

海産微小生物の人工海水ベースの培養液による培養と PIXE 分析法による元素分析

岩田吉弘、高橋祥子

秋田大学教育文化学部
010-8502 秋田市手形学園町 1-1

1 はじめに

海産生物は海水中の物質移動に大きな役割を果たしている^{1,2)}。海産藻類中の元素存在量は、海水から藻類が全ての栄養を直接海水から得ていることと、藻類が海洋における第一次生産者である点から大変興味深い。著者らは、この役割を定量的に評価するため、PIXE 分析法により微細藻類中の主要および微量元素の定量をおこない、微量金属の生物濃縮を研究してきた^{3,4)}。

これまでの研究では、微細藻類は、海水に栄養塩を添加した栄養強化海水中で培養された。海水は、岩手県釜石市の太平洋岸から採取し、岩手県海洋技術センターで 0.5 μm のフィルターハウジングでろ過されたろ過海水を使用してきた。しかし 2011 年 3 月の東日本大震災で岩手県海洋技術センターが罹災したため、ろ過海水の入手が困難となった。

本研究では、熱帯魚飼育用の人工海水に栄養塩を添加した培養液を調製し、海産藻類と動物プランクトンのワムシの培養を試みた。PIXE 分析法を用い、藻類およびワムシの元素分析をおこない、培養液による元素組成の違いを調べた。

2 実験

2.1 海産微細藻類の培養

海産藻類(真正眼点藻綱)の *Nannochloropsis sp.* (以下藻類) は、岩手県釜石市の岩手県海洋技術センターから提供され、著者の研究室で継続培養された。藻類は球形で直径 2 - 4 μm であった。培養液のベースとなる海水は、岩手県海洋技術センターから提供されたろ過海水と、熱帯魚飼育用の人工海水を用いた。人工海水は、ReefSalt (Seachem Laboratories) 34 g を 1 L の精製水に溶解して調製した。500 mL の耐熱ネジロビンにろ過海水あるいは人工海水を 200 mL とり、これに 40 mL の精製水を加え希釈した。さらに 2 種類の栄養塩、5 種類の生体必須元素、3 種類のビタミン、EDTA および pH 緩衝剤の HEPES を含む PES³⁻⁵⁾ を 0.4 mL 加え、水酸化ナトリウムあるいは塩酸を用いて、pH を 7.8 から 8.0 に調整し、培養液とした。使用直前に 2 気圧、120°C で 2 時間の加圧滅菌を行った。継続培養では、培養液 200 mL に 20 mL の藻類の保存溶液を新しい培養液に移し、22.0°C、3200 lux (12 時間明暗) の密閉培養し、新たな保存溶液とした。中規模培養では、3 L の三角フラスコに培養液を 2 L 調製し、ホットプレート上で加熱滅菌し、保存溶液 80 mL を加えた。三角フラスコに通気性のあるシリコン栓でフタをして、22.0°C、3200 lux (12 時間明暗) で通気培養した。藻類の細胞数はビルケルチュルク血球計算版と光学顕微鏡を用いて計数した。

2.2 動物プランクトンのワムシの培養

動物プランクトンとしてシオミズツボワムシ (*Brachionus plicatilis* 以下ワムシ) を選び、耐久卵 (L 型ワムシ耐久卵、クロレラ工業) を購入し、ふ化させて培養した。500 mL の耐熱ネジロビンに 200 mL の人工海水をとり、これに 50 mL の精製水を加え希釈した。水酸化ナトリウムあるいは塩酸を用いて、pH を 7.8 から 8.0 に調整し、使用直前に 2 気圧、120°C で 2 時間の加圧滅菌を行った。これに耐久卵、約 25000 粒を入れ、27.0°C、3200 lux (12 時間明暗) でエアポンプによるエアレーションによる通気培養をおこなった。餌として、中規模培養した *Nannochloropsis sp.* の培養液を用いた。耐久卵投入後、藻類の培養液を 24 時間後に 20 mL、5 日以降毎日 10 mL 与えた。培養は 18 日間おこなった。個体数は、培養液 3 mL を界線スライドガラスにとり、光学顕微鏡を用いて計数した。

2.3 PIXE分析法による微小生物の元素分析

藻類分析用ターゲットは、細胞約 2.4×10^7 cell/mL含む培養液3 mLをニュークリポア・ポリカーボネートフィルター(25 mm ϕ 、孔径 1.0 μm)で吸引ろ過し、風乾し、Mylar製のターゲットフレームにマウントして調製した。吸引ろ過した藻類の質量を求めるため、別に培養液10 mLを吸引ろ過し、85°Cで20分乾燥し、質量を測定した。

ワムシ分析用ターゲット調製のため、ワムシをマイクロプレートに移して精製水で洗浄し、培養液の塩分を取り除いた。洗浄したワムシを3から8匹、パストールピペットでメンブランフィルターにのせたニュークリポア・ポリカーボネートフィルター(25 mm ϕ 、孔径 1.0 μm)の中心部にのせた。ワムシ周囲の水分は短時間の吸引ろ過で取り除いた。これを風乾し、Mylar製のターゲットフレームにマウントしてターゲットとした。

いずれのターゲットもc (2 mm径、電流値 30 - 60 nA、電荷量 20 - 60 μC)で照射された。発生するX線はSi(Li)半導体検出器で測定し、スペクトルは非線形最小自乗プログラム(SAPIX)で解析された^{6,7)}。藻類分析用ターゲットは、均一ターゲットとして単位面積あたりの元素量、ワムシ分析用ターゲットはスポットターゲットとしてフィルター上の元素量を求めた。

3 結果と考察

3.1 人工海水ベースの培養液による藻類およびワムシの培養

藻類およびワムシの培養では、汽水域の塩分濃度が適するため、ベースの海水はいずれも精製水で希釈して用いた。

藻類は、岩手県海洋技術センターから提供されてきたが、震災のため再入手は不可能となった。このため継続培養には慎重におこなう必要がある。個体数のカウントは開封作業となるため、他の藻類の混入の危険性を増す。このため継続培養の状況は、着色の程度で観察した。その結果、藻類の継続培養は、人工海水ベースの培養液を用いても、ろ過海水同様であることが確認できた。一方、藻類はワムシの餌とするため、人工海水ベースの培養液で、中規模培養をおこなう必要がある。継続培養(密閉培養)では、藻類は400時間で約 2×10^6 cell/mLまで増殖した^{3,4)}。今回おこなった人工海水ベースの培養液による中規模培養(通気培養)では、400時間で約 2.4×10^7 cell/mLとなり、ワムシの餌として十分な細胞密度となる拡大培養に成功した。

ワムシはろ過海水ベース、人工海水ベースのいずれの培養液でも2日からふ化がはじまり、10日で1 mLあたり5個体まで増殖した。海産仔稚魚の養殖では、個体密度を1 mLあたり100個体程度まで増殖させる⁸⁾。これは海洋では想定できない個体密度である。またPIXE分析では数ミリグラムの試料で十分なため、現状の個体密度で照射試料の作成には十分である。また、耐久卵をふ化させることで、いつでもワムシを得ることが出来るので、継続培養はおこなっていない。

3.2 PIXE分析法による藻類の元素組成の比較

ろ過海水ベース、人工海水ベースで培養した藻類のPIXE分析の結果をTable 1に示す。藻類中の12-13元素が定量できた。これまでの報告では、ナトリウムと塩素は分析結果に再現性が得られなかったが^{3,4)}、今回は相対標準偏差で10-40%と比較的再現性が良かったのでリストした。海水中に多く存在するNa、Cl、S、KおよびCaは両者ともほぼ同程度の存在量であった。また海水中の微量元素の鉄は同程度であった。それ以外のMgと微量元素は、ろ過海水ベースより人工海水ベースで培養した藻類中の存在量が少ない傾向が見られた。いずれの培養液についても、P、Siや遷移金属の含有量を求めることは容易ではなく、現在のところ正確な量は測定していない。しかし、生物濃縮で関心が持たれる遷移金属の含有量が少ないことは、バックグラウンドが低いことになり、研究には好都合である。また、数百リットル分のReefSaltをストックしているので、安定な品質の培養液を長期にわたり大量に準備できることになった。ことため、実験室で海産生物を飼育する生物濃縮の研究においては、ReefSaltをもちいる人工海水ベースの培養液は、従来のろ過海水ベースより優れていると言える。

3.3 PIXE分析法によるワムシの元素組成の比較

細胞壁をもつ藻類に比べ、体が柔らかいワムシのターゲット作成は容易ではない。ワムシの培養液を藻類が通過するニュークリポア・ポリカーボネートフィルター(25 mm ϕ 、孔径 10 μm)で吸引ろ過し、均一ターゲットを調製しようと試みた。しかし、吸引の負圧でフィルター上のワムシの体は壊れ、体液が流れ出しているように観察された。このため、吸引を緩やかにすると、ワムシがフィルターの外周に集まり、均一ターゲットが作成できなかった。このため、洗浄したワムシを一個体ずつ手作業でフィルターの中心部分に置いてスポットターゲットとした。1個体では分析感度が十分に得られなかったため、3-8個体を同時に照射して、各元素の定量値(ng)を個体数で割って、1個体当たりの元素存在量とした。

ろ過海水ベース、人工海水ベースで培養したワムシの PIXE 分析の結果を Table 2 に示す。ワムシ中の 0.2-2000 ng 存在する 9-10 元素の定量ができた。ほとんどの場合で、相対標準偏差は 10%以下で再現性も良かった。比較的再現性が良かったのでリストした。両者を比較すると、Cl、Ca および Sr を除くと、ろ過海水ベースより人工海水ベースで培養した藻類中の存在量が少ない傾向が見られた。この理由は今のところ不明であるが、Cl と Ca は餌の藻類の場合でも元素含有量に差が小さいことが影響しているのかも知れない。今回の研究では、生物濃縮の研究におけるワムシの培養においても、元素含有量のバックグラウンドの点で、人工海水ベースの培養液は、従来のろ過海水ベースより優れていると言える。

Table 1. PIXE analysis for marine micro algae* cultured by two kinds of culture solutions (µg/g)

	Natural Seawater	Artificial Seawater
	n=5	n=5
Na	2700 ± 1100	3400 ± 1100
Mg	1600 ± 700	690 ± 250
Si	1200 ± 200	300 ± 150
P	470 ± 42	200 ± 20
S	620 ± 50	790 ± 190
Cl	5700 ± 700	6700 ± 1400
K	480 ± 20	650 ± 90
Ca	240 ± 20	230 ± 90
Cr	4 ± 1	11 ± 4
Mn	76 ± 4	15 ± 2
Fe	88 ± 7	110 ± 10
Cu	4 ± 1	ND
Zn	10 ± 1	6 ± 1

* *Nannochloropsis sp.*

Table 2. PIXE analysis for marine micro zooplankton* cultured by two kinds of culture solutions (ng)

	Natural Seawater	Artificial Seawater
	n=5	n=3
Na	510 ± 30	230 ± 10
Mg	310 ± 20	83 ± 4
Al	9 ± 5	7 ± 2
S	140 ± 10	120 ± 10
Cl	1800 ± 100	2100 ± 100
K	98 ± 5	50 ± 5
Ca	47 ± 3	65 ± 3
Fe	1.5 ± 0.1	0.50 ± 0.03
Zn	3.4 ± 0.2	0.20 ± 0.03
Sr	ND	2.0 ± 0.2

* *Brachionus plicatilis*

4 まとめ

本研究で、従来のろ過海水ベースの培養液と同様に人工海水ベースの培養液で藻類の *Nannochloropsis sp.* の継続培養が可能であることが確認できた。また、通気培養による中規模培養においてワムシの餌として十分な細胞密度まで培養を拡大できた。動物プランクトンのシオミズツボワムシ (*Brachionus plicatilis*) の培養においては、耐久卵を用い、人工海水ベースの培養液中で、ふ化、増殖させることに成功した。これらの海産微小生物の PIXE 分析用ターゲットを作成し、NMCC サイクロトロンからの 2.9MeV のプロトンビームによる PIXE 分析に供した。PIXE 分析では、主要から微量の約 10 元素を同時定量できた。得られた元素存在量は、藻類、ワムシのいずれもろ過海水ベースより ReefSalt を用いた人工海水ベースで培養した藻類中の存在量が少ない傾向が見られた。生物濃縮の研究では、遷移元素など生物濃縮に関心が持たれる元素の含有量が少ないことは有利である。

以上の検討により、実験室内で海産微小生物を培養し、微量金属の生物濃縮の研究においては、ろ過海水ベースより人工海水ベースの培養液の使用が有利であることがわかった。

謝辞

本研究を進めるにあたり御協力下さった、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターのスタッフに感謝申し上げます。

文 献

1. W. S. BROECKER, *Chemical Oceanography*, Harcourt Brace Jovanovich Inc., 1974.
2. F. J. MILLERO, *Chemical Oceanography* 3rd ed., CRC press. 2006.
3. 岩田吉弘, 佐藤専, 佐々木裕美子, 伊藤亮, 倉町宏治,
NMCC 共同利用研究成果報文集 10, 162 (2002).
4. Y. IWATA, A.SATO, Y. SASAKI, R. ITO, and K. KURAMACHI,
J. Radioanal. Nucl. Chem., 264 (2005) 295.
5. L. PROVASOLI, *Proceeding of US - Japan Conference, Cultures and Collection of Algae*,
ed. by A. WATANABE, A. HATTORI, p63, Japan Society of Plant Physiology (1968).
6. K. SERA, T. YANAGISAWA, H. TSUNODA, S. FUTATSUGAWA, S. HATAKEYAMA,
Y. SAITOU, S. SUZUKI, H. ORIHARA, *Intern. J. PIXE*, 3 (1993) 325.
7. K. SERA, S. FUTATSUGAWA, *Nucl. Instr. Meth.*, B 109/110 (1996) 99.
8. 福所邦彦、平山和次編、初期餌料生物-シオミズツボウムシ-、恒星社厚生閣 (1989).

Cultivation of marine micro organisms by the culture solution based on the artificial seawater and elemental analysis by PIXE

Yoshihiro Iwata and Shoko Takahashi

Department of Chemistry, Faculty of Education and Human Studies, Akita University
1-1 Gakuen-Machi, Tegata, Akita 010-8502, Japan

Abstract

The elemental abundances in the marine micro organisms are very interesting because they have played the large role in the mass transfer in the ocean. By this research, it has checked that continuous cultivation of marine micro algae (*Nannochloropsis sp.*) by the culture solution based on the artificial seawater (ReefSalt, Seachem Laboratories) was possible like the conventional culture solution based on the filtration seawater. In the middle-scale cultivation by aeration cultivation of the algae, cultivation has been expanded to cell density sufficient as food of wheel animals (*Brachionus plicatilis*). In cultivation of the wheel animal, the resting egg was used and it succeeded in making it hatch and increase in the culture solution based on the artificial seawater. The target for PIXE analysis of these marine micro organisms were created and they were bombarded by a 2.9MeV proton beam from a NMCC cyclotron. The simultaneous determination of the main and trace elements in the organisms was carried out by PIXE analysis. The tendency with few amounts of element existence in the organisms cultivated by the culture solution based on the artificial seawater than that of by the culture solution based on the filtration seawater was seen. In research of the bioaccumulation, it is advantageous that there is little content of the elements.