

海産緑藻 *Dunaliella tertiolecta* の生育に及ぼす Mn の影響

野 呂 忠 秀

Effect of Mn on the growth of a marine green alga,
Dunaliella tertiolecta

Tadahide NORO

NORO, T. 1978. Effect of Mn on the growth of a marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. Jap. J. Phycol. 26 : 69-72.

The effects of Mn at various concentrations on the growth, protein, carbohydrate and chlorophyll of *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER have been studied. The cells were grown in batch culture in a medium used by JOHNSON et al. (1968). The cultures were kept at 20°C, 12:12 LD and 5,000 lux. The cells were analysed during the stationary phase of growth. Significant differences in growth and cell contents appeared at various levels of Mn. The growth was optimal between 0.1 and 0.5 ppm. The toxic effect on the growth became apparent above 10 ppm and the addition of Mn at the concentration of 16 ppm resulted in the rapid death of the cells. The cells grown at Mn less than 0.1 ppm decreased in growth rate and cell length. Carbohydrate and protein also decreased in contents, while chlorophyll contents remained unaffected under this experimental condition. Chlorosis arose as a result of the reduction of chlorophyll contents when grown in medium lacking both Fe, which is known as hydrogenase activator, and Mn. It is interesting to know that the occurrence of this phenomenon was manifested exclusively under the depletion of these two elements. As a result, it is suggested that *D. tertiolecta* is a hydrogenase-containing alga and its chlorophyll is stable in contents under the depletion of Mn alone.

Tadahide Noro, Laboratory of Marine Botany, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Kagoshima, 890 Japan.

藻類にとってマンガン (Mn) は微量必須元素であり (REISNER and THOMPSON 1956), 低 Mn 海域では藻類の生育が抑制される可能性があると言われている (HARVEY 1947)。藻類の生理及び代謝に及ぼす Mn の影響については多くの報告があり (武田 1970; O'KELLEY 1974), その役割としては, 種々のリン酸転移酵素や脱炭酸酵素を賦活することと, 光合成の酸素発生系に必要であることが知られている (BOWEN 1966; 岩崎 1967)。

海産の単細胞緑藻 *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER については, 種々の微量元素の栄養生理学的研究が行われているが, HARVEY (1974) は, 本種 (*Chlamydomonas* sp. として) の生育に低濃度の Mn が必要

であることを調べ, 一方 RILEY and ROTH (1971) は, 本種に含まれている Mn 量を分析している。しかし本種における Mn の栄養生理学的側面については不明の点が多い。

筆者は本種の Mn 吸収機構を解明するため研究を行なっているが, 今回, 培地中の Mn が本種の生育及び代謝に与える影響について若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

実験には北海道立栽培漁業センターより保存種の分与をうけ, 藻体をマイクロビペット洗浄法によって無菌化して培養を行った。培養液は JOHNSON et al. (1968) の培地を一部改変し (Table 1), 無菌テスト

Table 1. Composition of culture medium*.

NaCl	2.4	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	g
KCl	0.2	g
CaCl ₂	0.2	g
KNO ₃	1.0	g
NaHCO ₃	0.043	g
TRIS	2.45	g **
K ₂ HPO ₄	0.045	g
Fe-EDTA	3.64	mg
EDTA·2Na	1.89	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.087	mg
H ₃ BO ₃	0.61	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.015	mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06	mg
MnCl ₂	0.23	mg ***
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.38	mg
H ₂ O	1,000.00	ml

* Modified from medium used by JOHNSON et al. (1968).

** Adjusted to pH 8.0 with HCl.

*** Stock manganese solution: Dissolve 1.000 g of manganese metal (99.99%) in the minimum volume of HNO₃ (40%). After evaporating to dryness on a water bath, again dissolve in 10 ml of conc HCl and dilute to 1,000 ml with H₂O.

には 2216E 及び STP 培地を用いた。培養は 15 ml 容のねじ口試験管に 5 ml の培地を入れ、20°C, 5,000 lux, 明暗周期 12:12 時間で静置培養した。添加した Mn は、片状金属 Mn (純度 99.99%) 1.000 g を少量の硝酸 (40%) に溶かし蒸発乾固したのち 10 ml 濃塩酸で溶出し、塩酸濃度が 0.1 N になるよう再蒸留水で希釈し、1,000 ml の保存液とした。細胞数はトーマ血球計数盤により測定し、クロロフィル量の測定には JEFFREY and HUMPHREY (1975) の方法を用いた。又、粗蛋白量は 1 N 水酸化ナトリウムで 3 時間室温で抽出し、LOWRY 変法 (HARTREE 1972) によってアルブミン量に換算した。粗炭水化物は細胞懸濁液をそのまま DUBOIS et al. (1956) の方法によって分析しグルコース量に換算して求めた。尚、細胞の生長及び成分含有量は培養開始 10 日後に測定した。

結 果

細胞分裂速度及び細胞の長さ。培地中の Mn 濃度

を変化させて培養し、10 日後 (定常期) の細胞数を求めたのが Fig. 1 である。また、Table 2 は培養開始 3-5 日後 (対数増殖期) の細胞分裂速度と添加 Mn 量の関係を示している。それによれば本種は 0.1-0.5 ppm Mn 付近で最大分裂速度を示し、16 ppm Mn では完全に生長が阻害された。更に細胞の長さも 0.1-0.5 ppm Mn 添加域で最大となった (Fig. 2)。

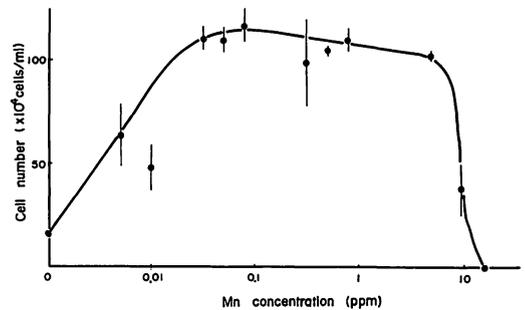


Fig. 1. Effect of Mn on the growth of *Dunaliella tertiolecta* kept at various levels of Mn in batch culture for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux.

Table 2. Mn effects on the growth rate constant (K) of *Dunaliella tertiolecta* incubated at 7 concentrations from 0-16 ppm Mn at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux. K is calculated from $K = \frac{1}{T_2 - T_1} \log \frac{N_2}{N_1}$, where N is the cell number at the early period during the exponential phase, and N₁ and N₂ are the numerical values at 3-day (T₁) and 5-day (T₂) growth, respectively.

Concentration of Mn in medium (ppm)	K
0.00	0.08
0.01	0.22
0.10	0.38
0.50	0.38
1.00	0.30
10.00	0.26
16.00	0.00

粗蛋白及び粗炭水化物量。培地への Mn 添加量と細胞中の粗蛋白・粗炭水化物量との関係を Figs. 3, 4 に示した。それによれば細胞中の各成分含有量は Mn 欠乏の影響を受け、0.01-0.1 ppm Mn 添加域で比較

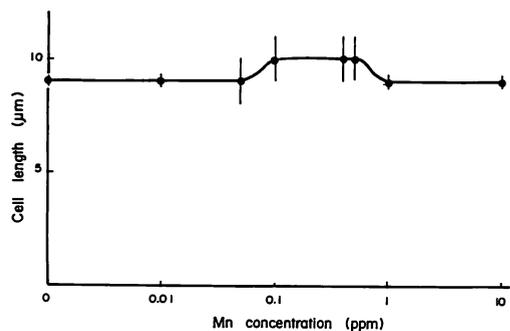


Fig. 2. Effect of Mn on the cell enlargement of *Dunaliella tertiolecta* kept at various levels of Mn in batch culture for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux.

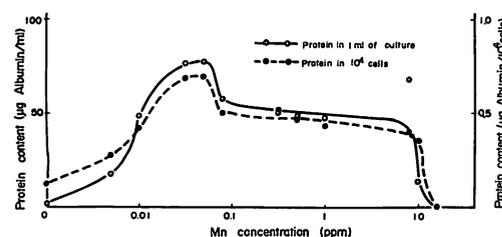


Fig. 3. Protein content of *Dunaliella tertiolecta* grown at various levels of Mn in batch culture for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux. Protein was analysed using the method of HARTREE (1972).

的高い値を示した。

クロロフィル量。細胞中のクロロフィル量と添加 Mn との関係は、上記の粗蛋白や粗炭水化物量とは様相を異にする。即ち細胞中のクロロフィル量は Mn 欠乏培地においても殆んど低下しない (Fig. 5)。一方、Table 3 は培地中の Fe 及び Mn の有無がクロロフ

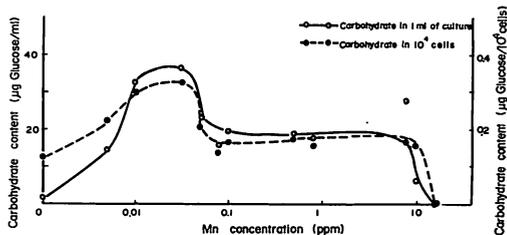


Fig. 4. Carbohydrate content of *Dunaliella tertiolecta* grown at various levels of Mn in batch culture for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux. Carbohydrate was analysed using the method of DUBOIS et al. (1956).

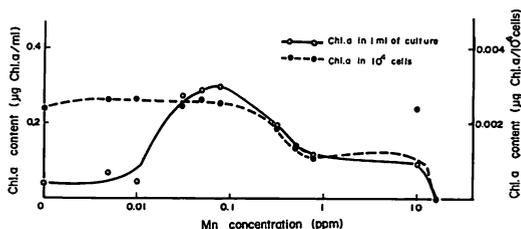


Fig. 5. Chlorophyll a content of *Dunaliella tertiolecta* grown at various levels of Mn in batch culture for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux. Chlorophyll a was analysed using the method of JEFFREY et al. (1975).

イル量に与える影響を見たものである。その結果、細胞中のクロロフィル量は Mn 欠乏の影響を受けないが、Mn とともに Fe をも欠いた場合、細胞中のクロロフィル量は減少し、その量は Fe のみを欠いた場合よりも低く、白化(クロロシス)状態を呈した (Table 3)。

Table 3. Chlorophyll a and b of *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture in 1 ml of media with and without Mn and Fe for ten days. Cells were incubated at 20°C, 12:12 LD, 5,000 lux. JM culture medium shown in Table 1, JM-Mn=Mn-deficient JM medium, JM-Fe=Fe deficient JM medium, JM-Mn,Fe=Mn- and Fe-deficient JM medium.

Medium	(1) Cell No./ml ($\times 10^4$ cells/ml)	(2) Chl. a/ml ($\mu\text{g/ml}$)	(3) Chl. a/cell ($\times 10^{-3} \mu\text{g}/10^4$ cells)	(4) Chl. b/ml ($\mu\text{g/ml}$)	(5) Chl. b/cell ($\times 10^{-3} \mu\text{g}/10^4$ cells)	(6) Chl. a/Chl. b
JM	452 \pm 63	0.63 \pm 0.08	1.39	0.15 \pm 0.02	0.33	4.21
JM-Mn	337 \pm 26	0.49 \pm 0.03	1.45	0.13 \pm 0.01	0.39	3.71
JM-Fe	349 \pm 35	0.37 \pm 0.03	1.06	0.09 \pm 0.01	0.26	4.08
JM-Mn, Fe	353 \pm 27	0.30 \pm 0.02	0.85	0.07 \pm 0.01	0.20	4.25

(3) = (2)/(1), (5) = (4)/(1), (6) = (3)/(5), \pm S.D.

考 察

藻類が生育する際に微量の Mn を必要とすることは既に述べたが、HARVEY (1947) は本種 (*Chlamydomonas* sp. として) の増殖が 0.5-2.0 mg Mn/m³ (0.5-2.0 ppb Mn) で促進するとした。しかし今回の結果から本種を静置培養する際には、0.1 ppm 程度の Mn 添加が好ましいことが、その細胞分速度と細胞内成分含有量から推察された。尚、この 0.1 ppm Mn とは、これまで藻類の培養に使用されてきた人工培地中の Mn 量にほぼ一致するものである。

種々の海産植物プランクトンや微細藻類の蛋白質や炭水化物量が調べられた例は多い (PARSONS et al. 1961)。しかし培地中の Mn が細胞中の蛋白や炭水化物量に与える影響についての報告はない。今回の実験により本種細胞中の粗蛋白と粗炭水化物量が Mn 欠乏の影響を受けていることが明確になったが、これは各種酵素類の賦活剤としての機能を Mn が有することを考えれば当然のことと思われる。

本種のクロロフィル含量については、JEFFREY (1961) の報告がある。しかし、これについても培地中の Mn 添加量との関係を調べた例は少ない。CONSTANTOPOULOS (1970) によれば Mn は *Euglena gracilis* の生長を促進するが、クロロフィル量には影響を与えないことが知られている。本種においても、Mn 欠乏によるクロロフィルの減少は見られなかった (Fig. 5)。KESSLER (1968) は、Mn が欠乏しても白化が起きない藻類には hydrogenase が存在すると述べている。そこで本実験において hydrogenase を賦活すると言われている Fe (WARING and WERKMAN 1944) を Mn と共に培地中から除去して培養したところクロロフィル量が減少し明らかに白化が見られた (Table 3)。従って、これらの結果から本種には hydrogenase が存在する可能性も示唆された。

終りに本稿の御校閲を賜った北海道大学、正置富太郎教授、ならびに貴重な材料を提供して下さった北海道立栽培漁業総合センター、西浜雄二博士に厚く御礼申し上げる。

引用文献

- BOWEN, H. J. M. 1966. Trace element in biochemistry. Acad. Press, London.
- CONSTANTOPOULOS, G. 1970. Lipid metabolism of manganese-deficient algae. I. Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena gracilis* Z. Pl. Physiol. [Lancaster] 45: 76-80.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. PEBERS, and F. SMITH. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- HARTREE, E. F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422-427.
- HARVEY, H. W. 1974. Manganese and the growth of phytoplankton. J. mar. biol. Ass. U. K. 26: 562-579.
- 岩崎英雄. 1967. 微細藻類の栄養要求, 日水誌 33: 1072-1083.
- JEFFREY, S. W. 1961. Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. Biochem. J. 80: 336-342.
- , and G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen 167: 191-194.
- JOHNSON, M. K., E. J. JOHNSON, R. D. MacElroy, H. L. Speer, and B. S. BRUFF. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunallelia viridis*. J. Bacteriol. 95: 1461-1468.
- KESSLER, E. 1968. Effect of manganese deficiency of growth and chlorophyll content of algae with and without hydrogenase. Arch. Mikrobiol. 63: 7-10.
- O'KELLEY, J. C. 1974. Inorganic nutrients. 610-635. In W. D. P. STEWART [ed.], Algal physiology and biochemistry. Blackwell Sci. Pub., London.
- PARSONS, T. R., K. STEPHENS, and J. D. H. STRICKLAND. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada 81: 1001-1016.
- RILEY, J. P., and I. ROTH. 1971. The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture. J. mar. biol. Ass. U. K. 51: 63-72.
- 武田恵二. 1970. 海産珪藻 *Chaetoceros calcitrans* f. *pumilus* (Paulsen) Takano の増殖と Mn 量との関係, 日本プランクトン学会報 17: 77-83.
- WARING, W. S., and C. H. WERKMAN. 1944. Iron deficiency in bacterial metabolism. Arch. Biochem. 4: 75-87.
- WIESSNER, W. 1962. Inorganic micronutrients. In R. A. LEWIN [ed.], Physiology and biochemistry of algae. 267-286. Acad. Press, London.