

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15892

研究課題名（和文）高アンモニア耐性微細藻類による環境水中の栄養塩負荷削減・リン回収システムの研究

研究課題名（英文）Removal and recovery of phosphorus from nutrient-rich environmental water using polyphosphate-accumulating microalgae with ammonium tolerance

研究代表者

片山 智代（Katayama, Tomoyo）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任助教

研究者番号：10755656

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）：微細藻類を利用し、環境水中のリン・アンモニアの除去とともにリン回収を最大化させる環境制御技術確立することを目指した。マレーシアや日本から単離した151株を対象に、アンモニア耐性を有し且つ増殖能の高い藻株(11株)を選定し、ポリリン酸(PolyP)蓄積能を調べた。PolyPは緑藻のSLG4-06株で最も高い蓄積量を示したことから、リン除去・回収の有望株と判断された。当該株のPolyP蓄積能に対する光強度と温度の影響を調べた。その結果、増殖速度とPolyP量は25・250  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件下で最大となり、増殖が最も活発な時期に細胞内にPolyPとしてリンを蓄積しやすいことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PolyP蓄積微細藻類の探索を行った研究例は希少な中、本研究では珪藻やハプト藻に比べ、緑藻はPolyPを蓄積しやすいことを明らかにした。本研究で選定されたSLG4-06株は、未記載種（緑藻クロレラ目の新属）であることがわかり、PolyP蓄積藻類として初めての報告である。今後は、細胞内へのリン酸塩の取り込みをより短期間で行う培養技術を開発し、リン除去率及びPolyP蓄積率のさらなる向上に挑戦し、水質環境汚染およびリン資源問題の解決に寄与する研究を展開していきたい。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to remove phosphate and ammonia from the nutrient-rich environmental water and recover phosphorus using microalgae. Among 151 strains isolated from Malaysia and Japan, 11 strains were selected for their ammonia tolerance and high growth potential. The highest accumulation of PolyP was observed in strain SLG4-06, which was determined to be a promising strain for phosphorus removal and recovery. The effects of light intensity and temperature on PolyP accumulation capacity were examined for this strain. The results showed that the growth rate and the amount of PolyP were maximum at 25 and 250  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , indicating that the SLG4-06 tended to accumulate phosphorus as PolyP in the cells during the exponential phase.

研究分野：海洋生物学

キーワード：微細藻類 リン回収 ポリリン酸 アンモニア 環境負荷低減 廃水

## 1. 研究開始当初の背景

リンは生物の必須ミネラルであり、作物肥料にも欠かせない成分であるが、リン鉱石の枯渇による食糧危機が危惧されている。一方で、環境中への負荷が高まっているリンは河川などの富栄養化を引き起こす汚染物質として問題視されており、富栄養化防止にはその主要な発生源でのリン除去を行うことが必須である。環境中に豊富にあるリン酸をバクテリアが必要以上に取り込み、リン酸の重合体である、ポリリン酸(PolyP)の形で細胞内に蓄積することは知られていたが、微細藻類でも同様のことが起こることが近年明らかとなってきた。PolyPは肥料に用いると作物の収量増加や品質向上など多数の効果が得られるため、革新的な肥料の一つとして注目されている。また、微細藻類は抗酸化物質であるカロテノイドや機能性脂質の生産も期待されている。しかし、ここで問題となるのがリンの他に廃水に豊富に含まれるアンモニア態窒素である。微細藻類の増殖には窒素源を必須とし、アンモニア態窒素は硝酸態窒素よりも窒素同化効率が高いが、高濃度のアンモニア存在下では多くの微細藻類で成長阻害が起こってしまう他、魚などの水中生物に対しても毒として作用する。人類にとって非常に有用である微細藻類の中でも高濃度のアンモニア耐性を有する藻類を用い、産業施設などからの廃水浄化に利用してリンを回収するシステムができれば、環境浄化に加え、肥料や機能性脂質として利用可能な藻類バイオマスの生産を同時に行う効果をねらえる。

リン資源問題を解決する上で微細藻類の作る PolyP は重要な物質であるが、PolyP 蓄積に関する知見は未だ乏しい。人工培地における微細藻類の PolyP 蓄積に影響を及ぼす環境因子としてリン酸濃度や光量、温度、イオウの欠乏が報告されているが、報告例は数種の緑藻類に限られている上、これら環境因子の相互的な影響についてはこれから研究が始まろうとしている段階である。ましてや廃水からのリン資源回収に関する研究はなされていない。微細藻類によるリン回収システムを構築するには、多様な藻類のリン取り込み能・蓄積能を把握し、各環境因子の影響を総合的に明らかにし、実際の廃水を用いた微細藻類によるリン回収の有用性を評価する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、アンモニア耐性の高い微細藻類を利用して、環境中に負荷されるリン・アンモニアの除去とともにリンの回収を最大化させる構築環境制御技術を確立することを目的とした。生物多様性の高い水域から単藻株を確立し、アンモニア耐性が高く、細胞内リン蓄積率の高い微細藻類のスクリーニングを行った。細胞内に蓄積される PolyP に関する研究は近年始まったばかりであり、これまでリン蓄積能が高いと報告されてきた微細藻類は藻類保存施設に保有されている株のみであり、研究対象は極めて限られている。野外にはこれらの能力を高く有する藻類が存在する可能性は十分にあるが、高性能藻類の探索は行われてきていない。本研究では世界 12ヶ国のメガダイバシティ国の一つであるマレーシアを中心に現地藻類を単離培養することでリン蓄積能の高い藻類を獲得し、これまでになく高性能藻株を見つけ出すことが期待できる。さらに本研究では、スクリーニングにより選定された高性能藻類株を対象に、細胞内リン蓄積率に及ぼす環境因子の影響について人工廃水を用いて調べた。

## 3. 研究の方法

本研究は(1)多様な単藻株を確立し、(2)アンモニア耐性を有し、且つ高いリン蓄積能を有する高性能な藻株のスクリーニングを行う。選定した高性能藻株を対象に(3)リン蓄積率に及ぼす環境因子の影響を把握し、廃水からの栄養塩除去・リン回収の有用性評価実験を行った。これにより、高性能微細藻類を用いたリン・アンモニア除去およびリン回収能が最大となる環境制御技術を確立することを目指した。

### (1) 多様な単藻株の確立

マレーシアや日本などの熱帯・温帯地域において海洋・河川・湖沼の表層水や栄養塩負荷の高い水域(計 15 地点)から藻類群集を採集し、従来法(顕微鏡下でのマイクロピペット法・寒天塗布によるコロニー分離法)を用いて藻類の単離を行った。

### (2) 高性能藻株のスクリーニング

確立した単藻株からアンモニア耐性を有する藻類を絞り込み、次にリン蓄積能の高い藻類(高性能藻株)のスクリーニングを実施した。アンモニア耐性の評価は、硝酸ナトリウムを窒素源とした f/2 培地と、塩化アンモニウムを窒素源とした改変 f/2 培地(両培地の窒素濃度は同じ 19.2 mg N L<sup>-1</sup>に調整)での増殖を 750 nm の吸光度(OD<sub>750</sub>)をもとに比較した。培養は温度 25°C、光量 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、明暗周期 12 時間の下、48 穴のウェルプレートで行った。

選定されたアンモニア耐性を有する藻類株を対象に、これまで高いリン蓄積率が報告されている既知種(*Parachlorella kessleri*, NIES-2152)と比較しながら、PolyP 蓄積能の評価を行った。PolyP と全リンの含有量は各抽出工程を経て、比色定量法によるリン酸塩濃度から算出した(Ota et al. 2016)。培養はエアレーションによる攪拌を行いながら、1 L の丸型ボトルで行った。

た。

### (3) リン蓄積率に及ぼす環境因子の影響・人工廃水のリン除去率の評価

高性能藻株を対象に、高濃度リン酸存在下で温度・光量の条件が異なる計6系列において人工廃水を用いて20日間培養し、PolyP蓄積能に与える影響を評価した。人工廃水の組成は  $K_3PO_4$  15.6 mg L<sup>-1</sup>,  $(NH_4)_2SO_4$  110.0 mg L<sup>-1</sup>,  $NaNO_2$  7.5 mg L<sup>-1</sup>,  $KNO_3$  73.4 mg L<sup>-1</sup> (de Alva et al. 2021) と、さらに f/2 培地の微量元素 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.022 mg L<sup>-1</sup>,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.18 mg L<sup>-1</sup>,  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$  0.014 mg L<sup>-1</sup>,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  3.15 mg L<sup>-1</sup>, EDTA-2Na 4.36 mg L<sup>-1</sup>,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  6.3 μg L<sup>-1</sup>,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  9.8 μg L<sup>-1</sup>) を加えた。PolyP と全リンの蓄積量は培養 6, 12, 20 日目に試料を採集した。同時に人工廃水中の栄養塩濃度 (リン酸塩アンモニウム塩硝酸+亜硝酸塩) を測定し高濃度なリンや窒素をどれだけ除去できるのか評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 高性能藻株のスクリーニング

マレーシアおよび日本の淡水域～海水域から単離された151株の藻類について、まずアンモニア耐性能のスクリーニングを行った。47株においてアンモニア存在下で増殖阻害が見られず、その中でも高い増殖速度を示した11株 (緑藻6株, 珪藻3株, ハプト藻1株) をアンモニア耐性株として選定した (表1)。

これら11株を対象にPolyP蓄積量を調べた結果、珪藻やハプト藻 (0.002–0.025 mg L<sup>-1</sup>) よりも緑藻 (0.048–0.209 mg L<sup>-1</sup>) で高い傾向を示した (図1)。最も高いPolyP蓄積量を示したのはSLG4-06株 (緑藻クロレラ目の未記載種) であり、対象株の *P. kessleri* と同等の値を示した。全リンに対するPolyPの割合についてもSLG4-06株が15.7±5.8%と高い値を示した。当該株をDAPI染色し蛍光顕微鏡下で観察するとPolyPが黄色く発色しているのが確認できた (図2)。これらの結果から、SLG4-06株はポリリン酸としてリンを細胞内に蓄積しやすいことが示唆され、リン回収の有望株として判断された。

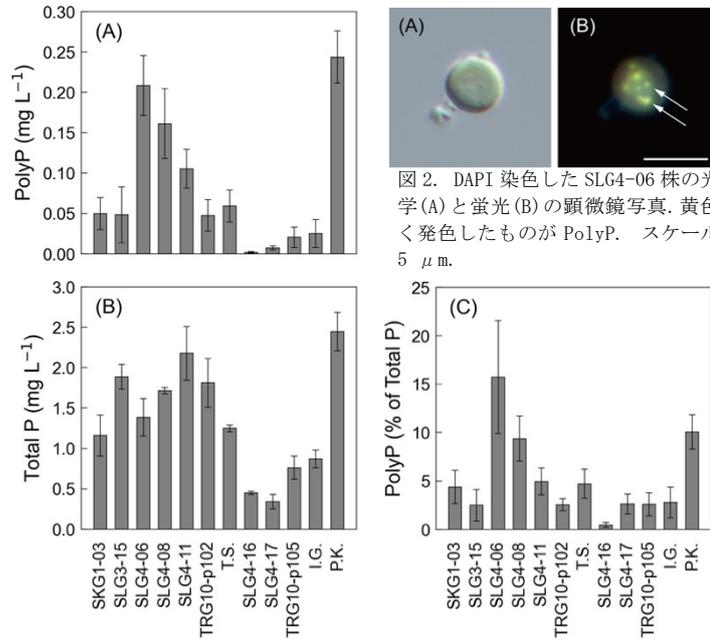


図1. 11候補株とコントロール株のPolyP量 (A), 全リン量 (B), 全リンに対するPolyPの割合 (C). T.S. *T. suecica*, I.G. *I. galbana*, P.K. *P. kessleri* (対象株)。

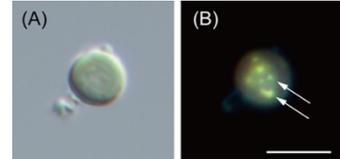


図2. DAPI染色したSLG4-06株の光学 (A) と蛍光 (B) の顕微鏡写真. 黄色く発色したものがPolyP. スケール5 μm.

表1. 選定された11候補株.

Strain	Class	Location	Habitat
<i>Chlamydomonas</i> sp. SKG1-03	Chlorophyceae	Wakamatsu Island, Nagasaki, Japan	Marine
<i>Chlorella sorokiniana</i> SLG3-15	Trebouxiophyceae	Shrimp Pond, Selangor, Malaysia	Brackish
SLG4-06 (Unidentified)	Trebouxiophyceae	Remis Beach, Selangor, Malaysia	Marine
<i>Picochlorum</i> sp. SLG4-08	Trebouxiophyceae	Remis Beach, Selangor, Malaysia	Marine
<i>Picochlorum</i> sp. SLG4-11	Trebouxiophyceae	Remis Beach, Selangor, Malaysia	Marine
<i>Oocystis heteromucosa</i> TRG10-p102	Trebouxiophyceae	Shrimp Pond, Terengganu, Malaysia	Brackish
SLG4-16 (Unidentified)	Bacillariophyceae	Remis Beach, Selangor, Malaysia	Marine
<i>Halamphora</i> sp. SLG4-17	Bacillariophyceae	Remis Beach, Selangor, Malaysia	Marine
<i>Thalassiosira weissflogii</i> TRG10-p105	Bacillariophyceae	Shrimp Pond, Terengganu, Malaysia	Brackish
<i>Tisochrysis lutea</i>	Prymnesiophyceae	Costal area, Selangor, Malaysia	Marine

### (2) リン蓄積率に及ぼす環境因子の影響

次に、SLG4-06株のPolyP蓄積率が最大となる環境因子の組み合わせを調べるため、高濃度リン存在下で温度 (15, 25°C) ・光強度 (50, 100, 250 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) 条件下で20日間培養した。本研究の計画当初は既存研究から硫黄の制限条件も環境因子の一つとして調査する予定であったがSLG4-06株は海産性藻類であり海水中に含まれる硫黄を制御することは難しいため本実験で扱う環境因子からは除外することとした。

増殖速度は15°Cよりも25°Cで高く、250 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>で最大値を示した (図3)。乾燥重量あた

りの PolyP 量の経時変化を調べたところ、25°Cでは培養6日目から20日目にかけて減少し、15°Cでは培養時間の経過とともに増加することが明らかとなった(図4)。さらに、PolyP量は25°Cおよび250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で最大値を示したことから、増殖が最も活発な時期に細胞内に PolyP としてリンを蓄積していることが考えられる。

### (3)人工廃水のリン除去率

25°C・250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下でのリン酸塩除去率は、培養6日目に27%、12日目に65%、20日目に100%であった。アンモニウム塩除去率は培養6日目に32%、12日目に97%、20日目に100%硝酸+亜硝酸塩の除去率は培養6日目に4%、12日目に48%、20日目に95%であり窒素源としてアンモニアを優先的に細胞内へ取り込んでいることがわかった。いずれの栄養塩も20日目に100%近く除去されたが PolyP 蓄積率が高くなる培養初期6日目では50%以下と低かった。

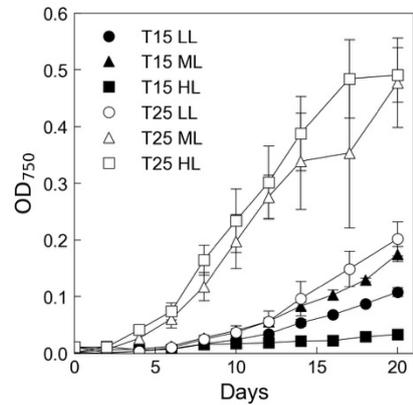


図3. 異なる温度と光条件下における SLG4 株の増殖曲線. T15, T25 は 15°C, 25°Cを, LL, ML, HL は 50, 100, 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を示す.

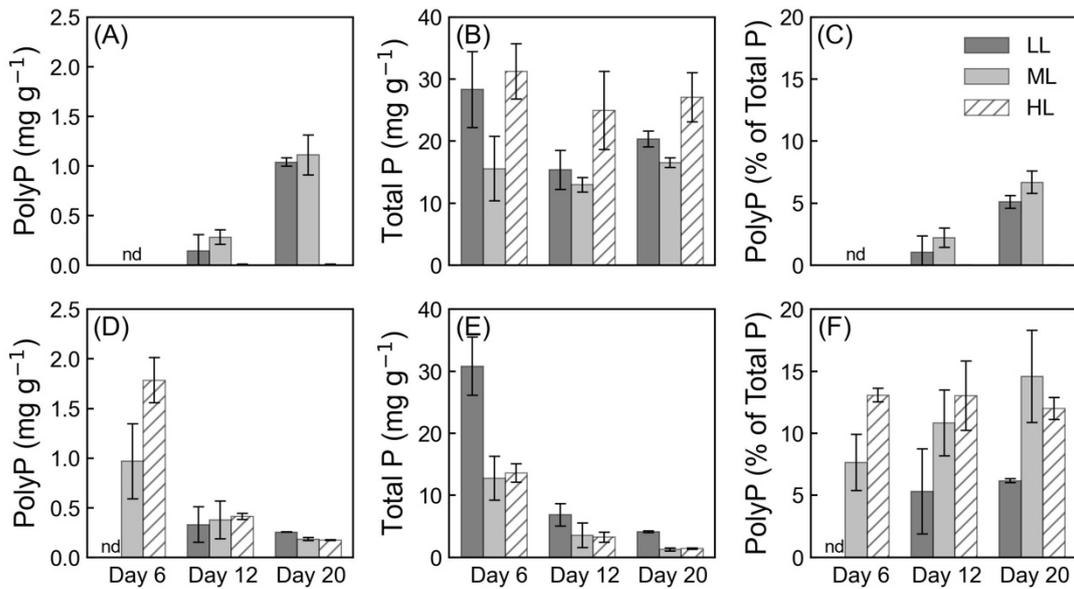


図4. 異なる温度と光条件下における SLG4 株の PolyP 量 (A, D), 全リン量 (B, E), 全リンに対する PolyP の割合 (C, F). 15°C (A, B, C), 25°C (D, E, F). LL, ML, HL は 50, 100, 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ を示す.

本研究によりマレーシア及び日本の淡水域～海水域から単離された 150 以上の微細藻類株のうち、マレーシアの海産性 SLG4-06 株は PolyP 蓄積量が高く、且つアンモニア耐性を有することから、廃水のリン除去・回収の有望株として選定された。また PolyP 蓄積藻類の探索を行った研究例は希少な中本研究では珪藻やハプト藻に比べ緑藻は PolyP を蓄積しやすいことを明らかにした。SLG4-06 株の PolyP 蓄積率は増殖が最も活発な時期に細胞内に PolyP としてリンを蓄積しやすいことが明らかになった。当該株は未記載種(緑藻クロレラ目の新属)であることがわかり、PolyP 蓄積藻類として初めての報告である。今後は細胞内リン酸塩取り込みをより短期間で行う培養技術を開発しリン除去率及び PolyP 蓄積率のさらなる向上に挑戦したい。

### <引用文献>

- Ota S., Kawano, S. (2006) Extraction and molybdenum blue-based quantification of total phosphate and polyphosphate in *Parachlorella*. Bio Protocol, 7: e2539.
- de Alva, M.S., Pabello, V. M. L. (2021) Phycoremediation by simulating marine aquaculture effluent using *Tetraselmis* sp. and the potential use of the resulting biomass. Engineering, 41: 102071.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoyo Katayama, Norazira Abdu Rahman, Helena Khatoon, Nor Azman Kasan, Norio Nagao, Yuichiro Yamada, Kazutaka Takahashi, Ken Furuya, Mohd Effendy Abd Wahid, Fatimah Md. Yusoff, Malinna Jusoh	4. 巻 27
2. 論文標題 Bioprospecting of tropical microalgae for high-value products: n-3 polyunsaturated fatty acids and carotenoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture Reports	6. 最初と最後の頁 101406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aqrep.2022.101406	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 Katayama Tomoyo, Nagao Norio, Kasan Nor Azman, Khatoon Helena, Rahman Norazira Abdu, Takahashi Kazutaka, Furuya Ken, Yamada Yuichiro, Wahid Mohd Effendy Abd, Jusoh Malinna	4. 巻 323
2. 論文標題 Bioprospecting of indigenous marine microalgae with ammonium tolerance from aquaculture ponds for microalgae cultivation with ammonium-rich wastewaters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology	6. 最初と最後の頁 113 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiotec.2020.08.001	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 片山智代, Helena Khatoon, Mohd Effendy Abd Wahid, 高橋一生, 古谷研
2. 発表標題 高アンモニア耐性をもつポリリン酸蓄積微細藻類の探索
3. 学会等名 日本藻類学会第47回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoyo Katayama, Kazutaka Takahashi, Ken Furuya, Mohd Effendy Abd Wahid, Malinna Jusoh
2. 発表標題 Bioprospecting of polyphosphate-accumulating microalgae with ammonium tolerance for phosphorus recovery from wastewater
3. 学会等名 COSMOS International Conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyo Katayama, Norazira Abdu Rahman, Kazutaka Takahashi, Ken Furuya, Mohd Effendy Abd Wahid, Malinna Jusoh, Yuichiro Yamada
2. 発表標題 Bioprospecting for Malaysian indigenous microalgae as functional food sources
3. 学会等名 The 7th Conference of the International Society for Applied Phycology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoyo Katayama, Norazira Abdu Rahman, Kazutaka Takahashi, Ken Furuya, Mohd Effendy Abd Wahid, Malinna Jusoh
2. 発表標題 Bio-prospecting of tropical indigenous microalgae for the production of carotenoids and polyunsaturated fatty acids from Peninsular Malaysia
3. 学会等名 EcoSummit 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Muhammad Faiz Zakaria, Jessreen Tega, Noorazilah Haris, Tomoyo Katayama, Nadiah W Rasdi, Mohd Effendy Abd Wahid, Malinna Jusoh
2. 発表標題 Enhancement of selected high-value microalgae for lipids and carotenoids production
3. 学会等名 The 7th International Biotechnology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山智代, Helena Khatoon, Mohd Effendy Abd Wahid, 高橋一生, 古谷研
2. 発表標題 マレーシア養殖池から得られた高アンモニア耐性をもつ有用微細藻類の探索
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------