〈論 文〉

赤潮珧藻 *Skeletonema costatum* の栄養要求と AGP 試験 に供試するための調製法

西 島 敏 隆* 山 砥 稔 文** 畑 幸 彦*

Studies on the Nutritional Requirements of *Skeletonema costatum* and its Preparation of Inoculum for AGP Assay

Toshitaka NISHIJIMA*, Toshifumi YAMATOI** and Yoshihiko HATA*

* Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783, Japan

** Nagasaki Prefectural Fisheries Experimental Station, 7-29 Matsugae, Nagasaki 850, Japan

Abstract

The nutritional requirements of *Skeletonema costatum*, a red tide phytoplankter, and effects of the preparation of inoculum on algal growth potential (AGP) assay using this alga as a test organism were studied. In addition, the AGP of Osaka Bay waters was measured and the growth limiting nutrients were determined.

The nutrient concentrations necessary for the maximum growth of *S. costatum* were $1.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of nitrogen, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of phosphorus, $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ of silicon, and $5 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ of vitamin B_{12} . The AGP was found to be dependent on the preparation of the algal inoculum. The accurate AGP was obtained only when sufficient nutrient-starved algal cells were inoculated into the samples, but insufficient starvation of cells gave an overestimation. The satisfactory inoculum was obtained from twice starvation with vitamin B_{12} -free medium but contained 1/100 of the other nutrients as much as the concentration necessary for maximum growth. Based from the results of the assay methods, the AGPs of Osaka Bay waters were about $10^5 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$, and the growth limiting nutrients were determined to be nitrogen and phosphorus.

Key words: *Skeletonema costatum*, nutrient requirement, algal growth potential, algal bioassay, eutrophication

1. 緒 言

瀬戸内海など富栄養化の進んだ水域では依然として赤潮多発の傾向が続いており、赤潮の防除とそれを可能にする栄養物質濃度の低減が重要な課題となっている。近年、赤潮プランクトンを用いる藻類生産潜在力 (Algal growth potential; 以下 AGP と称する) 試験によって、水域の富栄養化を総合的に評価したり、現

場水の赤潮発生潜在力や赤潮プランクトンの増殖制限因子を推定することなどが試みられている^{1), 2), 3), 4)}。しかし、AGP 試験は一種の生物検定であり、試験に用いるプランクトンの種類だけでなく、その生理状態や接種量によっても、結果が著しく異なることが知られている^{5), 6)}。特に、微細藻類は細胞内に必須栄養物質を必要量以上に貯蔵する能力を持つので、試験液の栄養状態を反映した AGP を得るには、これを最少限に減じ

* 高知大学農学部 〒783 高知県南国市物部乙200

** 長崎県水産試験場 〒850 長崎市松が枝町 7-29

た、しかも増殖能を有する藻体を用いて試験する必要がある。

そこで、日本の内湾域で最も普通に見られる赤潮の原因種の一つ、*Skeletonema costatum* を試験藻に用いる AGP 試験法を確立するため、本研究では、まず本藻の栄養物質要求量を求め、それを基礎に、試験液の栄養状態に応答した AGP を得るための接種藻調製法を検討した。さらに、この方法によって大阪湾海水の AGP を測定すると共に、増殖の制限因子を推定した。

2. 方 法

2.1 供試生物

大阪湾の赤潮から分離された *Skeletonema costatum* (GREVILLE) CLEVE NIES-324 株 (無菌クローン株) を国立公害研究所から譲受し、供試した。

2.2 培養および計数

培養は、18mm 試験管に培地またはモデル海水を 10 ml 入れて、3 本法、パッチ培養法で、水温 22°C、照度 3,000 lx、14 時間明 10 時間暗の明暗サイクルで行った。プランクトンの保存および試験には基礎培地として ASP₂NTA (Table 1)⁷⁾を用い、試験の目的に応じて成分を変更した。増殖量は界線入りスライドグラスを用いて細胞数を直接計数して求めた。なお、試験培養中は随時 0.4% 寒天添加 STP 培地⁷⁾に少量の培養液を接種して細菌検査を行い、細菌による汚染を監視した。

2.3 栄養要求試験

本種の必須栄養物質、窒素、リン、ケイ素およびビタミン B₁₂ (以下 B₁₂ と称する) の要求量を最終増殖量および増殖速度を指標として求めた。この試験では、試験成分が接種に伴って試験培地に持ち込まれるのを防ぎ、かつ接種藻体の細胞内含量を最少にするために、

Table 1 Composition of ASP₂NTA medium

NaCl	18 g	Vitamin B ₁₂	0.2 μg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g	Vitamin mix. S3*	10 ml
KCl	0.6 g	P II metals**	30 ml
Ca(as Cl ⁻)	0.1 g	Fe(as Cl ⁻)	0.5 mg
NaNO ₃	50 mg	Tris buffer	1 g
K ₂ HPO ₄	5 mg	Nitritrotriactic acid	0.1 g
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	150 mg	Distilled water	1000 ml
Na ₂ CO ₃	30 mg	pH	7.8

* One ml of vitamin mix. S3 contained: thiamine HCl 0.05 mg, nicotinic acid 0.01 mg, Ca pantothenate 0.01 mg, *p*-aminobenzoic acid 1 μg, biotin 0.1 μg, inositol 0.5 mg, folic acid 0.2 μg, thymine 0.3 mg.

** One ml of P II metals contained: EDTA 1 mg, Fe(as Cl⁻) 0.01 mg, B(as H₃BO₃) 0.2 mg, Mn(as Cl⁻) 0.04 mg, Zn(as Cl⁻) 5 μg, Co(as Cl⁻) 1 μg.

基礎培地から目的成分を除いた培地で 7~10 日間飢餓培養した藻体を接種した。また、比増殖速度は次式(1)により、基質半飽和定数は Monod の式(2)を直線化した Woolf プロット(3)⁸⁾によって算出した。

$$\ln N = \ln N_0 + \mu \cdot t \quad (1)$$

$$\mu = \mu_m \cdot S / (K_s + S) \quad (2)$$

$$(S/\mu) = (K_s/\mu_m) + (1/\mu_m) \cdot S \quad (3)$$

ここで、 N_0 は培養初めの、 N は t 日間培養後の細胞数 (cells·ml⁻¹) を μ は比増殖速度 (d⁻¹)、 S は基質濃度 (mg·l⁻¹ または ng·l⁻¹)、 μ_m は基質飽和時の最大比増殖速度 (d⁻¹)、 K_s は基質半飽和定数 (mg·l⁻¹ または ng·l⁻¹) を表す。

2.4 最少細胞内含量の算定

植物プランクトンをある一種類の必須栄養物質制限下でパッチ培養した場合、増殖が定常期に達した藻細胞中のその制限栄養物質含量は、その藻の生存にとって必要最少量、最少細胞内含量にとどまると考えられる。したがって、十分飢餓培養した藻体を接種して培養した場合には、定常期までに増加した細胞数は、初期制限栄養物質濃度に比例する。そこで、次式(4)により最少細胞内含量を算出した。

$$q_0 = S / (N_f - N_i) \quad (4)$$

ここで、 q_0 は最少細胞内含量 (pg·cell⁻¹)、 N_i および N_f は接種時および定常期の細胞数 (cells·ml⁻¹) を表す。

2.5 AGP に及ぼす接種藻前培養条件の影響

あらかじめ求めた供試プランクトンの栄養物質要求量を基礎に、栄養物質濃度を各種に制限したモデル海水を作成してパッチ培養による AGP を測定し、モデル海水の制限栄養物質濃度を正確に反映した結果を与える、接種藻の前培養培地と培養回数を検討した。前培養培地には、要求量の窒素、リン、ケイ素および B₁₂、および金属類 (ASP₂NTA 培地基準) を含む培養液 (以下要求量基準前培養培地と称する) を、人工海水で 1/1~1/100 に希釈した培地、およびこれから B₁₂ を除いた培地を用いた。

また、モデル海水には、窒素、リン、ケイ素および B₁₂ を要求量を基準に、金属類を ASP₂NTA 培地中濃度を基準に、それぞれ 1/1~1/100 に制限した人工海水 (全栄養物質制限モデル海水)、および B₁₂ のみを同様に制限した人工海水 (B₁₂ 制限モデル海水) を用いた。

なお、*S. costatum* を用いてパッチ培養した場合、その最大増殖量と誘導期の期間は、接種量に依存するので、誘導期を短くし、最終増殖量に変動のない初期細胞濃度の限度、 5×10^3 cells·ml⁻¹ を下回らないように考慮して、接種量を培地またはモデル海水の 1/20 量とした。

Fig. 1 Location of sampling sites in Osaka Bay.

2.6 現場海水の AGP 試験

試料は1987年9月および12月に大阪湾(Fig. 1)の表層から採取し、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで濾過して、その濾液を -20°C に凍結して保存した。分析直前に解凍した試水を孔径 $0.22\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで無菌的に濾過した後、これに栄養物質を種々の組み合わせで添加し、上記で得られた接種藻調製法により AGP を求めた。

3. 結 果

3.1 *S. costatum* の栄養要求

3.1.1 窒素要求量

無機態窒素のうち植物プランクトンが最も一般的に

利用する硝酸態窒素の要求量および細胞内最少含量を求めた。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 $0 \sim 20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲で試験し、窒素濃度と最終増殖量および比増殖速度との関係を Table 2 に示す。これによれば、最終増殖量および比増殖速度は、 $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 未満の低濃度では、いずれも培地中の窒素濃度に依存して増大し、約 $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ でほぼ飽和することが明らかである。さらに、Woelf プロットによって求めた比増殖速度に関する窒素の半飽和定数は $0.16\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と算定された。Monod の式によると、基質濃度が半飽和定数の10倍では、増殖制限がない場合の91%に相当する増殖速度を与えると計算され、この付近の濃度で増殖速度がほぼ飽和すると考えてよい。したがって、本藻の場合、 $\text{NO}_3\text{-N}$ $1.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度で増殖速度がほぼ飽和し、結局、最終増殖量と増殖速度の両者を最大にする $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度、すなわち本藻の窒素要求量は $1.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度であると考えられる。

次に、窒素制限下で求めた、初期窒素濃度と定常期までに増殖した細胞数との間には比例関係が得られず、一定の最少細胞内窒素含量を求めることができなかった。すなわち、初期濃度がちょうど要求量に相当する場合の細胞内窒素含量は $0.54\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ と算定されたが、初期濃度が $0.1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下で細胞内含量が小さくなる傾向が見られた。

3.1.2 リン要求量

$\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度 $0 \sim 5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲で試験した。リン濃度と、最終増殖量および比増殖速度との関係を Table 3 に示す。これから明かなように、増殖量と増殖速度は共に $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度で最大となったが、最終増殖量は $5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で明らかに抑制が見られた。また、増殖速度に関するリン半飽和定数は、 $0.03\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ と算定され、増殖速度は $0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 付近の低濃度で飽和す

Table 2 Specific growth rate and maximum cell yields of *S. costatum* for different $\text{NO}_3\text{-N}$ concentrations*

$\text{NO}_3\text{-N}$ concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Specific growth rate (d^{-1})	Maximum cell yields ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)
0	—**	—**
0.01	0.30	1.76×10^5
0.05	0.41	2.29×10^5
0.1	0.58	4.14×10^5
0.5	0.64	1.07×10^6
1.0	0.81	2.20×10^6
10.0	0.99	3.49×10^6
20.0	1.01	3.49×10^6

* $K_s=0.16\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

** No growth.

Table 3 Specific growth rate and maximum cell yields of *S. costatum* for different $\text{PO}_4\text{-P}$ concentrations*

$\text{PO}_4\text{-P}$ concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Specific growth rate (d^{-1})	Maximum cell yields ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)
0	—**	—**
0.005	0.37	1.39×10^5
0.01	0.46	1.93×10^5
0.05	0.55	6.35×10^5
0.1	0.58	1.26×10^6
0.5	0.67	3.49×10^6
1.0	0.78	3.58×10^6
5.0	0.78	2.06×10^6

* $K_s=0.03\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

** No growth.

と考えられる。したがって、本藻の増殖量と増殖速度を最大にするリン要求量は約 $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であると推定される。

さらに、リン制限下における初期リン濃度と増殖量との関係には、窒素の場合と同様の傾向が見られ、一定の最少細胞内含量を求めることができなかった。要求量相当の初期リン濃度で培養した場合の細胞内リン含量は $0.14\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ と算定された。

3.1.3 ケイ素要求量

珪藻の必須栄養塩、ケイ素の要求量を $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 濃度 $0\sim 15\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲で調べた。ケイ素濃度と最終増殖量および比増殖速度との関係は Table 4 に示されている。このうち、最終増殖量は $10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ で最大となり、 $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下では濃度に依存して増殖量も抑制された。一方、増殖速度に関するケイ素の半飽和定数は $0.027\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、増殖速度は $0.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度のごく低濃度で飽和することが明らかになった。これらのことから、本藻の増殖量と増殖速度の両者を最高に高めるケイ素要求量は $5\sim 10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度であると推察される。

また、ケイ素制限下で求めた初期ケイ素濃度と定常期の細胞数との関係には、先の窒素・リンの場合と同様の傾向が見られ、一定の最少細胞内含量が得られなかった。要求量相当の初期濃度で培養した場合の細胞内含量は $1.2\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ と推算された。

3.1.4 ビタミン B_{12} 要求量

S. costatum は B 群ビタミンのうち B_{12} を必須に要求することが知られているので、 B_{12} の要求量を求めた。 B_{12} 濃度 $0\sim 50\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ の範囲で試験した最終増殖量および増殖速度と B_{12} 濃度との関係を Table 5 に示す。これに見るとおり、最終増殖量は $10\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ で最大と

Table 4 Specific growth rate and maximum cell yields of *S. costatum* for different $\text{SiO}_3\text{-Si}$ concentrations*

$\text{SiO}_3\text{-Si}$ concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	Specific growth rate (d^{-1})	Maximum cell yields ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)
0	—**	—**
0.005	0.30	8.20×10^4
0.01	0.46	1.86×10^5
0.05	0.53	2.50×10^5
0.1	0.53	2.56×10^5
0.5	0.69	9.06×10^5
1.0	0.71	1.39×10^6
10	0.76	3.68×10^6
15	0.76	3.68×10^6

* $K_s=0.027\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

** No growth.

Table 5 Specific growth rate and maximum cell yields of *S. costatum* for different vitamin B_{12} concentrations**

Vitamin B_{12} concentration ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$)	Specific growth rate (d^{-1})	Maximum cell yields ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)
0	—**	—**
0.1	0.44	1.81×10^5
0.5	0.69	5.99×10^5
1.0	0.76	8.54×10^5
5.0	0.78	2.31×10^6
10	0.78	3.61×10^6
20	0.87	4.11×10^6
50	0.90	3.49×10^6

* $K_s=0.50\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

** No growth.

なった。また、比増殖速度に関する B_{12} の半飽和定数は $0.5\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ であり、増殖速度は $5\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ 程度で飽和すると考えられる。したがって、本藻の B_{12} 要求量は $5\sim 10\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ と推定される。

また、 B_{12} 制限下で培養した増殖量と初期 B_{12} 濃度との関係には比例関係が見られず、前述の栄養塩の場合と同様の傾向を示した。その細胞内含量は要求量相当の初期濃度の場合には、 $2.8\times 10^{-6}\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$ であった。

3.2 AGP に与える接種藻調製法の影響

先の試験で得られた *S. costatum* の窒素、リン、ケイ素および B_{12} の要求量、および ASP_2NTA 培地処方の鉄濃度を基準に、Table 6 に示す 6 種の前培養培地で、前培養（すなわち飢餓培養）を 1 回あるいは 2 回行い、全栄養物質制限および B_{12} 制限のモデル海水に接種して培養し、増殖量を測定した。その結果の一部は Fig. 2 に示されている。図中の実線は、栄養物質が要求量を満たした時の増殖量を基準点として描いた傾き 1 の直線であり、制限濃度範囲で増殖量がこの直線上に乗っている場合は、増殖量が栄養物質濃度に正比例し、基準点の増殖量に比べて AGP が適正に得られていることを示している。また、上方にずれている場合は AGP が過大に、下方にずれている場合は過小に表れていることを示す。さらに、それぞれの図で基準点にした、栄養物質充足時の増殖量そのものは、栄養物質を十分含む培地で前培養して求めた増殖量と比較して、適正であるか否かを判定できる。Table 7 にこの方法によって判定した結果を総括して示す。

これに見るとおり、前培養（飢餓培養）を 1 回行って接種した場合は、前培養培地に B_{12} を含むかどうかにかかわらず、2 種類のモデル海水とも低濃度側で過大の AGP が得られた。さらに、飢餓培養回数を 2 回に

Table 6 Nutrient requirements for maximum growth and composition of media for the pre-culture of *S. costatum**

Nutrient	Requirement	Composition of media for the pre-culture					
		V+1/1	V+1/10	V+1/100	V-1/1	V-1/10	V-1/100
NO ₃ -N(mg·l ⁻¹)	1.6	1.6	0.16	0.016	1.6	0.16	0.016
PO ₄ -P(mg·l ⁻¹)	0.5	0.5	0.05	0.005	0.5	0.05	0.005
SiO ₃ -Si(mg·l ⁻¹)	10	10	1.0	0.1	10	1.0	0.1
Fe(mg·l ⁻¹)	—***	0.5	0.05	0.005	0.5	0.05	0.005
PII(m·l ⁻¹)**	—***	30	3.0	0.3	30	3.0	0.3
B ₁₂ (ng·l ⁻¹)	5	5	0.5	0.05	0	0	0

* ASP₂NTA medium was used as a basal medium.

** See foot note of Table 1.

*** Not tested.

Fig. 2 Effects of pre-culture of *S. costatum* on the AGP of nutrient- and vitamin B₁₂-limited seawater models.

Medium of pre-culture: V-1/100 (see Table 6). Number of times for starvation of pre-culture: A and C, once; B and D, twice. Seawater models: A and B, nutrient-limited; C and D, vitamin B₁₂-limited.

増やした場合でも、前培養培地に B₁₂が含まれると、2種のモデル海水の AGP はすべて低濃度側で過大に表れた。B₁₂欠如の1/10培地 (V-1/1) で飢餓培養を2回行くと、B₁₂のみ制限した(要求量の栄養塩および金属類を含む)モデル海水では適正な AGP が得られたが、栄養塩、金属類、ビタミンを制限したモデル海水では低濃度側で過大に表れた。結局、B₁₂欠如の1/100培地 (V-1/100, N: 0.016mg·l⁻¹, P: 0.005mg·l⁻¹, Si: 0.1mg·l⁻¹) を用いて飢餓培養を2回行った場合のみ、2種のモデル海水ともすべての濃度で適正な AGP が得られた。したがって、以下の現場水の AGP を求める試験では、B₁₂欠如の1/100培地で飢餓培養を2回行った

Table 7 Evaluation of the preparation of algal inoculum for accurate AGP assay of nutrient- and vitamin B₁₂-limited seawater models

Medium of pre-culture*	Number of starvation	Estimation of AGP**	
		Nutrient-limited model	Vitamin B ₁₂ -limited model
V+1/1	1	+++	+++
V+1/1	2	+++	+++
V-1/1	1	+++	+++
V-1/1	2	+++	A
V+1/10	1	+++	+++
V+1/10	2	+++	+++
V-1/10	1	+++	+++
V-1/10	2	++	++
V+1/100	1	+++	+++
V+1/100	2	+	++
V-1/100	1	+++	+++
V-1/100	2	A	A

* See Table 6.

** A represents the accurate estimation, and +++, ++, and + represent overestimation for three models (1/10, 1/50, and 1/100), for two models (1/50 and 1/100), and for one model (1/100), respectively.

藻体を接種藻として用いた。

3.3 大阪湾現場海水の AGP

S. costatum を試験藻とし、B₁₂欠如の1/100培地で飢餓培養を2回行った藻体を接種して求めた、大阪湾の原海水およびこれに栄養物質を添加した海水の AGP を Fig. 3 に示す。なお、原海水に添加した栄養物質の濃度は *S. costatum* の要求量に相当している(鉄は ASP₂NTA 培地の濃度に相当)。これから、原海水の AGP は、9月が 2.53×10^5 (St.17) および 4.59×10^5 cells·ml⁻¹ (St.19)、12月が 3.95×10^5 (St.17) および 4.04×10^5 cells·ml⁻¹ (St.19) であり、いずれの試料も

Fig. 3 Effects of various nutrients addition on the AGP of Osaka Bay waters.

Concentration of nutrients added: $\text{NO}_3\text{-N(N)}$, $1.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $\text{PO}_4\text{-P(P)}$, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $\text{SiO}_3\text{-Si(Si)}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; Fe-EDTA(Fe) , $0.3 \text{ mgFe} \cdot \text{l}^{-1}$; vitamin $\text{B}_{12}(\text{B}_{12})$, $5.0 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Date of sampling: A(St. 17) and B(St. 19), Sep. 8, 1987; C(St. 17) and D(St. 19), Dec. 8, 1987.

潜在的にスケルトネマ赤潮になり得る増殖能を持つと考えられる。また、栄養物質添加による増殖量増大効果を見ると、窒素、ケイ素、 B_{12} および鉄の単独添加では効果がなく、リン添加により9月試料でのみ若干の増大(1.3倍)が見られた。一方、複合添加の場合、いずれの試料も窒素とリンの添加で顕著に増大した。しかし、これにケイ素、 B_{12} および鉄を追加しても増大効果はほとんど認められなかった。これらのことから、大阪湾原海水中で *S. costatum* の増殖を制限している栄養物質は、9月試料では第一制限因子がリン、第二制限因子が窒素であり、12月試料では窒素とリンが同程度に増殖を制限していること、さらに、ケイ素、鉄および B_{12} はいずれの試料でも増殖制限因子にはなっていないことが明らかになった。

4. 考 察

本試験で得られた *S. costatum* の窒素、リン、ケイ素および B_{12} の要求量、それぞれ、 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ および $5 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ を、他の赤潮プランクトンの要求量と比較すると、窒素要求量は *Heterosigma akashiwo* の $14 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ⁹⁾ に比してその約1/10であり、*Chattonella antiqua* の $1.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ¹⁰⁾ と同程度である。リンの要求量は *H. akashiwo* の $0.93 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ⁹⁾ よりやや低く、*C. antiqua* の $0.31 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ¹⁰⁾ とほぼ同じである。また、 B_{12} 要求量は、*H. akashiwo* の $20 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ ¹¹⁾ および *C. antiqua* の $10 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ ¹²⁾ と類似している。

さらに、栄養物質制限下で定常期に達した藻体の栄養物質の含量は、いずれの栄養物質の場合も一定値を

とらず、とくに培地の初期制限栄養物質濃度が低い場合に、含量が小さくなることが示された。このことは、飢餓培養が不十分で低濃度側で過大に増殖した可能性のほか、栄養物質の制限が厳しい低濃度側で細胞が小さくなった可能性も考えられ、詳細は今後の検討を要する。

次に、本試験では、飢餓培養の不十分な場合には低濃度のモデル海水で過大の AGP が得られた。この原因として、接種に伴って栄養物質が培養液または藻体として持ち込まれたことのほか、接種量が過大であったことが考えられる。各前培養培地で飢餓培養を 1 回行った場合の接種量は、培養初期密度で表して、 $2.7 \times 10^4 \sim 6.3 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$ であった。また、飢餓培養を 2 回行った場合のうち、1/100 培地、1/10 培地および B_{12} 欠如の 1/1 培地を用いた場合は、 $7.7 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$ 、 B_{12} を含む 1/1 培地を用いた場合は $4.5 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$ であった。一方、栄養物質を 1/100 に制限したモデル海水の適正な AGP は、 $1.6 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{m}^{-1}$ と推定される。これを接種時の密度と比較すると、飢餓培養を 2 回行った場合は、 B_{12} を含む 1/1 培地の場合を除いてこの密度を下回ったが、飢餓培養が 1 回の場合および B_{12} を含む 1/1 培地で 2 回行った場合には、この密度を上回った。したがって、後者の場合、1/100 モデル海水において AGP が過大に表れた原因として、栄養物質の持ち込みとともに、藻体の過剰接種が考えられる。しかし、前者の場合で、1/100 モデル海水で過大評価された場合の原因は、培養液または藻体と共に持ち込まれた栄養物質によることが明らかである。結局、本藻を試験藻に用いた場合、 B_{12} 欠如の 1/100 培地で 2 回飢餓培養することで、持ち込みの栄養物質を減じ、しかも試験液の栄養物質濃度に応答した AGP を得る接種藻初期密度を保持することができた。

既述のとおり、*S. costatum* の場合、バッチ培養法による AGP 試験では、接種藻の初期培養密度が小さい時に誘導期が長くなり、最終増殖密度も小さくなることが示されている⁶⁾。本試験の結果、接種と共に培養液または接種藻体として持ち込まれる、栄養物質を飢餓培養処理で低減することにより、培養初期密度を十分高く保ちながら、試験液の栄養物質濃度に応答した AGP 試験結果を得ることが可能であることがわかつ

た。このような飢餓培養処理は、渦鞭毛藻等試験に用いるプランクトン細胞が脆弱で、洗浄処理が困難な場合の接種藻調製法としても有効であると考えられる。

謝辞

試料の採取に際して、多大の援助をいただいた、大阪府水産試験場の皆様に感謝の意を表する。

また、本研究の一部は財団法人鉄鋼業環境保全技術開発基金の助成金によった。ここに謝意を表する。

(原稿受理 1989年12月8日)

引用文献

- 1) 林光則, 葉山八千代, 秋山広子, 永井史郎 (1978) 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, 水質汚濁研究, **1**, 199-202.
- 2) 今岡務, 寺西靖治, 八木修身, 須藤隆一 (1981) 赤潮生物を用いた都市下水の AGP の測定, 下水道協会誌, **18**, 20-27.
- 3) 西村昭史 (1982) 魚類養殖漁場の有機汚染が赤潮生物 *Gymnodinium* type-'65 および *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす影響, 日本プランクトン学会報, **29**, 1-7.
- 4) 矢持進 (1984) 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 *Prorocentrum micans*, *Eutryptella* sp. および *Chattonella marina* の増殖制限栄養因子について, 日本プランクトン学会報, **31**, 97-106.
- 5) 岡田光正, 須藤隆一 (1978) AGP をめぐる諸問題, 用水と廃水, **20**, 765-779.
- 6) 中島敏光 (1988) 海産珪藻 *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす海洋深層海水の影響, 日本プランクトン学会報, **35**, 45-55.
- 7) 岩崎英雄 (1967) 微細藻類の分離と培養, 54pp., 日本水産資源保護協会, 東京.
- 8) Dowd, J.E. and Riggs, D.S. (1965) A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetics constants from various linear transformations. *Journal of Biological Chemistry*, **240**, 863-869.
- 9) Watanabe, M.M., Nakamura, Y., Mori, S. and Yamochi, S. (1982) Effects of physicochemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* HADA from Osaka Bay, Japan. *Japanese Journal of Phycology*, **30**, 279-288.
- 10) Nakamura, Y. and Watanabe, M.M. (1983) Growth characteristics of *Chattonella antiqua*. Part 2 Effects of nutrients on growth. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, **39**, 151-155.
- 11) 西島敏隆, 畑 幸彦 (1984) *Heterosigma akashiwo* HADA の B 群ビタミン要求に関する増殖生理, 日本水産学会誌, **50**, 1505-1510.
- 12) Nishijima, T. and Hata, Y. (1986) Physiological ecology of *Chattonella antiqua* (HADA) ONO on B group vitamin requirements. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 181-186.

論文要旨

懸濁液型水ガラス系注入剤を含有するトンネル工事排水の石灰処理法について

丸山 俊朗* 宮根 正樹** 山田 僚一** 隆島 史夫*

* 東京水産大学 ** 佐藤工業株式会社

〈水質汚濁研究 Vol.13 No.3 (1990) pp. 163~172〉

水ガラスとセメントを用いる薬液注入工事排水の、各種水質基準を達成し、かつ魚毒性のない処理法の一つとして、「石灰処理-過剰 Ca^{2+} の炭酸塩化- CaCO_3 のバンドによる凝集処理法」について検討した。得られた知見は次の通りであった。(1)数百 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ の S.SiO_2 を $30\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ まで石灰スラリーで処理する場合の反応所要時間は、石灰添加量が S.SiO_2 に対してほぼ等モルでは、約60分であり、石灰添加量が多いほど反応所要時間は短縮された。(2)検水の S.SiO_2 濃度に関係なく、 $\text{pH}\geq 11.9$ (約25°C) に調整するのみで $30\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 以下まで、濁度は同時に数濁度単位まで除去できた。(3) Ca^{2+} は CO_2 の直接供給により $\text{pH}9.5\sim 10.5$ で最も CaCO_3 を析出し、 CaCO_3 のバンドによる上限の凝集至適 pH は約8.5であった。(5)処理水の水質は pH , S.SiO_2 , SS (濁度), Ca^{2+} ならびに EC のうち、 EC のみが関連水質基準を達成できなかった。(6)(5)で得られた処理水はニジマス稚魚の鰓にも障害を与えなかった。

赤潮珪藻 *Skeletonema costatum* の栄養要求と AGP 試験に供試するための調製法

西島 敏隆* 山砥 稔文** 畑 幸彦*

* 高知大学農学部 ** 長崎県水産試験場

〈水質汚濁研究 Vol.13 No.3 (1990) pp. 173~179〉

S. costatum の増殖速度・増殖量を最大にする栄養物質要求量は、窒素が $1.6\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、リンが $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、ケイ素が $5\sim 10\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、ビタミン B_{12} が $5\sim 10\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。AGP 試験の結果は接種藻の調整法によって著しく異なった。接種と共に持ち込まれる栄養物質を飢餓培養処理で低減することにより、接種量を比較的多くしても、栄養物質濃度を正確に反映した AGP を得ることができた。飢餓培養が不十分な場合は過大値を与え、本藻の場合は、栄養物質を要求量の1/100に減じた、 B_{12} 欠如の培地で2回飢餓培養することで適正な AGP が得られた。本試験法を用いて測定した大阪湾海水の AGP は約 $10^5\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ で、現場海水はスケルトネマ赤潮になり得るポテンシャルを持ち、その増殖を制限している栄養物質は窒素とリンであると推察された。