

駿河湾の水深 687 m から汲み上げられた深層水から 単離された珪藻 *Rhaphoneis crinigera*

A diatom *Rhaphoneis crinigera* Takano isolated from deep seawater
from a depth of 687 m in Suruga Bay

松浦玲子¹・花井孝之²・岡本一利¹・石井織葉³・鈴木秀和³

Reiko MATSUURA, Takayuki HANAI, Kazutoshi OKAMOTO,
Oriha ISHII and Hidekazu SUZUKI

Abstract

At some domestic deep seawater (DSW) utilization facilities, occurrence of diatom has been reported from aquaria or tap DSW. As previous studies were aimed to make *in situ* diatom flora in the facilities as databases for further use, little efforts have been made to separate species contaminated after being pumped on land. In the present study, we carefully sampled a bottle of DSW pumped from Suruga Bay, central Pacific coast of Honshu, Japan, and isolated one diatom species of highly possible DSW origin. The DSW sample (700 ml) was immediately packed after tapped through a 7,200 m long seamless pipeline deployed from a depth of 687 m off Yaizu City. After culturing at a condition (20°C, 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, 12L:12D) for four months (three month in still water and one month on agar plate) using filtered and sterilized DSW, a diatom was isolated among the colony of microorganisms. The diatom was identified as a planktonic pennate species, *Rhaphoneis crinigera* Takano by morphological observation using the light and scanning and transmission electron microscops. This is not only the deepest record of *R. crinigera* but that among all of the diatoms collected through pipelines.

Surprisingly, the diatom could be passaged 79 times during 7 years by changing with filtered and sterilized DSW once a month.

Key Words: Culture, Deep seawater, Diatom, Isolation, *Rhaphoneis crinigera*, Suruga-Bay

要 旨

駿河湾深層水取水供給施設では、水深 687 m から延長約 7.2 km のシームレス管を通して深層水が供給されている。本研究では、施設の取水口から汲み上げた駿河湾深層水から直接採水した後直ちに密閉し、細心の注意を払いながら培養を行った結果、これまで国内浅海域で報告されていた海産浮遊珪藻 *Rhaphoneis crinigera* Takano を単離することができた。これまでも海洋深層水取水施設から多くの種の珪藻の出現が報告されているが、取水後の混入の可能性もあった。従って、今回の報告は、深層水由来であることが「最も確実」で、*R. crinigera* の最深採集記録であるだけでなく、深層水取水管を通して採集されたすべての珪藻の最深採集記録である。本種はろ過滅菌した駿河湾深層水のみで7年以上継代培養が可能であった。

キーワード: 培養, 珪藻, *Rhaphoneis crinigera*, 深層水, 駿河湾, 単離

¹ 静岡県経済産業部水産局水産振興課 (〒420-8601 静岡県静岡市葵区追手町9-6)

² 静岡県経済産業部水産局水産資源課 (〒420-8601 静岡県静岡市葵区追手町9-6)

³ 東京海洋大学 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

1. 緒言

静岡県では2001年より、駿河湾の水深397 mおよび687 mから海洋深層水（以下、深層水）を取水しており、このうち、水深687 mは国内では最も深い取水で、延長7,200 mのシームレス管を通して取水されている。今回、この深層水を陸上施設の蛇口より採水し、取水中に潜在する生物の培養を試みた結果、微細藻類複数種が目視できる量にまで増殖し、このうち、珪藻については1種を単離することができた。この珪藻を培養し、光学および電子顕微鏡で観察したところ、浮遊性の海産羽状珪藻 *Rhaphoneis crinigera* Takano (Takano, 1983) と同定することができた。これまで、国内各地の深層水取水施設の飼育水槽や取水口では珪藻の出現が報告されている（鈴木ら, 2000, 2005, 2007, 2008）が、駿河湾深層水取水供給施設で取水される深層水に出現する珪藻については全く知見がなく、他の深層水取水施設においても *R. crinigera* の出現例や培養例は報告されていない。また、これまでの研究は、珪藻を有効利用するためのデータベースとしての珪藻相の解明に主眼が置かれており、取水後の混入種との区別が明確になされていなかった。本研究では、採水から培養まで細心の注意を払い、培養特性の一端も明らかにすることができたので、これらの結果について報告する。

2. 材料と方法

2.1 単離

単離方法の概要を Fig. 1 に示した。2002年8月、静岡県焼津市鰯ヶ島の駿河湾深層水取水供給施設において、水深687 mから採取した深層水（以下、687 m 深層水）を、オートクレーブ（121°C, 15分）にて滅菌済みの700 ml 容ポリカーボネイト製透明容器で給水口から直接採水した。取水後、直ちに密封し（Fig. 1-①）、20°C, 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, 明暗周期 12L : 12D の条件下で約4カ月間静置培養した（Fig. 1-②）。その間、培養を開始して1カ月間は換水を行わないまま培養を続け、その後は

週に1回の頻度で換水した（Fig. 1-③）。換水時は、容器内の深層水を10分の1程度残して捨て、新たに用意したろ過滅菌後の687 m 深層水を培地として容器に継ぎ足し、強く攪拌した。

培地用の687 m 深層水は、駿河湾深層水取水供給施設の小口給水所において、十分に洗浄して乾燥させた1 L ポリエチレン瓶に採水後、直ちに実験室へ持ち帰り、クリーンベンチ内で孔径0.2 μm メンブランフィルターを用いて減圧ろ過し、オートクレーブ滅菌（121°C, 15分）した1 L ガラス瓶に受けたものを使用した。

静置培養を開始して3カ月が経過すると、容器の内壁に微細藻類が繁殖するようになったため、滅菌処理したスクレーパーで剥離し、同じく滅菌処理した容器に微細藻類の懸濁液を作製した後、寒天平板上に塗布した（Fig. 1-④）。寒天培地には、寒天粉末（和光純薬工業株式会社, 大阪）7.5 g を687 m 深層水1 L で加熱溶解し、オートクレーブ滅菌（121°C, 15分）したものをを用いた。

微細藻類の懸濁液を塗布した寒天平板を20°C, 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, 明暗周期 12L ; 12D の条件下で培養したところ（Fig. 1-⑤）、複数の単一コロニーが出現したため、採水より4カ月後の2002年12月20日に単離した（Fig. 1-⑥）。

2.2 継代培養

2002年12月20日に単離した微細藻類は、その日のうちにろ過滅菌した687 m 深層水中に懸濁させた後、分類群毎に継代培養を行った。培養条件は20°C, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 以下（明暗周期 8L : 16D）とした。微細藻類の増殖を確認した後、約30日毎にクリーンベンチ内で、滅菌したピペットを用いて新しい培地に細胞懸濁液2 ml を加えて、79回継代培養を行った（Fig. 1-⑦）。

このうち、*R. crinigera* については、植え継いだ日から40日後まで、増殖ステージに合わせて毎日ないし1~5日毎に光学顕微鏡下で細胞数を計数し、細胞密度を求めた。計数用のサンプリングはクリーンベンチ内で行い、滅菌したピペットを用いて必要量（20~200 μl ）採取した後、プレパラート上に

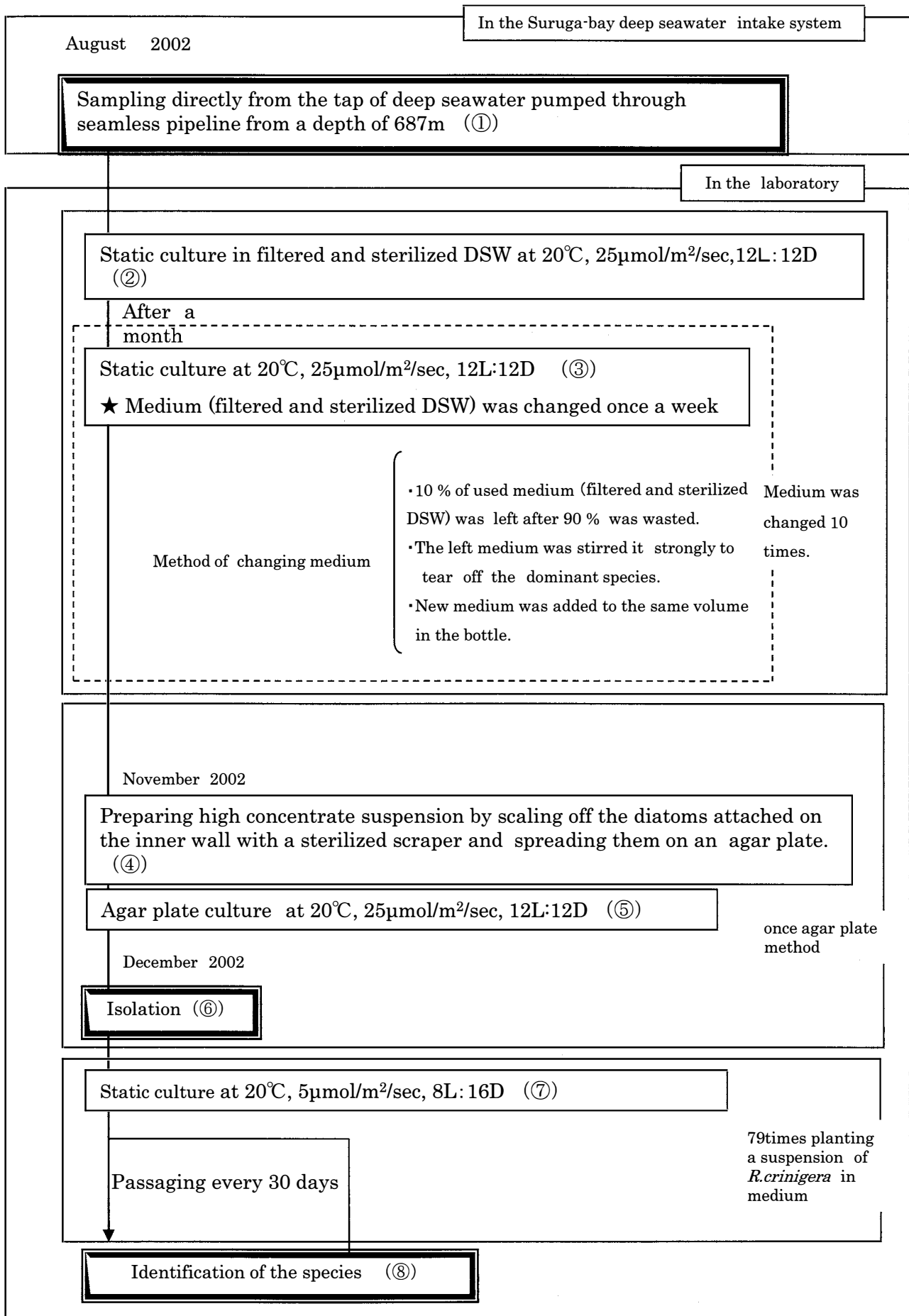


Fig. 1. The method of isolation of a diatom *Rhaphoneis crinigera*

展開し、適宜ろ過滅菌した 687 m 深層水で希釈後、細胞数を計数した。

継代培養用培地の培養容器は 50 ml 容ガラス製試験管 (マルエム NX-50, 大阪) を使用し、試験管本体は乾熱滅菌処理 (161°C, 60 分), メラミン樹脂製の蓋はオートクレーブで滅菌 (121°C, 15 分) した。オートクレーブで滅菌したピペットを用いて、試験管にろ過滅菌深層水 (上述) を 40 ml 添加した後、速やかに蓋を装着した。

2.3 珪藻の観察

珪藻試料 (Fig. 1-⑧) は遠沈管に適当量分取した後、蒸留水を加え遠心分離によって水洗する操作を 3, 4 回繰り返し脱塩した。その後、配水管洗浄剤パイプユニッシュ (ジョンソン株式会社, 神奈川) を 2, 3 滴入れ, 5~7 分間静置して有機物などを取り除いた (南雲, 1995)。これに再び蒸留水を加え, 遠心分離して洗浄し, 長田・南雲 (2001) に準拠して顕微鏡観察用の試料を作製した。

光学顕微鏡 (LM) 観察は定法に従った。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察は, 上記の方法で処理した試料をカバーガラス上に滴下し加熱乾燥した後, オスミウムコーター NEOC-AN (メイワフォーシス株式会社, 大阪) でオスミウムを蒸着し, HITACHI-S-5000 (株式会社日立ハイテクノロジース, 東京) を用いて行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察は, 上記の方法で処理した試料を, フォルムバル支持膜を張ったグリッドに滴下し自然乾燥した後, JOEL-2000EX (日本電子株式会社, 東京) を用いて行った。

3. 結 果

単離した珪藻の細胞は, 単体, または不定形の塊を形成し (Fig. 2), 浮遊性であった。殻長 4.2~6.7 μm , 殻幅 3.3~5.0 μm で, 殻面観の殻形は細長い楕円形および菱形, 軸域は狭く縦溝はない (Fig. 3)。条線は 1 μm に約 3 本で, 軸域に対して垂直に配列する。殻帯部胞紋から細長い粘液糸を放射状に分泌する (Fig. 4, 鎌)。唇状突起を欠く (Fig. 5)。両

殻端には 3~5 個の小孔があるが, 網目状の殻端小孔域を呈さない (Fig. 6, 鎌)。帯面観の殻形は丸みを帯びた長方形 (Fig. 2)。これらの形態学的特徴により, 本種は *Rhaphoneis crinigera* Takano と同定され, 原記載 (Takano, 1983) とよく一致した。

R. crinigera は 4 カ月の静置培養から, 1 カ月の寒天培地による培養を経て, 6 年 7 カ月に及ぶ 79 回の継代培養に至るまで, 植継ぎの度に増殖が確認された。継代培養中の *R. crinigera* の増殖曲線を Fig. 7 に示した。

4. 考 察

冒頭にも述べた通り, 国内各地の深層水取水施設では, 海洋深層水をかけ流ししている水槽では多数種の珪藻種の出現することが知られている (鈴木ら, 2000, 2005, 2007, 2008) が, かけ流しの場合, 飛沫など空中からの微細藻類の混入が否定できず, 鈴木ら (2000) も, 得られた珪藻類が休眠孢子などの形で深層水中に含まれていたものか, 陸上に汲み上げられてから混入したものかは明らかにすることができなかったと述べている。そもそも, 海洋深層水の取水管の沈設時にも表層水から珪藻が侵入する可能性があるため, 取水管からの取水で採集された珪藻が深層水由来かどうかを確認することには限界がある。しかし, 今回, 採水やその後の培養については細心の注意を払ったことから, 今回単離同定した珪藻が深層水中に含まれていたことは 'これまで以上に確実' と考えられる。

今回, 水深 687 m の駿河湾深層水から同定された *R. crinigera* は, 1982 年に隅田川河口域で発見された浮遊性の羽状珪藻 (Takano, 1983) で, 東京湾以外にも北海道釧路や愛知県渥美湾, 長崎県島原など, 日本沿岸の陸水の影響のある浅所の水中 (Takano, 1983) で検出されている。今回の報告は, 上記の理由から, 本種生体の最深採集記録となることはほぼ確実である。また, 水深 687 m は, これまでに鈴木ら (2000, 2005, 2007, 2008) が報告してきた取水施設よりも深いことから, これ

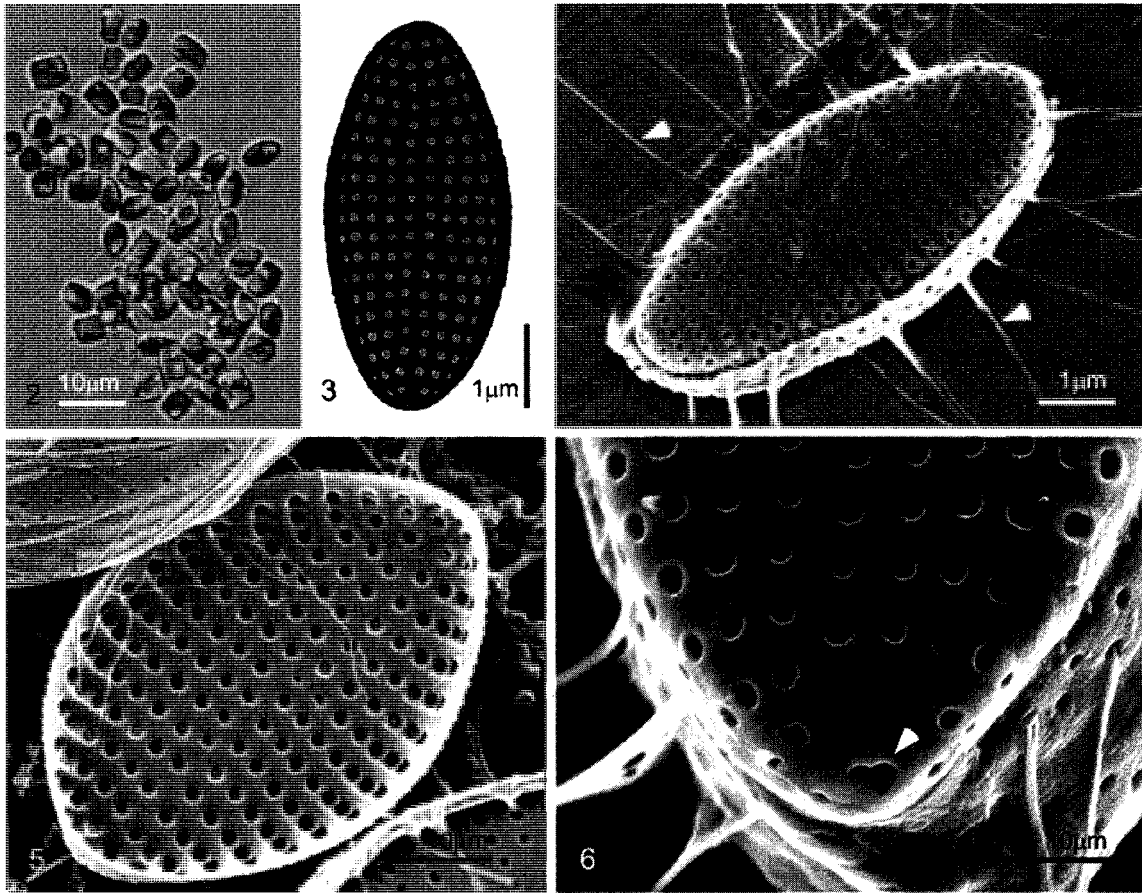


Fig. 2-6. *Rhaphoneis crinigera*. Fig. 2. LM. Fig. 3. TEM. Figs. 4-6. SEM.

Fig. 2. Living cells.

Fig. 3. Valve-view.

Fig. 4. Frustule. Arrowheads indicate the mucilaginous threads from areolae.

Fig. 5. Internal view of a whole valve. Note that no labiate process is found in the valve.

Fig. 6. External polar-view showing the openings of the tiny simple pores (arrowhead).

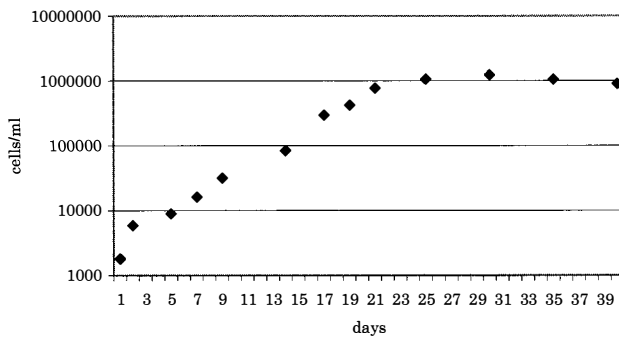


Fig. 7. Cell density of *R. crinigera* at subculture

までに得られた珪藻がすべて深層水由来であるとしても、最深採集記録といえるであろう。

R. crinigera の継代培養は、7年間、ろ過滅菌した 687 m 深層水のみを培地として行うことが可能であった。また、継代培養における増殖曲線が、対数増殖期を経て定常期へ移行していることから、*R.*

crinigera は駿河湾深層水を培地として、一般的な微細藻類の増殖過程を経ていることがわかる。

通常の微細藻類の培養は、基礎となる海水に、窒素、リン、金属およびビタミンなどの栄養分の添加が必要であるが、駿河湾深層水は栄養分無添加のまま継代培養に用いることが可能であった。これは、急激な増殖による栄養要求が起こらないよう、 $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 以下といった低照度の条件に設定し、緩やかな増殖となるような培養方法を用いたことも理由の一つとして挙げられる。しかし、海洋深層水から単離した微細藻類を海洋深層水で長期間、継代培養した事例はなく、駿河湾深層水の水質と本種の栄養要求が適合している可能性があることを示している。

例えば、*R. crinigera* はその後の研究において、継代培養だけでなく拡大培養を経て、 $140 \mu\text{mol}/$

m²/sの強光下で数トン規模の大量培養も可能になっている(花井・大河内, 2009).

駿河湾深層水のうち, 687 m 深層水は, 高知県室戸市や富山県滑川市の海洋深層水と比較しても硝酸態窒素やリン酸態リン, 珪酸態珪素が多く含まれており(五十嵐, 2004), *R. crinigera*のみならず, 藻類の培養により適していると考えられる.

今後は, 完全培地や飢餓培地を用い, 駿河湾深層水の培地としての特性や *R. crinigera* の栄養要求等の培養条件について調査していく予定である. また, 今回, *R. crinigera* がどのような状態(例えば増大胞子)でどの程度の密度で存在していたのかは明らかになっておらず, これらの情報についても調査する必要があるであろう.

5. 謝 辞

駿河湾深層水の採水に御協力いただいた駿河湾深層水取水供給施設の野中敬八氏に謝意を表す. なお, 本研究の一部は科学研究費(20580197)と文部科学省特別経費(大学の特性を生かした多様な学術研究機能の充実・海洋生物多様性に関する高精度モニタリングと影響評価)の助成を受けたものである. 記して感謝の意を表す.

参考文献

- 花井孝之・大河内敏雄(2009) 駿河湾産微細藻類利用開発研究. 平成19年度事業報告, 静岡県水産技術研究所, 57-58.
- 五十嵐保正(2004) 陸上採取した駿河湾深層水中の主要成分の変動. 平成14年度駿河湾深層水利用可能性調査報告書, 静岡県農業水産部水産振興室, 1-2.
- 南雲 保(1995) 簡単に安全な珪藻被殻の洗浄法. *Diatom*, 10, 88.
- 長田敬五・南雲 保(2001) 珪藻研究入門. 日本歯科大学紀要(一般教育系), 30, 131-141.
- 鈴木秀和・阿部祐子・藤田大介・南雲 保(2007) 高知県海洋深層水研究所の養殖施設から採集した付着珪藻. *海洋深層水研究*, 8, 27-37.
- 鈴木秀和・藤田大介・南雲 保(2005) 富山県入善町の海洋深層水アワビ養殖施設に出現した付着珪藻. 日本歯科大学紀要(一般教育系), 34, 55-62.
- 鈴木秀和・南雲 保・藤田大介(2000) 富山湾深層水で自然繁茂する付着珪藻. 富山県水産試験場研究報告, 12, 33-42.
- 鈴木秀和・渡邊 徹・南雲 保・藤田大介(2008) 北海道知床らうす簡易取水施設から採集した付着珪藻. *海洋深層水研究*, 9, 69-78.
- Takano, H. (1983) New and rare diatoms from Japanese marine waters-IV. A new *Raphoneis* emitting mucilaginous threads. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, 109, 27-39.
- (2011年12月5日受付; 2011年12月15日受理)