

10. 植物プランクトン培養用人工海水システムの開発 (No.8910)

大城 香 (岡崎国立共同研究機構)

植物プランクトンは海洋における重要な一次生産者である。従来から植物プランクトンの培養を目的とした人工海水の開発は試みられているが、その多くは培養の容易な沿岸性種の培養を目的としたもので、そのため、外洋性種の人工海水による安定した培養はきわめて困難であり、実験培養に用いられるプランクトン種が極度に制限されている。我々は培養の困難な外洋性種の培養に用いることの可能な人工海水システムの開発を試み、以下に示す方法で人工海水の調整を行った。1. 海水と同じアルカリ性 pH (8.0-8.2) に調整するのによく用いられる緩衝剤はしばしば強い生育阻害を示すため、 NaHCO_3 , NaOH , HCl を用いた炭酸一重炭酸塩、無機塩系を用いて pH 調整を行う、2. 滅菌法はフィルターを用いたろ過滅菌が沈澱物生成や pH 変動を起こさない点ではすぐれているが、日常的にはより簡単な高圧滅菌法を用いた場合も (a) 酸性 pH (6.0) で高圧滅菌を行う、または (b) 沈澱物生成を起こし易い性分を他の成分と分けて滅菌する。 (c) 高圧滅菌後の急激な pH 変動が起こらなくなるまで (24-72時間) 静置した後必要に応じて pH 再調整を行う事で使用出来る。すでに報告しているように 3. 用いる試薬は純度の高いものを選び必要に応じてキレックス樹脂 (Chelex, Bio-Rad社) 処理により重金属除去を行う 4. 使用する器具は希塩酸処理により重金属除去を行う。このように調整した人工海水系で外洋性浮遊ラン藻種 19 株の培養を試みたところ 15 株で天然海水培地と同等あるいは同等以上の良好な生育が得られた。本システムを用いて行った貧栄養海域における植物プランクトンの重要な生育律速因子である鉄及びリン酸塩濃度の外洋性浮遊ラン藻の生育に対する影響の予備的な実験から、外洋性種では低濃度の鉄あるいはリン酸塩を生育に利用出来る能力を持つ種の存在を示唆する結果を得た。

9. 植物プランクトン培養用人工海水システムの開発 (No.8910)

大城 香 (岡崎国立共同研究機構)

研究目的

植物プランクトンは、海洋における重要な一次生産者である。植物プランクトンの生物学的役割の実態を知り、さらに生物資源として利用するためにはその生理的、生化学的、分子生物学的諸性質を明らかにしていくことは重要な課題であり、そのためには植物プランクトン、特に外洋性種を実験室で安定に培養する系を開発することは不可欠である。従来から植物プランクトンの培養を目的とした組成の明かな人工海水開発が試みられているが、その多くは培養の容易な沿岸海域に生息する植物プランクトンの培養を目的としたもので、そのため、外洋性種の人工海水による安定した培養はきわめて困難であり、実験培養に用いられるプランクトン種が極度に制限されている。培養の困難な外洋性種を人工海水で培養するとき、問題となるのは 1. 栄養塩、特にリン酸塩の阻害作用、 2. pH 緩衝剤の生育阻害、 3. 沈澱物生成による生育阻害があげられる。

1. に関しては我々はすでにこの阻害効果の少なくとも一部は用いた試薬に混入している重金属で、試薬をキレックス樹脂で処理することにより阻害作用が少なくなることを示してきた (Ohkura, 1986)。本研究は、2. 及び 3. の問題の解決を試み、開発した人工海水を実際の培養に用いることを目的に行った。さらに、開発した人工海水システムを用い、貧栄養的性格を持った温暖な外洋海

域における植物プランクトンの重要な生育律速因子であるといわれているリン酸塩及び鉄の生育に対する影響の予備的な実験を行い、若干の知見を得たのであわせて報告する。

研究方法

培養実験には、助成研究者及び共同研究者が主として日本近海の外洋（黒潮海域）から単離し保有している浮遊性ラン藻種（Synechococcus属 および Trichodesmium属）19株を用いた。

Synechococcus株の培養は蛍光灯照射下（白色光タイプ、連続明、 1.5 W/m^2 ）、 25°C で、Trichodesmium株の培養は蛍光灯照射下（白色タイプ、10時間明・14暗、 10 W/m^2 ） 26°C で、静置培養を行った。

培地調整には、純度の高い特級あるいは生化学用試薬を用い、必要に応じてキレックス樹脂（Bio-Rad社、Chelex 100）を用いて重金属の除去を行った。実験に用いたガラス器具は重金属等の混入を避けるため、洗浄後希塩酸中に一日以上浸漬した後蒸留水で洗ったものを用いた。ろ過滅菌にはミリポアフィルター（HAWP、ポアサイズ $0.47 \mu\text{m}$ ）を高圧滅菌後使用した。

生育は細胞数、 750 nm における濁度、あるいはクロロフィル量の変化により追跡した。

研究結果

1. 培地の調整

基本培地として Morelら(1979)により開発されたAquil培地の Sea Water Salt を一部改変して用い（Table 2参照）、これに窒素源、リン酸塩、微量元素、ビタミン類を加えた。

海水のpHは8.2前後のアルカリ性である。人工海水のpHを

海水と同じ pH に調整するため緩衝剤がしばしば用いられる。従来アルカリ性 pH 調整によく用いられる緩衝剤が多くの外洋種藻類の生育に阻害作用を示すことが知られている。Table 1. は緩衝剤として用いたトリスヒドロキシアミノメタン(Tris)の外洋性浮遊ラン藻の生育に対する影響を調べた結果で、Trisの阻害作用は種により異り *Synechocystis* 株では顕著な阻害作用は見られなかったが、*Trichodesmium* sp. NIBB1067株では顕著な生育阻害が起こり Tris を加えた培地中では本種は 2~3 日以内に完全に死滅した。本種は他の緩衝剤であるグリシルグリシンによっても生育は阻害された。

緩衝剤を用いない系として、培地の pH 調整に NaHCO_3 を単独で用いることを試みたが、培地 1000ml 当り 0.2 グラム以上の添加で沈澱を生じ、藻細胞の生育が阻害された。また後述する高圧滅菌法による滅菌での pH 変動も大きかった。

pH 調整に NaHCO_3 と NaOH を用いた系では、 NaOH 添加直後若干の沈澱を生じたが、攪拌により沈澱は消失し、高圧滅菌法による pH 変動も小さかった。

Table 1. Effect of tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Tris) on the growth of marine, pelagic cyanobacteria.

Algal strains	<u>number of transfers with active growth</u>	
	without Tris	with Tris ^a
<i>Synechococcus</i> sp. NIBB1059	> 10	> 10
<i>Synechococcus</i> sp. NIBB1070	> 10	> 10
<i>Synechococcus</i> sp. NIBB1071	> 10	> 10
<i>Trichodesmium</i> sp. NIBB1067	> 10	0

^a Tris-(hydroxymethyl) aminomethan was added at the concentration of 8×10^{-3} M.

2. 培地の滅菌

培地の滅菌は、フィルターによるろ過滅菌が沈澱物生成や pH 変動を引き起こさないという点ではすぐれていた。滅菌に一般的に用いられる高圧滅菌法を用いて 1. で調整したアルカリ pH (8.0) の培地を滅菌したところ沈澱を生じ、藻細胞は生育しなかった。これをさけるため (a) 培地をいったん HCl 添加により酸性 pH (6.0) にし、高圧滅菌後アルカリ pH (8.0) に水酸化ナトリウム添加で戻す。(b) 沈澱を生成しやすい成分 (CaCl_2 , $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を他の成分と分けて高圧滅菌を行い、冷却後添加する方法を試みた。滅菌に用いた容器の容積や形状、培地の量等により (a) の方法では若干の沈澱物を生成することもあったが、(b) の方法では沈澱物は生

Table 2. Composition of artificial sea water medium

Components	Concentration (gram/liter)	Components	Concentration (gram/liter)
Sea Water Salts¹		Trace Metals	
NaCl	23.9	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5×10^{-7}
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.8	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.9×10^{-6}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.3	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6.0×10^{-7}
KCl	7.0×10^{-1}	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.6×10^{-6}
K_2SO_4	3.9	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2×10^{-6}
NaHCO_3	2.0×10^{-1}	Fe-EDTA	9.0×10^{-5}
KBr	1.0×10^{-1}	Nutrients²	
NaF	3.0×10^{-3}	NaNO_3	0 - 1.7×10^{-1}
H_3BO_3	3.0×10^{-2}	K_2HPO_4	0.25 - 5.0×10^{-3}
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.7×10^{-2}	Vitamines	
		B_{12}	1.0×10^{-6}
		Biotin	5.0×10^{-7}
		Thiamine	1.0×10^{-4}

¹ Sea water salts of Morel et al. (1979) was partially modified.

² Concentrations were varied with algal strains.

成しなかった。(a) (b) いずれの方法で滅菌した場合も高圧滅菌直後はかなり大きなpH変動が見られたが、この変動は培地を2～3日静置する事により一定値になるので、その時点でアルカリpH(8.0)になるようにNaOHまたはHCl添加により調整して培養に使用するようにした。Table 2. に培地の組成を示した。

3. 藻株の培養と鉄・リン酸塩濃度の影響

1. 2. に示した方法で調整した培地を用い、外洋性ラン藻株の培養を行った。対照実験としてGuillardの強化天然海水培地(f/2培地, GuillardとRyther, 1962)を用いた。Table 4に示したように、用いた藻株15株のうち、11株は本培地中で5回以上の継代培養を行っても強化天然海水培地と比較しても同等あるいはそれ以上の良好な生育が観察された。一例として外洋性窒素固定ラン藻 *Trichodesmium* sp. NIBB1067株の本培地を用いた対数生育期における生育速度(速度定数 $\mu = 0.15 \sim 0.18 \text{ day}^{-1}$) は強化天然海水を用いた場合 ($\mu = 0.07 \text{ day}^{-1}$) より早かった。

Table 3. Growth of marine, pelagic cyanobacteria in artificial and natural sea water medium.

	Artificial sea water	Natural sea water ¹
Number of algal strains tested	19	19
Number of algal strains actively grow after 5 transfers	15	19

¹ f/2 medium of Guillard and Ryther (1962)

次にこの培地を利用して *Trichodesmium* NIBB1067株の生育に対する鉄の影響及び *Synechococcus*株に対するリン酸塩の影響を調べた。 Table 4 は *Trichodesmium* NIBB1067株を培地中の鉄の濃度を変えて培養した時の対数生育期における細胞数の増加を速度定数 ($\mu \text{ day}^{-1}$) で示したもので、従来海産植物プランクトンの培養によく用いられる培地の鉄の百分の一の濃度でもその生育は約40%しか抑制されなかった。 *Synechococcus*株を従来海産植物プランクトンの培養に用いられているリン酸塩濃度の四十分の一 ($1.8 \times 10^{-6} \text{ M}$) のリン酸塩を加えた培地で培養結果は、細胞収量が、実験に用いた *Synechococcus*株7株のうち2株 (NIBB1059株とNIBB1071株) で残りの株に比べて高い収量が得られ、またこれらの株の初期生育速度はリン酸塩を $7.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ 含む培地と変わらない傾向を示した。

Table 4. Effect of iron concentrations on the growth of marine, pelagic cyanobacterium, *Trichodesmium* sp. NIBB1067

Iron concentrations	Growth rate ¹ (day^{-1})
10^{-7} M	0.16
10^{-8} M	0.14
10^{-9} M	0.10

¹ Growth rate was estimated from the increase in cell number during exponential growth phase.

考察と今後の問題点

本研究で開発した人工海水システムは外洋性種植物プランクトンの安定した培養に用いることが可能であった。海水はアルカリ性(pH 8.2前後)で、外洋性植物プランクトンの生育している海域の塩分濃度が高い(33~35%)ことから、外洋性種の培養に用いる培地ではその調整中特に高圧滅菌中に沈澱を生じ易いこと、pH変動が起りやすいことが大きな問題点である。これをさけるためにはフィルターを用いたろ過滅菌法がすぐれているが、方法が煩雑であること、経費がかかるといった点を考慮に入れると日常的には高圧滅菌法による培地の調整を行うことが望ましい。結果に示したように沈澱物の生成については高圧滅菌時の培地のpHを酸性にする、あるいは沈澱を生じる原因となる成分を分けて滅菌することでさけることが出来た。pH変動については、高圧滅菌中及び直後に大きな変動が見られること、その変動は培地の量、表面積等により異なり一定値になる(平衡状態になる)のに時間がかかることから滅菌後十分な時間(24~72時間)をおいたのち必要があればpHの再調整を行った後培養に用いることが重要であった。

開発した人工海水システムを用いて行った鉄及びリン酸塩濃度の外洋性植物プランクトンの生育に及ぼす影響の実験はまだ非常に予備的なものではある。しかし本実験用いた *Trichodesmium* NIBB 1067株あるいは *Synechococcus* NIBB1059, 1071株が低濃度の鉄あるいはリン酸塩を生育に利用できるという結果はこのような外洋性種が貧栄養海域(鉄の濃度 10^{-10} M、リン酸塩濃度検出限界以下)で生育可能である一つの説明となりうる事を示唆している。このような実験はわれわれが開発したような人工海水システムを用いることにより初めて可能になったと考え、今後その機構のさらに詳しい解析を予定している。

Table 3 に示したように本システムにより多くの外洋種は強化天然海水培地を用いたと同等の生育をしめしたものの、本システム

では生育しなかった種もある。原因としては栄養塩として加えた成分の濃度が不適切であった、試薬に混入していた不純物が阻害作用を示した、あるいは生育に必要な未知の成分が欠けていた等が考えられるが、その原因を解明するのは本システムをさらに普遍的なものとするために不可欠と考えている。また本システムの基本に用いたAquil培地のSea Water Saltの成分は天然海水の成分にもとづいて作成されたもので、必ずしもその全てが植物プランクトンの生育に不可欠かどうかはまだ不明である。栄養成分として現在加えているビタミン類についても同様で、これらの点を検討し、より単純でしかも簡単な改変だけで外洋種から沿岸種の植物プランクトンの培養に応用の可能な人工海水システムを開発して行くのが今後の課題と考えている。

引用文献

Guillard, R.R. and Ryther, J.H. (1962). Can. J. Microbiol. 8: 229-239

Morel, F.M.M., Rueter, J.G., Anderson, D.M. and Guillard, R.R. (1979). J. Phycol. 15: 135-141

Ohki, K., Rueter, J.G. and Fujita, Y. (1986) Mar. Biol. 91: 9-13

Development of artificial medium for oceanic phytoplankton

Kaori Ohki, Yoshihiko Fujita, Tohru Ikeya and Jhon G. Rueter¹
Department of Cell Biology, National Institute for Basic
Biology and Department of Biology, Portland State
University¹

Summary

The artificial medium was developed for cultivation of oceanic phytoplankton. 1. The Sea Water Salt of Aquil medium (Morel et al.) was used as a basic salts after modification. 2. As the pH buffer, such as tris-(hydroxymethyl) aminomethan, was toxic on some oceanic species, combination of NaHCO_3 , NaOH and HCl was used to adjust the pH. 3. To avoid forming precipitaion during autoclaving, (a) the medium was kept in low pH (6.0) or (b) two components, CaCl_2 and $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were separately autoclaved. 4. The dramatic pH change was observed after autoclaving. The pH of the medium was re-adjusted, if necessary, after the pH change was in equilibration. Fifteen out of nineteen oceanic phytoplankton able to grow in this artificial medium as well as in enriched sea water. The preliminary experiments using this artificial medium suggested that some oceanic phytoplankton have an ability to utilize the very low concentration of iron and inorganic phosphate.