



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	培養条件下で観察された赤潮ラフィド藻 <i>Chattonella marina</i> の 高い増殖速度
Author(s)	今井, 一郎
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 62(3), 71-74
Issue Date	2012-12-14
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51115
Type	departmental bulletin paper
File Information	62(3)p71-74.pdf



培養条件下で観察された赤潮ラフィド藻 *Chattonella marina* の高い増殖速度

今 井 一 郎

(2012 年 8 月 27 日受付, 2012 年 9 月 27 日受理)

High growth rates of the red tide flagellate *Chattonella marina* (Raphidophyceae) observed in culture

Ichiro IMAI

Abstract

Growth of the fish-killing raphidophyte *Chattonella marina* MS3-P was examined in the 200 mL modified SWM-3 culture medium in a 500-mL flask at a temperature of 25°C with light intensity of 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ under a photo-cycle of 14hL-10hD. Growth conditions were supposed to be ideal and sufficient to achieve the potentially maximum growth rates, and the obtained growth rates were 1.42 and 1.48 divisions day^{-1} . *C. marina* MS3-P also grew in the filter-sterilized (0.1 μm pore) seawater (collected in winter) with a growth rate of 0.81 divisions day^{-1} , suggesting a possibility that *C. marina* can reach from the cell density of several cells mL^{-1} to the red tide level of several hundreds cells mL^{-1} (fish-killing level) or higher within about a week. These rather higher growth rates presumably contribute to form harmful red tides in the coastal seas of Japan such as the Seto Inland Sea, Yatsushiro Sea, and other embayments.

Key words : Red tide, *Chattonella marina*, Growth, Nutrients

緒 言

赤潮は、水中の微小生物、特に光合成を行う植物プランクトンの大量増殖や集積の結果発生する海水の着色現象の事を指す(岩崎, 1976)。わが国沿岸域においては高度経済成長時代に富栄養化が顕著に進行したことにより、赤潮の発生件数は著しく増加し規模も大きくなり、養殖魚介類の大量斃死が引き起こされるようになって社会問題化した(Imai et al., 2006)。赤潮を形成する植物プランクトンは多種多様であり 100 種以上に及ぶが(福代ら, 1990), 中でもラフィド藻の *Chattonella* 属の種による養殖魚介類の斃死被害は群を抜いて大きい(今井, 2012)。

赤潮が発生するためには当該種の細胞数の増加が前提となるが, *Chattonella* 属の種においては縦二分裂による細胞分裂を通じて細胞数を増加させる(今井・山口, 1993)。従って、増殖速度を把握することは、赤潮の発生過程を理解する上で基本的に重要な事項である(山口, 2000)。これまでに、有害な *Chattonella* 属の種の増殖に与える環境要因(水温、塩分、光強度、栄養塩等)の影響について検討がなされてきた(Nakamura and Watanabe, 1983a, b; 山口ら, 1991; Khan et al., 1998; Marshall and Hallegraeff, 1999; Yamaguchi et al., 2008, 2010; 紫加田ら, 2010, 2011)。しかしながら、環境要因による制限が殆どない条件下で、

どの程度の最大増殖速度が実際に達成できるのかについて検討された例はほとんどない。本研究では、*Chattonella marina* の無菌クローン培養株を用いて実施した培養実験の結果を報告する。

材料および方法

実験には、瀬戸内海西部の周防灘から 1985 年に分離培養し、ミクロピペット洗浄法(岩崎, 1967)により無菌化したクローン培養株 *Chattonella marina* MS3-P を用いた。継代維持培養および培養実験には、栄養強化培地である改変 SWM-3 培地 (Table 1) を使用した (Chen et al., 1969; 伊藤・今井, 1987)。

温度 25°C, 光強度 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 明暗周期 14hL : 10hD の条件下で前培養を行い、良好に増殖した *C. marina* MS3-P 株 (29,800 cells mL^{-1} の細胞密度) を改変 SWM-3 培養液で 10 倍希釈し、500 mL 容の三角フラスコ中の 200 mL の培養液に 1 mL 接種して培養実験を行った。培養開始時の細胞密度は 14.8 cells mL^{-1} であり、指数関数的増殖を充分に行う事ができるように設定した。実験のフラスコは 2 本設け、前培養と同じ条件下で培養を実施し、原則として 2 日に 1 度サンプリングを行い、各 4 回の計数で細胞数を求めた。また指数関数的増殖期のデータか

Table 1. Composition of the modified SWM-3, an enriched seawater medium.

Substance		Substance	
NaNO ₃	2 mM	P-1metals (in 10 ml)	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.1 mM	H ₃ BO ₃	1 m mol
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.2 mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.5×10^{-2} m mol
Fe-EDTA	2 μ M	ZnCl ₂	4.0×10^{-3} m mol
Na ₂ EDTA	30 μ M	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0×10^{-4} m mol
Na ₂ SeO ₃	2 nM	CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.0×10^{-6} m mol
TRIS	500 mg	S-3vitamins (in 2 ml)	
P-1 metals	10 ml	B ₁ -HCl	0.5 mg
S-3 vitamins	2 ml	Ca-Pantothenate	0.1 mg
Seawater up to	1,000 ml	Nicotinic acid	0.1 mg
pH	7.7~7.8	p-Aminobenzoic acid	10 μ g
		Biotin	1 μ g
		Inositol	5 mg
		Folic acid	2 μ g
		Thymine	3 mg
		Vitamin B ₁₂	1 μ g

ら、増殖速度 (1 日当たりの分裂回数: divisions day⁻¹) を得た。

次に自然海水中における *C. marina* MS3-P 株の増殖を検討した。1986 年 12 月 3 日に広島湾から得た海水 (塩分 31.6 psu) を GF/C ガラス繊維濾紙で濾過して 1 ヶ月間以上保存し、孔径 0.1 μ m の滅菌フィルターで濾過したものを前培養および実験に用いた。改変 SWM-3 培養液中で良好に増殖した上述の本藻 (29,800 cells mL⁻¹ の細胞密度) を濾過滅菌海水で 100 倍希釈し、50 mL 容の三角フラスコ中の 25 mL の濾過滅菌海水に 0.5 mL 接種して前培養を行った (約 6 cells mL⁻¹)。前培養を 2 週間行って濾過滅菌海水に馴致増殖させた細胞 (70 cells mL⁻¹) を用い、300 mL 容の三角フラスコ中の 100 mL の濾過滅菌海水に 3 mL 接種して (約 2 cells mL⁻¹) 培養実験を全培養と同じ条件下で実施した。原則として 3 日に 1 度サンプリングを行い、各 4 回の計数で細胞数を調べ、上記と同様に増殖速度 (1 日当たりの分裂回数: divisions day⁻¹) を求めた。

結果および考察

改変 SWM-3 培地中における *Chattonella marina* MS3-P 株の増殖を Fig. 1 に示した。培養実験の開始後、誘導期はほとんど認められず、すぐに増殖を開始した。各々の培養容器中の *C. marina* MS3-P 株の増殖速度は、1.42 divisions day⁻¹ と 1.48 divisions day⁻¹ であった。本種の増殖は温度 25°C、塩分 31.3 psu の条件下、光強度 110 μ mol photons m⁻² sec⁻¹ 以上で概ね飽和するので (山口ら, 1991)、本研究の光条件は飽和状態と思われる。本研究と同一培養株で山口ら (1991) によって導き出された光強度 (I) と増殖速度 (m) の関係は、 $\mu = 1.39 \times (I - 10.51) / (I + 42.36)$ であることから、

理論的な最大増殖速度は 1.39 divisions day⁻¹ となる。このことより本研究で得られた上記の増殖速度の値は、培養条件下で達成されるほぼ最大の増殖速度と考える事ができよう。

オーストラリア産の *C. marina* CMPL01 株は、光強度 400 μ mol photons m⁻² sec⁻¹ 以上で増殖が飽和し (温度 25°C、塩分 25psu)、最大増殖速度は 1.57 divisions day⁻¹ と報告されている (Marshall and Hallegraeff, 1999)。増殖が飽和する光強度が日本産の *C. marina* よりもかなり高く (山口ら, 1991; Marshall and Hallegraeff, 1999)、得られる最大の増殖速度も本研究の値よりも少し高い値と言えよう。

鹿児島湾産の *C. marina* の増殖速度は、温度 25°C と塩分 30 psu の条件下、光強度 100 μ mol photons m⁻² sec⁻¹ 以上で飽和し、最大値は光強度 140 μ mol photons m⁻² sec⁻¹ で 0.74 divisions day⁻¹ が報じられている (Khan et al., 1998)。この最大増殖速度は本研究の約半分の値であり、かなり低いように思われる。Khan et al. (1998) による研究はねじ口試験管を用いて行われており、ガス交換の程度が培養容器中における植物プランクトンの増殖に大きな影響を与える事から (Yamamoto and Nakahara, 2005)、ガス交換があまり良くなかった結果である可能性が考えられる。

Honjo (1987) は三重県五カ所湾において *C. marina* の出現密度をモニターした。そして組織培養用容器の各ウェルの中に Guillard f 培地 (Guillard and Ryther, 1962) を 0.2 mL 入れて (塩分 33.5 psu)、海水中から 1 細胞ずつキャピラリーで拾い上げ、培地で 2 回洗浄して各ウェルに接種し、それぞれの増殖を温度 24°C、照度 3,000 lux、明暗周期 12hL: 12hD の条件下で 3 日間観察した。その結果、3 日間で最大の増殖は 4 つの細胞の平均で 19.25 倍 (1.42 divisions day⁻¹) が観察され、その中で最大の速度を示した細胞

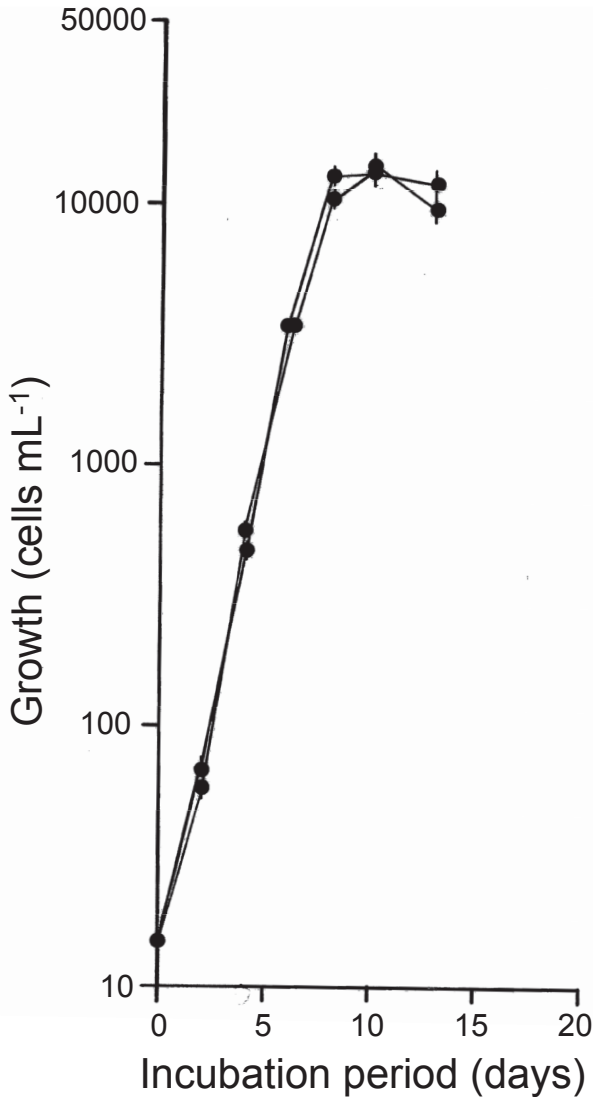


Fig. 1. Growth of the fish-killing raphidophyte *Chattonella marina* MS3-P in the 200 mL modified SWM-3 culture medium in a 500-mL flask at a temperature of 25°C with light intensity of 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ under a photo-cycle of 14hL: 10hD. Error bars indicate standard deviations (SD).

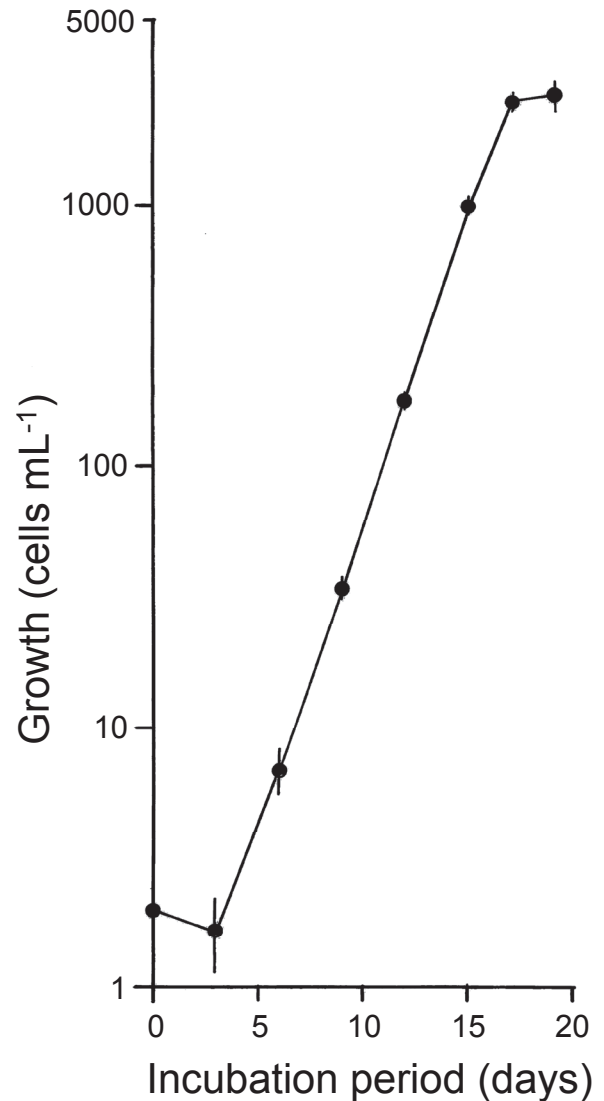


Fig. 2. Growth of the fish-killing raphidophyte *Chattonella marina* MS3-P in the 100 mL 0.1 μm -filter sterilized seawater in a 300-mL flask at a temperature of 25°C with a light intensity of 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ under a photo-cycle of 14hL: 10hD. Error bars indicate standard deviations (SD).

は3日間で27倍にまで増加し、増殖速度は1.59 divisions day^{-1} と算出されている (Honjo, 1987)。本研究で得られた1.42と1.48 divisions day^{-1} は上述の4細胞の増殖速度の平均値と匹敵している。

濾過滅菌した海水中における *C. marina* MS3-P 株の増殖を Fig. 2 に示した。培養実験の開始後3日間の誘導期の後、本藻は増殖を開始した。得られた *C. marina* MS3-P 株の増殖速度は、0.81 divisions day^{-1} となった。これは細胞数が4日間で約10倍、8日間で約100倍に増加する増殖速度であり、現場海域で10 cells mL^{-1} 以下の低い細胞密度から、養殖ブリの斃死の警報発生レベルである100 cells mL^{-1} 以上の細胞密度の赤潮を、容易に発生させるに足る増殖速度と見なす事ができる (今井, 2000; Imai et al., 2006)。

本実験において *C. marina* MS3-P 株は2,620 cells mL^{-1} にまで達したが、その際には細胞の色調が薄くなり明らかに栄養塩類を消費し尽くした兆候を呈していた。近縁種の *Chattonella antiqua* において、窒素やリンに関する最小細胞内持ち分 (minimum cell quota) が求められており、その値はNで7.8 μmol 、Pで0.62 μmol と報じられている (Nakamura et al., 1988)。 *C. antiqua* と *C. marina* の最小細胞内持ち分が等しいと仮定すると、1 μM のNは128 cells mL^{-1} の *C. marina* に、1 μM のPは1,613 cells mL^{-1} の細胞密度に相当すると試算される。これらの値を基に、増殖実験に用いた広島湾海水中に含まれていた栄養塩類の量を推算すると、Nが増殖の制限要因であった場合には20.5 μM のNが含まれ、Pが増殖の制限要因であった場合には1.62

μM の P 含有されていたということになる。これらは比較的高い値であるが、冬季の広島湾の栄養塩濃度は N で 10 μM , P で 1 μM を超えるのは普通であることから(山口ら, 1995), 妥当な結果と考えられる。

我が国沿岸の *Chattonella* 属の赤潮形成種 *C. antiqua*, *C. marina*, *C. ovata* は、何れも養殖魚を殺す強力な活性を有する。現場海域に、栄養塩類を巡る強力な競争者である珪藻類が不在の場合にこれら *Chattonella* 属の種は赤潮を形成するが(今井, 2000, 2012), 本研究で得られた様な比較的高い増殖速度で増殖すれば、数 cells mL^{-1} レベルの細胞密度から、1 週間程度で養殖魚介類を斃死させるレベルの密度(数百 cells mL^{-1})の赤潮の形成にまで至る事は十分に説明可能と考えられる。

謝 辞

本研究において、有益なご助言を戴いた当時の南西海区水産研究所赤潮部赤潮生物研究室長の伊藤克彦博士、ならびに発生予察研究室の古賀文洋博士と山口峰生博士に心から感謝申し上げます。本研究は、環境庁の国立機関公害防止等試験研究費による“赤潮の発生予知技術の開発に関する研究”の一環として行われた。

参 考 文 献

- Chen, L.C.M., Edelman, T. and McLachlan, J. (1969) *Bonne-maisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.
- 福代康夫・高野秀昭・千原光雄・松岡数充編 (1990) 日本の赤潮生物—写真と解説—. 407 pp, 内田老鶴圃, 東京.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- Honjo, T. (1987) Growth potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, central Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **34**, 119-124.
- 今井一郎 (2000) ラフィド藻赤潮の発生機構と予知. In: 有害・有毒赤潮の発生と予知・防除(石田祐三郎・本城凡夫・福代康夫・今井一郎編)水産研究叢書 48, 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 29-70.
- 今井一郎 (2012) シャットネラ赤潮の生物学. 171 + IX pp, 生物研究社, 東京.
- 今井一郎・山口峰生 (1993) *Chattonella antiqua* (Hada) Ono. In: 藻類の生活史集成 第3巻 単細胞性・鞭毛藻類(堀輝三編), 内田老鶴圃, 東京, pp. 175-176.
- Imai, I., Yamaguchi, M. and Hori, Y. (2006) Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.*, **1**, 71-84.
- 伊藤克彦・今井一郎 (1987) ラフィド藻. In: 赤潮生物研究指針(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, pp. 122-130.
- 岩崎英雄 (1967) 微細藻類の分離と培養. 55pp, 日本水産資源保護協会, 東京.
- 岩崎英雄 (1976) 赤潮—その発生に関する諸問題—. 126pp, いるかぶっくす 6, 海洋出版, 東京.
- Khan, S., Arakawa, O. and Onoue, Y. (1998) Physiological investigations of a neurotoxin-producing phytoflagellate, *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Aquacult. Res.*, **29**, 9-17.
- Marshall, J.A. and Hallegraeff, G.M. (1999) Comparative eco-physiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from south Australia and Japanese waters. *J. Plankton Res.*, **21**, 1809-1822.
- Nakamura, Y. and Watanabe, M.M. (1983a) Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114.
- Nakamura, Y. and Watanabe, M.M. (1983b) Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 151-155.
- Nakamura, Y., Takashima, J. and Watanabe, M. (1988) 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.
- 紫加田知幸・櫻田清成・城本祐助・生地 暢・吉田 誠・大和田紘一 (2010) 八代海における植物プランクトンの増殖に与える水温、塩分および光強度の影響. 日本水産学会誌, **76**, 34-45.
- 紫加田知幸・櫻田清成・城本祐助・小山長久・生地 暢・吉田 誠・大和田紘一 (2011) 八代海におけるラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖および栄養塩との関係. 日本水産学会誌, **77**, 40-52.
- Yamaguchi, H., Sakamoto, S. and Yamaguchi, M. (2008) Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, **7**, 26-32.
- Yamaguchi, H., Mizushima, K., Sakamoto, S. and Yamaguchi, M. (2010) Effects of temperature, salinity, and irradiance on growth of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, **9**, 398-401.
- 山口峰生 (2000) 赤潮原因プランクトンの増殖生理. 月刊海洋, 号外 **21**, 107-115.
- 山口峰生・今井一郎・本城凡夫 (1991) 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. 日本水産学会誌, **57**, 1277-1284.
- 山口峰生・今井一郎・松尾 豊 (1995) 広島湾における植物プランクトンの現存量と光合成速度の季節変化. 南西水研報 **28**, 63-72.
- Yamamoto, Y. and Nakahara, H. (2005) Competitive dominance of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in nutrient-rich culture conditions with special reference to dissolved inorganic carbon uptake. *Phycol. Res.*, **53**, 201-208.