

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14903

研究課題名（和文）藻類培養におけるアンモニア毒性制御技術の開発：途切れた循環社会のループをつなぐ

研究課題名（英文）Development of an ammonia-inhibition control system in microalgal cultivation

研究代表者

岸 正敏（Kishi, Masatoshi）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・地球環境部門（地球表層システム研究センター）・特別研究員（PD）

研究者番号：00824020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：微細藻類は廃棄性有機物由来の栄養やCO₂を用いて有価物を生産でき、循環型社会形成に貢献する。しかし栄養分の多くが藻類に高い毒性を持つアンモニア（NH₃）であり直接利用が困難である。NH₃濃度が阻害未達となるよう供給を制御できれば、廃棄物の直接利用を可能にする。そこで本研究では蛍光を用いたNH₃阻害検知法の確立を目指した。その結果、複数の励起波長を用いた蛍光分析や、パルス変調蛍光分析等により、アンモニア阻害が暴露後わずか数分で検知できることが明らかとなった。さらに、多変量解析を組み合わせることで、環境要因による変動をある程度除外できることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで無希釈消化液などの高濃度アンモニア含有水を直接供給して藻類培養に成功した例は耐性の極端に強い種などに限られるが、本研究で開発している技術が実現すれば、ほとんどの藻類種で直接供給を可能にする。さらに、クロロフィル蛍光と多変量解析との組み合わせにより、アンモニア阻害だけでなく広範な藻類の生理状態判別および大量培養の生産性向上に応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Microalgae have the potential to produce valuable products using nutrients and CO₂ derived from organic waste, contributing to the formation of a circular society. However, a significant portion of the nutrients is in the form of toxic ammonia (NH₃), making direct utilization challenging. If we can control the supply to ensure that NH₃ concentration remains below inhibitory levels, direct utilization of waste becomes possible. In this study, we aimed to establish a fluorescent-based NH₃ inhibition detection method. The results revealed that fluorescence analysis using multiple excitation wavelengths and pulse-modulated fluorescence analysis can detect ammonia inhibition within a few minutes of exposure. Furthermore, by combining multivariate analysis, it was possible to mitigate variations caused by environmental factors.

研究分野：環境工学

キーワード：微細藻類 アンモニア 阻害 クロロフィル蛍光 モニタリング 循環型社会

1. 研究開始当初の背景

東南アジアやアフリカ諸国などの途上国では有機性廃棄物の処理にコストをかけられず、処理効率は先進国の80~100%と比較して低い0~60%程度に留まる[1]。一方、それらの多くの国が35°以下の低緯度域に存在し、豊富な太陽光が利用可能である。微細藻類培養はこの太陽光を利用して、処理の副産物であるアンモニア(NH₄⁺)やリン酸(PO₄³⁻)などから化粧品材料などの有価物を生産して経済的インセンティブを生み出すことのできる、循環型社会構築の鍵となる技術である(図1)。

廃棄物から排出される窒素のほとんどはアンモニアであるが、アンモニウムイオン(NH₄⁺)はpHが高くなると強力な毒性を示す遊離アンモニア(NH₃)に変化する。NH₃は光化学反応系の始点であるMnクラスターやATP合成酵素を駆動するH⁺勾配を破壊し、藻類の増殖を強く阻害する。多くの藻類で0.5~5mMの範囲で50%以上増殖が抑制されるため、廃棄物から排出される高濃度の栄養を藻類培養に使うためには何らかの対策が必須となる。

NH₃阻害を回避する方法として希釈や硝化が有効であるが[2-4]、それぞれ大量の水やエネルギーが必要であり持続性に乏しい。そこで、藻類の利用速度に合わせて連続的にアンモニアを供給することで槽内NH₃を低濃度に維持する方法が考えられる(図2)。しかしながら、この方法はアンモニアの需要供給バランスが崩れるとNH₃阻害や窒素不足が起こる可能性がある。特に、屋外大量培養では日射量など環境に応じて藻類によるアンモニア利用速度が変化するため、阻害回避のためにはアンモニア供給速度制御のための培養系モニタリングが必要となる。

NH₃阻害を防ぐためのモニタリングにはまず槽内アンモニア濃度の測定が考えられる。しかし近年の研究で微細藻類のアンモニア阻害濃度範囲は光強度や温度によって大きく変化することが明らかとなっており[5,6]、培養環境の日周/季節変動を考慮するとアンモニア濃度のみのモニタリングでは低濃度での増殖阻害を防止できない可能性がある。

そこで、より環境に左右されない方法として、蛍光による光合成活性の直接モニタリングが考えられる。実際に、既往研究では光合成活性の指標である蛍光値(Fv/Fm)がNH₃暴露1時間後に減少するという応答性が確認された[7]。しかしながら、アンモニア制御のために迅速かつ汎用性の高いアンモニア毒性検知ができるか試験する必要がある。また、これまでのアンモニア毒性を研究した蛍光分析のほとんどがパルス変調蛍光(PAM)測定であった。この手法は高感度であるが、機器が高価で繊細であり、特に途上国での大規模培養の管理に応用するのは難しい。そこで、安価に実施可能な多波長の蛍光分光分析が考えられるが、アンモニア阻害との関係性はこれまで明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では種々の蛍光手法を用いたNH₃阻害検知法の確立を目的とした。具体的には、励起蛍光マトリックス分析による多波長の蛍光分析と、PAMによるFv/Fmの解析を行った。研究を進める中で、阻害検知の限界が明らかとなったことから、本研究ではさらに励起光照射直後のクロロフィル蛍光強度の変化であるOJIPカーブを測定し、多変量解析と組み合わせることで、検知精度の強化を図った。これらの分析手法の確立により、将来的にはアンモニアを用いた藻類の屋外大量培養において、アンモニア供給速度の制御に適した非破壊的な藻類NH₃阻害の検知による窒素供給制御の達成を目指す。

3. 研究の方法

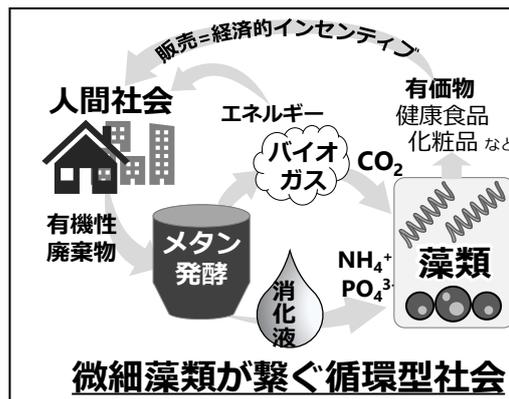


図1. 本研究が目指す循環型社会の形。藻類が経済的インセンティブを創る。

本研究の提案：利用に合わせた供給



- 利点：排水をそのまま利用できる
- ✗ 欠点：需給のバランスが崩れるとNH₃阻害を引き起こす可能性
- ➡ 培養系のモニタリングが必要

図2. 本研究提案のNH₃阻害を防ぐ手法

実験対象種として広範な分類群に所属する緑藻 *Chlorella sorokiniana* NIES-2173、ハプト藻 *Isochrysis galbana* UPMC-A009、およびシアノバクテリア *Arthrospira platensis* NIES-39 の3種を用いた。培養実験において、アンモニア濃度を各藻類の50%阻害濃度 (EC₅₀) 比で0 (対照区)、50、100、300、500%の5条件とした。培養液へのアンモニア添加後は温度 25°C、光子束密度 150 μmol photons m⁻² s⁻¹ で培養し、各種蛍光パラメーター、光学密度、pH を0、1、2、5、24 時間に測定した。蛍光測定として、励起蛍光マトリックス測定、PAM による Fv/Fm 測定、OJIP カーブ測定、および非光化学的消光(NPQ)を測定した。励起蛍光マトリックスの測定には、蛍光分光光度計 (F-7000, Hitachi) を使い、励起 250-700nm 蛍光 300-800nm を 5nm 間隔でスキャンした。PAM の各種分析には AquaPen-C (AP-110, PSI) を用いた。また、OJIP カーブの解析として多変量解析の一種である Canonical analysis of principal coordinates (CAP) を R の BiodiversityR パッケージを用いて実施した。

4. 研究成果

アンモニア暴露により3種で明確な比増殖速度の減少が見られ、対照区と比較した相対増殖速度は幅広くほぼ均等に分布した (図3)。

励起蛍光マトリックスでは、アンモニア濃度の増加に対して、光化学系 II 由来の蛍光(波長 680nm)がより顕著に変化した (図4)。このうち、励起波長がクロロフィル由来励起の 440nm と比較して、カロテノイド由来と考えられる 470-490nm 付近がアンモニア濃度に応じて高くなる傾向にあり、緑藻 *C. sorokiniana* で R²=0.669 (N=20)、ハプト藻 *I. galbana* では暴露 24 時間後に R²=0.902 (N=4) の比較的高い相関が確認された。この結果により、励起波長を複数設けることで、簡便に NH₃ 毒性検知を行える可能性を示した。しかしながら、長期培養においては他の要因でも色素や蛍光特性が変化する可能性があるため、今後汎用性の調査が必要である。

続いて、光化学系 II の最大量子収率を示す Fv/Fm を指標として、アンモニア濃度との関係を調査した。その結果、Fv/Fm は暴露直後わずか数分 (Time 0) でもアンモニア濃度と有意な相関を示し、アンモニア阻害検知が可能であることが明らかとなった (図5)。しかしながら、*C. sorokiniana* および *I. galbana* において、対照区でも培養開始後に光適応が原因と見られる Fv/Fm 値の減少が確認された (図5 赤丸)。これにより、暴露 2 時間以降の対照区は Time 0 の高アンモニア濃度区とほぼ同等の Fv/Fm 値を示し、Fv/Fm 値だけでは光適応による応答とアンモニア阻害による応答を区別できないことを意味した。

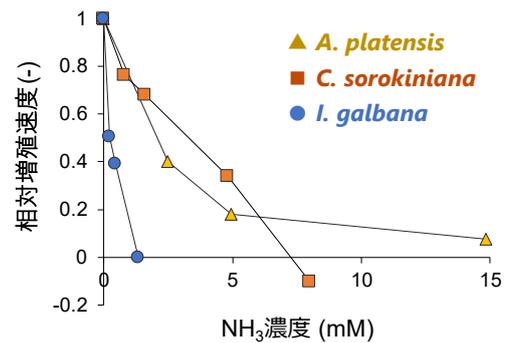


図3. 各藻類種のアンモニア耐性。 *I. galbana* の耐性が最も低く、他2種は同程度だった。

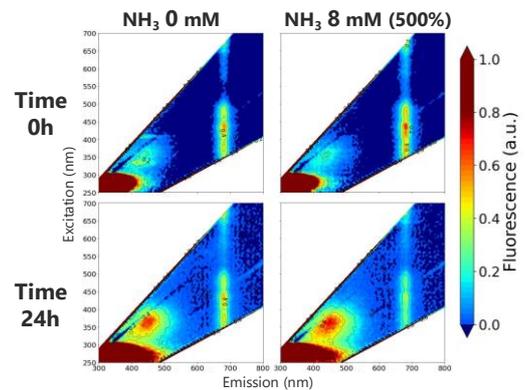


図4. 励起蛍光マトリックス分析の *C. sorokiniana* における分析例。680nm 付近で縦に延びるバンドが光化学系 II による蛍光。

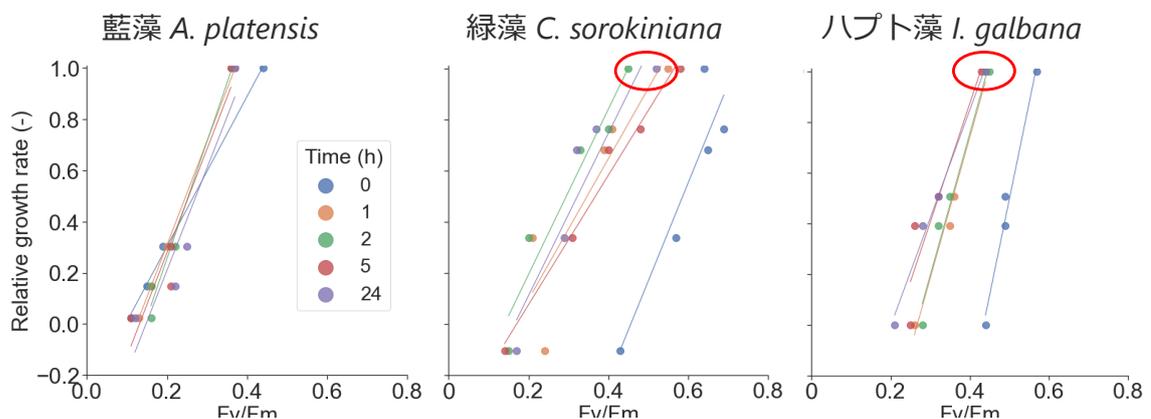


図5. 励起蛍光マトリックス分析の *C. sorokiniana* における分析例。

そこで、続いて、励起光照射直後数 μ 秒～数秒の間の蛍光変化である OJIP カーブ (誘導期現

象)に着目し、ここから得られる蛍光値の多変量解析による NH₃ 阻害の判別を、同様の培養条件で試験した (図 6)。その結果、3 種の藻類それぞれにおいて、培養時間に関わらず 60~100% の精度で対照区をアンモニア添加区と区別することができた。これは、光適応による光化学系の変化に左右されず、NH₃ 阻害を判別できたことを意味する。このことから、クロロフィル蛍光誘導期現象にはアンモニア阻害の影響を光適応と分けて区別できるだけの十分な情報が含まれており、これを多変量解析によって抽出することで、各種阻害の判別ができることが明らかとなった。

本研究により種々の非破壊的な蛍光分析により藻類のアンモニア阻害検知が可能であることが明らかとなった。しかしながら、それぞれ他の環境要因にも影響されうる指標であるため、より多くの試験をして汎用性を試験する必要がある。今後は各手法の制限を補いつつ屋外環境下でも実用可能な手法の開発を進める。

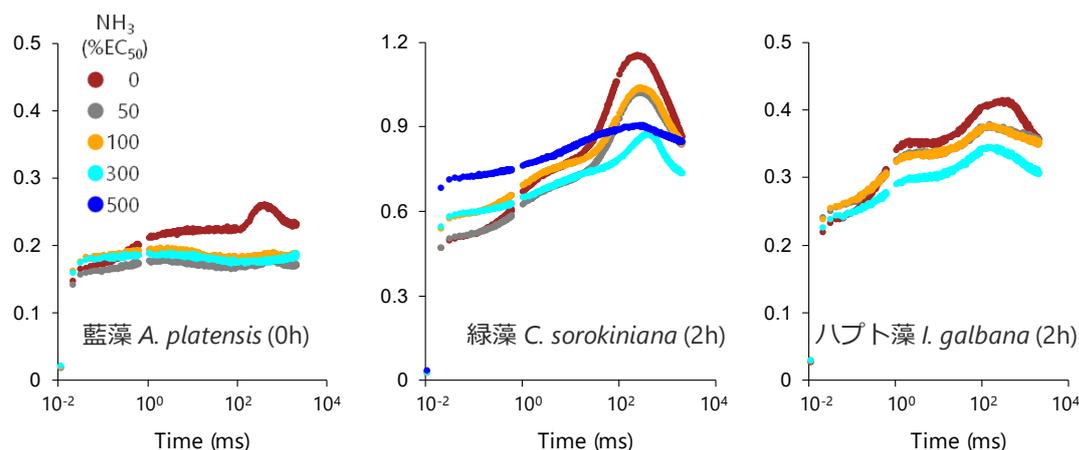


図 6. 各藻類種のアンモニア添加による OJIP カーブの変化。

[引用文献]

- [1] UN-Water, UN world water development report: Wastewater, the untapped resource, Paris, France, 2017. <http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/>.
- [2] M. Sekine, A. Yoshida, S. Akizuki, M. Kishi, T. Toda, Microalgae cultivation using undiluted anaerobic digestate by introducing aerobic nitrification–desulfurization treatment, *Water Sci. Technol.* 82 (2020) 1070–1080. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.153>.
- [3] X. Liu, M. Fujiwara, T. Kodera, K. Watanabe, S. Akizuki, M. Kishi, M. Koyama, T. Toda, S. Ban, Conditions for continuous cultivation of *Chlorella sorokiniana* and nutrient removal from anaerobic digestion effluent of aquatic macrophytes, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 149 (2020) 104923. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104923>.
- [4] X.-B. Tan, Y.-L. Zhang, L.-B. Yang, H.-Q. Chu, J. Guo, Outdoor cultures of *Chlorella pyrenoidosa* in the effluent of anaerobically digested activated sludge: The effects of pH and free ammonia, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.095>.
- [5] G. Markou, K. Muylaert, Effect of light intensity on the degree of ammonia toxicity on PSII activity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 216 (2016) 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.094>.
- [6] G. Markou, O. Depraetere, K. Muylaert, Effect of ammonia on the photosynthetic activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: A study on chlorophyll fluorescence and electron transport, *Algal Res.* 16 (2016) 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.039>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Agborambang Mfor E., Fujiwara Masaaki, Bhatia Pranshu, Kishi Masatoshi, Sekine Mutsumi, Salangsang Maria Cecilia D., Matsuyama Tatsushi, Toda Tatsuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of Mixing by CFD Simulation and Optimization of Mixing Frequency to Break Scum and Enhance Methane Yield in Chinese Dome Digester	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioEnergy Research	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） 10.1007/s12155-022-10519-w	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 Xia Yuanjun, Kishi Masatoshi, Sugai Youta, Toda Tatsuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Microalgal flocculation and sedimentation: spatiotemporal evaluation of the effects of the pH and calcium concentration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioprocess and Biosystems Engineering	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00449-022-02758-0	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 Chowdhary Anupreet Kaur, Kishi Masatoshi, Toda Tatsuki	4. 巻 65
2. 論文標題 Enhanced growth of Chromochloris zofingiensis through the transition of nutritional modes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Algal Research	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） 10.1016/j.algal.2022.102723	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 Fujita Akinori, Kishi Masatoshi, Sekine Mutsumi, Toda Tatsuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Anaerobic Digestion Effluent Purification using Activated Sludge Process, Slow Sand Filtration, and Activated Carbon Filtration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society of Material Cycles and Waste Management	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3985/jjsmcwm.33.1	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 Bhatia Pranshu, Akizuki Shinichi, Kishi Masatoshi, Habtu Nigus Gabbiye, Legesse Solomon Addisu	4. 巻 -
2. 論文標題 Biomethane from microalgae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 3rd Generation Biofuels	6. 最初と最後の頁 463 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/b978-0-323-90971-6.00034-6	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 風間健宏, 小原静夏, 岸正敏, 湯浅光貴	4. 巻 69
2. 論文標題 2021年日本ベントス・日本プランクトン学会合同大会 自由集会 「クロロフィル蛍光を用いた藻類研究の最前線」開催報告	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本プランクトン学会報	6. 最初と最後の頁 57 ~ 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24763/bpsj.69.1_57_1	査読の有無 無
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 岸 正敏, 尾内 秀美, 田中 健児, 吉田 あかり, 戸田 龍樹	4. 巻 1
2. 論文標題 メタン発酵消化液を用いた微細藻類培養とバイオガス精製同時プロセス	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 プランクトン工学研究	6. 最初と最後の頁 58 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kishi Masatoshi, Tanaka Kenji, Akizuki Shinichi, Toda Tatsuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Development of a gas-permeable bag photobioreactor for energy-efficient oxygen removal from algal culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 102543 ~ 102543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.algal.2021.102543	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 岸 正敏、小松 一弘、土屋 健司	4. 巻 69
2. 論文標題 排水を用いた藻類生産におけるアンモニア毒性検知技術の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本プランクトン学会報	6. 最初と最後の頁 59～60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24763/bpsj.69.1_59	査読の有無 無
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 1件)

1. 発表者名 岸正敏、小松一弘、土屋健司
2. 発表標題 排水を用いた藻類生産におけるアンモニア毒性検知技術の開発
3. 学会等名 2021年日本ベントス・日本プランクトン学会合同大会 自由集会 「クロロフィル蛍光を用いた藻類研究の最前線」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Kishi, K. Tsuchiya and K. Komatsu
2. 発表標題 Chlorophyll Fluorescence Response towards Ammonia Toxicity: Ammonia Detection in Algal Ponds
3. 学会等名 IWA 13th Wastewater Pond and Algal Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田明則, 関根睦実, 戸田龍樹, 岸正敏
2. 発表標題 順次回分式活性汚泥処理と緩速ろ過の組合せによるメタン発酵消化液清澄化能の評価
3. 学会等名 日本水処理生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根睦実, 戸田龍樹, 秋月真一, 岸正敏
2. 発表標題 メタン発酵バイオガスおよび消化液の後段処理のための脱硫-硝化同時処理槽および微細藻類生産槽の連結プロセスの構築
3. 学会等名 日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸正敏, 関根睦実, 田中健司, 吉田あかり, 戸田龍樹
2. 発表標題 屋外高層微細藻類リアクターにおける水圧対策と水温上昇抑制の検討
3. 学会等名 日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸正敏, 古谷研, 後藤緑, 関根睦実, 戸田龍樹
2. 発表標題 アンモニア供給法の改善によるハプト藻 <i>Isochrysis galbana</i> の高密度培養
3. 学会等名 日本水環境学会年会
4. 発表年 2022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			
エチオピア	Bahir Dar University	Injibara University	LTaOWPDA	
スペイン	Universidad de Valladolid			
チェコ	Centre Algatech			