海産浮遊珪藻 *Skeletonema costatum* (GREV.) CLEVE の寒天培地 でのコロニー形成^{*1}

山田真知子・鶴田新生・吉田陽一

(1985 年 4 月 24 日受理)

Colony Formation in/on an Agar Plate of Planktonic Diatom *Skeletonema costatum* (GREV.) CLEVE

Machiko YAMADA,^{*2} Arao TSURUTA,^{*3} and Yoichi YOSHIDA^{*4}

Marine planktonic diatom *Skeletonema costatum* (GREV.) CLEVE is a notorious phytoplankton which often caused red tide in the coastal waters anywhere. *S. costatum* was found to grow and form in/on an agar plate in this study whereas almost centric diatoms had been scarcely grown on the solidified medium.

S. costatum used were field samples from Dokai Bay, Hibiki Nada, and Suho Nada, Northern Kyushu, and several clonal strains of uni-algal cultures and axenic cultures from these marine regions. The culture of this species was mainly done by mixed plate method with the agar medium containing various nutrients under the conditions of 1.0-8.0 Klx for 14 h per day and about 25°C.

Most strains of *S. costatum* used grew well and formed brown colonies in/on an agar plate. These colonies were observable in a visual manner within eight days of incubation. Colonies had disk-like on an agar plate but irregular shapes in it. The cells resuspended into the liquid medium from the colonies in/on agar plates grew as well as the cultures before inoculating into the agar medium. Several strains of *S. costatum* of axenic cultures grew better in/on agar plates with trypticase than in/on these without it.

海産浮遊珪藻 *Skeletonema costatum* (GREV.) CLEVE は、北極や南極の極海を除いて世界中の沿岸海域に分布することから cosmopolitan species と言われている¹⁾。また、本種は沿岸内湾海域では頻繁かつ優占的に出現し、しばしば赤潮を形成するプランクトンである。^{1,2)}

珪藻類の寒天培養については、岩崎³⁾は羽状型のものはできるが *S. costatum* を含む円心型のは困難視している。筆者等は *S. costatum* を海域の富栄養度判定のための生物指標に用いる⁴⁾ 一方、本種の生理学的特性について検討を続けてきた⁵⁻⁷⁾が、このたび *S. costatum* は寒天培地でよく増殖し、さらにコロニーを形成できることが判明したので報告する。

実験方法

試料プランクトン 寒天培養実験に用いた *S. costatum*

種株は、1984 年 2 月、3 月、および 8 月に洞海湾、響灘、および周防灘の 3 海域からそれぞれ採水した生海水とネットプランクトンのほか、1981 年 7 月から 1984 年 7 月に洞海湾、周防灘、博多湾、および八代海の 4 海域からそれぞれ採集され単種培養されている *S. costatum* 8 株、および 1984 年 6 月と 7 月に洞海湾と響灘から採集し無菌培養されている 7 株である。

一方、*S. costatum* と比較するために、1984 年 2 月から 7 月に洞海湾と響灘からそれぞれ採集し単種培養されている *Coscinodiscus* sp. や *Ditylum brightwellii* など 7 種の珪藻類についても寒天培地での培養を試みた。試料の無菌化の確認は、ISHIDA and KADOTA の TF 10⁻¹ 培地、⁸⁾ ZOBELL 2216E 培地、⁹⁾ および STPm 培地¹⁰⁾の 3 方法で行った。

培養方法 *S. costatum* の単種培養には肝臓エキスを

^{*1} 本報の概要は 1984 年 4 月、日本水産学会春季大会 (東京) で発表した。

^{*2} 北九州市環境衛生研究所 (The Kitakyushu Municipal Institute of Environmental Health Sciences, Kitakyushu 804, Japan).

^{*3} 水産大学校増殖学科 (Department of Agriculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries, Shimonoseki 759-65, Japan).

^{*4} 京都大学大学院農学研究科熱帯農学専攻 (Division of Tropical Agriculture, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606, Japan).

Table 1. Chain numbers of *Skeletonema costatum* suspended in several samples of sea water and net-plankton, and their colony formation in/on an agar plate

Sample	Collected strain		Chain number in sample (Chains/ml)	Colony number formed in/on agar plate (Colonies/ml of sample)
	Area	Date		
Sea water	Dokai Bay:	Feb. 1984	1.0×10	4.5×10
		Mar. '84	1.0×10^2	1.6×10^2
	Hibiki Nada:	Feb. '84	—*	4.0
		Mar. '84	—	0
	Suho Nada:	Mar. '84	—	0
Net-plankton	Dokai Bay:	Feb. '84	6.0×10	2.0×10
		Mar. '84	1.5×10^4	1.6×10^4
	Hibiki Nada:	Feb. '84	2.0×10	1.0×10
		Mar. '84	1.0×10^2	5.8×10
	Suho Nada:	Mar. '84	—*	1.0×10

* *Skeletonema costatum* was not detected in 0.1 ml of sample counted.

除いた SWM III 培養液¹¹⁾を、無菌培養には PES 培養液¹²⁾を用い、*Coscinodiscus* sp. などその他 7 種の珪藻類の培養には SWM III 培養液や PES 培養液を用いた。これらの試料プランクトンはそれぞれ 0.5 ml ずつ 10 倍希釈段階の濃度でベトリ皿に移し、寒天培地を注いで混釈培養をした。なお、培養液および寒天培地の塩素量は約 16‰ に調整した。寒天培地は試料プランクトンをそれぞれ培養した同じ種類の培養液に Difco 製のバクタアガーを 15% 濃度になるように添加して作成した。また、*S. costatum* の無菌株の培養液や寒天培地には、BBL 製のトリプチケースペプトンを 0.5 g/l を添加したものも使用した。

寒天培養器には、直径 60 mm のガラス製ベトリ皿を使用した。寒天平板での *S. costatum* のコロニー形成能の実験では、混釈培養法のほかにコンラージ棒を用いた塗抹法と Nunc 社製のディスプレイ・イノキュレーティンググループ (10 μ l) を用いた画線法を行った。試料プランクトンの液体および寒天培養は、温度 25°C において、白色蛍光灯による 14 時間明、10 時間暗の照度 1.0 から 8.0 klx で行った。なお、寒天培養中におけるプランクトンの存在、コロニーの形状や数などの観察と計測は、40 日間以上にわたり、生物顕微鏡や実体顕微鏡を用いて行った。また、寒天培養のコロニー形成率は、添加した試料 1 ml 当たりのコロニー形成数に換算して表示した。

結 果

海水試料 洞海湾など 3 海域から採取した生海水やネットプランクトンをそれぞれ 0.5 ml ずつベトリ皿に接種し、寒天培養した結果を Table 1 に示した。試料中の *S. costatum* は、群体 (chain) 数の 33~450% が寒天平板で増殖しコロニーを形成した。また、響灘から 2

月に採水した生海水や周防灘から 3 月に採取したネットプランクトンでは、試料中に *S. costatum* はほとんど検出されなかったのに、接種した寒天平板にはコロニーが形成される場合があった。

海水試料を希釈して寒天培養を行った場合は、例えば洞海湾から 3 月に採水した海水中には *S. costatum* は約 100 chains/ml 存在していた。この海水 0.5 ml を寒天平板で培養した結果コロニーが 160 colonies/ml 形成され、海水を 20 倍希釈した場合は 360 colonies/ml が形成された。また、洞海湾から 3 月に採取したネットプランクトンでは、*S. costatum* が 15,000 chains/ml 存在していたが、寒天平板では 2 倍、20 倍、200 倍の希釈濃度でのコロニー数はそれぞれ 16,000 colonies/ml, 22,000 colonies/ml, および 29,000 colonies/ml で、2,000 倍以上の希釈濃度ではコロニーは形成されなかった。

これらの試料の寒天培養で、*S. costatum* のほかにコロニーをよく形成できたのは *Navicula* 属や *Nitzschia* 属などの羽状型珪藻類と細菌類であった。円心型珪藻では *Melosira nummuloides* のコロニーが少量観察された。また、試料中には *S. costatum* のほかに *Chaetoceros affinis* など *Chaetoceros* 属の各種、*Nitzschia pungens*, *Asterionella glacialis*, および *Eucampia goodiicus* などの浮遊珪藻類も多量存在したが、これらの種類はいずれも寒天培地では枯死してコロニーは形成されなかった。

なお、1984 年 8 月に洞海湾と響灘から採水した生海水とネットプランクトンを 2 月や 3 月の試料と同様に寒天培養を行ったが、*S. costatum* のほかに優占的に出現していた珪藻類の *Cyclotella* 2 種類が *S. costatum* のコロニーと良く似た色や形のコロニーを形成し混在したため、*S. costatum* のコロニーは計測できなかった。

Table 2. Colony formation of eight strains of *Skeletonema costatum* cultured not axenically

Collected strain		Chain number in sample (Chains/ml)	Colony number formed in/on agar plate (Colonies/ml of sample)
Area	Date		
Dokai Bay	July 1982	2.3×10^5	3.9×10^5
	Jan. '84	2.7×10^5	1.6×10^5
	Feb. '84	1.3×10^5	1.7×10^4
	July '84	1.9×10^5	8.6×10^5
Suho Nada	July '81	1.9×10^5	1.3×10^5
	Sep. '81	3.2×10^5	0
Hakata Bay	June '81	6.1×10^5	1.9×10^5
Yatsushiro Sea	Jan. '84	2.0×10^4	2.2×10^4

単種培養株 洞海湾など4海域から採集した *S. costatum* の単種培養株の培養液を 0.5 ml あてベトリ皿に接種し、寒天培養した結果を Table 2 に示した。周防灘から 1981 年 9 月に採集した *S. costatum* を除く 7 株が寒天平板でよく増殖しコロニーを形成した。コロニー数はベトリ皿に接種した *S. costatum* のチェイン数の 0.2~110% であった。

S. costatum 単種培養株を段階的に希釈して寒天培地に添加した場合、コロニーの形成状況は、洞海湾から 1984 年 7 月に採集した株と同年 1 月に八代海から採集した株では、それぞれ 2 倍希釈濃度までと 20 倍希釈濃度までにコロニーが認められた。このように、寒天培地ではある希釈段階で急にコロニーが形成されにくくなるという傾向が他の単種培養している 6 株にも認められた。

無菌培養株 洞海湾と響灘から採集し無菌培養した 7 株の培養液をトリプチケース添加寒天培地と無添加の寒天培地にそれぞれ 0.5 ml ずつ添加して培養した結果を

Table 3 に示した。洞海湾産の 4 株のうち 1 株は、トリプチケース無添加の寒天培地では死滅して全く増殖できなかったが、トリプチケース添加の寒天培地ではチェイン数の 93% のものがコロニーを形成した。また、他の 1 株は寒天培地へのトリプチケースの添加の有無にかかわらずコロニーが形成されたが、その数はチェイン数の 1.1~1.2% と少なかった。残り 2 株は、トリプチケース添加寒天培地の方が無添加の寒天培地よりコロニー数が多かった。

響灘産の 3 株のうち 1 株は、トリプチケース添加寒天培地と無添加の寒天培地で形成されたコロニー数がそれぞれチェイン数の 100% と 97% であった。残り 2 株は、トリプチケース無添加の寒天培地ではコロニーが全く形成されないか、またはコロニー数がチェイン数の 4% と少なかった。このように寒天培地にトリプチケースを添加すればコロニーの形成率がよくなるものが洞海湾産と響灘産合わせて 5 株に認められ、またトリプチケース添加の有無にかかわらずコロニーの形成率の高いものが響灘産の 1 株に、低いものが洞海湾産の 1 株に認められた。

次に、寒天培養前の液体培地にトリプチケースを添加して、*S. costatum* 無菌株の形成状況をしらべ Table 4 に示した。洞海湾産の株は、トリプチケース無添加の寒天培地では培養液へのトリプチケース添加の有無にかかわらず 2 倍希釈濃度までしかコロニーは形成されなかったが、トリプチケース添加寒天培地では 20,000 倍希釈濃度でもコロニーが形成された。このように、寒天培地にトリプチケースが添加されれば、高い希釈率までコロニーが形成される傾向が他の 4 株にも認められた。一方、響灘産の 1 株は培養液や寒天培地へトリプチケースを添加してもコロニーの形成率に大差は認められなかった。

コロニーの形状 海水試料中の *S. costatum* ならびに単種培養や無菌培養している *S. costatum* は、いずれも Fig. 1 や Fig. 2 に示したように、寒天平板上で

Table 3. Colony formation of seven strains of *Skeletonema costatum* cultured axenically

Collected strain		Chain number in sample (Chains/ml)	Colony number formed in/on agar plate (Colonies/ml of sample)	
Area	Date		A*	B*
Dokai Bay	June 1984	1.4×10^5	0	1.3×10^5
	June '84	1.5×10^5	1.7×10^3	1.8×10^3
	June '84	1.2×10^5	1.7×10^4	2.7×10^4
	July '84	2.5×10^5	3.1×10^4	1.8×10^5
Hibiki Nada	July '84	7.2×10^4	7.2×10^4	7.0×10^4
	July '84	2.6×10^5	0	4.2×10^4
	July '84	2.4×10^5	8.6×10^3	5.0×10^4

* A used agar medium without trypticase, and B used agar medium with trypticase.

Table 4. Colony formation of two strains of *Skeletonema costatum* cultured axenically in series of dilution of samples

Date and area of collected strain	Chain number in sample (Chains/ml)	Actual volume of sample added in petri dish (ml)	Colony number formed in/on agar plate (Colonies/ml of sample)		Colonies/ml of sample $\times 100$	
			C*	D*	C*	D*
July 1984 Dokai Bay	A* 2.5×10^5	0.5	3.1×10^4	1.8×10^5	12	72
		0.05	0	8.6×10^5	0	34
		0.005	0	1.1×10^5	0	44
		0.0005	0	7.0×10^4	0	28
	B* 2.8×10^5	0.5	4.6×10^4	2.2×10^5	16	78
		0.05	0	3.8×10^4	0	14
		0.005	0	3.4×10^4	0	12
		0.0005	0	3.2×10^4	0	11
July '84 Hibiki Nada	A* 7.2×10^4	0.5	7.2×10^4	7.0×10^4	100	97
		0.05	9.6×10^3	6.0×10^3	13	8.3
		0.005	0	0	0	0
		0.0005	0	0	0	0
	B* 2.5×10^5	0.5	1.3×10^5	1.3×10^5	52	52
		0.05	6.3×10^3	2.4×10^4	2.5	9.6
		0.005	6.4×10^3	0	2.6	0
		0.0005	0	0	0	0

* A and C used liquid and agar mediums without trypticase respectively, and B and D used liquid and agar mediums with trypticase respectively.

は円盤状のコロニーを形成し、周辺部はきれいなレース模様となった (Fig. 3)。また、Fig. 4, 5 に示したように、寒天平板内で形成されたコロニーの形は不定形であった。コロニーは茶色を呈し、寒天培養開始後8日目頃から肉眼で認められ、大きなコロニーは直径約4mmに達した。しかし、*S. costatum* が寒天中で増殖してコロニー数が 10^3 colonies/cm³ 以上に増加すると、コロニーは顕微鏡で計測しなければならぬほど小さかった (Fig. 5)。

実験に用いた *S. costatum* は、混釈法、塗抹法、および画線法の3つの接種方法を行ったが、混釈法が最もよくコロニーを形成し、画線法 (Fig. 6) ではコロニーが形成されない場合が多かった。なお、寒天平板でコロニーを形成した *S. costatum* は、培養液に再接種した場合もよく増殖した。

その他の珪藻類 1984年2月から7月の間に、洞海湾から分離した *Coscinodiscus* sp., *Thalassionema nitzschioides*, *Asterionella glacialis*, *Ditylum brightwellii*, 響灘から分離した *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros distans*, および *Chaetoceros van heurckii* など計7種の珪藻類をそれぞれ単種培養し、*S. costatum* と同様に寒天培養を行った。しかし、7種ともに寒天平板では死滅してしまい、増殖できずコロニー形成はみられなかった。

考 察

S. costatum は生海水やネットプランクトン試料中で生きているもの、また単種培養や無菌培養されているもの、いずれのものも寒天平板でよく増殖し、コロニーを形成した。しかし、*S. costatum* と共に海水中に多量に存在した *Eucampia goodiacus* などの珪藻類や単種培養した *Ditylum brightwellii* などの珪藻7種は内湾・沿岸性種であるが、いずれも寒天平板では増殖できなかった。*S. costatum* のほかに生海水中の珪藻類で寒天平板に増殖できたものは、岩崎³⁾ が指摘したように *Navicula* 属や *Nitzschia* 属など羽状型のものであった。円心型の珪藻類で寒天培養ができたのは *S. costatum* のほかに *Melosira nummuloides* と *Cyclotella* 属2種の合計3種であった。

LEE ら¹³⁾ はボウアオノリ (*Enteromorpha intestinalis*) に着生する珪藻群を寒天培養した結果、寒天培地にボウアオノリのアセトン抽出物質を添加すればコロニーを形成する種類や、コロニー数を増加する種類のあることを報告した。*S. costatum* は無菌株の場合、寒天培地にトリプチケースを添加することによって多数のコロニーを形成することができた。このことから、*S. costatum* のコロニー形成にトリプチケースが促進的に作用していることが推定される。

Figs. 1-6. Light micrographs of colonies of *Skeletonema costatum*.
 Figs. 1 and 2. Colonies on an agar plate by spread plate method. Ca. $\times 1$ and $\times 2$.
 Fig. 3. Border of a colony on an agar plate. Ca. $\times 150$.
 Fig. 4. Colony in an agar plate. Ca. $\times 150$.
 Fig. 5. Colonies in/on an agar plate by mixedplate method. Ca. $\times 15$.
 Fig. 6. Colonies by streaking method. Ca. $\times 10$.

TAKANO* は、多毛類のタマンキゴカイ (*Arenicola brasiliensis*) の卵塊中には多量の羽状型珪藻に混って少量の *S. costatum* が存在していたことを報じた。また、ボウアオノリの着生珪藻群の多くの羽状型珪藻類に混って *S. costatum* も存在したことが報告されている。¹³⁾ これら野外観察結果や本実験結果から、*S. costatum* は浮遊生活に加えて非浮遊生活にも適応する生態的特性を具備しているものと考えられる。

本稿をまとめるにあたり、プランクトンの無菌化に援助いただいた水産大学校大貝政治博士、また博多湾産の *S. costatum* を提供された福岡市衛生試験所西田政司氏、そして本研究の実施に便宜と援助をいただいた北九州市環境衛生研究所長白石幸生氏、宮崎昭夫主査に深甚な感謝の意を表する。

文 献

- 1) G. R. HASLE: *Nor. J. Bot.*, **20**, 109-137 (1973).
- 2) 山田真知子・鶴田新生・吉田陽一: 日水誌, **48**, 1129-1132 (1982).
- 3) 岩崎英雄: 海洋プランクトン (元田 茂編), 海洋科学基礎講座 6, 東海大学出版会, 東京, 1975, pp. 54-56.
- 4) 山田真知子・鶴田新生・吉田陽一: 日水誌, **46**, 1435-1438 (1980).
- 5) 山田真知子・武居 薫・鶴田新生: 日水誌, **48**, 1453-1456 (1982).
- 6) 山田真知子・武居 薫・鶴田新生: 日水誌, **48**, 1457-1461 (1982).
- 7) 山田真知子・新井義昭・鶴田新生・吉田陽一: 日水誌, **49**, 1445-1448 (1983).
- 8) Y. ISHIDA and H. KADOTA: *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **12**, 77-85 (1979).
- 9) R. MORITA and C. E. ZOBELL: *Deep-Sea Res.*, **3**, 66-73 (1955).
- 10) H. IWASAKI: *Plant. Cell Physiol.*, **6**, 325-336 (1965).
- 11) 尾形英二: 藻類, **18**, 171-173 (1970).
- 12) L. PLOVAZOLI: *Cultures and collections of algae*, Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Sept. 1966 (ed. by A. WATANABE and A. HATTORI), Jap. Soc. Plant Physiol., 63-75 (1968).
- 13) J. J. LEE, M. E. MCENERY, E. M. KENNEDY, and H. RUBIN: *J. Phycol.*, **11**, 14-49 (1975).

* H. TAKANO: Program of international symposium on marine plankton, Shimizu Japan, 22 July- 1 August 1984, p. 35.