

II-77 M. aeruginosa培養槽内の細胞外代謝有機物に関する研究

岩手大学 学生員○小松佳幸 石崎正志 桜田準也

岩手大学 正員 大村達夫 大沼正郎 相沢治郎 海田輝之

1. はじめに

藻類は増殖あるいは自己溶解の間に水環境中に多種多様の代謝生産物を放出することが知られている。この代謝生産物は、共生生物や自己の増殖に対して多大な影響を与えられていると言われており、水域生態系をコントロールする重要な因子の1つであると考えられている¹⁾。これらの代謝生産物は、一般に炭水化物、タンパク質そして有機酸に大きく分類される²⁾。そこで本研究においては、藍藻類のMicrocystis aeruginosaを実験室内において無菌的に回分培養を行ない、培養液中への溶存有機物の挙動を明らかにするため、ゲルクロマトグラム、TOC（総有機炭素量）不揮発性有機酸などを溶存有機物の指標として用いて検討を行なった。

2. 実験装置および方法

2.1 藻類培養装置および培養条件

藻類の培養は、Fig-1に示すような装置内でTable-1に示される条件のもと行なわれた。また、基質はChu培地を用いた。

2.2 分析装置および分析条件

(1) 藻類生物量 クロロフィル-aが藻類量の指標として使用された。

(2) ゲルろ過 ゲルカラムは内径25mm、高さ90cmで、ゲルはSephadex G-15 が使用された。展開流量は60(ml/hr)で1(fraction)を10(ml)とし50 (fraction)分画を行ないそれぞれのろ液の吸光度 (E_{220} , E_{260}) を測定しゲルクロマトグラムが描かれた³⁾。カラムに添加される試料は培養液の50倍濃縮液10(ml)とした。

(3) TOC TOCは分画されたfractionごとに測定された。

(4) 不揮発性有機酸 培養液を0.45 μ mガラスフィルターでろ過した後、減圧乾固しエステル化⁴⁾の前処理を経てガスクロマトグラフィーで定量された。

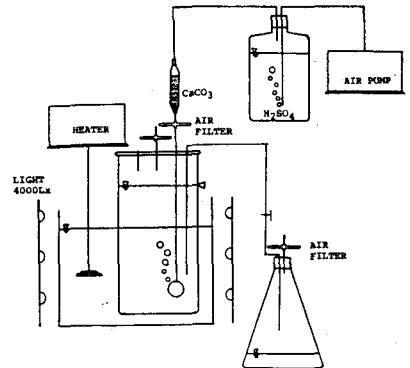


Fig-1 藻類培養装置

Table-1 培養条件

培養槽	容量9.6(l)の混合培養槽
照度	4000(lux)で12/12明暗培養
温度	恒温槽により25(℃)に保持
混合	無菌空気ではっ気

3. 結果および考察

3.1 M.aeruginosaの増殖過程

Fig-2には、M.aeruginosa の増殖曲線を示している。M.aeruginosaは接種後約10日の遅滞期を経た後、20日後まで対数増殖した。しかし、その後クロロフィル含有量に明らかな減少が見られた。そこで、対数増殖期以降を減衰期として以降の考察を行なうことにする。

3.2 不揮発性有機酸およびTOCについて

本研究の実験結果から、藻類から放出される主要な不揮発性有機酸として、ビルビン酸、乳酸、グリコール酸、しゅう酸、およびフマル酸を取り上げた。そして、これらの不揮発性有機酸の総量を総有機酸量とみなした。

Table-2は経時日数での各有機酸濃度を示したものである。これを見ると培養液中の総有機酸量は減衰期において著しい増加が見られる。この現象は衰退期まで一貫して総有機酸量の60~100 (%) を占めるグリコール酸が直接反映しており、M.aeruginosaの放出有機酸として主要な位置を占めるものと考えら

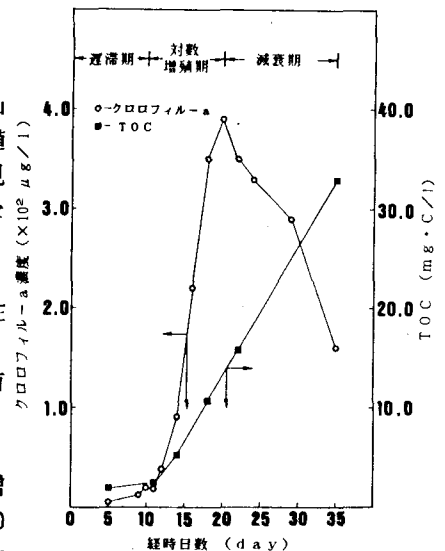


Fig-2 Microcystis増殖曲線

れる。

Fig-2中には、培養液中のT O Cの変化も同時に示されている。これによると、T O Cは有機酸と同様に経時日数に従い増加を示しており、初期の培地に有機炭素がほとんど含まれていない事を考えれば、このT O Cの増加はMicrocystisによる代謝および自己分解が主な原因と考えられる。

また、総有機酸量がT O Cに占める割合は他種と比較すると低いものであった。

3.3 ゲルクロマトグラムによる放出代謝有機物の検討

有機物の種類は、数百万にもおよぶがその大半の有機物の分子量は2000以下である。また本実験で用いる藻類の培養液を考へても評価の為のゲルサイズは、低分子領域を良く分画し得るものが必要と考えられる。そこで、ここではSephadex G-15を用いることにした。Fig-3にM. aeruginosaの培養液をゲルろ過によって分画した一例を示した。これを見てわかるように3つのピークが生じ、代謝物の成分は3つの画群に分画された。そしてそれぞれの画群をI II IIIとする。

Fig-4には、各経時日数における3画群それぞれのT O C値を示したものである。これらの結果を見ると、増殖期におけるT O Cは画群I < 画群II < 画群IIIとなり低分子側の存在が大きいことが確認された。しかし、減衰期になると画群Iや画群IIの増加が著しくなり、減衰期後期には画群IとIIのT O Cが画群IIIの約2倍にもなった。これはMicrocystis細胞の自己分解過程が進行し、細胞内容物である比較的高分子量の物質が培養液中に放出されることが大きく関与していると考えられる。

また、予備実験により前述の有機酸(M.W 76~116)が画群IIIと同様なフラクションナンバーに出現することや画群IIIのT O Cに占める有機酸の割合がかなり高いことより画群IIIは有機酸の指標となり得ると考えられる。

4. 結論

- 1) M.aeruginosaから放出される不揮発性有機酸のうち主要なものはグリコール酸のみであり、全T O Cに対する占有率は低いものであった。
- 2) M.aeruginosaの培養液をSephadex G-15でゲル分画すると3つの画群に分れた。
- 3) T O Cが、減衰期において著しく増加するのはゲル分画における画群Iと画群IIの比較的高分子量物質が大きく影響していると考えられる。

参考文献

- 1) 坂本 充：生態遷移Ⅱ，共立出版，東京(1978)
- 2) TAKEO HAMA, NOBUHIKO HANDA：Pattern of organic matter production by natural pytoplankton population in a eutrophic lake 1.2, Arch. Hydrobiol. 109:227-243(1987)
- 3) 亀井翼，丹保憲仁：水質のマトリックス評価のためのゲルクロマトグラフィー，水道協会雑誌 第51号(1977)
- 4) 山下市二ら：有機酸のガスクロマトグラフィーの為のブチルエステル化 Jappan Analyst vol.22(1973)

Table-2 各有機酸濃度と総有機酸に占める割合

経時日数	遅滞期		増殖期				減衰期	
	5 day	11 day	14 day	18 day	22 day	35 day		
ビルビン 酸	-	-	0.08 (5.9%)	0.10 (1.8%)	0.30 (4.0%)	1.00 (9.6%)		
乳 酸	-	-	0.02 (1.5)	0.07 (1.3)	0.10 (1.3)	0.30 (2.9)		
グリコール酸	0.20 (100%)	0.96 (100%)	1.15 (85.2)	3.20 (57.5)	5.00 (66.7)	7.11 (68.2)		
しゅう 酸	-	-	-	1.00 (17.9)	1.10 (9.5)	0.81 (7.8)		
フマル 酸	-	-	0.10 (7.4)	0.20 (3.6)	1.00 (4.8)	1.01 (9.9)		
総有機酸量	0.20**/l	0.96**/l	1.35**/l	5.57**/l	7.50**/l	10.42**/l		

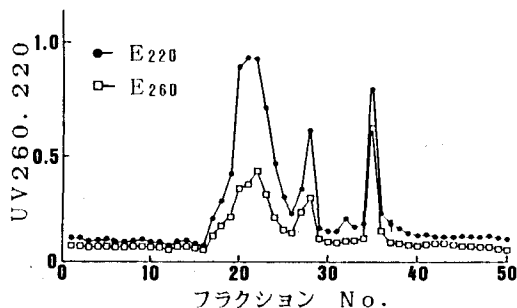


Fig-3 藻類培養液のゲルクロマトグラム

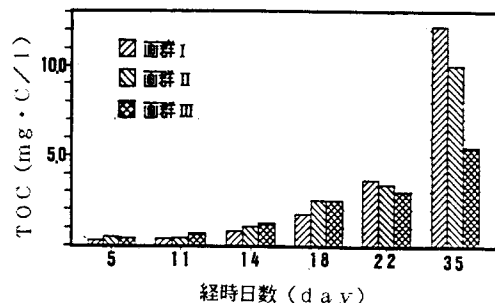


Fig-4 各画群のT O Cの変化