

## 論文

# 養殖ノリ色落ち原因珪藻 *Eucampia zodiacus* の大量発生機構に関する 生理生態学的研究

西川哲也\*

Physiological ecology of the harmful diatom *Eucampia zodiacus*, a causative organism in the bleaching of aquacultured *Porphyra thalli*  
- Mechanism of mass occurrences in recent year -

Tetsuya NISHIKAWA

### 目 次

第 I 章 序論	2
第 II 章 播磨灘における海域環境と植物プランクトンの長期変動	4
第 III 章 <i>Eucampia zodiacus</i> の増殖に及ぼす環境諸要因の影響	16
第 1 節 増殖に及ぼす光強度、温度および塩分の影響	17
第 2 節 増殖に及ぼす栄養塩(窒素, リン, 珪素)の影響	28
第 3 節 窒素、リン取り込みの動力学	40
第 IV 章 播磨灘における <i>Eucampia zodiacus</i> のサイズ変化と個体群動態	47
第 1 節 季節的な細胞密度の変動および細胞サイズの減少と回復	48
第 2 節 生態学的特性を利用した発生予察	57
第 V 章 総括	61
摘要	68
Summary	69
謝辞	71
文献	72

キーワード: *Coscinodiscus wailesii*, *Eucampia zodiacus*, 色落ち, 珪藻, 植物プランクトン, ノリ養殖, 播磨灘

---

\*Tel: 0796-36-0395. Fax: 0796-36-3684. Email: [tetsuya\\_nishikawa@pref.hyogo.lg.jp](mailto:tetsuya_nishikawa@pref.hyogo.lg.jp)

兵庫県立農林水産技術総合センター但馬水産技術センター (669-6541 兵庫県美方郡香美町香住区境 1126-5)

## 第1章 序論

日本人は古くから海藻を食用に有効利用してきた。中でもノリは、江戸時代すでに養殖が行われ、現在の板海苔としての食べ方もこの時代に確立されている(河村2004)。ノリは1970年代半ば頃まで、生産量が少なく高価であったことから、贈答品として人気が高かった。1980年代半ばになると、ギフト、家庭用の需要は減少したものの、コンビニエンスストアのおにぎり等で使われる業務用の需要が増大するようになった。ノリはビタミン類、ミネラル類、食物繊維が豊富な健康食品であり、現在でも寿司やおにぎりに代表される日本の食文化に欠かせない食材である。

瀬戸内海東部海域では、ノリ養殖が盛んに行われており、兵庫県ではノリ養殖が全漁業生産量の約半分、生産金額でも約4割を占めている(近畿農政局兵庫農政事務所2009)。本海域におけるノリ養殖は、1960年代半ば頃から右肩上がりに発展した(鷲尾ほか2005)。この背景には、ノリ糸状体の培養(1965年)、浮き流し養殖の普及(1969年)、ノリ網冷凍保存技術の定着(1970年)、多収穫性品種の導入(1973年)、全自動のり製造機の普及(1977年)といった相次ぐ養殖技術の進歩があった(鷲尾ほか2005)。とりわけ、浮き流し養殖の普及は、埋め立て等によって消失した支柱式のノリ漁場に代わって、兵庫県沿岸のほぼ全域にノリ漁場が拡大する契機となり、本海域においてノリ養殖漁業が発展する大きな要因となった。鷲尾ほか(2005)は、兵庫県におけるノリ養殖漁業の推移を大きく3期に分類し、この1960~1980年までの間をノリ養殖飛躍の時代としている。

兵庫県のノリ養殖は1980年代~1990年代半ば頃までその生産が軒増し、1993年度漁期には生産枚数が18億枚に達した(Fig. 1-1)。鷲尾ほか(2005)は、この1980~1995年までをノリ養殖安定の時代としている。一方で、1980年代後半になると本海域ではノリ養殖漁期に珪藻が大量発生するようになり、養殖ノリは

しばしば色落ちするようになった(眞鍋ほか1994a)。ノリの色落ちは、大量発生した植物プランクトンによって海域の栄養塩(窒素やリン)が多量に消費され、ノリの生育に必要な栄養塩が不足することによって起こるノリの色調低下現象である(Fig. 1-2)。一般にノリは黒く艶のあるもの程等級が高く、良いノリとされる。そのため、特に窒素の不足によって色調の低下したノリは、見た目も悪く、旨味成分であるアミノ酸含量も少ないことから、商品価値が低く、しばしば商品とならない。

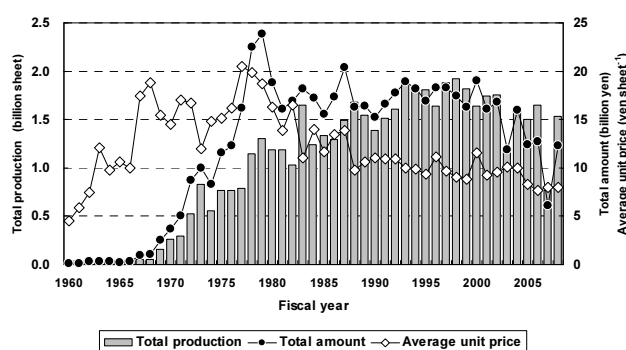


Fig. 1-1. Yearly changes of total production, total amount and average unit price in "Nori" (*Porphyra*) cultivation in the Seto Inland Sea of Hyogo Prefecture.

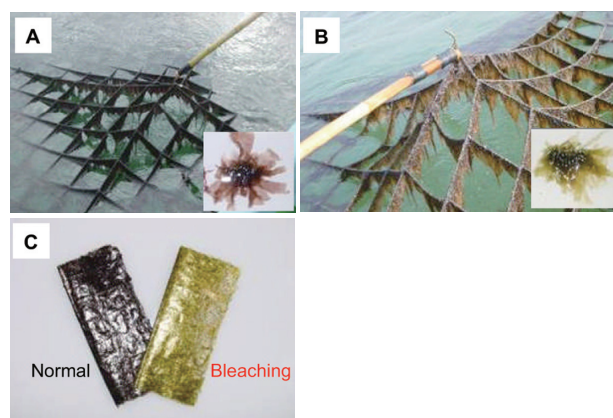


Fig. 1-2. Photographs of aquacultured "Nori" (*Porphyra*): (A) normal thalli, (B) bleached thalli and (C) product of each Nori.

一般に、珪藻は「海の牧草」とも呼ばれ、海の生物生産を支える基礎生産者として最も重要な植物プランクトンである。しかし、珪藻の中にも幾つかの有害種が報告されている。例えば、北米では *Pseudo-nitzschia* 属の数種が記憶喪失性貝毒の原因藻であることが知られている (Hasle 1994; Bates and Trainer 2006)。また、北海では *Coscinodiscus wailesii* Gran の大量発生により本種が分泌する粘液物質が漁網に付着し、操業時に目詰まりを起し、漁網が破れるといった漁業被害が報告されている (Boalch and Harbour 1977; Percival et al. 1980)。本種は瀬戸内海でも、大量発生時に多くのデトライタスや他の植物プランクトンを吸着しながら沈降するため、透明度が上昇し、海底に沈降した大量の堆積物によって底層の貧酸素化等、底質環境の悪化を引き起こすことが指摘されている (Manabe and Ishio 1991; 眞鍋ほか 1994a)。このように、人類や海洋生物に悪影響を及ぼす微細藻は“Harmful algae”と称され、それらが個体群を増加させる現象は“Harmful algal bloom (HAB)”と呼ばれる (今井 2007)。現在、日本周辺海域における HAB の中で最も被害金額が大きく深刻な問題は養殖ノリの色落ち被害である (Imai et al. 2006)。ノリの色落ち被害は現在、瀬戸内海 (原田ほか 2009) をはじめ、有明海 (首藤ほか 2009) など西日本の主要なノリ養殖漁場で発生し、大きな社会問題となっている。

瀬戸内海東部海域では当初、養殖ノリ色落ちの主要原因藻は珪藻の一種、*C. wailesii* であった (Manabe and Ishio 1991)。一方、1980 年代の播磨灘は富栄養化が進行した状態であったため (眞鍋ほか 1994b)、色落ち被害も深刻な問題に発展しない場合がほとんどであった。しかし 1990 年代後半以降、瀬戸内海東部海域では播磨灘北部沿岸域を中心に深刻な色落ち被害が頻発するようになった。1993 年度以降の兵庫県における養殖ノリの色落ち被害状況を Fig. 1-3 に示す。兵庫県におけるノリ養殖は、概ね 11 月から翌年の 4 月頃まで行われる。ここでは、11~4 月までのノリ漁期年度で

集計された統計値を用い、兵庫県が採用している次の方法に準じて色落ち被害を算出した。まず、ノリの生産がピークに達した 1993 年度以降、色落ちの発生しなかった年の平均値 (生産枚数 18.03 億枚、生産金額 173.3 億円) を基準値とし、被害枚数は各年度の実生産枚数と基準値との差、被害金額は各年度の実生産枚数×基準単価 (9.38 円, 1993~2008 年度漁期までの 16 年平均値) と生産金額基準値との差からそれぞれ算出した。なお、各年度の実単価が、基準単価よりも高い場合は、各年度の実単価を用いて被害金額を算出した。その結果、1999 年度漁期以降、色落ち被害は毎年発生し、十億円を超える甚大な被害が頻発していることが明らかとなった (Fig. 1-3; ただし、2007 年度漁期は、明石海峡付近で発生した船舶事故による流出油被害分を含む)。

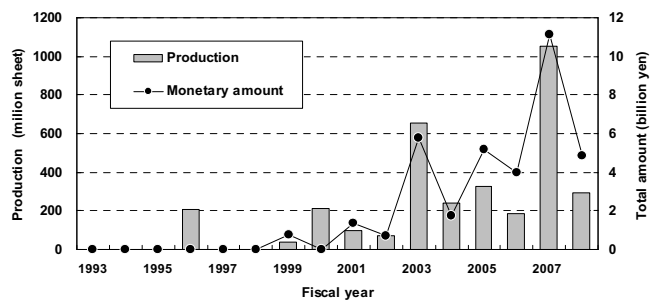


Fig. 1-3. Changes of damage occurrences of *Porphyra thalli* by bleaching due to diatom blooms in the Seto Inland Sea of Hyogo Prefecture from 1993 to 2008.



Fig. 1-4. Light micrograph of *Eucampia zodiacus* (scale bar, 100  $\mu$ m).

深刻な色落ち被害が頻発し始めた海域では、*C. walesii*に加え、*Eucampia zodiacus* Ehrenberg (Fig. 1-4)の大量発生が目立つようになった。本種は、珪藻綱 (Bacillariophyceae) 円心目 (Centrales) ビドゥルフィア 亜目 (Biddulphiaceae) ビドゥルフィア 科 (Biddulphiaceae) に属し、暖流域の沿岸性種とされ、以下のような形態的特徴を有す (高野 1990)。細胞の幅 (頂軸長) は 13~100  $\mu\text{m}$ 、厚さ (切頂軸長) は頂軸長の 1/4 程度で、扁平なくさび形をしている。また、蓋殻両端の突出部で連結し、外から見て右上がり巻きの螺旋状群体を形成する。一細胞当たりの細胞体積が比較的大きいため、多くの細胞からなる螺旋状の群体は肉眼でも観察できる。本種は春先に東京湾、相模湾、外房一帯で増殖し、夏季に銚子港外に多量に出現したという記録がある (高野 1990)。瀬戸内海東部海域では以前から生息が確認されており (中村ほか 1989)、1979年と1981年には大阪湾で赤潮を形成した記録がある (城 1986)。しかしながら、1990年代以前、本種は播磨灘において漁業被害を発生させた事例がなかった。そのため、本種は瀬戸内海東部海域で頻りに観察される植物プランクトンの一種ではあったものの、有害種とは見なされず、主要な研究対象種ではなかった。このため、本種に関する知見は極めて少ないのが現状である。

以上のような背景から、本研究はノリの色落ち原因藻として現在最も問題視されている *E. zodiacus* を対象として、本種が近年になってなぜ毎年大量発生するようになったのか、また他の植物プランクトンと比較して、本種が大量発生した場合、なぜ甚大な色落ち被害が発生するのか、そのメカニズムを解明し、本種によるノリの色落ち被害軽減に向けた基礎資料を得ることを目的として行った。

本論文は全5章で構成されている。本章の序論に続いて、第II章では1973~2007年までの間、播磨灘で実施されてきた海洋観測調査結果を用い、35年間の海域環境と植物プランクトンの長期変動を明らかにし、

播磨灘における *E. zodiacus* の経年的、季節的な出現特性と環境要因との関係について調べた。第III章では、室内培養実験から *E. zodiacus* の増殖に及ぼす光強度、温度、塩分および栄養塩の影響を明らかにすると共に、窒素、リンの取り込みに関する動力学的解析を行った。さらに、以前の主要種 *C. walesii* に対してそれら一連の培養実験を同様に実施し、両者の応答を比較することによって、環境諸要因に対する *E. zodiacus* の増殖生理学的特性を明らかにした。第IV章では、播磨灘北部沿岸域において *E. zodiacus* の細胞密度および細胞サイズの変動を詳細に調査し、当海域における周年を通じた個体群動態を明らかにし、本種の生態学的特性を利用した発生予察の可能性について検討した。第V章では、以上の成果を総括し、生理生態学的特性から見た本種の大量発生機構について論じると共に、本種による色落ち被害軽減に向けた対策について検討した。

## 第II章 播磨灘における海域環境と植物プランクトンの長期変動

有害藻の大量発生機構を解明するためには、海況、気象条件等、現場海域における環境因子の変動と、対象とする有害藻の出現特性との関係を明らかにする必要がある。そのためにはまず、現場海域における海洋観測調査から、対象とする海域の物理・化学的環境要因と有害藻の出現動態を把握することが重要である (山口 1994)。

本研究の対象海域である播磨灘は、瀬戸内海東部に位置する半閉鎖性海域で、東部は明石海峡を経て大阪湾に、南部は鳴門海峡を経て紀伊水道に、西部は備讃瀬戸に通じている (Fig. 2-1)。面積は 3426  $\text{km}^2$  で、瀬戸内海では伊予灘、周防灘に次いで広く、瀬戸内海全体の約 15% を占める。平均水深は 25.9 m で、灘中央部の最深部は 40 m に達するが、北部沿岸域を中心に全体の 32% が水深 20 m 以浅の浅海域となっている (眞鍋 1992; Yanagi 2008)。主要な流入河川は千種川、



掛保川, 夢前川, 市川および加古川など北部に多く, 播磨灘における栄養塩類のほとんどが北部の陸域からこれら河川を通して流入している (眞鍋 1992)。

播磨灘は高い生産性を持ち, 漁業生産量の高い好漁場として知られている (眞鍋ほか 1994b)。また本海域は, 兵庫県におけるノリ養殖の主力漁場として重要な海域である (永田ほか 1998, 2001)。一方で本海域は, 1950年代後半以降の高度経済成長期に, 北部臨海地域の工業地帯化に伴う水質汚濁負荷の増大, 海岸線の護岸化, 埋め立てによる浅場域の減少が進行し (樽谷 2007; Toda 2008b), 瀬戸内海の中でも大阪湾や広島湾と並んで最も富栄養化の進行した海域となった (Yanagi 2008)。そのため, 1970年代には大規模な赤潮が恒常的に発生し, 養殖魚介類の大量斃死が大きな社会問題に発展した (Imai et al. 2006)。瀬戸内海では, 1973年に瀬戸内海環境保全臨時措置法が制定され, その後1978年に特別法として恒久法化されて総量規制および排出削減規制が進められた結果, 水質そのものは改善傾向にある (Imai et al. 2006)。瀬戸内海における赤潮の発生件数も, 1976年の299件をピークにその後1990年代にかけて減少し, 1990年代以降は年間約100件前後で推移している (Yamamoto 2003; Imai et al. 2006)。その反面, 近年の漁業生産量は概ね斬減あるいは低位横ばいで推移する傾向にあり, 養殖業においてもノリの色落ちやカキの身入りの低下等が問題となっている (樽谷 2007; Toda 2008a)。

1970年代, 瀬戸内海に面した関係府県では, 漁場環境の保全を図り水産資源を持続的に利用するため, 海域の富栄養化を監視することを目的とした海洋観測調査を開始した (樽谷 2007)。本調査は, 現在まで調査項目, 調査規模等にほとんど変更のない一貫した調査内容で継続されている (眞鍋ほか 1994b)。したがって, 本調査結果は瀬戸内海の富栄養化とその回復過程を評価できる極めて貴重かつ有用なデータセットである。兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターでは, 1973年4月から播磨灘に設けた19定点

(Fig. 2-1)において本海洋観測を実施している。本調査では, 水質の調査項目に加え, 植物プランクトンの同定と計数を行ってきた。これまでに, 本データセットを使って中村ほか (1989) は, 1973~1988年までの15年間, 播磨灘において出現した植物プランクトン種の同定と計数を行い, その経年的, 季節変化をとりまとめている。また, 眞鍋ほか (1994b) は 1973~1993年の20年間の調査結果から播磨灘の富栄養化と植物プランクトンの関係を解析している。

これまでに, 米国東部のNarragansett湾や東京湾等, 閉鎖性の強い海域において植物プランクトンの個体群動態と海域環境の長期変動に関する解析が行われている (例えば Pratt 1959, 1965; Karentz and Smayda 1984, 1988; Li and Smayda 1998; 野村 1998; Smayda 1998)。瀬戸内海においても, *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (矢持 1989) や *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi (松山 2003), *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech (Itakura et al. 2002) 等を対象とした研究が行われている。しかしながら, 瀬戸内海での研究は主に有害・有毒鞭毛藻を対象としたものであり, 海域に出現する植物プランクトン群集の個体群動態や主要珪藻種を対象とした報告は, 特に *Eucampia zodiacus* の出現が目立つようになった1990年代後半以降ほとんどない。そこで本章では, まず播磨灘において35年間にわたり実施されてきた海洋観測調査結果を基に, 海域環境と植物プランクトンの長期変動について概観し, 海域環境の変動が植物プランクトン群集にどのような影響を及ぼすのか検討した。さらに, 播磨灘における *E. zodiacus* の経年および季節的な出現傾向, および本種が近年どのような環境条件下で大量発生するようになったのかを明らかにし, 本種が大量発生するようになった要因の抽出を試みた。

## 方 法

海洋観測調査は, 1973年4月~2007年12月までの

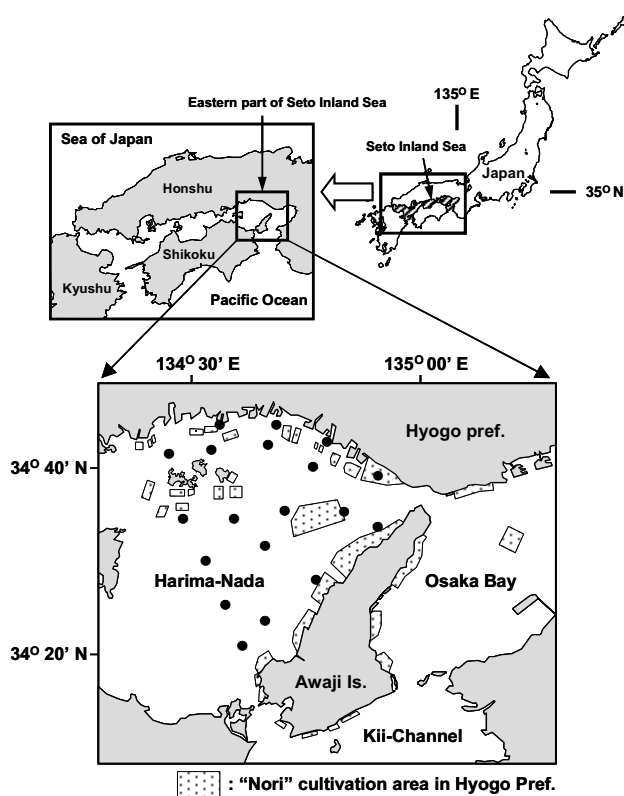


Fig. 2-1. Location of the sampling stations in Harima-Nada, eastern part of the Seto Inland Sea.

35年間、毎月1回、各月の月上旬に播磨灘に設けた19定点 (Fig. 2-1) において計417回実施した。各定点の表層 (0.5 m)、中層 (10 m、ただし水深10 m前後の沿岸4定点は5 m)、および底層 (海底上1 m) の3層から、表層はポリバケツ、10 m層は北原式採水器、底層は北原式採水器または眞鍋・反田 (1985) により改良されたバンドーン型採水器を用いそれぞれ採水した。本章では、水温、塩分、無機態窒素 (アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の合計値、以下DINと略す)、反応性リン酸 ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ; 以下リン酸と略す)、反応性珪酸 ( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ; 以下珪酸と略す) および植物プランクトン細胞密度 (主に細胞サイズが約20  $\mu\text{m}$  以上のマイクロプランクトンの種を対象) の値を解析に供した。各調査項目は、1993年3月までは眞鍋ほか (1994b) の方法により、1994年4月以降は眞鍋ほか (1994b) に準じて以下の方法により実施した。水温と塩分は主

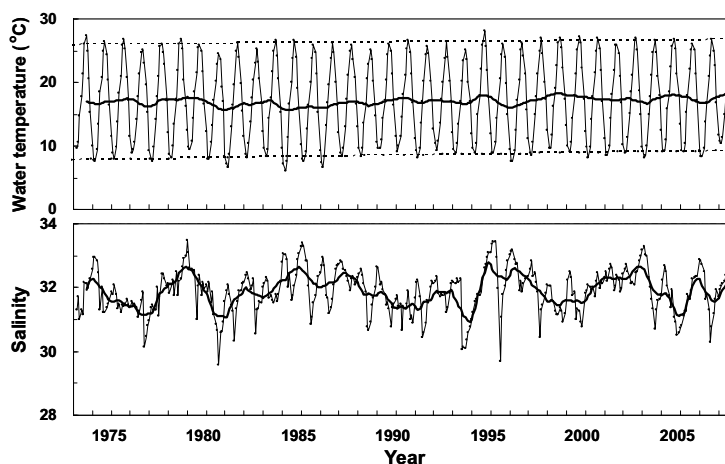
に多項目水質計 (アレック電子社製 AST-1000 または ACL215) により測定した。塩分は塩分計 (鶴見精機社製, DIGIAUTO Model 3-G) にてクロスチェックを行った。アンモニア態窒素はインドフェノール法 EDTA 変法 (眞鍋 1969)、亜硝酸態窒素は GR 変法、硝酸態窒素はカドミウム還元法、リン酸および珪酸はモリブデン青法により、各項目とも眞鍋・反田 (1986) の自動分析法に従い、Auto Analyzer II (Technicon 社製) または TRAACS 800 (BI-Tec 社製) により測定した (眞鍋ほか 1994b; 堀ほか 1998)。植物プランクトンは、無固定、無濃縮の表層海水 1 ml を光学顕微鏡下で観察し、種の同定と計数を行った。これら全ての測定は原則として調査日当日または遅くとも翌日までに終了した。なお、本調査では *Skeletonema* 属を *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve と *Skeletonema tropicum* Cleve に分類してきた。しかし近年, Sarno et al.

(2005) によって *Skeletonema* 属の分類体系が見直され、この中に *Skeletonema japonicum* (Zingone et Sarno) 等、数種の *Skeletonema* 属を含む可能性が考えられた。そこで、ここでは *Skeletonema* 属の表記を *Skeletonema* spp. とした。また、本研究では各調査項目とも19定点の3層または表層の月平均値または年平均値を求め、その値を基に播磨灘における海域環境と植物プランクトンの長期変動を解析した。統計学的な解析として、35か年間の月平均値を直線回帰し、その傾きに有意性があるかどうか検討した。

## 結 果

**海域環境の長期変動** 水温、塩分および栄養塩濃度の35か年間の長期変動を Fig. 2-2 および 2-3 にそれぞれ示す。播磨灘における水温は、季節的に上昇と低下を繰り返した。水温は、2~3月に8°C前後まで低下し、その後夏季にかけて上昇し、8~9月に25~28°Cまで達した後、再び低下した (Fig. 2-2)。1990年代後半以降、特に冬季の水温が高めで推移する傾向が見られ、

**Fig. 2-2.** Long-term variations in water temperature and salinity in Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly data were averaged for three depths at 19 sampling stations. The smoothed lines were derived from a 13-month moving average. The dashed horizontal lines for temperature show the highest or lowest values in each year.

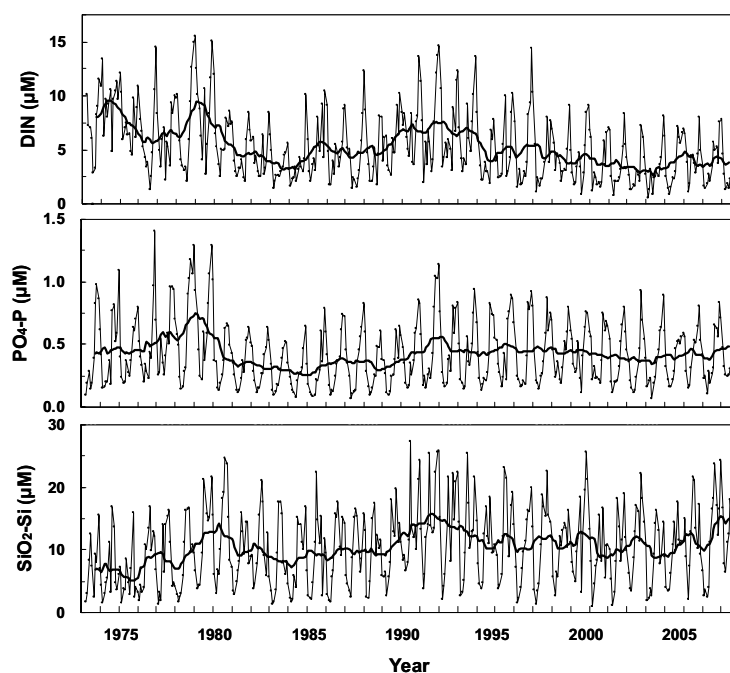


各年の最低水温は、35 か年間に  $0.042^{\circ}\text{C year}^{-1}$  有意に上昇した (Fig. 2-2; t-test,  $p < 0.05$ )。一方、水温の月変動および各年の最高水温は、35 か年間でそれぞれ  $0.024$  および  $0.021^{\circ}\text{C year}^{-1}$  上昇したが、統計学的に有意な差はなかった (t-test,  $p > 0.05$ )。塩分は、概ね 30~33 の範囲で変動し、季節的および長期的な変動に一定の傾向は見出せなかった (Fig. 2-2)。

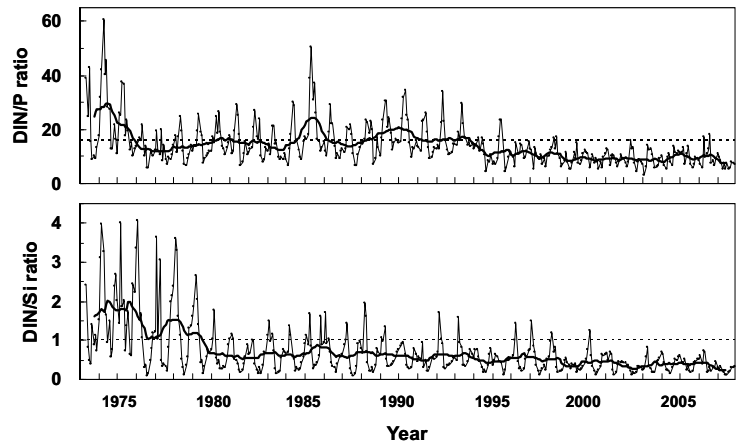
DIN 濃度は、1970 年代、13 か月の移動平均値で  $5 \sim 10 \mu\text{M}$  の範囲で変動した (Fig. 2-3)。その後、1970 年代後半~1980 年代半ばにかけて低下し、 $5 \mu\text{M}$  を下

回った。その後 1990 年代前半にかけてやや上昇したが、再び緩やかに減少した。35 か年の長期変動には、有意な低下が見られた (Fig. 2-3; t-test,  $p < 0.05$ )。リン酸は、1980 年代に減少し、1990 年代にかけてやや増加した後、1990 年代以降は  $0.4 \mu\text{M}$  前後の値でほぼ横ばいで推移し、35 か年間の変動に有意差はなかった (Fig. 2-3; t-test,  $p > 0.05$ )。珪酸は 1970 年代半ばまで  $2 \sim 15 \mu\text{M}$  の範囲で変動したが、1980 年代後半以降徐々に上昇した (Fig. 2-3; t-test,  $p < 0.05$ )。DIN/P 比は 1970 年代に 25 前後であったが、1990 年代半ばには 10 前後

**Fig. 2-3.** Long-term variations in dissolved inorganic nitrogen (DIN =  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4$ ), phosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ), and silicic acid ( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ) concentrations in Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly data were averaged for three depths at 19 sampling stations. The smoothed lines were derived from a 13-month moving average.



**Fig. 2-4.** Long-term variations in DIN/P and DIN/Si molar ratios in Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly data were averaged for three depths at 19 sampling stations. The smooth lines were derived from a 13-month moving average. The dashed horizontal lines represent the Redfield ratio of DIN/P = 16: 1 and DIN/Si = 1: 1, respectively.



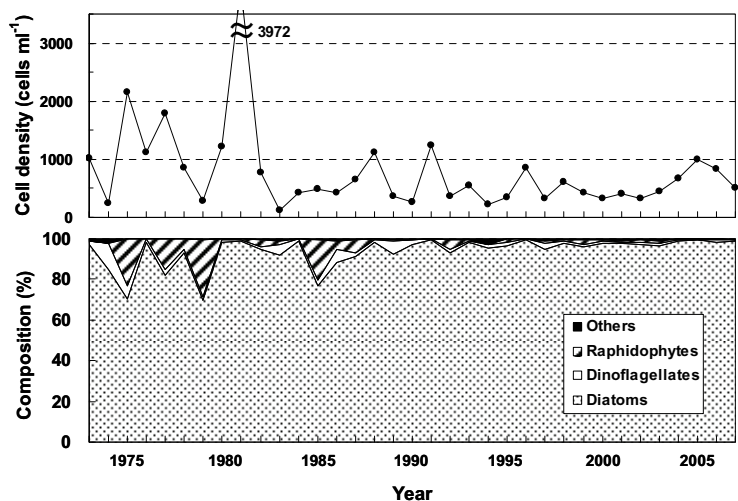
まで低下し、その後ほぼ横ばいで推移している (Fig. 2-4)。DIN/Si 比も 1970 年代後半まで 1~2 の範囲で変動していたが、その後 1980 年代前半にかけて低下した。その後も徐々に低下し、1990 年代後半には 0.5 前後となった (Fig. 2-4)。

**植物プランクトンの長期変動** 播磨灘における全植物プランクトンの細胞密度と、珪藻、ラフィド藻、渦鞭毛藻およびその他に分けた分類群組成の長期変動を Fig. 2-5 に示す。植物プランクトンの細胞密度は、1970 年代~1980 年代前半にかけて高く、1980 年代前半に大きく減少し、その後横ばいで推移した (Fig. 2-5)。1970 年代~1980 年代前半は、ラフィド藻の占める割合が全体の 20 %前後に達する年も見られたが、構成種の大部分は珪藻であった。1990 年代以降、その傾向は

より顕著となり、珪藻の占める割合は毎年 90 %以上であった (Fig. 2-5)。珪藻の優占種は、*Skeletonema* 属、*Thalassiosira* 属、*Leptocylindrus* 属、*E. zodiacus*、*Chaetoceros* 属、*Pseudo-nitzschia* 属等で、約 30 属が出現した (中村ほか 1989)。

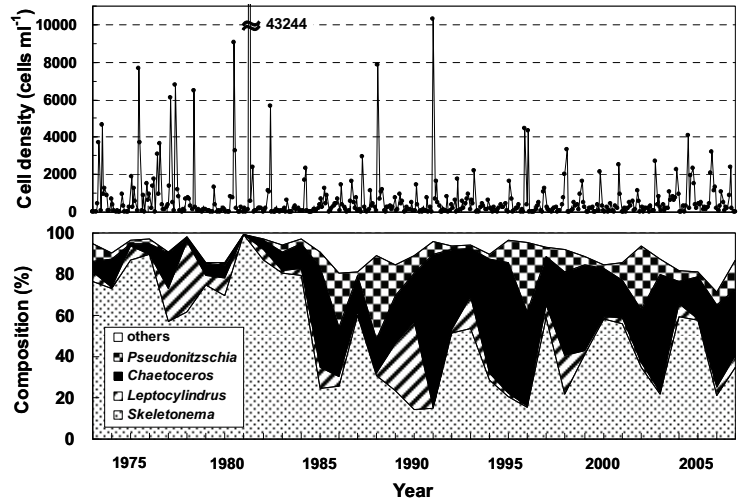
珪藻、ラフィド藻、渦鞭毛藻の細胞密度と種組成の長期変動を Figs. 2-6~2-8 にそれぞれ示す。珪藻の細胞密度の年平均値は  $110\sim 3900\text{ cells ml}^{-1}$  の範囲で変動した。年毎の月平均値は、1970 および 1980 年代がそれぞれ  $930, 914\text{ cells ml}^{-1}$  であったが、1990 年代以降は、約  $500\text{ cells ml}^{-1}$  と半減した。また、珪藻のメンバー組成にも劇的な変化が見られた (Fig. 2-6)。すなわち、1970 年代~1980 年代前半は、*Skeletonema* spp. が大部分を占めていたが、1980 年代半ば以降は、*Chaetoceros*

**Fig. 2-5.** Long-term variations in yearly total cell density and composition of four phytoplankton groups in the surface layer of Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Yearly data are the average of monthly sampling at 19 stations.

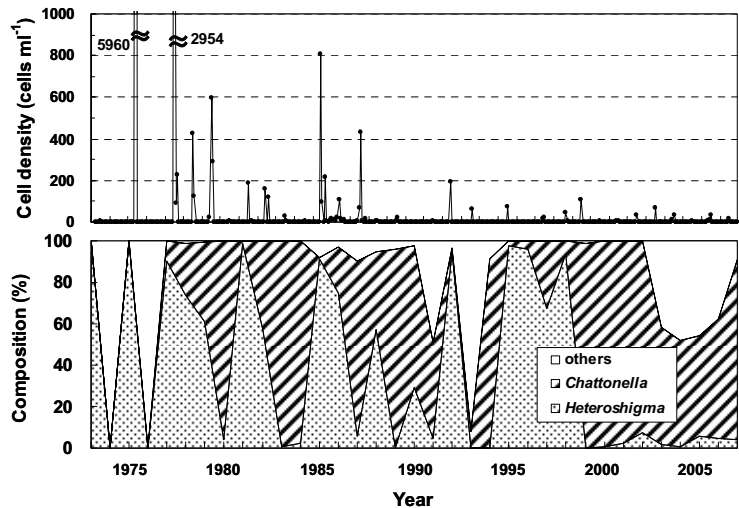




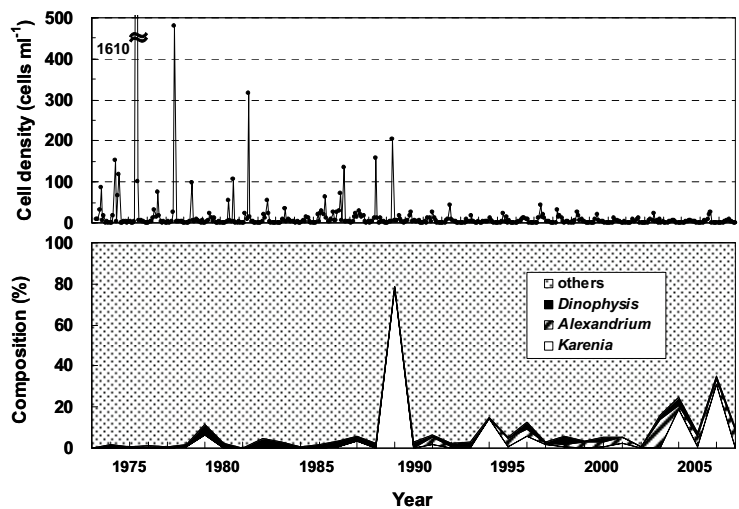
**Fig. 2-6.** Long-term variations in monthly total cell density and yearly composition of diatoms in the surface layer of Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly cell densities and yearly composition data are the average of monthly sampling at 19 stations.



**Fig. 2-7.** Long-term variations in monthly total cell density and yearly composition of raphidophytes in the surface layer of Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly cell densities and yearly composition data are the average of monthly sampling at 19 stations.



**Fig. 2-8.** Long-term variations in monthly total cell density and yearly composition of dinoflagellates in the surface layer of Harima-Nada, Seto Inland Sea, for 35 years from April 1973 to December 2007. Monthly cell densities and yearly composition data are the average of monthly sampling at 19 stations.



spp.をはじめ他種の占める割合が増大した (Fig. 2-6)。ラフィド藻では、1970年代～1980年代前半にかけて *H. akashiwo* および *Chattonella* spp. がしばしば高密度に出現した。しかし、1990年代以降そのような高密度の出現は見られなくなった (Fig. 2-7)。同様の傾向は渦鞭毛藻でも見られた。渦鞭毛藻の減少は、ラフィド

藻よりも顕著で、1990年代以降の月平均値は全て 50 cells ml<sup>-1</sup> を下回った。一方で、*Karenia mikimotoi* (Miyake and Kominami) Hansen and Moestrup や *Alexandrium* spp. 等 HAB 種の占める割合は、近年増大する傾向が見られた (Fig. 2-8)。

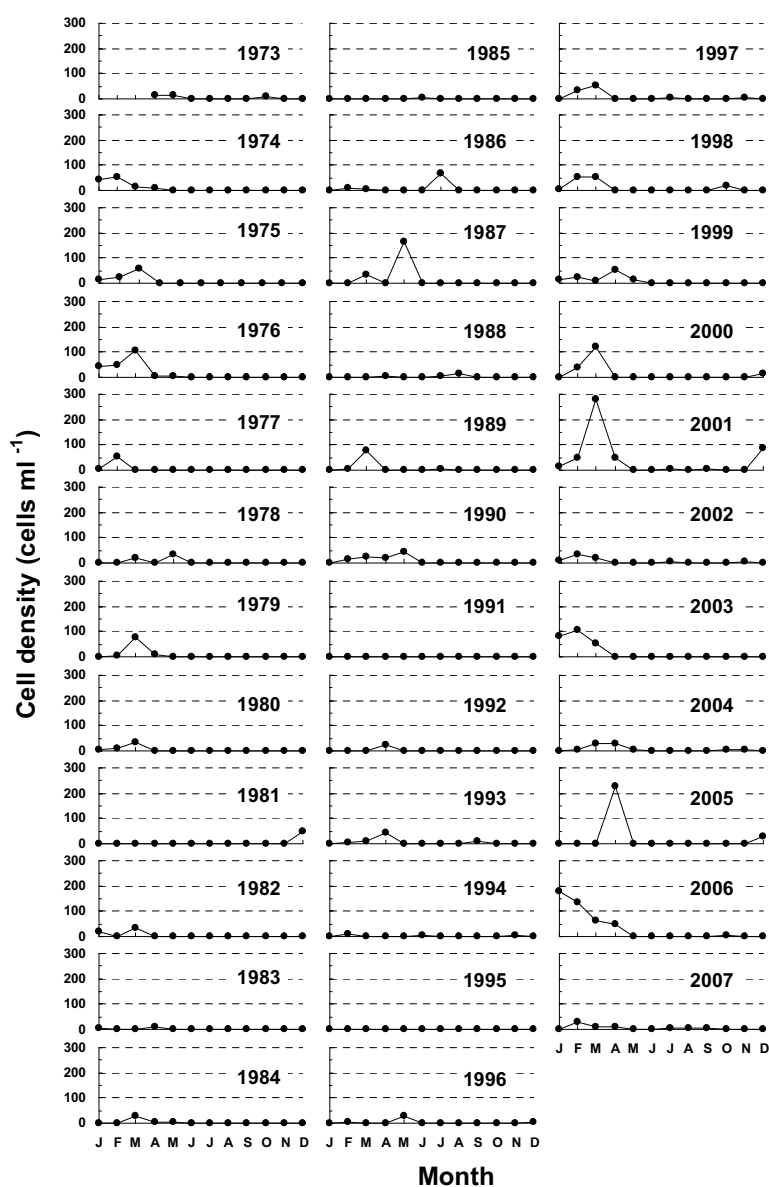
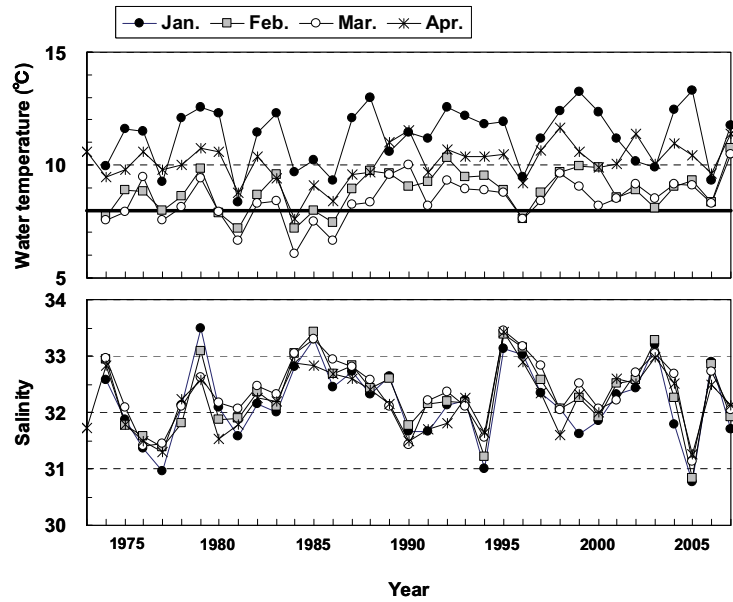
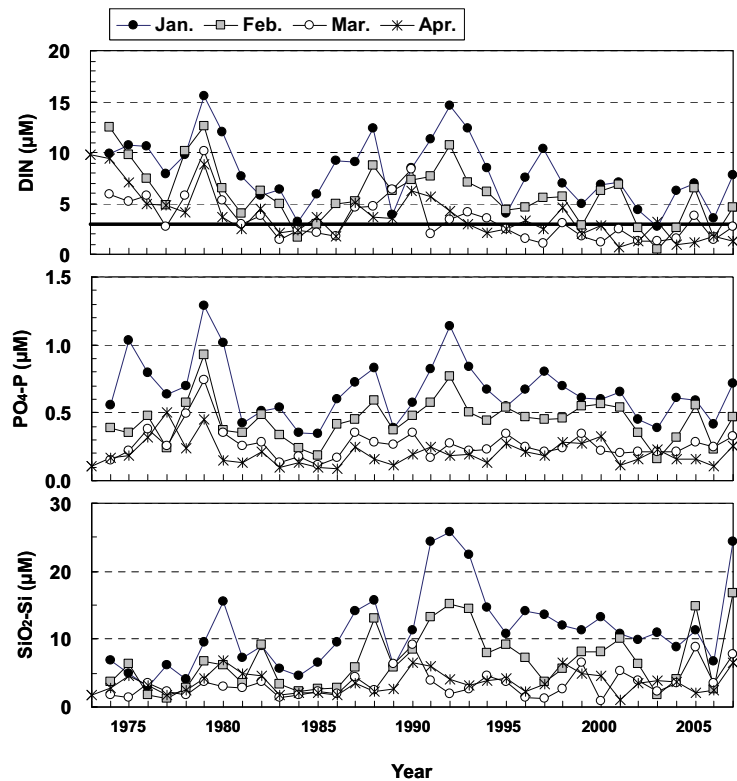


Fig. 2-9. Long-term variations in monthly cell density of *Eucampia zodiacus* in the surface layer of Harima-Nada for 35 years from April 1973 to December 2007. Cell densities are the averages of monthly samplings at 19 stations.

**Fig. 2-10.** Long-term variations in water temperature and salinity of Harima-Nada from January to April in each year (1973-2007). Monthly data are averaged for three depths at 19 sampling stations. The horizontal bold line for water temperature shows the value of 8 °C.



**Fig. 2-11.** Long-term variations in dissolved inorganic nitrogen (DIN =  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4$ ), phosphate ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) and silicic acid ( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ) concentrations of Harima-Nada from January to April in each year (1973-2007). Monthly data are averaged for three depths at 19 sampling stations. The horizontal bold line for DIN concentration shows the level of 3  $\mu\text{M}$ .

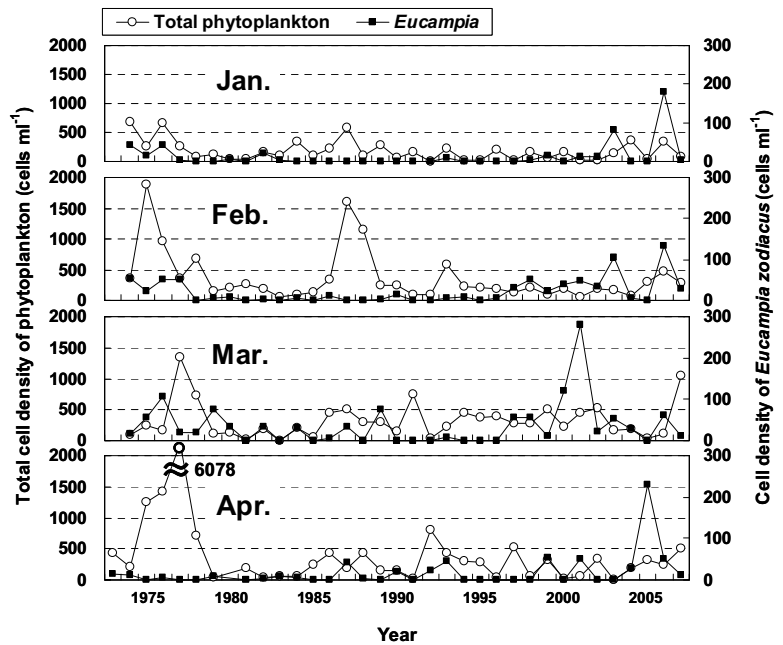


***Eucampia zodiacus* の経年的・季節的長期変動** 調査を実施した 35 か年の間、*E. zodiacus* は毎年出現し、細胞密度は 1~4 月に高い値を示した (Fig. 2-9)。細胞密度の月平均値は、1970 年代 ND ( $< 1 \text{ cell ml}^{-1}$ ) ~100  $\text{cells ml}^{-1}$  の範囲で変動し、その後 1980 年代前半に低下し、1980 年代後半に少し盛り返し、1990 年代前半まで低

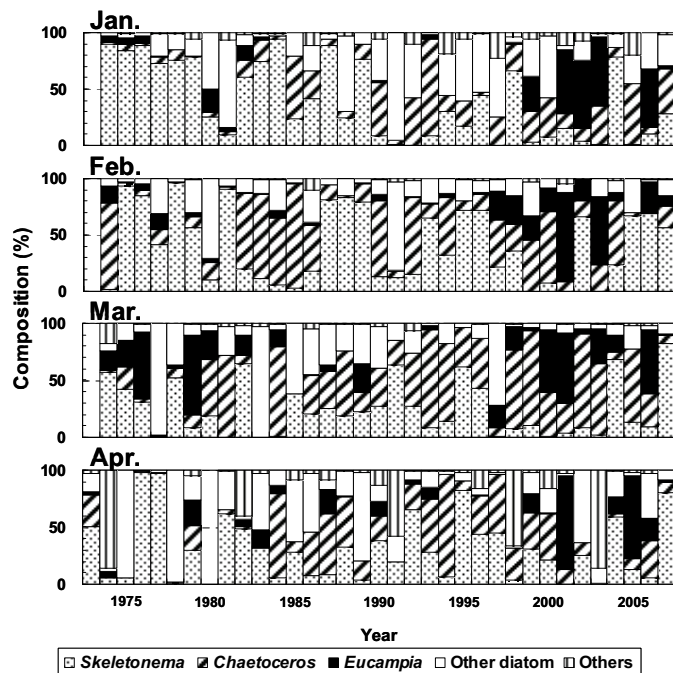
い出現密度の状態が続いた。しかし 1990 年代後半以降、出現細胞密度が増大し、月平均の最大値がしばしば 100~300  $\text{cells ml}^{-1}$  の範囲で変動した。

*E. zodiacus* が高密度で出現した 1~4 月の月毎の水溫、塩分の変動を Fig. 2-10 に示す。1973~1993 年の月別平均水溫の最低値は、3 月の 8.25°C (眞鍋ほか 1994b)

**Fig. 2-12.** Long-term variations in cell density of total phytoplankton and *Eucampia zodiacus* in the surface layer of Harima-Nada from January to April in each year (1973-2007). Cell density data are the averages of monthly samplings at 19 stations.



**Fig. 2-13.** Long-term variations in composition of major phytoplankton (indicated as genera) in the surface layer of Harima-Nada from January to April in each year (1973-2007). Phytoplankton composition data are the averages of monthly samplings at 19 stations.



であることから、ここでは8℃を基準に1~4月の水温を概観することとした。各年の1~4月の水温は、1990年代以降、1996年の2、3月を除いて8℃よりも高い値を示し、1月を除く2~4月の水温は35か年間に有意に上昇した (t-test,  $p < 0.05$ )。塩分は、31.0~33.5の範囲で変動したが、一定の傾向は見出せなかった。

DIN濃度の月平均値は、35か年間に各月とも有意に減少した (Fig. 2-11; t-test,  $p < 0.05$ )。1990年代半ば以降、3および4月の月平均値のほとんどは播磨灘においてノリの色落ちが始まるとされる3  $\mu\text{M}$ を下回った。リン酸濃度は、1~4月にかけて徐々に低下し、2月以降多くの年で0.5  $\mu\text{M}$ を下回った。しかし、35か年間の



変動を統計学的に解析しても有意な低下は検出されなかった (Fig. 2-11; t-test,  $p>0.05$ )。珪酸濃度は、1970年代～1980年代前半にかけて低く、各月とも概ね  $10 \mu\text{M}$  を下回っていたが、1980年代半ば以降増大した。1～3月の月平均値に有意な上昇が見られたが (t-test,  $p<0.05$ )、4月の値には有意な上昇は見られなかった (Fig. 2-11; t-test,  $p>0.05$ )。

播磨灘表層における1～4月の月毎の植物プランクトン細胞密度と *E. zodiacus* や他の珪藻類の組成について、長期変動を Figs. 2-12 および 2-13 にそれぞれ示す。全植物プランクトン細胞密度は1970年代に高かった。1980年代前半は低く、後半にやや高くなったが、以後比較的レベルで推移した。これとは対照的に、*E. zodiacus* の細胞密度は1990年代半ば以降高くなった (Fig. 2-12)。4月はまれに渦鞭毛藻の占める割合が全体の50%以上に達する月もあったが、各月とも植物プランクトンの主要な構成種は珪藻であった (Fig. 2-13)。植物プランクトンの細胞密度に占める *E. zodiacus* の割合は、近年増加する傾向が見られた。

## 考 察

1973～2007年までの35年間、播磨灘では、冬季最低水温に有意な上昇と DIN 濃度に有意な低下が見られた (Figs. 2-2, 2-3)。水温の上昇は、瀬戸内海の他の海域からも報告されている (樽谷 2007)。例えば、備讃瀬戸では1966～2002年の37年間に  $0.81^\circ\text{C}$  上昇している (山本 2003)。同様の傾向は、日本海など日本周辺海域で観測されていることから (加藤ほか 2006)、瀬戸内海東部海域におけるローカルな現象ではなく、より大きな規模での変動であると考えられた。

全植物プランクトン細胞密度と栄養塩濃度、特に DIN 濃度の長期変動は非常に良く一致した。両者とも1970年代に高く、1980年代前半に大きく減少し、後半に少し盛り返した後、ほぼ横ばい～緩やかな減少で推移している (Figs. 2-3, 2-5)。DIN 濃度は、13か月の

移動平均値で1980年代前半まで  $10 \mu\text{M}$  前後で推移していたが、1980年代半ばには  $5 \mu\text{M}$  以下にまで減少した (Fig. 2-3)。また、植物プランクトン細胞密度の年平均値も大まかに見ると、1980年代半ばまでは  $1000 \text{ cell ml}^{-1}$  を上回る年が多かったが、以降はそのような高い値はほとんど見られなくなった (Fig. 2-5)。このことから、DIN 濃度の低下は播磨灘における植物プランクトンの出現細胞密度を制限する重要な要因の一つであることが示唆された。また、1990年代以降は DIN 濃度の低下に伴い、DIN/P 比はレッドフィールド比を下回り、DIN/Si 比も 0.5 前後であることから、1990年代以降、播磨灘の植物プランクトン群集は窒素制限を受けやすい環境下にあることが示唆された。

1970年代～1980年代にかけて、播磨灘では *Skeletonema* spp. (例えば1981年; Fig. 2-6) や *H. akashiwo* (例えば1975および1977年; Fig. 2-7) の大規模で高密度な赤潮が発生していた。しかし、1990年代以降は栄養塩濃度の低下とともに赤潮の発生規模が小さく、継続期間も短くなる傾向にある (Imai et al. 2006)。Smayda (1990) は、栄養塩比がプランクトン優占種の遷移を引き起こす要因であることを指摘している。他方、瀬戸内海の西部に位置する広島湾では、播磨灘と異なった DIN/P の長期変動が報告されている (山本ほか 2002a)。すなわち、広島湾ではリンの負荷削減対策を推進した結果、DIN/P 比が上昇する傾向にあり、その結果、植物プランクトンの構成種も変化したことが示唆されている。Yamamoto (2003) は、広島湾においては富栄養化の過程で主要な赤潮形成種が無害な珪藻から有害なラフィド藻へと変化したこと、その後栄養塩濃度の低下と共に有害・有毒渦鞭毛藻の赤潮発生頻度が高くなったとしている。これに対して播磨灘では、珪藻の占める割合が高く、1990年代以降その傾向はより顕著になっている (Fig. 2-5)。これは、播磨灘ではリン酸濃度以上に DIN 濃度の低下が顕著であったこと、加えて、珪酸濃度が上昇したことから、DIN/P 比および DIN/Si 比の変動が、広島湾に比べて珪

藻が優占しやすい条件へ変化したことによる差であると考えられた。なお、播磨灘における珪酸濃度は、1970年代～1980年代前半にかけて低レベルであったが、これはこの時期の優占種であった *Skeletonema* spp. の大量消費によるものであると推察された。また、1980年代後半以降の播磨灘は、窒素制限によって *Skeletonema* spp.をはじめ珪藻全体が細胞密度を減少させ、結果的に珪酸濃度が上昇したのではないかと考えられた。すなわち、播磨灘では陸域から負荷される珪酸濃度は、35年間大きく変動しておらず、また濃度も比較的高いことから、珪藻の増殖を制限する第一因子として作用している可能性は低いことが考えられた。

珪藻の優占種は、1980年代を境に大きく変化した。1970年代はその構成種の大部分が *Skeletonema* spp.であったが、1980年代以降は *Chaetoceros* spp.をはじめ他の珪藻が占める割合が増大した (Fig. 2-6)。一方で、室内培養実験から報告されている *Skeletonema* と *Chaetoceros* の増殖生理学的特性には、現場海域における両種の種交替の変化を説明しうる顕著な差は見られない (Eppley and Thomas 1969; Eppley et al. 1969; Yoder 1979; 山口 1994)。このことは、両者の増殖特性の比較だけでは現場海域における優占種の変化を説明できないことを示唆している。一方、*Skeletonema* の減少は、播磨灘以外の海域、例えば Narragansett 湾等でも報告されている (Smayda 1998; Borkman 2002; Borkman and Smayda 2009)。Smayda (1973) は、Narragansett 湾における *Skeletonema* の減少要因として温度、光、栄養塩、捕食圧、種間の相互作用等多くの要因を指摘している。また Borkman (2002) は、1980～1990年代、冬季の水温が高かった結果、冬季～春季にかけて捕食圧が上昇したことが、Narragansett 湾において *Skeletonema* が減少した主要因であることを指摘している。

野村(1998)は、東京湾では1920年代から *Skeletonema* が優占種であること、特に1970年代に高密度で出現した要因として、東京湾の富栄養化の進行との関連を

指摘している。山田ほか(1980a)は、海域を栄養塩レベルによって貧栄養域、富栄養域、過栄養域、腐水域の4つの海域に分類し、各海域における植物プランクトンの優占種を調べている。その結果、*Skeletonema* は栄養塩濃度の非常に高い海域で高密度に出現する種であることを示し、本種を過栄養海域の指標種としている。また、*Chaetoceros* は *Skeletonema* に比べてやや栄養塩レベルが低い富栄養海域の指標種としている。同様の傾向は、周防灘、広島湾、大阪湾など瀬戸内海の他の海域からも報告されている (山田ほか 1980b, 1982)。板倉・山口(2007)も *Skeletonema* は *Chaetoceros* に比べて栄養塩濃度の高い海域に出現することを指摘している。これらのことから、播磨灘では1980年代の栄養塩レベルの低下が *Skeletonema* の減少を引き起こしたことが考えられた。

播磨灘において、優占種が *Skeletonema* から *Chaetoceros* へ変化した要因として、両者のライフサイクルの違いも考慮する必要がある。浮遊珪藻の多くは、そのライフサイクルの中に休眠細胞/休眠胞子(ここではこれらを総称し休眠期細胞と表記する)を形成することが知られている (McQuoid and Hobson 1996)。休眠期細胞は目まぐるしく変化する海域環境に適応し、増殖に不適な時期を生残して乗り切るために、一般に増殖に適さない時期に形成される。休眠期細胞を形成する種は、*S. costatum* (板倉ほか 1992)、*Chaetoceros didymus* var. *protuberans* Ehrenberg (板倉ほか 1993)、*Chaetoceros pseudocurvisetus* Mangin (Kuwata and Takahashi 1990; Kuwata et al. 1993; Oku and Kamatani 1999)、*Leptocylindrus danicus* Cleve (Davis et al. 1980; French and Hargraves 1986) など播磨灘で優占する主要な珪藻で報告されている。また、窒素の欠乏は珪藻の休眠期細胞形成を促す最も効果的なトリガーとされ (Hargraves and French 1983)、*Chaetoceros* 属からも窒素の欠乏によって休眠期細胞を形成する種が報告されている (Kuwata and Takahashi 1990; 板倉ほか 1993; Kuwata et al. 1993; Oku and Kamatani 1997)。これに対し

て板倉 (2000) は, *S. costatum* が窒素またはリン酸が欠乏した条件下では休眠細胞を形成しないことを示し, 本種の休眠期細胞形成には一定濃度以上の栄養塩が必要であることを指摘している。このことから, 栄養塩レベルの高かった 1970 年代~1980 年代前半の播磨灘は, *Skeletonema* spp. のライフサイクルに非常に適した環境であったと考えられた。

これまでに, 瀬戸内海における主要珪藻の休眠期細胞分布状況が精力的に調べられている (今井ほか 1990; Itakura et al. 1997)。板倉・山口 (2007) は, 播磨灘海底泥中の *Skeletonema*, *Chaetoceros* および *Thalassiosira* 属の分布密度を調査し, 海底泥中に休眠期細胞で生残している珪藻の優占種も *Skeletonema* から *Chaetoceros* へ変化していることを明らかにしている。これらのことから, 植物プランクトン群集の変動を解析するためには, 主要種の増殖特性のみならず, 生活史特性も考慮した検討が必要であると考えられた。

近年, 瀬戸内海では *H. circularisquama* (Horiguchi 1995) や *Chattonella ovata* Hara et Chihara (高辻ほか 2005; Yamaguchi et al. 2008b), *Alexandrium tamiyavanichii* Balech (Nagai et al. 2003) 等これまで報告のなかったラフィド藻や渦鞭毛藻の新奇有害・有毒種の出現や, これまで大規模な赤潮を形成したことのなかった種による赤潮発生が問題となっている。これらの種に共通する点として, 従来の HAB 種に比べてより高温を好むことが指摘されている (Yamaguchi et al. 1997; Shiraishi et al. 2008; Yamaguchi et al. 2010)。現在これらの現象は, 播磨灘 19 定点の月平均値や年平均値には顕著に表れていない (Figs. 2-7, 2-8)。しかし, *C. ovata* を含む *Chattonella* 属の出現は, 1970 年代や 1980 年代に見られた大規模な赤潮の形成には至っていないものの, その出現頻度は高くなる傾向にある (Imai et al. 2006)。これらのことから, 水温の上昇は HAB 種の優占種を変化させる重要な要因の一つであると考えられる。

渦鞭毛藻では, 全体の細胞密度が減少する中, *K.*

*mikimotoi* や *Alexandrium* spp. 等 HAB 種の占める割合が増大している (Fig. 2-8)。Itakura et al. (2002) は, 珪藻の春季ブルームによって栄養塩濃度が低下した海域で *A. tamarense* がブルームを形成する頻度が高くなっていることを報告している。*K. mikimotoi* や *A. tamarense* は, 無機態のリン酸が枯渇した環境下で有機態リンをリン源として利用することが可能である (Oh et al. 2002, 2005; Yamaguchi and Itakura 1999)。一方, *S. costatum* が有機態リンの多くを増殖に有効利用できないことから (山口・松山 1994), Yamaguchi and Itakura (1999) は, 渦鞭毛藻は一般に珪藻に比べて増殖速度は低いものの, 栄養塩濃度が低下した海域において生態学的に有利な立場になり得ることを示唆している。

上述した新奇 HAB 種の出現時期と *E. zodiacus* が毎年のように大量発生するようになった時期は比較的良く一致する。新奇 HAB 種の中には, 例えば *H. circularisquama* のように 1988 年に初めて日本で出現が確認され, その後瞬く間に西日本各地に分布域を拡大させた種が知られている (Honjo et al. 1998; 本城 2000)。本種は, 日本で確認される以前に, 香港近郊の Tolo Harbour で採水された固定保存試料からも確認されており (Iwataki et al. 2002), 水産物の移動や船舶のバラスト水, あるいは海流によって近年日本に定着するようになったと推察されている (今井 2007)。これに対して *E. zodiacus* は, 少なくとも 1973 年には播磨灘で出現が観察されており (中村ほか 1989), 1979 年と 1981 年には大阪湾で赤潮を形成した記録も残っている (城 1986)。また播磨灘における植物プランクトンの細胞密度は, 経年的に減少する傾向にある中, 本種の細胞密度は 1990 年代後半から増大する傾向にある。これらのことから, 播磨灘において *E. zodiacus* の出現頻度が高くなった要因として, 現在の海域環境が相対的に *E. zodiacus* の増殖に適した条件へと変化してきたことが考えられた。本研究から, 播磨灘では 35 か年間に冬季水温に有意な上昇 (Fig. 2-2) と DIN 濃度に有意な低下 (Fig. 2-3) が見られたことから, 特にこれらの要

因が *E. zodiacus* の優占化機構と密接な関係があるように思われた。そこで次章では、室内培養実験から環境諸要因が *E. zodiacus* の増殖に及ぼす影響についてさらに詳細な検討を加える。

播磨灘における *E. zodiacus* の季節的な出現特性は、35 年間の調査期間を通して大きく変動することはない。すなわち、本種の細胞密度は 1~4 月に高い値を示し、他の時期にはほとんど出現しなかった (Fig. 2-9)。珪酸質の硬い殻に覆われた珪藻は比重が大きく、細胞サイズが大きい種ほど海底に沈降しやすい (Bienfang and Harrison 1984)。播磨灘においてノリの色落ち原因藻とされる *Coscinodiscus wailesii* や *E. zodiacus* は、珪藻の中でも細胞サイズが大きく沈降速度も大きいことが知られている (Bienfang et al. 1982; Bienfang and Harrison 1984; 小野ほか 2006)。播磨灘では、*Skeletonema* spp. や *Chaetoceros* spp. 等の珪藻が主要な優占種であり、これらの珪藻は主に 6~9 月にかけて高密度に出現する (中村ほか 1989)。これに対して、*C. wailesii* や *E. zodiacus* 等の大型珪藻は、表層と底層に温度差があり、鉛直安定度の高い成層期 (概ね 5~9 月) には、有光層に留まることが出来ず、この時期にブルームを形成することは出来ないと考えられる。したがって、これらの種が大量発生可能な時期は鉛直混合期 (概ね 10~4 月) に限定される。この時期は、ノリ養殖漁期 (11~4 月) と重なるため、大型珪藻は養殖ノリと栄養塩を巡って競合することとなり、これら珪藻の大量発生は結果的に養殖ノリに色落ち被害を及ぼすことになると考えられた。

Nagai et al. (1996) は、*C. wailesii* の栄養細胞と休眠細胞の出現には明瞭な季節性があり、*C. wailesii* の栄養細胞は 9~4 月の鉛直混合期に、休眠細胞は 2~8 月の海底泥中からそれぞれ検出されることを報告している。また、*C. wailesii* は播磨灘において年に 2 回、秋季 (10~11 月) と春季 (2 月) に栄養細胞が出現のピークを示し、一般に秋季に細胞密度が最大となる (長井 2000)。これに対して *E. zodiacus* は、過去 35

か年間を通して、夏季同様、鉛直混合が始まる秋季なっても細胞密度が増大しない (Fig. 2-9)。*E. zodiacus* の細胞密度がピークを示す時期は、*C. wailesii* の春季ブルームよりもやや遅い時期である。このように、ノリの色落ちに關与する比較的大型の珪藻は鉛直混合期に出現のピークを示すものの、季節的な出現特性には種間に大きな違いが見られた。このような点を踏まえて、次章以降は *E. zodiacus* の生理生態学的特性について、*C. wailesii* との比較を通して議論を深めていくこととする。

### 第三章 *Eucampia zodiacus* の増殖に及ぼす環境諸要因の影響

有害藻の大量発生機構を解明するための研究法には、大きく分けて二つの取り組みがある。一つは現場海域における海況、気象条件等、環境因子の変動と、対象有害藻の出現特性との関係を明らかにする環境面からの調査・研究であり、もう一方は対象種の増殖生理や生態、生活史の解明といった生物学的側面からのアプローチである (岩崎 1973; 山口 1994)。植物プランクトンのある特定の種が大量発生する現象は、現場海域において様々な因子が複雑に絡み合っている。したがって、環境面のみからのアプローチ、または生物学的側面からのアプローチのみではいずれも不十分であり、両方向からの研究が有機的に連携していることが重要である。

前章 (第 II 章) では、播磨灘における 35 年間の海域環境と植物プランクトン群集についてその長期変動を解析した。その結果、播磨灘では冬季水温に有意な上昇と DIN 濃度に有意な低下が検出され、そのような海域環境の変化の中で近年 *Eucampia zodiacus* が大量発生するようになったことを示した。このような解析は、上記の環境面からの取り組みと位置付けられる。しかし、このような海域環境の変動と *E. zodiacus* 個体群動態との関係は、*E. zodiacus* の増殖生理学的特



性の裏付けがなければ単なる現象の記載に終わってしまう。また場合によっては、現場海域で起こった現象に対して誤った解釈を与える可能性もある。したがって、現場調査から得られた知見において、環境要因が *E. zodiacus* の個体群動態に及ぼす影響について科学的な根拠を付与するためには、実験的な解析による立証が必要である。

自然条件下において、植物プランクトンは光、温度、塩分、栄養塩、微量栄養素、金属、種間競争や捕食圧、殺藻といった様々な環境因子の制限下にある (Smayda 1973)。したがって、どのような環境因子が増殖を制限しているのかを明らかにすることは、対象種の大量発生機構を解明する上で極めて重要な課題である。これまで、多くの植物プランクトンに対して、室内培養実験からその増殖生理学的特性が検討されている。特に瀬戸内海では、赤潮による漁業被害が大きな問題となってきたことから、*Chattonella antiqua* (Hada) Ono (Nakamura and Watanabe 1983a, 1983b, 1983c; Nakamura 1985a, 1985b; 山口ほか 1991), *Karenia mikimotoi* (山口・本城 1989; Yamaguchi and Itakura 1999), *Heterocapsa circularisquama* (Yamaguchi et al. 1997, 2001) 等、主要な有害赤潮藻を対象に種々の培養実験が実施され、多くの知見が蓄積されている。

一方ノリの色落ち原因藻では、*Coscinodiscus wailesii* 生活環の各ステージにおける生理学的特徴や、生活環の果たす生態学的役割などが培養実験において検討されている (長井・眞鍋 1994; Nagai et al. 1995, 1999; Nagai and Imai 1997, 1999)。また現場調査から、播磨灘における *C. wailesii* 個体群の増殖・消滅過程は、主に水温、塩分、栄養塩および日射量といった物理・化学的環境要因が関与していること、さらにこれら因子は個々の直接的な作用というよりは相乗作用によって、*C. wailesii* の出現に季節性が生じていることが示唆されている (長井 2000)。しかし、*C. wailesii* の増殖生理学的特性に関する知見はほとんどなく (Eppley et al. 1969), *E. zodiacus* に関しては皆無に等しいのが現状で

ある。

本章では、特に瀬戸内海における有害赤潮藻の研究において長年蓄積されてきた実験手法をノリ色落ち原因藻に応用し、室内培養実験から *E. zodiacus* の環境諸要因に対する増殖応答を調べ、その増殖生理学的特性から現場海域における大量発生機構の解明を試みた。まず第1節では増殖に及ぼす光強度、温度および塩分の影響を明らかにし、色落ち原因藻の最適増殖条件、増殖可能条件の範囲等を定量的に評価した。第2節では増殖に及ぼす栄養塩濃度の影響および形態別栄養塩利用能を調べ、栄養塩制限下における増殖の動力学を解析した。さらに第3節では、窒素、リンの取り込み能を明らかにし、現場海域における色落ち原因藻と他の珪藻やノリとの栄養塩を巡る競争について論じた。なお、これら一連の培養実験はもう一種の重要なノリ色落ち原因珪藻 *C. wailesii* に対しても実施し、両者の比較を通してノリの色落ち原因藻の播磨灘における挙動、ならびにノリ養殖へ及ぼす影響を考察した。

## 第1節 増殖に及ぼす光強度、温度および塩分の影響

光は光合成を行う植物プランクトンにとって最も重要な環境要因であり、光合成のエネルギー源としての重要性に加え、空間的 (水深や緯度)、時間的 (日変化や季節変化) により大きく変動するため、しばしば増殖を制限する因子として作用する (Darley 1987)。また温度は、細胞内の物質およびエネルギー代謝に関わる生化学反応を通して、塩分は植物プランクトンの細胞成分や浸透圧に対する作用を通してそれぞれ増殖速度に影響を与えることが考えられる。したがって、光、温度および塩分は植物プランクトンの増殖に影響を及ぼす物理的な環境因子の中でも最も基本的かつ重要な要因である。またこれらの因子は、植物プランクトンの増殖に対して相乗的または干渉的な相互作用を持つことが報告されている (Tomas 1978; 山口

1994)。本節では、培養実験によって *E. zodiacus* の増殖に及ぼす光強度、温度、塩分の影響を明らかにし、前章（第II章）において抽出した現場海域における環境変動と *E. zodiacus* の出現特性との関係を比較しながら、増殖生理学的特性から本種の大量発生機構について考察する。

### 材料および方法

**供試株と培地** 本実験に用いた *E. zodiacus* および *C. wailesii* の培養株は、1999年および1993～1998年にそれぞれ播磨灘より分離し、マイクロピペット洗浄法（岩崎1967）およびNagai et al. (1998)の方法を併用して無菌化したクローン株である。無菌化の確認はST10<sup>-1</sup>培地（Ishida et al. 1986）により行った。両珪藻種の継代培養および以降の培養実験には、MP1培地を用いた（長井・眞鍋1994）。

**in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定** 植物プランクトン生物量の測定法として、細胞密度の直接計数に比べより迅速で簡便な方法として、in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度測定法が室内培養実験で採用されている（Brand et al. 1981; 山口・本城1989; 山口ほか1991; Imai et al. 1996, 2004; Yamaguchi et al. 1997; 山本・樽谷1997; Yamaguchi and Itakura 1999; Yamaguchi et al. 2001; Naito et al. 2005a, 2005b, 2008; Herndon and Cochlan 2007; Yamaguchi et al. 2008a, 2010; Xu et al. 2010）。本方法は、従来の方法のように試験管や三角フラスコから少量の培養を取り、その細胞数を計数する必要がないため、大量のサンプルを迅速かつ簡便に測定することが可能であり、また培養容器のふたを開けることがないため、実験中のコンタミネーションを防止できるといった利点もある（Brand et al. 1981）。そこで、ここではまず本手法が *E. zodiacus* の増殖速度測定にも利用可能か検討した。

MP1培地27.5 mlが入ったキュベット（25×150 mm, TURNER DESIGNS 社製）に *E. zodiacus* を初期細胞密

度が50 cells ml<sup>-1</sup>となるように接種し、温度20°C、明暗周期10hL:14hDの条件下で培養した。光強度は、30, 70, 120, 150 および185 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の5段階を設けて実施した。*E. zodiacus* の in vivo クロロフィル蛍光値は蛍光光度計（TURNER DESIGNS 社製, TD-700）を用いて、細胞密度はよく攪拌した0.1～1 mlの培養をピペットで取り、光学顕微鏡下で直接計数することによって、それぞれ毎日測定した。

**増殖速度に及ぼす光強度と温度の影響** *E. zodiacus* の培養実験は、光強度を5, 10, 20, 30, 50, 70, 90, 120, 150, 200, 250, 300 および350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の13段階とし、温度は、8.0, 9.0, 12.5, 15.0, 20.0 および25.0°Cの条件下で実施した。光源は白色蛍光灯を用い、明暗周期は10hL:14hDとした。まず、MP1培地35 mlが入った50 ml三角フラスコで、温度10°C、光強度35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>で継代維持培養した *E. zodiacus* の培養株を用い、培養温度を各実験温度まで徐々に上昇あるいは下降させた。各実験温度で馴致後、各温度条件下でMP1培地27.5 mlが入ったキュベット（25×150 mm, TURNER DESIGNS 社製）に *E. zodiacus* を初期細胞密度が50～100 cells ml<sup>-1</sup>となるように接種し、各光強度条件下で培養した。なお、実験は各設定条件下においてキュベット3本立てで実施し、3本の平均値をその実験条件の値とした。実験開始後、毎日蛍光光度計を用いて in vivo クロロフィル蛍光を測定した。増殖速度（μ; divisions d<sup>-1</sup>）は、対数増殖期について次式から最小自乗法により算出した（Guillard 1979）。

$$\mu = \Delta t^{-1} \times \ln(N_t/N_0) \quad (1)$$

ここで、tは培養日数(d)、N<sub>0</sub>は対数増殖初期の in vivo クロロフィル蛍光値(相対値)、N<sub>t</sub>は対数増殖後期の in vivo クロロフィル蛍光値(相対値)をそれぞれ示す。増殖速度と光強度の関係は、Lederman and Tett (1981) 直角双曲線モデルを改変した次式を適応し、東海(1997)の方法で各パラメータ値を求めた。

$$\mu = \mu_m(I-I_0)/((K_s-I_0)+(I-I_0)) \quad (2)$$

ここで  $\mu_m$  は最大増殖速度 (divisions  $d^{-1}$ ),  $I$  は光強度 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $I_0$  は光強度の閾値 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  $K_s$  は  $\mu_m/2$  を与える光強度 (半飽和定数,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) をそれぞれ示す。

一方, *C. walesii* に関する実験は, 温度  $15^\circ\text{C}$ , 光強度  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件下で, MP1 培地 18 ml が入った試験管 (18 mm  $\times$  180 mm) にて継代培養した株を用い, 光強度が 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90, 120, 150, 185, 250, 300 および  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の 13 段階, 温度は, 9.0, 12.5, 15.0 および  $20.0^\circ\text{C}$  の条件下で実施した。*E. zodiacus* と同様, 各実験温度で培養株を馴致した後, MP1 培地 7.0 ml が入った 6 穴プレート (Nalge Nunc 社製) に *C. walesii* が  $10\sim 15 \text{ cells well}^{-1}$  となるように接種した。接種後, 実体顕微鏡下で毎日 *C. walesii* の細胞数を計数し, 上述の *E. zodiacus* と同様, (1) 式から増殖速度を算出し, (2) 式により増殖速度と光強度の関係を求めた。

**増殖速度に及ぼす温度と塩分の影響** 培養実験は, 温度 5, 7, 10, 15, 20, 25,  $30^\circ\text{C}$  の 7 段階, 塩分を 10, 15, 20, 25, 30, 35 の 6 段階とし, それらを組み合わせた計 42 通りの実験条件を設定して実施した。30 以下の塩分は, 基本海水を超純水により各実験条件まで希釈し, 35 の塩分は培地に用いた基本海水 (塩分 32.0) を  $50^\circ\text{C}$  の恒温器中で一夜放置し, 蒸発濃縮することによってそれぞれ調製した。供試株の各実験条件への馴致は以下の手順で行った。まず温度  $20^\circ\text{C}$ , 塩分 32 で継代培養した *E. zodiacus* を新たな MP1 培地に植え継ぎ, 培養温度を 1 日に  $1\sim 2.5^\circ\text{C}$  ずつ上昇あるいは下降させ, 3~7 日かけて各実験条件の温度にした。各実験温度において *E. zodiacus* の増殖を確認後, 各温度条件で塩分を 6 段階に調整した MP1 培地にそれぞれ接種した。各温度, 塩分条件に馴致させた *E. zodiacus* は, 光強度  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 明暗周期 12hL: 12hD の条件下で

1 か月間前培養した。前培養後, 各実験条件に調整した MP1 培地 27.5 ml の入った 25 mm 径のキュベットに *E. zodiacus* を  $50 \text{ cells ml}^{-1}$  となるように接種した。ただし, 温度  $5^\circ\text{C}$  および  $7^\circ\text{C}$  では, 実験に必要な十分な細胞が得られなかったことから, 温度  $10^\circ\text{C}$  で前培養した *E. zodiacus* をそれぞれの塩分条件の培養キュベットに接種した。また温度  $30^\circ\text{C}$  で増殖が見られなかった塩分 10, 15 の実験条件は同温度条件の塩分 20 で前培養した *E. zodiacus* をそれぞれ接種した。光強度と明暗周期は前培養と同条件とした。接種後, 蛍光光度計 (TURNER DESIGNS 社製 TD-700) で毎日 *E. zodiacus* の in vivo クロロフィル蛍光値を測定した。さらに, 対数増殖期について (1) 式から増殖速度 ( $\mu$ ; divisions  $d^{-1}$ ) を求めた。なお, 各実験条件はキュベット 3 本立てで実施し, 3 本の平均値をその実験条件の値とした。

*C. walesii* の実験には, 1993 年~1998 年の秋季~春季に播磨灘で採取し, 無菌化した 4 株 (S-31, S-54, A-64, A-72) を用いた。培養実験の温度は 5, 10, 15, 20, 25 および  $30^\circ\text{C}$  の 6 通り, 塩分は 10, 15, 20, 25, 30 および 35 の 6 通りとし, それらを組み合わせた計 36 通りの実験条件を設定した。温度  $20^\circ\text{C}$ , 塩分 32, 光強度  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 明暗周期 8hL: 16hD の条件下で継代培養した *C. walesii* を, 塩分 20, 25, 30, 35 に調整した培地に約 20 細胞ずつ接種した。各培地において *C. walesii* の増殖を確認後, 水温を 1 日に  $1\sim 2.5^\circ\text{C}$  ずつ上昇あるいは下降させ, 各実験条件の温度にした。次いで, 各温度条件の塩分 25 で馴致させた *C. walesii* を各温度条件下で塩分 10, 15, 20 の培地に接種した。各実験条件に馴致させた *C. walesii* は, 光強度  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 明暗周期 16hL: 8hD の条件下で 1 か月間前培養した。その後, 各実験条件の培地 7.5 ml を分注した 6 穴プレートの各ウェルにそれぞれ  $10\sim 15 \text{ cells well}^{-1}$  接種した。ただし, 1 か月間の前培養中に塩分 10 で増殖しなかった実験区については, 同温度条件の塩分 15 で増殖した細胞を接種した。同様に, 塩分 15 でも増殖しなかった条件では塩分 20 で増殖した細胞

を塩分 10 および 15 へ、塩分 35 で増殖しなかった実験区では塩分 30 で増殖した細胞をそれぞれ接種した。接種後、実体顕微鏡下で毎日 *C. wailesii* の細胞数を計数し、*E. zodiacus* と同様 (1) 式から対数増殖期について最小自乗法により増殖速度 ( $\mu$ ; divisions  $d^{-1}$ ) を求めた。

## 結 果

in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定 *E. zodiacus* の増殖に伴う細胞密度 (C) と in vivo クロロフィル蛍光 (F) の変化を Fig. 3-1 に示す。両者の間には、いずれの光強度条件下においても次式に示す高い相関関係が認められた。

$$35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} : \ln C = 1.10 \times \ln F + 4.58 \quad (r^2 = 0.97)$$

$$70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} : \ln C = 1.15 \times \ln F + 4.08 \quad (r^2 = 0.97)$$

$$120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} : \ln C = 1.04 \times \ln F + 4.37 \quad (r^2 = 0.98)$$

$$150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} : \ln C = 1.01 \times \ln F + 4.55 \quad (r^2 = 0.98)$$

$$185 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} : \ln C = 1.07 \times \ln F + 4.58 \quad (r^2 = 0.98)$$

また、*E. zodiacus* 細胞密度と蛍光値の関わりに光強度による差がないか併せて検討した。各光条件下の回帰直線について回帰係数の差を検定した結果、全ての組み合わせにおいて傾きおよび切片に有意な差は検出されなかった ( $p < 0.05$ )。これらのことから、*E. zodiacus* の増殖速度の測定には細胞密度の代わりに蛍光値を利用できることが判明した。

**増殖速度に及ぼす光強度と温度の影響** 各温度条件下における *E. zodiacus* の増殖曲線を Fig. 3-2 に示す。温度 8.0, 9.0, 12.5°C では、 $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の光強度条件下でも僅かながら増殖が見られたが、15°C 以上の温度条件下では、増殖しなかった。各温度条件とも  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  以上の光強度条件下では増殖が認められ、光強度の増大と共に増殖速度も高くなった。一方、*C. wailesii* はどの温度条件下においても  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  の弱光下では増殖できなかった。増殖は全ての温度条件

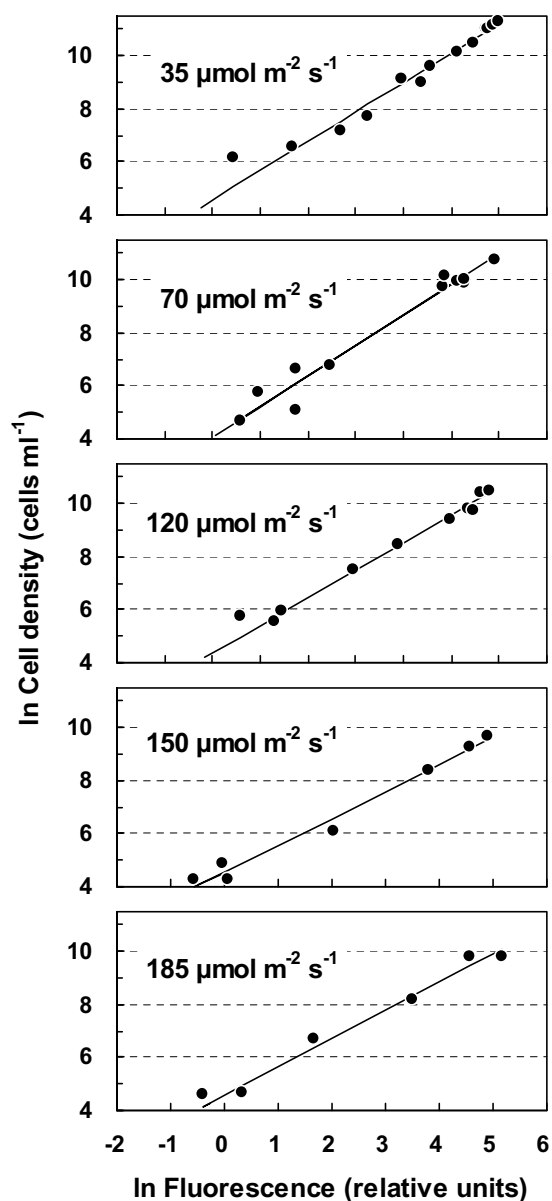


Fig. 3-1. Relationship between cell density and in vivo chlorophyll fluorescence in *Eucampia zodiacus*.

下において、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  以上の光強度下でみられた (Fig. 3-3)。また *E. zodiacus* と同様、光強度が高くなるほど増殖速度は高くなった。

各温度条件下における *E. zodiacus* の増殖速度と光強度の関係を Fig. 3-4 に示す。両者の関係は直角双曲線モデルの改変式でそれぞれ以下のように表すことができた。



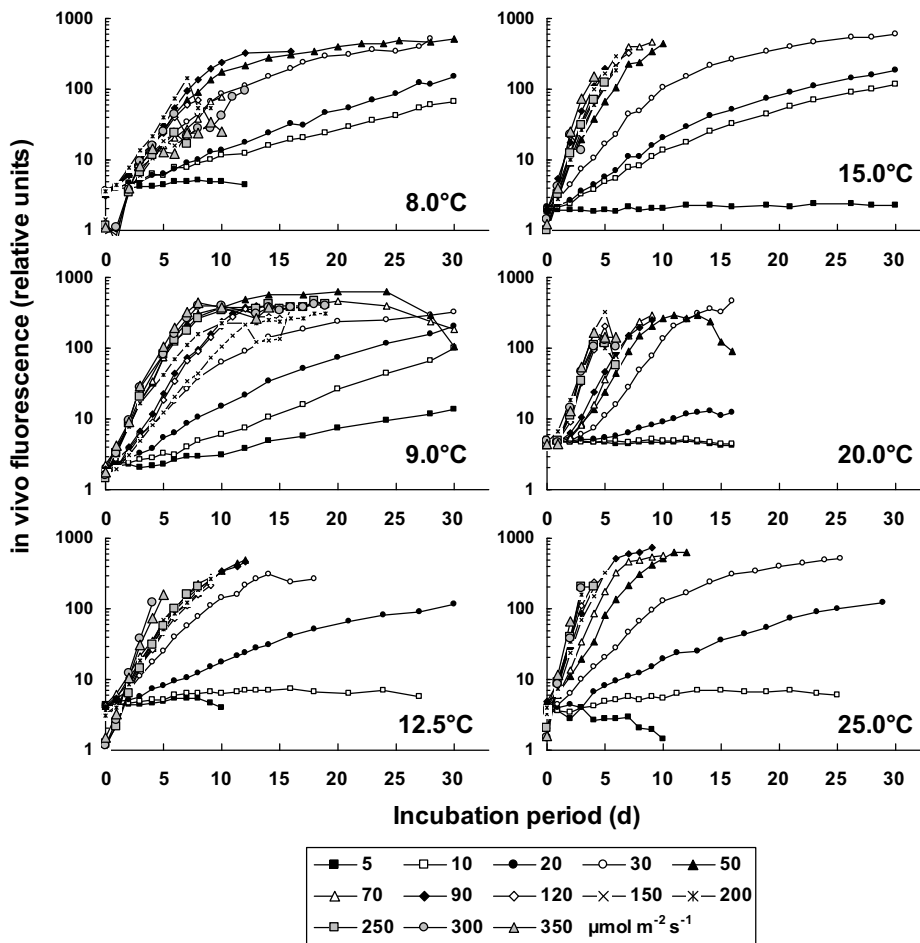


Fig. 3-2. Growth curves of *Eucampia zodiacus* at various irradiance and temperature combinations. Growth was expressed as natural logarithm on in vivo chlorophyll fluorescence intensity averaged for three replicates.

$$8.0^{\circ}\text{C}: \mu = 0.984(I-2.65)/(I+18.7) \quad (r^2 = 0.88)$$

$$9.0^{\circ}\text{C}: \mu = 1.06(I-3.75)/(I+22.8) \quad (r^2 = 0.86)$$

$$12.5^{\circ}\text{C}: \mu = 1.36(I-4.20)/(I+31.4) \quad (r^2 = 0.89)$$

$$15.0^{\circ}\text{C}: \mu = 1.83(I-5.04)/(I+39.8) \quad (r^2 = 0.96)$$

$$20.0^{\circ}\text{C}: \mu = 3.08(I-7.90)/(I+47.0) \quad (r^2 = 0.93)$$

$$25.0^{\circ}\text{C}: \mu = 3.02(I-7.45)/(I+51.7) \quad (r^2 = 0.96)$$

各パラメータ値を Table 3-1 に示す。 *E. zodiacus* の  $\mu_m$  は、温度が 8.0 から 20.0°C へ高くなるにしたがって上昇した。同様に、 $K_s$  および  $I_0$  の値も温度と共に増大した。20.0 と 25.0°C はほぼ同程度の値であった。

*C. walesii* の増殖速度と光強度の関係も *E. zodiacus* と同様、直角双曲線モデルの改変式で以下のように表すことができる (Fig. 3-5)。

$$9.0^{\circ}\text{C}: \mu = 0.662(I-5.69)/(I+40.6) \quad (r^2 = 0.94)$$

$$12.5^{\circ}\text{C}: \mu = 0.762(I-5.86)/(I+34.9) \quad (r^2 = 0.95)$$

$$15.0^{\circ}\text{C}: \mu = 1.11(I-5.93)/(I+60.9) \quad (r^2 = 0.97)$$

$$20.0^{\circ}\text{C}: \mu = 1.46(I-6.77)/(I+70.6) \quad (r^2 = 0.98)$$

*C. walesii* の各パラメータ値も、温度が高くなる程上昇する傾向を示した (Table 3-1)。

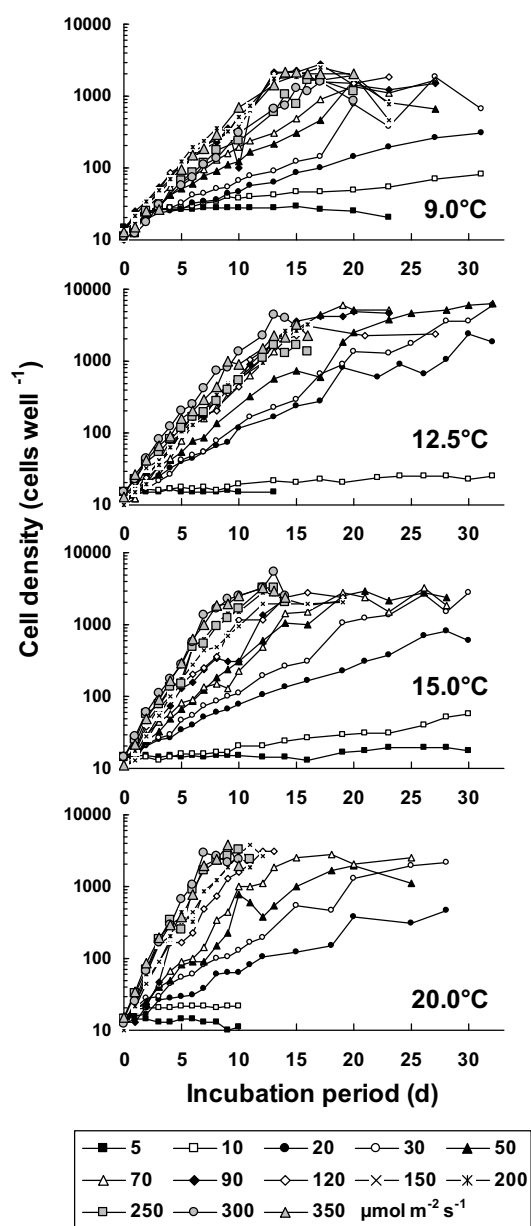


Fig. 3-3. Growth curves of *Coscinodiscus wailesii* at various irradiance and temperature combinations.

**増殖速度に及ぼす温度と塩分の影響** *E. zodiacus* の水温、塩分に対する増殖速度の等値線を Fig. 3-6 に示す。

*E. zodiacus* は温度 5°C では全ての塩分条件下で増殖出来なかった。温度 7°C では塩分 10 および 15 で増殖出来なかったが、塩分 20 以上の条件下では僅かながら増殖が見られた。増殖速度は温度が高くなるに従って増大し、温度 10°C では塩分 25 以上の条件下で増殖速

度が 1.0 divisions d<sup>-1</sup> を上回り、温度 15°C では全ての塩分条件下で増殖速度が 1.0 divisions d<sup>-1</sup> 以上となった。温度 20°C では塩分 20 以上の条件下で、また温度 25°C では全ての塩分条件下で増殖速度が 2.0 divisions d<sup>-1</sup> 以上となり、最大増殖速度は温度 25°C、塩分 25 で 3.0 divisions d<sup>-1</sup> の高い値を示した。しかし温度 30°C では、増殖速度は急激に低下し、塩分 10 および 15 では増殖が見られなかった。このように、*E. zodiacus* は広範な温度、塩分条件下で増殖が可能であった。また、低温条件から増殖最適温度 (20~25°C) までの増殖速度の増大に比べ、高温域での増殖速度の減少はその変動が急であり、増殖最適温度は増殖耐性温度の上限に近い微細藻類に典型的な増殖応答 (Eppley 1972) を示した。

実験に供した *C. wailesii* 4 株の温度、塩分に対する増殖速度について Fig. 3-7 に等値線グラフで示す。温度 5°C では、S-31 株が全ての塩分条件下で、また他の 3 株は塩分 10 および 15 で増殖が認められなかった。温度 10°C では、S-31 株が塩分 10 および 15 で、他の 3 株は塩分 10 で増殖が認められなかった。S-31 株は、温度 15、20°C の塩分 10 でも増殖できなかった。増殖速度は、温度 20~25°C、塩分 20~30 で最も高く、低温、低塩分条件下からその範囲に向かって増殖速度は緩やかに上昇した。一方、温度 30°C では増殖速度は急激に低下し、塩分 10、15 および 20 の条件下では 4 株とも増殖が認められず、S-31 株は塩分 30、35 で、S-54 株は塩分 35 でもそれぞれ増殖しなかった。

*C. wailesii* の供試株 4 株について、各実験区における増殖速度を二元配置分散分析法により比較した。その結果、S-54、A-64、A-72 株の 3 株間には増殖速度に統計学的に有意差はなかった。しかし、S-31 株は他の 3 株と比較して増殖速度に有意な差がみられた。これは温度 5 および 30°C の実験区で、他の供試株は僅かながら増殖した実験区が多かったのに対し、S-31 株はこれらの実験区でほとんど増殖できなかったことによるものであった。しかしながら、5°C および 30°C は、播磨灘において実際に起こり得ることがほとんどな

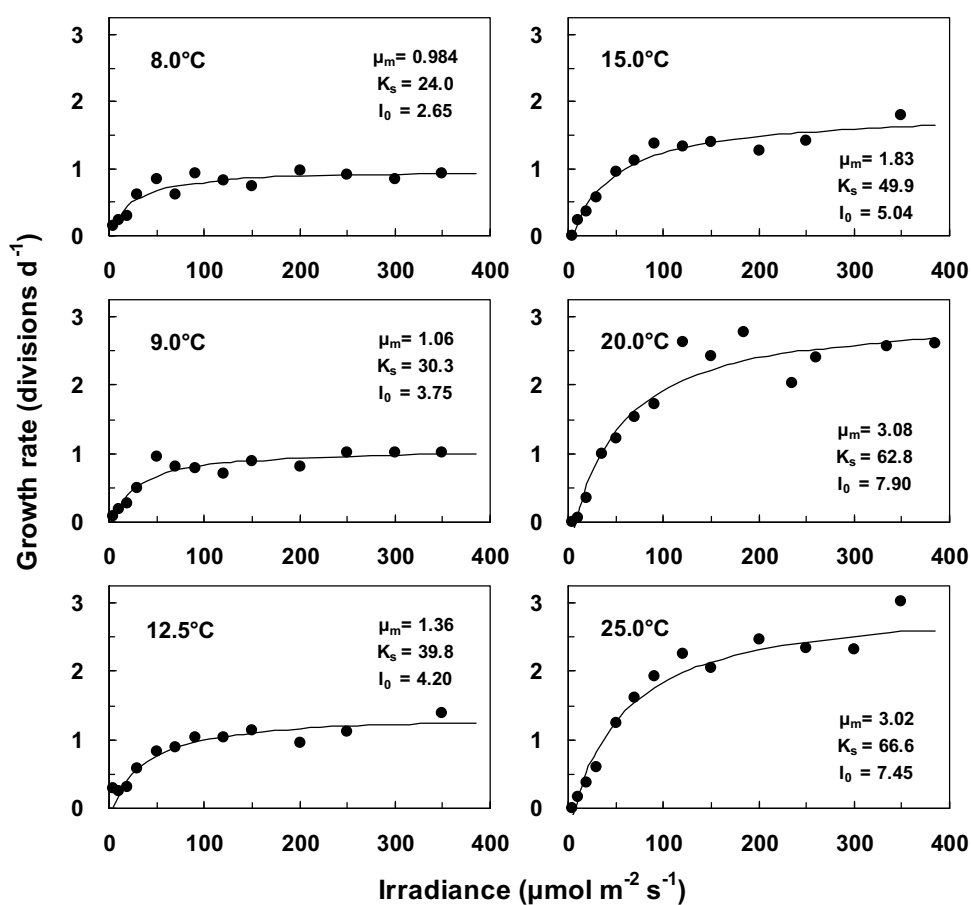


Fig. 3-4. Growth rate of *Eucampia zodiacus* as a function of irradiance for the various experimental temperatures.

**Table 3-1.** Maximum growth rate ( $\mu_m$ ), half saturation constant ( $K_s$ ) and threshold value of irradiance ( $I_0$ ) of *Eucampia zodiacus* and *Coscinodiscus walesii* with varying light intensities at the different experimental temperatures.

Species	Temperature (°C)	$\mu_m$ (divisions d <sup>-1</sup> )	$K_s$ (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	$I_0$ (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<i>Eucampia zodiacus</i>	8.0	0.984	24.0	2.65
	9.0	1.06	30.3	3.75
	12.5	1.36	39.8	4.20
	15.0	1.83	49.9	5.04
	20.0	3.08	62.8	7.90
	25.0	3.02	66.6	7.45
<i>Coscinodiscus walesii</i>	9.0	0.662	52.0	5.69
	12.5	0.762	46.6	5.86
	15.0	1.11	72.8	5.93
	20.0	1.46	84.1	6.77

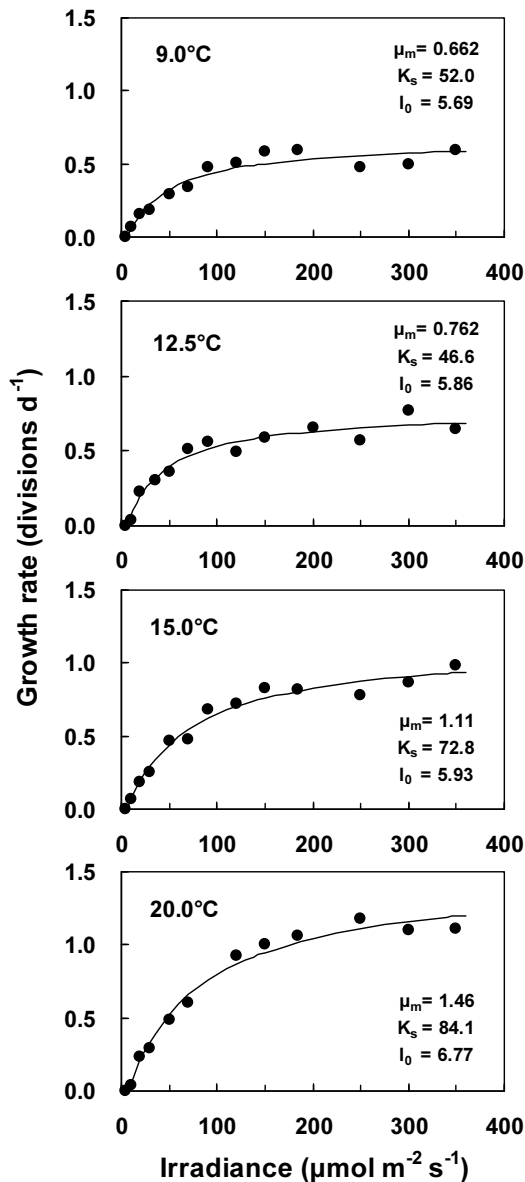


Fig. 3-5. Growth rate of *Coscinodiscus wailesii* as a function of irradiance for the various experimental temperatures.

い水温であること(眞鍋ほか1994b),この両実験区を除去し,同様の統計学的分析を行ったところ,4株に有意差はなかったことから,ここでは4株の増殖速度の平均値を播磨灘における*C. wailesii*の増殖速度とした。供試株4株の平均値から得た*C. wailesii*増殖速度の温度,塩分に対する等値線をFig. 3-8に示す。*C. wailesii*の増殖速度は,温度20~25°C,塩分20~30の範囲で1.0 divisions d<sup>-1</sup>以上の値を示し,最大値は4

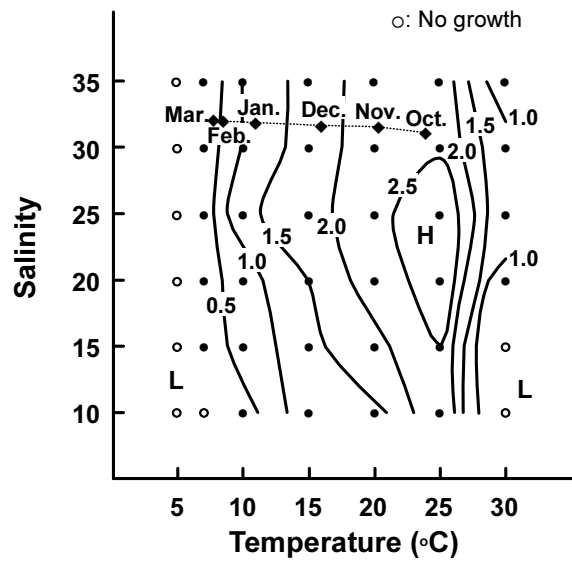


Fig. 3-6. Contour plots of the growth rate of *Eucampia zodiacus* at various temperature and salinity combinations under 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 12L: 12D, and seasonal changes of water temperature and salinity in Harima-Nada (◆). Monthly water temperature and salinity data are shown as the average of 19 sampling stations from April 1973 to December 2007.

株の平均で1.02 divisions d<sup>-1</sup>であった。

### 考 察

培養実験から,*E. zodiacus* および *C. wailesii* の増殖に対して及ぼされる環境要因の相互作用の関係が示された。そこで,ここではそれら要因間の相互作用も考慮しながら,現場海域における環境諸要因と*E. zodiacus*の増殖特性との関係を検討した。

まず,光強度と*E. zodiacus*の増殖速度との関係をもとに,10~3月の現場海域の光環境下における個体群動態について解析した。ここではその指標として,*E. zodiacus*の増殖が可能な最低光強度(閾値)の水深( $D_l$ ; m),および増殖速度が0.5 divisions d<sup>-1</sup>まで低下する水深( $D_{0.5}$ ; m)をそれぞれ次式により算出した。

$$D_l = -\ln(I_0/I_s)/k$$

$$D_{0.5} = -\ln(I_{0.5}/I_s)/k$$

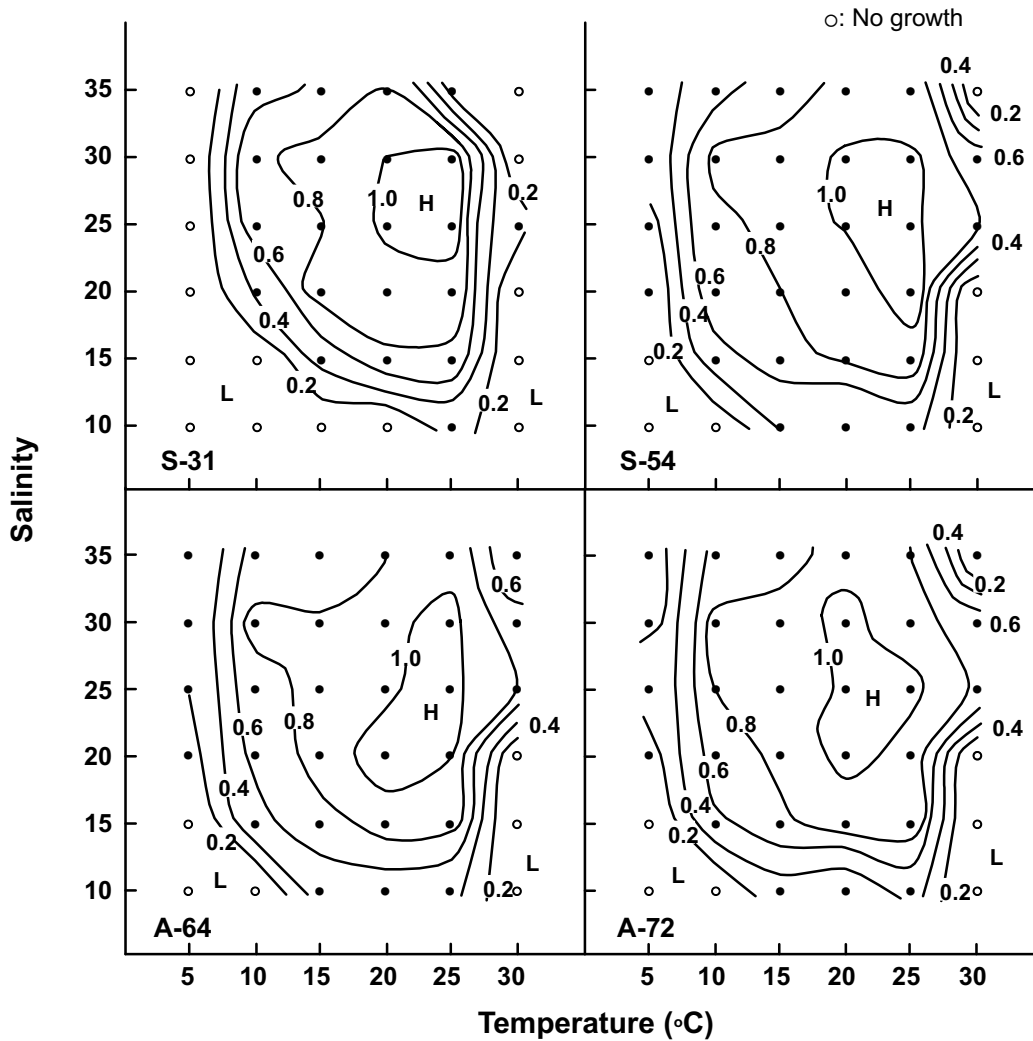


Fig. 3-7. Contour plots of the growth rate of *Coscinodiscus wailesii* at various temperature and salinity combinations under  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16L: 8D.

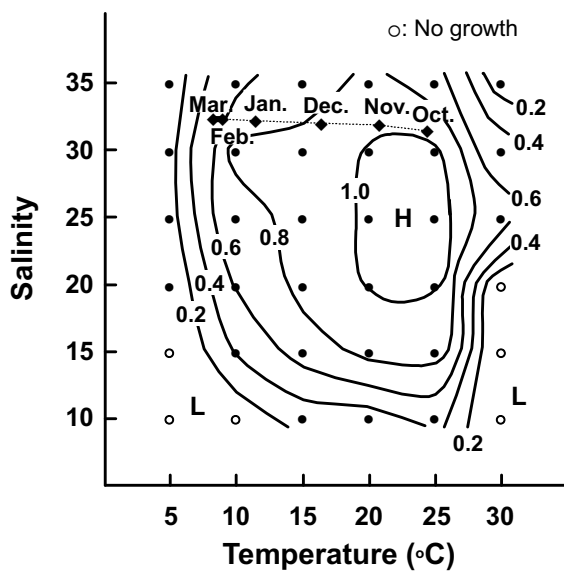


Fig. 3-8. Contour plots of the growth rate of *Coscinodiscus wailesii* averaged from four strains at various temperature and salinity combinations under  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16L: 8D, and seasonal changes of water temperature and salinity in Harima-Nada (◆). Monthly water temperature and salinity data are shown as the average of 19 sampling stations from April 1973 to December 2007.



ここで、 $I_0$ は閾値の光強度 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $I_{0.5}$ は 0.5 divisions  $d^{-1}$ の増殖速度を与える光強度 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $k$ は消散係数 ( $m^{-1}$ ),  $I_s$ は海表面直下での光強度 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )をそれぞれ示す。解析に必要な消散計数 ( $k$ )および海表面直下の光強度の値 ( $I_s$ )はそれぞれ以下の値を用いた。消散計数は、1994~1999年の10~3月に毎月1回、播磨灘の9定点で測定した透明度と水中光量子量の値から、次式を用いて算出した(岡山県ほか1999)。

$$k = 0.904 \times \text{Tr}^{-0.782} \quad (r^2 = 0.562, n = 92)$$

ここで  $\text{Tr}$ は透明度 (m)を示す。透明度の値には播磨灘における月毎の透明度の平均値を用いた(眞鍋ほか1994b)。また、 $I_s$ の値には、1993~2004年に兵庫県水産技術センターにおいて自動気象観測装置(AANDERAA社製、日射量センサ2770)により毎日測定した日射量の平均値(西川ほか2005)を次式により光量子量に変換することによって得た(西條・三田村1995)。なお、換算値は海表面での反射などによっ

て15%が消失し(高橋ほか1996)、さらに残りの50%が光合成有効波長として海水中に透過すると仮定した(Strickland 1958)。

$$1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} = 2 \times 10^{-1} \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

本研究から、 $I_0$ 値は $\mu_{\text{max}}$ など他のパラメータと同様に、温度によって変動することが明らかになった(Table 3-1)。そこでここで使用する $I_0$ の値には、播磨灘における10~3月の水温の変動を考慮し(眞鍋ほか1994b; 西川ほか2005), 10月上旬~10月中旬は25.0°C下で得られた値を、同様に10月下旬~11月中旬は20.0°C, 11月下旬~12月上旬は15.0°C, 12月中旬~1月上旬は12.5°C, 1月中旬~1月下旬および3月中旬~3月下旬は9.0°C, 2月上旬~3月上旬は8.0°C下で得られた値をそれぞれ用いた。

10~3月の播磨灘における海表面の光強度と *E. zodiacus* の  $D_t$ および  $D_{0.5}$ の変動を Fig. 3-9に示す。*E. zodiacus* の  $D_t$ は18.9~32.9 mの範囲で変動した。10~12月にかけて日射量は低下したが、水温の低下に伴い

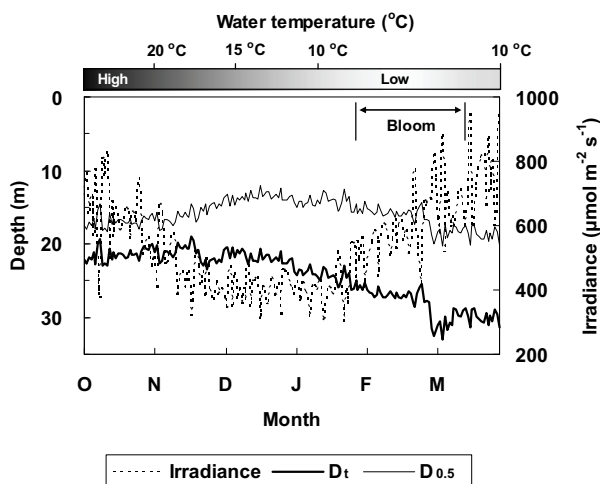


Fig. 3-9. Changes in irradiance,  $D_t$  and  $D_{0.5}$  of *Eucampia zodiacus* in Harima-Nada from October to March.  $D_t$  is the depth for the threshold value of irradiance for growth of *E. zodiacus* and  $D_{0.5}$  is the depth which *E. zodiacus* is able to grow at the growth rate of 0.5 divisions per day.

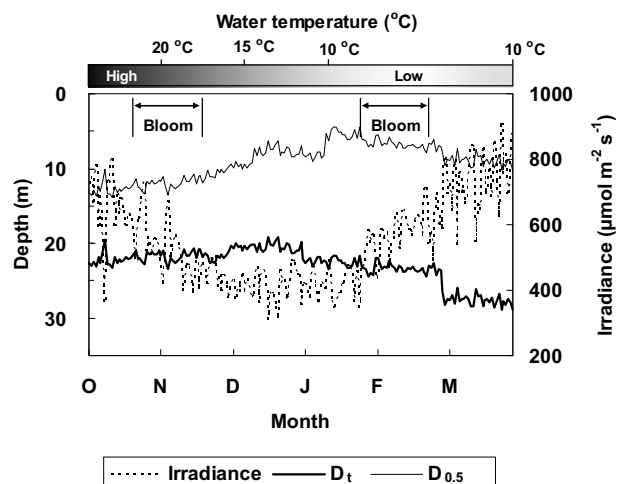


Fig. 3-10. Changes in irradiance,  $D_t$  and  $D_{0.5}$  of *Coscinodiscus wailesii* in Harima-Nada from October to March.  $D_t$  is the depth for the threshold value of irradiance for growth of *C. wailesii* and  $D_{0.5}$  is the depth which *C. wailesii* is able to grow at the growth rate of 0.5 divisions per day.

光強度の閾値も低下したため、 $D_L$  はほぼ横ばいで推移した。その後、さらに水温が低下したものの、1 月以降は日射量が増大に転じたことから、 $D_L$  値は増大し、3 月上旬に最大値 32.9 m を示した。また、*E. zodiacus* の  $D_{0.5}$  は 10~12 月下旬にかけて低下し、最小値は 12.1 m (12 月中旬) であった。その後、水温はさらに低下したものの日射量が増大によって  $D_{0.5}$  の値も上昇に転じ、3 月上旬に最大値 20.3 m を示した。

同様の方法で求めた *C. wailesii* の  $D_L$  および  $D_{0.5}$  の変動を Fig. 3-10 に示す。なお、*C. wailesii* の解析には 10 月上旬~11 月中旬は温度 20°C 下で得られたパラメータ値、1 月中旬~3 月下旬までは 9°C 下で得られた値をそれぞれ用い、他の時期については *E. zodiacus* と同様の温度条件下で得られた値を用いた。*C. wailesii* の  $D_L$  は 10~12 月にかけてほぼ横ばいで推移し、12 月中旬に最小値 19.2 m を示した。その後、 $D_L$  の値は日射量が増大とともに高くなり、3 月下旬に最大値 28.8 m となった。一方、 $D_{0.5}$  は 10 月中旬に最大値 13.8 m を示し、1 月中旬にかけて低下し (最低値 4.4 m)、その後やや増大した。

*C. wailesii* の  $D_{0.5}$  は、最大でも 13.8 m であり、12~3 月にかけて 0.5 divisions  $d^{-1}$  以上の速度で増殖が可能な水深は 10 m 以浅と推算された。一方、*E. zodiacus* の  $D_{0.5}$  は 12~1 月にやや低下し、最低値 12.1 m を示すものの、10~11 月および 2~3 月は概ね 15~20 m の範囲で変動した。播磨灘のノリ養殖は大部分が水深 20 m 以浅の浅海域で行われていることから、*E. zodiacus* は大量発生時においてノリ養殖漁場周辺海域の底層でも比較的高い速度で増殖できることが示唆された。また、*E. zodiacus* および *C. wailesii* と同様に、1~3 月にかけて日射量が増大と、水温の低下に伴って増殖が可能な光強度の閾値が小さくなり、現場海域において増殖が可能な水深 ( $D_L$ ) が増大することが示唆された。特に、*E. zodiacus* は温度の低下とともに閾値 ( $I_0$ ) が小さくなるため、その傾向が顕著であった (Figs. 3-9, 3-10)。*E. zodiacus* および *C. wailesii* は両種とも細胞のサイズ

が大きく、播磨灘で優占する他の珪藻より沈降速度も大きい (小野ほか 2006)。したがって、両種とも大量発生は鉛直混合期に限られ、ブルームのピーク時においても鉛直的に表層から底層にかけて分布する (長井 2000; Tada et al. 2000; 堀ほか 2006)。このような分布特性を持つ種にとって、増殖可能な水深が増大することは極めて重要な意味を持つと考えられ、特に *E. zodiacus* にとって 1~3 月の増殖可能水深の増大は、本種がノリ漁期後半に大量発生するために重要な要因の一つであると考えられた。

これまでに、多くの植物プランクトンの増殖生理に関する培養実験が行われており、増殖に及ぼす温度の影響が明らかとなっている種も多い (Jitts et al. 1964; Smayda 1969; Yoder 1979; Nakamura and Watanabe 1983a; 矢持 1984; 西島ほか 1989; 山口・本城 1989; 山口ほか 1991; Yamaguchi et al. 1997; 山本・樽谷 1997; Yamamoto et al. 2002; 佐々木・鬼頭 2003; 山砥ほか 2005a, b; Yamaguchi et al. 2010)。これらの研究から、例えば *C. antiqua* (Nakamura and Watanabe 1983a; 山口ほか 1991) や *H. circularisquama* (Yamaguchi et al. 1997; 山砥ほか 2005a) は温度 10°C 以下では増殖できないこと、*Alexandrium tamarense* (山本・樽谷 1997) は温度 10~20°C の範囲で増殖できるが、5 および 25°C では増殖できないことが報告されている。また、多くの種の増殖最適温度が 20°C 付近にある反面、*Chattonella ovata* や *H. circularisquama* のように温度 30°C でより増殖速度が高くなる種や (Yamaguchi et al. 1997; 山砥ほか 2005a; Yamaguchi et al. 2010)、*A. tamarense* のように 15°C 前後に最適増殖温度を持つ種が知られている (山本・樽谷 1997)。このように、増殖最適水温や増殖が可能な温度の範囲は種特異的である (山口 1998)。また、塩分に対する増殖応答も種によって異なっており、多くは広範な塩分条件下で増殖できる種 (euryhaline) であるが、塩分の変化に敏感な狭塩分種 (stenohaline) も知られている (山口 1998)。*E. zodiacus* は広範な温度、塩分条件下で増殖し、広温・広塩分性種であると

判断された。また、播磨灘の平均的な水温、塩分の変動範囲 (Fig. 2-2) では周年増殖が可能であると推定された。

*E. zodiacus* の最適増殖条件は温度 20~25°C, 塩分 20~25 付近にあり, *C. wailesii* やその他多くの種と類似した増殖特性であった。最大増殖速度は 3.0 divisions d<sup>-1</sup> 前後と見積もられ, *C. wailesii* の約 3 倍と高い値であった。他の有害赤潮藻の最大増殖速度は, 例えば *K. mikimotoi* では 0.95~1.18 divisions d<sup>-1</sup> (飯塚・峯 1983; 山口・本城 1989), *C. antiqua* では 0.74~1.34 divisions d<sup>-1</sup> (Nakamura and Watanabe 1983a; 山口ほか 1991), *Heterosigma akashiwo* では 0.89~1.9 divisions d<sup>-1</sup> (Tomas 1978; Yamochi and Abe 1984; Herndon and Cochlan 2007) とされている。一般に, 増殖速度は鞭毛藻よりも珪藻で大きく (Chan 1978), *Skeletonema costatum* では最大増殖速度が, 1.9~3.81 divisions d<sup>-1</sup> (Chan 1978; Yoder 1979; 山口 1994), *Chaetoceros didymium* var. *protuberans*, *Ditylum brightwellii* (West) Grunow ex Van Heurck および *Thalassiosira* sp. ではそれぞれ 2.1, 3.1, 2.2 divisions d<sup>-1</sup> と報告されている (山口 1994)。これらの結果から, *E. zodiacus* は播磨灘で優占する珪藻の中でも増殖速度の大きい種であることが明らかになった。

本実験から, *E. zodiacus* は温度 5°C ではどの塩分条件下においても増殖できず, 増殖は温度 7°C 以上で見られた。それに対して, *C. wailesii* は温度 5°C 下でも塩分 20~35 の条件下で僅かながら増殖が可能であった。Gallagher (1982) は, Narragansett 湾から夏季に採集した *S. costatum* の培養株は 5°C 以上で, 冬季に採集した株は 2°C でもそれぞれ継代培養が可能であることを報告している。これらのことから, *E. zodiacus* は他の珪藻に比べて, 低温条件下における秀れた増殖耐性を有しているとは考えにくい。一方で, *E. zodiacus* は現場海域において鉛直混合期の中でも水温が 10°C を下回る低水温期にブルームを形成する (Figs. 2-9, 2-10)。すなわち, *E. zodiacus* は最大増殖速度が至適温度条件下 (20~25°C) の約 1/3 まで低下する時期に現場海域に

おいて細胞密度がピークを示す。これに対して, *C. wailesii* は培養実験から得られた最適増殖温度と現場海域において細胞密度がピークを示す時期がよく一致している。本種は現場海域の水温が 20~25°C の 10~11 月に周年を通して細胞密度が最大値を示す (長井 2000)。珪藻が現場海域において, 培養実験から得られた増殖最適温度に比べて水温の低い時期に高密度となる現象は, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran, *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve, *S. costatum* などでも報告されている (Jitts et al. 1964; Smayda 1969, 1980)。このことについて Smayda (1980) は, 温度のみが種の増殖を制限するのではなく, 他の要因やそれらの組み合わせが影響している可能性を指摘している。

播磨灘では近年, 水温が上昇傾向にあり, 特に冬季の最低水温でその傾向が顕著である (Figs. 2-3, 2-10)。*E. zodiacus* は高い増殖速度を持ち, *C. wailesii* に比べて温度の上昇とともにその増殖速度も急激に増大し, その最大増殖速度は, 温度 10°C 下において *C. wailesii* の至適増殖温度下 (20~25°C) における最大増殖速度に達する (Figs. 3-6, 3-8)。本種は, 温度, 光条件以外の要因, または本種の生態学的な特性によって, 温度条件からは至適増殖条件とはほど遠い冬季に出現密度がピークを示していると考えられる。したがって, 近年の, 特に低水温期における水温の有意な上昇は *E. zodiacus* の増殖にとって極めて有利な環境変動であると考えられた。一方, 鉛直混合期において, 本種が低水温期にブルームを形成するメカニズムは, 本節で実施した培養実験だけではその全容を解明することは出来なかった。この点については, 他の環境要因が増殖に及ぼす影響や生態学的な特性, 生活史の解明等, 他の視点からのアプローチが必要であると考えられる。それらは, 次節以降でさらに詳細に検討する。

## 第2節 増殖に及ぼす栄養塩 (窒素, リン, 珪素) の影響

植物プランクトンが増殖するためには、外界から光エネルギーとともに各種栄養物質を取り込む必要がある。それらは大別すると比較的多量に必要とする多量栄養素（窒素、リンなど）と、要求量が小さい微量栄養素（ビタミン類、金属など）に分けられる。これら栄養素のうち、微量栄養素はふつう沿岸域において植物プランクトンの要求量に対して比較的十分存在していることが多い。しかし、多量栄養素である窒素やリンは現場海域において不足しがちであり、しばしば植物プランクトンの増殖を制限する因子として作用する。また珪藻は、珪酸質の殻を持ちオルト珪酸として珪素を必要とすることから、珪素も増殖を制限する因子となりうる（角皆 1979; Yamamoto and Tsuchiya 1995）。植物プランクトンが栄養塩類を利用するにあたって問題となるのは、(1) 海水中の栄養塩濃度と藻類の利用との対応関係、(2) 栄養塩類の化学型と藻類による利用の違いである（高橋 1997）。そこで本節では、これら栄養塩（窒素、リン、珪素）濃度が *E. zodiacus* の増殖に及ぼす影響を明らかにするために室内培養実験を実施し、得られた結果を *C. wailesii* をはじめ他種と比較することによって、*E. zodiacus* の栄養塩濃度に対する増殖特性を検討した。また、無機栄養塩に加え、各種有機態窒素とリン源の利用能を調べ、これら形態別の窒素やリン化合物の利用特性を考慮し、本種の現場海域における個体群動態との関係について考察した。

### 材料および方法

**供試株と培地** 実験には播磨灘より分離し、マイクロピペット洗浄法（岩崎 1967）および Nagai et al. (1998) の方法を併用して無菌化した *E. zodiacus* と *C. wailesii* のクローン株を用いた。継代培養および実験には、硝酸態窒素、リン酸態リンおよび珪酸の濃度をそれぞれ 500, 50 および 500  $\mu\text{M}$  とした改変 MP1 培地（長井・眞鍋 1994）を用いた。また、以下の実験は全て光強度

150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 10hL: 14hD の条件下で行った。

**増殖速度に及ぼす栄養塩濃度（窒素、リン、珪素）の影響** 目的とする栄養塩を添加しない改変 MP1 培地に *E. zodiacus* を接種し、増殖が定常期に達するまで培養した。培養温度は 9 および 20°C を設定した。温度 9°C は *E. zodiacus* が播磨灘において出現のピークを示す 2~3 月の水温、温度 20°C は *E. zodiacus* および *C. wailesii* の至適増殖温度をそれぞれ想定したものである。上述の培養によって目的とする栄養塩を欠乏させた *E. zodiacus* を、それぞれの栄養塩の濃度を 10 段階に調整した改変 MP1 培地 100 ml が入った 200 ml 三角フラスコに 100 cells  $\text{ml}^{-1}$  となるよう接種した。ただし、珪酸の影響を調べる実験では、テフロン製 250 ml の三角フラスコ（Nalgene 社製）を用いた。各栄養塩の添加濃度は、硝酸態窒素（硝酸カリウム）を 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$ 、リン酸（リン酸二カリウム）を 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ 、珪酸（メタ珪酸ナトリウム九水和物）を 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{M}$  とした。*E. zodiacus* は人工合成培地で継代培養できないことが報告されている（山本ほか 1994）。近年、継代培養が困難な微細藻を培養するために新たな培地の開発が進められた結果、これまで人工合成培地では良好な増殖を示さなかったラフィド藻等の培養が可能な IHN 培地が開発された（Imai et al. 2004）。しかしながら、本培地においても *E. zodiacus* は継代培養することができなかった（内藤私信）。そのため、本実験では天然海水を基礎とした改変 MP1 培地（長井・眞鍋 1994）を用いることとした。培地に用いた海水は、海水由来の栄養塩濃度の影響を出来る限り小さくするため、栄養塩濃度が低下した 2001 年 3 月の播磨灘 H1 定点（34° 41.0' N, 134° 45.5' E）表層において採水し、Sterivex-GV 0.22  $\mu\text{m}$  Filter unit（Millipore 社製）でろ過した後、冷暗所で 6 か月以上保存したものを用いた。天然海水中に含まれている栄養塩濃度は、あらかじめ Auto Analyzer II に



よる自動分析(眞鍋・反田1986)により測定し(無機態窒素濃度(DIN): 0.9  $\mu\text{M}$ , リン酸態リン濃度( $\text{PO}_4\text{-P}$ ): 0.24~0.26  $\mu\text{M}$ , 珪酸態珪素濃度( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ): 1.2  $\mu\text{M}$ ), 海水由来の栄養塩濃度と添加した栄養塩濃度との和を実験開始時の制限栄養塩濃度とした。各栄養塩添加後, 定常期に達するまで少量の培養を取り, その中に含まれる *E. zodiacus* の細胞数を光学顕微鏡下で計数することによって, 第1節で示した計算式を用いて対数増殖期の増殖速度 ( $\mu$ ; divisions  $\text{d}^{-1}$ ) を算出した。増殖速度と栄養塩濃度との関係は, 以下に示した Monod (1949) の式を適用し, 東海(1997)の方法により各パラメータ値を推定した。

$$\mu = \mu_m \times S / (K_s + S)$$

ここで  $S$  は培養開始時の栄養塩濃度 ( $\mu\text{M}$ ),  $\mu_m$  は最大増殖速度 (divisions  $\text{d}^{-1}$ ),  $K_s$  は半飽和定数 ( $\mu\text{M}$ ) をそれぞれ示す。また, 最大細胞密度から接種密度を減じて, 各栄養塩濃度条件下における最大細胞収量を求めた。さらに, 栄養塩制限下において増殖が定常期に達し, 細胞密度が最大となった時, 細胞内の栄養塩濃度は細胞の維持に必要な最小量となると仮定し, 藻体の最大細胞収量 ( $N$ ) と培養開始時の栄養塩濃度 ( $S_0$ ) の関係から, 次式に従って最小細胞内含量 ( $Q_0$ ) を求めた(渡辺1988; 松田ほか1999, 2001)。

$$Q_0 = S_0 / N$$

また, *C. wailesii* に対しても同様に目的とする栄養塩を無添加とした改変 MP1 培地において増殖が定常期に達するまで飢餓培養し, 増殖に及ぼす栄養塩濃度の影響を調べた。目的とする栄養塩が欠乏状態となった *C. wailesii* は, 栄養塩濃度を *E. zodiacus* の実験と同様, 10段階に調整した改変 MP1 培地 7.5 ml を分注した6穴プレートに, 1ウェル当たり 10~15細胞接種した。その後, 毎日 *C. wailesii* の細胞密度を実体顕微鏡下で

直接計数し, 増殖速度を求めた。さらに, Monod の式から各パラメータ値を推定するとともに, 上述のように各栄養塩の最小細胞内含量を算出した。

**形態別窒素, リン利用特性** 温度 20°C の条件下において, 窒素源利用特性に関する実験では窒素を, リン源利用特性に関する実験ではリン源を無添加とした改変 MP1 培地で, *E. zodiacus* の増殖が定常期に達するまで増殖させ, 目的とする栄養塩が欠乏した飢餓細胞とした。その栄養塩欠乏細胞を以下に示す各種形態別窒素, リン源を添加した改変 MP1 培地 125 ml が入った 200 ml 三角フラスコに 100 cells  $\text{ml}^{-1}$  となるよう接種した。窒素源としては, 硝酸態窒素 ( $\text{KNO}_3$ ), 亜硝酸態窒素 ( $\text{KNO}_2$ ), アンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), 尿酸 (Uric Acid), 尿素 (Urea), およびアラニン (Ala), アルギニン (Arg), アスパラギン (Asn), アスパラギン酸 (Asp), グルタミン (Gln), グルタミン酸 (Glu), グリシン (Gly), ヒスチジン (His), イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu), リジン (Lys), メチオニン (Met), フェニルアラニン (Phe), プロリン (Pro), セリン (Ser), トリプトファン (Trp), チロシン (Tyr), バリン (Val), オルニチン (Orn), タウリン (Tau) の 20 種類のアミノ酸をそれぞれ培地に単独で添加した。リン源は, リン酸二カリウム ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム (Glycero-P), トリポリリン酸ナトリウム (Tripoly-P), ピロリン酸ナトリウム (Pyro-P), メタリン酸 (Meta-P), ウリジン-5'-リン酸二ナトリウム (UMP), D-フルクトース-6'-リン酸二ナトリウム (F6P), アデノシン-5'-三リン酸 (ATP), アデノシン-5'-二リン酸 (ADP), アデノシン-5'-一リン酸 (AMP), p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (NPP), D-グルコース-6'-リン酸二ナトリウム (G6P),  $\alpha$ -D-グルコース-1'-リン酸二ナトリウム (G1P), グアノシン-5'-一リン酸二ナトリウム (GMP), シチジン-5'-一リン酸 (CMP) の 14 種類をそれぞれ添加した。窒素, リン源は, あらかじめオートクレーブ処理 (121 °C, 15 分) した窒素あるいはリン源無添加の改変 MP1 培地に濾過滅菌 (TOYO ADVANTEC 社製,



DISMIC-13cp, 孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) した各種窒素, リン源の水溶液を無菌的に添加した。各窒素およびリン源の添加濃度は, それぞれ 500 および 50  $\mu\text{M}$  とした。ただし, 高濃度のアンモニアは植物プランクトンの増殖を阻害することが報告されていることから (Nakamura and Watanabe 1983b; Iwasaki et al. 1990), アンモニアについては, 50, 100 および 250  $\mu\text{M}$  濃度でも同様の実験を行った。定常期に達するまで, 少量の培養を採取し, その中に含まれる *E. zodiacus* の細胞数を光学顕微鏡下で計数し, 各窒素, リン源における最大細胞収量を求めた。増殖量は窒素源あるいはリン源無添加区の増殖量を 0, 硝酸態窒素添加区およびオルトリン酸添加区の増殖量を 100 とし, それに対する相対増殖量 (%) で

示した。同様に目的とする栄養塩を欠乏させた *C. walesii* を各種窒素, リン源を添加した改変 MP1 培地 7.5 ml の入った 6 穴プレートに 10~15 cells well<sup>-1</sup> となるように接種した。実体顕微鏡下で細胞密度を計数することによって, *E. zodiacus* と同様, 各窒素, リン源における最大細胞収量を求めた。

## 結 果

### 増殖に及ぼす栄養塩濃度 (窒素, リン, 珪素) の影響

各栄養塩濃度に対する *E. zodiacus* の増殖速度は, 培地に添加した濃度とともに増大した (Fig. 3-11)。温度 9 および 20°C 下における各栄養塩濃度 (S) と増殖速

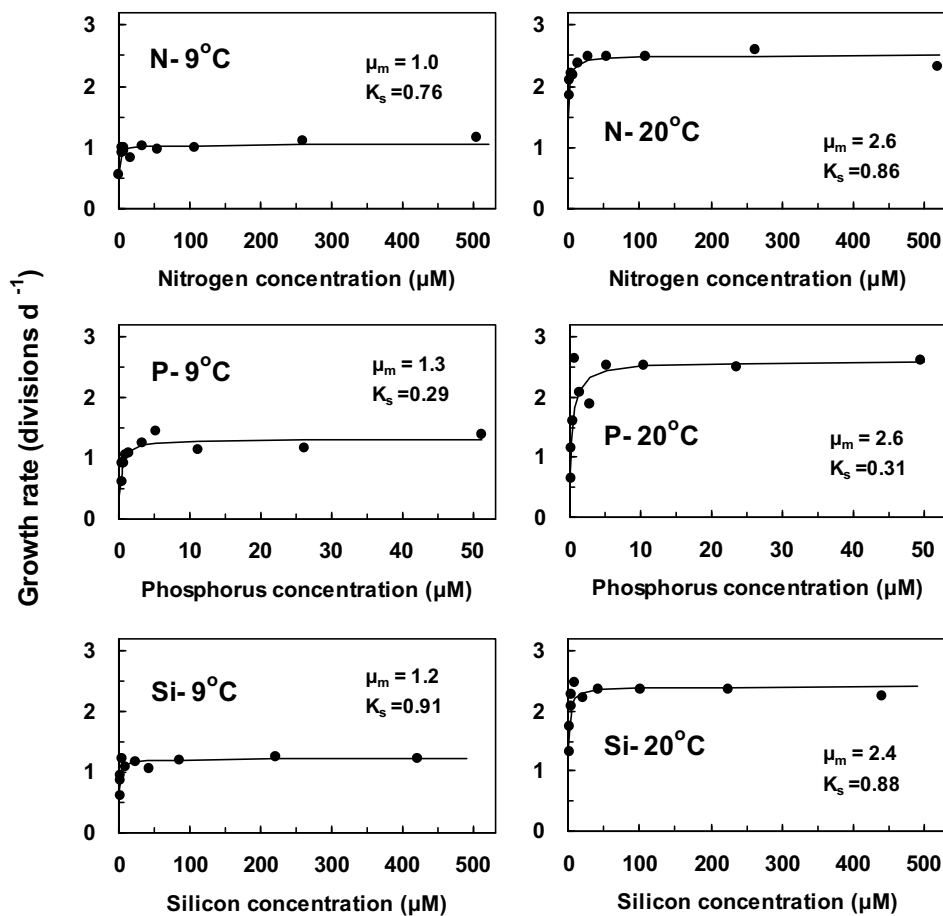


Fig. 3-11. The growth rate of *Eucampia zodiacus* versus initial concentrations of nitrate (N), orthophosphate (P) and silicate (Si) in the medium at 9 and 20°C.

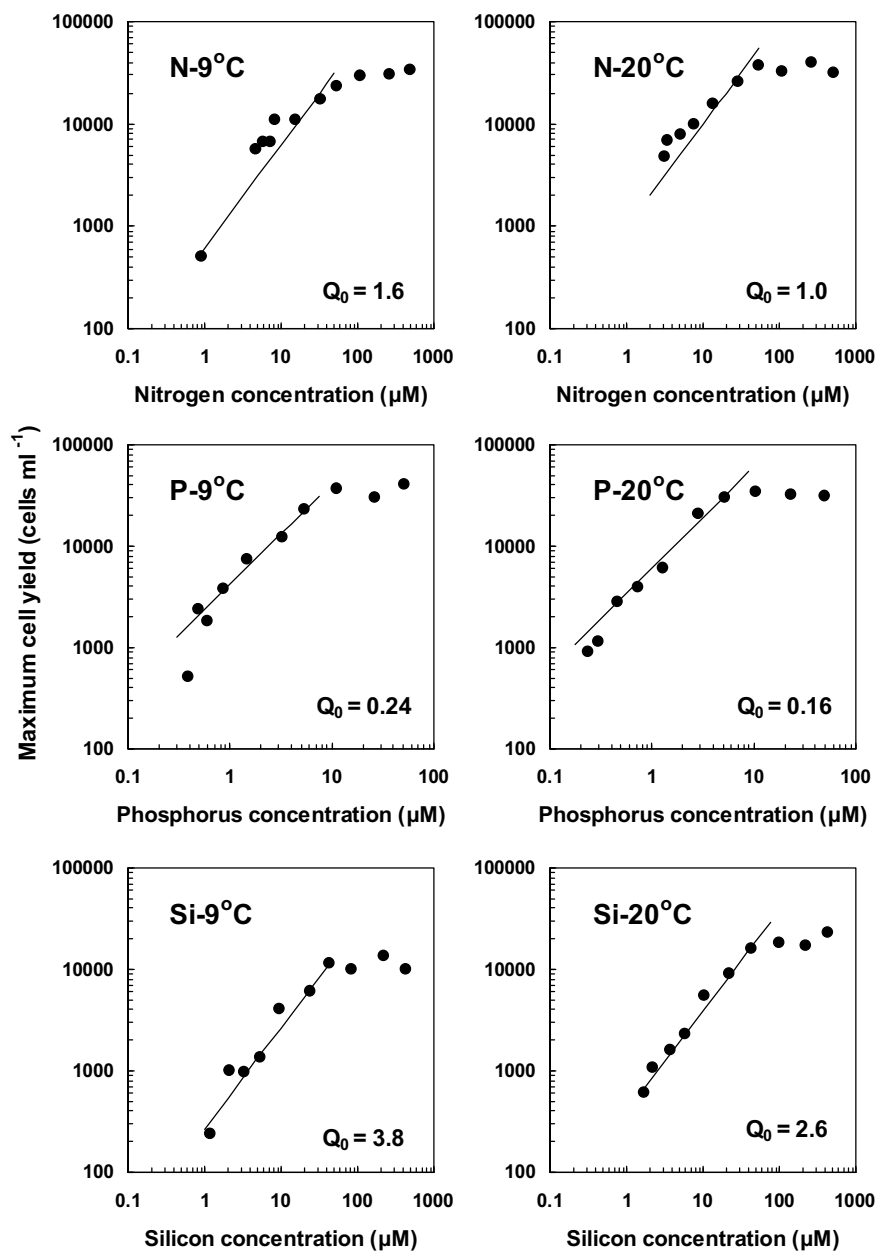


Fig. 3-12. Maximum cell yields of *Eucampia zodiacus* grown with different concentrations of nitrate (N), orthophosphate (P) and silicate (Si) in the medium at 9 and 20 °C.

度 ( $\mu$ ) の関係は、Monod の式でそれぞれ以下のよう  
に表せた。

$$9^{\circ}\text{C} \quad \text{窒素: } \mu = 1.0 \times S_N / (0.76 + S_N) \quad (r^2 = 0.77)$$

$$\text{リン: } \mu = 1.3 \times S_P / (0.29 + S_P) \quad (r^2 = 0.78)$$

$$\text{珪素: } \mu = 1.2 \times S_{Si} / (0.91 + S_{Si}) \quad (r^2 = 0.84)$$

$$20^{\circ}\text{C} \quad \text{窒素: } \mu = 2.6 \times S_N / (0.86 + S_N) \quad (r^2 = 0.83)$$

$$\text{リン: } \mu = 2.6 \times S_P / (0.31 + S_P) \quad (r^2 = 0.74)$$

$$\text{珪素: } \mu = 2.4 \times S_{Si} / (0.88 + S_{Si}) \quad (r^2 = 0.81)$$

各栄養塩に対する *E. zodiacus* の最大増殖速度 ( $\mu_m$ ) お

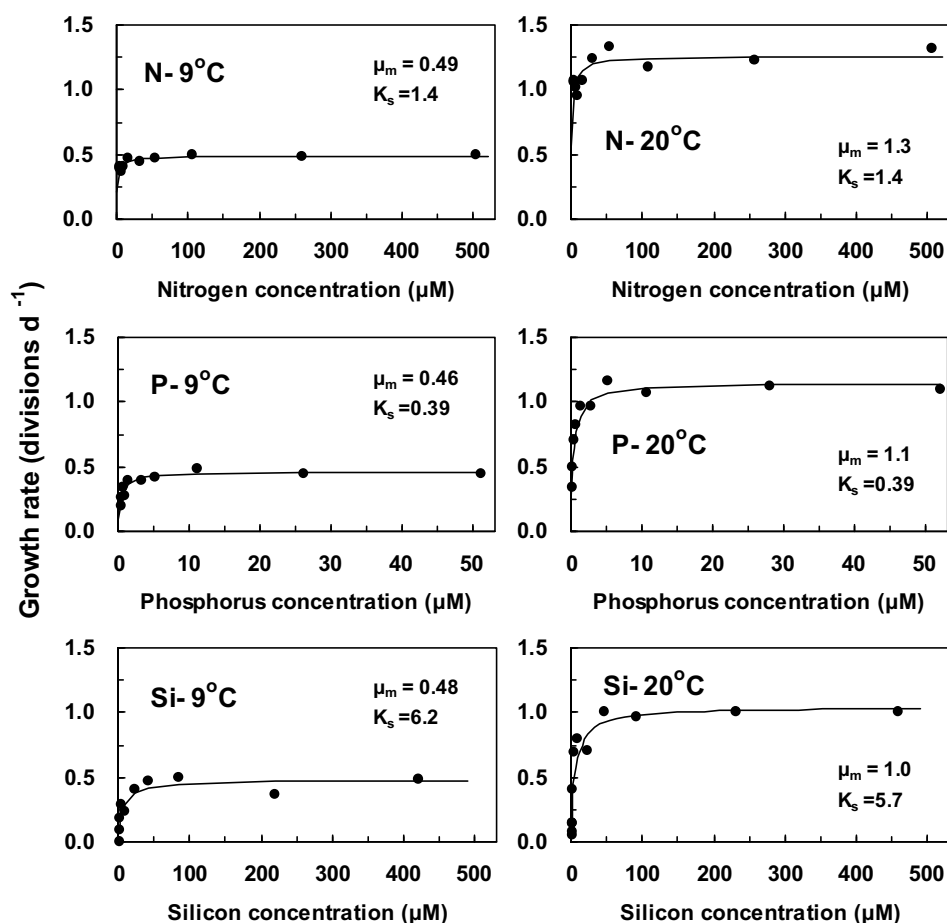


Fig. 3-13. The growth rate of *Coscinodiscus wailesii* versus initial concentrations of nitrate (N), orthophosphate (P) and silicate (Si) in the medium at 9 and 20 °C.

よび半飽和定数 ( $K_s$ ) は、温度 9°C 下でそれぞれ窒素が 1.0 divisions d<sup>-1</sup>, 0.76 μM, リンが 1.3 divisions d<sup>-1</sup>, 0.29 μM, 珪素が 1.2 divisions d<sup>-1</sup>, 0.91 μM, 20°C 下で窒素が 2.6 divisions d<sup>-1</sup>, 0.86 μM, リンが 2.6 divisions d<sup>-1</sup>, 0.31 μM, 珪素が 2.4 divisions d<sup>-1</sup>, 0.88 μM であった。9°C 下における *E. zodiacus* の最大増殖速度は、20°C 下で得られた値の約 1/2 であったが、半飽和定数はほとんど差がなかった (Table 3-2)。

最大細胞収量は栄養塩濃度とともに増大し、9°C 下では窒素が 47 μM, リンが 7.8 μM, 珪素が 42 μM でほぼ飽和した (Fig. 3-12)。飽和濃度以下の濃度において、最大細胞収量と栄養塩濃度の関係から求めた最小細胞内含量は、窒素、リン、珪素でそれぞれ 1.6, 0.24,

3.8 pmol cell<sup>-1</sup> と推算された。また、20°C 下における最大細胞収量は窒素が 34 μM, リンが 5.4 μM, 珪素が 50 μM でほぼ飽和し (Fig. 3-12), 最小細胞内含量は窒素、リン、珪素でそれぞれ 1.0, 0.16, 2.6 pmol cell<sup>-1</sup> であった (Table 3-2)。

*E. zodiacus* 同様、*C. wailesii* の増殖速度も培地に添加した栄養塩濃度とともに上昇に増大し、各栄養塩濃度 (S) と増殖速度 ( $\mu$ ) の関係は Monod の式によりそれぞれ次のように求めることができた (Fig. 3-13)。

$$9^\circ\text{C} \quad \text{窒素: } \mu = 0.49 \times S_N / (1.4 + S_N) \quad (r^2 = 0.83)$$

$$\text{リン: } \mu = 0.46 \times S_P / (0.39 + S_P) \quad (r^2 = 0.88)$$

$$\text{珪素: } \mu = 0.48 \times S_{Si} / (6.2 + S_{Si}) \quad (r^2 = 0.88)$$

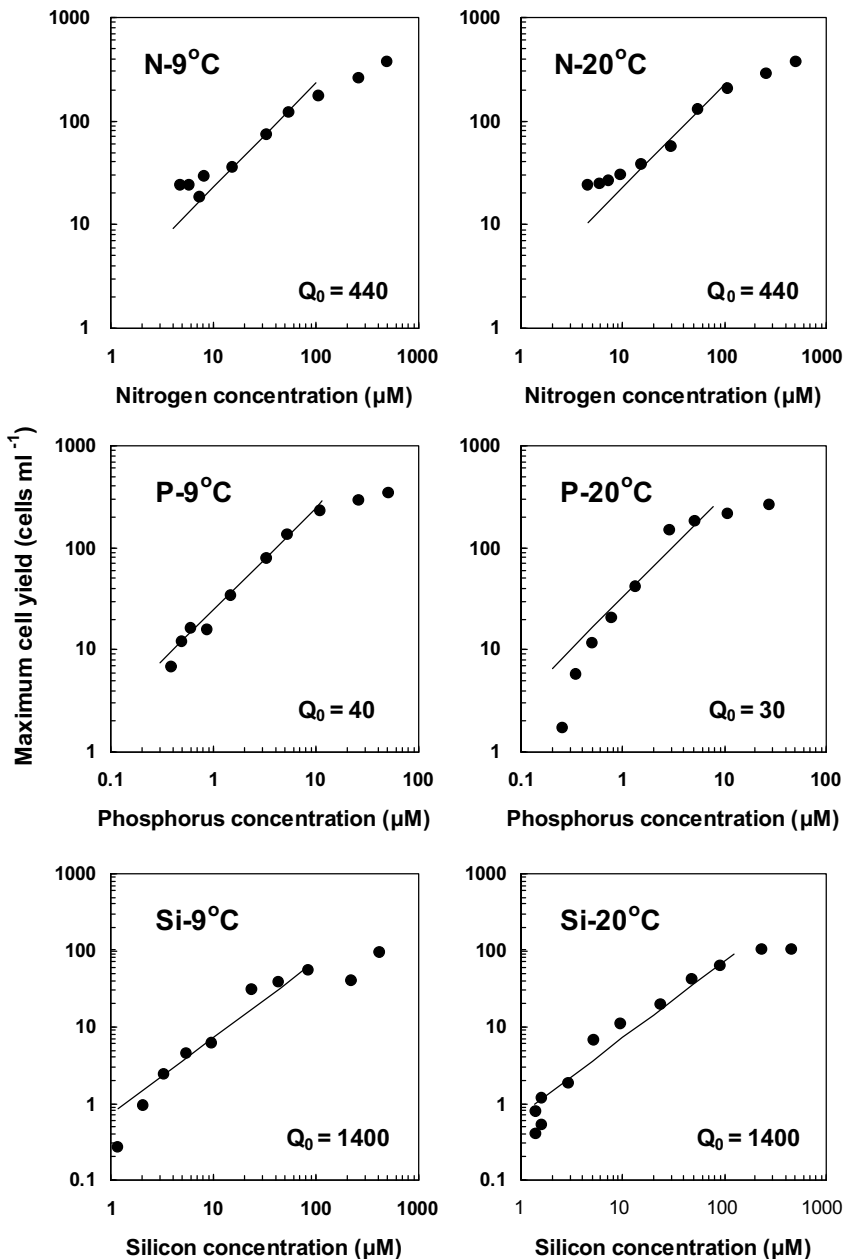


Fig. 3-14. Maximum cell yields of *Coscinodiscus walesii* grown with different concentrations of nitrate (N), orthophosphate (P) and silicate (Si) in the medium at 9 and 20 °C.

20°C 窒素:  $\mu = 1.3 \times S_N / (1.4 + S_N)$  ( $r^2 = 0.59$ )

リン:  $\mu = 1.1 \times S_P / (0.39 + S_P)$  ( $r^2 = 0.94$ )

珪素:  $\mu = 1.0 \times S_{Si} / (5.7 + S_{Si})$  ( $r^2 = 0.89$ )

最大増殖速度 ( $\mu_m$ ) および半飽和定数 ( $K_s$ ) は、9°C

下でそれぞれ窒素が 0.49 divisions d<sup>-1</sup>, 1.4 μM, リンが 0.46 divisions d<sup>-1</sup>, 0.39 μM, 珪素が 0.48 divisions d<sup>-1</sup>, 6.2 μM, 20°C下で窒素が 1.3 divisions d<sup>-1</sup>, 1.4 μM, リンが 1.1 divisions d<sup>-1</sup>, 0.39 μM, 珪素が 1.0 divisions d<sup>-1</sup>, 5.7 μM であった。*C. walesii* のパラメータ値も *E. zodiacus* 同様, 最大増殖速度が 20°C下に比べ 9°C下で

**Table 3-2.** Maximum growth rate ( $\mu_m$ ), half saturation constant ( $K_s$ ), and minimum cell quota ( $Q_0$ ) of *Eucampia zodiacus* and *Coscinodiscus wailesii* versus nitrate, phosphate and silicate at 9 and 20°C.

Species	Nutrient	Temperature (°C)	$\mu_m$ (divisions d <sup>-1</sup> )	$K_s$ ( $\mu$ M)	$Q_0$ (pmol cell <sup>-1</sup> )
<i>Eucampia zodiacus</i>	Nitrate	9.0	1.0	0.76	1.6
		20.0	2.6	0.86	1.0
	Phosphate	9.0	1.3	0.29	0.24
		20.0	2.9	0.31	0.16
	Silicate	9.0	1.2	0.91	3.8
		20.0	2.4	0.88	2.6
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	Nitrate	9.0	0.49	1.4	440
		20.0	1.3	1.4	440
	Phosphate	9.0	0.46	0.39	40
		20.0	1.1	0.39	30
	Silicate	9.0	0.48	6.2	1400
		20.0	1.0	5.7	1400

約 1/2 に低下したが、半飽和定数はほとんど差がなかった (Table 3-2)。

*C. wailesii* の各栄養塩濃度に対する最大細胞収量は、9°C下で窒素が 101  $\mu$ M, リンが 12  $\mu$ M, 珪素が 86  $\mu$ M でほぼ飽和した (Fig. 3-14)。各栄養塩の最小細胞内含量は、窒素が 440  $\mu$ M cell<sup>-1</sup>, リンが 40  $\mu$ M cell<sup>-1</sup>, 珪素が 1400  $\mu$ M cell<sup>-1</sup> と推算された。また 20°C下における最大細胞収量は、窒素が 109  $\mu$ M, リンが 7.6  $\mu$ M, 珪素が 124  $\mu$ M でほぼ飽和し (Fig. 3-14), 最小細胞内含量は、窒素, リン, 珪素でそれぞれ 440, 30, 1400 pmol cell<sup>-1</sup> と推算された (Table 3-2)。

**形態別窒素, リン利用特性** *E. zodiacus* は窒素源として硝酸態窒素と同様に亜硝酸態窒素を増殖に利用した (Fig. 3-15)。また, 50 および 100  $\mu$ M のアンモニア態窒素では硝酸態窒素に比べ 147 および 289 % の増殖量を示したが, 250  $\mu$ M 以上の濃度では増殖できず細胞も死滅した。尿酸, 尿素はほとんど利用できなかった。アミノ酸態窒素では, グルタミン (Gln) での増殖量が高く, アスパラギン (Asn), ヒスチジン (His), ロイシン (Leu), フェニルアラニン (Phe), トリプトファン (Trp) で硝酸態窒素の 36~67 % の増殖量であった。しかし, それ以外のアミノ酸態窒素は窒素源としてほとんど, または全く増殖に利用できなかった。一方リンに関しては, *E. zodiacus* は実験に用いた全ての無機態および有機態をリン源として増殖に利用した

(Fig. 3-16)。ピロリン酸 (Pyro-P), メタリン酸 (Meta-P), アデノシン-5'-三リン酸 (ATP), p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (NPP) の場合の増殖量は無機態リンの 61~72 % とやや低かったが, 他のリン源ではオルトリン酸とほぼ同程度の増殖量を示した。

*C. wailesii* は, 窒素源として亜硝酸態窒素およびグルタミンの添加時にも硝酸態窒素と同程度の増殖量を示した (Fig. 3-17)。アンモニア態窒素では 500  $\mu$ M の濃度でも増殖量が硝酸態窒素の 77 % と比較的高かった。尿酸, 尿素の増殖量はそれぞれ 20, 13 % であった。グルタミン以外のアミノ酸態窒素では, グリシンの増殖量が 76 % と比較的高く, アスパラギン, セリンおよびオルニチンの増殖量が 50 % 前後, アラニン, アルギニンおよびグルタミン酸の増殖量が 22~33 % であった。しかし, それ以外の 12 種類のアミノ酸態窒素はほとんど, または全く増殖に利用できなかった。一方, リン源の利用特性は, ピロリン酸ナトリウムの増殖量が無機態リンの 113 %, トリポリリン酸ナトリウム, メタリン酸, アデノシン-5'-三リン酸, アデノシン-5'-二リン酸の増殖量が 78~89 % と比較的高かった (Fig. 3-18)。また, D-フルクトース-6'-リン酸二ナトリウムの増殖量が 13 %, p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムの増殖量が 23 % で, それ以外の 7 種類の有機態リンはリン源としてほとんど, または全く増殖に利用できなかった。



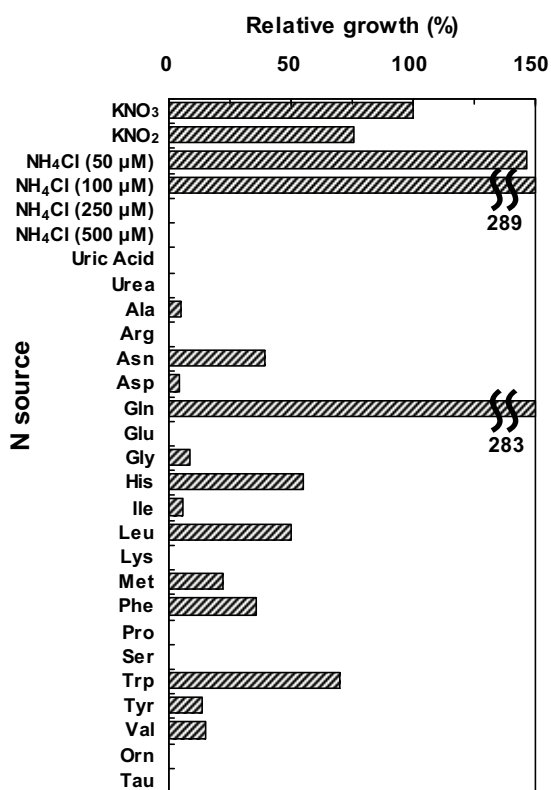


Fig. 3-15. Utilization of variety of nitrogenous compounds by *Eucampia zodiacus*, expressed as percent of maximum growth in the medium containing 500 μM nitrate.

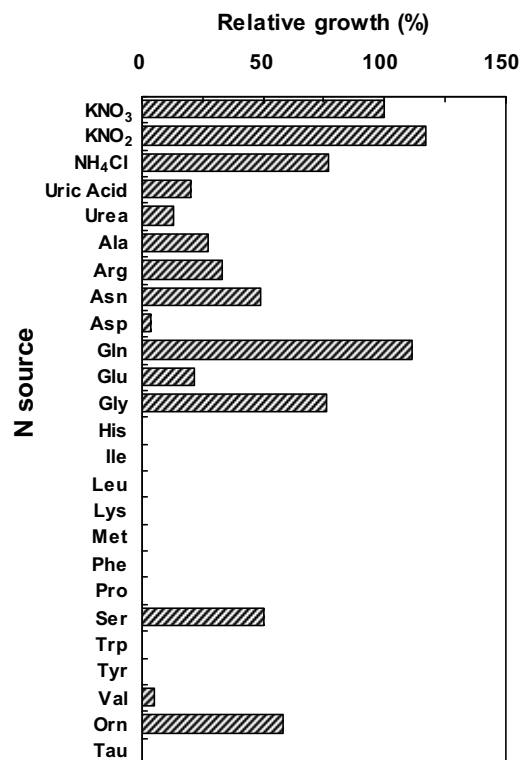


Fig. 3-17. Utilization of variety of nitrogenous compounds by *Coscinodiscus wailesii*, expressed as percent of maximum growth in the medium containing 500 μM nitrate.

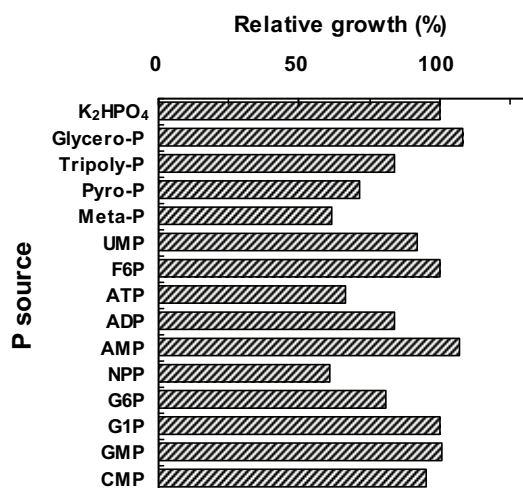


Fig. 3-16. Utilization of variety of phosphorus compounds by *Eucampia zodiacus*, expressed as percent of maximum growth in the medium containing 50 μM orthophosphate.

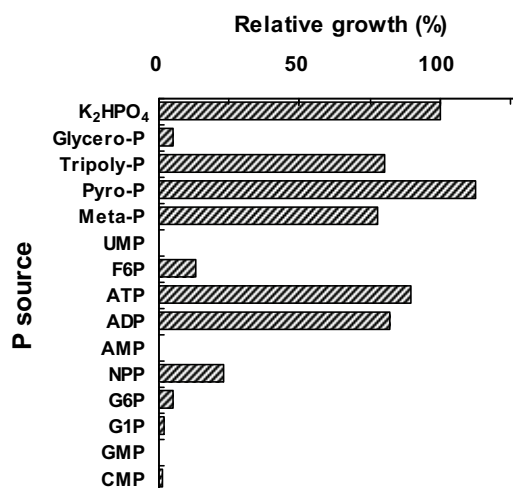


Fig. 3-18. Utilization of variety of phosphorus compounds by *Coscinodiscus wailesii*, expressed as percent of maximum growth in the medium containing 50 μM orthophosphate.

## 考 察

Monod の式を用いて増殖速度と栄養塩濃度を解析する場合、半飽和定数 ( $K_s$ ) が低い種では、 $K_s$  値以下の栄養塩濃度が栄養塩分析の検出限界値に近く、半飽和定数より低い栄養塩濃度下の増殖速度を十分に検討できないことが問題となる。このため、栄養塩濃度に対する増殖応答を調べる実験では、人工合成培地を用いた実験によって、目的とする栄養塩が全く添加されていない実験区を設定することが望ましい (松田ほか 1999)。しかし *E. zodiacus* は、人工合成培地では継代培養できないため、現状では本種の培養実験に海水を基本とした培地を使用せざるを得なかった。本実験では、海水由来の栄養塩濃度の影響を出来る限り小さくするために、栄養塩濃度が低下した時期に現場海水を採水し、それをベースに培地を作製した。しかしながら、*E. zodiacus* の  $K_s$  値は窒素、珪素で  $1.0 \mu\text{M}$  以下、リンで  $0.3 \mu\text{M}$  前後であり、半飽和定数以下の栄養塩濃度下において増殖速度と栄養塩濃度との関係を十分に検討することはできなかった。この点については、*E. zodiacus* がなぜ既存の人工合成培地で培養できないのか、その原因の解明を含め今後の課題である。

上述の問題点があるものの、ここでは Monod の式から得られた *E. zodiacus* および *C. wailesii* の増殖速度と栄養塩濃度の関係から両種の栄養塩濃度に対する増殖応等について以下の検討を行った。まず、*E. zodiacus* はどの栄養塩濃度を変化させた培養条件においても  $20^\circ\text{C}$  下において  $2.4 \sim 2.6 \text{ divisions d}^{-1}$  の最大増殖速度を示した。これは第 1 節で求めた温度や光強度に対する増殖応答と同様、一般に増殖速度が大きい珪藻の中でも高い値であった。また *E. zodiacus* は、 $9^\circ\text{C}$  条件下においても  $1.0 \sim 1.3 \text{ divisions d}^{-1}$  の最大増殖速度を示した。これは同温度下の *C. wailesii* における最大増殖速度の約 2 倍、*C. wailesii* の至適増殖温度下 ( $20^\circ\text{C}$ ) における最大増殖速度とほぼ同じ値であった (Table

3-2)。これらのことから、*E. zodiacus* は栄養塩濃度に対しても高い増殖速度を有しており、本種が播磨灘において大量発生する低水温期においても、他種と比較して高い増殖速度を維持していることが裏付けられた。

*E. zodiacus* の  $K_s$  値と播磨灘における各栄養塩濃度の月平均値を比較した結果、DIN と珪酸では周年を通して  $K_s$  値が月平均値を下回った。このことから、これら栄養塩濃度が *E. zodiacus* の増殖に及ぼす影響は比較的小さいことが示唆された。特に珪酸では、*C. wailesii* の  $K_s$  値が 9 および  $20^\circ\text{C}$  下のいずれにおいても  $5 \mu\text{M}$  を上回ったのに対し、*E. zodiacus* の  $K_s$  値は  $0.91$  および  $0.88 \mu\text{M}$  であり (Table 3-2)、播磨灘における月平均値の変動範囲 ( $3.5 \sim 16.8 \mu\text{M}$ ) を大きく下回っていた。逆に、*C. wailesii* の珪酸に対する  $K_s$  値は播磨灘の 3 月以降の平均値を上回った。*C. wailesii* は播磨灘において 10~11 月と 2 月の年に 2 回ピークを示す (長井 2000)。本章第 1 節では、播磨灘における光環境と *E. zodiacus* および *C. wailesii* の光強度に対する増殖速度との関係から、1~3 月にかけて日射量の増大とともに、増殖が可能な水深やより高い速度で増殖が可能な水深が増大することを示した。また、*E. zodiacus* はこのような光環境の好転に伴い、3 月にかけて細胞密度を増大させることを示唆した。一方 *C. wailesii* は、*E. zodiacus* と同様に光環境がより増殖に適した条件に好転しているにもかかわらず、2 月に出現のピークを示した後、3 月には春季のブルームが終息に向かう。本節の実験結果から、このような現場海域における両種の出現ピークのずれは、両種の栄養塩濃度に対する増殖応答の差による現象と考えられた。すなわち、*C. wailesii* は 3 月になると栄養塩濃度の低下によっても増殖が制限され、春季のブルームが終息に向かうこと、また *E. zodiacus* はそのような栄養塩濃度の制限を受けにくく、3 月になってもブルームが終息しないことが考えられた。

これまでに、半連続培養実験から主要な HAB 種の

最小細胞内栄養塩含量が明らかとなっている。本方法は、操作が簡単なことなど連続培養系の実験に比べて多くの利点がある。しかし *E. zodiacus* は、同調的に分裂する時間帯が明瞭でなかったことから、本方法による培養実験を実施できなかった。実験方法に違いがあるものの、ここでは *E. zodiacus* と他の主要な HAB 種との最小細胞内栄養塩含量の比較を行った。*E. zodiacus* の最小細胞内窒素含量は、9 および 20°C 下でそれぞれ 1.0 および 1.6 pmol cell<sup>-1</sup> と推算された。この値は、*C. wailesii* (440 pmol cell<sup>-1</sup>) や、これまでに報告されている *C. antiqua* の 7.7 pmol cell<sup>-1</sup> (Nakamura 1985b), *H. akashiwo* の 1.44 pmol cell<sup>-1</sup> (Watanabe et al. 1982), *K. mikimotoi* の 3.13 pmol cell<sup>-1</sup> (Yamaguchi and Itakura 1999), *H. circularisquama* の 1.10 pmol cell<sup>-1</sup> (Yamaguchi et al. 2001) と比較して、*E. zodiacus* の細胞サイズ (宮井ほか 1988) を考慮すると主要な HAB 種の中でかなり低い。同様に、*E. zodiacus* の最小細胞内リン含量も、0.16 (9°C) および 0.24 pmol cell<sup>-1</sup> (20°C) と推算され、*C. wailesii*, *C. antiqua* (Nakamura 1985b) および *K. mikimotoi* (Yamaguchi and Itakura 1999) 等、*H. akashiwo* (Watanabe et al. 1982) や *H. circularisquama* (Yamaguchi et al. 2001) を除く主要な HAB 種と比較して低い値であった (Table 3-3)。これら細胞内窒素、リン含量と現場海域における栄養塩濃度との関係から、*E. zodiacus* が現場海域において増殖可能な細胞密

度を求めることができる。*E. zodiacus* が出現のピークを示すことが多い播磨灘の3月における各栄養塩濃度の平均値 (DIN: 3.5 μM, PO<sub>4</sub>-P: 0.27 μM, SiO<sub>2</sub>-Si: 3.5 μM) では、*E. zodiacus* はそれぞれ 2187, 1125, 931 cells ml<sup>-1</sup> の細胞密度まで増殖可能であると推算された。本種は現場海域において細胞密度が最大 1000 cells ml<sup>-1</sup> 前後まで増殖することから、播磨灘では物理的、生物的集積がなくても、播磨灘の平均的な栄養塩環境下で現場海域における最大細胞密度まで増殖できると推察された。また、最小細胞内含量から得られる 9 および 20°C 下での *E. zodiacus* の細胞内 N/P 比は 6.7 および 6.3 であった。これは、上述した HAB 種の N/P 比が Redfield 比 (N/P = 16) に比較的近い 11~15 の範囲にあるのに対し、それよりも低かった。近年、播磨灘では DIN 濃度の有意な低下によって、本海域に出現する植物プランクトンは窒素制限を受けやすくなったことを第II章で示唆した。そのため、他種に比べて N/P 比の低い *E. zodiacus* は、現在の播磨灘の栄養塩環境下において生態学的に有利であると考えられる。また、播磨灘におけるノリの色落ちは、栄養塩の中でも窒素の不足によって発生することから、本種のこのような栄養塩に対する増殖特性は、本種の大量発生による近年の深刻なノリ色落ち被害とも密接な関連があるように思われる。

*E. zodiacus* は数種類の有機態窒素を増殖に利用する

**Table 3-3.** Comparison of minimum cell quota (Q<sub>0</sub>) for nitrogen (N) and phosphorus (P) between *Eucampia zodiacus* and other marine phytoplankton.

Species	Minimum cell quota (Q <sub>0</sub> )		Reference
	N (pmol cell <sup>-1</sup> )	P (pmol cell <sup>-1</sup> )	
<i>Eucampia zodiacus</i> (9°C)	1.6	0.24	Present study
<i>Eucampia zodiacus</i> (20°C)	1.0	0.16	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (9°C)	440	40	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (20°C)	440	30	Present study
<i>Chattonella antiqua</i>	7.7	0.60	Nakamura (1985b)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	1.44	0.095	Watanabe et al. (1982)
<i>Karenia mikimotoi</i>	3.13	0.25	Yamaguchi and Itakura (1999)
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	1.10	0.0894	Yamaguchi et al. (2001)

ことができ、特にグルタミンで無機態窒素を上回る高い値を示した (Fig. 3-15)。また、50 および 100  $\mu\text{M}$  のアンモニア濃度でも良好な増殖を示し、硝酸での増殖量を上回った (Fig. 3-15, 17)。しかし、*C. wailesii* が 500  $\mu\text{M}$  のアンモニア濃度下においても硝酸態窒素の 77% の増殖量を示したのに対し、*E. zodiacus* はアンモニアが 250  $\mu\text{M}$  以上の濃度では増殖できなかった。山口・松山 (1994) は 0~250  $\mu\text{M}$  の濃度下で、珪藻 4 種 (*C. didymium* var. *protuberans*, *D. brightwellii*, *S. costatum*, *Thalassiosira* sp.) のアンモニア利用能を調べ、実験に供した全ての珪藻でアンモニア濃度の上昇に伴い最大収量が増大し、その増殖量は硝酸を窒素源とした実験区とほぼ同程度だったことを報告している。これらのことから、*E. zodiacus* のアンモニア耐性は他の珪藻に比べて低いことが示唆された。また、増殖量は低いものの *C. wailesii* が尿酸や尿素を窒素源として利用できたのに対し、*E. zodiacus* はこれらをほとんど利用できなかった。深尾ほか (2006, 2007) は赤潮プランクトン 6 種の尿素利用能を培養実験から明らかにし、水質汚濁の進行した浦ノ内では、DIN に対して尿素が比較的高い割合で存在し、DIN に加え尿素が植物プランクトンの窒素源として利用されていることを報告している。また瀬戸内海においても、今井ほか (1986) が周防灘で、山本ほか (2002b) が広島湾での調査から、溶存態有機窒素 (DON) が全窒素 (TN) の半分以上を占めていることを報告している。今後は播磨灘においても DIN に加え DON の調査を行うことによって、より詳細な栄養塩と植物プランクトンの関係を調査する必要がある。

植物プランクトンの各種形態別窒素、リン源の利用特性やその適正濃度は種によって異なり、特に有機態窒素、リンの利用特性の違いは、現場海域における種の出現や優占種の交代に影響を及ぼす要因の一つと考えられている (Bonin and Maestrini 1981)。そのため、各種形態別窒素、リン源の利用特性は多くの HAB 種で比較的良好に研究されている (例えば、Nakamura and

Watanabe 1983b; 山口・松山 1994; 松田ほか 1999; Yamaguchi and Itakura 1999; Yamaguchi et al. 2001; Oh et al. 2002; Yamaguchi et al. 2008a)。特にリン源の利用特性は、本節で実験に供した有機態リンをほぼ全て増殖に利用できるタイプと、数種類の有機態リンのみ増殖に利用できるタイプに大きく分けられる。前者には *K. mikimotoi* (Yamaguchi and Itakura 1999) や *H. circularisquama* (Yamaguchi et al. 2001) が、後者にはラフィド藻の *C. antiqua*, (山口・松山 1994) や *C. ovata* (Yamaguchi et al. 2008a) 等がそれぞれ該当する。また珪藻の中では、*C. didymus*, *D. brightwellii*, *Thalassiosira* sp. が前者、*S. costatum* が後者のタイプであることが報告されている (山口・松山 1994)。本実験から、*E. zodiacus* は実験に用いた 14 種類の有機態リンを全て増殖に利用することができた (Fig. 3-16)。一方、*C. wailesii* は 14 種類のうち 8 種類の有機態リンを利用できなかった (Fig. 3-18)。このことから、*E. zodiacus* は有機態リンを増殖に有効利用できる種、*C. wailesii* は有効利用できない種に分類することができる。*E. zodiacus* のリン酸に対する  $K_s$  値は、播磨灘における 3~7 月のリン酸の月平均値を上回ることから、この期間はリンが本種の増殖を制限する可能性が考えられた。しかし本種は、無機態リンが不足した環境下において、有機態リンを増殖に利用することによって個体群の増大や維持を図ることが可能であると考えられる。一方、*C. wailesii* のリン酸に対する  $K_s$  値も *E. zodiacus* と同様、3 月以降の播磨灘の月平均値を上回ることから、本種は 3 月以降の栄養塩環境下では、上述した珪酸に加えリンによっても増殖が制限される可能性が示唆された。

有機態リンを増殖に有効利用できる種は、alkaline phosphatase (以下 APase) 等の酵素作用によって有機態リンを加水分解し、その過程で生じるオルトリン酸塩を増殖に利用する (Kuenzler and Perras 1965; 呉ほか 2005)。また、植物プランクトンの APase は細胞外のオルトリン酸が枯渇するとその活性が誘導されることが知られている (Uchida 1992; Oh et al. 2002)。松山



(2003)は、7種の植物プランクトンについて APase の活性を調べ、*H. circularisquama* で非常に強い活性を示したことが、*S. costatum* にはその活性がほとんど認められなかったことを報告している。APase 活性を持ち、広範なリン源を増殖に利用できる種は、無機態リンが枯渇した環境下でも有機態リンを利用して増殖することができるため (Flynn et al. 1986)、リン酸制限下での種間競争に有利である。近年、瀬戸内海では *Chattonella* や *Skeletonema* など最小細胞内栄養塩含量が大きい種や、有機態リンを有効利用できない種の出現が減少し、*H. circularisquama* や *Chaetoceros* といった細胞内栄養塩含量が比較的小さい種や有機態リンを増殖に有効利用できる種の出現割合が増大する傾向が見られる。本実験結果から、ノリに色落ち被害を引き起こす比較的大型の珪藻についても同様の傾向が示唆された。すなわち、近年の播磨灘では、有機態リンを増殖に有効利用でき、低栄養塩条件下においても高密度まで増殖可能な *E. zodiacus* のような種が優占しやすい栄養塩環境になっていると考えられる。

### 第3節 窒素、リン取り込みの動力学

ノリの色落ち現象は、海水中の限りある栄養塩を巡ってノリと植物プランクトンが競争し、ノリの生育に必要な栄養塩の不足によって起こり、播磨灘や有明海など多くのノリ漁場では主に溶存無機態窒素の不足によって発生することが知られている (川口ほか 2002; 松岡ほか 2005)。一方、東京湾では溶存無機態リンの不足がその原因とされている (長谷川・石井 2007)。そのため、養殖ノリに色落ち被害を引き起こす珪藻の栄養塩取り込み能を定量的に評価することは、これら珪藻による色落ち被害を考える上で重要な課題である。

現在、養殖に使われているノリの品種はほぼ全てがスサビノリ (*Porphyra yezoensis* Ueda) である (Niwa and Aruga 2003)。山本・高尾 (1988) は、スサビノリのア

ンモニア態および硝酸態窒素の取り込み能を、温度 4～18℃の範囲で調べている。また、スサビノリと *S. costatum* の窒素取り込みに対する半飽和定数を比較し、両者が窒素の取り込みを巡って競争した場合、特に低濃度の栄養塩環境下では珪藻の方が効率的に栄養塩を取り込むことを指摘している。

植物プランクトンの栄養塩取り込み能は種特異的であり、現場海域における植物プランクトン群集の種間競争や特定の種が優占する機構を考える上でも重要な要因である (Eppely et al. 1969; Lehman et al. 1975)。本章では、代表的なノリの色落ち原因藻である *E. zodiacus* および *C. wailesii* について、両種の窒素、リン取り込み能を培養実験から求めた。また、両種の栄養塩取り込み能を他の植物プランクトン種と比較しながら、これらノリの色落ち原因藻の栄養塩取り込み特性を明らかにすることによって、両種がノリ養殖に及ぼす影響について検討を加えた。

### 材料および方法

**供試株と培地** 実験には播磨灘より分離し、マイクロピペット洗浄法 (岩崎 1967) および Nagai et al. (1998) の方法を併用して無菌化した *E. zodiacus* と *C. wailesii* のクローン株を用いた。継代培養および実験には硝酸態窒素およびリン酸態リン濃度をそれぞれ 500 および 50  $\mu\text{M}$  とした改変 MP1 培地 (長井・眞鍋 1994) を用いた。また、以下の実験は全て温度 9 および 20℃、光強度 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 10hL: 14hD の条件下で行った。

**窒素、リンの取り込みの経時変化** 植物プランクトンによる栄養塩取り込みの濃度依存性を評価するためには、目的とする栄養塩の添加後、その取り込み速度が一定である時間内に実験を行う必要がある (Harrison et al. 1989)。そこで、窒素、リンの取り込みを評価する前実験として、*E. zodiacus* による窒素、リンの経時的な取り込みを以下の方法で確認した。まず、



窒素またはリンを無添加とした改変 MP1 培地で *E. zodiacus* の増殖が定常期に達するまで数日間培養し、窒素またはリン欠乏細胞とした。その細胞を窒素またはリンを無添加とした改変 MP1 培地 1.5 L が入った 2 L の三角フラスコに細胞密度が 5000~10000 cells ml<sup>-1</sup> となるよう接種し、40 μM の硝酸態窒素または 5 μM のリン酸態リンを添加した。栄養塩添加後、0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360 分後および以降は 7 日後まで毎日 1 回、少量の培養を取り、PTFE フィルター (孔径 0.45 mm, Advantec) で濾過した後、TRAACS-800 を用いて窒素およびリン濃度を測定した (眞鍋・反田 1986)。

また、*C. wailesii* に対しても同様の実験を実施した。*C. wailesii* は、窒素またはリン欠乏細胞を窒素またはリン無添加の改変 MP1 培地 1.5 L の入った 2 L の三角フラスコに 20~30 cells ml<sup>-1</sup> となるように接種した。窒素、リンの添加濃度および培養摂取時間の間隔は、*E. zodiacus* の実験に準じた。

**窒素、リンの取り込みの濃度依存性** 上述の前実験と同様、窒素またはリンを無添加とした改変 MP1 培地で *E. zodiacus* を培養し、窒素またはリン欠乏細胞とした。窒素またはリン源を無添加とした改変 MP1 培地 150 ml が入った 300 ml 三角フラスコをそれぞれ 14 本用意し、窒素またはリンが欠乏状態となった *E. zodiacus* の細胞が 10000~20000 cell ml<sup>-1</sup> となるように調整した。窒素の取り込み実験では硝酸態窒素を 7 段階 (1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μM)、リンの実験ではリン酸態リンを 7 段階 (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μM) の濃度でそれぞれ添加し、緩やかな攪拌条件下で培養した。栄養塩添加直後および一定時間培養後、少量の培養を取り、目的とする栄養塩の濃度を測定するとともに *E. zodiacus* の細胞密度 (N; cells ml<sup>-1</sup>) を計数した。各栄養塩濃度 (S; μM) における栄養塩取り込み速度 ( $\rho$ ; pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) は、次式により求めた。

$$\rho = -(dS/dt)/N$$

また、植物プランクトンによる栄養塩取り込み速度は、栄養塩濃度 (S) に依存し、酵素反応式である Michaelis-Menten の式と同じ次式で表すことができる (Dugdale 1967)。パラメータ値の推定は東海 (1997) の方法により行った。

$$\rho = \rho_{\max} \times S / (K_s + S)$$

ここで、 $\rho_{\max}$  は最大取り込み速度 (pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)、 $K_s$  は半飽和定数 (μM) をそれぞれ示す。

また、*C. wailesii* においても窒素またはリン欠乏細胞を用いて同様の栄養塩取り込み実験を行った。*C. wailesii* の実験では、窒素またはリンが無添加の改変 MP1 培地 150 ml の入った 300 ml の三角フラスコに、*C. wailesii* が 30~40 cells ml<sup>-1</sup> となるように接種し、各栄養塩の取り込み速度を求めた。

## 結 果

**窒素、リン取り込みの経時変化** 窒素を無添加とした培地で窒素欠乏状態となるまで培養した *E. zodiacus* に 40 μM の硝酸態窒素を添加したところ、硝酸態窒素濃度は *E. zodiacus* の取り込みによってほぼ直線的に低下した (Fig. 3-19)。培地の窒素濃度は、温度 9 および 20°C のいずれの温度条件下においても窒素添加 360 分後には 5 μM 以下にまで低下し、1 日後にはほぼ枯渇した (Fig. 3-19)。同様に、リン酸態リンの取り込みでも培地のリン濃度はリン添加直後から経時的に減少し、1 日後にはほぼ枯渇した (Fig. 3-20)。しかし、リンの 20°C 下における実験では、リン添加直後~45 分後までのリン取り込み速度 (0.40~0.74 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) と比較して、リン添加後 60~120 分後および添加後 150~360 分後のリン取り込み速度がそれぞれ 0.25~0.31 および 0.017~0.10 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> であり、取り込み速度は有意に低下した (Fig. 3-20, p<0.05)。

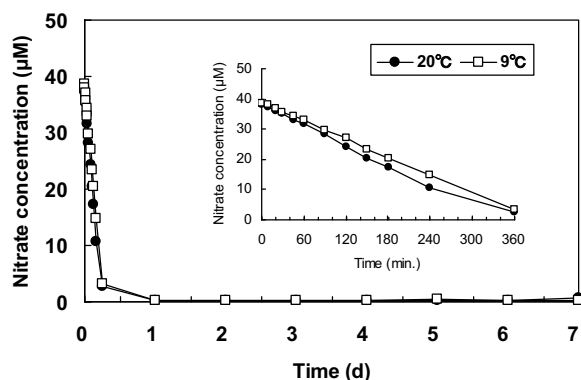


Fig. 3-19. Decrease in nitrate concentration after addition of nitrate to nitrogen-starved *Eucampia zodiacus* at 9 and 20 °C. The inset is an expanded view of the time range  $\leq 360$  minutes.

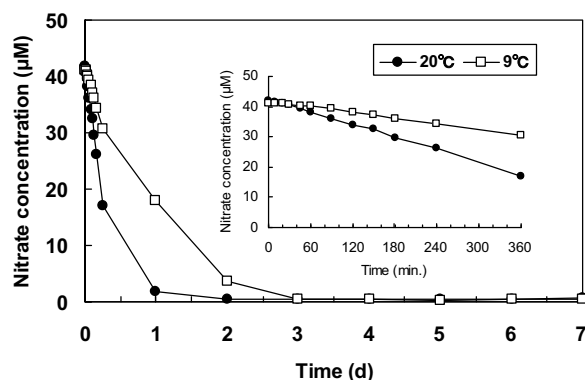


Fig. 3-21. Decrease in nitrate concentration after addition of nitrate to nitrogen-starved *Coscinodiscus wailesii* at 9 and 20 °C. The inset is an expanded view of the time range  $\leq 360$  minutes.

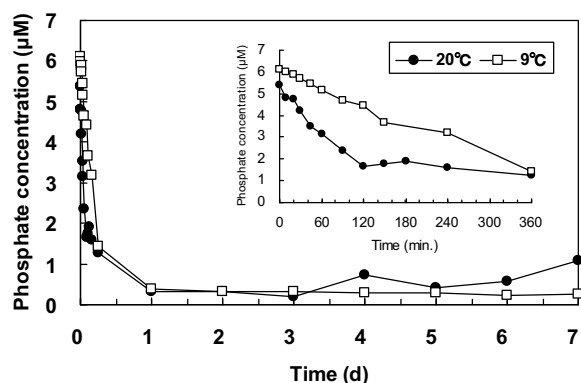


Fig. 3-20. Decrease in phosphate concentration after addition of phosphate to phosphorus-starved *Eucampia zodiacus* at 9 and 20 °C. The inset is an expanded view of the time range  $\leq 360$  minutes.

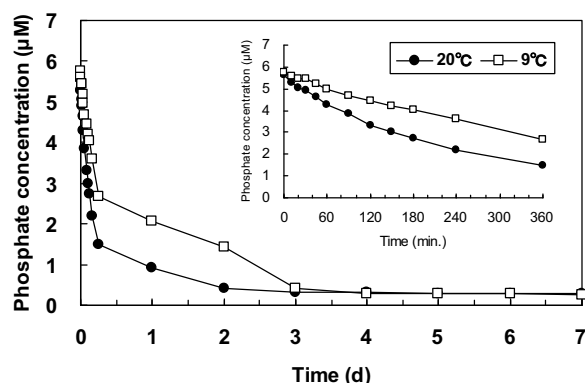


Fig. 3-22. Decrease in phosphate concentration after addition of phosphate to phosphorus-starved *Coscinodiscus wailesii* at 9 and 20 °C. The inset is an expanded view of the time range  $\leq 360$  minutes.

一方、*C. wailesii* では、培地の窒素濃度がいずれの温度条件下でも窒素添加後 360 分後まで直線的に減少し、2 または 3 日後にほぼ枯渇した状態となった (Fig. 3-21)。リンの取り込み実験でも、2 または 3 日後に添加したほぼ全てのリンが *C. wailesii* に取り込まれた。また、*E. zodiacus* と同様、いずれの温度条件下においてもリン源添加直後 ~60 分後までの取り込み速度 ( $0.17 \sim 0.21 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) と比較してその後の取り込み速度 (90~360 分後;  $0.024 \sim 0.13 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) が有意に低下した (Fig. 3-22,  $p < 0.05$ )。以上のことから、以下の窒素、リン取り込み実験は、培養時間を 30 分とした (渡辺 1988)。

窒素、リンの取り込みにおける濃度依存性 温度 9 および 20°C 下における *E. zodiacus* の硝酸態窒素およびリン酸態リンに対する取り込み速度を Fig. 3-23 に示す。両温度とも窒素取り込み速度は窒素濃度の上昇とともに増大した。窒素濃度 ( $S$ ) と窒素取り込み速度 ( $\rho$ ;  $\text{pmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) の関係は Michaelis-Menten の式で以下のように表すことができた。

$$9^{\circ}\text{C}: \rho = 0.777 \times S / (2.59 + S) \quad (r^2 = 0.67)$$

$$20^{\circ}\text{C}: \rho = 0.916 \times S / (2.92 + S) \quad (r^2 = 0.90)$$

各パラメータ値を Table 3-4 に示す。9°C および 20°C に

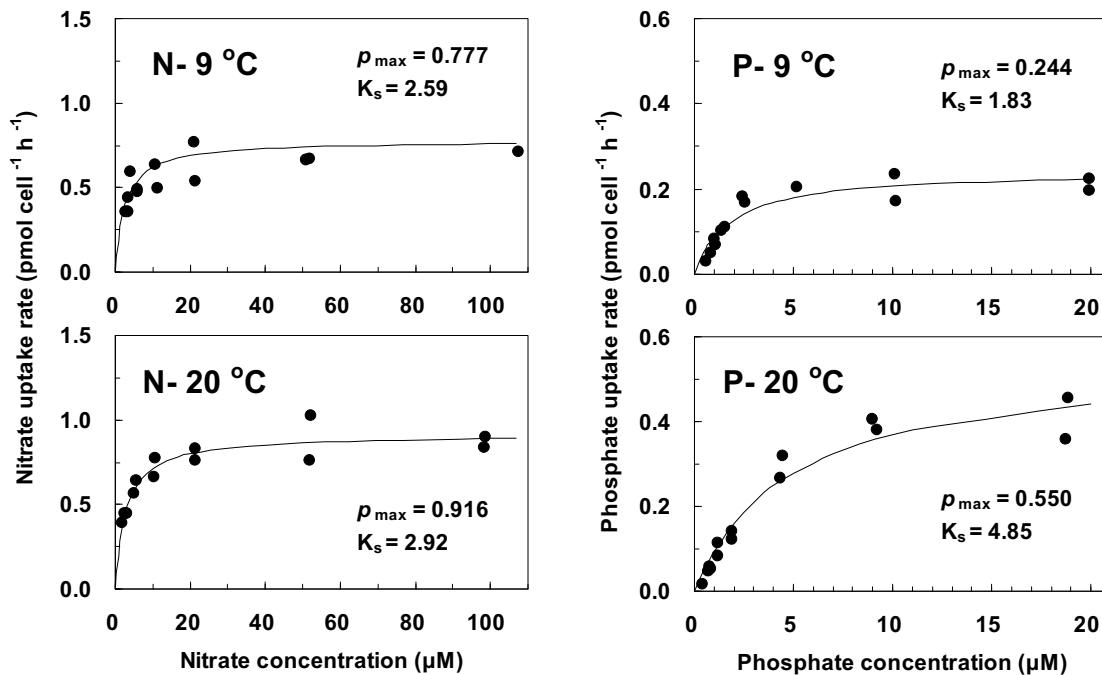


Fig. 3-23. Nitrate and phosphate uptake rate of *Eucampia zodiacus* as a function of ambient nutrient concentration at 9 and 20 °C. The solid curve of Michaelis-Menten equation was fitted to the observed value (●) using the maximum likelihood method.

における硝酸態窒素の最大取り込み速度および半飽和定数は、それぞれ0.777, 0.916 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>および2.59, 2.92 μMと推定された。最大取り込み速度 ( $\rho_{max}$ ; pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) および半飽和定数 ( $K_s$ ) の両パラメータとも、9°C下での実験に比べ20°C下の方が高い値を示した。

またリン酸態リン濃度 (S) と取り込み速度の ( $\rho$ ) の関係も硝酸態窒素と同様、Michaelis-Menten の式で以下のように表せた。

$$\begin{aligned} 9^\circ\text{C}: \rho &= 0.244 \times S / (1.83 + S) & (r^2 = 0.86) \\ 20^\circ\text{C}: \rho &= 0.550 \times S / (4.85 + S) & (r^2 = 0.95) \end{aligned}$$

得られたパラメータ値を Table 3-5 に示す。最大取り込み速度および半飽和定数は、9および20°C下でそれぞれ0.244, 0.550 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>および1.83, 4.85 μMであった。9°C下と20°C下で得られたパラメータ値の差は窒素の値に比べて大きく、いずれも20°C下の1/2程度の値であった。

次に同様の方法で求めた *C. walesii* の窒素、リン濃度とその取り込み速度の関係を Fig. 3-24 に示す。*C. walesii* の窒素、リン取り込み速度も Michaelis-Menten の式に従い、それぞれ以下のように表せた。

$$\begin{aligned} \text{硝酸態窒素} \quad 9^\circ\text{C}: \rho &= 58.3 \times S / (2.91 + S) & (r^2 = 0.71) \\ &20^\circ\text{C}: \rho &= 95.5 \times S / (5.08 + S) & (r^2 = 0.90) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{リン酸態リン} \quad 9^\circ\text{C}: \rho &= 41.9 \times S / (5.62 + S) & (r^2 = 0.92) \\ &20^\circ\text{C}: \rho &= 59.1 \times S / (6.67 + S) & (r^2 = 0.92) \end{aligned}$$

各パラメータ値を Table 3-4 および 3-5 にそれぞれまとめた。9°Cおよび20°C下における硝酸態窒素に対する最大取り込み速度 ( $\rho_{max}$ ) および半飽和定数 ( $K_s$ ) は、それぞれ58.3, 95.5 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>および2.91, 5.08 μMと算定された。またリン酸態リンの  $\rho_{max}$  および  $K_s$  値はそれぞれ41.9, 59.1 pmol cell<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>および5.62, 6.67 μMであった。*C. walesii* の栄養塩取り込みに関する各パ

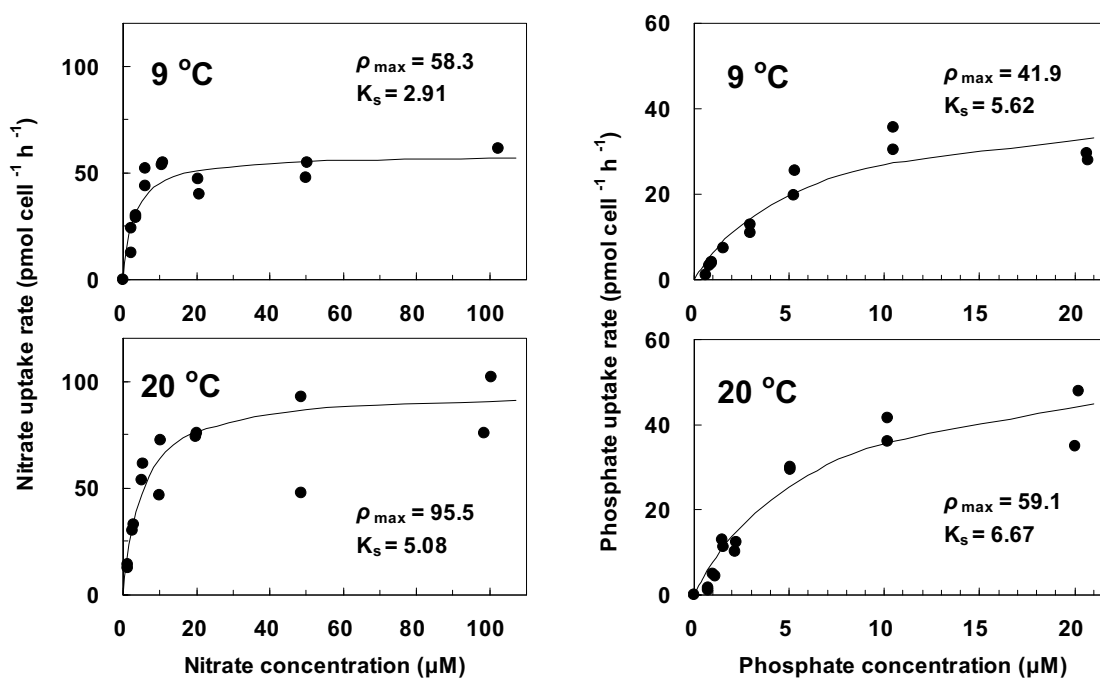


Fig. 3-24. Nitrate and phosphate uptake rate of *Coscinodiscus wailesii* as a function of ambient nutrient concentration at 9 and 20 °C. The solid curve of Michaelis-Menten equation was fitted to the observed value (●) using the maximum likelihood method.

ラメータ値は、窒素、リンともに *E. zodiacus* に比べて高い値を示した。

### 考 察

本実験により、*E. zodiacus* の栄養塩濃度とその取り込みの関係が明らかになった。ここでは、本実験から得られた *E. zodiacus* の窒素、リン取り込み能を *C. wailesii* をはじめとする他の植物プランクトン種と比較することにより、*E. zodiacus* が栄養塩の取り込みに関してどのような特性を持つのか検討した。まず半飽和定数 ( $K_s$ ) は、栄養塩濃度に対する親和性を示す指標として、種間の取り込み能の比較に用いられる (Eppley and Thomas 1969; Eppley et al. 1969; Gotham and Rhee 1981; Yamamoto and Tarutani 1999; Yamamoto et al. 2004)。さらに  $K_s$  値は細胞のサイズに依存し、一般にサイズが大きいほど高くなる傾向がある (Eppley et al. 1969; Hein et al. 1995)。窒素の取り込み能をみる

と、珪藻の中でも細胞のサイズが大きい *C. wailesii* が、他の珪藻に比べて  $K_s$  値も高く、渦鞭毛藻の *Gymnodinium catenatum* Graham (Yamamoto et al. 2004) やラフィド藻の *C. antiqua* (Nakamura and Watanabe 1983c; Nakamura 1985b) と同程度の値であった (Table 3-4)。一方、*E. zodiacus* は珪藻の中でも細胞のサイズが比較的大きい種であるにも関わらず、 $K_s$  値はサイズの小さい *S. costatum* を除く *Chaetoceros* spp. や *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hasle 等の珪藻種と同程度の値であった。また、最大取り込み速度 ( $\rho_{max}$ ) も細胞のサイズに依存し、細胞のサイズが大きい種ほど大きい値を示す傾向がある (Nakamura and Watanabe 1983c)。そのため、次々に示す細胞内最小栄養塩含量を考慮し標準化した最大比取り込み速度 ( $V_{max}; h^{-1}$ ) を用いて、種間の栄養塩取り込み能を比較することが試みられている (Nakamura and Watanabe 1983c)。

Table 3-4. Comparison of uptake kinetic parameters for nitrate between *Eucampia zodiacus* and other marine phytoplankton.

Species	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$P_{\text{max}}$ ( $\text{pmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$Q_0$ ( $\text{pmol cell}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}/K_s$	Reference
<i>Eucampia zodiacus</i> (9°C)	2.59	0.777	1.6	0.49	0.19	Present study
<i>Eucampia zodiacus</i> (20°C)	2.92	0.916	1.0	0.92	0.32	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (9 °)	2.91	58.3	440	0.13	0.045	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (20 °)	5.08	95.5	440	0.22	0.043	Present study
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	2.8	0.310	1.93	0.17	0.06	Lomas and Gilbert (2000)
<i>Skeletonema costatum</i>	0.4	0.063	0.65	0.10	0.25	Lomas and Gilbert (2000)
<i>Chaetoceros spp.</i>	3.1	0.024	0.21	0.11	0.04	Lomas and Gilbert (2000)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	7.59	6.48	31.3	0.21	0.027	Yamamoto et al. (2004)
<i>Chaetonea antiqua</i>	2.81	0.91	7.7	0.12	0.042	Nakamura and Watanabe (1983c), Nakamura (1985b)

Table 3-5. Comparison of uptake kinetic parameters for phosphate between *Eucampia zodiacus* and other marine phytoplankton.

Species	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	$P_{\text{max}}$ ( $\text{pmol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$Q_0$ ( $\text{pmol cell}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}/K_s$	Reference
<i>Eucampia zodiacus</i> (9°C)	1.83	0.244	0.24	1.0	0.56	Present study
<i>Eucampia zodiacus</i> (20°C)	4.85	0.550	0.16	3.4	0.71	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (9 °)	5.62	41.9	40	1.05	0.19	Present study
<i>Coscinodiscus wailesii</i> (20 °)	6.67	59.1	30	1.97	0.30	Present study
<i>Skeletonema costatum</i>	0.68	0.038	0.0038	10	14.7	Tarutani 1999)
<i>Alexandrium tamarense</i>	2.6	1.4	0.47	3.0	0.87	Tarutani 1999)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	3.40	1.42	1.83	0.776	0.228	Yamamoto et al. (2004)
<i>Chaetonea antiqua</i>	1.76	0.14	0.6	0.23	0.13	Nakamura and Watanabe (1983c), Nakamura (1985b)



$$V_{\max} = \rho_{\max}/Q_0$$

ここでは第III章第2節で求めた *E. zodiacus* および *C. wailesii* の最小細胞内栄養塩含量 ( $Q_0$ ;  $\text{pmol cell}^{-1}$ ) を用いて、両種の  $V_{\max}$  を算出した (Table 3-4)。また Healey (1980) は、種間の栄養塩取り込み能を比較する指標として、 $V_{\max}/K_s$  による評価を提案している。*E. zodiacus* の  $V_{\max}$  および  $V_{\max}/K_s$  値を他の植物プランクトンと比較した結果、本種の  $V_{\max}$  は播磨灘で優占する他の小型珪藻や *G. catenatum*, *C. antiqua* と比較して高い値を示した (Table 3-4)。また、 $V_{\max}/K_s$  値については *S. costatum* と並んで高い値であった。これらのことから、*E. zodiacus* は他種と比較して高い窒素取り込み能力を有していることが示された。

*E. zodiacus* の 9°C と 20°C 下の窒素に対する  $K_s$  および  $\rho_{\max}$  値を比較した結果、いずれのパラメータ値も 9°C 下で得られた値の方が低く、9°C 下の  $V_{\max}$  および  $V_{\max}/K_s$  値は、20°C 下における値に比べて 1/2 程度の値であった。しかしながら、この 9°C 下の  $V_{\max}$  および  $V_{\max}/K_s$  値でも *S. costatum* の  $V_{\max}/K_s$  値を除く Table 3-4 に示した他種の全ての値を上回っていた。このことから、*E. zodiacus* は水温が 10°C を下回るノリ漁期後半においても、他の植物プランクトンに比べて相当に高い窒素取り込み能を維持していることが示された。本種が大量発生した海域では、他の植物プランクトンが大量発生した時に比べて、深刻な色落ち被害が発生する。その要因の一つとして、本種が高い窒素取り込み能を有し、低温下でもそれが高いレベルで維持されていることがその大きな要因として考えられる。

リンの取り込みに関しては、概ね細胞サイズに応じて  $K_s$  値も高い傾向があり、細胞サイズが比較的大きい *E. zodiacus* の  $K_s$  値は高い値を示した。*E. zodiacus* の  $V_{\max}$  および  $V_{\max}/K_s$  値も、特に *S. costatum* と比較して低く、*A. tamarensis* とほぼ同程度の値であった。樽谷 (1999) は *S. costatum* と *A. tamarensis* のリン取り込みに関する各動力学的パラメータを比較し、*A. tamarensis*

のリン取り込み速度は現場海水中のリン酸がいかなる濃度であっても *S. costatum* を下回り、*A. tamarensis* が *S. costatum* より優占することはもちろんのこと、共存することさえも不可能であることを指摘している。したがって、*A. tamarensis* が個体群を拡大するためには、*S. costatum* が他の要因によって制限されることが必要であるとしている。本実験から、*E. zodiacus* が *S. costatum* とリンの取り込みを巡って競合した場合、*A. tamarensis* と同様の結果となることが考えられた。しかし、近年のノリ養殖漁期後半の現場海域においては、*Skeletonema* の占める割合が減少し、*E. zodiacus* の割合が増大している (Fig. 2-13)。これは、リン以外の水温、窒素など他の環境要因による制限や有機態リンの利用特性の違い等の差が考えられる。加えて、両種の現場海域における出現特性の違いには、両種の生態学的特性の差も影響していることが想定された。*S. costatum* は一定濃度以上の栄養塩を必要とし、低い光強度条件下において休眠細胞を形成することが報告されており (板倉 2000)、本種は海域の栄養塩が枯渇する前に悪天候による低光強度の環境下で休眠細胞を形成し始めると想定される。これに対して、*E. zodiacus* は現時点までに休眠期細胞が確認されておらず、周年水中で浮遊生活をしていると推察されている (山口ほか 2003; 板倉・山口 2007)。そのためこのような種間の関係を考える際には、両種の増殖生理学的特性の比較のみならず、生活史や生態学的な特性についても考慮する必要がある。

一方、*C. wailesii* は植物プランクトンの中でも細胞のサイズが非常に大きく、窒素、リンとも他種に比べて最大取り込み速度も極めて高い値を示した (Table 3-4, 3-5)。しかし同時に、 $K_s$  値や最小細胞内含量も大きいことから、本種の  $V_{\max}$  および  $V_{\max}/K_s$  値は、*E. zodiacus* や *S. costatum* と比較して、珪藻の中では小さく、低濃度下における栄養塩の取り込みや、他の珪藻との栄養塩を巡る競合では強者でないことが示唆された。

Sommer (1985, 1989) は栄養塩取り込み能から植物プランクトンを次の3つのタイプに分類している。

(1) 低濃度の栄養塩を効率よく取り込む種 ( $V_{\max}/K_s$  が大)

(2) 取り込んだ栄養塩を速やかに利用して増殖する種 ( $\mu_m$  が大)

(3) 取り込んだ栄養塩を細胞内に蓄積する種 ( $V_{\max} > \mu_m$ )

*E. zodiacus* は  $V_{\max}/K_s$  が大きい(1), または増殖速度が大きく, 取り込んだ栄養塩を速やかに増殖に利用する戦略をとる(2)に属すると考えられる。一方, *C. walesii* は栄養塩取り込みに関する  $\rho_{\max}$  値が大きく, (3) の栄養塩を蓄積するタイプであると考えられた。このように, 養殖ノリに色落ち被害を引き起こす珪藻の中でも, その栄養塩取り込み能は種特異的である。すなわち, *C. walesii* は細胞のサイズが極めて大きく, 一細胞当たりの栄養塩取り込み量も大きい。*C. walesii* は, 栄養塩濃度の比較的高い秋季に細胞密度がピークを示し, 本種が大量発生した海域では, 本種による取り込みによって栄養塩濃度が大きく低下する (眞鍋ほか 1994a; 長井 2000)。一方で, 本種の栄養塩取り込み能は, 他種と栄養塩を巡る競争には不利であり, 栄養塩濃度の低下した海域では, 本種は栄養塩による制限を受け, *E. zodiacus* をはじめ他種よりも早くブルームが終息する。これに対して, *E. zodiacus* は最小細胞内栄養塩含量が低く, 低栄養塩環境下においても長期間ブルームが継続する。また *E. zodiacus* は, 温度, 光強度, 栄養塩濃度など主要な環境要因に対して高い増殖速度を示し, さらに窒素の取り込みにおいても, 高い  $V_{\max}$ ,  $V_{\max}/K_s$  値を有していることが明らかとなった。このような生理学的特性から, 本種は現場海域において活発な増殖を繰り返しながら, 栄養塩が徹底的に枯渇するまで増殖を繰り返す種であることが推察された。

現在, 播磨灘では栄養塩濃度に対する増殖応答や取り込み能の異なる珪藻によって, 二重にダメージを受

けるようになったと考えられる。すなわち, *C. walesii* が大量に栄養塩を消費し, その後, *E. zodiacus* の増殖によって栄養塩がほぼ枯渇するまで低下する。特に水温の上昇や栄養塩濃度の低下によって, 近年 *E. zodiacus* が大量発生するようになったことで, 従来見られなかったような深刻な色落ち被害が頻発するようになったと考えられた。以上から, *E. zodiacus* はノリ養殖に色落ち被害を引き起こす珪藻の中で極めて甚大な被害を引き起こす可能性があり, 現在最も注意を要する珪藻であると考えられた。

#### 第四章 播磨灘における *Eucampia zodiacus* のサイズ変化と個体群動態

温帯域の沿岸, 内湾に出現する植物プランクトンの多くは, 明瞭な季節的消長を示す (Smayda 1980)。同様の傾向は, 瀬戸内海の主要な HAB (Harmful Algal Bloom) 種や珪藻からも報告されている (Imai and Itoh 1987; Nagai et al. 1996; Itakura et al. 2002; Shiraishi et al. 2007)。またこれらの種の中には, 生活史の中に浮遊生活を送る時期に加え, シストや休眠期細胞と呼ばれる底生性の耐久細胞を形成することが知られている (Hargraves and French 1983; 今井・伊藤 1986; Imai 1989; Kuwata and Takahashi 1990; 板倉ほか 1992; 吉松 1992; Imai et al. 1993; 長井ほか 1995; 板倉 2000)。例えば, 瀬戸内海における代表的な有害赤潮藻である *Chattonella* 属 (*Chattonella antiqua* および *Chattonella marina* (Subrahmanyam) Hara et Chihara) は, 栄養細胞が概ね6~9月に観察され, 7~8月に赤潮を形成するが, それ以外の一年の大部分をシストとして海底泥中で過ごすことが明らかとなっている (Imai and Itoh 1987; Imai et al. 1991)。また, *Chattonella* 属のシストには休眠, 成熟, 発芽能など生理的状态にも季節性があり, 夏季の赤潮発生には越冬したシストが “seed population” として重要な役割を果たしていることが指摘されている (Imai and Itoh 1987; Imai et al. 1989,

1991)。したがって、近年の HAB 種を対象とした研究では、その大量発生機構を解明する上でブルーム形成時期と同様、それ以外の時期の生態を明らかにすることの重要性が認識されるようになり、瀬戸内海においても多くの HAB 種でシスト調査が実施されてきた (Imai and Itakura 1991; Imai et al. 1991; 山口ほか 1995; Itakura and Yamaguchi 2001; Yamaguchi et al. 2002)。このようなシストに関する生理生態学的な研究など、HAB 種の生活環に関する研究が精力的に行われた結果、有害赤潮の発生機構の解明が飛躍的に進展し、*Chattonella* 属では生活史の全容が解明されている (今井 1990; Yamaguchi and Imai 1994)。また珪藻においても、Itakura et al. (1997) が広島湾における調査で、*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* spp. および *Thalassiosira* spp. の休眠期細胞がほぼ一年を通して海底泥中に存在することを明らかにし、栄養細胞が海水中から検出されない時期に“seed”として重要な役割を果たしていることを報告している。また、Nagai et al. (1996) も *Coscinodiscus wailesii* が一年の内で最も不適で“critical”な季節である夏季を休眠細胞として生残し、それが秋季に大量発生する個体群の“seed population”として作用していることを報告している。

一方 HAB 種栄養細胞の現場調査は、対象とする種のブルーム形成期や漁業被害発生時において、対象種の出現密度の把握や環境要因との関係解明に重点が置かれることから、対象種の出現期に調査が集中する傾向がある。したがって、*Eucampia zodiacus* をはじめとするノリの色落ち原因藻の場合、現場調査は主にノリ養殖漁期(11月～翌年3月)に実施され(堀ほか2006)、年間を通じた詳細な調査はほとんど行われていない。そのため、播磨灘における *E. zodiacus* の周年を通じた生活様式は、特に、本種の増殖に不適だと推察される成層期の生態に関して不明な点が多い。

以上のような観点から、播磨灘における周年を通じた *E. zodiacus* の生活環を明らかにし、その生態学的役割を解明することは、本海域における本種の大量発生

機構と現場海域における環境要因との関係について理解を深め、さらには本種による色落ち被害発生機構や発生予察、被害防除を検討する上でも重要な研究課題であると考えられる。そこで本章では、まず第1節において *E. zodiacus* の細胞密度と細胞サイズの変動を詳細に追跡することによって、本種の年間の生活様式を明らかにした。また第2節では、第1節で得られた本種の生態学的特性を利用し、色落ち被害軽減対策に繋がる本種の発生予察手法の確立を試みた。

### 第1節 季節的な細胞密度の変動および細胞サイズの減少と回復

第3章で実施した種々の培養実験の結果から、*E. zodiacus* や *C. wailesii* など比較的細胞サイズの大きい珪藻にとって、最も増殖に適した時期は秋季であることが示された。一方で、播磨灘において *E. zodiacus* は、ノリ養殖漁期の後半(1～4月)に細胞密度が増大する (Figs. 2-9, 2-12)。この時期は、現場海域の水温が 10℃前後と周年を通して最も低下する時期であり、*E. zodiacus* の最大増殖速度も至適増殖条件下(20～25℃)で得られる値 (ca. 3 divisions d<sup>-1</sup>) の 1/3 まで低下する (Figs. 3-4, 3-6)。すなわち、*E. zodiacus* は培養実験から得られた至適増殖条件と、現場海域においてブルームを形成する時期の環境条件が大きく異なっており、播磨灘において好適とは言い難い条件下でブルームを形成している。これは室内培養実験から得られた本種の増殖生理学的特性だけでは、本種の播磨灘における大量発生機構を十分に説明することができないことを意味する。したがって、本種の播磨灘における個体群動態を理解するためには、増殖に不適な成層期や至適増殖環境であるにも関わらずブルームを形成しない秋季など、本種のブルーム形成期以外の時期も含め、周年を通して本種の個体群生態を明らかにすることが重要である。

一方、珪藻は珪酸質の被殻で覆われており、栄養細

胞は無性的な二分裂により増殖する。また珪藻は，“MacDonald and Pfitzer’s Rule” と呼ばれる被殻の内生的形成機構により，細胞のサイズが分裂回数とともに減少することが知られている（上野 1991）。そのため珪藻は，同一種であっても細胞サイズの変動範囲が大きく，栄養細胞が二分裂による増殖を繰り返し，ある一定の大きさまで小さくなるとそれ以上細胞分裂ができず死滅してしまうサイズが存在する（Gallagher 1983; 上野 1991; 長井・眞鍋 1994）。例えば，長井・眞鍋（1994）は，*C. walesii* の最小サイズが蓋殻径で 70  $\mu\text{m}$  前後であると報告している。このような特性から，珪藻は生理活動が低下し死滅する大きさに達するまでに，あるいは達した時に，増大胞子の形成によって細胞サイズの回復を図ることが知られている（長井・眞鍋 1994）。

以上のことから，本節では *E. zodiacus* の細胞密度と細胞サイズの変動を明らかにするために，4 年間の詳細なモニタリング調査を実施し，播磨灘における周年を通した *E. zodiacus* の生活環の解明を試みた。

## 方 法

調査は播磨灘北部に設けた 3 定点で実施した（Fig. 4-1）。兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター地先に設けた二見定点（水深 3 m; 34° 41.2' N, 134° 52.8' E）では，2002 年 4 月～2005 年 12 月までの間，週に 1 回の頻度で調査を実施した。また，加古川河口から南西へ約 5 km に設けた H1 定点（水深 20 m; 34° 41.0' N, 134° 45.5' E），および加古川河口 1 km に設けた H28 定点（水深 10 m; 34° 43.6' N, 134° 47.4' E）での調査は，調査船「ひょうご」または「新ひょうご」を用いて，月に 1 回（ただしノリ養殖漁期である 11～3 月は月 3 回）の頻度で実施した。二見定点ではバケツを用いて陸上から表層の海水を 5～30 L 採水した。水温および塩分は，ST センサー（アーンデラー・ジャパン社製 model 3210）により測定した。H1 および H28 定

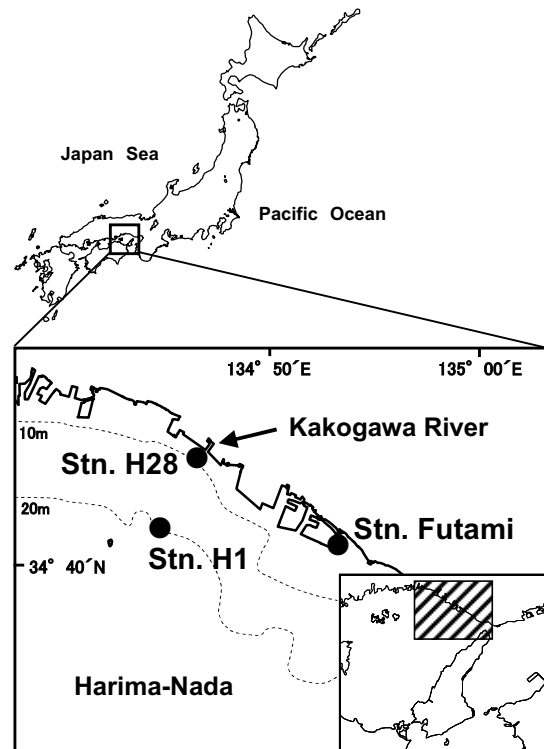


Fig. 4-1. Location of the sampling stations in the north eastern part of Harima-Nada, the Seto Inland Sea.

点では，表層（0.5 m），5 m（H28）または 10 m（H1），底層（海底上 1 m）の 3 層から，北原式またはバンドーン型採水器（眞鍋・反田 1985）を用いて 500 ml の海水を採水した。水温と塩分は多項目水質計（アレック電子社製 ACL215）で測定した。無機態窒素（DIN;  $\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$ ），リン酸（ $\text{PO}_4\text{-P}$ ），珪酸（ $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ）の測定は，眞鍋・反田（1986）の自動分析法に従い，Auto Analyzer II（Technicon 社製）または TRAACS 800（BI-Tec 社製）により行った。

二見定点において採水した海水サンプルは，5  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルター（47 mm; Millipore 社製）を用い，板倉ほか（1990）の方法により 10～30 ml まで濃縮した。濃縮した海水サンプルは，1 ml を光学顕微鏡下で観察し，*E. zodiacus* の細胞数を計数するとともに，画像解析装置（オリンパス社製 VM-50）を用いて 300 細胞を上限に頂軸長（ $\mu\text{m}$ ）を測定し，*E. zodiacus* の細胞

サイズを求めた。H1 および H28 定点で得たサンプルは、同様の方法で 20 倍に濃縮し細胞密度と細胞サイズを測定した。

## 結 果

二見定点における *E. zodiacus* の細胞密度と細胞サイズの変化を Fig. 4-2 に示す。調査を実施した 4 年間を通して、*E. zodiacus* の栄養細胞はほぼ周年観察することができた。*E. zodiacus* の細胞密度は、2~4 月に高く（最大値は  $3.6 \times 10^5$  cells L<sup>-1</sup>）、それ以外の月は低密度で推移した。細胞サイズ（頂軸長）は、 $10.8 \pm 0.69 \sim 81.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$  の範囲で変動し、10~11 月に最小サイズとなり、その直後最大値まで回復した。秋季に細胞サイズを回復した個体群は徐々に細胞サイズを減少させ、1 年かけて再び同時期に最小サイズに達した。調査を実施した 4 年間を通して、*E. zodiacus* は毎年こ

のような細胞サイズの減少と回復を周期的に繰り返した。

二見定点において 2002~2005 年の 10~12 月の間に観察された *E. zodiacus* の細胞サイズを 10  $\mu\text{m}$  毎の頻度分布として示す (Fig. 4-3)。各年とも当初最小サイズに近い 10~20  $\mu\text{m}$  にピークを持つ個体群が単独で観察され、その後明らかに大きさの異なる比較的サイズの大きい個体群が出現した。また、経時的にサイズの小さい個体群の割合が減少し、サイズの大きい個体群の割合が増大した。サイズの大きい個体群が出現し始めてから約 1 か月後には、出現する全ての個体群が細胞サイズの大きい個体群となった。

次に、二見定点における水温、塩分、無機態栄養塩濃度の変化を Fig. 4-4 に示す。*E. zodiacus* の大量発生は、水温が 7.2~10.3°C の範囲で見られた。なお、ここでは *E. zodiacus* の細胞密度が 100 cells ml<sup>-1</sup> を超えた期間を本種の大量発生期とした。塩分は 28.45 (2003 年

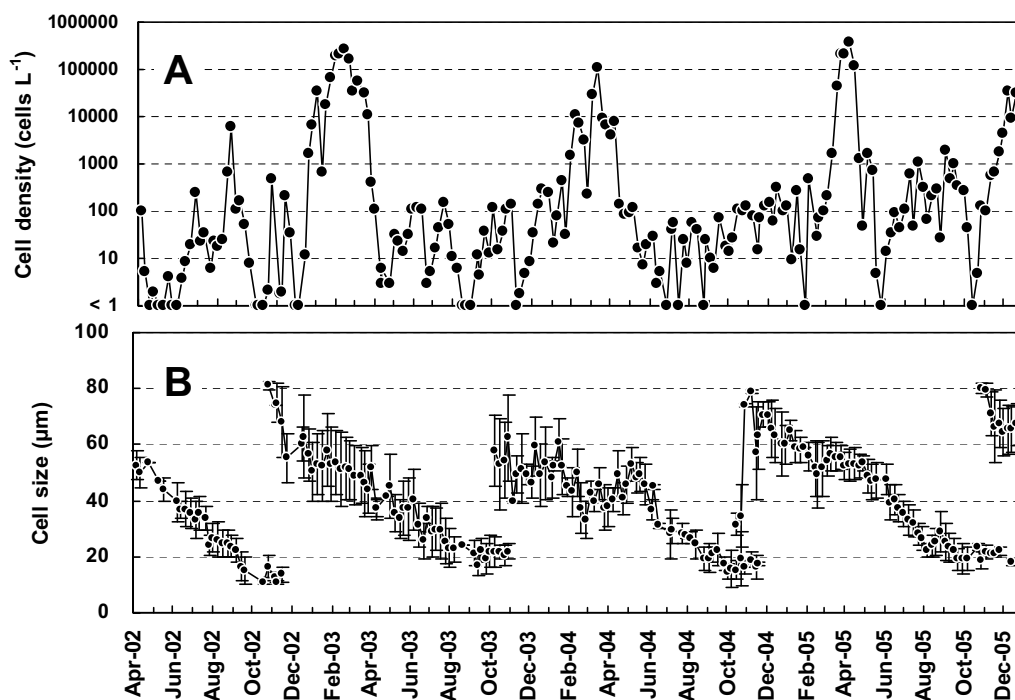


Fig. 4-2. Seasonal changes in cell density (A) and cell size (B) of *Eucampia zodiacus* at Stn. Futami from April 2002 to December 2005.



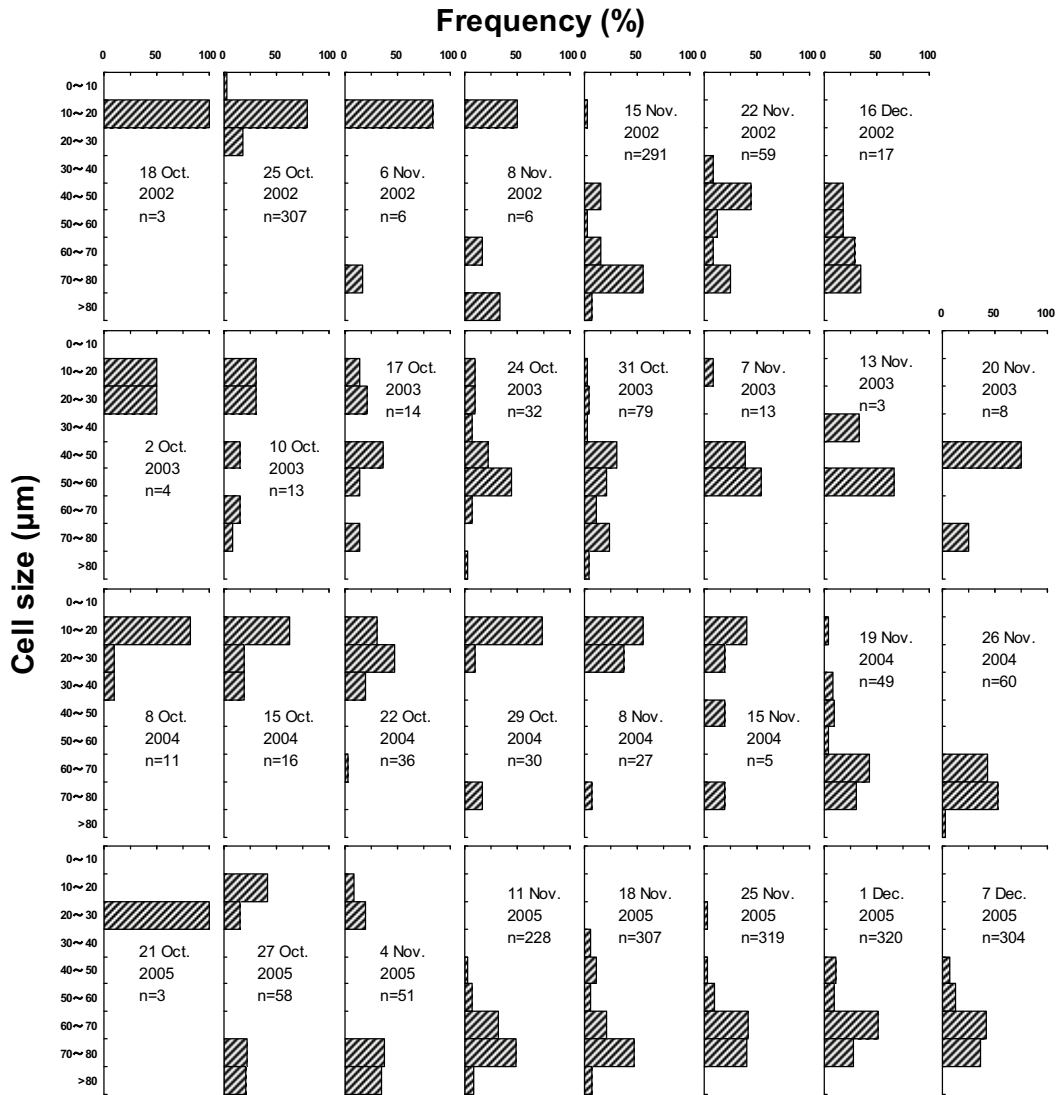


Fig. 4-3. Changes in cell size frequency distribution of *Eucampia zodiacus* at Stn. Futami during the period from October to December of each year (2002-2005).

9月) ~33.26 (2004年2月) の範囲で変動した。また無機態栄養塩濃度は、DIN濃度が1.0~21.2 μM, PO<sub>4</sub>-Pが0.15~1.48 μM, SiO<sub>2</sub>-Siが1.1~32.5 μMの範囲でそれぞれ変動し、毎年ほぼ同様の季節的変動を示した。*E. zodiacus* 大量発生期の無機態栄養塩は、DIN濃度が2.5~4.9 μM, PO<sub>4</sub>-P濃度が0.15~0.31 μM, SiO<sub>2</sub>-Si濃度が1.1~7.9 μMの範囲で変動し、4年間とも一年のうち比較的栄養塩濃度が低い時期であった。

H1 および H28 定点における *E. zodiacus* の細胞密度

と細胞サイズの変化を、Fig. 4-5 および 4-6 に示す。*E. zodiacus* の大量発生は1月上旬~4月上旬にかけて認められた。また、*E. zodiacus* は鉛直的には水柱内において表層~底層にかけて全層に分布し、底層ほど細胞密度が高くなる傾向が見られた。細胞密度と細胞サイズの季節変動については、二見定点で得られた結果とほぼ同様であった。すなわち、栄養細胞の出現はほぼ周年観察することができ、細胞密度は5~12月にかけて低く、1~4月の間に高くなる傾向が明らかである。

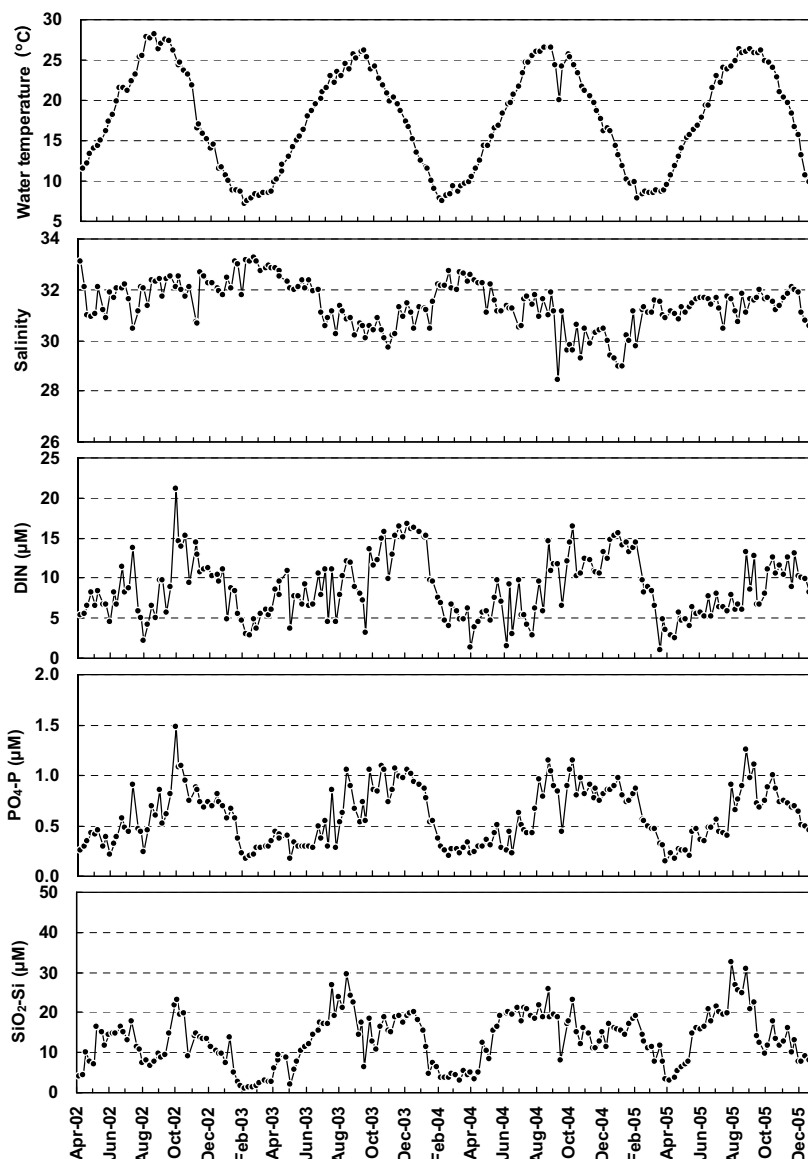


Fig. 4-4. Seasonal changes in water temperature, salinity, DIN, PO<sub>4</sub>-P and SiO<sub>2</sub>-Si at Stn. Futami from April 2002 to December 2005.

また、細胞サイズは年に1回、秋季に最小サイズに達した直後、最大値まで回復した。さらに、沿岸寄りに設けた H28 定点の方が、沖合に設定した H1 定点に比べて全般に *E. zodiacus* の細胞密度が高い傾向がうかがわれた。

H1 および H28 定点における水温、塩分、無機態栄養塩濃度の変化を Fig. 4-7 および 4-8 に示す。水温の変動は毎年同じような季節変動を示し、2月に約 8°C

まで低下した後、夏季にかけて上昇し、8月または9月の表層で 26~28°C に達した。表層と底層の温度差から判断して (Itakura et al. 2002), 9月から翌年の3月まで間が鉛直混合期であった。*E. zodiacus* 大量発生期の水温は 7.5~11.0°C, 塩分は 26.14~33.46 の範囲であった。表層における塩分の低下は、加古川からの河川水流入によるものであると判断されたが、*E. zodiacus* の大量発生と明瞭な関係は見出されなかった。4年間

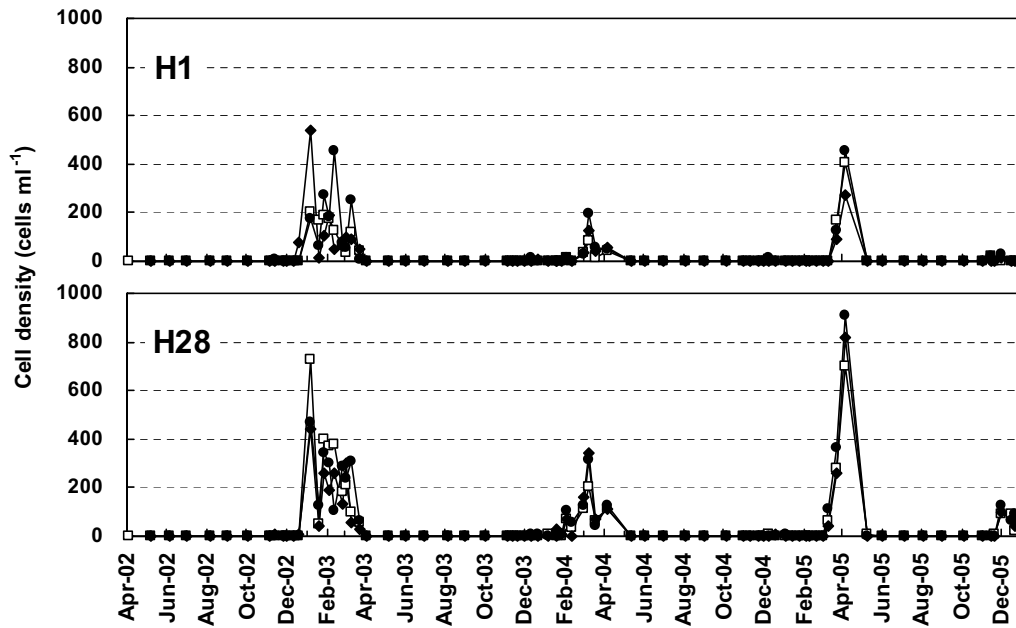


Fig. 4-5. Seasonal changes in cell density of *Eucampia zodiacus* in each depth layer at Stns. H1 and H28 from April 2002 to December 2005. Surface (□); middle layer (◆); 1 m above the bottom (●).

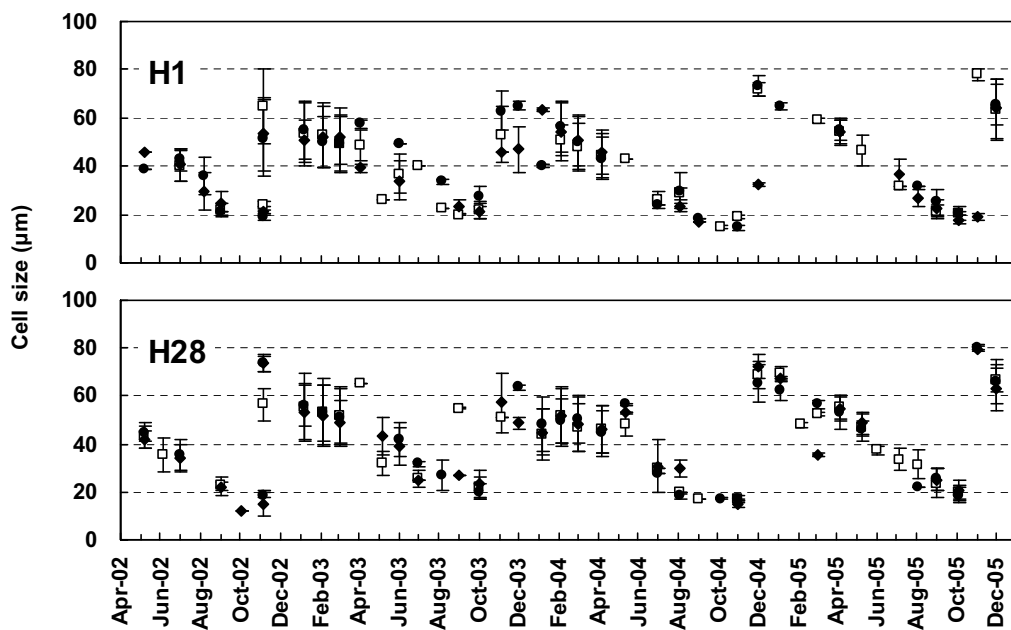


Fig. 4-6. Seasonal changes in cell size of *Eucampia zodiacus* in each depth layer at Stns. H1 and H28 from April 2002 to December 2005. Surface (□); middle layer (◆); 1 m above the bottom (●).

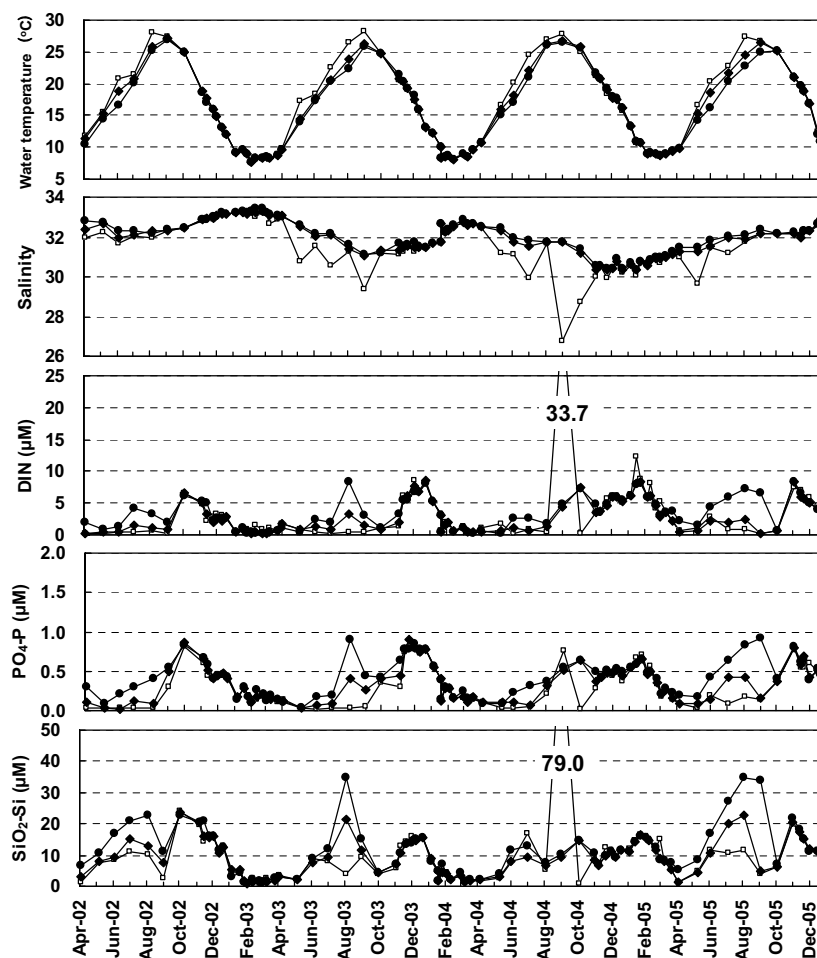


Fig. 4-7. Seasonal changes in water temperature, salinity, DIN,  $\text{PO}_4\text{-P}$  and  $\text{SiO}_2\text{-Si}$  in each depth layer at Stn. H1 from April 2002 to December 2005. Surface ( $\square$ ); middle layer ( $\blacklozenge$ ); 1 m above the bottom ( $\bullet$ ).

の調査期間中、DIN、 $\text{PO}_4\text{-P}$  および  $\text{SiO}_2\text{-Si}$  濃度はそれぞれ  $0.1\sim 34.9$ 、 $0.02\sim 1.91$  および  $0.7\sim 85.3 \mu\text{M}$  の範囲で変動した。無機態栄養塩の濃度はいずれも夏季の底層で高く、秋季の鉛直混合の始まりとともに表層～底層にかけて濃度差がなくなり、翌年の春季にかけて減少した。特に *E. zodiacus* の大量発生期は、全ての年で無機態栄養塩が低濃度の状態が継続した。

#### 考 察

4年間の調査期間を通して、*E. zodiacus* の栄養細胞密度は毎年同様の変動パターンを示し、大量発生は年

に1回、1～4月の間に見られた。この間、*E. zodiacus* は植物プランクトンの大部分を占める優占種であり (Fig. 2-13)、無機態栄養塩濃度は *E. zodiacus* 細胞密度の増加とともに低下し、大量発生期間中、低濃度の状態が継続した (Figs. 4-4, 4-7, 4-8)。 *E. zodiacus* は大量発生期に栄養細胞が表層～底層にかけて全体的に分布し、底層ほど密度が高くなる傾向が認められた (Fig. 4-5)。同様の傾向は同じノリの色落ち原因藻である *C. wailesii* でも報告されている (長井 2000)。 *C. wailesii* は他の珪藻に比べて細胞のサイズが大きく、沈降速度も大きい (小野ほか 2006)。一方、*E. zodiacus* は活発な増殖期に長い螺旋状の群体を形成し、*C. wailesii* よ

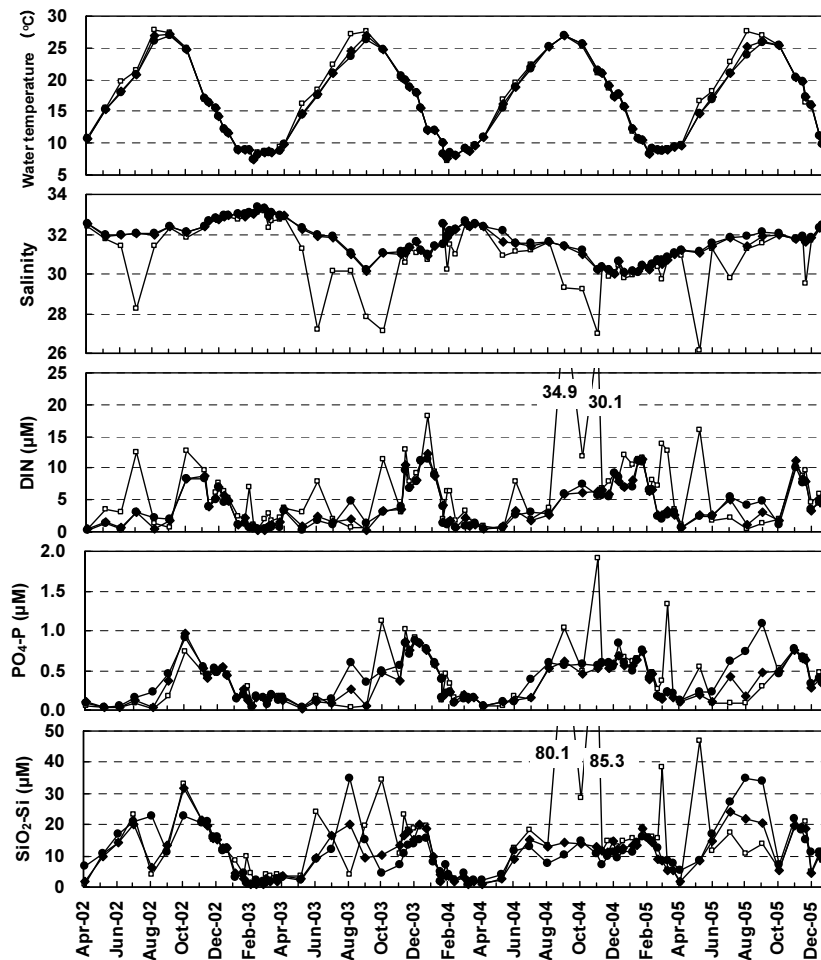


Fig. 4-8. Seasonal changes in water temperature, salinity, DIN,  $\text{PO}_4\text{-P}$  and  $\text{SiO}_2\text{-Si}$  in each depth layer at Stn. H28 from April 2002 to December 2005. Surface ( $\square$ ); middle layer ( $\blacklozenge$ ); 1 m above the bottom ( $\bullet$ ).

り細胞サイズが小さいものの、播磨灘で優占する *Skeletonema* や *Chaetoceros* 等他の珪藻との比較では細胞サイズが大きく、沈降速度も大きい(小野ほか 2006)。これらのことから、*E. zodiacus* は *C. wailesii* 同様、有光層に留まって大量発生するためには水柱内の鉛直混合が必要であると考えられる。

植物プランクトンは、季節的な変動など海洋環境の様々な変化に適応した種特有の生活環を持ち、特に瀬戸内海のような浅海域に生息する有害・有毒鞭毛藻や珪藻の多くは、その生活史の中に耐久性のあるシストや休眠期細胞を形成することが知られている (Hargraves and French 1983; 今井・伊藤 1986; Imai

1989; Kuwata and Takahashi 1990; 板倉ほか 1992; 吉松 1992; Imai et al. 1993; 長井ほか 1995; 板倉 2000)。シストや休眠期細胞の形成は、植物プランクトンが栄養細胞による増殖に不適な環境条件を乗り切るための生残戦略と見なされ、生態学的にも重要な役割を果たしていると考えられている (Imai et al. 1991; 板倉 2000)。播磨灘で優占する主要な珪藻では、*S. costatum* (今井ほか 1990; 板倉ほか 1992) をはじめ、*Chaetoceros didymus* var. *protuberans* (板倉ほか 1993)、*Chaetoceros pseudocurvisetus* (Kuwata et al. 1993; Oku and Kamatani 1999)、*Leptocylindrus danicus* (French and Hargraves 1986; Ishizaka et al. 1987)、*C. wailesii* (長井ほか 1995;



Nagai and Imai 1999)などで休眠期細胞の形成が報告されている。また瀬戸内海では、終点希釈法 (Imai et al. 1984) によって海底泥中における珪藻の休眠期細胞分布密度が調べられている (今井ほか 1990; Itakura et al. 1997; 板倉・山口 2007)。その結果、播磨灘北部沿岸域の海底泥中 (底泥表面から 1 cm) には *Skeletonema* spp., *Chaetoceros* spp., *Thalassiosira* spp. 等の休眠期細胞が多いところで  $10^5$  cells MPN  $\text{cm}^{-3}$  wet sediment のオーダーで検出され、本海域の海底泥中には珪藻の休眠期細胞が高密度で分布していることが明らかとなっている (今井ほか 1990; 板倉・山口 2007)。また、これら珪藻の海底泥中の休眠期細胞分布密度は、海水中の栄養細胞の挙動ともよく一致することが指摘されている (Itakura et al. 1997; 板倉・山口 2007)。さらに、長井ほか (1995) は *C. wailesii* の休眠細胞を探索し、播磨灘の海底泥中から初めてこれを発見している。このように、現場海域では珪藻の休眠期細胞に関する調査が精力的に実施されている (今井ほか 1990; Itakura et al. 1997; 板倉・山口 2007)。それにも関わらず、現時点では *E. zodiacus* の休眠期細胞は未だ発見されていない。一方、本研究から播磨灘ではほぼ周年を通して *E. zodiacus* の栄養細胞が観察され、本種の細胞サイズの減少と回復には周期性と連続性が見られた (Figs. 4-2, 4-5, 4-6)。これらのことから、*E. zodiacus* は休眠期細胞を形成しない、または少なくとも播磨灘の海洋環境下では休眠期細胞の形成期間が他種に比べて非常に短い種であることが示唆された。

近年、Ishikawa et al. (2007) は現場海域において植物プランクトン休眠期細胞の発芽動態を直接捉えることが可能な “Plankton emergence trap/chamber” (以下 PET チャンバー) を開発し、三重県南部に位置する英虞湾において、PET チャンバーを使った珪藻休眠期細胞の発芽挙動を調べている。その結果、*Chaetoceros* 属を中心に浮遊性中心目珪藻 15 属 25 種の出現が確認され (石川・石井 2007)、海底泥上から *E. zodiacus* も捕捉されている (石井私信)。今後はこうした新たな

調査手法によって、*E. zodiacus* の休眠期細胞の探索等、現場海域における *E. zodiacus* についてのより詳細な挙動が解明されるものと期待される。

*E. zodiacus* の大量発生による養殖ノリの色落ちが、他の珪藻種による被害に比べてより深刻で長期化する要因として、本調査から明らかとなった *E. zodiacus* の生理生態学的特性が密接に関わっていることが考えられた。上述のとおり播磨灘において優占する主要な珪藻は、そのほとんどが休眠期細胞を形成する。これらの種は、海域の栄養塩濃度が低下すると休眠期細胞を形成し、水柱からは消失していく。したがって、例えば *C. wailesii* が大量発生した場合、本種は一細胞あたりの栄養塩取り込み速度が大きいため (Table 3-4, 3-5)、一時的には海域の栄養塩濃度が大きく低下するものの、色落ち被害は *E. zodiacus* に比べて長期化、深刻化することはない。これは、本種の一細胞あたりの栄養塩要求量が大きく、海域の栄養塩濃度の低下とともに他の珪藻よりも比較的早い段階で休眠細胞を形成するためであると考えられる。これに対して、*E. zodiacus* は低栄養塩環境下でも休眠期細胞を形成せず、栄養細胞のまま生残していることが示唆された。また、第三章の培養実験から本種は高い増殖速度を有し、最小細胞内栄養塩含量が低く、低温下での窒素の取り込み能も優れていることが明らかとなった。このような特性から、*E. zodiacus* は海域の栄養塩が枯渇するまで増殖を繰り返し、栄養塩濃度が著しく低下した海域でも他の植物プランクトン種に比べて長期間栄養細胞として生残し、降雨によって河川から栄養塩が補給されれば、他の珪藻やノリよりも素早くその栄養塩を取り込むことによって個体群の維持を図ることが可能と考えられた。すなわち、近年の播磨灘では *E. zodiacus* が大量発生した海域において、本種の栄養細胞が存在する限り栄養塩濃度が上昇に転じる可能性は低く、その結果、甚大な色落ち被害が発生すると想定された。

第三章では、*E. zodiacus* および *C. wailesii* の増殖に及ぼす光強度、温度、栄養塩濃度等、環境諸要因の影

響を培養実験から明らかにした。その結果、これらノリの色落ち原因藻の増殖生理学的特性と、その増殖に影響を及ぼすと考えられる現場海域の環境諸要因の変動から、一年の中でも秋季(10~11月)がこれら珪藻の増殖にとって最も適した時期であることを示した。しかし *E. zodiacus* は、いずれの年においても秋季にブルームを形成することはなかった(Figs. 4-2, 4-5)。これに対して *C. wailesii* は、播磨灘において秋季に細胞密度が最大となり(長井 2000)、培養実験から得られた至適増殖条件と現場海域における細胞密度の増大時期が良く一致する。ノリの色落ち原因珪藻におけるこのような出現特性の違いは、両種的生活環の差によって生じていることが可能性として考えられた。すなわち、*C. wailesii* は成層期に休眠細胞を形成することによって海底泥中で生残り、鉛直混合の始まりとともに栄養細胞へと復活し、二分裂による活発な増殖を行う(Nagai et al.1996)。それに対して *E. zodiacus* は、播磨灘において休眠期細胞を形成せず、周年栄養細胞のまま生残していると推察される。そして、周期的に細胞サイズの減少と回復を繰り返しながら、年に1回、秋季の至適増殖環境下において最小サイズ近くに達した個体群が細胞サイズを回復する。つまり *E. zodiacus* は、秋季に二分裂による活発な増殖を行うのではなく、最小サイズ近くまで減少した細胞サイズの回復を図っていることが示唆された。すなわち本種は、秋季に細胞サイズを回復させ、その後サイズを回復した個体群が増殖を繰り返すために、秋季ではなくノリ漁期後半である1~4月にかけてブルームを形成していることが考えられた。

本研究における *E. zodiacus* の観察では、現場海域における本種の増大胞子形成を確認することができなかった。したがって、本種の細胞サイズ回復がどのような過程を経て行われるのか、また現場海域では、どのようなトリガーによってサイズ回復が誘因されるのか、明らかにすることは出来なかった。珪藻は有性生殖を伴う増大胞子の形成、または栄養的な増大(無

性的増大)によって細胞のサイズを回復させることが *S. costatum* (右田 1967; Gallagher1983), *L. danicus* (French and Hargraves 1986), *C. wailesii* (長井・眞鍋 1994; Nagai et al. 1995; Nagai and Imai 1997) など播磨灘における主要な珪藻から報告されている。この点については、今後培養条件下での *E. zodiacus* の詳細な観察等を通して解明する必要がある。

## 第2節 生態学的特性を利用した発生予察

有害藻による漁業被害防止対策は、発生予察技術と被害防除技術に大別される(Honjo 1994)。発生予察には長期、中期および短期予察技術があり、被害防除には対症療法的技術と根本治療技術がある(本城 2000)。瀬戸内海と並んでノリの一大生産地である有明海では、珪藻の大量発生によって栄養塩が低下したノリ漁場に硫酸などの窒素肥料を人為的に添加(施肥)し、養殖ノリの色落ち防止を図っている。本方法は、栄養塩濃度の低下したノリ漁場において降雨等により河川から再び栄養塩が供給されるまでの間、栄養塩濃度を一定レベル以上に保つのが目的である(川村 2006)。本方法では、海域全体の栄養塩レベルを上昇させ、それを維持する必要があることから、潮流が緩やかで、水深が浅い海域で実施される。したがって、水深の浅い海域において支柱式のノリ養殖が主流である有明海では、本方法が有効な色落ち対策となっている。これに対して、播磨灘では海岸線のほとんどが埋め立てられ、有明海に比べて水深の大きい海域において、浮き流し式によるノリ養殖が行われている。特に、当海域の主要なノリ漁場は、潮流の速い明石海峡周辺海域であることから、本海域では施肥によるノリ漁場の栄養塩濃度の維持、上昇の効果は期待できないであろう(反田私信)。以上のことから、播磨灘における色落ち被害対策としては、まず原因珪藻の発生予察技術を確立することが急務である。

有害赤潮藻に対する発生予察手法は、各海域の環境

特性を考慮した様々な試みが検討されており、例えば三重県五ヶ所湾では、冬季の平均水温と *Karenia mikimotoi* の栄養細胞がその後  $1 \text{ cell ml}^{-1}$  に達するまでの期間に高い相関関係があることを利用した長期予察技術が確立されている (Honjo et al. 1991)。また、播磨灘におけるノリ色落ち原因藻対策としては、長井 (2000) が *C. wailesii* 秋季発生量を予察する手法を確立している。しかしながら当海域において現在、ノリの色落ち原因藻として最も問題視されている *E. zodiacus* を対象とした予察手法は皆無である。本章第1節では、*E. zodiacus* の周年を通じた生活環を明らかにし、本種が播磨灘に出現する他の主要な珪藻と比較して、特徴的な生態学的特性を有していることを示した。本節では、前節で得られた本種の生態学的特性を利用し、播磨灘における *E. zodiacus* の発生予察の可能性について検討を試みた。

調査を継続し、*E. zodiacus* の細胞サイズを測定した。調査は、2006年1月～3月までの間は原則として週に1回、それ以降は1～9月および12月は月に1回、10～11月は月3回の頻度で実施した。サンプルの採集および計測は、本章第1節で実施した方法に準じた。また、兵庫県水産技術センターが毎年度11～3月に、播磨灘北部12定点において月3回の頻度で実施している珪藻赤潮調査結果 (珪藻赤潮情報等: [http://www.hyogo-suigi.jp/ka/ka\\_top.htm](http://www.hyogo-suigi.jp/ka/ka_top.htm)) から、年毎に播磨灘において *E. zodiacus* の出現がピークに達した時期を調べた。細胞密度のデータからピークに達した時期の判断が難しい場合は、無機態窒素 (DIN) 濃度の値も併せて参照し、細胞密度が高い期間のうち、DIN濃度が低下しほぼ枯渇した状態のまま横ばいで推移し始めた時期を、その年の *E. zodiacus* の出現がピークに達した時期と判断した。

## 方 法

2002年4月～2005年12月までは、本章第1節で実施した調査によって得た *E. zodiacus* 細胞サイズの測定値を解析に用いた。2006年1月以降は、兵庫県水産技術センター地先に設けた二見定点 (Fig. 4-1) における

## 結 果

*E. zodiacus* 細胞サイズ (頂軸長) の平均値は、2006年以降も周期的に減少と回復を繰り返し、細胞サイズの回復は、7年間の調査期間を通していずれも秋季に観察された (Fig. 4-9)。 *E. zodiacus* の秋季個体群は、

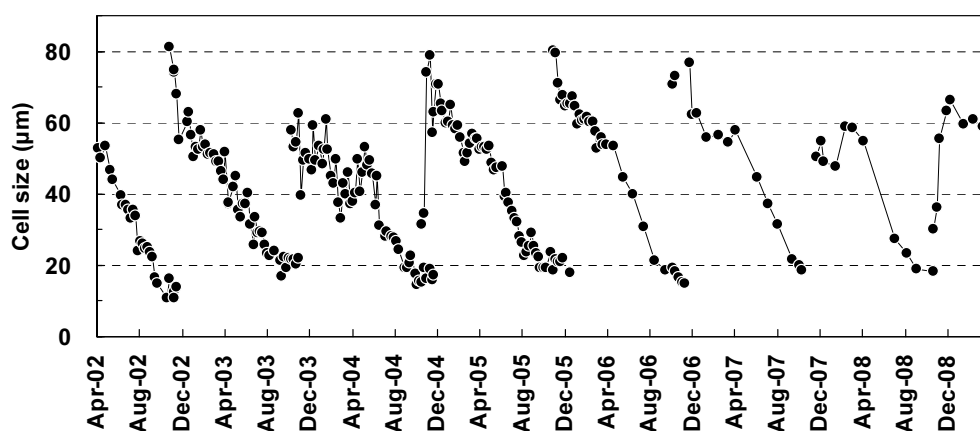


Fig. 4-9. Seasonal changes in cell size of *Eucampia zodiacus* at Stn. Futami from April 2002 to March 2009.

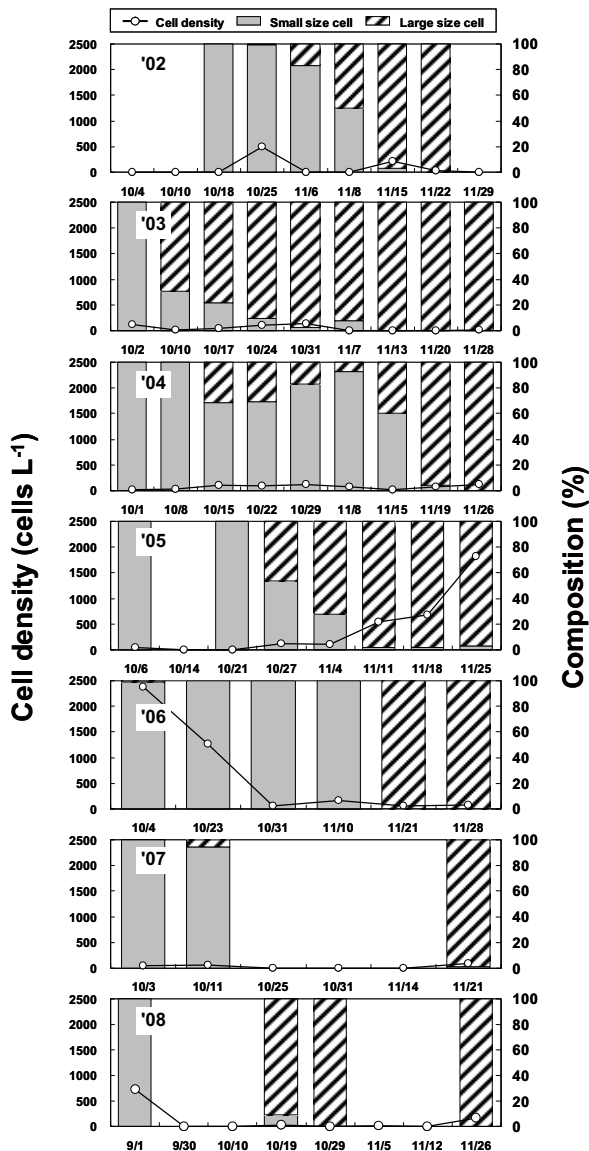


Fig. 4-10. Changes in cell density and ratio of small size and size restored large cells of *Eucampia zodiacus* from October to November in each year (2002-2008).

細胞サイズを回復した細胞が出現し始めてから約 10～30 日後に全ての出現個体群が細胞のサイズを回復した (Fig. 4-10)。年毎に細胞サイズを回復した細胞の割合が全体の 50%に達したと推定される日を求めた結果、最も早かったのが 2008 年度漁期の 9 月 29 日、最も遅い時期が 2006 年度漁期の 11 月 16 日であった (Table 4-1, Fig. 4-10)。また、細胞サイズ回復期の平均

細胞密度および珪藻赤潮調査結果から各年の *E. zodiacus* 細胞密度がピークに達した時期をそれぞれ求め、Table 4-1 に示した。さらに、細胞サイズを回復した細胞が全体の 50%に達したと推定される日を起点として、その日からその年度のノリ漁期において *E. zodiacus* の細胞密度がピークに達した時期までの積算日数を求めた (Table 4-1)。その結果、細胞サイズ回復期の平均細胞密度 (X; cell L<sup>-1</sup>) と、*E. zodiacus* の細胞密度がピークに達するまでに要した積算日数 (Y) の関係を検討したところ、両者には以下に示す負の相関が見られた (Fig. 4-11)。

$$Y = -0.117X + 143.7 \quad (r^2=0.73)$$

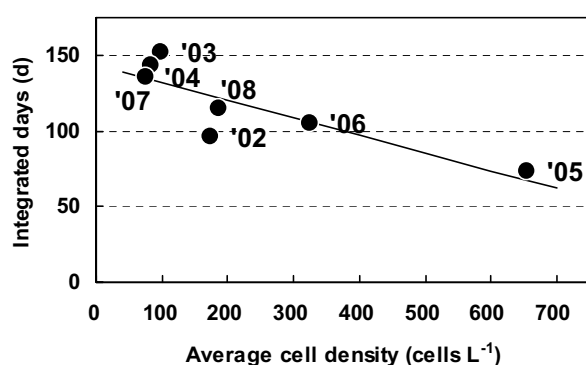
すなわち、秋季の細胞サイズ回復期に *E. zodiacus* の細胞密度が高い年は、サイズ回復後本種がブルームを形成するまでに要する日数が短かった。

## 考 察

播磨灘では、養殖ノリに色落ち被害を引き起こす有害珪藻の発生予察として、*C. walesii* の秋季発生量を予察する手法が確立されている (長井 2000)。本種は、増殖に不適な 4～8 月を海底泥中で休眠細胞として生残し、鉛直混合の始まる 9 月以降、栄養細胞となって増殖する (Nagai et al. 1996)。長井 (2000) は、培養条件下において *C. walesii* の休眠細胞の生残率が水温の上昇と共に低下することに注目し、播磨灘 19 定点における 3～8 月の 3 層平均水温の積算値と 9～11 月の *C. walesii* 細胞密度の積算値に負の相関があることを見出した。また、この両者の関係から成層期の水温をモニターすることによって、*C. walesii* 秋季発生量を予察できることを示した。一方、*E. zodiacus* は *C. walesii* とは異なった生活環を持つことを前節で示した。すなわち *E. zodiacus* は、播磨灘において周年栄養細胞が観察されること、細胞サイズの減少と回復に連

**Table 4-1.** Parameters to predict the time when *Eucampia zodiacus* blooms reached the peak in each year (2002-2008). Average cell densities were the mean values during the period from first detection of size restored large cells to all the cells became large size in each year. Total of days from restoration of cell size to the peak of *E. zodiacus* blooms were defined the integrated day. The starting point of integrated day was the day assumed small size cell: size restored large cell = 1: 1.

Fiscal year	Average cell density (cells L <sup>-1</sup> )	Cell size (Small: Large = 1:1)	Peak of bloom	Integrated day (d)
2002	174.7	8 Oct. 2002	14 Feb. 2003	96
2003	97.9	10 Oct. 2003	11 Mar. 2004	152
2004	81.8	15 Nov. 2004	7 Apr. 2005	143
2005	654.3	30 Oct. 2005	11 Jan. 2006	73
2006	324.0	16 Nov. 2006	1st Mar. 2007	105
2007	75.6	31 Oct. 2007	15 Mar. 2008	136
2008	187.4	29 Sep. 2008	22 Jan. 2009	115



**Fig. 4-11.** Relationship between average cell densities of *Eucampia zodiacus* and integrated day during the period from restoration of cell size to the peak of blooms in each year (2002-2008). Average cell densities were the mean values during the period from first detection of size restored large cells to all the cells became large size in each year. The starting point of integrated day was the day assumed small size cell: size restored large cell = 1: 1.

続性と周期性が見られることから、本種は播磨灘において休眠期細胞を形成しない、または他種に比べて休眠期細胞を形成する期間が極めて短い種であることが考えられた。そして、*E. zodiacus* の細胞サイズは調査を実施した7年間を通して、毎年1回、秋季にサイズ回復が見られ (Fig. 4-9)、サイズ回復期の平均細胞密度が高い年は、その後本種のブルームがピークに達するまでに要する日数の短いことが明らかとなった (Fig. 4-10)。そこで *E. zodiacus* の発生予察を考える場

合は、秋季に細胞サイズを回復させた個体群を、翌年1~4月にブルームを形成する個体群の“seed population”と見なし、秋季の平均細胞密度と細胞サイズ回復時期を把握することによって、当該年度のノリ漁期における *E. zodiacus* 発生時期を予察することが可能ではないかという仮説を設定した。

本章第1節では、近年、播磨灘において深刻な色落ち被害が長期間継続するようになった要因として、*E. zodiacus* の増殖生理学的特性に加え、本種の生態学的特性が密接に関わっていることを指摘した。すなわち、播磨灘で優占する主要な珪藻が休眠期細胞を形成するのに対し、本種は休眠期細胞を形成せず、栄養細胞のまま長期間生残していることが考えられた。そのため、低栄養塩環境下では他の主要な珪藻の多くが休眠期細胞を形成し、水柱内から消失することから、結果的に *E. zodiacus* が単独で優占しやすい状況が生じると想定される。一方、本種の細胞密度が減少する要因としては、海域環境の鉛直混合期から成層期への移行、または鉛直混合期においても海域の栄養塩濃度がほぼ枯渇し、その状態が長期間継続することが必要であろう。したがって、*E. zodiacus* の細胞密度がピークを示し、それが減少に転じる時期は、ノリ漁場の栄養塩もほぼ枯渇し、養殖ノリに色落ちが発生する時期とほぼ一致すると見なすことができる。このことから、*E.*



*zodiacus* のブルームのピークを予察することは即ち、養殖ノリの色落ち発生時期を予察することに繋がると考えられる。

近年、播磨灘ではほぼ毎年、珪藻の大量発生により養殖ノリに色落ち被害が発生し、ある程度色落ち被害が発生することを前提にノリ養殖を行っていかねばならない状況となっている（原田ほか 2009）。播磨灘において、*E. zodiacus* ブルームのピークはノリ漁期後期である 1~4 月に認められる（Figs. 4-2, 4-5）。兵庫県の主要なノリ漁場では、ノリ養殖（本張り）は 11 月下旬頃から前期生産が始まり、1 月下旬~2 月上旬に一度ノリ網を張り替えて後期生産を行うため（川村 2005）、*E. zodiacus* の出現のピークはノリ網の張替時期、または後期生産開始直後と重なることが多い。本予察手法では、10~11 月の観測値を用い、12 月にはノリ漁期のいつ頃、*E. zodiacus* による色落ちが発生するのかを予察することが可能である。これは予察技術の中では、長期または中期予察技術に該当し、本手法による色落ち発生時期に関する情報は、ノリの刈り取りのタイミングや回数の調整、ノリ網の張り替え時期の判断材料として活用できると考えられる。すなわち本予察手法は、色落ち被害を最小限に抑えるため、色落ち被害が発生する状況下において生産に係るコストを最小限に抑えるための有用な対策の一つになり得るであろう。今後は、本予察に必要な *E. zodiacus* のデータ収集に関して単純化と簡便化を図ると同時に、予察精度の向上を図り、各地先におけるノリ漁場の海域特性も考慮したよりきめ細かな被害軽減対策を検討していく必要がある。

## 第 V 章 総括

兵庫県の瀬戸内海海域では、ノリ養殖が盛んに行われており、漁業生産量の約半分、生産金額では約 4 割を占める重要な漁業種類となっている（近畿農政局兵庫農政事務所 2009）。一方で、兵庫県の主要なノリ漁

場である播磨灘においては、1980 年代後半頃からノリ養殖漁期に珪藻が大量発生するようになった。珪藻が大量発生した海域では多量の栄養塩が消費され、ノリの生育に必要な栄養塩が不足し、養殖ノリに色落ち被害が発生する。

色落ち被害が発生し始めた当初、その原因藻は *Coscinodiscus wailesii* であった。1990 年代後半になると、*C. wailesii* に加え、*Eucampia zodiacus* がほぼ毎年大量発生するようになり、深刻な色落ち被害が頻発するようになった。*E. zodiacus* は、以前から瀬戸内海東部海域において出現は観察されていたが、過去に漁業被害を発生させた事例はなかった。そのため、本種は有害種とは見なされておらず、主要な研究対象種ではなかったことから、本種に関する知見は極めて少ない。

以上のような背景から、本研究ではノリの色落ち原因藻として現在最も問題視されている *E. zodiacus* を対象に、本種が近年になってなぜ毎年大量発生するようになったのか、また本種が大量発生した場合なぜ甚大な色落ち被害が発生するのか、そのメカニズムを解明し、本種によるノリの色落ち被害軽減に向けた基礎資料を得ることを目的とした。本研究ではまず、播磨灘における *E. zodiacus* をはじめとする植物プランクトンと、海域環境の長期変動について調べた。また室内培養実験から、*E. zodiacus* の増殖に及ぼす環境諸要因の影響を明らかにした。さらに、播磨灘における *E. zodiacus* の周年を通じた生活環を明らかにし、本種の生態学的特性を利用した発生予察の可能性について検討した。本研究によって得られた成果の概要を以下に要約する。

1. 播磨灘に設けた 19 定点において、1973 年 4 月~2007 年 12 月までの 35 年間、毎月 1 回、月の月上旬に計 417 回の海洋観測調査を実施した。本研究では、水温、塩分、栄養塩濃度および植物プランクトンのデータについて、19 定点の月または年平均値を求め、その値を用いて長期変動の解析を試みた。その結果、各水質の調査項目において、冬季最低水温に有意な上昇と、DIN

濃度に有意な低下が検出された (Fig. 5-1)。

2. 播磨灘における植物プランクトンの細胞密度は、1970年代～1980年代前半に高く、1980年代前半に大きく減少し、以降はほぼ横ばいで推移した。1980年代前半までは、ラフィド藻の占める割合が全体の20%前後に達する年も見られたが、構成種の大部分は珪藻であった。また、珪藻の種組成にも劇的な変化が見られた。すなわち、1970年代～1980年代前半は、富栄養化した海域の代表的な指標種である *Skeletonema* spp. が大部分を占めていたが、1980年代半ば以降は *Chaetoceros* spp.をはじめ他種の占める割合が増大した (Fig. 5-1)。このような珪藻の細胞密度や種組成の変動は、DIN濃度の低下が密接に関係していることが考えられ、優占種の *Skeletonema* spp. から *Chaetoceros* spp. への変化も、生活史特性を含めた両種の栄養塩に対する応答の差によるものと考えられた。

3. 播磨灘における *E. zodiacus* 細胞密度の長期変動は、他の植物プランクトンとは異なった傾向を示した。

すなわち、*Skeletonema* spp. に代表される他の多くの種では経年的に細胞密度が減少する傾向にあるのに対し、本種は1990年代半ば以降から出現密度が増大している。また本種は、季節的には1～4月の低水温期に細胞密度が増大し、1990年代半ば以降、例年1～4月に出現する構成プランクトン種の大部分を占め、優占種となる頻度が高くなった。これらのことから、水温の上昇、栄養塩レベルの低下といった播磨灘の海域環境の変化が、*E. zodiacus* の増殖にとって有利に作用していることが示唆された (Fig. 5-1)。

4. 培養実験を基本に、*E. zodiacus* の増殖に及ぼす光強度の影響を、6段階(8～25℃)の温度条件下で調べた。各増殖パラメータ値(最大増殖速度、半飽和定数および光強度の閾値)は、いずれも温度の上昇とともに増大した。得られた増殖パラメータをもとに、現場海域における *E. zodiacus* の増殖可能水深 ( $D_l$ )、および0.5 divisions  $d^{-1}$  の増殖速度を与える水深 ( $D_{0.5}$ ) を推算し、これらの値が本種のブルーム形成期に上昇する

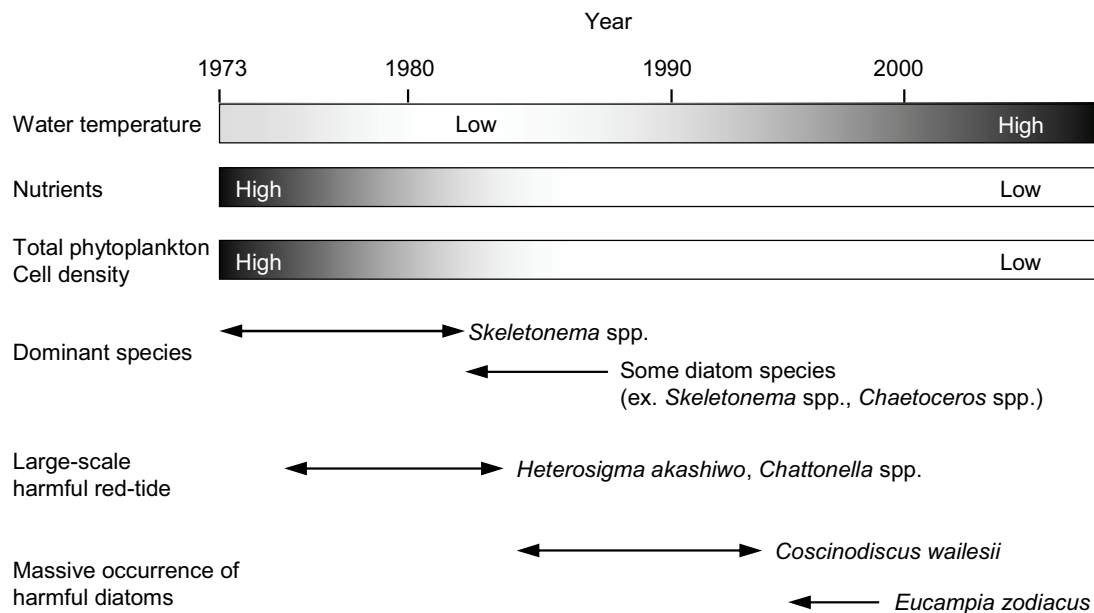


Fig. 5-1. A schematic representation of long-term changes in water quality and phytoplankton assemblage in Harima-Nada, the Seto Inland Sea.

ことを示した。このことから、表層～底層にかけて分布する本種にとって、水柱内で増殖水深が鉛直的に拡大することは、本種が大量発生するために重要な要因の一つであることが示唆された。

5. *E. zodiacus* の増殖に及ぼす水温と塩分の影響を調べるため、それら 2 要因（水温 5～30℃の範囲で 7 段階、塩分 10～30 の範囲で 6 段階）を組合せた全ての条件下で培養実験を実施した。本種は、温度 7℃以上で増殖し、広範な温度と塩分条件下で増殖が可能であった。最大増殖速度は、温度 25℃と塩分 25 の条件の組合せで 3.0 divisions d<sup>-1</sup> と見積もられ、*Skeletonema* や *Chaetoceros* と並んで植物プランクトンの中でも高い増殖速度を有することが明らかとなった。一方、本種が現場海域においてブルームを形成する時期（1～4 月の低水温期）の現場水温は 10℃前後であり、本種の最大増殖速度は至適増殖温度条件下（20～25℃）の値の約 1/3 まで低下していることから、本種は現場海域において自身に好適とは言い難い環境下でブルームを形成していることが判明した。また *E. zodiacus* は、低温条件下において増殖耐性を有しているとは考えにくいことから、播磨灘における長期的な低水温期の水温上昇は、近年本種が大量発生するようになった重要な環境変動であると思われる。

6. *E. zodiacus* の増殖に及ぼす栄養塩（窒素、リン、珪素）濃度の影響を検討した。各栄養塩濃度と増殖速度の関係は、Monod の式で表すことができた。*E. zodiacus* の K<sub>s</sub> 値（最大増殖速度の 1/2 を与える栄養塩濃度）と播磨灘における各栄養塩濃度の月平均値とを比較した結果、DIN と珪酸に対しては周年を通して K<sub>s</sub> 値の方が栄養塩の月平均値を下回った。このことから、現場海域における平均的な栄養塩レベルでは、*E. zodiacus* の増殖に殆ど影響を及ぼさないことが示唆された。

7. *E. zodiacus* の最小細胞内栄養塩含量は、9 および 20℃下において窒素が 1.6 および 1.0 pmol cell<sup>-1</sup>、リンが 0.24 および 0.16 pmol cell<sup>-1</sup>、珪素が 3.8 および 2.6

pmol cell<sup>-1</sup> であった。この値は、*E. zodiacus* の細胞サイズを考慮すると、他の HAB 種と比較してかなり低いことが明らかとなった。また、最小細胞内含量から求めた細胞内 N/P 比は、他の HAB 種が Redfield 比（N/P = 16）に比較的近い 11～15 の範囲であるのに対し、*E. zodiacus* は 9 および 20℃下でそれぞれ 6.7 および 6.3 という値であった。近年の播磨灘における栄養塩レベルでは、DIN 濃度の低下によって他の植物プランクトンは窒素制限状態になっていることから、*E. zodiacus* は現在の海洋環境において増殖生理学的に有利と推察された。

8. *E. zodiacus* の無菌株を用いて各種形態別窒素、リンの利用能を検討した。*E. zodiacus* は数種類の有機態窒素を増殖に利用することができたが、アンモニアでは 250 μM 以上の濃度では増殖が阻害され、アンモニア耐性は他の珪藻に比べて低かった。一方、*E. zodiacus* は無機態リン同様、実験に用いた 14 種類の有機態リンを全て増殖に利用することができた。リン源の利用特性は、大別すると本研究で実験に供した有機態リンの全てを増殖に利用できるタイプと、数種類の有機態リンのみ増殖に利用できるタイプに分けられ、同じ色落ち原因珪藻でも *E. zodiacus* は前者、*C. wailesii* は後者であった。近年、栄養塩レベルが低下傾向にある瀬戸内海では、有機態リンを増殖に有効利用できる種の出現割合が増大する傾向が認められ、*E. zodiacus* もそのような利用能を有していることが明らかとなった。

9. 培養条件下において、*E. zodiacus* の窒素、リンの取り込みに関する動力学的解析を行った。*E. zodiacus* の栄養塩取り込み速度は栄養塩濃度に依存し、酵素反応式である Michaelis-Menten の式で表すことができた。種間の栄養塩取り込み能を V<sub>max</sub>（最大比取り込み速度）および V<sub>max</sub>/K<sub>s</sub>（最大比取り込み速度/半飽和定数）の値により比較した結果、*E. zodiacus* は他種に比べて高い窒素取り込み能を有し、水温が 10℃前後まで低下するノリ漁期後半においても、その高い窒素取り込み能が維持されていることが判明した。また同じ色落ち

原因珪藻でも、*E. zodiacus* と *C. wailesii* では栄養塩濃度に対する増殖応答や取り込み特性が異なっており、現在の播磨灘においてはタイプの異なる珪藻によってノリ養殖は二重にダメージを受けていることが示唆された。特に、*E. zodiacus* が大量発生するようになったことにより、従来見られなかった深刻な色落ち被害が頻発するようになったことが、培養実験から裏付けられた。

10. 2002年4月～2005年12月にかけて、播磨灘北部沿岸域において *E. zodiacus* の周年を通じた細胞密度と細胞サイズの変化を詳細に検討した。*E. zodiacus* の栄養細胞は、調査を実施した4年間を通してほぼ周年観察することができた。また、細胞サイズ(頂軸長)は  $10.8 \pm 0.69 \sim 81.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$  の範囲で変動し、サイズの減少と回復には周期性と連続性が見られた。すなわち、本種の細胞サイズは毎年1回、秋季に最小サイズとなり、その直後に最大値まで回復した。秋季に細胞サイズを回復した個体群は徐々に細胞サイズを減少させ、1年かけて再び最小サイズに達した。これらのことから、本種は休眠期細胞を形成しない、または少なくとも播磨灘の海洋環境下では休眠期細胞の形成期間が他種に比べて非常に短い種であることが示唆された。

11. *E. zodiacus* と *C. wailesii* はいずれも、播磨灘で優占する珪藻の中では細胞のサイズが大きく、沈降速度も大きい。そのため、大量発生は鉛直混合期(10月～翌年の3月)のみに見られ、それが結果的にノリの養殖漁期(11～4月頃)と重なることから、ノリと栄養塩をめぐって競合する状況が生じている。一方で、ノリ色落ち原因藻の生活環は、種によって大きく異なっていることが明らかとなった。*C. wailesii* は増殖に不適な時期(4～9月の成層期)に休眠細胞を形成して海底泥中で生残し、鉛直混合の始まりとともに復活して栄養細胞となり、二分裂による増殖を開始する。本種は播磨灘において年に2回、秋季(10～11月)と春季(2月)に出現のピークを示し、一般に秋季に細胞

密度が最大となる。一方、*E. zodiacus* も秋季が至適増殖環境であるにも関わらず、本種はこの時期にブルームを形成しない。本種は、周年栄養細胞として生残していると推察され、秋季に二分裂による活発な増殖を行うのではなく、増大胞子の形成によって細胞サイズを回復させていることが示唆された。さらに、本種においては秋季に細胞サイズを回復させた個体群がその後増殖を繰り返す、ノリ漁期後半(1～4月)にブルームを形成すると想定される。このように、*E. zodiacus* は播磨灘で優占する他の主要な珪藻とは異なった、本種特有の生活環を持つことが明らかとなった。

12. *E. zodiacus* による色落ち被害軽減対策として、本種の生態学的特性を利用した発生予察の可能性について検討した。秋季に細胞サイズを回復した細胞の割合が全体の50%に達した日を起点として、*E. zodiacus* のブルームがピークに達するまでに要した積算日数を調べた。また、細胞サイズ回復期における *E. zodiacus* 秋季個体群の平均細胞密度( $X$ ;  $\text{cell L}^{-1}$ )を求め、積算日数( $Y$ )との関係と比較した。その結果、両者には以下に示す負の相関が見られ、秋季に細胞サイズを回復した個体群密度が高い年は、本種がブルームを形成するまでに要した日数が短いことが判明した。

$$Y = -0.117X + 143.7 \quad (r^2=0.73)$$

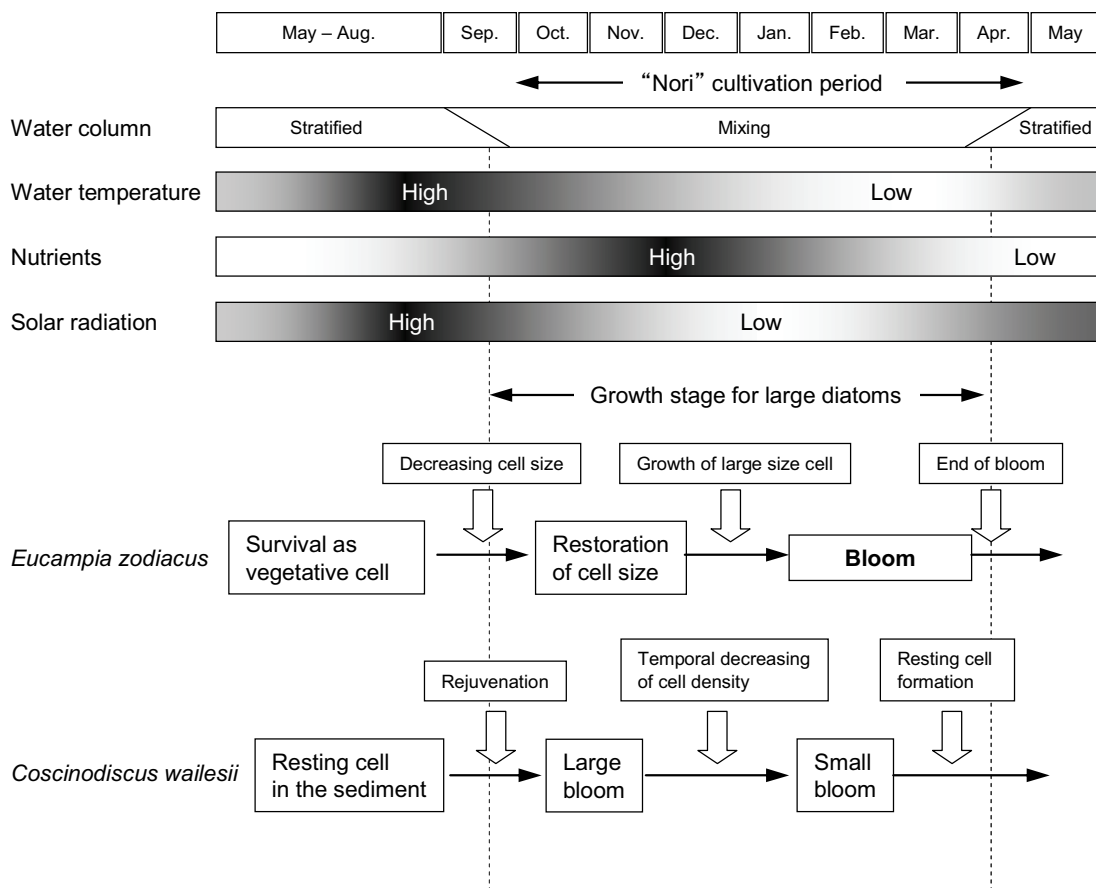
このことから、秋季に細胞サイズを回復した個体群を、本種ブルームのシードポピュレーションと見なし、秋季の細胞サイズ回復時期と平均細胞密度をモニターすることによって、その年のノリ養殖漁期における色落ち発生時期を予測することが可能であると考えられた。

本研究では、主に環境諸要因に対する *E. zodiacus* の増殖生理学的特性と生活環の解明から、本種の播磨灘における大量発生機構の解明を試みた。その結果、本種が水温の上昇、栄養塩レベルの低下といった近年の播磨灘の海域環境によく適応した生理生態学的特性

を持ち、それは一方で、他種に比べて甚大な色落ち被害を発生させる要因となっていることを示した。本研究によって得られた生物学的諸特性に基づき、*E. zodiacus* の周年を通した生活環を Fig. 5-2 に整理した。養殖ノリに色落ち被害を引き起こす細胞サイズの大きい珪藻にとって、活発な増殖が可能な時期は鉛直混合期（概ね 10~3 月）である。特に鉛直混合期の中でも、水温、光、栄養塩といった環境諸要因から考えて、秋季がこれら珪藻にとって最も増殖に適した時期と言える。*E. zodiacus* と並んでノリの色落ち原因藻として問題視されている *C. wailesii* は、この時期に細胞密度がピークを示す。これに対して、*E. zodiacus* はこの至適増殖条件下においてブルームを形成せず、本種は

この時期に細胞サイズの回復を行い、その後細胞サイズを回復した個体群が 1~4 月にかけてブルームを形成する。

ところで、1990 年代前半頃まで、*E. zodiacus* はなぜ近年のようにノリ養殖漁期に大量発生しなかったのであろうか？*E. zodiacus* は 1990 年代半ば以前も現在と同様、秋季に細胞サイズを回復していたであろう。しかし、大量発生が可能な鉛直混合期の間に、ブルームを形成するレベルにまで増殖できなかったのではないかと考えられる。*E. zodiacus* は現在、播磨灘において一年のうち最も水温が低下する時期にブルームを形成するものの、他の珪藻と比較して必ずしも低温耐性が高い種ではない。一方で、本種は珪藻の中でも



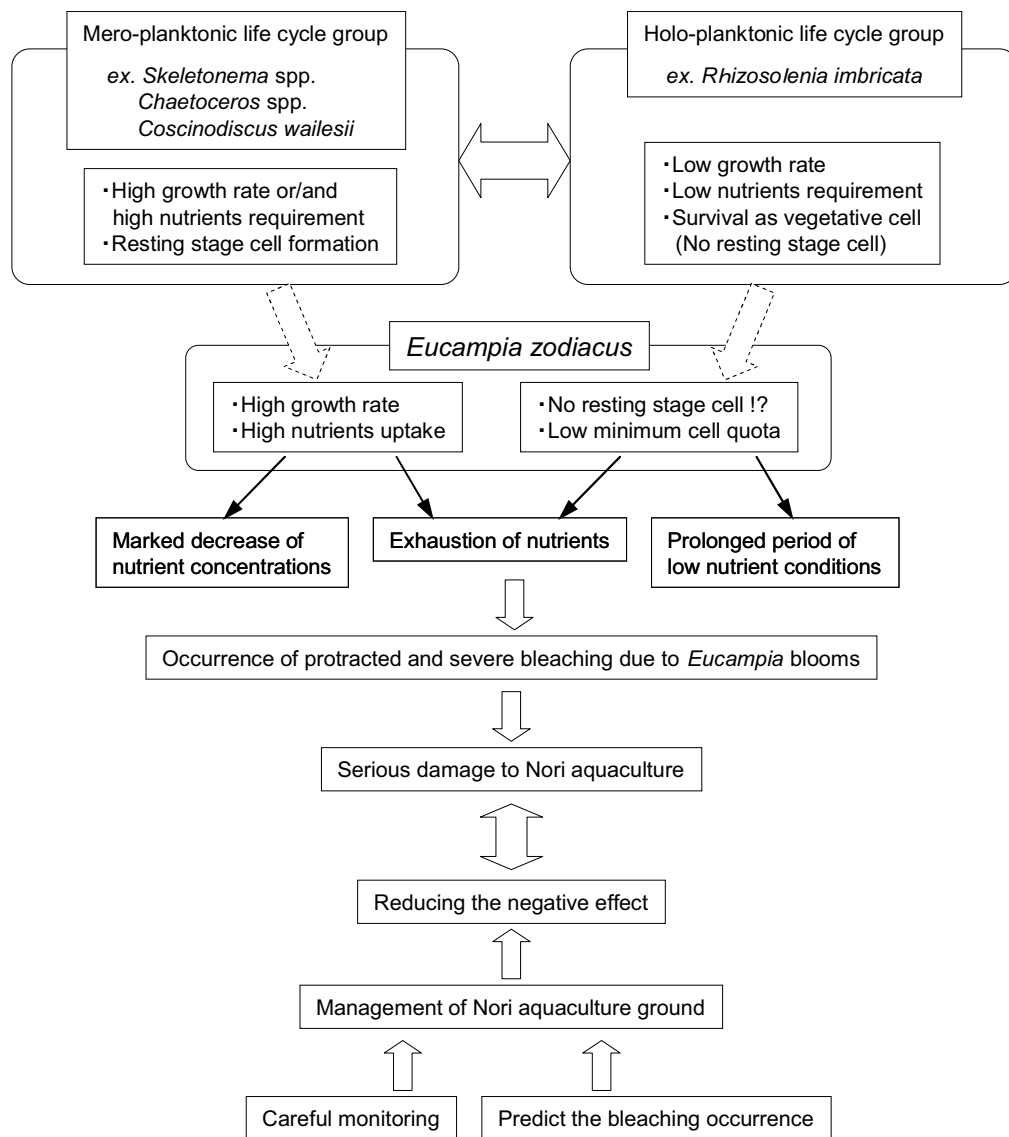
**Fig. 5-2.** A schematic representation of biological phases of *Eucampia zodiacus* and *Coscinodiscus wailesii*, and environmental factors affecting their seasonal occurrences in Harima-Nada, the Seto Inland Sea.



高い増殖速度を有し、増殖が可能である 7°C以上の温度条件下において至適増殖温度である 20~25°Cに向かかって、温度の上昇とともに増殖速度も急激に増大する。したがって、1990年代後半以降、水温が高め基調で推移するようになったことにより、本種は大量発生が可能な鉛直混合期にブルームを形成できるようになったと考えられる。それ以前は、冬季水温が低く、

増殖速度も低いままで春の成層期を迎えていたものと考えられる。このように播磨灘における環境要因の変動、とりわけ冬季水温の上昇が本種の大量発生機構に大きく関与していると考えられた。

一方、水温以外の要因、例えば DIN 濃度の低下といった環境要因の変動も、本種の優占化機構に有利に作用していると想定される。他の主要な珪藻と比較した



**Fig. 5-3.** Comparison of growth characteristics for environmental factors and life history of *Eucampia zodiacus* and other marine diatoms, with the damage to Nori aquaculture by bleaching and counter actions for reducing the negative effects due to *Eucampia* blooms.

本種の生理生態学的特性を Fig. 5-3 にまとめた。浮遊珪藻類は、その生活様式から生活史の一部に休眠期細胞を形成する (Mero-planktonic life cycle) 種と終生浮遊生活を送る (Holo-planktonic life cycle) 種に大別することができる。前者には *Skeletonema* spp., *Chaetoceros* spp., *C. wailesii* 等が含まれ、後者は *Rhizosolenia imbricata* Brightwell が代表的である。播磨灘で優占する主要珪藻の大部分は Mero-plankton に属し、これらは概して高い増殖速度を有し (and/or 栄養塩の要求が高い)、増殖に不適な環境下では休眠期細胞を形成する。また、海域環境が好転すると速やかに栄養細胞へ復活し、活発な増殖を繰り返すことによって個体群を増大させる。したがって、このような特性を持つ種が赤潮を形成した海域では、栄養塩が多量に消費され、その濃度が急激に低下する。これに対して、Holo-plankton は珪藻の中では比較的増殖速度が低く、*R. imbricata* のように、栄養塩が高濃度で添加されている培地では増殖できない種も知られている (佐々木・鬼頭 2003)。さらに、Holo-plankton は一般に低栄養塩濃度下における耐性が高く、低栄養塩濃度下でも栄養細胞のまま長期間生残することが可能である。そのため、このような種が形成する赤潮は継続日数が長い傾向があり (山口ほか 2003)、栄養塩濃度の低い状態が長期間継続する。

*E. zodiacus* を特徴づける本種特有の生理生態学的特性は、ノリ養殖に対して悪影響を及ぼす Mero-および Holo-plankton 両方の特性を備えていると言えよう。すなわち、本種は珪藻の中でも高い増殖速度を有し、低温下において窒素の取り込み能に優れていることから、本種が大量発生した海域では海域の栄養塩がほぼ枯渇するまで消費される。一方で、本種は休眠期細胞を形成せず、最小細胞内栄養塩含量も低いことから、栄養塩濃度が低下した海域においても栄養細胞のまま長期間生残することができる。その結果、本種の大量発生は長期に及び、その間、海域の栄養塩もほぼ枯渇した状態が継続する。このような Mero-および

Holo-plankton 両方の特性を持つ種は、沿岸域の浮遊珪藻の中では、特に播磨灘に出現する主要な珪藻の中では、*E. zodiacus* 以外に見あたらない。加えて、*E. zodiacus* は細胞サイズが比較的大きく、特に活発な増殖により螺旋状の群体を形成している場合には、動物プランクトンなどによる捕食圧も小さいことが想定される。以上のことから、近年の播磨灘ではノリ養殖漁期に *E. zodiacus* が大量発生するようになり、他種の大量発生時には見られない甚大な色落ち被害が発生するようになったと考えられる。播磨灘では今後も、本種による色落ち発生が懸念されることから、その被害を最小限に抑えるために、ノリ養殖漁期における本種のモニタリング調査を継続し、得られた水温、栄養塩濃度、細胞密度等のデータを迅速に情報発信するとともに、色落ち発生時期の予察情報を活用した効率的なノリ養殖を漁業者と一緒に検討する必要がある (Fig. 5-3)。

最後に、瀬戸内海の赤潮発生件数は現在、年間約 100 件前後で推移しており、ピーク時の約 1/3 近くまで減少した (Imai et al. 2006)。「瀬戸内海を魚の棲めるきれいな海に戻す」ための様々な取り組みは、一定の成果を収めたと言えよう。その一方で、「瀬戸内海の再生」が叫ばれる昨今、瀬戸内海が未だ「豊かな海」を取り戻したとは言い難い。有害赤潮に関する問題において、本来「善玉」植物プランクトンであるはずの珪藻によって養殖ノリに色落ち被害が発生するようになり、従来にはなかった新たな問題が提起されている。これは、瀬戸内海の今日的な問題として、瀬戸内海が未だ「豊かな海」を取り戻せていないこととも関連の深い現象であろう。今後、瀬戸内海にとって「豊かな海」とはどのような海なのか、またそれを取り戻すためにはどうすればよいか、さらに議論を積み重ねていく必要がある。本研究では、播磨灘における養殖ノリの色落ち被害について、現在その原因藻として最も問題視されている *E. zodiacus* の大量発生機構を解明し、近年の本種の大量発生が海域環境の変化を反映した現象であることを示した。本研究成果は今後、珪藻による色

落ち被害対策に加え、これからの瀬戸内海のあるべき姿を考えていくにあたり、その一助となれば幸いである。

## 摘要

ノリ養殖が盛んな播磨灘では、1990年代半ば以降、中心目珪藻 *Eucampia zodiacus* がほぼ毎年のように大量発生するようになり、深刻な色落ち被害が頻発している。本研究は、*E. zodiacus* がなぜ近年になって毎年大量発生するようになったのか、また本種が大量発生した場合、なぜ甚大な色落ち被害が発生するのか、そのメカニズムを解明し、本種によるノリ色落ち被害軽減に向けた基礎資料を得ることを目的として実施した。その主な内容は次の通りである。

播磨灘における1973年4月～2007年12月まで、35年間の海域環境と植物プランクトンの長期変動を解析した。*E. zodiacus* の出現は毎年確認され、1990年代半ば以降、出現密度が増大し、季節的には1～4月に細胞密度が高くなる傾向が認められた。一方、植物プランクトン全体の細胞密度は、1970年代～1980年代前半に高く、1980年代前半に減少し、以降はほぼ横ばいであった。植物プランクトンの大部分は珪藻で、種組成は1970年代～1980年代前半は、*Skeletonema* spp. が大部分を占めていたが、1980年代半ば以降は *Chaetoceros* spp.をはじめ他種の占める割合が増大した。35か年の間、海域環境では冬季の最低水温に有意な上昇とDIN濃度に有意な低下が検出され、植物プランクトンの長期変動はこのような海域環境の影響を受け、*E. zodiacus* にとってはそれが有利に作用していると考えられた。

培養実験によって *E. zodiacus* の増殖に及ぼす光強度、温度、塩分および栄養塩の影響を調べた。本種の光強度に対する各増殖パラメータ値は、いずれも温度の上昇とともに増大した。*E. zodiacus* の増殖可能水深 ( $D_0$ ) および  $0.5 \text{ divisions d}^{-1}$  の増殖速度を与える水深 ( $D_{0.5}$ )

は、本種のブルーム形成期に上昇した。このことから、表層～底層にかけて分布する本種にとって、水柱内で増殖可能な水深が鉛直的に拡大することは、本種が大量発生するために重要な要因の一つであることが示唆された。

本種は、温度  $7^\circ\text{C}$  以上で増殖し、広範な温度、塩分条件下で増殖が可能であった。最大増殖速度は、温度  $25^\circ\text{C}$ 、塩分25の条件下で  $3.0 \text{ divisions d}^{-1}$  と見積もられ、珪藻の中でも高い増殖速度を有していることが明らかとなった。一方、本種は現場海域において水温が  $10^\circ\text{C}$  を下回る低水温期にブルームを形成することから、近年の播磨灘における最低水温の上昇は、本種の大量発生にとって重要な環境要因となっていると考えられた。

*E. zodiacus* の増殖に及ぼす栄養塩（窒素、リン、珪素）濃度と増殖速度の関係は Monod の式で表すことができた。*E. zodiacus* の  $K_s$  値（最大増殖速度の1/2を与える栄養塩濃度）は、DINと珪酸においては周年を通して  $K_s$  値が播磨灘における栄養塩濃度の月平均値よりも下回った。また、本種の最小細胞内栄養塩含量は他の有害赤潮種と比較してかなり低いことが判明した。さらに、*E. zodiacus* は実験に用いた14種類の有機態リンを、全て増殖に有効利用することができた。このような栄養条件に対する増殖生理学的特性から、本種は海域の栄養塩が枯渇するまで増殖を繰り返すことが可能であること、栄養塩レベルが低下傾向にある播磨灘において、他種との栄養塩を巡る競合に有利であることが示唆された。

窒素、リンの取り込みに関する動力学的解析から、*E. zodiacus* の栄養塩取り込み能を  $V_{\max}$ （最大比取り込み速度）および  $V_{\max}/K_s$ （最大比取り込み速度/半飽和定数）値を指標として他種と比較した結果、*E. zodiacus* は優れた窒素取り込み能を有し、それは低水温下においても維持されていることが明らかとなった。

播磨灘北部沿岸域において、*E. zodiacus* の周年を通じた細胞密度と細胞サイズ（頂軸長）の変動を詳細に

調べた。4年間の調査期間を通して、*E. zodiacus* の栄養細胞はほぼ周年観察することができた。また、細胞サイズは  $10.8 \pm 0.69 \sim 81.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$  の範囲で変動し、サイズの減少と回復には周期性と連続性が認められた。すなわち、本種の細胞サイズは毎年1回、秋季に最小となり、その直後に最大値まで回復した。このことから、本種は至適増殖環境条件下である秋季に増大胞子の形成などによる細胞サイズの回復を図っていることが示された。また、本種は休眠期細胞を形成しない、または少なくとも播磨灘の海洋環境下では休眠期細胞の期間が他種に比べて非常に短い種であると考えられた。

*E. zodiacus* が細胞サイズ回復後、ブルームを形成するまでに要した積算日数と、サイズ回復期である秋季

個体群の平均細胞密度には負の相関関係があることを見出した。この両者の関係から、秋季に細胞サイズを回復した個体群を、本種ブルームのシードポピュレーションと見なし、秋季の細胞サイズ回復時期と平均細胞密度をモニターすることによって、その年のノリ養殖漁期における色落ち発生時期の予測が可能であることを示した。

以上、*E. zodiacus* の環境諸要因に対する増殖生理学的特性と生活環から、本種の播磨灘における大量発生機構が明らかとなり、本種が近年の播磨灘の海域環境によく適応した生理生態学的特性を持ち、それは一方で他種に比べて甚大な色落ち被害を発生させる要因となっていることが本研究によって解明された。

### Summary

In Harima-Nada, eastern part of the Seto Inland Sea, “Nori” (*Porphyra yezoensis*) cultivation is of significant economic importance for fisheries with the average production of around 10-15 billion yen per year. Since the mid 1990s, the chain-forming diatom *Eucampia zodiacus* have caused blooms almost every year during the harvest season of Nori cultivation. The blooms lead to depletion of nutrients, and indirectly cause bleaching of aquacultured *Porphyra* thalli through competitive and overwhelming utilization of nutrients during bloom events. Therefore, *E. zodiacus* has become a predominant organism causing the bleaching of *Porphyra* thalli in Harima-Nada. For reducing the negative effect of the blooms on Nori bleaching, the present study was conducted to understand the biological background of the mechanism of mass occurrence and serious damage to *Porphyra* thalli due of *E. zodiacus* in recent year.

Long-term monitorings of water quality and phytoplankton was conducted at 19 sampling stations in Harima-Nada for 35 years during 1973 to 2007. Over the study period, *E. zodiacus* cells were detected every year, and seasonal cell densities tended to be higher from January to April. Total phytoplankton cell densities tended to be higher from the 1970s to the early 1980s, then declined in the mid 1980s, and remained at a relatively stable level thereafter. In contrast to the trend, the abundances of *E. zodiacus* increased in the mid 1990s. The major phytoplankton component was always diatoms over the 35-year period, and there was a dramatic shift from *Skeletonema* dominance to *Chaetoceros* in the mid 1980s. There were two significant long-term changes, i.e. an increase in winter water temperatures and decrease in dissolved inorganic nitrogen (DIN). The present results suggest that the shift of environmental conditions is more advantageous to the growth of *E. zodiacus*, which corresponded to the domination of the *E. zodiacus* abundance in recent years.

The effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on the growth of *E. zodiacus* were examined using clonal and axenic cultures to evaluate the relative importance of those factors on the dynamics of natural populations. The results

showed that all the parameters of growth-irradiance curves, such as the maximum growth rate ( $\mu_m$ ), half saturation constant ( $K_s$ ) and threshold value of irradiance ( $I_0$ ), increased with increasing temperature. The effect of irradiance on the population dynamics of *E. zodiacus* in water columns was evaluated using two indices,  $D_t$  (depth of the threshold irradiance for growth) and  $D_{0.5}$  (depth where a growth rate of 0.5 divisions  $\text{day}^{-1}$  is attained).  $D_t$  and  $D_{0.5}$  remained almost stable from October to December, but gradually increased in early March when *E. zodiacus* blooms in Harima-Nada. As the vegetative cells of *E. zodiacus* were observed in the whole water columns, the increase in the depth range over which *E. zodiacus* is able to grow is concluded to be an important factor allowing development of its blooms.

*Eucampia zodiacus* can grow at 7°C and above, but not at 5°C. The tolerable salinity range for growth was very broad. The highest growth rate of 3.0 divisions  $\text{d}^{-1}$  was observed under the environment of the combination of 25°C and 25, respectively. The growth rates of *E. zodiacus* are approximately equal or higher than values reported for other diatom species, and rapidly increase along with a rise in temperature. Consequently, *E. zodiacus* can grow at higher rates under the recent warm winter conditions, and it is an important factor allowing the dominant development of the abundance in recent years.

The relationship between nutrients (nitrate, phosphate and silicate) concentration and growth rate is well described by Monod equation. The  $K_s$  values of nitrate and silicate were lower than mean concentrations of these nutrients in water of Harima-Nada year-round, and *E. zodiacus* can successfully use various organic phosphorus compounds of different molecular structures as the sole P source. In addition, minimum cell quotas for nutrients of *E. zodiacus* are relatively lower than those of other harmful species. These parameters indicate that *E. zodiacus* is advantaged in competing for nutrients to other species, and it enables this species to grow until available nutrients are almost exhausted.

We experimentally investigated the nitrate and phosphate uptake kinetics of *E. zodiacus*, Harima-Nada strain. The maximum specific uptake rate ( $V_{\max}$ ) and  $V_{\max}/K_s$  for nitrate at 9 °C are about 1/2 of those obtained at the optimum temperature (20 °C), they are still higher than those obtained for many other phytoplankton at their optimum temperature conditions for uptake. These results suggest that *E. zodiacus* utilizes nitrogen efficiently at low water temperature, and it is one of the important factors causing the serious damage to *Porphyra* thalli by bleaching.

The seasonal changes in cell density and cell size of *E. zodiacus* were investigated for four years (April 2002-December 2005) to understand the population ecology of this diatom in Harima-Nada. Vegetative cells of *E. zodiacus* were usually detected year-round. The average cell size (length of apical axis) of *E. zodiacus* populations ranged from  $10.8 \pm 0.69 \mu\text{m}$  to  $81.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , and the restoration of cell size occurred only once in autumn every year just after reaching the minimum cell size. In addition, its great seasonal regularity was confirmed by the decrease and restoration of its cell size through four-year study period. Although temperature and nutrients were suitable in autumn for the growth of *E. zodiacus*, its blooms never occur in that season. These results strongly suggest that *E. zodiacus* did not have a resting stage, and it spends autumn for size restoration and starts to bloom thereafter in Harima-Nada in winter and spring.

Average cell densities of *E. zodiacus* population in autumn, when it spent for restoration of its cell size, had a significant negative correlation with the integrated day during the period from restoration cell size to the peak of bloom. It was considered that vegetative cells of *E. zodiacus* observed in autumn season played an important role as seed populations in winter and early spring bloom. Therefore, it is proposed to predict the time of Nori bleaching occurrence by monitoring the



cell size restoration time and the mean cell density of *E. zodiacus* in autumn season in Harima-Nada.

## 謝辞

本研究の遂行および取りまとめにあたり、終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学大学院今井一郎教授、並びに独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所山口峰生博士に深甚なる感謝の意を表します。本論文についてご助言とご校閲の労を賜りました北海道大学大学院齊藤誠一教授、並びに山口篤准教授、本研究に多くの有益なご教示を賜るとともに、本論文のご校閲を賜りました独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部長板倉茂博士に衷心より感謝いたします。

本研究の機会を与えて下さり、懇切なるご指導と暖かい励ましをいただきました兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター所長反田實博士、元所長眞鍋武彦博士、八橋良忠前所長、並びに但馬水産技術センター廣瀬和孝所長に衷心より感謝いたします。

本研究に対し、多くの有益なご教示とご鞭撻を賜りました独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所長井敏博士をはじめ、同研究所赤潮環境部の皆様に深く感謝いたします。また、同研究所の樽谷賢治博士と広島大学大学院山本民次教授には、珪藻の栄養塩取り込みに関する動力学的解析のほか、珪藻の室内培養実験に関してご教示を賜りました。香川大学農学部多田邦尚教授と香港科学技術大学 Paul J. Harrison 教授には、植物プランクトンと海域環境の長期変動解析にご助言とご鞭撻を賜りました。マイクロワールドサービスの奥修博士には、顕微鏡観察と珪藻の生態について懇切丁寧なご指導とご助言を賜りました。また、函館短期大学志賀直信教授（元北海道大学大学院教授）には、本研究を取りまとめるにあたり暖かいご声援を賜りました。ここに記して衷心より感謝いたします。

兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術セン

ター宮原一隆博士には英文校閲をはじめ、数々のご助力とご助言を賜りました。同センター堀豊博士（現但馬水産技術センター）には海洋観測全般について、特に栄養塩の分析に関してご教示いただきました。心から厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益な情報とご助言をいただいた大阪府環境農林水産総合研究所水産研究部水産技術センター山本圭吾主任研究員、熊本市水産振興課松田篤志技師、和歌山県農林水産部水産局水産振興課白石智孝博士、京都大学大学院農学研究科博士課程石井健一郎氏、並びに各県の赤潮・貝毒調査担当者の皆様に感謝いたします。また、本研究の遂行にご助言とご鞭撻を賜った東京海洋大学東海正教授、四国大学短期大学部西堀尚良教授、愛媛県農林水産研究所水産研究センター小泉喜嗣博士、香川県赤潮研究所所長吉松定昭博士、徳島県立農林水産総合技術支援センター水産研究所上田幸男博士、株式会社総合水研究所吉村直孝博士、千葉県農林水産部水産局水産課高山敬介主査に深謝いたします。

フィールド調査を実施するにあたり、海洋観測等にご協力いただいた兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センター調査船「新ひょうご」の中筋晴喜船長および船員各位に感謝いたします。同センター資源部各位には海洋観測調査にご協力いただくとともに、画像解析や統計学的解析等をご教示いただき、また多くの有意義な議論をさせていただきました。同センター二羽恭介博士、望月松寿主査（現兵庫県農政環境部農林水産局水産課専技）、並びに JF 兵庫漁連のり研究所の各位には、ノリ養殖やノリの色落ち対策について貴重な情報とご意見をいただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

最後に、私の研究を終始献身的に支えてくれた妻、由実子に感謝します。

## 文献

- Bates, S. S. and V. L. Trainer, 2006: The ecology of harmful diatoms. In "Ecology of Harmful Algae" (eds. by E. Graneli and J. T. Turner), Springer, Berlin, 81-93.
- Bienfang, P. K. and P. J. Harrison, 1984: Co-variation of sinking rate and cell quota among nutrient replete marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **14**, 297-300.
- Bienfang, P. K., P. J. Harrison and L. M. Quarmby, 1982: Sinking rate response to depletion of nitrate, phosphate and silicate in four marine diatoms. *Mar. Biol.*, **67**, 295-302.
- Boalch, G. T. and D. S. Harbour, 1977: Unusual diatom off the coast of south-west England and its effect on fishing. *Nature*, **269**, 687-688.
- Bonin, D. J. and S. Y. Maestrini, 1981: Importance of organic nutrients for phytoplankton growth in natural environments: Implications for algal species succession. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210**, 279-291.
- Borkman, G. D., 2002: Analysis and simulation of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve annual abundance patterns in lower Narragansett Bay 1959 to 1996. PhD dissertation, University of Rhode Island, Rhode Island, 1-395.
- Borkman, G. D. and T. Smayda, 2009: Multidecadal (1959-1997) changes in *Skeletonema* abundance and seasonal bloom patterns in Narragansett Bay, Rhode Island, USA. *J. Sea Res.*, **61**, 84-94.
- Brand, L. E., R. R. L. Guillard and L. S. Murphy, 1981: A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankt. Res.*, **3**, 193-201.
- Chan, A. T., 1978: Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. I. Growth under continuous light. *J. Phycol.*, **14**, 396-402.
- Darley, W. M., 1987: 基礎微生物学 9 藻類の生理生態学 (手塚泰彦・渡辺泰徳・渡辺真利代訳), 培風館, 東京, 24-61.
- Davis, C. O., J. T. Hollibaugh, D. L. R. Seibert, W. H. Thomas and P. J. Harrison, 1980: Formation of resting spores by *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) in a controlled experimental ecosystem. *J. Phycol.*, **16**, 296-302.
- Dugdale, R. C., 1967: Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 685-695.
- Eppley, R. W., 1972: Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish. Bull.*, **70**, 1063-1085.
- Eppley, R. W. and W. H. Thomas, 1969: Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **5**, 375-379.
- Eppley, R. W., J. N. Rogers and J. J. McCarthy, 1969: Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 912-920.
- Flynn, K. J., H. Opik and P. J. Syrett, 1986: Localization of the alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase activities of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 289-298.
- French, F. W. and P. E. Hargraves, 1986: Population dynamics of the spore-forming diatom *Leptocylindrus danicus* in Narragansett Bay, Rhode Island. *J. Phycol.*, **22**, 411-420.
- 深尾剛志・西島敏隆・深見公雄・足立真佐雄, 2006: 汚濁海域浦ノ内湾における植物プランクトンの発生に対する尿素の寄与. 日本プランクトン学会報, **53**, 77-86.
- 深尾剛志・西島敏隆・山口晴生・足立真佐雄, 2007: 赤潮プランクトン 6 種の尿素利用能. 日本プランク

- トン学会報, **54**, 1-8.
- Gallagher, J. C., 1982: Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **18**, 148-162.
- Gallagher, J. C., 1983: Cell enlargement in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **19**, 539-542.
- Gotham, I. J. and G. Y. Rhee, 1981: Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate uptake in phytoplankton in continuous culture. *J. Phycol.*, **17**, 309-314.
- Guillard, R. R. L., 1979: Division rates. In “*Handbook of phyycological methods. Culture method & growth measurements*” (ed. by J. R. Stein), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 289-311.
- 原田和弘・堀豊・西川哲也・藤原建紀, 2009: 播磨灘の栄養塩環境とノリ養殖. 海洋と生物, **181**, 146-149.
- Hargraves, P. E. and F. W. French, 1983: Diatom resting spore: significance and strategies. In “*Survival strategies of the algae*” (ed. by G. A. Fryxell), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 49-68.
- Harrison, P. J., J. S. Parslow and H. L. Conway, 1989: Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **52**, 301-312.
- 長谷川健一・石井光廣, 2007: 冬季の東京湾における珪藻プランクトンの出現状況. 千葉水総研報, **2**, 25-32.
- Hasle, G. R., 1994: *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **30**, 1036-1039.
- Healey, F. P., 1980: Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microb. Ecol.*, **5**, 281-286.
- Hein, M., M. F. Pedersen and K. Sand-Jensen, 1995: Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **118**, 247-253.
- Herndon, J. and W. P. Cochlan, 2007: Nitrogen utilization by the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*: Growth and uptake kinetics in laboratory cultures. *Harmful Algae*, **6**, 260-270.
- Honjo, T., 1994: The biology and prediction of representative red tides associated with fish-kills in Japan. *Rev. Fish. Sci.*, **2**, 225-253.
- 本城凡夫, 2000: 第1章 有害プランクトンによる漁業被害の発生状況とその問題点. 「有害・有毒赤潮の発生と予知・防除」(石田祐三郎・本城凡夫・福代康夫・今井一郎編), 日本水産資源保護協会, 東京, 4-17.
- Honjo, T., M. Yamaguchi, O. Nakamura, S. Yamamoto, A. Ouchi and K. Ohwada, 1991: A relationship between winter water temperature and the timing of summer *Gymnodinium nagasakiense* red tides in Gokasho Bay. *Nippon Suisan Gakk.*, **57**, 1679-1682.
- Honjo, T., N. Imada, Y. Ohshima, Y. Maema, K. Nagai, Y. Matsuyama and T. Uchida, 1998: Potential transfer of *Heterocapsa circularisquama* with pearl oyster consignments. In “*Harmful Algae*” (eds. by B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernandez and T. Wyatt), Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Paris, 224-226.
- 堀豊・宮原一隆・長井敏・辻野耕実・中嶋昌紀・山本圭吾・吉田陽一・荒木伸生・酒井康彦, 1998: 大阪湾および播磨灘における主要植物プランクトンと DIN: DIP 比等との相互関係. 日水誌, **64**, 243-248.
- 堀豊・中谷明泰・西川哲也・鈴木輝明・高倍昭洋, 2006: 冬季の播磨灘における *Eucampia zodiacus* の分布特性と環境条件. 海洋理工学会誌, **12**, 13-22.
- Horiguchi, T., 1995: *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): A new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in

- Japan. *Phycol. Res.*, **43**, 129-136.
- 飯塚昭二・峯邦宏, 1983: 培養条件下で期待される赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp. ('65年型種)の最高生長速度. 日本プランクトン学会報, **30**, 139-146.
- Imai, I., 1989: Cyst formation of the noxious red tide flagellate *Chattonella marina* (Raphidophyceae) in culture. *Mar. Biol.*, **103**, 235-239.
- 今井一郎, 1990: 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西水研研報, **23**, 63-166.
- 今井一郎, 2007: 有害有毒赤潮生物の出現と分類の歴史的経過. 海洋と生物, **172**, 454-464.
- Imai, I. and S. Itakura, 1991: Densities of dormant cells of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **6**, 1-7.
- 今井一郎・伊藤克彦, 1986: 周防灘海底泥から見出された *Chattonella* のシストについて (予報). 日本プランクトン学会報, **33**, 61-63.
- Imai, I. and K. Itoh, 1987: Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **94**, 287-292.
- Imai, I., K. Itoh and M. Anraku, 1984: Extinction dilution method for enumeration of dormant cells of red tide organisms in marine sediments. *Bull. Plankton Soc. Jpn.*, **31**, 123-124.
- 今井一郎・伊藤克彦・寺田和夫・神菌真人, 1986: 周防灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と夏季の赤潮. 日水誌, **52**, 1665-1671.
- Imai, I., K. Itoh and M. Anraku, 1989: Dormancy and maturation in the cysts of *Chattonella* spp. (Raphidophyceae), red tide flagellates in the Inland Sea of Japan. In "Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology" (eds. by T. Okaichi, D. M. Anderson and T. Nemoto), Elsevier, New York, 289-292.
- 今井一郎・板倉茂・伊藤克彦, 1990: 播磨灘および北部広島湾の海底泥中における珪藻類の休眠細胞の分布. 沿岸海洋研究ノート, **28**, 75-84.
- Imai, I., S. Itakura and K. Itoh, 1991: Life cycle strategies of the red tide causing flagellates *Chattonella* (Raphidophyceae) in the Seto Inland Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **23**, 165-170.
- Imai, I., S. Itakura and K. Itoh, 1993: Cysts of the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo*, Raphidophyceae, found in bottom sediments of northern Hiroshima Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakk.*, **59**, 1669-1673.
- Imai, I., S. Itakura, Y. Matsuyama and M. Yamaguchi, 1996: Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.*, **62**, 834-835.
- Imai, I., M. Hatano and K. Naito, 2004: Development of a chemically defined artificial medium for marine red tide-causing raphidophycean flagellates. *Plankton Biol. Ecol.*, **51**, 95-102.
- Imai, I., M. Yamaguchi and Y. Hori, 2006: Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.*, **1**, 71-84.
- Ishida, Y., M. Eguchi and H. Kadota, 1986: Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**, 197-203.
- 石川輝・石井健一郎, 2007: 有害有毒赤潮生物のシスト発芽研究における進展と将来展望. 海洋と生物, **172**, 411-417.
- Ishikawa, A., M. Hattori and I. Imai, 2007: Development of the "Plankton emergence trap/chamber (PET Chamber)", a new sampling device to collect in situ germinating cells from cysts of microalgae in surface sediments of coastal waters. *Harmful Algae*, **6**, 301-307.

- Ishizaka, J., M. Kaichi and M. Takahashi, 1987: Resting spore formation of *Leptocylindrus danicus* (Bacillariophyceae) during short time-scale upwelling and its significance as predicted by a simple model. *Ecol. Res.*, **2**, 229-242.
- 板倉茂, 2000: 沿岸性浮遊珪藻類の休眠期細胞に関する生理生態学的研究. 瀬戸内水研報, **2**, 67-130.
- Itakura, S. and M. Yamaguchi, 2001: Germination characteristics of naturally occurring cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Hiroshima Bay, Inland Sea of Japan. *Phycologia*, **40**, 263-267.
- 板倉茂・山口峰生, 2007: 瀬戸内海の赤潮発生機構と環境変動. 日本ベントス学会誌, **62**, 57-61.
- 板倉茂・今井一郎・伊藤克彦, 1990: 広島湾における赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* 出現密度の季節変化. 南西水研研報, **23**, 27-33.
- 板倉茂・今井一郎・伊藤克彦, 1992: 海底泥中から見出された珪藻 *Skeletonema costatum* 休眠細胞の形態と復活過程. 日本プランクトン学会報, **38**, 135-145.
- 板倉茂・山口峰生・今井一郎, 1993: 培養条件下における浮遊性珪藻 *Chaetoceros didymus* var. *protuberans* の休眠胞子形成と発芽. 日水誌, **59**, 807-813.
- Itakura, S., I. Imai and K. Itoh, 1997: "Seed bank" of coastal planktonic diatoms in bottom sediments of Hiroshima Bay, Seto Inland Sea, Japan. *Mar. Biol.*, **128**, 497-508.
- Itakura, S., M. Yamaguchi, M. Yoshida and Y. Fukuyo, 2002: The seasonal occurrence of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) vegetative cells in Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **68**, 77-86.
- 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, 東京, 1-55.
- 岩崎英雄, 1973: 赤潮鞭毛藻の生理特性からみた赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 46-56.
- Iwasaki H., C. H. Kim and M. Tsuchiya, 1990: Growth characteristics of a dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. *Japan. J. Phycol.*, **38**, 155-161.
- Iwataki, M., M. W. Wong and Y. Fukuyo, 2002: New record of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) from Hong Kong. *Fish. Sci.*, **68**, 1161-1163.
- Jitts, H. R., C. D. McAllister, K. Stephens and J. D. H. Strickland, 1964: The cell division rates of some marine phytoplankters as a function of light and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **21**, 139-157.
- 城久, 1986: 大阪湾における富栄養化の構造と富栄養化が漁業生産におよぼす影響について. 大阪水試研報, **7**, 1-174.
- Karentz, D. and T. J. Smayda, 1984: Temperature and seasonal occurrence patterns of 30 dominant phytoplankton species in Narragansett Bay over a 22-year period (1959-1980). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **18**, 277-293.
- Karentz, D. and T. J. Smayda, 1998: Temporal patterns and variations in phytoplankton community organization and abundance in Narragansett Bay during 1959-1980. *J. Plankt. Res.*, **20**, 145-168.
- 加藤修・中川倫寿・松井繁明・山田東也・渡邊達郎, 2006: 沿岸・沖合定線観測データから示される日本海及び対馬海峡における水温の長期変動. 沿岸海洋研究, **44**, 19-24.
- 川口修・山本民次・松田治, 2002: 有明海熊本沿岸におけるノリ不作年度の水質環境の特徴. 海の研究, **11**, 543-548.
- 河村敏弘, 2004: 海苔産業の歴史とその推移. 「有用海藻誌 海藻の資源開発と利用に向けて」(大野正夫編), 内田老鶴圃, 東京, 333-345.
- 川村嘉広, 2005: 1. ノリ. 「水産増殖システム3 貝類・甲殻類・ウニ類・海藻」(森勝義編), 恒星社厚生閣, 東京, 1-22.



- 川村嘉広, 2006: 有明海奥部のノリ養殖. 海洋と生物, **167**, 603-610.
- 近畿農政局兵庫農政事務所, 2009: 第57次兵庫農林水産統計年報, 兵庫県農林統計協会, 神戸, 165-201.
- Kuenzler, E. J. and J. P. Perras, 1965: Phosphatases of marine algae. *Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, **128**, 271-284.
- Kuwata, A. and M. Takahashi, 1990: Life-form population responses of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, to oligotrophication in regionally upwelled water. *Mar. Biol.*, **107**, 503-512.
- Kuwata, A., T. Hama and M. Takahashi, 1993: Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **102**, 245-255.
- Lederman, T. C. and P. Tett, 1981: Problems in modeling the photosynthesis-light relationship for phytoplankton. *Botanica Mar.*, **24**, 125-134.
- Lehman, J. T., D. B. Botkin and G. E. Likens, 1975: The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, **20**, 343-364.
- Li, Y. and T. J. Smayda, 1998: Temporal variability of chlorophyll in Narragansett Bay, 1973-1990. *ICES J. Mar. Sci.*, **55**, 661-667.
- Lomas, M. W. and P. M. Glibert, 2000: Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J. Phycol.*, **36**, 903-913.
- 眞鍋武彦, 1969: インドフェノール改良法による海水中微量アンモニアの直接定量. 日水誌, **35**, 897-906.
- 眞鍋武彦, 1992: 瀬戸内海東部海域における堆積物の汚染. 瀬戸内海科学, **11**, 235-240.
- Manabe, T. and S. Ishio, 1991: Bloom of *Coscinodiscus wailesii* and DO deficit of bottom water in Seto Inland Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **23**, 181-184.
- 眞鍋武彦・反田實, 1985: 浅海域底層水の採取法. 日水誌, **51**, 1745.
- 眞鍋武彦・反田實, 1986: 海水中に含まれる微量の反応性珪酸, 反応性リン酸, アンモニア, 亜硝酸および硝酸の同時自動分析法について. 海と空, **62**, 25-37.
- 眞鍋武彦・長井敏・堀豊, 1994a: 厳しさを増す沿岸漁業. 「水産学シリーズ103水産と環境」(清水誠編), 恒星社厚生閣, 東京, 9-18.
- 眞鍋武彦・反田實・堀豊・長井敏・中村行延, 1994b: 播磨灘の漁場環境と植物プランクトンの変動—20年間のモニタリングの成果—. 沿岸海洋研究ノート, **31**, 169-181.
- McQuoid, M. R. and L. A. Hobson, 1996: Diatom resting stages. *J. Phycol.*, **32**, 889-902.
- 松田篤志・西島敏隆・深見公雄, 1999: 有害渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の増殖に及ぼす窒素・リン栄養塩の影響. 日水誌, **65**, 847-855.
- 松田篤志・西島敏隆・深見公雄・足立真佐雄, 2001: 有害渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* の増殖に及ぼすB群ビタミンの影響. 日水誌, **67**, 658-663.
- 松岡聡・吉松定昭・小野哲・一見和彦・藤原宗弘・本田恵二・多田邦尚, 2005: 備讃瀬戸東部(香川県沿岸)におけるノリ色落ちと水質環境. 沿岸海洋研究, **43**, 77-84.
- 松山幸彦, 2003: 有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* に関する生理生態学的研究—I *H. circularisquama* 赤潮の発生および分布拡大機構に影響する環境要因等の解明. 水研センター研報, **7**, 24-105.
- 右田清治, 1967: *Skeletonema costatum* の有性生殖について. 日水誌, **33**, 392-398.
- 宮井博・松崎加奈恵・小川数也・杉原拓郎, 1988: 植物プランクトンの形態に基づく種類別生物量の簡

- 易推定法. 日本プランクトン学会報, **35**, 121-126.
- Monod, J., 1949: The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, **3**, 371-394.
- 長井敏, 2000: 第 4 章 播磨灘における有害大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* の大量発生機構とその予知. 「有害・有毒赤潮の発生と予知・防除」(石田祐三郎・本城凡夫・福代康夫・今井一郎編), 日本水産資源保護協会, 東京, 71-100.
- Nagai, S. and I. Imai, 1997: The effect of irradiance and irradiation time on the size of initial cells in vegetative cell enlargement of *Coscinodiscus wailesii* (Centrales, Bacillariophyceae) in culture. *Phycol. Res.*, **45**, 117-121.
- Nagai, S. and I. Imai, 1999: Factors inducing resting-cell formation of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) in culture. *Plankton Biol. Ecol.*, **46**, 94-103.
- 長井敏・眞鍋武彦, 1994: 培養条件下における大型の珪藻類の *Coscinodiscus wailesii* の増大胞子形成. 日本プランクトン学会報, **40**, 151-167.
- 長井敏・堀豊・眞鍋武彦・今井一郎, 1995: 播磨灘海底泥中から見いだされた大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* Gran 休眠細胞の形態と復活過程. 日水誌, **61**, 179-185.
- Nagai, S., Y. Hori, T. Manabe and I. Imai, 1995: Restoration of cell size by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). *Phycologia*, **34**, 533-535.
- Nagai, S., Y. Hori, K. Miyahara, T. Manabe and I. Imai, 1996: Population dynamics of *Coscinodiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) in Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. In "Harmful and Toxic Algal Blooms" (eds. by T. Yasumoto, Y. Oshima, and Y. Fukuyo), IOC of UNESCO, Paris, 239-242.
- Nagai, S., I. Imai and T. Manabe, 1998: A simple and quick technique for establishing axenic cultures of the centric diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran. *J. Plankt. Res.*, **20**, 1417-1420.
- Nagai, S., I. Imai, K. Yamauchi and T. Manabe, 1999: Induction of sexuality in the diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium *Alcaligenes* sp. in culture. In "14th Diatom Symposium 1996" (eds. by S. Mayama, M. Idei and S. Koizumi), Koeltz Scientific Books, Koenigstein, 197-212.
- Nagai, S., S. Itakura, Y. Matsuyama and Y. Kotani, 2003: Encystment under laboratory conditions of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) isolated from the Seto Inland Sea, Japan. *Phycologia*, **42**, 646-653.
- 永田誠一・中筋昭夫・中谷明泰・井川直人・堀豊, 1998: 1995, 1996 年度漁期後半に播磨灘のノリ漁場において観測された珪藻プランクトンについて. 兵庫水試研報, **34**, 41-48.
- 永田誠一・名角辰郎・中谷明泰・鷲尾圭司・眞鍋武彦, 2001: 近年の播磨灘主要ノリ漁場の環境調査結果. 兵庫水試研報, **36**, 59-73.
- Naito, K., M. Matsui and I. Imai, 2005a: Influence of iron chelation with organic ligands on the growth of red tide phytoplankton. *Plankton Biol. Ecol.*, **52**, 14-26.
- Naito, K., M. Matsui and I. Imai, 2005b: Ability of marine eukaryotic red tide microalgae to utilize insoluble iron. *Harmful Algae*, **4**, 1021-1032.
- Naito, K., I. Imai and H. Nakahara, 2008: Complexation of iron by microbial siderophores and effects of iron chelates on the growth of marine microalgae causing red tides. *Phycological Res.*, **56**, 58-67.
- Nakamura, Y., 1985a: Ammonium uptake kinetics and interactions between nitrate and ammonium uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **41**, 33-38.
- Nakamura, Y., 1985b: Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth

- conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **41**, 381-387.
- Nakamura, Y. and M. M. Watanabe, 1983a: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114.
- Nakamura, Y. and M. M. Watanabe, 1983b: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 151-155.
- Nakamura, Y. and M. M. Watanabe, 1983c: Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 167-170.
- 中村行延・松田泰嗣・安田基・眞鍋武彦, 1989: 播磨灘における植物プランクトンの出現状況. 兵庫水試研報, **26**, 11-17.
- 西島敏隆・畑幸彦・山内章三, 1989: 赤潮渦鞭毛藻 *Prorocentrum triestinum* の増殖生理. 日水誌, **55**, 2009-2014.
- 西川哲也・宮原一隆・長井敏, 2005: 南二見における定置観測結果12ヵ年(1993年1月~2004年12月)の整理. 兵庫農技総セ研報(水産), **38**, 35-40.
- Niwa, K. and Y. Aruga, 2003: Rapid DNA extraction from conchocelis and ITS-1 rDNA sequences of seven strains of cultivated *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, **15**, 29-35.
- 野村英明, 1998: 1900年代における東京湾の赤潮と植物プランクトン群集の変遷. 海の研究, **7**, 159-178.
- Oh, S. J., T. Yamamoto, Y. Kataoka, O. Matsuda, Y. Matsuyama and Y. Kotani, 2002: Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Fish. Sci.*, **68**, 416-424.
- 呉碩津・松山幸彦・山本民次・中嶋昌紀・高辻英之・藤沢邦康, 2005: 近年の瀬戸内海における有害・有毒渦鞭毛藻の分布拡大とその原因 - 溶存態有機リンの生態学的重要性. 沿岸海洋研究, **43**, 85-95.
- Oh, S. J., Y. H. Yoon, T. Yamamoto and Y. Matsuyama, 2005: Alkaline phosphatase activity and phosphatase hydrolyzable phosphorus for phytoplankton in Hiroshima Bay, Japan. *Ocean Sci. J.*, **40**, 183-190.
- 岡山県・香川県・徳島県・兵庫県, 1999: 瀬戸内海東部海域赤潮広域共同調査(冬季調査)報告書. 「平成10年度赤潮対策事業技術開発試験 海域特性による赤潮被害防止技術開発試験」, 水産庁, 東京, 1-12.
- Oku, O. and A. Kamatani, 1997: Resting spore formation of the marine planktonic diatom *Chaetoceros anastomosans* induced by high salinity and nitrogen depletion. *Mar. Biol.*, **127**, 515-520.
- Oku, O. and A. Kamatani, 1999: Resting spore formation and biochemical composition of the marine planktonic diatom *Chaetoceros pseudocurvisetus* in culture: ecological significance of decreased nucleotide content and activation of the xanthophyll cycle by resting spore formation. *Mar. Biol.*, **135**, 425-436.
- 小野哲・一見和彦・多田邦尚, 2006: ノリ養殖に被害を及ぼす大型珪藻 *Coscinodiscus wailesii* の現存量と沈降速度. 日本海水学会誌, **60**, 253-259.
- Percival, E., M. A. Rahman and H. Weigel, 1980: Chemistry of the polysaccharides of the diatom *Coscinodiscus nobilis*. *Phytochemistry*, **19**, 809-811.
- Pratt, D. M., 1959: The phytoplankton of Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **4**, 425-440.
- Pratt, D. M., 1965: The winter-spring diatom flowering in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 173-184.
- 西條八束・三田村緒佐武, 1995: 新編湖沼調査法. 講談社サイエンティフィク, 東京, 121-125.

- Sarno, D., W. H. C. F. Kooistra, L. K. Medlin, I. Percopo and A. Zingone, 2005: Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *J. phycol.*, **41**, 151-176.
- 佐々木和之・鬼頭鈞, 2003: 有明海で発生した *Rhizosolenia imbricata* Brightwell の増殖特性. 日本プランクトン学会報, **50**, 79-87.
- Shiraishi, T., S. Hiroishi, K. Nagai, J. Go, T. Yamamoto and I. Imai, 2007: Seasonal distribution of the shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Ago Bay monitored by an indirect fluorescent antibody technique using monoclonal antibodies. *Plankton Benthos Res.*, **2**, 49-62.
- Shiraishi, T., S. Hiroishi, S. Taino, T. Ishikawa, Y. Hayashi, S. Sakamoto, M. Yamaguchi and I. Imai, 2008: Identification of overwintering vegetative cells of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* in Uranouchi Inlet, Kochi Prefecture, Japan. *Fish. Sci.*, **74**, 128-136.
- Smayda, T. J., 1969: Experimental observations on the influence of temperature, light, and salinity on cell division of the marine diatom, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *J. Phycol.*, **5**, 150-157.
- Smayda, T. J., 1973: The growth of *Skeletonema costatum* during a winter-spring bloom in Narragansett Bay, Rhode Island. *Norw. J. Bot.*, **20**, 219-247.
- Smayda, T. J., 1980: Phytoplankton species succession. In "The physiological ecology of phytoplankton" (ed. by I. Morris), Blackwell, Oxford, 493-570.
- Smayda, T. J., 1990: Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In "Toxic Marine Phytoplankton" (eds. by E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler and D. M. Anderson), Elsevier, New York, 29-40.
- Smayda, T. J., 1998: Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. *ICES J. Mar. Sci.*, **55**, 562-573.
- Sommer, U., 1985: Comparison between steady state and non-steady state competition: Experiments with natural phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **30**, 335-346.
- Sommer, U., 1989: The role of competition for resources in phytoplankton succession. In "Plankton ecology: Succession in plankton communities" (ed. by U. Sommer), Springer, Berlin, 57-106.
- Strickland, J. D. H., 1958: Solar radiation penetrating the ocean. A review of requirements, data and methods of measurement, with particular reference to photosynthetic productivity. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **15**, 453-493.
- 首藤俊雄・松原賢・久野勝利, 2009: 有明海の栄養塩環境とノリ養殖. 海洋と生物, **181**, 168-170.
- Tada, K., S. Pithakpol, K. Ichimi and S. Montani, 2000: Carbon, nitrogen, phosphorus, and chlorophyll a content of the large diatom, *Coscinodiscus wailesii* and its abundance in the Seto Inland Sea, Japan. *Fish. Sci.*, **66**, 509-514.
- 高橋正征, 1997: 赤潮生物の生物学的特徴, 3・3 生理学的特徴. 「赤潮の科学」(岡市友利編), 恒星社恒星閣, 東京, 76-98.
- 高橋正征・古谷研・石丸隆(監訳), 1996: 粒状物質の一次生産. 「生物海洋学2」, 東海大学出版会, 東京, 11-19.
- 高野秀昭, 1990: *Eucampia zodiacus*. 「日本の赤潮生物」(福代康夫・高野秀昭・千原光雄・松岡敷充編), 内田老鶴圃, 東京, 274-275.
- 高辻英之・飯田悦左・高山晴義, 2005: 2004年に広島県沿岸で発生した *Chattonella ovata*. 広水研報, **23**, 19-22.
- 樽谷賢治, 1999: 有害渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense*

- の増殖機構に関する生理生態学的研究. 瀬戸内水研報, **1**, 63-96.
- 樽谷賢治, 2007: 瀬戸内海の環境の30年間の変化—水産の環境モニタリング“浅海定線観測調査”のとりまとめ—. 日本ベントス学会誌, **62**, 52-56.
- Toda, T., 2008a: Industrial and human activities, Changes in the environment in the Seto Inland Sea. In “*Environmental conservation of the Seto Inland Sea*”, International EMECS Center, Kobe, 20-26.
- Toda, T., 2008b: Negative load on the environment, Changes in the environment in the Seto Inland Sea. In “*Environmental conservation of the Seto Inland Sea*”, International EMECS Center, Kobe, 27-32.
- 東海正, 1997: MS-Excel のソルバーによる曳網の網目選択性 Logistic 式パラメータの最尤推定. 水産海洋研究, **61**, 288-298.
- Tomas, C. R., 1978: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survivals. *J. Phycol.*, **14**, 309-313.
- 角皆静男, 1979: 植物プランクトン組成を決定する第1因子としての溶存ケイ素. 北大水産彙報, **30**, 314-322.
- Uchida, T., 1992: Alkaline phosphatase and nitrate reductase activities in *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **38**, 85-92.
- 上野俊士郎, 1991: 日本沿岸における海産珪藻 *Skeletonema* 属 2 種の生活環と分布に関する研究. 水大研報, **40**, 23-58.
- 鷲尾圭司・島本信夫・堀豊・岡本繁好・上田隆敏, 2005: 兵庫県における栄養環境の変化とノリ養殖漁場の盛衰. 海洋と生物, **158**, 238-245.
- 渡辺信, 1988: 水の華, 赤潮の微生物実験法. 「環境微生物実験法」(須藤隆一編), 講談社サイエンティフィク, 東京, 190-214.
- Watanabe, M. M., Y. Nakamura, S. Mori and S. Yamochi, 1982: Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.*, **30**, 279-288.
- Xu, N., S. Duan, A. Li, C. Zhang, Z. Cai and Z. Hu, 2010: Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae*, **9**, 13-17.
- 山田真知子・鶴田新生・吉田陽一, 1980a: 植物プランクトンの富栄養階級表. 日水誌, **46**, 1435-1438.
- 山田真知子・鶴田新生・吉田陽一, 1980b: 二・三の海域の富栄養度判定. 日水誌, **46**, 1439-1444.
- 山田真知子・鶴田新生・吉田陽一, 1982: 瀬戸内海主要海域の生物学的富栄養階級図. 日水誌, **48**, 1129-1132.
- Yamaguchi, H., S. Sakamoto and M. Yamaguchi, 2008a: Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorous-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful algae*, **7**, 26-32.
- Yamaguchi, H., K. Mizushima, S. Sakamoto and M. Yamaguchi, 2010: Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, **9**, 398-401.
- 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. 南西水研報, **27**, 251-394.
- 山口峰生, 1998: 赤潮. 「沿岸の環境圏」(平野敏行監修), フジテクノシステム, 東京, 181-190.
- 山口峰生・本城凡夫, 1989: 有害赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の増殖におよぼす水温, 塩分および光強度の影響. 日水誌, **55**, 2029-2036.
- Yamaguchi, M. and I. Imai, 1994: A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stages in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Phycologia*, **33**, 163-170.



- Yamaguchi, M. and S. Itakura, 1999: Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus- limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fish. Sci.*, **65**, 367-373.
- 山口峰生・松山幸彦, 1994: 珪藻類における栄養塩の利用特性及び *Chattonella* との栄養塩競合. 「有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究」, 南西海区水産研究所, 広島, 77-91.
- 山口峰生・今井一郎・本城凡夫, 1991: 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antique* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. *日水誌*, **57**, 1277-1284.
- 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**, 700-706.
- Yamaguchi, M., S. Itakura, K. Nagasaki, Y. Matsuyama, T. Uchida and I. Imai, 1997: Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattoella verruculosa* (Raphidophyceae). *J. Plankt. Res.*, **19**, 1167-1174.
- Yamaguchi M., S. Itakura and T. Uchida, 2001: Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the 'novel red tide' dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae). *Phycologia*, **40**, 313-318.
- Yamaguchi, M., S. Itakura, K. Nagasaki and Y. Kotani, 2002: Distribution and abundance of resting cysts of the toxic *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in sediments of the western Seto Inland Sea, Japan. *Fish. Sci.*, **68**, 1012-1019.
- 山口峰生・板倉茂・長井敏, 2003: 生活史特性からみた珪藻赤潮の発生機構. *海苔と海藻*, **65**, 18-22.
- Yamaguchi, M., H. Yamaguchi, G. Nishitani, S. Sakamoto and S. Itakura, 2008b: Morphology and germination characteristics of the cysts of *Chattonella ovata* (Raphidophyceae), a novel red tide flagellate in the Seto Inland Sea, Japan. *Harmful Algae*, **7**, 459-463.
- 山本千裕・本田一三・白石日出人, 1994: 赤潮対策技術開発試験—マリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験—. 「平成 5 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告書」, 福岡県水産海洋技術センター, 福岡, 265-269.
- 山本昌幸, 2003: 瀬戸内海中央部の備讃瀬戸における水温と塩分の長期変動. *水産海洋研究*, **67**, 163-167.
- Yamamoto, T., 2003: The Seto Inland Sea - eutrophic or oligotrophic? *Mar. Pollut. Bull.*, **47**, 37-42.
- 山本民次・高尾允英, 1988: スサビノリ *Porphyra yezoensis* 葉体のアンモニア態および硝酸態窒素の取り込みに及ぼす温度の影響. *藻類*, **36**, 37-42.
- Yamamoto, T. and H. Tsuchiya, 1995: Physiological responses of Si-limited *Skeletonema costatum* to silicate supply with salinity decrease. *Bull. Plankton Soc. Jpn.*, **42**, 1-17.
- 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**, 95-101.
- Yamamoto, T. and K. Tarutani, 1999: Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Phycol. Res.*, **47**, 27-32.
- 山本民次・石田愛美・清水徹, 2002a: 太田川河川水中のリンおよび窒素濃度の長期変動—植物プランクトン種の変化を引き起こす主要因として. *水産海洋研究*, **66**, 102-109.
- 山本民次・橋本俊也・辻けい子・松田治・樽谷賢治, 2002b: 1991~2000 年の広島湾海水中における親生物元素の時空間的変動, 特に植物プランクトン態 C: N: P 比のレッドフィールド比からの乖離. *沿岸海洋研究*, **39**, 163-169.

- Yamamoto, T., S. J. Oh and Y. Kataoka, 2002: Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **68**, 356-363.
- Yamamoto, T., S. J. Oh and Y. Kataoka, 2004: Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **70**, 108-115.
- 山砥稔文・坂口昌生・松田正彦・岩永俊介・岩滝光儀・松岡数充, 2005a: 大村湾産有害渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* の二枚貝への影響と増殖特性. *日水誌*, **71**, 746-754.
- 山砥稔文・坂口昌生・高木信夫・岩滝光儀・松岡数充, 2005b: 西九州沿岸に分布する有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* Margalef の増殖に及ぼす水温, 塩分および光強度の影響. *日本プランクトン学会報*, **52**, 4-10.
- 矢持進, 1984: 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 6 種の増殖に及ぼす水温の影響. *日本プランクトン学会報*, **31**, 15-22.
- 矢持進, 1989: 大阪湾における *Heterosigma akashiwo* の赤潮発生機構に関する研究. *大水試研報*, **8**, 1-110.
- Yamochi, S. and T. Abe, 1984: Mechanisms to initiate a *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay. *Mar. Biol.*, **83**, 255-261.
- Yanagi, T., 2008: Outline of the Seto Inland Sea. In "Environmental conservation of the Seto Inland Sea", International EMECS Center, Kobe, 2-18.
- Yoder, J. A., 1979: Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **15**, 362-370.
- 吉松定昭, 1992: 瀬戸内海における赤潮生物特に渦鞭毛藻類 *Alexandrium* 属 2 種, ラフィド藻類 3 種の生活史に関する研究. *香赤潮研報*, **4**, 1-90.