

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖特性

阿知波英明*・岩崎英雄

三重大学水産学部 (514 三重県津市江戸橋2-80)

ACHIWA, H. and IWASAKI, H. 1990. Growth characteristics of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*. Jpn. J. Phycol. 38: 51-59.

An axenic clone of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (= *Protogonyaulax tamarensis*) was obtained from a seawater sample collected from Ofunato Bay, Iwate Prefecture, northern coast of Japan. The lag phase in fresh medium was shortened by increasing inoculum size and presence of bacteria. The growth was markedly promoted by addition of the filtrate from lag phase culture. Optimal temperature for growth was 10-18°C. The organism preferred higher salinity compared with other neritic red tide flagellates. The optimal salinity was 32‰ S. *A. tamarense* grew moderately well at pH 8.1-8.3. Nitrate, ammonium salt, urea and glycine were utilized as N sources and both inorganic and organic phosphates were utilized as P sources. The highest growth was obtained at high concentrations (> 10 mg/l) of Na₂-glycerophosphate. The growth was stimulated with organic substances such as uracil, guanine and hypoxanthine. Chelated iron, manganese and NTA promoted the growth. *A. tamarense* needed only vitamin B₁₂ for growth. The critical concentration was about 6 ng/l. Enrichment of the seawater (Ise Bay) with nitrate and phosphate enhanced the growth. Moreover, the addition of amino-acids or NTA or trace metal mixture to the enriched seawater greatly increased the growth. It is probable, therefore, chelate substances and trace metals play a significant role in blooming of the organism in Ise Bay.

Key Index Words: *Alexandrium*—*bioassay*—*growth physiology*—*toxic dinoflagellate*.

Alexandrium tamarense (= *Protogonyaulax tamarensis*) は麻ひ性貝毒 (PSP) の原因プランクトンの一種で、とくに毒性が強いことで知られている。この属のプランクトンは増殖に不適当な時期をシストとして過ごし、このシストも毒性を持つといわれる (DALE *et al.* 1978)。近年、日本沿岸海域においても同属の生物による PSP 発生が増加しており、現在 *Alexandrium* による貝毒の対策が緊急の重要な課題となっている。

Alexandrium の発生については、シストがそのタネとなり、温度が発芽に重要な役割を果たすことが知られている (ANDERSON and MOREL 1979, ANDERSON 1980)。しかし、本種の発生後の増殖についてはあまり知られていない。その中で本種の生理的要求についてはすでにいくつかの報告 (PRAKASH 1967, PRAKASH and

RASHID 1968, YENTSCH *et al.* 1975, WHITE 1978) が見られるが、その全貌についてはまだ十分に解明されていない。さらに、同じ種類でも生育環境により生理的性質に差が見られることが珪藻類で指摘されている (GUILLARD and RYTHYER 1962)。そこで、本研究では岩手県大船渡産の *A. tamarense* を用い、本種の適水温、塩分耐性、pH 耐性、窒素源、リン源、微量金属要求、ビタミン要求、および増殖に及ぼす有機物ならびにキレート物質の影響について実験、検討を行なった。

材 料

本実験には、1981年8月岩手県大船渡湾で福代により採集、分離された *A. tamarense* OF815 の単一種培養株を用い、ビベット洗浄法 (岩崎 1967) によって得られた無菌のクローン株が使用された。塩分、pH 耐性に関する実験は、単一種培養で、その他の実験は無菌培養で行なわれた。

培養実験には、20×125 mm の Pyrex 製のスクリーキャップ付き試験管とテフロン製のキャップを使

* 現住所：愛知県水産試験場尾張分場 (470-34 愛知県知多郡南知多町豊浜豊浦2-1)

Present address: Aichi Prefecture Fisheries Experiment Station Owari Branch, 2-1, Toyoura, Toyohama, Minamichita-cho, Chita-gun, Aichi, 470-34 Japan

用した。なお、ガラス器具類は、油脂系粉石鹼で洗浄後、エチレンジアミン4酢酸塩(EDTA)0.05%液に一昼夜浸漬し、蒸留水でよく洗浄した後、250°Cで1時間焼いてから使用した。この蒸留水は、活性炭、イオン交換樹脂処理後、ガラス製の蒸留器(ヤマト Autostill WAG28型)で蒸留されたものである。

培養液には、予備実験に基づき、塩分耐性試験には栄養添加海水 SWII (IWASAKI 1961, Table 1) を、その他の試験には人工海水 ASP₂NM (岩崎 1971, Table 1) を使用し、それぞれ1分間、20分間高圧滅菌後に使用した。細菌検査培地としては、ST3 (IWASAKI 1965) の液体および半固体培地を使用した。

塩分耐性試験には、基本海水に伊勢湾の海水(27.3‰S)を用いた。これを70°Cで加熱して塩分を34‰Sに濃縮した濃縮海水と、再蒸留水にSWIIの処方に従い栄養塩を添加した蒸留水の両者を、種々の割合

で混合して所定の塩分とした。

pH試験では、生物の培養によってpHが変動するが、変動は小さいため、ここでは培養中のpH変動は考慮せずに、高圧滅菌後のpHで表示した。

窒素要求試験には、硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、尿素、グリシン、グルタミン酸およびアスパラギン酸を用い、1μg~500mg N/lの濃度での実験を設定した。

リン要求試験には、グリセリン酸ナトリウム、リン酸第2カリウム、アデニール酸、グアニル酸を用い、10μg~30mg P/lの濃度で行なった。

ビタミン要求については、ビタミンB₁₂、ビオチン、チアミンの3種類について検討し、さらにその相互作用についても試験した。

微量元素に関する実験では、キレート鉄およびキレートマンガンを使用した。ここでは、テフロン製のピーカーやスターラーなどを用いて、微量元素汚染を最小限にとどめるようにした。

有機物の増殖に対する影響試験には、プリン類としてアデニン、グアニン、キサンチン、ヒポキサンチン、

Table 1. Composition (w/v) of culture media.

	SWII (modified)	ASP ₂ NM (modified)
Filtered seawater	1,000 ml	
Distilled water		1,000 ml
NaCl		25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O		5 g
KCl		600 mg
Ca (as Cl ⁻)		100 mg
NaNO ₃		50 mg
KNO ₃	72.2 mg	
KH ₂ PO ₄	4.5 mg	
K ₂ HPO ₄		5 mg
Na ₂ glycerophosphate	10.5 mg	
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O		150 mg
Na ₂ CO ₃		30 mg
Fe (as Fe-EDTA)	0.5 mg	0.3 mg
PII metals*		10 ml
S2 metals**		10 ml
Vitamin mixture I***	10 ml	10 ml
NTA		100 mg
TRIS	1 g	1 g
pH	7.9	8.1

* One ml of PII metals contains; Na₂-EDTA 1 mg, B (as H₃BO₃) 0.2 mg, Fe (as Cl⁻) 10 μg, Mn (as Cl⁻) 40 μg, Zn (as Cl⁻) 5 μg, Co (as Cl⁻) 1 μg.

** One ml of S2 metals contains; Mo (as Na⁺) 50 μg, Br (as K⁺) 1 mg, Sr (as Cl⁻) 200 μg, Rb (as Cl⁻) 20 μg, Li (as Cl⁻) 20 μg, I (as K⁺) 1 μg.

*** One ml of Vitamin mixture I contains; Vitamin B₁₂ 0.02 μg, biotin 0.1 μg, thiamine HCl 10 μg.

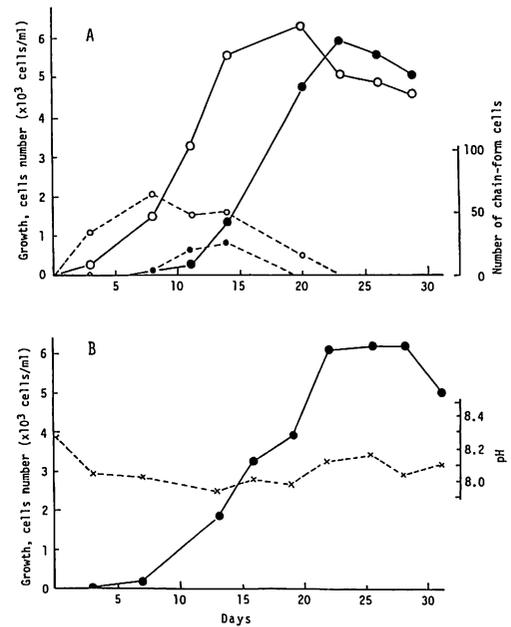


Fig. 1. Growth curves of *Alexandrium tamarense* with different size of inoculum. A: 125 cells inoculated into 10 ml of the medium (●); 990 cells inoculated into 10 ml (○) in unialgal culture. B: 420 cells inoculated into 10 ml in axenic culture. Circles and broken lines show the cell number of chain-form.

ピリミジン類としてシトシン, チミン, ウラシル, メチルトシチンをおのおの 100 $\mu\text{g/l}$, 1 mg/l 添加して実験を行なった。また, その他の物質として, HY-case, デオキシリボ核酸 (DNA), ショ糖, 土壌抽出物および炭素源としての C-source mix-II を使用し, その影響について検討した。

本種の増殖にとり, 腐植物質が重要視されている (PRAKASH 1967, PRAKASH and RASHID 1968, YENTSCH *et al.* 1975) が, ここでは, エチレンジアミン 4 酢酸塩 (EDTA) とニトリロ 3 酢酸塩 (NTA) の 2 種類のキレート物質の直接的作用を知る目的で実験が行なわれた。培養液には pH 緩衝剤としてキレート作用をもつトリスヒドロオキシメチルアミノメタン (TRIS) を 1 g/l 含んでいるが, 実験は TRIS を含んだ状態で実施された。

なお, 窒素, リン, ビタミンおよび微量元素などの要求実験では, 生物を各試験物質欠乏の培養液で増殖させ, それぞれの物質について飢餓状態に近いものを接種材料として用いた。培養は 15°C, 明暗 12:12 時間, 3,000~4,000 lux で行ない, 対数増殖期の後半に計数して 3 本の平均値から増殖量を求めた。

結果および考察

1. 増殖特性

接種量, 接種材料と誘導期

単一種培養における接種量の違いによる増殖曲線の变化についてみると, Fig. 1-A に示されるように, 接

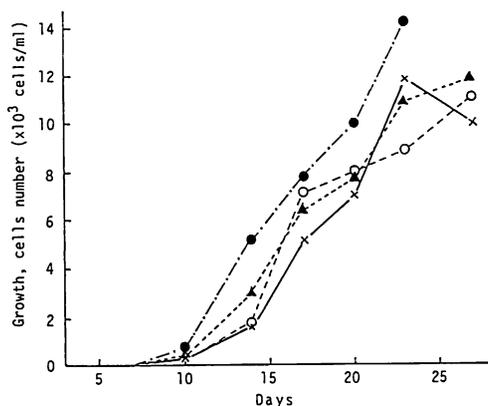


Fig. 2. Growth of *A. tamarense* with addition of filtrates from different growth phase. ×, control; ●, lag phase (after 8 days from inoculation); ○, exponential growth phase (after 22 days); ▲, death phase (after 37 days).

種量が少ないと誘導期は長く, 増殖曲線の立ち上がりは遅れた。

接種量が少ない時の“遅れ”の存在については, すでに SPENCER (1954) が *Nitzschia closterium* の培養実験で指摘しているが, 本種の場合も同様の“遅れ”がみられ, 珪藻に比べるとこの誘導期はかなり長いことがわかる。

一方, 連鎖細胞数は対数増殖期の初めまでは増加したが, 対数増殖期の途中から減少し, 定常期にはまったくみられなくなった。

細胞代謝物の増殖に及ぼす影響

本種の各増殖段階における培養濾液の添加と増殖との関係を Fig. 2 に示す。本実験では, 培養 8 日後 (誘導期後期), 22 日後 (対数増殖期中期) および 37 日後 (死滅期) の培養液を 0.4 μm のミリポアフィルターで無菌的に濾過し, 滅菌後の新培養液 10 ml に各 0.5 ml ずつ添加して増殖が試験された。

この実験結果は, 本種は自己の増殖を助長する細胞代謝物 (autostimulate substances) を細胞外に分泌し, とくに誘導期で著しいことを示している。このことは本種は増殖を始めると, 連鎖反応的に増えやすくなることを示唆しており, 本種の大増殖にとって重要な意味をもつものと考えられる。

2. 水温と増殖

本実験においては, 10, 15, 20 および 25°C における増殖量が調べられた。その結果を Fig. 3 に示す。本種は比較的低温を好み, 15°C でもっとも増殖がよく,

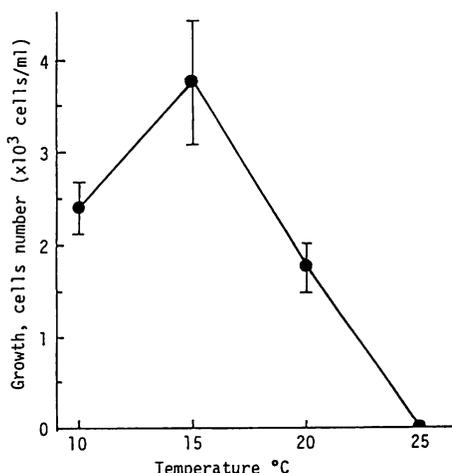


Fig. 3. Growth of *A. tamarense* at different temperatures (after 21 days).

25°C ではまったく増殖しなかった。

一般に、温度は生物の生活に大きな役割を果たしている。本種の場合も、水温は増殖の主要な要因といわれ (NEEDLER 1949, PRAKASH 1967, YENTSCH *et al.* 1975)、また、シストの発芽は水温に大きく左右されるといわれる (ANDERSON and MOREL 1979, ANDERSON 1980)。今回の実験の結果、本株の増殖に最適な水温は 10~18°C であり、外国産の種類 (IWASAKI 1979) とほぼ共通している。しかし、天然では大増殖は 7~17°C の時に多く観察されており、15°C 以下の低水温時での大増殖は、水温以外の要因が関与していることが考えられる。

3. 塩分と増殖

実験結果を Fig. 4 に示す。本種は、塩分32%付近でもっともよく増殖し、10%以下になると増殖はほとんどみられなくなる。

本種は天然海域では塩分27.0~34.8%の範囲で出現している。この値は、YENTSCH *et al.* (1975), PRAKASH (1967) の実験結果による好適塩分とは必ずしも一致しないが、今回の実験結果および WHITE (1978) の結果とはよく一致している。これら最適塩分の違いは株による差と考えられる。

4. pH と増殖

予備実験において、本種は狭 pH 性であり、pH 8.3 付近でよく増殖することがわかったので、この付近の pH を中心に実験を行なった。結果は Fig. 5 に示したように pH 8.2~8.5 で増殖がもっともよく、pH 7.9 では最高増殖量の1/2以下、また、pH 8.9 では増殖量は1/10以下となり、pH 6.9 では増殖はまったくみられ

ず細胞は死滅した。このように本種は比較的高い pH でよい成長を示した。

5. 窒素源と増殖

本種は、実験を行なった6種類の窒素化合物をいずれも窒素源として利用した (Table 2)。窒素源としては硝酸態窒素が相対的にすぐれ、次いでアンモニア態窒素、尿素などで比較的よく増殖したが、増殖は $\text{NH}_4\text{-N}$ では 100 $\mu\text{g N/l}$ 、尿素で 1 mg N/l をピークに、それ以上の濃度では漸減した。これに対して、有機窒素化合物では実験を行なった 10 mg N/l まで、硝酸態窒素では 500 mg N/l でも増殖阻害はみられなかった。一般に、本種の窒素源およびその濃度に対する反応は鈍く、特徴的な増殖反応はみられなかった。

6. リン源と増殖

各種リン酸源の各濃度における *A. tamarensis* の増殖を Table 3 に示す。最高の増殖はグリセロリン酸の 10 mg P/l 以上の濃度で得られたが、沿岸、内湾海域における濃度 (無機リンの場合、東京湾では 31~155 $\mu\text{g P/l}$ 、伊勢湾では 31 $\mu\text{g P/l}$ 以下、また、全リンの場合、前者では 50~102 $\mu\text{g P/l}$ 、後者では 34~53 $\mu\text{g P/l}$ (西條 1985)) でも増殖がみられた。

本種はリン酸の細胞内貯蔵が少ないためか、リン酸欠乏の培養液での2回の植え継ぎ (約5~6世代) で死滅している。計算によると、正常な細胞は外部からリン酸の補給がないと、1細胞から32~64細胞以上には増殖できないことを示している。

PRAKASH and RASHID (1968) はリン源として、グリセロリン酸ナトリウムを用いて培養実験を行い、13 μg ~1.3 g P/l の間で増殖に変動はみられなかったと報

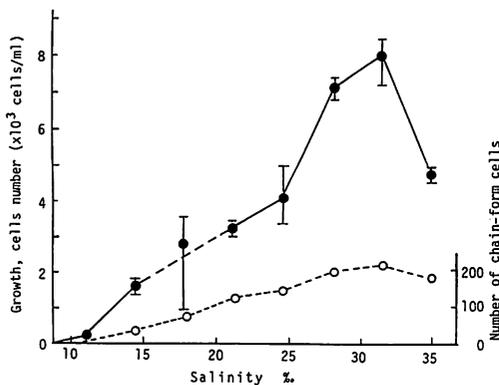


Fig. 4. Growth of *A. tamarensis* at various salinities in unialgal culture (after 20 days).

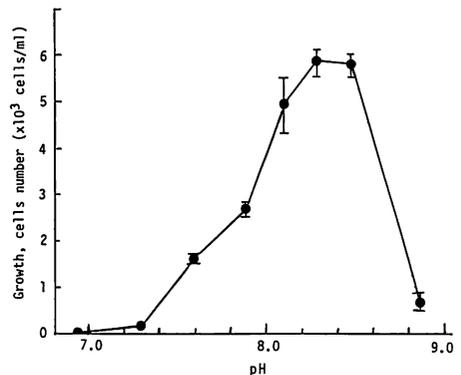


Fig. 5. Effect of pH on the growth of *A. tamarensis* in unialgal culture (after 18 days).

Table 2. Growth of *A. tamarense* with different nitrogen sources and concentrations (after 22 days).

Weight/l	Growth, number of cells/ml					
	NH ₄ Cl	NaNO ₃	Urea	Glycine	Gultamic acid	L-Asparagine
None added	380	380	380	380	380	380
1 µg	400	390	450	—	—	—
10 µg	520	710	350	660	260	410
100 µg	840	1080	640	530	570	340
1 mg	590	970	1010	680	410	430
3 mg	—	—	590	—	—	—
10 mg	0	960	430	810	490	480
30 mg	—	—	0	—	—	—
100 mg	—	1050	—	—	—	—
500 mg	—	1120	—	—	—	—

告している。本実験では、10 mg P/l 以上ではよく増殖したが、3 mg P/l 以下では増殖が悪く、彼らの結果とは異なった結果が得られた。

7. 鉄およびマンガンと増殖

キレート鉄とキレートマンガンを除いた培養液で17日間予備培養した生物を、キレート鉄とキレートマンガン種々の濃度に含む培養液に接種して実験を行なった。結果を Table 4 に示す。

Table 4 にみられるように、*A. tamarense* は、キレート鉄の添加によって22日間で最高2.4倍の増殖を、また、キレートマンガンの添加では約2倍量の増殖を示した。とくに、1~10 µg/l 程度の低濃度で増殖促進作用がみられることは注目に値する。本実験では、実験

Table 3. Growth of *A. tamarense* with different phosphorus sources and concentrations (after 22 days).

Weight/l	Growth, number of cells/ml			
	K ₂ HPO ₄	Na ₂ -glycero-phosphate	Adenylic acid	Guanylic acid
None added	0	0	0	0
10 µg	—	290	—	—
30 µg	—	—	110	1,500
100 µg	2,710	530	—	—
300 µg	—	500	580	1,050
1 mg	4,500	2,100	—	1,520
3 mg	—	2,370	2,920	—
10 mg	6,010	13,140	—	2,460
30 mg	3,400	13,700	850	—

器具にはテフロン製品を用いているが、試薬、培養容器などからの微量な金属汚染は避けられなかったものと思われる。

GLOVER (1978) は、メイン沿岸において本種の増殖と海水中の鉄濃度との間に強い相関がみられたことを報告しているが、本実験の結果とも符合している。

8. 有機物の影響

プリン、ピリミジン類の添加による *A. tamarense* の増殖量を Table 5 に示す。Table 5 にみられるように、本種は、グアニン (1.0 mg/l)、ヒポキサンチン (0.1 mg/l)、ウラシル (1.0 mg/l) などによって増殖が促進され、18日間に無添加のものに比べ3~4倍量の増殖を示した。

これに対して、プリン、ピリミジン類以外の有機物 (Table 6) では、その添加によって若干の増殖量の増加はみられたが、陸土壌抽出液を除いて、とくに増殖

Table 4. Effect of iron and manganese on the growth of *A. tamarense* in ASP₂NM (after 22 days).

Weight/l	Growth, number of cells/ml	
	Fe-EDTA	Mn-EDTA
None added	3,680	4,700
1 µg	3,600	8,830
5 µg	—	5,640
10 µg	8,870	—
100 µg	7,940	9,070
500 µg	6,240	—
1 mg	—	6,100

Table 5. Growth response of *A. tamarensis* to purines and pyrimidines (after 18 days).

Substances	Concentrations mg/l	Growth, number of cells/ml
None added		1,060
Adenine	0.1	1,300
	1.0	1,790
Guanine	0.1	1,720
	1.0	3,200
Xanthine	0.1	1,150
	1.0	1,480
Hypoxanthine	0.1	2,970
	1.0	2,490
Cytosine	0.1	1,100
	1.0	1,580
Thymine	1.0	1,210
	Uracil	0.1
		1.0
Methylcytosine	0.1	1,740
	1.0	1,220

の促進効果はみられなかった。

9. キレート物質の影響

キレート物質として Na_2EDTA (10 mg/l) に NTA を種々の濃度に加えた場合と NTA のみの場合の増殖量を Fig. 6 に示す。この図から明らかのように、本種は

Table 6. Growth response of *A. tamarensis* to organic substances (after 15 days).

Substances	Concentrations	Growth, number of cells/ml
None added		5,800
Hy-case	10 mg/l	6,410
	50 mg/l	5,700
DNA	0.1 mg/l	6,740
	1.0 mg/l	6,550
	10 mg/l	5,150
Sucrose	0.1 mg/l	6,840
	1.0 mg/l	5,450
C-source mix. II*	0.1 ml/l	6,840
	1.0 ml/l	6,820
	10 ml/l	6,170
Soil extract (land)	1.0 ml/l	6,240
	10 ml/l	8,200

* One ml contains: glycine 1 mg, DL-alanine 1 mg, L-asparagine 1 mg, Na-acetate 2 mg, glucose 2 mg, L-glutamic acid 2 mg.

NTA の添加によって増殖が促進され、とくに 10 mg/l 以上の高濃度域で著しかった。

鞭毛藻類の増殖に対するキレート物質の重要性については多くの研究者によって指摘されており、本種についても、PRAKASH (1967), PRAKASH and RASHID (1968), YENTSCH *et al.* (1975) などにより、天然のキレーターである腐植物質やアミノ酸などによる増殖促進作用が報告されている。YENTSCH *et al.* (1975) は、濾過海水に NTA を加えて増殖促進効果をみているが、それによると、本種の増殖は NTA 10 mg/l の添加で促進されたが、50 mg/l では増殖が阻害されたといわれる。本実験では EDTA は増殖をそれほど刺激しなかったが、NTA の添加による増殖促進作用は著しく、300 mg/l の濃度でも阻害作用はみられなかった。これは、本実験が人工海水を基本液として用いているのに対して、彼らは天然海水を基本液として使用したことによる違いと考えられる。

このように、本種の増殖に対してキレート物質が大きく関与しており、その作用機構については明らかではないものの、キレート物質の河川からの流入や底泥からの補給により本種の増殖が促進される可能性はきわめて強いと考えられる。

10. ビタミン要求

本実験には、この生物をビタミン欠除の培養液で15日間ずつ2回予備培養を行なったものを使用した。これをビタミン B_{12} 、チアミン、ピオチンおよびその組合せを含む培養液に接種し、20日間培養した場合の *A. tamarensis* の増殖量を Table 7 に、ビタミン B_{12} の濃

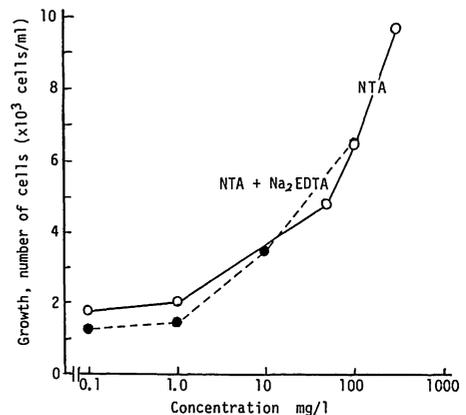


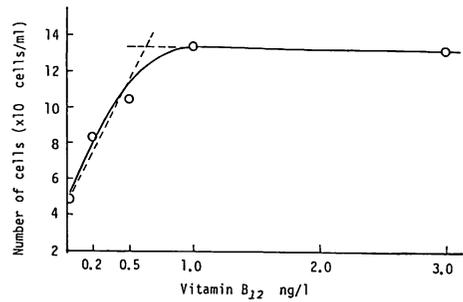
Fig. 6. Effect of NTA and EDTA on the growth of *A. tamarensis*. Basal medium contains TRIS 1 mg/l, and the growth was 1,600 cells/ml.

Table 7. Growth response of *A. tamarense* to vitamin B₁₂, biotin and thiamine (after 20 days).

	Growth, number of cells/ml
None added	3,700
Vitamin B ₁₂ (10 ng/l)	13,130
Biotin (1 µg/l)	0
Thiamine (100 µg/l)	3,740
Vitamin B ₁₂ (10 ng/l)+Thiamine (100 µg/l)	6,110
Biotin (1 µg/l)+Thiamine (100 µg/l)	2,380
Vitamin B ₁₂ +Biotin+Thiamine	6,720

度を変えて22日間培養した場合の増殖量を Fig. 7 に示す。

Table 7 にみられるように、*A. tamarense* はビタミン B₁₂ 10 ng/l の存在によって約3.5倍量増殖した。これに対してビオチンの単独添加の場合には増殖は全くみられず、他のビタミンとの組合せでも増殖阻害的に作用した。一方、チアミンの添加によってはとくに影響はみられなかったが、B₁₂ との組合せでは増殖阻害的に

Fig. 7. Growth response of *A. tamarense* to vitamin B₁₂ (after 22 days).

作用した。本種の増殖にはビタミン B₁₂ 6 ng/l 付近に臨界点がみられたが、B₁₂ が本種の増殖に必須の要素であるか否かについては確認できなかった。

YENTSCH *et al.* (1975) は本種のビタミン要求については16種のビタミンを用いて培養実験を行なったが、これらのビタミンは増殖に影響はなく、ビタミン類は本種の増殖に対して本質的な意味をもたないとしている。一方、PRAKASH (1967) によれば、B₁₂ とチアミン

Table 8. Growth of *A. tamarense* in Ise Bay seawater enriched with various nutrients (after 22 days).

	Growth, number of cells/m
Filtered seawater	810
+NaNO ₃ (50 mg/l)	770
+Na ₂ glycerophosphate (50 mg/l)	2,200
+PII metals (10 ml/l)	890
+S2 metals (10 ml/l)	840
+NTA (100 mg/l)	850
+Vitamin mix. I (10 ml/l)	1,170
+C-source mix. II (1 ml/l)	1,060
+Hy-case (50 mg/l)	3,710
+Filtrate of culture medium* (50 ml/l)	2,170
+NaNO ₃ (50 mg/l)+Na ₂ glycerophosphate (50 mg/l)	3,310
+N+P+Vit. mix. I (10 ml/l)	3,790
+N+P+C-source mix. II (1 ml/l)	7,230
+N+P+Hy-case (50 mg/l)	3,360
+N+P+Filtrate of culture medium* (50 ml/l)	3,440
+N+P+NTA (100 mg/l)	7,120
+N+P+PII metals (10 ml/l)	10,410
+N+P+S2 metals (10 ml/l)	3,930
+N+P+NTA+PII metals	7,790
+N+P+NTA+S2 metals	3,870

* The filtrate of medium in which the organism grew axenically.

の組合せで増殖は促進されたといわれる。本実験では B₁₂ の単独添加により増殖が大きく刺激されたが、さらにチアミンを添加しても増殖促進効果はみられず、むしろ阻害的な効果がみうけられた。このように、本種のビタミン要求に対しては異なった結果が得られている。これは彼らの実験が栄養添加海水を基本培養液とした混菌培養であったことに起因するものと考えられる。MULLIGAN (1975) によれば、海水中の主要なビタミンはバクテリアに起因するといわれ、混菌状態である単一種培養によるビタミン要求実験は大きな問題を含んでいる。しかし、本実験においてもビタミン欠乏培養液での2回の継代培養(約11~12世代)後でさえ、約3000 cells/mlに増殖し、本種のビタミン要求性はきわめて少量であることが示された。

11. 各種栄養物質の相対的効果

以上の実験をふまえ、天然環境における各種栄養物質の *A. tamarensis* の増殖に対する相対的な影響度、換言すると、伊勢湾では、本種は外部からどのような栄養物資の添加もしくは供給によってよく増殖するかについて検討するための実験が行なわれた。本実験では、伊勢湾海水(三重県伊勢市沖で採水, 29.0‰S)を70°Cで加熱後、グラスファイバー濾紙(Whatman GF/F)で濾過したものに TRIS 1 g/l を加えたものを基本液として用い、各種の栄養物質を Table 8 に示すように添加して培養を行なった。

本種は無添加の伊勢湾海水でも 800 cells/ml にまで増殖した。伊勢湾海水に窒素(硝酸ナトリウム 50 mg/l)を添加した場合、増殖促進はみられなかったが、リン(グリセロリン酸ナトリウム 50 mg/l)の添加で増殖は2.7倍にも促進された。基本海水に NTA (100 mg/l), PII metals (10 ml/l), S2 metals (10 ml/l) をそれぞれ単独に添加しても増殖に影響は認められなかった。しかし、濾過海水に Vitamin mix. I を 10 ml/l 加えると増殖は無添加の約1.5倍となり、HY-case 50 mg/l の添加により約4.6倍量の増殖を示し、リン添加以上の増殖刺激効果がみられた。培養濾液の添加(誘導期の濾液 50 ml/l)でも無添加の約2.7倍にも増殖した。窒素とリンの添加では無添加の約4倍、さらに、窒素とリンに Vitamin mix. I を加えても増殖量は窒素とリンの添加に比べてわずかに増加(無添加の4.7倍量)したにとどまったが、窒素、リンに C-source mix. II (1 ml/l) を加えると、窒素とリン同時添加の場合よりさらに2.2倍も増殖した。また、窒素とリンに、NTA または PII metals を加えることによって増殖は著しく促

進された。すなわち、前者で窒素とリン添加の約2.2倍、後者で約3.1倍の増殖を示した。つまり、濾過海水に窒素、リン、PII metals を加えることにより、無添加の場合に比べて約13倍にも増殖量が増大した。

以上の結果から、伊勢湾海域に存在するシストが温度要因により発芽したときに、リンやキレート物質、微量金属類が添加されると *A. tamarensis* の増殖は促進され、また、増殖による自己代謝物がさらに増殖を刺激することが示された。

謝 辞

本研究をまとめるに当たり、実験材料の供与を受けた東京大学農学部福代康夫博士に深く感謝する。

文 献

- ANDERSON, D. M. 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.* **16**: 166-172.
- ANDERSON, D. M. and MOREL, F. M. M. 1979. The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypocysts. *Est. Coast. Mar. Sci.* **8**: 279-293.
- DALE, B., YENTSCH, C. M. and HURST, J. W. 1978. Toxicity in resting cysts of red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* from deeper water coastal sediments. *Science* **201**: 1223-1225.
- GLOVER, H. E. 1978. Iron in Maine coastal waters: seasonal variation and its apparent correlation with a dinoflagellate bloom. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 534-537.
- GUILLARD, R. R. L. and RYTHER, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* HUSTEDT and *Detonula confervacea* (CLEVE). *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- IWASAKI, H. 1961. The life-cycle of *Porphyrta tenera* in vitro. *Biol. Bull.* **121**: 173-187.
- IWASAKI, H. 1965. Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyrta tenera* I. The influence of different B₁₂ analogues, plant hormones, purines, and pyrimidines on the growth of *Conchocelis*. *Plant Cell Physiol.* **6**: 325-336.
- 岩崎英雄 1967. 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, 東京.
- 岩崎英雄 1971. 赤潮鞭毛藻に関する研究—VI. 1970年備後灘に出現した *Eutreptiella* sp. と *Exuviaella* sp. について. *日本海洋学会誌* **27**: 152-157.
- IWASAKI, H. 1979. Physiological ecology of red tide flagellates. p. 357-393. *In* M. LEVANDOWSKY and S. H. HUNTER (ed.), *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 1. Academic Press, New York.

- MULLIGAN, H. F. 1975. Oceanographic factors associated with New England red tide blooms. p. 23-40. In V. R. LoCICERO (ed.), Proc. 1st Internat. Conf. Toxic Dinoflagellate Blooms. Mass. Sci. Technol. Found., Wakefield.
- NEEDLER, A. B. 1949. Paralytic shellfish poisoning and *Gonyaulax tamarensis*. J. Fish. Res. Bd. Canada 7: 490-504.
- PRAKASH, A. 1967. Growth and toxicity of a marine dinoflagellate, *Gonyaulax tamarensis*. J. Fish. Res. Bd. Canada, 24: 1589-1606.
- PRAKASH, A. and RASHID, M. A. 1968. Influence of humic substance on the growth of marine phytoplankton: Dinoflagellates. Limnol. Oceanogr. 13: 598-606.
- 西條八束 1985. 1. 水質, III化学, 第13章伊勢湾・三河湾. p. 528-539. 日本海洋学会沿岸海洋研究部会(編), 日本全国沿岸海洋誌. 東海大学出版会, 東京.
- SPENCER, C. P. 1954. Studies on the culture of a marine diatom. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 33: 265-290.
- WHITE, A. W. 1978. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. J. Phycol. 14: 475-479.
- YENTSCH, C. M., COLE, E. J. and SALVAGGIO, M. G. 1975. Some of the growth characteristics of *Gonyaulax tamarensis* isolated from the Gulf of Maine. p. 163-180. In V. R. LoCICERO (ed.), Proc. 1st Internat. Conf. Toxic Dinoflagellate Blooms. Mass. Sci. Technol. Found., Wakefield.

