

藻類の活性度把握のための電子スピン共鳴装置適用の試み

東北学院大学大学院	学生員	○菅野雅文
東北学院大学	フェロー	石橋良信
東北学院大学	正会員	韓 連熙
東北学院大学大学院	非会員	藤原丈二
東北学院大学	非会員	菅原拓巳

1. はじめに

最近、山形県西置賜郡飯豊町の白川ダムや青森県黒石市の浅瀬石川ダムでかび臭が発生するなど、東北地方北部でかび臭の発生がみられている。

発生原因の1つとして、北方の温暖化に伴い、各ダムの水温が上昇し、*Oscillatoria limnetica*などの藍藻類が大量発生したことにより、かび臭も発生したと推察されている。かび臭を産出する藍藻類の異常増殖の度合いは水温に影響され、言い換えれば、生物の活性に深く関わりをもっている。藍藻類をはじめ、微生物の増殖を制御するためにも、活性の度合いを予測するのが重要である。微生物の活性は、増殖曲線を描く方法やATPを測定するなどの従来からの方法を行われてきた。しかし、それらの方法は活性を把握するのに時間を要し、効率的ではないと考えられる。そのため、簡便で、より迅速に微生物の活性を測定する方法を確立させる必要がある。

本実験では、生体内で呼吸や光合成反応の過程で、電子により酸素が還元されたときに生成されるヒドロキシルラジカルなどの活性酸素を生じるのが多いことに着目し、フリーラジカルなどを唯一直接的に捉えられるESR装置で活性酸素の測定を試み、微生物の活性の指標化を図ることを目的とした。

2. 実験方法

本研究で対象にした菌株 *Oscillatoria limnetica* は、国立環境研究所微生物系統保存施設より購入し、実験に供した。

O. limnetica を 11, 18, 20, 23, 28℃台の各温度下、蛍光灯により 1,000~1,200 lux の照度で、容積が 4.5 mL のプラスチックセルを用いて純粋培養を行いつつ、分光光度計で微生物の量を測定した。ただし、各温度における代表の3サンプルの個体数だけを測定し、他サンプルの個体数は近似値であるとみなした。

ESR装置でヒドロキシルラジカル量を測定したのは、培養してから1日目、3日目、5日目に行った。また、ESR装置で測定する際に、温度別に毎回違うセルから *O. limnetica* を 8 µL そのまま採取し、50 mM のスピントラップ剤 CYPMPO を 32 µL 入れ、ピペッティングを 20 回し、ボルテックスを 1 分間かけて、CYPMPO の最終濃度を 40 mM にしてから行った。

3. 実験結果および考察

表に、各温度における培養日数に伴う *O. limnetica* の吸光度と ESR スペクトルの高さを示す。

全体的に、培養1日目より3日目の方が活性酸素の量が多いという結果となった。この結果より、1日目から3日目にかけて *O. limnetica* が温度に慣れようとしたためだと推察される。

3日目から5日目においては、各温度において次のような結果が得られた。

培養温度が 11℃および 18℃は個体数が若干ではあるが増加傾向にあり、20℃台も個体数が増加傾向にあり、それぞれの ESR スペクトルの高さは低下または変わらない結果となった。理由として、*O. limnetica* が 5 日目程から 11℃、18℃の環境に慣れてきて、体内の代謝活動が落ち着いてきたため、活性酸素の量が低下または一定になったのではないかと考えられる。

また、表の 11℃②、20℃、28℃の結果から、培養の3日目、5日目において、*O. limnetica* の適性温度である 20℃や 28℃で培養した方が 11℃で培養したときより、活性酸素が多く発生したので、活性があると判断される。したがって、生体内で発生する活性酸素は周りの温度に影響しているが影響しているのであろうと推測される。

キーワード：ESR 装置 活性 活性酸素 増殖曲線

住所：多賀城市中央一丁目 13-1、電話：022-368-7418、FAX：022-368-7070

さらに、表の 11℃の①と②の結果を比較したとき、OD 測定値が多いときの方が活性酸素も多く検出されたことが確認された。

表 培養日数に伴う *Oscillatoria limnetica* の吸光度と ESR スペクトルの高さ

培養温度	11℃①						培養温度	20℃					
培養日数	1	2	3	4	5	6	培養日数	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.17	0.18	0.18	0.19	0.20		吸光度	0.32	0.39	0.39	0.40	0.40	0.41
	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15			0.25	0.28	0.28	0.34	0.35	0.33
	0.14	0.14	0.14	0.16	0.16			0.24	0.27	0.27	0.28	0.26	0.25
ESRスペクトルの高さ (mm)	7		8		4		ESRスペクトルの高さ (mm)	5		17		11	

培養温度	11℃②						培養温度	23℃					
培養日数	1	2	3	4	5	6	培養日数	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.30	0.32	0.30	0.30	0.31	0.31	吸光度	0.11	0.13	0.15	0.15	0.17	0.18
	0.27	0.32	0.29	0.29	0.28	0.29		0.10	0.13	0.13	0.14	0.15	0.16
	0.27	0.27	0.27	0.28	0.24	0.24		0.10	0.09	0.11	0.12	0.13	0.13
ESRスペクトルの高さ (mm)	4		11		11		ESRスペクトルの高さ (mm)	0		7		7	

培養温度	18℃						培養温度	28℃					
培養日数	1	2	3	4	5	6	培養日数	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	吸光度	0.27	0.35	0.45	0.44	0.44	0.44
	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07		0.27	0.37	0.42	0.44	0.45	0.44
	0.07	0.09	0.10	0.10	0.11	0.11		0.28	0.36	0.46	0.46	0.45	0.46
ESRスペクトルの高さ (mm)	0		6		0		ESRスペクトルの高さ (mm)	0		15		15	

4.おわりに

現在まで、微生物の活性を測定は、一般的に増殖曲線や ATP 量を測定する方法や個体の数の変化を観測し、微生物の増殖がどの程度活発に進行しているかを把握する方法がある。しかし、これらの方法では、活性を確認するのには長時間が必要となり、効率的ではないと考えられる。そのため、簡便で、より迅速な微生物の活性または増殖の度合いを推測可能な方法を確定させる必要がある。

本研究は、簡便で、より迅速に微生物の活性を測定する方法として、生体内で呼吸や光合成などの代謝反応の過程で、電子により酸素が還元されたときに生成されるヒドロキシルラジカルなどの活性酸素を生じることに着目し、ESR 装置を用いた水系の藍藻類の活性の指標化を図ることを目的とした。

実験方法は、*Oscillatoria limnetica* を対象に ESR 装置を用いて温度別に活性酸素を測定し、活性酸素の量と増殖曲線の比較を行った。

O. limnetica を 11, 18, 20, 23, 28 ℃台の各温度で培養した結果、それぞれ活性酸素が検出され、活性があると判断した。また、10℃台で培養していても、個体数は若干であるが増加傾向にあり、活性酸素量は 1 日目から 3 日目からは増加し、以降は減少するまたは一定になる傾向がみられた。この傾向から、1 日目から 3 日目にかけて *O. limnetica* が培養する環境に慣れようとして活発になり、5 日以降は環境に順化したからだと考えられる。また、培養の 3 日目、5 日目において、*O. limnetica* の適性温度である 20℃や 28℃で培養した方が 11℃で培養したときよりも活性酸素が多く発生したことが確認された。したがって、生体内で発生する活性酸素は周りの温度に影響しているのであろうと推測される。

ESR 装置の適用にあたり、活性酸素は真核生物のミトコンドリアを介して産生される。藍藻類は原核生物であり、ミトコンドリアは有していない。なお、原核生物でも活性酸素が生じるとの報告もわずかにみられている。本実験では、藍藻類を用いた状況において活性酸素が検出されたときの特徴あるスペクトルがみられ、原核生物でも活性酸素が産生できるということが明らかになる証拠を見出したことは重要な知見と考えている。

今後は、培養する微生物の量を増したり、別の藍藻類を用いたり、スピントラップ剤 CYPMPO の最終濃度を上げるなど実験の更なる検討や改善を重ね、ESR 装置を用いる方法が微生物の活性の指標化になりうるかを検討していく。