

## 兵庫県内の池に発生したヒカリモ（黄金藻）の観察

大石英明\*・矢野 洋\*\*・伊藤裕之\*\*・中原正展\*\*

\*神戸市環境保健研究所（650 神戸市中央区港島中町4-6）

\*\*神戸市水道局水質試験所（652 神戸市兵庫区楠谷町37-1）

Ohishi, H., Yano, H., Ito, H. and Nakahara, M. 1991. Observations on a chrysophyte "Hikarimo" in a pond in Hyogo Prefecture, Japan. Jpn. J. Phycol. 39: 37-42.

An alga "Hikarimo" in Japan usually referred to as *Chromulina rosanoffii* was collected from a pond in Miki City, Hyogo Prefecture, Japan. It was cultured and examined with light and electron microscopes. Judging from a reduced flagellum observed on a motile cell, this alga was identified as *Ochromonas vischeri* not as *Chromulina rosanoffii*. Statorspores (chrysophycean cysts) were found among the clumped cells at floating stage. Large cysts with the same structure as the statorspore were found among the palmelloid cells.

*Key Index Words:* *Chromulina rosanoffii*—*Chrysophyceae*—*cyst*—*Ochromonas vischeri*—*palmelloid stage*—*reduced flagellum*.

Hideaki Ohishi, Public Health Research Institute of Kobe City, Minatozima-nakamachi 4-6, Chuo-ku, Kobe, 650 Japan;

Hiroshi Yano, Hiroyuki Ito and Masanobu Nakahara, Water Quality Laboratory, Kobe City Waterworks Bureau, Kusutani-cho 37-1, Hyogo-ku, Kobe, 652 Japan

ヒカリモは我国では1913年千葉県竹岡の黄金窟から初めて報告されている（三好 1915）。その後、1914年長野県下虎岩の横井戸（日比野 1915）、1947年長野県篠井山布施の横井戸（大田 1947）、1947年熊本県八代高等学校の池（西村 1948）より見い出されている。これらの報告ではヒカリモを *Chromulina rosanoffii* (Woronin) Bütschli と同定している。

著者らは兵庫県三木市の寺院の境内にある池の表面がヒカリモによって黄金色に輝いているとの報告を得て調査した。このヒカリモを光学顕微鏡及び電子顕微鏡により観察した結果、本藻を *Chromulina* 属に所属させることは適当でないとの結論に達した。また、浮遊する群体、及び大きさの異なった2つのタイプのシストを観察したので報告する。

### 材料と方法

#### 1) 調査場所及び調査方法

池は兵庫県三木市志染町にある伽耶院の境内にあり、雑木林のなだらかな斜面の下に位置し、寺の建造物と木々に囲まれている。池の大きさは4×5 m、水深約1 mである。調査は池の表面にヒカリモが大増殖し、黄金色を呈していた1986年2月26日、1987年4

月16日に行った。その時の水質を Table 1 に示す。試料はひしゃくを用い、池の表面水を1 lのガラス瓶に採取した。

#### 2) 培養

1986年2月26日の試料より本藻をピペット法（舘脇 1979）で分離し、単種培養を行った。培養はUr-1培養液（Kimura and Ishida 1985）を75 ml入れた100 mlマイヤーフラスコにて行った。培養条件は10°C、白色蛍光灯 900 Lux、光周期8:16（明期:暗期）である。

#### 3) 観察

光学顕微鏡（LM）観察は生きた試料と固定試料（ギムザ染色）の両方を用いた。

透過型電子顕微鏡（TEM）観察試料作成法は以下のとおりである。コロジオン・カーボン膜張りグリッドに試料を滴下し、オスミウム酸蒸気中で1時間固定した。次に自然乾燥した後、真空蒸着装置内で20度の角度で白金パラジウム合金を蒸着した。樹脂包埋は試料を4°Cにおいて、2%グルタルアルデヒド・カコジル酸緩衝液（0.2 M, pH 7.4）により30分間固定し、同じ緩衝液で洗浄後、さらに2%オスミウム酸・カコジル酸緩衝液（0.2 M, pH 7.4）により1時間固定した。次に緩衝液で洗浄後50~100%エタノール・シリーズにより脱水し、Spurr (1969) の樹脂に包埋し

Table 1. Chemical quality of water of the pond.

		Feb. 26, 1986	Apr. 16, 1987
Water temperature	°C	6.4	9.2
pH		5.9	5.9
Electric conductivity	μS/cm	64.1	60.0
COD (Mn)	mg/l	2.8	3.3
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	0.00	0.10
NO <sub>2</sub> -N	mg/l	0.000	0.002
NO <sub>3</sub> -N	mg/l	0.02	0.14
Total-N	mg/l	0.31	0.71
Total-P	mg/l	0.18	0.074
Total hardness	mg/l	8.4	5.4
Alkalinity (as CaCO <sub>3</sub> )	mg/l	3.0	2.4
Chlorophyll <i>a</i>	μg/l	14.2	7.2

た。切片作成は Porter-Blum MT-2 を用い、切片は酢酸ウラニールと酢酸鉛 (Reynolds 1963) による 2 重染色を施した。TEM 観察は JEM-1200EX にて行った。

走査型電子顕微鏡 (SEM) による浮遊相の群体及びシストの観察法は以下のとおりである。小さく切ったカバーガラスに試料を滴下し、自然乾燥をして水分が無くなる頃にオスミュウム酸蒸気中で 1 時間固定し、乾燥後金蒸着を施した。遊泳細胞の観察は樹脂包埋試料と同様に固定し、脱水した後、酢酸イソアミルに置換して臨界点乾燥し、次に金蒸着を施した。SEM 観察は JSM-35CF にて行った。

## 結 果

天然試料及び培養試料から 3 つの異なる細胞相が観察された。

### 1) 浮遊相

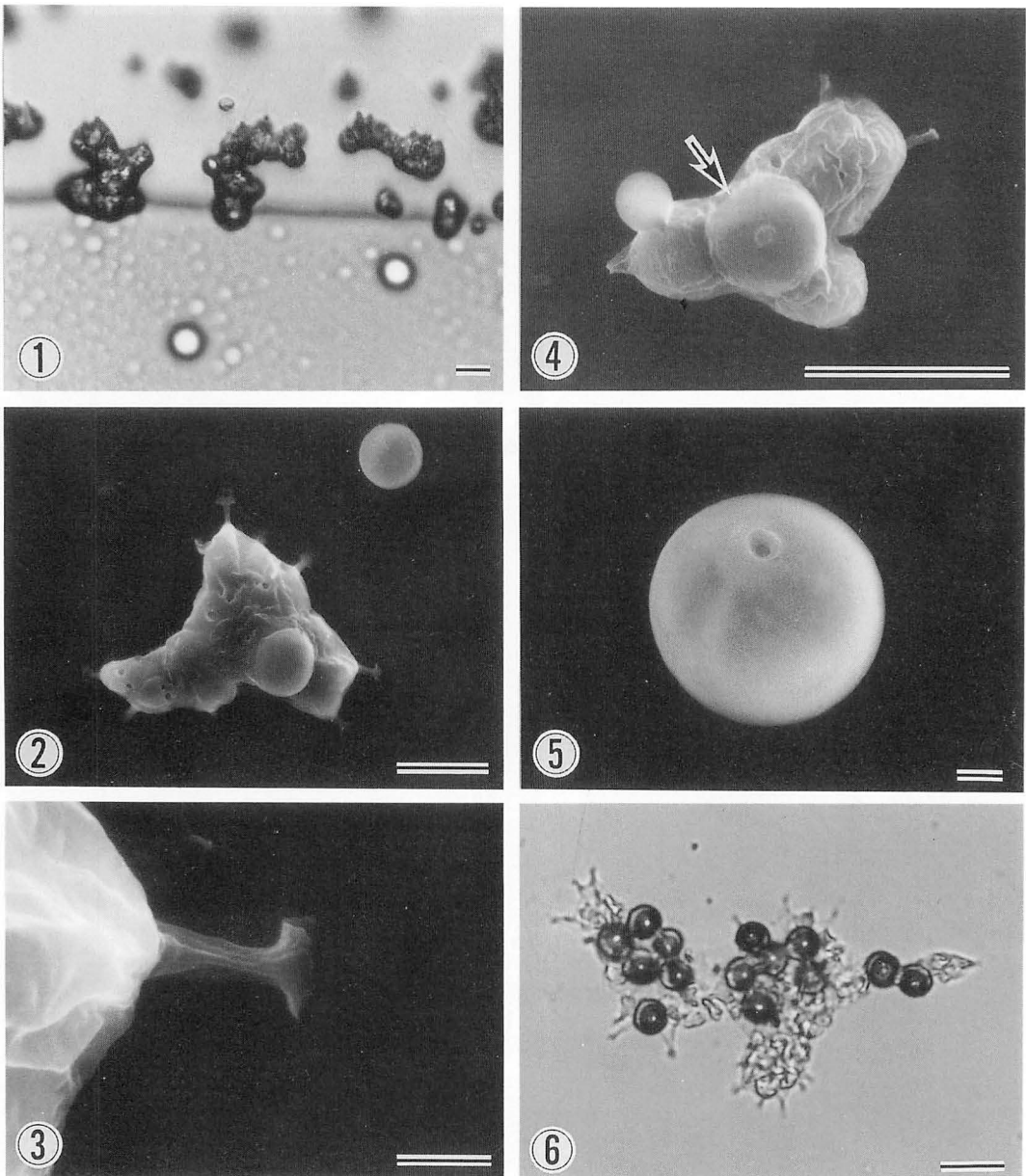
光沢を発する天然試料をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを掛けずに観察を行うと、部分的に黄褐色を帯びた大小の集塊が見られた。これらは 1~約 35 個の浮遊細胞が疎水性の柄 [日比野 (1915) による小管状体] を持った袋状の構造に包まれて水面上に浮遊しており、光を強く屈折するため気泡と同様に周縁部が黒く見える。球形をした単細胞性のもので直径 5~7.5 μm、多細胞性で不定形の群体は 30×90 μm に達する。柄は単細胞性のものでは 1 本、不定形の群体には最大 20 本その周辺部に存在する (Fig. 1)。群体を SEM 観察すると柄の長さは 0.8~1.8 μm、先端部はラッパ状に広がっている (Figs. 2, 3)。カバーガラスを掛けると、浮遊相群体は壊れ、鞭毛を持つ遊泳細胞が放

出された。このことにより、浮遊相群体の中には鞭毛を持った遊泳細胞が存在することがわかる。浮遊相群体中にはシスト (スタトスポア) も観察された (Fig. 4)。シストは球形で、直径 5.1~6.2 μm、表面は滑らかであり、直径 1.0~1.2 μm、高さ 0.3 μm の襟に囲まれた直径 0.3 μm の孔を持つ (Fig. 5)。群体をカバーガラス上で乾固させると、シストを最大 14 個含んだ群体が観察された (Fig. 6)。

### 2) 遊泳相

遊泳細胞を LM により観察すると細胞は球形もしくは卵形をしており、長さ 3~7 μm、幅 3~6 μm であった。細胞内には 1 個の黄褐色のカップ状ないし帯状の色素体が存在する。眼点は観察されなかった (Fig. 7)。

また、体長の 1~1.5 倍の長さの長鞭毛だけが観察されたが、ギムザ染色を施すと約 1 μm 長の短鞭毛が観察された (Fig. 8)。TEM 観察によると、長鞭毛は羽状鞭毛で、マスティゴネマ (*mastigonemes*) は太い軸部と先端部から成り、*Chromulina placentula* と同様に先端部は 1 本ないし 2 本に分かれている (Belcher and Swale 1967)。また、基部より 0.2 μm 付近で折れ曲がる事が多く、このことはマスティゴネマが *Ochromonas* や褐藻類の遊走細胞のそれと同様に基部、シャフト、先端の細毛という 3 つの部分からなっていることを示唆している (Bouck 1969, 1971)。短鞭毛は中央部に膨潤部を持ち、長さは 1.2~1.4 μm で、マスティゴネマなどの付属物はない (Fig. 9)。切片観察より短鞭毛の膨潤部の中に電子密度の高い領域がみられた (Fig. 10)。また、この領域は蛍光顕微鏡によっても蛍光を発するのが観察された。Kawai (1988) によ

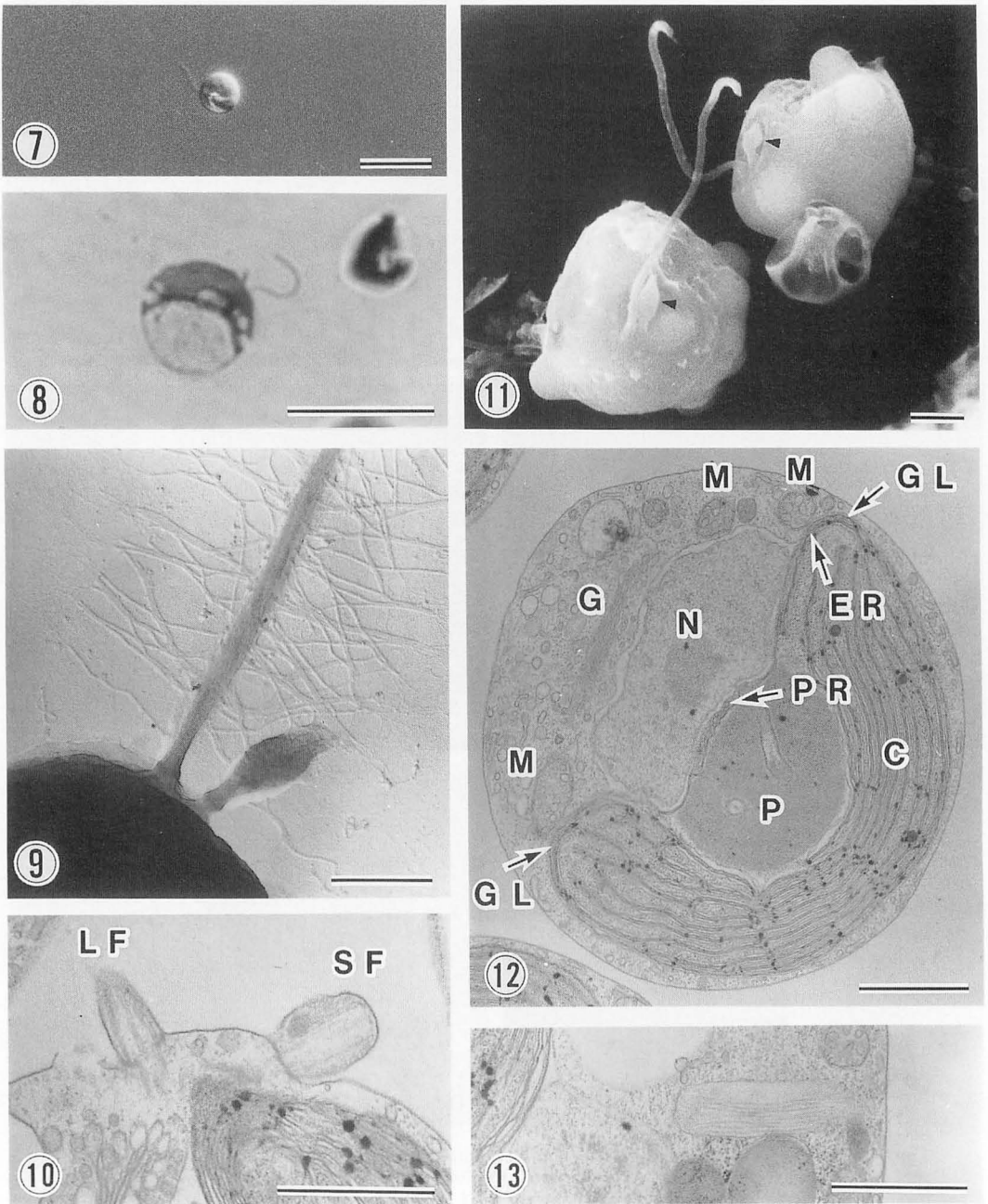


Figs. 1-6. "Hikarimo" at floating stage. Fig. 1. Clumped cells (LM). Fig. 2. Clumped cells (SEM). Fig. 3. Detail of a projection (SEM). Fig. 4. A cyst (arrow) among the clumped cells (SEM). Fig. 5. A cyst (SEM). Fig. 6. Smear preparation of 14 cysts among clumped cells (LM). (Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  for Figs. 1, 2, 4, 6; 1  $\mu\text{m}$  for Figs. 3, 5).

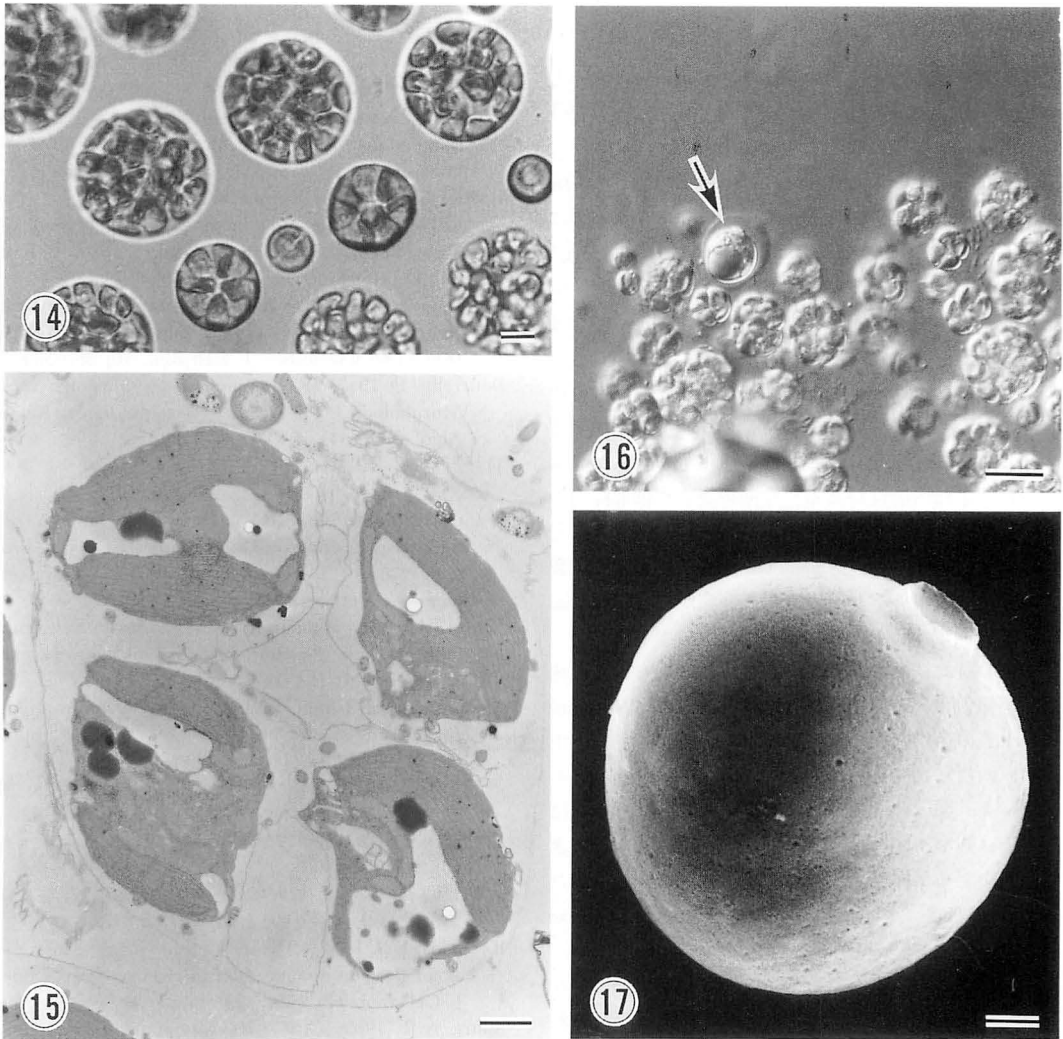
れば、この蛍光物質は黄金藻や褐藻類の眼点を持つ遊走細胞の短鞭毛に存在するといわれている。本藻では、眼点がないが蛍光が見られ、この点で例外的な存在である。SEM 観察によっても、長鞭毛が生じる部分の横から短鞭毛が突き出ているのが確認された

(Fig. 11)。

色素体はガードラメラをもち、カップ状で、その内部の窪みに核が配置している。そして核と葉緑体は核の外膜と葉緑体 ER によってつながっている。ピレノイドは核に面して位置し、チラコイドの貫入がなく



Figs. 7-13. "Hikarimo" at motile stage. Fig. 7. A motile cell (LM). Fig. 8. A motile cell stained with Giemsa (LM). Fig. 9. Long flagellum bearing typical mastigonemes in two rows, and short one lacking such hair appendages (TEM). Fig. 10. Short flagellum (SF) with electron-dense substance. Fig. 11. Two motile cells with short flagella (arrow heads) and long flagella (SEM). Fig. 12. Section of a cell, showing major cellular components (TEM). C, chloroplast; ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi body; GL, girdle lamella; M, mitochondrion; N, nucleus; P, pyrenoid; PR, periplastidal region. Fig. 13. A vesicle containing mastigonemes (TEM). (Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  for Figs. 7, 8; 1  $\mu\text{m}$  for Figs. 9-13).



Figs. 14-17. "Hikarimo" at palmelloid stage. Fig. 14. *Palmelloid* cells in culture (LM). Fig. 15. Section of cells at palmelloid stage (TEM). Fig. 16. A cyst (arrow) and cells at palmelloid stage (LM). Fig. 17. A cyst (SEM). (Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  for Figs. 14, 16; 1  $\mu\text{m}$  for Figs. 15, 17).

て、葉緑体膜が貫入してチューブ状の窪みを作っている。その中には電子密度の高い所が観察される。ピレノイドと核の間 (periplastidal region) の中に小胞が多く観察される。ゴルジ体は核の近くに位置し、数個のミトコンドリア断面が観察される (Fig. 12)。また、マスティゴネマを内在した小胞がみられる (Fig. 13)。

### 3) パルメロイド相

パルメロイド相の細胞は培養で出現し、天然では観察されなかった。培養を始めて10日後にはヒカリモは増殖し、培養液の水面が微かに黄色を呈した。LMにより観察すると2, 4, 8, 16, 32個の鞭毛を持つ細

胞が球形の膜に包まれたパルメロイドを形成しており (Figs. 14, 15)、大きさは直径10~48  $\mu\text{m}$ であった。これらは水面に浮遊して黄金色を呈するが、柄がなく、光を強く屈折しない点で浮遊相と異なる。また、パルメロイドより遊泳細胞が外の膜を破って泳ぎ出すのが観察された。20日後には培養液の水面が一様に黄褐色を呈した。LMにより観察するとパルメロイドと共に球形をした直径8~10  $\mu\text{m}$ のシストが混在していた (Fig. 16)。このシストは、SEM観察によると表面は滑らかで、直径1.8~2.3  $\mu\text{m}$ 、高さ0.4~0.9  $\mu\text{m}$ の襟で囲まれた直径0.8  $\mu\text{m}$ の孔を持つ (Fig. 17)。

## 考 察

水面で黄金色に光る黄金藻は *Chromulina rosanoffii* と *Ochromonas vischeri* が知られている。これらの藻類の分類は混乱しており、次のような歴史を持っている。

*Chromulina rosanoffii* は Woronin (1880) が *Chromophyton rosanoffii* として記載した藻を Bütschli (1889) が本種に組替えたものである (Huber-Pestalozzi 1941 による)。一方 *Ochromonas vischeri* は、Vischer (1943) が *Chromophyton rosanoffii* Woronin の名で短鞭毛を持つと記載した藻を Bourrelly (1957) が本種に組替えたものである。Starmach (1985) も 2 種を別属として取り扱っている。しかし従来 *Chromulina rosanoffii* の学名で呼ばれてきた藻は、観察する過程で短鞭毛の存在が見落とされてきた可能性がある。今回調査した伽耶院内の池のヒカリモは細胞のサイズ、形態その他の点で *Chromulina rosanoffii* と *Ochromonas vischeri* の双方の記載によく一致しているが、短鞭毛の存在から *Ochromonas vischeri* と同定するのが妥当である。

本邦の各地に産するヒカリモは、短鞭毛を欠く遊泳細胞が報告されており、*Chromulina rosanoffii* (Woronin) Bütschli の名が当てられている (日比野 1915, 大田 1947, 西村 1948)。ヒカリモに *Chromulina rosanoffii* と *Ochromonas vischeri* の 2 種が存在するのか、あるいは LM では観察が困難な短鞭毛の存在が見落とされてきたのかを明らかにするために、タイプ種が記載された地方を含む多くの地点から採集を行い *Chromulina rosanoffii* についての再調査を行う必要がある。

浮遊相群体中にみられるシスト、及び培養時にパルメロイドと混在しているシストの 2 種類が観察された。前者は直径 5.1~6.2  $\mu\text{m}$  に対し、後者は直径 8~10  $\mu\text{m}$  である。形は共に球形で、表面は滑らかで、襟に囲まれた孔があり黄金藻に典型的なスタト胞子である。大きさの差が有性あるいは無性の生殖の違いによるものかどうかまだ分からないが、今後この点も研究していきたい。

## 謝 辞

本研究のご指導を賜り、また原稿を御校閲くださった筑波大学井上 勲博士に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- Belcher, J.H. and Swale, E.M.F. 1967. *Chromulina placentula* sp. nov. (Chrysophyceae), a freshwater nanoplankton flagellate. Br. phycol. Bull. 3: 257-267.
- Bouck, G.B. 1969. Extracellular microtubules. The origin, structure, and attachment of flagellar hairs in *Fucus* and *Ascophyllum* antherozoids. J. Cell Biol. 40: 446-460.
- Bouck, G.B. 1971. The structure, origin, isolation, and composition of the tubular mastigonemes of the *Ochromonas* flagellum. J. Cell Biol. 50: 362-384.
- Bourrelly, P. 1957. Recherches sur les Chrysophycées. Morphologie, Phylogénie, Systématique. Revue Algol. Mém. Hors-Série 1: 1-412.
- 日比野信一 1915. 信州下虎岩ニ於テ発見セラレタル光藻ニ就テ. 植物学雑誌 29: 125-149.
- Huber-Pestalozzi, G. 1941. Das Phytoplankton des Süßwassers. In A. Thienemann [ed.] Die Binnengewässer. Band 16 Teil 2. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Kawai, H. 1988. A flavin-like autofluorescent substance in the posterior flagellum of golden and brown algae. J. Phycol. 24: 114-117.
- Kimura, B. and Ishida, Y. 1985. Photophagotrophy in *Uroglana americana*, Chrysophyceae. Jpn. J. Limnol. 46: 315-318.
- 三好 学 1915. 日本ニ於ケル光藻ノ発見ニ就テ. 植物学雑誌 29: 123-125.
- 西村謙一 1948. ヒカリモの発生と培養. 採集と飼育 10: 219-220.
- 大田繁則 1947. ヒカリゴケとヒカリモの新産地. 採集と飼育 9: 148-149, 155.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Starmach, K. 1985. Chrysophyceae und Haptophyceae. In H. Ettl, J. Gerloff and H. Heying [eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 館脇正和 1979. 分離の一般操作. p. 69-86. 西澤一俊・千原光雄 [編], 藻類研究法. 共立出版, 東京.
- Vischer, W. 1943. Über die Goldalge *Chromophyton Rosanoffii* Woronin. Ber. Schweiz. Bot. Gesell. 53: 91-101.
- Woronin, M. 1880. *Chromophyton Rosanoffii*. Bot. Zeitg. 38: 641-648.