海産珪藻 *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO の増殖と塩化コバルト量との関係*

武 田 恵 二

(1971 年 11 月 4 日受理)

Relative Cell Growth of a Marine Diatom, *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO, in Media Containing Various Concentration of Cobaltous Chloride

Keiji TAKEDA**

Since 1963 the author has carried out studies on improvements of the mass culture media of a marine centric diatom, *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO, a useful marine shell larvae food. In the present paper the relative cell growth of this diatom and cobaltous chloride concentration in media is discussed.

For the culture experiments, globular flasks of 100 ml in volume were used under the following conditions:

Temperature, 20.0~27.5°C; specific gravity of media based by filtered natural sea water (Table 1), 22.18~24.56 (σ_{15}); light intensities, 1.5 Klux (the radiated energy from light of 400~700 nm was 4.4 W and from the whole light wave length was 17.3 W), 2.0 Klux (radiated energy from light of 400~700 nm was 5.8 W and from the whole light wave length was 23.0 W) or from direct sun beams (about 7 Klux maximum).

The results obtained were as follows:

1. Cell division was influenced a little by a cobalt concentration of 0~49.4 $\mu\text{g Co/l}$, but was inhibited at 61.8 $\mu\text{g Co/l}$ (Figs. 1, 2, 3). On the other hand, the effective concentration of cobalt, basing on P. C. V. (packed cell volume), was 12.4~37.1 $\mu\text{g Co/l}$, proving 24.7~37.1 $\mu\text{g Co/l}$ as optimum (Figs. 1, 2, 3).

2. Cobalt was not effective for the cell division of *Ch. calcitrans* f. *pumilus*. However, some facts obtained show that Vitamin B₁₂ promotes the cell division of this diatoms, *Skeletonema costatum*, various species of marine pelagic diatoms and flagellates. Consequently the author came to the conclusion that the cobaltous chloride has a somewhat different effect from that of Vitamin B₁₂ on the acceleration of cell division.

今日までの Co の一般的な生理作用に関するいくつかの業績を概観すると, PARR ら¹⁰⁾は, Swiss albino mice (白ネズミ) の X-線照射の前後を通じて, Co-食を与えると死亡率が著しく低下し, GALSTON ら³⁾は, Co が Alaska pea (アラスカエンドウ) の幼芽成長を促進する IAA の破壊を防止すると述べ, Co が酸化力の強い有害な過酸化物の発生抑制や連鎖分解作用に関与していると思われる諸点について報告している。一方 MCELROY ら⁷⁾によれば, Co が他の金属と協合して炭水化物代謝やトリカルボン酸回路などに関与する約 9 種類の酵素を活性化するという。Co は一般に世界の広い範囲に亘って不足しているが, 植物体内には極めて微量に存在して, Fe, Mn を伴い, 作物体, 特に種子中の alginase, ビルビン酸脱炭酸酵素の活性,

* 本研究は昭和 44 年 10 月, 日本水産学会秋季大会で講演発表した。

** 青森県水産修練所 (Training Center for Fisheries Development of Aomori Prefecture, Shimomekurakubo 25-1, Same, Hachinohe, Japan 031)

ATP 生成の反応段階の促進, 花粉の育成成長呼吸等に有効であることが知られている¹⁸⁾。しかし, 実際にはこれらの過程において, Co が真に植物の生理機能に直接関与する必須不可欠のものなのか, また, 単に生理作用の側面的援助物質であるのか未だ不明であり¹⁹⁾, Vitamin B₁₂ の 4% にも当る構成要素となっている Co の効果についても, 単に生物学的機能の一部が知られているのみで⁵⁾, 究明すべき多くの問題が残されている。今回, 著者は *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO の高密度培養研究の一環として, Co の増殖効果について実験を行ない, いくつかの知見を得たので取りまとめて報告する。

本報告を取りまとめるに当り, 御校閲いただいた北海道大学水産学部教授近江栄博士, 測定機器の御便宜をいただいた青森県水産増殖センター 津幡文隆所長, 伊藤 進博士, 横山勝幸技師, 並びに各種資料の御便宜いただいた弘前大学理学部助教授 佐藤進一博士, 元東北大学農学研究科 坂本正幸博士, 東京大学農学部教授 能勢幸雄博士, 小島幸彦氏らに対して深甚なる謝意を表する。

実験方法

実験に供した *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO は, Table 1 に示す stock culture medium をもって室温 20~27.5°C, 照度 2.0 Klux のもとで植え継いできたものであるが bacteria free ではない。

培養は, コンプレッサーからの空気を洗気槽に導びき, 次に綿を詰めた空気槽を通して浄化した後, 100 ml 容量平底フラスコに連続通気する方法と¹¹⁾, 1日2回の手で振盪する静置の2通りについて試みた。通気培養の光源には National Hi-light 30 W 白色蛍光灯を使用した, これの 1.5 Klux における輻射エネルギー量は 400~700 nm 波長域で 4.4 W, 全波長域で 17.3 W, 2.0 Klux でのそれは, 400~700 nm 波長域で 5.8 W, 全波長域で 23.0 W のものであり, 400~700 nm 波長域での相対分光エネルギー分布の特徴はすでに報告のとおりである¹¹⁾。また, 静置培養に対しては, 北東に面する窓からの天然光 (約 7.0 Klux

Table 1. Amount of element in culture media (pH 8.0~8.2) for *Ch. calcitrans* f. *pumilus*.

Element	Amount of element (mg)	
	Stock culture medium	Experimental culture medium
N (as KNO ₃)	13.2	13.2
Mn (as MnSO ₄)	0.5	0.5
Na ₂ EDTA	4.0	4.0
Silicate (water glass)	10.0	10.0
Tris buffer (pH 7.4~7.5)	100.0	100.0
P (as Na ₂ HPO ₄)	4.3	4.3
Fe (as FeCl ₃ with HCl)	0.1	0.1
Co (as CoCl ₂)	—	0, 6.2, 12.4, 24.7, 37.1, 49.4, 61.8 µg
Filtered natural sea water	1,000 ml	1,000 ml

Table 2. Conditions for culture of *Ch. calcitrans* f. *pumilus*.

Exp.	Date	Temperature (°C)	Medium volume (ml)	Specific gravity (σ ₁₅)	Light intensity (Klux)	Aeration (l/l/min.)	Inoculated cell (cells/ml)
1	Sep. 1~10, 1969	20.0~23.0	100	24.56	2.0	2.0	10×10 ⁴
2	Sep. 14~24, '69	21.0~25.0		22.18	1.5	1.5	20×10 ⁴
3	Sep. 3~10, '69	21.0~27.5		24.56	Sun light [7.0(max.)]	Stationary culture	15×10 ⁴

Fig. 1. Relative cell growths of *Ch. calcitrans* f. *pumilus* in media with different values of cobalt.

●: Cell numbers.
×: Packed cell volume (P. C. V.).

Fig. 2. Relative cell growths of *Ch. calcitrans* f. *pumilus* in media with different values of cobalt.

●: Cell numbers.
×: Packed cell volume (P. C. V.).

以下)を用いたが、今回の培養実験の全般に亘る諸条件は Table 2 に示すとおりである。

実験に供した *Chaetoceros* 細胞は、実験前に1回だけ Table 1 の実験用培養液 (ただし Co-無添加) をもって予備培養後、約 $350 \sim 400 \times 10^4$ cells/ml 程度に増殖した角型細胞 (標準型) であつて、これらを Table 1 に示す Co を 0, 6.2, 12.4, 24.7, 37.1, 49.4, 61.8 μg Co/l の各濃度に添加した実験用培養液に接種して増殖状況を観察した。

培養期間中は、毎日血球計算盤で細胞を計数した外、実験終了日には、増殖細胞を含む一定量の試水をヘマトクリット管に採り、4,000 rpm, 約 3.0 時間の遠心沈澱を行なつて P. C. V. (packed cell volume) をもあわせて測定した。

Fig. 3. Relative cell growths of *Ch. calcitrans* f. *pumilus* in media with different values of cobalt.

●: Cell numbers.
×: Packed cell volume (P. C. V.).

実験結果

今回の実験温度は、本種の培養に多少上限が高過ぎた観があつたが、いずれも類似の成果を得、次のような諸点を明らかにすることができた。

1. 人工光による通気培養: 実験 1, 2 の細胞数の増加を見ると (Figs. 1, 2), 0~49.4 μg Co/l の 6 区の Co-添加濃度範囲では、細胞分裂を促進する作用は皆無と見てよく、61.8 μg Co/l の添加濃度区に至れば、むしろ細胞分裂が遅れる傾向を示している。

一方、P. C. V. について見ると (Figs. 1, 2), Co の添加量の増加に伴ない P. C. V. は増大し、12.4~49.4 μg Co/l の 4 区の濃度範囲に増大の山が認められ、特に 24.7, 37.1 μg Co/l の両区で最も大きな P. C. V. 値を得た。

2. 天然光による静置培養: 実験 3 によつた結果であるが (Fig. 3), 0~49.4 μg Co/l の 6 つの Co-添加濃度区では、実験 1, 2 と同様に、いずれも細胞分裂の促進効果がなく、61.8 μg Co/l の添加濃度になると、明らかに細胞分裂が遅れる傾向が現われる。

他方、P. C. V. について見ると (Fig. 3), Co の P. C. V. 増大効果は 6.2 μg Co/l 区から現われ、特に 24.7, 37.1 μg Co/l の両添加濃度区で、明瞭な P. C. V. 値の増大効果が認められ、これらの作用傾向は人

工光による通気培養成果とはほとんど一致している。

考 察

微細藻類に対する Co-効果について、KETCHUM⁶⁾ は幾種類かの鞭毛藻類が Zn, Mn, Cu と共に Co をも要求することにふれ、また、HOLM-HANSEN ら⁴⁾ も藍藻類に対する Co-効果を認め、さらに Co の *Scenedesmus obliquus* の増殖効果にも言及している。今回、著者が行なつた *Ch. calcitrans* f. *pumilus* の培養実験からも、下記のように Co が本種の生産に必要なことが認められた。

先ず細胞数の増殖についてであるが、Figs. 1, 2, 3 に見るように、0~49.4 $\mu\text{g Co/l}$ の各濃度区での増殖細胞数は、いずれも同数と見てよく、この濃度範囲では、細胞分裂能の増減を左右するような効果は皆無とはいへ、61.8 $\mu\text{g Co/l}$ 区では細胞分裂が著るしく抑制される傾向が現われている。かかる現象は、Co が構成要素の 4% を占めるといわれている Vitamin B₁₂ が *Ch. calcitrans* f. *pumilus*¹⁴⁾, *Skeletonema costatum*, *Cyclotella nana* [Clone 13-1]¹¹⁾, Pelagic な珪藻、各種の鞭毛藻類⁷⁾ などの細胞増殖 (分裂能) の向上に大きな効果を有する点に比較すると、著しく作用面に違いがある。従つて、Co の有効性を論ずる場合、細胞数の増殖面のみから見ると、Co は増殖に対して無効であるばかりか、添加量が約 50 $\mu\text{g Co/l}$ をこえるあたりから細胞分裂を抑制する作用が現われるため、培養液への Co-添加は不用もしくは有害という結論にもなる。

ところが、P.C.V. の増大に対する Co の影響を見ると、Co が細胞の増加にほとんど無効であつたのに反し、P.C.V. の増大面では極めて有効なことが解つた。すなわち、Figs. 1, 2, 3 に示されているように、P.C.V. 値は 0 および 61.8 $\mu\text{g Co/l}$ 以外のすべての濃度区で増大し、最適添加量は 24.7, 37.1 $\mu\text{g Co/l}$ の区間にあると推測された。ここで、3 回に亘るそれぞれの実験で得た対照培養 (Co-無添加区) における P.C.V. を 1 とし、最高の P.C.V. 値を示した 37.1 $\mu\text{g Co/l}$ 区の培養で得たそれらと比較すると、後者は約 1.7, 1.3, 1.4 倍という高い増大率を示し、本種に対する明瞭な P.C.V. の増大効果を認めた。また、著者はその後の実験で¹²⁾、37.1 $\mu\text{g Co/l}$ 添加時における本種の単位試水当りの生産量は、対照培養に比し、細胞数で 1.04 倍、P.C.V. で 1.13 倍、葉緑素量で約 1.2 倍という値も得ており、やはり Co は細胞分裂能の促進効果はほとんど無いが P.C.V. の増大や、葉緑素生産向上に寄与するという結果を得ている。このような量的な増大効果は、藍藻類の *Nostoc muscorum*, *Calothrix parietina*, *Coccochloris penicystis*, *Diplocystis aeruginosa* などの培養の際に、培養液に適当量の Co を添加すると、それら細胞の乾燥重量と細胞窒素量が著しく増加することが知られており⁴⁾、高等植物では、青白化した豆の葉の切片が Co の存在で著しく拡大し⁹⁾、また、豆の青白化幼苗茎も CoCl_2 と IAA を含む培地で成長が促進され、これに糖が加わると、より以上に伸長したり、細胞そのものが拡大するという^{8,9)}。上記の内、特に Co による藍藻類の生産細胞の乾燥重量や窒素量の増加は、今回著者が *Ch. calcitrans* f. *pumilus* の培養実験で得た結果と関連のある現象と見てよい。

次に、Co と Vitamin B₁₂ の関係についてであるが、HOLM-HANSEN ら⁴⁾ は藍藻類に対する Co の増殖効果の調査の際、細胞数の増加傾向に関する検討結果にふれることなく、生産細胞の乾燥重量と細胞窒素量増加の二面から得た値が、Co 量で換算した量の Vitamin B₁₂ を添加して得た増殖結果と類似していたことから、Co は Vitamin B₁₂ で置換し得ると述べているようである。しかし、上記の二面の効果は単に両者に限つた特異的な現象ではなく、一般の各種栄養塩類でも、それらが何元素であれ、生化学的面で中間過程に違いはあるが、終局的には炭水化物、蛋白質の代謝状況に伴う遊離アミノ酸、還元糖の集積の多少という共通した現象をもたらすという戸辺ら¹³⁾の物質増減に関する生化学的見地に立つて考えると、単なる乾燥重量や窒素量の増加で示される最終的な値をもつて、Co と Vitamin B₁₂ の相互置換利用が可能であろうとする点に疑問が生ずる。問題は、Co と Vitamin B₁₂ は生物学的面と化学的面で過程にどのような違いがあるかによつて類似性が論ぜられねばならぬと考える。かかる観点から見れば、Co は *Ch. calcitrans* f. *pumilus* の細胞分裂を促進しないが、Vitamin B₁₂ は本種の外¹⁴⁾、*Skeletonema*, *Cyclotella*¹¹⁾,

その他の珪藻、鞭毛藻類²⁾などの細胞分裂能の向上に有効であるという生物学的現象面では、互いに異なった作用面を有する異質の要素と見るのが妥当であろう。

要 約

1. 有用二枚貝類浮游幼生の餌料である海産円心目珪藻 *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* TAKANO の連続通気による高密度培養研究の一環として、本種の増殖に対する CoCl_2 の効果について検討した。
2. 本種の培養は Co 添加量を 0, 6.2, 12.4, 24.7, 37.1, 49.4, 61.8 $\mu\text{g Co/l}$ の7区とした天然海水を基本とする、比重 (σ_{15}) 22.18~24.56 の著者調整培養液 (Table 1) で、100 ml 容量平底フラスコを用いて、1.5, 2.0 l/min. の連続通気または1日2回の手による振盪を与える静置法、室温 21.0~27.5°C、人工光による連続照射 (1.5, 2.0 Klux), あるいは約 7.0 Klux の天然光のもとで行なわれた。使用した人工光 (National Hi-light 30 W 白色蛍光管) の 1.5 Klux での輻射エネルギー量は、全波長域で 17.3 W, 400~700 nm 波長域で 4.4 W, また 2.0 Klux でのそれは全波長域で 23.0 W, 400~700 nm 波長域で 5.8 W であった。
3. 培養実験中の温度、特に上限が幾分高過ぎたが、人工光による通気培養、天然光下での静置培養共類似的 Co -効果を示した。
4. 0~49.4 $\mu\text{g Co/l}$ の6添加濃度区では、細胞分裂の促進効果は皆無といつてよく、61.8 $\mu\text{g Co/l}$ 区では、細胞分裂が抑制される傾向が現われた。
5. P. C. V. (packed cell volume) から見ると、12.4~37.1 $\mu\text{g Co/l}$ の添加濃度区に増大の山があり、最適添加量は 24.7, 37.1 $\mu\text{g Co/l}$ の両区間にあると推測された。その後の同様実験でも、37.1 $\mu\text{g Co/l}$ 添加培養時の単位試水当り生産量 (P. C. V., 葉緑素量) が対照培養に比し向上するのが認められた。
6. 今回、 CoCl_2 は本種の細胞分裂を促進する効果は無かつたが、 Co を多量に含む Vitamin B_{12} は本種を含む各種の微細藻類の細胞分裂を促進すると報告されていることから、 CoCl_2 と Vitamin B_{12} は、かかる生物学的現象面から見ると、互いに異なつた作用を有する異質の要素と考えられる。

文 献

- 1) H. CURL, JR.: *Limn. and Ocean.*, 7 (3), 422~424 (1962).
- 2) M. R. DROOP: *J. Mar. biol. Ass. U. K.*, 46, 67~76 (1961).
- 3) A. W. GARSTON and S. M. SIEGEL: *Science*, 120, 1070~1071 (1954).
- 4) O. HOLM-HANSEN, G. C. GERLOFF and F. SKOOG: *Physiol. Planta.*, 7, 665~675 (1954).
- 5) S. H. HUTNER and L. PROVASOLI: *Microchem. J., Symp. Series* 1, 95~113 (1961).
- 6) B. H. KETCHUM: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 7, 55~74 (1954).
- 7) W. D. McELROY and A. NASON: *ibid.* 5, 1~30 (1953).
- 8) C. O. MILLER: *Plant Physiol.*, 27, 408~412 (1951).
- 9) C. O. MILLER: *ibid.* 29, 79~82 (1954).
- 10) O'NEILL T. PARR and A. KREBS: *Science*, 117, 155~156 (1953).
- 11) 武田恵二: 日本プランクトン学会報, 17 (1), 11~19 (1970).
- 12) 武田恵二: 昭和 45 年度日本水産学会秋季大会。
- 13) 戸蒔義次, 山田 登, 林 武: 作物生理講座 (2), 朝倉書店, 東京, 264~265 (1969).
- 14) 梅林 脩: 水産増殖, 9 (3), 147~150 (1961).