

大阪湾底泥における珪藻類休眠期細胞の分布・発生とそれに基づいた有益・有害ブルーム識別評価

○石井健一郎(京都大学地球環境学学術研究員)

山口晴生(高知大学農林海洋科学部准教授)

松岡数充(長崎大学名誉教授・(株)Seed Bank 顧問)

1. 研究目的

大阪湾では珪藻類や渦鞭毛藻類がしばしば大規模なブルームを形成しているが、そのシードをはじめとしてブルーム形成要因は未だ不明である。今年度はそれらの初期発生場を明らかにするために精密調査法をフィールドに援用して海底堆積物中の珪藻休眠期細胞の種組成と密度を明らかにすることを目的とした。合わせてこれまで貝毒原因プランクトンとして注目されてきた *Alexandrium tamarense* や *A. catenella* などの渦鞭毛藻シストの分布状況も明らかにする。

2. 研究方法

サンプリングは2016年10月13, 14日に大阪湾12地点で行った(図1)。各点でエクマンバージ採泥器もしくは改良型TF0コアラーを用いて採泥し、表層約2cmを分取し、黒色プラスチック容器へ移し、研究室まで冷暗状態で運搬し、分析開始まで15°Cで保存した。

<底泥含水率の測定>

休眠期細胞やシスト産出量を堆積物乾燥重量で表現するために堆積物の含水率を以下の方法で求めた。空のペトリ皿の重量を測定後、よく攪拌した底泥試料(冷凍の場合は溶解後)をスプーン

で1gを添加、ペトリ皿を含めた全重量を求めた。次に、定温恒温乾燥機(EYELA製NDO-400)にペトリ皿ごと移し、70°C、12時間で乾燥させ、冷却後再び全重量を測定した。試料の含水率は乾燥前後の底泥重量の差から以下の式を用いて求めた。

$$V = \{ (W_m - W_d) / W_m \} \times 100$$

V: 含水率(%), W_m : 湿状態の重量(g), W_d : 乾燥状態の重量(g)

<珪藻休眠期細胞の抽出と観察>

試料採取後直ちに冷暗所(15°C)に移し、2ヶ月以上保存することで栄養細胞の生残する可能性を排除した。試料をそのまま観察すると鉱物粒子等の影響で観察が困難であるため、試料1g(湿重)を目合い100µm及び20µmと10µmの篩を用いてサイズ分画を行なった後、目合い20µm及び10µmの篩上の残渣物を10mLの濾過滅菌海水に懸濁し、

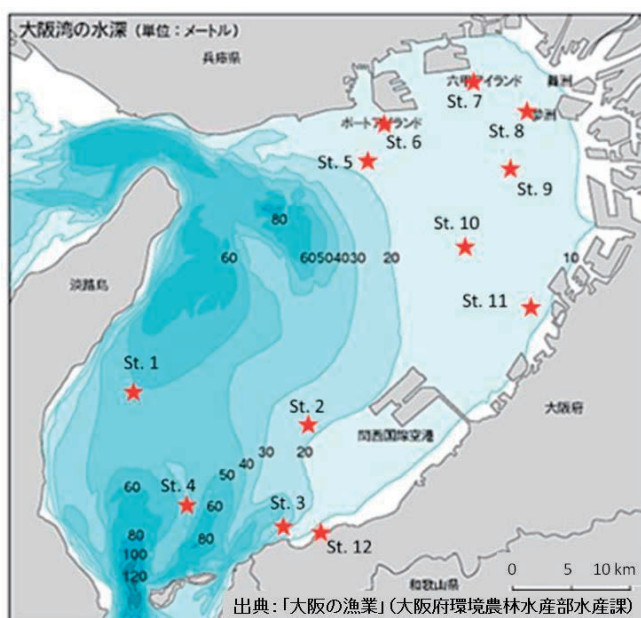


図1; 試料採取地点

その中の珪藻類休眠期細胞を対象に種同定と計数を行った。観察の過程で、種同定が不可能と判断された休眠期細胞については発芽・復活実験に供し、得られた栄養細胞の形態に基づいて種を確定した。発芽・復活実験は、キャピラリー操作によって単離した当該細胞を、培養液（ダイゴIMK；日本製薬KK）で充たしたチャンバースライド（Matsunami Glass, Osaka）に収容して培養した（培養温度20°C, 光条件50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, 24 時間明期）。その後、培養状況が良好な種については、培養株として確立し維持した。

<渦鞭毛藻シストを含むパリーノモルフの抽出と観察>

Matsuoka et al. (1989) に従って試料を処理し、検鏡用試料を調製した。100 ml 容量のテフロン製ビーカーに底泥試料を分取し、湿重量を測定した。次いで蒸留水を90 ml 程度入れ、塩抜きのため1晩放置した後、上清みを捨てた。新たに蒸留水を70 ml 程度入れ、約10%塩酸を10 ml 加え、炭酸カルシウムを除去した。1日静置した後、上清を除去、蒸留水を加える作業を繰り返して中和した。その後、ビーカーに蒸留水を70 ml 程度入れ、約20%のフッ化水素酸を10 ml 加え、珪酸質粒子を除去した。1日静置した後、前述の方法で中和した。次に、超音波処理でシストの付着物を取り除き、目合い125 μm のステンレス製の篩と目合い10 μm の篩で分画した。目合い10 μm の篩上の残渣を蒸留水で10 ml にメスアップした後、プラスチックバイアル瓶へ移し、濃縮精製試料とした。濃縮試料を十分に攪拌した後、適量ピペットでスライドグラスに取り、観察した試料の重量を測定した後、カバーガラスをかけ、正立顕微鏡（DN-107T, AsOne）を用いて400倍でシストの同定・計数をおこなった。

3. 研究結果

<珪藻休眠期細胞>

12 属 21 種以上の珪藻休眠期細胞が産出した。中でも *Chaetoceros* 属が11種と最も多かった。産出休眠期細胞密度は641cells/g (St. 5)から18157 cells/g (St. 8)で、全地点平均では6621cells/gであった。珪藻休眠期細胞産出密度は湾南部のSt. 1-4, 12では3281 cells/gであったのに対して湾北部のSt. 5-11では9008 cells/gであった(図2)。今回の調査では、当初大量に出現すると予想していた *Skeletonema* 属休眠期細胞はほとんど確認されず、12地点中わずかに3地点 (St. 2, 7, 11) で極めて低密度で産出した。これに対し、

Chaetoceros 属の休眠期細胞は全地点で存在が確認でき、特に湾北部において種数、細胞数ともに多かったが、これらも低密度であった。今回得られた最も高密度の種は *Chaetoceros didymus* で、1600 cells/gであった。また、湾北部においては発芽能の無い、いわゆる死んだ休眠期細胞が大量に存在している地点があった。特に、St. 9で

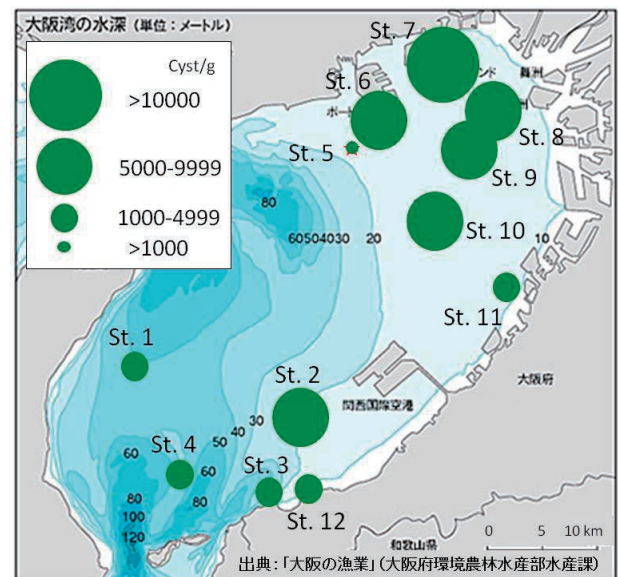
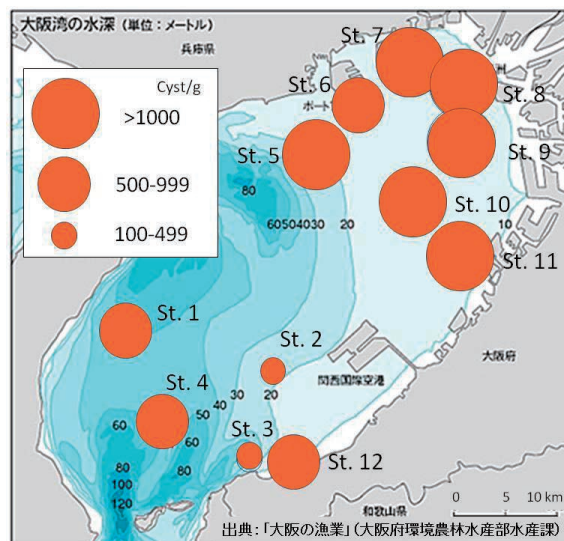


図2;珪藻休眠期細胞分布

は *Chaetoceros* 属休眠期細胞の 90%以上が死んだ状態の細胞であった。

<渦鞭毛藻シスト>

18 属 43 種以上の渦鞭毛藻シストが産出した。Gonyaulacales の 3 属 10 種、Gymnodiniales の 2 属 4 種、Peridinales の 16 属 39 種であった。これらの中には対応するプランクトンが未確認の Peridinales の種も多数含まれていた。産出シスト密度は 1836cyst/g (St. 3) から 20657cysts/g (St. 8) で、全地点平均では 7974cyst/g であった。渦鞭毛藻シスト産出密度は湾南部の St.1-4, 12 では 2625 cyst/g あったのに対して湾北部の St. 5-11



シスト分布

貝毒原因種である *Alexandrium tamarense/catenella* シスト (無色で長楕円形のシストは *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* が形成するが、形態のみでは両種を識別することが出来ない) のシストは全地点で 136 cyst/g (St. 3) から 3610 cyst/g (St. 7) の範囲で産出した (図 3)。光合成種から構成されていた *Alexandrium tamarense/catenella* シストを除く Gonyaulacales は湾南部で平均 526 cyst/g、湾北部で 1076 cyst/g、従属栄養性種を主とする Peridinales と Gymnodiniales は湾南部で平均 1289cyst/g、湾北部で 1076 cyst/g であった。有毒種 *Lingulodinium polyedrum* シストは少量 (48-190 cyst/g) 湾北部で産出した。光合成種と従属栄養性種シストの比率は湾全体で従属栄養性種シストが 54.7%を占め、湾南部では 55.4%、湾北部では 66.9%であった。

4. 考察

大阪湾では平成 21 年度に『大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する研究助成事業』において、香川大学の多田邦尚氏らのグループを中心に、大阪湾に出現する珪藻類の季節・経年変動に関する研究が行われた。その結果、近年の栄養塩類の減少と水柱内の光透過量の増加により、これまで大阪湾で優占してきた *Skeletonema* 属が淘汰され、代わって *Chaetoceros* 属が優占していく可能性が室内実験に基づいて示唆された。しかしながら、近年の大阪湾での珪藻赤潮発生状況は、例えば平成 28 年度では依然として *Skeletonema* 属を優占種としており、*Chaetoceros* 属を優占種として発生する赤潮は稀である (大阪府立環境農林水産総合研究所大阪湾赤潮発生情報 <http://www.kannousuiken-osaka.or.jp/suisan/gijutsu/akashio/index.html>)。このような状況に鑑みると、現在でも水柱で形成された *Skeletonema* 属の休眠期細胞が大量に大阪湾の海底に溜まっており、それらが次回の赤潮形成のシードポピュレーションとして機能していることが予測される。ところが今回の調査では *Skeletonema* 属の休眠期細胞は極めて低密度でしか検出されなかった。この原因として、今回我々が

調査を行った 10 月 17 日前後には大阪湾北部で *Skeletonema* 属珪藻赤潮が発生していたことから、海底堆積物中の *Skeletonema* 属休眠期細胞が栄養細胞の出現に寄与した結果であると考えられる。しかし、海底堆積物中の *Skeletonema* 属休眠期細胞が全て水柱へと放出される可能性は低く、大阪湾で赤潮を形成している *Skeletonema* 属は他海域からの移入による可能性もある。これに対して、*Chaetoceros* 属休眠期細胞は大阪湾全域で検出され、特に湾北部水深 20 m 以浅の試料から多種の *Chaetoceros* 属休眠期細胞も産出したが、発芽能力を持たないいわゆる生細胞と比較して格段に多く存在していることも明らかになった。死細胞が検出される湾北部の堆積物には硫化水素臭が確認でき、現場海底は還元的環境であったことが予測される。このような還元環境においては珪藻類の休眠期細胞の生残率が下がる可能性がある。後述する渦鞭毛藻類などが形成するシストの多くが還元的環境でも生残可能であることが知られている。このような還元的環境における休眠期細胞やシストの生残率の違いが、大阪湾での赤潮発生機構に大きく影響している可能性がある。

大阪湾では以前より麻痺性貝毒原因種である渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* や *Alexandrium tamarense*、*A. catenella*、*A. tamiyavanichii* の存在が知られているが、2002 年春季に *A. tamarense* が増殖してアサリやアカガイ、ヤマトシジミなどが毒化した（濱野ほか 2002, 山本 2004）。その後、底泥中のシストが次期増殖のシードとなり得るとの観点から、加えて 2007 年には *A. tamarense* が湾北部から湾東部にかけて赤潮状態にまで増殖したことを受け、当該プランクトンのみならず、底質中のシスト分布についても大阪湾全域で調査が進められてきた（Yamaguchi et al. 1996, 山本ほか 2009）。その結果、2006 年には湾東部沿岸域を中心に湾全域で *Alexandrium tamarense/catenella* のシストが確認（最大密度 $112\text{cysts}\cdot\text{cm}^{-3}$; $380\text{cyst/g dry weight}$ ）され、ブルーム後の 2007 年にはさらに高密度（ $5683\text{cysts}\cdot\text{cm}^{-3}$; $19596\text{cyst/g dry weight}$ ）で底泥に保存されていることが明らかになった。今回の調査でも *Alexandrium tamarense/catenella* シストは全地点で出現が確認され、特に湾北部で多産した。これは山本ほか（2009）が指摘した湾北部から湾東部にかけてより多く分布しているという傾向と一致している。以上のことは大阪湾では 2007 年以降も *Alexandrium tamarense/catenella* が定着していることを示している。

5. 結論

今回の調査では大阪湾の海底堆積物中に存在する珪藻類及び渦鞭毛藻類等の休眠期細胞及びシストの種組成と分布密度が明らかになった。珪藻類の休眠期細胞に関わる調査は、これまで全て最確数法（MPN 法）と呼ばれる方法で行われており、得られた細胞密度は推測値に過ぎなかった。本研究で得られた珪藻類の休眠期細胞の種組成と密度は、世界で初めて直接的に得られたデータである。本研究結果では大阪湾北部海域には *Chaetoceros* 属を中心とした休眠期細胞が多種存在することが明らかになった。同時に、北部海域では多くの有毒藻類 *Alexandrium tamarense/catenella* シストも検出された。これらの分布が本海域の赤潮発生にどのように寄与するのか、今後は季節変動を通したさらなるデータの蓄積が必要である。また同時に、珪藻類及び渦鞭毛藻類の長期的な変動を解明することが重要な課題と考える。