

令和6年度 水質保全研究助成 成果報告会

琵琶湖で新たにブルームを形成するようになった微細藻類の分類学的・水処理生物学的研究



琵琶湖周辺に生息する日本一長いミミズ！ハッタミミズを大 ...

YouTube ひわこのちからチャンネル【琵琶湖博物館公式】 2023/02/03

YouTube



大塚 泰介
根来 健
(琵琶湖博物館)

おしながき

1. 研究目的
2. 研究方法
3. この3年間で論文を出版できた種
Raphidiopsis raciborskii, *Fragilaria longifusiformis* ssp. *euromfusiformis*, *Cymbella compactiformis*, *Cymbella janischii*
4. 一定の進展はあったものの論文報告に至らなかった種
Dolichospermum minisporum sensu Ohtsuka et al., *Uroglenopsis* sp., *Discostella* sp., *Achnantheidium catenatum*, *Sellaphora constricta*
5. 「微小円盤状珪藻」定量方法の検討
6. プランクトン図鑑の作成
7. 今後の課題
8. 本研究と関連した成果公表（2024年度分）

1. 研究目的

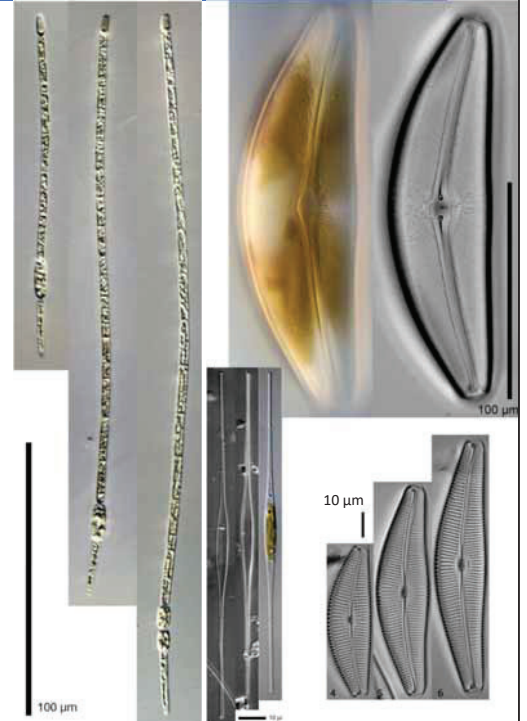
- 今世紀に入って新たに琵琶湖および内湖でブルームを生じるようになった微細藻類のいくつかについて
 - 形態、遺伝子、発生状況などの基本情報を解明
 - 浄水場などへの影響を検討
- 琵琶湖博物館で作成を進めているプランクトン図鑑に、当該種の基本的情報を掲載する。
- さらに琵琶湖集水域で最近になって見られるようになった付着藻類のうち、HAB（有害藻類ブルーム）を引き起こす恐れがある種についても、同定して出現状況を報告する。

2. 研究方法

- 烏丸半島（琵琶湖南湖東岸）および西の湖でプランクトンネットおよび採水によってプランクトンを定期的に採集する。
- 関係者から寄せられた情報を手がかりに、サンプルをいただいたり現地に採集に行ったりして追加材料を集める。
- 珪藻についてはクリーニングをして殻だけにした上で、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡で形態観察する。
- 同定が困難な場合には十分な文献調査を行った上で、専門家に同定を依頼する。
- 必要に応じて単離培養を行い、国立科学博物館の辻 彰洋博士に送って遺伝子（主に *rbcL*）解析を行って同定を確認する。

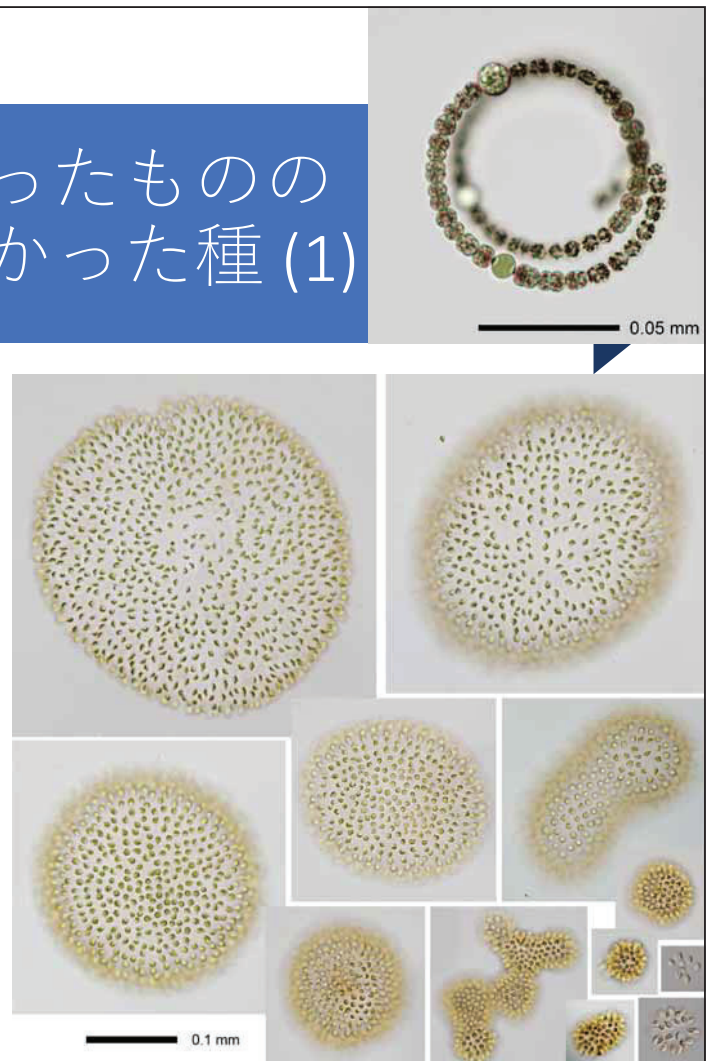
3. この3年間で論文を出版できた種

- *Raphidiopsis raciborskii* は、2022年11月に近畿圏で初めて琵琶湖博物館生態観察池で見つかり、同年秋と翌2023年夏に大発生した。しかし2024年に行われた池干しによってほとんど出現しなくなった。
- *Cymbella janischii* は、2022年5月に近畿圏で初めて安曇川の朽木地域で見つかった。しかしそれ以降も分布は狭い範囲に留まり、他地点への拡散は認められていない。
- *Fragilaria longifusiformis* ssp. *euofusiformis* は、2021-22年冬に琵琶湖南湖および西の湖で *Ulnaria japonica* に次ぐ優占種となった。2024年1月にも南湖で増加したが、この際に濾過閉塞障害は起こらなかった。
- *Cymbella compactiformis* は、2020年頃から天野川や犬上川などで目立ってきた。しかし今のところ、本種を優占種とする付着珪藻ブルームは観察されていない。



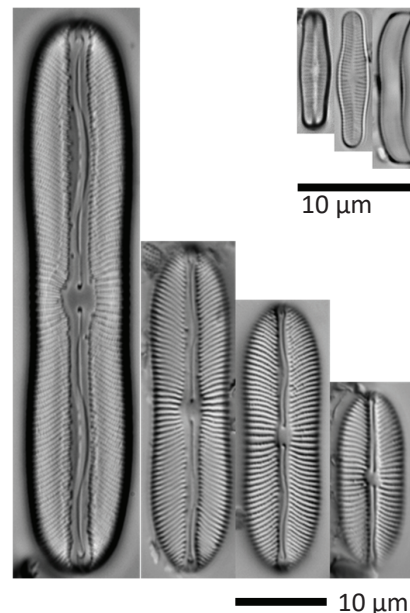
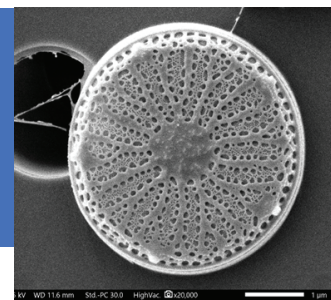
4. 一定の進展はあったものの論文報告に至らなかった種 (1)

- 琵琶湖で2020年から出現している“*Dolichospermum minisporum*”は、辻彰洋らの遺伝子解析によって別属である可能性が示された。しかしその後、詳細な検討はできていない。
- 琵琶湖のウログレナには複数種が混在している疑いがかけられた。しかし複数の場所で採集された多様な形態の100群体の *rbcl* 遺伝子を解析したところ、全て同種で遺伝的変異もほとんどないことが明らかになった。ただし本種は *Uroglenopsis americana* より *Uroglenopsis botrys* に近縁な、おそらくは新種である（投稿準備中）。
- 琵琶湖南湖では2024年11月から2025年2月にかけてまとまった量のウログレナが発生し、12月上旬にはもう少しで赤潮になるレベルにまで増加した。

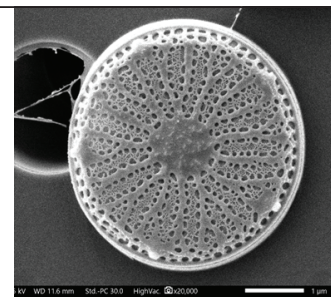


4. 一定の進展はあったものの論文報告に至らなかった種 (2)

- 琵琶湖南湖で冬期に優占することがある直径3~5 μm の超小型円盤形珪藻は、Chang & Chang-Schneider (2008) が *Discostella nana* (Hustedt) T.P.Changの組み替え論文で示した電子顕微鏡写真と形態がよく一致した。しかし本種の条線は光学顕微鏡下でも十分に解像可能であるのに対して、Hustedt (1957) の原図には条線が描かれておらず、Simonsen (1987) が示したタイプ写真でも、原記載と形態的に一致するものは条線がずっと細かいので、別種の可能性が高い。単離培養による遺伝子の調査に成功していないため、未だ新種記載に踏み切れず。
- 琵琶湖博物館生態観察池で発生していた *Achnantheidium catenatum* は、2024年に池干しを行った後、ほとんど発生していない。報告論文の執筆に必要な情報が揃っているが、まだ執筆に取りかかれていない。
- 犬上川と堅田内湖から見つかри、当初 *Sellaphora tanghongquii* としていた珪藻は、後の文献調査で *Sellaphora constricta* が正名であることが明らかになった。現在、九州からの出現報告と併せて報告論文を執筆中である。



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討 (1) 問題の所在

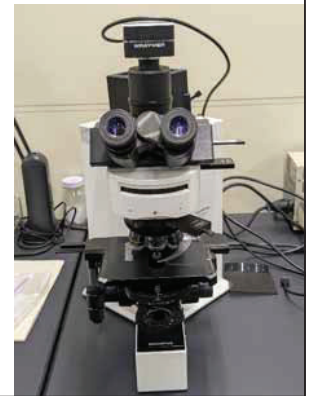


- 根来健は、冬期に琵琶湖南湖あるいは北湖港湾部などで、直径3~5 μm の微小な円盤形珪藻が 10^4 cells/mlオーダーで優占していることを発見した。そして冬期、ピコプランクトンの発生が少ない時期にしばしば起こる濾過漏出障害の原因になっていることを示唆した。
- 本種は *Discostella* 属の、おそらくは新種であることが明らかになった。
- しかし本種はあまりに小さいため、通常のプランクトン計数板を用いて100~200倍で観察しても、ほぼ確実に見逃される。
- 一方、ピコプランクトンが濾過漏出障害を起こすときと比べて細胞数が1桁以上少ないので、ピコプランクトンの計数法も検出に向かない。
- それではどのようにすれば、本種のような微小珪藻を確実に定量することができるだろうか？
- そこで、2025年2月27日に烏丸半島前の琵琶湖南湖で得た試水を材料として、3つの計数方法による定量結果の比較検討を試みた。

5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(2) 3つの計数方法

- SEMによる定量
- 倒立顕微鏡＋プランクトン計数板による定量
- 微分干渉顕微鏡＋セキスイ検鏡プレートによる定量



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(3) SEMによる定量

- 10 mlの試水を直径25 mm、孔径2 μm のPCTEフィルタで濾過する（濾過面の直径16 mm）。
- フィルタの一部を切り取って試料台に貼り、ホットプレート上で乾燥させる。
- 試料を白金によりイオンコーティングする。
- SEMを用いて、一定の間隔で選んだ視野を2,000倍で写真撮影していく（今回は54視野）。
- パソコン上で撮影された像に含まれる珪藻の被殻を同定計数する。

5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(4)倒立顕微鏡×プランクトン計数板による定量

- 試水をプランクトン計数板（松浪硝子工業）に注ぎ、倒立顕微鏡のステージ上に**30分間**静置する（珪藻を全て底まで沈めるため）。
- 倒立顕微鏡で**40倍**の対物レンズを用い、適当に間隔をあけながら、**0.5 mm×0.5 mm**のマスキ内に殻の中心がある珪藻を全て同定計数していく。



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(5)微分干渉顕微鏡×セキスイ検鏡プレートによる定量

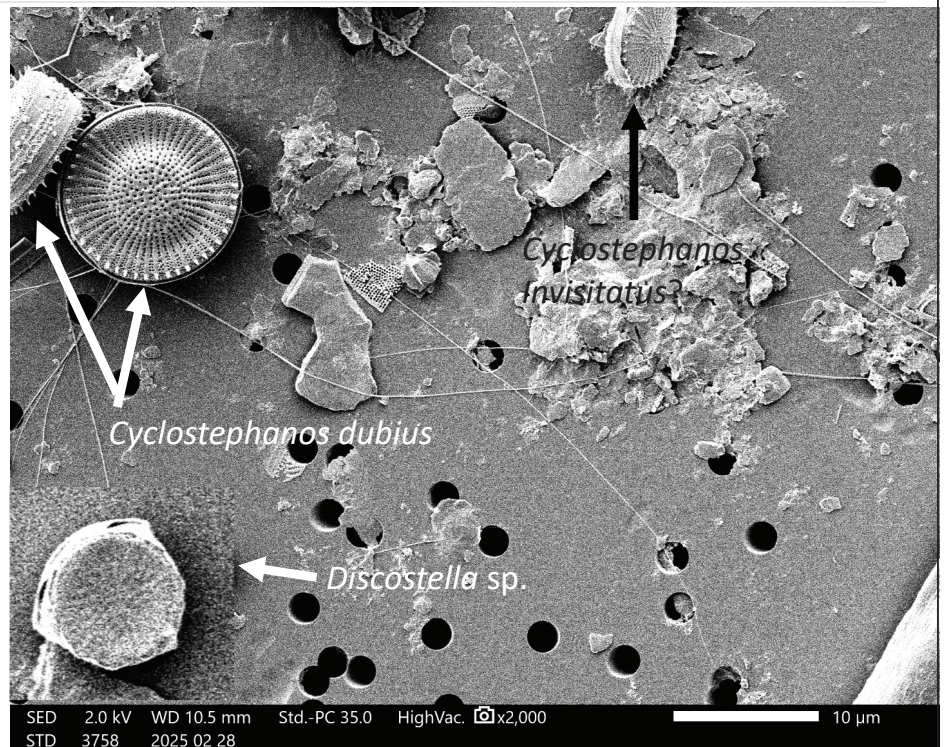
- 6本の遠沈管に試水**10 mL**ずつを注ぎ、自動遠心分離機で**450 G・3分間**遠心分離した後、斜めに堆積した沈殿物を底に沈めるため手回し遠心分離機で約**250 G・1分間**遠心分離して上澄みを捨てた。
- 沈殿物を口径**0.22 μm** のシリンジフィルタで濾過した湖水で洗い、1本の遠沈管に集めて、濾過湖水を加えて液量を**3 mL**にした試料中に懸濁させた（**20倍濃縮**）。
- この試料をセキスイ検鏡プレート（積水マテリアルソリューションズ）に注ぎ、微分干渉装置を備えた生物顕微鏡**BX60**（オリンパス光学）のステージ上に**10分間**静置して珪藻を全て底まで沈めた。
- 接眼グリッド（**10 mm×10 mm**；**40倍**対物レンズを用いた際にプレパラート上の**250 μm ×250 μm** をカバーすることを確認済み）を用いて、その内側に細胞の中心がある藻類を全て同定計数した。およそ**1 mm**間隔で視野を移動しながら**100**視野を観察して計数値を得た。



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(6)SEM 2000倍で見える世界

- SEM、2000倍で撮影した写真では、同定形質が概ね写り込んでいるため、小型円盤型珪藻の同定が可能になる。
- ただし生細胞については殻の裏面が観察できないので、同定に迷うことがある。

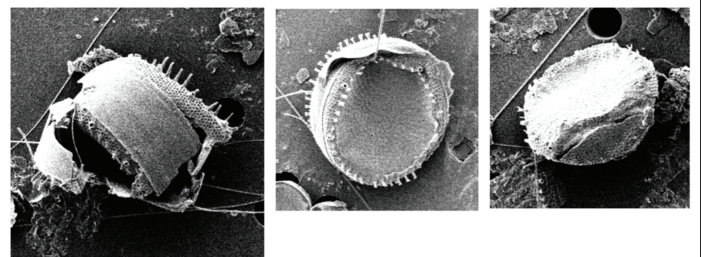


5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

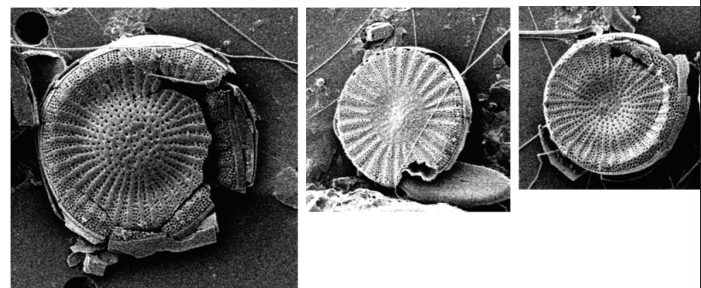
(7)割れた珪藻の殻をどう扱うか？

- SEM観察では試料処理の際に濾過と乾燥を行うため、硬い殻をもたない藻類はほぼ観察できない。
- そして珪藻についても、変形したり割れたりしたものが数多く観察される。
- そこで今回、変形したり割れたりしていても被殻の全体が残っているものは計数し、ごく一部でも欠けているものは計数しなかった。

計数した



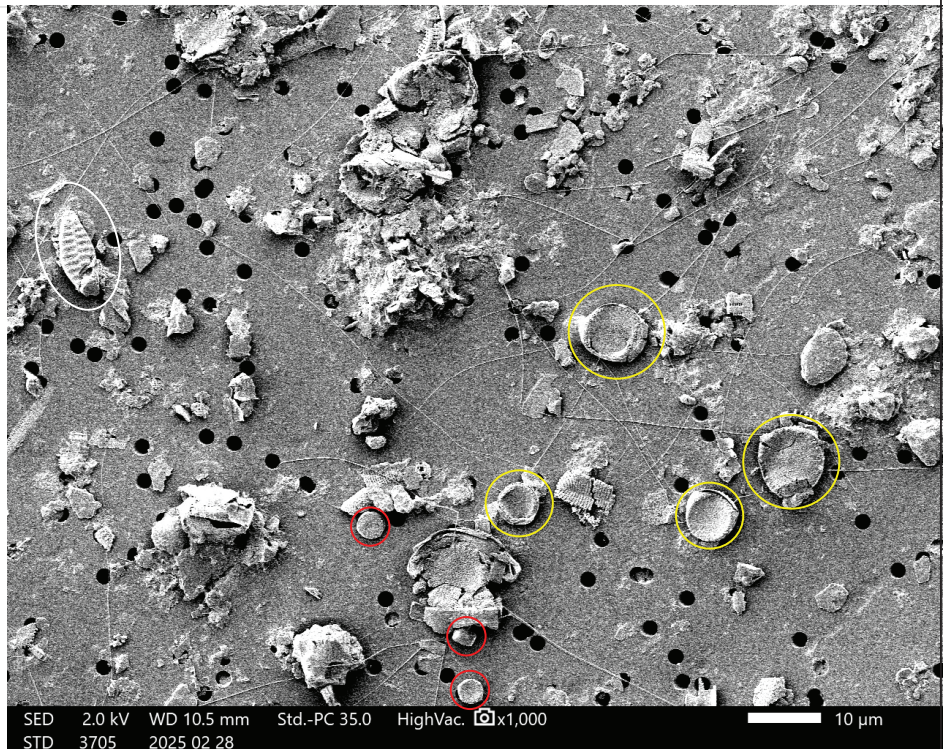
計数しなかった



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(8) SEM 1000倍での観察および水凍結乾燥法

- 倍率を1,000倍に下げると観察時間を大幅に短縮できるが、もはや小型円盤型珪藻の同定形質は写り込んでいない。
- 潰れやすい藻類を計数するために水凍結乾燥法によるプレパレーションも試みたが、藻類が周縁部にたまってしまったため断念。



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(9) 倒立顕微鏡400倍で見える世界

- これは観察視野（直径約600 μm）の1/4程度を撮影したものだが、どこに*Discostella* sp. が写っているか、わかるだろうか？



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(10) 微分干渉顕微鏡400倍で見える世界

水浸レンズで撮影



10 μm

- これはグリッド内視野（250 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ ）よりもやや広い範囲を撮影したものである。
- 倒立顕微鏡による観察よりは *Discostella* sp. が判別しやすくなった...のか？
- また、珪藻の殻骸が、より観察しやすくなった。→大型の円盤状珪藻は半数以上が殻だけ。



5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討

(11) 計数結果の比較

SEMによる定量

種	カウント	細胞密度 (cells/ μl)
<i>Discostella</i> sp.	33	4.0
<i>Discostella woltereckii</i> ?	1	0.1
<i>Stephanodiscus minutulus</i>	11	1.3
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> f. <i>tenuis</i>	2	0.2
<i>Stephanodiscus bideranus</i> var. <i>oestrupii</i>	27	3.3
<i>Cyclostephanos dubius</i>	7	0.8
<i>Cyclostephanos invisitatus</i>	9	1.1
<i>Cyclotella atomus</i>	1	0.1
(他の円盤形珪藻計)	58	7.0
<i>Aulacoseira ambigua</i>	3	0.4
<i>Asterionella formosa</i>	1	0.1
<i>Fragilaria</i> sp.	1	0.1
<i>Staurosirella</i> sp.	2	0.2
<i>Sellaphora pupula</i>	1	0.1
<i>Achnanthyrium</i> sp.	1	0.1
<i>Nitzschia draveillensis</i>	1	0.1
<i>Nitzschia fonticola</i>	1	0.1
<i>Sellaphora saugerresii</i>	2	0.2
<i>Sellaphora nigri</i>	1	0.1

倒立顕微鏡による定量

分類群	カウント	細胞密度 (cells/ μl)
<i>Discostella</i> sp.	22	1.8
(他の円盤形珪藻)	34	2.7
<i>Asterionella formosa</i>	4	0.3
<i>Aulacoseira pusilla</i>	4	0.3
<i>Nitzschia subacicularis</i> ?	2	0.2
<i>Nitzschia</i> sp.	1	0.1
Komma?	4	0.3
<i>Trachelomonas</i> ?	1	0.1
<i>Pseudanabaena</i> sp.	23	1.8

微分干渉顕微鏡による定量

分類群	カウント	細胞密度 (cells/ μl)
<i>Discostella</i> sp.	34	3.9
(他の円盤形珪藻)	23	2.6
<i>Asterionella formosa</i>	5	0.6
<i>Fragilaria</i> sp.	2	0.2
<i>Pinnularia</i> sp.	1	0.1
<i>Chroomonas</i> ?	1	0.1
Komma?	1	0.1
<i>Monoraphidium</i> ?	1	0.1
球形の緑藻	1	0.1

5. 「微小円盤状珪藻」 定量方法の検討 (12) 計数方法まとめ

- 2025年2月27日の琵琶湖南湖では微細な*Discostella* sp. が優占していなかった(4×10^3 cells/ml程度)が、それでも湖水10 μ l程度の定量により、十分に信頼できる計数値が得られた。
- SEM観察は微細珪藻の種同定を可能にする点で優れているが、結果が分かるまでに時間がかかりすぎ、試料をつくる段階で多くの珪藻の被殻を壊している可能性がある。また、細胞の生死判定ができないため、死細胞が多い場合には細胞数を過大評価することになる。
- 倒立顕微鏡＋プランクトン計数板による観察は最も簡易であるが、プランクトン計数板の光学特性の悪さにより、5 μ m以下の珪藻では見逃しが多くなる。
- 遠沈濃縮した試水を微分干渉顕微鏡＋セキスイ計数プレートで観察する方法では、ごく小型の珪藻でもあまり見逃していないことがわかったが、正確な定量には相当の修練が必要である。

6. プランクトン図鑑の作成 (1) 電子図鑑作成の方針

- ▶ 琵琶湖で新たに出現した、HABを形成しうる微細藻類の分類は、検討すればするほど「わかっていないことがよくわかる」ばかりで、このままでは一向に現場で使える知識にならない。
- ▶ そこで見切り発車の格好で、電子図鑑の原稿作成を始めた。
- ▶ 手始めにアオコをつくるラン藻について、琵琶湖とその集水域に出現する種を網羅する図鑑を作成している。
- ▶ この図鑑には、顕微鏡写真、大きさ、形態の特徴の他、琵琶湖で出現した時期、長期的盛衰、毒性、環境への影響などの情報を網羅し、引用文献もつけている。



本当はサンプルページをお見せできるはずだったのですが、
・・・データベース公開システムのエラーで表示できません。

6. プランクトン図鑑の作成

(2) 琵琶湖でアオコをつくるラン藻

- ▶ これまでの文献調査と遺伝子に基づく検討、そして撮りためた写真の精査により、琵琶湖および集水域ではガス胞をもつ浮遊性ラン藻が少なくとも24種発生してきたことが明らかになった。

<i>Dolichospermum affine</i>	“ <i>Dolichospermum minisporum</i> ”	“ <i>Planktothrix pseudagardhii</i> ”
<i>D. crassum</i>	<i>Sphaerospermopsis eucompacta</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
<i>D. flos-aquae</i>	<i>S. oumiana</i>	<i>M. flos-aquae</i>
<i>D. hangangense</i>	<i>Raphidiopsis raciborskii</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>
<i>D. mucosum</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>M. novacekii</i>
<i>D. smithii</i>	<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	<i>M. smithii</i>
<i>D. ucrainicum</i>	<i>Oscillatoria kawamurae</i>	<i>M. viridis</i>
<i>D. sp. cf. circinale</i>	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	<i>M. wesenbergii</i>

ただしその多くが、発生終期になって異形細胞やアキネートが成熟したり、群体が成長するのを待たないと同定できないーミネルヴァの梟は黄昏時に飛び立つ

7. 今後の課題

- 近年になってふえはじめた微細藻類の可及的速やかな同定と情報提供
 - ▶ 論文執筆が追い付いていない。寄せ手（共同研究者）を求む！
- 水道生物としての有害種の増加を手早く検出する技術の確立
 - ▶ *Dolichospermum*のカビ臭物質生成種あるいは有毒種を、アキネートが発達しない初期に類似種と区別する技術の開発（顕微鏡観察か、遺伝子検査か？）
 - ▶ *Discostella* sp.のようなナンノプランクトン下限に近いサイズの微細藻類が、濾過漏出障害が起こるレベルで増えてきたときに、いち早く検出する技術の開発（常にバックグラウンドで少し出現しているのである程度の定量性が必要）
- 技術講習と電子図鑑の整備
 - ▶ 水処理生物基礎講座との連携
 - ▶ 電子図鑑「琵琶湖のプランクトン」の公開（5月までにアオコの原因となるラン藻全種を公開予定）
- 次世代の「形態も分子もできる」微細藻類研究者・技術者の育成

8. 本研究と関連した成果公表（2024年度分）

学会発表など

根来 健. 浄水処理（水道）と珪藻類. 日本珪藻学会第45回大会 公開シンポジウム「珪藻と社会」、2024年6月23日、酪農学園大学.

根来 健・大塚泰介. プランクトンの変動. 令和6年度日本水産学会秋期大会水産環境保全委員会企画研究会 琵琶湖における環境変動と漁業生産の変化：瀬戸内海と比較して考える、2024年9月27日、京都大学.

根来 健. 環境調査において過小評価される淡水産浮遊珪藻とその特性. 日本珪藻学会第43回研究集会 公開シンポジウム「珪藻が出ない!」、2024年10月20日、琵琶湖博物館.

一瀬 諭・根来 健・大塚泰介・辻 彰洋. 琵琶湖南部・瀬田川に突然出現した*Coronia echeneis* (Ehrenberg ex Kützinger) Ehrenberg について. 日本水処理生物学会第60回大会、2024年11月3日、姫路市市民会館.

根来 健・大塚泰介. 琵琶湖で再増殖し始めた直鎖型 *Aulacoseira ambigua*. 日本水処理生物学会第60回大会、2024年11月3日、姫路市市民会館.

根来 健・大塚泰介. 滋賀県安曇川中流域で増殖を始めた外来性ミズワタクチビルケイソウ. 日本陸水学会近畿支部会第36回研究発表会、2025年3月8日、京都大学.

大塚泰介. 珪藻の固有種と外来種 外来種の増加は人新世の現象か？2025年日本プランクトン学会春季シンポジウム「珪藻研究の最前線」、2025年3月16日、東京海洋大学. (予定)

雑誌記事

大塚泰介・辻 彰洋 (2024) 外来珪藻はなぜ次々と見つかるようになったか？月刊海洋 56(10): 675-685.

新聞記事

大塚泰介 (2024) 植物プランクトンの盛衰①～④. ビワハツ 琵琶湖博物館研究だより. 朝日新聞滋賀版 (2024年4月7日、21日、5月5日、19日)

書籍

石上三雄・一瀬諭・大塚泰介 (2024) びわ湖のプランクトン フォト&ムービー. 文理閣

琵琶湖の小さな生き物を観察する会 (編) (2025) ミクロの世界によこそ 琵琶湖博物館マイクロアクアリウムから. 京都新聞出版センター (3月末刊行予定)