

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium ostenfeldii* の

増殖に及ぼす水温と塩分の影響

【水環境対策チーム】

岡本将揮、森明寛¹⁾、前田晃宏、福井利憲²⁾、坂本節子³⁾、山口峰生⁴⁾

要旨

湖山池に生息する有毒渦鞭毛藻の *Alexandrium ostenfeldii* の増殖に及ぼす水温と塩分の影響を明らかにするために、各水温 (5-30°C)、各塩分 (0-35psu) による室内培養試験を実施した。

その結果、20~25°C-10~15psu の組み合わせで比増殖速度が最大となった。また、水温は 15~30°C、塩分は 5~35psu の範囲で増殖が認められた。

さらに増殖できる塩分の下限値を詳細に実験したところ、塩分 4psu 以下で増殖が抑制されることが示された。

1 はじめに

渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属による麻痺性貝毒の被害は日本沿岸域で数々の報告⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾があり、水産上及び食品衛生上、深刻な問題になっている。したがって麻痺性貝毒原因種が出現する水域では食用二枚貝の毒化に注意を払う必要がある。

鳥取県鳥取市に位置する湖山池 (図 1) では 2012 年 3 月に行われた汽水化⁽⁴⁾以降、それまで見られなかった海産種の珪藻や渦鞭毛藻等による赤潮が発生するようになった⁽⁵⁾。こうした状況の中、2013 年 10 月と 2015 年 11 月に麻痺性貝毒原因種である *Alexandrium ostenfeldii* を含む大規模な赤潮が発生した⁽⁶⁾⁽⁷⁾。本種は spirolide や gymnodimine といった麻痺性貝毒成分を有することが知られている⁽⁸⁾⁽⁹⁾。本種の分布は、瀬戸内海⁽¹⁰⁾、岩手県沿岸⁽¹¹⁾、海外ではニュージーランド⁽¹²⁾、オランダ⁽¹³⁾、バルト海

⁽¹⁴⁾、カナダ東部⁽¹⁵⁾、デンマーク⁽¹⁶⁾ 等でも報告されているが、日本海側沿岸で発生した事例は初めてである⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

ヤマトシジミの毒化による食中毒被害を防ぐうえで、*A. ostenfeldii* の増殖特性などの基礎データを把握することは重要である。また、現在の湖山池の塩分濃度は湖山川にある水門の開閉操作により調節している。今後の塩分管理の方針を決定するうえで、本種の塩分に対する増殖特性を把握することは特に重要であると考えられる。

本稿では水温と塩分に応じた増殖特性を明らかにするため室内実験を実施した。特に塩分については増殖できる下限値を詳細に検討し、水門管理による本種の増殖抑制の可能性について検討したので報告する。

2 方法

2.1 供試株

培養実験に供した *Alexandrium ostenfeldii* の株は 2016 年 11 月 28 日に湖山池で採水した湖水からキャピラリーピペット法で単藻分離した。単離した *A. ostenfeldii* は改変 L1 培地で継代培養した (表 1)。継代培養の条件は水温 20°C、塩分は超純水と濾過海水 (日本海の海水を 0.45μm のフィルターで濾過したもの) により 15psu* に調整した。光強度は 120μmol/m²/s、明暗周期は 16L:8D、震盪強度は 50rpm とした。なお、光強度は LI-1000 (LI-COR 社製) にて測定した。pH は 1 N 塩酸を適宜添加し pH 7.8 に調整した。

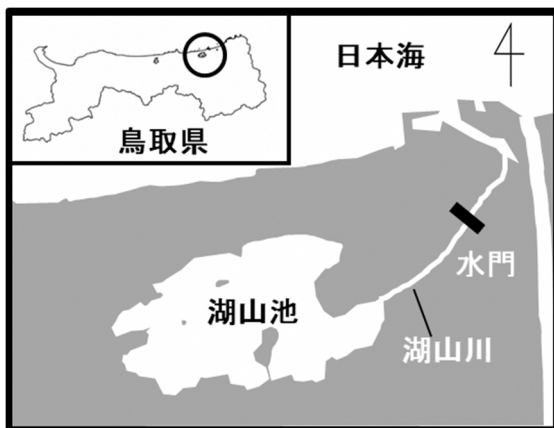


図 1 湖山池位置図

1) 現 鳥取県生活環境部くらしの安心推進局水環境保全課、2) 鳥取県農林水産部栽培漁業センター、3) 瀬戸内海区水産研究所、4) 北里大学
※本稿で扱う塩分の単位は実用塩分単位 (psu) を用いている

表 1 改変 L1 培地の組成

NaNO ₃	75 mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30 mg
L1 Trace Metal Solution ^{※1}	1 ml
f/2 Vitamin Solution ^{※2}	0.5 ml
tris(hydroxymethyl)aminomethane	50 mg
調製海水 (15psu)	999 mL

※1 L1 Trace Metal Solutionの組成

FeCl ₃ ·6H ₂ O	3150 mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4360 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.45 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	19.9 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	178.1 mg
H ₂ SeO ₃	1.3 mg
NiSO ₄ ·6H ₂ O	2.7 mg
Na ₃ VO ₄	1.84 mg
K ₂ CrO ₄	1.94 mg
distilled water	1000 mL

※2 f/2 Vitamin Solutionの組成

cyanocobalamin	1 mg
biotin	1 mg
thiamine·HCl	200 mg
distilled water	1000 mL

2.2 増殖に及ぼす水温・塩分の影響

水温と塩分に応じた増殖特性を明らかにするため、培養温度は5°C間隔で5, 10, 15, 20, 25, 30°Cの6段階を設定した。塩分は5psu間隔で、0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35psuまでの8段階に設定した。塩分は超純水と濾過海水を混合することにより調整した。その他の条件 (pH、光強度、明暗周期、震盪強度) は継代培養の条件と同様である。

300ml 三角フラスコに100ml ずつ培地を分注した後に高圧蒸気滅菌 (121°C、20分) し、実験培地とした。この培地に初期細胞密度が約100cells/mLとなるように対数増殖期の培養株を播種した。

細胞の増殖状況は光学式顕微鏡による細胞数の計数から細胞密度を算出することにより評価した。培養開始から3, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 24日目に培養液を1ml採水し、固定液 (25%グルタルアルデヒド溶液500mlにホルマリン2.5mlと塩化カルシウム6.25gを溶解させたもの) を添加して界線入計数板 (離合社製) で細胞数に応じて0.04~1mlを計数した。この計数は3回行い、その平均値を用いた。試験は3

本立てで行い、3本の平均値から細胞密度を算出した。

各日数の細胞密度を片対数グラフにプロットし、その直線部分 (対数増殖期) に対して、最小二乗法により傾きを計算し、比増殖速度 (μ ; day⁻¹) を計算した。

2.3 低塩分耐性

本種が増殖できる塩分の下限値を明らかにするために、塩分を1, 2, 3, 4, 5psuに段階的に調整した培地を用いて培養実験を行った。培養温度は20°Cとし、その他の条件 (初期細胞密度、計数頻度、pH、光強度、明暗周期、震盪強度) は前節 (2.2) で記載した条件と同様である。

3. 結果

3.1 増殖に及ぼす水温・塩分の影響

各水温及び塩分の組み合わせによる本種の増殖曲線を図2に、比増殖速度を図3に示す。

最大比増殖速度を示したのが、水温20~25°C、塩分10~15psuの範囲であった (図3; 0.27~0.28day⁻¹) 。

水温が20~25°Cから上昇、あるいは下降するに従い比増殖速度は低下していき、水温10°C以下では明瞭な増殖が見られなかった (図2,3)。水温10°Cでは、細胞密度は徐々に減少していったが実験終了後 (培養24日目) でも、ほとんどが遊泳細胞として残存していた。水温5°Cでは、時間経過に伴い残存していた遊泳細胞はテンポラリーシストへ変化していった。

塩分が10~15psuから増加、あるいは減少するに従い比増殖速度は低下していき、5psuでは20~25°Cでのみ明瞭な増加が認められ (図2,3)、0psuではいずれの水温でも3日目以降、細胞が見られなくなった (図2) 。

3.2 増殖可能な低塩分の閾値

1~5psuにおける本種の増殖曲線を図4に示す。

明瞭な細胞増殖は塩分5psuのみで認められた (図4)。4psuで初期濃度をおおむね維持したが、明瞭な細胞数の増加は見られなかった (図4)。3psuでは時間経過とともに細胞密度が徐々に減少したものの、実験終了後 (培養24日目) でも遊泳細胞は認められた (図4)。1, および2psuでは3日目以降、細胞密度は10cells/ml未満まで減少し、実験終了後 (培養24日目) には細胞は見られなくなった (図4) 。

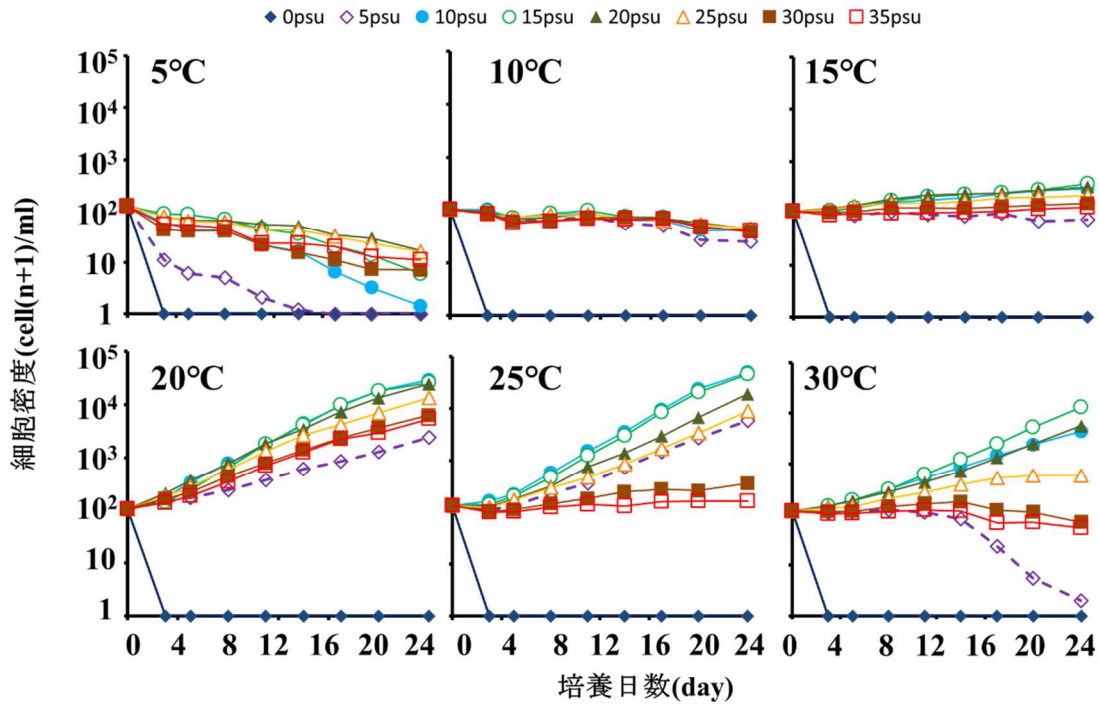


図2 細胞密度の推移

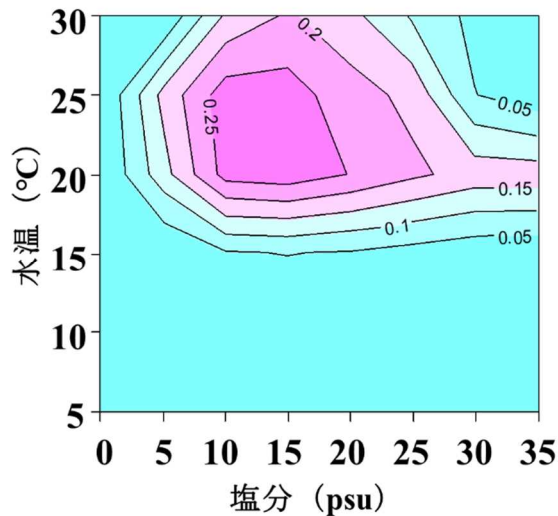


図3 比増殖速度 (day^{-1})

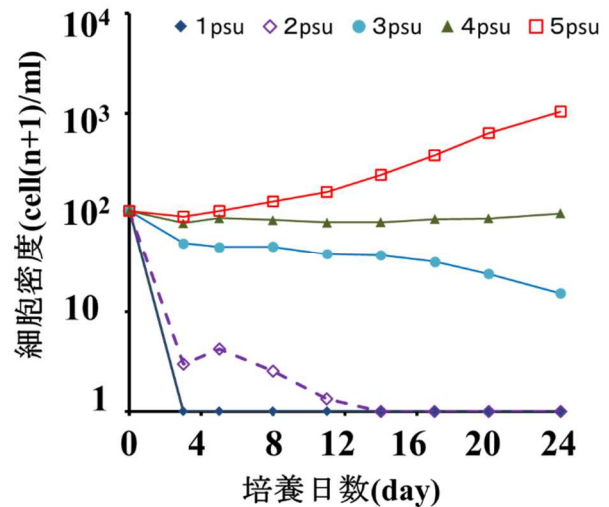


図4 低塩分条件 (1~5psu) における増殖経過

4. 考察

4.1 増殖に及ぼす水温・塩分の影響

比増殖速度が水温 20~25°C、塩分 10~15psu で最大となったことから (図3)、本種の増殖における最適条件は水温 20~25°C、塩分は 10~15psu の範囲内であることが示された。デンマークの分離株で水温 20°C、15~20psu で比増殖速度が最大になったと報告されており⁽¹⁵⁾、本研究とよく一致する。一方、カナダ東部

の分離株で 15psu よりも 25psu 以上の高い塩分で比増殖速度が大きくなる報告⁽¹⁶⁾、バルト海の分離株では 6~10psu でよく増殖する報告もあり⁽¹⁴⁾、これらの報告は本研究の結果とは異なっていた。このことから水温、塩分以外の培養条件や分離株間による生理的特性などの違いによって最適塩分は変化する可能性があることが示唆された。この点については、さらなる研究が期待されるところである。

また、湖山池において湖水温が 20~25°Cになる時期

は5~6月と9~10月ごろのため、水温のみを考慮すれば春季または秋季が増殖に適しているといえる。

2014~2015年における湖山池での現地調査⁽⁶⁾⁽⁷⁾で本種の主要な出現ピークは水温が低下する秋から冬であると報告されており、過去に2回あった本種を含む赤潮はいずれも10~11月に発生している。これらの事実から、同じ最適水温(20~25°C)の時期でも春季より秋季に細胞密度が増加する傾向にあると考えられる。本種の出現挙動を詳細に解明するには、現地モニタリングの継続のほかに水温、塩分以外の要因の増殖特性やシストからの遊泳細胞の供給量の検討が期待される。

水温が15°C以上でのみ明らかな増殖が見られたことから(図3)、増殖可能な水温の閾値は10~15°Cの範囲にあることが示された。湖山池の水温が15°Cを上回る時期はおおむね4~11月頃であることから、十分な塩分(10psu以上)であれば冬季(12~3月頃)を除く時期で増殖可能であると考えられる。

また、水温10°Cでは増殖しないものの実験終了後(培養24日目)に遊泳細胞が残存していたことから(図2)、12月頃の水温でも遊泳細胞として、しばらく水中に存在できることが示唆された。このことは現地調査の結果からも示唆されており、山口ら(2016)は、2015年の現地調査において、12月上旬でも遊泳細胞の出現が確認され、細胞密度が100cells/mlを超えた期間の水温は10.2~17.7°Cであったと報告している⁽⁷⁾。

4.2 増殖可能な低塩分の閾値

5psu 間隔の培養試験により、低塩分域では増殖できないことが示唆された。

そこで増殖できる塩分の詳細な下限値を明らかにするために、塩分を1psu 間隔に段階的に調整して培養実験を行ったところ、増殖できる塩分濃度の下限値は4psu 前後であることが示された。

3psu は細胞密度が減少していったものの、実験終了後(培養24日目)に遊泳細胞は残存していた。よって、3psu は増殖まではできないものの、しばらくは生存できる塩分であると考えられる。一方、1および2psu は3日目以降、細胞が見られなくなった。これらの塩分での計数時に破裂した細胞片が存在していたことから、培養液と細胞内の浸透圧差により、速やかに破裂及び死滅したものと考えられた。

オランダの分離株では塩分が4.5psu では増殖できず、3psu では速やかに死滅したと報告されており⁽¹³⁾、本研究の結果とおおむね一致している。

5. 結論

培養実験により、水温と塩分の *Alexandrium ostenfeldii* の増殖特性を検討したところ、最適条件は水温20~25°C、塩分は10~15psu であった。増殖可能な水温の下限値は10~15°C、塩分の下限値は4psu 前後であった。しかし、植物プランクトンの出現挙動は水温、塩分だけでなく、その他の要因(光、栄養塩、他の植物プランクトンとの競合など)やシストからの発芽条件も関与していると考えられるため、さらなるモニタリングや実験的検証が必要であろう。

6. 引用文献

- (1) 山本圭吾, 中嶋昌紀, 田渕敬一: 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, (2009).
- (2) 坂本節子, 長崎慶三, 松山幸彦, 小谷祐一: 徳山湾に発生した *Alexandrium catenella* 赤潮による二枚貝類の毒化, 瀬戸内海区水産研究所研究報告, 1, 55-61, (1999).
- (3) Hashimoto T, Matsuoka S, Yoshimatsu S, Miki K, Nishibori N, Nishio S, Noguchi T.: First paralytic shellfish poison (PSP) Infestation of bivalves due to toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii*, in the southeast coasts of the Seto Inland Sea, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 43, 1-5, (2002).
- (4) 鳥取県, 鳥取市: 湖山池将来ビジョン推進計画, (2013).
- (5) 岡本将揮, 宮本康: 鳥取県湖山池の海水導入前後における植物プランクトン群集の変化, Laguna, 22, 1-12, (2016).
- (6) 山口峰生, 坂本節子, 及川寛, 紫加田知幸, 鬼塚剛, 阿部和雄, 野々村卓美, 福井利憲, 前田晃宏, 森明寛: 山陰沿岸汽水域に出現した *Alexandrium ostenfeldii* III. 栄養細胞の出現動態とシストの発芽, 日本水産学会春季大会講演要旨集, p106, (2015).
- (7) 山口峰生, 及川寛, 阿部和雄, 紫加田知幸, 坂本節子, 鬼塚剛, 福井利憲, 前田啓助, 前田晃宏, 森明寛: 山陰沿岸汽水域に出現した *Alexandrium ostenfeldii* IV. 栄養細胞の出現に及ぼす環境要因の影響, 日本水産学会春季大会講演要旨集, p86, (2016).
- (8) Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M.: The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins, Phycologia, 39, 67-74, (2000).

- (9) Dedmer B. Van de Waal, Urban Tillmann, Helge Martens, Bernd Krock, Yvonne van Scheppingen, Uwe John: Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands, *Harmful Algae*,49,94-104, (2015).
- (10) 結城勝久, 吉松定昭: 屋島湾における渦鞭毛藻 *Alexandrium minutum* Halim と *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangen の出現, 香川県赤潮研究所研究報告, 8, 1-6, (2012).
- (11) 加賀新之助, 関口勝司, 吉田誠, 緒方武比古: 岩手県沿岸に出現する *Alexandrium* 属とその毒生産能, 日本水産学会誌,72,1068-1076,(2006).
- (12) MacKenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J. : The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand, *Phycologia*, 35, 148-155, (1996).
- (13) Martens, H., Van de Waal, D.B., Brandenburg, K. M., Krock, B., Tillmann, U.: Salinity effects on growth and toxin production in an *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) isolate from The Netherlands, *Journal of Plankton Research*, 38, 1302-1316, (2016).
- (14) Kremp, A., Lindholm, T., Dressler, N., Erler, K., Gerdt, G., Eirtovaara, S., Leskinen, E.: Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the land archipelago Northern Baltic Sea, *Deep-Sea Research*, 52, 2745-2763, (2009).
- (15) Jensen, M. and Moestrup, Ø: Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* life history and growth at different temperatures and salinities, *European Journal of Phycology*, 32, 9-18, (1997).
- (16) Maclean, C., Cembella, A.D., Quilliam, M.A.: Effects of Light, Salinity and Inorganic Nitrogen on Cell Growth and Spirolide Production in the Marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangen, *Botanica Marina*, 46, 466-476, (2003).

**Effects of Temperature and Salinity on the Growth of Toxic Dinoflagellate *Alexandrium Ostenfeldii*
(Dinophyceae)**

Masaki OKAMOTO, Akihiro MORI, Akihiro MAEDA, Toshinori FUKUI, Setsuko SAKAMOTO,
Mineo YAMAGUCHI

Abstract

To clarify the effects of temperature and salinity on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in Lake Koyama-ike, its growth rate under various temperatures (5–30 °C) and salinity (0–35 psu) were examined by laboratory experiments.

The highest growth rate was observed in the combinations of 20 °C and 15 psu and 25 °C and 10 psu. Overall, growth occurred at temperatures from 15 °C to 30 °C and at salinity from 5 to 35 psu.

Furthermore, we examined in detail the lower limit of salinity at which *A.ostenfeldii* would be able to grow. We found that growth was inhibited for salinity below 4 psu.