植物プランクトンの培養（武田研）

2013年12月9日

文責：野崎

培養株の植え継ぎ手順

1．用意した新しい培地(新培地)を、これから植え継ぐ古い培地(旧培地)と同じインキュベーターに入れて温度を合わせる(植え継ぎの1時間前)

2．滅菌ブースの床面と作業者の両手、植え継ぎ用の使い捨てスポイト(ビニール袋の外側)をエタノールで殺菌する、衣服の袖はめくった状態で作業する。ブースの蛍光灯、換気スイッチを入れておく。

3．新培地と旧培地をブース内へ入れ、以後は正面のカバーを下した状態で作業する。

4．植え継ぎ前に旧培地を優しく撹拌する(何度か上下を反転させればよい)。二つの培地のキャップを緩めて、旧培地からスポイトで1ml取る。すぐに新培地へ添加して蓋を閉める。

5．植え継ぎ後の新培地を植え継ぎ前と同様に撹拌する。植え継いだ培地に植え継ぎ日を記入してインキュベーターに戻す。旧培地は、新培地がうまくいかなかった時の為にとっておく。

＊今回は活発に増殖するのを防ぐために、側面を紙で覆っていた(2013年11月)

＊通常は二週間に一回植え継いでいるが、植え継ぎ時に添加する植物プランクトンの量を減らせば、植え継ぐまでの期間を伸ばす事が出来る。

＊武田研所有の植物プランクトン、培地、温度、撹拌条件

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 植物プランクトン | 培地 | 維持温度 | 増殖適温 | 明暗条件 | 撹拌条件 |
| *Skeletonema* sp. | 珪藻 | f/2培地 | 15℃ |  |  | 一日二回、朝・晩 |
| *Prorocentrum* sp. | 渦鞭毛藻 | f/2培地 | 15℃ |  |  | 不要 |
| *Synechococcus* | 藍藻 | L1培地 | 23℃ |  |  | 一日一回 |

培地の作成

1．半年から一年寝かせた海水をGF/Fフィルターでろ過する。濾過海水を出すための穴と、アスピレーターに繋ぐ穴は別にする。この濾過海水で培地を作る用器を二回共洗いする。

2．1Lの濾過海水を培地作成ボトルに入れる。このボトルに前もって1Lの目盛を分かりやすく付けておくと、注ぐ時に合わせやすい。今回は先に1Lの濾過海水を培地作成ボトルに注いだ。

3．各溶液を定量、ピペットマンを使って添加する。チップを溶液で共洗いしてから規定量取り、添加していく。添加したらすぐに蓋をきつく締め、よく混ぜて溶液がコロイド状になるのを防ぐ。添加と混合を4～5種の溶液で繰り返す。通常は、この時添加する量が1mlで済むような溶液濃度で作成する。

f/2培地：硝酸、リン酸、ケイ酸、微量金属、ビタミンの溶液をそれぞれ添加

L1培地：硝酸、リン酸、微量金属、ビタミンの溶液をそれぞれ添加

4．ろ過滅菌のキットを使って、栄養塩・微量金属・ビタミンを加えた培地を、滅菌の為ろ過する。クリーンブース内でブース内および両手をエタノールで消毒し、ろ過滅菌をおこなう。ろ過滅菌後には、50mlのカルチャーフラスコに分注する。分注は素早く行い、あまり長くフタを開けない様に注意する。

＊古い海水の方が、生物の活性が下がっていて良い。今回は2012年の東シナ海で組んだ表層海水を使用した。

＊通常はここでは電動のアスピレーターを使用するが、真空ポンプやハンドアスピレーターを使う際には、そちらにろ過海水が流れないよう、別の穴を使うので注意。

＊厳密には、950ｍLのろ過海水に対して各溶液を添加して、最後に1Lになるようにメスアップする。

＊ビタミンの溶液はバクテリアがコンタミするので、保存時は冷凍している。その他の溶液については冷蔵。

＊武田研では、チップを各溶液用に専用の物を用意して使用。使用前にミリQ水ですすぎ、溶液で一度共洗いしてから、培地ボトルへ溶液を添加、その後内側と外側をミリQ水で洗ってから、ラップにくるんで溶液と一緒に保存。

＊武田研では、ろ過滅菌のキット(今回はNalgenのものを使用)が無い場合の滅菌にオートクレーブを行っている(121℃、20分)

＊武田研では培地を作成するボトルは専用の物を用意していた。過去に使ったろ過滅菌の空用器を再利用しているとの事。

＊f/2培地作成に使用する溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | Stock溶液 | 1/10量のStock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| NaNO3 | 75g/L | 7.5g/100mL | 1mL | 8.82×10-4M |
| NaH2PO4H2O | 5g/L | 0.5g/100mL | 1mL | 3.62×10-5M |
| Na2SiO39H2O | 30g/L | 3 g/100mL | 1mL | 1.06×10-4M |
| 微量金属溶液 | (下記参照) |  | 1mL | ‐‐‐ |
| ビタミン溶液 | (下記参照) |  | 0.5mL | ‐‐‐ |

＊Stock溶液、一次Stock溶液は蒸留水を用いて作成する。

＊f/2微量金属溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 一次Stock溶液 | 1/10量の一次Stock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| FeCl3 6H2O | ‐‐‐ | 0.315g | 3.15g | 1.17×10-5M |
| Na2EDTA 2H2O | ‐‐‐ | 0.436g | 4.36g | 1.17×10-5M |
| CuSO4 5H2O | 9.8g/L | 0.98g/100mL | 1mL | 3.93×10-8M |
| Na2MoO4 2H2O | 6.3g/L | 0.63g/100mL | 1mL | 2.60×10-8M |
| ZnSO4 7H2O | 22.0g/L | 2.2g/100mL | 1mL | 7.65×10-8M |
| CoCl2 6H2O | 10.0g/L | 1g/100mL | 1mL | 4.20×10-8M |
| MnCl2 4H2O | 180.0g/L | 18g/100mL | 1mL | 9.10×10-7M |

＊FeCl3 6H2O及びNa2EDTA 2H2Oの添加量は1Lの微量金属溶液を作る際の分量なので、100mLの微量金属溶液を作る際は注意。

＊f/2ビタミン溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 一次Stock溶液 | 1/10量の一次Stock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| thiamine HCl (vit.B1) | ‐‐‐ | 20mg | 200mg | 2.96×10-7M |
| biotin (vit. H) | 0.1g/L | 0.01g/100mL | 10mL | 2.05×10-9M |
| cyanocobalamin(vit.B12) | 1.0g/L | 0.1g/100mL | 1mL | 3.69×10-10M |

＊thiamine HCl (vit.B1)の添加量は1Lのビタミン溶液を作る際の分量なので、100mLのビタミン溶液を作る際は注意。

＊f/2培地の調合表はNational Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA)のHP内にある、Algal Medium Recipesの中からf/2Mediumを引用した。

＊L1培地作成に使用する溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | Stock溶液 | 1/10量のStock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| NaNO3 | 75g/L | 7.5g/100mL | 1mL | 8.82×10-4M |
| NaH2PO4H2O | 5g/L | 0.5g/100mL | 1mL | 3.62×10-5M |
| Na2SiO39H2O | 30g/L | 3 g/100mL | 1mL | 1.06×10-4M |
| 微量金属溶液 | (下記参照) |  | 1mL | ‐‐‐ |
| ビタミン溶液 | (下記参照) |  | 0.5mL | ‐‐‐ |

＊Stock溶液、一次Stock溶液は蒸留水を用いて作成する。

＊L1微量金属溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 一次Stock溶液 | 1/10量の一次Stock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| Na2EDTA 2H2O | ‐‐‐ | 0.436g | 4.36g | 1.17×10-5M |
| FeCl3 6H2O | ‐‐‐ | 0.315g | 3.15g | 1.17×10-5M |
| MnCl2 4H2O | 178.10g/L | 17.81g/100mL | 1mL | 9.09×10-7M |
| ZnSO4 7H2O | 23.0g/L | 2.3g/100mL | 1mL | 8.00×10-8M |
| CoCl2 6H2O  | 11.90g/L | 1.19g/100mL | 1mL | 5.00×10-8M |
| CuSO4 5H2O | 2.50g/L | 0.25g/100mL | 1mL | 1.00×10-8M |
| Na2MoO4 2H2O | 19.9g/L | 1.99g/100mL | 1mL | 8.22×10-8M |
| H2SeO3 | 1.29 g/L | 0.129g/100ｍL | 1mL | 1.00×10-8M |
| NiSO46H2O | 2.63 g/L | 0.263g/100mL | 1mL | 1.00×10-8M |
| Na3VO4 | 1.84 g/L | 0.184 g/100mL | 1mL | 1.00×10-8M |
| K2CrO4 | 1.94 g/L | 0.194 g/100mL | 1mL | 1.00×10-8M |

＊FeCl3 6H2O及びNa2EDTA 2H2Oの添加量は1Lの微量金属溶液を作る際の分量なので、100mLの微量金属溶液を作る際は注意。

＊L1ビタミン溶液

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 成分 | 一次Stock溶液 | 1/10量の一次Stock溶液 | 添加量 | 培地の最終mol濃度 |
| thiamine HCl (vit.B1) | ‐‐‐ | 20mg | 200mg | 2.96×10-7M |
| biotin (vit. H) | 0.1g/L | 0.01g/100mL | 10mL | 2.05×10-9M |
| cyanocobalamin(vit.B12) | 1.0g/L | 0.1g/100mL | 1mL | 3.69×10-10M |

＊thiamine HCl (vit.B1)の添加量は1Lのビタミン溶液を作る際の分量なので、100mLのビタミン溶液を作る際は注意。

＊L1培地の調合表はNational Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA)のHP内にある、Algal Medium Recipesの中からL1Mediumを引用した。

引用したHP

PROVASOLI-GUILLARD National Center for Marine Algae and Microbiota

f/2Medium <https://ncma.bigelow.org/node/79>

L1Medium <https://ncma.bigelow.org/node/83>

クロロフィル蛍光による植物プランクトンの定量