

II-86 クロレラの連続培養におよぼす 滞留時間の影響について

岩手大学 学生員 ○小松佳幸 吉田勝司

正員 相沢治郎 海田輝之 大村達夫 大沼正郎

1. はじめに

藻類は、増殖中に様々な代謝生産物を水中に放出する事が知られている。この藻類増殖中の代謝生産物の挙動を明らかにする事は、複雑な富栄養化システムを明らかにするステップとなると考える。そこで、ここではクロレラを滞留時間を变化させた連続流完全混合培養槽中で培養し、培養液中に放出される代謝生産物のうち特に有機酸の挙動を検討した。

2. 実験方法

クロレラの培養には、図-1に示す様な連続流完全混合培養槽を用いた。内容量は、9.6(1)で無菌的なクロレラ培養を行う目的で、培養槽が滅菌できるようにガラス製とした。また、培養温度は25℃であり側面からは4000(1ux)の白色蛍光灯を照射し、12時間毎の明暗培養を行った。流入基質はC培地を使用し、除菌の為0.22 μ mのフィルターを通過させた。また、培養槽には十分なCO₂の供給と槽内の混合を保証する為、無菌空気による曝気が行われた。無菌空気は濃硫酸に接触させた後、CaCO₃のカラムを通過させ、更に0.20 μ mのフィルターを通過させることにより得られた。

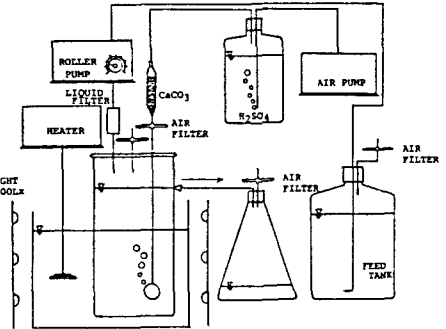


図-1 実験装置

次に、クロレラの無菌培養液が植種の為10ml(1ml中に10⁵オーダーのクロレラを含む)培養槽に加えられた。そして、4日間のバッチ培養後、所定の滞留時間(2日と10日)で連続培養を行った。実験期間中、流出水のクロレラ数、クロロフィルa,b,cおよびpHが測定され、ガスクロマトグラフィーによって藻類代謝生産物である有機酸も定量した。

3. 実験結果および考察

図-2にクロレラ増殖曲線を示す。滞留時間が10日の場合は15日目頃から、2日の場合は11日目頃からクロレラがそれぞれ4.1 $\times 10^7$ (cell/ml), 7.0 $\times 10^6$ (cell/ml)のレベルでほぼ定常値となった。

図-3, 4に滞留時間が10日および2日の槽内におけるクロレラ数とクロロフィルa,bとの関係を示

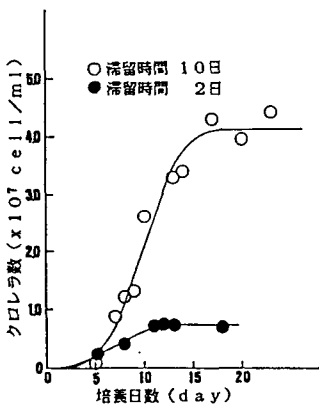


図-2 クロレラ増殖曲線

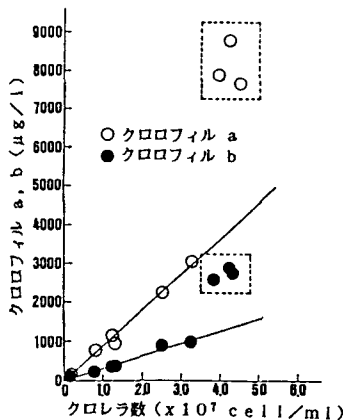


図-3 クロレラ数-クロロフィルa,bの関係
(滞留時間10日)

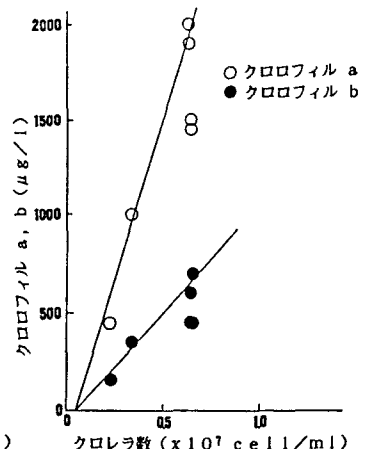


図-4 クロレラ数-クロロフィルa,bの関係
(滞留時間2日)

した。滞留時間が10日の場合は、クロレア数が 3.5×10^7 (cell/ml)程度までは良い相関性が得られており、クロレア1個当りのクロロフィルa,bの含有量はそれぞれ、 9.2×10^{-5} ($\mu\text{g chl.a/cell}$)、 3.1×10^{-5} ($\mu\text{g chl.b/cell}$)となった。しかし、クロレア数が 3.5×10^7 (cell/ml)以上になると、直線性が失われクロレア1個当りのクロロフィルa,bの値が非常に高くなった。これは、槽内のクロレアの濃度が高くなる為に光が内部まで届くのが困難になってくるので、クロレア自体が、細胞内のクロロフィル量を増加させ、光を最大限に利用しようとする作用が働くからと考えられる。すなわち光の照度が低くなるとクロロフィル含有量が大きくなると言われており、この効果によるものと思われる。図-4の滞留時間が2日の場合は、クロレア数が最大で 7.0×10^6 (cell/ml)であるので、滞留時間が10日の場合にみられたクロロフィル含有量の急激な増加はみられず、両者の間には良い直線性が得られている。この時、クロレア1個当りのクロロフィルa,b含有量はそれぞれ 3.3×10^{-4} ($\mu\text{g chl.a/cell}$)、 1.1×10^{-4} ($\mu\text{g chl.b/cell}$)となった。この値を滞留時間10日の結果と比較すると3倍~3.6倍となっており、滞留時間が短いほどクロロフィル含有量が多くなる事を示している。

表-1 滞留時間10日の有機酸定量結果 (単位: mg/l)

	定常期						
	6日目	8日目	9日目	10日目	13日目	15日目	17日目
ビルビン酸	—	0.33	—	0.37	0.41	0.14	0.31
乳酸	0.0003	0.01	—	—	—	—	—
グリコール酸	—	2.60	10.50	9.10	6.80	7.70	7.10
酢酸	—	—	0.25	—	7.56	8.80	7.10
フマル酸	—	—	1.07	0.51	3.20	3.50	0.35
合計	0.0003	2.94	11.82	9.98	17.97	20.14	14.86

表-2 滞留時間2日の有機酸定量結果 (単位: mg/l)

	定常期						
	6日目	8日目	10日目	11日目	12日目	17日目	18日目
ビルビン酸	—	—	—	0.002	0.005	0.0001	0.0016
乳酸	0.01	0.01	0.33	0.58	—	1.18	0.02
グリコール酸	0.24	0.52	0.82	1.00	2.24	0.50	0.88
酢酸	0.01	—	0.01	0.01	0.01	0.13	0.71
フマル酸	—	1.19	—	0.32	0.32	0.23	0.40
合計	0.26	1.72	1.16	1.91	2.58	2.04	2.01

表-1, 2に滞留時間が10日および2日の有機酸の定量結果をそれぞれ示した。これらの表よりTotalの有機酸は槽内のクロレアの培養が定常期に近づくにつれて増加し、定常期では滞留時間が10日の場合、平均で17.50(mg/l)、2日の場合は2.14(mg/l)となった。したがって定常期における有機酸濃度は滞留時間が5倍になるとほぼ8倍増加することを示している。また、主要な有機酸はどちらの滞留時間においてもグリコール酸となり、クロレアの代謝生産物の中では重要な役割を演じているものと考えられる。

また、Totalの有機酸は時間の経過に伴い増加するが、グリコール酸濃度は定常期直前においてピークをむかえ、その後減少する傾向がどちらの滞留時間においても観察された。この点はクロレアの生理的な特性と重要な係わりを示すものとも考えられ、今後の検討課題である。

次に、滞留時間が10日の場合、酢酸もグリコール酸と同レベルの濃度となり滞留時間が長くなるような培養系においては無視できないものと思われる。一方、乳酸、ビルビン酸及びフマル酸はグリコール酸に比べて濃度は低いけれども、長い滞留時間ではフマル酸とビルビン酸、そして短い滞留時間では逆に乳酸が無視できない濃度となった点も大変興味深いものがある。

ここで、定常期における主要な有機酸であるグリコール酸のクロレアによる比放出速度を次式により計算する。($r = Q \cdot S_{out} / (V \cdot X)$ r :グリコール酸の比放出速度(mg/cell・day) Q :流量(l/day) S_{out} :流出グリコール酸濃度(mg/l) V :培養槽の容量(l) X :槽内のクロレア数(cell/l))

定常期のグリコール酸濃度を滞留時間10日の場合7.2(mg/l)、2日の場合0.8(mg/l)とすると比放出速度 r はそれぞれ 1.7×10^{-11} (mg/cell・day)、 5.7×10^{-11} (mg/cell・day)となる。

このように滞留時間が短いほどグリコール酸の比放出速度は大きくなり、ほぼ3倍の値となっている。しかし、この比放出速度は無菌的な条件で行われたと仮定した場合であり、実際には実験終了時に細菌および原生動物による若干の汚染が見られたので、見かけの比放出速度と考えられる。グリコール酸は他栄養細菌の栄養源として利用される可能性があるので真の比放出速度を求めるために今後培養系を十分コントロールする必要があると思われる。

4. まとめ

クロレアの代謝生産物のうち主要な有機酸はグリコール酸であったが、滞留時間の差によって無視できない他の有機酸が培養液中に放出されるのが明らかになった。また、滞留時間の差によってクロレアのクロロフィル含量やグリコール酸の比放出速度も変化することがわかった。