＜論 文＞

海洋プランクトンの栄養要求と

藻類培養試験による海水の富栄養評価に関する研究

Studies on Nutritional Requirements for the Growths of
Marine Planktons and Eutrophication Assessment
of Sea Water by Algal Growth Tests

林 光 則*, 葉 山 八千代*, 秋 山 広 子*, 永 井 史 郎*
Mitsunori HAYASHI Yachiyo HAYAMA Hiroko AKIYAMA Shiro NAGAI

Abstract

Marine planktons being dominant in the Inland Sea of Seto, *Gymnodinium* sp. (*Gym.* sp.), *Hemietreptia antiqua* HADA (*H. antiqua*), *Chlamydomonas* sp. (*Chl.* sp.), *Skeletonema* sp. (*Ske.* sp.) and *Navicula* sp. (*Nav.* sp.) were studied to examine the nutritional requirements for the growth and an applicability of eutrophication assessment of the sea water from the Hiroshima Bay.

Nitrogen source as nitrate and phosphorus source as phosphate were essential nutrients for the growth, however, some overplus uptake of phosphorus at the beginning of the growth could further support the growth on phosphorus free media. Cell yields based on nitrogen, $\times 10^5$ cells/ μg N and phosphorus, $\times 10^5$ cells/ μg P were measured to be 0.4 and 3.1 for *Gym.* sp., 3.0 and 28.0 for *Chl.* sp., and 7.0 and 28.6 for *Ske.* sp., respectively. The mixture of vitamin B₁ and B₁₂, and biotin enhanced the growths of *Gym.* sp., *H. antiqua* and *Nav.* sp. whereas *Chl.* sp. and *Ske.* sp. did not require the vitamins for their growths. Vitamin B₁₂ was an essential growth factor for the growths of *Gym.* sp. and *Nav.* sp.

The growth activities of *Chl.* sp. and *Ske.* sp. when they were grown on the media based on sea water from St. 1 to 3 either with or without spiking N or P or N and P suggested that nitrogen concentration in the sea water might be a growth limiting nutrient for the planktons rather than phosphorus. Relatively low concentrations of nitrogen and phosphorus might be classified the sea water of the Hiroshima Bay as a mesotrophy. The increases of growth activities of *Gym.* sp., *H. antiqua* and *Nav.* sp. when vitamin B₁₂ was spiked in the samples from St. 2 suggested that vitamin B₁₂ or its related substance might be a growth limiting factor for vitamin B₁₂-requiring plankton in St. 2.

1. 緒 言

自然水域の富栄養化の評価には水質に対する化学的分析と生物学的分析があり、後者にはさらに種々な方法があるが、そのうちバイオアッセイ手法による藻類培養試

験で藻類増殖潜在力（以下 AGP と略す）を測定して水質を評価する試みが行なわれ始めた¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。したがって、この方法による瀬戸内海の富栄養化の評価を目的と

*広島大学工学部醸酵工学科, 730 広島市千田町3-8-2

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Sendamachi, Hiroshima 730

してまず培養試験に用いる藻類を数種分離した。一般に藻類は生育に無機窒素、無機リンおよび微量の金属を要求するが、さらにビタミンなどの有機物質を要求するものがある。しかし藻類の栄養要求性は必ずしも明らかでない。そこで分離した藻類の栄養要求性および培養特性を検討して供試藻類を選定し、つぎに供試藻類を用いて広島湾海水に対する藻類培養試験を行なったので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試藻類

培養試験の接種藻類は対象水域の優占種が最適¹⁾と考えられているので瀬戸内海に良く出現する藻類を分離、同定²⁾³⁾し、このうち *Gymnodinium* sp. (以下 *Gym.* sp. と略す), *Hemietreptia antiqua* HADA (以下 *H. antiqua* と略す), *Chlamydomonas* sp. (以下 *Chl.* sp. と略す), *Skeletonema* sp. (以下 *Ske.* sp. と略す) および *Navicula* sp. (以下 *Nav.* sp. と略す) を供試藻類とした。

2.2 培養方法

基本培地は Provasoli ら⁹⁾の培地組成に準じ Table 1 に示すように調製した。

栄養要求性や培養特性の検討および AGP 測定において供試藻類はまず基本培地 (Table 1) で 3~7 日間前培

Table 1 Composition of basal medium⁹⁾

Deionized water	1000ml	Na ₂ CO ₃	30mg
NaCl	18 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.83
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	1 g
KCl	0.6	Nitrilotriacetic acid	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.13	Vitamin B ₁₂	0.2μg
NaNO ₃	50mg	Vitamin mix. S3*	10ml
K ₂ HPO ₄	5	PII metals**	30ml
Na ₂ SiO ₃	59.3	pH 7.8	

*Vitamin mix. S3(100ml)

B ₁ ·HCl	5mg	Biotin	10μg
Nicotinic acid	1	Folic acid	20
Ca-pantothenate	1	Inositol	50mg
p-Aminobenzoic acid	0.1	Thymine	30

** PII metals (100ml)

EDTA	100mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	6.3mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.7	ZnCl ₂	0.50
H ₃ BO ₃	20	CoCl ₂ ·6H ₂ O	183μg

Sterilized by autoclaving at 1 atm for 10min

Table 2 Composition of artificial sea water²⁾

NaCl	23.48 g	H ₃ BO ₃	0.03 g
Na ₂ SO ₄	3.92	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.61
NaHCO ₃	0.19	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.04
KCl	0.66	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47
KBr	0.10	Deionized water	1000ml

salinity 35‰

養後遠沈 (2000rpm, 1~15min) した。つぎに遠沈した藻体から前培養液の影響を除くため窒素、リン源およびビタミンを欠く塩分濃度 20‰ の人工海水²⁾に藻体を持ち、さらに 24 時間培養したものを種々条件の基本培地および海水試料に接種した。なお、人工海水は孔径 0.45μm のメンブランフィルターで濾過して用い、その組成は Table 2 に示した。

また、供試藻類のビタミン要求性を詳細に検討した場合は藻類をまず基本培地で前培養後、さらにビタミンを除いた基本培地で 5 日間ビタミンの飢餓培養を行なった藻体を接種に用いた。

培養は基本培地または海水試料 20ml を入れたシリコンセン (信越ポリマー製) 付 50ml 容三角フラスコを植物用蛍光灯下 4 klux の連続照明をしながら 20°C の定温水槽内に静置して行なった。

2.3 藻類量の測定

藻類量は Thoma の血球計算盤で計数した細胞個数で表わした。

Nav. sp. の場合は細胞が凝集して個数の計数が困難なので遠沈、洗浄した藻体から 90% アセトンでクロロフィル a (以下 chl. a と略す) を抽出し、抽出液の吸光度から chl. a を定量¹⁰⁾して藻類量とした。

Fig. 1 Sampling stations in the Hiroshima Bay.

St.1 Lat. 34°20'N. Long. 132°25'E.

St.2 Lat. 34°19'N. Long. 132°22'E.

St.3 Lat. 34°17'N. Long. 132°24'E.

2.4 海水の採取

海水試料は Fig. 1 に示す広島湾の 3 定点 (以下 St. と略す, すなわち St. 1 は北緯34°20', 東経132°25', St. 2 は北緯34°19', 東経132°22', St. 3 は北緯34°17', 東経132°24') の水深0.5mの表層水である。St. 1 と 2 は広島湾奥部で潮流が停滞しており, 河川, 生活廃水, 産業廃水などの影響をうけ易いように考えられ, 1, 2 とともに同じような水質と思われる。St. 3 は西南方向へ潮流があり水質は St. 1, 2 に比較して良好と思われる。採水は1977年の4月25日, 5月28日, 6月23日, 8月30日, 9月28日, 10月28日, 11月24日および12月6日に行なった。

2.5 海水試料の前処理

AGP 測定の場合, 試料を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過して用いる方法と 1 気圧, 10 分間加熱して用いる方法があり, 両方法とも論拠²⁾がある。そこで予備実験として海水試料を 2 分し, 濾過と加熱の異なる方法で処理し, いずれにも NaNO₃ 24.3mg/l (4 mg N/l) と K₂HPO₄ 2.26 mg/l (0.4 mg P/l) を添加して *Chl. sp.* と *Ske. sp.* を培養したところ, 処理方法の異なる両試料間に *Chl. sp.* では増殖の差が認められなかった。しかし *Ske. sp.* では濾過試料での増殖より加熱試料での増殖が 3~8 倍高かった。これは加熱によって高い

Fig. 3 Growth of *Navicula sp.*

Culture condition: see Fig. 2.

AGP を示すように考えられるので, 本研究では海水試料はすべて加熱して用いた。

2.6 海水試料の化学分析

採取した海水試料について COD⁽¹¹⁾, 粒状有機炭素⁽¹²⁾ (以下 POC と略す), 全無機窒素⁽¹⁰⁾ (以下 TIN と略す), 全リン⁽¹⁰⁾ (以下 TP と略す) および chl. a など定量した。ただし, TIN と TP は海水試料を孔径 0.8 μ m のフィルターで濾過した濾液について定量した。

3. 実験結果と考察

3.1 供試藻類の増殖

供試藻類の基本培地 (Table 1) における増殖経過を Fig. 2, 3 に示す。Fig. 2, 3 から明らかなように供試藻類はいずれも良く増殖し 7~10 日間の培養でほぼ最大値に達した。実験値は示さないが, このうち *Chl. sp.* は塩分濃度 16~35‰ の範囲においても, pH 6.5~8.5 の範囲においても大差なく良く増殖し環境への適応性の良さを示し代表的な供試藻類¹⁾ の 1 つと考えられる。

3.2 増殖に対する窒素とリンの影響

藻類の栄養の主因子である窒素とリンについて検討した。

基本培地 (対照, Table 1), 基本培地から NaNO₃ を除いた培地, 基本培地から K₂HPO₄ を除いた培地計 3 種類の培地にそれぞれ供試藻類を培養した。

NaNO₃ を除いた場合, *Gym. sp.* は Fig. 4 に示すように増殖しなかった。また *Chl. sp.*, *Nav. sp.* も同じ現象を示した。これは藻類の増殖に窒素源の不可欠なことを

Fig. 2 Growth of marine planktons on basal medium (Table 1) under continuous illumination of 4 klux at 20°C in a 50 ml conical flask contained 20 ml basal medium

Ske. sp.: *Skeletonema sp.*

Chl. sp.: *Chlamydomonas sp.*

Gym. sp.: *Gymnodinium sp.*

H. antiqua: *Hemieutreptia antiqua*

HADA

Fig. 4 Growths of *Gymnodinium* sp. (A) and *H. antiqua* (B) on NaNO_3 -free basal media based on Table 1

Culture conditions: see Fig. 2

- : growth on basal medium of Table 1 (control experiment)
- 1: growth on NaNO_3 -free basal medium inoculated from the control experiment
- 2: growth on NaNO_3 -free basal medium inoculated from #1 experiment
- ◇---◇3: growth on NaNO_3 -free basal medium inoculated from #2 experiment

Fig. 5 Growth of *Gymnodinium* sp. on basal medium (Table 1) eliminated K_2HPO_4

Culture conditions: see Fig. 2

- : growth on basal medium (control experiment)
- 1: growth on K_2HPO_4 -free basal medium inoculated from the control experiment
- 2: growth on K_2HPO_4 -free basal medium inoculated from #1 experiment

示している。一方 *H. antiqua* (Fig. 4) および *Ske.* sp.

は良く増殖したので増殖した藻体をさらに NaNO_3 欠除基本培地に3回植継いたがなお増殖した。そこで基本培地組成のうち衝衡剤のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンおよびキレート剤のニトリロ三酢酸の窒素化合物を除いて *H. antiqua* を培養した。この場合、植継2回目ではほとんど増殖しなかった。この結果から *H. antiqua* は NaNO_3 以外の有機化合物の窒素も利用するように考えられる。

基本培地(Table 1)からリンを除いた場合、Fig. 5に示すように *Gym.* sp. はかなり増殖し培養10日目で対照の約1/10の細胞数を示したが、この藻体をさらにリン欠除基本培地に植継いたときは(Fig. 5.2参照)増殖しなかった。*Chl.* sp., *Ske.* sp., *Nav.* sp. はこのような植継を3回行なっても若干の増殖が認められた。 NaNO_3 欠除の場合と異なり、リン飢餓培養を続けてもなお増殖することはリンを全く含まない培地でもある程度の増殖が可能であり、リン存在培地において初期の過剰摂取¹³⁾したリンを増殖に逐次利用できることを示した。

藻類培養試験では多くの場合試料液の N/P 比から制限栄養塩が推定されているので藻類の増殖と基本培地の

Fig. 6 Cell yield based on NaNO_3 uptake of *Gymnodinium* sp.

Initial amounts of NaNO_3 in basal media (Table 1) were adjusted from 0 to 50 mg/l. Initial amount of K_2HPO_4 was 5 mg/l in composition of basal medium.

Culture conditions: see Fig. 2

Initial inoculum size: 0.5×10^4 cells/ml
Cell yields: cell number after 10 to 14-day cultivation

Fig. 7 Cell yield based on K_2HPO_4 uptake of *Gymnodinium* sp.
Initial amounts of K_2HPO_4 in basal media (Table 1) were adjusted from 0 to 5 mg/l. Initial amount of $NaNO_3$ was 50 mg/l in composition of basal medium.
The other conditions: see Fig. 6

Table 3 Cell yields based on nitrogen and phosphorus compound, and N/P ratios of *Gym. sp.*, *Chl. sp.* and *Ske. sp.*
N/P ratio of basal medium (Table 1): 9.3

plankton	$\times 10^5$ cells/ μ g N	$\times 10^5$ cells/ μ g P	N/P
<i>Gym. sp.</i>	0.4	3.1	7.8
<i>Chl. sp.</i>	3.0	28.0	9.3
<i>Ske. sp.</i>	7.0	28.6	4.1

窒素、リン量の関係を *Gym. sp.*, *Chl. sp.* および *Ske. sp.* について検討した。 *Gym. sp.* は 0.5×10^4 cells/ml, *Chl. sp.* と *Ske. sp.* は 2×10^4 cells/ml になるよう接種後 10~14 日間培養し最大増殖量を測定した。 **Fig. 6** に $NaNO_3$ の添加量を種々変えた基本培地 (K_2HPO_4 5 mg/l 含有) における *Gym. sp.* の増殖を示した。同じように **Fig. 7** に K_2HPO_4 の添加量を種々変えた基本培地 ($NaNO_3$ 50 mg/l 含有) における *Gym. sp.* の増殖を示した。 **Fig. 6, 7** から明らかなようにいずれの場合も増殖細胞数はそれぞれ添加 $NaNO_3$ および K_2HPO_4 量に正比例した。 **Fig. 6, 7** から計算すると 1μ g の窒素は 0.41×10^5 個の細胞, 1μ g のリンは 3.1×10^5 個の細胞の生産に対応する。したがって、これから N/P 比を算出し、同じように *Chl. sp.* および *Ske. sp.* について得た値を **Table 3**

Fig. 8 Growth yields of *Gymnodinium* sp. on vitamin (B_1 , B_{12} and biotin)-free basal medium
Culture condition: see Fig. 2
C: growth on basal medium of Table 1 (control experiment)
1: growth after inoculated from the control experiment to vitamin-free basal medium
2: growth after inoculated from #1 experiment to vitamin-free basal medium
Growth yield: cell number after 5 to 8-day cultivation
▨: inoculum size

に示した。

N/P 比は **Table 3** に示すように藻類によって多少異なるが、N/P 比が 4~9 の範囲で一般に窒素、リンがともに制限要因となる既報の $N/P = 5 \sim 10^5$ にほぼ一致した。また基本培地 (**Table 1**) の N/P 比も良い適合を示した。この比は藻体中の N/P 比にほぼ対応し、またこの比で窒素またはリンが摂取されることを示した。

3.3 ビタミンに対する栄養要求性

藻類には増殖にビタミンを要求するものがあり、このビタミンは B_1 , B_{12} , ビオチンに限定されているようである¹⁴⁾。そこで供試藻類のビタミンに対する栄養要求性を検討した。

基本培地 (対照, **Table 1**) と基本培地からビタミン (B_1 , B_{12} , ビオチン) を除いたもので供試藻類を培養した。供試藻類のうち *Gym. sp.* を 5~8 日間培養し最大増殖量を求めた結果を **Fig. 8** に示した。 **Fig. 8** に示すように *Gym. sp.* はビタミン欠除基本培地でも良く増殖したが、これは細胞内に持込んだビタミンに依存して増殖したと考えられる。すなわち、その藻体をさらにビタミン欠除基本培地に植継いだときはほとんど増殖しなかった。したがって *Gym. sp.* は増殖にビタミン (B_1 , B_{12} , ビオチン) を要求するように考えられる。 *Gym. sp.* と同じように要求性を示した *H. antiqua*, *Nav. sp.* はいずれも要求性の発現に飢餓培養が必要であるので、リンの

Fig. 9 Effect of B₁, B₁₂ and biotin on the growth of *Gymnodinium* sp.

control: vitamin-free medium eliminated vitamin from basal medium (Table 1)

■: inoculum size

□: growth after 9-day cultivation

amounts of vitamin added: B₁ 500 $\mu\text{g/l}$,

B₁₂ 0.2 $\mu\text{g/l}$, biotin 1 $\mu\text{g/l}$

Cells of 5-day cultivation on vitamin-free basal medium were inoculated to respective experiment.

場合と同じようにこれら藻類は必要量以上のビタミンを藻体に保持するようと思われる。なお *Chl. sp.* および *Ske. sp.* はビタミン要求性を示さなかった。

つぎにビタミン (B₁, B₁₂, ビオチン) 要求性を示した *Gym. sp.*, *H. antiqua*, *Nav. sp.* についてさらに詳細な要求性をビタミン (B₁, B₁₂, ビオチン) 欠除基本培地(対照)と、ビタミン欠除基本培地に B₁(500 $\mu\text{g/l}$), B₁₂(0.2 $\mu\text{g/l}$), ビオチン (1 $\mu\text{g/l}$) をそれぞれ単独あるいは組合せて添加したもので検討した。接種にはビタミン (B₁, B₁₂, ビオチン) 欠除基本培地で5日間ビタミンの飢餓培養を行なった藻体を用いた。*Gym. sp.* に対する結果を **Fig. 9** に示した。**Fig. 9** から明らかなように *Gym. sp.* は B₁₂ が存在する培地にのみ良く増殖し, *Gymnodinium nelsoni* の B₁₂ 要求性¹⁵⁾と一致した。さらに *H. antiqua* は B₁ やビオチン添加培地でもかなり増殖するが岩崎の報告¹⁶⁾のように B₁₂ 含有培地で非常に良く増殖した。*Nav. sp.* は *Gym. sp.* と同じように B₁₂ が存在する培地でのみ良く増殖した。さらに厳密な B₁₂ 要求性の検討が必要であるが, *Gym. sp.*, *H. antiqua*, *Nav. sp.* は B₁₂ で増殖が促進されることから, これら藻類の増殖量と B₁₂ 量の間に比例関係が得られれば海水試料に

Table 4 Results of chemical analysis of sampling waters

St.	1977	COD (ppm)	POC (mgC/l)	Chl. a ($\mu\text{g/l}$)	TP ($\mu\text{gP/l}$)	TIN ($\mu\text{gN/l}$)
1	Apr.	2.7	0.3	4.94	10.8	75.7
	May	2.7	3.9	11.54	14.2	29.8
	Jun.	5.6		31.55	38.4	38.6
	Aug.	4.0	2.7	6.20	18.9	19.9
	Sep.	6.4		33.74	25.1	16.8
	Oct.	2.6	1.3	14.1	19.2	10.1
	Nov.	2.5		4.89	38.4	133.3
	Dec.	1.9	0.7	4.36	33.4	135.4
	Apr.	2.2	1.7	2.38	9.9	30.8
	May	2.5	2.0	21.52	11.1	16.5
2	Jun.	3.8		12.58	42.1	16.7
	Aug.	6.0	1.4	9.41	22.9	21.8
	Sep.	5.2		8.83	25.4	12.2
	Oct.	2.2	1.5	8.0	19.2	5.5
	Nov.	2.4	2.4	5.99	37.8	144.3
	Dec.	1.9		4.11	36.9	100.9
	Apr.	1.9		3.54	8.7	23.7
	May	2.9		5.80	12.7	26.9
	Jun.	4.0		7.11	36.2	15.8
	Aug.	3.6	2.4	5.60	18.9	28.8
3	Sep.	3.3		8.72	21.7	23.2
	Oct.	2.2	0.3	1.8	78.7	14.4
	Nov.	1.9	0.2	44.5	31.3	84.3
	Dec.	1.9	0.5	3.79	31.6	61.7

COD: chemical oxygen demand

Chl. a: chlorophyll a

TIN: total inorganic nitrogen

POC: particulate organic carbon.

TP: total phosphorus

おけるこれら藻類の増殖量から試料中の B_{12} 量の推測も可能であろう。

3.4 広島湾海水に対する藻類培養試験

栄養要求性を検討した供試藻類を用い、Fig. 1 に示す広島湾の3定点から1977年4月～12月の間に採取した海水試料について培養試験を行ない、その結果と海水試料の化学分析値を比較検討した。ただし、培養試験は海水試料を加熱して用い、化学分析は海水試料をそのままあるいはその沝液 (TP, TIN) を用いた。実験方法 2.5 に示すように加熱試料と沝過試料の間に *Ske. sp.* は増殖に差があるので、培養試験で高い AGP を示すように考えられる。一方 *Chl. sp.* は両試料間に増殖差がないので、培養試験結果と化学分析値の比較に最適と思われる。試料の化学分析値は Table 4 に示した。

Table 4 の St. 1 に示すように6月～9月の間は COD, POC, chl. a 値が高く藻類量の多いことを示し、冬期で

Fig. 10 Growth of *Chlamydomonas* sp. on the media based on sea water from St. 1
Inoculation: Harvesting cells (centrifugation: 2000 rpm, 1 to 15 min) grown for 3 to 7 days on basal medium (Table 1) was inoculated in the artificial sea water (Table 2).
After 24-hr cultivation, the cells were inoculated in a test sample of sea water in the size of 2×10^4 cells/ml.
Growth: maximum cell number after 3 to 10-day cultivation under the culture conditions described in Fig. 2

Fig. 11 Growth of *Skeletonema* sp. on the media based on sea water from St. 1
Details see Fig. 10

Fig. 12 Growth of *Chlamydomonas* sp. on the media based on sea water from St. 2
Details see Fig. 10

藻類量の少ない11, 12月は TP, TIN 値が高く栄養塩の蓄積を示した。St. 2 の6月～9月の間は COD 値, 5月～10月は chl. a 値が高く, 11, 12月は TP, TIN 値が高く, St. 2 の分析値は St. 1 と同じような傾向を示した。St. 3 の分析値は6月～9月の間 COD, chl. a 値が高

Fig. 13 Growth of *Skeletonema* sp. on the media based on sea water from St. 2
Details see Fig. 10

Fig. 15 Growth of *Skeletonema* sp. on the media based on sea water from St. 3
Details see Fig. 10

Fig. 14 Growth of *Chlamydomonas* sp. on the media based on sea water from St. 3
Details see Fig. 10

St. 1, 2, 3 の試料について *Chl.* sp. および *Ske.* sp. による培養試験を行なった。すなわち試料 (対照) と、試料に NaNO_3 を 24.3 mg/l (4.0 mg N/l)³⁾ 添加したもの、試料に K_2HPO_4 を 1.55 mg/l (0.275 mg P/l)³⁾ 添加したもの、試料に NaNO_3 を 24.3 mg/l (4.0 mg N/l) と K_2HPO_4 を 1.55 mg/l (0.275 mg P/l) 添加したものの計 4 種類に接種して培養した。いずれも $2 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ になるよう接種後 3~10 日間培養し最大増殖量を測定した。St. 1 の結果は Fig. 10 と Fig. 11, St. 2 の結果は Fig. 12 と Fig. 13, St. 3 の結果は Fig. 14 と Fig. 15 に示した。

St. 1 の *Chl.* sp., *Ske.* sp. いずれの場合 (Fig. 10, 11) も対照とリン添加のものは同じ AGP を示したが窒素添加のものは高い AGP を示し、窒素とリン添加でさらに高い AGP を示した。このことは窒素が制限栄養塩でありまた窒素、リン量とも低いことを示している。さらに対照の AGP は 4 月~8 月の間低く 12 月に高い傾向を示した。この原因として夏期は増殖する藻類によって栄養塩が消費され、冬期は藻類増殖が少なく栄養塩が蓄積するように考えられ、このことは化学分析値と良く適合した。St. 2 の *Chl.* sp., *Ske.* sp. いずれの場合 (Fig. 12, 13) も St. 1 の場合と同じような傾向を示した。すなわち窒素が制限栄養塩であり、窒素、リン量とも低くまた 12 月に高い AGP を示し化学分析値と良く適合した。

く St. 1, 2 と同じ傾向を示したが、6 月~9 月の間は TP 値が概ね高く St. 1, 2 と異なった。11 月, 12 月は TIN 値が高く St. 1, 2 と同じ傾向であった。

Fig. 16 Growths of *Gymnodinium* sp., *Hemietreptia antiqua* HADA and *Navicula* sp. on the media based on sea waters from St. 1, 2 and 3 Sampling of sea water: Aug. 30, 1977

□: maximum cell number and chl. a contents after 3 to 10-day cultivation

The cells of *Gym. sp.*, *H. antiqua* and *Nav. sp.* were inoculated in a test sample of sea water in the size of 0.5×10^4 cells/ml, 0.7×10^2 cells/ml and $1.2 \mu\text{g}$ chl. a/l, respectively. C: control (sea water), P: control + K_2HPO_4 (0.275 mg P/l), N: control + NaNO_3 (4.0 mg N/l), NP: control + NaNO_3 (4.0 mg N/l) + K_2HPO_4 (0.275 mg P/l), NPB₁₂: control + NaNO_3 (4.0 mg N/l) + K_2HPO_4 (0.275 mg P/l) + B_{12} (0.2 μg /l) The other conditions: see Fig. 10

St. 3の *Chl. sp.*, *She. sp.* いずれの場合 (Fig. 14, 15) も St. 1, 2 の場合と同じような傾向を示した。なお St. 1, 2, 3 の 9 月の高い AGP は化学分析値と関連が乏しく、窒素 (無機)、リン以外の物質の影響とも考えられる。

つぎに St. 1, 2, 3 から 1977 年 8 月 30 日に採取した試料に B_{12} に栄養要求性を示す *Gym. sp.*, *H. antiqua* および *Nav. sp.* を接種して培養試験を行なった。すなわち試料 (対照) と、試料に前述のようにリンを添加したもの、窒素を添加したもの、窒素とリンを添加したものおよび試料に窒素、リンと B_{12} を $0.2 \mu\text{g}/\text{l}$ になるよう添加したもの計 5 種類を用いた。この場合 *Gym. sp.* は 0.5×10^4 cells/ml, *H. antiqua* は 0.7×10^2 cells/ml, *Nav. sp.* は $1.2 \mu\text{g}$ chl. a/l 相当の藻体になるよう接種後 3~10 日間培養し最大増殖量を測定した。結果は Fig. 16 に示す

ように全般的にリン添加のものは低い AGP を示し、窒素添加で高い AGP, 窒素とリンの添加でさらに高い AGP を示し、窒素が制限栄養塩であり、また窒素、リン量とも低いことが認められた。とくに St. 2 では窒素、リンおよび B_{12} 添加で *Gym. sp.*, *H. antiqua*, *Nav. sp.* いずれに対しても高い AGP が認められ、 B_{12} またはそれに代わる物質が制限栄養因子と考えられる。

4. 結 論

供試藻類の窒素、リンおよびビタミンに対する栄養要求性を検討し、*Chl. sp.*, *Ske. sp.*, *Nav. sp.* は培地中のリンを過剰摂取することが認められた。また *Gym. sp.*, *H. antiqua* および *Nav. sp.* は B_{12} に要求性を示したが *Chl. sp.* および *Ske. sp.* は B_1 , B_{12} , ビオチンいずれにも要求性を示さなかった。St. 1, 2, 3 の海水の培養試験で供試藻類の増殖はいずれも窒素および窒素とリンの添加で対照よりかなり促進された。これから St. 1, 2, 3 いずれの海水も窒素、リン量が少なく、また海水の化学分析値の窒素、リン量を Chiaudani ら³⁾の値と比較、分類すると St. 1, 2, 3 は中栄養の海水と考えられる。しかし St. 2 の海水に窒素、リン、 B_{12} をともに添加した場合、*Gym. sp.*, *H. antiqua* および *Nav. sp.* の増殖は促進され高い AGP を示した。このことから St. 2 の水質は St. 1, 3 の水質と若干異なるように考えられる。したがって、対象水域の培養試験による富栄養化の評価は栄養要求性の異なる若干数の供試藻類を用い、しかも B_{12} のような微量の増殖促進物質を考慮した方法で行ない、その結果と対象水域の化学分析値を比較検討することが重要と思われる。

終りに供試藻類の一部を分株いただいた広島県水産試験場の高山義晴氏に深謝します。また、海水試料および試料の化学分析値をいただいた当工学部環境化学砂原研究室の諸氏に深謝します。

(原稿受理・昭和53年10月2日)

—引用文献—

- 1) 須藤隆一, 森忠洋, 岡田光正 (1973), 藻類培養試験による富栄養化の評価。用水と廃水, 15, 107-116.
- 2) U.S. Environmental Protection Agency (1974), Marine Algal Assay Procedure, Bottle Test. Eutrophication and Lake Restoration Branch, Corvallis, Oregon.
- 3) Chiaudani, G., and Vighi, M. (1974), The N:P Ratio and Test with *Selenastrum* to Predict Eutrophication in Lakes. Water Research, 8, 1063-1066.
- 4) Payne, A.G. (1975), Responses of the Three Test Algae of the Algal Assay Procedure: Bottle Test. Water Research, 9, 437-445.
- 5) 日本下水道事業団試験部 (1976), 富栄養化防止のた

- めの指標の開発と実用化。日本下水道事業団試験部報告51-004.
- 6) 水野寿彦(1975), 日本淡水プランクトン図鑑, 10版, 保育社, 大阪。
- 7) 山路勇(1973), 日本海洋プランクトン図鑑, 7版, 保育社, 大阪。
- 8) 小久保清治(1972), プランクトン分類学, 増2版, 恒星社厚生閣, 東京。
- 9) Provasoli, L., McLaughlin, J.J.A. and Droop, M.R. (1957), The Development of Artificial Media for Marine Algae. Arch. Mikrobiol., **25**, 392-428.
- 10) 気象庁編(1977), 海洋観測指針, 日本海洋学会, 東京。
- 11) 日本規格協会(1974), 日本工業規格JISK0102-1971。
- 12) Menzel, D.W. and Vaccaro, R.E. (1964), The Measurement of Dissolved Organic and Particulate Carbon in Seawater. Limnol. Oceanogr., **9**, 138-142.
- 13) Harold, F.M. (1966), Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function. Bact. Rev., **30**, 772-794.
- 14) 大和田紘一(1971), 海水中のビタミン類。海洋科学, **3**, 516-520。
- 15) 岩崎英雄(1973), 富栄養化と赤潮発生, 用水と廃水, **15**, 47-54。
- 16) 岩崎英雄(1971), 赤潮鞭毛藻に関する研究—Ⅶ。日本海洋学会誌, **27**, 152-157。

日本水質汚濁研究会運営委員会名簿

委員長	上田喜一	昭和大学歯学部衛生・口腔衛生学教室教授
副委員長	合田健	国立公害研究所水質土壌環境部長
委員	田口勝久	茨城県公害技術センター所長
〃	檜山義夫	東京大学総合研究資料館水産部名誉教授
〃	今泉常正	東京大学工学部資源開発工学科教授
〃	岩井重久	京都大学工学部衛生工学教室教授
〃	小島貞男	㈱日本水道コンサルタント中央研究所長
〃	尾形保	農林省草地試験場環境部土壌肥料第一研究室長
〃	左合正雄	東京理科大学理工学部土木工学科教授
〃	澤村良二	日本大学理工学部薬学科教授
〃	佐谷戸安好	国立衛生試験所環境衛生化学部環境衛生室長
〃	植松喜稔	通産省工業技術院東京工業試験所主任研究官
〃	山県登	国立公衆衛生院放射線衛生学部長
〃	吉田多摩夫	東京水産大学海洋環境工学科教授
〃	石原透	通産省工業技術院公害資源研究所公害第3部長
〃	柏谷衛	日本下水道事業団試験研修本部試験部長
監事	岩塚良三	中央大学理工学部土木工学科教授
〃	新田忠雄	日本エス・ユー・エス㈱顧問
幹事	真柄泰基	国立公衆衛生院衛生工学部施設計画室長
幹事	村上健	建設省土木研究所下水道部水質研究室長
〃	松尾友矩	東京大学工学部都市工学科助教授
〃	片山徹	環境庁水質保全局水質管理課課長補佐
〃	鈴木基之	東京大学生産技術研究所助教授
〃	茂庭竹生	東海大学工学部土木工学科講師
〃	須藤隆一	国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室長
〃	岡田光正	国立公害研究所水質土壌環境部陸水環境研究室研究員