

## 赤潮鞭毛藻に関する研究—I.

福山沿岸水域に出現した *Entomosigma* sp. について

岩崎英雄・藤山虎也・山下栄次\*

(広島大学水畜産学部水産学科)

### Studies on the red tide dinoflagellates—I.

On *Entomosigma* sp. appeared in coastal area of Fukuyama

Hideo IWASAKI, Toraya FUJIYAMA and Eiji YAMASHITA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,  
Hiroshima University, Fukuyama

(Figs. 1-7; Tables 1-5)

本邦南西部の沿岸，特に内湾にはほとんど毎年赤潮が発生し，ハマチや真珠などの養殖業および貝類その他の沿岸漁業に大きな被害を与えている。赤潮については，わが国だけでもすでに100篇以上におよぶ多数の報告が見られるが，その大部分は原因プランクトンの種類や現象の記述，被害などに関するもので，赤潮の発生要因や機構についての研究は少なく，多くの場合現象面から推測がなされているに過ぎない。

赤潮の発生要因を明らかにするには発生水域の物理，化学的環境条件，ならびに水理的条件などに関する調査，研究はもちろん必要であるが，同時に赤潮を構成するプランクトンの生理・生態についても解明されねばならず，この両方の研究が相まってはじめて達成されるものとする。本研究は赤潮プランクトンを培養してその生理・生態を明らかにするとともに，無菌培養によって特に栄養生理の面から赤潮の発生要因について解明することを試みたものである。

本文に入るに先立ち，本種を同定された鈴ヶ峯女子短大の羽田良禾博士，また多くの  $B_{12}$  類似物の供与を受けた Dr. K. BERNHAUER，下水汚泥から分離された貴重な factors  $Z_1, Z_2, Z_3$  を利用させて戴いた Dr. Halina NEUJAHN に深く感謝する。また採水などで御協力下さった兵庫県山内技師，山口県河本技師に対して感謝の意を表す。なお，本研究の一部は昭和41，42年度農林水産特別試験研究費補助金でなされたことを附記し，あわせて感謝の意を表す。

### 材料および方法

この赤潮は1966年6月19日に芦田川の河口附近に発生したものである。赤潮発生時の状況は発生3日前の6月16日にかんがりの降雨（福山で約30mm）があり，河川水は黄褐色に濁り，赤潮プランクトンは黄褐色の河川水と海水との境界水帯に特に濃密に見られた。21日の午後における分布状況（肉眼判定）は第1図に示されるようであった。採集した生物を直ちに実験室に持帰り，各種の培養液に接種して培養液の試験を行なうとともに，形態や運動習性などについて観察を行なった。このプランクトンは大略

\* 現在，兵庫県尼崎市役所。

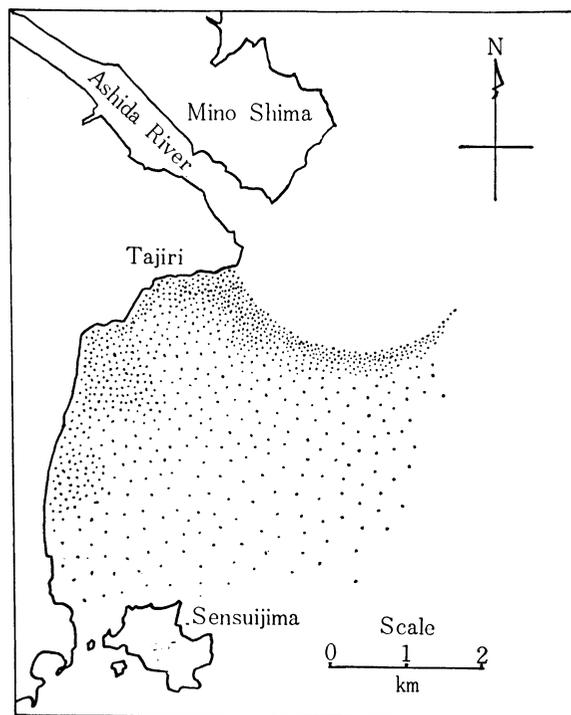


Fig. 1. Local distribution of red water (*Entomosigma* sp.) on June 21, 1966.

第2図に示されるように大きさは平均  $11 \times 15 \mu$  で、2本の不等の鞭毛を有し、ローテーションを繰返して前進運動を行なう。本種は羽田博士により *Entomosigma* sp. と同定された\*。

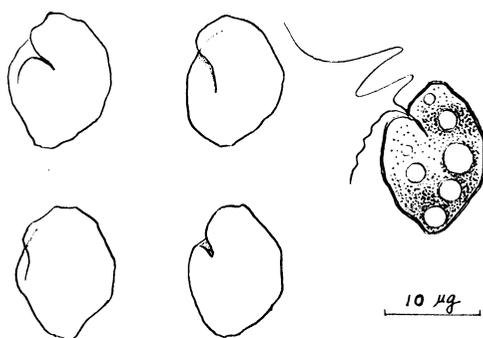


Fig. 2. *Entomosigma* sp.

培養液試験の結果、人工培養液  $ASP_2NTA$  で良く増殖することが判明したのでビタミン要求に関する実験にはこの培養液が使用された。海水は赤潮発生時に発生水域に隣接する瀬の浦で採水したものを加熱濾過して使用した。生物は毛細管ピペットによって単一種に分離され、同ピペットによる稀釈洗浄を繰返すことによって無菌培養が得られた。なお細菌検査の培地には  $STP_m$  と  $ST_3^{(1)}$  の液体および寒

\* その後 *Entomosigma akashiwo* n. sp. と命名。HADA Y. (1967) Bull. Suzugamine Women's Coll., Nat. Sci., 13, 1-26

天の半固体培地が使用され、細菌検査は各実験ごとに行なわれた。培養実験は 10 ml の培養液を含む 20×125 mm の KIMAX のねじ蓋付試験官を用い、これに exponential growth stage の生物を接種し、20°C, 2,000~3,000 Lux の条件下で培養を行ない、一定期間後に計数して増殖量を求めた。

Table 1. Composition (w/v) of culture medium (ASP<sub>2</sub>NTA)

Distilled water	1,000 ml	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	30 mg
NaCl	18 g	vitamin B <sub>12</sub>	0.2 μg <sub>)*</sub>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g	vit. mix. S3**	10 ml <sub>)*</sub>
KCl	0.6 g	P II metals***	30 ml
Ca (as Cl <sup>-</sup> )	0.1 g	Fe (as Cl <sup>-</sup> )	0.5 mg
NaNO <sub>3</sub>	50 mg	"Tris" buffer	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mg	Nitriiotriacetic acid	0.1 g
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	150 mg	pH	7.8

\* These vitamins are eliminated in the vitamin experiment.

\*\* One ml of vitamin mix. S3 contains: thiamine HCl 0.05 mg, nicotinic acid 0.01 mg, Ca pantothenate 0.01 mg, *p*-aminobenzoic acid 10 μg, biotin 0.1 μg, inositol 0.5 mg, folic acid 0.2 μg, thymine 0.3 mg.

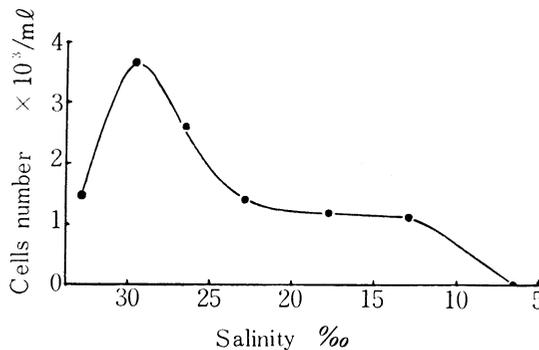
\*\*\* One ml of P II metals contains: EDTA 1 mg, Fe (as Cl<sup>-</sup>) 0.01 mg, B (as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 0.2 mg, Mn (as Cl<sup>-</sup>) 0.04 mg, Zn (as Cl<sup>-</sup>) 5 μg, Co (as Cl<sup>-</sup>) 1 μg.

前に述べた発生時の観察結果から、降雨による河川水の影響、すなわち、1) 海水の稀釈、2) 各種栄養物質(窒素、燐、微量の金属および生長促進物質など)の搬入、3) 搬入された有機物によるキレート作用(海水中に溶存する金属イオンの無害化)などが赤潮発生の原因として考えられたので、この観点から実験が進められた。

## 実験結果

### 1. 塩分濃度

海水を 70°C に加熱、濾過したものを再蒸留水で種々の塩分濃度に稀釈し、*Entomosigma* sp. を接種して各塩分濃度における増殖速度を調べた。実験の結果は第3図に示されるように、S 25-31‰ (Cl 14-17‰) で増殖がよく、S 29.6‰ (Cl 16.4‰) で無処理の元海水の約2倍半の最高の増殖を示した。

Fig. 3. Growth of *Entomosigma* sp. at the various salinities.

### 2. 微量金属の影響

加熱濾過海水を再蒸留水で稀釈したもの (S 26.6‰) に硝酸ナトリウムとグリセロ 燐酸ナトリウムを

N, Pとしてそれぞれ 50 mg/l, 10 mg/l に, Tris (pH緩衝剤) を 0.5 g/l 加えたものを基本培養液とし, 2種類の微量金属混合液, P11, S2 液を種々の濃度に加えてその影響を調べた. 実験の結果を第4図に示す. すなわち, 金属類の添加によって増殖は50%前後促進された.

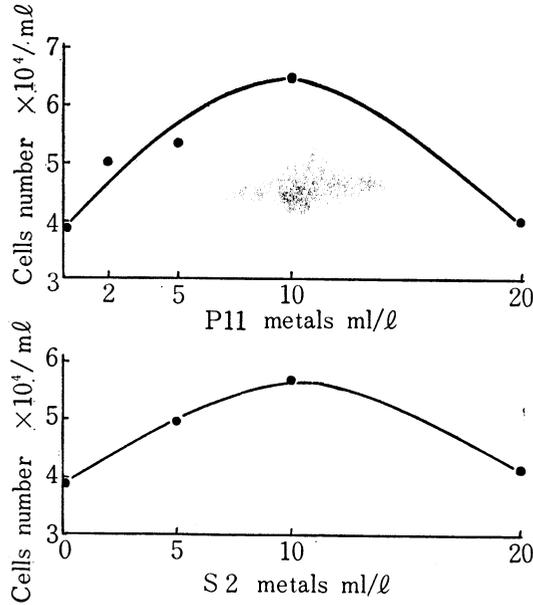


Fig. 4. Growth of *Entomosigma* sp. in enriched sea water supplemented with metal mixtures.

### 3. キレート物質の影響

河川水によって陸地から搬入される有機物による金属キレート作用の影響について検討するため, キレート剤, EDTA (エチレンジアミン4酢酸塩) と NTA (ニトリロ3酢酸) を指標として実験を進めた. 基本培養液は実験2と同じ栄養添加稀釈海水である.

実験の結果は, 強キレート剤である EDTA の添加によって増殖は阻害されたが, 弱キレート剤の NTA の場合にはその添加 (10 mg/l) によって約2倍程度増殖が促進された (第5図). ここで注意すべきことは, 稀釈海水に窒素, 磷の栄養塩を添加しただけで, 1 ml 当り約20万個体の増殖が得られた

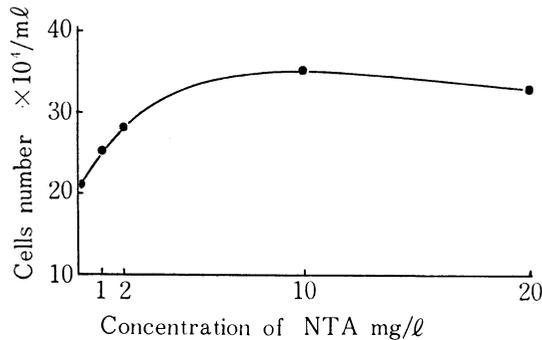


Fig. 5. Growth of *Entomosigma* sp. in enriched sea water supplemented with chelator.

ことである。

#### 4. pH の影響

環境水の pH と *Entomosigma* sp. の増殖との関係は第6図に示される。本実験では人工培養液 ASP<sub>2</sub>NTA を用い、pH は弱塩酸と弱水酸化ナトリウム液で調整された。この生物は海水の pH よりも僅かに低い pH=7.5 で最もよく増殖し、pH=7.5 からのずれとともに増殖速度は低下する。

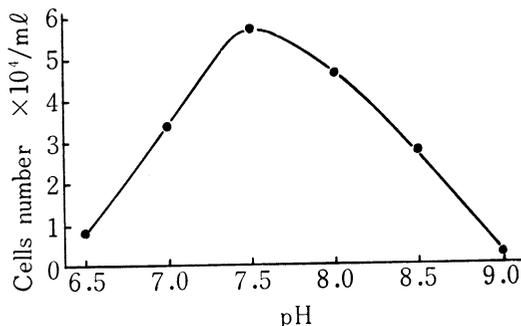


Fig. 6. Effect of pH on the growth of *Entomosigma* sp.

#### 5. 窒素, 燐の濃度と増殖量

実験3において指摘したように、赤潮発生水域の周辺にあたる鞆の浦で採水した海水に窒素, 燐を加えただけで、約20万個体/mlの濃密培養が得られた。本実験は *Entomosigma* sp. の増殖に対する窒素, 燐の至適濃度を知る目的で行なわれた。培養の基本液には瀬戸内海東部の赤穂, 中央部の伯方島および周防灘の山口県秋穂付近で採水した3種類の海水を準備し、70°C に加熱後濾過して再蒸溜水で S 29.0 ‰ (Cl 16.05‰) に調整したものをを用いた。本実験に使用した培養液の処方第2表に示す。

Table 2. Enriched sea water medium

Filtered sea water (adjusted to S 29.0 ‰)	1,000 ml	S 2 metals**	10 ml
		vitamin B <sub>12</sub>	0.2 μg
NaNO <sub>3</sub>	180 mg	“Tris” buffer	0.5 g
Na <sub>2</sub> -glycerophosphate	75.5 mg	Nitritotriacetic acid	0.1 g
P II metals	10 ml	pH	7.8

\* These elements are eliminated in the nitrogen, phosphorus experiments respectively.

\*\* One ml of S 2 metals contains: Br (as Na<sup>+</sup>) 1 mg, Sr (as Cl<sup>-</sup>) 0.2 mg, Rb (as Cl<sup>-</sup>) 0.02 mg, Li (as Cl<sup>-</sup>) 0.02 mg, Mo (as NaMoO<sub>4</sub>) 0.05 mg, I (as K<sup>+</sup>) 1 μg.

以上のような各種の栄養添加海水に窒素源の硝酸ナトリウムの量だけを変えて加えた場合の *Entomosigma* sp. の増殖量は第3表に示される。この結果から見ると、伯方島海水を基本液とするものではNとして0.1g/lまでは濃度の増加とともに増殖量は多くなっている。秋穂の海水ではN 2 mg/lで最高の増殖を示し、それ以上の濃度になると増殖量は低減の傾向が見られた。また赤穂の海水では窒素源の添加によっても増殖量はほとんど変わらず、2 mg/lの濃度ですでに増殖阻害作用が見られた。この原因については現在のところ不明であるが、海水の生理的性質に大差のあることは明らかである。

磷酸塩添加の場合には、最高の増殖は秋穂海水を基本液とする培養液 (P 20 mg/l) で得られたが、全体的には窒素の場合とほぼ同様な傾向が見られ、海水の性質に差違のあることが認められる。

Table 3. Growth of *Entomosigma* sp. in enriched sea water with various amounts of  $\text{NaNO}_3$  as nitrogen source  
(After 16 days)

Wt./litre (as N)	Growth (number of cells per ml)		
	Akō s. w.*	Basal sea water Aio s. w.**	Hakata-jima s. w.***
None added	22, 200	19, 900	18, 400
0.2 mg	28, 500	33, 300	33, 740
0.5 "	33, 200	39, 200	43, 200
1 "	25, 300	49, 100	65, 650
2 "	2, 500	75, 750	75, 280
5 "	2, 900	43, 400	85, 200
10 "	1, 460	40, 500	88, 720
30 "	1, 000	21, 600	95, 920
100 "	300	21, 200	109, 050

\* Collected at Akō, Hyōgo pref., locating the eastern part of the Inland Sea.

\*\* At Aio, Yamaguchi pref., the western part of the Inland Sea.

\*\*\* At Hakata-Is., Ehime pref., the central part of the Inland Sea.

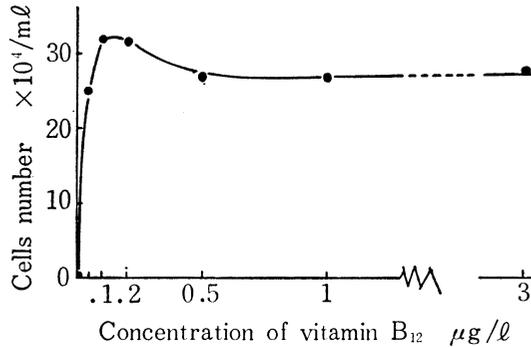
Table 4. Growth of *Entomosigma* sp. in enriched sea water with various amounts of  $\text{Na}_2$ -glycerophosphate as phosphorus source  
(After 16 days)

Wt./litre (as P)	Growth (number of cells per ml)		
	Akō s. w.	Basal sea water Aio s. w.	Hakata-jima s. w.
None added	10, 100	14, 000	7, 400
0.1 mg	10, 400	10, 200	8, 900
0.2 "	10, 300	12, 100	9, 100
0.5 "	10, 400	16, 000	13, 200
1 "	9, 800	17, 900	24, 300
2 "	11, 000	28, 500	37, 300
5 "	26, 800	63, 000	70, 500
10 "	100	—	66, 600
20 "	0	111, 360	70, 200
50 "	0	200	52, 400

## 6. ビタミンの影響

実験Ⅰ. ビタミン  $B_{12}$  を除いた培養液  $\text{ASP}_2\text{NTA}$  で1週間培養を行なって、生物を充分ビタミン  $B_{12}$  欠乏状態にさせた後、種々の濃度に  $B_{12}$  を含む培養液に接種してその増殖量を調べた。実験結果は第7図に示されるように無添加のものでは全然増殖しないが、僅か  $0.1 \mu\text{g}/\text{l}$  の濃度で33万個体/ml の高密度に達した。したがって、*Entomosigma* sp. の増殖にビタミン  $B_{12}$  は不可欠のものであるが、ごく微量で充分ということができる。

実験Ⅱ. ビタミン  $B_{12}$  には多くの類似物が存在するが、これら類似物の *Entomosigma* sp. の増殖におよぼす影響について実験が行なわれた。実験の結果は第5表に示される。すなわち、ベンジミダゾールを有するコバラミンが存在すると *Entomosigma* sp. は活潑に増殖するが、ヌクレオチドにアデニンを

Fig. 7. Growth response to vitamin B<sub>12</sub> of *Entomosigma* sp.

持つコバラミンでは増殖は著しく劣り、ヌクレオチドを持たないコバラミンではほとんど増殖しないことがわかる。したがって、この生物の B<sub>12</sub> 類似物に対する反応特性は *Euglena* 型の性質も幾分示すようであるが *Ochromonas* 型に入れることができる。

Table 5. Growth response to B<sub>12</sub> analogues of *Entomosigma* sp.  
(After 17 days)

B <sub>12</sub> analogues	Base of nucleotide	Growth Number of cells/ml
Cyanocobalamine (=B <sub>12</sub> )	5, 6-dimethylbenzimidazole	129, 200
5-methylbenzimidazole cobalamine	5-methylbenzimidazole	145, 400
Benzimidazole cobalamine		153, 300
Factor III	5-hydroxybenzimidazole	52, 100
Pseudovitamin B <sub>12</sub>	adenine	12, 400
Factor A	2-methyladenine	7, 500
2-methylmercaptoadenine		5, 600
Aetiocobalamine (=Factor Ib)	none	0
Factor B	none	9, 300
Factor Z <sub>1</sub>	none	100
Factor Z <sub>2</sub>	none	0
Factor Z <sub>3</sub>	none	600

実験Ⅲ. その他のビタミンの影響を調べる目的で B<sub>12</sub> を含む培養液 ASP<sub>2</sub>NTA にビタミン混合液 S 3 (組成は第 1 表脚註参照) をそれぞれ量を変えて加え実験を行なった。その結果 *Entomosigma* sp. の増殖はこれらビタミンの添加によって僅かながら促進され、S 3 液を 50 ml/l に添加した場合約 50% 程度増殖が促進された。

## 考 察

以上の実験結果によると、低塩分、低 pH および微量金属またはキレート作用をもつ物質の添加、導入によって、この赤潮プランクトン *Entomosigma* sp. の増殖はいずれも促進される。赤潮発生時における発生水域の塩分濃度は S 22.6~29.8‰ (Cl 12.5~16.5‰) で、pH は 7.8~8.0 であった。この低塩

分、低 pH は河川水の大量流入に原因するものであり、微量金属やキレート作用をもつ有機物なども陸水によって搬入される公算は極めて大きい。

*Entomosigma* sp. には従属栄養の能力がなく、各種の有機炭素源によって増殖に影響は見られなかった。ビタミン B<sub>12</sub> はこの生物の増殖に不可欠の要素であるが、ごく微量 (0.1 µg/l) で充分である。B<sub>12</sub> の類似物のうち、ベンジミダゾールを有するコバラミンは B<sub>12</sub> と同じように作用し、B<sub>12</sub> の代用をすることができる。赤潮発生時に、発生水域周辺部 (柄の浦) の海水を稀釈したものに窒素と燐を加えただけで 21 万個体/ml の密度に増殖したことから、その海水には B<sub>12</sub> (または同じ機能を有する類似物) が存在したことは確かである。このビタミン B<sub>12</sub> については、1) 発生水域の海水中には常時存在する。2) 降雨による河川水の大量流入によって陸地から直接搬入された。3) 同じく有機物の大量供給によって B<sub>12</sub> の生産菌が増殖し、間接的に補給されたことなどが考えられる。海水中の B<sub>12</sub> の量的変動については観測資料がないので論議できないが、降雨による河川水の大量流入と関係がありそうである。

要するに本赤潮の発生は、陸水の大量流入によって *Entomosigma* sp. の増殖に好適な物理、化学的環境がつくられ、さらに窒素、燐および増殖に必須のビタミン B<sub>12</sub> (または類似物) が陸地から運搬、もしくは二次的に補給されたことに原因するものと考えられる。

さらに二、三を附言すると海水に土壌エキスを加えるだけで 20 万個体/ml の密度に増殖する。さらに上記の実験結果に基づいて、海水の塩分濃度、pH などを調整し、栄養塩、キレート剤を加えた海水を基本液とする培養液、および上記の条件を満足する人工海水培養液 (改良 ASP<sub>2</sub>NTA 液) によって、赤潮発生時の現場における最高密度 (21,700/ml) の約 15 倍に当る 35 万個体/ml、および 33 万個体/ml の高密度に増殖させることができ、実験室内で赤潮現象を再現することが可能である。現在、大量培養中のものでは培養液 10 l で乾燥重量約 2 g の生物が得られている。

前にも述べたように、海水は採水場所によってその生理的性質に大きな差違のあることが認められたが、この問題については今後の研究にまたねばならない。また、平野<sup>2)</sup>によって指摘されたような昼夜間の垂直移動による離散集積の現象についても、松平<sup>3)</sup>の報告と同じような現象を観察しているが、これらの問題については他の赤潮プランクトンとあわせ検討を行ないたい。

## 要 約

1966年、福山市田尻附近に赤潮として出現した *Entomosigma* sp. をマイクロペット法で分離して無菌培養を行ない、その生理、生態について観察実験を行なうとともに栄養要求に関する二、三の実験を行ない、その発生要因について検討した。

- 1) この生物の至適塩分濃度は海水より僅かに低い S 28.9‰ (Cl 16.0‰) 附近である。
- 2) 海水に微量金属類および弱キレート剤 (NTA) が添加されると、それぞれ 50%、80% 程度増殖が促進される。
- 3) 至適 pH は 7.5 で海水より低く、pH=7.5 からのずれとともに増殖は減少する。
- 4) 一般に海水に窒素、燐を添加するだけで *Entomosigma* sp. の増殖は促進されるが、その割合は海水の種類によって異なる。
- 5) ビタミン B<sub>12</sub> はこの生物の増殖に不可欠の要素である。B<sub>12</sub> 類似物のうち、ベンジミダゾールを持つコバラミンは B<sub>12</sub> と同じように作用し、B<sub>12</sub> の代用ができる。この生物の B<sub>12</sub> 要求特性は *Ochromonas* 型といえる。

以上の結果から、この赤潮の発生は降雨による陸水の大量流入が主な原因と考えることができそうである。

## 文 献

- 1) IWASAKI, H.: Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera* I. The influence of different B<sub>12</sub> analogues, plant hormones, purines and pyrimidines on the growth of *Conchocelis*. *Plant Cells Physiol.*, **6**, 325-336 (1965)
- 2) 平野礼次郎：内湾における赤潮発生機構。日本プランクトン研究連絡会報，松江博士還暦記念号，25～29 (1967)
- 3) 松平近義・川上玲子：昭和43年度水産学会年会講演 (1968)

## SUMMARY

The red tide that appeared in the coastal area of Fukuyama, June 1966, was caused by the microscopic dinoflagellate *Entomosigma* sp. Since this red tide came after rainfall, it was implied that the organism might prefer low salinities and perhaps nutrients washed into the sea from the land. From this hypothesis, laboratory culture was started.

*Entomosigma* sp. was obtained in axenic culture by micropipette washings. The organism prefers slightly low salinity (Cl 16.0‰), yet, tolerates a wide range of salinities. The growth is accelerated by the trace metals and/or the weak chelator, nitrilotriacetic acid, to sea water. Supplement of nitrogen and phosphorus sources to sea water favors growth. *Entomosigma* sp. needs vitamin B<sub>12</sub> for growth. The pattern of specificity is similar to that of *Ochromonas malhamensis*. All the analogues containing benzimidazole can replace B<sub>12</sub>. These results seem to substantiate the above hypothesis.