

[J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 7, p. 416~424, 1970]

鞭毛藻の工業的利用の可能性について

中山大樹

(山梨大学工学部発酵生産学科)

Use of Flagellate Algae for the Treatment of Waste Waters with Non-aerated Photoheterotrophic Process Securing an Algal Protein

Ooki Nakayama

(Dept. of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu, Yamanashi-ken)

Possibility of an industrial application of flagellate algae, particularly some strains of *Euglena*, which are found most frequently in the polluted sewage ditches where the level of dissolved oxygen in the water was determined no more than one part per million, was studied.

Forty-three strains of *Euglena*, including a strain of *E. sanguinea* and 9 strains of other algae, e. g., *Chlamydomonas*, *Pyrobotrys*, *Gonium*, *Pandorina* and *Haematococcus*, were isolated from the water as axenic cultures, by means of the washing technique.

Most isolates could propagate under certain anaerobic conditions so far as appropriate amounts of organic nutrients and light were supplied. In the head space of the closed culture in a vacuum ampoule, small amounts of CO₂ and O₂ were detected.

The growth response to the kinds and concentrations of nutrients varied among the strains. It was striking that *Pyrobotrys* sp. and *Ochromonas danica* propagated abundantly in organic media containing more than 8% glucose. Some flagellates, e. g., *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica*, were more resistant to bacterial contaminations than the non-flagellated green algae in the closed system.

Euglena gracilis consumed up to 1.5% glucose photoheterotrophically within 10 days without aeration, giving a yield of 0.33% on the medium of dried cell materials, which contained about 52% crude protein and 26% crude fats. Under the same conditions, about 80% COD was eliminated from a sewage model.

The advantages of seeding these flagellates were discussed for accomplishing a high degree of sewage purification together with the production of a single cell protein by the non-aerated treatment devised from the results above mentioned.

緒 論

汚水処理媒体, single cell protein 源などとして微細藻類を工業的に利用するための研究のほとんどは, その対象が, *Chlorella*, *Scenedesmus* など, 鞭毛を持たない緑藻に限られている観がある。しかし, 自然

界, とくに有機質に富む汚水中には, むしろ鞭毛藻の方が多く見出される。鞭毛藻は運動性をそなえているので, 攪拌などの人工的管理をある程度省くことができ, また, その多くは硬い細胞壁を持たないなど, 注目すべき利点を持っている。

鞭毛藻の工業的利用につながる研究としては、筆者らの鞭毛藻培養法¹⁾, *Euglena* の栄養分析²⁾, *Euglena* と細菌の混合培養³⁾, *Euglena* による廃液処理⁴⁾ の研究の他、大久保らの予備的研究⁵⁾, Kott らによる野生 *Euglena* のアミノ酸分析⁶⁾ などが、わずかに見られる。これらは、いずれも、たまたま手に入った特定の株を用いた研究なので、更に視野を広げて、広く野外を調査し、鞭毛藻の分離法を確立し、その工業的利用の可能性を見きわめるための基礎的な実験を行なった。

実験方法および結果

1. 野外調査 年間を通じて、主として甲府市内各所の下水溝、池などにおける藻類の繁殖状態および、pH, COD, 溶存酸素量などを観察した。

A. 実験方法 藻類の繁殖状態の評価は、肉眼、写真および鏡検によった。分析すべき試料水は、500 ml 三角フラスコと市販のポリエチレン製液体移注ポンプを用いて作った Fig. 1 のような採水器で採取して、空気との接触を断ったまま持ち帰り、直ちに分析した。pH はガラス電極 pH 計, COD はアルカリ性過マンガン酸カリ高温法⁷⁾, 溶存酸素は Fig. 2 に示す容器を用い、空気を断ったまま、東芝ベックマン製溶存酸素計によって測定した。

B. 実験結果 汚水がゆるやかに流れている下水溝の場合、冬は珪藻、夏は藍藻が多いが、冬至過ぎから夏至の頃にかけて *Euglena* が出現し、特に 3~4 月にかけて爆発的に増殖する。Fig. 3 に山梨大学工学

部発酵化学研究施設の南を流れている巾約 50cm の、底が泥のままの下水溝の 4 月下旬における観察例を示す。住宅群の台所下水が地下を通過して図の左端のマンホールに集まる。その近くには白い *Beggiatoa* や藍色の *Oscillatoria* が多いが、少し進むと水底が一面に *Euglena* の濃緑色に覆われる。このあたりまでは、溶存酸素が 0.1 ないし 1 ppm 程度である。下水は次いで 8m×5m のコンクリート製の池に入るが、この池の表面には haematochrome 粒の変形により変色することで知られている *Euglena sanguinea*⁸⁾ が一面

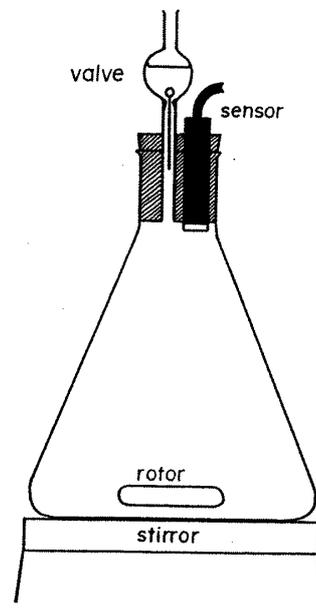


Fig. 2. Apparatus for the determination of dissolved oxygen.

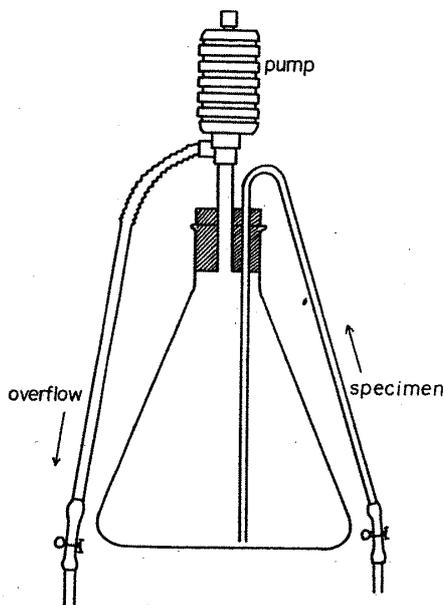


Fig. 1. Apparatus for the sampling of sewage.

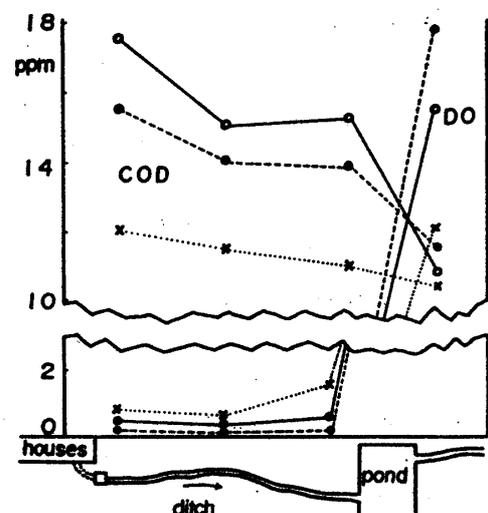


Fig. 3. Dissolved oxygen and COD values of sewage along a ditch in which *Euglena* was growing abundantly (April, 1968).

に繁殖し、日中は煉瓦色、朝夕は緑色を呈している。池を出るとCODが低下し、溶存酸素は数十倍に増加し、生物相としては褐色の珪藻が多くなる。

このような傾向は他の多くの下水溝にも認められ、*Euglena* は溶存酸素の乏しい汚水によく繁殖すると結論される。止水の場合は *Chlamydomonas* が繁殖していることが多いが、ここに記した以外の藻類が強度の汚水に、長期にわたり、かなり濃密に繁殖している例には遭遇しなかった。

2. 藻類の純粹分離 *Chlorella* などは無機培地を用いた寒天平板法で、たやすく分離されるが *Euglena* などは無機培地に生育し難く、有機培地では細菌や糸状菌の方が早く増殖するので、単純な寒天平板法では分離し難い。そこで、*Euglena gracilis* Z-strain の保存株および野生の *Euglena* を用いて各種の分離法を試みた。しかし、抗生物通添加法、各種濾紙およびメンブラン・フィルターによる濾過法、濾紙パルプを用いたクロマトグラフィー類似法、趨光性利用法、Lindner の小滴培養法、Fott らの酸性培地法¹⁰⁾、Mc Daniel のフェノール洗滌法¹¹⁾ および、これらの併用法は、いずれも不成功であった。これは、*Euglena* の場合、細胞が損傷を受けやすく、また孤立した細胞はきわめて好適な条件でなければ増殖しないためかと思われる。成功した唯一の方法は次のとおりである。

A. 水滴による洗滌法 乾熱滅菌したシャーレを50~80倍程度の双眼実体顕微鏡の視野に置き、約0.05 ml ずつの殺菌水の小滴を10~20滴ぐらいならべる。端の1滴に藻を含む試料を混ぜ、顕微鏡でのぞきながら、毛細管ピペットを用いて1個の細胞を吸い取り、次の水滴に移す。以下これを水滴の数だけ反復して洗滌し、最後に培地に移し、照明下に20°Cで培養する。

Gordon¹²⁾ は野生 *Euglena* 用万能培地として、穀粒など、土壌、水の重層系を推奨しているが、これでは生育の検出が困難である。その他、種々の培地を試みたが、現在のところ、次の培地が最も成功率が高いように思われる。*Euglena* が生育している下水溝の泥500gに水道水1.5ℓを加え、130°C 20分間オートクレーブをかけ、遠心分離した上澄液20ml、ポリペプトン、酵母エキス(ミースト)、ブドウ糖、酢酸アンモニウムそれぞれ1g、硝酸カリウム0.5g、KH₂PO₄、K₂HPO₄それぞれ50mg、MgSO₄·7H₂O 30mg、Koren-Hutner の微量元素¹³⁾を水道水で1ℓにのぼしたものに寒天18gを溶解し、試験管に約10ml ずつ分注して115°C15分オートクレーブをかけ、斜面に固めた後、斜面の高さの約1/3まで無菌的に殺菌水を注加し

て2相培地としたものである。

上記2相培地の殺菌水の部分に1個の細胞を入れて1~2週間培養した後、雑菌が生育せず、ルーペで認められる程度のコロニーが現れたら、鏝でスパーテル状に加工したエーゼで切って、一部は水中に留め、一部は斜面上に引き上げて、更に培養を続ける。株により、液中によく生育するものと、寒天上の方が繁殖がよいものがある。コロニーが肉眼で認められるようになったら、各種の培地に分けて接種し、適した培地を決める。

B. 実験結果 1969年3~4月の間に70株の藻を分離したが、死滅させることなく、秋まで維持することができたのは、次の52株であった。*Scenedesmus* 属3; *Chlamydomonas* 属2; *Pyrodotrys* 属1; *Gonium* 属1; *Pandorina* 属1; *Hæmatococcus* 属1; *Euglena* 属34。いずれも分離に使用したと同じ培地および、寒天を0.25%とした soft agar に接種して照明下に20°Cで十分繁殖させた後、10°Cの低温室にプラントルクス蛍光灯照明下で保存している。3カ月毎に植え継いでいるが、時々検査し、変色の兆候が認められた株は、そのつどに直ちに植え継ぐ。いずれも未同定であるが、*Euglena* の1株は *E. sanguinea* と認められる。43株の *Euglena* の中で、試験管内での生育が比較的早く、通常の方法で生理的試験をおこないやすいものは8株であった。これ以外の株も、下水溝の中ではおう盛に生育しているので、条件によっては実用に供される可能性があるものと思われる。

3. 培地等の検討 藻株の培養保存のためにも工業的利用を考えるためにも、炭素源および窒素源の資化性を調べる必要がある。また従来、習慣的に、藻類の培養には有機質濃度が低い培地が用いられてきたが、工業的に利用するためには、有機質濃度を上げた場合のことを検討するのも有益かと思われる。

A. 炭素源および窒素源の検討 *Euglena* など細胞が大型な藻の場合、接種量が少ないと、種の中の細胞の絶対数がきわめて少なくなり、lag phase の期間中に死滅するか否かが偶然に左右されやすく、また酵母エキスなどの複雑な窒素化合物が少量存在しないと生育しないことが多いので、厳密な意味の栄養要求試験は容易でない。そこで、とりあえず次の方法により、実用的な意味の試験を行なった。

Table 1 の基礎培地に、炭素源を変える場合は、硝酸アンモニウム0.1%、窒素源を変える場合にはブドウ糖、0.2%、酢酸ナトリウム0.1%を加え、炭素源または窒素源となるべき物質0.1%を加えたものを、綿

Table 1. Basal medium without gross N-and C-sources.

Ingredients	ppm
Yeast extracts	300
K ₃ citrate	500
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	50
MgSO ₄ · 7H ₂ O	30
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	25
MnSO ₄ · H ₂ O	18
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	4
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.8
H ₃ BO ₃	0.6
NH ₄ VO ₃	0.5
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.5
Thiamine HCl	1
Cyanocobalamin	0.005

Table 2. Growth responses of algae to N-and C-sources.

Group	N-sources				C-sources	
	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	Urea	Gluta-mate	Glucose	Acetate
A	+	+	++	++	++	+
B	+	+(-)	++	++	+	++
C	++	+(-)	++	++(+)	++	+
D	++	+(-)	++(+)	++(+)	+(-)	++

A: *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, *Euglena* sp. 5012, *Haematococcus* sp. 5032.

B: *Euglena gracilis* Strain Z, *Euglena* sp. 5039.

C: *Euglena* spp. 5007, 5037, 5058. *Pyrobotrys* sp. 5069, *Chlamydomonas* sp. 5004.

D: *Euglena* spp. 5065, e5066, 5067, *Scenedesmus* sp. 5001, *Chlorella pyrenoidosa* C-28, *Chlorella vulgaris* C-30.

Abbreviations: ++, growth abundant; +, moderate; -, none.

栓した血清試験管に 3 ml ずつ分注し, 115°C に 15 分加熱滅菌した後, 藻の細胞懸濁液 0.1 ml を接種し, 30W プラントクルス蛍光灯 2 本で照明した内容積 60 × 60 × 50 cm³ の冷凍機つき定温器内で 20°C で 1 カ月間培養した. 細胞懸濁液は, 分離用培地から寒天を除いた液体培地に藻を接種して, 照明下 20°C で 10 日間培養し, 殺菌水で 1 回遠心洗浄した後, もとの培地と同量の殺菌水に懸濁したものである.

試験管内では, *Euglena* の多くは膠質塊状, *Pyrobotrys* などは粗粒状に生育し, 比濁, 計数などが困難なので, 生育度の評価は肉眼によった.

供試 48 株の中で 32 株はほとんど生育せず, 生育のためにペプトンなどが必要なものと思われる. 保存株を含む 16 株についての試験結果を Table 2 に示す. 窒素源 4 種, 炭素源 2 種に対する態度から, 大まかに分類すると, 次の 4 つのタイプになる. 上の 5 株は窒素源として尿素やグルタミン酸を好み, その内 3 株は炭素源としてブドウ糖を, 2 株は酢酸塩を好む. 次の 5 株は硝酸塩とブドウ糖, 最後の 6 株は硝酸塩と酢酸塩を好むタイプである. 各グループに *Euglena* が含まれており, *Euglena* は生理的には, かなり多様な生物群であることが想像される.

B. 培地濃度の検討 無機成分は Table 1 と同じとし, これに酵母エキス, ポリペプトン, ブドウ糖をそれぞれ 1%, 尿素, 酢酸ナトリウムをそれぞれ 0.1% 加えたものを標準培地とし, 標準培地の 0.06 ないし 2 倍濃度の培地および標準培地の 0.5 倍濃度の培地のブドウ糖のみ 4 ~ 8% としたものを作り, これらの培地 10 ml に, 藻の細胞懸濁液 0.3 ml を接種し, 照明下 20°C に 15 日培養して, 肉眼により生育度を比較し, Somogyi 法により, 残糖をしらべた.

生育度を Fig. 4, 残糖を Table 3 に示す. 鞭毛藻の中でも, *Gonium* 5070 などは典型的な淡水藻で, ごくうすい液にしか生育しない. *Pyrobotrys* 5069,

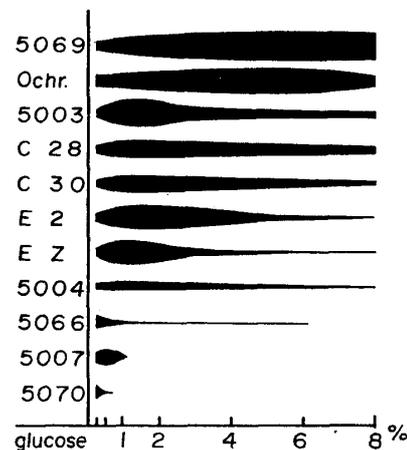


Fig. 4. Algal growth in the media containing varied concentrations of glucose, incubated at 20 for 15°C days.

5069: *Pyrobotrys* sp., Ochr.: *Ochromonas danica*.

5003: *Scenedesmus* sp., C 28: *Chlorella pyrenoidosa*,

C 30: *Chlorella vulgaris*, E 2: *Euglena gracilis* var. *bacillaris*,

EZ: *Euglena gracilis*, 5004: *Chlamydomonas* sp.,

5066, 5007: *Euglena* sp., 5070: *Gonium* sp.

Table 3. Residual glucose after 15 days incubation of osmo-tolerant algae.

Initial concentration of glucose (%)	4	6	8
<i>Ochromonas danica</i>	2.2%	4.0%	6.3%
<i>Pyrobotrys</i> sp. 5069	1.7 "	3.2 "	5.5 "
<i>Scenedesmus</i> sp. 5003	1.9 "	4.1 "	6.7 "

Ochromonas danica IAM CS-2 は、ブドウ糖 8% の液にもさかんに生育する。これらは 1% 程度のブドウ糖はたやすく消費するが、極端に高濃度の場合、短期間にそれらを消費してしまうことはない。

4. 閉鎖培養 無機培地で藻類を培養する場合、二酸化炭素を 5% 以下含む空気を通ずるのがふつうである。分離用培地から寒天を除いた有機培地に *Euglena gracilis* Z-strain を接種して、種々の組成の気体を毎分培地量の 10% の割に通じながら、照明下に 10 日培養したところ、空気に 5% の割に二酸化炭素を混ぜたものでも、20% の割に混ぜたものでも生育度は変わらず、空気の代りに窒素を用いてもよく生育し、空気の代りに酸素を用いると、生育が抑制された。以上の予備実験および、野外では溶存酸素分圧が、低い汚水中に *Euglena* がよく生育していることから想像すると、*Euglena* などは、かなりの嫌気状態に耐えるものと思われる。通気不要ということは工業的な観点からきわめて興味深い事実なので、閉鎖系で培養することを試みた。

A. 密閉状態での *Euglena* の生育 綿栓し、乾熱滅菌した径 16mm の試験管の中程を加熱し、引きのばして毛細管とし、前述の有機培地に *Euglena gracilis* Z-strain を 5% の割に接種したものを無菌的に入れ、減圧した後、常圧にもどして毛細管より下の部分を液でみだし、更に水銀柱 3mm の減圧状態に 1 分間保って溶存酸素をよく除いてから、なるべく気相部分を残さぬよう、毛細管部を熔封したアンプル 2 本および、対照として同じ液を綿栓試験管に 10ml ずつ入れたものを 2 本ずつ作り、1 本ずつは照明下、1 本ずつは光をさえぎって、いずれも 20°C で培養した。

照明下に培養したものは対照とほとんど変わらない程度によく生育し、3 カ月後にも緑色を保ち、毛細管部を鏡検すると、さかんに遊泳していた。暗所で培養した方は、対照は黄白色の藻体が増殖していたが、アンプルの方は全く生育していない。しかし、培養 10 日後に照明下に置くと、更に 6 日後には、最初から照明したものと変わらない程度に増殖し、死滅していないことが証明された。

B. 嫌気培養 前記の実験では、培養のはじめには嫌気状態が保たれていたに相違ないが、なんらかの機作で嫌氣的に二酸化炭素を生じ、これが光合成に利用されて酸素となり、直ちに呼吸に使われていないとは限らない。そこで更に嫌気状態を確実にするため、次の実験をおこなった。

前記の有機培地に可溶性澱粉を 1% 加えたもの 10 ml ずつを入れた綿栓試験管に 4 種の藻を単独に接種したものおよび、*Clostridium butyricum* IFO-3859 と混合接種したものを嫌気ジャーに入れ、アルカリ性ピロガロール液および室温固形触媒を添え、空気を 1.2 気圧の水素で置換し、照明下 20°C で培養した。対照はジャーの外で培養した。4 日後の観察結果を Table 4 に示す。

Table 4. Photo-heterotrophic growth of algae under strictly anaerobic (A) and natural (B) conditions.

	A	B
<i>Euglena gracilis</i> Strain Z	++	++
<i>Ochromonas danica</i>	++	++
<i>Chlamydomonas</i> sp. 5004	+	++
<i>Pyrobotrys</i> sp. 5069	-	++
<i>Scenedesmus</i> sp. 5001	+	++
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28	+	++

Abbreviations: See Table 2.

もし分子状酸素が発生すれば、室温触媒およびピロガロールのため、直ちに除かれるはずであるが、10 日間の培養期間を通じて、ピロガロール液は淡黄色を保ったままであった。したがって分子状酸素はほとんど発生していないものと思われる。*Clostridium* を接種した試験管は、翌日から第 4 日目にかけて、さかんに発泡し、生理的嫌気状態がよく保たれていることが示された。*E. gracilis* および *Ochromonas danica* は、嫌気状態でも対照とほとんど変わらない程度に増殖した。*Scenedesmus* 5003 や *Chlamydomonas* 5004、とくに後者は嫌氣的生育が劣っていた。*E. gracilis* と *Clostridium* の混合培養は、やや生育が劣ったが、それでも *Clostridium* が発生する水素などの泡が明らかに緑色を呈する程度に生育した。

C. 閉鎖培養に伴うガスの発生 光さえ照射してやれば、有機質を含む閉鎖系に *Euglena* などがよく生育することが明らかになったが、この際二酸化炭素、酸素、その他のガスの、いずれが発生するか、あるいは見掛け上ガスを発生しないか、ということは、生

学的にも実用的にも興味深い問題なので、およその見当をつけるため、次の実験を行なった。

A. に述べたと同じ方法で無菌的なアンプルを作り、ブドウ糖を 0.3% に増した有機培地に 5% の割合に藻を接種したもの 4 ml を入れて、水銀柱 3 mm 以下に減

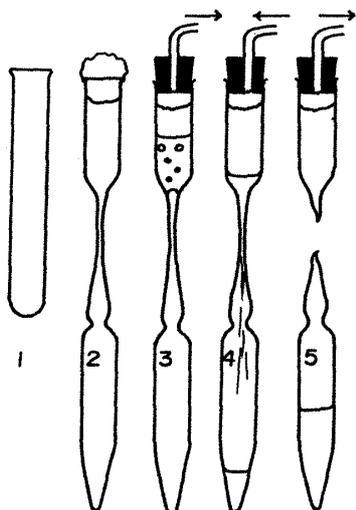


Fig. 5. Preparation of vacuum sealed ampoule with seeded culture medium.

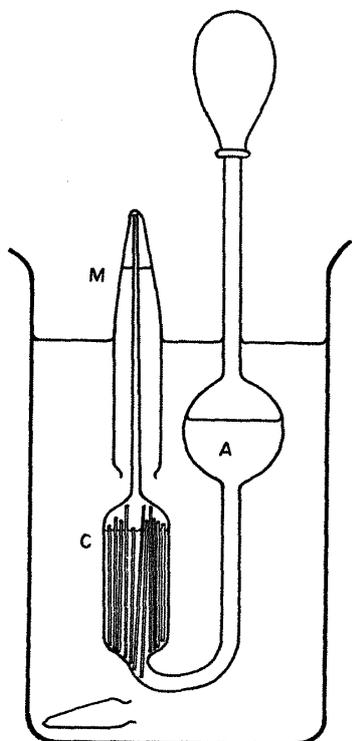


Fig. 6. Absorbing pipette for the determination of gases accumulated in the head-space of ampoule. A: Absorbent solution, C: Absorbing chamber with capillaries, M: Ampoule with culture medium cut in the water.

圧して溶存ガスを除き、約 12 ml の真空部を残して熔封し、恒温水槽に浮かべて、プラントルクス蛍光灯の照明下に 20°C で 14 日間培養した。アンプルの製法を Fig. 5 に示す。

培養終了後、アンプルを強く振って溶存ガスを揮散させ、水中に倒立させてアンプルの頸を折ると、水が侵入するので、内外の水面を合わせて、印をつける。次に Fig. 6 に示す手製の吸収ピペットに水酸化カリウム濃厚溶液を充たしたものを挿入し、ガスを吸引、排出して二酸化炭素を吸収し、水面に印をつける。次にアルカリ性ピロガロールを充たした吸収ピペットを用いて酸素を吸収して水面に印をつけ、最後にパラジウム黒を詰めた銅管を挿入して水素を吸収し、印をつける。アンプルを乾燥させた後、メスピペットを用いて、印の所まで水を入れて、ガスの量を計った。また、各藻とも、アンプルを破る直前に水冷しながら直射日光に 30 分さらしたものを試みた。これらの結果を Fig. 7 に示す。

液面上のガス量は 0.2~1.6 ml であった。蛍光灯照明の場合、そのガスの大部分は二酸化炭素であるが、直射日光にさらすと、酸素の割合が増大する。

D. 好気性菌による酸素の検出 前記の実験の結果、光が極端に強くない場合、閉鎖培養系内部に蓄積される酸素ガスは微量であることが示された。これは、おそらく、その藻の呼吸に利用され、二酸化炭素と動的な平衡関係にあるためと考えられ、ある程度の期間を見た場合、その藻に必要な量より以上の酸素を生ずるか否かは、別の問題である。このことは、基質とし

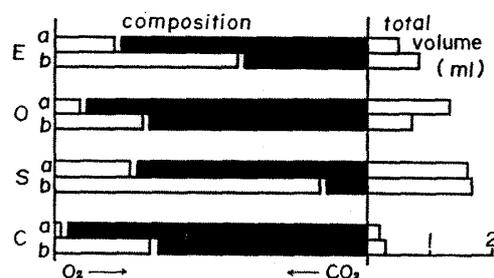


Fig. 7. Composition and total volume of gas phase in equilibrium with algal cultures started from vacuo.

E: *Euglena gracilis* Strain Z, O: *Ochromonas danica*,

S: *Scenedesmus* sp. 5003, C: *Chlorella pyrenoidosa* C-28.

a: Illuminated by fluorescent lamp for 2 weeks,

b: " , and exposed to sun light for 30 minutes.

ては閉鎖, 生物相の面では開放的な系で汚水浄化などを行なう場合には重要な問題になるので, 次の実験を行なった。

発生した酸素を好気性菌の発育によって検出するための予備実験として嫌気条件では全く生育せず, 生育すれば藻類とまぎらわしくなく明瞭に識別でき, 常圧の下では多くの藻類と互に拮抗することなく共存する菌を検索した結果, *Aspergillus oryzae* および *Geotrichum* が, この条件に適合していた。そこで, 前記同様の有機培地に各種藻類と *Asp. oryzae* または *G. candidum* を混合接種し, 減圧アンフル培養および常圧培養を試みた。その結果は Table 5 のとおりで, *Euglena gracilis* Z-strain はアンフル内にきわめてよく生育するが, 1カ月培養しても好気性菌の生育を許さない。他の藻は好気性菌の生育を支えており, とくに *Chlamydomonas* 5004 は辛うじて生育している程度であるが, 好気性菌の生育は旺盛であり, 有機培地からの酸素生成能力は藻の種類により大差があることを示している。

E. 細菌との混合培養 *Euglena* などが酸素の欠乏

Table 5. *Aspergillus oryzae* as a detector for oxygen produced by algae in vacuum sealed ampoule.

	Growth	
	Algae	<i>Asp. oryzae</i>
<i>Euglena gracilis</i> Strain Z	+++	-
<i>Ochromonas danica</i>	++	+
<i>Chlamydomonas</i> sp. 5004	+	+++
<i>Scenedesmus</i> sp. 5001	++	+++
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28	++	++

Abbreviations: See Table 2.

Table 6. Algal growth in vacuum sealed ampoules (A) and cotton plugged test tubes (T) in presence of *E. coli* (E) compared with pure cultures (P).

	A		T	
	E	P	E	P
<i>Euglena gracilis</i> Strain Z	+++	+++	+++	+++
<i>Ochromonas danica</i>	+++	++	+++	++
<i>Chlamydomonas</i> sp. 5004	+	+	+	++
<i>Scenedesmus</i> sp. 5001	-	++	-	+++
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28	-	++	-	+++

Abbreviations: See Table 2.

によく耐えることがわかったが, 汚水処理などの場合, もうひとつの問題点は雑菌に対する耐性である。筆者らの1966年の研究⁴⁾で, *Euglena* は *Chlorella* にくらべて種々の細菌との共生能力に富むことが明らかになっているが, ここでは嫌気条件下での混合培養を試みた。

前記の *Asp. oryzae* などの代りに *Escherichia coli* K-12 に置き換えた結果は, Table 6 のとおりで, 多くの藻は混合培養ではほとんど生育しないが, *Euglena gracilis* と *Ochromonas danica* は常圧の場合も減圧の場合も, 混合培養の方がむしろ良く生育し, *Ochromonas* の場合, この傾向が著しい。理由は不明であるが, ひとつには *Ochromonas* の食菌作用を挙げることができよう。

5. 純粋培養試験 前記有機培地のポリペプトンを1%, ブドウ糖を1.5%, 無機窒素源を硝酸アンモニウム0.2%としたもの1ℓを綿栓した三角フラスコに入れ, *Euglena* および *Chlorella* それぞれ2種類を接種して, とくに通気せず, 照明下に20°Cで10日間培養した結果を Table 7 に示す。通気や攪拌を行わない場合, *Chlorella* は沈降するが, *Euglena gracilis* は游泳により液内に広く分布し, 糖を旺盛に消費し, 培地当りの藻体収量も多い。

この実験により得られた乾燥藻体の分析値は次のとおりであった。()内は%を示す。

粗蛋白(52.02), アミノ態窒素(6.24), 粗脂肪(26.62) 粗灰分(6.47), 粗繊維(0.00), 可溶性無窒物(4.58) 水分(10.31), RNA(2.40), DNA(0.34) ペーパークロマトグラフィーにより検出されたアミノ酸: Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Ser, Thr, Phe, Tyr, Tyr, Met, Pro, Asp, Glu, His, Arg, Lys.

6. 汚水浄化試験 5種類の合成汚水を100 ml ず

Table 7. Glucose consumption and cell yields in stand cultures of algae incubated for 10 days.

	Glucose consumed	Yields of dried cells
<i>Euglena gracilis</i> Strain Z	100%	0.33%
<i>E. gracilis</i> var. <i>bacillaris</i>	45 "	0.20 "
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> C-28	34 "	0.21 "
<i>C. vulgaris</i> C-30	32 "	0.06 "

Medium: Yeast ex. 0.1, polypeptone 0.1, NH₄NO₃ 0.2, glucose 1.5%; mineral components as shown in Table 1.

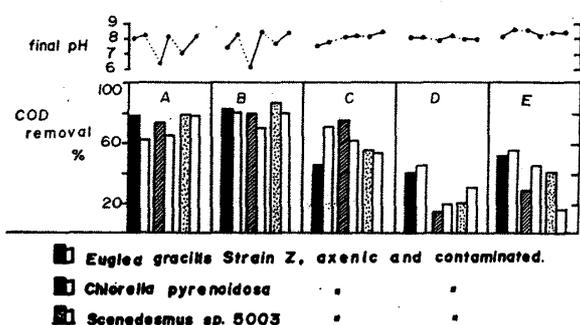


Fig. 8. COD removal and pH change in sewage models after 10 days culture of algae without aeration.

Composition of the sewage models: A, peptone and glucose 1% each; B, peptone 0.1% and glucose 0.5%; C, peptone 0.1% and sodium acetate 0.1%; D, urea 0.1% and glucose 0.1%; E, urea 0.2% and glucose 0.1%.

つ入れた 100 ml 容の三角フラスコに 3 種類の藻を 5% の割合に接種し, 平行して雑菌に富む汚水を混合接種したものを置き, いずれも綿栓の上をポリ塩化ビニール膜で覆ってゴム・バンドでしばり, 下からプラント・ルクス蛍光灯 2 本で約 1,500 Lx になるように照明しながら, 20°C で 10 日間静置培養した後, 遠心分離により, 藻体および菌体をのぞいた上澄液について, 過マンガン酸カリ高温法で COD を測定した結果を Fig. 8 に示す. COD 除去能力は曝気した場合は比較にならないほど弱いが, ペプトンを含む液では約 80% の COD が除去されており, また, *Euglena* の能力は *Scenedesmus* や *Chlorella* に優るとも劣らない.

考 察

今日, 石油の食糧化などが精力的に進められている一方で, 食糧に由来する有機質廃物が公害の原因となり, これらを酸化分解するだけのために大きな犠牲が払われている. 有機質廃物を効率よく食糧化することができれば, 二つの課題に同時に貢献することになるが, 光があれば藻類は有機物を基質として閉鎖系でよく生育し, しかも総和として著しいガスの出入がないという実験結果は, このための媒体として藻類が有望であることを示すものである. しかし, 一般に藻類は, 利用し得る基質の濃度および生育速度の点で細菌等に劣るので, 藻類を用いるときは, 汚水の稀釈度を高め, 時日をかけて処理することが必要になり, そのためには, 海洋など, 既存産業の邪魔にならない場所を使う必要がある. このような人工的管理の困難な条件下に使用する藻類としては, 自律的な運動能力があり, またこの度の実験の結果, 細菌の汚染に強く, single

cell protein としてもすぐれていることが示された鞭毛藻が好適であろう. 有機栄養性の鞭毛藻は, 常法による純粋分離が困難で *Euglena* の場合 Cambridge¹⁴⁾ に約 100 株, Indiana 大学¹⁵⁾ に 27 株保存されている程度であったが, 筆者の方法によって容易に分離できることが明らかになったので, 鞭毛藻利用のための本格的な研究への道が開かれたと言えよう.

総 括

1. 甲府市内の下水溝等を調査した結果, 溶存酸素が 1 ppm もしくはそれ以下の場所に, 冬至過ぎから夏の頃にかけて, とくに春分前後に *Euglena* が多く発生することを示した.
2. 滅菌したシャーレにならべた殺菌水の水滴の中を, 毛細管ピペットを用いて逐次移して洗滌した単細胞を, 有機培地寒天斜面と殺菌水の 2 相からなる培地に接種する方法で, *Euglena* 43 株, その他の藻 9 株を純粋分離した.
3. 代表的な株につき, 窒素源および炭素源の資化性をしらべたところ, 硝酸塩を好むもの, 尿素の方がよいもの, 酢酸塩を好むもの, ブドウ糖の方がよいものと, *Euglena* の中でも, その性質は多様であった. *Ochromonas*, *Pyrobotrys* にはブドウ糖 8% を含む培地中で旺盛に生育する株があった.
4. 多くの単細胞藻類は, 有機培地に接種し, 照明すれば嫌気条件でもよく生育する. *Euglena gracilis* の場合, 嫌気性細菌 *Clostridium butyricum* との混合培養も可能である. 有機培地に藻を接種してアンフルに詰め, 脱気, 熔封して照明下に培養すると, 酸素および二酸化炭素が生ずるが, その量および組成比は, 照度や藻の種類によって異なる. 蛍光灯照明の場合, *Aspergillus oryzae* などの好気性菌を混合接種しておく, *Ochromonas*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella* との混合のときは菌が生育するが, *Euglena gracilis* は菌の生育に必要な量の酸素を放出しない. *Escherichia coli* と混合接種してアンフルを用いて閉鎖培養すると, 他の藻はほとんど生育しないが, *Ochromonas*, *Euglena* はよく生育する.
5. ブドウ糖 1.5% を含む有機培地に接種し, 照明下に静置培養したところ, *Chlorella vulgaris* は, 糖の 32% を消費し, 培地当り 0.06% の乾燥藻体を生じたのに対し, *Euglena gracilis* は糖の 100% を消費して培地当り 0.33% の乾燥藻体を生じた. 後者は粗脂肪 26.62%, 粗蛋白 52.02% で, 天然アミノ酸 18 種をすべて含んでいた.
6. 各種の模擬汚水に藻を接種し, 空気の流通が悪い

条件で照明下に10日間静置培養すると、汚水によっては COD の約80%が除去され、*Euglena* の汚水浄化能力は、*Scenedesmus* や *Chlorella* に優るとも劣らないことが示された。

以上の知見にもとづき、*Euglena* などの鞭毛藻の工業的利用の可能性を論じた。

終りに臨み、この研究の費用の一部は文部省科学研究費によったものであることを付記し、実験の一部を担当された清田美咲、都築一男氏、貴重な示唆を賜った Indiana 大学の Starr 教授、東大応微研の市村輝宣博士、本学の小原巖、加賀美元男、兎東保之博士に深謝します。

本報告の概要は昭和44年11月、日本醸酵工学会大会、光合成シンポジウムにおいて講演した。

文 献

- 1) 多田, 中山: 特許公告, 昭31.6089 (1956).
- 2) 中山, 酒井, 多田, 六所, 神谷: 農化, **33**, 290 (1959).
- 3) 六所, 神谷, 中山, 酒井, 多田: 農化, **33**, 293 (1959).
- 4) 中山, 小池: 山梨大醸酵研, **10**, 49 (1963).
- 5) 中山, 小池: 山梨大醸酵研, **10**, 59 (1963).
- 6) 大久保, 手塚, 佐々木, 高毛: 発協誌, **25**, 38 (1967).
- 7) Kott, Y., Wachs, A. M.: *Appl. Microbiol.*, **12**, 292 (1964).
- 8) 西片: 下水試験法, 日本水道協会 (1953).
- 9) Gojdics, M.: *The Genus Euglena*, Univ. of Wisconsin Press, Wisconsin (1953).
- 10) Fott, B., Mc Carthy, A. J.: *J. Protozool.*, **11**, 116 (1964).
- 11) Mc Daniel, R. H.: *Appl. Microbiol.*, **10**, 223 (1962).
- 12) Gordon, F. G.: *Euglenoid Flagellates*, Prentice-Hall Inc., N. J. (1967).
- 13) Koren, L. E., Hutner, S. H.: *J. Protozool.*, **14**, Supplement 17 (1967).
- 14) University of Cambridge: *Culture Collection of Algae and Protozoa*. The Botany School, Cambridge (1966).
- 15) Starr, R. C.: *The Culture Collection of Algae at Indiana Univ.*, Dept. of Botany Indiana Univ., Bloomington, Indiana (1964).

(昭 45.2.28 受付)