

平成 19 年度 厚岸湖・別寒辺牛湿原学術研究奨励補助研究実績報告書

別寒辺牛湿原の微細藻類の系統保存

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

傳法 隆

別寒辺牛湿原の微細藻類の系統保存

要旨

最近人口の爆発的増加に伴い、様々な人間活動が直接的に自然環境を破壊している。また人間の化石燃料の消費によって引き起こされた地球温暖化はさらに気候変動を誘発し、これにより間接的に緑地を乾燥させ、砂漠化も引き起こしている。これらの現象は、地球規模で種の大量絶滅を引き起こし、現在ある種の多様性も急速に失われつつある。

北海道には湖沼や湿原が多く、未だ多くの自然が残されている。その中でも別寒辺牛湿原は日本第2位の広大な湿原で、別寒辺牛川中流域にある高層湿原にタンチョウの営巣地もあるため、1993年には厚岸湖とともにラムサール条約登録湿地となった貴重な湿原であるが、今後地球規模で起こっている環境汚染もしくは地球温暖化による何らかの影響を受ける可能性がある。種の絶滅が地球規模で進行している現状において、種の保全を図るためにまず把握しなければならないことは現時点でその地域にどのような種が存在し、どのような状態にあるかということである。しかしながら、種の保全と言っても、湿原では一般に肉眼で観察することができる水鳥、湿原植物、水生昆虫等に関心が集まり、肉眼で観察できないプランクトンのような小さな生物の消長にはほとんど関心が払われない傾向にあり、このままでは、プランクトンのような小さな生物は絶滅危惧種のレッドデータブックにも取り上げられることなく、人知れず失われていっても分からない。そこで、本研究では別寒辺牛湿原並びに周辺河川に生息する淡水微細藻類を採集し、まず人工合成培地を用いて単藻培養することによって、種の系統保存を図り、次にこれを用いて当地の淡水微細藻類相を同定し、記載することを目的とした。

結果として、別寒辺牛湿原並びに周辺河川から珪藻類 13 属 25 種、緑虫藻類 1 属 1 種、並びに緑藻類 9 属 18 種を単離・同定し、それらの単藻培養株を確立することに成功した。珪藻類では、別寒辺牛湿原の林道沿いの地塘や小川から好清水性種が採集され、反対に大別川から好汚濁性種が採集される傾向にあった。また、同様に緑藻類ホシミドロ目でもどこにでも普通に見られる *C. moniliferum* や *C. peracerosum-strigosum-littorale* 種複合体が大別川から得られ、その他のデスマッド類は林道沿いの池塘や小川から得られている。デスマッド類は、珪藻類の種のように生態的に詳しく研究されていないが、水質に適応した種類がそこで増えているのが明らかである。ミズゴケ湿原は水質が酸性で貧栄養であるが、そのような場所に平地の池沼では見られないデスマッド類が多く生息しているのなら、別寒辺牛湿原のような湿原が失われることにより最も影響を受ける淡水微細藻類はデスマッド類であるかも知れない。

はじめに

地質学的記録から明らかにされている過去の五回の大量絶滅に匹敵する種の絶滅が現在静かに進行している。種の絶滅は進化の自然なプロセスであるため、それ自体は致し方ないことであるが、問題なのは種の絶滅が新しい種の創成を伴うことなく、かつ異常な早さで進行していることにある。例えば、白亜紀末には、隕石の衝突により短期間の内に恐竜を始め多く動植物が絶滅してしまったが、それにより解放されたニッチ（生態的地位）に哺乳類や被子植物の種の新たな発展の道が開かれている。しかしながら、現代の種の絶滅は新たな種の創成を伴わないため、現在ある種の多様性も急速に失われつつあることが懸念されている。

このような種の大量絶滅がなぜ起きているのか？その原因が人間の活動にあることは言うまでもない。人口の増加に伴い、必然的に人間は衣食住の増産も図らなければならない。現在までに食糧、衣料もしくは好品として乱獲によって失われた多くのほ乳動物の種があることは知られているが、今もアマゾンでは日々熱帯雨林がどんどん切り開かれ、畑地になり、これにより生息地を奪われることによって主に未記載の多くの昆虫種が人に知られることなく消失している。同様に、世界各地で農地に使用されている殺虫剤や除草剤が分解されずに周囲の水や土壌を汚染していることから、そこに生息している生物の生存が危ぶまれているし、また工場や自動車から排出される硫酸化物や窒素酸化物による大気汚染物質が雨に溶けて硫酸や硝酸となり、酸性雨として、実際に湖水の中和力の低い北欧やカナダの湖沼の水生生物の死滅を引き起こしている。さらに、人が持ち込んだ外来種のために、その地域の安定していた生態系が乱され、新たに生じた生物間相互作用により、本来生息していた固有種が絶滅に瀕していることが島嶼においてしばしば報告されている。このように、人による乱獲、生息地の破壊や汚染、並びに生態系の攪乱が現代の種の大量絶滅の最大の原因であると考えられる。

日本では昔から多くの湿地や干潟を埋め立て、田畑とし、食料を生産することが至上の命題であった。しかしながら、減反により田畑が住宅地へと変貌している今、都市部では周囲に辛うじて残っていた湿地の多くは既に失われてしまった。幸いなことに、北海道にはまだ自然の湿原が多く残っている。別寒辺牛湿原は、日本最大の湿原である釧路湿原の東方にある総面積 10,825 ヘクタールの日本第2位の広大な湿原である。湿原の大部分はハンノキ林とヨシ、スゲ類からなる低層湿地であるが、別寒辺牛川中流域にある高層湿原にはタンチョウの営巣地があるため、1993年には厚岸湖とともにラムサール条約登録湿地となっている。現在厚岸町により湿地の保全が図られているため、湿地が埋め立てられ、放牧地に変えられることはないが、地球規模で起こっている環境汚染もしくは地球温暖化による影響が将来起こらないとは限らない。

種の絶滅が地球規模で進行している現状において、種の保全を図るためにまず把握しなければならないことは現時点でその地域にどのような種が存在し、どのような状

態にあるかということである。しかしながら、種の保全と言っても湿原では、一般に肉眼で観察することができる水鳥、湿原植物、水生昆虫等に関心が集まり、肉眼で観察できないプランクトンのような小さな生物の消長にはほとんど関心が払われない傾向にある。このままでは、プランクトンのような小さな生物は絶滅危惧種のレッドデータブックにも取り上げられることなく、人知れず失われていっても分からない。そこで、本研究では別寒辺牛湿原並びに周辺河川に生息する淡水微細藻類を採集し、まず人工合成培地を用いて単藻培養することによって、種の系統保存を図る。次に、これを用いて当地の淡水微細藻類相を同定し、記載することを目的とする。

材料と方法

採集地点と採集方法

別寒辺牛湿原における淡水微細藻類の採集は、2007年7月12日(予備調査)、8月28日、9月26日及び11月2日に行った。図1に採集地点を示す。別寒辺牛湿原に入るには林道から自動車で接近するか、もしくは別寒辺牛川、トライベツ川及びチャンベツ川を船外機付きのボートで遡上するかしなければならない。ボートを使用すれば、採集しながら湿原の中央部に接近できる利点があるが、今回の採集は一人で行わなければならなかったことから、安全を考慮し、自動車でパイロットフォレスト1号沿いに湿地に進入した。パイロットフォレスト1号から分岐する林道は全て進入禁止だったため、図1から分かるように、残念ながら別寒辺牛湿原の外縁部からしか微細藻類を採集することができなかった。分岐する林道を徒歩で進入しなかったのは、別寒辺牛湿原にはヒグマが多く生息しているからである。別寒辺牛湿原の中、下流域を流れる河川には藻類が付着できる基質(岩石、小石、水草など)がほとんどない状態であり、また池沼もないため、調査当初採集地点を選定するのに苦慮した。予備調査の結果、できるだけ生育環境が異なる場所から採集することを考慮して、別寒辺牛川中流域(No.2:別寒辺牛川橋付近のカヌー出発点付近)から始め、支流のビッチィ川(No.3)、パイロットフォレスト1号沿いの池塘(No.4, No.5:林道によって流れを堰き止められた水たまり)、小川(No.6:小さな湧き水の流れ)、別寒辺牛川上流域(No.7)の順番に回り、最後に大別川(No.1:大別川橋付近)で採集することとした。

一般に、河川や池沼ではベントス性淡水藻類は水底の石や泥の表面、及び水生植物の葉や茎の部分に付着している。そこで、石の表面に付着している藻類は石を水中からバット内に取り出し、表面に付着した藻類をスポイトで少量の水をかけながら歯ブラシでこすり落とす方法を用いた。落葉や泥の表面にいる藻類は、大きめの口の開いた大きいピペットで直接採集した。水生植物等に付着している藻類はビニール袋に入れ、水と共に激しく攪拌することによって分離した。湿原の池塘では当初はプランクトンネットを用いて採集する予定だったが、池塘No.4とNo.5は水深が浅く、水草

も繁茂していたため、プランクトンネットでの採集は行わなかった。後で微細藻類の培養に用いる生きた微細藻類が入った試料は 50ml 容のディスポーザブルプラスチック遠心管に数本約 45ml ずつ分取し、その他に試料の長期保存のために 100ml 容のポリ瓶に約 80ml の試料を入れ、現地にて 8ml グルタルアルデヒド溶液 (25%) を加えて固定した。

淡水微細藻類培養培地の調製法

淡水微細藻類培養用培地として、人工合成培地である C 培地, C_{Si} 培地, CA 培地及び AF6 培地を調製し、主に C 培地は接合藻類 (緑藻綱ホシミドロ目) に、C_{Si} 培地は珪藻類に、CA 培地は緑藻類 (接合藻類も含む) に、AF6 培地は緑色鞭毛藻類 (緑虫藻綱) の培養に使用した。培地調製法を、C 培地を例に以下に述べる。

まず始めに、培地を調製する前にそれぞれの試薬を高濃度で溶解したストック液を準備しなければならない。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及び硫酸マグネシウムは、ストック液の容量を 500ml とした場合 5g ずつ溶解する (1ml=10mg 液 : 1ml 当たり 10mg の試薬が溶解している)。ビタミン B₁₂、ビオチン及びチアミンはそれぞれ 1ml 当たり 10 μg, 10 μg 及び 100 μg のストック液を調製する (これらのストック液は濃度が非常に低いため、試薬を秤量しやすいように、さらに高濃度の溶液から希釈することによって調製すると楽に作ることができる)。PIV 微量金属混液 500ml を調製するためには、同じようにそれぞれの高濃度液を準備した後 (高濃度液を調製するのは試薬量が多くなることにより、正確に秤量できるため)、蒸留水にキレート剤である Na₂EDTA を 500mg 溶解してから、それぞれの高濃度液から塩化第二鉄 98mg (1ml=10mg 液の場合 9.8ml を加える)、塩化マンガン 18mg (1ml=10mg 液 : 1.8ml)、塩化亜鉛 11mg (1ml=10mg 液 : 1.1ml)、塩化コバルト 2mg (1ml=1mg 液の場合 2ml を加える) 及びモリブデン酸ナトリウム 1.25mg (1ml=1mg 液 : 1.25ml) を順次加え、最終的に 500ml になるようにメスアップする。それぞれのストック液には、保存のため防腐剤 (o-フルオロトルエン : 1,2-ジクロロエタン : 塩化 n-ブチルを 1 : 1 : 3 の割合で混合した物) を数滴滴下しておく。

1L の C 培地を調製する場合、約 800ml の蒸留水にメスピペットもしくはマイクロピペッターを用いて、スターラーで攪拌しながら、表 2 の試薬を順次混合する (表 2 の試薬の順番で、それぞれ 15ml, 10ml, 5ml, 4ml, 10 μl, 10 μl, 100 μl, 3ml 加える)。最後に、pH を一定に保つために緩衝剤 (バッファー) を加え、ビーカーの目盛で凡そ 900ml に合わせた後 pH を 7.5 に調整し、さらに蒸留水を加え 1L にメスアップする。これを自動分注器を用いて、20ml 容の培養試験管に 10ml ずつ分注し、スクリーキャップを少し緩めた状態でオートクレーブにより 15 分間滅菌後 (防腐剤を気散させるため)、キャップを締めてから冷暗所に保存する。

淡水微細藻類の分離法

生きた試料は研究室に持ち帰り、すぐにディスポーザブルプラスチック遠心管からプラスチックシャーレに移し、室温蛍光灯照明下で予備培養した。できるだけ期間を置かずに、模式図に示すようなピペット洗浄法（図2）もしくはサンプル稀釈法（図3）により淡水微細藻類を単離した。以下にそれぞれの分離法を簡単に述べる。

(1) ピペット洗浄法

あらかじめクリーンベンチ内に実体顕微鏡、滅菌処理したウェルスライドグラス、パスツールピペット、培地入り培養試験管及び24穴セルプレートセットし、殺菌灯と高性能フィルターを備えた通風装置によってベンチ内を無菌環境にしておく。その間、倒立顕微鏡でプラスチックシャーレ内の微細藻を観察し、目的の藻体をアルコールランプの炎で先端を細く伸ばした綿栓付きパスツールピペット（滅菌済）を用いて、ガラスシャーレに入れた液体培地入りの時計皿（滅菌済）に1~10個体ずつ分離する（この際他藻やゴミなどが混入する）。これをクリーンベンチ内に持ち込み、実体顕微鏡下で同じように先端を細く伸ばしたパスツールピペットで液体培地を入れたウェルスライドグラスに移す。ウェル内の培地中でピペッティング操作（ピペットで藻体を吸ったり、吐き出したりする操作）を繰り返すことにより藻体を洗いながら、となりのウェルに移動させる。この操作を5回繰り返す。最後に、吸い上げた藻体を培地入りの培養試験管もしくはウェルに培地を入れたセルプレートに移す。培養試験管に植え付けた藻体はそのまま培養するが、24穴セルプレートに植え付けた藻体は二週間ほど前培養した後、倒立顕微鏡で観察して目的の藻体が単藻で増えているかどうかを確認する。確認後、これをクリーンベンチ内に持ち込み、実体顕微鏡下でパスツールピペットにて液体培地を入れた培養試験管に移し、本培養する。

培養は、室温（18℃から28℃まで）で14時間明期：10時間暗期の日長条件で行った。培養株番号は、藻体を培養試験管に植え付けた段階で与えている。

(2) サンプル稀釈法

この方法は菌類を分離するときによく使われる方法である。

まず始めに、あらかじめ寒天プレートを作成しておく。藻類培養培地を200ml容の三角フラスコに120ml入れ、これに寒天を0.84g（0.7%）加え、5分間オートクレーブし、寒天が固まりはじめる前にクリーンベンチ内でプラスチックシャーレ4枚に素早く流し込む。これらを十分に冷却するまでふたをせずにクリーンベンチ内に放置し、冷却後ふたをして使用するまで無菌的に保存する。次に、予備培養しているプラスチックシャーレの中でパスツールピペットを用いてピペッティング操作を行い、藻類を懸濁させ、この懸濁液を約1ml分取し、室内で滅菌した10ml液体培地入りの培養試験管に入れる（これを1/10倍液とする）。これを攪拌後クリーンベンチ内で持ち込み、無菌条件下で同じようにこの稀釈懸濁液を約1ml分取し、別の培養試験管に移す操作を繰り返し、1/100倍液、1/1000倍液、1/10000倍液及び1/100000倍液の稀釈液を調製する。1/100~1/100000倍の稀釈液からそれぞれ約1mlずつ分取し、別々の寒天プ

プレートに入れ、寒天プレートを静かに傾けながら、稀釈液を寒天表面全体に広める。余分な液をパスツールペットで取り除いた後、ラボフィルムで密封して倒置（もしくは正置）状態で一ヶ月間室温にて前々培養する。一ヶ月後、形成されたコロニーを無菌条件下実体顕微鏡でできるだけ高倍率で観察し、コロニーの色と形、もしくはもし藻体の形が実体顕微鏡で見えるならその外観から判断してできるだけ重複しないようにまた他藻が混入しないように注意しながら、単一コロニーをウェルに培地を入れたセルプレートに移し、ラボフィルムで密封後室温 14 時間明期：10 時間暗期の日長条件で 2 週間前培養する。2 週間後、倒立顕微鏡で観察してどのような種類の藻体が増えているか、また単藻で増殖しているか確認する。確認後、セルプレートをクリーンベンチ内に持ち込み、パスツールピペットで液体培地を入れた培養試験管に移し、同じ条件下で本培養する。(1)と同様に、培養株番号は、藻体を培養試験管に植え付けた段階で与えている。

珪藻類の被殻洗浄法とプレパラート作成法

珪藻類の被殻を洗浄するために、培養試験管から珪藻を PYREX 目盛付き 10ml 容の遠心管に取り、3000rpm で 3 分遠心して上澄みを捨て、容量を 2ml にする。これに市販の配水管洗浄剤（パイプユニッシュ）1 乃至 2ml を藻体量に応じて加え、時々攪拌しながら 20～30 分放置する。処理後蒸留水を 10ml の目盛まで加え、攪拌後 3000rpm で 3 分遠心分離する。遠心後、白色化した珪藻の被殻試料を吸い込まないように静かに 1～2ml の目盛まで上澄みを捨て、新たに蒸留水を 8ml の目盛まで加え、攪拌後再度遠心分離する。この操作を 5 回繰り返した後、試料量に応じて被殻試料を 1～3ml の蒸留水に懸濁して 6ml 容のスクリー管瓶に保存する。

珪藻類の被殻プレパラートを作成するために、22mm 角のきれいなカバーガラス（JIS No.1）をホットプレート（約 95℃）上に置き、洗浄済みの珪藻殻の懸濁液を 1～2 滴滴下する。この水分が蒸発する前に、被殻試料をカバーガラス上に均一に分散させるためエタノールを 1～2 滴滴下する。水分蒸発後もしばらく加熱処理し、試料を完全に乾燥させる。次に、屈折率の高い封入剤であるプリューラックス（マウントメディア）をきれいなスライドガラス上に竹串で 1 滴滴下し、これにカバーガラスの試料面を下に向けて被せ、密着させる。これをホットプレート上に移し、封入剤から気泡が出なくなるまで加熱し、泡立たなくなったら実験台上に戻して、上からピンセットで軽く押さえ平坦にし、カバーガラスの位置を調整後、培養株番号と日付を書いたラベルを貼って珪藻殻プレパラートとする。

微細藻類の観察と種の同定

本研究では、微細藻類の種の同定の試料として単藻培養株を用いた。単藻培養株からスライドガラス上に藻体懸濁液を一滴取り、すぐに藻体がつぶれないように大きめのカバーガラス（24×36mm）をかけて光学顕微鏡（カートン CS-T15）を用いて、倍

率 150 倍から 1500 倍の間で観察した。緑藻類では、細胞の形態と大きさ、群体の形態と大きさ、運動性の有無、鞭毛の数、葉緑体のピレノイドの配列状態や数及び細胞壁の模様や条線の有無などを種の判定の材料とした。珪藻類では、その他に被殻のプレパラートを観察して、殻面の形態、背線の有無、中心区の有無、軸域の幅、条線や肋線の数及び遊離点の有無と数などを観察し、種の判定を行った。顕微鏡写真は、ニコン COOLPIX4500 で倍率 40 倍から 400 倍の間で撮影した。

結果と考察

別寒辺牛湿原の物理化学的性状

表 1 に淡水藻類採集地点における 2007 年 9 月 25 日に計測した水温 (WT), pH, 電気伝導度 (EC) 及び溶存酸素濃度 (DO) の結果を示した。水温は採集地点間ではほとんど変化がなかったが、pH は湿原内の池塘 No. 4, 小川 (No. 6), 別寒辺牛川上流域 (No. 7) でやや酸性側に低下していた。電気伝導度は大別川 (No. 1) で最も高く、中流域の別寒辺牛川 (No. 2) やビッチィ川 (No. 3) がそれに続き、パイロットフォレスト 1 号沿いの湿原内では河川、池塘とも低い値を示した。電気伝導度は水中に溶存しているイオンの多寡を示しているため、大別川では栄養度はある程度保たれているが、別寒辺牛湿原内はかなり低く、貧栄養の状態にあると推定できる。溶存酸素濃度は付着藻類の光合成活性の影響を受けるため、日中藻類の生産力が高くなると上昇し、反対に夜間には呼吸により消費されるため減少する傾向がある。これによると、大別川と池塘 No. 4 で日中生産力が高くなっていることになるが、池塘 No. 4 では pH が酸性側に低下しているため、この推定と矛盾している。

培養株を用いた淡水微細藻類の種の同定

本研究では、微細藻類の種の同定の試料として単藻増殖させた培養株を用いた。なぜならば、単藻培養株は単一細胞もしくは単一群体から増殖させているため、同一の遺伝子を持ったクローンだからである。これを種の同定に用いると、野外からの固定サンプルでは得られない均質な試料を一度に多量に観察することができる。同時に、クローン内での形や大きさの変異の程度や同一クローンをいろいろな角度から観察できることなど、野外からの固定サンプルを用いるときよりもより多くの情報を得ることができる。また、接合藻類の種では、同定のために接合型や接合子の形態を観察しなければならない種があるが、野外のサンプルから栄養細胞と同時にそれらを得ることはめったにない。しかしながら、培養株なら増殖用培地から窒素を含まない成熟誘導培地 (MI 培地) に移すことで容易に成熟を誘導することが可能である。ただし、接合藻類の接合のタイプには、ホモタリズム (雌雄同源性) とヘテロタリズム (雌雄異源性) の二型があり、動物の雌雄の性に相当するプラスとマイナスの配偶子が合体することにより接合子を形成している。ホモタリズムの場合、一つの親細胞が分裂す

ることによりそれがプラスとマイナスのどちらであっても、プラスとマイナスの娘細胞に分裂するため、容易に接合子を観察することができるが、ヘテロタリズムの場合、プラスの親細胞が分裂すると2個体のプラスの娘細胞になり、反対にマイナスの親細胞が分裂すると2個体のマイナスの娘細胞になるため、1つの培養株内で接合を誘導することができず、別の培養株から接合相手を捜し出し、交配する必要がある。また、その他に単為生殖という繁殖方法もあるが、これはホモタリズムと同様に、1つの培養株だけで休眠胞子（接合していないので接合子とは呼べない）を得ることができる。さらに有利な点としては、もし光学顕微鏡を用いた観察で同定ができなかった場合でも、後で培養株からDNAを抽出して、核リボソームDNAのsmallサブユニット領域や葉緑体のルビスコ遺伝子の塩基配列を調べ、同定することができる点である。

残念ながら、全てが有利である訳ではない。第一に、培養株を用いるということは微細藻類を単離し単藻で増殖させる必要があるが、これはかなりの労力を要することである。次に、培養自体が難しい種類もある。例えば、スリレラ属のような藻体の大きい珪藻類は予備培養のプラスチックシャーレ中で見つけることも、培養試験管に単離することも藻体が大きいので簡単なのだが、増殖してくることは全くなかった。恐らく、藻体の大きい種は成長速度が遅いので細菌類の増殖に負けてしまうか（藻体が大きいので細菌類も多く付着している）、培養試験管では培地量が足りなくなるか、もしくは培地に何か別の成分を補う必要があるのであろう。細胞の生理活性が高ければ、藻類は細胞表面から抗菌作用物質を出し、細菌類の繁殖を抑えることができるので、小さく増殖が早い藻体ほど培養株を確立しやすい。これは接合藻類のミカヅキモ属にも当てはまり、大きい種は簡単に増殖させることがなかなかできなかった。また、群体を形成する種は群体自体が大きくても一つ一つの細胞は小さく、増殖が早いことから比較的培養株を確立しやすかったが、珪藻類のバキラリア属の種だけはすべり運動により南京玉すだれのようにさかんに伸び縮みをし、藻体表面に多くの付着物をつけていたため、できるだけ藻体表面がきれいなものを選択して単離しても増殖してこなかった。反対に、藻体が小さくなればなるほど、見つけることも単離することも難しくなり、ピペッティング操作中に見失ってしまうことが頻繁に起こる。そこで、本研究ではピペット洗浄法では容易に単離できない小さな藻体を得るために、菌類の株分離に使われているサンプル希釈法を用いた。この方法では、何か増殖して欲しい藻体があってもその藻体を選んで増殖させることができず、もっぱら現存量が多い藻体が増えてきてコロニーを形成するという欠点があるが、根気良く寒天プレートに播種していると、偶然に思いがけない藻体を分離できる可能性がある。本研究でも、もっぱら緑藻類のクロレラ属とクロロコックム属、珪藻類の藻体の小さい種類が増殖してきたが、浮遊しているためにその存在に気がつかなかった接合藻類チリモ科の *Staurastrum varians* を分離することに成功した。

なお、本研究の分類体系は Bourrelly (1966-1970) 並びに秋山・山岸 (1984-1998) に従っている。

珪藻類

表 3 に、別寒辺牛湿原から単離された珪藻類の種名と培養株番号を示す。13 属 25 種しか分離できなかつたが、別寒辺牛湿原の珪藻類の種数が特に少ないという訳ではなく、別寒辺牛湿原を流れる中流域の河川に付着基質となるようなものが特に少なかつたことで採集できなかつたことと、せつかく単離しても藻体の大きい珪藻種が増殖して来なかつたことがその原因である。少なくとも他にスリレラ属、ディプロネイス属、キマトプレウラ属、キンベラ属及びバキラリア属の種が存在していた。

珪藻類は、正面から見た形態（殻面観という）の違いにより、大きく中心珪藻亜綱と羽状珪藻亜綱に分けられる。字面から分かるように、中心珪藻亜綱の種は正面から見ると円形をしていて、羽状珪藻亜綱の種は大雑把に言うと羽形をしている。図 4 の写真 1 と 2 が中心珪藻亜綱の種で、その他の写真が羽状珪藻亜綱の種である。

写真 1 では、*Cyclotella meneghiniana* の殻面観と帯面観（側面から見た形態）の両方が同時に見ることができ。正面から見ると丸く、側面から見ると太鼓のような形をしている。今回単離された唯一の好汚濁性種で、大別川より単離された。写真 2 は、*Melosira varians* の帯面観で、細胞が連結して群体を形成している。和名はチャヅヅケイソウで広適応性種ではあるが、他のプランクトンが生育できないほどの汚濁水域にも出現すると言われている。今回大きさから区別できる 4 系統の培養株が大別川より単離された（表 2 参照）。写真 3 は、オビケイソウの仲間である *Fragilaria virescens* の帯面観で、帯状の群体である。殻面観は次の写真 4 のような細長い形を形成している。写真 4 は、*Synedra ulna* の殻面観で、和名はマルクビハリケイソウと言う。これらのフラギラリア属とシネドラ属の種が、固定試料から作成された珪藻殻プレパラート内に混在していると属の判別が難しいが、本研究のように培養株を使用していると属の判断に迷うことはない。写真 5 と 6 は、タベラリア属の 2 種である。神社でおはらいに使う幣に似ていることからヌサガタケイソウと呼ばれ、腐食性種、貧栄養性種である。池塘 No. 4 より単離された。写真 7 は、エウノチア属の種の帯面観で、フラギラリア属のように長くはないが平べったい帯状の群体を形成している。写真 8 と 9 に珪藻殻プレパラートの殻面観を示しているが、細長い芋虫のような形態である。自然状態ではこのような殻面観を見ることは難しいので、帯面観を見ただけではフラギラリア属の仲間かと思うかもしれない。これらは共に好清水性種である。林道内の小川（No. 6）と林の中から大別川へ流れ込んでいた流水路の中から単離された。写真 10 と 11 に、ピンヌラリア属の種を示す。写真 10 では殻面観と帯面観の両方を同時に見ることができ。これらは殻面中央にはっきりした背線を持ち、その両側に肋骨のように太い細管模様（肋線）がある。写真 12 は一見エウノチア属の群体のように見えるが、殻面観を見ると全く異なるネイジウム属の種である（写真 13）。この属は殻面にある背線が中心部で反対側に曲がっているのが特徴である。写真 14～16 は、スタウロネイス属の 2 種である。殻面観は類似しているが、帯面観は *Stauroneis acuta*

は群体（4～6細胞が連結したものが多い）で、*S. phoenicenteron* は単細胞ある。殻面の模様のない部分が十字形をしているのが特徴で、和名もジュウジケイソウと言う。写真 17 と 18 は、ニッチア属の 2 種である。珪藻殻プレパラート写真を示していないが、殻面の片側に外縁に沿って縦に走る隆起線（背線）があり、それに沿って竜骨点という細点列が見える。和名をササノハケイソウというが、サンプル稀釈法を用いると珪藻類ではもっぱらこの種類がよく増殖してきた。

緑虫藻類

緑虫藻類ユウグレナ目の種は鞭毛を持ち、遊泳することができる。図 5 写真 1 は、ミドリムシ（ユウグレナ）属の種ではなく、ファクス属の種である。うちわのような形をしていることから、和名をウチワヒゲムシと言う。藻体の長い突起状の部分が鞭毛なのではなく、その反対側中央やや窪んだ部分から 1 本の長い鞭毛が伸びている。赤紅色の色素は眼点で緑虫藻類では鞭毛の基部近くにあるが、光の受容器であり、これを持つことによって正の走光性を示す。細胞中の白色の構造物はパラミロンで同化産物の結晶体であり、その形や数は属、種によって一定しているので重要な分類形質である。今回別寒辺牛湿原の池塘 No. 4 から単離された。

緑藻類

表 4 に、別寒辺牛湿原から単離された緑藻類の種名と培養株番号を示す。9 属 18 種分離されたが、そのほとんどが接合藻類（緑藻綱ホシミドロ目）の種であり、特にミカヅキモ属の種が多かった。接合藻類の内ホシミドロ科の種は 1 細胞列の分岐しない糸状体であるが、サヤマメモ科とチリモ科の種の多くは単細胞性であることから、これらを合わせてデスミッド（鼓藻）類と呼ぶならわしがある。それらの生育環境は、平地の池沼、湖や水田にも見られるが、水が酸性のミズゴケ湿原の池沼に多く生息していることが知られている。形態がよく似たものも多く、しかも細胞の形態に変異性があるので、培養株を用いた種の同定が必要である。

図 5 写真 2 は、オオヒゲマワリ（ボルボックス）目クラミドモナス科の種である。別寒辺牛湿原の池塘 No.5 から得られた試料内を頂端の等長の 2 本の鞭毛を使って高速で泳ぎ回っていた。写真は、環境条件が悪くなった時に遊泳細胞が鞭毛を失い、細胞の周りに寒天質状の物質を分泌し細胞分裂後非運動性になったもので、パルメラ状群体と呼ばれている（写真左の分裂前の藻体には短い鞭毛が残っていた）。写真 3 と 4 は、ホシミドロ目ホシミドロ科の 2 種である。葉緑体が板状のものはモウゲオチア属の種で、リボン状のものがスピロギラ属の種である。これらの種を正確に同定するには、接合型を観察する必要があるが、スピロギラ属は記載種が約 500 種あるのでかなり難しい。写真 5 は、サヤマメモ科の種で *Gonatozygon kinahani* v. *kinahani* である。緩く結合した糸状体で、細胞は離れてばらばらになりやすい。別寒辺牛湿原の林道沿いの池塘 No. 4 と 5 から採集されている。次の写真 6～16 は、全てチリモ科ミカヅキモ

属の種である。写真 6~8 は *Closterium ehrenbergii* で細胞が太めで、大きく湾曲している。ピレノイドも葉緑体内で分散しているが、これら 3 系統の単藻培養株は大きさ、形態に若干の違いが見られる。まだ交配試験を行っていないが、これらは別の生物学的種に属する可能性もある。これらは、林道沿いの池塘 No. 5 と小川 (No. 6) より採集されている。写真 9 は *C. lanceolatum* である。内側縁はほとんど直線で、細胞の長さは幅の 7~8 倍、細胞壁は無色平滑である。林道沿いの小川より採集された。写真 10 は *C. lineatum v. lineatum* である。大型種で細長くてあまり湾曲せず、細胞の長さは幅の約 16 倍ある。細胞壁は褐色、ピレノイドは半細胞に 11~13 個でほぼ一列に並んでいる。林道沿いの池塘 No. 5 より採集された。写真 11 は *C. littorale* である。小型種でわずかに湾曲し、細胞の長さは幅の約 10~11 倍である。細胞壁は無色平滑、ピレノイドは半細胞に 3~6 個でほぼ一列に並んでいる。これは大別川 (No. 1) より採集された。写真 12 は *C. macilentum v. macilentum* である。大型種で細長くあまり湾曲せず、細胞の長さは幅の約 25 倍、細胞壁は無色で帯、条線がある。林道沿いの池塘 No. 5 より採集されている。写真 13 と 14 は *C. moniliferum* の 2 変種である。写真 13 が変種 *moniliferum* でやや小さく、大きいピレノイドが長軸に沿って一列に配列しているのに対し、写真 14 の変種 *submoniliferum* は少し大きくて、ピレノイドが若干分散する傾向にある。これらの変種は *C. ehrenbergii* と形態が類似しているが、大きさとピレノイドの分散状態で種の判別をする。実は、これらは近縁種で *C. moniliferum-ehrenbergii* 種複合体として扱われている。林道沿いの池塘 No. 5 にも見られるが、大別川と林の中から大別川へ流れ込んでいた流水路の中から主に単離されている。写真 12 は *C. rostratum v. rostratum* で、細胞中央が紡錘形をなした特徴的な形態をしており、細胞壁に条線がある。大別川から採集されている。写真 16 は *C. strigosum* で、小型種である。*C. littorale* と形態が似ているが、やや細めで中央部が膨れることなく内側縁は凹形を示す。これも大別川より単離されている。実は、これらも近縁種で *C. peracerosum-strigosum-littrale* 種複合体として扱われている。写真 17 は *Desmidium swartzii* である。1 細胞列の糸状体であるが、少しねじれている。一個一個の細胞にバラバラにすることができ、写真にあるように頂面観は三角形で角は丸い。林道内の池塘 No. 5 から採集されている。写真 18 は *Staurastrum variens f. truncata* で、頂面観と側面観を同時に見ることができる。細胞壁には角の部分から環状に並ぶ細点の列がある。これも林道沿いの池塘 No. 5 から単離された。

このように、どこに採集に行っても普通に見られる *C. moniliferum* と *C. peracerosum-strigosum-littrale* 種複合体が大別川から得られ、その他のデスマッド類は *C. rostratum* を除き別寒辺牛湿原内の林道沿いの池塘や小川から得られている。デスマッド類は、珪藻類の種のように好清水性種、広適応性種及び好汚濁性種、もしくは好酸性種、中性種及び好アルカリ性種のように分けられるほど生態的に研究されていないが、水質に適応した種類がそこで増えているのが明らかである。ミズゴケ湿原は水質が酸性であり、そのような場所に平地の池沼では見られないデスマッド類が多く

生息しているのなら，別寒辺牛湿原のような湿原が失われることにより最も影響を受ける淡水微細藻類はデスミッド類であるかも知れない。

参考文献

- 市村輝宜. (2000) ツヅミモ類の世界. 国立科学博物館, 東京.
- 田中正明. (2002) 日本淡水産動植物プランクトン図鑑. 名古屋大学出版会, 名古屋
- 南雲保・出井雅彦・長田敬五. (2000) 珪藻の世界. 国立科学博物館, 東京.
- 濱田仁. (1990) 接合藻の生物学. 濱田仁 (自費出版), 富山.
- 廣瀬弘幸・山岸高旺. (1977) 日本淡水藻図鑑. 内田老鶴圃, 東京.
- 森下雅子. (1991) 川と湖の博物館 1. 植物プランクトン. 山海堂, 東京.
- 山岸高旺. (1998) 淡水藻類写真集ガイドブック. 内田老鶴圃, 東京.
- 山岸高旺. (1999) 淡水藻類入門. 内田老鶴圃, 東京.
- 山岸高旺. (2007) 淡水藻類 淡水産藻類属総覧. 内田老鶴圃, 東京.
- 鷺谷いづみ・矢原徹一. (1996) 保全生態学入門. 文一総合出版, 東京.
- 渡辺仁治. (2005) 淡水珪藻生態図鑑. 内田老鶴圃, 東京.
- Richard Frankham, Jonahan D. Ballou & David A. Briscoe (西田睦監訳). (2007) 保全遺伝学入門. 文一総合出版, 東京.

謝辞

別寒辺牛湿原での淡水微細藻類の採集にあたりお忙しい中わざわざ来て協力して頂き，さらに採集中ヒグマの接近を警戒して下さいました阿寒湖畔エコミュージアムマリモ研究室の若菜勇博士に心から感謝申し上げます。また，資料や地形図を提供して下さいました厚岸水鳥観察館の渋谷辰生さんの御好意にも感謝申し上げます。



図1 別寒辺牛湿原における淡水微細藻類採集地点

	WT*	pH	EC *	DO*
①大別川	11.5	7.44	17.37	15.83
②別寒辺牛川中流	12.4	7.04	9.93	7.01
③ビッチィ川	11.6	7.03	9.81	8.69
④池塘	11.7	6.80	5.63	12.12
⑤池塘	12.8	7.19	7.22	6.14
⑥小川	12.2	6.74	6.68	8.50
⑦別寒辺牛川上流	11.6	6.64	7.98	8.90

表1 別寒辺牛湿原とその周辺河川の物理化学的性状

* WT:水温(°C), EC;電気伝導度(mS/m), 溶存酸素濃度(mg/L)
2007年9月25日計測

1) C培地

硝酸カルシウム	CaNO ₃ ·4H ₂ O	15mg
硝酸カリウム	KNO ₃	10mg
グリセロリン酸 ナトリウム	Na ₂ glyceroPO ₄ ·5H ₂ O	5mg
硫酸マグネシウム	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4mg
ビタミンB12	Vitamin B12	0.01 μg
ビオチン	Biotin	0.01 μg
チアミン	Thiamine HCl	1μg
PIV微量金属混液*	PIV metals	0.3ml
バッファー	Tris (hydroxy-methyl) aminomethane	50mg
蒸留水	D.W.	/100ml
	pH	7.5

2) C_{Si}培地(C培地に添加)

ケイ酸ナトリウム	Na ₂ SiO ₄ ·7H ₂ O	10mg
	pH	7.5

3) CA培地

硝酸カルシウム	CaNO ₃ ·4H ₂ O	2mg
硝酸カリウム	KNO ₃	10mg
硝酸アンモニウム	NH ₄ NO ₃	5mg
グリセロリン酸 ナトリウム	Na ₂ glyceroPO ₄ ·5H ₂ O	3mg
硫酸マグネシウム	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2mg
ビタミンB12	Vitamin B12	0.01 μg
ビオチン	Biotin	0.01 μg
チアミン	Thiamine HCl	1μg
PIV微量金属混液*	PIV metals	0.1ml
Fe液	Fe (as EDTA; 1:1 molar)	0.1ml
バッファー	HEPES	40mg
蒸留水	D.W.	/100ml
	pH	7.2

4) AF6培地

硝酸ナトリウム	NaNO ₃	14mg
硝酸アンモニウム	NH ₄ NO ₃	2.2mg
硫酸マグネシウム	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3mg
リン酸一カリウム	KH ₂ PO ₄	1mg
リン酸二カリウム	K ₂ HPO ₄	0.5mg
塩化カルシウム	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1mg
クエン酸鉄	Iron citrate	0.2mg
クエン酸	Citric acid	0.2mg
ビタミンB12	Vitamin B12	0.1μg
ビオチン	Biotin	0.2μg
チアミン	Thiamine HCl	1μg
ビタミンB6	Vitamin B6	0.1μg
PIV微量金属混液*	PIV metals	0.5ml
バッファー	MES	40mg
蒸留水	D.W.	/100ml
	pH	6.6

* PIV微量金属混液: 蒸留水100mlにNa₂EDTA100mgを溶解後、順次塩化第二鉄(19.6mg), 塩化マンガン(3.6mg), 塩化亜鉛(2.2mg), 塩化コバルト(0.4mg), モリブデン酸Na(0.25mg)を溶解させる。

表2 淡水微細藻類培養用培地

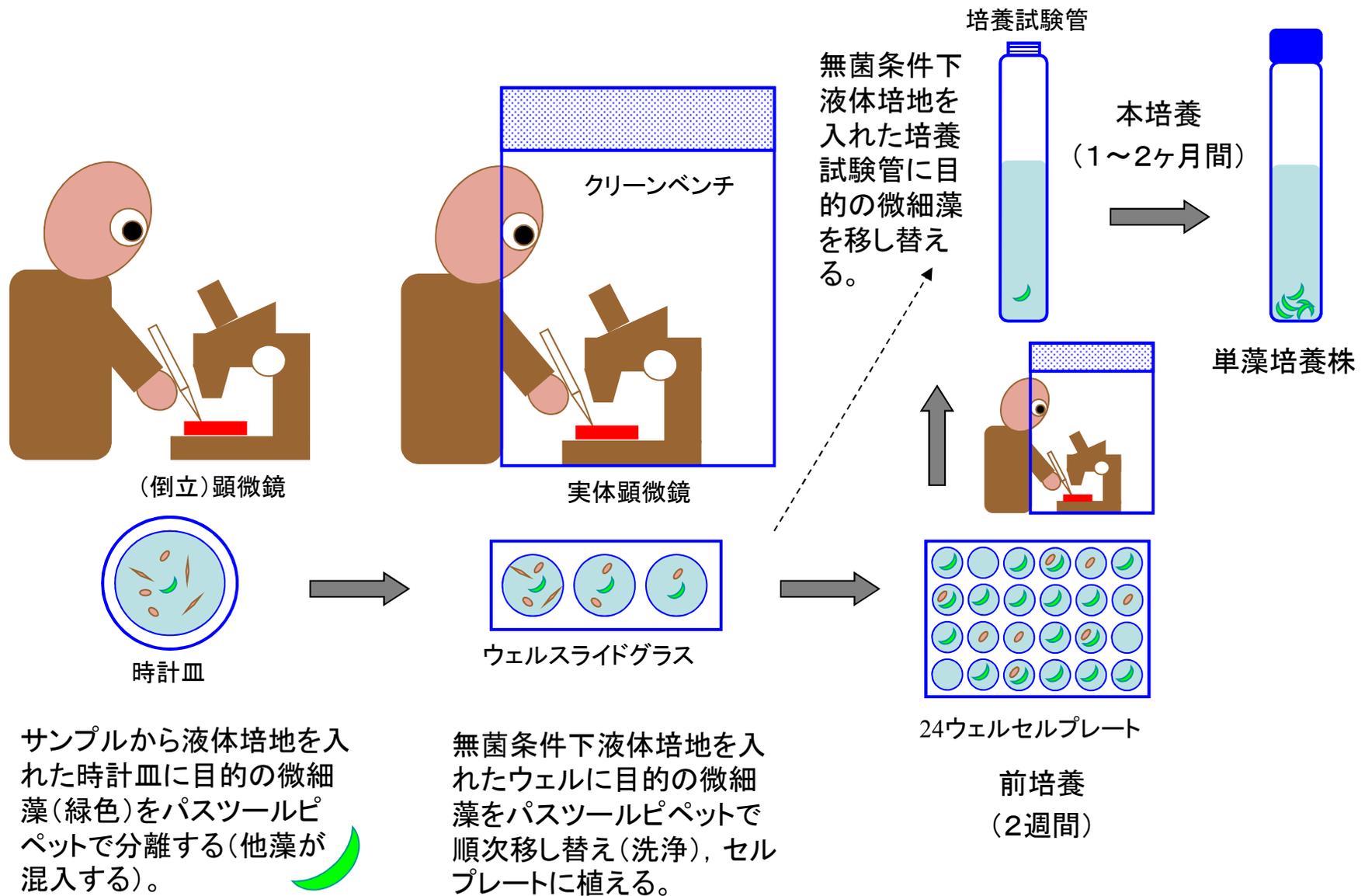


図2 ピペット洗浄法による微細藻類の分離方法

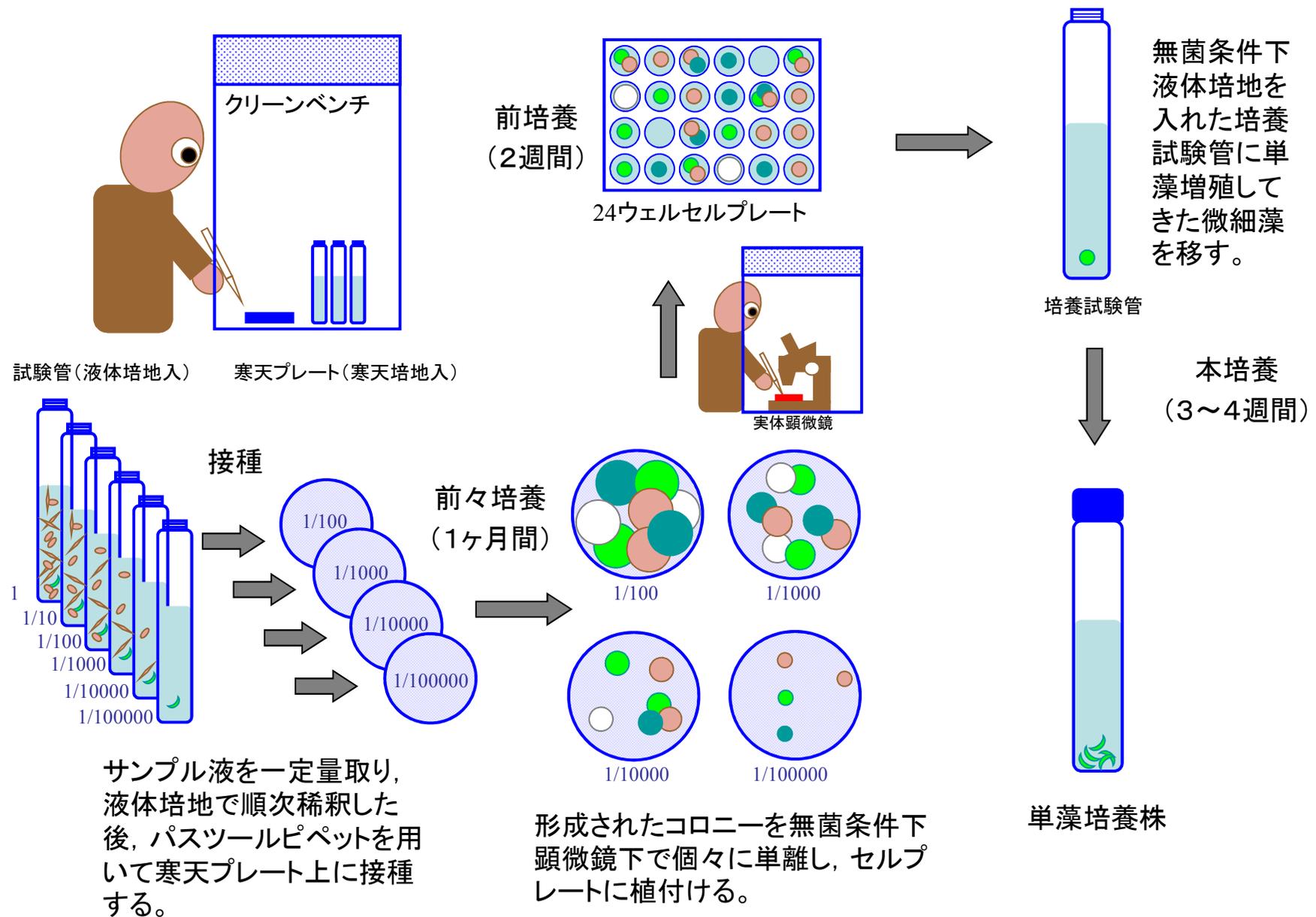
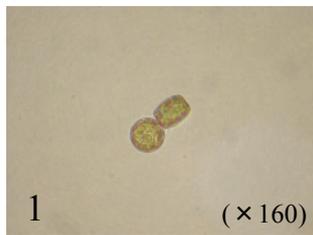


図3 サンプル希釈法による微細藻類の分離方法

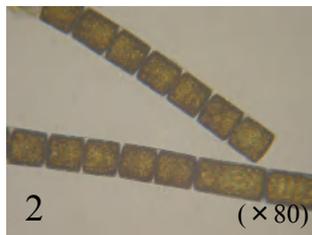
分類階級	種名	培養株No.
Chrysophyta 黄藻植物門		
Bacillariophyceae 珪藻綱		
Centrophycidae 中心珪藻亜綱		
Coccinodiscales コアミケイソウ目		
Coccinodiscaceae コアミケイソウ科		
<i>Aulacoseira italica</i> v. <i>tenuissima</i>	BKB-335, 336	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> v. <i>meneghiniana</i>	BKB-299*, 337**	
<i>Melosira varians</i>	BKB-9*, 49*, 50*, 168**, 235***, 236*, 300*, 301*, 307*, 308***, 318*, 331****	
Pennatophycidae 羽状珪藻亜綱		
Diatomales イタケイソウ目		
Diatomaceae イタケイソウ科		
<i>Fragilaria capucina</i> v. <i>vaucheriae</i>	BKB-319	
<i>Fragilaria virescens</i>	BKB-41*, 42*, 43*, 185*, 186*, 212*, 213**	
<i>Synedra minuscula</i>	BKB-312	
<i>Synedra rumpens</i> v. <i>familians</i>	BKB-339	
<i>Synedra ulna</i>	BKB-24	
<i>Tabellaria fenestrata</i>	BKB-134, 135	
<i>Tabellaria flocculosa</i>	BKB-33, 129, 140, 195, 268, 269	
Eunotiales エウノチア目		
Eunotiaceae エウノチア科		
<i>Euntia exigua</i> v. <i>exigua</i>	BKB-338	
<i>Eunotia formica</i> v. <i>formica</i>	BKB-198*, 249**	
<i>Eunotia pectinalis</i> v. <i>pectinalis</i>	BKB-246, 247	
Naviculales フナガタケイソウ目		
Naviculaceae フナガタケイソウ科		
<i>Encyonema minutum</i>	BKB-340	
<i>Navicula cryptocephala</i>	BKB-84	
<i>Pinnularia acrosphaeria</i> v. <i>acrosphaeria</i>	BKB-251	
<i>Pinnularia major</i> v. <i>major</i>	BKB-291	
<i>Pinnularia viridis</i>	BKB-169	
<i>Neidium iridis</i> v. <i>amphigomphus</i>	BKB-216	
<i>Stauroneis acuta</i>	BKB-209, 210, 286, 287, 289	
<i>Stauroneis phoenicenteron</i> v. <i>phoenicenteron</i>	BKB-149, 151, 152, 157, 172	
Nitzschiaceae ササノハケイソウ科		
<i>Nitzschia augustiforaminata</i>	BKB-323	
<i>Nitzschia obsoleta</i>	BKB-310	
<i>Nitzschia palea</i> v. <i>debilis</i>	BKB-67, 71, 334	
<i>Nitzschia vermicularis</i>	BKB-174	
不明種1	BKB-61, 311, 317, 329	

Bourelly (1966-1970) 並びに秋山・山岸 (1984-1998) の分類体系による。
アスタリスク(*)によって、同一形態種であっても大きさが異なるものがあることを示している。

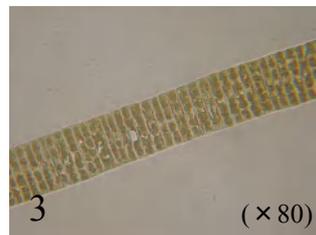
表3 別寒辺牛湿原から単離された珪藻類の種名と培養株番号



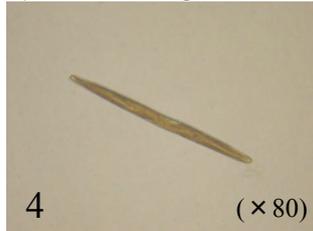
1 *Cyclotella meneghiniana*



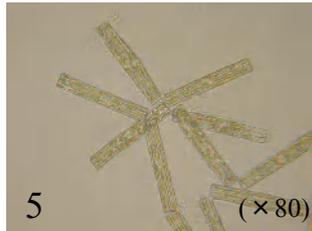
2 *Melosira varians*



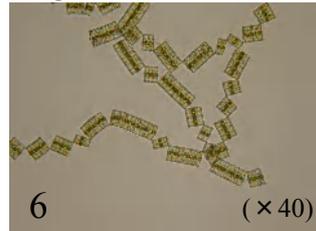
3 *Fragilaria virescens*



4 *Synedra ulna*



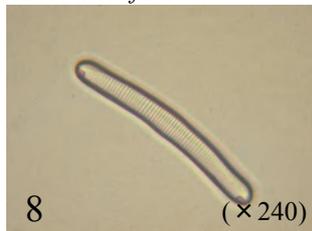
5 *Tabellaria fenestrata*



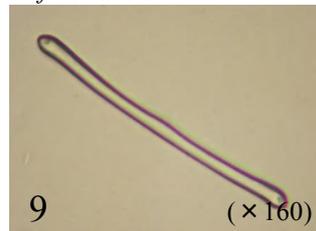
6 *T. flocculosa*



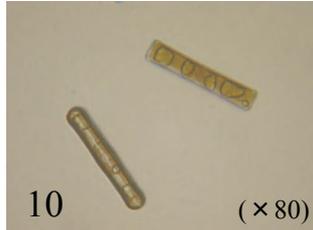
7 *Eunotia formica* v. *formica*



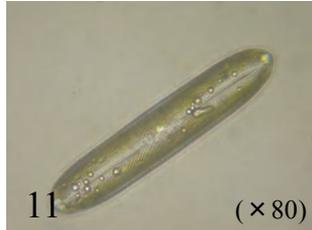
8 *E. formica* v. *formica*



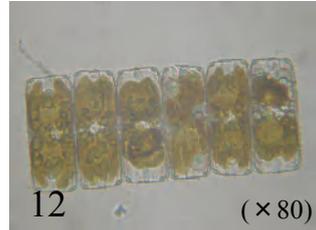
9 *E. peclinalis* v. *pectinalis*



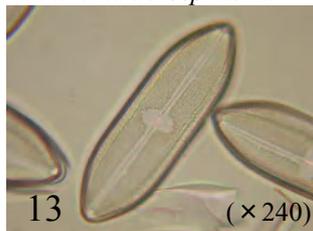
10 *Pinnularia acrosphaeria*



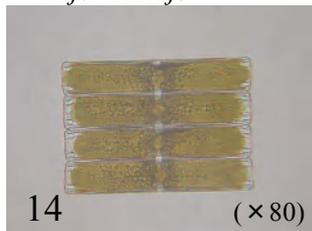
11 *P. major* v. *major*



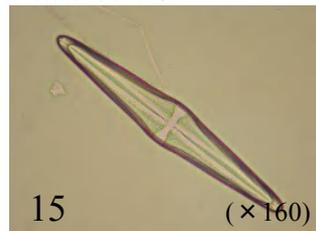
12 *Neidium iridis*



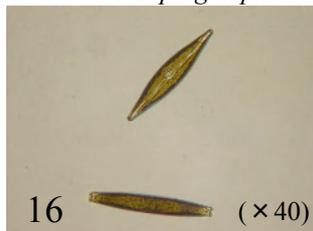
13 *N. iridis* v. *amphigomphus*



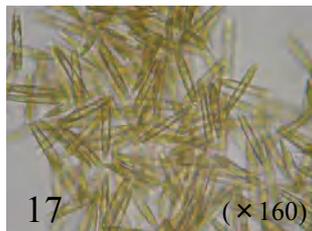
14 *Stauroneis acuta*



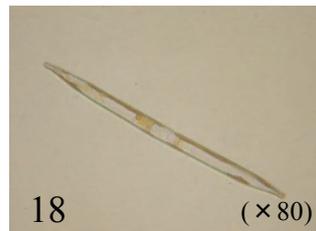
15 *S. acuta*



16 *S. phoenicenteron*



17 *Nitzschia palea* v. *debilis*



18 *Nitzschia vermicularis*

図4 別寒辺牛湿原の珪藻類

分類階級	種名	培養株No.
Euglenophyta 緑虫植物門		
Euglenophyceae 緑虫藻綱		
Euglenales ミドリムシ目		
Euglenaceae ミドリムシ科	<i>Phacus tortus</i>	BKB-138
Chlorophyta 緑藻植物門		
Chlorophyceae 緑藻綱		
Volvocales オオヒゲマワリ目		
Chlamydomonadaceae クラミドモナス科	<i>Chlamydomonas augulosa</i>	BKB-260
Chlorococcales クロロコックム目		
Chlorococcaceae クロロコックム科	<i>Chlorococcum</i> spp.	BKB-82, 313, 314, 326, 327, 333
Oocystaceae オーキスチス科	<i>Chlorella</i> spp.	BKB-64, 65, 72, 309, 316, 320, 324, 325, 328, 332
	不明種2	BKB-321, 322
	不明種3	BKB-330
Zygnematales ホシミドロ目		
Zygnemataceae ホシミドロ科	<i>Mougeotia</i> sp. 1	BKB-31*, 104**, 105*, 121**, 264***
	<i>Spirogyra</i> sp.1	BKB-126
Mesotaeniaceae サヤマメモ科	<i>Gonatozygon kinahani</i> v. <i>kinahani</i>	BKB-120, 343
Desmidiaceae チリモ科	<i>Closterium ehrenbergii</i>	BKB-85*, 86*, 94**, 95***, 98***, 99***, 274***
	<i>Closterium lanceolatum</i>	BKB-101
	<i>Closterium lineatum</i> v. <i>lineatum</i>	BKB-176
	<i>Closterium littorale</i>	BKB-295
	<i>Closterium macilentum</i> v. <i>macilentum</i>	BKB-277
	<i>Closterium moniliferum</i> v. <i>moniliferum</i>	BKB-45*, 113**, 116**, 118**, 119**, 219*, 220*, 222*, 238*, 239**, 241**, 242*
	<i>Closterium moniliferum</i> v. <i>submoniliferum</i>	BKB-218*, 229*
	<i>Closterium rostratum</i> v. <i>rostratum</i>	BKB-14, 232
	<i>Closterium strigosum</i>	BKB-231
	<i>Closterium</i> sp.	BKB-44
	<i>Desmidium swartzii</i>	BKB-88, 89, 93
	<i>Staurostrum varians</i> f. <i>truncata</i>	BKB-341

Bourrelly (1966-1970) 並びに秋山・山岸 (1984-1998)の分類体系による。
アスタリスク(*)によって、同一形態種であっても大きさが異なるものがあることを示している。

表4 別寒辺牛湿原から単離された緑虫藻類と緑藻類の種名と培養株番号



図5 別寒辺牛湿原の緑虫藻類と緑藻類