

アオコの増殖及び分解に関する研究

Studies on the Growth and Decomposition of Water-Bloom of *Microcystis*

矢木修身 編著

Edited by Osami Yagi

水質土壌環境部

Water and Soil Environmental Division

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

〔研究担当者〕 矢木修身*・稲森悠平*・稲垣典子*

O. Yagi, Y. Inamori, N. Inagaki

細見正明*・須藤隆一*・萩原富司**

M. Hosomi, R. Sudo, T. Hagiwara

熊谷光彦**・大久保紀男***・高村義親****

M. Kumagai, N. Okubo, Y. Takamura

* 国立公害研究所水質土壌環境部

** 国立公害研究所共同研究員（茨城大学農学部）

*** 国立公害研究所共同研究員（東邦大学理学部）

**** 国立公害研究所客員研究員（茨城大学農学部）

序

国内外を問わず、各地の富栄養化した湖沼では、*Microcystis*を中心とするアオコが大発生し、魚類のへい死、水道原水のろ過障害等の被害が起きており、これらの異常発生を防止することは湖沼の水質保全をすすめる上で極めて重要な課題である。

アオコは自然界で異常増殖するにもかかわらず、フラスコ内での培養が困難であり、これまでに*Microcystis*の増殖に関する研究は数少なく、この分野での研究が各方面から要望されていた。また各地で大発生したアオコの処理、処分法にも問題を残している。そこで、処理処分法の一つとして、アオコの減量化とともにメタンガスの回収を目的とするアオコのメタン発酵について検討を加えた。

また、この報告には、同様な立地条件にある霞ヶ浦と牛久沼とで、なぜアオコの発生に著しい差があるかにつき、増殖促進物質、生理の面から検討を加え、キレート物質が増殖の鍵を握っていることを再確認するとともに、その存否が上記両湖沼の差とかわりがあることを示した。

これらの成果が、アオコの発生の制御並びにアオコの処理、処分の一つとして役立つことができれば幸いである。

昭和61年2月

国立公害研究所 水質土壌環境部

部長 合田 健

目 次

Abstract	1
はじめに	3
1 <i>Microcystis aeruginosa</i> (アオコ) の純粋分離	7
1.1 はじめに	7
1.2 実験方法	7
1.2.1 培養方法	7
1.2.2 無菌化法	9
1.2.3 無菌化の確認法	10
1.3 実験結果	11
1.3.1 UV法	11
1.3.2 抗生物質法	11
1.3.3 キャピラリーピペット法	11
1.3.4 無菌化の確認	13
1.4 考 察	13
1.5 ま と め	15
引用文献	16
2 <i>Microcystis</i> の無菌株と単藻株の増殖特性	19
2.1 はじめに	19
2.2 実験方法	19
2.2.1 供試藻類	19
2.2.2 培 地	20
2.2.3 保存培養及び前培養	20
2.2.4 本培養	20
2.2.5 藻体濃度及び細菌数の計数法	20
2.3 実験結果	21
2.3.1 <i>Microcystis</i> の増殖曲線	21
2.3.2 培養に伴う群体粒子径の変化	23
2.3.3 温度の影響	23

2.3.4	照度の影響	24
2.3.5	窒素の影響	25
2.3.6	リンの影響	26
2.3.7	鉄の影響	27
2.4	考察	28
2.5	まとめ	30
	引用文献	31
3	霞ヶ浦における藻類増殖の制限栄養物質	33
3.1	はじめに	33
3.2	実験方法	33
3.2.1	供試藻類	33
3.2.2	試水の前処理法	34
3.2.3	添加栄養物質	34
3.2.4	藻類の接種及び培養方法	34
3.2.5	藻体量の測定法	35
3.2.6	水質分析法	35
3.3	実験結果	35
3.3.1	霞ヶ浦の水質とAGP	35
3.3.2	霞ヶ浦における藻類増殖の制限栄養物質	37
3.4	考察	46
3.4.1	栄養物質の添加濃度	46
3.4.2	制限栄養物質	46
3.5	まとめ	47
	引用文献	48
4	牛久沼における藻類増殖の制限栄養物質	51
4.1	はじめに	51
4.2	実験方法	51
4.2.1	試水の採取場所	51
4.2.2	試水の前処理及び培養方法	52
4.3	実験結果	52
4.3.1	牛久沼及び流入河川の水質	52
4.3.2	栄養塩添加試験	53

4.4	考 察	60
4.5	ま と め	61
	引用文献	61
5	アオコの好氣的分解	63
5.1	はじめに	63
5.2	実験方法	63
5.2.1	材料及び実験装置	63
5.2.2	分析項目	63
5.3	実験結果及び考察	63
5.3.1	細菌の計数条件	63
5.3.2	<i>Microcystis</i> と細菌数の変化	64
5.3.3	DOCと栄養塩の変化	67
5.4	ま と め	69
	引用文献	69
6	アオコの嫌氣的分解	71
6.1	はじめに	71
6.2	実験方法	71
6.2.1	培養装置	71
6.2.2	基 質	72
6.2.3	培養条件	72
6.2.4	種 汚 泥	74
6.2.5	分析方法	74
6.3	実験結果	75
6.3.1	基質の組成	75
6.3.2	回分培養	75
6.3.3	半連続培養	81
6.4	考 察	83
6.5	ま と め	86
	引用文献	86
7	おわりに	88

CONTENTS

Abstract	1
Preface	3
1 Purification of <i>Microcystis aeruginosa</i>	7
1.1 Introduction	7
1.2 Materials and methods	7
1.2.1 Cultivation methods of algae	7
1.2.2 Purification methods of algae	9
1.2.3 Verification methods of axenic culture	10
1.3 Results	11
1.3.1 UV method	11
1.3.2 Antibiotic method	11
1.3.3 Capillary-pipette method	11
1.3.4 Verification of axenic culture	13
1.4 Discussion	13
1.5 Summary	15
References	16
2 Growth characteristics of axenic and unialgal <i>Microcystis</i> culture	19
2.1 Introduction	19
2.2 Materials and methods	19
2.2.1 Algae	19
2.2.2 Media	20
2.2.3 Stock-culture and pre-culture	20
2.2.4 Main culture	20
2.2.5 Determination of algal and bacterial growth	20
2.3 Results	21
2.3.1 Growth curve of <i>Microcystis</i>	21
2.3.2 Change of flock size of <i>Microcystis</i>	23
2.3.3 Temperature	23

2.3.4	Ligth intensity	24
2.3.5	Nitrogen	25
2.3.6	Phosphorus	26
2.3.7	Iron	27
2.4	Results	28
2.5	Summary	30
	References	31
3	Limiting nutrients of algal growth in Lake Kasumigaura	33
3.1	Introduction	33
3.2	Materials and methods	33
3.2.1	Algae	33
3.2.2	Pretreatment of test water	34
3.2.3	Addition of nutrients	34
3.2.4	Inoculum size and cultivation methods of algae	34
3.2.5	Determination of algal growth	35
3.2.6	Analysis of water quality	35
3.3	Results	35
3.3.1	Water quality and AGP of Lake Kasumigaura	35
3.3.2	Growth limiting nutrients of algae in Lake Kasumigaura	37
3.4	Discussion	46
3.4.1	Concentration of limiting nutrient	46
3.4.2	Determination of limiting nutrient	46
3.5	Summary	47
	References	48
4	Limiting nutrients of algal growth in Marsh Ushiku	51
4.1	Introduction	51
4.2	Materials and methods	51
4.2.1	Sampling station	51
4.2.2	Pretreatment and cultivation of sample	52
4.3	Results	52
4.3.1	Water quality of Marsh Ushiku and influent rivers	52
4.3.2	Growth limiting nutrients	53

4.4	Discussion	60
4.5	Summary	61
	References	61
5	Aerobic decomposition of <i>Microcystis</i>	63
5.1	Introduction	63
5.2	Materials and methods	63
5.2.1	Substrate and Microcosm	63
5.2.2	Analytical procedure	63
5.3	Results and discussions	63
5.3.1	Determination of bacterial number	63
5.3.2	Change of <i>Microcystis</i> and bacterial number	64
5.3.3	Change of DOC and nutrients	67
5.4	Summary	69
	References	69
6	Anaerobic decomposition of <i>Microcystis</i>	71
6.1	Introduction	71
6.2	Materials and methods	71
6.2.1	Anaerobic fermentor	71
6.2.2	Substrate	72
6.2.3	Culture conditions	72
6.2.4	Seed sluge	74
6.2.5	Analytical method	74
6.3	Results	75
6.3.1	Composition of Aoko	75
6.3.2	Batch culture	75
6.3.3	Semi-continuous culture	81
6.4	Discussion	83
6.5	Summary	86
	References	86
7	Conclusions and further works	88

ABSTRACT

In order to control the growth of water-bloom of *Microcystis* in aquatic environment, the growth and decomposition of *Microcystis* were investigated.

A bacteria associated *Microcystis aeruginosa* isolated from Lake Kasumigaura was treated with the UV radiation, antibiotic treatments and capillary-pipette washing methods. An axenic clone of flock forming *M. aeruginosa* K-3A was obtained by the capillary-pipette method.

Growth characteristics of *M. aeruginosa* K-3A were studied under various physical and chemical conditions. The maximum specific growth rate (μ_{\max}) was observed at 35°C and the value of μ_{\max} was 1.5 d⁻¹. Light intensities for maximum growth and μ_{\max} were 1,000 lx and 3,000 lx, respectively. The nitrogen, phosphorus and iron concentrations for μ_{\max} were 1.0 mg · l⁻¹, 0.05 mg · l⁻¹ and 0.03 mg · l⁻¹, respectively. It was concluded that physical and chemical environmental conditions of Lake Kasumigaura in summer season were suited for the well growth of *Microcystis*.

The limiting nutrients of *Microcystis* in the filtrate samples of Lake Kasumigaura and Marsh Ushiku were investigated. The limiting nutrients in summer season in the Lake Kasumigaura water were nitrogen and phosphorus, while a limiting nutrient was iron or EDTA from fall to spring. The limiting nutrients in the Marsh Ushiku and influent river water were phosphorus and EDTA in summer season. *Microcystis* grows well in Lake Kasumigaura more than in Marsh Ushiku in summer season.

A decomposition of *Microcystis* in a microcosm under the aerobic condition was investigated. Decomposition rate constants were 0.021 d⁻¹ at 20°C and 0.034 d⁻¹ at 30°C. An anaerobic decomposition of *Microcystis* in a methane fermentor was also studied under various conditions. The 390 ml of digestion gas was produced from 1 g of *Microcystis* in 4% of *Microcystis* solution at 30°C. Sixty % of the digestion gas was methane and the residual was carbon dioxide. The digestion gas yield to the theoretical yield was 44%. It was considered that *Microcystis* was a good material for the methane fermentation.

はじめに

本研究の位置づけ

全国各地の富栄養化した湖沼では、夏期に *Microcystis* を中心とするアオコが大発生し、魚類のへい死、水道におけるろ過障害、カビ臭問題、観光地としての景観の低下等の弊害が生じると同時に、最近では毒性を有するアオコが各地の湖で見いだされる等種々の問題が引き起こされている。このような弊害をなくすためには、*Microcystis* の増殖機構を解明し、その上で *Microcystis* の異常増殖を抑制する方法を見いだす必要がある。またアオコにより汚濁した湖水を早急に回復させるためには、アオコを回収し、湖水中から窒素、リン、有機物等を除去することが大変有効であるが、回収したアオコの適当な処理、処分法がなく、回収できないのが現状である。

本研究は、まずアオコの増殖特性を正確に把握するため群体を形成するアオコの無菌化を試みた。次いで得られた無菌株の増殖特性について検討を加えると同時に、毎年夏期にアオコの大量発生する霞ヶ浦とアオコが発生しはじめた牛久沼について水質の相違について検討を加えた。さらに湖の水質を回復させるために回収したアオコのメタン発酵による処理法、並びに発生するメタンガスをエネルギー源として利用すべく、メタンガスの生成条件について検討を加えた。

本研究の経過

アオコの増殖に関する研究は、昭和52年度から54年度までの3年間、特別研究「陸水域の富栄養化に関する総合研究」の中で開始された。この間の研究成果は国立公害研究所研究報告第25号にまとめられた。アオコの発生のメカニズムはこの3年間でかなり解明されたが、依然として不明の点もかなり残されていることから、以後も引き続き研究を継続した。昭和55年度からは、水質土壌環境部経常研究「陸水域における富栄養化の機構に関する基礎的研究」の中で取り組まれた。またアオコの分解に関する研究は昭和56年度から58年度の3年間特別経常研究「アオコ、ヘドロ及び水生植物の回収による水質改善と回収物の有効利用に関する研究」の中で遂行された。本報告は、昭和55年度以後のアオコの研究についてまとめたものである。

なお本研究は、1章 萩原、須藤、2章 萩原、高村、3章 萩原、4章 大久保、5章 熊谷、稲垣、細見、6章 稲森、熊谷が主に担当し、全体の研究のとりまとめ及び執筆を矢木が担当した。

研究の概要

我が国での *Microcystis* の増殖に関する研究は数少なく、特に群体を形成する無菌の *Microcystis* の研究は世界でもほとんど報告がなされていない。そこでまず無菌の *Microcystis* を分離すべくキャピラリーピペット法、抗生物質法、UV法等の各種の無菌化法による無菌化を試み、キャピラリーピペット法により細菌を全く含まない、群体を形成する *Microcystis* の純粋分離に成功した。

この無菌株を用いて増殖特性について検討を加えたところ、増殖最適温度が35°Cであり、他の藻類と比較しかなり高い温度を好むこと、また窒素、リン、鉄に対し、それぞれ1.0mg・l⁻¹、0.05mg・l⁻¹、0.03mg・l⁻¹の低濃度で最大の比増殖速度を示すことが明らかとなった。また窒素、リン、鉄1mgからは、それぞれ28mg、900mg、1,000mgの藻体が形成された。さらに細菌の存在は *Microcystis* の増殖を促進させる作用を有していることが明らかとなった。

次に、毎年夏になるとアオコが大発生する霞ヶ浦とアオコが発生しはじめた牛久沼及びその流入河川水中の藻類の増殖制限物質について検討を加えた。霞ヶ浦の夏期のろ過水は、窒素とリンが制限栄養物質であった。しかしながら、秋から春期にかけては鉄又はEDTAが制限栄養物質であり、窒素及びリンを同時に添加しても全く増殖が認められないことから、秋～春期にかけての湖水は夏期と比較し *Microcystis* にとって増殖しにくい水といえる。

一方牛久沼及び流入河川水の夏期のろ過水はリンとEDTAが同時に *Microcystis* の増殖の制限栄養物質になっており、窒素及びリンの同時添加でも増殖が認められず、牛久沼の湖水は霞ヶ浦に比べ *Microcystis* にとって増殖しにくい水であった。

さらにアオコの分解について検討を加えたが、マイクロコズム内のアオコの分解速度定数は20°Cで $k_1 = 0.021d^{-1}$ 、30°Cでは $k_1 = 0.034d^{-1}$ と30°Cの方がかなり速い速度であった。一方アオコの嫌氣的分解について、アオコの分解過程並びにメタンガスの生成条件について検討を加えた。その結果、半連続培養法では、35°C、4%アオコ濃度溶液がガス生成に最適であり、1gのアオコから390mlのガスが生成された。生成したガスの60%がメタンガス、残りの40%は炭酸ガスであった。ガスの発生量は理論収量の44%であり、アオコはメタン発酵処理されている下水汚泥とほぼ同様に扱うことが可能であることが判明した。

成果発表一覧

印刷発表

- (1) 矢木修身 (1982) : 霞ヶ浦のアオコについて. 水, 24(2), 48-50.
- (2) 稲森悠平・須藤隆一 (1982) : 嫌気性処理の最近の動向(I). 用水と廃水, 24, 179-192.
- (3) 稲森悠平・須藤隆一 (1982) : 嫌気性処理の最近の動向(II). 用水と廃水, 24, 303-312.
- (4) 萩原富司・矢木修身・高村義親・須藤隆一 (1984) : 霞ヶ浦に発生する *Microcystis aeruginosa* の純粋分離. 水質汚濁研究, 7, 437-442.
- (5) 矢木修身・萩原富司・高村義親・須藤隆一 (1984) : 霞ヶ浦から分離した *Microcystis* の無菌株と単藻株の増殖特性. 水質汚濁研究, 7, 496-503.

口頭発表

- (1) 矢木修身・萩原富司・高村義親・須藤隆一 : ミクロキスティスの増殖特性. 日本農芸化学会大会, 福岡 (55.4)
- (2) 矢木修身・萩原富司・須藤隆一 : *Microcystis* の増殖特性—鉄およびその他の増殖に及ぼす因子について—. 日本陸水学会第45回大会, 新潟 (55.6)
- (3) 矢木修身・萩原富司・須藤隆一 : *Microcystis* の増殖促進物質. 日本陸水学会第46回大会, 東京 (56.9)
- (4) 萩原富司・矢木修身・高村義親・須藤隆一 : 霞ヶ浦より分離した *Microcystis* の無菌化について. 昭和56年度日本農芸化学会関東支部大会, 東京 (56.10)
- (5) 萩原富司・矢木修身・高村義親・須藤隆一 : *Microcystis* の増殖に及ぼす細菌の影響. 第16回水質汚濁学会, 東京 (57.3)
- (6) 矢木修身・稲森悠平・熊谷光彦・高村義親・須藤隆一 : アオコのメタン発酵に及ぼす環境条件の影響. 日本水処理生物学会第19回大会, 潮来 (57.11)
- (7) 矢木修身・稲森悠平・熊谷光彦・高村義親・須藤隆一 : アオコのメタン発酵に関する研究. 第17回水質汚濁学会, 東京 (58.3)
- (8) 熊谷光彦・矢木修身・稲森悠平・高村義親・須藤隆一 : アオコのメタン発酵, 富栄養化対策とバイオマス利用の可能性の検討. 日本農芸化学会, 仙台 (58.3)
- (9) 須藤隆一 : 微小動物・藻類の培養と新しい水処理技術の模索. 第12回水処理研究会, 大阪 (58.12)

1 *Microcystis aeruginosa* (アオコ) の純粋分離

1.1 はじめに

全国各地の富栄養化した湖沼では、*Microcystis*の大発生により、魚類の斃死、水道原水のろ過障害、カビ臭問題、観光地の景観の低下等様々な弊害が生じ、大きな問題となっている。*Microcystis*の異常増殖を防止するためには、*Microcystis*のフィールドにおける増殖特性を知ることが重要であるが、同時に環境因子を制御できるフラスコレベルでの培養実験により、*Microcystis*の本来の性質を知ることが大変重要である。

*Microcystis*の本来の性質を知るためには、細菌の共存しない無菌の*Microcystis*を用いて実験を行う必要がある。ラン藻類の中には、*Microcystis*. *Anabaena*のように細胞外に多量の粘質物質を出し^{1,2)}、これに多数の細菌が付着しているため³⁾、無菌株を得ることが困難なものが多い。また寒天平板培地上で増殖しないものが多いため⁴⁾無菌化をより一層困難にしている。無菌化の方法としては、希釈法⁵⁾、抗生物質や殺菌剤などの薬品を用いる方法⁶⁾、紫外線^{7,8)}マイクロピペットを用いた洗浄法⁹⁾などがある。さらにこれらを組み合わせた複雑な方法も試みられている¹⁰⁾。これまでに、*Microcystis*の無菌化についていくつかの報告がなされているが、そのほとんどが無菌化により群体形成能を失ってしまっている^{9,11)}。*Microcystis*は湖沼において常に群体を形成しており、群体形成が*Microcystis*の異常増殖を可能ならしめているという報告もあり¹²⁾、この点を明らかにする上でも群体形成能を保持した無菌の*Microcystis*を得ることが大変重要である。

本研究は、霞ヶ浦より分離された群体形成能を有する細菌の共存する*Microcystis*の単藻株を用いて、紫外線照射法、抗生物質法、洗浄法による無菌化を試み、洗浄法による無菌株の分離に成功したのでその手法及び確認法について述べる。

1.2 実験方法

1.2.1 培養方法

水の華の発生している霞ヶ浦の湖水より、キャピラリーピペット洗浄法により単藻化した*Microcystis* K-3株を用いて¹³⁾、無菌化を試みた。図1.1 (a), (b)にK-3株の顕微鏡写真を示した。K-3株は細胞の直径が6~7 μ m、ガス胞を有し、明りょうな粘質鞘で覆われた不定形の群体を形成することから*M. aeruginosa*と同定した¹⁴⁾。図1.1 (b)はフクシンで生体染色したもので

注1) 最近、分類学者の間で認められつつあるKomárek (1958)の分類体系では、K-3株は*M. wesenbergii*.後述するK-5株は*M. aeruginosa*と同定される。しかし、彼の体系は、まだあらゆる分野に広く流布されていないので、混乱をさけるために、著者らは我が国で長年親しまれてきたDesikachae (1959)の分類体系を採用した日本淡水藻図鑑(広瀬・山岸編, 1977)に従った。

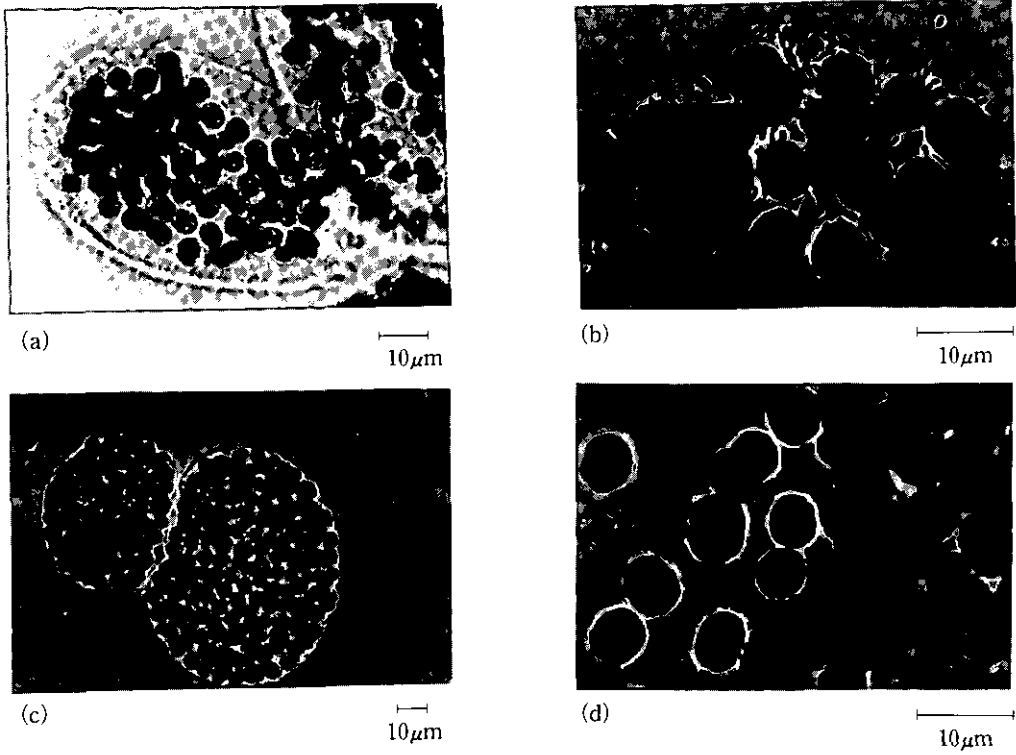


図 1.1 *Microcystis*の顕微鏡写真

Fig. 1.1 Microscopical observation of *Microcystis aeruginosa*

- (a) bacteria-associated *M. aeruginosa* K-3
- (b) bacteria-associated *M. aeruginosa* K-3 stained with fuchsin
- (c) bacteria-free *M. aeruginosa* K-3A
- (d) bacteria-free *M. aeruginosa* K-3A stained with fuchsin

表 1.1 M-11培地の組成

Table 1.1 Composition of M-11 medium

NaNO ₃	100mg
K ₂ HPO ₄	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	40
Na ₂ CO ₃	20
Fe-citrate	6
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1
Deionized water	1l
pH	8.0

あるが粘質鞘に細菌が多数付着しているのが認められる。

*Microcystis*の培養にはM-11培地を用いた。M-11培地はGorham⁸⁾のラン藻用培地を改変したものでありその組成を表1.1に示した。無菌化には対数増殖期の*Microcystis*を用いた。すなわち500 mlの三角フラスコに200mlのM-11培地を加え、*Microcystis*を接種し、30°C、2000lxで1日1回手で振とうする静置培養で5~7日間培養したものについて無菌化を行った。光源としては白色蛍光灯を用いた。

1.2.2 無菌化法

(1) 紫外線照射法 (以後これをUV法と略す)

培養藻体をプランクトンネット (網目の大きさ: 193 μ m) 上にとりこれを無菌水 (滅菌脱イオン水) で洗浄した後、群体を駒込ピペットで10mlの無菌水を含む試験管に移した。この時の藻体濃度は100mg/l程度とした。次いでこれを50W、30秒間超音波で群体をばらばらにした。このようにして得られた*Microcystis*の懸濁液10mlを内径8.5cmのシャーレに入れ、15Wの紫外線灯を15cmの距離から一定時間照射した。次にこの0.5mlを10mlのM-11培地の入った試験管に接種し、1,000 lx、30°Cで30~50日間培養した。増殖の認められたものについて、検鏡により共存する細菌の有無を調べた。

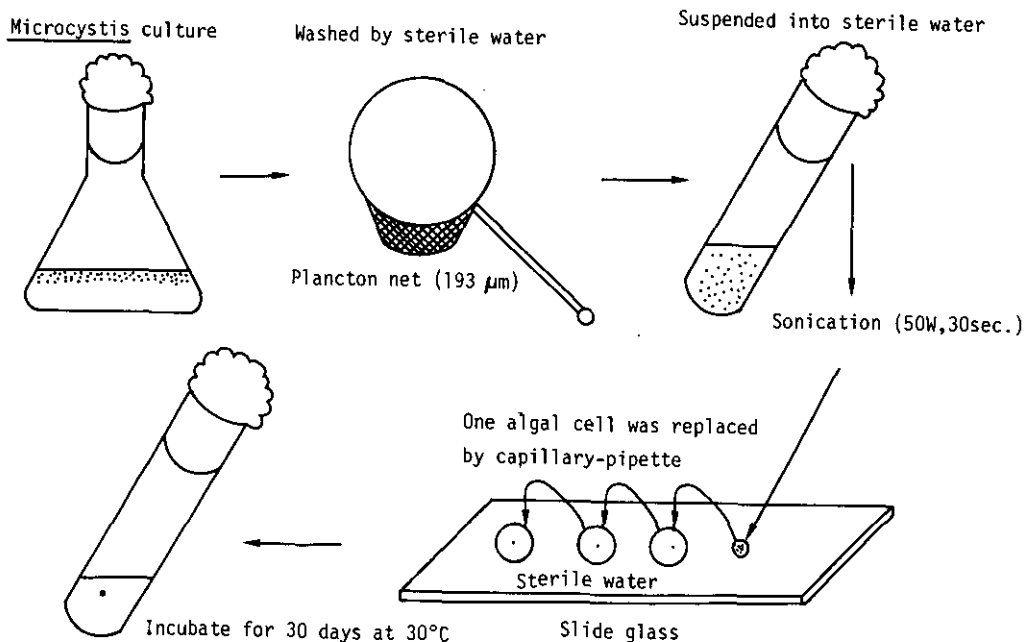


図 1.2 キャピラリーピペット法による *M. aeruginosa* の純粋分離

Fig. 1.2 Purification procedure of *M. aeruginosa* by capillary-pipette washing method

(2) 抗生物質法

UV法と同様な方法で得られた100mg/l程度の*Microcystis*の懸濁液0.5mlを、抗生物質を加えたM-11培地10mlの入った試験管に接種した。約30日間培養した後、増殖の認められたものについて検鏡を行い細菌の有無を確認した。なお添加する抗生物質は無菌水に溶解した後、0.22 μ mのミリポアフィルターでろ過滅菌を行った。これをあらかじめ120°C、15分間高圧蒸気滅菌しておいた培地に所定の濃度になるように添加した。

(3) キャピラリーピペット洗浄法

キャピラリーピペット洗浄法の手順を図1.2に示した。まずUV法と同様にして調製した*Microcystis*の懸濁液の100倍希釈液一滴をスライドガラス上にとり、顕微鏡下(150倍)でキャピラリーピペットを用いて単一細胞を拾い上げ0.1mlの無菌水中に移す。さらに、これを再びキャピラリーピペットで拾い上げ、新たな無菌水0.1ml中に移す。この操作を少なくとも5回以上繰り返した後、単一細胞を10mlのM-11培地の入った試験管に移し、30°C、1,000lxで約30日間培養した。培養開始後約2週間程度で、*Microcystis*の群体が肉眼で認められる程度の大きさとなって浮上してくる。無菌化の操作はすべてクリーンベンチ内で実施した。

1.2.3 無菌化の確認法

無菌化の確認は、検鏡により細菌の有無を調べ、細菌の認められなかった株について、表1.2に示した各種の細菌用培地に*Microcystis*の培養液0.5mlを添加し、30°C、2週間培養を行い細菌の増殖の認められないものを無菌であるとした。

表 1.2 細菌試験用培地
Table 1.2 Media for bacterial test

Components	Media					
	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6
Peptone (g)	0.5		1	1		
Yeast extract (g)		1		1		
Beef extract (g)	0.3					
Glucose (g)				1	0.25	0.5
Water (l)	1*	1*	1*	1*	1**	1***

Agar 18g, pH was adjusted at 7.0

*Deionized water

**Autoclaved and filtrated Kasumigaura lake water

****M. aeruginosa* was incubated in M-11 medium for 10 days. Then the culture broth containing 50mg *M. aeruginosa* was autoclaved at 121°C for 15 min. and filtrated.

1.3 実験結果

1.3.1 UV法

UV法により *Microcystis* の無菌化を試みた。その結果を表1.3に示した。UV照射を1分間行った場合、*Microcystis*は無照射の場合とほぼ同様な増殖速度を示したが、検鏡の結果依然として細菌が多数共存していた。照射を5分行うと、*Microcystis*の増殖速度は著しく低下し、試験管によっては全く増殖の認められないものも存在した。検鏡を行ったが、細菌がわずかではあるが共存していた。7分照射では *Microcystis* 及び細菌ともに増殖は認められず死滅したものと思われた。紫外線に対する *Microcystis* の耐性は細菌と同程度であり、UV法により本藻を無菌化することはできなかった。

表 1.3 *M. aeruginosa* K-3及び共存細菌の紫外線に対する耐性

Table 1.3 Effect of UV radiation on the growth of bacteria-associated *M. aeruaeruginosa* K-3

Microorganisms	UV radiation time (min.)					
	0.5	1	5	7	10	20
<i>M. aeruginosa</i> K-3	++	++	+	-	-	-
Associated bacteria	+	+	+	-	-	-

++; good growth, +; growth, -; no growth

The magnitudes of algae and bacteria growth were determined by microscopic observation on 30 day incubation.

1.3.2 抗生物質法

抗生物質法により無菌化を試みた結果を表1.4に示した。*Microcystis*が増殖可能な抗生物質の最大濃度は、テトラサイクリン、ペニシリンG、クロラムフェニコール及びストレプトマイシンでそれぞれ $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $1\times 10^{-3}\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。しかしこれらの濃度で増殖した *Microcystis* すべてに、かなりの数の細菌が認められた。*Microcystis* 及び共存する細菌群の抗生物質に対する耐性は、ほぼ同程度かやや細菌の方が高く、本法により無菌の藻体を得ることはできなかった。

1.3.3 キャピラリーピペット洗浄法

キャピラリーピペット洗浄法により無菌化を試みた結果を表1.5に示した。第1回目の実験では *Microcystis* の単一細胞を5回無菌水中で洗浄を繰り返した後M-11培地を含む試験管に接種した。16個の単一細胞を培養したところ、2本の試験管で良好な増殖が認められた。次いでこの2株を検鏡した結果、2株ともに細菌がわずかながら存在していた。そこでこの2株のうち、細菌数の少ない株を用いて第2回目の実験を行った。第2回目は、3回洗浄を繰り返した。100細胞を

表 1.4 *M. aeruginosa* 及び共存細菌の抗生物質に対する耐性

Table 1.4 Effect of antibiotics on the growth of bacteria-associated *M. aeruginosa* K-3

Antibiotics	Concentration	Expriment No.				
		1	2	3	4	5
Tetracycline	0.1 (mg/l)	A B	A B	A B	A B	A B
	1	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—
Penicillin G	0.1($\times 10^{-2}$ U/ml)	A B	A B	A B	—B	—B
	1	—B	—B	—B	—B	—B
	2	—B	—B	—B	—B	—B
Chloramphenicol	1 (mg/l)	A B	A B	A B	A B	A B
	5	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—
Streptomycin	0.001(mg/l)	A B	A B	A B	A B	A B
	0.01	A B	A B	A B	A B	A B
	0.1	—	—	—	—	—

A; Algal growth, B; Bacterial growth, —; no growth

The growth of the algae and bacteria was observed microscopically on 30 days culture of *M. aeruginosa* K-3

表 1.5 キャピラリー洗浄法による *M. aeruginosa* の無菌化

Table 1.5 Purification of *M. aeruginosa* by capillary pipette washing method

Experiment No.	No. of capillary pipette wash	No. of isolated <i>Microcystis</i>	No. of well grown <i>Microcystis</i>
1	5 (times)	16 (tubes)	2 (strains)
2	3	100	10
3	3	323	6

The less bacteria-associated *Microcystis* obtained by experiment 1 was used at experiment 2. *Microcystis* obtained by experiment 2 was used at experiment 3.

拾って培養したところ、10株が良好な増殖を示した。検鏡の結果、10株の中には細菌が非常に少ない株もあったが無菌には至らなかった。そこで最も細菌数の少ない株を用いて、第3回目の実験を行った。3回目は、3回洗浄を繰り返して、323細胞を拾い培養した結果、6株が良好な増殖を示した。そこでこの6株について検鏡したところ、2株には細菌が認められたが、他の4株には細菌は全く認められなかった。この検鏡的に無菌の4株について、群体形成能と最大増殖量を調べた。結果を表1.6に示したが、No.78, No.123株は群体形成能を保持していたが、No.278,

表 1.6 無菌化の確認試験

Table 1.6 Cultivation test for purified 6 strains

Strain No.	Presence of bacteria	Flock formation	Maximum growth
78	—	+	70 (mg/l)
123	—	+	70
124	+	NT	NT
272	+	NT	NT
278	—	±	150
287	—	±	150

Presence of bacteria was observed by microscope.

NT; not tested.

Flock formation, +; strong, ±; weak

No.287株は増殖する途中で群体の一部が壊れてしまった。また群体形成能の弱い株の最大増殖量は、群体形成能を保持したNo.78, No.123株の約2倍高い値であった。

1.3.4 無菌化の確認

鏡的に無菌の4株の*Microcystis*が得られたが、このなかで強い群体形成能を有するNo.78株について無菌化確認実験を行った。結果を表1.7に示した。各種細菌用培地を用い5連で行ったところ、No.78株はいずれの培地でも細菌の増殖は認められなかった。以上よりNo.78株は細菌が共存しない無菌株といえる。以後No.78株を*M. aeruginosa*K-3 Axenic Strain (K-3 A株)と呼ぶ。図1.1(c)はK-3 A株の顕微鏡写真であり、図1.1(d)は、K-3 A株をフクシンで生体染色したものである。K-3 A株は湖水中と全く同じ形の群体を形成し、藻細胞の周囲には、図1.1(b)で見られた細菌は全く認められなかった。

1.4 考察

藻類の無菌株を得る方法としては、①紫外線を用いる照射法、②抗生物質や化学物質等の薬剤による方法、③洗浄法のように物理的に細菌と藻類とを分離する方法等が挙げられる。*Microcystis*は粘質鞘に被われた群体を形成し、この鞘に細菌が付着しているため無菌化は大変困難である。1950年にGerloffら⁷⁾がUV法による*Microcystis*の無菌株の培養に成功したと報告したが、後にHughesら⁸⁾は、異なった無菌検定培地及び検定条件を採用したとき、UV法で無菌化されたと思われた*Microcystis*の株には多くの細菌が混在していたことを記述している。UV処理した株を培養し、再びUV処理することにより無菌株が得られる可能性があるが、UV処理は染色体DNA中のピリミジン塩基の2量化による突然変異を誘起することが知られているため¹⁴⁾、野生型が必要とされる環境科学研究には適さない方法といえる。

表 1.7 *M. aeruginosa* No. 78(無菌株) の無菌化確認試験

Table 1.7 Bacterial test of the purified strain of *M. aeruginosa* No. 78

Strain	Sample No.	Media					
		M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6
Purified strain <i>M. aeruginosa</i> No. 78	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
Bacteria-associated strain	1	+	+	+	+	+	+
<i>M. aeruginosa</i> K-3	2	+	+	+	+	+	+

化学物質や抗生物質を用いる無菌化法は、これまでに種々の検討が加えられている。Zehnderら¹⁶⁾は、細菌の増殖は阻害しないが、カビや酵母の増殖を阻害するアクチジオンを用いて無菌化を試みている。アクチジオンは多くの藻類の増殖を阻害するが、ラン藻類は阻害を受けないため、アクチジオンを用いることにより *Microcystis* の単藻株を、容易に得ることができたが、この方法で無菌株を得ることは困難であったと述べている。また、Carmichael¹⁰⁾は、*Microcystis* に0.3%になるようフェノールを添加し、暗所で4~6時間処理することにより無菌の *Microcystis* を得ることができたと報告している。さらに、Vance⁶⁾は32種の抗生物質を用い、*Microcystis*、*Anabaena* 等5種の藻類の増殖に対する阻害を調べている。その結果、ジヒドロストレプトマイシン、ネオマイシンは、藻類よりも細菌に対し強い毒性を示すこと、また両抗生物質を同時に $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 濃度添加することにより *Microcystis* の無菌株を得ることに成功している。しかしながら、無菌株は2か月後には死んでしまい無菌株の培養の難しさを報告している。Goto¹⁰⁾も *Microcystis* とそれに共存する細菌に対する抗生物質の影響を調べた。クロラムフェニール $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ストレプトマイシン $0.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ のそれぞれの濃度で細菌、藻の増殖を抑制するが、その増殖範囲が似ているため完全な無菌株を得ることはできなかつたと述べている。本実験では表1.4に示すように、種々の抗生物質を用いて検討したが、抗生物質の *Microcystis* に対する増殖阻害濃度は $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であり、すでに報告されている値とほぼ同程度であった。また抗生物質処理により細菌数がかなり減少したことから、抗生物質とUV照射法を組み合わせることで無菌株を得ることも可能と考えられた。

キャピラリーピペットを用いて、*Microcystis* の単一細胞を何回も洗浄することにより、群体形成能を保持した *Microcystis* の無菌株を得ることができた。一般に *Microcystis* の無菌株は、群体形成能を失ってしまうことが知られているが^{9,17)}、本実験においても、得られた無菌株4株のうち2株は、群体形成能が著しく低下してしまった。何故、無菌株になると群体形成能が低下するのかは不明である。本実験で得られた無菌のNo.78株は1か月に1度の植継ぎを3年以上続けている

が、依然として強固な群体を形成していることから、群体の形成に細菌の存在は必ずしも必要としないといえる。

単藻株K-3に多くの細菌が共存しているため、表1.2で示したM-1培地を用いて共存細菌の分離を試みた。その結果M-1培地上でオレンジ色、黄色、半透明な白色を呈する10株の細菌が分離されたが、標準寒天培地上では6株が黄色を呈した。この6株は、いずれも大きさが0.5~1.8 μ mの短桿菌で運動性を有し、グラム陰性で、培地を変えることにより異なった色を呈し、生理試験はいずれも同じであった。その結果を表1.8にまとめたが、これらの6株は*Flavobacterium*に属するものと考えられる。

表 1.8 *M. aeruginosa* 共存細菌の性質
Table 1.8 Characteristics of the associated bacteria with *M. aeruginosa* K-3

Shape of cell	Short rod
Gram stain	+
Motility	+
Pigment	Yellow
Catalase	+
Oxidase	+
O-F test	-

湖水中に*Flavobacterium*が多数存在することは明らかにされており¹⁸⁾、Tanakaら¹⁹⁾は琵琶湖のいずれの地点においても、*Flavobacterium*が優占種であると報告している。また*Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Xanthomonas*等の色素生産性細菌が、水の華の発生に関連した消長を示すため²⁰⁾、細菌と*Microcystis*の相互作用に興味もたれているが、無菌のK-3A株はこれらの点を解明する上で、大変有用なものと思われる。

1.5 まとめ

群体形成能を有する単藻の*Microcystis*について紫外線照射法、抗生物質法、洗浄法により無菌化を試み以下の結果を得た。

1) キャピラリーピペットを用いて*Microcystis*の単一細胞について洗浄法を繰り返した結果、群体形成能を有する*Microcystis*の無菌化に成功した。

2) 紫外線照射法により無菌化を試みた結果、*Microcystis*は5分照射までは増殖するが、7分照射では増殖が認められなかった。5分照射により細菌数は著しく減少したが無菌には至らなかった。

3) *Microcystis*が増殖可能な抗生物質の最大濃度は、ストレプトマイシン、テトラサイクリ

ン、クロラムフェニコール。ペニシリンGでそれぞれ $0.01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1\times 10^{-3}\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ であった。しかしながらこれらの濃度においては、細菌は完全に死滅せず、抗生物質の単独添加による無菌化は成功しなかった。

4) *Microcystis*に共存する細菌は、主として*Flavobacterium*属に属するものであった。

引用文献

- 1) Lange, W. (1976): Speculation on a possible essential function of the gelatinous sheath of bluegreen algae. *Can. J. Microbiol.*, **22**, 1181-1185.
- 2) Kessel, M. and J.N. Eloff (1975): The ultrastructure and development of the colonial sheath of *Microcystis aeruginosa*. *Arch. Microbiol.*, **106**, 209-214.
- 3) Caldwell, D.E. and S.J. Caldwell (1978): A *Zooglea* sp. associated with blooms of *Anabana flos-aguae*. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 922-931.
- 4) 西澤一俊 (1979): 藻類研究法. 共立出版, 東京. 754p.
- 5) 渡辺 篤 (1973): 藻類実験法. 南江堂. 東京. 455p.
- 6) Vance, B.D. (1966): Sensitivity of *Microcystis aeruginosa* and other blue-green algae and associated bacteria to selected antibiotics. *J. Phycology*, **2**, 125-128.
- 7) Gerloff, G.C., G.P. Fitzgerald and F. Skoog (1950): The isolation, purification, and culture of blue-green algae. *Am. J. Botany*, **37**, 216-218.
- 8) Hughes, E.O., P.R. Gorham and A. Zehnder (1958): Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **4**, 225-236.
- 9) Ichimura, T. and M.M. Watanabe (1977): An axenic clone of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin from Lake Kasumigaura. *Bull. Jpn. Soc. Phycol.*, **25**, 177-181.
- 10) Calmichael, W.W. and P.R. Gorham (1974): An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae. *J. Phycol.*, **10**, 238-240.
- 11) Kruger, G.H.J. and J.N. Eloff (1977): The influence of light intensity on the growth of different *Microcystis* isolates. *J. Limnol. Soc. South Africa*, **3**, 21-25.
- 12) Droop, M.R. and H.W. Jannasch (1977): *Adv. in Aquatic Microbiol.*, Vol. 1, Academic Press.
- 13) 矢木修身・須藤隆一 (1981): *Microcystis*の純粋分離. 国立公害研究所研究報告, 第25号, 7-15.
- 14) 柳田友道 (1981): 微生物科学. 2, 学会出版センター, 東京, 578p.
- 15) Zehnder, A and E.O. Hughes (1958): The antialgal activity of actidion. *Can. J. Microbiol.*, **4**, 399-408.
- 16) Goto, S. (1972): Growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* under defined conditions. Research report of the Univ. of Nebraska. Lincoln. Nebraska. A-020-NEB(2).
- 17) 梅崎 勇 (1981): 藍藻類の形態変異について, 微生物の生態, **9**, 171-196, 学会出版センター, 東京.
- 18) Lighthart, B. (1975): A cluster analysis of some bacteria in the water column of green lake Washington. *Can. J. Microbiol.*, **21**, 392-394.
- 19) Tanaka, N., Y. Ueda, M. Onizawa and H. Kadota (1977): Bacterial populations in water

- masses of different organic matter concentrations in Lake Biwa. *Jpn. J. Limnol.*, **38**, 41-47.
- 20) 前田秋一・手塚泰彦 (1970) : 相模湖の従属栄養細菌—とくに植物プランクトンとの関係—. *水道協会雑誌*, **536**, 19-31.

2 *Microcystis*の無菌株と単藻株の増殖特性

2.1 はじめに

*Microcystis*の増殖特性に関しては、1950年代にGerloffら^{1,2)}により増殖特性についての研究が開始され、高いpHが増殖に適していること、またCa, Mg, K濃度が増殖に重要であることを指摘した。次いでGorhamら^{3,4)}は*Microcystis*の増殖に及ぼす培地組成の影響について詳細に調べ高濃度のMg, Kは阻害的に作用すること、窒素源としてアンモニア態、硝酸態窒素及び尿素をよく利用できることを報告している。さらにLangeは有機物の存在が細菌のCO₂生成を促進し、そのCO₂が藻類の増殖を刺激することを⁵⁾、またキレート物質が*Microcystis*の増殖を促進することを見いだした⁶⁾。

我が国においては、*Microcystis*の増殖は、はじめは養鰻池の“水作り”として関心もたれていたが⁷⁾、その後、環境汚染の問題としてとらえられ1973年にOkino⁸⁾は諏訪湖における*Microcystis*による水の華の発生条件について詳細な現場調査を行い、異常発生の要因として温度とpHの重要性を述べている。また坂本ら⁹⁾は*Microcystis*の増殖因子について、渡辺ら¹⁰⁾は*Microcystis*の無菌化に成功しているが、無菌化により群体形成能が消失してしまうことを、さらにOkadaらは大型マイクロコズムにおける*Microcystis*の増殖^{11,12)}及びリンの取り込み速度¹²⁾について検討を加えている。

一般に湖水中での*Microcystis*は、粘質鞘で覆われた群体を形成し、群体のまわりには多くの細菌が付着している。これまでの報告は、群体を形成する*Microcystis*の無菌培養が大変困難であることから、研究のほとんどが細菌の共存している*Microcystis*か、あるいは無菌化に成功しても群体形成能を消失してしまったものについてであり、群体を形成する無菌の*Microcystis*の増殖特性についてはほとんど報告がなく、また*Microcystis*と細菌との関係についてもほとんど研究がなされていない^{13,14)}。筆者ら¹⁵⁾は、霞ヶ浦より、群体を形成し、かつ無菌の*Microcystis*の培養に成功したので*Microcystis*の増殖特性、特に細菌の共存する系としない系での相違について検討を加えた。

2.2 実験方法

2.2.1 供試藻類

実験にはK-3, K-3A, K-5の3株の*Microcystis*を用いた。K-3株は*M. aeruginosa*であり、図1.1(a), (b)に示すように、霞ヶ浦に発生した水の華よりキャピラリーピペット洗浄法により単藻化したもので、藻細胞のまわりに多数の細菌が共存している。K-3A株¹⁵⁾はK-3株を

さらに数回ピペット洗浄法を繰り返すことにより無菌化したものであり、図1.1(c), (d)に示すように細菌は全く共存していない。形態はK-3株と全く同じである。K-5株はガス胞を有し、細胞の直径が約4 μ mとやや小さいことから、*M. flos-aquae*^{#2)}と思われる。

本株は、分離当時群体形成能を保持していたが現在ではほとんど消失してしまっており、細菌が共存している。

2.2.2 培地

藻類の培養には、M-11培地を用いた。M-11培地はGorhamのラン藻用培地を改変したものであり、組成は表1.1に示されている。培地は沈殿物の生成を防ぐため、クエン酸鉄及びリン酸塩をそれぞれ別に滅菌した。滅菌終了後、無菌的に混合した。細菌の計数には1/10ブイヨン寒天培地を用いた。その組成は、肉エキス0.3g、ペプトン0.5g、寒天18gを水1lに溶かしたものである。

2.2.3 保存培養及び前培養

*Microcystis*の保存方法は、M-11培地を用いて30°C、1,000lxで1週間静置培養した後に、20°C、500lxの条件下に移し保存した。2か月ごとに植継ぎを行った。

前培養は500mlの三角フラスコに200mlのM-11培地を加え、これに保存培養液0.5mlを接種し、30°C、2,000lx連続照射下で1週間静置培養を行った。光源としてすべて白色蛍光灯を用いた。

2.2.4 本培養

本培養は500mlの三角フラスコに200mlのM-11培地を加え、これに前培養液を0.1~0.5ml添加した。培養条件は、特に断らない限り、30°C、2,000lx連続照射下で静置培養(1日1回手で振とう)とした。リン、窒素及び鉄の影響に関する実験では、前培養液からの栄養塩の持ち込みをできるだけ少なくするために、対象とする栄養塩のみをM-11培地の1/10濃度にして前培養を行った。また強固な群体を形成するK-3A、K-3株は滅菌したプランクトンネットで前培養液から分離し、無菌水で洗浄した後超音波処理により群体をばらばらにし、その0.5mlを接種した。K-5株については前培養液の0.1mlを接種した。鉄の影響に関する実験では、クエン酸鉄溶液を0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過滅菌して無菌的に培地に添加した。

2.2.5 藻体濃度、比増殖速度(μ)及び細菌数の測定法

藻体濃度の測定には、平均細胞容積計算機(Mean Cell Volume Computer)付きのコルター

注2) 注1参照

カウンター (Coulter Counter Electronics Inc., Healeath) を用いた。細胞数と平均細胞容積を算出し、あらかじめ作成しておいた検量線より藻体の乾燥重量を求めた。なおK-3 A及びK-3株は強固な群体を形成するため50w, 20秒間超音波処理し、群体をばらばらにした後、コールターカウンターで測定した。

比増殖速度 (μ) は(1)式より求めた。

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

X : 藻体濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

μ : 比増殖速度 (d^{-1})

単藻株に共存する細菌数は、培養液を50w, 20秒間超音波処理して均一にした後、これを1/10ブイオン寒天培地上で30°C, 約1週間培養し、生成したコロニー数を計算した。

2.3 結果

2.3.1 *Microcystis*の増殖曲線

図2.1に無菌株K-3 A, 単藻株K-3並びにK-3株に共存する細菌の増殖曲線を示した。K-3 A株は培養3日目までは対数的に増殖し、K-3株とほぼ同じ比増殖速度(以後 μ と記す)を示し

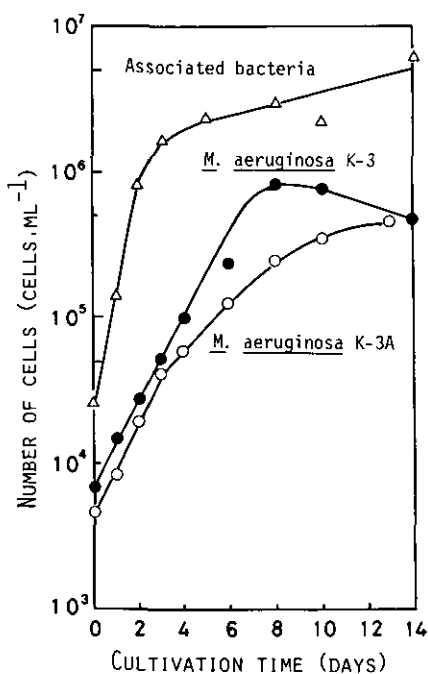


図 2.1 *M. aeruginosa* K-3A, K-3 及び共存細菌の増殖曲線

Fig. 2.1 Growth curves of *M. aeruginosa* K-3A, K-3 and associated bacteria

たが、その後 μ が低下する現象が認められた。一方K-3株は、培養6日目までは対数的に増殖し、8日目には約 10^6 cells/mlと最大に達した。この結果から以後の μ の値は培養開始後3日間の培養より求めることとした。またK-3株に共存する細菌は培養2日目までは高い μ を示すが、その後は比較的ゆっくりと増殖し、培養14日目には 6×10^6 cells/mlにまで達した。

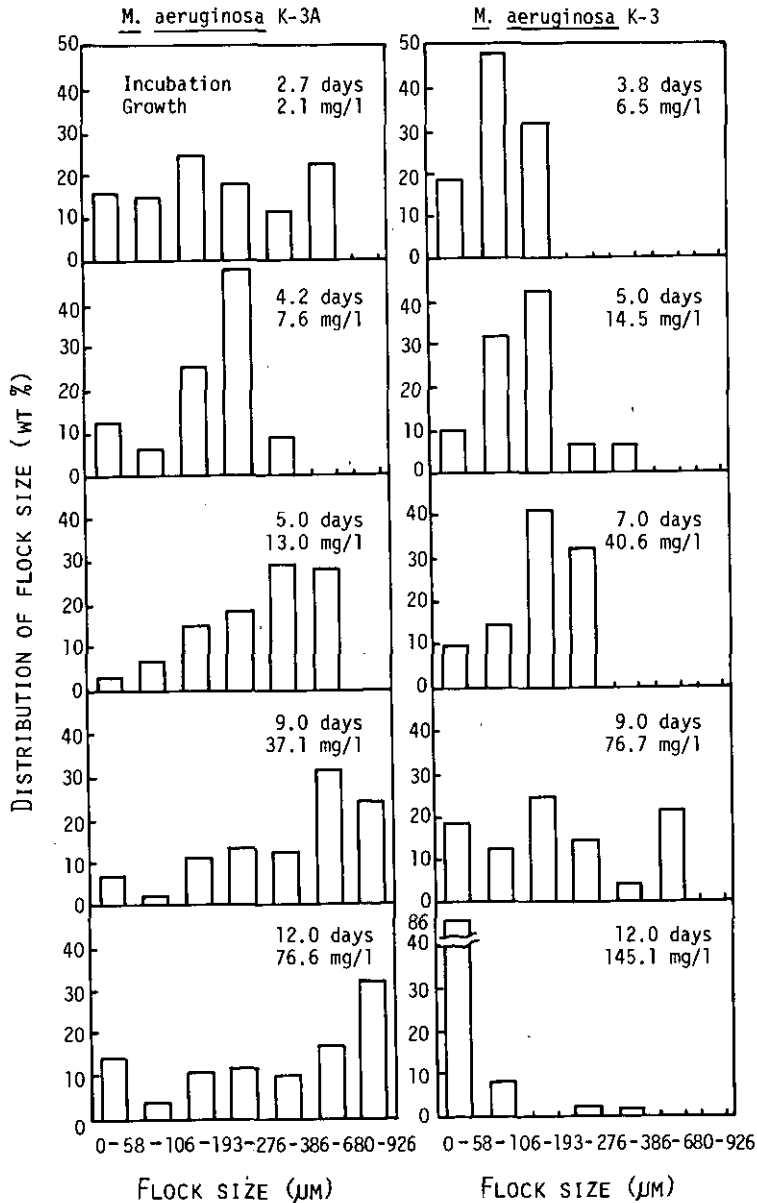


図 2.2 培養経過に伴う *M. aeruginosa* K-3A, K-3 株の群体径の変化
 Fig. 2.2 Distribution of flock size of *M. aeruginosa* K-3A and K-3 during cultivation

2.3.2 培養経過に伴う群体粒子径の変化

2.3.1の実験において、K-3 A株は培養後期になるとK-3株に比べ大きな群体を形成することが観察されたため、両者の群体形成能をより正確に知る目的で、培養経過に伴う群体の粒径分布について検討を加えた。群体の粒径測定は、一定期間培養した*Microcystis*を、網目の異なった各種のプランクトンネットの網目の大きい方から順次通過させ、ろ液の藻体量の減少から、一定の粒径範囲の藻体量を求めた。その結果を図2.2に示した。K-3 A株は培養5日目には約270 μ m以上の群体が全重量の50%以上を占め12日目には約700 μ m以上の群体が32%に達し、群体の巨大化が認められた。一方K-3株は培養5日目でも群体のほとんどが約200 μ m以下であり、12日目にはほとんどが58 μ m以下となり、培養期間を通して300 μ m以上の直径を有する群体はあまり認められなかった。このことから細菌が共存しない*Microcystis*は大きな群体を形成する性質を有することが判明した。

2.3.3 温度の影響

K-3株の各温度における増殖曲線を図2.3に示した。K-3株は15°Cでほとんど増殖が認められないが、20°Cでは、約2日のlag timeの後に増殖が始まった。また40°Cでの増殖量は2.6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とわずかであった。K-3 A株もほぼ同様の挙動を示した。図2.4は*Microcystis*の比増殖速度に及ぼす温度の影響についてまとめたものである。K-3 A, K-3株いずれも20°C~40°Cで増殖が認め

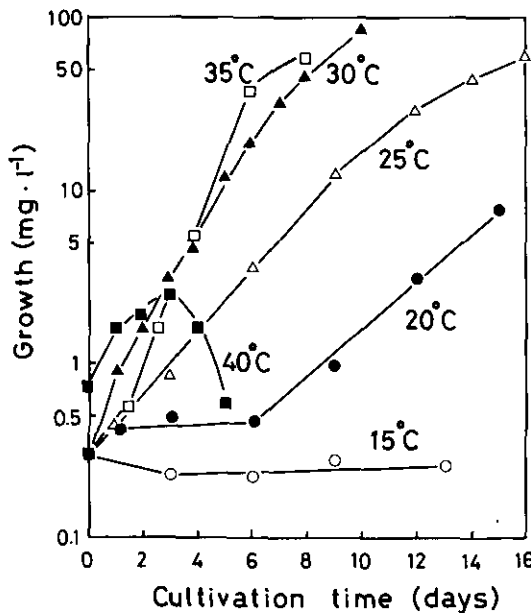


図 2.3 各種温度における *M. aeruginosa* K-3 の増殖曲線

Fig. 2.3 Growth curves of *M. aeruginosa* K-3 at various temperature

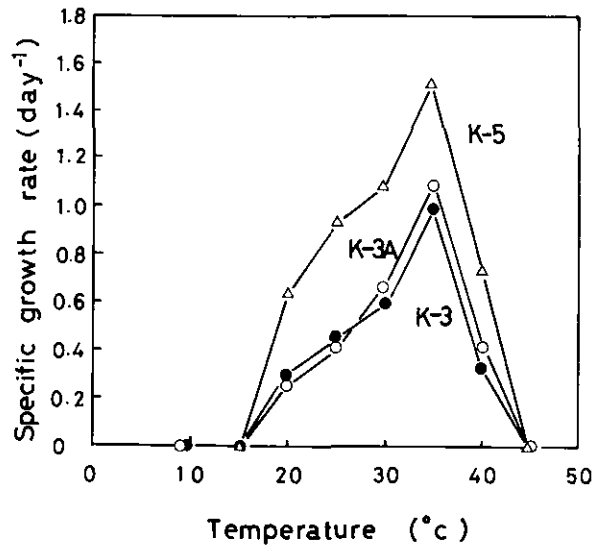


図 2.4 *Microcystis*の比較増殖速度に及ぼす温度の影響

Fig. 2.4 Effect of temperature on the specific growth rate of *Microcystis*

られたが、40°Cでは培養2日目から3日目で増殖は停止した。K-3 A, K-3株の μ は、温度による差は認められず、ほとんど同じ値を示し、最大の μ は、35°Cの $1.0d^{-1}$ で倍加時間は約17時間であり、2日で3回分裂する速度である。しかし35°Cでは最大増殖量に達した後に、すぐに*Microcystis*が分解し始め、培養液が白濁するため、以後の実験はすべて30°Cで行った。一方*M. flos-aquae* K-5株は、K-3 A株、K-3株に比べて μ が各温度で1.5~2倍程高い値を示した。

2.3.4 照度の影響

K-3 A, K-3, K-5株の比増殖速度及び最大増殖量に及ぼす照度の影響を図2.5に示した。K-3 AとK-3株を比較すると1,000 lx以下ではほとんど同じ μ で増殖するが、1,000 lx~5,000 lxでは、K-3株の方が高い μ を示した。K-3 A株は3,000 lxで最大の μ 、 $0.8d^{-1}$ を示し、一方K-3株は5,000 lxで最大の μ 、 $1.2d^{-1}$ 示した。

一方最大増殖量においては、K-3 A株は1,000 lx、15日間の培養で最大の増殖量が、またK-3株は2,000 lx、12日間の培養で最大の値が得られたが、いずれの照度においても、K-3株はK-3 A株に比べかなり高い最大増殖量を示した。両株ともに最大の μ を示す照度よりもかなり低い照度で最大の増殖量が得られる傾向があった。以上のことから細菌の共存は、*Microcystis*の増殖に有利に働いているものと考えられた。

一方比較としてK-5株について同様の実験を行ったが、いずれの照度においてもK-3 A, K-3株より高い最大増殖量を示し、 μ_{max} は $1.4d^{-1}$ であった。また15,000lxと高照度下においては、

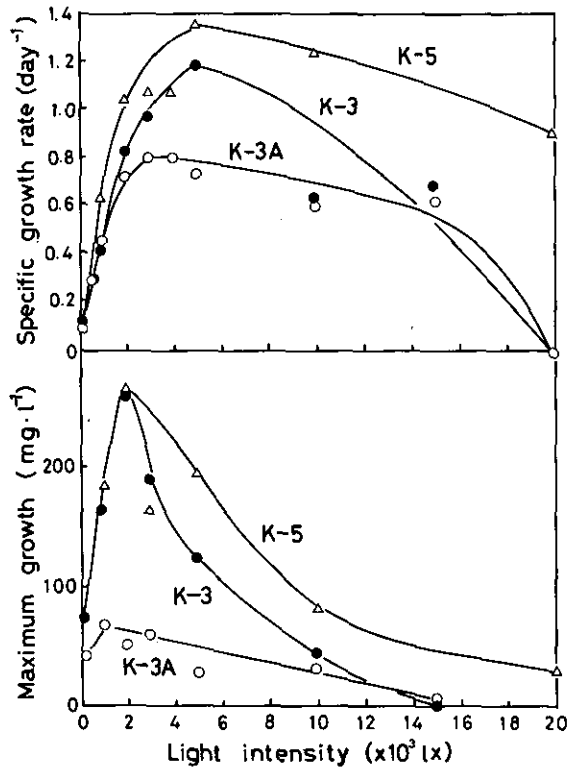


図 2.5 *Microcystis*の比較増殖速度と最大増殖量に及ぼす照度の影響

Fig. 2.5 Effect of light intensity on the specific growth rate and the maximum growth of *Microcystis*

K-3 A株, K-3株は共に培養初期には高い μ を示すが, 培養3日目には色素が分解されて白化し, 増殖が停止して低い最大増殖量しか得られないのに対し, K-5株は20,000 lxでも高い μ で増殖が可能であり, K-3 A, K-3株に比べて高照度に対して強い株であるといえる。

2.3.5 窒素の影響

*Microcystis*の比増殖速度及び最大増殖量に及ぼす窒素濃度の影響を図2.6に示した。窒素は NaNO_3 の形で添加した。K-3 A, K-3株は $\text{NO}_3\text{-N}$ が $1.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でそれぞれ $\mu = 0.70, 0.62\text{d}^{-1}$ とほぼ最大の μ を示した。また $0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でもK-3 A株で $\mu = 0.58\text{d}^{-1}$, K-3株で $\mu = 0.49\text{d}^{-1}$ と最大値の約80%と高い値を示した。細菌の存在の有無の差はほとんど認められなかった。一方K-5株の場合は, μ は窒素濃度の増加に伴ってより高い値を示した。K-5株はいずれの濃度においてもK-3 A株, K-3株より高い μ を示し, $\text{NO}_3\text{-N}$ が $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で μ が約 1.0d^{-1} と非常に高い値を示した。

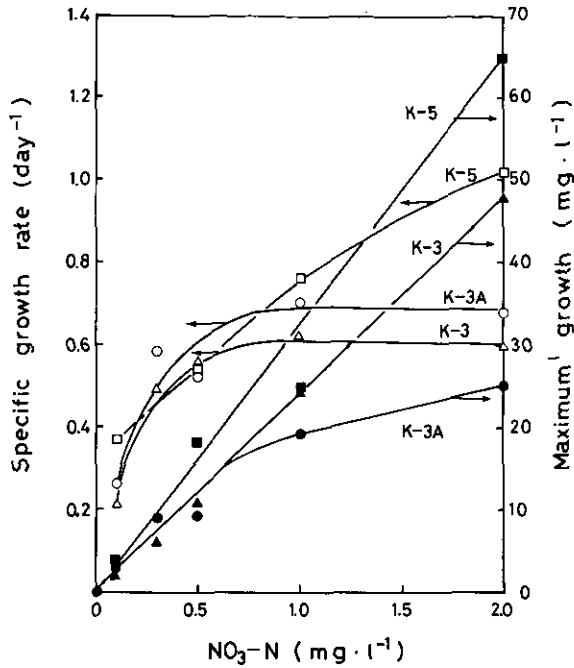


図 2.6 *Microcystis*の比増殖速度と最大増殖量に及ぼす窒素濃度の影響

Fig. 2.6 Effect of nitrogen concentration on the specific growth rate and the maximum growth of *Microcystis*

最大増殖量は、窒素濃度に比例し高くなり、K-3 A、K-3 株ともに $\text{NO}_3\text{-N}$ が $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下では培養5～6日目、 $1.0\sim 2.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では8～10日目で最大増殖量が得られた。直線部分の傾きよりK-3 A、K-3 株は 1mg の窒素から 28mg の藻体が、またK-5 株は 32mg の藻体が生成された。しかしK-3 A株は $\text{NO}_3\text{-N}$ が $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上で、窒素に対する藻体生成率は低下した。

2.3.6 リンの影響

図2.7に*Microcystis*の比増殖速度及び最大増殖量に及ぼすリン濃度の影響について示した。リンは K_2HPO_4 の形で添加した。K-5 株の値のみは、 $1,000\times$ で培養した結果である。いずれの株もリンが $0.05\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在すれば最大の μ を示したが、 $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と低濃度でもほぼ最大に近い μ を示した。なお3株ともに、リン無添加培地においても、培養開始後2～3日の間比較的高い μ での増殖が認められたが、その後すぐに増殖が停止し、白化現象が認められた。一般に藻類はリンを過剰に摂取することが知られており、前培養はリン制限下で行う必要がある。しかしながらリン濃度の低い培地で前培養を行うと、本実験での藻体の増殖が非常に不安定となり再現性のある結果が得られないことから、前培養は、M-11培地濃度の $1/10$ ($0.18\text{mg}\cdot\text{P}\cdot\text{l}^{-1}$)で行った。

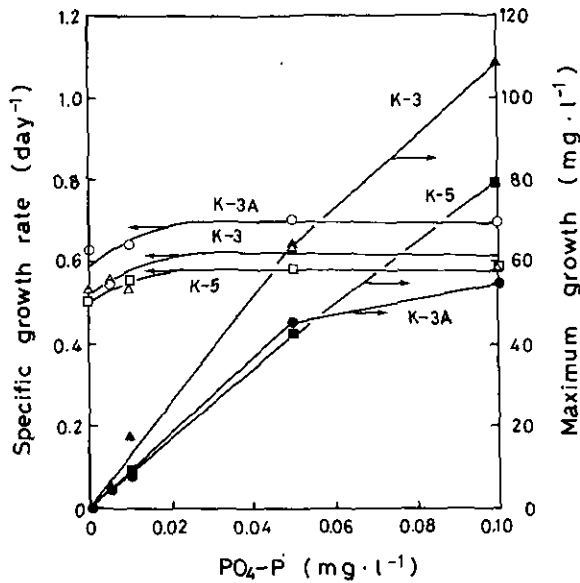


図 2.7 *Microcystis*の比増殖速度と最大増殖量に及ぼすリン濃度の影響

Fig. 2.7 Effect of phosphorus concentration on the specific growth rate and the maximum growth of *Microcystis*

最大増殖量は、いずれの株もリンが $0.05\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ までは、ほぼ濃度に比例して増加したが、それ以上になるとやや傾きが小さくなり、特にその傾向は細菌の存在しないK-3 A株で顕著であった。なお最大増殖量はリン濃度の低い $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ では5～6日間の培養で、 $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と高い濃度では10日間の培養で得られた。リンが $0.05\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下では、K-3株はリン1mgから1,300mg、K-3 A株は900mg、また*M. flos-aquae* K-5株では800mgであり、微量のリンから多量の藻体が生成された。

2.3.7 鉄の影響

*Microcystis*の比増殖速度及び最大増殖量に及ぼす鉄濃度の影響について検討を加え、その結果を図2.8に示した。鉄としてはクエン酸第2鉄を用いた。K-3 A株の場合、鉄は $0.03\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在すれば $\mu = 0.73\text{d}^{-1}$ と最大値を示した。また $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でも $\mu = 0.67\text{d}^{-1}$ と最大値の92%という高い μ が得られ、増殖は7日間継続した。また鉄を全く加えない培地では、 μ は 0.57d^{-1} と最大値の78%を示したものの増殖は3日で停止した。K-3株もほぼ同様の挙動を示した。K-5株の場合、最大の μ は約 1.4d^{-1} と他の2株に比べて大きい値が得られたが、鉄として $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在すれば十分高い μ で増殖できることが判明した。

鉄についても、*Microcystis*の最大増殖量はほぼ濃度に比例し増加した。また最大増殖量に達す

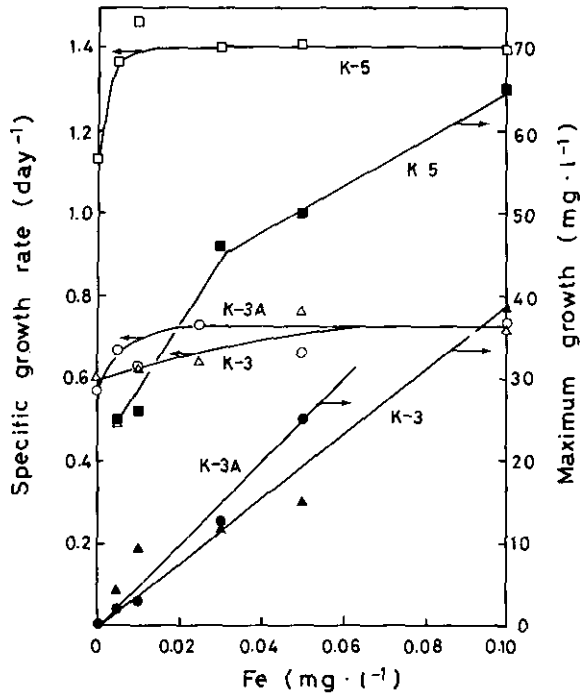


図 2.8 *Microcystis*の比増殖速度と最大増殖量に及ぼす鉄濃度の影響

Fig. 2.8 Effect of iron concentration on the specific growth rate and the maximum growth of *Microcystis*

る培養日数は、鉄濃度の増大につれ増加し、鉄 $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で5~7日、 $1.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で14日間であった。グラフの傾きより鉄1mg当たりの藻体生成量を求めると、K-3A株では500mg、またK-3株では390mgであった。K-5株の場合、鉄濃度と最大増殖量には明りょうな比例関係は得られなかったものの、鉄が 0.05mg 存在すれば50mgもの藻体が得られ、これは1mgの鉄から1,000mgの藻体が生成されたことを示している。

2.4 考察

細菌の共存しない無菌の*Microcystis* K-3A株と、細菌の共存するK-3株の増殖特性の相違について検討を加えたところ、無菌株K-3Aでは図2.1に示したように培養3日目ごろから μ が低下し、また最大増殖量も図2.5に示したようにK-3株より著しく低く、約 $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下であった。これは無菌株が大きな群体を形成することが原因と考えられた。そこで次にK-3A株を無菌的に超音波処理し、群体を小さく保って培養を行った。その結果を図2.9に示した。超音波処理

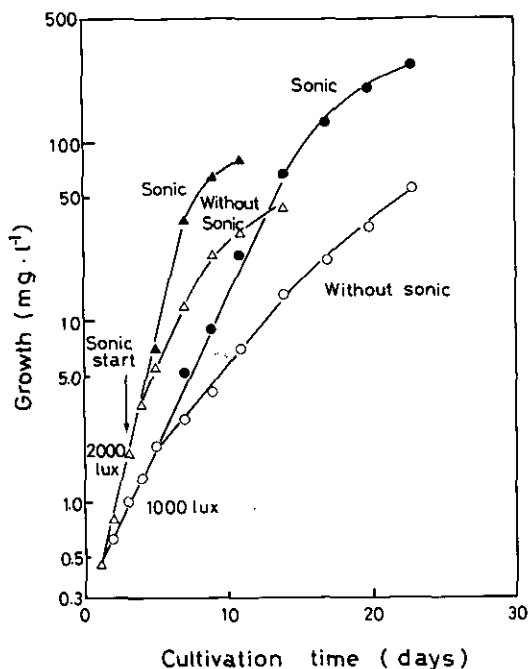


図 2.9 *M. aeruginosa* K-3Aの群体破壊の増殖速度に及ぼす影響

Fig. 2.9 Effect of flock destruction on the growth of *M. aeruginosa* K-3A

は測定日ごとに60wで肉眼的に群体が認められなくなるまで2～5分間適宜行った。超音波処理は矢印で示す培養3日目から行った。1,000 lxで培養した場合、無処理のものは培養6日目から μ の低下が認められたが超音波処理したものは μ の低下は認められず、最大増殖量も処理しないものが $60\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度であるのに対して、処理したものは $300\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しく高い値が得られた。2,000 lxで培養した場合も同様の傾向が認められた。この結果からK-3A株は細菌が存在しないと大きな群体を形成し、これによって μ が低下し、また最大増殖量が低くなるものと思われた。細菌が共存すると何故に群体が小さくなるのかは現在のところ不明であるが、単藻株に共存する細菌は、群体を小さくし、栄養塩や光の吸収能を高めるものと考えられる。ほとんど群体を形成しない*M. flos-aquae* K-5株がK-3A株やK-3株より高い μ を示すのは同様の理由と考えられる。

*Microcystis*の増殖に及ぼす温度、照度、窒素、リン及び鉄の影響について調べたが、これまで群体形成能を有する*Microcystis*の増殖特性に関してはほとんど報告がなされていない。Stanierら¹⁶⁾またKonopkaら¹⁷⁾は、ラン藻は藻類の中でも比較的高い温度を好む生物であることを述べているが、本実験に用いた3株の*Microcystis*はいずれも $30\sim 35^\circ\text{C}$ で高い μ を示した。この結果は、夏季の表層の水温が 30°C を超すような霞ヶ浦で、*Microcystis*による水の華が大発生することをよく裏づけているといえよう。

藻類は一般に高照度になると増殖量が低下したり μ が低下するいわゆる強光阻害を受けることが知られている¹⁸⁻²⁰⁾。今回実験に用いた3株の*Microcystis*も10,000 lx以上になると μ 及び最大増殖量が低下し、明らかに強光阻害が認められた。しかしながら100,000 lxを超えるような夏季の湖水面でも*Microcystis*の大発生が認められることから、*Microcystis*は浮上、沈降する性質を有し²¹⁾、また昼夜の存在により強光阻害から身を守っているのではないかと考えられる。一方K-3 A株、K-3株などは200lxという低い照度でも最大増殖量は $42\sim 75\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にも達することから、富栄養化が進行して透明度が低下し、薄暗くなった水中でも十分増殖が可能であるといえよう。

湖水中における藻類増殖は、リン、窒素以外にも鉄が制限栄養塩になることが知られている²²⁾。Lange⁶⁾、Murphyら²³⁾は腐植物質等のキレーター存在により、鉄の利用性が高まり、ラン藻の比増殖速度が高くなることを報告している。そこで窒素、リン及び鉄について*Microcystis*の増殖特性を検討した結果、いずれの株もほぼ窒素は $0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、リンは $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、鉄は $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 存在すれば最大の μ に近い値が得られた。現在の霞ヶ浦の湖水の水の華発生直前の無機態の窒素、オルトリン酸、溶存態の鉄はそれぞれ $0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.005\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を超えている。したがって霞ヶ浦において、これらの栄養塩類は、*Microcystis*を高い μ で増殖させるのに十分存在しているものと考えられる。

2.5 まとめ

霞ヶ浦の水の華より分離した3株の*Microcystis*について増殖特性の検討を行い、以下の結果が得られた。

1) 3株の*Microcystis*のいずれもが、 $30\sim 35^\circ\text{C}$ と藻類としては高温において高い μ を示した。表層水温が 30°C を超える夏季の霞ヶ浦は、*Microcystis*の増殖に最適といえる。

2) *Microcystis*の照度に対する挙動を検討した結果、3株ともに1,000 lxから3,000 lxにおいて高い増殖量が得られた。最大の μ の得られる照度は*M. aeruginosa* K-3株及び*M. flos-aquae* K-5株で5,000 lx、*M. aeruginosa* K-3 A株で3,000 lxであった。最大増殖量が得られる照度は最大の μ の得られる照度よりやや低い値であった。3株ともに5,000 lxで最大増殖量の低下が、また10,000 lxで μ の低下が認められたが、これは強光阻害によるものと考えられた。

3) 窒素、リン及び鉄に対する増殖特性を検討した結果、3株の*Microcystis*は、窒素 $1.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、リン $0.05\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、鉄 $0.03\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の濃度で、最大の μ を示した。霞ヶ浦湖水の栄養塩濃度では、本藻が十分に高い μ で増殖可能であることが判明した。

4) *M. aeruginosa* K-3 A株(無菌株)は、*M. aeruginosa* K-3株(単藻株)に比べて大きな群体を形成し、その結果 μ の低下並びに最大増殖量の低下を引き起こすものと考えられた。細菌の共存は*Microcystis*の増殖を有利にしているものと思われた。

引用文献

- 1) Gerloff, G. C., G. P. Fitzgerald and F. Skoog (1952): The mineral nutrition of *Microcystis aeruginosa*. Am. J. Bot., **39**, 26-32.
- 2) Gerloff, G. C. and K. A. Fishbeck (1969): Quantitative cation requirement of several green and blue-green algae. J. Phycol., **5**, 109-114.
- 3) Mclachlan J. and P. R. Gorham (1961): Growth of *Microcystis aeruginosa*. Kütz. in a precipitate free medium buffered with TRIS. Can. J. Microbiol., **7**, 869-882.
- 4) Mclachlan, J. and P. R. Gorham (1962): Effects of pH and nitrogen sources on growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Can. J. Microbiol., **8**, 1-11.
- 5) Lange, W. (1971): Enhancement of algal growth in Cyanophyta-bacteria systems by carbonaceous compounds. Can. J. Microbiol., **17**, 303-314.
- 6) Lange, W. (1974): Chlating agents and blue-green algae. Can. J. Microbiol., **20**, 1311-1321.
- 7) 須藤俊造 (1959): 養鰻池の *Microcystis* sp. の培養について. 水産増殖, **7**, 13-16.
- 8) Okino T. (1973): Studies on blooming of *Microcystis aeruginosa*. Jpn. J. Botany, **20**, 381-402.
- 9) 神谷知子・坂本充 (1974): 諏訪湖における植物プランクトンの生産支配因子としての鉄の存在状態. 陸水富栄養化の基礎的研究. 奈良女子大理学部生物学教室, 27-29.
- 10) Ichimura, T. and M. Watanabe (1977): An axenic clone of *Microcystis aeruginosa*. Kütz. emend Elenkin from Lake Kasumigaura. Bull. Jpn. Soc. Phycol., **25**, 177-181.
- 11) Okada, M. and R. Sudo (1980): Microcosm system study of algal bloom formation. JWPCF, **52**, 1029-1034.
- 12) Okada, M. and R. Sudo and S. Aiba (1982): Phosphorus uptake and growth of blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*. Biotech. Bioeng., **24**, 143-152.
- 13) 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, 第25号, 47-58.
- 14) Lange, W. (1976): Speculation on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. Can. J. Microbiol., **22**, 1181-1185.
- 15) 萩原富司・矢木修身・高村義親・須藤隆一 (1984): 霞ヶ浦に発生する *Microcystis aeruginosa* の純粋分離. 水質汚濁研究, **7**, 437-442.
- 16) Stanier, R. Y., R. Kunisawa and B. Cohen (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae. Bact. Rev., **35**, 171-205.
- 17) Konopka, A. and T. D. Brock (1978): Effect of temperature on blue-green algae in Lake Mendota. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 572-576.
- 18) 有賀祐勝 (1973): 水界植物群落の物質生産II. 共立出版, 東京, 91p.
- 19) Jüttner, F. (1977): Thirty liter tower-type pilot plant for the mass cultivation of light and motion-sensitive planktonic algae. Biotech. Bioeng., **19**, 1679-1687.
- 20) Küger, G. H. and J. N. Eloff (1977): The influence of different *Microcystis* isolate. J. Limnol. Soc. Sowth Africa, **3**, 21-25.
- 21) Weathers, P. J., M. Jost and D. T. A. Lampport (1977): The gas vacuole membrane of *Microcystis aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys., **178**, 226-244.
- 22) Gerloff, G. C. and F. Skoog (1957): Availability of iron and manganase in southern Wisconsin Lake for the growth of *Microcystis aeruginosa*. Ecology, **38**, 551-556.

- 23) Murphy, T. P., D. R. S. Lean and C. Nalewajiko (1976): Blue-green algae; their excretion of iron selective chelators enables them to dominate other algae. *Science*, **192**, 900-902.

3 霞ヶ浦における藻類増殖の制限栄養物質

3.1 はじめに

霞ヶ浦では毎年夏から秋にかけて *Microcystis* を優占種とした水の華が発生し、利水上さまざまな障害を引き起こしている¹⁾。このような *Microcystis* による被害を防止するためには、*Microcystis* の発生機構を解明し、その発生を抑制することが重要である。小島²⁾は、曝気により藻類の増殖が抑制されることを、また岡田³⁾は、*Microcystis* の発生機構について数理モデルを用いて検討を加え、その制御方法を提案している。一方 *Microcystis* の発生を栄養物質の観点から制御する試みもなされているが、この場合にはどのような物質が藻類の増殖に制限となっているかを知ることが必要である。

藻類培養試験法は、生物の増殖は制限栄養物質に支配されるというリービッヒの最少律を基礎にした一種の生物検定である。すなわち、試水中の藻類の最大増殖量は増殖に必要な種々の栄養物質の最少量によって決定され、さらにこの制限栄養物質を十分に添加した場合には、藻体は次に制限となる物質の存在量に対応した量まで増殖を続ける。このように試水に各種の栄養物質を添加することにより、試水中の制限栄養物質の推定が可能となる。

一般に湖沼における藻類の増殖制限物質は、窒素あるいはリンとされているが⁴⁾、*Microcystis* 等のラン藻類の増殖については必ずしも窒素とリンだけでは十分説明されず、鉄やキレート物質が大きな影響を及ぼすことが知られている^{5,6)}。しかしながらラン藻類における鉄やキレート物質の必要性は、室内実験ではその重要性が証明されながら、実際の湖沼で証明された例は Lange⁷⁾ の報告のみである。また特定の水域を対象として藻類培養試験を行う場合には、その湖沼で種占種となる藻類を選ぶことが重要である⁸⁾。

本章では、霞ヶ浦の水の華より分離した2種の *Microcystis* を用いて、藻類培養試験法により霞ヶ浦における *Microcystis* の増殖制限物質を検討した結果について報告する。供試藻類による違いを比較するため、藻類培養試験の標準種とされている *Selenastrum capricornutum* についても同様の実験を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 供試藻類

実験には *Microcystis flos-aquae* K-5、*Microcystis aeruginosa* K-3、*Selenastrum capricornutum* の3種の藻類を用いた。2種の *Microcystis* は、霞ヶ浦で発生した水の華より分離したものである⁹⁾。*M. flos-aquae* K-5 は群体形成能をほとんど消失してしまったものであり、*M.*

*aeruginosa*K-3は明りょうな粘質鞘で覆われた不定形の群体を形成する。*S. capricornutum*はSkulbergによりノルウェーのNitelvall川より分離されたものである。なおこれら3種は、藻類としては単一であるが、細菌が共存している。

供試藻類の保存・前培養培地として表1.1に示すM-11培地を用いた。前培養は500mlの三角フラスコに200mlの培地を加え、保存培養液を1%添加し、蛍光灯による連続照射の条件下で行った。*M. flos-aquae*, *M. aeruginosa*の場合、照度は2,000lx、温度は30°Cで静置条件とした。*S. capricornutum*は4,000lx、25°Cで振とう条件とした。

3.2.2 試水の前処理法

1) ろ過法

実験には、1980年の5月から1981年の4月までの期間にほぼ月1回、霞ヶ浦の湖心の表層下0.5mから採取した湖水を用いた。ろ過法の場合は、試水をワットマンGF/Cのガラスフィルターで無菌的にろ過した。この際に用いた器具はすべてオートクレーブあるいは乾熱機により滅菌したものをを用いた。

2) 熱分解法

試水を121°Cで15分間オートクレーブ処理を行った後、放冷後3.2.2の1)に従ってろ過操作を行い、実験に供した。

3.2.3 添加栄養物質

添加栄養物質は窒素、リン、鉄とEDTAを用いた。これらの栄養物質の添加量は、窒素として NaNO_3 1.0mg-N \cdot l $^{-1}$ 、リンとして K_2HPO_4 0.1mg-P \cdot l $^{-1}$ 、鉄として $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2mg-Fe \cdot l $^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mg \cdot l $^{-1}$ となるように試水に添加した。これらの添加溶液はあらかじめオートクレーブにより滅菌した。ただし、 FeCl_3 溶液は沈殿を防ぐため孔径0.22 μm のメンブランフィルターによりろ過滅菌を行った。

3.2.4 藻類の接種及び培養方法

前処理を行った試水100mlを300mlの三角フラスコに無菌的に分注し、これに栄養物質を添加した後、前培養した藻類を接種した。接種量は*M. flos-aquae*及び*S. capricornutum*の場合培養液0.1mlとした。*M. aeruginosa*は強固な群体を形成する。そのためプランクトンネット上で群体を洗浄後、無菌水に懸濁させ、これを50W、30秒超音波処理を行い、群体を破壊した細胞懸濁液0.2mlを接種した。接種量はいずれも乾燥重量として0.01~0.02mg \cdot l $^{-1}$ とし、接種の際持ち込まれる栄養塩をなるべく少なくした。培養条件は培養液が100mlであること以外は3.2.1で記した保存・前培養と同一である。培養はすべて2連で行った。試水を採取してから培養を開始するまでの期間は通常2日以内とし、なるべく試水の保存期間を短くすることに努めた。

3.2.5 藻体量の測定

増殖量は粒子計数器（コールターカウンター）を用いて細胞数と平均細胞容積より全細胞容積を測定し、あらかじめ作成しておいた検量線より乾燥重量として表示した。増殖が最大に達したときの乾燥重量から培養開始時の乾燥重量を差し引いた値を最大増殖量とした。

3.2.6 水質分析法

藻類培養試験の結果と水質を比較検討するため、霞ヶ浦から採取した試水について、以下に示す方法で水質分析を行った。

pH：比色法により現場で測定した。

SS：ワットマンGF/Cを用いた。

DO：ウィンクラーアゾ化ナトリウム法

CDO：酸性過マンガン酸カリウム法

Chl-*a*：Parsons法による吸光光度法

T-P：過硫酸カリ分解後モリブデンブルー法

PO₄-P：モリブデンブルー法

T-N：全窒素分析装置（三菱化成工業製）

NH₄-N：インドフェノール法

NO₂₊₃-N：スルファニルアミド法

Fe：フェロジン試薬による方法¹⁰⁾

3.3 実験結果

3.3.1 霞ヶ浦の水質とAGP

藻類培養試験に用いた試水の分析結果を表3.1に示した。霞ヶ浦湖心の透明度はほぼ1m以下であり、SSは変動が激しく2月と4月を除けば10mg・l⁻¹以上の高い値を示した。クロロフィル-*a*も2月と4月は20μg・l⁻¹以下と比較的低い値であったが、7月から12月にかけては50μg・l⁻¹を超えていた。CODは5.4~11.9mg・l⁻¹と年間を通じて霞ヶ浦の環境基準であるA類型（COD3mg・l⁻¹以下）を上回っていた。全リン（T-P）は、0.044~0.141mg・l⁻¹と高いが溶解性全リン（DTP）は0.002~0.031mg・l⁻¹と極めて低く、そのほとんどは植物プランクトン体中に取り込まれているものと考えられる。またオートクレーブ後のDTPは0.029~0.120mg・l⁻¹とDTPの2倍以上となっており、熱分解によりかなりのリンが溶存態に変化していることがわかる。全窒素（T-N）は0.30~1.31mg・l⁻¹と高いのに対して無機態であるNH₄-Nは0~0.16、NO₂₊₃-Nは0~0.37mg・l⁻¹と低くなっていた。全鉄（T-Fe）は0.018~0.154mg・l⁻¹の範囲であり、夏期に高く冬期に低くなる傾向があった。

このような試水に*M. flos-aquae*を接種して、霞ヶ浦湖水の有する藻類生産の潜在能力（Algal

表 3.1 霞ヶ浦の水質分析結果

Table 3.1 Water quality of Lake Kasumigaura

Items		1980								1981	
		May.19	Jun.23	Jul.23	Aug.26	Sep.24	Oct.23	Nov.25	Dec.22	Feb.10	Apr.24
Wat. Temp.	(°C)	19.3	23.7	27.0	23.2	22.5	18.8	12.5	5.8	4.0	15.9
Transparency	(m)	0.8	1.00	0.95	0.45	0.90	1.30	0.85	0.60	1.2	1.0
pH		8.0	-	9.0	8.7	8.4	8.2	8.2	8.1	7.5	7.9
SS	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	10.3	11.5	16.7	32.6	20.3	13.5	12.2	11.7	4.9	8.6
Chlorophyll- <i>a</i>	(μ g. <i>l</i> ⁻¹)	44.7	40.7	72.4	118.2	90.1	50.2	100.1	89.8	12.6	20.0
COD	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	7.1	7.8	8.9	11.9	10.8	8.1	8.9	8.6	5.4	6.7
Dissolved COD	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	5.3	5.4	4.3	4.9	6.5	5.4	4.5	4.8	4.2	4.6
DO	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	10.1	7.0	13.6	7.5	8.3	9.2	10.6	12.3	10.9	10.9
T-P	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.084	0.141	0.055	0.110	0.094	0.063	0.093	0.067	0.055	0.044
Dissolved T-P	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.022	0.031	0.015	0.023	0.017	0.011	0.002	0.012	0.017	0.022
PO ₄ -P	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.003	0.000	0.006	0.000	0.003	0.007	0.001	0.000	0.004	0.004
Dissolved T-P (Auto.*)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.056	0.120	0.033	0.068	0.060	0.050	0.062	0.029	0.046	0.032
PO ₄ -P (Auto.*)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.014	0.026	0.016	0.024	0.022	0.022	0.019	0.021	0.005	0.007
T-N	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.50	0.71	0.90	1.31	1.27	0.84	0.94	-	1.23	0.30
Dissolved T-N	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.18	0.36	0.49	0.15	0.17	0.34	0.41	-	0.96	0.22
NH ₄ -N	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.01	0.04	0.08	0.00	0.03	0.08	0.12	0.00	0.16	0.02
NO ₂ + ₃ -N	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.00	0.00	0.05	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.37	0.15
Dissolved T-N (Auto.*)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.27	0.54	0.64	0.55	0.49	0.50	0.62	-	1.35	0.28
NH ₄ -N(Auto.*)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.04	0.16	0.11	0.04	0.06	0.14	0.10	0.04	0.43	0.05
NO ₂ + ₃ -N (Auto. *)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.00	0.00	0.02	0.02	0.01	0.00	0.05	0.04	0.40	0.15
T-Fe	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.048	0.095	0.056	0.154	0.096	0.050	0.054	0.054	0.021	0.018
Dissolved T-Fe	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.014	0.052	0.043	0.022	0.009	0.006	0.004	0.010	0.004	0.004
Dissolved T-Fe (Auto.*)	(mg. <i>l</i> ⁻¹)	0.012	0.040	0.049	0.005	0.010	0.010	0.005	0.012	0.006	0.007

Auto*: Analysed aftry autoclaving the lake water

Growth Potential：以後AGPと記す)を測定した結果を図3.1に示した。ろ過法により測定した場合のAGPは $0.1\sim 3.7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、8月に最大値を示し9月から12月までの期間はほぼ $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と低い値であった。一方熱分解法によるAGPは $3.9\sim 11.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、6月と2月に $11\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の高い値を示し、8月と9月は $4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下と低い値であった。このようにろ過法によるAGPが熱分解法によるAGPのほぼ1/10と低い値を示すのは、クロロフィル-*a*やSSが高濃度に存在していることからわかるように、湖水中に常に植物プランクトンが多量に存在し、利用可能な栄養塩が非常に少ないためと考えられる。

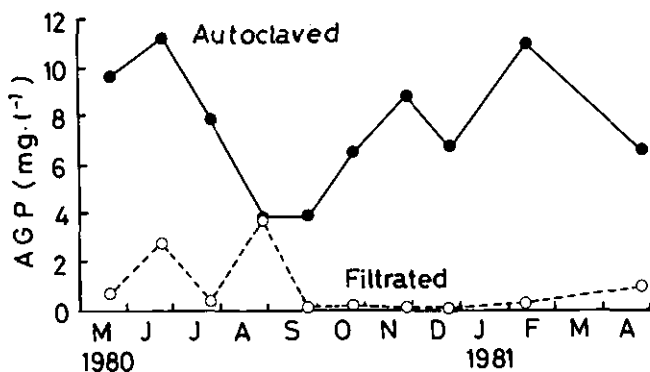


図 3.1 霞ヶ浦におけるAGPの変化

Fig. 3.1 Seasonal change of AGP in Lake Kasumigaura

3.3.2 霞ヶ浦における藻類増殖制限栄養物質

*M. flos-aquae*を用いて霞ヶ浦湖水について栄養物質の添加試験を行い制限栄養物質を調べた。その結果を図3.2～3.11に示した。

5月19日(図3.2)：ろ過法の場合、AGPは $0.7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と低い値であるがこれに鉄を添加することにより藻体量は $2.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と3倍以上に増加し、またEDTAを添加することにより $3.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と約5倍に増加した。しかしリン、窒素を単独に添加しても藻体量の増加は認められなかった。このことから、このときのろ過試水は鉄またはEDTAが制限物質になっていると考えられる。さらに鉄とEDTAの存在下でリンと窒素を添加すると藻体量は $27\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しく増加することから、鉄またはEDTAに次いでリンと窒素が同時に制限物質になっていると考えられる。熱分解法の場合、AGPは $9.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であるがこれに窒素を加えることにより藻体量は $36\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しく増加していることから、窒素が制限物質になっていると推定される。窒素以外のリン、鉄及びEDTAを加えても藻体量の増加は全く認められなかった。また窒素とリンを同時に添加した場合、窒素のみの添加と比較し、藻類の増殖量がやや低下しているがこれは誤差によるものと考えられる。

6月23日(図3.3)：ろ過法の場合、試水にリン、窒素、鉄及びEDTAを単独で添加しても藻体

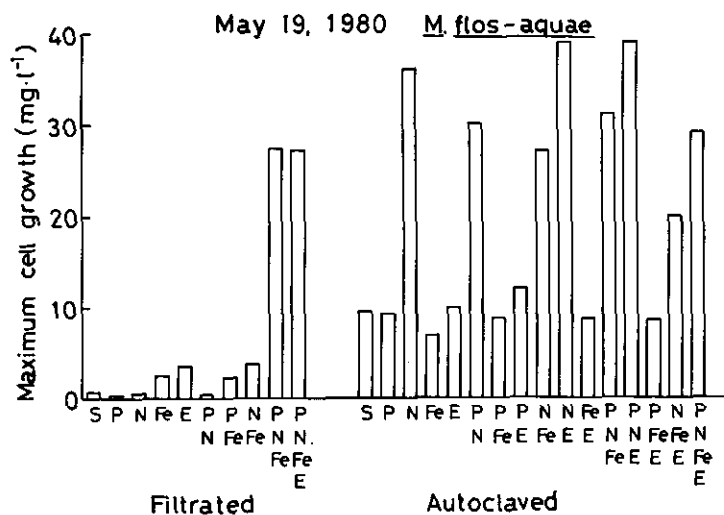


図 3.2 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.2 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

- S : no addition,
- P : $\text{PO}_4\text{-P}$ $0.1\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ addition
- N : $\text{NO}_3\text{-N}$ $1.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ addition
- Fe : FeCl_3 $0.2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ addition
- E : $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1.0\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ addition

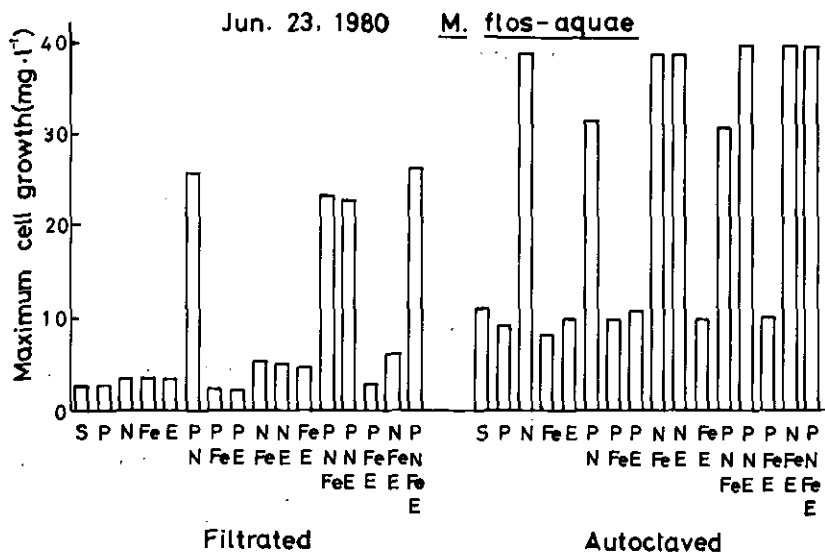


図 3.3 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.3 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

量はほとんど増加しないが、リンと窒素の同時添加により $26\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と藻体量は著しく増加した。したがってリンと窒素の二成分が同時に制限物質となっているものと考えられる。熱分解法の場合は窒素添加により藻体量が著しく増加しており、窒素が制限物質であると考えられる。

7月23日(図3.4)：ろ過法の場合、単独添加ではFeまたはEDTAを添加することにより藻体量の増加が認められた。しかしリンと窒素を同時に添加すると鉄やEDTAが存在しなくても藻体量は $16\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しく増加することから、窒素とリンが同時に制限物質になっているとも考えられる。熱分解法の場合は、窒素を添加することにより藻体量の増加が認められた。さらに窒素とともにリンを添加することにより、窒素の単独添加より藻体量が増加した。したがってこの試水は窒素が制限物質となっており、次いでリンが制限となっていると考えられる。

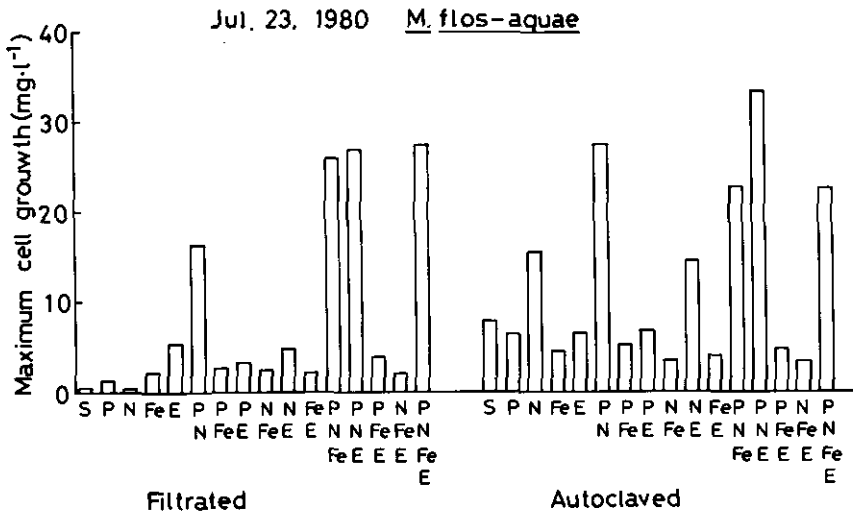


図 3.4 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.4 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

8月26日(図3.5)：ろ過法の場合は、リンと窒素の同時添加により藻体量が増大し、リンと窒素が制限となっていた。熱分解法の場合、窒素の単独添加では藻体量の増加はほとんど認められないが、窒素の他に鉄またはEDTAを同時添加した場合に高い増殖量が得られた。

9月24日(図3.6)：ろ過法によるAGPは $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、これにリン、窒素を単独あるいは同時に添加しても藻体量は増加しなかった。しかし、試水に鉄を添加すると藻体量は $1.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にまで増加し、またEDTAを添加すると $2.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となった。さらに鉄あるいはEDTAの存在下で、リンと窒素を添加すると藻体量はいずれも $18\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上となった。したがってこの試水では鉄またはEDTAが制限物質であり、次いで窒素とリンが同時に制限物質になっていると考えられる。

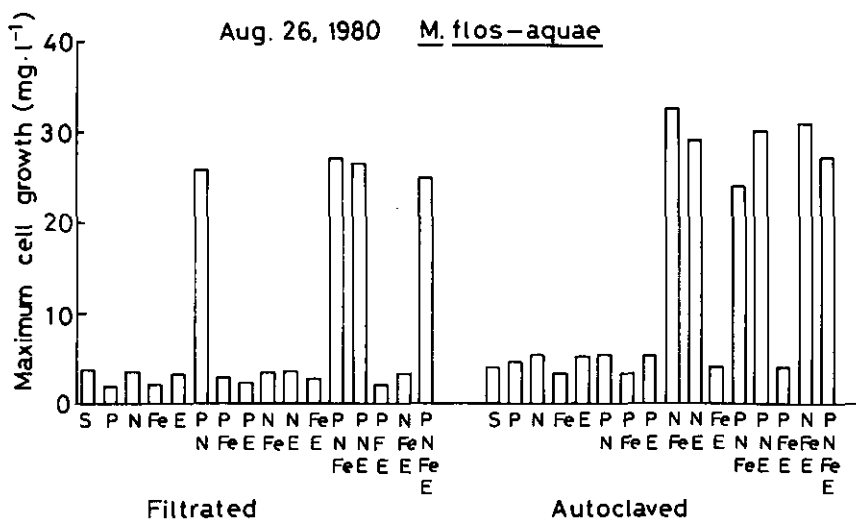


図 3.5 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.5 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

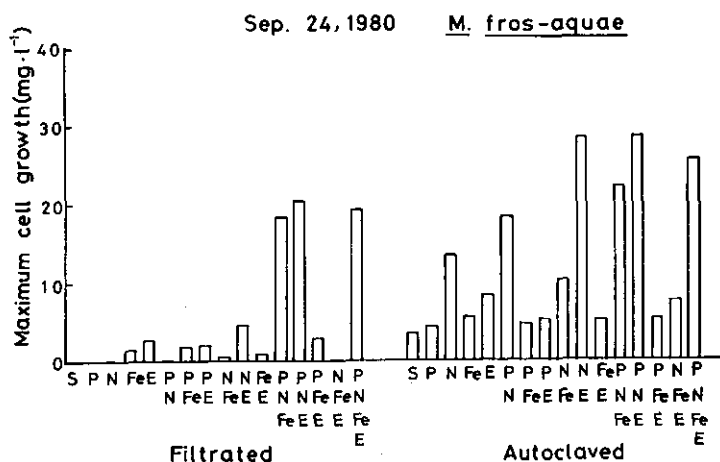


図 3.6 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.6 Effect of nutrient addition on the growth of *M. fros-aquae*

これは5月のろ過法で得られた結果とよく似ていた。熱分解法の場合は窒素添加により高い増殖量を得られ、これにリンを添加するとさらに高い増殖量を得られた。

10月23日(図3.7)：ろ過法の場合AGPは $0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と低い、これに鉄またはEDTAを単独添加することにより、藻体量の増加が認められた。さらにこれらのうちのどちらか一方の存在下で、リンと窒素を添加することにより高い増殖量を得られた。試水中にリンと窒素が十分存在したと

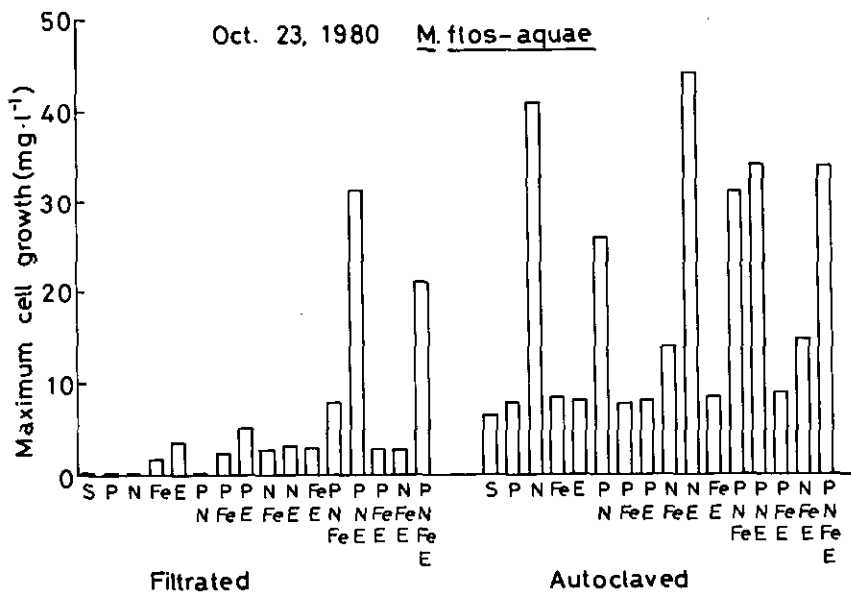


図 3.7 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.7 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

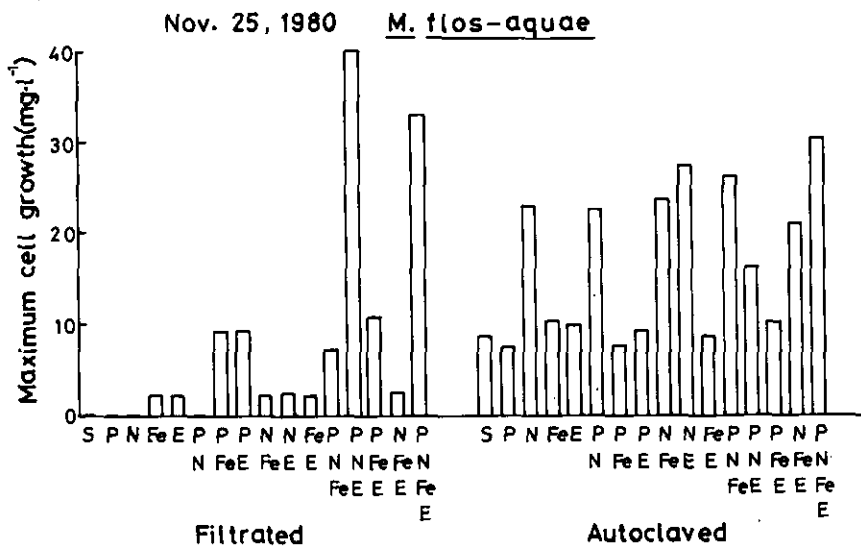


図 3.8 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.8 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

きの藻体量の増加効果は鉄よりもEDTAの方が顕著であった。熱分解法では、窒素添加により藻体量の著しい増加が認められた。

11月25日(図3.8)：ろ過法では鉄またはEDTAを添加することにより藻体量が増加し、これらのどちらか一方の存在下でリンを添加すると藻体量はさらに増加した。熱分解法では、窒素添加により藻体量の著しい増加が認められた。

12月22日(図3.9)：ろ過法ではEDTA添加で藻体量が増加した。さらにEDTAと同時にリンと窒素を添加すると藻体量は著しく増加した。熱分解法では、窒素添加により藻体量は著しく増加した。また図3.3, 図3.7, 図3.9で熱分解法でリン及び窒素の同時添加が、窒素単独添加より低い値を示したが、熱分解法では増殖量が $30\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上となると値が増えることがあるが、高濃度の場合この程度の誤差が時々認められた。

2月10日(図3.10)：ろ過法の場合、単独添加では藻体量の増加はほとんど認められないが、リンとEDTAを同時に添加することにより、藻体量は著しく増加した。これに窒素を添加すると藻体量はさらに増加した。熱分解法の場合、リンを添加することにより藻体量の増加が認められ、これに窒素を添加することにより藻体量はさらに増加した。

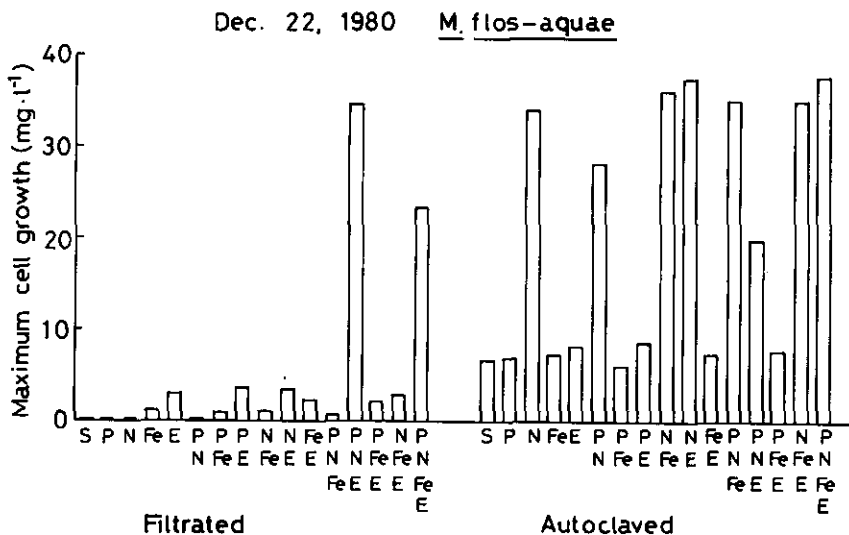
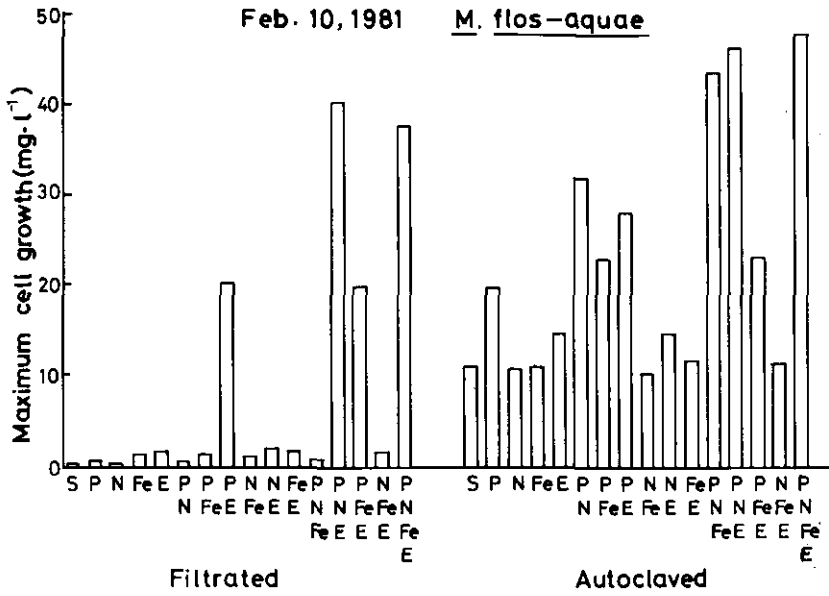


図 3.9 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

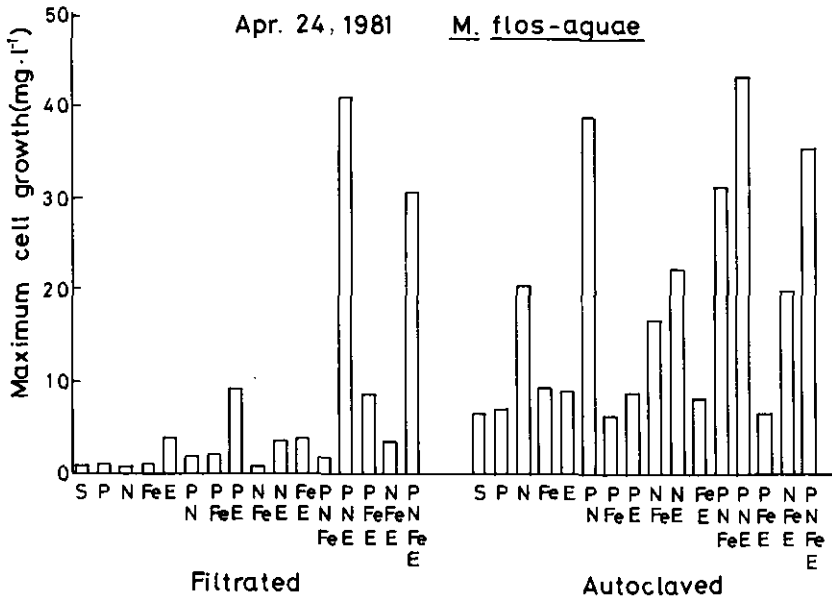
Fig. 3.9 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

4月24日(図3.11)：ろ過法の場合、EDTAを添加することにより藻体量が増加した。これにリンを、次いで窒素を順次添加してゆくと、藻体量もこれに従って段階的に増加した。熱分解法の場合、窒素を添加することにより藻体量は増加し、これにリンが加わるとさらに藻体量が増加し



☒ 3.10 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.10 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*



☒ 3.11 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.11 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

た。

これまでに述べてきた制限栄養物質とは、試水中に各種の栄養物質を単独で添加した際に、標準（無添加の場合）と比較して藻体量を増加させる物質であり、目安として $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上の藻体量の増大が認められた場合を制限栄養物質とした。また単独で添加しても藻体量に増加が認められない場合は、二成分を同時に添加し、藻体量に増加が認められたとき、この二成分を制限物質とした。このような考えのもとに図3.2～図3.11に示した試験結果から各月の制限物質をまとめると表3.2のようになる。*Microcystis*を用いたろ過法の場合6月、7月、8月の夏期は、リンと窒素を同時に添加することにより著しい増殖が認められ、リンと窒素が制限となっていたが、その他の秋～春期では鉄あるいはEDTAが制限物質となっていた。また熱分解法の場合は、2月を除いたいずれの季節においても窒素が制限物質となっていた。

一般に湖沼において藻類増殖の制限となりやすい栄養物質はリンと窒素であるといわれているが⁴⁾、*M. flos-aquae*の場合、霞ヶ浦のろ過水では必ずしもリンと窒素だけでは説明できなかった。しかし6月から8月までの期間はリンと窒素の二成分添加のみで $16 \sim 26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と十分高い増殖量が得られており、この期間は鉄やキレート物質が湖水中に存在し、これが霞ヶ浦において *Microcystis* が増殖することを容易ならしめていると考えられる。また熱分解法により鉄やEDTAの制限が解除されるのは、藻体中に取り込まれた鉄やEDTA物質が溶解したか、あるいは水中の懸濁物が加熱によって変性・分解された際にEDTAに変わる物質が生成したためと考えられる。

*M. flos-aquae*はこれを霞ヶ浦から分離・単藻化する過程において、群体形成能をほとんど消失してしまっている¹¹⁾。しかし霞ヶ浦などの湖沼に大発生して水の華を形成する *Microcystis* は、常に

表 3.2 *M. flos-aquae* に対する霞ヶ浦の増殖制限物質

Table 3.2 Growth limiting factors in Lake Kasumigaura for *M. flos-aquae*

Algae	Sampling date	Limiting nutrient	
		Filtrated	Autoclaved
<i>M. flos-aquae</i>	May. 19, 1980	Fe or E	N
	Jun. 23, 1980	P and N	N
	Jul. 23, 1980	P and N, or Fe or E	N
	Aug. 26, 1980	P and N	N and Fe, or N and E
	Sep. 24, 1980	Fe or E	N
	Oct. 23, 1980	Fe or E	N
	Nov. 25, 1980	Fe or E	N
	Dec. 22, 1980	E	N
	Feb. 10, 1981	P and E	P
	Apr. 24, 1981	E	N
<i>M. aeruginosa</i>	Feb. 10, 1981	P and E	-
	Apr. 24, 1981	E	-
<i>S. capricornutum</i>	Feb. 10, 1981	P	P

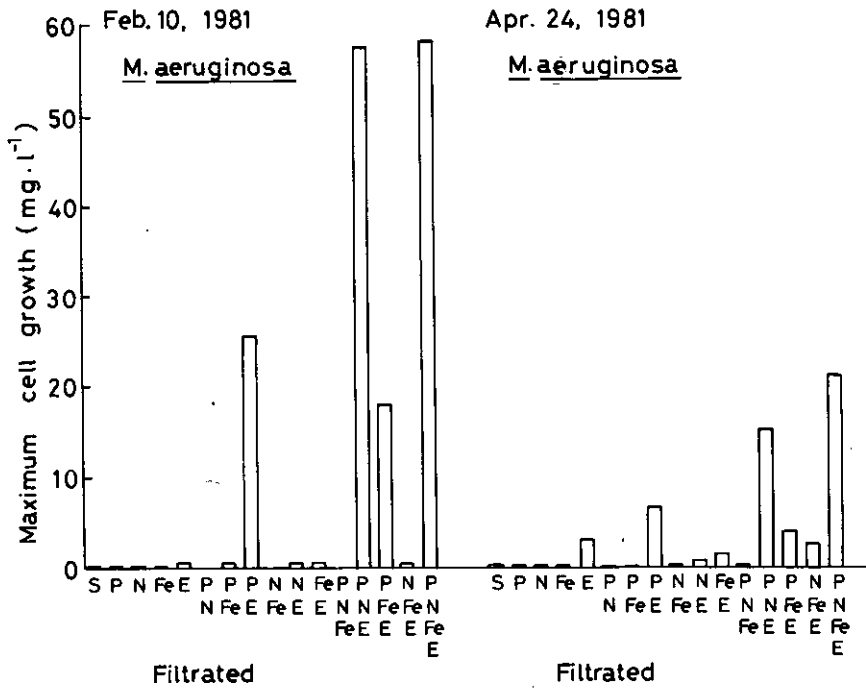


図 3.12 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.12 Effect of nutrient addition on the growth of *M. Aeruginosa*

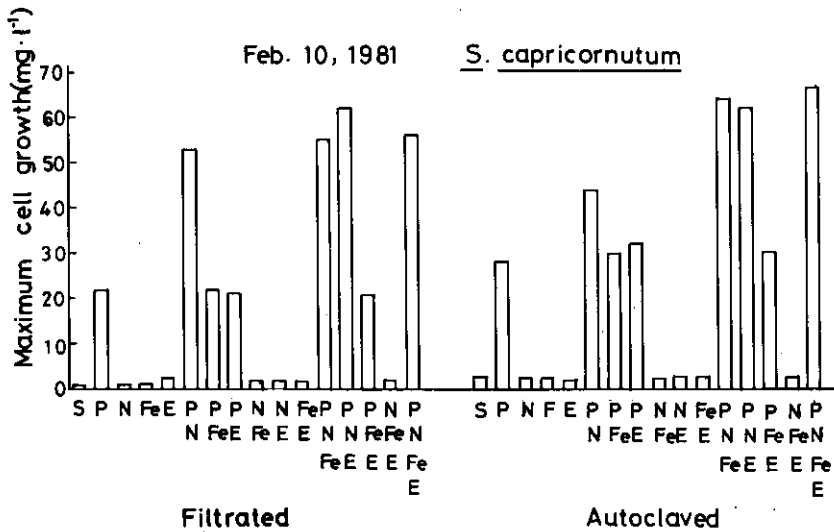


図 3.13 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 3.13 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

群体を形成して存在している。そこで群体形成能を保持している *M. aeruginosa* についてもろ過法により栄養物質の添加試験を実施し、その結果を図3.12に示した。2月の試水についてろ過法で検討した場合は、リンとEDTAが同時に制限物質となっていた。また4月においてはEDTAが制限物質となっており、次いでリンが制限となっていた。これを *M. flos-aquae* の結果と比較すると増殖量がやや異なっているものの、各種の添加ケースに対する応答は非常によく似ていた。このことから *M. flos-aquae* と *M. aeruginosa* のどちらを用いても同じ結果が得られるものと考えられた。これに対して緑藻類である *S. capricornutum* を供試藻類として栄養物質の添加試験を行った結果を図3.13に示した。これは霞ヶ浦の2月の試水について検討したものであるが、*S. capricornutum* の場合鉄やEDTAの添加効果は全く認められず、ろ過法、熱分解法ともにリンが制限物質となっている。この結果から霞ヶ浦の冬期のろ過水において、*Selenastrium* などの緑藻類はその増殖にEDTAを必要としないが、*Microcystis* などのラン藻類はその増殖にEDTAなどのキレート物質を必要とすることが推定された。

3.4 考察

3.4.1 栄養物質添加試験

合成培地における *M. flos-aquae* の培養実験結果¹²⁾によればリン源として K_2HPO_4 、窒素源として $NaNO_3$ 、鉄源として $FeCl_3$ を用いた場合、1mgのリン、窒素、鉄からそれぞれ約800mg、約32mg、約1000mgの藻体を得られることが2.3.5～7で明らかにされている。またEDTAは本藻の増殖に必須のものではないが、一般に藻類の増殖を良好にする物質として培地中に添加されている。本実験においては、試水にリン $0.1mg \cdot l^{-1}$ 、窒素 $1mg \cdot l^{-1}$ 、鉄 $0.2mg \cdot l^{-1}$ 、EDTA $1mg \cdot l^{-1}$ を添加したので、この場合他の栄養物質が制限とならない限り、 $32mg \cdot l^{-1}$ までは増殖が可能であると考えられる。各試水におけるリン、窒素、鉄及びEDTAの4種を同時添加したときの増殖量はろ過法で約 $20 \sim 38mg \cdot l^{-1}$ 、熱分解法では約 $23 \sim 48mg \cdot l^{-1}$ の範囲となっており、 $32mg \cdot l^{-1}$ を下回る結果がろ過法、熱分解法でそれぞれ8回、6回認められた。下回った主な原因としては、①4種の栄養物質以外の物質が制限となった、②添加した栄養物質が不溶化等により利用不可能な形態となった、③試水中に増殖阻害物質が含まれていた、等があげられる。しかしながら4種同時添加することにより藻体量は最低でも $20mg \cdot l^{-1}$ まで増殖したことから、このレベルまでは4種のうちいずれかが制限物質となっていることが判別できる。以上のことより、これらの4種の物質の選択で制限栄養物質が何であるかを十分把握できるものと考えられる。

3.4.2 制限栄養物質

湖沼における植物プランクトンの制限物質はその水域の富栄養化が進行するに従い、リンから窒素に移行するといわれている¹²⁾。本研究においても藻類培養試験を熱分解法で行った場合、2月以外の試水について窒素制限という結果が得られ、これが霞ヶ浦が過栄養湖と称せられるゆえん

である¹³⁾。しかしろ過法で行った場合、夏期の試水以外では*Microcystis*の増殖は鉄あるいはEDTAが制限となっており、これらを添加しないとリンと窒素を加えても高い増殖量が得られなかった。一方*S. capricornutum*を用いた場合には*Microcystis*の増殖が鉄やEDTAで制限となっている試水においても、リンを加えることにより著しい増殖量を示した。このように栄養物質の添加試験から、供試藻類により制限栄養物質が異なることが判明した。これは藻類によってN/P比やその他の栄養物質の要求量が異なるからであり、したがって調査対象とする湖沼で優占種となる藻類を用いることが重要となってくる。

これまで*Microcystis*の増殖に対する鉄やキレート物質の重要性が、合成培地を用いた培養実験により指摘されていたが^{5,6)}、本研究ではこれが実際の湖水でも重要であることが示された。鉄とEDTAの藻類増殖に対する影響としては、まず前者は生体中の酸化還元反応を触媒する酵素の構成要素として重要な栄養素であり¹⁴⁾、後者は金属とキレート結合することによりその金属の藻類に対する毒性を弱めたり¹⁵⁾、藻体中への吸収性を高めたりする物質である^{5,16)}。したがってEDTAは鉄と結合した場合、その吸収性を高めるという意味で藻類にとって鉄添加と同じ効果をもたらすが、湖水に含まれる金属の毒性を弱めるという意味からは、鉄添加とは全く効果が異なってくる。このような観点からろ過湖水への栄養物質の添加実験結果をみると9、10、11月はEDTAは鉄と同じ働きをしていると考えられる。12月、2月や4月はEDTAは鉄とは別の働き、すなわち金属の毒性を弱めるような働きをしていると考えられた。これに対して、*S. capricornutum*を用いた2月のろ過試水では、*Selenastum*の増殖にEDTAの添加効果は全く認められなかった。これは*Microcystis*が*Selenastum*に比べて鉄の要求性が高いか、あるいは湖水に溶存する重金属に対する感受性が高いことによるものと推定される。

今後、霞ヶ浦における*Microcystis*の増殖制限物質としての鉄とEDTAの問題を検討する場合には、増殖に及ぼす鉄濃度の影響を利用性(Availavility)の点から検討してゆくことと、*Microcystis*の増殖に及ぼす金属の毒性を湖水中の金属濃度レベルとEDTA(キレート物質)の有無という点から検討してゆくことが重要であると考えられる。

3.5 まとめ

1) 霞ヶ浦湖水のAGPは熱分解法で測定した場合 $3.9\sim 11.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、ろ過法で測定した場合 $0.1\sim 3.7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、熱分解法の約1/10であった。これは湖水中の栄養物質のほとんどが植物プランクトンを起源とする懸濁態として存在し、利用可能な栄養物質が非常に少ないためと考えられた。

2) 霞ヶ浦湖水における*Microcystis*の増殖制限栄養物質は、ろ過法の場合、6、7、8月はリンと窒素が制限物質となっていたが、これ以外の季節では鉄あるいはEDTAが制限となっていた。また熱分解法ではほとんどの季節で窒素が制限となっていた。

3) 2月と4月の試水について2種の*Microcystis*(群体形成能を消失した*M. flos-aquae*、群

体形成能を保持した *M. aeruginosa*) を用いてろ過法により栄養制限物質を検討した結果、両者の結果は全く同じであり、2月はリンとEDTAが、4月はEDTAが制限物質であった。

4) 2月の試水については、*Microcystis*の他に *Serenastrum capricornutum* を用いて培養試験を行った結果、ろ過法、熱分解法いずれもリンが制限物質であり、EDTAは制限物質ではなかった。このことは同じ試水でも用いる藻類によって得られる結果が異なる場合があることを示しており、対象となる湖沼の優占種があるいは社会問題となっている種を供試することの重要性が認識された。

5) *Microcystis*の異常増殖にはEDTA様物質の存在が大きく関与しているのではないかと考えられた。

引用文献

- 1) 杉浦則夫・飯島昭夫 (1978): 霞ヶ浦における植物プランクトンの経年変動。用水と廃水, 20, 1233-1241.
- 2) 小島貞男 (1982): 湖水強制循環による富栄養化対策。水質汚濁研究, 5, 251-257.
- 3) 岡田光正 (1983): *Microcystis* (藍藻類) による水の華の発生機構とその制御。「微生物の生態11」(微生物生態研究会編), 学会出版センター, 東京, 129-149.
- 4) Sakamoto, M. (1966): Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth. Arch. Hydrobiol., 62, 1-28.
- 5) Murphy, T.P., D.R.S. Lean and C. Nalewajko (1976): Blue-green algae; their excretion of iron selective chelators enables them to dominate other algae. Science, 192, 900-902.
- 6) Lange, W. (1974): Chelating agents and blue-green algae. Can. J. Microbiol., 20, 1311-1321.
- 7) Lange, W. (1971): Limiting nutrient elements in filtered lake Erie water. Water Res., 5, 1031-1048.
- 8) 岡田光正・須藤隆一 (1978): AGPをめぐる諸問題。用水と廃水, 20, 765-779.
- 9) 矢木修身・須藤隆一 (1981): *Microcystis*の純粋分離。国立公害研究所研究報告, 第25号, 7-15.
- 10) Gibbs, M.M. (1979): A simple method for the rapid determination of iron in natural waters. Water Res., 13, 295-298.
- 11) 矢木修身・萩原富司・高村義親・須藤隆一 (1984): 霞ヶ浦から分離した *Microcystis*の無菌株と単藻株の増殖特性。水質汚濁研究, 7, 496-503.
- 12) Miller, W.E., T.E. Maloney and J.C. Greene (1974): Algal productivity in 49 lake waters as determined by algal assays. Water Res., 8, 667-679.
- 13) Seki, M. and E. Takahashi (1983): Spring bloom in a hypereutrophic lake, Lake Kasumigaura, Japan—I. Water Res., 17, 441-445.
- 14) 中原昭次・山内 脩 (1979): 入門生物無機化学 (化学モノグラフ28), 化学同人, 京都, 182p.
- 15) Fitzgerald, G.P. and S.L. Faust (1963): Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper. Appl. Microb., 11, 345-351.
- 16) Armstrong, J.E. and C.V. Baalen (1979): Iron transport in microalgae: the isolation and biological activity of hydroxamate siderophore from the blue-green algae *Agmenellum*

quadruplicatum. J. Gen. Microbiol., 111, 253-262.

4 牛久沼における藻類増殖の制限栄養物質

4.1 はじめに

第3章において霞ヶ浦における*Microcystis*の増殖制限物質について検討を加えたが、夏期にアオコの大発生の認められる霞ヶ浦と気候条件に近いにもかかわらず1981年9月まではアオコの発生がほとんど認められなかった牛久沼に着目し、霞ヶ浦との相違を知る目的で牛久沼の水質と*Microcystis*の増殖制限物質について検討を加えた。また同時に牛久沼の汚濁負荷の主要な部分を占める三つの流入河川、稲荷川、東谷田川、西谷田川の水質分析並びに*Microcystis*の増殖制限物質についても検討を加えた。

4.2 実験方法

4.2.1 試水の採取場所

牛久沼及び流入河川を図4.1に示すが、St.1牛久沼、St.2稲荷川、St.3東谷田川基崎橋、St.4西谷田川細見橋の4地点で採水を行った。St.1では1980年6月11日、8月1日、1982年5月12日、

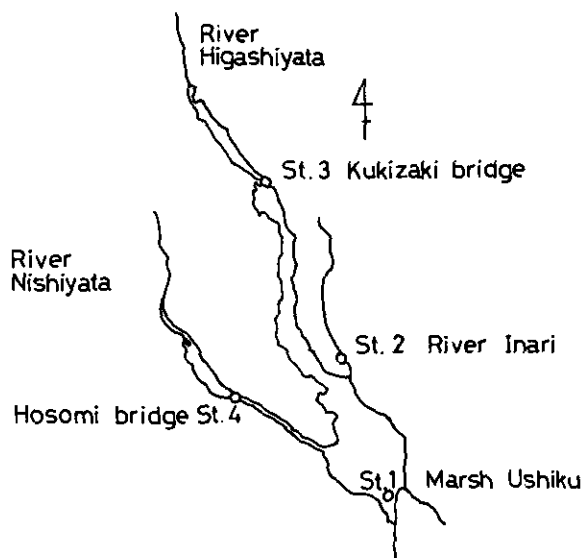


図 4.1 牛久沼及び流入河川における採水地点

Fig. 4.1 Sampling stations in Marsh Ushiku and influent rivers

7月2日の4回、またSt.2, St.3, St.4, では1982年7月2日に採水を行った。

牛久沼は図4.1に示すように東西4 km, 南北7 kmにわたりその周囲は20kmの湖沼であり, 東谷田川, 西谷田川の河口部は水路様を呈し, 沼部分は東西3 km, 南北2.5km程である。流出河川は八間川と舞鶴ポンプ場からの用水路がある。牛久沼の貯水量は500万 m^3 といわれ平均滞留時間は17日と考えられている¹⁾。

4.2.2 試水の前処理及び培養方法

試水の前処理, 添加栄養物質, 培養方法, 藻体量の測定, 水質分析法はいずれも3.2.1~3.2.6に示したものと同様の方法を用いた²⁾。

4.3 実験結果

4.3.1 牛久沼及び流入河川の水質

牛久沼並びに流入河川の水質分析結果を表4.1に示した。1980年の牛久沼のT-Pは0.050~0.072 $mg \cdot l^{-1}$ と霞ヶ浦と比較するとやや低い値であった。1982年は0.05 $mg \cdot l^{-1}$ 前後であり1980年に比べやや低い値であった。一方, 1982年の3河川のT-Pは, 0.033~0.080 $mg \cdot l^{-1}$ であり稲荷川が最も高い値を示した。PO₄-Pは牛久沼, 3河川いずれも0.01 $mg \cdot l^{-1}$ 以下でかなり低い濃度であった。

T-Nに関しては, 牛久沼で1.00~1.51 $mg \cdot l^{-1}$, 3河川で0.94~1.60 $mg \cdot l^{-1}$ とほぼ同レベルであり, またこれらの値は霞ヶ浦と同じ濃度レベルであった。一方ろ過水中のNO₂₊₃-Nは, 牛久沼

表 4.1 牛久沼及び流入河川の水質

Table 4.1 Water quality of Marsh Ushiku and influent rivers

Item	Marsh Ushiku (St. 1)				River Inari (St. 2)	River Higashiyata (St. 3)	River Nishiyata (St. 4)
	1980		1982		1982	1982	1982
	Jun. 11	Aug. 1	May 12	Jul. 2	Jul. 2	Jul. 2	Jul. 2
pH	—	—	8.0	8.6	8.3	8.0	7.5
COD ($mg \cdot l^{-1}$)	5.1	3.8	5.2	4.7	4.0	4.5	3.3
DO ($mg \cdot l^{-1}$)	—	—	—	9.7	12.7	10.6	8.8
T-P ($mg \cdot l^{-1}$)	0.050	0.072	0.051	0.046	0.080	0.045	0.033
PO ₄ -P ($mg \cdot l^{-1}$)	0.003	0.010	0.002	0.004	0.002	0.004	0.003
T-N ($mg \cdot l^{-1}$)	1.51	1.41	1.31	1.00	0.94	1.29	1.60
NH ₄ -N ($mg \cdot l^{-1}$)	0.04	0.04	0.11	0.12	0.05	0.17	0.15
NO ₂₊₃ -N ($mg \cdot l^{-1}$)	0.97	0.89	0.56	0.50	0.57	0.98	1.23

で $0.50\sim 0.97\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、3河川が $0.57\sim 1.23\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であったが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が牛久沼、3河川で $0.04\sim 0.17\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲であることを考えると牛久沼の窒素の形態はそのほとんどが $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ 態であるといえる。夏期の霞ヶ浦では、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ がいずれも $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下であり、牛久沼の無機能の窒素濃度は霞ヶ浦に比べかなり高い値といえる。

4.3.2 栄養塩添加試験

牛久沼の湖水について *Microcystis flos-aquae* 並びに *Selenastrum capricornutum* を用いて測定したAGP並びに藻類培養試験結果を図4.2～図4.6に示した。

牛久沼の1982年5月の場合、*S. capricornutum* では、図4.2に示したようにろ過水のAGPは $0.9\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であったが、窒素添加では増加が認められずリン添加で $28\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しい増殖量の増大が認められたことからリンが制限になっていた。窒素とリンを同時に添加すると $57\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とさらに増大することから次に窒素が制限になっているといえる。また熱分解法の場合はAGPが $6.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でろ過法の約7倍であったが、この場合も制限物質はリンであった。

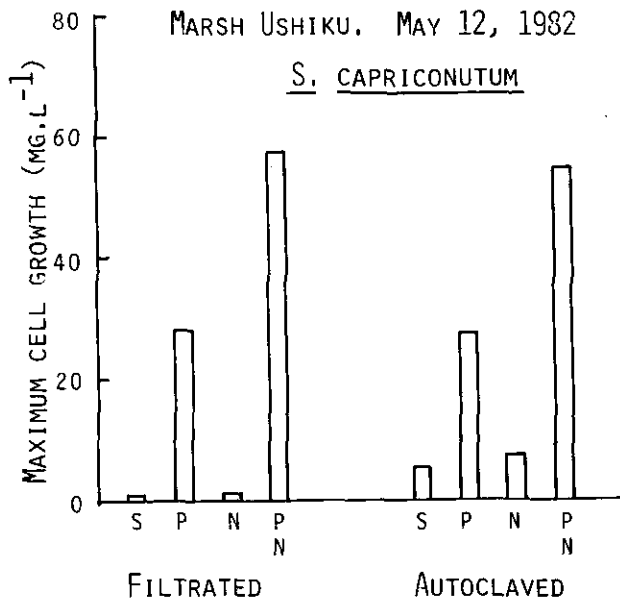


図 4.2 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.2 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

一方、牛久沼の7月の場合を図4.3に示したが、*S. capricornutum* では5月と比べて藻類の増殖量は低い傾向が認められたが、ろ過法、熱分解法ともに5月と同様にリンが制限栄養物質となっていた。

図4.4に牛久沼1982年5月の湖水について *M. flos-aquae* で調べた結果を示すが、AGPは $1.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と *S. capricornutum* に近い値を示した。しかし制限栄養物質に関しては *S. capricornutum*

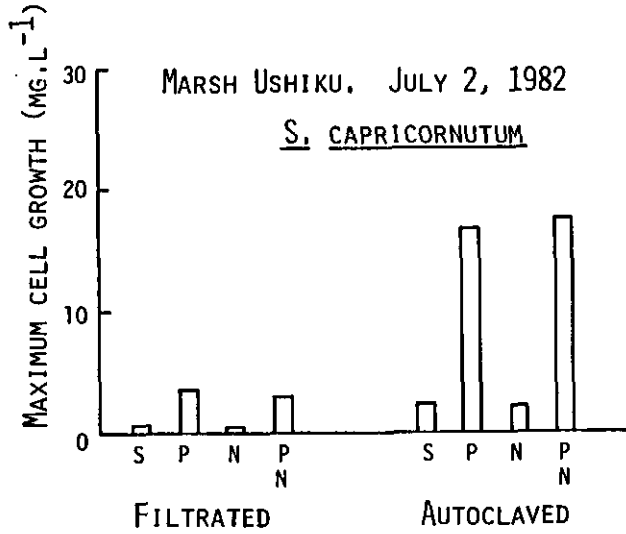


図 4.3 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.3 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

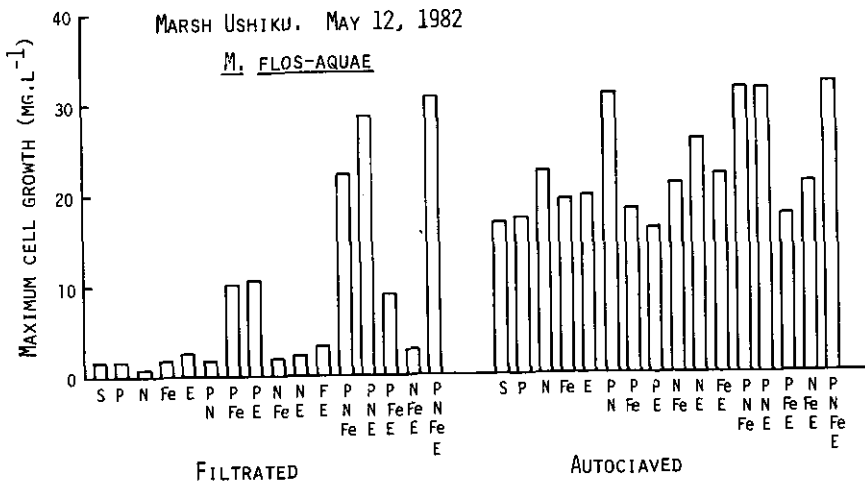


図 4.4 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.4 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

の場合リンが制限となっていたが、*M. flos-aquae*ではリン、窒素、鉄、EDTAの単独添加では増殖量の増加は認められず、リンと鉄あるいはリンとEDTAを添加することにより増加が認められた。したがってリンと鉄、リンとEDTAがそれぞれ同時に制限となっていた。この場合EDTAは鉄と同様の作用を有しているのではないかと考えられる。またリンと窒素と鉄の同時添加及びリンと窒素とEDTAの同時添加ではそれぞれ $22.2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $28.6\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とさらに高い値が得られた。一方熱分解法の場合のAGPは $17\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と*S. capricornutum*に比べかなり高い値を示した。窒素添加でいくぶん増大が認められることから窒素が制限になっているといえよう。これは*S. capricornutum*のリン制限とは異なった傾向を示した。

図4.5に牛久沼の1982年7月の場合の*M. flos-aquae*を用いたろ過法の結果を示したが、AGPは $1.2\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で*S. capricornutum*と同程度であった。また、リンとEDTAを同時に添加することにより初めて増殖量が增大した。5月の場合にはリンと鉄添加でも効果が認められこの点でやや異なっているが、窒素、リン添加ではあまり増殖せずEDTAが増殖を刺激する点では5月と7月は類似している水といえよう。窒素、鉄、EDTAの添加でも最大増殖量は $8\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と低かったがこの理由については不明である。

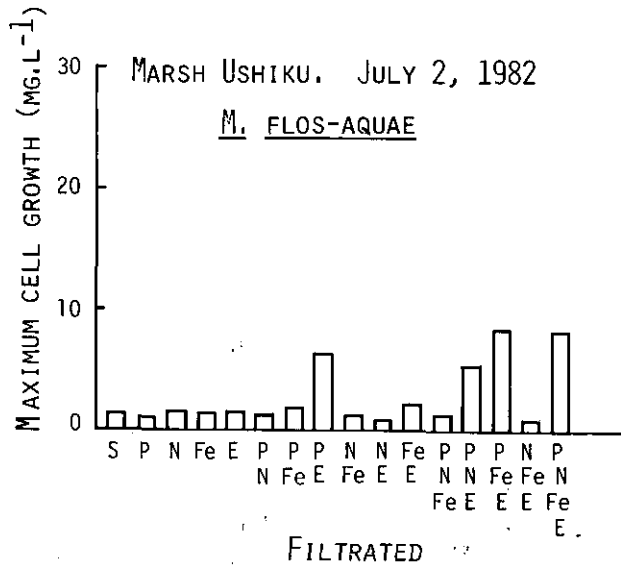


図 4.5 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.5 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

図4.6に1980年8月の牛久沼の湖水について*M. flos-aquae*を用いて制限物質を調べた結果を示したが、この結果も1982年の場合と同様に、牛久沼のろ過水は、窒素、リンを添加しても*Microcystis*の増殖が認められず、リンとEDTAを同時に加えることにより*Microcystis*が著しく増

殖した。1980年6月の牛久沼の湖水もほぼ同様の傾向を示した。

一方3河川について*S. capricornutum*を用いて調べた結果を図4.7～図4.9に示した。稻荷川、東谷田川、西谷田川のろ過法のAGPはそれぞれ $0.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でいずれも $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下とかなり低い値であった。しかしいずれの場合も窒素添加では増大は認められずリンを添加することにより増殖量が $22.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $2.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $30.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に増加することからリンが制限物質になっているといえる。東谷田川の場合リン添加あるいはリンと窒素添加しても増殖量は低かった。この理由については不明である。

一方、熱分解法の場合はAGPは稻荷川、東谷田川、西谷田川でそれぞれ $23.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $4.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $5.4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とろ過法に比べかなり高い値を示した。またリン添加により著しく増殖量が増大し、ろ過法と同様にリンが制限栄養物質といえた。

また3河川について*M. flos-aquae*を用いて調べた結果を図4.10～図4.12に示す。ろ過法のAGPは稻荷川、東谷田川、西谷田川それぞれ $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $0.0\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と*M. flos-aquae*の増殖はほとんど認められなかったが、いずれの場合もリンとEDTAを同時に添加するとそれぞれ

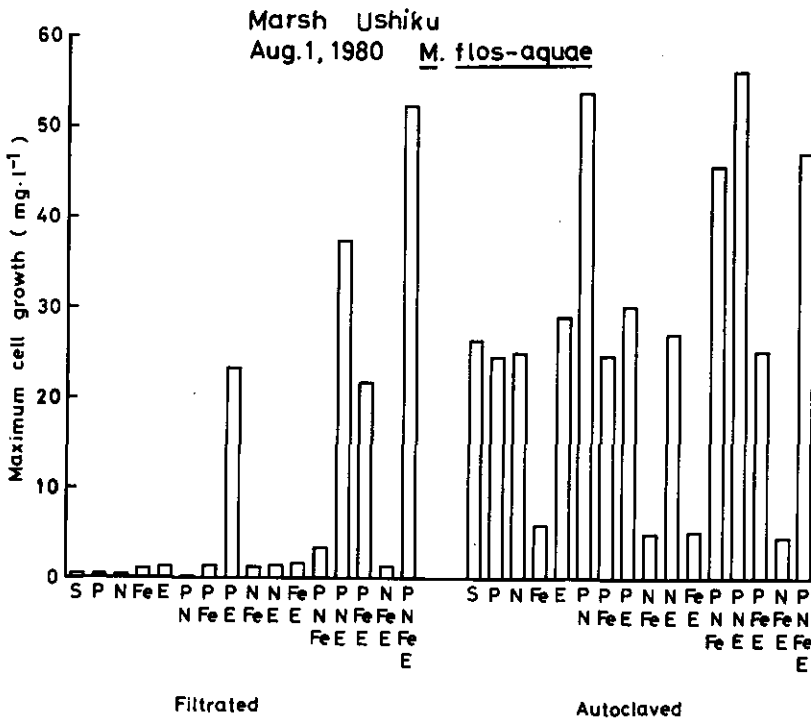


図 4.6 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.6 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

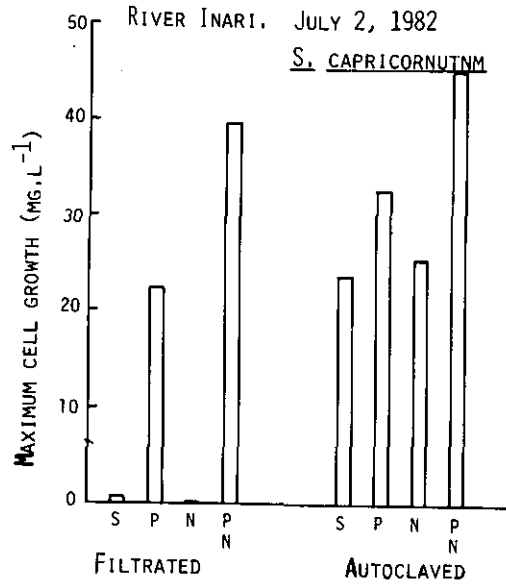


図 4.7 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.7 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

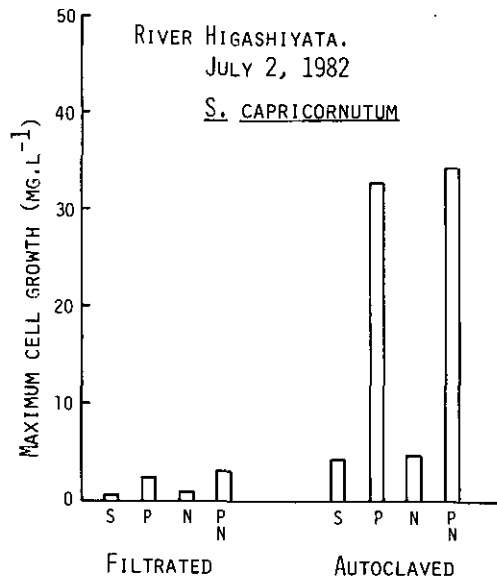


図 4.8 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.8 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

れ $23.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $28.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $31.9\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と著しい増加が認められ、いずれもリンとEDTAが制限物質となっていた。一方熱分解法の場合のAGPは、稲荷川、東谷田川でそれぞれ $19.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $8.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。制限栄養物質は稲荷川が窒素、東谷田川はリン又は鉄あるいはEDTAであった。

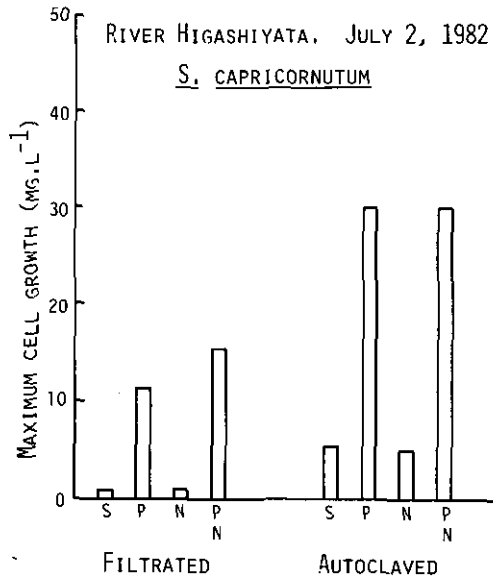


図 4.9 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.9 Effect of nutrient addition on the growth of *S. capricornutum*

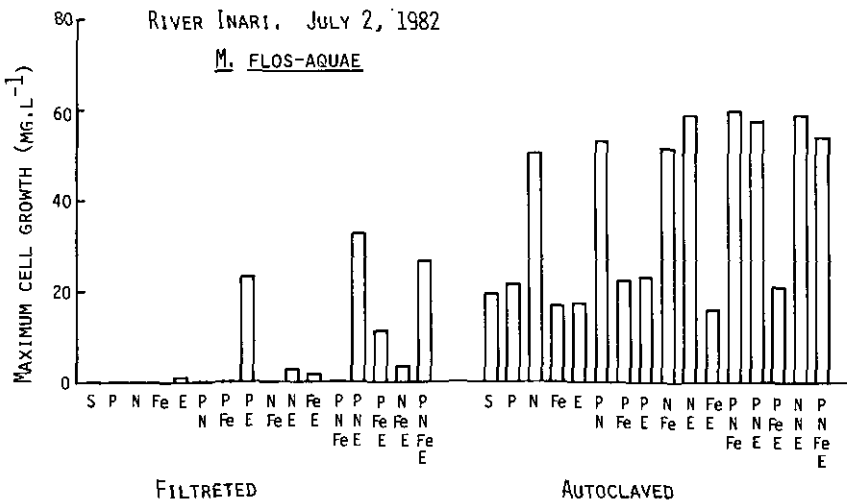


図 4.10 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.10 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

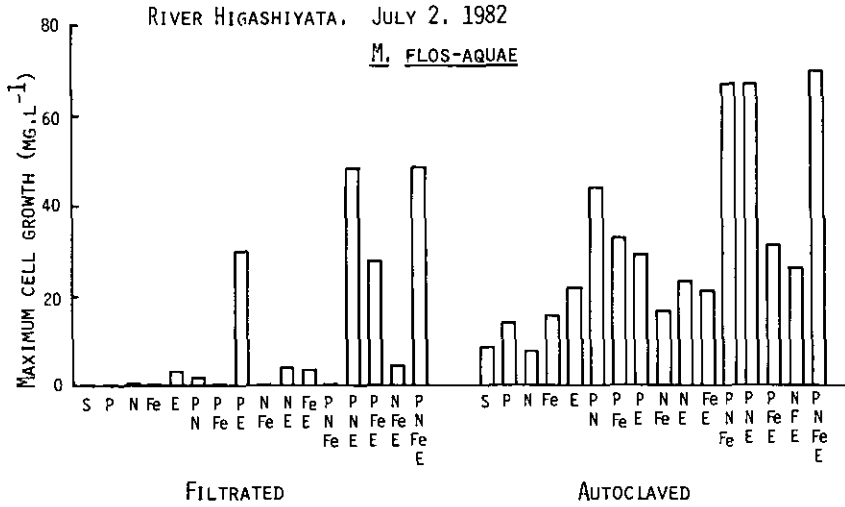


図 4.11 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.11 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

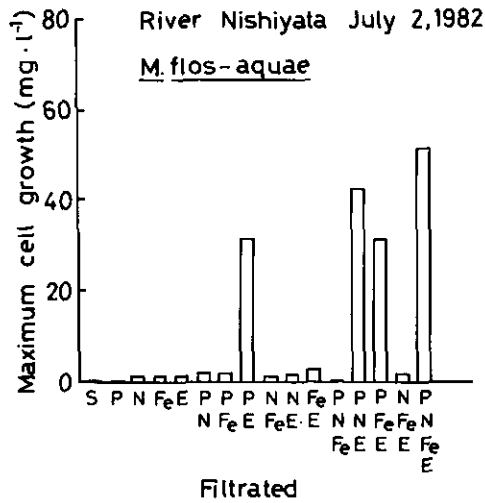


図 4.12 藻類増殖に及ぼす栄養塩添加効果

Fig. 4.12 Effect of nutrient addition on the growth of *M. flos-aquae*

4.4 考察

牛久沼及び牛久沼に流入する稲荷川, 東谷田川, 西谷田川の3河川水のAGPを表4.2に示したが, ろ過法のAGPは*S. capricornutum*, *M. flos-aquae*共に低く, 牛久沼の1982年5月における*M. flos-aquae*を用いた場合の $1.6\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ が最大であった。熱分解法はろ過法に比べ試水中の栄養塩濃度が高くなることから一般にろ過法より高いAGP値を示すが, 1982年7月の牛久沼の*M. flos-aquae*の場合以外はこの傾向が認められた。また*S. capricornutum*と*M. flos-aquae*を用いたが両者のAGP値は異なった値を示した。

表4.3に牛久沼及び三河川水の制限栄養物質をまとめたが, *S. capricornutum*の場合ろ過法, 熱分解法ともにリンが制限栄養物質であった。一方, *M. flos-aquae*の場合ろ過法ではリンだけでは増殖が認められずリンにEDTAあるいは鉄を加えて初めて増殖量が増大した。リンとEDTAがほとんどの場合制限となっていた。また, これを熱分解法で調べると制限物質は, 窒素又はEDTA, あるいはリンか鉄の場合と様々であった。これらの結果と水質分析の結果とを比較してみると, ろ過法の場合の試水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は表4.1に示すように著しく低く, リンが制限栄養物質になっていることが推定できる。*S. capricornutum*の実験においても同様の結論が得られた。しかしながら*M. flos-aquae*の場合は, リンのほかにEDTAも増殖に必要であることが藻類培養試験によって明らかにされたが, この点に関しては水質分析から推定することは不可能である^{3,4)}。

表 4.2 牛久沼及び流入河川のAGP
Table 4.2 AGP of Marsh Ushiku and influent rivers.

Sampling station	Date	Algae (mg. l ⁻¹)			
		<i>S. capricornutum</i>		<i>M. flos-aquae</i>	
		Fil.	Auto.	Fil.	Auto.
Marsh Ushiku	(St. 1) Aug. 1, 1980	—	—	0.5	26.5
Marsh Ushiku	(St. 1) May12, 1982	0.9	6.1	1.6	16.8
Marsh Ushiku	(St. 1) July 2, 1982	0.6	2.4	1.2	0.2
River Inari	(St. 2) July 2, 1982	0.6	23.5	0.1	19.8
River Higashiyata	(St. 3) July 2, 1982	0.5	4.3	0.1	8.2
River Nishiyata	(St. 4) July 2, 1982	0.8	5.4	0.0	0.2

Fil. ; Filtrated, Auto. ; Autoclaved

表 4.3 牛久沼の藻類増殖の制限栄養物質

Table 4.3 Limiting nutrients of algal growth in Marsh Ushiku.

Sampling Station	Date	<i>S. capricornutum</i>		<i>M. flos-aquae</i>	
		Fil.	Auto.	Fil.	Auto.
Marsh Ushiku	(St. 1) Aug. 1, 1980	—	—	P and E	N
Marsh Ushiku	(St. 1) May 12, 1982	P	P	P and Fe, or P and E	N
Marsh Ushiku	(St. 1) July 2, 1982	P	P	P and E	—
River Inari	(St. 2) July 2, 1982	P	P	P and E	N
River Higashiyata	(St. 3) July 2, 1982	P	P	P and E	P or Fe or E
River Nishiyata	(St. 4) July 2, 1982	P	P	P and E	E

Fil. ; Filtrated, Auto. ; Autoclaved

*S. capricornutum*は制限物質がリンか窒素かを知る上では適した藻類といえよう。熱分解した場合、*M. flos-aquae*の制限物質が必ずしもリンではなくてしまい窒素の場合もでてくるが、これは熱処理により試水中の成分が変化したためかあるいは藻類による栄養要求性によるものと考えられるが、この原因については今後の検討課題である。

4.5 まとめ

牛久沼と霞ヶ浦とを比較してみると、牛久沼の夏期のろ過水の制限栄養物質は*Microcystis*にとってほとんどの場合リンとEDTAであった。一方、霞ヶ浦の場合は、リンと窒素が同時に制限となっており*Microcystis*の増殖にEDTAが存在する必要はなく、明らかに両者に差が認められた。すなわち、牛久沼の湖水は窒素、リンをいくら添加しても*Microcystis*が増殖できない水であり霞ヶ浦の湖水に比べ*Microcystis*が発生しにくい水といえよう。

引用文献

- 1) 茨城県環境局 (1975) : 湖沼富栄養化実態調査報告書。
- 2) 須藤隆一・田井慎吾・矢木修身・岡田光正・細見正明・山根敦子 (1981) : 藻類の培養試験法によるAGPの測定。国立公害研究所研究報告, 第26号, 53p.
- 3) 神谷知子・坂本 充 (1974) : 諏訪湖における植物プランクトンの生産支配因子としての鉄の存在状

態. 奈良女子大学理学部動物学教室, 27-29.

- 4) Gardiner, J. (1976) : Complexation of trace metals by ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) in natural waters. *Water Res.*, **10**, 507-514.

5 アオコの好氣的分解

5.1 はじめに

霞ヶ浦、手賀沼等全国各地で夏期に大発生するアオコは、9月末～10月にかけて気温の低下に伴い現存量が急激に減少する。アオコの分解については、Jewell と McCarty¹⁾、高村ら²⁾、Stewart ら³⁾の報告があり、アオコの分解には細菌、カビ、シアノファージ、アメーバ等の多くの微生物が関与していることが明らかにされている。アオコの分解時には有機物や窒素、リン等の栄養物質が水域へ溶解して汚濁の要因となることから^{4,5)}、これらの点を明らかにすべく湖水からアオコを採水し、10 l用のマイクロコズムの中でのアオコ及び栄養物質の分解時の挙動について検討を加えた。

5.2 実験方法

5.2.1 材料及び実験装置

分解実験に用いたアオコは、1983年10月4日にアオコが大量に発生している霞ヶ浦の土浦港より採取したもので、プランクトンネットで採取し、アオコを約5倍に濃縮したものである。

実験には内径23cmの10 l容のガラス製マイクロコズムを用い、この中にアオコ溶液8 lを添加し、分解条件を湖水中に類似させるため、1日に1回、15分間、エアポンプにて曝気を行い、3,000 lxの照度で12時間ごとの明暗条件で分解を調べた。分解温度は20°C、30°Cの条件で行った。

5.2.2 分析項目

マイクロコズムから経時的に採水し、*Microcystis*及び細菌の計数、DOC、T-N、NH₄-N、NO₂₊₃-N、PO₄-Pを測定した。*Microcystis*は検鏡法により、細菌は採水した試料を、一定時間超音波破砕器によりアオコの群体をばらばらにさせた後、無菌水で希釈後、F-10培地（肉エキス0.5g、ペプトン、1.0g、NaCl 0.5g、寒天15gを1 lの脱イオン水に溶かす）を用いて生菌数を計数した。

5.3 実験結果及び考察

5.3.1 細菌の計数条件

アオコを含む試水中の細菌を計数する場合、アオコの群体に多くの細菌が付着しているため正確に細菌を計数することが困難である。そこで自然水中の細菌を計数する場合、細菌を分散させるため何秒間超音波処理するのが適しているのかについてまず検討を加えた。100mlの3角フラスコに50mlの試水を加え一定時間超音波処理した後に希釈後、寒天平板培地で培養して計数した

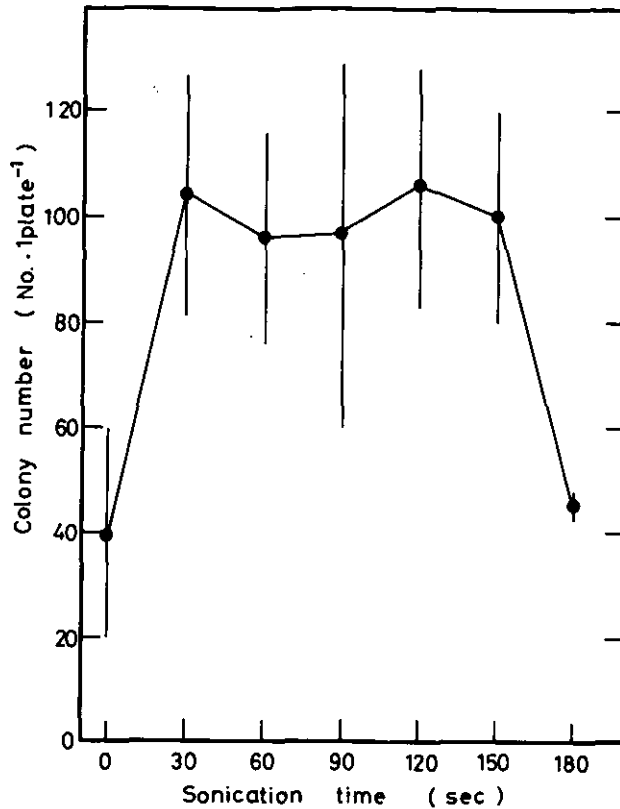


図 5.1 細菌計数に及ぼす超音波処理時間の影響

Fig. 5.1 Effect of the sonication time on the viable bacterial count

結果を図5.1に示した。超音波処理時間が30~150秒間で最大の細菌数が得られ、それ以上の時間になると急激に値は低くなった。超音波処理することにより、処理しない場合の約2.5倍高い計数値が得られた。したがって以後の細菌の計数には30秒間の超音波処理を採用した。

また細菌を計数する場合、培養日数が大きく影響する。図5.2は超音波処理した試水について培養日数に伴って増殖してきた細菌数の変化を示したものである。培養日数が長くなるにつれ細菌数は増大し培養15日目にはほぼ最大の値を示し、培養5日目の6倍、培養10日目の2倍の値を示した。したがって、細菌の計数には以後は15日間培養することにした。

5.3.2 *Microcystis*と細菌数の変化

図5.3に20°C、30°Cにおける*Microcystis*の数の変化を示した。*Microcystis*は、実験開始時に $5.8 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 存在したが、20°Cでは14日後でも20%しか分解しなかったが以後急速に分解し35日後に80%が分解した。一方30°Cの場合は、実験開始直後から分解が開始し35日後には95%が分解

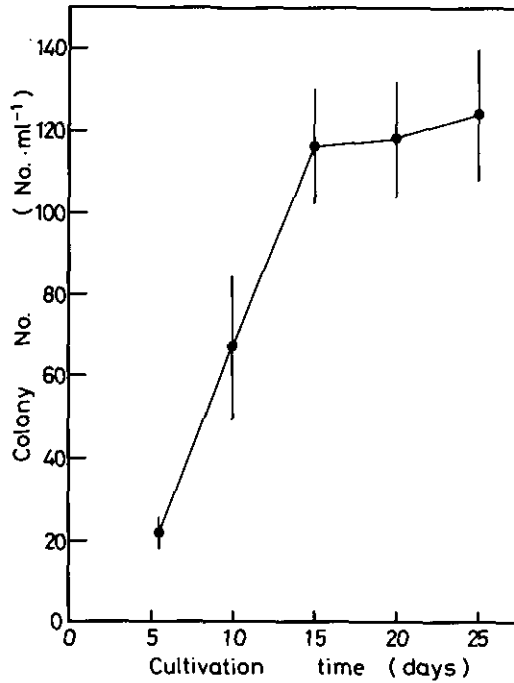


図 5.2 細菌計数に及ぼす培養日数の影響

Fig. 5.2 Effect of incubation time on the viable bacterial count

された。20°C, 30°Cの分解速度定数は(1)式より

$$N = N_0 \cdot 10^{-kt} \dots\dots\dots (1)$$

N_0 : 初期のアオコ濃度 (mg · l⁻¹)

N : t 時間後のアオコ濃度 (mg · l⁻¹)

t : 分解時間 (d)

k : 分解速度定数 (d⁻¹)

それぞれ $k=0.021d^{-1}$, $k=0.034d^{-1}$ であり, 30°Cの方が20°Cの1.6倍高い値を示した。

図5.4に細菌数の変化を示したが, 開始直後は $2.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-3}$ の細菌が存在していたが20°Cの場合 *Microcystis* の分解に伴い細菌数が増大し27日後に最大 $1.0 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-3}$ になったがその後減少した。一方30°Cの方は14日間はあまり数の変化が認められず, *Microcystis* が減少しているにもかかわらず27日目には約1/10に減少してしまった。培養20日頃から30°Cのマイクロコズムのみにミジンコが異常発生する現象が認められ, 細菌の減少はこのためではないかと考えられた。

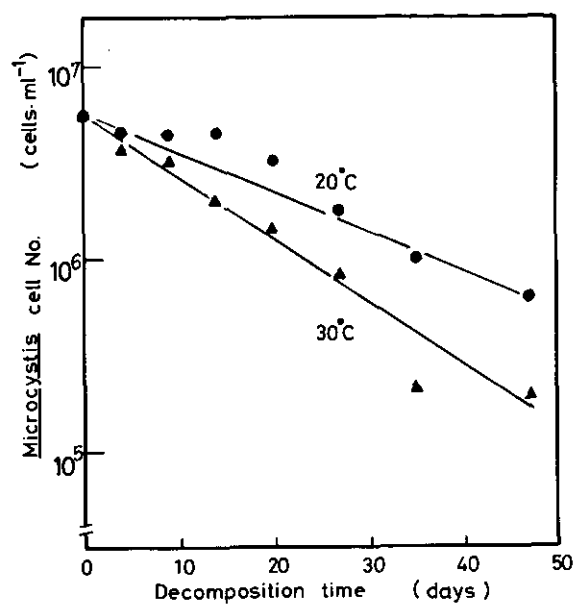


図 5.3 マイクロコズム中での *Microcystis* の分解

Fig. 5.3 Decomposition rate of *Microcystis* in a microcosm

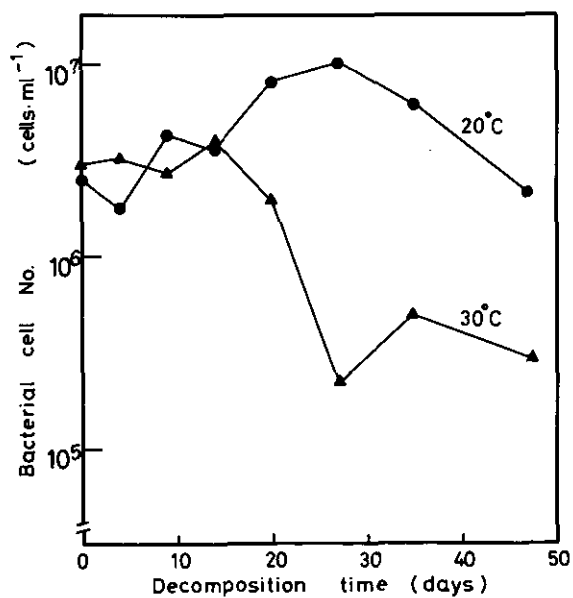


図 5.4 マイクロコズム中の細菌数の変化

Fig. 5.4 Change of bacterial number in a microcosm

5.3.3 DOCと栄養塩の変化

20°C及び30°Cのマイクロコズムにおける溶解性有機態炭素（DOC）の変化を図5.5に示した。DOCは開始直後では $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であったが、20°C、30°C共に10日目、14日目と増大して行き20日目に最大となり20°Cでは $28\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、30°Cでは $24\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となった。以後DOCは減少していった。DOCの増大は*Microcystis*の分解に由来するものと考えられた。

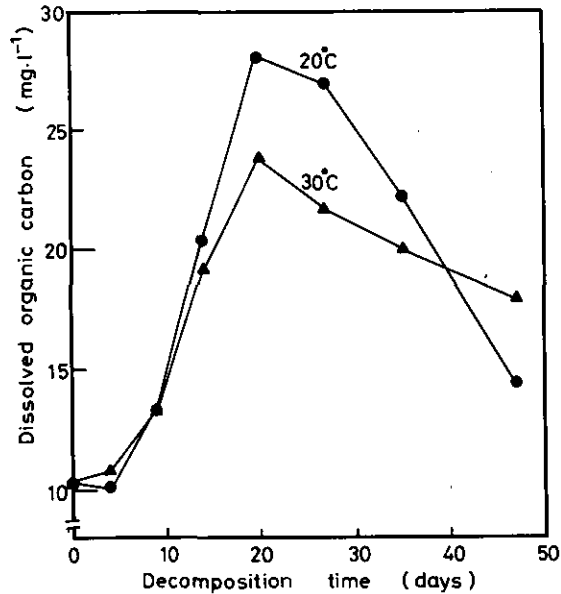


図 5.5 アオコ分解過程におけるDOCの変化

Fig. 5.5 Change of DOC during the Aoko decomposition

図5.6は20°Cにおける $\text{NH}_4\text{-N}$ 及び $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ の変化を示したものである。 $\text{NH}_4\text{-N}$ は開始時は $0.01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であるが20日目には $0.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にまで増加し、27日目には最大の $1.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ に達するが、47日目にはほとんど消失した。

一方 $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ は14日目までは減少していき再び増大し35日目に最大となった。T-Nは $18.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、そのほとんどが*Microcystis*由来と考えられるため、*Microcystis*のごく一部が $\text{NH}_4\text{-N}$ になり、その $\text{NH}_4\text{-N}$ が $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ に変えるものと考えられる。50日以上では $\text{NH}_4\text{-N}$ の生成はほとんどなくなるものと考えられた。

30°Cの場合の $\text{NH}_4\text{-N}$ 及び $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ の変化を図5.7に示したが、その変化は20°Cの場合に類似した傾向を示したが、30°Cの方が $\text{NH}_4\text{-N}$ の生成またそれに伴う $\text{NO}_{2+3}\text{-N}$ の生成が20°Cに比べかなり早い時期に起こった。

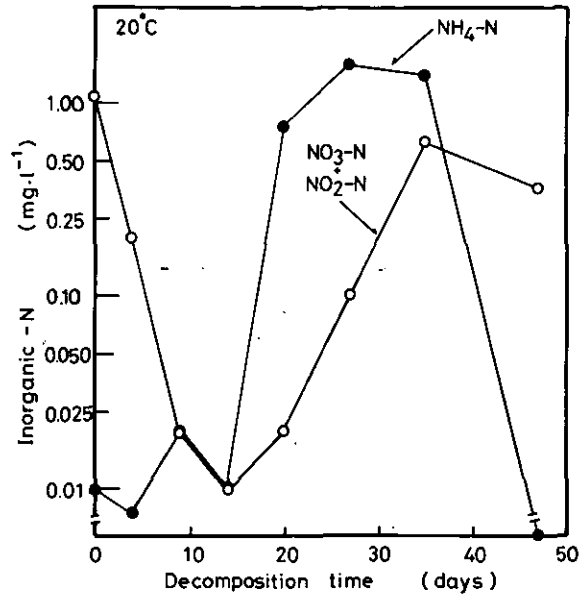


図 5.6 アオコ分解過程における無機能窒素の変化 (20°C)

Fig. 5.6 Change of inorganic nitrogen during the Aoko decomposition

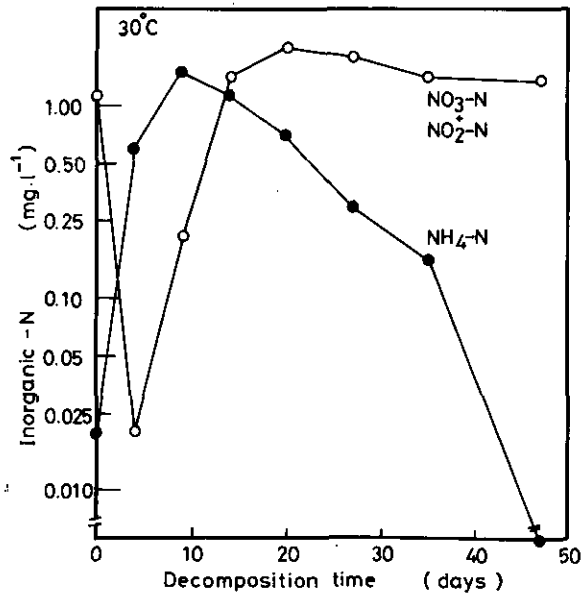


図 5.7 アオコ分解過程における無機能窒素の変化 (30°C)

Fig. 5.7 Change of inorganic nitrogen during the Aoko decomposition

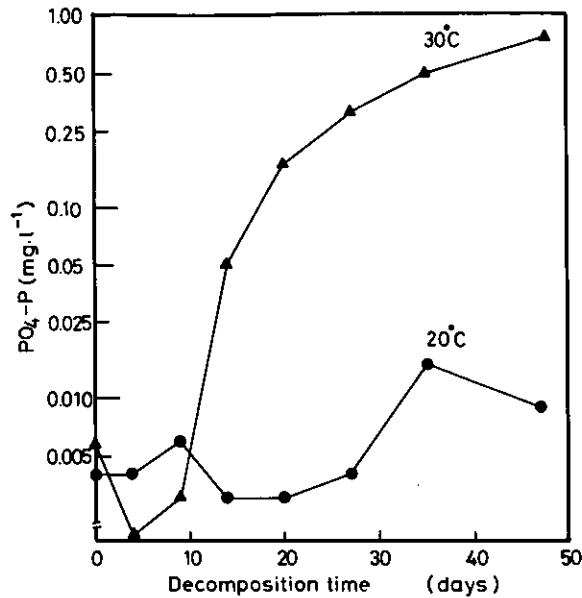


図 5.8 アオコ分解過程におけるPO₄-Pの変化

Fig. 5.8 Change of PO₄-P during the Aoko decomposition

PO₄-Pの変化を図5.8に示すが、開始時は0.005mg・l⁻¹であるが、20°Cの場合はほとんど増大しないが30°Cの場合は分解時間が長くなるにつれ増加し、47日目には0.77mg・l⁻¹にまで達した。20°Cで*Microcystis*が分解しているにもかかわらずPO₄-P濃度が低い理由は定かではないが20°Cの場合に細菌数がかなり増大したことに起因するかもしれない。

5.4 まとめ

*Microcystis*の分解について検討を加えたが、1日15分間だけしか曝気をしなかったため必ずしも好氣的分解とはいえないが、夏期～秋期の湖における*Microcystis*の分解過程を知る上では役立つものと考えられる。*Microcystis*の分解速度並びに*Microcystis*からの窒素、リンの溶出速度は20°Cに比べ30°Cの方がかなり速いものであった。しかしながら20°C、30°Cにおいても*Microcystis*からのDOC、窒素、リンの溶出量は、12時間明るくしていたせいもあり、1か月間で2割以下であり、光照射条件下では完全分解するのにかなりの時間を要するものと考えられた。

引用文献

- 1) Jewell, W. J. and P. L. McCarty (1971): Aerobic decomposition of algae. Environ. Sci. Tech., 5, 1023-1031.

- 2) 高村典子・相崎守弘・安野正之 (1985): 霞ヶ浦における植物プランクトンの分解過程について, 第2回自然浄化シンポジウム, 国立公害研究所, 33-40.
- 3) Stewart, D.P. and M. D. Daft (1977): Microbial pathogens of cyanophycean blooms. *Advances in Aquatic Microbiology*, Vol. 1, 177-218.
- 4) Depinto, J.V. and F. H. Verhoff (1977): Nitrogen regeneration from aerobic decomposition of green algae. *Environ. Sci. Tech.*, **11**, 371-377.
- 5) Fallon, R.D. and T. D. Brock (1979): Decomposition of blue-green algal (cyanobacterial) blooms in Lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environ. Microb.*, **37**, 820-830.

6 アオコの嫌氣的分解

6.1 はじめに

我が国には、霞ヶ浦、諏訪湖、手賀沼をはじめとして夏になると毎年アオコの大発生が認められる湖がたくさん存在している。発生したアオコは、秋期～冬期にかけ分解され、有機物はCO₂としてまた窒素は脱窒作用により減少するが、リンは保存性物質であるため湖水中に蓄積する¹⁻³⁾。湖水の水質を改復させるためには、湖水中からのリン除去が必須であり、湖水中のリンを除去する方法の一つとして発生したアオコを回収することは大変有効なことと考えられる。しかしながらアオコの回収についてはいくつかの問題点が残されている。第1は、どのような方法で回収するのか、そのエネルギーコストはどれくらいかということ、第2は回収したアオコの処理、処分をどうしたらよいかという点である。

第1のアオコの回収法については、遠心分離法、長もうろ布法、フィルタープレス法等による回収法があるが、アオコの有効利用法が確立すれば、性能のよりよいものが作られるものと考えられる。問題なのは第2の点であり、回収したアオコの処理、処分方法としては焼却か土壌中への埋め込み処分が行われている。しかし、焼却の場合、回収されたアオコが90～98%の水分を含んでいるため極めて大きな付加エネルギーを必要とするため、省エネルギーが叫ばれている今日においては問題である。またそのまま土壌中へ埋め込むことも地下水汚染が懸念されている。またアオコを肥料化、飼料化して用いることも期待されているが、いまだに十分な研究がなされておらず新しい処分方法が切望されている。

現在、下水処理場から出る余剰汚泥の処理において、メタン発酵による嫌気性処理方法が利用されているが⁴⁻⁶⁾、この方法は特に高濃度の有機性の排水処理に適しており、また活性汚泥法や生物膜法のような生物処理と比較し、エネルギー生産型の処理法として知られている。

そこでアオコの嫌気性処理の可能性を明らかにすべく、アオコを基質とするメタン発酵について検討を加えた。すなわち、回分培養及び半連続培養法によるアオコからのメタンガスの生成過程並びに生成最適条件さらにアオコの減量化について詳細な研究を行った。

6.2 実験方法

6.2.1 培養装置

実験に用いた培養装置は、図6.1に示したようにかくはん速度及び培養温度が制御できる容量2.5 lの嫌気培養槽と、発生した消化ガスを回収するためのガスタンクから成っている。培養槽には、基質の注入とサンプリングを行うためのノズル、発生した消化ガスをガスタンクへ移送する

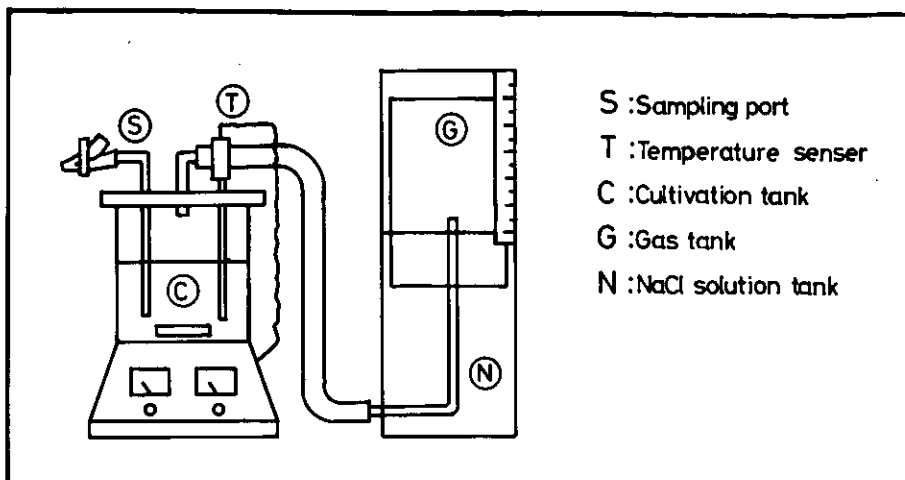


図 6.1 メタン発酵槽

Fig. 6.1 Methane fermentor

ためのパイプ、温度計及び温度センサ、そしてガスサンプルを採取するための採ガス管が取り付けられている。一方、ガスタンクは浮屋根式で中には飽和食塩水が入っている。また、発生したガスを測定するため、ガスタンクの上部には、1mm間隔の目盛りがつけられている。

6.2.2 基質

メタン発酵の基質としてアオコと下水汚泥を用いた。アオコは夏期に霞ヶ浦で大量発生したものをプランクトンネット（離合社製，xx13）を用いて回収したものであるが、藻体濃度が1%程度であるため、これを連続遠心分離（25,000×g）で5%程度にまで濃縮しこれを所定の濃度に水で希釈して使用した。なお濃縮アオコは-70°Cで凍結保存し使用時に溶かして使用した。一方対象として用いた下水汚泥は、東京都の下水処理場の余剰汚泥であり、この場合もアオコと同様の方法で保存及び調製を行った。

6.2.3 培養条件

回分培養と半連続培養実験を行った。回分培養は、培養温度、基質濃度に着目して、後に連続培養を行う場合の最適な培養条件を設定するために必要な基本的知見を得ることを目的とした。また半連続培養では、従来からメタン発酵の基質として用いられている下水汚泥を対象として、アオコと比較することで、メタン発酵におけるアオコの基質としての価値を明らかにすることを目的として行った。

1) 回収培養

① 培養温度

従来、都市下水や食品加工工場廃水などの1次処理、あるいは2次処理で生ずる有機物濃度の高い余剰汚泥を用いて行われているメタン発酵では、30~37°C（中温発酵）及び53~55°C（高温発酵）に最適な培養温度があることから本実験においては、35°Cと55°Cの温度条件で実験を行った⁹⁾。また培養液量は1.2 lとした。

㊦ 基質濃度

アオコを基質としたメタン発酵に関する報告がないことから、アオコのメタン発酵を行った場合、その分解生成物が良好なメタン発酵を阻害する可能性を考慮して、従来のメタン発酵で行われている基質濃度よりも比較的低い濃度、すなわちTS濃度（乾燥重量）1%を基準として、2%及び3%で培養を行った。

2) 半連続培養

㊦ 培養温度

半連続培養における培養温度は、回分培養実験によって、35°C及び55°Cがメタン発酵に支障がないことがわかったので、回分培養の場合と同じく、中温発酵の35°C、高温発酵の55°Cについて検討を加えた。

㊦ 基質濃度

連続培養においては、前述のようにアオコの他に下水汚泥を基質として実験に供した。TS濃度は、アオコの場合、2%、3%及び4%、一方、下水汚泥の場合では、2%及び3%とした。

㊦ 滞留日数

半連続培養における滞留日数の設定は、回分培養実験の結果を考慮し、中温発酵においては30日、高温発酵においては15日とした。したがって、培養槽内の培養液量を1.5 lとしていることか

表 6.1 半連続式メタン発酵の操作条件

Table 6.1 Conditions of methane production in semi-continuous culture

Temp. (°C)	Ditention time(d)	Feed and withdraw (ml.d ⁻¹)	Substrate conc. (%)	TS loading (g.d ⁻¹)
35	30	50	Aoko	2
				3
				4
			Sludge	2
				3
				1.5
55	15	100	Aoko	2
				3
				4
			Sludge	2
				3
				4

ら、1日当たりの引き抜き及び投入量は、中温発酵の場合、 $50\text{ml}\cdot\text{d}^{-1}$ 、高温発酵の場合では $100\text{ml}\cdot\text{d}^{-1}$ である。なお半連続培養における培養条件を表6.1に示した。

6.2.4 種汚泥

アオコ用の場合は、 35°C 、 55°C のそれぞれの温度で下水汚泥をアオコで馴養させて種汚泥を調整した。すなわち、 35°C 及び 55°C で運転されている下水処理場の消化汚泥を採取し、この 1.5l に対して、それぞれの温度で、TS1%濃度のアオコを半連続的に週1回 500ml ずつ引き抜き投入を繰り返して、基質のアオコに十分馴養させ、これを種汚泥とした。回分培養の場合は、培養槽に種汚泥を 100ml に加えこれにアオコ溶液を 1.1l に加え反応を開始した。一方、下水汚泥を基質とするメタン発酵においては、上述の下水処理場からの消化汚泥を、馴化を行わずそのまま培養に供した。

6.2.5 測定項目及び測定方法

回分培養においては、1日おきに培養槽から 30ml ずつサンプリングし、各種の分析に供した。一方、半連続培養においては、培養を開始してから、それぞれ所定の引き抜き投入を繰り返し、1日当たりのガス発生量が安定した後の引き抜き液を各種分析に供した。本実験では以下の項目について分析を行った。

1) ガス組成とガス発生量

発生ガス組成は、発酵槽よりガスタイトのシリンジでガスを採取後表6.2に示す条件でメタン、炭酸ガスの分析をガスクロマトグラフ法により行った。ガスの発生量は、ガスタンクに取り付けた目盛りよりガス発生量を調べた。

表 6.2 メタン、炭酸ガス及び有機酸のガスクロマト分析条件
Table 6.2 Conditions of gas chromatography for CH_4 , CO_2 and fatty acid analysis

Item.	CH_4	CO_2	Fatty acid
Column	Molecular sieve 5A $3\text{mm}\times 3\text{m}$	Silica-gel $3\text{mm}\times 1.5\text{m}$	Chlomosorb 101 $3\text{mm}\times 3\text{m}$
Detector	TCD	TCD	FID
Temp. ($^{\circ}\text{C}$)			
Column	80	80	170
Injection	120	120	220
Carrier gas	He	He	N_2
($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	30	30	30

2) 脂肪酸

培養液の遠心分離した上澄液を用いて、低級脂肪酸の場合は、表6.2に示すようにFID検出器を用いるガスクロマトグラフ分析法により、また高級脂肪酸については、ジアゾメタンでメチル化後、OV-17のカラムによるガスクロマトグラフ法により分析を行った。

3) TS (蒸発残留物), VS (強熱減量)

下水試験法によった。

4) TOC

島津製TOC-10B型 TOC計を用いた。

5) CN

Yanaco社製 CNコーダーを用いた。

6) T-P

混合試薬法によった。

6.3 結果

6.3.1 基質の組成

メタン発酵の基質として用いたアオコ及び下水汚泥の組成を表6.3に示した。表からわかるように、アオコは下水汚泥と比べて窒素の含有量が高く、C/N比は5.6であった。炭素含有量の値を用いて1gのアオコ及び下水汚泥から得られる発生ガスの最大理論量は次のとおりである。

$$\text{ガス発生量 (ml)} = \frac{\text{基質 1g} \times \text{炭素含有率}}{12} \times 22.4 \times 10^3$$

すなわち、アオコ1gからは、892ml、下水汚泥1gからは、683mlのガスが得られることになる(ただし、発生するバイオガスがすべてCH₄とCO₂から成ると仮定した場合)。

表 6.3 アオコと下水汚泥のC, N及びP含量

Table 6.3 C, N and P contents of Aoko and sludge

Substrate	C%	N%	P%	C/N
Aoko	47.8	8.4	0.79	5.7
Sludge	36.6	4.5	1.68	8.1

6.3.2 回分培養

回分培養におけるアオコからのガス発生量と有機酸の生成量を図6.2～図6.7に示した。

図6.2は35°Cでアオコ1%の条件で行った場合の結果である。有機酸(LFA)の生成は培養4日

目で酢酸が $2,600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と最大に達したが以後減少した。またプロピオン酸は4日目~15日目の間で $600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度存在しこの間あまり変動は認められなかった。*n*-酪酸は4日目で最大 $610\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ となった。有機酸の生成が4日目で最大となったが、ガス発生はこの頃から認められ、以後徐々に増加し培養20日後には 3.0l とほぼ最大となった。またギ酸の生成は最大でも $29\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と大変低い値であった。

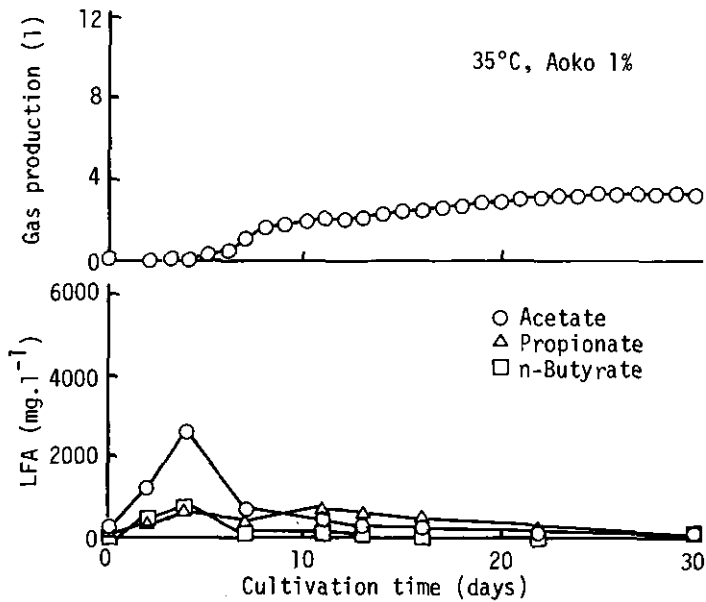


図 6.2 アオコからガス及び有機酸の生成 (35°C, 1%, 回分培養)

Fig. 6.2 Gas and fatty acid production from Aoko (batch culture)

図6.3は35°Cでアオコ2%の場合の結果である。有機酸の生成は1%と比べて、すべての酸で高い値を示した。酢酸は4日目で最大となったが濃度が $3,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と高く10日目までこの高い値は続いた。一方、*n*-酪酸も培養4日目には $1,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を超えかなり高濃度となり、10日目まで高い値が続いた。培養10日目からガスが急激に生成され始めたが、ガスの生成に伴い有機酸の濃度が著しく低下した。ガスの生成は培養25日目ではほぼ最大となり 6l が生成された。

図6.4は35°Cでアオコ3%の場合である。この場合も1%, 2%と同様に酢酸が培養7日目で最大となり $4,740\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にまで達した。*n*-酪酸, *i*-吉草酸, プロピオン酸も最大でそれぞれ $1,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,030\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,940\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ にまで達した。ガスの発生は10日目から開始し24日目には最大の 9.7l に達した。

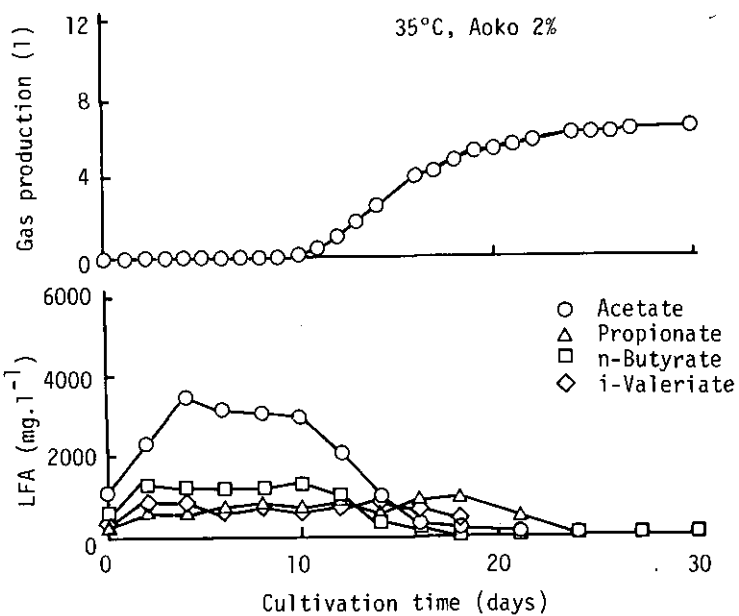


図 6.3 アオコからガス及び有機酸の生成 (35°C, 2%, 回分培養)
Fig. 6.3 Gas and fatty acid production from Aoko (batch culture)

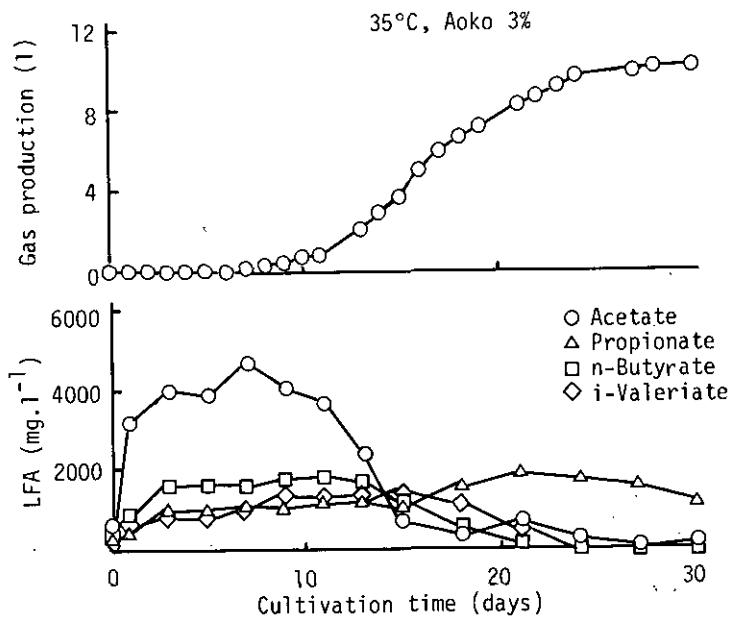


図 6.4 アオコからガス及び有機酸の生成 (35°C, 3%, 回分培養)
Fig. 6.4 Gas and fatty acid production from Aoko (batch culture)

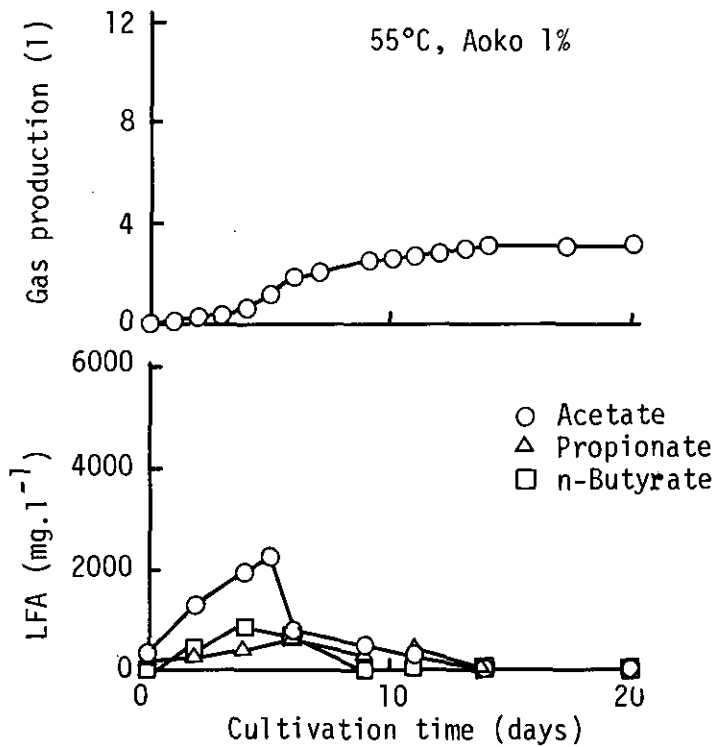


図 6.5 アオコからガス及び有機酸の生成 (55°C, 1%, 回分培養)
Fig. 6.5 Gas and fatty acid production from Aoko (batch culture)

図6.5は55°Cアオコ1%の場合である。有機酸の生成は、酢酸が培養5日目で $2,180\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と最大の濃度となり以後急激に減少した。プロピオン酸は6日目で最大の $632\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を示し、*n*-酪酸は4日目で $653\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と最大となった。ガスの発生は4日目から始まり20日にはほぼ最大の3 lとなった。これらの傾向はアオコ35°C, 1%の場合と類似していた。

図6.6は55°C, アオコ2%の場合である。この場合も酢酸の生成量が最も高く、4日目で $3,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 近くに達した。*n*-酪酸も、プロピオン酸も最大で $1,500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 前後となり、ガス発生に伴い有機酸の生成も減少した。ガスの発生も15日目でほぼ最大の6.7 lに達した。これらの結果は、35°C, アオコ2%の場合の培養経過と類似していた。

図6.7は55°C, アオコ3%の場合である。この場合、酢酸は培養2日目から $3,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を超え9日目には $4,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 近くに達した。*n*-酪酸も $2,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 近くに上昇し、プロピオン酸、*i*-吉草酸も $1,000\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\sim 600\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲とかなり他の場合より高い値を示した。しかしながらこの場合にはガスの発生はほとんど認められなかった。

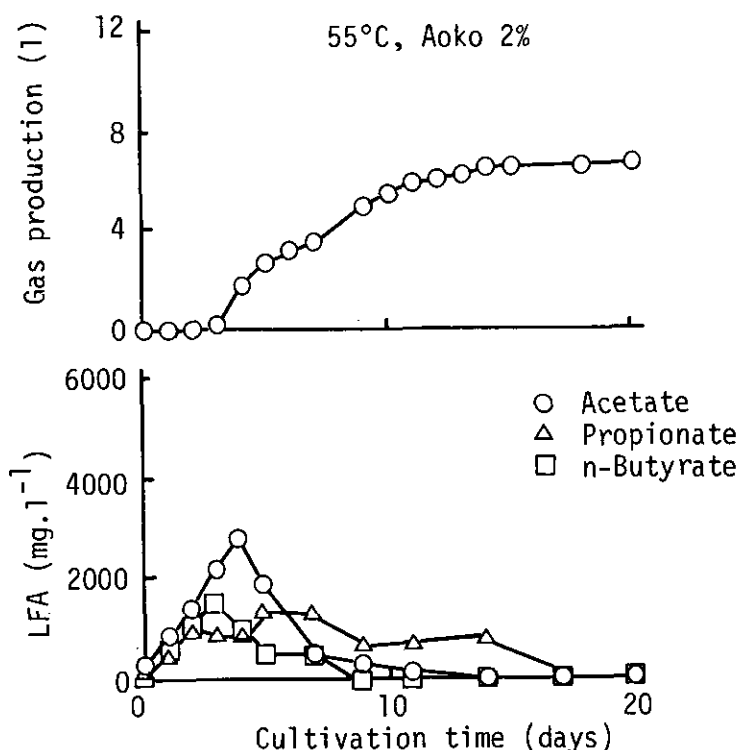


図 6.6 アオコからガス及び有機酸の生成 (55°C, 2%, 回分培養)

Fig. 6.6 Gas and fatty acid production from Aoko

表6.4に35°C, 55°Cにおけるアオコからのガス生成量とアオコ 1gからのガス生成量を示した。35°Cと55°Cを比べてみると, 55°Cのアオコ 3%を除くとアオコ 1gからガスが250ml~300mlが発生し, アオコ濃度が1~2%の範囲では, アオコ濃度は単位アオコから生成されるガスの発生量にほとんど影響を及ぼさないものと考えられるが, 図6.3~図6.7からわかるように, 55°Cの方がガスの発生が35°Cに比べ約2倍程度も速いことがわかる。したがって以後の半連続培養の実験では, 35°Cの滞留時間を30日, 55°Cの場合は15日間と35°C半分の日数とした。

またこれらの種々の条件下で, 生成されたガス中のメタンと炭酸ガスの比率を調べたが, いずれの場合も, メタン:炭酸ガスの比率は6:4とほぼ一定であった。

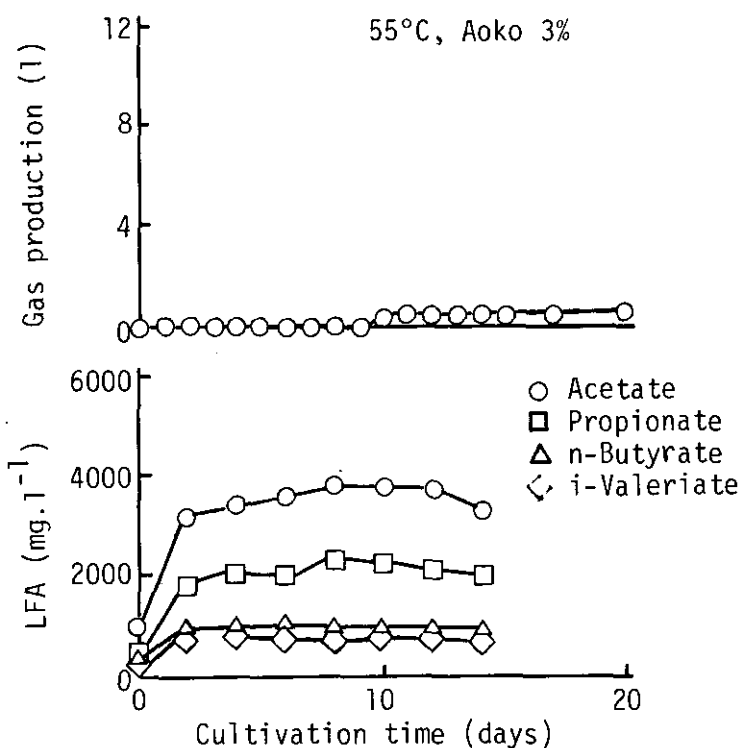


図 6.7 アオコからガス及び有機酸の生成 (55°C, 3%, 回分培養)
 Fig. 6.7 Gas and fatty acid production from Aoko (batch culture)

表 6.4 回分式培養におけるガス生成

Table 6.4 Gas production under several conditions in batch culture

Temp. (°C)	Aoko (%)	Gas production	
		Total (l)	l.g-Aoko ⁻¹
35	1	3.3	0.28
	2	6.4	0.27
	3	10.3	0.29
55	1	3.0	0.25
	2	7.1	0.30
	3	0.2	0.01

6.3.3 半連続培養

回分培養の結果、アオコが分解するのに35°Cでは約30日間を、55°Cでは15日間を要することから、滞留時間を35°Cは30日、55°Cは15日として半連続培養を行った。すなわち、培養液が1.5 lであるので35°Cでは毎日50mlを、また55°Cでは100mlの引き抜き、添加を行った。この場合、比較として下水汚泥についてもアオコと同様の実験を行った。半連続培養を繰り返し、ガスの発生量の安定したところで有機酸の分析を行った。ガスの発生が安定化するのに約1か月を要した。

図6.8はアオコ2%濃度で半連続培養を行い、ガス発生が安定してから約1か月間のガス発生量の変化を示したものである。日によりガスの発生量はかなり変化するが、35°Cでは平均340ml・d⁻¹、55°Cでは640ml・d⁻¹のガスの発生が認められた。55°Cの方が35°Cに比べ発生量が2倍近く高いのは、55°Cの方が滞留時間が短く、負荷量が2倍高いためと考えられる。

図6.9はアオコ3%濃度の場合でガスの発生が安定してから1か月間のガス発生量を調べたものである。アオコ3%の場合、35°Cでは発生ガス量は580ml・d⁻¹、55°Cでは830ml・d⁻¹であり2%と比べ35°Cで1.7倍、55°Cで1.3倍の値を示した。

また表6.5にアオコ及びスラッジからのガスの発生量を示したが、35°Cでは2%、3%ともに汚泥の方が1.4倍、1.6倍、55°Cでは2%、3%で1.6倍、2.0倍といずれもアオコより高いガス生成量を示した。

表6.6に半連続培養時の有機酸濃度とそのときのガスクロマトグラフを図6.10、図6.11に示した。汚泥を用いた場合、35°C、55°Cでは、最大でも酢酸が300mg・l⁻¹と非常に低いのに対し、ア

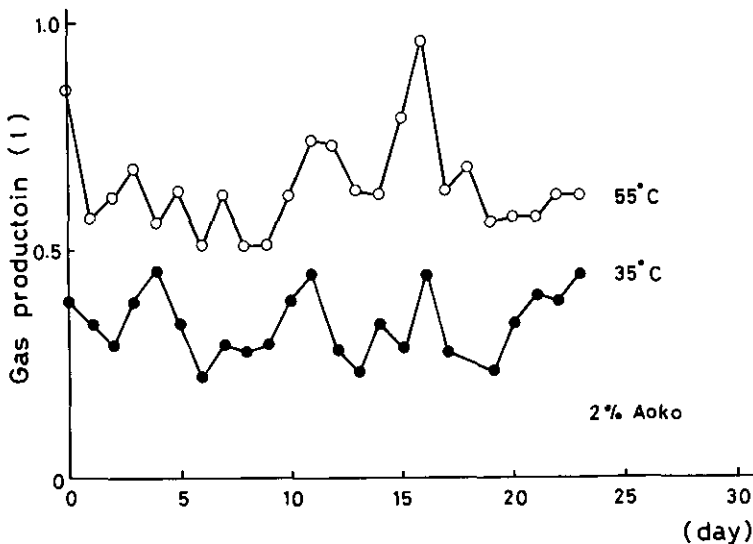


図 6.8 半連続培養におけるアオコからガスの生成 (2%, アオコ)

Fig. 6.8 Gas production from Aoko in semi-continuous culture

オコの3%でプロピオン酸が $1,220\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 生成され、回分培養に比べかなり低い値であった。しかし4%で 55°C の場合は酢酸が $3,200\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とかなり高い値を示した。半連続培養は回分培養に比べ有機酸濃度はかなり低くなるものといえよう。

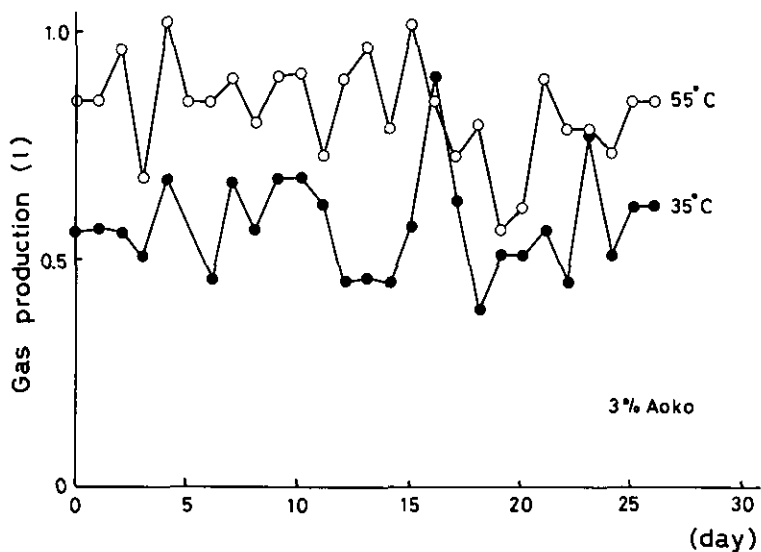


図 6.9 半連続培養におけるアオコからガスの生成 (3%, アオコ)
 Fig. 6.9 Gas production from Aoko in semi-continuous culture

表 6.5 半連続式培養における基質負荷とガス生成

Table 6.5 Substrate loading and gas production in semi-continuous culture

Temp. (°C)	Detention time(d)	Substrate conc.(%)	Loading			Gas production				Gas production yield (%)	
			TS (g.d ⁻¹)	VS (g.d ⁻¹)	TOC (g.d ⁻¹)	l.d ⁻¹	l.g-TS ⁻¹	l.g-VS ⁻¹	l.g-TOC ⁻¹		
35	30	Aoko	2	0.96	0.90	0.46	0.34	0.35	0.38	0.74	40
			3	1.52	1.43	0.73	0.58	0.38	0.41	0.79	42
			4	2.03	1.90	0.97	0.79	0.39	0.42	0.81	44
		Sludge	2	1.20	0.91	0.44	0.46	0.38	0.42	1.05	56
			3	1.83	1.39	0.67	0.83	0.45	0.60	1.24	66
			4	2.46	1.78	0.91	1.29	0.51	0.67	1.51	74
55	15	Aoko	2	1.92	1.86	0.92	0.64	0.33	0.36	0.70	37
			3	3.04	2.86	1.45	0.83	0.27	0.29	0.57	31
			4	4.06	3.80	1.94	0.35	0.09	0.09	0.18	10
		Sludge	2	2.39	1.82	0.88	1.03	0.43	0.57	1.17	63
			3	3.66	2.77	1.34	1.66	0.45	0.60	1.24	66
			4	4.95	3.70	1.86	2.49	0.48	0.62	1.31	67

表 6.6 半連続式培養における低級有機酸濃度

Table 6.6 Concentration of lower fatty acids in semi-continuous culture

Temp. (°C)	Substrate conc.(%)	Acetate (mg.l ⁻¹)	Propionate (mg.l ⁻¹)	<i>i</i> -Butyrate (mg.l ⁻¹)	<i>n</i> -Butyrate (mg.l ⁻¹)	
35	Aoko	2	70	30	0	0
		3	260	1,180	50	40
		4	510	450	0	0
	Sludge	2	70	40	0	0
		3	60	70	10	0
	55	Aoko	2	20	10	0
3			740	1,220	60	50
4			3,200	1,830	60	40
Sludge		2	40	20	0	0
		3	300	80	20	20

6.4 考 察

藻類やホテイアオイ¹⁰⁻¹²⁾を用いるメタン発酵については、これまでにいろいろの研究がなされているが、アオコを用いたメタン発酵についてはほとんど報告がなされていない。そこで本研究は、アオコからどの程度のメタンガスが生成されるのか、アオコの濃度はどの程度が適しているのか、回分法と半連続法でどのような相違が生ずるのかを中心に検討を加えた。

メタン発酵は酸生成菌^{13,14)}とメタン生成菌の^{15,16)}2種類の菌が関与する2段反応¹⁷⁾であることが知られている。第1段の反応では可溶化過程と呼ばれ、有機物が加水分解され低分子の酸、アルコール等が生成される。第2段の反応では、生成された低分子物質が分解されメタンガスと炭酸ガスが生成される。しかしながらこの2種類の菌の性質は大きく異なっており、酸生成菌は通性嫌気性でpH 4~5の酸性側を好み、メタン生成菌は嫌気性菌であり至適pHは6.5~7.5である。したがって二つの異なった反応槽でメタン発酵させることが理想的と考えられるが、これまでに2槽式の発酵についてはあまり検討がなされていない。本研究では、従来からの1槽式を用いて検討を行ったため、酸生成菌とメタン生成菌のバランスが重要なポイントであった。

アオコを基質にした場合、回分培養では図6.2~図6.7に示すように高濃度の有機酸が生成され、その後にガスの発生が認められた。また初期にpHの低下が認められたため培養初期にpHを修正したが、いずれの場合も3日目以後はpH 7~8で安定した。メタン発酵では一般に有機酸が蓄積するとメタンの生成が阻害され、その濃度は500mg・l⁻¹程度といわれているが、アオコを基質とした場合には表6.5に示すように2,000mg・l⁻¹以上の有機酸が存在してもメタンが生成され、従来の下水汚泥の場合とかなり相違していた。図6.7に示すように、55°Cでアオコ3%の場合にはガス

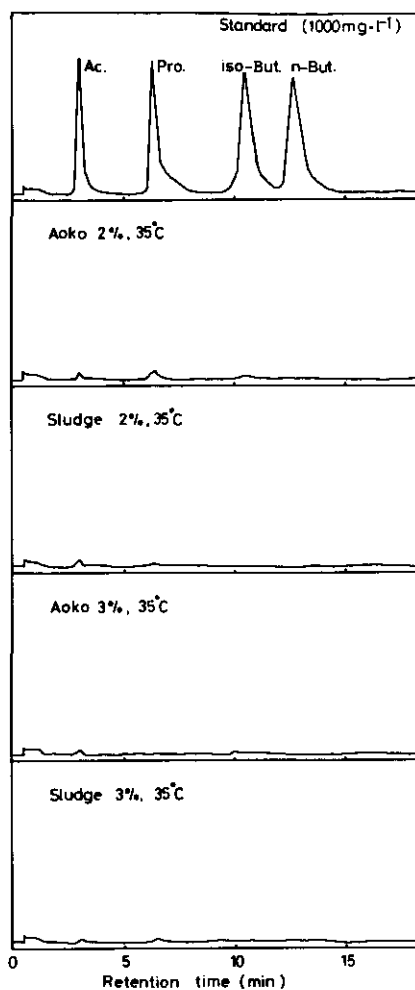


図 6.10 半連続メタン発酵液中の有機酸のガスクロマトグラム

Fig. 6.10 Gas chromatogram of fatty acid in semi-continuous culture (Aoko)

の生成がほとんど認められなかったが、その理由として高濃度の有機酸の生成によるものとも考えられたが、図6.4に示すように35°Cの場合、55°Cと同等の有機酸が生成されているにもかかわらずガスが生成されることから、必ずしも有機酸の濃度によるものとは考えられず、この点については不明である。

メタン発酵においてはガスの収率が重要であるが、下水汚泥の場合は表6.6に示すように半連続培養では35°C~55°Cで汚泥TS 1g当たり380~450mlのガスが生成され、理論収率は683mlであることから、収率は56~66%とかなり高い値が得られた。一方アオコの場合は、アオコTS 1g当たり270~390mlのガスが生成され収率は31~44%と下水汚泥には劣るが、それでもかなりの量のガ

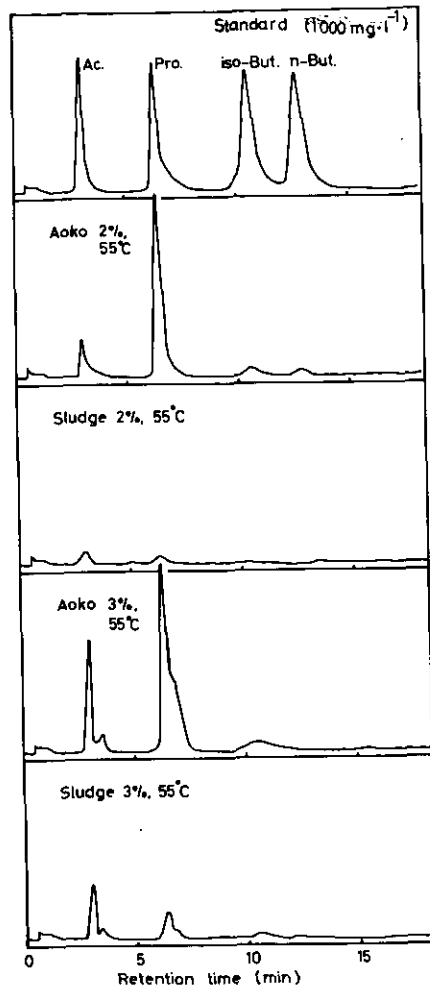


図 6.11 半連続メタン発酵液中の有機酸のガスクロマトグラム

Fig. 6.11 Gas chromatogram of fatty acid in semi-continuous culture (sludge)

スが生成されることが判明した。アオコを用いた場合の収率が低いのは、用いた種汚泥が下水汚泥由来のものを馴養して使用したためと考えられ、アオコでの馴養期間が短いためであり、より長時間の馴養を行うことにより、下水汚泥とほぼ同程度まではガスが発生するものと考えられる。また表6.4に示すように回分培養ではアオコ1gから最大300mlのガスの生成が認められ、この場合の収率は34%であったが、回分式と比較し半連続培養の方が高い収率が得られた。また35°Cと55°Cでは回分および半連続式いずれも35°Cの方がやや良好な結果が得られ、アオコからメタンの生成には35°Cで十分であると考えられた。

一方アオコをメタン発酵処理した場合の残査が問題となるが、表6.7にメタン発酵によるTOC

表 6.7 半連続式培養における流入及び流出水中のTOC

Table 6.7 TOC of feed supply and withdraw in semi-continuous culture

Temp. (°C)	Detention time (d)	Substrate conc. (%)	TOC		Removal (%)	
			Feed supply (g. l ⁻¹)	Withdraw (g. l ⁻¹)		
35	30	Aoko	2	9.2	4.6	50.1
			3	14.5	6.5	55.2
			4	19.4	8.5	56.0
		Sludge	2	8.8	3.6	58.5
			3	13.4	5.3	60.6
			4	19.4	5.2	43.2
55	15	Aoko	2	9.2	5.2	43.2
			3	14.5	8.6	40.5
			4	19.4	16.9	13.0
		Sludge	2	8.8	4.3	51.1
			3	13.4	5.7	57.4
			4	19.4	16.9	13.0

の除去率を示した。下水汚泥の場合TOCで50~60%の除去率が得られたが、アオコでも40~55%の除去率が得られ、メタン発酵によりアオコの有機物の約半分が減量化することが判明した。

以上のことから、アオコの回収法並びにメタン発酵後の残渣の処理法等の解決しなければならない問題は残されているものの、アオコは下水汚泥にはやや劣るが、メタン発酵原料として十分使用できることが明らかとなった。

6.5 まとめ

アオコを原料としてメタン発酵によるガスの回収とアオコの減量化を試みた。回分培養法では、55°C、2%のアオコ濃度で1g当たり300mlのガスの生成が認められた。一方、半連続培養法では、35°C、4%アオコ濃度で1g当たり390mlのガスの生成が認められ、ガスの収率は理論量の44%とかなり高い値が得られた。アオコは従来の下水汚泥と同様にメタン発酵により処理が可能と考えられた。

引用文献

- 1) Middleton, A.C., R.M. Narbaiz and A. Uchida (1980): Phosphorus solubilization during anaerobic decomposition of algae. U.S. Department of Commerce, National Technical Information Service, PB80-157225 40p.
- 2) Bikbulatova, E.M. (1977): Decomposition of an organic substance of blue-green algae under aerobic and anaerobic conditions at room temperature. *Vodnye Resursy*, 132-147.
- 3) Otsuki, A. and T. Hanya (1972): Production of dissolved organic matter from dead green

algal cells. *Limnol. Oceanogr.* **17**, 258-264.

- 4) 山内 徹 (1980): 天然系有機物のメタン発酵法によるメタン回収. *発酵と工業*, **38**, 21-29.
- 5) 須藤隆一 (1977): 廃水処理の生物学. 産業用水調査会.
- 6) 古屋 昇・松永 旭・船山聖二・林 攻 (1979): 下水汚泥の高温嫌気性消化. *下水道協会誌*, **16**, (183), 1-10.
- 7) Therkelsen, H.H. and D.A. Carlson (1979): Thermophilic anaerobic digestion of a strong complex substrate. *J. WPCF*, **51**, 1949-1964.
- 8) 稲森悠平・須藤隆一 (1982): 嫌気性処理の最近の動向(II). *用水と廃水*, **24**, 303-312.
- 9) Maly, J. and H. Fadrus (1971): Influence of temperature on aerobic digestion. *J. WPCF*, **43**, 641-650.
- 10) Wolverson, B.C. and R.C. McDonald (1976): Don't waste waterweeds. *New Sci.*, **12**, 318-320.
- 11) Wolverson, B.C. and R.C. McDonald (1979): Energy from aquatic plant wastewater treatment systems. *NASA Technical Memorandum*, 1-6.
- 12) Lecuyer, R.P. and J.H. Marten (1976): An economic assessment of fuel gas from water hyacinths. *Syp. Clen Fuel Biomass Sewage Urban Refuse Agric Waste*, 267-285.
- 13) Toerien, D.F., M.L. Siebert and W.H.J. Hattingh (1967): The bacterial nature of the acid-forming phase of anaerobic digestion. *Water Res.*, **1**, 497-507.
- 14) Uribelarrea, A. Pareilleux (1981): Anaerobic digestion: Microbial and biochemical aspects of volatile acid production. *Eur. J. Appl. Microb. Biotech.*, **12**, 118-122.
- 15) Kirsch, E.J. (1969): Studies on the enumeration and isolation of obligate anaerobic bacteria from digesting sewage sludge. *Devs. Ind. Microbiol.*, **10**, 170-177.
- 16) Siebert, M.L., D.F. Toerien and W.H.J. Hattingh (1968): Enumeration studies on methanogenic bacteria. *Water Res. Pergamon Press*, **2**, 545-554.
- 17) Keenan, J.D. (1974): Two stage methane production from solid wastes. *The American Society of Mechanical Engineers*, 1-12.

おわりに

本研究により、アオコの温度、照度、栄養塩類に対する増殖特性並びに分解時における物質の変化及びメタンガスの生成等、アオコの増殖及び分解に関する多くの知見を得ることができた。

しかしながら、アオコの異常発生が認められる霞ヶ浦において、夏期の湖水ではアオコが増殖しやすく、秋～春期にかけては増殖しにくい水に変化すること、またアオコの発生が少ない牛久沼の水はアオコの増殖しにくい水であることが明らかにされたが、その原因が何に由来するのかは今後の課題である。

またアオコの異常発生を抑制する方法として、湖水中の窒素、リン濃度を減少させることは最も重要なことではあるが、アオコと細菌、アオコと藻類との相互作用あるいはビタミン、キレート物質などのアオコ増殖促進物質、さらにアオコ分解微生物の検索等の窒素、リン以外の増殖抑制要因について、アオコの発生の防止を目指し今後も検討を続ける予定である。

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究——霞ヶ浦を対象域として——昭和51年度。(1977)
- 第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51/52年度 研究報告。(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- ※第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素——窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和52年度中間報告。(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素——窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究。——昭和51, 52年度 研究報告。(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II)——霞ヶ浦を中心として——昭和53年度。(1979)
- ※第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- ※第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和52, 53年度 研究報告。(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素——窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和53年度中間報告。(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51~53年度 特別研究報告。(1979)
- ※第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレームおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
——第 1 報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係——
——第 2 報 その一支流に見出されたChironominae 亜科の20種について——)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)
- ※第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和54年度 特別研究報告。(1980)

- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- ※第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果——臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)
- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- ※第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (III) ——霞ヶ浦 (西浦) の湖流——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (IV) ——霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (V) ——霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VI) ——霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VII) ——湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究——昭和53, 54年度 (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (VIII) ——富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (IX) ——*Microcystis* (藍藻類) の増殖特性——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (X) ——藻類培養試験法による A G P の測定——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (XI) ——研究総括——昭和53, 54年度。(1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究——昭和54, 55年度 特別研究報告。(1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
——第 3 報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科Orthoclaadiinae 各種の記載と, その分布の下水汚染との関係について——
——第 4 報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載——)
- ※第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究——昭和54, 55年度 特別研究報告。(1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和55年度 特別研究報告。(1981)
- 第 32 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究——環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 1) ——昭和54年度 特別研究中間報告。(1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——大気運動と大気拡散過程のシミュレーション——昭和55年度 特別研究報告。(1982)
- ※第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和55年度 特別研究報告。(1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究。(1982)
- 第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究——昭和55, 56年度 特別研究報告。(1982)

- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究。(1982)
- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
(環境標準試料「池底質」の調製、分析及び保証値)
- ※第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和56年度 特別研究報告。(1982)
- 第 40 号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和56年度 特別研究報告。(1983)
- ※第 41 号 土壌環境の計測と評価に関する統計学的研究。(1983)
- ※第 42 号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究。(1983)
- ※第 43 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
——第 5 報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する 6 月の調査成績とユスリカ亜科に属する 15 新種等の記録——
——第 6 報 多摩本流より 6 月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について——
——第 7 報 多摩本流より 3 月に採集されたユスリカ科の各種について——)
- 第 44 号 スモッグチャンバーによる炭化水素—窒素酸化物系光化学反応の研究——環境大気における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究 2)——昭和54年度 特別研究 中間報告。(1983)
- 第 45 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和53~55年度 特別研究報告。(1983)
- 第 46 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和54, 55年度 特別研究報告 第 1 分冊。(1983)
- 第 47 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和54, 55年度 特別研究報告 第 2 分冊。(1983)
- ※第 48 号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析。(1983)
- 第 49 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第 50 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(I)——霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第 51 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(II)——霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第 52 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(III)——霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 53 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(IV)——霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 54 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(V)——霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 55 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VI)——富栄養化防止対策——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 56 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VII)——湯ノ湖における富栄養化とその防止対策——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)

- ※第 57 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VIII) ——総括報告——昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 58 号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究——昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第 59 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究——光化学スモッグチャンバーによるオゾン生成機構の研究——大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究——昭和55~57年度 特別研究報告 (第 1 分冊)。(1984)
- 第 60 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究——光化学エアロゾル生成機構の研究——昭和55~57年度 特別研究報告 (第 2 分冊)。(1984)
- 第 61 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究——環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 1) ——昭和55~57年度 特別研究報告 (第 3 分冊)。(1984)
- 第 62 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究——昭和56~58年度 特別研究中間報告。(1984)
- ※第 63 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究——昭和56年度 特別研究報告。(1984)
- ※第 64 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究——昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第 65 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants - Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響——第 1 分冊)
- ※第 66 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants - Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響——第 2 分冊)
- 第 67 号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究——昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第 68 号 汚泥の土壤還元とその環境影響に関する研究——昭和56~57年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第 69 号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- 第 70 号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park. (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
——第 1 部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究——
——第 2 部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的、形態学的研究——)
- ※第 71 号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第 72 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) ——昭和55~57年度 特別研究報告 (第 4 分冊)。(1985)
- ※第 73 号 炭化水素—窒素酸化物—硫黄酸化物系光化学反応の研究——昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※第 74 号 都市域及びその周辺の自然環境に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標——その考え方と作成方法——昭和59年度 特別研究報告。(1984)
- 第 75 号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)

- 第 76 号 Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第 77 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和58年度 特別研究報告。(1985)
- 第 78 号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第 79 号 Studies on the method for long term environmental monitoring —— Research report in 1980-1982. (1985)
(環境汚染による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)
- 第 80 号 海域における赤潮発生のモデル化に関する研究——昭和57/58年度 特別研究報告。(1985)
- 第 81 号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究——地方公共団体の制度運用を中心として。(1985)
- 第 82 号 植物の大気環境浄化機能に関する研究——昭和57～58年度 特別研究報告。(1985)
- 第 83 号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
(日本の湖沼に発生するユスリカ類の研究)
- 第 84 号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究——昭和57～59年度 特別研究総合報告。(1985)
- 第 85 号 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
(フリーラジカルの反応速度と分光学的及び熱力学的パラメーターに関する研究)
- 第 86 号 GC/MSスペクトルの検索システムに関する研究。(1986)
- 第 87 号 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する研究——昭和53～58年度 特別研究総合報告。(1986)
- 第 88 号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究II. 環境指標——応用例とシステム。(1986)
- 第 89 号 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
(LANDSAT リモートセンシングによる霞ヶ浦の水質計測)
- 第 90 号 ナショナルトラスト運動にみる自然保護運動にむけての住民意識と行動——知床国立公園内100平方メートル運動と天神崎市民地主運動への参加者の分析を中心として。(1986)
- 第 91 号 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
(人間による環境資源利用の経済分析——水環境と国立公園地域を対象にして)
- 第 92 号 アオコの増殖及び分解に関する研究。(1986)

※ 残部なし

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1 * Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura —Progress report in 1976. (1977)
- No. 2 * Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants —Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- ※No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4 * Smog chamber on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system —Progress report in 1977. (1978)
- No. 5 * Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells —Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6 * Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura —Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- ※No. 8 * Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants —Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9 * Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system —Progress report in 1978. (1979)
- No. 10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants —Progress report in 1976-1978. (1979)
- ※No. 11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No. 12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No. 13 Studies on chironomid midges of the Tama River.(1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No. 14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem—Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※No. 15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants —Research report in 1977-1978. (1980)
- No. 16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※No. 17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes —Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region—Progress report in 1978-1979. (1980)
- No. 18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)

- ※No. 19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Lake current of Kasumigaura (Nishiura)— 1978-1979. (1981)
- No. 20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment— 1978-1979. (1981)
- No. 21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura— 1978-1979. (1981)
- No. 22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura— 1978-1979. (1981)
- No. 23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Applicability of trophic state indices for lakes — 1978-1979. (1981)
- No. 24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources— 1978-1979. (1981)
- No. 25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis* — 1978-1979. (1981)
- No. 26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Determination of argal growth potential by algal assay procedure— 1978-1979. (1981)
- No. 27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas—Summary of researches — 1978-1979. (1981)
- No. 28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Progress report in 1979-1980. (1981)
- No. 29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※No. 30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment—Progress report in 1979-1980. (1982)
- No. 31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants —Research report in 1980. (1981)
- No. 32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system —Progress report in 1979 —Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). (1982)
- No. 33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region—Simulation of atmospheric motions and diffusion processes —Progress report in 1980. (1982)
- ※No. 34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1980. (1982)
- No. 35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No. 36* Studies on the method for long term environmental monitoring —Progress report in 1980-1981. (1982)
- No. 37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy —The evaluation laboratory of Man-Environment Systems. (1982)
- No. 38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)

- ※No. 39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1981. (1983)
- No. 40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants —Research report in 1981. (1983)
- ※No. 41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical condition of soil. (1983)
- ※No. 42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics of mud transportation. (1983)
- ※No. 43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
 Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June, with description of 15 new species.
 Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
 Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No. 44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system—Progress report in 1979 —Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No. 45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem —Outlines of special research project— 1978-1980. (1983)
- No. 46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem —Research report in 1979-1980, Part 1. (1983)
- No. 47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem —Research report in 1979-1980, Part 2 (1983)
- ※No. 48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No. 49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental pollution —Research report in 1982. (1984)
- ※No. 50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Estimation of input loading of Lake Kasumigaura.— 1980-1982. (1984)
- ※No. 51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—The function of the ecosystem and significance of sediment in nutrient cycle in Lake Kasumigaura. — 1980-1982.(1984)
- ※No. 52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura. — 1980-1982. (1984)
- No. 53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacea in Lake Kasumigaura. — 1980-1982. (1984)
- No. 54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura. — 1980-1982.(1984)
- No. 55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Measures for eutrophication control.— 1980-1982.(1984)
- No. 56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Eutrophication in Lake Yunoko. — 1980-1982. (1984)
- ※No. 57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Summary of researches. — 1980-1982. (1984)

- No. 58* Studies on the method for long term environmental monitoring—Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No. 59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system —Photochemical ozone formation studies by the evacuable smog chamber —Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds —Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No. 60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system —Formation mechanisms of photochemical aerosol —Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No. 61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system —Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1) —Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)
- No. 62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems —Progress report in 1980-1983. (1984)
- ※No. 63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment —Progress report in 1981. (1984)
- ※No. 64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Final report in 1979-1981. (1984)
- No. 65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
- ※No. 66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
- No. 67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques —Project research report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil —Research report in 1981-1982. (1984)
- No. 69* Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji—Basic research report. (1984)
- No. 70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park—Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park. —Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※No.71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No.72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. —Research report in 1980-1982. (1985)
- ※No.73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Final report in 1980-1982. (1985)
- ※No.74* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality—Environmental indices-Basic notion and formation (1984)
- No.75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No.76 A Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- No.77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1983 (1985)
- No.78* Study on residents' role in conserving the living environment. (1985)

- No.79 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report in 1980-1982. (1985)
- No.80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea—Research report 1982-1983. (1985)
- No.81* A study on effects of implementing environmental impact assessment procedure—With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- No.82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants —Research report in 1982-1983. (1985)
- No.83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
- No.84* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure —Final report in 1982-1984. (1985)
- No.85 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
- No.86* A novel retrieval system for identifications of unknown mass spectra. (1986)
- No.87* Analysis of the photochemical secondary pollutants and their toxicity on cultured cells —Research report in 1978-1983. (1986)
- No.88* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality II—Environmental indices—Applications and systems. (1986)
- No.89 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
- No.90* National trust movement in Japanese nature conservation —Trustworthy or illusion? (1986)
- No.91 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
- No.92* Studies on the growth and decomposition of water-bloom of *Microcystis*. (1986)

* in Japanese

* out of stock

編集委員会委員

委員長	廣崎 昭太	委員	福山 力
副委員長	村岡 浩爾	"	陶野 郁雄
"	溝口 次夫	"	嵯峨井 勝
委員	阿部 重信	"	安藤 満
"	松本 幸雄	"	近藤 矩朗
"	北畠 能房	"	高橋 弘
"	大槻 晃	"(幹事)	増田 啓子

[昭和60年10月30日受領]

[昭和60年11月26日受理]

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 92

国立公害研究所研究報告 第92号

(R-92-'86)

昭和61年2月28日発行

発行 環境庁 国立公害研究所

〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 勝美印刷株式会社

住所 東京都文京区小石川1-3-7

Published by the National Institute for Environmental Studies

Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

February 1986