

ナノクロロプシス培地の pH と溶存態無機炭素濃度に及ぼす アンモニウム態窒素の影響

山崎繁久, 川井田新, 宝満龍輝

Influences of NH_4^+ on pH and Dissolved Inorganic Carbon Concentrations in Culture of *Nannochloropsis oculata*

Shigehisa Yamasaki, Arata Kawaida, and Tatsuki Hohman

Keywords : *Nannochloropsis*, Ammonium, Nitrate, pH, Dissolved inorganic carbon

Abstract

Influences of NH_4^+ as a nitrogen source on pH, dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations, dissolved inorganic nitrogen (DIN) concentrations, and recovery of DIC were examined in the culture of *Nannochloropsis oculata* from the lag phase to the early stationary phase, comparing those chemical parameters of NO_3^- as a different nitrogen source. In the treatment with NH_4^+ , a rapid decrease of pH was observed when DIC became close to 0 ppm with little or no recovery of DIC. However, no marked changes were observed in DIN concentrations. On the other hand, in the treatment with NO_3^- , higher levels of pH and DIC were maintained. These observations suggest that the differences in the above water quality might be derived from release or absorption of hydrogen ions from or into *N. oculata* cells.

ナノクロロプシス (*Nannochloropsis oculata*) は、魚介類稚仔の重要な餌料生物として用いられているシオミズツボウムシ類の飼育開始時の餌料、およびそのワムシ類の栄養補強のための二次飼育の餌料として必要とされる¹⁾。このナノクロロプシスの培養は立方メートル単位の比較的大きな規模で培養される場合が多く、安価な農耕用肥料を主体とした栄養塩類が用いられ²⁾、その栄養塩類の窒素源は硫酸アンモニウムで占められている。一方、微細藻類の数リットル単位の比較的小規模培養や株の保存では窒素源として硝酸カリウムや硝酸ナトリウム等の硝酸態窒素が用いられる場合が多い³⁾。前報ではこれらアンモニウム態窒素と硝酸態窒素で培養したナノクロロプシス培地における培養初期の pH および溶存態無機炭素 (DIC) 濃度の相違についての知見を紹介した⁵⁾。今回は、ナノクロロプシスの培養開始時から定常

期までの観察を行った結果、指数増殖期の後期に、アンモニウム態窒素を使用した実験区において、培地の pH および DIC 濃度に大きな変化が見られた。

材料および方法

ナノクロロプシス培地の pH、溶存態無機炭素 (DIC) 濃度および溶存態無機窒素 (DIN) 濃度の測定

ナノクロロプシスは1997年12月に鹿児島県栽培漁業協会から分与を受け、当研究室の恒温室 (25±1℃) において、3L 容量のガラス製三角フラスコの片側から白色蛍光灯による光の照射を行い (蛍光灯に近い側面で150μmol/m²/s; 08:00点灯, 23:00消灯) 指数増殖期間内の植え継ぎを繰り返しながら株の保存を行った。その際、栄養塩には農耕用肥料主体のものをを用い、通気速度は

280mL/minとした。実験に先立ち、同様に約2カ月間硫酸アンモニウムを窒素源として培養すると同時に、対照とした硝酸態窒素源として、硝酸ナトリウムを用いた培養も行った。硫酸アンモニウムを用いた実験区では、栄養塩として、農耕用硫酸アンモニウム (150mg/L)、農耕用過リン酸石灰 (30mg/L)、それに微量金属元素類を含むクレワット32 (帝国化学産業, 大阪) (15mg/L) の3種類を用いた。硝酸ナトリウムを用いた実験区では、過リン酸石灰およびクレワット32に加えて、上述の硫酸アンモニウムのアンモニウム態窒素濃度と硝酸態窒素濃度が同じになるよう硝酸ナトリウムの添加を行うとともに、硫酸態硫黄濃度が同じになるよう硫酸ナトリウムをも添加した。ナノクロロプシス培養の海水は、鹿児島市地先で採取し孔径0.5 μ mのグラスファイバーフィルター (Toyo Roshi GC50) でろ過した自然海水に蒸留水を混合して30%の塩分に調整した。ナノクロロプシスの培養容器には5L容量のガラス製ビーカーを用い、これに4Lの上記培地を入れた後、セルを用いた遠心分離 (5,000 \times g, 10分間) により培地を除いた前培養のナノクロロプシスを、約 2×10^6 cells/mlになるよう接種した。容器は、各実験区毎に3個ずつ用意し、前培養と同じ恒温室内に設置した。照明は白色蛍光灯を用いて上方から行い (培地の表面で74~83 μ mol/m²/s)、通気は内径4mmのガラス管を通して約1,600mL/minの速度で行った。なお、ナノクロロプシスは非無菌状態で培養した。

ナノクロロプシス密度、pH、DIC濃度、およびDIN濃度測定用の採水は毎朝10:00に行った。ナノクロロプシスの密度の計数には血球計数盤 (ビルケルチュルク型)、pHの測定には携帯用pHメーター (Yokogawa PH81)、DIC濃度の測定には全有機態炭素計 (Shimadzu TOC-5000) を、それぞれ用いた。また、測定したDINはアンモニウム、亜硝酸、および硝酸の各態窒素で、それらの濃度はStrickland & Parsonsの方法⁹⁾に従って分析した。DICおよびDIN濃度測定用試水には遠心分離 (5,000 \times g) の上澄を使用し、前者用の試水は直ちに測定に供するとともに、後者用の試水は-20 $^{\circ}$ Cの冷凍庫に保存し、後日の測定に供した。

通気によるナノクロロプシス培地への二酸化炭素の溶入

ナノクロロプシスは、窒素源として農耕用の硫酸アンモニウムを用い、上記の条件で培養を開始した。培養開始後、異なる増殖段階において、3個の培養容器からナノクロロプシス培地をそれぞれ250mLずつ採取し、遠心分離 (5,000 \times g) によって上澄を採取した。上澄は

300mL容量のガラス製ビーカー3個に別々に移し入れ、それぞれ、内径3.5mmのガラス管を用いて約260mL/minの速度で通気を行った。通気は上記温度に設定した恒温室内において24時間継続し、通気開始時と終了時にpHおよびDIC濃度を測定した。遠心分離のためのナノクロロプシス培地の採取は午後2時前後に行った。

結 果

ナノクロロプシス培地のpH、溶存態無機炭素 (DIC) 濃度および溶存態無機窒素 (DIN) 濃度の変化

ナノクロロプシスの密度は、アンモニウム態窒素区 (以下アンモニウム区と略す) においても、また硝酸態窒素区 (以下硝酸区と略す) においても、培養の経過に伴い、開始時の約 2×10^6 cells/mLから徐々に増加し、開始後8日目には両実験区とも約 47×10^6 cells/mLに達した (Fig.1)。その後、アンモニウム区の増加はほとんど見られなかったが、硝酸区では開始後11日目まで増加し、約 64×10^6 cells/mLの密度で安定する兆候を示した。なお、培養初期において、両実験区の密度の間には、差はわずかではあるがアンモニウム区の密度の方が高い傾向 (t-test: $p < 0.05$) が認められた。

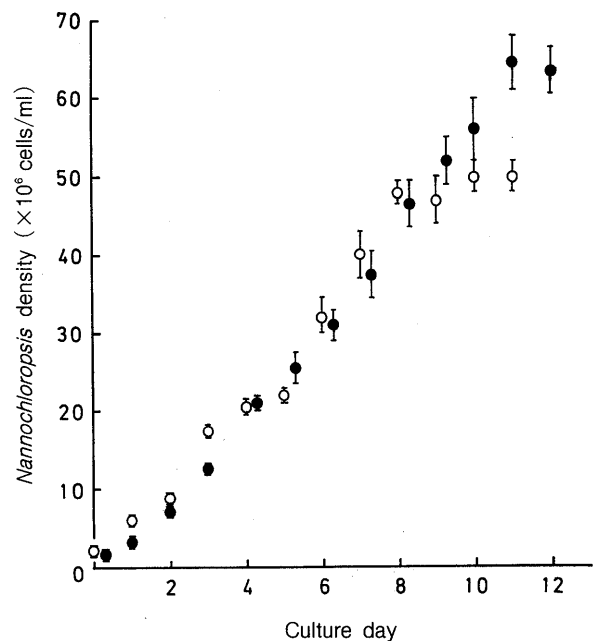


Fig. 1 Change in cell densities of *Nannochloropsis oculata* in the culture with different nitrogen sources. Vertical bars represent standard deviations. Treated with NH₄⁺ (○) and with NO₃⁻ (●).

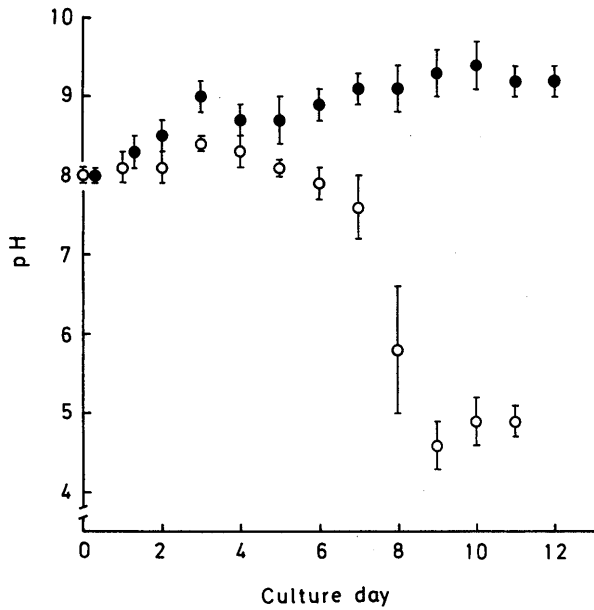


Fig. 2 Change in pH in the culture of *N. oculata* with different nitrogen sources. Vertical bars represent standard deviations. Treated with NH₄⁺ (○) and with NO₃⁻ (●).

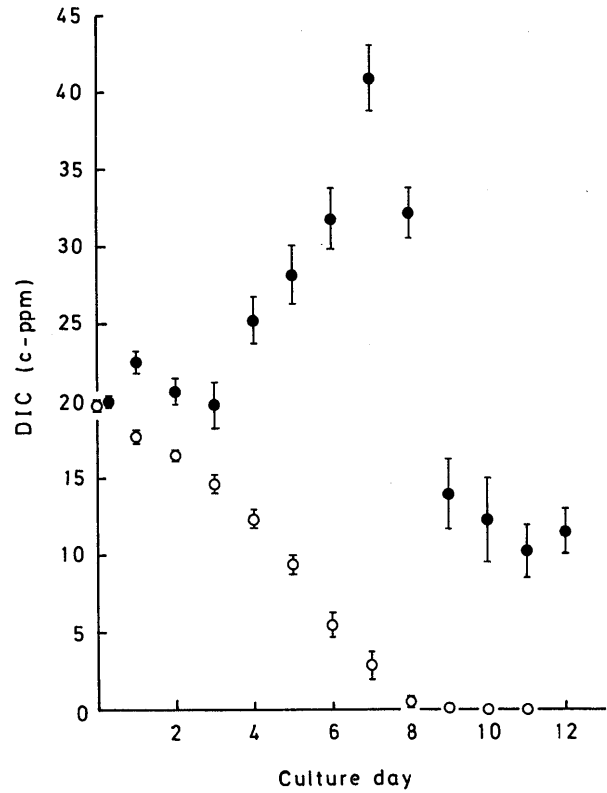


Fig. 3 Change in dissolved inorganic carbon concentrations in the culture of *N. oculata* with different nitrogen sources. Vertical bars represent standard deviations. Treated with NH₄⁺ (○) and with NO₃⁻ (●).

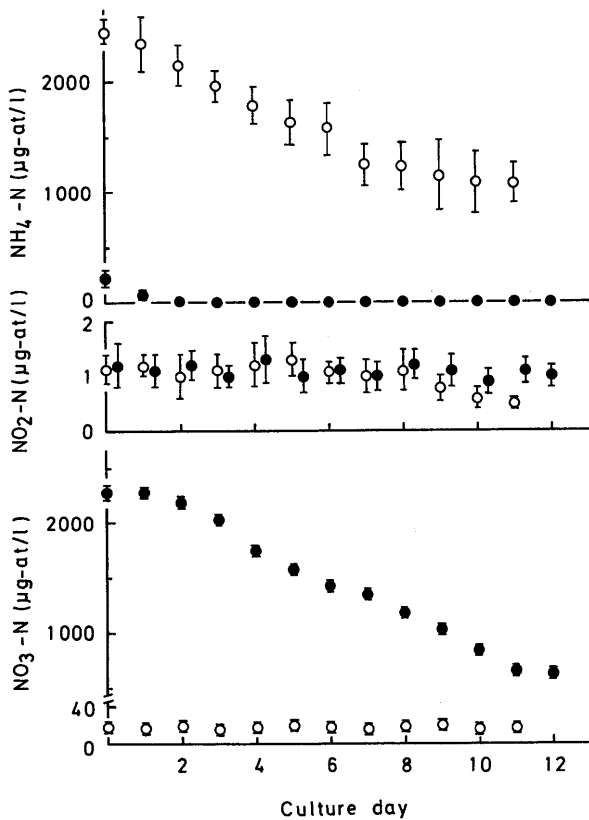


Fig. 4 Change in dissolved inorganic nitrogen concentrations in the culture of *N. oculata* with different nitrogen sources. Vertical bars represent standard deviations. Treated with NH₄⁺ (○) and with NO₃⁻ (●).

両実験区の pH は培養開始後 5 日目まで 8.0~9.0 の値を示した (Fig. 2)。その間、2 日目以降にはアンモニウム区の方が硝酸区より低い傾向が現われ始めた。さらに、6 日目以降には両実験区の値の差は培養の経過とともに大きくなった (t-test: $p < 0.01$)。すなわち、アンモニウム区における pH の平均値が 6 日目の 7.9 から 9 日目の 4.6 へ急減したのに対し、硝酸区では 8.9 から 9.4 へと上昇の傾向を示した。10 日目以降は、アンモニウム区では 4.9、硝酸区では 9.2 前後の値を維持した。

DIC 濃度は、アンモニウム区では、平均値で、培養開始時の 19.7 ppm から 8 日目の 0.7 ppm まで次第に減少し、9 日目以降は 0 ppm を維持した (Fig. 3)。それに対し、硝酸区では、開始時から 7 日目までの期間内に 19.8 ppm から 41.0 ppm まで次第に増加した。その後 2 日間で 13.9 ppm まで急減し、10 日目以降は 10.2~12.3 ppm の範囲の値を維持した。

アンモニウム区におけるアンモニウム態窒素濃度は、培養期間中の急減は認められず、培養開始時の 2,470 µg-at/L から 8 日目の 1,220 µg-at/L まで徐々に減少した (Fig. 4)。その後減少傾向は続いたが、速度は 8 日目ま

でより遅かった。硝酸区でも培養開始時にアンモニウム態窒素が検出されたが、その濃度は240 $\mu\text{g-at/L}$ と低く、2日目以降にはほとんど検出されなくなった。

亜硝酸態窒素濃度は、両実験区とも培養期間中極めて低い濃度を維持した。すなわち、アンモニウム区で0.5~1.3 $\mu\text{g-at/L}$ 、硝酸区で0.9~1.3 $\mu\text{g-at/L}$ の値を示し、両実験区とも増加の傾向は認められなかった。

硝酸態窒素濃度は、アンモニウム区で培養期間を通して16~20 $\mu\text{g-at/L}$ の低い値で検出された。硝酸区では、開始時の2,290 $\mu\text{g-at/L}$ から終了時の620 $\mu\text{g-at/L}$ まで徐々に減少した。

通気によるナノクロロプシス培地への二酸化炭素の溶入

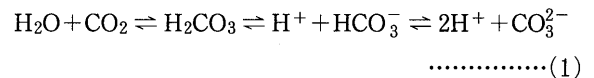
培養開始時の培地のDICは21.2ppmで、24時間通気後は19.7ppmとなった(Fig. 5)。そのpHは7.8で、通気前、通気後とも同じ値を示した。ナノクロロプシス密度が 0.5×10^6 cells/mLの時には、DICは16.2ppmから

18.2ppmへ増加し、pHは8.4から7.6に減少した。ナノクロロプシス密度が 21×10^6 および 44×10^6 cells/mLになると、通気前のDIC濃度がそれぞれ2.2および1.9ppmと低い値となったが、通気によるDIC濃度の増加は大きく、それぞれ13.2および9.1ppmの増加を示した。pHは両密度とも9.4であったが、通気後には、それぞれ7.4および7.5に減少した。しかし、ナノクロロプシス密度が 46×10^6 cells/mL以上では、通気によるDIC濃度の増加はほとんど見られなくなった。すなわち、 46×10^6 cells/mLでは0から0.8ppmへと増加したのにとどまり、 48×10^6 cells/mLでは0ppmからの増加は全く見られなかった。それらのナノクロロプシス密度におけるpHは、それぞれ6.0および4.5と低く、通気による変化もほとんど認められなかった。

考 察

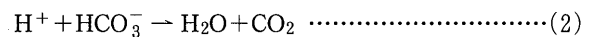
植物プランクトンによるアンモニウム態窒素および硝酸態窒素の利用に関して、植物プランクトンの*Chrysochromulina breviturrita*によるアンモニウム態窒素の利用に際しては水素イオンを細胞外に放出し⁷⁾、また、*Monoraphidium braunii*による硝酸態窒素の利用に際しては細胞内への水素イオンの取り込み⁸⁾が報告されている。本報で用いたナノクロロプシスでもこの機構が働いていると仮定すれば、アンモニウム態窒素を主な窒素源としたナノクロロプシス培地でのpHの降下、および、硝酸態窒素を主な窒素源とした培地でのpHの上昇、が理解できる。

また、海水のpHへの無機態炭素の関与は一般に知られているところである。それは次式で示される。



水素イオンが海水中に放出されると式(1)の平衡は左に傾き、海水中の主な無機炭素である重炭酸イオンおよび炭酸イオンの濃度が減少すること、また反対に、水素イオンが海水中から取り除かれると式(1)の平衡は右に傾き、重炭酸イオンおよび炭酸イオンの濃度が増加すること、が考えられる。

さらに、ナノクロロプシスは次式の反応を触媒するカーボニックアンヒドラーゼを保有することが報告されている⁹⁾。



式(2)はナノクロロプシスの光合成による二酸化炭

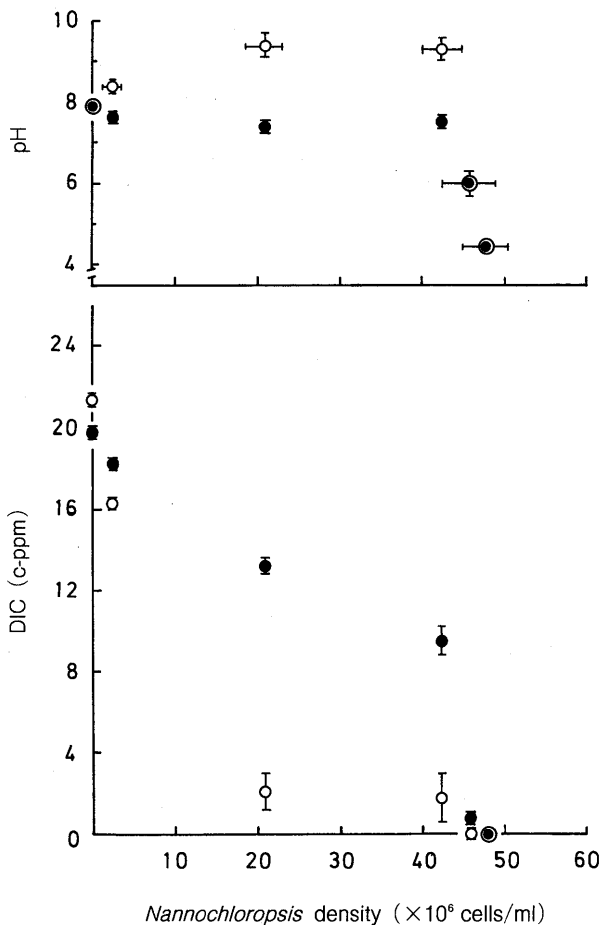


Fig. 5 Recovery of pH (upper) and DIC (lower) in the culture of *N. oculata* under 24 h of aeration. Vertical and horizontal bars represent standard deviations. Before aeration (○) and after aeration (●).

素の吸収による培地の pH の上昇を意味する。アンモニウム区において、5~10ppmの低い DIC にもかかわらず7.6~7.9の比較的高い pH が観察されたが、この働きがその一要因として挙げられよう。

また、アンモニアが *Nitrosomonas* 属菌によって亜硝酸イオンに還元される際に、水素イオンが放出されることが報告されているが¹⁰⁾、本実験の場合にはアンモニウム態窒素濃度の急減および亜硝酸イオンの増加は観察されなかったため、アンモニアの亜硝酸イオンへの還元の際生じる水素イオンの影響を考慮する必要はないものと考えられる。

なお、アンモニウム態窒素を主な窒素源とした場合、pH がおよそ4.5に降下した時点でナノクロロプシスの増殖が停止したが、それに近い pH 値で、培地への二酸化炭素の溶入の抑制が生じたことを考慮すると、pH4.5付近でのナノクロロプシスの増殖の停止は DIC 濃度の欠乏が原因とも考えられる。*Paramecium bursaria* の共生藻類である *Chlorella* sp. の生長と硝酸態窒素の吸収が pH4.0で抑制されたとの報告¹¹⁾ は、それとほぼ一致した結果を示しているが、*Chlorella saccharophila* の細胞外に存在するカーボニックアンヒドラーゼの活性が pH5.0で検出されなくなったとの報告¹²⁾ もあるので、カーボニックアンヒドラーゼの失活の可能性も否定できない。

文 献

- 1) J.P. Yu, A. Hino, M. Ushiro, and M. Maeda (1989): Function of Bacteria as Vitamin B₁₂ Producers during Mass Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1799-1806.
- 2) 北島 力 (1989): 栄養欠陥ワムシと改善法. 「初期餌料生物-シオミズツボワムシ」(福所邦彦, 平山和次編), pp. 158-166 (恒星社厚生閣, 東京).
- 3) 平田八郎 (1964): 屋島事業場における餌料生物の培養(その1). 栽培漁業ニュース, No. 2, 3.
- 4) 岩崎英雄 (1979): 培養液の種類と組成. 「藻類研究法」(西澤一俊, 千原光雄編), pp. 281-293 (共立出版, 東京).
- 5) 山崎繁久, 川井田 新 (2001): ナノクロロプシスの培養初期の培地の pH と溶存態無機炭素濃度に及ぼすアンモニウム態および硝酸態窒素の影響. 日水誌, 67 (印刷中).
- 6) J. D. H. Strickland and T. R. Parsons (1972): Determination of Reactive Nitrate, Reactive Nitrite, and Ammonia. "A Practical Handbook of Seawater Analysis", pp.71-90 (Fish. Res. Bd. Can., Ottawa).
- 7) J.D. Wehe, L.M. Brown, and K. O'Grady (1987): Highly Specialized Nitrogen Metabolism in a Freshwater Phytoplankter, *Chrysochromulina breviturrita*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 736-742.
- 8) P.J. Aparicio, F.G. Witt, J.M. Ramirez, M.A. Quinones, and T. Balandin (1994): Blue-Light-Induced pH Changes Associated with NO₃⁻, NO₂⁻ and Cl⁻ Uptake by the Green Alga *Monoraphididium braunii*. *Plant. Cell Environ.*, **17**, 1323-1330.
- 9) M.J. Merrett, N.A. Nimer, and L.F. Dong (1996): The Utilization of Bicarbonate Ions by the Marine Microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. *Plant. Cell Environ.*, **19**, 478-484.
- 10) E.E. Conn, P.K. Stumpf, G. Bruening, and R.H. Doi (1987): 硝化. "コーン・スタンプ生化学" (田宮信雄, 八木達彦訳), pp.453-454 (東京化学同人, 東京).
- 11) M. Dorling, P.J. McAnleg, and H. Hodge (1997): Effect of pH on Growth and Carbon Metabolism of Maltose-Releasing *Chlorella* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.*, **32**, 19-24.
- 12) T.G. Williams and B. Colman (1996): The Effects of pH and Dissolved Inorganic Carbon on External Carbonic Anhydrase Activity in *Chlorella saccharophila*. *Plant. Cell Environ.*, **19**, 485-489.