

(25) ダム貯水池に発生する*Peridinium*淡水赤潮の発生要因に関する考察
- 共存藻類の増殖特性に着目して -

Study on the Dominating Factors of Freshwater Red Tides Caused by
a Dinoflagellate *Peridinium bipes* in a Dam Reservoir
- Focusing on the Multiplication Characteristics in Algae -

岸本直之^{*}, 大西庸介^{**}, 峇地賢二^{**}, 宗宮功^{*}, 大西正記^{***}

Naoyuki KISHIMOTO^{*}, Yosuke OHNISHI^{**}, Kenji KAKUCHI^{**}, Isao SOMIYA^{*}, Masaki OHNISHI^{***}

ABSTRACT ; The dominating factors of freshwater red tides caused by a dinoflagellate *Peridinium bipes* were studied by means of the cultivations of algae in the Asahi reservoir which was a mesotrophic or oligotrophic lake. Targeted species of study were *Peridinium bipes* (clonal and axenic population), *Melosira granulata* (clonal and axenic population), *Nitzschia* sp. (mono-population), *Ankistrodesmus falcatus* (mono-population), and *Synechococcus* sp. (mono-population) which were collected from the Asahi reservoir except for *M. granulata*. Cultivations were conducted by use of synthetic mediums (AFH, C, and Csi).

The multiplication curve of *P. bipes* to light showed that *P. bipes* was adapted to stronger light intensity than other tested algae, though the response to water temperature was analogous to other tested algae. Half-saturation constants of *P. bipes* for nitrate and β -glycerophosphate were $0.055\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ and $0.0015\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ which was nearly equal to those of *M. granulata* and lower than those of the other algae. These results indicated that *P. bipes* was able to be superior to the other algae in the surface layer in the Asahi reservoir. This estimation was confirmed from the monthly vertical distributions of *P. bipes* and *M. granulata* in the Asahi reservoir from April 1995 to March 1996. Although the vertical distributions of *P. bipes* were not necessarily determined only by the specific growth rate because of its positive phototaxis and negative geotaxis, *P. bipes* was considered to get the taxis for making a best use of the above-mentioned physiological advantages. Therefore, the multiplication characteristic in *P. bipes* should be useful to forming freshwater red tides.

KEYWORDS ; freshwater red tide, *Peridinium bipes*, diatoms, Chlorophyceae, Cyanophyceae

1. はじめに

西日本のダム貯水池を中心に1970年頃より渦鞭毛藻綱の*Peridinium*属による淡水赤潮の発生が多数報告されている¹⁾²⁾。*Peridinium*淡水赤潮は相模湖で報告された*Peridinium polonicum*によるブルーム³⁾を除いて毒性物質の産生は報告されていないが、上水設備においてろ過障害や飲料水の着臭を引き起こしたり、貯水池の景観阻害を引き起こすことから⁴⁾早急な対策が望まれている。

アオコや海域の赤潮が比較的富栄養化した水域で発生が見られるのに対し、*Peridinium*淡水赤潮は富栄養化が進行した水域よりもむしろ清浄な貧栄養から中栄養に属する貯水池で観測されることが多いという特徴を持っている。その増殖速度も他の藻類と比較して小さく、なぜ、清浄な貯水池においてブルームを形成するのかという点について明確な結論は出されていない。

本研究では、揚水発電所の下部調整池である奈良県旭貯水池において頻発している*Peridinium bipes*による淡水赤潮に関して、*Peridinium bipes*とその共存藻類の増殖特性から見た淡水赤潮の形成要因について報告する。

^{*} 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 (Department of Environmental Eng., Graduate School of Eng., Kyoto Univ.)

^{**} (株)関西総合環境センター (Kansai Environmental Engineering Center Co., Ltd.)

^{***} 関西電力(株)総合技術研究所 (Technical Research Center, The Kansai Electric Power Co., Inc.)

2. 実験方法

2.1 対象貯水池

研究対象とした旭貯水池は揚水発電所の下部調整池であり、1978年に湛水した。総貯水量は1527万トン、貯留水の交換率は約4.6回/年で、集水面積39.2km²である。集水域には人家が存在せず、貯水池への流入負荷はほとんど自然負荷源に由来している。過去7年間の平均水質はTN 0.191 mgN・L⁻¹、IN 0.068 mgN・L⁻¹、TP 0.013 mgP・L⁻¹であり、Vollenweiderがまとめた富栄養化限界⁹⁾から判断するとその栄養レベルは貧栄養から中栄養に属する。本貯水池における淡水赤潮の発生は1980年以降毎年のように確認されており、その原因藻類種は渦鞭毛藻綱の*Peridinium bipes*である。

2.2 実験材料

増殖特性の把握は渦鞭毛藻綱の*Peridinium bipes* (無菌クローン株) および珪藻綱の*Melosira granulata* (無菌クローンNIES-258保存株) と*Nitzschia* sp. (単藻株)、緑藻綱の*Ankistrodesmus falcatus* (単藻株)、藍藻綱の*Synechococcus* sp. (単藻株) を対象として実施した。*M. granulata*以外は全て旭貯水池より単離した株であり、*M. granulata*のみ国立環境研究所(NIES)の保存株を用いた。これらの藻類は旭貯水池において一般に観察される藻類である。これらの藻類について、水温・光強度に対する増殖応答の把握には前培養を行って対数増殖期にある細胞を実験に供し、窒素・リン濃度に対する増殖応答の把握には対象とする窒素もしくはリンを取り除いた欠乏培地を用いて一定期間飢餓培養を行った細胞を実験に供した。飢餓培養期間は種によって異なるが、窒素濃度の実験では7日間(*P. bipes*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*, *Synechococcus* sp.) および20日間(*M. granulata*) に設定し、リン濃度の実験では7日間(*P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp.) および28日間(*A. falcatus*, *Synechococcus* sp.) に設定した。

2.3 増殖特性の把握

増殖特性は人工培地を用いた培養実験により把握した。使用した培地は、AFH培地(*P. bipes*)、C培地(*A. falcatus*, *Synechococcus* sp.)、Csi培地(*M. granulata*, *Nitzschia* sp.)である(Table 1)。これらの培地では窒素源として硝酸態窒素を、リン源としてβ-グリセロリン酸を用いている。窒素濃度に対する増殖応答の把握にはそれぞれの培地においてCa(NO₃)₂・H₂OをCaCl₂・2H₂Oに置き換え、KNO₃で窒素濃度を調整した改変培地を用い、緩衝液やEDTAに含まれる窒素は窒素源として利用されないものとして以後の解析を行った。リン濃度に対する増殖応答の把握にはリン濃度のみを調整した改変培地を用いた。

*Peridinium bipes*の培養は100mL三角フラスコ3本立てで実施し、培地60mLに前培養した*P. bipes*細胞を細胞濃度が100cells・mL⁻¹となるように接種して、温度および光強度をコントロールしたインキュベータを用いて行った。生物量は培養液1mLを採取し、その中に含まれるクロロフィルaによる自家蛍光を有する細胞を蛍光顕微鏡で観察、計数することにより測定した。

M. granulata, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*, *Synechococcus* sp.の培養は口径18mmの試験管3本もしくは4本立てで実施し、培地15mLに前培養した細胞を1mLずつ接種して、温度および光強度をコントロールしたインキュベータを用いて行った。生物量は蛍光強度計(TURNER DESIGNS Co., Model 110)を用いて530nmの蛍光強度を測定することにより計測した。

一般に藻類の比増殖速度 μ [d⁻¹]は水温、光強度、栄養塩類濃度等によって規定される。増殖を規定する栄養塩類としてN, Pのみを考えると、比増殖速度 μ は最大比増殖速度 $\mu_{\max}$ [d⁻¹]と増殖規定因子の影響関数の積として式(1)のように表現される⁹⁾。

$$\mu = \mu_{\max} \times f_T \times f_I \times f_N \times f_P \quad (1)$$

f : 増殖影響関数 ($0 \leq f \leq 1$)

添字 T, I, N, P : それぞれ水温, 光強度, 窒素濃度, リン濃度を表す

比増殖速度 μ は培養日数 t [d] と生物量 N を片対数紙にプロットし, 対数増殖期について回帰直線を求め, 式(2)に基づき回帰直線の傾きより求めた。また, 窒素, リン濃度に対する増殖応答については MONOD の式(3)に当てはめ, 最大比増殖速度および半飽和定数を算定し, 解析に用いた。なお, 比増殖速度の算出には 3 本立てもしくは 4 本立て培養の平均値を用いた。

$$\ln N = \ln N_0 - \mu t \quad (2)$$

N_0 : 初期生物量

$$\mu = \mu_{\max} f_s = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

S : 栄養塩濃度 [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]

f_s : 栄養塩濃度 S に対する増殖影響関数

K_s : 栄養塩濃度 S に対する半飽和定数 [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]

Table 1 Composition of mediums

AFH medium		C medium	
NaNO ₃	20mg	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15mg
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	60mg	KNO ₃	10mg
Na ₂ glycerophosphate	10mg	β-glycerophosphate	5mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20mg	MgSO ₄	4mg
KCl	10mg	Vitamine B ₁₂	0.01μg
Tris aminomethane	100mg	Biotin	0.01μg
Fe(as EDTA)	20μg	Tiamine	1μg
PII Metals	5mL	PIV metals	0.3mL
Vitamine B ₁₂	2μg	Tris buffer	50mg
Thiamine HCl	100μg	Distilled water	99.7mL
Biotin	1μg	pH	7.5
Distilled water	1000mL		
pH	7.5		
PII metals		PIV metals	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100mg	FeCl ₃ ·6H ₂ O	19.6mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.9mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	3.6mg
H ₃ BO ₃	20mg	ZnCl ₂	1.05mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	14.4mg	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.4mg
ZnCl ₂	1.04mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.4mg	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100mg
Distilled water	100mL	Distilled water	100mL
		Csi medium	
		Add HEPS 50mg instead of Tris buffer and Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O 10mg to C medium.	

3. 結果と考察

3.1 増殖速度に及ぼす水温の影響

水温 T [°C] を変化させた培養実験の結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 に示した近似曲線は水温に関する増殖応答曲線であり, 式(4)に示すような指数型関数⁷⁾で表現した。本関数は高水温時の増殖阻害を一つの式で表現できるという利点を有している。

$$f_T = \frac{\mu}{\mu_{\max}} = \left\{ \frac{T}{T_{opt}} \exp \left(1 - \frac{T}{T_{opt}} \right) \right\}^{\xi} \quad (4)$$

T_{opt} : 増殖至適水温[°C]
 ξ : 定数

Fig. 1を見ると*P. bipes*の水温に対する増殖応答曲線は他の藻類と比較して顕著な違いはなく、増殖至適水温は20°C付近で、より高温域では増殖阻害が観測された。本結果から水温に関して*P. bipes*が生理的に有利な点は認められなかった。一方、*A. falcatus*は供試藻類の中で唯一25°C付近に増殖至適水温を有し、高い水温に適應した種であると考えられる。

3.2 増殖速度に及ぼす光強度の影響

光強度 I [$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]に対する各藻類の増殖応答曲線をFig. 2に示す。増殖応答曲線は以下に示す3つのグループに大別された。

- A) 強光阻害のないグループ(*Peridinium bipes*),
- B) 強い強光阻害を有するグループ(*M. granulata*, *A. falcatus*),
- C) 弱い強光阻害を有するグループ(*Nitzschia* sp., *Synechococcus* sp.)

A)のグループについては式(3)において栄養塩濃度 S の代りに光強度 I を用いたMONOD型の関数で増殖応答曲線を近似し、その半飽和定数 K_I をグラフ中に示した。B)およびC)のグループについては式(4)において水温 T の代りに光強度 I を用いた指数型関数により増殖応答曲線を近似し、至適光強度 I_{opt} および指数 ξ をグラフ中に示した。本結果より*P. bipes*は強光下において他の藻類に対して生理的に優位となることが考えられる。

3.3 増殖速度に及ぼす窒素・リン濃度の影響

窒素濃度およびリン濃度に対する各藻類の増殖応答曲線をFig. 3, Fig. 4に示す。また、Table2にはMONODの式より算出された最大比増殖速度を示した。Figure 3より*P. bipes*の窒素濃度に関する半飽和定数 K_N は0.055[mgN $\cdot\text{L}^{-1}$]であり、他の藻類と比較すると*Melosira granulata*よりは大きいものの、*Nitzschia* sp.の約1/5、*Ankistrodesmus falcatus*の約1/3、*Synechococcus* sp.の約1/19と非常に小さい値となった。また、Figure 4よりリン濃度に関する半飽和定数 K_P をみても*P. bipes*は*Nitzschia* sp.

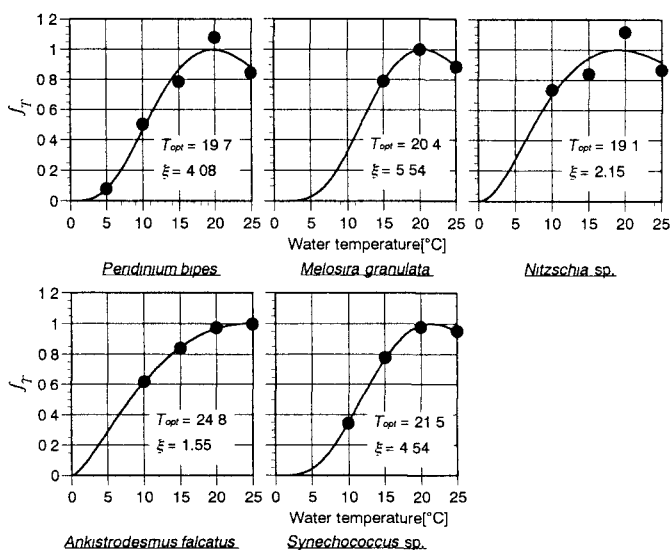


Figure 1 Response curves of multiplication to water temperature

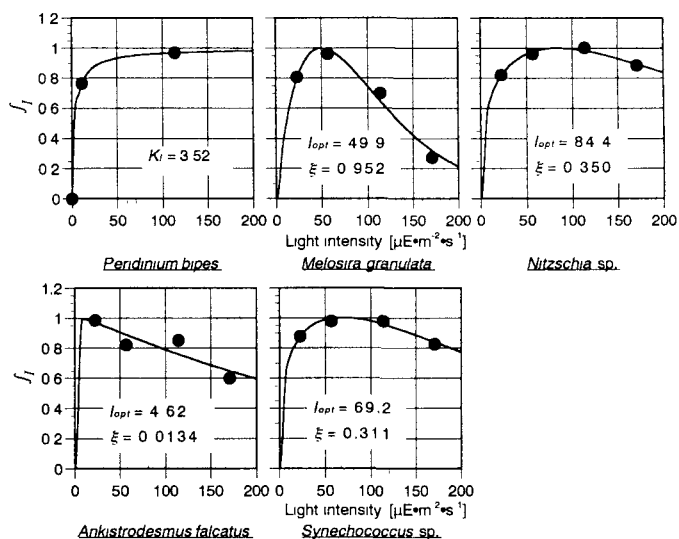


Figure 2 Respose curve of multiplication to light intensity

と同程度であり、*M. granulata*や*A. falcatus*の約1/3、*Synechococcus* sp.の約1/8と非常に小さい値を取っていた。これらの結果から各藻類の栄養塩要求性からみた特徴をまとめてみると、以下のように大きく3つのグループに分けられる。

- A)窒素，リンともに半飽和定数が小さい貧栄養適応型
(*P. bipes*, *M. granulata*)
- B)リンの半飽和定数は小さいが窒素の半飽和定数が大きい窒素要求型(*Nitzschia* sp., *A. falcatus*)
- C)窒素，リンともに半飽和定数が大きい富栄養適応型(*Synechococcus* sp.)

Table 2に示されているように*P. bipes*は最大比増殖速度が他の藻類に比較して小さいため、窒素やリンなどの栄養塩濃度が高い富栄養水域では明らかに他の藻類との競合に負けてしまうが、窒素，リンに対する半飽和定数が小さいため、貧栄養水域においては他の藻類と同等もしくはそれ以上の増殖速度を維持できる可能性がある。

3.4 貯水池における各藻類の比増殖速度

培養実験より得られた水温，光強度，窒素濃度，リン濃度について増殖影響関数および最大比増殖速度を用いて式(1)により旭貯水池における各藻類の比増殖速度を推定した。水温，窒素濃度，リン濃度は旭貯水池において1995年4月～1996年3月の期間に月1回の頻度で測定した実測値を代入した。培養実験では窒素源として硝酸態窒素を，リン源としてβ-グリセロリン酸を用いたが，一般的に藻類はアンモニア態窒素や尿素等の有機態窒素を利用可能であることやリン源としてオルトリン酸を利

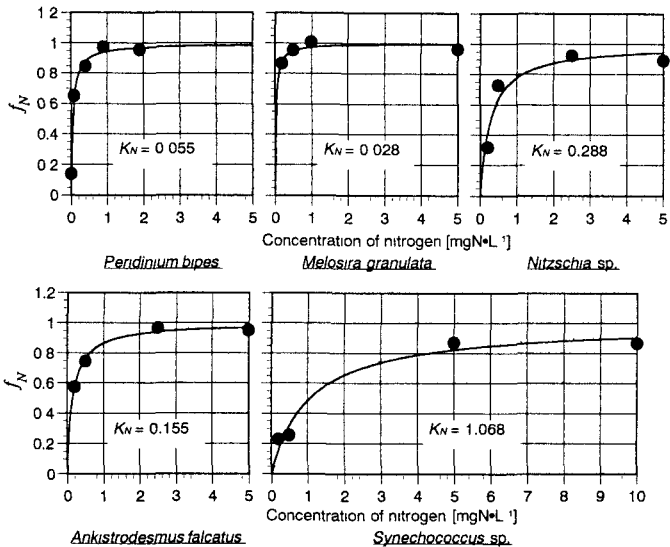


Figure 3 Response curves of multiplication to nitrate concentration

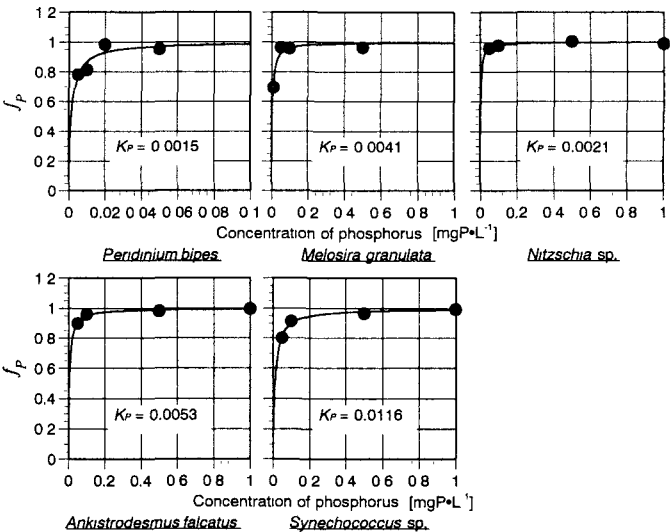


Figure 4 Response curves of multiplication to β-glycerophosphate concentration

Table 2 Maximum specific growth rates of algae

Species	Maximum specific growth rate[d ⁻¹]
<i>Peridinium bipes</i>	0.128
<i>Melosira granulata</i>	0.320
<i>Nitzschia</i> sp.	0.324
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	0.321
<i>Synechococcus</i> sp.	0.310

用可能であることを考慮して、比増殖速度の推定には窒素濃度として溶存態窒素濃度（濃度範囲0.110～0.239mgN・L⁻¹）を、リン濃度として溶存態リン濃度（濃度範囲0.001～0.009mgP・L⁻¹）を与えた。なお、計算対象期間における旭貯水池の溶存態窒素に占める硝酸態窒素の割合は平均70%，溶存態リンに占めるオルトリン酸の割合は平均57%であった。また、強光下の光強度条件として300μE・m⁻²・s⁻¹を与え、弱光下の光強度条件として10μE・m⁻²・s⁻¹を与えた。これらの値はそれぞれ旭貯水池においておよそ水深2～3m付近および水深10m付近の光強度にほぼ等しい。Figure 5より強光下においては*P. bipes*が最も大きい比増殖速度を示し、次いで*Nitzschia* sp., *A. falcatus*の比増殖速度が大きかった。一方、弱光下では*Synechococcus* sp.以外の藻類はほぼ同様の比増殖速度を示した。*Synechococcus* sp.は窒素およびリンの要求レベルが高いため、強光下、弱光下ともに比増殖速度が小さく、本種が旭貯水池において優占種とは成り得ないことを示している。また、*M. granulata*は強光下において比増殖速度が著しく低下しているが、これは強光阻害によるものである。

供試藻類のうち貧栄養適応型の2種（*P. bipes*, *M. granulata*）について旭貯水池のダムサイト付近の定点における水深毎の細胞数の経月変化をFig. 6に示す。このデータは1995年4月～1996年3月の期間に水質調査と同時にサンプリングし、ホルマリン固定後、顕微鏡下で観察、計数したものである。Figure 6によると*P. bipes*は水深が浅くなるにつれて細胞数を急激に増加させており、表層付近では完全に優占種となっていることが判る。逆に*M. granulata*は水深が浅くなるにつれて細胞数を減少させている。この2種の藻類の細胞数の分布はFig. 5に見られる比増殖速度の大小の関係と一致している。*P. bipes*は正の走光性^{*)}および負の走地性（岸本，私信）を有しているため、水深の違いによる細胞数の差が必ずしも増殖速度の違いに起因しているとはいえないが、*P. bipes*の走性自体が他の藻類に対して生

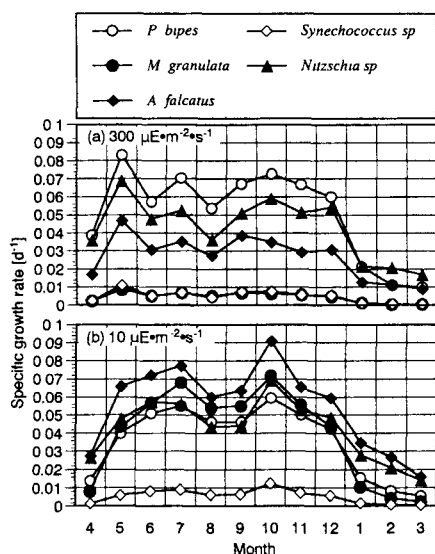


Figure 5 Calculated Specific growth rates of *P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*, and *Synechococcus* sp. in the Asahi reservoir from April 1995 to March 1996

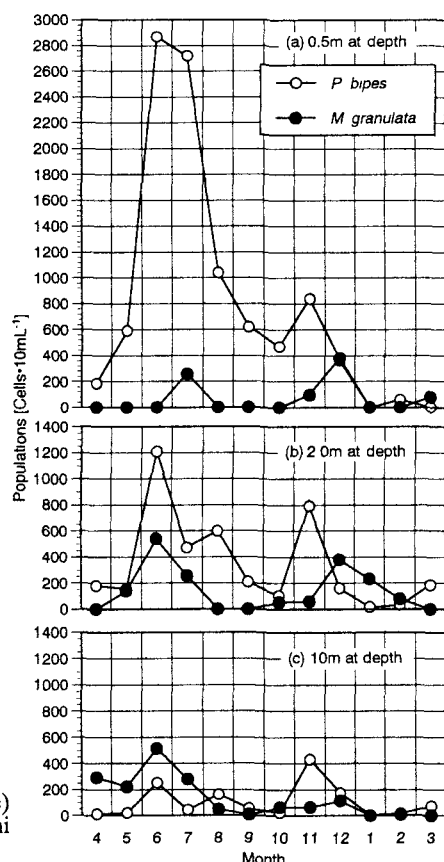


Figure 6 Transition of populations of *P. bipes* (open circle) and *M. granulata* (solid circle) in the Asahi reservoir from April 1995 to March 1996.

理的に優位に立つための一つの戦略と考えれば、強光に強く、貧栄養レベルに適応した*P. bipes*の増殖生理特性が清浄な貯水池において淡水赤潮を形成する上で果たす役割は大きいといえる。

4. 結 論

本研究では、奈良県旭貯水池において頻発する*Peridinium bipes*による淡水赤潮について、共存藻類の増殖特性に着目して発生要因を考察した。以下に結論を示す。

- 1) *P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*および*Synechococcus* sp.の水温に対する増殖応答を培養実験により調べた結果、*P. bipes*と他の藻類との間に明確な違いは観測されなかった。
- 2) *P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*および*Synechococcus* sp.の光強度に対する増殖応答を培養実験により調べた結果、*P. bipes*以外の藻類では強光阻害が観測され、強光下で*P. bipes*が生理的に優位に立つことが示された。
- 3) *P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*および*Synechococcus* sp.の窒素・リン濃度に対する増殖応答を培養実験により調べた結果、*P. bipes*と*M. granulata*は窒素・リン濃度に対する半飽和定数が小さく旭貯水池のような清浄な水域に適応していることが示された。
- 4) *P. bipes*, *M. granulata*, *Nitzschia* sp., *A. falcatus*および*Synechococcus* sp.の培養実験結果から旭貯水池における各藻類の比増殖速度の経月変化を推定したところ、弱光下では*P. bipes*の比増殖速度は*Synechococcus* sp.を除く藻類と同等であったが、強光下においては他の藻類よりも大きな比増殖速度を示し、貯水池の表層付近で優占種となる可能性が示唆された。
- 5) 旭貯水池において1996年4月～1997年3月の1年間の*P. bipes*と*M. granulata*の細胞数の変化を調べた結果、*P. bipes*は水深が浅くなるにつれ細胞数が増加する傾向にあったが、*M. granulata*では逆に減少する傾向にあり、両者の比増殖速度の大小関係と同じ傾向が得られた。*P. bipes*は正の走光性および負の走地性を有しているため、細胞数の分布が必ずしも比増殖速度の大小により決定されるとはいえないが、*P. bipes*の走性自体が*P. bipes*の増殖生理特性を最大限に生かす戦略と考えれば、強光に強く、貧栄養レベルに適応した*P. bipes*の増殖生理特性が清浄な貯水池において淡水赤潮を形成する上で、大きな役割を果たしていると考えられる。

参考文献

- 1) 小野田義輝：淡水赤潮の発生に関する二、三の考察 -I. 淡水赤潮の特徴と発生例-，*用水と廃水*，Vol. 31，pp. 495-501，1989.
- 2) 石田祐三郎：淡水赤潮の現状と問題点，*水質汚濁研究*，Vol. 14，pp. 270-275，1991.
- 3) Y. Hashimoto, T. Okachi, L. D. Dang and T. Noguchi：Glenodinine, an Ichthyotoxic Substance Produced by a Dinoflagellate, *Peridinium polonicum*, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, Vol. 34, pp. 528-534, 1968.
- 4) S. Fukuju, T. Takahashi and T. Kawayoke：STATISTICAL ANALYSIS OF FRESHWATER RED TIDE IN JAPANESE RESERVOIRS, *IAWQ-IWSA Joint Specialist Conference Reservoir Management and Water Supply - an Integrated System*, Vol. 1, pp. 273-280, 1997.
- 5) OECD COOPERATIVE PROGRAMME FOR INLAND WATERS (Eutrophication control) Project：SHALLOW LAKES AND RESERVOIRS FINAL REPORT, Vol. 1, 1979.
- 6) 宗宮功，住友恒，津野洋，松尾直規，松岡諱：湖沼工学，山海堂(東京)，p. 307，1990.
- 7) 宗宮功，住友恒，津野洋，松尾直規，松岡諱：湖沼工学，山海堂(東京)，p. 314，1990.
- 8) 山田正人，宗宮功，安永望，小野芳朗：渦鞭毛藻*Peridinium*の走光性による遊泳速度に関する研究，*陸水学雑誌*，Vol. 56，pp. 125-135，1995.