

国立公衆衛生院 正 金子光美  
同上 正 〇国包章一  
新日本気象海洋(株) 市村 保

## 1. はじめに

ATP (アデノシン三リン酸) は自然水中における微生物の現存量に関する指標として有効であることが、いくつかの研究<sup>(1)(2)など</sup>によって明らかにされている。ATPは生細胞には必ず存在するが、細胞が死滅すると直ちに失われるという面で大きな利点がある。一般に、ATPの測定を行なう上で最も考慮しなければならない点は、試料中のATPの全量のうちできるだけ多くの量を抽出溶媒中にとり出すこと、および、測定操作の全過程を通してのATPのロスをできるだけ少なくすることである。しかし、ATPは非常に加水分解されやすく、とくに自然を対象とした場合のこれらを同時に満足するような測定方法は、まだ十分に確立されていない。

このようなことから、自然水中のATPの測定方法を確立するための基礎実験として、藻類中のATPの測定における、抽出溶媒や抽出温度などによる影響について調べることを目的として、以下のような実験を行なった。

## 2. 実験方法

試料は実験室で培養した緑藻 *Scenedesmus dimorphus* を用いた。また、抽出液のATP濃度の測定にはDuPont社製Biometerを使用した。前処理を含めた測定操作の概略は図-1のとおりである。

## 3. 結果と考察

## 3-1. ATP濃度と発光量の関係

ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いた発光分析によるATPの検量線を図-2に示す。ATP濃度と発光量との間には、広い範囲にわたって両対数グラフ上で直線関係が成り立つ。

酵素試薬の濃度と発光量との関係について別に調べた結果、酵素試薬の濃度を標準処方量の2倍にすれば発光量がほぼ平衡値に達することがわかっており、図-2の場合をはじめここではすべてこの条件で測定を行なっている。

## 3-2. 抽出溶媒と加熱方法による影響

ATPの抽出には各種の抽出溶媒が用いられており、これらのそれぞれに応じて煮沸又はホモジナイズなどを行なって、ATPを抽出するという方法がとられている。ここではとくにTrio又はグリシンを用いて煮沸抽出する方法について比較検討した。抽出溶媒および加熱の条件は次のとおりである。

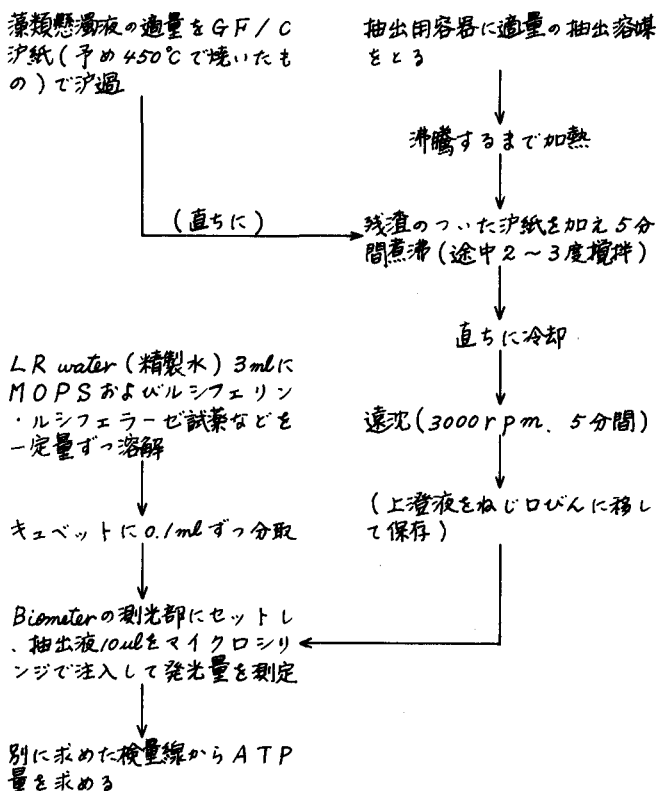


図-1 藻類中のATPの測定操作

## <抽出溶媒>

- ① Tris緩衝液(0.025 M, pH 7.75)
- ② グリシン溶液(0.01 M, pH 10.0)
- ③ グリシン+Mg-EDTA溶液(②にMg-EDTAを0.005 M加えたもの)

## <加熱方法>

- ① 100 ml 三角フラスコに抽出溶媒50 mlをとり湯浴で加熱(実測95-96℃)
- ② 試験管に抽出溶媒10 mlをとり湯浴で加熱(実測98-99℃)
- ③ 試験管に抽出溶媒10 mlをとりブロックヒーターで加熱(設定115℃, 実測100-104℃)

これらの条件について実験した結果を図-3に示す。抽出溶媒に関しては、Tobin<sup>3)</sup>らが述べているようにTrisよりもグリシンの方が優れており、さらに、グリシンだけの場合よりもMg-EDTAを加えた場合の方が、共存イオンによる妨害がなくなり、ATPの回収率がより高くなっている。一方、加熱方法に関しては、湯浴よりもブロックヒーターによる方が回収率が高くなっている。これは、ブロックヒーターを用いた場合の方が抽出温度が高いことなどによるものと考えられる。

## 3-3. 抽出温度による影響—ブロックヒーターを用いた場合

上記で最も高い回収率がえられた、グリシン+Mg-EDTAを用いてブロックヒーターで加熱する方法において、設定温度がATPの回収率におよぼす影響について調べた結果を図-4に示す。実際に試料からATPを抽出したときには、設定温度が120℃のとき発光量が最も高く、110℃で最も低いが、ATP溶液を同じようにして加熱した場合には全く逆の関係になっている。つまり、抽出温度があまり高いといったん抽出されたATPが加水分解されやすいが、細胞から抽出溶媒へのATPの抽出ということに限って言えば、温度が高いほど抽出率が高くなる傾向がより強いようで、この結果全体としてのATPの回収率も温度が高いほど高くなるものと考えられる。

なお、設定温度120℃は突沸がおこらない限界の温度に相当している。

## 4. まとめ

本実験の結果、藻類中のATPを測定するにあたっては、グリシン+Mg-EDTA溶液を抽出溶媒として、ブロックヒーターを用いてできるだけ高温で煮沸抽出する方法が優れていることがわかった。

藻類中のATPの測定に関しては他にもいくつかの問題点はまだ残されているので、これらのそれぞれについて今後さらに詳しく検討して行きたい。

参考文献 1) O. Holm-Hansen, et al., L & O, Vol. 11, 510-519 (1966)

2) P. L. Brezonik, et al., WR, Vol. 9, 155-162 (1975)

3) R. S. Tobin et al., WR, Vol. 12, 783-792 (1978)

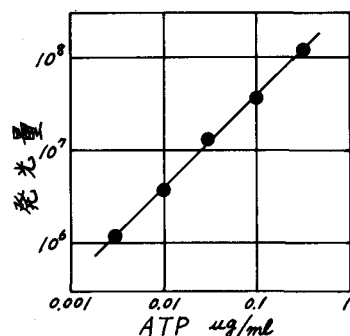


図-2 ATPの検量線

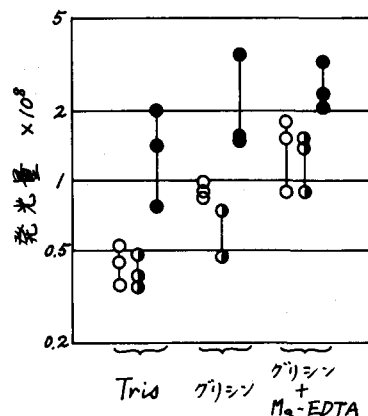


図-3 抽出溶媒と加熱方法による影響

(○: 三角フラスコ-湯浴  
◐: 試験管-湯浴  
●: 試験管-ブロックヒーター)

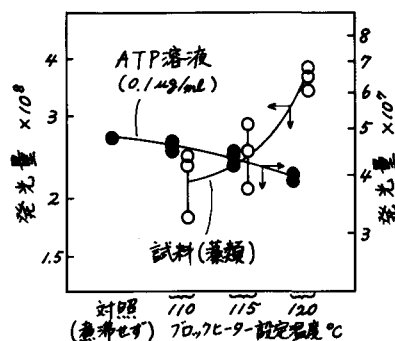


図-4 抽出温度の影響