

井上 勲: 微細藻類ノート (1): 海産微細藻類の分離法  
Isao INOUE: Notes on microalgae in Japan  
(1). Isolation technique

微細藻類の多くは細胞壁構造をもたないので固定によって変形あるいは破裂して、研究材料として使えなくなるものが多い。そのために、微細藻類の研究には珪藻などを除くと、ほとんど例外なく培養株を材料として用いるようになっている。赤潮などによる大量発生のような特殊な場合を別として、一般には採取した海水や河口水の中には、個体数および種数ともにごくわずかの藻が観察されるに過ぎない。プランクトンネットによる採集は、多くの種や個体数を得ることができるが、微細藻類の大部分を占める大きさ  $20\ \mu\text{m}$  以下のナンノプランクトンはネットを通り抜けてしまうので、採集方法としては適当ではない。またろ過あるいは遠心器による濃縮などの手段も用いられるが、このような試料には多数の種が混在しており、分類や同定に電子顕微鏡レベルの微細形態の観察が要求される種の研究材料としては不適当である。結局、このような試料からそれぞれの種類を分離し、単藻培養を確立する操作が研究の前提条件として必要ということになる。微細藻類の分類学的研究およびフロラの解明のための基礎的な手段として、筆者は以下の方法を試み、良い結果を得ているので紹介したい。

- 1) 試料として各地の港湾、河口水や海浜の砂や泥を採取し、実験室にもちかえる。
- 2) 腰高のプラスチックあるいはガラスの容器に約  $50\ \text{ml}$  の試料水や試料砂を入れ、Erd-Schreiber (FØYN, 1934) あるいは GPM (LOEBLICH III, 1975) などの培地を等量から数倍量加え、さらに LEWIN (1966) によって報告された珪藻類の成長阻害物質である  $\text{GeO}_2$  溶液 (作製法は STEIN (1973) あるいは西澤・千原 (1979) に詳しい) を  $10\text{-}50\ \text{mg/l}$  の濃度になるように滴下する。
- 3) これを  $15\text{-}20^\circ\text{C}$  の培養庫で  $3000\text{-}6000\ \text{lux}$  の照度下でおよそ 1 週間から 1 ヶ月間予備培養を行うときさまざまな種類の微細藻類が増殖してくる。
- 4) このときに全個体数の  $10\%$  以上を占める種類は、希釈法 (dilution-culture method) によってほとんどの場合容易に分離することができる。希釈には  $\text{GeO}_2$  を含まない培地を用いる。また容器は  $1\text{-}2\ \text{ml}$  の容量 (例えばヌンク社 24 穴培養プレート) が最適である。希釈には次のような操作を行う。

1) 培地を培養プレートまたは適当な容器に  $0.9\ \text{ml}$  ずつ分注しておく。

- 2) 分離しようとする種類が最も高密度になっている部分を駒込ピペットで  $0.1\ \text{ml}$  とり出し、培養プレートの第 1 の容器に入れる。これで  $10^{-1}$  の希釈になる。
- 3) よく攪拌したあとで第 1 の容器から  $0.1\ \text{ml}$  をとり出し第 2 の容器に入れる。この操作を第 4 の容器までくりかえすと  $10^{-4}$  までの希釈率の試料水が得られる。
- 4) この第 4 の容器からパストゥールピペットを用いて 1 滴 (約  $0.03\ \text{ml}$ ) をとり出し注意深く検鏡して、1 滴の培地に何個体の藻体が存在するか確かめる。この操作を最低 5 回くりかえす。もしこのとき 2 個体以上が 1 滴のなかに含まれていれば、さらに希釈を行い、1 滴に 1 個体だけが含まれるような濃度にまで希釈する。経験的には、5 滴のうち 3 滴にはそれぞれ 1 個体、残りの 2 滴には 0 個体という濃度のとき最も良い結果が得られるようである。
- 5) 適当に希釈された試料水を 1 滴ずつ約 20 個の容器に入れ、 $15\text{-}20^\circ\text{C}$ 、約  $3000\ \text{lux}$  で 2 週間培養する。
- 6) 増殖した藻をパストゥールピペットでとり出し、前もって用意した  $10\ \text{ml}$  ずつ培地を含む試験管に植えつける。以上の操作によって比較的容易に単藻培養を得ることができる。上にあげた数字はあくまでも目安にすぎないので、藻の優先度や試料の汚染度によって適当に変える必要がある。

註: 何らかの理由で、はじめは優先的に増殖しない種の多くは、単藻培養にならない希釈率で希釈をくりかえすことで次第に優先順位をあげることができ最終的に希釈法で分離できる。

#### 引用文献

- FØYN, B. 1934. *Lebenzyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceae Cladophora suhriana* Kützling. Arch. Protistenk. 83: 1-56.
- LEWIN, J.C. 1966. Silicon metabolism in diatom V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6: 1-12.
- LOEBLICH, A.R. III. 1975. A seawater medium for dinoflagellates and the nutrition of *Cachonina niei*. *J. Phycol.* 11: 80-86.
- 西澤一俊・千原光雄 1979. 藻類研究法, 共立出版, 東京.
- STEIN, J.R. 1973. *Handbook of phycological methods. Culture and growth measurements.* 448 pp. Cambridge University Press.

(筑波大・生物)