

赤潮総合対策調査事業 -
 (赤潮対策技術高度化事業 - 2)
 (シャットネラ等赤潮被害防止技術高度化)

保科圭佑・西 広海・矢野浩一・小湊幸彦

【目的】

シャットネラ属に対する改良型粘土の有効濃度と野外における養殖魚（ブリ）への影響及び海中における粘土の沈降状況，破裂細胞の毒性を把握する。

【方法】

1 改良型粘土による有害プランクトン防除効果、外部形態別密度の変化の把握

改良型粘土(入来モンモリ+焼ミョウバン，以下「粘土」)の防除効果確認のため，有害プランクトンを用いた添加試験を実施した(n=3)。試験には*Chattonella antiqua* (平成21年八代海産株)および*Chattonella marina* (平成20年鹿児島湾産株)を用いた。培養は22℃，14hL:10hDの明暗条件下で実施した。大量培養した*C. antiqua* は1,000~5,000 cells/ml，*C. marina* は16,000 cells/mlの密度になるよう調整し，300 ml容フラスコに300 ml分注した。なお，*C. antiqua* 5,000 cells/ml区及び*C. marina* 16,000 cells/ml区は，試験開始前のpHが9以上と高く，6N塩酸を用いてpH 8.1~8.2になるように調整した。これらに表1に示す配合の粘土を添加し，時間ごとの外部形態別細胞密度，pHの経時変化を計測した。外部形態別の細胞は遊泳，遊泳停止，球形・変形細胞の3種に分けて計数し，試験設定時の細胞密度から前述3種の合計を引いて算出したものを死滅細胞密度と判断して時間ごとの細胞減少率を算出した。

表1 粘土添加試験の設定条件

種	細胞密度 (cells/ml)	pH調整	改良型粘土添加量(ppm)	測定時間	外部形態判定
			入来モンモリ+焼ミョウバン		
<i>Chattonella antiqua</i>	1000	無し	1,000+100	散布前 5分後 30分後 1時間後 3時間後 6時間後 24時間後	遊泳細胞 遊泳停止細胞 球形・変形細胞
			1,000+125		
			1,000+150		
	2000		1,000+100		
			1,000+125		
			1,000+150		
5000	1,000+100				
	16,000	有り	1,000+100	死滅細胞	
			1,000+125		
1,000+150					

2 改良型粘土の海中における拡散状況の把握試験及び安全性確認試験

鹿児島県水産技術開発センター前の係留施設に設置した生簀で6月19日と11月27日に実施した。測定内容を表2，試験生簀の見取り図を図1に示す。

1) 第1回試験(6月19日)

縦4 m×横4 mの生簀内にブリを6尾収容し，生簀の直上から粘土を散布後，24時間行動観察を行った。供試魚は平均体重1,271 gのブリを用いて，試験実施日の1週間前より生簀に収

容して馴致し、その間は絶食とした。散布する粘土は水深1 mまで拡散した際に1,000+100 ppmとなる量（入来モンモリ16kg，焼ミョウバン1.6kg）とし，コンテナ内で海水と5分間攪拌後，生簀の2方向からバケツを用いて散布した。粘土の鉛直方向の広がりを確認するため，試験は潮流の影響の少ない満潮時に実施した。採水場所は生簀直上で散布した地点（以下St.1）とそこから潮流の下流方向に当たる南東方向に約4 m離れた地点（以下St.2）の2地点とした。この2地点で時間ごとに水深0 m，1 m，3 m，5 mで採水と多項目水質計（DS-5 HYDOLAB社製，YSI6600-V2 YSI社製）を用いた水質測定（水温、塩分、溶存酸素量）を行った。pHについては海水を試験室に持ち帰り，卓上pHメーターを用いて測定した。また，採水した海水試料はガラス繊維濾紙でろ過し，懸濁物質量を測定した。

さらに電磁流速計(ACM-8M アレック電子社製)をSt.3の水深1 m，3 mに設置し，潮流を測定した。測定は1分ごとに1秒間隔で15サンプル計測するように設定し，回収したデータから水深毎の平均流速を求めた。また，粘土の沈降・拡散状況や魚類の行動を把握するため，水深1 m，3 mに水中カメラを設置した。

2) 第2回試験（11月27日）

生簀内にブリを10尾収容し，生簀の直上から粘土を散布後，24時間行動観察を行った。供試魚は平均体重3,105 gのブリを用い，試験実施日の1週間前より生簀に収容して馴致し，その間は絶食とした。粘土の散布量は第1回目の試験と同様の1,000+100 ppmとし，コンテナ内において海水と5分間攪拌後，生簀の4方向からバケツを用いて散布した。粘土の鉛直方向の広がりを確認するため，試験は潮流の影響の少ない満潮時に実施した。第1回試験と同様の地点，水深及び方法で水温，塩分，溶存酸素量，pH，懸濁物質量を測定した。なお，潮流についてはSt.3の水深1 mのみを測定した。

表2 試験時の測定内容

地点	測定水深	測定時間	測定項目
St. 1 (粘土散布地点)	0m	散布前 散布直後	水温 塩分 溶存酸素量 pH 懸濁物質量
	1m	5分後 10分後	
St. 2 (散布地点から4m地点)	3m	20分後 1時間後	
	5m	2時間後 24時間後	
St. 3 (電磁流速計設置位置)	1m (1回のみ)3m	散布前 ～ 1時間後	流向・流速

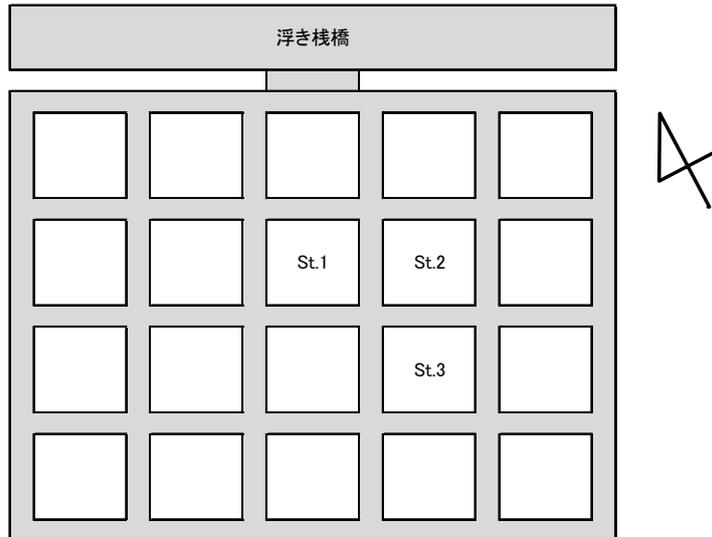


図1 試験生簀見取り図

3 シャットネラ アンティーカの破裂細胞による魚類への影響試験

昨年度、粘土によって球形・変形化した細胞が魚類への毒性を保持していることを報告した。そこで、本試験では粘土により破裂した*C. antiqua*が魚類へ与える影響を検討した。設定した試験内容を表3に示す。ろ過海水に粘土を添加し上清をブリに曝露した区（試験区1）、*C. antiqua*の培養液に粘土を添加し細胞を破壊した上清をブリに曝露した区（試験区2）およびろ過海水を用いた対照区の3区を設定した（表3）。試験区ごとに500 Lポリカーボネート水槽に海水300 Lを注水し、平均体重860 gのブリ2尾を試験1週間前から収容した。試験までの期間は止水・通気・無給餌とし、毎日飼育水の2/3を交換した。水温は1 kWチタン棒ヒーターで1日1 ずつ昇温し、16 から最終的に23 にした。

試験に用いた*C. antiqua*は、1 tポリカーボネート水槽にSWM 培地20 Lを注水し、培養開始密度が64 cells/mlとなるよう接種した。その後24 , 60 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, 14hL:10hDの明暗条件下で培養を行った。

ろ過海水のみ及び、培養した*C. antiqua*をろ過海水で6,000 cells/mlになるよう希釈したものをそれぞれ200 Lアルテミア孵化槽に200 Lずつ注水した。それぞれの水槽に粘土(1,000+150 ppm)を添加後5分間攪拌、15分間静置し、粘土を沈降させた。

500 Lポリカーボネート水槽から事前に100 L排水し、200 Lアルテミア孵化槽で得られた上清各100 Lを添加して試験を開始した。なお、試験区2は*C. antiqua* 2,000 cells/ml換算とした。試験中は止水・通気条件とし、多項目水質計を用いた水質測定及び供試魚の行動観察を24時間行った。また、*C. antiqua*に粘土を添加・静置した上清は、曝露試験開始後20分、30分、6時間、24時間に採水し、*C. antiqua*の状態を検鏡にて確認した。

表3 試験区設定

試験区	粘土添加	細胞密度 (cells/ml)	測定時間	測定項目
試験区1	有	0	散布前 散布直後	水温
試験区2	有	2000	5分後 10分後 20分後 1時間後	
対照区 (濾過海水のみ)	無	0	2時間後 24時間後	塩分 溶存酸素量 pH

【結果及び考察】

1 改良型粘土による有害プランクトン除去効果、外部形態別密度の変化

1) *C. antiqua* 1,000 cells/mlへの効果

全ての試験区において細胞減少率は5分後に70%，30分後に90%以上となった(図2)。

pHは焼ミョウバンの添加量に応じて低下したが、いずれの試験区も6を下回ることにはなかった(図3)。

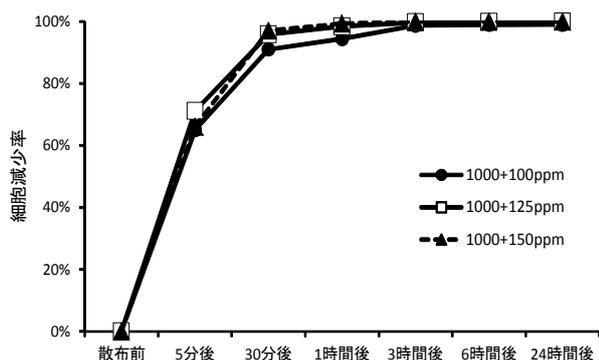


図2 粘土散布後の細胞減少率変化
(*C. antiqua* 1,000 cells/ml)

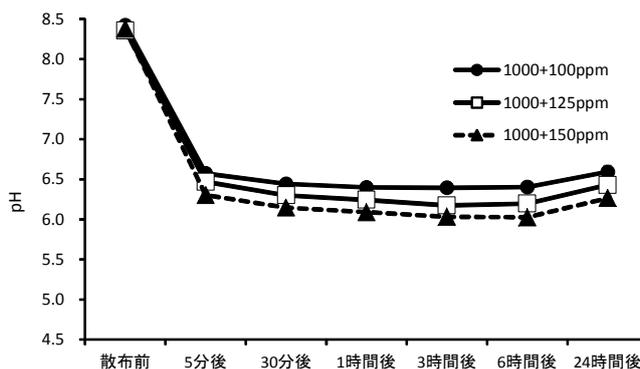


図3 粘土散布後の pH 変化
(*C. antiqua* 1,000 cells/ml)

2) *C. antiqua* 2,000 cells/mlへの効果

1,000+100 ppm区, 1,000+150 ppm区では細胞減少率が5分後に70%，1,000+125 ppmでは60%で、30分後には全ての試験区において90%以上となった(図4)。pHは焼ミョウバンの添加量に応じて低下したが、1,000+150 ppm区を除き6を下回ることにはなかった(図5)。

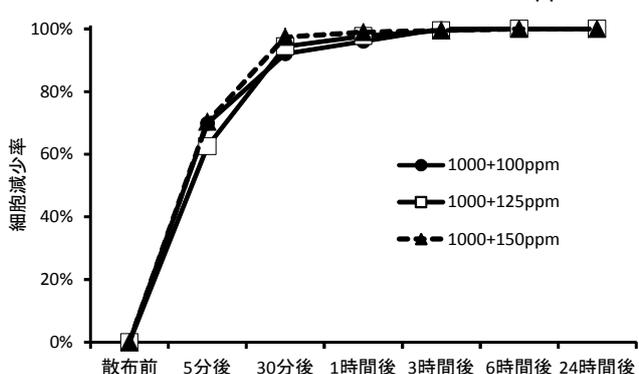


図4 粘土散布後の細胞減少率変化
(*C. antiqua* 2,000cells/ml)

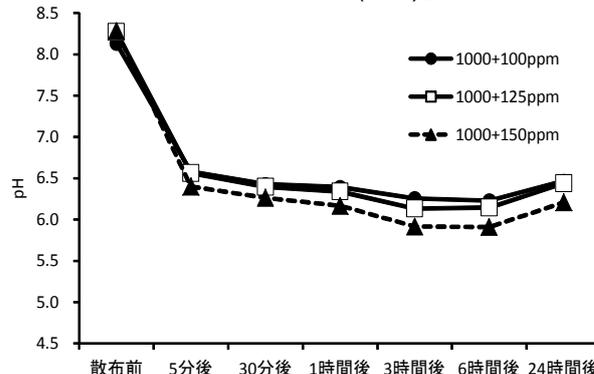


図5 粘土散布後の pH 変化
(*C. antiqua* 2,000cells/ml)

3) *C. antiqua* 5,000 cells/mlへの効果

細胞減少率は5分後に85%以上となり(図6), pHは5.9まで低下した(図7)。

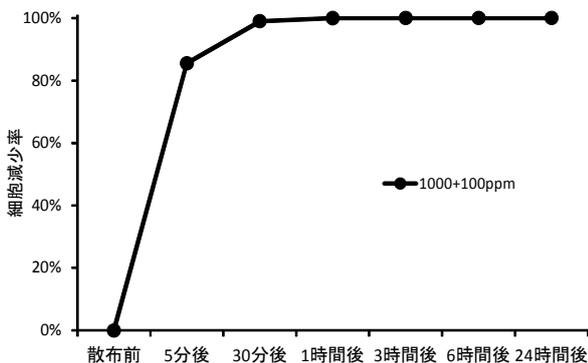


図6 粘土散布後の細胞減少率変化
(*C. antiqua* 5,000cells/ml)

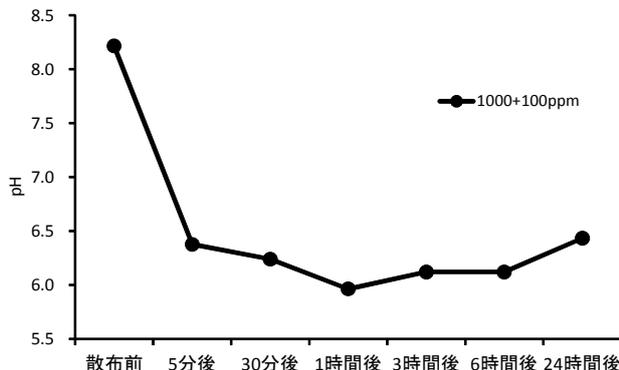


図7 粘土散布後のpH変化
(*C. antiqua* 5,000cells/ml)

4) *C. marina* 16,000 cells/mlへの効果

全ての試験区において細胞減少率が5分後に95%以上となった(図8)。また全ての試験区で5分後にはpHが6以下となり, 1000+125 ppm区、1000+150 ppm区ではそれぞれ1時間後, 6時間後に5以下となった(図9)。

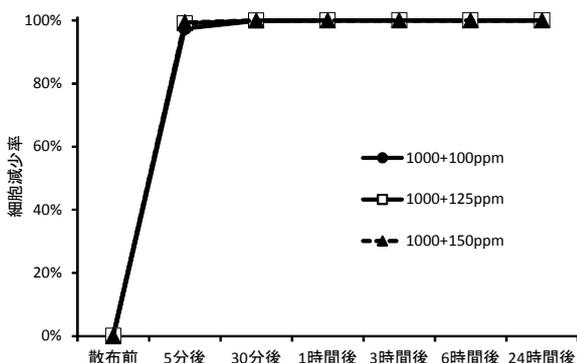


図8 粘土散布後の細胞減少率変化
(*C. antiqua* 16,000cells/ml)

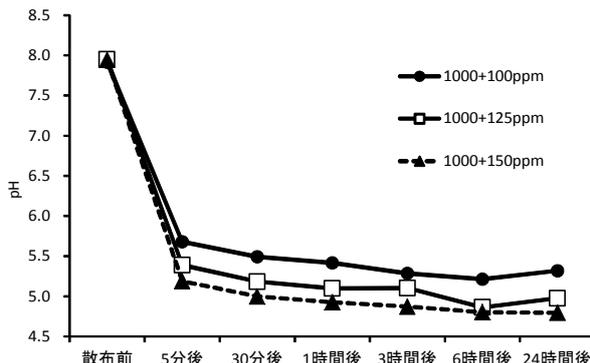


図9 粘土散布後のpH変化
(*C. antiqua* 16,000 cells/ml)

5) 改良型粘土の*C. antiqua* および*C. marina* に対する効果について

C. antiqua において, 1,000 cells/ml区及び2,000 cells/ml区に対し1,000+100 ppmの改良型粘土を添加することによって両者ともに5分後には70%以上の細胞減少率を示した。この結果から, *Chattonella antiqua* について2,000 cells/mlまでは防除効果に変化が無いことが示唆された。一方で、より細胞密度の高い*C. antiqua* 5,000 cells/ml区の5分後の細胞減少率が85%, *C. marina* 16,000 cells/ml区では5分後の細胞減少率が95%と高い減少率を示した。

C. antiqua 5,000 cells/ml区及び*C. marina* 16,000 cells/ml区では焼ミョウバン添加量が同じであってもpHの低下が顕著であり, これに伴ってアルミニウムイオンの溶出量が増加し防除効果が向上したと考えられる。この2試験区は事前に6N塩酸によるpH調整を実施しており, 顕著なpH低下はpH調整が要因の一つとして考えられるが, 詳細な要因については今後さら

に検討する必要がある。なお、6N塩酸を添加しpH調整後に粘土添加を行った予備試験 (*C. marina* 8,000 cells/ml) においては今回のような急激なpHの変化は確認されなかった。またこの予備試験ではpH調整後に*C. marina*に対する変形や球形化などの細胞への影響は確認されず、30分経過後にはパッチ形成を確認した。

2 改良型粘土の安全性確認試験及び海中における拡散状況の把握試験

1) 第1回試験(6月19日実施)

懸濁物質量の推移を図10, 11に、pHの推移を図12, 13に、水深1 m, 3 mの南北方向の流速を図14, 15に、水深1 m, 3 mの東西方向の流速を図16, 17に示す。

水質について水温は23.0~23.6℃, 塩分は33.1~33.6‰, 溶存酸素量は6.0~7.3 mg/lで推移した。上記3項目について試験中には大きな変化が見られず、粘土が与える影響は非常に小さいと考えられた。一方pHは散布直後のSt.1 (水深0~3 m)において著しく低下したが、5分後には散布前とほぼ同じ値になった(図12, 13)。

散布直後のSt.3 水深1 mの流速は北東方向に3.8 cm/s, 水深3 mは南南西方向に1.5 cm/sであった。水深1 mと3 mで逆方向の流れがあり、散布された粘土はほぼ南北方向に往復するような移動が目視で観察された。平均流速は水深1 mで3.9 cm/s, 水深3 mで2.1 cm/sであった。

沈降状況について懸濁物質量に着目すると、水深0~3 mでは散布直後に最も高くなり、5分後ではほぼ散布前と同じ値になったことから(図10, 11)、散布された粘土は沈降を続け、表層に滞留する時間は5分以内であることが示唆された。また水中カメラの映像から散布後30秒で水深3 mまで到達していたことや、St.1の水深5 mで5分後に懸濁物質量のピークがあること、目視で25分後に水深3 mの底網が確認できたことなどから、潮止まり時の粘土の沈降速度は約0.2~10 cm/sほどと推測された。なお、直下地点において30分以降に懸濁物質量が増加しているが、色や粒径が異なることから粘土の影響ではないと思われた。

魚類への影響について、散布開始から24時間後まで鼻上げ、立ち泳ぎなどの異常行動やへい死などは確認されなかった。

今回の試験では懸濁物質量が最大でも149 mg/lであり、想定していた散布量(1,100mg/l)の約1/8しか得ることができなかった(図10)。

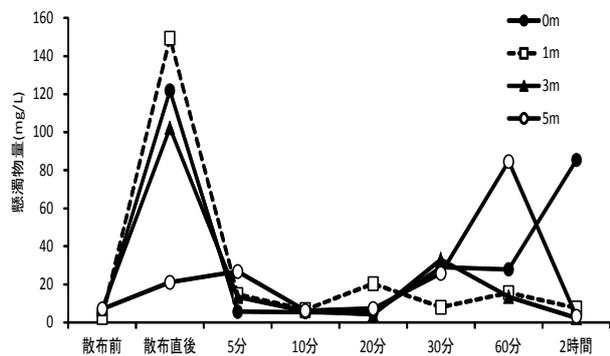


図10 St.1 の懸濁物質量推移

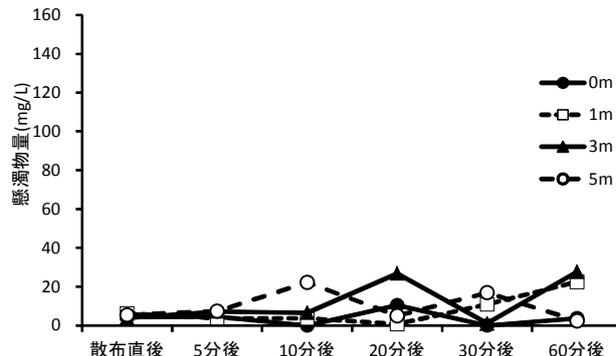


図11 St.2 の懸濁物質量推移

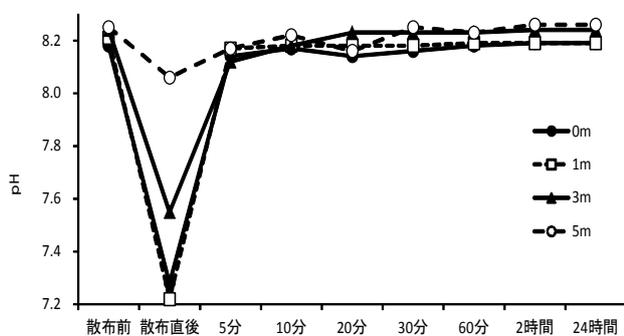


図12 St.1 のpH推移

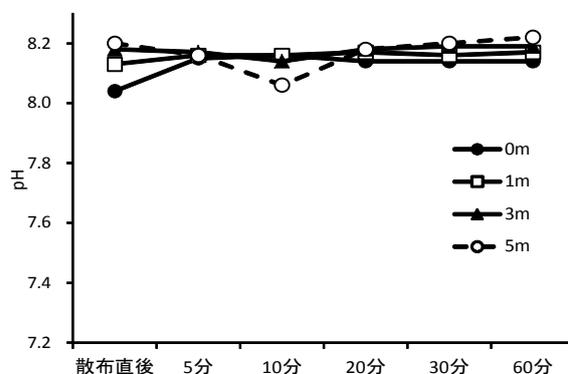


図13 St.2 のpH推移

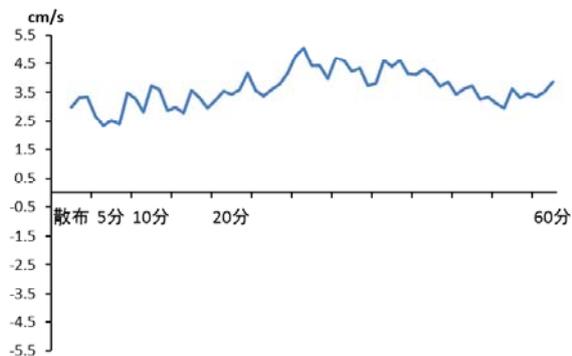


図14 St.3 水深1 mの流速(南北方向)

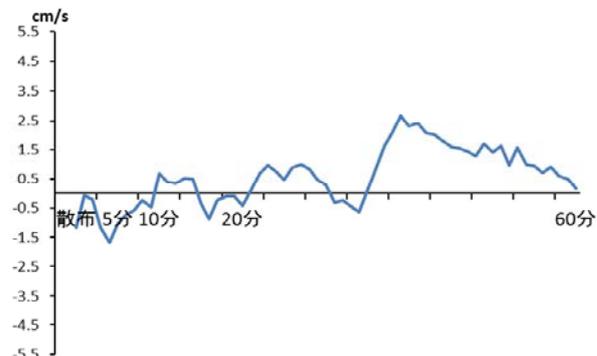


図15 St.3 水深3 mの流速(南北方向)

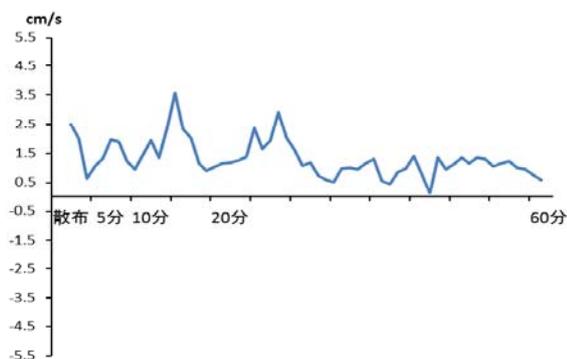


図16 St.3 水深1 mの流速(東西方向)

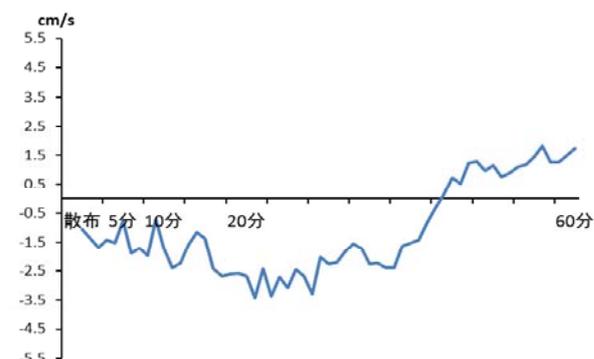


図17 St.3 水深3 mの流速(東西方向)

2) 第2回試験(11月27日実施)

6月に実施した第1回試験では2方向から粘土を散布したため、散布に時間がかかり、想定していた懸濁物質量を得ることができなかった。そこで第2回試験では迅速に散布するため、4方向から散布して散布時間の短縮を図った。

懸濁物質量の推移を図18, 19に、pHの推移を図20, 21に、St.3 水深1 mの南北・東西方向の流速を図22, 23に示す。

水質について、水温は19.7~20.6℃、塩分は33.1~33.5、溶存酸素量は7.1~7.5 mg/lで推移し、上記3項目について試験中には大きな変化が見られず、粘土が与える影響は非常に小さいと考えられた。一方pHは散布直後のSt.1 (0 m)において低下したが、5分後には散布前とほぼ同じ値になった(図18, 19)。

流況は散布直後の流速は東方向に2.4 cm/sで、平均流速は3.1 cm/sであった。沈降状況について懸濁物質量に着目するとSt.1の水深0 mでは散布直後に最も高くなり、5分後ではほぼ散布前と同じ値になった。St.1の水深0 m以外では懸濁物量の顕著な増加は確認できず、最大でも114 mg/lであり、想定していた散布量(1,100 mg/l)の約1/10しか得ることができなかった(図18)。なお、20分後には水深3 mにある生簀の底を目視することができた。魚類への影響について、散布開始から24時間後まで異常行動やへい死などはみられなかった。

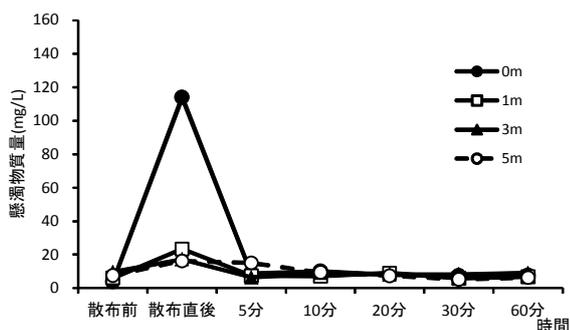


図18 St.1 の懸濁物質量推移

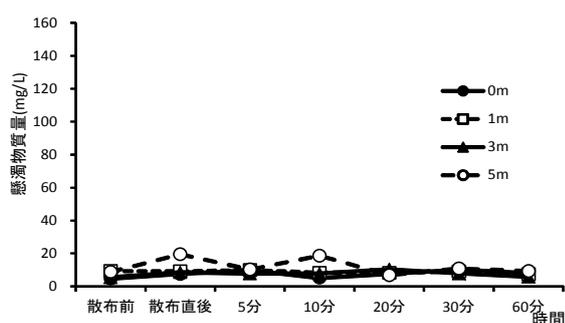


図19 St.2 の懸濁物質量推移

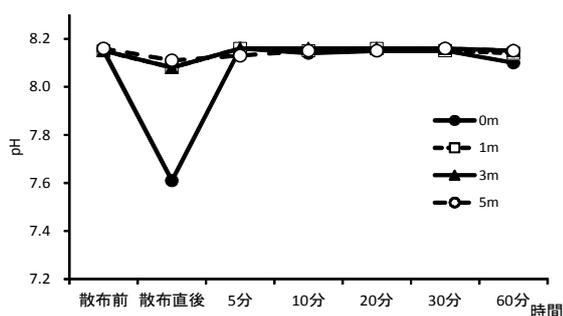


図20 St.1 のpH推移

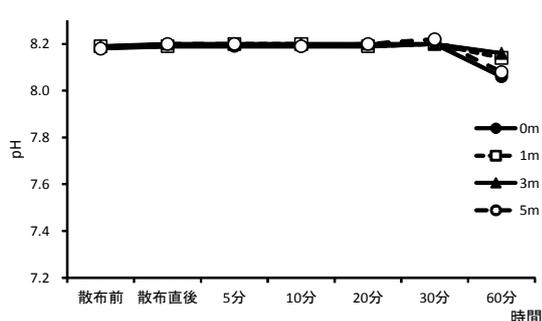


図21 St.2 のpH推移

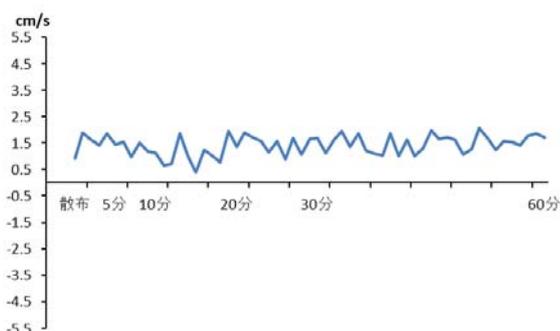


図22 St.3 水深1 mの流速(南北方向)

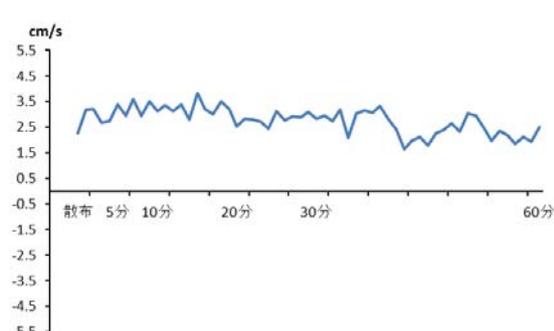


図23 St.3 水深1 mの流速(東西方向)

3 シャットネラ属の破裂細胞による魚類への影響試験

各試験区の水質変化を表4に，上清添加後の*C. antiqua*細胞密度を表5に示す。また，溶存酸素量とpHの推移を図24，25に，試験区2の細胞密度推移を図26に示す。水温・塩分はいずれの試験区でも試験期間中を通してほぼ一定で推移した(表4)。溶存酸素量は，試験区1、2ともに開始直後から30分にかけて減少した(図24)。この間は供試魚が活発に遊泳し，それに伴い溶存酸素が低下したと考えられる。pHは，無処理区においても8以下で推移した(表4，図26)。試験区1では試験30分後に最低値7.0，試験区2では24時間後に最低値7.2となった(表4，図26)。試験区2のpH低下の要因は供試魚の呼吸によるものと考えられる。

*C. antiqua*について，開始時6,000 cells/mlだった細胞密度が粘土添加15分後には遊泳停止細胞24 cells/ml，球形・変形細胞392 cells/mlとなり，90%以上の細胞減少率を示した。試験区2において*C. antiqua*の細胞密度は試験中ほぼ一定であったが，時間経過と共に球形・変形細胞は減少し，逆に遊泳・遊泳停止細胞は増加した(図26)。改良型粘土の有効成分が希釈された事によって*C. antiqua*の状態が回復したのと考えられる。

供試魚の行動について無処理区は変化が見られず，一方で試験区1，2において試験開始30分間に鰓蓋の開閉運動の増加及び遊泳速度の上昇などが確認された。特に試験区2では，頻繁に反転し，通常と異なった遊泳行動が見られた。いずれの試験区においても試験開始60分以降は沈静化し，鼻上げや立ち泳ぎなどの異常行動及びへい死は確認されなかった。今回改良型粘土の添加により2,000 cells/mlの*C. antiqua*を破裂させた海水は，860 gのブリの24時間までの生存に対し影響がないことが示唆された。なお，過去の試験において*C. antiqua*の培養株1,000 cells/ml程度でブリのへい死が見られたことから，培養株2,000 cells/mlでは確実にブリをへい死させたと思われた。

表4 各試験区の水質変化

試験区名	水温()	塩分(PSU)	溶存酸素量(mg/L)	pH
試験区	23.5 ~ 23.9	34.2 ~ 34.3	3.7 ~ 6.0	7.0 ~ 7.7
試験区	23.5 ~ 23.8	34.2 ~ 34.3	3.1 ~ 6.1	7.2 ~ 7.7
無処理区	23.5 ~ 23.7	34.2 ~ 34.3	5.1 ~ 6.1	7.5 ~ 7.8

表5 *C. antiqua* の検鏡結果

サンプリング水槽	状態	曝露試験開始後				
		直後	20分	30分	6時間	24時間
(cells/ml)						
試験区2	遊泳	2,000相当	0	1	17	31
	遊泳停止		12	24	27	56
	球形・変形		137	124	108	58

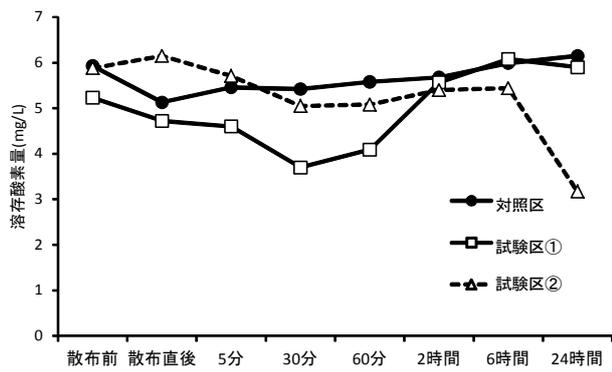


図24 各試験区における溶存酸素量の推移

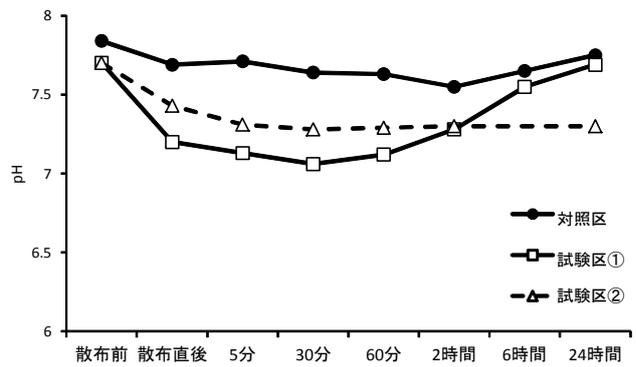


図25 各試験区におけるpHの推移

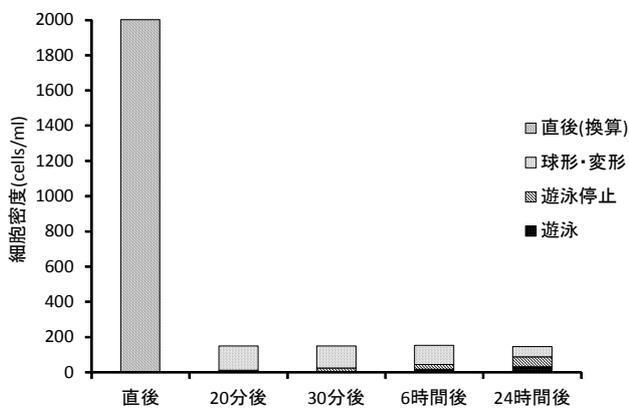


図26 試験区2における外部形態別細胞密度の推移