

蛍光光度法による珪藻の増殖速度の測定

野呂明美 (生物資源学部・生物生産機械学講座)

はじめに 今年4月より、システム制御研究室の卒論テーマ「藻類の生長に及ぼす音響の効果」(卒研生：中谷)に技術スタッフとして取り組むことになった。音響の効果を評価するために、蛍光光度法による珪藻の生長曲線を作成した。この方法は、珪藻細胞中にある葉緑体の、チラコイド膜に存在する、クロロフィルaから放出される蛍光強度を測定することにより、珪藻細胞の増殖を計測する方法である。珪藻の生長曲線より与えられる、細胞の平均世代時間、比増殖速度、誘導期の長さ(Time lag)、定常期の細胞数(Maximum-growth)から、珪藻細胞の増殖を評価した。この方法の長所、短所、測定精度を上げるための工夫点などについて紹介する。

実験試料および装置 実験試料として、天然の植物プランクトンより無菌分離した野生株を、水産微生物学研究室(耳塚氏)より分譲して頂き用いた(野生株の種類については、現在同定中である)。培地は、天然の海水を濾過したものに、栄養剤を添加して調整した液体培地SWM-IIIを用いた。培地の組成を表1に示す。

写真1は、珪藻培養中のグロースキャビネット内部を撮影したものである。珪藻は、(株)日本医化器械製作所製グロースキャビネットNC-220-Sにより、20℃、昼白色蛍光灯11.00 klux(光量子量 86.4 μE/m²/s)、明期14時間、暗期10時間のサイクルで静置培養した。

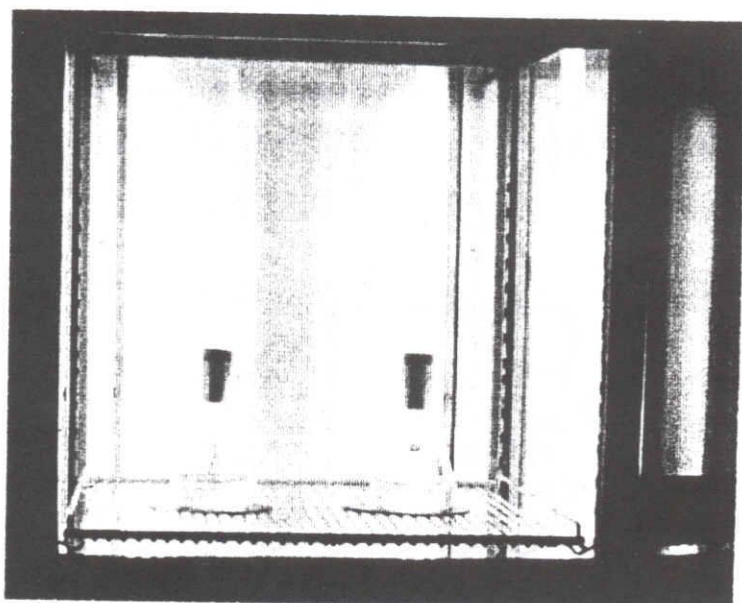


写真1 グロースキャビネット内で培養中の珪藻

表1 液体培地SWM-3の組成

NaNO ₃	2.0mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1mM
Na ₂ SiO ₃	0.2mM
NaSeO ₃	10 μM
FeCl ₃	2.0 μM
Na ₂ EDTA	30.0 μM
"Tris" buffer	500mg
P-1 metals [*]	10ml
S-3 Vitamins ^{**}	2ml
Sea Water	1000ml
pH	7.5

* P-1 metals

H ₃ BO	1.0mM
MnCl ₃ ·4H ₂ O	3.5x10 ⁻² mM
ZnCl ₂	4.0x10 ⁻³ mM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0x10 ⁻⁴ mM
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.0x10 ⁻⁶ mM

** S-3 Vitamins

Vitamin B ₁ -HCl	0.5mg
Ca-Pantothenate	0.1mg
Nicotinic acid	0.1mg
p-Aminobenzoic acid	10.0 μg
Biotin	1.0 μg
Inositol	5.0mg
Folic acid	2.0 μg
Thymine	3.0mg
Vitamin B ₁₂	1.0 μg

グロースキャビネット内の光量子量は、小糸工業製 小型光量子センサ IKS-25を使用し測定した。蛍光強度測定には、SEQUOIA-TURNER社製蛍光光度計 MODEL 450を使用した。写真2に、カバーをはずした蛍光光度計の内部の様子を示す。ランプ室(a)内の光源からでた光は、スリット(b)を通り、440nm narrow bandフィルター(c)を通過して、セル室内の試料(d)に照射される。クロロフィルaが発した蛍光は、垂直方向から665nm以下の波長の光をカットするフィルター(e)を通して、検出器(f)に達する。検出器には光電子増倍管が使われており、感度良く測定できる。

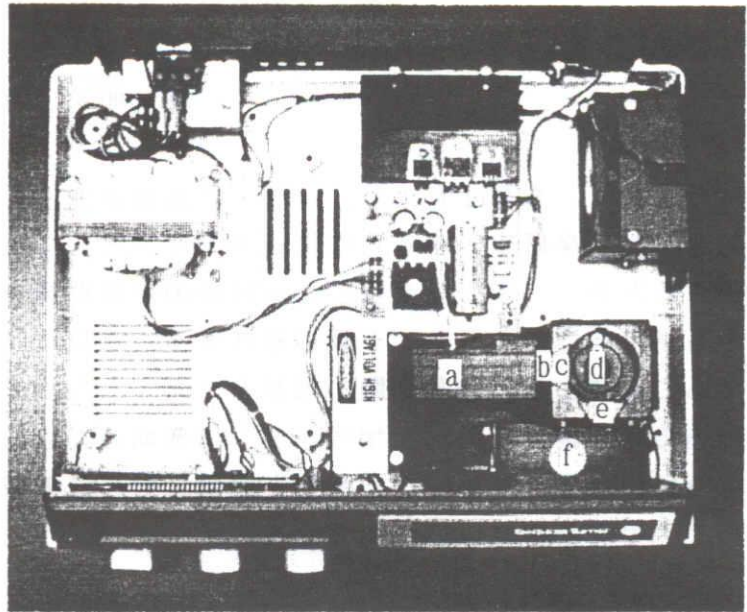


写真2 蛍光光度計の内部

音波は、三菱製スピーカーACT-1を直接三角フラスコ低部に取り付け、ファンクションジェネレータを介し、周波数1000 Hzを選択し、明期に14時間連続照射した。

実験方法 300mlの三角フラスコに培地195mlを入れ、オートクレーブで120℃、20分間滅菌処理した。滅菌後、前培養4日目の試料を5ml接種し、グロースキャビネット内で培養を開始した。サンプリングは24時間毎に3回、暗期に、三角フラスコ内の試料をよく攪拌した後行なった。サンプリングおよび接種は、クリーンルーム内のクリーンベンチで、無菌操作により行った。蛍光強度は、蒸留水をブランクにしてゼロ合わせをしてから、専用のラウンド型セルにサンプリングした試料を注入し、よく攪拌後測定した。感度は、標準試料として、濃度1mg/lに調製した和光純薬製ウラニン（フルオレセインナトリウム）水溶液を用いて校正した。セルは標準試料を用いて、全てのセルが同一の蛍光値を示すよう少しずつ回転させて蛍光値を測定し、最も良い方向をマーキングしたものを使用した。

蛍光光度法について 図1に、クロロフィルaの構造を示す。クロロフィルaは、Mgが4個のピロールで囲まれた構造をしている。クロロフィルaは、青色部440nmと赤色部680nmに強い吸収を持ち、赤色部の長波長側に蛍光を発生する。クロロフィルaの発する蛍光強度を測定することにより、クロロフィル量を求めることが出来る。細胞数とクロロフィルの量は、リニアな関係にあり、生長曲線の縦軸に細胞数の対数の

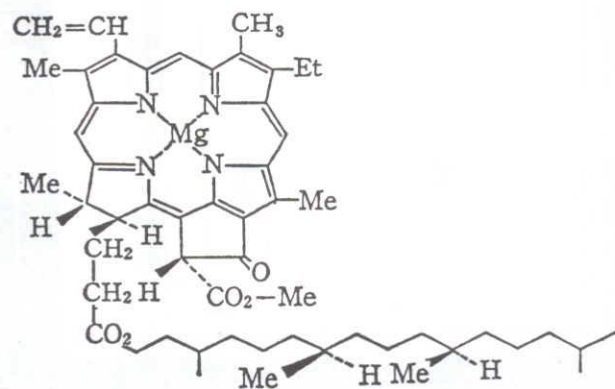


図1 クロロフィルaの構造

代わりに、クロロフィル a の蛍光強度の対数を用いることが出来る。

蛍光光度法の短所と長所について 蛍光光度計を導入するまでは、微細藻類の増殖の測定は、希釈した試料中の細胞数を光学顕微鏡で、計数専用のスライドガラス（トーマの血球計算盤）を用いて、目で見ながら計数する方法で行っていた。この方法は、時間と労力を要したいへんであった。

蛍光強度を測定する方法には、濾過試料から溶媒（アセトン）で植物色素を抽出してから測定する抽出蛍光法と、試料中の植物プランクトンに含まれるクロロフィル濃度をそのまま蛍光光度計で測定する現場蛍光法がある。今回採用した測定法は、現場蛍光法である。この方法は、採取した海水を処理せずに直接測定するので、従来、海洋の植物プランクトンの相対的な分布特性を把握するのに、有効な方法として利用されてきた。測定が簡便で容易であるが、試料を濃縮せず測定するため、高感度にする必要があり、このため測定精度は低いとされている。また、抽出法に比べ透明で均質な試料でないため、安定した蛍光値を得にくいと言われている。しかし、サンプルを前処理無しに、非常に簡単に測定できる利点がある。

精度の良い生長曲線を得るための工夫点

図 2 (a) に、以前作成された生長曲線を示す。図 2 (b) に、先月実験した結果から作成した生長曲線を示す。改善した点を以下に記す。

- ① 生長速度に合ったサンプリング間隔にした。
- ② ブランクに純水を用い、試料から発する蛍光のみを計測するようにした。
- ③ 感度良く測定するために、スパン、ゲイン、スリット幅を最適値に、調整しなおした。
- ④ セルの個体差をなくすように、標準試料を用いてセル補正を行った。
- ⑤ 測定精度を論ずることができるよう、サンプリング数を 1 回から 3 回に増やした。

以上の点を改善することにより、データのばらつきが少なくなり、生長曲線から、増殖速度、平均世代時間、Maximum Growth を精度良く、求めることが出来た。

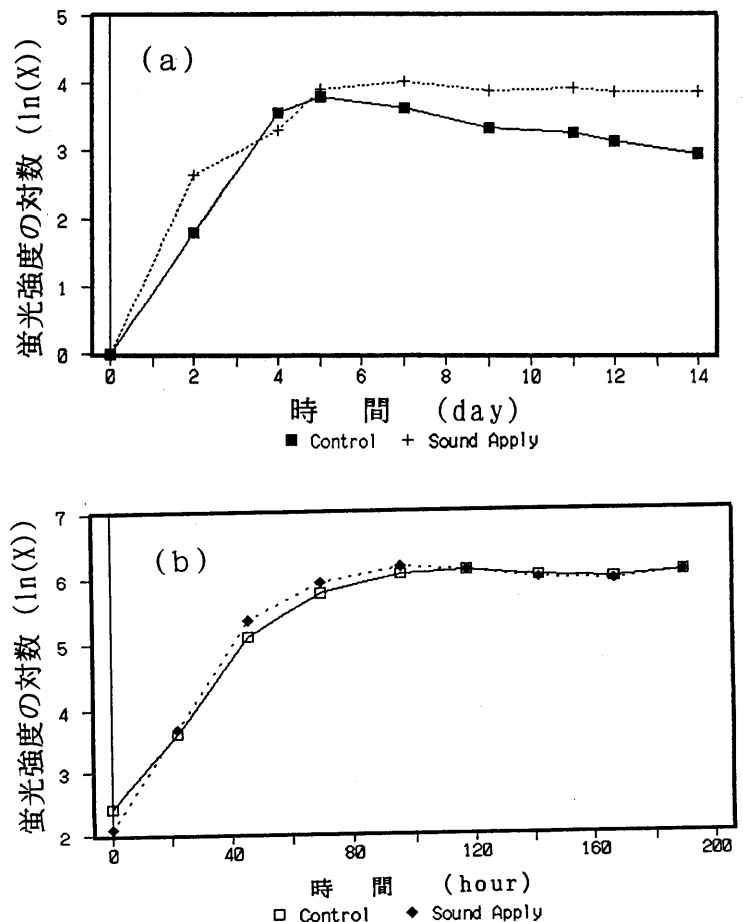


図 2 珪藻の生長曲線

結果と考察

前述の改善を加えて測定し取得した、図2(b)の生長曲線から計算して求めた、珪藻細胞の増殖の評価を表2に示す。誘導期の時間は、コントロールでは4.14時間、音波照射側では観測されなかった。最大増殖量はコントロールでは6.112、音波照射側では6.175と大きい差は見られなかった。細胞分裂から次の細胞分裂までの時間、差平均世代時間はコントロールでは10.75時間、音波照射側では9.67時間、比増殖速度は、コントロールで0.0645、音波照射側では0.0717であった。以上の結果から、音波を照射することにより、誘導期の時間が短くなること、増殖が促進され増殖速度が速くなり、平均世代時間は短くなることが判った。しかし、音波照射の効果は、音波以外の培養条件、例えば倍地作製に用いた海水の状態による差などに比べて非常に小さく、周波数を1000Hz、500Hz、100Hzと変化させても音波照射側とコントロール側の間に大きい差はみられなかった。

表2 生長曲線より与えられる細胞増殖の評価

	Control	Sound Apply
Time lag (hour)	4.14	0
Maximum Growth (ln Xt)	6.112	6.175
平均世代時間T (hour)	10.75	9.67
比増殖速度 μ (ln2/T)	0.0645	0.0717

参考文献

- 1) 御橋廣真他著，日本分光学会測定法シリーズ3，蛍光測定－生物科学への応用－，(株)学会出版センター，1983.
- 2) 気象庁編，海洋観測指針，(財)日本気象協会，1990.
- 3) 林 孝三他著，植物色素－実験・研究への手引き－，(株)養賢堂，1980.
- 4) 西澤一俊，千原光雄編，藻類研究法，共立出版(株)，1985.
- 5) 平本幸男，毛利秀雄編，生物学概論，放送大学教材，1994.
- 6) 高辻正基編，地球を救うバイオテクノロジー，(株)オーム社，1991.