

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-9-'92

富栄養化による内湾生態系への影響評価に関する研究

Studies on the Assessment of the Eutrophication on Coastal Ecosystems

昭和61年度～平成2年度

FY 1986~1990

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

国立環境研究所特別研究報告

SR-9-'92

富栄養化による内湾生態系への影響評価に関する研究

Studies on Assessment of the Eutrophication on Coastal Ecosystems

昭和61年度～平成2年度

FY 1986~1990

環境庁 国立環境研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「富栄養化による内湾生態系への影響評価に関する研究」

(期間 昭和 61 年度～平成 2 年度)

特別研究責任者：村岡浩爾 水質土壤環境部 部長 (昭和 61～63 年度)

須藤隆一 同 上 (平成元年度)

内藤正明 地域環境研究グループ統括研究官 (平成 2 年度)

特別研究幹事：渡辺正孝・竹下俊二・木幡邦男

報告書編集担当：竹下俊二・木幡邦男

序

本報告書は、昭和61年度から平成2年度にかけて実施した特別研究「富栄養化による内湾生態系への影響評価に関する研究」の研究成果をまとめたものである。近年、内湾は周辺都市の発展に伴って生活排水や産業排水などの流入が増大し、その汚濁が急速に進行した。その結果、富栄養化が顕著になり、赤潮発生などの有力な一因となっている。一方、内湾域は生物生産の最も著しい水域でもあり、種々の漁業に活発に利用されている。そこで、本研究は、内湾域の窒素、リンなどの汚濁物質について、その質的、量的変化とそれに伴う生態系への影響を調べ、海域における生物生産の増大と海域環境の保全が両立するためにはどのような状態が望ましいかを明らかにし、内湾の環境管理のための基礎となる科学的知見の蓄積を目的として行われた。研究は(1)閉鎖性海域における富栄養化がもたらす環境特性の把握(現場調査)、(2)制御実験系を用いた富栄養化の影響評価(室内実験)、(3)現場メゾコズムを用いた内湾生態系の物質循環・動態に関する実験的研究の3課題について行われた。現場海域で得られた化学・物理・生物的環境因子の観測データ、マイクロコズム装置を用いた室内実験及び現場海域に設置した海洋メゾコズム装置による生態系隔離実験結果を総合的に活用して赤潮生物の形成機構や他生物との相互作用・競合、赤潮の発生年・非発生年と栄養塩躍層との関連など赤潮発生機構の解明に関して多くの成果が得られた。

内湾の富栄養化による生態系への影響に関する研究は今後、赤潮に限らず青潮や悪臭の発生、海域の持つ自浄作用の低下など沿岸域における開発、利水、舟運、親水などの多様な機能への影響について総合的な視点からとらえた研究が必要であるとの考えから、平成3年度から特別研究「閉鎖性海域における水界生態系機構の解明及び保全に関する研究」が開始されている。

本研究は当研究所担当研究員のみならず研究所外の客員研究員の多くの方々のご協力をご指導を頂いた。ここにこれらの方々へ深く感謝の意を表したい。

平成4年3月

国立環境研究所

所長 小泉 明

目 次

1	研究の目的と経緯	1
2	研究の成果	3
2.1	閉鎖性海域における富栄養化がもたらす環境特性の把握に関する研究	3
2.1.1	赤潮多発海域の環境特性の把握と富栄養化の評価	3
2.1.2	光合成色素を指標とした植物プランクトン種組成の推定と種遷移の把握	11
2.2	制御実験系を用いた富栄養化の影響評価に関する研究	18
2.2.1	栄養塩成層条件下での <i>Chattonella antiqua</i> による日周鉛直移動と 夜間栄養塩摂取	18
2.2.2	指標動植物プランクトン及びバクテリアの相互作用に関する研究	30
A	植物プランクトン間の相互作用に関する研究	30
B	赤潮藻類と細菌及び微小動物との相互作用に関する研究	35
2.2.3	富栄養化が赤潮発生に及ぼす影響評価	39
2.2.4	赤潮生物の生活史に関する研究	47
2.3	現場メゾコズムを用いた内湾生態系の物質循環・動態に関する研究 —人為的富栄養化と浅い栄養塩成層の形成による <i>Chattonella</i> 赤潮の発生—	55
2.4	まとめ及び今後の研究の展望	65
	[資料]	
I	研究の組織と研究課題の構成	71
1	研究の組織	71
2	研究課題と担当者	72
II	研究成果発表一覧	73
1	誌上発表	73
2	口頭発表	77

1 研究の目的と経緯

内湾は構造的に外海水との交換・混合の物理的作用が抑制されるという閉鎖性の特徴を持つ。内湾・内海では一般に海水交換率が低く、都市排水・産業排水が一旦流入すると、有機物や窒素、リンなどが累積し富栄養化状態を呈することになる。とりわけ、富栄養化が進行した海域では藻類など水生生物が大量に増殖して赤潮が発生したり、貧酸素水塊が生成して青潮を発生させる原因ともなる。このような各種の生態系破壊現象は、しばしば多大の漁業被害をもたらすことから社会的な問題に発展しており、今日赤潮発生機構の早期説明が強く求められている。

先の特別研究「海域における富栄養化と赤潮発生機構に関する基礎的研究」及び「海域における赤潮発生のモデル化に関する研究」では、成層している現場海域を室内で再現するために海水マイクロコズム装置を試作するとともに、これを用いた室内実験の手法を確立した。さらに、試験管・フラスコレベルの実験系で得られたデータの蓄積とその解析をも行った結果、赤潮発生に関与する主要藻類種（特にシャットネラ、ヘテロシグマ等）の増殖特性、集積特性及び個々の発生条件にかかわる個生態学的課題について明らかになった。

本特別研究では、これら個生態学的研究等の成果を踏まえ、新たに現場海域に隔離生態系実験施設を設け、自然条件における群生態学的研究を進めることによって、沿岸海域での主として赤潮生物構成種の発生—変遷—消滅及び動態等の機構を実験的に明らかにすることを目的とした。サブテーマ（1）閉鎖性海域における富栄養化がもたらす環境特性の把握に関する研究（本文2.1節）では1986年から毎年夏期の1か月間播磨灘家島において化学的環境因子（窒素、リン、ケイ素、炭素、色素成分、金属類、pH及び溶存酸素）、物理的環境因子（水温、塩分、光強度及び透明度）、微生物を中心とした生物相（植物プランクトン、動物プランクトン及びバクテリアの現存量と種組成）のフィールド観測を行い、赤潮生物の増殖速度に与える諸因子の特性を評価することによって赤潮発生との関連性を明らかにすることができた。サブテーマ（2）制御実験系を用いた富栄養化の影響評価に関する研究（本文2.2節）では、まずフラスコ・試験管レベルで1～数種のプランクトンについて、温度、塩分、照度及び栄養塩濃度を種々変化させて培養実験を重ね、*Chattonella antiqua*を用いて赤潮の初期発生が底泥からシスト（休眠孢子）の発芽によって生起されることを実証するとともにシストの形成過程が初めて明らかになった。次に、夏期の家島海域の環境条件を室内実験で再現するためにパイロットスケール実験に発展させた手法を取り入れた。大型の海水マイクロコズム装置内で栄養塩濃度、塩分及び温度成層を人工的に作ることによって*C. antiqua*の日周鉛直移動と夜間の栄養塩（窒素、リン）摂取の仕組みが実験的に明らかにされた。サブテーマ（3）現場メゾコズムを用いた内湾生態系の物質循環・動態に関する研究（本文2.3節）—人為的富栄養化と浅い栄養塩成層の形成による*Chattonella*赤潮の発生—では、先の特別研究やサブテーマ（1）及び（2）で得られた室内実験の知見について、現場海

域における検証とその適応性の解析を行った。すなわち、播磨灘家島の海域に大型海洋メゾコズムを設置し、装置内へ自然海域に存在する生態系をそのまま取り込むとともに、周囲と隔離した条件で任意の深さの栄養塩成層を形成させた。一連の実験で、*C. antiqua* はメゾコズム内で日周鉛直移動を行い、その移動距離の大きさが約7.5 mであることが明らかになった。その結果、栄養塩成層深さを制御することによって、海洋メゾコズム内に *Chattonella* 赤潮を人為的に発生させることに成功するとともに、赤潮発生機構の解明に貴重な手掛かりが得られた。

2 研究の成果

2.1 閉鎖性海域における富栄養化がもたらす環境特性の把握に関する研究

2.1.1 赤潮多発海域の環境特性の把握と富栄養化の評価

(1) はじめに

富栄養化がもたらす内湾生態系への影響を評価するに当たり、対象となる海域の環境特性を把握することは基本的に重要である。本研究では環境特性として、物理環境（水温、塩分、光強度、透明度）、化学環境（窒素、リン、ケイ素、ビタミンB₁₂、炭素、色素、金属類、pH、DO等）、微生物を中心とした生物相（植物プランクトン、動物プランクトン、バクテリアの現存量と種組成）の現場把握を行った。海域環境のモニターは月に数回の頻度で定期的に行われることが多い。しかし、刻々と変化する海域環境を、より正確に把握するためには連続した観測が望ましい。本研究では、現場に試料の前処理や簡単な培養実験の可能な施設を用意し、夏期に約30日間連続した調査を行った。

富栄養化の一つの側面である赤潮についても、多発海域での環境のモニターが、

- 1) 発生機構の解明及び予察
- 2) 富栄養化が赤潮発生に及ぼす影響評価
- 3) リン窒素排出規制を含めた広い意味での防除対策

を行う上での出発点になることはいうまでもない。このような観点から、1986年以来5年間、瀬戸内海において、赤潮の頻発する夏期に環境調査を実施した。本海域においては、過去、夏にラフィド藻 *Chattonella antiqua* による赤潮が頻発し、養殖魚類（ハマチ等）に多大の被害を与えている。本報告では、対象を本種による赤潮に絞って、発生年と非発生年で現場の環境がどのように異なっているかを検討した。

(2) 調査概略

播磨灘（瀬戸内海）家島諸島周辺の観測定点A、B（水深はそれぞれ30、21m）において、1986年以来毎年、約1か月（7月中旬～8月中旬）現場環境のモニターを行った（図1）。観測項目及び手法は表1にまとめて示した。

1987年と1989年に *C. antiqua* 赤潮が発生した。特に1987年の赤潮は規模が大きく、播磨灘全域で養殖ハマチ（特に2年魚）が大量にへい死した。両年以外は *C. antiqua* 赤潮の発生は認められなかった。なお、1987、1989両年とも赤潮は調査開始後発生し、終了直前に終息したため、赤潮の発生・発達・減衰を含む全過程を通じての環境変化をモニターすることができた。

発生年・非発生年を合わせた各観測項目の測定値範囲を表2に示す。現場海域では通常温度成層が認められたが、赤潮の発生・非発生にかかわらず、*C. antiqua* の生息深度と考えられる0～10

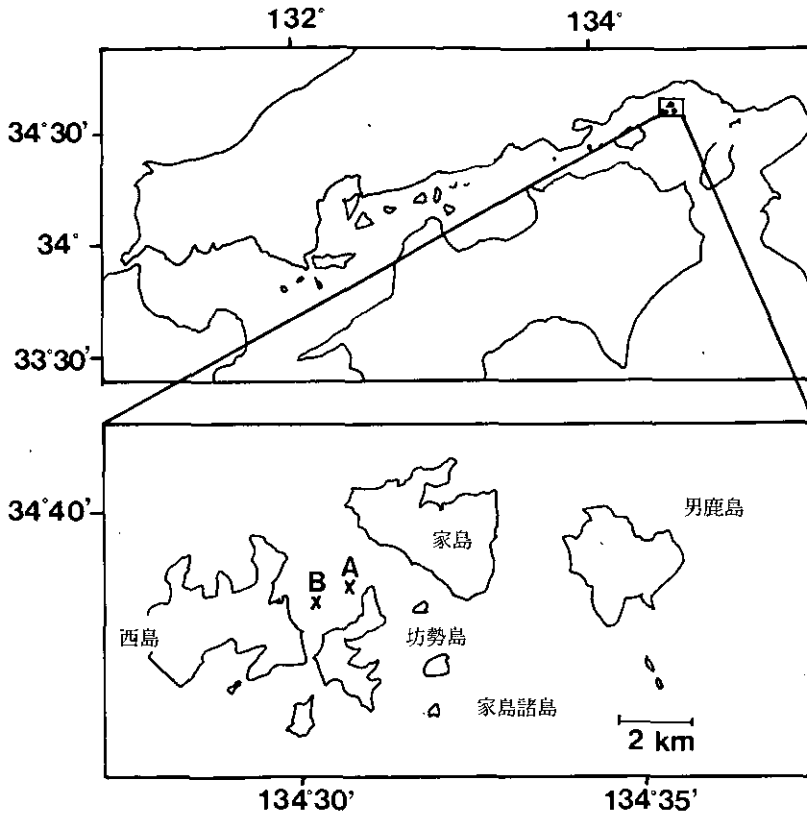


図1 家島諸島調査海域概略図
A, B: 採水定点, E: 実験場

m層(2.2.3項)の水温は、*C. antiqua*の増殖の最適範囲(24~27°C)にあった。また、塩分や透明度及び全日射量から推定した水中照度も、毎年、本種の増殖の最適範囲にあった。N、P栄養塩は温度成層と対応して、水温躍層(5~15m;年により変動)より上で低く、下で高い値を示した。ただし、赤潮発生のごく初期の段階では、表層(0~5m)でも高濃度の栄養塩(NO_3^- で $2\mu\text{M}$ 、 PO_4^{3-} で $0.2\mu\text{M}$ 程度)が存在していた。*C. antiqua*の増殖にとって必須なビタミン B_{12} は、発生・非発生にかかわらず2~5ng/l程度は存在しており、深度方向の変化も顕著でなかった。表層海水中の溶存(厳密には $0.8\mu\text{m}$ のフィルターを通過する)鉄と銅は、それぞれ3.9~10.0nM、9.3~11.2nMの濃度範囲にあり、赤潮発生との明らかな相関は認められなかった。

(3) 1987年の *Chattonella antiqua* 赤潮調査

調査開始時(7月20日)には *C. antiqua*の細胞濃度は10 cells/ml以下(水柱全体での平均値)であったが、以後次第に増加して赤潮状態となり、8月7日には250 cells/mlに達した。この間の個体群の増加速度(見かけの増殖速度)は、0.21/dであった。8月8日以降、細胞濃度は、急速に減少して、調査終了時点(8月13日)では40 cells/mlとなっており、赤潮はほぼ消滅した(図

表1 瀬戸内海家島での調査項目及び分析方法

測定項目	測定深度・頻度	分析手法
透明度	毎日	透明度板
水温	毎日 2.5mピッチ	多項目水質測定器
塩分	〃	〃
溶存酸素	〃	〃
アンモニア (NH ₄ ⁺)	毎日,0,5,10,15,19m	オートアナライザー
亜硝酸 (NO ₂ ⁻)	〃	〃
硝酸 (NO ₃ ⁻)	〃	〃
リン酸 (PO ₄ ³⁻)	〃	〃
溶存全リン (DTP)	〃	〃
珣酸 (SiO ₃ ²⁻)	〃	〃
<i>Chattonella</i> 個体数	毎日,0,5,10,15,19m	光顕直接計数
クロロフィル <i>a</i>	〃	蛍光光度計
ビタミンB ₁₂	3~7日に一度,0,10,19m	<i>C. antiqua</i> を用いた バイオアッセイ
溶存Fe, Cu	7日に一度,0m	フレームレス原子吸光

2)。また、赤潮発生期間中の8月3~4日にかけて、*C. antiqua* の鉛直分布の日周変化を追跡したが、本種は日中は表層(0~5 m)に、夜間は10 m前後に集積し、いわゆる日周鉛直移動を行っていることが確認された。

調査期間中の水温、硝酸塩、リン酸塩の変化を図3に示す。赤潮発生の初期の段階から、ピーク直前の8月3日にかけて強い温度成層が認められ、躍層は5~10 mに存在していた。4日以降は、強風により成層は次第に破壊された。栄養塩類(NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄³⁻)は、赤潮発生のごく初期の時点で全層を通じて高い濃度を示したが、*C. antiqua* 個体群の発達に伴い、その後、表層(0~5 m)では枯渇した。また、10 m層では8月3日(赤潮のピーク直前)まで高濃度の栄養塩が存在していた。8月4日以降は、風による鉛直混合と*C. antiqua* による摂取によって、栄養塩は、10m以深でも急速に減少し、8月7日には全層で無機態窒素(NO₂⁻+NO₃⁻+NH₄⁺)が枯渇した。ビタミンB₁₂は全層で常に1.8 ng/l以上存在していたが、この値は2.2.3項で示すように、*C. antiqua* の速やかな増殖を維持するのに十分な量であった。ケイ酸塩は調査期間中、全層で10 μM以上存在していた。このことは、*C. antiqua* の競争者であるケイ藻類の増殖が、ケイ素によって制限されたため、*C. antiqua* が卓越したのではないことを示している。

赤潮発生年・非発生年の環境変化を比較するために、図4に1990年(非発生年)の水温、硝酸塩、リン酸塩の変化を示す。1990年も温度成層が認められ、水温躍層の位置(15 m)は1987年

表2 1986~1990年における定点Bでの各環境因子の変動^{a)}

深度(m)	温度(°C)	塩分(‰)	NH ₄ ⁺ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	PO ₄ ³⁻ (μM)	SiO ₃ ²⁻ (μM)	B ₁₂ (ng/l)	溶存 Fe(nM)	溶存 Cu(nM)	クロロフィル <i>a</i> (μg/l)
0	23.1-28.3 (25.5)	28.0-32.8 (31.4)	<0.2-1.3 (0.3)	<0.1-5.5 (0.2)	<0.02-0.46 (0.06)	0.8-19.7 (8.0)	1.9-7.1 (3.1)	3.9-10.0 (6.7)	9.3-11.2 (10.2)	0.6-17.5 (3.5)
5	22.9-27.7 (25.0)	30.9-32.8 (31.8)	<0.2-1.3 (0.2)	<0.1-2.1 (0.3)	<0.02-0.21 (0.05)	0.6-20.2 (8.1)				0.6-13.4 (3.9)
10	20.2-27.1 (24.1)	31.2-33.4 (32.0)	<0.2-1.5 (0.3)	<0.1-5.7 (1.3)	<0.02-0.48 (0.12)	1.7-22.3 (9.8)	1.3-5.1 (3.1)			0.6-10.7 (3.4)
15	20.2-26.6 (23.2)	31.4-33.8 (32.2)	<0.2-2.5 (0.6)	<0.1-9.0 (3.3)	0.04-0.71 (0.29)	3.3-33.1 (15.7)				0.8-7.4 (2.5)
19	19.7-25.4 (22.4)	31.7-34.0 (32.4)	<0.2-3.6 (1.5)	<0.1-10.7 (4.9)	0.23-2.64 (0.58)	6.6-40.3 (23.6)	1.9-6.0 (3.1)			0.9-11.9 (3.0)

^{a)}透明度は4.5~18.5 mの間を変動。カッコ内の数値は平均値。

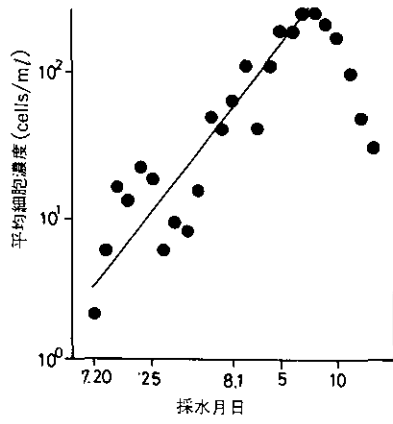


図2 家島諸島定点Bにおける1987年夏期の *Chattonella antiqua* の消長

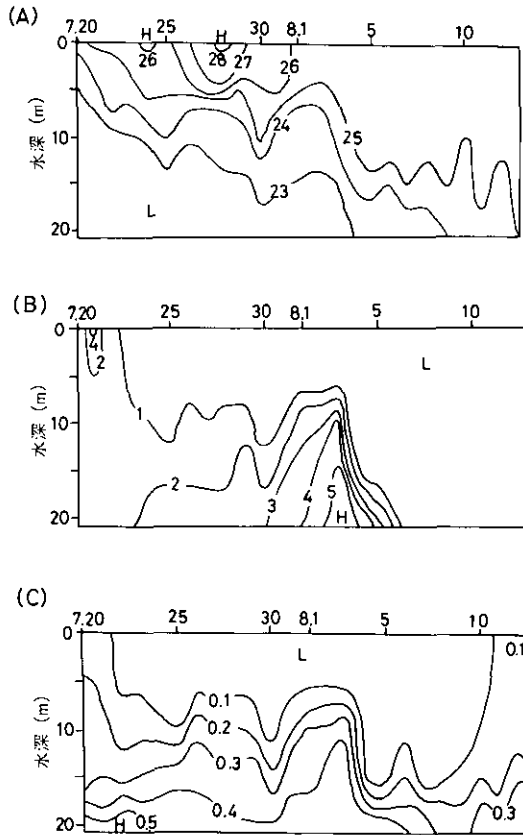


図3 赤潮発生時(1987年)の温度(A; °C), 硝酸塩(B; μ M), リン酸塩(C; μ M)の経日変化

(5~10 m)に比べて深い所に存在している。これに対応して、高濃度の硝酸塩、リン酸塩を含む海水は、1987年の赤潮発達期に比べて、より深い所(15 m以深)にしか存在していない。このような傾向は、他の非発生年でも同様に認められ、発生年は非発生年に比べて水温躍層(及びこれに伴う栄養塩躍層)が浅い位置に存在するという結果が得られた。

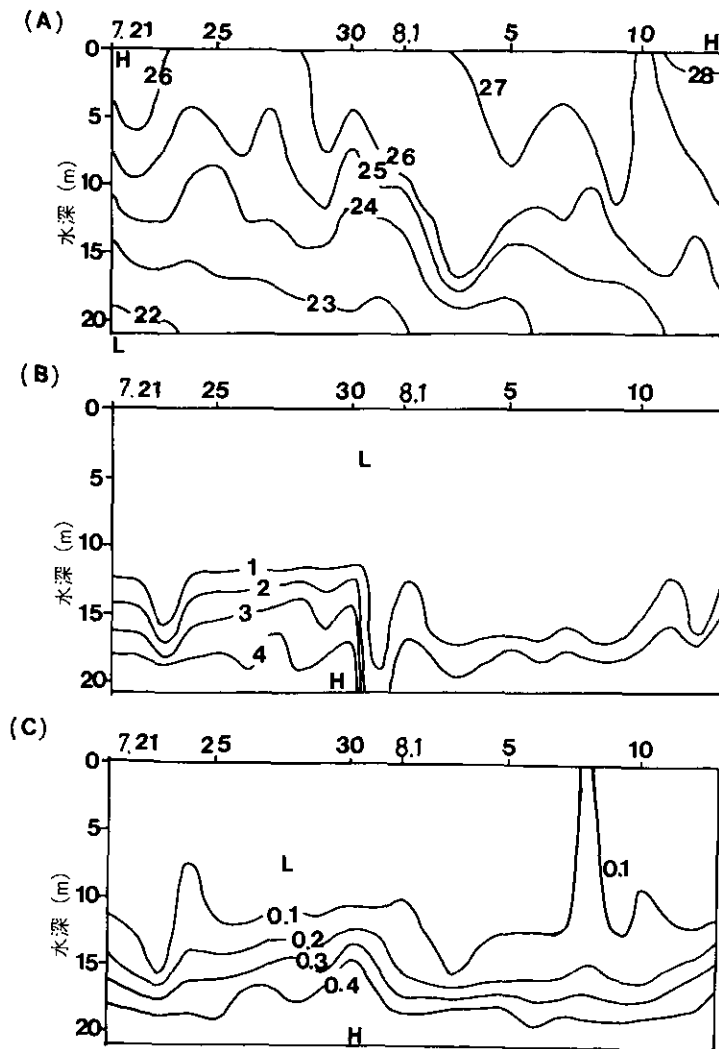


図4 赤潮非発生時(1986年)の温度(A; °C), 硝酸塩(B; μM), リン酸塩(C; μM)の経日変化

(4) 赤潮発生海域での富栄養化の評価

富栄養化が、赤潮発生に及ぼす影響を評価するためには、どの程度の栄養塩レベルであれば、赤潮藻類が速やかな増殖を維持しうるのか、すなわち、赤潮藻類の増殖速度の栄養塩濃度依存性を明らかにする必要がある。ここでは、*C. antiqua* について、実験室系で得られた増殖速度の栄養塩濃度依存性を調査結果に適用した。

海水中の硝酸態、アンモニア態の窒素濃度の和を S_N (μM)、リン酸態リンの濃度を S_P (μM) とするとき、*C. antiqua* の増殖しやすさを表すパラメータ GP (growth potential; 最大増殖速度 $\mu_{\max}=0.7/\text{d}$ で規格化されているため無次元) を次の式のように定義する (2.2.3 項)。

$$GP = \mu / \mu_{\max}^{\text{obs}} = 1.4 \frac{S_N}{1.0 + S_N} \cdot \frac{S_P}{0.11 + S_P}$$

ただし、 $S_N = S_{\text{NO}_3} + S_{\text{NH}_4}$ 。

ここで GP は $GP = 0 \sim 1$ の値をとり、最もよく増殖できる環境で $GP = 1$ となる。

赤潮発生年 (1987 年) と非発生年 (1990 年) の、家島諸島定点 B での GP の変化を図 5 に示す。1987 年の場合、赤潮発生のごく初期の段階では表層でも GP は高い値 (>0.4) を示すが、以後、値は急速に減少した。10 m 層での GP は発生初期から、赤潮のピーク近く (8 月 3 日) まで高い値を示すが、以後は、風による混合と、*C. antiqua* による栄養塩摂取により、全層で GP は急速に減少した。

一方、非発生年である 1990 年の GP は、表層~10 m 層できわめて低く (<0.2)、高い値の GP を持つ海水は 15 m 以深にしか存在していない。このような、赤潮発生年には高 GP の海水が、非発生年に比べてより浅い層 (10 m 以浅) にまで存在しているという傾向は、他の発生年、非発生年を通じて認められる。

(5) まとめ

本項で述べた赤潮多発海域での現場観測の結果に、室内培養実験結果 (2.2.3 項) を併せることで *C. antiqua* の個体群拡大のメカニズムを次のように概略的に描くことができる (図 6)。すなわち、*C. antiqua* は日周鉛直運動を行って、日中は表層に、夜間は下層に集積することが知られている。そして、夜間の集積深度は 10 m 前後であると考えられている (2.3 節)。赤潮発生年を見ると、赤潮の発達期間中、表層では GP はきわめて小さい (= 栄養塩が枯渇) もの、10 m 層では高い値 (>0.4) を示す。したがって、日中、栄養塩の枯渇した表層に集積していた *C. antiqua* は、夜間、10 m 層に沈降し、 GP の高い海水中で活発に栄養塩を摂取することができる (例えば 2.2.1 項)。こうして本種は、日中不足しがちであった N 、 P -栄養塩を補給する。そして翌日は再び表層に上昇して活発に光合成を行い、夜再び 10 m 層に沈降して栄養塩の補給と細胞分裂を行

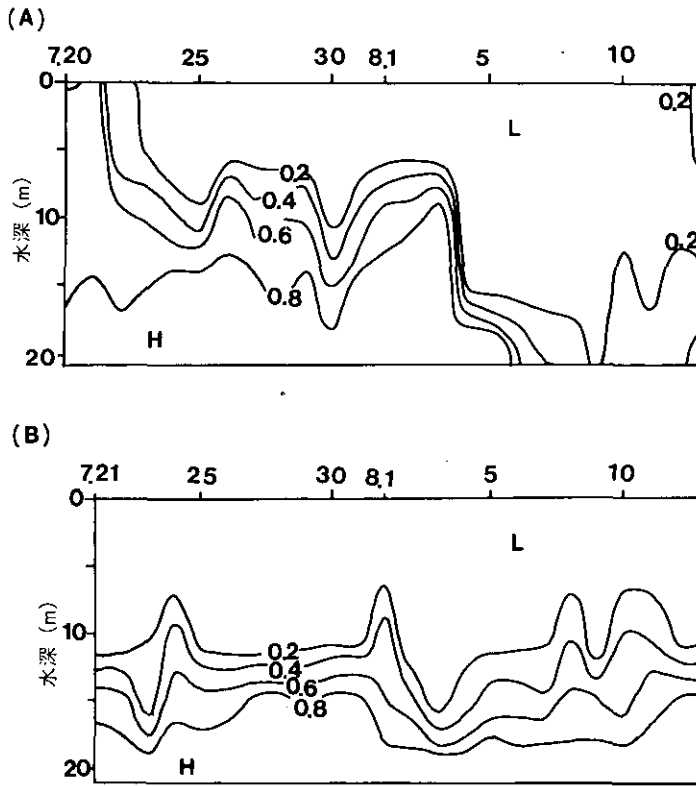


図5 調査定点Bでの *Chattonella antiqua* の増殖しやすさを表すパラメーターGPの変動
 (A) 発生年 (1987年), (B) 非発生年 (1990年)

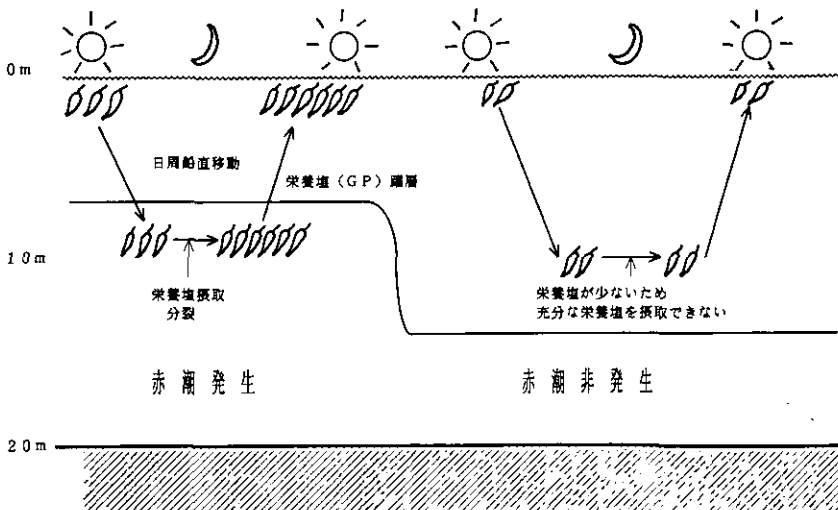


図6 栄養塩躍層の位置と *Chattonella antiqua* 赤潮形成の関係 (模式図)

う。その結果、*C. antiqua* の個体群の拡大が起こり、最終的には大規模な赤潮にまで発達する。一方、赤潮非発生年には、高いG P値を持つ海水は15 m以深にしか存在していない。したがって夜間*C. antiqua* が下層に沈降しても、その集積深度は10 m前後であるので高G Pの海水に触れることができない。したがって*C. antiqua* は増殖に必要な栄養塩を十分に摂取することが不可能となって、個体群を赤潮レベルにまで拡大することができない。

このように、浅い層(5~10 m)での高G P海水の存在が*C. antiqua* の日周鉛直移動能力や、夜間における栄養塩摂取能力と結び付いて、*C. antiqua* の個体群は拡大されると考えられる。しかしながら、ここに述べたことは、赤潮発生のためのあくまで必要条件であることを強調しておきたい。日周鉛直移動能力を持ち夜間活発に栄養塩を摂取しうる植物プランクトンは、*C. antiqua* に限らない(例えば *Heterosigma akashiwo*—ラフィド藻—など)。したがってなぜ、*H. akashiwo* でなく *C. antiqua* が現場で卓越するのかといった、種の選択に関する問題は今後に残された課題である。

2.1.2 光合成色素を指標とした植物プランクトン種組成の推定と種遷移の把握

(1) はじめに

海域で得られる試水中のクロロフィル系の色素量は生物量の指標として広く用いられてきた。近年は、色素を高速液体クロマトグラフィー(HPLC; 図7)で分析することが多くなり、従来の分光法や蛍光法より正確に容易にクロロフィル*a, b, c*, フェオ色素量の測定が可能になった。色素分析用HPLCの検出器には、クロロフィル系色素には蛍光、カロチノイドとクロロフィルを同時に測定するには可視分光器が用いられる。後者の場合、分光器の波長がカロチノイド・クロロフィルのほとんどに吸収のある410~440 nmで得られたクロマトグラムを使う(図8 b)。この方法では、色素同定の手掛かりは保持時間(t_R)だけであるため、分離が不十分である場合などに色素の同定が困難なことが多かった。本研究では、多波長同時にモニターできるフォトダイオードアレイ検出器を用い、 t_R に加えて各ピークのスペクトルを測定し、色素の同定・定量を試みた(図8 a)。この結果、同時に多くのカロチノイドの定量が可能になり、特に、渦ベン毛藻に特有のペリジニン、ケイ藻の持つフコキサンチン、シャットネラ等ラフィド藻の持つビオラキサンチン等のカロチノイドの定量ができた。これら色素の多変量解析で、藻類種の変遷を知る手掛かりが与えられた。

(2) 高速液体クロマトグラフィー分析

本研究で使用したフォトダイオードアレイ検出器を含む分析システム(図7)では、350~680 nmの波長範囲で2 nm 間隔に、時間間隔は2秒で測定した。この時、1つの試料につき得られる約13万個のデータを、一時、フロッピーディスクに保存し、その後、国立環境研究所の大型計算機及びその画像出力装置で解析した(図8, 9)。カロチノイドの標準試料となる数種の藻類につ

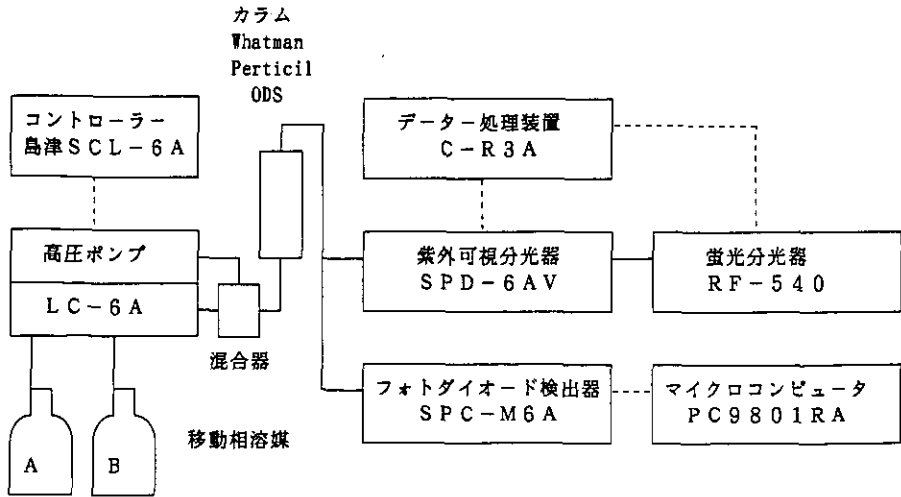


図7 高速液体クロマトグラフィー構成図

いて得られたクロマトグラムの例を図10に示した。未知試料中のスペクトル $X(\lambda)$ は、標準試料で得られた既知のスペクトル $Y(\lambda)$ との次式で表される類似度 R を用いて同定した。

$$R = \frac{\sum X \cdot Y - \frac{(\sum X \cdot \sum Y)}{n}}{\sqrt{\left[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right] \left[\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right]}}$$

ただし、上式中の総和は350~680 nmの波長範囲について行う。また、 n はこの範囲のデータ数を表す。この類似度は、クロマトグラム上のピークの純度を検定するためにも使用した。クロマトグラム上に、600 nm以上に吸収を持つクロロフィル系の色素が数多く見いだされた(図9)。これらは、クロロフィル a 、 b ($t_R = 20 \sim 21 \text{ min}$)のほかに、 $t_R < 8 \text{ min}$ の領域ではクロロフィリド a 、 c 、 $t_R \sim 13 \text{ min}$ ではフェオフォルビッド a 関係、 $t_R > 22 \text{ min}$ ではフェオフィチン a が観測されたためである。蛍光検出の場合にはこれらを測定できるが、カロチノイドをも同時に分析しようとする可視光吸収検出では、フェオフォルビッド a 関係の色素が、ペリジニン・フコキサンチン等の極性の高いカロチノイドの領域に重なり、それぞれを分離して測定するのは困難である。このため、我々は、カロチノイド測定の際はフェオ色素の吸収がほとんどない440 nmの波長を用い、フェオ色素の情報が必要な場合には蛍光検出を併用してきた。本研究のようにフォトダイオードアレイ検出器を用い、吸収スペクトルをモニターしたクロマトグラム(図8a)では、カロチノイドとフェオ色素を分離して測定できた。本研究の方法の第2の利点は、野外調査で得られ

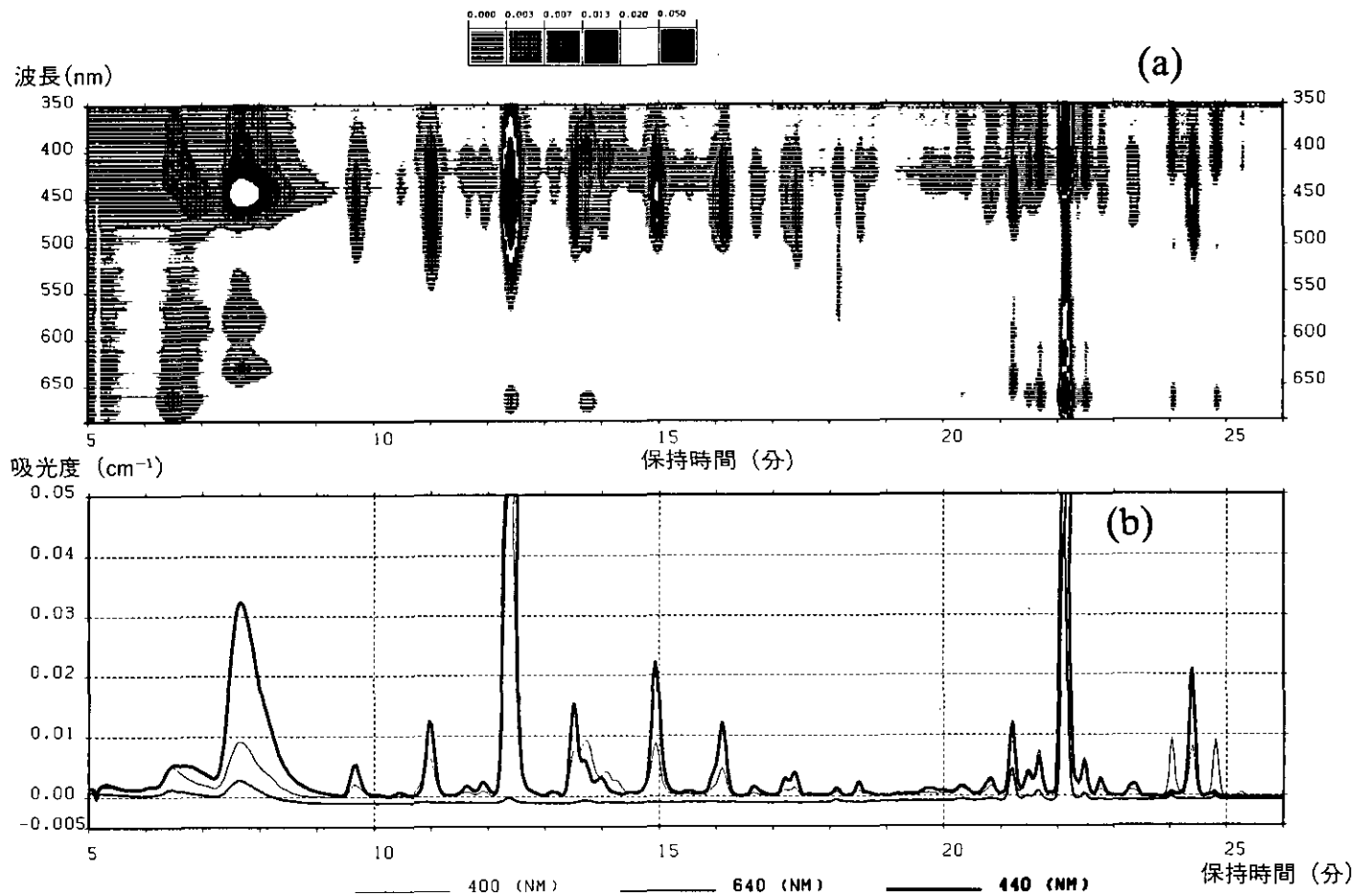


図8 (a) フォトダイオードアレイ出力の等高線表示の例(1989年7月23日播磨灘家島海域表層水)と
 (b) 図(a)の440nmにおけるクロマトグラム断面

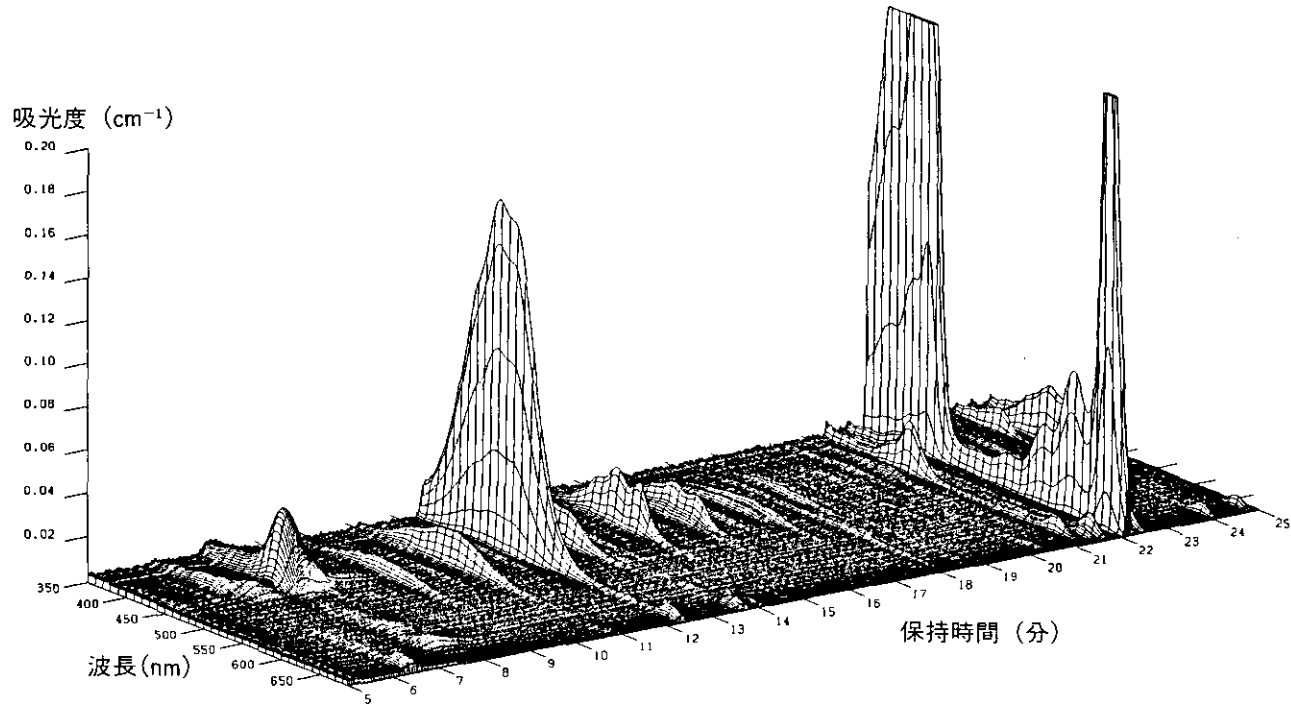


図9 図8と同じ試料について得られたクロマトグラムの三次元表示

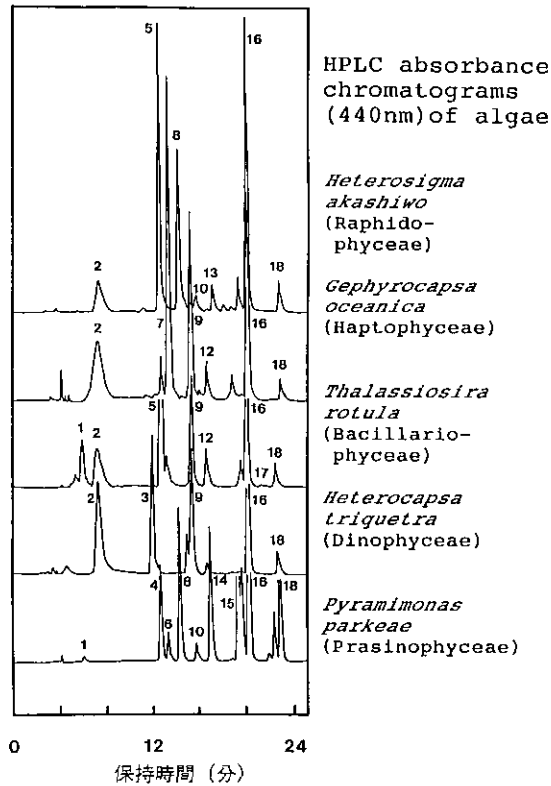


図10 様々な藻類の440nmにおけるクロマトグラム

同定された色素は、(1)クロロフィリド *a*, (2)クロロフィル *c*, (3)ペリジニン, (4)ネオキササンチン, (5)フコキササンチン, (6)ロロキササンチン, (7)19'-ヘキサノイロキシフコキササンチン, (8)ピオラキササンチン, (9)ディアディノキササンチン, (10)アンテラキササンチン, (11)アロキササンチン, (12)ディアトキササンチン, (13)ルテイン, (14)ゼアキササンチン, (15)クロロフィル *b*, (16)クロロフィル *a*, (17)フェオフィorbイド *a*, (18)β-カロテン。

る試料のように、天然の未知色素やそれらの分解生成物を多く含む場合に、それらの吸収スペクトルが分析と同時に示されることから、どのような色素であるかの推定が容易なことにある。

(3) 多変量解析による植物プランクトン種組成の推定

植物プランクトンの分類学上の各綱は、特徴的なカロチノイドを持つ物が多く、例えば、渦ベン毛藻に特有のペリジニンやシャットネラ等ラフィド藻の持つピオラキササンチンがある(図10)。

播磨灘家島で採水した試料のカロチノイドを解析した結果、この海域にはケイ藻(B)・渦ベン毛藻(D)・ラフィド藻(R)・ハプト藻(H)が多いことが明らかになった。そこで、例えばケイ藻のクロロフィル *a* を [Chl *a*]_B, 存在量を c_B のように表記すれば、海域に存在する全クロ

ロフィル a 量はこれらの和として表される。

$$[\text{Chl } a] = c_o + c_B [\text{Chl } a]_B + c_D [\text{Chl } a]_D \\ + c_R [\text{Chl } a]_R + c_H [\text{Chl } a]_H$$

ここで、植物プランクトン中のカロチノイド量とクロロフィル a 量の比が一定とするならば、例えば渦ベン毛藻について、

$$[\text{Chl } a]_D = r_D [\text{ペリジニン}]$$

のように表され、ペリジニンの量から、渦ベン毛藻の全クロロフィル a に対する寄与が計算される。この関係を用いて前式を書き直し、整理して次式を得る。

$$[\text{Chl } a] = a_0 + a_1 [\text{フコキサンチン}] \\ + a_2 [\text{ペリジニン}] + a_3 [\text{ビオラキサンチン}] \\ + a_4 [19'\text{-ヘキサノイロキシフコキサンチン}]$$

各カロチノイド量を独立変数、クロロフィル a 量を従属変数、 a_i をパラメーターとした多変量解析の手法を用い、測定されたカロチノイド量から、植物プランクトン各綱の全クロロフィル a 量に対する寄与が計算できる。

この方法を、1987年7月20日から8月13日まで、播磨灘家島の調査で得られた光合成色素量の経日変化の測定結果に適用した。この時期には、*C. antiqua* による赤潮が大発生した。調査期間中に得られた全層のデータ（70 サンプル）を同時に多変量解析した。簡単のために、この解析では、フコキサンチンとディアディノキサンチンで特徴づけられる綱をケイ藻、ペリジニンで特徴づけられる綱を渦ベン毛藻、19'-ヘキサノイロキシフコキサンチンで特徴づけられる綱をハプト藻、フコキサンチンとビオラキサンチンで特徴づけられる綱をラフィド藻とした。結果を図11に示す。縦軸に多変量解析により推定された Chl a 量と、それに占める各カロチノイドで代表される植物プランクトン綱の割合を示した。また図中の (●) は HPLC によって得られた Chl a の実測量である。推定した Chl a 量は実測量とよく一致した。このことは、上記の Chl a に対するカロチノイドの比が調査期間を通じて大きく変動しなかったことを示唆している。

各層において7月28日頃まではケイ藻が90%を示していたが、赤潮発生と同時に優占種が *C. antiqua* に移行したことが明らかである。また、各層を比較して見ると赤潮発生時における *C. antiqua* による場の独占の度合いが、表層に近いほど大きい。これは測定時刻が午前中であったため、日周鉛直移動により *C. antiqua* が表層に集積していたためであろう。

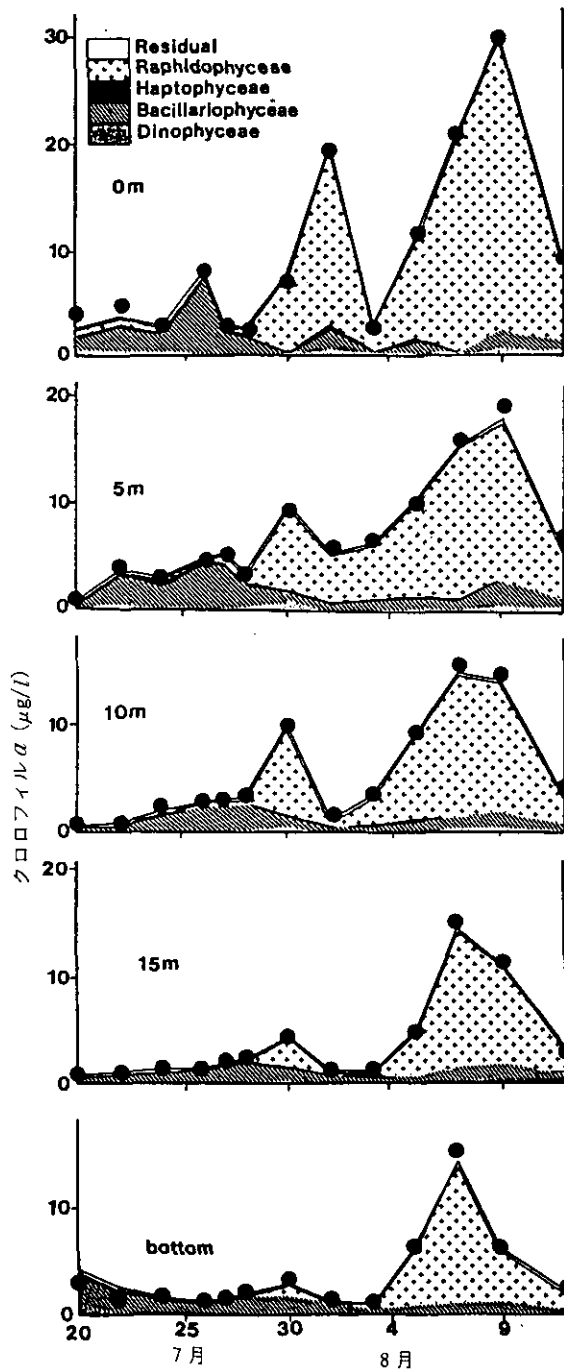


図11 植物プランクトン各綱に特徴的なカロテノイド量からクロロフィル a の寄与率として計算された植物プランクトン各綱の存在量変化 (1987年播磨灘家島海域での赤潮発生時)

(4) まとめ

内湾生態系の中で、一次生産者である植物プランクトンに、富栄養化による影響が顕著に表れる。栄養塩の濃度や鉛直分布が変化すると、植物プランクトンの種組成が大きく変動すると考えられる。

従来、植物プランクトン種別の存在量を知るためには、検鏡による同定・計数を行ってきたが、この方法は高度な知識と熟練を必要とし、分類を専門とする研究者に頼るしかなく、また、多大の労力と時間を必要とした。一方、クロロフィル *a* 量から現存量を測定する方法も通常とられてきたが、これでは各植物プランクトンの種構成や変遷については何の情報も得られない。

通常の海域にはケイ藻綱に属する植物プランクトンが多く分布するが、ラフィド藻綱に属する *Chattonella* が場を占有すると大きな赤潮被害が起こる。また、ペン毛藻には有毒なものが多い。このようなことから、生態学的には種レベルでなくとも、綱のレベルでその存在量の変化が測定されれば有用なことが多い。

本研究では、植物プランクトンの綱に特徴的なカロチノイドの定量をし、その多変量解析から綱別の存在量を推定した。高速液体クロマトグラフィーによる分析は、簡単で誰にでもでき、分析時間は1検体当たり20~40分と短いのでルーチン分析に適している。海域における長期モニターや、2.5節に記した栄養塩添加実験の追跡調査などで、植物プランクトン組成の変動を明らかにするために、本研究の方法が有効である。

2.2 制御実験系を用いた富栄養化の影響評価に関する研究

2.2.1 栄養塩成層条件下での *Chattonella antiqua* による日周鉛直移動と夜間栄養塩摂取

(1) はじめに

瀬戸内海の夏期における海洋構造の特徴は安定した塩分・水温と栄養塩による成層構造である。日周鉛直移動による栄養塩摂取と蓄積の生態的意義は従来より多く議論されてきた。特にリン成層条件下での夜間底層での *Heterosigma akashiwo* によるリン摂取が明らかにされた。瀬戸内海においては表層水の窒素・リン濃度は *C. antiqua* にとって制限要因となり得るが夏期安定成層条件下では底層では窒素約 $5 \mu\text{M}$ 、リンは約 $0.5 \mu\text{M}$ 程度とされている。*C. antiqua* 赤潮発生机構解明にとって窒素・リン成層条件下での日周鉛直移動による細胞内炭素、窒素、リン挙動の詳細な解析は重要である。大量無菌培養装置(マイクロコズム; 内容量 1 m^3 ; 図12)を用いて瀬戸内海に見られる安定塩分・栄養塩成層を形成し *C. antiqua* の日周鉛直実験を行った。

(2) 実験方法

実験には *C. antiqua*(Hada) Ono(NIES-1)の無菌クローン株を用いた。三角フラスコ(2~3 l)中1 lの培地で *C. antiqua* を予備培養し、マイクロコズムに接種した。実験には f/2 培地 1 m^3 を使い、照明は5 kWのキセノンランプで与え、6時点灯、18時消灯の12:12時間のLD周

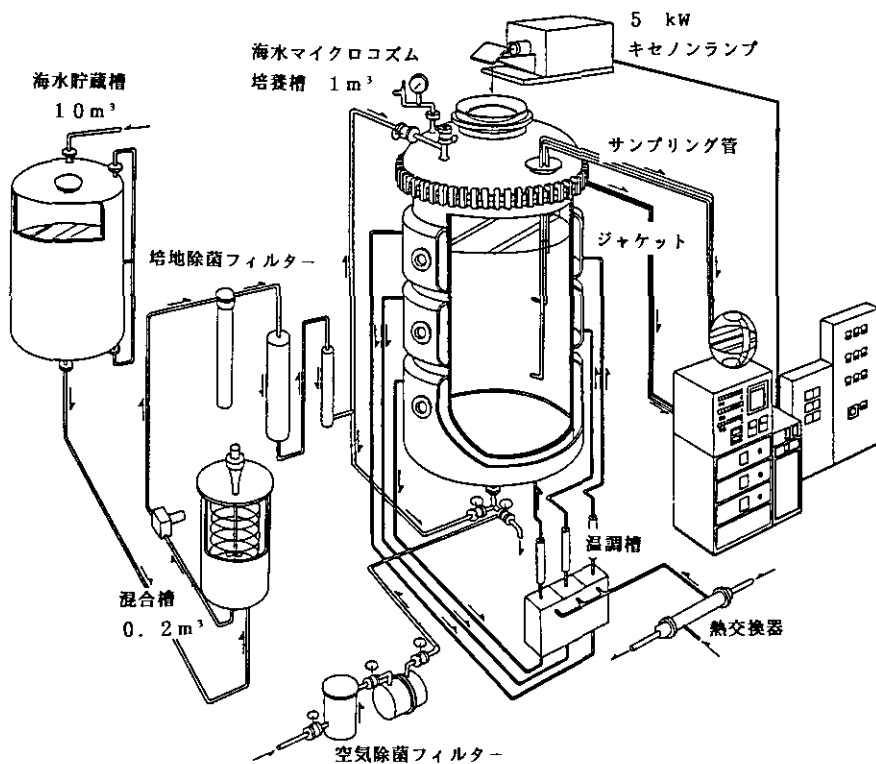


図12 国立環境研究所マイクロコズムの概略図

期、明期での照度が表層の中央で約 $530 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ となるよう調整した。水温は 20.5°C に設定し、培養槽下部から滅菌された空気を入れてかくはん培養を行った。以下の P-制限、N-制限、N・P-制限の 3 実験は実験方法がほとんど同一であるので、P-制限のみについて詳述する。

(a) リン成層

リン成層実験の第 1 段階では予備培養した 1 l の *C. antiqua* を接種し初期濃度 $7 \text{ cells}/\text{ml}$ にてかくはん培養を行った。細胞数は毎日 14 時に測定した。初期のオルトリン酸 ($\text{Pi}:\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 濃度は $1.3 \mu\text{M}$ 、塩分濃度は 31% に設定した。培養 10 日目の 9 時における細胞数は $983 \text{ cells}/\text{ml}$ に達し培地中の Pi は完全に欠乏状態となった (比増殖速度 = $0.55/\text{d}$)。

実験の第 2 段階では培養 10 日目の 10 時にばっ気を停止し *C. antiqua* を上層に集積させた。この時の表層での細胞濃度は $24,100 \text{ cells}/\text{ml}$ に達していた。培養槽の底部中心のバルブを開け、下層から約 100 l を抜き取り、その後同量のリン添加培地 ($22.6 \mu\text{M}$; NaH_2PO_4) でかつ塩分濃度が少し高い (33.6%) 培地を下層より注入し、リン及び塩分の安定成層を形成した。この塩分差

($\Delta S = 2.6\%$) が鉛直混合を防止し、安定した栄養塩成層を維持し続けることが可能となった。13時と23時に鉛直5点でサンプリング(各点2 l)を行い、水温、塩分、栄養塩、細胞濃度、細胞中の炭素、窒素、リン量を測定した。サンプリングはテフロンチューブを通して5 lの三角フラスコにアスピレーターを用いて吸引採水した。細胞濃度の測定にはコールターカウンターTA-IIを使用した。細胞中炭素・窒素量はGF/Cフィルターにサンプル500 mlをろ過しギ酸アンモニウム水溶液で洗浄後80°Cで48時間乾燥後、柳本CHNコーダー・MT3を用いて測定した。懸濁態全リン(PTP)はペルオキシ2硫酸カリによる分解を行い、サンプル中の有機リンをオルトリン酸に変化させて分析試料とした。溶存無機態リン(DIP)は通常の方法によりTechnicon社製オートアナライザーAAII型を用いて分析を行った。

(b) 窒素成層

窒素成層実験の第1段階では初期細胞濃度は7 cells/mlであった。初期窒素濃度(Ni; NaNO_3)は36.0 μM で塩分は31%であった。培養9日目の9時に細胞数は557 cells/ml、比増殖速度は $\mu = 0.62/\text{d}$ であった。第2段階では培養9日目の10時にばっ気を停止し、*C. antiqua*は表層に集積した(表層での細胞数は6,508 cells/ml)。この時点で培地中の窒素濃度は13.8 μM であり欠乏状態とはならなかった。窒素添加(651.5 μM ; NaNO_3)したやや高い塩分(33.8%)濃度の培地を導入し、安定した窒素成層状態を形成した。

(c) 窒素・リン成層

窒素・リン成層実験の第1段階では初期細胞濃度は3 cells/mlで塩分は31.5%であった。初期リン濃度は1.2 μM で窒素濃度は58.1 μM であった。培養10日目の9時に細胞数は1,044 cells/mlとなり比増殖速度は $\mu = 0.62/\text{d}$ であった。培養10日目の10時にばっ気を停止し*C. antiqua*を表層に集積させた。この時の表層での細胞数は17,480 cells/mlであった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度は0.1 μM 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は19.0 μM であり、窒素は完全には欠乏状態ではなかった。リン(23.4 μM ; NaH_2PO_4)と窒素(678 μM ; NaNO_3)の添加された塩分濃度の少し高い(33.8%)培地を底層を導入し窒素・リン成層を形成した。

(3) 実験結果

(a) リン成層

培養10日目の9時に細胞数は983 cells/mlで、細胞内P含有量は1.12 pmol/cellと最小P含有量(1.0 pmol/cell)に近い値であった(図14)。安定成層条件下(図13a,b)で、*C. antiqua*は照明が消える1~2時間前に底層へと移動し底に集積層を形成する(図13c, 23時)。リン欠乏細胞はリン豊富な底層に達し、夜間リン摂取を行っていることが、細胞内P含有量の増加(13時: 1.12 pmol/cellから23時: 2.04 pmol/cellへと増加)から明らかとなった。表層への移動と細胞

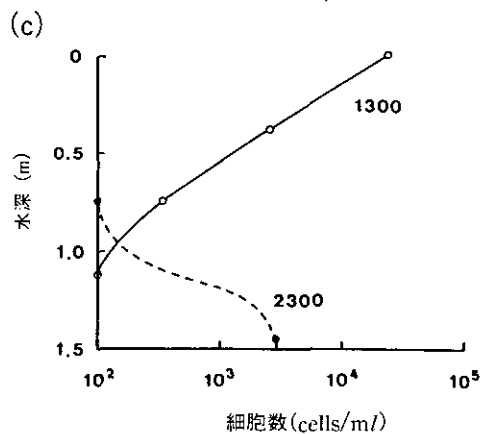
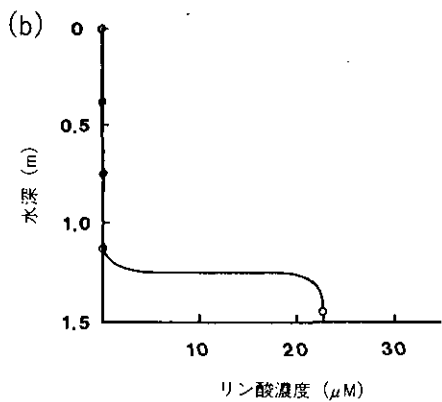
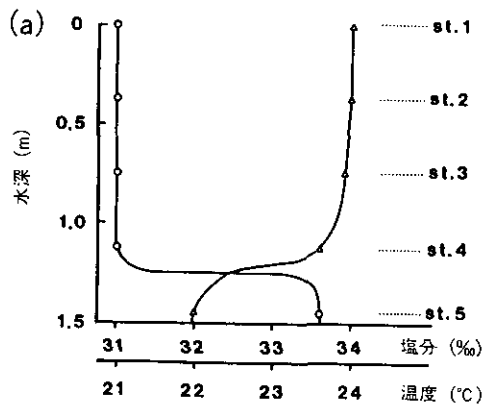


図13 (a) リン成層実験での塩分・水温の鉛直分布 (st.1: 水表面, st.5: 底), (b) リン成層実験の初期に与えられたリン酸 ($\text{PO}_4\text{-P}$) 濃度の鉛直分布, (c) リン成層実験における *Chattonella antiqua* 細胞数の鉛直分布

○: 培養10日目の13時に測定, ●: 培養10日目の23時に測定

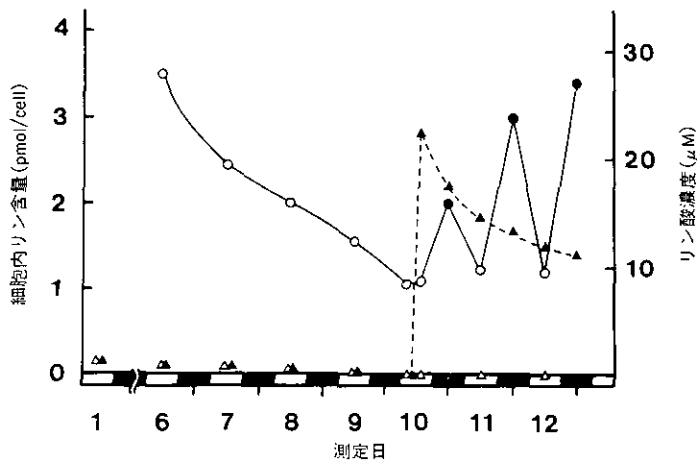


図14 リン成層実験での細胞内リン含有量 (○: st.1 で13時に測定, ●: st.5 で23時に測定) と培地中リン酸 ($\text{PO}_4\text{-P}$) 濃度 (△: st.1,2,3,4 で測定, ▲: st.5 で測定) の変化

分裂は、その時間が重複 (2~6時) しており、細胞内P含有量はその期間中減少する。照明が点灯する2~3時間前に表層への移動が始まる。培養11日目の表層 (13時) では細胞内P含有量は1.23 pmol/cellであった。このような日周鉛直移動と底層でのリン摂取が実験期間中繰り返された (図14)。

リン成層の場合窒素は制限因子とはなっていない。本種がリン豊富な底層に移動し夜間にリン摂取を行ったとき、23時の細胞内N含有量はリン含有量と同様に増加し、同調した挙動を示した (表3)。細胞内炭素、窒素、リン含有量は同調した挙動を示すけれど、C/N比は13時、23時を通してあまり変動しない (6.1~6.7)。またC/P比は13時では120~125、23時では61~68であった。

(b) 窒素-成層

培養9日目の13時のN-成層実験開始時には表層での $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は $13.8 \mu\text{M}$ であり細胞内N含有量は 32.8 pmol/cell (図15, 表4) とN欠乏状態とはなっていない。しかし表層に集積した細胞数は $6,500 \text{ cells/ml}$ であり、集積後表層での窒素は直ちに *C. antiqua* に摂取された。このため培養10日目の13時には表層での窒素濃度は検出限界以下であり、この時が日周鉛直移動と底層での窒素摂取実験の開始時期と考えることができる。培養11日目の13時には細胞内N含有量は 19.2 pmol/cell であったのが、夜間23時の細胞内N含有量が 23.5 pmol/cell と増加したことから、窒素豊富な下層に移行し窒素を摂取したことが明らかになった (図16, 17, 表4)。同様の

表3 リン成層条件下での細胞内炭素・窒素・リン及びC:N比, C:P比, N:P比の変化

日付	時刻	場所 ^{a)}	リン	窒素	炭素	C:N ^{b)}	C:P ^{b)}	N:P ^{b)}
			(pmol/cell)					
10	1300	S	1.1	27.0	179	6.6	163	25
	2300	B	2.0	27.4	183	6.7	92	14
11	1300	S	1.2	22.4	150	6.7	125	19
	2300	B	3.0	32.7	203	6.2	68	11
12	1300	S	1.2	22.4	144	6.4	120	19
	2300	B	3.4	33.6	206	6.1	61	10

^{a)} S:表層, B:底層

^{b)} モル比

表4 窒素成層条件下での細胞内炭素・窒素・リン及びC:N比, C:P比, N:P比の変化

日付	時刻	場所 ^{a)}	リン	窒素	炭素	C:N ^{b)}	C:P ^{b)}	N:P ^{b)}
			(pmol/cell)					
9	1300	S	2.2	32.8	213	6.5	97	15
	2300	B	3.0	32.5	207	6.4	69	11
10	1300	S	1.7	27.9	178	6.4	105	16
	2300	B	2.9	29.9	192	6.4	66	10
11	1300	S	1.6	19.2	128	6.7	80	12
	2300	B	2.5	23.5	161	6.9	64	9
12	1300	S	1.7	18.3	128	7.0	75	11
	2300	B	2.6	22.7	158	7.0	61	9
13	1300	S	1.7	17.5	119	6.8	70	10

^{a)} S:表層, B:底層

^{b)} モル比

日周鉛直移動のパターンと底層での窒素摂取が実験期間中繰り返された。このN成層実験においてはリンは制限因子ではなかったが、細胞内リン含有量は細胞内窒素含有量と同様に夜間増加し昼間減少した。培養9日目では窒素が表層で欠乏状態ではなかったが、C/N比は大きな変化は示さず6.4~6.5の間の値をとっていた。しかし培養10日目の13時で表層において窒素が完全に欠乏した後はC/N比の明確な日周変化は見られなかった。

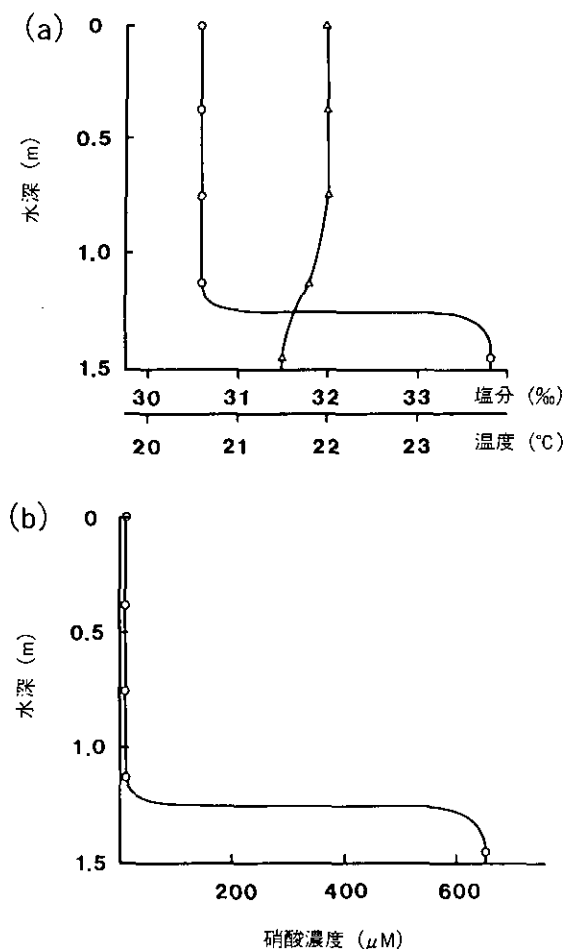


図15 (a) 窒素成層実験での塩分・水温の鉛直分布と (b) 窒素成層実験の初期に与えられた硝酸 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 濃度の鉛直分布

(c) 窒素・リン成層

培養10日目の13時における窒素・リン成層実験の開始時には表層でのリンと窒素濃度はそれぞれ $0.1 \mu\text{M}$ と $19.0 \mu\text{M}$ であった (図18)。さらにこの時の細胞内リン、窒素含有量は 1 pmol/cell , 24.6 pmol/cell であった (図20, 21, 表5)。したがって細胞はリン欠乏状態ではあったが、Nは完全には欠乏状態とはなっていなかった。しかし培養11日目の13時においては表層での窒素濃度はゼロであり、表層の窒素は *C. antiqua* 細胞にすべて摂取されてしまった。この時の細胞内リン・窒素含有量にそれぞれ 1.0 pmol/cell , 23.9 pmol/cell であった。しかし同じ日の23時には細胞はリン・窒素豊富な底層に移動し夜間リン・窒素を摂取したことが細胞内リン・窒素含有量が 2.0 pmol/cell , 30.0 pmol/cell へと増加したことから分かる (図19, 20, 表5)。同様のパターンは培養12, 13日目にも繰り返された (図19~21, 表5)。

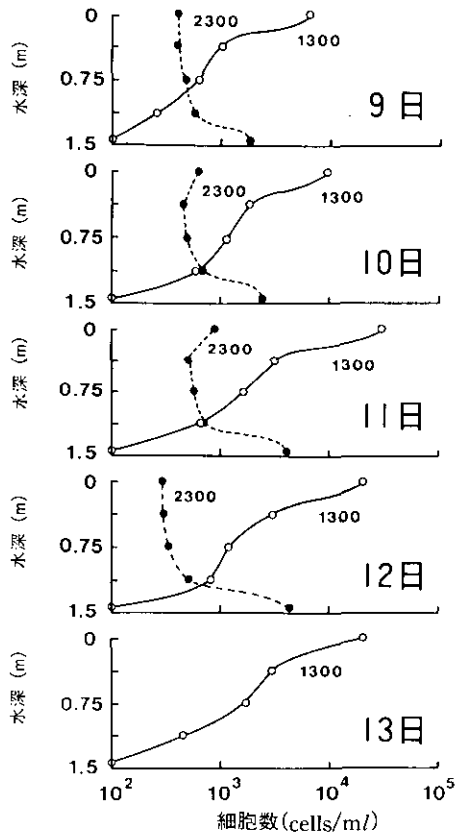


図16 窒素成層実験での *Chattonella antiqua* 細胞数 (○: 13時, ●: 23時) の鉛直分布

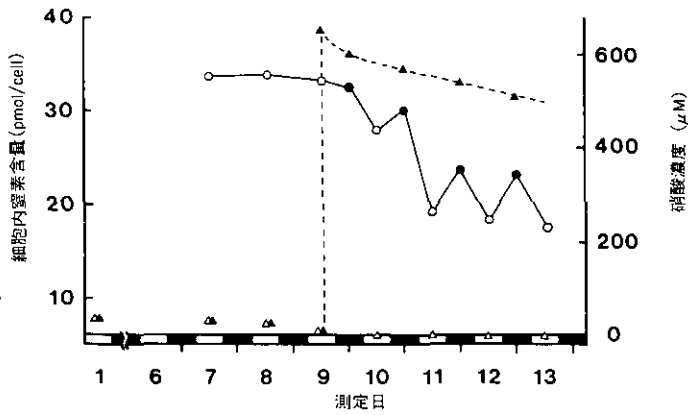


図17 窒素成層実験での細胞内窒素含有量 (○: st.1 で13時測定, ●: st.5 で23時測定) と培地中硝酸 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 濃度 (△: st.1,2,3,4 で測定, ▲: st.5 で測定) の変化

(4) 考案

日周鉛直移動を行う渦ベン毛藻にとって夜間の $\text{NO}_3\text{-N}$ 摂取は生態的に強い優位性を与えることが示唆されてきた。自然海域において渦ベン毛藻による夜間の $\text{NO}_3\text{-N}$ 摂取が報告されている。その報告によれば成層した海域では、ブルームを形成している渦ベン毛藻は夜間底層での $\text{NO}_3\text{-N}$ 摂取により個体群を増加させることが可能であることが示唆されている。しかし渦ベン毛藻 *Gonyaulax polyedra* の栄養塩摂取率は光に依存するという相反する結果も報告されている。現場海域での非常に厳しい条件での観測では、正確な日周鉛直移動のデータを得ることは困難である。

実験系において高さ 2 m の円柱状の培養器の中で渦ベン毛藻の日周鉛直移動実験を行い、夜間に無機態窒素を摂取することにより個体群を増加させることが報告されている。しかしその実験には栄養塩成層は形成されておらず、したがって厳密には栄養塩成層条件下での日周鉛直移動と夜間の栄養塩摂取は検証されていない。

本研究において、高さ 1.5 m のマイクロコズム内に N・P 成層を形成し、*C. antiqua* の日周鉛直移動に伴う夜間底層での窒素・リン摂取が明らかにされた。本実験で底層での栄養塩濃度はリン $23 \mu\text{M}$ 、窒素 $650 \mu\text{M}$ と現場赤潮海域で観測されている濃度より 40~300 倍も高い値となっている。しかし日周鉛直移動実験では表層に蓄積した細胞数は $6,000\sim 24,000 \text{ cells/ml}$ と高く、赤潮発生時に観測されている細胞数より 10~40 倍高い。このため底層での栄養塩摂取による栄養塩減少は急激であり、栄養塩濃度を高く設定しておく必要がある。本実験では大量のサンプルを 3 時間ごとに連続して採水しなければならず、*C. antiqua* 細胞数の急激な減少を避けるためには栄養塩レベル及び細胞数レベルを高くし安定して均質なサンプルを長く採集できるようにする必要があった。しかし細胞内炭素・窒素・リン含有量はそれぞれ現場海域で見られるような濃度範囲(リン $1.5 \mu\text{M}$ 、窒素 $30 \mu\text{M}$)で行ったときの細胞内含有量と差異はなく、底層での高栄養塩濃度の影響はないと考えられる。

リンまたは窒素成層実験の場合、一方のみが制限因子であるように設定して実験を行っている。このため制限因子とはならない栄養塩は表層、底層ともに十分に存在しており、制限因子となる栄養塩のみ表層はゼロ、底層に多量に存在する。しかし日周鉛直移動中 *C. antiqua* の細胞内リン・窒素含有量は同調して変化している(表 3, 4, 5)。本種はリンのプールであるポリリン酸を形成することができないことが ^{31}P -NMR 計測から判明している。したがってリンの Luxury uptake を行わず、窒素についても同様と考えられる。したがって窒素・リンともに必要な量だけを摂取していると考えられる。

本実験において安定した栄養塩成層条件下では *C. antiqua* は夜間底層で栄養塩摂取を行い、昼間表層で光合成を行うことにより増殖し続けることが判明した。このことは *C. antiqua* 赤潮の発生機構解明にとって重要な鍵となる。

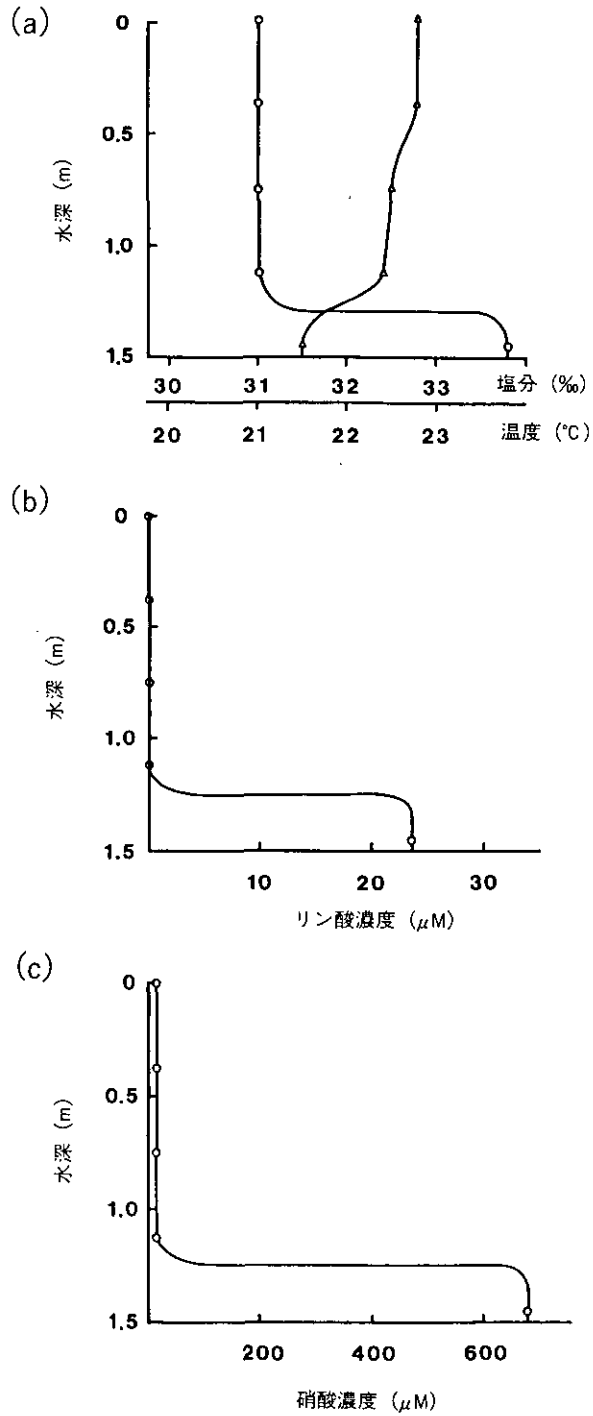


図18 (a) 窒素・リン成層実験での塩分・水温の鉛直分布, (b) 窒素・リン成層実験の初期に与えられたリン酸 ($\text{PO}_4\text{-P}$) の鉛直分布, (c) 窒素・リン成層実験の初期に与えられた硝酸 ($\text{NO}_3\text{-N}$) の鉛直分布

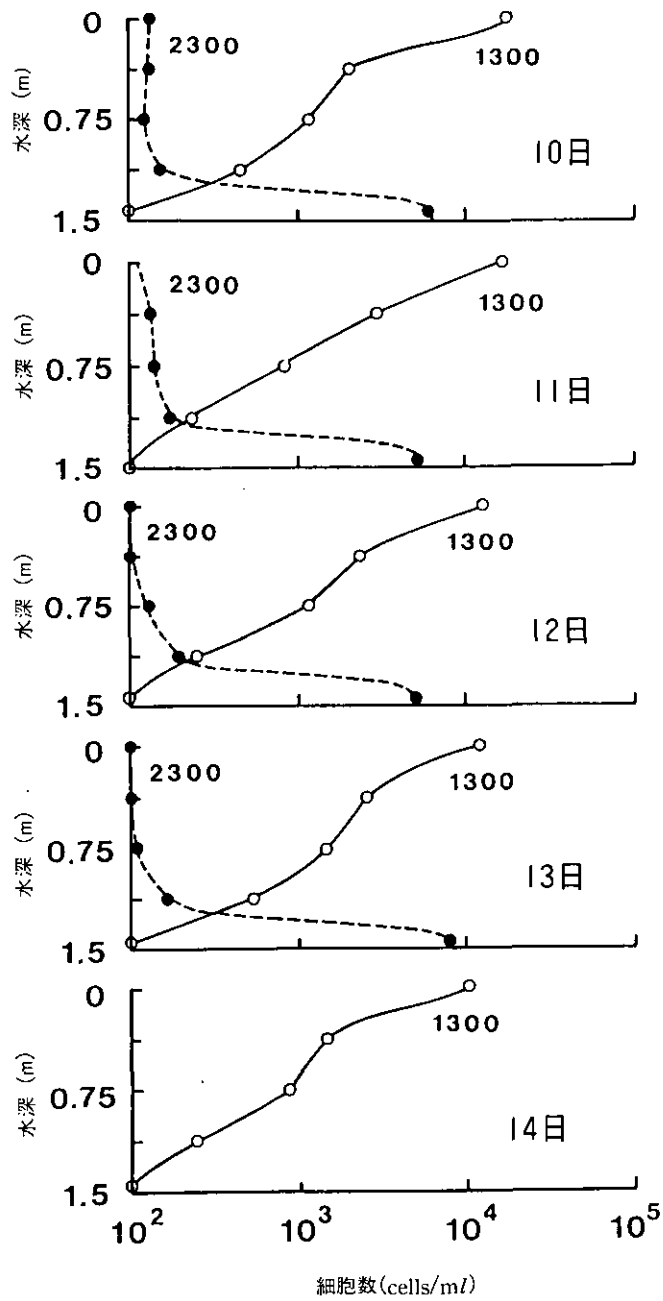


図19 窒素・リン成層実験での *Chattonella antiqua* 細胞数 (○: 13時測定, ●: 23時測定) の鉛直分布

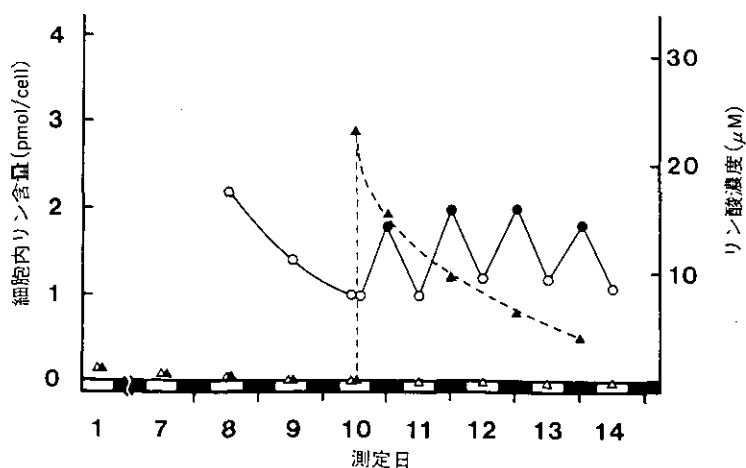


図20 窒素・リン成層実験における細胞内リン含有量 (○: st.1 で13時測定, ●: st.5 で23時測定) と培地中のリン酸 ($\text{PO}_4\text{-P}$) 濃度 (Δ : st.1,2,3,4 で測定, \blacktriangle : st.5 で測定) の変化

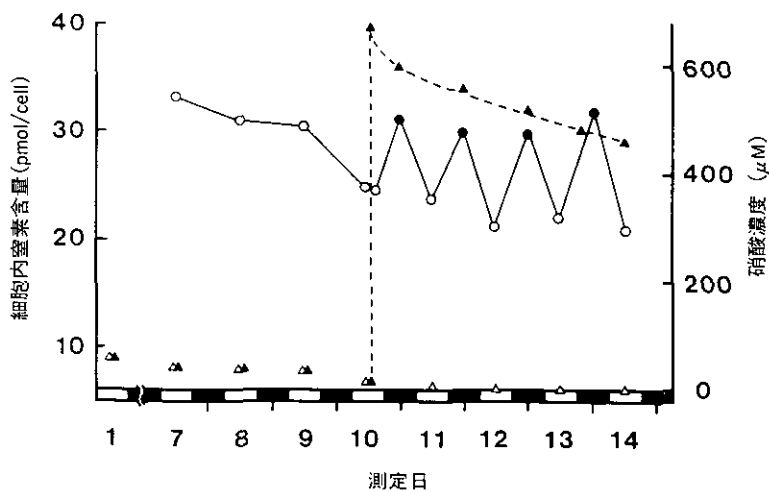


図21 窒素・リン成層実験における細胞内窒素含有量 (○: st.1 で13時測定, ●: st.5 で23時測定) と培地中の硝酸 ($\text{NO}_3\text{-N}$) 濃度 (Δ : st.1,2,3,4 で測定, \blacktriangle : st.5 で測定) の変化

表5 リン・窒素成層条件下での細胞内炭素・窒素・リン及びC:N比, C:P比, N:P比の変化

日付	時刻	場所 ^{a)}	リン	窒素	炭素	C:N ^{b)}	C:P ^{b)}	N:P ^{b)}
			(pmol/cell)					
10	1300	S	1.0	24.6	153	6.2	153	25
	2300	B	1.8	31.4	201	6.4	112	17
11	1300	S	1.0	23.9	151	6.3	151	24
	2300	B	2.0	30.0	189	6.3	95	15
12	1300	S	1.3	21.3	134	6.3	103	16
	2300	B	1.6	25.3	157	6.2	98	16
13	1300	S	1.2	22.0	137	6.2	114	18
	2300	B	1.8	31.8	193	6.1	107	18
14	1300	S	1.1	20.9	132	6.3	120	19

^{a)}S:表層, B:底層

^{b)}モル比

2.2.2 指標動植物プランクトン及びバクテリアの相互作用に関する研究

A 植物プランクトン間の相互作用に関する研究

(1) はじめに

1つの生物が、離れて生育している他の生物に影響を与える作用、他感作用(allelopathy)は、陸上の植物生態学の分野で広く研究され、多くの化学的相互作用に関与する物質、他感作用物質(allelochemicals)の構造が明らかにされている。海洋生態系での他感作用物質はあまり研究例が多くなかったが、最近オキナワモズクが産する脂肪酸の一種がこの他感作用を示し、植物プランクトンの増殖を制限することが報告されている。海域における植物プランクトン種変遷の原因として、温度・塩分・栄養塩濃度等環境条件の違いによる各植物プランクトン種の増殖速度の差によるもののほかに、植物プランクトン種間の相互作用や動物プランクトンによる摂食の差等が考えられる。海洋生態系に対する富栄養化の影響を調査する際に、これら相互作用を無視することはできないだろう。

本研究では赤潮多発海域である瀬戸内海播磨灘より10数種の植物プランクトンを採集・単離し、これらと、播磨灘に発生する赤潮の代表的な種である。ラフィド藻 *Chattonella antiqua* (HADA) ONO との混合培養を試みたところ、2種類の株が *C. antiqua* の増殖を阻害する結果を得た。このうち1種は、ケイ藻綱に属する *Amphiprora hyalina* EULENSTEIN と同定された。

植物プランクトン種間相互作用の例として、本研究ではフラスコレベルにおける *C. antiqua* と *A. hyalina* の種間関係の解明を目標とし、両種の混合培養下での競合を観察した。また、*C. antiqua* が増殖阻害に至った原因の究明を試みた。赤潮プランクトンと他種植物プランクトンとの種間関

係を知ることは、将来の赤潮対策の基礎としても重要な課題と思われる。

(2) 混合培養実験

培養形態は無菌条件下バッチ培養とした。容量 1,000 ml のガラス製培養器に pH 電極を組み込み、f/2 培地 600 ml を入れて使用した。*C. antiqua* を先行して培養器に接種・培養し、対数増殖期に移行したのを確認して、*A. hyalina* を接種して混合培養を開始した。培養条件は、25°C・L/D=12/12・4,000lux の蛍光灯下の静置培養とした。また、同条件で *C. antiqua* ならびに *A. hyalina* をそれぞれ単独で接種・培養した物を対照とした。

混合培養開始 3 日目に *C. antiqua* の個体数激減を伴う増殖阻害が引き起こされた。この時点で正常細胞の *C. antiqua* は皆無であり、翌日には全個体の死滅が確認された。一方で、*A. hyalina* の増殖は良好であり、混合培養による影響は見られず、接種後 6 日目に定常期に達した (図22)。また、各培養系とも増殖に伴い pH 8.9 が最高値であったのに対して、*A. hyalina* 単独培養及び混合培養では最高値 pH 9.7 まで上昇した。特に、*C. antiqua* の個体数激減時には pH 8.9→pH 9.5 と顕著な上昇が示された。

培養液の高い pH も *C. antiqua* の増殖阻害要因と考えられるので、pH を最高 8.8 になるよう制限した混合培養を行ったところ、やはり *C. antiqua* に増殖阻害が見られた。そこで、*A. hyalina*

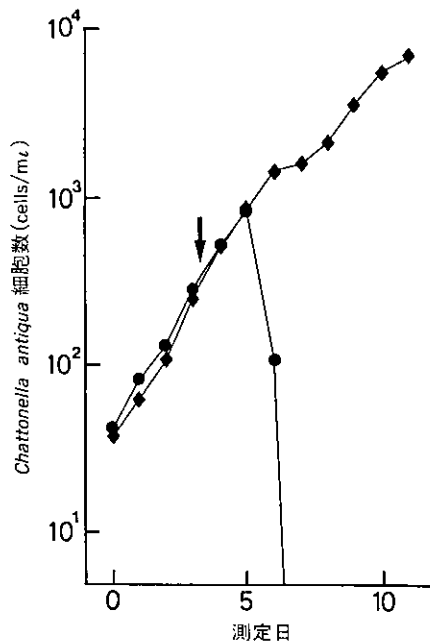


図22 *Chattonella antiqua* の細胞濃度の変化

◆: *C. antiqua* のみの培養, ●: *Amphiprora hyalina* との混合培養。矢印の時に混合培養開始。

の培養を熱処理してろ液を作成し *C. antiqua* を接種したところ短時間で死滅が認められた。また、このろ液中より脂肪酸と思われる5つのカラムクロマト画分を抽出したので *C. antiqua* の培養に添加したところ3つの画分で増殖阻害を認めた。これより、*A. hyalina* の細胞内に *C. antiqua* 増殖阻害物質の存在を認めた。

(3) 増殖阻害物質

前記の *C. antiqua* に対する増殖阻害物質の単離・同定のために、*A. hyalina* を f/2 培地を用いて無菌的に培養した。藻体 1×10^6 cells/ml 以上を含む培養液は、アルカリ性下において脂質の熱水抽出を行った。これを ODS 系前処理カラムで精製し、エタノールで抽出後、減圧下で溶媒を除去して抽出脂質を得た。この結果 *A. hyalina* の培養 (細胞濃度 1.6×10^6 cells/ml) 1 l 当たり約 3 mg の黄白色の脂質を抽出した。

抽出脂質は、一定量を f/2 培地に溶解後、 $20^\circ\text{C} \cdot 4,000\text{lux}$ (L/D=12/12) の条件下において、赤潮藻類3種 (*C. antiqua*・*Heterosigma akashiwo*・*Skeletonema costatum*) を用いたバイオアッセイを行い、細胞形状ならびに個体数の変化をモニターした。バイオアッセイの結果、濃度 50 ppm では *C. antiqua* ならびに *H. akashiwo* は3時間で、*S. costatum* は6時間で全細胞の死滅(破裂)が確認された。そこで、ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で抽出脂質の分画を行い、5つの主画分を得た(図 23)。分取した各画分は f/2 培地に溶解後、*C. antiqua* を用いたバイオアッセイを行った。その結果、画分4と5に増殖阻害作用があった。これら試料を蛍光ラベル化した後、さらに HPLC で分析した結果、画分4は1種類の脂肪酸であり、画分5は4種類の脂肪酸の混合物であることが示された。これらを、飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸の市販の標準物質の HPLC 分析結果と比較したが、ピークの一致は少なく、画分5に tetradecanoic acid ($\text{C}_{14:0}$) と hexadecaenoic acid ($\text{C}_{16:1}$) が認められただけで、ほかは高度不飽和脂肪酸であることが示唆された。

そこで、試料をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) でさらに分析し、増殖阻害物質として含まれる脂肪酸の構造を決定した(表6)。

(4) まとめ

本研究では、*A. hyalina* に含まれる高度不飽和脂肪酸にアレロパシーがあることが明らかにされ、これによる *C. antiqua* の増殖阻害が認められた。高度不飽和脂肪酸がアレロパシー物質として植物プランクトンに作用することに関しては、既にいくつかの研究例が報告されているが、本研究のように同一海域で採取された植物プランクトン間にアレロパシーが発見されたのは例が少なく、また自然生態系を研究する上で興味深い。

ケイ藻 *A. hyalina* のアレロパシー物質が、GC-MS 分析により hexadecatrienoic acid ($\text{C}_{16:3}$ 、以下 HDTA と略す) ならびに eicosapentaenoic acid ($\text{C}_{20:5}$ 、以下 EPA と略す) と

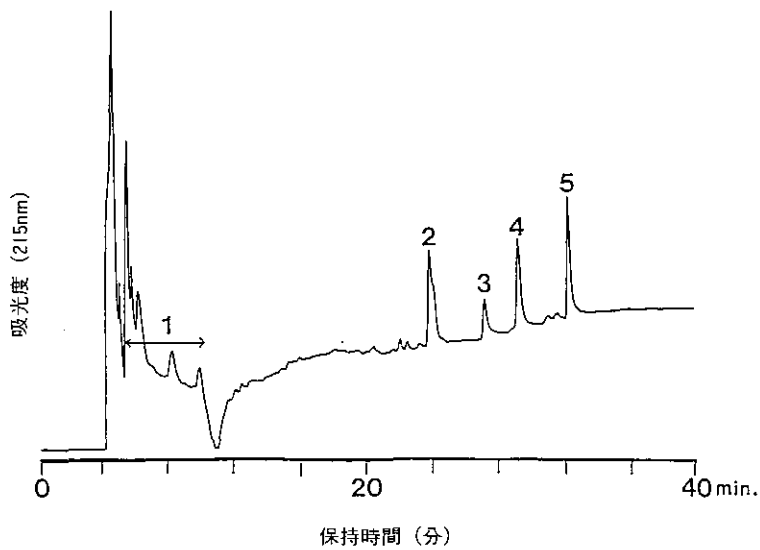


図23 高速液体クロマトグラフィー(215 nm)による *Amphiprora hyalina* から抽出された脂質の分画

表6 他感作用物質同定結果

画分	物質名	構成比 (乾重量) * (%)	
		A	B
画分4	hexadecatrienoic acid (C16:3)	0.99	14.8
画分5	eicosapentaenoic acid (C20:5)	0.34	4.9
	tetradecanoic acid (C14:0)	0.11	1.6
	hexadecaenoic acid (C16:1)	0.06	0.9
	hexadecadienoic acid (C16:2)	0.17	2.5

* 構成比A：抽出(全)脂質中における構成比
 構成比B：遊離脂肪酸における構成比

同定された(図24)。

これらの高度不飽和脂肪酸のうち EPA は、植物プランクトンの比較的多くの種類に存在が認められ、ケイ藻類においては特徴的な存在であることが知られている。また EPA が *C. antiqua* などに対してアレロパシーを示した例や *Staphylococcus* 等に対する抗菌活性を示した例等が報告さ

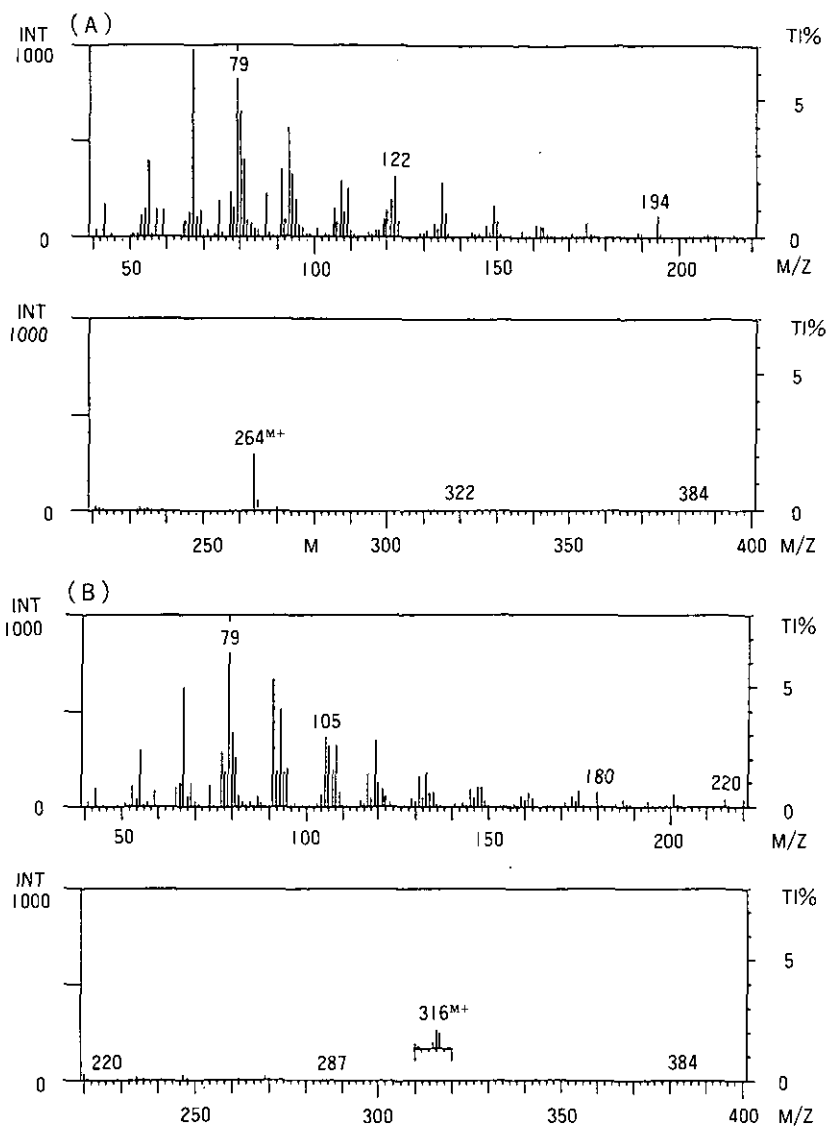


図24 *Amphiprora hyalina* 抽出脂質より分離された脂肪酸の質量スペクトラム
 (A) 画分 No.4 中の hexadecatrienoic acid.
 (B) 画分 No.5 中の eicosapentaenoic acid.

れている。

一方、HDTA は自然界では比較的珍しい存在とされるが、*A. hyalina* と同じナビキュラ科のケイ藻 *Navicula delognei* や、ケイ藻 *Thalassiosira* 2 種類にも存在が報告されている。しかし、HDTA については、その抗菌活性が報告されているものの、現在のところ植物プランクトンに対

するアレロパシーは報告されていない。したがって、アレロパシー物質として分離されたHDT Aが、非常に低濃度（約1 ppm）でも *C. antiqua* に増殖阻害を発現させることが認められた本実験成果は新しい知見であると考えられる。

B 赤潮藻類と細菌及び微小動物との相互作用に関する研究

(1) はじめに

内湾における赤潮の発生・消滅には物理的、化学的、生物的要因が密接に関連しているといわれている。しかし、これらの要因の中で生物的要因、特に細菌が赤潮藻類に与える影響、赤潮藻類に対する動物プランクトンの捕食作用という重要な要因について定量的な研究が少ないのが現状である。

本研究では赤潮の発生・消滅に関連の深い細菌 *Vibrio alginifestus* が各種赤潮藻類の生存・増殖抑制に対しいかなる効果を有するか、また、赤潮藻類を捕食する微小動物として、沿岸海域で普通に見られる原生動物有鐘類 *Favella taraikaensis*、魚類の養殖用餌料として重要な袋形動物輪虫類 *Brachionus plicatilis* に着目し、赤潮藻類の生存・増殖にいかなる効果を有するかを基礎的研究を行うことにより明らかにすることを目的として実験的検討を行った。

(2) 実験材料と方法

(a) 供試藻類と前培養

実験に供した赤潮藻類は、渦ベン毛藻の *Heterocapsa triquetra*、ラフィド藻の *Chattonella antiqua*、*C. marina*、*Heterosigma akashiwo*、緑藻の *Oltmansiellopis viridis*、プラシノ藻の *Pyramimonas amyliifera*、ケイ藻の *Skeletonema costatum*、ラン藻の *Oscillatoria amphibia* を使用した。

これらの赤潮藻類は国立環境研究所微生物系統保存施設より分譲されたものであり、300 ml 容三角フラスコに Guillard の f/2 培地約 100 ml 中で1か月間培養した。このときの培養条件は 20°C、静置、3,000 lux の照度で明期 12 時間、暗期 12 時間（明期 6：00～18：00）の断続光とした。なお、使用した海水は八丈島沖で採水したものをミリポア水で塩分濃度を 25‰ に調整し、ろ過滅菌したものをを用いた。

(b) 供試細菌と前培養

細菌による赤潮藻類の生存能に及ぼす影響を見るためにベン毛桿菌 *Vibrio alginifestus* (図 25) を使用した。また *V. alginifestus* の効果を見るために同じ *Vibrio* 科の細菌である *Flavobacterium okeanokoites* を用いた。これらはいずれも IFO より分譲され、100 ml 容三角フラスコに *Vibrio* 用培地 100 ml で 30°C、150 rpm で 1 日間培養した。

(c) 供試微小動物と前培養

赤潮藻類に対する微小動物の捕食作用を見るために、各種微小動物の中で培養特性、増殖特性が明らかとなっている原生動物繊毛虫有鐘類 *Favella taraikaensis* 及び袋形動物輪虫類 *Brachionus plicatilis* (L型) を用いた。*F. taraikaensis* は 500 ml 容三角フラスコにポアサイズ 0.45 μm のミリポアろ紙でろ過した現場海水約 200 ml で 20°C、静置、2,000 lux の連続光のもとで赤潮藻類 *H. triquetra* を食物源として供与したものをを用いた。

Brachionus plicatilis (L型) は八丈島沖で採水された海水の塩分濃度を 25‰ に調整したもので培養した。食物源としてはこの海水に栄養塩を添加した培地 5 l で 2,000 lux の連続光のもとで静置、ばっ気をしながら培養した海産の緑藻 *Chlorella* sp. を与えた。*F. taraikaensis*, *B. plicatilis* の形態をそれぞれ図 26, 27 に示す。

(d) 細菌と赤潮藻類の二者培養

細菌 *V. alginifestus* の影響を見るために 50 ml 容三角フラスコに赤潮藻類を 1 か月間培養したものを 3 ml, f/2 培地を 23 ml 入れ、この中に *V. alginifestus* の培養液を 4 ml 加え、これに多孔質のシリコン栓でふたをした。対照として *V. alginifestus* の培養液 4 ml の代わりに *Vibrio* 用培地 4 ml を加えたものをを用いた。なお、これらの 50 ml 容三角フラスコは 20°C、3,000 lux で明期 12 時間の断続光下においた。

(e) 微小動物と赤潮藻類との二者培養

Favella taraikaensis 及び *Brachionus plicatilis* (L型) の赤潮藻類に対する捕食作用を見るために、培養した赤潮藻類を直径 3 cm のシャーレに 3 ml 入れ、この中にキャピラリーで *F. taraikaensis* については 3 個体、*B. plicatilis* については 6 個体入れ、増殖の可否を見た。培養基のシャーレは、25°C、静置で *F. taraikaensis* では 2,000 lux 連続光下、*B. plicatilis* では暗条件下においた。

(f) 測定方法

赤潮藻類の *V. alginifestus* に対する感受性試験は、よく振った 50 ml 容三角フラスコから 1 時



図25 ビブリオ細菌の形態

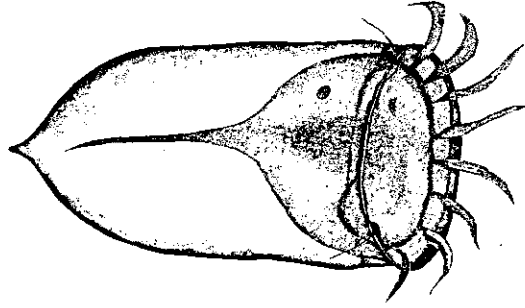


図26 原生動物 *Favella taraikaensis* の形態

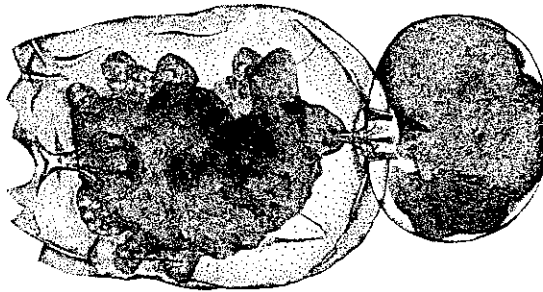


図27 輪虫類 *Brachionus plicatilis* の形態

間おきに 50 μ l 取り出し顕微鏡で個体数を計測するという操作を 6 時間続けた。

実験に供した赤潮藻類の中で最も *V. algoinfestus* に感受性の高い種については、よく振った 50 ml 容三角フラスコから 1 日おきに 50 μ l 取り出し顕微鏡で個体数を計測するという操作を 15 日間続けた。

微小動物による赤潮藻類の捕食試験は、1 日おきに実体顕微鏡で全個体数を計測し、このとき微小動物が赤潮藻類に対しどのような行動をとるかということも併せて観察した。

(3) 結果及び考察

(a) 赤潮藻類の生存、増殖に及ぼす細菌 *V. algoinfestus* の効果

V. algoinfestus はいずれの赤潮藻類にも抑制効果を発揮するが、*H. triquetra* に対しては他の赤潮藻類と比べてあまり効果がみられないことが分かった。一方、*C. antiqua*, *C. marina*, *H. akashiwo* などのラフィド藻の中では、特に *C. antiqua* に対して抑制効果の大きいのが認められた。

V. algoinfestus は供試赤潮藻類の中で最も *C. antiqua* に感受性が高いということが明らかになったので、細菌類の中で *V. algoinfestus* が特異的に抑制効果を有しているのか否かを明らかに

するために通常海域に生息する細菌である *Flavobacterium okeanokoites* を用いて *C. antiqua* に対する生存, 増殖能を調べた。結果は図 28 に示すとおりである。これより *F. okeanokoites* は *C. antiqua* に対してほとんど生存, 増殖抑制能はなく *C. antiqua* に対する抑制効果は *V. alginifestus* に特有のものであることが確認された。

(b) 赤潮藻類の生存, 増殖に及ぼす微小動物の効果

F. taraikaensis が沿岸水域の塩濃度下で増殖しやすい種であることを培養実験で明らかにできたことから *F. taraikaensis* に食物源として赤潮藻類を供試した場合の挙動と増殖能を見た。結果は表 7 に示すとおりである。*F. taraikaensis* は *H. triquetra* をよく捕食して増殖するが, 他の赤潮藻類の *O. viridis*, *P. amylifera* では捕食が認められる程度であった。一方, 捕食されなかった赤潮藻類は *C. antiqua*, *C. marina*, *H. akashiwo*, *O. amphibia*, *S. costatum* であった。また, *B. plicatilis* (L型) に食物源として赤潮藻類を供試した場合の挙動と増殖を見た。結果は表 8 に示すとおりである。本表より *B. plicatilis* (L型) は緑藻の *O. viridis*, プラシノ藻の *P. amylifera* をよく捕食することが分かる。なお, *S. costatum*, *O. amphibia* は凝集してフロック状になったものを *B. plicatilis* (L型) が捕食しているところは観察できたが, 増殖能はあまり高くないことが分かった。

F. taraikaensis 及び *B. plicatilis* (L型) の摂餌選択性が明らかとなり, 双方とも赤潮藻類の *H. triquetra* を捕食可能なことが分かった。そこで, *H. triquetra* 由来の赤潮が発生している現場において *F. taraikaensis* 及び *B. plicatilis* が捕食により赤潮藻類を消滅させる上でいかなる効果を有しているかについてシミュレーションを行ったが, 適正環境条件のもとではこれらの微

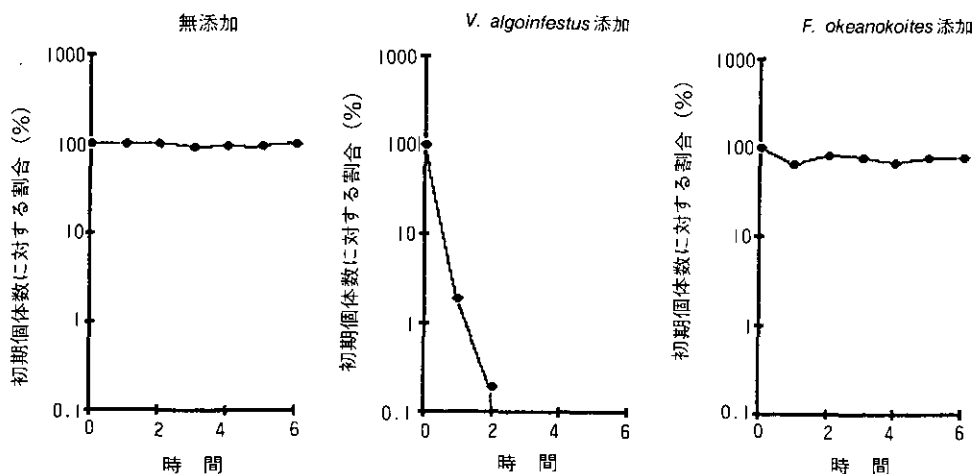


図28 *C. antiqua* の生存に及ぼす *V. alginifestus* 及び *F. okeanokoites* の影響の比較

小動物の捕食能により赤潮は短期間に消滅する可能性の高いことを推定できた。

表7 *Flavobacterium taraikaensis* の摂餌選択性

赤潮藻類	<i>F. taraikaensis</i>
<i>H. triquetra</i>	++
<i>C. antiqua</i>	-
<i>C. marina</i>	-
<i>H. akashiwo</i>	-
<i>O. viridis</i>	+
<i>P. amyliifera</i>	+
<i>S. costatum</i>	-
<i>O. amphibia</i>	-

++ : よく捕食する, + : 捕食する, - : 捕食しない

表8 *Brachionus plicatilis* の摂餌選択性

赤潮藻類	<i>B. plicatilis</i>
<i>H. triquetra</i>	++
<i>C. antiqua</i>	-
<i>C. marina</i>	-
<i>H. akashiwo</i>	-
<i>O. viridis</i>	++
<i>P. amyliifera</i>	++
<i>S. costatum</i>	+
<i>O. amphibia</i>	+

++ : よく捕食する, + : 捕食する, - : 捕食しない

(4) まとめ

赤潮藻類として渦ベン毛藻類, ラフィド藻類, 緑藻類を用い分解者, 捕食者として細菌類 *V. alginifestus*, 微小動物 *F. taraikaensis*, *B. plicatilis* を対象として相互作用の観点から, 赤潮藻類の消滅との関係について検討を加えた。その結果, 赤潮藻類の消滅分解に対して, 細菌類, 微小動物が大きな効果を有しており, これらの分解能, 捕食能が赤潮藻類の消滅と密接に関係する重要な生物学的因子であることが明らかになった。

2.2.3 富栄養化が赤潮発生に及ぼす影響評価

(1) はじめに

富栄養化現象が, 赤潮発生にどのように結びついているのかを明らかにするためには, 赤潮発生環境のモニター (2.1.1 項) と併行して, 制御された実験系での赤潮生物の「富栄養化」(例えば N, P-栄養塩等の添加) に対する応答を定量的に把握することが重要である。

このような観点から, 次の3つの研究を行った。

- 1) 夏の瀬戸内海における *Chattonella antiqua* の増殖速度制限因子の推定
- 2) *Chattonella antiqua* の増殖速度の N, P-栄養塩濃度依存性
- 3) *Chattonella antiqua* 赤潮発生と微量元素 (Fe, Cu) の関係

そして得られた結果を, 現場観測データに照らし合わせることで, *C. antiqua* 赤潮の発生に, 富栄養化物質 (N, P) や微量元素がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目標とした。

(2) 夏の瀬戸内海における *Chattonella antiqua* 増殖速度制限因子の推定

2.1.1項において、夏の家島諸島(瀬戸内海)のN, P-栄養塩濃度は、温度躍層より上で低く、下で高い値をとることを述べた。また、赤潮発生年は、非発生年に比べて、高濃度の栄養塩を含む層が、より浅い深度にまで存在していることを示した。しかしながら、このような栄養塩分布の発生年・非発生年での差が、*C. antiqua* 赤潮の発生に果たして重要な役割を演じているのかどうかを明らかにするためには、躍層上(下)の「低(高)濃度」栄養塩レベルの海水が *C. antiqua* の速やかな増殖を維持しうるのか否かを示す必要がある。(躍層上の栄養塩濃度が「低い」といっても、それは躍層下での値と比較した相対的なものであって、このような「低い」栄養塩レベルの海水でも、*C. antiqua* の速やかな増殖が起こりうる可能性は実験によって検証しない限り否定できない。また、*C. antiqua* の増殖に必須であるビタミンB₁₂についても現場における濃度が、*C. antiqua* の増殖を律速しうるか検討する必要がある。

本研究においては、1986年夏(赤潮非発生)の、家島諸島定点Aの海水(低栄養塩レベルの表層海水と高栄養塩レベルの25m層海水)を試水として用い(1986年の調査期間中、合計4回採水)*C. antiqua* の培養株を半連続培養系(希釈率0.5/d)で培養した。そして現場の海水が、*C. antiqua* の速やかな増殖を維持できるかどうかを増殖速度を指標として検討した。実験に際しては、温度・照度・微量元素レベルを本種の増殖の最適値に設定した。また海水は、ヌクレオアフィルター(孔径0.4μm)でろ過したものを使用した。さらに、これらの海水に硝酸塩(10μM)、リン酸塩(1μM)、ビタミンB₁₂(2ng/l)を添加した際、増殖速度がどのように変化するかについても併せ検討した。

得られた結果の代表的な例を図29に示す。他の海水で得られた結果も図29と同様のパターンを示した。つまり、

- 1) 低濃度(NO₃⁻<0.2μM, NH₄⁺<0.2μM, PO₄³⁻<0.05μM)の栄養塩しか含まない表層海水中では、*C. antiqua* の増殖速度は極めて小さい(<0.1/d)。
- 2) 表層海水に硝酸塩、リン酸塩、ビタミンB₁₂を単独で添加しても増殖速度の増加はほとんど認められない。
- 3) 表層海水に硝酸塩とリン酸塩を同時に添加すると、(B₁₂は添加せずとも)増殖速度は、通常の培養系で得られる値(〜0.7/d)と同程度の大きな値を示すようになる。
- 4) 高濃度の栄養塩を含む25m層の海水では、N, P, B₁₂を添加せずとも *C. antiqua* の増殖は極めて速やかである。

以上の結果から、夏の瀬戸内海において、*C. antiqua* の増殖を制限する因子につき次の結論が得られた。

- 1) 表層海水中のN, Pレベルは、両者とも、*C. antiqua* の速やかな増殖を維持するには不十分である。
- 2) 表層、25m層中のビタミンB₁₂(>2ng/l)は、既に充分存在していて、*C. antiqua* の律

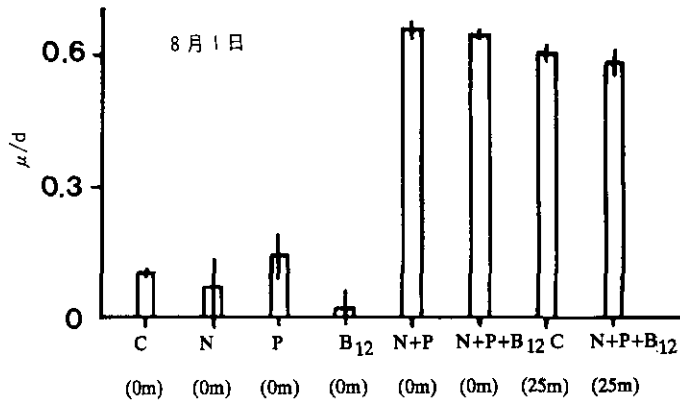


図29 *Chattonella antiqua* の増殖速度制限因子の推定
1986年（非発生年）、定点A（図1：0,25m）の海水を実験に使用。 μ は増殖速度、C, N, P, B₁₂はそれぞれコントロール、硝酸塩、リン酸塩、B₁₂の添加を示す。

速因子とはなり得ない。

- 25 m 層の海水中の N, P-レベルは、*C. antiqua* の速やかな増殖を維持するのに充分な量が存在している。

(3) *Chattonella antiqua* の増殖速度の栄養塩濃度依存性

前項において、夏の瀬戸内海の表層海水中の N, P は *C. antiqua* の速やかな増殖を維持できないが、水温躍層下の N, P は充分な量存在していることを示した。しかしながら、富栄養化が、赤潮発生に及ぼす影響を評価するためには、どの程度の栄養塩レベルであれば、*C. antiqua* は速やかな増殖を維持しうるのかを明らかにする必要がある。そこで、ろ過した黒潮海水 (NO_3^- $0.6\mu\text{M}$, PO_4^{3-} $0.07\mu\text{M}$, $\text{NH}_4^+ < 0.2\mu\text{M}$) を試水として用い、この中に硝酸塩、アンモニウム塩、リン酸塩を系統的に添加し *C. antiqua* を前述の半連続培養系で培養することで、増殖速度の N, P-栄養塩濃度依存性を検討した。実験に際しては、温度、照度、ビタミン B₁₂ 及び微量元素濃度を、本種の増殖の最適値に設定した。実験は次の 5 シリーズについて行った。

- 1) 硝酸塩が海水中に高濃度存在している場合 ($6\mu\text{M}$) の増殖速度のリン酸濃度依存性
- 2) リン酸塩が高濃度存在している場合 ($0.6\mu\text{M}$)、増殖速度の硝酸塩、アンモニウム塩濃度依存性
- 3) 硝酸塩がある程度増殖を律速している場合 ($1.4\mu\text{M}$) の増殖速度のリン酸塩濃度依存性
- 4) リン酸塩がある程度増殖を律速している場合の増殖速度の硝酸塩濃度依存性
- 5) 硝酸塩 ($1.4\mu\text{M}$)、リン酸塩 ($0.18\mu\text{M}$) とともに、増殖を律速するレベルにある場合の増殖速度

図 30 に 1), 2) の実験で得られた結果を示す。いずれの場合も、増殖速度 (μ) は栄養塩濃度 (S) の関数として、いわゆる Michaelis-Menten タイプの式で記述された。

$$\mu = \frac{\mu_0 \cdot S}{K + S} \quad (1)$$

ここで μ_0 は S 無限大での増殖速度、K は半飽和定数 ($\mu = \mu_0 / 2$ を与える S の値) である。K はリン酸塩に対しては $0.11 \mu\text{M}$ 、硝酸塩に対しては $1.0 \mu\text{M}$ であった。これらの値は栄養塩摂取速度の栄養塩濃度依存性と増殖速度の体内 N、P 濃度依存性から概算される値と、ほぼ同程度の値であった。また、図 30 B に見られるように、窒素源を硝酸塩からアンモニウム塩に切りかえても、増殖速度に有意の変化は見られなかった。

図 31 に 3), 4) の実験で得られた結果を示す。いずれの場合も、基質濃度無限大に外挿した増殖速度は図 30 に示した結果に比べて小さいものの、リン酸塩(硝酸塩)濃度に対して Michaelis-Menten 的に増加した。

表 9 に、硝酸塩、リン酸塩濃度とも半飽和定数と同程度である場合の増殖速度を示した。対照として、硝酸塩(リン酸塩)のみが半飽和定数近くにあり、リン酸塩(硝酸塩)は大過剰に存在している場合の結果も示した。その結果、硝酸塩、リン酸塩ともに半飽和定数と同程度である場合の増殖速度は、硝酸塩(リン酸塩)が単独で半飽和定数近くにある場合に比べて明らかに小さいことが判明した。

図 30, 31, 表 9 で得られた結果を統一的に整理するために、*C. antiqua* の硝酸塩、リン酸塩濃度依存性は、下に示すような Michaelis-Menten タイプの式の掛け合わせで表されることを仮定した。

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_{\text{NO}_3}}{K_{\text{NO}_3} + S_{\text{NO}_3}} \cdot \frac{S_{\text{PO}_4}}{K_{\text{PO}_4} + S_{\text{PO}_4}} \quad (2)$$

図 30 で得られた結果から $\mu_{\max} = 1.0/\text{d}$ 、 $K_{\text{NO}_3} = 1.0 \mu\text{M}$ 、 $K_{\text{PO}_4} = 0.11 \mu\text{M}$ を得る。この式に基づき、硝酸塩(リン酸塩)が、半飽和定数と同程度であるときのリン酸塩(硝酸塩)濃度依存性を計算すると(図 31 実線)、この式は実験結果をうまく説明している。さらに、硝酸塩、リン酸塩とともに半飽和定数近くにある場合の増殖速度(表 9)も上式によってよく説明されている。こうして *C. antiqua* の増殖速度の硝酸塩、リン酸塩濃度依存性は Michaelis-Menten タイプの式の掛け合わせとして記述されることが判明した。さらに、図 30 に示すように、窒素源を硝酸塩からアンモニウム塩に置き換えても増殖速度の変化は認められない。そこで式(2)はさらに、次のように変形させることができる。

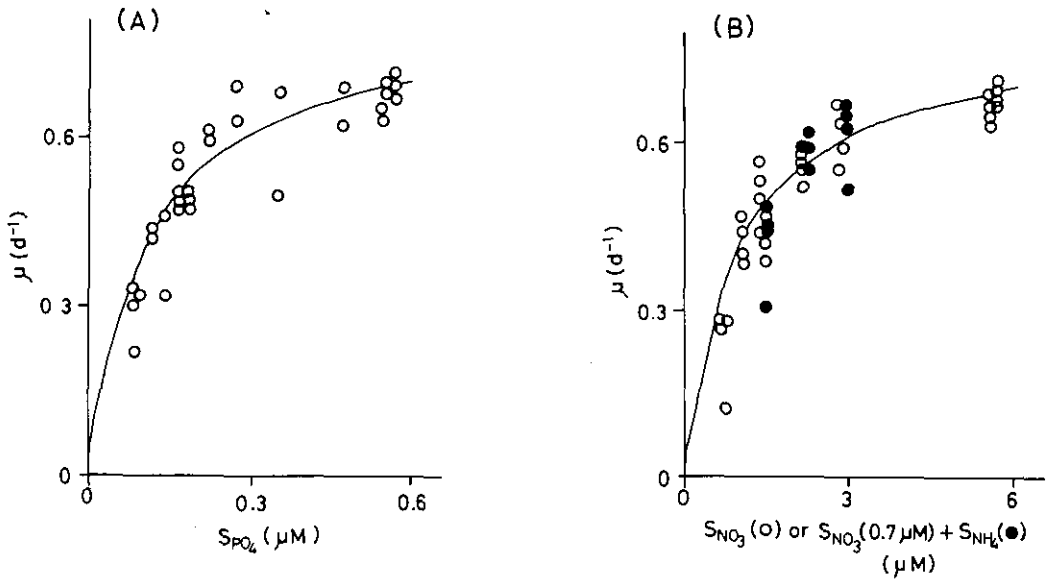


図30 (A) *Chattonella antiqua* 増殖速度 (μ) のリン酸塩濃度 (S_{PO_4}) 依存性；硝酸塩 (6 μM) が充分存在している場合と (B) *Chattonella antiqua* 増殖速度 (μ) の硝酸塩濃度 (S_{NO_3}) 依存性；リン酸塩 (0.6 μM) が充分存在している場合

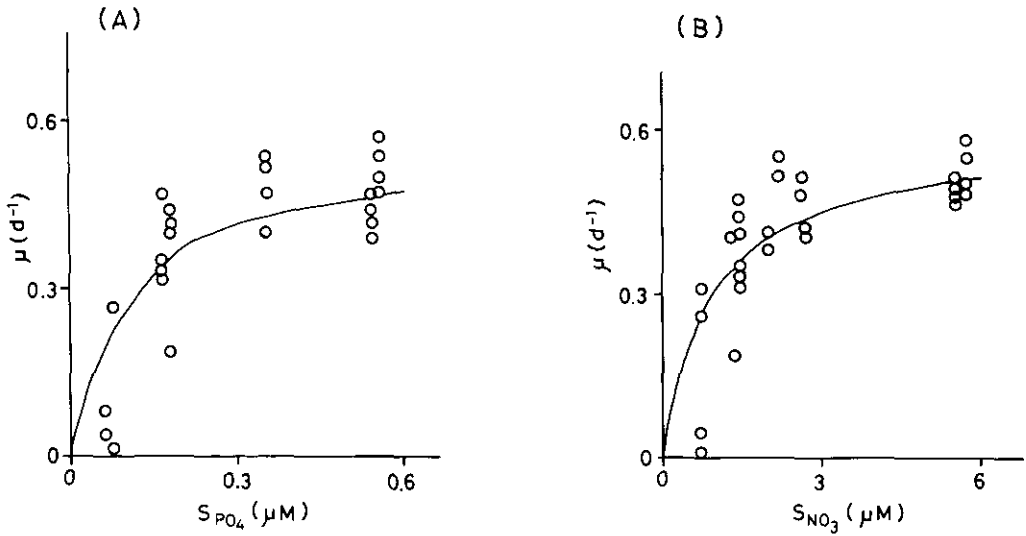


図31 (A) *Chattonella antiqua* 増殖速度 (μ) のリン酸塩濃度 (S_{PO_4}) 依存性；硝酸塩 (1.4 μM) が増殖を制限している場合と (B) *Chattonella antiqua* 増殖速度 (μ) の硝酸塩濃度 (S_{NO_3}) 依存性；リン酸 (0.18 μM) が増殖を制限している場合

表9 硝酸濃度 (SNO₃), リン酸濃度 (SPO₄) とともに増殖の半飽和定数に近い場合の *Chattonella antiqua* の増殖速度 (μ)

SNO ₃ (μM)	SPO ₄ (μM)	測定回数	μ _{obs} (d ⁻¹)	標準偏差(d ⁻¹)	μ _{calc} (d ⁻¹) ^{a)}
1.1	0.13	8	0.21	0.06	0.27
5.6	0.13	4	0.41	0.06	0.49
1.1	0.57	4	0.43	0.04	0.42

^{a)} μ_{calc} は式 (5) から計算した増殖速度。

$$\mu = \mu_{\max} \frac{(S_{NO_3} + S_{NH_4})}{K_N + (S_{NO_3} + S_{NH_4})} \cdot \frac{S_{PO_4}}{K_P + S_{PO_4}} \quad (3)$$

ただし, μ_{max} = 1.0/d, K_N = 1.0μM, K_P = 0.11μM

C. antiqua は増殖のための窒素源として硝酸塩, アンモニウム塩を利用できるが有機態の窒素 (アミノ酸) は利用できない。また本種のアルカリホスファターゼ活性はリン枯渇条件下でもきわめて小さいため, 有機リン酸エステルをリン酸源として利用できない。したがって, 海水中の硝酸塩, アンモニウム塩, リン酸塩濃度がわかれば, 式 (3) に基づき—他の条件 (温度, ビタミン B₁₂ 等) が最適である場合—その海水で, *C. antiqua* がどの位の速さで増殖しうるかが推定できる。換言すれば, 式 (3) によって海水中の N, P 環境を, *C. antiqua* 赤潮発生との対応において評価することが可能となった。なお, 実用的には *C. antiqua* が好適条件下で示す増殖速度 (μ_{max} = 0.7/d) で式 (3) を除して無次元化したパラメーター GP (式 (4)) によって, 海域の N, P 環境を評価している (2.1.1 項参照)。

$$GP = \mu / \mu_{\max} = 1.4 \cdot \frac{S_N}{1.0 + S_N} \cdot \frac{S_{PO_4}}{0.11 + S_{PO_4}} \quad (4)$$

ただし, S_N = SNO₃ + SNH₄

(4) *Chattonella antiqua* 赤潮の発生と微量元素 (Fe, Cu) の関係

本項 (1), (2) で *C. antiqua* 赤潮の発生に, 窒素とリンが重要な役割りを果たしていることを述べた。しかしながら, 海域において本種の増殖を左右する可能性のある因子としては, N, P, ビタミン B₁₂ 以外に微量元素, 特に鉄と銅が考えられる。これらの元素に対する植物プランクトンの応答は種ごとに大きく異なっているために海域での鉄と銅の消長が, 特定種の卓越や, ひいては赤潮の発生に深くかかわっているのではないかという議論がなされてきた。このような観点から 2.1.1 項に示したように, 家島諸島における「溶存」(0.8μm 通過) 鉄と銅の表層濃度を

1986～1988年にわたってモニターしてきた。さらに、先の特別研究において、銅による *C. antiqua* の増殖阻害を調べ、増殖速度 (μ) が次式で近似できることを見いだした。

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{1}{1 + K (a_{Cu})^2} \quad (5)$$

ただし、 a_{Cu} は銅アコイオン活量、 K は任意定数 ($2.8 \times 10^{20} \text{mol}^{-2} l^2$) であり、 μ_m は増殖阻害の存在しないときの増殖速度である。また、増殖の半阻害 ($\mu = \mu_m/2$) を与える $pCu (= -\log a_{Cu})$ は 10.2 である。そして、瀬戸内海海水中の溶存銅 ($\sim 10 \text{ nM}$, 表 2 参照) が無機イオンのみと錯形成を行っていると仮定するなら、海水の pCu は 10.0 (増殖を著しく阻害するレベル, $\mu = 0.26 \mu_m$) となるので、赤潮の発生には、有機物との錯形成による銅の無毒化が重要であると推察された。

本研究においては、上記の結果を踏まえ、次の 2 点につき検討を行った。

- 1) 瀬戸内海の海水中の鉄は *C. antiqua* の速やかな増殖を維持できるのか?
- 2) 海水中の銅は有機物との錯形成により無毒化されているのか?

実験に供した海水は家島諸島定点 B の表層海水である。採水後、現場の実験場にて $0.8 \mu\text{m}$ のフィルターで海水のろ過を行い、一部は Fe, Cu の定量に供するとともに、残りのろ液を鉄及び銅に関する実験に使用した。

鉄に関する実験では、ろ過海水に N, P, B_{12} を十分な量添加し、さらに鉄 (FeCl_3 , $0.1 \mu\text{M}$), EDTA ($1 \mu\text{M}$) を添加して得られる 4 種類の培地 (コントロール, +Fe, +EDTA, Fe+EDTA) での *C. antiqua* 培養株をモニターした。

銅については、ろ過海水に N, P, B_{12} , Fe を十分な量添加した後、この海水に無機態の銅を $0 \sim 130 \text{ nM}$ の範囲で添加し、得られた一連の培地中での *C. antiqua* の増殖速度をバッチモードでモニターした。

図 32 に、鉄に関する実験結果の代表例を示す。実験は 3 年間にわたり都合 8 回行ったが、非発生年の 6 例と、発生年のうち赤潮形成前の 1 例については、本図 A で示すようなパターンが得られた。すなわち、鉄も EDTA も添加しないコントロールの増殖速度は、最大増殖速度 ($0.7/\text{d}$) に比べてかなり低い。そして、EDTA を単独で添加しても増殖速度の回復は認められないが、無機鉄を単独で添加すると増殖速度は増加して、最大増殖速度に近づく。このことは、通常の家島の表層海水中の鉄は *C. antiqua* の最大増殖速度を維持できないことを示している。一方、*C. antiqua* が個体群を活発に拡大している場合 (1987 年 7 月 29 日, 図 32), コントロールの増殖速度は大きな値 ($\sim 0.65/\text{d}$) をとり *C. antiqua* は鉄不足から免れている。しかしながら、この際の海水中の溶存鉄濃度は、他の 7 例と比較しても有意な差は認められなかった。このことは、「溶存」鉄の大部分は *C. antiqua* の増殖に積極的に利用されず、「溶存」鉄濃度だけでは鉄不足の指標となり得ないことを示している。

通常の(赤潮が個体群を拡大していない)状況下では、表層海水中の鉄は *C. antiqua* の最大増殖速度を維持できないことが示された。しかしながら、コントロール(=N, P 添加, Fe 無添加)での増殖速度は最大増殖速度の半分以上($\sim 0.4/d$)であり、図 29 のコントロール(=N, P 無添加, Fe 添加)での増殖速度($< 0.2/d$)に比べてはるかに大きい。さらに、1987 年の赤潮に際し、*C. antiqua* 個体群の増加速度は $0.21/d$ (図 2)であり、鉄無添加のコントロールで得られる値($\sim 0.4/d$)よりもかなり小さい。これらの結果から、海水中の鉄は、*C. antiqua* の増殖を支配する因子として潜在的に重要であるものの、N, P に比べると、その重要性は小さいと考えられる。

図 33 に銅に関する実験結果の代表的な例を示す。赤潮の発生、非発生にかかわらず得られた結果は、ほぼ同一であり、現場海水中の銅濃度(~ 10 nM)の 10 倍程度の Cu を加えて初めて、増殖は阻害された。このことは、海水中の銅のかなりの部分は天然の有機物と錯形成して無毒化されていることを示している。さらに、この銅による滴定曲線と増殖速度の a_{Cu} 依存性(式(5))、海水中の溶存銅全濃度を併せることで、海水中の pCu 及び有機物と錯形成している銅の割合を推定することができる。この結果、海水中の pCu は $11.5\sim 11.7$ 程度であり、銅の 97% 以

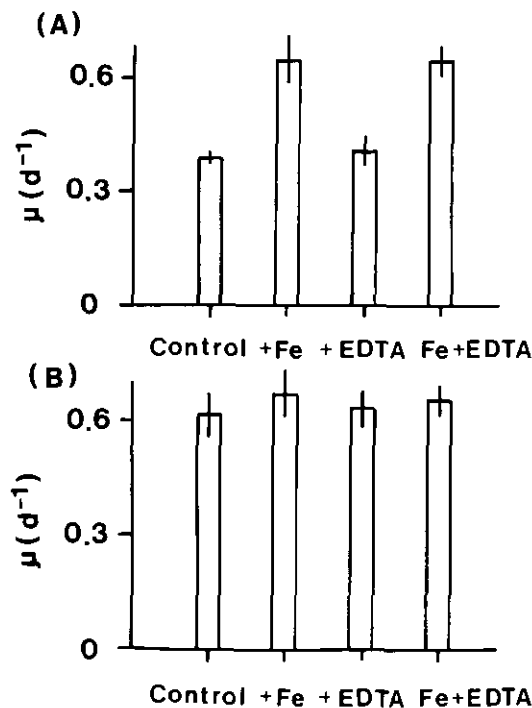


図32 鉄, EDTA 添加による *Chattonella antiqua* 増殖速度への影響
 (A) *C. antiqua* が卓越していない場合 (1987年7月23日)
 (B) *C. antiqua* が赤潮を形成し、個体群を活発に拡大している場合 (1987年8月5日)

上が有機物と錯形成していることが判明した。さらに、海水中の全 Cu 濃度が現在の3倍程度に増加したとしても、pCu は 11.1 程度であり、*C. antiqua* の増殖を阻害しないことが判明した。こうして、海水中の銅は、海水中の豊富な有機物によって常に無毒化されており、赤潮の発生には重要な役割を果たしていないと考えられた。

2.2.4 赤潮生物の生活史に関する研究

(1) はじめに

現場観測及び室内実験の結果(2.2.1, 2.2.3 項)を併せることにより *Chattonella antiqua* がどのような条件下個体群を拡大して赤潮を形成しうるのかがある程度明らかとなった。しかしながら、これまでの研究は、赤潮の原因となる *C. antiqua* の遊泳細胞の増殖と、環境因子との関連について検討したのみであって *C. antiqua* の「生活史」については、全く考慮が払われていなかった。

赤潮を形成する植物プランクトンの多くは1年を通じて水の中で生活している訳ではなく、かなりの期間は底泥中で休眠胞子(シスト)として生活している(図34)。そして、底層水温の上昇といったなんらかの刺激に反応して、シストは発芽を行い、水中に遊泳細胞を放出する。さらに周囲の環境が遊泳細胞の増殖にとって好適であるときに、遊泳細胞は細胞分裂を繰り返し個体群を拡大し、赤潮を形成する。また赤潮形成後環境が(栄養塩の枯渇等により)増殖に不都合に

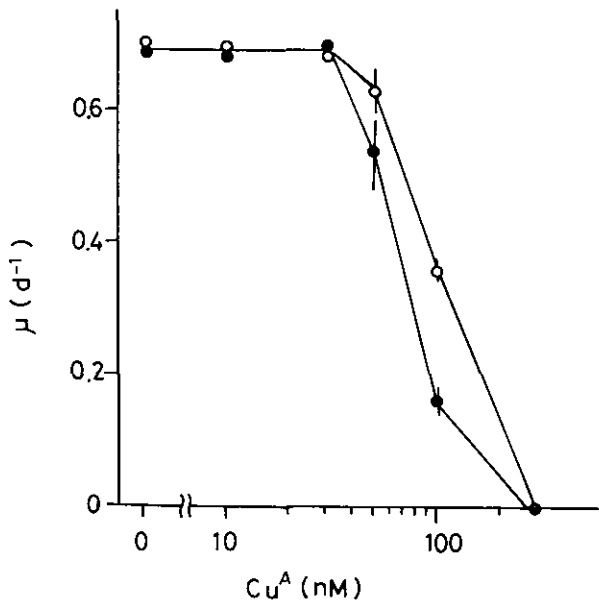


図33 無機態の Cu を加えたときの *Chattonella antiqua* の増殖速度の変化
○; 1986年8月6日, ●; 1987年8月5日

なると、遊泳細胞からシストが形成され、底泥に沈降して来年になるまでの眠りにつく。このような赤潮生物の生活史に関するイメージは1980年代に渦ベン毛藻赤潮 (*C. antiqua* とは綱を異にする)の研究を通じて確立されたものである。そして、どのような条件下でシストが発芽や形成を行っているかを明らかにすることは、赤潮の初期発生や消滅過程を理解し、将来、赤潮の発生子測を行う上で重要である。

冬の瀬戸内海の底泥を培地に懸濁して培養すると *C. antiqua* の遊泳細胞が出現する。このことから、本種もシストとして越冬していると考えられてきた。しかしながら泥中のどの粒子がシストなのかが分からなかったため、*C. antiqua* の生活史研究は最近までほとんど手つかずの状態であった。ところが、1988年になって、今井により、瀬戸内海の底泥から本種のシストが単離され、生活史解明の口火を切った。

このような背景のもと、本特別研究では、*C. antiqua* の生活史解明のため以下の研究を行った。

1) *C. antiqua* シストの培養系での形成と形成過程の解明

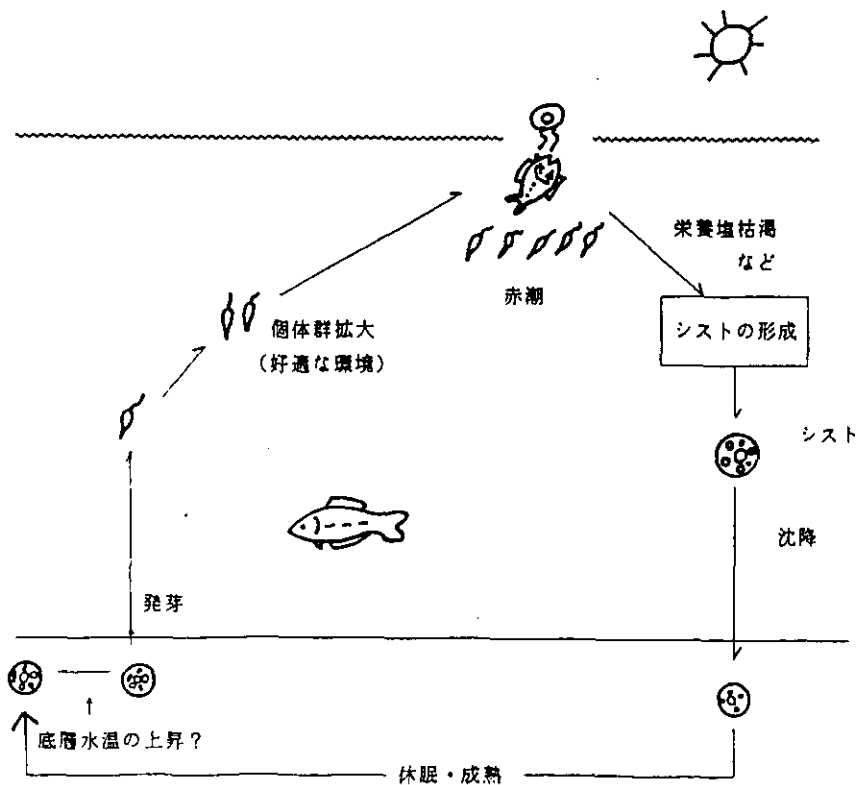


図34 赤潮生物の生活史 (模式図)

2) *C. antiqua* のシスト形成条件の解明—現場におけるシストフラックスの追跡とバッチ系でのシスト形成量の環境因子依存性

(2) *Chattonella antiqua* のシストの培養系での形成と形成過程の解明

シストの形成・発芽を環境因子との対応で明らかにするためには、環境の制御された培養系でシストを形成させることが重要である。本研究においては、培養系でのシスト形成の確立と、シストがどのようなプロセスを経て形成されるのかを明らかにした。

(a) シスト形成法の確立

C. antiqua のクローン株 (A-0, B-20) をリン制限培地 ($1 \mu\text{M PO}_4^{3-}$) に植え継ぎ、通常の培地条件下 (25°C , $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12:12 LD) 培養した。増殖がピークに達した時点で培地の底にカバーガラスを敷き詰め、培養を暗所に移して培養を継続した。1週間後カバーガラスを取り出して検鏡するとシストがこの上に形成されていた(図35)。形成量は約 $50 \text{ cysts}/\text{cm}^2$ であった。そして形成されたシストを 10°C の暗所で5か月間保存した後、再び、通常の培地条件に戻すと、シストから、遊泳細胞の出現が認められた。

(b) シスト形成過程の解明

シストがどのようなプロセスを経て形成されるのか、(特に、有性生殖によって形成されるのか否か)を明らかにするための第1段階として、シスト中のDNA含量を定量し、遊泳細胞(G_1 期)のそれと比較した。DNAは、Hoechst 溶液で核を染色し、その蛍光強度を測光することで定量した。その結果、シストは1つの核を持ち、しかもそのDNA含量は G_1 期の遊泳細胞での値の2倍であることが分かった。このことは、2つの遊泳細胞が合体し、その後、各々の遊泳細胞由来の核が融合してシストが形成されていること—つまり、シストは、有性生殖によって形成されること—を強く示唆している。

さらにシストの形成が同一クローン内で生じるのか否かを調べたところ、シストはクローン内でも形成されるものの、形成量は、2つのクローン株を混ぜた場合に比べて著しく小さいことが

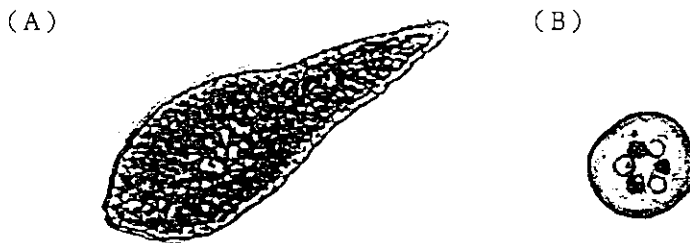


図35 *Chattonella antiqua* の (A) 栄養細胞, (B) シストの顕微鏡写真

判明した。この結果も、シストが無性的に形成されると考えられると説明されず、有性生殖によって形成されることを支持している。

以上のような知見を基に、シスト形成過程の追跡を光学顕微鏡下で行った。その結果、

- 1) 培地中のリン(ないし窒素)が枯渇し、増殖がピークに達した時点で、通常の遊泳細胞(図 36 A; $\sim 100 \mu\text{m}$)から微小遊泳細胞(図 36 B; $\sim 30 \mu\text{m}$)が形成される。
- 2) 微小細胞は、暗黒下に放置されることで、細胞の融合を行い(図 36 C) 三角形の遊泳細胞(planozygote, 図 36 D)になる。
- 3) この三角細胞は、カバーガラス等に付着してシスト(図 36 E)になることが判明した。こうして、シストは有性生殖によって形成されることが明らかになった。

(3) *Chattonella antiqua* のシスト形成条件の解明—現場におけるシストフラックスの追跡とバッチ系でのシスト形成量の環境因子依存性

(a) シストフラックス

C. antiqua のシストが赤潮発生過程のどの時点で、どの水深で、また、どれだけの量形成されるかを明らかにするために、1989年夏の家島での環境調査の際、本種のシストフラックスを追跡した。具体的には水深 21 m の定点 B (図 1) の 15 m 層と 19 m 層に、セディメントトラップ(10 cm ϕ , 高さ 50 cm)を毎日吊り下げ、翌日までのあいだにトラップにたまる *C. antiqua* のシストを計数した。*C. antiqua* のシストは、*C. marina* のそれと、形態的に差がない。したがって計数されるシストは、*C. antiqua* と *C. marina* のシストの和であるが、調査当時 *C. marina* は *C. antiqua* に比べ格段に個体数が少なかったため、ここでは計数されたシストは *C. antiqua*

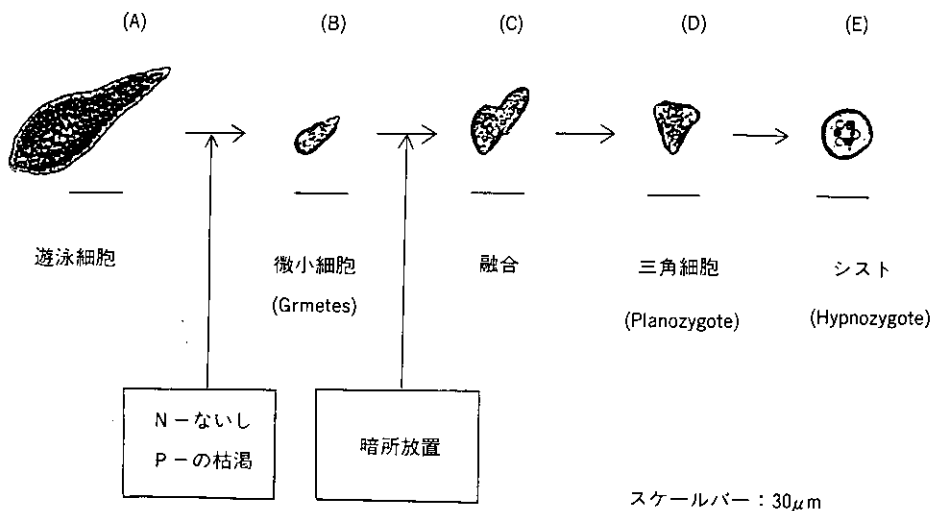


図36 実験系で確認された *Chattonella antiqua* シストの形成過程

由来であると仮定する)。セディメントトラップ実験は8月5日に開始し、調査終了時点の8月13日まで行った。この際、8月7日に小規模ながら *C. antiqua* による赤潮が発生し、8月11日には赤潮が終息したために、赤潮の全過程を通じてのフラックスをモニターすることができた。

図37に定点Bでの *C. antiqua* 遊泳細胞（微小細胞（図36 B）は除く）とシストフラックスの消長を示す。8月7日に小規模ながら赤潮が発生し、8日にかけて遊泳細胞濃度は増加した。9日以降、赤潮は減衰に転じ12日にはほとんど消滅した。8月7～8日にかけて、遊泳細胞は、その大きさ（ $\sim 100 \mu\text{m}$ ）や色調から見る限り非常に元気があったが、減衰期である9日以降は、細胞は小さくなり色調も薄いといった栄養塩の枯渇した細胞に特徴的な形態を示した。さらに、8月10日と11日の19 m 層海水中には、微小細胞（図36 B）がそれぞれ19,176 cells/ml 検出され細胞融合中と思われる微小細胞のペアまで観測された。赤潮の消長に伴う栄養塩の消長パターンは、基本的には1987年の赤潮の場合と同様であり、発生直前から発達期間中の8日にかけては10 m 以深に豊富なN、P-栄養塩が存在していた。そして、8月9日以降の減衰期においては、*C. antiqua* の生息深度である0～10 m（2.3節）でのN、P-栄養塩はほぼ枯渇し、本種の増殖速度に対する半飽和定数（2.2.3項）よりもはるかに小さい値（例えば $< 0.3 \mu\text{M NO}_3^-$, $< 0.03 \mu\text{M PO}_4^{3-}$ ）を示した。ただし本年の場合は15 m 以深での栄養塩の枯渇は生じなかった（2.1.1項）。

このような状況のもと、19 m 層での *C. antiqua* のシストフラックスは、赤潮の発生前からピ

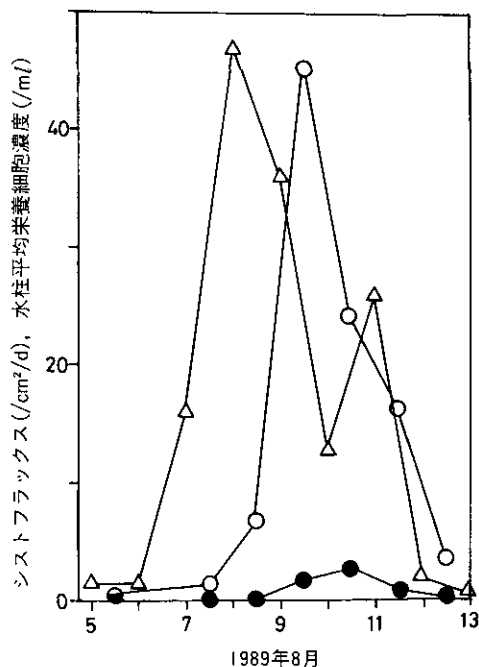


図37 1989年の赤潮発生時のシストフラックス（○；19m，●；15m）と栄養細胞濃度（△；水柱平均）の日変化

ーク（8月8日）にかけては小さな値を示したが、減衰期に入ると急激に増大して、9～10日にかけて最大値（47 cysts/cm²/d）を示した。そして、10日以降は再び衰退した。一方、15 m 層でのシストフラックスは、赤潮の減衰期にやや増加が認められるものの、その値（3 cysts/cm²/d）は19 m 層での値に比べてはるかに小さかった。こうして、*C. antiqua* のシストは赤潮の減衰期に15 m より深い深度で主として形成されることが判明した。

（b）バッチ系でのシスト形成に及ぼす環境因子の影響

現場で観測されたシストフラックスの変化を環境変動との対応で見通しよく説明するために、シスト形成の環境依存性をバッチ培養系で検討した。

図38に実験の概略を示した。栄養塩を制限した培地（1 μM PO₄³⁻ないし10 μM NO₃⁻）に *C. antiqua* の2株（A-0、B-20）を同時に植え継ぐ。通常の温度、光条件下培養を行い、培地中の栄養塩が枯渇して、シスト前駆体である微小細胞が出現した時点で、本実験を開始する。すなわち、この培養をいくつかのサブカルチャーに分け（底にはシストを付着させるためのカバーグラスを敷いておく）、例えば温度の効果を調べる場合には、これらを暗黒下、様々な温度で約1週間培養してカバーグラスに付着したシストを計数する。

その結果以下の点が明らかとなった。

- 1) 培地中の栄養塩が枯渇する前の培養液（=微小細胞を全く含まない）をいきなり暗所に移しても（図38）シストは全く形成されない。
- 2) シスト形成の最適温度は21.6～26.6°Cである（図39）。
- 3) 低照度ほどシスト形成量は大きい（図40）。

これまで調べた範囲では、培養系でシストを形成させるためには、栄養塩の枯渇が必要であった。ところが、シストフラックスのデータ（図37）は、栄養塩の豊富な15 m以深でのシスト形成を示している。そこで、現場と培養系での矛盾を解消するために、栄養塩再添加実験を行った（図38）。すなわち、栄養塩の枯渇した培養液をサブカルチャーに分け、栄養塩を再添加した場合としない場合でシスト形成量に差が認められるか否かを検討した（表10）。その結果、栄養塩の再添加を行った場合でもシストは形成され、形成量は再添加を行わなかった場合と同程度であった。さらに、微小細胞を栄養塩十分な培地に単離しても（図38）元の大きな遊泳細胞への逆行は認められなかった。これらの結果から、①栄養塩の枯渇はシスト前駆体である微小細胞の形式に必要なのであって、②微小細胞は一度形成されてしまえば以後周囲の栄養塩濃度が再上昇しても、細胞融合によるシスト形成能力を維持できることが判明した。そして栄養塩豊富な層でシストが形成されるという現場での結果が、この実験によって無理なく説明できるようになった。

（4）現場でのシスト形成イメージ

シストフラックスのデータと、培養系で得られた結果を併せ、さらに、赤潮発生現場での環境

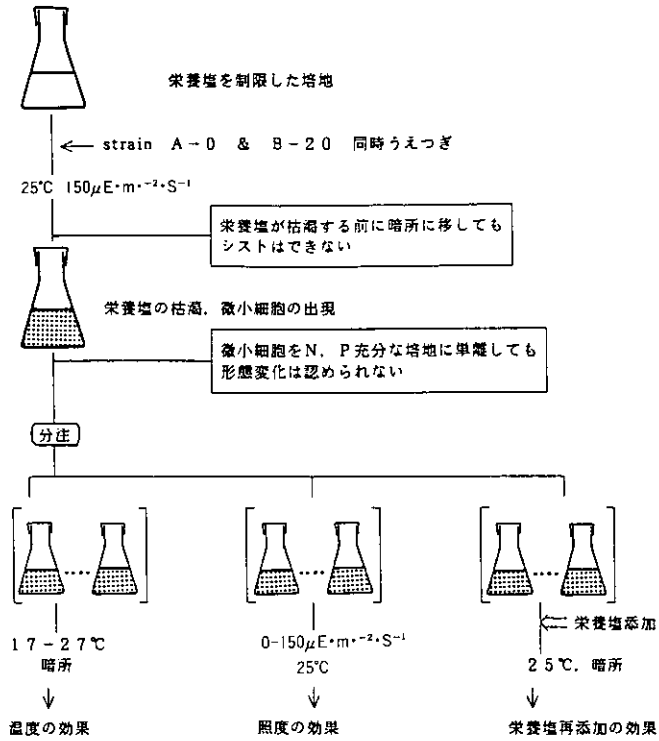


図38 シスト形成に及ぼす環境因子の影響と実験の流れ

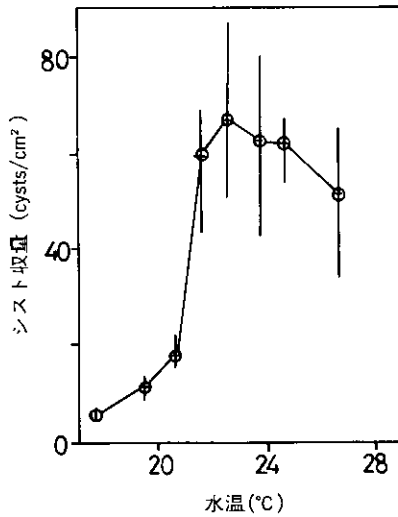


図39 *Chattonella antiqua* シスト形成量の温度依存性

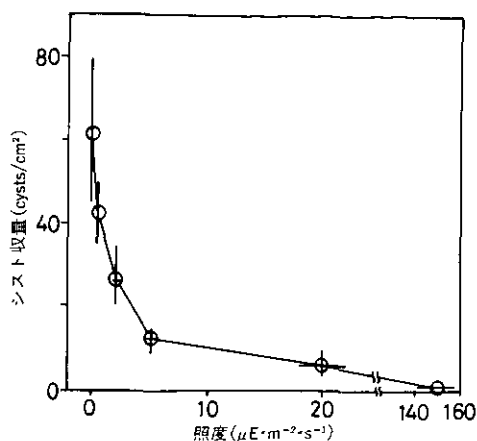


図40 *Chattonella antiqua* シスト形成量の照度依存性

表10 窒素(N)ないしリン(P)の枯渇している*Chattonella antiqua*の培養に栄養塩を再添加した際のシスト形成量の変化

	処 理	シスト形成量 ^{a)} (SE)
窒素枯渇	control (無添加)	48 (6)
	+N	45 (3)
	+N, P	47 (3)
リン枯渇	control (無添加)	76 (14)
	+P	76 (15)
	+N, P	69 (6)

^{a)} 3回の実験の平均値

データを参照することにより、海域においてシストがいかにして形成されてくるかのイメージが次のように描けるようになった(図41)。すなわち、

- 1) 赤潮がピークに達し *C. antiqua* の生息深度である0~10 m層の栄養塩が枯渇することで通常の遊泳細胞から微小細胞が形成される。
- 2) 微小細胞は日周鉛直移動を行わず、下層に沈降してゆく(中村, 未発表データ)。このことは、1989年夏、赤潮衰退期の底層近く(19 m)でのみ微小細胞が検出されたことと符合している。
- 3) 現場水温はシスト形成に最適である(図39)。
- 4) 照度は、下層にいけばいくほどシスト形成に有利である(図40)。
- 5) 15 m以深に存在する豊富な栄養塩は微小細胞のシスト形成能力に何の影響も及ぼさない(表10)。
- 6) 以上の結果、シストは赤潮の減衰期に微小細胞の融合によって、15 m以深で主として形成される。

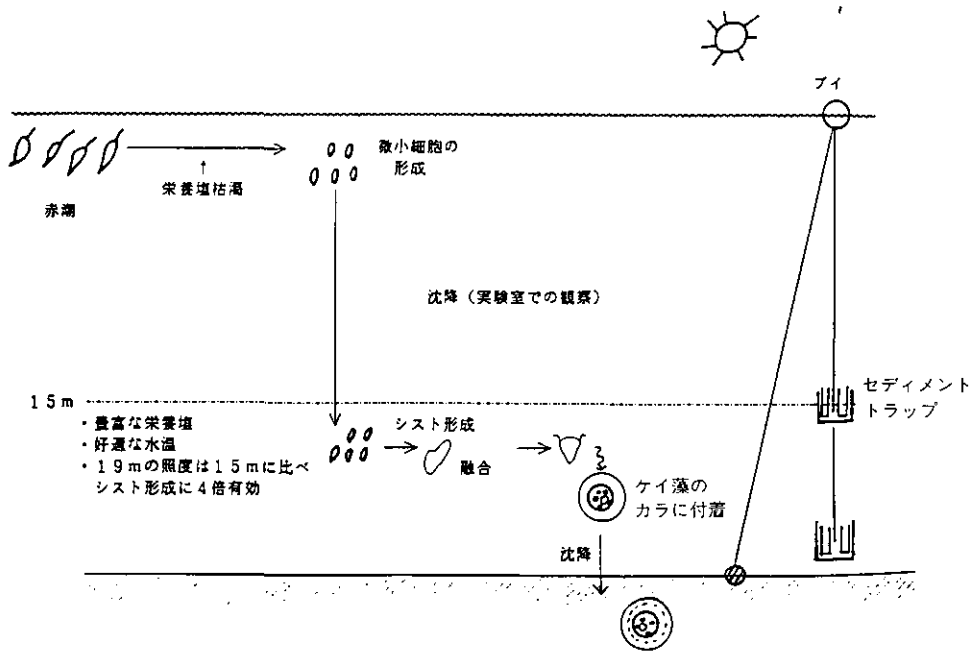


図41 現場海域での *Chattonella antiqua* シストの形成過程模式図

本項においてはシストの形成に関する実験室及び現場での結果を述べてきた。しかしながら、将来赤潮の発生予測を行うためには、シストの発芽がいかなる環境条件で生じているかを明らかにすることが今後の検討課題であろう。

2.3 現場メゾコズムを用いた内湾生態系の物質循環・動態に関する研究

—人為的富栄養化と浅い栄養塩成層の形成による *Chattonella* 赤潮の発生—

(1) はじめに

瀬戸内海での赤潮発生件数は1965年に44件であったのが、1976年には326件とピークに達し、その後も横ばい状態である。このように内湾・沿岸海域の富栄養化現象の進行とともに赤潮が多発し広域化していった。しかし海域の富栄養化と赤潮発生、特に *Chattonella antiqua* 赤潮との関連については明確な因果関係が得られてはいない。*C. antiqua* 赤潮の発現場で見られる特徴的な海洋構造では比較的浅い水深(5~7m)に安定した栄養塩成層が存在し、表層での栄養塩は欠乏状態であり、底層に多くの栄養塩が存在している。従来より日周鉛直移動による底層での栄養塩摂取の生態的意義については多く議論されてきた。特に室内実験系マイクロコズムを用いて *C. antiqua* によるリン・窒素成層条件下での日周鉛直移動と夜間底層での栄養塩摂取が明らかにされた(2.2.1項)。しかし1.5mの高さのマイクロコズム実験によっては *C. antiqua* が本当

に栄養塩豊富な底層にまで達することが可能かどうか不明であり、この仮説は長く検証されてこなかった。

本研究においては、海域に存在する自然生態系をそのまま捕獲する隔離水塊（メゾコズム）を開発し、人為的富栄養化や種々の環境制御を行い海洋生態系を *C. antiqua* 赤潮発生へと導くことを試みた。これは海洋生態系を直接用いた現場実験であり、*C. antiqua* の日周鉛直移動距離や *C. antiqua* 赤潮を発生させる環境条件・制御因子等を現場海域において明らかにすることを目的としている。

(2) 海洋メゾコズムの実験方法

メゾコズム実験は *C. antiqua* 赤潮の発生現場である瀬戸内海家島海域（図1）にて1989年7月21日～8月14日まで行った。

(a) メゾコズムの概要

海洋メゾコズムは自然の海洋生態系をそのまま捕獲し、潮流の影響を受けず系内の物質が保存されている。したがって系内の変化はすべて生物、化学過程及び沈降過程により説明できる系となっている。しかし海域を隔離することにより乱流が抑止され、遊泳能力を持たないケイ藻類の沈降が著しく、長期間貧栄養海域の生態系を維持することは困難であった。これらの点を改良したものととして図42に示すようなメゾコズムを開発した。直径5m、深さ18mは家島海域の設置場所が水深18mあり、従って海面から海底まで底層も含めてすべて隔離する構造になっている。シートはポリエステル製の格子で強化したエチレンビニルアセテート（EVA）で作られ、可塑性を用いないため生物増殖阻害をもたらす物質の表面からの溶出はない。海底にダイバーにより底部を深さ1m埋め込み、おもりにより完全に固定した。その後、自然の海洋生態系が元に戻るのを待ってシート部を静かに引き上げ、海洋生態系を捕獲した。メゾコズムの上部はアンカで固定されている浮き桟橋につなぎ止めた。海洋生態系を隔離後、遊泳能力を持たないケイ藻類の沈降を防止し長期間隔離生態系を維持するために、鉛直循環流発生装置（図43）を直ちに設置した。これは水深約0.2mにてポンプ揚水（約80m³/d）した海水を、鉛直につり下げた2本の円筒（長さ2.7m、内径21cm、水深0.3mからつり下げ）内に上向きに設置したノズル（内径2.5cm）よりジェット噴射し、鉛直循環流を形成した（図43）。この上方ジェット噴流は円筒内の海水を連行するため、水深3mより下の海水が円筒内に引き込まれ、ゆっくりと湧昇するとともに、メゾコズムの中央と側壁に沿って下降流が形成される。これにより表層0～5mぐらゐの間に非常にゆっくりとした鉛直循環流が形成された。これにより貧栄養海域においても一部大型ケイ藻を除いて大部分のケイ藻を中心とした藻類を浮上・維持することが可能となった。

メゾコズム外5m層の海水をポンプ揚水し、ミリポアフィルター（CJ：5μm、CN25：2.5μmポアサイズ）を通してメゾコズム内表層0.5mのところに入流させた。流入量はサンプル採水量を補償する程度の量（約2m³/d）とした。

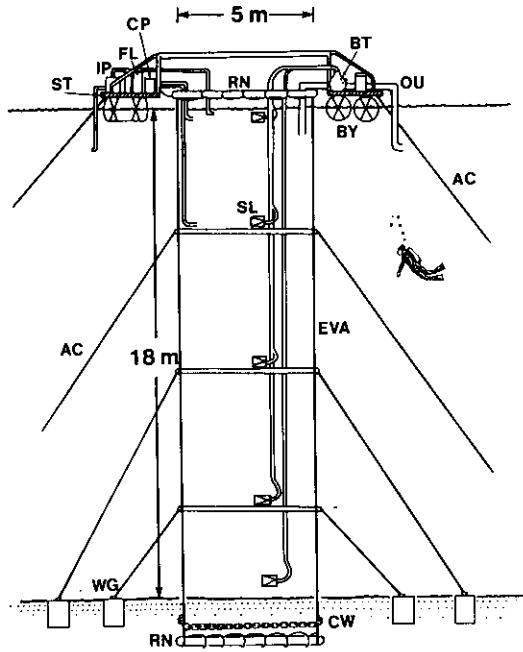


図42 国立環境研究所メゾコズムの概略図

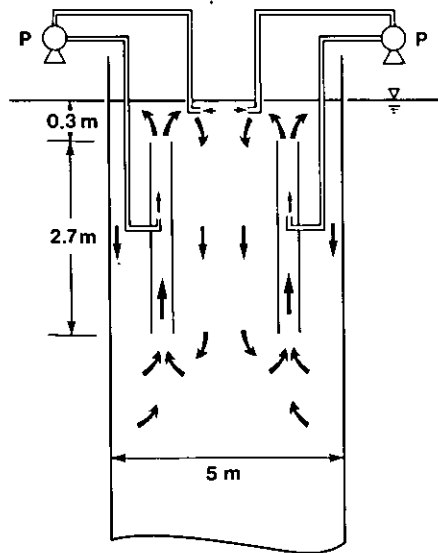


図43 鉛直循環装置の概略図

(b) 人為的富栄養化実験

1987年夏、瀬戸内海家島海域での *C. antiqua* 赤潮発生の場合、7月20日には窒素・リンともに表層から底層まで全層にわたって存在していたが、成層の発達とともに表層0~5mでは急速に枯渇した。このような栄養塩分布を再現させるため1989年7月21日の生態系捕獲後直ちに窒素 (NaNO_3 ; 250.2g)、リン (NaH_2PO_4 ; 30.6g) を0~18mの全層にわたって添加し人為的富栄養化実験を開始した。この栄養塩添加は鉛直に混合したとすると $\text{PO}_4\text{-P}$ で約 $0.5\ \mu\text{M}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ で約 $7.5\ \mu\text{M}$ に相当する濃度である。実験期間中浅い栄養塩安定成層を形成するため、水深6~18mに人為的に栄養塩を(上記同量)2度添加した(1989年7月28日、8月10日)。8月8日には底層から表層への栄養塩巻き上げを防止するため鉛直循環装置を停止した。

(c) 観測方法

水温、塩分、溶存酸素、pHの測定は毎日朝10時頃に行った。多項目水質測定装置(Hydrolab社製 Surveyor II)を使用し、各項目を水深0, 1, 2, 5, 7.5, 10, 12.5, 15mと底より1~2m上にて測定した。

栄養塩、生物量等測定用の試水は、メゾコズム内中央の水深0, 5, 10, 15m及び海底より1~2m上の各層に設置されたテフロン製採水口からシリコンチューブを通してアスピレータで吸引し、5lのガラスビンに採水した。さらにミリポアフィルター通過後のメゾコズム流入水も分析のため採水した。採水した海水の一部は直ちに Whatman GF/C フィルターにてろ過され、ろ紙は後日研究所にて解凍・分析に供されるまで -20°C で冷凍保存された。栄養塩 ($\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, TP, DTP, PTP, $\text{SiO}_3\text{-Si}$) の分析は Technicon 社製オートアナライザーを使用した通常の方法で行った。栄養塩類の試水は多層にて毎日採水した。植物プランクトン種組成カウント用サンプルは、採水した海水5lに中性ホルマリンを40ml入れ2日間放置後上澄み4lをサイホンで静かに捨てた。その残り1lを1lポリビンに移し、さらにグルタルアルデヒド5mlを加え冷暗所に保存した。動物プランクトン計数用サンプルは、海水20lを動物プランクトンネット(100 μm メッシュサイズ)でろ過し、ネットを海水で2度洗浄後、内容物を250mlポリビンに移した。さらに中性ホルマリン8mlにて固定後、冷暗所に保存した。

(3) 実験結果

(a) 水温、塩分、溶存酸素

7月21日の隔離生態系実験開始時の水温は表層で 24.5°C 、底層で 21.5°C であった(図44)。特に底層の水温はこの時 *C. antiqua* のシスト発芽にとって好適な水温 (22°C) となっていた。実験開始時の塩分濃度は表層で31.5%、底層で32.3%であり塩分による成層が存在していた(図44)。表層水温は実験期間中 $24.5\sim 27.5^\circ\text{C}$ と植物プランクトンの増殖に好適水温であった。台風が本土に接近し、7月27~29日は強風となり、その後も8月1日頃まで時々強風が吹いた。この

ため7月30日～8月1日までは成層が破壊され、鉛直混合が進行したことが水温、塩分の鉛直分布から分かる。8月1日以降も風と鉛直循環流装置の影響で鉛直混合がある程度存在していた。

8月8日に鉛直混合装置停止後は安定した成層が発達し、特に水温による成層が顕著に発達し表層で27°C、底層で24°Cとなった。

水温・塩分に見られる鉛直混合や安定成層の発達に連動して溶存酸素の鉛直分布も追隨して発達している(図44)。

(b) 栄養塩

7月21日の海洋生態系捕獲後直ちに窒素・リンを0～18 mの全層にわたって添加した。この結果 $PO_4\text{-P}$ で0.5～0.7 μM 、 $NO_3\text{-N}$ で8～11 μM の値が全層にわたって観測された(図45)。この結果ケイ藻と炎色ベン毛藻が水深10 m以浅の有光層で急速に増加した。このため特に水深6 mのところ強い栄養塩成層が形成され、7月24日以降は水深6 m以浅では $PO_4\text{-P}$ は約0.1 μM 、 $NO_3\text{-N}$ は1 μM 以下となってしまった。海洋メゾコズム内は有限の容量であるため、水深5 m以深においても栄養塩は摂取され、安定した栄養塩成層を長期間維持することが困難である。このため7月28日及び8月10日に窒素・リンを同量水深6～18 mにのみ添加し、安定した栄養塩成層を強制的に形成させた。台風の本土接近により7月27日～8月1日の間強風が吹き、成層が破壊され6 m以深の栄養塩が巻き上げられた。特に7月31日には表層に $PO_4\text{-P}$ で0.2～0.3 μM 、 $NO_3\text{-N}$ で1～2 μM の濃度が巻き上げにより出現した。しかし8月1日以降は安定した栄養塩成層が形成された。8月8日には鉛直循環流装置を停止し完全ななぎ状態とした。この結果水深5～6 mを境として安定な栄養塩成層が形成され、表層においては $PO_4\text{-P}$ で0.1 μM 、 $NO_3\text{-N}$ で1 μM 以下の濃度となり、6 m以深の下層では $PO_4\text{-P}$ で0.5～0.8 μM 、 $NO_3\text{-N}$ で4～9 μM となった。

$SiO_3\text{-Si}$ は7月21日の実験開始時表層では9 μM 、底層では25 μM であった(図45)。窒素・リン添加に伴うケイ藻の増加・摂取により5～6 mより以浅の表層の $SiO_3\text{-Si}$ は瞬く間に減少し、8月1日以降は表層では0.3～0.7 μM 、5～10 m層においても2～5 μM と少なく、10 m以深においてのみ15 μM と多量に存在していた。このようなSiの安定成層は8月1日以降実験終了時まで維持された。

(c) 藻類種遷移と *Chattonella* 赤潮発生

7月21日の生態系隔離後全層にわたる栄養塩添加によりケイ藻と炎色ベン毛藻(渦ベン毛藻)の増加が顕著に見られた(表11)。ケイ藻では *Chaetoceros*, *Dactyliosolen*, *Rhizosolenia*, *Thalassiosira* が主要な種であり、炎色ベン毛藻では *Prorocentrum*, *Protoperdinium*, *Scrippsiella* が主要種であった。このほか黄金色ベン毛藻では *Distephanus*, *Ebria* が主要な種であった。これら藻類種の数・体積の測定値より藻類中の炭素量を次式で求めた。

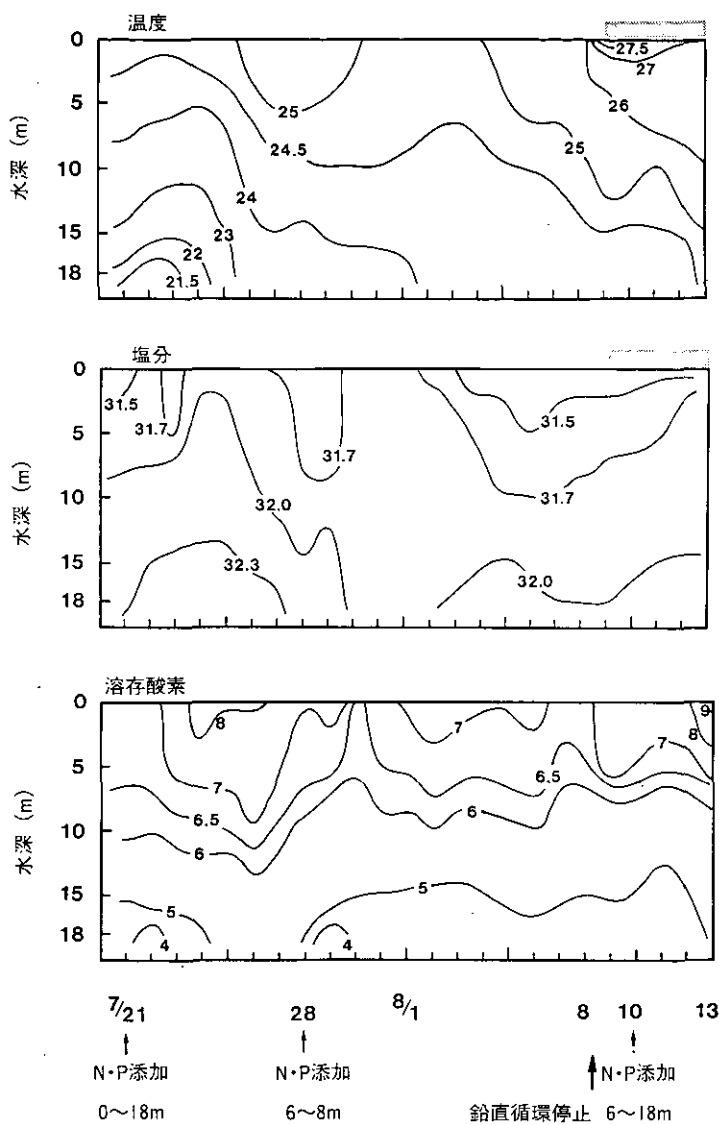


図44 メゾコズム内の水温、塩分、溶存酸素濃度鉛直分布の経時変化

ケイ藻 $\text{Log } C = -0.422 + 0.758 \text{ Log } V$

その他 $\text{Log } C = -0.460 + 0.866 \text{ Log } V$

ここで C = 炭素量 (pg/cell), V = 藻類種体積 (μm^3)

この式を用いてケイ藻 Centrales, Pennales, 炎色ペン毛藻, *Chattonella* 及びその他の藻類の生

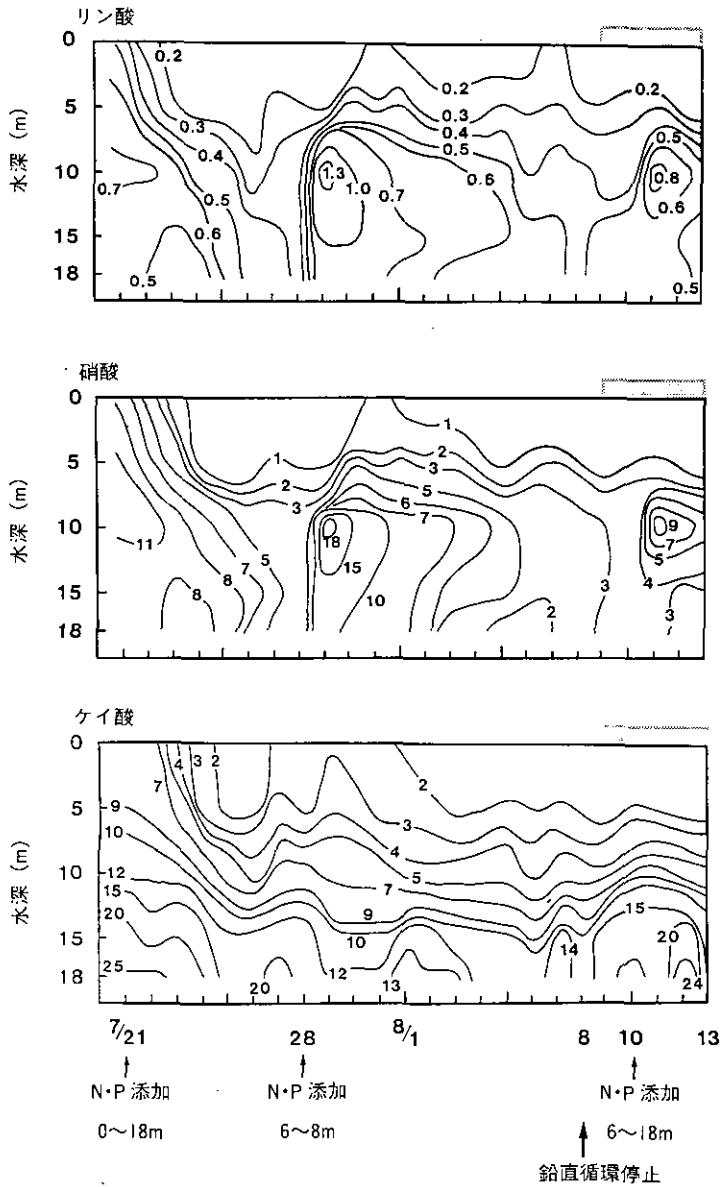


図45 メゾコズム内の $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 鉛直分布の経時変化

物量を、炭素量として解析を行った。初期栄養塩添加によりケイ藻と炎色ベン毛藻の増殖が見られた (図 46)。この結果表層での窒素・リン・ケイ素は摂取され急激に減少し、水深 5~6 m を境として窒素・リン・ケイ素の安定成層が形成された (図 45)。このため表層では窒素・リン欠乏

のみならずケイ素欠乏のためケイ藻類CentralsとPennalesともに7月27日以降はほとんど増殖できなかったと思われる(図46)。台風が本土に接近した7月30日~8月1日にかけての鉛直混合により水深5m以深の栄養塩やケイ素が表層に巻き上げられた(図45)。この結果7月31日以降ケイ藻類Pennales(*Amphiprora*, *Diatoma*, *Nitzschia*)が主に増殖し炭素量としては5ng·C/ml程度となった。ケイ素は表層ではゼロとなっていたためケイ藻類Pennalesが8月1日以降大きく増殖することができなかったと思われる(図46)。これに対して8月2日以降炎色ペン毛藻(*Prorocentrum*, *Protoperidinium*, *Scrippsiella*)が急激に増加してきた(図46)。しかし鉛直循環装置を停止した8月8日をピークとして8月10日には炎色ペン毛藻はほとんど検出することができなかった。この短期間の急激な減少は、橈脚類(*Microsetella norvegica*及び*Harpacticoida*)の8月8日以降の急激な増加が見られることより捕食によるものと推測されている(表12)。おそらく昼間表層に鉛直移動により集積した炎色ペン毛藻が*Microsetella*, *Harpacticoida*により集中的な捕食を受けたものと思われる。

8月7日までは*C. antiqua*は出現していなかったが、鉛直循環装置を停止した8月8日午前9時に5m層で2cells/ml出現した。8月9日午前9時表層で8cells/ml, 8月10日午前9時表層で21cells/mlと増加し, 8月11日15時には表層で157cells/mlと赤潮状態となった(図46)。*C. antiqua*は体長50~100 μ Mと炎色ペン毛藻類に比較して大きく,*Microsetella*, *Harpacticoida*に捕食されにくいサイズであるとともに, 次に示す日周鉛直移動により捕食から逃れることが可能であったと推測される。

(d) *Chattonella antiqua*の日周鉛直移動観測

8月9日以降*C. antiqua*の赤潮状態となったが, 8月12~13日にかけて昼夜連続観測を行い,*C. antiqua*の赤潮現場海域での日周鉛直移動を観測した(図47)。8月12日15時には表層で119cells/mlであったが, 21時には表層は8cells/mlとなり, 5m層に最大値143cells/mlを示した。24時には5m層で88cells/ml, 7.5m層で86cells/mlとなり, 約半分の細胞が栄養塩豊富な6m以深に移動してきた。この水深6m以深の人為的富栄養化による栄養塩成層は安定に維持されており, 鉛直循環装置の停止により表層への栄養塩の巻き上げはほとんどなかった(図45)。8月13日3時にはほとんどすべての*C. antiqua*細胞は栄養塩豊富な7.5m層に移動し, そこでの濃度は229cells/mlとなった。6時には上層へと移動し, 5m層に147cells/ml, 7.5m層で109cells/mlとなっていたが, 表層にはまだほとんどの細胞は到達していなかった。9時には表層で116cells/mlとなり7.5m層にまで広く分布していた。12時にはほとんどの細胞は表層に達し集積しており, 421cells/mlという*C. antiqua*大規模赤潮状態となった。この観測により*C. antiqua*は現場海域で水深7.5mまで鉛直移動することが初めて判明した(図47)。水深6m以深の人為的富栄養化が, 7.5mまで日周鉛直移動を行う*C. antiqua*に夜間7.5m層での栄養塩の摂取を可能にしたと思われる。

表11 メゾコズム実験期間中の藻類種の変遷

		7/21	7/23	7/25	7/27	7/29	7/31	8/2	8/4	8/6	8/8	8/10	8/12	
ケイ藻 Centrales	<i>Chaetoceros compressus</i>	—————												
	<i>Chaetoceros curvisetum</i>				—————									
	<i>Chaetoceros lorensianus</i>	—————												
	<i>Dactyliosolen mediterraneus</i>		—————											
	<i>Rhizosolenia delicatula</i>	—————												
	<i>Rhizosolenia fragilissima</i>			—										
	<i>Tralassiosira sp.</i>		—————											
ケイ藻 Pennaales	<i>Amphiprora hyalina</i>						—————							
	<i>Diatoma hyalina</i>								—————					
	<i>Nitzschia closterium</i>						—————							
	<i>Nitzschia delicatissima</i>	—————					—							
	<i>Nitzschia longissima</i>							—————						
	<i>Nitzschia pungens var. atlantica</i>		—————											
炎色 ペン毛藻	<i>Prorocentrum micans</i>								—————					
	<i>Prorocentrum minimum</i>			—						—————				
	<i>Prorocentrum triestinum</i>	—————							—————					
	<i>Protoperdinium bipes</i>	—————						—————						
	<i>Protoperdinium cerasus</i>		—						—————					
	<i>Scrippsiella trochoideum</i>	—————						—————						
黄金色	<i>Distephanus speculum</i>	—————						—						
ペン毛藻	<i>Ebria tripartita</i>		—————											
クリプト藻	<i>Phodomonas sp.</i>					—————								
ユーグレナ藻	<i>Eutreptiella braarudii</i>							—————						
ラフィド藻	<i>Chattonella antiqua</i>									—————				

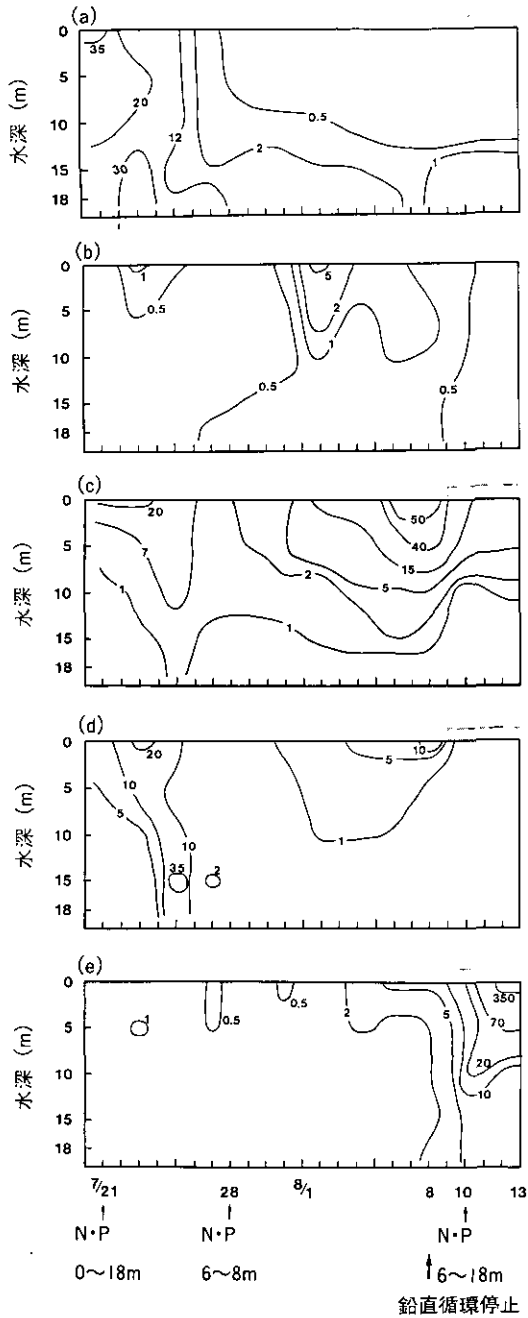


図46 炭素量で表現した藻類現存量鉛直分布の経時変化
 (a) ケイ藻円心目, (b) ケイ藻羽状目, (c) 炎色ペン毛藻, (d) その他,
 (e) *Chattonella* (単位=ng·C/ml)

(4) おわりに

本実験により海洋メゾコズム内の鉛直循環流と人為的富栄養化の度合いを変化させることにより、それに伴う栄養塩の鉛直構造の変化や窒素・リン・ケイ素を始めとする微量金属類の存在比が変化する。これらの環境変化と動物プランクトンによる選択的捕食が藻類組成をケイ藻類-炎色ペン毛藻類-C. *antiqua* 赤潮へと遷移させ得ることが明らかになった。現場海域での海洋生態系に対してこのような制御因子を抽出し得たことは、海域環境制御の可能性を大きく前進させるものと思われる。

2.4 まとめ及び今後の研究の展望

海域生態系研究は、その方法から現場調査を主体にした研究と実験系を中心とする研究に大別できる。実験系には、例えば、試験管の中で観察されたことが本当に現場の現象を説明し得るかどうかという不安があり、一方、現場観測には、余りに複雑な自然を限られた地域の限られた観測項目だけで自然をとらえられているかどうか、また、正しく現場の現象を解釈できているかどうかという不安が残る。我々は、先の特別研究で、深さ1.5 mで、内部に温度・塩分・栄養塩濃度の成層を形成し、ある程度現場環境に近づけた実験系としてマイクロコズムを開発した。本研究では、さらに、自然生態系をそのまま隔離したメゾコズムを開発し、栄養塩添加等の方法で、系を制御し、実験系で得られた結果の現場での検証を目指した。また、ベンチスケールからマイクロコズム、メゾコズム、フィールドと順次スケールアップした系で得られた結果を総合的に解析し、現場と実験系のギャップを埋めるよう努力した。

海洋生態系は、移流・水平拡散・風による集積や混合など物理的な影響のほか、栄養塩・微量金属濃度などの化学的要因の影響を受け、さらに、生態系自身が多くの食物連鎖を通して複雑に絡み合っており、生態系機構をすべて解明するのは極めて困難である。本研究では、メゾコズムを用いた実験で、移流などの物理的要因の影響を減じて、化学・生物学的側面からの調査を5年にわたり行った。この間の、調査項目は多岐にわたり、膨大なデータが得られているが、データは相互に複雑に影響し合っているため、その解析はまだ不十分であり、生態系全貌の解明には至っていない。

このような状況の下で、本研究ではいくつかの特異的な現象に焦点を絞った解析を行ってきた。その1つに赤潮発生機構解明がある。序に述べたように、内湾の富栄養化が生態系に与える影響の顕著な例は赤潮であり、繰り返される大きな被害を考えると、その発生機構解明は急を要する課題であった。

赤潮（この場合 *Chattonella antiqua*）発生に必要なように条件設定したメゾコズム内で、1989年に *C. antiqua* による赤潮発生に成功した（2.3節）。現場で赤潮を発生させ、実験系で得られた研究成果を実証し得たことの意義は大きい。この成功の背景となる成果は数多いが、例えば、現場における栄養塩の鉛直分布に関する知見（2.1.1項）や、底層での赤潮藻類の栄養塩摂

表12 メゾコズム実験期間中の動物プランクトン種の遷移

		7/21	7/23	7/25	7/27	7/29	7/31	8/2	8/4	8/6	8/8	8/10	8/12	
橈脚	<i>Paracalanus parvus</i>	—————										—————		
	<i>Oithona davisae</i>									—————				
	<i>Oithona fragilis</i>												—————	
	<i>Oithona similis</i>						—————							
	<i>Oithona spp.</i>		—————											
	<i>Corycaeus spp.</i>	—————												
	<i>Microsetella norvegica</i>	—————												
	<i>Harpacticoida</i>										—————			
尾索	<i>Doliolletta spp.</i>				—————									

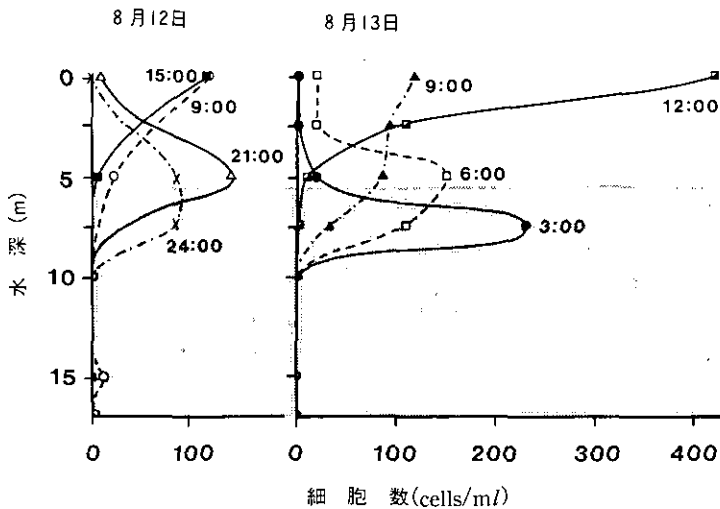


図47 メゾコズム内で観察された *Chattonella antiqua* の日周鉛直移動

取と増殖に関する知見 (2.2.1 項) が挙げられる。また、移流の影響のないメゾコズム内で、*C. antiqua* を発生できたため、その日周鉛直移動を詳細に観測できた。栄養塩成層下では、日周鉛直移動能力のある *C. antiqua* が生態学的に有利であるとされ、マイクロコズム (2.2.1 項) や、現場調査 (2.1.1 項) で確認されてきたが、この点もメゾコズム実験で実証された (2.3 節)。

実験系での培養で得られた富栄養化と *C. antiqua* の増殖に関連する成果 (2.1.3 項) の多くは、現場に適応可能なことが示された (2.1.1 項)。また、現場調査の過程で、海域の富栄養化を評価する手法の開発も試みられた (2.1.1, 2.1.2 項)。以上のように、ここで述べた研究手法の有機的結合と、それぞれの長所を生かした実験で得られる結果の総合的解釈が、生態系研究に非常に有効であると考えられる。

赤潮発生に至る過程を明らかにするためには、例えば、赤潮生物の生活史 (2.2.4 項) や、他生物との相互作用 (2.2.2 項) など、上記の栄養塩との関連のほかにも、明らかにすべき要因が多くある。これら生物個々の特性は、まだ十分に解明されたとはいえず、これからも知見の集積を必要とするであろう。

5年間にわたるメゾコズム実験で、動・植物プランクトンの組成は、より高次の捕食者の存在に大きく影響されることが明らかになった。栄養塩の添加という人為的富栄養化は、第一に植物プランクトン存在量の増加、及び種組成の変化という形で表れるが (2.3 節)、その後は、様々な動物や、その幼生の異常増殖に移ることも観測された。富栄養化による生態系の変動をより明らかにするためには、このような高次捕食者をも含めた食物連鎖に関する研究を進めて行かねばならない。

現場メゾコズムは、海域を隔離することで物質の外部との交換を制限し、保存性のよい場となっている。本研究では、セディメントトラップを用いて沈降物を捕集し、炭素・窒素・植物プランクトン中の色素等の物質循環を検討した。今後は、メゾコズムの保存性を生かし、大気との交換や底泥からの溶出等も検討に加え、全系について物質循環を明らかにしていく必要があると考えられる。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織（当時）

[A 研究担当者]

水質土壌環境部	部長	村岡浩爾 須藤隆一
地域環境研究グループ	統括研究官	内藤正明
水質土壌環境部		
海洋環境研究室		渡辺正孝*1・原島 省*1・木幡邦男*2・中村泰男*2
陸水環境研究室		矢木修身・稲森悠平*3・内山裕夫
土壌環境研究室		高松武次郎*4
地域環境研究グループ		
海域保全研究チーム		竹下俊二
湖沼保全研究チーム		相崎守弘
環境情報部		
情報システム室		宮崎忠国
情報調査室		須賀伸介・横田達也
総合解析部		
総合評価研究室		安岡善文
計測技術部		
分析室		功刀正行・西川雅高
水土壤圏環境部		
地下環境研究室		大坪国順
社会環境システム部		
資源管理研究室		原沢英夫

*1 地球環境研究グループ 海洋研究チーム

*2 地域環境研究グループ 海域保全研究チーム

*3 地域環境研究グループ 水改善手法研究チーム

*4 水土壤圏環境部 土壌環境研究室

[B 客員研究員]

青山 莞爾	(東邦大学)	(昭和61、63年度～平成2年度)
庵谷 晃	(東京水産大学)	(昭和61～平成2年度)
上 真一	(広島大学)	(昭和61～62年度)
岡田 光正	(東邦大学)	(昭和61～平成2年度)
河原 長美	(岡山大学)	(昭和61年度)
木暮 一啓	(東京大学海洋研究所)	(昭和62年度)
合田 健	(摂南大学)	(昭和61年度)
佐藤 一省	(東京理科大学)	(平成2年度)
塩井 祐三	(宮崎医科大学)	(昭和63～平成2年度)
河野 健三	(筑波大学)	(昭和62年度、平成2年度)
東 禎三	(日本大学)	(昭和61～平成2年度)
広海 十朗	(日本大学)	(昭和63～平成2年度)
藤田 真一	(大阪府庁)	(昭和61～62年度)
古城 方和	(兵庫県立公害研究所)	(昭和61年度)
増沢 敏行	(名古屋大学)	(平成2年度)
森 忠洋	(島根大学)	(昭和61～平成2年度)
吉野 善彌	(東京理科大学)	(昭和61～平成2年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(1) 閉鎖性海域における富栄養化がもたらす環境特性の把握に関する研究

渡辺正孝・竹下俊二・原島 省・木幡邦男・中村泰男・西川雅高・相崎守弘

(2) 制御実験系を用いた富栄養化の影響評価に関する研究

渡辺正孝・竹下俊二・木幡邦男・中村泰男・稲森悠平・功刀正行・高松武次郎

(3) 現場メゾコズムを用いた内湾生態系の物質循環・動態に関する研究

渡辺正孝・竹下俊二・木幡邦男・庵谷 晃*・東 禎三*・広海十朗*

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者	題目	掲載誌	巻(号)	ページ	刊年
[昭和161年度]					
稲森悠平, 矢木修身, 須藤隆一	沿岸海域の水質保全のための窒素, リン除去対策	用水と排水	28 (1)	66-77	1986
K.Kohata, M.Watanabe	Synchronous division and the pattern of diel vertical migration of <i>Heterosigma Akashiwo</i> (Hada)(Raphidophyceae) in a laboratory culture tank	J.Exp.Mar.Biol.Ecol.	100	209-224	1986
須藤隆一, 合田 健	陸上での処理対応	漁業からみた閉鎖性海域の窒素・リン規制 (村上彰男編, 恒星社厚生閣, 155p.)		83-95	1986
A.Harashima, M.Watanabe	Laboratory experiments on the steady gravitational circulation excited by cooling of the water surface	J.Geophys.Res.	91(C11)	1305-1306	1986
S.Fujita, M.Watanabe	Transition from periodic to non-periodic oscillation observed in a mathematical model of bioconvection by motile micro-organisms	Physica D	20	435-443	1986
M.Watanabe, A.Harashima	Interaction between motile phytoplankton and Langmuir circulation	Ecol.Modelling	31	175-183	1986
[昭和162年度]					
Y.Nakamura, K.Sawai, M.Watanabe	Growth inhibition of a red tide flagellate, <i>Chattonella antiqua</i> by copper	J.Oceanogr.Soc.Jpn.	42	481-486	1987
M.Watanabe, K.Kohata, M.Kunugi	³¹ P nuclear magnetic resonance study of intracellular phosphate pools and polyphosphate metabolism in <i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) (Raphidophyceae)	J.Phycol.	23	54-62	1987
渡辺正孝	内湾における赤潮発生機構	水	30	16-22	1988

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
M.Watanabe, K.Kohata, M.Kunugi	Phosphate accumulation and metabolism by <i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae) during diel vertical migration in a stratified microcosm	J.Phycol.	24	22-28	1988
[昭和63年度]					
稲森悠平, 須藤隆一, 松本順一郎	第5章環境設計—保全と対策— 6. 塩水による微生物的浄化工法	河口, 沿岸域の生態学 とエコテクノロジー(東 海大学出版会, 335p.)		259-275	1988
K.Kohata, M.Watanabe	Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in <i>Chattonella antiqua</i> (Raphidophyceae)	J.Phycol.	24	58-66	1988
Y.Nakamura, J.Takashima, M.Watanabe	Chemical environment for red tides due to <i>Chattonella antiqua</i> in the Seto Inland Sea, Japan. Part I	J.Oceanogr.Soc.Jpn.	44	113-124	1988
A.Harashima, M.Watanabe, I.Fujishiro	Evolution of bioconvection patterns in a culture of motile flagellates	Phys.Fluids	31	764-775	1988
渡辺正孝	地球規模の赤潮問題	環境研究	(70)	109-115	1988
[平成元年度]					
相崎守弘, 田中秀之, 北村 博	東京湾における無酸素水塊の形成と青潮	用水と排水	32(1)	41-45	1990
稲森悠平, 須藤隆一, 田中伸幸, 青山莞爾	内湾における赤潮藻類と細菌および微小動物との相互作用に関する研究	用水と排水	32(1)	46-54	1990
K.Kohata, M.Watanabe	Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in <i>Pyramimonas parkeae</i> (Prasinophyceae)	J.Phycol.	25	377-385	1989
K.Kohata, M.Watanabe	Diel changes in the composition of photosynthetic pigments in <i>Chattonella antiqua</i> and <i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	Red Tides; Biology, Environmental science and toxicology		329-332	1989

発表者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
Y.Nakamura, T.Umemori, M.Watanabe	Chemical environment for red tides due to <i>Chattonella antiqua</i> Part 2. Daily monitoring of the marine environment throughout the outbreak period	J.Oceanogr.Soc.Jpn.	45	116-128	1989
Y.Nakamura, J.Takashima, M.Watanabe	Chemical environments for red tides of <i>Chattonella antiqua</i>	Red Tides;Biology, Environmental science and toxicology		249-252	1989
I.Fujishiro, Y.Ikebe, A.Harashima, M.Watanabe	A note on cyclic reduction poisson solvers with application to bioconvective phenomena problems	Comput.& Fluids	17(3)	419-435	1989
M.Watanabe, T.Takamatsu, K.Kohata, M.Kunugi, M.Kawashima, M.Koyama	Luxury phosphate uptake and variation of intracellular metal concentrations in <i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	J.Phycol	25	428-436	1989
M.Watanabe, K.Kohata, M.Kunugi	³¹ P-NMR study of polyphosphate metabolism associated with diel vertical migration by <i>Heterosigma akashiwo</i> under salinity and phosphate stratification	Red Tides;Biology, environmental science and toxicology		321-324	1989
[平成2年度]					
相崎守弘	湖沼・内湾のアオコ・赤潮	からだの科学臨時増刊「環境保健入門」(日本評論社, 224p.)		40-44	1990
K.Kohata, M.Watanabe, K.Yamanaka	Highly sensitive determination of photosynthetic pigments in marine in situ samples by high-performance liquid chromatography	J.Chromatogr.	558	131-140	1991
Y.Nakamura, T.Umemori, M.Watanabe, D.M.Kulis, D.M.Anderson	Encystment of <i>Chattonella antiqua</i> in laboratory cultures	J.Oceanogr.Soc.Jpn.	46(2)	35-43	1990
Y.Nakamura	Chemical environments for red tides due to <i>Chattonella antiqua</i> Part 3. Roles of iron and copper	J.Oceanogr.Soc.Jpn.	46	84-95	1990

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
Y.Nakamura,T.Umemori	Encystment of the red tide flagellate of <i>Chattonella antiqua</i> ; Cyst yield in batch cultures and cyst flux in the field	Mar.Ecol.Prog.Ser.	78	273-284	1991
竹下俊二	青潮の発生機構	化学工学	54	932-933	1990
M.Watanabe, K.Kohata, M.Kunugi	Nitrogen and Phosphate accumulation by <i>Chattonella antiqua</i> during diel vertical migration in a stratified microcosm	Toxic Mar, Phytoplankton		244-248	1990
M.Watanabe, K.Kohata, T.Kimura	Diel vertical migration and nocturnal uptake of nutrients by <i>Chattonella antiqua</i> under stable stratification	Limnol.Oceanogr	36	593-602	1991

2 口頭発表

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
[昭和61年度]				
木幡邦男, 渡辺正孝	<i>Chattonella antiqua</i> 同調培養にみられる光合成色素の日周変化	1986年度日本海洋学会 春季大会	東京	61.4
T.Goda, M.Watanabe	Some basic considerations on marine disposal of waste-water and solid wastes	13th Int.Conf.Water. Pollut.Res.Control	Rio de Janeiro	61.8
原島 省, 渡辺正孝	水面冷却による重力循環流の支配パラメータ	1986年日本海洋学会 春季大会	東京	61.4
原島 省, 渡辺正孝	鞭毛藻による生物対流(2)	1986年日本海洋学会 秋季大会	福岡	61.10
渡辺正孝, 木幡邦男, 刃刀正行	<i>Chattonella antiqua</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Skeletonema costatum</i> のポリリン酸形成能力	1986年度日本海洋学会 春季大会	東京	61.4
渡辺正孝, 木幡邦男 刃刀正行	成層条件下での <i>Heterosigma akashiwo</i> の日周鉛直移動と体内リン蓄積過程	1986年日本海洋学会 春季大会	東京	61.4
[昭和62年度]				
木幡邦男, 渡辺正孝	<i>Chattonella antiqua</i> 同調培養にみられるカロチノイドの日周変化	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
K.Kohata, M.Watanabe	Diel changes in the composition of photosynthetic pigments in <i>Chattonella antiqua</i> and <i>Heterosigma akashiwo</i> (Raphidophyceae)	Int.Symp on Red Tides	高松	62.11
中村泰男, 高島 順, 渡辺正孝	瀬戸内海の化学環境と <i>Chattonella</i> 赤潮(I)	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
中村泰男, 高島 順, 渡辺正孝	瀬戸内海の化学環境と <i>Chttonella</i> 赤潮(II)	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
Y.Nakamura, J.Takashima, M.Watanabe	Chemical environments for red tides of <i>Chattonella antiqua</i>	Int.Symp.on Red Tides	高松	62.11
原島 省, 渡辺正孝	大船渡湾における熱塩循環流の数値シミュレーション(II)	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
渡辺正孝, 中村泰男, 木幡邦男, 井野光秋	<i>Chattonella antiqua</i> 赤潮の発生モデル(I)-モデルの基本構造	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4

発表者	題目	学会等名称	開発都市名	年月
渡辺正孝, 中村泰男, 木幡邦男, 井野光秋	<i>Chattonella antiqua</i> 赤潮の発生モデル(II)－現場適用上の問題点	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
渡辺正孝, 木幡邦男, 中村泰男, 原島 省, 山中和夫	Marine Mesocosumによる海洋生態系 実験(1)－メゾコズムの基本設計	1987年度日本海洋学会 春季大会	東京	62.4
M.Watanabe, K.Kohata, M.Kunugi	³¹ P-NMR study of polyphosphate metabolism associated with diel vertical migration by <i>Heterosigma akashiwo</i> under salinity and phosphate stratification	Int.Symp.on Red Tides	高松	62.11
[昭和63年度]				
稲森悠平, 須藤隆一, 田中伸幸, 青山莞爾, 谷口 旭	赤潮藻類と細菌および微小動物との相互作用に関する研究	環境科学会1988年会	東京	63.11
稲森悠平, 須藤隆一, 田中伸幸, 青山莞爾	ヒブリオ細菌の赤潮藻類の生存特性に及ぼす影響	日本水処理生物会 第25回大会	川崎	63.11
木幡邦男, 渡辺正孝	<i>Pyramimonas parkeae</i> 同調培養にみられるカロチノイドの日周変化	1988年度海洋学会 春季大会	東京	63.4
木幡邦男, 渡辺正孝, 山中和夫, 庵谷 晃, 石川祐二	栄養塩添加によるメゾコズム内植物プランクトン組成の変動	1988年度日本海洋学会 秋季大会	長崎	63.10
合田 健, 村岡浩爾, 原島 省	閉鎖性海域の環境に及ぼす水理的, 水質的因子の影響－大船渡湾－	日本沿岸域会議研究討論会	東京	63.6
中村泰男, 梅森龍史, 渡辺正孝	瀬戸内海の化学環境と <i>Chattonella</i> 赤潮 III	1988年度日本海洋学会 春季大会	東京	63.4
中村泰男, 梅森龍史, 渡辺正孝	室内培養系における <i>Chattonella antiqua</i> の“シスト”形成の試み	1988年度日本海洋学会 春季大会	東京	63.4
中村泰男, 梅森龍史, 渡辺正孝	<i>Chattonella antiqua</i> のシスト形成過程	1988年度日本海洋学会 秋季大会	長崎	63.10
原島 省, 渡辺正孝	生物対流パターンのフラクタル次元について	1988年度日本海洋学会 春季大会	東京	63.4
A.Harashima, M.Watanabe	Physical model of the anoxic water behavior in the coastal seas	Techno-Ocean'88 Int. Symp.	神戸	63.11

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
原島 省	生物対流における遷移現象	東京大学海洋研究所 共同利用シンポジウム 「地球の進化と対流現象」	東京	1.1
山中和夫, 木幡邦男, 渡辺正孝	カロチノイド量から推定した植物 プランクトン現存量とこれによる 87年播磨灘における <i>Chattonella antiqua</i> 赤潮の消長	1988年度日本海洋学会 秋季大会	長崎	63.10
[平成元年度]				
国安裕子, 稻森悠平, 須藤隆一	環境浄化に関わる微小動物の分 離培養と保存	第5回日本微生物生態学会	東京	1.11
木幡邦男, 渡辺正孝	<i>Pyramimonas parkeae</i> のカロ チノイド組成	1989年度日本海洋学会 秋季大会	筑波	1.10
中村泰男, 渡辺正孝, D.M.Kulis, D.M.Anderson	<i>Chattonella antiqua</i> の有性生 殖2 シスト中のDNAの定量	1989年度日本海洋学会 秋季大会	筑波	1.10
中村泰男	瀬戸内海の化学環境と <i>Chattonella antiqua</i> 赤潮3. 銅 と鉄が赤潮発生に果たす役割	1989年度日本海洋学会 秋季大会	筑波	1.10
原島 省, 菊池 靖, 山上博三	衛星データによる広域海洋の biogeophysical modeling(1) 概念設計	1990年度日本海洋学会 春季大会	東京	1.4
原島 省, 菊池 靖	衛星データによる広域海洋の biogeophysical modeling(2) グラウンドトゥース・データベー スおよびパーソナルコンピュ ータ・ディスプレイ	1990年度日本海洋学会 春季大会	東京	1.4
A.Harashima	Remote Sensing for the envi- ronmental problems and as- sociated modelling and in situ monitoring schemes in the con- tinental shelf region	JECSS The 5th Workshop	Kangnung	1.9
A.Harashima	Satellite ocean color data for environmental science	Japan-US Ocean Color Remote Sensing Symp.	東京	2.2
宮下一明, 三輪竜一, 木幡邦男, 渡辺正孝	ラフィド藻 <i>Chattonella anti- qua</i> と珪藻 <i>Amphiprora hyalina</i> の混合培養	1990年度日本海洋学会 秋季大会	筑波	1.10

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
渡辺正孝, 木幡邦男, 功刀正行 [平成2年度]	栄養塩成層条件下での <i>Chattonella antiqua</i> の日周鉛 直移動と細胞内N, Pの変動	1990年度日本海洋学会 秋季大会	筑波	1.10
相崎守弘	底泥における細菌分布とその役割	第24回水質汚濁学会	川崎	2.8
相崎守弘, 木幡邦男	水中分光機を利用した野外での 藻類現存量測定に関する研究	第24回水質汚濁学会	川崎	2.3
梅森龍史, 中村泰男, 渡辺正孝, 東 禎三	ラフィド藻 <i>Chattonella anti- qua</i> のシスト形成におよぼす栄養 塩の効果	1991年度日本海洋学会 春季大会	東京	2.4
木幡邦男, 渡辺正孝, 木村敏彦, 石川裕二	多波長同時検出HPLCによる 植物プランクトン光合成色素の 分析	1991年度日本海洋学会 春季大会	東京	2.4
K.Kohata, M.Watanabe	Diel carotenoid-synthesis pat- tern in algae under light:dark synchronized conditions	Int.Sympo.on Carotenoid	京都	2.5
田中秀之, 相崎守弘	東京湾における青潮に関する研 究—無酸素水塊の形成と硫酸塩 還元細菌の挙動—	第24回水質汚濁学会	川崎	2.3
H.Tanaka, M.Aizaki, H.Kitamura	Changes in vertical distribu- tions of several kinds of bacte- ria caused by up-welling of anoxic water in Tokyo Bay, Japan	15th Bienn.Conf.IAWPRC	京都	2.8
中村泰男, 梅森龍史	シストトラップ: <i>Chattonella antiqua</i> 赤潮発生期間中のシス トフラックス	1991年度日本海洋学会 春季大会	東京	2.4
宮下一明, 木幡邦男, 渡辺正孝	珪藻 <i>Amphiprova hyalina</i> より 抽出した脂質による赤潮藻類の 防除作用	平成2年度日本水産学会 秋季大会	奈良	2.11
山口伸一郎, 渡辺正孝, 木幡邦男, 木村敏彦, 佐藤一省	海洋物質循環解明のための隔離 生態系の形成に関する研究	化学工学会第56年会	東京	3.3
渡辺正孝, 木幡邦男, 木村敏彦, 山口伸一郎	Marine Mesocosmによる海洋 生態系実験(II)—人為的富栄養 化と <i>Chattonella</i> 赤潮発生	1991年度日本海洋学会 春季大会	東京	2.4

平成2年度 編集小委員会

委員長	相馬光之	委員	須賀伸介
副委員長	高松武次郎	〃	岡本研作
委員	渡邊和夫	〃	鈴木明
〃	中野安則	〃	泉克幸
〃	中根英昭	〃	高村典子
〃	高村健二	〃	井上元子
〃	松本幸雄	事務局	松井文子
〃	兜真徳		

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR-9-'92

平成4年3月30日発行

編集 国立環境研究所 編集小委員会

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305 茨城県つくば市小野川16番2

印刷 ニッセイエプロ 株式会社

〒305 茨城県つくば市吾妻3-13-11

Published by the National Institute for Environmental Studies
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305 Japan
March 1992