

## 有害赤潮ラフィド藻*Chattonella antiqua*のAGP試験のための前培養法

山 砥 稔 文, 宮 原 治 郎, 高 田 純 司

Preculture of Noxious Red Tide Flagellate *Chattonella antiqua*  
(Raphidophyceae) for AGP assay

Toshifumi Yamatogi, Jiro Miyahara, and Junji Takata

Based on the nutritional requirement, preparation of preculture media and incubation period were studied for algal growth potential (AGP) assay of *Chattonella antiqua*. The results of the AGP test was found to be dependent on the algal inoculum prepared. The satisfactory inoculum was obtained after 11 days preculture in surface seawater, sampled at 60km off western coast of Goto Islands in July 1995, enriched with nitrogen and phosphorus to the level of 1/50 concentration necessary for maximum growth.

近年、漁業被害を伴う赤潮の発生が内湾などの富栄養化した海域を中心に広域化してきており、水産業の将来に深刻な問題を投じている。赤潮の発生機構を解明してその防除をはかることは水産振興上重要な課題である。赤潮の発生機構の解明を目的として、これまで赤潮の発生環境や原因プランクトンの増殖生理などに関する研究が進められてきている。<sup>1-2)</sup> さらに近年は、赤潮プランクトンを用いる藻類生産潜在力(Algal growth potential;以下AGPと称する)試験が多く行われ、水域の富栄養化の評価をしたり、現場水の赤潮発生潜在力の把握や赤潮プランクトンの増殖制限因子を推定する試みなども行われている。<sup>3-6)</sup> しかしAGP試験では、使用する接種藻の生理状態により結果が著しく異なることが知られている。<sup>9)</sup> また、藻類は細胞内に必須栄養物質を必要量以上に貯蔵する場合があるので、<sup>10)</sup> 試験液の栄養状態を正しく反映したAGPを得るには、前培養により充分な飢餓処理を行い、貯蔵栄養物資を最小限に減じて、しかも増殖能を有する藻体を用いて試験を

行う必要がある。<sup>11)</sup>

そこで、本研究では過去に橘湾で甚大な漁業被害を与えた有害赤潮ラフィド藻の*Chattonella antiqua*を試験藻に用いるAGP試験法を確立するための接種藻の調製法について検討し、知見が得られたので報告する。さらにこの方法を橘湾海水に適用して、現場海水のAGPと増殖の制限栄養物質を推定した。

### 方 法

**供試生物** 1978年9月に瀬戸内海の播磨灘から分離された *Chattonella antiqua* (Hada) Ono NIES-1株(無菌クローン株)を財団法人地球・人間環境フォーラムから受領し供試した。

**培養および計数** 培養は、試験管(φ18mm×180mm)に培地またはモデル海水を10ml入れて、3本法、バッチ培養法で、水温22.5°C、光強度110 μE・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>、14時間明10時間暗の明暗サイクルで行った。プランクトンの保存培地としてESM<sup>12)</sup>を用い、試験には1995年7月に五島西沖(32° 55.5'N, 128° 15.5'E)で採取し

た表層水 (DIN : 0.21  $\mu$ M, DIP:0.02  $\mu$ M)を基礎培地とし, 試験の目的に応じて成分濃度を調節して使用した。増殖量は界線入りスライドグラスを用いて細胞数を直接計数して求めた。なお, 試験培養中は随時0.4%寒天添加STP培地<sup>13)</sup>に少量の培養液を接種して細菌検査を行い, 細菌による汚染を監視した。

**AGPIに及ぼす接種藻前培養条件の影響** AGPは, 供試プランクトンの栄養物質要求量<sup>14)</sup>を基準に栄養物質濃度を数段階に制限したモデル海水を調製し, バッチ培養により測定する。ここではモデル海水の制限栄養物質濃度を正確に反映した結果が得られる前培養培地の種類と接種藻の培養日数を検討した。前培養培地には, 表1に示す栄養物質を添加しない基礎培地 (以下栄養物質無添加培地と称する) と接種藻の窒素・リンの各要求量の1/50を添加した培地 (以下NP1/50添加培地と称する) の2種類を用いた。前培養日数は, 対数増殖期中, 後期, および静止期に

あるものを接種できるように8,11,および14日とした。

またモデル海水には, 基礎培地に窒素, リン, 鉄およびビタミンB<sub>12</sub> (以下B<sub>12</sub>と称する) の要求量の1/1~1/25を添加した制限モデル海水 (全栄養物質制限モデル海水), 窒素のみを同様に制限した海水 (窒素制限モデル水), リンのみを同様に制限した海水 (リン制限モデル海水), 鉄のみを同様に制限した海水 (鉄制限モデル海水), およびB<sub>12</sub>のみを同様に制限した海水 (B<sub>12</sub>制限モデル海水) の計5種類を用いた (表1)。

なお, *C. antiqua* を前培養培地で飢餓処理するにあたっては, あらかじめ, 保存培地で8日間培養した藻体を用いた。接種密度は, 培養液からの栄養物質の持ち込みの影響を最小限に抑え, かつ安定増殖が得られる初期細胞濃度 $2 \times 10^2$  cells  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>を下回らないように配慮して, 培地またはモデル海水の1/14~1/20とした。

表1 *C. antiqua*の栄養物質要求量および前培養培地の組成と試験用モデル海水

Table 1. Nutrient requirements for the maximum growth<sup>\*1</sup>, media composition for preculture, and seawater models for growth experiments, of *C. antiqua*.

Nutrient	Symbol	Requirement	Preculture media		Seawater models														
			None <sup>*2</sup>	NP1/50 <sup>*3</sup>	All nutrients limited			N limited			P limited			Fe limited			Vitamin B <sub>12</sub> limited		
					1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25
NaNO <sub>3</sub> (mgN $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	N	1.12	0	0.0224	1.12	0.112	0.0448	1.12	0.112	0.0448	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O (mgP $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	P	0.15	0	0.003	0.15	0.015	0.006	0.15	0.15	0.15	0.15	0.015	0.006	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
FeCl <sub>3</sub> $\cdot$ 6H <sub>2</sub> O (mgFe $\cdot$ l <sup>-1</sup> ) + Na <sub>2</sub> EDTA $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O (mg $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	Fe	0.06	0	0	0.06	0.006	0.0024	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.006	0.0024	0.06	0.06	0.06
Vitamin B <sub>12</sub> (ng $\cdot$ l <sup>-1</sup> )	B <sub>12</sub>	6	0	0	6	0.6	0.24	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0.6	0.24

\*1:Nakaura et al. (1983)

\*2:no nutrient was added

\*3:1/50 of N and P requirement were added

**現場海水への適用** 試料は1995年7月18日～8月29日の間に約10日間隔で5回、橘湾（図1）の表層および海底面上1mの2層から採取し、孔径0.45  $\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過した後-20°Cに凍結して保存した。分析直前に解凍した試水を孔径0.22  $\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで無菌的に濾過した後、これに栄養物質を所定の組み合わせで添加し、上記で得られた接種藻調製法に基づいてAGPを求めた。

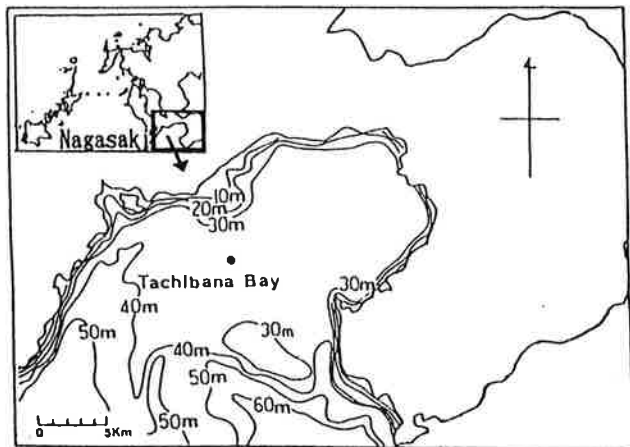


図1 橘湾の調査定点  
Fig. 1. Location of sampling site in Tachibana bay.

**海水試料の化学分析** 採取した海水試料については、溶存無機態窒素（DIN：NH<sub>4</sub>-N,<sup>15)</sup>およびNO<sub>3</sub>-N<sup>16)</sup>および溶存無機態リン（DIP）<sup>16)</sup>を定量した。

### 結果と考察

**AGPに与える接種藻調製法の影響** 栄養物質無添加培地とNP1/50添加培地の2種類の前培養培地で、C. antiquaの前培養を8,11,14日間行い、栄養物質濃度を3段階に制限した5種のモデル海水に接種し、モデル海水の各濃度での増殖量を測定した。図2に結果の一部を示した。これらの図で横軸はモデル海水中の栄養物質の濃度を示し、縦軸はその濃度におけるC. antiquaの最大増殖収量を示す。図中の実線は、栄養物質濃度が要求量を満たした時の増殖量を基準点として描いた傾き1の直線であり、制限濃度範囲で

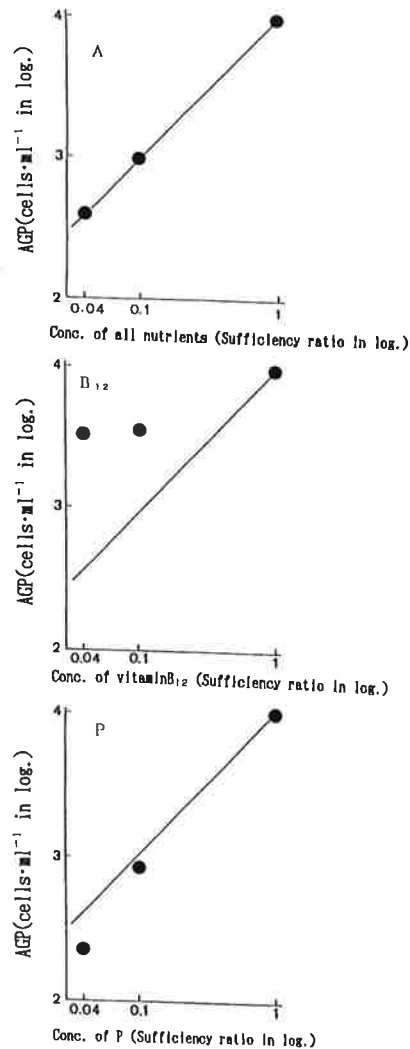


図2 モデル海水のAGPに及ぼすC. antiquaの前培養法の影響  
Fig. 2. Influence of preculture of C. antiqua on the AGP of seawater models.  
Preculture media: A, NP 1/50; B<sub>12</sub> and P, None (see Table 1). Incubation period of preculture: A and P, 11 days; B<sub>12</sub>, 8 days. Seawater models: A, all nutrients limited; B<sub>12</sub>, Vitamin B<sub>12</sub> limited; P, P limited (see Table 1).

増殖量がこの直線上に乗っている場合は、増殖量が栄養物質濃度に正比例し、AGPが適正に得られていることを示している（図2-A）。また、上方にずれている場合はAGPが過大に（図2-B<sub>12</sub>）、下方にずれている場合は過小に表れていることを示す（図2-P）。<sup>11)</sup>この方法によって測定した結果を表2に総括して示した。栄養物質無添加培地で8日間前培養を行った場合の接種藻の増殖量は、すべてのモデル海水の低濃度側で過大であった。同じく、11日間前培養したものは、全栄養物質、窒素およびリン制限のモデル海水

表2 前培養を異にする*C. antiqua*の各種モデル海水におけるAGP

Table 2. AGP estimation on various seawater models by *C. antiqua* precultured in different media

Preculture media	Incubation period (days)	AGP estimation														
		All nutrients limited model			N limited model			P limited model			Fe limited model			VitaminB <sub>12</sub> limited model		
		1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25	1/1	1/10	1/25
None	8	A	+	+	A	+	+	A	+	+	A	+	+	A	+	+
	11	A	-	-	A	A	-	A	-	-	A	+	+	A	+	+
NP 1/50	11	A	A	A	A	A	+	A	-	A	A	A	+	A	A	+
	14	A	-	-	A	-	0	A	-	0	A	A	-	A	A	-

AGP estimation : A, accurate ; +, over ; -, under ; 0, no growth

では低濃度側で過小、B<sub>12</sub>および鉄制限のモデル海水では過大に表れた。一方、NP 1/50添加培地で14日間前培養した場合の増殖量は、5種類のモデル海水の全ての低濃度側で過小、あるいは増殖がなかった。しかし、同じく11日間前培養した場合には低濃度側で若干の直線からのずれはあるものの、全てのモデル海水で増殖が認められ、広い栄養物質濃度範囲で適正と判断された。これらのことから、*C. antiqua*を接種藻とし、バッチ培養で行うAGP試験では、接種藻の前培養方法によって、結果が著しく異なることがわかった。つまり、前培養条件が不十分な場合は、栄養物質低濃度のモデル海水で過大のAGPが得られ、限度を越えた前培養の場合は増殖が見られない場合や、過小の値しか得られない。前者の原因として、接種に伴って栄養物質が培養液または藻体内の貯蔵物質として持ち込まれた可能性、後者は前培養が長すぎたため、培養液中および細胞内部の栄養物質を消費し尽くしたことにより、藻体の増殖能が低減したことが推察される。結論として、本藻を試験藻に用いた場合、NP1/50添加培地で11日間前培養することで接種と共に持ち込まれる栄養物質を減

じ、かつ、正常な増殖能を有する藻体が得られ、試験液の栄養状態に正しく応答したAGPを得ることが可能であることがわかった。

**橋湾現場海水のAGP** *C. antiqua* を試験藻とし、NP1/50添加培地で11日間前培養した藻体を接種して求めた橋湾の現場海水およびこれに栄養物質を添加した海水のAGPを図3に示した。なお、添加した栄養物質濃度は本藻の要求量に相当している。現場海水は表層では、260~297cells・ml<sup>-1</sup> (平均283cells・ml<sup>-1</sup>) のポテンシャル、底層では、420~1110cells・ml<sup>-1</sup> (平均689cells・ml<sup>-1</sup>) のポテンシャルを持ち、表層水の平均AGPは底層水のその45%と低いレベルであった。また、栄養物質添加による増殖量の増大効果をみると、表層では、窒素、鉄、およびビタミンB<sub>12</sub>の単独添加では効果はなく、リンの単独添加により、対照の1.5~1.8倍と若干の増大が見られ、さらに複合添加の場合、いずれの試料も窒素とリンの添加で対照の7.0~11.0倍と顕著な増大が見られた。一方、底層は7月18日と7月27日の試料では単独添加で効果は見られず、8月7日と8月17日の試料では窒素の単独添加で対照の1.3~2.1倍と若干の増大が、8月29

日の試料ではリンの単独添加で対照の1.3倍と若干の増大が見られた。また複合添加の場合、いずれの試料も窒素とリンの添加で、対照の3.2~6.0倍と顕著な増大が見られた。これらのことから、橘湾海水中で本藻の増殖を制限している栄養物質は、表層では第一制限因子がリン、第二制限因子が窒素であり、底層では7月がリンと窒素が同程度、8月上旬・中旬は

第一が窒素で、第二がリン、8月下旬はリンが第一で、窒素が第二の制限因子であることがわかった。*C. antiqua*の栄養細胞は昼間には表層に、夜間には4~10m層に多く分布することが知られており、<sup>17-18)</sup>この栄養物質添加試験の結果から、本湾での*C. antiqua*の増殖を抑制するためには、リンを削減することがより効果的であろうと考えられた。

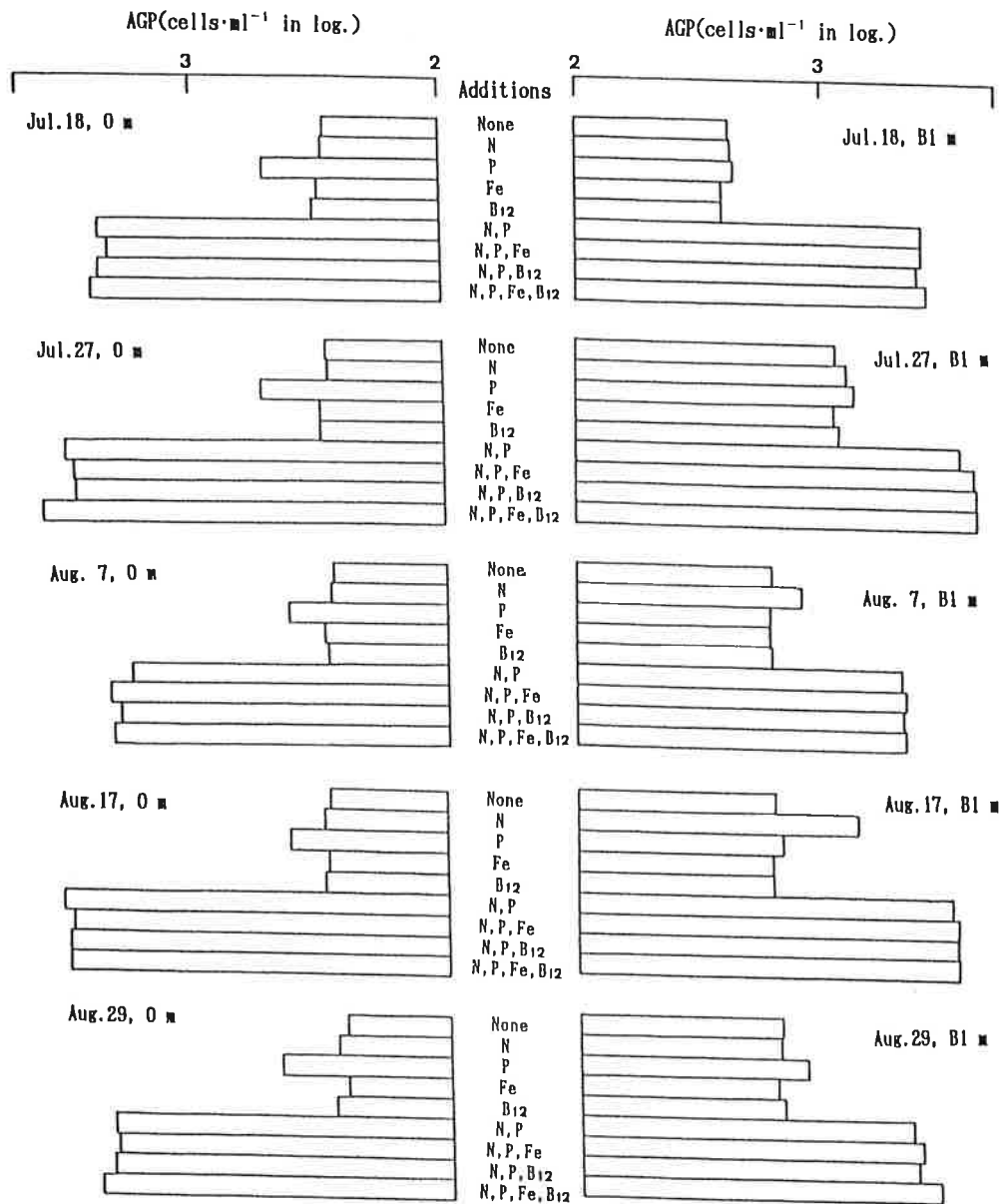


図3 *C. antiqua*による橘湾海水のAGPおよび栄養物質添加の効果  
 Fig. 3. Effects of nutrients addition for the AGP of Tachibana Bay waters.  
 Concentration of nutrients added was shown in Table 1.

**制限因子の検討結果** 一般に、植物プランクトンの増殖に対する制限栄養塩が窒素からリン、あるいはその逆へ移行する点については、種ごとの最適N:P比（最小細胞内含量N:P比）との関係に起因するものと考えられる。<sup>19,20)</sup>すなわち、*C. antiqua*の最適N:P比は12.8<sup>21)</sup>であることから、環境水のN:P比（DIN:DIP比）が、この値以上では*C. antiqua*の増殖はリンによって制限されるが、これ以下では窒素制限となると考えられる。

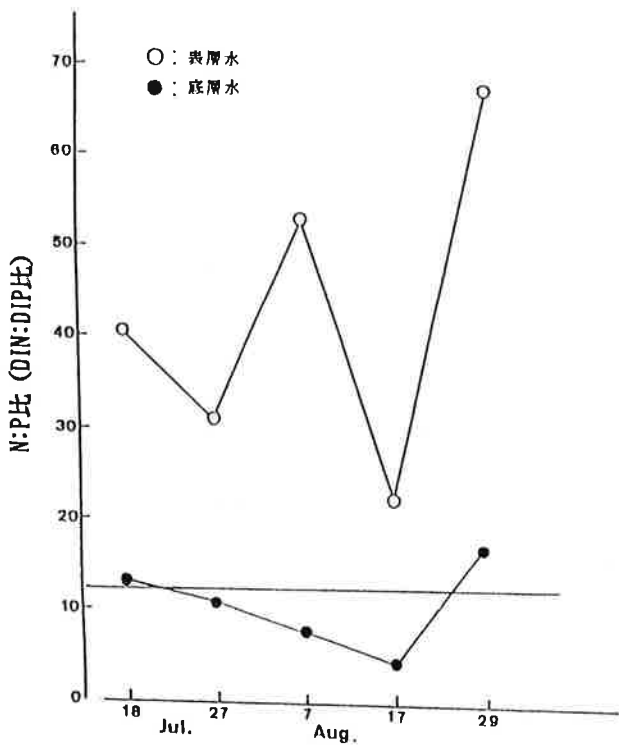


図4 橘湾現場海水のN:P比 (DIN:DIP比) の変化  
Fig. 4. Change of N/P ratio in the waters of the Tachibana Bay.  
Open circle: surface, solid circle: bottom.

図4に橘湾現場海水におけるN:P比 (DIN : DIP比) の経日変化を示した。表層水では調査期間を通して25.2~69.6の値を示し、明らかにリン制限であった。底層水では7月は9.9~12.0とほぼ基準値に近い値を示し制限栄養塩は明確でないが、8月上・中旬には4.3~8.5と窒素制限、8月下旬には17.1とリン制限であることがわかる。この結果は、先の栄養物質添加試験

の結果とほぼ一致する。このことから、この調製法によれば制限因子の特定にしても、正確な結果が得られることがわかった。

おわりに、本研究を進めるにあたり試料採取にご協力頂いた、「盛漁丸」船長井上氏、南串山町漁業協同組合および島原水産業改良普及所の職員の方々、また、取りまとめにあたり種々ご教示いただいた西海区水産研究所漁場保全研究室渡邊康憲博士に厚くお礼申しあげる。

## 文 献

- 岡市友利：赤潮現象，「赤潮の科学」（岡市友利編），第1版，恒星社厚生閣，東京，1987，pp. 5-36.
- 北川安彦，宮原治郎，轟木重敏：1992年夏季の橘湾における植物プランクトンと*Chattonella antiqua*の消長。長崎水試研報，19，37-44(1993).
- 林光則，葉山八千代，秋山広子，永井史郎：海洋プランクトンの栄養要求と藻類培養試験による海水の富栄養評価に関する研究。水質汚濁研究，1，199-202 (1978).
- 今村務，寺西靖治，八木修身，須藤隆一：赤潮生物を用いた都市下水のAGPの測定。下水道協会誌，18，20-27 (1981).
- 西村昭史：魚類養殖漁場の有機汚染が赤潮生物*Gymnodinium* type-'65および*Chattonella antiqua*の増殖に及ぼす影響。日本プランクトン学会報，29，1-7 (1982).
- 矢持進：大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 *Prorocentrum micans*, *Eutreptiella* sp. および*Chattonella marina*の増殖制限栄養因子について。日本プランクトン学会報，31，97-106 (1982).
- 須藤隆一，田井慎吾，八木修身，岡田光正，細見正明，山根敦子：藻類の培養試験法によるAGPの測定。陸水域の富栄養化に関する総合研究(X)。国立公害研究所研究報告，26，(1981).
- 木村凡：生物間相互作用の解析とAGP試験，「赤潮と微生物—環境にやさしい微生物農薬を求めて」（石田祐三郎，菅原庸編），水産学シリーズ99，恒星社厚生閣，東京，1994，pp. 33-45.

- 9) 西島敏隆, 深見公雄：赤潮藻類によるAGP(Algal Growth Potential)試験, 「赤潮と微生物-環境にやさしい微生物農薬を求めて」(石田祐三郎, 菅原庸編), 水産学シリーズ99, 恒星社厚生閣, 東京, 1994, pp. 22-32.
- 10) 岡田光正, 須藤隆一：AGPをめぐる諸問題. 用水と廃水, 20, 765-779 (1978).
- 11) 西島敏隆, 山砥稔文, 畑幸彦：海産珪藻*Skeletonema costatum*の栄養要求とAGP試験に供試するための調製法. 水質汚濁研究, 13, 173-179 (1990).
- 12) 岡市友利, 西尾幸郎, 今富幸也：有毒プランクトン研究法, 「有毒プランクトン-発生・作用機構・毒成分」(日本水産学会編), 水産学シリーズ42, 恒星社厚生閣, 東京, 1982, pp. 26.
- 13) 岩崎英雄：微細藻類の分離と培養, 日本水産資源保護協会, 東京, 1967, pp.54.
- 14) Y.Nakamura and M.M.Watanabe : Growth characteristics of *Chattonella antiqua*. Part 2 Effects of nutrients on growth, *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 39, 151-155 (1983).
- 15) 気象庁編：海洋観測指針, 日本海洋学会, 東京, 1990, pp.181-183
- 16) Strickland J.D.H., T.D.Parsons : A practical Handbook of Seawater Analysis. *Jour. Fish. Res. Bd. Canada*, Bulletin No.167, (1968).
- 17) 浜本俊作, 吉松定昭, 山田達夫：夜間連続観測調査. 昭和53年6月発生ホルネリア赤潮に関する調査報告書, 香川県, 33-37 (1979).
- 18) 池田武彦, 高山繁昭, 桃山和夫：1970年の山口県瀬戸内海における赤潮. 山口内海水試報, 2, 9-17 (1971).
- 19) 山口峰生：植物プランクトンの増殖に及ぼすN:P比の影響, 「水域の窒素：リン比と水産生物」(吉田陽一編), 水産学シリーズ95, 恒星社厚生閣, 東京, 1993, pp. 11-19.
- 20) 西田政司, 高野昭男, 藤本和司：室内培養した藻類のN/P値から推定した博多湾の制限栄養塩. 水質汚濁研究, 8, 181-183 (1985).
- 21) Y.Nakamura : Kinetics of nitrogen- or phosphorous-limited growth and effect of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 41, 381-387 (1985).

