

珪藻類休眠期細胞を活用した有害鞭毛藻赤潮の発生予防、
及び海底生性珪藻類を用いた有害鞭毛藻赤潮発生予知に関する研究
(修士論文中間発表)

【研究背景】

我が国の沿岸域では、養殖魚介類の大量斃死を引き起こす有害赤潮が多発しており、その対策が急務となっている。環境にやさしい対策が根本的に重要であり、近年、有害赤潮防除の為の生物学的防除策として海底耕耘による珪藻類休眠期細胞の活用が提案されている。これは海底に豊富に存在する珪藻類休眠期細胞を有光層に巻き上げて発芽、増殖させ、栄養塩の消費を通じて有害鞭毛藻類の増殖を未然に防ぐという手法である。近年の実験から、水中に有害鞭毛藻類が存在しても光が得られる環境下であれば珪藻類休眠期細胞は発芽、増殖し、珪藻類が卓越することが明らかになってきている。しかし、赤潮発生防除に実質的に有効な海底泥濃度、水理環境に関するデータは乏しいのが現状である。

沿岸浅海域の海底には底生性の珪藻類が生息しており、海底の栄養塩を吸収し水柱への栄養塩供給を軽減することが知られている。赤潮渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* は約 20 m の日周鉛直移動を行う能力を有し、夜間、底層や海底の栄養塩を利用して増殖すると考えられる。よって海底の栄養塩濃度に影響を与える底生珪藻類は、沿岸域における *K. mikimotoi* の動態に何らかの影響を与える可能性がある。そこで両者の関係性を明らかにすることは、有害赤潮の初期発生水域の特定の科学的根拠となり、赤潮発生予知に大きく貢献すると考えられる。しかし両者の関係性について調査した例はほとんどない。

以上のことから、本研究では赤潮発生予防策としての珪藻類休眠期細胞活用、及び有害鞭毛藻赤潮発生予知の為の底生性の珪藻類活用の有効性を検討することを究極の目標とし、以下の実験を実施した。①佐伯湾海底堆積物中の珪藻類休眠期細胞の分布密度の把握し、②珪藻類休眠期細胞の有光層への持ち上げを想定した赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と珪藻の競合試験。③底生珪藻類密度の違いによる *K. mikimotoi* の挙動の調査研究、④ *K. mikimotoi* 及び珪藻類 (ともに無菌株) を用いた共培養実験、⑤底生珪藻類が存在する海底堆積物を用いた *K. mikimotoi* 培養実験。以上により、上記の課題を検討した。

【材料と方法】

①2016年6月18日に大分県佐伯湾の12地点からエクスマンバージ採泥器によって海底堆積物試料を採取し、MPN法により試料中の珪藻類休眠期細胞数を推定した。また採集した試料を1年間冷暗所で保管し、再び珪藻類休眠期細胞数を推定した。

②有害鞭毛藻類が水柱に存在する環境下における珪藻類休眠期細胞の有光層への巻き上げを想定した競合試験を、2015年8月3-17日、10-24日の14日間実施した。7月28日に佐伯湾浦漁港にて表層水と海底泥(表層1cm)を採集した。海底泥濃度とSWM-3培地添加の有無から以下の6つの実験区を設定した。すなわちA: 海底泥濃度 0.1 g L^{-1} 区, B: 海底泥濃度 0.01 g L^{-1} 区, C: 海底泥濃度 0.001 g L^{-1} 区, D: 海底泥濃度 0.1 g L^{-1} 区と1/100強度SWM-3培地添加区, E: 海底泥濃度 0.01 g L^{-1} 区と1/100強度SWM-3培地添加区, F: 海底泥濃度 0.001 g L^{-1} 区と1/100強度SWM-3培地添加区である。各実験区に *C. antiqua* (50 Cells mL^{-1}) を添加した後、大分県農林水産研究指導センターの生簀にて0, 5, 9 m層に垂下した。培養開始0, 1, 2, 4, 7, 10, 14日目に副試料を採取し、環境要因を測定した。副試料はクロロフィル *a* 濃度、栄養塩濃度測定、及び *C. antiqua* と珪藻類の同定、計数に用いた。

③2015年8月11日に佐伯湾沖松浦漁港にて採取した海底泥約20gを、インキュベーター内で底生珪藻の培養、または GeO_2 添加による増殖阻害を行った。6日間の培養後、直接検鏡により底生珪藻類の細胞密度を計数した後、1/100強度SWM-3培地1.5Lの入ったアクリル管(直径5cm, 高さ約90cm)に海底泥を添加し、*K. mikimotoi* を約 $200 \text{ Cells mL}^{-1}$ となるよう加えた。1日静置後、4時間毎に24時間まで8層から採水し、*K. mikimotoi* の日周鉛直移動を確認した。確認後は2, 3, 6, 8日目に水柱全体の細胞密度の変動を観察した。

④底生珪藻類、あるいは浮遊性の珪藻類が *K. mikimotoi* の増殖に与える影響を評価するため無菌培養株を用いた共培養実験を行った。滅菌した1/10強度SWM-3培地600mLが入った1Lショットビンに実験区毎に *K. mikimotoi* ($1000 \text{ cells mL}^{-1}$)、珪藻類 ($2000 \text{ cells mL}^{-1}$) の無菌株を添加し、温度

20°C, 光強度約 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 明暗周期 14 h L: 10 h D の条件下で 14 日間培養した。共培養実験は 4 回行い以下の実験区とした。すなわち実験 1: *K. mikimotoi* と *Chaetoceros curvisetus*, 実験 2: *K. mikimotoi* と *Nitzschia sp. 1*, *K. mikimotoi* と *Nitzschia longissimi*, 実験 3: *K. mikimotoi* と *Nitzschia sp. 2* (有菌), *K. mikimotoi* と *Chaetoceros didymus*, *Nitzschia sp. 1* と *Ch. curvisetus*, 実験 4: *K. mikimotoi* と *Asterionellopsis gracialis*, *K. mikimotoi* と *Skeletonema sp.*, *A. glacialis* と *Nitzschia sp. 1* である。副試料は 0, 2, 4, 7, 10, 14 日目に採取し, 細胞密度を計数した。なお 0, 14 日目には栄養塩測定も行った。

⑤2016 年 10 月 26 日に, 北斗市七重浜海水浴場にて採取した海底堆積物を 500 μm メッシュで篩にかけ 1 日静置した後, 以下の実験区の実験に用いた。すなわち 1: *K. mikimotoi* (コントロール), 2: *K. mikimotoi* と海底堆積物 50 g, 3: *K. mikimotoi* (10 μm メッシュ内) と海底堆積物 50 g, 4: *K. mikimotoi* と *Nitzschia sp. 1* (2000 cell mL^{-1}), 5: *C. antiqua* と海底堆積物 50 g, 6: *K. mikimotoi* と海底堆積物 50 g (1 週間培養後) である。各実験区は 2 本立てとし, *K. mikimotoi* 及び *C. antiqua* の初期密度は約 1000 cells mL^{-1} に調整した。実験開始 0, 2, 4, 7, 10 日目にガラス管にて鉛直的に採取し細胞密度を計数した。0, 10 日目は栄養塩測定も行った。

【結果と考察】

①佐伯湾における海底堆積物中の珪藻類休眠期細胞は 3.7×10^4 - 2.5×10^5 MPN g^{-1} wet sediments の範囲で存在し, 過去の報告とほぼ同程度の値であった。比較的水深の浅い観測点では *Navicula* 属, *Nitzschia* 属等の底生性の羽状目珪藻類が高密度で検出されたが, これは水深が浅く海底にも光が当たり, 海底で増殖していた結果と考えられる。

②実験期間中の水温, 塩分は珪藻類の増殖に好適であり, 光強度についても珪藻類休眠期細胞の発芽・復活及びその後の増殖にとっても十分な強度であった。各実験区のクロロフィル *a* 濃度は, 実験開始 4 日目までに珪藻類休眠期細胞の発芽と生じた栄養細胞の増殖による値の増加が見られ, ピークまでの日数は水深により異なった。*C. antiqua* の挙動を見ると 7-10 日目まで細胞密度が増加し, 14 日目に急激に減少した。ただし泥濃度の低い実験区 (C, F) の 9 m 層では 14 日目まで細胞密度がゆっくり増加した。珪藻類との関係について, 珪藻類の最大密度が 10^4 cells mL^{-1} を超えた実験区 D の 0.5 m 層, E の 0 m 層にて *C. antiqua* 細胞密度が 10^2 cells mL^{-1} まで減少したことから, 珪藻類による増殖抑制が示唆された。ただし両実験区とも栄養塩添加区であるため, 有害赤潮鞭毛藻抑制のためには栄養状態が好適な環境で懸濁濃度が少なくとも 0.1-0.01 g L^{-1} 程度巻き上がる必要があると考えられた。

③4 時間毎の各層における細胞数の計数の結果, 底生珪藻類低密度区では正常な日周鉛直移動が見られた。一方, 高密度区では暗期に底層に移動したものの, 明期での表層への移動が認められなかった。また水柱全体の細胞密度は, 低密度区で減少後に若干の増加が見られたのに対し, 高密度区では実験期間を通して減少した。

④実験の結果, 実験 2 の *K. mikimotoi* と *Nitzschia sp. 1* の培養期間中 *K. mikimotoi* の細胞密度が増加せず, 10 日目以降は栄養細胞が検出されなくなった。また実験 4 の *K. mikimotoi* と *Skeletonema sp.* において 4 日目までは *K. mikimotoi* 細胞密度の増加が見られたが, その後 14 日目までに大きく減少した。その他の実験区における *K. mikimotoi* 細胞密度は, 4-10 日目まで増加しその後減少する, または 14 日目まで増加する傾向が見られた。以上から, 底生珪藻類が *K. mikimotoi* の増殖に影響を与える可能性が示唆された。

⑤実験の結果, コントロール区を除くすべての実験区で *K. mikimotoi* 細胞密度の減少が確認され, 特に実験区 2 では 2 日目から急激に減少した。この急激な減少について, 海底堆積物を加えた実験区において繊毛虫類の増加が観察されたことから, 繊毛虫類による *K. mikimotoi* の捕食の可能性が大きい。さらに実験終了時の海底堆積物中に約 20×10^5 cells g^{-1} の底生珪藻類が存在したことから, *Nitzschia sp. 1* を加えた実験区でも *K. mikimotoi* 細胞密度の減少が見られたことから, 海底の底生珪藻類も *K. mikimotoi* の増殖に何らかの阻害的影響を与えたと考えられる。

【今後の予定】

1 年間冷暗所で保管した海底堆積物中の珪藻類休眠期細胞密度を測定する。また培養実験で観察された繊毛虫類と *K. mikimotoi* の関係について, 培養実験を行い, 捕食等を明らかにする予定である。

森田 航也