

## 有毒藍藻類の浮揚性能を利用した新たなアオコ除去システム構築に向けた基礎研究

研究代表者 千葉大学 大学院工学研究院 助教 天野 佳正

共同研究者 千葉大学 総合安全衛生管理機構 教授 町田 基

共同研究者 Tennessee Technological University 准教授 Tania Datta

### 1. 緒言

地球温暖化を原因とする気温・水温上昇により湖沼やダム湖での藍藻類の異常増殖(アオコ)頻度の高まりが世界各国で観測されている [1]。藍藻類の中には猛毒物質である青酸カリウムや青酸ソーダを上回るほどの強力な毒性物質を生産する種が存在するため、アオコの発生を如何に抑えるかが重要課題となる。一般の浄水場では、原水中の懸濁物質を凝集剤によりフロック化させて沈殿除去している。しかし、原水にアオコが含まれるとアオコ特有の浮揚性によりフロックの沈殿作用が低下する。これにより、凝集剤添加量を通常時より数倍に高めることになり、処理コストが増加するといった報告がなされている(例えば千葉県水道局)。今後、安全・安心な飲料水を安定して確保するためには、浄水処理に弊害をもたらすアオコに主眼をおいた新たな処理プロセスの構築が必要となる。

アオコ形成藍藻類マイクロキスティスは、粘質性の細胞外多糖類 (extracellular polysaccharides; EPS)を分泌し、この EPS をまとう形で細胞を凝集させて群体を形成している。通常、比重が 1 よりも小さいマイクロキスティスは、群体サイズを拡大して浮揚性を高めているといわれている(ストークスの法則)。しかし、マイクロキスティスの活性や環境条件に応じて群体サイズと浮揚性は複雑に変化し、このような不規則な性質が凝集沈殿池におけるアオコ除去の妨げとなっている。

マイクロキスティスの EPS 分泌量を増大させることができれば、群体形成の促進、群体サイズの拡大、浮揚性の向上、という逐次的な反応により効率よく水面に集積できると予想されるが、そのような技術は未だ確立されていない。研究代表者らはこれまでの研究において、湖沼にて採取したアオコから EPS (mixed EPS; MX-EPS, 以下で説明)を粉末試料として単離し、この MX-EPS を群体形成能と浮揚性能を失ったマイクロキスティス培養株に与えることで、これまで不可能とされてきた人為的なマイクロキスティスの群体形成に成功している [2]。さらに最近の研究では、実湖沼にて得られたアオコ(主にマイクロキスティス)に MX-EPS とカチオンを同時添加したところ、アオコの浮揚性が促進する可能性を見出している。これらの成果から、マイクロキスティスの群体形成に関与する因子をつきとめ、群体サイズの拡大を促す最適条件を見出すことができれば、浮揚性も制御することが可能であると考えられる。

本研究は、アオコの浮揚性能を利用した新たな除去手法を確立するための基礎的知見の集積を主な目的とする。はじめに、マイクロキスティス細胞に強く結合している結合性

細胞外多糖類 (tightly-bound EPS; TB-EPS)をアオコから単離し、この TB-EPS およびカチオン ( $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$ ) を、通常の条件では決して群体を形成しないマイクロキスティス培養株に添加することで、群体を効率的に形成する最適条件を明らかにした。さらに、マイクロキスティスを主とするアオコを上記のマイクロキスティス培養株と同条件で培養することにより、群体サイズが増大し、かつ浮揚性が向上するかについて検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1. 供試藻類

#### 2.1.1. ミクロキスティス培養株

本研究では、米国のテキサス大学、藻類コレクションから購入した株 (strain: UTEX LB 2061) を群体形成試験に用いた。この株は、室内培養条件で培養を行っても群体を形成せず、通常、単細胞あるいはツイン細胞として存在している。

#### 2.1.2. ミクロキスティス野生株 (アオコ)

茨城県千波湖で発生したアオコを採取し、TB-EPS の単離と浮揚性試験に用いた。アオコは主に、ゲル状の細胞外多糖類をまとい、群体を形成したマイクロキスティスにより構成され、浮揚性を有していた。

### 2.2. 結合性細胞外多糖類 (TB-EPS)の単離

マイクロキスティスの分泌する EPS は、溶存性- (soluble EPS; SL-EPS)、弱結合性- (loosely-bound EPS; LB-EPS)および結合性 EPS (tightly-bound EPS; TB-EPS)の混合物 (mixed EPS; MX-EPS)である。本研究では、より細胞への接着が強い結合性 EPS を実験に用いた。TB-EPS は、Xu らの方法に準じて抽出した [3]。アオコ試料に 0.05 wt%の NaCl を加えて混合した後、遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) により上澄み液を除去し、藻体を回収した。再び元のアオコ試料容量と同じになるよう藻体を蒸留水で希釈し、0.05 wt%の NaCl を加えた後、ホットプレートを用いて試料を 60℃に加熱して 30 min 熱処理を施した。常温にした後、3,000 rpm で 15 min 遠心分離を行い、上澄み液を回収した。ガラス繊維ろ紙 (GF/C, Whatman) により上澄み液をろ過した後、ろ液に対し 1.5 倍量の氷冷したエタノールをろ液に加え、-20℃で一晩静置した。析出した沈殿物を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) 後に回収し、-20℃、真空度-0.1 MPa の条件で沈殿物を凍結乾燥させ、乳鉢にて粉末状にしたものを TB-EPS 試料とした。

### 2.3. ミクロキスティス培養株の群体形成試験

TB-EPS およびカチオン ( $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$ ) が単体状のマイクロキスティス培養株の群体形成に及ぼす影響を調べるため、群体形成試験を行った。培養容器には 100 mL 三角フラスコを用い、初期細胞密度が  $1.0 \times 10^6$  cells/mL になるよう洗浄したマイクロキステ

イス培養株をトリス緩衝液 (500 mg/L) に接種した。そこへ、所定の濃度になるよう TB-EPS およびカチオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ・ $\text{Mg}^{2+}$ ) を添加した。Table 1 に示すように、培養系は Run1 (TB-EPS: 100 mg/L), Run2 (TB-EPS: 40 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$ : 100 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$ : 100 mg/L), Run3 ( $\text{Ca}^{2+}$ : 250 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$ : 250 mg/L),

Table 1 群体形成実験に用いた培養液

Condition	TB-EPS (mg/L)	$\text{Ca}^{2+}$ (mg/L)	$\text{Mg}^{2+}$ (mg/L)
Control	0	0	0
Run1	100	0	0
Run2	40	100	100
Run3	0	250	250
Run4	100	250	250

Run4 (TB-EPS: 100 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$ : 250 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$ : 250 mg/L), および Control 系の 5 系とし、最終的な培養液量は 50 mL となるようにして試験を行った。0.5 M の塩酸水溶液を用いて、すべての培養液の初期 pH を  $8.0 \pm 0.1$  となるように調整した。培養条件は、温度 25°C, 照度 10,000 lx, 明暗周期 14 h 明/10 h 暗, 培養期間 3 d とした。藻体の沈殿による群体様の細胞塊ができないように、培養開始後は各フラスコを毎日、120 rpm, 30 s の条件で振とうした。実験は 3 系 ( $n = 3$ ) で行い、測定結果を[平均値]  $\pm$  [標準偏差]で示した。

#### 2.4. ミクロキスティス野生株 (アオコ) の浮揚性試験

TB-EPS およびカチオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ・ $\text{Mg}^{2+}$ ) がミクロキスティス野生株 (アオコ) の群体サイズおよび浮揚性に及ぼす影響について調べるため、浮揚性試験を行った。試験には栓付 50 mL メスシリンダーを用い、初期細胞密度が  $1.0 \times 10^7$  cells/mL となるようにミクロキスティス野生株をトリス緩衝液 (500 mg/L, pH 8.0) に接種した。そこへ、所定の濃度になるよう TB-EPS およびカチオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ・ $\text{Mg}^{2+}$ ) を添加した。培養系は、上述の群体形成試験で得られた結果を基に、Run1 (TB-EPS: 100 mg/L), Run3 ( $\text{Ca}^{2+}$ : 250 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$ : 250 mg/L), Run4 (TB-EPS: 100 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$ : 250 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$ : 250 mg/L) および Control 系の 4 系で試験を行い、最終的な培養液量は 50 mL とした。0.5 M 塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を用いて、すべての培養液の初期 pH を  $8.0 \pm 0.1$  となるように調整した。培養条件は、温度 25°C, 照度 5,000 lx, 培養期間 3 h とし、静置条件にて培養した。培養終了後、メスシリンダーの上層と下層それぞれ 25 mL を分取し、各層の細胞密度を測定した。実験は 3 系 ( $n = 3$ ) で行い、測定結果を[平均値]  $\pm$  [標準偏差]で示した。

本研究では、全細胞のうち上層に存在する細胞の割合を算出することで浮揚性を評価した。上層と下層の培養液が混ざらないよう駒込ピペットを用いて分取し、各層における細胞密度を測定した。上層および下層の細胞密度の値を  $C_1$  および  $C_2$ , 溶液量を  $V_1$  および  $V_2$  とし、細胞密度 ( $C_1$  および  $C_2$ ) と溶液量 ( $V_1$  および  $V_2$ ) から、相対浮揚率 (relative buoyancy; RB%) を次式から算出した [4]。

$$RB = \frac{c_1V_1}{c_1V_1+c_2V_2} \quad (1)$$

本研究では  $V_1$  および  $V_2$  が 25 mL であるため、細胞が上層と下層で均一に分布している場合の RB 値は 50% となる。

## 2.5. 結合性細胞外多糖類 (TB-EPS) の化学分析

### 2.5.1. 単糖

TB-EPS 試料の構成糖を調べるために HPLC にて糖分析を行った。蒸留水に TB-EPS を 5,000 mg/L になるよう溶解させた水溶液を測定試料とした。また TB-EPS 試料に対し、酸加水分解を行うことで糖鎖を単糖とし、酸加水分解後の試料に対しアミノ安息香酸エチル (ABEE) で標識化することにより蛍光検出を可能とした。なお、酸加水分解および標識化は「GlyScope ABEE 標識化キット」を用いて行った。カラムは Honenpak C18 (75 mm × 4.6 mm I.D.) を使用し、移動相として 0.2 M ホウ酸 (カリウム) 緩衝液 (pH 8.9) を用いた。流速は 1 mL/min, カラム温度は 40°C とした。また標準試料として単糖状態の D(-)-アラビノース,  $\alpha$ -L(+)-ラムノース, D(+)-グルコース, D(+)-ガラクトツロン酸, D(+)-ガラクトース, D(+)-キシロース, D(+)-フコースおよび D(+)-マンノース混合溶液を使用し検量線を作成した。TB-EPS 試料中の単糖濃度はピーク高さより計算した。

### 2.5.2. 粘度

TB-EPS 水溶液の粘度変化を調べるために粘度測定を行った。測定試料として、Table 1 に示した Run1 (TB-EPS: 100 mg/L), Run3 (Ca<sup>2+</sup>: 250 mg/L, Mg<sup>2+</sup>: 250 mg/L), Run4 (TB-EPS: 100 mg/L, Ca<sup>2+</sup>: 250 mg/L, Mg<sup>2+</sup>: 250 mg/L) および Control 系 (蒸留水) の 4 系で試験を行った。測定は安定した 3 つの値が得られるまで繰り返し行った。測定の際、純水の 20°C における粘度を 1.00 mPa·s として校正した。なお、すべての試料の pH を 8.0 とし、pH 調整の際には 0.5 M 塩酸水溶液を使用した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. 結合性細胞外多糖類 (TB-EPS) の構成糖

マイクロキスティスを主とするアオコから単離した TB-EPS を溶解させ、HPLC にて

Table 2 TB-EPS の単糖組成 (試料: 5000 mg/L TB-EPS 溶液)

Sample	Monosaccharides (mg/L)							
	GalA	Gal	Man	Glc	Ara	Xyl	Fuc	Rha
TB-EPS	55.8	12.9	29.8	120	6.38	19.7	36.3	28.8

単糖濃度を測定した。その結果を Table 2 に示す。TB-EPS は、本実験で対象とした 8 種の単糖をすべて含有していた。中でもグルコースおよびガラクトuron酸濃度はそれぞれ 120 および 55.8 mg/L と最も高い含有濃度を示していた。それに対し、アラビノース濃度は最も低く 6.38 mg/L であった。研究代表者らは、SL-EPS, LB-EPS および TB-EPS の混合物である MX-EPS について同様の分析を行っており [5], 上述した 8 種の単糖濃度は 0 mg/L (ガラクトース)~5.85 mg/L (キシロース)であった。これらの結果をまとめると、TB-EPS を構成する単糖種は MX-EPS より多く、またグルコースやガラクトuron酸は 1~2 オーダー高く含有していることが明らかとなった。

### 3.2. 結合性細胞外多糖類 (TB-EPS) とカチオンが溶液の粘性に及ぼす影響

TB-EPS およびカチオンをトリス緩衝液に添加したときの溶液の粘性変化を Table 3 に示す。溶液に TB-EPS を添加することにより (Run1), 粘度は  $1.08 \pm 0.00$  mPa·s となった。この結果からも TB-EPS には高分子状の多糖類が含有していることがわかる。一方、カチオン ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$ ) を添加した Run3 における粘度は蒸留水の粘度

Table 3 各培養液における粘度

Condition	Viscosity (mPa·s)
Control	$1.00 \pm 0.00$
Run1	$1.08 \pm 0.00$
Run3	$1.01 \pm 0.00$
Run4	$1.11 \pm 0.02$

( $1.00 \pm 0.00$  mPa·s) とほとんど変化がなかったが、TB-EPS とカチオンを同時に添加することで、溶液の粘度は最も高い値 ( $1.11 \pm 0.02$  mPa·s) を示した (Run4)。一般に、TB-EPS 表面上にはカルボキシ基のような酸性官能基が存在していることが指摘されている [6]。EPS 表面上のカルボキシ基は、水溶液中の 2 価のカチオンと架橋反応を示し、より高分子状へと変化するものと予想される。このため、TB-EPS とカチオンが共存する水溶液において粘度が増加したものと考えられる。これらの結果から、マイクロキスティス細胞あるいはマイクロキスティス群体を取り巻く TB-EPS は水溶液中のカチオンと架橋構造をとり、単体状のマイクロキスティスは群体を、群体を形成しているマイクロキスティスはそのサイズを拡大するものと推察される。

### 3.3. ミクロキスティス培養株の群体形成試験

培養終了時 ( $t = 3$  d) における各培養液のマイクロキスティス培養株を Fig. 1 (a)~(e) に示す。Run1, Run3 および Run4 において、マイクロキスティス培養株は群体を形成しており (Fig. 1 (b), (d), (e)), その他の系では単細胞およびツイン細胞のみが観察された。これらの培養液におけるマイクロキスティスの群体密度は、それぞれ  $333 \pm 276$ ,  $27 \pm 21$  および  $1856 \pm 150$  colonies/mL の順で高くなり、また Run4 においては他の系よりも明らかに大きな群体が観察された (Fig. 1 (e))。研究代表者らのこれまでの研究の中で、マイクロキスティス培養株の群体形成には、MX-EPS: 200 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$ : 1,000

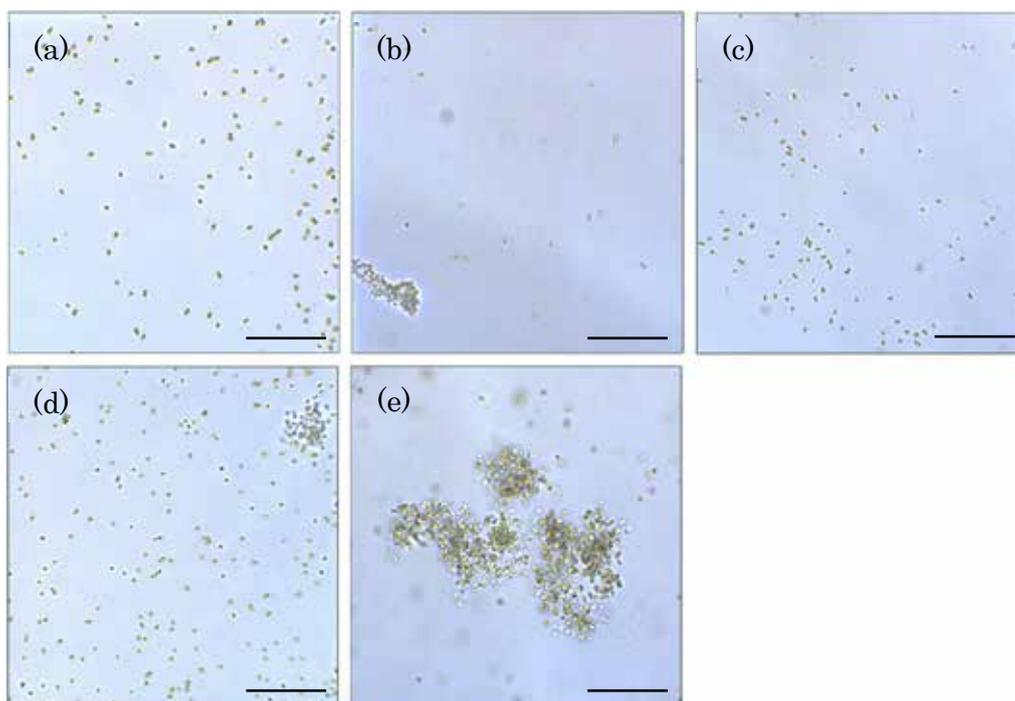


Fig.1 各培養液における培養 3 日後のミクロキスティス (a) Control, (b) Run1, (c) Run2, (d) Run3, (e) Run4 Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

mg/L および培養時間 1 日の条件 [7], あるいは MX-EPS: 100 mg/L,  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}^{2+}$ : 250 mg/L および培養時間 5 日の条件 [8]が必要であることを示していたが, 本実験では TB-EPS を利用することにより, より低濃度の TB-EPS およびカチオン条件で, かつ短時間でミクロキスティスが群体を形成することがわかった。また Run1 と Run2 を比較すると, TB-EPS が 100 mg/L のときにミクロキスティスが群体を形成するのに対し, TB-EPS を 40 mg/L と低減することで,  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  濃度が 100 mg/L 共存していてもミクロキスティスは群体を形成しなかった。この結果より, ミクロキスティスの群体形成には TB-EPS が必要であり, その濃度は少なくとも 100 mg/L 以上必要であることが見出された。

以上の結果から, 本実験におけるミクロキスティスの群体形成のための最適条件は, TB-EPS が 100 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  濃度が 250 mg/L であることがわかった。これらの成果を基に, TB-EPS およびカチオン制御技術を浮揚性のある実際のアオコに応用することで, アオコの群体形成と浮揚性も制御可能であると予想される。

### 3.4. アオコ (ミクロキスティス野生株)の浮揚性試験

各培養液にてアオコ (ミクロキスティス野生株)を培養した結果を Fig. 2 に示す。また各培養液の上層と下層の細胞密度のデータから算出したミクロキスティス野生株の相対浮揚率 (RB)を Fig. 3 に示す。Control 系において, 上層および下層のミクロキステ

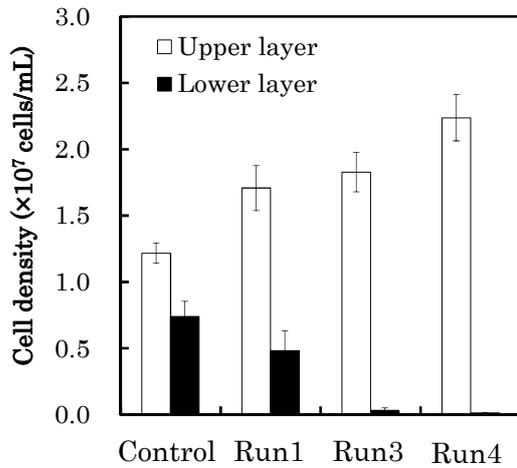


Fig.2 各培養液における上層および下層のマイクロスキステイスの細胞密度

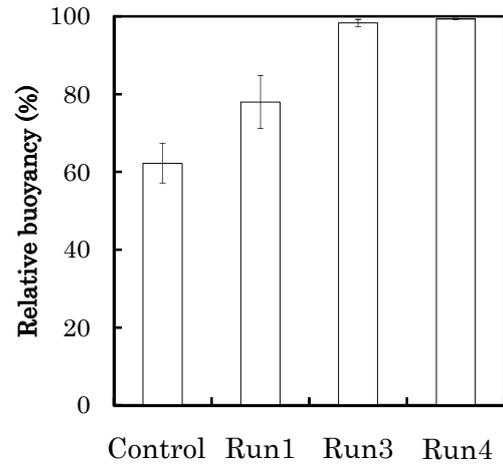


Fig.3 各培養液におけるマイクロスキステイスの相対浮揚率

イス野生株の細胞密度は、それぞれ  $1.22 \times 10^7 \pm 0.08 \times 10^7$  cells/mL および  $0.74 \times 10^7 \pm 0.11 \times 10^7$  cells/mL であり、またこれらのデータから(1)式に基づき相対浮揚率を算出したところ、RB 値は  $62 \pm 5.1\%$  であった。これは、千波湖から採取したマイクロスキステイス野生株が強い浮揚性を有していることを示唆している。一方、培養液に TB-EPS, カチオンあるいはそれらを同時添加すると、培養槽上層のマイクロスキステイス野生株の細胞密度が顕著に高まる傾向を示した (Fig. 2)。各培養液における RB を計算した結果、値はそれぞれ  $78 \pm 6.8\%$ ,  $98 \pm 0.9\%$  および  $99 \pm 0.1\%$  となり、TB-EPS およびカチオンを同時添加

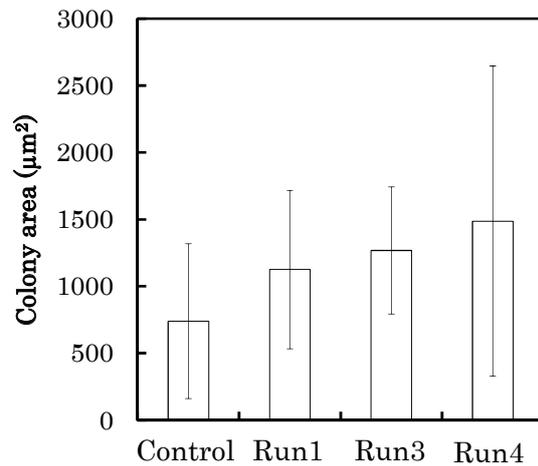


Fig.4 各培養液におけるマイクロスキステイスの群体面積

することで、ほぼすべてのマイクロスキステイス野生株が上層に集積することがわかった。

次に、各培養液におけるマイクロスキステイス野生株の群体面積を Fig. 4 に示す。Control 系の群体面積は、 $739 \pm 579 \mu\text{m}^2$  であった。それに対し、Run1, 3 および 4 の群体面積は、それぞれ  $1125 \pm 592$ ,  $1267 \pm 475$  および  $1486 \pm 1159 \mu\text{m}^2$  と、特に TB-EPS およびカチオンを添加した系においてマイクロスキステイス野生株の群体面積が高まる結果となった。

一般にマイクロスキステイスの浮揚性は、群体径の 2 乗に比例して増加すると言われている (ストークスの法則)。Run1, 3 および 4 を見ると、マイクロスキステイス野生株の浮

揚性は群体面積に比例して高くなっていることから、本実験結果はストークスの法則に従っていると言える。しかしながら、Run3 および Run4 の RB 値を比較すると、群体面積に差が認められるものの、両培養条件ともに 98~99% と高い値を示している。これは、マイクロキスティス野生株の浮揚性試験における培養時間が 3 時間と長く、ほぼすべての細胞が上層に集積したためと推察される。目視による観察結果から、Run4 におけるマイクロキスティス野生株は、実験開始直後に Run3 と比べて急速に上昇し、上層に集積する傾向を示した。この結果は、TB-EPS およびカチオンを添加することで、マイクロキスティス野生株の細胞を、より短期間で上昇させ得る可能性があることを示唆している。従って、今後は実浄水場あるいは実湖沼での処理を視野に入れ、より短時間でマイクロキスティス野生株を水面に集積させることができる処理手法の開発に着手する予定である。

#### 4. 結言

本研究は、アオコ（マイクロキスティス野生株）由来の結合性細胞外多糖類（TB-EPS）を単離し、この TB-EPS とカチオン（ $\text{Ca}^{2+}$ ・ $\text{Mg}^{2+}$ ）を、通常の条件では決して群体を形成しないマイクロキスティス培養株に添加することで、群体を効率的に形成する最適条件を明らかにすることを目的とした。マイクロキスティス培養株は、TB-EPS およびカチオン（ $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Mg}^{2+}$ ）をそれぞれ 100 mg/L および 250 mg/L となるように同時添加することで、効率的に群体を形成することが明らかになった。これらの実験にて得られた成果を、実湖沼のマイクロキスティス野生株に応用したところ、群体面積が向上し、浮揚性が飛躍的に高まる（全細胞のうちおよそ 99%）ことを見出した。

本浮揚性試験は培養 3 時間で行ったものであるが、実際にはより短い時間で水面に集積させ得る可能性が示唆された。今後は実際の浄水処理あるいは実湖沼での処理を視野に入れ、より短時間で、かつ効率的にアオコを浮揚させることができる、より実用的な除去システムの確立を目指す。

#### 謝辞

本研究は、「公益財団法人 JFE21 世紀財団」の研究助成による支援を受けて実施しました。ここに感謝の意を表します。

#### 引用文献

- [1] Wells, M. L., Trainer, V. L., Smayda, T. J., Karlson, B. S. O., Trick, C. G., Kudela, R. M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D. M., Cochlan, W. P. "Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future". *Harmful Algae*, 49, 68-93, 2015.
- [2] Sato, M., Amano, Y., Machida, M., Imazeki, F. "Colony formation of highly

- dispersed *Microcystis aeruginosa* by controlling extracellular polysaccharides and calcium ion concentrations in aquatic solution”. *Limnology*, 18, 111-119, 2017.
- [3] Xu, H., Yu, G., Jiang, H. “Investigation on extracellular polymeric substances from mucilaginous cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater lakes”. *Chemosphere*, 93, 75-81, 2013.
- [4] Wang, Y. W., Zhao, J., Li, J., Li, S. S., Zhang, L. H., Wu, M. “Effects of calcium levels on colonial aggregation and buoyancy of *Microcystis aeruginosa*”. *Current Microbiology*, 62, 679-683, 2011.
- [5] Sakurai, S., Omori, K., Amano, Y., Machida, M. “Removal of *Microcystis* blooms using enhanced colony formation and buoyancy by controlling extracellular polysaccharides and cation concentrations”. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 4793-4802, 2019.
- [6] Xu, H., Yu, G., Jiang, H. “Investigation on extracellular polymeric substances from mucilaginous cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater lakes”. *Chemosphere*, 93, 75-81, 2013.
- [7] Sato, M., Omori, K., Tania, D., Amano, Y., Machida, M. “Influence of extracellular polysaccharides and calcium ion on colony formation of unicellular *Microcystis aeruginosa*”. *Environmental Engineering Science*, 34, 149-157, 2017.
- [8] Omori, K., Sato, M., Amano, Y., Machida, M. “Induction of colony formation of *Microcystis aeruginosa* by controlling extracellular polysaccharides and metal cation concentrations”. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 51, 289-297, 2018.