

微細藻バイオマスから凝集沈殿法によって活性汚泥をつくる試み

Ⅲ. 活性フロクの微細藻フロラ

田邊幾之助・稲吉勝文・当 直樹

(応用微生物学研究室)

昭和61年8月10日 受理

A Contribution to the Formation of an Activated Sludge by the Chemical Flocculation Using an Algal Biomass

Ⅲ. On the Microalgal Flora of the Flocculated Algal-Biomass

Ikunosuke TANABE, Katsuhumi INAYOSHI and Naoki ATARI

(Laboratory of Applied Microbiology)

緒 言

前報⁷⁾で報告したように微細藻バイオマスから活性汚泥を形成させる研究, すなわち, 葉面散布肥料(強力ヨーゲンⅡ号, 三井東圧化学)で増殖させた微細藻バイオマスを凝集剤 PAC (polyaluminium chloride) を用いて凝集した活性フロクで焼酎蒸留廃液を連続処理し活性汚泥化を図った. 今回は活性フロクの活性汚泥化の進行にともない, その微細藻フロラに変化がおきるかどうかを明らかにすることを目的に研究を行なった. また, その際分離した微細藻の純粋分離も行なったので, あわせて報告する.

材 料 と 方 法

1. 連続処理実験

前報⁷⁾に示したように, 完全混合型曝気槽(有効容 8.9 l)に形成した活性フロクで連続処理実験を行なった. まず, 焼酎蒸留廃液を COD (化学的酸素要求量) 146 ppm とし COD 負荷量 $0.07\text{kg}/\text{m}^3/\text{day}$ で流下し, 処理した. COD 除去率が90%をこえたのち, 13日目からさらに COD 292 ppm の焼酎蒸留廃液を $0.15\text{kg}/\text{m}^3/\text{day}$ の COD 負荷量で流下し, 処理した. この連続処理実験中, 実験開始時, 負荷切換時および連続処理終了時のそれぞれの活性フロクを微細藻分離用無機培地 (Table 1) のスポット寒天平板上にスポットし, 20℃, 蛍光灯で照射しながら約1カ月培養を行ない分離した⁶⁾.

2. 微細藻の純粋分離

微細藻の純粋分離は通常の純粋分離方法を採用し, 結果の部に示したような工夫を加えて行なった⁸⁾.

3. 微細藻株の生理的性質

微細藻株の基質呼吸は前報⁷⁾と同様に YSI 53 型生物用酸素モニター (Yellow Springs Instrument Co., Inc.) を使用して測定した. 反応混液は Table 2 に示したように細胞懸濁液 2 ml と基質 300 ppm 溶液 1 ml および滅菌 4 倍希釈リンゲル液 1 ml からなる. なお, 細胞懸濁液は無機培地上の斜面培養から 1 白金耳を滅菌水に懸濁しクレット濁度で 100 となるよう調製した. また, 測定前に, 細胞懸濁液はアルミホイルで包み, 光を遮断して, 30℃ 1~3 時間振盪し飢餓状態とした. 自家呼吸は基質溶液の代わりに滅菌 4 倍希釈リンゲル液 1 ml を加えて測定した. 基質はグルコース, フルクトース, ガラクトース, サッカロース, ソルビトール, セロビオース, マルトース, D-リボースおよび酢酸ナトリウムをそれぞれ 4 倍希釈リンゲル液に 300 ppm となるよう溶かし, 濾過滅菌して使用した. 実験はいずれも 30℃ 温度平衡ののち測定装置を黒色ビニール布で二重に覆い光を遮断して行なった. 結果は 1 時間・菌体乾物重 1 mg あたりの酸素消費量を酸素消費度として表した.

糖類の資化性は基質呼吸と同じ糖類を 0.5% とした分離用液体培地に微細藻株を接種し, 黒色ビニール布で遮光, 30℃ で振盪培養した. 資化性は, 生育の有無を 540 nm のフィルターを用いクレット濁度で測定し, 判断した.

生育温度については温度勾配培養装置 (東洋科学工業, TN-12) を用いて生育温度範囲と生育速度定数を測定し, これから至適生育温度を求めた. なお, 培養は微細藻用有機培地 (Table 1) 5 ml で L 字管を使用, 20 W の蛍光灯を 20cm の距離で照射する明条件で行ない, 生育を 540 nm のフィルターでクレット濁度として測定した.

Table 1. Culture media for green microalgae

1) Inorganic culture-medium for isolation of green microalgae		
Mineral solution*	1	l
KNO ₃	2	g
Yeast extract (Difco)	0.1	g

pH7.2

* Mineral solution		
K ₂ HPO ₄	0.8	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
NaCl	0.2	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	g
Fe-EDTA	0.01	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0005	g
Na ₂ MoO ₄	0.0005	g
Na ₂ WO ₄	0.0005	g
Distilled water	1	l

pH7.2

2) Inorganic culture-medium for cultivation of green microalgae

Mineral solution	1	l
KNO ₃	2	g
Yeast extract (Difco)	0.5	g
Beef extract	0.5	g

pH7.0~7.4

3) Glucose culture-medium for heterotrophic cultivation of green microalgae

Mineral solution	1	l
KNO ₃	2	g
Yeast extract (Difco)	0.5	g
Beef extract	0.5	g
Glucose	10	g

pH7.0~7.4

4) Yeast extract-malt extract medium (Ym medium)

Yeast extract (Difco)	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Distilled water	1	l

pH7.2

5) 0.04M Tris-EDTA 1% Sodium lauryl sulfate solution*

Tris(hydroxymethyl)aminomethane,		
(Tris)	4.85	g
Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt,		
(EDTA-2Na)	14.89	g
Sodium lauryl sulfate	10.00	g
Distilled water	1	l

* The 0.04M Tris-EDTA-1% sodium lauryl sulfate solution is added 1:1 to an algal cell suspension, to obtain 0.02M Tris-EDTA-0.5% sodium lauryl sulfate solution.

Table 2. Reaction mixture, used for the determination of respiratory activity (oxygen consumption)

	Endogenous respiration	Substrate respiration
Algal-cell suspension	2ml	2ml
Substrate solution, substrate, 300mg/l-1/4-strength Ringer solution	—	1ml
1/4-strength Ringer solution	2ml	1ml

結果と考察

1. 連続処理実験中の活性フロックの微細藻フロラ
 活性フロック中の微細藻フロラが、COD 146 ppm の焼酎蒸留廃液を10日間流下処理し、さらに引続いてCOD 292 ppm のものを13日間流下処理⁷⁾する間に、どのように変化するかを検討するため、スポット寒天平板法で微細藻の分離を行なった (Photo 1)。とくにこの問題について、実験開始時の活性フロックの呼吸活性は非常に低いものであったが、廃液の流下処理にともない次第に呼吸活性が増加して行くことが報告された⁷⁾。活性フロックは外見上、微細藻の緑色が実験終了時まで強く残っていたので、これが微細藻フロラの変化にもとづく呼吸活性の増加なのか、細菌相の



Photo 1. Spot-agar plates: washed-cell suspension is spotted on the agar plates.

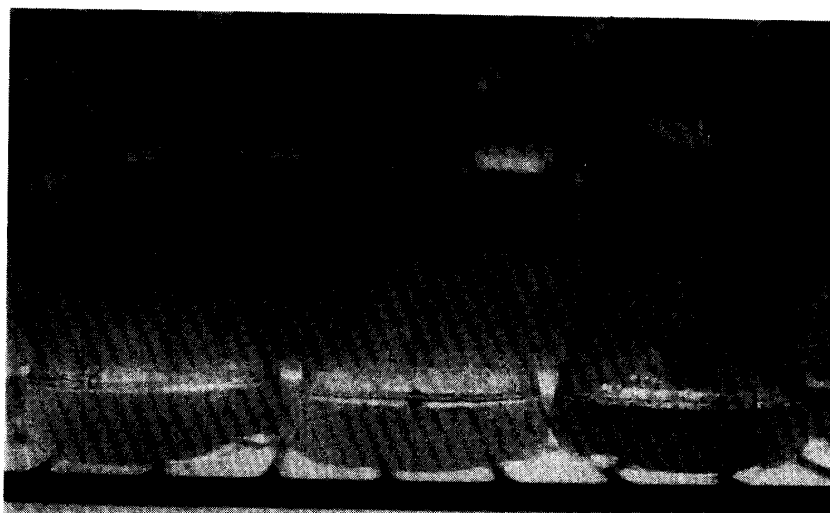


Photo 2. Isolation of microalgae: pour-plate method in a soft-agar medium.

充実によるものなのか明らかにしなければならなかった。分離方法はスポット寒天平板法で定性的である。しかし分離に使用したどの試料からもほぼ同一形態の微細藻株が分離され、しかもそれらは各試料につき出現頻度は100%であった。また、後述の結果からも明らかのように、それら微細藻株は全て同一種 *Chlorella vulgaris* に属し、生理的にもほぼ同一の生理群とみなしうる結果であった。したがって、活性フロックの微細藻フロラの優先種は *Chlorella vulgaris* で、連続処理実験を通じて微細藻フロラには変化なく、細菌相が充実することによって活性フロックの活性汚泥化が進行したということが明らかとなった。

2. 微細藻株の純粋分離

i) スポット寒天平板のスポットから微細藻分離用培地(液体) 5 ml (15mm φ 試験管) にクレット濁度が200となるよう懸濁した。この懸濁液を0.5%寒天の微細藻分離用培地45 ml (100 ml 三角フラスコ) で10段階に希釈し、これを20℃蛍光灯下約1カ月培養した (Photo 2)。

ii) 出現してきた単独のコロニーを釣菌、0.5%寒天の微細藻用無機培地 (Table 1) に穿刺し、20℃蛍光灯下で約10日間培養した。この時点で微細藻株はいずれも汚染細菌が認められたので、この穿刺培養に滅菌水を2 ml 加え、これに微細藻菌体をよく懸濁した。この懸濁液を1 ml とり、遠沈 (8,500 rpm 10分) した後、0.02 M Tris-EDTA-0.5% SLS (sodium lauryl sulfate) で30℃10分間振盪洗浄した。この懸濁液の0.2ml をすぐ滅菌4倍希釈リングル液1.8 ml に



Photo 3. Isolation of microalgae: cultivation of membrane filters on the culture-medium, on which microalgal cells have been trapped through filtration at a pore-size of 3 μm.

投入、さらに続けて同様に6段階に希釈した。5段階と6段階希釈から1 ml ずつとり、それぞれ滅菌した孔径3 μm のメンブランフィルターで吸引濾過した。濾過後、メンブランフィルターを100 ml 三角フラスコ中、0.5%寒天の微細藻分離用培地50 ml を固めた上に上面を上静かに置き、28°~30℃、明条件下約10日間培養した (Photo 3)。

iii) メンブランフィルター上に生育してきたコロニーを釣菌し微細藻分離用斜面培地にとり、30°C 1週間明条件下で培養、これを第一段階分離培養と呼ぶことにする。

iv) ここで、第一段階分離培養の汚染を Ym 培地 (Table 1) で検討したが、その際、汚染が認められた培養は微細藻分離用培地平板 3 枚に常法どおり画線希釈し、その画線平板を 30°C 明条件下 1~2 週間培養した。出現したコロニーを微細藻分離用培地斜面に釣菌接種し、30°C 1 週間の明培養を行なった。ここで再び Ym 培地で汚染チェックを行なったが、汚染が認められたものはさらに画線法をくり返した。ただ第一段階分離培養の場合の汚染菌はグラム陽性の oligotroph 細菌のことが多く、これらは光合成能を有するようになる。したがって微細藻分離用培地上でも

汚染は発見出来る。このようにして得られた第二段階分離培養は純粹培養で、第一段階分離で得られた純粹培養とともに形態観察・生理実験に使用した。

3. 分離微細藻株の形態と生理的性質

分離微細藻株は葉面散布肥料の 0.5% 溶液に適応した微細藻バイオマスの中心となるもので、いずれも細胞の大きさは Photo 4a, 4b, 4c および 4d に示すように、adult cells は径 5.0~6.0 μm でほぼ完全な球形、また、autospores は径 2.6~2.8 μm の多少扁平な球形であった。大きさに関して、こまかく見ると、連続処理実験開始時と 146 ppm の廃液流下の段階とは Table 3 に示したように分離株は平均して大きさが多少小さいが、この程度の差ならば同一種と判断してもよいと思われた。また、これらはいずれもグルコースを含む微細藻用有機培地で培養が古くなると褪色して

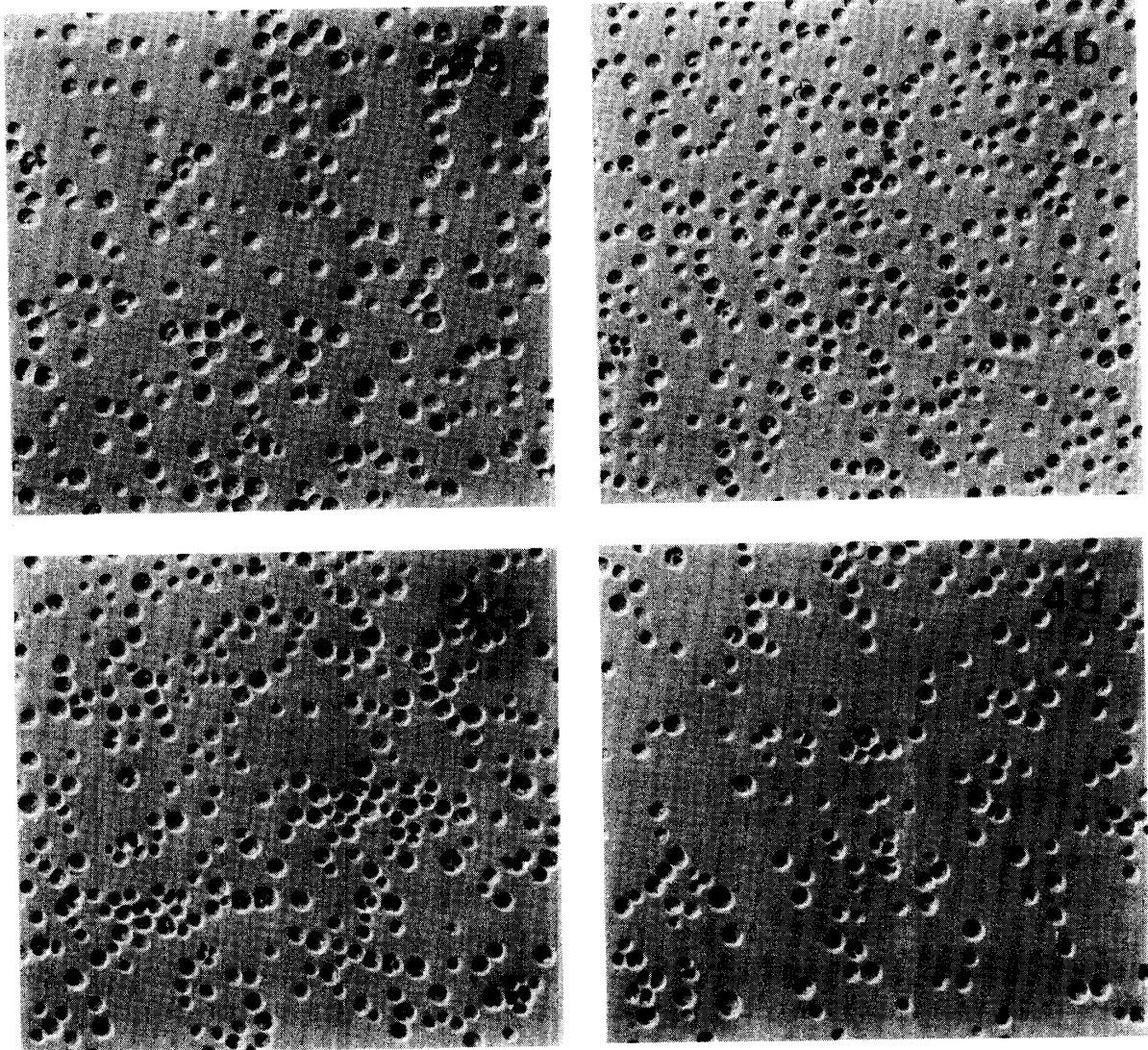


Photo 4. Algal isolates in the inorganic culture-medium: 4a, 107; 4b, 104; 4c, 103; 4d, 102.

Table 3. Morphological and cultural characteristics of the algal isolates

strain No.	Source : flocculated algal-biomass	Cell size in μm		Color of the old cultures in glucose-agar slant
		Adult cells	Autospores	
Isolate, 104 (Photo 4b) 122	at the start of treatment	5.0~6.0	2.6~2.8	decolorized
		4.5~6.0	2.6	〃
Isolate, 103 (Photo 4c) 112	after treatment of Shôchû-distiller's slops (146ppm)	5.0~6.0	2.6~2.8	decolorized
		4.5~6.0	2.6	〃
Isolate, 101 102 (Photo 4d)	after treatment of Shôchû-distiller's slops (292ppm)	5.0~6.0	2.6~2.8	decolorized
		〃	〃	〃
Isolate, 106 107 (Photo 4a)	algal-biomass	5.0~6.0	2.6~2.8	decolorized
		〃	〃	〃
<i>Chlorella vulgaris</i> Al-26		4.5~5.0		decolorized
<i>Chlorella vulgaris</i> Al-ly-3(11)		4.5~5.3		decolorized

白色になるが、この点、既報⁸⁾の *Chlorella vulgaris* Al-ly-3(11) および *Chl. vulgaris* Al-25 と同じであった。ただし、細胞の大きさに関してはこれら既報の2株は多少小さ目で、分離株の112と122とはほぼ同じであった。とくに、122には *Chl. vulgaris* Al-ly-3(11) 株で認められた出芽による桿状細胞が認められた。以上の結果を SOEDER らの報告^{1,2)}と照らし合わせても分離株は全て *Chlorella vulgaris* の範疇に入るものと判断できる。生育温度については *Chl. ellipsoidea* などでは25℃が至適生育温度とされているが⁵⁾、*Chl. vulgaris* については上限温度が39℃とか40℃が報告されている^{3,4,8)}。本実験で分離した微細藻株の至適生育温度は生育速度定数から36.5℃ (103, 107) および35.7℃ (102, 104) であったが、実験条件から至適生育温度は36℃をとるのが妥当であろう (Fig. 1)。また、生育上限温度は、図で示したように42.1℃ (102, 104) と42.7℃ (103, 107) で生育がなかったと判断できるので、その下の40.0℃と40.6℃とから40℃をとるのが妥当であろう。

分離微細藻株の糖類の資化性について検討したが、Fig. 2 に示したように、いずれの菌株も、グルコース、ガラクトース、酢酸ナトリウムでの生育はきわめて良好で、フルクトースがこれに次いだ。また、マルトースとセロビオースでは生育量は非常に低いが、それぞれこれによって生育が維持できるものと考えられる。D-リボース、サッカロース、ソルビトールではいず

れの菌株も生育を維持することができないものと判断した。今までに分離した *Chl. vulgaris*⁸⁾の糖類の資化性についてみると、グルコースと酢酸ナトリウム以外は全くあるいはほとんど利用できない *Chl. vulgaris* Al-ly-3(11) 型のもものとグルコース、フルクトース、ガラクトース、酢酸ナトリウムをよく利用生育し、マルトースとセロビオースでもある程度生育が維持される *Chl. vulgaris* Al-26 型のもものとがある⁹⁾。この図式でみるならば、今回の活性フロクからの微細藻分離株はいずれも *Chl. vulgaris* Al-26 型とみなしてよいので、連続処理実験の開始時から終了時まで、微細藻フロラには大きな変化はなく、この期間を通じて *Chl. vulgaris* Al-26 型のもものが優先種であったことを示すと結論できる。

微細藻分離株の基質呼吸については資化性の実験で用いたと同じ基質で呼吸活性を測定した。資化性と同様、グルコース、フルクトース、ガラクトース、酢酸ナトリウムは十分な酸素消費度を示し、これら菌株にとって良好な呼吸基質であることが示された (Fig. 3)。一方、セロビオースとマルトースについては酸素消費がないと判断できるものとか、それらをわずかに呼吸基質とすることができるものがあり、菌株により異なった。D-リボース、サッカロース、ソルビトールは資化性実験の場合と同様の結果で、微細藻分離株はこれらの糖類を呼吸基質としても全く利用できないことが明らかとなった。

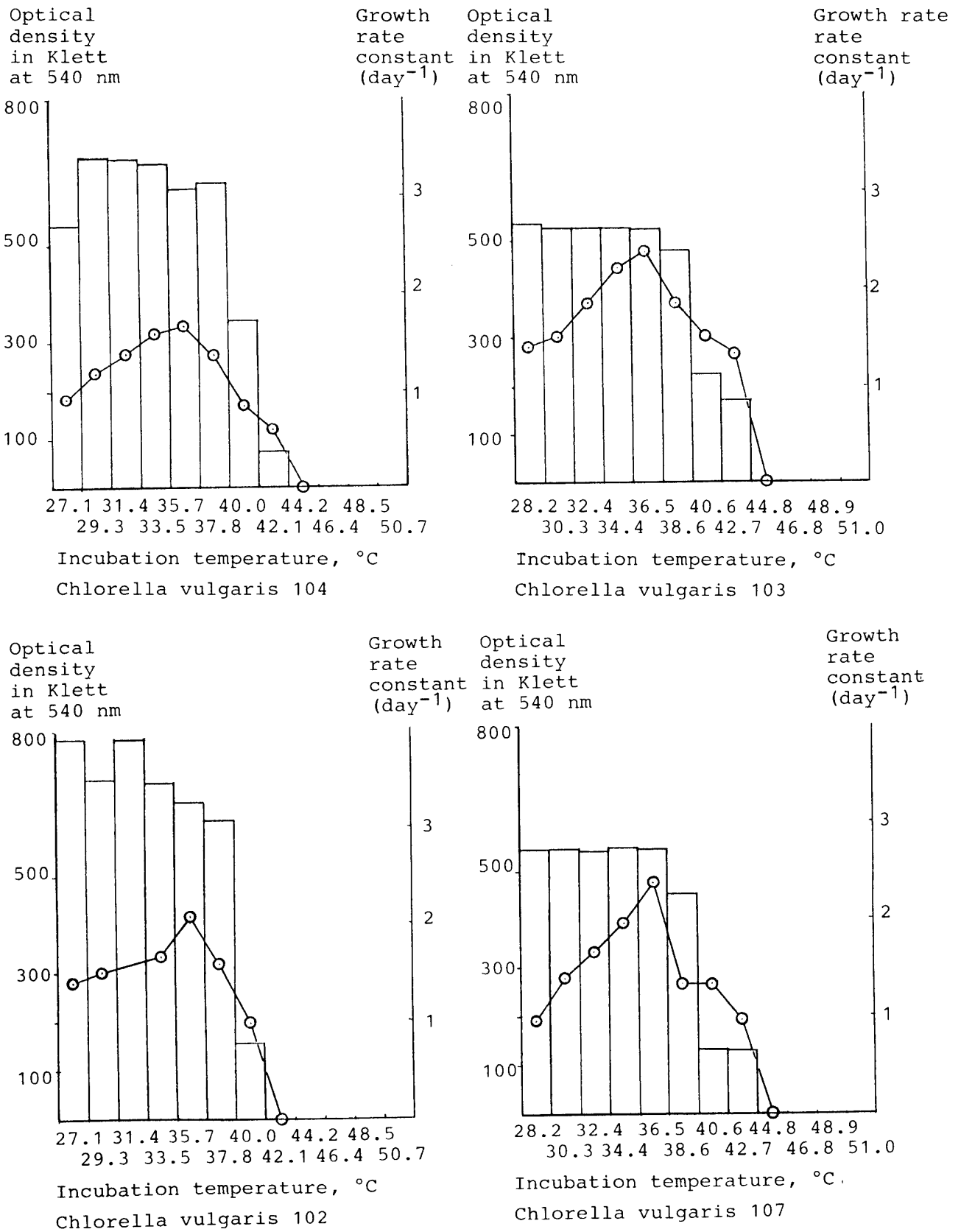


Fig. 1. Growth-temperature-range and growth-rate constant of the algal isolates.
 -○-○-: Growth rate constant.

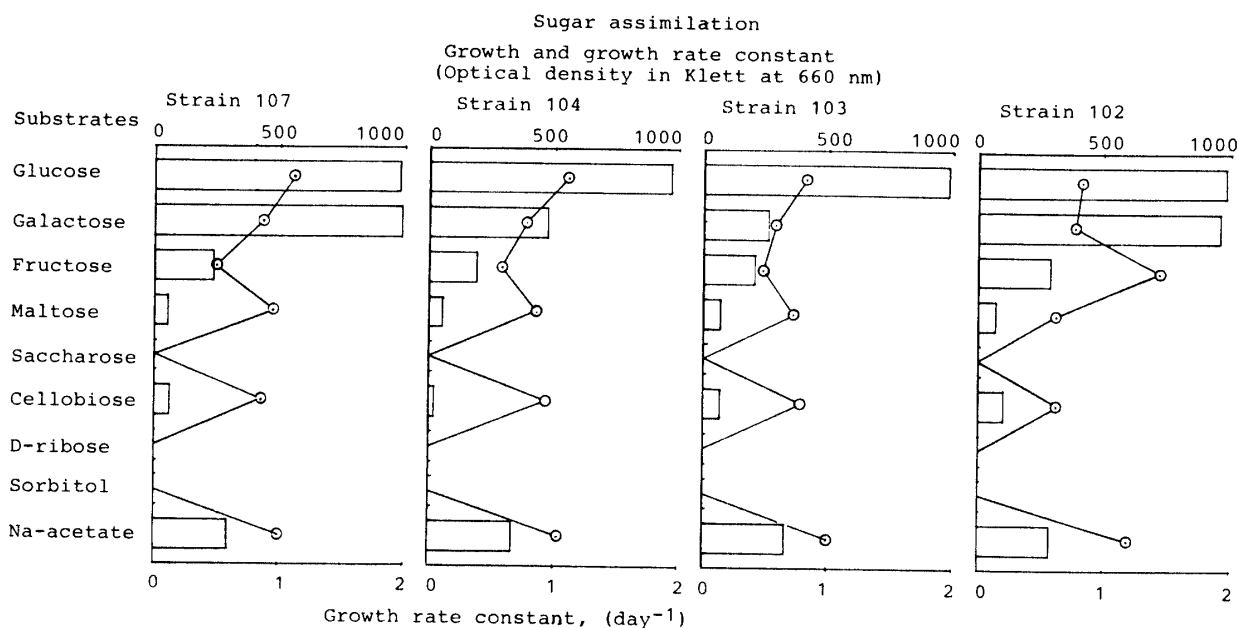


Fig. 2. Sugar assimilation of the algal isolates.
-○-○- : Growth rate constant.

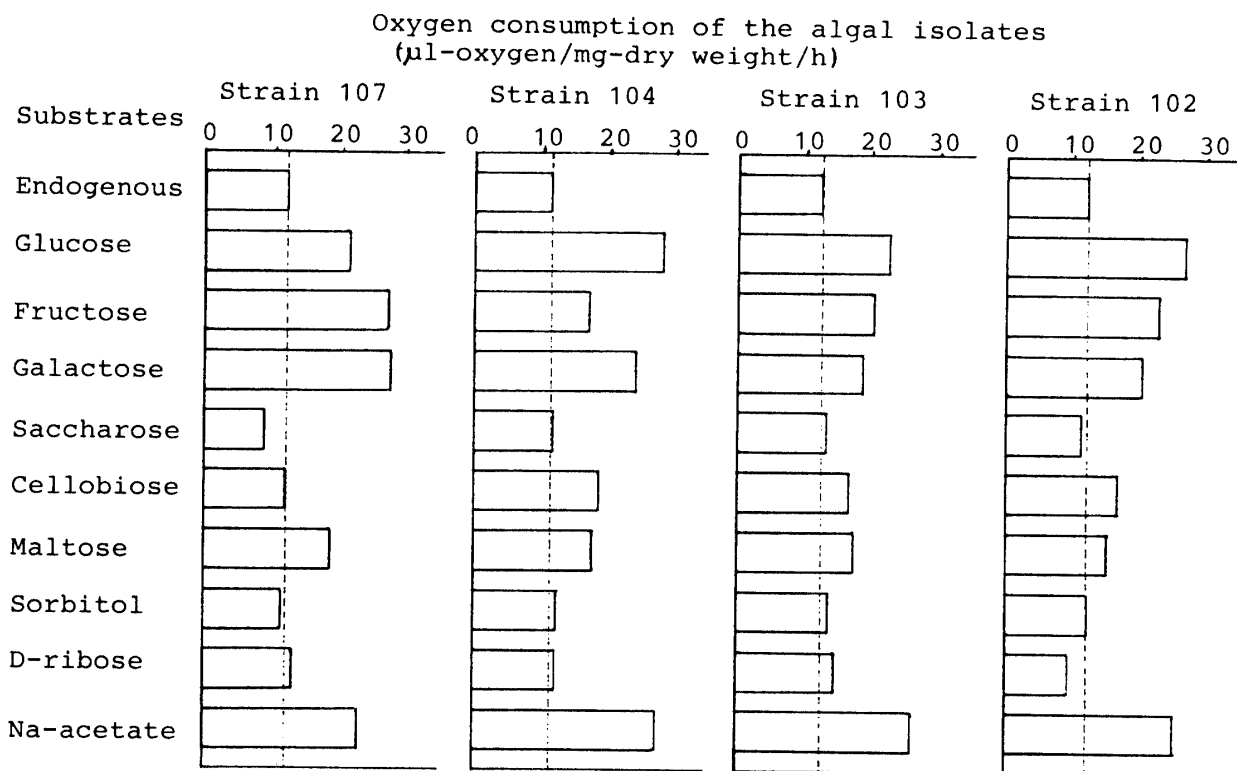


Fig. 3. Oxygen consumption of the algal isolates.

要 約

微細藻バイオマスから凝集沈殿法で形成させた活性フロックに COD 146 ppm の焼酎蒸留廃液を COD 負

荷量 $0.07 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ で10日間流下処理し、さらに引続いて COD 292 ppm の廃液を $0.15 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ で13日間流下、連続処理を行なった。この間、活性フロックの微細藻フロラについてスポット寒天法で検討

した。その結果、活性フロックの微細藻フロアの優先種は連続処理期間を通じて *Chlorella vulgaris* であった。また、活性フロックの細菌相が充実することにより活性フロックの活性汚泥化が進行することが明らかとなった。

微細藻は、稀釈培養法、0.02 M Tris-EDTA-0.5% sodium lauryl sulfate 溶液による洗浄と孔径 $3 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター濾過、寒天培地上にメンブランフィルターを置き培養、無機平板培地上の画線などを組合せて純粋分離を行なった。純粋分離した微細藻株はいずれも *Chlorella vulgaris* で細胞形態は径 $5.0-6.0 \mu\text{m}$ の球形、autospores は径 $2.6-2.8 \mu\text{m}$ の多少扁平な球形であった。また、グルコース培地では培養が古くなると褪色して白くなる。生育の上限温度は 40°C で至適生育温度は 36°C であった。糖類の資化性については、グルコース、ガラクトース、フルクトース、酢酸ナトリウムをよく資化した。また、D-リボース、サッカロースおよびソルビトールでは生育は認められなかった。基質呼吸については資化性と同じで、グルコース、ガラクトース、フルクトース、酢酸ナトリウムが良好な呼吸基質であったのに対し、D-リボース、サッカロース、ソルビトールは全く利用できなかった。

文 献

1) Kessler, E., and Soeder, C. J.: Biochemical Con-

tributions to the Taxonomy of the Genus *Chlorella*. *Nature*, **194** (4833), 1096-1097 (1962)

2) Soeder, C. J.: Weitere Zellmorphologische und Physiologische Merkmale von *Chlorella*-Arten. *Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, 21-34 (1963)

3) Sorokin, C.: Tabular Comparative Data for the Low- and High-Temperature Strains of *Chlorella*. *Nature*, **184** (4686), 613-614 (1959)

4) Sorokin, C. and Myers, J.: A High-Temperature Strain of *Chlorella*. *Science*, **117**, 330-331 (1953)

5) 田宮 博・渡辺 篤: 藻類実験法, 南江堂, 東京, 昭和40年 (1965)

6) 田邊幾之助: 旧式焼酎蒸留廃液の海水活性汚泥による処理とその微生物生態学的局面. 環境科学研究報告, 汚染防除技術における微生物の生態, 109-123 (1980)

7) 田邊幾之助・今村光宏・当直樹: 微細藻バイオマスから凝集沈殿法によって活性汚泥をつくる試み. I. 微細藻バイオマスの培養と凝集沈殿による活性フロック形成について. II. 活性フロックによる連続処理実験. 用水と廃水, **28** (7), 691-699 (I); **28** (9), 903-908 (II) (1986)

8) Tanabe, I., Kobayashi, T., Dent, D. F., Meiki, S. and Obayashi, A.: Isolation of Heterotrophic Microalgae. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8** (2), 9-25 (1972)

9) Tanabe, I. and Tago, Y.: Alcohol Fermentation for the Securing of Energy Resources and Single Cell Protein Production. *Report of Overseas Visits*, NODAI Research Institute, TUA, April 1982 - March 1983, 40-64 (1983)

Summary

Some experimental continuous-treatments of Shōchū-distiller's slops were carried out, using the flocculated algal-biomass. The slops of COD of 146 ppm were allowed to flow into the flocculated algal-biomass at a COD loading of $0.07 \text{ kg} / \text{m}^3 / \text{day}$ during the first 10-day-period, and those of COD of 292 ppm, at a COD loading of $0.15 \text{ kg} / \text{m}^3 / \text{day}$ during the another 13-day-period. A change in the microalgal flora of the flocculated algal-biomass through the period was investigated by the method of spot-agar-plate. It was ascertained that a prevailing species in the microalgal flora of the flocculated algal-biomass during the period was *Chlorella vulgaris* and the flocculated algal biomass was transformed into and activated sludge by the further repetition of bacterial-multiplication, succeeding to the slops-treatment.

Pure cultures of microalgae were obtained by the combined methods of the pour-plate method, consisting of washing of the microalgal cells with 0.02 M Tris-EDTA-0.5% SLS solution followed by the filtration of microalgal cells on a membrane-filter of a pore-size of $3 \mu\text{m}$, cultivation of the membrane-filter trapping microalgal cells on the culture-medium, and the streak-plate method in the inorganic culture-medium. All pure microalgal-strains belong to the species *Chlorella vulgaris*: sphereshaped with the cell diameter of 5.0 to $6.0 \mu\text{m}$, and with autospores of more or less depressed sphere with the cell diameter of 2.6 to $2.8 \mu\text{m}$. They are bleached in an

old culture in the glucose medium. Their optimum growth temperature is 36°C and maximum, 40°C. They assimilate well glucose, galactose, fructose, and sodium acetate together with much cell-production, but their growth were not supported with D-ribose, saccharose and sorbitol. Their substrate-respirations reached the same result as their assimilations of sugars did : glucose, galactose, fructose and sodium acetate were used as respiration-substrate, but D-ribose, saccharose and sorbitol were not used.