

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の増殖に及ぼす 窒素・リン栄養塩の影響

松田 篤志, 西島 敏隆, 深見 公雄

(1999年2月8日受付)

Effects of Nitrogenous and Phosphorus Nutrients on the Growth of Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*

Atsushi Matsuda,*1,*2 Toshitaka Nishijima,*1 and Kimio Fukami*1

Alexandrium catenella, the causative dinoflagellate of paralytic shellfish poisoning and red-tide, has been grown in axenic and batch conditions to determine the effects of nitrogen and phosphorus on its growth.

This organism could use NH_4^+ , NO_3^- , and NO_2^- -N, as a sole nitrogen source, but could not use urea and twenty amino acids, except glutamine. And this species could utilize both inorganic and organic phosphorus compounds, as a sole phosphorus source. The half-saturation constant for growth (K_S) of inorganic nitrogen and phosphate were 3.3-7.7 μM N and 0.72 μM P respectively. The minimum cell quota of nitrogen and phosphorus were 7.0-7.3 pmol-N/cell and 0.32 pmol-P/cell respectively. The maximum specific growth rate (μ_{max}) was 0.47-0.55 day^{-1} under nutrient saturated conditions.

The relatively large K_S and small μ_{max} by *A. catenella* compared to other typical red-tide phytoplankton species suggest that this organism could not be a dominant species under inorganic nitrogen and/or phosphate limited waters. The present study reveals that *A. catenella* is suitable to grow in eutrophied coastal waters of elevated organic phosphorus concentration.

キーワード: *Alexandrium catenella*, 窒素, リン, 増殖速度, 細胞内栄養塩含量, 半飽和定数

Alexandrium catenella (Whedon et Kofoid) Balech の生産する麻痺性貝毒 (=Paralytic Shellfish Poison) は, 本藻を摂食した二枚貝に蓄積され死亡率の高い食中毒を引き起こす。その為, 本藻による貝類の毒化は食品衛生並びに貝類増殖上大きな問題となっている。近年, 日本においても *Alexandrium* 属プランクトンによる貝類の毒化が多発化・広域化する傾向にあり,¹⁾ その対策が急務となっている。さらに, 本藻は沿岸海域において赤潮を起こすこともあり,²⁾ 赤潮プランクトンとしての対策も求められている。

これら, 貝類毒化, 赤潮発生の防止・予知のためには自然界に存在する本藻の生態を理解する必要がある。現場海域では多種多様な生物が栄養塩の利用をめぐる競争を行っていることから, 本藻がどの様な種類の栄養塩を増殖に利用し, どの様に増殖できるかを知ることは, 現

場海域での本藻の生態を知る上で重要である。しかし, 本藻は分離・培養, 特に無菌培養が困難であったことに加え, 完全人工培養液では増殖が悪いことから, 栄養塩類利用特性に関する詳細な研究はなされてこなかった。

そこで, 本研究では, *A. catenella* の増殖生理特性を試験するのに適した培養液を検討し, さらに *A. catenella* の窒素・リン要求についての増殖速度論的解析および各種窒素・リン化合物の利用能について検討した。

材料および方法

実験には京都大学左子芳彦氏らが1987年に和歌山県田辺湾の底泥中のシストを発芽させ, これより分離した *Alexandrium catenella* TNY7 (無菌クローン株) を用いた。培養は全て温度 20°C, 光強度 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 明暗周期 14 h 明 : 10 h 暗で行った。試験中の無菌状態は,

*1 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan).

*2 現所属: 熊本市役所 (Kumamoto City Office, Tetorihoncho, Kumamoto 860-8601, Japan).

FeTY,³⁾ ST10⁰, ST10⁻⁴ 培地⁴⁾を用いた培養試験および DAPI(4'6-diamidino-2-phenylindole) 染色による直接観察法により確認した。

増殖に適した完全人工培地の検討 培養液を各種作成し, 各培養液が 10 ml 入った ϕ 18 mm 試験管に SW II m 培地⁵⁾で増殖させた本藻を, 初期細胞密度が約 500 cells/ml となるように接種した。試験は 2 度にわたっておこない, Series 1 では培養 18 日目, Series 2 では培養 17 日目に少量の培養液をとり, 界線入りスライドグラスを用いて倒立顕微鏡下で直接計数を行い増殖量をもとめた。試験は, いずれもバッチ法で 3 本立てで行った。

増殖に及ぼす無機態窒素・リン濃度の影響 培養液には, 上述の試験で最もよい増殖の得られることになった metals mix SW II 培地⁶⁾を用いた。A. catenella を, 試験を行う栄養塩類(窒素またはリン源)を全く添加していない metals mix SW II 培地⁶⁾で増殖が止まるまで飢餓培養した。飢餓培養した A. catenella を, 目的とする栄養塩類の濃度を種々に変化させた metals mix SW II 培地⁶⁾が 10 ml 入った ϕ 18 mm 試験管に接種し, 3 本立てでバッチ法により本培養を行った。無機態窒素濃度の影響については, アンモニア態窒素(NH₄Cl) および, 硝酸態窒素(KNO₃)の培養液中への添加濃度を 9 段階(0・0.1・0.5・1・10・50・100・250・500 μ M)に変化させ試験を行った。リン濃度の影響については, 培養液中のリン酸一カリウム(KH₂PO₄)濃度を 8 段階(0・0.1・0.2・0.5・1・5・10・25 μ M)に変化させた。窒素濃度の影響を調べる試験では, 前もってオートクレーブ処理(121°C, 15 min)しておいた窒素無添加の metals mix SW II 培地⁶⁾に, 濾過滅菌(Millipore 社, Millex GV4)した窒素源の水溶液を無菌的に加え, 培地を調製した。無機態リン濃度の影響については, リン源を添加した培地をオートクレーブ処理(121°C, 15 min)し, 試験に用いた。ただし, 試験に用いた培養液は, 天然海水を基礎としていることから栄養塩類を添加していない培養液中にもすでに栄養塩類が含まれている。そこで, 栄養塩類を添加する前の培養液中に含まれる栄養塩濃度(無機態窒素濃度: 1.6 μ M, 無機態リン濃度: 0.6 μ M)と, 添加した栄養塩濃度の和を培養開始時の培養液中の制限栄養塩濃度とした。細胞密度は, 倒立顕微鏡を用いて直接計数により求めた。比増殖速度(μ)は, 増殖曲線の傾きが最も大きくなった期間の細胞密度の計数値から次式(1)を用いて算出した。

$$\ln Nt' = \ln Nt + \mu(t' - t) \quad (t' > t) \quad (1)$$

ここで, Nt , Nt' はそれぞれ t 日目, t' 日目の細胞密度, μ は比増殖速度 (day^{-1}) を表す。

また, 比増殖速度 (μ) と栄養塩濃度 (S) との関係

は Monod の式⁷⁾(2)で表すことができる。

$$\mu = \mu m \frac{S}{K_S + S} \quad (2)$$

ここで, S は培養開始時の栄養塩濃度 (μ M), μm は最大比増殖速度 (day^{-1}), K_S は半飽和定数で $K_S/2$ を与える栄養塩濃度 (μ M) を示す。(2)式から, 反復計算アルゴリズム (Levenberg-Marquardt 法⁸⁾)により最大比増殖速度 (μm) および半飽和定数 (K_S) を算出した。また, 最大細胞密度から接種量を減じて最大細胞収量を算出した。さらに, 十分飢餓培養を行った藻体を接種して培養を行った場合, 最大細胞収量 (N) は培養開始時の栄養塩濃度 (S_0) の増加に伴い直線的に増加し, 次式

$$q_0 = S_0/N \quad (3)$$

で表すことができると仮定し, 反復計算アルゴリズム (Levenberg-Marquardt 法⁸⁾)により最小細胞内栄養塩含量 (q_0) を求めた。

各種窒素・リン源利用特性 窒素源利用特性に関する試験では窒素源を, リン源利用特性に関する試験ではリン源を全く添加していない metals mix SW II 培地⁶⁾で, 本藻の増殖が止まるまで飢餓培養を行った。飢餓培養をした本藻を, 各種窒素・リン源を含む metals mix SW II 培地⁶⁾が 10 ml 入った ϕ 18 mm 試験管に接種し, 本培養を行った。培養液は, あらかじめオートクレーブ処理(121°C, 15 min)した窒素あるいはリン無添加の metals mix SW II 培地⁶⁾に, 濾過滅菌(Millipore 社, Millex GV4)した各種窒素・リン源の水溶液を, 培養液中の窒素濃度が 250 μ M あるいは, リン濃度が 25 μ M となるように無菌的に添加した。窒素源利用特性に関しては硝酸, 亜硝酸, 尿素およびタウリン (Tau), プロリン (Pro), リジン (Lys), オルニチン (Orn), ロイシン (Leu), イソロイシン (Ile), フェニルアラニン (Phe), バリン (Val), メチオニン (Met), トリプトファン (Trp), チロシン (Tyr), アラニン (Ala), アルギニン (Arg), スレオニン (Thr), グリシン (Gly), ヒスチジン (His), グルタミン (Gln), セリン (Ser), アスパラギン (Asn), グルタミン酸 (Glu), アスパラギン酸 (Asp) の 21 種類のアミノ酸を窒素源としてそれぞれ単独に培地中に添加し試験した。リン利用特性については, リン酸二水素カリウム (PO₄), β -グリセロリン酸ナトリウム (Glycero-P), トリポリリン酸ナトリウム (Tripoly-P), ピロリン酸ナトリウム (Pyro-P), メタリン酸 (Meta-P), ウリジン-5'-リン酸二ナトリウム (UMP), D-フルクトース-6'-リン酸二ナトリウム (F6P), アデノシン-5'-三リン酸 (ATP), アデノシン-5'-二リン酸 (ADP), アデノシン-5'-リン酸 (AMP), β -ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (NPP), D-グル

コース-6'-リン酸二ナトリウム (G6P), α -D-グルコース-1'-リン酸二ナトリウム (G1P), グアノシン-5'-ニリン酸ナトリウム (GDP), グアノシン-5'-ニリン酸二ナトリウム (GMP) の 15 種類をリン源としてそれぞれ単独で培地中に添加し試験した。20 もしくは 22 日間培養した後、倒立顕微鏡下で直接計数により細胞密度を計数した。増殖量は、窒素源あるいはリン源無添加区の増殖量を 0, 硝酸態窒素添加区および無機態リン添加区 (KH_2PO_4) の増殖量を 100 とし、これに対する増殖量の相対値 (%) で示した。

結 果

増殖に適した完全人工培養液の検討 Series 1 では、本藻は天然海水を基礎とした SW II 系培地⁹⁾で増殖量が高かった (Table 1)。中でも海底泥抽出液 (高知県浦ノ内湾にて採取した底泥より調製) を添加した SW II m 培地⁵⁾で増殖量が高かった。一方、本藻は ASP₂ 系培地¹⁰⁾や、改変石丸培地 (人工海水)¹¹⁾といった人工海水を基礎とした完全人工培養液では低い増殖量しか得られなかった (Table 1)。しかし、完全人工培養液の中でも、改変石丸培地¹¹⁾ (人工海水) の増殖量は 0.49×10^4 cells/ml と他の完全人工培養液と比較して約4倍、増殖

量が高かった (Table 1)。さらに、改変石丸培地¹¹⁾については、天然海水を基礎とし、土壌抽出液を全く含まない改変石丸培地¹¹⁾ (天然海水) でも SW II m 培地⁵⁾とほぼ同じ増殖量が得られた (Table 1)。そこで、Series 2 で SW II m 培地⁵⁾の土壌抽出液を改変石丸培地¹¹⁾で使用した金属混液に置き換えた metals mix SW II 培地⁶⁾を試験したところ SW II m 培地⁵⁾に匹敵する増殖量が得られた (Table 1)。以上のことから、培養液中の土壌抽出液は、金属混液に置き換えることが可能であり、また、金属混液と天然海水を併用することでよい増殖が得られることが分かった。そこで、以後の全ての試験には metals mix SW II 培地⁶⁾を使用した。

増殖に及ぼす無機態窒素・リン濃度の影響 本藻の比増殖速度は、添加した無機態窒素濃度が上昇するにつれ高くなった (Fig. 1)。しかし、窒素源としてアンモニア態窒素を添加した場合、無機態窒素濃度 $251.6 \mu\text{M}$ では増殖が可能であったものの培養開始後 9 日目まで細胞密度は増加せず誘導期が長くなりさらに、無機態窒素濃度 $501.6 \mu\text{M}$ では増殖できなかった (Fig. 1B)。培地中の初期栄養塩濃度と比増殖速度との関係から増殖速度基準の半飽和定数および最大比増殖速度を算出した結

Table 1. Growth of *Alexandrium catenella* in various culture media

Series	Culture media	Cell yield ($\times 10^4$ cells/ml)
1	SWII m ⁵⁾	2.06
	SWII ⁹⁾	0.55
	SWII ⁹⁾ + PII* ¹⁾ (10 ml/l) + SII* ²⁾ (10 ml/l)	0.76
	SWII ⁹⁾ + Yest extract (10 mg/l)	0.84
	Modified Ishimaru Medium ¹¹⁾ (based on natural seawater)	1.74
	Modified Ishimaru Medium ¹¹⁾ (based on artificial seawater)	0.49
	ASP ₂ NTA ¹⁰⁾	0.12
	ASP ₂ NM ¹⁰⁾	0.10
2	SWII m ⁵⁾	1.61
	metals mix SWII ⁶⁾	2.26
	SWII ⁹⁾ + PII* ¹⁾ (10 ml/l) + SII* ²⁾ (10 ml/l) + CII* ³⁾ (20 ml/l)	0.42

*1 PII (1 ml) contains; Na₂-EDTA 1 mg, B (as H₃BO₄) 0.2 mg, Fe (as Cl⁻¹) 10 μg , Mn (as Cl⁻¹) 40 μg , Zn (as Cl⁻¹) 5 μg , Co (as Cl⁻¹) 1 μg .

*2 SII (1 ml) contains; Mo (as Na⁺) 50 μg , Br (as K⁺) 1 mg, Sr (as Cl⁻¹) 200 μg , Rb (as Cl⁻¹) 20 μg , Li (as Cl⁻¹) 20 μg , I (as K⁺) 1 μg .

*3 CII (1 ml) contains; Glycine 1 mg, D, L-alanine 1 mg, L-asparagine 1 mg, Na-acetate 2 mg, Glucose 2 mg, L-glutamic acid 2 mg.

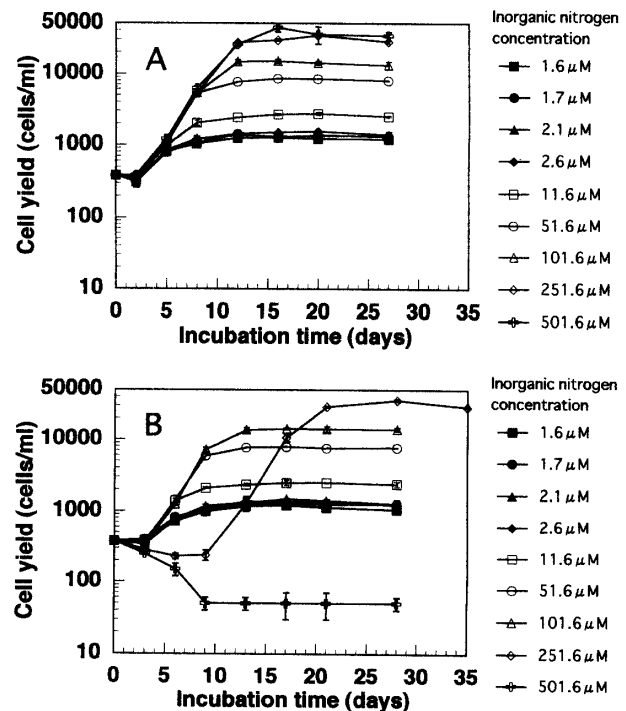


Fig. 1 Growth of *Alexandrium catenella* for different concentrations of inorganic nitrogen.

KNO_3 (A) or NH_4Cl (B) was added as a nitrogen source to metals mix SWII medium without nitrate. Inoculation of experimental test tube was with cells previously incubated in metals mix SWII medium without nitrogen until stationary phase.

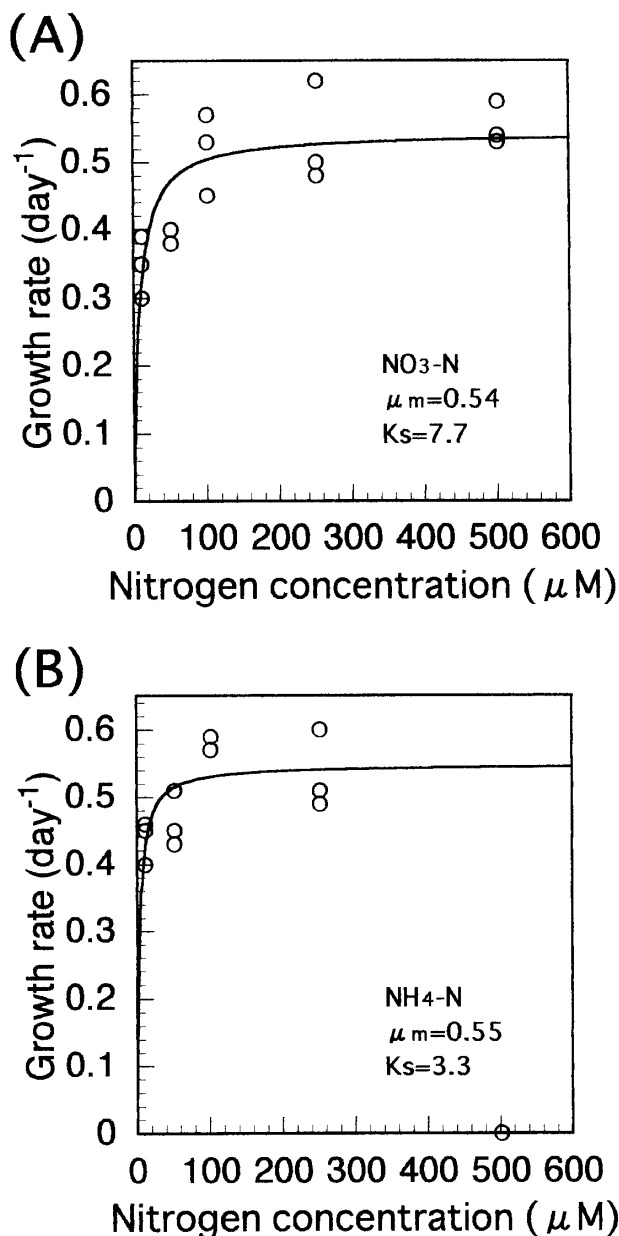


Fig. 2 The specific growth rate of *Alexandrium catenella* versus initial concentrations of inorganic nitrogen in the medium.

KNO₃ (A) or NH₄Cl (B) was added as a nitrogen source to metals mix SWII medium without nitrate. Maximum growth rate (μ_m) and half saturation constant for growth (K_S) were calculated to be 0.54 day⁻¹ and 7.7 μM in (A), and 0.55 day⁻¹ and 3.3 μM in (B), respectively.

果, 半飽和定数および最大比増殖速度はそれぞれ, 硝酸態窒素で 7.7 μM, 0.54 day⁻¹ (Fig. 2A), アンモニア態窒素で 3.3 μM, 0.55 day⁻¹ (Fig. 2B) であった。(2)式より半飽和定数の 10 倍の値が最大比増殖速度の約 91%

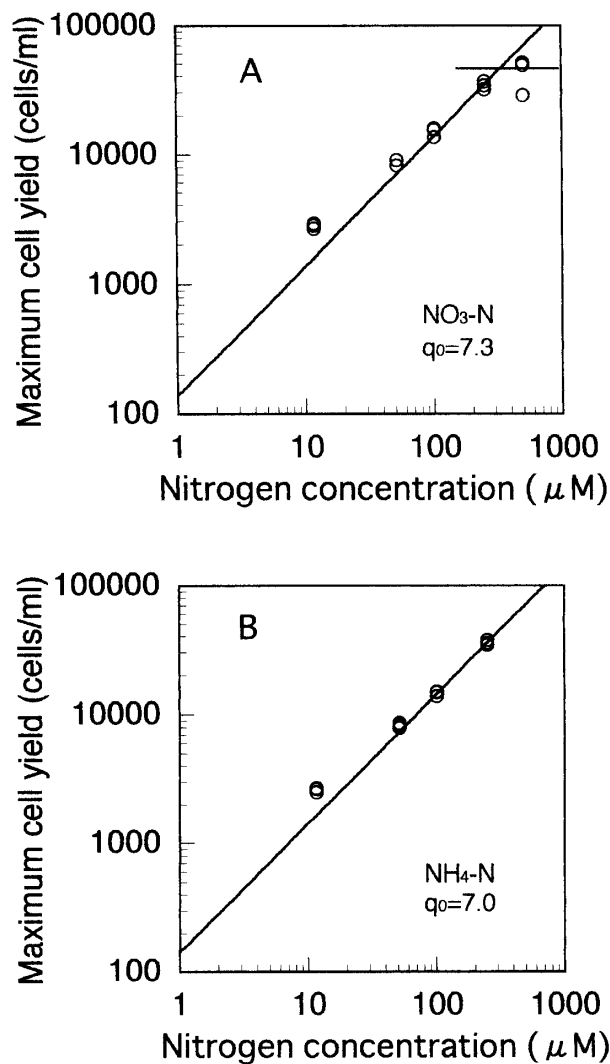


Fig. 3 Maximum cell yields of *Alexandrium catenella* grown with different concentrations of inorganic nitrogen.

KNO₃ (A) or NH₄Cl (B) was added as a nitrogen source to metals mix SWII medium without nitrate. Minimum cell quota of nitrogen (q_0) was calculated to be 7.3 pmol/cell in (A) and 7.0 pmol/cell in (B).

を与える栄養塩濃度と算出される*3ことから, 本藻の比増殖速度は硝酸態窒素濃度 77 μM, アンモニア態窒素濃度 33 μMで飽和すると考えられる。

最大細胞収量は, 窒素濃度が上昇するにつれて増大し, 硝酸態窒素では 251.6 μMでほぼ飽和に達し (Fig. 3A), アンモニア態窒素では 251.6 μMで最大となった (Fig. 3B)。

栄養塩制限下において, 増殖が定常期に達し細胞密度が最大細胞密度となった時の細胞中のその物質濃度は, 細胞の維持に必要な最小量 (最小細胞内栄養塩濃度) に

*3 半飽和定数 (K_S) の 10 倍の栄養塩濃度を $10K_S$ とすると(2)式より $\mu = \mu_m \times 10K_S / (K_S + 10K_S) = \mu_m \times 10/11$

とどまり、細胞当たりの栄養塩濃度はほぼ一定値をとると仮定すると、培地中の初期栄養塩濃度とそれに対する最大細胞収量との関係は、原点を通る直線関係で示すことができる。これを両対数グラフ上で示すと傾き1の直線上に並ぶと期待される。そこで、今回の結果を両対数グラフ上にプロットし、解析を行った。その結果、硝酸態窒素、アンモニア態窒素ともに $251.6 \mu\text{M}$ 以下で最大細胞収量と初期栄養塩濃度との関係を式(3)で表すことができ、最小細胞内窒素含量は硝酸態窒素、アンモニア態窒素でそれぞれ $7.3, 7.0 \text{ pmol/cell}$ と推算された (Fig. 3)。

本藻の比増殖速度は、培地中に添加した無機態リン濃度が上昇するにつれて増大し、 $5.6 \mu\text{M}$ でほぼ飽和に達した (Figs. 4, 5)。無機態リン濃度と比増殖速度との関係から増殖速度基準の半飽和定数および最大比増殖速度を求めたところそれぞれ $0.72 \mu\text{M}$, 0.47 day^{-1} と算出された (Fig. 5)。この半飽和定数から、本藻の比増殖速度は無機態リン濃度 $7.2 \mu\text{M}$ で飽和すると考えられる。

最大細胞収量は、培地中の初期無機態リン濃度に依存し無機態リン濃度 $10.6 \mu\text{M}$ で飽和に達した (Fig. 6)。培地中の初期無機態リン濃度とそれに対する最大細胞収量から算出した本藻の最小細胞内リン含量は 0.32 pmol/cell と推算された (Fig. 6)。

以上の結果から、本藻の窒素およびリン要求量つまり、比増殖速度と最大細胞収量の両方を最大にする栄養塩濃度は、アンモニア態窒素および硝酸態窒素でそれぞれ $251.6 \mu\text{M}$ 、無機態リンで $10.6 \mu\text{M}$ であることが明らかになった。

各種窒素・リン源利用特性 本藻は、試験を行ったアミノ酸態窒素のうちグルタミンを除くほとんどを窒素源

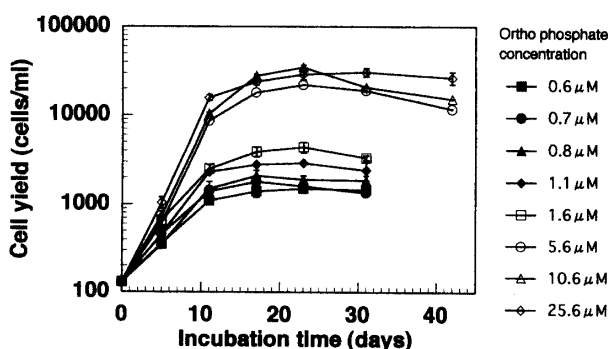


Fig. 4 Growth of *Alexandrium catenella* for different concentrations of ortho phosphate.

KH_2PO_4 was added as a phosphorus source to metals mix SWII medium without phosphorus. Inoculation of experimental test tube was with cells previously incubated in metals mix SWII medium without phosphorus until stationary phase.

として増殖に利用できなかった (Fig. 7)。増殖に利用可能であったグルタミンの増殖量は、硝酸態窒素による増殖量の約40%にとどまった。また、尿素を窒素源として利用することができず、本藻は試験を行った有機態窒素源をほとんど増殖に利用できなかった。亜硝酸態窒素は、硝酸態窒素と同様に増殖に利用可能であった。

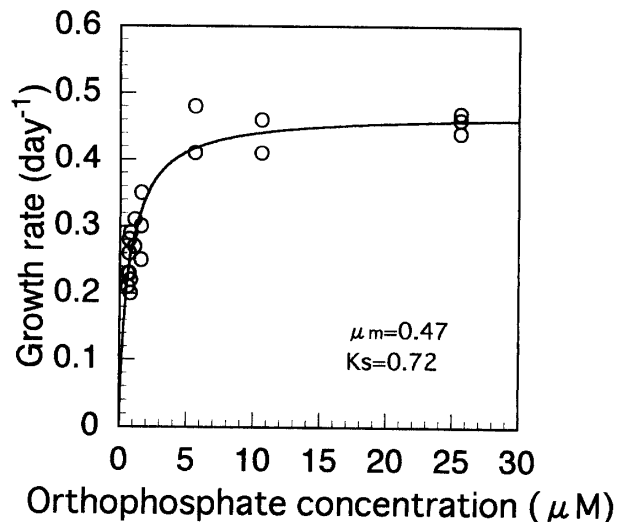


Fig. 5 The specific growth rate of *Alexandrium catenella* versus initial concentrations of ortho phosphate in the medium.

KH_2PO_4 was added as a phosphorus source to metals mix SWII medium without phosphorus. Maximum growth rate (μ_m) and half saturation constant for growth (K_s) were calculated to be 0.47 day^{-1} and $0.72 \mu\text{M}$, respectively.

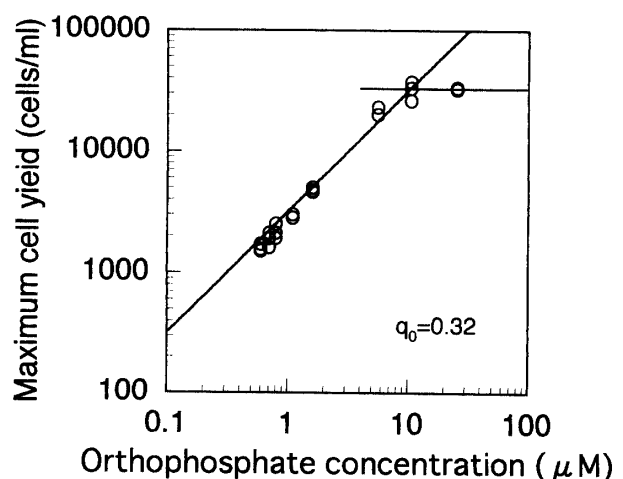


Fig. 6 Maximum cell yields of *Alexandrium catenella* grown with different concentrations of ortho phosphate.

KH_2PO_4 was added as a phosphorus source to metals mix SWII medium without phosphorus. Minimum cell quota of phosphorus (q_0) was calculated to be 0.32 pmol/cell .

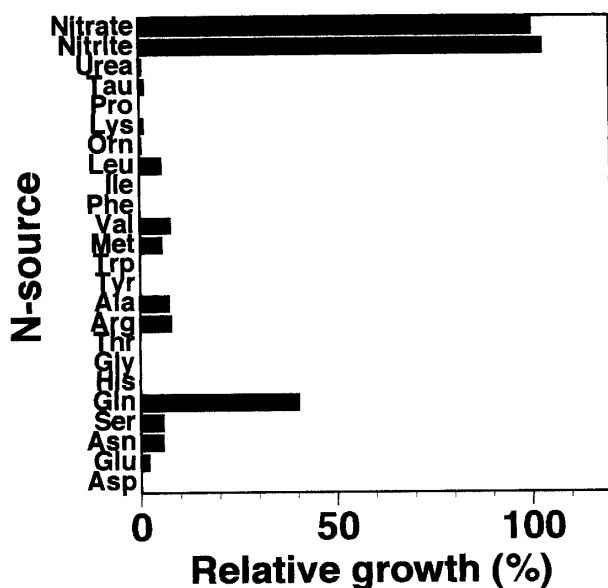


Fig. 7 Growth of *Alexandrium catenella* in media containing various nitrogen sources at 250 μM , expressed as percent of maximum growth in the medium containing nitrate at 250 μM .

Inoculation of experimental test tube was with cells previously incubated in metals mix SWII medium without nitrogen until stationary phase.

本藻は、試験した全ての無機態および有機態リンをリン源として増殖に利用できた (Fig. 8)。試験したリン源のうち、トリポリリン酸 (Tripoly-P)、ピロリン酸 (Pyro-P)、フルクトース-6'-リン酸 (F6P)、 α -ニトロフェニルリン酸 (NPP)、グルコース-6'-リン酸 (G6P)、グルコース-1'-リン酸 (G1P) の増殖量は無機態リンの 56~80% と若干低かったものの、他のリン源ではオルトリン酸に匹敵する(あるいは越える)増殖量を示した。

考 察

様々な培養液について検討を行ったが *A. catenella* を良く増殖させることのできる完全人工培養液は作ることができなかった (Table 1)。培地から天然海水を除くことができなかった理由としては、海水中に存在する既知のビタミン、微量金属以外の物質を本藻が必須に要求するためと思われる。今回の試験では、数種の金属混液を培養液中に添加しても効果がなかった。しかし、改変石丸培地¹¹⁾に用いられている金属混液を添加すると高い増殖量が得られたことから、この金属混液にのみ含まれるセレンに本藻に対する増殖促進効果がある可能性がある。

よい増殖が得られた metals mix SW II 培地⁶⁾は、窒素、リン等の栄養塩濃度の低い夏季の土佐湾沖の外洋表層水を基礎としている。また、複雑な成分を含む土壌抽

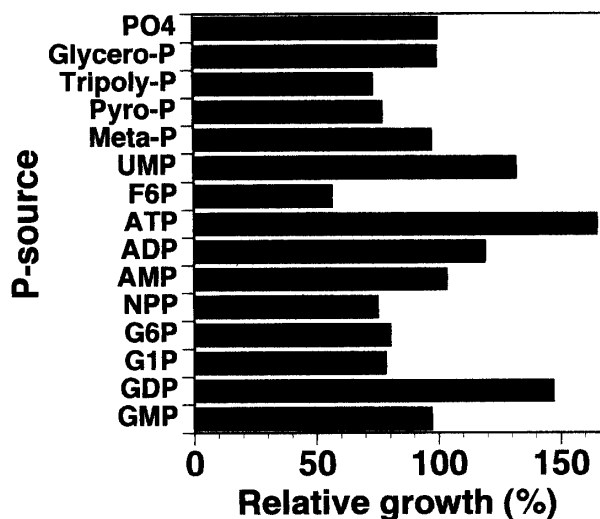


Fig. 8 Growth of *Alexandrium catenella* in media containing various phosphate sources at 25 μM , expressed as percent of maximum growth in the medium containing ortho phosphate at 25 μM .

Inoculation of experimental test tube was with cells previously incubated in metals mix SWII medium without phosphate until stationary phase.

出液を成分既知の金属混液へと置き換えていることから栄養要求性試験に十分使用可能である。

植物プランクトンの増殖の動力学に関する試験は、成分既知の完全人工培養液で行うことが望ましい。しかし、本藻は完全人工培養液では増殖が悪く、天然海水を基礎とした培養液を試験に用いざるを得なかった。そのため、培養液中の窒素濃度を変化させて試験をする際、添加した窒素源濃度が非常に低いと、添加した窒素源よりも培養液の基礎となる天然海水中にもとから含まれるアンモニアあるいは硝酸態窒素の影響を強く受け、窒素源の違いによる増殖の差をみるのが困難となった。そこで、培養液中の窒素濃度を変化させた試験では、添加した窒素源の濃度が海水中の栄養塩濃度よりも十分多くなる初期無機態窒素濃度 11.6 μM 以上のデータのみを解析に用いた (Figs. 2, 3)。なお、本藻は有機態窒素をほとんど利用できないことから、海水中の有機態窒素源が増殖に及ぼす影響は無視できると考えられる。一方、無機態リンに関する動力学的解析 (Figs. 5, 6) については、培養液の調製に使用した天然海水中の溶存態有機リン濃度を測定 (過硫酸カリウム法¹⁶⁾) したところ 0.1 μM 以下とごくわずかしかなかったことから、培地中にあらかじめ含まれる溶存態有機リン源が、試験に影響を及ぼす可能性はないと考えられる。

一般に、半飽和定数 (K_S) が低い植物プランクトンは、低濃度の栄養塩条件に適応しており、貧栄養環境下

での増殖に有利であると言われている。本研究で得られた *A. catenella* の窒素・リンに関する比増殖速度の半飽和定数を沿岸海域に生息する代表的な珪藻類、赤潮鞭毛藻と比較すると、全ての栄養塩に関して他種より高かった (Table 2)。また、*Alexandrium tamarense* について Yamamoto and Tarutani が求めたオルトリン酸摂取およびリン制限下における増殖に関するパラメータ¹⁷⁾ を基に Tilman and Kilham¹⁸⁾ の式を用いて増殖速度の半飽和定数を算出したところ $0.01 \mu\text{M}$ となり、本藻の値は *A. tamarense* と比較しても高かった。さらに、本藻の最大比増殖速度については、他の植物プランクトンよりも低い値であった (Table 2)。したがって、比増殖速度の半飽和定数について比較した限りにおいては、本藻が珪藻類、他の赤潮鞭毛藻と無機態窒素・リンの利用をめぐる競争した場合、本藻が優位になる可能性は低いと考えられる。

今回、海底泥抽出液を金属混液に置き換えた天然海水基礎培養液を使うことで、完全人工培養液では増殖の悪い本藻でも増殖速度の半飽和定数を算出することができた。しかし、培養に天然海水を基礎とした培養液を試験に用いなくてはならない現時点では、無機態窒素の増殖の半飽和定数に関しては $11.4 \mu\text{M}$ 以上のデータを解析に用いざるを得なく、低濃度下での結果を半飽和定数の算出に反映させることができないという問題点も残った。本来なら成分既知の完全人工培養液を用いて高濃度から低濃度まで栄養塩濃度を設定し試験を行うことが最も望ましい。無機態窒素の増殖速度の半飽和定数については、今後も本藻に適した完全人工培養液を見つけて試験を行うことや、更に栄養塩濃度の低い天然海水を培養液の基礎として用い、低濃度下の増殖を試験することなどでより妥当な増殖速度の半飽和定数へ近づけていく必要があると考えられる。

本藻の最小細胞内窒素含量は、窒素源として硝酸態窒素を用いた場合は 7.3 pmol/cell (Fig. 3A)、アンモニア態窒素を用いた場合は 7.0 pmol/cell (Fig. 3B) と算出され、両者に大差はなかった。*Alexandrium* 属プランクトンの最小細胞内窒素含量については本論文以外にも *Alexandrium minutum* の2株についてそれぞれ 3.0 pmol/cell , 2.7 pmol/cell , *Alexandrium tamarense* で 5.2 pmol/cell , *Alexandrium affine* で 17.0 pmol/cell との報告¹⁹⁾ がなされており、本藻の最小細胞内窒素含量はこれらプランクトンの中間的な値であった。また、本藻の細胞内最小リン含量については 0.32 pmol/cell (Fig. 6) と *A. tamarense* の 0.56 pmol/cell ¹⁷⁾ よりも低い値であった。

本研究で得られた *A. catenella* の最小細胞内含量を基に本藻が赤潮を形成するのに必要な栄養塩濃度の算出を

Table 2. Summary of reported maximum growth rate (μ_{max}) and half-saturation constant for growth (K_s) of nitrate, ammonium and ortho phosphate on various marine phytoplankton

Nutrient	Species	μ_{max} (day^{-1})	K_s (μM)	Reference
Nitrate	<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	0.97	0.8	12)
	<i>Chattonella antiqua</i>	0.81	1.0	13)
	<i>Chaetoceros didymum</i>	1.82	1.29	15)
	<i>Ditylum brightwellii</i>	2.02	0.73	15)
	<i>Thalassiosira</i> sp.	1.69	1.28	15)
	<i>Alexandrium catenella</i>	0.54	7.7	This study
Ammonium	<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	0.98	0.58	12)
	<i>Chattonella antiqua</i>	0.74	0.23	14)
	<i>Chaetoceros didymum</i>	1.71	0.48	15)
	<i>Ditylum brightwellii</i>	1.89	0.26	15)
	<i>Thalassiosira</i> sp.	1.63	0.77	15)
	<i>Alexandrium catenella</i>	0.55	3.3	This study
Phosphate ($\text{PO}_4\text{-P}$)	<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	0.82	0.14	12)
	<i>Chattonella antiqua</i>	0.83	0.11	13)
	<i>Chaetoceros didymum</i>	2.16	0.09	15)
	<i>Ditylum brightwellii</i>	2.00	0.16	15)
	<i>Skeletonema costatum</i>	1.36	0.32	15)
	<i>Thalassiosira</i> sp.	1.70	0.23	15)
	<i>Alexandrium catenella</i>	0.47	0.72	This study

試みた。本藻が赤潮を引き起こすためには、少なくとも $1,000 \text{ cells/ml}$ の細胞増殖が必要であり、これに最小細胞内含量を乗じて得た値を赤潮発生のために必要な栄養塩濃度とした。その結果、赤潮形成には硝酸態窒素濃度で $7.3 \mu\text{M}$ 、アンモニア態窒素濃度で $7.0 \mu\text{M}$ 、無機態リン濃度 $0.32 \mu\text{M}$ が必要であると推算された。しかし、*A. catenella* が発生する時期の和歌山県田辺湾の無機態窒素・リン濃度が、上述の赤潮形成に必要な無機態窒素・リン濃度を越えることはまれにしかなく、²⁰⁾ 本藻は現場海域において常に無機態窒素・リン源が制限されていると考えられる。

各種有機態窒素のうち、本藻はグルタミンを除く全てを窒素源として増殖に利用できなかった (Fig. 7)。一方、沿岸海域でしばしば高密度に増殖することが知られている *Skeletomena costatum* (洞海湾産) は、グルタミン、アルギニンが無機態窒素源とほぼ同様に利用できるとの報告がある。²¹⁾ 富栄養化の進行した海域では、有機態窒素濃度が無機態窒素濃度とほぼ等しいかもしくは上回る場合が多い²²⁾ ことから、この様な有機態窒素の利用特性の違いは、現場海域での本藻の出現、増殖や、他の赤潮プランクトンの増殖、優占種の交代に影響を及ぼしている因子の一つと考えられる。本藻は、無機態窒素に関して、他のプランクトンとの競合に不利であることに加え有機態窒素源のほとんどを利用できないことから、窒素源の利用に関しては無機態・有機態を問わず他のプランクトンとの競合に不利であると考えられる。

本藻は、試験に用いた各種リン源を全て増殖に利用可能であった (Fig. 8)。代表的な赤潮植物プランクトンのうち *Gymnodinium mikimotoi* は、本藻と同様に多種類の有機態リン源をオルトリン酸と同様に利用できるが、²³⁾ *Skeletomena costatum* や *Chattonella antiqua*, *Chattonella marina* は、今回試験した各種リン源のうち5~7種しか利用できなかったことが報告されている。¹⁵⁾ 沿岸海域には、無機態リン濃度とほぼ等しい有機態リンが存在しており、²²⁾ 和歌山県田辺湾においても有機態リンが無機態リン濃度に匹敵する濃度で存在することを著者らは確認している (未発表)。このことから、海水中のオルトリン酸の濃度が低いあるいは、使い尽くされた条件下においても本藻は多種類の有機態リン等を利用することで、各種リン源を幅広く利用できない藻類よりも優位に立つことができると考えられる。

本藻は、今回明らかになったように増殖速度に対する無機態窒素・リンの半飽和定数を比較する限りでは、他の赤潮植物プランクトンとの競合にも弱い生物と位置づけられる。しかし、実際は、本藻は沿岸海域において赤潮を形成するまで増殖することもある。この様に無機態窒素・リンの半飽和定数の低い本藻が現場海域において優占種となることができるのは、本藻の至適増殖水温が他の鞭毛藻よりも低いこと、オルトリン酸以外にも有機態リンをはじめ各種リン源を幅広く増殖に利用可能であることがその理由として考えられる。赤潮原因種を含む多くの渦鞭毛藻は20°C付近に至適水温がある²⁴⁾ のに対して、本藻はそれよりも低い15~20°Cで増殖速度、最大細胞密度が最も高くなり、また水温10°Cの低温でも増殖可能である。⁶⁾ これは、*C. antiqua* や *C. marina* といった鞭毛藻の至適温度が25°C付近である^{25,26)} のと比較しても低い。一方、*Heterosigma akashiwo* (大阪湾株)²⁷⁾ や *S. costatum*¹⁵⁾ といった赤潮原因種が有機態リン

を全くまたは数種を除きリン源として利用できないのに対して、本藻は有機態リンをはじめ各種形態のリン源を幅広く増殖に利用可能である。このことから、有機汚濁が進んだ海域において、水温が他の鞭毛藻が増殖しにくい15°C付近となり、オルトリン酸が欠乏すると、本藻は有機態リンをはじめ各種のリン源を利用して増殖し、オルトリン酸しか利用できない種、リン酸を幅広く利用できない種よりも優位となり、赤潮を形成すると考えられる。

以上のことから、本藻は富栄養型沿岸海域に適応しており、他の赤潮植物プランクトンと無機態窒素・リンの利用に関して競合した場合、本藻が他の赤潮プランクトンよりも優位に立つ可能性は低いことが明らかになった。また、富栄養化の進行した沿岸域の様な有機態リン等が多く存在する海域でオルトリン酸濃度が低くなった場合、他の赤潮プランクトンよりも優位に増殖できると推察された。

今回の結果から、本藻による貝類毒化の多発化・広域化、赤潮発生は、沿岸海域で有機態リンをはじめオルトリン酸以外のリン源の濃度あるいは構成比の上昇がその原因の一つではないかと考えられる。しかし、赤潮多発海域や富栄養化の進行した海域の現場海水中に含まれる有機態リンの構成成分についての知見はほとんどないことに加え、本藻が直接利用可能な有機態リンが現場海水中にどれだけ含まれているのかは明らかになっていない。本藻の現場海域での出現・増殖機構を解明するには、無機態窒素・リンに加え現場海域中の有機態リンの構成成分や本藻による現場海域中の有機態リン利用効率などについて今後、詳細に検討する必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、*Alexandrium catenella* の無菌・クローン株を分譲くださいました京都大学名誉教授 (現 福山大学工学部) 石田祐三郎先生、京都大学大学院農学研究科左子芳彦先生に心よりお礼申し上げます。また、本研究を行うにあたりご助言をいただいた高知大学農学部 足立真佐雄先生、ご協力をいただいた永山純子さんに感謝いたします。

文 献

- 1) 宮沢啓輔：日本における最近の貝毒発生状況。日水誌, 60, 683-684 (1994).
- 2) 竹内照文：貝毒プランクトンの生態学—紀伊半島西岸域一, 「貝毒プランクトン—生物学と生態学」(福代康夫編), 恒星社厚生閣, 東京, 1985, pp. 98-108.
- 3) K. Fukami, T. Nishijima, and Y. Hata: Availability of deep seawater and effect of bacteria isolated from deep sea water on mass culture food microalga *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 931-936 (1992).

- 4) Y. Ishida, M. Eguchi, and H. Inoue: Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**, 197-203 (1986).
- 5) Y. Sako, C.-H. Kim, H. Ninomiya, M. Adachi, and Y. Ishida: Isozyme and cross analysis of mating populations in the *Alexandrium catenella/tamarensis* species complex, in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler, and D. M. Anderson), Elsevier, New York, 1990, pp. 320-323.
- 6) A. Matsuda, T. Nishijima, and K. Fukami: Effects of nitrogen deficiency on the PSP production by *Alexandrium catenella* under axenic cultures, in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. by T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 1996, pp. 305-308.
- 7) J. Monod: The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 371-394 (1949).
- 8) W. H. Press, A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery: ニュメリカルレシピ・イン・シー: C言語による数値計算のレシピ (丹慶勝市他訳), 技術評論社, 東京, 1993, pp. 505-510.
- 9) H. Iwasaki: The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.*, **121**, 173-187 (1961).
- 10) L. Provasoli, J. J. A. McLaughlin, and M. R. Droop: The development of artificial medium for marine algae. *Archiv. fur mikrobiol.*, **25**, 392-428 (1957).
- 11) T. Ishimaru, T. Takeuchi, Y. Fukuyo, and M. Kodama: The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*, in "Red Tides, Biology, Environmental Science and Toxicology" (ed. by T. Okaichi, D. M. Anderson and T. Nemoto), Elsevier, New York, 1989, pp. 357-360.
- 12) 山口峰生: *Gymnodinium mikimotoi* の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. 南西水研報, **27**, 251-394 (1994).
- 13) Y. Nakamura, J. Takashima, and M. Watanabe: Chemical environment for red tides due to *Chattonella antiqua* in the Seto Inland Sea, Japan. Part 1. Growth bioassay of the seawater and dependence of growth rate on nutrient concentrations. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **44**, 113-124, (1988).
- 14) Y. Nakamura: Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **41**, 381-387 (1985).
- 15) 山口峰生, 松山幸彦: 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究・5ヶ年の研究報告書, 南西海区水産研究所, 1994, pp. 77-91.
- 16) 日本海洋学会編: 有機態リン, 「海洋環境調査法」, 恒星社厚生閣, 東京, 1979, pp. 279.
- 17) T. Yamamoto and K. Tarutani: Growth and phosphate uptake kinetics of *Alexandrium tamarensis* from Mikawa bay, Japan, in "Harmful and Toxic Algal Blooms" (ed. by T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 1996, pp. 293-296.
- 18) D. Tilman and S. S. Kilham: Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.*, **12**, 375-383 (1976).
- 19) K. Flynn, K. J. Jones, and K. J. Flynn: Comparisons among species of *Alexandrium* (Dinophyceae) grown in nitrogen- or phosphorus-limiting batch culture. *Mar. Biol.*, **126**, 9-18 (1996).
- 20) 竹内照文: 主要赤潮種の増殖動態—田辺湾におけるアレキサンドリウムの増殖動態—, 「瀬戸内海の赤潮プランクトン」, 月刊海洋, **24**, 17-24 (1992).
- 21) 山田真知子, 新井義昭, 鶴田新生, 吉田陽一: 海産植物プランクトンの有機態窒素化合物利用能. 日水誌, **49**, 1445-1448 (1983).
- 22) 城久: 大阪湾における富栄養化が漁業生産に及ぼす影響について. 大阪府水試研報, **7**, 1986, pp. 1-174.
- 23) 山口峰生: 海洋性渦鞭毛藻の増殖に及ぼす栄養塩構成比の影響, 「平成4年度栄養塩類構成比変化影響調査報告書」, 弘前大学, 1993, pp. 15-29.
- 24) H. Iwasaki: Physiological ecology of red tide flagellate, in "Biochemistry and Physiology of Protozoa second edition, vol. 1" (ed. by M. Levandowsky and S. H. Hunter), Academic Press, New York, 1979, pp. 357-393.
- 25) 山口峰生, 今井一郎, 本城凡夫: 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日水誌, **57**, 1277-1284 (1991).
- 26) Y. Nakamura and M. M. Watanabe: Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on the growth of *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **39**, 110-114 (1984).
- 27) M. M. Watanabe, Y. Nakamura, S. Mori, and S. Yamochi: Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jap. J. Phycol.*, **30**, 279-288 (1982).