

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04404

研究課題名(和文)アオコ形成藍藻類ミクロキスティスの浮揚性制御技術の確立と高度捕集除去への応用

研究課題名(英文)Control of buoyancy of algal bloom-forming blue-green alga Microcystis and its application to advanced removal

研究代表者

天野 佳正 (Amano, Yoshimasa)

千葉大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：40517976

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)：本研究では、富栄養化した湖沼において発生する有害アオコ(ミクロキスティス)が有する浮揚性を利用したアオコ捕集除去プロセスの開発を行った。ミクロキスティスの群体形成を担う結合性細胞外多糖類(TB-EPS)と水溶液中のカチオン濃度を制御することで、ミクロキスティスの群体サイズを拡大させ、浮揚性を向上させることに成功した。また、光照射の有無による浮揚性制御にも成功し、アオコ捕集除去手法構築のための更なる研究展開に向けての道筋を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

湖沼に発生するアオコ(ミクロキスティス)の除去には特殊な装置や薬剤の使用など、コスト高や環境負荷が課題となっていた。本課題は、ミクロキスティスが有する結合性細胞外多糖類(TB-EPS)量を制御し、群体サイズの拡大によって浮揚性を向上させることに成功した学術的に特徴のある研究である。ミクロキスティスの群体形成および浮揚性能を利用するため、動力源を一切必要としない環境に負荷のかからない捕集除去手法として期待され、社会的にも意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：This study developed the novel collection and removal method using buoyant ability of harmful algal blooms (Microcystis) occurred in eutrophic lakes. Controlling the amount of tightly-bound extracellular polysaccharides (TB-EPS), which contribute to colony formation of Microcystis, and cation in solution, we succeeded the promotion of Microcystis colony size expansion and buoyancy. Also, we successfully controlled the buoyancy depending the presence or absence of light irradiance, indicating the path to further research development for the construction of a method for collecting and removing algal blooms.

研究分野：土木環境システム

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の影響により、湖沼での有毒藍藻類 (アオコ) の発生頻度の高まりが世界各国で危惧されている (H. K. Hudnell, *Toxicon*, 2010)。アオコの除去方法の一つとして知られる吸引法は、浮揚性のあるアオコを水面で吸引除去する手法であり、国内外の多くの湖沼で実施されている。しかしながら、水中には浮揚性の低い細胞も存在しており、これがやがて浮揚性を高めてアオコを再形成するため、吸引法によるアオコ抑制効果の持続性は非常に低い。吸引法による除去効果を高めるには、アオコを効率的に水面に浮揚させる必要があるが、そのような手法は皆無であるのが現状である。

アオコの代表種であるマイクロキスティスは、細胞内にガス胞を有し、光合成と呼吸によって増減する炭水化物量とのバランスにより浮揚性を示す。また、マイクロキスティスは細胞外多糖類 (Extracellular polysaccharides; EPS) を分泌し、EPS に被われる形で群体を形成するとともに、群体サイズを大きくすることで浮揚速度を高めている (ストークスの法則) (C. S. Reynolds, *Hydrobiologia*, 2007)。しかしマイクロキスティスを室内で培養すると、EPS の分泌量は減少し、群体形成能が失われ、さらに浮揚性も示さなくなる。これを、上述した浮揚性の低いマイクロキスティスと同質の細胞と捉えたとすると、室内培養したマイクロキスティスの EPS の分泌能と群体形成能はともに低下していると予想される。従って、EPS の分泌量を増加させ、群体形成を促すことができれば、マイクロキスティスに浮揚性を与えられると予想される。

申請者はこれまで、湖沼から採取したアオコから EPS を単離し、この EPS と金属カチオン (Ca^{2+} : 1,000 mg/L) 濃度を調整した培養液にて、群体形成能と浮揚性能を失ったマイクロキスティス (単細胞株) を培養することで、単細胞株の群体形成に成功している (M. Sato and Y. Amano *et al.*, *Limnology*, 2017; *Environ. Eng. Sci.*, 2017)。また、細胞内の炭水化物量の消費を促す光量を変化させることで、単細胞株の細胞重量が減少し、浮揚性が向上することも示唆している (杉本・天野ら, 環境情報科学論文集, 2014)。これらの研究から、細胞重量を減少させ、かつ群体を形成もくしは群体サイズを拡大することができれば、実際のアオコを短時間で水面に浮揚・捕集することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、群体形成と細胞重量減少によるマイクロキスティスの浮揚性を向上させることを目的とし、アオコを効率的に捕集除去できる技術開発への応用を最終目標とした。これまでの研究において、マイクロキスティスの群体を形成させるために必要な金属カチオン (Ca^{2+}) 濃度は 1,000 mg/L であり、この濃度は実湖沼の濃度と比べて 10~100 倍ほど高い。本研究では、 Ca^{2+} とともに Mg^{2+} を同時添加することで、群体形成に必要な金属カチオン濃度の低減を試みた。

3. 研究の方法

(1) アオコ試料の採取

アオコ試料は茨城県千波湖にて採取した。表層 (~5cm) に集積したアオコをポリ容器に採取し、直ちに研究室に持ち帰った。その後、使用するまで冷暗所にて保存した。顕微鏡により試料の観察を行ったところ、アオコを構成する藍藻類のほとんどがマイクロキスティス属であった。

(2) EPS の単離

EPS は、細胞との結合力に応じて可溶性 EPS (Soluble EPS; SL-EPS)、弱結合性 EPS (Loosely-bound EPS; LB-EPS) および強結合性 EPS (Tightly-bound EPS; TB-EPS) に分類される。本研究では、塩化ナトリウムを用いた NaCl-熱処理抽出法にて TB-EPS を抽出し、エタノール沈殿、凍結乾燥操作を経て、粉末試料として単離した。単離した TB-EPS の表面化学・物性を調べるため、熱重量示差熱分析 (TG-DTA) により表面官能基測定を、また TB-EPS 水溶液中の単糖濃度および粘性について分析を行った。

(3) アオコの浮揚性実験

水溶液中のカチオン (Ca^{2+} および Mg^{2+}) 濃度および TB-EPS 濃度調整がアオコ (マイクロキスティス属) の群体形成および浮揚性に及ぼす影響を調べるために、浮揚実験を行った。培養液として Tris buffer 溶液 (500 mg/L, pH 8.0) を使用した。培養液中の Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度をそれぞれ 250 mg/L に、TB-EPS 濃度を 100 mg/L に調整し、4 種類の培養液 (Control 溶液, TB-EPS 溶液, Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 溶液, TB-EPS・ Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 溶液) にてアオコを培養した。培養温度および照度は、それぞれ 25°C および 5,000 lux とした。培養時間は 3 時間とし、培養終了時における各培養液の上層 (25 mL) および下層 (25 mL) 中のマイクロキスティス細胞を計数した。このデータを基に、培養槽上層に存在しているマイクロキスティスの割合を示す相対浮揚率 (RB_{50} [%]) を算出した。なお、マイクロキスティスが培養槽の上下層に均一に分散しているときの RB_{50} 値は 50% を示す。

次に、光を長時間照射したマイクロキスティスと暗所に静置したマイクロキスティスを用いて浮揚実験を行い、光が浮揚性に及ぼす影響を調査した。前培養として、採取したアオコ (マイクロキスティス) を 10,000 lux もしくは 0 lux, 25°C で 24 時間培養した。浮揚性実験には、窒素やリンなどの成分を含む WC 培地を用いた。前培養にて得られたマイクロキスティスを WC 培地に植え

継ぎ、15 分間培養した。培養後、培養槽上層および下層中の細胞密度を計数して、相対浮揚率 RB_{25} (%)を算出した。なお、ミクロキスティスが培養槽の上下層に均一に分散しているときの RB_{25} 値は 25%を示す。

4. 研究成果

(1) TB-EPS の表面化学・成分分析

熱重量示差熱分析 (TG-DTA)により得られた TB-EPS 試料の DTG 曲線を Fig. 1 に示す。また比較試料として、SL-EPS, LB-EPS および TB-EPS の混合物である EPS (Mixed EPS; MX-EPS)の DTG 曲線も同図に記した。TB-EPS および MX-EPS とともに、80 ~100°C においてピークが見られる。これは、EPS 試料中の水あるいはエタノール沈殿によって残余したエタノールに起因するものと考えられる。また 250-270°C 付近に見られるピークはカルボキシ基の分解に起因するものと考えられ (Y. F. Jia and K. M. Thomas, Langmuir, 2000)。2つの試料を比較すると、このピークは TB-EPS の方が MX-EPS より明らかに大きい。したがって、TB-EPS 中にはより多くのカルボキシ基が存在していると推察される。

各 EPS 濃度を 5000 mg/L に調整し、EPS 構成糖の単糖分析を HPLC にて行った。その結果を Table 1 に示す。それぞれの EPS 水溶液には、ガラクトuron酸 (GalA), マンノース (Man), グルコース (Glu), アラビノース (Ara), キシロース (Xyl), フコース (Fuc)およびラムノース (Rha)が存在しており、ガラクトース (Gal)は TB-EPS 水溶液にのみ検出された。これらの単糖のうち、TB-EPS 水溶液においてグルコース (120 mg/L) およびガラクトuron酸 (55.8 mg/L)の含有量が多いことがわかった。全単糖濃度は MX-EPS より TB-EPS 水溶液の方が高いことから、カルボキシ基を有するウロン酸のような酸性糖も多く含有していると予想される。

Table 1. Monosaccharides contents of TB-EPS and MX-EPS

Sample	Identified monosaccharides (mg/L)							
	GalA	Gal	Man	Glc	Ara	Xyl	Fuc	Rha
TB-EPS	3.55	0.00	4.77	4.80	1.72	5.85	4.94	3.33
MX-EPS	55.8	12.9	29.8	120	6.38	19.7	36.3	28.8

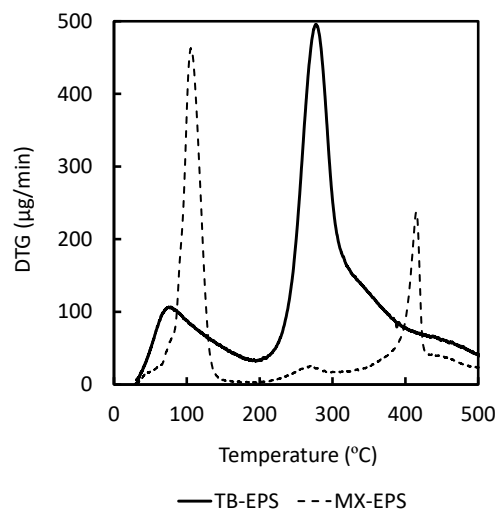


Fig. 1. DTG curves of TB-EPS and MX-EPS extracted from algal blooms by different methods.

TB-EPS が有する粘性を調べるために粘度測定を行った。Tris buffer 溶液 (500 mg/L, pH 8.0)に TB-EPS (100 mg/L), カチオン (Ca^{2+} および Mg^{2+} : それぞれ 250 mg/L), およびそれらを添加したときの溶液の粘度は、それぞれ 1.08, 1.01 および 1.11 mPa·s となり、Tris buffer 溶液の粘度 (Control: 1.00 mPa·s)と比較すると、TB-EPS を添加することで粘度が増加し、さらに TB-EPS に $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ を加えることで粘度が増加することがわかった。上述した通り、TB-EPS は表面にカルボキシ基を有する高分子であるため、TB-EPS の存在により水溶液の粘度が高まる。その水溶液に $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ を加えると、TB-EPS 表面のカルボキシ基と $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ が架橋し、より大きなポリマーへと変化したことで溶液の粘度が増加したと推察される。

以上の結果から、TB-EPS にはこれまでの研究にて抽出してきた MX-EPS より多くのカルボキシ基を有し、水溶液中のカチオン (Ca^{2+} および Mg^{2+})と架橋し、溶液の粘度を増加させる作用があることが明らかとなった。したがって、アオコ (ミクロキスティス属)が存在する水溶液中に TB-EPS およびカチオンを添加することにより、群体を形成しているミクロキスティスはその群体サイズを拡大するものと予想される。以下の実験では、群体サイズの拡大に伴う浮揚性の変化について検討した。

(2) アオコの浮揚性に及ぼす TB-EPS とカチオンの影響

Control (Tris buffer)溶液, TB-EPS 溶液, $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 溶液および TB-EPS $\cdot Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 溶液にてアオコ (ミクロキスティス)を培養し、その後、培養槽上層 (25 mL)および下層 (25 mL)における細胞密度を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。上層の細胞密度はすべての培養液で初期細胞密度 (10^7 cells/mL)よりも高く、また下層部の細胞密度はすべて初期細胞密度よりも低かった。上層に着目すると、ミクロキスティスの細胞密度は、Control 溶液 < TB-EPS 溶液 < $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 溶液 < TB-EPS $\cdot Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 溶液の順で増加した。これらの溶液において、全ミクロキスティス細胞のうち上層 (50%)に存在する細胞の割合を示す相対浮揚率 (RB_{50})を算出した。その結果を Fig. 3 に示す。

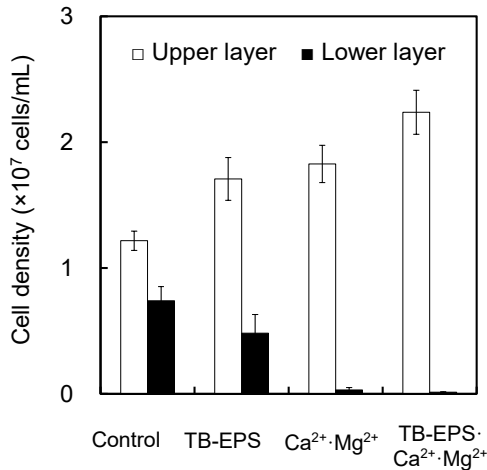


Fig. 2. Cell density of algal blooms (*Microcystis*) in the upper and lower layer in each medium.

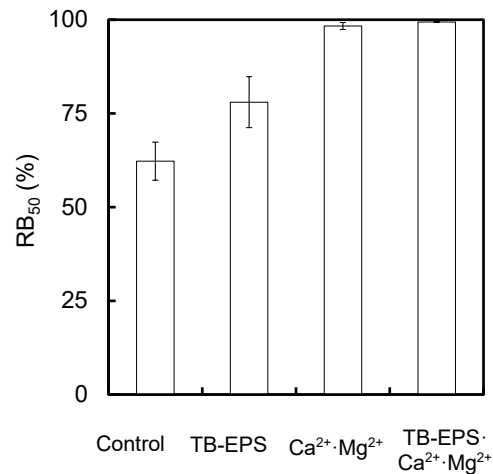


Fig. 3. Relative buoyancy (RB₅₀) of algal blooms (*Microcystis*) in each medium.

Control 溶液の RB₅₀ は 62% であり、採取したマイクロシステキスが強い浮揚性を有していることを示している。TB-EPS 溶液では、RB₅₀ 値が 62% からおよそ 75% にまで増加し、さらに Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液および TB-EPS · Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液では、RB₅₀ 値がおよそ 90% 以上にまで増加した。しかしながら、後者 2 つの溶液における浮揚性には明確な差は見られなかった。各培養液における上層のマイクロシステキスの群体サイズ (群体面積として) を算出したところ、RB₅₀ 値と同様に Control 溶液 < TB-EPS 溶液 < Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液 < TB-EPS · Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液の順に大きくなった。その平均値はそれぞれおよそ 740, 1130, 1270 および 1490 μm² となり、Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液および TB-EPS · Ca²⁺ · Mg²⁺ 溶液の群体サイズには大きな差が認められた。群体サイズに差異が認められたにも関わらずほぼ同じ浮揚性を示した理由について、本浮揚実験では、培養槽の上層および下層の容量をそれぞれ 25 mL とした相対浮揚率 RB₅₀ にてマイクロシステキスの浮揚性を評価したことが原因の一つであると考えられる。したがって、浮揚性の評価において、上層の容量を 5 mL あるいは 10 mL とした RB₁₀ や RB₂₀ 値で評価すればより明確に浮揚性を評価できる可能性がある。また浮揚実験における培養時間を 3 時間としたが、この時間が長すぎたことも浮揚性に差異が生じなかった原因であると考えられる。

以上の結果から、TB-EPS およびカチオン添加による濃度調整によってアオコ (マイクロシステキス) の群体サイズ、ならびに浮揚性が向上することが見出された。

(3) アオコの浮揚性に及ぼす光照射の影響

光照射および光無照射条件にてマイクロシステキスを培養した後、浮揚実験を行った。実験後の培養槽上層および下層におけるマイクロシステキスの細胞密度を Fig. 4 に示す。光照射および無照射系において、初期細胞密度よりも上層の細胞密度は高く、また下層の細胞密度は低かった。上層の細胞密度を比較すると、光照射系よりも光無照射系の方がおよそ 3 倍高く、逆に下層は 2 倍程度低い値を示した。Fig. 5 に各系の細胞密度から計算した RB₂₅ の値を示す。光照射系および光無照射系の RB₂₅ はそれぞれ 29 および 69% を示し、マイクロシステキスを光無照射条件にて培養するだけで浮揚性が著しく向上することがわかった。またそれぞれの系におけるマイクロシステ

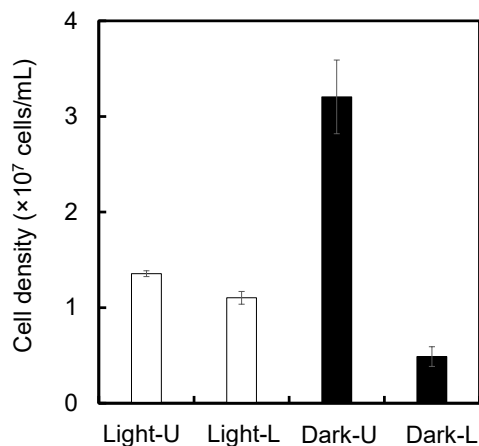


Fig. 4. Cell density of algal blooms (*Microcystis*) in the upper (U) and lower (L) layer after 24 h-light and 24 h-dark cultivation.

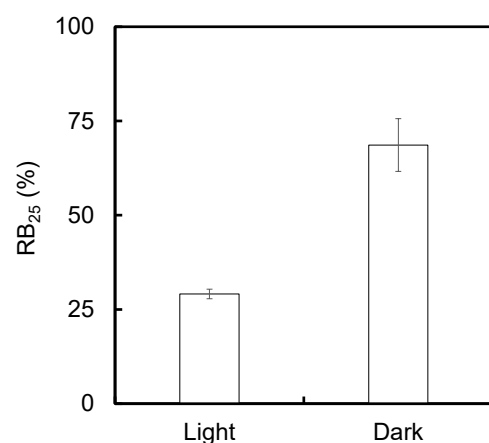


Fig. 5. Relative buoyancy of algal blooms (*Microcystis*) after 24 h-light and 24 h-dark cultivation.

イスの群体サイズを計測したところ、それぞれお 5958 および 5565 μm^2 となり、大きな差は見られなかった。このため、光照射の有無による浮揚性の向上は、群体サイズの拡大ではなく、別の原因、すなわちマイクロキスティス細胞内の炭水化物量あるいはガス胞に起因している可能性がある。

以上の結果から、マイクロキスティスの浮揚性は光照射の有無で大きく変化することが見出された。この浮揚性の変化に対する群体のサイズの影響はほぼないと言えることから、今後、光無照射条件で培養したマイクロキスティスに対し、TB-EPS およびカチオンを用いた群体サイズの拡大を図ることができれば、より効果的なアオコの捕集除去方法になり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kai Wei, Sanghyeob Jung, Yoshimasa Amano, Motoi Machida	4. 巻 1
2. 論文標題 Control of the buoyancy of <i>Microcystis aeruginosa</i> via colony formation induced by regulating extracellular polysaccharides and cationic ions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SN Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 1573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42452-019-1637-3	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 Sakurai Shohei, Omori Ken, Amano Yoshimasa, Machida Motoi	4. 巻 16
2. 論文標題 Removal of <i>Microcystis</i> blooms using enhanced colony formation and buoyancy by controlling extracellular polysaccharides and cation concentrations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Science and Technology	6. 最初と最後の頁 4793-4802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13762-019-02289-4	査読の有無 有
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 Omori Ken, Datta Tania, Amano Yoshimasa, Machida Motoi	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of different types of extracellular polysaccharides isolated from cyanobacterial blooms on the colony formation of unicellular <i>Microcystis aeruginosa</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 3741-3750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11356-018-3892-z	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Wei Kai, Amano Yoshimasa, Machida Motoi, Asukabe Hirohiko, Harada Ken-ichi	4. 巻 229
2. 論文標題 Effects of light and potassium ion on buoyancy regulation with gas vesicle in a cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Water, Air, & Soil Pollution	6. 最初と最後の頁 352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11270-018-4010-z	査読の有無 有
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 Kai Wei, Yoshimasa Amano, Motoi Machida	4. 巻 232
2. 論文標題 The effect of pH and light on the colony formation and buoyancy of <i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX-2061	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water, Air, & Soil Pollution	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11270-021-05066-7	査読の有無 有
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 Masato Chujo, Jingnan Li, Tania Datta, Yoshimasa Amano, Motoi Machida	4. 巻 38
2. 論文標題 A competitive growth model for the simulation of cyanobacterial blooms under eutrophic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Engineering Science	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ees.2020.0056	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kai Wei, Yoshimasa Amano, Motoi Machida	4. 巻 56
2. 論文標題 Impacts of different extracellular polysaccharides on colony formation and buoyancy of <i>Microcystis aeruginosa</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annales de Limnologie - International Journal of Limnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1051/limn/2020026	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山田 稯武, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 アオコ原因種 <i>Microcystis</i> から抽出した細胞外多糖類の成分分析および物性評価
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshimasa Amano, Kai Wei, Shohei Sakurai, Masato Chujo, Motoi Machida
2. 発表標題 Removal of cyanobacteria from lake water using enhanced buoyancy caused by enlargement of colony size
3. 学会等名 The 9th Indonesia-Japan Joint Scientific Symposium (IJSS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井翔平, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 有害藍藻類の群体形態制御によって変化する浮揚特性と新たなアオコ除去方法の構築
3. 学会等名 化学工学会横浜大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kai Wei, Yoshimasa Amano, Motoi Machida
2. 発表標題 Control of the buoyancy of <i>Microcystis aeruginosa</i> via colony formation induced by regulating the amount of extracellular polysaccharides and cationic ions
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (WET2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄭相協, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 金属イオンおよびEPSの濃度制御によるミクロシスティの浮揚性を利用した除去法の検討
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井翔平, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 異なる方法で抽出した有毒藍藻 (Microcystis) 由来の細胞外多糖類の成分組成と特性評価
3. 学会等名 日本化学会第98回春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋寛陽, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 光制限に基づくアオコ形成種 ミクロキスティスの浮揚性制御方法の検討
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成山雄基, 天野佳正, 町田基
2. 発表標題 アオコ形成種アナベナの発芽を促す底泥の微生物由来代謝物の影響評価
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

環境化学研究室のホームページ
<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb15/index.html>

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	町田 基 (Machida Motoi) (30344964)	千葉大学・総合安全衛生管理機構・教授 (12501)	

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			
米国	Tennessee Technological University			