

陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ)

Comprehensive Studies on the Eutrophication of Fresh-water Areas

Microcystis (藍藻類)の増殖特性

Growth Characteristics of Blue-Green Algae, Microcystis

昭和53～54年度

1978—1979

須藤隆一・矢木修身・岡田光正・合葉修一
高村義親・萩原富司・長雨信雄・平松 昭
松田智明・野村和輝

Ryuichi SUDO, Osami YAGI, Mitsumasa OKADA, Shuichi AIBA
Yoshichika TAKAMURA, Tomiji HAGIWARA, Nobuo CHONAN, Akira HIRAMATSU
Toshiaki MATSUDA, Kazuteru NOMURA

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

序

本冊は特別研究「陸水域の富栄養化に関する総合研究」の昭和53～54年度報告となった8分冊の一つである。

湖沼の富栄養化による被害は、アオコ（*Microcystis*）の異常増殖と密接に関係していることは周知の通りである。このため、水質保全の立場からは、アオコの異常増殖機構を解明し、ついで、その増殖を抑制する方策を探ることが重要である。この報告は、純粹分離したアオコの増殖と環境条件との関係について、水環境実験施設を用いて行った研究の成果で、*Microcystis*の純粹分離、微細構造、化学組成、増殖特性、リンの取り込み、大量培養および水の華の生成と消滅のシミュレーションに関するものである。このようにして水の華の生成と消滅のシミュレーションを作るまでになったが、本研究が富栄養化問題の解決にいささかでも役立つことができれば幸甚である。

昭和56年1月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

緒 言

本報告の位置づけ 霞ヶ浦をはじめとして富栄養化が極度に進行した湖沼には、夏期を中心に *Microcystis* を主成分とした水の華が発生し、魚類の大量斃死、水道のカビ臭発生などの被害が頻繁に生じている。このような被害は、*Microcystis* の異常増殖と密接に関係しているので、水質保全の立場からは *Microcystis* の異常増殖機構を解明し、ついで、その増殖を抑制する策を見つけ出す必要がある。

本研究においては、霞ヶ浦における水の華の主成分である *Microcystis aeruginosa* および *Microcystis flos-squae* を純粋分離し、試験管、フラスコ、大型培養装置（マイクロコズム）を用いて培養実験を行い、増殖速度におよぼす栄養塩濃度、照度、温度、pH、増殖促進物質などの影響、栄養塩の吸収速度や収率、浮上および沈降速度などについて検討を行った。

本研究の最終目標は、*Microcystis* による水の華の発生を予測し、これを制御できる手法を見出すことであるが、そのためのシミュレーションモデルとして、*Microcystis* の浮上、沈降に関する諸因子、光合成活性、細胞内圧力変化、ガス胞量の変化等を定式化し、水の華の発生、死滅過程を計算追跡できるようにした。

研究のいきさつ この特別研究は当研究所創立の翌年、すなわち昭和50年に企画され、約1年ていどの準備・調整期間を経て実施に移されたもので、対象陸水として研究所から至近の距離にある霞ヶ浦を選び、フィールド調査とデータ収集が始まった。52年4月に特別研究として正式にスタートしてからは霞ヶ浦のみでなく、全国の湖沼をも対象としたが、湖沼と汚染源の流域の関係が比較的シンプルな系として独得の調査を行った湯の湖を除き、霞ヶ浦以外の他湖沼では霞ヶ浦で行ったようなルーチンサーベイが不可能であったので、主として夏期における各湖沼の水質特性をつかむためのフィールド調査のみに止め、その成果は湖沼一般の富栄養度評価の研究や、他湖沼との比較における霞ヶ浦の特性把握に役立てた。

研究スタッフと研究の性格 この特別研究には、研究所の9部が参加し、35名の研究者が寄与している。その内訳は水質土壌環境部13、総合解析部6、生物環境部5、環境情報部5、計測技術部4および技術部2である。その専門分野も陸水学、生態学、環境工学のようなフィールド調査に直接関係のあるものから、気象学、地文学、情報工学、社会工学といった諸分野にまで亘っていて、まさに典型的な学際研究である。第1期の特別研究の特徴は、第2期（昭55年4月より）のそれが「陸水域の富栄養化防止」をかかげたのに対し、明らかに基礎研究の色彩が濃い。霞ヶ浦でいえば、その流域、背後地まで含めた面、空間でみられる物質移動、状態変化から、視覚・心理学的価値評価まで、富栄養化に関連する可能な限りの角度からスポットをあてて、その実態、実相をつかむことを試みた。

本報告各分野の紹介 成果をまとめて1冊にするには種々難点があるので、全体をRシリーズで8分冊(R-19……………R-26), プラス(R-27)計9冊とした。本冊はその一つであるが、全体との関係を知って貰うため分冊のタイトルを紹介すると、Ⅲ, 「霞ヶ浦(西浦)の湖流」, Ⅳ, 「霞ヶ浦の微地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響」, Ⅴ, 「霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価」, Ⅵ, 「霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量」, Ⅶ, 「湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究」, 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」, Ⅸ, 「*Microcystis* の増殖特性」, Ⅹ, 「藻類培養試験法によるAGPの測定」で、これに加えて総括編がある。Ⅲ~Ⅹを通じて、Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵは標題が示す通り霞ヶ浦, とくに西浦の現象を扱ったもので、Ⅶもその色彩が強い。

霞ヶ浦をめぐる行政の現実と研究の今後 第一期特別研究のこれらの成果(I~X)を足がかりに第二期特研で富栄養化防止策を研究するにあたり、霞ヶ浦の現実を見直すと、一方で現行水質環境基準A類型を達成すべしという命題が重くのしかかっており、富栄養化防止関係の諸要求充足のための対応策を早急に講じなければならない。また一方では、水資源公団が昭和60年度完成を期している霞ヶ浦開発事業があって、その主たる目的である43m³/秒の新規利水と沿岸の浸水や塩害防止のため湖周の護岸や常陸川水門の改造が行われ、それにより調節可能水深は2.85mとなり、治水容量3.4億m³, 利水容量2.8億m³となる。この合計である有効貯水量6.2億m³は、霞ヶ浦の現貯水容量8.8億m³に比し極めて大きな数字であり、この新規利水により常陸川水門を流下する放流量は、現在の14億m³/年から5億m³/年と大幅に減ずる。富栄養化しやすい浅湖の代表である霞ヶ浦にとって極めて重大なこの改造が将来水質にどう影響するか予測も重要な課題である。われわれはこうした行政上の現実を注視して今後の研究を有効に展開することを心掛けるつもりだが、将来水質の予測は正直なところ難しいものになると予想される。研究グループがなお保持している高いポテンシャルに期待するのみである。

昭和56年1月

国立公害研究所

水質土壌環境部長 合 田 健

目 次

I. 研究の概要と今後の課題(須藤隆一)	1
II. 報 文	
1. <i>Microcystis</i> の純粋分離	7
矢木修身・須藤隆一	
2. 霞ヶ浦に発生する <i>Microcystis aeruginosa</i> と純粋培養した <i>Microcystis aeruginosa</i> の形態および微細構造	17
長南信雄・松田智明・矢木修身・高村義親	
3. 霞ヶ浦に発生するアオコと <i>Microcystis aeruginosa</i> の化学的組成	31
高村義親・野村和輝・萩原富司・平松 昭・矢木修身・須藤隆一	
4. <i>Microcystis</i> の増殖特性	47
矢木修身・岡田光正・須藤隆一・萩原富司・高村義親	
5. 藍藻類 <i>Microcystis aeruginosa</i> のリン取り込みと増殖	59
岡田光正・須藤隆一・合葉修一	
6. マイクロコズムシステムによる <i>Microcystis</i> の大量培養	69
岡田光正・須藤隆一	
7. 水の華の生成と消滅のシミュレーション	83
岡田光正・須藤隆一・合葉修一	

CONTENTS

I. Outline of Performed Researches and Future Prospects	1
R. SUDO	
II. Papers	
1. Isolation of <i>Microcystis</i>	7
O. YAGI and R. SUDO	
2. The Morphology and Fine Structure of <i>Microcystis</i> in Lake Kasumigaura as Compared with <i>Microcystis aeruginosa</i> in the Pure Culture	17
N. CHONAN, T. MATSUDA, O. YAGI and Y. TAKAMURA	
3. Chemical Compositions of Aoko (<i>Microcystis</i>) in Lake Kasumigaura and <i>Micro-</i> <i>cystis aeruginosa</i> in the Pure Culture	31
Y. TAKAMURA, K. NOMURA, T. HAGIWARA, A. HIRAMATSU, O. YAGI and R. SUDO	
4. Growth Characteristics of <i>Microcystis</i>	47
O. YAGI, M. OKADA, R. SUDO, T. HAGIWARA and Y. TAKAMURA	
5. Phosphorus Uptake and Growth of Blue-Green Alga, <i>Microcystis aeruginosa</i>	59
M. OKADA, R. SUDO and S. AIBA	
6. Mass Cultivation of <i>Microcystis</i> in a Microcosm System	69
M. OKADA and R. SUDO	
7. Simulation on Emergence and/or Disappearance of Waterbloom in a Eutrophic Lake	83
M. OKADA, R. SUDO and S. AIBA	

I 研究の概要と今後の課題

須藤 隆 一¹

Outline of Performed Researches and Future Prospects

Ryuichi SUDO¹

1. 本研究のねらい

霞ヶ浦をはじめとして富栄養化が極度に進行した湖沼には、夏期を中心に *Microcystis* を主成分とした水の華が発生し、魚類の大量へい死、水道のカビ臭発生などの被害が頻繁に生じている。このような被害は、*Microcystis* の異常増殖と密接に関係しているので、水質保全の立場からは *Microcystis* の異常増殖機構を解明し、ついでその増殖を抑制する方策を見つげ出すことが最も重要な研究であると考えられる。

実際の湖沼では、*Microcystis* は、他の生産者、消費者、分解者と共存して増殖するので、多くの相互作用のために *Microcystis* の増殖を支配する因子を厳密に調べることはできない。微生物の増殖を調べるために通常用いられる手法は、対象とする微生物を純粋分離して試験管やフラスコなどの培養容器のなかで、特定の環境を与えて増殖させる、いわゆる純粋培養である。純粋培養で得られた知見が混合培養を理解するのにそのまま応用できる保証は全くないが、現状では純粋培養での挙動を基本にせざるを得ない。

本研究においては、霞ヶ浦における水の華の主成分である *Microcystis aeruginosa* および *Microcystis flos-aquae* を純粋分離し、試験管、フラスコ、大型培養装置（マイクロコズム）を用いて培養実験を行い、増殖速度におよぼす栄養塩濃度、温度、照度、pH、増殖促進物質などの影響、栄養塩の吸収や収率、浮上および沈降速度などについて検討を行った。本研究の最終目標は、*Microcystis* による水の華の発生を予測し、これを制御できる手法を見出すことであるが、それにはシミュレーションモデルを確立する必要がある。このシミュレーションには、*Microcystis* の増殖、死滅、代謝などにおける定量的な値が必要であり、これらを現場の陸水学的な調査から得るのは難しい。培養手法を用いて、これらの数値を得ることも本研究のねらいの一つである。培養で得られた数値を実際の場と照合して妥当であることを確認することはもちろんである。

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

2. 研究体制

本研究は、水質土壌環境部陸水環境研究室の研究員のほか、客員研究員、共同研究員、などが分担した。

水質土壌環境部陸水環境研究室

須藤 隆一 矢木 修身 岡田 光正

技術部 技術室

土屋 重和

大阪大学工学部醗酵工学科教授

(客員研究員) 合葉 修一

大阪大学工学部醗酵工学科

(共同研究員) 関根 敏朗

茨城大学農学部農芸化学科助教授

(客員研究員) 高村 義親

茨城大学農学部農芸化学科

(共同研究員) 萩原 富司

3. 研究成果の概要

- (1) 霞ヶ浦の湖水から、群体を形成する3種の *Microcystis* (*M. aeruginosa* 2種, *M. flos-aquae* 1種) を単藻培養として分離した。これらの藻株について、いくつかの無菌化実験を行ったが、わずかに細菌の共存が認められた。
- (2) *Microcystis* はいずれの藻株とも 25~35℃で最高の比増殖速度(倍加時間12~24時間)が得られた。*M. aeruginosa* は低照度でよく増殖したが、*M. flos-aquae* は5,000~8,000 lxで最も高い比増殖速度を示した。またリン0.02 mg/l、窒素1.0 mg/lのような低い栄養塩濃度でも高い比増殖速度が得られた。
- (3) *Microcystis*の浮上している細胞には、ガス胞が40%程度存在したが、沈降している細胞にはガス胞はほとんど認められなかった。細胞内には、チラコイド、ポリホスフェート、多面体物体、脂質小粒が観察された。
- (4) 霞ヶ浦から採取したアオコと純粋培養した *Microcystis* の化学的組成はきわめて類似していた。*Microcystis* のC/Nは4.0程度で、大腸菌に近い値を示した。*Microcystis* は、必要以上のリンを細胞内に取り込み、貯留形として細胞内蓄積する性質を有した。
- (5) *Microcystis* のリン摂取速度は、細胞内に含有するリン含量によって異なり、リンが枯渇している細胞は、豊富な細胞に比較して10倍以上の摂取速度を示した。リンの摂取速度と細胞外のリン濃度および細胞内のリン濃度との関係について定式化を行った。
- (6) 容積3 m³の大型培養槽(マイクロコズムシステム)を用いて、*Microcystis* の大量培養を

行い、培養槽表面に水の華をつくらせることができた。このような場合、培養槽底部の溶存酸素と照度の著しい低下が認められた。

(7) 光合成活性、クロロフィル α 含量、群体の移動速度、細胞の膨圧などの算定を行ったうえで、水の華の生成・消滅を予測するためのシミュレーションモデルを確立した。この結果、単一の群体は3日周期で上下移動すること、水中のSS濃度、群体径、ガス胞の生成速度の増加が水の華の生成を促すことなどがわかった。

4. 今後の課題

本研究に用いた *Microcystis* の藻株は単藻培養であり、細菌がある程度共存している。したがって藻株に共存する細菌が *Microcystis* の増殖に影響を与えている可能性がある。このため、藻株の無菌化を行い、無菌培養の増殖特性と単藻培養のそれとを比較検討する必要がある。また *Microcystis* の増殖は、他の藻類、細菌、原生動物などが密接に関連していることが予想されるので、種間の相互作用についても今後研究しなければならない。本研究では、実験手法として回分培養を採用したが、相互作用を定量的に解析するためには連続培養法を用いる必要がある。*Microcystis* の連続培養は本研究のなかで成功しているが、十分な成果の蓄積がないので、論文としては示していない。リンの過剰摂取、低い照度への適応、浮上・沈降の特性などについてもさらに実験を続ける必要がある。

Microcystis の増殖は、窒素、リン、鉄などの栄養塩類だけでは十分に説明できず、何らかの増殖促進物質の関与がAGPの測定などによっても推定される。水の華の発生防止という立場からは、とくに *Microcystis* に対する増殖促進物質の研究が重要である。

実際の湖沼の環境に近づける意味で、フラスコスケールの培養実験のほかに本研究ではマイクロコズムも使用したが、浮上・沈降などの物理的な挙動、底泥の影響などを把握するにはマイクロコズムでの培養実験がとくに重要である。底泥を投入した場合の培養実験は今後実施するつもりである。

シミュレーションによる研究は、緒についたばかりであり、得られている成果も十分であるとはいえない。浮上・沈降と増殖との関係を考慮し、シミュレーション結果を現場の現象と照合しつつ、水の華生成のモデルを確立したいと考えている。この問題は富栄養化防止を目標として第2期の特別研究の重要課題であるので、一層の研究を行う予定である。

なお、本研究では、*Microcystis* の死滅・分解がきわめて重要な課題であるにもかかわらず、十分な実験を行うことができなかった。*Microcystis* の分解を促進するファージ、細菌、原生動物などの研究、水質に与える *Microcystis* 分解の影響などが残された課題である。水の華を制御するためには、消滅の立場からの研究も必要であろう。

終りに臨み、本研究に際し有益なる助言を賜った大阪大学工学部醸酵工学科小川隆平博士、実

際に多大なる協力をいただいた陸水環境研究室田井慎吾主任研究員，細見正明研究員，山根敦子研究員，国安祐子氏，柳橋祐子氏，マイクロコズム実験に多大なるご尽力をいただいた環境プラント内野弘之氏，寺蘭克博氏に対し，心から感謝の意を表する。

研究発表

(講演)

1. 岡田光正・須藤隆一：*Microcystis* の分解について．日本水処理生物学会，大阪．(50.11)
2. 岡田光正・須藤隆一：*Microcystis* による水の華の発生に関する研究(その1) — *Microcystis* の増殖特性．日本醗酵工学会大会，大阪．(52.11)
3. 岡田光正・須藤隆一：*Microcystis* の栄養塩吸収と増殖特性について．第12回水質汚濁研究に関するシンポジウム，東京．(53.2)
4. 矢木修身・岡田光正・細見正明・須藤隆一：水の華および赤潮生物の培養について．国立公害研究所研究発表会，筑波．(53.4)
5. 矢木修身・岡田光正・須藤隆一：*Microcystis* の分離および培養について．日本陸水学会第43回大会，奈良．(53.7)
6. 岡田光正・矢木修身・須藤隆一：*Microcystis* の増殖促進物質について．日本陸水学会第43回大会，奈良．(53.7)
7. 矢木修身・須藤隆一：*Microcystis* による水の華の発生および消滅に関する研究(第2報) — 霞ヶ浦に発生する *Microcystis* の培養について．日本醗酵工学会大会，大阪．(53.11)
8. 岡田光正・須藤隆一・合葉修一：*Microcystis* による水の華の発生および消滅に関する研究(第3報) — *Microcystis* のリン吸収と増殖．日本醗酵工学会大会，大阪．(53.11)
9. 岡田光正・須藤隆一・合葉修一：*Microcystis* による水の華の発生および消滅に関する研究(第4報) — *Microcystis* の窒素吸収と増殖．日本醗酵工学会大会，大阪．(53.11)
10. 岡田光正・矢木修身・須藤隆一・関根敏朗・合葉修一：*Microcystis* による水の華の発生および消滅に関する研究(第5報) — リン制限下における *Microcystis* の連続培養．日本醗酵工学会大会，大阪．(53.11)
11. 矢木修身・須藤隆一：*Microcystis* の増殖特性．日本陸水学会第44回大会，仙台．(54.5)
12. 須藤隆一：霞ヶ浦における水の華の発生と消滅．日本陸水学会第44回大会，仙台．(54.5)
13. 細見正明・福島武彦：水の華形成期における *Microcystis* の動態 — 隔離水塊実験(現場マイクロコズム法) — ．土木学会第34回年次学術講演会，福岡(54.10)
14. 須藤隆一・矢木修身・岡田光正・細見正明・内藤敦子・熊谷裕子・土屋重和：*Microcystis* による水の華の発生および消滅に関する研究(第6報) — 霞ヶ浦における *Microcystis* の消長 — ．日本醗酵工学会大会，大阪．(54.11)

15. 細見正明・矢木修身・岡田光正・相崎守弘・後藤考秀・須藤隆一：*Microcystis* による水の華の発生と消滅に関する研究（第7報）— 現場マイクロコズム実験．日本醗酵工学会大会，大阪．（54.11）
16. 矢木修身・萩原富司・岡田光正・寺藺克博・須藤隆一：*Microcystis* による水の華の発生と消滅に関する研究（第8報）— 霞ヶ浦から分離した2種の*Microcystis*の増殖特性．日本醗酵工学会大会，大阪．（54.11）
17. 岡田光正・矢木修身・須藤隆一・合葉修一：*Microcystis* による水の華の発生と消滅に関する研究（第9報）— *Microcystis*の異常発生のシミュレーション．日本醗酵工学会大会，大阪．（54.11）
18. 岡田光正・須藤隆一・合葉修一：*Microcystis*の浮上・沈降のシミュレーション．第14回日本水質汚濁研究会年次学術講演会，東京．（55.2）
19. 高村義親・野村和輝・萩原富司・平松 昭・松田智明・矢木修身：霞ヶ浦に発生するアオコの物質組成と形態ならびに微細構造について．日本農芸化学会大会，福岡．（55.4）
20. 矢木修身・須藤隆一・萩原富司・高村義親：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）
21. 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）
22. Okada, Mitsumasa, Shuichi Aiba and Ryuichi Sudo: Simulation on Emergence and/or Disappearance of Water Bloom of *Microcystis aeruginosa* in a Eutrophic Lake. The XX1st Congress of International Association of Theoretical and Applied Limnology, Kyoto. (55.8)
23. 岡田光正・寺藺克博・須藤隆一：マイクロコズムを用いた藍藻類の大量培養．第17回日本水処理生物学会，丹沢．（55.10）

（印刷）

1. 岡田光正・須藤隆一（1978）：AGPをめぐる諸問題．用水と廃水，20，5-19
2. Sudo, Ryuichi and Mitsumasa Okada (1979): The Contribution of Sediment to Lake Eutrophication as Determined by Algal Assay. EPA-600/3-79-102, 161-179, Sep.
3. 須藤隆一（1979）：水域の富栄養化とその防止対策．発酵と工業，37，41-47．
4. 須藤隆一（1979）：富栄養化とその防止対策．日本機械学会誌，82，1052-1057．
5. 矢木修身・岡田光正・須藤隆一（1979）：水の華および赤潮生物の培養について．国立公害研究所研究報告，第6号，223-229．
6. 岡田光正・須藤隆一（1979）：*Microcystis*の栄養塩吸収と増殖特性について．国立公害研究所研究報告，第6号，293-302．

- 7 Okada, Mitsumasa, Ryuichi Sudo (1980): Microcosm System Study of Algal Bloom Formation. J. WPCF, 52, 1029 - 1034.
8. 須藤隆一 (1980): 霞ヶ浦における水の華に関する研究. 陸水学雑誌, 41, 124 ~ 131.
9. 岡田光正 (1980): アオコ (*Microcystis*) の浮上・沈降とその増殖について. 環境技術, 9, 627 - 629.
10. 国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室編(1980): *Microcystis aeruginosa* (アオコ) による水の華の生成, その発生防止のための基礎的研究. 陸水環境研究室研究資料 FRL / 80-1, 114 p.
11. 岡田光正・須藤隆一 (1980): 藻類増殖とリン. 用水と廃水, 891 ~ 906.
12. 須藤隆一・岡田光正 (1980): アオコによる水の華の生成. 日本河川水質年鑑, 817 - 828.

1.

Microcystis の純粋分離

矢木修身¹・須藤隆一¹

Isolation of *Microcystis*

Osami YAGI¹ and Ryuichi SUDO¹

Abstract

Three strains of *Microcystis*, K-3, K-4 and K-5 were isolated from the algal bloom in Lake Kasumigaura. These strains formed gelatinous sheath. From the form of colonies, K-3 and K-4 strains were identified as *Microcystis aeruginosa* and K-5 strain was identified as *Microcystis flos-aquae*.

1. はじめに

藻類の中でもとりわけ藍藻類は、一般に細胞外に多量の粘質物を出した寒天平板培地上で増殖しないものが多いため、その純粋分離が困難なものが多い^{1)~3)}。しかしながら、藍藻体の保存ならびにその性質を調べる上で、純粋分離株を得ることは大変重要なことである。

現在までに行われている純粋化の方法としては、希釈法、抗生物質添加法、紫外線およびコバルト 60 照射法などが用いられている⁴⁾。さらに、マイクロピペットを用いて洗浄する方法、マイクロマニピュレーターを利用する方法、運動性を利用する方法、フレンチプレスを利用する方法、化学薬剤で処理する方法、熱で処理する方法などがある。菌糸状の藍藻では菌糸を機械的に分解後、マイクロピペット洗浄法を利用した小川らの方法もある。

Microcystis の純粋分離株はすでに報告されているが、そのほとんどが純粋化により群体形成能を失ってしまっている^{5)~8)}。そこで本実験では、霞ヶ浦より群体を形成する *Microcystis* の単藻化ならびに無菌化の検討を行った。

2. *Microcystis* の分離方法

2.1 単藻化

水の華の発生している霞ヶ浦の湖水より *Microcystis* の分離を行った。すなわち試験管に表 1 に示した BS 培地を 10ml 添加し、これに水の華の発生している霞ヶ浦の湖水 0.1ml を加え、光を照射して静置集積培養を行った。培養 10 日後、*Microcystis* の増殖の認められたものについて無菌水で希釈し寒天様被膜で包まれた 2 ~ 10 個程度の小さな群体を、キャピラリーを用いて顕微鏡下で分離し、培養を行った。培養 2 週間ごとに同様の操作を 3 回くり返した。培養条件は 500 ~ 2,000 lx とし、温度は 20 ~ 30 °C で行った。

表 1 培地組織
Table 1 Composition of Media

Components	Media	
	BS	M-11
NaNO ₃	500 mg	100 mg
K ₂ HPO ₄	40	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	80	75
CaCl ₂ ·2H ₂ O	40	40
Na ₂ SiO ₃	60	
Na ₂ CO ₃	20	20
Fe-citrate	6	6
Citrate	6	
Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	1	1
Deionized water	1 L	1 L

2.2 無菌化

2.1 で単藻化した *Microcystis aeruginosa* K-3 を用いて、洗浄法、紫外線照射法、抗生物質添加法による無菌化を試みた。

2.2.1 洗浄法

M. aeruginosa K-3 を表 1 に示した M-11 培地で、30 °C、2,000 lx で 1 週間培養した培養液 10 ml を超音波破碎器を用いて 50 W、2 分間処理し、群体を 1 個 1 個の細胞にする。この液を無菌水で適当に希釈し、その 0.05 ml を滅菌したスライドガラスにとり、顕微鏡下でマイクロピペットを用いて 1 細胞を採取する。これを 0.2 ml の無菌水にけん濁した後、マイクロピペットを用いて再び採取する。この操作を 5 回くり返した後、M-11 培地に植種し、30 °C、1,000 lx の条

件下で培養を行う。約3週間後に肉眼で確認できる程度に増殖が認められた群体を顕微鏡で観察し、細菌の存在の有無を調べた。

2.2.2 紫外線照射法

単藻となった *M. aeruginosa* K-3 を M-11 培地で、30℃、2,000lx、1週間培養した培養液を、50W、2分間超音波処理した後、シャーレに移す。このシャーレを10Wの紫外線ランプ下10cmの位置に置き1分ごとにその0.1mlを採取し、これをM-11培地に接種し、30℃、1,000lxの条件で培養を行った。一定期間培養した後、顕微鏡による細菌の存在の有無を調べた。

2.2.3 抗生物質添加法

M-11培地に、ペニシリンGを0.005~0.02U/mlになるように、またストレプトマイシンの場合は1~100µg/l濃度になるよう添加し、これに *M. aeruginosa* K-3 を接種し、30℃、1,000lxの条件で培養を行い、1週間ごとに *Microcystis* の増殖の有無と細菌の存在の有無を調べた。

3. 結果および考察

群体を形成する3株の *Microcystis*, K-3, K-4, K-5 の単藻化に成功した。K-3, K-4, K-5 株顕微鏡写真を図1、図2、図3に示した。

図1に示したようにK-3株は、細胞の直径が6~7µm、ガス飽(gas vacuole)を有し寒天様被膜(gelatinous sheath)が明瞭なことから、廣瀬ら⁹⁾の分類に基づいて *M. aeruginosa* と同定した。霞ヶ浦で観察されるアオコはこの種の *Microcystis* が優占していることが多い。

K-4株を図2に示したが、この株も細胞の直径が6~7µm、ガス飽を有し、寒天様被膜が明瞭であることはK-3株と同様であるが、常に群体がひも状を呈する特徴を有し、このひもの長さは時には数cmに達することが認められた。以上の結果からK-4株も *M. aeruginosa* に属するものと考えられる。しかしながらこの株は、霞ヶ浦では出現頻度の低い種であった。

K-5株は図3に示したように直径が4µmとやや小さく、ガス飽は有しているが寒天様被膜があまり明瞭でないことから、*M. flos-aquae* と考えられる。この株は霞ヶ浦において50%以上の優占率を示すことがしばしば認められる。

以上分離した3株は群体を形成し、いずれも藻類的には純粋になっているが、細菌が若干共存しており無菌にはなっていない。そこで次にK-3株を用いて無菌化を試みた。

2.2.1で示した洗浄法で無菌化を実施し、増殖して群体を形成したものを顕微鏡観察した結果、細菌数が著しく減少した藻体を得られたが、無菌化には至らなかった。現在、洗浄法による無菌化を継続している。

2.2.2で示した紫外線照射法による無菌化の結果を表2に示した。5分間の照射で、細菌数は

表 2 · *Microcystis* の増殖に及ぼす紫外線照射の影響

Table 2 Effect of UV Irradiation on the Growth of *Microcystis*

Microorganisms	UV irradiation time (min)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Microcystis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bacteria	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+: well growth, +; growth, -; no growth

著しく減少したが依然として生存していた。8分間の照射では細菌はほとんど死滅したが、*Microcystis* の増殖がわずかながら認められた。しかしながらこの条件下で処理した藻体を新たな培地で培養したが、増殖能が著しく低下しており、植継いで保存させることはできなかった。細菌と *Microcystis* の紫外線耐性能はほぼ同程度であり、紫外線照射法のみで無菌化することは困難と思われた。

2.2.3 で示した抗生物質処理による無菌化の結果を表3に示した。K-3 株は非常に低濃度のペニシリンGにより増殖が阻害された。一方ストレプトマイシンの場合は、50 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で細菌および *Microcystis* の増殖がともに阻害された。抗生物質に対する挙動は細菌と *Microcystis* とではかなり相違していた。本法によって、細菌の著しく減少した藻体を得ることはできたが、無菌の藻体を得ることはできなかった。

表 3 *Microcystis* の増殖に及ぼす抗生物質の影響

Table 3 Effect of Antibiotics on the Growth of *Microcystis*

Antibiotics	Concentration	<i>Microcystis</i>	Bacteria
Penicillin G	0.0005 U/ml	+	+
	0.001	+	+
	0.01	-	+
	0.02	-	+
Streptomycin	1 $\mu\text{g}/\text{l}$	+	+
	10	+	+
	50	-	-
	100	-	-

+: well growth, +; growth, -; no growth

4. まとめ

霞ヶ浦の湖水から、群体を形成する3種の *Microcystis* を分離した。この3種のうち、最も霞ヶ浦で出現頻度の高い *M. aeruginosa* K-3 を用いて洗浄法、紫外線照射法、抗生物質添加法によ



図 1 霞ヶ浦から分離した *Microcystis*

Fig. 1 *Microcystis aeruginosa* K-3 isolated from Lake Kasumigaura. $\times 300$

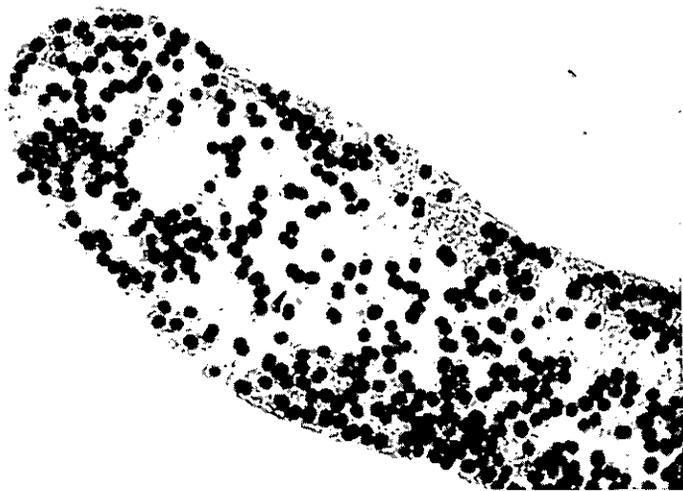


図 2 霞ヶ浦から分離した *Microcystis*

Fig. 2 *Microcystis aeruginosa* K-4 isolated from Lake Kasumigaura. $\times 300$

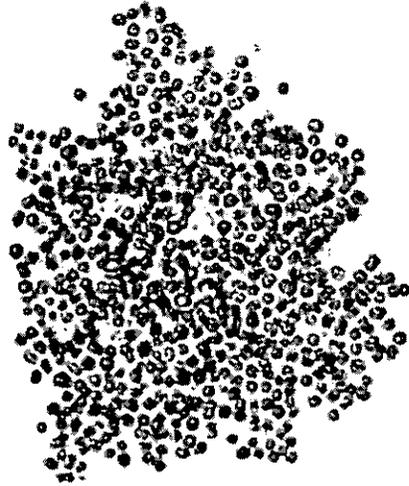


図 3 霞ヶ浦から分離した *Microcystis*

Fig. 3 *Microcystis flos-aquae* K-5 isolated from Lake Kasumigaura. $\times 300$

る無菌化を試み、細菌のほとんど共存しない藻体を得ることはできたが、無菌の藻体を得るには至らなかった。

引 用 文 献

- 1) 渡辺 篤(1973):藻類実験法. 南江堂, 455 p.
- 2) 西澤一俊(1979):藻類実験法. 共立出版, 754 p.
- 3) Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel and C. Bazire (1971): Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae. *Bac. Rev.*, **35**, 171 – 207.
- 4) Kraus, M. P. (1966): Preparation of Pure Blue-Green Algae. *Nature*, **211**, July 16., 310.
- 5) Zehnder, A. and P. R. Gorham (1960): Factors Influencing the Growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Can. J. Microbiol.*, **6**, 645 – 660.
- 6) Lange, W. (1970): Cyanophyta-Bacteria Systems; Effects of Added Carbon Compounds or Phosphate on Algal Growth at Low Nutrient Concentrations. *J. Phycol.*, **6**, 230 – 234.
- 7) Scott, W. E. (1974): The Isolation of *Microcystis*. *South African J. of Science*, **70**, 197.
- 8) Terunobu Ichimura, Shin Watanabe (1977): An Axenic Clone of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin from Lake Kasumigaura. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, **25**, 177 – 181.
- 9) 廣瀬弘幸ら(1977):日本淡水藻図鑑. 内田老鶴圃新社.

2. 霞ヶ浦に発生する *Microcystis* と純粋培養した
Microcystis aeruginosa の形態および微細構造

長南信雄¹・松田智明¹・矢木修身²・高村義親¹

The Morphological and Fine Structure of *Microcystis* in Lake Kasumigaura
as Compared with *Microcystis aeruginosa* in the Pure Culture.

Nobuo CHONAN¹, Toshiaki MATSUDA¹, Osami YAGI² and Yoshichika TAKAMURA¹

Abstract

The blue-green algae, *Microcystis aeruginosa*, which are so-called the "Aoko", in Lake Kasumigaura were observed by light and electron microscopes. The floating colonies were small in size, irregular in shape and show an indistinct margin of the colonial mucilage. The cells of floating colonies measured 2.8 μ m in average diameter and possess the gas vacuoles occupying 40 per cent of the cell volume. The submerged colonies were large in size and show a distinct margin of the colonial mucilage. The cells of submerged colonies measured 4.2 μ m in average diameter and were lacking in gas vacuole, but contained the filamentous bodies in the nucleoplasmic regions. The cells of both floating and submerged colonies had the photosynthetic thylakoids, polyheadral bodies, polyphosphate bodies and lipid globules.

The size and shape of colonies, and the fine structure of gas vacuoles of *M. aeruginosa* in the pure culture were similar to the floating "Aoko" in Lake Kasumigaura. However, the cells of *M. aeruginosa* were larger in diameter and had more photosynthetic thylakoids than the cells of floating "Aoko" in Lake Kasumigaura.

1. はじめに

霞ヶ浦では富栄養化にともないアオコが大量に発生し、魚介類のへい死や水道水の異臭味の原因となっている。アオコは藍藻の一種で、*Microcystis aeruginosa* が最も普通にみられる種であるが、霞ヶ浦のアオコについては、その種構成や形態学的研究が少ない。最近、矢木ら¹⁾は霞ヶ浦のアオコを分離培養して2株の *M. aeruginosa* と1株の *M. flos-aquae* を分離することに

1. 茨城大学農学部 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町

Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki, 300-03, Japan.

2. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

成功した。一方、岡田ら²⁾はアオコの発生機構を解明するため *M. aeruginosa* を単藻培養して、その栄養塩吸収と増殖特性などを調べている。

著者らは霞ヶ浦における水質とアオコ発生の関係を明らかにするため、湖水および藻体の化学分析と形態学的観察の両面から研究を進めているが^{3,4)}、本研究は霞ヶ浦に発生したアオコを光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察し、その結果を *M. aeruginosa* 培養株と比較したものである。

2. 材料および方法

霞ヶ浦のアオコを1977年と1978年の2年間にわたって採取した。1977年は9月中旬に1回だけ採取したが、1978年には6月下旬から11月下旬にかけて4回にわたって採取し、アオコ発生の最盛期にあたる9月26日には湖の4地点(三ッ又、牛渡、舟子、石田)で採取した。アオコ発生量の多い時期にはプランクトンネットを用いて採取したが、発生初期にあたる6月30日にはこれをさらに東洋汙紙Na2で濾過し回収した。採取したアオコをくり返し浮遊洗浄してから7,500rpm、15分で遠心分離を行ない、浮上藻体と沈降藻体に分けた。この両者についてそれぞれ光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行なった。

電子顕微鏡で観察するため、アオコを4%のグルタルアルデヒドで2時間固定したのち、寒天に封入して細切し、さらに1.5%のオスミウム酸で2時間30分固定した。固定終了後は材料を0.1Mのカコジル酸ナトリウム緩衝液で洗い、アルコールシリーズで脱水してスパー樹脂に包埋し、超薄切片とした。切片をウラニウムと鉛で染色してJEM-T7で観察した。

M. aeruginosa の培養株は霞ヶ浦から分離した *M. aeruginosa* K-3であり、これをM-11培地を用いて、30℃、2,000lxの条件下で2週間培養し、対数増殖期末期のものを前期と同じ方法で観察した。

3. 観察結果および考察

3.1 霞ヶ浦のアオコの形態と微細構造

(1) 群体の形態

浮上性のアオコは沈降性アオコに較べて量的に多いことから、霞ヶ浦では浮上性アオコが主体をなしているものとみられる。また、アオコ発生初期を除けば、時期別および地点別のアオコの形態的差異はみられないが、浮上性アオコと沈降性アオコの間には明瞭な形態的差異が認められた。光学顕微鏡によって普通の方法で観察した結果によると、図1に示したように浮上性アオコは緑色がうすく黄緑色を呈し、大型の不定形な群体を形成し、群体周囲の寒天様被膜は明瞭でない。しかし、沈降性アオコは濃緑色で小型な群体が多く、群体周囲にはきわめて明瞭な寒天様被膜を有し、群体の形は球形のものから分枝をもつ複雑な形のものなど多様である。

(2) 細胞の大きさと微細構造

浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞の電顕写真は図3および図5に示されている。細胞の形は両者ともほぼ球形であるが、細胞の直径は浮上性アオコよりも沈降性アオコの方が大きい。細胞の中央付近を通る断面で直径を測定した結果(表1)によると、浮上性アオコの平均は2.8 μ mで最大のものでも4 μ mを越えるものはないが、沈降性アオコは平均4.2 μ mで最大5.6 μ mのものまでみられた。

表 1 霞ヶ浦のアオコと *M. aeruginosa* の細胞の大きさと微細構造
Table 1 The size and fine structure of the cells of *M. aeruginosa* in Lake Kasumigaura and *M. aeruginosa* in pure culture.

	Cell diameter* (μ m)	Gas vacuoles (volume %)	Number of thylakoids**	Filamentous bodies
Floating <i>Microcystis</i> in Lake Kasumigaura	2.8	+ (40)	5	-
Submerged <i>Microcystis</i> in Lake Kasumigaura	4.2	-	5	+
<i>M. aeruginosa</i> in the pure culture	4.3	+ (45)	10	-

* Measured by the electron micrographs of cell sections.

** Maximum number of thylakoids arranged in parallel.

浮上性アオコと沈降性アオコの間で最も明瞭な差異がみられたのはガス胞(gv)^{注)}である。浮上性アオコの細胞では体積の40%がガス胞によって占められているが、沈降性アオコの細胞にはガス胞がみられない。浮上性アオコ細胞のガス胞は円筒状のユニットが数本から100本以上も結合した構造をもち、円筒状ユニットの直径は75~90nm、長さは250~750nmで、円筒の末端部は円錐形になっている。この測定結果はBowenら⁵⁾が数種の藍藻細胞で測定した結果とはほぼ一致し、Jostら⁶⁾が *M. aeruginosa* で測定した値に近いものである。ガス胞は細胞の中心部よりも周辺部に位置することが多く、大小さまざまなガス胞はチラコイド(t)によって仕切られたようになっている。

図5に示したように、沈降性アオコの細胞周辺部には原形質濃度の薄い部分があり、その中には長さが約120nmの微細な繊維状構造体(f)がみられる。ガス胞が破壊された場合にも、その破壊された膜が繊維状構造を示すことから⁵⁾、沈降性アオコ細胞の繊維状構造体もガス胞の破壊産物である可能性も考えられる。しかし、沈降性アオコ細胞には破壊されずに残ったガス胞が全く認められないので、繊維状構造体はガス胞の破壊産物ではなく、核質部位のDNA系であることも考えられる^{8), 9)}。

チラコイドは浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞に存在し、細胞中心部よりも周辺部に多い傾向がみられる。細胞周辺の特定部位には数本のチラコイドが集中していることがあるが、この

注) 偽空胞(pseudovacuoie)と同じものである。最近では gas vacuole の用語が使われているので(Walsby, 1972)、こゝでは"ガス胞"と訳すことにする。

部分ではチラコイド膜と原形質膜が結合しているものとみられる。チラコイドの配列方向は規則性がみられないが、局部的に平行に配列する場合でも5本以内で、浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞間にチラコイドの明瞭な量的差異はみられない。

(3) 細胞内顆粒

浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞内には大きさや形および電子密度の異なる数種類の顆粒が観察される。直径200~500nmの大型顆粒には電子密度の高い顆粒と低い顆粒の2種類がみられる。電子密度の高い顆粒は多面体物体 (polyhedral body, pb) と推定され、電子密度の低い顆粒はしばしば顆粒中央が電子線で分解されて電子透過性を示すことから、ポリホスフェート物体 (polyphosphate body, p) と推定される。このほかに電子密度の高い球形の小顆粒もみられるが、これは脂質小粒 (lipid globule, l) で高等植物の葉緑体に存在するプラストグロビュール (plastoglobule) と同じように脂質やカロチノイドを含むと考えられている⁹⁾。これら顆粒の含量は個体差が大きく、浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞間の差異は明瞭でない。なお、藍藻細胞には一般に膜状の内部構造をもつシアノフィシン顆粒が存在するとされているが、霞ヶ浦のアオコ細胞ではこのような顆粒はきわめて少ない。しかし、シアノフィシン顆粒の内部構造は固定条件の影響を強く受けるのでさらに観察する必要がある。

(4) 細胞分裂

図4に示したように、アオコ細胞はガス胞やチラコイドなどを持ったままの状態ですべて分裂する。分裂細胞は細長い形になり、その長軸中央部附近で細胞壁 (cw) が陥入し、くびれるようにして大きさと構造のほぼ等しい2つの細胞に分裂する。そして分裂中の細胞と非分裂細胞との間には細胞内の微細構造に明瞭な差異がみられない。浮上性アオコは比較的高い頻度で細胞分裂像がみられたので、分裂像と非分裂像で細胞直径を比較し、分裂による細胞直径の変化を検討した結果分裂細胞は非分裂細胞よりわずかに0.2 μm しか小さくなかったことから、細胞直径に及ぼす分裂の影響は小さいものとみられる。

(5) アオコ発生初期の細胞

アオコ発生初期の6月30日に採取した藻体中には図6に示すような細胞が観察された。この細胞は長径4.5~5.0 μm 、短径約3 μm の楕円体で、著しく厚い電子透明な物質で包まれている。細胞内には数層に積み重なったチラコイドと脂質小粒がみられる。そして、チラコイドに囲まれた部分は葉緑体のデンプン粒に類似した構造を示すことから、一種の貯蔵炭水化物と考えられる。

この細胞は休眠孢子の一種と推定されるが、これがアオコのものであるかそれとも他の単細胞藻類のものかは明らかでない。

3.2 霞ヶ浦のアオコと *M. aeruginosa* 培養株の比較

M. aeruginosa 培養株を光学顕微鏡により観察した結果によると、群体の形は不定形で、藻体の

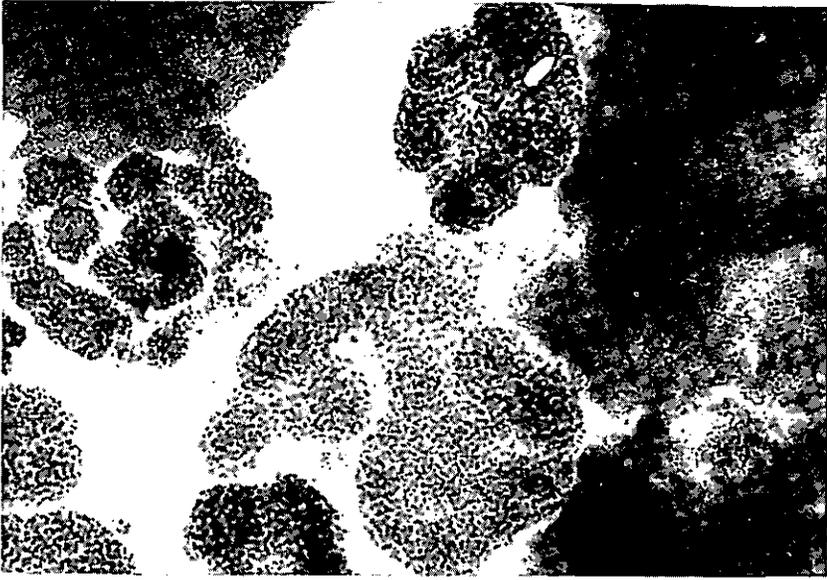


図 1 霞ヶ浦の浮上性アオコ群体 × 130
Fig. 1 The floating colonies of *Microcystis* in Lake Kasumigaura. × 130

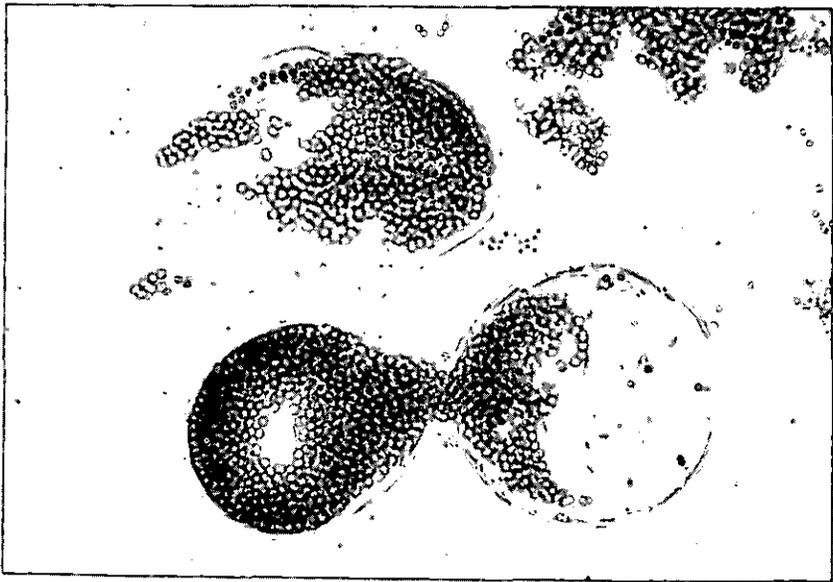


図 2 霞ヶ浦の沈降性アオコ群体 × 180
Fig. 2 The submerged colonies of *Microcystis* in Lake Kasumigaura. × 180

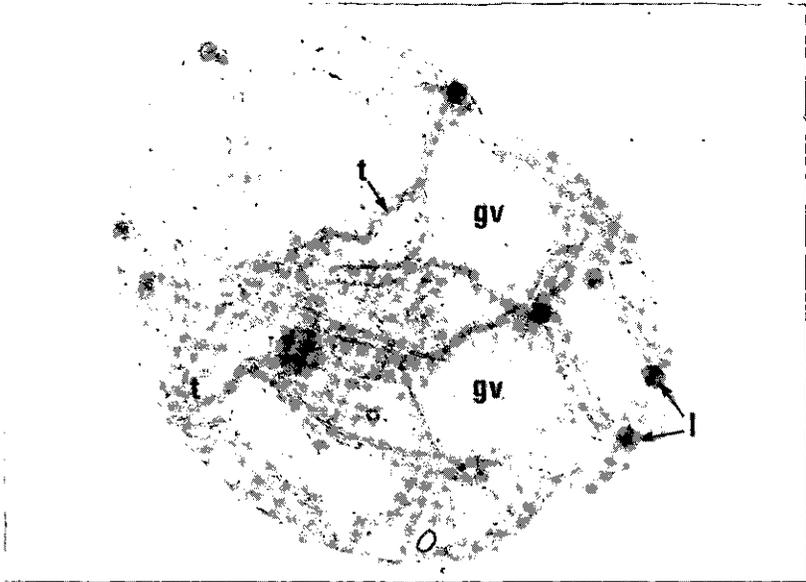


図 3 霞ヶ浦の浮上性アオコ細胞 × 26000

gv : ガス泡, l : 脂質小粒, t : チラコイド

Fig. 3 A cell of the floating *Microcystis* in Lake Kasumigaura. × 26,000

gv: gas vacuole, l: lipid globule, t: thylakoid.

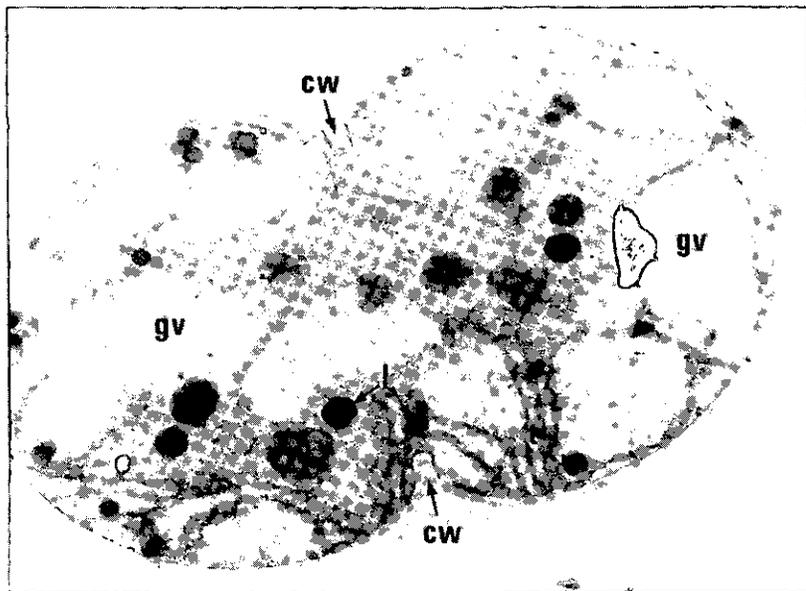


図 4 霞ヶ浦の浮上性アオコの分裂細胞 × 28000

cw : 細胞壁, p : ポリホスフェート物体

Fig. 4 A dividing cell of the floating *Microcystis* in Lake Kasumigaura. × 28,000

cw: cell wall, p: polyphosphate body.

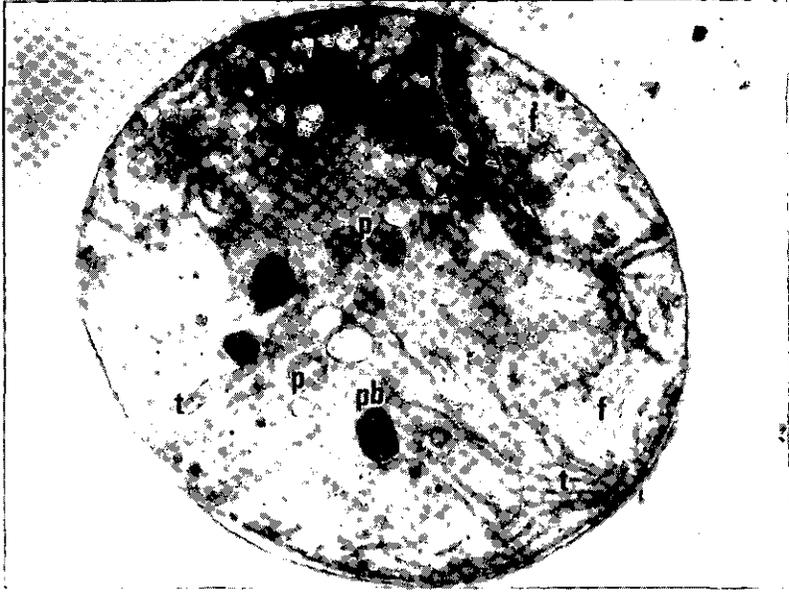


図 5 霞ヶ浦の沈降性アオコ細胞 × 17,000
f : 繊維状構造体, pb : 多面体物体

Fig. 5 A cell of the submerged *Microcystis* in Lake Kasumigaura. × 17,000
f: filamentous body, pb: polyheadral body.

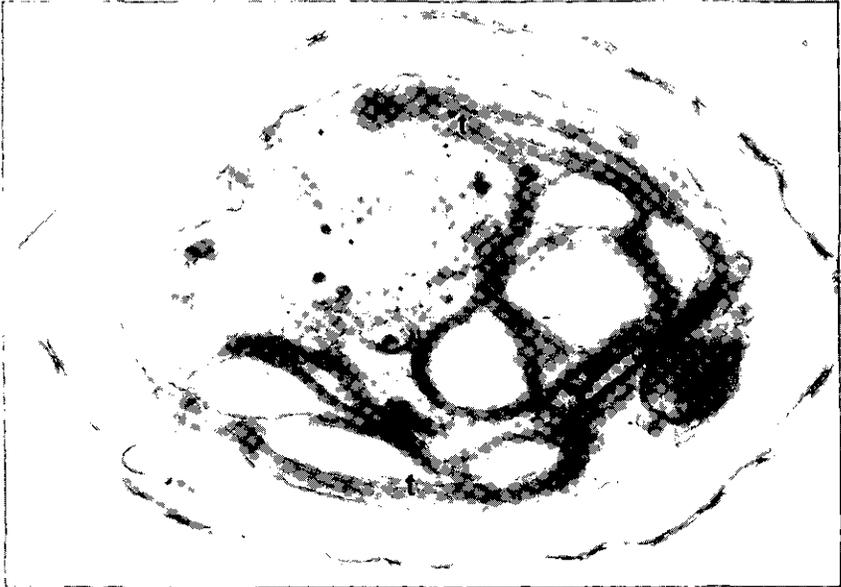


図 6 霞ヶ浦のアオコ発生初期にみられた細胞 × 23,000

Fig. 6 A cell sampled at the early growth stage of water bloom in Lake Kasumigaura.
× 23,000

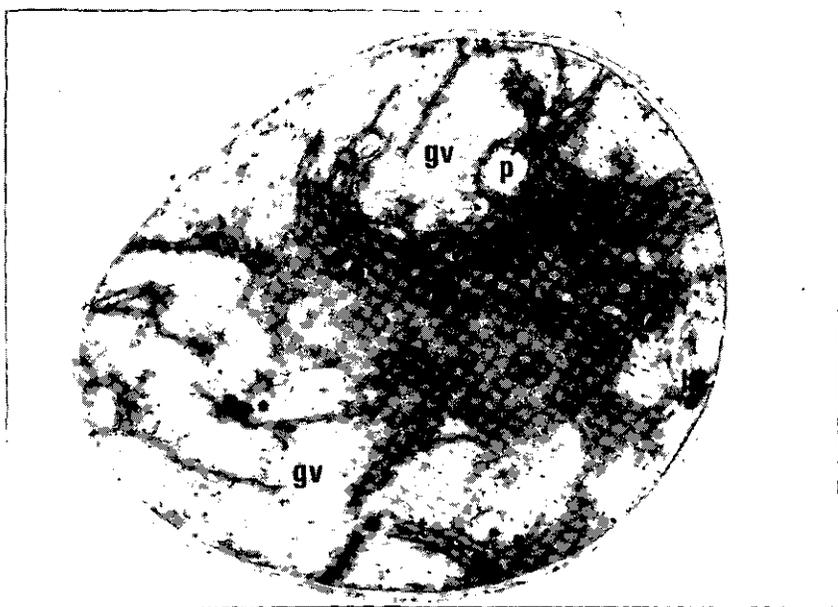


図 7 *M. aeruginosa* の細胞 × 17,000

Fig. 7 A cell of *M. aeruginosa* in the pure culture. × 17,000

大部分を占める大型群体では寒天様被膜が不明瞭であるが、少数の小型群体では寒天様被膜が観察される。これを霞ヶ浦のアオコ群体と比較すると、培養株の大型群体は浮上性アオコと類似している。

表Iに示したように培養株の細胞は球形で、細胞断面の電顕像により測定した細胞直径は3.5~4.9 μm の範囲にあり、平均直径は4.3 μm である。この測定結果は矢木ら¹⁾が分離培養株について光学顕微鏡により測定した細胞直径6~7 μm よりも小さな値になっているが、これは測定方法の違いによるものと考えられる。すなわち、本研究のように細胞断面によって測定する場合は、細胞中央を通る断面で測定した値が細胞直径を表わすが、実際には細胞中央からはなれた断面で測定されることが多いので直径が小さくなる傾向がある。そのほか電顕観察のための脱水および樹脂包埋の過程で、細胞がいくぶん収縮するために、電顕像により測定した値は光学顕微鏡で測定した値よりも小さな値になるものと考えられる。細胞直径について培養株と霞ヶ浦のアオコを比較すると、浮上性アオコの細胞直径は培養株より約1.5 μm 小さくなっているが、沈降性アオコと培養株はほぼ同じ値を示している。

培養株の細胞は体積の45%がガス胞によって占められ、その微細構造も霞ヶ浦の浮上性アオコ細胞とよく類似している。しかし、チラコイドの発達程度については両者の間に明瞭な差がみられ、平行に配列した部分のチラコイド数によって示されるように、培養株は明らかに浮上性アオコよりもチラコイドが発達している。藍藻の一種 *Chlorogloea fritshii* を光量の異なる条件で培養した結果によると、高い光量(700 ft-C)よりも低い光量(20~60 ft-C)でチラコイドがより発達している⁹⁾。本研究で観察した培養株はフィールドよりも低い光量で培養されたためにチラコイドが発達したことも考えられる。

培養株の細胞内には図7に示されるように電子密度の高い脂質小粒と電子密度の低い大型のポリホスフェート物体が含まれている。しかし、浮上性アオコでみられた多面体物体は培養株では認められない。細胞内の各種顆粒についても培地組成やその他の培養条件により変動することが考えられる。

4. まとめ

霞ヶ浦のアオコの形態と微細構造を光学顕微鏡と電子顕微鏡によって観察した。浮上性アオコは大型で不定形の群体を形成し、群体周囲の寒天様被膜は不明瞭である。浮上性アオコの細胞は平均直径2.8 μm で、細菌体積の40%はガス胞によって占められている。沈降性アオコは小型の群体を形成し、寒天様被膜が明瞭である。沈降性アオコの細胞は平均直径4.2 μm でガス胞をもたないが、細胞内の核質部位に繊維状構造体が見られる。浮上性アオコと沈降性アオコの両細胞内にはチラコイドのほかにも多面体物体とポリホスフェート物体および脂質小粒が含まれている。

M. aeruginosa 培養株の形態と微細構造を霞ヶ浦のアオコと比較した。その結果、培養株と浮上

性アオコは、群体の大きさと形が類似し両細胞内には構造的に類似したガス胞の存在することが明らかとなった。しかし、培養株は浮上性アオコよりも細胞が大きく、チラコイドが発達している。

引用文献

- 1) 矢木修身・岡田光正・須藤隆一(1979): 水の華および赤潮生物の培養について. 国立公害研究所研究報告, 6, 223-229.
- 2) 岡田光正・須藤隆一(1979): *Microcystis* の栄養塩吸収と増殖特性について. 国立公害研究所研究報告, 6, 293-302.
- 3) 高村義親・大槻英明・阿部紀子・齊藤 悟(1979): 霞ヶ浦の窒素, リン, CODおよび有機炭素の存在形態と変動. 用水と廃水, 21, 22-28.
- 4) 高村義親・野村和輝・萩原富司・平松 昭・矢木修身(1981): 霞ヶ浦に発生するアオコと *Microcystis aeruginosa* の化学的組成. 国立公害研究所研究報告, 第25号, 31-46.
- 5) Bowen, C.C. and T.E. Jensen (1970): Blue-Green Algae: Fine Structure of Gas Vacuoles. *Science*, 147, 1460-1462.
- 6) Jost, M., D.D. Jones and P. J. Weathers (1971): Morphological Parameters and Macromolecular Organization of Gas Vacuole Membranes of *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin. *Can. J. Microbiol.*, 16, 159-164.
- 7) Walsby, A. E. (1972): Structure and Function of Gas Vacuoles. *Bacteriol. Rev.*, 36, 1-32.
- 8) Lang, N. J. (1968): The Fine Structure of Blue-Green Algae. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 15-46.

3. 霞ヶ浦に発生するアオコと *Microcystis*
aeruginosa の化学的組成について

高村義親¹・野村和輝¹・萩原富司¹・平松 昭¹
矢木修身²・須藤隆一²

Chemical Compositions of Aoko (*Microcystis*) in Lake Kasumigaura
and *Microcystis aeruginosa* in the Pure Culture

Yoshichika TAKAMURA¹, Kazuteru NOMURA¹, Tomiji HAGIWARA¹,
Akira HIRAMATSU¹, Osami YAGI² and Ryuichi SUDO²

Abstract

This study was conducted to accumulate fundamental knowledges on the chemical compositions of blue-green algae, *Microcystis*, "Aoko", in Lake Kasumigaura and *Microcystis aeruginosa* K-3 in the pure culture. Cell contents of nitrogen, phosphorus and total organic carbon in both sells were 8 to 10 mg, 0.6 to 0.8 mg and 36 to 42 mg per 100 mg dry algal cells, respectively. The contents of nitrogen, phosphorus and total organic carbon in "Aoko" were similar to pure cultured *Microcystis aeruginosa* K-3. Furthermore, contents and compositions of chlorophyll-a, pigments, fatty acids and amino acids in both cells were analyzed.

1. はじめに

夏から秋にかけて霞ヶ浦に発生する"アオコ"は *Microcystis* 属藍藻を優占種とする水の華とされてい¹⁾~²⁾。アオコは湖内で再生産される有機物負荷として湖水質を支配する主要因となっている³⁾。アオコの発生は湖水の外観を悪くし、底層水中の溶存酸素を低下させるなど著しく水質を劣化させる。養殖鯉の大量斃死、水道水の異臭などいづれもアオコの発生に原因が求められている。著者らの試算によるとアオコの現存量は土浦入り(面積:44.8 km², 水量:152.6 × 10⁶ m³)だけでも乾燥重量にして約1,000トンにのぼる⁴⁾アオコの発生をいかに制御するかという課題は

1. 茨城大学農学部農芸化学科 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町阿見

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Ibaraki University,
Ami, Ibaraki, 300-03, Japan.

2. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies,
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

富栄養化した淡水域に共通する全国的な問題になっている。しかし、*Microcystis* 属藍藻の研究はようやく緒についたばかりである。*Microcystis* 属藍藻の分類、生理、生態、細胞構造、化学的組成などいずれも研究は少なく、不明な点が多い。なかでも、微細構造と化学的組成について詳細に検討した報告はほとんどない。著者らは霞ヶ浦で採取したアオコと矢木ら⁵⁾により単藻に純化され室内培養をした *M. aeruginosa* の藻体について分析を行ない、化学的組成を明らかにした。また、長南ら⁶⁾ は著者らと同一の試料について光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡観察を行ないそれらの形態と微細構造を比較検討した。

本報では、アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体の化学的組成について主に記述し、微細構造との関係についても考察する。

2. 調査実験方法

2.1 アオコの採取ならびに純化

霞ヶ浦に発生するアオコは1978年7月29日、8月17日、9月25日、11月9日および1979年9月12日に採取した。アオコはプランクトンネット(183メッシュ)を用いて採取し実験室に持ち帰って純化を行なった。アオコはその浮上する性質を利用して浮上藻体を分取し、蒸留水に懸濁する“浮遊洗浄”を繰り返す。次に、浮上藻体を7,500 rpm 15分遠心分離を行ない、遠心管上層に浮上する藻体を集めて再び蒸留水に懸濁する。これを更に15,000 rpm 15分遠心分離を行ない浮上する藻体を葉匙ですくい取る。直ちに凍結してから、凍結乾燥を行ない、得られた乾燥藻体を分析試料とした。

2.2 *Microcystis aeruginosa* K-3 の培養

前報⁵⁾に準じ国立公害研究所で照度2,000 lx、温度30°Cで静置培養を行なった。アオコの場合と同様に浮遊洗浄を繰り返し、15,000 rpm 15分遠心分離で浮上する藻体を集め凍結乾燥を行なった。群体が大きい時は網目193 μmのナイロン布(離合社, NXX7)で濾過して集めた。

2.3 分析方法

i) クロロフィル: 試料10 mg をとり、ワットマンGF/C(47 mm)の半枚を細かく切って加え、90%冷アセトンに湿らす程度に加えて乳鉢で十分に摩砕する。これに冷アセトンを加えて、10 ml のメスシリンダーに洗い込む。液量を測定してからフタ付き遠心管に移し、15,000 rpm 15分遠心分離を行なう。その上清区分について630, 645, 663および750 nmの吸光度を測定する。全操作にわたり、できるだけ遮光し、アイスボックスを用いて低温で実験を行なった。計算は750 nmの値を引いてから次式によった。

$$\text{Chl. } a \text{ (} \mu\text{g/10mg)} = (11.64 E_{663} - 2.16 E_{645} + 0.10 E_{630}) \times \text{抽出液量 (ml)}$$

- ii) 全窒素：ケルダール法で行なった。
- iii) 全リン：アレン法により湿式灰化後、リンモリブデン酸ブルー法で行なった⁷⁾。
- iv) 全有機態炭素：ベックマン社 TOC アナライザーを用いて測定した。
- v) 炭水化物態炭素：試料 10 mg を純水 30 ml に懸濁させ、その 1 ml をとり氷冷しながらアンシロン溶液 6 ml を加えてよく振り、沸騰水中に 7 分間静置して加熱する。15 分間放冷後 620 nm の吸光度を測定した。検量線はグルコースを用いて作成し炭素量を算出した⁸⁾。
- vi) タンパク態炭素：試料 5 mg をとり、2N NaOH 5 ml を加えて一夜放置し、藻体を溶解させる。純水で正確に 50 ml に定容し、その一部をとって Lowry 法で分析した。検量線には Bovine serum albumin を用い炭素率 56.7 % として計算した。
- vii) 窒素、リンの Schneider 法による分画⁹⁾：藻体細胞内に存在する機能的に異なる各種の窒素とリンを抽出定量するために Schneider 法による分画を行なった。試料として約 50 mg の凍結乾燥アオコを用い、冷酸可溶性区分、脂質区分(脂溶性色素も含む)、核酸区分、タンパク質区分および残渣区分に分画した。
- viii) 色素：a) 脂溶性色素¹⁰⁾；藻体試料にアセトン(100%)を加えて脂溶性色素を抽出した。アセトン抽出液は窒素ガス気流中で濃縮しシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行なった。展開剤としてエーテル：ヘキサン：アセトン：エタノール(18:9:1:1)を用いた。TLC から色素のスポットをかき取り、適当な溶媒で色素を抽出し、マルチパーパススペクトロフォトメーターで全波長吸収を測定した。b) 水溶性色素¹¹⁾；試料を 0.01M リン酸バッファー(pH 6.5)に懸濁し、10KC、10分超音波破壊を行なった。次に、15,000rpm 15分遠心分離によって得られた上清を 100,000g 60分の超遠心分離にかけた。得られた上清区分について 560nm、620nm、650nm の吸光度を測定した。これらの値から藤田¹¹⁾らの方法によりフィコエリトリン、フィコシアニンおよびアロフィコシアニンの濃度を求めた。
- ix) 脂肪酸組成：試料約 20 mg に無水塩化水素メタノール 1 ml を加えて 2～3 時間還流しながら煮沸し藻体脂肪酸をメチルエステルにした。脂肪酸メチルエステルの分析は日立ガスクロマトグラフ 163 型(FID)を用い下記の条件で行なった。カラム；4 mm×2 m ガラスカラム。カラム充填剤；15% DEGS。キャリアーガス；窒素ガス。温度；160℃から 195℃まで 3℃/分の昇温法。脂肪酸メチルエステルの同定は、標準試料に C₁₀~C₁₈ の飽和偶数酸および C₁₃~C₁₇ の飽和奇数酸を用い retention time から James¹²⁾の方法で求めた。
- x) アミノ酸組成：試料 2.2~2.5 mg をパイレックス試験管に秤量し、蒸留塩酸 0.5 ml を加え、真空封管後、105° ± 1℃ で 24 時間加水分解した。分解後窒素ガスを吹きつけ 40℃ で乾固した。これをクエン酸塩バッファー(pH 2.2) 5 ml に溶解し、ガラスフィルターで濾過後、

Spackman らの方法に従って日立自動アミノ酸分析計KLA-3Bを用いて分析した。

x) 元素分析：試料 90 mg を 100 ml のビーカーにとり、濃硝酸 5 ml、過酸化水素 15 ml (5 ml ずつ 3 回) を加え、蒸発皿をかぶせてホットプレート (150 °C) 上で 2 時間加熱して灰化した。灰化後、蒸留水 50 ml を加えて定容とした。分析はプラズマ発光分光分析装置 (Model 975 Plasma Atom. Comp.) で行なった。

3. 結果および考察

3.1 アオコの窒素、リン、全有機態炭素およびクロロフィル a の含有量

土浦入り石田沖 (St. 1) でアオコの発生が顕著に認められた 1978 年 7 月から 11 月まで毎月一回アオコを採取した。6 月ならびに 12 月にも湖水中にアオコの存在は認められたが、現在量も少なくかつ群体も小さいためプランクトンネットによる採取は出来なかった。各月のアオコのクロロフィル a (Chl. a)、ケルダール窒素 (K-N)、全リン (T-P) および全有機態炭素 (TOC) の含有量を表 1 に示した。月別の変動はあまり認められなかった。また、1978 年 9 月に石田沖 (St. 1)、舟子沖 (St. 2)、牛渡沖 (St. 3) および三ツ又沖 (St. 4) の 4 地点でアオコを採取し同様に分析を行なったが、表 2 に示したように地点別の変動もほとんど認められなかった。フィールドでは増殖のステージの異なる藻細胞が混在している筈であるが、実験室における浮遊洗浄、遠心分画等の純化の過程が特定の増殖ステージ藻体を選別したためかもしれない。表に示したように C/N が平均 4 前後と小さい。このことは後述するようにアオコの TOC の 60% を越える部

表 1 アオコのクロロフィル a、窒素、リン、全有機炭素の含有量とその月別変化
Table 1 Monthly Variation of Cell Contents of Chlorophyll a, Nitrogen, Phosphorus and Total Organic Carbon in *Microcystis* (Aoko) proliferated in Lake Kasumigaura

Items	Jul.	Aug.	Sep.	Nov.	Average
Chl. a	0.59	0.54	0.59	0.50	0.56*
K-N	10.18	8.63	9.98	8.90	9.42
T-P	0.71	0.74	0.76	0.59	0.70
TOC	37.3	39.6	36.8	37.0	37.7
C/N	3.66	4.59	3.68	4.15	4.00**
N/Chl. a	17.25	15.98	16.92	17.80	16.89
P/Chl. a	1.20	1.37	1.29	1.18	1.25
C/Chl. a	63.2	73.3	62.4	74.0	67.3

* mg/100 mg dry algae.

** Arbitrary units

表 2 アオコのクロロフィル *a*, 窒素, リン, 全有機態炭素の含有量とその地点別変化

Table 2 Situational Variation of Cell Contents of Chlorophyll *a*, Nitrogen, Phosphorus and Total Organic Carbon in the *Microcystis* (Aoko)

Items	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	Average
Chl. <i>a</i>	0.59	0.50	0.55	0.66	0.59*
K-N	9.98	8.08	9.93	9.98	9.49
T-P	0.76	0.61	0.72	0.69	0.70
TOC	36.8	37.3	38.2	41.5	38.5
C/N	3.69	4.61	3.84	4.20	4.90**
N/Chl. <i>a</i>	16.29	16.16	18.05	14.97	16.53
P/Chl. <i>a</i>	1.29	1.22	1.31	1.05	1.22
C/Chl. <i>a</i>	62.3	74.6	69.5	62.9	67.3

St. 1: Tsuchiura, St. 2: Funako, St. 3: Ushiwata, St. 4: Mitsumata

* mg/100 mg dry algae.

** Arbitrary units.

分がタンパク態の炭素であることと関係している。大腸菌の C/N は 3.57 でアオコに近い値を示している¹³⁾。アオコの乾物量の約 10% が窒素, 約 1% がリンであることは注目する必要がある。すなわち, アオコは発生時に N, P を生物濃縮する固定者として働き, 分解時は N, P の放出源となりうることを示している。事実, 湖水中の年間を通じた N の動態は上述のことを反映している³⁾。

3.2 *Microcystis aeruginosa* 培養藻体の窒素, リン, 全有機態炭素およびクロロフィル *a* の含有量

表 3 に *Microcystis aeruginosa* K-3 の培養藻体の K-N, T-P, TOC および Chl. *a* 含有量をアオコの含有量と比較して示した。K-N, T-P, TOC の含有量については両者の値はよく似ている。しかし, Chl. *a* 量はアオコが 0.55 mg/100 mg-乾燥藻体に対し, *M. aeruginosa* は 0.95 mg/100 mg-乾燥藻体と多い。このことは, 長南ら⁶⁾ の電子顕微鏡による微細構造の観察結果とよく一致している。すなわち, 培養藻体では光合成装置であるチラコイド膜がアオコの約 2 倍もよく発達している。培養時の照度が 2,000 lx というフィールドにくらべて著しく弱光であることが関係している。Chl. *a* の含有量が大きいため Chl. *a* 当たりの N, P, C の比はアオコの約 1/2 の値になっている。

3.3 アオコの Shneider 法による細胞分画と窒素, リンの分布

藻体に含まれる N, P が藻体細胞内のどのような機能をもった成分に分布しているか検討した結果が表 4 である。アオコは Shneider 法により冷酸可溶性区分, 脂質区分, 核酸区分, タンパク

表 3 アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体のクロロフィル *a*, 窒素, リン, 全有機態炭素の含有量の比較

Table 3 Comparison of Cell Contents of Chlorophyll *a*, Nitrogen, Phosphorus and Total Organic Carbon in *Microcystis* (Aoko) with *M. aeruginosa*

	Aoko	"Pure" cultured <i>M. aeruginosa</i>
Chl. <i>a</i>	0.55*	0.95*
Nitrogen	9.93	8.61
Phosphorus	0.72	0.65
TOC	38.20	38.70
C/N	3.84**	4.49**
N/Chl. <i>a</i>	18.10	9.10
P/Chl. <i>a</i>	1.30	0.68
C/Chl. <i>a</i>	69.4	38.7

* mg/100 mg dry algae.

** Arbitrary units.

Aoko: *Microcystis* proliferated in Lake Kasumigaura.

表 4 アオコの藻体構成成分の分画と窒素およびリンの分布

Table 4 Cellular Distribution of Nitrogen and Phosphorus in Various Cell Fractions of *Microcystis* (Aoko)

Fractions	Nitrogen	Phosphorus
Cold-PCA soluble	0.50*(5.9%)	0.250*(40.3%)
Lipids	0.64 (7.5)	0.046 (7.4)
Nucleic acids	0.80 (9.4)	0.299 (48.1)
Protein	5.57 (65.3)	0.017 (2.7)
Residues	1.02 (11.9)	0.009 (1.5)

* mg/100 mg dry algae.

質区分および不溶性残渣区分に分画した。Nは65.3%がタンパク質区分に分布していることが示された。一方、リンは48%が核酸区分、40.3%が冷酸可溶性区分に分布していることが認められた。冷酸可溶性区分には生体高分子の素材や代謝中間体などの低分子成分が抽出されてくる区分である。冷酸可溶性区分に含まれるPの形態を見た結果が表5である。冷酸可溶性区分に含ま

れるPの49%がオルソリン酸であった。ATPやG-6-Pなどオルソリン酸を放出しやすい有機リン化合物(7分P, 15分P)は少ない。残りの31%は灰化してはじめてオルソリン酸の反応を示すリンであった。これらの結果はアオコが“luxurious”にリンをup takeし、細胞内に貯留形として蓄積している可能性を示している。長南ら⁶⁾がアオコにポリリン酸顆粒の存在することを認めていることや、岡田ら¹⁴⁾の無リン培地における*M. aeruginosa*の増殖試験の結果と一致している。しかし、冷酸可溶性リン中のオリソリン酸については、細胞内に貯留されているのではなく、細胞の外側にあるスライム層に吸着している可能性も残している。

3.4 アオコの一般成分

アオコの一般成分分析の結果を表6に示した。粗タンパクはK-Nに窒素係数6.25を乗じて求めた。粗リピドはFolchの方法¹⁵⁾で脂質を抽出し重量法で求めた値であるが、後述するような各種の脂溶性色素が含まれている。可溶性炭水化物は藻体熱水抽出物をアンスロン法で測定した値である。これらの値は細菌などの単細胞生物の値によく似ている。アオコの約6割がタンパク質

表 5 アオコの冷酸可溶性区分のリンの形態

Table 5 Chemical Forms of Phosphorus in the Cold PCA Soluble Fraction of *Microcystis* (Aoko)

Fractions	Contents	%
Orthophosphate	0.122*	48.8%
7' phosphorus	0.014	5.6
15' phosphorus	0.036	14.4
Other phosphorus	0.250	31.2

* mg/100 mg dry algae.

表 6 アオコの凍結乾燥藻体の一般成分

Table 6 Chemical Composition of *Microcystis* (Aoko)

Items	Per cent
Crude Protein	56.3%
Crude Lipids*	13.5
Soluble Carbohydrates	10.0
Crude Fiber	3.2
Ash	5.0
Water	4.3
Others	7.7

* Contained pigments.

であることは、霞ヶ浦の湖水がタンパク態炭素の多いことと関係してるとと思われる。アオコの脂質含有量はかなり多い。長南らはアオコの細胞内に脂質小粒が多く存在していることを認めているが、このことと関係があろう。表7にはアオコの成分を有機炭素の割合で示した。

表 7 アオコの全有機態炭素の形態
Table 7 Chemical Forms of Organic Carbon in *Microcystis* (Aoko)

Fractions	Contents	
Protein-C**	22.2*	60.3%
Carbohydrate-C***	4.0	10.9
Lipid & Other-C	10.6	28.8
total	36.8	100.0

* mg/100 mg dry algae.

** Lowry method.

*** Anthron method.

3.5 アオコの色素

アオコの脂溶性色素の薄層クロマトグラムを図1に示した。全部で8種の色素が分離された。Spot 1~8の吸収スペクトルを図2および図3に示した。黄色のSpot 1は β -カロチン、灰緑色のSpot 3はフェオフィチン α 、緑色の一番大きいSpotはクロロフィル α 、Spot 8はミクソキサントフィルと同定された。Spot 2, Spot 5, Spot 6, Spot 7については未同定であるがカロチノイド系の色素と推定される。

水溶性色素の吸収スペクトルを図4に示した。水溶性色素が藍藻類に特有なフィコビルン系色素であると認められた。フィコシアニン₇₀₀を1.00としたときの相対含量を計算するとアロフィコシアニン0.55, フィコエリスリン0.03であった。フィコエリスリンがほとんど含まれていない。

3.6 アオコと*M. aeruginosa*の脂肪酸組成

アオコならびに*M. aeruginosa*の全藻体の脂肪酸組成を比較検討した結果を図5および表8に示した。いずれも、5%無水塩化水素メタノールで構成脂肪酸をメチルエステルにしてから、DEGSを充填剤としたガラスカラムで昇温ガスクロマトグラフィーを行なった結果である。アオコと培養株はC_{16:0}が全構成脂肪酸の約半分をしめること、ならびにC_{16:4}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:4}などの不飽和二重結合を2個以上有するポリエン酸(多不飽和酸)の多い点は共通している。Stanierは*Microcystis*属藍藻にポリエン酸の多いことを分類学的特徴のひとつとしている¹⁶⁾。アオコは脂質含量が比較的多く、かつ構成脂肪酸として多不飽和酸がかなり多いことは注目しておく必要がある。一般に不飽和脂肪酸は過酸化物をつくりやすく、異臭や毒性のある物質を生成することが多いからである。

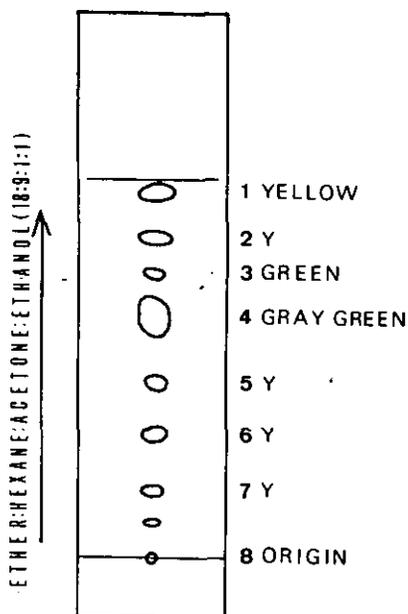


図 1 アオコの脂溶性色素のシリカゲル薄層クロマトグラフィーによる分離
 Fig. 1 TLC of Solvent Extractable Pigments of *Microcystis* (Aoko)

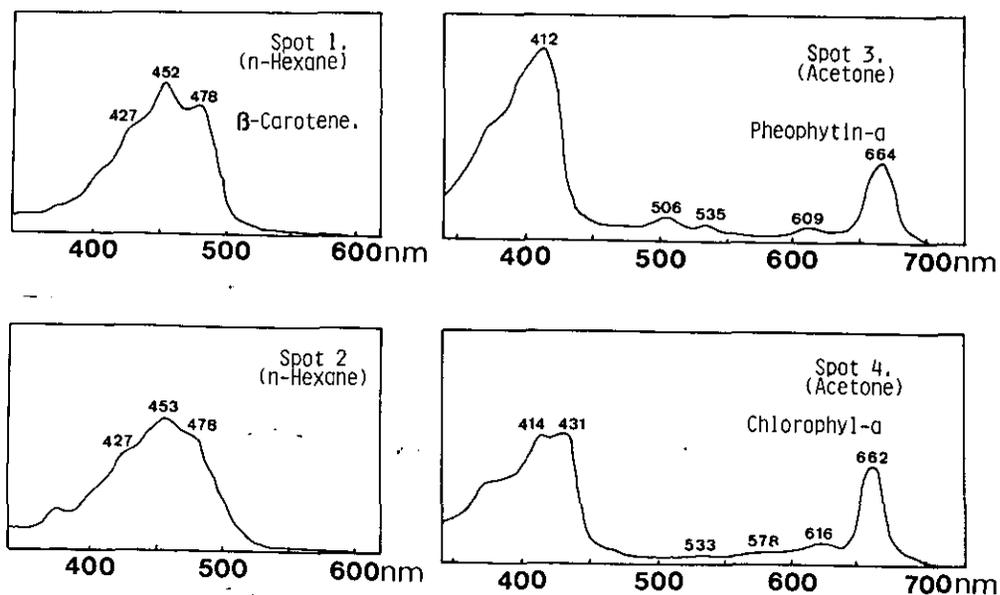


図 2 アオコの脂溶性色素の吸収スペクトル(1)
 Fig. 2 Absorption Spectrograms of Solvent Extractable Pigments of *Microcystis* (Aoko) (1)

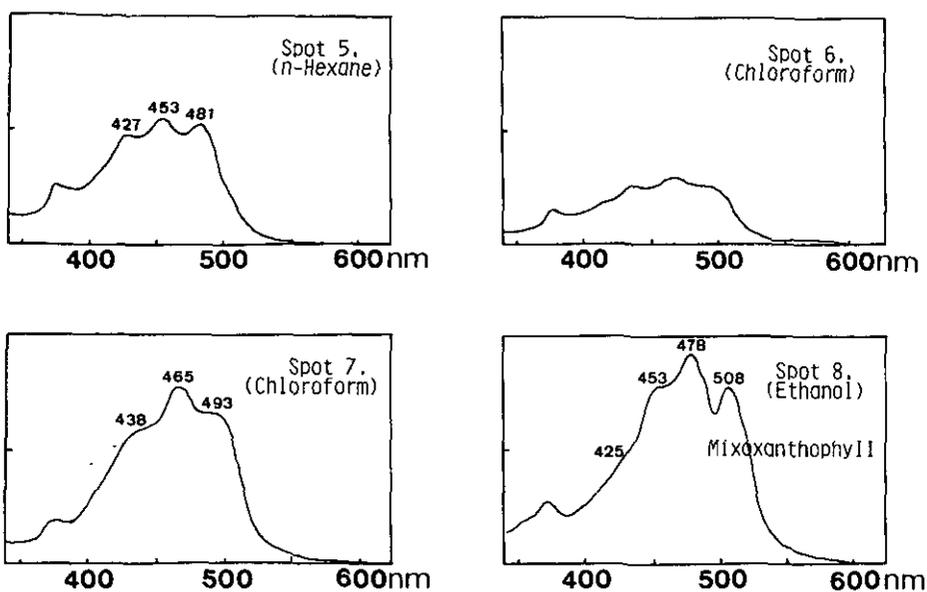


図 3 アオコの脂溶性色素の吸収スペクトル(2)

Fig. 3 Absorption Spectograms of Solvent Extractable Pigments of *Microcystis* (Aoko) (2)

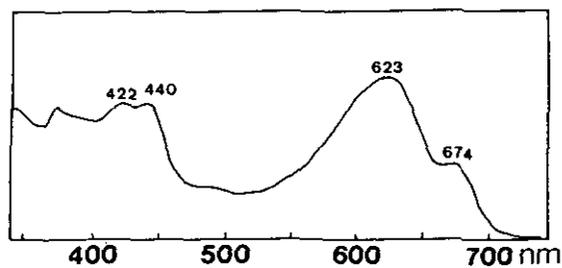


図 4 アオコの水溶性色素の吸収スペクトル

Fig. 4 Absorption Spectrum of Water Extractable Pigments of *Microcystis* (Aoko).

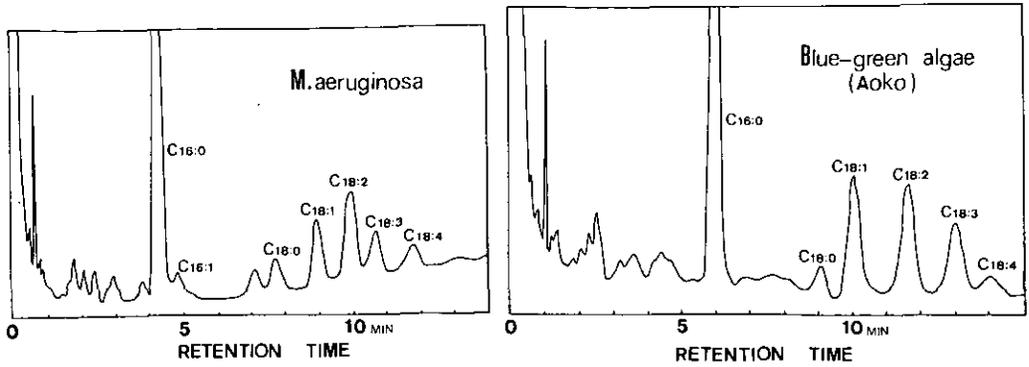


図 5 アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体の構成脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

Fig. 5 Gas Chromatogram of the Fatty Acid Methyl Esters of *Microcystis* (Aoko) and *M. aeruginosa*

表 8 アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体のアミノ酸組成

Table 8 Fatty Acid Composition of *Microcystis* (Aoko) and *M. aeruginosa*

Fatty acids	Aoko*	"Pure" cultured <i>M. aeruginosa</i>
8 : 0	3.33%	4.84%
10 : 0	0.30	1.52
10 :	tr.	0.64
12 : 0	tr.	0.23
14 : 0	1.35	0.46
14 :	1.00	1.48
16 : 0	56.20	48.99
16 : 1	1.23	tr.
16 : 2	tr.	tr.
16 : 3	tr.	tr.
16 :(4)	3.01	0.22
18 : 0	4.07	3.17
18 : 1	8.27	12.60
18 : 2	11.17	12.85
18 : 3	5.48	9.26
18 :(4)	3.94	1.58

* Aoko: *Microcystis* harvested from
Lake Kasumigaura (September, 1979)

3.7 アオコと *M. aeruginosa* のアミノ酸組成

アオコと *M. aeruginosa* の全藻体を加水分解してアミノ酸分析計で分析した結果が表9である。アオコと培養株はアミノ酸組成の点でほとんど同じである。主たるアミノ酸はグルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、アルギニン等である。リジン、メチオニンなどのアミノ酸の含量も少ない。アミノ酸組成の面からだけみるとアオコおよび *M. aeruginosa* のタンパク質は良質といえよう。*Spirulina maxima* のアミノ酸組成¹⁷⁾とも類似している。

3.8 アオコと *M. aeruginosa* の元素分析

プラズマ発生分光分析装置を用いてアオコと *M. aeruginosa* 培養株の元素分析を行なった結果を表10に示した。アオコのリンについては先に示した表3の結果とよく一致しているが、培養藻体ではやや高めの値を示した。Fe, Al, Znはアオコにくらべて培養藻体の方が10~50倍多く含まれている。この理由については不明である。Co, Ni, Cu, Crは検出限界以下 (0.01×10^{-3} mg/kg)であった。Hg, Cdについては分析出来なかった。

表 9 アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体のアミノ酸組成

Table 9 Amino Acid Compositions of *Microcystis* (Aoko) and *M. aeruginosa*

Amino acids	Aoko*	"Pure" cultured <i>M. aeruginosa</i>
Lys	5.76%	5.75%
His	1.53	1.50
Arg	7.77	7.28
Asp	11.20	11.56
Thr	5.37	5.45
Ser	5.17	5.69
Glu	15.07	14.37
Gly	4.40	4.12
Ala	6.76	6.19
Cys	1.23	4.24
Val	7.11	7.45
Met	1.62	2.63
Ile	5.67	5.44
Leu	9.99	9.65
Tyr	4.89	4.39
Phe	5.57	4.28

* Aoko: *Microcystis* collected from Lake Kasumigaura (September, 1979)

表 10 アオコと *M. aeruginosa* 培養藻体の元素分析

Table 10 Cell Contents of Some Elements in *Microcystis* (Aoko) and *M. aeruginosa*

Elements	Aoko*	"Pure" cultured <i>Microcystis aeruginosa</i>
Phosphorus	7.33 mg/g	9.56 mg/g
Potassium	6.75	5.73
Calcium	5.27	17.5
Magnesium	2.83	2.48
Sodium	0.63	1.21
Iron	0.36	16.2
Aluminium	0.14	1.28
Zinc	0.02	0.50
Cobalt	N.D	N.D
Nickel	N.D	N.D
Copper	N.D	N.D
Chromium	N.D	N.D

* Aoko: *Microcystis* collected from Lake Kasumigaura (September, 1979)

3.9 湖水中の窒素、リン、有機炭素に対するアオコの寄与

表1および表2に示したアオコ藻体のChl. *a* 当りのN, P, TOCの比を用いて、湖水中のそれぞれの“生きているアオコ”に起源する濃度を計算で求めた。すなわち、アオコ発生時の湖水中のクロロフィル *a* はすべてアオコに由来するものとし、各地点、各時期に採取されたアオコの分析値(N/Chl. *a*, P/Chl. *a* およびTOC/Chl. *a*)を用いて、アオコそのものに由来する濃度を求めた。結果を図6、図7、図8に示した。また、表11には1975~1977年の3ヶ年について計算した結果を示した。アオコ発生時(6月~11月)の湖水(三ツ又沖)のT-Nの62%, T-Pの75%およびTOCの30%は直接アオコに由来することが示された。さらに、著者らは湖水を粒形と分子量で分画し、年平均で、T-Nの52%, T-Pのほぼ100%, CODの32%が1.2 μ m以上の粒形の懸濁性成分で占められることを報告したが、この値と前述のアオコ由来の値は相関が高い。これらの結果は、アオコの除去が水質を著しく改善できることを示しているが、実際のフィールドがそれ程、単純かつ機械的でないことは勿論である。また、この計算に用いたアオコの化学的組成は霞ヶ浦で採取したアオコを実験室内で“純化”し、均一にした藻体について分析し

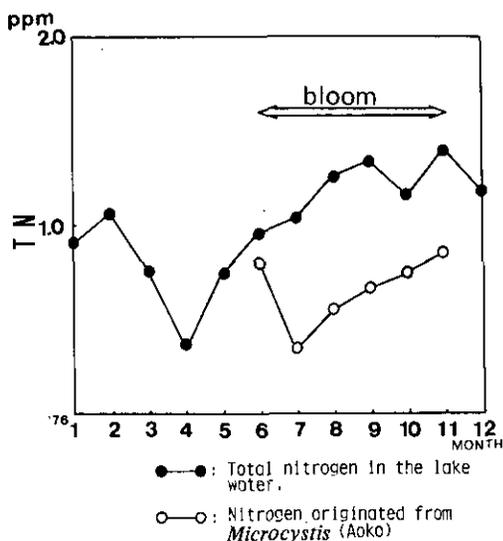


図 6 湖水中の全窒素とアオコに由来する窒素の濃度(湖心)

Fig. 6 Contribution of *Microcystis* (Aoko) to the Concentration of Total Nitrogen in the Lake Water

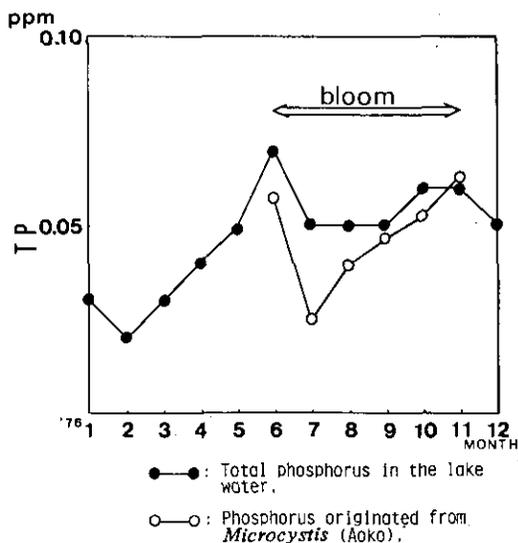


図 7 湖水中の全リンとアオコに由来するリンの濃度(湖心)

Fig. 7 Contribution of *Microcystis* (Aoko) to the Concentration of Total Phosphorus in the Lake Water

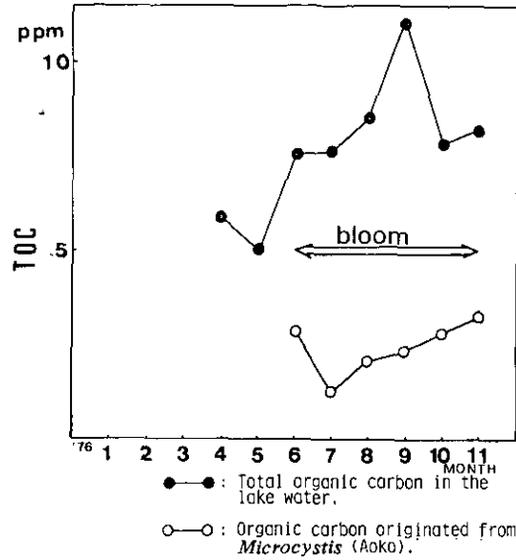


図 8 湖水中の全有機炭素とアオコに由来する全有機態炭素の濃度 (湖心)

Fig. 8 Contribution of *Microcystis* (Aoko) to the Concentration of Total Organic Carbon in the Lake Water

表 11 湖水のアオコに由来する窒素, リン, 全有機態炭素の割合

Table 11 Per cent of Nitrogen, Phosphorus and Total Organic Carbon Originated from *Microcystis* (Aoko) in the Lake Water during the Period of the Bloom

Periods	Per cent of contribution of <i>Microcystis</i> (Aoko) to water qualities		
	T-N	T-P	TOC
1975	65%	79%	—
1976	56	81	30
1977	64	64	—
Average	62	75	30

たものである。アオコが優占種となる夏から秋にかけての発生時期でも増殖・分解をくりかえしている。したがって、実際にはもっとヘテロな藻体集団であるアオコの水質への寄与は、ここで得られた値とは若干異なるものとして考慮しなければならないだろう。

4. まとめ

霞ヶ浦に発生するアオコとは一体どのようなものであるか、その実体を化学的組成の面から検討した。また同時に霞ヶ浦から分離され単藻となった *Microcystis aeruginosa* K-3 の単藻培養藻体についても分析しアオコとの比較を行なった。すなわち、T-N, T-P, TOC, Chl. a, 色素類, タンパク質, 脂質, 炭水化物, 灰分などの一般成分のほか、藻体の構成脂肪酸組成, アミノ酸組成および元素分析を行なった。また, N, P については, 藻体細胞のどのような機能をもった成分に分布しているか検討を行なった。

化学的組成の結果からみると, アオコと *M. aeruginosa* K-3 培養株は Chl. a の含量および Fe, Al, Zn, Ca などの元素含量の点をのぞけば両者はきわめてよく類似している。とくに, 通常の細菌には認められないポリエー酸が両者に共通して検出され, 構成脂肪酸のガスクロマトグラムはよく類似したパターンを示した。また藻体のアミノ酸分析の結果もよく一致していた。化学的組成の面からは, 霞ヶ浦に発生するアオコが *Microcystis aeruginosa* K-3 と同一またはそれにきわめて近縁な種であることが明らかにされた。

アオコの主要な成分はタンパク質であり, 大腸菌と類似した C/N を示した。クロロフィル a を含有することを除けば, 形態, 増殖形式, 化学的組成などからは, まさに細菌として分類するのがふさわしい。藻体の N の大部分がタンパク質に分布していることは当然であるが, 藻体リンの約半分が細胞の冷酸可溶性区分に分布していることは注目された。すなわち, アオコは自己の増殖に必要な以上のリンを細胞内にとりこみ, 貯留形として細胞内に含有していることが示された。

藻体の化学的組成と湖水の化学的分析値から湖水中の N, P, TOC に対する寄与率を求めた。アオコ発生時には平均すると湖水の N の 62%, P の 75% および TOC の 30% がアオコの生きている藻体そのものに由来することが示された。

アオコの化学的組成の検討は分類, 形態, 微細構造, 増殖特性などアオコの研究をすすめていく上で基本的に必要であろう。また, アオコの水質への寄与, さらにはバイオマスとしての利用を考えていく上でも重要と考えられる。

引用文献

- 1) 国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室: *Microcystis aeruginosa* (アオコ)による水の華の生成。その発生防止のための基礎的研究, 陸水環境研究室研究資料 FRL/80-1
- 2) 沖野外輝夫(1980):アオコ大発生メカニズム。科学朝日, 8月号, 72-76.
- 3) 高村義親・大槻英明・阿部紀子・斉藤信(1979):霞ヶ浦の窒素, リン COD および有機炭素の存在形態と変動。用水と廃水, 21, 382-388.
- 4) 高村義親:未発表
- 5) 矢木修身・岡田光正・須藤隆一(1979):水の華および赤潮生物培養について。国立公害研究所研究報告, 第6号, 223-229.
- 6) 長南信雄・松田智明・矢木修身・高村義親(1981):霞ヶ浦のアオコと *Microcystis aeruginosa* の形

態および微細構造の比較. 国立公害研究所研究報告, 第25号

- 7) 日本化学会編(1957): 実験化学講座, 23, 531-547, (丸善)
- 8) 小山忠四郎・半田彦・杉村行勇共著(1972): 湖水・海水の分析, 73, (講談社)
- 9) 山川民夫編(1971): 医化学実験法講座, 生体構成成分(I), 55-59, (中山書店)
- 10) 吉浦昌彦・入山啓治(1979): クロロフィルの調整法と定性定量分析法. 白核酸酵素, 24, 612-620.
- 11) 田宮博・渡辺篤編(1965): 藻類実験法, 296-301, (南江堂)
- 12) James A. T. (1960): Methods of Biochemical Analysis, 8, 1-60.
- 13) R. Y. スタニエ, E. A. エーデルバーグ, J. L. イングラム共著(1978): 微生物学(上), p. 31, (培風館)
- 14) 岡田光正・須藤隆一(1979): *Microcystis* の栄養塩吸収と増殖特性について. 国立公害研究所研究報告, 第6号, 223-229.
- 15) Folch J., M. Lees, G. H. Sistanley (1957): J. Biol. Chem., 226, 497.
- 16) Stanier R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel and G. Cohen-Bazier (1971): Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae. Bacteriological Reviews, 171-205.
- 17) 大儀敏雄編(1976): 食品のアミノ酸含量表. (第一出版株式会社)

4.

Microcystis の増殖特性

矢木修身¹・岡田光生¹・須藤隆一¹・萩原富司²
高村義親²

Growth Characteristics of *Microcystis*

Osami YAGI¹, Mitsumasa OKADA¹, Ryuichi SUDO¹, Tomiji HAGIWARA²,
and Yoshichika TAKAMURA²

Abstract

Growth characteristics of *M. aeruginosa* K-3 and *M. flos-aquae* which form colonies were studied in a batchwise culture. Specific growth rate of both strains were much influenced by temperature, light intensity, phosphorus, nitrogen and iron concentrations. The maximum temperature for specific growth rate was 25° to 35°C in both strains but *M. flos-aquae* grew more rapidly than *M. aeruginosa*. The maximum specific growth rate was observed at the phosphorus concentration of 0.02 mg/l and at the nitrogen concentration of 1 mg/l. These concentrations were lower than those of Lake Kasumigaura.

1. はじめに

全国各地の富栄養化した湖沼では“アオコ”と呼ばれる *Microcystis* による水の華が大発生し種々の弊害を引き起こすことから大きな問題となっている。それゆえ、水の華の発生を防止することが各方面から望まれているが、この目的を達成するためには、*Microcystis* の増殖特性を明らかにする必要がある。

Microcystis の増殖に及ぼす要因としては、温度、照度、pH、攪拌の状態等の物理化学的要因と、リン、窒素、鉄、CO₂ 濃度等の栄養的要因が考えられる。*Microcystis* の増殖特性に関しては、Gerloff ら¹⁾、Zehnder ら²⁾、McLachlan ら³⁾、Lange ら⁴⁾ により多くの研究がなされている。しかしながら *Microcystis* は自然界では群体を形成するが、フラスコ内で培養を繰り返すと細胞が

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

2. 茨城大学農学部 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町

Faculty of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Ibaraki 300-03, Japan.

ばらばらとなり群体が形成されなくなることから、群体を形成する *Microcystis* の増殖特性を扱った報告は少ない。著者らは群体を形成する *Microcystis* の分離培養に成功しており、この株を用いて、若干の増殖特性についてはすでに報告した⁵⁾。本報告は、霞ヶ浦から分離した群体を形成する *Microcystis aeruginosa* K-3, *Microcystis flos-squae* を用いて、温度、照度、振とう、リン、窒素、鉄の増殖に及ぼす影響について詳細に検討を加えたものである。

2. 実験方法

2.1 使用藻種

用いた *M. aeruginosa* K-3 および *M. flos-aquae* は、1977年8月霞ヶ浦に発生した水の華より分離したものである。*M. aeruginosa* K-3 は、直径が6~7 μm 、ガス飽を有し強固な群体を形成し、群体の大きさは時には500 μm 程度にも成長する。*M. flos-aquae* は直径が4 μm 、ガス飽を有し、弱い攪拌条件下で群体を形成するが、*M. aeruginosa* K-3 と比較すると群体形成力はかなり弱い。比較として、米環境保護庁コーバリス環境研究所より分譲を受けた *M. aeruginosa* K-1 についても検討を加えた。K-1 株は、直径が4 μm 、ガス飽を有するが群体形成能は消失してしまった株である⁶⁾。

2.2 培地

培地はM-11培地を用いた。培地組成を表1に示したが、Gorham の藍藻用培地を改変したものであり、窒素、リン濃度を $\frac{1}{2}$ とし、クエン酸、ケイ酸とGaffronの微量元素溶液を除いたものである。培地の殺菌は、沈殿を防ぐため、 K_2HPO_4 、クエン酸鉄および他の成分はそれぞれ別に120℃、10分間殺菌した。殺菌終了後室温で放冷し、無菌的に混合した。

表 1 M-11 培地組成
Table 1 Composition of M-11 Medium

NaNO_3	100 mg
K_2HPO_4	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40
Na_2CO_3	20
Fe-citrate	6
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Deionized water	1 L
pH	8.0

2.3 前培養および保存培養

前培養は 50 ml の三角フラスコに 20 ml の M-11 培地を添加し、30 °C、1,000 lx、静置の条件下で培養を行った。前培養期間は約 1 週間で、対数増殖期の藻体を本培養に用いた。保存培養は 10 ml の M-11 培地を含む試験管を用いて、30 °C、1,000 lx の条件下で植継ぎを行った。植継ぎは約 1 ヶ月ごとに実施した。

2.4 培養方法

500 ml の三角フラスコに 200 ml の培地を加え、けい光灯を用いて連続照射の条件下で培養を行った。とくに断らない限り温度は 30 °C、照度は 2,000 lx、静置条件（1 日 1 回手で攪拌）とした。ただし温度および振とうの効果に関しては 1,000 lx で行った。振とうの影響に関しては、回転式振とう機を用い、1 分間に 70 回転の条件とした。リン、窒素、鉄の影響の実験においては、前培養液からの栄養塩の持込みをできるだけ少くするために、*M. aeruginosa* K-3 については前培養藻体を蒸留水で洗浄した後、200 ml の培地に 1 ml 接種し、また *M. flos-aquae* については 200 ml の培地に 0.5 ml といずれも藻体濃度が約 0.5 mg/l となるように接種した。鉄の影響に関する実験では、クエン酸鉄溶液を 0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過滅菌して培地に無菌的に添加した。

2.5 藻体濃度

藻体濃度の測定には、平均細胞容積計算機 (Mean Cell Volume Computer) 付きのコールターカウンター、ZF 型 (Coulter Counter, Coulter Electronics Inc., Healeah Florida) を使用した。細胞数と平均細胞容積より、500 μ l 当たりの細胞の全容積を計算し、予め作成しておいた検量線により藻体の乾燥重量を算出した。なお藻体の乾燥重量は、藻体懸濁液を 0.45 μ m のポアサイズを有するミリポアフィルターで濾過し、105 °C、4 時間乾燥後の重量変化より求めた。なお *M. aeruginosa* K-3 は強固な群体を形成するため、超音波処理 (50W、30 秒間) し、細胞をばらばらにした後にコールターカウンターで測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 温度

M. aeruginosa K-3、*M. flos-aquae* の比増殖速度 (μ) に及ぼす温度の影響を図 1 に示した。*M. aeruginosa* K-3 の場合、15 °C では $\mu = 0.025 \text{ day}^{-1}$ 、20 °C で 0.07 day^{-1} と非常に低いが、25 ~ 35 °C で $\mu = 0.25 \text{ day}^{-1}$ と高い値を示した。一方、*M. flos-aquae* の場合は、*M. aeruginosa* K-3 株と同様の挙動を示し、25 ~ 35 °C で最大の $\mu = 0.35 \text{ day}^{-1}$ を示した。40 °C では両株ともに増殖は認められなかったが、35 °C 以下では *M. flos-aquae* の方が *M. aeruginosa* K-3

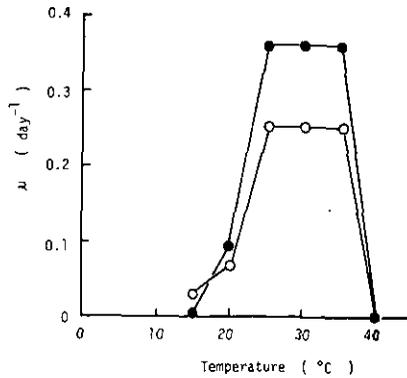


図 1 比増殖速度に及ぼす温度の影響

Fig. 1 Effect of Temperature on Specific Growth Rate

○ *M. aeruginosa* K-3

● *M. flos-aquae*,

1,000 lx

より高い μ を示した。25 °Cで両株ともに急激に μ が高くなる現象は、霞ヶ浦において、湖水の水温が25 °C以上になると*Microcystis*による水の華が大発生することを良く裏付けているものと思われる。また35 °Cと他の藻類が増殖困難な温度でも高い増殖速度を有することが、夏期における*Microcystis*の異常発生を容易ならしめているものと思われる。

3.2 振とう

M. aeruginosa K-3の増殖速度に及ぼす振とうの効果を図2に示した。静置培養の場合は μ

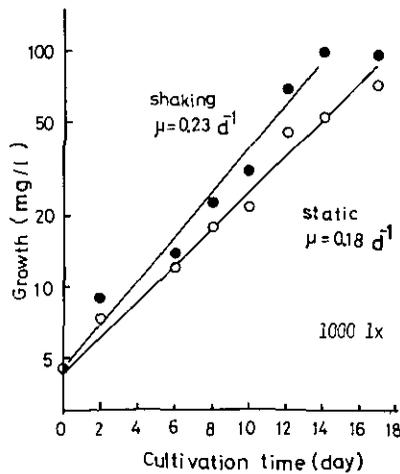


図 2 増殖に及ぼす振とうの影響

Fig. 2 Effect of Shaking on Growth

= 0.18 day^{-1} であるが、1分間に70回転の振とう培養では $\mu = 0.23 \text{ day}^{-1}$ であった。振とうすることにより比増殖速度はやや高くなった。しかしながら培養後期に群体が大きくなり、時には直径1cm程度となる現象が認められ、再現性良く藻体量を測定することが困難となった。したがって以後の実験ではすべて静置条件下で培養を行うこととした。

3.3 照度

M. aeruginosa K-3, *M. flos-aquae* の比増殖速度に及ぼす照度の影響を図3に示した。*M. aeruginosa* K-3の場合、500, 1,000 lxで μ がそれぞれ 0.20 day^{-1} , 0.30 day^{-1} と低いが、2,000 lx以上では光飽和となり $\mu = 0.50 \text{ day}^{-1}$ とほぼ最大の値を示した。一方、*M. flos-aquae*の場合は、500 luxでは $\mu = 0.28 \text{ day}^{-1}$ とほぼ*M. aeruginosa* K-3とほぼ同じ値を示すが、照度が増すにつれて*M. aeruginosa* K-3に比べかなり高い μ を示し、5,000 lxではほぼ光飽和に達し、 $\mu = 1.30 \text{ day}^{-1}$ とほぼ最大となった。*M. aeruginosa* K-3, *M. flos-aquae* の倍加時間はそれぞれ約1.3日, 0.5日であった。*M. aeruginosa* K-3の方が μ が低い理由としては、*M. aeruginosa* K-3の方が大きく強固な群体を形成するため、照度あるいは栄養物質の供給速度が低下してしまうことによるのではないかと考えられる。一方高照度で培養した場合、*M. aeruginosa* K-3は増殖が不安定となり、同時に藻体濃度が高くならないいわゆる強光阻害の現象が認められた。そこで次にこの点を明らかにするため、照射方法について検討を加えた。

図4および図5は、*M. aeruginosa* K-3および*M. flos-aquae* の、低照度(3,000 lx)ならびに高照度(5,000 lx)における連続照射および断続照射条件下での増殖曲線を示したものである。

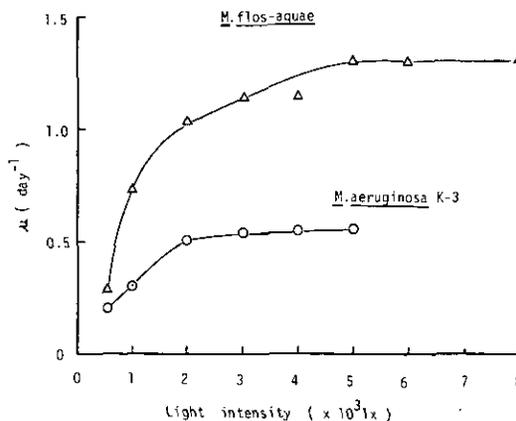


図 3 比増殖速度に及ぼす照度の影響

Fig. 3 Effect of Light Intensity on Specific Growth Rate.

断続照射条件とは、14時間照射し残りの10時間を暗くして培養したものである。

図4に示したように、*M. aeruginosa* K-3の場合、低照度では連続照射で $\mu = 0.55 \text{ day}^{-1}$ 断続照射では $\mu = 0.45 \text{ day}^{-1}$ であり連続照射の方がやや高い μ を示した。一方高照度の場合、連続照射で $\mu = 0.69 \text{ day}^{-1}$ 、断続照射で $\mu = 0.47 \text{ day}^{-1}$ と連続照射の方がかなり高い μ が認められた。しかしながら高照度、連続照射で培養した場合、藻体濃度が約100mg/lとなると藻体が白くなり分解する現象が認められた。ところが高照度、断続照射では μ は低いが、200mg/l程度まで藻体濃度が増加し、良好な増殖が認められた。このことから、*M. aeruginosa* K-3の光合成色素系は高照度により阻害を受けるが、その阻害は暗所での培養で回復するのではないかと考えられた。

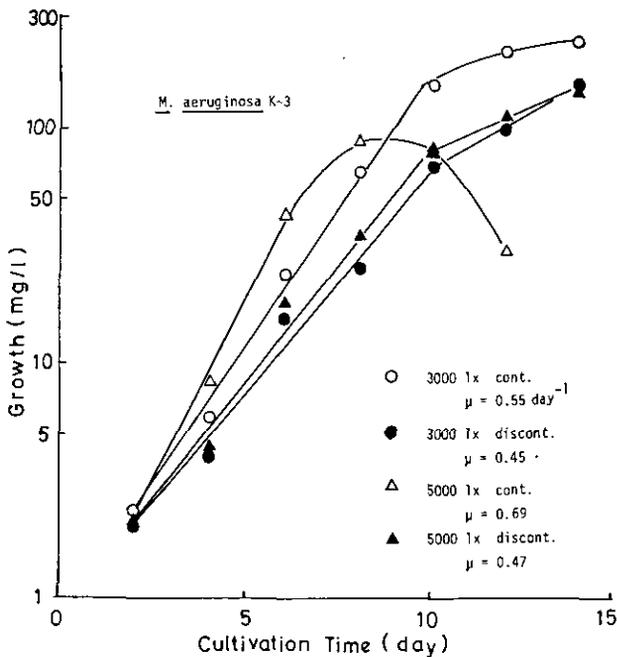


図 4 高照度および低照度の増殖に及ぼす影響
Fig. 4 Effect of High and Low Light Intensity on Growth

一般に酸素の存在下では、光によるクロロフィルの分解が知られており^{7),8)}これが強光による増殖阻害の理由の一つと考えられている。夏期における湖面での照度は10万lxを越えるが、このような強光条件下でも*Microcystis*の異常増殖が認められることは、*Microcystis*が浮上および沈降する性質を有すると同時に昼と夜とがあることが増殖可能ならしめているものと考えられる。

M. flos-aquae の場合を図5に示したが、高照度、低照度ともに連続照射の方が高い μ を示し、*M. aeruginosa* K-3に見られたような強光阻害は認められなかった。これは、*M. flos-aquae*が図3に示したように8,000 luxの連続照射条件下でも増殖阻害が認められないためであり、*M. flos-aquae*は*M. aeruginosa* K-3よりも強光に強い種といえよう。また、強光阻害の認められない照度条件下では、連続照射の方が速い増殖速度を示すものといえよう。

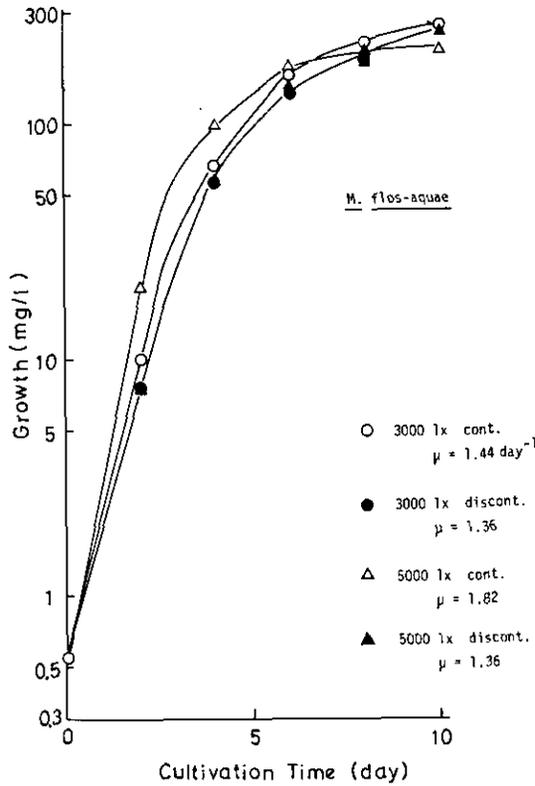


図 5 高照度および低照度の増殖に及ぼす影響
Fig. 5 Effect of High and Low Light Intensity on Growth

3.4 リン

藻類の要求する栄養塩のうち、リンと窒素は藻体中の含量が高いことからその重要性が指摘されている。図6はリン濃度の比増殖速度に及ぼす影響を示したものである。リンとしては $K_2HP O_4$ の形で添加した。*M. aeruginosa* K-3の場合は、 PO_4-P として0.01 mg/lの低濃度で $\mu = 0.17 \text{ day}^{-1}$ を示し、最大比増殖速度の74%とかなり高い値を示した。また0.02 mg/lの濃度で

μ は最大となった。一方 *M. flos-aquae* の場合は、 $\text{PO}_4\text{-P}$ が 0.01 mg/l で $\mu = 0.55\text{ day}^{-1}$ と最大比増殖速度の89%と非常に高い値を示した。以上の結果ならびに霞ヶ浦の湖水中の全リン濃度が 0.04 mg/l 以上であることを考え合わせると、リンに関しては霞ヶ浦の湖水は、*Microcystis*を速い速度で増殖させるに十分なリン濃度を保持しているといえよう。

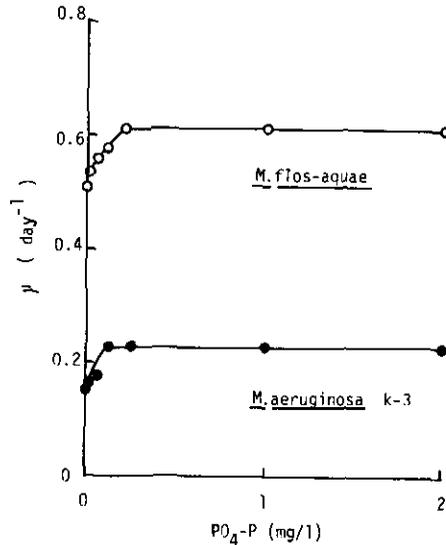


図 6 比増殖速度に及ぼすリン濃度の影響

Fig. 6 Effect of Phosphorus Concentration on Specific Growth Rate

なおリン無添加の培地で培養した場合でも、両株ともに高い μ を示すが、これは植種時のリンの持込みによるものである。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、*Microcystis*も多量のリンを摂取することが明らかにされている。したがって、前培養はリン制限下で行う必要があるが、リン濃度をあまり低くすると藻体が白色化し、分解してしまい高濃度の藻体が得られない欠点がある。一般に、リンを含まない培地中では、藻体が植菌量の5~10倍増加した時点で藻体の増殖が停止し、分解が開始する現象が認められた。

図7は、*M. aeruginosa* K-1, K-3, および *M. flos-aquae* に関するリン濃度と最大増殖量の関係を示したものである。いずれの株も $\text{PO}_4\text{-P}$ の濃度が高くなるにつれ最大増殖量は増加した。*M. aeruginosa* K-1, *M. aeruginosa* K-3, *M. flos-aquae* はそれぞれリン 0.1 mg から95, 94, 82mgの藻体が生成された。以上の結果から、*Microcystis*のリンに対する藻体収率(増殖した藻体量mg/消費されたリン量mg)は約900と非常に高い値であることが明らかとなった。

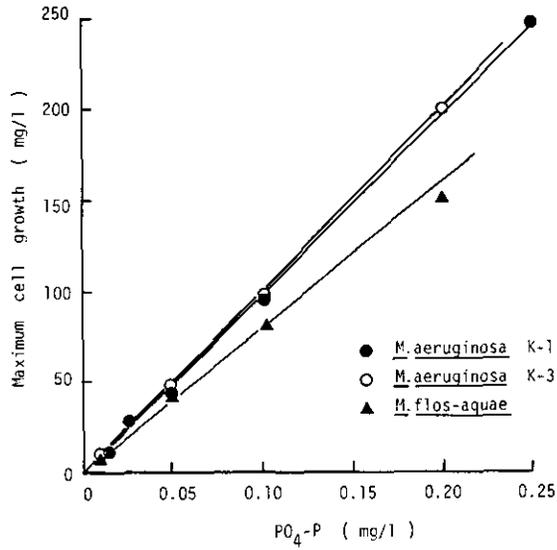


図 7 最大増殖量に及ぼすリン濃度の影響

Fig. 7 Effect of Phosphorus Concentration on Maximum Cell Growth

3.5 窒素

M. aeruginosa K-3 および *M. flos-aquae* を用いて比増殖速度に及ぼす窒素濃度の影響について検討を加えた結果を図8に示した。窒素は NaNO_3 の形で添加した。*M. aeruginosa* K-3 の場

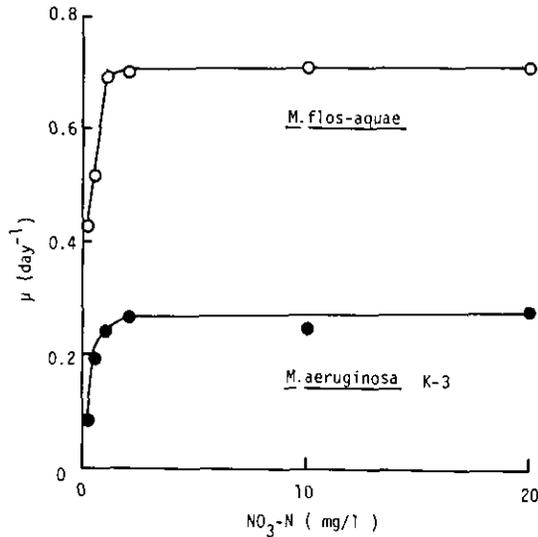


図 8 比増殖速度に及ぼす窒素濃度の影響

Fig. 8 Effect of Nitrogen Concentration on Specific Growth Rate.

合、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が 1 mg/l の濃度で $\mu = 0.24\text{ day}^{-1}$ とほぼ最大の μ に近い値を示した。また 0.1 mg/l と低濃度の場合でも培養開始時から5日目までは $\mu = 0.09\text{ day}^{-1}$ と最大の μ の約30%の値を示したが藻体が培養開始時の約3倍に達したときに増殖は停止した。一方、*M. flos-aquae* の場合は、 1 mg/l 以上の濃度で $\mu = 0.73\text{ day}^{-1}$ と最大を示し、 0.5 mg/l の低濃度でも $\mu = 0.44\text{ day}^{-1}$ とかなり高い値を示した。

なお、*M. flos-aquae* の場合、窒素を含まない培地中でも、3日間は $\mu = 0.44\text{ day}^{-1}$ と高い μ を示し接種量の約3倍まで増殖が認められるが、その後は藻体の分解が認められた。この現象は、接種に際して窒素が微量持込まれたことによるものと考えられた。

次に、*M. aeruginosa* K-1, K-3, および*M. flos-aquae* に関する、窒素濃度と最大増殖量の関係を図9に示した。霞ヶ浦から分離した*M. aeruginosa* K-3, *M. flos-aquae* の場合は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ として 2 mg/l までは濃度の増加に伴い比例的に最大増殖量が増加し、窒素当りの藻体収率は31であった。また $\text{NO}_3\text{-N}$ が 2 mg/l 以上の高濃度になると両株ともに収率の低下が認められた。一方K-1のEPA株は $\text{NO}_3\text{-N}$ が 4 mg/l と高い濃度まで比例的に最大増殖量の増加が認められた。またその収率は55と霞ヶ浦から分離した株よりも2倍弱も高い値を示した。この理由としては、*M. aeruginosa* K-3, *M. flos-aquae* は群体を形成し、寒天様被膜を多量に生成するため、寒天様被膜の成分として⁹⁾あるいは他の藻体外成分として、窒素が藻体形成以外にEPA株よりも多く消費されるのではないかと考えられる。

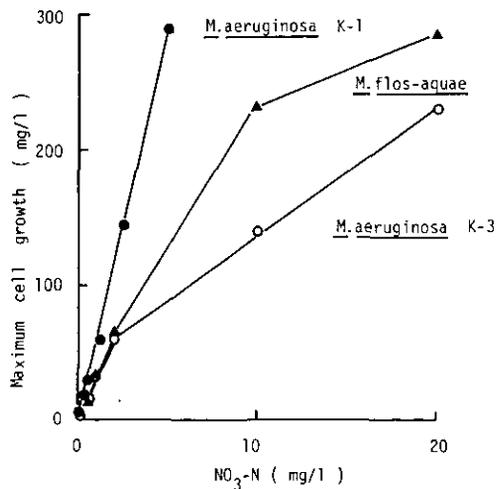


図 9 最大増殖量に及ぼす窒素濃度の影響

Fig. 9 Effect of Nitrogen Concentration on Maximum Cell Growth.

3.6 鉄

Microcystis, *Anabaena*等の藍藻の増殖に鉄が大きく関与していることが知られており, Gerloffら¹⁰⁾, Lange¹¹⁾, Murphyら¹²⁾は腐植物質あるいはキレート物質等の存在により鉄の利用性が高まり, 藍藻の増殖速度が速くなることを報告している。そこで鉄濃度の比増殖速度に及ぼす影響について検討を加え, その結果を図10に示した。鉄としてはクエン酸鉄を用いた。鉄として0.01 mg/l濃度で $\mu = 0.55 \text{ day}^{-1}$ とほぼ最大の比増殖速度が得られ, 低濃度でも高い μ が得られた。鉄を全く含まない培地中でも, 接種量の10倍の藻体量まで $\mu = 0.46 \text{ day}^{-1}$ と高い μ での増殖が認められた。このことから, 鉄はリンと同様にかなり藻体内に蓄積され得る物質であることが推定された。

図11は鉄の濃度と最大増殖量の関係を示したものである。鉄として0.1mg/lの濃度の場合, 13.5mg/lの藻体が生成された。この濃度以下では, 鉄に対する藻体の収率は125であった。一方0.1mg/l以上では収率が約50と著しく低下したが, この理由は不明である。

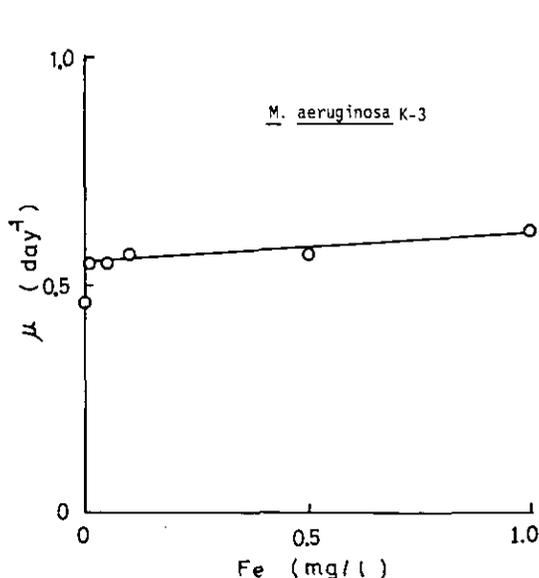


図 10 比増殖速度に及ぼす鉄濃度の影響
Fig. 10 Effect of Iron Concentration on Specific Growth Rate

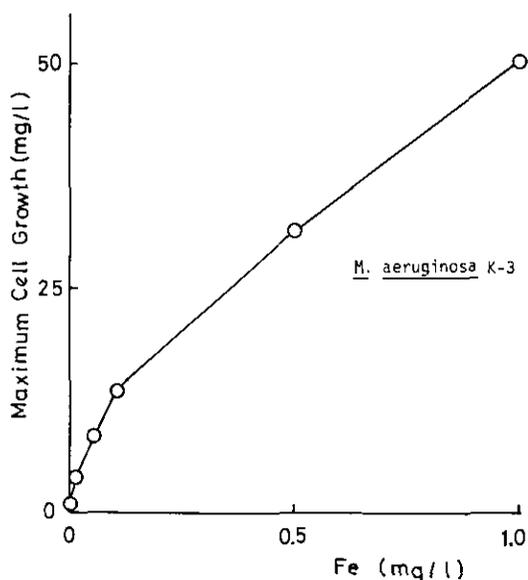


図 11 最大増殖量に及ぼす鉄濃度の影響
Fig. 11 Effect of Iron Concentration on Maximum Cell Growth

4. まとめ

霞ヶ浦から分離した群体を形成する *M. aeruginosa* K-3 および *M. flos-aquae* の回分法による増殖特性について検討を加えた。両株ともに温度, リンおよび窒素濃度に対する挙動は非常に類

似していた。すなわち両株ともに25~35℃と高い温度で最大の比増殖速度を示し、またリンは0.02 mg/l、窒素は1 mg/lと低濃度でほぼ最大の比増殖速度を示した。このことから、霞ヶ浦の湖水は、*Microcystis* を非常に速い速度で増殖させるのに十分な濃度のリンと窒素を含んでいることが明らかとなった。一方光に関しては、両株ともに照度により比増殖速度が著しく影響を受けるが、*M. flos-aquae* の方が*M. aeruginosa* に比べかなり高い比増殖速度を有することが明らかとなった。良好な条件下では、*M. aeruginosa* K-3の倍加時間は約1日、*M. flos-aquae* は約0.5日であった。鉄濃度の低い条件下でも*M. aeruginosa* K-3は速い比増殖速度を示し、リンと同様に鉄も藻体内に過剰摂取されているものと考えられた。

引用文献

- 1) Gerloff, G. C., G. P. Fitzgerald and F. Skoog (1952): The Mineral Nutrition of *Microcystis aeruginosa*. American J. Botany, 39, 26-32.
- 2) Zehnder, A. and P. R. Gorham (1960): Factors Influencing the Growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. Can. J. Microbiol., 6, 645-660.
- 3) 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.
- 4) Lange, W. (1970): Cyanophyta-Bacteria Systems; Effects of Added Carbon Compounds or phosphate on Algal Growth at Low Nutrient Concentrations. J. Phycol., 6, 230-234.
- 5) 矢木修身・岡田光正・須藤隆一(1979): 水の華および赤潮生物の培養について. 国立公害研究所研究報告, 第6号, 223-229.
- 6) 岡田光正・須藤隆一(1979): *Microcystis* の栄養塩吸収と増殖特性について. 国立公害研究所研究報告, 第6号, 293-302.
- 7) 須藤隆一(1980): *Microcystis aeruginosa* (アオコ)による水の華の生成, その発生防止のための基礎的研究. 国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室資料, FRL/80-1, 114.
- 8) 柴田和雄他(1979): 光生物学(上). 学会出版センター, 220 p.
- 9) Osetrov, V. I., E. I. Shnyukova and V. F. Vlasishin (1969): Histochemical Study of Polysaccharide Complex of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenk. *Gidrobiologicheskii Zhurnal.*, 5, 30-37.
- 10) Gerloff, G. C. and F. Skoog (1957): Availability of Iron and Manganese in Southern Wisconsin Lakes for the Growth of *Microcystis aeruginosa*. Ecology, 38, 551-556.
- 11) Lange, W. (1974): Chelating Agents and Blue-green Algae. Can. J. Microbiol., 20, 1311-1321.
- 12) 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.

5.

藍藻類 *Microcystis aeruginosa* のリン取り込みと増殖

岡田光正¹・須藤隆一¹・合葉修一²

Phosphorus Uptake and Growth of Blue-Green Alga, *Microcystis aeruginosa*

Mtsumasa OKADA¹, Ryuichi SUDO¹ and Shuichi AIBA²

Abstract

The specific uptake rate, Q_p , of orthophosphate (expressed throughout as phosphorus) and the specific growth rate, μ , of *Microcystis aeruginosa* were measured using batch-precultured cells, whose growth phase, and intracellular and extracellular phosphorus concentrations, f_p and P had been changed, respectively. When the cells from phosphorus-rich precultures were used, smaller values of Q_p ($0.1 \sim 0.3 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) were observed. However, if phosphorus-starved cells were used, the initial value of Q_p was enhanced more than 10 times of those smaller values referred to above, but declined rapidly with time after the transfer. Q_p levelled off at around $t = 4$ h when f_p approached the maximum value, even if phosphorus was still available in the medium. A new correlation was presented here with respect to Q_p as function of P and f_p as follows:

$$Q_p = Q_{p, \max} \cdot \frac{P}{K_p + P} \cdot \frac{(f_{p, \max} - f_p)}{K_q + (f_{p, \max} - f_p)}$$

The above equation could account not only for phosphorus uptake during which changes in phosphorus content in the cells were observed, but also for initial rates of uptake presented previously by other workers. μ values were confirmed to be a hyperbolic function of f_p as has been suggested by previous workers.

-
1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 大阪大学工学部 醸酵工学科 〒565 吹田市山田上
Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamada-kami, Suita-shi, Osaka 565, Japan.

1. はじめに

リン制限下で培養された微生物は、リンの豊富な培地に移された場合、ポリリン酸¹⁾⁻⁴⁾として多量のリンを蓄積することが知られている。藻類についても、連続培養、回分培養等の手段により、同様な現象が存在することが報告されている^{5), 8)}。富栄養湖における“水の華”の生成因子を検討する場合、このようなリンの蓄積ならびにリン制限下における増殖特性を考慮することも重要であると考えられる。

藍藻類の一種 *Microcystis aeruginosa* は、富栄養湖においては夏期にしばしば優占種となることが知られている。時には、異常発生して水表面に厚いマットを形成する⁹⁾。当然のことながら、リン以外にも窒素をはじめとして鉄イオン、ある種の有機物等が、水の華の発生要因となりうる。しかしながら、本報告においては、まずリンの *M. aeruginosa* に対する影境に着目することとした^{10), 11)}。

富栄養湖においても、湖水中のリン濃度は通常かなり低い ($0.01 \sim 0.1 \text{mg P} \cdot \text{l}^{-1}$)¹²⁾。Nyholm¹³⁾ は緑藻類によるリンの比取り込み速度 (初期) を測定した結果、Michaelis-Menten 型の動力学が適用できることを明らかにした。飽和定数 K_s の値は $0.02 \sim 0.08 \text{mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。したがって富栄養湖においても、藻類はリン制限下に置かれる可能性が十分にあると想像される。とくに、降雨の後などにリン濃度の高い水が湖沼に流入すると、藻類は急速にリンを取り込むであろう。これ以外にも、*M. aeruginosa* のように静水中で垂直移動する藻類は、通常リン濃度が低いと考えられる表層より、それが高い底層部に近づいた場合、急速なリンの取り込みを行う可能性も考えられる。

リンの取り込み速度、ならびにその動力学に関しては既に多くの報告がある。これらは回分培養¹⁴⁾⁻¹⁹⁾、ケモスタット連続培養^{7), 13), 26)}、タービドスタット連続培養²¹⁾、サイクロスタット連続培養^{22), 23)} 等を前培養として種々の生理学的状態の異なる細胞を準備し、それらのリン取り込み特性について検討した。Rhee⁷⁾ はその実験結果にもとづいて細胞内および細胞外の両者のリン濃度に着目した動力学式を提案した。しかしこれらの研究では、細胞に生理的变化が生じない程度の短い時間、すなわち初期のリン取り込み速度の解析のみを行った。本研究では、リン取り込みにもなう取り込み速度の時間変化も含めて、*M. aeruginosa* のリン取り込みに関する動力学的検討を行う。

2. 実験方法

2.1 使用藻株ならびに培地

使用した藻株は、米国環境庁コーバリス環境研究所より分譲を受けた *Microcystis aeruginosa* K-1 である。培地は Zehnder-Gorham²⁴⁾ の No.11 修正培地 (MZG 培地) を用いた。すなわち、リン酸態リン濃度を除いて、他のすべての成分はもとの培地の $\frac{1}{5}$ 濃度とした。リン酸態リン濃度 (リンとして) は K_2HPO_4 添加量を変えて $0.05 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ から $2.0 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲で変化さ

せた。カリウム濃度を一定にするため KHCO_3 を添加し、培地の K 濃度を $3.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ に保った¹⁷⁾。MZG 培地は使用前にオートクレーブ (120°C 10 分) で滅菌した。MZG 培地の pH は 8.0 となるよう、滅菌後に 1N-HCl で調整した。

2.2 培養条件

培養にはウレタンフォーム製の栓をした 500 ml の三角フラスコを使用した。培地の容量は 100 ml とし、けい光灯 (GE cool-white) で上部から照明した回転式振とう器で培養した。温度は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ に保った。炭酸ガスは空気中より栓を通して供給されるので律速とはならない。照度はフラスコ外側の培地表面の位置で測定し、 0.5 klx となるように調整した。なおこの照度は、予備実験によると、本実験で使用した藻株では、比増殖速度、 μ が照度に対して飽和する照度である。したがって光が増殖を制限しない。

2.3 前培養

リンの比取り込み速度 q_p 、および比増殖速度 μ の測定に先立ち、異なる細胞内リン濃度 f_p 値および履歴を有する細胞を得るための前培養を行った。前培養の接種量は MZG 培地 100 ml に対し 1 ml とした。MZG 培地中のリン濃度は $1.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。この培養より、異なる増殖期に細胞を採取した (対数増殖期、減衰期、静止期)。採取された細胞は遠心分離法 ($6,000 \times g$, 10 分) による細胞の分離操作を用いて、2 回洗浄 (洗浄液は、 NaHCO_3 溶液、 $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) した。洗浄後、既に述べた 500 ml の三角フラスコ中の培地 (100 ml) に接種した。

2.4 藻類量の測定

藻類濃度の測定には、平均細胞容積計算機 (Mean Cell Volume Computer) 付きのコルターカウンター、ZF 型 (Coulter Counter, Model ZF, Coulter Electronics Inc., Heath, Florida) を使用した。細胞数と平均細胞容積とから、予め作成しておいたキャリブレーションチャートにより藻類の乾燥重量に換算した。なお藻類の乾燥重量は、藻体懸濁液をミリポアフィルター (Type HA, ポアサイズ = $0.45 \mu\text{m}$) で濾過し、 90°C 、4 時間乾燥後の重量変化より求めた。

2.5 リンの分析

MZG 培地中のリン酸態リン濃度は藻体をミリポアフィルター (同上) により濾別した後、濾水を混合試薬法²⁵⁾ により分析して決定した。ここでは $\text{mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ の単位で表わす。一方細胞内のリン濃度、 $f_p \text{ mg P} \cdot \text{mg dw}^{-1}$ (ϕ) は、 NaHCO_3 溶液 ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) で 2 回洗浄した藻体を NaHCO_3 溶液に懸濁 (約 50 ml) させた試料について、全リン濃度を分析するとともに、別に求めた懸濁

液の藻類濃度の値より計算によって求めた。全リン分析のための分解は試料に硫酸 (11N, 1 ml) および過硫酸アンモニウム (0.4 g) を試料 50 ml に対し添加後, 120 °C, 30 分間オートクレーブ処理して行った。分解後のリンの分析は混合試薬法によった。

2.6 リンの比取り込み速度, Q_p

新しい培地 (Q_p , μ 測定用) には, 培養開始時のリン濃度を 0.1 から 0.25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とした MZG 培地を用いた。接種藻類量は約 3 ~ 24 $\text{mg dw} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。

接種後, 約 30 分から 60 分毎に MZG 培地中のリン濃度を, 4 時間にわたって測定した。各サンプリング時刻における Q_p の値は次のように推定した。すなわち, 当該サンプリング時刻と次のサンプリング時刻とにおいて測定された MZG 培地中のリン濃度の差を, サンプリング間隔で割り, さらにその間の平均藻類濃度で割った値を Q_p とした。このようにして得た Q_p の値は, 細胞内部に吸収されたリンの量と, 細胞表面に吸着したリンの量の両方に起因している。しかしながら, 細胞内に取り込まれたリン量の方が, 細胞表面に吸着したリン量よりも支配的であるとされている¹⁸⁾。

2.7 比増殖速度, μ

前培養した細胞 (3 ~ 24 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) を, 種々のリン濃度の MZG 培地に接種した。接種後, 数日間にわたり, 毎日藻類の増殖量を測定した。 μ は藻類濃度の毎日の増加分と, その間の平均値とから推定した。

3. 結果と考察

図 1 A および図 1 B はそれぞれ前培養において対数増殖期 (E 細胞), ならびに減衰期 (D 細胞) にあった *M. aeruginosa* のリン取り込み過程を示す。E 細胞の Q_p 値は, 取り込み実験初期においてやや減少する場合もあったが, 通常ほぼ一定の値を示した。減少する場合, 最大 0.3 $\mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。空試験の結果この減少はフラスコの内面にリンが付着したことによると推定された。このため, 2 時間目以降の Q_p 値が信頼できるものと考えた。図 1 A および他の同様な測定値より, 2 種の E 細胞 (E 1 細胞 = 4.8 日間前培養, $f_p = 0.74\%$; E 2 細胞 = 7.7 日間前培養, $f_p = 0.85\%$) に対する Q_p の平均値, \bar{Q}_p は, 0.1 より 0.3 $\mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。

\bar{Q}_p に対するリン濃度 P (MZG 培地中) の影響は, リン濃度が 0.08 ~ 0.24 $\text{mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲ではどちらの E 細胞ともに認められなかった。 \bar{Q}_p が P に依存しないことは, 式(1) (後述) における K_p 値が小さいことによく一致する。

図 1 B に示したように, D 細胞および静止期にあった細胞 (S 細胞) はリン取り込みが E 細胞と著しく異った。 $t = 0$ (MZG 培地に移した直後) における Q_p 値は, D 細胞では 2.3 ~ 3.5 μg

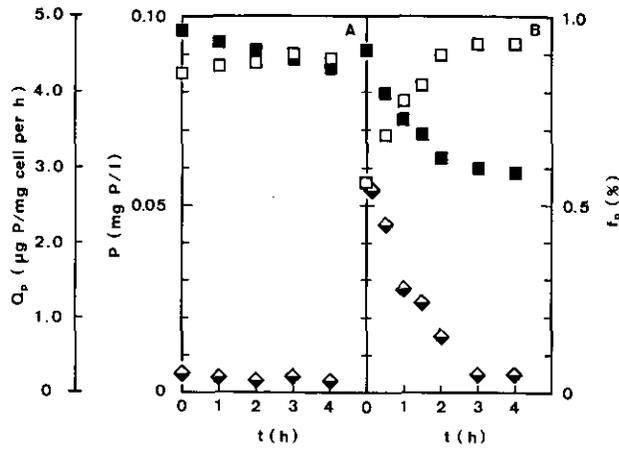


図 1 リンの比取り込み速度, Q_p , 細胞内および細胞外のリン濃度, f_p および P の時間 t 変化

A : E (E2) 細胞, 藻類濃度 = $13.5 \text{ mg dw} \cdot \text{l}^{-1}$ (対数増殖期の細胞)。B : D細胞 藻類濃度 = $8.1 \text{ mg dw} \cdot \text{l}^{-1}$ (減衰期の細胞)。

記号: ■, P ; □, f_p ; ◆, Q_p

Fig. 1 Specific rate of phosphorus uptake, Q_p , intra- and extra-cellular concentrations of phosphorus, f_p and P , respectively as dependent on time, t (*Microcystis aeruginosa*).

A : E (E2) cells, algal cell concentration = $13.5 \text{ mg dw} \cdot \text{l}^{-1}$, harvested from the exponential growth phase. B : D cells, algal cell concentration = $8.1 \text{ mg dw} \cdot \text{l}^{-1}$, harvested from the declining phase. Symbols: ■, P ; □, f_p ; ◆, Q_p .

$P \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, S細胞では $4.6 \sim 5.2 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。これらの値は, E細胞におけるそれと比較して10倍以上である。D細胞およびS細胞の場合, $t = 0$ における Q_p 値が大きいため, フラスコ内壁へのリンの吸着は無視しうるものと考えた。

図1Bに示すように, Q_p は時間が経過するにしたがって次第に減少していくとともに, MZG培地中のリン濃度も減少し, 逆に f_p は増加した。 f_p 値が最大値 ($f_{p, \text{max}}$: DおよびS細胞について0.95%) に近づくにつれて, 培地中にリンが残存していても, Q_p 値はE細胞と同レベルに低下した。D細胞の場合, Q_p 値は4時間後には一定値まで減少し, E細胞と同レベルとなった。本実験条件では, Q_p に対する初期細胞外(培地中)リン濃度の影響はほとんど認められなかった(図2参照, 後述)。

図2は, DおよびS細胞に対する Q_p と f_p との関係を示す。前述のE細胞に対する Q_p 値も図

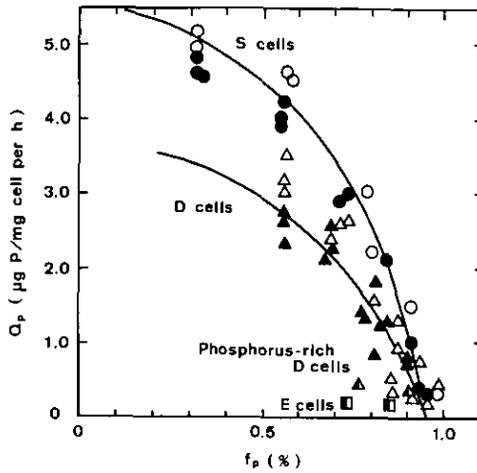


図 2 Q_p と f_p との関係

実線はDおよびS細胞ともに $f_{p, \max} = 0.95\%$ として式(1)により計算した。このとき $Q_{p, \max}$ および K_q は Lineweaver-Burk プロット ($1/Q_p$ 対 $1/(f_{p, \max} - f_p)$) により決定した。その値は、D細胞: $Q_{p, \max} = 5.3 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_q = 0.36\%$, S細胞: $Q_{p, \max} = 7.1 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_q = 0.26\%$ 。

記号: ○, 初期リン濃度 $0.23 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ のMZG培地に移したS細胞; ●, 初期リン濃度 $0.10 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ のMZG培地に移したS細胞; △, 初期リン濃度 $0.22 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ のMZGの培地に移したD細胞; ▲, 初期リン濃度 $0.09 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ のMZG培地に移したD細胞; ■, E1およびE2細胞; ▲, リン過剰(残存リン濃度 $0.06 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上)条件下で前培養されたD細胞

Fig. 2 Q_p as affected by f_p . Solid lines were secured from Eq. (1), using $f_{p, \max} = 0.95\%$ for both D and S cells, and taking $Q_{p, \max}$ and K_q values that were assessed separately by the Lineweaver-Burk plot of $1/Q_p$ against $1/(f_{p, \max} - f_p)$.

D cells: $Q_{p, \max} = 5.3 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_q = 0.36\%$. S cells: $Q_{p, \max} = 7.1 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_q = 0.26\%$. Symbols: ○, S cells transferred to MZG medium where initial phosphorus concentration = $0.23 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$; ●, S cells transferred to MZG medium where initial-phosphorus concentration = $0.10 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$; △, D cells transferred to MZG medium where initial phosphorus concentration = $0.22 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$; ▲, D cells transferred to MZG medium where initial phosphorus concentration = $0.09 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$; ■, E1 and E2 cells; ▲, D cells precultured under phosphorus-rich condition (residual phosphorus: more than $0.06 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$).

中に示した。MZG培地におけるリン濃度が $0.05 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下で測定された Q_p 値は図2より除外した。図2より、DおよびS細胞に対する Q_p 値は、MZG培地におけるリン濃度、 P よりもむしろ f_p の関数であることがわかる。 Q_p に対する既往の研究^{13),16),19),22),23)}、ならびに以上の結果より Q_p は次式で表わされよう。

$$Q_p = Q_{p,\max} \cdot \frac{P}{K_p + P} \cdot \frac{(f_{p,\max} - f_p)}{K_q + (f_{p,\max} - f_p)} \quad (1)$$

ここに

$$Q_{p,\max} = Q_p \text{の最大値, } \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$K_p = \text{定数, } \text{mg P} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$K_q = \text{定数, } \%$$

式(1)に示すように、 Q_p は K_p ならびに K_q を定数(藻類種およびその生理学的状態によって定まる)とする、 P ならびに f_p の関数である。(後述)。*Chlorella ellipsoidea*²⁶⁾は、対数増殖期にある場合、その f_p 値はほとんど変化しなかった。本実験においても、E細胞の場合、 f_p はほとんど変化せず、 $(f_{p,\max} - f_p) / (K_q + (f_{p,\max} - f_p))$ は一定と見なせる。したがって、E細胞に対する Q_p 値は P のみの関数となるべきである。既に報告された K_p 値は、*Scenedesmus* Sp.⁷⁾では $0.019 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 、*Asteriorella formosa*¹⁹⁾では $0.059 \sim 0.087 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 、*Euglena gracilis*²²⁾では、 $0.012 \sim 0.087 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ および *Chlorella pyrenoidosa*¹³⁾では $0.021 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ である。本研究において Q_p 値が P に依存しなかったのは K_p 値がこのように低いことによるものと思われる。

(1式における $f_{p,\max}$ 値は、D細胞、S細胞にかかわらず0.95%とした。図2における実線は、 $Q_{p,\max}$ および K_q をLineweaver-Burkプロット($1/Q_p$ 対 $1/(f_{p,\max} - f_p)$)により求めた後、式(1)に従って計算した値である(D細胞では、 $Q_{p,\max} = 5.3 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $K_q = 0.36\%$ 、S細胞では、 $Q_{p,\max} = 7.1 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $K_q = 0.26\%$ とした)。図2に示すように、 Q_p は P に対して独立であった。これは(1式において P を含む項が1に近い値をとったことに対応する。逆に、別の実験において、DおよびS細胞にかかわらずリン濃度が $0.05 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下では Q_p 値が減少した事実は、(1)式より容易に理解できる。

前述したように、リン取り込みには2種類のパターンが認められた。すなわち、E細胞における遅い取り込みと、DおよびS細胞における速い取り込みである。しかし、D細胞による速い取り込み速度は、図2に示すように f_p 値が同一であっても、S細胞と異なる値を示した。したがって、 Q_p は f_p および P の両者だけでなく、前培養における履歴にも依存した。Nyholm^{13),27)}は、*Chlorella pyrenoidosa*によるリン取り込みには2つのパターンがあることを報告した。この差異は、細胞がリン欠乏下にあったか否かに依存すると考えられる。

本研究の前培養における残存リン濃度は、E細胞では $0.62 \sim 0.96 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 、DおよびS細胞

ではほぼ0であった。減衰期までリンの豊富な接地（初期リン濃度 = $0.2 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ ）で増殖した細胞（リン過剰D細胞：窒素が増殖制限因子となり、残存リン濃度は $0.06 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上であった）は、図2に示すとおり、小さい取り込み速度を示した。S細胞とD細胞とを比較すると、リン欠乏期間が長くなるにつれて、 f_p が同一値であってもリン取り込み速度は大きくなった。これは、リンの輸送システムの脱抑制作用によるものと思われる^{28)–30)}。しかしながら、前培養の履歴を表わす項を導入することは、本研究の範囲を超えるものとして行わなかった（(1)式においてパラメータ K_q 、および $f_{p,\max}$ は細胞の履歴によって異なる）。

Healey¹⁵⁾ は *Anbaena flos-aquae* を用いて Q_p の初期値 ($t=0$) を求めた。培地中のリン濃度は約 $0.3 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ である。細胞が、リン欠乏下になかった場合、 Q_p 値はかなり小さかった。Healeyの結果では、前培養におけるリン欠乏期間が長くなるほど Q_p は上昇し、最大 $28.0 \mu\text{g P} \cdot \text{mg dw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ となった。

Q_p （ただし $t=0$ における初期値のみである）に関しては、連続培養を前培養とした研究もある²⁰⁾。この場合、 Q_p の値は μ により変化した。すなわち、 μ が低かった細胞は大きな Q_p 値を示し、逆に μ が高い細胞は小さな Q_p 値を示す傾向にあった。これは、希釈率の大きい（ μ が大きい）前培養から得た細胞は、リンの豊富な状態にあったのに対し、希釈率の小さい前培養では、細胞がリン欠乏状態にあったことに由来すると解釈される。これらの研究で Q_p の初期値が P の関数として表わされたことは、 f_p が一定とすると(1)式と矛盾しない。なぜならば、リン取り込みにしたがって f_p が変化することを既往の研究では考慮していないからである。

リン欠乏下にあった細胞にリンが供給された場合、その急速な取り込みはごく短時間で終了（約4時間：図1B参照）し、ゆっくりした取り込みとなった。Healey¹⁵⁾ は、リン欠乏細胞にリンを供給した場合、急速な取り込みは20時間目には（それ以前の測定値は不明である）停止したと報告している。逆に Q_p 値が小さい細胞（例えばE細胞）が、細胞内のリンを使いいきり、再び大きな Q_p 値（DおよびS細胞等）を得るまでには数日間という長い時間を要した。

図3は、MZG培地に移されたE細胞の比増殖速度を示す（実験方法の項参照）。接種直後、約2日の誘導期間が認められた点を除けば、DおよびS細胞についても同様な関係が得られた。比増殖速度 μ は、 f_p のみの関数となった。培地中のリン濃度はたとえそれが0であっても増殖が認められた。図3のデータにはかなりばらつきが認められるが、 f_p が増加するにつれて μ も増加する傾向にあった。このばらつきは、数日間の回分培養における1日ごとの増殖量より μ を決定したためであると思われる（実験方法参照）。 f_p が最小値（ $f_{p,\min}$ 、約0.1%）にまで減少した場合、増殖は認められなかった。しかし、 f_p が増加し、0.8%になった場合、 μ は最大値、 μ_{\max} となった。

既に報告^{7),13),27),31)} された結果と同様に、本研究における μ と f_p との関係は次式で表わされた。

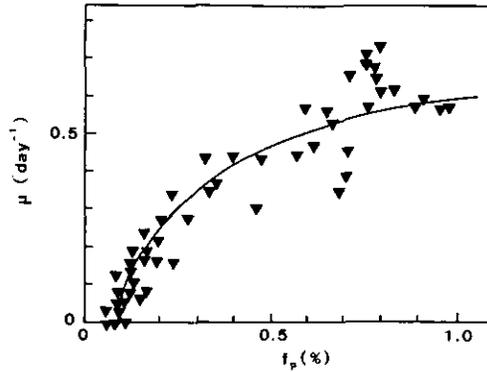


図 3 μ と f_p との関係。実線は $\mu_{\max} = 0.7 \text{ d}^{-1}$, $K_g = 0.2\%$, および $f_{p,\min} = 0.1\%$ として式(2)より計算した。

Fig. 3 μ vs. f_p

Solid line was obtained from Eq. (2), wherein $\mu_{\max} = 0.7 \text{ d}^{-1}$, $K_g = 0.2\%$, and $f_{p,\min} = 0.1\%$ were used.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{(f_p - f_{p,\min})}{K_g + (f_p - f_{p,\min})} \quad (2)$$

ここに,

μ_{\max} = 最大比増殖速度, d^{-1}

$f_{p,\min}$ = 最小 f_p 値 (増殖が認められない f_p) $\text{mg P} \cdot \text{mg dw}^{-1}$, %

K_g = 定数, %

図3の実線は, $\mu_{\max} = 0.7 \text{ d}^{-1}$, $K_g = 0.2\%$, ならびに $f_{p,\min} = 0.1\%$ とした式(2)による計算値である。この定数のうち, $f_{p,\min}$ については増殖が認められなくなる f_p の平均値を採用した。他の値は, Lineweaver - Burk プロットによって推定した。Nyholm¹³⁾の報告によれば, μ_{\max} , K_g , および $f_{p,\min}$ として次のような値が示されている。

Chlorella pyrenoidosa

$$\mu_{\max} = 2.4 \text{ d}^{-1}, K_g = 0.4\%, f_{p,\min} = 0.13\%$$

Selenastrum capricornutum

$$\mu_{\max} = 2.3 \text{ d}^{-1}, K_g = 0.3\%, f_{p,\min} = 0.15\%$$

D および S 細胞についてのデータは図3には示さなかった。しかし, 図3の実線と同一のパラメータが D および S 細胞に適用できた。したがって, 初期2日程度の誘導期を除けば μ は前培養によらないといえる。

引 用 文 献

- 1) Harold, F. M. (1963): *J. Bacteriol.*, **86**, 216.
- 2) Harold, F. M. (1964): *J. Gen. Microbiol.*, **35**, 81.
- 3) Harold, F. M. (1966): *Bacteriol. Rev.*, **30**, 772.
- 4) Weimberg, R. (1976): *Can. J. Microbiol.*, **22**, 867.
- 5) Droop, M. R. (1976): *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **55**, 541.
- 6) Fuhs, G. W. (1969): *J. Phycol.*, **5**, 312.
- 7) Rhee, G. (1973): *J. Phycol.*, **9**, 495.
- 8) Sicko-Goad, L. and Jensen, T. E. (1976): *Amer. J. Bot.*, **63**, 183.
- 9) Reynolds, C. S. (1973): *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **184**, 29.
- 10) Gerloff, G. C. and Skoog, F. (1954): *Ecology*, **35**, 348.
- 11) Reynolds, C. S. (1972): *Freshwater Biol.*, **2**, 87.
- 12) Schnoor, J. L. and O'Connor, D. J. (1980): *Water Research*, **14**, 1651.
- 13) Nyholm, N. (1977): *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 467.
- 14) Batterton, J. C. and Van Baalen, C. (1968): *Can. J. Microbiol.*, **14**, 341.
- 15) Healey, F. P. (1973): *J. Phycol.*, **9**, 383.
- 16) Lehman, J. T. (1976): *J. Phycol.*, **12**, 190.
- 17) Mohleji, S. C. and Verhoff, F. H. (1980): *Jour. Water Poll. Control Fed.*, **52**, 110.
- 18) Stewart, W. D. P. and Alexander, G. (1971): *Freshwater Biol.*, **1**, 389.
- 19) Tilman, D. and Kilham, S. S. (1976): *J. Phycol.*, **12**, 375.
- 20) Healey, F. P. and Hendzel, L. L. (1975): *J. Phycol.*, **11**, 303.
- 21) Azad, H. S. and Borchardt, J. A. (1970): *Environ. Sci. Technol.*, **4**, 737.
- 22) Chisholm, S. W. and Stross, R. G. (1976): *J. Phycol.*, **12**, 210.
- 23) Chisholm, S. W. and Stross, R. G. (1976): *J. Phycol.*, **12**, 217.
- 24) Zehnder, A. and Gorham, P. R. (1960): *Can. J. Microbiol.*, **6**, 645.
- 25) U.S. Environmental Protection Agency "Phosphorus, all forms (Automated Colorimetric Ascorbic Reduction Method)", in *Manual of methods for chemical analysis of water and wastes*, USEPA, Ed. (EPA-625/6-74-003a, USEPA *Technology Transfer*, 1976), P. 256.
- 26) S. Aiba, "Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganism", in *Advances in Biochemical Engineering*, (Springer-Verlag, New York) (in press).
- 27) Nyholm, N. (1976): *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1043.
- 28) Aiba, S. Ohtake, H. and Inoue, T. (1979): *Biotechnol. Letters*, **1**, 235.
- 29) Lowendorf, H. S., Bazinet, G. F. Jr. and Slayman, C. W. (1975): *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 541.
- 30) Lowendorf, H. S. and Slayman, C. W. (1975): *Biochim. Biophys. Acta*, **413**, 95.
- 31) Goldman, J. C. and McCarthy, J. J. (1978): *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 695.

6. マイクロコズムシステムによる *Microcystis* の大量培養

岡田光正¹・須藤隆一¹

Mass Cultivation of *Microcystis* in a Microcosm System

Mitsumasa OKADA¹ and Ryuichi SUDO¹

Abstract

A highly controllable microcosm system which is able to simulate thermal stratification and diurnal variation of light intensity and is capable of microbial culture under sterilized conditions has been constructed. Two unialgal strains of *Microcystis* were cultivated in this system and *M. aeruginosa* accumulated at the surface of water as is observed in lakes. The specific rates of population growth in the microcosm were 0.1 day^{-1} for *M. aeruginosa* and from 0.3 day^{-1} to 0.5 day^{-1} for *M. flos-aquae* and these values were significantly smaller than those observed in flask culture experiments in spite of high light intensity at the surface of the microcosm. The dissolved oxygen concentration in the microcosm showed vertical distribution and was only 2 mg/l at 2 m depth.

1. はじめに

下水や産業廃水の処理施設の普及にともない、いわゆる有機物による汚濁は著しく減少したが、これらの施設は窒素およびリンの除去には効果的でない。このため湖沼の富栄養化は相変わらず進行している。とくに諏訪湖、霞ヶ浦などの富栄養化が著しく進行した湖沼においては藍藻類の *Microcystis*, *Anabaena* を中心とした水の華が大発生し、悪臭の発生、美観の低下のみならず、養殖魚類の斃死、浄水処理障害など多くの社会的問題を引きおこしている。

このような諸問題は富栄養化の進行した湖沼に一般に発生することであるが、とくにアオコ、赤潮と呼ばれる藻類の大発生は我々の生活に直接的な被害をもたらすため、緊急の対策が望まれている。

藍藻類による水の華の発生に関する調査・研究は既にかなり多く行われている。これらは① Reynolds^{1),2)} Sirenko³⁾のような湖沼における水の華の調査を主体とする研究、および②実験

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16-2

Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

室内で水の華の主要構成種を培養し、その培養特性より湖沼における水の華生成現象を理解しようとする微生物学的研究^{4),5)}とに分類される。

しかし、前者は対象とする系が複雑であるため、目的とする情報を得ることが困難な場合が多い。またデータの再現性、普遍性にも問題がある。逆に後者は系を単純化しすぎているため得られる情報に限界がある。また湖沼としての特性を無視しているため、このような情報のみから湖沼における水の華の特性を理解することは困難である。とくにアオコ、赤潮などのように大発生が見られる種は、垂直方向に移動することが知られている。通常の室内実験によってこのような特性を把握するのは困難であろう⁶⁾。

以上の2者の中間的方法としてマイクロゾム法がある。本研究においては水の華の生成機構を解明するために建設した制御能力の高いマイクロゾムの機能について述べるとともに、*Microcystis* の単藻培養による実験室内での人為的な水の華の生成結果について述べる。

2. マイクロゾムの概要

図1に示したように、マイクロゾムは自然系とフラスコレベルの実験系との中間段階の実

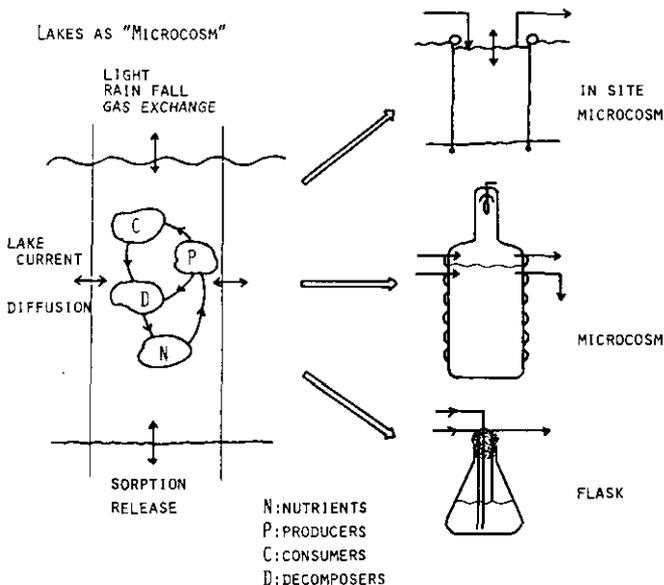


図 1 自然の湖沼と実験室におけるフラスコレベルの実験系との中間規模にあるマイクロゾムの概念図

Fig. 1 Schematic diagram of a natural system of lakes, a small-scale laboratory system, and the intermediate "microcosm" system.

験装置である。その設置場所によってマイクロコズムは湖沼に設置するもの (in site microcosm) と、実験室に設置するものとに分類できる。湖沼に設置するもの⁷⁾は流動および栄養塩濃度などの制御が可能であるが、他の条件は設置した湖沼と同一である。実験室に設置するものは^{8),9)}多少小規模にならざるを得ないが温度、照度などの環境条件の制御も可能となる。

本研究で述べるマイクロコズムは、従来の実験室内マイクロコズムよりさらに制御性を向上させ、温度躍層の形成、照度の日変化を可能にした。また全システムを滅菌可能にして特定の微生物の純粋培養をも可能にした。したがって陸水学的な意味での湖沼と、微生物学的な意味での培養装置との両者の特性を兼ね備えた制御性の高いシステムである。

2.1 システム構成

マイクロコズムシステムの構成を図2に示す。マイクロコズム-A 2槽、マイクロコズム-B 5槽、滅菌槽 2槽、およびそれらを結ぶ配管、さらに20 kWの小型コンピュータ(HITAC 10IIA)を中心とする計測制御系が本システムの主要部である。

これ以外にも滅菌用のスチーム、通気用の無菌空気、温度制御用の冷凍機、ヒーター、調温水槽などの系統もあるが図2には示さなかった。

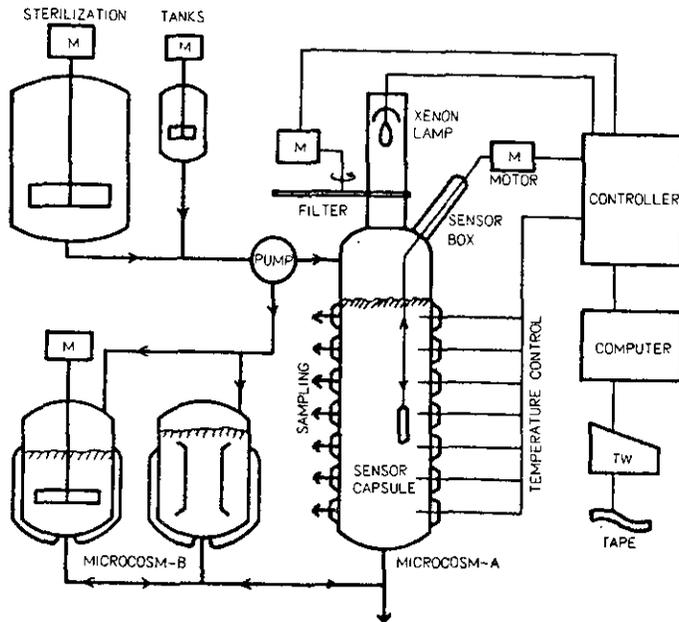


図 2 マイクロコズムシステムの構成図

Fig. 2 Schematic diagram of the NIES microcosm system

2.2 マイクロコズム-A

マイクロコズム-Aは内径1 m、高さ4 mの円筒型の鉄製タンクで内部はステンレス製(SUS 304)である。図3はその外観である。タンク外壁には温度制御用のジャケットが帯状に設置されている。このジャケット(高さ35 cm、厚さ5 cm)は、約10 cmの間隔で7段設けた。各々のジャケットには独立した恒温水槽が連結され、ヒーターおよび冷凍機によってジャケット内と恒温水槽間を循環(約2~6 l/min)する水を所定の温度に制御している。

照明は①波長分布が太陽光線に近い、②高い照度が得られる、という理由により、キセノンランプ(5 kw、松下電工製)を用いた。ランプからの光はレンズにより平行光線にした後、熱線吸収フィルター、照度調節フィルターを通過し、タンク上部の強化ガラス窓よりタンク内部を照射する。照度調節フィルターにはメッシュの異なる金網を用いた。これはキセノンランプ光源が電氣的にその強度を変化させ得ないことによる。フィルターは図4に示すように、フィルター板上に8枚配列され、フィルター板の回転により異なるメッシュを選択し、照度を変化させるようにした。得られる最大照度は、ランプの使用時間によって異なるが、水表面で約30~35 klxである。

マイクロコズム-Aは原則として槽内の水を混合せず、温度成層を形成するような条件で運転する。したがって機械攪拌装置は設けなかった。しかし、必要に応じて底部より無菌空気を吹き

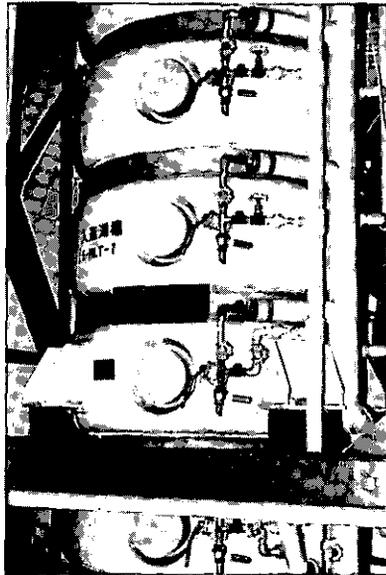


図 3 マイクロコズム-Aの外観
Fig. 3 Exterior view of microcosm-A

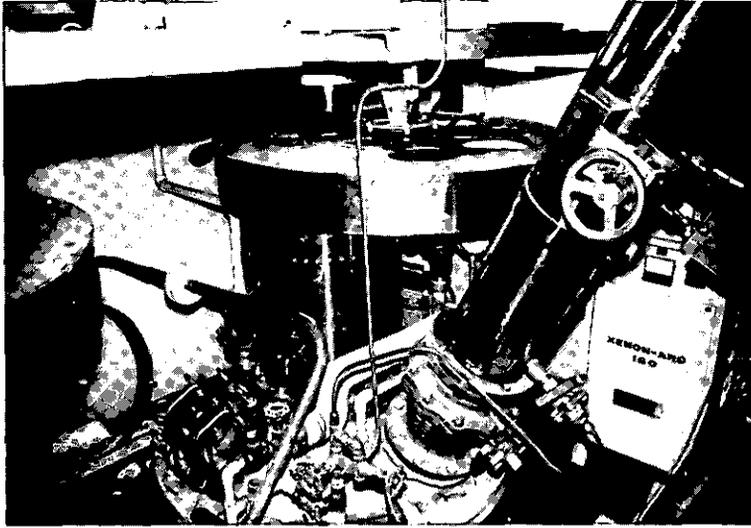


図 4 マイクロコズム-Aの上部に設置したフィルター板とセンサーボックス

Fig. 4 Filter disk and sensor-box at the top of microcosm-A

込むことによって内部を混合すること、もしくは上部のジャケットを低温に、下部のジャケットを高温に設定することにより、密度差に起因する混合を起こすことも可能である。後者の方法は、湖沼における秋期の循環と同じである。

実験に使用する水量は約 2.7 m³ であり、上部に約 0.4 m³ の空間を設けた。この空間には無菌空気を流し、実湖沼と同様に水と空気とのガス交換、および風による表層水の循環 (Langmuir 循環) が起こるようにした。

2.3 マイクロコズム-B

5 基あるマイクロコズム-Bは、通常の小型醗酵槽で内径 1 m、高さ 1.5 m、実容量 1 m³ の内部をステンレスにした鉄製のタンクである。マイクロコズム-Bは槽内温度を均一としたため、ジャケットは一段とした。攪拌は通気攪拌以外に機械攪拌も可能であり、通常型 (3 基) とドラフト型 (2 基) を設けた。マイクロコズム-Aが湖沼の有光層のシミュレーターであるのに対し、マイクロコズム-Bは湖沼の無光層のシミュレーターとして使用し、従属栄養細菌の培養に用いる。このため光源は設けなかった。

2.4 滅菌

マイクロコズムで用いる培地の滅菌には、3 m³および0.5 m³の2つの滅菌槽を用いた。培地をかくはんしながら加圧蒸気を吹きこみ、1.2気圧、120℃で15分間行う。なお小型の滅菌槽は、分離滅菌用である。

マイクロコズムおよび配管システムの滅菌は加圧蒸気を通すことにより、また計測装置のような高温高压に耐えないものはエチレンオキサイドガスによる滅菌を行った。

滅菌、冷却後の培地は所定のマイクロコズムに圧送されるが、必要に応じて定量ポンプ(100 ml/min ~ 960 ml/min)による連続供給も可能にした。

2.5 計測・制御系

マイクロコズム-Aの水温は垂直方向に一定間隔で設置された7つの熱電対(Pt 100 Ω)により、またマイクロコズム-Bの水温は一つの熱電対により測定した。このデータは所定の時間間隔でA/D変換後計算機に取り込まれ、記録されるとともに、電子式温度指示調節計へ入力され、ジャケットと恒温水槽間の循環水の温度制御に用いられる。

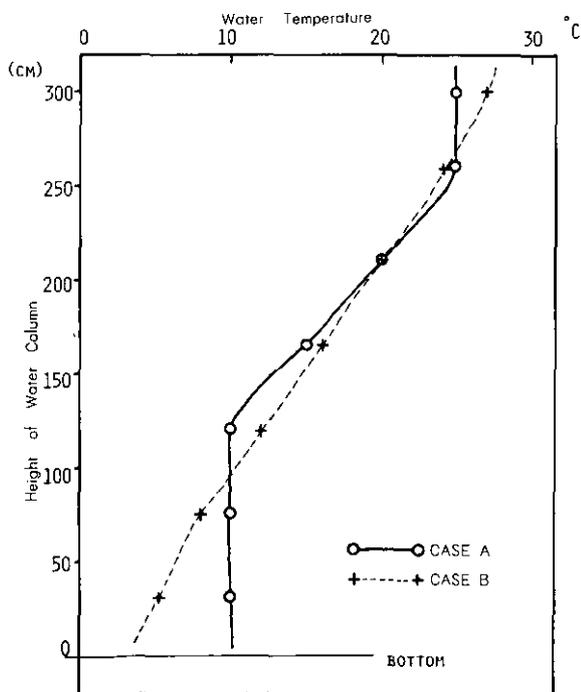


図 5 マイクロコズム-Aに形成した人為的な温度成層

Fig. 5 Artificial thermal stratification formed in microcosm-A

ジャケット内循環水温は10~40℃、ただしマイクロコズム-Aの最下部2段は4~40℃に制御できる。図5にはマイクロコズム-A内の温度分布の一例を示したが、通常半日以下でこのような温度成層が形成された。図中のCASE-Aは夏期の湖沼における温度成層を近似したものであり、CASE-Bは実際には起こり得ないが、温度制御性の確認のために形成した水温分布であり、所定の温度分布が得られることを示している。なお槽内の水平方向の温度差は小さく、中心部と外壁の部分との間で1℃以内であった。

マイクロコズム-Aの照度制御は、照度制御フィルターの計算機による自動交換およびキセノンランプの点滅によって行われる。

pH, ORP, DOのセンサー(ベックマンジャパン製)は、まとめて一つのセンサーカプセル(直径15cm, 長さ80cm)に格納した。マイクロコズム-Bのセンサーカプセルは固定位置であるが、マイクロコズム-Aのセンサーカプセルは計算機制御により、0.3mから3.0mの間を45cm間隔で下降し、7深度のデータを収集する。

センサーカプセルは所定の位置に降下した後、5分静止し、データ取込みの後、さらに降下するようにプログラムを作成した。またマイクロコズム上部にはセンサーボックスを設けた。マイクロコズムを滅菌する場合には、センサーカプセルがセンサーボックスに引き上げられ、タンクとセンサーボックス間が仕切られる。これはセンサーが高温・高圧によって破壊されることを防止するためである。またセンサーのキャリブレーション、補修などを行う場合にもセンサーカプセルはセンサーボックスに引き上げられ、タンクと仕切ることによりタンク内の汚染を防いでいる。なおセンサーボックスはセンサーカプセルのエチレンオキサイドガスによる滅菌容器としても使用される。

センサーによって測定されたデータは計算機によって処理され、タイプライターに出力されるとともに、紙テープの形で出力される。この紙テープは大型計算機による解析のためのデータベースとした。

2.6 採水及び観察

藻類量および栄養塩濃度などの分析は、マイクロコズム内より直接採水して行わなければならない。このためマイクロコズム-Aについては垂直方向に7点、マイクロコズム-Bについては、1点ずつ、採水口を設けた。なお採水によるマイクロコズム内の汚染を防ぐために、各採水口には加圧蒸気および無菌空気による洗浄装置を設置した。

またマイクロコズム-A内を肉眼で観察できるよう、観測窓を外壁に7ヶ所設置した。(図3の円型の窓)

3. 実験材料ならびに方法

使用した藻株は霞ヶ浦より分離した *Microcystis aeruginosa* K-3, および *Microcystis flos-squae* K-5 株である。両株ともにガス胞を有する。しかし実湖沼に出現するようなコロニー形成能を有する株は, *M. aeruginosa* K-3 株のみである。使用培地は水道水によって作成した修正 Zehnder, Gorham の No 11 培地¹⁰⁾ である。各成分の濃度は原組成の 1/5 とした。前培養には 5 l の三角フラスコに培地 2 l を入れ, 光源として白色けい光灯を用いた。温度は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。対数増殖期にある細胞をマイクロコズム-A 内の培地 1 ml につき約 4 l 接種した。

照明は 1 日 14 時間行い, 照度は 2 時間ごとに 5 段階の変化をさせた。水温は $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ もしくは $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ とした。なお温度成層のある条件の場合, 下層 4 層は 25°C とした。攪拌はとくに行わず, 表面に無菌空気を流すのみとした。

藻類濃度 (乾燥重量 mg/l) は毎日採水口より内部の水を採水して測定した。乾燥重量の測定法は, "Standard Methods"¹¹⁾ の濾過法 (802 G) に従った。深さ Z における *Microcystis* の比増殖速度, $r(Z)$ (day^{-1}) は次式によって定義した。

$$r(Z) = \frac{1}{x(z)} \frac{dx(Z)}{dt}$$

ここで,

$x(Z)$: 深さ Z (m) における藻類濃度 mg/l t : 時間, day

なおこの実験においては藻類の垂直方向の移動が考えられるため, $r(Z)$ は必ずしも比増殖速度と同一ではない。

4. 実験結果ならびに考察

図 6 は温度成層のない条件下における深さ別の *M. aeruginosa* の濃度変化を示す。ここで No 1 は, 0.3 m の深さ, No 1 から No 7 は 0.45 m 間隔で, No 7 は深さ 3.0 m に対応する。上層部 (表面より深さ 0.65 m まで) では, 藻類濃度が $r \approx 0.1$ (day^{-1}) で増加した。20 日目から藻類量が急速に減少した 27 日目までの間, *Microcystis* に特有な水表面への集積が認められた。図 7 は, その写真である。ここで放射状のしま模様は藻類の集積を示し, 水表面における空気の流れて生じたものと推定される。これは湖水の Langmuir 循環¹²⁾ によって現われるしま模様の水の華と同一の現象である。下層 (2.1 m から底) では $r = 0$ であった。これはこの深さにおける照度が, 表層における藻類増殖のため著しく低下 (0.2 klx) したためと考えられる。

図 8 は, *M. flos-aquae* の深さ別の濃度変化を示す。この培養においては表層 2 層を 30°C , 下層を 25°C に設定した。このため表層の藻類濃度は下層の 10 倍程度と著しい差が生じた。 r の値は表層では約 $0.3 \sim 0.5 \text{ day}^{-1}$, 下層では約 0.2 day^{-1} であった。

図 9, 図 10 には *M. flos-aquae* 培養 24 日目における照度および溶存酸素濃度の深さごとの日

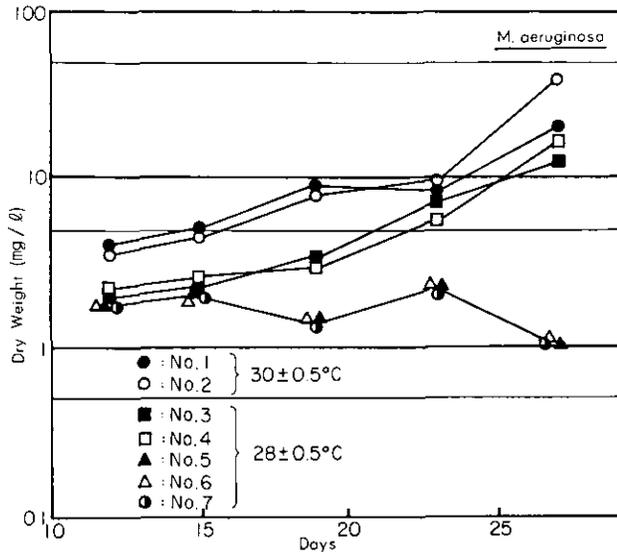


図 6 温度成層のない条件下における深さごとの *M. aeruginosa* の増殖曲線

No 1 から No 7 は深さを示す

(No 1 = 0.3 m, No 2 = 0.75 m, No 3 = 1.2 m, No 4 = 1.65 m,

No 5 = 2.1 m, No 6 = 2.55 m, No 7 = 3.0 m)

Fig. 6 Growth curves of *M. aeruginosa* at different depths without thermal stratification.

No. 1 to No. 7 indicate the depth in the water column: No. 1 = 0.3 m, No. 2 = 0.75 m, No. 3 = 1.2 m, No. 4 = 1.65 m, No. 5 = 2.1 m, No. 6 = 2.55 m and No. 7 = 3.0 m.



図 7 表面に集積した *M. aeruginosa* による水の華
(マイクロコスム-A 上部より撮影)

Fig. 7 Surface-accumulated waterbloom of *M. aeruginosa*. (photograph taken from the top of the microcosm-A)

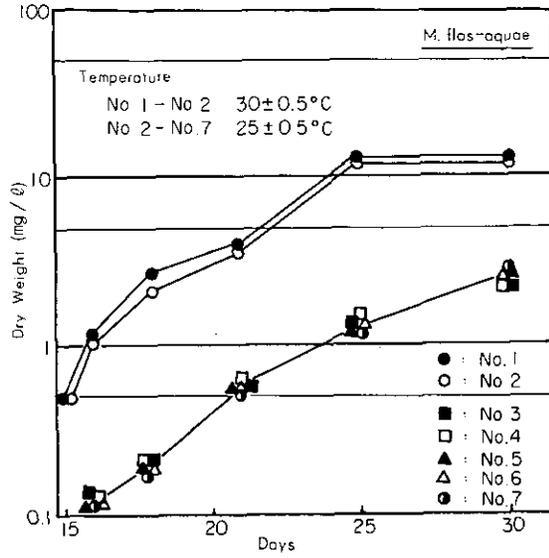


図 8 温度成層のある条件下における深さごとの *M. flos-aquae* の増殖曲線
 Fig. 8 Growth curves of the biomass of *M. flow-aquae* at different depths with thermal stratification

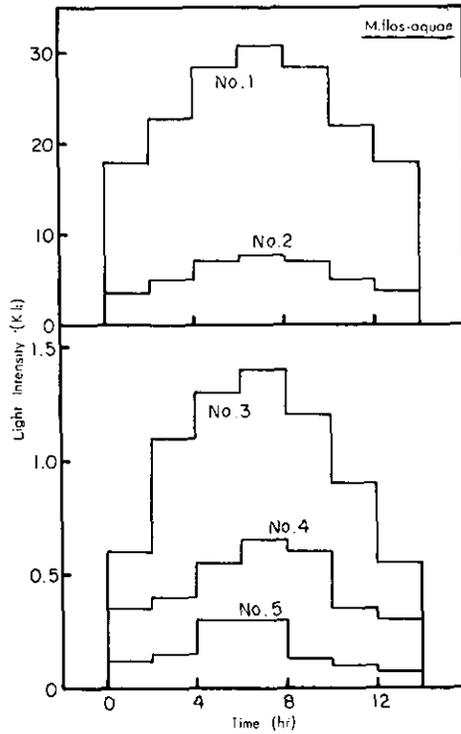


Fig. 9 Diurnal variations of light intensity at different depths measured on the 24th day of the culture of *M. flos-aquae*

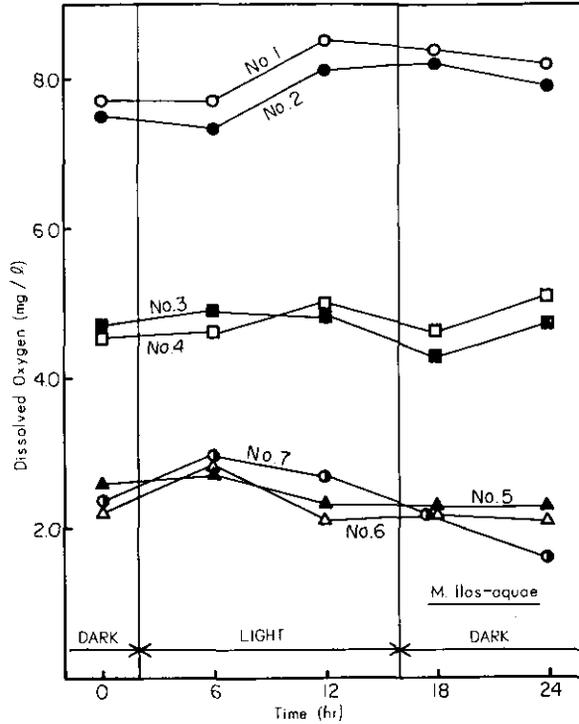


図 10 *M. flos-aquae* 培養中 (24 日目) における深さごとの溶存酸素濃度の日変化
 Fig. 10 Diurnal variations of dissolved oxygen concentration at different depths on the 24th day of the culture of *M. flos-aquae*.

変化を示した。なお図中の番号は既に述べた深さを示す。照度は 0.3 m (No. 1) において最高 30 klx と高く、1.2 m (No. 3) においても照明時間中は 0.5 klx 以上となった。なお 2.55 m (No. 6) 以深の照度は 0.2 Klx 以下と非常に低かったため省略した。

フラスコスケールによる *Microcystis* の比増殖速度 (μ) は、*M. aeruginosa* および *M. flos-aquae* でそれぞれ 1.0 day^{-1} (0.2 klx)、 0.6 day^{-1} (0.5 klx 以上) であった¹³⁾。マイクロコズムにおける表面より 1.2 m (No. 1 より No. 3) 付近の照度は日変化し、夜間がある点を除けば、上述の μ を求めた照度と同程度かもしくはそれ以上である。したがって藻類自身の移動がないとすれば、 r は μ の半分以上の値 (夜間を考慮している) を示してもよい。実際には r の値は、 $\mu/2$ より小さく、とくに *M. aeruginosa* では著しく小さい。したがって実験室の小規模な実験で求めた比増殖速度の値を、そのまま湖沼における *Microcystis* の増殖速度の推定に使用することはできず、浮上・沈降などの湖沼に特有な現象を考慮することの重要性を示唆していると考えられる。

溶存酸素濃度の経時変化はほとんどなかった。しかし深さ方向には著しい差が認められた。表

面より 0.75 m までは飽和濃度であったが、2.1 m では 2 mg/l と急激に低下した。なおデータは示されていないが、*M. aeruginosa* の場合にも同様な溶存酸素濃度の低下が観察された。

5. 結論

1) 温度躍層の形成、照度の日変化、および微生物の純粋培養の可能な制御性の高いマイクロコズムシステムを建設した。

2) マイクロコズム内で *Microcystis aeruginosa* (藍藻類) の単藻培養を行い、水表面に集積する現象(水の華の生成)を再現するのに成功した。

3) マイクロコズム内における *Microcystis* の比増加速度は *M. aeruginosa* では $0.1 (\text{day}^{-1})$ 、*M. flos-aquae* では、 $0.3 \sim 0.5 (\text{day}^{-1})$ であった。フラスコ実験と同様もしくは、それ以上の照度にもかかわらず、この値はフラスコ実験で得られた比増殖速度より小さかった。

4) 溶存酸素濃度の日変化は少なかったが、垂直変化は著しく大きく、2 m の深度でも 2 mg/l に減少した。

引用文献

- 1) Reynolds, C. S. (1973): Growth and Buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin in a Shallow Eutrophic Lake. Proc. R. Soc. Lond. B., 184, 29.
- 2) Reynolds, C. S. and D. A. Rogers (1976): Seasonal Variations in the Vertical Distribution and Buoyancy of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin in Rostherne Mere. England. Hydrobiologia, 48, 17.
- 3) Sirenko, L. A. et al. (1969): Factors of Mass Development of Blue-Green Algae. Hydrobiol. J., 5, 1.
- 4) Gerloff, G. C. et al. (1952): The Mineral Nutrition of *Microcystis aeruginosa*. Am. J. Bot., 39, 26.
- 5) McLachlam, J. and P. R. Gorham (1962): Effects of pH and Nitrogen Sources on Growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Can. J. Microbiol., 8, 1.
- 6) Walsby, A. E. and M. J. Booker (1976): The physiology of Water-Bloom Formation by Planktonic Blue-Green Algae. Br. Phys. J., 11, 200.
- 7) Strickland, J. D. H. and L. D. B. Turhume (1961): The Study of *in situ*. Marine Photosynthesis Using a Large Plastic Bag. Limnol. Oceanogr., 6, 93.
- 8) Mullin, M. M. and P. M. Evans (1974): The Use of a Deep Tank in Plankton Ecology. II., Efficiency of a Plankton Food Chain. Limnol. Oceanogr., 19, 902.
- 9) Ollason, J. G. (1977): Freshwater Microcosms in Fluctuating Environments. Oikos, 28, 262.
- 10) Zehnder, A. and P. R. Gorham (1960): Factors Influencing the Growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin. Can. J. Microbiol., 6, 645.
- 11) "Standard Methods for the Examination of Water and Waste water." 14th Ed., Amer. Pub. Health Assn., Wash., D. C. (1976).
- 12) "Algal Cultures and Phytoplankton Ecology." 2nd Ed., G. E. Fogg, The Univ. of Wisconsin Press, Madison (1975).
- 13) 岡田光正・須藤隆一 (1978): A G P をめぐる諸問題. 用水と廃水, 20, 765.

7.

水の華の生成と消滅のシミュレーション

岡田光正¹・須藤隆一¹・合葉修一²

Simulation on Emergence and/or Disappearance of Waterbloom
in a Eutrophic Lake

Mitsumasa OKADA¹ Ryuichi SUDO¹ and Shuichi AIBA²

Abstract

A mathematical model, unsteady and five dimensional, was constructed to predict the vertical migration, emergence and/or disappearance of the waterbloom of *Microcystis aeruginosa*.

To establish the basis of this simulation, the following rate functions were formulated: i) the algal photosynthetic activity as functions of irradiation light intensity, chlorophyll *a* content, and temperature, ii) the rate of change in chlorophyll *a* content (light adaptation), iii) the rate of vertical migration of vacuoles, and v) the rate of change in turgor pressure as a function of the algal photosynthetic activity.

The simulation showed that the vertical migration, emergence and/or disappearance of single colonies exhibited a cycle of three days and did not necessarily represent that in the natural environment, because the group of algal colonies in practice should have distribution in size and showed apparently the cycle of a day.

A sort of sensitivity analysis on various state- and control-variables used in the model revealed that "increase" of the following variables tend to favor the emergence of the waterbloom at the surface: i) concentration of suspended materials in water, ii) algal colony-size, and iii) regeneration rate of gas vacuoles. On the other hand, variables, whose "decrease" being likely to be accompanied by the waterbloom appearance, were: 1) temperature (provided: a range between 24 and 32 °C), ii) chlorophyll *a* synthesis rate, and iii) rate of change in turgor pressure.

-
1. 国立公害研究所 水質土壌研究部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
 2. 大阪大学工学部 醸酵工学科 〒565 吹田市山田上
Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Yamada-kami, Suita-shi, Osaka 565, Japan.

1. はじめに

我国の富栄養湖においては、*Microcystis*、*Anabaena* 等による水の華の発生が、夏から秋にかけて頻りに観察されている。水の華の大発生は、特有の悪臭の発生、湖面の美観の低下のみならず、魚類の斃死、水質の悪化（COD、SSの増加、透明度の低下）をも招くため、大きな問題となっている^{1),2)}。

このような水の華の発生 — 水表面への藻類の集積、マットの形成 — は、水の華を構成する藻類の垂直移動、すなわち水表面への浮上によるものと考えられている³⁾⁻⁶⁾。水表面において、*Microcystis* 等が厚い層となって存在するのは、必ずしも水表面における異常な増殖を意味するものではない。水の華の生成と消滅の過程を予測するには、垂直移動の機構を知ることが不可欠であるといえる。

プランクトン性の藍藻類は通常ガス胞（gas vacuole）と呼ばれる空隙を細胞内に有する。赤潮（red tide）構成種が運動性を有し、水表面への移動はその運動性に由来するものと見なされるのに対し、*Microcystis*、*Anabaena*等の垂直移動は、このガス胞量の変化による細胞（もしくはコロニー）の比重の変化に由来するものと考えられている³⁾⁻⁷⁾。図1はWalsbyらの報告を中

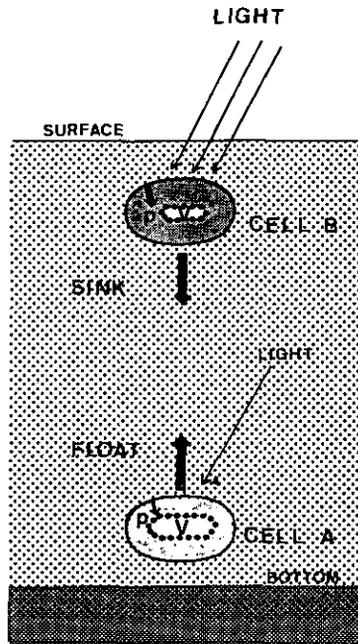


図 1 ガス胞による藻類の浮上・沈降の機構

Fig. 1 Schematic diagram of the mechanism of vertical migration of gas-vacuolated algae

心にして作成したガス胞の増加、減少による藻類の垂直移動の機構を示す模式図である。ガス胞量、 V_f (%)は、細胞の膨圧の増加によって耐圧性の低いガス胞が破壊されるため減少し、逆に膨圧が低い場合にはガス胞量は増加する。膨圧 P (kN/m²) は光合成活性が高い場合は上昇し、光合成活性が低いか、暗条件のように全くない場合には減少する^{5),7),8)}。コロニーが下層に存在する場合(図1, Cell A), 細胞が受ける光の強度は小さい。光合成活性も低く、したがって膨圧も低い。この場合、ガス胞量が増加するため、コロニーの比重は低下し、浮上するようになる。表面付近に浮上したコロニー(図1, Cell B)は強光を受けるため、下層と全く逆の変化をする。(光合成活性上昇 → 膨圧増加 → ガス胞の破壊 → 比重増加 → 沈降)。

ガス胞を有する藻類の垂直移動を、実際の湖沼で観察した研究は既にいくつか発表されている。定性的ではあるが上述のメカニズムにより、その垂直移動パターンを説明している報告^{4)-6),8),9)}もある。しかし、その垂直移動の状況は必ずしも一定でない。Watanabe⁹⁾, Walsby⁴⁾, Reynolds⁶⁾らは、季節によっては表層でなく、ある一定の深さにガス胞を有する藍藻が集積し、表面に水の華を形成しない例を報告している。一方、Okino²⁾, Reynolds⁵⁾は *Microcystis aeruginosa* の水の華の発生時の垂直移動を調査した。この場合、藻類は夜間から朝にかけて水表面に浮上した。このため水表面に集積し、午前中は水の華を形成した。しかし夜間再び上昇は始めるまでの間、午後はむしろ沈降し、藻類濃度は深さ方向に均一となった。この変化は毎日繰り返された。この例に反し、一度浮上したコロニーがほとんど沈降せず、長期間水表面に水の華を形成する例も霞ヶ浦で観測されている。

ガス胞に由来する水の華の発生・消滅の過程は、その中にいくつかの変化過程を含み、実際に観察される浮上・沈降のパターンは必ずしも一定でない。したがって単に定性的な議論のみではなく、速度、量に対して具体的な値を与えるように諸過程を定量化することが必要となる。さらにその数学モデルを作成し、既往の観測値と対応するように、全過程の数値シミュレーションを行うことは、水の華発生の諸特性を理解し、さらにその対策を立案するうえで有効であろう。

現在に至るまで富栄養化に関する論文は数多く発表され、とくに近年においてはその数は莫大なものとなっている¹⁰⁾⁻¹²⁾。しかしながら、藻類の増殖特性を十分に考慮したモデルは少ない。Biermann¹²⁾らは藻類種の季節的な変化をも考慮したモデルを提案している。しかし、用いた式、パラメータに対する実測データ等の裏付けはほとんどないといってよい。シミュレーション結果の信頼性を高めるためには、可能な限り室内実験、および湖沼の現地調査データに立脚したシミュレーションを行うことが重要である。

この点に関し、浮上・沈降の機構を明らかにしたWalsbyらの論文では、定式化には至っていないが各変化過程、もしくはそれを組み合わせた過程に関する種々の測定値 — ガス胞の増加・減少速度、膨圧の上昇・下降速度 — が報告されている^{7),13)}。またLehmanらはガス胞の生成速度を測定している¹⁴⁾。Reynoldsらは野外調査により、*Microcystis*, *Anabaena*等の浮上・沈降速度を測

定し、その速度がガス胞の量に依存するとともに、Stokesの公式に従ってコロニーの大きさにもよることを確認している^{5),8)}。本研究においては、種々の光強度下においてタービドスタット連続培養を行った *Microcystis aeruginosa* の光合成活性等の実測データ、ならびに既発表のデータを整理して *Microcystis* による水の華発生過程の定式化を行う。

浮上・沈降は単に水の華を生成する要因であるのみならず、水の華形成種に対して、水の華を形成しない種 — 浮上・沈降を行わない — とは異なる環境条件をもたらす点も無視しえない。すなわち、光に関していえば、浮上・沈降を行うことにより異なる照度の光を受けることになる。また栄養塩濃度は、とくに成層した場合下層の方が高い。したがって自力で浮上・沈降しうる藻類は、深層部に下降して栄養塩を吸収するとともに、表層部で十分な照度を得て光合成を活発に行うことが可能であると考えられている¹⁾。上記の理由により、浮上・沈降は水の華の生成、とくに水の華の生成種他種に対する優占性を論ずるには重要な点であろう。

以上述べた議論より、本章の目的を下記の諸点として議論を進める。

- 1) 水の華生成種の浮上・沈降、および増殖の諸過程を数学モデルで表現する。
- 2) 全過程を通じた数値シミュレーションモデルを作成する。
- 3) シミュレーション結果を既往の観測のデータと対比させ、水の華の生成と消滅過程の特色を明らかにする。
- 4) シミュレーションモデルにおける種々の外部・内部因子に関するパラメータに対してモデルの応答を検討し、水の華の生成要因を明らかにする。
- 5) 4)の結果より、水の華の防止対策を提示する。

後述するが、本章のシミュレーションにおいては、水の華構成種の代表として *Microcystis aeruginosa* を選び、その増殖、水表面への集積による水の華の生成、さらにその消滅の過程を明らかにする。したがって議論を単純にするために湖水の上下方向の混合はないものとした。また、浮上・沈降の過程と直接的な相互関係が明らかでない栄養塩についても、それが全過程に対し律速とならないと仮定した。

2. シミュレーションモデル

2.1 モデルの構成

水の華の発生および消滅に関する状態変数および外部変数、またその相互関係を図2に模式的に示した。この図は既往の研究結果³⁾⁻¹⁰⁾をもとにして作成した。

状態変数は下記の5変数である。

- 1) 藻類濃度(乾燥重量), X [g·dry-cell/m³]
- 2) コロニーの深さ, Z [m]
- 3) ガス胞の容積比, V_f (%)

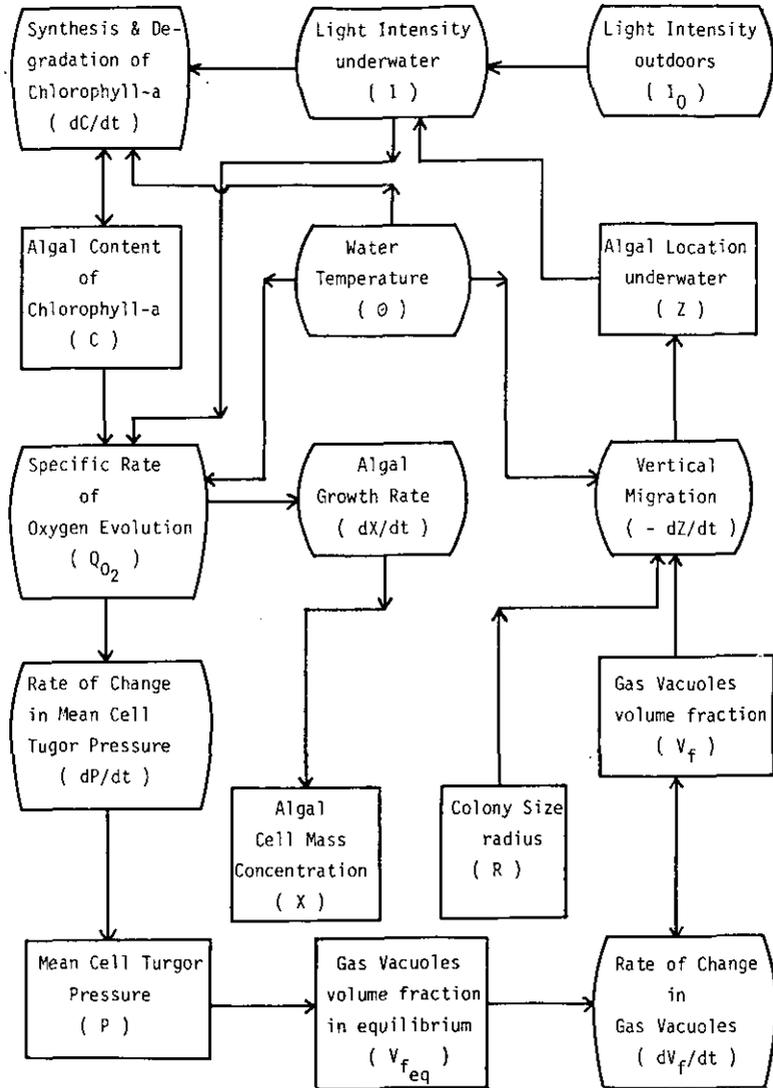


図 2 水の華 (*Microcystis aeruginosa*) 生成および消滅のシミュレーションモデルの構成図

Fig. 2 Schematic diagram of state- and control-variables used in simulation of the waterbloom (*M. aeruginosa*)

- 4) 細胞の膨圧, P [kN/m²]
- 5) 細胞のクロロフィル含有率, C [w/w %]

外部変数は次のとおりである。

- 1) 水表面および水中照度 I_0 および I klx
- 2) 水温 θ °C
- 3) コロニーの半径 R [m]

図中の dc/dt , dP/dt , dX/dt , dV_f/dt , $-dz/dt$ はそれぞれの変化速度、また Q_{O_2} は光合成活性を表わしている。 I , I_0 , θ , Z , R , X を除いた主たる変化過程は細胞内の生理活性を示している。図中の矢印はある変数(変化速度)の他の変数に対する依存性を示し、矢印の起点となる変数の関数となることを表わしている。一例として Q_{O_2} を挙げると、これは I , θ , および C の関数と考えられ、また逆に Q_{O_2} は dX/dt , および dP/dt に影響を与えることを示している。下記のモデルは本図に基づいて構成された。

2.2 仮定

本ミミュレーションモデルは下記の仮定に基づいて構成された。

- 1) 風もしくは深さの方向の温度差に起因する垂直方向の水の流れはない。
- 2) コロニー径は一定である。
- 3) 藻類の生理学的な特徴、すなわち、 V_f , P , C , および存在する深さ Z は、藻類間で差がないものとする。したがって対象となる藻類はある時刻 t において、深さ Z にのみ存在し、 X はその場所での濃度を示す。(記号については図2を参照のこと)
- 4) 表面照度, I は日間変動し、そのパターンについては既往の文献値で代表する¹⁵⁾。また水温, θ および着目する *M. aeruginosa* 以外の藻類濃度(水の濁度を代表する) θ は、深さ方向に一定でかつ時間変化しないものとする。
- 5) 栄養塩類はいずれも対象とする諸過程に影響を与えないものとする。

2.3 定式化

上述のモデル構成および仮定に従って導かれた非定常の数値モデルを表1に示す。各々の式の導出については3で述べる。

(1)式より(5)式に至る連立微分方程式を、(6)より(18)式の補助方程式とともに解析的に解くことは明らかに不可能である。ここでは Runge-Kutta-Gil 法による数値解法を採用した。使用した計算機は国立公害研究所電子計算機室の HITAC 8450 システムである。

表 1 システム方程式 (連立微分方程式(1)~(5)および補助方程式(6)~(18))
 Table 1 System equations (Eqns. (1) to (5) and adjust ones used in simulation)

Five state variables used:

- X = algal cell mass concentration, g dry cell/m³
 Z = algal location underwater, m
 V_f = volume fraction of gas vacuoles in cells, %
 P = turgor pressure of cells, kN/m²
 C = chlorophyll a content in cells, % (w/w)

The system of differential equations:

$$\frac{dX}{dt} = \kappa \cdot Q_{O_2} \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dZ}{dt} = - \frac{2g \cdot (\rho_c - \rho_w - a' \cdot V_f)}{9\mu_w} \times 3600 \quad 0 \leq Z \leq Z_{\max} \quad (2)$$

$$\frac{dV_f}{dt} = - \frac{(V_f - V_{feq})}{dt} \quad \text{for } V_f > V_{feq} \quad (3)$$

or

$$= \lambda \quad \text{for } V_f \leq V_{feq}$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot (P_{\max} - P) \cdot Q_{O_2} - \beta \cdot (P - P_{\min}) \quad (4)$$

$$\frac{dC}{dt} = \alpha' \cdot (C_{\max} - C) - \beta' \cdot C \quad (5)$$

$$Q_{O_2} = \kappa' \cdot I \quad \text{for } I < (Q_{O_2})_{\max}/\kappa' \quad (6)$$

or

$$= (Q_{O_2})_{\max} \quad I \geq (Q_{O_2})_{\max}/\kappa'$$

$$\kappa' = m \cdot C \quad (7)$$

$$(Q_{O_2})_{\max} = (a \cdot \theta + b) \cdot C \quad (8)$$

$$\alpha' = \omega \cdot \gamma' \quad (9)$$

$$\beta' = \gamma' \cdot I \quad (10)$$

$$\omega = 1/(p' + q' \cdot \theta) \quad (11)$$

$$\rho_w = 998.2 + 0.256 \times (20 - \theta) \quad (12)$$

$$\mu_w = 10^{(1.65 + 262/(\theta + 139))} \times 10^{-2} \quad (13)$$

表1 (つづき)
Table 1 (Continued)

$$V_{f_{eq}} = V_{f_{max}} \cdot \left(1 - \int_0^P f_{n, \xi, \sigma}(P) dP\right) \quad (14)$$

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot Z} \quad (15)$$

$$\epsilon = m' \cdot \delta + n' \quad (16)$$

$$I_0 = I_{0_{max}} \cdot \sin^3 \left(\frac{\pi \cdot (t_d - t_{sr})}{t_{ss} - t_{sr}} \right) \quad \text{for } t_{sr} \leq t_d \leq t_{ss} \quad (17)$$

or

$$= 0 \quad \text{for } t_d < t_{sr}$$

or

$$\text{for } t_{ss} < t_d$$

$$t_d = t - \left[\frac{t}{24} \right]_{\text{Gauss}} \times 24.0 \quad (18)$$

3. 基礎データおよび定式化

3.1 Q_{O_2} に対する温度とクロロフィル a 含有率の効果

霞ヶ浦より分離した *Microcystis aeruginosa* K-2 を用いて、温度、照度、クロロフィル a 含有率の異なる種々の条件下で光合成活性 Q_{O_2} の測定を行った。

図3は種々の温度条件下における Q_{O_2} と照度、 I との関係を示したものである。ここで使用した藻体は 2.6 klx, 33°C におけるタービドスタット連続培養 (Run 3, 表2 参照) で定常状態となったものである。図から明らかなように、高照度下で飽和している Q_{O_2} の値は温度に依存した。しかし、 Q_{O_2} が光制限の範囲 (約 10 klx まで) においては、他の報告にもあるように¹⁶⁾⁻¹⁸⁾ Q_{O_2} に対する温度の影響はないと考えられる。図中の実線については後述する。

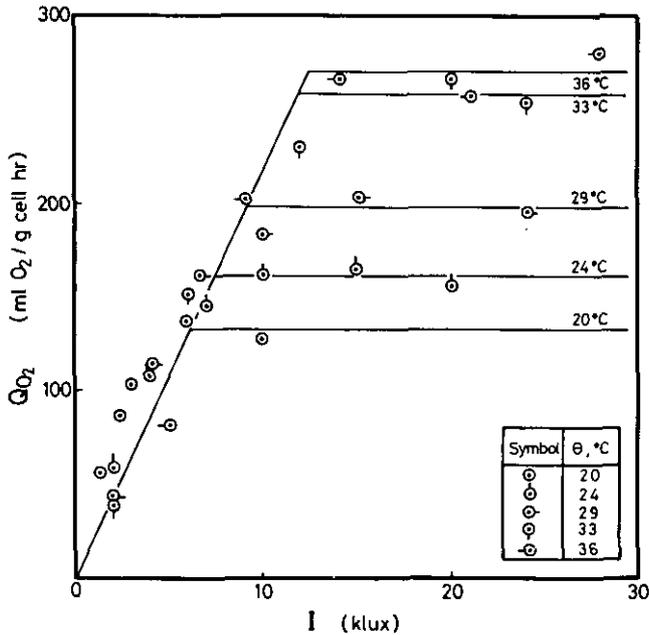


図 3 *M. aeruginosa* の Q_{O_2} に対する照度 (I , klx) と温度 (θ , °C) の効果 2.6 klx, 33°C におけるタービドスタット連続培養 (Run No.3, 表2) から採取した藻体による測定値。図中の実線は最小2乗法によって求めた。

Fig. 3 Q_{O_2} values affected by irradiation light intensity, I and temperature, θ in *M. aeruginosa* cells harvested from a turbidostat culture (2.6 klx and 33°C, Run No.3 in Table 2). Solid lines are secured by the method of least squares.

表 2 *M. aeruginosa* のタービドスタット連続培養結果, および Q_{O_2} 値を表わすパラメータ

Table 2 Algal characteristics in turbidostat cultures and the parameters estimated from Q_{O_2} measurements (*M. aeruginosa*)

Turbidostat cultures						Parameters assessed				Symbol*
Run	θ	I	X	D	C	θ	$(Q_{O_2})_{max}$	K	$(Q_{O_2})_{max}/C$	
	(°C)	(klx)	(g cell/l)	(hr ⁻¹)	(%)	(°C)	($\frac{ml O_2}{g \text{ cell hr}}$)		($\frac{ml O_2}{g \text{ chl. } a \text{ hr}}$)	
1	33	1.8	0.048	0.024	1.9	33	233	19.7	123 × 10 ²	○
2	33	2.5	0.052	0.032	1.5	33	258	19.7	172	□
3	33	2.6	0.045	-	1.5	20	133	21.6	89	⊙
						24	161	21.6	107	⊙
						29	198	21.6	132	⊙
						33	258	21.6	172	⊙
						36	270	21.6	180	⊙
4	33	2.7	0.053	0.037	1.5	33	268	18.8	179	●
5	33	3.9	0.046	0.051	1.7	33	241	20.6	142	●
6	33	6.0	0.046	0.059	1.3	33	234	14.4	180	▲
7	33	8.0	0.046	0.044	1.2	33	142	9.7	118	●
8	33	10.8	0.045	0.028	1.2	33	129	9.8	108	△
9	27	2.6	0.053	0.034	1.1	27	164	16.6	149	●
						33	235	16.6	214	●
10	27	3.9	0.050	0.046	1.0	27	148	11.9	148	●
						33	178	11.9	178	●
11	27	6.0	0.053	0.052	0.71	27	88	6.8	124	●
						33	117	6.8	165	●

* These symbols are used throughout, but in Fig. 6 and 7, symbols in addition to those summarized here are employed.

図4も Q_{O_2} と照度との関係を示す。ただしクロロフィル a 含有率をパラメータとしている。藻体は33°C, 照度1.8から10.8 klx (Run 1, 2, 4~8, 表2参照)における連続培養から得た。光制限下では, Q_{O_2} の光に対する応答はクロロフィル a 含有率に影響されると考えられる。すなわち, 高照度下のタービドスタット培養より得たクロロフィル a 含及量の低い細胞は Q_{O_2} の値が低く, 逆にクロロフィル a 含有率の高い細胞の Q_{O_2} は高い。しかし, 光飽和領域におけ

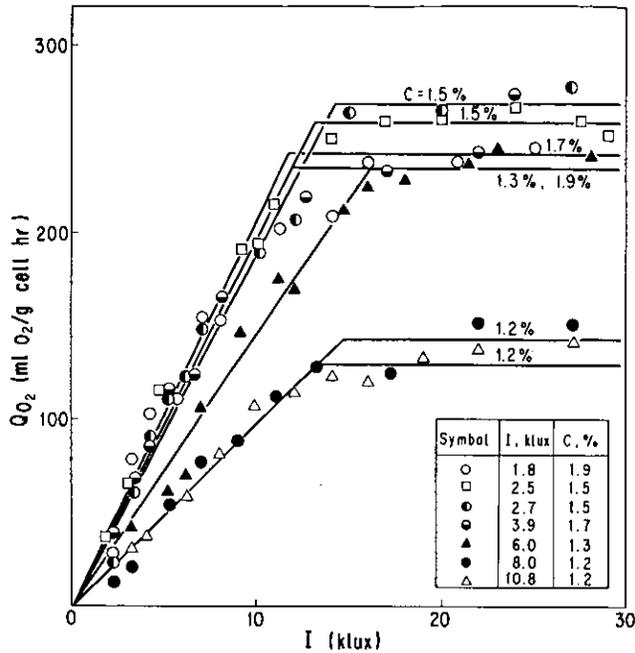


図 4 *M. aeruginosa* の Q_{O_2} に対する照度とクロロフィル *a* 含有量 (*C*, %) の効果

33°C, 1.8~10.6 klx におけるタービドスタット連続培養 (Run No 1, 2, 4~8, 表 2) から得た種々のクロロフィル *a* 含有量 (1.2~1.9%) を持つ藻体による測定値, 実線は最小 2 乗法によって求めた。

Fig. 4 Q_{O_2} values (measured at 33°C) of *M. aeruginosa* cells harvested from a turbidostat culture (light intensities ranged from 1.8 to 10.8 klx, 33°C) vs. light intensity, *I* Chlorophyll *a* content, *C* being parameter (Runs Nos. 1~2, 4~8 in Table 2). Solid lines are secured by the method of least squares.

る Q_{O_2} の値は必ずしもクロロフィル *a* 含有率の増加に対応して増加していない。すなわち, Bader⁸⁾ および Nielsen⁹⁾ によって指摘されたように, 光制限領域でない Q_{O_2} の値は必ずしもクロロフィル *a* 含有率の影響を受けず, 場合によっては関連する酵素反応によって決定されるという可能性を示している。図中の実線については後述する。

図 3 ならびに図 4 より明らかなように, 光合成による比酸素発生速度 (ここでは光合成活性をこの値で代表する) を定式化するためには, 照度, 温度, およびクロロフィル *a* 含有率を考慮しなければならない。図中の各点のプロットより, 最初に検討したのは Monod 型の式による定式化である。しかし, Lineweaver-Burk のプロットによりパラメータ (飽和定数, (Q_{O_2})_{max})

を推定するのは、

- ① データのバラツキが大きい
- ② 求められたパラメータの値は、 I が大きい場合 Q_{O_2} の値を過大に評価しやすい。逆にこの Q_{O_2} (I :大)の値を合わせると他の値を過小評価する。

などの理由で困難であった。

ここではBlackmanの式²⁰⁾により Q_{O_2} と照度、 I との関係を表わし、クロロフィル a 含有率、 C および温度、 θ の効果はパラメータの値で表現した。

$$Q_{O_2} = \kappa' \cdot I \quad \text{for } I < (Q_{O_2})_{\max} / \kappa'$$

or

$$(Q_{O_2})_{\max} \quad \text{for } I \geq (Q_{O_2})_{\max} / \kappa'$$
(6)

ここに、

κ' : 比例定数 (C の関数)

ml O_2 /g cell hr klx

$(Q_{O_2})_{\max}$: Q_{O_2} の最大値 (C と θ との関数)

ml O_2 /g cell hr

(6)式の κ' 、 $(Q_{O_2})_{\max}$ の値は、図3、図4、および他の同様なデータを用いて推定した。推定には非線型の最小2乗法²¹⁾を用い、計算は国立公害研究所のHITAC-8450大型電子計算機(以降HITAC-8450と呼ぶ)で行った。推定値は表2に示した。

κ' の値は図5に示すように C の値の関数で与えられる。

$$\kappa' = m \cdot C$$
(7)

ここに、

m : 比例定数

表2に示した $(Q_{O_2})_{\max}/C$ の値、すなわち1gのクロロフィル a 量当たりの光合成による酸素発生速度を、温度に対してプロットしたのが図6である。33°Cのデータについてはかなりのばらつきがあるが、直線関係を仮定しうる。この仮定は先の議論、すなわち高照度下で飽和した Q_{O_2} の値は必ずしもクロロフィル a 含有率によらない、という事実と矛盾するものではない。 Q_{O_2} に対する C の値を除き、温度 θ の影響を明らかにする目的で $(Q_{O_2})_{\max}/C$ 対 θ というプロットを用いだけである。事実、33°Cにおけるデータのばらつきはクロロフィル a の効果を除外していないこと、換言すれば $(Q_{O_2})_{\max}$ の値は必ずしも C の値に比例しないことを示している。

図6のすべての点より、図中の直線を最小2乗法によって求めた。

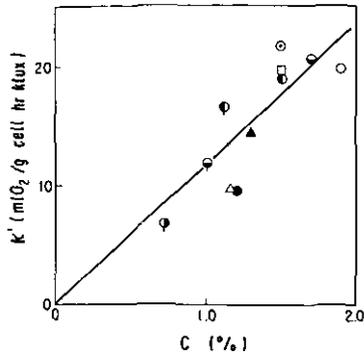


図 5 κ' と C との関係

直線は最小 2 乗法によって求めた。(7)式中の m は 11.7 (図中の記号については表 2 参照)

Fig. 5 Correlation between κ' and C

Solid line came from the method of least squares (for symbols see Table 2)
 $m = 11.7$ in Eq. (7) in the text.

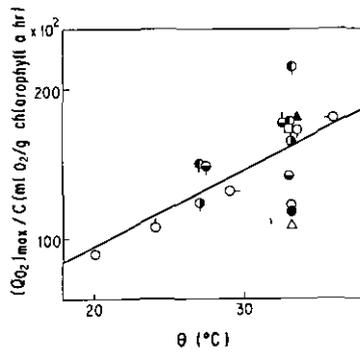


図 6 $(Q_{O_2})_{\max}$ に対する温度の影響。

直線は最小 2 乗法によって求め、(8)式中の a , b の推定値は、 $a = 5.1$, $b = -7.1$ である。

Fig. 6 $(Q_{O_2})_{\max}/C$ vs. temperature, θ (for symbols, see Table 2)

Solid line was obtained by the method of least squares for all the data points. For a and b in Eq. (8) in the text, $a = 5.1$ and $b = -7.1$.

$$(Q_{O_2})_{\max} / C = a \cdot \theta + b \quad (8)$$

ただし、

a , b : 定数

3.2 クロロフィル a 含有率の変化速度

3.2.1 実験方法

使用した *M. aeruginosa* は、3.1 と同じ K-2 株である。500 ml の三角フラスコ (培地: 100ml) にシリコンフォーム (信越化学) の栓をし、タングステンランプ (100W, 東芝) の照明下で回転式振とう培養 (100 回転/分) を行った。照度はフラスコの外側で平均 1.5 klx (液の光路長 = 1 cm), 温度は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ で前培養を行った。

OD₅₅₀ が 0.15 ($\approx 50 \text{ mg cell/l}$) 程度になるまで増殖した後、藻体はそのまま異なる照度条件下 (0~12 klx) に移された。以後 5 から 20 時間毎に藻体中のクロロフィル a 含有率, $C\%$ の測定を行った。なおこの培養は回分式であるため、藻類濃度が増加する。しかし、光遮蔽効果はこの実験の濃度 ($I = 3.0 \text{ klx}$ で 40hr 以内の場合, 最大 210mg/l, 図7 参照) では無視しうるものと仮定した (藻類懸濁液の通過光は、入射光に対し、この実験条件下では約 95% 程度であった)。

3.2.2 実験結果ならびに定式化

図7は、前培養の 1.5 klx より図中に示した照度に移した時刻を $t = 0$ とし、その後の C の経時変化を示したものである。 C の値は 1.5 klx より低照度に移した場合、増加する傾向にあり、逆に高照度下では減少した。 C の値が新しい照度に対して平衡値, C_{eq} になるには約 40 時間を要した。図中の曲線については後述する。

図7に示した現象は、光適応 (light adaptation) と呼ばれており、既にいくつかの報告がある^{17),19),22),23)}。しかし、光適応に関する定式化の試みは現在まで全くなされていない。したがって、ここでは直観的に次の式による定式化を試みた。

$$\frac{dC}{dt} = \alpha' \cdot (C_{\text{max}} - C) - \beta' \cdot C \quad (5)$$

ここに

C_{max} : クロロフィル a の最大含有率, %

α' : クロロフィル a の合成速度に対応する速度定数 (温度の関係), hr^{-1}

β' : クロロフィル a の分解速度に対応する速度定数 (照度の関数とする), hr^{-1}

式(5)右辺第1項は、クロロフィル a 合成可能量, ($C_{\text{max}} - C$) に対する一次反応としてクロロフィル a 合成速度を定義し、第2項は一次反応による分解を仮定している。

(5)式の左辺を0とすると C_{eq} 値が求められる。

$$C_{\text{eq}} = \frac{C_{\text{max}}}{1 + \frac{\beta'}{\alpha'}} \quad (19)$$

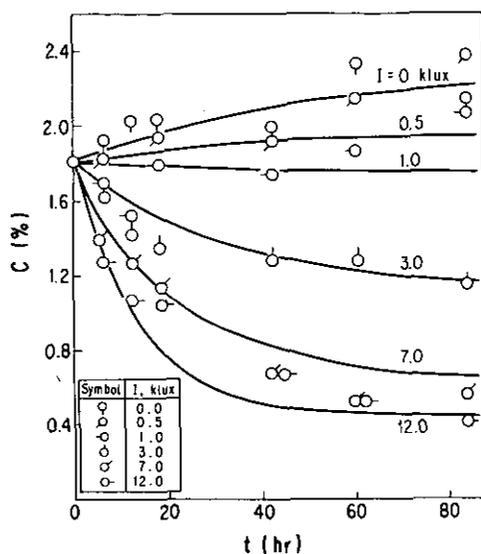


図 7 *M. aeruginosa* のクロロフィル *a* 含有量の経時変化, 27°C, 1.5 klx において回分培養した藻体を 0~12.0 klx に移した後の変化
 図中の曲線は $r' = 0.0053$ として (22) 式により計算した。

Fig. 7 Synthesis and/or degradation of chlorophyll *a* content, *C* of *M. aeruginosa* (batch culture, 27°C, 1.5 klx), when the algal cells were transferred into another batch (27°C), where the light intensity was changed from 0 to 12.0 klx

Solid lines are secured from Eq. (22) by taking the value of r' as 0.0053.

ここでさらに下記の仮定を行う。

$$\beta' = r' \cdot I \quad (10)$$

ここに

r' : 比例定数

(10) 式を (19) 式に代入すると次式が得られる。

$$\frac{1}{C_{eq}} = \frac{1}{C_{max}} + \frac{1}{C_{max}} \cdot \frac{r'}{\alpha'} \cdot I \quad (20)$$

図 7 における 84 時間目の *C* の値, および表 2 における *C* の測定値 (タービドスタット連続培養) を C_{eq} に対応するものとして, *I* に対してプロットを行ったのが図 8 である。 C_{max} および r'/α' の比を求める (20) 式参照) ために, 図中の直線は最小 2 乗法で決定した。直線の傾きに

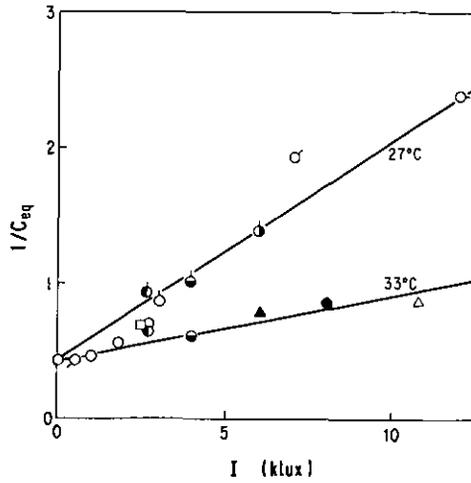


図 8 $1/C_{eq}$ と I のプロット 27°C, 33°Cにおける結果より, r'/α' はそれ
27°C, 33°Cにおける結果より, r'/α' はそれぞれ 0.16, 0.05, C_{max} は 2.4% と
なった。両者のデータの補間により, 任意の温度 θ に対して次の推定式を得た。

$$r'/\alpha' = 0.05 + (33 - \theta) \cdot \frac{(0.61 - 0.05)}{(33 - 27)} = \frac{1}{\omega}$$

$$\omega = \frac{1}{p' + q' \cdot \theta} \quad \begin{array}{l} p' = 0.66 \\ q' = -0.018 \end{array}$$

Fig. 8 $1/C_{eq}$ plotted against I

Solid lines for 27°C and 33°C gave the values of $r'/\alpha' = 0.38$ and $r'/\alpha' = 0.11$, respectively and $C_{max} = 2.4\%$. The value of r'/α' as varied by θ was assumed by a linear interpolation between $\theta = 27$ and $\theta = 33^\circ\text{C}$, when needed, i.e.

$$r'/\alpha' = 0.11 + (33 - \theta) \cdot \frac{(0.16 - 0.05)}{(33 - 27)} = \frac{1}{\omega}$$

$$\omega = \frac{1}{p' + q' \cdot \theta} \quad \begin{array}{l} p' = 0.66 \\ q' = -0.018 \end{array}$$

C_{max} を乗ずることにより, 次式の w の値が求められる。

$$\alpha' = w \cdot r' \tag{9}$$

ここに,

w : 定数 (θ の関数と仮定する)

ここで(9), (10)式を(5)式に代入すると, 次式が得られる。

$$\frac{dC}{dt} = w \cdot \gamma' \cdot (C_{\max} - C) - \gamma' \cdot I \cdot C \quad (21)$$

(21) 式の解析解は、温度、および照度を与えれば得られる。

$$C(t) = \frac{w \cdot C_{\max}}{w + I} + \left(C_0 - \frac{w \cdot C_{\max}}{w + I} \right) \cdot \exp \left\{ - (w + I) \cdot \gamma' \cdot t \right\} \quad (22)$$

ここに、

C_0 : ($t = 0$) におけるクロロフィル a 含有率, %

図7における曲線は、図中の実測値と(22)式による計算値の差の平方和が最小となるように、 γ' を決定し、(22)式によって計算したものである(計算は前述のHITAC-8450による)。(21)式は、第1次近似としては C の変化(光適応)を十分に再現している。

3.3 比増殖速度

図9は、 Q_{O_2} と I との関係式(6式)、および表2に示したタービドスタット連続培養の希釈率($= D = \mu$)のデータを用いて、 Q_{O_2} 値と同一条件下(照度、温度に対して)で得られた比増殖速度、 μ との関係をプロットしたものである。

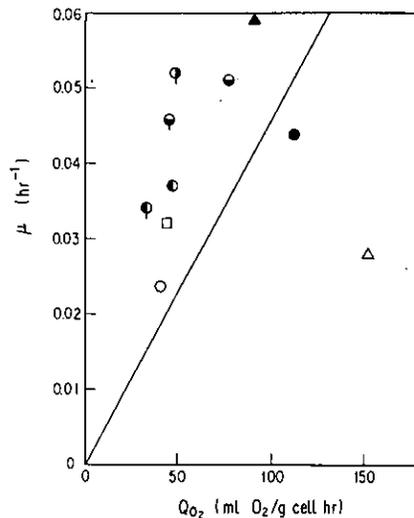


図 9 μ と Q_{O_2} との関係 図中の直線は最小2乗法によって求めた式。式(23)に
図中の直線は最小2乗法によって求めた式。式(23)における $\kappa = 4.6 \times 10^{-4}$

Fig. 9 μ vs. Q_{O_2} (*M. aeruginosa*)

Solid line in the figure was secured by the method of least squares. $\kappa = 4.6 \times 10^{-4}$ in Eq. (23) in the text.

図より,

$$\mu = \kappa \cdot Q_{O_2} \quad (23)$$

ここに,

κ : 比例定数, g cell / ml O₂

図中のプロットにはかなりばらつきがある。しかし, ここでは第1次近似として, 最小2乗法で求めた図中の直線の傾きより κ の値を推定した。

3.4 垂直移動速度

1971年および1972年の夏期, Reynolds⁵⁾ は Crose Mere 湖 (イギリス) に発生した *M. aeruginosa* のコロニーの浮上および沈降速度を測定した。コロニーをキュベットに入れ, 横置きした倒立顕微鏡により, その速度を測定した。温度は $17 \pm 3^\circ\text{C}$ とした。コロニーの沈降速度は9気圧の窒素ガスによりガス泡を完全に破壊した後に測定した。報文中では, 平均コロニー半径, R_m , ガス泡の容積比, $V_f\%$, および膨圧, P kN/m² 等の測定値とともに, その経時変化が図示されている。

1971年および1972年の夏期のデータがそれぞれ報告されている。図示されたデータから上記の諸測定値の相互関係を見出すのは, ガス泡がないコロニーでは沈降し, ガス泡を持つコロニーでは浮上すること, およびこれらの速度は R と V_f の値に依存すること, などの定性的関係以外一

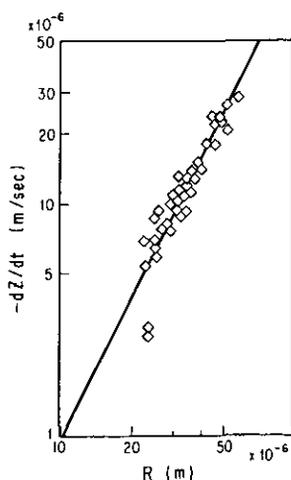


図 10 $17 \pm 3^\circ\text{C}$ におけるコロニーの沈降速度とコロニー半径との関係⁵⁾
直線は最小2乗法による。

Fig. 10 Sinking rate of algal colony in water ($17 \pm 3^\circ\text{C}$) vs. colony radius⁵⁾
Solid line was taken by the method of least squares.

見困難に思われる。

しかし、これらのデータより、ガス胞のないコロニー（ $V_f = 0$ なる細胞からなる）の沈降速度（ $-dZ/dt$ ：正の値になる）と、コロニーの半径、 R_m が、大きな誤差を招かずに図より読み取れるとすると、図10に示すような $-dZ/dt$ と R との関係が得られる。ただし、 V_f の値は大きくても7~8%であるため、ガス胞のあるコロニーと、ないコロニーの半径は変わらないものと仮定した。図中の直線は最小2乗法によって決定した。この直線の傾きがほぼ2であることより、沈降速度はStokesの公式に従うと考えてよい。

$$-\frac{dZ}{dt} = \frac{2g(\rho_c - \rho_w)}{9\mu_w} R^2 \times 3,600 \quad (24)$$

ここに、

- $-dZ/dt$: ガス胞のない細胞から成るコロニーの沈降速度, m/hr (この定義では浮上速度は $-dZ/dt < 0$ で表わされる)
- Z : コロニーの存在する深さ (水表面を $Z = 0$ mと定義するため負の値をとる。)
- t : 時間, hr
- g : 重力加速度, m/sec^2
- R : コロニーの半径, m
- ρ_w : ガス胞のないコロニーの密度, kg/m^3
- ρ_w : 水の密度, kg/m^3
- μ_w : 水の粘度, $kg/m \cdot sec$

図1の直線より ρ_c の値を求めるため、次の式を用いて $17^\circ C$ における ρ_w および μ_w の値を推定した。

$$\rho_w = 998.2 + 0.256 \cdot (20 - \theta) \quad (12)$$

$$\mu_w = 10^{(1.65 + 262/(\theta + 139))} \times 10^{-3} \quad (13)$$

(12), (13)式において $\theta = 17^\circ C$ として求めた ρ_w, μ_w の値を(24)式に代入して ρ_c を求めると、 $\rho_c = 1003.7 \text{ kg/m}^3$ となった。

(24)式において明らかなように、右辺の ρ_c をガス胞を有するコロニーの密度、 $\rho_v \text{ kg/m}^3$ で置き換えると、 $-dZ/dt$ は浮上速度(ただし、ガス胞量が多く浮上しうる場合)を表わす。Reynoldsの報告⁵⁾には、浮上速度、コロニーの半径、ガス胞の容積率が示されている。したがって ρ_w, μ_w ($\theta = 17^\circ C$)が与えられれば、(24)式によって ρ_v を推定できる。

このようにして求めた ρ_v と V_f との関係を示したのが図11である。なお図中の直線は最小2

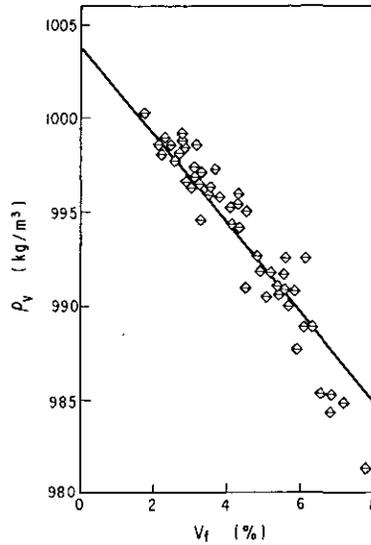


図 11 ρ_v と V_f との関係 (*M. aeruginosa*)⁵ 図中の直線は $V_f = 0$ で $\rho_v = \rho_c$
 図中の直線は $V_f = 0$ で $\rho_v = \rho_c (= 1003.7 \text{ kg/m}^3)$ となるように最小2乗法により決定した。本図より、(2)および(25)式における a' を決定した ($a' = 2.36$)。

Fig. 11 ρ_v vs. V_f (*M. aeruginosa*)⁵
 Solid line was secured by the method of least squares. The intercept of this line with the ordinate corresponds to $\rho_c (= 1003.7)$. $a' = 2.36$ in Eqns. (2) and (25) in the text.

乗法により決定した。ただし、 $V_f = 0$ の場合、 $\rho_v = \rho_c = 1003.7 \text{ kg/m}^3$ となることを前提とした。これより、

$$\rho_v = \rho_c - a' \cdot V_f \quad (25)$$

ここで

a' : 定数

(24) 式、(25) 式より、コロニーの垂直方向の移動速度は、 V_f 、 R 、および θ (直接的には表われない、 μ_w 、 ρ_w は θ の関数) の関数として次式のように表わされる。

$$-\frac{dZ}{dt} = \frac{2g(\rho_c - a'V_f - \rho_w)}{9\mu_w} R^2 \times 3,600 \quad (2)$$

3.5 ガス胞の生成および消滅速度

3.5.1 ガス胞の破壊

藍藻類の *Anbaena flos-aquae* を用いた Walsby¹³⁾ の研究によると、細胞より分離されたガス胞 (gas vesicles) の長さ、耐圧強度とは特定の相関がないこと、またガス胞の長さおよび破壊される限界圧力は正規分布をなすとされている。ガス胞は (gas vacuole) は数多くの gas vesicle の集合体であるため、*M. aeruginosa* のガス胞を破壊する限界圧力分布も正規分布を示すものと仮定した。

湖水中でガス胞に加わる圧力は、静水圧以外膨圧のみであると考えてよい¹³⁾。したがって、ガス胞の耐圧分布が正規分布に従うと仮定すれば、膨圧の変化によるガス胞の容積率の変化はその累積分布関数で与えられる。

図 12 はこの考えに基づいて Reynolds⁵⁾ の測定値 (1971 および 1972 年) より、膨圧 P とガス胞容積率 V_f との関係をプロットしたものである。データはかなりばらついているが、 P が上昇するにつれて V_f が減少する傾向が認められる。図中の曲線は、ガス胞の耐圧分布に関する上述の議論にもとづいて得られた。

$$V_{f\text{eq}} = V_{f\text{max}} \left(1 - \int_0^P f_{n, \xi, \sigma}(P) dP \right) \quad (14)$$

ここに、

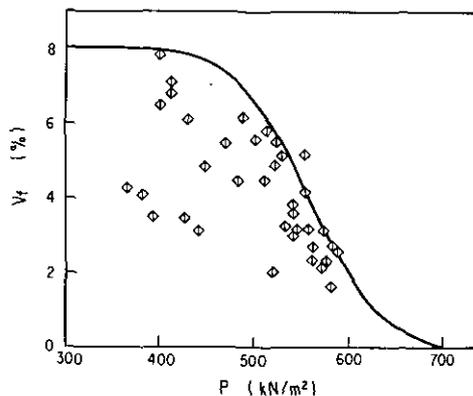


図 12 V_f と P との関係 (*M. aeruginosa*)⁵⁾。図中の曲線に $V_{f\text{max}} = 8.0\%$ 、 $\xi = 560 \text{ kN/m}^2$ 、 $\sigma = 60 \text{ kN/m}^2$ として (14) 式より計算した。

Fig. 12 V_f vs. P (*M. aeruginosa*)⁵⁾ Solid line in the figure was from Eq. (14) in the text, wherein $V_{\text{max}} = 8.0\%$, $\xi = 560 \text{ kN/m}^2$, and $\sigma = 60 \text{ kN/m}^2$.

- $V_{f_{eq}}$: 膨圧と平衡にあるガス胞の容積率, %
 $V_{f_{max}}$: ガス胞容積率の最大値, %
 f_n, ξ, σ : 正規分布関数 (ガス胞の膨圧に対する耐圧分布関数)
 ξ : ガス胞の耐圧分布関数の平均値, kN/m²
 σ : ガス胞の耐圧分布関数の標準偏差, kN/m²

(14) 式において, $V_{f_{max}} = 8.0\%$, $\xi = 560$ kN/m², および $\sigma = 60$ kN/m²を採用すると, 図中の曲線となり, ほとんどのデータポイントはその曲線より下方に分布した。

なお, (14) 式の左辺は V_f でなく, $V_{f_{eq}}$ である。これは, 任意の膨圧 P に対し, 図中の曲線 ((14) 式) で推定されるガス胞量 $V_{f_{eq}}$ より大きなガス胞量を細胞が持ち得ないと仮定したことに対応する。すなわち, (14) 式の値 ($V_{f_{eq}}$) はガス胞容積率の上限を与え, このガス胞量は膨圧 P と平衡になる量である。

上述の議論は, 図 12 において V_f の値が膨圧と平衡になっていないことを, 必ずしも十分に説明するものではない。しかし, この仮定を便宜上正しいものとすれば, 下記のようなガス胞の变化速度式が得られる。

$$\begin{aligned}
 -\frac{dV_f}{dt} &= \frac{(V_f - V_{f_{eq}})}{dt} \quad \text{for } V_f > V_{f_{eq}} \\
 \text{or} & \\
 &= 0 \quad \text{for } V_f \leq V_{f_{eq}}
 \end{aligned}
 \tag{26}$$

ただし, (26) 式に示したようにガス胞は瞬時に破壊するもの (物理的破壊のため) としている。

3.5.2 ガス胞の生成

Lehmann ら¹⁴⁾ は電子顕微鏡により, 超音波処理後 (ガス胞を破壊する) のガス胞の再生速度を推定した。この速度は, 細胞当たりのガス胞 (gas vesicle) の数, および長さを経時的に測定して求めている。(円筒状のガス胞の半径は不変 (= 70 nm) としている)。図 13 はこの結果をもとにして新たに作成した。本図は細胞当たりのガス胞の容積の経時変化を示している。図中に示した直線から明らかなように, ガス胞は一定の速度で再生すると考えてよい。

したがって, ガス胞生成速度は次式で表わされると仮定した。

$$\frac{dV_f}{dt} = \lambda
 \tag{27}$$

ここに,

$$\lambda = \text{定数}$$

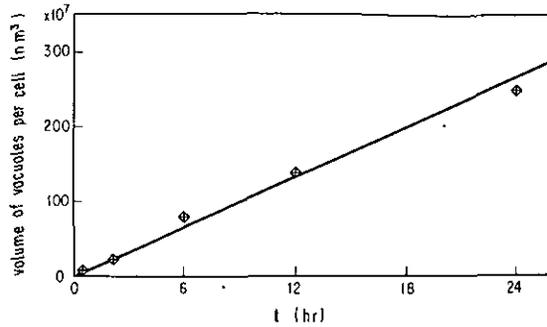


図 13 ガス胞の再生 (*M. aeruginosa*)¹⁴⁾ (27) 式における λ の値は細胞の容積を (27) 式における λ の値は細胞の容積を $1.0 \times 10^{11} \text{ nm}^3/\text{cell}^5$,¹⁴⁾ とすると $(1.1 \times 10^8 \text{ nm}^3/\text{cell hr}) / (1.0 \times 10^{11} \text{ nm}^3/\text{cell}) \times 100 = 0.11 \text{ \% / hr}$

Fig. 13 Regeneration of gas vacuoles (*M. aeruginosa*)¹⁴⁾

The value of λ in Eq. (27) in the text was $(1.1 \times 10^8 \text{ nm}^3/\text{cell hr}) / (1.0 \times 10^{11} \text{ nm}^3/\text{cell}) \times 100 = 0.11 \text{ \% / hr}$, taking the cell volume as $1.0 \times 10^{11} \text{ nm}^3/\text{cell}^5$,¹⁴⁾ The cell volume came from that $V_f = 8 \text{ \%}$ ¹⁴⁾ corresponds to $8.0 \times 10^9 \text{ nm}^3$ for gas vacuoles per cell. The original data of $5.8 \times 10^9 \text{ nm}^3$ ⁵⁾ was enhanced by nearly 40 % without particular reason.

なお、(27) 式で仮定される再生速度は $V_f = 0$ より V_f の最大値 ($P = 360 \text{ kN/m}^2$ で 8 %, 第 8 - 12 図参照) に至るまで一定であると仮定した。ただし、実験は V_f が飽和するまで行われていない。

全体としてのガス胞の生成、および破壊による、ガス胞容積率の変化速度は、(26) 式および (27) 式の組み合わせで与えられる。

$$\begin{aligned}
 -\frac{dV_f}{dt} &= \frac{(V_f - V_{f_{eq}})}{dt} \quad \text{for } V_f > V_{f_{eq}} \\
 \text{or} & \\
 &= \lambda \quad \text{for } V_f \leq V_{f_{eq}}
 \end{aligned} \tag{3}$$

3.6 膨圧の変化速度

細胞内の膨圧は、光合成活性により生産された低分子 (浸透圧上昇の効果がある) の有機物、糖などが、細胞内に蓄積することにより上昇すると考えられている。したがって、膨圧、 P の値は光合成活性、 Q_{O_2} に対応して増加する。逆に、暗条件下では低下することも観察^{5), 7), 8)} されている。これらの P の上昇、および下降速度の測定値を検討した結果、第 1 次近似として次のような定式

化を試みた。

$$(P \text{の上昇速度}) = \alpha \cdot Q_{O_2} \quad (28)$$

$$(P \text{の下降速度}) = \beta \cdot (P - P_{\min})$$

ここに、

P_{\min} : 光合成活性が全くない状態が続き、細胞内の余剰な光合成生産物がなくなった場合に観察されると考えられる P の値。

α, β : 定数

P の変化速度が (28) 式により、 $\alpha Q_{O_2} - \beta \cdot (P - P_{\min})$ で表わされると仮定すると、実測データより α および β の値を推定しよう。しかし、種々の α, β の値を検討したが、実測データと計算値との対応は必ずしも満足のものではなかった。(詳細は省略する)

ここでは、上昇速度を Q_{O_2} と P の上昇可能量 (すなわち現在の P の値と P_{\max} との差、 $(P_{\max} - P)$) との積で表わされるものと仮定した。ただし、 P_{\max} は P の最大値を示す。このとき P の変化速度は次式で与えられる。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot (P_{\max} - P) Q_{O_2} - \beta \cdot (P - P_{\min}) \quad (4)$$

Q_{O_2} の値が一定ならば (4) 式に対する解析解が与えられる。

$$P = \frac{P_{\min} + \frac{\alpha}{\beta} \cdot Q_{O_2} \cdot P_{\max}}{1 + \frac{\alpha}{\beta} \cdot Q_{O_2}} - \left(\frac{P_{\min} + \frac{\alpha}{\beta} \cdot Q_{O_2} \cdot P_{\max}}{1 + \frac{\alpha}{\beta} \cdot Q_{O_2}} - P_0 \right) \times \exp \{ -(\alpha \cdot Q_{O_2} + \beta) \cdot t \} \quad (29)$$

ここに、

P_0 : 時刻 $t = 0$ における膨圧, kN/m^2

図 14 における曲線は (29) 式より計算した。ただし、 $Q_{O_2} = 0$ 、 $P_0 = 400 \text{ kN/m}^2$ とし、 β については $1.02 \sim 0.12 \text{ hr}^{-1}$ の各々の値に対する解を示している。図中のプロット (▼) は *Anabaena flos-aquae* を用いて光合成活性がない場合の P の経時的な減少を測定した結果である⁷⁾。方法としては、強光下 (10 klx , けい光灯) で培養した藻体を 50 lx 以下の弱光に移し (この時刻を $t = 0$ とする) その後の P の変化を測定している。なお、(29) 式を計算する場合、実験が行われた 50 lx 以下の照度においては $Q_{O_2} = 0$ であると仮定した。

図 14 から明らかなように、 $Q_{O_2} = 0$ とした場合、 P の実測値と、計算値との対応は必ずしも

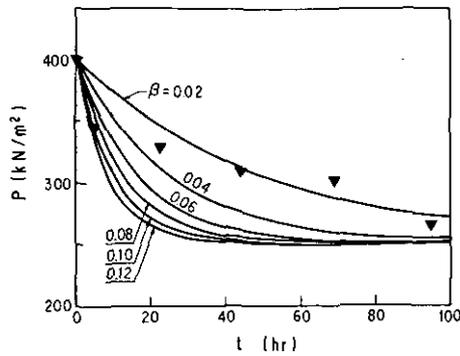


図 14 (4)式における β の推定。 $P_{\min} = 250 \text{ kN/m}^2$

▼: *Anabaera flos-aquae* の膨圧の経時変化⁷⁾

Fig. 14 Estimation of β in Eq. (4), taking the value of P_{\min} as 250 kN/m^2

▼: observed value of P vs. t for *Anabaena flos-aquae*⁷⁾

良くない。すなわち、実測値は $\beta = 0.1$ より $\beta = 0.02$ にわたるいくつかの曲線上に存在する。しかし、*A. flos-aquae* のこのデータ以外に (29) 式の妥当性を立証しうるデータが現在得られないこと、また本研究におけるシミュレーションの目的から考えると、図 14 に見られるような実測データとの不一致はやむを得ないものと考えられ、(29) 式の妥当性を全く否定するものでない。

しかしながら、シミュレーションを行う際の β の値のとり方には注意を要することは当然である。

図 15 は同じく *A. flos-aquae* の膨圧の上昇速度を測定した結果を示す⁷⁾。この場合は弱光下 (50 lx , けい光灯) にあった藻体を $2 \sim 10 \text{ klx}$ の種々の光条件下に移し、その後の P の変化を測定している。測定値のプロットから明らかなように、 P の値は急速に増加するが、ある値で飽和する。またこの上昇は、強光下ほど迅速であることより、光合成活性に由来するものであることは明らかである。

P の上昇に対して、(29) 式の妥当性を検討するには、各々の照度 ($2 \sim 10 \text{ klx}$) における Q_{O_2} の値を知る必要がある。しかしながら、報文中にはその値が記載されていない。ここでは既に求めた *M. aeruginosa* の Q_{O_2} と I の関係を使用して Q_{O_2} の値を推定した。図中に示した Q_{O_2} の値は推定値である。図中の曲線は $\alpha = 0.004 \text{ g cell/ml O}_2$ 、および $\beta = 0.10 \text{ hr}^{-1}$ として (29) 式により各 Q_{O_2} に対して計算した結果である。(HITAC-8450 使用)

図 15 における実測値と計算値との適合性についても詳細に検討するのは困難である。むしろ、膨圧の変化速度に関するより一層の研究を待つ必要がある。しかし、第 1 次近似としては (29) 式、またその微分形としての (4) 式をシミュレーションに採用することはやむを得ない。

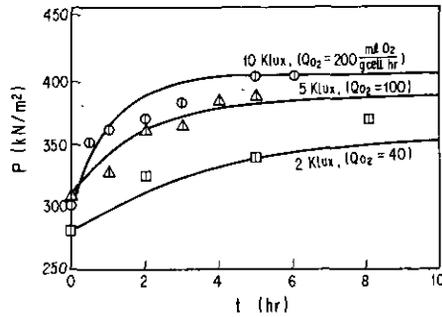


図 15 膨圧の経時変化

実測値⁷⁾は、○：10 klx, ($Q_{O_2} = 200 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$)；△：5 klx, ($Q_{O_2} = 100 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$)；□：2 klx, ($Q_{O_2} = 40 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$)。曲線は $\alpha = 0.004$, $\beta = 0.10$, および $P_{\max} = 425 \text{ kN/m}^2$ として (21) 式により計算した。

Fig. 15 P vs. t (cont'd)

Observed data,⁷ ○: 10 klx, ($Q_{O_2} = 200 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$); △: 5 klx, ($Q_{O_2} = 100 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$); □: 2 klx, ($Q_{O_2} = 40 \text{ ml O}_2/\text{g cell hr}$). Solid lines correspond to Eq. (21), wherein $\alpha = 0.004$, $\beta = 0.10$, $P_{\max} = 425 \text{ kN/m}^2$, and $P_{\min} = 250 \text{ kN/m}^2$ were taken.

3.7 水中照度

深さ Z m における水中照度, I klx は次式で表わされる。

$$I = I_0 \exp(-\epsilon \cdot Z) \quad (15)$$

ここに,

I_0 : 水表面における照度, klx

ϵ : 減衰係数, m^{-1}

霞ヶ浦における実測値 (深さ方向の照度の減衰) より ϵ を計算し, 懸濁物質濃度 δ (ここでは藻類がそのほとんどを占めるためクロロフィル a 濃度 mg/m^3 で代表した) との関係を表わしたのが図 16 である。図中の直線は最小 2 乗法によって決定した。これより,

$$\epsilon = m' \cdot \delta + n' \quad (16)$$

ここに,

m' , n' : 定数

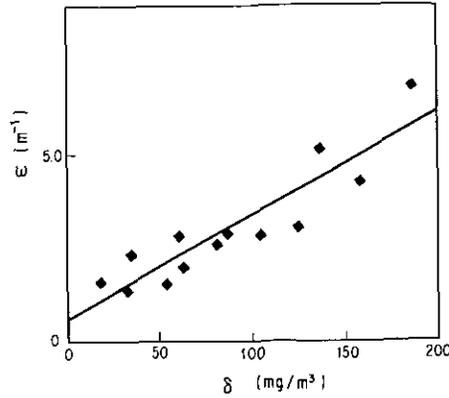


図 16 ϵ と δ の関係 (霞ヶ浦, 1977)²⁴ 図中の直線は最小 2 乗法によって決定
 図中の直線は最小 2 乗法によって決定し, (16) 式の m' , n' はそれぞれ $m' = 0.028$,
 $n' = 0.61$ と推定された。

Fig. 16 ϵ vs. δ (Lake Kasumigaura, 1977²⁴)

Solid line in the figure was obtained by the method of least squares. For m' and n'
 in Eq. (16) in the text, $m' = 0.028$ and $n' = 0.61$.

水表面における照度, I_0 の日変化は, 南中時の照度, I_{0max} , 日出および日没の時刻, t_{sr} ,
 t_{ss} をパラメータとして次の式で表わされる¹⁵⁾

$$I_0 = I_{0max} \cdot \sin^3 \left\{ \frac{\pi \cdot (t_d - t_{sr})}{t_{ss} - t_{sr}} \right\} \quad \text{for } t_{sr} \leq t_d \leq t_{ss}$$

or

$$= 0 \quad \text{for } t_d < t_{sr} \quad \text{or} \quad t_{ss} < t_d$$
(17)

ここに,

t_d : 第 1 表の (18) 式で表わされる時刻

3.8 *M. aeruginosa* のコロニー径

M. aeruginosa のコロニー径, R を推定するために, 霞ヶ浦より *M. aeruginosa* の試料を採取した。*M. aeruginosa* による水の華の発生時期に, 表層 ($Z = 0 \sim 0.5$ m) および下層 ($Z = -4$ m) よりコロニーを採取し, 顕微鏡下でその半径を測定した。一つの試水について通常 100 以上のコロニーを計測した。コロニーが球形でない場合, コロニーの中央を通過する最大径, および最小径の幾何平均をもってそのコロニーの代表径とした。表 3 は 10 回採取を行い, 表層, 下層をも含めた 20 試料に対する平均のコロニー径分布を示したものである。

表 3 霞ヶ浦における *M. aeruginosa* のコロニー径分布 (6月24日~8月17日, 1979)

Table 3 Colony-size distribution of *Microcystis aeruginosa* (Lake Kasumigaura) (24th June ~ 17th Aug., 1979)

R ($\times 10^{-6}$ m)	0 ~ 10	10 ~ 20	20 ~ 30	30 ~ 40	40 ~ 50	50 ~ 60	60 ~
%	0.7	8.4	22.5	20.9	17.9	16.4	13.2

Average colony radius = 41.9×10^{-6} m

3.9 諸定数

このシミュレーションで使用したパラメータおよび諸数値を表4に示す。表に示した数値は、膨圧の変化速度に関する α および β (*Anabaena flos-aquae* のデータより推定)を除いて、すべて *M. aeruginosa* に関する室内実験および湖沼調査から得られたものである。 α , β に関するこの矛盾は既に述べたようにやむを得ないものである。

表 4 係数および諸定数値一覧表

Table 4 List of empirical coefficients and/or parameters used

Nomenclature	Implication*	Values adopted	Source
a	temperature effect on photosynthetic activity	5.1	Fig. 8-6
a'	effect of gas-vacuolation on colony density	2.36	Fig. 8-11
b	empirical constant appearing in correlation between photosynthetic activity and temperature	-7.1	Fig. 8-6
C_{\max}	(maximum value of chlorophyll a content)	2.4 %	Fig. 8-8
m	chlorophyll a content, affecting photosynthetic activity	11.7	Fig. 8-5
m'	effect of suspended materials on extinction coefficient of water	$0.028 \text{ m}^{-1}/\text{mg}/\text{m}^3$	Fig. 8-16
n'	extinction coefficient of water, wherein no suspended materials exist	$0.61. \text{ m}^{-1}$	Fig. 8-16

* Note in parentheses designates nomenclature

表 4 (つづき)
Table 4 (Continued)

Nomenclature	Implication*	Values adopted	Source
P_{\max}	(maximum value of turgor pressure)	760 kN/m ²	Fig. 8-12
P_{\min}	(minimum value of turgor pressure)	360 kN/m ²	Fig. 8-12
p'	temperature effect on chlorophyll <i>a</i> content	1.60	Fig. 8-8
q'	temperature effect on chlorophyll <i>a</i> content	-0.045	Fig. 8-8
$V_{f\max}$	(maximum value of gas vacuoles' volume fraction)	8.0 %	Fig. 8-12
α	turgor pressure (increase)	0.004 g cell/ml O ₂	Fig. 8-15
β	turgor pressure (decrease)	0.1 hr ⁻¹	Figs. 8-14, 15
γ'	chlorophyll <i>a</i> content	0.0053 hr ⁻¹ kl x ⁻¹	Fig. 8-7
λ	gas vacuoles' volume fraction (regeneration)	0.11 %/hr	Fig. 8-13
ξ	(mean value of turgor pressure that gas vacuoles can withstand)	560 kN/m ²	Fig. 8-12
ρ_c	(density of algal colonies with non-vacuolate cells)	1003.7 kg/m ³	Fig. 8-10
σ	(standard deviation of turgor pressure <i>P</i> (normal distribution) that gas vacuoles can withstand)	60 kN/m ²	Fig. 8-12
κ	specific growth rate μ and photosynthetic activity Q_{O_2}	4.6×10^{-4} g cell/ml O ₂	Fig. 8-9

4. シミュレーション結果と考察

4.1 初期条件

シミュレーションの標準的な初期条件は次のとおりである。

$$(X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, -4.0, 0.0, 760.0, 1.2)$$

$X = 0.01 \text{ g cell/m}^3$ という初期条件は、湖水が *Microcystis* の発生により緑色に変わる濃度である $X = 10 \text{ g cell/m}^3$ に基づいている。すなわち、これよりかなり低い 0.01 g cell/m^3 を初期濃度とした。

$Z = -4 \text{ m}$ なる初期値は、冬期において *M. aeruginosa* のコロニーが底泥表面付近に存在し、夏の増殖にともなって浮上してくるという観測結果⁶⁾ より採用した。 V_f および P は、それぞれ 0% および 760 kN/m^2 とし、コロニーが底層に存在する条件と矛盾しないようにした (図2 参照)。 C に対する初期値、 $C = 1.2\%$ は単なる平均値である。なお初期条件を変化させても、結果に大きな影響がないことは後述する (図18 参照)

4.2 シミュレーション (標準条件)

霞ヶ浦における *M. aeruginosa* の増殖期の水質、および藻類の観測結果²⁴⁾ さらに表3の結果より、標準条件のシミュレーションでは δ , R , θ の値として、それぞれ 60 mg クロロフィル a / m^3 , $40 \times 10^{-6} \text{ m}$, 28°C を採用した。なおここでいう標準条件とは、パラメータ、諸数値を前述の推定値とし、外部変数も我国における *M. aeruginosa* の増殖期の値に近いものとした条件を意味する。その結果を図17に示す。

この条件下では、*M. aeruginosa* のコロニーは、3日の周期で中層部 (約 2 m) と表面との間を上下移動する (図17(B))。

この結果を見ると、コロニーの垂直移動の周期、すなわち3日ごとの水の華の出現は、湖沼においては強風、降雨等がない限り毎朝観察されるコロニーの表面への集積と、一見矛盾するようと思われる (図21 参照、後述)^{2),6)}。しかし、湖沼における水の華の観察は、様々な性質、前歴 (R , C , P , Z 等に分布がある) のコロニー群の全体としての挙動を観察していることになるため、この差違はモデルの誤りを意味するものではない (2.の仮定を参照)。換言すると、湖沼の観察ではある一定の大きさのコロニーの挙動を把握することは不可能であるのに対し、このシミュレーションでは、大きさ等の性質が均一なコロニーの挙動を再現していることに由来する。

増殖の過程は同図の(C)に示されている。図から明らかなように、比増殖速度 (縦軸は対数スケールであるため、傾きが比増殖速度となる) は経時変化する。ここでは段階的な増殖が認められた。すなわち、コロニーが深部に存在する場合は増殖速度が低く、表面付近に浮上した場合、急激な増殖が認められた。後者の場合、比増殖速度 μ は、 $\mu = 2.2 \text{ day}^{-1}$ になったが、前者ではわ

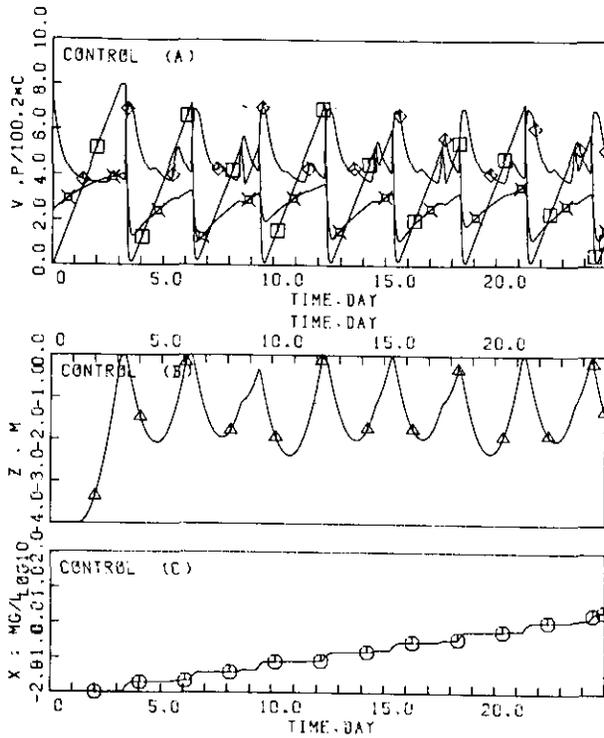


図 17 シミュレーション(標準)。

(A): ガス胞容積率の変化, % (V_f ; \square), 膨圧の変化, kN/m^2 (P ; \diamond , 1/100 スケール), およびクロロフィル a 含有率の変化, % (C ; \times , 2.0 スケール), (B): コロニーの垂直移動, m, (C): 増殖, g/m^3 .

Fig. 17 Simulation (Control Run)

(A): changes of gas vacuoles' volume fraction, % (V_f ; \square), turgor pressure, kN/m^2 : P : \diamond , (scale = 1/100), and chlorophyll a content, % (C ; \times) (scale = 2.0), (B): vertical migration of colonies, (C): population growth.

ずかに 0.05 day^{-1} 程度であった (図 17 (B) および (C) を比較)。平均としての μ の値は、最大の約 $1/10$ である $\mu = 0.23 \text{ day}^{-1}$ となった。これは、表面に浮上するのが 3 日に 1 度であることによる。

同図 (A) には V_f , C , および P の変化を示した。膨圧 P が 760 kN/m^2 もしくはそれに近い値に増加すると、ガス胞は瞬時に破壊され、その回復には 3 日を要している。この間コロニーは深部に存在するため、昼間でも膨圧が上昇せず、ほぼ一定速度で V_f が増加している。クロロフィル a 含有率は $C_{\max} = 2.4\%$ に達せず、表面に浮上した時が 1.8% と最大値を示した。浮上後は強光を

受けて急速にその含有率が低下しているが、すぐに沈降するため、再び浮上するまではその合成が行なわれている。全体として、図の(A)より(C)に示された*M. aeruginosa*の挙動は、従来の知見と矛盾するものでないと考えられる。

4.3 水の華の生成に対する諸定数の影響

水の華の発生に対する $\delta, R, \theta, \gamma', \alpha, \beta$ および λ の各定数の影響を知るために一種の感度解析を行った。変動させた定数の値を表5に示す。これに先立ち、初期条件の影響を調べたがその結果を図18に示す。標準的な条件(図中では $Z = 4.0$ として表わす)以外に、

$$(X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, -2.0, 4.0, 560.0, 1.2)$$

$$(X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, 0.0, 8.0, 360.0, 1.2)$$

の二つ(図中ではそれぞれ $Z = 2.0, Z = 0.0$)を選択し、その結果より浮上、沈降の過程のみ図示した。図から明らかなように、10日目以降はほとんど同じ浮上・沈降を示す。(ただし、位相は異なる)したがって以降のシミュレーションでは、すべて標準的な初期条件を採用した。

各々のシミュレーションにおいては、諸定数のいずれか一つを変化させて標準条件と同様な計算を行った。一例として δ の場合を述べると、他の諸定数はそのままとして、 δ の値を標準の60

表 5 感度解析のための諸定数値一覧表
Table 5 Simulation runs

Nomenclature	Values used for control run	Discrete (range of) values used in subsequent simulation	Objective of subsequent simulation to find the effect of
δ	60	0, 30, 100, 200	turbidity of water
R	40	10, 20, 70, 100	algal colony size
θ	28	24, 26, 30, 32	water temperature
γ'	0.0053	0.001, 0.003, 0.01, 0.02	rate of chlorophyll a synthesis of and degradation
α	0.004	0.001, 0.002, 0.006, 0.01, 0.02	rate of turgor-pressure increase
β	0.1	0.02, 0.05, 0.2, 0.5	rate of turgor-pressure decrease
λ	0.11	0.02, 0.05, 0.2, 0.5	regeneration rate of gas vacuoles
$I_{0\max}$	80.0	-	-
t_{sr}	5.0	-	-
t_{ss}	17.0	-	-

Initial condition: $(X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, 4.0, 0.0, 760, 1.2)$

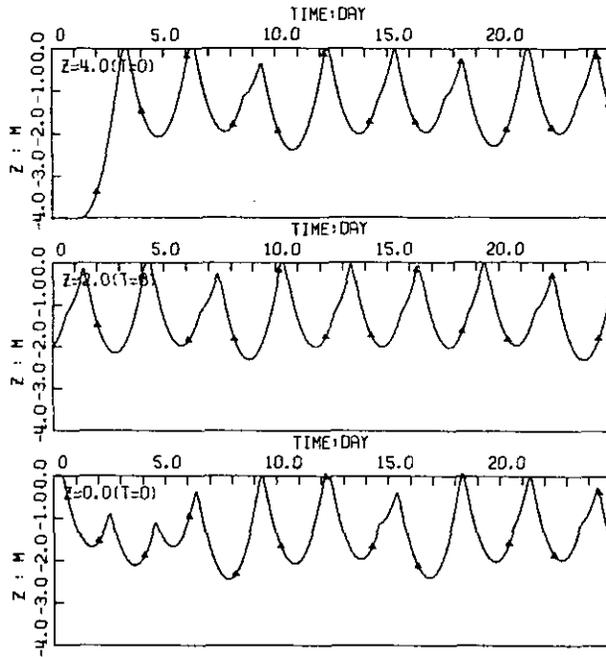


図 18 シミュレーション (初期条件の効果)

$Z = 4.0 : (X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, -4.0, 0.0, 760.0, 1.2)$, $Z = 2.0$
 $: (0.01, -2.0, 4.0, 560.0, 1.2)$, $Z = 0.0 : (0.01, 0.0, 8.0, 360.0,$
 $1.2)$ 。

Fig. 18 Simulation runs (Effect of initial condition)

$Z = 4.0 : (X, Z, V_f, P, C)_{t=0} = (0.01, -4.0, 0.0, 760.0, 1.2)$, $Z = 2.0 : (0.01, -2.0,$
 $4.0, 560.0, 1.2)$, $Z = 0.0 : (0.01, 0.0, 8.0, 360.0, 1.2)$ 。

より0, 30, 100, 200のそれぞれに変更してシミュレーションを行った(表5参照)。図19, 図20には、全体で30回のシミュレーションのうち、その一部を深さ方向のコロニーの移動に着目して示した。これらの図、ならびにここに示されていない他の計算結果より、水の華の発生に与える諸定数値の影響は次のように要約される。下記に示す i) ~ iii) の定数についてはその増加が水の華の発生 — コロニーの水表面への集積 — につながり、iv) ~ vi) については逆の傾向となる。

- i) 懸濁物質濃度, δ : この増加により, コロニーの移動範囲は, 深部 (Run No 2, $\delta = 0$) より表層 (Run No 5, $\delta = 200$) に移る。また図には示されていないが, δ の増加とともに, 表層に存在する期間は長くなる。
- ii) コロニーの半径, R : 小さいコロニーの場合, ほとんど垂直移動しないと見させる (Run

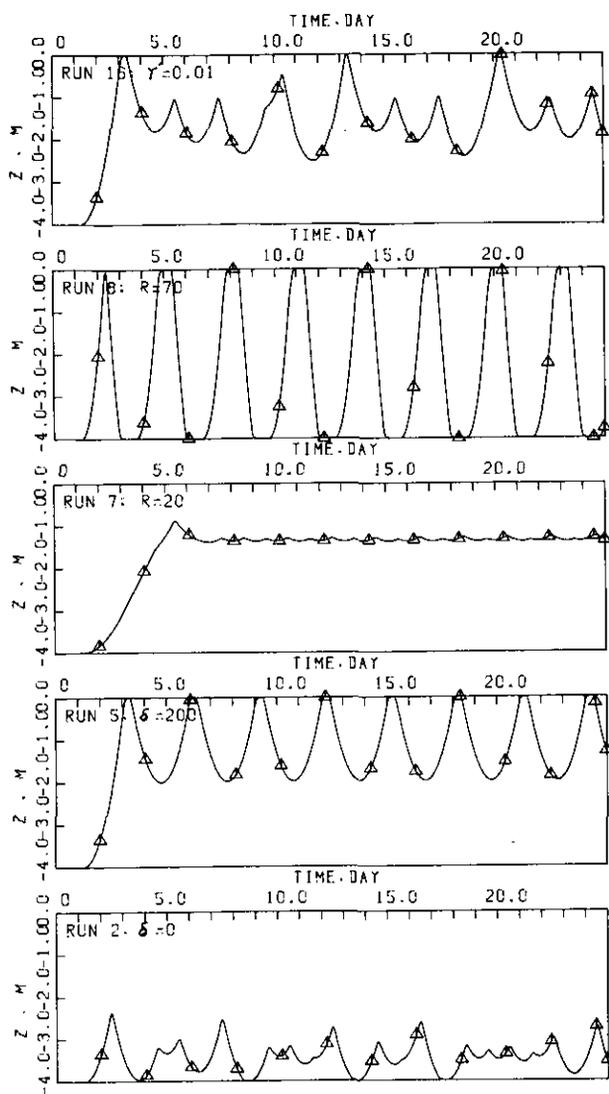


図 19 シミュレーション (感度解析)。No 2 : $\delta = 0$, No 5 : $\delta = 200$, No 7 :
 No 2 : $\delta = 0$, No 5 : $\delta = 200$, No 7 : $R = 20$, No 8 : $R = 70$,
 No 16 : $\gamma' = 0.01$.

Fig. 19 Simulation runs
 No. 2: $\delta = 0$, No. 5: $\delta = 200$, No. 7: $R = 20$, No. 8: $R = 70$, No. 16: $\gamma' = 0.01$.

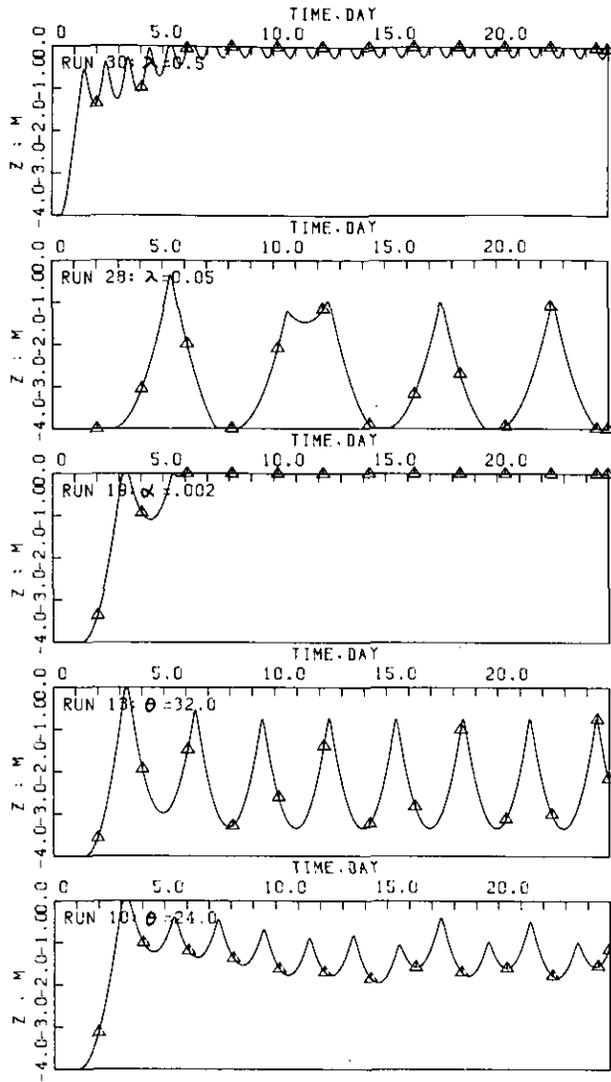


図 20 シミュレーション (感度解析)。No 10 : $\theta = 24.0$, No 13 : $\theta = 32.0$

No 10 : $\theta = 24.0$, No 13 : $\theta = 32.0$, No 19 : $\alpha = 0.002$, No 28 : $\lambda = 0.05$,
 No 30 : $\lambda = 0.5$

Fig. 20 Simulation runs

No. 10: $\theta = 24.0$, No. 13: $\theta = 32.0$, No. 19: $\alpha = 0.002$, No. 28: $\lambda = 0.05$, and No. 30:
 $\lambda = 0.5$.

Na 7, $R = 20$)。一方コロニーサイズが大きくなると, 3日周期で表層から底部までの広い範囲を移動する (Run. Na 8, $R = 70$)。

iii) ガス胞の再生産速度, λ : λ が小さい場合 (Run. Na 28, $\lambda = 0.05$) 垂直移動の周期が長くなり, 水表面への集積は起こりにくい。しかし, λ が大きくなると (Run Na 30, $\lambda = 0.5$) 1日周期で変動し, ほとんど表層に存在する。

iv) 温度, θ : Run Na 10 ($\theta = 24^\circ\text{C}$), Run Na 13 ($\theta = 32^\circ\text{C}$), および標準条件 ($\theta = 28^\circ\text{C}$, 図 17) を比較すると, θ の減少により, 垂直移動の範囲が小さくなり, 表層部に存在する傾向がうかがわれるが, 必ずしも明確でない。

v) 係数, γ' : γ' (クロロフィル a の変化速度。 γ' が大きくなるとクロロフィル a の増加, 減少速度ともに大きくなる) が減少すると, コロニーは表層に集積する頻度が高くなる傾向にある (Run Na 16, $\gamma' = 0.01$ (図 19) および標準条件, $\gamma' = 0.0053$ (図 17) を比較)。

vi) 係数, α : α (膨圧の上昇速度定数) の減少により, 相対的に膨圧の減少速度が早くなるためガス胞量は増加する (図 19, 図 20 には示されていない) 傾向にある (Run Na 19, $\alpha = 0.002$ (第 8 - 20 図) および標準条件, $\alpha = 0.004$ (図 17 を比較)。当然のことながら β (膨圧の下降速度定数) については全く逆のことがいえる (図 19, 図 20 には示されていない)。

図 21²⁵⁾ は 1979 年 7 月 29 日より 7 月 31 日にかけて測定された *M. aeruginosa* による水の華の発生と消滅の状況である (霞ヶ浦)。縦軸は深さを示し, 横軸は時刻を表わす。図中の曲線はクロロフィル a による等濃度線である。図から明らかなように, *M. aeruginosa* による水の華は早朝より午前中は表面に現われ, 午後には消滅して全層ほぼ均一な濃度となる。

図 21 に示されたように, 湖沼の観察では日間変動が認められるのに対し, シミュレーション

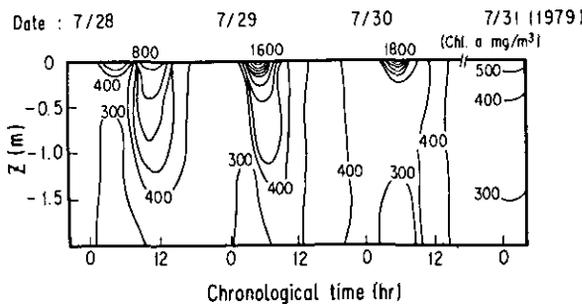


図 21 *M. aeruginosa* の垂直移動 (クロロフィル a mg/m^3 , 霞ヶ浦)

Fig. 21 Diurnal vertical migration of *M. aeruginosa* (parameter: chlorophyll a mg/m^3) (Field observation)

においては直接そのような日間変動を再現し得なかったという点で、本シミュレーションは必ずしも満足のいくものではない。既に述べた通り、シミュレーションと観察結果との間のこの矛盾は、コロニー径、藻類の性質等が均一であるとした本モデルの単純な構成に起因するものと思われるが、それが直ちにモデルの構造の誤りを意味するものでない。逆に、均一なコロニーに着目することにより、他の手法では明らかにすることの困難な、水の華発生に係る諸要因をシミュレーションによって抽出し、その影響を明らかにし得たと考える。

最後になるが、本シミュレーションの結果より、水の華の発生、すなわち *M. aeruginosa* の水面への集積を防止する手段に言及したい。

まず、水の濁度（シルト、藻類等の懸濁物質の湖沼への流入、および湖沼内での生産）の増加を制御することは有効である〔i〕。また、湖沼のエアレーション²⁶⁾等による湖水の混合は、コロニー径を小さくする（せん断力等による）効果がある場合（この証明は本研究の範囲を逸脱する）有効な手段となろう〔ii〕。他の諸定数、すなわち $\alpha, \beta, \gamma', \lambda$ については水の華の生成を左右するが、すべて細胞の生理学的特性を表わすパラメータである。したがって具体的な手段を提示するのは現時点では困難である。しかしこれらの値、もしくは同時な特性 (Q_{O_2} など) を制御する方法を研究することが有益であることは本シミュレーション結果より明白である。

5. 結 論

1. *Microcystis aeruginosa* の Q_{O_2} は、Blackman の式を用いて I, C, θ の関数で表わされた

$$Q_{O_2} = \kappa' \cdot I \quad \text{for} \quad I < (Q_{O_2})_{\max} / \kappa'$$

or

$$(Q_{O_2})_{\max} \quad \text{for} \quad I \geq (Q_{O_2})_{\max} / \kappa'$$

ただし、

$$\kappa' : \text{定数} = m \cdot C$$

$$(Q_{O_2})_{\max} : (a \cdot \theta + b) \cdot C$$

$$m : \text{定数}$$

$$a, b : \text{定数}$$

しかし、 $(Q_{O_2})_{\max}$ の値は必ずしも C の値に比例せず、場合によっては C の値でなく関連する酵素反応速度が $(Q_{O_2})_{\max}$ の値に影響することが示唆された。

2. 光適応による C の値の変化は次式で表わされた。

$$\frac{dC}{dt} = \omega \cdot \gamma' \cdot (C_{\max} - C) - \gamma' \cdot I \cdot C$$

ただし、

γ' : 定数

ω : 定数

上式は非定常状態における C の経時変化の測定結果より、一次近似としては妥当であることが示された。

3. *M. aeruginosa* のコロニーの垂直移動速度はストークスの公式に従うことが示された。ガス胞のあるコロニーの密度、 ρ_c は次式で表わすことができた。

$$\rho_v = \rho_c - a' \cdot V_f$$

ただし、

a' : 定数

V_f : 細胞内のガス胞の容積比, %

ρ_c : ガス胞のない細胞の密度, kg/m^3

4. ガス胞の破壊に関し、膨圧と平衡にあるガス胞の量、 $V_{f_{\text{eq}}}$ を次式で推定した。

$$V_{f_{\text{eq}}} = V_{f_{\text{max}}} \left(1 - \int_0^P f_{n, \xi, \sigma}(P) dP \right)$$

ただし、

$V_{f_{\text{max}}}$: ガス胞の最大容積比, %

$f_n(\xi \cdot \sigma)$: ガス胞の耐圧分布関数 (正規分布)

ξ : 耐圧分布関数の平均値, kN/m^2

σ : 耐圧分布関数の標準偏差, kN/m^2

ガス胞の破壊速度に関しては次の推定を行った。 V_f と P が与えられたとし、 P に対して上式で決定される $V_{f_{\text{eq}}}$ が V_f より小さい場合にはガス胞は瞬時に破壊され、その量は $V_{f_{\text{eq}}}$ となる。逆の場合、ガス胞の破壊は全く起こらないものとする。

5. ガス胞の再生速度は一定であると仮定するのが、現在得られるデータからは最も妥当であった。

6. 膨圧の変化速度は次式で表われた。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \cdot (P_{\max} - P) \cdot Q_{O_2} - \beta \cdot (P - P_{\min})$$

ただし,

α, β : 定数

P_{\max}, P_{\min} : 膨圧の最大値および最小値, kN/m^2

この定式化は改良の余地が多く残っているが, シミュレーションの目的を考慮すると適用可能であるとした。

7. *M. aeruginosa* の濃度, コロニーの深さ, ガス胞の容積比, 膨圧, およびクロロフィル *a* 含有率を状態変数とした, 均一なコロニー群の挙動を表わすシミュレーションモデルを作成した。

8. 単一のコロニーの垂直移動は, 湖沼で観察されるように, コロニー径に分布を有するコロニー群全体としての挙動とは異なることが示された。すなわち, シミュレーションでは, 湖沼における1日周期の移動(見かけ上)と異なり, 約3日周期の浮上・沈降が再現された。

9. モデル中の諸定数が水の華の生成に与える影響について検討を加えた。水中の懸濁物質濃度, コロニー径, およびガス胞の生成速度の増加は水の華の生成(コロニーの水表面への集積)を促した。また, 水温の低下, 膨圧の増加速度の減少, クロロフィル *a* 濃度の変化速度の減少も水の華の生成を促すことが明らかとなった。

10. 本シミュレーションにより, 水の華の生成と消滅に関する湖沼での観測結果をある程度説明することが可能となった。しかしここで検討された水の華の生成に関する細胞内外の諸因子については, より一層の検討を加えることが, 具体的な発生防止対策を立案する上で重要であることを示した。

記 号

a, a', b	定 数
C	細胞内のクロロフィル <i>a</i> の含有率, %
C_0	時刻 $t = 0$ におけるクロロフィル <i>a</i> 含有率, %
C_{eq}	ある照度に対して平衡となったクロロフィル <i>a</i> の含有率, %
C_{max}	最大クロロフィル <i>a</i> 含有率, %
D	希釈率, hr^{-1}
f_n	正規分布, 膨圧に対するガス胞の耐圧分布関数
g	重力加速度, m/sec^2
I	水中照度, klx
I_0	表面照度, klx
$I_{0\text{max}}$	南中時の表面照度(最大値), klx
m	比例定数
m', n'	定 数

P	細胞の膨圧, kN/m^2
P_0	時刻 $t = 0$ における膨圧, kN/m^2
P_{\max}	膨圧の最大値, kN/m^2
P_{\min}	膨圧の最小値, kN/m^2
p', q'	定数
Q_{O_2}	光合成活性, $\text{ml O}_2/\text{g cell hr}$
$(Q_{O_2})_{\max}$	最大光合成活性, $\text{ml O}_2/\text{g cell hr}$
R	コロニーの半径, m
t	時間, hr
t_d	時刻
t_{sr}	日出時刻
t_{ss}	日没時刻
V_f	細胞中のガス胞の容積比, %
$V_{f_{eq}}$	膨圧と平衡なガス胞の容積比, %
$V_{f_{\max}}$	ガス胞の容積比の最大値, %
X	細胞の乾燥重量濃度, g dry cell/m^3
Z	コロニーの深さ (ただし, 水表面を 0 m とするため負の値をとる), m

ギリシャ文字

α	膨圧の上昇速度定数, g cell/ml O_2
α'	クロロフィル a の合成速度定数, hr^{-1}
β	膨圧の下降速度定数, hr^{-1}
β'	クロロフィル a の分解速度定数, hr^{-1}
γ'	比例定数
δ	<i>M. aeruginosa</i> 以外の懸濁物質の濃度, $\text{mg クロロフィル } a/\text{ml}$
ϵ	光の減衰係数, m^{-1}
θ	温度, $^{\circ}\text{C}$
κ	比例定数, g cell/ml O_2
κ'	比例定数 (クロロフィル a 含有率の関数), $\text{ml O}_2/\text{g cell hr klx}$
λ	ガス胞の容積比の増加速度, %/hr
μ	比増殖速度, hr^{-1}
μ_w	水の粘度, kg/m sec
ξ	ガス胞が耐えうる膨圧の平均値, kN/m^2

ρ	粒子の密度, kg/m^3
ρ_c	ガス胞のない細胞のみから成るコロニーの密度, kg/m^3
ρ_v	ガス胞のある細胞から成るコロニーの密度, kg/m^3
ρ_w	膨圧に対するガス胞の耐圧分布関数の標準偏差, kN/m^2
ω	比例定数

引 用 文 献

- 1) G. E. Fogg, (1975): *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*, 2nd Ed., University of Wisconsin Press, Madison, p.79.
- 2) Okino, T. (1973): *Japan. J. of Botany*, 20, 381.
- 3) Walsby, A. E. (1972): *Bacteriol. Rev.*, 36, 1.
- 4) Walsby, A. E. and A. R. Klemer (1974): *Arch. Hydrobiol.*, 74, 375.
- 5) Reynolds, C. S. (1973): *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 184, 29.
- 6) Reynolds, C. S. and D. A. Rogers (1976): *Hydrobiologia*, 48, 17.
- 7) Dinsdale, M. T. and A. E. Walsby (1972): *J. Exp. Bot.*, 23, 561.
- 8) Reynolds, C. S. (1972): *Freshwater Biol.*, 2, 87.
- 9) Watanabe, M. F. (1979): *Arch. Hydrobiol.*, 86, 66.
- 10) Middlebrooks, E. J., D. H. Falkenberg and T. E. Malony, *Modeling the Eutrophication Process*, Workshop Proceedings, Utah Water Research Laboratory PRWG 136-1, Utah State University, Logan, 1973.
- 11) Jorgensen, S. E., H. Mejer and M. Friis (1978): *Ecol. Modeling*, 4, 253.
- 12) Bierman, V. J., Jr., In "Modeling Biochemical Processes in Aquatic Ecosystems", (R. P. Canale, Ed.), p.1, Ann Arbor Science Pub., Ann Arbor, 1976.
- 13) Walsby, A. E. (1971): *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, 178, 301.
- 14) Lehman H. and M. Jost (1971): *Arch. Microbiol.*, 79, 59.
- 15) Ikushima, I. (1967): *Bot. Mag. Tokyo*, 80, 57.
- 16) Meyers J. and W. A. Kratz (1955): *J. Gen. Physiol.*, 39, 11.
- 17) Nielsen, E. S. and E. G. Jorgensen (1968): *Physiol. Plant.*, 21, 401.
- 18) Bader, F. G. (1978): *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 229.
- 19) Nielsen, E. S., V. K. Hansen and E. G. Jorgensen (1962): *Physiol. Plant.*, 15, 505.
- 20) Dabes, J. N., R. K. Finn and C. R. Wilke (1973): *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 1159.
- 21) Zar, J. H., *Biostatistical Analysis*, p.198, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, 1974.
- 22) Jorgensen, E. G. (1969): *Physiol. Plant.*, 22, 1307.
- 23) Halldal, P. (1958): *Physiol. Plant.*, 11, 401.
- 24) 国立公害研究所 (1979): 陸水域の富栄養化に関する総合研究(III) — 霞ヶ浦を中心として — . 昭和53年度, 国立公害研究所研究報告, 第6号, pp. 420.
- 25) 細見正明他: 未発表データ (1979).
- 26) Lorenzen, M. and A. Fast, *A guide to Aeration/Circulation Techniques for Lake Management*, EPA-600/3-77-004, 1977.

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. (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. (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イ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AGPの測定 — 昭和53/54年度. (1981)

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 1966. (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 studies 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)
- No.14* Studies on the effect 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 1979. (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. (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 hydro-meteorological 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 *Microcystis* – 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)

* in Japanese