

# *Anabaena macrospora* の休眠細胞内ジオスミン含有について

東北大学工学部 学生会員 ○鈴木 有咲海  
東北大学大学院工学研究科 正会員 野村 宗弘  
東京都水道局 非会員 矢島 悠一  
東北大学工学部・工学研究科 非会員 田中 伸幸  
東北大学大学院工学研究科 正会員 西村 修

## 1 はじめに

日本全国で、水源における水へのカビ臭着臭が問題となっている。カビ臭が着臭した水を取水した浄水場では処理のために新たなプロセスやコストが発生する。既往の研究において、水のカビ臭原因物質は 2-MIB やジオスミンという物質であるということがわかっている。これらの物質を産生する生物として *Anabaena* 属や *Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属、放線菌が挙げられてきた。しかし、最近になって原因物質を産生する生物が新たに確認されたり<sup>1)</sup>、原因物質産生生物とされる生物の増加とカビ臭原因物質の増加との相関が不明瞭な水域がある<sup>2)</sup>など、カビ臭問題解決のためには、原因物質産生生物のさらなる究明が必要と考えられる。ところで現在、ジオスミンを産生する藻類である *Anabaena* 属は、休眠細胞を作ることでも知られている。しかし休眠細胞を大量に形成・回収する技術がこれまで確立されていなかったこともあり、*Anabaena* 属の休眠細胞がジオスミンを産生するかどうか研究した例はない。そこで、本研究では *Anabaena* 属の休眠細胞内を大量に形成し、その休眠細胞の細胞壁を破碎して、休眠細胞内にジオスミンが含まれているのかを検討した。

## 2 実験方法

今回の実験に供した *Anabaena* 属は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの *Anabaena macrospora* の継代培養株である。

### (1) *A. macrospora* の大量培養

CT 培地を入れた試験管 100 本で 4 週間 *A. macrospora* を培養した。その後、同じく CT 培地を入れた 300ml フラスコ 80 個に移し、さらに 4 週間培養した。どちらも条件は水温 20°C、照度 5,000Lx、明暗周期 12L-12D とした。

### (2) 細胞を多く含む培養液の採取

フラスコで 4 週間培養した培地を 1L 分液漏斗に入れ、水温 20°C、照度 5,000Lx、明暗周期 12L-12D の条件下で 12 時間静置した。その後、分液漏斗底部約 10% から休眠細胞を多く含む培養液 (sample A) と水面近くの栄養細胞を多く含む培養液 (sample B) をビーカーに採取した。採取した培養液それぞれを孔径 0.2µm の MEMBRANE FILTER を使って濾過し、フィルター上に細胞を捕集した。フィルターにミリ Q 水を少量かけながら、超音波細胞破碎 (MicrosonXL -2000) を使って細胞を剥ぎ取り、50ml ファルコンチューブに入れた。

### (3) 休眠細胞の精製

分液漏斗底部から採取した培養液 (sample A) のファルコンチューブからは、休眠細胞のみを回収するために、栄養細胞を超音波で破碎した。破碎後の培養液を再び濾過し、フィルター上に捕集された休眠細胞のみを 50ml ファルコンチューブに入れた。

### (4) 細胞壁の破碎

細胞内に含有していると考えられるジオスミンの全量を GC-MS 分析で検出させるために、細胞壁を破碎し、サンプル液体中にジオスミンを溶出させた。それぞれのファルコンチューブに入れた細胞の細胞壁を超音波にかけ、顕微鏡で観察しながら、細胞の形状が確認されなくなるまで破碎した。

### (5) ジオスミンの測定

ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ-質量分析法を用い、サンプル中のジオスミン濃度を測定した。サンプル量は 10ml とし、その中に 500°C で 2 時間強熱した NaCl を 5g 入れた。また、測定条件は表 1 で示した通りとした。

keywords : ジオスミン, *Anabaena*, カビ臭, 休眠細胞

連絡先 : 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学工学部 建築・社会環境工学科 環境生態工学研究室

TEL:022-795-7473 FAX:022-795-7471

表 1 測定条件

GC	Agilent 6890N
MS	Agilent 5975C
カラム	HP5ms (内径:0.25mm, 膜厚:0.25 $\mu$ m, 長さ:30m)
カラム温度	40°C(1分保持)→220°C(10°C/分)
キャリアーガス	99.999v/v%以上ヘリウムガス, 1.0ml/min
イオン化電圧	電子衝撃イオン化電圧 70V
フラグメントイオン(ジオスミン)	112, 111, 125
フラグメントイオン(2-MIB)	95, 107, 135

### (6) 細胞内ジオスミン量算出

休眠細胞内ジオスミン量は、サンプル内ジオスミン量[ng]を細胞壁破壊前のサンプル内細胞数[cell]で割ることにより算出した。栄養細胞内ジオスミン量は、サンプル内ジオスミン量から休眠細胞ジオスミン量を引いたものをサンプル内栄養細胞数で割って算出した。

## 3 結果

### (1) 休眠細胞の精製

分液漏斗底部から採取した sample A は、休眠細胞と栄養細胞が図 2(a)のように混在している状況であった。栄養細胞よりも休眠細胞の方が超音波破碎の影響を受けないため、これを利用して超音波細胞破碎機をメモリ 3 で 240[s]かけて栄養細胞を破碎した。その結果、図 2(b)のように栄養細胞を破碎し、休眠細胞のみを回収することができた。

### (2) 細胞壁の破碎

sample A には超音波細胞破碎機をメモリ 20 で 14 40[s]かけ、sample B には超音波細胞破碎機をメモリ 20 で 240[s]かけることにより、細胞壁を破碎できた。図 3 に示すように、細胞壁が破碎され、細胞の形状が確認されなくなった。

### (3) 細胞内ジオスミン量

休眠細胞内ジオスミン量は、サンプル内ジオスミン量[ng]を細胞壁破壊前のサンプル内細胞数[cell]で割ることにより算出した。栄養細胞内ジオスミン量は、サンプル内ジオスミン量から休眠細胞ジオスミン量を引いたものをサンプル内栄養細胞数で割って算出した。休眠細胞内のジオスミン量は  $1.00 \times 10^{-5}$  ng/cell、栄養細胞内のジオスミン量は  $5.12 \times 10^{-7}$  ng/cell であり、休眠細胞内のジオスミン量が、栄養細胞内のジオスミン量より大きい結果となった。なお、図 4 の結果は平均値±標準偏差(n=3)で示している。

## 4 考察

これまで、休眠細胞内のジオスミンについて着目した研究は無かったが、休眠細胞内にもジオスミンが含まれていることが明らかになり、水へのカビ臭着臭の

原因となっている可能性が考えられる。そのため、今後は水域における休眠細胞とジオスミン濃度の相関についても検討してみる必要が出てきた。また、休眠細胞は藻類異常増殖への寄与については問題視されており、発芽させない方法などが検討されてきた<sup>3)</sup>が、休眠細胞によるカビ臭問題への寄与が考えられる場合、発芽しなければ良いわけではなく、休眠細胞自体を除去させなければならない。休眠細胞を除去するためには、休眠細胞と栄養細胞の間にある異なった生理・生態<sup>4)</sup>を考慮した対策を考える必要がある。

## 5 まとめ

本研究で、*A. macrospora* の休眠細胞内にジオスミンが含まれていることがわかった。

### 謝辞

本研究は科研費 24560657 の助成を受けたものである。ここに記して感謝の意を表す。

### 参考文献

- 1)島根環境政策課,オンライン,  
(<http://www.pref.shimane.lg.jp/environment/kankyo/kankyo/taiki/kabi.data/110331.pdf>), 2013年1月25日参照
- 2)岩崎ら,茨城内水試調研報 36,24-35,2000
- 3)辻村,第9回河川整備基金助成事業成果報告書,104-112,2002
- 4)板倉,瀬戸内水研報,2,67-130,2000

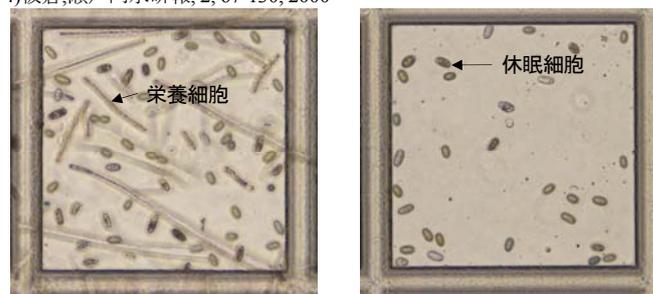


図 1 栄養細胞分離前後

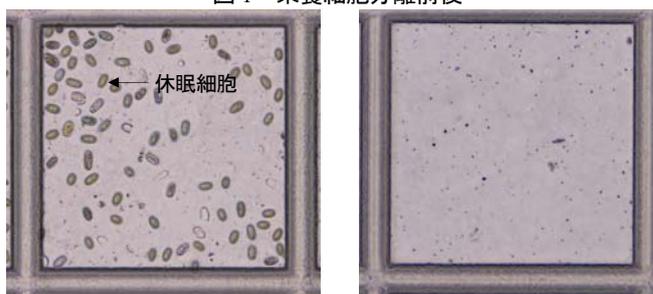


図 2 細胞壁破碎前後

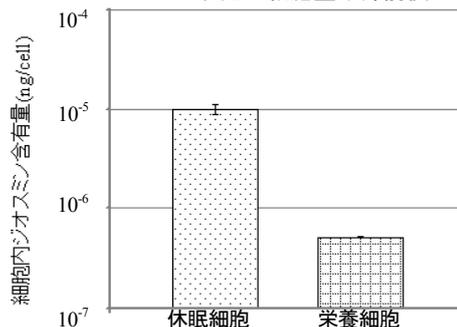


図 3 細胞内ジオスミン含有量