

[水質汚濁研究 第14巻 第9号 615—623 1991]

〈論 文〉

バッチ培養における *Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の細胞外代謝不揮発性有機酸の培養液中への蓄積

大村 達夫* 海田 輝之* 相沢 治郎*
小松 佳幸** 石崎 正志* 大沼 正郎*

Accumulation of Extracellular Non-volatile Organic Acids in Batch Cultures of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*

Tatsuo OMURA*, Teruyuki UMITA*, Jiro AIZAWA*,
Yoshiyuki KOMATSU**, Masashi ISHIZAKI* and Masao ONUMA*

* Department of Civil Engineering, Faculty of Engineering, Iwate University, Ueda 4-3-5, Morioka 020 Japan

** Nippon Koei Co. Ltd.

Abstract

The accumulation processes of non-volatile organic acids were investigated in pure batch cultures of *Chlorella vulgaris* cultivated in the Chu medium and *Microcystis aeruginosa* cultivated in the Chu and MA medium, respectively.

Glycolic and oxalic acids accumulated in the culture of *Chlorella vulgaris*. The former acid mainly accumulated in the logarithmic growth phase, while the latter acid accumulated in the decrease phase.

The glycolic acid was the significant non-volatile organic acid in the culture of *Microcystis aeruginosa*, and accumulations of pyruvic, fumaric, oxalic and lactic acids were also determined at the end of experiment. However, these organic acids did not accumulated in the logarithmic growth phase of *Microcystis aeruginosa* cultivated in the MA medium with organic compounds.

Key words: *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa*, batch culture, non-volatile organic acids, dissolved organic carbon

1. 緒 言

藻類がバクテリアと同様に環境中に有機物を放出するであろうと主張したのは約100年前の Putter (1908) である¹⁾。その後、多くの研究者の報告の中で藻類による細胞外代謝産物は量的にも無視できないものであり、生態学上重要なものであるという主張がなされている²⁾。

このように藻類によって水中に放出される有機物は光合成により同化されたものであるが、同化された炭

素量のうち放出される炭素量の比率は、0～90%と広い範囲にわたっていることが報告されている³⁾。また、放出有機物の分子量の評価についても、Maguer (1980) や Iturriaga (1981) は、代謝産物のほとんどを低分子量物質が占めると報告しており^{4),5)}、一方 Chrost と Faust (1983) は10,000 (dalton) 以上の物質が50%を占めると報告している⁶⁾。

これらの放出される代謝産物は藻類の種類・環境条件・藻類の状態によって非常に異なるし、健康な細胞から細胞膜を浸透し放出される場合と自己分解により

* 岩手大学工学部土木工学科 〒020 盛岡市上田4-3-5

** 日本工営(株) 〒102 東京都千代田区麹町5-4

外界にそれぞれ放出される場合があり⁷⁾両者を区別して議論しなければならない。しかし、多くの場合、細胞外代謝産物とは両者を合せた意味で用いられていることが多い。

一般に藻類の細胞外代謝産物には多糖類やタンパク質のような高分子量物質とグルコース、アミノ酸および有機酸のような低分子量物質があり⁸⁾、藻類の活発な増殖が観察される水域においては、これらの有機物により他栄養性細菌の活性が助長され藻類と細菌の集団を形成するものと考えられている。これは代謝有機物の無機化の最初の段階を担うことになり、水系において非常に重要な過程となる⁹⁾。

このように藻類から放出される代謝産物は共存微生物の増殖やそれら微生物による分解によってもたらされるCO₂により藻類自身の増殖を助長する可能性など水域の生態系に影響を与える重要な因子の1つであると考えられる。

細胞外代謝産物のうち、グリコール酸等の不揮発性有機酸に着目し、これら不揮発性有機酸を定量、評価することは、藻類の存在する水域での水質評価に役立つものと考えられる。

藻類から放出される不揮発性有機酸には様々なものが報告されている。その例をいくつか挙げると、無色藻類である *Prototheca zopfii* は、半嫌気状態でグルコースの発酵にともない相当量のL-乳酸を生成し¹⁰⁾、*Prototheca* 類はピルビン酸も放出すると報告されている¹¹⁾。*Ochromonas malhamensis* は乳酸を生成するし^{12),13)}、*Chlamidomonas* 各種はグリコール酸、修酸、ピルビン酸を放出することも見出されている¹⁴⁾。

そこで本研究では、緑藻類の *Chlorella vulgaris* と藍藻類の *Microcystis aeruginosa* を用いてバッチ形式で無菌的に純粋培養を行い増殖期あるいは減衰期において、培養液中に蓄積される不揮発性有機酸を定量するとともに、溶存有機炭素量(DOC)、ゲルクロマトグラフィーを用いて、これらの藻類からの細胞外代謝不揮発性有機酸について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 藻類培養方法および培養条件

Fig. 1 に藻類の培養に用いた実験装置を示した。完全混合培養槽は容量9.6lのガラス製のものを用い、また、側面から白色蛍光灯(4,000lux)を照射し、12/12時間明暗培養を行った。実験に使用した装置は無菌的に培養を行うため、あらかじめ121°Cで30分間蒸気滅菌された後、実験まで紫外線照射が可能な無菌箱の中に保存した。また、培養温度を恒温槽によって *C. vulgaris* と *M. aeruginosa* の至適温度の25°Cに保った。Table 1 には有機炭素をほとんど含まないChu培地を示し、また、Table 2 には有機炭素をDOCとして約210 mgC・l⁻¹含むMA培地を示した。*C. vulgaris* の培養においてはChu培地を使用し、*M. aeruginosa* に関してはChu培地およびMA培地を使用した。

さらに、槽内の混合を保障するために培養液を無菌空気でばっ気した。無菌空気は、濃硫酸の中に通気し

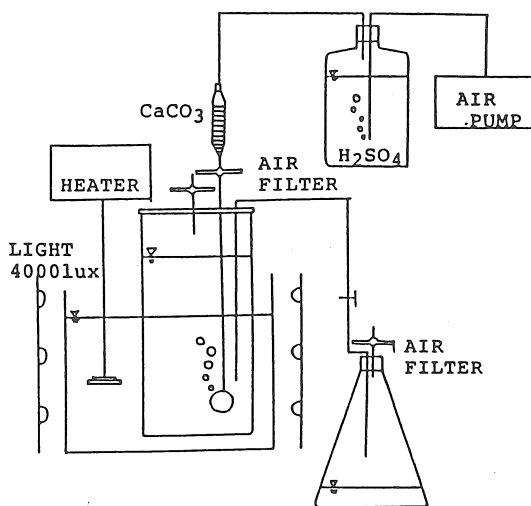


Fig. 1 Algal cultivation system

Table 1 Composition of Chu's medium

Ca(NO ₃) ₂	0.04 g
K ₂ HPO ₄	0.02 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.025 g
Na ₂ CO ₃	0.02 g
Na ₂ Si ₃	0.025 g
FeCl ₃	0.0008g
PIV金属混液 ¹⁾	1.0 ml
蒸留水	1,000 ml

1) PIV金属混液	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.196 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.036 g
ZnCl ₂	0.0105g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.001 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0025g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1.0 g
蒸留水	1,000 ml

Table 2 Composition of MA medium

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.05 g
KNO ₃	0.10 g
NaNO ₃	0.05 g
Na ₂ SO ₄	0.04 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.05 g
βグリセロリン酸ナトリウム	0.10 g
Na ₂ EDTA	0.005 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0005g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0005g
ZnCl ₂	0.0005g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.005 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0008g
H ₃ BO ₃	0.02 g
Bicine (グッドの緩衝剤)	0.50 g
蒸留水	1,000 ml

Table 4 Calibration curves of 1-butyl esters of non-volatile organic acids

Pyruvic acid	Y = 0.0227 X + 0.0003
Lactic acid	Y = 0.0265 X + 0.0012
Glycolic acid	Y = 0.0292 X - 0.0015
Oxalic acid	Y = 0.0650 X - 0.0012
Fumalic acid	Y = 0.0347 X + 0.0005

Y: $\frac{\text{Non-volatile organic acid area}}{\text{Internal standard area}}$

X: Non-volatile organic acid conc. (mg·l⁻¹)

たのち、炭酸カルシウムのカラムを通過させ、その後、0.2μmのフィルター (Millex-FG50) を通過させることにより得た。

実験に使用した *C. vulgaris* (227) および *M. aeruginosa* (87) は国立環境研究所微生物系統保存施設より提供を受けた。また、これらが無菌的に植え継ぎ培養し、植え継ぎ培養後10日経過したものを実験時の植種とした。その時の *C. vulgaris* の細胞数は10⁷ cell·ml⁻¹のオーダーであり、*M. aeruginosa* の場合クロロフィル a 濃度は約10² μg·l⁻¹であった。また、植種量はこれらの培養液の10mlであり、培養槽上部よりシリンジで植種した。

2.2 測定項目および方法

(1) 測定試料：培養槽より採取した試料をガラス織維濾紙 GS-25 (東洋濾紙) によって濾過した。濾紙はクロロフィル a およびフェオ色素の測定に使用した。次に濾液の不揮発性有機酸濃度、ゲルクロマトグラフィーおよび DOC を測定した。

(2) 藻類量：藻類量としてはアセトン抽出法によるクロロフィル a を用いた。藻類の死細胞の指標としては Lorenzen の方法を用いてフェオ色素を測定し

Table 3 Condition of gas chromatograph

Instrument	YANACO G-180 (FID) Sic Chromatocorder 11
Column temperature, °C	
Starting	60
Heating rate, °C/min	5
Finishing	240
Injectin port temperature, °C	200
Detector temperature, °C	200
Sensitivity	10 ⁻¹
Attenuation	1/2
Nitrogen flow, kg·cm ⁻²	2.0
Hydrogen flow, kg·cm ⁻²	0.8
Air flow, kg·cm ⁻²	0.5

た¹⁵)。同時に *C. vulgaris* の場合にはトーマの血球計数盤を用いて光学顕微鏡による細胞数計測も行った。

(3) 不揮発性有機酸：不揮発性有機酸はエステル化手法¹⁶)を用いてガスクロマトグラフィーで定量する方法を用いた。まず、濾過した培養液0.5lを1/10(N) NaOHにより中和滴定し、共せん付き試験管に移す。これをロータリーエバポレーターを用いて45°Cで減圧乾固し、次にこの乾固した白色粉末にブタノール2 ml、無水硫酸ナトリウム約2 g、濃硫酸を0.2ml加え、冷却管を付し30分間穏やかに沸騰させエステル化する。充分冷却後、5 mlのn-ヘキサンで冷却管を洗浄し蒸留水5 mlを加えよく混合して、生成したエステルをn-ヘキサン5 mlで抽出する。さらに3回ずつn-ヘキサン5 mlで抽出し全量を20mlとし、少量の無水炭酸ナトリウムを加え濾過する。これにn-ドデカンの内標準として加え、ガスクロに5 μl注入する。また、Table 3にガスクロの測定条件を示した。

Fig. 2に本研究で定量した各不揮発性有機酸のガスクロマトグラム例を示した。これより、それぞれのピーク温度および保持時間を求めるとピルビン酸は117.5°C, 11.3min, 乳酸は121.5°C, 12.3min, グリコール酸は125.0°C, 13.0min, シュウ酸は175.0°C, 23.0 min, フマル酸は193.5°C, 27.0minであった。Table 4に各不揮発性有機酸のピーク面積と内標準のピーク面積の比で作成した検量線を示した。これを用いて培養液の各不揮発性有機酸の定量を行った。

(4) ゲル濾過：ゲルカラムは内径25mm, 高さ90cmで、ゲルの分画可能分子量が0~1,500のSephadex G-15を使用した。展開流量は60ml·hr⁻¹で1 fractionを10mlとし50fraction分画を行い、それぞれの濾液の吸光度を測定しゲルクロマトグラムを描いた。吸光度は、260nm (E₂₆₀) および220nm (E₂₂₀) を測定した。

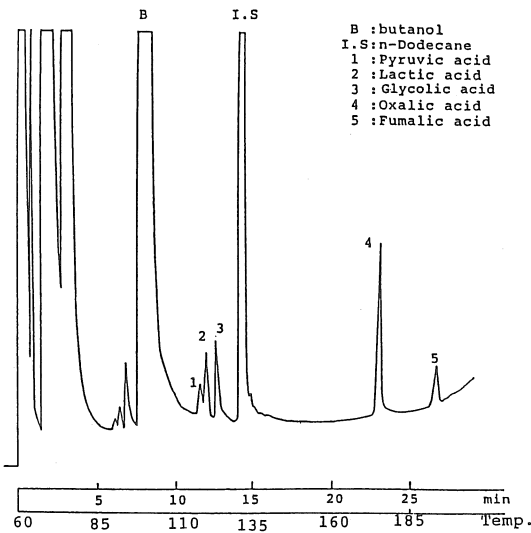


Fig. 2 Typical gas chromatogram for 1-butyl esters of non-volatile acids

E_{260} は無機成分の妨害をほとんど受けることなく不飽和結合を有する有機物を低濃度領域で測定でき、また、 E_{220} は不飽和結合を有する有機物の他に硝酸、亜硝酸、炭酸などの微生物の代謝に関与する無機物の指標として用いられている¹⁷⁾。本研究で対象とする藻類の培養液中の不揮発性有機酸の挙動を評価する場合には、ゲルのタイプとして、低分子量を良く分画し得るものが良いと考えられる。したがって、Sephadex G-15を用いて分画することにした。

また、溶出容量と溶質の分子量との関係を示す経験式も多く研究者によって報告されているが、本研究ではゲル分画の有効性をGranathらの式を用いて検討を行った¹⁸⁾。ただし、溶質としては、シュウ酸 (M.W. 90)、グルコース (M.W. 180)、N,N-ビス(2ヒドロキシエチル)グリシン (M.W. 163)、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (M.W. 372) を用いた。Fig. 3にこれらの溶質の溶出容量と溶質の分子量との関係を示した。この図より、良い直線性が得られGranathらの式にあてはめると次のようになる。

$$V_e/V_t = -0.43 \log M + 1.65$$

ここで、 V_e は溶出容積、 V_t はベッド溶積、 M は溶質の分子量である。これより、本実験におけるゲル分画の有効性が確かめられた。

(5) 溶解性有機炭素量 (DOC) : DOCはゲル分画し

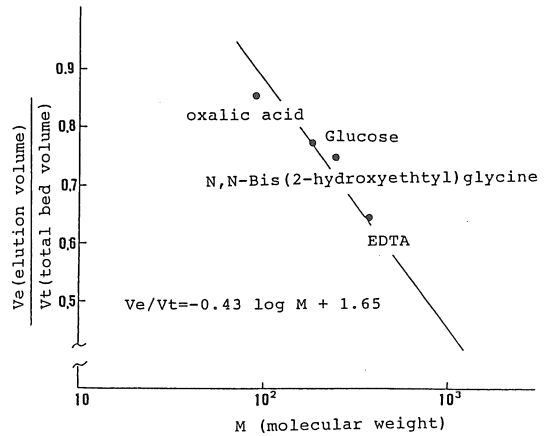


Fig. 3 Relationships between molecular weight and V_e/V_t

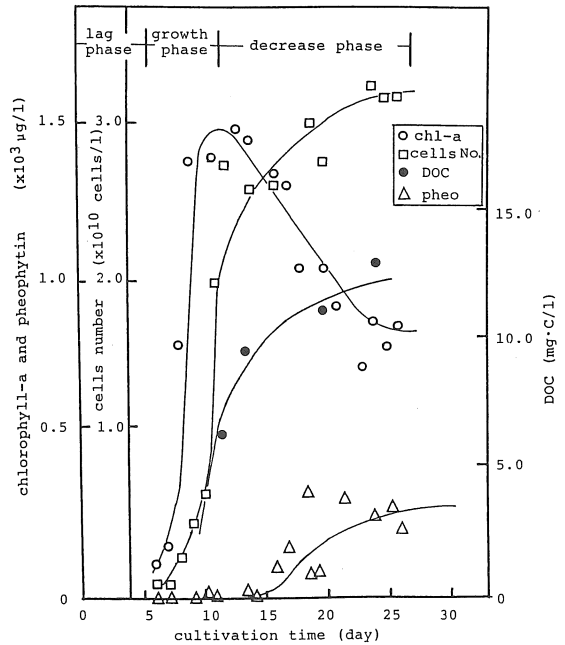


Fig. 4 Growth curves of *Chlorella vulgaris* and accumulation of DOC

た fraction ごとに全有機体炭素計 TOC-500 (島津製) によって測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 *Chlorella vulgaris*

3.1.1 *Chlorella vulgaris* の増殖過程

Fig. 4に *C. vulgaris* の増殖曲線およびフェオ色素、培養液中のDOC濃度をそれぞれ示した。*C. vulgaris* は、培養開始後約5日間の遅滞期を経た後約11日目ま

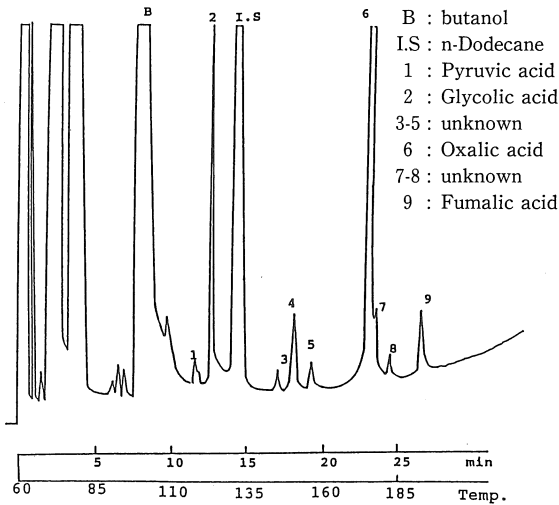


Fig. 5 Gas chromatogram of the pure culture for *Chlorella vulgaris* after 23 days from the beginning of experiment

で対数的に増殖した。この時の比増殖速度は、クロロフィル a 換算で $0.29d^{-1}$ であり、細胞数換算で $0.31d^{-1}$ であった。そして、約 $1.5 \times 10^3 \mu g \cdot l^{-1}$ でクロロフィル a の増加は停止し、その後クロロフィル a の含有量は減少し、培養終了時には約 $0.81 \times 10^3 \mu g \cdot l^{-1}$ となった。しかし、この時細胞数の減少はなかった。これは細胞数の測定を光学顕微鏡で行ったので死細胞を生細胞と同様に計数したためと考えられる。フェオ色素を見ると増殖期にはほとんど検出されなかったものが実験終了時には $0.2 \times 10^3 \mu g \cdot l^{-1}$ となり、クロロフィル a の約 25% を占めた。このようにクロロフィル a が低下する間には *C. vulgaris* の死滅過程が進んでいるものと考えられる。

以上から、*C. vulgaris* の培養開始から 5 日目までを遅滞期、5~12 日目までを対数増殖期、それ以降を減衰期として考察を進めることにする。

培養液中の DOC 濃度は、経過日数に従って増加し培養終了時には約 $13.1 mg \cdot C \cdot l^{-1}$ になった。すなわち、*C. vulgaris* による培養液中への代謝有機物の蓄積が起こっていることを示している。

3.1.2 *Chlorella vulgaris* 培養液中の不揮発性有機酸

Fig. 5 に本研究で得られた *C. vulgaris* の 23 日目の培養液のガスクロマトグラムの一例を示したが、ピルビン酸、グリコール酸、シュウ酸およびフマル酸が検出されている。また、物質を特定できないピークも見られるが、ここでは特定できた上記の不揮発性有機酸に乳酸を加えた 5 種類について考察を行うことと

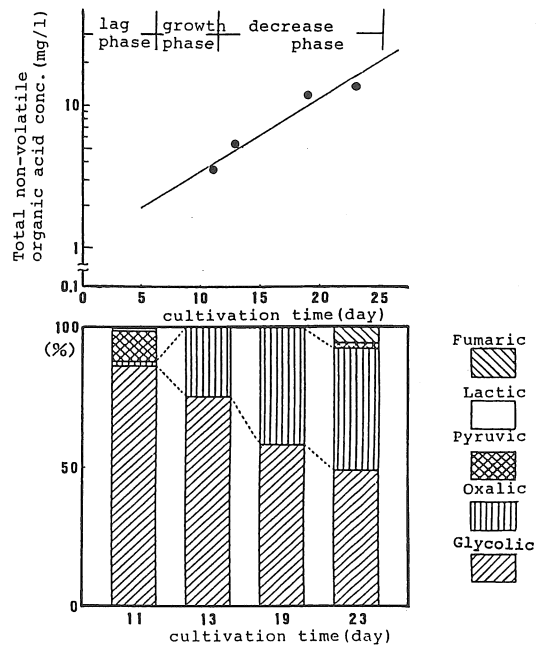


Fig. 6 Accumulation of non-volatile organic acid in the pure culture for *Chlorella vulgaris*

し、これらの有機酸の総量を総不揮発性有機酸量とみなすことにする。

Fig. 6 に *C. vulgaris* の各培養日数での不揮発性有機酸の定量結果とそれぞれの不揮発性有機酸が総不揮発性有機酸量に占める割合を示した。

C. vulgaris は増殖および減衰期を通じて不揮発性有機酸を培養液中に対数的に蓄積していることがわかる。また、*C. vulgaris* の対数増殖期には光合成において生成される初期の生成物として報告されているグリコール酸の蓄積が総不揮発性有機酸の 87.5% と高い割合となり、減衰期前半においても 70% 以上の割合となった。一方、減衰期前半から後半にかけて培養液中でのシュウ酸の蓄積が顕著になり、培養終了時にはシュウ酸の割合がグリコール酸とほぼ同じになった。

また、代謝経路の分岐点に位置するといわれるピルビン酸や好氣的代謝においてクエン酸回路の重要な要素であるフマル酸も若干培養液中に蓄積されていることがわかった。

3.1.3 *Chlorella vulgaris* 培養液のゲル分画

Fig. 7 に、*C. vulgaris* の対数増殖期および減衰期における培養液のゲルクロマトグラムを示した。蓄積有機物の成分は 3 つの大きな画群に分画されることがわかる。そして、それぞれのピークを画群 I, II, III として以降の考察を進めることとした。

C. vulgaris のゲルクロマトグラムで求められた各

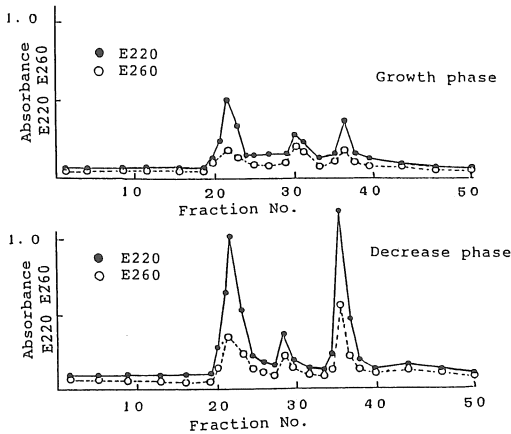


Fig. 7 Gelchromatogram for *Chlorella vulgaris* in the growth and decrease phases

画群のピークまでの V_e の値はそれぞれ画群 I では約 200ml, 画群 II では約 280ml, 画群 III では約 350ml となり, Fig. 3 で得られた回帰直線により画群 I では 602, 画群 II では 228, 画群 III では 97 前後の分子量の物質が溶出していることが考えられる。

本研究における不揮発性有機酸の分子量が 76~116 の範囲にあることを考えると, 5 種類の不揮発性有機酸は Fraction (No.) で 33~37 (Fraction) に溶出することになる。

このことにより, これらの不揮発性有機酸は画群 III に含まれ, 画群 III は不揮発性有機酸の蓄積の指標になるものと考えられる。

Fig. 8 に, 各経過日数の培養液を分画して得られた画群 I, II, III に含まれる DOC の変化を示した。

この図より, 培養開始 11 日目および 13 日目の対数増殖期に培養液に蓄積された代謝有機物の各画群の割合はほぼ同じ, $2.00 \sim 2.68 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲にあった。その後減衰期になると画群 I と画群 III の DOC の蓄積が顕著になった。画群 I の DOC の増加は少なくとも分子量の大きい代謝有機物が培養液中に蓄積することを示し, 画群 III の DOC の増加は減衰期における不揮発性有機酸の蓄積を端的に示している。

3.2 *Microcystis aeruginosa*

3.2.1 *Microcystis aeruginosa* の増殖過程

Fig. 9 に *M. aeruginosa* の増殖曲線を示した。Fig. 9-(a) の増殖曲線から, クロロフィル a の濃度は Chu 培地使用の実験では約 10 日間の遅滞期を経たのちに増加し, Fig. 9-(b) の MA 培地使用の実験では約 5 日間の遅滞期を経たのちに増加した。

それぞれの遅滞期を経た後, *M. aeruginosa* は Chu 培地では比増殖速度が 0.27 d^{-1} , MA 培地でも 0.26 d^{-1}

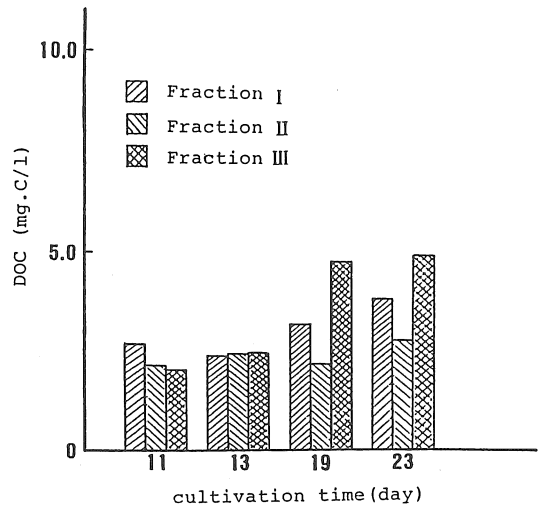


Fig. 8 Accumulation of DOC with cultivation time for *Chlorella vulgaris*

で対数増殖した。これらの比増殖速度は M-11 培地を用い, 培養温度 $25 \sim 35^\circ \text{C}$, 照度 $2,000 \text{ lux}$ の環境下での実験による比増殖速度¹⁹⁾の 0.25 d^{-1} とほぼ一致する値となっている。

クロロフィル a の濃度は約 $3.5 \sim 4.0 \times 10^2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ で増加が停止し, その後 *C. vulgaris* の場合と同様に減少した。Fig. 4 に示したフェオ色素を見ると培養終了時には約 $1.5 \times 10^2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であり, クロロフィル a とほぼ同じ量を占めた。この結果より *C. vulgaris* 以上に死滅過程が進行していることが考えられる。そこで *M. aeruginosa* の増殖過程の場合も *C. vulgaris* と同様に遅滞期, 対数増殖期, 減衰期と区分し考察することにした。

Chu 培地の場合対数増殖期初期から DOC は増加し, 培養終了時には $33.1 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ となった。これは *C. vulgaris* と同様に代謝有機物の蓄積を示している。

MA 培地の場合の DOC の変化を見ると Chu 培地と異なって培地に約 $210 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ の有機炭素が含まれているので, 初期の増殖期において *M. aeruginosa* による有機炭素の利用が顕著である。増殖期後期には, DOC は $5.0 \text{ mg} \cdot \text{C} \cdot \text{l}^{-1}$ まで減少し, 培地の有機炭素が *M. aeruginosa* の増殖によってほとんど利用されていることを示している。したがって, 減衰期における培養液の DOC の増加は *M. aeruginosa* によって放出された有機物の蓄積を示していると考えられる。

3.2.2 *Microcystis aeruginosa* 培養液中の不揮発性有機酸

Fig. 10 に Chu 培地を使用した場合の, 各培養日数での不揮発性有機酸の定量結果とそれぞれの不揮発性

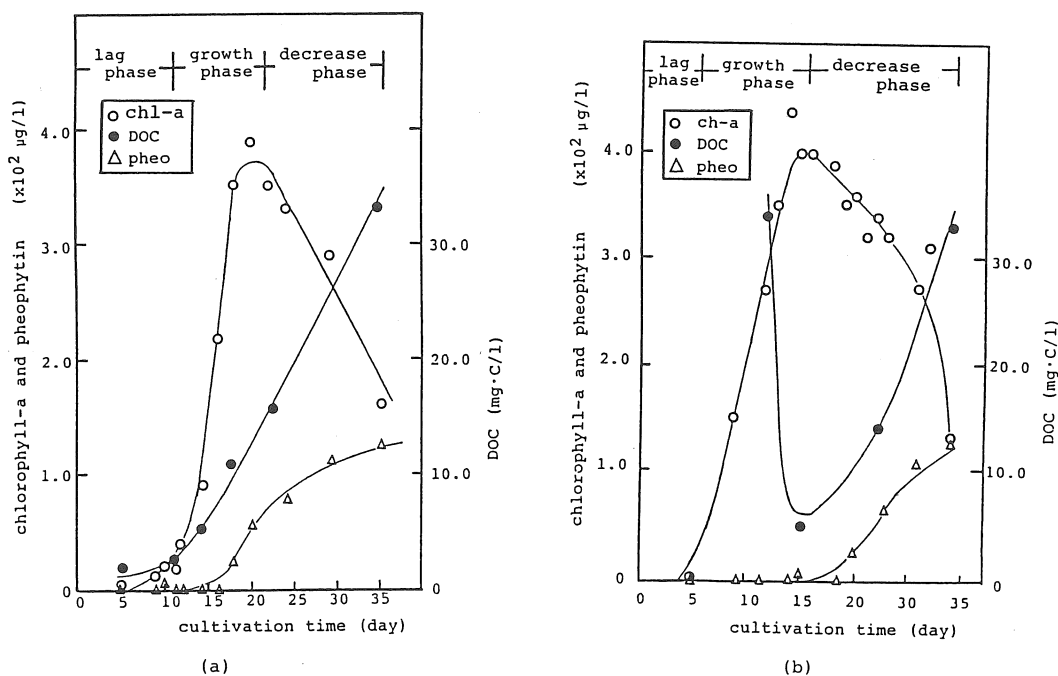


Fig. 9 Growth curves of *Microcystis aeruginosa* and accumulation of DOC
 a) culture in Chu's medium b) culture in MA medium

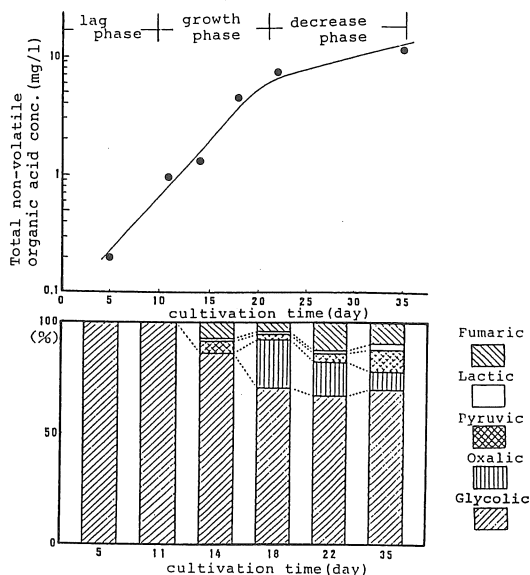


Fig. 10 Accumulation of non-volatile organic acid in the pure culture for *Microcystis aeruginosa* cultivated in Chu's medium

有機酸が総不揮発性有機酸量に占める割合を示した。この図から、*M. aeruginosa* の対数増殖期の初期に蓄積される不揮発性有機酸はグリコール酸であり、対数増殖期の後期にはフマル酸、乳酸、ピルビン酸も培養液中に存在した。しかし、対数増殖期を通じて、蓄積される不揮発性有機酸はグリコール酸であることが明らかになった。

減衰期においても主要な不揮発性有機酸はグリコール酸であるがピルビン酸、乳酸、シュウ酸、フマル酸なども総不揮発性有機酸のほぼ30%を占めた。

Fig. 11 に MA 培地を使用した場合の結果を示した。MA 培地を用いた場合には対数増殖期の初期において培養液中への不揮発性有機酸の蓄積はまったく観測されず、Chu の培地を用いた場合とは異なる結果となった。また、対数増殖期の最後においても培養液中の総不揮発性有機酸は $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、Chu の培地での対数増殖期初期の値程度であった。すなわち、MA 培地のように、培地中に有機物を多量に含んでいる場合は、対数増殖期にほとんど不揮発性有機酸の蓄積は起こらないことが明らかになった。

しかし、実験終了時の不揮発性有機酸の濃度は $8.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となり Chu の培地を使用した場合の $10.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にほぼ匹敵した。このように MA 培地を用いた場合、培養液中への不揮発性有機酸の蓄積は主に対数増

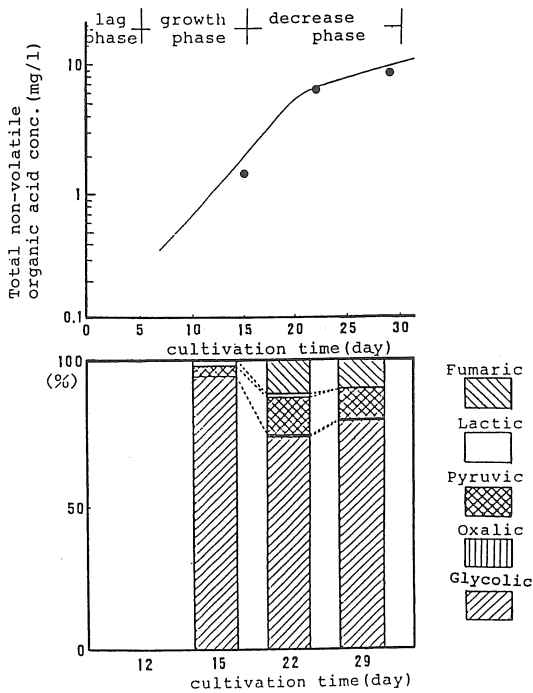


Fig. 11 Accumulation of non-volatile organic acid in the pure culture for *Microcystis aeruginosa* cultivated in MA medium

殖期ではなく、減衰期で起こることが明らかになった。

次に培養液中の不揮発性有機酸の種類を見ると、Chuの培地の場合と同様に主要な不揮発性有機酸はグリコール酸であり、フマル酸およびピルビン酸も蓄積した。しかし、シュウ酸の蓄積はほとんど起こらなかった。また、実験の最後におけるグリコール酸以外の不揮発性有機酸の占める割合はほぼ20%であった。

3.2.3 *Microcystis aeruginosa* 培養液のゲル分画

図には示していないが、Chuの培地を用いたときの *M. aeruginosa* の対数増殖期および減衰期における培養液のゲルクロマトグラムもMA培地を用いた場合のゲルクロマトグラムも *C. vulgaris* の場合と同様に3つのピークが存在し、その位置もほぼ同じであった。したがって、ピークの画群をI, II, IIIとして考察を行った。

Fig. 12および13にChu培地とMA培地を用いた場合の各分画のDOCをそれぞれ示した。どちらの場合も不揮発性有機酸が含まれる画群IIIのDOCの蓄積が観察されるが、その程度は画群I, IIに含まれるDOCに比べて小さかった。これは *C. vulgaris* の場合の画群IIIに含まれるDOCの蓄積が画群IおよびIIに

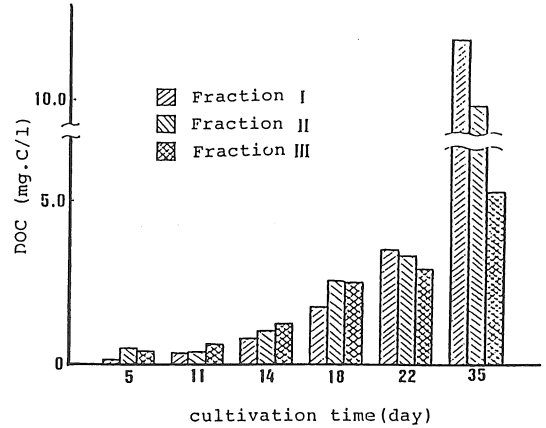


Fig. 12 Accumulation of DOC with cultivation time for *Microcystis aeruginosa* in Chu's medium

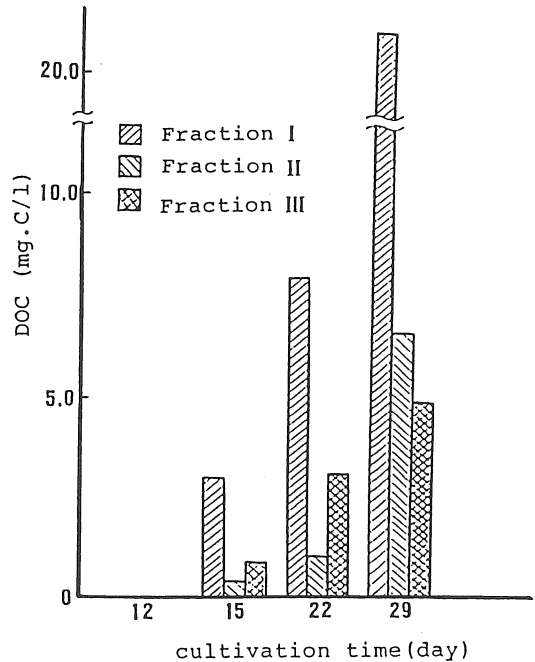


Fig. 13 Accumulation of DOC with cultivation time for *Microcystis aeruginosa* in MA medium

含まれるDOCの蓄積に較べて大きかったことは異なる結果となった。

また、MA培地を用いた場合にはChuの培地の場合に比べて画群Iの培養液への蓄積が極端に大きいことがわかる。このことより有機物を含む基質を利用して増殖した *M. aeruginosa* は減衰期に分子量として600前後の物質を顕著に蓄積することが明らかになった。

4. 結 論

1) *Chlorella vulgaris* の主要な蓄積不揮発性有機酸はグリコール酸とシュウ酸である。とくに、前者は増殖期に、後者は減衰期に主に蓄積する。

2) *Microcystis aeruginosa* の場合は蓄積される主要な不揮発性有機酸はグリコール酸であるが、Chu の培地の場合は増殖期後半から、MA 培地の場合は減衰期においてピルビン酸、フマル酸、シュウ酸および乳酸も蓄積する。

3) *Microcystis aeruginosa* は MA 培地のように有機物を含む基質を利用して増殖をする場合は、対数増殖期に不揮発性有機酸をほとんど蓄積しない。

4) *Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の培養液の分画においては常に3つにピークが得られ、とくに画群IIIは不揮発性有機酸の蓄積の指標となり得る。

5) *Chlorella vulgaris* の培養液の分画により、画群IIIに含まれるDOCの蓄積は画群IおよびIIに含まれるDOCの蓄積より顕著である。一方、*Microcystis aeruginosa* の場合は、画群IIIに含まれるDOCの蓄積に比べて、画群IおよびIIに含まれるDOCの蓄積が大きく、とくに減衰期に著しい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、国立環境研究所から藻類株の提供を受けたことに対し謝意を表します。また、岩手大学卒業生広野吉幸氏(現、高弥建設)、吉田勝司氏(現、安藤建設)、桜田準也氏(現、エース交易)の多大な協力を得たことにおいて、ここに付して感謝の意を表します。

(原稿受付 1990年12月10日)

(原稿受理 1991年6月29日)

参 考 文 献

1) Putter, A. (1908) Der stoffhaushalt des Meeres. allgem. *Physiol.* 7, 321-368.

2) 坂本充 (1976) 生態遷移II, 共立出版.
 3) W.M.グーリー著 手塚泰彦, 渡辺泰徳, 渡辺真利代共訳 (1987) 藻類の生理生態学, 培風館.
 4) Mague, T.H. (1980) Extracellular release of carbon by marine phytoplankton. a physiological approach, *Limnol. Oceanogr.* 25, 262-279.
 5) Iturriaga, R. (1981) Phytoplankton photoassimilated extracellular products. heterotrophic utilization in marine environment, *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 5, 318-324.
 6) Chrost, R.J. and Faust, M.A. (1983) Organic carbon release by phytoplankton. its composition and utilization by bacterioplankton, *J. Plankton Res.*, 5, 477-493.
 7) Fogg, G.E. (1962) Extracellular products, in *Physiology and Biochemistry of Algae* (Levin, R.A. ed.) Academic press. 30, 475-489.
 8) Zumstein, J. and Buffle (1989) Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in eutrophic Lake, *Wat. Res.*, 23, 229-239.
 9) Bell, W.H. (1983) Bacterial utilization of algal extracellular products. 3, The specificity of algalbacterial interaction, *Limnol Oceanogr.*, 28, 1131-1143.
 10) Barker, H.A. (1935) The metabolism of the colourless alga, *Prototheca zopfii*, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 7, 73-93.
 11) Anderon, H.H. (1945) Studies on the metabolism of the colorless alga *Prototheca zofii*, *J. Gen. Physiol.*, 28, 297-327.
 12) Goffron, H (1939) Über anonalien des atmungsquotienten von algen aus zuckerkulturen, *Biol Zentr.*, 59, 288-302.
 13) Syrett, P.J. (1958) Fermentation of glucose by *Chlorella vulgaris*, *Nature*, 182, 1734-1735.
 14) Allen, M.B. (1956) Excretion of organic compounds by *Chlamydomonas*, *Arch. Mikrobiol.* 24, 163-168.
 15) 西澤一俊, 千原光雄 (1980) 藻類研究法, 共立出版,
 16) 山田市二, 田村太郎, 吉川誠次, 鈴木重治 (1973) 揮発性有機酸および不揮発性有機酸のガスクロマトグラフィーによる同時定量のためのブチルエステル化, *Japan Analyst*, 55, 1334-1341.
 17) 亀井翼, 丹保憲仁 (1977) 水質のマトリックス評価の為にゲルクロマトグラフィー, *水道協会誌*, 519, 24-41.
 18) 志村憲助, 吉田充輝, 江尻慎一郎, 石原弘 (1987) ゲル濾過法, 学会出版センター.
 19) 矢木修身, 岡田光正, 須藤隆一, 萩原富司, 高村義親 (1981) *Microcystis* の増殖特性, 国立公害研究所研究報告, 25, 47-58.

論文要旨

バッチ培養における *Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の細胞外代謝不揮発性有機酸の培養液中への蓄積

大村 達夫* 海田 輝之* 相沢 治郎* 小松 佳幸* 石崎 正志* 大沼 正郎*

* 岩手大学工学部土木工学科

〈水質汚濁研究 Vol.14 No.9 (1991) pp.615~623〉

藻類の細胞外代謝溶存有機物は共存微生物の増殖や、これらの微生物による分解によってもたらされる CO₂ の供給により藻類自身の増殖を助長する可能性など、水域生態系に影響を与える重要な因子の一つと考えられている。

本研究においては、緑藻の *Chlorella vulgaris* と藍藻の *Microcystis aeruginosa* を無菌的に回分培養し、増殖過程あるいは死滅過程での不揮発性有機酸の培養液中への蓄積の状況を調べた。

その結果、*C. vulgaris* は主要な不揮発性有機酸としてグリコール酸とシュウ酸を蓄積し、*M. aeruginosa* はグリコール酸を蓄積することが明らかとなった。しかし、*M. aeruginosa* は有機物を利用して対数増殖する時は不揮発性有機酸をほとんど蓄積しないことが分かった。

また、グルクロマトグラフィーの結果では、代謝有機物は3つの画群に分画された。これらの画群に含有される DOC の変化を見てみると *C. vulgaris* の場合、増殖期にはほぼ同じ割合で各画群を蓄積しているが、減衰期には高分子成分と低分子成分の蓄積が顕著になった。一方、*M. aeruginosa* は、減衰期において高分子成分が著しく高くなり低分子成分の約2倍になった。また、不揮発性有機酸は、低分子成分の第III画群の主要な成分であることも明らかになった。

好気性バイオフィルターにおける気液間酸素移動特性

藤江 幸一* 胡 洪營* 池田 康郎** 浦野 紘平*

* 横浜国立大学工学部物質工学科

** 大日本インキ㈱

〈水質汚濁研究 Vol.14 No.9 (1991) pp.624~632〉

装置底部全面から汙材充填部に直接空気を吹き込む方式の好気性バイオフィルターにおいて、気液間酸素移動特性に対する影響因子を、実測データの解析に基づいて明らかにし、代表径6~23mmの球状坑火石発泡体を充填した場合の K_La を、充填担体の大きさおよび微生物保持濃度の関数として予測するための相関式を提案した。さらに、散気性能指標 Φ および酸素溶解の動力効率を指標として、酸素溶解性能を活性汚泥エアレーションタンクと比較したところ、充填担体の存在は気泡の分散と、装置内での液旋回流の発達を抑制することによる気液接触面積の増大をもたらすので、磁製散気板など微細な気泡を生成する散気装置を設置したエアレー