

B-0805 湖内生産および分解の変化と難分解性有機物を考慮した有機汚濁メカニズムの解明
に関する研究

(2) 植物プランクトンの培養技術の確立に関する研究

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 生物圏担当
龍谷大学理工学部
東レテクノ株式会社環境科学技術部

一瀬 諭・古田世子
岸本直之
馬場大哉・八嶋 博

平成20～21年度 合計予算額	6,894 千円
(うち、平成21年度予算額	2,767 千円)

予算額には、間接経費を含む。

[要旨] 琵琶湖に出現する植物プランクトンの長期観察の結果、近年、細胞の周囲に粘質鞘を持つ種が増加する傾向が見られており、藻体および粘質鞘が含有する有機物の量、分解特性および粘質鞘を構成する有機物の種類を明らかにすることは、湖内における一次生産量を初めとする湖内における物質循環、プランクトンの増殖機能を研究する上の基礎データを提供すると考えられる。しかしながら、琵琶湖に出現する多種の植物プランクトンに含有される有機物について、細胞質と粘質鞘に分離し、さらに、水質管理指標として用いられている各種指標 (TOC、COD) や構成する物質について分析データを取得した事例が少ない。そこで、本研究では、複数の植物プランクトンについて、これらの検討を行う際必要な試料量を得るために、大量培養技術の確立を行い、13属21種の琵琶湖産植物プランクトンの大量培養に成功した (平成20年度)。また、大量培養によって得られた試料を用いて、粘質鞘と細胞質を分離する手法を検討し、粉碎器による粉碎後に遠心分離する方法により、粘質鞘が比較的良好な状態で分離することを確認した。さらに、精製して得られた粘質鞘に含まれる有機物の各種指標値の測定を行った。その結果、*Tetraspora* sp. の粘質鞘では、BODが 124 mg/g・dry、CODが 445 mg/g・dry、TOCが 415 mg/g・dry であり、琵琶湖の夏期に見られる有機物より、COD値に寄与しにくい特性を有していることが示唆された。また、3種の植物プランクトンで金属元素を測定した結果、Na、Mg、Si、P、K、Ca、Fe、Zn、Ba の9元素が検出され、種による含有濃度の差が見られた。

[キーワード] 琵琶湖、植物プランクトン、大量培養、粘質鞘、有機物含有量、微量元素

1. はじめに

植物プランクトン中の有機物量を測定するためには、分析感度、分析精度および分析操作上、粘質鞘や細胞質の体積として、分離精製後に概ね1～2 mLの精製された試料が必要であるが、天然株では、任意の時期に、試験に十分な量を安定的に確保するのが困難であるため、各種プランクトンの大量培養技術の確立を行った (平成20年度)。粘質鞘と細胞質を分離する方法についての既存の研究では、分離後の定量分析を目的としていないため、分離時の粘質鞘が流失し、他の有機物が混入しているものが多い。本研究では、分離後の粘質鞘と細胞質が含有する有機物量を

測定することに配慮した分離手法について検討を行った。

2. 研究目的

植物プランクトンによる内部生産を把握するための基礎データとして、粘質鞘と細胞質に含まれる各種有機物指標値等を測定することを目的とし、これに必要な、大量培養技術の確立および、分析に必要な粘質鞘と細胞質を得るための分離手法を検討した。

3. 研究方法

(1) 植物プランクトンの大量培養技術の確立（平成20年度）

琵琶湖より採取した植物プランクトン細胞について、単離操作を行った後、M-11 培地またはCT 培地を用い、一次培養（試験管培養）、二次培養（数百 mL サイズでのフラスコ培養）、三次培養（5～10Lサイズの大量培養）を行った。種毎に増殖特性が異なるため、単離操作での洗浄回数、培養サイズ毎の移植タイミング、培養温度等について検討を行った。

(2) 細胞質と粘質鞘の分離試験

植物プランクトンの分離方法として、既存研究等（Michihiko et. al., 1987）により、物理的作用、化学的作用など、14手法が考えられた（表2.1）。本研究では、表 2.1 中、印をつけた7手法について検討を行った（一部は、平成20年度検討）。

表 2.1 植物プランクトンの粘質鞘分離方法

分類	連番	手法	検討実施
物理的作用利用	1	強振	○ (H2O)
	2	熱処理（温浴）	○
	3	微粒子混在	
	4	噴射衝撃	
	5	超音波処理	○ (H2O)
	6	物理破碎	○
	7	水洗除去	○
化学反応利用	8	酵素	○
	9	薬剤（抗生物質）	
	10	pH条件	○
助剤利用	11	EDTA 処理（Ca除去）	
	12	陽イオン交換樹脂（Ca除去）	
細胞質固化	13	ホルムアルデヒド + NaOH	
	14	グルタルアルデヒド	

4. 結果・考察

(1) 植物プランクトンの大量培養技術の確立 (平成20年度)

検討を行った各種プランクトンについて、単離操作での洗浄回数、培養サイズ毎の移植タイミング、培養温度等について検討を行った結果、13属21種の琵琶湖産植物プランクトンの大量培養に成功した (図 2.1)。

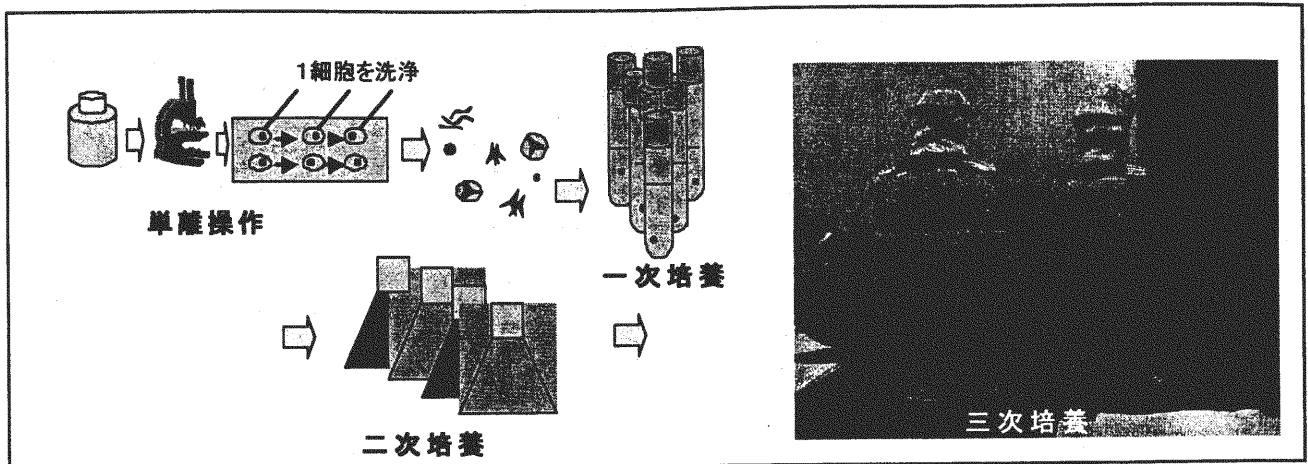


図 2.1 植物プランクトンの大量培養イメージ

(2) 細胞質と粘質鞘の分離試験

各種手法について、粘質鞘と細胞質の分離試験を行った結果、粉碎器によるホモジナイズ (図 2.2 の 6) 後に遠心分離精製する方法により粘質鞘を分離精製することができた。また、粘質鞘を洗い流し、細胞質を残す方法として、水洗除去法 (図 2.2 の 7) が有効であった。

ホモジナイズ後遠心分離精製する手法を用いて、*Tetraspora* sp. の各種有機物指標を測定した結果を表 2.2 に示した。測定の結果、粘質鞘の有機物指標は、BODが 124 mg/g · dry、CODが 445 mg/g · dry、TOCが 415 mg/g · dry であり、BOD/COD は 0.28、BOD/TOC は 0.30 であった。琵琶湖北湖の BOD/COD が 0.16、BOD/TOC が 0.31 であることから、本種の粘質鞘は、COD指標に寄与しにくい特性を有していることが示唆された。

また、水洗除去法により得られた試料中の微量元素を測定したところ、Na、Mg、Si、P、K、Ca、Fe、Zn、Ba の 9 元素が検出され、種による含有濃度の差が見られた (表 2.3)。※平成19年度琵琶湖北湖中央夏期平均値 BOD:0.5 mg/L、COD:3.1 mg/L、TOC:1.6 mg/L (滋賀県, 2008) より計算

表 2.2 粘質鞘中の各種有機物指標測定値

項目	含有濃度 (mg/g · dry)
BOD	124
COD	445
TOC	415
水分率	99.89 %

使用株 : *Tetraspora* sp.

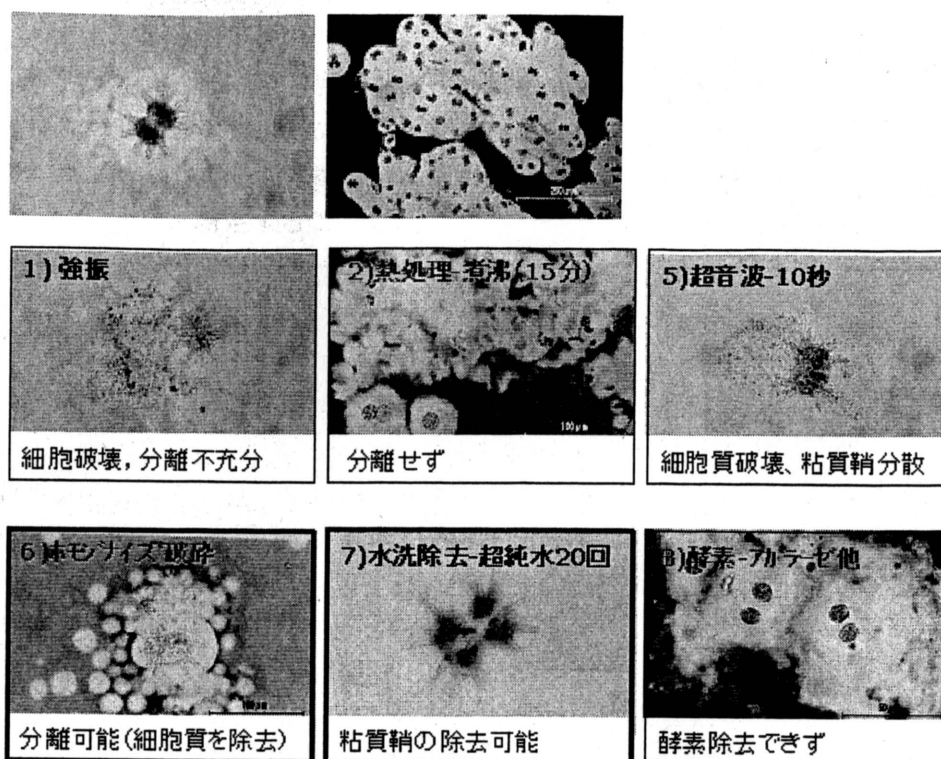


図 2.2 粘質鞘と細胞質の分離方法検討結果 (上段: 分離前の状態、中下段: 分離後の状態)

表 2.3 水洗除去法による培養株の微量金属元素分析結果

種名	PTG	SEL	STD (粘質鞘込み)	STD (細胞質のみ)	STD (粘質鞘のみ)	
細胞数(cells/mL)	5788800	2204000	75600	75600	-	
ろ過量(mL)	10	10	10	10	-	
ろ過重量(g-dry)	0.0004	0.0005	0.0018	0.0017	-	
細胞重量(pg/cell)	7.34	20.42	2407	2222	185	
元素量(pg/cell)	TOC	3.4	7.4	1039	958	81
	TON	0.5	0.9	93	85	8.6
	Na	2.1	5.7	168	171	-
	Mg	0.05	0.1	9.9	6.8	3.0
	Si	0.6	1.7	47	65	-
	P	<0.35	<0.35	<27	<27	-
	K	0.6	1.5	54	50	3.4
	Ca	0.1	0.3	16	13	2.5
	Fe	0.0	0.1	12	11	0.9
	Zn	0.3	0.9	27	30	-
	Ba	0.3	0.8	23	26	-
合計	8.2	20.1	1509	1438	71	
元素含有量(μ g/mg)	TOC	437	431	450	428	22
	TON	68	53	41	38	2.7
	Na	303	251	67	79	-
	Mg	7.1	4.9	3.9	3.1	0.8
	Si	82	76	19	30	-
	P	<50	<5	<11	<13	-
	K	87	68	21	23	-
	Ca	15	13	6.3	6.1	0.2
	Fe	2.6	3.5	4.7	5.0	-
	Zn	48	40	11	14	-
	Ba	44	35	9.0	12	-

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

大量培養技術の確立により、いままで測定が出来なかった粘質鞘等中の物質を測定することが可能となった。また、粘質鞘と細胞質を分離する技術を開発したことにより、植物プランクトンの粘質鞘の有機物指標値の測定が可能となった。本法を各種プランクトンに応用することにより、植物プランクトンのバイオマスが湖内の有機物循環に与える影響を知る上での、基礎データを取得することが可能である。

(2) 環境政策への貢献

本サブテーマの目的は琵琶湖の植物プランクトンバイオマスを炭素量および各種有機物指標値として正確に評価することであり、引き続き、そのための技術的手法を検討、開発しているところである。湖内の有機物量を定量的に把握することは湖沼管理を行う上で不可欠な基礎情報であり、本サブテーマはその基礎情報およびその手法を提示することで、今後の琵琶湖および他の湖沼における水質管理技術の向上に貢献するものである。

6. 引用文献

滋賀県(2008): 滋賀の環境 2008(平成20年度版滋賀県環境白書) - 資料編 - , pp.25-42

Michihiko, N., Yoshichika, T., Osami, Y. (1987) Isolation and Characterization of Slime from a Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A, *Agric. Biol. Chem.*, 51(2), 329-337

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

なし

<その他誌上発表(査読なし)>

なし

(2) 口頭発表(ポスター発表; 学会)

- 1) 馬場大哉、一瀬 諭、古田世子、岸本直之: 琵琶湖の植物プランクトンの粘質鞘と藻体の分離技術について」日本陸水学会本陸水学会講演要旨集、Vol. 74, (2009), pp.52

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

なし

(5) マスコミ等への公表。報道等

なし

(6) その他

なし