

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651064

研究課題名(和文)糸状緑藻の優占化機構の解明とこれを利用した大気開放系での水処理と物質生産の両立

研究課題名(英文)Clarification of the domination mechanisms of filamentous green algae and simultaneous achievement of water treatment and production of materials using it

研究代表者

下ヶ橋 雅樹(Sagehashi, Masaki)

国立保健医療科学院・その他部局等・研究員

研究者番号：20334360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：糸状緑藻を活用した開放系での水処理・物質生産プロセスを開発することを目的とした一連の研究を行い、次のような成果を得た。室内培養実験により糸状緑藻*Oedogonium obesum*とシアノバクテリア*Microcystis aeruginosa*双方の増殖速度に与える培地種の影響を把握した。また *Spirogyra*属の成長速度に関する照度の影響を評価した。屋外実験水路を用いた水処理実験により、糸状緑藻群落植栽水路の模擬農業排水中の窒素除去特性が把握できた。また、糸状緑藻群落の化学変換による資源化ポテンシャルを把握することができた。

研究成果の概要(英文)：A series of studies were implemented to realize the water treatment / resource production process using filamentous green algae, and following outcomes were obtained. With indoor culture experiments, the influence of the difference in culture media on the growth rates of green alga *Oedogonium obesum* and cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, and the effect of illumination on the growth of *Spirogyra* sp. were clarified. With outdoor water treatment experiments using experimental waterway, the nitrogen removal property of the water way with filamentous green algal community for the artificial agricultural wastewater was clarified. And the production potentials of chemicals from filamentous algal community by chemical reactions was clarified.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：糸状緑藻 ノンポイント汚濁源 農業排水 排水処理 バイオレメディエーション バイオマス資源

1. 研究開始当初の背景

大型の糸状緑藻は水域の美観の低下や利水障害の原因となりうる一方で、その生育管理は容易と考えられる。これまでのところ、国外においては家畜糞尿などの高濃度排水の藻類処理や、重金属や反応性染料など有害物質の吸収に大型糸状緑藻を適用した報告例がみられ、大型糸状緑藻の環境工学的応用に関する注目度は高い。一方、糸状緑藻の大量発生は水田などで普遍的にみられるものである。もとより糸状緑藻は大型であり、生産されたバイオマスを資源として利用する際には水中からの分離が容易であるというアドバンテージを有する。こういった背景からこの糸状緑藻を利用した解放系での水処理及び物質生産を両立するシステムの構築に着想し、その基礎研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、大型の糸状緑藻の優占化に影響する因子の検討を、培養実験を通じて検討して、その解放系での優占的培養方法について言及すること、また解放系での模擬農業排水からの栄養塩除去能力を、現場実験を通じて評価すること、さらには藻体の資源としての利用の可能性を、化学分析を通じて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 優占化機構の解明

室内培養実験系にて糸状緑藻優占化に関する観測実験を実施した。糸状緑藻の例としてサヤミドロ (*Oedogonium obesum*, NIES-203) の単種培養時の増殖速度を、2種類の培地 (C培地及びCT培地) 中で観察した。培養器温度設定は 25℃、明/暗サイクルは 14h/10h、明時の照度は 3,500 lx とし、L字型試験管を用いて静置で実施した。生物量は培養液の 660nm 吸光度により評価した。一方で代表的な有害シアノバクテリアである *Microcystis aeruginosa* 2種 (NIES-1090、及び河口湖より採取したもの) についても同様に単種培養を実施し、それぞれの結果を比較することで、培地の違いが優占化に与える影響を把握した。

またつくば市の実験圃場で採取した糸状緑藻群落から *Spirogyra* 属をピンセットで分離し、洗浄 - 培養を数回繰り返して共存する藻類をできるだけ除去した藻体を得た。また *Spirogyra* 属の増殖特性評価手法として、シャーレにて培養し経時的に写真撮影を行って画像解析により藻体長さの変化を計測する方法を採用した。この方法で光条件の異なる状態 (1,500 lx と 3,500 lx) での増殖速度の違いを観察した。なお、温度は 25℃、明暗サイクルは 12h/12h とした。

(2) 栄養塩除去能の評価

実験装置

屋外に設置した実験水路 (図1) を用いて、

冬季及び夏季の模擬農業排水に対する栄養塩除去能力を把握した。2011年8月、同実験水路を設置した農業排水路に発生していた糸状緑藻群落 (FGAC) を実験水路に移植し、予備的に培養した後に実験に利用した。実験では下流側に配置したポンプによって流出流量を制御し、タンクに貯留した模擬農地排水をレベルセンサ・電磁弁システムにより一定水位を保つように流入させるものである。観察期間中は A~E より採水し、メンブレンフィルタにてろ過した後に、各種水質を測定した。また水温の測定も並行して行った。

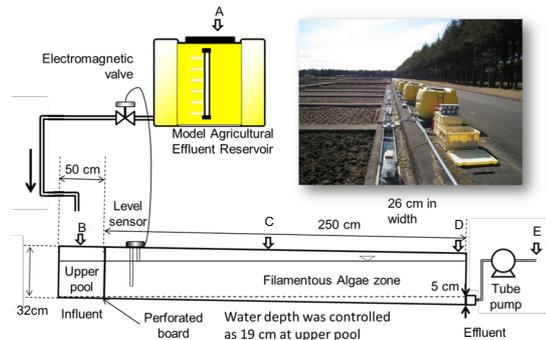


図1 屋外解放系実験装置とその概略

冬季実験

冬季実験は2011年11月から2012年1月にかけて実施した。実験系列を表1に示す。この実験ではFGACの存在する実験水路を利用し、水深と水理学的滞留時間を制御した。この実験では固形の化学肥料由来の模擬農業排水を系に負荷し、窒素及びリンの除去能を評価した。なお、W1は予備的な観測として実施した。

表1 冬季実験の実験系列

#	実験期間	水深 [cm]	平均流速 [L/day]	平均 HRT [day]
W1	2011/11/07 ~11/30	21	17	8
W2	2011/12/7	22	15	10
W3	~2012/1/11	14	16	6

夏季実験

夏季実験では、2012年7月26日から8月30日にかけて、FGACを植栽した水路と植栽しない水路での栄養塩挙動の比較を行った。実験系列を表2に示す。この実験では液体化学肥料由来、ならびに牛糞尿由来の模擬農業排水を系に負荷し、窒素及びリンの除去能を評価した。ここでFGAC植栽系は上述の予備観察ならびに冬季実験を経た後の系である。なお、実験開始時、Run S2及びS4の糸状藻類はいずれも *Cladophora* 属と *Chaetomorpha* 属が優占種として観察された。なお実験期間中に発生したウキクサや、Run 1及び3の水路全体ならびに Run 2及び4の流入部において発生したFGACは適宜除去した。

表2 夏季実験の実験系列

#	模擬排水由来	実験開始時のFGAC	水深 [cm]	平均流速 [L/day]	平均 HRT [day]
S1	化学肥料	×	19.3	13.0	13.0
S2			19.3	12.7	13.4
S3	畜産排水	×	19.6	15.2	11.3
S4			18.9	14.3	11.7

(3) 資源としての利用可能性

農業環境技術研究所水田圃場内排水路より *Spirogyra* 属を含む FGAC を採取し、目視により夾雑物を取り除いた後に水洗して供試サンプルとし、構造体内の糖類の測定を行った。また下水汚泥を用いた嫌気性メタン発酵において FGAC を添加基質とした場合の、FGAC あたりのメタン発生増加量を見積もった。

4. 研究成果

(1) 優占化機構の解明

異なる培地中での *O. obesum* 及び *M. aeruginosa* の増殖を図3に示す。CTではC培地中では *M. aeruginosa* の増殖速度が高い一方で、C培地では同程度か、*O. obesum* のほうが高い傾向となった。ここで、C培地とCT培地では窒素やリン組成に違いはない一方で、pH緩衝剤とpH値が異なり、C培地では7.5、CT培地は8.2にそれぞれ調整したものである。この結果から、pHが *O. obesum* の優占化に影響を与える可能性が示唆された。

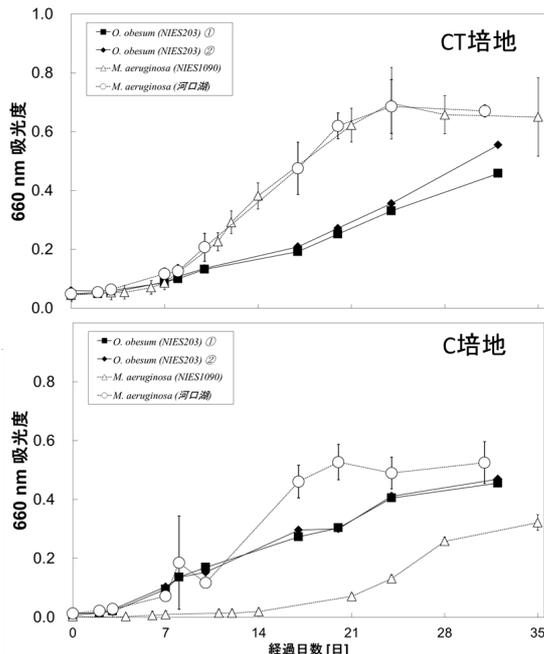


図3 異なる培地中での *O. obesum* 及び *M. aeruginosa* の増殖 (*O. obesum* については n=2 で、それぞれを個別に、として図示。*M. aeruginosa* については n=3 で、平均と標準偏差を図示)

一方、より大きな *Spirogyra* 属に関するのシャーレ培養における藻体長さの変化を図4に示す。対数増殖期の増殖速度は、3,500 lx系のほうが1,500 lx系より増殖速度が高いことがわかる。一方で、培養後期には3,500 lx系では増殖が停止したが、1,500 lx系ではさらに増殖が続いた。この理由について、共存藻類の影響から考察する。図5は培養開始からのシャーレの様子を撮影したものである。図より特に3,500 lx系では15日目以降で明らかに培地の色が緑色を呈しており、本研究において分離・洗浄した *Spirogyra* 属藻体表面に残存していた他種の浮遊性藻類が剥離して増殖したことがわかった。特に3,500 lx系ではこのような共存藻類の増殖により増殖阻害を受けたものと推測された。このことから、*Spirogyra* 属は、増殖速度は低下するものの、比較的暗い条件で他種との競争的優位にたつ可能性が示唆された。

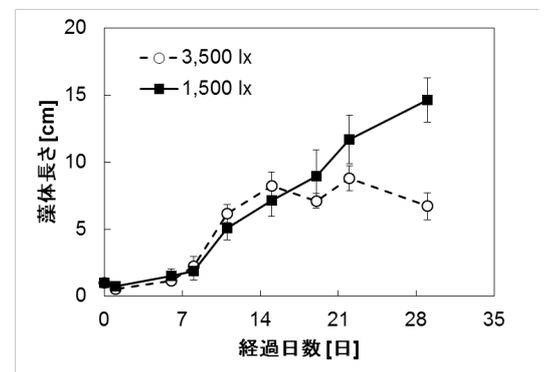


図4 他種との共存下での *Spirogyra* 属の伸展 (n=3, 平均値±SD)

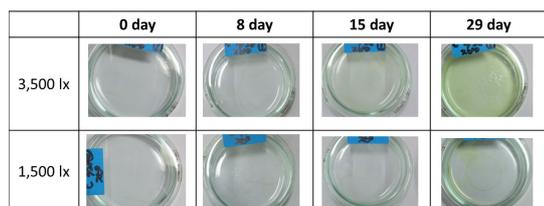


図5 *Spirogyra* 属培養時のシャーレ写真

以上の結果から得られた、各藻類の対数増殖期の比増殖速度を表3に整理した。これらの優占化に影響を与える増殖特性を活かした解放系での培養プロセスを確立することが望ましい。

表3 各藻類の対数増殖期の比増殖速度

	<i>O. obesum</i> (NIES-203)		<i>M. aeruginosa</i> (NIES-1090)		<i>M. aeruginosa</i> (河口湖)		<i>Spirogyra</i> 属	
	C	CT	C	CT	C	CT	C	C
明暗サイクル [h/h]	14/10						12/12	
明時の照度 [lx]	3,500						3,500	1,500
比増殖速度 [/day]	0.37	0.07	0.25	0.24	0.20	0.14	0.34	0.25

(2) 栄養塩除去能の評価

冬季実験

実験期間中の平均水温は、W1 で 11℃, W2, 3 で 5℃であった。また付近の気象観測結果に基づく期間中の総降水量は、W1 で 51 [mm], W2, 3 で 5 [mm]であった。W2 及び 3 における各採水地点でのアンモニウム態窒素濃度の測定結果を図 4 に示す。装置内の水学的滞留時間が低いため、系の定常化に時間を要したが、実験開始から 12~35 日目 (2011 年 12 月 19 日~2012 年 1 月 11 日)にはおおむね定常とみなせるレベルに達したものと推測された。この期間の平均水温は 4℃, 総降水量は 0 [mm]であった。この期間の結果をもとに、タンク (図 1 の A), ならびに上流溜り (図 1 の B) から水路出口 (図 1 の D 及び E) にかけてのアンモニウム態窒素の除去率を算出した結果を表 4 に示す。滞留時間の増加とともに除去率が向上した。一方、全溶存態窒素や全溶存態リンに関しては、除去は確認できなかった。

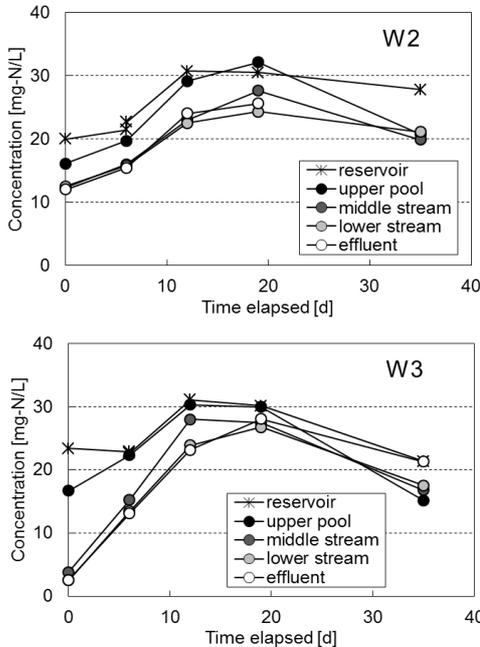


図 6 冬季実験におけるアンモニウム態窒素濃度変化

表 4 冬季実験におけるアンモニウム態窒素除去率

系	タンク 水路出口での除去率[%]	上流溜り 水路出口での除去率[%]
W2	21	15
W3	12	3

夏季実験

実験期間中の平均水温は 29℃, 付近の気象観測結果に基づく期間中の総降水量は 14.5 [mm]であった。図 7 に各系列の実験期間中の濃度変化から算出された窒素収支を示す。ここの除去とは流入から流出及び水路内 DN

残存量を差し引いたものであり、FGAC を含む植物による吸収分, ならびに細菌による脱窒分と考えられる。図より、化肥及び畜産両系で FGAC 移植系の除去率が高かった。特に化肥系での FGAC の窒素除去率促進が比較的大きかった。

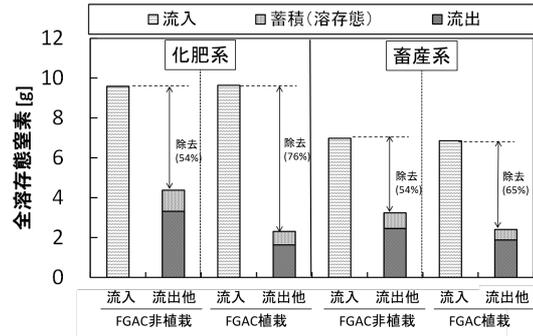


図 8 夏季実験期間中の窒素収支 (カッコ内の数値は除去率)

また各系におけるタンク内の全溶存態窒素 (DN), ならびに水路出口でのアンモニウム態窒素 (NH₄-N) 及び硝酸・亜硝酸態窒素 (NO₂+3-N) の濃度変化を、化肥系を図 9 に、畜産系を図 10 にそれぞれ示す。いずれの系においても FGAC 非植栽系と比較して FGAC 植栽系で硝酸・亜硝酸態濃度が低くなった。以上より、今回確認された FGAC 植栽による窒素除去率向上には、藻体の取り込みのみならず、大型の糸状緑藻の存在による脱窒反応促進が寄与している可能性が考えられた。またその寄与は化肥由来の排水処理でより顕著となるものと推測された。一方リンに関しては FGAC 植栽の有無による除去率の違いは見られなかった。

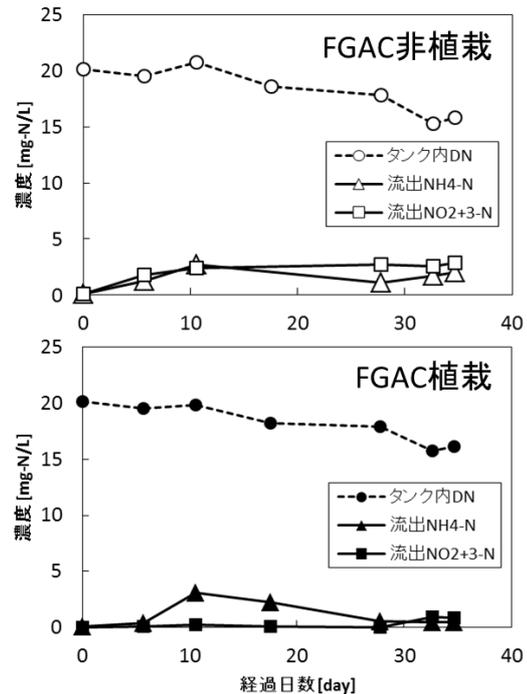


図 9 化肥系実験における流入全溶存態窒素及び流出各態窒素の濃度変化

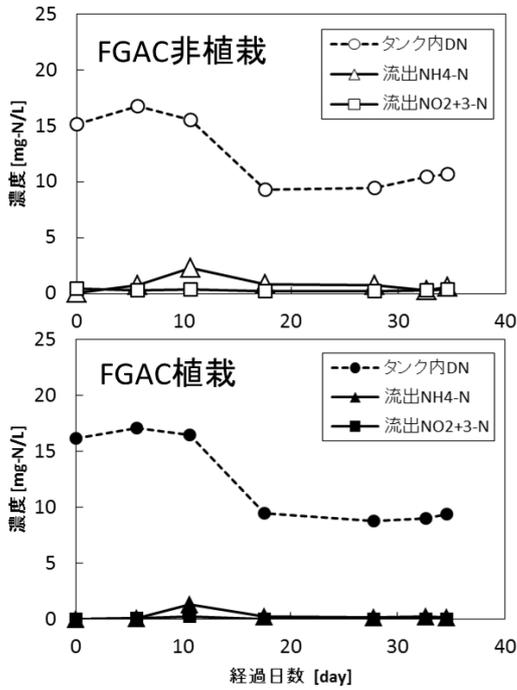


図 10 畜産系実験における流入全溶存態窒素及び流出各態窒素の濃度変化

(3) 資源としての利用可能性

FGAC の構造体のグルコース及びガラクトース量と灰分を測定したところ、表 5 のような結果となった。また下水汚泥嫌気性メタン発酵における FGAC の揮発性固形物(VS)あたりのメタン発生量増加量は 1 ヶ月間あたり約 0.75 L/g-VS と推定された。

表 5 FGAC の構造体炭水化物量と灰分

成分	乾燥重量あたりの含量 [mg/g]	クロロフィル a あたりの含量 [mg/mg-chl.a]
グルコース	211	15.5
ガラクトース	43	3.2
灰分	80.2	5.9

以上の結果踏まえて、糸状緑藻を屋外開放系で生育させた場合の単位面積あたりの物質・エネルギー生産ポテンシャルを、文献をもとに FGAC 発生量 1,000 mg-chl.a/m²、グルコースからのエタノール変換効率を 90%として推算した結果を表 6 に示す。特にエタノールに関しての 1 回の生育あたりの生成ポテンシャルは他の資源作物の 1 年あたりの生産ポテンシャルと比較して少ないが、年間複数回の栽培や、グルコース以外の糖ならびにメタン生産ポテンシャル、前処理の容易性の活用、および糸状緑藻生育時の栄養塩取り込み能を利用した水処理・資源回収などを複合的に検討することにより、糸状緑藻を用いた物質・エネルギー生産システムが確立されてゆくものと思われる。

表 6 FGAC の発生量を 1,000 mg-chl.a/m² と仮定した場合の資源化ポテンシャル

成分	生産量 [t/ha]	エネルギー換算生産量 [GJ/ha]
グルコース+ガラクトース	187 kg	-
エタノール	91 L	1.9
メタン	510 m ³	19

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

下ヶ橋雅樹, 周勝, 寺田昭彦, 細見正明. 糸状緑藻の資源化に関する研究, 環境科学会 2011 年会, 2011 年 9 月, 環境科学会 2011 年会プログラム, p.71 .

下ヶ橋雅樹. 水処理との両立を目指したバイオマス生産とその資源化, 第 4 回化学工学 3 支部合同福井大会, 2011 年 12 月, 第 4 回化学工学 3 支部合同福井大会講演要旨集, p.36 .

Sagehashi M, Kobara Y, Zhou S, Riya S, Akiba M, Hosomi M. Agricultural Effluent Treatment by Large Filamentous Green Algae within Water Drainage Channel in Cold Season, 第 10 回日中水環境シンポジウム, 2012 年 4 月, 深セン, 中国, 第 10 回日中水環境シンポジウム会議論文集, p.37-42.

Sagehashi M, Kobara Y, Tanaka K, Zhou S, Riya S, Akiba M, Terada A, Hosomi M. Agricultural Drainage Treatment and Biomass Based Chemical Production by Filamentous Green Algae. 2nd Water Research Conference; Jan. 2013; Singapore. 2nd Water Research Conference プロシーディングス CD. P166.

下ヶ橋雅樹, 小原裕三, 田中和明, 周勝, 利谷翔平, 秋葉道宏, 寺田昭彦, 細見正明. 大型糸状緑藻を生育させた水路による農地排水処理. 化学工学会 第 78 年会; 2013 年 3 月; 大阪. 化学工学会第 78 年会講演要旨 CD, 発表番号 H113 .

Sagehashi M, Kobara Y, Tanaka K, Zhou S, Riya S, Akiba M, Terada A, Hosomi M. Purification of Agricultural Drainage using Open-Air Channel with Filamentous Green Algae, 第 11 回日中水環境シンポジウム, 2014 年 3 月, アモイ, 中国, 第 11 回日中水環境シンポジウム会議論文集, p.10-12.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

下ヶ橋雅樹 (SAGEHASHI, Masaki)
国立保健医療科学院・国際協力研究部・主
任研究官
研究者番号：20334360

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし