

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14960

研究課題名(和文) 日周鉛直移動する赤潮藻カレニアへの底生性珪藻類による初期発生過程阻害効果の検討

研究課題名(英文) Inhibiting effects of benthic diatoms on the harmful dinoflagellate *Karenia mikimotoi* performing diurnal vertical migration

研究代表者

今井 一郎 (Imai, Ichiro)

北海道大学・水産科学研究院・特任教授

研究者番号：80271013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)： 有害赤潮渦鞭毛藻カレニアは日周鉛直移動を行い、水深約20mまで到達する。海底に到達した際、底生珪藻類の生息はカレニアの赤潮発生に大きな影響を与えられ、底生珪藻と中心目珪藻休眠期細胞は、1万～百万/g 湿泥のオーダーの密度で存在した。海底泥中に十万/g のオーダーで底生珪藻が生息すると、カレニアは日周鉛直移動と増殖が阻害された。また底生珪藻の分離株はカレニアを容易に死滅させた。新鮮な海底泥をカレニアに加えたところ、予想外に捕食性の繊毛虫が検出分離された。以上から底生珪藻がカレニアの増殖を阻害すると同時に、繊毛虫も協働して阻害すると考えられた。

研究成果の概要(英文)： The harmful dinoflagellate *Karenia mikimotoi* performs diurnal vertical migration reaching deeper than 20m deep at night. When *K. mikimotoi* reach the sea bottom, dwelling pennate diatoms probably give various adverse effects on *K. mikimotoi*. The densities of pennate diatoms and resting stage cells of centric diatoms were detected as many as 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>6</sup> cells per gram wet sediments. The existence of pennate diatoms with densities more than 0.1 million per gram wet sediment inhibited the diurnal vertical migration and growth of *K. mikimotoi*. Newly established pure strain of *Nitzschia* sp.1 entirely killed *K. mikimotoi* through co-culture experiment. Freshly collected sediments were also inhibiting to *K. mikimotoi*, and the grazer ciliate *Pleuronema* sp. was newly isolated as predator on *K. mikimotoi*. Obtained results showed that the pennate diatoms dwelling sea bottom inhibited the growth of *K. mikimotoi* and ciliates probably also kill *K. mikimotoi* at sea bottom in the shallow area.

研究分野：有害有毒プランクトン

キーワード：赤潮 底生珪藻 羽状目珪藻 中心目珪藻 珪藻休眠期細胞 *Karenia mikimotoi* 日周鉛直移動 増殖 阻害

## 1. 研究開始当初の背景

赤潮原因プランクトンの増殖に影響する要因としては、物理（光、温度、塩分等）、化学（栄養塩、微量元素、有機物等）、生物学的なもの（競争、捕食、感染等）があげられ、様々な種においてこれらの要因が増殖に与える影響が検討されている。なかでも物理、化学的な要因については比較的研究報告が多いが、生物学的な要因は検討が困難であり、まだ知見が少ないのが現状である。近年になって、栄養塩を巡る競争者である浮遊珪藻類（主に中心目のプランクトン種）が水柱に多いと有害な渦鞭毛藻類が発生しにくい事が、ようやく認知される様になってきた1)。さらに微生物による感染等は、研究の蓄積が待たれている状況である2)。

底生珪藻類は海底に生息し、普通には浮遊生物である植物プランクトンとの生態学的な関連性は無いと思われる。しかしながら赤潮の原因となる鞭毛藻類の中には、日周鉛直移動を行う種が多く知られ、とくに有害赤潮渦鞭毛藻カレニア (*Karenia mikimotoi*) はその能力が高く、夜間に20m以上の水深にまで到達する事が実証されている3)。カレニア赤潮の細胞密度を考慮すると、水柱の栄養塩濃度だけでは説明不能であり、海底で溶出して出て来た栄養塩類を吸収していると考えが必要がある。夜間海底に到達したカレニアは、10m以上の深い海域では栄養塩類や微量元素、有機物等を独占的に吸収して利用し、昼間は光環境の良い中層で増殖していると想定される。

カレニア赤潮が現場で実際に発生する際に観察されている主要な環境要因としては、悪天候とそれに伴う大量の降雨が知られ、また底層の貧酸素化（時に無酸素）も指摘されている4,5)。これらの要因は、栄養環境や弱光条件下における有害渦鞭毛藻の増殖特性を基本として論じられて来た。しかしながらこれらの環境要因を底生珪藻類への影響の観点から見ると、悪天候は海底で生息する底生珪藻類にとって極めて不利な条件であり、1週間程度続けば多大な悪影響を受けると予想できる。また海底の無酸素化は、底生珪藻類にとってはそれこそ死活問題と言える。硫化水素に耐性を持つカレニアの性質を考え合わせるなら、無酸素環境で拮抗関係にある底生珪藻類が死に絶えたと思われる海底は、溶出した栄養塩類や鉄等の微量元素類を独占的に利用できる天国の場となるであろう。そして赤潮を形成し魚貝類の斃死を惹きおこす。このように、底生珪藻との関係で赤潮の発生機構を解明しようとした研究は、知る限りこれまで認められない。

## 2. 研究の目的

魚介類を大量斃死させる有害渦鞭毛藻

*Karenia mikimotoi* (カレニア) は、夜間に水深20m超の層まで達する顕著な日周鉛直移動を行い (Koizumi et al. 1996)、海底での栄養塩類の吸収により、大量増殖していると考えられている。また本種赤潮は、水深10~20mの静穏な水域の5~10m程度の中層を発生中心として増殖する事が知られている (飯塚 1972)。

カレニアはやや沖合域の中層で増殖する事が知られている。また米国のメキシコ湾沿岸域における *Karenia brevis* (カレニアの近縁種) の赤潮は、岸から沖合へ18~74kmの水深12~37mの水域が初期発生域と報じられている6)。栄養塩環境のみを考慮するならば、河川水が流入する河口域付近等のごく沿岸域の方が良い条件であり、実際に浮遊性珪藻類は恒常的に大量に増殖している。さらに、底生性羽状目珪藻 *Amphipora hyalina* はアレロパシーによって赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖を阻害するという7)。以上から、浅海域にはカレニアの増殖にとって好ましくない要因が存在し、それは海底に生息する底生性の羽状目珪藻類ではないかという仮説を得た。すなわち、浅海域では海底に光が届いて底生珪藻類が繁茂しており、夜間に海底へ到達したカレニアに何らかの悪影響を与え、増殖を阻害すると言うものである。そこで、カレニア赤潮の発生する周防灘と大分県佐伯湾を対象に、底生珪藻類の分布を検討し、また底生珪藻類を分離してカレニアへのアレロパシー効果を実験によって検証した。底生珪藻類の重要性が判明すれば、カレニア赤潮の初期発生水域の特定が生物学的に裏付けられ、底生珪藻類の増殖に影響する光や底層の酸素条件等から、カレニア赤潮の発生予知の精度が向上すると期待される。これまで底生珪藻類を考慮した有害赤潮の発生機構に関する研究は皆無である。

## 3. 研究の方法

### (1) 底生珪藻の分布

2016年6月に、周防灘の5地点および佐伯湾の11地点において採泥をおこなった。得られた堆積物試料について、底生珪藻と中心目珪藻の休眠期細胞の直接計数を倒立型落射蛍光顕微鏡を用いて行った。また試料を冷暗所に6ヶ月間保存して栄養細胞を死滅させた後に、終点希釈法によって発芽・復活可能な休眠期細胞密度を各分類群について調べ計数した。

### (2) カレニアの日周鉛直異動と増殖に与える底生珪藻の影響の検討

佐伯湾の沖松浦漁港で海底泥を採取し、表層の試料20gずつ2つ用意した。それぞれに1/10強度のSWM3培養液を加え、片方にはGeO<sub>2</sub> (1mg/L)を加え6日間培養した。これにより、底生珪藻類が高密度と低密度の実験

区を作成した。これらの海底泥は、高さ 90cm, 内径 5cm のアクリル管の底部に置き、1/100 強度 SWM3 培養液 1.5L を満たした。静置 1 日後にカレニアを 200 細胞/mL で加え、管の 8 層から 4 時間毎に 24 時間、注射針で採水し各層のカレニア細胞を計数した。その後は底層までチューブ採水し、水柱の平均細胞数を求めた。実験条件は温度 25°C, 光強度 250  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ , 14hL : 10hD である。

(3) 底生珪藻の無菌培養株がカレニアの増殖に与える影響

佐伯湾の沖松浦から羽状目珪藻 *Nitzschia* sp.1 株を分離し無菌培養を確立した。これを 2,000 細胞/mL でカレニアの無菌培養 (1000 細胞/mL) に添加して共培養実験を行った。温度 20°C, 光強度約 50  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 明暗周期 14hL: 10hD の条件下で 10 日間培養実験を行った。

(4) 北海道七重浜沿岸の海底泥がカレニアの増殖に与える影響

北海道北斗市七重浜にて採集した海底堆積物 50g に対し、1/20 強度の SWM-3 培地を添加し、さらにカレニア培養株 (1,000 細胞/mL) を添加して、温度 20°C, 光強度約 50  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 明暗周期 14hL: 10hD の条件下で 10 日間培養実験を行った。

(5) 七重浜から分離された繊毛虫によるカレニアの捕食実験

上記 (4) の実験により、カレニアを捕食する繊毛虫 *Pleuronema* sp. が予期せずに見られた。そこでこの繊毛虫のカレニアに対する捕食の特性を調べた (図 4)。細胞密度を 100, 1000 および 10000 細胞/mL としたカレニアの培養株 50 mL の各々に対し、細胞密度 0, 10 および 100 細胞/mL の *Pleuronema* sp. をそれぞれ添加し、様々な細胞密度を組合せた実験区を用意した。各実験区のフラスコを温度 20°C, 光強度約 50  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ , 明暗周期 14hL: 10hD の条件下で 7 日間培養し両種の細胞密度を計数した。また、繊毛虫の捕食行動を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 底生珪藻の分布 (図 1-4))

直接検鏡法は採泥後 5 日以内に行った。底泥中の珪藻類休眠期細胞密度は、佐伯湾では  $3.6 \times 10^4 - 2.4 \times 10^5$  cells/g 湿泥 (図 1), 周防灘で  $1.0 \times 10^4 - 9.9 \times 10^4$  cells/g 湿泥 (図 3) の範囲であった。採泥後 5 日以内の MPN 法による計数の結果、佐伯湾では  $1.1 \times 10^4 - 1.9 \times 10^5$  MPN/g 湿泥 (図 2), 周防灘で  $8.0 \times 10^2 - 2.1 \times 10^5$  MPN/g 湿泥 (図 4) となった。水深の浅い地点で中心目珪藻に比べて羽状目珪藻の割合が高かった。また 6 か月冷暗所保存後の MPN 法による計数の結果、休眠期細胞数はやや減少した。分類群では中心目珪藻類の割合が高く、特に *Chaetoceros* 属が卓越した。羽状

目では *Navicula* 属の割合が増加した。以上から、水深の浅い場所では海底に羽状目珪藻が多数生息し、採泥後に暗黒条件下で生理的に耐性を持つ休眠期細胞を形成するが、その寿命は *Navicula* 属で比較的長く *Nitzschia* 属等と短いと考えられた。

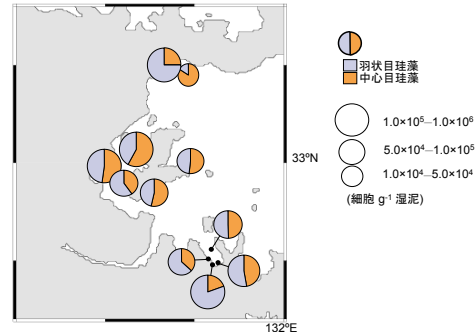


図 1 佐伯湾における底生珪藻と中心目珪藻休眠期細胞の分布 (直接計数法)

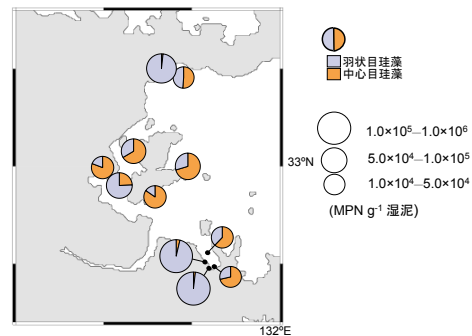


図 2 佐伯湾における底生珪藻と中心目珪藻休眠期細胞の分布 (終点希釈法: MPN 法)

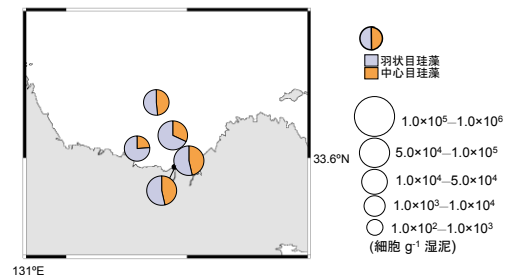


図 3 周防灘における底生珪藻と中心目珪藻休眠期細胞の分布 (直接計数法)

(2) カレニアの日周鉛直異動と増殖に与える底生珪藻の影響

実験開始時の底生珪藻は、高密度区で 33 万/g, 低密度区で 5 万/g であった。底生珪藻高密度区では、暗期に底層で *K. mikimotoi* は高密度になったが翌日の明期に表層の細胞数は著

しく減少した(図5)。底生珪藻低密度区では、夜間に下層におりたが翌日の明期には再度表層で高密度になった。

その後カレンシアは底生珪藻高密度区で増殖せず減少し、低密度区でも減少傾向にあったがその程度は高密度区よりも影響が小さかった(図6)。栄養塩類はこの間あまり減少しなかった。以上から、底生珪藻高密度区ではカレンシアの日周鉛直移動と増殖の阻害が明確に起こったと結論された。

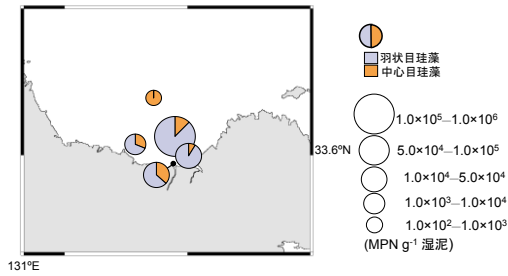


図4 周防灘における底生珪藻と中心目珪藻休眠期細胞の分布(終点希釈法:MPN法)

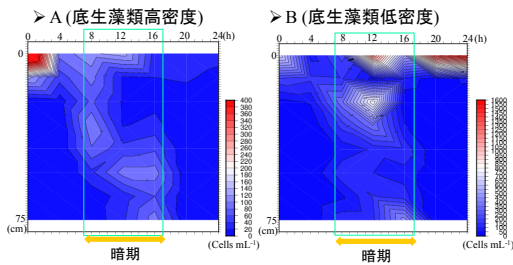


図5 カレンシアの日周鉛直移動に及ぼす底生珪藻の影響

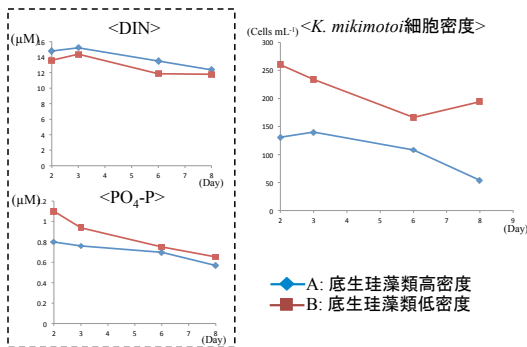


図6 日周鉛直移動実験の長尺パイプ中における海水中の栄養塩の推移とカレンシアの細胞数の変動

3) 底生珪藻の無菌培養株がカレンシアの増殖に与える影響

底生珪藻 *Nitzschia* sp.1 とカレンシアの共培養実験の結果、この底生珪藻のはカレンシアの増殖を顕著に阻害することが明らかとなった(図7)。底生珪藻類には他にも赤潮鞭毛藻の増殖を著しく阻害するものの存在が報告されている(7)。今後の課題としては、アレロパシー等のメカニズムの解明があげられる。

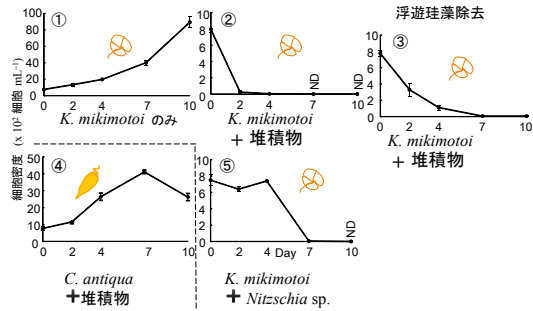


図7 底生珪藻 *Nitzschia* sp.1 株、及び七重浜の海底泥がカレンシアの増殖に与える影響

(4) 北海道七重浜沿岸の海底泥がカレンシアの増殖に与える影響

カレンシアのみ添加の対照区ではカレンシアの細胞密度が増加し続け、10日目には8935細胞/mLとなった(図7)。一方、堆積物とカレンシアを添加した実験区では、培養2日目にカレンシアの細胞密度が大きく減少し(25細胞/mL)、潰れた細胞が確認された。また2日目以降、繊毛虫 *Pleuronema* sp.の増殖が観察されるようになり、7日目にはカレンシアが全滅し、最終的に繊毛虫類のみが認められた。

(5) 七重浜から分離された繊毛虫によるカレンシアの捕食とその特性

カレンシアの初期密度を100および1000細胞/mLとして繊毛虫 *Pleuronema* sp.を添加した実験区では、実験期間を通してカレンシアの細胞密度がさほど減少せず、カレンシアのみを添加した実験区とほぼ同様の変動を示した(図8)。これらの実験区では、*Pleuronema* sp.の細胞密度は実験開始4日目まで増加したが、その後減少に転じた。一方、カレンシアの初期密度を10000細胞/mLとした実験区においては、実験開始4日目以降カレンシアの細胞密度が著しく減少していた。

これらの実験区において *Pleuronema* sp.は実験期間を通して細胞密度が増加し続け、複数の *Pleuronema* sp.が群がりカレンシアの細胞が潰されてゆく様子が観察された(図9)。カレンシアは顕著な遊泳能力を有し、この渦鞭毛藻の初期密度が低い実験区では、遊泳行動によりこの繊毛虫による捕食から逃れることができたが、カレンシアが高密度で存在する条件では捕食の成功率が高まり、カレンシアの細胞

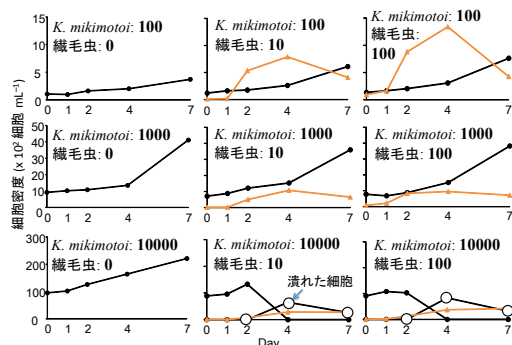


図8 七重浜から分離された繊毛虫によるカレニアの捕食実験の結果

密度が減少する捕食圧となったと考えられる。しかしながら、海底泥を添加した実験系では1000細胞/mLのカレニア密度でも効率良い捕食が観察されていることから、実際の現場では砂粒等の存在によって繊毛虫による捕食が効率よく起こっていると考えられた。今後はさらに条件を詳細に吟味し、現場海域における捕食 - 被食関係のより良い再現が得られる要検討が必要である。

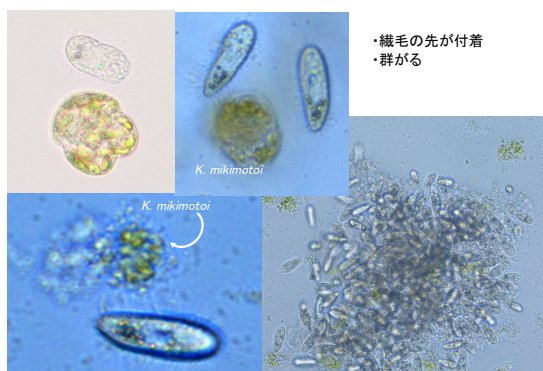


図9 繊毛虫 *Pleuronema* sp. によるカレニアの摂食行動の観察

<引用文献>

- 1) Imai I, Yamaguchi M (2012) Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae* 14: 46-70.
- 2) Salomon PS, Imai I (2006) Pathogens of harmful microalgae. In *Ecology of Harmful Algae*, Ecological Studies Vol. 189 (eds. Graneli E, Turner JT), pp.271-282, Springer-Verlag, Berlin.
- 3) Koizumi Y, Uchida T, Honjo T (1996) Diurnal vertical migration of *Gymnodinium mikimotoi* during a red tide in Hoketsu Bay. *Journal of Plankton Research* 18: 289-294.
- 4) 飯塚 昭二 (1972) 大村湾における *Gymnodinium* '65 年型赤潮の発生機構. *日本プランクトン学会報* 19: 22-33.
- 5) 山口 峰生 (1994) *Gymnodinium nagasakiense*

の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究. *南西海区水産研究所研究報告* 16: 251-394.

- 6) Steidinger K (2009) Historical perspective on *Karenia brevis* red tide research in the Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 8: 549-561.
- 7) 宮下 一明, 木幡 邦男, 渡辺 正隆, 広海 十朗, 門田 定美 (1994) 赤潮ラフイド藻 *Chattonella antiqua* に対する珪藻 *Amphiprora hyalina* の増殖阻害効果. *日本大学農獣医学部学術研究報告* 51: 158-163.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

- ①各務 彰記, 森田 航也, 嶋田 宏, 山口 篤, 今井 一郎, 北海道函館湾における有害渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の初出現および2015年と2016年の出現動態, *日本プランクトン学会報*, 査読有, 65巻, 2018, 1-11
- ②今井 一郎, 各務 彰記, 小原 静夏, 結城 貴志, 小池 一彦, 萩原 悦子, 小川 憲太, 米山 弘行, 海底耕耘を活用した *Chattonella* 赤潮制御の試み, *北海道大学水産科学研究彙報*, 査読無, 67巻, 2017, 57-66  
<http://doi.org/10.14943/bull.fish.67.3.57>
- ③今井 一郎, 有害有毒プランクトンの発生機構と発生防除に関する研究, *日本水産学会誌*, 査読無, 83巻, 2017, 314-324  
<http://doi.org/10.2331/suisan.WA2409>

[学会発表] (計 9件)

- ①今井 一郎, 森田 航也, 宮村 和良, 大竹 周, 紫加田 知幸, 底生珪藻類の存在下での有害渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の挙動, 平成30年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学(東京都, 港区), 平成30年3月26-30日
- ②中野 温美, 赤穂 那海, 小原 静夏, 中嶋 義宏, 矢野 良子, 小池 一彦, 萩原 悦子, 米山 弘行, 今井 一郎, Trials of sediment perturbation for prevention of *Chattonella* red tides by using of diatom resting stage cells in sediments in coastal sea of Tomono-Ura, the Seto Inland Sea, 10<sup>th</sup> EASTHAB Symposium "Harmful Algal Blooms in East Asia" (国際学会), 函館市国際水産・海洋総合研究センター(北海道, 函館市), 平成29年12月13-14日
- ③赤穂 那海, 中野 温美, 小原 静夏, 中嶋 義宏, 矢野 良子, 小池 一彦, 萩原 悦子, 今井 一郎, Mesocosm experiments demonstrating the prevention of harmful flagellate blooms by diatoms, 10<sup>th</sup> EASTHAB Symposium "Harmful Algal Blooms in East Asia" (国際学会), 函館市国際水産・海洋総合研究センター(北海道, 函館市), 平成29年12月13-14日
- ④今井 一郎, Environment-friendly strategies for controlling harmful algal blooms, 10<sup>th</sup>

EASTHAB Symposium “Harmful Algal Blooms in East Asia” (国際学会), 函館市国際水産・海洋総合研究センター (北海道, 函館市), 平成 29 年 12 月 13-14 日

- ⑤赤穂 那海, 宮村 和良, 岩野 英樹, 今井 一郎, Diatom resting stage cells and benthic diatoms in the sediment of the Japanese coastal waters, JSGFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (国際学会), 東京海洋大学 (東京都, 港区), 平成 29 年 9 月 22-24 日
- ⑥今井 一郎, 今井 佑実, 森田 航也, 宮村 和良, 野田 誠, 石井 健一郎, In situ bottle experiments demonstrating feasibility of diatom resting stage cells in sediments to prevent red tides of noxious flagellates, JSGFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (国際学会), 東京海洋大学 (東京都, 港区), 平成 29 年 9 月 22-24 日
- ⑦今井 一郎, 森田 航也, 各務 彰記, 仲村 康秀, 海底堆積物中の絨毛虫類による赤潮渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* の捕食と赤潮防除の可能性, 2017 年日本プランクトン学会・ベントス学会合同大会, 滋賀県立大学 (滋賀県, 彦根市), 平成 29 年 9 月 3-5 日
- ⑧今井 一郎, 有害有毒プランクトンの発生機構と発生防除に関する研究, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学 (東京都, 港区), 平成 29 年 3 月 26-30 日
- ⑨今井 一郎, Biological control of harmful algal blooms by using of diatoms through germination of resting stage cells in coastal environments, 1st Annual Scientific Conference of Institute for Research in Innovative Technology and Sustainability (IRITS), (国際学会), The Open University of Hong Kong (Hong Kong, China), 平成 28 年 8 月 24-27 日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :

番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 一郎 (Imai Ichiro)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授  
研究者番号 : 8 0 2 7 1 0 1 3

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

宮村 和良 (Miyamura Kazuyoshi)  
岩野 英樹 (Iwano Hideki)