渦鞭毛藻 *Peridinium bipes* のシスト形成に関する実験的研究岸 本 直 之*
宗 宮 功***大 西 庸 介**
大 西 正 記****Encystment of *Peridinium bipes* (Dinophyceae) in Gogawa ReservoirNaoyuki KISHIMOTO*, Yosuke OHNISHI**,
Isao SOMIYA*** and Masanori OHNISHI****

* Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshida-honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

** Kansai Environmental Engineering Center, Co., Ltd., 1-3-5 Azuchi-cho, Chuo-ku, Osaka 541-0052, Japan

*** Faculty of Science and Technology, Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta-Ohe-cho, Otsu-shi, Shiga 520-2194, Japan

**** Technical Research Center, The Kansai Electric Power Co., Ltd., 3-11-20 Nakoji, Amagasaki-shi, Hyogo 661-0974, Japan

Abstract

The dominant factors of encystment in a wild strain of *Peridinium bipes* (Dinophyceae) were studied through encystment experiments in culture medium using natural water. The wild strain of *P. bipes* and the natural water sample were collected from Gogawa Reservoir in Wakayama Prefecture. Based on the results of the encystment experiments, the optimal temperature for encystment was found to be in the range of 10 to 15 °C, and no encystment was observed at 25 °C. In addition, natural water during the water bloom of *P. bipes* induced encystment of vegetative cells. Nutrients concentrations of the natural water were very low, 0.025 mgN·l⁻¹ of nitrate ion and 0.003 mgP·l⁻¹ of orthophosphate ion, because of the uptake by phytoplanktons. Accordingly, it was inferred that resting cysts of *P. bipes* are formed during the bloom and that the new cysts serve as a seed population for the next bloom. Therefore, it is strongly required to develop countermeasures to break the daisy chain of bloom and encystment.

Key words: encystment, dinoflagellate, *Peridinium bipes*, freshwater red tide, water bloom

1. はじめに

渦鞭毛藻 *Peridinium* 属による淡水ブルームは世界各地で観測されており、淡水赤潮と呼ばれている^{1~3)}。*Peridinium* 属はその生活環の中でシストと呼ばれる休眠細胞を形成することが知られており⁴⁾、ブルームのイニシエーターとしてその役割が注目されている⁵⁾。よって、シストの発芽形成因子を把握し、自然界での挙動を明らかにすることはブルームの消長を理解するうえで重要である。

シスト形成条件についてはいくつかの研究が報告されている。*Peridinium* 属の生活環に関する研究は1970年代にPfiester^{6~8)}によって精力的に進められた。その研究の中で彼はシストの形成について実験的に検討し、栄養細胞を窒素欠乏培地に接種することによりシストの形成が誘発されることを明らかにした。その後、Spector *et al.*⁹⁾も *P. cinctum* f. *ovoplanum* について同様の報告をしている。1980年代に入ってシストの発芽形成因子そのものを目的とした研究が

報告されるようになった。Sako *et al.*^{10~12)}は高知県永瀬ダムで淡水赤潮を形成する *P. cunningtonii*, *P. penardii* についてクローン株を用いてシストの形成条件を検討し、両者とも水温 15 ~ 20 °C, 照度 5,000 ~ 10,000 lux の条件で N, P 欠乏培地で培養することにより最大の形成率を得たとし、水温 5 °C ではシスト形成が見られず、低照度ではシスト形成率が低下し、暗条件ではシストの形成が起らないことを報告している。また、Park & Hayashi^{13, 14)}は木崎湖でブルームを形成する *P. bipes* f. *occulatum* のシスト形成至適条件として水温 15 ~ 20 °C, 光強度 30 ~ 105 μmol-quanta·m⁻²·s⁻¹ を報告している。Chapman & Pfiester¹⁵⁾は *P. cinctum* と *P. willeyi* のシスト形成の第一要因として窒素の欠乏を挙げ、第二要因として光の照射を挙げている。以上の報告をまとめると、シスト形成には栄養塩欠乏と光の照射が必要であり、水温条件は 15 ~ 20 °C が望ましいということが言える。しかしながら、これらの研究は栄養塩を除去した人工合成培地を用いた極端な条件下での結果であり、自然水において

* 京都大学大学院工学研究科 〒606-8501 京都市左京区吉田本町

** 関西総合環境センター 〒541-0052 大阪市中央区安土町 1-3-5

*** 龍谷大学理工学部 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

**** 関西電力㈱総合技術研究所 〒661-0974 兵庫県尼崎市若王子 3-11-20

完全栄養塩欠乏状態が存在するののかという点も含めて、自然水中において同様の結果が得られるのかどうかは必ずしも明確ではない。

そこで、本研究では合川貯水池（殿山貯水池）でブルームを形成する*P. bipes*野性株を用い、実際の貯水池水を培地としてシスト形成実験を実施し、自然水中でのシスト形成に及ぼす因子を検討した。

2. 方 法

2.1 供試藻類

合川貯水池（殿山貯水池）は、和歌山県に位置し、田辺湾に流入する日置川上流に建設されたアーチ式の殿山ダムによって堰き止められた発電用ダム湖で1957年に湛水した。総貯水量 $21.4 \times 10^6 \text{ m}^3$ 、満水時の平均水深17.1 mの一循環湖で、計4本の流入河川を有し、年回転率は約30回/年である。集水域は 294 km^2 で、約3,000人程度の居住人口を有している。合川貯水池では1978年10月以降、渦鞭毛藻の*P. bipes*による淡水赤潮の発生が確認されており（Table 1）¹⁶⁾、河川流入部を中心に淡水赤潮の形成が見られる。

サンプルは1998年11月11日に合川貯水池熊野川流入部付近（Fig. 1）で目合い $63 \mu\text{m}$ および $32 \mu\text{m}$ のプランクトンネットにて粒子画分 $32 \sim 63 \mu\text{m}$ の湖水を採取し、湖水が着色しない程度に濃縮後、実験室に持ち帰り、*P. bipes*栄養細胞を採取した。同時に同地点の湖水を持ち帰り、実験室にてWhatman GF/F グラスファイバーフィルターにてろ過湖水を作成した。採水時の水温は 15.0°C 、pHは7.3で、採水地点において*P. bipes*によるブルームの形成が確認された。採取された*P. bipes*は作成したろ過湖水で走光性を利用して2回藻体洗浄を行い、実験に供した。

2.2 実験方法

実験は*P. bipes*栄養細胞を $500 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ の濃度で懸濁させたろ過湖水 150 mL を 200 mL の三角フラスコに注入し、Table 2に示す条件で静置培養を行った。ろ過湖水の硝酸態窒素濃度は $0.025 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ 、リン酸態リン濃度は $0.003 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$ であった。通常、ブルームが発生していない状態の殿山ダム湖水中の硝酸態窒素濃度およびリン酸態リン濃度はそれぞれ

Fig. 1 Overview and sampling point of Gogawa Reservoir.

Table 1 Monthly occurrence of freshwater red tide in Gogawa Reservoir.¹⁶⁾

Year	Jan	Feb	mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
1957						Open						
⋮												
1978										●	●	●
1979	-	-	-	-	-	●	●	●	●	●	●	●
1980	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●	●	●
1981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●	●
1982	●	-	-	-	●	●	●	-	-	●	●	●
1983	●	●	●	●	●	●	●	●	-	●	●	●
1984	-	-	-	-	●	●	●	●	●	-	●	●
1985	●	●	-	-	●	●	-	-	●	●	●	●
1986	-	-	-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1987	●	●	●	●	●	●	●	-	-	●	●	●
1988	●	●	●	●	●	-	●	-	●	●	●	●
1989	●	-	-	-	-	●	●	●	No measurement			●

Table 2 Experimental conditions for encystment

Case	Water temp. (°C)	Medium	Irradiance (μ -Einstein $m^{-2} s^{-1}$)
No.1	10	Filtrated lake water (FLW)	79.8
No.2	15		
No.3	20		
No.4	25		

れ0.1 mgN・ l^{-1} および0.006 mgP・ l^{-1} 程度であり、実験に使用した湖水は植物プランクトンによる栄養塩摂取の影響でかなり栄養塩濃度が低い状態であった。細胞数の計数は培養液1 mlを採取し、ホルマリン固定後、蛍光顕微鏡下で栄養細胞、接合子、シストを区別して計数した。計数時にはクロロフィルaによる蛍光の有無を確認し、クロロフィルaの蛍光が確認された細胞を生細胞と見なした。計数は培養開始後40日目までは4日毎に、それ以降60日目までは5日毎に、それ以降は概ね10日毎に行った。実験はすべて3連培養で行った。

シスト形成率の計算には渡辺ら¹⁷⁾が用いた式(1)と畑ら¹⁸⁾が用いた式(2)がある。

$$R_{en} = \frac{2N_h}{N_v + 2N_h} \quad (1)$$

$$R_{en} = \frac{N_h}{N_v} \quad (2)$$

ここで、 R_{en} : シスト形成率、 N_v : 栄養細胞数 (cells・ ml^{-1})、 N_h : 接合子 (接合子+シスト) 数 (indiv.・ ml^{-1}) である。式(1)は接合子やシストが有性生殖によって形成されることを考慮した式で、式(2)は個体数に基づいた形成率といえる。ここでは渡辺らが用いた式(1)の考え方にに基づき、以下の式により実験開始 t 日後の接合率およびシスト形成率を計算し

た。

$$R_{cy} = \frac{2N_h}{\text{Max}(N_v + 2N_h)_t} \quad (3)$$

$$R_{en} = \frac{2N_c}{\text{Max}(N_v + 2N_h)_t} \quad (4)$$

ここで、 R_{cy} : 接合率、 N_c : シスト数 (indiv.・ ml^{-1})、 $\text{Max}(N_v + 2N_h)_t$: 実験開始から t 日後までに観測された $N_v + 2N_h$ の最大値 (cells・ ml^{-1}) を表す。分母に最大値を採ったのは栄養細胞の死滅に伴って、シスト数が変化していないにも関わらず見かけ上接合率やシスト形成率が上昇することを防止するためである。

3. 実験結果および考察

Fig. 2 に本研究で観察された栄養細胞や接合子の光学顕微鏡写真を示す。栄養細胞は運動性配偶子を形成し、2つの配偶子が接合して接合子を形成した。接合子は接合直後は運動性を有していたが(運動性接合子: Planozygote)、次第に運動性を失っていった(非運動性接合子: Aplanozygote)。非運動性接合子には2つの核が認められた。非運動性接合子はさらに成熟し、最終的に明瞭な赤斑を有する休眠シスト(休眠接合子: Hypnozygote)に変化した。

実験条件No. 1~4における全細胞数と接合率およびシスト形成率の経時変化をFig. 3に示す。水温10℃と15℃の変化パターンは類似しており、全細胞数は培養開始後、増加し始め、16~20日目で最大値(初期値の約2倍)に達した。その後、36~45日頃から徐々に減少し転じた。接合は細胞数が最大値に達する直前の12日目から観測され、接合率は全細胞数が減少しはじめる41日頃に最大値(10℃で34%, 15℃で44%)に達し、その後減少しはじめた。完全なシストは30日目前後から観測され、シスト形成率は41

Fig. 2 Light micrographs of encystment in *P. bipes*.

(a) Vegetative cell, (b) Fusion of gametes, (c) Planozygote, (d) Aplanozygote, (e) Aplanozygote, (f) Hypnozygote (resting cyst)

Fig. 3 Effect of water temperature on zygosis and encystment. Error bars show standard deviations of samples.

～45日目以降、5%前後で推移した。水温20℃の条件では培養初期の全細胞数、接合率の変化は水温10℃、15℃と同様であったが、24日目を境に急速に低下した。シスト形成率も24日目に最大値3.6%を記録した後、接合率の低下とともに速やかに低下し、最終的に0.5%程度の低い値で推移した。また、水温25℃では接合子およびシストの形成は全く確認されなかった。

これらの結果から、本 *P. bipes* のシスト形成は水温10～20℃の範囲で見られるものの、シスト形成率から判断して水温10～15℃が最適であると判断される。木崎湖の *P. bipes* (最適水温15～20℃)¹⁴⁾と比較するとやや低温を嗜好する傾向にあるが、これはサンプリング時の水温(15℃)の影響を受けている可能性がある。最終的なシスト形成率は木崎湖の *P. bipes* (Max. 36%)¹⁴⁾や他の *Peridinium* (*P. cunningtonii*, Max. 70%)¹⁰⁾; *P. penardii*, Max. 40%)¹²⁾に比較して低い値となっているが、これは、上記の研究では、本研究における接合率をシスト形成率として記述していることに起因している。本研究における最大接合率は、15℃で34%、20℃で44%であり、接合率を基準として考えれば、木崎湖の *P. bipes* や *P. penardii* の結果と同等であるといえ

る。

シスト形成パターンについては全細胞数の増加から9日程度のタイムラグで接合が始まり、さらに数日のタイムラグでシスト形成が起こることがわかる。Sako *et al.*¹²⁾は窒素もしくはリンを取り除いたMW2培地を用いて *P. penardii* の培養を行い、培養10日後に接合子形成を確認している。種は異なるものの本研究結果は栄養塩欠乏培地で培養した *P. penardii* と同様のシスト形成パターンを示しており、本研究で使したろ過湖水は、シスト形成という点において栄養塩欠乏培地と同等であるといえよう。つまり、*P. bipes* のシスト形成は完全栄養塩欠乏培地でなくともある程度の貧栄養状態に曝露されることにより誘起され、このような状態は自然の湖沼や貯水池においてブルーム形成時に一般に起こり得ると言える。Park & Hayashi¹⁴⁾は木崎湖において *P. bipes* のシスト形成がブルーム形成時に起こることを報告しており、本結果は彼等の観測結果を裏付けるものである。

4. 結 論

本研究では殿山ダム貯水池でブルームを形成する

Peridinium bipes 野性株を用い、実際の貯水池水を培地としてシスト形成実験を実施し、自然水中でのシスト形成に及ぼす因子を検討した。得られた結論を以下に要約する。

- 1) シスト形成の至適水温は 10～15℃であった。
- 2) 完全栄養塩欠乏状態でなくとも貧栄養状態に曝露されることによりシスト形成が誘発される。
- 3) 自然界においてブルーム形成時にはシスト形成に必要な貧栄養状態が創出される。

このように、自然界においてはブルーム形成時を中心としてシストが形成され、その結果、湖底に集積したシストが翌年のブルーム形成のための種の供給源として働くものと考えられる。つまり、ブルームが次のブルームを呼ぶ連鎖構造となっており、このような悪循環を断ち切る対策の立案が求められている。その意味では、シスト形成が終了した冬季に湖底覆砂を行って翌年のシストの発芽を抑制したり、冬季に底泥浚渫を行ってシストを除去する等、シストの形成時期を考慮した底質対策も一考の価値があると言えよう。

(原稿受付 2001 年 9 月 21 日)

(原稿受理 2002 年 6 月 28 日)

参 考 文 献

- 1) Horne, A. J., Javornichky, P. and Goldman, C. R. (1970) A freshwater "Red Tide" on Clear Lake, California, *Limnol. Oceanogr.*, **15**, 684-689.
- 2) Herrgesell, P. L., Sibley, T. H. and Knight A. W. (1976) Some observations on dinoflagellate population density during a bloom in a California reservoir, *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 619-624.
- 3) Pollinger, U. and Serruya, C. (1976) Phased division of *Peridinium cinctum* f. *westii* (Dinophyceae) and development of the Lake Kinneret (Israel) bloom, *J. Phycol.*, **12**, 162-170.
- 4) 宗宮功, 岸本直之 (1998) ダム貯水池で発生する淡水赤潮の現状と問題点, *ダム技術*, (144), 4-10.
- 5) Kishimoto, N., Ohnishi, Y., Somiya, I. and Ohnishi, M. (2001) Behavior of *Peridinium bipes* (Dinophyceae) resting cysts in the Asahi Reservoir, *Limnology*, **2**(2), 101-109.
- 6) Pfister, L. A. (1975) Sexual reproduction of *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum* (Dinophyceae), *J. Phycol.*, **11**, 259-265.
- 7) Pfister, L. A. (1976) Sexual reproduction of *Peridinium willei* (Dinophyceae), *J. Phycol.*, **12**, 234-238.
- 8) Pfister, L. A. (1977) Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae), *J. Phycol.*, **13**, 92-95.
- 9) Spector, D. L., Pfister, L. A. and Triemer, R. E. (1981) Ultrastructure of the dinoflagellate *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum*. II. Light and electron microscopic observations on fertilization, *Amer. J. Bot.*, **68**(1), 34-43.
- 10) Sako, Y., Ishida, Y., Kadota, H. and Hata, Y. (1984) Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries*, **50**(5), 743-750.
- 11) Sako, Y., Ishida, Y., Kadota, H. and Hata, Y. (1985) Encystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries*, **51**(2), 267-272.
- 12) Sako, Y., Ishida, Y., Nishijima, T. and Hata, Y. (1987) Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium penardii*, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries*, **53**(3), 473-478.
- 13) Park, H. and Hayashi, H. (1992) Life cycle of *Peridinium bipes* f. *occulatum* (Dinophyceae) isolated from Lake Kizaki, *J. Fac. Sci. Shinshu Univ.*, **27**(2), 87-104.
- 14) Park, H. and Hayashi, H. (1993) Role of encystment and excystment of *Peridinium bipes* f. *occulatum* (Dinophyceae) in freshwater red tides in Lake Kizaki, Japan, *J. Phycol.*, **29**, 435-441.
- 15) Chapman, A. D. and Pfister, L. A. (1995) The effects of temperature, irradiance, and nitrogen on the encystment and growth of the freshwater dinoflagellate *Peridinium cinctum* and *Peridinium willei* in culture (Dinophyceae), *J. Phycol.*, **31**, 355-359.
- 16) 池田知司 (1996) 淡水赤潮を形成する渦鞭毛藻類 *Peridinium bipes* f. *occulatum* の培養及び数値モデルによる増殖要因の解析, pp. 9-14, 京都大学博士学位論文.
- 17) 渡辺信, 渡辺正孝, 福代康夫 (1982) 赤潮鞭毛藻類のシスト形成と発芽 I. *Scripsiella trochoidea* におけるシスト形成の誘起条件について, *国立公害研究所研究報告*, **30**, 27-42.
- 18) 畑幸彦, 西島敏隆, 藤岡敏修 (1984) § 6 ペリディニウムの増殖生理およびシストの形成と発芽, 「永瀬ダム湖における淡水赤潮の発生機構に関する研究」(畑幸彦編), pp.135-137, 高知県委託研究報告書.