

1. はじめに

炭鉱や金属鉱山の排水路にバイオフィルムを形成する底生ミドリムシ種は、強酸性で高濃度の重金属を含む排水に耐性を持ち、酸性排水の水質形成に大きな役割を担っていることが知られている^{1) 2)}。この底生ミドリムシ種に関する報告は大変限られており、その生育環境や生活史、増殖などの生態的特性や、培養条件などに関する詳細な情報はまだ得られていない。

本研究では、この底生ミドリムシ種を、石炭、褐炭の採掘地や旧炭坑からの坑排水の水質改善や重金属類の除去、回収に利用することを最終目的として、(1) 底生ミドリムシ種の分布や生育環境を明らかにする、(2) 増殖や培養条件を明らかにする、(3) 水質形成や重金属吸収機能を評価することを具体的な目的とした研究を行った。

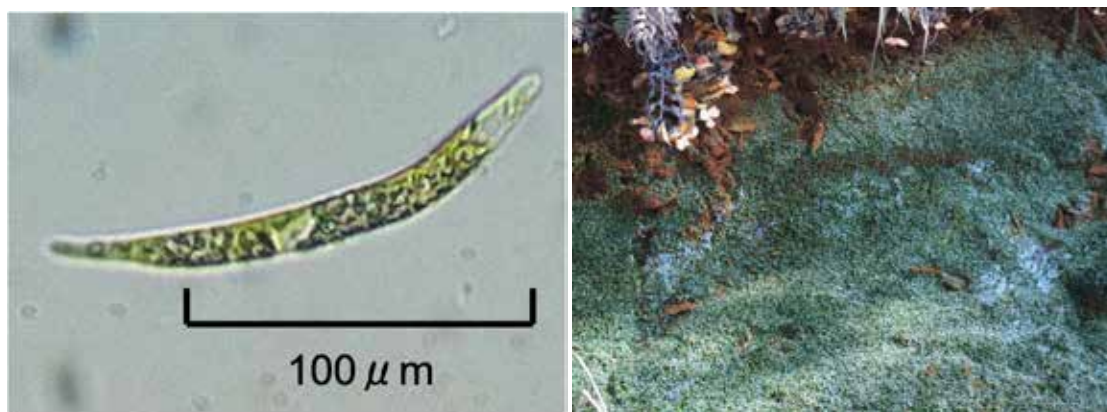


Fig. 1 本研究で用いた底生ミドリムシ種（左）と福岡県鞍手町泉水の坑排水中に形成された底生ミドリムシ種群集（右）

本研究で用いた底生ミドリムシ種 (Fig. 1) は *Euglena* 属に属するが、鞭毛を持たず、遊泳能力を持たないため、底生の固着生活を行っている。この底生ミドリムシ種に関しては、ヨーロッパやオーストラリア、東南アジア、南米の炭坑や金属鉱山から流出する強酸性の坑排水中に生息し、強酸性環境と高濃度の重金属濃度の排水に高い耐性を持っているとの報告が見られる^{3) 4)}。しかしながらこの底生ミドリムシ種に関する情報は大変少なく、その生理特性や生態特性はほとんど解明されていない。日本におけるこの種の生息の記載はあるものの、分布域やその環境に関する報告はなく、この種の生理生態特性に関する情報を得ること自体重要である。本種の同定は完了していないが、生息地の環境特性と形態から *Euglena mutabilis* F. Schmitz である可能性が高い⁵⁾。

2. 底生ミドリムシ種の分布と生育環境

これまで、*Euglena mutabilis* の生育が確認されている場所は、酸性でかつ硫酸イオンと各種重金属濃度が高いという点で共通しているため、これを基準に、坑廃水、湧水、温泉排水などの調査地点を設定した。これらの調査地点で、底生藻類が認められなかつ

た地点は除外し、37 地点において底生藻類群集中の底生ミドリムシの分布の有無、および水質の調査を行った。底生ミドリムシの分布は、底生藻類群集の採取後、検鏡により判別した。採水した試料水は定量分析用ろ紙（5C, ADVANTEC）でろ過した後、100mL ポリエチレン容器に保存し、必要に応じて 0.20 μ m セルロースアセテートメンブランフィルター（DISMIC, ADVANTEC）でろ過したのち分析に供した。現地および実験室での測定項目は、水温、pH、EC（電気伝導度）、DO（溶存酸素濃度）、流速、TOC、IC、SO₄²⁻、溶存金属（Na、Ca、Mg、Si、Fe、Al）である。水温、pH、EC、DO、流速は現地で測定を行い、TOC、IC、SO₄²⁻、溶存金属は実験室で測定を行った。

これらの計測・分析結果に基づき、底生ミドリムシの生育が確認された地点と確認されなかった地点とで平均値の有意差検定を行った結果、Na、Ca、Fe については有意差（ $p < 0.05$ ）が認められたが、他の測定項目については有意差は認められなかった。pH および電気伝導度（EC）の結果を Fig. 2 に示すが、既存の報告^{6) 7)}とは異なり、底生ミドリムシの生育が認められた地点の pH の範囲は 3.74-7.73 であり、このことから、底生ミドリムシは弱アルカリ性環境にも分布していることがわかった。

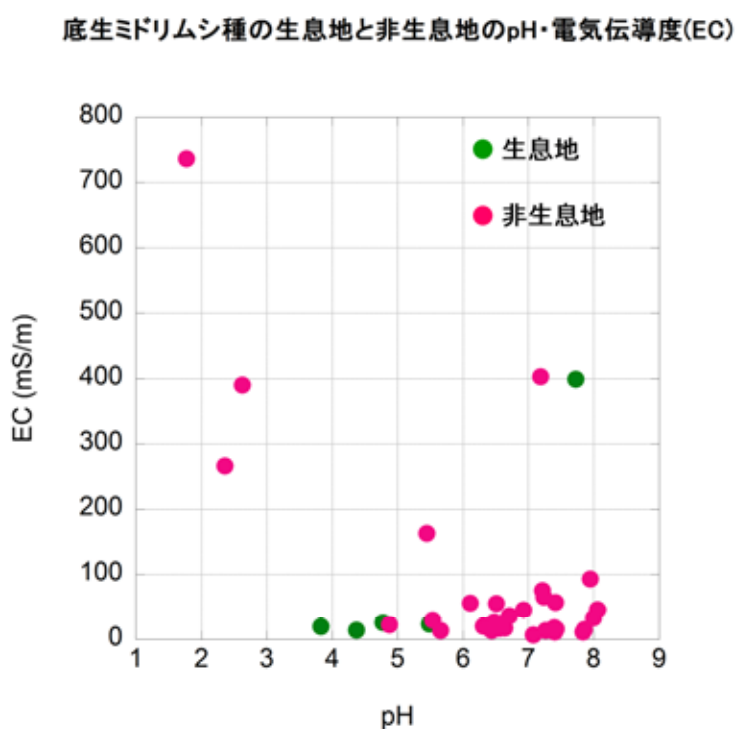


Fig. 2 底生藻類が認められた坑廃水、湧水、温泉排水など 37 地点における、底生ミドリムシの分布の有無と pH、電気伝導度(EC)との関係 ●：生息地 ●：非生息地

本研究では、福岡県鞍手郡鞍手町泉水にある、遠賀川水系の南田川に流入する泉水の坑排水中に形成されている底生ミドリムシ種群集から試料を得た。この坑排水の水質を Table 1 に示した。

3. 底生ミドリムシ種の増殖と培養条件

本研究で用いた底生ミドリムシ種の培養条件に関しては、まだ確実な方法が確立され

ていない。そこで、本研究では、2種の培養液と振とうの有無の条件下で培養可能性について検討した。用いた培養液は、Dach 培養液⁸⁾、および Hoagland 培養液である。Dach 培養液は Dach (1939) によって提唱された、*Euglena* 属の培養に適した培養液であるが、底生ミドリムシの培養への適否についての報告はない。一方、Hoagland 培養液は水耕栽培で汎用されるものである。両者の組成を Table 2 に示すが、Dach 培養液に関しては、有機物質として添加されているペプトンを除外した培養液を用いた。

Table 1 福岡県鞍手郡鞍手町泉水にある、遠賀川水系の南田川に流入する坑排水の水質。2011 年 10 月計測。

項目			項目			項目		
pH		3.61	Co	mgL ⁻¹	0	Mn	mgL ⁻¹	5.7
EC	mSm ⁻¹	17.79	Cr	mgL ⁻¹	0	Na	mgL ⁻¹	687.2
Ag	mgL ⁻¹	0	Cu	mgL ⁻¹	0	Ni	mgL ⁻¹	0
Al	mgL ⁻¹	28.1	Fe	mgL ⁻¹	23.2	Pb	mgL ⁻¹	0
B	mgL ⁻¹	0.2	Ga	mgL ⁻¹	0	Sr	mgL ⁻¹	1.3
Ba	mgL ⁻¹	0	In	mgL ⁻¹	0	Tl	mgL ⁻¹	0
Bi	mgL ⁻¹	0	K	mgL ⁻¹	15.1	Zn	mgL ⁻¹	0.5
Ca	mgL ⁻¹	349.5	Li	mgL ⁻¹	0			
Cd	mgL ⁻¹	0	Mg	mgL ⁻¹	14.4			

振とうの有無の条件は、底生ミドリムシ種が、採取地の泉水坑排水をはじめその生息地において流水中で群集を形成することから、水流を生ずる条件設定として振とう条件を設定した。詳細な条件と手順は以下のとおりである。

Table 2 Dach 培養液、および Hoagland 培養液の組成。Dach 培養液からは、ペプトンを除いた。

Dach 培養液			Hoagland 培養液		
水	1.00	L	水	1.00	L
KH ₂ PO ₄	0.25	g	H ₂ SO ₄	1	mL
CaCl ₂	1.00	g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	9.96	mg
NaHCO ₃	0.25	g	MnSO ₄ · 5H ₂ O	2.19	mg
KNO ₃	1.85	g	H ₂ BO ₃	2.86	mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.03	g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.88	mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.4	mg	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.04	mg
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.32	mg	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ · 4H ₂ O	0.01	mg
ペプトンは除く			NH ₄ NO ₃	171.44	mg
			KCl	57.20	mg
			CaCl ₂ · 2H ₂ O	366.81	mg
			NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	100.74	mg
			K ₂ SO ₄	66.85	mg
			MgSO ₄ · 7H ₂ O	405.53	mg

Dach 培養液（ペプトンを除く）、および Hoagland 培養液を調製し、水酸化ナトリウム水溶液と塩酸を用いて pH を 3.5 に調整した後、オートクレーブ処理（121℃、20 分

間)を行った。現地で採取した本種を含む底質試料は、250mL 容ポリビンに入れて持ち帰った。この試料水を上下に軽く 5 回振り、底質が沈殿し溶液が緑色になったのを確認した後、緑色の上清を 2ml とり、2ml マイクロチューブに入れ、遠心分離 (600rpm、10 分間)を行った。遠心分離後、上清を取り除き、これにそれぞれの培養液 1ml を入れ、個体が分散するようマイクロチューブを振り混ぜ、溶液が均一な緑色となるようにした。この溶液中の個体群密度を検鏡により求め、滅菌済みの培養液をさらに加えて底生ミドリムシ初密度が 200 number/ml になるように調整した。この底生ミドリムシ溶液 20ml を滅菌済みの直径 9.0cm シャーレに移し、培養を開始した。培養は、静置培養、振とう培養ともに光合成有効波長の光量子束密度 $56.5 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 、温度 20°C で、振とう培養においては振とう数 115 回/分で行った。培養開始から、24 時間毎に倒立顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TE300) で検鏡して個体数を計数し、それぞれの培養条件で、個体群密度が定常期に達するまで培養を行い、増殖曲線を作成した。個体数の計数は、コロニーを形成している個体と形成していない個体とを分けて行った。

設定した培養条件の中で、Hoagland 培養液を用いた振とう培養のみで培養 9 日目にコロニーの形成が認められ (Fig. 3)、その後も増殖が継続して高い定常期個体群密度を示した。本種はコロニーを形成することによって増殖速度が急速に増加することがわかった。このことから、底生ミドリムシ種の培養とコロニーの形成には、本種の採取地と同様の水流を倣した振とうが効果的であり、無機塩のみで構成される Hoagland 培養液が適していることがわかった。

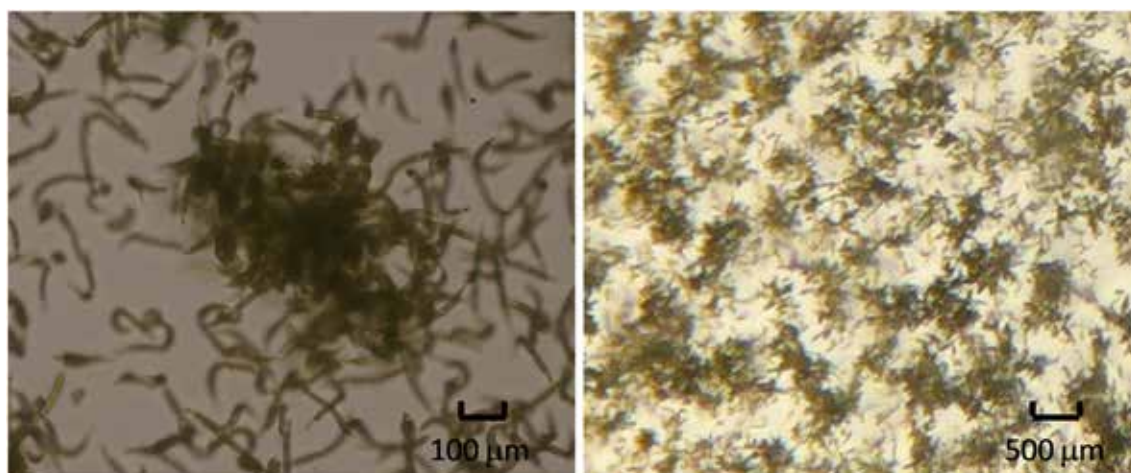


Fig. 3 底生ミドリムシ種のコロニー 左の写真は、右の写真に見えているコロニーの一つを拡大したもの。

底生ミドリムシ種は、Fig. 3 に示すように個体集合したコロニーを形成する。コロニーの大きさと、それを形成する個体数は変動が大きかった。コロニーの形状は、自然環境中にバイオフィルムを形成して生息している個体群のコロニーと同一であった。したがって、コロニーの形成がバイオフィルムの形成を導くものであることがわかる。

本種のコロニー形成の条件を明らかにするため、コロニーを形成している個体の数を含まず、溶液中に分散している個体のみの個体数を計数した (Fig. 4 左)。Hoagland 培養液を用いた振とう培養条件において、培養日数 9 日目にコロニーを形成したが、培養 9 日目の各培養条件での個体群密度は、コロニーを形成した Hoagland 培養液を用いた振とう培養では 20,000 number/ml 以上、他の培養条件では 20,000 number/ml 以下で定

常期に入っていた。したがって、単離状態で 20,000 number/ml 以上の個体群密度となることがコロニーを形成する要因の一つであると考えられる。

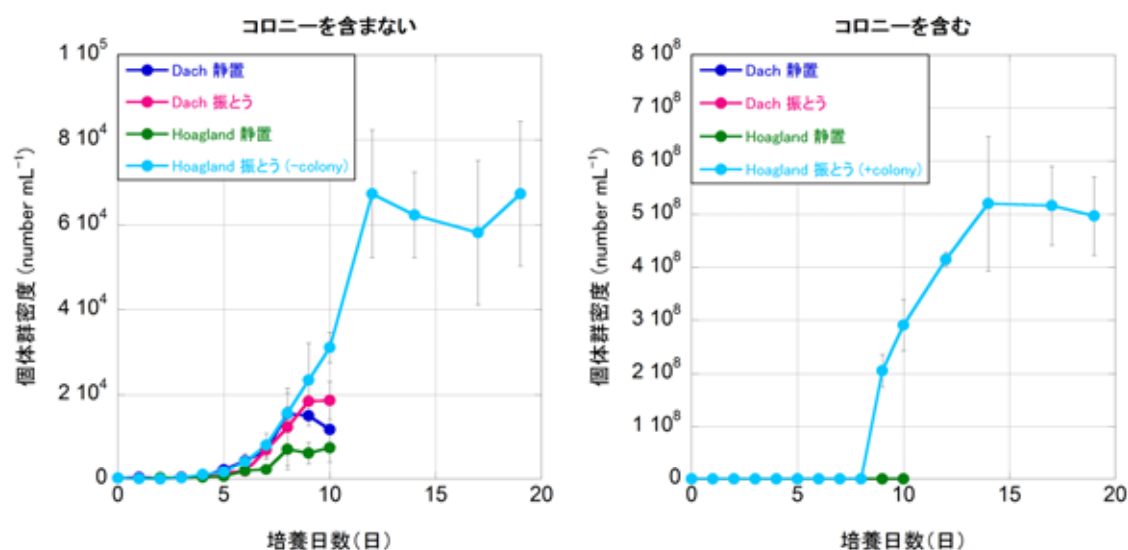


Fig. 4 左図：底生ミドリムシ種のコロニーを除いた個体群密度の時間変化、および、右図：コロニーを含めた個体群密度の時間変化（ともに反復数 $n=3$ ） Dach 培養液を用いた静置培養、振とう培養、Hoagland 培養液を用いた静置培養は、培養開始から 10 日後までのデータを示してあるが、以後もコロニーの形成は認められなかった。

4. 水質形成と重金属吸収機能

底生ミドリムシ種による鉄、マンガン、亜鉛の吸収および蓄積機能に関して検討した。ここでは、まず鉄およびマンガンを除いた Dach 培養液を調製し、第 3 節に示す方法で培養液の pH を 3.5 に調整し、滅菌を行った。1mM の $\text{FeSO}_4(\text{II})$ 水溶液、1mM の MnSO_4 水溶液、100 μM の ZnSO_4 水溶液をそれぞれ調製し、これをそれぞれ重金属を除いた Dach 培養液に以下の濃度になるよう調整して加え、直径 2.7cm シャーレに合計 2ml を入れて培養を開始した。ここで、鉄は 0、250、500、750、1000 μM 、マンガンは 0、100、250、500、1000 μM 、亜鉛は 0、25、50、100 μM に調整したが、各金属濃度は底生ミドリムシ種の採取地の水の金属濃度を基準に設定した。また、底生ミドリムシ種の分離も第 3 節に示す方法で行い、1ml の鉄およびマンガンを除いた培養液中に分散させた。本種を初濃度が 15 number/ml になるように培養液中に添加し、静置培養（光強度 56.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 、温度 20 $^{\circ}\text{C}$ ）を行い、24 時間毎に全個体数を計数した。それぞれの培養器で個体群密度が定常期になるまで培養を行い、増殖曲線を作成した。なお、ここで静置培養を行ったのは、遊離状態の個体に対する重金属の効果を確認するためで、コロニーの形成が起こらない条件を設定したものである。また、増殖の改善の効果を明らかにするために、培養には不適と判断された Dach 培養液を用いた。

Dach 培養液（鉄、マンガン、亜鉛を含まない）に鉄を添加した場合の本種の増殖曲線を Fig. 5 に示す。本種は、鉄濃度が 500 μM で最大の増殖を示した。また、本種は 500 μM 以下の濃度で、鉄無添加の場合より高い増殖速度を示したが、750 μM 以上の濃度では本種の増殖は改善されなかった。同様に、マンガンに関しては 100 μM で最大の増殖を示し、

500 μM 以下の濃度でマンガン無添加の場合より高い増殖速度を示したが、1000 μM 以上の濃度では本種の増殖は改善されなかった。また、亜鉛に関しては、25 μM で最大の増殖を示し、100 μM 以下の濃度で亜鉛無添加の場合より高い増殖速度を示した。

鉄、マンガン、亜鉛のうち、最も底生ミドリムシ種の増殖に効果があった金属は鉄であった。本種の採取地の金属濃度においても、鉄はマンガンや亜鉛より高濃度で含まれていることから、本種の成長に鉄は欠かせないものであることがわかった。さらに、鉄、マンガン、亜鉛いずれか1つの金属があれば、底生ミドリムシ種の増殖は改善されることがわかった。

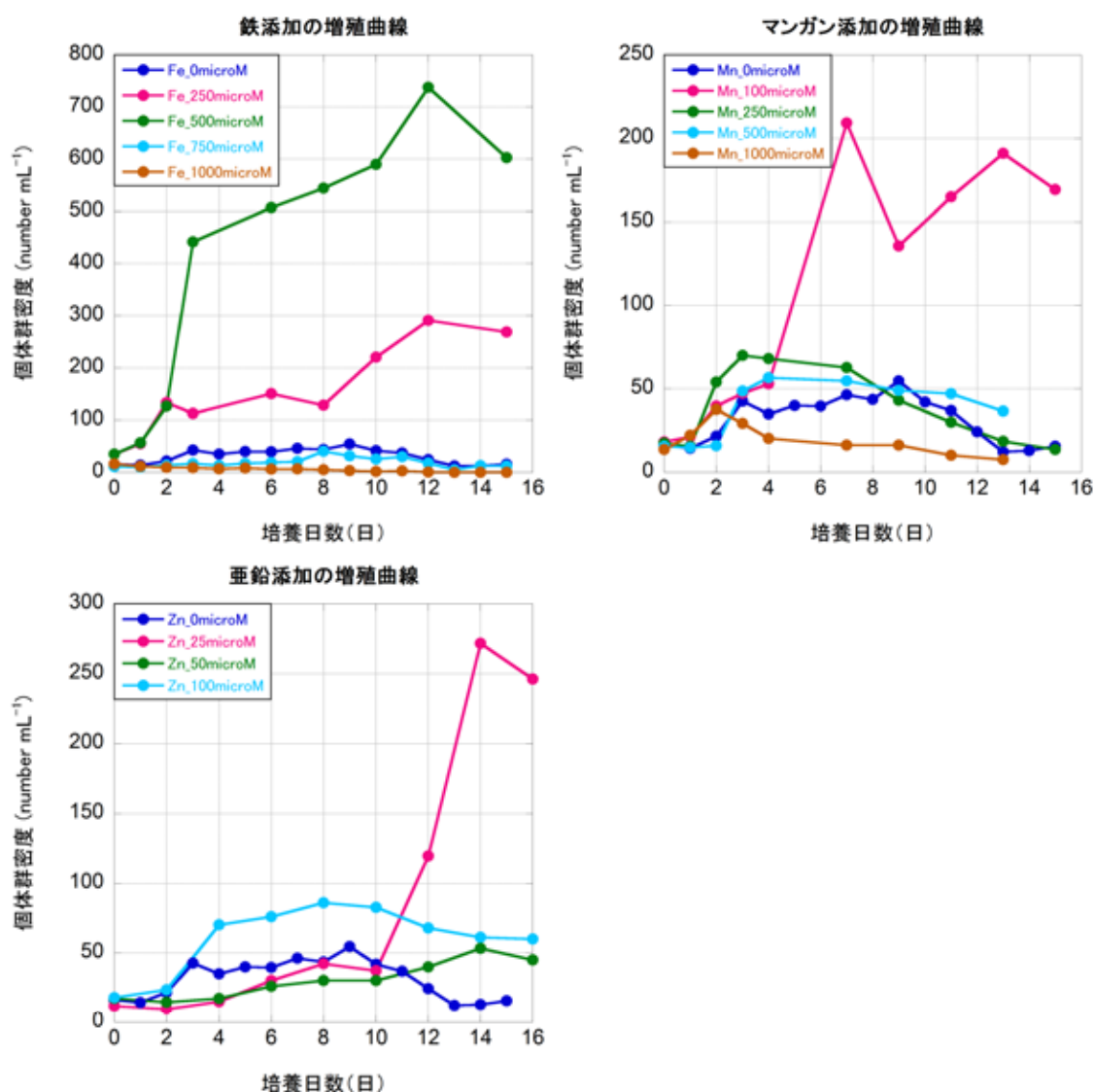


Fig. 5 鉄（上）、マンガン（中）あるいは亜鉛（下）を、これらの金属を除いた Dach 培養液に加えた場合の底生ミドリムシ種の増殖曲線（n=3）

次に、底生ミドリムシ種による鉄、マンガン、亜鉛の吸収能の評価を行った。ここでは、鉄、マンガン、亜鉛の金属濃度をすべて3倍にした Hoagland 培養液を調製した。高濃度の鉄を含む培養液はオートクレーブ滅菌の際に鉄が沈殿するため、金属の添加は

滅菌した培養液（金属濃度を原液のままにしたもの）に対して行った。その後、0.20 μ m メンブランフィルターでろ過し、培養液の金属濃度を ICP 発光分光分析により求めた。底生ミドリムシ種の分離は第3節に示した方法で行い、1ml の Hoagland 培養液（金属濃度を原液のままにしたもの）中に分散させた。これを、金属を添加した Hoagland 培養液に加え、底生ミドリムシ初濃度 200 number/ml になるように調整し、溶液 20ml をシャーレに入れて培養を開始した。個体群密度が定常期に入るまで振とう培養を行った。

定常期に達した後、シャーレ内の溶液を 10ml 採り、15ml 遠沈管に入れ、遠心分離（600rpm、10 分間）を行い、底生ミドリムシ種と培養液を分離した。分離した培養液を 15ml 遠沈管から 5ml とり、0.20 μ m メンブランフィルターでろ過し、それを別の 15ml 遠沈管にいった。ろ過した培養後の培養液の金属濃度を ICP 発光分光分析により求めた。

さらに、底生ミドリムシ種の金属含有量を以下の方法で求めた。泉水坑排水から得た本種を含む溶液は、ポリ瓶に入れて上下に軽く 5 回振り、底質が沈殿し溶液が緑色になったのを確認した後、個体数を計数した。底質を除いた底生ミドリムシ溶液 10ml を 15ml 遠沈管に採り、遠心分離（600rpm、10 分間）を行った。上澄み液を取り除き、濃硝酸を 2ml 滴下し遠沈管を 15 分おきに 1 時間振り混ぜ、24 時間常温で放置した。溶液が黄色になり、完全に本種が溶解したことを確認したのち、溶液 1ml を取り出し、超純水で 10 倍希釈した後、直ちに ICP 発光分光分析を行い、底生ミドリムシ種の金属含有量を求めた。金属を添加した Hoagland 培養液を用いて振とう培養を行って得た溶液についても同様の方法で酸分解を行い、ICP 発光分光分析を行った。

培養前後の培養液中の鉄、マンガン、亜鉛の金属濃度を Fig. 6 に、個体あたりの金属含有量を Fig. 7 に示す。底生ミドリムシ種は鉄および亜鉛を吸着・吸収することがわかった。マンガンに関しては、培養後の濃度が培養前より上昇しており、また坑排水から得た個体はマンガンを含むのに対して培養した個体はマンガンを含まないことから、本種は培養中にマンガンを培養液中に放出したことがわかった。鉄に関してもマンガン同様の培養による含有量の低下が認められたが、これは現場から得た試料からは底質中の酸化鉄が完全に除去されていなかったためで、本種の鉄吸収機能は確認できた。

5. 結論

本研究で用いた底生ミドリムシ種は、生育が確認された地点と確認されなかった地点とで Na、Ca、Fe 濃度の平均値について有意差が認められたが、pH に関しては有意差が認められず、生育地の pH の範囲は 3.74-7.73 に及んでいた。これは、*Euglena mutabilis* に関する既存の報告とは異なっており、本底生ミドリムシ種は酸性環境以外にも分布していることがわかった。

本種の培養条件に関する検討の結果、光強度 56.5 μ mol s⁻¹ m⁻²、温度 20℃の条件下で Hoagland 培養液を用いた振とう培養を行った場合、底生ミドリムシ種はコロニーを形成し、良好な増殖を示した。振とう条件はコロニーの形成において必須の条件で、Hoagland 培養液を用いた場合には個体群密度 20000 number/ml 以上に増殖することが可能であるため、コロニーの形成が見られたものと考えられる。バイオフィームはコロニーの集合体であることが確認できたため、廃水処理に本種のバイオフィームを利用する場合には、この培養条件を利用することが最低限必要である。

培養液中の重金属が本種の増殖に及ぼす効果に関する実験からは、鉄では 500 μ M、マンガンでは 100 μ M、亜鉛では 25 μ M が最大の増殖速度を得る濃度であった。また、鉄では 500 μ M 以下、マンガンでは 1000 μ M 以下、亜鉛では 100 μ M 以下で、金属の添加が本種の増殖を促進させた。これらの金属の中で、鉄と亜鉛が選択的に底生ミドリムシ種に吸着・吸収された。

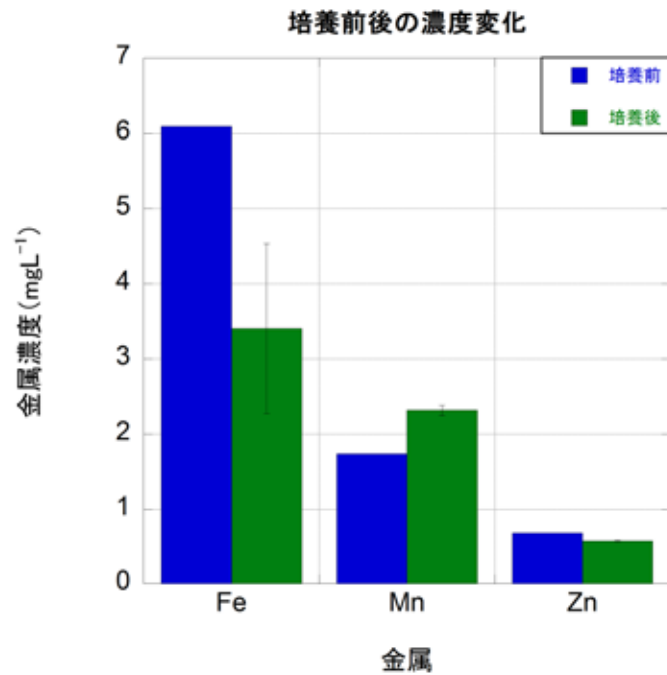


Fig. 6 鉄、マンガン、亜鉛の金属濃度を添加した Hoagland 培養液を用いた底生ミドリムシの培養前後の培養液中の金属濃度 (n=4)

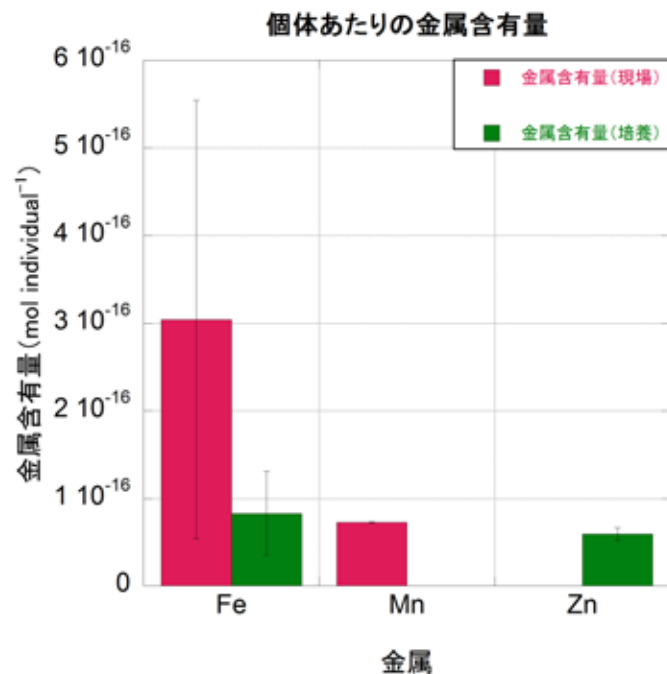


Fig. 7 泉水坑排水から得た底生ミドリムシ種（現地底生ミドリムシ）、および金属を添加した Hoagland 培養液を用いて振とう培養を行った後の底生ミドリムシ種（培養底生ミドリムシ）1 個体当たりの金属含有量 (n=4)

以上より、この底生ミドリムシ種のバイオフィルムを人工的に作ることは可能であり、重金属排水処理への応用が期待できることがわかった。廃水処理への応用技術開発のためには、さらに、Hoagland 培養液を用いた振とう培養によって形成されたコロニーを基板上に固定化し、安定化させたバイオフィルムを構築する技術の開発が必要である。そのためには、流水系を用いた培養の検討が有効であろう。本種は鉄と亜鉛を選択的に吸着・吸収するため、廃水中の鉄と亜鉛の除去への利用が可能であろう。他方、本底生ミドリムシ種の同定、本種の金属の代謝経路の生理機構の解明も必要である。

6. 謝辞

本研究は、公益財団法人 JFE21 世紀財団 2010 年度・技術研究助成により行われました。

7. 参考文献

- 1) Mann H, Fyfe WS (1989) Metal uptake Fe-, Ti-oxide biomineralization by acidophilic microorganisms in mine-waste environments Canadian Journal of Earth Science 26: 2731-2735.
- 2) Brake SS, Hasiotis ST, Dannelly HK, Connors KA (2002) Eukaryotic stromatolite builders in acid mine drainage: implication for Precambrian iron formations and oxygenation of the atmosphere? Geology 30: 599-602.
- 3) Lessmann D, Deneke R, Ender R, Hemm M, Kapfer M, Krumbeck H, Wollmann K, Nixdorf B (1999) Lake Plessa 107 (Lusatia, Germany) -an extremely acidic shallow mining lake. Hydrobiologia 408/409: 293-299.
- 4) Brake SS, Dannelly HK, Connors KA (2001) Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality. Environmental Geology 40: 458-469.
- 5) Kudo RR (1966) Euglenoidida Blochmann (Order 4, Chapter 11) In: Protozoology 5th ed. Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA, pp.350-369.
- 6) Hargreaves JW, Whitton B. (1976) Effect of pH growth of acid stream algae. British Phycological Journal 11: 215-223.
- 7) Olaveson MM, Nalewajko C (2000) Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. Hydrobiologia 433: 39-56.
- 8) Dach von H (1943) The effect of pH on pure cultures of *Euglena mutabilis* The Ohio Journal of Science 43: 47-48.