

細菌の低温培養とアルカリ性ホスファターゼ活性

磯貝知香・広谷博史（大阪教育大・教）

1. はじめに

アルカリ性ホスファターゼは、環境中の有機リンを分解して溶存反応性リン (SRP) を生成する酵素であり、藻類や細菌によって生産される。そのため、環境中のリン濃度の目安となるのではないかと考えられてきたが、細菌に関しては、環境中のリン濃度に関係なく生成・分泌しているとの指摘もある。

ダム湖の調査によって、アルカリ性ホスファターゼ活性 (APA) とプレート法で測定した従属栄養細菌には有意な関係が認められ

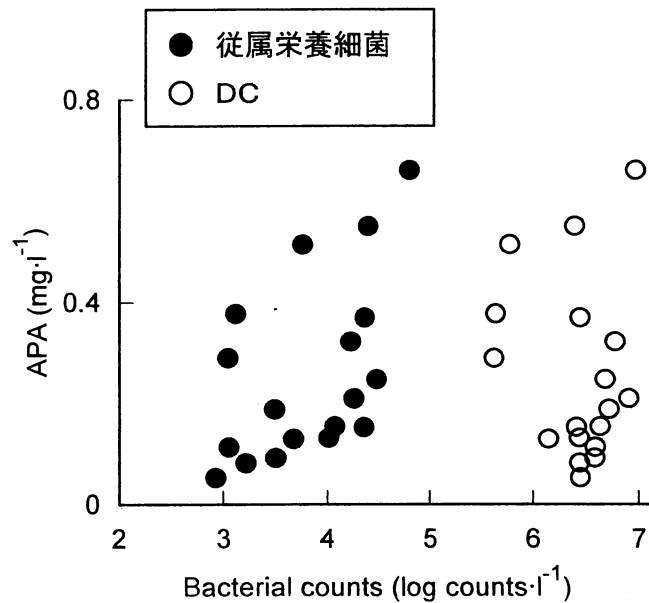


図1 ダム湖調査

(図1)、無光層のアルカリ性ホスファターゼは細菌に由来するということが示されている¹⁾。しかし、APAとDirect Countで測定した全菌数には有意な関係は認められなかった(図1)。また、細菌は生きてはいるけれど培養できない(VBNC: Viable But Non Culturable)状態に陥ることが知られている。これは急激な温度低下や飢餓といった生存の危機に対する防御反応であり、生存のために増殖を抑制すると考えられている。

そこで、本研究では細菌がVBNC状態に陥ることによって、APAにどのような影響があるのかを、調べることを目的として、*Escherichia coli*を用いた低温栄養培養を行った。

2. 実験の概要

*E. coli*を用いて低温培養実験と低温低栄養培養実験を行った。

両実験とも、前培養は液体のF培地で行い、そこから、本培養用の培養液が入った三角フラスコに入れてよく攪拌し、36°Cのインキュベーター内で24時間静置培養を行った。その後、4°Cで静置培養を開始した。温度変動を防ぐため、サンプルと温度計を入れた発泡スチロールの箱ごと冷蔵庫内に入れ、培養を行った。ただし、低温低栄養培養実験については、最後の約1週間を4°Cの静置培養から36°Cのインキュベーター内での静置培養に戻した。実験項目は、APAと全菌数、生菌数、コロニー形成細菌数の4つとした。

低温培養実験では、培養液は F 培地を用い、培養は約 1 ヶ月半行った。低温低栄養培養実験では、リン栄養を除去した F 培地と滅菌水の 2 種類を培養液として用いて各 2 連で行い、培養は約 4 ヶ月行った。

3. 結果と考察

低温培養実験では、ほとんど変化がなかったコロニー形成細菌数に比べ、生菌数は増加していた。APA は、その間も低下し続けていた (図 2)。

低温低栄養培養実験では、96 日目まで、コロニー形成細菌数と生菌数に変化は見られなかった (図 3)。しかし、102 日目以降は、コロニー形成細菌数が減少し、生菌数が増加していた。また、APA は、その間も低下し続けていた。4℃から 36℃の培養へと戻すと、ただちに菌数はともに増加し、APA も高くなった。

このことから、*E.coli* を VBNC 状態に誘導できたと考えられた。APA は VBNC 状態とは関係なく、低下し続けていたことから、増殖を抑制されるとアルカリ性ホスファターゼの分泌が抑制されると考えら

れた。また、長期にわたる 4℃での低温培養において、細菌は、アルカリ性ホスファターゼ分泌能力を失うことはなく、増殖を開始するとただちにアルカリ性ホスファターゼを分泌するということがわかった。

4. 参考文献

1) 広谷博史, 中川歩, 香川尚徳 (2004) アルカリ性ホスファターゼ活性のダム湖内鉛直分布, 水環境学会誌, 27, 175 - 180.

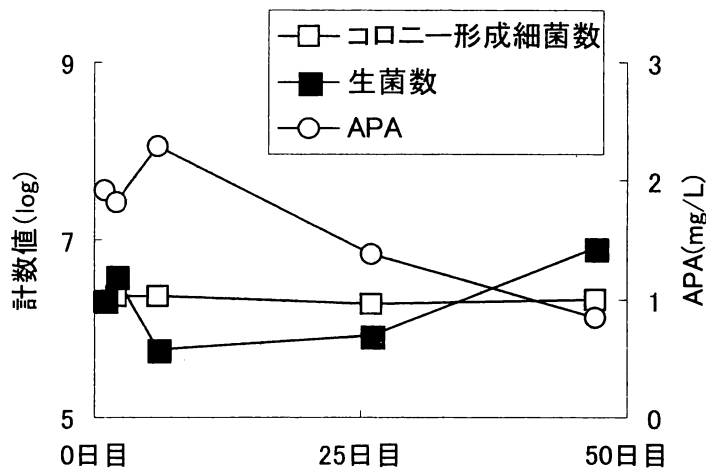


図 2 低温培養実験

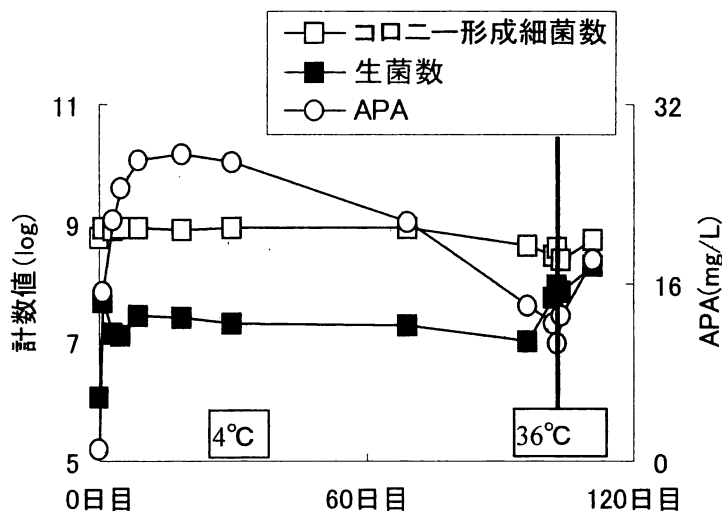


図 3 低温低栄養培養(F培地-リン除去)