テトラゾリウム塩によるオゴノリの傷害 ・生死の判定について

尾 形 英 二

(大阪市立大学理工学部)

Application of Tetrazolium Salt as a Viability Indicator for *Gracilaria verrucosa* (HUDSON) PAPENFUSS

Eizi OGATA

While the visual estimation of the TTC reduction by *Gracilaria* was almost impossible due to its dark reddish-brown colour and compactly parenchymatous structure, it was found effective to employ the quantitative determination of the formazan production by the optical density measurement at 490 m μ following the extract with toluene (Fig. 1). Using 0.2 g. in fresh weight of material, incubation for 3 hours at 30°C. in 1 mg./cc. solution of TTC gave desirable results (Fig. 2). Illumination and evacuation were not indispensable (Table 2). Differences were also distinguishable by visual comparison of the extracts in their colour gradation.

Significantly serious injury discriminated by the above procedure, was caused by copper sulfate of 10⁻⁵ M or above (Table 3), exposure to diluted salinity of 25% or below (Table 4), elevated temperature of 31°C (Table 1 and 5) and 66% relative humidity for 3 days or over (Table 6), leading to death after 5 days.

海藻のうちでも、アサクサノリ、ヒトエグサ等葉状体のものは傷害・生死の判定が比較的容易である^{1),2)}特に TTC の還元による呈色を比べる方法は良好な結果がえられる。

ところがオゴノリは枝状に分岐した体制をもち、組織は緊密で内層と外層の構成がちがう。また表層の同化組織は地色が濃い暗紅褐色なので、外観的には勿論 TTC による呈色の差を見わけるともむづかしい。

このようなオゴノリについては、TTC 反応によつて藻体内に生成されたフォルマザンを抽出し、その抽出液の色調の比較またはその分光的測定による方法が既報³⁾の結果からみて有利である。

こゝでは、1956 年 5～6 月にかけて、大阪湾内に自生するオゴノリ *Gracilaria verrucosa* (HUDSON) PAPENFUSS でおこなつた結果についてのべる。

反応条件の検討

TTC 濃度と反応時間 反応に適当な濃度をしらべるために、0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/cc の濃度の TTC 海水溶液（海水は 1/2 にうすめたもの）を作り、そのおのおの 6cc 中にオゴノリ片 0.2 g づつをひたし、30°C、排気、照明下で反応させた。

一定時間反応させた各サンプルから、フォルマザンのトルオール抽出液を得るために既報の方法³⁾で抽出する。その抽出液の吸収曲線は第 1 図のようである。

すなわち、1 時間の処理では 4 mg/cc でもつとも多く還元され、処理した TTC 濃度が低いとその 490 m μ におけるピークの吸光度も低くなる。クロロフィル等による吸収が低波長部に僅かにみられるが、490 m μ におけるフォルマザンの吸収には影響が少い。

TTC 濃度を高めると藻体による還元量はふえる。しかし処理時間が長くなるとかえつて高濃度で還元量が増える。その関係を 490 m μ における吸光度で示したのが第 2 図である。

この図からわかるように、反応時間が 3 時間で、TTC 濃度が 2 mg/cc のときがもつとも反応がけんちよで効率がよいのであるが、1 mg/cc でも 3 時間の反応で相当効率がよいので、以下の実験ではすべて 1 mg/cc、3 時間を反応の基準とした。

Fig. 1. Spectral absorption curves of toluene extracts from 0.2 g. of *Gracilaria* thalli. Incubated for 1 hr. at 30°C under illumination and evacuation in solutions of different TTC concentrations. 4.0 (A), 2.0 (B), 1.0 (C) and 0.5 (D) mg./cc. TTC respectively. Peaks at 490 mμ represent formazan.

4 mg/cc のような高濃度の TTC 溶液中に長時間おかれると、かえって還元量がへるの、このような条件では藻体が多少害をうけるためと思われる。

温度 TTC 反応 (1 mg/cc の場合) におよぼす温度の影響を、暗中で排気せずにしらべた。3 時間処理の結果を第 1 表に示す。25~30°C の間で還元量が多く 30°C で最高の値がみられる。32°C 以上では、あきらかに高温による傷害のためと思われる反応の低下がみられる。室温 (12°C) では反応不十分である。

排気 23°C と 30°C において、排気による反応促進の効果をみたが (第 2 表) オゴノリについては一般に排気の実作はあまり効果がみられない。

照明 排気の条件と同時に照明の効果をしらべると、やはり第 2 表に示すように、照明もほとんど反応促進に効果がみられない。温度や排気の有無にもあまり関係がみられない。

Table 1. Relation of formazan production (optical density) by 0.2 g. of thalli to varied temperature. Note a decline above 32°C. Tested for 3 hrs. in 1 mg./cc. TTC solution under illumination and evacuation

Temperature	12	25	28	30	32	34
Optical density at 490 mμ	0.220	1.490	1.350	1.800	0.820	0.370

傷害と TTC 還元量との関係

硫酸銅の影響 0.2 g のオゴノリ片を今までとおり 10^{-3} ~ 10^{-8} モルの硫酸銅海水溶液のシリーズに 2 日間ひたしたのち、2 時間 TTC 反応 (照明・排気・30°C) をさせ、生成されたフォルマザンを抽出してその吸光度を測定した。その結果は第 3 表にみられるように、硫酸銅による傷害が強いほど吸光度がへり、したがって TTC 還元能が減少することがわかる。この傾向はアサクサノリ、ヒトエグサ³⁾の場合と全く同様である。

第 3 表において、 10^{-6} モル以下の硫酸銅濃度では吸光度が 1.000 以上を示すように、今までのべた条件による抽出では吸光度 1.000 以上を一応健全とみとめてよい。これまでの実験において全く健全とみとめ

Fig. 2. Relation of formazan production by *Gracilaria* (0.2 g.) to TTC concentration used in testing for varied durations. Optical density at 490 mμ. Test conditions the same as in Fig. 1. A : 1, B : 2, C : hours.

Table 2. Relation of formazan production (optical density) to illumination and evacuation at different temperatures. See Table 1 for test procedure.
Incubated for 3 hrs. in 1 mg./cc. solution of TTC

Temp. (°C)	Evacuation	Evacuated	Open
	Illumination		
23	Illuminated	2.000	1.730
	Dark	2.250	1.710
30	Illuminated	1.900	1.570
	Dark	1.750	2.130

Table 3. Formazan production at 30°C in *Gracilaria* as affected by previous exposure to CuSO_4 for 2 days. Note the decline representing severe injury and death caused by increased concentrations. See Table 1 for test procedure

CuSO_4 conc. (M in sea water) used for pretreatment	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Optical density at 490 m μ of toluene extract from 0.2g. of thalli	0.058	0.148	0.780	1.050	1.700	1.860
Optical density at 490 m μ accounting for native pigments	0.045	0.068	0.078	0.115	0.125	0.185
Net optical density accounting for formazan	0.013	0.080	0.702	0.935	1.575	1.675
TTC reduced per 0.2g. of thalli (mg.)	0.0002	0.001	0.095	0.128	0.215	0.230

られるものは、大体その吸光度が 1.300~2.000 の間にあつて必ずしも一定でない。しかし、その時の健全なものの値を基準とすれば、還元程度（吸光度）は傷害とともに減少してその程度を反映することはいうまでもない。

吸光度の測定が困難なときは、単に抽出液のみによる判定も可能である。すなわち、抽出液の呈色程度は肉眼でもその差がわかり、吸光度測定による傷害判定の順序とよく一致する。

クロロフィル、カロチン等の影響 トルオール抽出液中にはクロロフィル、カロチン等が当然抽出されてくる。この影響はフォルマザンの吸光にはあまり問題にならないが、藻体による TTC 還元の絶対量をより正確に求める場合には知る必要がある。

第3図は TTC 反応をさせない試料 (0.2g) のトルオール抽出液が示す吸収曲線であるが、やはり傷害をあたえると吸収曲線が低下することは、ヒトエグザ²⁾ のアルコール抽出液の場合と同様である。これらの色素の 490m μ における吸光度は図にみられるように僅かなものであるが、影響が皆無とはいえないので、TTC と反応させた試料の抽出液の吸光度から反応させない対照試料の抽出液の値 (第3図) をさしひいて、フォルマザンによる正味の吸光度を知りそれから TTC 還元の絶対量を求めたのが第3表に示してある。

低鹹の影響 普通海水をそれぞれ 0, 25, 50, 75, 100% になるようにうすめたシリーズに 3 日間ひたしたのについてしらべたところ、第4表のようになった。25%海水と全淡水中では、還元能が大巾に低下

Fig. 3. Absorption curves of toluene extracts as effected by CuSO_4 (2 days pretreatment) A: Control. B: 10^{-7} , C: 10^{-6} , D: 10^{-5} , E: 10^{-4} , F: 10^{-3} M, respectively. Note the gradual decline in native pigments.

している。50%以上では、3日間ではほとんど影響がみとめられない。

Table 4. Formazan production at 30°C (optical density) as effected by lowered salinities. Pretreated for 2 days

Salinity (per cent of sea water)	0	25	50	75	100
Optical density	0.630	0.620	1.100	1.280	1.450

温度の影響 23~34°C までの間の海水温度によってうける藻体の傷害程度をしらべた。各温度の定温器中で一定温度にした海水中に一定期間ひたしたオゴノリ片 0.2g づつを TTC 反応させそれをトルオールで抽出した結果 (第5表), 1日では 31°C 上で影響があらわれ 34°C では相当いたんでいる。2日後には 28°C でもやゝ影響があらわれ, 31, 34°C では完全に死んでいる。3日たつと 28°C でも被害いちじるしく, 31, 34°C では藻体がくずれて処理が困難になる。

Table 5. Formazan production at 30°C. (optical density) as effected by previous exposure to varied temperatures

Temp. (°C.) Duration (day)	23	25	28	31	34
1	1.500	1.350	1.150	0.685	0.285
2	2.000	1.100	0.960	0.075	0.095
3	1.500	1.150	0.420	0.105	0.095
5	1.070	1.100	0.440		

乾燥の影響 飽和塩類水溶液 (NaNO₂) で恒湿 (66%, 20°C) にした密閉器中で乾燥させた藻体片について同じくその還元能をしらべたところ, 第6表にみられるように3日目までは多少還元能は下つてもまだ生きているが, 5日目のものは相当干上つてすっかり死んだものとみとめられる。

Table 5. Formazan production at 30°C. as effected by previous desiccation at 20°C. and 66% rel. humidity

Duration (day)	1	2	3	5
Optical density	1.375	0.900	0.900	0.170

要 結

オゴノリにおける TTC 反応の定量的測定のための好適条件は次のようである。TTC 濃度は 2mg/cc がもつとも反応の効率がよいが, 1mg/cc でも判定には充分である。温度は 30°C が一番よい。30°C をこすと害がみられ還元能が低下する。反応時間は3時間がよい。

いろいろな影響によるオゴノリの TTC 還元能の低下を, この方法で測定して傷害の起る条件をしらべた。硫酸銅海水溶液中では 10⁻⁵ モル以上の濃度で2日間にいちじるしい害をうける。

低鹹海水中では3日後に 25% 海水以下で被害がいちじるしく, 50% 以上の海水中ではあまり影響がみられない。

海水温度が高いと害をうけるが, 31°C 以上では1日で弱り, 28°C 以上で3日後から害がいちじるしい。乾燥すると5日目には死ぬが, 3日まではあまり変化がみられない。

この研究に対して, 終始激励と便宜を頂いた三木教授はじめ, 九大瀬川博士, 京大米田博士, また実験にあたって適切な助言を頂いた永井博士に心から御礼申し上げる。

文 献

- 1) 尾形英二, 永井進: 生理生態 **6**, 10 (1954).
- 2) 尾形英二: 本誌, **21**, 7 (1956).
- 3) 尾形英二: 本誌, **21**, 7 (1956).