HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻Alexandrium tamarenseと珪藻Skeletonema sp.の栄養塩利用性の比較
Author(s)	夏池, 真史; 山本, 圭吾; 中嶋, 昌紀 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 68(1), 17-26
Issue Date	2018-03-16
DOI	https://doi.org/10.14943/bull.fish.68.1.17
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68503
Type	departmental bulletin paper
File Information	bull.fish.68.1.17.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
68(1), 17–26, 2018.
DOI 10.14943/bull.fish.68.1.17

大阪湾における麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* と珪藻 *Skeletonema* sp. の栄養塩利用性の比較

夏池　真史[1)]・山本　圭吾[2)]・中嶋　昌紀[2)]・澤山　茂樹[3)]・今井　一郎[4)]

(2017 年 11 月 30 日受付，2018 年 1 月 11 日受理)

Comparison of nutrient availabilities between the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* and the non-toxic diatom *Skeletonema* sp. in Osaka Bay, Japan

Masafumi Natsuike[1)], Keigo Yamamoto[2)], Masaki Nakajima[2)], Shigeki Sawayama[3)] and Ichiro Imai[4)]

Abstract

Alexandrium tamarense is a toxic dinoflagellate known to cause paralytic shellfish poisoning to human and marine animals. Previous studies observed the depletion of macronutrients during the *A. tamarense* blooming periods in Osaka Bay, Japan, and suggest the different nutrient availabilities between surface and bottom layers allow *A. tamarense* to grow. In this study, the field observation and Algal growth potential (AGP) bioassay with *A. tamarense* and the non-toxic, dominant diatom *Skeletonema* sp. in Osaka Bay are conducted to compare the nutrient availabilities during the period of *A. tamarense* occurrences in the Bay. The field observations confirmed the depletion of dissolved inorganic nitrogen, PO_4-P, and SiO_2-Si concentrations with the *A. tamarense* occurrences in spring. The phosphorous limitation to both species at surface layer were frequently determined by the AGP bioassay in spring. The bioassay also revealed the higher AGP of both species at deeper water than those at surface water and different limiting nutrients between surface and bottom waters or between *A. tamarense* and *Skeletonema* sp. These different nutrient availabilities probably allow *A. tamarense* and dominant diatoms to coexist and grow in Osaka Bay during spring.

Key words : *Alexandrium tamarense*, *Skeletonema*, Nutrients, Bioavailability, Osaka Bay, Algal growth potential, Limiting nutrient

緒　　言

麻痺性貝毒 (PSP) は，大量発生した有毒微細藻類を摂餌することによって高毒化した二枚貝類等を，人間がきっ食することによって麻痺性症状を発症する食中毒である。PSP 原因藻類による規制値を超える二枚貝類等の毒化は，水産物の安定供給の課題となっている。大阪湾では有害有毒藻類の監視が開始された 1960 年代より長らく，規制値 (4 MU/g) を超える麻痺性貝毒 (PSP) による二枚貝類の毒化は観測されていなかった。しかし，2002 年春季に初めて PSP 原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の出現 (最高密度 37 cells/ml) と規制値を超えるアサリの毒化 (最高毒量 18.0 MU/g) が報告された (山本，2004)。それ以降，ほぼ毎年のように春季に *A. tamarense* の大量出現と二枚貝類の高毒化が発生している。大阪湾における *A. tamarense* の出現密度は他海域と比較して大規模になる傾向がある (山本ら，2009) ため，本種大量発生のメカニズムを解明する上で重要な海域と言える。

大阪湾を含む瀬戸内海域では高度経済成長期以降，陸域負荷による富栄養化が著しかったが，近年の排水処理等の進展による環境改善によって栄養塩類濃度と赤潮発生件数の減少が報告されている (Imai et al., 2006)。瀬戸内海域の広島湾や大阪湾において，*A. tamarense* の大規模出現時に栄養塩濃度が低いことが報告されており (Itakura et al., 2002 ; 山本ら，2009)，本種と多種競合植物プランクトンとの間で栄養塩類の競合が起こっていることが示唆されている。しかしながら，*A. tamarense* 出現時の多種競合プランクトンの栄養塩類の利用性に関する研究は少ない。

自然水に特定の藻類を接種して培養し，得られる増殖量からその自然水が持つ潜在的な藻類の生産能力を知る

[1)] 東京工業大学環境・社会理工学院
(*Tokyo Institute of Technology, School of Environment and Society*)
[2)] 大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター
(*Marine Fisheries Research Center, Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture*)
[3)] 京都大学大学院農学研究科
(*Graduate School of Agriculture, Kyoto University*)
[4)] 北海道大学大学院水産科学研究院
(*Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University*)

方法として Algal Growth Potential (AGP) 試験が知られている。リービッヒの最小律に基づいて，自然水に藻類の増殖に必要な栄養塩類を添加してその AGP を測定することによって，自然水中において藻類の増殖を制限する要因を特定することが試みられている (例えば Waiser and Brants, 1995 ; 紫加田ら，2009)。著者らの研究グループによる 2008 年の大阪湾における現場観測および *A. tamarense* を接種藻類とした AGP 試験の結果，本種が出現する春季に，無機態窒素，リンおよび珪素濃度が，藻類増殖の半飽和定数を下回るほど低くなる場合があること，表層における藻類増殖能よりも底層の AGP が高い場合，表層と底層で異なる栄養塩が *A. tamarense* 増殖の制限要因となる場合がある事を報告した (Natsuike et al., in press)。*A. tamarense* は，鞭毛による遊泳能力を有し，日収鉛直移動によって夜間に栄養塩躍層下まで移動することが報告されている (Fauchot et al., 2005)。これら低い栄養塩濃度と表層と底層で異なる栄養塩類の利用性を有する環境下では，*A. tamarense* は本種の有力な競合種と考えられる珪藻類よりも栄養塩の取り込みに関して有利である可能性がある。本研究では，大阪湾における *A. tamaresne* と珪藻類の種間競合におよぼす栄養塩類の利用性の影響を検討することを目的に，水質調査を実施するとともに本湾から単離した *A. tamarense* および珪藻 *Skeletonema* sp. を本湾で採取した海水サンプルに接種して AGP 試験を行い，接種藻類の最大増殖収量と増殖を制限する栄養塩類の特定を試みた。

材料および方法

現場観測と水質分析

大阪湾東部に設けた 2 定点 (St. 11, St. 13, Fig. 1) において，*A. tamarense* が出現する 2009 年と 2010 年の 1 月から 5 月に月 1〜2 回の頻度 (2009 年のみ月 2 回) で日中に水質調査行った。これらの定点では，大阪湾において 2007 年に *A. tamarense* の大量出現が確認されており (山本ら，2009)，本種が潜在的に大量に発生する環境である。現場において，他項目水質計 (ACL215-DK, JFE アレック) を用いて水温および塩分の鉛直分布を確認するとともに，バケツ採水によって 0 m 層の海水を，北原式採水器を用いて 5，10 m 層の海水を採取した。

採取した海水は，酸洗浄したポリエチレン製ボトルに入れて，暗所に冷蔵保存して実験室に持ち帰った。この一部を海水採取後 24 時間以内に孔径 0.45 μm のガラス繊維フィルター (GF/F, Whatman) でろ過した。ガラス繊維フィルターは，塩酸洗浄した後，電気炉で 450°C で 1 時間加熱して有機物を燃焼除去したものを使用した。ろ過に用いたフィルターとろ水を水質分析および AGP 試験に用いるまで，暗所冷凍 (−30°C) で保存した。また，残りの海水に終濃度 0.37% のホルマリンを添加して固定し，植物プランクトンの観察に供するまで暗所で保存した。

冷凍保存した濾過海水サンプルを，暗所室温で解凍した後，サンプル中の溶存態無機栄養塩濃度 (NO_2-N, NO_3-N, PO_4-P, SiO_2-Si) を，オートアナライザー (QuAAtro 2-HR, BLTEC) を用いて測定した。NH_4-N 濃度を，インドフェノール法 (西條・三田村，1995) に従って分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) を用いた比色定量によって測定した。NH_4-N, NO_2-N，NO_3-N 濃度を合計し，溶存無機態窒素 (DIN) とした。ろ過に用いたフィルターを室温，暗所条件下で自然解凍した後，90% アセトンに浸潤した上で冷暗所にて 24 時間静置してクロロフィル *a* 色素を抽出した。その後，蛍光光度計 (10AU005, Turner Designs) を用いて抽出物の蛍光値を計測し，測定値からクロロフィル *a* 濃度を計算した。固定した海水サンプルを，沈殿法 (Utermol, 1958) によって約 10 倍に濃縮した。濃縮しサンプルに Calcofluor White M2R (Fritz and Triemer, 1985) を添加して 30 分間静置して染色した。1 mL のサンプルをスライドガラス上に滴下し，落射蛍光顕微鏡 (TE 300, Nikon) を用いて UV 励起光 (350 nm) 下で鎧版を観察し，外部形態，頂孔板の形態及び第 1，第 4 頂板間の腹孔の有無で *A. tamarense* の種同定および細胞密度の計数を行った。この操作を 1 サンプルにつき 3 回行って平均値を細胞密度とした。

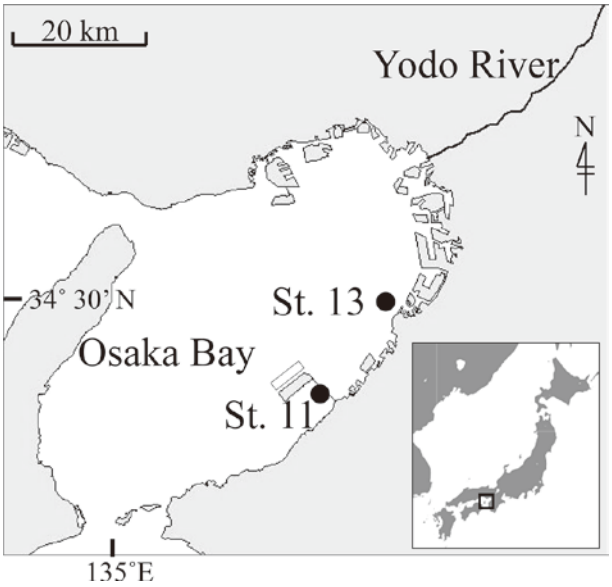

Fig. 1. Locations of the sampling stations in the Osaka Bay (●).

AGP 試験

共試藻類

2007 年の大阪湾より単離された *A. tamarense* 有菌株を，Imai and Yamaguchi (1994) に従って無菌化した。2010 年 2 月 1 日に大阪湾の湾奥部より，先端を熱で引き伸ばしたパスツールピペットを用いて *Skeletonema* sp. を単離した。培養したこの *Skeletonema* sp. 有菌株を超音波処理の後に，アルコール滅菌した孔径 20 μm のナイロンメッシュ上に展開した。フィルター上の藻体に付着した細菌をすすぎ落とすように，オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分) した海

水で洗浄した後に，フィルター残渣を滅菌した培地を分注した 48 穴マイクロプレートの各ウェルに回収して培養した。培養の一部を DAPI (4′,6～diamidino～2～phenylindole) 溶液で染色し，蛍光顕微鏡 (E800, Nikon) を用いて UV 励起 (350 nm) 下，1,000 倍で検鏡した。細菌が検出されなかったウェル内の *Skeletonema* sp. 培養を無菌株とみなした。*A. tamarense* および *Skeletonema* sp. の有菌・無菌株の培養には，オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分) した改変 SWM-3 培地 (Chen et al., 1969 ; Imai et al., 1996 ; Table 1) を用い，15°C，光強度 130–150 μmol photons m^{-2} s^{-1}(light : dark = 12 h : 12 h) の条件で培養した。培地の元になる海水には，孔径 0.45 μm のガラス繊維ろ紙 (GF/F, Wahtman) で濾過した大阪湾で採取した海水を使用した。培養容器として，塩酸洗浄したガラス製 50 mL 容三角フラスコを用いた。

前培養

AGP 試験に用いる藻類を維持培養に直接接種すると，維持培養に含まれる栄養塩類の持ち込みの影響によって，結果に重大な誤差を与えることが報告されている (西嶋・深見，1994)。そこで，維持培養からの栄養塩類の混入を極力防ぐとともに，AGP 試験に用いる藻類を栄養塩飢餓状態にするための前培養を行った。前培養の第 1 継代として対数増殖期の維持培養 1 mL を，20 倍に希釈した改変 SWM-3 培地 100 mL に接種した。培養容器には 250 mL 容のポリカーボネート製透明角型ビン (Nalgene nunc) を用い，培地はオートクレーブによって滅菌した (121°C, 20 分)。培養期間は，両培養が対数増殖期の後期に達するまでとし，*A. tamarense* 株では 17 日間，*Skeletonema* sp. 株では 10 日間であった。この前培養第 1 継代 1.0 mL を，100 倍に希釈した改変 SWM-3 培地 200 mL を分注し，オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分) した 500 mL 容ポリカーボネート製角型ビン (Nulgene nunc) に接種した。この前培養第 2 継代を *A. tamarense* 株で 14 日間，*Skeletonema* sp. 株で 7 日間，対数増殖後期になるまで培養した。AGP 試験では，この前培養第 2 継代 0.1 mL を培地 4.0 mL に接種した。よって前培養に含まれる栄養塩類の持ち込みは，改変 SWM-3 培地の栄養塩類の濃度の約 4,000 分の 1 となる。さらに，前培養のベースとなる濾過海水にはサンプリングで得た大阪湾の海水サンプルを用いた。この海水の無機栄養塩類濃度は，DIN で 5.0 μM，DIP で 0.1 μM であった。これらを合わせると，前培養からの栄養塩類の持ち込みは，最大で N で 0.62 μM, P で 0.005 μM となる。水質分析の結果，調査で採取した試料における栄養塩濃度は, DIN で平均 6.7 μM，PO_4-P で平均 0.21 μM であり，前培養による栄養塩類の持ち込みは，AGP 試験に重大な誤差を与えないと判断した。AGP 試験も含め，培地の作成や培養株の接種等の操作は，クリーンベンチ内で無菌的に行われた。また，培養容器およびチップなどの実験器具は 3 mol L^{-1} の塩酸に 24 時間浸潤した後に超純水で洗浄したものを用いることによって，栄養塩類の混入を可能な限り排除した。

AGP 試験

現場調査で得た試料の中で，本種が比較的高密度に出現した (Fig. 2)，3～5 月の 0，10 m 層のろ過海水試料を AGP 試験に用いた。各試料を孔径 0.22 μm のシリンジフィルター (Minisart, Sartorius) を用いてろ過滅菌し，3.6 mL を滅菌済み 8 mL 容ポリスチレン製試験管 (Fisher scientific) に分注した。これに 0.4 ml の各栄養因子を添加した。添加する栄養因子は，改変 SWM-3 の栄養塩類組成から各栄養因子群 (窒素，リン，ケイ素，鉄，微量金属類，ビタミン類) を 1 種類ずつ取り除いた栄養塩類添加区を設けた。すなわち，－N (窒素) 区，－P (リン) 区，－Si (ケイ素) 区 (*Skeletonema* sp. の AGP 試験のみ設定)，－Fe (鉄) 区，－微量金属区，－ビタミン区およびコントロールとして超純水添加区および SWM-3 添加区の 8 種類 (*A. tamarense* は 7 種類) を設定した (Table 1)。添加する栄養因子の最終濃度は，SWM-3 の栄養塩類濃度の 10 分の 1 である (Table 1)。すべての試験区は，3 本立てで用意した。

この培地に前培養第 2 継代 0.1 mL を接種し，死滅期に入ったことを確認するまで培養を行った。接種後の初期細胞密度は *A. tamarense* で 50 cells mL^{-1}，*Skeletonema* sp. で 1,500 cells mL^{-1} であった。蛍光光度計 (10–AU005, Tuener Designs) を用いて *in vivo* クロロフィル *a* 量を測定し，この値を藻類の増殖量とした (Brand et al., 1981 ; Imai et al., 1993)。*in vivo* クロロフィル *a* 量の測定を隔日で行い，得られた最大増殖量から初期接種量を引いた値を AGP とした。実験終了後に培養の一部を $ST10^{-1}$ 細菌培地に接種し，実験期間において無菌状態が維持されたことを確認した。

統計学的解析

A. tamarense 出現量と環境要因の関係を調べるために，本種が検出された試料 (n=35) における *A. tamarense* 細胞密度 (cells L^{-1}) の対数 (底は 10) と，各環境要因の間でピアソンの積率相関分析を行った。

AGP 試験において，海水試料の超純水添加区における接種藻類の AGP を，海水試料が有する AGP とした。各藻類の試料採取日間の AGP を，2009 年と 2010 年で分けて比較した。多重検定には，Steel–Dwass の方法を用いた。各定点における 0, 10 m 層の AGP を student の t 検定によって比較した。

各海水試料の藻類増殖の制限要因となる栄養因子を特定するために，各栄養添加区における AGP を Steel の方法によって超純水添加区を対照群とし，その他の栄養因子添加区群の AGP の多重比較を行った。なお，すべての海水試料において，－Si 区，－微量金属区，－ビタミン区では，超純水添加区よりも著しく増殖量が増加した (Fig. 3)。これらの栄養因子は微細藻類の増殖制限要因となり得ないと考えられたので，多重検定の群から外し，－N 区，－P 区，－Fe 区のみを検定対象とした。これらの栄養因子添加群の AGP が対照群の AGP と比較して有意に増加しなかった場合，加えなかった栄養因子を増殖制限因子とした (例

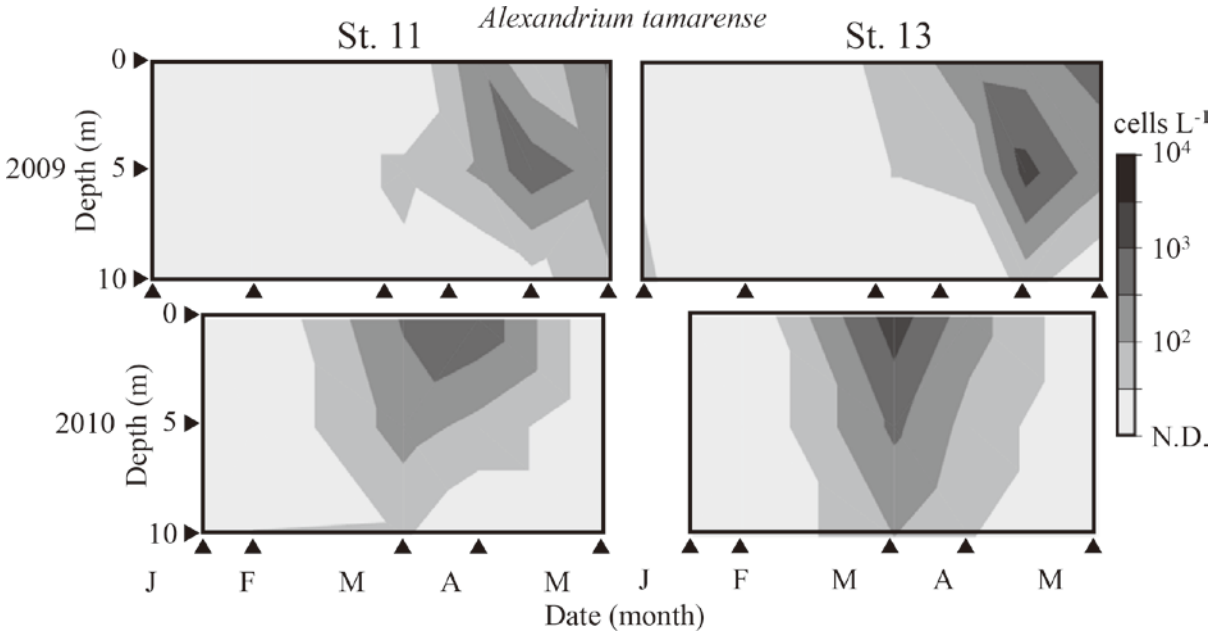

Fig. 2. Seasonal changes in the cell densities of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (cells L^{-1}) from 0 to 10 m at Sts. 11 and 13 in the eastern part of Osaka Bay from January to May 2009 and 2010.

えば，−N 区のみ対照群と有意な差があることが棄却された場合，増殖制限因子を窒素とした)。これら統計学的解析の有意水準は全て 5% 以下とした。

結　　果

水質の変動

調査期間中，水温および塩分はそれぞれ 8.61〜21.8°C，25.7〜32.7 の範囲で変動した (Fig. 4)。2009 年では 3 月から 5 月にかけて，2010 年では 4 月から 5 月にかけて，0〜5 m 層で水温・塩分躍層が認められた (Fig. 4)。塩分は St. 13 で St. 11 より低い傾向がみられた (t 検定，$p < 0.01$)。

DIN，PO_4-P，SiO_2-Si 濃度は，それぞれ 0.03〜25.9 μM，検出限界以下 (< 0.01 μM)〜1.14 μM，0.42〜25.2 μM の範囲で変動した。2009 年では全ての栄養塩類で両定点において 1 月に全層で高い傾向を示し，2 月から 4 月にかけて減少する傾向を示した (Fig. 5)。その後，DIN 濃度は，4 月から 5 月にかけて表層で増加する傾向を示し，PO_4-P，SiO_2-Si 濃度は，4 月から 5 月にかけて底層で増加する傾向を示した (Fig. 5)。2010 年では，1 月から 3 月にかけて低い濃度で推移し，4 月から 5 月にかけて DIN 濃度は表層で増加する傾向を示し，PO_4-P，SiO_2-Si 濃度は，4 月から 5 月にかけて底層で増加する傾向を示した (Fig. 5)。DIN 濃度は，St. 13 で St. 11 より高い傾向がみられたが (t 検定，$p < 0.01$)，その他の栄養塩類で定点間の有意な差は認められなかった。

クロロフィル a 濃度は，0.18〜18 μg L^{-1} の範囲で変動し，2009 年では 3 月から 4 月にかけて St. 11 および St. 13 ともに全層で比較的高くなり，4 月から 5 月にかけて表層で高くなる傾向が見られた (Fig. 4)。2010 年ではクロロフィル a 濃度は，1 月に両定点において全層で高くなり，3 月から 4 月にかけて表層で高くなる傾向が見られた。クロロフィル a 濃度は，St. 11 より St. 13 で高い値をとる傾向が見られた (t 検定，$p < 0.05$)。調査期間中，表層において最も多く検出された植物プランクトン群は珪藻類であり，出現細胞数の 90% 以上は珪藻類であった。

A. tamarense は，2009 年では 3 月から 5 月にかけて，2010 年では 3 月から 4 月にかけて 0〜5 m 層を中心に比較的高密度に出現した (Fig. 3)。2009 年および 2010 年の最高出現密度は，それぞれ 1,600 cells L^{-1}, 1,900 cells L^{-1} であった。St. 11 と St. 13 の定点間における *A. tamarense* の出現密度に差は認められなかった (t 検定，$p > 0.05$)。本種の細胞密度は，PO_4-P 濃度と塩分と有意な負の相関を示し (それぞれ $r = -0.46, -0.33$)，クロロフィル a 濃度と水温で有意な正の相関が見られた (それぞれ $r = 0.28, 0.32$)。

AGP 試験

超純水添加区における *A. tamarense* の AGP 試験の結果，2009 年では 5 月の試料群の AGP のみ有意に増殖量が小さくなり，2010 年 3 月の試料群でその他の月の採集試料群よりも有意に小さくなった (Fig. 6)。超純水添加区における *Skeletonema* sp. の AGP は，2009 年では 4 月後半の試料による結果のみ有意に高くなり，2010 年では 3 月の試料でその他の採集日の試料よりも有意に低くなった (Fig. 6)。2009 年の 4 月前半の採集日の海水試料において，St. 11 および St. 13で表層よりも底層で *A. tamarense* の AGP が高くなった。同様に，2010 年では，St. 11 の 4 月と 5 月，St. 13 の 3 月と 4 月において，表層よりも底層で *A. tamarense*

Table 1. The compositions and final concentrations of the added nutrients to seawater samples for the Algal Growth Potential bioassay. The removed nutrients from added nutrients at each treatment based on the modified SWM-3 medium are indicated in (A), and the compositions and final concentrations of P-I metals and S-3 vitamins in SWM-3 nutrients are indicated in (B).

A

Abbreviation	Composition	Final amaounts (L^{-1})
− N	$NaNO_3$	200 µmol
− P	NaH_2PO_4	10 µmol
− Fe	FeEDTA	200 nmol
− Si	Na_2SiO_3	10 µmol
− Trace metals	Na_2SeO_3	0.2 nmol
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	10 nmol
	P-I metals	1 mL
	Na_2EDTA	3 µmol
− Vitamins	S-3 vitamins	0.2 mL

B

	Composition	Final amaounts (L^{-1})
P-I metals	H_3BO_3	100 µmol
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3.5 µmol
	$ZnCl_2$	400 nmol
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10 nmol
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 nmol
S-3 vitamins	Vitamin B1-HCl	50 µg
	Ca-Pantothenate	10 µg
	Nicotinic acid	10 µg
	p-Aminobenzonic acid	0.1 µg
	Biotin	0.1 µg
	Inositol	500 µg
	Folic acid	002 ng
	Thymine	300 µg
	Vitamin B_{12}	100 ng

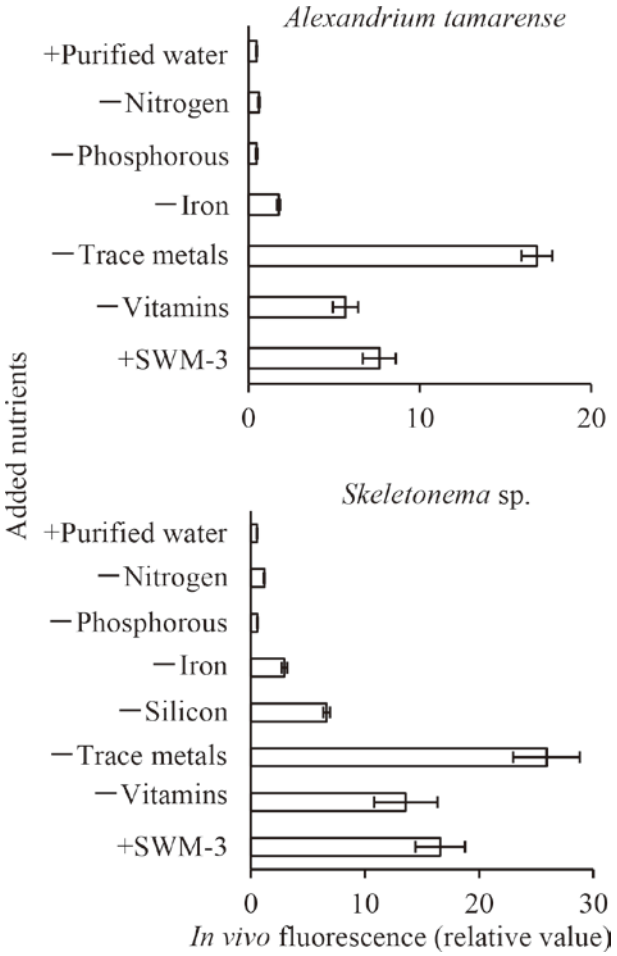

Fig. 3. The typical results of the Algal Growth Potential bioassay with *Alexandrium tamarense* and *Skeletonema* sp. to determine the growth-limiting nutrients of the seawater samples. This figure shows the results using the sample collected from 0 m layer at St. 11 in January, 2009. Error bars indicates the standard deviations.

の AGP が高くなった (Fig. 6)。*Skeletonema* sp. による AGP 試験では，底層より表層の AGP が高くなる場合は，St. 11 では 2009 年の 3，4 月および 2010 年の 4，5 月，St. 13 では 2009 年の 4 月および 2010 年の 4，5 月に採集された試料で認められた (Fig. 6)。2009 年の 5 月には，底層よりも表層で両種の AGP が高くなる傾向が見られた。また，超純水添加区における *A. tamarense* と *Skeletonema* sp. の AGP は，各試料中の PO_4-P 濃度と正の相関を示した (それぞれ $r = 0.59, 0.91$)。

全ての海水試料において，SWM-3 を添加した試験区では，超純水添加区よりも接種した微細藻類の AGP が大幅に増加したことから (Fig. 3)，添加した栄養因子は本種の増殖に必要な栄養を満たしていると考えられた。また，材料および方法でも述べた通り，−Si 区，−微量金属区，−ビタミン区では，超純水添加区よりも著しく増殖量が増加した。

A. tamarense および *Skeletonema* sp. の増殖制限因子は表層では多くの場合，リン単独，もしくはリンと窒素であった (Table 2)。底層での増殖制限因子は，*A. tamarense* では 2009 年の場合 St. 11，St. 13 ともにリン単独もしくはリンと窒素の場合が大半であったが，2010 年 3，5 月の St. 11 では窒素制限が，2010 年 4 月の St. 11 および St. 13 で鉄制限が認められた (Table 2)。*Skeletonem* sp. の底層の増殖制限因子は，リン単独の場合 (St. 11 の 2009 年 4 月および St. 13 の 2009 年 3，4 月，2010 年の 3，5 月)，窒素単独の場合 (St. 11 および St. 13 の 2009 年 3，4 月と 2010 年の 4 月)，リンおよび窒素の場合 (St. 11 の 2009 年 3 月と 2010 年の 3，5 月) が見られた (Table 2)。

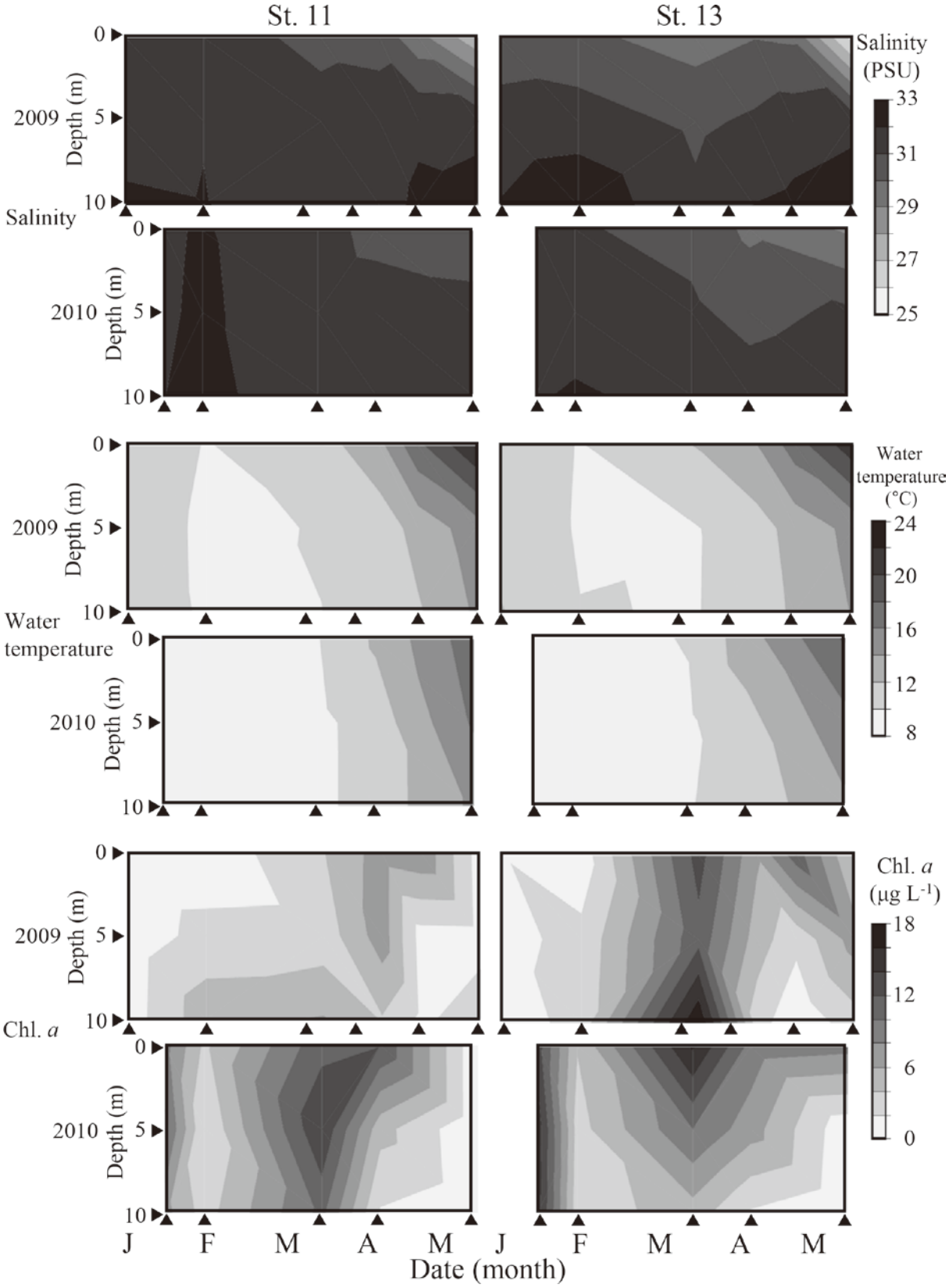

Fig. 4. Seasonal and vertical changes in the water temperature (°C), salinity (PSU), and Chlorophyll a concentration (μg L^{-1}) from 0 to 10 m water depths at Sts. 11 and 13 in the eastern part of Osaka Bay from January to May 2009 and 2010.

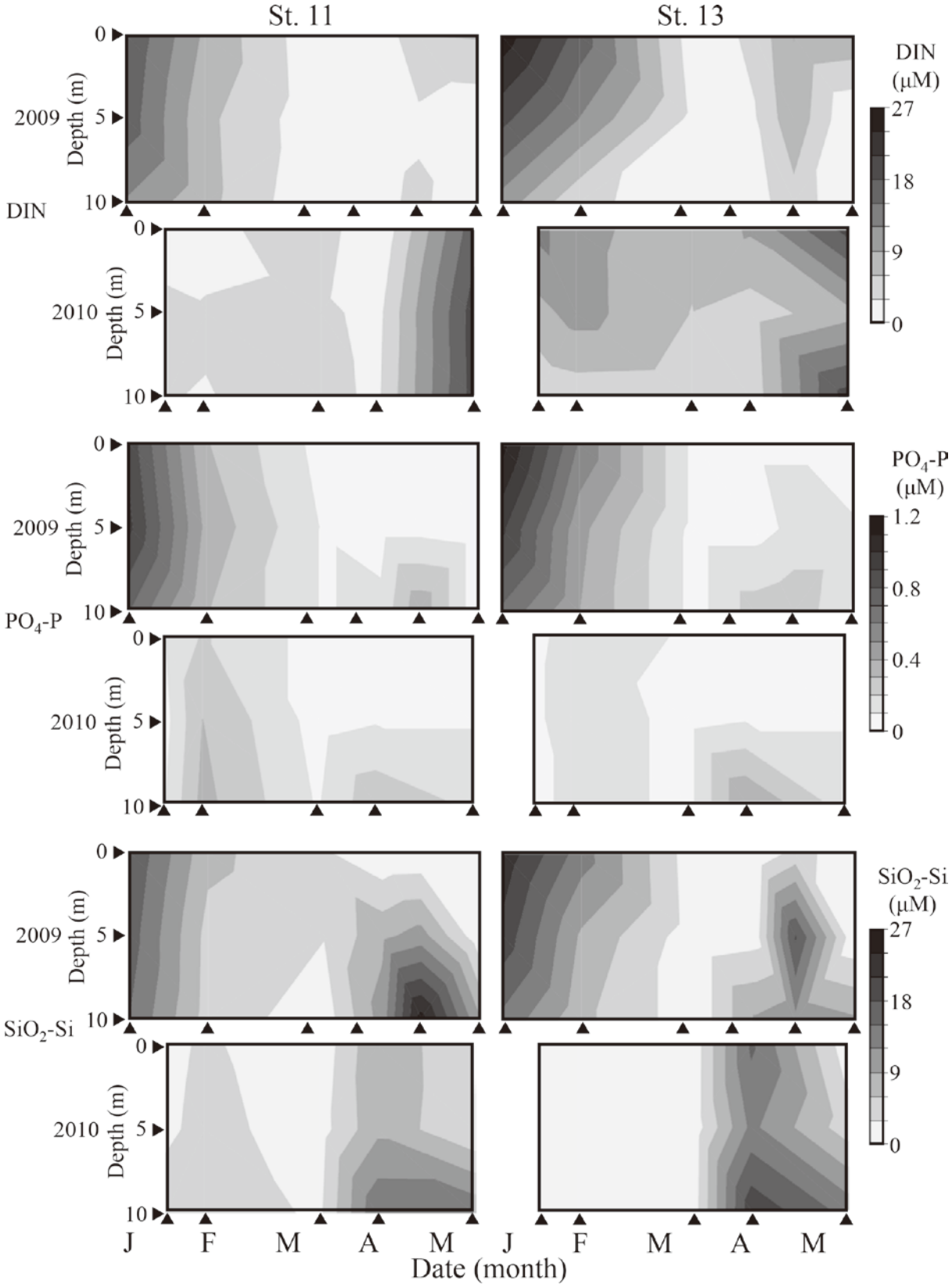

Fig. 5. Seasonal and vertical changes in the dissolved inorganic nitrogen concentration (DIN ; μM), phosphate concentration (μM), and silicate concentration (μM) from 0 to 10 m at Sts. 11 and 13 in the eastern part of Osaka Bay from January to May 2009 and 2010.

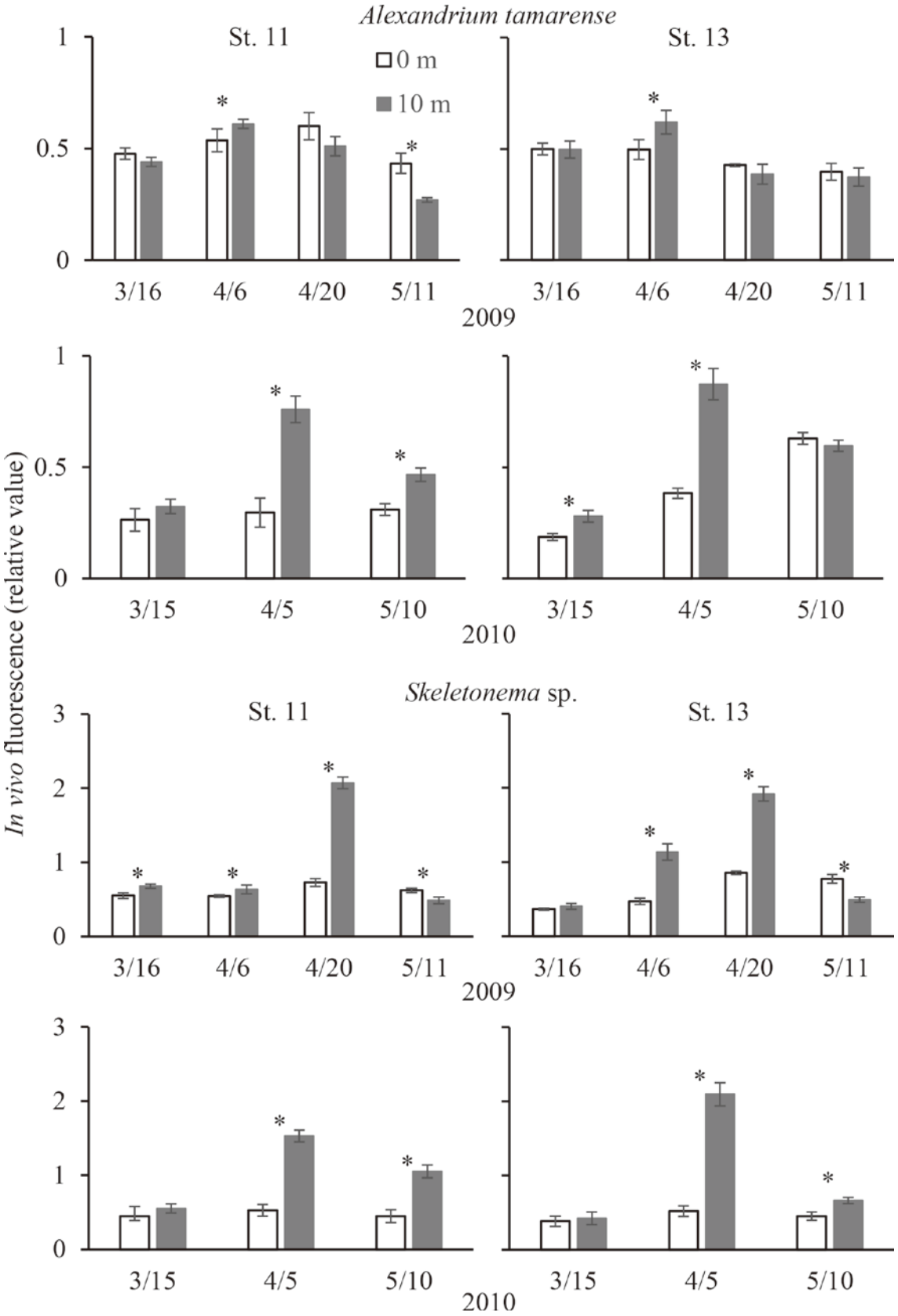

Fig. 6. Results of the Algal Growth Potential bioassay with *Alexandrium tamarense* and *Skeletonema* sp. to determine the growth potentials of seawater samples collected at 0 and 10 m in depth at Sts. 11 and 13 in the eastern part of Osaka Bay from January to May 2009 and 2010. An asterisk (*) indicates a significant difference between growth potentials at 0 and 10 m ($p < 0.05$). Error bars indicate standard deviation.

Table 2. The limiting nutrients revealed by the bioassay with *Alexandrium tamarense* and *Skeletonema* sp. using the seawater samples collected from 0 and 10 m in depth at Sts. 11 and 13 in the eastern part of Osaka Bay from January to May 2009 and 2010. N, P, and Fe in the table indicate nitrogen, phosphorous, and iron growth limitation.

Date		St. 11				St. 13			
		A. tamarense		*Skeletonema* sp.		*A. tamarense*		*Skeletonema* sp.	
		0 m	10 m	0 m	10 m	0 m	10 m	0 m	10 m
2009	3/16	P	P	P	N, P	P	P	P	P
	4/6	N, P	P	P	P	P	N, P	P	P
	4/20	P	P	P	N	P	N, P	P	N
	5/11	P	N, P	P	N	P	N, P	P	N
2010	3/15	P	N	P	N, P	P	N, P	P	P
	4/5	N	Fe	N, P	N	P	Fe	P	N
	5/10	P	N	N, P	N, P	N, P	P	N, P	P

考　　察

A. tamarense の増殖至適水温は，概ね 15 ± 5°C の範囲で報告されており (樽谷，1999)，本研究において本種が比較的高密度に出現した 3 月から 4 月の水温帯 (9.5〜17.5°C) と概ね一致している (Fig. 2 and Fig. 4)。また，この期間における塩分の変動範囲も，概ねこれまでに報告されている本種の単離培養株による培養実験で報告されている至的範囲内であった (山本・樽谷，1997；Natsuike et al., 2017)。このことから，水温および塩分は春季の大阪湾における本種増殖の要因の一つであると考えられる。一方で，2009 年の 3，4 月にかけて本種の増殖に至的な水温帯であるにも関わらず，本種出現量が小さい場合も認められるため，水温と塩分だけが本種増殖の要因でないことが示唆された。

本研究では，PO_4-P 濃度と *A. tamarense* の出現細胞密度の間に負の相関が認められ，大阪湾において本種は栄養塩類が枯渇する環境において増殖することが示唆された。本種細胞密度と無機栄養塩濃度の間に負の相関が見られることは，広島湾においても報告されており (Itakura et al., 2002)，大阪湾における先行研究においても本種大量出現時に低い栄養塩濃度が報告されている (山本ら，2009；Natsuike et al.，投稿中)。一般に温帯域の沿岸域では，冬季における鉛直混合期に底層から供給される栄養塩によって冬季に栄養塩濃度が高くなり，光環境が改善される早春〜春季に珪藻類を中心とする大規模な植物プランクトンブルーム (いわゆる春季ブルーム) が発達する。本研究においても，2009 年には 1 月から 2 月にかけて栄養塩濃度が減少する一方で，2 月から 3 月にクロロフィル *a* 濃度の顕著な増加が見られ (Fig. 4, 5)，2010 年には 1 月と 3 月にクロロフィル *a* の顕著な増加が見られ (Fig. 4)，3 月から 5 月にかけて，栄養塩類濃度が低い傾向が見られた (Fig. 5)。このような春季ブルーム発生からブルーム直後における栄養塩濃度が減少する時期に本種は増殖すると考えられる。

AGP 試験の結果，*A. tamarense* が比較的高密度で出現した 3〜5 月には，*A. tamarense* および *Skeletonema* sp. ともに表層でリンが増殖制限因子となった (Table 2)。この時の表層の PO_4-P 濃度は，0.03〜0.09 µM の範囲であった (Fig. 5)。大阪湾より単離した *A. tamarense* および *Skeletonema* sp. の増殖に対する PO_4-P 濃度の半飽和定数は，それぞれ 0.15, 0.12 µM であることが報告されており (夏池ら，2013)，表層のリン濃度は両種の半飽和定数よりも低かった。大阪湾において春季ブルーム後に *A. tamarense* の増殖がリンによって制限する要因となり得ることは，著書らの先行研究においてすでに指摘したが (Natsuike et al., in press)，本種の競合種と考えられる珪藻類においても同様にリンによって増殖が制限され得ることが明らかとなった。

春季の大阪湾の海水試料を用いた *A. tamarense* を接種藻類とした AGP 試験の結果，表層における AGP よりも底層の AGP が高い場合，表層と底層で異なる栄養塩が *A. tamarense* 増殖の制限要因となる場合があることが報告されている (Natsuike et al., in press)。*A. tamarense* は，鞭毛による遊泳能力を有し，日収鉛直移動によって夜間に栄養塩躍層下まで移動することが報告されている (Fauchot et al., 2005)。表層と底層で異なる栄養塩類の利用性を有する環境では，日収鉛直移動が可能である *A. tamarense* は，本種の有力な競合種と考えられる珪藻類よりも栄養塩の取り込みに関して有利である可能性がある。本研究においても，同様に栄養塩濃度が低い環境において，*A. tamarese* の底層の AGP が表層の AGP よりも大きい場合，表層と底層で異なる制限要因である場合が確認された (Table 2, Fig. 6)。このような場合に加えて，本研究では同一の海水試料において *A. tamarense* と *Skeletonema* sp. の間で制限因子が共通しない場合が見られた (例えば，2010 年の 4 月の St. 11 と 13)。この差は藻類種間の各栄養塩類の要求量や有機態リン・窒素の利用能の差等を反映していると考えられるが，両種の増殖に必要とする栄養塩類が同所的に

異なることによって，互いが不足する栄養塩類を取り込む余地がある結果，両種が共存できる可能性がある。

本研究による同一海水試料における *A. tamarense* と珪藻 *Skeletonema* sp. の AGP 試験の結果，栄養塩類が枯渇する春季の大阪湾において，*A. tamarense* と春季の大阪湾で優占する珪藻類はともに主にリンの枯渇によって増殖が制限され得ることが明らかとなった。さらに，*A. tamarense* と珪藻類の栄養塩類の利用性が異なることが明らかとなった。すなわち，栄養塩類が枯渇する春季の大阪湾において，① 表層と底層で AGP が異なる場合，② 表層と底層で異なる栄養塩類が増殖制限因子となる場合，③ 両種で異なる栄養塩類が制限因子となる場合，が起こり得ることが明らかとなった。このような鉛直方向・種間での栄養塩類の利用性の差によって，栄養塩類が枯渇した環境においても両種の増殖ならびに共存を可能としていることが示唆された。

謝　　辞

本研究遂行に当たり現場観測の機会を賜りました大阪府立環境農林水産総合研究所調査船「おおさか」の船長並びに乗組員の皆様に厚く御礼申し上げます。現場観測にご協力頂いた京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋環境微生物学研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

Brand, L.E., Guillard, R.R.L. and Murphy, L.S. (1981)　A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates.　*J. Plankton Res*., **3**, 193–201.

Chen, L.C.M., Edelstein, T. and McLachlan, J. (1969)　*Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture.　*J. Phycol.*, **5**, 211–220.

Fauchot, J., Levasseur, M. and Roy, S. (2005)　Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada).　*Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **296**, 241–250.

Fritz, L. and Triemer, R.E. (1985)　A rapid technique utilizing Calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plate.　*J. Phycol.*, **21**, 662–664.

Imai, I., Ishida, Y. and Hata, Y. (1993)　Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan.　*Mar. Biol.*, **116**, 527–532.

Imai, I., Itakura, S., Matsuyama, Y. and Yamaguchi, M. (1996) Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture.　*Fish. Sci.*, **62**, 834–835.

Imai, I. and Yamaguchi, M. (1994)　A simple technique for establishing axenic cultures of phytoflagellates.　*Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol*., **9**, 15–17.

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.

Itakura, S., Yamaguchi, M., Yoshida, M. and Fukuyo, Y. (2002) The seasonal occurrence of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) vegetative cells in Hiroshima Bay, Japan.　*Fisheries Sci*., **68**, 77–86.

夏池真史・今井一郎・山本圭吾 (2013)　淀川河川水からのリン供給が麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* および珪藻 *Skeletonema* sp. の種間競合に及ぼす影響について．瀬戸内海，**66**, 50–53.

Natsuike, M., Oikawa, H., Matsuno, K., Yamaguchi, A. and Imai, I. (2017)　The physiological adaptations and toxin profiles of the toxic *Alexandrium fundyense* on the eastern Bering Sea and Chukchi Sea shelves.　*Harmful Algae*, **63**, 13–22.

Natsuike, M., Shiraishi, T., Ishii, K.I., Yamamoto, K., Nakajima, M., Sawayama S. and Imai, I. (2018)　Different nutrient availabilities of surface and bottom water under nutrient-depleted conditions during bloom Formation of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in Osaka Bay, Japan.　*Bull. Fish. Sci., Hokkaido Univ*., **68**, in press.

西島敏隆・深見公雄 (1994)　赤潮藻による AGP(Alal Growth Potential) 試験．pp. 22–32，石田祐三郎・菅原　庸 (編)，赤潮と微生物―環境に優しい微生物農薬を求めて，恒星社厚生閣，東京.

西條八束･三田村緒佐武 (1995)　新編 湖沼調査法．講談社，東京.

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．日水誌，**77**, 40–52.

樽谷賢治 (1999)　有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖機構に関する生理生態学的研究．瀬戸内水研報，**1**, 63–96.

Utermöhl, H. (1958)　Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton-Methodik.　*Mitt Int Ver Theor Angew Limnol*, **9**, 1–38. (In Italian with English abstract)

Waker, M.J. and Richard, D.R. (1995)　Microbial nutrient limitation in prairie saline lakes with high sulfate concentration.　*Limnol. Oceanog.*, **40**, 566–574.

山口晴生・足立真佐雄 (2010)　海洋真核植物プランクトンによる有機態リンの利用 (総説)．日本プランクトン学会報，**57**, 1–12.

山本圭吾 (2004)　2002 年春期に大阪湾東部海域で発生した麻痺性貝毒について．大阪水試研報，**15**, 1–8.

山本圭吾・中嶋昌紀・田渕敬一・濱野米一 (2009)　2007 年春期に大阪湾で発生した *Alexandrium tamarense* 新奇赤潮と二枚貝の高毒化．日本プランクトン学会報，**56**, 13–24.

山本民次・樽谷賢治 (1997)　広島湾産有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖に及ぼす水温，塩分及び光強度の影響．藻類，**45**, 95–101.