

滅菌処理した表面微細凸凹寒天培地による有害赤潮藻類の培養

山口晴生^{1*}・早川由真¹・関美紀¹・足立真佐雄¹・木村圭²・外丸裕司³¹高知大学教育研究部自然科学系 (〒783-8502 高知県南国市物部乙200)²佐賀大学低平地沿岸海域研究センター (〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町1番地)³国立研究開発法人 水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 (〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5)Haruo Yamaguchi^{1*}, Yuma Hayakawa¹, Miki Seki¹, Masao Adachi¹, Kei Kimura² & Yuji Tomaru³: Culturing of the harmful algae on the sterilized micro-bumpy agar plate media. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 64: 89-93, July 10, 2016

Culturing of microalgae on plate media is a useful technique for selective detection of the mutant algae and algicidal activities of bacteria, viruses, and chemicals, through visualization of the algal growth on the media. In this study, we modified the sterile preparation of a micro-bumpy agar plate medium and thereby applied the medium to culturing of the harmful algae. A micro-bumpy surface layer was built on an agar plate medium by using a completely sterilized polyester mesh. Our results showed that the harmful diatom *Asteroplanus karianus* (Grunow) Gardner et Crawford, the harmful flagellate *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada, and the others grew in the micro-liquid areas on the surface of the sterilized agar plate medium, suggesting that the micro-bumpy agar plate medium is certainly applicable to cultures of the harmful algae.

Key Index Words: harmful algae, diatom, flagellate, liquid culture, micro-bumpy agar plate medium, solid culture

¹Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University, Otsu-200, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan²Institute of Lowland and Marine Research, Saga University, Honjo-machi 1, Saga 840-8502, Japan³National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Japan Fisheries Research and Education Agency, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan

*Author for correspondence: yharuo@kochi-u.ac.jp

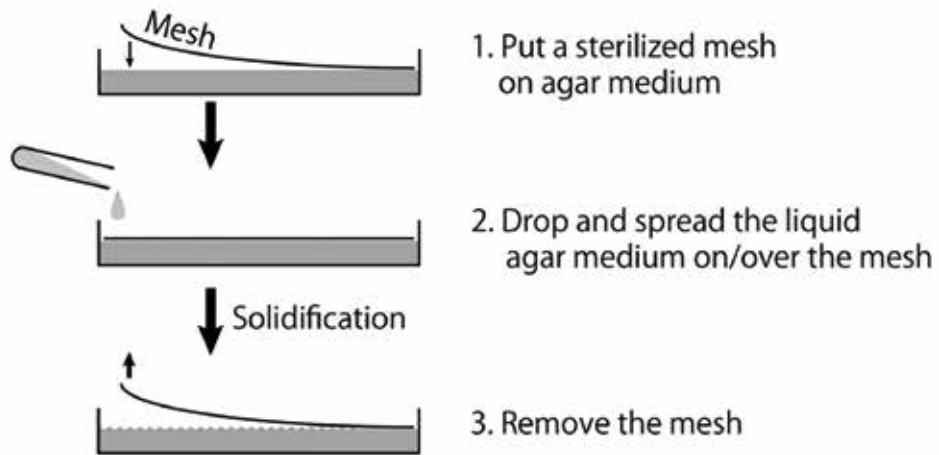
沿岸海域においては有害赤潮が頻発し、それにとまう魚介類の大量斃死あるいは海藻の色落ちがあとを絶たない。そのため、有害赤潮の発生防除・予測は急務であり、それを図る上で原因生物の消長を明らかにすることは重要である。これまでに、殺藻性の細菌・ウイルスあるいは薬剤やアレロパシー様の化学物質は、有害赤潮藻類の消長に大きく影響していることが指摘されている(石田 1994)。これらの因子を効率よく検出、計数、分離し、性状解析を推し進めるためには、それらに感受性を示す微細藻類を用いたバイオアッセイが必要となる。

このアッセイのうち代表的な重層寒天平板法は、比較的高温の軟寒天培地に微細藻培養液を混合し、それを寒天培地上に接種することで、藻細胞のマットを培地上に形成させることに特徴がある。ここで殺藻性因子が存在すれば、それに感受性を示す微細藻類の死滅とともに透明な溶解斑(プラーク)が出現するため、そのプラーク径あるいは数に基づいて、殺藻因子の有無とその数が簡便に把握可能である(長崎・今井 1994)。また、あらかじめ寒天培地に殺藻因子あるいは薬剤を接種・添加した上で微細藻類を培養すれば、それらの因子に耐性を有する微細藻種あるいは変異株の選択・分離も可能である。これらのことから、これまでに寒天培地を用いた有害赤潮藻の培養がいくつかの種で試みられている(長崎・今井 1994, Lakeman & Cottolico 2007)。しかし一方で、有害赤潮藻をふくめた水圏の微細藻は、本来、海水・淡水といった液相で増殖するためか、乾燥をとまう固相の寒天培地上で増殖可能な種は限ら

れている。

このことを考慮し、Kimura & Tomaru (2013) は、通常の寒天培地の表面にナイロンメッシュを敷き、その上から注いだ軟寒天培地が固化した後メッシュを引きはがすことで、マイクロレベルの凸凹(でこぼこ)を設ける新手法(Fig. 1A)を考案した。本手法で調製した寒天培地(表面微細凸凹寒天培地、以下“微細”は省略)では、微細な“くぼみ”状の液相画分において中心目珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* Meunier の良好な増殖が認められ(Kimura & Tomaru 2013)、いくつかの淡水産珪藻種の分離培養にも表面凸凹寒天培地が有効なことが判明しつつある(辻・新山 2014)。これらのことから、当該培地を用いることで、これまで困難と言われていた有害赤潮種の固体培養を検討することが可能になるものと期待される。しかし、これまでに検討された微細藻種はごく限られており、有害赤潮藻の試験事例はない。また、従来の凸凹画分の形成には、エタノール洗浄された“殺菌”メッシュが用いられているため(Kimura & Tomaru 2013, 詳細は非記載)、培地を完全に滅菌することができない。さらに、表面凸凹寒天培地における藻細胞の増殖能とともに、その分離・選抜を視野に入れた液体培地移行時の増殖の可否に関しては試験されていない。そこで本研究では、代表的な有害赤潮藻類の固体培養の実現に向けて、表面凸凹寒天培地の滅菌化を図り、各種有害赤潮藻の固体培養に対する当該培地の応用可能性を明らかにしようとした。

A: Preparation



B: Culturing

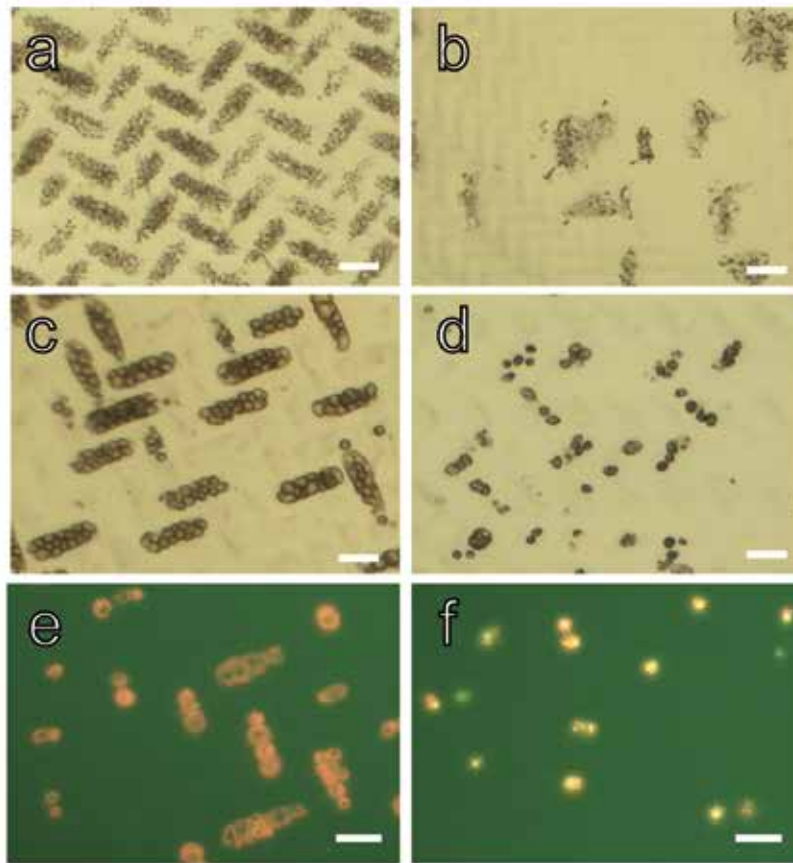


Fig. 1. Preparation of the sterilized micro-bumpy agar plate medium (A) and the algal cells cultured on the media (B). Light (a–d) and epifluorescence (e and f) micrographs of *Chaetoceros tenuissimus* (a), *Asteroplanus karianus* (b), *Heterosigma akashiwo* (c, e), and *Heterocapsa circularisquama* (d, f) grown on agar plate media that have micro bumpy on surface. The cells of *H. akashiwo* (e) and *H. circularisquama* (f) were observed using blue-light excitation. Scale bars = 100 μm .

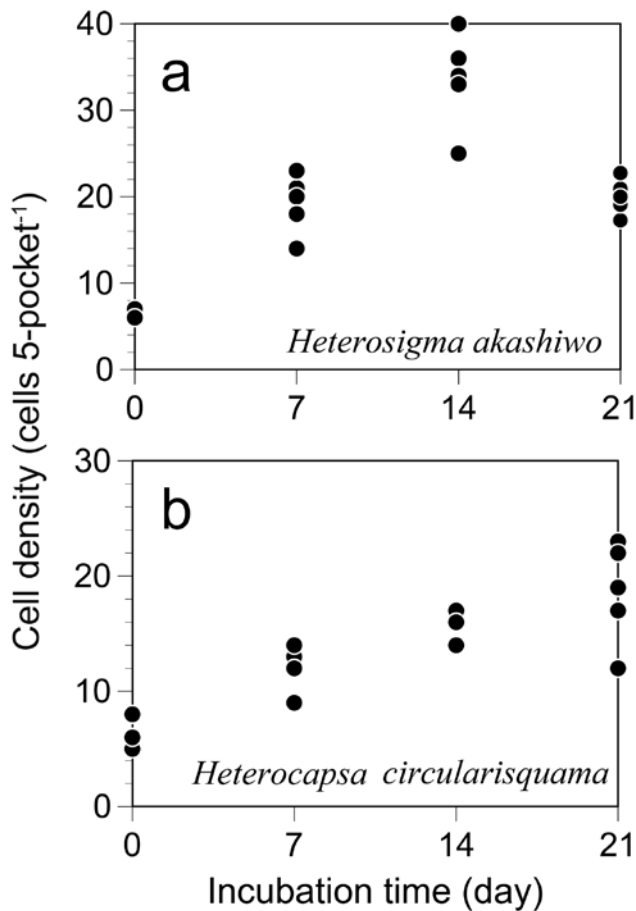


Fig. 2. Changes in cell density of *Heterosigma akashiwo* (a) and *Heterocapsa circularisquama* (b) grown in 5-pocket formed on surface of micro-bumpy agar plate media.

本試験には代表的な有害赤潮藻6種のクローン株を供した。ノリの色落ち被害を引き起こす種として注目されている、羽状目珪藻 *Asteroplanus karianus* (Grunow) Gardner et Crawford (Ak5株) および中心目珪藻 *Rhizosolenia setigera* Brightwell (RsURN1K株) を供試珪藻とした。魚介類の大量斃死を引き起こす、ラフィド藻 *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara & Chihara (CmURN1株) および *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (NIES-6株) ならびに渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi (HCHS-95株) についても供試した。なお、これまでに表面凸凹寒天培地で培養可能なことが判明している中心目珪藻 *C. tenuissimus* (2-10株) をコントロールとして供試した。これらの供試藻のうち *C. marina* のみは有菌であった。これら供試株を、2 nM 亜セレンを含む塩分33のSWM-3液体培地 (Chen et al. 1969, Imai et al. 1996) に接種し、20°Cにて、光量子束密度60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期L:D = 12hr:12hrの条件下で培養した。

寒天培地上の凸凹面分の形成には、Kimura & Tomaru (2013) で用いられたナイロンメッシュに代わり、耐熱ポリエ

ステルメッシュクロスPET24 (目開き21 μm , 糸径41 μm) あるいはPET54 (目開き54 μm , 糸径56 μm) (SEFAR, Switzerland) を用いた。なお予備的にPET90-HD (目開き90 μm , 糸径79 μm) も用いた。あらかじめ、これらを直径8.5 cmの円形にカットした上で、従来のエタノールによるメッシュ洗浄処理 (Kimura & Tomaru 2013, 未記載) に代わり、121°Cの下、30分間のオートクレーブ処理を施した。続いての凸凹面分を設ける操作は、Kimura & Tomaru (2013) に準じて実施した。すなわちクリーンベンチ内にて、寒天1%含有のSWM-3培地25 mLを滅菌シャーレに調製し、培地の固化後、その表面にオートクレーブ処理したメッシュを重ね置いた (Fig. 1A)。そのメッシュ上に、液状のSWM-3寒天培地約5 mLを注ぎ入れ、寒天が固化した後、附着する寒天培地ごとメッシュを取り除いた (Fig. 1A)。これら操作により、表面凸凹寒天培地を無菌的に調製し、試験直前まで密封した状態で10°C下で保存した。

表面凸凹寒天培地における微細藻の培養試験を実施した。滅菌した当該培地に供試藻の保存培地5 mLを接種後、培地表面を上に向けた状態で、前項と同じ条件で静置培養した。培養5日目に、液相画分で藻細胞を増殖させるために、固体培地上の液体培地の余剰分をデカンテーションとピペッティングで除去し、その後静置培養を継続した。この期間中、培地上の微細藻の増殖能を評価するために、藻細胞およびクロロフィル自家蛍光を倒立顕微鏡 (IX70, OLYMPUS) 下で観察した。1つのシャーレを対象に、5つの“くぼみ” (pocket) をランダムに選択し、それらに分布する細胞数 (cells 5-pocket⁻¹) を計数した。当該シャーレにおいて同様の選択・計数操作をくり返し5回行った。なお、“くぼみ”内で密集する種については計数が困難と判断した。続いて、固体培地上の微細藻の増殖能とともにその分離可能性を検証するために、固体培地から液体培地への微細藻移行の可否を試験した。まず微細藻が増殖した表面凸凹寒天培地に、SWM-3液体培地2 mLを添加し、その1時間後、液体培地1 mLを、SWM-3液体培地9 mLを含むシリコンキャップ付き平底ガラス管 (25 × 120 mm, マルエム) に接種した。本試験は2本立てで行った。固体培地から液体培地への移行のコントロールとして、供試藻の保存培地1 mLを同様に1本立てて接種した。これらを同条件下で18日間培養し、ターナー (10-AU, TURNER DESIGNS) を用いてクロロフィル *a* 由来の蛍光を経時的に測定した。

本試験の結果、滅菌調製した表面凸凹寒天培地の保存あるいはそれを用いた培養の期間中、カビあるいはバクテリアのコロニーは認められなかった。当該培地に接種した微細藻培養株のうち、中心目珪藻 *C. tenuissimus* のみならず羽状目珪藻 *A. karianus*、ラフィド藻 *H. akashiwo* ならびに渦鞭毛藻 *H. circularisquama* が、培地表面上の多数の微細な“くぼみ”を埋め尽くすように増殖した (Fig. 1)。なお、目視のかぎりではあるが、PET24あるいはPET54で調製した培地間での各種藻類の増殖に、大きな差は認められなかった。これら

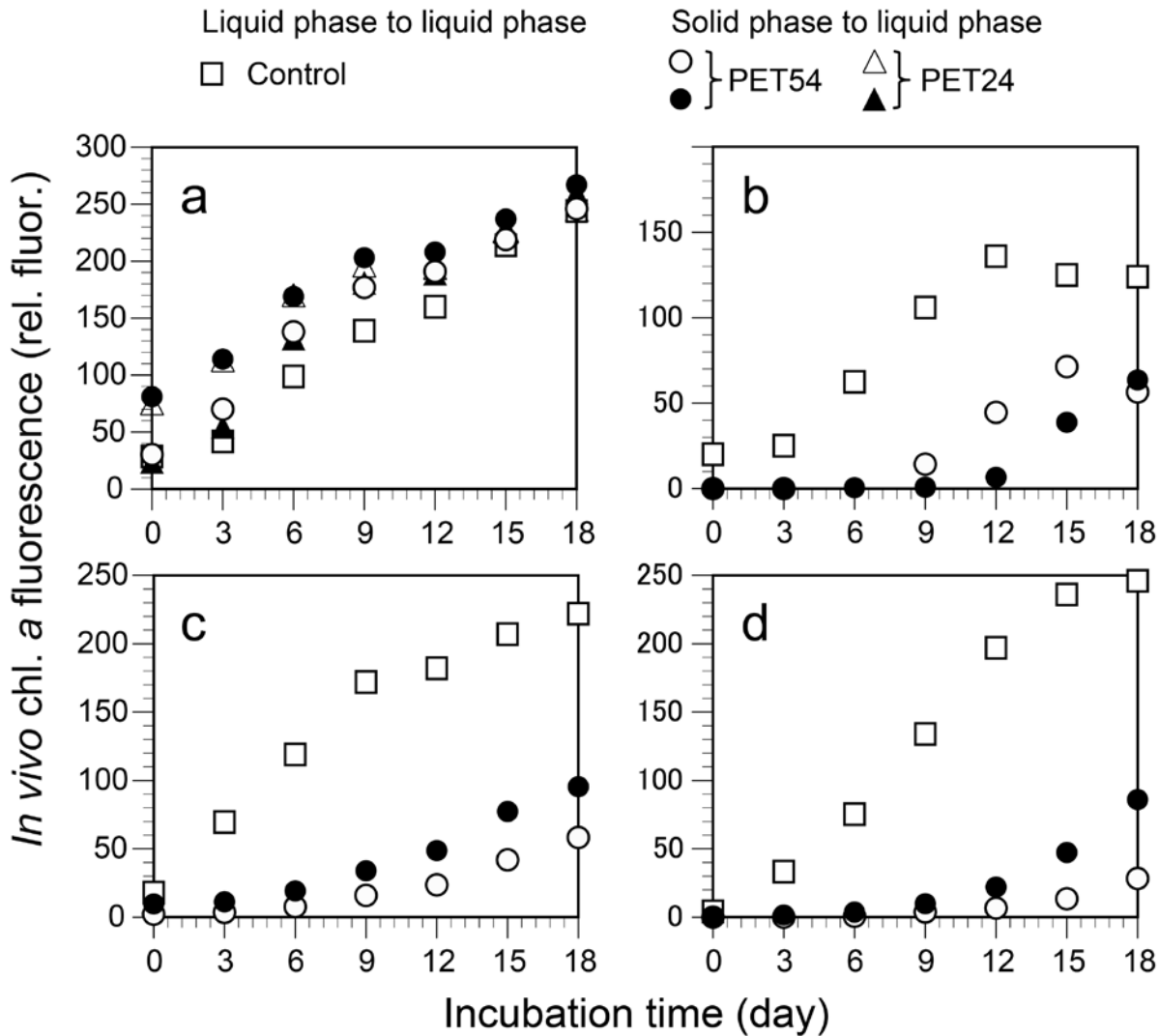


Fig. 3. Changes in in vivo chlorophyll (chl.) *a* fluorescence (relative fluorescence: rel. fluor.) of *Chaetoceros tenuissimus* (a), *Asteroplanus karianus* (b), *Heterosigma akashiwo* (c), and *Heterocapsa circularisquama* (d) cultures transferred in SWM-3 liquid media from micro-bumpy agar plate cultures. Their stock cultures were used as the positive control sample (square symbols). PET24 and PET54 mean the models of mesh used for preparation of micro-bumpy agar plate media. Open and closed symbols of circle and triangle indicate duplicate.

の種は、B 励起光照射下において、通常の液体培養でも認められるようなクロロフィル自家蛍光を発したことから、培地上で増殖能を有しているものと判断された。これらのうち、比較的細胞サイズが大きく、経時的に細胞計数可能な鞭毛藻種 *H. akashiwo* および *H. circularisquama* を対象に、それらの増殖をモニタリングした。その結果、5つの“くぼみ”に占める *H. akashiwo* の細胞数 (cells 5-pocket⁻¹) は、培養初日においては 6.6 (±0.55) cells 5-pocket⁻¹ であり、培養1週間ならびに2週間目には、それぞれ 19.2 (±3.42) cells 5-pocket⁻¹ ならびに 33.6 (±5.50) cells 5-pocket⁻¹ に有意 (Tukey test, $p < 0.01$) に増大した (Fig. 2)。 *H. circularisquama* も培養初日に 6.0 (±1.22) cells 5-pocket⁻¹ であった細胞数が培養21日目には 18.6 (±4.39) cells 5-pocket⁻¹ に達した (Fig. 2)。一方で、棒状・円筒形の珪藻 *R. setigera* ならびに倒卵形のラフィド藻

C. marina の細胞については、“くぼみ”内で細胞がほとんど検出されなかった。続いて、藻細胞が存在する固体培地に液体培地を添加し、1時間静置した結果、いくつかの藻細胞が液体培地の面分で観察されるようになり、鞭毛藻 *H. akashiwo* および *H. circularisquama* については遊泳細胞が確認された。その液体培地を採取し、SWM-3 液体培地に接種した結果、培養の経過に伴い、 *H. akashiwo* および *H. circularisquama* 生細胞由来のクロロフィル蛍光値が有意に増大 ($p < 0.05$) した (Fig. 3)。同様の結果は *C. tenuissimus* についても認められ、PET24 あるいは PET54 で調製した培地いずれにおいても本種は良好に増殖した (Fig. 3)。これらより微細藻類の液体培地への移行可能性が示された。

一般的な寒天培地には液相画分が設けられていない。長崎・今井 (1994) も指摘しているように、通常用いられる寒天培

地の表面では藻細胞の乾燥が進み、微細藻類の増殖を制限する主要因になると考えられる。これに関連して、一般的な寒天培地上では、ラフィド藻 *H. akashiwo* や渦鞭毛藻などの増殖がほとんど認められない (長崎・今井 1994, Lakeman & Cottoico 2007)。今回、表面凸凹寒天培地に存在する微細な液相画分が、増殖制限要因となる乾燥を緩和し、乾燥耐性に乏しい鞭毛藻類の増殖を可能にしたと示唆される。一方で、固体培地から液体培地への移行においては、実験に用いた *C. tenuissimus* 以外の *A. karianus*, *H. akashiwo* および *H. circularisquama* の3種全てで、培地調製に用いたメッシュにかかわらず、増殖速度・収量が陽性対照区のそれらと比較すると低くなる傾向を示した。この原因としては、初期密度が陽性区のそれよりも著しく低いことが大きい。また、マイクロレベルの液相では微細藻の集積密度が通常の液体培地のそれと比較して極めて高い。そのような高密度状態に適応した後、通常の液相の状態に速やかに適応することは、今回供試した有害赤潮藻で困難なものと推察される。したがって、表面凸凹寒天培地を用いた微細藻類の分離にあたっては、液相への馴致操作について検討する必要がある。

珪藻 *R. setigera* ならびにラフィド藻 *C. marina* の細胞は、それぞれ細胞長 100 ならびに 40 μm を超える。このサイズは、“くぼみ” 1つのサイズとほとんど同等もしくはそれ以上であることから、“くぼみ” におさまる細胞がほとんどない。これらを考慮すると、有害赤潮藻類の増殖の制限要因として“くぼみ”のサイズは重要であろう。そのサイズに関連して、PET24・PET54 メッシュよりも糸径が大きい、PET90-HD (目開き 90 μm , 糸径 79 μm) を予備的に用いて調製した表面凸凹寒天培地では、比較的大型の“くぼみ”が形成された。一方で、当該固体培地では、液体培地がデカンテーション・ピペッティング操作により流出し、ほとんど“くぼみ”に維持されなかった。これらを踏まえると、当該培地を用いた有害赤潮藻あるいは主要海産微細藻であるハプト藻やプラシノ藻などの固体培養を検討するにあたっては、培養微細藻の細胞サイズ、高密度増殖に対する耐性、ならびに液体培地の維持に関わる“くぼみ”の表面張力などの培養要因を考慮することが重要かもしれない。

以上、本研究により、表面凸凹寒天培地を用いることでいくつかの有害赤潮珪藻・鞭毛藻の固体培養が可能と考えられた。今後、表面凸凹寒天培地上に微細藻の細胞をより高密度・広範囲に形成させるための諸要因について詳細に検討する必要がある。なお、表面凸凹寒天培地は、これまで固体培養が困難とされていた淡水産珪藻 *Cymbella* 属ならびに *Gomphoneis* 属等の培養に適しており (外丸ら 2014, 辻・新山 2014)、それらの検出・分離に強力な威力を発揮するようである。今後、殺藻因子あるいは特定微細藻の検出・選択・分離を効率よく推し進める上で、本研究の手法がその一助になるものと期待される。

本研究は科学研究費助成事業のうち基盤研究 (B) 課題番号 26292101 の助成の一部を受けて実施された。

引用文献

- Chen, L. C. M., Edelman, T. & McLachlan, J. 1969. *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.* 5: 211–220.
- Imai, I., Itakura, S., Matsuyama, S. & Yamaguchi, M. 1996. Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.* 62: 834–835.
- 石田祐三郎 1994. 赤潮藻の微生物学的防除に関する現状と将来. 石田祐三郎・菅原庸 (編) 赤潮と微生物 環境にやさしい微生物農業を求めて. pp. 9–21. 恒星社厚生閣. 東京.
- Kimura, K. & Tomaru, Y. 2013. A unique method for culturing diatoms on agar plates. *Plankton Benthos Res.* 8: 46–48.
- Lakeman, M. B. & Cottoico, R. A. 2007. Cryptic diversity in phytoplankton cultures is revealed using a simple plating technique. *J. Phycol.* 43: 662–674.
- 長崎慶三・今井一郎 1994. 海産微細鞭毛藻類の固相培養. 日本微生物生態学会報 9: 37–43.
- 外丸裕司・木村圭・辻彰洋 2014. 新奇凸凹表面寒天プレート (KT プレート) を用いた珪藻の培養と応用例. 藻類 (日本藻類学会第 38 回大会講演要旨集) 62: 55.
- 辻彰洋・新山優子 2014. 皇居における淡水珪藻植生 II 期. 国立科博専報 49: 76–88.

(Received Sep. 19, 2015; Accepted Mar. 23, 2016)