

第5節 藻類・プランクトン

【目的】 海産微細藻類の多くは浮遊生活を送るプランクトンである。これらは海洋の基礎生産者として根幹的に重要な役割を演じているが、一方で大量に増殖した際に赤潮を形成して魚介類を大量斃死させたり有用二枚貝を毒化させたりして、人間や他の高等動物に大きな害作用を及ぼすものも存在する。これらの発生機構を解明するためには、生理生態を把握しなければ成ならない。その第一歩として、培養実験による検討が必須である。すなわち、室内条件下で特定の藻種を培養する事である。微細藻類はサイズの小さいものが多いが、それらを1細胞ずつ洗浄して培養を確立する技術を修得する。

【準備する器具等】

キャピラリーピペット (市販のパスツールピペットを加熱して口の細いものを作成)、滅菌駒込ピペット、ホールスライドグラス、滅菌ペトリ皿、倒立型顕微鏡、培養液 (表を参照)

表1. 海産微細藻類の培養に適した培養液の例 (改変Se-SWM-3)

NaNO ₃	2	mM	P-1 metals (in 10ml)
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.1	mM	H ₃ BO ₃ 1 m mol
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	0.2	mM	MnCl ₂ · 4H ₂ O 3.5x10 ⁻² m mol
Fe-EDTA	2.0	μM	ZnCl ₂ 4.0x10 ⁻³ m mol
Na ₂ EDTA	30	μM	CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.0x10 ⁻⁴ m mol
Na ₂ SeO ₃	2	nM	CuCl ₂ · 2H ₂ O 1.0x10 ⁻⁶ m mol
TRIS	500	mg	
P-1 metals	10	ml	S-3 vitamins (in 2ml)
S-3 vitamins	2	ml	B ₁ -HCl 0.5 mg
Seawater upto	1000	ml	Ca-Pantothenate 0.1 mg
pH	7.7-7.8		Nicotinic acid 0.1 mg
			<i>p</i> -Aminobenzoic acid 10 μg
			Biotin 1 μg
			Inositol 5 mg
			Folic acid 2 μg
			Thymine 3 mg
			Vitamin B ₁₂ 1 μg

【最初の準備】

- 1) 培養液を作成し滅菌する。
- 2) キャピラリーピペット、ペトリ皿、ホールスライドグラス等を滅菌する。
- 3) 対象微細藻類の入っている海水試料を用意する。

【基本的注意点】 カビが入って増殖すると微細藻類は死滅してしまうので、基本的に無菌操作が必要である。最終目標は無菌クローン培養株の作成であるが、これはなかなか難度が高いため、取り敢えず細菌の入った単種クローン培養の確立を目指す。細菌を取り除く無菌化には幾つかの方法があるが、得られた単種クローン培養株について、基本的には下記の実施手順を丁寧に繰り返す事により無菌株が得られる。

【実施手順】

- 1) 現場の試水を滅菌ペトリ皿に適量入れる。
- 2) 滅菌ホールスライドグラスに滅菌培養液を適量入れる。
- 3) 滅菌キャピラリーピペットを用いて、1) から細胞を1個ずつ拾い上げ、2) に入れる。数十細胞を目安とする。
- 4) 別の滅菌キャピラリーピペットでできるだけ多くの細胞を1個ずつ拾い上げ、滅菌培地の入った次のホールに移す。順次新しい滅菌キャピラリーピペットを用いてこの洗浄作業を繰り返す。合計6～8回行う。
- 5) 4) の最後のホールから1細胞を拾い上げ、新しいホールに移す。この1細胞のみの洗浄を2～3回繰り返した後、滅菌済みのマイクロプレート（48ウェルが望ましい）のウェルに入った滅菌培養液に細胞を収容し、好適な条件下（温度20℃前後、光強度50～100 $\mu\text{mol photon}/\text{m}^2/\text{sec}$ 程度、14時間明-10時間暗の光周期）で培養を行う。
- 6) 倒立顕微鏡を用いマイクロプレートのウェル中で細胞が増殖しているかを確認する。増殖しているものを無菌的に滅菌ピペットで取り出し、試験管またはフラスコ等の滅菌培養液に接種する。
- 7) 増殖したものについて、無菌チェックを行う。第2部、4章、3節で述べたDAPI染色を用いる細菌の直接検鏡観察法により、完全な無菌チェックができる。

【補遺】 他の無菌化の方法としては、抗生物質を混菌培養株に作用させる方法と、遊泳能力を持つ鞭毛藻類に関しては走光性と浮上性を利用した方法がある。