珪藻 *Licmophora* の増殖に及ぼす環境諸要因の影響

大貝 政治・塚原 博・松井敏夫・中島和広

(1983 年 11 月 21 日受理)

The Effect of the Environmental Factors on the Growth of two Epiphytic Diatoms *Licmophora abbreviata* AGARDH and *L. paradoxa* (LYNGBYE) AGARDH *in vitro*

Masaharu OHGAI,*¹ Hiroshi TSUKAHARA,*² Toshio MATSUI,*¹
and Kazuhiro NAKAJIMA*³

This study deals with the influence of temperature, pH, light intensity, chlorinity and nutrients on the growth of two epiphytic diatoms, *Licmophora abbreviata* and *L. paradoxa* in the laboratory culture. They are known to be the harmful species attaching to the edible laver, *Porphyra* and other algae. The results were as follows:

- 1) The range of the optimal temperature for good growth was 15–25°C in *L. abbreviata* and 20–25°C in *L. paradoxa*.
- 2) The optimal chlorinity was 15–16.5‰ in *L. abbreviata* and 14–16‰ in *L. paradoxa*.
- 3) The optimal pH was not different from each other, 7.8–8.5.
- 4) The relationship between light intensity and growth was found to vary with the temperature. At 15°C both species showed the optimal growth in the interval from 8,000 to 20,000 lx, while at 20°C the optimal growth was from 5,000 to 20,000 lx in *L. abbreviata* and from 5,000 to 10,000 lx in *L. paradoxa*.
- 5) The cultures in the standard artificial medium (ASP₁₂) and its variations without each nutrient element showed that the growth of both species decreased with lack of inorganic N, inorganic P, Borate and Silicate. Especially lack of inorganic N and Borate caused serious damage to the growth of both species.

着生珪藻は、のり養殖における害藻で、のり網に着いて単胞子の着生や幼芽の生育を阻害し、またのり葉体にも大量に付着してドタグサレ症を引き起こして品質低下の害をあたえる。とくに瀬戸内海西部における浮き流し漁場では、12 月以降これによって大きな被害を受けている。

着生珪藻については、これまで岡村¹⁴⁾がのり簀に着生する珪藻について報告して以来、加藤,⁹⁾ 加藤ら¹⁰⁾の葉体に着生する珪藻の月別消長と分布の研究、佐野ら¹⁷⁾、東京都水試¹⁸⁾ののり漁場にみられる珪藻の種類と量の研究および山口県内海水試¹⁹⁾のドタグサレ症を起す *Licmophora* の生態に関する報告などがみられるが、その生理・生態については不明な点が多い。このため筆者等は、のり養殖期に出現する着生珪藻のうち主要な数種を選び、それらの生理・生態の研究を行なっているが、今

回はのり葉体に着生する *Licmophora* 2 種の増殖に及ぼす温度、塩素量、pH、照度、栄養塩の影響を室内実験から調べたので、その結果を報告する。

材料及び方法

実験に用いた材料は、1981 年 2 月、11 月に下関市王司地先ののり養殖場で採集した *Licmophora abbreviata* AGARDH と *L. paradoxa* (LYNGBYE) AGARDH である。採集後直ちに実験室に持ち帰り、ビベット法で洗滌したあと、海水 100 ml 中に Table 1 に示した ES enrichment¹⁶⁾ (Si を含む) 2 ml 加えた培養液 PESSi で培養した。実験は、径 18 mm、高さ 150 mm のネジロ試験管に 10 ml の培養液を入れ、この中に細胞数が 10 cells/ml になるように材料を接種して、一定期間後に細胞数を調べた。培養液は、栄養塩の実験には ASP₁₂¹⁵⁾ (Table 2)

*¹ 水産大学校 (Shimonoseki University of Fisheries, Yoshimi, Shimonoseki 759-65, Japan).

*² 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan).

*³ 小野田水圏公害研究所 (Onoda Municipal Laboratory of Water Pollutions, Takahama, Onoda, Yamaguchi 756, Japan).

Table 1. Composition of ES₂ enrichment

Distilled water	100 ml
NaNO ₃	350 mg
Na ₂ -glycerophosphate	50 mg
Fe-EDTA	2.5 mg
PII metals*	25 ml
Vitamin B ₁₂	10 µg
Thiamine HCl	0.5 mg
Biotin	5 µg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	500 mg
TRIS	500 mg
pH	7.8

* One ml of PII metals contains: ethylenediamine tetracetic acid, 1 mg; Fe (as Cl), 0.01 mg; B (as H₃BO₃), 0.2 mg; Mn (as Cl), 0.04 mg; Zn (as QI), 0.005 mg; Co (as Cl), 0.001 mg.

Table 2. Composition of ASP₁₂

Distilled water	100 ml
NaCl	2.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4 g
KCl	0.07 g
Ca (as Cl ⁻)	40 mg
NaNO ₃	10 mg
K ₃ PO ₄	1 mg
Na ₂ -glycerophosphate	1 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	15 mg
Vitamin B ₁₂	0.02 µg
Biotin	0.1 µg
Thiamine HCl	10 µg
PII metals* ¹	1 ml
S2 metals* ²	1 ml
TRIS	0.1 g
pH	7.8-8.0

*¹ See Table 1.

*² One ml of S2 metals contains: Br (as Na), 1.0 mg; Sr (as Cl), 0.2 mg; Rb (as Cl), 0.02 mg; Li (as Cl), 0.02 mg; I (as K), 0.01 mg; Mo (as Na), 0.05 mg.

を用いたのはいずれも PESSi を使用した。培養実験はいずれも無菌条件下で行ない、細菌検査は STP 培地⁶⁾を用いた。

温度の実験は、5~30°C の間に 5°C ごとの 6 区を設け、照度 4,500~5,000 lx (光源は白色蛍光灯)、1 日 12 時間照明の条件下で行なった。培養期間は各区の増殖を観察しながら、それぞれ定常期 (stationary phase) に達するまでとした。

塩素量の実験は、海水と蒸留水を混合して普通海水の 0.1~1.0 倍の濃度区及び 70~80°C に加熱して濃縮した 1.2 倍までの濃度区を設けて行なった。

pH の実験は、1 N HCl と 0.5 N NaOH を用いて 6.0~9.0 の間に 8 pH 区を作って行なった。なお塩素量と pH については、15, 20°C の恒温区で、光条件を温

度の項と同じにした。

照度の実験は、15, 20°C の各恒温区で、光源に 300W のフォトリフレクターランプを用い、光源からの距離をかえることによって 0~20,000 lx の間に 8 照度区を作り、12 時間ごとの明暗周期で行なった。

栄養塩の実験は、人工海水 ASP₁₂ から主要要素を 1 つずつ除いた培養液を作成し、塩素量や pH の項と同じ光、温度条件下で培養し増殖量の変化を観察した。培養期間は、温度の項を除きいずれも 10 日間であった。

実験終了時の細胞数の計測は、最初に 0.5 N の NaOH を 0.2 ml 加えてよく攪拌してそのまま 4~24 時間放置し、つぎに試験管内壁に着いた *Licmophora* を落すため径 1 mm のガラス玉を 150~200 個入れてさらに攪拌した後、一定量の液をとり顕微鏡下で行なった。

結果及び考察

Licmophora の増殖に及ぼす種々の要因の影響は、方法でも述べたように 10 日間培養してその増殖量から判定した。10 日間というのは、*Licmophora* を 15, 20°C、照度約 5,000 lx、1 日 12 時間照明の条件下で培養するとほぼ定常期に達するまでの所要日数である。今回はこれを基準にして実験を行ない、10 日後に一定の増殖量を示さなければ何らかの影響があると判断した。

温度 *L. abbreviata* の増殖と温度の関係は、Fig. 1, A に示した。これによれば増殖が定常期に達した時の細胞数は、いずれも 7000~9000 cells/ml であった。しかしそれまでの所要日数は温度によって異なり、5°C で 23 日、10°C で 15 日、15°C で 11 日、20°C で 10 日、25°C で 9 日間で、増殖速度は温度の上昇につれて早まる傾向にあった。なお 30°C では 2~3 日後にすべて死滅した。

つぎに *L. paradoxa* の増殖と温度の関係は Fig. 1, B に示した。本種も 30°C では 2~3 日後に死滅したが、そのほかの温度区では、5°C で 23 日、10°C で 18 日、15°C で 12 日、20°C で 10 日、25°C で 9 日間で増殖の定常期に達した。しかし 15°C 以下になると *L. abbreviata* より増殖速度が次第に遅くなる傾向にあった。

下関市地先と小野田市地先ののり養殖場の観察によれば、葉体に着生する *Licmophora* の種類は、とくに 1~3 月の低水温期になると *L. abbreviata* が大部分を占めるようになった。また藤山³⁾は、山口県柳井市地先の養殖場でみられる *Licmophora* が、2~3 月には *L. abbreviata* が多かったと報告している。これらの結果からのり漁場では、水温の下降にともなって葉体に着生する種類の組成も変化しており、低水温期になると低い水温でもよく増殖する *L. abbreviata* が優占してくるものと考えられる。

Fig. 1. Growth curves of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) at different temperature. The curves of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C and 25°C are represented by ▲, ■, ●, ○ and □, respectively.

Fig. 2. Growth of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) at various chlorinities after 10-day cultivation. The solid line indicate the growth in the case of cultivation at 15°C and the dotted line at 20°C. Each point is mean value of cell numbers and each vertical bar represents a range between maximum and minimum of cell numbers in six experiments.

塩素量 *L. abbreviata* の増殖と塩素量の関係は、15, 20°C の温度条件について行ない、Fig. 2, A に示した。両温度区とも 13~18‰ で増殖量が多く、そのうち 15~16.5‰ で最も増殖が多かった。

L. paradoxa の増殖と塩素量の関係は、Fig. 2, B に示した。増殖の傾向は、*L. abbreviata* とほぼ同じで、両温度区とも 14~16‰ で最大の増殖量を示した。また本種と前種の増殖に及ぼす塩素量の影響を比較すると、Fig. 2, A, B にみられたように前種の方が塩分変化に広い適

応範囲をもつ種類であると思われる。

塩素量については、両種とも普通海水より低い塩素量で増殖量が多かったが、この傾向から両種の生育分布が沿岸内湾に限定されているものと思われる。このことから漁場では、河川水の流入や降雨などによる塩素量の低下が刺激となって両種の増殖を促進させることもあると考えられる。

pH *Licmophora* 両種の増殖と pH の関係は、それぞれ Fig. 3, A 及び B に示した。両種とも 15, 20°C 区の

Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) after 10-day cultivation. The solid line indicate the growth in the case of cultivation at 15°C and the dotted line at 20°C. Each point is mean value of cell numbers and each vertical bar represents a range between maximum and minimum of cell numbers in six experiments.

Fig. 4. Growth of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) under different light intensity after 10-day cultivation. The solid line indicate the growth in the case of cultivation at 15°C and the dotted line at 20°C. Each point is mean value of cell numbers and each vertical bar represents a range between maximum and minimum of cell numbers in six experiment.

増殖量は、pH 7.5~8.5 で多かったが、低 pH 区 (6.5~7.0) では *L. paradoxa* が、高 pH 区 (9.0) では *L. abbreviata* がよく増殖する傾向にあった。pH の影響については、植物プランクトンは一般に最適塩素量が低い種類は高い pH を好み、最適塩素量が高くなるにしたがって好適な pH が低くなる傾向にある。⁷⁾ 前項の結果から両種の最適塩素量に若干の違いがみられたが、pH については顕著な違いがみられなかった。

りの漁場では、漁期を通じて pH の変動を調べてみると普通 8.0~8.3 の範囲である。この pH 域は、上述の結果から *Licmophora* の増殖には最も良い条件と思われる。また日中のりの光合成が盛んなときに、葉体に接触している海水の pH が 8.3 以上になる場合もあること

が報告⁸⁾されているが、このときでも *Licmophora* は活発な増殖を行なっているものと考えられる。

照度 *L. abbreviata* の増殖と照度の関係は、Fig. 4, A に示した。15°C 区では、8,000 lx 以上で最も増殖量が多くなり、20,000 lx までほぼ同じ増殖量であった。一方 20°C 区では、5,000 lx 以上で増殖量が最大となり、20,000 lx までほぼ同じであった。

L. paradoxa の増殖と照度の関係は、Fig. 4, B に示した。15°C 区では、*L. abbreviata* とほぼ同じで 8,000 lx 以上で最大の増殖量を示し、20°C 区では 5,000~10,000 lx で最も増殖量が多かった。

山口県内海水試¹⁹⁾は、*Licmophora* sp. の増殖と照度の関係について、10, 15°C 区では 3,000 lx で増殖量が最大

となり、これを超えると低下していくと報告している。今回の結果と比較すると、種類が異なっていることも原因として考えられるが、大きな違いがみられた。しかし今回の結果から、のり漁場では日中の照度が普通数万 lx あるので、20,000 lx を超える 照度のときの増殖については不明であるが、照度不足による *Licmophora* の増殖

阻害はまずおこることはないと考えられる。

栄養塩 *L. abbreviata* の増殖と栄養塩の関係は、Fig. 5, A に示した。20°C 区の増殖がやや良いが両温度区ともほぼ同じ傾向がみられ、ASP₁₂ から K₃PO₄, NaNO₃, Na₂Si·O₃, PII metals をそれぞれ除いたもので増殖量が少なく、とくに NaNO₃, PII metals を除くとほとんど

Fig. 5. Difference of growth of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) after 10-day cultivation in ASP₁₂ and various media which omitted each nutrient element from ASP₁₂. Each element omitted is represented by minus signs. The growth cultured at 15°C is symbolized as and the growth at 20°C as .

Fig. 6. Difference of growth of *Licmophora abbreviata* (A) and *L. paradoxa* (B) after 10-day cultivation in ASP₁₂ and various media which omitted each metal from PII metals of ASP₁₂. Two species of *Licmophora* were cultured at 20°C.

増殖しなかった。一方 $\text{Na}_2\text{-glycerophosphate}$, ビタミン類を除いても増殖量の低下は, 比較的僅かであった。

L. paradoxa の増殖と栄養塩の関係は, Fig. 5, B に示した。本種も前種とほぼ同じような関係がみられ, 15, 20°C 区とも NaNO_3 , PII metals を除くとほとんど増殖せず, K_3PO_4 を除いたものでも増殖が抑制された。一方 Na_2SiO_3 , $\text{Na}_2\text{-glycerophosphate}$ を除くと増殖が少し抑制されたが, ビタミン類についてはあまり影響がみられなかった。

つぎに PII metals の欠除は, 両種の増殖を極めて低下させたので, PII metals に含まれる個々の金属についてその影響を調べ, 結果を Fig. 6, A 及び B に示した。これによれば両種とも H_3BO_3 が欠除すれば全く増殖せず, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ を除いても増殖が抑制された。

今回の実験結果から *Licmophora* の増殖には, 無機窒素, 硼酸が特に必要で, 無機磷, 珪酸なども必要な要素であることがわかった。これらの栄養塩のうち無機窒素, 無機磷, 珪酸については, 他の珪藻でも確められている。¹⁾

珪藻は, 一般に磷を磷酸として蓄積し, 外部環境に磷がなくなると貯蔵磷酸を使用して細胞分裂を行うことが知られている。^{11, 12)} 今回の結果から無機磷無添加区での増殖量が無機窒素無添加区より多かったのは, *Licmophora* も上述の機能を有しているためと考えられる。のり漁場では, 漁期末期になると栄養塩とくに無機の窒素, 磷が減少し, また葉体に着生する *Licmophora* も次第に減ってくる。この *Licmophora* の減少の要因は, 栄養塩以外にも種々の要因が作用しているものと考えられるが, 栄養塩のなかでは無機窒素の減少が大きいと考えられる。硼酸については, HERZINGER⁴⁾ が珪藻の増殖を刺激すると報告しているが, そのほか藍藻の *Nostoc*,²⁾ 緑藻の *Chlorella*¹³⁾ などの培養にも必要とされている。これらと同様に *Licmophora* についても同じような作用を認めた。珪酸は珪藻の殻を構成する重要な要素であるが, *Bacillaria paradoxa* の対数増殖期における増殖率には珪酸の濃度が $1 \mu\text{g-at/l}$ あればほとんど影響を受けないとされている。⁶⁾ この濃度は, 普通のり漁場でみられる最低値以下であるので, 珪酸の減少が *Licmophora* の増殖の抑制要因とはならないと思われる。

以上から *Licmophora* 2 種の増殖に及ぼす環境諸要因の影響が明らかになった。のり漁場での葉体に着生する *Licmophora* の月別消長は, 瀬戸内海西部においては普通張り込みと同時に着生がみられ, ついで 11, 12 月から翌年の 1 月にかけて着生量が多くなり, 2, 3 月には減少する。このような状況は今回の実験結果から推測すると, 10~12 月にかけては水温も高く, 栄養塩も豊富であり, また塩素や pH などの要因を考えても *Licmophora*

の増殖にはほぼ適した環境で, *Licmophora* が急速に増殖する時期と思われる。しかし 1 月になると水温の低下及び栄養塩の減少などで増殖がにぶり, 2, 3 月には pH, 光条件は良好と思われるが, 水温が最も低い時期となり, 栄養塩もさらに減少し, また湧水期における塩素量の上昇などから *Licmophora* の増殖が抑制され, 着生量も減少していくものと考えられる。

摘 要

本研究は, のり葉体に着生する *Licmophora abbreviata*, *L. paradoxa* の増殖に及ぼす温度, 塩素量, pH, 照度, 栄養塩の影響について室内培養実験を行ない, 以下の結果を得た。

1. *L. abbreviata* の増殖適温は 15~25°C, *L. paradoxa* は 20~25°C であった。
2. 塩素量は, *L. abbreviata* が 15~16.5‰ *L. paradoxa* が 14~16‰ で最も増殖がよかった。
3. pH は両種とも 7.5~8.5 で増殖量が多かった。
4. 照度は, 15°C で両種とも 8,000~20,000 lx, 20°C で *L. abbreviata* が 5,000~20,000 lx *L. paradoxa* が 5,000~10,000 lx で増殖量が多かった。
5. 栄養塩は, 両種とも無機窒素, 無機磷, 珪酸, 硼酸が必要で, そのうちとくに無機窒素, 硼酸がないとはほとんど増殖しなかった。

終りに本報告に対し有益な御助言をいただいた九州大学奥田武男博士, 水産大学校鶴田新生教授, 広島大学名誉教授藤山虎也先生に心より感謝申し上げる。

文 献

- 1) P. K. BIENFANG, P. J. HARRISON, and L. M. QUARMBY: *Mar. Biol.*, **67**, 295-302 (1982).
- 2) C. EYSTER: *Nature*, **170**, 755 (1952).
- 3) 藤山虎也: 柳井湾 漁業資源実体調査 報告書, 柳井湾漁業調査委員会, 128-139 (1980).
- 4) F. HERZINGER: *Pflanzenernährung*, **16**, 141-168 (1952).
- 5) 今田 克・安藤 真・前木 樹: 日水誌, **35**, 362-378 (1969).
- 6) H. IWASAKI: *Plant and Cell Physiol.*, **6**, 325-336 (1965).
- 7) 岩崎英雄: 海洋プランクトン (丸茂隆三編), 海洋学講座, **10**, 第 1 版, 東京大学出版会, 東京, 1974, pp. 41-63.
- 8) E. L. JORGENSEN: *Dansk. Botan. Arkiv.*, **18**, 6-54 (1957).
- 9) 加藤 孝: 日本生態学誌, **5**, 35-37 (1955).
- 10) 加藤 孝・河村光保: 日本生態学誌, **6**, 6-7 (1956).
- 11) E. J. KUENZLER and B. H. KETCHUM: *Biol. Bull.*, **123**, 134-145 (1962).

- 12) F. J. MACKERETH: *J. Exptl. Botany*, **4**, 296–313 (1953).
- 13) W. J. MCILARTH and J. SKOK: *Plant. Physiol.*, **32**, suppl., xxiii (1957).
- 14) 岡村金太郎: 浅草海苔, 第1版, 博文館, 東京, 1909, pp. 105–112.
- 15) L. PROVASOLI, J. J. A. McLAUGHLIN, and M. R. DROOP: *Arch. für Mikrobiol.*, **25**, 392–428 (1957).
- 16) L. PROVASOLI: in “*Cultures and collections of algae*” (ed. by WATANABE and A. HATTORI), Proc. U. S.-Japan Conf. Hakone, Sept, 1966, Japan Soc. Plant Physiol., 1968, pp. 63–75.
- 17) 佐野 孝・佐藤重勝: 東北水研報, **16**, 127–134 (1960).
- 18) 東京都水産試験場: 東京都水試出版物通刊 No. 136, 1–17 (1960).
- 19) 山口県内海水産試験場: 昭和 46 年度指定調査研究総合助成事業報告書, 39–48 (1972).