

麻痺性貝毒プランクトン *Alexandrium catenella* の 増殖に及ぼす水温、塩分および pH の影響

岩 崎 順

Effect of Temperature, Salinity and pH on the Growth of *Alexandrium catenella*,
a Paralytic Shellfish Poison Producing Dinoflagellate

Jun IWASAKI*¹

A clone of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (= *Protogonyaulax catenella*) was obtained from a seawater sample collected from Kashima nada, Ibaraki Prefecture, the central coast of Japan. The lag phase in a fresh medium was shortened by the increasing inoculum size. Optimal temperature for growth was 10–15°C. Optimal salinity was 32‰. *A. catenella* grew moderately well at pH 6.5–8.0. *A. catenella* contained chlorophyll *a*, chlorophyll *c*, β -carotene and an unknown pigment which have an absorption peak of 450nm. Numerous bacteria adhered to the surface of cells. *A. catenella* performed the sexual reproduction during the culture.

Key words : *Alexandrium catenella*, culture, growth biology, toxic dinoflagellate

親潮・黒潮の寒暖両流が相接する開放性海域の茨城県シロ岸域では、1987年から1989年にかけてムラサキイガイ、チョウセンハマグリから規制値(4 MU/g 中腸腺)以上の麻痺性貝毒が検出された。これは渦鞭毛藻類の *Alexandrium catenella* (以下 *A. catenella* と言う) が大量に発生し、上記二枚貝類がこれを摂食することに起因するものである。*Alexandrium* 属は、茨城県海域では通常冬・春季(2~5月)に出現するが、*A. catenella* の場合1987年には4月下旬~5月中旬、1988年には5月下旬~6月中旬、そして1989年には5月中旬~6月上旬にかけて高密度に出現している

(各々最高31, 1450, 13120 cells/ml)。

Alexandrium 属の発生については、シストがそのタネになり、温度が発芽に重要な役割を果たすことが知られている (ANDERSON and MCEL 1979, ANDERSON 1980)。しかし、本種の発生後の増殖過程についてはあまり知られていない。その中でも本種の生活史についてはすでにいくつかの報告(吉松1985, 井ノ口1989, 竹内1992)が見られるが、生理的要求についてはまだ十分に解明されていない。そこで、本研究では茨城県鹿島灘産の *A. catenella* を用い、本種の適水温、塩分耐性、pH耐性について実験・検討を行った。また、

* 1 現 : 茨城県内水面水産試験場 (Ibaraki Prefectural Freshwater Fisheries Experimental Station, Tamatsukuri, Ibaraki 311-35, Japan).

高速液体クロマトグラフ (HPLC) による *A. catenella* の色素分析および走査型電子顕微鏡 (SEM) による細胞観察も行ったので、あわせて報告する。

材料と方法

本実験は、1988年5月下旬に茨城県鹿島灘（大洋村沖合い約1km地点）で大島によって採集・分離された *A. catenella* IBK-14の単一培養株を用いて行われた。

培養実験には、20×125mmのPyrex製スクリーカップ付き試験管とテフロン製キャップを使用した。なお、ガラス器具類は、無リン合成洗剤で洗浄後、硝酸5%液に一昼夜浸漬し、イオン交換水でよく洗浄した後90℃で1時間乾燥してから使用した。

培養液としては、予備実験に基づき、塩分耐性試験には人工海水培地 M-ASP7 (WATANABE *et al.*1982) を、その他の試験には基本海水に黒潮水(約34.5%)を用いた強化海水培地 ESM (OKAICHI *et al.*1982) を使用し、照度4000lux, L :

D = 12 : 12の培養条件下で実験した。

塩分耐性試験では、M-ASP 7の化学組成のうち、NaClとMgSO₄・7H₂Oの割合を変化させることにより、所定の塩分とした。

pH耐性試験では、生物の培養によってpHが変動するが、その変動は小さいため、ここでは培養中のpH変動は考慮せずに、高圧滅菌後のpHで表示した。

色素分析には、高速液体クロマトグラフ(島津LC-9A)を用いた。分析条件等は、Table 1に示す。

細胞観察には、走査型電子顕微鏡(明石ABT-55)を用いた。SEM試料作成過程は、Fig. 1に示す。

Table 1. Condition of pigment analysis.

HPLC	
Reversed-phase HPLC	
Reversed-phase ion-suppression method	
Reversed-phase ion-pairing method	
SHIMADZU SYSTEM	
2 Pumps	
Controller	
Photodiode array Ultraviolet-visible spectrophotometric detector	
Column, ODS-column (octadecyl silica column)	
Linear gradient elution	
A Ion-pairing solution: water: methanol 5:5:90	
B ethylacetate	
0 min A 100%	
20 min B 100%	
25 min B 100%	
30 min A 100%	
Ion-pairing solution	
Tetrabutylammonium hydroxide: 10 ml of 0.5 M solution.	
Ammonium acetate 7.7 g	
To 100 ml (pH 7.1)	

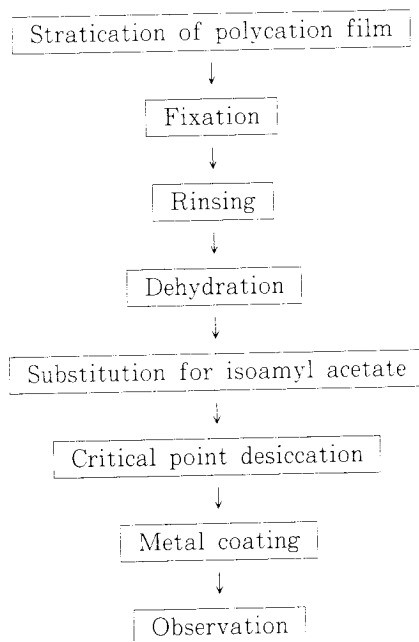


Fig. 1 Preparation of SEM sample by the polycation-film carrier method.

結 果

1. 増殖特性

単一種培養において、初期細胞密度の違いによる対数増殖期の比増殖速度 (μ_2) の変化を見ると、Fig. 2 に示されるように初期細胞密度が少ない (2~7 cells/ml) と比増殖速度は小さく (0.11), 初期細胞密度が多い (100 cells/ml) と比増殖速度は大きくなり (0.32), 両者の関係はシグモイド曲線に近似されることが明らかになった。したがって、適水温、塩分耐性、PH耐性の各試験では、比増殖速度が高位で安定するように、初期細胞密度を50 cells/ml に設定した。

2. 水温と増殖

本実験では、5, 10, 15, 20および25℃におけ

る比増殖速度が塩分32.8%, PH8.0のもとで調べられた。その結果を Fig. 3 に示す。本種は、10, 15℃で各々0.22, 0.23と増殖がよく、25℃では0.02とほとんど増殖しなかった。

一般に、温度は生物の活性に大きな役割を果たしている。本種の場合も、水温は増殖の主要な要因と言われ (竹内1992), またシストの発芽は水温に大きく依存すると言われる (Anderson and Millie 1979, Anderson 1980)。今回の実験の結果から、本株の増殖に最適な水温は10~15℃であることがわかるが、東北海域での *A. catenella* の高密度出現時の水温は5~15℃を示しており (井ノ口1989), 10℃以下の低水温時での増殖には、水温以外の要因が関与していることが考えられる。

3. 塩分と増殖

本実験では、14, 20, 26, 32, 38‰における比増殖速度が水温15℃, PH8.0のもとで調べられた。その結果を Fig. 3 に示す。比増殖速度は、塩分32‰で0.27と最もよく増殖し、14‰では0.09とほとんど増殖しなくなる。本種は茨城県沿岸域では塩分30.3~33.7‰の範囲で高密度に出現しており (岩崎1989), 本実験の結果と概ね一致する。一方、竹内 (1992) は、*A. catenella* の好適塩分範囲として20~34‰を示しており、本実験の結果とは必ずしも一致しない。これら好適塩分の違いは、株による差と考えられる。

4. PHと増殖

本実験では、PH6.5~9.0 の範囲での比増殖速度が、水温15℃, 塩分32.8‰のもとで調べられた。結果は Fig. 3 に示したように、PH6.5~8.0で0.23~0.24と高く、PH8.5で0.18, PH9.0で最高値の1/2以下の0.11と低くなった。このように、本種は比較的低いPHでよい増殖を示した。

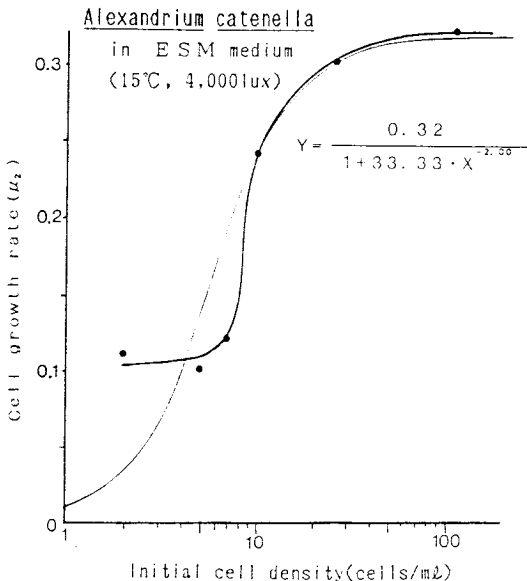


Fig. 2 Cell growth rates at various kinds of initial cell density on *Alexandrium catenella* collected from Kashimanada.

$$\mu_2 = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

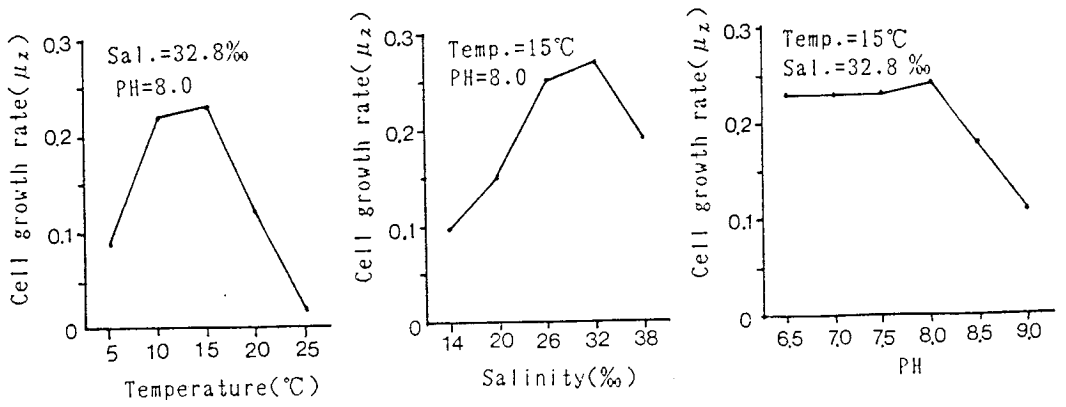


Fig. 3 Cell growth rates of *Alexandrium catenella* at different temperatures, salinities and PH in unialgal culture.

5. HPLCによる色素分析

HPLCを用い、アセトン抽出した *A. catene-*

lla 色素の定性分析を行った。その結果、*A. caten-*
ella はクロロフィル *a*、クロロフィル *c*、 β -カ

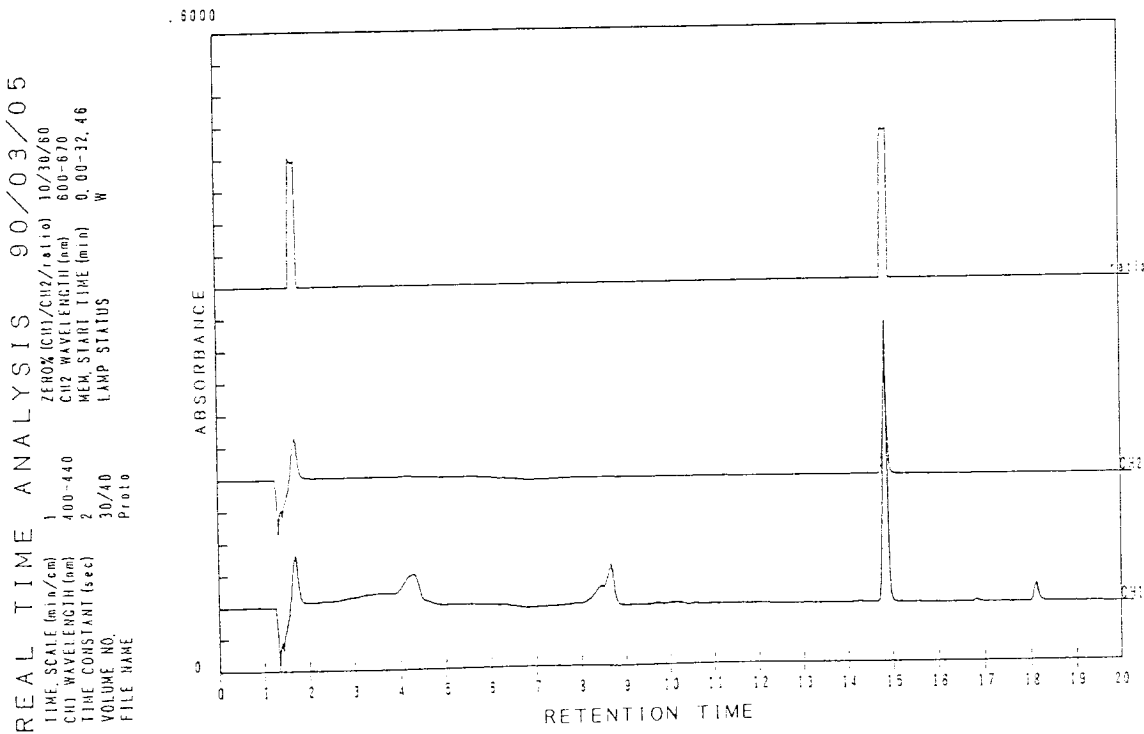


Fig. 4 Chromatogram of pigments of *A. catenella*.

Alexandrium catenella の増殖特性

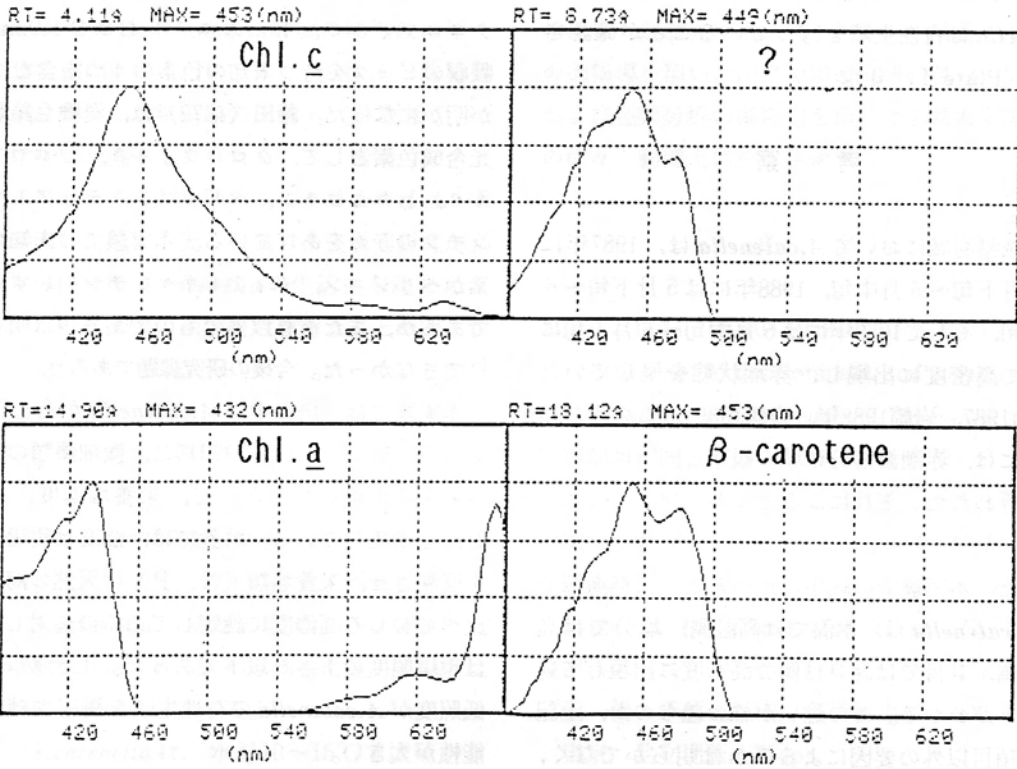


Fig. 5 Post-analysis contour plot of pigments.

ロチンおよび450 nm に吸収のピークを持つ未知の色素の4つを含むことが明らかになった (Fig. 4, 5)。

6. SEMによる細胞観察

培養した *A. catenella* を用い、SEM用試料の作製 (Fig. 1) を行い、SEMによる細胞観察を行った。その結果、*A. catenella* の表面に多

Plate I

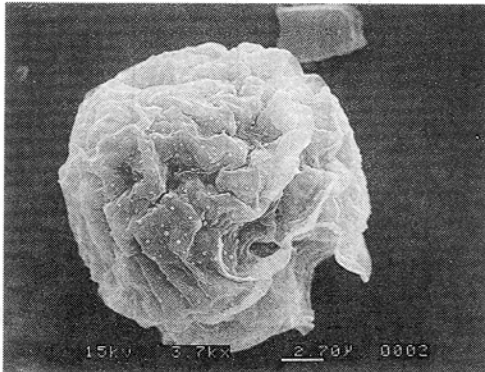
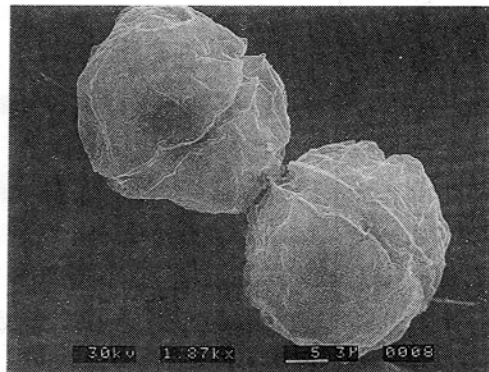


Plate II



数のバクテリアが付着していること、培養中に *A. catenella* は有性生殖を行っていることが確認された (Plate I, II)。

考 察

茨城県海域において *A. catenella* は、1987年には4月下旬～5月中旬、1988年には5月下旬～6月中旬、そして1989年には5月中旬～6月上旬にかけて高密度に出現し、赤潮状態を呈していた (岩崎1987, 岩崎1988年, 岩崎1989)。このうち1989年には、赤潮濃密分布域の観察と同時に環境調査が行われた。それによると水温は14.3～18.4°C、塩分は30.3～33.7‰、PHは8.2～8.7の範囲にあった。本実験での結果と比べると、天然海域での *A. catenella* は、水温では高温側、塩分では高塩分側、PHでは高PH側で高密度に出現していることがわかる。この違いが株の差なのか、上記水質項目以外の要因によるのかは明らかでなく、今後の調査・研究が待たれる。

本実験から、*A. catenella* はクロロフィルa、クロロフィルc、b-カロチンおよび450nmに吸収のピークを持つ未知の色素の4つを含むことが明らかになった。藤田 (1979) は、渦鞭毛藻類の光合成色素として、クロロフィルa、クロロフィルc、b-カロチン、ペリジニン、ディアトキサンチンの5つをあげている。本実験での未知の色素がペリジニン、ディアトキサンチンのいずれかであるか、またそれ以外のものであるかは明らかにできなかった。今後の研究課題であろう。

本実験では、培養中に *A. catenella* が有性生殖を行っていた。市村 (1979) は、微細藻類の有性生殖を誘起する要因として、栄養塩濃度、光、温度を指摘している。培養では、温度は現場水温を反映させ、栄養塩類 (N, P) は天然の海水と比べてむしろ高濃度に設定してあるのに対し、光は現場照度の1/5以下であった。したがって、低照度が *A. catenella* の有性生殖を誘起させた可能性が大きい。

茨城県では現在までのところ、麻痺性貝毒によ

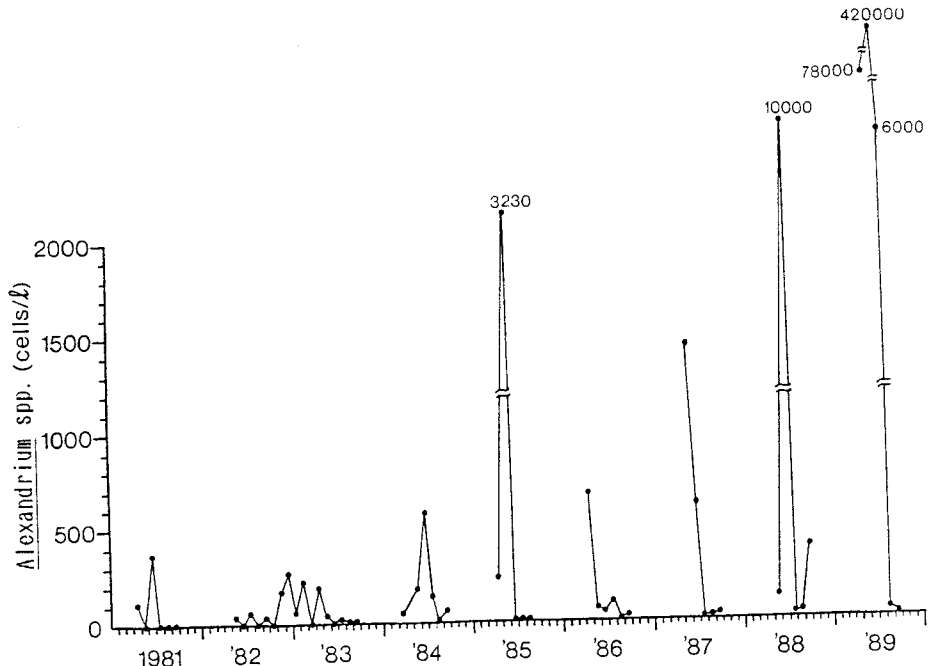


Fig. 6 Annual density change of *Alexandrium* spp. in kashimanada.

る中毒事件は発生していないが、鹿島灘では *A. catenella* を含む *Alexandrium* 属の細胞数は年々増加する傾向にある (Fig. 6)。これは、茨城県沿岸域における堆積物中のシスト (休眠接合子) 数の増加に起因すると考えられる。増殖のタネとしてのシストの役割を明らかにするためには、室内実験だけでなく、天然海域での定量的研究が必要になる。今後 *A. catenella* の生活史を踏まえた上で、季節変動等の動態研究を行うことが望まれる。

要 約

茨城県沿岸域で採集・分離された *A. catenella* の増殖特性について、以下の知見を得た。

1. *A. catenella* の初期細胞密度が少ないと比増殖速度は小さく、初期細胞密度が多いと比増殖速度は大きくなる。
2. *A. catenella* は、水温10~15°Cで増殖がよく、25°Cではほとんど増殖しない。
3. *A. catenella* は、塩分32‰で最もよく増殖し、14‰ではほとんど増殖しない。
4. *A. catenella* は、pH6.5~8.0で増殖がよく、pH8.5~9.0で増殖が悪い。
5. *A. catenella* は、クロロフィルa、クロロフィルc、b-カロチンおよび450 nmに吸収のピークを持つ未知の色素の4つを含む。
6. *A. catenella* の表面には、多数のバクテリアが付着していた。培養中に *A. catenella* は有性生殖を行っていた。

謝 辞

本実験は、1989年度茨城県技術職員派遣研修により、環境庁・国立環境研究所 (当時、国立公害研究所) で行われたものである。報告を終える

にあたり、実験材料の供与を受けた東北大学農学部の大島泰克博士、プランクトン培養についての御指導を頂いた国立環境研究所の渡辺 信博士および色素分析の御協力を頂いた宮崎大学医学部の佐々 勤博士に深く感謝する。

文 献

- ANDERSON, D.M. (1980) Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarens* (DINOPHYCEAE) hypnozygotes. *J. Phycol.*, 16, 166-172.
- ANDERSON, D.M. and M'GHEE, F.M.M. (1979) The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarens* hypocysts. *Est. Coast. Mar. Sci.*, 8, 279-293.
- 藤田善彦 (1979) 光合成色素の定性と定量法. 西沢一俊・千原光雄編, 藻類研究法, 474-507. 東京, 共立出版, 754pp.
- 茨城県 (1990) 平成元年度赤潮貝毒監視事業報告書 (毒化モニタリング), 35pp.
- 市村輝宜 (1979) 有性生殖の誘起と交配実験法. 西沢一俊・千原光雄編, 藻類研究法, 195-209. 東京, 共立出版, 754pp.
- 井ノ口伸幸 (1989) 東北・北海道沖合海域における *Protogonyaulax* 属2種の分布動態5ケ年の推移. 重要貝類毒化対策事業5ケ年の調査研究のとりまとめ (東北・北海道ブロック), 10-15, 水産庁, 45pp.
- 岩崎 順 (1987) 茨城県海域で麻痺性貝毒発生. 茨城県人工衛星速報, 62-No.12.
- 岩崎 順 (1988) 麻痺性貝毒プランクトン *Protogonyaulax catenella* について. 茨城県漁海況速報 (人工衛星速報代号), 63-No.21.
- 岩崎 順 (1989) 茨城県沿岸域に出現した *Protogonyaulax* 赤潮について. 茨城県漁海況速

- 報 (人工衛星速報代号), 元-No.10.
- OKAICHI, T., NISHINO, S. and I MATOMI, Y. (1982) Collection and mass culture. In *Toxic phyto-Plankton Occurrence, mode of action, and toxins*, Ed. by Jpn. Soc.Sci.Fish., Koseisha - Koseikaku, Tokyo, pp.23-24.
- SPENCER, C.P. (1954) Studies on the culture of a marine diatom. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.*, 33 265-290.
- 竹内照文 (1992) 主要赤潮種の増殖動態 - 田辺湾におけるアレクサンドリウムの増殖動態. 月刊海洋, 24, 17-24.
- 吉松定昭 (1985) 生活史. 福代康夫編, 貝毒プラクトン - 生物学と生態学, 31-39. 東京, 恒星社厚生閣, 125 pp.
- WATANABE, M.M., NAKAMURA, Y., MORI, S. and YAMOCCHI, S. (1982) Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jap.J.Phycol.*, 30, 279-288.