

「原著」

植物プランクトン *Skeletonema costatum* の培養と

バクテリアの様相変化

輪島 毅・高橋 卓

1. はじめに

植物プランクトンの生理的特性を調べるため、無菌的に植物プランクトンを培養した数多くの実験が行なわれている。ここでは特に無菌的な処理を施さずに *Skeletonema costatum* を培養し、本種の細胞数の増減とバクテリアの総菌数との関係を見る予備的な実験を行なったので、ここに報告する。

2. 方法

実験供試種は、1988年4月13日に東京湾、芝浦海岸で採水し、海水中よりキャピラリーピペットを用いて分離された *Skeletonema costatum* を、改良Erd-Schreiber 培地にて単一種培養したものをを用いた。バクテリアは、*S. costatum* の分離に付随してきたもの、あるいは作製した培養液中に存在していたものである。

培養液としては、保存海水20ℓをワットマンGF/Cフィルターで濾過したものにNaNO₃を2g、Na₂HPO₄・12H₂Oを0.4gを加えたものを使用し、実験容器は

酸洗浄した20ℓのコック付きガラス容器を使用した。この実験海水に単一種培養し、対数増殖期にある *S. costatum* 100cc を接種した。実験開始時の *S. costatum* の細胞の濃度は 674cells/mlであった。実験期間中の水温は20±1℃に保ち、実験海水はマグネットスターラーにより常時攪拌した。光条件は、白色蛍光灯による50μE/m²/secの光量で12時間明暗（7：30～19：30明）とした。

S. costatum は、鎖状の群体を形成する珪藻であるので、群体数と群体毎の細胞数を計数した。また、バクテリアの総菌数、栄養塩（NO₂-N、NO₃-N、PO₄-P）濃度、クロロフィルa量とフェオ色素量、及び総生産量を測定した。*S. costatum* の群体数と群体毎の細胞数は光学顕微鏡により毎日計数した。総菌数はアクリジンオレンジで染色後、落射蛍光顕微鏡で検鏡を行った。クロロフィルa量とフェオ色素量の計測は、12：30に実験水100ccを採水し、ワットマンGF/Cフィルターで濾過し、90%アセトンで抽出後、分光蛍光光度計により測定した。栄養塩

は、実験開始後0日目、4日目、8日目、11日目、及び13日目(12:30)に採水した。栄養塩の分析は、ワットマンGF/Cフィルターで濾過した実験水を試水とし、 $\text{NO}_3 + \text{NO}_2\text{-N}$ 、及び $\text{NO}_2\text{-N}$ はスルファニアミド法で、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 量はアスコルビン酸還元法で行った。総生産量の測定には、5日目、8日目、及び11日目に採水し、酸素ビンに分取し4時間放置後DO固定により行う明暗ビン法を取り入れた。

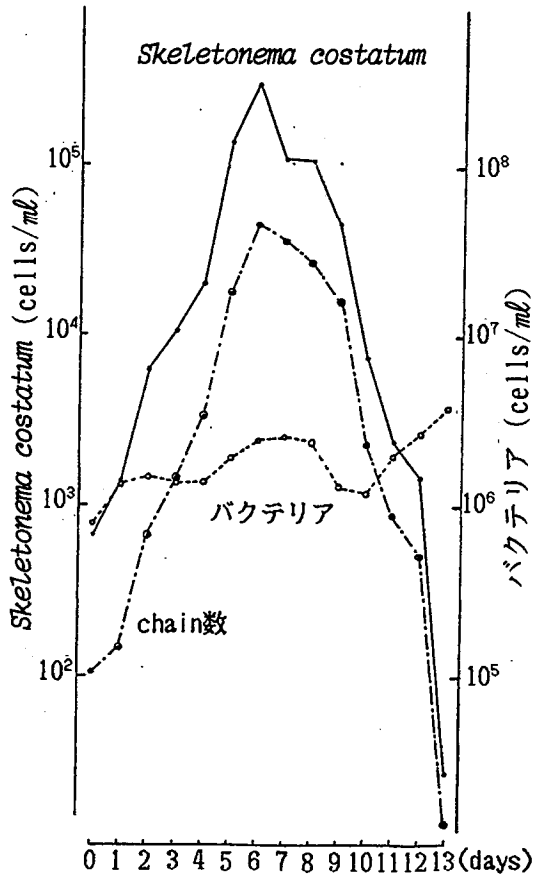


図1 *Skeletonema costatum*の細胞数、chain数とバクテリアの細胞数

3. 結果

(1) *Skeletonema costatum*とバクテリアの増殖状態

実験開始時に 674cells/mlだった *Skeletonema costatum*の細胞数は、指数関数的に増加し6日目に最大値 2.9×10^5 cells/mlを示したが、その後は急激に減少した(図1)。*S. costatum*の群体数は、細胞数と同様に指数関数的に増加し、6日目に最大値43520chains/mlを示した(図1)。その後9日目まではゆるやかな減少を示し、10日目以後に急激に減少した。さらに、13日目には13.3群体/mlとなった。実験開始時から6日目にかけては*S. costatum*が増殖し、褐色で長いchainを形成している様子が観察され、10日目以後は群体が分裂して短くなりバクテリアが付着していた。また、培養終了時付近では、攪拌にもかかわらず、培養液中に沈降物がみられた。

バクテリアの総細胞数は、実験開始後ゆるやかに増加し、8日目にやや減少したが、*S. costatum*の群体の分裂が観察された10日目以後急増し13日目に最大値 3.78×10^6 cells/mlを示した(図1)。観察によると、培養初期のバクテリアは糸状のもので、後に球状のものが現れた。

図1に示した*S. costatum*の細胞数より増殖速度定数 K_z を下記の式から求めた。

$$K_z = \frac{1}{t_2 - t_1} \log_e \frac{N_2}{N_1}$$

ここで N_1 は t_1 時の細胞数、 N_2 は t_2 時の細胞数である。

この増殖速度定数 K_s と1群体当りの *S. costatum* の細胞数について、3日毎の移動平均値を図2に示した。増殖速度定数 K_s は、4日目までは増加傾向を、5日目以後は減少傾向を示した。1群体当りの細胞数は、1日目には増加傾向だが、2日目以後から減少傾向を示した。

(2) クロロフィルa量とフェオ色素量の変化

クロロフィルa量とフェオ色素量は、*Skeletonema costatum*の細胞数の増加に対応して指数関数的に増加し、各々の最大値は、クロロフィルa量は5日目に $88.8 \mu\text{g}/\ell$ 、フェオ色素量は8日目に

$184.6 \mu\text{g}/\ell$ と、細胞数の最大値時(6日目)をはさんで前後していた(図3)。

(3) pH変化

pHは、実験開始後徐々に高くなり、9日目に最大値8.6を示し、その後、やや減少して8.5~8.6の間でほぼ一定であった(図4)。

(4) 総生産量の変化

総生産量は、細胞数がやや減少し始めた7日目に $2.48 \text{mg}/\ell/4\text{h}$ で、*Skeletonema costatum*の細胞数が増加中であった4日目の $1.01 \text{mg}/\ell/4\text{h}$ に比較して約2.5倍の値を示した(図5)。11日目の生産量は $0.20 \text{mg}/\ell/4\text{h}$ であった。しかし、こ

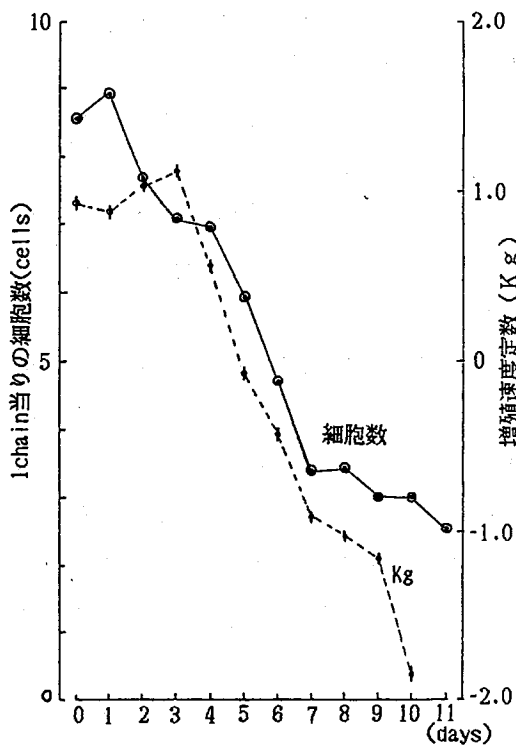


図2 1 chain 当りの細胞数と、増殖速度定数(K_s)の移動平均の変化

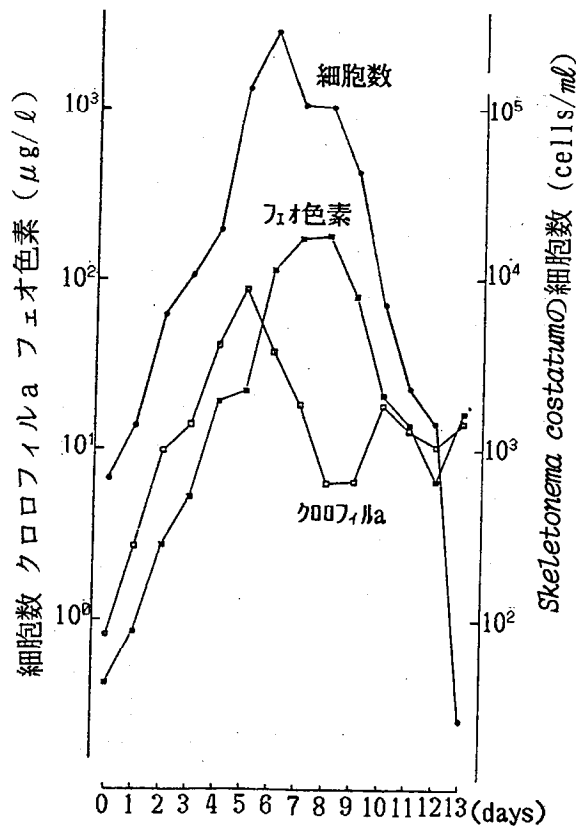


図3 クロロフィルa、フェオ色素の経日変化

の値は、細胞数の増加に比べると少なく、1細胞当りの総生産量に換算して見ると、4日目が $5.1 \times 10^{-5} \text{mg/cell/4h}$ 、そして7日目は $2.3 \times 10^{-5} \text{mg/cell/4h}$ と減少し、11日目は $749 \times 10^{-5} \text{mg/cell/4h}$ となり極端に増加した値であった。

(5) 栄養塩 ($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$) の変化

実験開始時、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、及び $\text{PO}_4\text{-P}$ 量は、それぞれ30.0、0.0162、及び $25.64 \mu\text{g-at/l}$ であった。 $\text{NO}_3\text{-N}$ は4日

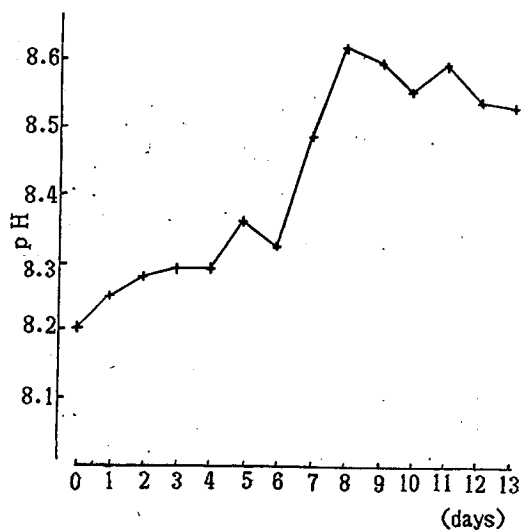


図4 pHの経日変化

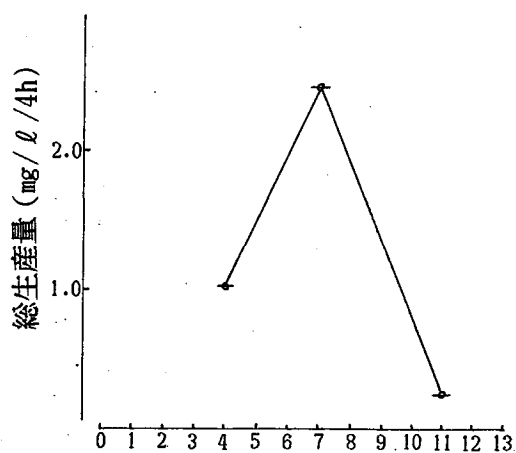


図5 *Skeletonema costatum*の総生産量の変化

目には減少し、7日目にやや増加するが、11日目には再び減少し最低値 $13.6 \mu\text{g-at/l}$ を示した。13日目には急増し実験開始時の量を上回る $50.5 \mu\text{g-at/l}$ となった。このような $\text{NO}_3\text{-N}$ 量の増減は、バクテリアの総菌数の増減とよく似た傾向を示していた。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 量は、実験期間を通して少なく、徐々に増加した。 $\text{PO}_4\text{-P}$ は、実験開始後11日目まで徐々に減少し $13.4 \mu\text{g-at/l}$ となったが、13日目にはやや増加した(図6)。

4. 考察

一般に*Skeletonema costatum*の衰退期には、その破片を分解するバクテリアが

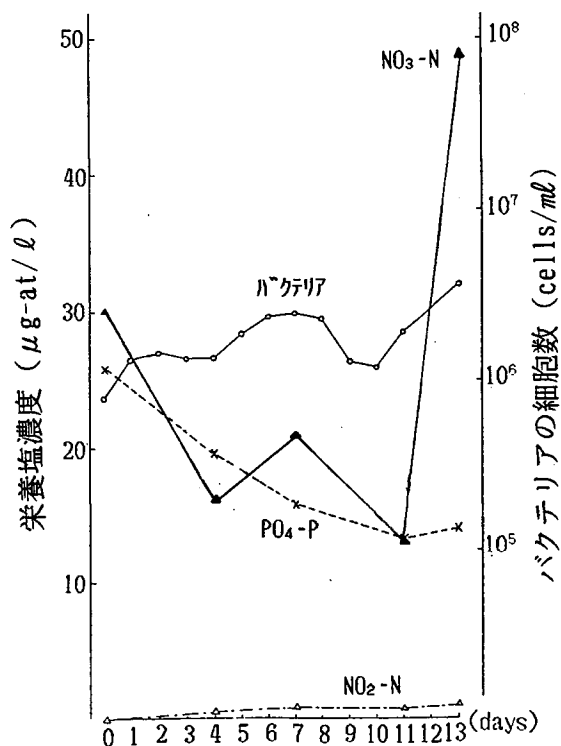


図6 栄養塩濃度の経日変化

増加すると考えられ、本実験においてもバクテリアの総菌数が、*S. costatum* の細胞数が減少している10日目以後に再び急増し、その時期の*S. costatum* の細胞や、破片の周辺部に多くのバクテリアが付着しているのが観察された。しかし、それとは別に、実験開始直後にもバクテリアの増殖が見られた。そのバクテリアと、10日目以後に増殖したものは形態が異なり、種組成が大きく変わったのではないかと考えられ、前者においては、分解すべき有機物がまだ乏しく、無機物が豊富な段階で*S. costatum* と同じように増殖したことから、独立栄養型のバクテリア、後者が従属栄養型のものかもしれない。

有機物の生産においては、全炭酸の減少と酸素の増加ならびにpHの上昇をもたらす。その後の有機物の無機化は全炭酸の増加と酸素の減少ならびにpHの低下をもたらす。本実験結果では、有機物の生産に伴うpHの上昇は示され、フェオ色素量が最大値を向かえた日にpHも最大値に達したが、その後の有機物の無機化に伴うpHの減少はあまり見られなかったことから、増殖した*S. costatum* の細胞の無機化は、実験期間中では不十分であったと考えられる。

栄養塩は、藻類の増殖に利用されて減少し、バクテリアなどによる藻類の分解により増加すると考えられる。

$\text{NO}_3\text{-N}$ のほとんどおよび $\text{PO}_4\text{-P}$ 量の値は、*S. costatum* の増殖により吸収され減少したと思われる。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 量の値は逆に増加していることから、 $\text{NO}_3\text{-N}$ が $\text{NO}_2\text{-N}$ に比較して優先的に吸収されたことを示している。 $\text{NO}_3\text{-N}$ の減少に関しては、*S. costatum* と共に増殖したバクテリアも吸収しているかもしれない。しかし、その後 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量は増加している。これは盛んになった2つめのバクテリアが有機物を分解して作られたのであろう。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 量について言えば、全体を通して減少傾向にあり、バクテリアの動向には関係していないようである。

本実験では、植物プランクトンの培養実験で多く用いられる*Skeletonema costatum*を対象として、単純な実験設定と装置を用い、閉鎖された環境下での本種の細胞数とバクテリアの総菌数の動向、そしてそれに伴う各要因との関係を測定したが、わずか10日くらいの中に激しく状況が変わっていた。*S. costatum* は栄養塩を取り入れて光合成によりその細胞数を増やし、バクテリアも同時に増殖した。やがて*S. costatum* の活性が急激に衰退するとフェオ色素量が増加した。それに伴い、種類が異なると思われる2つめのバクテリアが増加して*S. costatum* を分解し始め、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 量も急増した。pHは*S. costatum* の増殖と共に上昇し、衰退後やや維持される傾向を示した。