

サロマ湖から単離した珪藻 7 株の形態と増殖特性

平野伴明¹・笠松伸江²・工藤 栄¹

The morphological and growth properties of seven diatom strains isolated from Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan

Tomoaki Hirano¹, Nobue Kasamatsu² and Sakae Kudoh¹

(2003 年 5 月 12 日受付; 2003 年 6 月 4 日受理)

Abstract: We observed morphological and growth properties of diatoms isolated from Saroma Ko lagoon, and cultured them under a low-temperature condition (1.7°C). Seven strains which belonged to three genera, *Chaetoceros* (2 strains), *Navicula* (2 strains), and *Nitzschia* (3 strains) were used for the present study. Each strain showed slightly different growth rate, lag and logarithmic growth phase lengths; however, they never showed any signs of occurrence of the senescent phase in 40 days of experiments. After the logarithmic growth phase, chlorophyll fluorescence of all cultures kept nearly the maximum level (stationary phase), at least for 10 days. Logarithmic growth rates under 1.7°C temperature ranged from 0.27 to 0.47 d⁻¹, suggesting psychrophilic growth ability of all isolated strains.

要旨: 単一藻株として安定した増殖を示しているサロマ湖からの単離株(7株)の形態と低温培養下での増殖に関する特性を調べた。単離株は *Chaetoceros* 属 2 株, *Navicula* 属 2 株, *Nitzschia* 属 3 株であった。それぞれの株で得られた増殖速度は株ごとにわずかに差があり, 誘導期・対数増殖期間の長さにも株ごとの違いが認められた。40 日間におよぶ実験期間内において, いずれの株にも急激な死滅が生じたような変動は認められず, 見た目上増殖停止した後, 少なくとも 10 日間は, クロロフィル蛍光強度が最大値付近を保っていた。また低温培養にも関わらず, 対数増殖期の増殖速度が 0.27–0.47 d⁻¹ という高い増殖能を示した。

1. はじめに

中・低緯度海域に較べ, 極域の海洋・湖沼は, その過酷な自然環境ゆえ, 頻繁な野外観測の機会が制限されやすく, ここでの基礎生産活動の主体である微細藻類の環境応答性や基礎生産活動の制御要因に関しては未知の部分が多い。海洋や湖沼で生活する微細藻類の生活現象の探求を目指す水圏生態学において, 多様な生物群と複雑な環境要因が混在する自然水域

¹ 国立極地研究所, National Institute of Polar Research, Kaga 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo 173-8515.

² 総合研究大学院大学数物科学研究科極域科学専攻, Department of Polar Science, School of Mathematical and Physical Science, The Graduated University for Advanced Studies, National Institute of Polar Research, Kaga 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo 173-8515.

から対象生物を単離し、制御された室内環境で培養を行う実験的研究は、環境と生活現象の因果関係を解析する上できわめて有効な手法である（池谷，1996）。

国立極地研究所生物部門では、数年前から極域生物の‘生きた’標本の維持・保存と管理とその共同研究への供与を目的として、低温培養設備の整備を実施してきた。その一端として冬季に海氷が発達し、海水生態系の発達がみられる北海道オホーツク沿岸のサロマ湖（工藤，1996）から複数の微細藻類株を単離し保存するとともに、培養株を用いて基礎生産活動の要である光合成反応の特徴などを順次報告してきた（Ikeya *et al.*, 2000, 2001; Kashino *et al.*, 1998; Kudoh *et al.*, 2003）。また現在では、南極及び北極圏内での海洋観測の折に採取した水試料からの微細藻類の単離・保存を試みており、培養株を用いた実験生態学的な共同研究の発展に努めようとしている。

単離株を用いた共同研究の活性化と推進には、当研究所が保存している株の基本的な特性の公表が必要と思われる。そこで本報告では、現在、種までの同定には至っていないものの、単一藻株として安定した増殖を示しているサロマ湖からの単離株（7株）の形態と低温培養下での増殖に関する特性を紹介する。

2. 微細藻類の単離と保存

海水存在時のサロマ湖（北緯44°08′，東経143°50′）で優占している藻類は、海水中・海水下のどちらにおいても珪藻類であることが知られている（Kikuchi-Kawanobe and Kudoh, 1995; Niimura *et al.*, 2000; Ikeya *et al.*, 2001）。海水融解と外海への流失が始まった1998年4月8日にサロマ湖東岸から表層水をバケツ採水し、これを滅菌チューブ（50 ml）中で約1°C、10 $\mu\text{mol Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 程度の低温・弱光下で数日間予備培養した。予備培養試料中で微細藻類が増殖し、黄金色に着色した頃をみはからって、先端を細くしたピペットにて単一の藻細胞を拾いだ

表1 サロマ湖表層水中から単離された珪藻株
Table 1. List of diatom strains isolated from Saroma Ko lagoon.

Order	Genus	Culture collection mark
Centrales	<i>Chaetoceros</i>	B23-p1*
	<i>Chaetoceros</i>	B23-p2
	<i>Chaetoceros</i>	B23-p3
	<i>Thalassiosira</i>	B5-P5*
Pennales	<i>Navicula</i>	P1-3
	<i>Navicula</i>	P7-1
	<i>Nitzschia</i>	P5-2
	<i>Nitzschia</i>	P5-3
	<i>Nitzschia</i>	P10-3

*These two strains were used for photosynthetic studies by Ikeya *et al.* (2000), but they had been lost accidentally due to incubator trouble.

し、20–40 倍に希釈した **Guillard** の **F** 培地 (**Guillard and Ryther, 1962**) 中に移植した。この操作により、9 株の珪藻を単離することができた(表1)。このうち 2 株は培養装置の偶発的故障により死滅したが、残りの 7 株は別の研究機関の培養装置に分与保存されていたため、この事故による死滅を免れ、現在 1.7°C でおよそ $10 \mu\text{mol Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件下で保存されている。

3. 形 態

保存されている 7 株を、2 倍に希釈した **F** 培地 (f/2 培地) 中で増殖させた後、形態観察のため一部をスライドガラス上にとりだし、顕微鏡写真撮影を実施した (図 1)。

3.1. *Chaetoceros* 属株

珪藻綱中心目の *Chaetoceros* 属の **B23-p2** 株と **B23-p3** 株は、その殻から 4 方に伸長した刺毛が確認できた (図 1A, B)。細胞は殻面観で楕円形をしており、帯面観で長方形であった。鎖状群体は確認されなかった。**B23-p2** 株と **B23-p3** 株のどちらも殻幅は $6 \mu\text{m}$ 程で、細胞の頂軸長は $10\text{--}12 \mu\text{m}$ であった。刺毛の長さは $10\text{--}12 \mu\text{m}$ であり、細胞の長さとはほぼ同じであった。

3.2. *Navicula* 属株

珪藻綱羽状目 *Navicula* 属の **P1-3** 株と **P7-1** 株は、7 株のうち最も細胞サイズが大きかった (図 1C, D)。単独性だが時として帯状の群体を形成していた事もあった。殻面は両株ともに細長い長方形で両極が細まっており、縦溝が観察できた。細胞の大きさは両株でそれぞれ多少異なり、**P1-3** 株で細胞の長さは $25 \mu\text{m}$ 、幅は $8 \mu\text{m}$ であるのに対し、**P7-1** 株では細胞は長さ $30 \mu\text{m}$ 、幅 $10 \mu\text{m}$ と **P1-3** 株に比べ多少大型であった。両株は細胞が単独時に自走し、頂軸長方向に移動することが認められた。

3.3. *Nitzschia* 属株

珪藻綱羽状目の *Nitzschia* **P5-2** 株、**P5-3** 株、及び **P10-3** 株の細胞は増殖にともなって帯状の群体を形成する場合が多かった (図 1E, F, G)。細胞の大きさは 3 株においてそれほど違いはなく、長さ $8\text{--}11 \mu\text{m}$ 、幅 $4\text{--}5 \mu\text{m}$ であった。

4. 増殖特性

4.1. 低温培養条件下での増殖

低温下での増殖特性を調べるため、7 株をそれぞれオートクレーブ滅菌した f/2 培地中にうえつき、1.7°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) で $50 \mu\text{mol Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光強度下で少なくとも 3 回以上継代培養した後、同一条件の 500 ml 三角フラスコ内で培養実験を開始した。それぞれの株について 24 時間おきに 5 ml ずつ 2 回の試料を採取し、ただちにその試料中のクロロフィル蛍光強度を

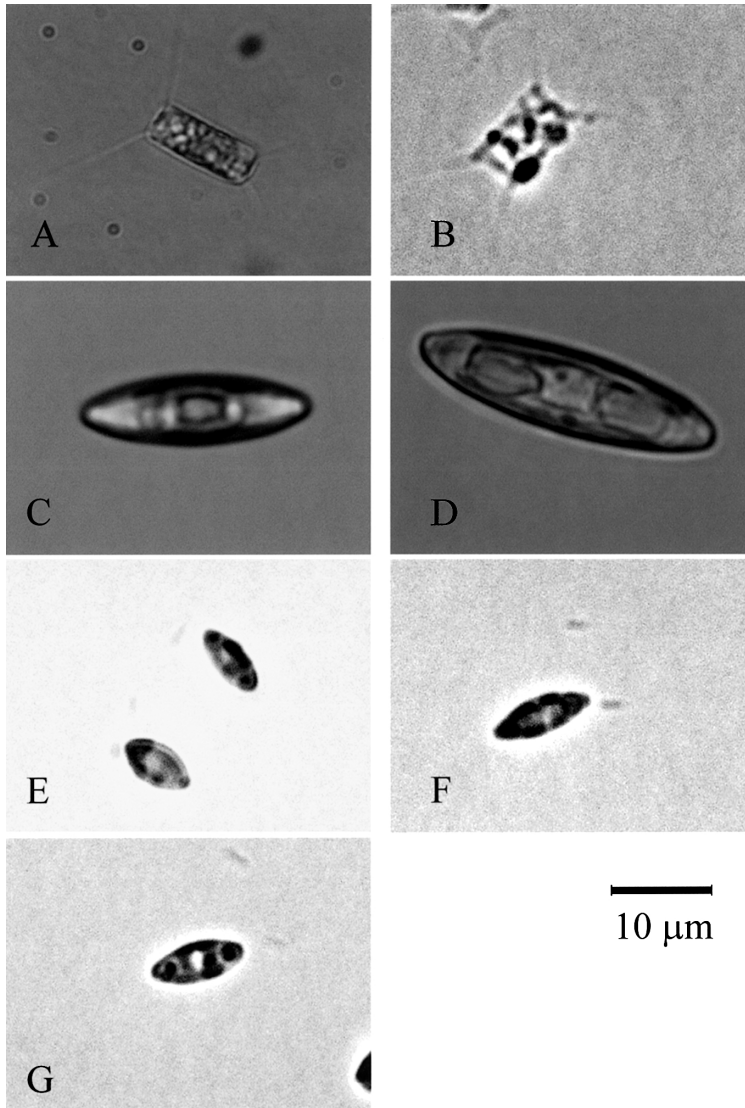


図1 珪藻7株の顕微鏡写真. A; *Chaetoceros* B23-p2, B; *Chaetoceros* B23-p3, C; *Navicula* P1-3, D; *Navicula* P7-1, E; *Nitzschia* P5-2, F; *Nitzschia* P5-3, G; *Nitzschia* P10-3.

Fig. 1. Micrographs of seven diatom strains. A; *Chaetoceros* B23-p2, B; *Chaetoceros* B23-p3, C; *Navicula* P1-3, D; *Navicula* P7-1, E; *Nitzschia* P5-2, F; *Nitzschia* P5-3, G; *Nitzschia* P10-3.

藻株量変化の指標として測定した。

4.2. *Chaetoceros* 属株

B23-p2株は培養開始後3日頃まではゆるやかな蛍光強度の増加を示し（誘導期），その後急激な増加をみせる対数増殖期に入った（図2）。この対数増殖期が約10日間続いた後，ほぼ

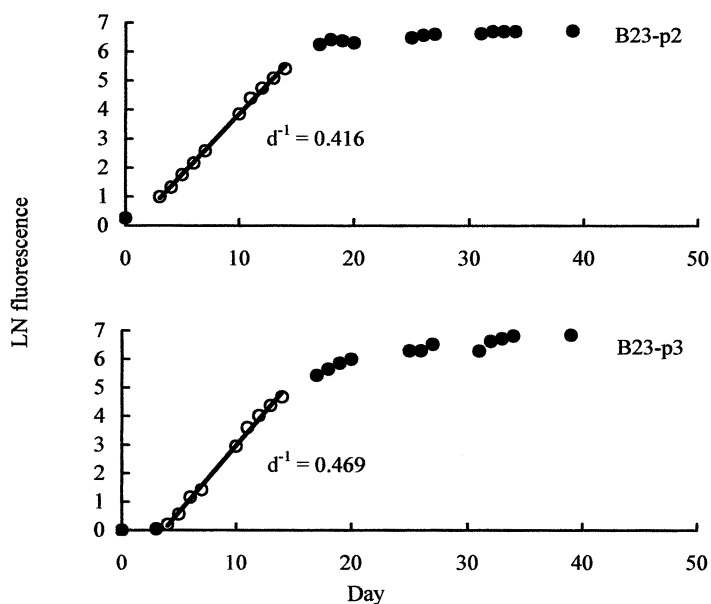


図2 *Chaetoceros* 株の成長曲線。蛍光強度を自然対数で表示した。上図に B23-p2 株、下図に B23-p3 株を示した。白のシンボルは対数増殖期を示す。

Fig. 2. Growth curve of *Chaetoceros* strains (B23-p2: upper, B23-p3: lower). Open circles with a line indicate 'logarithmic growth phase'.

一定の蛍光強度を示す定常期を迎えた。B23-p3 株は前株よりも 1 日おくれた培養 4 日目に対数増殖期にはいり、それが約 10 日間続いた後、定常期を迎えた。両株の対数増殖期における増殖速度は B23-p2 株と B23-p3 株でそれぞれ 0.416 , 0.469 d^{-1} であった。これは 1.7°C という低温条件を考慮すると非常に高いものであるといえる（例えば Ikeya *et al.*, 2000）。また両株ともに定常期を迎えた後に約 20 日間は大幅に減衰することなく一定の蛍光強度を示したことから、この期間であれば増殖停止後急激には死滅しない性質があることを示唆している。

4.3. *Navicula* 属株

P1-3 株と P7-1 株においても蛍光強度変化から *Chaetoceros* 2 株と同様な誘導期、対数増殖期、定常期が認められた（図 3）。P1-3 株は培養 3 日後に対数増殖期を迎えた。本株は約 10 日間の対数増殖期終了後の定常期にやや蛍光強度のばらつきが確認されるものの、わずかな蛍光強度の減少傾向が観察された。一方の P7-1 株では誘導期間がやや長く培養 5 日～10 日に対数増殖期を迎え、その後 1 週間ほどかけて蛍光強度増加速度がゆるやかになり、培養 20 日頃に定常期を迎えた。その後蛍光強度はわずかに減衰していった。*Navicula* 属 2 株の対数増殖期間中の増殖速度は P1-3 株で 0.335 d^{-1} 、P7-1 株で 0.320 d^{-1} であった。定常期に達し、やや蛍光値が減衰したようにみえた時の両株を顕微鏡観察したところ、細胞個体は対数増殖期

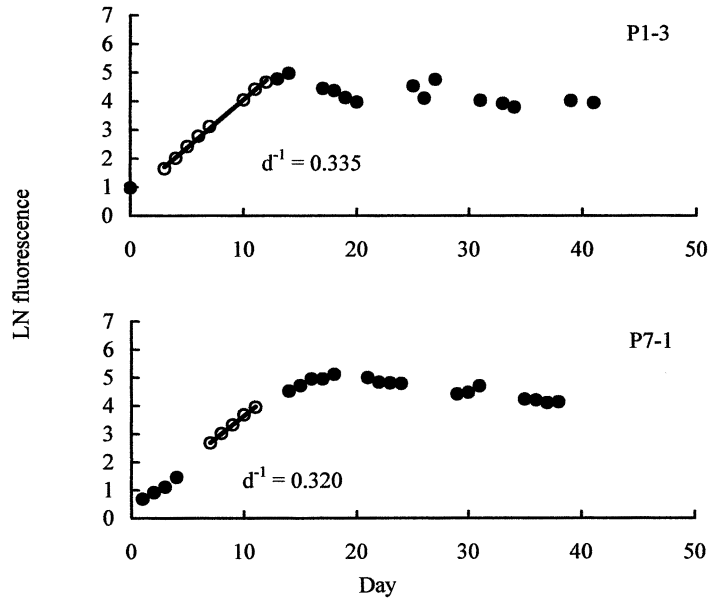


図3 *Navicula* 株の成長曲線. 蛍光強度を自然対数で表示した. 上図に P1-3 株, 下図に P7-1 株を示した. 白のシンボルは対数増殖期を示す.

Fig. 3. Growth curve of *Navicula* strains (P1-3: upper, P7-1: lower). Open circles with a line indicate 'logarithmic growth phase'.

とほとんど変わらないものの、細胞どうしが多数不定形に付着 (aggregation) していたのが認められた。この細胞の集積がクロロフィル蛍光を被陰し蛍光強度のわずかな減衰の傾向を導いた可能性がある。

4.4. *Nitzschia* 属株

P5-2, P5-3, P10-3 株も蛍光強度変化から前述の 4 株と同様に誘導期・対数増殖期・定常期をみてとることができた。対数増殖期の長さには 3 株の間で大きな差はみられなかったものの、3 株間でその間の増殖速度は大きく異なっていた(図4)。それぞれの増殖速度は P5-2 株で 0.274 d^{-1} , P5-3 株で 0.370 d^{-1} , P10-3 株で 0.442 d^{-1} であった。*Navicula* 2 株ほど顕著ではないが、P5-3 株と P10-3 株では定常期以後は、クロロフィル蛍光値がわずかに減衰していた。

5. ま と め

Ikeya *et al.* (2000) によると、本 7 株と同時期に同様の手法でサロマ湖から単離した珪藻 2 株は、 $1\text{--}2^{\circ}\text{C}$ 程度の低水温下での対数増殖期の増殖速度が $0.3\text{--}0.5 \text{ d}^{-1}$ と速く、水温 15°C 以上では全く増殖することができない、いわゆる好冷性 (Psychrophilic) の性質を持つ藻類株であったことが記述されている。本報告中の 7 株は低温での高い増殖速度という点では Ikeya

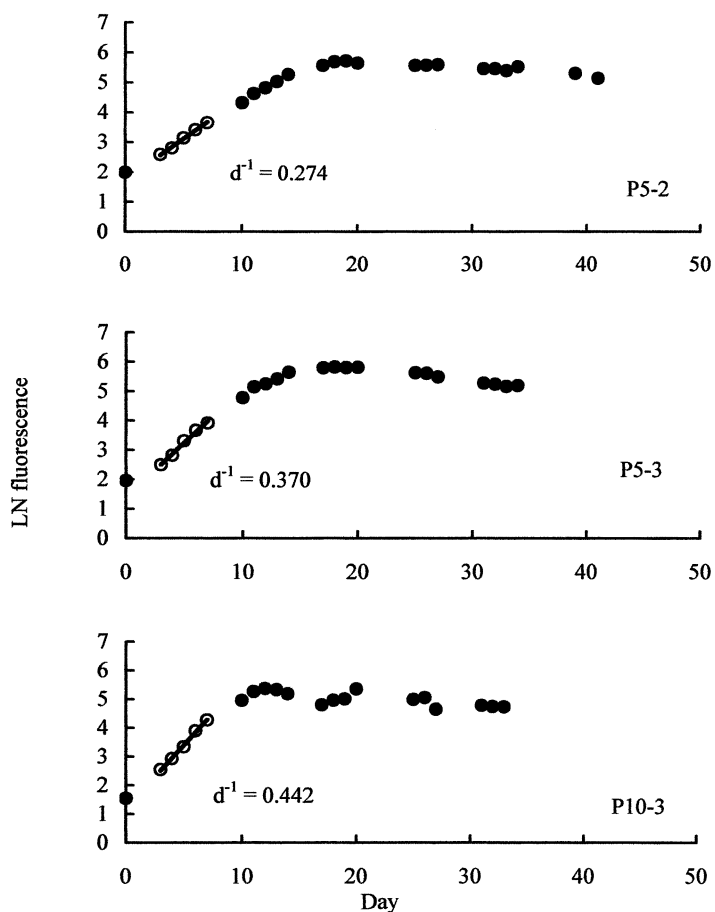


図 4 *Nitzschia* 株の成長曲線. 蛍光強度を自然対数で表示した. 上図に P5-2 株, 中図に P5-3 株, 下図に P10-3 株を示した. 白のシンボルは対数増殖期を示す.

Fig. 4. Growth curve of *Nitzschia* strains (P5-2: upper, P5-3: middle, P10-3: lower). Open circles with a line indicate 'logarithmic growth phase'.

et al. (2000) の報告中の 2 株とほぼ同等の能力を持った珪藻類であり, この意味において低温下での生理応答や生産性の実験生態学的研究に十分使用できるものと考えられる.

今回紹介した 7 株の珪藻には, いずれも増殖パターンから誘導期・対数増殖期間の長さに株ごとの違いが認められたものの, 1.7°C という低温培養条件下で, 対数増殖期の増殖速度として 0.27–0.47 d^{-1} (世代時間 1.5–2.6 日) という高い増殖能が認められた (表 2). 40 日間におよぶ実験期間内において, いずれの株にも定常期に達した後に急激な死滅が生じたような変動は認められず, 見た目上増殖停止した後, 少なくとも 10 日間は, クロロフィル蛍光強度が最大値付近を保つことから, 単離株の継代保存上, 1 カ月に 1 度程度の植え継ぎ操作で株の維持ができることが明らかとなった. ここで紹介したように当研究所では, 現在サロマ湖産の 7 株の好冷性珪藻を低温培養条件下で継代培養して共同研究への提供準備を整えてお

表 2 培養珪藻株の対数増殖期と成長速度

Table 2. Period of logarithmic growth phase after inoculation and the growth rates of the isolated diatom strains.

Culture collection mark	Genus	Log phase (days)	Growth rate (day ⁻¹)
B23-P2	<i>Chaetoceros</i>	3 to 14	0.416
B23-P3	<i>Chaetoceros</i>	4 to 14	0.469
P1-3	<i>Navicula</i>	3 to 12	0.335
P7-1	<i>Navicula</i>	7 to 11	0.320
P5-2	<i>Nitzschia</i>	3 to 7	0.274
P5-3	<i>Nitzschia</i>	3 to 7	0.370
P10-3	<i>Nitzschia</i>	3 to 7	0.442

り、今後さらに南北両極の微細藻類の単離と培養保存に着手していく計画である。

謝 辞

本報告は文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (B) (2) (課題番号 14380247, 代表・工藤栄) の補助を受けた研究の一部をまとめたものである。東京大学の池谷透、姫路工業大学の菓子野康浩両博士には、培養株の維持と管理に多大なご協力をいただいたことに深く感謝します。

文 献

- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962): Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229–239.
- 池谷 透 (1996): 海洋植物プランクトンの単離と培養. 月刊海洋, 号外 **10**, 93–96.
- Ikeya, T., Kashino, Y., Kudoh, S., Imura, S., Watanabe, K. and Fukuchi, M. (2000): Acclimation of photosynthetic properties in psychrophilic diatom isolates under different light intensities. *Polar Biosci.*, **13**, 43–54.
- Ikeya, T., Kikuchi-Kawanobe, K. and Kudoh, S. (2001): Floristic examination of diatom assemblage in the dim light-environment of water column and sea ice, Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan. *Polar Biosci.*, **14**, 33–44.
- Kashino, Y., Fujimoto, K., Akamatsu, A., Koike, H., Satoh, K. and Kudoh, S. (1998): Photosynthetic pigment composition of ice algal and phytoplankton assemblages in early spring in Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, **11**, 22–32.
- Kikuchi-Kawanobe, K. and Kudoh, S. (1995): Species composition of ice algal assemblages in Saroma Ko lagoon and Resolute Passage, 1992. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, **8**, 59–63.
- 工藤 栄 (1996): 海水生態系—サロマ湖に冬季に発達する季節海水生態系を例に一. *海洋と生物*, **102**, 21–27.
- Kudoh, S., Imura, S. and Kashino, Y. (2003): Xanthophyll cycle of ice algae on the sea ice bottom in Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan. *Polar Biosci.*, **16**, 86–97.
- Niimura, Y., Ishimaru, T. and Taguchi, S. (2000): Initial incorporation of phytoplankton into young ice in Saroma Ko lagoon, Hokkaido, Japan. *Polar Biosci.*, **13**, 15–27.