

藻類の培養と教材化

高校の生物でしばしば名前が出てくる淡水産藻類の簡単な培養と保存

橘 淳治（神戸学院大学）

三浦靖弘（今宮工科高校）

加藤 励（泉陽高校）



はじめに

- 高校の生物において藻類は実験・観察の教材としてしばしば用いられる。
- ここでは，藻類の生理生態を知った上で，培養と教材化について考えたい。



藻類とは

- 水中に生育し同化色素をもち**独立栄養生活をする植物**の総称.
- 海草も含み，系統的に単一でなく便宜的にまとめられた群.
- 厳密には，光合成の過程において O_2 を放出する生物から有胚植物を除いたもの.



- 藍藻類・原核緑藻類・紅藻類・灰色藻類・クリプト藻類・渦鞭毛藻類・黄金色藻類・珪藻類・褐藻類・黄緑藻類・ハプト藻類・ラフィド藻類(緑色鞭藻類)・クロララクニオン藻類・ミドリムシ藻類・プラシノ藻類・緑藻類・車軸藻類などがあり，**藍藻類**(藍色植物)と原核緑藻類は**原核生物**に，他の藻類は**原生生物**に分類されることがあるとされている。



- 「藻類」という呼称は光合成を行うという共通点を持つだけの多様な分類群の総称であり、それ以上の意味を持たないとされている



高校の生物で扱われる藻類

- カルビン・ベンソン回路の発見に繋がった生物としての緑藻類のクロレラや、顕微鏡観察の試料のほか、進化の教材としてボルボックスも有名である。また、生物基礎の原核生物の例としてはシアノバクテリア（ラン藻類）のイシクラゲやアオコ (*Microcystis*) もよく知られている。
- ケイ酸質の殻をもつケイ藻類のほか、原生生物に属するミドリムシ (*Euglena*) も教材生物として有名である。



2. 藻類の入手

- 藻類の採取には採水法（湖沼水から直接水中に存在している藻類を採取する方法）と、プランクトンネット法（湖沼にプランクトンネットを投げ入れて採取する方法）があるほか、河川等の付着藻類では剥離法（河床の岩や石に付着している藻類を剥がしとって採取する方法）などがある。

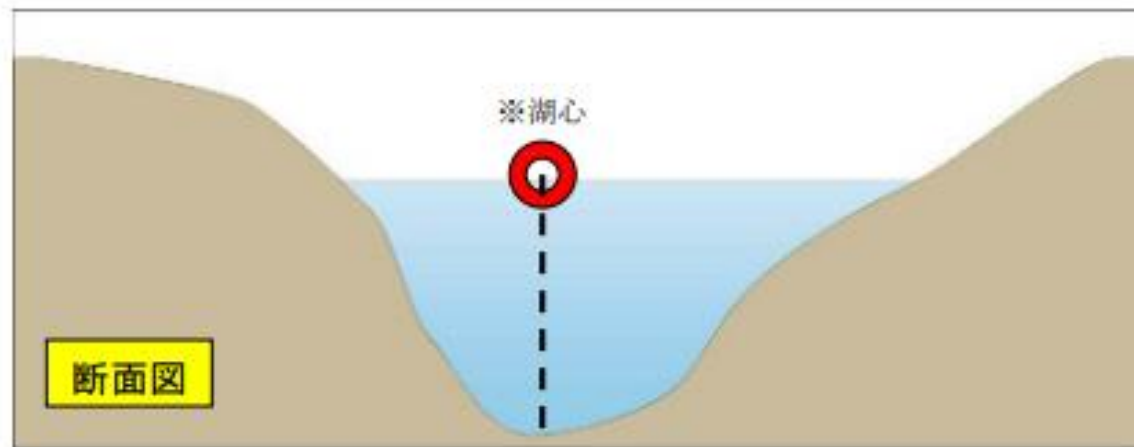


①採水法

- バンドーン採水器やバケツにより湖沼や河川から直接水を採取する方法である。
- 採水自体は簡単であるが，採水地点の選定に注意する必要がある。
- 河川や湖沼の代表地点の採水とは，河川では，河川断面の単位面積について最も流量が大きい部分（最も水深があり一番流れの速い部分）「**流心部**」で，また，湖沼では湖沼の中で最も深い地点である**湖心部**で行うのが原則である

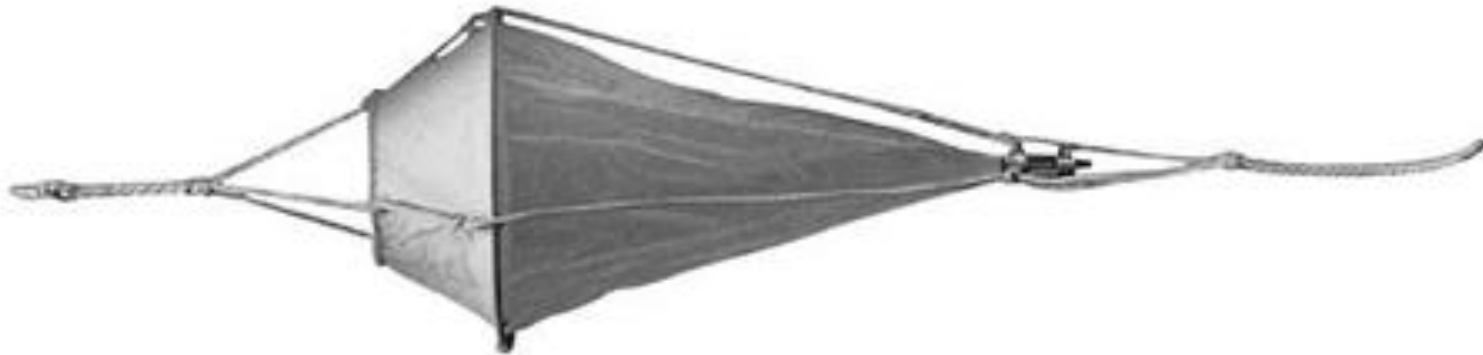


採水地点の選定



②プランクトンネット法

- プランクトンネットを用いて、湖沼水を濾過して藻類を採取する方法である。



サイズによるプランクトンの呼称

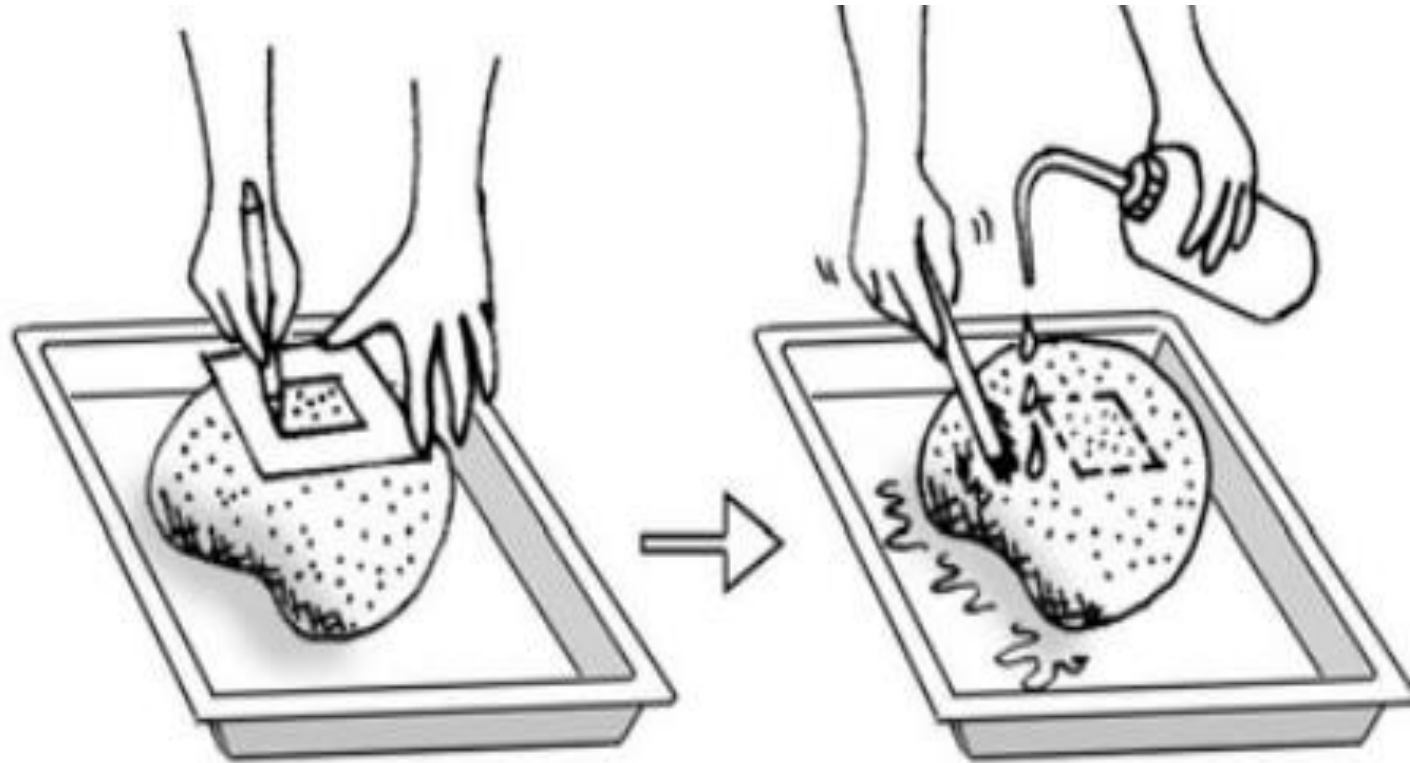
- 直径 $2\ \mu\text{m}$ 以下のものを picoplankton
(ピコプランクトン)
- 直径 $2\sim 20\ \mu\text{m}$ のものを nanoplankton
(ナノプランクトン)
- $20\sim 200\ \mu\text{m}$ のものを microp plankton
(マイクロプランクトン)
- $200\ \mu\text{m}$ 以上のものを mesoplankton
(メソプランクトン)



③剥離法

- 主に河床の付着藻類の採取に使われる方法で、河床の岩や河川堤防などに付着して生息する藻類を剥がし取る方法である。
- 具体的には、藻類の付着した岩などに5cm×5cm程度の正方形の穴を空けたゴムシートを当てて、その穴の部分に歯ブラシなどで水をかけながらこすって剥がし落として、採取する(図4)。

付着藻類の剥離法



①研究機関等からの藻類の入手

- **国立環境研究所**の微生物系統保存施設では、研究・教育目的での使用に関しては無償で提供も行っている。
- 微生物保存施設のURLは次のとおりである。
<https://mcc.nies.go.jp/index.html>
- 都道府県の教育センター等でも入手可能な場合がある



②業者からの購入

- **理化学業者**（例えば株式会社ケニスなど）も、教材目的に販売している。理化学カタログや学校出入りの業者に問い合わせるとよい。
- 店頭あるいはネットの熱帯魚ショップにおいても**飼料用**として比較的安価で販売しているが、単一種ではなく目的外の藻類も**コンタミネーション**しているので注意が必要である。



(1) 検鏡用の固定と保存

- 藻類試料の固定には**ルゴール液**を用いるのがよい。
- ルゴール液を固定に用いると藻類細胞内に**ヨウ素**が取り込まれて沈殿しやすくなるため、検鏡用に濃縮するには都合がよい。
- また、着色して検鏡しにくい場合は、3%**チオ硫酸ナトリウム**（ハイポ）を少量加えることによりヨウ素の色が抜けて透明になるので、藻類細胞の細部の観察にも都合がよい。



ホルムアルデヒド水溶液

- ホルマリン固定は，室温で長期間の保存が可能のため古くから用いられてきた。
- 藻類種や試料の量によって異なるが，ホルムアルデヒドの濃度が**0.4～5%**程度になるように固定する。
- ここで注意しなければならないのは，市販のホルムアルデヒド溶液は**37～40%**であるので，希釈の際の**濃度計算**には注意する必要がある。



注意点

- 教員向けの実験書などを見ていると、**市販のホルムアルデヒド溶液を100%と勘違いして**、濃度計算をして“**50%ホルマリン**”などと、**ありえない濃度**の記載があるので注意が必要である。
- ホルムアルデヒドは**発癌性**が疑われる物質であるので、学校においては使用すべきで無い。



アルコール保存

- エタノールで藻類の水を置換するものである。
- 検鏡用というよりか近年簡単に行えるようになった遺伝子解析や環境DNA用の試料の固定に用いられている。
- 欠点としては、エタノールは藻類のクロロフィル色素を脱色してしまうため、検鏡用の固定にはあまり適さないが、学校教育の場においては児童・生徒ならびに教員の安全確保の観点から、ホルムアルデヒド固定に代わるものとして使うことが増えている。



藻類試料の濃縮方法

- **重力沈殿**による濃縮方法が用いられる。これには、静置沈澱法という、藻類をメスシリンダーなどに入れて、しばらく放置し、上澄みをサイホンやメスピペットで吸引して捨てることにより、底部に濃縮したものを貯めて利用する方法がある。
- 重力沈殿では沈殿時間がかかるため、遠心分離器により沈殿させる**遠心沈殿法**もしばしば使われる。



プランクトンネット

- プランクトンネットを用いて，濾過を行い，プランクトンネット上に残った藻類試料を利用する方法もある。
- プランクトンネットの目のサイズ（メッシュサイズ）を変えることにより，大きさにより藻類を**分離濃縮**することもできる。

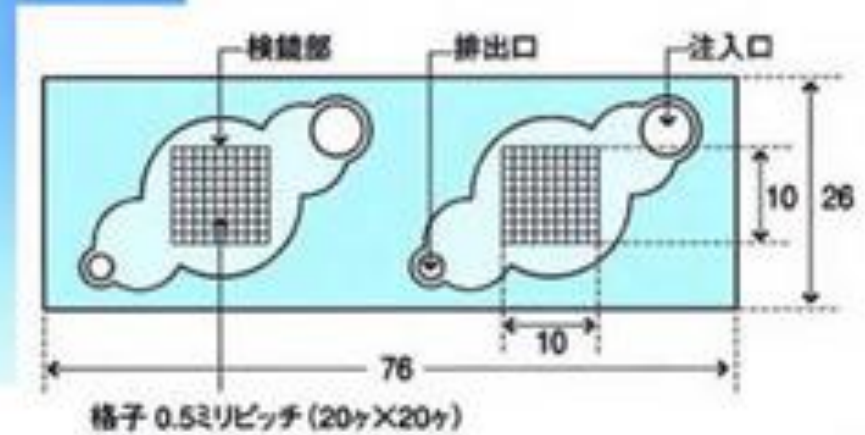


(3) 藻類細胞の観察と定量

- 藻類量を測定する簡単な方法として**計数板**を使う方法がある。
- 計数板には色々な種類があるが、研究用のものは比較的高価で学校の実験観察には向かない。
- そこで、安価な**プラスチック製計数板**を利用するのが实际的である。



matsunami プラントン計数板



②コロニー（群体）の計数

- ボルボックスのほかイカダモや、シアノバクテリアのミクロキスティスもコロニーを作って生活をしている。
- これらの藻類については、細胞数の計数ではなく、コロニー数の計数を行うことが一般的である。
- 細胞数が必要なときは、コロニーあたりの細胞数を文献等で調べて、それに、実際に観察したコロニー数をかけて細胞数を算出するとよい。



③生物量

- 藻類の生物量を重量，炭素量，窒素量，リン量で表すことがある。
- 藻類の形状を近似的に球，回転楕円体，円筒，円錐として，藻類の細胞数と種類による平均的な大きさ（長径）から体積を算出し，その体積に藻類の密度（通常は水とほぼ同じ $1\text{g}/\text{cm}^3$ ）をかけて重量と計算することが行われている。



クロロフィル， 元素量

- 藻類の光合成色素をアセトン（安全性のためにエタノールを使うことが多い）で抽出し、その抽出液中に含まれる**クロロフィル色素**を定量し、その値で比較検討したり、また、クロロフィル量と炭素量との量的関係から藻類の炭素量を算出したりする。
- 藻類をろ紙上に集めて高温で燃焼させてガス化を行い**CHN元素分析計**（CHNコーダー）で定量したり、また、酸化剤を用いて科学的に酸化分解し、比色定量で求める方法もある。



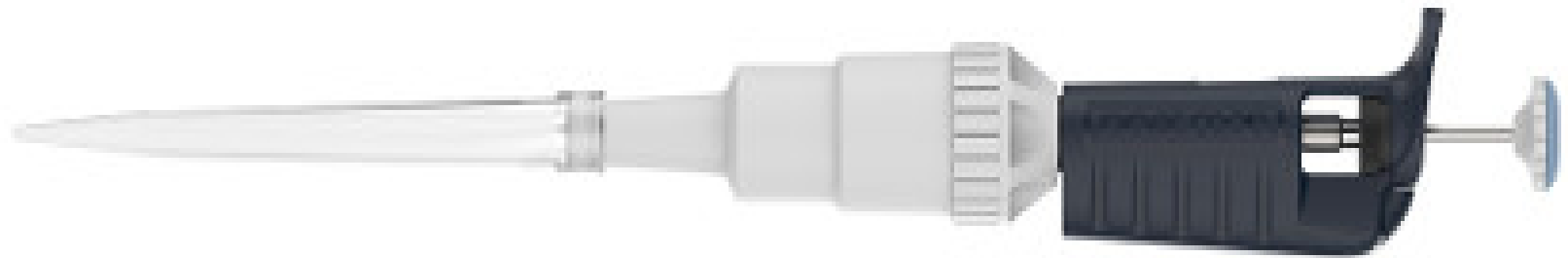
(1) 藻類の単離

① ピペット洗浄法

- 天然水中から採取した微生物群集を顕微鏡下で観察し，目的の藻類を**キャピラリー（パスツールピペット）**で吸い取る方法である。
- 通常の駒込めピペットでは，ピペット先端が大きすぎるのでパスツールピペットを自作するか購入するかして利用する。
- 少し値段が高くなるが，10～50 μ L程度の**マクロピペット**を利用する方法もある(図6)。



図6 ギルソンピペットマン



②寒天プレート法

- 栄養塩を含む**1.5%程度の寒天培地**に天然水を直接まいて培養し，寒天プレート上で増殖してきた**藻類を白金耳や柄付き針で単離**する。
- 寒天上で増殖が可能な種類は限られるため，この方法が使えない藻類もある。
- 目的とする藻類種に合わせて栄養塩の組成や濃度を変えたり，また，抗生物質を加えたりして，目的外の微生物の増殖を抑えることもある。

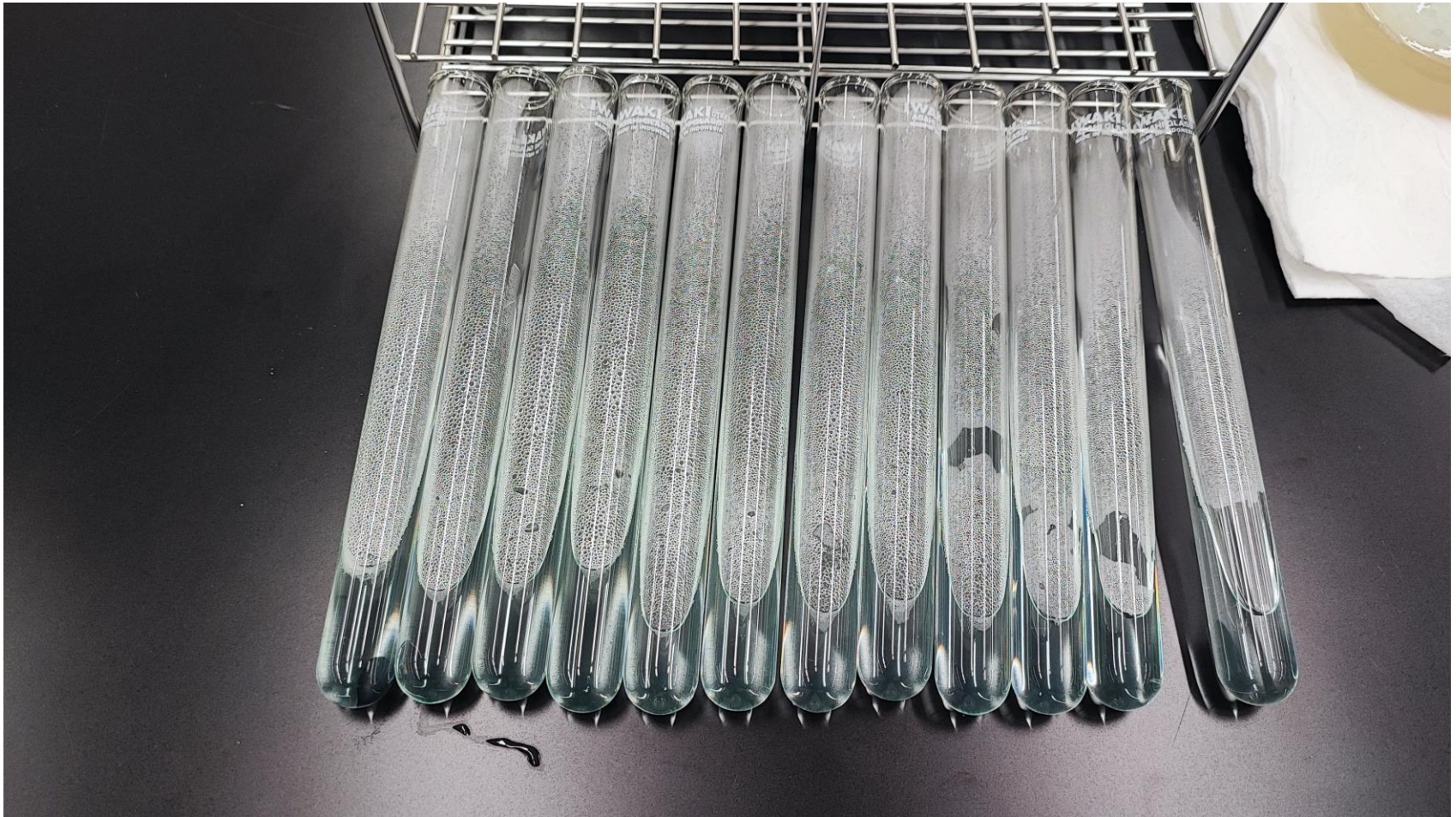


藻類の保存

- 寒天プレートは藻類の分離に用いるほか、単離した藻類の保存に用いることが多い。
- 試験管と寒天培地を用いた傾斜寒天培地による、藻類の保存がある(図7)。



傾斜寒天培地の作製



傾斜寒天培地上のChlorella



長期保存

- 低温下の**弱光の下**に置くと長期間の保存が可能となる。
- 増殖させたいときは、寒天表面上の藻類を白金耳や柄付き針で採取し、それを**液体合成培地**に植えついで、十分な光と適切な温度の下で培養し、さらに、**大量に増やしたい時には**、培養容器に実験用の二酸化炭素ボンベから**CO₂ガス**を吹き込むとよい。

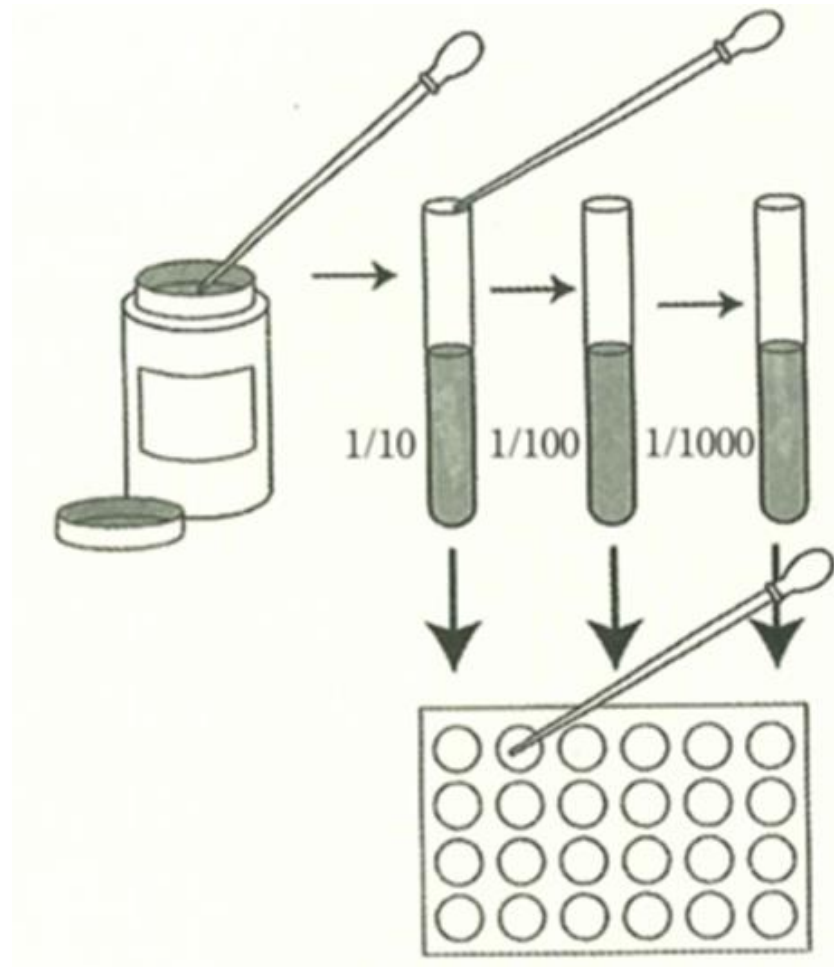


③希釈培養法

- 天然水に栄養塩を加えて培養しながら**単離する方法**である。これは、希釈培養法や粗培養法と呼ばれる。
- 希釈培養法では、10倍、100倍、1000倍段階的に希釈し、これを複数用意して**確率論的な培養**を行って単離する（図9）。



図9 希釈培養法



(2) 継代培養

- 継代培養は、培養を続けることにより培地中の栄養塩類が枯渇するほか、藻類の代謝産物により藻類の増殖が停止したり、藻類が死滅したりするため、藻類種や培養濃度によっても異なるが、通常は**1週間から1ヶ月に1回程度**の割合で植え継ぎを行う。



コンタミネーションを避ける

- コンタミネーションは一度起こしてしま
うと、単離するのは難しい。
- コンタミネーションを防ぐには器具類の
滅菌が重要であるが、コンタミネーション
を避ける方法としては、可能な限り**器
具を使わずに植え継ぎを行う**ことである。



(3) 無菌操作

- 純粋な藻類（**バクテリアフリー**の藻類）の場合は，細菌類の混入を避けるために**クリーンベンチ**内での操作が必須である。
- しかしながら，通常の実験・観察に用いる藻類は**単一株ではあるが細菌類は混入している**（**プランクトンピュアー**の藻類である）ため，クリーンベンチが無くても，藻類のコンタミネーションに気をつければ大丈夫である。



無機合成培地の利用

- 藻類の多くは**光独立栄養**（光合成が可能）であるため、無機塩類や微量金属、ビタミンなどから成る**有機物を含まない合成培地**で培養することにより、従属栄養の原生動物や動物プランクトンのコンタミネーションによる増殖を回避することができる。



藻類の培養

(1) バッチ培養

- バッチ培養は、**培地を追加をしない**ために藻類が増殖に伴い、栄養塩類が枯渇して最終的に**死滅**するほか、藻類密度の増加に伴う被陰効果で光透過率が低下したり、排出物の蓄積による藻類の増殖の抑制がはたらく。



植え継ぎ

- 藻類の時間的な増殖は、遅滞期 (lag phase) , 指数増殖期 (exponential phase) , 定常期 (stationary phase) , 減衰期 (decline phase) の4つに分けられるので、効率よく大量培養するには、**定常期に入ると直ぐに大きな容器に植え継ぎ**を行うとよい (図10, 図11) 。



*Chlorella*のバッチ培養



Chlorellaの大量培養



(2) セミバッチ培養

- 培養の途中で、**一定量の培地を入れ替える方法**をセミバッチ培養 (semibatch culture) という。通常は数日おきの頻度で**培地の半分程度**を入れ替える。
- 生理的に良い状態での藻類の保存・培養ができるが、メンテナンスが面倒という欠点がある。



(3) ケモスタット

- ケモスタット (chemostat) は連続培養ことで、定量ポンプやタイマーを用いて新しい培地を培養容器に定常的に送り込み、それと同量の培地を捨てるものである。
- 培地の供給と放出をうまく調整すると、培養容器内の藻類細胞密度は一定になり、良い状態で連続的に培養することができるが、装置の購入や製作に時間や金銭がかかるのが欠点である。



5. 藻類の培地

- (1) 強化培地
- 藻類を採取した水域の水を採水し，その試水をワットマン社のGF/Cグラスファイバーフィルターでろ過して懸濁物を取り除く。
- このろ液に，合成培地で紹介する窒素，リンなどの栄養塩類，微量元素，ビタミンなどを加えてオートクレーブ滅菌または $0.2\mu\text{m}$ 程度の孔径のニトロセルロースメンブレンフィルターで濾過滅菌して用いる。



(2) 合成培地

- 藻類の生育に必要な**栄養分**を，**蒸留水**に人工的に添加し，**滅菌**したものである。
- 藻類種により必要な栄養分は異なるために，藻類に応じた合成培地が多数考案されているので，培養したい藻類用の合成培地を使用するのが望ましいが，試薬の調整が面倒である。
- 藻類の培養には，**窒素とリン**が必須であるが，**ケイ藻類では殻を作る必要からケイ酸塩を培地に添加する必要がある。**



色々な合成培地

- ユーグレナのような光合成を行う原生生物の場合は、光を与えて無機培地で培養することもできるし、また、ペプトンやイーストエクストラクトなどの有機物を与えて従属栄養的に培養することも可能である。
- 海産の藻類（大型の海藻も含む）の場合は、蒸留水の代わりに濾過した海水や人工海水を用いたり、また、塩化ナトリウムなどの塩を加えて培地を作製する場合もある。



C 培地の作製方法

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	15 mg
KNO ₃	10 mg
β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	5 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
Vitamin B ₁₂	0.01 μg
Biotin	0.01 μg
Thiamine HCl	1 μg
PIV metals 1	0.3 mL
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50 mg
Distilled water	99.7 mL



P IV metals

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	19.6 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.6 mg
ZnCl_2 ¹⁾	1.04 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg
Distilled water	100 mL



C培地の多栄養素

- C培地（培養液）を毎回調整するのは、試薬の秤量が大変なので、通常は**ストック用の溶液**を作製し、使用時にはそれを希釈して用いる。
- **多栄養素**（硝酸カルシウム、硝酸カリウム、グリセロリン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム）については**1000倍量の溶液**を作製して**ストック溶液**とする。
- 培地作成時に**ストック液を1,000倍希釈**（便宜的に蒸留水1Lに対してストック溶液をそれぞれ1mLずつ入れて希釈）して用いる。



ビタミン類

- ビタミン類（シアノコバラミン， ビオチン， サイアミン）については， **微量であるため1,000倍程度の溶液であっても希薄溶液であり，不安定で分解する可能性がある**ので， **100万倍**程度の溶液を作製してストックとする。培地調整時に，ストック溶液を**1,000倍に希釈**したものを**プレスストック液**とし，これをさらに**1,000倍に希釈**して用いる。



P IV 金属溶液

- P IV 金属溶液の金属類（塩化第2鉄，塩化マンガン，塩化亜鉛，塩化コバルト，モリブデン酸ナトリウム）に関しては，それぞれを秤量し，さらに EDTA を 100mL の蒸留水に加えてキレーターとしてストック溶液を作製する。
- 培地作成時には P IV 金属溶液を培地 1 L に対して 3mL 添加する。



pH緩衝剤

- pH緩衝剤としてトリスヒドロキシルアミノメタンの1,000倍量溶液を作製しておき、培地作成時に1,000倍に希釈（便宜的に蒸留水1Lに対してストック溶液をそれぞれ1mLずつ入れて希釈）して用いる。



ストック溶液



pH調整と滅菌

- 培地作成後にpHメーターで合成培地のpHを測定し、**0.1Nの塩酸溶液**でpHを**7.5**に調整する。
- 作製した培地には雑菌や空気中の落下細菌、藻類の休眠孢子などが入り込んでいる可能性があるため、オートクレーブを用いて**高圧蒸気滅菌**を行ってから使用する。
- オートクレーブ滅菌を行うとビタミン類の多くは分解する可能性があるため、メンブレンフィルターで濾過滅菌した**プレストックビタミン溶液をオートクレーブ滅菌の後に加える**方が望ましい。



ユーグレナなどの原生生物用培地

- 暗所で培養するため緑藻類などのコンタミがあってもユーグレナ以外の藻類は増殖できないが、滅菌が不十分であったり、入手したユーグレナに**細菌類**が混入していると**培地が腐敗**して培養が失敗する可能性もある。



PYG培地（原生動物用）

Proteose Peptone	0.15 g
Yeast extract	0.1 g
Glucose	0.5 g
Distilled water	100 mL



(3) 簡易培地

- 藻類の培養には窒素，リンなどの栄養塩類，金属，ビタミンが必要である。
- **栄養塩類**については市販の植物栽培用の**複合肥料**を利用するとよい。
- **微量金属**については培地に用いる水を蒸留水ではなく，市販の**ミネラルウォーター**を用いると滅菌もされており適度な微量金属も溶け込んでいる。
- **ビタミン**については，市販の**栄養ドリンク**はビタミン類が多く含まれているので，これを利用するとよい。



具体的な簡易培地

- C培地の多栄養素のみを使用し，微量金属を入れる代わりに，市販の国産ミネラルウォーター（軟水）1Lを蒸留水の代わりに用いる。ビタミン類の代わりに，市販の栄養ドリンクを0.1mL添加する。
- pHを安定化させるための緩衝液の代わりに，よく焼いたチョークの破片入れる。

※本日はこの培地を持ち帰り用に用意しました。



もっと手抜きので培地

- 市販の国産ミネラルウォーター（軟水）の2Lペットボトルに、**ハイポネクス**溶液2mLを入れ、そこに、市販の栄養ドリンクを0.1mL添加する。最後に沸騰石を少量加える。



まとめにかえて

- 藻類の増殖にとって必要な炭素源である。大気中の二酸化炭素濃度は人間活動によって400ppmまで増加したと言われるが、藻類の大量培養時には不足する。大量培養するには**二酸化炭素の供給**が必要なため、実験用のガスボンベなど用意するよい。
- コンタミネーションの問題回避策としては滅菌やクリーンベンチの使用が難しい場合がある。その場合は、可能な限り培養時には**器具を使わない**ことで回避できることが多い。



- 藻類の教材化についても、**植物の栽培と同じ**考え方や、**微細で大量に存在する**という特徴を活かすと、**化学実験のように均一条件下での実験**も可能であるので、**多種多様な教材化**ができる。



謝辞

- 本研修をはじめ，生研大阪の活動は2022年度河川基金助成（助成番号2022-6111-007）研究題目「5,000人の児童・生徒による大阪の河川環境調査とその評価」，並びに，2023年度河川基金助成（助成番号2023-6111-006）研究題目「淀川・大和川を見る・観る・診るプロジェクト」の支援を受けて実施いたしました。
- 公益財団法人河川財団様のご支援に心から感謝いたします。



END

