

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22930

研究課題名（和文）藻類の成長を促進する共生細菌の検索とその利用による高効率バイオマス生産技術の開発

研究課題名（英文）Screening of microalgae-growth promoting bacteria and their application for efficient microalgal biomass production

研究代表者

池 道彦（Ike, Michihiko）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：40222856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微細藻類と共生して成長促進させることのできる細菌（MGPB：microalgae-growth promoting bacteria）を活用した微細藻類バイオマス高効率生産技術の基礎を確立することを目的とし、*Euglena gracilis*を研究対象として、下水中からMGPBを検索し、そのMGPBとしての特性を調査した。研究結果から、*Cloacibacterium* sp. S9が*Euglena gracilis*の成長及びパラミロン生産を促進する能力を有する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

藻類は第3世代バイオマスといわれ、将来の再生型エネルギー資源や肥・飼料、バイオリファイナリ材料など、様々な用途における活用が期待されている。本研究の成果は、藻類バイオマス生産の高効率化を進めるにあたり大きな意義を有するものと期待される。また、本研究では、*Cloacibacterium*属の細菌が*Euglena gracilis*の成長及びパラミロン生産の促進作用を有することを世界で初めて明らかにすることができ、関連分野の学術発展にとっても意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to establish the basis for efficient microalgal biomass production technology using microalgae-growth promoting bacteria. To this end, this study screened potential MGPB from municipal wastewater, and examined their capabilities to promote the growth of *Euglena gracilis* and its and paramylon production. Consequently, this study succeeded in obtaining *Cloacibacterium* sp. S9 capable of promoting both the *Euglena gracilis* growth and paramylon production.

研究分野：生物環境工学

キーワード：微細藻類 バイオマス 成長促進細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

藻類は第3世代バイオマスといわれ、将来の再生型エネルギー資源や肥・飼料、バイオリファイナリ材料など、様々な用途における活用が期待されている。しかし、その実用化には幾つかの課題が残されており、特にバイオマス生産の大幅な低コスト化は最重要課題の一つである。この課題を克服するためには、排水・汚水のような安価な基質をオープンポンドなどの非滅菌条件下で用いて、これまでよりも高効率に藻類を培養することが求められる。他方、富栄養化する水域や排水を用いた藻類バイオマス生産は、汚水浄化や排水処理を兼ねることから、現状のバイオマスが有する問題の一部を解決し、かつ、低炭素社会実現にも貢献する高いポテンシャルを有している。

陸生の高等植物においては、その成長を促進する細菌 (PGPB: Plant-Growth Promoting Bacteria) が存在することが知られている。そのため、農学分野において研究・開発が活発に行われてきており、一部は農作物の bio-fertilizer などとして製剤化されてきた。他方、我々は、浮遊性及び抽水性の水生植物を用いた水質浄化及びバイオマス生産に関する研究を長年実施してきており、その一連の研究の中で、ウキクサなどの水生植物にもそれらの成長を促進する PGPB が存在することを明らかにし、研究を重ねてきた。その知見をもとに、同様に水中に生息する光合成生物である藻類においても、共生により成長を促進させることのできる細菌 (MGPB: Microalgae-Growth Promoting Bacteria) が存在する可能性があると考え、下水や排水中において複数の微細藻類の培養を検討したところ、いずれの藻類においても無菌系に比べて細菌群集の共存下において成長が有意に高くなることを観察し、下排水中に MGPB が存在する可能性のあることを見出した (引用文献、 )。藻類と MGPB との共生関係を明らかにし、MGPB を藻類バイオマス生産に合理的に利用することができれば、新たに多くのエネルギーや資源を投入することなく藻類の高効率生産を達成する革新的な手段になり得ると考えられる。

### 2. 研究の目的

上述した背景から本研究では、環境中から有望な MGPB をスクリーニングし、MGPB としての特性を明らかにするとともに、それらを活用した藻類バイオマス高効率生産技術の基礎を確立することを目的とした。

なお、本研究では、代表的な微細藻類として、*Euglena gracilis* を研究対象として用いることとした。*E. gracilis* は、アミノ酸やタンパク質、ビタミン類など 59 種類もの有用成分を蓄積することが明らかにされており、エネルギー資源だけでなく、健康食品や医薬品、家畜の飼料などへの利用も世界的に進められている。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Euglena gracilis* および培養条件

本研究では、国立環境研究所微生物系統保存施設より分譲された無菌の *E. gracilis* Z (NIES-48) 株を無菌的に継代培養し、実験に使用した。*E. gracilis* の継代培養には CYT 培地を用い、人工気象器内 (25℃, 16 時間明/8 時間暗条件) で 110 rpm で回転振盪培養を行った。細菌株との共培養の際には、16 時間明/8 時間暗条件を 24 時間暗条件に変更した。

#### (2) MGPB 候補株の分離及び同定

大阪府下の都市下水処理場より下水を採取し、下水中で *E. gracilis* を培養した。その培養液及び *E. gracilis* に付着した微生物を R2A 培地で培養することにより、細菌株を分離した。各細菌株は、16S rRNA 遺伝子配列に基づき系統分類学的に同定した。

#### (3) MGPB 候補株のスクリーニング

分離されたすべての菌株を対象として、小スケール (6 穴マイクロプレートを使用) で *E. gracilis* の成長への影響を評価した。*E. gracilis* は、3 日間の前培養の後、回収・洗浄し、グルコース (20 g/L) を添加した CYT 培地に  $2.0 \times 10^4$  cells/mL となるように懸濁し、6 穴プレートに 4.75 mL ずつ分注した。各菌株は、R2A 液体培地で前培養し、菌体を回収・洗浄し、CYT 培地に懸濁させ、濁度 (波長 600 nm での吸光度) が 0.01 となるように、*E. gracilis* を含むウェルに植種した。7 日間の培養後、Countess 自動セルカウンターを使用して *E. gracilis* の個体数を測定し、各菌株の植種による *E. gracilis* 成長促進の可能性を評価した。

#### (4) MGPB 有望株の *E. gracilis* バイオマス・パラミロン生産促進能の評価

(3) の検討において *E. gracilis* 成長促進の可能性が認められた菌株を対象として、フラスコスケール (50 mL 系) において同条件で培養を行い、7 日後の個体数、パラミロン蓄積量、有機物消費量を測定することにより、成長促進及びパラミロン生産への影響を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1)MGPB 候補株の分離、同定、成長促進能のスクリーニング

下水中で *E. gracilis* を培養後、その培養液及び *E. gracilis* から細菌株を分離した結果、表 1 に示す 20 菌株が分離された。

全分離菌株の *E. gracilis* 成長促進の可能性を調査した結果、図 1 に示すように、S1、S2、S9、SE2、SE11 の 5 菌株を植種した場合、無菌系に比べて *E. gracilis* の個体数が顕著に増加することが観察され、*E. gracilis* 成長促進作用を有する可能性が考えられた。一方、20 菌株のうち 10 菌株では、無菌系と比較して *E. gracilis* の個体数が顕著に低く、共生により *E. gracilis* の成長を抑制することが示唆された。特に、*E. gracilis* から分離した 11 菌株のうち 7 菌株が *E. gracilis* の成長を抑制した。ウキクサを用いた既往研究においては、ウキクサ表面に付着する細菌群集に宿主の成長を促進するものと抑制するものが共存していることが報告されているが(引用文献) *E. gracilis* 表面に付着する細菌群集でも同様であることが示唆された。

また、各菌株の系統分類と成長促進作用の関係をみると、*Pseudomonas* 属に分類された 4 株(S2、SE2、SE4、SE11)のうち 3 株が成長促進作用を有する可能性があり、同属が *E. gracilis* の成長促進作用を広く有する可能性が考えられた。一方、*Aeromonas* 属(2 菌株)では 1 菌株のみが成長促進作用を有し、*Comamonas* 属(4 菌株)と *Chryseobacterium* 属(2 菌株)では明確な成長促進作用を示すものは見られなかった。以上の結果から、さらに検討する必要はあるものの、各菌株の系統分類が *E. gracilis* への成長促進/抑制作用と関係している可能性が考えられた。

表 1 分離された菌株

分離源	菌株名	最近縁種 [ Accession 番号 ]( 相同性 )
培養後の下水	S1	<i>Aeromonas hydrophila</i> [ NR_119039 ]( 99.85% )
	S2	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> [ NR_169411 ]( 99.30% )
	S3	<i>Comamonas testosteroni</i> [ NR_029161 ]( 100.00% )
	S4	<i>Comamonas testosteroni</i> [ NR_029161 ]( 100.00% )
	S5	<i>Comamonas testosteroni</i> [ NR_029161 ]( 98.99% )
	S6	<i>Kinneretia asaccharophila</i> [ NR_115151 ]( 99.76% )
	S7	<i>Chryseobacterium gwangjuense</i> [ NR_135722 ]( 99.76% )
	S8	<i>Acidovorax temperans</i> [ NR_028715 ]( 99.77% )
	S9	<i>Cloacibacterium normanense</i> [ NR_042187 ]( 99.92% )
培養後の <i>E. gracilis</i>	SE1	<i>Aeromonas caviae</i> [ NR_104824 ]( 100.00% )
	SE2	<i>Pseudomonas poae</i> [ NR_028986 ]( 99.85% )
	SE3	<i>Comamonas testosteroni</i> [ NR_029161 ]( 100.00% )
	SE4	<i>Pseudomonas nitritireducens</i> [ NR_133020 ]( 99.61% )
	SE5	<i>Chryseobacterium timonianum</i> [ NR_164881 ]( 99.84% )
	SE6	<i>Serratia marcescens</i> [ NR_036886 ]( 99.92% )
	SE7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> [ NR_025104 ]( 99.77% )
	SE8	<i>Acidovorax temperans</i> [ NR_028715 ]( 99.77% )
	SE9	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> [ NR_108849 ]( 98.59% )
	SE10	<i>Sphingomonas melonis</i> [ NR_028626 ]( 100.00% )
	SE11	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> [ NR_169411 ]( 99.30% )

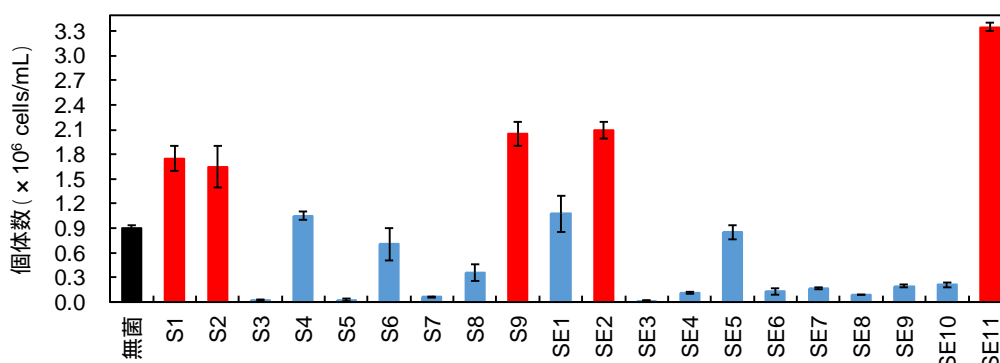


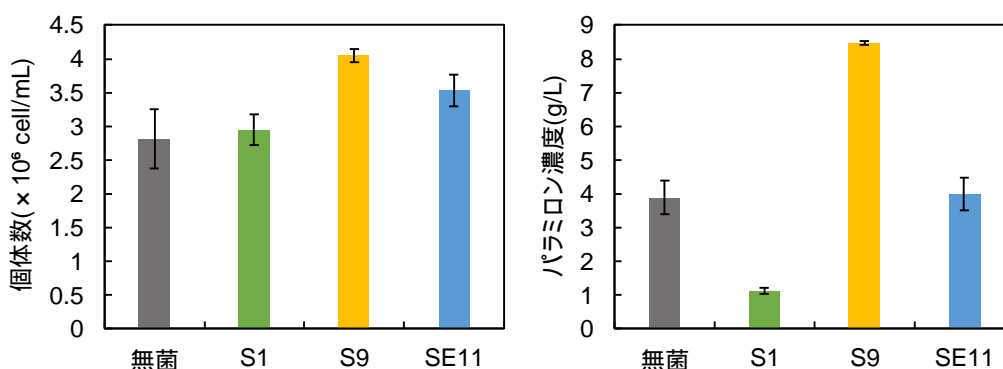
図 1 分離菌株による *E. gracilis* 成長促進効果のスクリーニング結果 (赤 : 成長促進)

##### (2)MGPB 有望株の *E. gracilis* バイオマス・パラミロン生産促進能

上のスクリーニング試験において *E. gracilis* の個体数を増加させることが確認された 5 菌株のうち S1、S9、SE11 を対象として、フラスコスケールで *E. gracilis* との共培養実験を行い、*E. gracilis* の個体数及びパラミロン生産量に及ぼす影響を調査した。その結果を図 2 に示す。SE11 を植種した場合、*E. gracilis* の個体数は無菌系に比べて増加し、スクリーニング試験と同

様に成長促進効果があるものと推察されたが、パラミロン濃度は無菌系と同程度であった。細胞あたりのパラミロン量は無菌系 (1.38 ng/cell) よりも SE11 を植種した方 (1.13 ng/cell) が低いことから、SE11 との共培養はパラミロン生産よりも個体数増加に強く働くことが示唆された。他方、S9 を植種した場合、無菌系に比べて *E. gracilis* の個体数は 1.44 倍増加し、パラミロン濃度は 2.18 倍増加した。また、細胞あたりのパラミロン量は 2.09 ng/cell であり、無菌系に比べて 1.52 倍高かった。すなわち、S9 は、*E. gracilis* を成長促進させるだけでなく、パラミロン生産も促進させる作用を有することが示唆され、*E. gracilis* の MGPB として非常に有望な菌株であることが明らかとなった。S9 が属する *Cloacibacterium* 属でこれまでに植物や藻類の成長促進の報告事例はみられず、S9 による *E. gracilis* の成長及びパラミロン生産の促進は本研究が明らかにした新規の知見である。

他方、スクリーニング試験で選定した 3 菌株のうち、2 菌株はフラスコスケールでも個体数の増加をもたらしたが、パラミロン生産能への効果は各菌株で大きく異なった。これは、各菌株の *E. gracilis* に対する作用の違いに起因するものと考えられ、今後は *E. gracilis* と各菌株の間どのような相互作用が成立しているのかを明らかにし、その結果も踏まえて高効率なバイオマス/有価成分生産システムの構築につなげていくことが必要であると考えられた。



#### < 引用文献 >

- Toyama, T., Kasuya, M., Hanaoka, T., Kobayashi, N., Tanaka, Y., Inoue, D., Sei, S., Morikawa, M., Mori, K., Growth promotion of three microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent, *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 176, 2018
- Kuroda, M., Horino, T., Inoue, D., Morikawa, M., Ike, M., Biomass production and nutrient removal through cultivation of *Euglena gracilis* in domestic wastewater, *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 54(4), 105-113, 2018
- Rubiyatno, Mori, K., Inoue, D., Kim, S., Yu, J., Lee, T., Ike, M., Toyama, T., Isolation and characterization of *Euglena gracilis*-associated bacteria, *Enterobacter* sp. CA3 and *Emticicia* sp. CN5, capable of promoting the growth and paramylon production of *E. gracilis* under mixotrophic cultivation, *Microorganisms*, 9(7), 1496, 2021
- Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M., Ike, M., Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*, *Biotechnology for Biofuels*, 10, 62, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内島雅希, 井上大介, 池道彦
2. 発表標題 様々な有機物がEuglera gracilisのバイオマス・パラミロン生産に及ぼす影響
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 Daisuke Inoue, Masaki Uchihata, Michihiko Ike
2. 発表標題 Effects of organic compounds on biomass and paramylon production by Euglena gracilis under heterotrophic condition
3. 学会等名 4th IWA Resource Recovery Conference 2021 (国際学会)
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
研究分担者	井上 大介  (Inoue Daisuke)  (70448091)	大阪大学・工学研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	黒田 真史  (Kuroda Masashi)  (20511786)	大阪大学・工学研究科・助教   (14401)	参画期間：令和2年3月31日まで

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