

国立公害研究所 ○津野 洋
谷田 健

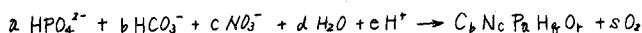
1. はじめに

現在日本各地の湖沼においては、窒素や磷等の栄養塩濃度の増加および藻類の増殖等の富栄養化現象が顕著になり、飲料水や生活環境へ悪影響を及ぼしている。これらの現象把握および制御のために、藻類増殖の潜在能力の評価(AGP試験)や栄養塩を添加することによる藻類の増殖の制限物質の把握に関する研究が行なわれつつある。⁽¹⁾⁽²⁾ しかしながら、水中の栄養塩濃度と藻類増殖との関係は明確には把握されていない。本研究は、クロレラ種を対象として、藻類の増殖特性、これに伴う窒素および磷の摂取特性および藻類の増殖特性に及ぼす窒素および磷濃度の影響を把握する目的で行なつたものである。

2. 文献的考察

藻類の増殖に影響を及ぼす因子としては、栄養塩の他に光、温度、pH等があり複雑である。また栄養塩としても、窒素や磷の他に炭酸、ビタミン類、金属類、有機炭素等が関与している。しかしながら、自然水域における藻類増殖制限栄養塩としては、窒素や磷である場合が多く、⁽²⁾ 本研究ではこれらの影響に關して考察を試みる。

藻類の主要成分をC, N, P, H, Oと考えると、栄養塩の摂取に伴う藻類の増殖は一般につぎのように表わされる。



藻類の組成式として、Redfield等は海洋性のプランクトンの場合について $\text{C}_{106} \text{N}_{16} \text{P}_1 \text{H}_{243} \text{O}_{110}$ を与えており、淡水性の藻類についても Stumm は同一の一般組成式を与えているが、これらの組成比は藻類種により異なることを示唆され、同一の藻類でもその増殖過程や栄養条件により異なることが知られている。⁽³⁾ 藻類はその増殖過程において細胞外の磷を細胞中に蓄積し、細胞外の磷が枯渇した後も蓄積の磷により増殖でき、その蓄積量は最少必要量の数倍に達することが知られており、またある種の藻類は無機体の窒素も蓄積することも知られている。⁽⁵⁾⁽⁶⁾ 栄養塩が十分にあり対数増殖相にある藻類は、乾燥重量の70%以上蛋白質を含有しクロロフィルaや核酸を多く含有しているが、一方、窒素欠乏条件下の藻類は蛋白質含有率は10%以下となり、クロロフィルaや核酸の含有量も少なくなり、脂質や炭水化物が少量に蓄積されることが知られており、また磷欠乏条件下でも同様の状態が生ずることも知られている。⁽⁵⁾ したがって、これらの現象を経時的に把握することは、藻類の増殖特性、窒素および磷の摂取特性、窒素および磷濃度の影響等を考察する上で重要であると考えられる。

3. 実験方法

実験は、静岡より分離・純粋培養を行なつた *Chlorella* sp. を対象として行なつた。クロレラ種の一般に知られている好適な培養条件を表-1にまとめて示す。⁽⁷⁾ 本研究では、150 mlのL字管を用いて、一定温度、一定照度、24時間明の条件下で、Detmerの培地⁽⁸⁾を基礎とした培地を用いて、振盪培養実験を行なつた。実験のうねり図-1に示すとおりであり、また実験条件は表-2に示す。窒素および磷については、Detmerの培地より窒素および磷成分を除いたものに希望量の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ および KH_2PO_4 を加えて条件設定を行なつた。実験No. 1および2は磷制

表-1 クロレラ種の好適な培養条件

条件	好適範囲
照度	4000 ~ 10000 Lux
温度	25°C
pH	4 ~ 8
攪拌	通気あるいは振盪
培養液主成分	N, P, Mg, S, K, Na, Ca 等

制限条件を、実験 No. 3 および 4 は栄養制限条件を想定したものであり、また実験 No. 5 は照度による影響を考察するために行なつたものである。

図-1 に示す手順に従って振盪培養を行なう直前および振盪培養開始後所定の日数毎に、各々の実験条件の L 字管について、表-3 に示す項目に関して分析を行なつた（1 回の測定毎に 1 本の培養管を培養瓶よりとりだし分析を行なつた）。

表-2 実験条件

実験 No.	初期濃度		初期 N/P 比	温度 (°C)	照度 (lux.)
	NO ₃ -N(mg/l)	T-P(mg/l)			
1	(1) 23.0	1.93	11.9	25	6000
	(2) 23.2	1.00	23.9		
	(3) 21.9	0.49	44.7		
2	(1) 15.3	1.76	8.69	25	6000
	(2) 15.4	1.20	12.8		
	(3) 14.5	0.64	22.7		
3	(1) 3.65	1.75	2.09	25	6000
	(2) 3.85	1.05	3.67		
	(3) 3.70	0.55	6.73		
4	(1) 2.40	6.10	0.39	25	6000
	(2) 1.00	6.20	0.16		
	(3) 0.47	6.40	0.073		
5	(1) 16.2	2.08	7.79	25	9000
	(2) 16.2	1.07	15.1		
	(3) 16.0	0.61	26.2		

表-3 測定項目および測定方法

試料	項目	測定方法
溶解性 (A5Mメンタ ンフルター ラ液に於て)	T-P	HClO ₄ による分解併用のモリブデン酸青法
	NO ₃ -N	フェーリンシスホン酸法
	NO ₂ -N	GR 試薬法
	NH ₃ -N	ナルマン変法
	ケルゲル N	ケルゲル法
藻類	炭水化物	硫酸炭アンスロン法 (グルコース基準)
	クロロフィル a	0.45M メンタニンフルターラ液によるアセトン抽出法
	T-P*	HClO ₄ による分解併用のモリブデン酸青法
	ケルゲル N*	ケルゲル法
	炭水化物*	硫酸炭アンスロン法 (グルコース基準)
混合液	SS	0.45M メンタニンフルターラ液
	pH	pH メータ

* 混合液での値より溶解性の値を差引いて計算

4. 実験結果および考察

1) 増殖特性と栄養塩摂取特性

栄養制限条件下での藻類増殖特性と栄養塩摂取特性を図-2 に示す。本研究ではバイオマスとしての藻類量をクロロフィル a で表わしたが、これは培養時間とともに急激な増加を示し、水中の磷が無くなると増加速度はゆるやかとなり、やがて平衡となる。しかしながら、水中の磷が消失した後もクロロフィル a の増加は続いている。藻類中の炭水化物はクロロフィル a の増加に伴って増加しているが、クロロフィル a の増加が平衡となった時点で炭水化物の増加量は大きく異なる傾向が示されている。水中の NO₃-N は、クロロフィル a の増加に伴って摂取され減少している。培養液中の全磷は藻類の増殖に伴って摂取されているが、増殖曲線の中で摂取されてしまっていることが示されている。

栄養制限条件下での藻類増殖特性と栄養塩摂取特性を図-3 に示す。この場合には、クロロフィル a の増加は水中の NO₃-N が無くなるまで止まり、その後減少する傾向にある。藻類中の炭水化物はクロロフィル a の増加が止まった後も増加し、藻類中に蓄積している。そして、それはやがて藻類の活性がなくなる（継代時には藻類混合液が自濁してくる）と、一定となる傾向にある。水中の NO₃-N は藻類の増殖に伴って摂取されてしまっていることが示されている。水中の全磷は藻類の増殖に伴って減少している。

混合液中の pH は、いずれの場合も藻類が増殖するにつれて増加し、培養日数 7 日前後で平衡となり、その後

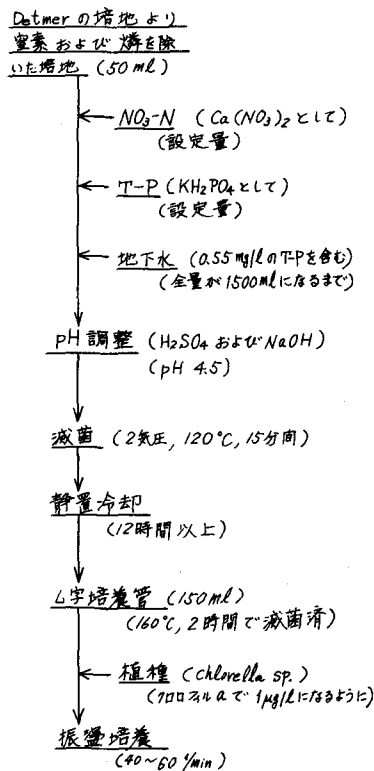


図-1 実験手順

クロロフィルaが減少し始めると低下する傾向にあった。平衡時のpHはクロロフィルaの増加が大きい程高い傾向にあり、その値は8.0~8.8の範囲であった。

水中の $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ およびゲルダールNは若干存在したが、培養期間を通じてそれらの値は2.5mg/L以下であった。

9000 lux.の照度の条件下での実験No.5において、クロロフィルaの増加速度が1.2倍程度遅くなった以外は、6000 lux.での実験と同様の傾向が示された。

2) 藻類中の炭水化物の蓄動

藻類中の炭水化物含有率の蓄動を図4に示す。藻類が培養に増殖している時期の炭水化物含有率は約50 (mg炭水化物/mgクロロフィルa)であるが、栄養塩が欠乏し増殖が鈍くなると増加する。とくに、窒素が制限条件である場

合には、この傾向は顕著である。図5には、クロロフィルaの増加が停止した時の藻類中の全糖の含有率とこの時期の藻類中への炭水化物の蓄積速度との関係を示してある。この全糖の含有率は、窒素制限条件が厳しくなるにつれて大きくなるので、その制限条件下での炭水化物の蓄積量は増加することが示されている。

3) 藻類の増殖と栄養塩の摂取

水中の糖は藻類の増殖に伴って摂取されるが、その摂取は一樣ではなく、図6に示すように、藻類中の糖含有率も変化する。すなわち、水中の糖が豊富にある場合には糖含有率は大きく、水中の糖が欠乏してくると糖含有率は小さくなり、一定値(2.7 mg糖/mgクロロフィルa)に漸近することが図6に示されている。これは、前述のように藻類は増殖必要量以上に糖を細胞内に蓄積し、水中の糖が欠乏しても細胞中の蓄積糖により増殖することと裏付けしており、この現象は図2においても示されている。また本研究の培養条件下および期間においては、クロロフィルaが低下し始めても、一度藻類中に取り込まれた糖の水中への溶出は観察されなかった。

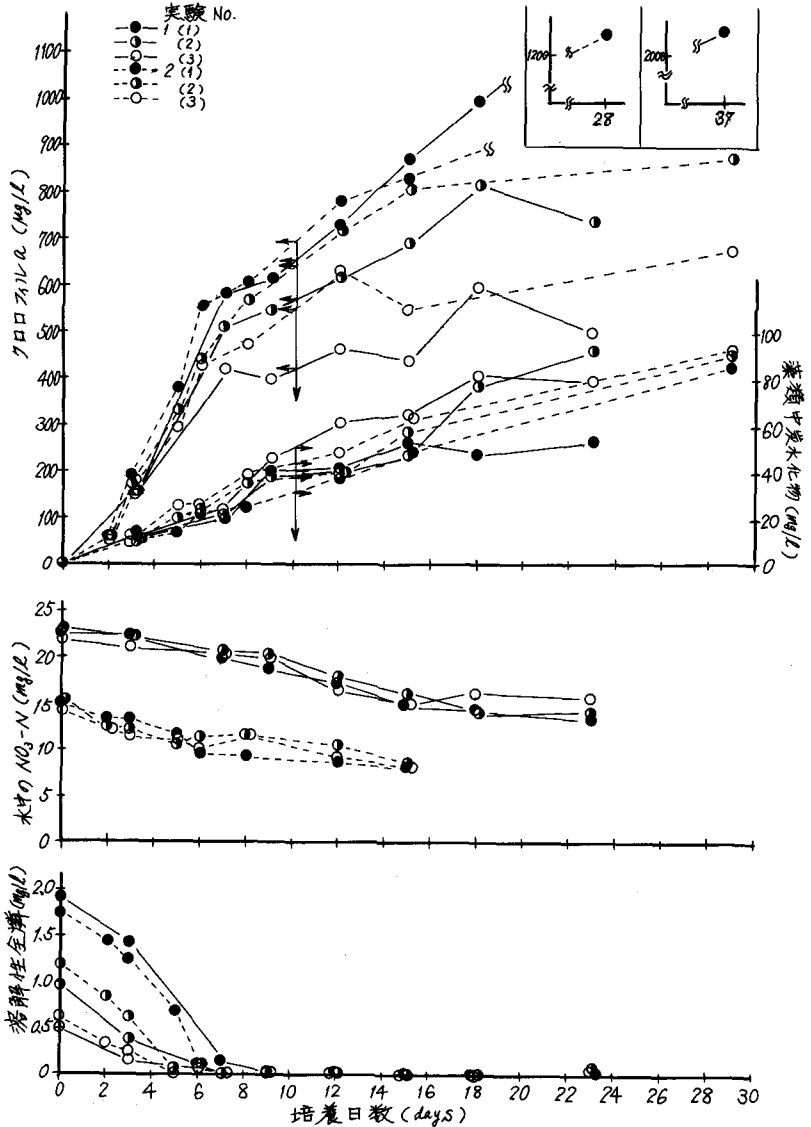


図-2 燐制限条件下における増殖特性と栄養塩摂取特性

クロロフィルaと藻類

中のケルダール窒素との関係を図-7に示すが、両者の間には直線的関係があり、藻類中の窒素含有率は2.2 (mg N/mg クロロフィルa)であることが示されている。水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ の摂取量とクロロフィルaの増加量との関係を示したのが図-8である。両者の間には直線的関係があり、増加クロロフィルaに対する摂取 $\text{NO}_3\text{-N}$ の量は、藻類中のケルダール窒素含有率とほぼ同じ値であることが示されている。これより、本実験条件下では、窒素は藻類中には増殖必要量以上にあまり蓄積されることなく必要に応じて摂取され、図-3に示されるように水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 欠乏状態になると増殖が停止するものと考えられる。

4) 浮遊物質質量(SS)の増減

混合液中のSS濃度は、培養日数を経過するにつれて増加し、クロロフィ

ルaの増加が停止した後も、鈍くはなつたが、炭水化物の増加を反映して増加が継続された。SSとクロロフィルaとの関係を示したのが図-9であるが、この図に示されている直線はクロロフィルaが増加し藻類中の炭水化物含有率が一定である時期のプロットより得られた両者の関係を示したものであり、両者の間には直線的関係があり、SS中の炭水化物含有率は 0.012 (mg クロロフィルa/mg SS)であることが示されている。また栄養塩が欠乏してきた後のプロットは、図-9に示される直線より右上にずれてき、SSはクロロフィルa以外のものによる支配があることがうかがえる。SSと藻類中の炭水化物との関係を示したのが図-11である。この図において、実験は栄養塩が豊富で増殖が活発な場合のプロットに対応するものであるが、これよりSS中の炭水化物(グルコース基準)の含有率は 0.55 (mg 炭水化物/mg SS)であることが知られ、また栄養塩欠乏状態に存るとSSは炭水化物量にも大きく支配されることの傾向(点線)が示されている。

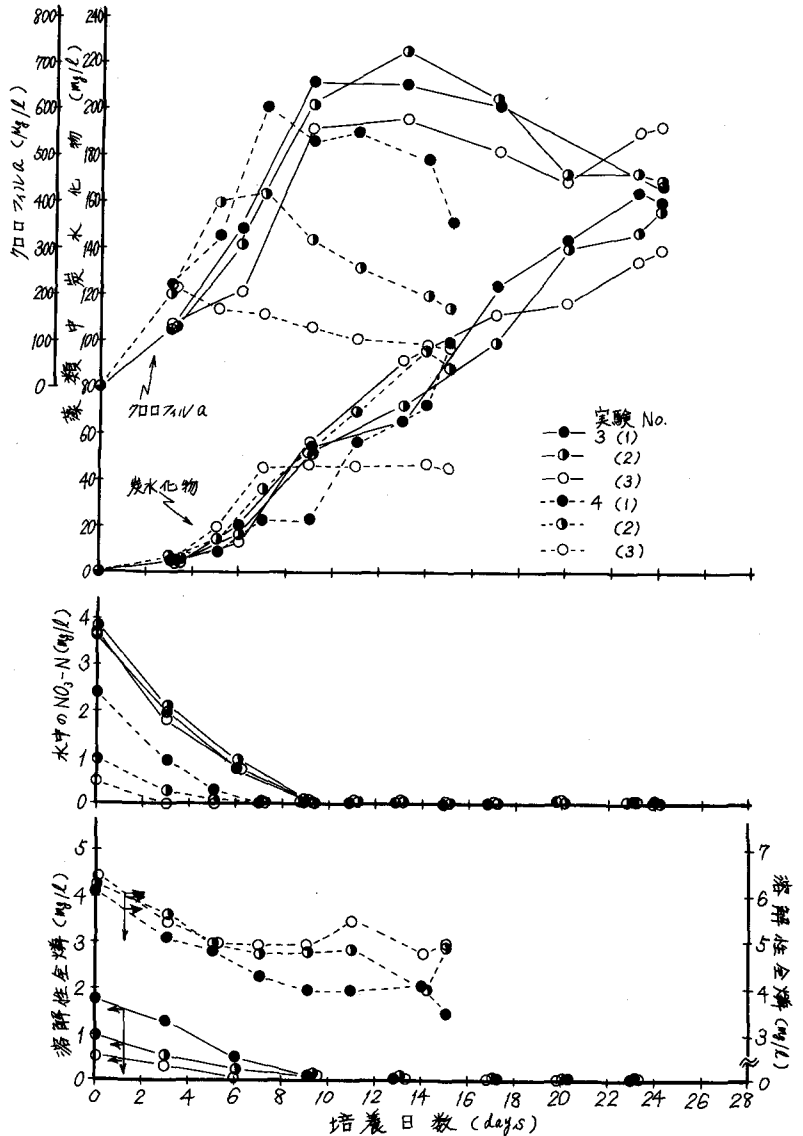


図-3 窒素制限条件下における増殖特性と栄養塩摂取特性

5) 藻類の組成

以上の結果より、蓄積がな
い場合の藻類中のN/P比は
10.3 (mg/mg) であり、炭水
化物の蓄積を無視した場合の
窒素および磷の含有率は各々
8.6% および 0.84% であり、
Stumm等の示した値(各々6.3
% および 0.87%)⁽³⁾⁽⁴⁾ と同程度
である。

しかしながら、磷の藻類中
への蓄積を考慮するとN/P比
は、磷が十分に存在するとき
の約1.7 (mg/mg) より、磷が
最少必要量のみ存在するとき
の10.3 (mg/mg) までの間で変動す
ることが本研究結果より得られる。
また炭水化物の蓄積を考慮すると
窒素および磷のSS中の含有率は
上記の値より低い値となることが
考えられる。

5. 結論

本研究は、フクロラ種を用いて、
その増殖過程における増殖特性、
窒素および磷の摂取特性、ならび
に藻類中炭水化物量の増動等に注
目して実験的検討を行なったもの
である。

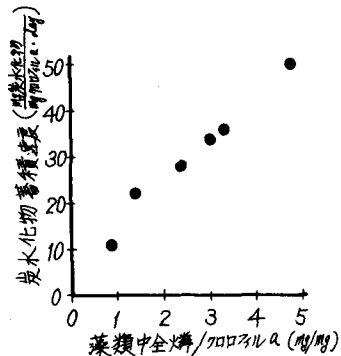


図5 炭水化物蓄積速度と磷含有率

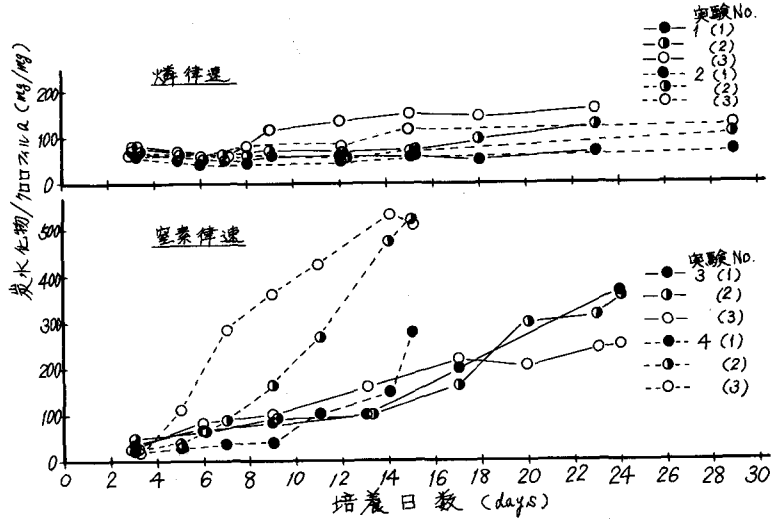


図4 藻類中の炭水化物の増動

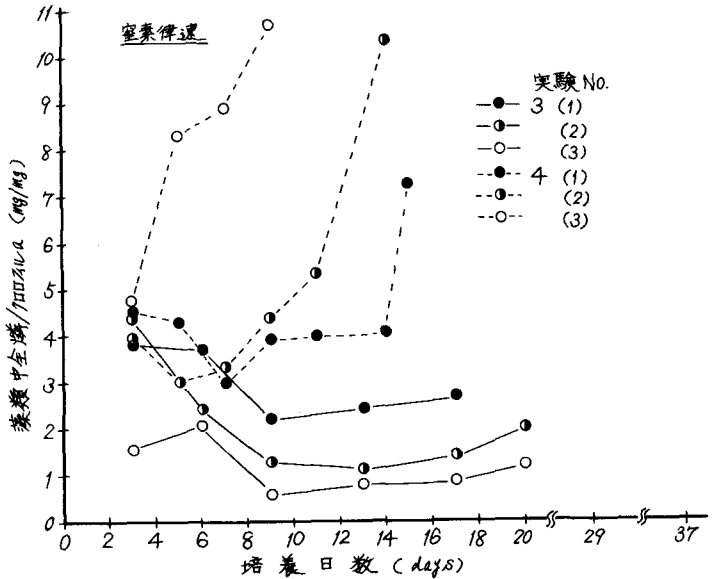
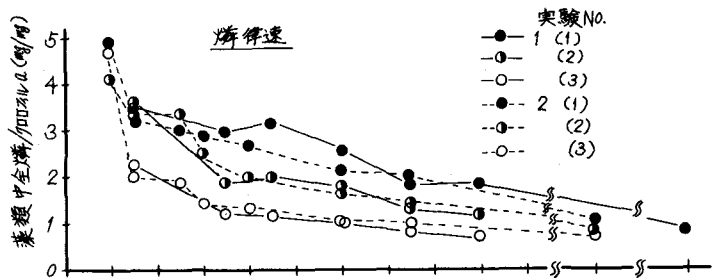


図6 磷含有率の変化特性

その結果つぎのようなことが知られた。すなわち、磷は豊富にある場合には藻類中に蓄積され（本実験条件下では、最少必要量の最大約6倍程度）、水中で欠乏してもその蓄積された磷により藻類は増殖した。窒素については増殖必要量に応じて摂取されるようであった。藻類中の炭水化物は、栄養塩欠乏状態になると（とくに窒素欠乏状態の場合）、藻類中に蓄積される傾向にあった。

したがって、藻類中の組成を考える場合や藻類の増殖と栄養塩の摂取特性を考える場合には、炭水化物や磷等の含有率が培養条件により大きく変化するもので、これらの変動に注目して考察する必要があると考えられる。また藻類の増殖に関するモデル化においても、これらの変動を加味することが必要であろう。

参考文献

- (1) A.G. Payne "Responses of the Three Algal Assay Procedure: Bottle Test" *Water Research*, Vol. 9, No. 4, 437~445 (1975)
- (2) V.H. Huang, et al. "Nutrient Studies in Texas Improvements" *WPCF*, Vol. 45, No. 1, 105~118 (1973)
- (3) H.E. Allen & J.R. Kramer "Nutrients in Natural Waters" *Environmental Science and Technology Series*, 55~68
- (4) 中西弘 "富栄養化に関する討議論文" 第12回衛生工学研究討論会, p. 56 (1976)
- (5) G.E. Fogg "Algal Cultures and Phytoplankton Ecology" The University of Wisconsin Press, 12~61 (1975)
- (6) W.J. Grenney "Effects of Intracellular Nutrient Pools on Growth Dynamics of Phytoplankton" *WPCF*, Vol. 46, No. 7, 1751~1760 (1974)
- (7) 田宮博, 渡辺篤 "藻類実験法" 南江堂, 46~104 (1972)

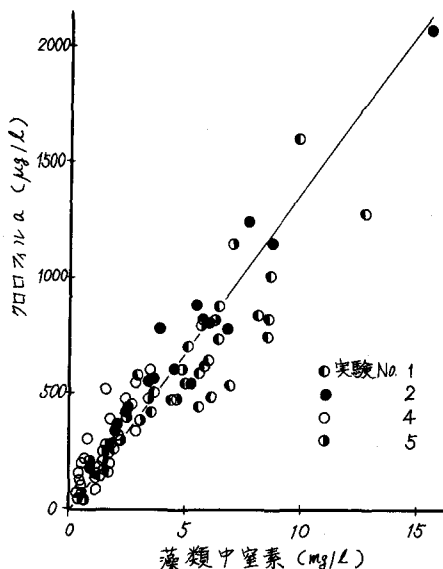


図-7 クロロフィルaと藻類中窒素

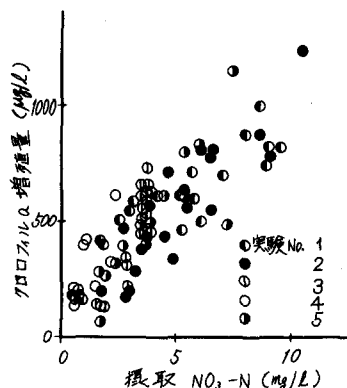


図-8 クロロフィルa増殖量と摂取NO₃-N

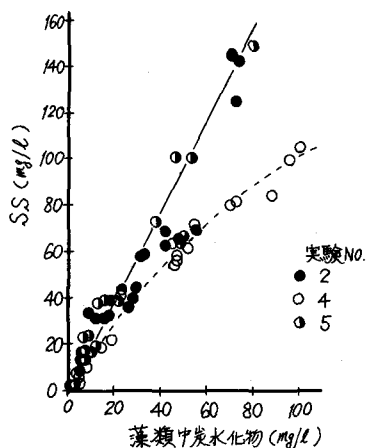


図-10 SSと藻類中炭水化物

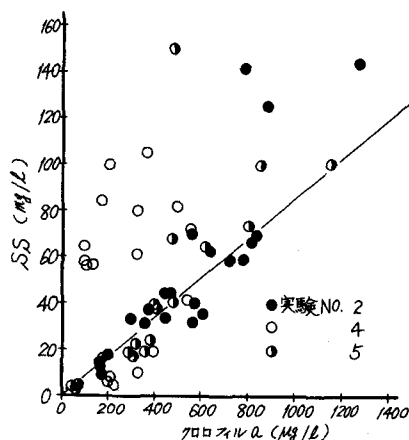


図-9 SSとクロロフィルa