

D-4 大型船舶のバラスト水・船体付着により越境移動する海洋生物がもたらす生態系攪乱の動態把握とリスク管理に関する研究

(2) バラスト水・船体付着生物群集遷移の把握及び管理に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

生物圏環境研究領域 微生物生態研究室 河地正伸・出村幹英・大村嘉人

化学環境研究領域 動態化学研究室 功刀正行

東京大学 福代康夫・都丸亜希子・大村卓朗

静岡県立大学 橋本伸哉

東海大学 津金正典・金子仁

<研究協力者> 日本郵船 安全環境グループ 舟山純・前田君丈

平成16～18年度合計予算額	97,268千円
(うち、平成18年度予算額	29,000千円)

[要旨]

バラストタンク内の物理化学的環境特性とクロロフィルの長期モニタリングを行い、バラスト水の温度、溶存酸素濃度(DO)、クロロフィル等の経時変化、季節変化、リバラストの影響等に関する詳細な情報を得た。タンク内に取り込まれた生物は、トータルでは、時間経過とともに数を減らしていたが、一定数を保持するグループ(一部の珪藻、原生動物)や増加するグループ(原生動物など)も一部認められた。リバラストの後、マイクロサイズのプランクトンの生物量は初期値の0.005-0.01%に激減し、原生動物の衰退も認められたが、ピコプランクトンは初期値の10～70%の減少に留まった。こうした生物の希薄なサンプルでも培養処理で増殖する種類が確認されており、リバラストを行っていても生物の越境移動が起こりうることを示唆された。細菌を中心とする微生物群集の調査では、リバラストにより全菌数・ウイルス状粒子は減少するが、一部の細菌や鞭毛虫の増殖が認められた。またドック入りした船舶のバラスト水からは糸状微生物が高頻度に検出され、独自の微生物生態系が形成されている可能性が示唆された。バラストタンク内の堆積物には、植物プランクトンのシストや栄養細胞、原生動物など様々な生物が確認され、これらの生物の除去処理は、越境移動を防止する上で大きな課題と言えた。既存の船でも対応可能と考えられる堆積物の淡水処理や乾燥処理の予備試験で、微生物の生存率が0になる結果も得られた。バラストタンクに特徴的な環境要因に関する培養試験から、ピコサイズの種を含む植物プランクトンの一部の種で暗条件に耐性をもち、栄養塩無添加のバルク系でも同様の結果が得られた。また世界的拡散が問題になっている有害種*Chattonella*を対象としたマイクロサテライトマーカーの開発にも成功した。これまでの調査及び実験結果を踏まえ、バラスト水条約発効時に運用上考慮すべき事項を整理した上で、将来におけるバラスト水管理手法への提言をまとめた。条約発効後の国内法の整備に際し、有効に活用されることが期待される。

[キーワード] バラスト水、有害植物プランクトン、越境移動、生態系攪乱、*Chattonella*

1. はじめに

海洋生物の移動は、海流などの自然現象に加えて、人為的な媒体によっても引き起こされる。人為的な移動には、船舶を介する場合、そして水産目的や水族館等の鑑賞目的で運ばれた生物とともに移動する場合などが知られている。人が関わる生物移動の場合、自然現象を介した移動と比べて、長距離を短期間に、また途中の海域を飛び越えるような分断的な移動も起こりうる。

船舶を介した海洋生物の移動は、船体付着によるものとバラスト水によるものに分けられる。船体付着は、船体表面の水に接する部分に生物が付着するもので、海藻やフジツボなどがよく知られている。船足を遅くするなどの船舶の管理上の問題に加えて、最近では船体付着による生物の越境移動問題がクローズアップされている¹⁾。バラスト水は、大型輸送船舶などが安定して航海するために、重しとして積載する海水のことで、通常、荷下ろし時に港湾海水をバラスト水として漲水している。バラスト水は1cm程度のメッシュを通して取り込まれるので、魚や海藻などの大型の海洋生物は入らないとされているが、微小な生物はそのままタンク内に導入されることになる。また大型の海洋生物であっても海藻の切れ端や遊走子、卵や幼生などのサイズの小さなステージの場合、タンク内に取り込まれる可能性がある。

バラスト水の最大の問題点は、バラスト水とともに様々な海洋生物が、本来の生息場所でない海域に移送・放出され、定着する可能性のあることである²⁻³⁾。バラスト水（＝荷下ろし港で取り込まれた海水）を積載した船は、目的港に向かって航海し、港で貨物を積み込む際に、積荷量に応じてバラスト水を排水する。世界の物量移動とともにバラスト水は移動しており、世界全体で年間100億トンものバラスト水が移動するという見積もりも出されている⁴⁾。バラスト水とともに輸送される海洋生物の状態や多様性は、漲水時の港湾における生物多様性、タンクの整備状況、リバラストの有無、航路、航行距離、タンク内の物理化学的条件など、様々な要因と関連して変化することが予想される。一方でバラスト水中の生物の動態に関する研究は、試料の入手や船上での処理作業の困難さなどからそれほど多くはなく、バラスト水を介した海洋生物の越境移動に関する様々なケーススタディが必要といえる。

我が国は圧倒的なバラスト水輸出国（資源輸入国）として世界各国から問題視されているが、海洋生態系への関心は比較的希薄である。こうした背景にもかかわらずバラスト水問題の実態は必ずしも明確ではないのが現状である。国際海事機関（IMO）は、バラスト水による生態系越境移動対策として、バラスト水の処理（物理的、化学的処理により規定されたサイズの生体数を規定数以内に処理）を義務づける国際条約を採択した。しかしながら、現在適切な処理方法およびモニタリング手法が確立されていないにもかかわらず、規制のみが先行しようとしており、本研究による総合的な実態把握および管理手法の確立は急務である。またこれらの船舶の船体には様々な生物が付着しており、バラスト水と同様、越境移入の原因となっているが、この問題は船体塗料への有機スズの使用禁止に伴いさらに深刻化する可能性が高い。従って、このような船体付着生物群集の動態と、移入生物の起源および拡散経路の解析も早急に進める必要がある。

2. 研究目的

バラスト水は海洋生物の越境移動の主要な原因として取り上げられているが、バラスト水中の生物の動態に関する研究は、試料入手の難しさや船上での処理作業の困難さ等が理由で、少ないのが現状である。バラスト水について調査・研究を行う上で、適切なサンプル収集法および処理

法を確立すること、フローサイトメトリやDGGE法などの分子生態学的手法により、タンク内生物の動態の詳細について調査・解析すること、そしてバラストタンク内の物理化学的環境要因の特性について明らかにすることを目的として研究を行ってきた。主な調査対象とした船舶は、バラ積み船（日本とオーストラリア間を航行）とコンテナ船（日本－中国－米国間を航行）である。これらの船舶に直接乗船して、バラストタンク内の生物種構成や生物量の経時変化について調査した。更にバラストタンク内の環境モニタリングの結果に基づき、実験室内において擬似的なバラストタンク環境を構築して培養試験が行えるようになった。特定の環境要因を変化させて培養試験を行うことで、生物の生存に影響を与える環境因子を実験的に検証し、バラスト水処理に効果的な環境要因を調査・解析することを目的として、港湾の海水中に含まれる植物プランクトンを対象として、実験室内での培養特性試験も実施した。

本研究では、世界的な分布拡散が問題になっている有害植物プランクトンの一種、*Chattonella*（ラフィド藻）を対象として、マイクロサテライトマーカーの開発も試みた。*Chattonella*は赤潮形成藻の一種で、西日本を中心に養殖魚の大量斃死の原因生物として問題視され、最近では日本から世界各地への分布域の拡大が懸念されている。この*Chattonella*を材料として、近縁分類群の識別と分布媒体や経路の解析を目的として、現在知られている分子マーカーの中で最も精度の高いマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

更に本研究の成果を政策的に寄与・貢献するために、バラスト水管理に関する国際条約の現状と今後の展開について把握しておく必要があり、条約実施に必要とされるガイドラインの抱える課題について情報収集を行った。

3. 研究方法

本調査では、船会社の協力により、バラ積み船およびコンテナ船に乗船して、船上でバラストタンク内の生物量と種の変化に関する調査およびバラストタンク内の環境要因のモニタリング調査を行った。また港湾に停泊中の船舶やドック入りした船舶を対象として、バラストタンク内において、バラスト水及び堆積物を収集し、生物多様性の調査や培養実験に供した。

バラ積み船（図1d）は、日本とオーストラリア間の航路において（図1a）、2004年8月20日～9月1日（0408航海）、2004年12月2日～12月21日（0412航海）、2005年6月20日～7月2日（0506航海）に乗船してバラストタンク内のモニタリング調査を行った。同船は、オーストラリアの規制により、日本で漲水したバラスト水を太平洋上を航行しながら、外洋海水と入れ替えるリバラストを実施している（バラスト水と外洋水との交換率は約95%）。我々の調査の際は、北緯20-10°、東経147-150°の範囲でリバラストを実施していた（図1a）。またオーストラリアでは、積載順を数日間に渡り沖合で停泊して待つこともあり、2004年12月の航海では13日間の航海後に沖合停泊を5日間、2005年6月の航海では13日間の航海後に沖合停泊を10日間行った。こうした停泊時には、様々な付着生物が船体表面に付着する可能性も考えられた。

バラ積み船の船上調査では、基本的に1日1回、左舷No.7 TSWBT(P)バラストタンクにおいて、最上部はマンホールから、最下部はサウンディングパイプから海水をポンプで汲み上げ、オリジナルの未処理の海水とプランクトンネットで濃縮した濃縮試料を収集した。このときに携帯型計測器でpH、塩濃度、水温も計測した。植物プランクトンの場合、孔径40μmのプランクトンネットを用いて100リットルを濃縮、動物プランクトンは孔径100μmのプランクトンネットで300リットル

の海水を濃縮した。船上の実験スペースにおいて、海水と濃縮試料を固定、培養、細菌数計測、DNA解析、観察用試料として一定量ずつ分取して、各々できるだけ速やかに処理を行った。船上では、顕微鏡－ビデオカメラシステムによる観察・ビデオ撮影を行うとともに、FlowCAMによる画像記録と解析を行った。FlowCAMの計測条件は、流速約0.5ml/min、light scattering particlesモード、gains and thresholds: 12-68-12-145、size range: 1-100、distance to nearest neighbor: 50、segmentation threshold: 20の条件で行った⁵⁾。

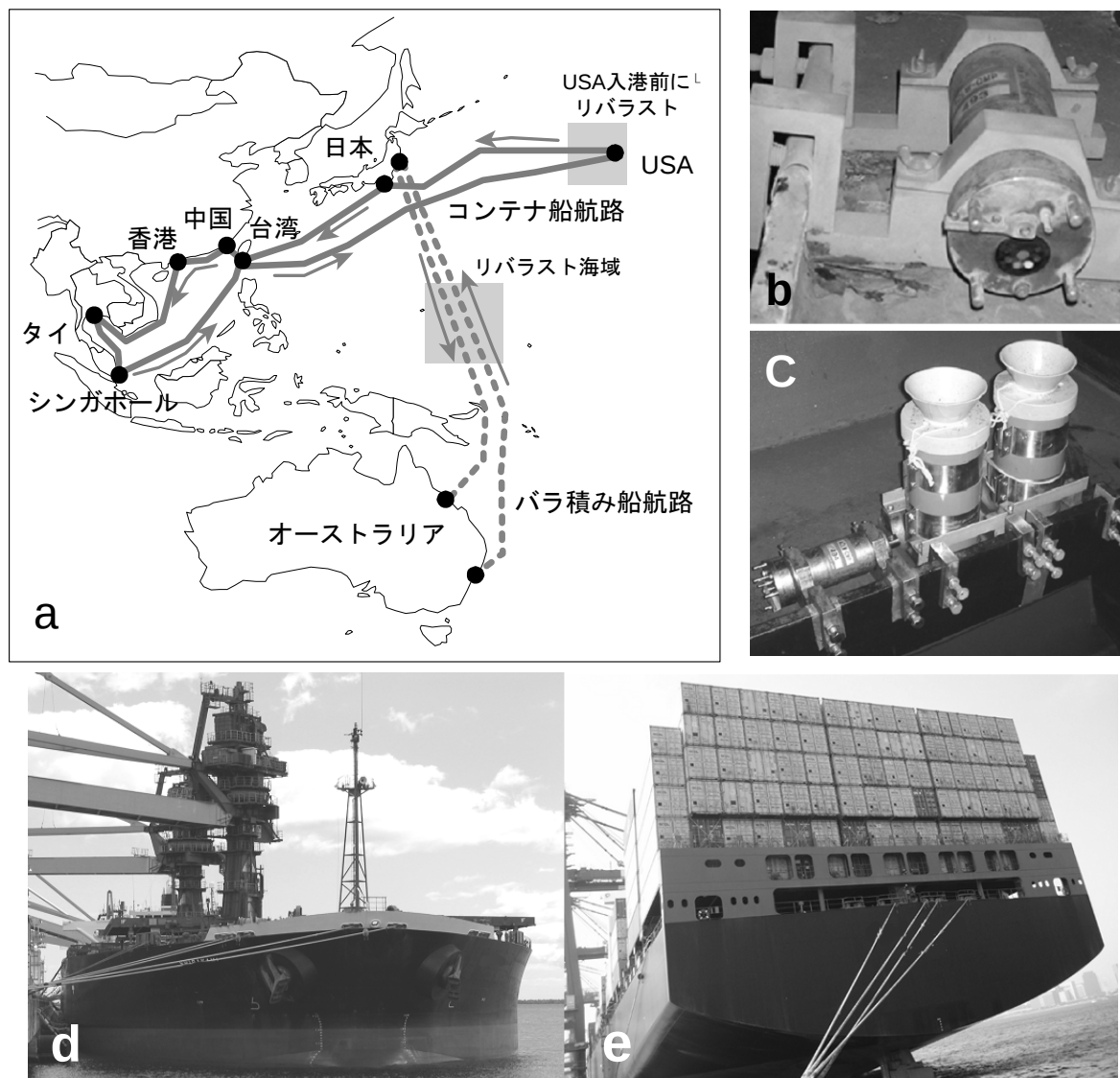


図1a. 調査を行ったバラ積み船およびコンテナ船の航路図。図1b. バラストタンク内に設置されたクロロフィルセンサー。図1c. バラストタンク内に設置されたセディメントトラップ。図1d. 停泊中のバラ積み船。図1e. 停泊中のコンテナ船。

コンテナ船（図1e）は日本－アジア各国－米国間航路（図1a）の一部の区間を対象として乗船調査を行った。2005年8月22日～8月29日に日本－中国間（0508航海）、そして2006年6月18日～7月3日に日本－台湾－中国－タイ－マレーシア－台湾の間（0606航海）を乗船調査した。バラ積み船で行った内容と同様の調査を船上にて実施した。コンテナ船では、マンホールからの直接採水が

行えずに、採水用ホースをサウンディングパイプを通し、タンク最下層近くまで挿入し、ホース先端部に取り付けたワイヤー付活栓でふさぐことでホース内に入ったバラスト水を収集、これを研究試料として用いた。また2005年12月5日、2006年1月9日、同3月26日に、日本寄港の際に、停泊中にバラストタンク内を調査した。

バラストタンク内の物理化学的環境特性として、航海中の温度、pH、塩濃度、溶存酸素濃度(DO)、そしてクロロフィルの経時変化および季節変化を調査した。バラ積み船の左舷No.7 TSWBT(P)バラストタンク最上部と最下部の2カ所にクロロフィルセンサー(アレック電子、ALEC WQC-24)およびクロロフィルセンサー(アレック電子製COMPACT-CLW)および多項目水質計(東亜DKK製WQC-24)を設置(図1b)することで、各項目について連続的にモニタリングを行った。またコンテナ船についても、クロロフィルセンサーを設置(船首に配置されているバラストタンクの最下層のタンク底面から約70cmの位置)して、連続モニタリングを行った。タンク内のプランクトンを含む懸濁粒子の動態を詳細に解析するために、セディメントトラップの設置を試験的に試みた(図1c)。バラ積み船は2004年8月から2005年8月までの全航海の連続モニタリングデータを得ることができた。またコンテナ船は2005年8月下旬から2006年1月上旬までの約5ヶ月間の連続モニタリングデータを得ることができた。それらの結果の一部の計測値について表10-11にまとめた。

4. 結果・考察

(1) バラストタンク内の物理化学的環境特性

1) バラ積み船における連続モニタリング

図2にバラ積み船のバラストタンク内におけるクロロフィル量の変動を、図3に温度変化を示す。クロロフィルは日本の荷揚げ地における荷揚げ終了後のバラスト水漲水に伴い極大値を示す。その後急速に減少し、太平洋上におけるリバラストによりほぼバックグランドレベルまで低下し、そのままオーストラリア沿岸域における排水時まで維持され、排水に伴いほぼゼロレベルになる。漲水からリバラストまでの間、上下層の差はほとんど無いが、リバラスト後は上層がわずかに高くなる場合がある。排水後の細かな変動は、センサー周辺がドライになっているためであり、実際にはもっと大きな変動があるがその部分はデータを削除している。

図3に示した温度はクロロフィルセンサーに内蔵されている温度計によるものである。水温は日本を出航後赤道付近まで上昇し、その後またオーストラリア沿岸まで下がる。日本周辺の冬場は5℃程度まで下がるが、オーストラリア側では冬場でも20℃程度までしか下がらない。上層は、喫水より上になるため外部気温の影響を受け、明確な日変動を示すが、下層は喫水以下になるため日変動は明確でない。図の白抜きの部分はバラストタンクが空の状態であり、特に上層は外気温の影響を受け大きな日変動を示している。センサーの設置場所は鋼板のすぐ脇であるため、より外部温度の影響を受けやすくなっていると考えられる。水温はバラストタンク内の各環境パラメーターの中で、最も大きく変化しており、生物の生存や状態変化、そして多様性の変遷に最も影響するファクターである可能性が考えられた。バラストタンク内における物理化学的環境の経時変化と季節変化に関する詳細な情報が得られており、実験室内でのバラストタンク内環境を再現した培養試験等に利用されるとともに、バラストタンクの基礎情報として整備した。

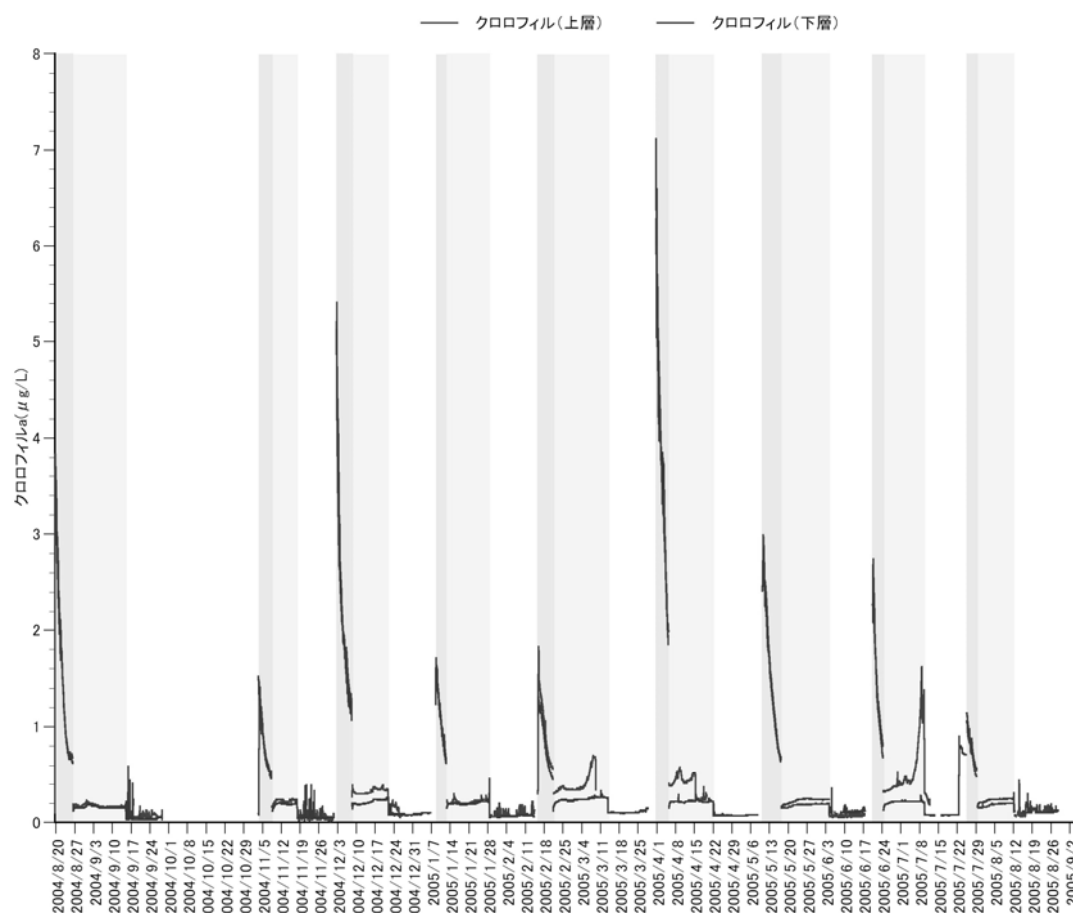


図2. バラ積み船バラストタンク内クロロフィル量の変遷。

図4に、タンク上部のバラスト水の漲水からリバラストまでのクロロフィル量の変化を示した。季節により漲水した海水中のクロロフィル量に大きな変動があるが、いずれの場合もクロロフィル量は一貫して急速に減少している。これは、バラストタンクは暗条件であること、水温が急上昇するため、植物プランクトンの成育には極めて厳しい環境となっているためと考えられる。また、同時に取り込まれた動物プランクトンによる捕食圧による影響も強いと考えられる。

同時に設置した多項目水質計により、pH、溶存酸素(DO)、電導率、塩分を連続観測した。しかしながら、電導率は、船体の構造物にセンサーを取り付けたが、非常に近い場所に鉄骨があること、また鉄の腐食を軽減するために亜鉛棒が多数取り付けられていることなどから、正常に測定出来なかった。塩分は、電導率から計算によって求めているため、同様に測定できなかった。DOは、概ね上層の方が高く、変動もあまり大きくなかった。これは、上層は常に空気に接しており、船の揺れによってかなり攪拌され、酸素は十分に取り込まれることを示している。全観測を通じて最下層においても、DOが6mg/Lを下回ることにはなかった。構造上バラストタンク内の上下混合はし難いと考えられるが、漲水からリバラストまでの期間はあまり長くないこと、リバラストによって新鮮な海水が供給されるためであろう。したがって、バラ積み船のバラストタンク内はほぼ好氣的に保たれており、嫌気条件になることは無いと考えられる。

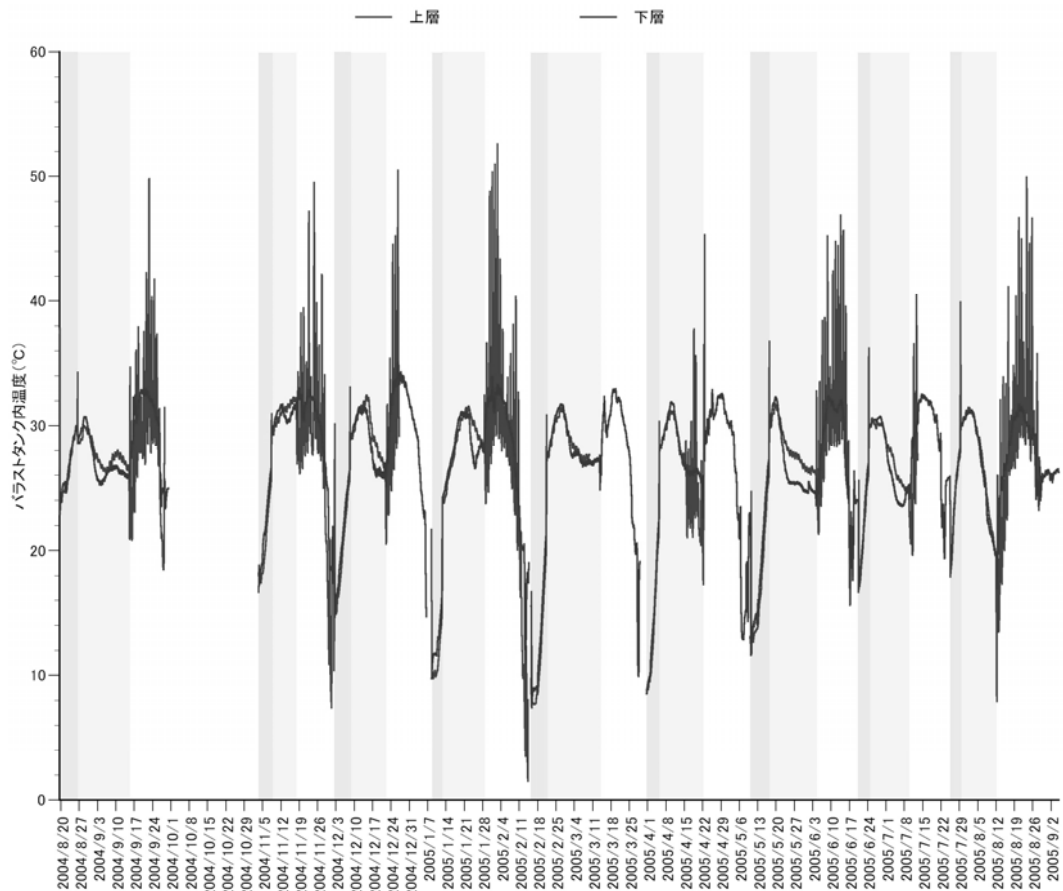
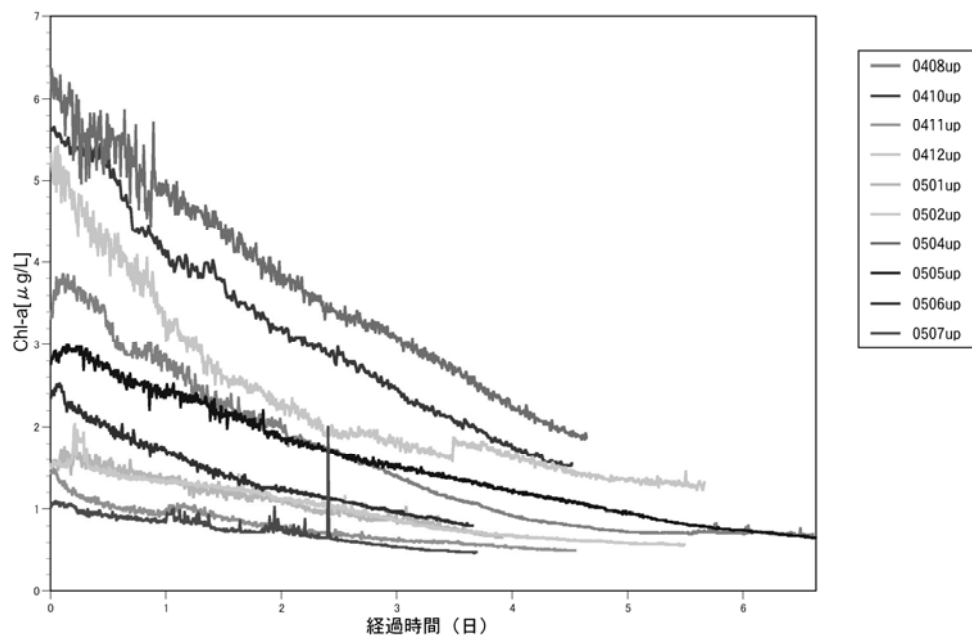


図3. バラ積み船バラストタンク内温度の変遷。



石炭運搬船バラストタンク内クロロフィル濃度変化 (タンク上層) (200408-200507)

図4. タンク上部におけるバラスト水漲水からリバラストまでのクロロフィル量の変化。

実際に運行している船舶を用いて、物理化学的環境の連続的な変化に関する有用な基礎的情報

を集積することができた。その一部ではあるが、参照用データとして、クロロフィル量の最大値（漲水時）とリバラスト直前の値、水温および溶存酸素の最大値と最小値の値を各航海について一年を通じて得られた結果を表10および表11にまとめた。

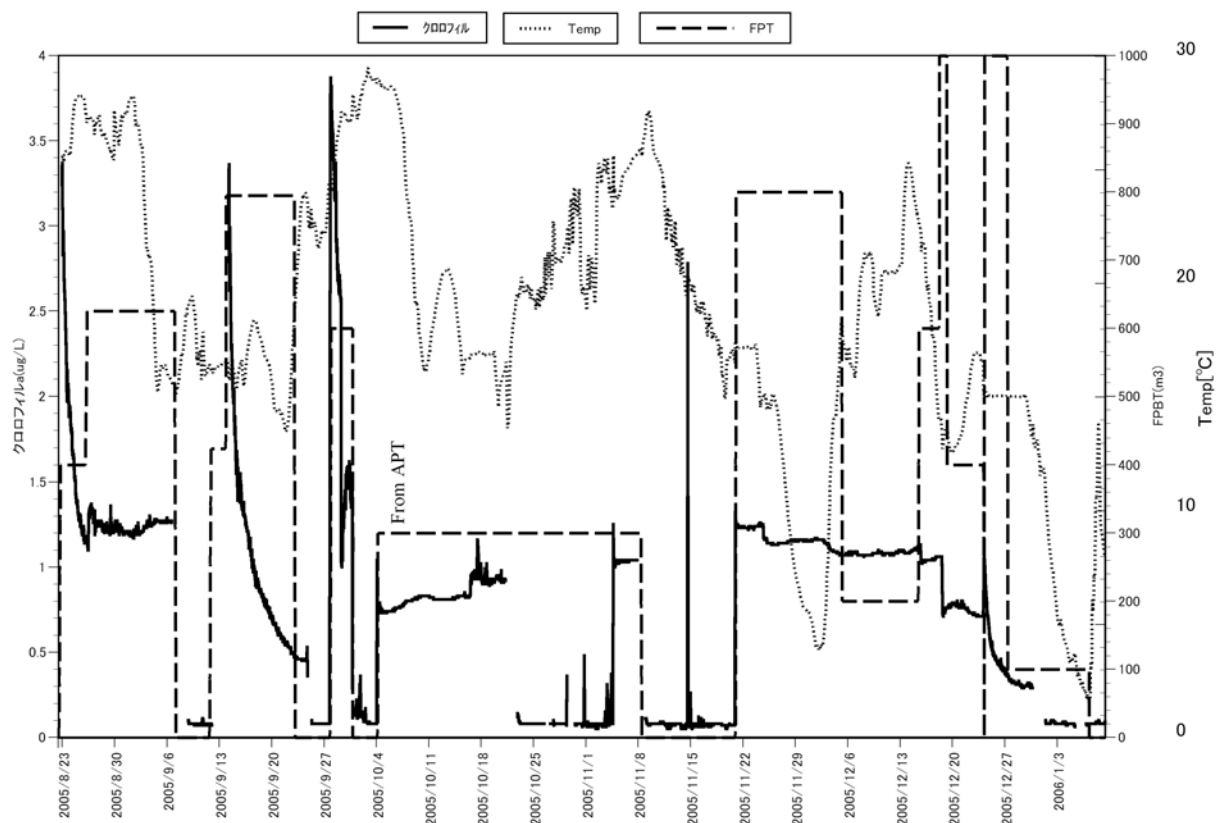


図5. コンテナ船バラストタンク内のクロロフィル、温度、およびバラスト水量の変遷。

2) コンテナ船における連続モニタリング

図5にコンテナ船での連続モニタリングの結果であるクロロフィル量の推移と水温変動、そしてバラストタンクの漲排水の動向を示す。8月下旬、東京湾でバラスト水を約40%を入れた直後のクロロフィル量は $3.4\mu\text{g/L}$ であるが、急速に減少し、約2日後には $1.3\mu\text{g/L}$ まで低下した。2日後に中国沖でバラスト水を約20%追加しているが、この後北米沖のリバラスト海域までクロロフィル量はほとんど変化していない。リバラスト後は $0.1\mu\text{g/L}$ と検出限界まで低下した。北米の港内で約80%のバラスト水漲水時のクロロフィル量は日本の港内とほぼ同一の $3.4\mu\text{g/L}$ で、その後急激に減少し、約10日で $0.5\mu\text{g/L}$ まで低下した。9月下旬の日本の港内でバラスト水漲水時にはまた $3.9\mu\text{g/L}$ まで上昇したが、急速に減少している。8月下旬の日本港内におけるバラスト水漲水後の水温と、9月中旬の米国港内におけるバラスト水漲水後の水温は、前者では約10日間 28°C を維持しており、後者ではやはり約10日間 17°C 前後と、 10°C 以上の差があるにもかかわらず、両者のクロロフィル量の減少傾向および速度はほとんど差が見られない。両者のバラスト水中に含まれる植物プランクトン種組成が明らかでないので、詳細は不明であるが、対象としたバラストタンクにおける植物プランクトンの育成環境においては水温はあまり影響していない可能性が考えられる。一方、今回の5ヶ月の連続観測では、植物プランクトン量の遷移に関して、従来通り漲水後急速に減少する場

合と、漲水後ほとんど濃度が変化しない場合の2タイプが観測された。特に後者の場合は極めて問題であり、種組成を含めた詳細な観測の必要性が示唆された。

③ バラスト水の重金属分析

キレートディスク法による濃縮を行い、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いてバラスト水の重金属を測定した。すべての元素で、相関係数が良い検量線が得られた。また回収率においては70-100%程度と良好な結果が得られた。結果として、Niはどのサンプルにおいてもあまり差がないこと、Cuは積荷港で積み込んだ直後以外は、濃度が初めの3分の一くらいであること、ZnとCdは、BW01SとBW07Sで低く、BW05SとBW15Sで高く、バラストタンク内で濃度が上昇することが分かった。Znは最高で2.4ppmとなり、過去の報告（バラストタンク内：1.7ppm）と同レベルの値となった。またSnは検出限界以下であり、PbはBW01SとBW07Sで高く、BW05SとBW15Sで低く、バラストタンク内で濃度が減少していることが分かった（表1）。これはタンク内の粒子に吸着して沈降した可能性が考えられる。

表1. バラ積み船航海(0412航海)において採取したバラスト水中の重金属濃度 (μg/L)。

No.	Ni	Cu	Zn	Cd	Sn	Pb
BW01S	0.276	1.44	307	0.044	n.d.	0.597
BW05S	0.311	0.564	15.6×10^2	0.140	n.d.	0.258
BW07S	0.200	0.514	184	0.033	n.d.	0.645
BW15S	0.261	0.528	24.1×10^2	0.171	n.d.	0.427

BW01Sはバラスト水導入直後、BW05Sは5日目、BW07Sはリバラスト直後、BW15Sは航海最終日のサンプル。

（2）植物プランクトンおよび関連微生物の動態

1) バラ積み船におけるバラストタンク内の経時変化

顕微鏡ービデオカメラシステムによる生サンプルの直接観察とその撮影結果から、バラストタンク内では、基本的に大部分の植物プランクトンが急速に衰退するとともに、植物プランクトンを分解あるいは捕食するバクテリアや原生動物の活性化・増殖が認められた（図6）。一方、*Pseudo-nitzschia*や*Cylindrotheca*など、ごく一部の植物プランクトンでは、活発に滑走運動を行うなど、バラストタンク内環境の影響を受けていないようであった。また太陽虫、繊毛虫、鞭毛虫といった原生動物の分裂増殖を確認した。

出港から7日目に行われた洋上交換（リバラスト、バラストタンク内の海水を外洋海水に置換する処理、12°55.0-24.0'N, 148°25.0-33.0'Eの海域で実施）により、植物プランクトンと原生動物は激減し、急速に衰退した。バラストタンク内の生物多様性は環境の変化を受け、また生物間の相互作用の影響を受けてダイナミックに変化しており、サンプルの状況を把握、記録するのに顕微鏡ービデオカメラシステムは有効な手段といえた。

標準的な細胞数計測手法の一つであるセディメントチャンバーを用いた計測では、バラスト水導入時に採取した港内海水サンプルの細胞数は1,260 cells/ml（珪藻99%）で、バラスト水導入後、タンク最上部から採取したサンプルの細胞数は850 cells/ml（初期値の67%）、1日経過した2日目のサンプルでは620 cells/ml（初期値の49%）、リバラスト前のサンプルでは217 cells/ml（初期値の

17%)に変化した(図7)。その翌日に行われたリバラスト直後のサンプルでは10cells/ml(初期値の0.8%)、そして15日目には64 cells/L(初期値の0.005%)にまで減少した。この15日目の細胞密度をバラスト水1トンあたりに換算すると64,000 cells/tonで、これには*Chaetoceros debilis*、*Pseudo-nitzschia*、*Cylindrotheca*、*Asterionella*といった珪藻が含まれていた。

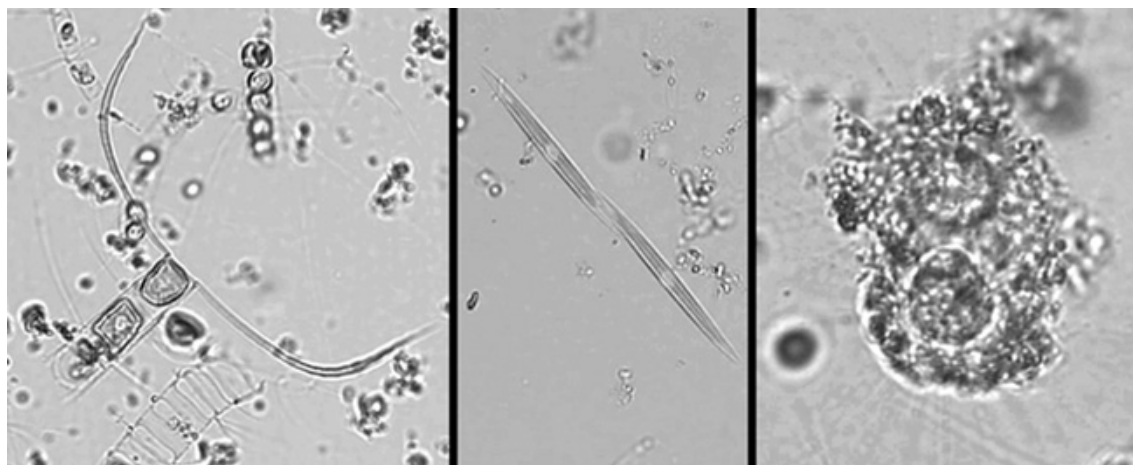


図6. バラスト水濃縮サンプルのビデオイメージ。バラスト水注入後5日目のサンプル。ダメージを受けた群体性珪藻(左)、活発に運動する*Pseudo-nitzschia*(中)、分裂中の太陽虫。

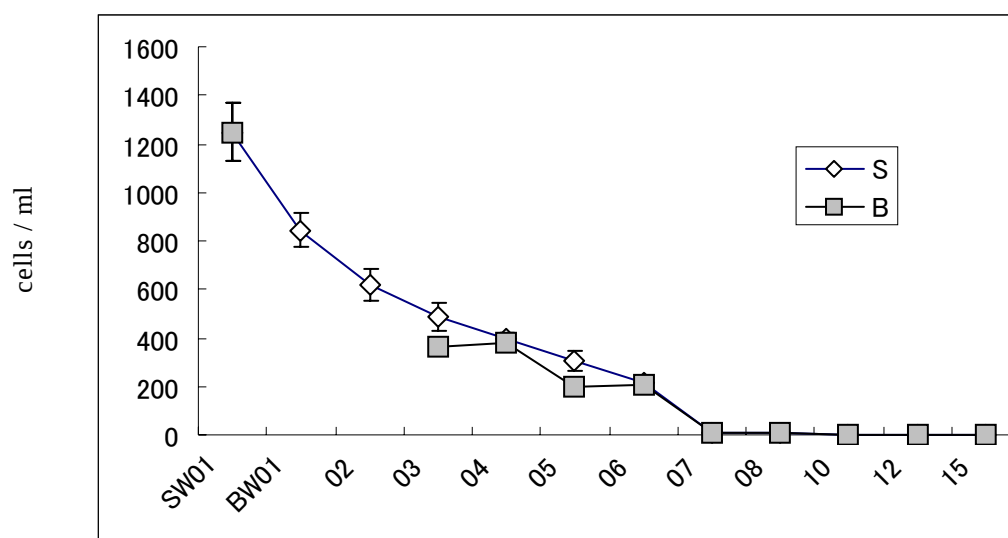


図7. セディメントチャンバーによるバラストタンク内植物プランクトンの計測結果。総細胞数を示す。Sはタンク表層、Bはタンク下層サンプル。BW07はリバラスト直後のサンプル。

イメージング・フローサイトメータ (FlowCAM) を用いて、採取直後の生のサンプルの計測・解析を行った結果、バラスト水を導入してから4日目までは、総細胞数が4,000-6,000 cells/mlの間を推移した後、5日目以降に急激に減少し始め、7日目のリバラスト以降に細胞はほとんど計測されなくなった。サイズ別に細胞数を比較してみると、直径に換算して5-30 μ mのサイズの細胞数が、時間経過とともに減少するが、1-5 μ mのサイズフラクションが1-4日の間増加した後、5日目以降に

急激に減少していた（図8）。細胞計測と同時に記録された画像データを解析することにより（図9）、細胞数が一定の値を推移したのは、群体性珪藻の断片化が進むことで、1-5 μm サイズの細胞や細胞の破片等が一時的に増加することによると考えられた。前処理が不用で試水を導入するだけで、即座に計測、イメージ記録、解析が可能なこと、そしてセディメントチャンバーでは計測するのが困難な1-5 μm サイズの細胞の動態を解析できる点で有効な方法といえた。

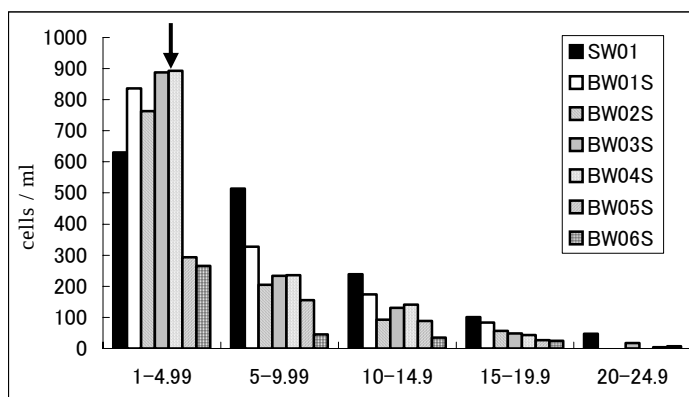


図8. 細胞サイズ別のヒストグラム。1-4.99 μm のサイズフラクションで数が一時的に増加(矢印)。

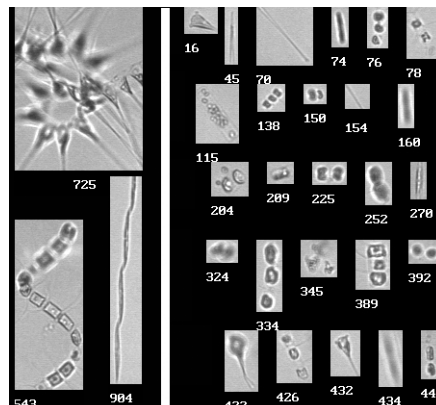


図9. FlowCAMイメージ。群体性珪藻(左)と断片化した群体(右)。

2) コンテナ船におけるバラストタンク内の経時変化

今回調査したコンテナ船では、積荷の状況に応じて不規則にバラスト水の漲排水を繰り返しており、2005年8月22日～27日の乗船調査では、日本出航後から香港で下船するまでに、東京湾と中国で一回ずつ漲水が行われた。グラフ中（図10a）のSW01はバラスト水漲水時に採取した東京湾の植物プランクトン数で、優占種として珪藻*Thalassiosira* spp.が高密度に存在し、その他に*Skeletonema* sp.と*Pseudo-nitzschia* spp.で生物量の大部分が占められていた（図10b）。BW01-04は出航後サウンディングパイプより採取したバラスト水中の植物プランクトン数で、順に2日目、3日目、4日目、5日目のサンプルである。東京湾では空のタンクに約401 m^3 の海水が漲水され、更にBW02とBW03の間で中国の港において、224 m^3 の海水が足された。中国の港の海水からは、*Thalassiothrix* spp.や淡水産緑藻など東京湾では認められない種が検出されたが、総細胞数は 0.4×10^6 cells/Lであり、BW03においてもごく僅かしか（10 cells/L以下）検出されなかった。ルゴール液固定サンプルをセディメントチャンバーで計測した結果、東京湾の漲水時における港内サンプルの細胞数は 15.0×10^6 cells/L、バラスト水を導入してから2日後に 18.5×10^3 cells/L、3日後に 6.9×10^3 cells/L、4日後に 3.6×10^3 cells/L、5日後には 2.6×10^3 cells/Lにまで減少した。最終的には初期値の0.02%にまで減少した。優占種の構成は基本的に変わらなかったが、*Thalassiosira* spp.は他の2種よりも高い減少率を示し、BW01以降のサンプルで占める割合は5%前後であった。サンプル中に*Thalassiosira* spp.の死骸や動物プランクトンによる捕食も認められなかったことから、大多数の細胞はタンクの底に堆積している可能性が考えられた。興味深いことに、BW04でのみ渦鞭毛藻のシスト様細胞が128 cells/Lの密度で検出された。こうした細胞はバラストタンク内環境が引き金となって形成される可能性が考えられた。

バラスト水の培養処理を行うことで、*Heterosigma akashiwo*や*Prymnesium* sp.といった有害藻類種

を含む12種の植物プランクトン種の増殖を確認できた（表2）。BW02-03で認められたハプト藻の *Prymnesium* と *Chrysochromulina*、そして黄金色藻の *Ochromonas* では、バクテリアを捕食して増殖する混合栄養が知られており、こうした特性はバラストタンク環境下で生存に有利に働いている可能性が考えられた。また *Chlorella saccharophila*、*Nanochloris* like species、*Ochrosphaera* sp. といった種はBW03-04でのみ特異的に認められ、東京湾由来のサンプルからは全く検出されなかったことから、中国港湾由来の種と考えられた。昨年度調査した日本ーオーストラリア間航路と比較して、より多くの種類が生存していることが明らかになった。この生存率の高さは日本ー中国間では、距離が短く、温度変化も小さく、また外洋でのリバラスト処理が行われなかったためと考えられる。

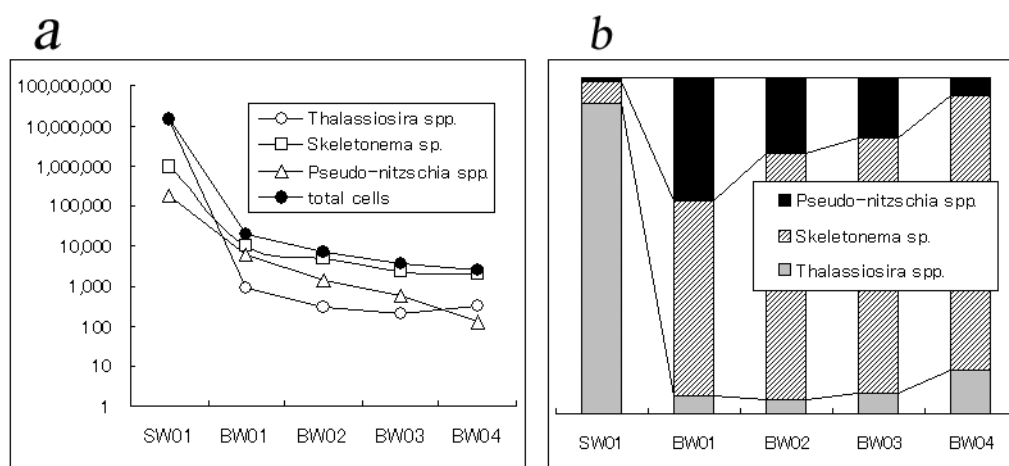


図10a. 大型コンテナ船バラスト水における植物プランクトン数の経時変化、図10b. 植物プランクトン種構成 (%) の経時変化。

バラ積み船のタンク内に試験的に設置したセディメントトラップ（図1c）のサンプルでは、日本ーオーストラリア間を約40日かけて往復したにも関わらず、*Lithodesmium variable*などの多くの植物プランクトンを生きた状態で確認することが出来た（表2）。多くは珪藻であり、次いで渦鞭毛藻、原生動物などが観察された。バラスト水中の細胞密度は急速に減衰していたが、実際には、タンク内に堆積して、堆積物中に生きたまま紛れている可能性も考えられた。

表2. バラストタンク環境下での生存^{*1}が確認された植物プランクトン種。

種名（分類群）	細胞(群体)サイズ (μm) ^{*2}	タンク内経過日数 ^{*1}	船舶 ^{*3} （航海年月）
<i>Oscillatoria</i> spp.（シアノバクテリア）	S	5c	Co(0508,)
<i>Pseudoanabaena</i> like species（シアノバクテリア）	S	5c	Co(0508)
<i>Synechococcus</i> spp.（シアノバクテリア）	SS	60c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Prymnesium parvum</i> （ハプト藻）	S	5c	Co(0508)
<i>Chrysochromulina</i> sp.（ハプト藻）	SS	4c	Co(0508)
<i>Platychrysis</i> sp.（ハプト藻）	S	5c	Co(0508)
<i>Ochrosphaera</i> sp.（ハプト藻）	S	5c	Co(0508)
<i>Chlorella saccharophila</i> （緑藻）	S	5c	Co(0508)
<i>Nanochloris</i> like species（緑藻）	SS	60c	Co(0508), Bu(0412)

<i>Scenedesmus</i> sp. (緑藻)	S	15c	Co(0508)
<i>Cladophora</i> like species (緑藻)	S-L	15c	Co(0508)
<i>Rhodomonas</i> spp. (クリプト藻)	SS	3c	Co(0508)
<i>Protocentrum dentatum</i> (渦鞭毛藻)	SS-S	5c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Protocentrum minimum</i> (渦鞭毛藻)	SS-S	3c	Co(0508)
<i>Oxyrrhis</i> sp. (渦鞭毛藻)	S	5f	Bu(0412)
<i>Scrippsiella</i> spp. (渦鞭毛藻)	S	5f	Bu(0412)
<i>Gymnodinium</i> spp. (渦鞭毛藻)	S	4f	Bu(0412)
<i>Ceratium furca</i> (渦鞭毛藻)	S	5f	Bu(0412)
<i>Ceratium fusus</i> (渦鞭毛藻)	S	1f	Bu(0412)
<i>Alexandrium</i> spp. (渦鞭毛藻)	S	3f	Bu(0412)
<i>Protoperdinium</i> spp. (渦鞭毛藻)	S	5f	Bu(0412)
<i>Noctiluca scintillans</i> (渦鞭毛藻)	L	0	Bu(0412)
<i>Pfiesteria</i> like species (渦鞭毛藻)	SS	60c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Heterosigma akashiwo</i> (ラフィド藻)	S	2c	Co(0508)
<i>Fibrocapsa japonica</i> (ラフィド藻)	S	2c	Co(0508)
<i>Ochromonas</i> sp. (黄金色藻)	SS	3c	Co(0508)
<i>Dictyocha fibula</i> (ディクチオカ藻)	S	6f	Bu(0412)
<i>Pseudonitzschia</i> spp. (珪藻)	SS-S	15c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Lithodesmium variabile</i> (珪藻)	S-L	60c	Bu(0412)
<i>Paralia sulcata</i> (珪藻)	S	60c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Papiliocellulus elegans</i> (珪藻)	SS	60c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Nitzschia</i> spp. (珪藻)	SS	60c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Asterionella glacialis</i> (珪藻)	S-L	15c	Bu(0412)
<i>Cylindrotheca closterium</i> (珪藻)	S	15c	Bu(0412)
<i>Skeletonema costatum</i> (珪藻)	S	15c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Chaetoceros curvisetus</i> (珪藻)	S-L	15c	Bu(0412)
<i>Chaetoceros debilis</i> (珪藻)	S-L	15c	Bu(0412)
<i>Chaetoceros</i> spp. (珪藻)	S-L	15c	Bu(0412)
<i>Leptocylindrus danicus</i> (珪藻)	SS-S	10c	Bu(0412)
<i>Thalassiosira</i> spp. (珪藻)	SS-S	15c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Coscinodiscus</i> spp. (珪藻)	S-L	5c	Co(0508), Bu(0412)
<i>Eucampia zodiacus</i> (珪藻)	S-L	5c	Bu(0412)
<i>Euplotes</i> spp. (原生動物・繊毛虫)	S-L	60	Co(0508), Bu(0412)
<i>Vorticella</i> sp. (原生動物・繊毛虫)	S-L	15	Co(0508), Bu(0412)
heliozoan species (原生動物・太陽虫)	S-L	60	Co(0508), Bu(0412)
amoeboid species (原生動物)	SS-S	60	Co(0508), Bu(0412)
<i>Gonyomonas</i> spp. (原生動物・鞭毛虫)	SS	60	Co(0508), Bu(0412)
<i>Bodo</i> spp. (原生動物・鞭毛虫)	SS	60	Co(0508), Bu(0412)
<i>Cafeteria</i> spp. (原生動物・鞭毛虫)	SS	60	Co(0508), Bu(0412)
coanoflagellates (原生動物・襟鞭毛虫)	SS	15	Co(0508), Bu(0412)

*1) 生存状態は培養処理及び蛍光顕微鏡による自家蛍光の確認により行った。タンク内経過日数の欄に、培養処理で確認した種の場合はC、自家蛍光で確認した種はFを付加。

*2) 細胞あるいはコロニーの最小サイズ(minimum dimension)が50μm以上：L、10～50μm：S、10μm以下：SSとして表記。

*3) コンテナ船：Co、バラ積み船：Buとして示す。

3) DGGE法による多様性解析

真核性生物を対象として、DGGE法による遺伝子レベルでの解析を行った。最上部と最下部のサ

ンプルで基本的なバンドパターンは一致していること、港内の海水サンプルのバンドパターンは時間経過とともに変化し、バンドが一定の濃さを維持する場合、バンドが次第に薄くなる場合、そしてはじめは存在が確認できなかったバンドが出現する場合が認められた（図11）。これらはバラストタンク内で数が一定の生物群、そして減少もしくは増加する生物群の存在に対応すると考えられる。またバラストタンク内で数の増加が認められた生物の場合、リバラストで一時的に希釈されるものの、その後速やかに（1-3日）回復することが判明した。

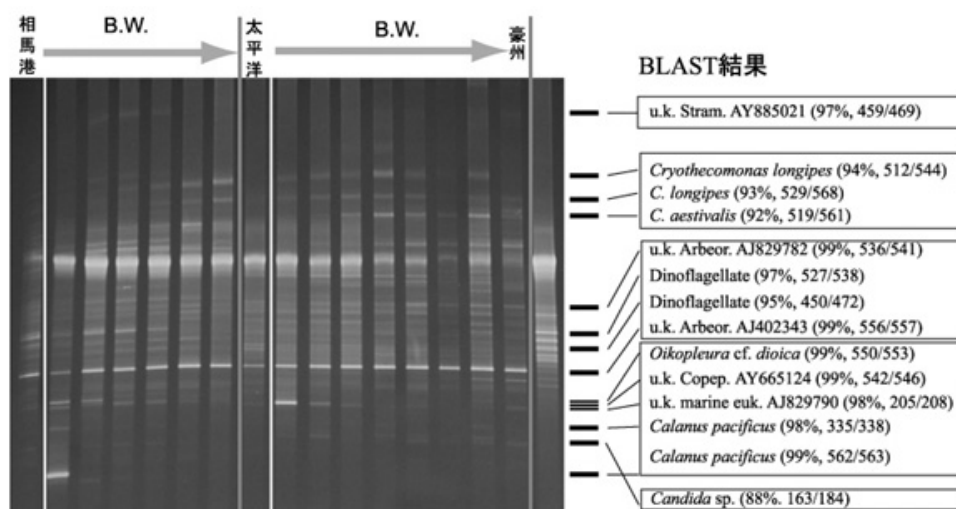


図11. ピコサイズの真核性微生物のDGGEバンドパターン。塩基配列を決定し、BLAST検索を行うことにより、主要なバンドに対応する微生物を同定。

得られたバンドのうち、15本の主要なバンドについて、塩基配列を決定し、BLASTによるホモロジー検索を行った結果、これらのバンドは、ケンミジンコ類（5本）、アメーバ鞭毛虫類（3本）、アルベオラータ群（4本）、ストラメノパイル群（1本）、真菌類（1本）、その他（1本）であることが判明した。それぞれの分類群のバラストタンク内での動態は異なっており、減少するもの（ケンミジンコ類、ストラメノパイル群）、変化が少ないもの（アルベオラータ群）、増加するもの（アメーバ鞭毛虫類、真菌類）に区分できた（図11）。このようにDNAレベルで微生物群集のモニタリングを行うことにより、通常の顕微鏡観察では検出の困難な生物群に関する動態を明らかにすることができた。これまでも形態観察に基づくバラストタンク内の原生動物の多様性に関する報告はあるが⁶⁾、タンク内での増減などの動態は明らかにされていない。増加の認められたグループの中には、DNAのホモロジーの点で病原性もしくは寄生性の種と近縁な種が含まれており、バラスト水排水域における生態系への影響が懸念された。バラストタンク内に普遍的な原生生物の存在が示唆されたことから、こうした生物を対象として分布や現存量に関するより詳細な調査が必要と言えた。

4) バラストタンク内の堆積物

バラストタンク内には、計器上は100%バラスト水を排出した状態であっても、タンクの最下層にバラスト水とウェットな堆積物が残存している。停泊中のコンテナ船とバラ積み船、そしてドック入りした船舶でバラスト水および堆積物を採取した。バラストタンク内堆積物に含まれる植

物プランクトンの多様性について培養処理を行い調査した結果、栄養細胞として*Nitzschia*等の珪藻、大型海藻、無色の渦鞭毛藻などが観察され、各々45～96細胞/gの密度で存在することがMPN法により確認された（図12）。様々な種類のシスト様細胞も観察されており（図13）、堆積物による生物の越境移動のリスクの高さが示唆された。

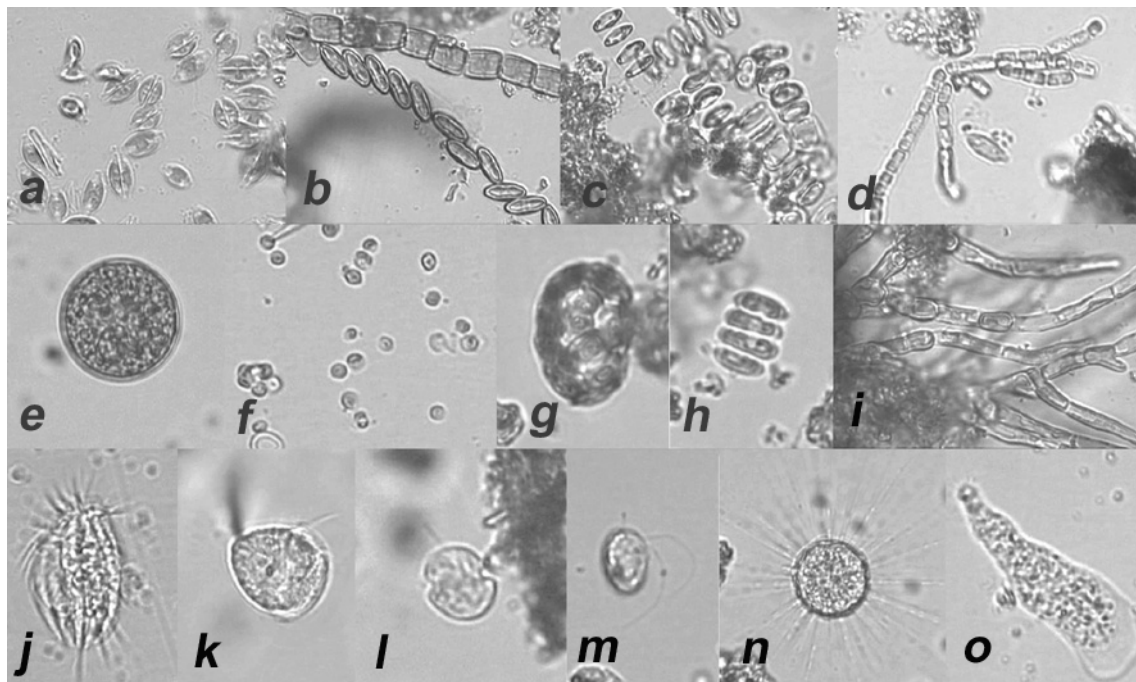


図12. バラストタンク内堆積物より確認された植物プランクトンの栄養細胞(a-h)、海藻(i)、原生動物(j-o)。

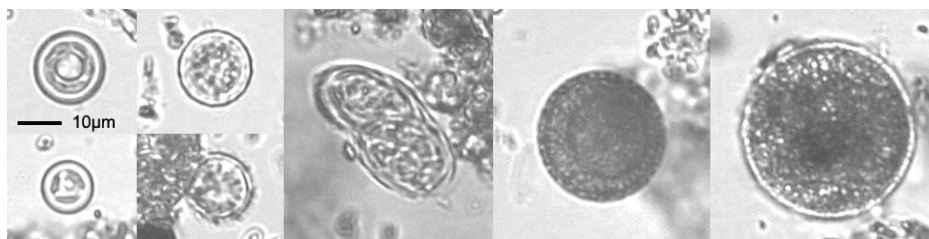


図13. バラストタンク内堆積物より確認されたシスト様細胞。

表3. 堆積物の淡水処理後に出現が確認された植物プランクトン及び原生動物。

Control	<i>Pfiesteria</i> like species, <i>Amphora</i> sp. <i>Nitzschia</i> spp., <i>Navicula</i> spp., <i>Skeletonema costatum</i> , <i>Cladophora</i> like species, <i>Gonyomonas</i> spp., <i>Bodo</i> spp., <i>Cafeteria</i> spp., amoeboid species, heliozoan species, <i>Euplotes</i> spp., other ciliates, brown cysts (dinoflagellates)
1% SWで1時間処理	<i>Gonyomonas</i> spp., <i>Bodo</i> spp., <i>Cafeteria</i> spp.
50%SWで1時間処理	<i>Pfiesteria</i> like species, <i>Gonyomonas</i> spp., <i>Bodo</i> spp., <i>Cafeteria</i> spp., amoeboid species, heliozoan species, <i>Euplotes</i> spp., other ciliates
1% SWで18時間処理	<i>Gonyomonas</i> spp., <i>Bodo</i> spp., <i>Cafeteria</i> spp.
50%SWで18時間処理	<i>Pfiesteria</i> like species, <i>Nitzschia</i> spp., <i>Gonyomonas</i> spp., <i>Bodo</i> spp., <i>Cafeteria</i> spp., amoeboid species, heliozoan species, <i>Euplotes</i> spp., other ciliates

更にコンテナ船で採取したバラストタンク内堆積物について、異なる塩濃度の海水で一定時間処理した後、通常の海水ベースの培養液により、希釈培養処理を行うことで、生存細胞数の変化を調査した（表3）。コントロールのサンプルからは、合計14藻類及び原生動物が出現した。塩濃度が約1.5%（海水の1/2）の処理条件では、出現種は10種であり、コントロールと比べて出現率はやや減少傾向を示した。更に塩濃度が約0.03%（海水の1/100）の処理条件では、植物プランクトンと繊毛虫が認められなくなった。一方、*Cafeteria* spp.、*Bodo* spp.、*Gonyomonas* spp.といった鞭毛虫はいずれの条件でもほぼ同じ出現頻度を示した。以上より、バラストタンク内堆積物を淡水で処理することで、有害植物プランクトン等の特定生物群を除去出来る可能性が示唆された。

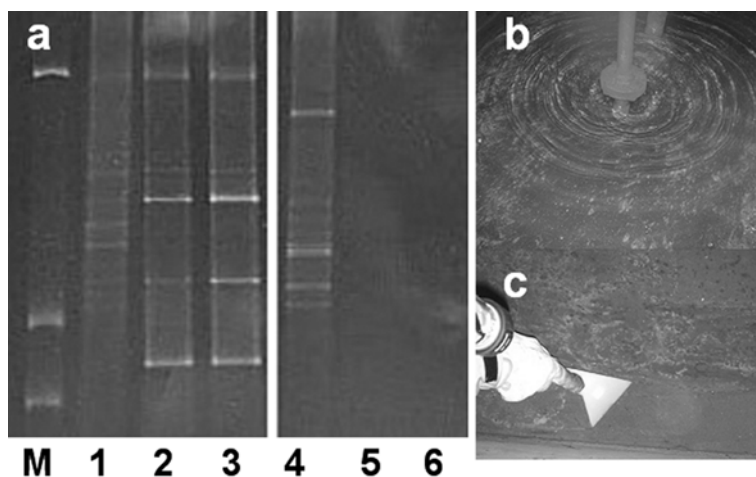


図14a. DGGEのバンドパターン。M: マーカ、1: ウェットな堆積物、2-3: 1の堆積物の培養処理試料、4: 乾燥した堆積物、5: 4の堆積物の培養処理試料、6: ウェットな堆積物を乾燥処理した後、培養処理した試料。図14b. バラストタンクの最下層に残存するバラスト水と堆積物、図14c. バラストタンク内で乾燥状態の堆積物（a-4で用いた試料）。

バラストタンク内には、計器上100%バラスト水を排出した状態であっても、タンクの最下層にバラスト水とウェットな堆積物が残存している（図14b）。また場所によっては堆積物の乾燥化が進んでいる（図14c）。DGGE法により、ウェットな堆積物および乾燥した堆積物、そしてそれらを培養処理した試料について、解析した結果、ウェットな堆積物からは少なくとも12本、その培養処理試料からは5本のバンドが検出された（図14a）。また乾燥した堆積物からは、少なくとも10本のバンドが検出されたが、培養処理試料からは、バンドは検出されなくなった。更にウェットな堆積物を実験室で乾燥処理した後、培養処理した試料からは、バンドは検出されなくなった（図14a）。乾燥した堆積物から検出されたバンドは、おそらく生きた細胞からではなく、環境中に残存したDNAに由来すると考えられる。ウェットな堆積物の培養試料からは、*Pfiesteria*、*Euplotes*、太陽虫といった原生動物が確認されたが、ウェットな堆積物を実験室で乾燥処理した後、培養処理した試料からは、生きた細胞は観察されなくなった。バラストタンク内の堆積物からは、様々な生物が確認されたが、環境耐性を有し、最も高頻度に出現する原生動物でさえも乾燥処理で死滅することが示唆された。淡水処理や乾燥処理といった堆積物の処理は、既存の船でも十分に対応可能であり、海洋生物の移動のリスクの低減につながる処理方法となる可能性が考えられた。

5) ピコ・ナノプランクトンの動態

バラ積み船の夏と冬の乗船調査航海時の試料を対象として、ピコプランクトンの動態解析を行った。冬の試料として2004年12月3日～12月16日の調査航海（0412航海（冬）試料）、夏の試料として2005年6月20日～7月1日の調査航海の試料（0506航海（夏）試料）を各々用いた。試料は採取直後にただちに50%グルタルアルデヒドで最終濃度2.5%になるように固定し-20℃で凍結保存した。解析の直前に試料を自然解凍し、41μmメッシュのプランクトンネットでろ過を行った後に、フローサイトメトリ（BECKTON DICKINSON, FACSCalibur）を用いて細胞密度の計測を行った。アルゴンレーザー（488nm）を励起光として使用し、'Detectors/Amps':FSC=E00, SSC=489, FL1=551, FL2=520, FL3=628, 'Events':10000, 'Threshold': FL3=38の設定条件で計測した。範囲設定には、*Synechococcus* (NIES-969)、*Prochlorococcus* (CCMP-1377)、*Micromonas* (NIES-1411)を利用した。検出器FL3（検出ca.650nm主にクロロフィル自家蛍光）において、3株の細胞粒子がすべて含まれる範囲を全植物プランクトン粒子数とした。検出器FL3と検出器FL2（検出550-650nm、主にフィコエリシリン自家蛍光）で検出できた粒子数の範囲を*Synechococcus*の粒子数とした。予備的に行った直接観察では、*Prochlorococcus*は観察されなかったことから、全植物プランクトン粒子数から*Synechococcus*粒子数を引いた値を真核性植物プランクトン粒子数とした。解析ソフトにはCELL Quest ver3.1を使用し、10,000粒子の中で、各範囲に入った割合を自動計測した。10,000粒子中の割合と、10,000粒子が流れた時間におけるサンプル量から、粒子密度を計算した。データ取得は同じサンプルで3回行い、平均と標準偏差を計算した。

0412航海（冬）の試料における真核性ピコ・ナノプランクトンは、出発港の海水(Win Port)に、 5.5×10^4 particles/ml存在しており、漲水直後の表層（Win 0）では、粒子数は 1.1×10^5 となり、有意に増加（ $P < 0.05$ ）した。2日目の底層(Win 2)はほぼ同じ数を維持した後、5日目(Win 5)に表層 $ca. 8.5 \times 10^4$ 、底層 $ca. 8.0 \times 10^4$ となった（図15）。その後、リバラストで外洋海水（Win O.S.、 4.9×10^4 ）に置換され、6日目(Win 6)には、有意な減少（ $P < 0.05$ ）が認められ、表層 $ca. 5.9 \times 10^4$ 、底層 $ca. 4.8 \times 10^4$ となった。最終的には16日目のオーストラリア停泊中に、表層 2.7×10^4 、底層 2.2×10^4 となり、初期値と比較して、表層は49% 底層は40%に減少した。一方*Synechococcus*は、出発港の海水(Win Port)に、 9.6×10^3 particles/ml存在した。真核性ピコ・ナノプランクトンと同様に、タンク内に注入直後の表層サンプルにおいて(Win 0)、粒子数が 2.1×10^4 となり、有意に増加した（ $P < 0.05$ ）。注入から2日目の底層(Win 2)でも、粒子数は、有意に増加（ $P < 0.05$ ）した。5日目(Win 5)には減少傾向に転じ、表層 1.4×10^4 、底層 2.0×10^4 となった。その後、リバラストで外洋水（Win O.S.、 4.8×10^3 ）に置換され、6日目(Win 6)には、表層 6.6×10^3 、底層 6.7×10^3 に減少した。最終的には16日目のオーストラリア停泊中に、表層 1.2×10^3 、底層 6.7×10^3 となり、初期値の約70%に減少した。

0506航海（夏）試料における真核性ピコ・ナノプランクトンは、出発港の海水(Sum Port)に、 1.3×10^5 particles/ml存在していた（図15）。これはWin Portの2.5倍に達した。タンク内漲水直後に（Sum 0）、表層 1.7×10^5 、底層 1.3×10^5 となり、Sum Portと同じ粒子数が維持された。3日目（Sum 3）には、表層 8.6×10^4 、底層 7.7×10^4 となり、有意に減少した。リバラストで外洋水（Sum O.S.、 9.5×10^4 ）に置換された後、4日目（Sum 4）には、表層 7.8×10^4 、底層 5.7×10^4 にやや減少した。最終的には9日目（Sum 9）のオーストラリア停泊時に、表層 3.6×10^4 、底層 2.4×10^4 となり、初期値と比べて、表層で38%、底層で25%に減少した。一方、*Synechococcus*は出発港の海水(Sum Port)に、 5.1

$\times 10^4$ particles/ml存在していた。冬と比較すると、約5倍の数であった。タンク内漲水入直後に (Sum 0)、表層 4.9×10^4 、底層 6.1×10^4 となり、Sum Portの粒子数が維持された。3日目 (Sum 3) には、表層 4.6×10^4 、底層 2.4×10^4 となり底層のみ減少した。リバラストで外洋水 (Sum O.S.、 6.0×10^3) に置換された後、4日目 (Sum 4) には、表層 7.9×10^3 、底層 5.8×10^3 となり、どちらも有意に減少した。最終的には9日目 (Sum 9) のオーストラリア停泊時に、表層 1.8×10^3 、底層 3.6×10^3 となり、初期値と比べて、表層で15%、底層で11%に減少した。

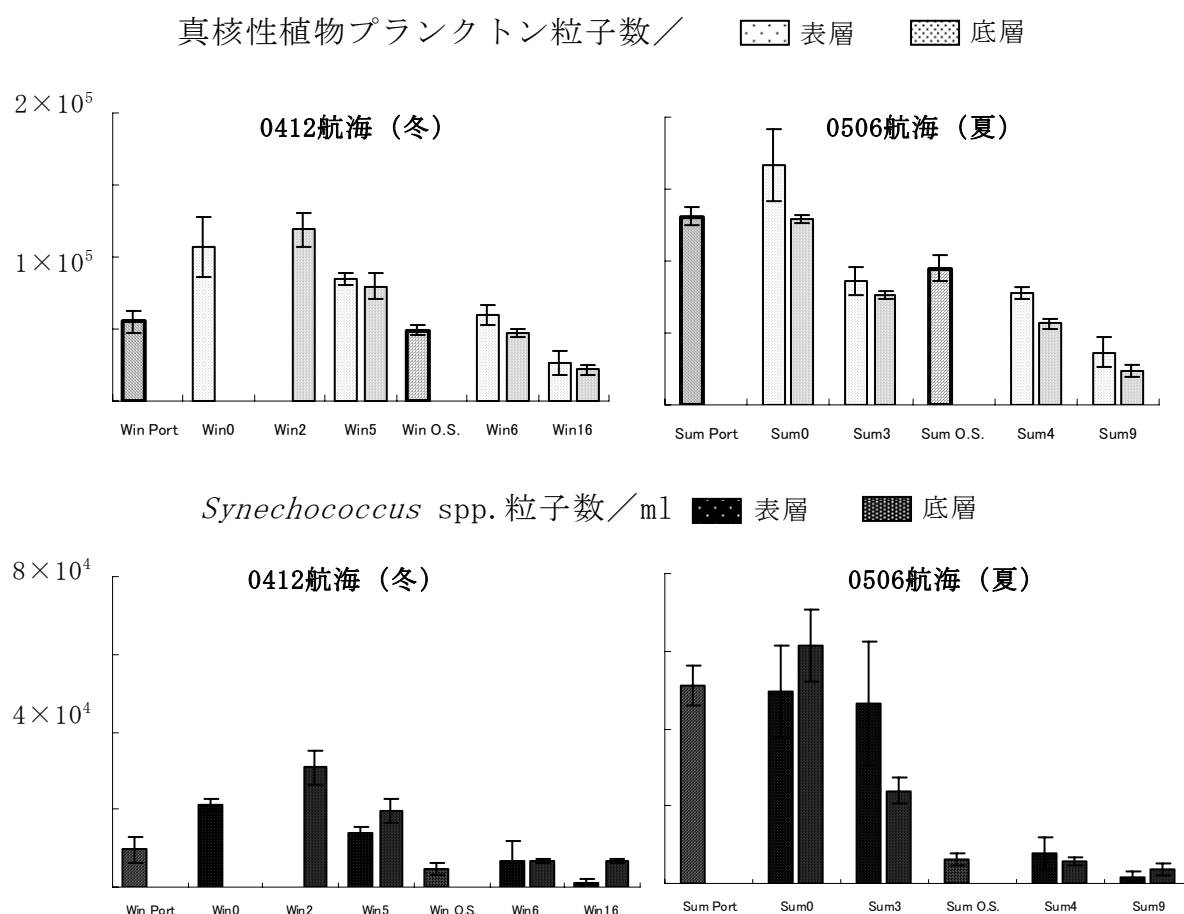


図15. フローサイトメトリで計測したピコ・ナノサイズの植物プランクトン粒子数の変遷。

Win Port, Sum Portは出航地の港の海水サンプル、Win O.S., Sum O.S.はリバラスト海域（太平洋）の海水サンプルの測定値。

バラストタンクに取り込まれたピコ・ナノサイズの植物プランクトン数は真核性および *Synechococcus* とともに、減少することが明らかとなった。こうした結果は、これまでの報告⁷⁾とも一致している。Gollasch et al.⁷⁾は、減少の原因として、タンクへの注入時のポンプによる衝撃や暗黒条件による細胞の死滅の可能性を指摘している。また今回の調査のように赤道を通過する航路の場合、水温が30℃にまで上昇することから、これが生存に影響する可能性も考えられた。その他の粒子数減少の要因として、以下の3つが考えられる。まず第1に、バラストタンクの底に堆積

して、他の堆積物と凝集、混在する可能性である。更に、タンク内の過酷な環境下で、シストあるいは休眠細胞に移行して、タンク内に堆積する可能性も考えられる。第2に動物性プランクトンによる捕食が考えられる。Gollasch et al.は、タンク内でカイアシ類の一種 (*Tisbe graciloides*) が初期値の5倍に増加するのを確認している。またタンク内には繊毛虫など多様な原生動物が確認されている。本研究でもバラストタンク内で動物プランクトンや原生動物の存在が確認されており、こうした生物による捕食の可能性は十分に考えられる。第3の可能性としては、本調査ではじめて確認された凝集性 *Synechococcus* の凝集性という性質によって、粒子数の減少が起きている可能性である。今回確認された *Synechococcus* は、外洋域等で認められる一つ一つの細胞が独立して存在する *Synechococcus* ではなく、細胞間に粘質物の存在する凝集性のあるタイプで、通常は沿岸の干潟などの環境から見つかることが多い。こうした凝集性、粘着性の性質により、タンクの壁や他の大型の植物プランクトンに付着したり、あるいはプレろ過の際にフィルターに付着することにより、細胞数が減少する可能性が考えられる。

フローサイトメトリによる解析結果と固定試料の直接計測による結果では、計測対象と計測方法が異なり、単純には比較できないが、減少率に大きな違いが認められた。フローサイトメトリによる計測結果 (表4) では、オーストラリア到着直前の時点で、出航時細胞数の40~70%に減少するにとどまった。一方、Gollasch et al.のマイクロサイズの植物プランクトンの直接計測による結果では、出航から、約12日後のサンプルでは、出航前の約0.02%にまで細胞数が減少した。また我々のマイクロサイズの植物プランクトンの直接計測では、Win-Portサンプルで1,299cells/mlの細胞密度が、最終的に64cells/Lとなり、0.005%にまで減少した。この原因として、リバラストの効果の違いが関係している可能性が考えられた。本研究におけるマイクロサイズの植物プランクトンの計測では、リバラスト直後の細胞数は、直前と比べて約4.5%に減少していた。そしてピコ・ナノプランクトンでは、リバラスト前後で細胞数に有意な差が認められないケースもあった。有意な差のあるケースでも、減少率は24%~74%であり、マイクロサイズの植物プランクトンと比べて明らかに少ない。今回リバラストが行われた海域の外洋水には、マイクロサイズの植物プランクトンはほとんど検出されなかったが、ピコ・ナノサイズの植物プランクトンは、出航港の細胞数と比較し、冬で約83%、夏で約56%に達する数が存在していた。そのためリバラストにより、マイクロサイズの植物プランクトンの細胞数は大きく減少したが、ピコ・ナノサイズの植物プランクトンの細胞数は見かけ上、変化が少なかったと考えられる。Zhang and Dickma⁸⁾は、マイクロサイズの植物プランクトンのリバラストの効果について検証を行い、リバラストを行わなかった船に比べ、リバラストを行った船は、到着後の細胞数で約23%の細胞数しか確認できなかったことを示し、リバラストが効果的であったと報告している。一方、Drake et al.⁹⁾のバクテリア、ウイルスを対象とした調査では、同じ船のリバラストを行わなかったタンクと行ったタンクの細胞数には有意な差が見出されなかった。このようにピコ・ナノサイズのプランクトンでは、全般的にリバラストによって細胞数を減少させるという効果が薄いことが分かる。

今回、ピコ・ナノサイズの植物プランクトンにおいて、タンク内へ注入後に、一時的に粒子数の増加が認められた。増加の原因としては、凝集した細胞の分散による影響が考えられる。表5に港湾と港湾からバラストタンク内に漲水した直後の細胞数と凝集体のサイズ毎の凝集体数を示す。タンク内に漲水された直後に、71細胞以上の凝集体の数が有意に減少し、逆に11~40細胞の凝集体が有意に増加した。ポンプによりタンク内に漲水される過程で、凝集体が壊れてより小さな凝

集体や細胞に分散したと考えられる。フローサイトメトリによる計測では、より大きな凝集体は前処理の段階で取り除かれるため計測されなかったが、漲水後に大きな凝集体が壊れて生成したより小さな凝集体や細胞が計測されることで、漲水直後の粒子数の増加が起きたと推察している。

ピコサイズの植物プランクトンが、越境移動することにより、移動先に定着しうるのか、また生態系にどのような影響を与えるかについては明らかでないが、多数のピコ・ナノサイズの植物プランクトンが、リバラストを行っている船舶のタンク内に生存しており、人為的に移動している現状が明らかになった。環境DNAについての遺伝的多様性の解析からは、特にピコプランクトンにおける新規生物群を含む割合の高さが指摘されており、環境によってはピコサイズの新規生物群が全体の36%を占めることも報告されている¹⁰⁾。また*Aureococcus anophagefferens*のように brown tideを引き起こす有害種がピコプランクトンにも認められており¹¹⁾、ピコプランクトンによる生態系への影響は皆無とは言えない。IMOのガイドラインでは、ピコ・ナノサイズの微生物は、病原菌を除いて、規制の対象から外れているが、その動態や多様性の把握、生態系への影響などに関する基礎研究を今後行う必要性が示唆された。

表4. フローサイトメトリによる検出粒子数の変化。前日の平均粒子数と当日の平均粒子数の差を算出した。前日と当日の平均粒子数に有意な差がみられる場合を*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ で示した。0412航海（冬）の低層Win0データは表層のWin0データを用いている。

0412航海（冬）				0506航海（夏）			
真核植物プランクトン				真核植物プランクトン			
表層	粒子数変化/ml			表層	粒子数変化/ml		
Win Port - Win 0	$+5.2 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^4$	*		Sum Port - Sum 0	$+3.6 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^4$		
Win 0 - Win 5	$-2.3 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^4$			Sum 0 - Sum 3	$-8.1 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^4$	*	
Win 5 - Win 6	$-2.5 \times 10^4 \pm 7.3 \times 10^3$	*		Sum 3 - Sum 4	$-7.7 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^4$		
Win 6 - Win 16	$-3.2 \times 10^4 \pm 9.2 \times 10^3$	*		Sum 4 - Sum 9	$-4.2 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$	*	
底層	粒子数変化/ml			底層	粒子数変化/ml		
Win 0 - Win 2	$+1.2 \times 10^4 \pm 2.4 \times 10^4$			Sum Port - Sum 0	$-1.2 \times 10^3 \pm 6.4 \times 10^3$		
Win 2 - Win 5	$-3.9 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$	*		Sum 0 - Sum 3	$-5.3 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^3$	**	
Win 5 - Win 6	$-3.2 \times 10^4 \pm 9.4 \times 10^3$	*		Sum 3 - Sum 4	$-2.0 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^3$	**	
Win 6 - Win 16	$-2.6 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^3$	**		Sum 4 - Sum 9	$-3.3 \times 10^4 \pm 4.8 \times 10^3$	**	
<i>Synechococcus</i> spp.				<i>Synechococcus</i> spp.			
表層	粒子数変化/ml			表層	粒子数変化/ml		
Win Port - Win 0	$+1.1 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$	*		Sum Port - Sum 0	$-1.6 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^4$		
Win 0 - Win 5	$-9.4 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^4$	*		Sum 0 - Sum 3	$-3.2 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^4$		
Win 5 - Win 6	$-7.2 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$			Sum 3 - Sum 4	$-3.8 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$	*	
Win 6 - Win 16	$-5.4 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$			Sum 4 - Sum 9	$-6.1 \times 10^3 \pm 4.2 \times 10^3$		
底層	粒子数/ml			底層	粒子数変化/ml		
Win 0 - Win 2	$+9.7 \times 10^3 \pm 4.2 \times 10^3$	*		Sum Port - Sum 0	$+1.0 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^4$		
Win 2 - Win 5	$-1.1 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^3$			Sum 0 - Sum 3	$-3.7 \times 10^4 \pm 9.3 \times 10^3$	**	
Win 5 - Win 6	$-1.3 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$	**		Sum 3 - Sum 4	$-1.8 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^3$	**	
Win 6 - Win 16	$0 \pm 6.4 \times 10^2$			Sum 4 - Sum 9	$-2.2 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^3$		

表5. 直接観察によるWin PortとWin 0サンプルの*Synechococcus* spp.の細胞数。Win Portは、0412出航港の海水であり、Win 0は、バラストタンクに漲水直後の海水である。両者の平均細胞数に有意な差がみられた場合を*; $P<0.05$, **; $P<0.01$ で示した。

		Win Port	Win 0	
全細胞数平均 (cells/ml)		$1.7 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	$2.2 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$	
コロニーサイズ別の平均細胞数／コロニー	1-10	39822.4 ± 5669.4	52824.0 ± 9676.2	
	11-40	81.8 ± 54.7	449.7 ± 54.5	**
	41-70	40.9 ± 54.7	286.2 ± 136.2	
	71-	204.4 ± 54.2	40.9 ± 54.7	*

(3) 細菌類および関連微生物の動態

1) ウイルス状粒子、細菌、鞭毛虫の数における外洋でのリバラスト効果

現在、実用化されている唯一のバラスト水処理法である外洋におけるバラスト水交換の効果を調べるために、夏季と冬季にバラ積み船に乗船してバラストタンク内生物量調査を行ったところ（サンプル記号は表7を参照）、生物量の変動は異なる季節にもかかわらず、両季節で同様の傾向がみられた。細菌に関しては、生死を区別せずに計数する直接計数法（全菌数）（図16a）と、コロニーを形成するものを生きている細胞であると判定するプレート計数法（生菌数）（図16c(1)–(6)）を用いて計数した。なお、このプレート計数法は、2004年2月に国際海事機構（IMO）によって採択された「バラスト水管理条約」における細菌数の計数方法と同様の手法である。ウイルス状粒子およびナノ鞭毛虫の計数は、蛍光染色を施して行った（図16b）。

直接計数法の結果（図17aとb）は、両季節において、リバラスト前後で全菌数は有為に減少し（Wilcoxon test. 夏季: 表層; $W = 0$, $p < 0.01$; 下層; $W = 0$, $p < 0.01$; Winter: Surface; $W = 24$, $p < 0.01$; Bottom; $W = 23$, $p = 0.02$ ）、この動態はバラストタンクの上層と下層で同様に観察された（Kendall's rank correlation. 夏季: $\tau = 0.68$, $p = 0.001$; 冬季: $\tau = 0.8222$, $p < 0.01$. Wilcoxon rank test. 夏季; $W = 112.5$, $p = 0.504$; 冬季; $W = 61$, $p = 0.4359$ ）。

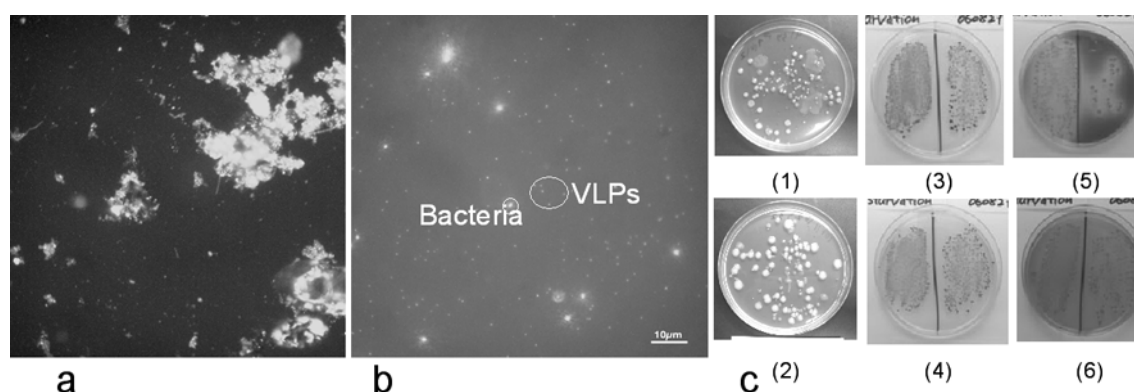


図16a. DAPI染色し、落射蛍光顕微鏡で観察（357nm）。白く光っているのが細菌。図16b. Syber Gold染色し、落射蛍光顕微鏡で観察（495nm）。白く光っているのが細菌。図16c (1) 海洋性従属栄養細菌: Marine Agar (BD Difco)。 (2) 陸棲従属栄養細菌: R2A (BD Difco)。 (3) 大腸菌; XM-G寒天培地（日水）, IID560*Escherichia coli*; O55。 (4) 大腸菌群; XM-G寒天培地（日水）, IID959*Escherichia coli*; O157, H7。 (5) コレラ菌のなかま: TCBS寒天培地（日水）, IID6024*Vibrio cholerae* MO45 O139。 (6) 腸球菌のなかま: mEnterococcus Agar（BD Difco）, IID768*Enterococcus faecium*

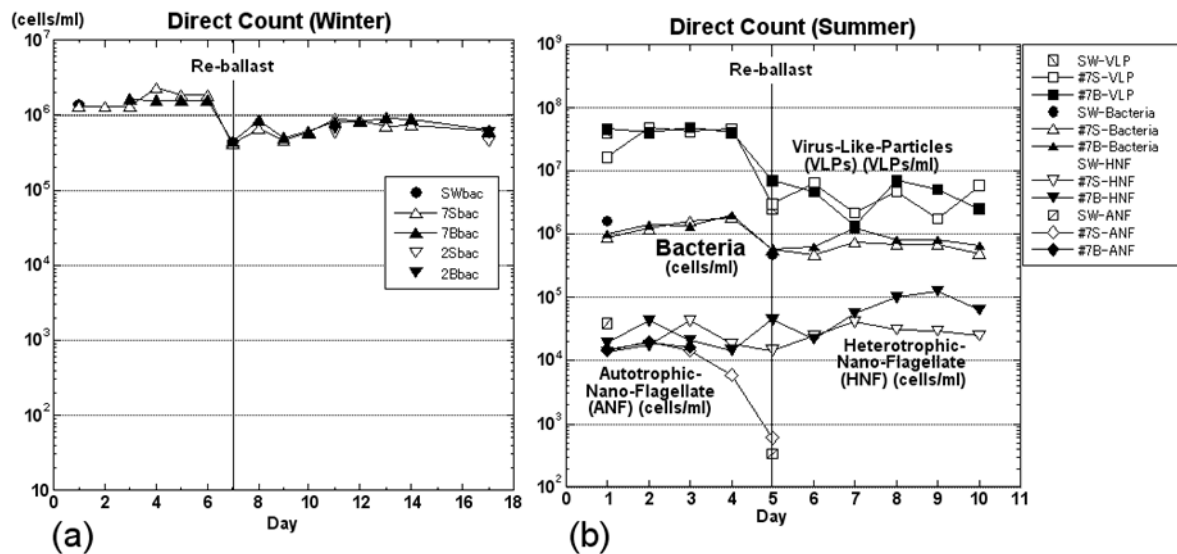


図17. 直接計数法による航海試料の計測結果。Day; 航海日: Re-ballast; 洋上交換. (a) 冬季。SW; 海水: 7Sbac; 7番タンクの表層: 7Bbac; 7番タンクの下層: 2Sbac; 2番タンクの表層: 2Bbac; 2番タンクの下層. (b) 夏季。SW-VLP: 海水のVLPs数: #7S-VLP; 7番タンクの表層のVLPs 数: #7B-VLP; 7番タンクの下層のVLPs 数: SW-bacteria: 海水の細菌数: #7S-Bacteria; 7番タンクの表層の細菌数; #7B--bacteria; 7番タンクの下層の細菌数: SW-HNF: 海水のHNF数: #7S-HNF; 7番タンクの表層のHNF数; #7B-HNF; 7番タンクの下層のHNF数: SW-ANF: 海水のANF数: #7S-ANF; 7番タンクの表層のANF数; #7B-ANF; 7番タンクの下層のANF 数。

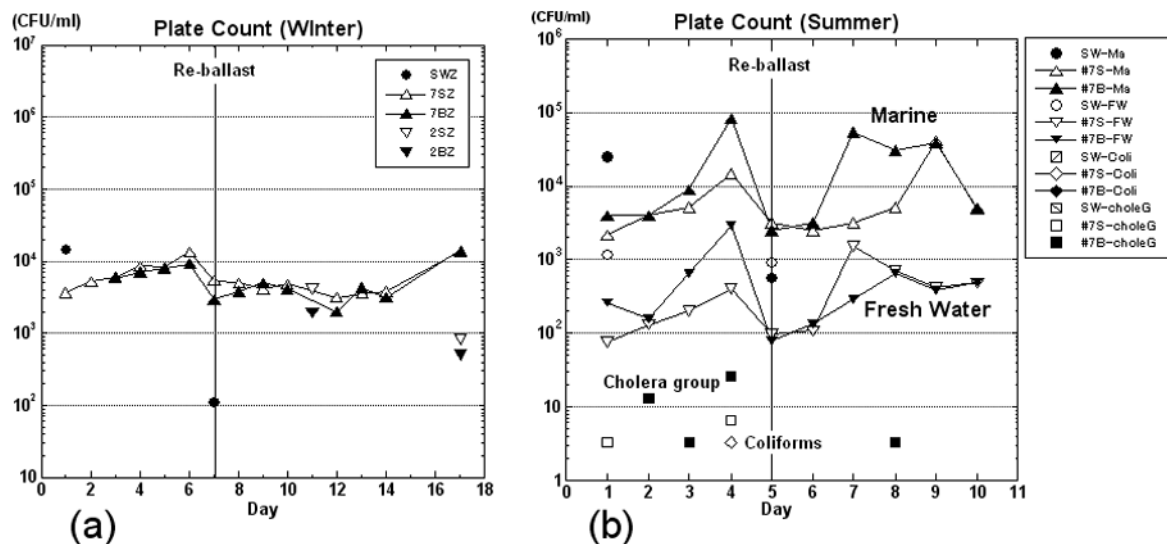


図18. プレート計数法による航海試料の計測結果。Day; 航海日: Re-ballast; 洋上交換. (a) 冬季。海洋性細菌の結果のみ。SWZ; 海水: 7SZ; 7番タンク表層: 7BZ; 7番タンク下層: 2SZ; 2番タンク表層: 2BZ; 2番タンク下層. (b) 夏季。Ma; 海洋性従属栄養細菌: FW; 陸棲従属栄養細菌: Coli; 大腸菌群: chole-G: コレラのグループ. SW; 海水: #7S; 7番タンク表層: #7B; 7番タンク下層。

これに対して、生菌数の測定結果（図18aとb）では、リバラスト効果は明瞭でなかった。リバラスト前後で海洋性従属栄養細菌の有為な減少は認められず(Wilcoxon test. 夏季: 表層; $W = 12$, $p = 0.142$; 下層; $W = 4$, $p = 0.048$; 冬季: 表層; $W = 12$, $p = 1$; 下層; $W = 13$, $p = 0.9143$)、同様の傾向は、夏季の航海時に同時に測定した陸棲従属栄養細菌についてもみられた(Wilcoxon test. 表層; $W = 6$, $p = 0.2571$; 下層; $W = 15$, $p = 0.6095$)。また、季節にかかわらず、海洋性従属栄養細菌 (Ma) および陸棲従属栄養細菌 (R) 共に、上層と下層の動態は一致していなかった(Kendall's rank correlation. 夏季: MA: $\tau = 0.055$, $p = 0.879$. 冬季: MA: $\tau = 0.539$, $p = 0.03$; R: $\tau = 0.422$, $p = 0.11$. Wilcoxon test. 夏季: MA; $W = 74$, $p = 0.631$; 冬季: MA: $W = 66$, $p = 0.2403$; R: $W = 58$, $p = 0.5787$.)。生菌数の動態として、リバラスト直後には一時的に減少が認められるが、その後、経時的に増加するため、リバラストの効果は期待できないと考えられる。

夏季の航海時では、「バラスト水管理条約」で検査を指定されている病原体の調査も行った(図18aとb)。この結果からは、沿岸域に生息するこれらの病原体に対して、洋上でのリバラストは除去効果が示唆された。本調査では沿岸域で漲水したにもかかわらず、漲水直後のバラスト水から検査すべき病原体はほとんど検出されなかったこのため、病原体がリバラスト時に排出されずに残留して、再増殖する可能性をリバラストで防ぐことができるか否かは検証できていない。

ウイルス状粒子と鞭毛虫の調査は、夏季航海で行った(図17aとb)。ウイルス状粒子は全菌数と同様にリバラスト後に有為に減少し(Wilcoxon test. 表層, $W = 24$, $p < 0.01$; 下層, $W = 24$, $p = 0.01$)、独立栄養(光合成)を行うと考えられるナノ鞭毛藻は航海開始から経時的に減少し、リバラスト後は検出できなかった。これに対して、従属栄養性ナノ鞭毛虫は、リバラスト後に有為に増加した(Wilcoxon test. 表層; $W = 1$, $p = 0.02$; 下層; $W = 1$, $p = 0.02$)。従属栄養性ナノ鞭毛虫はバクテリアやデトライタスを捕食して増加が可能であることに対して、光合成ができないバラストタンク内では、独立栄養性ナノ鞭毛藻は生存できなかったと考えられる。ウイルス状粒子は沿岸域に比較して外洋では数が少ないため、リバラストにより減少したと考えられる。

2) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)を用いたリバラスト効果の検証

試料は、冬季、夏季航海共にバラスト水をフィルター上に濃縮したものを用い、さらに夏季航海では、生菌数を計数した後の細菌も試料とした。これらの試料は、DNAを抽出し、PCRで増幅した後、DGGEを行った。DGGEの解析には、クラスター解析(ユークリッド距離, UPGMA)と多次元尺度法(Multidimensional scaling; MDS)を行った。

フィルター上に濃縮した試料のDGGE法によるバンドパターン(図19a-c)のクラスター解析の結果から、リバラスト前後で大きく菌相が変化することを確認した(図20a-d)。また、MDSの結果から、タンク内にバラスト水が保存されている間にも菌相が変化することを確認した(図21a-d)。この傾向は、バラストタンクの上下両層において、季節にかかわらず認められた。これに対して、生菌数計数後のコロニーを試料として用いた場合(図22aとb)は、クラスター解析で、リバラスト前後で明瞭なクラスターが形成されなかったが(図23aとb)、MDSの結果からは、バラストタンク内に保存されている間に菌相が変化することは確認できた(図23cとd)。この傾向は、バラストタンク内の上層と下層で同様に認められた。このことは、外洋でリバラストを行っても、沿岸域で生存が可能な細菌を運搬してしまう可能性を示唆しており、リバラスト後に増加する細菌を同定して、リバラスト前の細菌と比較する必要がある。

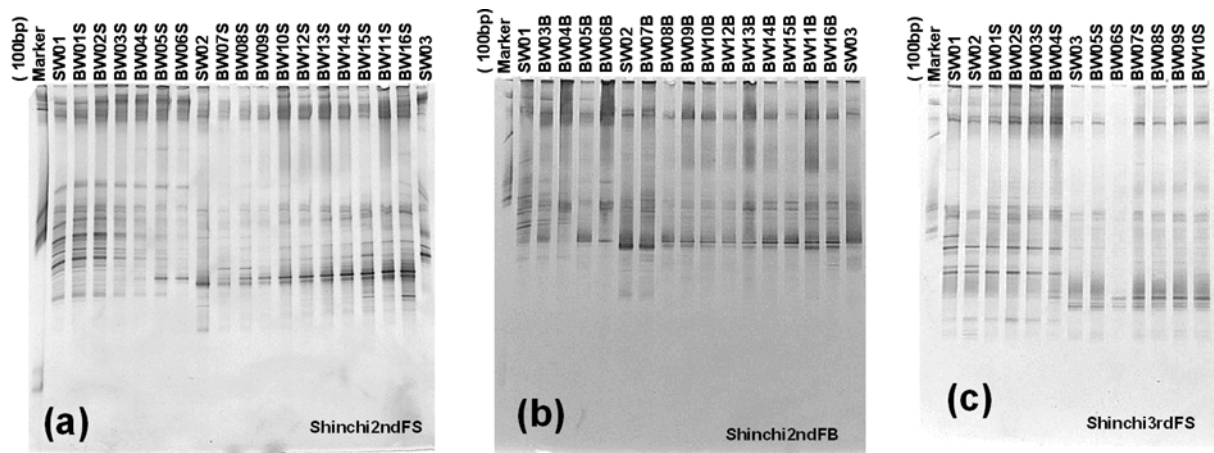


図19. DGGEの電気泳動像。

(a) 冬季バラスト水の表層サンプル、(b) 冬季バラスト水の下層サンプル、(c) 夏季バラスト水の下層サンプル。略号は表2を参照。

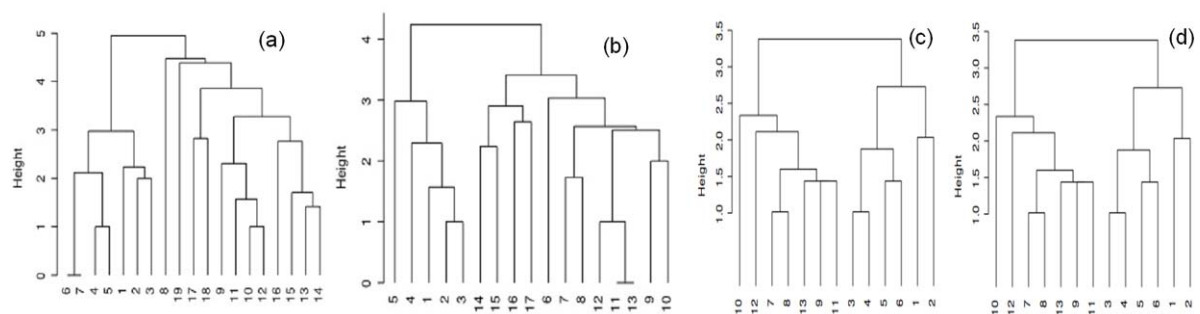


図20. DGGEパターンのクラスター解析により作成したデンドログラム。

(a) 冬季のタンク表層試料、(b) 冬季のタンク表層試料、(c) 夏季のタンク表層試料、(d) 夏季のタンク下層試料。略号は表2を参照。

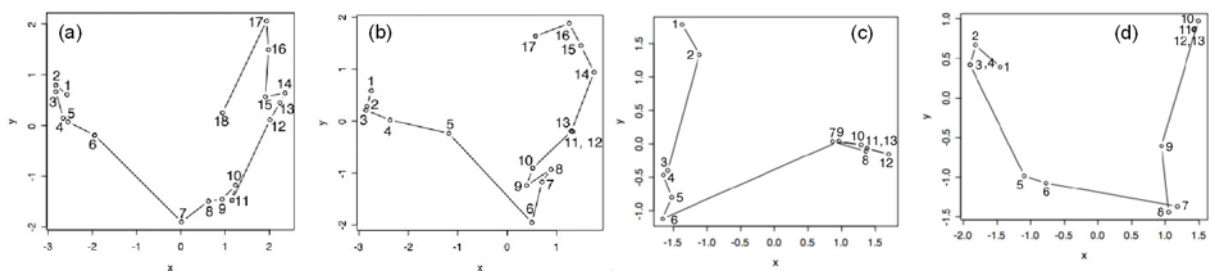


図21. DGGEパターンのMDS解析図。

(a) 冬季のタンク表層試料、(b) 冬季のタンク表層試料、(c) 夏季のタンク表層試料、(d) 夏季のタンク下層試料。略号は表2を参照。

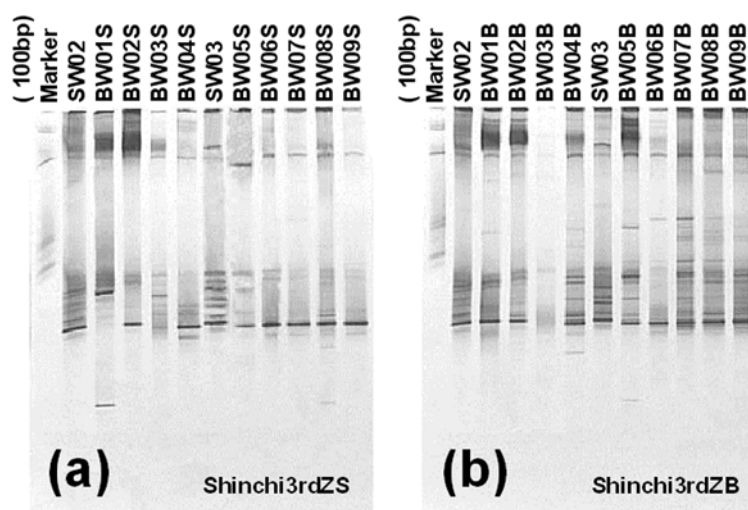


図22. DGGEの電気泳動像。

(a) 夏季コロニーの表層サンプル、(b) 夏季コロニーの下層サンプル。略号は表2を参照。

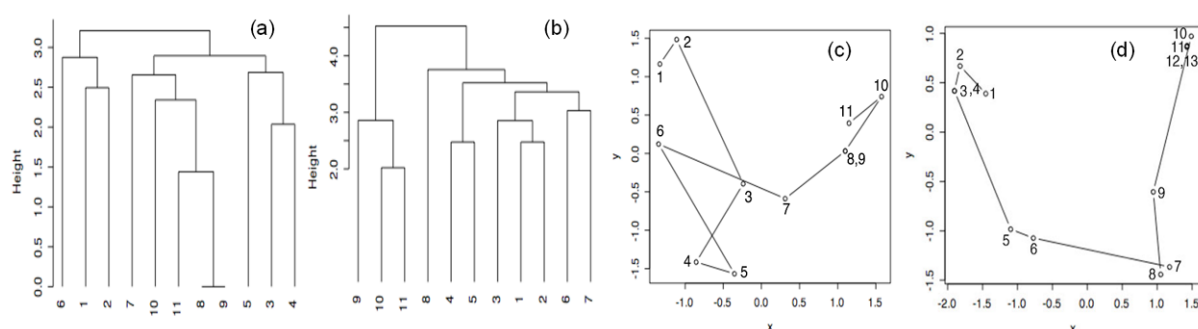


図23. DGGEパターンのクラスター解析図(a, b)とMDS解析図(c, d)。

図23a, c. 夏季コロニーの表層サンプル、図23b, d. 夏季コロニーの下層サンプル。1; SW0 1 : 2; BW01: 3; BW02 : 4; BW03: 5; BW04: 6; SW03 : 7; BW05 : 8; BW06 : 9; BW07: 10; BW08: 11; BW09。

3) 乾ドック入りした大型商船のバラストタンク調査

日本の造船所にドック入りする大型商船を対象として、バラスト水中の微生物群集調査を行った。調査は、長期航海を終了した、バラ積み船 (SF, SC)、コンテナ船 (NL, NP)、自動車船 (B, GL) で行った。コンテナ船はバラ積み船とは異なり、寄港地で各タンクにおいてバラスト水の一部のみの漲排水が頻繁に行われている。また、自動車船はバラスト水の交換がバラ積み船と比較して少量である。このためバラスト水中の生態系はバラ積み船のものとは大きく異なることが予想され、この違いを微生物群集の違いで説明することを試みた。検出方法は、上記のリバラスト効果の調査と同様である。

全菌数 (図24a) は、船舶やタンクの違いにかかわらず $10^5 - 10^6$ cells/mL であり、これまでの調査とほぼ同じ結果であった。この値は海洋で検出される全菌数に匹敵する。これら乾ドック入りした船舶の一連の試料から、糸状微生物 (図24b) が頻出するという特徴がみられた。天然の海域では、糸状微生物はほとんど検出できない。今回の調査ではSFのNo.5のタンクおよびSCの以外の採

集を行った全てのタンクから、糸状微生物が検出された(図24a, b)。蛍光値に基づく画像解析から生物量を推定した結果(表6)、その生物量は、全菌数の0.04–9.15倍、海洋性従属栄養細菌の0.08–349.15倍、陸棲従属栄養細菌の31.25–11573.37倍にも達し、バラストタンク内の微生物生態系に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

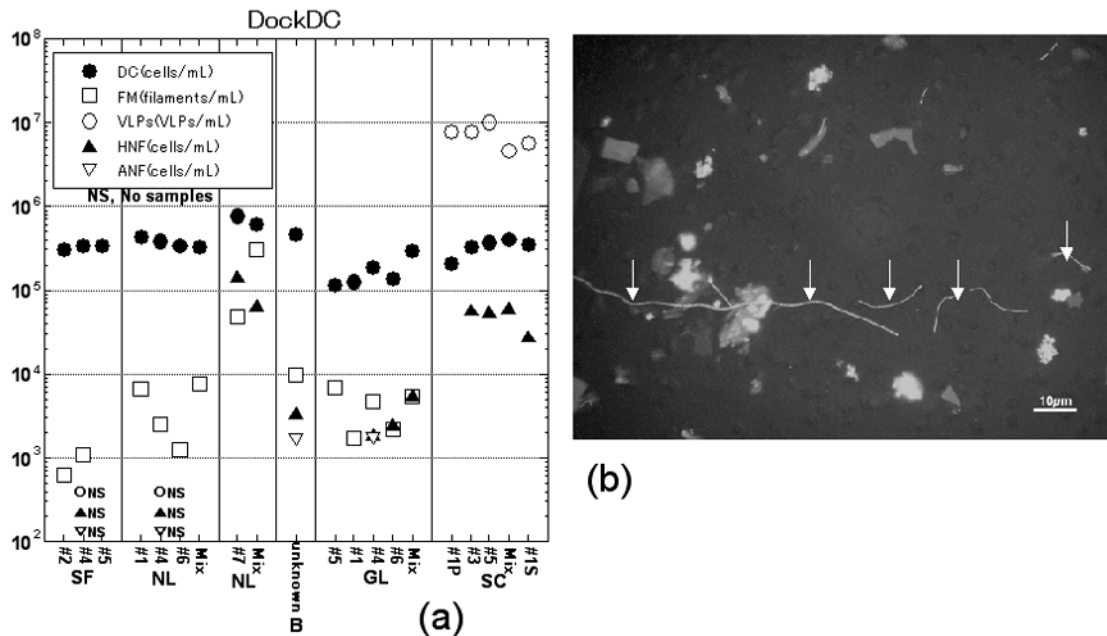


図24a. 直接計数法によるドックの試料結果。SFとSC; バラ積み船: NLとNP; コンテナ船: Band GL; RO-RO船。DC; 細菌: FM; 糸状微生物: VLPs; ウイルス状粒子: HNF; 従属栄養性ナノ鞭毛虫: ANF; 独立栄養性ナノ鞭毛虫。

図24b. DAPI染色し、落射蛍光顕微鏡で観察(357nm)。矢印で示した蛍光像が糸状微生物。

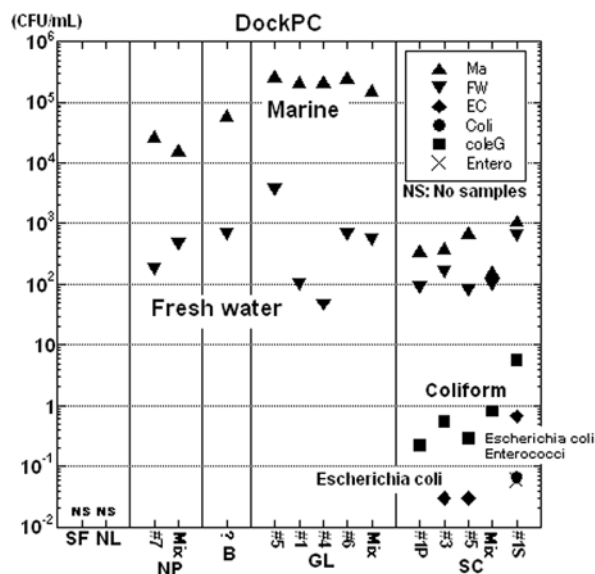


図25. プレート計数法によるドックの試料結果。SFとSC; バラ積み船: NLとNP; コンテナ船: Band GL; RO-RO船。Ma; 海洋性従属栄養細菌: FW; 陸棲従属栄養細菌: EC; 大腸菌: Coli; 大腸菌群: coleG; コレラ菌グループ: Enterococci; 腸球菌グループ。

ウイルス状粒子およびナノ鞭毛虫の計数は、SFとNL以外の試水で行ったが(図24a)、ウイルス状粒子の計数は、SC以外では夾雑物が多いためできなかった。従属栄養性ナノ鞭毛虫は、 10^3 –

10^5 cells/mLの範囲で値にばらつきがみられたが、これらの値は天然の海水に匹敵する。独立栄養性ナノ鞭毛虫はBとGLのNo.4で検出されたが、これらはドック入り前に漲水した際にタンクに侵入したと考えられる。また、GLのNo.4では、原生動物が85cells/L検出できた。

生菌数は、SFとNL以外の船舶で調査を行った(図25)。この結果、NP, B, GLでは、海洋性従属栄養細菌の数が多く($10^4 - 10^5$ CFU/mL)、SCのみ沿岸域と同様の値を示した。陸棲従属栄養細菌に関しては、GLのNo.5のみ、 3.55×10^3 CFU/mLと高い値であったが、このタンク以外は、 $10^1 - 10^2$ CFU/mLであり、沿岸域や外洋の陸棲従属栄養細菌数とほぼ同じであった。病原性の微生物はSCからのみ検出されたが、その値は非常に低い。

また、今回調査したドック入り船舶は、SCのバラスト水はいずれのタンクからも各培地に出現する生菌数や糸状微生物が検出されないことから、沿岸域の海水の特徴を示す可能性を示唆する。SCは、入渠直前に日本の沿岸水を漲水したとの情報も得ており、バラストタンクの水のほとんどが日本の沿岸水に置き換わっていたと考えられる。これに対して、SC以外の船舶のタンクからは、海洋性従属栄養細菌の数が多く(図25)、その割合も比較的高い(表6)、また、糸状微生物が頻繁に検出されている(図24a)ことから、バラストタンク内で新たな生態系を形成していると考えられる。

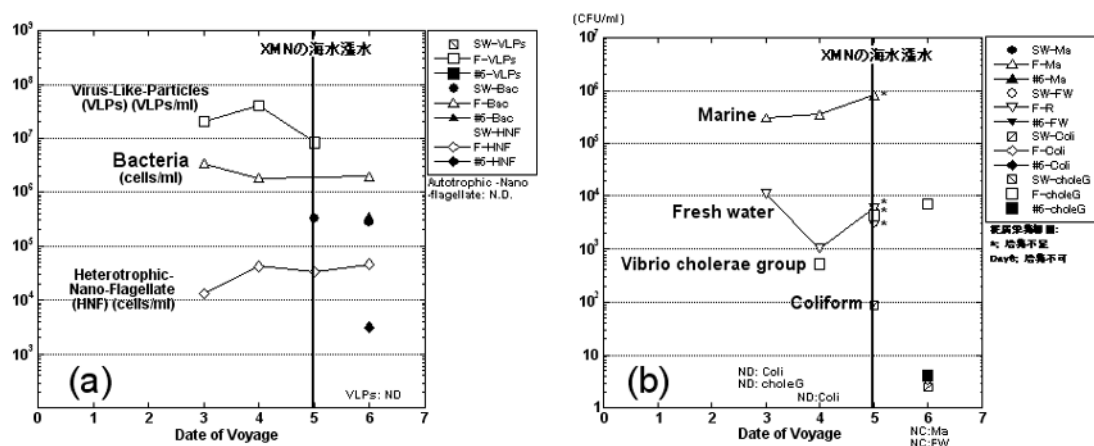


図26a. 短期航海における直接計数法による結果。SW: 海水、F: FPタンク、#6: 6番タンク。VLP: ウィルス様粒子の数、Bac: 細菌数、HNF: 従属栄養性ナノ鞭毛虫。

図26b. 短期航海におけるプレート計数法による結果。SW: 海水、F: FPタンク、#6: 6番タンク。Ma: 海洋性従属栄養細菌、FW: 陸棲従属栄養細菌、Coli: 大腸菌群、choleG: コレラ菌の仲間。

4) コンテナ船の短期航海中におけるウィルス状粒子、細菌、鞭毛虫の数の動態

少量のバラスト水の漲排水を頻繁に行うコンテナ船におけるバラストタンク内の微生物の動態調査を乗船して行った。検出方法は、上記のリバラスト効果および乾ドック入りの大型商船の調査と同様の方法である。

直接計数法の結果(図26a)では、独立栄養性ナノ鞭毛虫は検出できなかったが、ウィルス状粒子(10^7 VLPs/mL)、細菌(10^6 cells/mL)、共に沿岸水の微生物群集にほぼ近い構成であった。従属栄養性ナノ鞭毛虫は沿岸水の密度にほぼ匹敵する(10^4 cells/mL)が、やや多い傾向である。また、定量はしていないが、乾ドック入りした大型商船の試水と同様、糸状微生物が頻出した。

生菌数の計数(図26b)においては、大腸菌群、コレラ菌の仲間もほとんど検出されなかったが、航海の途中で沿岸水を漲水した直後に、わずかに検出できた。これは、沿岸水のフロラを反映したためと考えられる。従属栄養細菌は、海洋性のもの、陸棲のもの、共に培養日数が少ないため、やや少ない見積もりである。それにもかかわらず、両従属栄養性細菌は1-2桁多い傾向であり(海洋性; 10^5 CFU/ml; 陸棲; $10^3 - 10^4$ CFU/ml)、海水を漲水後、タンク内で増殖した可能性は捨てきれないが、この結果だけでは断言はできない。

以上の結果を総合すると、糸状微生物が頻出し、独立栄養性ナノ鞭毛虫が検出されない、かつ、従属性栄養細菌及び従属栄養性ナノ鞭毛虫が比較的高密度あることから、調査したタンクは、バラストタンク内で独自の生態系を形成している可能性が高いと考えられる。

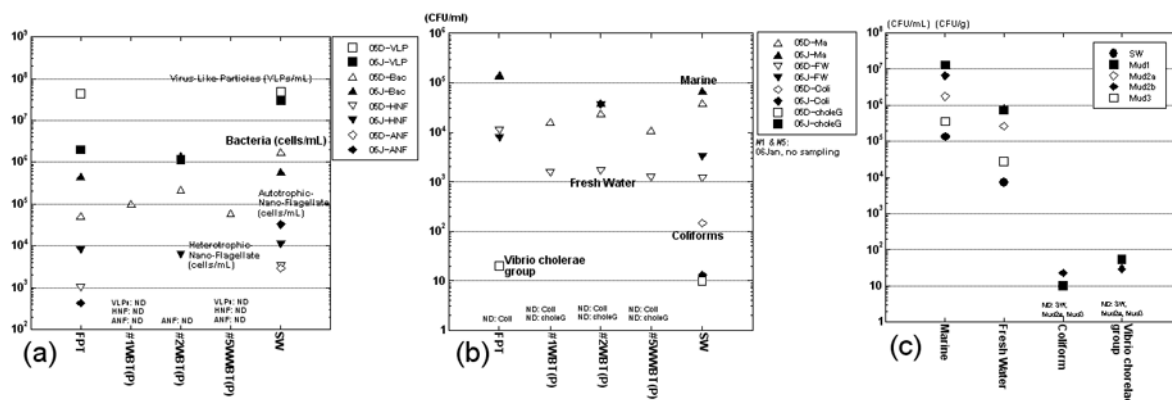


図27a. 直接計数法の結果。05D: 2005年12月、06J: 2006年1月に夫々採集。FPT: FPタンク、#1WBT(P): 1番タンク、#2WBT(P): 2番タンク、#5WWBT(P): 5番タンク、SW: 沿岸水。VLP: ウィルス様粒子の数、Bac: 細菌数、HNF: 従属栄養性ナノ鞭毛虫、ANF: 独立栄養性ナノ鞭毛虫。

図27b. プレート計数法の結果。05D: 2005年12月、06J: 2006年1月に夫々採集。FPT: FPタンク、#1WBT(P): 1番タンク、#2WBT(P): 2番タンク、#5WWBT(P): 5番タンク、SW: 沿岸水。Ma: 海洋性細菌、FW: 陸棲細菌、Coli: 大腸菌群、choleG: コレラ菌の仲間。

図27c. FPタンクのバラスト水と泥のプレート計数法の結果。SW: バラスト水、Mud1: 泥1、Mud2a: 泥2a、Mud2b: 泥2b、Mud3: 泥3。Marine: 海洋性従属栄養細菌、Fresh Water: 陸棲従属栄養細菌、Coliform: 大腸菌群、Vibrio cholerae group: コレラ菌の仲間。

5) コンテナ船の寄港時のバラストタンク内の調査

バラスト水の調査は、2回(2005年12月と2006年の1月)行い、タンクの泥の調査は、2006年の1月の1回、FPTタンク内で行った。

直接計数法の結果(図27a)では、検出できたウィルス状粒子(NDまたは $10^6 - 10^7$ VLPs/mL)、細菌($10^4 - 10^5$ cells/mL)、鞭毛虫(NDまたは $10^2 - 10^3$ cells/mL)の数はタンク間のばらつきが大きいようであるが、沿岸水の密度(ウィルス状粒; 10^7 VLPs/mL: 細菌; 10^6 cells/mL: 鞭毛虫(NDまたは $10^3 - 10^4$ cells/mL))に匹敵する。これらのタンク間のばらつきは、コンテナ船の場合、漲排水が港毎タンク毎に異なることを反映しているためと考えられる。また、2005年12月の1番、2番、5番タンクは夾雑物が多いために、ウィルス状粒子と鞭毛虫は計数が不可能であった。しかし、これらの夾雑物は落射蛍光顕微鏡で観察する限り泥ではない。この場合も定量はしていないが、いず

れの試水においても糸状微生物が確認された。

生菌数の計数の結果（図27b）においては、沿岸水からは、大腸菌群、コレラ菌の仲間が検出されているのに対して、バラスト水からは、2005年12月にコレラ菌の仲間が検出されただけである。また、従属栄養性細菌は、海洋性（ $10^4 - 10^5$ CFU/mL）および陸棲（ $10^3 - 10^4$ CFU/mL）ともに沿岸域の海水とほぼ同様であるが、この値は、沿岸域でも比較的高い値である。調査した沿岸水の大腸菌群が比較的多く検出していることから、調査した沿岸水自体が生活排水等で汚染されている可能性が高い。このことを考慮すると、調査を行ったバラスト水は、漲水した海水自体に従属栄養性細菌の密度が高かった可能性と、タンク内で従属栄養細菌が増殖した可能性の二つが考えられる。

タンクの泥は生菌数の調査のみ行った（図27c）。ほぼ同体積（1mLあたりと泥1gの比較）あたりの密度を比較すると、何れの場合も泥に存在する従属栄養細菌は高い値を示す（海洋性：泥、 $10^5 - 10^7$ CFU/mL；海水、 10^4 CFU/mL。陸棲：泥、 $10^4 - 10^5$ CFU/mL；海水、 10^3 CFU/mL。）。これは一般的傾向である。また、病原性の細菌の仲間は、Mud1とMud2bサンプルからのみ検出された。このサンプルは全て同じタンク内からサンプリングを行っており、このばらつきは、同一タンク内でも、泥の細菌の密度は1- 2桁のばらつきが見られることを示す。

表6. 糸状微生物（FM）に対する、全菌数（DC）、海洋性従属栄養細菌（PCsw）、陸棲細菌（PCfw）の割合。

	船	航路	タンク の番号	バラスト 水の起源	FM/DC	FM/PCsw	FM/PCfw
SF	バラ積み船	日一豪	#2	新居浜	0.04	ND	ND
			#4	新居浜	0.06	ND	ND
			#5	新居浜	ND	ND	ND
NL	コンテナ船	欧- 中	#1	不明	0.29	ND	ND
			#4	不明	0.12	ND	ND
			#6	不明	0.07	ND	ND
			Mix	不明	0.43	ND	ND
NP	コンテナ船	欧- ア ジア	#7	洋上交換	1.16	32.53	5191.60
			Mix	不明	9.15	349.15	11573.37
B	RO-RO船	パナマ 運河通 過	不明	不明	0.42	3.12	294.73
GL	Ro-RO船	日一米	#5	不明	1.05	0.47	34.63
			#1	不明	0.42	0.25	521.85
			#4	不明	0.68	0.58	2663.47
			#6	不明	0.15	0.08	31.25
			Mix	不明	0.23	0.41	125.84
SC	バラ積み船	日一豪、 インド ネシア	#1WBT(P)	松島	ND	ND	ND
			#3WBT(P)	松島	ND	ND	ND
			#5WWBT(P)	松島	ND	ND	ND
			Mix	松島	ND	ND	ND
			#1WWBT(S)	松島	ND	ND	ND

表7. 冬季及び夏季サンプルに用いた記号と航海日程。

航海日程	冬季	夏季
0	No sample	SW01
1	SW01/BW01	SW02/BW01
2	BW02	BW02
3	BW03	BW03
4	BW04	BW04
5	BW05	SW03/BW05
6	BW06	BW06
7	SW02/BW07	BW07
8	BW08	BW08
9	BW09	BW09
10	BW10	BW10
11	BW11 (#2tank ^{*1)})	
12	BW12	
13	BW13	
14	BW14	
15	SW03/BW15/BW16(#2tank)	

^{*1)}#2tank(2番タンク)以外の試料は全て7番タンクの試料。

(4) バラストタンク環境下での植物プランクトンの培養特性

1) 暗条件での生存植物プランクトン群集の変化とその温度影響

清水港で採取した海水に栄養塩を添加せずに培養した。光条件として、明条件(L:D=12:12)のみの系(D0)、4、8日間アルミホイルで包み暗条件で培養した後に明条件で培養する系(D4、D8)の合計3系を用意した。定期的に培養液中のクロロフィル(Chl a)の測定を行い、また顕微鏡観察から植物プランクトンを同定した。Chl aの測定結果を図28a-cに示す。Chl a濃度は4日後に、培養初日(0.2–0.3 µg/L)の半分に減少した。Chl a濃度はD8において、明条件に移した8日後に最大となった(5.6 µg/L)。

Chl a濃度は暗条件の長さにかかわらず、明条件下に移すことで増加した。温帯性の植物プランクトンも暗条件にさらされた後、10℃、明条件下で増加した。このことは、温帯域の港で汲まれたバラスト水が寒帯域の海洋、または港で放出された際に増加することを示唆している。in vivo クロロフィルの値は明条件のみで培養したもの(D0)で低く、8日間暗条件で培養したもの(D8)で最も高い値を示した。クロロフィル濃度の温度による明らかな差は見られなかった。顕微鏡観察の結果、植物プランクトンの優占種はD0では羽状目であったのが、D8では中心目に変化していたことが分かった。珪藻では羽状目に比べ中心目では耐暗性が高い、もしくは暗期後の増殖が早いことが示唆された。クロロフィルがD8で最も高い値を示した原因としては、①D0では培養容器への付着によりクロロフィルの測定値は実際の生物量より低い値であったこと、そして②暗条件下で分解が進み、栄養塩が供給され、増殖速度が上がったことなどが考えられた。

以上より、植物プランクトンの一部の種は暗条件に対し耐性を持つことが明らかになった。また、栄養塩を添加しない、バルクの系においても同様の結果が得られた。このように植物プランクトンが暗条件に対し耐性を持ち、栄養塩の添加なしに明条件下において増殖することは、①バラスト水は増殖能を有する沿岸性の植物プランクトンを移動させること、②外洋におけるバラスト水の交換は、外洋における沿岸性植物プランクトンの増加を引き起こす可能性があることを示

唆する。よって“招かれざる客”の問題を真に解決するためには、バラスト水の外洋での交換だけでなく、別の処理を合わせて行うことが必要不可欠であると考えられる。

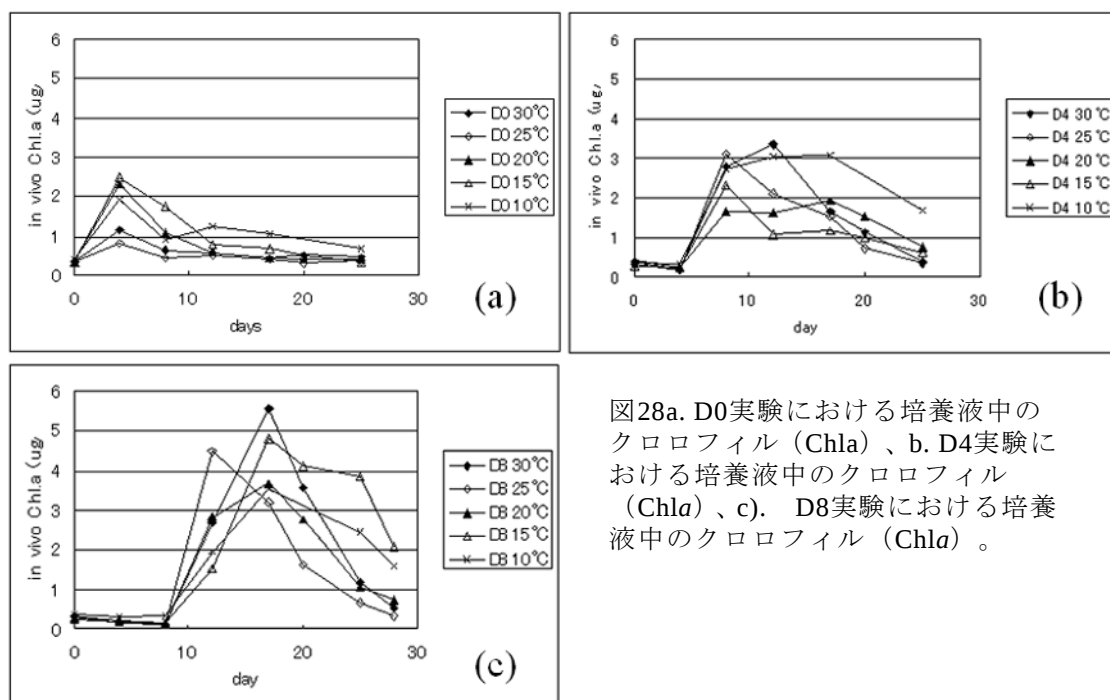


図28a. D0実験における培養液中のクロロフィル (Chla)、b. D4実験における培養液中のクロロフィル (Chla)、c). D8実験における培養液中のクロロフィル (Chla)。

2) 連続暗条件下における植物プランクトンの生存状態

(I) 連続暗条件での植物プランクトンの耐性

連続暗条件での植物プランクトンの耐性を調べるために、3種類の株を20°Cでコントロール（明条件 約2,000 Lux）と連続暗条件の2条件で培養し、1～2日おきに細胞数を計測した（図29）。連続暗条件で14日間培養後、*Prorocentrum dentatum*、Pico planktonic diatomは、400 マス / 0.1 mlの計測では、0個を示す結果となった。*Cylindrotheca* sp.は、83.3個 / mlを示し、14日間・連続暗条件で生存する植物プランクトンということが分かった。また、リバラストによりバラストタンク内（暗）から海洋環境（明）に解き放たれた際の生存状態を調べるために、前実験で14日間・連続暗条件で培養したものを、明条件（2,000 Lux）に移し、7日後細胞数を計測した。前実験で大幅に細胞数を減少し0個を示したPico planktonic diatomは明条件移行7日後では、289,600個 / mlと大きく増殖し14日間・連続暗条件下で僅かに生存していたことになる。*Cylindrotheca* sp.は連続暗条件培養において細胞数は比較的残存しており、明条件移行7日後では27,100個 / mlまで増殖した。ただしPico planktonic diatomは前実験のコントロールと同じレベルまで細胞密度が増殖したが、*Cylindrotheca* sp.はコントロールと比較して増殖速度が一割程度であった。また*P. dentatum*は明条件移行後増殖しなかったが、前実験のコントロールにおいて7日目に増殖を始め（6,700 個 / ml）、14日目に91,200個 / mlまで増殖しているため、明条件移行後、14～21日程度の培養が必要だと考えられる。以上から、種毎に暗条件に対する耐性や明条件に戻したあとの応答が異なること、リバラストが海洋環境に影響を与えうることがわかった。

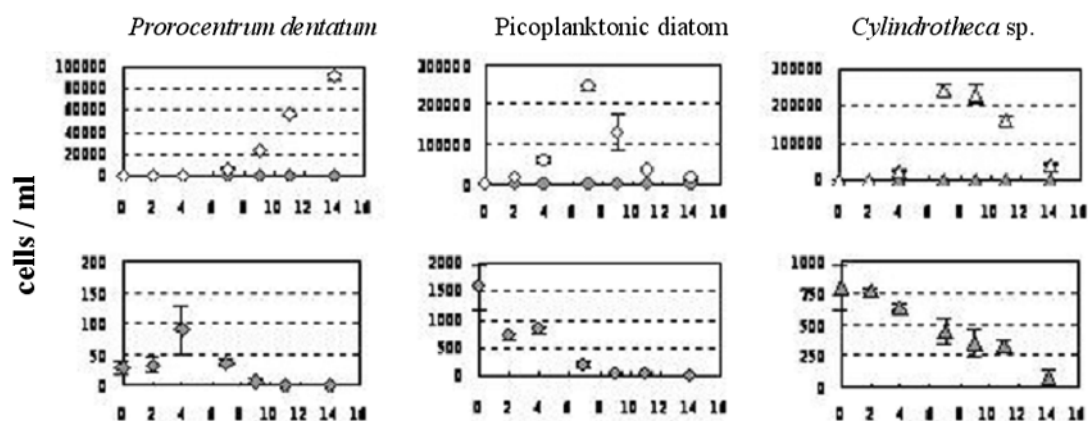


図29. 連続暗条件下での3種類の植物プランクトンの耐性実験。上段は明条件、下段は暗条件。

(II) 連続暗条件下での温度の影響

バラストタンク内の温度が連続暗条件下での生存に影響を与えるかを調べるために、前述の3株について連続暗条件下で15、25、35℃の3つの条件で培養し、細胞数を計測した。3つの条件のうち15℃での培養が最も生存状態が良かった。逆に、35℃では細胞数の減少が激しく*P. dentatum*では2日目、*Cylindrotheca sp.*では7日目には0個/mlになった。最終的に、*P. dentatum*は全ての温度条件下で細胞数が0個/mlに、*Cylindrotheca sp.*では15℃でのみ僅かに残存した。その後、それぞれ温度は変えず、明条件（2,000 Lux）に移行した。18日間明条件下で培養した結果、*P. dentatum*では増殖は見られず、本種は4日間程度の連続暗条件下では生存できないことがわかった。また*Cylindrotheca sp.*では15、25℃で増殖が見られた。これらの結果から、バラストタンク内の温度によって生存できる時間が大きく変化するることがわかった。植物プランクトンが連続暗条件下におかれた場合の主な生存戦略として、1) 呼吸活性の低下、2) 従属栄養への移行、3) resting stage の形成が考えられる。今回は細胞数の変化しか追っていないため、どの戦略を各々の株がとっているのか明らかではないが、*Cylindrotheca sp.*とPicoplanktonic diatomは耐暗性が強いという結果になった。しかし現場条件とは異なる培養実験であるため、直接バラストタンク内での生存能力と結びつけるのは注意が必要である。

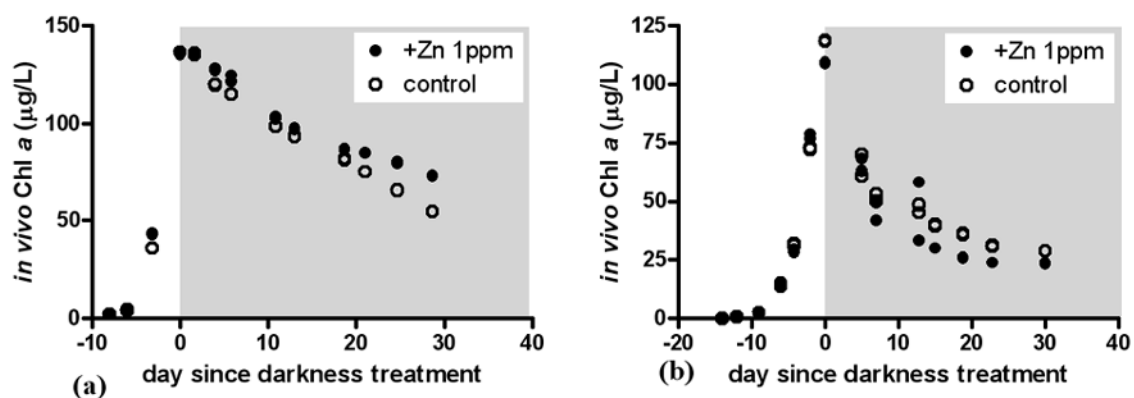


図30a. *P. tricornatum*の耐暗性に対する亜鉛の影響、b. *E. huxleyi*の耐暗性に対する亜鉛の影響。

3) 増殖への亜鉛の影響

バラスト水中の金属の測定を行った結果、カドミウム、亜鉛濃度はバラストタンク内において高くなり、逆に鉛の濃度は低くなる傾向がみられた。中でも亜鉛は腐食を防止するために溶出しているということもあり、ppmレベルで検出された。また、ニッケルの濃度には有意な変化はみられず、スズは今回の測定では検出されなかった。バラスト水中の金属の測定結果をうけ、最も濃度の高かった亜鉛について、バラストタンク内における植物プランクトンの生存に対する影響を調べることを目的として培養実験を行った。材料には、世界中に広く分布する珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*(CCMP373)、ハプト藻 *Emiliania huxleyi* (CCMP630) の無菌株を用いて亜鉛による耐暗性への影響を調べた。対数増殖期後期の*P. tricornutum*、*E. huxleyi*を暗条件下に移し、亜鉛を添加した。亜鉛はバラストタンク内の平均濃度とほぼ同じ、1ppmになるように添加した。培養液を数日おきに採取し、クロロフィル濃度を測定した。その結果、*P. tricornutum*、*E. huxleyi*ともに暗条件に移行後クロロフィル濃度が減少したが、亜鉛1ppm添加サンプルとコントロールには有意な差はみられなかった(図30a-b)。以上のことから、バラストタンク内の亜鉛は植物プランクトンの生存に大きな影響をあたえないことが示唆された。

(5) *Chattonella*におけるマイクロサテライトマーカーの開発

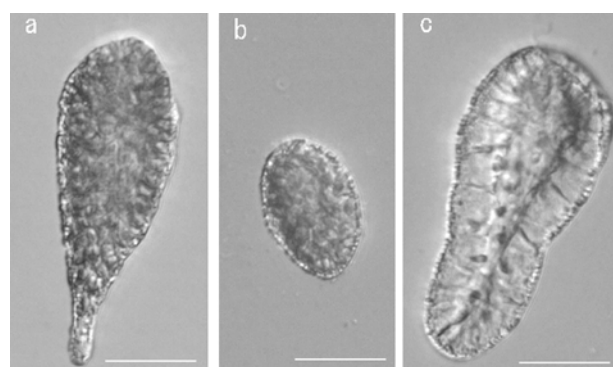
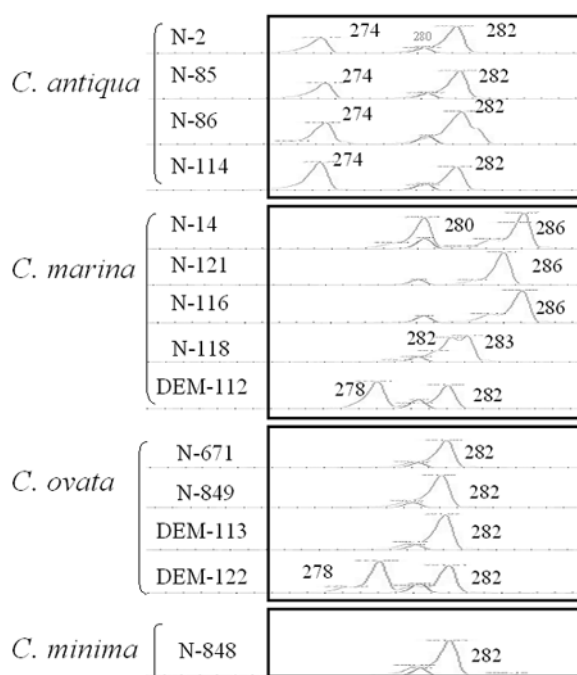


図31. *Chattonella*培養株の写真。3種の典型的な形態を示す。(a) *C. antiqua*、(b) *C. marina*、(c) *C. ovata*。スケールバーは25 μ m。

図32. 開発したマイクロサテライトマーカーChamo48による増幅DNA断片長の比較。



開発にはいくつかの方法を試み、最終的にはZane et al.¹²⁾の方法で解析に使用可能なマイクロサテライトマーカーの開発に成功した。この方法では、①*Chattonella antiqua* (NIES-2) 全DNAを制限酵素で断片化し、②ビオチン標識したマイクロサテライトプローブと断片化した全DNAとハイブリダイズさせ、③ビオチンと特異的に結合するストレプトアビジンコート微小磁気ビーズでマイクロサテライトプローブとハイブリダイズした断片を捕捉、④その後、磁場中で磁気ビーズを分離し、マイクロサテライト領域をもつDNA断片のみを濃縮、⑤濃縮した断片の塩基配列を決定し、⑥マイクロサテライト領域を挟むプライマーセットを設計した。

スクリーニングした1608断片のうち、プライマーセットを設計できたのは、27のみであり、さらに、27のプライマーセットの中でマイクロサテライト領域を増幅できたセットが11であった（表8）。開発したプライマーセットは、*Chattonella*属生物4種*C. antiqua*、*C. marina*、*C. ovata*、*C. minima*（1株のみ）に応用可能であった（図31）。通常、マイクロサテライトマーカは、開発した種以外にはほとんど利用できない。同じマーカが使用できた4種は非常に遺伝的類似性が高いと考えられる。その他のラフィド藻類についても有効性を検討したが、増幅断片が得られなかった。

各プライマーセットによって増幅した断片は、フラグメント解析装置にかけ、正確に増幅断片長を測定した。この場合、マイクロサテライト領域の変異が増幅断片長の変異として検出できる。*C. antiqua*、*C. marina*、*C. ovata*の3種について、各28株、22株、28株、計78株について11セットでPCRし、増幅断片を測定した。プライマーセットによっては、増幅できない株も存在した。例えば、Chamo52では、*C. marina*と*C. ovata*に増幅できない株が多かった。3種の遺伝的な背景については、今後より詳細な解析が必要である。増幅されたプライマーセットでは、非常に多様な増幅断片長を得ることができた。とくにChamo67、Chamo70では、16種類の変異が検出された（表8）。

表8. 開発したマイクロサテライトマーカと*Chattonella* 3種への適用。

プライマーセット名	増幅するマイクロサテライト配列	増幅断片長 (bp)	増幅断片長の種類	増幅に成功した株数／解析株数		
				<i>C. antiqua</i>	<i>C. mairna</i>	<i>C. ovata</i>
				n/28	n/22	n/28
Chamo48	(AG) ₁₁	268–290	15	23	20	26
Chamo52	(AG) ₉	176–180	5	27	4	2
Chamo58	(GA) ₅ T(AG) ₅	246–277	10	28	22	28
Chamo59	(GA) ₅ G ₃ (AG) ₃	204–213	6	28	21	28
Chamo60	(AG) ₈	217–223	5	28	22	10
Chamo65	(AG) ₁₀	263–289	12	28	20	28
Chamo66	(GA) ₉	157–171	7	28	22	28
Chamo67	(AG) ₅ A ₂ (AG) ₆	155–199	16	28	22	28
Chamo70	(AG) ₁₁ GA ₂ (AG) ₄ (AAAG) ₂	209–230	16	28	22	28
Chamo71	(AG) ₁₁	170–200	11	28	22	28
Chamo73	(AG) ₁₀	215–239	13	28	22	27

Chamo48による14株のフラグメント解析像を図32に示す。各プライマーセットは、1本または、2本の断片を増幅することが判明した。PCR増幅とフラグメント解析をすべてのセットで78株においておこない、遺伝子型をタイピングした。結果の一部を表9に示す。その結果、すべての株は、違う遺伝子型でタイピングすることができた。つまり、78株は78の遺伝子型に識別することができた。この結果は、開発したマーカが非常に高精度の遺伝的多様性解析能をもつことを意味する。

また、78株すべてにおいて1本または、2本のバンドを検出することができた。この結果は、*Chattonlla* 3種が2倍体ヘテロ接合体であることを示唆している。つまり、1対の染色体があり、1つのプライマーセットは、1つの遺伝子座あたり2つの対立遺伝子を増幅したと考えられる。その際、2つの対立遺伝子が同一である場合1本バンドとなり、違う場合2本バンドとなって検出で

きたと推察される。2倍体ヘテロ接合体であることから、*Chattonella* 3種が接合（有性生殖）を行っている可能性が高いと考えられる。*Chattonella*の生活史における接合（有性生殖）の野外における頻度については報告がない。今回、78株すべてが2倍体ヘテロ接合体であることが判明したことは、接合（有性生殖）が野外においてまれな現象ではないことを示唆する。

今回開発に成功したマイクロサテライトマーカーは、個体識別の可能な高精度のDNAマーカーであり、これを用いてDNAレベルの集団分化を様々な個体群間で比較解析することが可能である。今後は、地域集団間の関係、そして人為的な拡散の影響について明らかにしていきたい。こうした研究はまさに端緒についたばかりであるが、今後、海洋生物の越境移動の媒体となっている自然現象や人間活動を区別し、客観的に評価する上で、有効かつ重要なアプローチとなることが期待される。

表9. 増幅断片長（bp）による遺伝子型タイピング。

プライマー セット名	<i>C. antiqua</i>		<i>C. marina</i>		<i>C. ovata</i>		<i>C. minima</i>
	N2	N85	N14	N121	N671	N849	N848
Chamo48	274/282	282/286	280/286	285	282	282	282
Chamo52	178	178	178	-	-	-	-
Chamo58	264	264	264	256	260/264	264	264
Chamo59	206/213	206	206	205	206	206	206
Chamo60	218	218	217	218	-	219	218
Chamo65	271/273	271	271	-	271	271	271
Chamo66	165	165	163	163	165	165	165
Chamo67	192	192	155/192	194	191	155	155
Chamo70	224	219/226	224/226	224	219/226	220/229	220/229
Chamo71	190/194	190	190/196	188/190	190	190	190
Chamo73	225	224/229	224/228	225	224	215/224	215/224

各種から2株と*C. minima*のみ示す。－は増幅できなかったことを示す。

（6）「バラスト水管理のための国際条約」に含まれる生物関連課題

バラスト水管理条約は、バラスト水で運ばれた生物が、本来分布していないはずの海域に侵入して定着繁殖し、固有の生物を駆逐したりして生態系を乱しているため、これを防ぐべく、バラスト水で運ばれるすべての生物を除去・殺滅することに目的がある。条約発効後には国際航路に従事するすべての船舶にバラスト水処理装置が装備され、生物の広域化、非分布地への侵入がなくなることが期待されている。しかし、海洋生物学の立場からみると、生物移動の原因はバラスト水だけでないことは明らかである。海流等の自然現象から、水産物の移植や船体表面付着等さまざまな要因が考えられる。このため、バラスト水処理のみですべての生物移動が抑えられると考えるのは楽観に過ぎ、今後条約の有効性について検証することが重要と思われる。特に、生物拡散のさまざまな機構を識別あるいはその重要度を計測する理論と方法確立が必要がある。

条約とそのガイドラインでは排出バラスト水中に許容される生物量に基準を設けており、50μm以上の大きさの生物はバラスト水1トン中に10個体未満、10μm以上50μm未満の大きさの生物は1ml

中に10個体未満とされている。しかし、両者の基準には100万倍もの差があり、前者はまだしも後者は基準が低すぎて実効性があるとは考えられない。このため、バラスト水条約そのものの実効性が疑われる可能性がある。しかし、前者では1トンの水中に10個体未満しかいない生物数を検証することの困難性が指摘されている。処理方式が濾過を含む場合には、残存生物量および処理後の残渣が少ないので生物量の計数時に困難さは少ないが、熱処理や他の物理的処理の場合には死骸が処理後の水中に残るため、生きている個体のみの計数が困難となる。このため、処理法が要求されている基準を満たしているか否かの検証すら難しいと考えられている。

排出バラスト水中に許容される生物量には細菌の基準もある。指標細菌として、O1あるいはO139株のコレラ菌がバラスト水100mlあたり1cfu以下、または動物プランクトン湿重量1gあたり1cfu以下、大腸菌と腸球菌がそれぞれバラスト水100mlあたり250cfuと100cfu以下とされている。このため、バラスト水処理方法として、濾過法など大きな生物を除去殺滅する方法に加え、細菌用に薬剤を併用する必要がある。この薬剤は二次的環境被害を防ぐため、必要最小限度の使用量に抑えなければならないのは当然であるが、実際の港湾水の性状は場所と季節によって大きく異なるため、本当の必要量を見極めるのは困難である。この対策としてバラスト水の濁度などに応じて使用薬剤量を自動的に増減させる装置をつけることが考えられている。また、薬剤が生物だけでなく、船体特にバラストタンク内の装備によって消費されることがありうるが、そのため薬品の期待される効果が減少するだけでなく、予想していない物質が二次的に生成され排出される可能性もある。

排出バラスト水中の生物量をこれらの基準値に抑えるため、バラスト水処理装置を船に常備することが必要となるが、その装置はいまだに完成されていないため、船に設置できていない。また、装置開発において性能試験要件が厳しく設定されており、特に陸上における模擬試験と船上における半年にわたる長期の実地試験は、その実施条件の難しさから実際の試験実施の可能性すら疑われているのが現状である。

（7）生物群集遷移を考慮したバラスト水管理手法

1）IMOのバラスト水条約に関する動向

2004年に採択されたバラスト水管理条約のガイドライン作成作業は昨年度末において6種のガイドラインの採択まで進められていたが、今年度も引き続き作成作業が進められ2006年10月開催のMEPC55で「（G1）沈殿物の受入施設」、「（G5）バラスト水処理施設」、「（G11）バラスト水交換の設計及び建造基準」、「（G12）船舶上の沈殿物を含む追加的方策」及び「（G13）緊急事態を含む追加方策」の5ガイドラインが採択された。残りの3ガイドラインのうち「（G7）バラスト水の排水に関するリスク評価」、「（G13）緊急事態を含む追加方式」の2ガイドラインについては2007年7月開催のMEPC56で採択を目指し作業が継続されている。また、最後の「（G2）バラスト水サンプリング」のガイドラインは来年に採択される予定である。

バラスト水管理条約の発効の鍵となっているバラスト水処理装置の開発も各国において鋭意進められており2006年10月開催のIMOのMEPC55では韓国、ドイツ、インド、日本、英国から合計15の開発中の処理装置が紹介された。しかしながら、現時点ではIMOの基本承認を受け、船上試験を実施している活性化物質を使用する装置は3機種だけであり、条約の最早期限である2009年1月1日までに完成されるかどうか微妙な状況にある。日本におけるバラスト水処理装置の開発は目下4機

関で行われている。その中で日本海難防止協会を中心に進められているスペシャルパイプ+オゾン殺菌方式の処理装置はIMOの基本承認をMEPC55で取得し現在、船上試験を実施している段階にある。

2) 清水注入実験及び船舶設備調査結果

昨年度の基礎実験結果においてバラスト水が少量となった場合に清水を加えると水生生物が死滅する可能性のあることが認められたことから、同効果が実際のバラストタンクで認められるかを確認するため揚荷港停泊中のバラ積み船において空のバラストタンクに上甲板上の清水ラインから清水を注水し、清水注入前後の水生生物の生存状況を比較する実験を2回実施した。第1回目の実験では有意な結果がみられたが、第2回目では清水の混じりが悪く第1回目のような結果は得られなかった。このことは清水の注入方法に工夫が必要であることを示唆している。第2回目は測深管がタンクの後部にあり、また船体姿勢が船尾側に傾いている船尾トリム状態であったためタンク前部方向への清水移動が充分に行われなかったことが考えられる。一方、第1回目はビニールホースを直接、タンク前部に持ち込んだため清水がトリムにより後部方向に向かい移動が充分に行われたものと考えられる。すべての水生生物に対し効果的であることにはならないが総合的にみると清水注入効果が確認されたものと考えられる。実際に清水注入を効果的に行うとすれば積荷港を出港した直後あるいは数日後、許容される喫水の範囲内でバラストラインを通じて清水を注水する方法が考えられる。この方法により揚荷港に到着しバラストを注水するまで低塩分濃度の状態を保持することができ、効果的な処理が可能となると考えられる。そこで、バラ積み船(2隻)とコンテナ船(1隻)においてバラストラインと清水ラインが機関室内で結合可能か調査した。調査結果はバラ積み船1隻及びコンテナ船が可能であることが判明した。このことから一般に、この清水注入方法を実施する可能性があると考えられる。

将来バラスト水管理条約が発効しバラスト水処理装置を既存船に設置することになった場合、同装置を設置する場所を確保することが重要な問題となってくる。そこで、既存船の設置スペースの調査を行った。一般に外航大型船舶は機関室のLow Floorの船首側にバラストポンプを含むバラストシステムを設置している。バラスト水運用においては、バラストポンプを利用し効率よく海水をバラストタンクに注水(または、排出)するため、配管系の圧力損失を減らすことが重要である。そのような理由から、バラスト水処理装置(処理装置)はバラストポンプ付近に設置することが必要である。今回の調査から処理装置の設置スペースとして、バラ積み船の場合は、機関室内前部の右舷または左舷にスペースが確認され、処理装置の設置が可能であると考えられる。また、機関室内の機器配置の密度高めることで処理装置用のスペースをつくることも可能であると考えられる。コンテナ船では、主機関およびその他の機器が大きくFloor全体に各種機器が設置されていて平面的にはスペースの確保は難しいが、上下方向には大きなスペースが存在する。このことから、各種機器を幾つかのグループにまとめ密度を高めて平面的なスペースをつくるか、あるいは立体的に処理装置を配置する必要がある。

3) 最適バラスト水管理方法の提案

バラスト水管理条約が発効された場合のバラスト水管理について検討した。暫定期間内ではバラスト水の洋上交換という方法も許されるが将来的には全船舶にバラスト水処理装置が装備され、

この装置の運用によりバラスト水による水生生物移動を最小限にとどめることが図られることになる。船舶に積載されるバラスト水は大量なものであることから、バラスト水処理装置を効果的に運用することがバラスト水管理上極めて重要になる。また、同条約ではバラストタンク内の沈殿物の管理も対象にしている。これまでの研究成果を踏まえ同装置の運用及び沈殿物の管理を効果的に行うために以下の(I)～(V)を提案する。

(I) バラスト水処理装置の運用時期

基本的にはバラスト水の漲水時に作動させる方式が考えられているが、これまでの研究成果からみると、長期間の航海を行う船舶にあってはタンク内のプランクトン類が少量に減少した時点でバラスト水処理装置を作動する方式も有効と考えられる。具体的にはバラスト水のタンク間サーキュレーションの中で処理装置を作動することになるが、特に熱処理、窒素ガス封入、活性化物質の注入方式には有効と考えられる。

(II) バラストタンク内のモニター

バラストタンク内の海水モニターはバラスト水管理条約でも規定されている。タンク内の海水の状況が連続的に把握できれば、排水時において条約規定をクリアーできるか否か、予測が可能となり安心してバラスト水の管理が行えることになる。本研究で使用されたクロロフィルセンサーも1つのモニター装置として機能とするものと考えられる。

(III) バラストタンク内の沈殿物の清水処理

既存船のバラストタンク内の底部にはどうしても少量のバラスト水が残存することになる。さらに同底部には漲水時に海水と共に入ってしまう泥が沈殿し、またタンク内壁の錆が落下し堆積する。この沈殿物や堆積物の中に水生生物が入り込み生存する可能性が高いことからバラスト水管理条約では沈殿物の処理を要求している。沈殿物を次回入渠時までずっと放置するとかなりの容量になるので、その対策として航海中、順番にタンク内沈殿物の清掃を行うことが必要である。清掃を毎航海実施すれば入渠時の沈殿物処理量を軽減させることが可能である。一方、これまでの研究成果から、タンク内底部の残水部分に清水を投入すると好塩性の水生生物が死滅する可能性が高いことがわかっている。また、すべての船舶ではないがバラストラインと清水ラインを簡単に結合させることが可能な配管構造になっていることも確認されている。そこで、積荷航海中の空になったバラスト水タンクに少量の清水を注水してタンク底部の残水の塩分濃度を下げ、水生生物あるいはシストの死滅をはかる処理方法を提案する。この処理は沈殿物を処理する際、タンク内に入る乗組員の健康対策にもつながることになると考えられる。

(IV) バラストタンク内の沈殿物の乾燥処理

バラストタンク内の沈殿物処理はタンク内を完全に乾燥させることが最も効果的であることは入渠時の完全排水した場合の調査結果から判明している。そこでタンク内に乾燥空気を注入し残水を蒸発させる方法を処理方法の1案として提案する。具体的には既存船ではバラスト排水を極力完全に実施し、航海中に少量の残水に対し各タンクのエスケープハッチからエアリング（できれば温風を注入）行うことで対応が可能と考えられる。

(V) 新造船に対する配慮

条約適用の新造船に対しては、バラスト水処理装置の最適位置の設定及び点検保守を考慮したスペースの確保、バラスト水モニターセンサーの最適位置の設定及び設置、バラスト排水時に完全にドライアップできるタンク構造の採用、清水ラインとバラストラインの結合可能な配管、バラストタンク内への乾燥風供給ラインの設置等の配慮を行いバラスト水及び沈殿物の管理をより実効のあるものとする必要があると考える。

表10. バラ積み船バラストタンク内におけるクロロフィル、水温、溶存酸素の計測値。
各航海毎に、最大値と最小値を示す。クロロフィルの値は、リバラスト後はいずれもセンサーの検出限界値となり、リバラスト前の値を示してある。

バラスト水漲水2004/8/19、リバラスト8/26、オーストラリア入港排水9/15		
クロロフィル（上層）	最大 3.9µg/L	リバラスト前 0.6µg/L
クロロフィル（下層）	最大 3.8µg/L	リバラスト前 0.7µg/L
水温（上層）	最高 30℃(8/28)	最低 24℃(8/20)
水温（下層）	最高 31℃(8/28)	最低 24℃(8/20)
溶存酸素（上層）	最大 8.0mg/L(8/19)	最小 6.8mg/L(8/26)
溶存酸素（下層）	最大 7.9mg/L(8/19)	最小 6.3mg/L(8/26)
バラスト水漲水2004/11/3、リバラスト11/8、オーストラリア入港排水11/17		
クロロフィル（上層）	最大 1.4µg/L	リバラスト前 0.5µg/L
クロロフィル（下層）	最大 1.4µg/L	リバラスト前 0.5µg/L
水温（上層）	最高 32℃(11/16)	最低 17℃(11/3)
水温（下層）	最高 32℃(11/12)	最低 18℃(11/3)
溶存酸素（上層）	最大 9.2mg/L(11/5)	最小 6.3mg/L(11/15)
溶存酸素（下層）	最大 9.5mg/L(11/5)	最小 7.4mg/L(11/8)
バラスト水漲水2004/12/2、リバラスト12/8、オーストラリア入港排水12/21		
クロロフィル（上層）	最大 5.0µg/L	リバラスト前 1.3µg/L
クロロフィル（下層）	最大 4.5µg/L	リバラスト前 1.1µg/L
水温（上層）	最高 32℃(12/14)	最低 15℃(12/2)
水温（下層）	最高 32℃(12/13)	最低 15℃(12/2)
溶存酸素（上層）	最大 11.5mg/L(12/2)	最小 7.2mg/L(12/22)
溶存酸素（下層）	最大 11.7mg/L(12/2)	最小 6.5mg/L(12/3)
バラスト水漲水2005/1/8、リバラスト1/12、オーストラリア入港排水1/28		
クロロフィル（上層）	最大 1.6µg/L	リバラスト前 0.7µg/L
クロロフィル（下層）	最大 1.6µg/L	リバラスト前 0.6µg/L
水温（上層）	最高 31℃(1/22)	最低 10℃(1/8)
水温（下層）	最高 31℃(1/19)	最低 11℃(1/8)
溶存酸素（上層）	最大 --mg/L(--/--)	最小 --mg/L(--/--)
溶存酸素（下層）	最大 19mg/L(1/14)	最小 11mg/L(1/8)
バラスト水漲水2005/2/15、リバラスト2/21、オーストラリア入港排水3/13		
クロロフィル（上層）	最大 1.6µg/L	リバラスト前 0.6µg/L
クロロフィル（下層）	最大 1.3µg/L	リバラスト前 0.5µg/L
水温（上層）	最高 32℃(2/27)	最低 8℃(2/16)
水温（下層）	最高 32℃(2/26)	最低 8℃(2/16)
溶存酸素（上層）	最大 12mg/L(2/15)	最小 5.3mg/L(2/21)
溶存酸素（下層）	最大 11mg/L(2/15)	最小 6.4mg/L(3/1)
バラスト水漲水2005/3/31、リバラスト4/5、オーストラリア入港排水4/15		
クロロフィル（上層）	最大 5.7µg/L	リバラスト前 1.9µg/L
クロロフィル（下層）	最大 6.0µg/L	リバラスト前 2.0µg/L
水温（上層）	最高 31℃(4/9)	最低 9℃(3/31)
水温（下層）	最高 32℃(4/10)	最低 9℃(3/31)
溶存酸素（上層）	最大 --mg/L(--/--)	最小 --mg/L(--/--)
溶存酸素（下層）	最大 10mg/L(3/31)	最小 6.2mg/L(4/11)
バラスト水漲水2005/5/10、リバラスト5/17、オーストラリア入港排水6/4		
クロロフィル（上層）	最大 3.0µg/L	リバラスト前 0.7µg/L
クロロフィル（下層）	最大 2.8µg/L	リバラスト前 0.7µg/L
水温（上層）	最高 32℃(5/19)	最低 13℃(5/10)
水温（下層）	最高 32℃(5/19)	最低 12℃(5/10)
溶存酸素（上層）	最大 11mg/L(5/10)	最小 8.0mg/L(5/22)
溶存酸素（下層）	最大 7.8mg/L(5/10)	最小 5.9mg/L(5/21)

バラスト水漲水2005/6/20、リバラスト6/24、オーストラリア入港排水7/9		
クロロフィル（上層）	最大 2.4μg/L	リバラスト前 0.8μg/L
クロロフィル（下層）	最大 2.6μg/L	リバラスト前 0.7μg/L
水温（上層）	最高 31℃(6/25)	最低 17℃(6/20)
水温（下層）	最高 31℃(6/28)	最低 17℃(6/20)
溶存酸素（上層）	最大 10mg/L(6/21)	最小 7.9mg/L(6/24)
溶存酸素（下層）	最大 6.5mg/L(6/20)	最小 6.0mg/L(6/26)
バラスト水漲水2005/7/25、リバラスト7/29、オーストラリア入港排水8/12		
クロロフィル（上層）	最大 1.1μg/L	リバラスト前 0.5μg/L
クロロフィル（下層）	最大 1.1μg/L	リバラスト前 0.6μg/L
水温（上層）	最高 31℃(8/1)	最低 18℃(7/25)
水温（下層）	最高 31℃(8/1)	最低 18℃(7/25)
溶存酸素（上層）	最大 -.mg/L(--/--)	最小 -.mg/L(--/--)
溶存酸素（下層）	最大 -.mg/L(--/--)	最小 -.mg/L(--/--)

表11. コンテナ船バラストタンク内におけるクロロフィルと水温の計測値。

各航海毎のクロロフィルの最大値とそのときの水温を示す。

年月日	クロロフィル(μg/L)	水温(℃)	年月日	クロロフィル(μg/L)	水温(℃)
2005/8/23	3.4	26	2005/11/4	1	24
2005/9/1	1.2	28	2005/11/9	0.1	27
2005/9/4	1.3	15	2005/11/19	0.1	15
2005/9/8	0.1	19	2005/11/20	1.3	17
2005/9/14	3.3	16	2005/12/1	1.2	4
2005/9/21	0.6	14	2005/12/14	1.1	25
2005/9/24	0.5	24	2005/12/19	0.8	13
2005/9/25	0.1	23	2005/12/24	1	15
2005/9/27	3.8	24	2005/12/30	0.3	14
2005/9/30	1.2	28	2005/1/1	0.1	10
2005/10/1	0.1	28	2005/1/5	0.1	4
2005/10/3	0.1	29	2005/1/6	0.1	2
2005/10/4	0.8	29	2005/10/21	-	14
2005/10/10	0.8	16	2005/10/22	0.1	19
2005/10/17	1	17	2005/11/4	1	24
2005/10/21	-	14	2005/11/9	0.1	27
2005/10/22	0.1	19			

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) バラストタンク内の生物調査を行う上で適切なサンプル収集法および処理法について検討を行い、細菌類、動・植物プランクトン等の生物群を対象として、大型輸送船舶のバラストタンクからサンプルを収集し、処理、解析することができた。船上での生サンプルの観察および実験室での複数の研究手法を用いて、バラストタンク内の生物多様性を調査することにより、その多様性が環境の変化や生物間の相互作用の影響を受けて変化するプロセスを詳細に追跡できた。また分子生態学的手法の一つ、DGGE法による遺伝子レベルでの解析を世界でもはじめて適用した結果、顕微鏡観察では検出が困難な生物群に関する動態を明らかにすることができた。タンク内で増加が認められた生物群には、病原性や寄生性の種と近縁な種が含まれており、バラスト水排水域における生態系への影響が懸念された。タンク内環境の連続観測データを、バラ積み船とコンテナ船について、1年に渡って収集することができた。これはオリジナリティの高い基礎データといえ、今後、様々な方面での有効利用が期待できる。

2) バラスト水の漲排水が不規則に行われるコンテナ船では、動植物プランクトンの動態について、不明な点が多かった。タンク内にセンサーを設置することで、連続的な長期モニタリングを行うことが可能になり、植物プランクトン量の遷移に関して、従来通り漲水後急速に減少する場合、そして漲水後ほとんど濃度が変化しない場合の2タイプが観測されるなど、バラストタンク内における植物プランクトンの動態に関する新しい知見を得ることができた。

3) コンテナ船に乗船して行った調査では、有害種を含む植物プランクトンの生存細胞数の残存率は初期値の0.02%と推定され、バラ積み船の場合(0.005%)と比較して、高い値を示すことが明らかになった。更にバラストタンク内堆積物の調査から、*Nitzschia*等の珪藻、大型海藻、無色の渦鞭毛藻等の栄養細胞、そして様々な種類のシスト様細胞が堆積物中から検出された。生存個体の多さは、移動距離が短く、北半球のみの移動で温度変化も小さいこと、そして外洋でのリバラスト処理の少なさなどが原因と考えられ、今回調査した航路において、生物の越境移動リスクが高いことを示す結果となった。

4) バラストタンク内の堆積物の調査から、様々な種類の植物プランクトンやシスト様細胞が検出された。生物の越境移動を防ぐ上で、堆積物中の生物の除去は大きな課題と言えた。今回、多数の生存微生物を含むタンク内の堆積物について、淡水処理にともなう微生物の生存率の変化を調査した結果、海水の50%程度の塩濃度では、一部の植物プランクトンで生存率の低下が認められ、海水の1%程度の淡水に近い塩濃度では、植物プランクトンの生存率は0となり、培養処理でも生存は確認されなくなった。しかし*Euplotes*などの繊毛虫や鞭毛虫は、処理前とほぼ同じ生存率を保つことが判明した。一方、堆積物の乾燥処理では、植物プランクトンおよび原生動物の生存率が0となることが、培養試験とDGGE法による調査から確認された。淡水処理や乾燥処理といった堆積物の処理は、既存の船でも十分に対応可能であり、海洋生物の移動のリスクの低減につながる処理方法となる可能性が考えられた。

5) 日本-豪州間に就航するバラ積み船における細菌数の調査結果から、直接計数法ではリバラスト後に減少し、リバラストの効果が認められたが、生菌数はバラストタンク内で増加すること、そして季節による細胞数の顕著な差は認められないことが明らかになった。またウイルス状粒子に関する調査を行い、ウイルス状粒子が直接計数法による細菌数の変化と同様の傾向を示すこと

を明らかにした。一方、鞭毛虫数は細菌の生菌数の増加に伴い増加することが分かった。更にドック入りした商船を含むコンテナ船バラスト水の調査から、高頻度に糸状微生物が検出され、バラストタンク内に長期間保存されることで固有の微生物群集形成の可能性が示唆された。

(2) 地球環境政策への貢献

環境省の「バラスト水の海洋環境に対する影響調査」検討会において、本研究組織の代表川井浩史と福代康夫が本研究成果をもとに検討に参加したほか、本研究成果である侵入外来生物種の特定と侵入機構の解析結果が、主要な海産生物群ごとのわが国への移入可能性の検討に利用された。また、同検討会のバラスト水中のプランクトン調査において、本研究成果に基づく試料採集手法の検討が行われ、コンテナ船のバラスト水採取分析方法が決められた。

現在国際海事機構 (International Maritime Organization, IMO) において、船舶による生物広域化に対する対策として、バラスト水管理条約に続き、船体付着による生物移動防除が検討され始めており、国土交通省・環境省を中心とした日本代表団も議論に加わり、日本からの情報提供と国際的対策策定を考えていこうという動きが出始めている。この際に、生態付着生物の実態と移動機構を検討した本研究成果は、日本の現状検討の資料として重要なものである。

6. 引用文献

- 1) 岩崎敬二: 日本における海産外来生物問題と公的機関の対応, 日本プランクトン学会報, 54: 17-24, 2007.
- 2) Carlton, J.T. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms, *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 23: 313-374, 1985.
- 3) Ruiz G.M., Rawlings T.K., Dobbs F.C., Drake L.A., Mullady T., Huq A. and Colwell R.R. Global spread of microorganisms by ships - Ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens. *Nature* 408: 49-50, 2000.
- 4) 菊地武晃: 船舶バラスト水問題とは, 海と安全, No. 509: 2-9, 2001.
- 5) Sieracki, C.K., Sieracki, M.E. and Yentsch, C.S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 168: 285-296, 1998.
- 6) Galil, B.S. and Hulsmann, N. Protist transport via ballast water - Biological classification of ballast tanks by food web interactions. *Eur. J. Prot.* 33: 244-253, 1997.
- 7) Gollasch, S., Lenz, J., Dammer, M., Andres, H.-G. Survival of tropical ballast water organisms during a cruise from the Indian Ocean to the North Sea, *J. Plankton Res.* 22: 923-937, 2000.
- 8) Zhang, F.Z., Dickman, M. Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 1: Seasonal factors affecting the transport of harmful diatoms and dinoflagellates, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176: 243-251, 1999.
- 9) Drake, L.A., Ruiz, G.M., Galil, B.S., Mullady, T.L., Friedman, D.O., Dobbs, F.C., Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 233: 13-20, 2002.
- 10) Diez, B., Pedros-Alio, C., Massana, R. Beatriz et al. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing.

Applied and Environmental Microbiology, 67: 2932-2941, 2001

- 11) Gobler, C.J., Lonsdale, D.J., Boyer, G.L. A review of the causes, effects, and potential management of harmful brown tide blooms caused by *Aureococcus anophagefferens* (Hargraves et Sieburth). *Estuaries* 28: 726-749, 2005.
- 12) Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16, 2002.

7. 国際共同研究等の状況

バラスト水により越境移動の可能性のある有害植物プランクトンの収集、保存、多型解析等の研究に関して、Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (USA)の Robert A. Andersen博士およびCawthron Institute (ニュージーランド)のLesley Rhodes博士らと共同で研究を進めている。またタイKasetsart大学におけるバラスト水問題の研究グループと4th Asian Pacific Phycological Forumにおいて研究打合せを行い、2005年11月にはタイの国際港において港湾生物相の共同調査を行った。

また、国際的に生物移動を検討している国際海洋探査委員会 (International Council for the Exploration of the Sea) の2つの作業部会であるWorking Group for Ballast and Other Ship Vectors (WGBOSV) やWorking Group for Introduction and Transfer of Marine Organisms (WGITMO)、および北太平洋の海洋科学に関する機関 (The North Pacific Marine Science Organization, PICES) に本研究組織の川井浩史と福代康夫が作業部会委員として参加し、国際的な共同研究を実施している。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Demura, M., Kawachi, M., Kunugi, M., Nishizawa, T., Kasai, F. and Watanabe, M.M. (2007) Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes*: 7: 315-317

<その他誌上発表 (査読あり)>

- 1) Gollasch, S., Daid, M., Voigt, M., Dragsund, E., Hewitt, C. and Fukuyo, Y. (2007) Critical review of the IMO international convention on the management of ship's ballast water and sediments. *Harmful Algae*: 6: 585-600
- 2) 福代康夫・都丸亜希子・大村卓朗 (2007) バラスト水管理条約とその問題点、日本プランクトン学会報: 54: 50-54

<その他誌上発表 (査読なし)>

- 1) 河地正伸 : (2005) Q44 バラスト水の問題について教えてください、いま地球がたいへん! (国立環境研究所編)、丸善株式会社、東京、p. 80-81
- 2) 功刀正行・津金正典・金子仁 (2007) 船舶におけるバラストタンクの構造とその物理化学環境、海洋と生物: 29 (3): 195-20
- 3) 河地正伸・出村幹英・ノエルマリエレン・都丸亜希子・大村卓朗 (2007) バラストタンク内に

おける微生物の動態と越境移動問題、海洋と生物: 29 (3): 204-211

(2) 口頭発表 (学会)

- 1) M.Kawachi (2005) The second National Conference on Algae and Plankton, Chiang Mai, Thailand.
“Overview of marine harmful algae and their culture collection in the world.”
- 2) M.Kawachi, M.Demura, M.-H. Noël, Y.Ohmura, M.Kunugi, A.Tomaru, Y.Fukuyo, S.Hashimoto, and Y.Furukawa (2005) 4th Asian Pacific Phycological Forum, Bangkok, Thailand. “Monitoring of the phytoplankton diversity in ballast water of a coal bulk carrier between Japan and Australia.” (APPF Abstracts, 111).
- 3) Demura, M. and Kawachi, M (2005) 4th Asian-Pacific Phycological Forum, Bangkok, Thailand.
“Dynamics of picophytoplankton in a coal bulk carrier’s ballast water. ” (APPF Abstracts, 199).
- 4) Tomaru, A., Fukuyo, Y., Kawachi, M. and Kawai, H. (2005) PICES (North Pacific Marine Science Organization) 14th Annual Meeting, Vladivostok, Russia. “Effect of mid-ocean exchange of ballast water on bacterial community in ballast tanks.”
- 5) 福代康夫：バラスト水問題の背景、海洋理工学会、東京、2005年6月
- 6) Kurahara, K. M., Nagai, T., Kawachi, M. and Hashimoto, S. (2006) Annual Meeting of American Society of Limnology and Oceanography, Honolulu, Hawaii, USA. “Transport of coastal phytoplankton via ships’ ballast water and their possible survival after release in the open ocean.”
- 7) 福代康夫：条約におけるバラスト水処理基準とその問題点、日本プランクトン学会、横浜、2006年3月
- 8) 河地正伸・出村幹英・ノエルマリエレン・大村嘉人・功刀正行・古川洋一：大型輸送船舶バラストタンク内における植物プランクトンの多様性モニタリング、日本藻類学会30回大会、鹿児島、2006年3月
- 9) ノエルマリエレン・河地正伸：バラストタンク環境における有害植物プランクトンシストの生理・生態学的研究、日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、広島、2006年9月
- 10) 栗原路子・永井貴宏・河地正伸・橋本伸哉：植物プランクトンの耐暗性、第11回静岡健康・長寿学術フォーラム、静岡、2006年10月
- 11) 河地正伸：バラストタンク内プランクトンの動態と培養生理学的解析、公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生態系攪乱」（主催：海洋移入生物研究グループ、東京大学アジア生物資源環境研究センター）、東京、2007年3月
- 12) 出村幹英・河地正伸・笠井文絵・渡邊信：ラフィド藻綱*Chattonella* 3種の分子系統とマイクロサテライト解析、日本藻類学会大会、神戸、2007年3月
- 13) 出村幹英・河地正伸・笠井文絵・渡邊信：マイクロサテライトマーカーを用いた*Chattonella antiqua*（ラフィド藻綱）における有性生殖の検証、日本藻類学会大会、神戸、2007年3月
- 14) 出村幹英・河地正伸・笠井文絵・渡邊 信：*Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*（ラフィド藻綱）におけるマイクロサテライトマーカーの開発、日本水産学会大会、横浜、2007年3月

(3) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 川井浩史・河地正伸・福代康夫：公開シンポジウム「大型船舶による海洋生物の越境移動と生

態系攪乱」世話人、東京、2007年3月

(4) その他

Demura and Kawachi (2005)が4th Asian-Pacific Phycological Forumで最優秀ポスター賞を受賞