

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

(3) 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

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 Mary-Hélène Noël

平成16～18年度合計予算額 2, 100千円
 (うち、平成17年度予算額 2, 100千円)

[要旨]

沿岸域の海底堆積物中に存在する有害植物プランクトンのシストが、バラストタンク環境下でどのような生理・生態的反応を示すのかを解析、解明するために、実験室に擬似的なバラストタンク環境を再現して、堆積物および培養株を用いた培養試験を行った。まず実験に最適な堆積物選定のために、日本の港湾および瀬戸内海で採取した海洋堆積物表層サンプル中に含まれる有害藻類シストの多様性を調査した。様々な渦鞭毛藻およびその他の有害藻類のシストが検出された堆積物試料を一定の希釈段階で培養処理を行い、栄養細胞の出現頻度から、シスト数の推定を試みた。有害な種はそれぞれ200–500シスト/g（堆積物湿重量）に達することが示唆された。すなわちバラストタンクの容量と海水中に再懸濁する堆積物の推定値から、一度の航海で、2千万–4億個のシストが運搬される可能性が考えられた。バラスト水を介して海洋堆積物が輸送されることにより、生物拡散の高いリスクが存在することになる。バラストタンクの擬似的な環境を構築して行った培養試験では、シストの発芽がタンク内環境下に置かれることで促進されることが示唆された。更に種によってはバラストタンク環境下に置かれた場合、栄養細胞からシスト様細胞に移行する現象も認められた。リバラスト処理を行うことで、こうした堆積物中のシストや栄養細胞から移行したシスト様細胞が、外洋環境に放出されることになり、海流等により、グローバルスケールで様々な環境に拡散する危険性も考えられた。

[キーワード] バラスト水、シスト、渦鞭毛藻、有害植物プランクトン、赤潮

1. はじめに

海上輸送用の大型船舶は、空荷の際に安定した航海を行うために「バラスト水」と呼ばれる海水を用いる。在来の植物プランクトン、動物プランクトン、小サイズの幼生、バクテリアや浮遊性懸濁粒子を含む大量の海水が、積荷の荷卸し港において取り込まれる。海底の堆積物は波や港湾活動によって簡単に再懸濁し、その平均濁度は港湾で1 mg/Lから8 mg/Lである。普通の60,000トン級船舶のバラスト水量は53,000 m³に達するので（オリンピック競技用プール3杯分に相当）、航海1回当たり50 kgから400 kgの堆積物が移動することになる。海洋堆積物は、熱、乾燥、暗黒、そして酸欠に対して強い耐性を有する植物プランクトンの細胞（すなわち休眠ステージ、シスト）を大量に含有している。それ故、懸濁粒子と一緒にバラストタンクに取り込まれたシストの状態は、高水温の赤道海域や極寒の極地を通過するような航路の航海後でもほとんど変質しない。船

が積荷港に到着すると、バラスト水が積荷のペースに合わせて徐々に放出される。つまり、積荷港では他からの港の海水を大量のバラスト水として受け取ることになる。国内及び国際的な海運業が盛んになるにつれて、バラスト水の移動も大きくなり、世界各地で外国産種が突如として出現するような現象に気付くことになる。更に有害植物プランクトンのブルーム（赤潮、有毒性の種）が、それまで汚染されていなかった地域へ世界的規模で増加、拡散していることも分かってきた。例えば、1970年以前には、南半球では渦鞭毛藻類の危険な赤潮形成藻 *Alexandrium tamarense* と *A. catenella* による貝中毒の麻痺化は知られていなかったが、1990年代には多数の赤潮が記録されるようになった（Hallegraeff, 2003）。実際、侵略的で厄介な種の持ち込みは世界の海洋の第4の脅威の1つと見なされている。また、他の形態の海洋汚染とは異なり、海洋の侵略種の影響はほとんどの場合、回復不能である。このため、バラスト水を介して持ち込まれるリスクを緩和するための措置が決定された。リオデジャネイロで1992年に開催された国連環境開発会議では、アジェンダ21の中で、バラスト水を外洋上で交換することを大型船に義務として課すよう国際海事機関（IMO）に要請した。しかし、徹底的なリバラスト対策を採用しても、バラストタンクには堆積物と大量の植物プランクトンそしてバクテリアが含まれる。しかも、外洋域でのリバラストの影響は明確ではない。リバラストは本当に安全な対策なのか、あるいは危険種の更なる大規模な拡散を招くのではないのか？そのようなこともわからないのである。

2. 研究目的

バラストタンク内のプランクトン群集の拡散に対する理解を深めること、そしてバラストタンク内のシストの動態について明らかにすることは、環境保護に非常に重要である。本研究では、タンク内環境が渦鞭毛藻等の有害植物プランクトンのシストの発芽に及ぼす影響について調査することを目的としている。海洋表層堆積物に潜む天然のシストは、海底環境の影響下（温度、栄養、濃度、そして恐らくは酸欠と暗黒の影響）にある。一方、海水中に生長する栄養細胞は水塊の物理化学特性の影響下にある。しかし、シストと栄養細胞がバラストタンク内に取り込まれると、環境が一変し、生きて細胞に様々なストレスが加わることになる。第1の顕著なパラメータは、突然の完全な暗黒である。また、船舶は風と波の影響を受けるので、タンク内では当然のように強い乱流が発生する。タンク内の温度は船舶の現在地の船外海水温度に左右されるため、航路によっては水温が絶えず変化する。最もストレスの多い航路は、地球の一方の半球からもう一方の半球へと航行する航路で、赤道地帯通過時にはタンク内の水温が31℃以上にも達する。また、バラストタンク内に貯蔵された海水の特徴として、タンク内で金属濃度、特に亜鉛とカドミウムが、徐々に上昇する点が挙げられる。そこで、バラストタンク内における潜在的に有害とされる渦鞭毛藻シストと栄養細胞に加わる複合ストレスの影響について解明する点についても留意して研究を進めた。

3. 研究方法

(1) 研究試料

日本の様々な港湾（相馬港、瀬戸内海、東京港、神戸港等）からシストの研究のための海洋堆積物試料を底泥表層より収集した（図1）。サンプルK4のシストの発芽実験の後に、5株の *Alexandrium* spp. を分離した（株K4）。また、瀬戸内海の小田北から2005年8月1日に採取した表層海水サンプル

(K7) より、*Alexandrium* sp. (2株)、*Gymnodinium catenatum* (3株)、*G. instriatum*、および*Akashio sanguineum*の培養株を確立できた。



図1. 本研究で使用した堆積物試料の採取地点および採取年月日。括弧内は試料の略号。

Soma port (So Feb) : 相馬港、2005年2月21日

Soma port (So Ju) : 相馬港、2005年6月17日

Seto Inland Sea (K4) : 瀬戸内海、織野の北、2005年5月12日

Kobe port (Ko) : 神戸港、2005年9月13日

Tokyo port (Oh) : 東京港、大井埠頭、2005年12月5日

(2) 実験の概要

実験の概要について、以下の図2にまとめる。

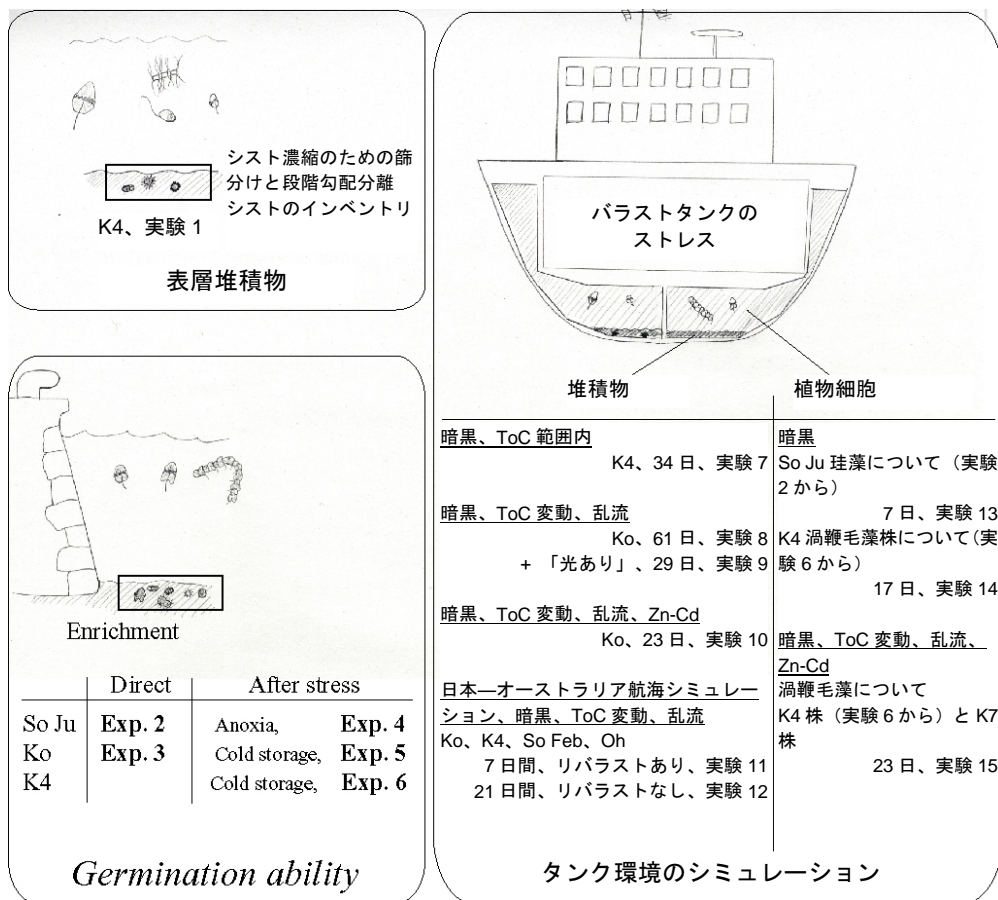


図2. 本研究で行った実験の概要。バラストタンク内の連続観測データおよび重金属濃度計測結果から、実験室内に擬似的なタンク環境を構築し、実験 1～15の実験を実施した。

(3) シストのインベントリ

堆積物中のシストの組成を評価するには、シストが含まれている鉱物性粒子をできるだけ除去する必要がある。瀬戸内海の堆積物K4について、Bolch法(1977)を改変した方法であるナトリウムポリタングステン酸塩による段階勾配分離を適用した(実験1)。このインベントリ調査は、シストの発芽能力試験のための処理サンプルについても行われており(実験6)、これによりシスト現存量とシストの発芽率を比較することができる。

(4) 海洋表層堆積物由来のシスト発芽能力と一般的な生長能力

まず、相馬港で採取して間もない海洋表層堆積物を濃縮した後で一般的な増殖を調べた(Inouye, 1981, Anderson and Kawachi, 2005)(実験2)。予備培養には、ESM(Kasai et al., 2004)、MNK(Noel et al., 2004)、およびFSW(濾過済みの外洋海水)の3種類の培養液で試験した。栄養細胞の増殖が顕著でない場合は、10日間の酸欠処理の後に同堆積物を再び処理した(実験4)。今回は堆積物の占める割合が大きいいため、予備培養に GeO_2 を添加した(Stein, 1973)。

次に、シストの発芽について検討した。神戸港から採取したサンプル(Ko)について、サンプリングの直後に、MNK- GeO_2 とFSW- GeO_2 を用いて予備培養を行うとともに(実験3)、3ヶ月間冷暗保存した後で同じ手順で予備培養を繰り返した(実験5)。2ヶ月前に瀬戸内海で採取された堆積物K4を暗黒環境下に置いて4°Cで保存し、栄養細胞ではなく、堆積物に含まれるシストが予備培養されるようにした。シストの発芽に最適な温度範囲を調べるために、ESM- GeO_2 とMNK- GeO_2 を使用してさまざまな温度(30、25、20、15、および10°C)を試した(実験6)。サンプル中に存在する初期細胞数をMPN法(最確数法)と呼ばれる統計的手法から推定するために、一定の希釈率で予備培養を行った(Anderson and Kawachi, 2005)。今回の実験におけるシストの発芽から出現した栄養細胞を使用して、5株の*Alexandrium* spp.の分離に成功し、現在も培養株として維持している。

(5) 擬似的バラストタンク環境が海洋表層堆積物から採取された渦鞭毛藻に与えるストレス

完全な暗黒期間がシストの発芽に及ぼす影響を調べるために、K4堆積物について、10°Cから30°Cの温度で実験した(実験7)。ESM- GeO_2 とMNK- GeO_2 を使用して予備培養したサンプルに34日間の暗黒処理を施した。実験6(タンクストレスなしの冷蔵後)から得られたシストの発芽能力を実験7のそれと比較することにした。

神戸港の堆積物Koについて、暗黒、温度の日変化(温度の変動)そして攪拌の複合的影響を調べた(実験8)。MNK- GeO_2 とFSW- GeO_2 を使用した予備培養サンプルにこの複合ストレスを61日間加えた。実験3は実験8(ストレスなし)のカウンターパートで、実験5は冷暗ストレスを加えたコントロールである。また、実験9は実験8の変形であり、光を当ててストレス期間を29日間に短縮したものである。一連の4種類の実験(実験3、5、8、9)から得られたシスト発芽の結果を相互に比較した。

実験10は、暗黒、温度変動、攪拌に加えて、バラストタンク内で数日後に発生する高濃度の亜鉛とカドミウムの影響を試験するために設計した。バラストタンクから採取して実験10に使用した海水は、2400 $\mu\text{g/L}$ の亜鉛濃度と0.17 $\mu\text{g/L}$ のカドミウム濃度で特徴づけられる。それぞれの自然海洋における通常濃度は、200 $\mu\text{g/L}$ (Zn)と0.03 $\mu\text{g/L}$ (Cd)である。ストレス期間は23日間であり、

その後MNK-GeO₂を使用して、20℃で予備培養した。

調査の最終段階として、さまざまな海域（相馬港、神戸港、および東京港と、瀬戸内海）から採取された4種類の表層堆積物サンプルについて、同時進行で擬似的バラストタンク環境下に置いた（実験11と実験12）。この実験における擬似環境は、冬にオーストラリアに向けて日本を出港し、途中の外洋でリバラストする（実験11）もしくはリバラストしない（実験12）という航海における環境が再現されるように設計した。リバラストする設定では、サンプルをストレス期間後に予備培養せずに27℃で培養することで、外洋でリバラストする環境を再現した。リバラストをしない場合の実験12では、サンプルをMNK-GeO₂、25℃で予備培養することで、バラスト水が沿岸で放出される環境を再現した。金属濃度はタンク内の滞留時間で異なるが、この濃度変化の影響については実験11と12では考慮しなかった。

(6) 栄養細胞に加わるバラストタンクのストレス

長いトゲをもつ珪藻は、水産養殖にとって障害になることがある。実験2から様々な種類の珪藻が得られたので、珪藻の暗黒/温度ストレスに対する耐性を試験するための簡単な実験も行った（実験13）。ESMとMNKで予備培養した珪藻の栄養細胞を30℃、25℃、20℃、15℃、および10℃の各温度で7日間、暗黒条件下に置いた。暗黒期間の直後に通常サイクルの明暗環境に戻した後で珪藻の状態を調べた。暗黒が渦鞭毛藻細胞に及ぼす影響は、実験6の発芽と隔離の後に得られた5株の*Alexandrium* spp.について実験14で試験した。培養温度は通常の培養温度に合わせて15℃にした。17日間の暗黒期間の培養液にはMNKとFSWを使用した。実験15では、*Alexandrium* spp. (7株)、*Gymnodinium catenatum* (3株)、*G. instriatum*、および*Akashio sanguineum*の栄養細胞に「暗黒、温度変動、攪拌、および高濃度Zn-Cd」の複合ストレスを加えた。実験10と実験15は、同じ物理化学ストレスを加えて同時に行った。従って、2セットのシストと栄養細胞の観察を比較することができる。栄養細胞（実験15）については、バラストタンク海水による実験に加えて、コントロールとして培養液MNKによる培養も行った。ストレス期間の後に、新たに培養液を加えないで、20℃の通常の明暗サイクルに細胞を戻した。

4. 結果

全ての実験の結果について表1、表2にまとめる。

表1. 日本各地で採取した堆積物について行った処理実験の詳細および処理後の培養により出現が確認された植物プランクトン。

堆積物の採取地	保存方法	保存期間	実験	観察された種とコメント
相馬港、 So Ju 05.06.17	なし	0	実験2	<i>Heterocapsa</i> sp.
	暗黒、室温 T°C	10日、酸 欠	実験4	<i>Heterocapsa</i> sp.、 <i>Alexandrium</i> sp.、 <i>Gymnodinium</i> spp.、 <i>Protoperdinium</i> sp.、 <i>Katodinium</i> sp
	珪藻の栄養 細胞		実験13	珪藻の形状と鎖は暗黒と高温によって大きく影響を受けたが、細胞は回復可能であった
相馬港 So Feb 05.02.21	暗黒、15°C、 2ヶ月、その 後は4°C	11ヶ月	実験11	実験進行中
			実験12	実験進行中

瀬戸内海、 織野の北、 K4 05.05.12	暗黒で4°C	2ヶ月	実験6	<i>Alexandrium</i> spp.、 <i>Gymnodinium catenatum</i> 、 <i>Gymnodinoid</i> sp.、 <i>Heterocapsa</i> sp.、 <i>Katodinium</i> sp (30°Cでは発芽せず) + ラフィド藻: <i>Fibrocapsa japonica</i> 、 <i>Chattonella</i> spp
			実験7	<i>Scrippsiella</i> spp.、 <i>Katodinium</i> sp
			実験1	密度勾配分離後に以下のシストを観察 <i>Alexandrium tamerense</i> 、 <i>A. minutum</i> 、 <i>A. affine</i> 、 <i>A. pseudogonyaulax</i> 、 <i>Gymnodinium catenatum</i> 、 <i>Scrippsiella trochoidea</i> 、 <i>Protopteridinium</i> sp.、 <i>Selenopemphix</i> sp.、 <i>Brigantedinium</i> sp.、および <i>Diplosalis</i> sp.とその他
		7ヶ月	実験11	実験進行中
			実験12	実験進行中
栄養細胞 K4		ストレス 付加	実験14	栄養細胞は暗黒での生存が可能
			実験15	応答は種によって異なる
栄養細胞 K7		ストレス 付加	実験15	応答は種によって異なる
神戸、Ko 05.09.13	なし	0	実験3	<i>Scrippsiella spinifera</i> 、 <i>S. trochoidea</i> (+ ラフィド藻: <i>Fibrocapsa japonica</i>)
			実験8	<i>Alexandrium</i> spp.、 <i>Gymnodinium</i> spp.、 <i>G. instriatum</i> 、 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 、 <i>Scrippsiella</i> spp.、 <i>Heterocapsa</i> sp (+ <i>Fibrocapsa japonica</i> 、 <i>Heterosigma akashiwo</i>)
			実験9	<i>Scrippsiella spinifera</i>
	暗黒で4°C	3ヶ月	実験5	<i>Alexandrium</i> spp.、 <i>Gymnodinium</i> spp.、 <i>G. instriatum</i> 、 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 、 <i>Scrippsiella spinifera</i> 、 <i>S. trochoidea</i> 、 <i>Heterocapsa</i> spp.、 <i>Katodinium</i> sp.、 <i>Protopteridinium</i> sp.、無色渦鞭毛藻 (+ <i>Fibrocapsa japonica</i> 、 <i>Heterosigma akashiwo</i>)
			実験10	<i>Alexandrium</i> sp.、 <i>Gymnodinium</i> sp.、 <i>Heterocapsa</i> sp. (発芽し始めた)
			4ヶ月	実験11
		実験12	実験進行中	
東京港、 Oh 05.12.05	暗黒で4°C	1ヶ月	実験11	実験進行中
			実験12	実験進行中

(1) 日本の港湾から採取した海洋表層堆積物のシストの種組成と多様性

表層堆積物をそのまま観察しても、シストは大量の鉱物粒子と岩くずに紛れ込んでいるので、観察できない。篩にかけて大きな粒子を取り除いても、シストは簡単には見つからない。ナトリウムポリタングステン酸塩段階勾配分離(実験1)は鉱物粒子の量を減らすのに有効な手段であり、処理後に瀬戸内海の堆積物を光学顕微鏡で観察したところ、18種類のシストが見つかった(図3)。シストの外観から、シストは*Alexandrium tamerense*、*A. minutum*、*A. affine*、*A. pseudogonyaulax*、*Gymnodinium catenatum*、*Scrippsiella trochoidea*、*Protopteridinium* sp.、*Selenopemphix* sp.、*Brigantedinium* sp.、および*Diplosalis* sp.と数種類の未確認属/種であると思われた。

日本の港湾から採取した海洋表層堆積物サンプルを実験室で予備培養したところ、*Alexandrium*

spp.、*Gymnodinium* spp.、*Cochlodinium polykrikoides*、*Scrippsiella* spp.、*Heterocapsa* spp.、*Katodinium* spp.、および*Protoperidinium* sp.（他にもラフィド藻の*Heterosigma akashiwo*、*Fibrocapsa japonica*、および*Chattonella* spp.）の発芽を誘導できた（表1、図4）。渦鞭毛藻の発芽に最適な温度は10℃から20℃の範囲であり、ラフィド藻は15℃から20℃であった。30℃では全く発芽しなかった。MNKとFSWは今回の培養で最高の発芽率をもたらした。統計的MPN法から、瀬戸内海から採取した表層堆積物K4に元々存在していた生存シスト（少なくとも実験下で実験期間内に発芽可能なシスト）の数を推定できた（実験6）（コンピュータソフトウェアは次のサイトより入手可能：<http://members.ync.net/mcuriale/mpn/index.html>）。シストのうち*Gymnodinium* spp.と*Alexandrium* spp.は、湿重量で200シスト/g程度であり、ラフィド藻の*Fibrocapsa japonica*と*Chattonella* spp.も大体同じ数であり（グループ1）、*Scrippsiella* spp.と*Heterocapsa* spp.は、湿重量で500シスト/g（グループ2）であった。バラスト水量が53,000 t、取り込まれる堆積物の量が50 kgから400 kgの船舶を想定して計算すると、シストはそれぞれ2,000万個から2億個の範囲（グループ1）と5,000万個から4億個の範囲（グループ2）になる。

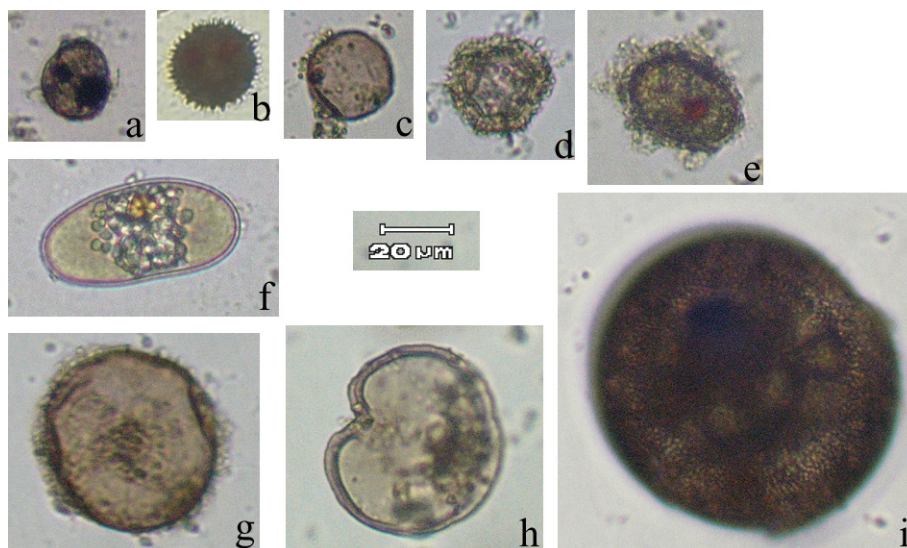


図3. 密度勾配分離の後に観察されたシストの光学顕微鏡写真。a) *Alexandrium minutum*, b) *Scrippsiella trochoidea*, c) *Diplosalis* sp., d) *A. pseudogonyaulax*, e) *A. affine*, f) *A. tamerense*, g) *Brigantedinium* sp., h) *Selenopemphix* sp., i) *Gymnodinium catenatum*.

(2) バラストタンク環境が渦鞭毛藻シストに及ぼす影響

暗黒条件下での34日間の培養の結果、*Scrippsiella* sp.と*Katodinium* sp.のような小型渦鞭毛藻のシストの発芽は促進されたが、*Alexandrium* spp.、*Gymnodinium* spp.やラフィド藻など、他の渦鞭毛藻の発芽を抑制、あるいは少なくとも遅らせた（表1の実験7と実験6の対比より）。しかし、バラスト水タンク内では、暗黒だけでなく温度変動、強い攪拌や金属汚染のような他の要因も加わっている。「暗黒—攪拌—温度変動」からなる複合ストレスを実験室で61日間加えたところ（実験8）、*Alexandrium* spp.、*Gymnodinium* spp.、*Cochlodinium polykrikoides*、*Scrippsiella* spp.、および*Heterocapsa* spp.の発芽を観察できた（表1）。同じ堆積物について、初期条件を同じにして、ストレスを一切加えないようにしたところ（実験3）、*Scrippsiella* spp.だけが発芽した。興味深いことに、実験9

の光が当たるストレス期間もまた *Scrippsiella* sp. の発芽だけを促進した。一方、同じ堆積物で3ヶ月間冷蔵して予備培養した実験では（実験5）、実験8の擬似暗黒タンク処理を施した渦鞭毛藻類よりも多くの種が発芽した。実験10では、日本からオーストラリアへ向かう航海の平均航海日数に相当する23日間の「暗黒—攪拌—温度変動—高濃度Cd/Zn」の複合的な影響について試験を試みた。この実験は進行中であるが、予備的結果として、*Alexandrium* sp. または *Gymnodinium* sp. のような栄養細胞と *Heterocapsa* sp. を観察することができた（表1）。

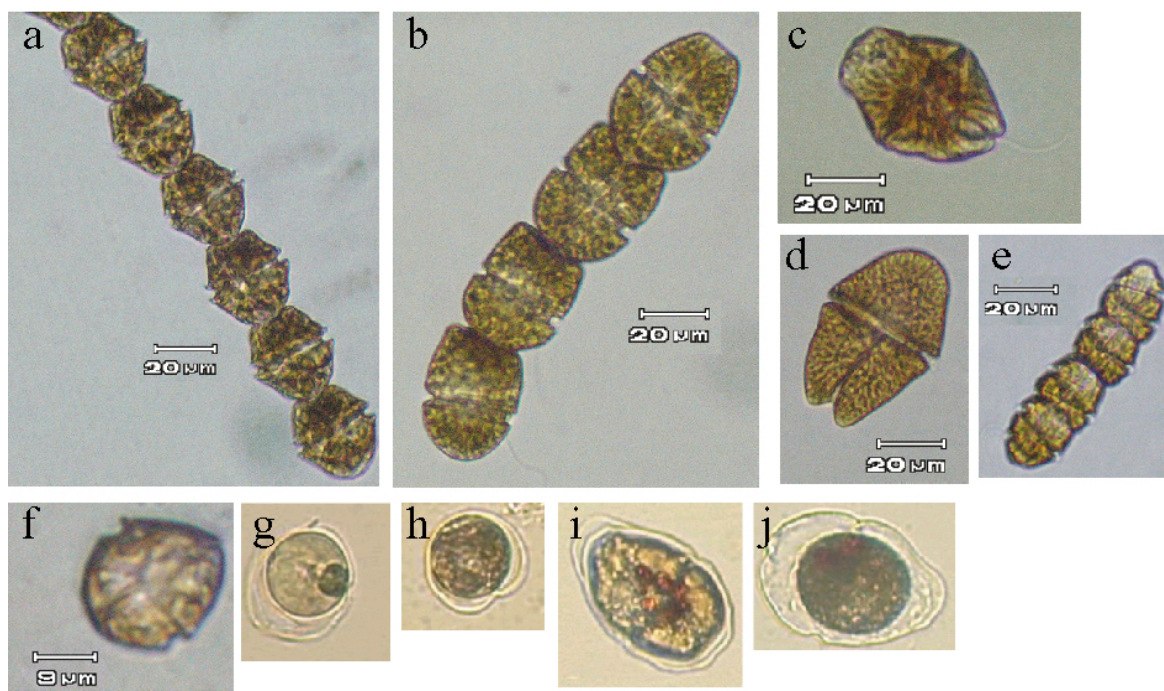


図4. 培養株として維持されている栄養細胞の光学顕微鏡写真とストレスによる処理後に形成されたシスト様細胞。

a) *Alexandrium* sp., b) *Gymnodinium catenatum*, c) *G. instriatum*, d) *Akashio sanguineum*, e) *Cochlodinium polykrikoides*, f) *Scrippsiella trochoidea*, g, h) シスト様の *Alexandrium* sp. (g : ストレス後、h : 明暗環境に戻した時の状態), i, j) シスト様の *Gymnodinium instriatum* (i : ストレス後、j : 明暗環境に戻した時の状態)

(3) バラストタンク環境が栄養細胞に及ぼす影響

①珪藻への影響

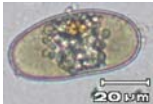



7日間の暗黒環境（実験13）が珪藻の栄養細胞に及ぼす影響は形状の全体的な劣化、鎖の長さの短縮、および色素の変色であった。しかし、珪藻を通常の明暗サイクル環境下に戻すと、そのほとんどがすぐに回復し、10℃から20℃の温度で高い耐性と回復力を示した。

②渦鞭毛藻株への影響

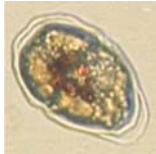

17日間の暗黒環境が *Alexandrium* spp. の培養株に及ぼす影響を調べた実験で、2種類の培養液の差はほとんどなかった（実験14、表1）。細胞は実験後も依然として泳いでおり、形状と葉緑体の色素はほとんど正常であった。培養容器の底に沈んだ細胞は極わずかで、シストは全く観察されなかった。



実験14では、23日間のストレス試験（暗黒—攪拌—温度変動）で培養液にMNKを使用し、擬似バラストタンクには高濃度のCdとZnを特徴とするバラスト海水を使用した。栄養細胞はこのストレスに強い影響を受けて、*Gymnodinium catenatum*と*Akashio sanguineum*の細胞の全てが死滅した。また*Alexandrium* spp.の7株のうち4株が培養液MNKで「シスト様」細胞（図4、g）を生成した。バラスト海水環境では、1株のみが「シスト様」細胞を生成できた。通常の明暗サイクル環境に戻して20日が経過すると、*Alexandrium* sp.はMNKの中でまだ「シスト様」細胞を保っていたが、シスト本来の外観は保たれていなかった（図4、h）。*Gymnodinium instriatum*に関しては、MNK培養液とバラストタンク海水（高濃度のZnとCd）の間で著しく異なる挙動が認められた。MNK培養液では、典型的な赤い集積体をとともう多くのシスト細胞が形成された（図4、i）。このシストの一部は20日以内に丸みを増した（図4、j）。しかし、ZnとCdが高濃度（外洋のそれぞれ200 µg/Lと03 µg/Lに対してそれぞれ2400µg/Lと0.17µg/L）のバラスト水では、全ての細胞が死滅して、シストは全く生成されなかった。

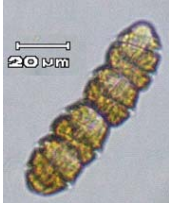
表2. 有害植物プランクトンおよび関連種のシスト発芽条件およびシスト形成条件。実験の番号は、表1を参照


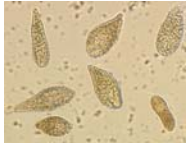

<i>Alexandrium</i> spp.	
 堆積物中のシスト	 シストから発芽した栄養細胞
シストの発芽が認められなかった条件 ・堆積物採取直後に培養処理 実験11, 12, 9, 7	シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件 ・10日間無酸素条件で保管後に培養処理 ・2ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験8, 15
<i>Alexandrium</i> spp.のシストは休眠期の解除にストレスが必要、増殖に最適な温度条件は15-20℃。発芽に有効なストレス条件：無酸素、冷暗所。	
Death of the vegetative cells	Encystment of the vegetative cells
栄養細胞死滅 7株のうち3株	栄養細胞からシスト形成 7株のうち4株で形成  形成直後のシスト  15日後のシスト
シスト形成は栄養細胞の状態や株に特異的である可能性あり	

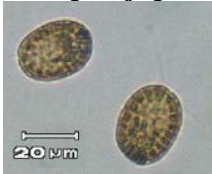
<i>Gymnodinium</i> spp.	
 堆積物中のシスト	 シストから発芽した栄養細胞
シストの発芽が認められなかった条件	シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件


<ul style="list-style-type: none"> ・堆積物採取直後に培養処理 実験9, 7 	<ul style="list-style-type: none"> ・10日間無酸素条件で保管後に培養処理 ・2ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11, 12, 8, 15
<p><i>Gymnodinium</i> spp.のシストは休眠期の解除にストレスが必要、栄養細胞は広い温度範囲で増殖。発芽に有効なストレス条件：無酸素、冷暗所。</p>	
<p>栄養細胞死滅 <i>G. catenatum</i>では3株</p>	<p>栄養細胞からシスト形成 <i>G. instriatum</i>で形成</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>形成直後のシスト 15日後のシスト</p>
<p>シスト形成は栄養細胞の状態に依存</p>	


<p><i>Scrippsiella</i> spp.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div>	
<p>シストの発芽が認められなかった条件 実験7</p>	<p>シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・堆積物採取直後に培養処理 ・10日間無酸素条件で保管後に培養処理 ・2ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11, 12, 9, 8, 15
<p>どのような条件下でも発芽。栄養細胞は広い温度範囲で増殖。金属濃度の高い条件は不適。</p>	

<p><i>Cochlodinium polykrikoides</i></p> <div style="text-align: center;">  <p>20 μm</p> </div>	
<p>シストの発芽が認められなかった条件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・堆積物採取直後に培養処理 実験11, 12, 9, 7 	<p>シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・3ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験8, 15
<p><i>Cochlodinium polykrikoides</i>のシストは休眠期の解除にストレスが必要、増殖に最適な温度条件は15-20°C。発芽に有効なストレス条件：無酸素、冷暗所。<i>Alexandrium</i> とよく似た環境応答。</p>	

<p><i>Chattonella</i> spp.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">    </div>	
<p>シストの発芽が認められなかった条件 実験7</p>	<p>シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件</p> <ul style="list-style-type: none"> ・2ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11, 12
<p><i>Chattonella</i> のシストは温度シフトストレス条件下で発芽促進</p>	

<i>Fibrocapsa japonica</i>	
	
シストの発芽が認められなかった条件 実験9, 7	シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件 ・堆積物採取直後に培養処理 ・2ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11, 12, 8, 15
<i>Fibrocapsa japonica</i> のシストはどのような条件下でも発芽。栄養細胞は広い温度範囲で増殖。金属濃度の高い条件に不応答。 <i>Scrippsiella</i> とよく似た環境応答を示すが、光条件は発芽に不応答な点で異なる。	

<i>Heterosigma akashiwo</i>	
	
シストの発芽が認められなかった条件 ・堆積物採取直後に培養処理 実験9, 15, 7	シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件 ・3ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11, 12, 8
<i>Heterosigma akashiwo</i> のシストは休眠期の解除にストレスが必要。広い温度範囲で増殖するが、金属濃度の高い条件は増殖に不適。	

<i>Gotoius abei</i>	
	
シストの発芽が認められなかった条件 ・堆積物採取直後に培養処理 実験12, 15	シストから発芽して栄養細胞が増殖した条件 ・3ヶ月間冷暗所で保管後に培養処理 実験11
<i>Gotoius abei</i> のシストは休眠期の解除にストレスが必要。金属濃度の高い条件で発芽せず。	

5. 考察

(1) バラストタンク内に取り込まれる堆積物の潜在的危険性

瀬戸内海K4からのシストインベントリでは、海洋表層堆積物中に各種渦鞭毛藻シストが観察された (*Alexandrium tamerense*, *A. minutum*, *A. affine*, *A. pseudogonyaulax*, *Gymnodinium catenatum*, *Scrippsiella trochoidea*, *Protoperidinium* sp., *Selenopemphix* sp., *Brigantedinium* sp., *Diplosalis* sp.) (実験1、表1、表2)。*Alexandrium tamerense*, *A. minutum*, *Gymnodinium catenatum*は毒素を生成する種として知られており、*Scrippsiella* spp.はブルーム形成時に有害性がある (Hallegraeff, 2003) ため、有毒種や有害種の拡散に海洋表層堆積物は潜在的に高い危険性をもつと考えられた。

日本の港湾 (神戸港、東京港、相馬港) と内海 (瀬戸内海) から採取された表層堆積物について

て、実験室で予備培養処理を行うと、*Alexandrium* spp.、*Gymnodinium catenatum*、*G. instriatum*、*Gymnodinium* spp.、*Cochlodinium polykrikoides*、*Scrippsiella* spp.、*Heterocapsa* spp.、*Katodinium* spp. および *Protoperdinium* sp.、他にラフィド藻の *Heterosigma akashiwo*、*Fibrocapsa japonica* および *Chattonella* spp. の発芽を誘導できた（実験2、3、4、5、6、表1、表2）。海洋表層堆積物中に混在するシストの全ての属／種が発芽したわけではないが（実験1）、高い発芽能力を示した。実験室における予備培養処理では、実際のごく一部しか反映しない可能性がある（Harris et al., 1998）。潜在的に危険であるが故に分類学的にも重要と考えられる種について、予備培養技術を用いた実験を実施する価値はある。瀬戸内海の堆積物の場合（実験6、表1、表2）、バラスト水53,000 tの船舶におけるタンク内のシスト数は、潜在的に有毒な渦鞭毛藻（*Gymnodinium* spp.、*Alexandrium* spp.）と赤潮を形成するラフィド藻（*Fibrocapsa japonica*と *Chattonella* spp.）で2,000万個から2億個の範囲であり、加えてブルームになると危険かもしれない *Scrippsiella* spp.と *Heterocapsa* spp.は、5,000万個から4億個の範囲であると推定された。これらのシストの発芽能力は高く、生存して繁殖できると考えられる。従って、バラスト水に混在する海洋表層堆積物が航海によって運ばれ、他の海域で放出されると、危険な微細藻類による侵略と拡散の大きなリスクが生じることになる。また、船のバラストタンクに蓄積した堆積物を定期的に洗浄・除去するための乾ドックもまた、汚染のリスクの高い場所といえる。ドックで除去された古い堆積物に含有されるシストも生存可能であることが実証されているので、やはり危険である（Harmer et al., 2001）。こうした高いレベルのリスクを考慮すると、乾ドックエリアを保護する特別対策を慎重に検討する必要があるかもしれない。

(2) 輸送時のバラストタンク環境がシストと栄養細胞に及ぼす影響

港湾と沿岸地域の海洋表層堆積物は多種多様で、膨大な量の有害シストを含有すると考えられる。このような表層堆積物がバラスト水を介して運ばれ、他の海域で放出されることにより、リスクの高い汚染と拡散が生じる。しかも、バラストタンク内の堆積物は輸送中に様々なストレスが加えられ、それがシストの生理に影響を及ぼす可能性がある。実際、我々の実験条件と発芽試験結果の比較から（図1、表1、表2）、強いストレスもしくは一定以上の複合ストレスは、属／種によっては、渦鞭毛藻シストの発芽を促進したり、遅らせたりすることが明らかになった。採取したての堆積物で観察された（実験2、3）シスト発芽能力は、ストレス期間後のそれ（実験4、5。暗黒一酸欠貯蔵、冷暗貯蔵）よりも低かった。また擬似的タンク環境により、一部の種のシスト発芽が同様に促進された（実験8と実験3および5との対比）。注目すべきは、光照射下の擬似的タンク環境（実験9）では、発芽が促進されなかったことで（実験9と実験3および8との対比）、暗黒条件が複合ストレスにおける重要な要因であることを示唆した。

従って、暗黒と複合ストレスに対するシストの応答は、属／種によって、そしておそらく初期の生理状態によって（古いシストは生成されたばかりのシストとは応答が異なる可能性がある）異なる。しかし、いずれにせよ、シストの新旧に関係なく、バラストタンクに取り込まれて運搬され、強いストレスを加えられたとしても、シストが死ぬことはないようである。死ぬどころか、シストの通常の休眠期間に関係なく、運搬されることによって発芽能力が促進されるなど、逆の影響すら考えられた。

バラストタンクに取り込まれた植物プランクトンの栄養細胞もストレスを受けることになる。

日本からオーストラリアに向かう航海中のバラストタンクにおいて、植物プランクトン群集の直接的なモニタリングが行われているが、このモニタリングから、珪藻が徐々に連鎖体を崩し、葉緑体の色調を失うことが明らかになった（サブテーマ2）。しかし、タンクから採取したサンプルの予備培養の結果、タンク環境から出されることで生長する個体のいることが分かった。この結果は、珪藻の栄養細胞に対して、暗黒期間の処理を行った実験13の結果と完全に一致した（実験1、表1、表2）。また、実験13の結果から、珪藻の栄養細胞の場合、航海中（赤道を通過しない航海）に冷温環境において被るダメージは比較的軽いと考えられた。有害な珪藻は数種類あるが、バラストタンクによる運搬によって全ての細胞が死ぬのではなく、航海後に寄港地に放出され、拡散するというリスクが存在する。

渦鞭毛藻の栄養細胞に関するバラストタンク内での挙動については、暗黒条件だけが影響を及ぼすというわけではなく（実験14）、バラストタンク環境のような複合ストレスが大きく影響しているのかもしれない（実験15、表1、表2）。その応答は渦鞭毛藻の属/種によって大きく異なるが、一般に耐久性をもつ形態（「シスト様」細胞）が生成される傾向を示した（実験15、MNK培養液使用）。渦鞭毛藻の栄養細胞が高濃度のZnとCdに急激に曝されると、耐久性をもつ細胞形態の生成が抑制された（実験15、バラスト海水環境）。バラストタンク内で、ZnとCdの濃度はタンク内における滞留時間とともに高くなり、実験に使用した濃度に達するのに数日かかる。つまり、タンク内に取り込まれた栄養細胞は、ZnとCdの濃度が実験15のレベルに到達する前に、まず完全な暗黒、温度変動、そしてタンク内の攪拌に対処しなければならない。そしてこの初期のストレスによって、栄養細胞は、高濃度のZnとCdにすら耐えて生存を可能にする耐久性をもつ形態（「シスト様」細胞）に変化する可能性がある。この点を確認するためには、物理的ストレス（暗黒、温度、攪拌）の再現に加えて、ZnとCdの濃度上昇を再現する必要がある。外洋でリバラストするケースを想定すると、栄養細胞の群集から生成される「シスト様」細胞は、栄養に乏しく温暖なリバラスト海域において、生き延びる可能性が高い。またリバラスト海域では、海流方向が一定しており、「シスト様」細胞のような軽い粒子は沿岸域まで運ばれる可能性がある。このような移動プロセスを確認できれば、リバラスト処理により、大型船舶の航行しないような海域にも有害な微細藻類が拡散する危険性が存在することになる。

6. 本研究により得られた成果

堆積物に含まれるシストは生存能力が高く、バラストタンクにバラスト水を漲水する際に取り込まれる堆積物を減らすための抜本的対策を検討する必要があることが明らかになった。また、船舶のバラストタンクの洗浄のためのドライドックにも特別な注意を払う必要があることが示唆された。小型船の堆積物取り込み量は少量だが、年間の航海回数によってはかなりの量に達する場合もある。またたとえ国際航路を航海していなくても、バラスト水を使用する船は他の港湾に有害植物プランクトンを拡散させる可能性がある。

外洋域でのリバラストにより、タンク内堆積物の量は減る傾向にあるが、かなりの量は残るため、生物拡散の問題の最終的解決策とは言えない。更に相当量の栄養細胞がタンクに取り込まれる場合、リバラストによって耐久性をもつ形態に変化した有害種が海流によって運ばれ、拡散する危険性がある。大型船が航行しない自然海域ですらいつかは汚染される危険性がある。またこうした汚染は水産養殖、漁業、人の健康への様々な問題を引き起こす可能性があると考えられる。

7. 引用文献

- 1) Andersen, R.A., Berges, J.A., Harrison, P.J. and Watanabe, M.M. 2005, Appendix A – Recipes for Freshwater and Seawater Media, 429-538, *in* Algal Culturing Techniques, Edited by R.A. Andersen, Elsevier Academic Press, 578 pp.
- 2) Andersen, R.A. and Kawachi, M. 2005, Traditional Microalgae Isolation Techniques, Chap. 6, 83-100, *in* Algal Culturing Techniques, Edited by R.A. Andersen, Elsevier Academic Press, 578 pp.
- 3) Blackburn, S. and Parker, N. 2005, Microalgal life cycles: Encystment and Excystment, Chap. 24, 399-417 *in* Algal Culturing Techniques, Edited by R.A. Andersen, Elsevier Academic Press, 578 pp.
- 4) Bolch, C.J.S. 1997, The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellates cysts from marine sediments, *Phycologia* 36(6):472-478.
- 5) Hallegraeff, G.M. 2003, Harmful algal blooms: a global overview, 25-49, *in* Manual on Harmful Marine Microalgae, Edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella. Monographs on oceanographic methodology 11, UNESCO publishing, 793 pp.
- 6) Hamer, J.P., Lucas, I.A.N. and McCollin, T.A. 2001, Harmful dinoflagellate resting cysts in ships' ballast tank sediments: potential for introduction into English and Welsh waters, *Phycologia*, 40 (3), 246-255.
- 7) Harris, A.S.D., K.J. Jones, J. Lewis. 1998, An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. *J. Exp. Marine Biol. and Ecol.* 231-1:21-30.
- 8) Inouye, I. 1981, Notes on microalgae in Japan (2). Employment of laboratory culture to floristic studies of marine microalgae. *Jap. J. Phycol.* 29:13-14.
- 9) Kasai, F., M. Kawachi, M. Erata, and M. Watanabe. 2004, List of strains. Seventh Edition 2004 Microalgae and protozoa. ISSN 1341-3643. 257 p.
- 10) Noel, M.H., Kawachi, M. and Inouye, I. 2004, Induced dimorphic life cycle of a coccolithophorid, *Calyptrosphaera sphaeroidea* (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *J. Phycol.* 40:112-129.
- 11) Stein, J.R., ed. 1973, Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.

8. 国際共同研究等の状況

堆積物中からのシストの分離・濃縮に必要とされたBolch法(1977)の改変をCommonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (オーストラリア)と共同で検討を行い、方法を確立した。また発芽実験の条件設定を行うにあたって、Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (USA)の Robert A. Andersen博士から有益な助言を頂いた。

9. 研究成果の発表状況

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 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, 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).
- 2) 河地正伸・出村幹英・Mary-Hélène Noël・大村嘉人・功刀正行・古川洋一：日本藻類学会30回大会 (2006)「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」
- 3) 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. 成果の政策的な寄与・貢献について

今後、学会発表および学会誌等への投稿を行い、成果の広報・普及に努める。