

赤潮総合対策調査事業－V (赤潮被害防止緊急対策事業)

折田和三, 西広海, 田原義雄

【目的】

赤潮発生前から終息後までの連続調査や発生時の集中調査を実施するとともに、*Chattonella*の分布状況や養殖魚に対する影響を調査することにより、赤潮の予察につながるデータを蓄積し、漁業者に的確な予察を提供する体制を構築する。

【方法】

1 シスト休眠解除に関する調査

(1)底層水温モニタリング

長島周辺の養殖漁場4点(図1★印)でデータロガー式水温計(Onset社Tidbit)を0m, 10m及び底上1m(以下B-1mという)に位置するよう養殖生簀鋼管枠に垂下し, 1時間ごとに周年測定した。

(2)シスト発芽能確認調査

2012年4月16日に長島周辺の養殖漁場4点(図1★印)で約50m四方の範囲内3カ所からエクマンバージ採泥器で海底泥を採取し, その表面から1cm程度をサジですくい取りサンプルとした。すくい取ったサンプルは, 広口密閉容器に収容後アルミホイルで遮光するとともに, 保冷剤を入れたクーラーボックスに入れ研究室まで持ち帰った。

持ち帰ったサンプルは10℃の冷蔵庫内に2日間保管した後, MPN法¹⁾により発芽したシストの数を求めた。なお, 培養温度は17,18,19,20,22℃の5段階とし, 14L:10Dの明暗周期, 光強度約35μmol/m²/sの光環境下で11日間培養した。

(3)シスト発芽細胞の早期確認

0及びB-1mからバケツ又は採水器((株)離合社製リゴーB号採水器)で採水した海水1Lを目合15μmのプランクトンネットで5ml程度に濃縮した後, その中の*Chattonella*属及び*Cochlodinium polykrikoides*遊泳細胞を検鏡した。4月17日から当所赤潮調査定点の内, 5定点及び薄井の計6定点(図1●印)で, 5月14日から鹿児島大学委託調査の3定点(図1■印)で, 5月17日から東町漁協の定期調査でそれぞれ濃縮検鏡を実施した。なお, 必要に応じて, 0～10m柱状採水のサンプルも用いた。

2 赤潮予察につながる水質連続測定

長島周辺の養殖漁場3定点(図1■印)で5月14日から8月31日まで週3回, 9月から翌3月まで月1回, 合計55回の調査を実施した(表1)。

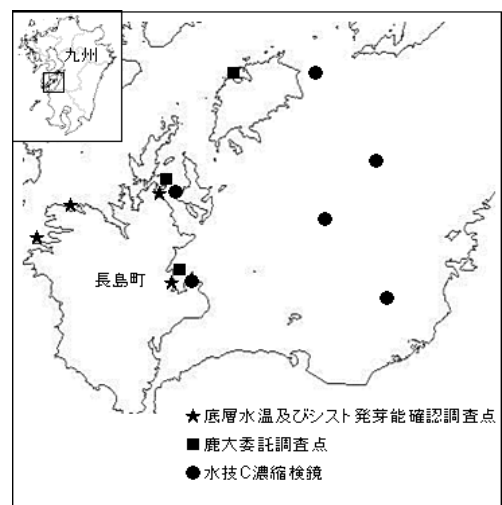


図1 調査定点

表1 水質連続調査実施日

| 月 | 調査実施日 | 回数 |
|----|---------------------------------------|----|
| 5 | 14,16,18,21,23,25,28,30 | 8 |
| 6 | 1,4,6,8,11,13,15,18,20,22,25,27,29 | 13 |
| 7 | 2,4,6,9,11,13,16,18,20,23,25,27,30 | 13 |
| 8 | 1,3,6,8,10,16,17,20,21,22,24,27,29,31 | 14 |
| 9 | 11 | 1 |
| 10 | 16 | 1 |
| 11 | 13 | 1 |
| 12 | 11 | 1 |
| 1 | 8 | 1 |
| 2 | 19 | 1 |
| 3 | 12 | 1 |
| 計 | | 55 |

各調査定点の0m,5m,10m,20m,B-1mで採水器((株)離合社製リゴ- B号採水器)を用いて採水するとともに、多項目水質計(Hyd-rolabo社, DS5)を用いて水温、塩分、pH、DO%、DOmg、Chl-aを測定した。

採水したサンプルは海水1ml中のプランクトンを計数するとともに、栄養塩類分析に供した。

なお、これらの現場調査は、鹿児島大学水産学部へ委託し、栄養塩類は採水されたサンプルを当所がオートアナライザ(BLTEC社製, AACs4)を用いてNO₃-N、NO₂-N、NH₄-N、PO₄-Pを分析した。

3 プリ暴露試験

試験区を表2に示す。密度試験暴露3試験区及び対照区、球形化細胞暴露1試験区及び対照区の計6試験区を設定した。

| 試験区 | <i>Chattonella</i> 細胞密度 (cells/ml) | 調整方法 | 備考 |
|-----|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1 | 2,000 | 培養株を飼育海水で希釈 | へい死密度確認 |
| 2 | 1,000 | 培養株を飼育海水で希釈 | へい死密度確認 |
| 3 | 500 | 培養株を飼育海水で希釈 | へい死密度確認 |
| 4 | 0 | 飼育海水のみ | 試験区1~3の対照区 |
| 5 | 球形2,000 | 培養株を防除剤で遊泳停止又は球形化させた後、上澄みを飼育海水で希釈 | 遊泳停止、球形化細胞毒性確認 |
| 6 | 0 | 試験区5と同様の方法で処理後、上澄みを飼育海水で希釈 | 試験区5の対照区 |

山川町漁協管内の養殖業者から購入したブリ1年魚(体重@1440g)を180L容角形水槽に1試験区当たり2尾を入れ、1日間温海水流水で安静させた後、止水にして暴露試験を行った。暴露試験中、水温は1KWヒーターで加温し23℃に維持した。また、通気及び酸素分散により酸素を供給した。なお、試験開始直後及び適宜、水温、塩分、DOを多項目水質計(YSI社製Model85)で測定し、pHは測定時刻に採水したサンプルをpHメーター(セントラル科学社製UC-23)で測定した。

暴露に供した *Chattonella antiqua*(以下 *C. antiqua* という)は、八代海で2009年8月に単離分離し継代培養していた培養株を設定細胞密度になるように適宜希釈して用いた。また、球形化細胞は同じ培養海水に赤潮防除剤(入来モンモリ300ppm及び焼ミョウバン75ppm)を添加し、5分間攪拌して遊泳停止又は球形化した細胞を用い、暴露の際は粘土粒子による影響を避けるため、処理海水を静置・沈殿させた後、上澄み液を分取して用いた。さらに飼育海水に球形化細胞暴露試験区と同様の粘土処理を施し、静置・沈殿させた後、上澄み液を分取したものを対照区とした。それぞれの試験区にブリを24時間暴露し、その間の供試魚の行動を観察した。

暴露試験でへい死したブリは、へい死確認後直ちに切りあげ、尾叉長及び体重を計測した。さらに、鰓を切り取り、第1鰓弓から第1及び第2鰓弁を数枚切り出して、光学顕微鏡で観察した。また、隣接する部位から鰓弁を含む鰓弓を1cmほどを切り出し0.1%リン酸バッファ2%グルタルアルデヒド固定液に浸漬した。

固定液に浸漬された鰓弁は、定法によりアルコール系列脱水、t-ブチルアルコール置換、凍結乾燥、イオンスパッタ金属蒸着を経て、走査型電子顕微鏡(以下SEMという)(日立製 S-3000N)で観察した。

なお、当初、本事業に計画されていた赤潮広域集中調査及び日周鉛直分布調査は、赤潮が発生しなかったため実施しなかった。

【結果及び考察】

1 シスト休眠解除に関する調査

(1)底層水温モニタリング

長島周辺4カ所に設置されたデータロガーで得られた水温データのうち、2011年12月1日から2012年5月31日までの10m及びB-1m水温の1時間毎の推移を図2に示す。この間、茅屋及び浜瀧では、10mとB-1mの水温差はほとんどなく、水温成層は形成されていなかったと推測される。なお、脇崎のB-1mは3月13日のロガー交換後のロガー計測不良、薄井のB-1mは3月13日のロガー交換時に回収不能によりデータを収集できなかった。2012年八代海における冬期水温は2月20日、脇崎で11.9℃、薄井11.9℃、茅屋12.7℃、浜瀧13.2℃で最低になり、その後脇崎と薄井は次第に、茅屋と浜瀧では3月上旬にかけて急激に上昇に転じた。

この間の、データロガーを設置した海域の底層水温の維持期間を表3に示す。B-1mのデータが欠測した脇崎及び薄井は10mのデータを用いた。12℃以下となった時間は、脇崎で60時間、薄井で42時間、茅屋及び浜瀧では0時間だった。

前年の2011年は2月1日頃、脇崎で11.3℃、幣串11.9℃、伊唐11.2℃で最低になった²⁾が、2012年は最低水温時期が約20日遅く、脇崎では0.6℃2011年より高かった。また、12℃以下となった時間が脇崎では2011年の496時間²⁾に比べて2012年は60時間と短かったことから、2012年の八代海の冬季水温は、2011年に比べてやや高めで推移したと推測される。

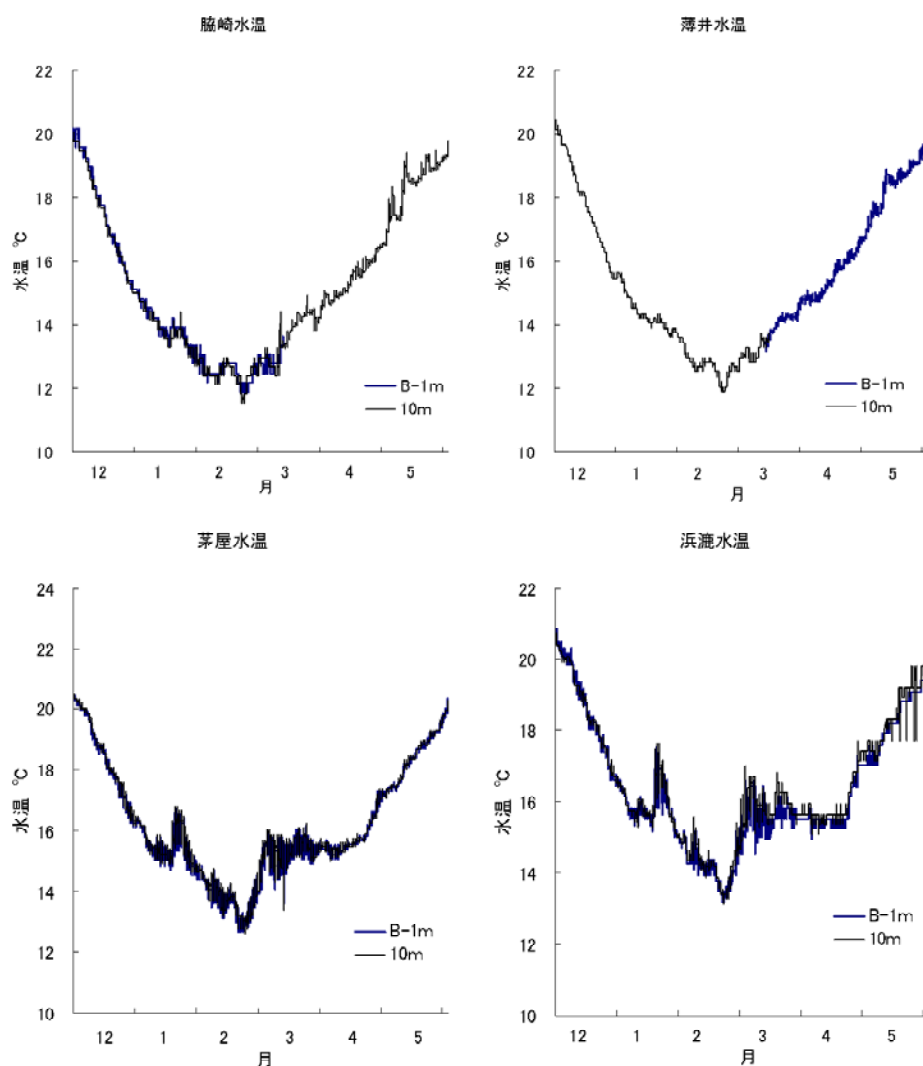


図2 長島周辺養殖漁場の冬季水温の推移

表3 底層水温の維持期間(B-1m又は10m) (時間)

| 水温区分 | 脇崎 | 薄井 | 茅屋 | 浜瀧 |
|-------|-------|-------|-----|-----|
| 15℃以下 | 2,365 | 2,289 | 991 | 704 |
| 14℃以下 | 1,582 | 1,312 | 483 | 211 |
| 13℃以下 | 896 | 761 | 96 | 0 |
| 12℃以下 | 60 | 42 | 0 | 0 |

※脇崎は3/12から、薄井は3/12まで10mデータを使用

(2)シスト発芽能確認調査

各培養温度で発芽したシストの数を図3に示す。長島周辺4カ所のうち、脇崎、薄井、浜瀧で採取されたサンプルから栄養細胞が確認され、茅屋からのサンプルからはどの温度帯からも発芽が確認されなかった。

発芽が確認された水温は、脇崎で20及び22℃の2温度帯、薄井では19及び20℃の2温度帯、浜瀧では17℃の1温度帯となっていた。シスト数はいずれも2MPN/g湿泥でほぼ検出限界の数値であった。

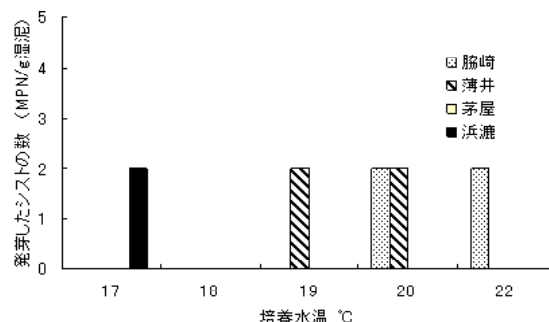


図3 培養水温別の発芽したシスト数

前年の2011年は浜瀧からのみ栄養細胞が確認さ

れ、18℃で7.5MPN/g湿泥、19℃で2MPN/g湿泥、22℃で33MPN/g湿泥であったことから、*Chattonella*のシストは18℃から発芽が始まり、水温が上昇した22℃ではさらに発芽が促されると推測された²⁾。一方、2012年は脇崎、薄井、浜瀧でシストからの発芽が確認されたが、それらの発芽開始水温は採泥した定点で異なり、また、培養水温と発芽したシスト数には明瞭な関係が見られなかった。

(3)シスト発芽細胞の早期確認

5月25日、東町漁協調査で脇崎 (B-1m)及び薄井 (0~10m柱状採水)から*Chattonella*栄養細胞が確認された。当所赤潮調査では6月22日に元ノ尻瀬戸 (0~10m柱状採水)から*Chattonella*栄養細胞が確認された。なお、鹿大委託定点からは、*Chattonella*栄養細胞は確認されなかった。

前年の2011年は5月27日、東町漁協調査で伊唐、幣串、辰の鼻の0~10m柱状採水1000倍濃縮試料から*Chattonella*栄養細胞が確認されており²⁾、2012年もほぼ同時期の初認であった。

2 赤潮予察につながる水質連続測定

2012年6月1日から8月31日までの水質測定結果を2011年と比較した。

水温の推移を図4に示す。底層水温は全ての定点で2012年は2011年よりも高かった。また、6月1日は、各定点ともほとんど2012年と2011年の底層水温に差は見られなかったが、その後20℃に達するまで2011年は10日以上要したのに対し、2012年は数日で到達し水温の上昇が前年よりも早かった。

塩分の推移を図5に示す。表層塩分は2012年は7月1日前後に塩分23~24に低下し、2011年よりもその時期が約10日遅かった。さらに、2011年は7月下旬にも一時的に塩分低下が見られたが、2012年は顕著な低下は見られなかった。

DOの推移を図6に示す。2012年珪藻類が最も多く計数された6月27日に、全ての定点の表層でDOが高かった。脇崎と薄井は、7月10日頃もDOが高かった。

Chl-aの推移を図7に示す。6月下旬と7月10日頃にピークが見られた。

pHの推移を図8に示す。期間を通じて、pH8前後で推移した。

プランクトン細胞密度の推移を図9に示す。6月27日に全ての定点の珪藻の細胞密度がピークとなった。

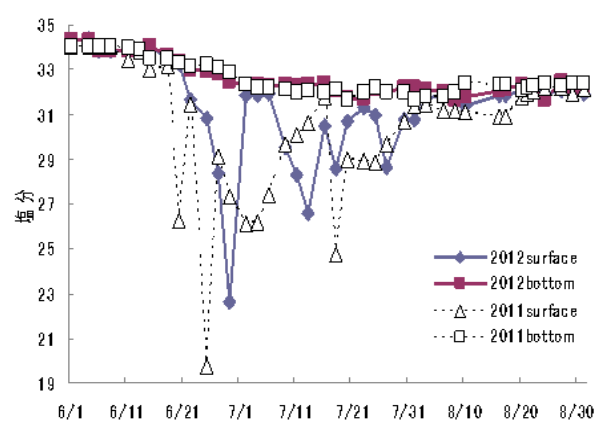
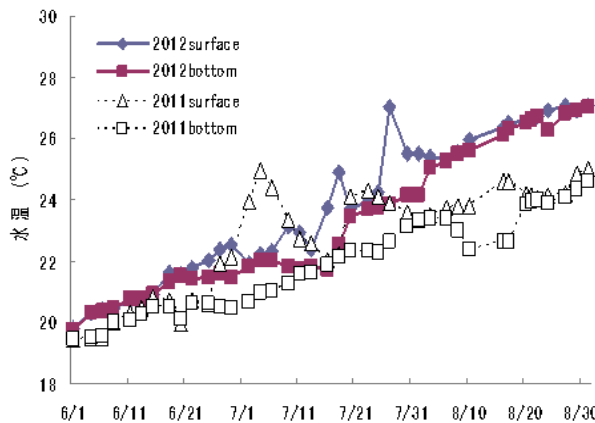
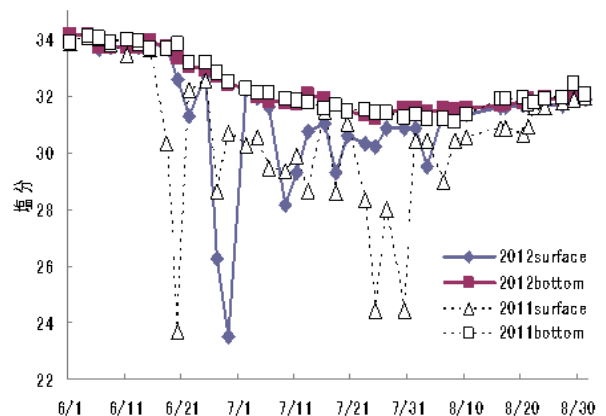
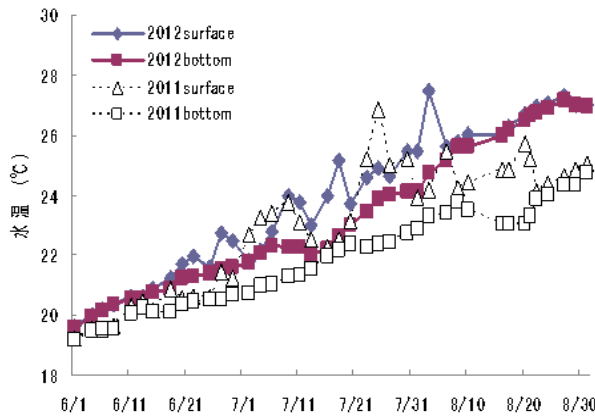
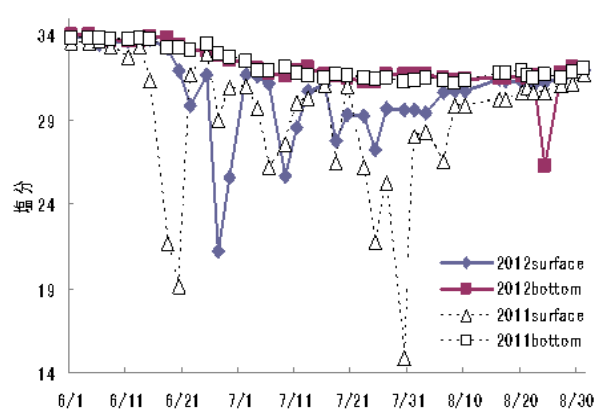
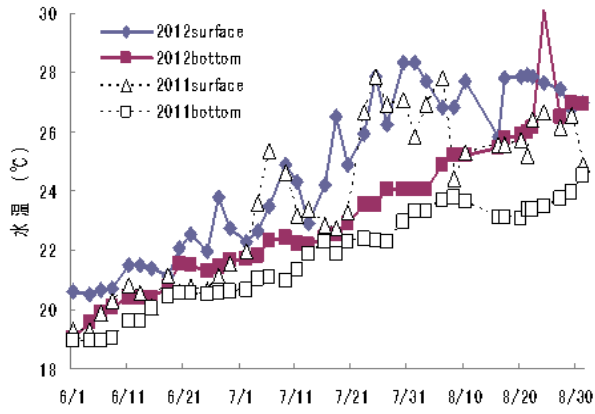


図4 水温の推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

図5 塩分の推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

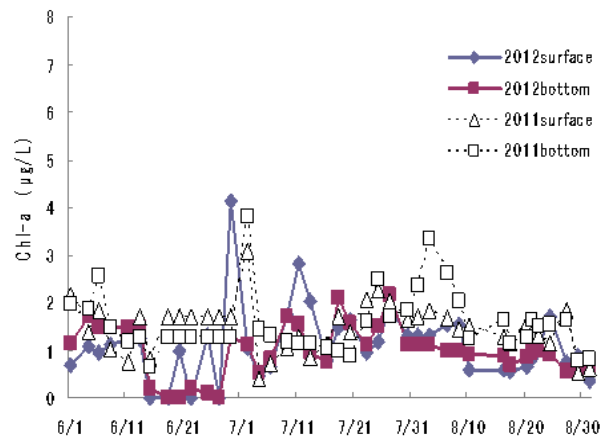
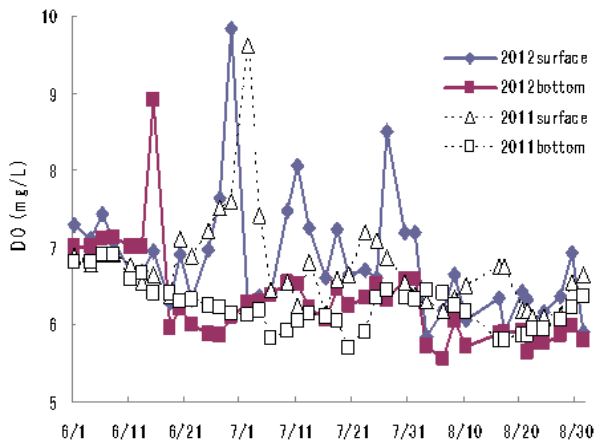
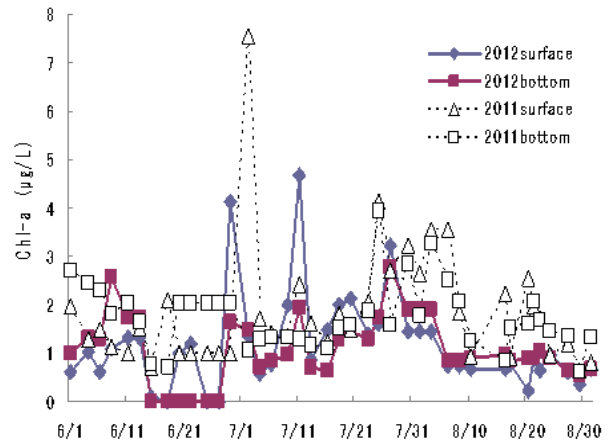
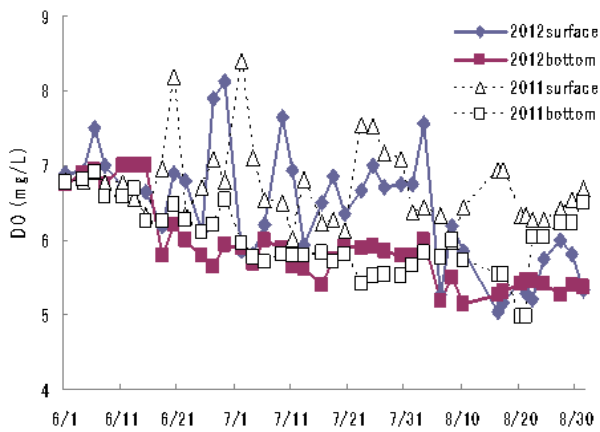
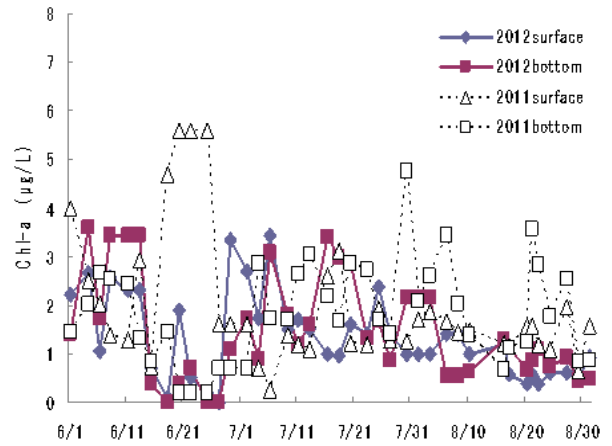
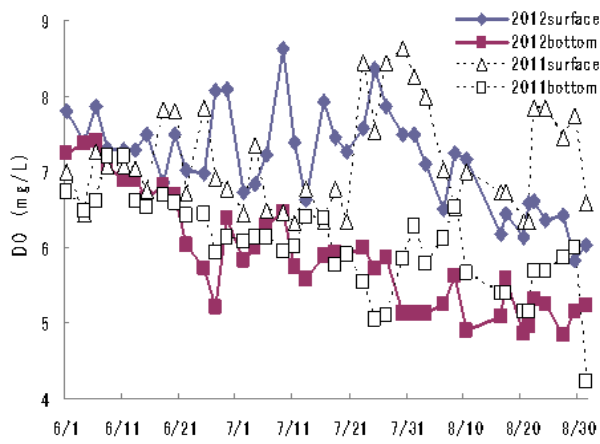


図6 DOの推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

図7 Chl-aの推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

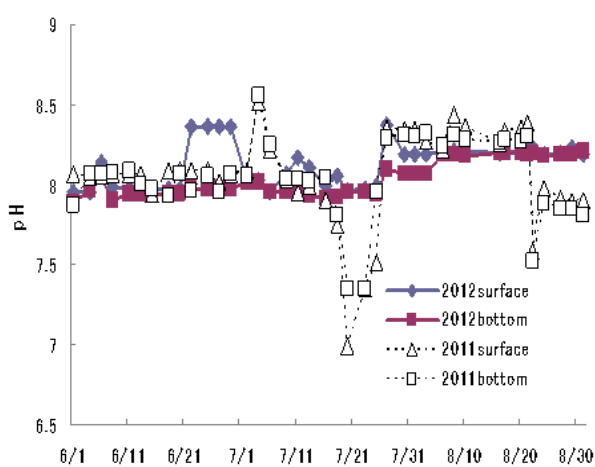
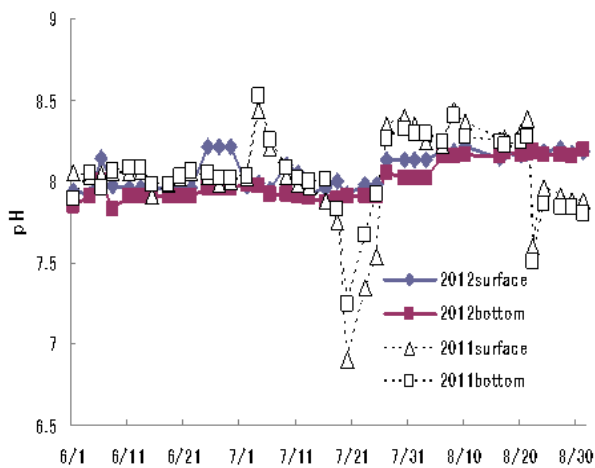
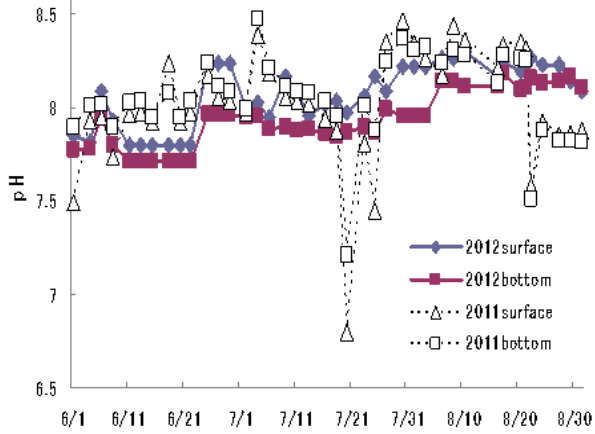


図8 pHの推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

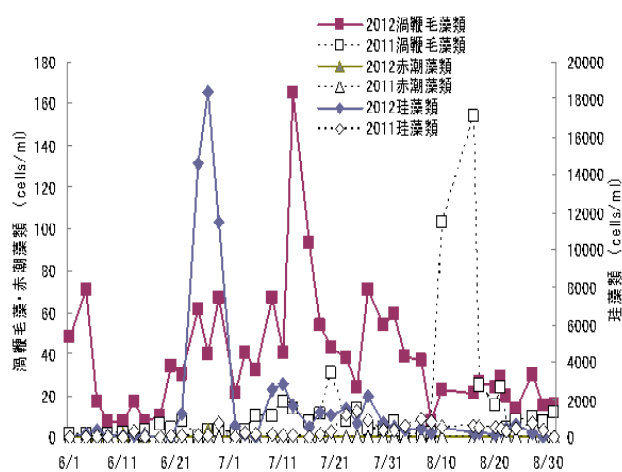
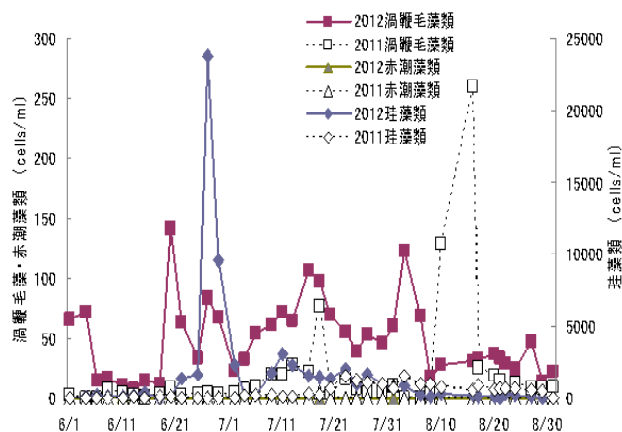
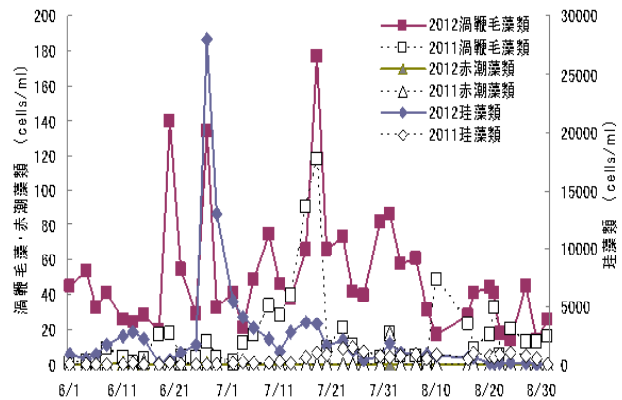


図9 プラクトン組成の推移
上:脇崎 中:薄井 下:御所浦

調査定点の内、脇崎における水温の推移と鉛直混合を図10に示す。表層と底層の水温差は7月中旬までは1℃以下になる時期があったが、その後8月中旬までの間は水温差は高くなり2℃を下回ることなく、水温成層が安定していたと考えられる。

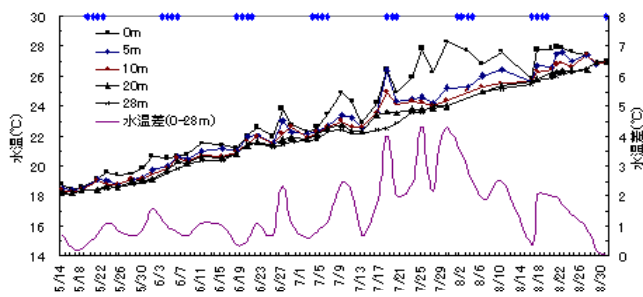


図10 水温の推移と鉛直混合（脇崎）

脇崎0mの栄養塩(DIN)と降水量(水俣)の関係を図11に示す。降水量の増加時期と栄養塩(DIN)の増加時期は、よく一致していた。そこで、栄養塩濃度と水俣及び八代における当日, 1日前, 2日前, 当日+1日前, 当日+1日前+2日前, 1日前+2日目の降水量との関係を回帰分析した。結果を表4及び5に示す。DINは2011年水俣及び八代が当日+1日前, 2012年水俣及び八代が1日前+2日前で最も寄与率が高かった($p < 0.001$)。一方, DIPも同様の傾向を示した($p < 0.001$)が, DINほど寄与率は高くなかった。これらのことから、栄養塩類特にDINは降水の影響を強く受け、1日前前後の降水により供給される可能性が高いと考えられる。

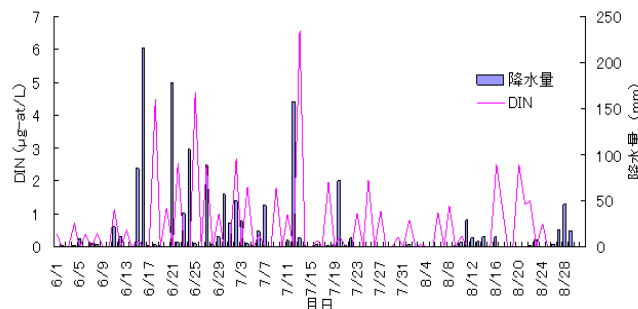


図11 栄養塩 (DIN) と降水量の関係

表4 栄養塩(DIN)と降水量との関係

| 降水量データ | 2011 | | | | 2012 | | | |
|------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | 水俣 | | 八代 | | 水俣 | | 八代 | |
| | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 |
| 当日 | 0.418 | *** | 0.473 | ** | 0.000 | | 0.000 | |
| 1日前 | 0.252 | ** | 0.160 | ** | 0.414 | *** | 0.569 | *** |
| 2日前 | 0.139 | ** | 0.099 | * | 0.180 | ** | 0.169 | * |
| 当日+1日前 | 0.596 | *** | 0.543 | *** | 0.322 | *** | 0.513 | *** |
| 当日+1日前+2日前 | 0.530 | *** | 0.355 | *** | 0.506 | *** | 0.692 | *** |
| 1日前+2日前 | 0.227 | | 0.139 | | 0.572 | *** | 0.728 | *** |

表5 栄養塩(DIP)と降水量との関係

| 降水量データ | 2011 | | | | 2012 | | | |
|------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | 水俣 | | 八代 | | 水俣 | | 八代 | |
| | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 | 寄与率 | p値 |
| 当日 | 0.347 | *** | 0.361 | *** | 0.017 | | 0.012 | |
| 1日前 | 0.103 | * | 0.119 | * | 0.079 | | 0.123 | |
| 2日前 | 0.106 | * | 0.140 | ** | 0.155 | * | 0.163 | * |
| 当日+1日前 | 0.414 | *** | 0.410 | *** | 0.033 | | 0.087 | * |
| 当日+1日前+2日前 | 0.378 | *** | 0.335 | *** | 0.157 | * | 0.225 | *** |
| 1日前+2日前 | 0.138 | ** | 0.154 | ** | 0.226 | *** | 0.272 | *** |

※*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

3 プリ暴露試験

暴露試験直後及び1時間後の*C. antiqua*細胞密度を表6に示す。

暴露直後の細胞密度は、設定した細胞密度より5~45%高かった。1時間後の細胞密度も暴露直後の細胞密度からほぼ維持されていた。

各試験区供試魚のへい死状況を図12に示す。

試験区1は*C. antiqua*暴露70分及び73分後に2尾ともへい死した。試験区2は90分及び104分後2尾ともへい死した。試験区3及び試験区4は24時間後まで行動に異状は認められなかった。試験区5は79分及び82分後に2尾ともへい死した。試験区6は24時間後まで行動に異状は認められなかった。

暴露試験中の水質の変動状況を表7に示す。DOは試験開始時に酸素通気を行ったが、著しく数値が高くなったため、30分後には全ての試験区で空気通気に切り替えたことから、数値変動は大きくなった。へい死した試験区1,2,5のDOは、24時間後まで生残した他の試験区と比べても酸欠になるほど低い状態にはなかった。また、試験区5及び6は防除剤添加によりpHが試験区1～4に比べやや低く、試験区5は対照区である試験区6と比べてpHがわずかに高かった。これらのことから、へい死は酸欠によるものでなく*C. antiqua*によるものと推測される。

表6 暴露時及び暴露1時間後の各試験区形態別 *Chattonella*細胞密度

| 試験区 | 暴露直後の細胞密度 (cells/ml) | 暴露1時間後の形態別細胞密度 (cells/ml) | | | | 合計 |
|-----|----------------------|---------------------------|------|-----|----|-------|
| | | 遊泳運動 | 運動停止 | 球形化 | 崩壊 | |
| 1 | 2,900 | 1,425 | 850 | 0 | 0 | 2,275 |
| 2 | 1,366 | 1,050 | 450 | 0 | 0 | 1,500 |
| 3 | 570 | 50 | 550 | 0 | 0 | 600 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 球形2,100 | 100 | 1000 | 700 | 0 | 1,800 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

表7 水質の変動(暴露直後～2時間後まで)

| 試験区 | 水温(°C) | 塩分 | pH | DO(mg/L) |
|-----|-----------|-----------|---------|-----------|
| 1 | 23.2～23.5 | 33.5～33.7 | 7.8～7.9 | 6.3～15.3 |
| 2 | 22.8～23.8 | 33.4 | 7.8～7.9 | 5.6～10.8 |
| 3 | 23.6～24.1 | 33.4～33.5 | 7.8～7.9 | 5.4～測定上限値 |
| 4 | 25.6～26.9 | 33.1～33.5 | 7.8～7.9 | 3.6～5.4 |
| 5 | 24.6～26.0 | 33.5～33.7 | 7.5～7.6 | 5.6～15.4 |
| 6 | 23.4～24.1 | 33.4 | 7.3～7.5 | 5.1～12.1 |

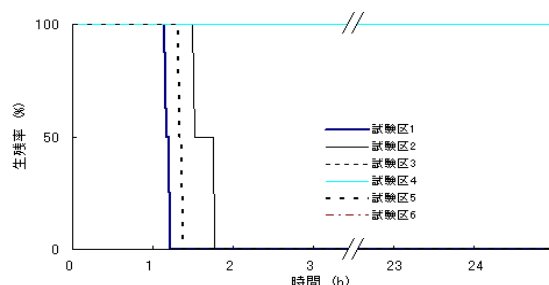


図12 *C. antiqua*暴露によるブリのへい死

試験供試魚の鰓のSEM画像を図13に示す。

へい死した試験区1,2,5の一次鰓弁は、いずれも二次鰓弁列の小出鰓動脈側前面が付着物で覆われていた(図13-1,2,4矢印)。二次鰓弁の小出鰓動脈側前面は基部から頂点部までが付着物でふさがれているが、頂点部から小入鰓動脈方向には付着物は認められず、上皮細胞にも剥離は認められなかった。一次鰓弁の小出細胞脈側は、上皮細胞の剥離や粘液細胞の放出痕が多数認められた。

*C. antiqua*には暴露されたがへい死しなかった試験区3の二次鰓弁列の小出鰓動脈側前面には付着物は認められなかった(図13-3矢印)。一次鰓弁の小出細胞脈側は、わずかに粘液細胞の放出痕があった。

これらのことから、鰓からの大量の粘液放出により、粘液が二次鰓弁の小出鰓動脈側を覆い、海水交換が妨げられ窒息によりへい死したと考えられる。また、今回の試験条件では約500から1,300cells/mlの間にへい死を引き起こす閾値があったと推測される。

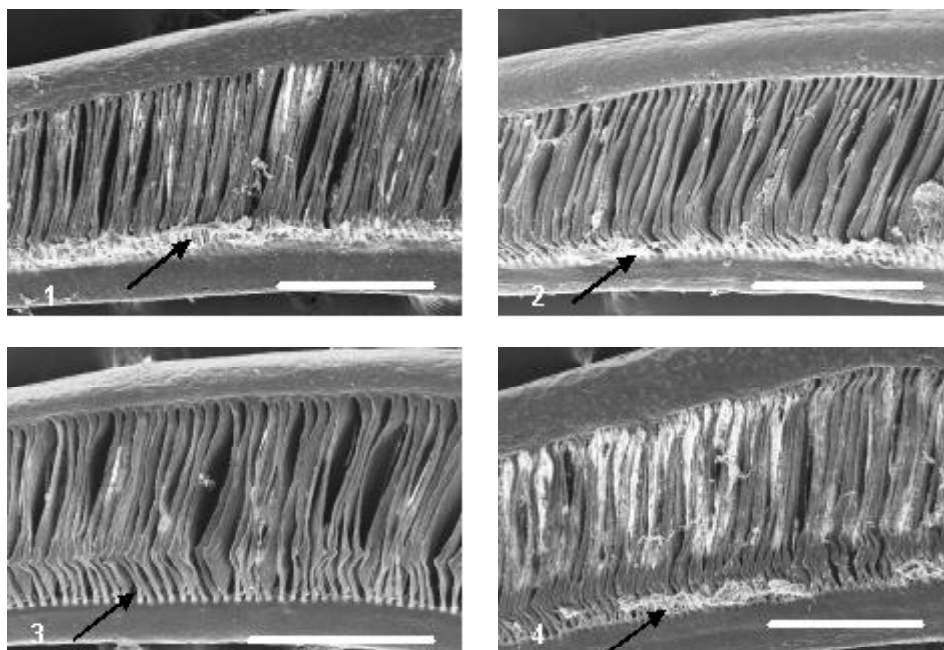


図13 供試魚の鰓SEM画像
1:試験区1 2:試験区2 3:試験区3 4:試験区5
スケールバー=500 μ m

文 献

- 1) 伊藤克彦,今井一郎(1987):第6章 ラフィド藻. 赤潮生物研究指針. 日本水産資源保護協会, 122-130.
- 2) 折田和三, 西広海, 田原義雄, 中村章彦(2012).赤潮総合対策調査事業-V(赤潮被害防止緊急対策事業).平成23年度鹿水技セ事報;110-123.