

VII-52

LC-MSによる *Microcystis aeruginosa* 由来凝集阻害物質の同定

東北大学 学生員 ○高荒智子

東北大学 学生員 須藤 丈

東北大学 正会員 大村達夫

1 はじめに

ダムや湖沼などの閉鎖性水域において、アオコを形成する *Microcystis* 属等の微細藻類は、浄水処理場において様々な障害を引き起こしている¹⁾。特に凝集阻害は、凝集剤や汚泥処理に係る費用の増大に繋がることで経済面への負担を拡大させるばかりでなく、残留した懸濁物質による過閉塞などの二次的問題を併発させる。このため凝集阻害に対する抜本的な対策が求められている。

凝集阻害誘因物質として、藻類由来有機物質 (Algogenic Organic Matter : AOM) が報告されているが²⁾、本研究では、*Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*) の細胞表面に存在する親水性物質に着目した。本実験では、*M. aeruginosa* 細胞自身の凝集阻害能を評価し、次に細胞表面に多く存在すると思われる *M. aeruginosa* 由来親水性物質の凝集阻害能を評価することを試みることとした。

2 実験方法

2.1 *M. aeruginosa* の培養および細胞回収

実験には *M. aeruginosa* を使用し、MA 培地で、照度 4000Lux (12時間明暗)、温度 30℃ の条件下で培養した。定常期 ($OD_{660}=0.90 \pm 0.05$) の *M. aeruginosa* を遠心分離 (1600×g, 10分, 室温) することにより細胞を回収した。

2.2 *M. aeruginosa* 細胞の凝集能評価実験

2.2.1 原水の作成

(1) *M. aeruginosa* 懸濁水の作成

2.1 で回収した細胞を生理食塩水に懸濁させ、遠心分離 (1500×g, 10分, 室温) することにより細胞を洗浄した。この操作を2回繰り返すことで細胞以外の夾雑物を除去した。

100g/L $NaHCO_3$ を添加してアルカリ度 50mg/L に調整した滅菌済み水道水に、洗浄した細胞を添加し、 $OD_{660}=0.0450 \pm 0.0005$ に調整した。最後に 1M HCl または 1M NaOH を用いて pH=7.00 ± 0.05 に調整し、これを *M. aeruginosa* 懸濁水とした。

(2) カオリン懸濁水の作成

100g/L $NaHCO_3$ を添加してアルカリ度 50mg/L に調整した滅菌済み水道水に、カオリン 20mg/L を添加し、 $OD_{660}=0.0450 \pm 0.0005$ に調整した。次に 1M HCl または 1M NaOH を用いて pH=7.00 ± 0.05 に調整し、これをカオリン懸濁水とした。

2.2.2 凝集実験

2.2.1 で作成した原水を 200mL ビーカーにそれぞれ 200mL ずつ分注し、20℃ の室温下でジャーテスターを用いて凝集実験を行った。ポリ塩化アルミニウム (Polyaluminum chloride : PAC) を表 1 に示す注入率で注入し、急速撹拌 (80rpm, 2分) および緩速撹拌

(30rpm, 15分) を行った後、10分の静置によってフロックを沈殿させた。その後 J 字型ガラス管の付いたビペットを用いて上澄水 50mL を採りし、その OD_{660} を測定した。

表 1 凝集実験における PAC 注入率

原水	PAC 注入率 (mg/L)
<i>M. aeruginosa</i> 懸濁水	10, 12, 15, 17, 50, 60, 65, 70, 90, 110, 130
カオリン懸濁水	10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 30, 35

2.3 *M. aeruginosa* 由来親水性物質の凝集能評価実験

2.3.1 phenol/water 法による親水性物質の抽出

2.1 で回収した細胞を凍結乾燥させた後、滅菌した超純水に懸濁させ、65℃ にした。その後 65℃ の 90% フェノールを等量加え vortex を施した後、65℃ で 15 分間撹拌した。次に 2℃ の水中で 15 分間静置し、遠心分離 (4000g, 30分, 2℃) することにより、混合液を水層、中間層およびフェノール層に分離後、水層のみを回収した。回収した水に再び 65℃ にした 90% フェノールを等量加え、上記と同様の操作を再び行った。最終的に得られた水を *M. aeruginosa* 由来親水性物質とした。

2.3.2 原水の作成

phenol/water 法により抽出された培養液 300mL 分の *M. aeruginosa* 由来親水性物質にカオリン懸濁水を加え、全量 300mL に調整した。この際 $OD_{660}=0.0450 \pm 0.0005$ になるようにカオリンを用いて再調整した。その後 1M HCl または 1M NaOH を用いて pH=7.00 ± 0.05 にした。尚凝集実験は PAC 注入率を 15mg/L とし、操作条件は 2.2.2 に従って行った。

2.4 *M. aeruginosa* 由来親水性物質の酸加水分解

M. aeruginosa 由来親水性物質の構成単糖を LC-MS により分析するために、親水性物質の酸加水分解を行った。まず phenol/water 法により抽出した *M. aeruginosa* 由来親水性物質に 99.5% エタノールを等量加え、遠心分離 (15000×g, 20分, 4℃) したのち上清を捨て、沈殿物を得た。次に 80% エタノールを加え、遠心分離 (15000×g, 20分, 4℃) したのち上清を捨てた。エタノールを十分に除去し、沈殿物を滅菌済み超純水に溶解させることににより、*M. aeruginosa* 由来親水性物質を精製した。

凍結乾燥させたエタノール沈殿の産物に 6N HCl を 100 μ L 添加し、95℃, 3 時間加熱することにより加水分解した。その後 HCl を除去し乾固させた。得られた乾固物を滅菌済み超純水に溶解させ、酸加水分解による産物を得た。酸加水分解を確認するために、SDS-PAGE による分離を行った。

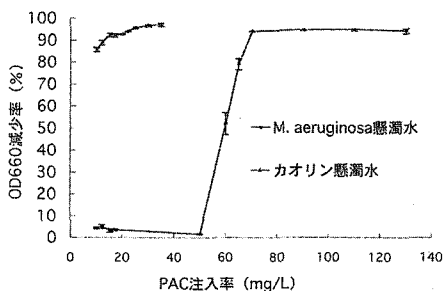


図1 *M. aeruginosa* 懸濁水の凝集実験におけるOD660減少率。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

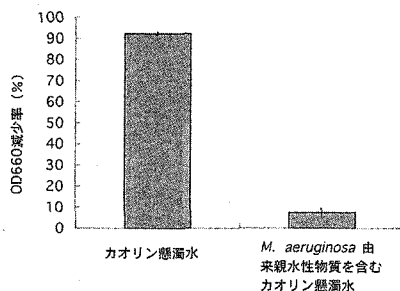


図2 *M. aeruginosa* 由来親水性物質を用いた凝集実験におけるOD₆₆₀減少率。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

3 結果及び考察

3.1 *M. aeruginosa* 細胞の凝集阻害能の評価

M. aeruginosa 懸濁水の凝集実験結果を図1に示した。*M. aeruginosa* 懸濁水は、90%以上のOD₆₆₀減少率を得るために、PAC注入率70mg/Lを必要とした。一方カオリン懸濁水においては、OD₆₆₀減少率90%を得るために、PAC注入率15ppmを必要とした。両者を比較すると、*M. aeruginosa* 懸濁水は90%以上のOD₆₆₀減少率を得るために、カオリン懸濁水と比較して、約4.6倍高いPAC注入率を示し、*M. aeruginosa* 懸濁水において凝集阻害の発生が確認できた。またPAC注入率50mg/L以下において、緩速攪拌後の*M. aeruginosa* 懸濁水を観察したところ、フロック形成が行われていなかった。この原因として、*M. aeruginosa* 細胞を荷電中和するためにより多くPACが消費されたか、もしくは細胞表面の有機物によって、PACの加水分解の進行が阻害され、フロック形成が行われなかった可能性が考えられた。したがって細胞において直接的に凝集剤と接触すると考えられる細胞表面の親水性物質が凝集阻害に関与した可能性が示唆された。

3.2 *M. aeruginosa* 由来親水性物質の凝集阻害能の評価

3.1により、*M. aeruginosa* の細胞表面に存在する親水性物質による凝集阻害が示唆されたことから、*M. aeruginosa* 由来親水性物質の凝集阻害能評価のための凝集実験を行った。

M. aeruginosa 由来親水性物質を含む原水の凝集実験におけるOD₆₆₀減少率を図2に示した。カオリン懸濁水のOD₆₆₀減少率が92.4%を示したのに対し、*M. aeruginosa* 由来親水性物質を含むカオリン懸濁水のOD₆₆₀減少率は7.5%を示した。これより、phenol/water法により抽出した*M. aeruginosa* 由来親水性物質による凝集阻害が確認された。この原因として*M. aeruginosa* 由来親水性物質がカオリン粒子の表面に付着したか、あるいは*M. aeruginosa* 由来親水性物質が直接PACに作用することによって、カオリンの凝集を妨害したと予想された。

3.3 *M. aeruginosa* 由来親水性物質の酸加水分解

phenol/water法により抽出した*M. aeruginosa* 由来親水性物質には、細胞表面のリポ多糖などの高分子有機物が含まれている。

M. aeruginosa 由来親水性物質を単糖に分解し、LC-MSによる分析を行うために、エタノール沈澱により精製した後、酸加水分解した。酸加水分解後の産物をSDS-PAGEにより分離した。泳動後、ゲルを銀染色により染色した結果を図3に示した。酸加水分解前の物質は30kDa程度の位置に存在していた。酸加水分解後の物質は14kDa以下に存在しており、*M. aeruginosa* 由来親水性物質は酸加水分解されたと考えられた。現在酸加水分解により得られた産物をLC-MSにより分析中である。

4 おわりに

M. aeruginosa 懸濁水を用いて凝集実験を行った結果、*M. aeruginosa* 細胞による凝集阻害が確認された。phenol/water法により抽出した*M. aeruginosa* 由来親水性物質をカオリン懸濁水に添加して凝集実験を行った結果、親水性物質による凝集阻害がみられ、*M. aeruginosa* 由来親水性物質が凝集阻害誘因物質として作用することが確認された。

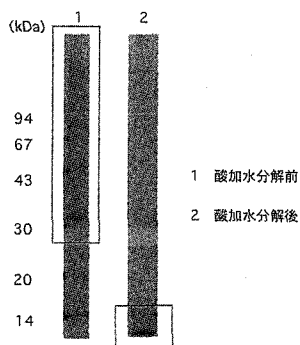


図3 酸加水分解産物のSDS-PAGE結果。

参考文献

- 1) 菅原繁, 黒川眞弓, 眞柄泰基, 胡建英, *Microcystis* spp. コロニーの細胞由来有機物 (AOM) が凝集処理に与える影響, 1996, 水道協会雑誌, Vol.65, No.8, 39-50
- 2) 佐藤敏久, 眞柄泰基, 上水道における藻類駆除-安全で良質な水道水を求めて, 技法堂出版, 1996