

(7) 富栄養化と赤潮発生機構解明の方法論 (I) 制御実験生態系

国立公害研究所 ○渡辺正孝, 渡辺 信, 原島 省, 木幡邦男

1. はじめに

赤潮発生機構解明のための方法論としては、従来より大別して2つの方法が用いられてきた。すなわちi)実験室内で試験管もしくはフラスコを用いて、制御した環境因子下での培養を行いながら増殖特性を解析することにより現象把握を行う方法と、ii)現場での観測を行い、環境因子と発生機構との関連を求める方法がある。前者は計測も容易であり、藻類の生理学的な性質を知るのに有効である反面、系が極度に単純化されており、その知見をそのまま応用して現場の現象を説明することには困難があり、その解析にはおのずと限界がある。一方後者はあまりにも多くの環境要因を同時に含んでおり、系の非線型的な複雑さに加えて、現場での計測の困難さのために発生機構の解明を阻んでいる。通常は両者を繰り返し行うことにより、より正確な現象把握を行う努力がなされているが、現実には実験室と現場での観察にはかなりの隔りがあることが指摘されている (Fogg, G.E. 1975)。この隔りを埋めるため、両者の中間に位置するものとしてマイクロコズムを用いた種々の制御実験生態系の実験が多く行われてきた。マイクロコズム (microcosm) は、“対象とする一生物種あるいは生物群集を、生物過程の時間および空間スケールを満足し得るような制御環境条件下で維持し、物理的・化学的環境要因と生物過程との関わりあいを再現させる実験系” と言うことができる。環境条件の設定及び設置場所に応じ、天然水中に設置する現場型と、陸上に設置する室内実験型の特殊条件培養のものまで多種多様である。現場型および室内型のいずれのマイクロコズムにとっても根本的な問題は、その制御実験系が現実の対象とする水域で発生している現象の何を、どの程度再現し得るかにある。物理過程から決定される相似則により縮小された時間及び空間スケール内で増殖・分裂といった生物過程を再現させることは不可能であり、物理過程と生物過程の両者を同時に満足させられるような相似則は存在しない。したがって空間スケールを歪ませることのない現場型マイクロコズムの方が、空間的歪みの大きい室内実験型マイクロコズムより解析上の問題点は少ない。しかしマイクロコズムの特質は、現場水域で特徴的な生物・物理・化学的諸過程を歪ませた形ではあっても再現させ、環境因子とそれら諸過程の相互作用を綿密に計測することにより、基礎的な因果関係を解明することにその有効性がある。環境因子を正確に制御し、綿密な計測が可能である室内実験型マイクロコズムの方が、制御及び計測が困難な現場型マイクロコズムより、本来の特質と有効性をより多く兼ねそなえていると言える。さらに赤潮現象の最大の特徴は、その構成プランクトン種がほとんどの場合に単一種であるということである。すなわち、赤潮現象はある生態系において生物的抑制の下で、ある種の占めている地位— realized niche — が大きく、かつ生物的抑制のない下で理論的に占める最大の地位— fundamental niche — に近似した状態にあると言える。その意味から、室内実験型マイクロコズムで単一種を扱い、その fundamental niche を解析することの赤潮現象解析に果たす役割は大きいといえるし、それをふまえて他種プランクトンとの混合培養を行うことで、その種の realized niche の実験的解析も可能である点に室内実験型マイクロコズムの特色がある。

本論文においては、海洋環境研究室が開発を行った室内実験型マイクロコズムの概要と実験結果の一部について報告する。

2. 赤潮鞭毛藻の垂直移動とその生態的意味

赤潮現象は特定種の異常増殖と水面への赤潮藻類の集積による水の変色で特徴づけることができる。特に藻類の表面への集積は対流渦などの物理過程によるものと、藻類に内在する因子によるものとの2つが考えられる。海域やダム湖に赤潮現象をもたらすものとして鞭毛藻が重要であるが、鞭毛藻の示す垂直移動は単なる物理的集積作用を示しているのみならず、栄養塩に富んだ下層に移行して増殖に必要な物質を取り込む

ことができるとともに、光合成を行うに必要な光層への上昇を行うことができ、鞭毛藻の個体群の発達に重要な意味を持つと考えられる（Eppley, et al, 1968；矢持 等 1980）。このような鞭毛藻の垂直移動にもとづく増殖、集積過程をマイクロコズム内に再現させ、鞭毛藻の個体群発達における競合力の解析を行った。

2-1. 垂直移動の日周性

空間的歪みをもたせた室内実験型マイクロコズムにおいて、鞭毛藻による垂直移動現象を現場水域に見られるようなパターンと同じ現象を再現できるかどうかをまず検証する必要がある。そのために作成されたマイクロコズム一号機の概略を図1に示す。本体は高さ75 cm、直径20 cm、容積 23.6 l、のガラス製のもので、垂直方向に5点サンプリング口がある。排出口は無菌的にメンブランフィルターを取り付け、又は取りはずしの可能な系になっており、目的に応じ連続培養または透析培養が可能な装置となっている。さらに速度可変な上下攪拌装置により、系内に既知の乱れを再現できるようになっている。渡辺等（1981）は大阪湾谷川港にて赤潮を形成し、日周垂直移動を示す *Olisthodiscus luteus* の無菌クローン培養株を使用して、マイクロコズム一号機で本種の垂直移動の実験を行った。実験条件は温度 20℃、照度 4,000 lx、12時間明期・12時間暗期サイクル下で、f / 2 培地を用いた。初期濃度 70 cells/ml で実験を開始し、除菌フィルターを通した空気による通気攪拌培養を行った。

図2に示すように対数増殖期にあたる18~19日目の株を用い、朝9時にばっ気を停止した後、2時間毎に表層、中層、底層の3層からサンプリングを行い、細胞数はノイバウエル血球計算盤を用いて計測した。*O. luteus* の垂直移動実験開始時の濃度は 2.2×10^4 cells/ml で一様であったが、集積の結果表層での濃度は 4.2×10^5 cells/ml に達している（図3）。

矢持等（1980）が大阪湾谷川港にて観察したように（図4）、日中は表層に、夜間は底層に集積し、かつ明暗周期に先行する垂直移動のパターンが実験系においても再現されている。

このようにマイクロコズム一号機は高さ75 cmと小さく、現場の水深とはまったく異なるにもかかわらず、少なくとも垂直移動の周期及びその垂直移動のパターン、集積された濃度等の生物過程は現場観測での結果と非常に類似しており、したがって他の物理的・化学的環境因子の空間的分布の歪みを考慮しないならば、このマイクロコズム一号機によっても鞭毛藻の垂直移動にもとづく集積特性及びそれにともなう増殖を見ることが可能であると言える。

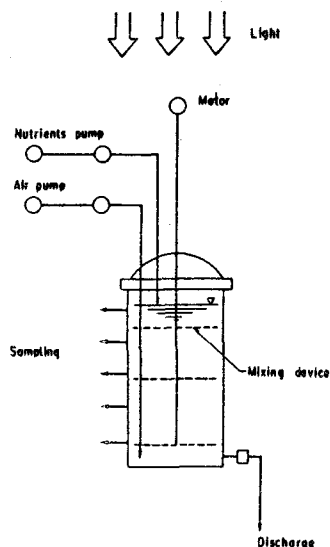


図1. マイクロコズム一号機の概略図

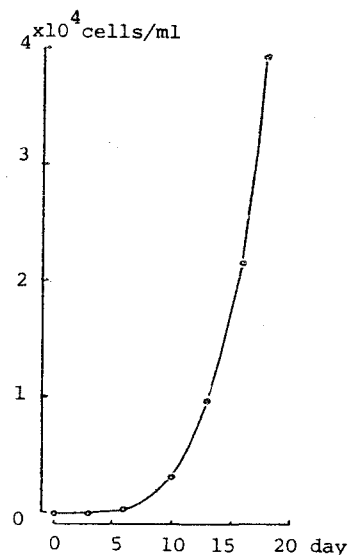


図2. マイクロコズム一号機での *O. luteus* の増殖

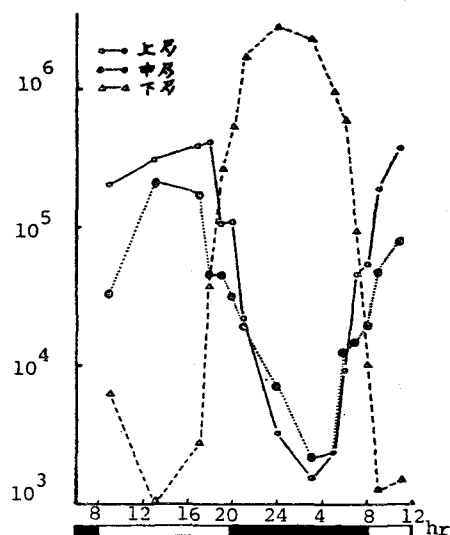


図3. マイクロコズム一号機での
O. luteus の垂直移動

2-2. リン酸塩取り込みの日周性

鞭毛藻の示す垂直移動は、日中に表層へ集積し、夜間は下層へと移行するパターンを示すがゆえに、鞭毛藻の個体群発達に関する生態的意味を論じるためには、栄養塩取り込みの日周性が検証されなければならない。

渡辺等（1981）はリン酸制限下での連続培養を行い、定常状態での外液濃度を測定することにより、*O. luteus* の栄養塩取り込みの実験を行った。リン酸塩制限の人工培地として、ASP-7 修正培地を使用し、8 l の培地貯蔵器に入れてオートクレーブ滅菌を行い、培地はローラーポンプを通じて培養シリンダーに送られる。培養シリンダー内の液量を固定するように調整されている（図5）。攪拌は1N, H_2SO_4 とフィルターを通じた無菌空気を通気することにより行った。12時間明期12時間暗期サイクル、照度4,000 lx、温度20°Cの条件下で行った。

図6は、*O. luteus* を稀釈率0.3 day⁻¹で連続培養した時の定常状態における外液の PO_4-P 濃度の経時的变化を示したものである。明期と暗期のそれぞれにみられる外液の PO_4-P 濃度の減少は、*O. luteus* による PO_4-P の取り込みを示しており、このことから*O. luteus* が夜間下層へ移行してリン酸塩を取り込みうるということが明らかになった。

以上の2つの実験により、*O. luteus* は日周垂直移動によって、上層（有光層）と栄養塩に富んだ下層との間を上下することにより、光合成を能率的に行い、同時に

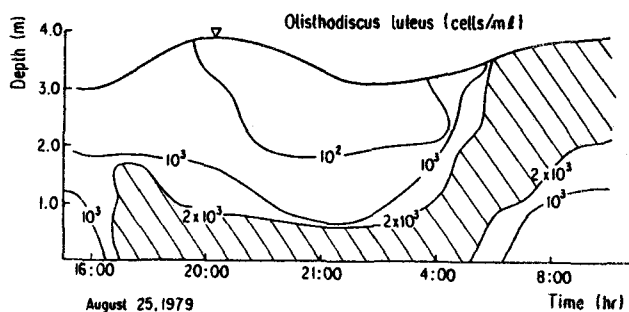


図4. 大阪湾谷川港における *O. luteus* の垂直移動
（矢持等1980による）

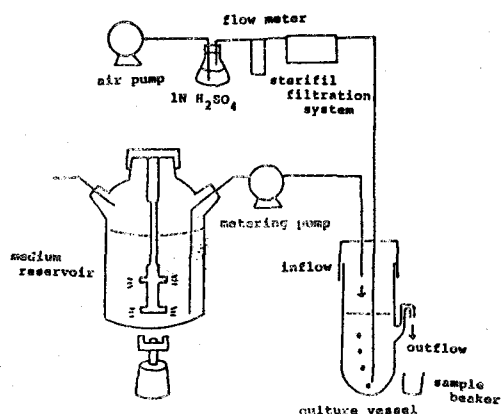


図5. 連続培養系の概略図

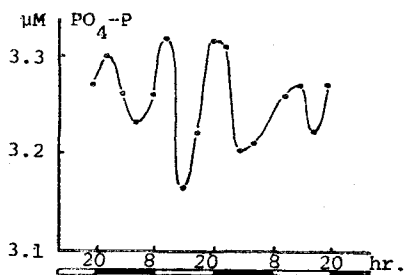


図6. 連続培養定常状態における外液 PO_4-P 濃度の周期変動

増殖に必要な栄養塩を夜間下層において取り込むことができると考えられる。

現在の実験段階においては鞭毛藻の日周垂直移動とリン酸塩取り込みの日周性についての実験とは別個に行われたが、最終的な実証は現場水域と類似の水温・塩分成層を形成し、下層にのみ栄養塩を導入し、栄養塩についても成層を形成した制御実験系において鞭毛藻の個体群発達過程を実験的に追跡する必要がある。

3. マイクロコズム 2 号機

マイクロコズム 1 号機の基本的性能を備え、さらに温度・塩分・栄養塩・光等の垂直分布を作成し、長期間の水質・生物量連続観測を可能にするような大容量のマイクロコズム 2 号機を完成した。図 7 にその概略図を示す。

八丈島沖の黒潮域より搬入した海水では、まずストレージタンク（容量 10 m^3 、内部はグラスライニング製）に貯蔵される。これより圧縮空気により溶解槽（容量 200 l ）に送られ、ここで硝酸塩・リン酸塩等の栄養塩と混合される。これより定量ポンプで殺菌装置に送られる。ろ過滅菌法を用い、培養液を 0.22μ のミリポアフィルターにより無菌化された培養液が培養槽本体に送られる。培養槽本体は高さ 1.5 m 、直径 1 m 、容積 1 m^3 であり、内部はグラスライニング製となっており、壁面からの溶出

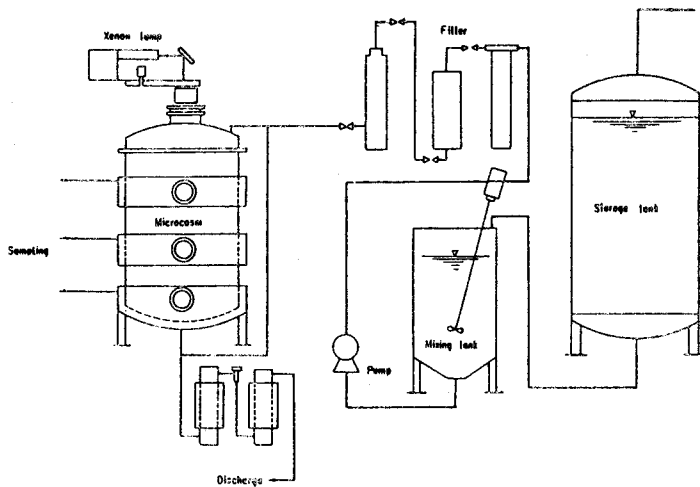


図 7. マイクロコズム 2 号機の概略図

は防止されている。培養槽本体、殺菌装置及びそれ以後の配管系統はすべて 1 気圧 、 150°C の蒸気による蒸気殺菌が行えるようになっている。培養槽内の搅拌は除菌フィルターを通じた空気を吹き込ませることにより行い、機械的な搅拌装置は用いなかった。培養槽より放流される培養液は蒸気殺菌槽（ 100°C 、流量 10 l/hr 、滞留時間 2 時間）を通し、赤潮藻類を死滅させる。培養槽本体の上部に設置された人工太陽照明装置（ 2 kW 、Xenon lamp）により、太陽光線に近い分光分布をもった光を照射し、種々のサイズのワイヤーメッシュをもった金網に光を通すことにより、一定周期で明るさを 8 段（ $200\text{ lx} \sim 20,000\text{ lx}$ ）に自動調光する。培養槽本体の外側は 3 つのジャケット（幅 3.5 cm 、厚さ 5 cm ）により被われ、この中を温度調整槽にて設定温度に制御された循環水（流量 $2 \sim 6\text{ l/min}$ ）を通すことにより、培養槽本体の中に任意の垂直温度勾配を設置することができる。すなわち夏季の強い成層から、秋・冬期の密度不安定による鉛直対流まで再現させることが可能である。その他塩分・pH・DO、栄養塩類を自動計測し、連続モニタリングを行うことが可能である。

大阪湾より採集・単離した *O. luteus* の無菌クローン株を、培養温度 $18 \sim 21^\circ\text{C}$ 、照明は 12 時間—12 時間の明暗サイクルの条記下で、f/2 培地により無菌培養を行った。初期細胞数濃度は 210 cells/ml で与え、最下層よりのばっ気による搅拌を加え内部を均一とし、サンプリングは上層で行い細胞数を計測した。70 日間にわたって行った連続実験での増殖曲線を図 8 に示す。培養開始後約 1 カ月で細胞数濃度は $1 \times 10^4\text{ cells/ml}$ に達して、その対数増殖期における増殖定数 k は約 0.1 day^{-1} であり、三角フラスコ（ $k = 0.68$ ）での増殖速度よりも遅い。培養 70 日目、細胞数濃度が $2.8 \times 10^4\text{ cells/ml}$ の時にばっ気を中止すると *O. luteus* は垂直移動による表層への集積を示し、昼間表層に顕著なパッチ状分布を形成

することが確認された。表1にはその時の各層での細胞数濃度を示すが、表層での細胞数 (8.2×10^5 cells/ml) は、均一な状態での細胞数 (2.8×10^4 cells/ml) に比較して一桁高い細胞数濃度を示しており、マイクロゾム一号機による結果と同様の集積パターンを示すことが確認できた。

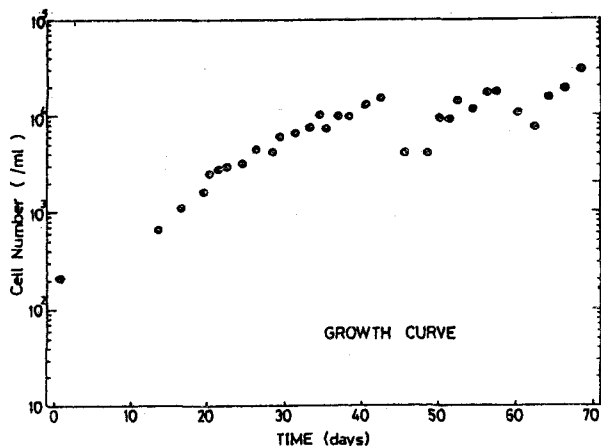


図 8. マイクロゾム 2 号機における *O. luteus* の増殖曲線

表 層	8.2×10^5 cells/ml
上 層	7.0×10^4
中 層	5.0×10^4
底 層	0

表 1. マイクロゾム 2 号機での各層の細胞数

4. 結 論

新しく開発された室内実験型制御実験生態系 (マイクロゾム) のフローシート、実験操作条件を提示するとともに、これらの実験装置を用いて無菌培養による赤潮状態の再現を行い、赤潮藻類及び環境因子の時間的・空間的分布の変動を定量的に解析し得る段階に達したことを示した。室内実験型マイクロゾムは、その空間的歪みのゆえにその結果の解析には多くの制約が加えられている。しかし赤潮発生機構の解明にとって本質的であると考えられる鞭毛藻の日周垂直移動の周期、上昇下降速度、集積パターン、等を現場水域におけるそれらに類似した状態に再現させることが可能になり、精密な計測を連続的に行うことにより、物理的・化学的環境因子と生物過程との複雑な関連を解明することの可能性が示唆された。さらに一樣混合している場合に比較して、温度・塩分・照度・栄養塩類などの鉛直分布による赤潮藻類の増殖、集積パターンへの影響の定量化など、より複雑な環境因子との関連の解析を行うことにより、マイクロゾム法の改良を加えていく予定である。

参 考 文 献

- Eppley, R. W., O. Holm-Hansen and J. D. Strickland, 1968: Some observations on the vertical migration of dinoflagellates, J. Phycol. 4: 333-340.
- Eppley, R. W. and W. G. Harrison, 1975: Physiological ecology of *Gonyaulax polyedra*, a red water dinoflagellate off southern California, Proc. Int. Conf. (1st), Mass. Sci. Tech. Found.
- Fogg, G. E., 1975: Algal cultures and phytoplankton ecology, 2nd Ed. The University of Wisconsin Press. 175.
- 矢持 進, 安部恒之, 城久, 1980: 赤潮多発期における植物プランクトン組成とその推移について, 昭

和 5 3 年度赤潮予察報告書

渡辺 信，木幡邦男，渡辺正孝，矢持 進，1981：赤潮鞭毛藻 O. luteus の垂直移動とその生態的意味
— I，日本海洋学会春季大会．