

Skeletonema costatum の培養時におけるクロロフィル a , 栄養塩濃度の変化

中根 徹

1. はじめに

従来, *Skeletonema costatum* 等, 微細藻類の研究に関しては, その増殖に対する栄養塩類, 金属類, ビタミン類の効果に主眼がおかれてきた。しかし, 微細藻類の増殖に伴う培地の変化, 細胞の活性度についての研究は比較的少ない。ここでは *Skeletonema costatum* を培養し, その増殖量と培地の水質変化を追跡し, 2, 3の知見が得られたので報告する。

2. 材 料

2.1 実験対象種

1979年5月31日, 東京湾芝浦沿岸でネット採集した *Skeletonema costatum* を単一種培養したものを用いた。ただし, Bacteria free ではない。

2.2 培養液

ろ過海水は, 神奈川県水産試験場の貯蔵海水をミリポアフィルター(孔径 $0.45\mu\text{m}$)でろ過して作製した。Flyn's Erd-Schreiber の培養液(以後 F E S と略す)は, このろ過海水10 l に, 硝酸塩として NaNO_3 を 1 g, 燐酸塩として $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 0.2 g 添加し, さらに土壌抽出液0.5 l を加え調整した。

2.3 培養装置

栄養塩類の分析試水量を考慮して, 10 l 下口付透明ガラスびんを用いた。図 1 に培養装置を示す。

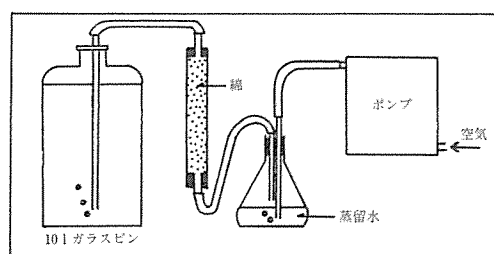


図 1 培養装置

3. 方 法

3.1 実験区および培養条件

ろ過海水と F E S 培養液の 2 つの培地について, 曝気と静置の条件下で計 4 実験区を設定した。実験区 A (ろ過海水), B (F E S) では, ポンプで送り出した空気を蒸留水に通し, さらに綿せん気槽を通過させ, 連続して曝気を行った。通気量は $15\sim 20\text{ml}/\text{min}$ であった。曝気しない C (ろ過海水), D (F E S) の実験区では 1 日に 2 回よく振とうし, 静置培養した。

各実験区とも, 水温は 20°C , 照度は 20W 白色蛍光灯を用い, $4\sim 10\text{KLux}$ で 08 時から 20 時まで照射し, 20~08 時は照射を止めた。

3.2 接 種

単一種培養した *Skeletonema costatum* が対数増殖期の終わりに近づいた時(細胞数 2×10^5 cells/ml), その 5 ml を駒込ピペットで採り, 各実験区に接種した。初期細胞数は, 100 cells/ml となる。

3.3 分析項目と分析方法

細胞数は光学顕微鏡で直接計数し算出した。細胞内のクロロフィル a とフェオ色素の分析には, 試水 100~200 ml に $MgCO_3$ を数滴加え, ワットマン GF/C フィルターでろ過したものを用いた。ろ紙上に残った懸濁物を 90% アセトンで抽出後, 分光蛍光光度計 (HITACHI 650 10-S) で測定した。

pH はガラス電極 pH メータで測定した。

栄養塩類は, ワットマン GF/C フィルターでろ過したものを試水とした。亜硝酸と硝酸態窒素 ($NO_2 + NO_3 - N$) は, 硝酸を Cu-Cd カラムで還元後, スルファニルアミド法で, リン酸態リン ($PO_4 - P$) はアスコルビン酸還元法で分析した。

化学的酸素要求量 (COD) は次の 2 つの形態についてアルカリ性法で測定した。① COD (Total): 未ろ過水を分析, ② COD (Dissolve): 栄養塩類と同様に, ワットマン GF/C でろ過したものを分析。

4. 結果

培養実験は 1979 年 6 月 13 日 ~ 6 月 25 日の 12 日間行った。各実験区における測定結果を付表に示した。

4.1 増殖特性

各実験区における *Skeletonema costatum* の増殖曲線を図 2 に示した。また増殖速度定数 kg (1/day) を下記の式から求め, 図 3 にその経日変化を示した。

$$Kg = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{W_2}{N_1}$$

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。

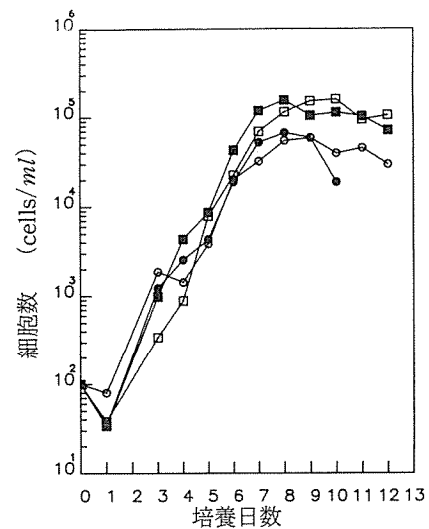


図 2 各実験区における *Skeletonema costatum* の増殖曲線。

- : A (ろ過海水・曝気)
- : B (FES・曝気)
- : C (ろ過海水・静置)
- : D (FES・静置)

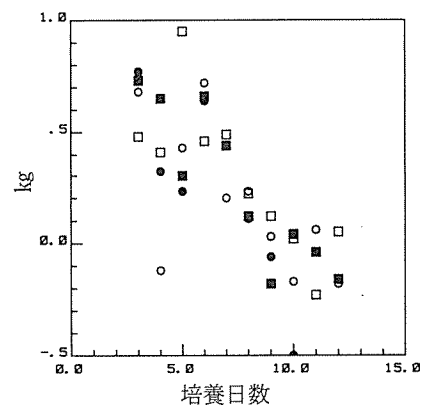


図 3 増殖速度定数 kg の経日変化。

- : A, ● : B, □ : C, ■ : D

表1 8日目に観察された2つの型の細胞数 単位: cells/ml ()内は%

型	実験区			
	A	B	C	D
a	27,100 (49.5)	17,100 (25.5)	106,800 (93.0)	139,500 (88.9)
b	27,600 (50.5)	50,000 (74.5)	8,100 (7.0)	17,400 (11.1)
合計	54,700	67,100	114,900	156,900

各実験区とも接種後3日あるいは4日後に対数的に増殖し、栄養塩を添加したFES培地のB, Dが8日目に、ろ過海水のAが9日目, Cが10日目にそれぞれ最大細胞数に達した。最大細胞数は、曝気させたA, Bでそれぞれ58,800 cells/ml, 67,100 cells/ml, 静置培養のC, Dで161,000 cells/ml, 157,000 cells/mlで、静置培養が曝気培養の約2.5倍多かった。

増殖速度定数kgは、A, B, Dでは最初の1-3日で0.6以上の高い値を示し、3-4日で低くなった後、再び高くなった。5-6日の各実験区でのkgはA:0.72, B:0.64, D:0.66(1/day)であった。実験区Cでは他の3実験区より1日早い4-5日で最大増殖速度0.95(1/day)を示した。各実験区とも増殖が最も盛んな対数増殖期にkgは高くなり、その後は変動しながらも低くなる傾向がみられた(図3)。

4.2 細胞の形態

培養期間中、*Skeletonema costatum*の細胞は図4に示したように、2つの型が出現した。8日目に観察したところ、栄養塩を加え曝気培養した実験区Bでは、全細胞の7割がb型で占められていた(表1)。表1をみると、静置培養した実験区C, DはA, Bの約2倍増殖しているが、その9割は細胞の小さいa型で占められ

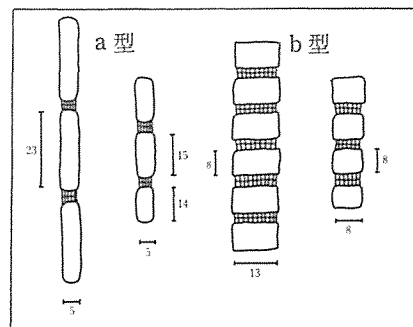


図4 培養中に出現した *Skeletonema costatum* の2つの型。数字は長さ(μ m)を示す。

ている。A, Bでは細胞数が少ない割に細胞の大きいb型がC, Dと比べて多い。

細胞の連鎖は、実験開始から数日間は7~10細胞が連結したものが多かったが、日数の経過に伴い連結する細胞数は少なくなり、2~3連のものが多く出現するようになった。

4.3 pH

実験期間中の各実験区における細胞数とpHの関係を図5に示した。

曝気した実験区A, Bは、静置培養したC, Dに比べてpHの変化幅は小さく、Aでは8.4~8.7, Bでは8.4~8.8であった。静置培養した実験区C, Dの変化幅は、Cが8.5~9.1, Dが8.4~9.5で、細胞数の増加に伴い、pHは高くなっ

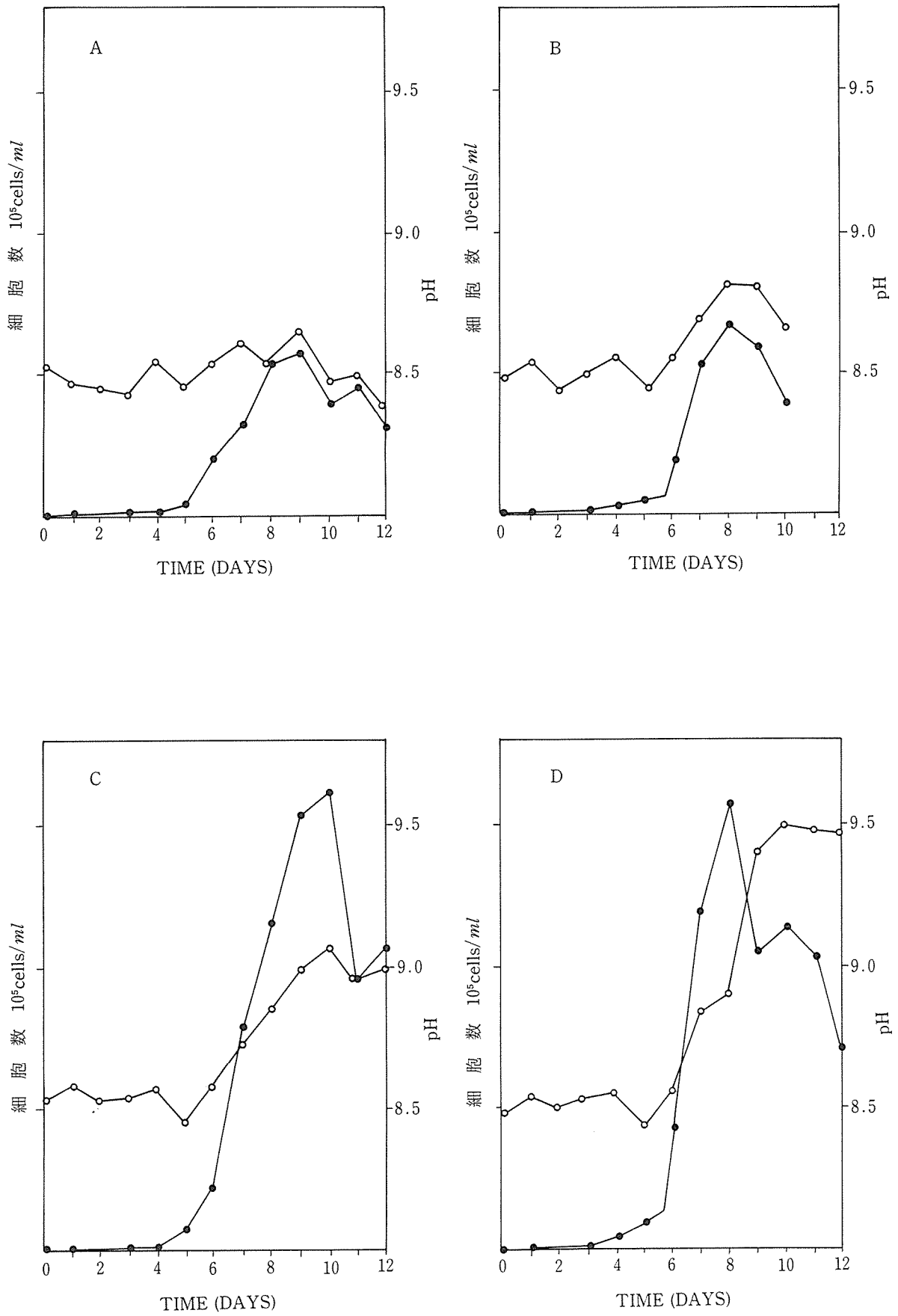


図5 各実験区における *Skeletonema costatum* の増殖曲線とpHの経日変化

●—● 細胞数, ○—○ pH

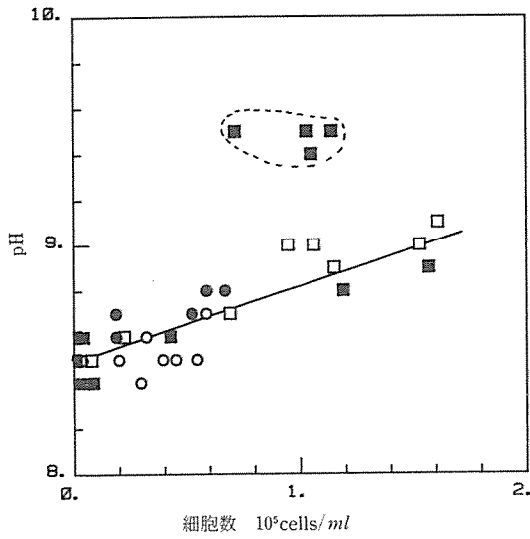


図5 細胞数と pH の関係。回帰直線は、 $pH = 0.337 \times \text{細胞数 (cell/ml)} + 8.49$ を示す。
○ : A, ● : B, □ : C, ■ : D

た。細胞数がピークに達した後でも pH は C で 9.0, D で 9.5 の付近で変動するだけであった。実験区 D の 9~12 日でみられた 9.4~9.5 の高い pH を除くと、全実験区の細胞数と pH の相関係数は 0.88 となった。

4.4 クロロフィル a, フェオ色素

図6に *Skeletonema costatum* の増殖曲線とクロロフィル a, フェオ色素の経日変化を示した。

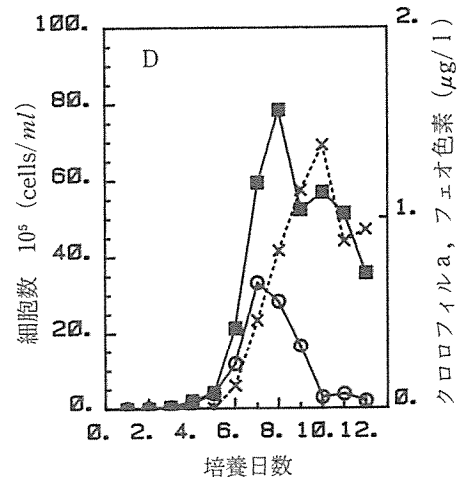
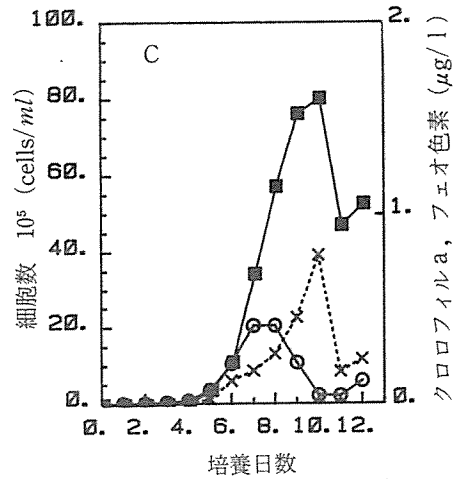
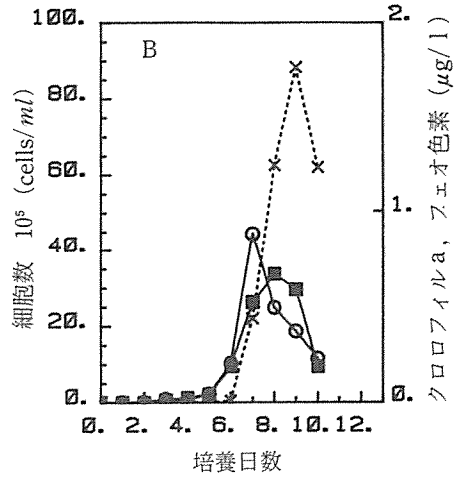
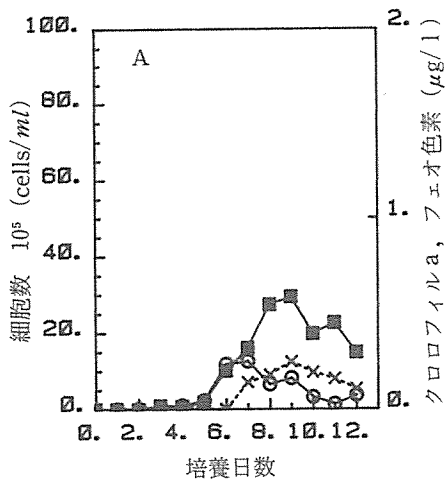


図6 各実験区における *Skeletonema costatum* の細胞数 (■), クロロフィル a (○), フェオ色素 (×) の経日変化。

各実験区とも細胞数の増加に伴い、クロロフィル a, フェオ色素が増加する傾向がみられたが、それぞれが最大値を示す日には“ずれ”が生じた。すなわち、5-6日に増殖速度定数は高くなり、7-8日にクロロフィル a の最大値、8-10日に最大細胞数、9-10日にフェオ色素の最大値がみられた。量的には、クロロフ

イル a, フェオ色素とも栄養塩を添加した B, D が、ろ過海水の A, C よりも高い値を示す傾向があった。

4.5 栄養塩

図 7 に *Skeletonema costatum* の増殖曲線と $\text{NO}_2 + \text{NO}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ の経日変化を示した。

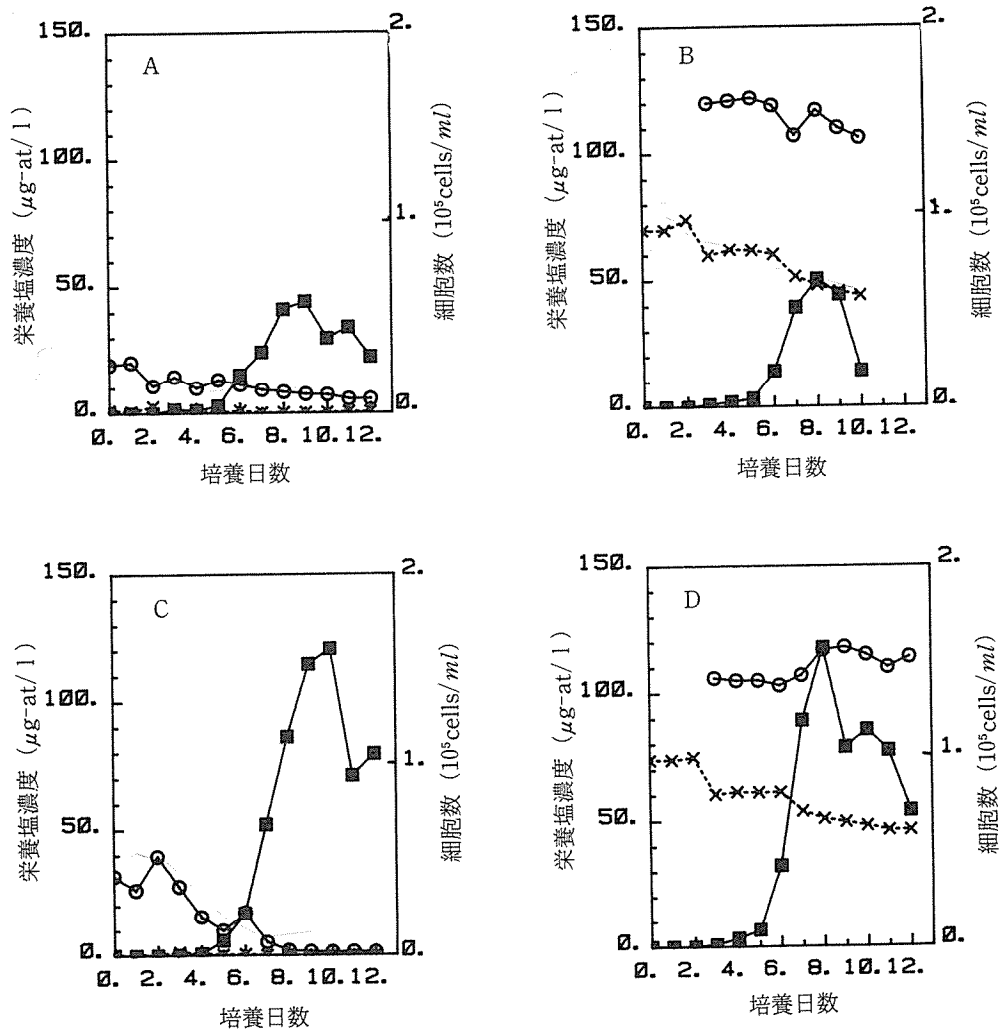


図 7 各実験区における *Skeletonema costatum* の細胞数(■), $\text{NO}_3 + \text{NO}_2\text{-N}$ (○), $\text{PO}_4\text{-P}$ (×) の経日変化。

今回の実験では、栄養塩を添加した実験区 B, D で $\text{NO}_2 + \text{NO}_3\text{-N}$ の初期濃度が $100\mu\text{g-at/l}$ と高濃度であったため、試水を希釈して分析に供した。そのため、この2つの実験区での測定値には希釈による誤差が含まれることが考えられる。Bでは細胞数のピーク後にやや減少傾向がみられたが、Dにおいては7日以後に濃度が増加した。ろ過海水を用いた実験区 A, C では、なだらかな減少傾向がみられ、初期濃度と最終濃度との差は、Aでは約 $14\mu\text{g-at/l}$ 、Cでは約 $30\mu\text{g-at/l}$ であった。

$\text{PO}_4\text{-P}$ も栄養塩を添加した実験区 B, D で初期濃度が $70\sim 75\mu\text{g-at/l}$ と高濃度であったが、対数増殖期に入る6日目から明瞭な濃度の減少を示し、Bでは10日目に $44\mu\text{g-at/l}$ 、Dでは12日目に $46\mu\text{g-at/l}$ となった。ろ過海水を用いた実験区 A, C では初期濃度は低く、実験開始後も変動を繰り返すだけで明らかな増減はみられなかった。

4.6 DOD

図8に *Skeletonema costatum* の増殖曲線と

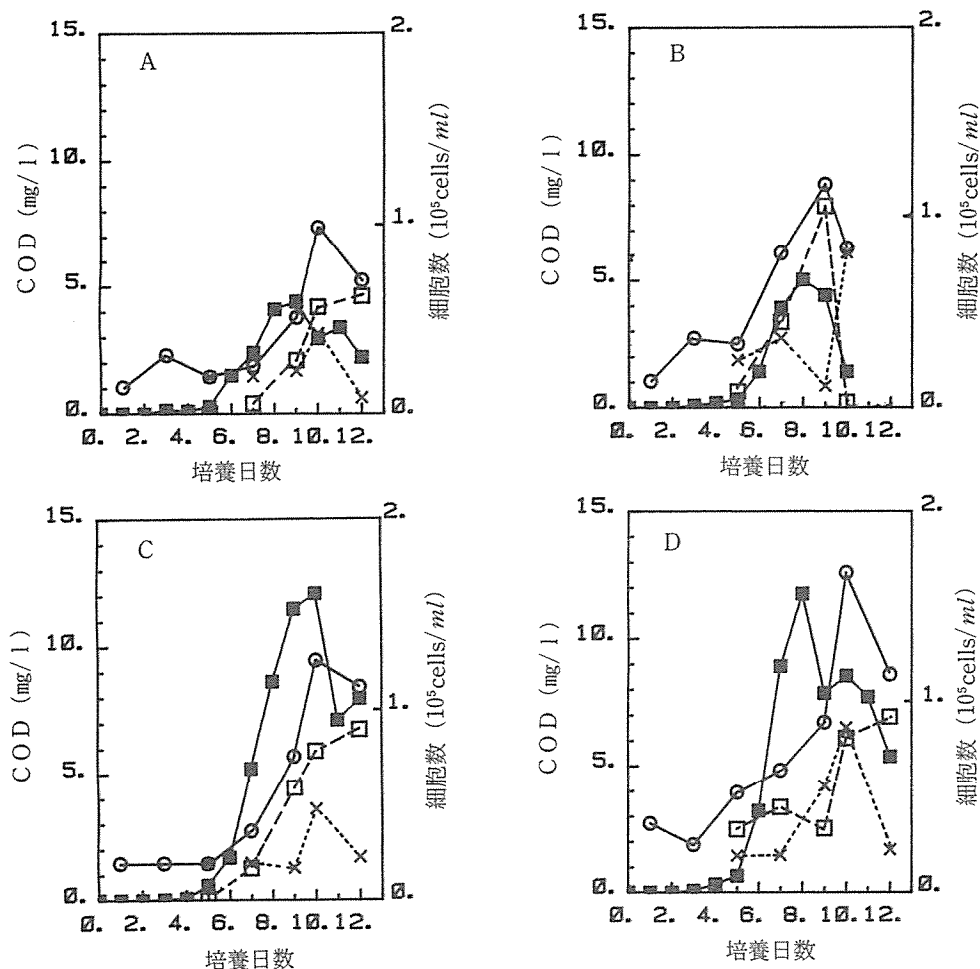


図8 各実験区における *Skeletonema costatum* の細胞数 (■), COD (○: Total, □: Dissolve, ×: Particulate) の経日変化。

CODの経日変化を示した。

CODは分析方法で示したように、ワットマンGF/Cフィルターを用いてろ過したろ過海水と未ろ過水に分け、前者をCOD(D)、後者をCOD(T)として測定した。

COD(T)は細胞数の増加に伴い高くなる傾向がみられた。その最大値は、実験区Cでは細胞数のピークと一致したが、実験区A、B、Dでは細胞数のピークの後にCOD(T)は最大値を示した。

COD(D)は実験区Bを除いて、細胞数がピークに達するまではほとんど濃度変化がみられなかった。COD(D)の最大値は、COD(T)と同様に、細胞数がピークを示した後に認められた。

COD(T)はフェオ色素とほぼ同じ日に最大値を示し、活性を失い老化した細胞がCOD(T)に反映され易くなることが考えられる。

5. 考察

藻類培養時における培養液の水質変化には、一般に次の現象が予測される。すなわち、同化物の生成(細胞の増殖)、培養種の増殖に伴う環境水(培地)中の栄養塩類の減少、排泄物、老廃物の増加、等である。本実験では対象種として *Skeletonema costatum* を使用し、同種の活性をみるためにクロロフィルaを、同化される栄養塩類として、 $\text{NO}_2 + \text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ をそれぞれ測定した

5.1 細胞の活性

図9に細胞数とクロロフィルaの関係を、図10に細胞数と単位細胞当りのクロロフィ

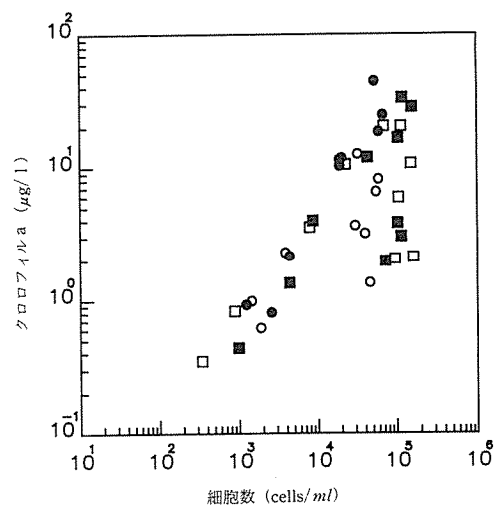


図9 細胞数とクロロフィルaの関係。

○：A，●：B，□：C，■：D

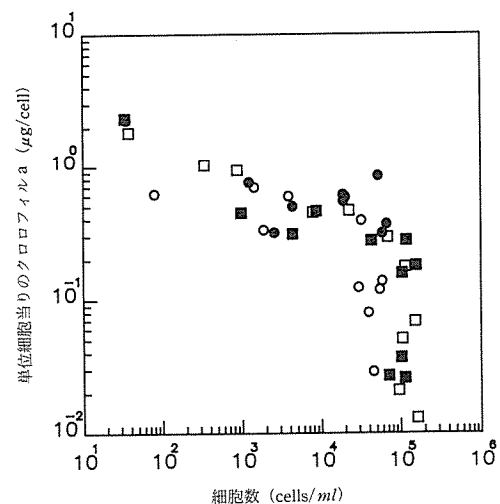


図10 細胞数と単位細胞当りのクロロフィルaの関係

○：A，●：B，□：C，■：D

ルaの関係を示した。

クロロフィルaの増加は細胞数の増加と対応し、正の相関がみられたが、この関係も対数増殖期が終わる7日目頃からくずれ始めた(図9)。これはフェオ色素が7日目頃から急激に増加し始める事から以下の原因が考えられ

る。①単位細胞当りのクロロフィル a の減少あるいは細胞の小型化。②細胞の増加と同時に老化や死滅(フェオ色素化)が進行。①に関しては図 10 に示したように、単位細胞当りのクロロフィル a が細胞数の増加に伴い減少していることから推察される。また、増殖速度定数 kg と単位細胞当りのクロロフィル a は、正の相関を示し(図 11)、増殖が盛んな時に単位細胞の活性度が高い事がうかがわれた。

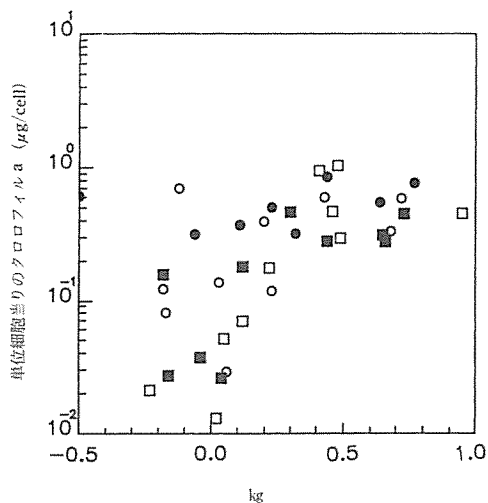


図11 増殖速度定数kgと単位細胞当りのクロロフィル a の関係
○ : A, ● : B, □ : C, ■ : D

5.2 栄養塩の同化

多くの報告で既に述べられている様に *Skeletonema costatum* は窒素源として、 $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ が等量に与えられた時、 $\text{NH}_4\text{-N}$ を優先的に吸収し次いで $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ の順で同化される。本研究では、窒素源として $\text{NO}_3\text{-N}$ を追跡したが、 $\text{NH}_4\text{-N}$ は分析項目に加えていない。実験区 A, C は培養液が貯蔵海水であることから、 $\text{NH}_4\text{-N}$

-N の存在量は微量と考えられるが、実験区 B, D では未知物質を含む土壌抽出液を加えて FES 培養液を調整しており、この土壌抽出液中に $\text{NH}_4\text{-N}$ が混入する可能性があった。実験区 B, D で $\text{NO}_3\text{-N}$ が明確な減少を示さなかった原因は、希釈誤差という分析上の問題に加えて、*Skeletonema costatum* が土壌抽出液に含まれていた $\text{NH}_4\text{-N}$ を $\text{NO}_3\text{-N}$ に優先して吸収した事が考えられる。

また、当初の実験計画では、栄養塩濃度が高い程最終的な細胞数が多くなると考えたが、実際には過海水と栄養塩を加えた FES とでは細胞数の差がほとんどみられず、静置培養と曝気培養との差が現れただけであった。このことは使用した過海水に、*Skeletonema costatum* を増殖させるのに十分な潜在的生産力があつたためと考えられ、対照とする海水の選択に誤りがあつた。

5.3 CODとして反映される物質

COD (T) と COD (D) の最大値は細胞数よりもフェオ色素のピークにほぼ一致することが認められた。これは、細胞の増殖、死滅とともに、ワットマン GF/C フィルターを通過する酸化され易い有機物が増加していることを示唆している。

COD (T) と COD (D) は、最大値を示した後はいずれも減少傾向が見られた。この原因としては、有機物の無機化、CODとして測定されない有機物への変化、あるいは細胞内への再吸収等が考えられるが、本研究のデータだけでは明らかにできない。細胞の死滅期における培地の変化、特に有機物の変化については、今後の研究課題である。

懸濁物質のCODとして計算上求めたCOD(P)の変化についても、フェオ色素の増加に伴い増加する傾向がみられた。細胞内のクロロフィルaがフェオ色素化するにつれ、CODとして反映され易くなることが示唆された。

6. まとめ

Skeletonema costatum 培養時における細胞の活性、培地中の栄養塩、CODの変化について実験を行った。

ろ過海水と栄養塩を添加したFESとは、細胞の増殖量にほとんど差はみられなかったが、曝気と静置では、最大細胞数で見ると、静置培養が曝気培養の約2.5倍の増殖量を示

した。

細胞数、クロロフィルa、フェオ色素のピークには、ほぼ1日の“ずれ”が生じた。すなわち、細胞の増殖が最も盛んな対数増殖期にクロロフィルaのピークが現れ、次に細胞数、その後フェオ色素のピークが認められた。

栄養塩類の同化については、細胞数の増加に伴い栄養塩濃度が低下したが、本実験では対照とする海水の選択、分析上の問題が残されており、明確な結論は得られなかった。

CODの最大値は細胞数よりもフェオ色素のピークとほぼ一致し、クロロフィルaがフェオ色素になるに従いCODとして反映され易くなる傾向がみられた。

付表1 分析結果：A ろ過海水・曝気

TIME (DAYS)	細胞数 (cells/ml)	pH	Chl-a ($\mu\text{g/l}$)	Phaeo ($\mu\text{g/l}$)	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	$\text{PO}_4\text{-P}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	COD(T)	COD(D) (mg/l)	COD(P)
0	100	8.5	-	-	19.3	1.27	-	-	-
1	80	8.5	0.05	0.22	20.2	0.71	1.05	-	-
2	-	8.5	0.12	0.09	10.9	2.68	-	-	-
3	1860	8.4	0.62	0.19	14.5	(6.66)	2.31	-	-
4	1420	8.6	0.99	0.88	9.98	1.04	-	-	-
5	3840	8.5	2.30	0.03	13.15	0.30	1.46	1.46	N.D
6	20100	8.5	11.8	<0.01	11.29	0.83	-	-	-
7	32100	8.6	12.6	7.06	9.20	0.10	1.89	1.47	0.41
8	54700	8.5	6.56	9.09	8.32	0.17	-	-	-
9	58800	8.7	8.16	12.4	7.43	0.12	3.78	1.68	2.10
10	39400	8.5	3.19	9.64	7.15	0.12	7.35	3.15	4.20
11	45200	8.5	1.35	7.97	5.48	0.36	-	-	-
12	29600	8.4	3.66	5.28	5.46	0.41	5.25	0.63	4.62

付表2 分析結果：B 栄養塩添加・曝気

TIME (DAYS)	細胞数 (cells/ml)	pH	Chl-a ($\mu\text{g/l}$)	Phaeo ($\mu\text{g/l}$)	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	$\text{PO}_4\text{-P}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	COD(T)	COD(D) (mg/l)	COD(P)
0	100	8.5	-	-	-	70.0	-	-	-
1	35	8.5	0.08	0.06	-	70.0	1.05	-	-
2	-	8.4	0.11	0.08	-	74.0	-	-	-
3	1220	8.5	0.93	0.07	120	60.0	2.73	-	-
4	2540	8.6	0.81	0.14	121	62.2	-	-	-
5	4320	8.4	2.16	0.01	122	62.0	2.50	1.87	0.63
6	18900	8.6	10.32	0.44	119	60.3	-	-	-
7	52400	8.7	44.4	21.9	107	51.5	6.09	2.73	3.36
8	67100	8.8	24.8	62.5	117	48.0	-	-	-
9	58900	8.8	18.6	88.3	110	45.5	8.82	0.84	7.96
10	18800	8.7	11.5	62.0	106	43.9	6.30	6.09	0.21

付表3 分析結果：C ろ過海水・静置

TIME (DAYS)	細胞数 (cells/ml)	pH	Chl-a ($\mu\text{g/l}$)	Phaeo ($\mu\text{g/l}$)	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	$\text{PO}_4\text{-P}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	COD(T)	COD(D)	COD(P)
							(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	100	8.5	-	-	31.7	0.05	-	-	-
1	38	8.6	0.07	0.06	26.1	0.28	1.47	-	-
2	-	8.5	0.11	0.08	39.5	0.31	-	-	-
3	340	8.5	0.35	0.07	27.5	1.39	1.47	-	-
4	880	8.6	0.83	0.12	15.5	0.66	-	-	-
5	7880	8.5	3.56	1.17	9.90	0.26	1.46	1.46	N.D
6	22500	8.6	10.5	5.99	17.1	0.45	-	-	-
7	69300	8.7	20.4	8.62	5.22	<0.01	2.73	1.47	1.26
8	115000	8.9	20.4	13.0	1.91	0.02	-	-	-
9	153000	9.0	10.7	22.5	1.41	<0.01	5.67	1.26	4.41
10	161000	9.1	2.11	39.1	1.23	<0.01	9.45	3.57	5.88
11	94800	9.0	2.05	8.38	1.32	0.18	-	-	-
12	106000	9.0	5.94	11.6	1.12	0.03	8.40	1.68	6.72

付表4 分析結果：D 栄養塩添加・静置

TIME (DAYS)	細胞数 (cells/ml)	pH	Chl-a ($\mu\text{g/l}$)	Phaeo ($\mu\text{g/l}$)	$\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	$\text{PO}_4\text{-P}$ ($\mu\text{g-at/l}$)	COD(T)	COD(D)	COD(P)
							(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
0	100	8.5	-	-	-	74.0	-	-	-
1	34	8.5	0.08	0.08	-	74.0	2.73	-	-
2	-	8.5	0.18	0.13	-	75.0	-	-	-
3	980	8.5	0.44	0.09	106	60.5	1.89	-	-
4	4340	8.6	1.35	0.10	105	61.4	-	-	-
5	8660	8.4	4.00	0.19	105	61.2	3.95	1.46	2.49
6	42900	8.6	11.9	6.11	103	61.3	-	-	-
7	119000	8.8	33.3	23.4	107	53.8	4.83	1.47	3.36
8	157000	8.9	28.4	41.7	117	50.8	-	-	-
9	105000	9.4	16.6	57.5	118	49.5	6.72	4.20	2.52
10	114000	9.5	3.03	69.3	115	48.0	12.6	6.51	6.09
11	103000	9.5	3.84	44.2	110	46.2	-	-	-
12	71600	9.5	1.97	47.2	114	46.2	8.61	1.68	6.93