

三河湾における *Alexandrium tamarense* シストの堆積密度及び発芽率の季節変動について

尊田佳子・石川雅章・松澤忠詞

Seasonal changes of abundance and germination frequency of resting cysts of *Alexandrium tamarense* in Mikawa Bay

SONDA Yoshiko^{*1}, ISHIKAWA Masaaki^{*2} and MATUZAWA Tadashi^{*1}

Abstract : Sediments samples were collected from Mikawa Bay to investigate the seasonal changes in abundance and germination frequency of the resting cysts of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. Occurrence of its vegetative cells was also examined.

Germination of cysts was observed from November to April (except February) when the water temperatures were between 8.0 and 18.8°C, and a clear seasonal fluctuation was recognized. Vegetative cells of *A. tamarense* occurred in the bay from January to April when the water temperature ranged from 5.8 to 17.2°C, but were not found from November to December when the water temperature was the same level. Occurrence of vegetative cells didn't always agree with the germination period of cysts. Cyst density ranged from 1,087 to 1,877 cysts/cm³ wet sediment. It was assumed that increase and decrease in the cyst density from December to May is related with the germination of cysts and with the occurrence of vegetative cells. March and April, in particular, was found to be the suitable period for germination of cysts and propagation of vegetative cells.

キーワード: *Alexandrium tamarense*, シスト, 栄養細胞, 水温

愛知県は、年間約1万トンのアサリ漁獲量を有するが、その一方で、麻痺性貝毒原因プランクトンである *Alexandrium tamarense* (以下、*A. tamarense* とする。)が毎年のように出現する海域を持ち、1991年及び2001年にはアサリをはじめとする貝類の出荷自主規制が実施され、^{1,2)} 食品衛生上のみならず、採貝漁業や潮干狩りによる観光業などの多方面にわたって大きな影響を与えた。

渦鞭毛藻の一種である *A. tamarense* は、生活史の一時期にシストと呼ばれる休眠細胞を形成し海底泥中で過ごし、不適な環境での生き残りや、分布域の拡大などの役割を果たしていると考えられている。³⁾ 三河湾には、湾内の広範囲に多数のシストが堆積していることが報告されている⁴⁾ものの、現存量の季節変動や発芽率に関する研究は行われていない。また、湾内における本種栄養細胞の出現時期は、従来は3-4月が中心であったが、2001, 02年には1月から出現し、早期化する事例が確認された^{2,5)}ことから、シストの現存量や発芽条件を把握することは、有毒プランクトンの発生予測におい

て、重要な課題であると言える。そこで、三河湾における *Alexandrium* 属シストの堆積密度と発芽率の年変動について調査したので報告する。

方法

調査期間及び調査海域

調査は、2003年10月から2004年9月にかけて毎月1回中旬頃に行った。調査海域は、1980年から水産試験場で実施している有毒プランクトンモニタリング調査結果をもとに、頻繁に栄養細胞が確認されている蒲郡市竹島南岸(水深6m)を試料の採集場所とした(図1)。

試料の採取と調整

試料の採集にはTF0式採泥器を用い、各コアの表面から3cmまでを採取し、5-6本分をまとめて一つの底泥試料とした。また同時に、底上1mの水温について多項目水質センサー(U-22, HORIBA)で測定した。試料の一部を、採取時の水温と等しくなるよう、あらかじめ温度調

整しておいたろ過海水に懸濁させ超音波処理を行った後、目合125 μm 及び26 μm のプランクトンネットで篩い分けをし、26 μm のネット上に残った粒子画分を集めてシスト濃縮液を作成した。なお、底泥試料の比重を、Kamiyama⁶⁾の方法に従い求めた。

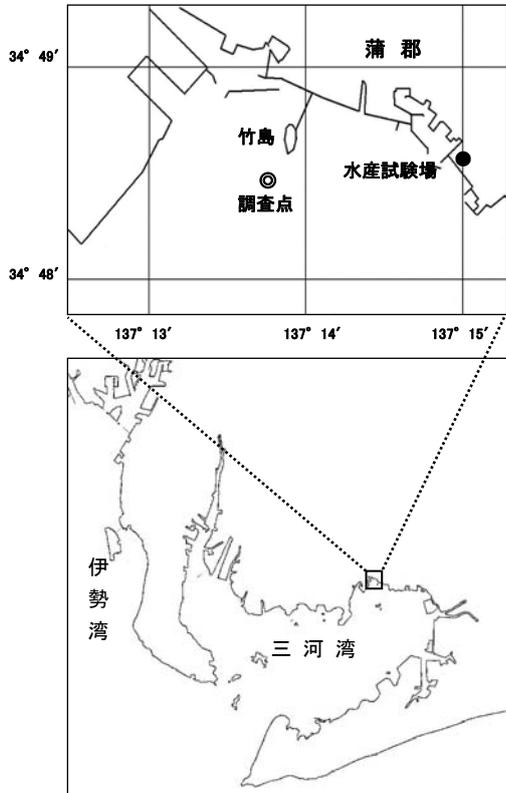


図1 調査海域

(1)堆積密度調査

堆積密度は直接計数法⁷⁾により求めた。すなわち、10mLに定容したシスト濃縮液を、5%グルタルアルデヒド溶液で固定、99%メタノールで脱色し、プリムリン溶液(2mg/mL)で染色した後、蒸留水で再度10mLに定容したものを計数用試料とし、この試料のうち100 μL を落射蛍光顕微鏡(E600, Nikon)のB励起下で観察し、黄緑色の蛍光を発するシストを計数した。計数は4回以上行い、この結果と先に求めた比重より湿泥1 cm^3 あたりのシスト堆積密度を算出した。

(2)発芽率調査

発芽率は、得られたシスト濃縮液から長楕円形をした*Alexandrium*属シストをピペット洗浄法により拾い出し、48穴マイクロプレートに播種して2週間後の発芽の有無を光学顕微鏡下で観察、計数することで求めた。なお、本調査は、マイクロプレートに播種するまでの行程を採泥当日に行うとともに、温度変化を避けるために、室温

調整したクリーンルーム内で作業を行った。培養液は栄養塩濃度を2分の1に調整したSWII⁸⁾を用い、各月とも底泥採取時の底層水温で、光強度約35 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、12L12Dの光条件にしたインキュベータ(MLR-350, SANYO)で培養した。発芽率は、マイクロプレート上に播種した全シスト数に対する発芽したシスト数を百分率で表した。

(3)栄養細胞の出現密度調査

シストに関する調査とは別に、海水中の栄養細胞の出現密度調査を実施した。調査点及び調査期間はシスト調査と同一であるが、調査頻度は2004年1-4月が月3回、その他は月1回とした。採水層は0m及び底上1mで、細胞密度の計数は、1-4月は海水250-1,000mLを目合10 μm のプランクトンネットで10mLまでろ過し、この濃縮液1mLを1-3回計数した平均値を、1Lあたりの細胞密度に換算した。その他の月については、生海水1mLを直接計数した。また、採水と同時に水温をCSTDメーター(ACL1150, アレック電子)で測定した。

結果

(1)堆積密度調査

シストの堆積密度の変動について図2に示した。調査を開始した10月から12月まではおよそ1,700cysts/ cm^3 wet sedimentで推移し、増減はほとんどみられなかった。1月の調査では調査期間中の最小密度の1,087cysts/ cm^3 wet sedimentとなり、前月より約35%減少した。2月には再び1,767cysts/ cm^3 wet sedimentまで増加し、その後5月まで緩やかに減少した。6月以降は増減を示し、最終月の9月には調査期間中の最大密度の1,877cysts/ cm^3 wet sedimentとなった。

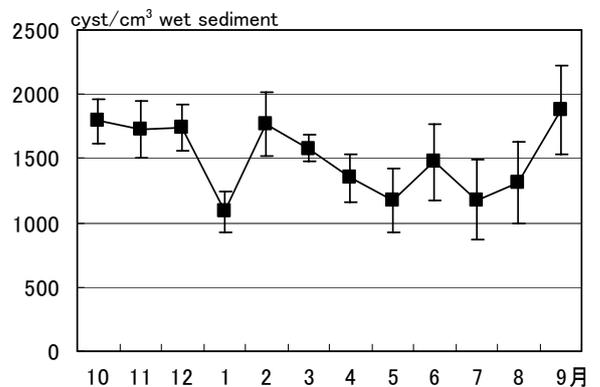


図2 シスト堆積密度の経月変化

I は標準偏差

(2)発芽率調査

各月の発芽率と水温を図3に示した。最初にシストの

発芽が確認されたのは11月で、発芽率は1.3%であった。その後、発芽が確認されたのは12, 1, 3, 4月で、発芽率は28.6-39.2%となり、その他の月は発芽が確認されなかった。高い発芽率となった12月と4月は、培養開始から1週間以内に発芽する個体が多数確認され、これらは発芽したシストの約50%を占めていた。調査時の水温は5.5-28.4°Cで推移し、このうち発芽が確認された水温は、8.0-18.8°Cであった。

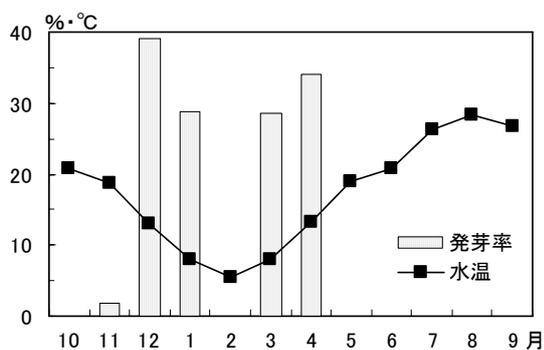


図3 シストの発芽率及び培養温度 (=底層水温)

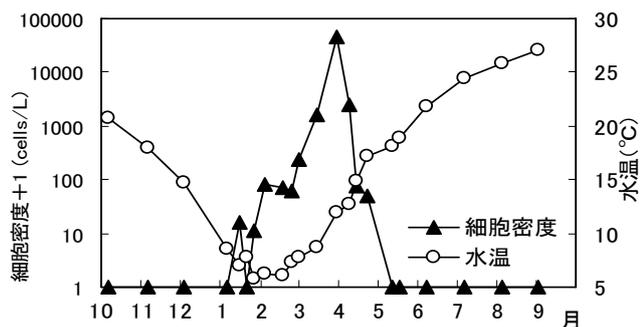


図4 *A. tamarense* 栄養細胞の出現密度と水温の推移

(3) 栄養細胞の出現密度調査

細胞密度の水柱平均と観測時の水温を図4に示した。調査期間中に *A. tamarense* の栄養細胞が確認されたのは1-4月であった。1月は0-15cells/Lで推移し、2月は60-80cells/Lであった。3月になると細胞密度は増加し、3月30日に最高細胞密度44,840cells/Lとなった。4月には減少に転じ、4月22日の50cells/Lを最後に確認されなくなった。調査期間を通じての水温は5.8-27.1°Cで推移したが、本種出現期間の水温は5.8-17.2°Cであり、最高細胞密度となった3月30日は水温12.0°Cであった。三河湾におけるこれまでの貝毒モニタリング調査結果では、水温5-17°Cで本種が出現し、3-4月頃に出現のピークをむかえることが報告されており⁹⁾ 本調査結果も、三河湾における典型的な出現状況であったといえる。

考 察

Alexandrium 属シストは、外部形態からの種同定は困難であり、今回対象とした長楕円形のシストは、*A. tamarense* と *A. catenella* の両者の可能性があるが、発芽率調査で発芽させたシストの一部について、鏡板の形態観察を行ったところ、いずれの栄養細胞も *A. tamarense* であった。また、三河湾で1980年から継続している貝毒プランクトンモニタリングにおいて、*A. catenella* が確認されたことはない。以上のことから、本調査で確認された *Alexandrium* 属シストは、すべて *A. tamarense* のシストとして扱った。

シストの発芽は、8.0-18.8°Cの温度条件下で確認されたが、18.9°Cとなった5月調査では発芽率が0%であることから、発芽至適水温は8.0-13.2°Cであったといえる。さらに、水温約13°Cで培養した12月と4月の場合、発芽後の栄養細胞は順調に増殖を続けた一方、約8°Cで培養した1月と3月は、発芽しても増殖が遅く、数日後には接合子を形成する個体が多数観察されたことから、水温13°Cの方がより増殖適水温であると考えられた。また、本県と同様に *A. tamarense* が頻繁に発生する広島湾産のシストでは、水温10-22°Cでの発芽が確認されており¹⁰⁾ 三河湾産の方がやや低めの水温であるが、ほぼ同様の結果となり、シストの発芽に明確な季節性が認められた。年間最低水温となった2月調査(水温5.5°C)では、低水温によりシストの発芽が抑制された結果、発芽率が0%となった。ただし、栄養細胞の出現調査を行った現場海域では2月に出現が確認されているうえ、三河湾の冬季の底層水温は、1月中旬から3月中旬までの約2ヶ月間6-7°Cで推移することから、水温6-7°Cにおけるシストの発芽率についても、今後調査する必要があると考えられる。

シスト堆積密度は、1年を通じて約1,000-1,900 cysts/cm³ wet sedimentで推移した。調査地点とした三河湾北部海域は、*A. tamarense* の栄養細胞が高密度に出現する海域であるが、栄養細胞の出現密度が高い海域とシストの高密度分布域はよく一致すると報告されている¹¹⁾ ことや、三河湾と同様に *A. tamarense* や *A. catenella* が高密度で発生している徳山湾で1,304±2,790 cysts/cm³ wet sediment、広島湾で647±1,207 cysts/cm³ wet sedimentの *Alexandrium* 属のシストが確認されている¹²⁾ ことなどと比較すると、本調査地点はシストの高密度海域であったといえる。

シスト堆積密度の季節変動についてみると、12-2月にかけて特に大きな増減がみられた。12-1月は、発芽率調査の結果からシストが発芽し、これと連動して堆積密度

が減少したものと考えられる。しかし12月は、現場海水中から栄養細胞は確認されていない。この海域の12月のシスト調査時の水温は13.2°Cであったが、その後急激に低下し10°C以下となった(図5)。また、*A. tamarensis*の増殖適水温は、大船渡湾株で10-18°C¹³⁾、広島湾株で10-20°C¹⁴⁾と報告されていることから、現場海域では、シストの発芽は起きるものの、栄養細胞は盛んに増殖することなく死滅するかシストを再形成し、その結果、2月のシスト堆積密度が増加に転じたものと推察される。一方、2-5月にかけてのシスト堆積密度は、緩やかに減少しているが、これは、この時期にシストの発芽が盛んであった実験結果と、3-4月を中心に現場海水中に栄養細胞が出現したことが連動した結果であるといえる。以上のことから、三河湾における*A. tamarensis*は、水温下降期である12-1月と水温上昇期である3-4月に、シストの発芽と栄養細胞出現の可能性があり、特に3-4月は、栄養細胞の増殖に適した時期であることが明らかとなった。

7-9月にかけては堆積密度が増加しているが、この期間にはシストの発芽も、栄養細胞の出現も確認されておらず、増加原因については解明することができなかった。

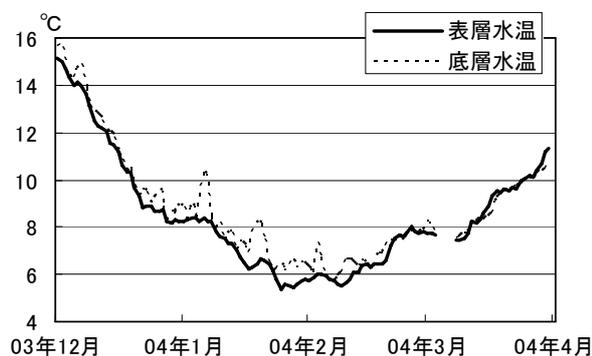


図5 自動観測1号ブイにおける水温の推移

年間最低水温となった2月は、シストが発芽していないにも関わらず、天然海水中には栄養細胞が確認されている。これまでにも現場海域において12月や1月初旬に*A. tamarensis*の栄養細胞が確認されていることもあり、これらの年は、水温下降期に発芽した本種が増殖し、貝毒発生に至ったと考えられる。その事例として、2000年と05年に本種が春季ブルームを形成した翌年の1-2月にも高密度に出現する事例が確認されており、このことは、前年の春季に底泥中に多数のシストが供給されたことが、翌年の冬季出現のためのSeed populationとしての役割を担っていたものと考えられ、多数のシストが存在すれば、水温下降期であっても貝毒発生の危険があることを

示唆している。したがって、*A. tamarensis*のシスト堆積密度を経年的に調査することで、本種発生の予測に利用できる可能性も考えられる。ただし、シストの発芽には、水温条件だけでなく内的要因なども関与しているうえ、発芽後の増殖には、環境条件や競合種、捕食者の出現状況などによって相違が生じるため、これらについても検討することで、プランクトン発生の予測に役立つデータ収集に努めたい。

要約

三河湾において貝毒発生の原因となる有毒渦鞭毛藻 *A. tamarensis* シストの堆積密度と発芽率および栄養細胞の出現状況について調査した。

シストは水温が8.0-18.8°Cとなった11-4月(2月を除く)に発芽し、明確な季節性が認められた。栄養細胞は水温が5.8-17.2°Cとなった1-4月に現場海域で出現したが、同水温帯であった11-12月には出現せず、シストの発芽と栄養細胞の出現時期は必ずしも一致しなかった。シスト堆積密度は1,087-1,877cysts/cm³ wet sedimentの高密度で推移した。12-5月にかけては、シストの発芽や栄養細胞の出現と連動して増減していることが推察され、特に3-4月は、シストの発芽と栄養細胞の増殖に適した時期であることが明らかとなった。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、貴重なご意見並びにご校閲を頂いた瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部長井敏博士に心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり数多くのご協力を頂いた愛知県水産試験場漁場環境研究部漁場保全グループの皆様に深謝いたします。

文献

- 1) 石田基雄(1992)平成3年度赤潮貝毒監視事業報告書. 愛知県, pp70.
- 2) 尊田佳子(2001)平成12年度赤潮貝毒監視事業報告書. 愛知県, pp22.
- 3) Anderson, D.M. and D. Wall (1978) Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. J. phycol, 14, 224-234.
- 4) 水産庁(1986)内湾シスト調査報告書`三河湾`. pp93.
- 5) 尊田佳子(2002)平成13年度赤潮貝毒監視事業報告書. 愛知県, pp20.

- 6) Kamiyama K. (1996) Determination of the abundance of viable tintinnid cysts in marine sediments in Hiroshima Bay, the Seto Inland Sea of Japan, using a modified MPN method. *J. Plankton Res.*, 18, 253-1259.
- 7) Yamaguchi, M., Itakura, S. Imai, I. and Ishida, Y. (1995) A rapid and precise technique for enumeration of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in natural sediments. *Phycologia*, 34(3), 207-214.
- 8) 岩崎英雄 (1967) 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, pp55.
- 9) 石田基雄・尊田佳子 (2003) 三河湾における *Alexandrium tamarense* の増殖とアサリの毒化について. 愛知水試研報, 10, 25-36.
- 10) 板倉茂・山口峰生 (2000) 広島湾産 *Alexandrium tamarense* シストの発芽生理. パイオニア特別研究「麻痺性有毒プランクトンの発生予察手法の開発」平成 11 年度研究報告, 瀬戸内海区水産研究所, 12-16.
- 11) 山口峰生・板倉茂・今井一郎 (1995) 広島湾海底泥における有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* および *Alexandrium catenella* シストの現存量と水平・鉛直分布. 日水誌, 61(5), 700-706.
- 12) Yamaguchi, M., Itakura, S. Nagasaki, K. and Kotani, Y. (2002) Distribution and abundance of resting cysts of the toxic *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan. *Fisheries Science*, 68, 1012-1019.
- 13) 阿知波英明・岩崎英雄 (1990) 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖特性. 藻類, 38, 51-59.
- 14) 山本民次・樽谷賢治 (1997) 広島湾産有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響. 藻類, 45(2), 95-101.