養魚池から分離した *Scenedesmus acutus* の増殖特性

Growth characteristics of *Scenedesmus acutus* isolated from fish pond.

小橋二夫¹⁾・出口吉昭¹⁾・東 禎三¹⁾・矢崎仁也¹⁾・矢木修身²⁾

Tsugio KOBASHI¹⁾・Yoshiaki DEGUCHI¹⁾・Teizoh HIGASHI¹⁾・Jinya YAZAKI¹⁾
Osami YAGI²⁾

日本大学農獣医学部¹⁾・国立環境研究所²⁾

College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University¹⁾・The National Institute for Environmental Studies²⁾

Abstract

Growth characteristics of *Scenedesmus acutus* isolated from fish culture pond were investigated in various nutrient concentrations.

Cultivations were carried out at 25-30°C in continuous light illumination with cool-white fluorescent lamps at 3,000lx.

Maximum growth was obtained at an initial pH value of 7.0 in Gorham's medium and 9.0 in modified Gorham's medium.

Nitrogen sources used urea, ammonium, nitrite and nitrate were significantly effective for the growth of *S. acutus*. Final pH value at ammonium were 4.1 or 9.0-10.0 at the other nitrogen. A good growth was obtained at concentration of 14mg/l for nitrogen and 62mg/l for phosphorus.

1. はじめに

わが国の養魚は養魚形態によって、止水式、流水式および循環濾過式養魚に大別され、そのほとんどが集約的な給餌養魚である。このような養魚では魚、池水および底泥等によって消費される酸素の補給、給餌に伴って生ずる多量の排せつ物および残餌の処理いかんによって、魚の生産量が左右される。

近年わが国の水資源もひっ迫し、再利用の方向があり、水産用水としての水資源も制約されつつある。そこで古くからウナギやコイ等の養殖に用いられ、養殖期間

中ほとんど池水の交換が行われない、止水式養魚を再検討する必要があると考える。

止水式養魚において、酸素補給は植物プランクトン、大気からの溶入、注水等で、植物プランクトン由来が51.1-76.2%¹⁾あるいは89.2%²⁾を占めると報告されている。また酸素消費は魚類、飼育水、池底泥、大気への放出等で、飼育水と池底泥による酸素消費量は46.9-59.4%¹⁾ないし83.7%²⁾であると報告されている。植物プランクトンは無機化された物質を栄養塩として増殖し、ひいては光合成作用により水中に酸素を補給している。

山形と丹羽はウナギを用い、アンモニアの急性毒性と慢性毒性について報告し、急性毒性はpH7で24h-LD₅₀が863mg/l、pH9で同じく16.8mg/lであり、pHが高いほどアンモニアの濃度が低く、毒性が高くなる。これはアンモニアの解離がpHと温度により影響される。魚類に顕著な毒性を与えるのが非解離のアンモニアで、非解離のアンモニアが0.067mg/l以上でウナギの成長量が半減する。またpH6.8で9週間の慢性毒性では20-40mg/l（非解離アンモニアで0.067-0.121mg/l）で摂餌率が約60%に減じ、増重率も約50%に低下する³⁾。同様に亜硝酸窒素についても、急性毒性は24h-LD₅₀で460mg/l、96h-LD₅₀で205mg/lであり、慢性毒性は30mg/lで増重率が約70%に減じたと報告している⁴⁾。

また千葉はウナギを用い、飼育期間中pHの低下時やアンモニアの増加時に摂餌不良が多発することを報告し

ている⁵⁾。これらは植物プランクトンの光合成活性と関係があることを推測している。

止水式養魚において重要な地位を占める植物プランクトンの増殖をコントロールし、有効に活用することが必要である。また水界環境の問題から下水処理の3次処理に植物プランクトンを利用する研究もなされている⁶⁾。

本研究では養魚池における藻類の役割を明らかにする基礎研究の第一歩として止水式養魚池で周年見られる *Scenedesmus acutus* を用い高濃度の栄養塩類条件における増殖特性について検討を加えた。

2. 実験材料および方法

2-1 供試藻類

春季の養魚池水を平板寒天培地に塗布し、出現したコロニーを無菌水で希釈後、平板寒天培地に画線し、これを数回繰り返して、単藻の *Scenedesmus acutus* を分離した。この藻は緑藻で1細胞の幅2.9-3.6 μm 、長さ9.5-10.7 μm であった。実験には本単藻株を液体培地で前培養し、対数増殖期の藻を蒸留水で2回洗浄して使用した。

2-2 培地および培養方法

分離、前培養および本培養の基本培地としてGorhamの培地を用いた (Table 1)⁷⁾。培養は温度25-30℃、24時間連続照明の条件で行った。光源には白色蛍光灯を用い、培養容器表面で3,000luxの照度を与えた。培養容器は500ℓの振とう培養フラスコを用い、1分間60往復の水平往復振とうを行った。

Table 1. Gorham's medium (mg/ℓ)

NaNO ₃	496(N=81.7)
K ₂ HPO ₄	39(P=6.9)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36
Na ₂ CO ₃	20
Na ₂ SiO ₃	58
Fe-citrate	6
Citric acid	6
EDTA	1

2-3 増殖量の測定法

島津製分光光度計UV-140-01を用い、波長750nm、光路長10mmの吸光度を測定し、増殖量を求めた。またワットマンGFCを用い、乾燥重量を測定し、吸光度との関係を調べた。

3. 結果

3-1 増殖曲線

750nmの吸光度と乾燥重量の関係をFig.1に示した。吸光度0.8以下では藻体量と比例関係が得られた。吸光度

Fig. 1. Relation between absorbance (at 750nm) and dry weight of *S. acutus*.

の440倍が乾燥重量のmg/ℓに相当した。以後の実験では吸光度による藻類の増殖量を表示した。

基本培地の増殖曲線をFig.2に示した。培養5日目までは対数的な増殖が認められたが、5日目以降、増殖速度が徐々に低下する傾向が認められた。培養開始から5日目までの比増殖速度 (μ) を算出すると、0.53day⁻¹となり、従って倍加時間は1.3日であった。培養14日目で定常期に達したので、培養14日目の吸光度をもって *S. acutus* の増殖量の比較を行った。

Fig. 2. Growth curve of *S. acutus* in Gorham's medium.

3-2 pHの影響

培地のpHを1N-HClないし1N-NaOHで4から11までの範囲に調整した基本培地および基本培地の窒素源であるNaNO₃をNH₄NO₃に替えた培地 (窒素量は等量) を用いて、増殖に及ぼすpHの影響を調べた。結果をFig.3(a)と(b)に示した。NaNO₃の場合、pH7の時に吸光度1.3と最大を示し、 μ も同様にpH7で0.60day⁻¹と最大を示した。NH₄NO₃の場合、pH9で最大の吸光度を示したが、比増

Fig. 3. Effect of initial pH on the growth of *S. acutus*.
(a) absorbance at 750nm. (b) specific growth rate (μ).
●—● NaNO₃, ▲—▲ NH₄NO₃.

殖速度 μ は pH5-7 で最大 0.99 day⁻¹ を示した。窒素源の種類によって増殖に及ぼす pH が異なったが、以後の実験は NaNO₃ を窒素源として用いたので pH8 に調整して行った。

3-3 窒素の影響

窒素量を等量として、尿素、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、亜硝酸ナトリウムおよび硝酸ナトリウムを用いた培地での増殖量の影響を検討した。窒素量として N=81.7mg/l であり、結果を Fig.4(a) と (b) に示した。いずれの窒素源においても藻体量が吸光度で 0.7 以上と良好な増殖を示した。11 日目の増殖量は尿素の場合が最大を示し、次いで塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウムの順であった。比増殖速度は尿素が最も高く $\mu = 0.77 \text{ day}^{-1}$ であり、一方硝酸ナトリウムおよび亜硝酸ナトリウムがやや低い値を示した。培地の pH は藻類の増殖に伴い尿素、硝酸ナトリウムおよび亜硝酸ナトリウムで上昇し、実験終了時に尿素で pH9、硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムで pH10 となった。また塩化アンモニウムと硝酸アンモニウムは 6 日目以降急激に低下し、pH4 となった。

Fig. 4. Effect of nitrogen source on the growth of *S. acutus*.
(a) change of pH in the media. (b) growth curve at 750nm.
●—● CO(NH₂)₂, ○—○ NaNO₃,
▲—▲ NaNO₂, ■—■ NH₄NO₃, ▼—▼ NH₄Cl.

養魚池で尿素形態の窒素は考えられないので、塩化アンモニウムおよび硝酸アンモニウムを用いて窒素濃度の増殖量への影響を検討し、その結果を Fig.5(a) に示した。塩化アンモニウムの場合、窒素として 14 から 100mg/l の範囲では吸光度 0.8 以上と良好な増殖を示したが、1,400mg/l では増殖が抑制された。硝酸アンモニウムの場合、窒素が 28mg/l で 0.61 と最大の増殖量を示した。同様に比増殖速度 μ への影響を Fig.5(b) に示した。塩化アンモニウムの場合、窒素として 70mg/l が最大の 1.15 day⁻¹ を示し、硝酸アンモニウムの場合は 56mg/l で 0.99 day⁻¹ と最大の μ を示した。

3-4 リンの影響

リン量の増殖量への影響を検討した結果を Fig.6 (a) に示した。塩化アンモニウムおよび硝酸アンモニウムいずれの場合も、リンとして 25mg/l 以上 310mg/l までは吸光度で 0.9 以上と良好な増殖を示し、3,100mg/l では増殖が抑制された。比増殖速度 μ に対する影響を Fig.6 (b) に示した。塩化アンモニウムの場合、リンとして 31mg/l で最大の 1.07 day⁻¹ を示し、硝酸アンモニウムの場合、リンが 6.2-62mg/l の範囲で高い μ を示した。

Fig. 5. Effect of NH_4Cl and NH_4NO_3 concentration on the growth of *S. acutus*. (a) absorbance at 750nm. (b) specific growth rate (μ).
● — NH_4Cl , ▲ — NH_4NO_3 .

4. 考 察

養魚池で周年出現する *S. acutus* を単藻培養し、各種の環境因子および化学因子の増殖におよぼす影響について検討を加えた。*S. acutus* は緑藻で、750nmの吸光度と藻体重量とは良好な相関がみとめられ、吸光度を測定することにより、藻体重量を推定することが可能であった⁸⁾。Rhee は *Scenedesmus* sp. を用い、20℃、17,000lux で μ が 0.59day^{-1} ⁹⁾、また Rhee & Gotham は pH 7.3-7.6、20℃以上、5,600lux 以上で μ が 1.3day^{-1} で一定になると報告している¹⁰⁾。本実験の条件である 3,000lux では 0.75day^{-1} となり、この値よりも低い値であった。

pH と緑藻類の増殖との関係については、弱酸性から弱アルカリ性でよく増殖することが知られている。*S. acutus* もこの範囲で良好な増殖が認められたが、窒素化合物の形態によって最大増殖量を示す培地の初期 pH が異なった。また培地の初期 pH による比増殖速度 μ と最大増殖量とは、必ずしも一致しなかった。さらに μ は硝酸ナトリウムに比べ硝酸アンモニウムで高い値を示した。

窒素化合物の形態による最大増殖量への影響を調べた。最大増殖量は尿素、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウムの順であり、いずれの窒素化合物でも良好な増殖を示した。培養中の

Fig. 6. Effect of phosphorus concentration on the growth of *S. acutus*.
(a) absorbance at 750nm. (b) specific growth rate (μ).
● — NH_4Cl as nitrogen source,
▲ — NH_4NO_3 as nitrogen source.

培地 pH は、尿素、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムで上昇し、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムで低下した。アンモニウムを含む培地で pH が低下することは、Trelease & Trelease¹¹⁾、Krauss & Thomas¹²⁾ や McLachlan & Gorham¹³⁾ 等が報告している。この実験で硝酸アンモニウムを用いた培地の pH が低下したことから、この *S. acutus* は硝酸イオンよりアンモニウムイオンを先に吸収したと推測され、また尿素がそれ以上に吸収され易いと思われる¹⁴⁾。窒素の増殖に適した濃度範囲は、*Anabaena variabilis*¹⁴⁾ で $106-466\text{mg/l}$ や *Phormidium luridum*¹⁷⁾ で $8-164\text{mg/l}$ と比較してほぼ同様な濃度範囲であった。*Scenedesmus obliquus* (日本淡水藻図鑑、内田老鶴圃新社(1977)) では *S. acutus* は 6.2-7.5% の窒素を含み、その 90% がタンパク質である¹²⁾ ことから、増殖に多量の窒素を要求すると考えられた。*S. acutus* は $\text{NH}_4\text{-N}$ 14mg/l の場合約 330mg/l の藻体が増殖したことから、窒素の約 24 倍の藻体が生成されたことになり、*Microcystis* で 30 倍¹⁶⁾、*Phormidium* で 15 倍¹⁷⁾ の報告があり、両者の中間的な窒素要求性の株であった。

良好な増殖が得られるリン濃度は *M. aeruginosa* で 0.18mg/l ¹⁸⁾、 0.9mg/l ¹⁵⁾、*Anabaena spiroides* で 0.52mg/l ¹⁹⁾ および *Phormidium persicinum* で約 1mg/l ²⁰⁾ と報告され、また *S. obliquus* の細胞内リン量が 1.02-1.82% 含有されて

いる¹²⁾。実験に供した *S. acutus* は NH_4NO_3 の場合、リン 62mg/ℓ、 NH_4Cl の場合、リン 155mg/ℓ で最大の増殖量が得られたが、 NH_4Cl の場合、3.1mg/ℓ のリンから 313mg/ℓ の藻体を得られ、リンに対し 100 倍の藻体が生成すると考えられた。このことから *S. acutus* は *S. obliquus* と同様であり、藍藻類に比し高濃度のリンを要求する株と考えられた。

5. まとめ

緑藻類 *S. acutus* を養魚池から単藻培養し、その栄養塩の要求性を検討した。増殖には弱アルカリ性が適し、最適 pH は 7-9 であった。窒素源としては尿素、アンモニウム、亜硝酸および硝酸塩どれでも良く、窒素が 14mg/ℓ 以上で良好な増殖が認められた。リンを高濃度に要求する株であった。

引用文献

- 1) 千葉健治、ステファノ・マルトラノ (1983) : 水質環境と魚類の成長 IX. 水産増殖, 31, 26-32.
- 2) 平野禮二郎 (1980) : 止水式養魚 (淡水養魚と用水 日本水産学会編), 恒生社厚生閣 (東京), 47-52.
- 3) 山形陽一、丹羽誠 (1982) : 日本ウナギに対するアンモニアの急性毒性および慢性毒性. 日本水産学会誌, 48, 171-176.
- 4) 山形陽一、丹羽誠 (1979) : 亜硝酸のウナギに対する毒性について. 水産増殖, 27, 5-11.
- 5) 千葉健治 (1980) : 水質環境と魚類の成長 VII. 水産増殖, 28, 66-77.
- 6) Talbot, P., J.-M. Thebault, A. Dauta and J. DE LA NOUE (1991) : A Comparative study and mathematical modeling of temperature, light and growth of three microalgae potentially useful for wastewater treatment. Wat. Res. 25, 465-474.
- 7) Hughes, E. O., P. R. Gorham and U. A. Zehnder (1958) : Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Microbiol., 4, 225-236.
- 8) 保坂三継 (1991) : 村山貯水池から分離した *Anabaena macrospora* MYK87X の培養と増殖特性について. 日本水処理生物学会誌, 27, 21-31.
- 9) Rhee, G.-Y. (1978) : Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. Limnol. Oceanogr., 23, 10-25.
- 10) Rhee, G.-Y. and I. J. Gotham (1981) : The effect of environmental factors on phytoplankton growth : Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. Limnol. Oceanogr., 26, 635-648.
- 11) Trelease, S. F. and H. M. Trelease (1935) : Changes in hydrogen concentration of culture solutions containing nitrate and ammonium nitrogen. Amer. J. Bot., 22, 520-542.
- 12) Krauss, R. W. and W. H. Thomas (1954) : The Growth and inorganic nutrition of *Scenedesmus obliquus* in mass culture. Plant Physiol., 29, 250-214.
- 13) McLachlan, J. and P. R. Gorham (1961) : Growth of *Microcystis aeruginosa* KUTZ. in a precipitate-free medium buffer with TRIS. Can. J. Microbiol., 7, 869-882.
- 14) Kratz, W. A. and J. Myers (1955) : Nutrition and growth of blue-green algae. Amer. J. Bot., 42, 282-287.
- 15) Zehnder, A. and P. R. Gorham (1960) : Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* KUTZ. emend. ELENKIN. Can. J. Microbiol., 8, 1-11.
- 16) 矢木修身、萩原富司、高村義親、須藤隆一 (1984) : 霞ヶ浦から分離した *Microcystis* の無菌株と単藻株の増殖特性. 水質汚濁研究, 2, 496-503.
- 17) 小橋二夫、出口吉昭、東 禎三、矢崎仁也、矢木修身 (1991) : 養魚池から分離した *Phormidium luridum* の増殖特性. 日本水処理生物学会誌, 27, 11-17.
- 18) Gerloff, G. C., G. P. Fitzgerald and F. Skoog (1952) : The mineral nutrition of *Microcystis aeruginosa*. Amer. J. Bot., 39, 26-32.
- 19) Volk, S. L. and H. K. Phinney (1966) : Mineral requirement for the growth of *Anabaena spiroides* in vitro. Can. J. Bot., 46, 619-630.
- 20) Pinter, I. J. and L. Provasoli (1958) : Artificial cultivation of red-pigmented marine blue-green alga, *Phormidium persicum*. J. Gen. Microbiol., 18, 190-197.