

(77) *Microcystis* spp.由来莢膜の 化学的特性と凝集阻害能

今江 泰貴^{1*}・真砂 佳史¹・高荒 智子²・藤井 学³・大村 達夫¹

¹ 東北大学大学院工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

² 福島工業高等専門学校建設環境工学科 (〒970-8034 福島県いわき市平上荒川字長尾 30)

³ ニューサウスウェールズ大学土木環境工学科 (Sydney, NSW 2052, Australia)

* E-mail : imae@water.civil.tohoku.ac.jp

アオコが発生している浄水場原水から採取した *Microcystis* 群体より莢膜を分離・濃縮し、その化学成分と凝集阻害能を評価した。回収した莢膜試料は、乾燥重量比で主に糖質 (57%)、タンパク質 (13%)、金属類 (8.6%)、脂質 (4.9%) から構成されていた。このうち酸性糖であるウロン酸は 8.7%含まれていた。莢膜試料中の主要金属濃度を測定した結果、特に Al 及び Zn が高濃度で莢膜中に濃縮されていることが明らかとなった。凝集処理試験では、莢膜保有細胞がポリ塩化アルミニウム(PAC)を消費し、凝集効率を低下させた。しかしながら、莢膜を細胞から分離して同様の凝集試験に供した場合、莢膜低濃度 (3.6mg-C L⁻¹以下) では凝集を促進し、高濃度 (3.6mg-C L⁻¹以上) では阻害する特性を有することが明らかとなった。

Key Words : Coagulation inhibition, *Microcystis*, Sheath materials, PAC, Chemical characterization

1 はじめに

我が国では水の安定供給を目的として、ダム・湖沼などの閉鎖性水域を主な水源として利用している。しかし、このような閉鎖性水域では、栄養塩類が停滞することにより富栄養化が起りやすく、夏期に大增殖した藻類 (いわゆるアオコ) が浄水処理施設に流入することで、しばしば処理障害が引き起こされている。例えば、アオコ発生時には凝集効率が低下することが知られている。凝集処理が不十分な場合、後続のろ過処理や塩素処理において、ろ過閉塞¹⁾ やトリハロメタンの生成²⁾ 等を生じるため、安全な浄水供給において問題となる。

本来凝集プロセスでは、凝集剤中のカチオンが持つ表面電荷の中和作用及び架橋作用により、負に帯電した懸濁粒子のフロックを形成させる。しかし、藻類が原水中に大量増殖している場合、原水中の藻類由来有機物によりこれらの作用が妨げられ、良好なフロック形成が妨害される³⁾。藻類由来有機物による凝集阻害機構としては、これまで凝集剤との錯体形成や微小フロック表面への吸着 (保護コロイド作用) が提案されている^{4,5)}。

凝集阻害を引き起こす藻類由来有機物は、(i)細胞

内に保持されており、細胞の死滅に伴う細胞破壊により放出される主にタンパク質などの細胞内有機物 (intracellular organic matters ; IOM)、(ii) 代謝活動などにより細胞からバルク溶液中へ放出される細胞外有機物 (extracellular organic matters ; EOM)、(iii) 細胞外ではあるが細胞表面に保持されている細胞表面保持有機物 (surface retained organic matters ; SOM) に大別され、それらの化学成分や凝集剤との親和性などについて、これまで多くの研究例がある³⁻⁹⁾。例えば、石藤ら⁶⁾は細胞内タンパク質の中でアルミニウムイオンと親和性の高いものをスクリーニングし、ヒ素リプレッサータンパク質 ArsR と高い相同性を有するタンパク質が強い凝集阻害を引き起こすことを発見した。Bernhardら⁷⁾は EOM 中の酸性高分子多糖質のもつ水酸基が、懸濁物質の表面において配位子交換 (ligand exchange) することにより、凝集剤による懸濁物質表面の荷電中和を阻害すると報告している。また、菅原ら⁸⁾は、EOM の中でも分子量 10⁴-10⁵ Da のフラクションがアルミニウム (Al) と高い錯形成能を有する一方、分子量 10⁵ Da 以上の EOM は生じたフロックに対する保護コロイド作用を有すると報告した。高荒ら⁹⁾は、*Microcystis aeruginosa* 由来の親水性有機物について、分子量 10⁴Da のリが多糖ま

たは RNA が凝集阻害を引き起こすことを明らかにした。

藻類由来有機物のうち SOM に分類される有機物として、リポ多糖などの細胞膜を構成する成分のほか、細胞外表面に保持される寒天状の莢膜がある。莢膜は、細胞の最外部に位置するため、凝集剤と直接に接触し、特に藻類ブルームを生じた原水を取水した場合に、凝集阻害の主な誘因物質となっている可能性がある。莢膜は、藻類細胞を包むように存在し、群体の形成および維持、ウイルスや細菌の攻撃に対するレセプター、細胞間同士の相互作用の仲介者などの機能^{10,11)}をもつとされている。また、莢膜はウロン酸などの酸性糖を多く含有しているため^{10,12,13)}、細胞表面の負電荷密度の増加や金属イオンの吸着をもたらすと考えられる。

夏期に凝集阻害を引き起こす藻類の代表種である藍藻類 *Microcystis* は、自然界中では多くの場合莢膜を産生して群体として存在しているため、*Microcystis* の莢膜は凝集阻害の主要な要因である可能性がある。しかしながら、一般的に実験室培養系において藻類の莢膜および群体の形成は困難であり¹⁴⁾、特に *Microcystis* の群体を形成する培養法は確立されていない。上述したように藻類由来の凝集阻害誘引物に関する研究例は過去に多数存在するが、そのほとんどが培養株により産生される細胞内・表面・外の有機物を対象としており、自然界中でのみ大量に産生される莢膜を対象として、凝集阻害能を検討した報告はこれまでにない。

本研究では、*Microcystis* の莢膜が凝集阻害の主要因子であるという仮説の下、アオコが発生している湖沼で採取した *Microcystis* 群体から莢膜を回収し、その化学組成分析を行った。また、莢膜を保有する藻体と除去後の藻体での凝集試験により、莢膜の有無による藻体の凝集性を比較した。加えて、藻体から分離・回収した莢膜試料を添加して凝集試験を行い、莢膜成分が懸濁粒子の凝集に与える影響を評価した。

2 実験方法

(1) *Microcystis* 群体の回収

Microcystis 群体を含む水試料は、毎年夏期にアオコの発生が確認される千葉県印旛沼を水源とする柏井浄水場の取水口で採取した。2008 年 8 月 14 日と 9 月 10 日の二回にわたり、取水口の表層水をポリバケツにより採水した。8 月 14 日の試料採取地点の水質データを表-1 に示した。採水試料 1 L を 500×g で

表-1 2008 年 8 月 14 日の柏井浄水場取水口の水質。測定方法は、すべて上水試験方法（日本水道協会, 2001）に従った。

測定項目	単位	値
水温	℃	29.8
pH	—	8.5
濁度	度	27.0
全有機炭素(TOC)	mg/L	5.3
溶解性有機炭素(DOC)	mg/L	3.9
E260 (50mmセル, 0.45μmろ過)	1/cm	0.11
色度	度	10

10 分間遠心分離して夾雑物を除去し、上清を回収した。回収した上清をさらに 8,000×g で 10 分間遠心分離し、ペレットを水試料中の藻体として回収した。8,000×g の遠心分離で得られたペレットは遠心管の壁面及び底面に確認され、上清は視覚的にほぼ透明であった。また、得られたペレットを光学顕微鏡（Axioplan2, ZEISS）で観察したところ、ペレットに含まれる藻体の 9 割以上が *Microcystis* であったため、これを *Microcystis* 群体試料とした。

(2) 藻類細胞と莢膜の分離

Microcystis 群体からの莢膜の分離手法は、雨宮ら¹⁰⁾、中川ら¹²⁾、Plude ら¹³⁾の用いた手法を参考にして決定した。

はじめに、採水試料 1 L より得た *Microcystis* 群体を超純水 1 L に懸濁させ、1 L の藻体懸濁水を作製した。続いて、藻体懸濁水を 2 分間 vortex することにより、群体を破壊した。その後 4℃で一晩静置し、莢膜成分を超純水に溶出させた。そして、藻体懸濁水を遠心分離（8,000×g, 10 min）し、ペレットと上清をそれぞれ、莢膜を除去した藻体試料と莢膜成分として回収した。以上の莢膜分離操作前後において、墨汁によるネガティブ染色を行い、光学顕微鏡下で細胞観察することで、莢膜分離状況を確認した。また、後述する凝集試験では、超純水による莢膜分離処理前後の藻類細胞を、それぞれ莢膜を保持した細胞および莢膜を除去した藻類細胞として用いた。

回収した莢膜成分は、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター（A045A090C, ADVANTEC）で濾過して夾雑物の除去を行った後、ロータリーエバポレーター（SHIBATA）および凍結乾燥（Yamato）により濃縮させた。最後に乾燥した莢膜を超純水に溶解させ、以降の分析に供した。莢膜を超純水に溶解させる際に溶液中に沈殿物を生じた場合は、雨宮ら¹⁰⁾の用いた手法に従い、超音波処理（50W, 4 min）により沈殿物を溶解させた。

(3) 莢膜の化学組成分析

2(2)で得た莢膜試料の糖質、タンパク質、脂質、ウロン酸、金属量、核酸の測定をそれぞれ以下の手法で行った。糖質はフェノール-硫酸法¹⁵⁾、タンパク質はDc Protein Assay キット (BIO-RAD) を用いた Lowry 法、脂質は Lab Assay Triglyceride kit (Wako) を用いた手法、ウロン酸含有量は定量法として広く利用されているカルバゾール-硫酸法¹⁶⁾に従い測定した。莢膜中に含まれる金属成分は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS, Agilent 4500 ICP-MS, Agilent Technologies) を用いて測定した。ICP-MS で測定する場合、試料中の有機分は測定を妨害するため、試料に 70%硝酸を添加し、前処理を行った後測定を行った。また、莢膜中と湖水中の金属含有量と比較するため、水試料を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過した湖水の金属濃度も併せて測定した。核酸は QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) による精製を行い、分光光度計 (Nano Drop 1000, Thermo) で測定した。

特別な記述がない場合、分析および実験に用いた試薬やストック溶液の調製には超純水を使用した。測定に用いたガラス器類は、使用前に硝酸を用いた酸浴による洗浄を行った。

(4) 莢膜成分の分画分析

莢膜成分の分子量分布を把握するため、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分析を行った。分析には、中高压液体クロマトグラフィー装置 (Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), Amersham Pharmacia Biotech) 及びゲルクロマトカラム Superdex 75 10/300 GL ($\phi 1.0 \times 30 \text{ cm}$) を用いた。カラムを 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (関東化学, pH 7.2 $\pm$ 0.05) で平衡化した後、超音波処理を行った莢膜試料 5 mL を 0.8 mL/min で挿入し、カラム溶出液の吸光度 (波長 280 nm) を測定した。標準分子量マーカーとして、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム (分子量 1.5-57kDa) を用いた。

(5) 凝集阻害能評価

a) 凝集実験の条件

試験水 (50 mL) は総アルカリ度が 50 mg L⁻¹ となるよう 100 g L⁻¹ 炭酸水素ナトリウム (関東化学) 水溶液を添加し、続いて pH 7.0 $\pm$ 0.05 となるよう 1 M 水酸化ナトリウム (関東化学) または 1 M 塩酸 (関東化学) を用いて調整した。凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (polyaluminum chloride (PAC), 大和薬品) を用い、急速攪拌 (100 rpm, 2 min) の後、緩速攪拌 (50 rpm, 15 min), 静置 (10 min) を行った。その後上澄水を 10 mL 採水し、波長 660 nm の吸光度

(A₆₆₀) を分光光度計 (BioSpec-1600, SHIMADZU) により測定して濁度を算定した。測定は同一試料につき 3 回行い、その算術平均および標準偏差を算出した。

藻類由来有機物を添加した既往の凝集実験¹⁷⁾では、有機物濃度が増加するに従い懸濁物質の ζ 電位が低下し、処理後の濁度が急激に増加することが確認されている。また、処理後の濁度が急激に増加する時の ζ 電位及び濁度はそれぞれ -15 mV と 5 度と報告されている。これに基づき、本研究では以下の凝集実験には濁度 5 度を基準値として使用した。すなわち、凝集試験後の濁度が 5 度以上であった場合、凝集阻害が生じていると定義した。

b) 藻類細胞の凝集実験

2 (2) で得た莢膜を保持した細胞および莢膜を除去した藻類細胞を用いて、藻類細胞自体の凝集性を評価した。上記藻体試料を、細胞数が $4.6 \times 10^7 \text{ cells L}^{-1}$ (濁度は共に 40 度であることを確認した) となるよう精製水 (大和薬品) に添加し、アルカリ度及び pH を調整して、これを試験水として用いた。凝集試験は PAC 濃度 0-20 mg L⁻¹ の条件で行い、試験後に上澄水の濁度を測定した。

c) 莢膜が懸濁粒子の凝集に及ぼす影響評価

莢膜成分が懸濁粒子の凝集に及ぼす影響は、カオリンをモデル懸濁粒子として用いた凝集試験により評価した。まず、精製水にカオリンを濁度 40 度となるように加え、アルカリ度及び pH を調整し、さらに莢膜試料を 0.0-6.4 mg-C L⁻¹ の濃度となるよう添加し、試験水を作製した。この試験水を用いて凝集試験を行い、処理後の濁度が 5 度以上となる莢膜濃度を求めた。この試験で用いた PAC 濃度は、予めカオリンのみの試験水で凝集試験を行った結果より、上澄水の残留濁度が本研究で用いた基準値 (5 度) となる濃度 (18 mg L⁻¹) とした。

3 結果及び考察

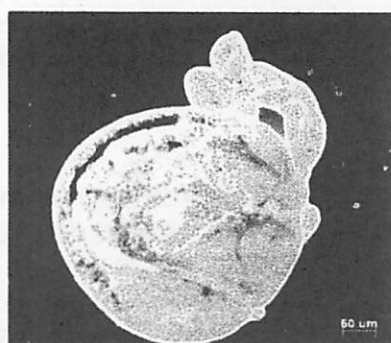
(1) *Microcystis* 群体回収及び莢膜分離

Microcystis 群体試料をネガティブ染色した後、光学顕微鏡観察した結果、群体中には多数の藻類細胞が密集し、莢膜がその周囲を包み込んでいるのが確認できた (図-1 (a))。一方、超純水への懸濁後、vortex による群体破壊及び一晩の静置による莢膜の溶出操作を行った後では、群体の大きさが縮小し、また群体周囲に存在していた莢膜成分は殆ど確認できな

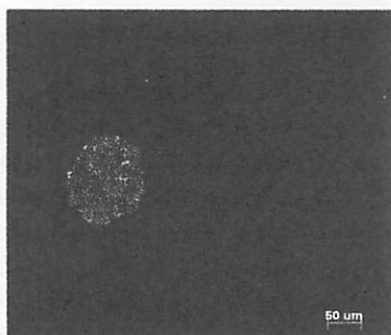
った(図-1(b))。以上より、本研究で用いた手法により *Microcystis* 細胞周囲に存在していた莢膜を超純水に溶出させ、細胞から莢膜のみを分離できたことを確認した。

(2) 莢膜成分の化学組成

表-2 に、本研究で分離・回収した莢膜成分の化学組成(乾燥重量比)を示した。糖質が 57 %と全体の半分以上を占め、次いでタンパク質が 13 %と多く含



(a) 莢膜分離操作前の *Microcystis* 群体



(b) 莢膜分離操作後の *Microcystis* 群体

図-1 *Microcystis* 群体の光学顕微鏡写真。(a) は莢膜分離操作前の *Microcystis* 群体試料、(b) は莢膜分離操作後の *Microcystis* 群体試料を示す。

表-2 莢膜構成成分の比較

成分	構成成分の割合(重量比%)			
	本研究	雨宮ら ¹⁰⁾	中川ら ¹²⁾	Plude ら ¹³⁾
糖 全糖	57±1.3	35-47	67	99 以上
質 ウロン酸	8.7±0.5	12-15	67	83
タンパク質	13±2.0	18-25	13	1.0 未満
金属類	8.6	9.7-20	6.4	-
脂質	4.9±0.3	2.3-4.1	-	-
核酸	n.d.	1.4-3.0	-	-

まれていた。構成比に差異はみられるものの、既往の研究^{10,12)}においても、共通して糖質およびタンパク質が莢膜の主成分であった。本研究では全糖とタンパク質を合わせた割合は 70 %であったが、*Microcystis* 野生株由来の莢膜を分析した雨宮ら¹⁰⁾や中川ら¹²⁾の分析結果でも、糖質とタンパク質の総量は全体の 6-8 割を占めており、本研究で分離した莢膜試料とほぼ同等の値を示した。一方、室内培養系での莢膜の大量生成や分析は一般に困難とされているが、Plude ら¹³⁾は *Microcystis flos-aquae* C3-40 の純培養で産生された莢膜を分離し、その構成成分はほぼ糖のみで、83 %がウロン酸であったと報告している。一方で、莢膜全重量に占めるウロン酸の割合は、本研究では 8.7 %であり、雨宮ら¹⁰⁾の研究でも同様に 12-15 %と低かった。野生環境と室内培養系では栄養条件や光・温度条件などの培養環境が異なる。本研究は野生環境中より採取した *Microcystis* を用いた。その *Microcystis* より回収した莢膜の成分構成は野生環境中より採取した *Microcystis* を用いた雨宮ら¹⁰⁾及び中川ら¹²⁾と同等であった。しかし、室内培養系の *Microcystis* より莢膜を回収した Plude らの報告¹³⁾では、主成分が糖であることは同じであるが、タンパク質はほぼ確認されていない。そのため、培養条件の違いが莢膜の生成や構成成分およびその比率に大きく影響すると推測される。

莢膜の総金属含有量は、全体の 8.6 %であった(表-2)。表-3 に、ICP-MS 測定により得られた、(i) 莢膜中の主要金属量 (B, Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Zn) と(ii)藻体を除いた原水、すなわちバルク中の金属量を示した。原水 1L から抽出された莢膜試料中の Al, Zn は、原水 1L のバルク溶液中に含まれる金属量より多いことが確認された。さらに、ネガティブ染色後の *Microcystis* 群体の写真からも確認できるように、莢膜が占める体積は、原水バルクよりはるかに小さい。

表-3 (i) 原水 1L あたりに含まれる莢膜中の金属量 (mg) 及び (ii) 藻体を除去した原水 1L 中の金属量 (mg)

	(i) 莢膜 (mg)	(ii) 原水 (mg)
B	0.033	0.050
Na	0.25	9.8
Mg	0.23	3.8
Al	0.017	0.013
K	0.073	1.7
Ca	0.70	15
Mn	0.012	0.22
Zn	0.15	0.12

それを考慮すると、莢膜中の金属濃度はバルク中のそれと比較して非常に高いと推測される。

既報においては、藍藻類を含めた細菌由来の莢膜による重金属除去能の検討も行われている¹⁸⁻²⁰⁾。Micheletti ら¹⁸⁾の実験結果は、莢膜を産生する藍藻類が、Cr, Cu, Niなどの多種の金属を同時に除去することができ、工学的応用が可能であることを示唆している。また、別の研究では、莢膜が特にPbあるいはCuに吸着を示すことが明らかとなっている^{19,20)}。また、雨宮ら¹⁰⁾は、*Microcystis* 莢膜内金属含有量と藻体内金属含有量、原水中の金属量の比較を行った結果、莢膜中に含まれるNa, Ca, Fe, Zn, Mnの含有量は、細胞中および原水中のそれよりはるかに多かったと報告している。加えて行った莢膜への金属濃縮実験では、莢膜に最も高い親和性を示した金属がFeであると報告している。本研究および既報^{10, 18-20)}のいずれの結果からも、莢膜が多種の金属と親和性を持つことが十分に考えられる。特に本研究では、既報では確認されなかったAlの莢膜への高い親和性及び濃縮が確認されている。

以上より、莢膜は金属類と高い親和性を有し、中でも我が国で広く利用されるPACなどの凝集剤中カチオンであるAlを吸着および濃縮する特性を有するために、Alを吸着及び濃縮することにより凝集剤を多く消費し、凝集阻害に寄与することが示唆された。

(3) 莢膜成分の分画分析

莢膜成分の分子量分画結果を図-2に示した。得られた莢膜成分は10 kDa以下の2種類の分子量群(約1.5 kDa付近と約7.4 kDa付近)より構成されていることが確認された。この結果は、主に1,000 kDa以上の高分子で構成されると推定した雨宮ら¹⁰⁾の結果とは異なっていた。莢膜は藻類細胞より分泌された物質であり、常に外界と接しているため、その成分や重合状態等は、水質や光条件などの環境条件に影響されやすいと考えられる。また、秋葉ら²¹⁾は*Chlorella* sp.の各培養時期に産生される藻類由来有機物の分子

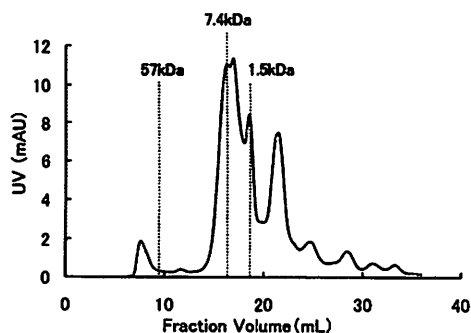


図-2 莢膜成分の分子量分画

量の特徴を調べ、対数増殖期で低分子量、定常期で高分子量、そして死滅期で再び低分子量の有機物が増加するとし、各培養時期により高分子量及び低分子量の有機物濃度が異なることを報告している。従って、採取した*Microcystis*の増殖時期(対数増殖期、定常期、死滅期)の違いが分子量不一致の原因の一つと考えられる。さらに、本研究のゲルクロマトグラフィー分析で検出に用いた紫外吸光度計は、不飽和結合を持たない有機物は検出されない。既報ではフラクションごとにそれぞれ雨宮ら¹⁰⁾は乾燥重量を測定後濃度に換算し、秋葉ら²¹⁾はTOCを測定している。このような検出手法の差異が、分子量分画結果に影響を及ぼしている可能性もある。

(4) 莢膜の有無による藻体の凝集性の比較

莢膜成分が藻体の凝集に及ぼす影響を評価するため、莢膜を保有する藻体試料と除去した藻体試料を用いて凝集試験を行った。その結果、それぞれ11.3, 6.0 mg L⁻¹のPAC注入率で濁度が5度以下となり(図-3)、凝集処理を良好に行うために必要なPAC注入率の差は実測値を減じることにより5.3 mg L⁻¹と算出された。すなわち、莢膜が存在する群体の方が粒子サイズは大きいにも関わらず凝集しにくいという結果となった。2種類の藻体試料の相違が莢膜の有無

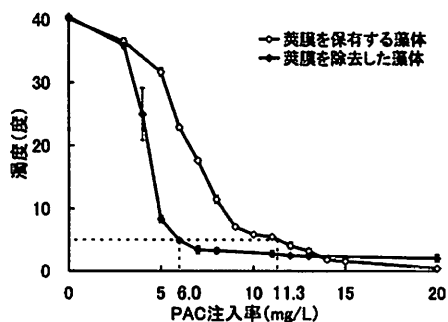


図-3 莢膜の有無による藻体の凝集性の比較 (エラーバーは標準偏差を表す (N=3))

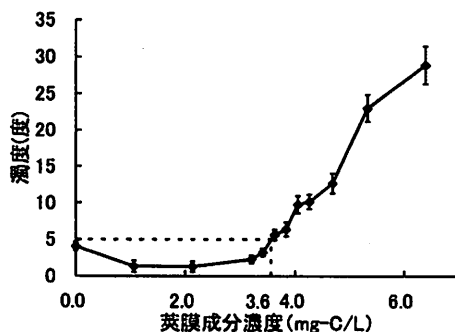


図-4 莢膜成分濃度が懸濁物質の凝集に及ぼす影響 (エラーバーは標準偏差を表す (N=3))

のみであることを考えると、算出された PAC 注入率の差は莢膜の影響によるものであり、莢膜が凝集阻害に寄与していることが示された。

(5) 莢膜成分の凝集阻害能評価

カオリン懸濁水をモデル処理水として、莢膜成分濃度を变化させた凝集試験を行った(図-4)。莢膜成分の含有率が 3.6 mg-C L^{-1} 以上の場合では、残留濁度が 5 度以上となり、凝集阻害が生じた。この際に形成されたフロックは繊維状で、水中に分散しており、沈降性が低いことが視覚的に観察された。

一方、莢膜成分の添加濃度が $1.1\text{--}3.4 \text{ mg-C L}^{-1}$ のとき、莢膜を添加しない場合よりも残留濁度が低く、良好なフロック形成が観察された。すなわち、莢膜成分は低濃度の場合、助剤的性質を示した。この性質は藻類の細胞外有機物や天然由来有機物(NOM)の性質と類似したものである^{8,22,23)}。Shin ら²²⁾は PAC ではないが、AI 系凝集剤を使用して NOM の凝集実験を行っている。その結果によると NOM が低濃度 ($0.75\text{--}1.5 \text{ mgC L}^{-1}$) の場合、凝集剤の最適注入量が減少している。一般に、除去粒子同士の衝突機会が増える条件下では効率的な凝集処理が行われる。従って、少量の NOM や莢膜試料が存在することでより効率的な凝集がみられた理由の一つとして、NOM や莢膜試料が水酸化アルミニウムの沈殿・架橋反応を促進し、濁質粒子間の衝突・凝集仲介物として効率的に働いたことが挙げられる。Shin ら²²⁾の実験では、DOC が 6 mgC L^{-1} 以上になると、NOM による助剤作用は観察されなくなった。NOM も莢膜試料も低濃度で凝集を促進させたこと、さらには NOM が生物由来であることを考えると、莢膜と NOM の凝集促進機構は類似していることが考えられる。

(6) 浄水場の凝集における莢膜成分の影響

以下の評価は同湖沼水の凝集処理における莢膜成分の影響の評価であるため、環境要因がほぼ一定で莢膜成分の性質に大きな差はないものとして行った。

藻類の莢膜が、実際の浄水場での凝集過程においてどの程度影響を及ぼしているのかを評価するため、3(4)の凝集試験結果及び浄水場における *Microcystis* の細胞密度データを用いて、莢膜成分による PAC 消費量を推定した。推定には、一年を通じて細胞密度データが利用可能であった 2004 年度のデータを使用した。具体的な手順としては、本実験結果より一細胞あたりの莢膜が PAC を消費した量を算出し、浄水場における *Microcystis* の細胞密度データより、莢膜成分による PAC 消費量を推定した。

PAC 消費量に関して、3(4)の実験結果から、莢膜成

分の有無による違いで、濁度除去に要した PAC 注入率に 5.3 mg L^{-1} の差が生じた。一方で、試験水に含まれる初期細胞数は一定 ($4.6 \times 10^7 \text{ cells L}^{-1}$) であった。従って、一細胞あたりの莢膜が PAC を消費した量を、PAC 注入率の差を藻体数で除することで、 $1.2 \times 10^{-7} \text{ mg cell}^{-1}$ と算出した。

浄水場のデータでは、*Microcystis* 細胞数を個々の細胞を計測するのではなく、藻類群体の密度として計数している。このため、藍藻類全体に占める *Microcystis* の割合は殆どの月で 20 % 以下と過小評価されている(図-5)。しかし、*Microcystis* の群体あたりには数百から数千以上もの細胞が存在し、群体の大きさも直径が数百 μm ほどとなる。一方、その他の優占藍藻類は *Phormidium* などの糸状体であるが、糸状体あたりに存在する細胞数は *Microcystis* の群体あたりに存在する細胞数よりはるかに少ない。2008 年 8 月に採取した原水中の *Microcystis* 群体密度と藻類密度を測定した結果、それぞれ 1.6×10^5 群体 L^{-1} 、 $1.4 \times 10^8 \text{ cells L}^{-1}$ であり、1 群体あたり平均 880 個の細胞が存在していた。従って、この値と、莢膜による PAC 消費度、2004 年度の柏井浄水場の細胞密度データから、各月ごとの PAC 消費量を算出した。具体的には、藻類群体密度を 880 倍することで細胞濃度 (cells L^{-1}) を計算し、PAC 消費度 ($1.2 \times 10^{-7} \text{ mg cell}^{-1}$) を乗ずることにより PAC 消費量を算出した。そして、各月ごとに浄水場で注入された全 PAC 量に占める莢膜の消費量を算出した(図-6)。その結果、*Microcystis* が大量増殖している 8、9 月には、PAC 添加量の約 3 割が莢膜に消費されているという計算結果が得られた。

また、2008 年 8 月に採取した *Microcystis* の原水中の藻体濃度 ($1.4 \times 10^8 \text{ cells L}^{-1}$) を用いた計算からも、莢膜を保有する *Microcystis* 存在下において、処理水の濁度を 5 度まで低減させるために必要な PAC 消費量は、原水 1L あたり 17 mg であると推測され、これは例年の夏期に投入される PAC の約 1 から 2 割に

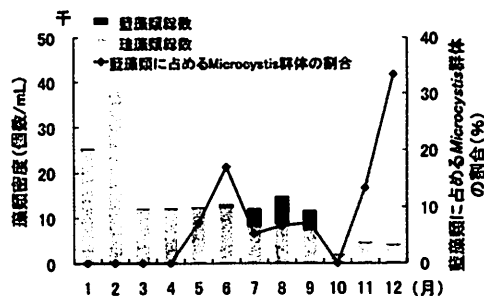


図-5 2004年度の柏井浄水場における藻類密度の経月変化。藻類密度の880倍値を細胞濃度と仮定した。

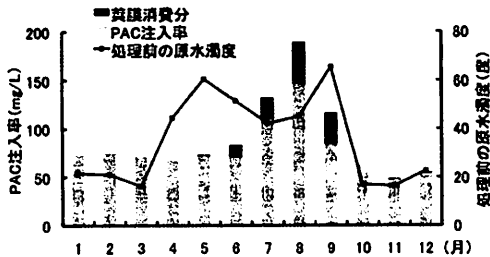


図-6 莢膜により消費されたPACの推定量。莢膜によるPAC消費度を $1.2 \times 10^{-7} \text{ mg cell}^{-1}$ と仮定し計算した。全PAC注入量データとして、2004年度の柏井浄水場におけるPAC注入率を使用した。

相当した。

以上より、実際の浄水場における莢膜のPAC消費量を算定することができた。しかし、莢膜による凝集阻害性、莢膜成分濃度および藻体の細胞数には、必ずしも正比例の関係が成り立つとは限らない。また、群体を形成し細胞表面に保持されている莢膜は、本研究において分離・回収された莢膜試料と異なり、PACとの接触面積が制限される。従って、厳密なPAC消費量を決定するには、群体の大きさや三次元形状、外部溶液との接触面積などをさらに考慮していく必要があるが、それと同時にこれは多くの不確定要因を伴う。本研究での試みは、簡便な手法ではあるが、アオコ発生時の*Microcystis*の莢膜のPAC消費量が大きい可能性を初めて示すことができた。

4 結論

本研究では、採水試料より回収した*Microcystis*群体より莢膜成分を分離した。回収した莢膜成分の組成割合（乾燥重量比）は糖質が半分以上を占め、次いでタンパク質が多く含まれていた。金属量に関しては、金属種別の存在量を調べたところ、莢膜中への金属濃縮能が確認された。また、莢膜の存在する藻体試料と除去した藻体試料で行った凝集試験より、莢膜が凝集阻害に寄与していることが示された。そして、分離・回収した莢膜とカオリンを用いた凝集試験から、莢膜は低濃度で凝集を促進し、高濃度で凝集を阻害する特性を有していることが明らかとなった。凝集実験の結果と浄水場の藻類密度データより、簡便な手法ではあるが、*Microcystis*の莢膜の凝集阻害に寄与する程度を示すことができた。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、データ提供および調

査に協力して下さった前澤工業（株）および千葉県水道局に感謝申し上げます。本研究は、科学研究費補助金-挑戦的萌芽研究（研究代表者：真砂佳史、研究課題番号：21656130）によって遂行されました。

参考文献

- 1) Hang-Bae, J., Young-Ju, L., Byung-Du, L. and Detlef, R. U. K.: Effectiveness of coagulants and coagulant acids for the removal of filter-clogging *Synedra*, *J. Water Supply: Res. Technol.*, Vol. 50, No. 3, pp.135-148, 2001.
- 2) Graham, N. J. D., Wardlaw, V. E., Perry, R. and Jiang, J. Q.: The significance of algae as trihalomethane precursors, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 37, No. 2, pp. 83-89, 1998.
- 3) 佐藤敦久, 真柄泰基: 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.
- 4) 菅原繁, 胡建英, 国包章一, 真柄泰基: カオリン人工濁水の凝集沈殿に与えるカルボン酸の影響, 水道協会雑誌, Vol. 69, No.10, pp.2-10, 2000.
- 5) 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 (AOM) が凝集沈殿に与える影響, 水道協会雑誌, Vol.65, No. 8, pp.39-50, 1996.
- 6) 石藤慎吾, 佐藤有一, 今江泰貴, 高荒智子, 佐野大輔, 真砂佳史, 大村達夫, *Microcystis aeruginosa* 由来凝集阻害誘因タンパク質の同定, 水環境学会誌, Vol. 33, No. 6, pp. 73-79, 2010.
- 7) Bernhart, H., Hoyer, O., Lu, S.B. and Schell, H.: Investigations on the influence of algal derived organic substances on flocculation and filtration. In: Huck, P.M., Toft, P. (Eds.), *Treatment of Drinking Water fore Organic Contaminants*, Pergamon Press, London, pp.185-216, 1987.
- 8) 菅原繁, 黒川眞弓, 胡建英, 真柄泰基: カオリン人工濁水の凝集沈殿に与える藻類由来有機物の分子量の影響, 水道協会雑誌, Vol. 66, No. 10, pp. 9-18, 1997.
- 9) 高荒智子, 佐野大輔, 須藤丈, 今野弘, 大村達夫: 凝集阻害を引き起こす *Microcystis aeruginosa* 由来親水性有機物質の分離及び特性評価, 環境工学研究論文集, Vol. 43, pp.585-591, 2006.
- 10) 雨宮由美子, 中山大樹: 藍藻 *Microcystis* より単離した粘質鞘物質の化学的性質と金属類に対する吸着特性, 日本陸水学会雑誌, Vol. 45, No. 3, pp. 187-193, 1984.
- 11) Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R., 高橋甫, 斎藤日向, 手塚泰彦, 水島昭二, 山口英世: 微生物学 [上], 培風館, 1989.
- 12) Michihiko, N., Yoshichika, T. and Osami, Y.: Isolation and Characterization of the Slime from a Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A, *Agric. Biol. Chem.*, Vol.51, No. 2, pp. 329-337, 1987.
- 13) Plude, J. L., Parker, D. L., Schommer, O. J., Timmerman, R.

- J., Hagstrom, S. A., Joers, J. M. and Hnasko, R.: Chemical Characterization of Polysaccharide from the Slime Layer of the Cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40, *Applied and Environ. Microbiol.*, Vol.57, No.6, pp.1696-1700, 1991.
- 14) De Philippis, R., Faraloni, C., Silli, C. and Vincenzini, M.: Population of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea, *Sci. of the Total Environ.*, Vol. 353, pp.360-368, 2005.
- 15) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, Vol. 28, No.3, pp. 350-356, 1956.
- 16) Bitter, T., Muir, H. M.: A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction, *Anal. Biochem.*, Vol. 4, pp. 330-334, 1962.
- 17) 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.
- 18) Micheletti, E., Colica, G., Viti, C., Tamagnini, P. and De Philippis, R.: Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria, *J. of Applied Microbiol.*, Vol. 105, No.1, pp.88-94, 2008.
- 19) De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C.: Heavy metal sorption by released polysaccharides and whole cultures of two exopolysaccharide-producing cyanobacteria, *Biodegradation*, Vol. 18, No. 2, pp.181-187, 2007.
- 20) Perez, J.A.M., Garcia-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M.: Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*, *World J. Microbiol Biotechnol.*, Vol. 24, No.11, pp.2699-2704, 2008.
- 21) 秋葉道宏, 後藤光龟, 佐藤敦久: *Chlorella* sp. の細胞内外有機物の凝集阻害に関する基礎的研究, 水道協会雑誌, Vol. 60, No. 2, pp. 2-10, 1991.
- 22) Shin, J. Y., Spinette, R. F. and O' Melia, C. R.: Stoichiometry of Coagulation Revisited, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 42, No. 7, pp. 2582-2589, 2008.
- 23) Bernhardt, H., Hoyer, O., Schell, H. and Lusse, B.: Reaction mechanisms involved in the influence of algaenic organic matter on flocculation, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, Vol. 18, pp. 18-30, 1985.

(2010.5.21 受付)

Sheath Materials Isolated from *Microcystis* spp. : Chemical Characterization and Potential of Inhibitory on Aluminum Coagulation

Hiroataka IMAE¹ · Yoshifumi MASAGO¹ · Tomoko TAKAARA²
· Manabu FUJII³ · Tatsuo OMURA¹

¹ Graduate School of Engineering, Tohoku University

² Department of Environmental Engineering, Fukushima National College of Technology

³ School of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales

Microcystis, a bloom-forming cyanobacterium in eutrophic lakes, often poses coagulation inhibition in drinking water treatment processes. We isolated sheath materials from *Microcystis* spp. forming algal bloom and examined the chemical composition and its effect on coagulation with polyaluminum chloride (PAC). The sheath was mainly composed of polysaccharides (57%) and proteins (13%). Uronic acid, an acidic sugar, was also significantly detected (8.7%). The metal concentration in the bulk solution and sheath materials suggested that metals particularly Al and Zn were highly accumulated in the sheath materials. In coagulation test, algal cells with the sheath materials consumed a larger amount of PAC to be settled down compared to cells without the sheath, indicating inhibitory effect of the sheath. Isolated sheath also showed coagulation inhibition, but it promoted removal of turbidity (kaolin) with PAC at low concentrations (<3.6 mg-C L⁻¹). These results suggested potential functions of sheath materials as both coagulant aid and inhibitor.