

VII-25

金属錯体形成能を有する藻類由来有機物質（AOM）の分離に関する研究

東北大学 学生員○丸山亜紀子

東北大学 学生員 高荒 智子

東北大学 正会員 大村 達夫

1. はじめに

水道水源の富栄養化により増殖した藻類が産出した藻類由来有機物質（Algal Organic Matter : AOM）は凝集剤との錯体形成や凝集剤の多価水和錯体あるいは無機懸濁物との吸着に寄与することにより、浄水処理において凝集阻害を引き起こすとされている^{1) 2)}。しかしながらその凝集阻害メカニズムは未だ未解明な点が多く、特にAOM組成に着目した凝集阻害に関する研究は少ない。

そこで本研究では *Microcystis.aeruginosa*（以下 *M.aeruginosa*）が産出したAOMの中からアルミニウム錯体形成能を有するAOMを分離する実験を行い、凝集阻害メカニズム解明のための知見を得た。

2. 実験方法

2.1 供試藻類及び培養方法

M.aeruginosa は国立環境研究所より提供を受けた。培地はMA培地を使用した。恒温培養槽内にて300ml三角フラスコを用い、温度25℃、照度5000lux、明暗12時間サイクルの培養条件で70rpmの回転振とう培養を行った。

2.2 試料の調整

培養液を0.22 μmメンブレンフィルター（GSWPO4700, MILLIPORE）でろ過し、ろ液200mlをロータリーエバポレーターによる真空濃縮で約10倍（20ml）に濃縮した。これを細胞外有機物質EOM（Extracellular Organic Matter）試料とした。また定常期中期、後期に関しては、EOM試料とは別の培養液を氷冷しながら超音波処理（20kHz、約60W、10分間処理、5分間休止）を6回繰り返して細胞を破壊した。処理後は、細胞内容物が水中に放出され培養液

は緑色から黄色がかった緑色に変化し、顕微鏡による観察により細胞の破壊が確認された。またろ液にも色の付着が見られた。このろ液はEOMに加えて細胞内有機物（Intracellular Organic Matter : IOM）及び細胞表面保持物質（Surface-retained Organic Matter : SOM）が含まれていると考えられたので、AOM試料とした。このAOM試料については10倍濃縮を行わなかった。

2.3 測定項目

培養液のろ液について溶存性有機炭素（DOC）、紫外線吸光度 E_{260} 、pHを測定した。また2.2で得られたEOM及びAOM試料に対してゲルクロマトグラフィーによる分子量分画を行い、得られたフラクションのDOC、 E_{260} を測定した。全体の実験手順を図1に示す。

2.4 ゲルクロマトグラフィーによる分子量分画

2.2で得られた試料についてゲルクロマトグラフィーにより分子量の分画化を行った。カラムはSuperdex200HR10/30（分画M.W.10000-600000）を使用した。バッファーには50mMリン酸ナトリウム0.15MNaCl（pH7.0）を用い、流速0.5ml/minとした。

2.5 アフィニティクロマトグラフィーによる錯体形成能を有するAOMの分離実験

藻類から生産された有機物の中からアルミニウム錯体を形成する有機物を分離した。カラムはHitrap chelating（1ml）に凝集剤（硫酸アルミニウム）をリガンドとして吸着させたものを用いた。リガンドに吸着したAOMの溶出はバッファーのpH変化により行った。開始バッファーは0.5MNaClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）とした。サンプル添加後、pH3.5に調整した開始バッファーと同じ成分を溶出バッファーとして使用し、カラムからAOMを溶出した。

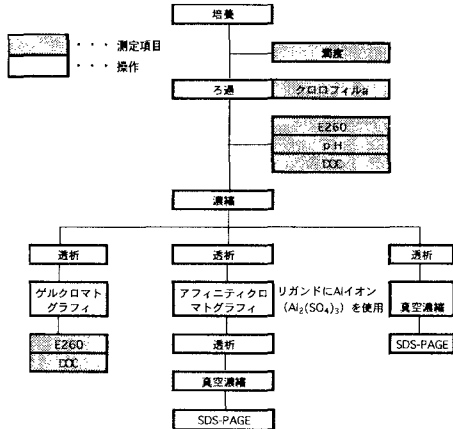
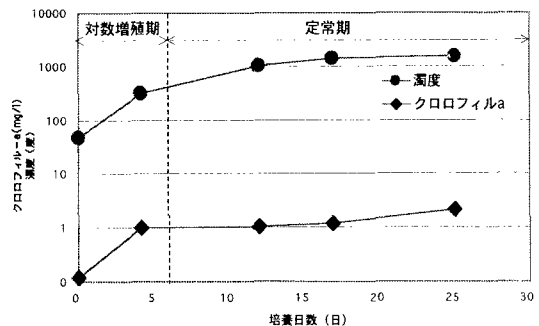


図1 実験手順


図2 *M.aeruginosa*の濁度とクロロフィルaによる培養曲線

3. 結果及び考察

3.1 培養曲線

クロロフィルaと濁度による培養曲線を図2に示す。培養開始後から対数的に増殖した期間を対数増殖期、その後緩やかに増加あるいは定常状態となった期間を定常期とし、実験は培養開始当日、対数増殖期(4日目)に1回ずつと定常期に3回(12, 17, 25日目)の合計5回行った。

3.2 ゲルクロマトグラフィによる分子量分画

定常期前期(培養日数12日目)と中期(培養日数17日目)に生産されたEOMの分子量分画の結果を図3に示す。それぞれ経過時間17分および40分付近にピークが見られた。標準タンパク質によるモデル図との比較より、M.W. 2000kDaとM.W. 10~20kDa付近の分子量に相当すると考えられた。

培養日数が経つほど有機物の生産量は増加し、特にM.W. 10~20kDaのEOMの生産量が増加するという結果が得られた。また定常期中期に生産されたEOMに対し超音波処理を施し分子量分画を行ったところ(図4)、M.W. 2000kDa付近の高分子有機物が著しく増加しており、細胞内及び細胞表面に存在するIOM+SOMはM.W. 60~2000kDaの比較的高分子の有機物を含むことが確認された。M.W. 2000kDaという高分子量から、経過時間17分付近に高いピークを示した有機物は糖であると推測される。

3.3 アフィニティクロマトグラフィによる錯体形成能を有するAOMの分離実験

アフィニティクロマトグラフィによりアルミニウム錯体形成能を有するAOMを分離した結果を図5, 6に示す。サンプル導入直後(0~10min)は錯体形

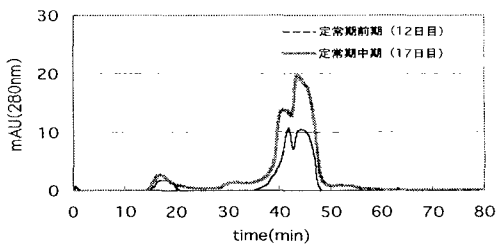


図3 定常期中期、後期に生産されたAOMの分子量分画

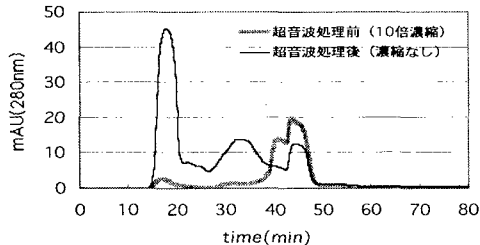


図4 定常期中期における超音波処理後のAOMの分子量分画

成能の低い有機物がカラムを素通りするため大きなピークが現れる。図5には、培養開始日~17日目のEOMに対するアフィニティクロマトグラフィの結果を示した。約25分経過後から2つのピークが現れた。0日目から12日目まではピーク①の増加が見られたが17日目には減少し、代わりに12日目に出現したピーク②がその後増加した。超音波処理前後の比較では、超音波処理後の試料は濃縮していないにも関わらず、両方のピークが超音波処理前の10倍濃縮した試料よりも上回っていた。

3.4 SDS-PAGEによるタンパク質検出

重炭酸アンモニウムによる透析後、真空遠心濃縮で約20倍濃縮したものをSDS-PAGEの試料とした。アフィニティクロマトグラフィの前後でタンパク質の検出が確認され、アルミニウムとの錯体形成能を有するタンパク質の存在が示唆された。

4. おわりに

*M.aeruginosa*が生産するAOMからアルミニウム錯体形成能を有するAOMを分離し、SDS-PAGEによるタンパク質の検出を行ったところ、アルミニウムとの錯体形成能を有するタンパク質の存在が確認された。またIOM+SOMは比較的高分子の有機物から構成され、EOMと比較してアルミニウムとの錯体形成能を有する有機物をより多く含むという結果が得られた。

5. 参考文献

- 1) 社団法人水道協会 佐藤敦久・真柄泰基編：上水道における藻類障害～安全で良質な水を求めて、技報堂出版、1996
- 2) 菅原繁：藻類の凝集阻害に関する研究、1997

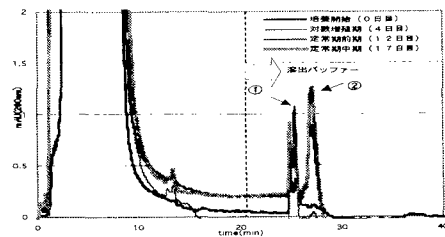


図5 アフィニティクロマトグラフィによるアルミニウム錯体形成能を有するAOMの分離

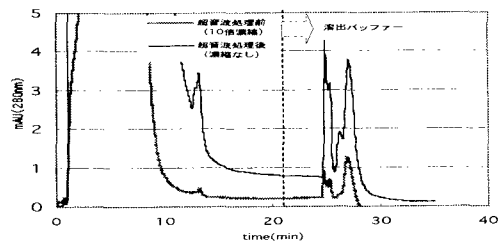


図6 定常期中期における超音波処理後のアルミニウム錯体形成能をもつAOMの分離