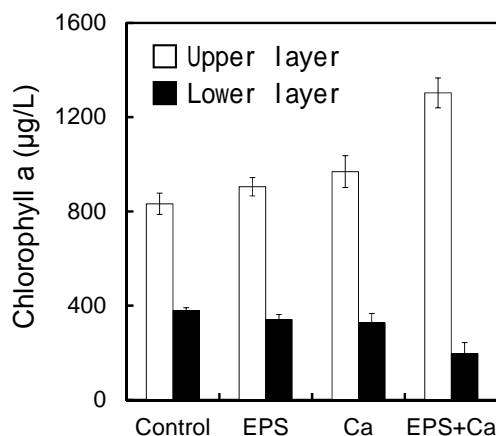


図 2 EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  の添加によって変化する培養槽上層および下層におけるクロロフィル a 濃度

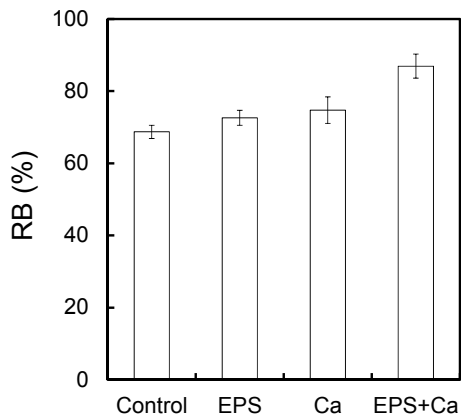


図3 EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  がアオコの相対浮揚性率 (RB, %) に及ぼす影響

培養槽上層部および下層部の細胞密度および溶液量から計算した相対浮揚率 (RB, %) を図3に示す。対照系のRB値は69%であり、この値と比較して統計的に有意に増加 ( $p < 0.05$ ) したのはEPS +  $\text{Ca}^{2+}$  添加系のみで、その値は87%であった。単体状のミクロシスティスと同様に、EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  の添加によってアオコの群体サイズが拡大したと予想され、これによりRB値が増加したと考えられる。従って、EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を調整することで、アオコの群体サイズだけでなく、浮揚性をも制御できることが見出された。

本研究結果をまとめると、ミクロシスティスは高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  (1000 mg/L) 条件において小群体を形成し、さらにEPS (200 mg/L) を同時に添加することで1群体当たりの平均細胞数を増大させることが明らかとなった。また、EPS および  $\text{Ca}^{2+}$  によって群体サイズを拡大したアオコの浮揚性は、対照系と比較して高くなることがわかった。本研究得られた結果は、効率的にアオコを捕集し、除去することができる新たな浄水処理プロセスの構築に寄与できると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. M. Sato, K. Omori, T. Datta, Y. Amano, M. Machida. Influence of extracellular polysaccharides and calcium ion on colony formation of unicellular *Microcystis aeruginosa* under laboratory conditions, *Environ. Eng. Sci.*, 査読有, 34(3), 149-157 (2017). DOI: 10.1089/ees.2016.0135
2. M. Sato, Y. Amano, M. Machida, F. Imazeki. Colony formation of highly dispersed *Microcystis aeruginosa* by controlling extracellular polysaccharides and calcium ion concentrations in aquatic solution, *Limnology*, 査読有, 18(1), 111-119 (2017). DOI: 10.1007/s10201-016-0494-7
3. M. Mikawa, T. Datta, Y. Amano, M.

Machida. Dominant characteristics between *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. accompanying dilution process in eutrophic lake, *Water Air Soil Pollut.*, 査読有, 228(5) (2017). DOI: 10.1007/s11270-017-3343-3

4. D. Jiang, Y. Amano, M. Machida. Removal and recovery of phosphate from water by calcium-silicate composites-novel adsorbents made from waste glass and shells, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 査読有, 24(9), 8210-8218 (2017). DOI: 10.1007/s11356-017-8503-x
5. M. Mikawa, K. Sugimoto, Y. Amano, M. Machida, F. Imazeki. Competitive growth characteristics between *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. accompanying changes in river water inflow and their simulation model, *Phycol. Res.*, 査読有, 64(3), 123-132 (2016). DOI: 10.1111/pre.12129
6. K. Sugimoto, Y. Negishi, Y. Amano, M. Machida, F. Imazeki. Roles of dilution rate and nitrogen concentration in competition between the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Cyclotella* sp. in eutrophic lakes, *J. Appl. Phycol.*, 査読有, 28(4), 2255-2263 (2016). DOI: 10.1007/s10811-015-0754-7

[学会発表](計2件)

1. 天野佳正, 細胞外多糖類とカルシウムイオンによる分散性ミクロシスティスにおける群体形成過程の連続観測, 日本水処理生物学会第53大会, 2016年11月12日, 千葉工業大学(千葉県習志野市)。
2. Y. Amano, Colony formation and promotion of unicellular *Microcystis* controlling concentrations of extracellular polysaccharides (EPS) and cationic ion, Water and Environment Technology Conference (WET2015), 5 Aug. 2015, Nihon University (Chiyoda, Tokyo).

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等:

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb15/index.html> (千葉大学大学院工学研究科共生応用化学専攻, 第15研究室 [環境化学研究室])

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 佳正 (AMANO Yoshimasa)  
千葉大学・大学院工学研究科 [兼] 千葉大学・総合安全衛生管理機構・助教  
研究者番号：40517976

### (2) 研究協力者

町田 基 (MACHIDA Motoi)  
千葉大学・総合安全衛生管理機構 [兼]  
千葉大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：30344964