

(24) アルミニウム錯体形成能を有する藻類由来有機物の分離

Isolation of aluminium-complexing organic matters originated from algae

高荒智子*, 丸山亜紀子**, 佐野大輔*, 今野弘***, 大村達夫*

Tomoko TAKAARA*, Akiko MARUYAMA**,

Daisuke SANO*, Hiroshi KONNO*** and Tatsuo OMURA*

ABSTRACT; Mass propagation of algae in raw water has been known related to disturbing the flocculation in drinking water treatment systems. Many researchers proposed that algal organic matters (AOMs) can interact with flocculants by coordinate bonds, and bring about several disorders due to increases in flocculant demand and in the residual flocculant in treated water. However, the inhibitory mechanism by AOMs have not been elucidated. In this study, aluminium-complexing substances in AOMs were successfully isolated with affinity chromatography. SDS-PAGE analysis revealed that these substances include proteins which have molecular weight between 40 and 70kDa. However, the results of the gel chromatography show that the amount of these proteins in AOMs were estimated to be very low compared to organic matters with high molecular weights around 2000kDa. These results imply that not only proteins but also other organic matters such as polysaccharides contribute to the inhibition of flocculation.

KEY WORDS; Algal Organic Matter (AOM); aluminium; coordinate bond; affinity chromatography; SDS-PAGE.

1. はじめに

我が国の水道水源の約40%はダム湖などの閉鎖水域が占めている。このような水域では富栄養化を原因とする藻類増殖が季節的に発生しており、浄水処理システム内のあらゆるプロセスにおいて藻類による処理障害が生じている¹⁾。水道水源の富栄養化による藻類増殖は、一度引き起こされると発生要因を排除しない限り繰り返し生じるが、藻類増殖を根本的かつ直ちに阻止することは困難であり、閉鎖水域の水を原水とする浄水場では藻類障害が発生すると取水口や処理システムの変更を要求されるという状況に置かれる場合がある。

藻類による障害を最も受け易いのは、処理システムの中心を担う凝集プロセスである。水道原水に大量の藻類が含まれた場合、一般的にはプロセス内での藻類活性を低下させ処理効率を改善する目的で前塩素処理が施される¹⁾。しかしながら、塩素処理は藻類細胞の破壊をもたらすため、細胞内容物に

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

** 東北大学工学部土木工学科 (Department of Civil Engineering, School of Engineering, Tohoku University)

*** 東北工業大学建設システム工学科 (Department of Civil Engineering, Tohoku Institute of Technology)

よる原水中の溶存態有機物濃度を増加させる場合がある。放出された藻類由来有機物（AOM）は、凝集操作において凝集剤成分金属イオンあるいは多価水和物と錯体を形成をするため²⁾、処理に要する凝集剤注入率増加を引き起こし、処理効率を低下させる。さらに、藻類由来有機物と塩素との反応によるトリハロメタンの生成³⁾や、アルミ系凝集剤を使用した場合の水道水中のアルミニウムの残留⁴⁾等の連鎖的かつ副次的問題を招く恐れがある。以上のことから、凝集処理の効率化および安全な水道水質の確保のためには、AOMによる凝集阻害への対策が必要不可欠である。

凝集阻害対策として、凝集操作条件の見直しまたは新たな凝集剤の開発等の手段が挙げられるが、それらは全て阻害メカニズムが解明された後に実際的な手段が講じられるものである。しかし、AOMによる凝集阻害の詳細なメカニズムは未だ十分な解明に至っていない。既往の研究によりAOMは、一般的に金属イオンが多価水和錯体になるための水和反応の阻害、および凝集剤と除去物質とのフロック形成のために重要な荷電中和反応の阻害を引き起こし、凝集効果の低下に関与すると考えられている⁵⁾。また、藻類種および藻類の各増殖期に放出されるAOMによって阻害度に相違が生じる²⁾という報告がある。例えば、藍藻類 *Microcystis* sp. は大量増殖し、その際に分泌される有機物が凝集阻害を引き起こすとされ、真柄らは *Microcystis* sp. の生産する有機物 1mg 当たり、約 0.1mg のアルミニウムを必要とすると報告している⁶⁾。また、緑藻類 *Dictyosphaerium*、珪藻類 *Melosira* 等から分泌される有機物について、生長期によって阻害度が変化する²⁾ことが知られていることから、AOM の分子構造が阻害度に大きく関与していることが考えられる。更に、最近の研究報告において、AOM成分中のタンパク質および炭水化物の分子量や官能基の違いが除去性や残留Al濃度の変化に関連しているという知見⁷⁾がある。しかし、AOMは多種多様の有機物から構成されていることから、阻害に関与する物質の分子構造を明らかにすることは困難を伴うため、阻害関与物質の分子構造および物理化学的特性に着目して、凝集阻害メカニズムを解明する試みは殆どみられない。

以上の背景のもと本研究は、AOM構成物質の分子構造および物理化学特性を把握することによる凝集阻害メカニズム解明を最終目標としている。今回は特に、タンパク質に着目し、凝集剤と錯体を形成するタンパク質のアフィニティクロマトグラフィによる分離を試みた。タンパク質に関しては一般的に金属親和性を持つことが知られていることから、分離されたタンパク質について SDS-PAGE による分析も行った。

2. 実験試料および方法

藻類培養からタンパク質検出までの実験フローチャートを図-1に示した。

2.1 藻類の培養

供試藻類には国立環境研究所より分与された藍藻類 *Microcystis*

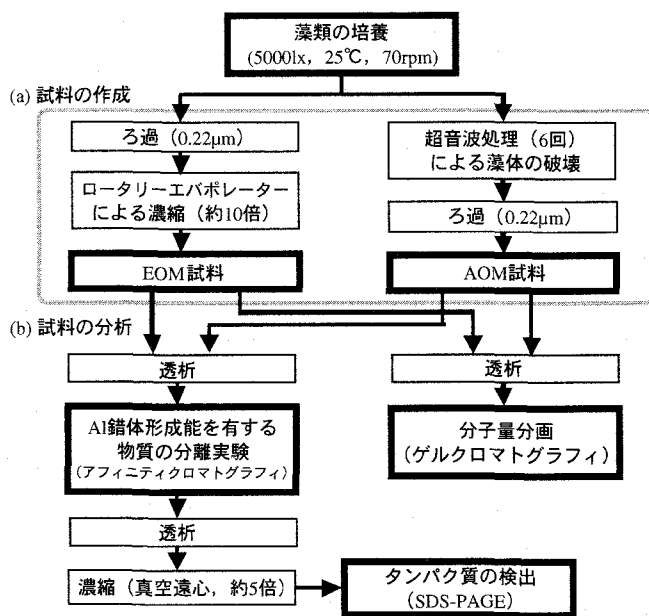


図-1. 実験フローチャート。

aeruginosa (NIES-91) を用いた。 *Microcystis aeruginosa* は閉鎖水域で大量増殖してアオコを形成する藻類として知られており、また凝集阻害を引き起こす代表的な藻類としても知られる。 MA 培地を用いて、照度 5000lx (12 時間明暗)、温度 25℃、振とう 70rpm の条件で無菌培養した。 培養においては、培養初期細胞数をほぼ等量にした 300mL の三角フラスコ (17 個) を用いた。 そして、培養開始時と培養後 4 日目、12 日目、17 日目および 25 日目においてそれぞれ三角フラスコ 3 個を培養器から取り出し、順々に実験に使用していった。 増殖曲線はクロロフィル-a を測定することにより求めたが、これらの値は各サンプリング日において取り出した 3 個の三角フラスコから得られた値の平均値とした。

2.2 有機物の分類と試料作成

藻類由来有機物 (AOM) は、代謝活動等により細胞外に分泌された細胞外有機物 (EOM)、細胞の構成成分である細胞内有機物 (IOM)、細胞の表面に保持されている細胞表面有機物 (SOM) の総称である (図-2)。

(1) EOM 試料作成

Microcystis aeruginosa の各生長期 (対数増殖期、定常期前期、定常期中期、定常期後期) において培養液を 0.22 μ m メンブレンフィルター (GSWPO4700, MILLIPORE) でろ過し、ろ水中の EOM を採取した。 ロータリーエバポレーターによる濃縮後、10m 蓋付きチューブに移し -80℃ で冷凍保存した。 使用時は随時解凍して用いた。 作成したサンプル中には EOM のみが存在するので、以下これを EOM 試料とした。

(2) AOM 試料作成

分子量および錯体形成能について細胞外有機物 (EOM) と AOM とを比較検討するために、超音波処理による藻体破壊を行って AOM を回収することを試みた。 まず培養した藻類に対し、超音波処理 (20kHz、60W、10 分処理、5 分休止) を 6 回施した。 超音波処理は光学顕微鏡で細胞の状態を観察しながら行った。 超音波処理により藻体が破壊され、培養液が緑色から黄褐色へと変化したことを確認した。 その後、0.22 μ m メンブレンフィルターにより固形物を除去し、得られたろ水から溶存態の全藻類由来有機物を採取した。 10mL 蓋付きチューブに入れて -80℃ で冷凍保存し、使用時は随時解凍して用いた。 作成したサンプル中には EOM に加えて IOM および SOM が含まれているので、以下これを AOM 試料とした。

2.3 分子量分画

試料に含まれる有機物を除去するため、EOM、AOM 試料共にゲルクロマト用バッファー (0.15M NaCl を含む 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液、pH は 7.0) で透析 (分画分子量: 14,000) した後、ゲルろ過クロマトグラフィによって分子量分画を行った。 透析は、MA 培地に含まれる波長 280nm 吸収成分を除外する目的で行った。 透析膜は分画分子量 14kDa のものを使用しているため、14kDa 以下の物質の大部分は取り除かれていることになる。 ゲルクロマトカラムには Superdex 200 HR10/30 (分画範囲 M.W10,000-600,000) を用いた。 まず試料 2mL を流速 0.5mL/min でゲルクロマトカラムに導入し、カラム出口で紫外外部吸光度 (280nm) を測定することによってゲルクロマトグラムを作成した。

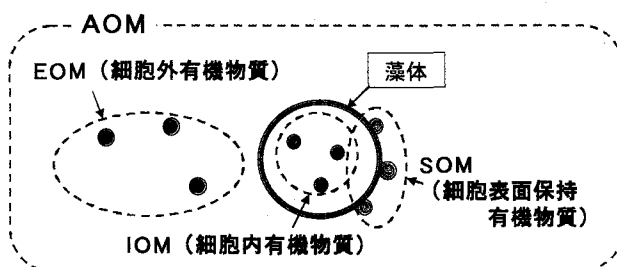


図-2. AOM の分類⁸⁾。

2.4 アフィニティクロマトグラフィによるアルミニウム錯体形成有機物の分離

(1) アフィニティクロマトカラム作成方法

実験に用いたアフィニティカラム (Hitrap chelating, 1mL) の担体表面には、リガンドとして用いる金属イオンを配位結合で捕捉するために、スパーサーを介して二つのカルボキシル基が固定化されている (図-3)。このカルボキシル基とリガンドとして用いたアルミニウムイオン (硫酸アルミニウム由来) がキレート結合し、カラム担体にアルミニウムイオンがカップリングされる。カラム作成は次の手順で行った。まず、脱気した Milli-Q 水でカラム内を洗浄し、0.1M 硫酸アルミニウムをカラム内に気泡が入らないように注意して注入した。一晩静置し十分に担体にアルミニウムをカップリングさせた後、脱気した 20mM リン酸バッファー (pH7.2) を注入し洗浄すると共に、カラムの平衡化を行った。

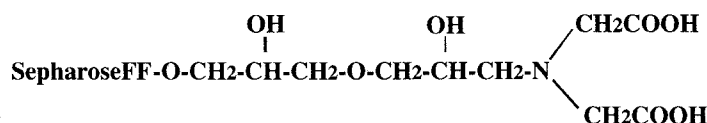


図-3 アフィニティカラム内の官能基。

(2) アフィニティクロマトグラフィによるアルミニウム錯体形成有機物の分離手順

アフィニティクロマトグラフィの原理を図-4に示した。まずEOMもしくはAOM試料をアフィニティカラムに導入した後、開始バッファーでカラムを洗浄することによって、リガンドであるアルミニウムイオンとの親和性が低い有機物を洗い流した (図-4, (1), (2) および (3))。続いて溶出バッファー (開始バッファーと組成は同じでpH3.5) をアフィニティカラムに導入し、リガンドに結合したアルミニウム錯体形成能を有する有機物を回収した (図-4, (4))。

EOM試料は含有有機物量が少ないため、ロータリーエバポレーターにより約10倍濃縮したものを用了。それに対し、超音波処理後のサンプルであるAOM試料は有機物量が多いので、濃縮操作を行わなかった。続いて、EOM、AOM試料共にアフィニティクロマトグラフィの開始バッファー (0.5MNaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)を用いて透析 (分画分子量: 14,000)を

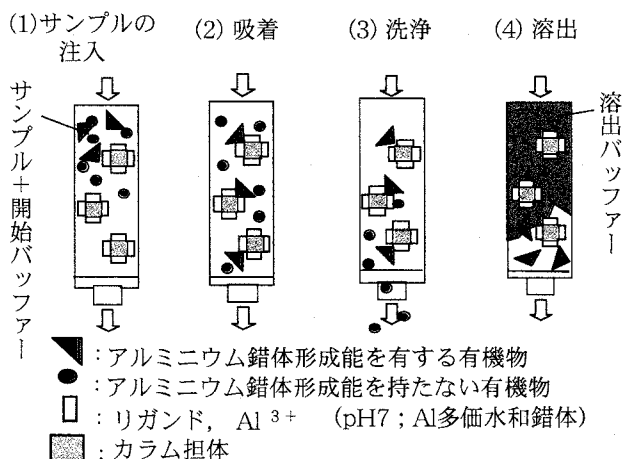


図-4 アフィニティクロマトグラフィの原理。

行い、培地中に含まれる有機物を除去した。試料2mLを流速0.4mL/minでフラクションは1mLずつ回収し、錯形成能を有する物質を分離し回収した。流速は0.4mL/minとし、カラム出口で吸光度(280nm)を測定した。

2.5 タンパク質検出

アフィニティクロマトグラフィにより回収されたアルミニウムと錯体形成を有する物質に対しSDS-PAGEによるタンパク質検出を行った。まず、回収されたフラクションを透析膜(分画分子量: 14,000)に入れ10mM 重炭酸アンモニウム(pH8.0, 4℃)で透析した。その際、透析バッファーは透析開始3時間後に交換し、その後一晩透析を続けた。透析を終了後、2mL容チューブに分注し、温度60℃の状態で真空遠心を行い200μLまで蒸発させた。濃縮したサンプル200μLのうち、10μLを用いてSDS-PAGEによるタンパク質検出を行った。

3. 結果と考察

3.1 藻類増殖曲線

各実験時におけるクロロフィル-aの値を図-5に示した。実験は、対数増殖期(4日目)、定常期前期(12日目)、定常期中期(17日目)、定常期後期(25日目)の増殖期における藻類に対して行った。

3.2 各試料におけるゲルクロマトグラフィによる分子量分画結果

標準物質に対するゲルクロマトグラフィの結果を図-6に示した。標準物質として用いた物質は、タンパク質4種類(Ribnuclease A, M.W. 13.7kDa; Chymotrypsinogen A, M.W. 25kDa; Ovalbmin, M.W. 43kDa; Bovine Serum Alubumin, M.W. 67kDa)および多糖類1種類(Blue Dextran 2000, M.W. 2000kDa)である。経過時間18分にBlue Dextran 2000, 29-31分にBovine Serum Alubumin及びOvalbmin, 41分にChymotrypsinogen A, そして44分にRibnuclease Aのピークが確認された。

図-7には、対数増殖期および定常期前期におけるEOM試料の分子量分画を示した。ここでは10-20kDa付近の分子量を有する物質の藻類による分泌が確認された。一方、図-8には定常期中期および定常期後期のEOM試料における分子量分画結果を示した。これらの増殖期においては、10-20kDa付近の物質に加え、40kDa付近および2000kDa付近の物

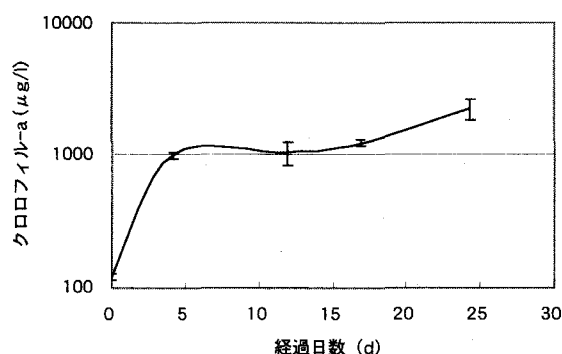


図-5 各実験時におけるクロロフィル-aの値。
Error barは標準偏差 (n=3)。

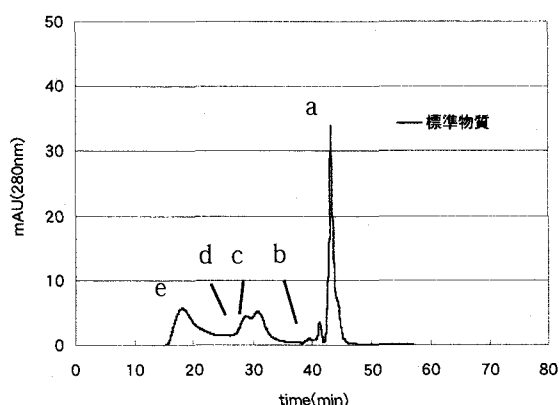


図-6 標準タンパク質の分子量分画結果。

- a: Ribnuclease A (M.W. 13.7kDa)
- b: Chymotrypsinogen A (M.W. 25kDa)
- c: Ovalbmin (M.W. 43kDa)
- d: Bovine Serum Alubumin (M.W. 67kDa)
- e: Blue Dextran 2000 (M.W. 2000kDa)

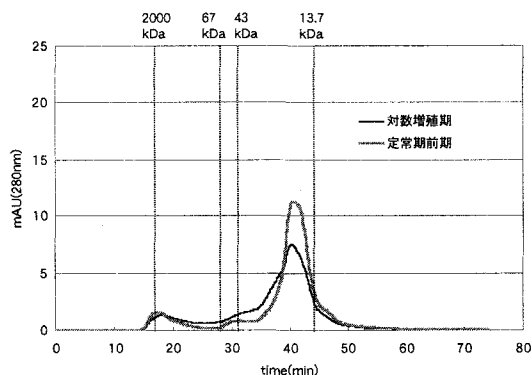


図-7 ゲルクロマトグラフィによる
分子量分画の結果。
(EOM 試料, 対数増殖期および定常期前期)

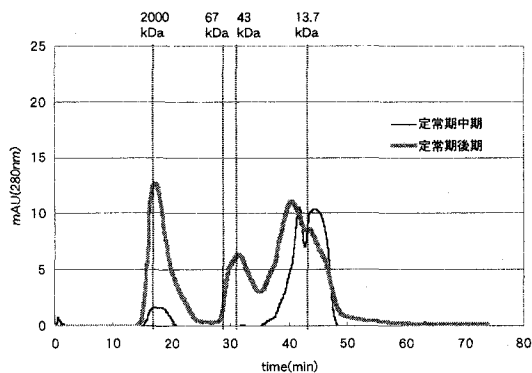


図-8 ゲルクロマトグラフィによる
分子量分画の結果。
(EOM 試料, 定常期中期および定常期後期)

質が増加していた。このことは、死滅した藻体からの細胞内容物の放出によるものと考えられた。また、定常期後期で高分子側にシフトしているように見えるのは、M.W. 10,000 付近、或いはそれ以下の物質が多様化したためであると推測された。図-7および図-8におけるピーク面積を比べると、水中に含まれる有機物濃度は生長に伴って増加することが確認でき、その成分は生長に伴って多様化および高分子化していることが観察された。高分子物質のうち、特に2000kDa以上のものは、タンパク質に糖質などが結合した複合物質である可能性も考えられ、*Microcystis aeruginosa* 中の細胞壁成分や外膜成分等に由来するものではないかと推測された。

次に、定常期中期及び後期に得られた藻体に対して超音波処理(60W, 10min×3)を施すことによって得られたAOM試料について分子量分画を行った。AOM試料に関しては濃縮作業を行わずにゲルクロマトグラフィを行った。図-9は定常期中期におけるAOM, EOM試料の分子量分画の結果である。AOM試料に対してはM.W. 40-2,000kDa 付近の有機物が著しく増加し、特に多糖類などが結合したタンパク質と思われる2,000kDa 付近の有機物に関しては、EOM試料(10倍濃縮後)の場合と比べ、吸光度にして約18倍まで増加した。同様に定常期後期(図-10)においては、EOM試料で確認され

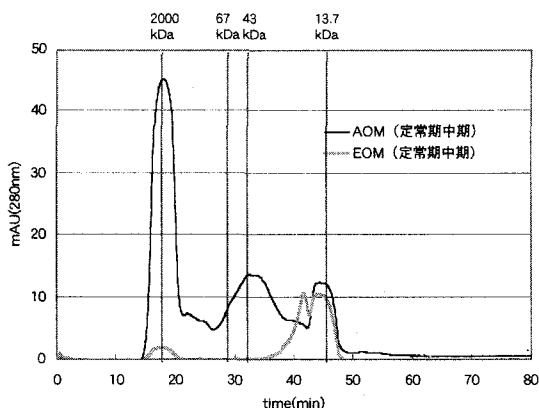


図-9 ゲルクロマトグラフィによる
分子量分画の結果。
(定常期中期でのEOM,AOMの比較)

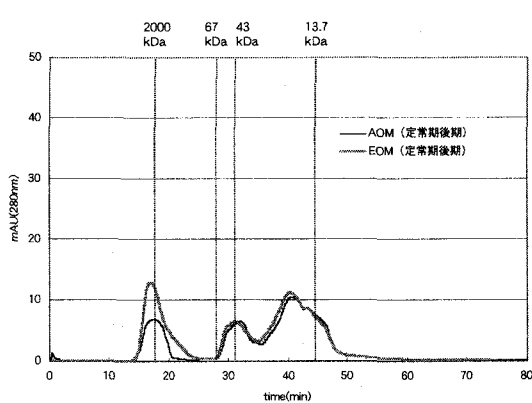


図-10 ゲルクロマトグラフィによる
分子量分画の結果。
(定常期後期でのEOM,AOMの比較)

た分子量の位置と同等の位置にAOM試料のピークが表れた。定常期後期では、藻類細胞は死滅しているものも含まれていると推測できる。そのため、定常期後期では死滅した藻体に由来する細胞内物質が外部に放出されてEOM試料にも含まれるようになるため、AOM試料とEOM試料における分子量分画におけるピーク位置はそれほど変わらなかったと考えられる。図-9に示す定常期中期AOMと図-10に示す定常期後期EOMのピークパターンが類似しているのは、定常期中期で細胞内に含まれていた物質が、定常期後期において細胞死により細胞外に分泌されたためと考えられる。

以上のことから、藻体内にはM.W. 40kDa程度の有機物や、多糖類等の結合タンパク質と推測される2,000kDa付近の高分子有機物が主に含まれているのに対し、対数増殖期等、光合成が活発に行われている生長期において分泌される有機物はM.W. 10kDa付近、あるいはそれ以下の分子量を有する有機物がEOMとして水中に放出されていたことが示唆された。

3.2 アフィニティクロマトグラフィによる錯体形成能を有する有機物の分離結果

カラム内にリガンドしたアルミニウム量は、カラムに注入したアルミニウム量とカップリング操作後にカラム外で回収されたアルミニウム量の収支から求めた(表-1)。カラムは繰り返し使用が可能であるが、カラム内の圧力が上昇した際は新たにカラムを作成し直したため、全ての実験が終了するまで計4本のカラムを要した。カラム内アルミニウム量は、カラム一本当たり平均5.01mmolであった。イオン数にして約 10^{21} 個程度のアルミニウムイオンがカラム内に吸着していることが確認された。

リガンドにアルミニウムイオンを用いたアフィニティクロマトグラフィの結果を図-11~14に示した。担体に結合したアルミニウムイオンは実験開始直後pH7に調整した開始バッファーで平衡化され

表-1. アフィニティカラム内にカップリングされたアルミニウム量

	1本目	2本目	3本目	4本目
Al 投入量 (m mol)	6.30	5.93	5.56	5.56
Al 回収量 (m mol)	0.52	1.04	0.85	0.85
カラム内Al量 (m mol)	5.78	4.89	4.70	4.70

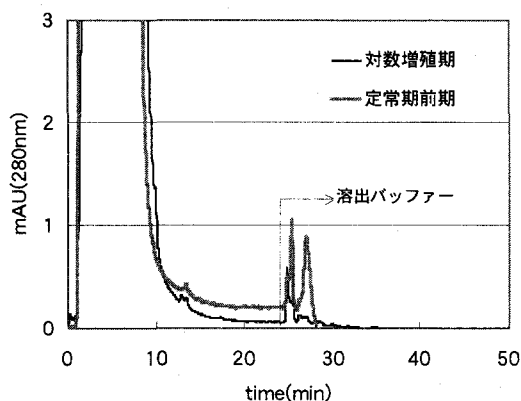


図-11 アフィニティクロマトグラフィの結果。
(EOM- 対数増殖期, 定常期前期)

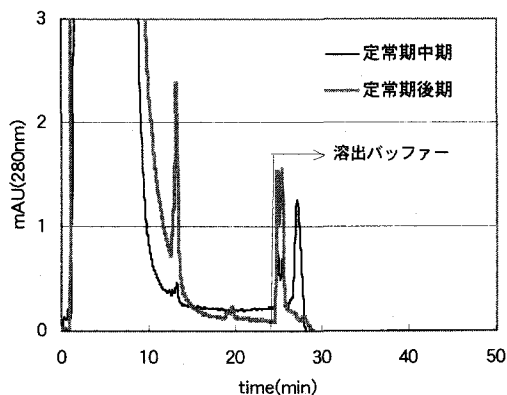


図-12 アフィニティクロマトグラフィの結果。
(EOM- 定常期中期, 定常期後期)

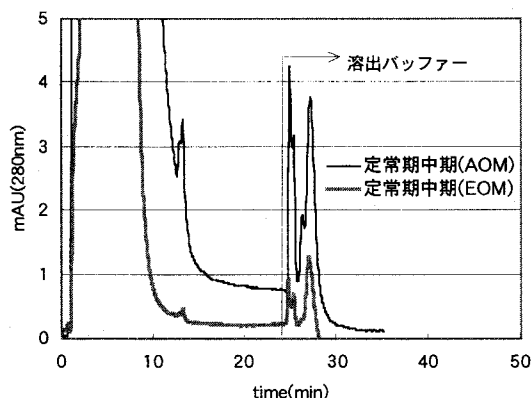


図-13 アフィニティクロマトグラフィの結果。
(定常期中期-AOM,EOM)

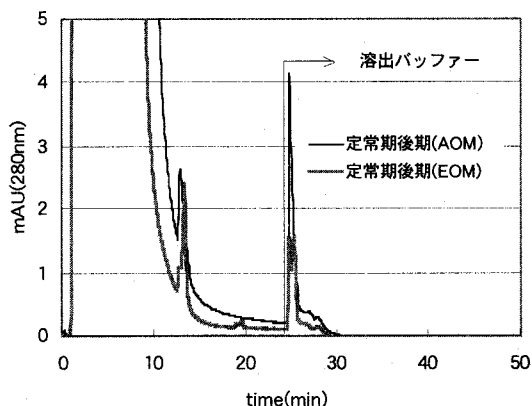


図-14 アフィニティクロマトグラフィの結果。
(定常期後期-AOM,EOM)

るため、サンプル注入時には殆どのアルミニウムが多価水和錯体の状態にあると考えられる。錯体形成能を持たない有機物はカラムを素通りし、開始バッファーにより洗い流されるため、最初に大きなピーク (0-10min) が現れる。一方、錯体形成能を有する有機物は溶出バッファーによって洗い流されるため、溶出バッファー添加後にピーク (24min 以降) となって現れている。

図-11 は対数増殖期および定常期前期における EOM 試料に対してアフィニティクロマトグラフィを行った結果である。溶出バッファー添加後にピークが現れており、錯体形成能を有する有機物の分離に成功したことが確認された。また定常期前期については、溶出バッファー注入後 2 つのピークが現れていることから、それぞれのピークに含まれる有機物間には錯体形成能の違いがあることが示唆された。

一方、図-12 は定常期中期および後期の EOM 試料に対してアフィニティクロマトグラフィを行った結果である。この場合も図-11 と同様に、錯体形成能を有する有機物が分離された。全増殖期を通して見ると、アルミニウム多価水和錯体と親和性を有する有機物は生長に伴って僅かながら増加傾向にあると考えられた。

今回行ったアフィニティクロマトグラフィにおいてはバッファー中にリン酸が含まれているが、アルミニウムはリン酸との作用性が高いことから、カラム内のアルミニウム多価水和錯体はリン酸とも錯体形成していると考えられる。したがって今回の実験で EOM 試料中から分離回収された錯体形成能を有する有機物とアルミニウムとの間には、リン酸-アルミニウム間の作用よりも高い親和性が存在したことが考えられる。

図-13 は定常期中期における EOM 試料と AOM 試料についてアフィニティクロマトグラフィを行った結果である。図-13 中の EOM 試料に関する結果は、図-12 中のそれと同じものである。明らかに AOM 試料中から錯体形成能を持つ有機物が多く分離されたことから、藻体内にはアルミニウムと錯体形成する物質が多く存在していることが示唆される。このことは、定常期後期におけるアフィニティクロマトグラフィの結果 (図-14) においても同様であった。分子量分画の結果 (図-9 および 10) で示したように、特に定常期中期の AOM 中には EOM 試料と比べて高分子量を有する有機物が多く含まれており、これらの中にアルミニウムに対して強い親和性を有する有機物が存在したと考えられた。また図-12~14 の結果において、定常期中期においては 2 つのピークであるのに対し、定常期後期にお

いては一つのピークになっているが、これは増殖時期、および有機物の存在部位によって有機物の成分が異なるためと推測できる。

3.3 タンパク質検出結果

EOM試料中および3-2において分離回収された有機物に対しSDS-PAGEを行ってタンパク質の検出を試みた(図-15)。Lane B～Eに示すように、EOM試料中には様々な分子量のタンパク質が溶存状態で存在することが確認できた。それに対し、アフィニティークロマトグラフィによりEOM試料中から分離されたタンパク質(図-15, F～I)は、どの増殖期に対しても40～70kDaのタンパク質が検出された。これらのタンパク質は、AOM試料中から分離されたサンプル中にも検出された(図-15, JおよびK)。これらの結果は、生長期により藻体外へ放出されるタンパク質の内容は変化するものの、アルミニウムと錯体形成を生じるタンパク質は共通して40～70kDaのものであることが示唆された。SDS-PAGEにおけるバンドの色の濃さから見ると、これらのタンパク質の存在量は微量であると考えられるが、微量であっても凝集剤と強く結合し、錯体形成物質が処理水中に残留することで、結果的に凝集剤の残留を引き起こすと予想される。

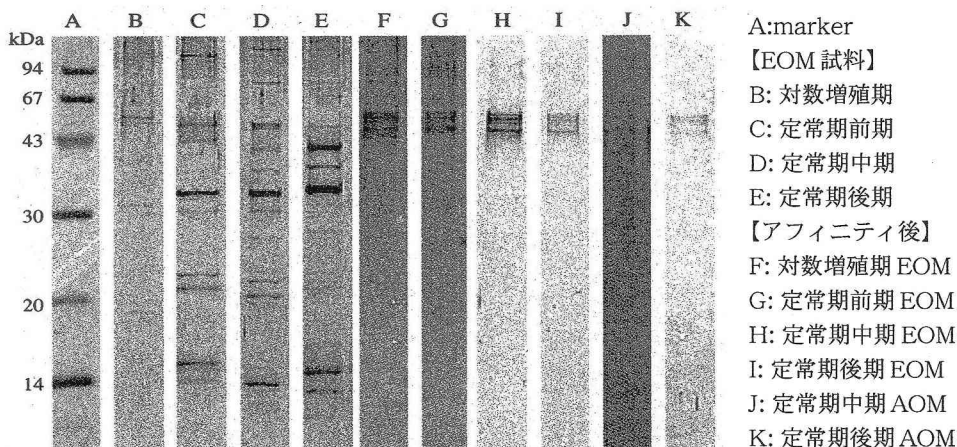


図-15 SDS-PAGEによるタンパク質検出結果。

4. 結論

*Microcystis aeruginosa*の各生長期ごとに生産される有機物の分子量分画、およびその錯形成能について検討した。その結果、AOMの分子量として、細胞内容物においてはM.W. 40-2,000kDa付近、藻体外への分泌物質としてM.W. 10-20kDa付近の物質が確認された。また、アフィニティークロマトグラフィによる錯体形成実験では、アルミニウム多価水和錯体と親和性を有するAOMの存在が確認されたが、物質によって錯体形成能の違いがあることが示唆される結果を得た。SDS-PAGEにより分子量40-70kDaのタンパク質が確認され、その存在量は微量であるものの、凝集阻害物質の一つであることが予想された。また、アルミニウム多価水和物との錯体形成能を有するAOM中にはM.W. 2000kDa付近の分子量を有する多糖の存在も示唆された。

本実験では、得られたタンパク質の定量的な議論をするまでには至らなかった。今回得られたタンパク質の定量、および阻害度の決定が今後の課題である。

5. 今後の展望

以上の結果から、アルミニウムとの錯体形成能を有するタンパク質はより強い阻害度を有する可能性がある。この点について確認するために、今後アフィニティクロマトグラフィを繰り返すことによってアルミニウムとの錯形成能を有するタンパク質を集め、それを用いて凝集実験等を行う必要がある。また、回収されたタンパク質のN末端アミノ酸配列解析等を進めることによりタンパク質の同定を進め、さらにこれらのタンパク質についてクローニングによって大量合成したものを凝集実験に用いる予定である。最終的にはタンパク質クローニングの際に得られるアミノ酸配列情報から阻害に寄与する部位を推定し、特定の部分を不活性化する凝集補助剤の開発を目指していきたい。

また、今回の結果から推測されたように、アルミニウムとの錯体形成能を有する有機物中には多糖等のタンパク質以外の成分が多く含まれることが考えられる。今後は多糖の組成についての検討も進め、凝集阻害タンパク質に対するアプローチと同様、最終的には凝集補助剤の開発を目指すこととする。

参考文献

- 1) 佐藤敦久, 真柄泰基編: 上水道における藻類障害-安全で良質な水道水を求めて, 技報堂出版, 1996.
- 2) H.Bernhardt, Shell, O.Hyer and O.Lusse: Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration, WISA, 1, pp.41-57, 1991.
- 3) 福島博, 相沢貴子, 真柄泰基: 藻類増殖過程で生成されるトリハロメタン前駆物質の評価, 水質汚濁研究, Vol6, No.3, pp.175-182, 1983.
- 4) John E Van Benschoten and James K. Edwald: Measuring Aluminum During Water Treatment: Methodology and Application, JOURNAL AWWA, MAY, pp.71-78, 1990.
- 5) Bernhardt.H, Hoyer.O, Lusse.B and Schell.H: Investigations on the influence of Algal-derived Organic Substances on Flocculation and Filtration, Huck, P. H., Toft, P. (ed.), Pergamon Press, pp.185-216, 1986.
- 6) 真柄泰基, 国包章一, 相沢貴子: 藻類の生産する有機物の凝集阻害に関する基礎的研究, 水道協会雑誌, vol.55, No.4, pp.33-39, 1986.
- 7) 菅原繁, 黒川眞弓, 真柄泰基, 胡建英: *Microcystis* spp. コロニーの細胞由来有機物質 (AOM) が凝集沈殿処理に与える影響-AOM中に含まれる有機物の除去特性とその化学属性, 水道協会雑誌, vol.65, No.8, pp.39-50, 1996.
- 8) 菅原繁, 黒川眞弓, 真柄泰基: *Microcystis* spp. コロニーから得られた有機物質が凝集沈殿処理に与える影響, 水道協会雑誌, vol.64, No.5, pp.2-11, 1995.