

# 自然の自己修復機能を利用した赤潮防除新技術開発研究

西村昭史・畑直亜・藤原正嗣

## 目的

平成4年に英虞湾で発生した *Heterocapsa circularisquama* (以下ヘテロカプサ) 赤潮はアコヤガイを大量へい死させ、真珠養殖漁業に大打撃を与えた。以降英虞湾および周辺真珠養殖漁場では毎年のようにヘテロカプサ赤潮が発生し、アコヤガイのへい死のみならず養殖真珠の品質低下を引き起こしている。このため、赤潮発生予察技術開発に取り組むとともに漁業者を取り込んだモニタリング体制を構築し、赤潮の早期発見による被害軽減に努めている。しかし、毎年繰り返される赤潮に対し、漁業者から赤潮の発生自体を阻止する技術の開発が求められている。赤潮防除技術として薬剤による殺藻や粘土散布による凝集沈殿があるが、これらは閉鎖性の強い英虞湾では漁場環境への悪影響が懸念される。そこで、本研究では最近発見されたヘテロカプサのみ特異的に殺藻し他の生物に影響を与えず、赤潮の消長に関与する可能性のあるウイルス (Tomaru et al.2004) に着目し、殺藻ウイルスによる生態系の恒常性維持機能を利用した環境に優しいヘテロカプサ赤潮発生防止技術を開発する。今年度はヘテロカプサおよび殺藻ウイルスの出現状況をモニタリングすると共に、両者の感染密度とウイルス感受性の把握、および海底耕耘影響調査を行う。

## 方法

### 1 海況およびヘテロカプサ出現状況調査

英虞湾立神浦では毎年のようにヘテロカプサ赤潮が発生するため、図1に示す立神浦の口部 (St.1)、中央部 (St.2)、奥部 (St.3) の3定点において、6月~10月の間は毎週1回、それ以外の期間は月2回、水温、塩分、pH、濁度、クロロフィルをクロロテック (アレック電子 AAQ1183) によって測定した。同時に St.1 では 0m, 5m,

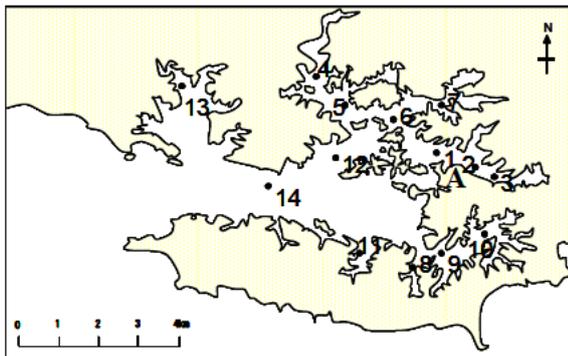


図1 調査地点図

B-1mの3層, St.2 および St.3 では 0m, B-1mの2層から採水し、栄養塩およびヘテロカプサ密度の測定に供した。

### 2 ヘテロカプサ殺藻ウイルス出現動態調査

上記海況調査に合わせて、St.1~3の3定点における水中および底泥中の殺藻ウイルス密度を、ウイルス感受性の異なるヘテロカプサ培養株2株 (H18A2およびH18A5) をホストにバイオアッセイによって測定した。すなわち、96穴ウェルプレートを用いて、SWM3培地で培養し対数増殖期にある2株のヘテロカプサ150 $\mu$ lに0.45 $\mu$ mでろ過した試水100 $\mu$ lを添加し、殺藻の有無によるMPN法でウイルス密度を算定した。なお、底泥は横山式柱状採泥器を用いて表層1cmから採泥し、SWM3を添加して振盪抽出および遠心分離した上澄のろ液を供試し、湿泥1g当りのウイルス密度に換算した。また、バイオアッセイで出現したウイルスを適宜分離し、その性状を調べた。

### 3 ヘテロカプサ殺藻ウイルス水平分布調査

図1に示す14測点において、7月9日と9月2日に採泥を行い、前項と同様の手法で底泥中のウイルス密度を測定した。

### 4 ウイルス感染密度試験

96穴ウェルプレートを用いて、ヘテロカプサ密度 $10^2 \sim 10^4$  cells/mlと殺藻ウイルス密度 $10^1 \sim 10^7$  titer/mlを組合せた接種を行い、ヘテロカプサが目視で70%程度沈積あるいは殺藻されるまでの日数を調べた。また、200ml三角フラスコにヘテロカプサ培養液100mlを入れ、ウイルス接種密度は一定でヘテロカプサ初期密度を変えた場合と、ヘテロカプサ初期密度は一定でウイルス接種密度を変えた場合について、ヘテロカプサ密度の変化を調べ、殺藻状況を推定した。なお、ヘテロカプサはH18A2株、ウイルスはV644を使用した。

### 5 ヘテロカプサ株のウイルス感受性試験

立神浦で発生しているヘテロカプサを6月30日、7月23日、8月4日、9月29日の4回、各20株程度を分離し、CYタイプ (ストレイン名V644,VA05) とUAタイプ (ストレイン名V34,VA15) のウイルスを接種し、殺藻の有無によってヘテロカプサ株の感受性を調べた。

### 6 海底耕耘影響調査

立神浦浚渫工事の一環として、8月5日に前年同様St.2付近で底泥中の殺藻ウイルス活性化手法の一つとして考えている海底耕耘と同等の影響が見込まれる海底掃除が行われたことから、防汚フェンスで囲まれた海底掃除(以

下海底耕耘) 場所と対照としてフェンス外の地点において、海底耕耘直前と直後、およびその後2週間におけるヘテロカプサおよび水中ウイルス密度を測定した。

### 7 発芽試験

海底耕耘や底泥散布による赤潮防除を実施した場合、底泥中に存在するシストの発芽がきっかけとなって有害赤潮が発生する危険性が考えられる。そこで、8月7日に図1に示す立神浦の赤崎西 (St.A, 水深8.7m) において底泥を採取し、シスト発芽試験によって有害プランクトンの発生リスクを調査した。濾過海水、SWM3培地および二酸化ゲルマニウム (GeO<sub>2</sub>) 添加 SWM3 培地の3種類を培養液とし、各培養液に対して底泥を0.02g/mlとなるように懸濁させた。各懸濁液は、それぞれ3本の試験管に10mlずつ分注して温度25℃で培養した。培養液が異なる3種の試験管培養は、それぞれ培養3日後、6日後および12日後に試験管1本ずつについて検鏡を行い、増殖した遊泳細胞の種類と細胞密度を調査した。また、底泥の凍結保存によるシスト発芽の抑制効果について検討するため、-30℃で約4ヶ月間保存した底泥を用いて、前述と同様に発芽試験を行った。

### 8 現場発生個体群へのウイルス接種試験

ヘテロカプサを含む現場海水200mlを三角フラスコに入れ、CYタイプ (ストレイン名VA04またはV644) とUAタイプ (ストレイン名V664) のウイルスを混合接種し、ウイルス接種区と非接種区における培養8日間のヘテロカプサ密度とウイルス密度の変化を調査した。栄養塩欠乏によって非接種区のヘテロカプサが増殖しない状

況を回避する目的で、現場海水に栄養塩をSWM3培地の組成となるように添加した条件でも同様の調査を行った。実験に供した海水は、7月2日のSt.1の5m層、7月23日のSt.2のB-1m層および8月5日のSt.3のB-1m層のもので、実験開始時のヘテロカプサ密度はそれぞれ53cells/ml, 868cells/mlおよび2,300cells/mlであった。

### 結果および考察

#### 1 海況およびヘテロカプサ出現状況調査

ヘテロカプサは6月23日にSt.2および3で最初に確認され、以後増加して7月下旬から8月上旬がピークで、8月4日のSt.3の底層で6,000cells/mlの最大密度を示し、表層より底層で密度が高い傾向が見られた。その後急速に減少して9月上旬には一旦確認されなくなったが、9月中旬から10月下旬までわずかながら再び出現し、11月にはほぼ消滅した。

ヘテロカプサは、夏季の成層が発達し、底層の溶存酸素が低下した時期に高密度化する傾向がある。また、栄養塩が低下し、珪藻の密度が低い時期に高密度化する傾向も認められている。今年度、ヘテロカプサが高密度に達した7月下旬から8月上旬にも同様の状況が認められた。一方、8月中旬には、低下していた底層の溶存酸素が急速に回復する状況が認められており、この時期にヘテロカプサ密度が急速に減少した一因として、水塊の安定度が弱まったことが影響した可能性が考えられた。

#### 2 ヘテロカプサ殺菌ウイルス出現動態調査

殺菌ウイルスは前年度にはほとんど検出されなかった

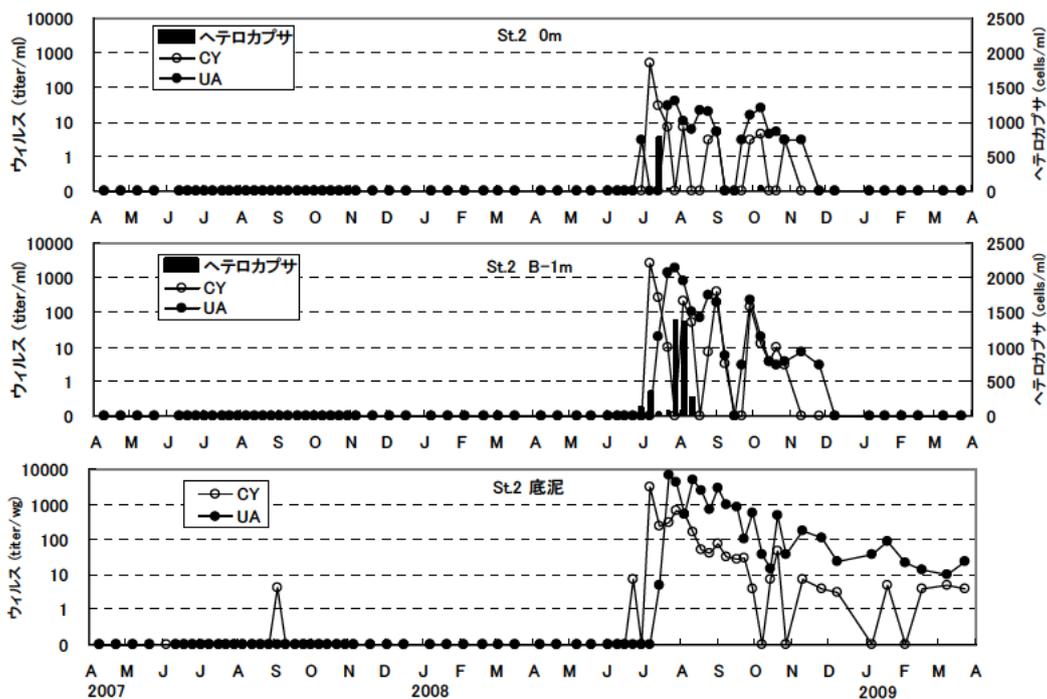


図2 St.2におけるヘテロカプサおよび殺菌ウイルス出現

が、今年度は水中、底泥中ともヘテロカプサ出現直後から検出された。St.1~3 での出現状況はほぼ同様の傾向を示したことから、St.2 での出現状況のみ図 2 に示す。水中のウィルスは 7 月には CY タイプ(Tomaru et al 2004)が主体で最大 2,670titer/ml 出現したが、8 月以降 UA タイプが優占するようになり、10 月以降減少して 12 月には検出されなくなった。全般に表層より底層でウィルス密度は高かった。一方、底泥中のウィルスは水中と同様 7 月から検出されるようになり、7 月は CY タイプ、8 月以降 UA タイプが優占し、CY タイプは 8 月以降減少して冬季にはわずかに検出されたのみであったが、UA タイプは 9 月以降減少傾向を示しながらも冬季にも検出された。

### 3 ヘテロカプサ殺藻ウィルス水平分布調査

英虞湾全域調査ではヘテロカプサ発生初期の 7 月 9 日には塩屋浦を除く全ての地点の底泥から CY タイプのウィルスが検出され、立神浦、鵜方浦、神明浦では 10<sup>3</sup>titer/w.g 以上で他地点より密度が高かった。この時点で英虞湾の広範囲にヘテロカプサが出現していたことが確認されており、また、昨年は各地点でほとんどウィルスが検出されなかったことから、殺藻ウィルスはヘテロカプサの出現と同調して急速に増殖し、海底に沈積したと考えられる。赤潮盛期を過ぎた 9 月 2 日には底泥中のウィルスは CY タイプが減少し、7 月にはほとんど出現しなかった UA タイプが増加して優占したが、塩屋浦では両タイプとも検出されなかった(表 1)。底泥中のウィルスタイプの変化は水中の変化と同様で、このこともウィルスの海底への急速な沈積を示唆している。

表 1 英虞湾全域における底泥中の殺藻ウィルス密度

調査日	2008/7/9		2008/9/2	
	Wirus Type	CY	UA	CY
St.1 立神口	5,800	0	1,688	3,655
St.2 立神中	3,092	0	76	2,893
St.3 立神奥	8,116	0	53	7,954
St.4 鵜方	411	0	26	174
St.5 鵜方口	1,091	0	7	103
St.6 賢島	828	0	27	351
St.7 神明	6,816	0	31	397
St.8 布施田	64	6.3	7	25
St.9 片田	22	4.5	18	67
St.10 船越	16	0	35	16
St.11 和具	28	0	6	14
St.12 間崎	37	0	9	13
St.13 塩屋	0	0	0	0
St.14 たこのぼり	8	0	0	26

titer/w.g

### 4 ウィルス感染密度試験

ウェルプレートを用いた感染実験から、殺藻ウィルスの感染時間は CY および UA タイプともヘテロカプサ密度には影響されず、ウィルス接種密度が高いほど短くなる傾向が認められた(表 2)。三角フラスコを用いた実験

表 2 ヘテロカプサおよび殺藻ウィルス密度と殺藻日数との関係

ウィルス(V34)密度	5.E+06	5.E+05	5.E+04	5.E+03	5.E+02	5.E+01
ヘテロカプサ	8.E+04	2	3	5	5	5
(H18A5)密度	8.E+03	2	3	3	5	5
cells/ml	8.E+02	2	3	5	-	-

UAタイプ						
ウィルス密度(V644)	3.E+07	3.E+06	3.E+05	3.E+04	3.E+03	3.E+02
ヘテロカプサ	9.E+04	2	2	2	3	-
(H18A2)密度	9.E+03	2	2	2	2	4
cells/ml	9.E+02	2	2	2	2	3

CYタイプ 70%沈積までの日数

では、ヘテロカプサ初期密度が 10<sup>5</sup>cells/ml の高密度の場合は対照区ではヘテロカプサは一旦増加してから減少したのに対し、ウィルス接種区では接種後すぐに減少した。初期密度が 10<sup>4</sup>cells/ml の中密度の場合は対照区ではヘテロカプサが著しく増加して 8 日目以降減少したのに対し、ウィルス接種区では 3 日目まで若干減少後やや増加したのみで、著しい密度変化はなかった。初期密度が 10<sup>3</sup>cells/ml の低密度の場合は対照区ではヘテロカプサが 9 日目まで増加してから減少したのに対し、ウィルス接種区では当初ヘテロカプサ密度にほとんど変化が見られず、4 日目から 9 日目にかけて増加したものの、対照区ほどの密度には達しなかった(図 3)。一方、ウィルス接種密度を変化させた実験では、ウィルス接種密度が高い

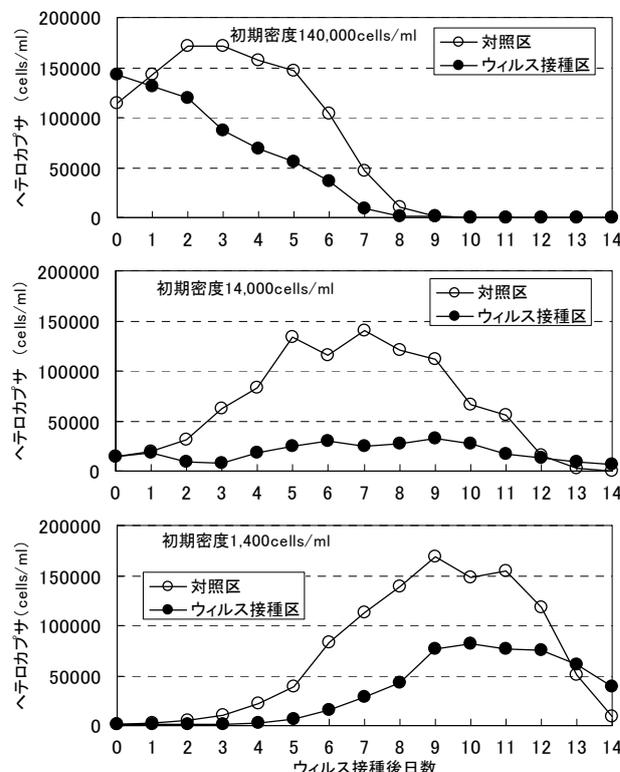


図 3 ウィルス接種密度一定でヘテロカプサ初期密度を変化させた場合のヘテロカプサ殺藻状況

ほどヘテロカプサ増殖抑制効果が早く現れたが、対照区でのヘテロカプサの増殖が不調であったため、対照区とウイルス接種区の差はそれほど大きくならなかった(図4)。以上のことから、ウイルスによるヘテロカプサ殺藻効果の発現はヘテロカプサ密度よりウイルス密度に依存していると推察される。また、ウイルスはヘテロカプサを完全に殺藻するのではなく、ヘテロカプサの増殖を抑制するだけであることが明らかになった。これらのことから、当初想定した赤潮発生初期にわずかに残存する底泥中のウイルスを水中に回帰させることでヘテロカプサ赤潮を制御することはきわめて困難であると言わざるを得ない。

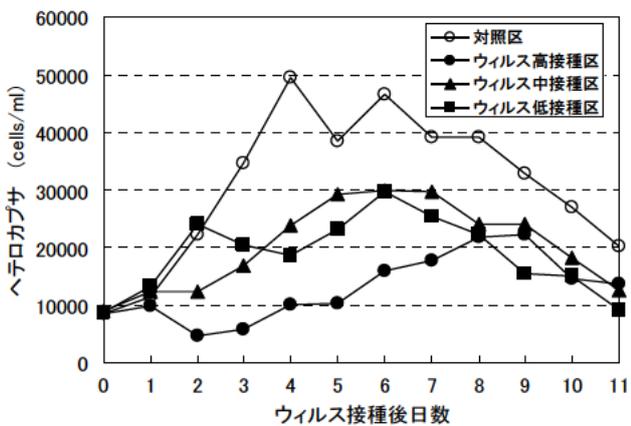


図4 ヘテロカプサ初期密度一定でウイルス接種密度を変化させた場合のヘテロカプサ殺藻状況

#### 5 ヘテロカプサ株のウイルス感受性試験

立神浦から分離したヘテロカプサ株はCY, UA, および両タイプのウイルスでは殺藻されない株の3タイプに分かれた。図5に示すように、ヘテロカプサ発生初期の6月下旬にはCYタイプが約50%を占めていたが、7月から9月と時期が進むにつれてCYタイプが減少してUAタイプが増加し、9月下旬にはUAタイプが約70%を占めた。一方、その他のタイプは15~25%を占め、7月から9月にかけて若干減少したが、顕著な変化を示さなかった。ヘテロカプサのウイルス感受性の変化は出現したウ

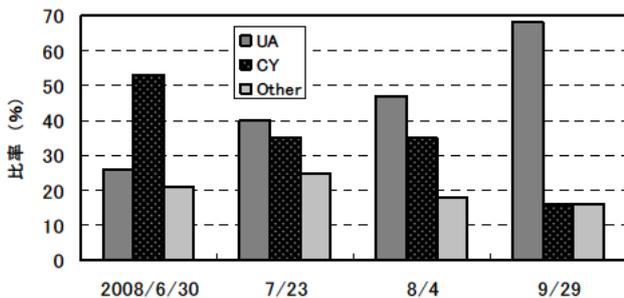
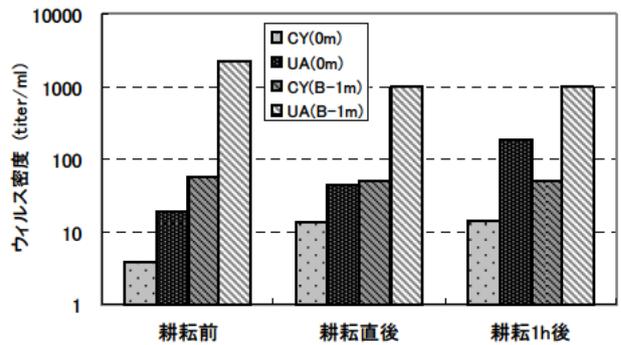


図5 立神浦から分離したヘテロカプサ株のウイルス感受性タイプ組成

イルスのタイプ変化と対応しているが、なぜ優占株がCYからUAに変化したのかは不明であり、赤潮の消長との関連の解明が今後の課題である。

#### 6 海底耕耘影響調査

海底耕耘場所における耕耘直前、直後、1時間後の表層および底層水中のウイルス密度をCYとUAタイプ別に図6に示す。ウイルスは耕耘前に既に4~2,260titer/ml



度の変化

存在しており、CYタイプ436titer/w.g, UAタイプ3,020titer/w.gを含む底泥が海底耕耘によって巻き上げられた後も、底層のウイルス密度に顕著な変化は見られなかった。また、海底耕耘後2週間における水中ウイルスとヘテロカプサ密度は耕耘区と対照区で明確な差は認められなかった(図7)。これは海底耕耘が行われた時点で立神浦には殺藻ウイルスが蔓延しており、海底耕

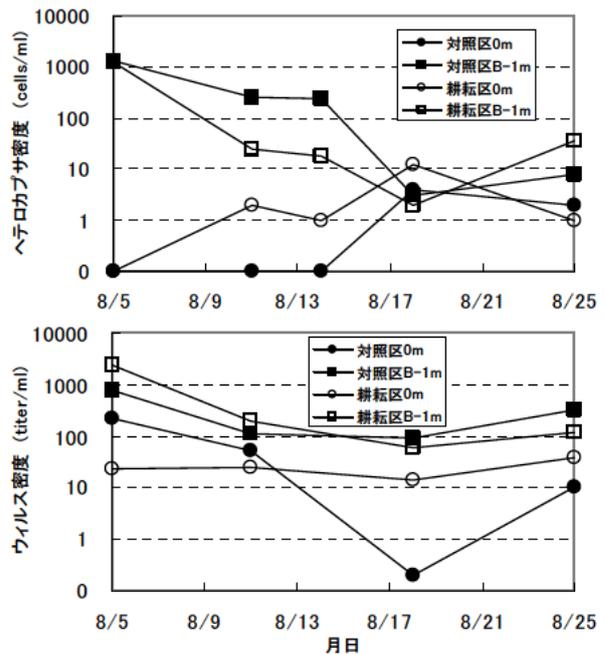


図7 海底耕耘後のヘテロカプサおよび水中ウイルス密度(CY+UA)の変化

転によって水中回帰した底泥中のウイルスが既に存在した水中のウイルスに埋没してしまった結果と考えられる。今後、水中にウイルスが蔓延していない時点での海底耕耘効果を検証する必要があるが、水中にウイルスが存在してもヘテロカプサが生存している事実、および室内での感染実験結果から、海底耕耘による赤潮防除は困難であると思われる。

### 7 発芽試験

凍結保存前の底泥からは、渦鞭毛藻や珪藻をはじめとする多種のプランクトンが増殖し、わずかながら有害種の *Heterosigma akashiwo* も含まれていた (表3)。一方、凍結保存後の底泥からは、プランクトンの増殖は全く確認されなかったことから、凍結保存した泥を利用することで有害赤潮の発生リスクを軽減できる可能性が示唆された。

表3 立神浦の底泥から増殖したプランクトンの組成

プランクトン種類	濾過海水		SWM-3		SWM-3 (GeO2)	
	保存前	保存後	保存前	保存後	保存前	保存後
渦鞭毛藻						
<i>Gummodinium impudicum</i>	6					
有殻渦鞭毛藻 (種不明)	15		15		200	
無殻渦鞭毛藻 (種不明)	10		20		140	
珪藻						
<i>Asterionella glacialis</i>			+			
<i>Chaetoceros</i> spp	120		285			
<i>Nitzschia</i> spp			20			
<i>Pleurosigma</i> spp			+			
<i>Skeletonema costatum</i>	120		22,700			
<i>Thalassiosira</i> spp			1,250			
円心目珪藻 (種不明)			600			
羽状目珪藻 (種不明)	10		945			
微細珪藻 (種不明)			≥100,000			
その他植物プランクトン						
<i>Heterosigma akashiwo</i>	1		1		1	
クリプト藻					115	
ユークレナ藻					+	
微細鞭毛藻 (種不明)	5		≥10,000		400	
動物プランクトン						
少毛繊毛虫亜目			15		40	
有繊毛虫亜目			30		440	

数字は、培養液中の細胞密度 (cells/ml)  
+は、培養液の遠沈濃縮で存在を確認

### 8 現場発生個体群へのウイルス接種試験

現場海水および現場海水に栄養塩を添加した条件下における培養期間中のウイルス接種区と非接種区のヘテロカプサ密度の変化を図8に示す。いずれの採水日の海水試料を用いた試験においても、ウイルス接種区と非接種区の間で細胞密度の変化に顕著な違いは認められなかった。また、培養期間中にヘテロカプサが増殖したのは、7月23日の栄養塩添加・接種区と栄養塩添加・非接種区の2区のみであった。各試験区における培養開始時と培養8日後におけるウイルス密度を表4に示す。7月23日と8月5日の試験区のウイルスアッセイ時には、現場海水に含まれていた細菌の影響と思われるヘテロカプサの溶藻があり、ウイルス密度を正確に測定することができなかった。培養期間中にヘテロカプサ密度が増殖した7月

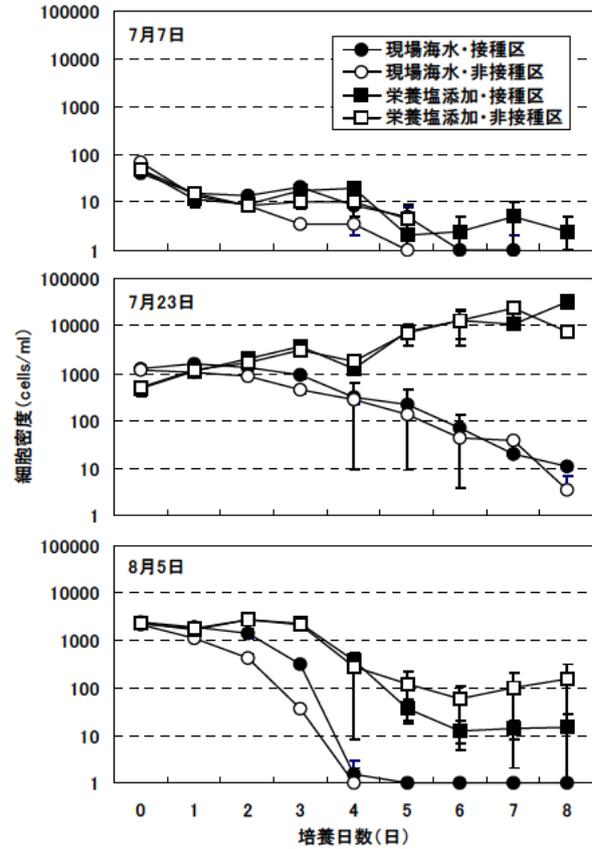


図8 ウィルス接種後の現場海水試料中におけるヘテロカプサ密度の変化

表4 ウィルス接種後の現場海水試料中におけるウイルス密度の変化

採水日	試験区	ウイルス密度 (titer/ml)				
		CY		UA		
		開始時	8日後	開始時	8日後	
7月7日	現場海水	接種区	78	129	43	29
		非接種区	4	2	ND	ND
	栄養塩添加	接種区	71	40	45	36
		非接種区	ND	ND	ND	ND
7月23日	現場海水	接種区	ND	63	223	51
		非接種区	ND	2	139	17
	栄養塩添加	接種区	ND	351	203	252
		非接種区	ND	12635	139	3850
8月5日	現場海水	接種区	320	3885	44750	370
		非接種区	3	974	34	2142
	栄養塩添加	接種区	343	546	34300	383
		非接種区	3	530	29	517

NDは、検出限界以下

23日の栄養塩添加・接種区および栄養塩添加・非接種区の培養8日後におけるウイルスアッセイでは、CY, UAの両タイプのウイルス密度が増加したという測定結果となったが、この測定結果にも細菌の影響が含まれていることが推測された。そこで、栄養塩添加・非接種区の培養8日後における両タイプのウイルスアッセイ時の培養液を用いて、溶藻因子の濾過性と両タイプおよび

抵抗性タイプのヘテロカプサ株への感染性から溶藻因子を調査した結果、培養液中には UA タイプのウイルスと粒子サイズが  $0.2\mu\text{m}$  以上と推定されるバクテリア様の溶藻因子の 2 種類が含まれていたことが確認できた (表 5)。これらの溶藻因子が存在しているにも関わらず、7 月 23 日の栄養塩添加・接種区および栄養塩添加・非接種

区でヘテロカプサが増殖した原因や、ウイルス接種区と非接種区でヘテロカプサ密度の変化に違いが見られなかった原因について今後さらに検討を進め、ヘテロカプサ現場個体群におけるウイルスの効果を明らかにする必要がある。

関連報文

Yuji Tomaru et al (2004) : Aquatic Microbial Ecology. 34,207-218.

西村昭史・他(2008) : 平成 19 年度三重科技セ水産研究部事業報告. 44-46.

表 5 栄養塩添加・非接種区で培養 8 日後に検出された溶藻因子の濾過性および感染性

検体	濾過サイズ	各ホスト株への感染性		
		CY	UA	抵抗性
CYタイプの溶藻因子	未処理	+(B)	+(B)	+(B)
	0.45 $\mu\text{m}$	+(B)	-(B)	+(B)
	0.2 $\mu\text{m}$	-	-	-
	0.1 $\mu\text{m}$	-	-	-
UAタイプの溶藻因子	未処理	+(B)	+(B)	+(B)
	0.45 $\mu\text{m}$	+(B)	+(B)	+(B)
	0.2 $\mu\text{m}$	-	+	-
	0.1 $\mu\text{m}$	-	+	-

(B)は、バクテリア様粒子を確認