

海域における赤潮発生モデル化に関する研究

Modeling of Red Tide Blooms in the Coastal Sea

昭和57/58年度 特別研究報告

Research Report in 1982-1983

渡辺正孝 編

edited by M. WATANABE

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

国立公害研究所研究報告 第80号

海域における赤潮発生モデルに関する研究

昭和57/58年度 特別研究報告

R-80 正誤表

ページ	行	誤	正
7	21	界	昇
13	Abstract 4行目	ca,	ca.
14	7	considard	considered
	7	facrors	factors
15	20	付けた,	付けた。
25-31	running title	CIN比	C/N比
34	23	で	を
47	11	ポリ <u>ソ</u> ン酸	ポリ <u>リ</u> ン酸
52	図3説明3	orthophosphbte	orthophosphate
	7	orthosphphoric	orthophosphoric
	9	orthosphate	orthophosphate
70	図1脚註	<i>Tatraselmis</i> sp.	<i>Tetraselmis</i> sp.
92	7	figer	finger
92	21	1072	1972
92	30	3℃低温の	3℃高温の
100	図10 キャプション中	1076	1976
120	29	<u>漏れる</u>	漏れない
131	20	良 <u>す</u>	良 <u>く</u>
135	Fig. 11 caption	modfl	model

序

赤潮は瀬戸内海、内湾など半閉鎖海域に起こる現象で、水産業、特に養殖漁業が被る被害はばく大である。

国立公害研究所では1979～1981年度に特別研究「海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究」を実施し、鞭毛藻を大量に純粋培養することのできるマイクロコズムや赤潮が集積する現象を解明するための内湾密度流実験装置などを開発して多くの知見を得た。これらは研究所の報告R-30-'82及びR-63-'84として発表した。

このような藻類が海中で急速に増殖して海面に筋状に集積するが、それは長くは停留せず消滅するなどその生態を含めて不明な点が極めて多い。そこで1982年よりは特別研究として「海域における赤潮発生のモデル化に関する研究」を実施し、さらに赤潮の現象の解明を続けるとともにその発生の機構を明らかにしようとして努力してきた。すなわち、なぜ鞭毛藻が一日を周期として昼間は海面近くにあがり、夜は海底に沈むのか、またそのようにして栄養塩を体内に取り入れて成長するメカニズムは何か、さらに海面に筋状に集積する現象はどのようにして説明ができるかなどについて実験や理論的な研究を積み重ねてきた。さらに実際に瀬戸内海に現場マイクロコズムを設置し室内実験と比較した。

この研究は現在も進行中であるが、1982年、1983年に得られた知見をまとめてここに刊行する次第である。

赤潮の現象はここに述べたように生態学的にも、また海洋の物理、化学の両面からも研究されなければならない。さらにその数学モデルを構築する問題になるとまだ不十分な点が少なくない。しかし、ここでは一つの試みを示し、実験や観測の結果をある程度説明するところまで進むことができた。これで十分とは言えないが、多くの方々から有益な御指導を受けることを期待している。

なお本研究については客員研究員として所外の多くの方々の協力を得ていることを付記する。

1985年3月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

目 次

I. 研究の概要と意義	1
渡辺正孝	
II. 報 文	
1. 制御実験生態系（マイクロコズム）を用いた赤潮発生機構の解析（III）—赤 潮鞭毛藻 <i>Heterosigma akashiwo</i> の日周鉛直移動と日周体積変化の関係	13
木幡邦男・渡辺正孝	
2. 制御実験生態系（マイクロコズム）を用いた赤潮発生機構の解析（IV）—赤 潮鞭毛藻 <i>Heterosigma akashiwo</i> の増殖中細胞にみられる C/N 比とクロロ フィル <i>a/c</i> 比の日周変化	23
木幡邦男・渡辺正孝	
3. <i>Heterosigma akashiwo</i> の日周鉛直移動による表面集積とマイクロコズム内 での光吸収係数	33
渡辺正孝・宮崎忠国	
4. <i>Heterosigma akashiwo</i> のリン酸塩摂取と ³¹ P-NMR によるポリリン酸代謝 過程の計測	47
渡辺正孝・木幡邦男・功刀正行	
5. <i>Chattonella antiqua</i> によるアンモニウム塩摂取及び硝酸塩—アンモニウム 塩摂取の相互作用	57
中村泰男	
6. <i>Chattonella antiqua</i> と <i>Heterosigma akashiwo</i> のアルカリホスファターゼ 活性	67
中村泰男	
7. 窒素あるいはリン制限下における <i>Chattonella antiqua</i> の増殖の動力学	73
中村泰男	
8. 内湾における熱塩循環流の実験的研究	85
原島省・渡辺正孝	
9. 鞭毛藻による生物対流の数値実験的研究	103
原島省・渡辺正孝・藤代一成	
10. 現場マイクロコズムにおける <i>Heterosigma akashiwo</i> の増殖	119
渡辺正孝・渡辺信・木幡邦男・中村泰男・原島省	

CONTENTS

I .	Outline and Significance of the Studies	1
	Masataka WATANABE	
II .	Papers	
1 .	The Use of a Controlled Experimental Ecosystem (Microcosm) in Studies of Mechanism of Red Tide Outbreaks, III—Interrelation between Diurnal Vertical Migration and Diurnal Change of Mean Cell Volume Found in the Culture of <i>Heterosigma akashiwo</i> , a Red Tide Fragellate	13
	Kunio KOHATA and Masataka WATANABE	
2 .	The Use of a Controlled Experimental Ecosystem (Microcosm) in Studies of Mechanism of Red Tide Outbreaks, IV—Diurnal Changes of C/N and Chlorophyll <i>a/c</i> Ratios in the Culture of <i>Heterosigma akashiwo</i> , a Red Tide Fragellate	23
	Kunio KOHATA and Masataka WATANABE	
3 .	Accumulation of <i>Heterosigma akashiwo</i> at the Water Surface due to Vertical Migration and Absorption Coefficient in Microcosm	33
	Masataka WATANABE and Tadakuni MIYAZAKI	
4 .	Phosphate Uptake and ³¹ P-NMR Studies of Polyphosphate Metabolism in <i>Heterosigma akashiwo</i>	47
	Masataka WATANABE, Kunio KOHATA and Masayuki KUNUGI	
5 .	Ammonium Uptake Kinetics and Interactions between Nitrate and Ammonium Uptake in <i>Chattonella antiqua</i>	57
	Yasuo NAKAMURA	
6 .	Alkaline Phosphatase Activity of <i>Chattonella antiqua</i> and <i>Heterosigma akashiwo</i>	67
	Yasuo NAKAMURA	
7 .	Growth Kinetics of <i>Chattonella antiqua</i> under Nitrogen- or Phosphorus-limited Conditions	73
	Yasuo NAKAMURA	
8 .	An Experimental Study on the Thermohaline Circulations in the Bay	85
	Akira HARASHIMA and Masataka WATANABE	
9 .	A Numerical Experiment on the Bioconvection in the Culture of a Flagellate	103

Akira HARASHIMA, Masataka WATANABE and Issei FUJISHIRO
10. In situ Microcosm Culture for Growth of *Heterosigma akashiwo*..... 119
Masataka WATANABE, Makoto M. WATANABE, Kunio KOHATA,
Yasuo NAKAMURA and Akira HARASHIMA

研究の概要と意義 Outline and Significance of the Studies

渡辺正孝¹

Masataka WATANABE¹

要 旨

本研究では制御実験生態系を用いた日周鉛直移動実験、純粹培養系を用いた増殖実験、内湾密度流実験装置を用いた海水交換実験、そして現場マイクロゾムを用いた現場増殖実験の結果を報告する。

制御実験生態系内で純粹培養された *H. akashiwo* の日周体積変化（細胞分裂周期）は明暗周期に同調し、日周鉛直移動を制御する要因の一つであることが判明した。さらに炭素・窒素・クロロフィル色素含有量の個体当たりの値は明暗周期に同調するが、体積当たりの変化は少なく、細胞体積の増大がそれら含有量の同化・合成と並行して行われていることが判明した。*H. akashiwo* は日周鉛直移動に伴う表面集積により、光エネルギーを有効に吸収しており、表面での吸収エネルギーの約90%が *H. akashiwo* により吸収されることが判明した。

³¹P-NMR により *H. akashiwo* 細胞内のリン代謝過程を計測した。リン欠乏状態からリン酸塩添加により、急激なリン摂取がみられ、その多くはポリリン酸の形態で蓄積することが判明した。

C. antiqua によるアンモニウム塩摂取は Michaelis-Menten 式に従うこと、硝酸塩摂取はアンモニウム塩により阻害を受けることが判明した。リン欠乏状態にある *C. antiqua* 及び *H. akashiwo* のアルカリホスファターゼ活性 (APA) は微弱であり、有機リン酸エステルをリン源として利用できないことが判明した。*C. antiqua* の増殖速度は窒素制限下及びリン制限下において、ともに Droop の式で記述できることが判明した。

夏期から冬期にかけての表面冷却にともなう連続的な海水交換過程の実験を行い、塩分・水温差と海水交換量との定性的な関連を明らかにした。鞭毛藻の鉛直移動に伴う密度不安定を2次元数値モデルにより解析し、培養実験に見られる流動パターンを定量的に説明した。

現場海域の環境をよく再現し、補食・競合・分散等の効果を除外した透析培養装置を大阪湾泉佐野港に設置し、現場増殖実験を行った。その結果 *H. akashiwo* は膜を通しての栄養塩移動量及び照度に制限を受けることが判明した。さらに室内培養実験結果をもとに作

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

成した増殖モデルは現場増殖実験結果を良く説明することが判明した。

Abstract

In this report we include the following research topics, namely diurnal vertical migration using the microcosm, growth kinetics using axenic clonal culture, sea-fresh water exchange using density current experimental facility and in situ growth experiments using field microcosm.

Clonal culture of *Heterosigma akashiwo* was grown in the microcosm and circadian rhythm associated with cell division cycle of *H. akashiwo* was entrained by LD cycle and was considered as one of major controlling factors on the vertical migrations. Although contents of carbon, nitrogen and chlorophyll pigments per cell number increased at the light period and decreased in the dark, those values per cell volume did not change significantly. It was suggested that cells of *H. akashiwo* enlarged their size at the light period in parallel with assimilation of carbon and nitrogen and with synthesis of chlorophyll pigments.

H. akashiwo accumulate at the surface due to vertical migration and absorb the light energy effectively. It was found that the light energy absorbed by *H. akashiwo* at the surface was about 90% of total absorbed energy.

Phosphorus metabolism of *H. akashiwo* was measured by ^{31}P -NMR. Rapid uptake of inorganic phosphorus was observed after adding inorganic phosphorus into phosphorus starved cells and it was found that most of phosphorus was stored as polyphosphate.

The ammonium uptake kinetics of *Chattonella antiqua* were examined and it was found that the ammonia uptake rate followed the Michaelis-Menten equation and the nitrate uptake was suppressed by ammonium.

The alkaline phosphatase activity of *C. antiqua* and *H. akashiwo* were found to be very weak. Both strains are apparently unable to utilize organic phosphomonoester for their growth.

Growth kinetics of *C. antiqua* under nitrogen- or phosphorus-limited conditions were analyzed using semi-continuous culture system, and growth rates were found to follow the Droop's equation for both cases.

An experimental study was carried out for the investigation of the thermohaline circulations and water exchange between the bay and the outer ocean due to the surface cooling in the period of late summer to autumn. The qualitative relationship between horizontal salinity or temperature differences and water exchange was investigated.

Density instability associated with vertical migration of flagellate was analyzed by numerical model and the causing mechanism of the convection patterns observed in a culture experiment was explained numerically.

In situ cage culture (field microcosm), which can eliminate the effects of grazing, competition and dispersion, was installed in Izumisano Harbor, Osaka Bay. It was found that the growth of *H. akashiwo* could be limited by the rate of mass transfer through filters and by under-water irradiance. The growth model based on culture

experiments can simulate the variation of cell number of *H. akashiwo* in field microcosm.

1 研究の目的

昭和54～56年度に実施された特別研究「海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究」（以後はこれを赤潮特研第Ⅰ期と呼ぶ）においては、赤潮研究を推進していくための基礎的な室内培養方法の確立、大量純粋培養装置である室内マイクロコズムや集積過程解明のための内湾密度流実験装置等研究手段・研究方法の確立をまず行った。そして代表的な赤潮藻類種 (*Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo*) についての生物学的知見の蓄積と整理を行うとともに、赤潮発生に至るまでの環境形成に強く関与している海洋物理学的及び海洋化学的な諸現象の抽出とその解明を行った。それらの詳細については国立公害研究所研究報告第30号及び第63号にまとめてある。その基礎研究を通じて以下のような研究の必要性が明らかとなった。

すなわち i) 同一赤潮藻類種についての増殖過程、シスト形成、休眠、シスト発芽にわたる一貫した生活史を明らかにする, ii) 単一赤潮藻類種の解析から、複合藻類種間の競合及び生産者—摂食栄養者—腐生栄養者の群集構造の解析への展開を行う, iii) 鞭毛藻類の示す日周垂直移動性に対する環境因子の影響とその生態的意味の解析, iv) 種々のスケールの鉛直対流の発生過程と赤潮藻類の集積作用の解析, v) 汚濁物質別の赤潮藻類の増殖に及ぼす影響を AGP 及び多様性指数により評価する, vi) 現場海域を用いた赤潮発生生態系の解析, vii) 個別知見の総合的定量化を行い、赤潮発生過程のモデル化を行う、等である。

以上の点をふまえて本特別研究では赤潮発生現象を海域の生態系変遷の中でとらえ、赤潮発生の物理的・化学的・生物学的過程の解明と、現場海域での実証結果を総合的に解析するとともに、さらに赤潮藻類についての基礎的な生物学的知見の蓄積を行い、赤潮発生過程のモデル化を行うことを目的とする。

2 研究課題と研究組織

本特別研究の目的を達成するために次の5課題を設定した。

研究課題

1. 増殖指標による富栄養化と赤潮発生の評価
2. ライフサイクル・シミュレーターによる周期的赤潮発生の予測
3. 付着藻類の増殖特性に関する研究
4. 赤潮発生生態系の物理的・化学的・生物的過程の解析
5. 現場型マイクロコズムによる赤潮発生生態系の解析
6. 赤潮発生生態系のモデル化

本研究には国立公害研究所内の3部（水質土壌環境部、環境情報部、計測技術部）の研究員15

表1 研究担当者所属・氏名

プロジェクト・リーダー	水質土壌環境部長 合田健
水質土壌環境部	
海洋環境研究室	渡辺正孝・渡辺 信・原島 省 木幡邦男・中村泰男
陸水環境研究室	須藤隆一・田井慎吾・矢木修身 岡田光正・細見正明・山根敦子 稲森悠平
環境情報部	
環境情報システム室	宮崎忠国・安岡善文
計測技術部	
分析室	功刀正行

表2 客員研究員所属・氏名

神山孝吉	(京都大学理学部)
狩谷貞二	(東北大学農学部)
福代康夫	(北里大学水産学部)
小林善親	(鹿児島大学理学部)
邑岡和昭	(高知県公害防止センター)
中川博次	(京都大学工学部)
池辺八洲男	(筑波大学電子情報学系)
藤田真一	(大阪府公害監視センター)
渡辺弘	(兵庫県公害研究所)
井上勲	(筑波大学生物科学系)
岩崎英雄	(三重大学水産学部)
中西正己	(京都大学理学部)
根井外喜男	(東日本学園大学)
水野真	(道都大学・教養部)
市村輝宣	(東京大学応用微生物研究所)

名が参加し、さらに次の客員研究員及び多数の共同研究員が参加した。

3 研究成果の発表

昭和57年度及び58年度までに得られた研究成果をまとめたものがこの中間報告書(国立公害研究所研究報告, 第80号)である。この他関連する学会・研究雑誌等において研究成果が公表された(表3)。

表3 発表リスト

口頭発表

- 木幡邦男・渡辺正孝(1983): マイクロコズム内での赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖(2), 日本海洋学会1983年度春季大会, 東京 (58.4)
- 木幡邦男・渡辺正孝・山田 明(1983): マイクロコズム内での赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖(3) — 垂直移動と体積変化の日周期性 —, 日本海洋学会1983年度秋季大会, 函館 (58.10)
- 中村泰男(1983): *Chattonella antiqua* および *Heterosigma akashiwo* のアルカリホスファターゼ活性, 日本海洋学会1983年度春季大会, 東京 (58.4)
- 中村泰男(1983): *Chattonella antiqua* のアンモニウム塩摂取と硝酸塩摂取におよぼすアンモニウム塩の阻害効果について, 日本海洋学会1983年度秋季大会, 函館 (58.10)
- 中村泰男・渡辺 信(1982): 赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* (ホルネリア) の増殖生理, 日本海洋学会1982年度春季大会, 東京 (57.4)
- 中村泰男・渡辺 信(1982): *Chattonella antiqua* (ホルネリア) の NO₃, PO₄ uptake, 日本海洋学会1982年度秋季大会, 鹿児島 (57.10)
- 中村泰男・渡辺 信(1983): 瀬戸内海に発生する赤潮 *Chattonella antiqua* の増殖生理維持II. リン酸塩の摂取, アルカリホスファターゼ活性およびリン酸制限下での増殖の動力学, 日本藻類学会第7回大会, 室蘭 (58.7)
- 中村泰男・渡辺 信(1983): *Chattonella antiqua* の栄養塩摂取と増殖の動力学, 「赤潮発生環境のモデリングに関する生理学的アプローチ」に関するシンポジウム, 東京 (58.10)
- 原島 省・渡辺正孝(1983): 実験系における Gravity current (II) — 数値モデル, 日本海洋学会1983年度秋季大会, 函館 (58.10)
- 東 貞三・矢木修身(1983): AGP 試験法による海水の富栄養化, 昭和58年度水産学会, 京都 (58.10)
- 宮崎忠国(1982): 赤潮藻類 *Olisthodiscus luteus* の活性と分光特性, 第21回計測自動制御学会, 東京 (57.7)
- 森 正武・中島裕之・渡辺正孝(1982): 潮汐流の有限要素解析に現われる連立一次方程式に対する ICCG 法, 京都 (57.11)
- 渡辺 信・奥沢 篤・木幡邦男・中村泰男(1982): 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* のリン制限下連続培養と増殖の動力学的解析, 日本植物学会第47回大会, 東京 (57.9)
- 渡辺 信・中村泰男(1983): 瀬戸内海に発生する赤潮 *Chattonella antiqua* の増殖生理特性 I 発生状況と増殖に影響を及ぼす環境因子, 日本藻類学会第7回春季大会, 室蘭 (58.7)
- 渡辺正孝・原島 省(1983): 実験系における Gravity current (I), 日本海洋学会1983年度春季大会, 東京 (58.4)
- 渡辺正孝・原島 省(1983): 組織的な鉛直循環流の実験的解析 (II), 日本海洋学会1983年度秋季大会, 函館 (58.10)

印刷発表

- 宮崎忠国・安岡善文(1983): 閉鎖性水域における水質調査法. 昭和57年度科学技術振興調整費「リモートセンシング技術の利用実証に関する研究」研究成果集, 76-80.
- Nakamura, Y. and M.M. Watanabe (1983): Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (raphidophyceae). Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. J. Oceanogr. Soc. Jpn., 39, 110-114.
- Nakamura, Y. and M.M. Watanabe (1983): Growth characteristics of *Chattonella antiqua*. Part 2. Effects of nutrients on growth. J. Oceanogr. Soc. Jpn., 39, 151-155.
- Nakamura, Y. and M.M. Watanabe (1983): Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. J. Oceanogr. Soc. Jpn., 39, 167-170.
- 渡辺 信(1982): 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の培養株間にみられた生理的差異—その生態的, 分類学的意味. 環境科学研究報告書「海洋環境特性と赤潮発生に関する基礎研究」, 231-239.
- 渡辺 信・中村泰男(1982): 赤潮—海の中の生命の混乱. 保健の科学, 24, 862-868.
- Watanabe, M.M., Y. Nakamura and K. Kohata (1983): Diurnal vertical migration and dark uptake of nitrate and phosphate of the red tide flagellates, *Heterosigma akashiwo* HADA and *Chattonella antiqua* (HADA) ONO (Raphidophyceae). Jpn. J. Phycol., 31, 161-166.

- Watanabe, M.M., Y. Nakamura, S. Mori and S. Yamochi (1982) : Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.*, 30, 279-288.
- 渡辺正孝(1983) : 赤潮鞭毛藻が示す日周垂直移動性の生態的役割. (編) 微生物生態研究会, 微生物の生態 11—変動と制御をめぐって. 学会出版センター, 188p.
- Watanabe, M. (1983) : The modelling of red tide blooms. In (Ed) Jørgensen, S.E., Application of ecological modelling in environmental management. Elsevier Sci. Publ. Co., 735p.
- 渡辺正孝・原島 省(1983) : 生物対流の発生とその機構について. 第27回水理講演会論文集, 27, 199-205.
- M. Watanabe D.R.F. Harleman and O.F. Vasiliev (1983) : Two-and three-dimensional mathematical models for lakes and reservoirs. In (Ed) Orlob, G.T., *Mathematical Modeling of Water Quality.*, John Wiley & Sons, 518p.
- 矢木修身(1983) : 微生物の代謝・土壌における自浄作用, 赤潮, 合成有機化合物の微生物分解. 須藤隆一編, 環境浄化のための微生物学. 講談社サイエンティフィック, 221p.
- 安岡善文(1983) : リモートセンシングによる環境監視. 月刊地球, 5, 668-672.
-

4 研究成果の概要

昭和57・58年度の研究報告としては, 研究課題 4) 赤潮発生生態系の物理的・化学的・生物的過程の解析及び, 研究課題 5) 現場型マイクロコズムによる赤潮発生生態系の解析, の2研究課題について得られた成果をまとめた。

4.1 赤潮発生生態系の物理的・化学的・生物的過程の解析 (研究課題 4)

本研究課題はさらに次の5サブテーマに分かれる。すなわち (i) 増殖・集積特性, (ii) 生態系群集構造の実験的解析, (iii) 熱力学モデルを用いた微量元素の溶存状態の推定, (iv) 赤潮発生海域の流動特性の解析, (v) リモートセンシングによる赤潮発生の計測。

赤潮現象は特定藻類種による場の独占状態と考えられるが, 赤潮発生に至る過程は赤潮藻類種の生理的特性のみならず, 赤潮藻類種とそれを取りまく環境との相互作用を理解することが重要である。したがって赤潮現象に至る発生機構解明のためには, 海域の生態系の変遷の中での特定赤潮藻類の挙動を理解すべきである。生態系を論じる場合, 生産者—摂食栄養者—腐生栄養者等を含む物質循環を把握する必要がある。しかしそれぞれの trophic level は種多様性を持っており, 個々の生態系構成メンバーすべての挙動を把握することは不可能な状態である。そのため本特別研究においては, まず最も単純な生態系としての要素である, 対象とする特定赤潮藻類種あるいは赤潮藻類群集を, 制御環境条件下で維持し, 赤潮発生現場海域に見られる特徴的な海洋物理的・海洋化学的環境要因と赤潮藻類種個体群発展との相互関係を明らかにすることにより生態系への理解を試みた。このためには以下の二つの技術が確立している必要がある。すなわち i) 特定赤潮藻類種あるいは赤潮藻類群集個々の環境因子に対する基本的な生理特性を培養実験により明らかにすること, ii) 赤潮発生現場海域に見られる特徴的な海洋物理的・海洋化学的環境因子を制御し, かつ純粋培養が行える大量培養装置の確立が不可欠である。以上の技術は赤潮特研第I期において確立された。これら培養実験系及び制御実験系を用いてサブテーマ1. 増殖・集

の解析, サブテーマ2. 生態系群集構造の実験的解析, を行っている。

赤潮藻類の増殖に微量元素, 特に鉄・銅の消長が関与している可能性が示唆されている。サブテーマ3. 熱力学モデルを用いた微量元素の溶存状態の推定, では特に *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす微量元素の効果を明らかにし, さらに現場における微量元素濃度を定量することで, 本種の赤潮形成にかかわる微量元素の役割を解明しようとするものである。

赤潮が頻発する内湾や閉鎖性海域における海水交換及び赤潮藻類の集積機構に最も大きい影響を与えるのは熱塩循環流であることは既に赤潮特研第I期において明らかにされた。この内湾規模の流動は内湾—外洋の海洋交換を通じて, 内湾に負荷された栄養塩類等物質の湾外排出量を規定し, その結果内湾の“閉鎖度”というべき量を規定するという意味でも重要である。赤潮特研第I期においては, 内湾密度流実験装置を完成させ, 海表面, 河川流入, 内湾—外洋境界における熱と塩分の境界条件を任意に設定し, 発生する熱塩循環流の計測と解析手法の確立を行った。本特別研究においては, この内湾密度流実験装置を用いるとともに, 現場観測結果及び数値モデルを用いて, サブテーマ4. 赤潮発生海域の流動特性の解析, を行っている。

海水中の赤潮藻類にとって最も重要な環境因子の一つは, 光環境である。海水中には粒子状物質, 有機物質等光エネルギーを吸収する物質が存在し, 鉛直方向にも光エネルギーが減衰する。このため赤潮藻類をとりまく海水中の分光特性を把握しておく必要がある。サブテーマ5. リモートセンシングによる赤潮発生の計測, ではラジオスペクトロメーターを用いて海水の分光特性及び赤潮藻類が受ける光エネルギーと増殖との関連を解析している。得られた成果をサブテーマに沿って以下に述べる。

鞭毛藻が示す鉛直移動性は, 表面への物理的集積作用のみならず, 増殖に必要な栄養塩に富んだ底層に下降することができると同時に, 光合成を行うに必要な有光層への上界を行うことができ, そのことが増殖機構並びに藻類種間競争における有利性を示し, 場での優占種に至る過程を説明する一つの機構であると考えられている。論文1においては, 鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の日周鉛直移動と細胞分裂周期との関係を, 温度成層条件下でのマイクロコズムを用いて解析した。f/2 培地により, 初期細胞濃度 $70\text{cells}\cdot\text{m}^{-1}$, 12:12時間の明暗周期下, 表層中央での照度が約 $350\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で培養を行った。実験初期は水温 $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ で槽内を一様攪拌条件で培養し, 培養9日目に細胞濃度が $2.16\times 10^3\text{cells}\cdot\text{m}^{-1}$ の時点で温度成層(表層 22°C , 底層 19°C)を形成し日周鉛直移動実験を行った。細胞体積の日周変化から推定した比増殖速度は約 0.48d^{-1} となり, 鉛直移動実験中でも対数増殖を続けていることが判明した。さらに *H. akashiwo* は底層で分裂し, 分裂直後の細胞がより速く上方に移動した。このことは鉛直移動と細胞分裂周期とは明暗周期に同調しかつ互いに同期していることを示唆する。さらに光合成活性の高い細胞は細胞分裂を行い鉛直移動したが, 光合成活性の低い細胞は行わなかった。このように細胞分裂周期は明暗周期に同調し, また鉛直移動を制御する要因の一つと考えられる。続いて論文2においてはマイクロコズム内に培養した *H. akashiwo* (比増殖速度 0.36d^{-1}) の一様かくはん状態での細胞濃度, 平均体

積、けい光強度、乾燥重量、炭素・窒素含有量、クロロフィル色素量の各項目の日周変動を計測した。*H. akashiwo* 1個体当たりの平均細胞体積は点燈直前(5:00)のサンプルが最小で、明期は光合成により増大し、消燈直前(17:00)のサンプルが最大であった。光合成活性は細胞分裂が行われている時間帯(2:00—8:00)に高くなり、11:00に最高となった。23:00には最低となっている。このように光合成活性は細胞分裂と同期して変動している。*H. akashiwo* 個体当たりの単位体積当たりの乾燥重量の変化は、明期に小さく($400\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)暗期に大きい値($480\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)となっている。これは密度こう配法により直接求められた比重(明期約 $1100\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 、暗期 $1146\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 以上)と比較して、明期と暗期の値の差が同程度であることから、細胞比重の変化の主な部分は乾燥重量の変化に依ると推察される。個体当たりの炭素量は明期に光合成により増大(最大 $130\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$)し、暗期には呼吸及び細胞分裂により減少(最小 $110\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$)した。明期の光合成速度は約 $2.25\text{pg}-\text{C}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ と推定される。

細胞当たりの窒素含有量も同様に明期に多く摂取され、摂取速度は $0.31\text{pg}-\text{N}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ と推定された。C/N比は8:00に最低値約4.7から増加し、20:00で最高値の約5.0に達する。以後暗期は減少するというパターンを繰り返す。

細胞当たりのクロロフィル *a*, *c* 量はともに明期に増大し、暗期に減少した。さらにクロロフィル *a* とクロロフィル *c* の比は8:00—11:00に極大値を持っており、分裂直後ではクロロフィル *a* の合成がクロロフィル *c* の合成より速いことを示している。

海水中では藻類は光合成を行うに必要な光エネルギーを獲得するため他の藻類種とのみならず他の光吸収物質とも競っている。日周鉛直移動を行う鞭毛藻類は昼間に表層に集積することにより光エネルギー吸収を効率よく行っていることが考えられるが、従来このことはあまり論じられてこなかった。論文3においてはマイクロコズム内に培養した *H. akashiwo* の光吸収特性を、新しく作製した4 π 集光器とラジオスペクトルメーターを用いて解析した。*H. akashiwo* の吸収スペクトルを分光光度計により求め、マイクロコズム内での照度及び個体数(又はクロロフィル *a* 量)より吸収された光エネルギーの総量及び *H. akashiwo* に吸収された光エネルギーを推定した。これより表層に *H. akashiwo* が集積し約 $3.3\times 10^6\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ の場合、表層で吸収された光エネルギーは約 $1.44\times 10^{16}\text{quanta}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ であり、その約90%が *H. akashiwo* により吸収されていること、さらに *H. akashiwo* 1個体が吸収した光エネルギーは約 $3.8\times 10^{11}\text{quanta}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$ であることが判明した。

藻類の増殖にとって最も重要な栄養塩であるリンが欠乏状態のときに藻類がどのように生命を維持し、次にリンが豊富に与えられるまでその個体群を維持することができるかという問題は、栄養塩濃度が変動する現場海域での赤潮発生過程を解析する上で重要な問題である。論文4においてはマイクロコズム内に *H. akashiwo* をリン酸塩欠乏状態で培養し、次にリン酸塩を添加し、細胞内リン含有量の変化を計測するとともに、 ^{31}P -NMRを用いて細胞内リンの存在形態を計測した。この結果 *H. akashiwo* はリン酸塩添加後急速にリン酸塩を取り込み、その多くをポリリン酸

の形で蓄積することが判明した。リン酸塩添加後、細胞内リン含有量は最小値から増加し、抽出されたリン中に占めるポリリン酸が約44%になった時点で細胞内リン含有量は定常状態となった。このようなポリリン酸としてのリン蓄積能力は、リン欠乏環境下での *H. akashiwo* 個体群維持と拡大にとって重要な生態的意味を持っている。

限りある栄養塩を特定藻類種がどれだけ速やかに摂取し、体内に取り込んだ栄養塩を個体群の拡大にどのように反映させるかという増殖の動力学は赤潮発生過程を解明する上で重要である。赤潮特研第I期では瀬戸内海で大規模な赤潮を形成する *Chattonella antiqua* の硝酸塩及びリン酸塩摂取を解析した。

論文5においては、さらに培養実験を続け、*C. antiqua* によるアンモニウム塩摂取の定式化を試みた。更にアンモニウム塩は藻類の硝酸塩摂取を阻害することが知られている。ここでは *C. antiqua* における硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の効果を解析した。この結果アンモニウム塩摂取速度はアンモニウム塩濃度が0—8 μM の範囲で Michaelis-Menten 式に従い、最大摂取速度は $2.0\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、半飽和定数は $2.2\mu\text{M}$ であった。さらにアンモニウム塩摂取速度は硝酸塩によっては影響を受けないことが判明した。一方硝酸塩摂取はアンモニウム塩により阻害された。アンモニウム塩による阻害は短時間 ($\ll 15$ 分) のうちに生じ、硝酸塩摂取速度は $2\mu\text{M}$ のアンモニウム塩の存在によって約50%の阻害を受けることが判明した。この研究により、*C. antiqua* の窒素摂取速度をアンモニウム塩濃度と硝酸塩濃度との関数として表示し、アンモニウム塩による硝酸塩摂取阻害をも含めて定式化を行うことができた。

多くの赤潮鞭毛藻が有機態リンを増殖に利用できると考えられているが、瀬戸内海で問題となっている *C. antiqua* や *H. akashiwo* がそのような能力を持つかどうかは、発生過程を理解する上で重要である。このため論文6においては、有機態リンを増殖に利用できるかどうかの指標としてのアルカリフォスファターゼ活性を測定した。リン欠乏状態で培養した *C. antiqua* 及び *H. akashiwo* のアルカリフォスファターゼ活性を調べた結果、両種とも検出することができなかった。このことは両種が有機態リンを増殖には利用することができないということであり、赤潮発生にかかわるリンの役割を理解する上で極めて重要な知見である。

栄養塩の供給形態、供給量、供給速度と赤潮藻類種の増殖速度との定量的な関係を明らかにする増殖の動力学解析のために、栄養塩の連続的な回転や捕食・移流による消失を模擬して系の定常状態を確立できる系として連続培養系の確立を行った。赤潮特研第I期においては、この連続培養系を用いてリン制限下での *H. akashiwo* の増殖の動力学解析を行ってきた。論文7においては、さらに研究を進め、窒素あるいはリン制限下における *C. antiqua* の増殖の動力学を半連続培養系を用いて解析した。今回用いた半連続培養系では、各三角フラスコに100ml ずつ分配された *C. antiqua* の培養がフラスコごとに指定された希釈率 (D) に応じて毎朝9:00から9:30の間に100Dml だけフラスコから抜き取られる。そしてこれと交換に新鮮な培地が同量だけ添加される。以上の操作を毎日繰り返すことで9:00に取り出される培養中の細胞濃度は希釈率と制

限栄養塩濃度に応じてある値に収束する。この定常状態での *C. antiqua* の増殖速度とリン・窒素の関係を解析した。この結果窒素制限下においては増殖速度 μ は細胞分裂開始直前の細胞内窒素含有量 Q^N の関数として Droop の式で記述できることが判明した。すなわち $\mu = \mu_N^* (1 - q_0^N / Q^N)$ 、ここで $\mu_N^* = Q^N$ を無限大に補外した時の増殖速度で $0.78d^{-1}$ 、 $q_0^N =$ 窒素の細胞内最小含有量で $7.8\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 。一方リン制限下においても μ は細胞分裂開始直前の細胞内リン含有量 Q^P の関数として Droop の式で記述できることが判明した。すなわち $\mu = \mu_P^* (1 - q_0^P / Q^P)$ 、ここで $\mu_P^* = Q^P$ を無限大に補外した時の増殖速度で $0.93d^{-1}$ 、 $q_0^P =$ リンの細胞内最小含有量で $0.62\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 。現在までにわかっている *C. antiqua* の窒素・リン摂取のモデルと増殖モデルとを組み合わせることにより、初期細胞濃度と栄養塩濃度のデータより *C. antiqua* の増殖過程を追跡することが可能となった。

赤潮特研第 I 期において、内湾における海水交換にはたす熱塩循環流の役割と、その内湾における水質及び生態系に与える影響について明らかにした。そして内湾での流動を解析する方向として、潮汐流・吹送流の影響をパラメタライズした形で熱塩循環流に取り入れることの有効性を論じた。論文 8 においては夏期の流動パターンから冬期の流動パターンへの遷移メカニズムを実験的に明らかにしようとした。温度条件を制御した実験水槽(内湾模擬部：長さ 4 m, 水深=0.1 m, 幅=0.5m；外洋模擬部：長さ=1.5m, 水深=0.7m, 幅=1.5m)に塩水を満たし、内湾模擬部の上流端より淡水を連続的に注入した。この場合淡水は表層を外洋部に向かって流れて行く。外洋部からは下層を通して湾内に流入してくる。この状態から外洋模擬部の水温を上昇させ、塩分偏差による密度差が水温偏差による密度差に相殺されていくように設定し、夏期から秋期にかけての流動を再現した。この結果として、塩分偏差・水温偏差の相殺による安定成層度の減少がおけると、湾奥部から上層厚さ h_1 が増大する。そしてこの変化は密度フルード数 $F_d = q / \sqrt{g(\Delta\rho/\rho)} \cdot h_1^3$ を保存するようにおこる。そして h_1 増大時は河川流入水は湾奥部に停滞し、外洋部に流出する割合は小さくなる。さらに水温差による密度差が塩分偏差による密度差より大きくなると河川流入水は下層を流れるようになる。そして外洋水が表層を湾奥に向けて流入してくる。このように河川水と外洋水とが水温と塩分条件によって全く逆転した方向の流れが形成される過程を可視化手法とレーザー流速計、水温・塩分計により計測した。これらの実験により夏期から冬期までの連続的な海水交換過程が定性的に明らかになったと言える。

日周鉛直移動性により表層に遊泳する鞭毛藻 *H. akashiwo* の分布パターンは巨視的には海洋構造により決定されているが、微細構造での分布パターンの決定要因については不明な点が多かった。赤潮特研第 I 期においてすでに明らかにされた事は、塩分などの溶質と同等に鞭毛藻自身の密度を考慮した流体としての密度として取扱うことが可能であること、鞭毛藻の比重は海水の比重より重く、日周鉛直移動により表層に集積することにより結果的には下層より重くなり密度不安定をもたらすこと、そして Rayleigh-Taylor instability 問題としての解は培養実験に見られる分布パターンを良く説明し得ること等である。論文 9 では以上の知見をもとに、流体の挙動

を支配する渦度方程式、鞭毛藻の個体数密度の輸送方程式、及び個体数密度に依存する状態方程式を用いて数値実験を行った。その結果培養実験結果より得られた分布パターンを定性的に良く説明し、不安定対流は Rayleigh-Taylor instability と Bénard 対流との二つの現象に類似した時期が存在することが判明した。

4.2 現場型マイクロコズムによる赤潮発生生態系の解析（研究課題5）

赤潮特研第Ⅰ期、第Ⅱ期を通じて行ってきた一連の培養実験についての基本的な考え方は、培養実験により得られた赤潮藻類種と環境因子との定量的関係は現場海域に対しても適用可能であるという考え方に基づくものである。そのため純粋培養下で環境因子を一定に制御して得られた結果を、環境因子が時間的にも大きく変動する現場に適用するための実証試験として位置づけられたのが論文10に述べられている現場マイクロコズムという考え方である。これは現場海域の水温・塩分・照度・栄養塩状態をよく再現し、かつ動物プランクトンによる捕食、他の藻類種との競合の影響、流動に伴う集積・分散の影響等を除外し得る透析培養装置である。大阪湾泉佐野港での実験においては、培養株 *H. akashiwo* を接種し、増殖過程を追跡した。その結果非常に良好な増殖が得られ、以下のことが明らかになった。すなわち i) マイクロコズム内外の物質移動量によって系内の栄養塩濃度が *H. akashiwo* の増殖にとって制限状態になり得ること、ii) 現場での増殖に及ぼす照度の影響が顕著なこと、iii) 培養実験をもとに水温・照度・塩分の関数として表現された増殖モデルを、それらの現場環境因子の日平均値を用いてシミュレーションした結果とマイクロコズム実験結果との間に良好な一致を得た。

この実験の成功により、現場海水の藻類増殖ポテンシャル評価としての AGP 的な展開や、混合藻類種の競合関係の現場での評価、動物プランクトンの捕食圧の現場での測定等多方面の研究展開が可能となった点は大きな前進である。

5 おわりに

室内培養実験、室内マイクロコズム、内湾密度流装置、現場マイクロコズム等の研究手段、研究方法の確立をもとに赤潮特研第Ⅱ期が進展している。それぞれの方法論における独自の研究展開が進むであろうが、赤潮特研第Ⅱ期の主要なテーマである赤潮発生のモデル化を行うための中心的役割を担うものとしての現場マイクロコズムの確立は本特研の中でも重要な位置を占めるものである。特に培養実験結果と現場海域とを結びつける手段として今後もその改良をはかっていかなければならない。さらに赤潮発生過程をモデル化し得るだけのすべての知見・情報が既知ではなく、これらの研究と並行して、基礎的な培養実験、水理実験、現場観測等の充実・蓄積をはかっていくことが重要と考えている。

II-1

制御実験生態系（マイクロコズム）を用いた赤潮発生機構の解析(III)

——赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の日周鉛直移動と

日周体積変化の関係——

The Use of a Controlled Experimental Ecosystem (Microcosm)

in Studies of Mechanism of Red Tide Outbreaks (III)

——Interrelation between Diurnal Vertical Migration and Diurnal Change

of Mean Cell Volume Found in the Culture of *Heterosigma akashiwo*,

a Red Tide Fragellate——

木幡邦男¹・渡辺正孝¹

Kunio KOHATA¹ and Masataka WATANABE¹

要 旨

大阪湾に赤潮として出現した *Heterosigma akashiwo* を海水マイクロコズム内、12時間・12時間の明暗周期下で培養した。かくはん条件下では、比増殖速度、 $0.43d^{-1}$ を得た。弱い温度成層下 ($\Delta t = 3-4^{\circ}C$) では、海域で見られるのと同様な日周鉛直移動が、少なくとも6日間観測された。*H. akashiwo* は、温度成層下でも増殖を続けていた。この実験条件下で、*H. akashiwo* の細胞濃度・平均体積・光合成活性を、2時間間隔で24時間、培養槽内の3層で測定した。細胞は点燈時刻の少し前に上昇を始めた。上昇中の細胞は他に比べ平均体積が小さかった。日周鉛直移動している細胞は、しないものより光合成活性が高かった。細胞分裂周期と関連した概日性周期 (circadian rhythm) は明暗周期に同調し、また鉛直移動を制御する要因の一つと考えられた。

Abstract

Clonal culture of *Heterosigma akashiwo* causing red tide in Osaka Bay was grown in the Microcosm on a 12 : 12 LD cycle. The specific growth rate of $0.43 d^{-1}$ in ln unit was obtained under the fully mixed condition. Under the weakly stratified condition (ca. $\Delta t = 3-4^{\circ}C$), the vertical migration pattern of *H. akashiwo* was similar to that observed in the field for at least 6 days. *H. akashiwo* continued to grow during a stratification

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

period. Under this experimental condition, cell concentration, mean cell volume, and photosynthetic activity of *H. akashiwo* were monitored at every 2 hours for 24 hours at three different levels in the Microcosm. Cell ascent began shortly before light was turned on. Rising cells had smaller volume than that of cells located at the bottom. Photosynthetic activity of migrating cells was higher than that of non-migrating cells. Circadian rhythm associated with cell division cycle was entrained by LD cycle and was considered as one of major controlling factors on the vertical migration.

1 はじめに

鞭毛藻の多くは日周鉛直移動を行う (Eppley ら, 1968 ; Kamykowski & Zentara, 1977 ; Blasco, 1978 ; Heaney & Furnass, 1980 ; Staker & Bruno, 1980 ; Heaney & Eppley, 1981 ; Kamykowski, 1981 ; Cullen & Horrigan, 1981)。現在までの研究で、照度・温度・栄養塩濃度の鉛直こう配が、日周鉛直移動に影響を与える因子であることが示されている (Eppley *et al.*, 1968 ; Heaney & Furnass, 1980 ; Kamykowski, 1981 ; Cullen & Horrigan, 1981)。また、鞭毛藻の鉛直移動は、栄養塩の摂取や増殖と関連する行動であり、生態的に重要な意味を持つと報告されている (Eppley & Harrison, 1975 ; 渡辺ら, 1984 ; 中村・渡辺, 1984)。例えば、昼間表層で十分な光のもとで光合成し夜間には底層で豊富な栄養塩を摂取できる可能性は、鞭毛藻が生態系での有利性を示し、場での優占種に至る過程を説明する一つの鍵と言われている。したがって、赤潮の原因となる鞭毛藻について、その日周鉛直移動や、これに伴う細胞の諸性質の日周変化を明らかにすることが、赤潮発生過程をモデル化し、発生機構を解明するうえで重要である。

我々は、藻類の大量培養槽 (高さ: 1.5m, 容量: 1 m³) を含む制御実験生態系 (マイクロコズム) を製作した (渡辺ら, 1982 ; 木幡・渡辺, 1984)。本装置は、温度・塩分・照度等の環境因子について鉛直こう配が形成できる。したがって、マイクロコズムは、鞭毛藻の日周鉛直移動及び細胞の諸性質の日周変化を、現場に近い条件下で解析するのに最適な系と考えられる。

大阪湾等で赤潮を形成する鞭毛藻、*Heterosigma akashiwo* は日周鉛直移動を行うことが、野外調査で (矢持ら, 1982)、また実験室系で (畑野ら, 1983 ; 木幡・渡辺, 1984) 知られている。

本研究では、*H. akashiwo* の温度成層下での日周鉛直移動と分裂周期との関係につき、マイクロコズムを用いて解析した結果を報告する。

2 材料と方法

培養実験に用いた赤潮マイクロコズム培養槽の詳細については既に報告した (木幡・渡辺, 1984)。培養槽は、高さが1.5m, 内容量が1 m³で、外側に温度制御のための三つのジャケットがあり、内部に温度成層を作れる。採水は、先端が表層・中層・底層に位置するテフロンチューブを用いて行った。後で述べる培養の9-12日目の実験では、*H. akashiwo* の夜間における過大なサンプリングを避けるため、底層での採水は底から約38cm上方で行った。

実験には、*H. akashiwo* の無菌クローン株 (OHE-1) を用いた。本株は、大阪湾谷川港に発生した本種赤潮より分離され、国立公害研究所微生物系統保存施設に保存されているもので、その生理特性は渡辺・中村 (1984 a, b) により報告されている。

予備培養は次のように行った。前記の株を 2 l の三角フラスコ内に 1 l の f/2 培地 (Guillard & Ryther, 1962) を入れ培養した。照明は 12 時間明期、12 時間暗期の周期で、明期に約 $80 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ になるよう調整された昼光色蛍光灯で与えた。温度は $21 \pm 1^\circ\text{C}$ に保たれた。

マイクロコズムを使った培養では、蒸気滅菌された孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のミリポアフィルターでろ過滅菌された f/2 培地を 1 m³ 用いた。培養槽は、使用前に蒸気滅菌 (110°C , 30 分) した。予備培養で細胞濃度が約 $1.0 \times 10^6 \text{cells} \cdot \text{m}^{-3}$ に達したものを、滅菌された注入口より無菌的に培養槽に入れ、培養槽内の初期細胞濃度を約 $7.0 \times 10^4 \text{cells} \cdot \text{m}^{-3}$ にした。照明は、2 kW のキセノンランプで与え、実験期間中、6 時点燈・18 時消燈の 12:12 時間の明暗周期下、表層の中央での照度が約 $350 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ となるように調整した。

実験の初め (9 日目まで) は、培養槽下部から滅菌された空気を入れて槽内を一様にかくはんした。水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。この条件で、*H. akashiwo* の細胞濃度を、中層のサンプルにつき 1 日 1 回の割合で測定した。

培養の 9 日目に、細胞濃度が $2.16 \times 10^3 \text{cells} \cdot \text{m}^{-3}$ に達した時点で、空気によるかくはんを止め、表層水温が $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、底層水温が $19 \pm 1^\circ\text{C}$ の成層を培養槽内に作った。温度成層下で *H. akashiwo* は日周鉛直移動を行った。培養の 9 日目より 5 日間、3 時間毎に、表層・中層・底層 (底より約 38 cm 上方) の 3 層について細胞濃度を測定した。

培養の 13 日目に底層のサンプリング口を底に付けた、この条件で、2 時間ごとに 24 時間、表層・中層・底層でサンプリングし、細胞濃度・平均体積、けい光強度を測定した。

細胞濃度・平均体積の測定にはコールターカウンターモデル TA-II を使用した。けい光強度は、試水に DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) を最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるよう添加したものとし、ないものについて、ターナーデザイン・モデル 10 型けい光光度計を用いて測定した (Slovacek & Hannan, 1977)。ここで得られる DCMU 添加前後の発光強度比は、藻類の光合活性の一つの指標となる (Samuelsson & Öquist, 1977)。

3 結果

培養槽内を一様にかくはんした条件で得られた *H. akashiwo* の増殖曲線を図 1 に示した。1 日の誘導期の後、対数増殖期になり、この期間の比増殖速度は $\mu = 0.43 \text{d}^{-1}$ であった。

温度成層の条件では、*H. akashiwo* は日周鉛直移動を行い、点燈時刻前に表層への集積が始まり、消燈時刻前に下降が始まった。この様子は実験期間中、正確に繰り返された。

表層・中層・底層のサンプルについて測定された細胞濃度・平均体積の日周変化を、誤差伝ばから見積もった (木幡ら, 1982) 誤差とともに表 1, 図 2 に示した。また、各サイズフラクシヨ

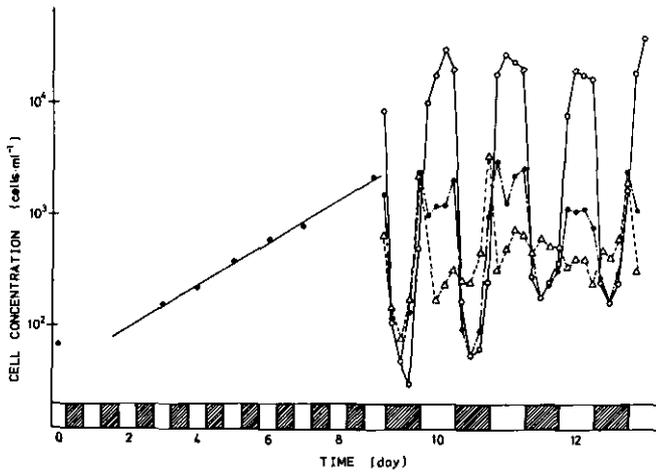


図 1 *H. akashiwo* のかくはん培養での増殖曲線と、温度成層下での鉛直移動：
 (○) 表層, (●) 中層, (△) 底上38cm層

Fig. 1 Growth curve of *H. akashiwo* under mixed condition and its vertical migration under thermally stratified condition
 (○) surface, (●) middle, and (△) 38 cm above the bottom.

ンごとの細胞濃度変化を図3, 4に示した。表層での細胞濃度は、昼間、底層での濃度より高かった。一方、細胞は夜間には底層に集積した。表層から底層へ、またその逆の細胞の移動は、中層での細胞濃度の極大として見られた。

温度成層下では、細胞濃度が鉛直移動により変化するので、細胞濃度の変化から比増殖速度を求めるのは難しい。濃厚に集積した層をサンプリングすると相当数の *H. akashiwo* 細胞を取ることになり、このことも比増殖速度の決定を難しくした。しかし、細胞体積の日周変化が増殖と関連するのを利用すれば、体積変化から比増殖速度を求められる。表1に示した分裂前と分裂後の平均体積比から、次式で成層下の比増殖速度、 μ_s を推定した。

$$\begin{aligned} \mu_s &= \ln(V_b/V_a)/t \\ &= \ln(8.9/5.5)/1 \quad (\text{d}^{-1}) \\ &\approx 0.48 \quad (\text{d}^{-1}) \end{aligned}$$

ただし、 V_b 、 V_a は分裂前と分裂後の細胞体積を表す。

この結果は、*H. akashiwo* が、鉛直移動の実験中でも対数増殖期と同様に増殖を続けたことを示す。

図2, 3に示されたように、*H. akashiwo* は夜間には表層に殆ど存在しないが、点燈時刻の少し前に表層へ上昇を始めた。上昇している細胞の平均体積は小さいが、細胞は昼間、表層にて増大した。この増大は、図3で小さいフラクションの細胞数が減じ、大きいものが増すことで示さ

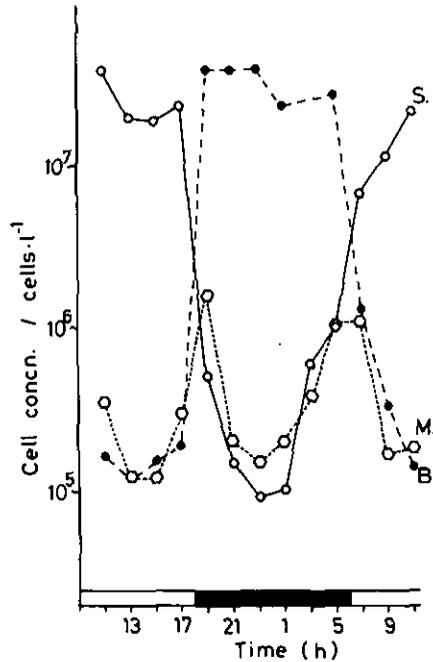


図 2 温度成層下、表 (○)、中 (□)、底 (●) 層での *H. akashiwo* の細胞濃度にみられる日周変化

Fig. 2 Diurnal change of cell concentrations of *H. akashiwo* under thermally stratified condition at three levels (○) surface, (□) middle, and (●) bottom.

れている。

図2に見られるように、*H. akashiwo* は消燈時刻直前に底層への移動を始め、夜間に底層で濃厚な層を作った。底層での細胞の粒径分布は基本的には19:00から23:00まで変化なく、また、表層での17:00の分布(図3)や中層での19:00の分布(図4b)と類似していた。このことから、増大した細胞は、細胞分裂に至るまで大きさの変化をせずに沈み、底層に集積することが示唆された。

細胞の平均体積の分布変化から見る限りでは、細胞分裂は初め底層で1:00から5:00の間に観測された。その後、分裂した細胞は中層で(図4b)、そして底層で(図4a)観測された。底層で5:00から7:00の間に、細胞濃度は減少するが、粒径の小さい細胞の方が大きいものより速く減少した。したがって、7:00の細胞平均体積が大きくなった(表1)。これは、分裂直後の細胞の方が分裂をしないものより速く上方に移動することを示すものであろう。

図5に示されたように、光合成活性は表層では昼間に高く底層では夜間に高い。中層では、鉛直移動している細胞が中層を通過する時に光合成活性のピークが観測された。光合成活性の最高値は、表層で朝に観測された。これらのことから、鉛直移動を行う細胞の方が行わないものより

表 1 成層条件下で得られた細胞濃度と平均体積

Table 1 Cell concentration and mean cell volume obtained in the experiment under the stratified condition^{a)}

DAY	TIME	SURFACE		MIDDLE		BOTTOM	
		N ^{b)}	V ^{c)}	N ^{b)}	V ^{c)}	N ^{b)}	V ^{c)}
13	13	19.7 (5)	7.0(2)	0.12(2)	--- ^{d)}	0.12(2)	--- ^{d)}
	15	19.0 (5)	7.9(3)	0.12(2)	---	0.16(2)	---
	17	23.3 (3)	8.9(1)	0.30(3)	---	0.19(3)	---
	19	0.49(4)	--- ^{d)}	1.60(8)	9.4(7)	38.9 (7)	8.8(2)
	21	0.15(2)	---	0.20(3)	---	38.1 (7)	8.9(2)
	23	0.09(2)	---	0.15(2)	---	38.6 (7)	8.9(2)
14	1	0.10(2)	---	0.20(3)	---	22.5 (3)	7.1(1)
	3	0.59(5)	---	0.37(4)	---	---	--- ^{e)}
	5	0.98(6)	5.8(5)	1.05(6)	5.6(5)	26.6 (6)	5.5(2)
	7	6.6 (2)	5.4(2)	1.08(7)	5.1(5)	1.27(7)	7.9(6)
	9	11.3 (2)	5.7(1)	0.17(3)	---	0.34(4)	---
11	21.1 (5)	6.2(2)	0.18(3)	---	0.14(2)	---	

a) Uncertainties in the last significant digits are given in parentheses.

b) Cell concentration (10^3 cells/ml)c) Mean cell volume ($10^2 \mu\text{m}^3/\text{cell}$)

d) Cell concentration was so low that calculated value of mean cell volume was meaningless.

e) Lack of data due to sampling problems.

光合性活性が高いことが分かった。

4 考 察

Eppley ら (1968) は海産渦鞭毛藻 3 種の日周鉛直移動について報告し、深さ 10m のタンク内で *Cachonina niei* が暗期になる前に表層を離れ、明期になる前に上昇することを観測した。*Cachonina niei* は、明暗周期に同調した後は連続明期でも連続暗期でも周期的な移動を続けることが観測された。

Ceratium furca でみられる鉛直移動について、Weiler & Karl (1979) は、水平に照明した実験から鉛直移動が単に照明や走光性の日周変動に対する受動的応答でなく、明らかにサーカディアンリズムの支配下にあることを示した。

ラフィド藻の *Heterosigma akashiwo* は、前述の渦鞭毛藻と同様の鉛直移動を行う。図 2-4 に掲げた結果は、*H. akashiwo* が点燈の少し前に細胞分裂を始め、ほとんど同じ時刻に表層に移動を始めることを示している。

同一種の日周鉛直移動は、大阪湾谷川漁港でも観測された (矢持ら, 1982)。野外調査の期間中、温度は 25.0-27.1°C、塩分は 32.75-33.17‰ の間を変動したが、顕著な成層構造はみられな

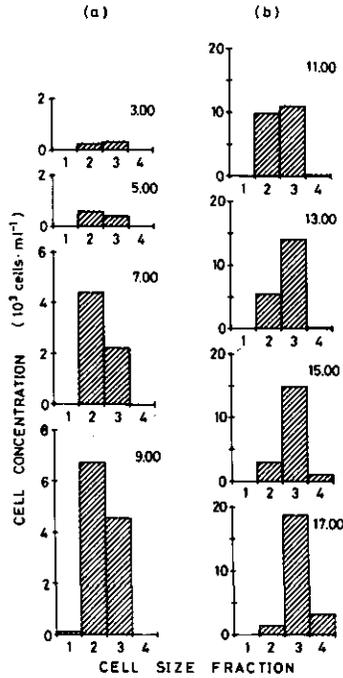


図 3 表層での *H. akashiwo* の細胞濃度と粒径分布の変化
 図中の数字は採水時刻を表す。*H. akashiwo* 細胞の各粒径分画 (μm 単位) は、
 1 : 6.35—8.00 ; 2 : 8.00—10.08 ; 3 : 10.08—12.70 ; 4 : 12.70—16.00 である。

Fig. 3 Changes of cell concentrations and size distributions of *H. akashiwo* sampled at the surface. Numerals in the figures denote sampling times. *H. akashiwo* cell size fractions were (in μm)
 1 : 6.35-8.00; 2 : 8.00-10.08; 3 : 10.08-12.70; 4 : 12.70-16.00.

かった。野外調査とマイクロコズムで得られた結果では、細胞濃度は異なるものの、特に上昇・下降が日昇・日沈に先行する点において同様な鉛直移動の様子が得られた。このように野外調査で観測された実際の海域での鉛直移動がマイクロコズム培養槽内で再現できた。

結果の項で述べたように、*H. akashiwo* は底層で分裂した後、点燈時刻より少し前に表層へ移動を始めた。この現象から、鉛直移動が細胞分裂周期に依存することが推察された。しかし、培養槽内の今回の実験では、比増殖速度は 0.48d^{-1} で、これは表層へ移動した細胞の約38%は分裂していないことを示す。したがって、分裂直後の細胞ばかりでなく、分裂しなかった細胞も一緒に上昇した。

鉛直移動と細胞分裂周期との直接的関係の存在はまだ断言できないが、両者はそれぞれ光の明暗周期に同調し、かつ、互いに同期している。この同期性は、両者の相互関係か、両者を制御す

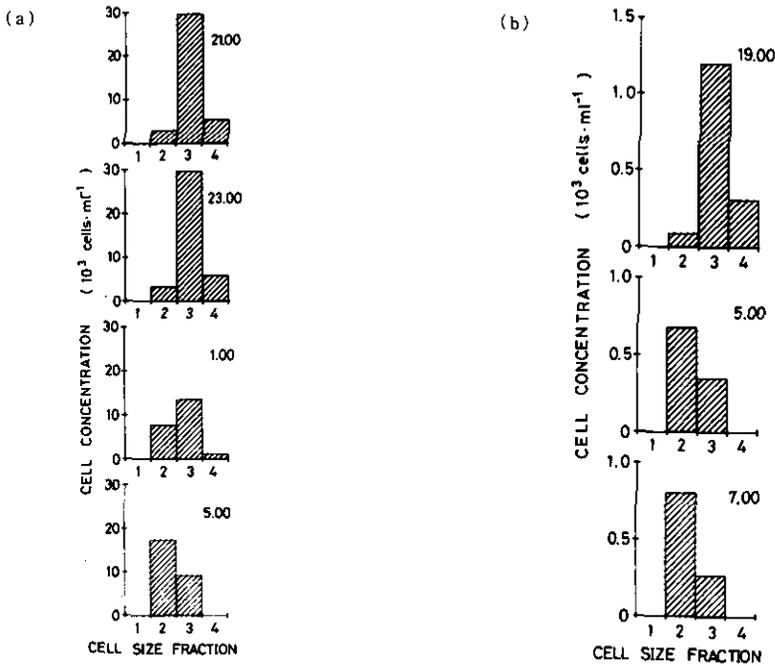


図 4 *H. akashiwo* の細胞濃度と粒径分布の変化。(a)底層, (b)中層でのサンプル
 図中の数字は採水時刻を表す。*H. akashiwo*細胞の各粒径分画(μm 単位)は, 1 :
 6.35-8.00; 2 : 8.00-10.08; 3 : 10.08-12.70; 4 : 12.70-16.00である。

Fig. 4 Changes of cell concentrations and size distributions of *H. akashiwo*
 sampled at the bottom (a) and at the middle (b)
 Numerals in the figures denote sampling times. *H. akashiwo* cell size
 fractions were (in μm); 1 : 6.35-8.00; 2 : 8.00-10.08; 3 : 10.08-12.70; 4 : 12.
 70-16.00.

る体内時計の存在を示唆するものであろう。

図 2 に示したように, 今回の実験条件では鉛直移動をしない藻類細胞は, 全体の 3% に満たな
 かった。鉛直移動をしない細胞は, 鉛直移動をする細胞に比べ光合成活性が低かった。つまり,
 光合成活性の高い細胞は, 細胞分裂を行い鉛直移動したが, 低い細胞は行わなかった。このよう
 に, 細胞の活性と鉛直移動とに関連があるということは, 先に述べた細胞分裂周期が鉛直移動に
 影響を及ぼすという推論のもう一つの証拠となるであろう。

5 結 論

鞭毛藻の日周鉛直移動を海域で詳細に測定するのは難しい。海水マイクロゾム培養槽内では,
 実際の海域と同様の鉛直移動を行わせながら, 細胞分裂との関連が研究できた。このように, マ
 イクロゾムを用いた研究では, 鞭毛藻の鉛直移動と関連した生化学的研究も可能である。温度

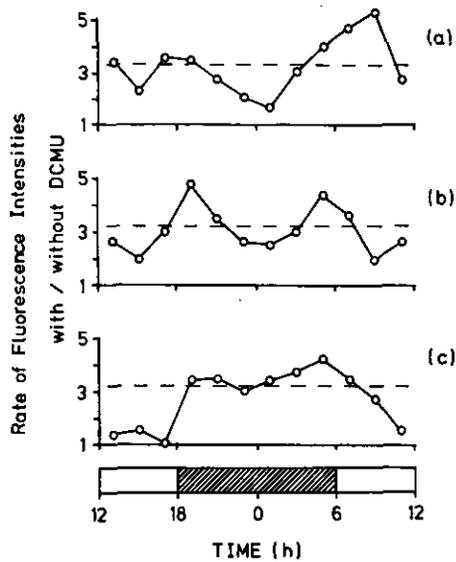


図 5 DCMU を添加・無添加した試水の蛍光強度比の日周変化
(a)表層, (b)中層, (c)底層

Fig. 5 Diurnal change of the ratio between fluorescence intensities of aliquots with and without DCMU sampled at (a)surface, (b) middle, and (c)bottom

成層下での鞭毛藻の鉛直移動と、これに伴う細胞内の生化学的変化を詳細に分析することは、鉛直移動の機構を明らかにし、鞭毛藻の生態系での有利性を理解する助けとなるであろう。

謝 辞

本研究遂行に当たり終始、実験補助をして下さった山田明氏（茨城環境技術センター）に感謝致します。

引 用 文 献

- Blasco, D. (1978) : Observations on the diel migration of marine dinoflagellates off the Baja California Coast. *Mar. Biol.*, **46**, 41-47.
- Cullen, J. J. and S. G. Horrigan (1981) : Effects of nitrate on the diurnal vertical migration, carbon to nitrogen ratio, and the photosynthetic capacity of the dinoflagellate *Gymnodinium splendens*. *Mar. Biol.*, **62**, 81-89.
- Eppley, R. W. and W. G. Harrison (1975) : Physiological ecology of *Gonyaulax polyedra*, a red water dinoflagellate of Southern California. In: Proceedings of First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms, V. R. LoCicero, (ed.), Massachusetts Science and Technology

- Foundation, Wakefield, Mass. 11-22.
- Eppley, R. W., O. Holm-Hansen and J. D. H. Strickland (1968) : Some observations on the vertical migration of dinoflagellates. *J. Phycol.*, **4**, 333-340.
- Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther (1962) : Studies on marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- 畑野智司・原慶明・高橋正征(1983) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の鉛直移動習性に対する照射と栄養物質の影響に関する予報. *Jap. J. Phycol.*, **31**, 263-269.
- Heaney, S. I. and T. I. Furnass (1980) : Laboratory models of diel vertical migration in the dinoflagellate *Ceratium hirundinella*. *Freshwater Biology*, **10**, 163-170.
- Heaney, S. I. and R. W. Eppley (1981) : Light, temperature and nitrogen as interacting factors affecting diel vertical migrations of dinoflagellates in culture. *J. Plankton Res.*, **3**, 331-344.
- Kamykowski, D. (1981) : Laboratory experiments on the diurnal vertical migration of marine dinoflagellates through temperature gradients. *Marine Biol.*, **62**, 57-64.
- Kamykowski, D. and S. J. Zentara (1977) : The diurnal vertical migration of motile phytoplankton through temperature gradients. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 148-151.
- 木幡邦男・渡辺信・中村泰男・渡辺正孝(1982) : 赤潮鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* のリン酸制限下での静置培養 : 増殖およびリン摂取の動力学的解析. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 95-111.
- 木幡邦男・渡辺正孝(1984) : 制御実験生態系(マイクロコズム)を用いた赤潮発生機構の解析(II). ——マイクロコズム内での赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 111-121.
- 中村泰男・渡辺信(1984) : *Chattonella antiqua* の日周垂直移動——特にその生態的意味について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 97-102.
- Samuelsson, G. and G. Öquist (1977) : A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, **40**, 315-319.
- Slovacek, R. E. and P. J. Hannan (1977) : *In vivo* fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll *a*. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 919-925.
- Staker, R. D. and S. F. Bruno (1980) : Diurnal vertical migration in marine phytoplankton. *Bot. Mar.*, **23**, 167-172.
- 渡辺信・中村泰男(1984 a) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性 1. 増殖に及ぼす水温, 塩分, 照度, pH の影響. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 51-58.
- 渡辺信・中村泰男(1984 b) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性 2. 栄養塩の利用. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 59-68.
- 渡辺信・中村泰男・木幡邦男(1984) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の日周垂直移動——特にその生態的意味について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 69-77.
- 渡辺正孝・渡辺信・木幡邦男・原島省(1982) : 制御実験生態系(マイクロコズム)を用いた赤潮発生機構の解析. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 11-26.
- Weiler, C. S. and D. M. Karl (1979) : Diel changes in phased dividing cultures of *Ceratium furca* (Dinophyceae) : nucleotide triphosphates, adenylate energy charge, cell carbon, and patterns of vertical migration. *J. Phycol.*, **15**, 384-391.
- 矢持進・安部恒之・城久(1982) : 大阪湾谷川港に於ける *Olisthodiscus luteus* の赤潮発生機構に関する研究——出現特性と日周鉛直移動について. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 191-214.

II-2

制御実験生態系 (マイクロコズム) を用いた赤潮発生機構の解析 (IV)

——赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖中細胞にみられる

C/N 比とクロロフィル *a/c* 比の日周変化——

The Use of a Controlled Experimental Ecosystem (Microcosm)

in Studies of Mechanism of Red Tide Outbreaks (IV)

——Diurnal Changes of C/N and Chlorophyll *a/c* Ratios in the Culture
of *Heterosigma akashiwo*, a Red Tide Fragellate——

木幡邦男¹・渡辺正孝¹

Kunio KOHATA¹ and Masataka WATANABE¹

要 旨

大阪湾に赤潮として出現した *Heterosigma akashiwo* を海水マイクロコズム内、12時間・12時間の明暗周期下で培養した。マイクロコズム下部から除菌空気を入れ、かくはんしながら培養した。3あるいは6時間間隔の採水を4日間続けた。試料の細胞濃度・平均体積、蛍光強度、乾燥重量、炭素・窒素含有量、クロロフィル色素量の各項目を測定した。*H. akashiwo* の細胞は、毎日、暗期の後半から分裂を始め、明期には平均体積を増大させるという様子を繰り返した。けい光強度からみた光合成活性は、暗期に低く、明期の前半に最大となった。炭素・窒素含有量、クロロフィル色素量は、一細胞当たりの値は明期に増大・暗期に減少したが、細胞体積当たりの変化は少なかった。これから、細胞の体積増大は、炭素・窒素の同化やクロロフィル色素の合成と並行することが推察された。

Abstract

Clonal culture of *Heterosigma akashiwo* causing red tides in Osaka Bay was grown in the Microcosm on a 12:12 LD cycle. Sterilized air was introduced from the bottom of the tank and a mixed condition was maintained in the tank throughout this experiment. Sampling was continued for 4 days at 3 or 6 hour interval. Sampled water was measured on cell concentration, mean cell volume, fluorescence intensity, dry weight, carbon and nitrogen contents, and content of chlorophyll pigments. *H.*

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

akashiwo repeated the diurnal pattern that it began to divide from the latter half of the dark period and enlarged itself at the light period. Photosynthetic activity measured by fluorescence was low at the dark period and had the largest value at the first half of the light period. Although contents of carbon, nitrogen and chlorophyll pigments per cell number increased at the light period and decreased in the dark, those per cell volume did not change significantly. It was suggested that cells of *H. akashiwo* enlarged their size at the light period in parallel with assimilation of carbon and nitrogen and with synthesis of chlorophyll pigments.

1 はじめに

赤潮を形成する鞭毛藻の多くは日周鉛直移動を行い(中村・渡辺, 1984b; 木幡・渡辺, 1985及びその引用文献), 昼は表層に, 夜は底層に集積する。また鞭毛藻の多くは, 一日のうちのある定まった時間帯に細胞分裂して増殖する(Chisholm, 1981)。赤潮発生機構を解明, あるいはモデル化していくためには, このような細胞の一日を周期の単位とした挙動を, 増殖や集積の過程と関連させて把握することが必要である。

温度・塩分・照度等の環境因子が, 赤潮鞭毛藻である *Heterosigma akashiwo* や *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす効果について詳細な研究がなされた(渡辺・中村, 1984; 中村・渡辺, 1984a)。増殖機構のモデル化のためには, 環境因子の変化に対する鞭毛藻の応答だけでなく, 鞭毛藻細胞内で各構成要素がどのように変化しているかを知る必要がある。

前述の様に, 鞭毛藻は細胞分裂により日周期的に増殖を行うため, 細胞内諸量の変化も日周性を持つものが多い。細胞内諸量の日周性を調べるには, 一日のうちに数回サンプリングをする必要があり多量の試料を必要とするため, 通常の試験管や三角フラスコの規模での培養系では困難な点があった。

海域の富栄養化や赤潮発生機構解明のための研究手段として製作された室内設置型制御実験生態系(マイクロコズム; 渡辺ら, 1982)では, 内容量が約1 m³の培養槽を用いた実験で赤潮鞭毛藻の一種 *Heterosigma akashiwo* について, その日周鉛直移動を長期に渡り再現できた(木幡・渡辺, 1984)。

本研究では, マイクロコズム培養槽が内容積が大きく多量採水が可能な利点を生かして, 3-6時間毎のサンプリングを4日間行った。この実験で測定した *H. akashiwo* 細胞の乾燥重量, 炭素・窒素含有量, クロロフィル量等の日周変化について得た結果を報告する。

2 材料と方法

大阪湾でしばしば赤潮を形成する種である *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) をマイクロコズム培養槽で培養した。マイクロコズム培養槽についての詳細は既に報告した(木幡・渡辺, 1984)。

培養実験には *H. akashiwo* の無菌クローン株 (OHE-1) で国立公害研究所微生物系統保存施設所有の株を使用した。予備培養は、2 l 三角フラスコ内で 1 l の f/2 培地 (Guillard & Ryther, 1962) を用い、温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12:12 時間の明暗周期の下、明期に $80 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ の照明条件にて行った。

予備培養で細胞濃度が $1.0 \times 10^8 \text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$ に達したものを、滅菌された注入口より無菌的に培養槽に入れ、槽内の初期濃度を $7.4 \times 10^4 \text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$ にした。6—18時に明期、18—翌6時に暗期の12:12時間の明暗周期で照明した。明期における培養槽内の水表面での平均照度は、 $175 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。

培養槽内、フィルター及びフィルターから培養槽までの海水導管、空気導管、さらにサンプリング用のテフロン管等は、培養前に 110°C の水蒸気で30分間滅菌した。培養槽内では、 $0.22 \mu\text{m}$ のミリポアフィルターでろ過滅菌した f/2 培地を 1 m^3 用いた。実験期間を通して、培養槽下部よりフィルターで除菌した空気を入れ、槽内を一樣にかくはんしながら培養した。培養槽内の水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

培養槽内の細胞濃度が $4.1 \times 10^6 \text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$ に達した培養の11日目から15日目までの4日間、3あるいは6時間ごとの連続測定を行った。サンプルは培養槽の表層・中層・底層の3層からテフロンチューブを通して、3 l 又は 5 l の三角フラスコにアスピレーターを用いて吸引採水した。この方法によれば、*H. akashiwo* の細胞が壊れることはなかった。

採水したサンプルの細胞濃度・平均体積、けい光強度、乾燥重量、炭素・窒素含有量、クロロフィル色素量の各項目について測定した。細胞濃度・平均体積の測定にはコールターカウンター TA-II 型を使用した。(木幡・渡辺, 1984)。三角フラスコに集めたサンプルのうち、 $1 \mu\text{M}$ の DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) を添加したものとしいないもの各 6 ml を小試験管にとり、ターナーデザイン・モデル10型けい光光度計でそれぞれのけい光強度を測定した(木幡・渡辺, 1985)。乾燥重量、炭素・窒素含有量の測定には、直径47mmのあらかじめ 400°C で4時間焼いた GF/C フィルター上に試水を 1 l ろ過捕集したものをを用いた。GF/C フィルターは、ろ過後に 0.5M ギ酸アンモニウム水溶液で洗浄した。ろ紙の乾燥は 80°C で48時間行い、重量はメトラー・M36で評量した。炭素・窒素含有量は柳本 CHN コーダー・MT-3 を用いて測定した。日立分光光度計 220A 型で、600—700nm の範囲にわたり 1 nm 間隔で、西條(1975)の方法で抽出した 90% アセトン溶液の吸光度を測定した。得られた吸光度から最少 2 乗法による当てはめで、クロロフィル a, c の量を計算した。

3 結果

実験期間を通して培養槽内を底部より空気泡を入れ混合したが、*H. akashiwo* が日周鉛直移動を行うためと培養槽が大きいために、槽内を完全に一樣にはできなかった。このため、培養槽の表層・中層・底層でのサンプルについての測定値を算術的に平均して培養槽内での値とした。

実験期間中に得られた *H. akashiwo* の細胞濃度 ($\text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$) の変化を図1に示す。比増殖速度は、培養の初日から11日目と連続測定期間中とでそれぞれ $0.36, 0.27 \text{d}^{-1}$ であった。コールターカウンターの計測で得られた細胞の全体積 ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-1}$) を細胞濃度で割って求めた細胞一つ当たりの平均体積 ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cell}^{-1}$) の日周変化を図2に示す。図2中の実線は、日周期性を抽出するために、実験期間中の測定値を各時刻毎に平均して求めた値をなめらかに繋いで得た曲線を、繰り返し描いたものである。この図で、平均細胞体積の日周期性とともに、実験期間中における培養槽内での平均細胞体積変化の再現性が示された。平均細胞体積は、明期に光合成により増大し暗期に減小したが、毎日の最大値と最小値は、ほぼ一定であった。

得られた試水の、DCMU を添加したものとししないものについてのけい光発光強度の比の日周変化を図3に示す。図3中の実線は図2中の実線と同様にして求めた。DCMU 添加前後の発光強度比は藻類の光合活性の一つの指標となる (Samuelsson & Öquist, 1977)。この場合では比の値が大きい方が光合活性が高い。図3に示されているように、*H. akashiwo* では明期に光合活性が高く、暗期に低い。図3でも、図2と同様に、実験期間中におけるけい光発光強度の再現性が示されている。

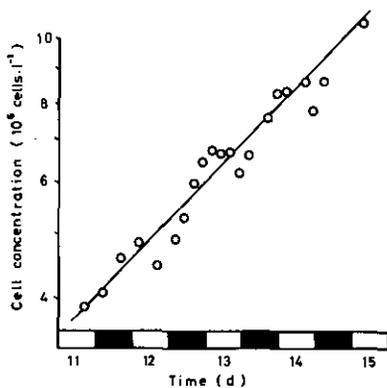


図 1 *H. akashiwo* の増殖曲線
Fig. 1 Growth of *H. akashiwo*

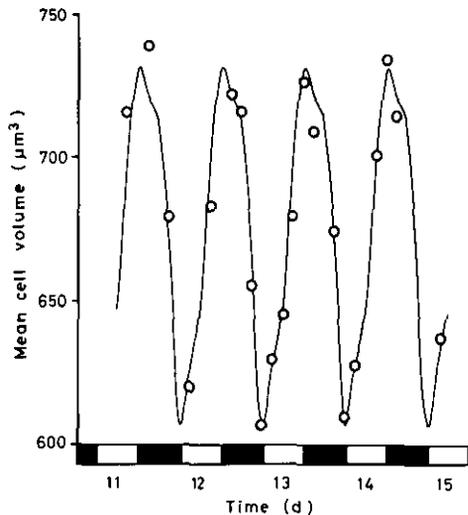


図 2 平均細胞体積の日周変化
実線は、平均した値をなめらかに結んで得た1日分の線を繰り返し描いた。

Fig. 2 Diurnal change of mean cell volume
Solid line for a day in the figure was obtained by smoothly connecting averaged data and was drawn repeatedly.

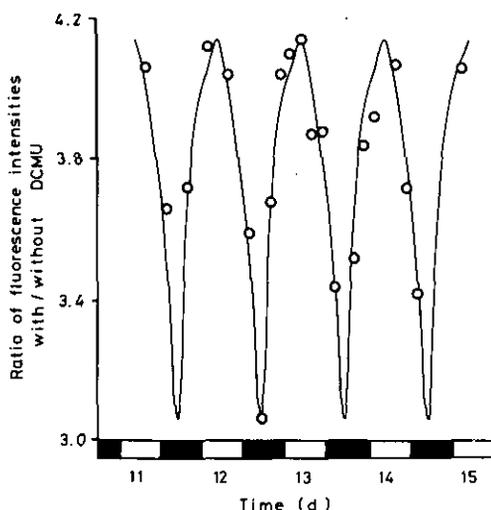


図 3 DCMU を添加・無添加して測定されたけい光強度の比の日周変化
実線は図 2 と同様に描いた。

Fig. 3 Diurnal change of the ratio between fluorescence intensities observed with and without DCMU of $1 \mu\text{M}$
Solid line was drawn by the same way as Fig. 2.

これより後の議論では、測定値を図 2, 3 中の実線のように各時刻ごとに平均して抽出された一日についての挙動を扱う。図 4-7 中の縦線は、平均の過程で得られた標準偏差である。

測定された各時刻における、一細胞当たりの乾燥重量 ($\text{pg} \cdot \text{cell}^{-1}$)*¹, 炭素・窒素量 ($\text{pg} \cdot \text{cell}^{-1}$) を図 4 に、また、細胞体積当たりの値 ($\text{fg} \cdot \mu\text{m}^{-3} = \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)*² を図 5 に示す。乾燥重量、炭素・窒素量とも、細胞当たりの値は明期に増大した。

クロロフィル a, クロロフィル c の一細胞当たりの値 ($\text{pg} \cdot \text{cell}^{-1}$) を図 6 に、細胞体積当たりの値 ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) を図 7 に示す。クロロフィル a, c とも、細胞当たりの値は明期に増大した。

4 考 察

実験期間中に得られた比増殖速度、 0.27d^{-1} は、通常最大と考えられる 1 日 1 分裂のときの値 (0.693d^{-1}) よりも低い。培養槽内の照明は上部で凹レンズを用いて拡散させている (木幡・渡辺, 1984) ため、底層での照度は表層での値に比べて低い。細胞濃度が高くなった場合には培地の吸光係数が大きくなるが、この値は培養槽の深さが 1 m と大きいいため無視できなく、さらに底層での照度を減ずる。本実験では培養槽内をかくはんしたために、*H. akashiwo* の各細胞が経験

* 1 $\text{pg} = 10^{-12}\text{g}$

* 2 $\text{fg} = 10^{-16}\text{g}$

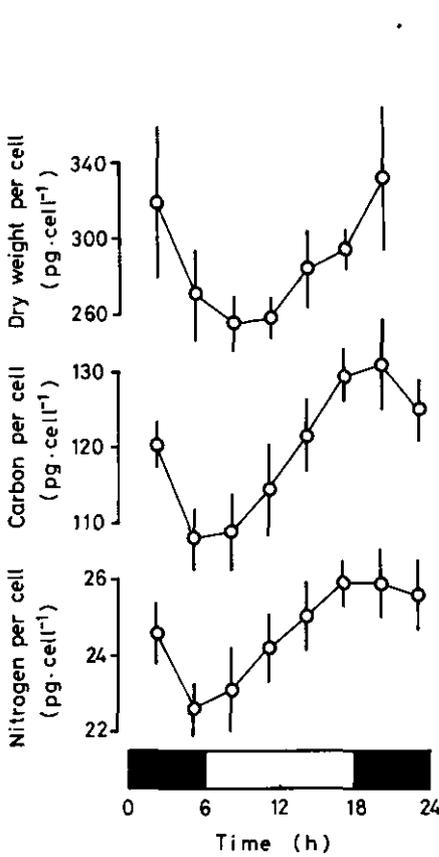


図 4 細胞個体数当たりの乾燥重量、炭素・窒素含有量の日周変化

Fig. 4 Diurnal changes of dry weight and cell contents of carbon and nitrogen per cell number

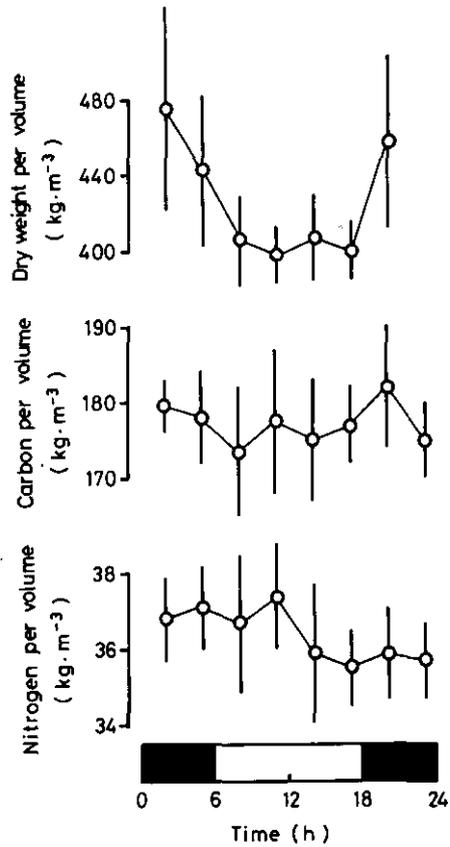


図 5 平均細胞体積当たりの乾燥重量、炭素・窒素含有量の日周変化

Fig. 5 Diurnal changes of dry weight and cell contents of carbon and nitrogen per mean cell volume

する光環境は、培養槽内全体の平均的なものと考えられる。この値は、表層での照度を $175\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ としたときに、細胞濃度の低い場合 ($1 \times 10^5 \text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下) に約 $70\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、高い場合 ($1 \times 10^7 \text{cells} \cdot \text{l}^{-1}$) に約 $58\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ と計算される。*H. akashiwo* の照度と増殖速度との関係 (渡辺・中村, 1984) を考慮すると、平均照度の値から、今回の培養実験は光制限になっていたと考えられる。

平均細胞体積は図2に示したように日周変化し、明期は光合成により増大し、一方暗期には細胞分裂のため減少した。平均細胞体積は、点燈直前の5:00のサンプルが最小で、消燈直前の17:00のサンプルが最大であった。また、最大・最小値は実験期間中ほぼ一定であった。ただし、今回の実験ではサンプリング間隔が3時間であるため、すべての測定項目について最大・最小となる時刻は、それぞれ1時間程度の誤差を含むと思われる。

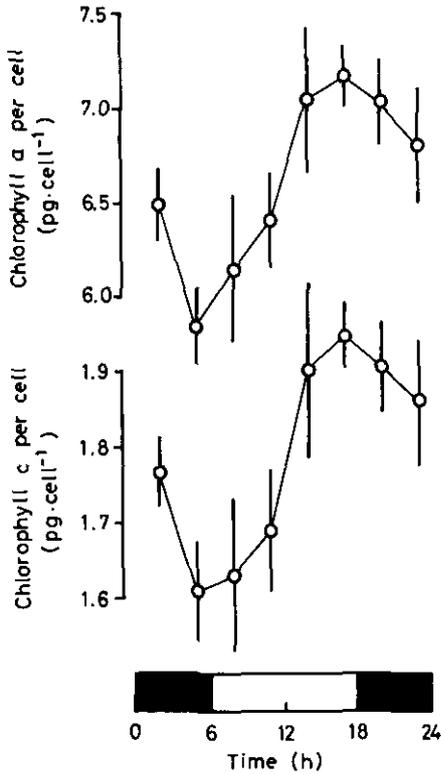


図 6 細胞個体数当たりのクロロフィル a, クロロフィル c 量の日周変化

Fig. 6 Diurnal changes of chlorophyll a and chlorophyll c contents per cell number

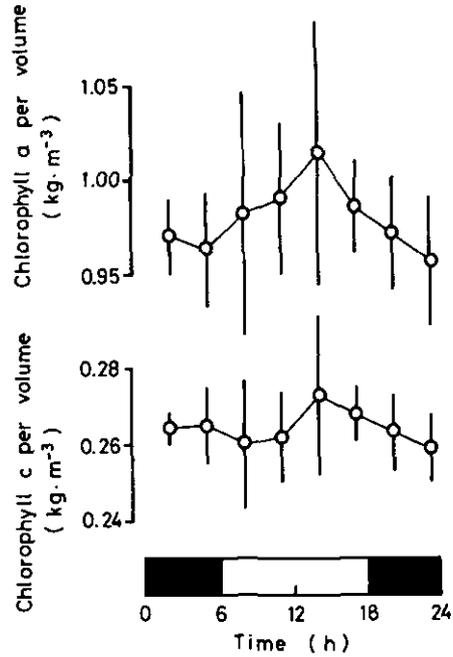


図 7 平均細胞体積当たりのクロロフィル a, クロロフィル c 量の日周変化

Fig. 7 Diurnal changes of chlorophyll a and chlorophyll c contents per cell volume

けい光発光強度比による光合成活性の測定で得られた結果を図 3 に示した。光合成活性は 23:00 で最低であるものが、細胞分裂が行われている時間帯の 2:00-8:00 に高くなり、11:00 に最高となった。このことは、分裂後の若い細胞では光合成活性が高いことを示唆する。この後、光合成活性は 14:00-23:00 にわたり低くなった。

H. akashiwo 細胞の乾燥重量を平均体積で割った比重と同じ次元を持つ量を計算した (図 5)。この量は明期は小さく暗期に大きい値になり、その差は約 $80\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ であった。渡辺 (1982) は *H. akashiwo* の比重を直接測定し、明期は $1,100\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 、暗期は $1,146\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 以上と報告している。今回得た結果と直接測定による比重の結果とで、明期と暗期の値の差が同程度であった。このことから、細胞の比重変化の主な部分は、乾燥重量の変化によると推察される。*H. akashiwo* は日周鉛直移動を行うことが知られている (木幡・渡辺, 1985) が、上記のように明期の比重が暗期

に比べて小さいことは、鉛直移動の助けとなるであろう。ただし、*H. akashiwo* の比重は明期でも海水の比重より大きいので、比重変化だけが鉛直移動の原因とは考えられない。

細胞の一個体当たり、体積当たりの炭素・窒素の含有量を図 4, 5 に示した。一細胞当たりの炭素量は、明期に増大し、暗期に減小した。炭素は明期に光合成により細胞内に蓄えられる。明期の光合成速度を 8:00—17:00 の値から計算して

$$P_n = 2.25 \text{ pg-C} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

を得た。暗期、23:00—5:00 の一細胞当たり炭素含有量の減少の主な原因は、細胞分裂により細胞が小さくなるためであるが、後に述べるように呼吸により炭素が消費されることの影響も同時に含まれると考えられる。

一細胞当たりの窒素含有量も炭素含有量とほぼ同様に变化する。窒素は明期に多く摂取され、明期の摂取速度は

$$V_N = 0.31 \text{ pg-N} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

と計算された。

C/N 比の時間変化を図 8 に示す。この図に見られるように、炭素が窒素に比べて、8:

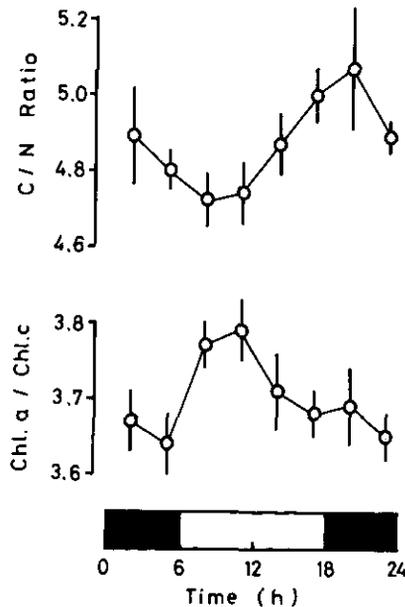


図 8 C/N 比 (w/w) とクロロフィル a/クロロフィル c 比 (w/w) の日周変化
 Fig. 8 Diurnal changes of C/N ratio (w/w) and chlorophyll a/chlorophyll c ratio (w/w)

00—20:00では増加し、これに反し、20:00—8:00では減少する。これは、暗期に呼吸により炭素が消費されるためであろう。

クロロフィル *a*, *c* の量は、平均細胞体積や炭素含有量等の変化と同様に、一細胞当たりでみると明期に増加し、暗期に減少した (図6)。平均細胞体積当たりでは、クロロフィル *a*, *c* 量の一日のうちの変化が少なかった。再現性が十分でないため断定できないが、平均細胞体積当たりのクロロフィル *a* 量は、14:00に極大値を持つようである (図7)。

クロロフィル *a* とクロロフィル *c* との比を図8に示す。この比は8:00—11:00に極大値を持つ。このことは、分裂直後では、クロロフィル *a* の合成がクロロフィル *c* の合成よりも速いことを示しているのであろう。

以上のように、平均細胞体積は、明期に光合成により増大し、暗期に分裂等により減少するが、細胞内の炭素・窒素含有量、クロロフィル *a*, *c* 量等は、この体積変化と並行して変化することが推察された。

謝 辞

本研究遂行に当たり終始、実験補助をして下さった山田明氏 (茨城環境技術センター) に感謝致します。また、徹夜実験を補助して下さった西井寛・柳下知也・鈴木和子・中島重信の諸氏に感謝致します。

引 用 文 献

- Chisholm, S. W. (1981): Temporal patterns of cell division in unicellular algae. *In*: T. Platt (ed.), *Physiological bases of phytoplankton ecology*, Can. Bull. Fish. Aquat. Sci., 210, 150-181.
- Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther (1962): Studies on marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- 木幡邦男・渡辺正孝(1984): 制御実験生態系 (マイクロコズム) を用いた赤潮発生機構の解析 (II) —— マイクロコズム内での赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の増殖。国立公害研究所研究報告, 第63号, 111-121.
- 木幡邦男・渡辺正孝(1985): 制御実験生態系 (マイクロコズム) を用いた赤潮発生機構の解析 (III) —— 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の日周鉛直移動と日周体積変化の関係。国立公害研究所研究報告, 第80号, 13-22.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 a): *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす温度, 塩分, 照度, pH の効果。国立公害研究所研究報告, 第63号, 79-85.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 b): *Chattonella antiqua* の日周垂直移動——特にその生態的意味について。国立公害研究所研究報告, 第63号, 97-102.
- 西條八東(1975): クロロフィルの測定法。 *Jap. J. Limnol.*, 36, 103-109.
- Samuelsson, G. and G. Öquist (1977): A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, 40, 315-319.

木幡邦男・渡辺正孝

渡辺 信・中村泰男(1984)：赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性 1. 増殖に及ぼす水温，塩分，照度，pH の影響. 国立公害研究所研究報告，第63号，51-58.

渡辺正孝(1982)：*Olisthodiscus luteus* と *Skeletonema costatum* の細胞密度の日周変動. 国立公害研究所研究報告，第30号，143-154.

渡辺正孝・渡辺 信・木幡邦男・原島 省(1982)：制御実験生態系（マイクロコズム）を用いた赤潮発生機構の解析. 国立公害研究所研究報告，第30号，11-26.

II-3

Heterosigma akashiwo の日周鉛直移動による表面集積と マイクロコズム内での光吸収係数 Accumulation of *Heterosigma akashiwo* at the Water Surface due to Vertical Migration and Absorption Coefficient in Microcosm

渡辺正孝¹・宮崎忠国²

Masataka WATANABE¹ and Tadakuni MIYAZAKI²

要 旨

マイクロコズム内で純粋培養された *Heterosigma akashiwo* の日周鉛直移動にともなう表層集積と、水中での光合成有効光量 (photosynthetically active irradiance) の垂直分布を、4 π 集光器とラジオスペクトロメーターにより計測した。さらに分光光度計により *H. akashiwo* の吸収スペクトルを求めた。それらをもとにマイクロコズム内での総吸収係数 $a(\lambda)$ を求めるとともに、各深度ごとの平均吸収係数を求めた。マイクロコズム内では平均吸収係数は深度によらずに一定であることが判明した。さらに表層で吸収された光エネルギーの内、表層に集積した *H. akashiwo* により吸収された光エネルギーの割合は約90%に達することが判明した。

Abstract

By using quantum scalar irradiance meter and radiospectrometer, vertical distributions of photosynthetically active irradiance were measured in microcosm, where axenic clonal culture of *H. akashiwo* was grown and accumulated at the water surface due to vertical migration. Absorption spectra of *H. akashiwo* were obtained by using a spectrophotometer. From these data total absorption coefficient $a(\lambda)$ and mean absorption coefficient were obtained, and it was found that mean absorption coefficients were independent from depth in microcosm. The ratio between energy absorbed by *H. akashiwo* at the surface and PAR_{abs} was found to be about 0.9.

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies. Yatabemachi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立公害研究所 環境情報部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Environmental Information Division, the National Institute for Environmental Studies. Yatabemachi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

水中では光は吸収及び散乱効果を受けるために、深度により光の強度や分光特性が大きく変化する。このため海域での藻類の増殖は、まず第1に光制限となる場合が多い。このために藻類は種間のみならず、さらに水中での他の光を吸収するものとも光エネルギー獲得のために競っている。特に日周鉛直移動を行う鞭毛藻類は昼間は表層に濃厚に集積することが知られており(木幡・渡辺, 1984), 増殖を行いつつ日周鉛直移動を行っているマイクロコズム内の光強度分布, 分光特性及び鞭毛藻類種特有の光吸収特性を解析することは、鞭毛藻類の増殖特性を知る上で非常に重要である。従来多くの研究がこの関連分野において行われ、優れた解説も行われている(Kirk, 1983)。通常水中での光吸収は水自身, 溶存態物質, 生物体そして粒子状物質の4成分によって行われる。水自身の光吸収はMorel & Prieur (1977), Prieur & Sathyendranath (1981), Smith & Baker (1981)により詳細に研究されている。マイクロコズム内においては、特に藻類による光吸収を見積もることが、マイクロコズム内の光強度分布を知る上で重要である。現場海域での藻類個体群が持つ吸収スペクトルと培養系で得られた吸収スペクトルとは必ずしも一致しないという理由によって現場海域での藻類による光吸収特性の解析を困難にしている。そのためマイクロコズムを用いた単一藻類種による光吸収スペクトルの実験は、藻類による光合成と水中での光との詳細な関係を知る上でも非常に有効であると考えられる。

本論文においては海水マイクロコズム(NIES Tank)内で純粋培養された*Heterosigma akashiwo*の日周鉛直移動に伴う昼間の表層集積と、水中での光合成有効光量(photosynthetically active irradiance)の垂直分布を正確に求め、マイクロコズム内の吸収係数を推定した。

2 実験方法

2.1 *H. akashiwo* の培養

マイクロコズム内において*H. akashiwo*の純粋培養を行った。八丈島沖の黒潮域より搬入した海水を用いてf/2培地で作成し、*H. akashiwo*の無菌クローン株(Watanabe *et al.*, 1982)を12:12時間のLD周期, 明期での照明条件は水面直上(中央)で約 $350\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で培養を行った。初期リン酸濃度は $6\mu\text{mol/l}$, 初期細胞数は 198cells/ml を与えている。本実験においては成層下培養(上層 $21\pm 1^\circ\text{C}$, 下層で $19\pm 1^\circ\text{C}$)を行った。垂直方向の照度計測前に上下ばっ気混合を行い、平均cell数は 2276cells/ml (対数増殖期)であった。ばっ気を停止し、表層に集積させた後鉛直方向の照度及び細胞個体数の計測を行った。

2.2 スカラー光量 E_0 の計測

従来の照度計測器は集光の方向性を持っていたために、ランダムな方向性を持って動いている藻類の光合成に用いることのできる光量を正確に計測することは困難であった。海水中での藻類

は全方向からの光を利用しているため、光量を測定する場合は全方向から一点に向けての光量をすべて積分したスカラー光量 E_0 を計測する必要がある。これは通常の照度を計測するのと同様に行うことができるが、集光部だけが異なっている。図1に計測システムを示す。ラジオスペクトロメーターは分光器部とデータ処理部の二つのユニットに分かれており、グレーティングによる分光方式、フォトマルチプライヤーによる検出方式を用いている。集光部は球形の光コレクター(直径2.5cm, テフロン製球)を用いているが(Booth, 1976), これは光のコレクターであると同時に拡散板の役割を持っている。このため球表面に入射した光はいかなる角度を持っていても、すべての入射した光量子を等しい効率でもって集光することができる。球形の光コレクター内に入った光は、球形コレクターの中心に接続されたオプティカルファイバーによりラジオスペクトロメーターに送られる。これにより水中での全方向からの光合成有効光量(400—700nm)を精度よく計測することができる。

500Wハロゲン標準電球を光源として、50cm離れた場所に球形コレクターを置き、集光部の感

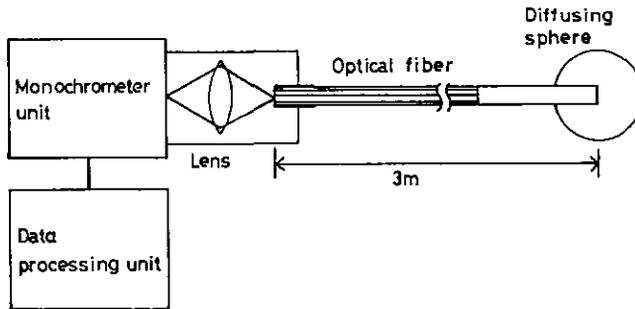


図 1 照度 (PAR) 計測システム

Fig. 1 Measurement system of photosynthetically available radiance (PAR)

度の角度特性を計測した。図2は 0° (光源に正対)から 90° (光軸に直角)までの照度の波長特性を示したものである。これによると、光軸に対する球形コレクターの角度を増すに従って照度は減少するが、波長特性は変化しないことがわかる。また図3には 0° から 90° までの600nmにおける感度特性を示したものである。光軸に対し角度をつけるに従い感度が落ちるが、これは球形コレクターと接続パイプとの接合部による集光表面積の減少が原因と考えられる。マイクロコズム内においては、常に光軸に対し 0° の角度になるように設置している。

3 H. akashiwo の吸収スペクトルと比吸収係数

マイクロコズム内の水中における総吸収係数に対して藻類が寄与する割合を求めるために、H. akashiwo のある濃度に対する光吸収を各波長ごとに計測し、吸収スペクトルを求めるとともに、

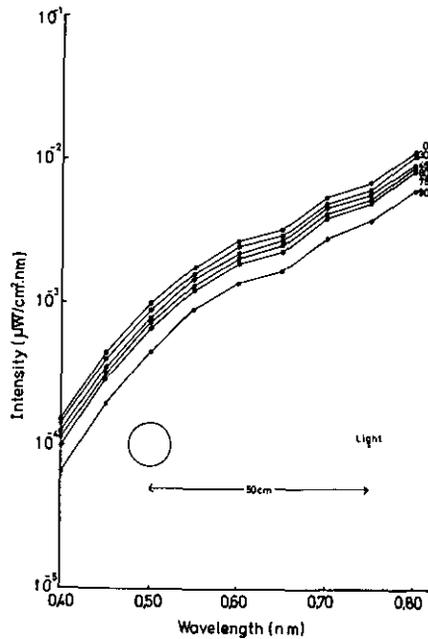


図 2 スカラー光量センサーの光軸からの角度とその波長特性

Fig. 2 Spectral distribution of irradiance measured by scalar irradiance sensor as a function of the directional angle from light

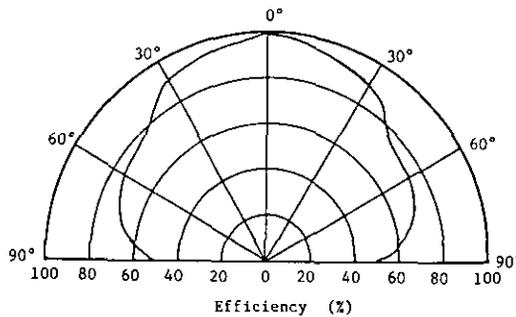


図 3 スカラー光量センサーの光軸からの角度と光吸収効率

Fig. 3 The relation between the directional angle from light and light efficiency

単位藻類量（通常は Chl-*a* を用いる）当たりの比吸収係数 $a_p(\lambda)$ を求めることが必要である。

H. akashiwo の吸収係数 $\alpha(\lambda)$ はヘッドオンフォトマルを組み込んだ HITACHI-220A ダブルビーム分光光度計を用いて計測した。厚さ $L = 1 \text{ cm}$ のガラス製セルにサンプルを入れ、GF/C

フィルターによりろ過した培養液を基準値として計測を行った。吸収の測定値からバックグラウンドによる750nmでの吸収(=0.1393)を差し引いたものを真の吸収値として求めた。これより吸収係数 $\alpha = D/L$, ここで $D = \text{optical density}$, を図4に示すごとく求めた。サンプル中の個体数はコーンターカウンターにより計測した結果 $N = 629678 \text{ cells/ml}$ と得た。クロロフィル量はアセトン抽出後, HITACHI-220A ダブルビーム分光光度計により, $4.02 \text{ mgChl-}a \cdot l^{-1}$ という計測結果を得た。以上の値をもとにして求めた *H. akashiwo* の比吸収係数 $k_c(\lambda)$ を図5に示す。620nmでの $a_p(\lambda)$ の値は $0.003 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl-}a$ であり, 675nmでの $a_p(\lambda)$ は $0.008 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl-}a$ となっている。また両者の比 $a_p(675)/a_p(620)$ は2.67となっている。

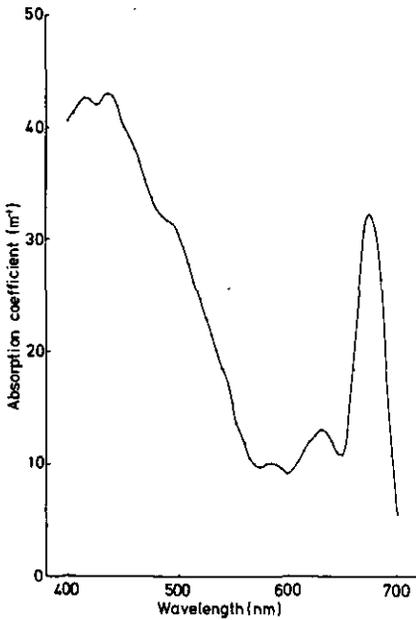


図 4 *H. akashiwo* の吸収係数
Fig. 4 Absorption coefficient for *H. akashiwo*

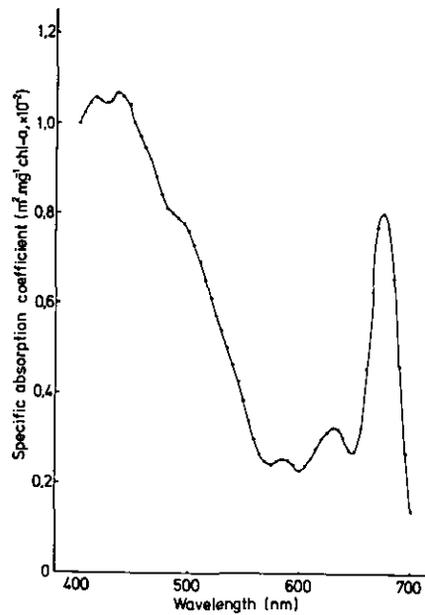


図 5 *H. akashiwo* の比吸収係数
Fig. 5 Specific absorption coefficient for *H. akashiwo*

4 実験結果

マイクロコズム内でのばつ気を停止し, 表層に *H. akashiwo* を集積させて後, 水表面下0, 10, 20, 40, 60, 80cmでの個体数を計測(表1)するとともに, 水表面直上及び上記各深度ごとの照度を計測した(図6)。

4.1 吸収係数 $a(\lambda)$

総吸収係数 $a(\lambda)$ は次式のように表現される。

表 1 マイクロコズム内の *H. akashiwo* 個体数の鉛直分布
 Table 1 Vertical distribution of cell number of *H. akashiwo* in Microcosm

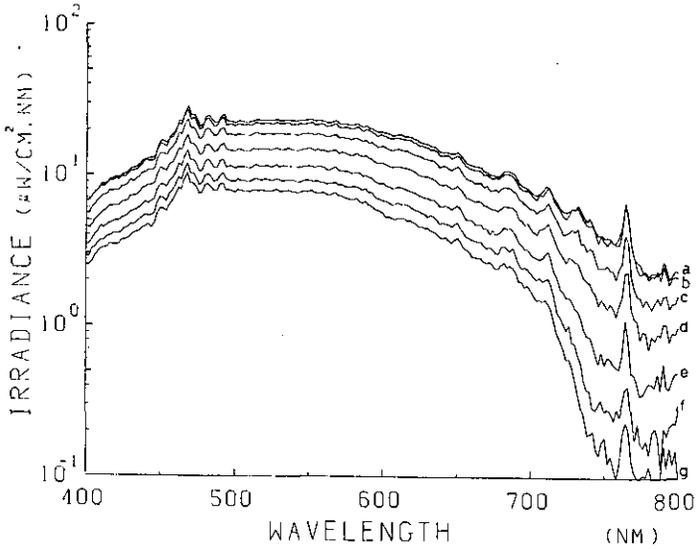
Run 1	depth (cm)	cell number (cells/ml)
	0	32822
	5	1702
	10	272
	20	126
	40	76
	60	74
Run 2	depth (cm)	cell number (cells/ml)
	0	63518
	10	5860
	20	668
	40	266
	60	202
	80	162
Run 3	depth (cm)	cell number (cells/ml)
	0	137544
	10	1748
	20	666
	40	592
	60	444
	80	334
Run 4	depth (cm)	cell number (cells/ml)
	0	272832
	10	80132
	20	8892
	40	836
	60	672
	80	506

$$a(\lambda) = a_p(\lambda) \cdot c(z) + a_y(\lambda) + a_w(\lambda) \quad (1)$$

ここで $c(z)$ は Chl-*a* 濃度 ($\text{mgChl-a} \cdot \text{l}^{-1}$) であり, $a_y(\lambda)$ は培地を GF/C フィルターによりろ過した後純水を基準として求めた吸収係数であり, $a_w(\lambda)$ は純水の吸収係数である。本実験においては, 個体数として計測されているため, *H. akashiwo* 1 個体当たり平均クロロフィル量 ($6.39 \text{ pg} \cdot \text{Chl-a/cell}$) を用いて表 1 の値を換算する。この換算された値を用いて *H. akashiwo* による吸収係数を求めることができる。 $a_w(\lambda)$ は Morel & Prieur (1977) 及び Prieur & Sathyendranath (1981) によって得られた結果を用いた。図 7 に表層 0 cm での吸収係数を示す。

(A) RED TIDE MICROCOSM EXPERIMENT

COD: 5 DAT: 401 REP: 20 GIN: 10
 MAX: 28.8860 AT: 468 MIN: 0.5995 AT: 848
 STA: 5 COM: 09:43:00 WATER SURFACE



(B) RED TIDE MICROCOSM EXPERIMENT

COD: 1 DAT: 1 REP: 20 GIN: 20
 MAX: 28.8860 AT: 468 MIN: 0.5995 AT: 848
 STA: 1 COM: 10:04:00 WATER SURFACE

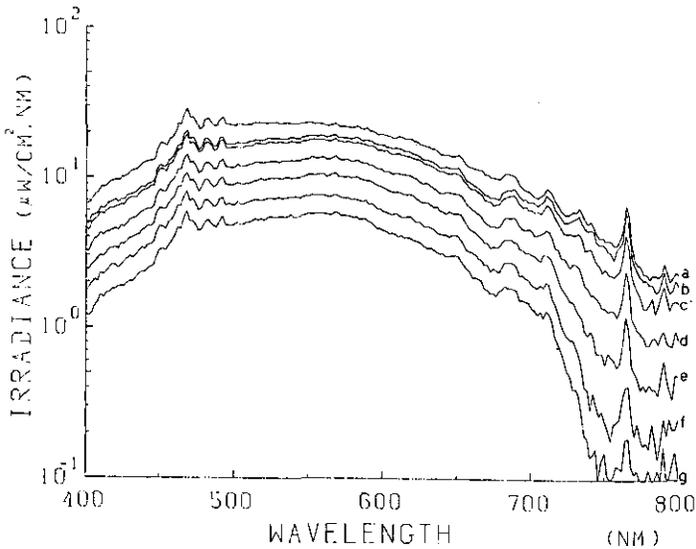
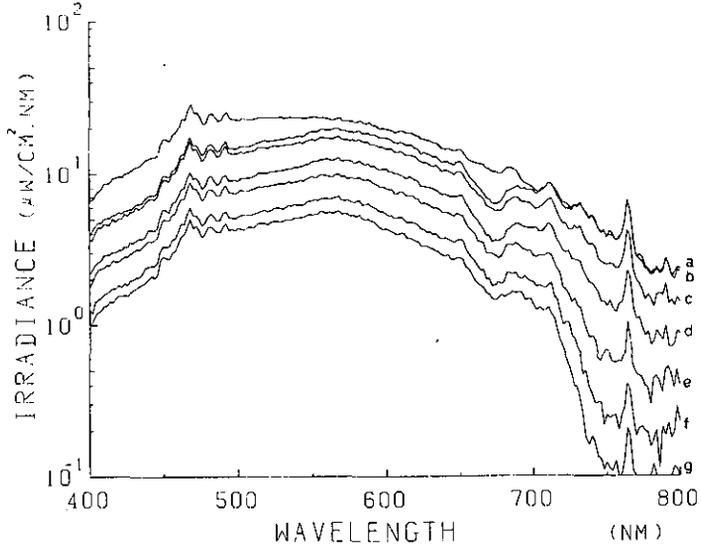


図 6 各深度ごとのスカラー光量のスペクトル分布
 (a : 空気, b : 水面下 0 cm, c : 10cm, d : 20cm, e : 40cm, f : 60cm,
 g : 80cm ; (A)海水, (B) Run 1)

Fig. 6 Spectral distribution of scala irradiance at each depth
 (a : air, b : 0 cm under water, c : 10 cm, d : 20 cm, e : 40 cm, f : 60 cm,
 g : 80 cm ; (A) sea water, (B) Run 1)

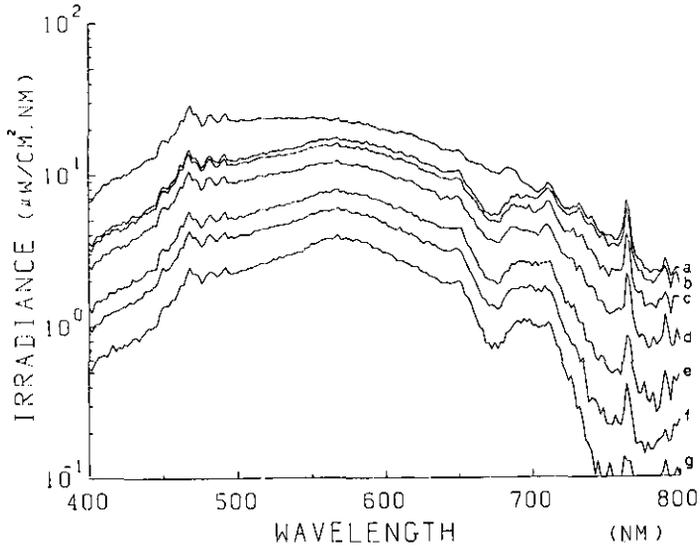
(C) RED TIDE MICROCOSM EXPERIMENT

COD: 2 DAT: 101 REP: 20 GIN: 20
 MAX: 28.8860 AT 468 MIN: 0.5995 AT 848
 STA: 2 COM: 10:35:00 WATER SURFACE



(D) RED TIDE MICROCOSM EXPERIMENT

COD: 3 DAT: 201 REP: 20 GIN: 20
 MAX: 28.8860 AT 468 MIN: 0.5995 AT 848
 STA: 3 COM: 13:35:00 WATER SURFACE



☒ 6 つづき

(a : 空気, b : 水画下 0 cm, c : 10cm, d : 20cm, e : 40cm, f : 60cm,
 g : 80cm ; (C) Run 2, (D) Run 3)

Fig. 6 Continued

(a : air, b : 0 cm under water, c : 10 cm, d : 20 cm, e : 40 cm, f : 60 cm,
 g : 80 cm; (C) Run 2, (D) Run 3)

(E) RED TIDE MICROCOSM EXPERIMENT

COD: 4 DAT: 301 REP: 20 GIN: 20
 MAX: 28.8860 AT: 468 MIN: 0.5995 AT: 848
 STA: 4 COM: 14:30:30 WATER SURFACE

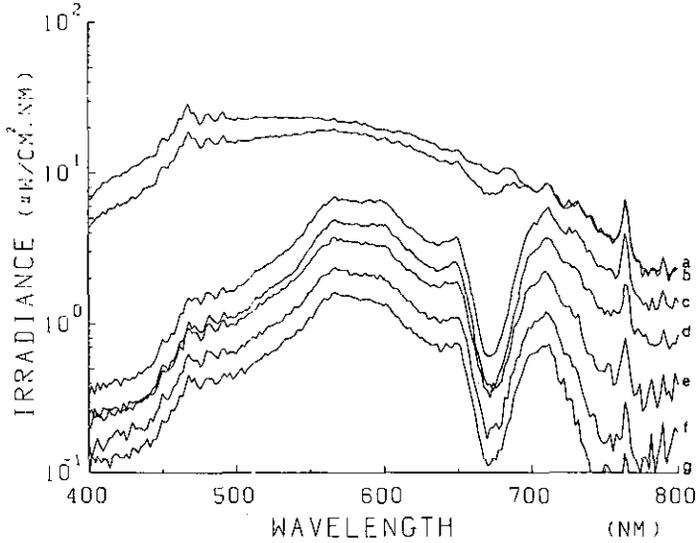


図 6 つづき

(a : 空気, b : 水面下 0 cm, c : 10cm, d : 20cm, e : 40cm, f : 60cm, g : 80cm ; (E) Run 4)

Fig. 6 Continued

(a : air, b : 0 cm under water, c : 10 cm, d : 20 cm, e : 40 cm, f : 60 cm, g : 80 cm; (E) Run 4)

4.2 平均吸収係数 \bar{a}_p と “パッケージ効果”

図6に示されるごとくに、各深度での照度の波長特性は、ほぼ同じと考えられる。このような場合はより単純化したものとして、藻類による平均吸収係数 \bar{a}_p が次式のように与えられている (Bannister, 1979; Atlas & Bannister, 1980)。

$$\bar{a}_p (\text{m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Chl-}a) = \frac{\int_{490}^{700} a_p(\lambda) \lambda e_r(\lambda) d\lambda}{\int_{400}^{700} \lambda e_r(\lambda) d\lambda} \quad (2)$$

ここで λ = nanometer, $e_r(\lambda)$ = 照度である。

図8に各実験における深度ごとの \bar{a}_p を示す。いずれの実験においても、深度方向には \bar{a}_p はほとんど変化せず一定である。本実験で得られた \bar{a}_p は約 $0.005 \text{m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Chl-}a$ のオーダーである。Atlas & Bannister (1980) は現場海域での \bar{a}_p が深度によって変化するという結果を出している

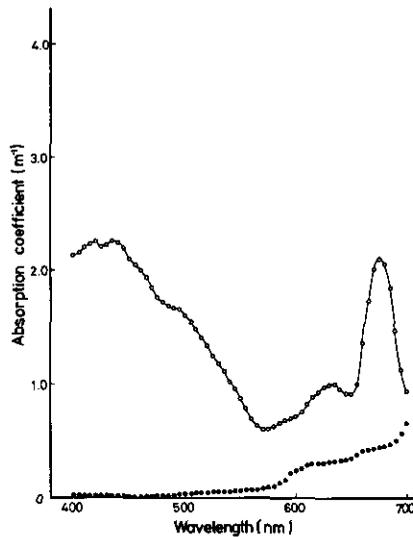


図 7 Run 1 の場合の表層での吸収係数
○：総吸収係数，●：水の吸収係数

Fig. 7 Absorption coefficient at the surface for Run 1
○：total absorption coefficient,
●：absorption coefficient for pure water

が、同時に計測された総吸収 \bar{a} は深度に依存しないという結果も出している。このことから藻類による吸収は小さいものであったと結論づけているが、表層での \bar{a}_p は $0.01 \sim 0.015 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Chl-}a$ と高い範囲にあり、藻類による吸収が小さかったとは言えない。本実験で得られた \bar{a}_p が深さ方向に一定という結果は妥当だと思われる。

図 8 において Run 1 から Run 4 になるに従って \bar{a}_p が小さくなっている。すなわち個体数が増加するに従って \bar{a}_p が減少するという点に特色がある。これは“パッケージ効果” (Kirk, 1975a, b, 1976; Morel & Bricaud, 1981) と呼ばれるもので、個体数が増加しそれぞれが重なり合った状態になると、光を受ける表面積が減少し、結果的に単位クロロフィル量当たりの光吸収効率が減少するためである。

5 考 察

図 6-a に示される海水のみの場合、空気側から水中に入るときに水面上での反射等の影響により、PAR (photosynthetically available radiance) は減少する。さらに藻類の増殖により、海水と藻類とそれぞれに光が吸収されることになる。このため与えられた光の中で、藻類により吸収された光の量を見積もってみる必要がある。

深さ z での単位体積当たりの吸収された光の照度 P は次式で与えられる (Gershun, 1939)。

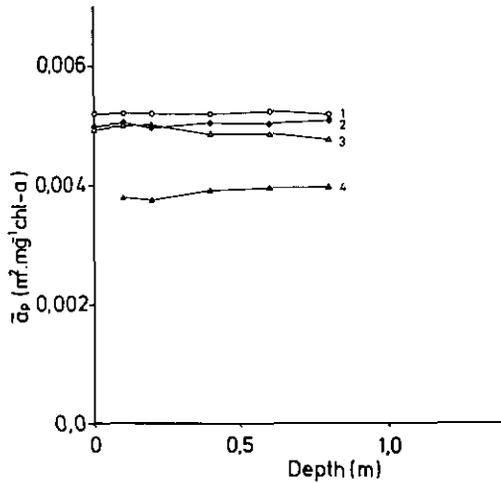


図 8 平均吸収係数の深度依存性
○ : Run 1, ● : Run 2, △ : Run 3, ▲ : Run 4

Fig. 8 Mean absorption coefficient as a function of depth
○ : Run 1, ● : Run 2, △ : Run 3, ▲ : Run 4

$$P(z, \lambda) = E_0(z, \lambda) a(z, \lambda) \quad (3)$$

水により吸収された PAR_{abs} は次のように与えられる。

$$PAR_{abs}(z) = \int_{400}^{700} P(z, \lambda) \frac{\lambda}{hc} d\lambda \quad (4)$$

ここで $h = \text{Plank}$ の定数, $c = \text{光の速度}$ 。これより水中の各成分 i により吸収される光の割合は次のように与えられる (Kishino ら, 1984)。

$$RQ_i(z) = \frac{\int_{400}^{700} P(z, \lambda) \frac{a_i(z, \lambda)}{a(z, \lambda)} \frac{\lambda}{hc} d\lambda}{PAR_{abs}(z)} \quad (5)$$

表2に Run 1~3での表層における PAR_{abs} 及び *H. akashiwo* と海水により吸収された光エネルギーの割合を示す。ここでは吸収された光エネルギーの90%強の光エネルギーが *H. akashiwo* に吸収されて残りは水に吸収されている。これは Kishino ら (1984) が報告している木崎湖の場合とほぼ同じである。本実験においては *H. akashiwo* と懸濁物とを区別して計測していないが、マイクロゾムは純粋培養系であり、不純物はない。さらに本実験においてはばつ気を停止し、*H. akashiwo* は日周鉛直移動性により表面に集積している。このため表面に存在する粒子のほと

んどすべては *H. akashiwo* であると考えることができる。したがって表 2 で得られている RQ_{pl} はすべて *H. akashiwo* による光エネルギー吸収の割合であると考え、*H. akashiwo* 1 個体が受ける光エネルギーは Run 1 の場合 $3.8 \times 10^{11} \text{ quanta} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ と推算される。ここで表層での個体数が増加するにつれて、*H. akashiwo* 1 個体当たり吸収する光エネルギーは減少していることがわかる。これは先述の“パッケージ効果”と呼ばれるものである。

表 2 表層における PAR_{abs} 及び *H. akashiwo* による光エネルギー吸収の割合
図 6 からわかるように表層 0 cm での計測時にセンサーの一部が水面上に出たので Run 4 の計算は除外した。

Table 2 PAR_{abs} at the surface and percentage of energy absorbed by *H. akashiwo*
(As shown in Fig. 6, a part of sensor appeared above the water surface during measurement at 0 cm and the calculation for Run 4 was deleted.)

	PAR_{abs} ($\text{quanta} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)	<i>H. akashiwo</i> RQ_{pl} (%)	Water RQ_w (%)	<i>H. akashiwo</i> N ($\text{cells} \cdot \text{cm}^{-3}$)	Energy absorbed by a cell of <i>H. akashiwo</i> ($\text{quanta} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$)
Run 1	1.44×10^{16}	87.4	12.6	32822	3.80×10^{11}
Run 2	2.37×10^{16}	92.5	7.5	63518	3.45×10^{11}
Run 3	4.21×10^{16}	96.3	3.7	137544	2.95×10^{11}

謝 辞

本研究遂行に当たり種々の御助言をいただいた国立公害研究所の岩熊敏夫室長に感謝致します。

引 用 文 献

Atlas, D. and T.T. Bannister (1980): Dependence of mean spectral extinction coefficient of phytoplankton on depth, water color and species. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 157-159.

Bannister, T.T. (1979): Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 76-96.

Booth, C.R. (1976): The design and evaluation of a measurement system for photosynthetically active quantum scalar irradiance. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 326-336.

Gershun, A. (1939): The light field. *J. Math. Phys.*, **18**, 51-151.

Kirk, J.T.O. (1975a): A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. I. General treatment of suspension of pigmented cells. *New Phytol.*, **75**, 11-20.

Kirk, J.T.O. (1975b): A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. II. Spherical cells. *New Phytol.*, **75**, 21-36.

Kirk, J.T.O. (1976): A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. III. Cylindrical and spheroidal cells. *New Phytol.*, **77**, 341-358.

- Kirk, J.T.O. (1983): Light and photosynthesis in aquatic ecosystem. Cambridge Univ. Press. 201-218.
- Kishino, M., C.R. Booth and N. Okami (1984): Underwater radiant energy absorbed by phytoplankton, detritus, dissolved organic matter and pure water. *Limnol. Oceanogr.*, **29**, 340-349.
- Morel, A. and L. Prieur (1977): Analysis of variations in ocean color. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 709-722.
- Morel, A. and A. Bricaud (1981): Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, **28**, 1373-1393.
- Prieur, L. and S. Sathyendranath (1981): An optical classification of coastal and oceanic waters based on the specific spectral absorption curves of phytoplankton pigments, dissolved organic matter, and other particulate materials. *Limnol. Oceanogr.*, **26**, 671-689.
- Smith, R.C. (1968): The optical characterization of natural waters by means of an "extinction coefficient". *Limnol. Oceanogr.*, **13**, 423-429.
- Smith, R.C. and K.S. Baker (1981): Optical properties of the clearest natural waters (200-800nm). *Appl. Opt.*, **20**, 177-184.
- Watanabe, M.M., Y. Nakamura, S. Mori and S. Yamochi (1982): Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jpn. J. Phycol.*, **30**, 279-288.

II-4

Heterosigma akashiwo のリン酸塩摂取と ^{31}P -NMR によるポリリン酸
代謝過程の計測

Phosphate Uptake and ^{31}P -NMR Studies of Polyphosphate
Metabolism in *Heterosigma akashiwo*

渡辺正孝¹・木幡邦男¹・功刀正行²

Masataka WATANABE¹, Kunio KOHATA¹ and Masayuki KUNUGI²

要 旨

大阪湾で赤潮を形成する *Heterosigma akashiwo* の無菌培養株を用いて、リン酸塩摂取の実験を行った。マイクロゾム内に初期リン酸塩濃度 $1.5\mu\text{mol/l}$ を与え増殖を行わせ、培地中にリン酸塩が欠乏した時点(培養15日目)でリン酸塩を $6\mu\text{mol/l}$ を与えた。リン酸塩添加前後の細胞内リン含有量の変化を計測するとともに、 ^{31}P -NMRによるポリリン酸代謝過程を計測した。これより、リン欠乏状態では P cell quota は $75\text{fmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 、また細胞抽出液中の P_i は約25%であった。リン酸塩添加後は急速にポリリン酸が形成され、1日後には P cell quota は $174\text{fmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ 、さらに細胞抽出液中の P の最大のプールはポリリン酸(約44%)であることが判明した。このようなリン蓄積能力は、リン欠乏環境下での藻類個体群拡大にとって重要な生態的意味を持っている。

Abstract

The uptake of inorganic phosphorus was studied in an axenic strain of phosphorus starved cells of *Heterosigma akashiwo*, an organism often causing red tide in Osaka Bay. Initial concentration of inorganic phosphorus was $1.5\mu\text{mol/l}$, and after phosphorus was depleted in the medium (15 days after inoculation) another $6\mu\text{mol/l}$ of inorganic phosphorus was added.

P cell quota was measured during the experiment and polyphosphate metabolism was studied by using ^{31}P -NMR. In phosphorus starved condition P cell quota was 75

-
1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立公害研究所 計測技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Chemistry and Physics Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

$\text{fmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ and approximately 25% of cell extract was Pi. After adding inorganic phosphorus, rapid formation of polyphosphate was observed and P cell quota became $174 \text{ fmol}\cdot\text{cell}^{-1}$. It was found that maximum portion of P was stored as polyphosphate. The ability to store phosphorus is very important for algae to sustain and develop the population under phosphorus depleted environment.

1 はじめに

バッチ培養での藻類は、培地中でのリン濃度が無くなっても増殖を続けることが知られており、培地中のリン濃度に増殖率が依存するとする Monod 式に表現される増殖率はこの実験結果とは合致しない。近年の chemostat を用いた実験により藻類の増殖は外液中のリン濃度ではなく、藻類細胞内リン含有量に依存することが報告されている (Droop, 1968, 1973, 1974; Caperon, 1968)。

リンが欠乏している環境に置かれていた藻類が、再びリン豊富な環境に戻されると多大なリンを吸収することが観察されている (Harold, 1966; Jensen & Sicko, 1974; Sicko-Goad ら, 1975; Sicko-Goad & Jensen, 1976; Fisher, 1971; Rubtsov & Kulaev, 1977; Grillo & Gibson, 1979; Lin, 1977)。特に多くの藻類は過剰のリンをポリリン酸の形で体内に蓄積することが知られている。多くの研究が体内蓄積されたリンの検出, 分離, 特性解析と定量に向けられた (Kanai ら, 1965; Harold, 1966; Rhee, 1973; Aitchison & Butt, 1973; Kuhl, 1976; Fitzgerald & Nelson, 1966; Jacobson & Halmann, 1982)。しかしそれらの分離操作によって測定し得るリン代謝産物は非常に限定されており, より多くのリン代謝産物を同時に検出する必要がある。

近年 ^{31}P -NMRを用いた細胞内リンの動態を計測することが yeast (Gillies ら, 1981; Salhany ら, 1975) や *E. coli* (Ugurbil ら, 1978; Navon ら, 1977a) について行われている。また非接触での藻類細胞内リンの測定 (Elgavish & Elgavish, 1980) も行われているが, 計測方法の確立を目指したもので, リン欠乏状態からリン添加状態への遷移過程でのリンの動態の計測ではなかった。また従来用いられている藻類は高濃度な細胞数 (通常 $10^6 \sim 10^7 \text{ cells/ml}$ オーダー) にまで増殖可能な藻類を用いており, 赤潮を発生させる鞭毛藻 (対数増殖期で最大 10^4 cells/ml 程度) については, 高濃度のサンプルを必要とする ^{31}P -NMRの応用は不可能であった。

本研究においては海水マイクロコズムを用いた大量培養により, リン欠乏状態からリン添加した状態での *H. akashiwo* によるリン取り込みとリン蓄積形態の詳細な実験を ^{31}P -NMRを用いて行った。

2 実験方法

海水マイクロコズムにおいて *H. akashiwo* の純粋培養を行った。八丈島沖の黒潮域より搬入した海水を用いて f/2 培地を作成し, *H. akashiwo* クローン株 (Watanabe ら, 1982) を 12 : 12 時間

(6:00, 18:00のサイクル)のLD周期, 明期での照明条件は平均約 $175\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で培養した。初期リン酸塩濃度は $\text{PO}_4\text{-P}=1.5\mu\text{mol/l}$, 初期細胞数は 79cells/ml を与えている。培養槽下部より空気泡を入れてかくはん培養を行い, 温度 $20^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ で培養を行った。細胞数計測は1日1回14:00に行った。接種後14日目に細胞数が 6938cells/ml (比増殖速度 $\mu=0.35$)に達した時点でばっ気を停止し, 表層に集積させてサンプリングを行った。この時点で細胞内リン含有量は最小含有量に達している。サンプリング後は直ちにばっ気を再度開始した。15日目の朝9:00にサンプリング後 $6\mu\text{mol/l}$ の $\text{PO}_4\text{-P}$ を添加し, 1時間ばっ気により混合した後, ばっ気を停止し表層に集積させサンプリングを行った(11:00)。サンプリング後は直ちにばっ気を開始する。その後14:00に完全混合の状態でのサンプリングを行った。同様の作業を16, 17, 18日目についても行った。11:00のサンプリングは4.0l行い, 内3lはNMR用試料としてガラス製遠沈管6個により2000rpm, 7分の遠沈を行った後過塩素酸による抽出を行った。抽出後遠沈により上澄液を残し, EDTA添加後 K_2CO_3 で $\text{pH}=7.5$ に調節した(Navonら, 1977)。さらに1lのサンプル液を用いて, TP, DTP, DIP, 細胞個体数を測定した。TP, DTPはペルオキシ2硫酸カリによる分解を行い(Menzel & Corwin, 1965), サンプル中の有機リンをオルトリン酸に変化させて分析試料とした。TP, DTP, DIPはMurphy & Riley (1962)法によりテクニコン社製オートアナライザーAA II型を用いて分析を行った。細胞個体数はコールターカウンターを用いてそれぞれ計測した。なお14:00のサンプルは1.5l行い, NMR用サンプル以外は同様の化学分析を行った。

^{31}P 測定は日本電子(株), JNM-GX-400超電導NMRを使用し, 観測周波数 161.8MHz , 観測範囲 20KHz , データメモリー 32K リード, 45° ないし 60° パルスで数千回~数万回の積算にて行った。繰り返し時間は, 緩和時間の差による信号強度の積分誤差をできるだけ少なくするため, 約1.7秒と長めにとっている。

10mm径のNMR試料管に, 30~40mmの高さに試料を入れて測定した。外部標準には外径約2mmのキャピラリーに, $\text{pH}0.5$ の D_2O 溶液中のリン酸を使用している。キャピラリー中の D_2O はNMRコック用信号に使用している。得られた化学シフト信号は, 85%リン酸を基準として記録している。

3 実験結果

図1に*H. akashiwo*の個体数変化と, 培地中の溶存態無機リン酸(14:00測定値)の濃度変化を示す。培養14, 15日目では培地中の無機リン酸は全く無くなっている。しかし個体数は依然として対数増殖を続けている。図2には細胞内リン含有量の時間変化を示しているが, 培養15日目の無機リン酸添加以前のサンプルでは, 細胞内リン含有量は 75fmol/cell となっており, 報告されているPの細胞内最小含有量 q_0 (95fmol/cell ; Watanabeら, 1982)以下の値になっている。この相異は測定上の誤差と考えられる。培養15日目の朝9時に無機リン酸($6\mu\text{mol/l}$)の添加を行ったが, 5時間後の培地中のリン濃度は $4.944\mu\text{mol/l}$ となっていた。それ以後培地中のDIP

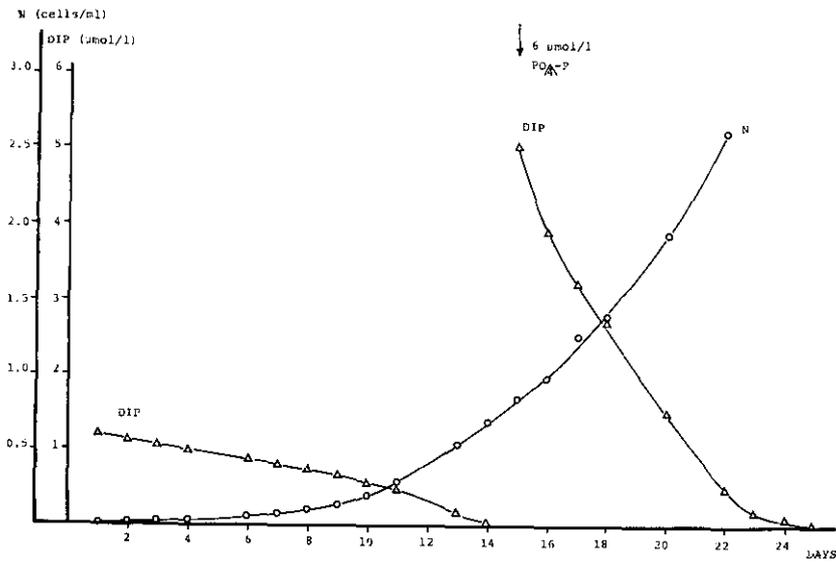


図 1 *H. akashiwo* の個体数と DIP 濃度の時間変化

Fig. 1 Temporal variation in number of *H. akashiwo* and in DIP concentration

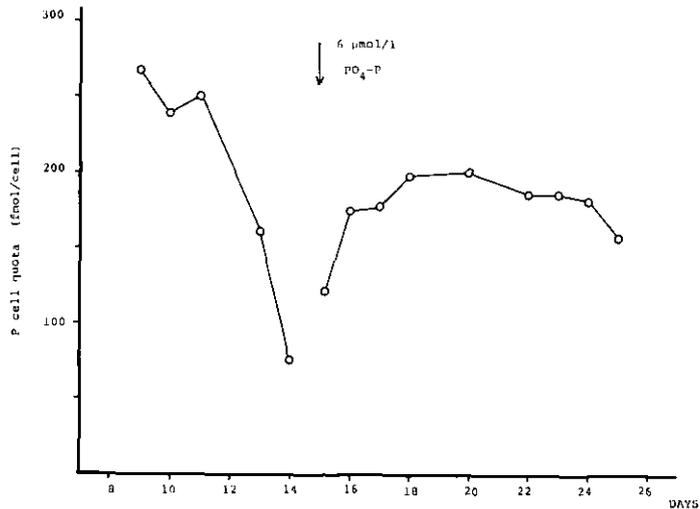


図 2 細胞内リン含有量の時間変化

Fig. 2 Temporal variation in P cell quota

(14:00測定 1日1回)の濃度はほぼ直線的に減少し、*H. akashiwo* によるリン酸塩摂取速度は $V_{PO_4} = 64 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ となっている。一方、図2に示すように、細胞内リン含有量は無機リン酸添加後5時間で $q = 75 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1}$ から $q = 119 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1}$ に増加している。この間分裂は行わ

れていないので細胞内リン含有量 q の変化から推定したリン添加直後の摂取速度は $V_{po_4} = 8.8 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($211 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) と非常に高い値となっている。その後細胞内リン含有量は $q \approx 180 \sim 200 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1}$ に収束しており、摂取速度も $V_{po_4} = 64 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ となっている。このようにリン欠乏状態下に置かれていた *H. akashiwo* はリン添加後数時間の間に、異常に高いリン摂取を行うことがわかる。このリン欠乏状態からリン添加2時間後、1日後、2日後、3日後の ^{31}P -NMRによるリン代謝過程の計測を行ったのが図3である。図3に示されている ^{31}P -NMRスペクトルの帰属に関しては今後より詳細に検討する予定であるが、本論文においては従来発表されている ^{31}P -NMRの論文(特にNavonら, 1977a, b; Salhanyら, 1975)などに基づき帰属したものである。図3-Iにはリン欠乏状態での*H. akashiwo*の ^{31}P -NMRスペクトルを示す。-2 ppm付近に見えるピークはPi(freeの状態のリン酸)である。ほかに4 ppm, 6 ppmにわずかにピークがみえるが顕著なものではない。リン添加2時間後のスペクトルが図3-IIに示してある。Piのピーク以外に顕著なものとして、-4 ppm付近にsugar phosphate, -1 ppm付近にorthophosphate, 6 ppm付近にポリリン酸のterminal phosphate, 22ppm付近にポリリン酸のnon terminal phosphateのピークが見られる。これらの実験結果は従来言われている藻類のポリリン酸の形態でのリン蓄積を実証するものとして非常に興味深いものである。それぞれのピーク値は直接リン各成分を定量することはできないが、それぞれのシグナルを積分することにより、抽出液中に占める相対的な存在比率を求めることができる。細胞内リン含有量のうち抽出されたリン量が正確に求まっていないため、ここでは抽出液中に含めるPi, orthophosphate, sugar phosphate及びポリリン酸の割合の変化を表1に示す。これより、培地中のリン欠乏状態での*H. akashiwo*細胞抽出液中には、Piが24.7%程度存在しており、ポリリン酸の蓄積は検出されていない。他のリンの存在形態については未帰属である。リン添加2時間後には、Piが10.6%と減少したのに対し、orthophosphateが7.4%, ポリリン酸が18.9%, sugar phosphateが8.8%と急激に増加し、特に摂取されたリンの多くは代謝経路を通してポリリン酸としての蓄積にまわされていることがわかる。リン添加26時間後ではPiは8.4%, orthophosphateが4.5%, ポリリン酸が43.5%, sugar phosphateが4.5%となり、これ以降でそれぞれのピークは上記の値をもつ一定した状態になっている。リン添加26時間後において、ポリリン酸のプールが*H. akashiwo*細胞抽出液中の約44%と飽和状態になったが、その時点で細胞内リン含有量も $174 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1}$ とほぼ最終値(約 $200 \text{ fmol} \cdot \text{cell}^{-1}$)に近い値となっており、その他のリン化合物もほぼ最終値に近い値となっている。以上のことから、リン欠乏状態にリンを添加した場合、急激なリン摂取が見られるが、これは摂取したリンを増殖のためのみならずポリリン酸としてできるだけ早く蓄積してしまい、ポリリン酸のプールが飽和状態になった段階以降では、増殖に必要なリンだけを摂取することが示唆された。

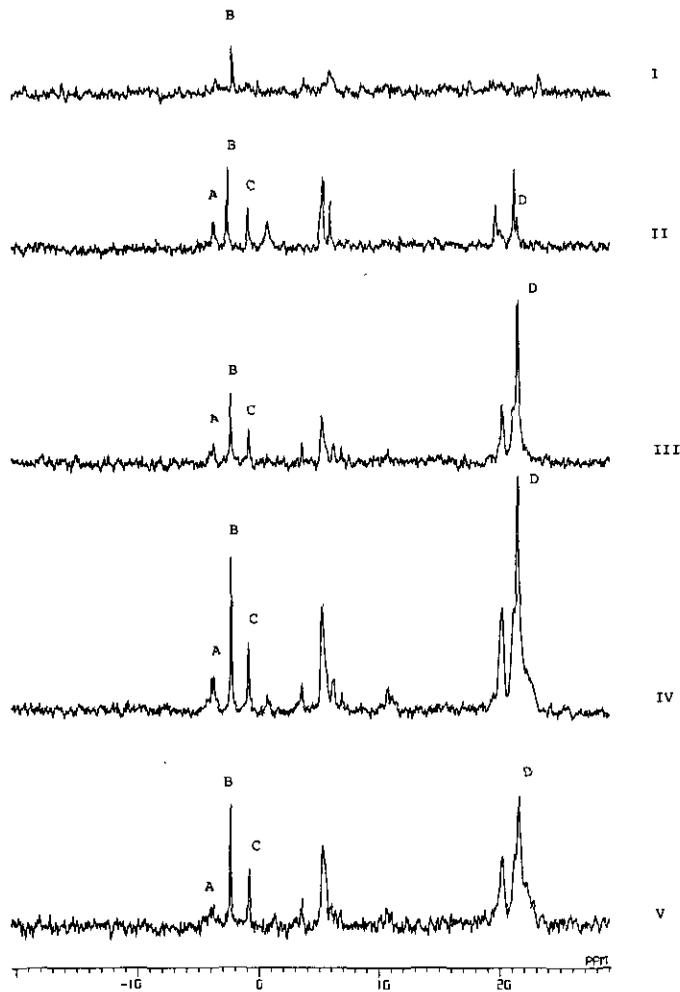


図 3 161.8MHz における ^{31}P -NMR のスペクトル

85%リン酸を 0 ppm として表示。

Navon ら, 1977a, b; Salhany ら, 1975 をもとに帰属。A: sugar phosphate, B: Pi, C: orthophosphate, D: ポリリン酸の non-terminal phosphate. (I : pH=7.5, II : pH=8.0, III : pH=7.7, IV : pH=7.6, V : pH=7.7)

Fig. 3 NMR spectra at 161.8 MHz of ^{31}P nuclei. All spectra are related to 85% orthophosphoric acid at 0 ppm

Spectra are assigned based on published data by Navon *et al.*, 1977b; Salhany *et al.*, 1975. A: sugar phosphate, B: Pi, C: orthophosphate, D: non-terminal phosphate of polyphosphate.

(I : pH=7.5, II : pH=8.0, III : pH=7.7, IV : pH=7.6, V : pH=7.7)

表 1 *H. akashiwo* 細胞の抽出液中に占めるリン化合物各成分の比率変化
 Table 1 Temporal variation in percentage of P components in extract of *H. akashiwo* cell

Time (h)	P cell quota (fmol cell ⁻¹)	Percentage of P components in extract of <i>H. akashiwo</i> cell			
		P _i (%)	orthophosphate (%)	sugar P (%)	polyphosphate (%)
I. Before P addition	75	24.7	0	0	0
II. 2 hours after P addition	119	10.6	7.4	8.8	18.9
III. 26 hours after P addition	174	8.4	4.5	4.5	43.5
IV. 50 hours after P addition	176	6.9	4.1	5.1	44.7
V. 74 hours after P addition	197	7.7	4.5	5.1	44.9
VI. 98 hours after P addition	199				

4 考 察

藻類によるリン利用の過程を解析することは海域の富栄養化問題にとって重要である。藻類やバクテリアはリンが十分に供給されているときにポリリン酸の形態で多量のリンを蓄積すると言われている。この現象は藻類がリン欠乏状態においても個体群を維持し、発展させていくためには不可欠の条件として重要である。このような蓄積は“luxury storage”又は“overplux”現象と名付けられている。閉鎖性海域におけるリンの供給形態は、特に(1)洪水時の河川流出、(2)工場廃水・下水等の放流、(3)底質からの溶出等が考えられる。下水・廃水等の放流制限を行ったとしても、その他の突発的なリン供給が起った時にでき得る限りのリンを蓄積させる能力は、藻類の増殖及び赤潮という藻類種による場の独占現象を説明する上で、重要な生態的意味を持っている。赤潮鞭毛藻に関するリンの luxury uptake, ポリリン酸の定量, ³¹P-NMR の適用といった研究は今後も詳細に実験を重ね、赤潮鞭毛藻のリン代謝機構を明らかにする必要がある。本研究はその第1歩であり、今後は本方法をさらに発展させるとともに、多くの藻類種についても適用していく必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり実験補助をして下さった山田明氏(茨城環境技術センター)に感謝致します。

引用文献

- Aitchison, P. A. and V. S. Butt (1973): The relation between the synthesis of inorganic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. J. Exp. Bot., **24**, 497-510.
- Caperon, J. (1968): Population growth response of *Isochrysis galbana* to variable nitrate environment. Ecology, **49**, 866-872.
- Droop, M. R. (1968): Vitamine B₁₂ and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. J. mar. biol. Assoc. U.K., **48**, 689-733.
- Droop, M. R. (1973): Some thoughts on nutrient limitation in algal. J. Phycol., **9**, 264-272.
- Droop, M. R. (1974): The nutrient status of algal cells in continuous culture. J. mar. biol. Assoc. U.K., **54**, 825-855.
- Elgavish, A. and G. A. Elgavish (1980): ³¹P-NMR differentiation between intracellular phosphate pools in *Cosmarium* (Chlorophyta). J. Phycol., **16**, 368-374.
- Fisher, K. A. (1971): Polyphosphate in a chlorococcaeal alga. Phycologia, **10**, 177-182.
- Fitzgerald, G. P. and T. C. Nelson (1966): Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus phosphorus in algae. J. Phycol., **2**, 32-37.
- Gillies, R. J., K. Ugurbil, J. A. DenHollander and R. G. Shulman (1981): ³¹P-NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**, 2125-2129.
- Grillo, J. F. and J. Gibson (1979): Regulation of phosphate accumulation in the unicellular *Cyanobacterium synechococcus*. J. Bacteriology, **140**, 508-517.
- Harold, F. M. (1966): Inorganic polyphosphates in biology. Bacteriol. Rev., **30**, 772-794.
- Jacobson, L. and M. Halmann (1982): Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. J. Plankton Research, **4**, 481-488.
- Jensen, T. E. and L. M. Sicko (1974): Phosphate metabolism in blue-green algae. I. Fine structure of the "poliphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. Can J. Microbiol., **20**, 1235-1239.
- Jensen, T.E., L. Sicko-Goad and R. P. Agala (1977): Phosphate metabolism in blue-green algae III. The effect of fixation and post-staining on the morphology of polyphosphate bodies in *Plectonema boryanum*. Cytologia, **42**, 357-369.
- Kanai, R., S. Aoki and S. Miyachi (1965): Quantitative separation of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. Plant Cell Physiol., **6**, 467-473.
- Kuhl, A. (1976): Phosphorus. In: W.D.P. Stewart (ed.), Algal Physiology and Biochemistry, Univ. California Press, 636-654.
- Lin, C. K. (1977): Accumulation of water soluble phosphorus and hydrolysis of polyphosphates by *Cladophora glomerata*. J. Phycol., **13**, 46-51.
- Menzel, D. W. and N. Corwin (1965): The measurement of total phosphorus in sea water based on liberation of organically bound fraction by persulfate oxidation. Limnol. Oceanogr., **10**, 280-282.
- Murphy, J. and J. P. Riley (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta, **27**, 31-36.
- Navon, G., S. Ogawa, R. G. Shulman and T. Yamane (1977a): High-resolution ³¹P nuclear magnetic resonance studies of metabolism in aerobic *Escherichia coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,

74, 888-891.

- Navon, G., S. Ogawa, R. G. Shulman and T. Yamane (1977b): ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of *Ehrlich ascites* tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**(1), 87-91.
- Rhee, G. Y. (1973): A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. J. Phycol., **9**, 495-506.
- Rubtsov, P. M. and I. S. Kulaev (1977): Some pathways of polyphosphate biosynthesis and degradation in *Acetabularia mediterranea*. Biochemistry (Engl. Transl. Biokhimiya), **42**, 1083-1089.
- Salhany, J. M., T. Yamane, R. G. Shulman and S. Ogawa (1975): High resolution ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 4966-4970.
- Sicko-Goad, L., R. E. Crang and T. E. Jensen (1975): Phosphate metabolism in blue-green algae. IV. In situ analysis of polyphosphate bodies by X-ray energy dispersive analysis. Cytobiology, **11**, 430-437.
- Sicko-Goad, L. and T. E. Jensen (1976): Phosphate metabolism in blue-green algae. II. Changes in phosphate distribution during starvation and the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. Amer. J. Bot., **63**, 183-188.
- Ugurbil, K., H. Rottenberg, P. Glynn and R. G. Shulman (1978): ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**, 2244-2248.
- Watanabe, M. M., Y. Nakamura, S. Mori and S. Yamochi (1982): Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay. Jpn. J. Phycol., **30**, 279-288.

II-5

Chattonella antiqua によるアンモニウム塩摂取及び
硝酸塩—アンモニウム塩摂取の相互作用*
Ammonium Uptake Kinetics and Interactions between Nitrate and
Ammonium Uptake in *Chattonella antiqua**

中村泰男¹

Yasuo NAKAMURA¹

要 旨

赤潮鞭毛藻 *Chattonella antiqua* のアンモニウム塩摂取及び硝酸塩—アンモニウム塩摂取の相互作用を検討した。

アンモニウム塩摂取速度はアンモニウム塩濃度が 0—8 μM の範囲で Michaelis-Menten 式に従った。最大摂取速度は $2.0 \text{ pmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、半飽和定数は $2.2 \mu\text{M}$ であった。

アンモニウム塩摂取速度は硝酸塩によって影響を受けなかった。一方硝酸塩摂取はアンモニウム塩によって阻害された。アンモニウム塩による阻害は短時間 ($\ll 15 \text{ min}$) のうちに生じた。また、硝酸塩摂取速度は $2 \mu\text{M}$ のアンモニウム塩の存在によって約 50% の阻害を受けた。

Abstract

Ammonium uptake kinetics and interactions between nitrate and ammonium uptake were examined in *Chattonella antiqua*. After the addition of ammonium to the culture of *C. antiqua*, the ammonium concentration decreased linearly with time. The ammonium uptake rate as a function of ammonium concentration followed the Michaelis-Menten equation; the maximal uptake rate was $2.0 \text{ pmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and half saturation constant, $2.2 \mu\text{M}$. Although the ammonium uptake was not affected by nitrate, that of nitrate was suppressed by ammonium; the suppression process of nitrate uptake by ammonium was rapid ($\ll 15 \text{ min}$) and a 50% reduction in nitrate uptake

*本論文は中村 (1984) の東京大学学位論文の一部を加筆修正したものである。

Part of this paper was originally submitted by Nakamura (1984) to the University of Tokyo as a Doctor thesis.

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

was observed at an ammonium concentration of ca. $2 \mu\text{M}$.

1 はじめに

赤潮発生過程をモデル化し、発生にかかわる栄養塩類の役割を把握するためには、赤潮の原因となる植物プランクトンが1) 各栄養塩をどれだけ速やかに自らの体内に取り入れ(栄養塩摂取の動力学)、さらに2) 体内に取り込んだ栄養塩を個体群の拡大にどのように反映させているか(増殖の動力学)を定量的に明らかにする必要がある(Lehmanら, 1975)。このような観点から前報においては夏の瀬戸内海で大規模な赤潮を形成するラフィド藻 *Chattonella antiqua* の硝酸塩及びリン酸塩摂取を解析した(中村・渡辺, 1984d)。

一方, *C. antiqua* は硝酸塩と同様にアンモニウム塩を窒素源として利用でき(中村・渡辺, 1984b)、また夏の瀬戸内海海水中のアンモニウム塩濃度は硝酸塩と同程度である(遠藤ら, 1982)。更にアンモニウム塩は一般に、植物プランクトンの硝酸塩摂取を阻害することが知られている(例: McCarthy, 1981; Zevenboom & Mur, 1981)。したがって, *C. antiqua* 赤潮発生にかかわる窒素栄養塩の役割を明らかにするためには硝酸塩摂取の他に、アンモニウム塩摂取及び硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の効果を解析する必要がある。本報においては *C. antiqua* のアンモニウム塩摂取及び硝酸塩-アンモニウム塩摂取の相互作用を窒素欠乏状態に近い細胞を用いて検討した結果を報告する。

2 実験: 材料と方法について

2.1 材料

Chattonella antiqua の無菌クローン株(Ho-1: 中村・渡辺, 1984a)を実験に使用した。

2.2 培養条件

すべての培養及び実験は 25°C , $0.04 \text{ ly}\cdot\text{min}^{-1}$ (昼光色蛍光灯), 12時間-12時間明暗サイクル(08:00点灯, 20:00消灯)にて行った。基礎培地はH培地(中村・渡辺, 1984a)であるが緩衝剤をTRISから $400 \mu\text{M}$ のピシンに変更した。これはTRISがアンモニウム塩の分析を妨害するためである(Healey & Hendzel, 1979)。

C. antiqua は 600 ml の培地を含む $1,000 \text{ ml}$ 三角フラスコで培養を行った。培地中の硝酸塩初期濃度は $11 \mu\text{M}$ (実験2, 4, 5; 下記参照)か $22 \mu\text{M}$ (実験1, 3)である。植え継ぎ細胞濃度は約 $50 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ である。すべての実験は培地中の硝酸塩が *C. antiqua* に吸収され尽くし、細胞内窒素含量(q^{N})が約 $13 \text{ pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ (最小細胞内窒素含量 q_0^{N} の約1.2倍; 中村・渡辺, 1984b)に達した時点で行った。

2.3 アンモニウム塩摂取の経時変化 (実験1)

硝酸塩の酒濁した *C. antiqua* の培養 (600ml) にアンモニウム塩を濃度が $8 \mu\text{M}$ になるよう添加した。添加後10—20分間隔で約20ml を採取、ろ過してアンモニウム塩濃度の経時変化を追跡した。

2.4 アンモニウム塩摂取速度のアンモニウム塩濃度依存性 (実験2)

硝酸塩の酒濁した *C. antiqua* 培養 (600ml) を100ml ずつ5本の三角フラスコ (200ml) に移しかえた。この操作は10:00前後に行った。約3時間の予備培養の後、13:00に各フラスコにアンモニウム塩を添加した。添加濃度は約1, 2, 3, 5, $8 \mu\text{M}$ である。添加後30分間の培養を行い、培養前後のアンモニウム塩濃度変化から各フラスコ内での摂取速度を求め、これをアンモニウム塩初期濃度の関数として評価した。

2.5 硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の効果 (その1) —経時変化 (実験3)

硝酸塩の酒濁した *C. antiqua* 培養 (600ml) に13:00に $6 \mu\text{M}$ の硝酸塩を添加し、その1時間後に $8 \mu\text{M}$ のアンモニウム塩を添加した。硝酸塩の添加後、約15分間隔で約20ml を採取、ろ過し硝酸塩及びアンモニウム塩濃度の経時変化を追跡した。こうして、アンモニウム塩添加後どれだけ速やかに硝酸塩摂取阻害が生じるかを見積った。

2.6 硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の効果 (その2) —アンモニウム塩濃度の関数として (実験4)

実験2と同様の方法で *C. antiqua* を五つの三角フラスコに分取した。13:00に各フラスコに硝酸塩とアンモニウム塩を添加した。硝酸塩濃度は4ないし $8 \mu\text{M}$ に固定した。アンモニウム塩濃度は各フラスコごとに異なり、0, 1, 2, 4あるいは $8 \mu\text{M}$ である。45分間培養を行い、培養前後の硝酸塩濃度の差から硝酸塩摂取速度を求め、これをアンモニウム塩初期濃度の関数として評価した。

2.7 アンモニウム塩摂取に及ぼす硝酸塩の効果 (実験5)

実験2と同様の方法で *C. antiqua* を五つの三角フラスコに分取した。13:00に各フラスコに $8 \mu\text{M}$ のアンモニウム塩と0, 1, 2, 4または $8 \mu\text{M}$ の硝酸塩を添加し、30分間培養した。培養前後のアンモニウム塩濃度の変化からアンモニウム塩摂取速度を求め、これを硝酸塩初期濃度の関数として評価した。

2.8 分析手法

各フラスコから採取した試料はワットマン GF/C ろ紙にてろ過を行った。ろ液はアンモニウム

塩及び硝酸塩の分析に供した。アンモニウム塩は Solórzano (1969) の方法, 硝酸塩は Woodら (1967) の方法に基づき, テクニコンオートアナライザー II 型で測定した。

なおアンモニウム塩及び硝酸塩の摂取速度は±15%の相対誤差範囲で再現性が認められた。

3 結果

3.1 アンモニウム塩摂取

実験 1 において *C. antiqua* によるアンモニウム塩摂取の経時変化を60分にわたって追跡した (図 1)。アンモニウム塩濃度は時間とともに直線的に減少し, 摂取速度は一定値 ($1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) を示した。

実験 2 においてアンモニウム塩摂取速度 (V_{NH_4}) をアンモニウム塩濃度 (S_{NH_4}) の関数として求めた (図 2)。摂取速度は Michaelis-Menten タイプの式に従った:

$$V_{\text{NH}_4} = V_{\text{max}}^{\text{NH}_4} \cdot S_{\text{NH}_4} / (K_{\text{S}}^{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4}) \quad (1)$$

ここで $V_{\text{max}}^{\text{NH}_4}$ は最大摂取速度, $K_{\text{S}}^{\text{NH}_4}$ は半飽和定数である。 $V_{\text{max}}^{\text{NH}_4}$ と $K_{\text{S}}^{\text{NH}_4}$ は (1) 式に非線型最小自乗法を適用して計算した (表 1)。

夜間におけるアンモニウム塩摂取をアンモニウム塩濃度 $4 \mu\text{M}$ 及び $8 \mu\text{M}$ にて測定した。アンモニウム塩の添加は 20:30 に行った。その他の実験条件は実験 2 と同一である。いずれの濃度においても *C. antiqua* は夜間活発にアンモニウム塩を摂取し, 摂取速度は日中の約 90% であった。

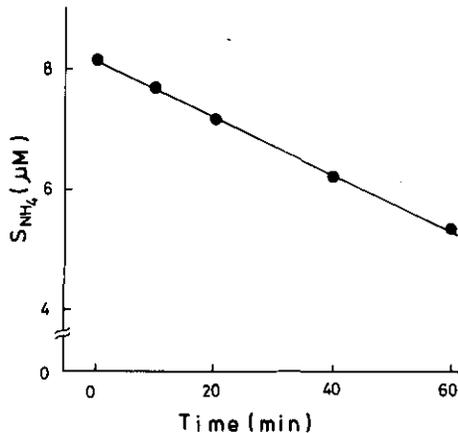


図 1 アンモニウム塩添加後のアンモニウム塩濃度の経時変化

Fig. 1 Time course of ammonium concentration (S_{NH_4}) following the addition of ammonium

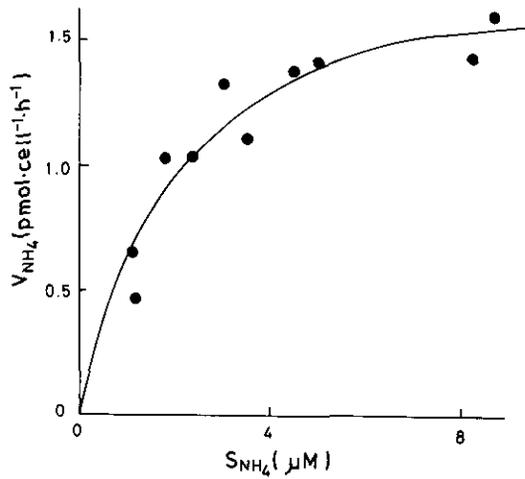


図 2 アンモニウム塩濃度の関数としてのアンモニウム塩摂取速度
実線は(1)式と表1の値を用いて求めた計算値。

Fig. 2 Uptake rate of ammonium (V_{NH_4}) as a function of ammonium concentration (S_{NH_4})
Solid line was calculated from Equation 1, using the values given in Table 1.

表 1 *Chattonella antiqua* のアンモニウム塩及び硝酸塩摂取パラメーター
Table 1 Parameters for ammonium and nitrate uptake

i	NH ₄	NO ₃ ^{-a)}
K_s (μM)	2.19 (0.57)	2.81
V_{max} ($pmol \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$)	2.02 (0.20)	0.91

K_s : half saturation constant for nutrient i.

V_{max} : maximal uptake rate for nutrient i

Figures in parenthesis are the standard deviations of each parameter. a) According to Nakamura and Watanabe (1984d).

3.2 アンモニウム塩が硝酸塩摂取に及ぼす効果と硝酸塩がアンモニウム塩摂取に及ぼす効果

実験3において硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の効果を時間の関数として解析した(図3)。アンモニウム塩添加前の硝酸塩濃度は速やかに減少し、硝酸塩が活発に摂取($0.59 pmol \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$)されていることがわかる。アンモニウム塩添加後、硝酸塩濃度の減少速度は添加前に比べて小さくなり、硝酸塩摂取速度は添加後短時間(<15min)のうちに $0.19 pmol \cdot cell^{-1} \cdot h^{-1}$ まで低下した。

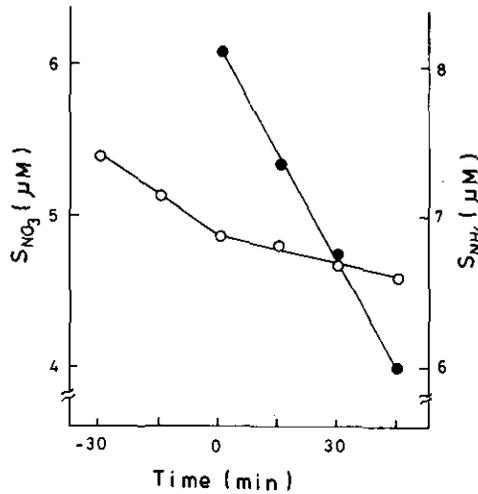


図 3 アンモニウム塩添加前後の硝酸塩濃度 (SNO₃, ○) 及びアンモニウム塩濃度 (SNH₄, ●) の経時変化
時刻ゼロにてアンモニウム塩を添加。

Fig. 3 Time course of the concentration of nitrate (SNO₃, ○) and ammonium (SNH₄, ●) before and after the addition of ammonium
At time zero, ammonium was added.

実験 4 において硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩の阻害効果をアンモニウム塩濃度の関数として測定した (図 4)。硝酸塩摂取阻害は次式 (2) によって表した。

$$F = V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4}) / V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4} = 0) \quad (2)$$

ここに $V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4})$ は硝酸塩濃度が S_{NO_3} 、アンモニウム塩濃度が S_{NH_4} のときの硝酸塩摂取速度である。 S_{NO_3} は $4 \mu M$ あるいは $8 \mu M$ に固定されている。 F 値はアンモニウム塩濃度の増加とともに減少し、アンモニウム塩濃度 $2 \mu M$ にて 0.5 (50%阻害) を示した。

実験 5 においてアンモニウム塩摂取に及ぼす硝酸塩の効果を検討した (図 5)。硝酸塩はアンモニウム塩摂取に何の影響も及ぼさなかった。

4 考 察

4.1 アンモニウム塩摂取

海洋性植物プランクトンの幾つかの種類ではアンモニウム塩摂取が (たとえ $S_{NH_4} \gg K_{NH_4}^{NH_4}$ であっても) 時間とともに変化することが知られている (Conway & Harrison, 1977; Glibert & Goldman, 1981; Goldman & Glibert, 1982)。このようなことが *C. antiqua* でも生じるとするならば、アンモニウム塩摂取速度をアンモニウム塩濃度の関数として解析することは極めて困難に

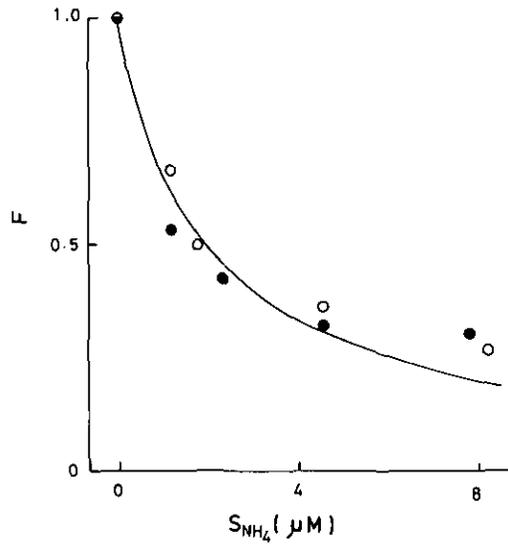


図 4 硝酸塩摂取に及ぼすアンモニウム塩濃度の効果
 $F = V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4}) / V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4} = 0)$ (結果の項参照)。○, $S_{NO_3} = 4 \mu M$;
 ●, $S_{NO_3} = 8 \mu M$ 。実線は(3)式と $K_1 = 2 \mu M$ から計算。

Fig. 4 Effects of ammonium concentration (S_{NH_4}) on nitrate uptake
 $F = V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4}) / V_{NO_3}(S_{NO_3}, S_{NH_4} = 0)$ (see Results). ○, $S_{NO_3} = 4 \mu M$; ●,
 $S_{NO_3} = 8 \mu M$. Solid line was calculated from Equation 3, using the K_1 value of
 $2 \mu M$.

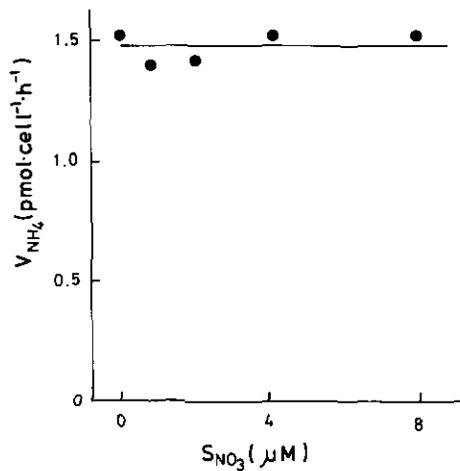


図 5 アンモニウム塩摂取に及ぼす硝酸塩の効果

Fig. 5 Effects of nitrate concentration (S_{NO_3}) on ammonium uptake rate
 (V_{NH_4}).

なる。しかしながら、本種の場合、アンモニウム塩摂取速度は時間によらず(図1)、従って摂取速度を(1)式にしたがって解析することができた。

アンモニウム塩摂取パラメーター ($K_{S^{NH_4}}$, $V_{max}^{NH_4}$) を表1に示した。比較のために硝酸塩摂取パラメーターも併せて記した(中村・渡辺, 1984d)。 $K_{S^{NH_4}}$ は約 $2.2\mu M$ で $K_{S^{NO_3}}$ ($2.8\mu M$)よりいくらか小さい。また $V_{max}^{NH_4}$ は $V_{max}^{NO_3}$ の2.2倍、 $2.0\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ である。このことは *C. antiqua* によるアンモニウム塩摂取が硝酸塩摂取よりも速やかであることを示している。

C. antiqua によるアンモニウム塩摂取は、硝酸塩、リン酸塩摂取と同様に光の明暗によって余り影響を受けなかった(中村・渡辺, 1984d)。*C. antiqua* は日周鉛直運動を行い、夜間は栄養塩の豊富な下層まで移動できると考えられるので(浜本ら, 1979; 中村・渡辺, 1984c)、夜間にも活発に栄養塩を摂取できる本種の能力は現場海域において個体群を維持、拡大してゆく上で重要な役割を担っていると考えられる。

4.2 硝酸塩—アンモニウム塩摂取の相互作用

アンモニウム塩が植物プランクトンの硝酸塩摂取を阻害することは広く知られているが(例 Eppley ら, 1969; Bates, 1976; McCarthy, 1981; Zevenboom & Mur, 1981; Dortch & Conway, 1984), これは *C. antiqua* においても同様に認められた(図3, 4)。一方幾つかの植物プランクトンでは硝酸塩がアンモニウム塩摂取を阻害するが(Dortch & Conway, 1984), *C. antiqua* においては硝酸塩はアンモニウム塩摂取に何の影響ももたらさなかった。

珪藻 *Skeletonema costatum* ではアンモニウム塩添加後、約30分かかって硝酸塩摂取阻害が生じる。しかしながら *C. antiqua* の場合、アンモニウム塩による阻害は *S. costatum* に比べより速やかで、阻害発現に要する時間はサンプリング間隔の15分よりはるかに小さかった。

藍藻 *Oscillatoria agardhii* ではアンモニウム塩が硝酸塩摂取を非競争的に阻害する(Zevenboom & Mur, 1981) :

$$F = 1 / (1 + S_{NH_4} / K_I) \quad (3)$$

ここに K_I は阻害定数である。実験4から得られたデータ(図4)は単一の双曲線によって記述されそうなるため、*C. antiqua* の硝酸塩摂取阻害を(3)式に基づき解析した。 $1/F$ vs. S_{NH_4} ($0-4\mu M$)のプロットから最小自乗法により K_I を求めると約 $2\mu M$ の値が得られた。 S_{NH_4} が $8\mu M$ で実測された F 値は計算値よりも高い値が得られたが、少なくとも $0-4\mu M$ の範囲では硝酸塩摂取阻害が(3)式で記述されそうである。

窒素栄養塩と赤潮生物の相互作用に焦点を絞って赤潮発生過程をモデル化する場合、窒素摂取 ($V_N = V_{NH_4} + V_{NO_3}$) をアンモニウム塩濃度 (S_{NH_4}) と硝酸塩濃度 (S_{NO_3}) の関数として定式化を行うことが重要である。*C. antiqua* のアンモニウム塩及び硝酸塩摂取速度は、それぞれの塩が単独で存在する場合 Michaelis-Menten タイプの式で記述され(図2, 中村・渡辺, 1984d), しか

もアンモニウム塩摂取は硝酸塩によって影響を受けない(図5)。また *C. antiqua* 赤潮が発生する瀬戸内海でのアンモニウム塩濃度は通常 $4 \mu\text{M}$ 以下であり(遠藤ら, 1982), この濃度範囲では硝酸塩摂取のアンモニウム塩による阻害は(3)式にて記述される(図4)。これらの結果をまとめると V_N は次のように定式化される:

$$V_N = \frac{V_{\text{max}}^{\text{NH}_4} \cdot S_{\text{NH}_4}}{K_S^{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4}} + F \cdot V_{\text{NO}_3} (S_{\text{NO}_3}, S_{\text{NH}_4} = 0)$$

$$= \frac{V_{\text{max}}^{\text{NH}_4} \cdot S_{\text{NH}_4}}{K_S^{\text{NH}_4} + S_{\text{NH}_4}} + \frac{1}{1 + S_{\text{NH}_4}/K_I} \cdot \frac{V_{\text{max}}^{\text{NO}_3} \cdot S_{\text{NO}_3}}{K_S^{\text{NO}_3} + S_{\text{NO}_3}} \quad (4)$$

しかしながら, (4)式では窒素摂取に及ぼす細胞の生理的状態の効果が考慮されていないことに注意しなければならない。栄養塩摂取速度は栄養塩濃度の他に, 細胞の生理的状態—細胞内窒素含量 (q^N) や増殖速度—によっても影響を受ける可能性がある(Dortch & Conway, 1984; Gotham & Rhee, 1981)。したがって, より正確に *C. antiqua* の窒素摂取を明らかにするためには, 細胞の生理的状態をも考慮しなければならない。

引用文献

- Bates, S. S. (1976): Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplakton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 212-218.
- Conway, H. L. (1977): Interactions of inorganic nitrogen in the uptake and assimilation by marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, **39**, 221-232.
- Conway, H. L. and P. J. Harrison (1977): Marine diatoms in chemostats under silicate or ammonium limitation. IV. Transient response of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum*, and *Thalassiosira gravida* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.*, **43**, 33-43.
- Dortch, Q. and H. L. Conway (1984): Interactions between nitrate and ammonium uptake: variation with growth rate, nitrogen source and species. *Mar Biol.*, **79**, 151-164.
- 遠藤拓郎・小山治行・今林博道(1982): 播磨灘における植物プランクトンと海況。とくに栄養塩の分布および水質の生理分析。海洋環境特性と赤潮発生に関する基礎的研究。文部省環境科学特別研究(B 148), 81-92.
- Eppley, R. W., J. L. Coatsworth and L. Solórzano (1969): Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 194-205.
- Glibert, P. M. and J. C. Goldman (1981): Rapid ammonium uptake by marine phytoplankton. *Mar. Biol. Lett.*, **2**, 25-31.
- Goldman, J. C. and P. M. Glibert (1982): Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 814-827.
- Gotham, I. J. and G-Y. Rhee (1981): Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate

- uptake in phytoplankton in continuous culture. *J. Phycol.*, **17**, 309-314.
- 浜本俊作・吉松定昭・山田達夫(1979): 夜間連続調査, 昭和53年6月発生ホルネリア赤潮に関する調査報告書, 香川県, 33-47.
- Healey, F. P. and L. L. Hendzel (1979): Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in five algae in culture. *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1364-1369.
- Lehman, J. T., D. B. Botokin and G. E. Likens (1975): The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, **20**, 343-364.
- McCarthy, J. J. (1981): The kinetics of nutrient utilization. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210**, 211-233.
- 中村泰男・渡辺 信(1984a): *Chattonella antiqua* の増殖におよぼす温度, 塩分, 照度, pH の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 79-85.
- 中村泰男・渡辺 信(1984b): *Chattonella antiqua* の増殖量におよぼす栄養塩の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 87-95.
- 中村泰男・渡辺 信(1984c): *Chattonella antiqua* の日周垂直移動—特にその生態的意味について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 97-102.
- 中村泰男・渡辺 信(1984d): *Chattonella antiqua* の硝酸塩, リン酸塩摂取について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 103-109.
- Solórzano, L. (1969): Determination of ammonium in natural waters by the phenolhypochlorine method. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 799-801.
- Wood, E. P., F. A. Armstrong and F. A. Richards (1967): Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **47**, 23-31.
- Zevenboom, W. and L. R. Mur (1981): Simultaneous short-term uptake of nitrate and ammonium by *Oscillatoria agardhii* in nitrate- or light-limited continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 355-363.

II-6

Chattonella antiqua と *Heterosigma akashiwo* の
アルカリホスファターゼ活性*
Alkaline Phosphatase Activity of *Chattonella antiqua*
and *Heterosigma akashiwo**

中村泰男¹

Yasuo NAKAMURA¹

要 旨

リン欠乏状態にある *Chattonella antiqua* と *Heterosigma akashiwo* のアルカリホスファターゼ活性 (APA) を測定した。両種の APA は極めて微弱であり、有機リン酸エステルをリン源として増殖に利用できないことが判明した。

Abstract

The alkaline phosphatase activity of *Chattonella antiqua* and *Heterosigma akashiwo* were found very weak. Each strain is apparently difficult to sustain growth when organic phospho-monoester is the sole source of phosphorus.

1 はじめに

多くの植物プランクトンは増殖に有機リン酸エステルをリン源として利用できる (Iwasaki, 1979)。また海水中の有機リン酸エステルの濃度はしばしばオルトリン酸塩濃度と同程度になる (例: Kobori & Taga, 1979)。したがって、赤潮発生にかかわるリンの役割を解明するには赤潮原因生物のリン酸塩摂取 (中村・渡辺, 1984c; 木幡ら, 1982) や、リン制限下における増殖の動力学 (渡辺ら, 1982; 中村, 1985) を明らかにすると同時に、赤潮生物がどれだけ有効に有機リ

* 本論文は中村 (1984) の東京大学学位論文の一部を加筆修正したものである。
Part of this paper was originally submitted by Nakamura (1984) to the University of Tokyo as a Doctor thesis.

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, The National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

ン酸エステルを利用できるかを把握する必要がある。

植物プランクトンが有機リン酸エステルをリン源として利用できるのはリン欠乏状態におかれたプランクトンの個体表面に誘導（あるいは抑制解除）されたアルカリホスファターゼが外液中の有機リン酸エステルを加水分解し、遊離したオルトリン酸塩をプランクトンが摂取するためと考えられている（Kuenzler & Perras, 1965）。したがって *in vivo* での植物プランクトンのアルカリホスファターゼ活性（APA）を測定すれば、これを“プランクトンがどれだけ有効に有機リン酸エステルを増殖に利用し得るのか？”の指標として用いることができる。

このような観点から本報においては赤潮生物 *Chattonella antiqua* 及び *Heterosigma akashiwo* の APA を測定した結果を報告する。

2 実験：材料と方法について

2.1 材料

C. antiqua の無菌クローン株（Ho-1：中村・渡辺，1984 a），*H. akashiwo* の無菌クローン株（OHE-1：渡辺・中村，1984 b），及び対照として *Tetraselmis* sp. の無菌クローン株（OT-1）を使用した。*Tetraselmis* sp. はグリセロリン酸塩（有機リン酸エステルの一つ）をリン源として極めて良く利用でき（表 2），APA が容易に検出されることが予想される。

2.2 培養条件

すべての培養及び実験は 25°C, 0.04ly·min⁻¹（昼光色蛍光灯），12時間-12時間明暗サイクル（08：00点灯，20：00消灯）にて行った。培地は 4 μM のオルトリン酸塩を初期濃度として含む H 培地（中村・渡辺，1984 a）を使用した。

培養は 500ml の培地を含む 1,000ml 三角フラスコにて行った。APA の測定は増殖がほぼ静止期に近づき，培地中のオルトリン酸塩が藻体に吸収され尽くした時点で行った。

2.3 アルカリホスファターゼ活性（APA）の測定

APA は基質であるパラニトロフェニルリン酸（NPP）が，着色したパラニトロフェノールに加水分解される速度から測定した（Kuenzler & Perras, 1965）。測定は生きたままの藻体を用いて行った。培地の pH は 8.2 に保たれた。測定に先立ち，リン欠乏状態にある藻体試料から 100ml を 200ml の三角フラスコに移しかえた。数時間の予備培養の後，1 ml の基質（10mM NPP+10mM TRIS）を添加し，上記条件下培養した。4-12時間ごとに 24時間まで，約 10ml のサンプルを採取し，ワットマン GF/C ろ紙にてろ過後，ただちに 410nm での吸光度を測定した。吸光度の測定には日立 220A 分光光度計を使用した。吸光度の時間変化は NPP の非生物的加水分解およびろ過液自身の吸収に対して補正を行ったが，これは余り大きくなかった（<0.005 absorbance·d⁻¹）。

APA に及ぼす亜鉛の効果も併せて測定した。100ml の藻体に 1 ml の基質と 0.1ないし 1 ml

の亜鉛溶液 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10mM) を添加した。

なお実験は亜鉛無添加の場合 4 回, 亜鉛添加の場合 2 回行い再現性を確認した。

2.4 増殖量に及ぼすリン源の効果

前報 (中村・渡辺, 1984 b) に記した方法で *C. antiqua*, *H. akashiwo*, *Tetraselmis* sp. の増殖量に及ぼすリン源 (オルトリン酸塩, グリセロリン酸塩) の効果を調べた。*C. antiqua* および *H. akashiwo* については既に報告がなされているが (中村・渡辺, 1984 b ; 渡辺・中村, 1984 b), 再現性確認の意味から再度実験を行った。

2.5 オートクレーブによるグリセロリン酸塩の加水分解

オートクレーブによるグリセロリン酸塩の加水分解は遊離してくるオルトリン酸塩の濃度を測定して求めた。オルトリン酸塩の測定は Murphy & Riley (1962) の方法によった。オートクレーブ (120°C, 20min) によって 3.6% のグリセロリン酸塩が加水分解を受けることが判明した。

3 結果と考察

一般に植物プランクトンのアルカリホスファターゼ活性 (APA) はリン欠乏が激しくなればなる程増大する (Fitzgerald & Nelson, 1966)。したがって *C. antiqua*, *H. akashiwo*, *Tetraselmis* sp. の APA 測定にもリン欠乏状態にある細胞を使用した。*Tetraselmis* sp. の APA は容易に検出されたが ($0.07 \text{ absorbance} \cdot \text{h}^{-1}$, 図 1), *C. antiqua* 及び *H. akashiwo* の APA は今回用いた方法では検出されなかった (表 1)。なお Tomas (1979) によると Naragansett 湾から単離した *H. akashiwo* (論文では *Olisthodiscus luteus* と表記; 渡辺・中村, 1984a 参照) でも APA は検出されなかったという。

アルカリホスファターゼは活性中心に亜鉛を含んでいる。その酵素は強いキレーターが周囲に存在すると亜鉛を抜き取られて失活するが, アポ酵素に亜鉛を添加すると活性が回復する (Clebowski & Coleman, 1976)。今回実験に用いた培地中には $80 \mu\text{M}$ の EDTA が含まれているので (中村・渡辺, 1984a), あるいは *C. antiqua* や *H. akashiwo* の個体表面に存在しているアルカリホスファターゼが EDTA の作用によって失活し, その活性が検出されなかったのかもしれない。そこで培地に亜鉛 ($10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) を添加し APA を測定した (表 1)。しかしながら亜鉛の添加によっても活性の回復は認められず *C. antiqua* 及び *H. akashiwo* 個体表層の APA は本来微弱であったと考えられる。

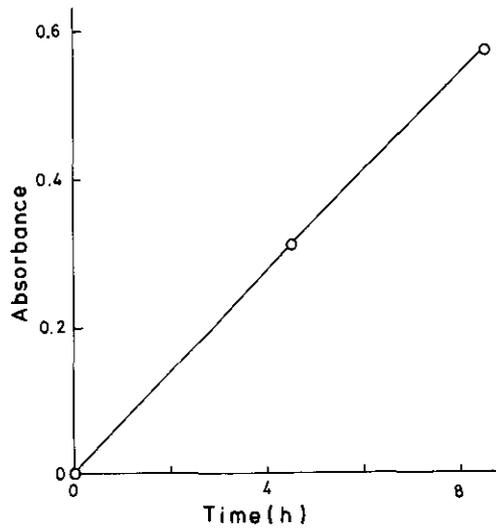


図 1 *Tetraselmis* sp.のアルカリホスファターゼ活性
吸光度(410nm)の経時変化

Fig. 1 Alkaline phosphatase activity of *Tetraselmis* sp.: Time course of absorbance at 410 nm

表 1 *Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo* 及び *Tetraselmis* sp.のアルカリホスファターゼ活性

Table 1 Alkaline phosphatase activity of *Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo* and *Tetraselmis* sp.

	<i>C. antiqua</i>			<i>H. akashiwo</i>			<i>Tetraselmis</i> sp.
cell concentration (cells·m ⁻¹)	3.9×10 ⁸			4.5×10 ⁸			4.2×10 ⁸
q ₀ ^p (pmol·P·cell ⁻¹)	1.0 ^{a)}			0.085 ^{b)}			0.008 ^{c)}
q ^p /q ₀ ^{p(d)}	1.03			1.04			1.20
T ₂ ^{e)}	1.36 ^{e)}			1.10 ^{e)}			0.50 ^{e)}
concentration of zinc (μM)	none	10	100	none	10	100	none
APA (absorbance·d ⁻¹)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1.62
APA (pmol·P·cell ⁻¹ ·d ⁻¹)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	0.21
R (%)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.3	<1.3	<1.3	300

a) according to Nakamura and Watanabe (1984b).

b) according to Watanabe and Nakamura (1984b).

c) obtained in the present study by the same method as that of Watanabe and Nakamura (1984b).

d) q^p is the cell quota for phosphorus at the experimental period and was obtained by the same method as that of Watanabe and Nakamura (1984b).

e) according to Nakamura and Watanabe (1984a).

表1ではAPAをRという無次元パラメーターに換算してある。Rは次式によって定義される：

$$R = \frac{100\text{APA}}{(q_0^0/T_2)} \quad (1)$$

ここに T_2 は栄養塩がプランクトンの増殖を制限していない時の倍加時間(d), q_0^0 は最小細胞内リン含量(中村・渡辺, 1984b; 渡辺・中村, 1984b), APAはアルカリホスファターゼ活性 ($\text{pmol-P}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) である。Rは1日当たりのリン要求量 (q_0^0/T_2) の何%をアルカリホスファターゼの作用によって有機リン酸エステルから供給できるかを示すパラメーターである。*C. antiqua* 及び *H. akashiwo* に対するRは、それぞれ1%以下、1.3%以下であり(表1)、このことは有機リン酸エステルのみをリン源とした場合、両種とも増殖を維持できないことを示している。

一方、表2や中村・渡辺(1984b)の結果を見ると、*C. antiqua*, *H. akashiwo* のいずれもグリセロリン酸塩添加培地で貧弱ではあるが、ある程度の増殖を行う。このことはAPAの測定から得られた結果とは一見矛盾しているように思われる。しかしながら、5 μM のグリセロリン酸塩はオートクレーブによって約0.2 μM のオルトリン酸塩を遊離する(2.5節参照)。グリセロリン酸塩添加培地中の *C. antiqua* 及び *H. akashiwo* が、この遊離したオルトリン酸塩のみをリン源として利用し、成育したと考えるなら、グリセロリン酸塩添加培地とリン無添加培地での増殖量の差は Spo_4/q_0^0 にて与えられるであろう (Spo_4 , オートクレーブにより遊離したオルトリン酸塩濃度)。この値は *C. antiqua* に対して約 $2 \times 10^2 \text{cell}\cdot\text{ml}^{-1}$, *H. akashiwo* に対して約 $2 \times 10^6 \text{cell}\cdot\text{ml}^{-1}$ と計算され、表2に示した実測値とよく一致している。従ってグリセロリン酸塩添加培地で認められる両種の増殖は、オートクレーブによるオルトリン酸塩の遊離によって無理なく説明される。

赤潮プランクトンの生理的性質は同一種であっても採取場所、時期により株間で異なっている可能性が指摘されている(渡辺・中村, 1984b)。したがって将来的には *C. antiqua* 及び *H.*

表 2 最終増殖量に及ぼすリン源の効果

Table 2 Effects of phosphorus source on final cell concentrations ($\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$)

phosphorus source	<i>C. antiqua</i> ^{a)}	<i>H. akashiwo</i> ^{b)}	<i>Tetraselmis</i> sp. ^{c)}
none	0.2×10^3	0.1×10^4	4.7×10^4
orthophosphate (5 μM)	4.3×10^3	28.3×10^4	30.1×10^4
glycerophosphate (5 μM) (GP medium)	0.4×10^3	0.4×10^4	30.0×10^4

a) results from 10 days incubation.

b) results from 8 days incubation.

c) results from 7 days incubation.

akashiwo のより多くの株について APA を測定する必要が生じるかもしれない。

謝 辞

本研究を行うに当たり、*Tetraselmis* sp.の同定を行っていただいた筑波大学 井上勲博士に感謝します。

引 用 文 献

- Clebowski, J. F. and J. E. Coleman (1976) : Zinc and its role in enzymes. *In: Metal Ions in Biological Systems*, Vol.6, (ed.) H. Siegel, Dekker, New York, 1-140.
- Fitzgerald, G. P. and T. C. Nelson (1966) : Extractive and enzymatic analysis for limiting or surplus phosphorus in algae. *J. Phycol.*, **2**, 32-37.
- Iwasaki, H. (1979) : Physiological ecology of red tide flagellates. *In: Biochemistry and Physiology of Protozoa*, Vol. 1, (ed.) M. Levandowski and S. H. Hutner, Academic Press, New York, 357-397.
- Kobori, H. and N. Taga (1979) : Phosphatase activity and its role in the mineraliation of organic phosphorus in coastal waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **36**, 23-29.
- 木幡邦男・渡辺 信・中村泰男・渡辺正孝(1982) : 赤潮鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* のリン制限下での静置培養：増殖およびリン摂取の動力学的解析。国立公害研究所研究報告，第30号，95-111.
- Kuenzler, E. J. and J. P. Perras (1965) : Phosphatase in marine algae. *Biol. Bull.*, **128**, 271-284.
- Murphy, J. and J. P. Riley (1962) : A modified single-solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.*, **27**, 31-36.
- 中村泰男(1985) : 窒素あるいはリン制限下における *Chattonella antiqua* の増殖の動力学。国立公害研究所研究報告，第80号，73-83.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 a) : *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす温度，塩分，照度，pH の効果。国立公害研究所研究報告，第63号，79-85.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 b) : *Chattonella antiqua* の増殖量に及ぼす栄養塩の効果。国立公害研究所研究報告，第63号，87-95.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 c) : *Chattonella antiqua* の硝酸塩，リン酸塩摂取について。国立公害研究所研究報告，第63号，103-109.
- Tomas, C. R. (1979) : *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). III. Uptake and utilization of nitrogen and phosphorus. *J. Phycol.*, **15**, 5-12.
- 渡辺 信・中村泰男(1984 a) : 瀬戸内海大阪湾と播磨灘における *Heterosigma akashiwo* Hada と *Chattonella antiqua* (Hada) Ono の赤潮。国立公害研究所研究報告，第63号，59-68.
- 渡辺 信・中村泰男(1984 b) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性 2. 栄養塩の利用。国立公害研究所研究報告，第63号，59-68.
- 渡辺 信・木幡邦男・中村泰男・渡辺正孝(1982) : 赤潮鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* のリン酸制限下連続培養：その方法の確立と増殖の動力学的解析。国立公害研究所研究報告，第30号，113-130.

II-7

窒素あるいはリン制限下における *Chattonella antiqua* の増殖の動力学*
Growth Kinetics of *Chattonella antiqua* under Nitrogen- or
Phosphorus-limited Conditions*

中村泰男¹

Yasuo NAKAMURA¹

要 旨

窒素あるいはリン制限下における *Chattonella antiqua* の増殖の動力学を半連続培養系を用いて解析した。

窒素制限下においては増殖速度 (μ) は、細胞分裂開始直前の細胞内窒素含量 (Q^N) の関数として、いわゆる Droop の式で記述できた。

$$\mu = \mu_N^* (1 - q_0^N / Q^N)$$

一方、リン制限下においても μ は細胞分裂開始直前の細胞内リン含量 (Q^P) の関数として Droop の式で記述できた。

$$\mu = \mu_P^* (1 - q_0^P / Q^P)$$

Abstract

Growth kinetics of *Chattonella antiqua* under nitrogen- or phosphorus-limited conditions were analyzed using semicontinuous culture system.

Under nitrogen-limited conditions, growth rate (μ) was described as a function of nitrogen cell quota just before the cell division (Q^N) and followed the Droop's equation.

$$\mu = \mu_N^* (1 - q_0^N / Q^N),$$

where q_0^N is the minimum nitrogen quota and μ_N^* the growth rate at infinite Q^N .

* 本論文は中村 (1984) の東京大学学位論文の一部を加筆修正したものである。
Part of this paper was originally submitted by Nakamura (1984) to the University of Tokyo as a Doctor thesis.

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Under phosphorus-limited conditions, μ was described as a function of phosphorus cell quota just before the cell division (Q^P) and followed the Droop's equation.

$$\mu = \mu_{\max}^* (1 - q_0^P / Q^P)$$

1 はじめに

栄養塩制限下にある植物プランクトンの増殖は、外液中の栄養塩濃度に直接依存するのではなく、むしろプランクトン体内の栄養塩濃度 (cell quota) に依存することが知られている (Droop, 1966; Gotham & Rhee, 1981a,b)。したがって、赤潮発生過程を栄養塩類とのかかわりあいにおいてモデル化する場合、原因生物の cell quota と増殖速度の関係 (増殖の動力学) を定量的に明らかにする必要がある (Lehman ら, 1975)。つまり、栄養塩摂取の動力学から、与えられた時刻における cell quota を算出し、これに cell quota と増殖速度の関係を結合することで、与えられた栄養環境のもと、赤潮原因植物プランクトンがどのような速度で増殖し赤潮を形成してゆくのが数値的に予測されるようになる。

このような観点から本報においては、夏の瀬戸内海で大規模な赤潮を形成するラフィド藻 *Chattonella antiqua* の窒素あるいはリン制限下における増殖の動力学を半連続培養系を用いて解析した結果を報告する。

2 実験：材料と方法

2.1 材料と培養条件

C. antiqua の無菌クローン株 (H₀-1; 中村・渡辺, 1984 a) を材料として使用した。基礎培地には H 培地 (中村・渡辺, 1984 a) を使用した。窒素制限系の場合、培地中の硝酸塩濃度は 11 あるいは 22 μM 、リン制限系の場合、培地中のリン酸塩濃度は 1.5 あるいは 3 μM である。培養は 25°C, 0.04 $\text{ly} \cdot \text{min}^{-1}$ (昼光色蛍光灯), 12時間—12時間明暗サイクル (08:00点灯, 20:00消灯) にて行った。

2.2 半連続培養系—実験システムの概要

図1に今回用いた半連続培養系実験システムの概要を示す。この系では各三角フラスコに100 ml ずつ分配された *C. antiqua* の培養がフラスコごとに指定された希釈率 (D) に応じて毎朝09:00から09:30の間に100× D ml だけフラスコから抜き取られる。そしてこれと交換に新鮮な培地 (制限栄養塩 i の濃度, S_i) が100× D ml 添加される。以上の操作を毎日繰り返すことで、09:00に取り出される培養中の細胞濃度 (N) は D 及び S_i に応じてある値に収束してくる。細胞濃度がある値に収束した状況を本報では「定常状態」と呼ぶことにする。そして定常状態で得られる情報をもとに *C. antiqua* の増殖速度に及ぼす窒素、リンの効果を解析する。

定常状態に達したフラスコ内で一日のうちに生じる変化を図2に模式的に示す。*C. antiqua* は

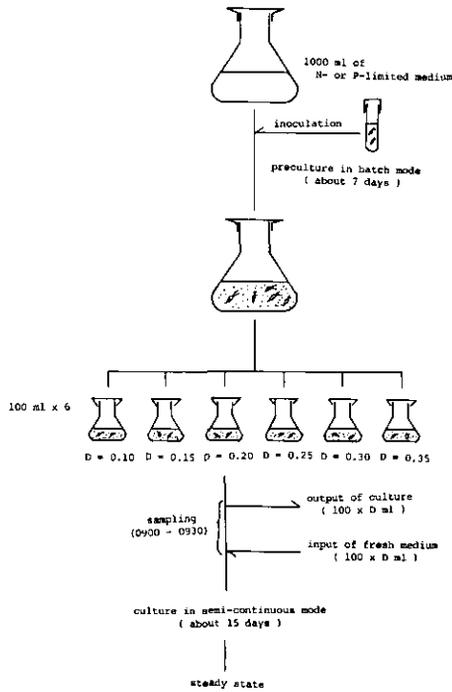


図 1 半連続培養系の概要

Fig. 1 Schematic diagram of semi-continuous culture system

上記明暗サイクルのもと、02:00から08:00の間に集中して細胞分裂を行うので(中村・渡辺, 1984c), この期間細胞濃度(N)は増加を続け、08:00には N_0 に達する。09:00までは分裂を行わないから細胞濃度は N_0 に保たれる。09:00に希釈が行われ、細胞濃度は $N_0(1-D)$ にまで減少する。この値は翌朝02:00まで一定に保たれる。そして08:00にかけて細胞分裂を行って前日の値 N_0 にまで回復する。一方、制限栄養塩 i の濃度(S_i)は09:00に新鮮な培地を添加するまでは $C. antiqua$ に吸収され尽くしてほぼゼロに近い。09:00に新鮮な培地(その中の i の濃度は S_i^0)の添加により S_i は $D \cdot S_i^0$ にまではね上がる。しかし i は比較的速やかに $C. antiqua$ に摂取されて夜半までには培地中から消え去ってしまう。そして翌朝09:00までゼロに近い値を保つ。 i の細胞内含量(cell quota, q^i)は09:00から i の摂取に伴い増加してゆく。 i が吸収され尽くした後、分裂開始時刻(02:00)まで q^i は一定に保たれるが02:00から08:00にかけて細胞分裂を行うことで q^i は減少し、08:00に前日の値まで戻る。

以上のような状況をふまえ、「平均化された」増殖速度(μ)と希釈率(D)の間に成り立つ関係を導く。細胞分裂は02:00から08:00の間に集中しているから増殖速度は一日のうちで変化する。そこで一日にわたって平均化された増殖速度(μ)を導入する。 μ と D の関係は09:00に培地の交換によって $N_0(1-D)$ にまで減少した細胞濃度が、速度 μ で指数的に増殖を行うことで

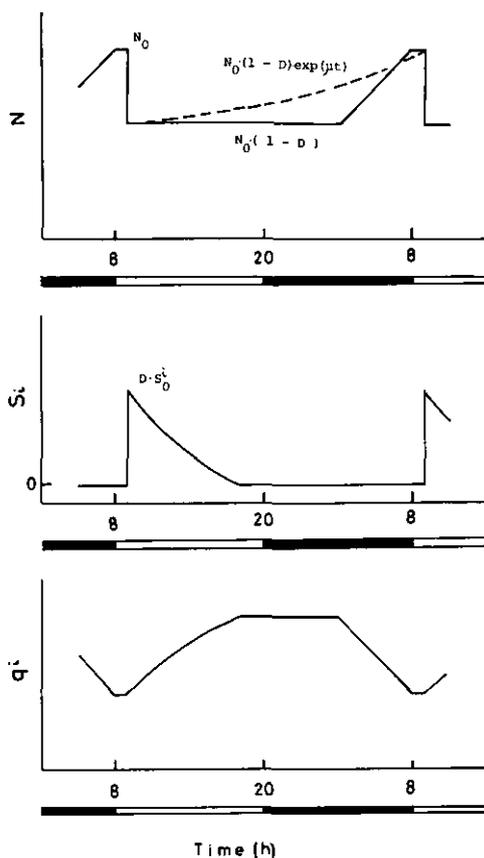


図 2 栄養塩制限定常状態における細胞濃度 (N), 栄養塩濃度 (S_i), 及び細胞内栄養塩含量 (q^i) の日周変化 (概念図)

Fig. 2 Diurnal changes of cell concentration (N), ambient nutrient concentration (S_i) under nutrient-limited steady state of semi-continuous culture system

翌朝09:00には N_0 にまで回復するという関係から導かれる (図2)。

$$N_0 (1-D) \cdot e^{\mu \cdot 1} = N_0 \text{から}$$

$$\mu = -\ln (1-D), \tag{1}$$

(1)式から明らかなように、ある固定した D のもとで定常状態をつくることにより、 $\mu = -\ln (1-D)$ の増殖速度をもつ *C. antiqua* を安定につくり出すことができる。

増殖速度 (μ) が、制限栄養塩 i の cell quota (q^i) の一価関数として表されることは多くの研究者によって指摘されてきた (例: Droop, 1966; Caperon & Mayer, 1972; Gotham & Rhee, 1981 a, b; 渡辺ら, 1982)。今回用いた実験系では q^i は一日のうちで変化をする (図2)。そこで、比較的

安定した値が得られ、しかも細胞分裂の割合（増殖速度）を支配すると思われる細胞分裂開始直前の q^i (特に Q^i で表す) を指標として *C. antiqua* の増殖を解析した。つまり、 $\mu = -\ln(1-D)$ を Q^i の関数として評価した。

2.3 半連続培養系—具体的実験法

毎朝09:00から09:30の間に培養容器(200ml 三角フラスコ, 100 ml の培養を含む)からのサンプル抜き取りと新鮮な培地の添加を行った(図1)。この操作は綿栓をつめ、オートクレーブ滅菌を施したメスピペットを用いて行った。培地交換前後の容器重量を測定することで培地交換が順調に進行していることを確認した。また、培地は蒸発を行うので、培地の添加とともに蒸発量に見合うだけの滅菌蒸留水を添加した。以上の操作によって希釈率 (D):

$$D = \underset{\text{def}}{\text{(一日の培地交換容積)}} / \text{(培地全容積)} \quad (2)$$

は一定に保たれた。

09:00に培養容器から抜き取られたサンプルは光学顕微鏡下計数を行い細胞濃度を測定した。毎日の細胞濃度の変動が±5%の相対誤差範囲に収まったとき、系は定常状態に達していると判断した。

系が定常状態に達した時点で、細胞分裂開始直前の制限栄養塩 i に対する cell quota (Q^i) を測定した。すなわち01:00に培養容器から約20 ml を抜き取り、約5 ml は細胞濃度 (N^*) 測定に使用した。残りはワットマン GF/C ろ紙にてろ過後、制限栄養塩 i ($i = \text{NO}_3^-$ 又は PO_4^{3-}) の分析に供した。 Q^i は次式により算出した。

$$Q^i = (S_0^i - S_1^i) / N^* \quad (3)$$

ここで S_0^i は添加培地中の制限栄養塩 i の濃度、 S_1^i は01:00における i の濃度である。

2.4 栄養塩の分析

硝酸塩濃度は Wood ら (1967) の方法、リン酸塩濃度は Murphy と Riley (1962) の方法に基づき、テクニコン社製オートアナライザーII型にて測定した。

3. 結果

図3に半連続培養系における細胞濃度の経日変化の一例を示す。半連続培養に切り換え後、7-10日で定常状態に達している。定常状態における細胞濃度、01:00での制限栄養塩濃度 (S_1^i) 及び cell quota (Q^i) を表1、表2に示す。希釈率 (D) が同一の場合、細胞濃度は添加培地中の制限栄養塩濃度 (S_0^i) にほぼ比例している。このことから今回用いた半連続培養系では実際に窒素(表1)、あるいはリン(表2)が *C. antiqua* の増殖を制限しており、その他の因子(例えば

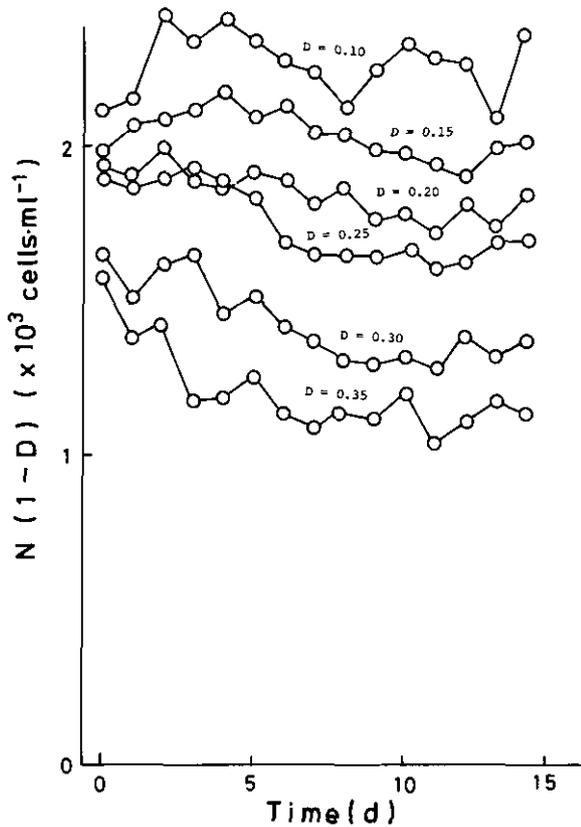


図 3 窒素制限状態における細胞濃度の経日変化

Fig. 3 Daily changes of cell concentration ($N(1-D)$) under nitrogen-limited conditions

N : cell concentration in the medium sampled at 09:00.

D : dilution ratio.

$N(1-D)$ is the cell concentration after dilution.

culture conditions: 25°C, 0.04 $ly \cdot min^{-1}$, 12:12 LD. Nitrate concentration of the input medium was 22 μM .

照度や炭酸塩)が増殖を制限していないことがわかる。

窒素制限系における増殖速度 (μ) と分裂直前の窒素の cell quota (Q^N) の関係を図 4 に示す。 μ は Q^N の関数としていわゆる Droop の式で表された。

$$\mu = \mu_N^* (1 - q_0^N / Q^N) \quad (4)$$

ここに q_0^N は窒素の minimum cell quota, μ_N^* は Q^N を無限大に補外した時の増殖速度である。 q_0^N は既にバッチ培養系における添加硝酸塩濃度—最終細胞濃度の関係から概算されているが(中村・渡辺, 1984 b), 本報ではこれとは独立に, 図 4 に示した実測値を直接(4)式に当てはめて算

表 1 窒素制限定常状態における細胞濃度, 硝酸塩濃度及び細胞内窒素含量

Table 1 Cell concentration, nitrate concentration and cell quota for nitrogen under nitrogen-limited steady state

D	μ (d^{-1})	$S_0^{NO_3}$ (μM)	$N_0(1-D)$ ($cells \cdot ml^{-1}$)	$S_{NO_3}^*$ (μM)	Q^N ($pmol \cdot cell^{-1}$)
0.10	0.105	12.0	1370	ND	8.76
0.10	0.105	20.7	2279	ND	9.08
0.15	0.163	12.0	1258	ND	9.54
0.15	0.163	20.7	1990	ND	10.40
0.20	0.223	12.0	1105	ND	10.86
0.20	0.223	20.7	1800	ND	11.50
0.25	0.288	12.0	995	ND	12.06
0.25	0.288	20.7	1580	ND	13.10
0.30	0.356	12.0	861	ND	13.94
0.30	0.356	20.7	1342	ND	15.42
0.35	0.431	12.0	700	0.48	16.46
0.35	0.431	20.7	1112	0.65	17.95

D : dilution ratio, $\mu = -\ln(1-D)$: growth rate, $S_0^{NO_3}$: nitrate concentration of the input medium, N_0 : output cell concentration at 09:00, $N_0(1-D)$: cell concentration after dilution process, $S_{NO_3}^*$: nitrate concentration at 01:00, Q^N : cell quota for nitrogen just before the cell division, ND: not detected.

表 2 リン制限定常状態における細胞濃度, リン酸塩濃度及び細胞内リン含量

Table 2 Cell concentration, phosphate concentration and cell quota for phosphorus under phosphorus-limited steady state

D	μ (d^{-1})	$S_0^{PO_4}$ (μM)	$N_0(1-D)$ ($cells \cdot ml^{-1}$)	$S_{PO_4}^*$ (μM)	Q^P ($pmol \cdot cell^{-1}$)
0.10	0.105	1.63	2403	ND	0.68
0.10	0.105	3.30	4757	ND	0.69
0.15	0.163	1.63	2177	ND	0.75
0.15	0.163	3.30	4458	ND	0.74
0.20	0.223	1.63	2112	ND	0.77
0.20	0.223	3.30	3767	ND	0.88
0.25	0.288	1.63	1970	ND	0.83
0.25	0.288	3.30	3428	ND	0.96
0.30	0.356	1.63	1706	ND	0.96
0.30	0.356	3.30	3092	ND	1.07
0.35	0.431	1.63	1416	ND	1.15

D : dilution ratio, $\mu = -\ln(1-D)$: growth rate, $S_0^{PO_4}$: phosphate concentration of the input medium, N_0 : output cell concentration at 09:00, $N_0(1-D)$: cell concentration after dilution process, $S_{PO_4}^*$: phosphate concentration at 01:00, Q^P : cell quota for phosphorus just before the cell division, ND: not detected.

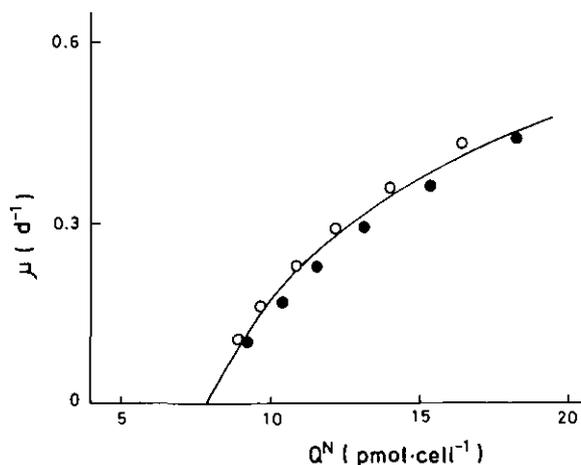


図 4 窒素制限下における増殖速度 (μ) の細胞分裂開始直前の細胞内窒素含量 (Q^N) 依存性

Fig. 4 Growth rate of *Chattonella antiqua* under nitrogen-limited conditions (μ) as a function of nitrogen cell quota just before cell division (Q^N)
 ○ : nitrate concentration in the input medium was 11 μ M,
 ● : nitrate concentration in the input medium was 22 μ M.
 Solid line was calculated from Equation 4 using the values given in Table 3.

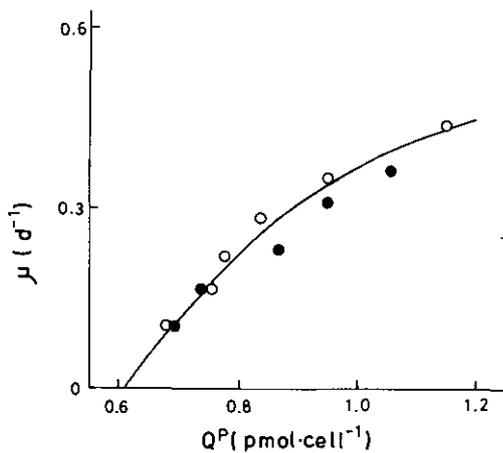


図 5 リン制限下における増殖速度 (μ) の細胞分裂開始直前の細胞内リン含量 (Q^P) 依存性

Fig. 5 Growth rate of *Chattonella antiqua* under phosphorus-limited conditions (μ) as a function of phosphorus cell quota just before cell division (Q^P)
 ○ : phosphate concentration in the input medium was 1.5 μ M,
 ● : phosphate concentration in the input medium was 3 μ M.
 Solid line was calculated from Equation 5 using the values given in Table 3.

出した。 μ_N^* は 0.78d^{-1} 、 q_N^0 は $7.8\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった(表3)。

リン制限系における増殖速度(μ)と分裂開始直前のリンの cell quota (Q^P) の関係を図5に示す。 μ と Q^P の間にも Droop の式

$$\mu = \mu_P^* (1 - q_P^0 / Q^P) \quad (5)$$

で表される関係が成立した。 μ_P^* は 0.93d^{-1} 、 q_P^0 は $0.62\text{pmol}\cdot\text{cell}^{-1}$ であった(表3)。

表 3 *Chattonella antiqua* の増殖パラメーター
Table 3 Growth parameters of *Chattonella antiqua*

nitrogen-limited	q_N^0 (pmol·cell ⁻¹)	7.8
	μ_N^* (d ⁻¹)	0.78
phosphorus-limited	q_P^0 (pmol·cell ⁻¹)	0.62
	μ_P^* (d ⁻¹)	0.93

q_N^0 : minimum cell quota for nitrogen, q_P^0 : minimum cell quota for phosphorus, μ_N^* : growth rate at infinite Q^N , μ_P^* : growth rate at infinite Q^P .
culture conditions: 25°C, 0.04 ly·min⁻¹, 12:12 LD.

4 考 察

植物プランクトンが栄養塩制限状態に置かれた場合、その増殖速度(μ)は制限栄養塩の cell quota の一価関数として Droop の式 ((4), (5)) で記述されることが多い(例: Droop, 1966; Caperon & Mayer, 1972; Gotham & Rhee, 1981 a, b)。 *C. antiqua* の場合も μ と細胞分裂開始直前の cell quota (Q^N 又は Q^P) の間に Droop の関係式が成立した(図4, 5)。なお、Droop の式は、あくまで経験的なものであって、その生物学的な意味は必ずしも明らかにされている訳ではないことを付記しておく。

今回求められた窒素、リンに対する minimum cell quota (q_N^0 , q_P^0 ; 表3)は、バッチ培養系で概算された値(中村・渡辺, 1984 b)の約2/3である。その差の原因は、おそらくバッチ系では培養の終期において栄養塩の制限がきびしくなるため、細胞の死亡が無視できなくなることに由来するのであろう。すなわち、バッチ系での最終細胞濃度は死亡率がゼロと考えたときに得られる値に比べて小さくなり、結局、中村・渡辺(1984 b)の(1)式から計算される minimum cell quota は実際の値よりも大きくなる。なお、連続培養系においても希釈率(D)を極めて小さく($D < 0.05$)し、系をバッチ培養系に近づけた場合、定常状態における cell quota は、Droop の式から予測される値よりも大きくなる可能性がある (swing back 現象) ことを指摘しておく(渡辺ら, 1982)。

著者らはこれまで *C. antiqua* による窒素、リン栄養塩摂取を解析してきた(中村・渡辺, 1984

d ; 中村, 1985 a, b)。栄養塩摂取のデータから、適当な初期条件と与えられた栄養環境のもとで、*C. antiqua* の細胞分裂直前の cell quota (Q) が計算できる。これに本研究で得られた増殖速度と Q の関係を組み合わせることで、与えられた栄養環境のもと、本種がどのような速度で増殖し、ひいては赤潮を形成してゆくかが明らかになるであろう。

ただし、これまでの栄養塩摂取実験は、栄養塩欠乏状態の細胞を用いて行われたものであることに注意しなければならない。栄養塩摂取速度は栄養塩濃度や光条件のほかに、細胞の生理的状态（特に増殖速度）によっても変化する例が知られており（例：Caperon & Mayer, 1972; Rhee, 1973; McCarthy & Goldman, 1979; Gotham & Rhee, 1981 a, b), この影響を *C. antiqua* についても評価してはじめて、本種と栄養環境の相互作用を適正な形でモデルに組み入れることが可能となり、ひいては *C. antiqua* 赤潮発生にかかわるそれぞれの栄養塩の役割を把握することが可能となろう。今回用いた半連続培養系は、さまざまな生理的状态（増殖速度）にある細胞を安定に供給できるため、栄養塩摂取に及ぼす細胞の生理的状态の効果を解析するのに適している。現在、*C. antiqua* の硝酸塩、アンモニウム塩、リン酸塩摂取速度と、増殖速度の関係を半連続培養系を用いて検討中である。

謝 辞

本研究を行うに当たり、実験の一部を手伝っていただいた東北大学農学部 須田彰一郎氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- Caperon, J. and J. Mayer (1972): Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton-II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, **19**, 619-632.
- Droop, M. R. (1966): Vitamin B₁₂ and marine ecology: the response of *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, **46**, 659-671.
- Gotham, I. J. and G-Y. Rhee (1981a): Comparative kinetic studies of phosphate-limited growth and phosphate uptake in phytoplankton in continuous culture. *J. Phycol.*, **17**, 257-265.
- Gotham, I. J. and G-Y. Rhee (1981b): Comparative kinetic studies of nitrate-limited growth and nitrate uptake in phytoplankton in continuous culture. *J. Phycol.*, **17**, 209-314.
- Lehman, J. T., D. B. Botokin and G. E. Likens (1975): The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, **20**, 343-364.
- McCarthy, J. J. and J. C. Goldman (1979): Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient-depleted waters. *Science*, **203**, 670-672.
- Murphy, J. and J.P.Riley (1962): A modified single-solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.*, **27**, 31-36.
- 中村泰男 (1985 a) : *Chattonella antiqua* によるアンモニウム塩摂取及び硝酸塩—アンモニウム塩摂取の相互作用. 国立公害研究所研究報告, 第80号, 57-66.

- 中村泰男(1975 b) : *Chattonella antiqua* と *Heterosigma akashiwo* のアルカリホスファターゼ活性. 国立公害研究所研究報告, 第80号, 67-72.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 a) : *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす温度, 塩分, 照度, pH の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 79-85.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 b) : *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす栄養塩の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 87-95.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 c) : *Chattonella antiqua* の日周鉛直移動一特にその生態的意味について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 97-102.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 d) : *Chattonella antiqua* の硝酸塩, リン酸塩摂取について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 103-109.
- Rhee, G-Y. (1973): A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedsmus* sp. J. Phycol., 18, 133-120.
- 渡辺 信・木幡邦男・中村泰男・渡辺正孝(1982) : 赤潮鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* のリン酸制限下連続培養 : その方法の確立と増殖の動力学的解析. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 113-130.
- Wood, E. P., F. A. Armstrong and F. A. Richards (1967): Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. J. mar. biol. Assoc. U. K., 47, 23-31.
- 中村泰男(1975 b) : *Chattonella antiqua* と *Heterosigma akashiwo* のアルカリホスファターゼ活性. 国立公害研究所研究報告, 第80号, 67-72.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 a) : *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす温度, 塩分, 照度, pH の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 79-85.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 b) : *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす栄養塩の効果. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 87-95.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 c) : *Chattonella antiqua* の日周鉛直移動一特にその生態的意味について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 97-102.
- 中村泰男・渡辺 信(1984 d) : *Chattonella antiqua* の硝酸塩, リン酸塩摂取について. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 103-109.
- Rhee, G-Y. (1973): A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedsmus* sp. J. Phycol., 18, 133-120.
- 渡辺 信・木幡邦男・中村泰男・渡辺正孝(1982) : 赤潮鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* のリン酸制限下連続培養 : その方法の確立と増殖の動力学的解析. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 113-130.
- Wood, E. P., F. A. Armstrong and F. A. Richards (1967): Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. J. mar. biol. Assoc. U. K., 47, 23-31.

II-8

内湾における熱塩循環流の実験的研究 An Experimental Study on the Thermohaline Circulations in the Bay

原島 省¹・渡辺正孝¹

Akira HARASHIMA¹ and Masataka WATANABE¹

要 旨

内湾における熱塩循環流と、それに関連した内湾・外洋間の海水交換の基本像を解析するために次のような実験を行った。温度条件を制御した実験水槽（内湾模擬部：長さ4 m、水深0.1m、幅0.5m；外洋模擬部：長さ1.5m、水深0.7m、幅1.5m）に塩水を満たし、一端から淡水を連続的に注入して弱混合河口流（エスチャリー）型の流動状況を形成した。この状態から外洋模擬部の水温を緩やかに上昇させ、塩分偏差による密度差が水温偏差による密度差に相殺されてゆくようにした。この結果以下のようなことが確認された。i) 塩分成層流時の密度フルード数は流量率（flow rate）に依存せず0.22程度である。ii) 塩分偏差、水温偏差の相殺による安定成層度の減少が起こると、湾奥部から上層厚さが大きくなる。この変化は密度フルード数を保存するように起こる。iii) 上層厚さの増大時には連続注入水は湾奥部に停滞し、外洋模擬部に流出する割合は小さくなる。iv) さらに水温差による密度差が塩分偏差による密度差をりょうがするようになると注入淡水は塩水よりも下層を流れるようになる（これを overturning と呼ぶ）。また ii) の時点では顕著な二重拡散界面が、iv) の時点ではソルトフィンガー界面がみられる。また、比較のため初期に淡水を満たし、より高温の淡水を連続注入し外洋模擬部の水温を上げてゆく実験を行った。この場合、iii) の特性や overturning は共通するが、塩分成層流の場合ほど急激な overturning は起こらず、overturning 前後の境界面の特性にも差異はみられない。

Abstract

An experimental study was carried out for the investigation of the 0-th order image of the thermohaline circulations and associated water exchange between the bay and the outer ocean. The experimental channel consists of the inner bay section (length : 4m, depth : 0.1m, width : 0.5m) and the outer ocean section (length and width : 1.5m, depth : 0.7m). They are thermally controlled at the bottom boundary. The fresh water was discharged at the end of the channel that was initially filled with the saline water. The

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

outer ocean section was then slowly heated up so that the salinity deviation was being gradually cancelled out by the temperature deviation in terms of the water density. Measurements of the temperature and the salinity profile reveal the facts as follows. i) The densimetric Froude number $F_d (\equiv q/h_u) / \sqrt{g(\beta\Delta S/\rho) h_u}$ is about 0.22, where q , h_u , $\beta\Delta S$ are the flowrates, the upper layer thickness, and the density deviation due to the initial salinity deviation. ii) The reduction of the density deviation due to the compensation of the temperature and the salinity causes the thickening of upper layer, which seems to conserve the Froude number. iii) In this stage the discharged water is tend to stagnate in the inner bay section to feed the thickening upper layer. iv) Further increase of the temperature of the outer ocean section causes the overturning, since then the fresher water flows underneath the warmer, saltier water. Remarkable 'diffusive interface' and 'salt finger interface' are observed at the stage of ii) and iv), respectively.

1 はじめに

内湾と外洋の間の海水交換に関しては、潮汐流と並んで重力対流（密度流，浮力駆動流）が重要な役割を果たすことがいくつかの観測例から示唆されている。この種の流れに関しては、観測データの不足もあり、十分な定式化は行われていないが、主に沿岸あるいは内湾を対象としたモデルから想定される鉛直循環のパターンは図1のように模式的に描かれる。すなわち、夏期には、海面に対する加熱及び河川水流入がともに外洋に対して内湾側の浮力を高める方向に働く（以後熱および塩分の流出入を浮力の流出入という意味で thermal buoyancy flux 及び saline buoyancy flux と呼ぶ）。この結果形成される渦度 $\omega_y (\equiv \partial w/\partial x - \partial u/\partial z)$ は負となり、循環流は上層で外洋に向かい、下層でそれぞれを補償する方向になる（図1-1）。これに対し、冬期には逆に thermal buoyancy flux は外洋に対して内湾の浮力を弱める。もし saline buoyancy flux が無視できる場合には上層で外洋から内湾に流入し、下層で流出する型の循環流が形成される（図1-2）。このモードの流動に関しては、前報文（原島・渡辺，1984 a, b）において水槽実験とそれに対応する数値実験を行った。また saline buoyancy flux が有意な場合には図1-3中の湾奥部に負の ω_y をもつ鉛直循環流が形成され、外洋起源の $\omega_y > 0$ の鉛直循環流と共存すると考えられている。

以上のメカニズムは次に示すような点で、微細藻類の生態にかかわっている。まず熱塩循環流が湾内外の海水交換を規定するため、湾内の栄養塩量等の分布を左右し、藻類の増殖に大きな影響を与える。また、熱塩循環流の結果でもあり、駆動力でもあるところの水温、塩分の分布が至適水温、至適塩分という形で藻類の増殖を左右する。さらに、Pingreeら(1973)が指摘するように、有光層深度と躍層深度（混合層深度）の相対的位置関係も一次生産に重要な役割を果たす。このような熱塩循環流現象の重要性にもかかわらず、室内実験からのアプローチの比重はこれまで小さかったといえよう。特に、夏期から冬期への熱塩循環流の遷移のメカニズムに関してはい

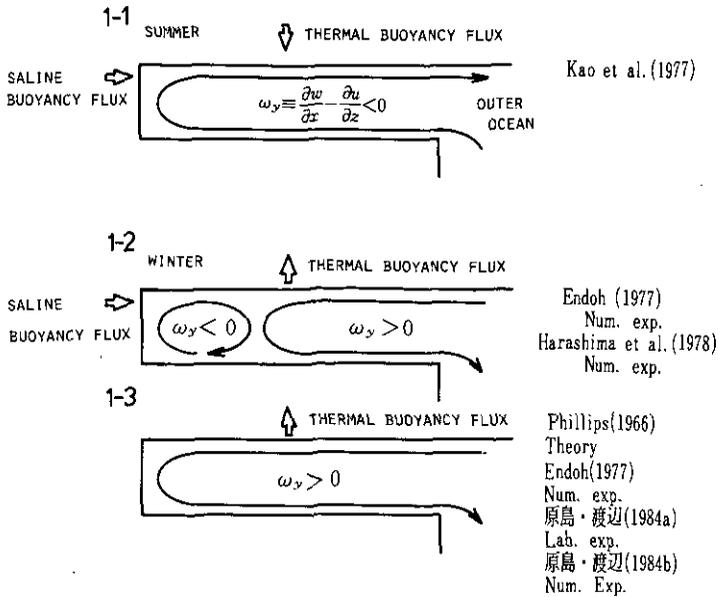


図 1 内湾における熱塩循環流の基本像 (非回転系モデルより想定される流動パターン)

Fig. 1 Schematic diagram of the 0-th order image of the thermohaline circulation in the bay

まだ不明の点が多い。図1に示された、単純化されたモデルから想定されるのは次のような過程である。すなわち夏期の安定成層期から秋口の表面冷却が始まると、上方の低塩分層がまず冷却され、塩分は安定成層要因であるが水温は不安定成層要因となる。また、このときに単位面積の水柱当たりの熱容量は、浅水域のほうが深水域に比較して小さいから、(地形性貯熱効果, Oonishi, 1975)内湾側のほうが早く冷却され、水平的にも水温のこう配が形成される。本研究では、上記の過程を、外洋模擬部の塩水を緩やかに加熱してゆくことに置き換え、結果として起こる熱塩循環流系の遷移を実験的に解析した。

2 実験系

実験系の概念図を図2-1に示す。系は、比較的浅い水路からなる内湾模擬部(長さ400cm, 幅50cm)とそれに接続した外洋模擬部(長さ, 幅ともに150cm)とからなる。後者は前者より60cm深い。実験の初期には水槽全体に1%の塩水を満たし、左端から同温度の淡水を連続的に流入させる。外洋模擬部の右端に、水平幅50cmの水平な辺をもつ overflow sink を設置し、水位が常に一定に保たれるようにする。なお、本研究においては、内湾模擬部において水深 H が10cmとなるように設定した。初期の水温は、塩水, 流入淡水ともに室内温度との差が 2°C 以内であり、こ

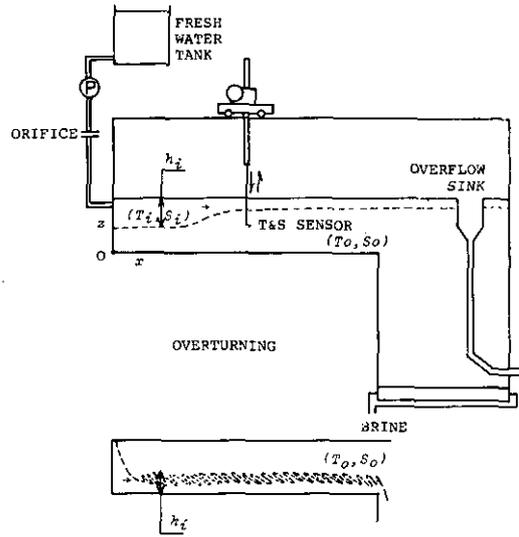


図 2-1 実験系の模式図

Fig. 2-1 Schematic diagram of the experimental system

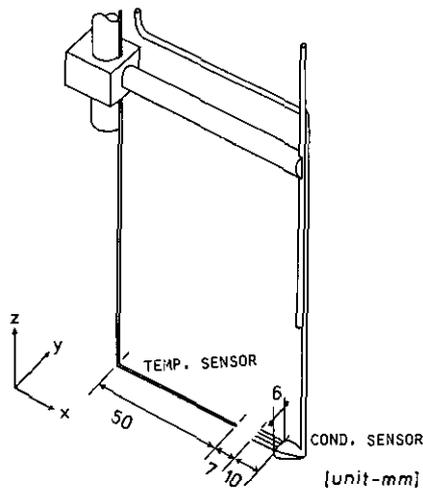


図 2-2 水温・塩分センサーの形状

Fig. 2-2 Arrangement of the temperature and salinity sensors

の水温は室内温度・湿度から計算される平衡温度に近い，したがって実験継続時間程度のタイムスケールでは，自由表面を通じての熱フラックスは無視できる。なお座標の原点を内湾最奥部水底の手前ガラス面とし， x ， y ， z 各座標軸をそれぞれ右向き，紙面向こう向き，鉛直上向きにとる。

水槽上部のレール上に設置した鉛直トラバース装置のロッド上に、水温センサー（測温抵抗体、Pt100Ω）及び電気伝導度センサー（四極誘導型）を取り付け、3か所（ $x=75, 200, 325\text{cm}$ ）の水路中央部で鉛直方向に移動させる。鉛直トラバース速度は $0.1\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ であり、電気伝導度、水温センサーの時定数が約 0.3s 、 1s であることを考慮すると鉛直方向の現象把握の分解能はほぼ 0.1cm 程度であると推測できる。なお両センサーの配置は図2-2に示すとおりである。水温、塩分の微細構造の把握のためには両者は近接していることが好ましいが、両センサーへの相互干渉を懸念し、 7mm の間隔をおいた。したがって水平方向の現象の分解能は 2cm 程度である。なお、両センサーからの信号は、それぞれ抵抗温度変換器、塩分計アンプを介し、ADコンバータ、マイクロコンピュータを通じて磁気テープに収録した。収録データはホストコンピュータHITAC M-180で処理し、電気伝導度の温度補正、密度の計算等の処理を行った。

また、水平流速の鉛直プロファイルは、メチレンブルーの粒を投入し、5秒間ごとに撮影したスライドフィルム上の染料軌跡の移動から求めた。

淡水の補給量 Q (cm^3s^{-1}) は 8ϕ オリフィスにおける差圧から求めた。 Q を内湾模擬部の水路幅で割った量を、鉛直積分流量あるいは flow rate q (cm^2s^{-1}) とする。予備的な実験として、形成される上層（淡水層）の厚さ h_u (cm) が q にどのように依存するかを調べるため、 q を三段階に変え、塩分の鉛直分布から h_u を求め、図3にプロットした。ちなみに、後に図4に示すように塩分分布が比較的明瞭な境界面を有するのに対し、水平流速は鉛直方向にほぼ連続であり、鉛直シアは局所的な集中をみせない。このことから、シア安定が起こるに至らないことは予想される。

図3によれば、 q に対して h_u は単調増大である。密度フルード数を F_d ($\equiv (q/h_u)/\sqrt{g(\Delta\rho/\rho)h_u}$) で定義すると、上記のプロット点は、等 F_d 線に平行に、ほぼ $F_d=0.22$ の直線上

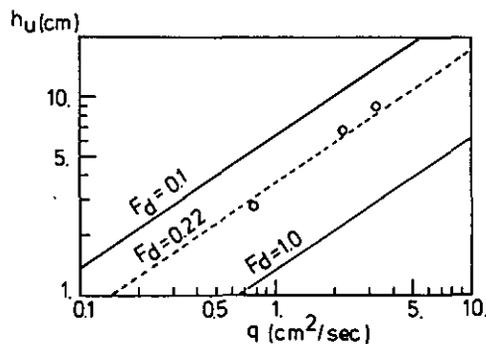


図 3 単位水路幅当たりの淡水負荷量 q と上層厚さ h_u の関係
斜線は密度フルード数 F_d の等値線を表す。

Fig. 3 Upper layer thickness h_u vs flow rate q
Sloping lines show the isopleths of densimetric Froude number F_d .

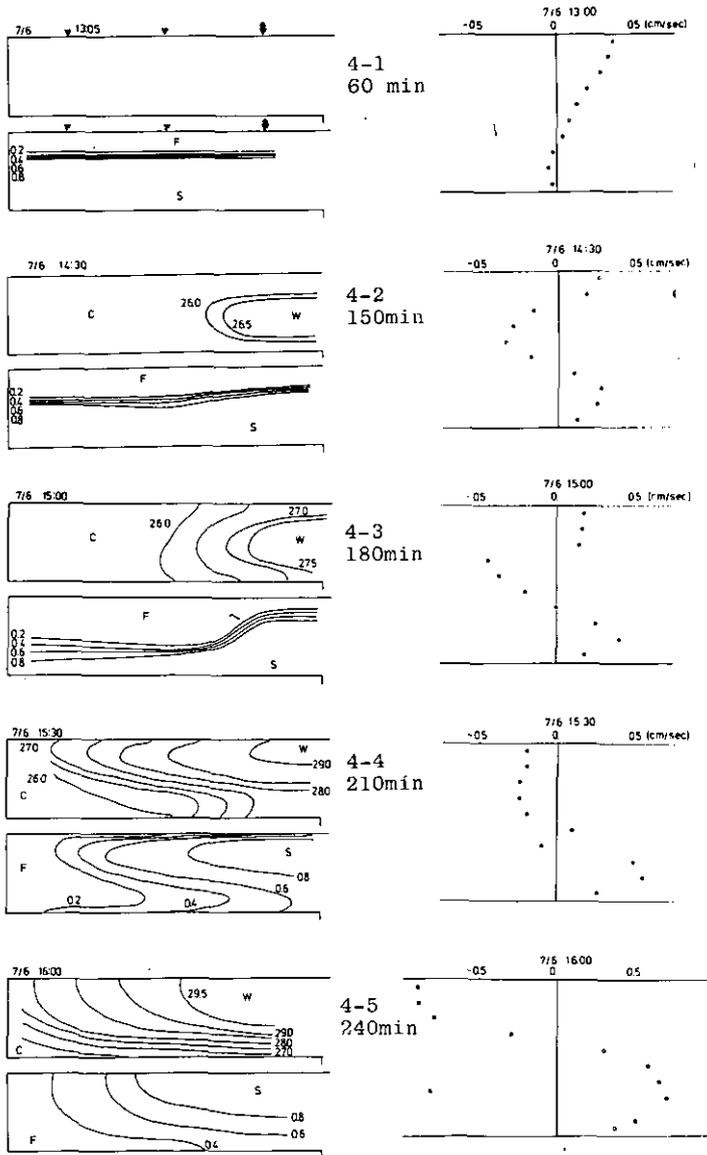


図 4 Run 1 の各時刻における水温 T (左上), 塩分 S (左下) の断面分布及び水平流速 (右) の鉛直分布

▼は T , S センサーの鉛直トラバース位置, ●は流動可視化位置。図中記号 H , C , S , F はそれぞれ相対的に高温, 低温, 高塩分, 低塩分であることを示す。

Fig. 4 Transition of the distribution patterns of temperature (upper left, salinity (lower left) and velocity profile (right) in Run1

▼ and ● show the locations of monitoring T & S and flow visualization, respectively.

に分布することが示される。

3 実験結果

最初に述べるケースは、初期濃度 1‰ の塩水に、同温度の淡水を流量 $Q=2.3 \text{ l}\cdot\text{m}^{-1}$ すなわち $q=0.767\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ で連続注入したものである。注入開始直後 ($t=0 \text{ min}$) では Simpson (1982) の総説等でよく知られている、travelling head を伴う重力対流が形成される。overflow sink における表層からの排出の結果、準定常状態の成層シア一流が形成される。この状態 ($t=60\text{min}$) の T , S の分布と $x=325$ における u の鉛直分布を図 4-1 に示す。 u は上層で外洋模擬部に向かうが、その鉛直シアーは塩分躍層付近に集中せず、むしろ上・下層で連続的である。また、下層で弱い左向きの流れが見られるが、これは下層から上層への連行加入 (entrainment) を補償するものであると考えられる。

この状態から、外洋模擬部の底板の温度を上げてゆき、外洋模擬部の塩水が底板からの熱伝導により徐々に暖められてゆくようにする。外洋模擬部の高温化により、内湾模擬部の塩水層内に、上部で左向き、下部で右向きの流れが形成される。($t=150\text{min}$, 図 4-2 参照)。この流れは、塩水層内に形成された水平密度こう配による渦度 ω_y の発生によるものである。さらに注目すべきことは、 $t=180\text{min}$ の時点 (図 4-3) で、淡水層の厚さ h_f が、内湾模擬部奥端から厚くなっていくことである。 $x=325$ における淡水層内の右向き体積輸送量は u の鉛直プロファイルから判別するように、 $t=60\text{min}$ のときに比べて小さい。したがって、この時点では、連続注入している淡水は、内湾模擬部に貯留され、淡水層をかん養しており、そのすべてが連続的に外洋に流出しているのではない。この時点での、染料の可視化写真 (図 5-3) は以下のような現象を明らかにしている。すなわち、塩水層下半では比較的層流的な鉛直シアーがみられるのに対し、淡水層 (淡青色の部分) と塩水層の境界面付近では染料跡が顕著な乱れを示す。また $t=60\text{min}$ の時点 (図 5-1) と異なり、淡塩水層間に集中した顕著なシアーがみられる。そして、淡水層内部では、前述の乱れによる鉛直混合が作用していることは明らかであるが、 T , S , u とも鉛直方向にほぼ均一である。本段落で述べた現象は、後に説明する、水温のみが浮力を決定する場合のケースにはみられず、明らかに熱と塩分の分子拡散係数 κ_T , κ_S の相異によって起こる二重拡散効果に起因するにちがいない。すなわち、比較的小さい κ_S のため、塩分成層は維持されているが、 κ_S より 100 倍ほど大きい κ_T のため、熱は下の塩水層から上の淡水層へ速やかに移動してしまう。(浮力に関しては、この拡散形態は negative diffusivity を示すといえる。) したがって、淡水層においては、下方からの熱輸送により鉛直対流が励起され、この乱流混合によって、 T , S , u ともに鉛直方向に均一になりやすいと考えられる。淡・塩水層の境界部に諸量のこう配が集中することは、このことの反映でもある。鉛直一次元の系における研究 (Turner, 1973; Huppert & Turner, 1980 の総説) では、上方で低温・低塩分、下方で高温・高塩分の境界面を二重拡散界面 (diffusive interface) と呼んでいる。この場合には、 u のシアーが加わっているが同様に diffusive interface という呼

称を用いることにする。

さらに外洋模擬部の水温を上昇させてゆくと、ついには注入淡水の密度のほうが塩水よりも重くなり、下層を流れるようになる。以下、この遷移のことを *overturning* と呼ぶ。*overturning* が完了した時点 (図 5-4) における境界面の形状は、*diffusive interface* と全く異なり、塩水と淡水が鉛直方向に互いに入り組み、稿状の模様を示す。鉛直一次元の系における研究では、上方が相対的に高温高塩分である場合を *salt finger interface* と呼ぶ。本実験においては、 u のシアが存在しているため、*finger* が斜めに変形を受けているが、同様の呼称を当てることにする。*salt finger interface* においては、*diffusive interface* に比べて *finger* が鉛直方向に熱、塩分、運動量を積極的に輸送する。このため図 4-4 に示される上層と下層の境界面は比較的ぼやけている。また、図 5-4 の可視化における染料跡は明りょうに乱れており染料の *dissipation* も速い。ただし、この“乱れ”には、*salt finger* に基づいた組織性・因果性が備わっていることに注意を要する。

また、図 4-4、図 6-1、2 において、*overturning* が起こる際の特徴として、次のようなことが示される。すなわち、上方に *diffusive interface* の残渣が残っているうちに下方に *salt finger interface* が形成されることである。すなわち、低温、低塩分の水塊と高温、高塩分の水塊が、一度は必ず等しい密度をもつはずであるのに、両者が水平的に安定して並列することはなく、*diffusive interface* あるいは *salt finger interface* をもつ重力対流により、相互の貫入を起こしやすい。

以上の、熱塩循環流の時間的変遷において注入淡水層の厚さ h_i の変化については、次のような整理が現象の概要を把握しやすくするであろう。注入淡水の温度、塩分を T_i, S_i 、外洋側に近い $x=325$ の測点における塩水の温度、塩分を T_0, S_0 とすれば、これらの値から多項式 (Friedrich & Levitus, 1972 による) により密度差 $|\Delta\rho| \equiv |\rho(T_0, S_0) - \rho(T_i, S_i)|$ ($\equiv |\alpha\Delta T - \beta\Delta S|$) が定義される。この $h_i, \Delta\rho$ を両対数軸上にプロットしたのが図 8 である。ここで、 $h_i, \Delta\rho$ から求められる密度フルード数 F_d ($\equiv q/\sqrt{g\Delta\rho/\rho h_i^3}$) により等 F_d 線をひくと $(\Delta\rho, h_i)$ のデータ点は、あたかも F_d を保存するような軌跡を描くことが示される。なお、 $\Delta\rho$ の減少から *overturning* を経て、再び *salt finger* を伴った下層について F_d が定義できるようになったときには (図 8 中●で示す)、 h_i がより大きくなっていることがわかる。これは、*diffusive interface* に比べ、*salt finger interface* がより *dissipative* であるため、貫入層を厚くし、密度フルード数を小さくするためである。

次に、浮力の決定要因が水温のみの場合 (Run 2) の結果について述べる。初期に系全体を淡水で満たし、3°C 低温の淡水 (塩分差 1% と、ほぼ同等の密度差を与える) を連続注入する。この設定で系が準定常状態に達した時点の T の断面図及び u の鉛直プロファイルを図 7-1 に示す。この場合には図 4-1 の塩分成層流に比べ、境界面はより不明りょうである。また、 u の鉛直プロファイルからは、下層における左向きの逆流が、塩分成層流の場合よりも強いことがわかる。このことは、特にリチャードソン数 Ri の低いレンジにおいて、同一の Ri に対して成層が塩分差か

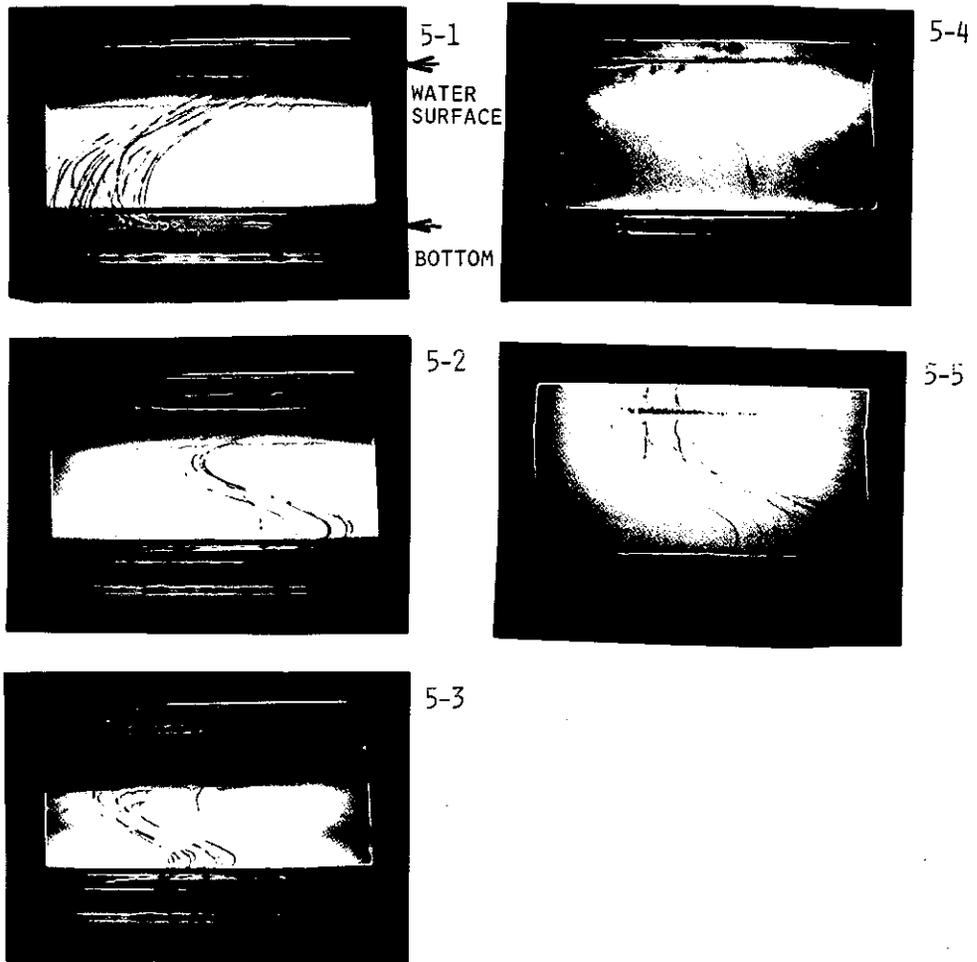


図 5 $x=325\text{cm}$ 付近における，染料跡による流動状態の可視化
 注入淡水は淡青色に着色されている。図5-1，……，5-5はほぼ図4-1，……，4-5
 の時点に対応する。図5-3では二重拡散界面が，図5-5ではソルトフィンガー界面
 が形成されている。

Fig. 5 Visualization of the flow and the stratification by means of casting dye
 particles
 The discharged fresh water is colored by light blue.

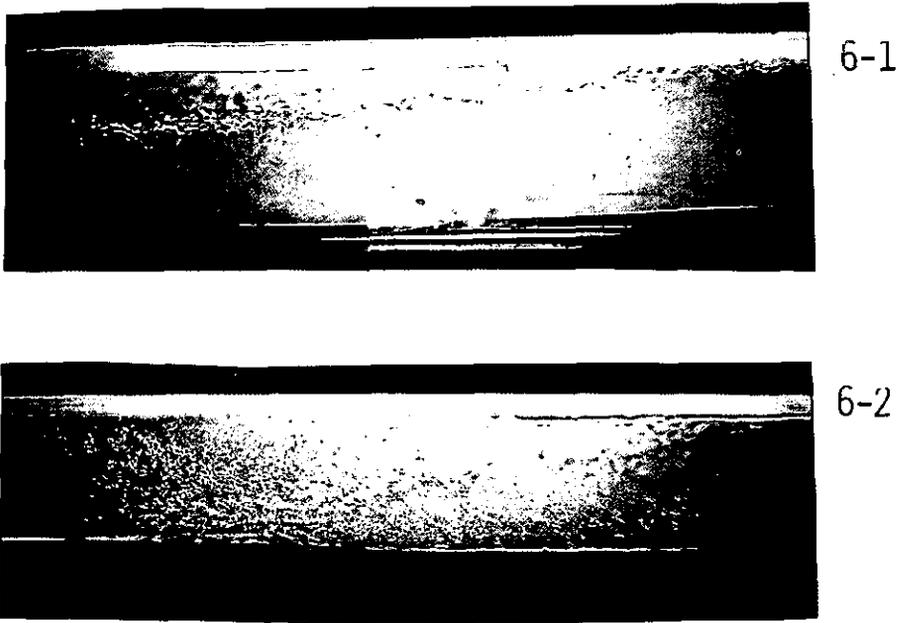


図 6 overturning 直前 (図6-1) と直後 (図6-2) のシャドウグラフ
図6-1では二重拡散界面上の碎波が目立つ。図6-2では上方に二重拡散界面の残渣
が残っているうちに、下方にソルトフィンガー界面を伴う重力対流が形成される

Fig. 6 Shadowgraph of the stratification pattern just before and after the
overturning

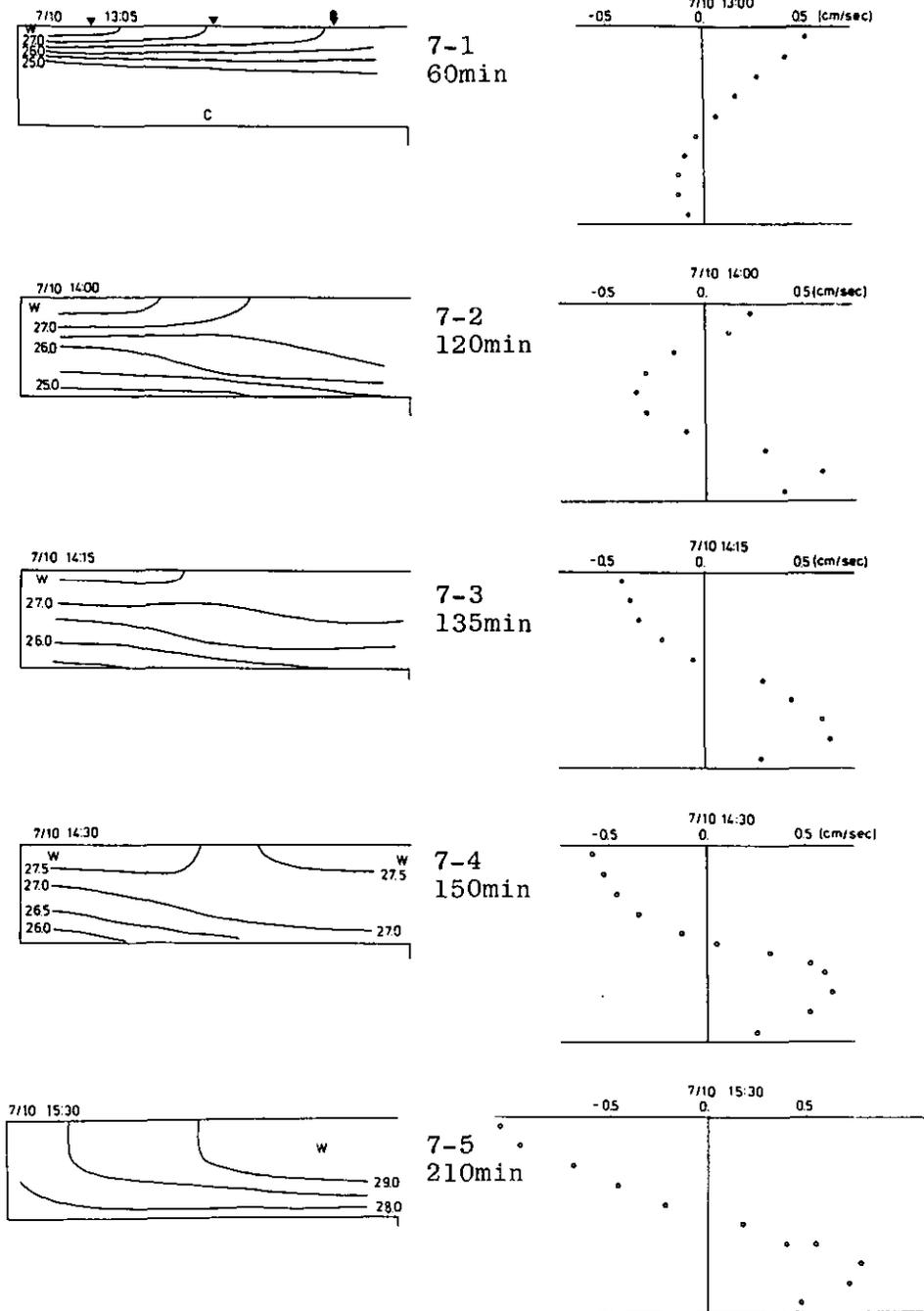


図 7 Run 2 の結果
表記法は図 4 と同様。

Fig. 7 Results of Run 2 expressed in the same way as in Fig. 4

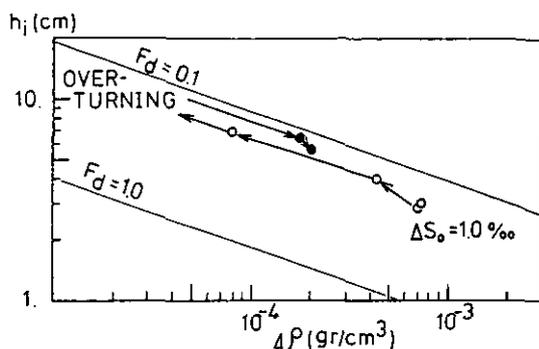


図 8 Run 1 における注入水層の厚さ h_i と密度差 $\Delta\rho$ の軌跡
 斜線は密度フルード数の等値線を表し、○、●はそれぞれ overturning 前、後を示す。

Fig. 8 Trajectory of $(\Delta\rho, h_i)$ in Run 1
 ○ and ● show the time before and after the overturning, respectively.

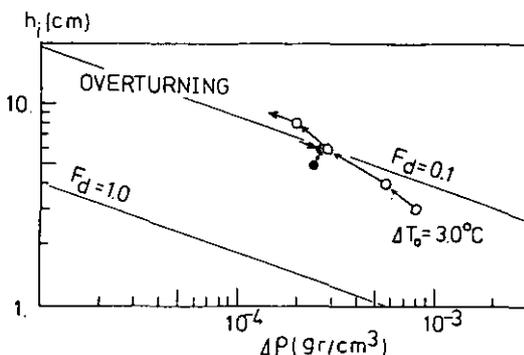


図 9 Run 2 における h_i と $\Delta\rho$ の軌跡
 表記法は図 8 と同様

Fig. 9 Trajectory of $(\Delta\rho, h_i)$ in Run 2

ら成る場合と温度差から成る場合では連行加入量が異なり、後者のほうが大きい (Turner, 1973) ことによると考えられる。

この状態から出発し、同様に外洋模擬部の水温を上げてゆくと、(図 7-2 参照) 下層上部に外洋から内湾への流入が、下層下部に外洋への流出がみられ、 u に関しては三層構造が形成される。そして、上層の厚さも次第に厚くなってゆく。これらの特性は塩分成層流の場合と同様であり $(\Delta\rho, h_i)$ の軌跡も、同じ性格を保っている (図 9 参照)。しかしながら、同時期に対応する塩分成層流においては diffusive interface が不連続面を形成していたのに対し、本ケースでは上層と下層で諸量はほぼ連続的に変化している。そして、overturning が起きるときの様相は、図 4-3

と異なる。すなわち、連続注入によって表層を流れていた上層流が次第に退き(図7-2→7-3)外洋模擬部に起源をもつ鉛直循環流が、右半部から表層を流れるようになり、中央部に相対的に低温な停滞域を形成する。したがって、この時点では、外洋側と内湾側に、独立した水塊が並列しているといえる。ただし、連続注入した流量に対応した部分は、外洋側の鉛直循環流の下部の右向きの流れに加わり、外洋模擬部に流出してゆくことを付記する。

さらに時間が経過すると、外洋模擬部に起源をもつ鉛直循環流が全域をおおい、連続注入水は相対的に重くなって底層を流れつつ外洋模擬部に向かう。当然のことながら、overturningの前後における上下層境界面には、diffusive interface, salt finger interface でみられたような質的な相異は観測されない。

4 結論と考察

以上の実験から結論づけられることは次のようにまとめられる。内湾を模擬した水路中に、より大きな浮力をもった水を連続注入して成層流を形成した場合、外洋模擬部の相対的な高温化により成層度が弱くなると、注入起源水の層厚 h_i は次第に大きくなる。この間注入水は初期の成層流状態と異なり、すべてが外洋側に流出してはゆかず、一部は内湾側に滞留して h_i を大きくするのに寄与する。そして、この変化は、 $(\Delta\rho, h_i)$ の軌跡が密度フルード数 F_d を保存するような形で行われる。

また、この特性は、初期の成層要因が塩分であれ、水温であれ、成層境界面の逸散(dissipation)の特性の差異を除いて本質的に変わらない。

実際の内湾における平均的な季節変動(宇野木・岸野, 1976, 図10参照)においても、夏期から冬期に移行して成層が弱まるにつれて、湾奥の上層厚さが増し、湾中央部で水平方向の諸量のこう配が際立つような傾向がみられる。この過程には、当然、海面冷却に起因する局所的な躍層の深化が働いていることは考えられる。この過程に関しては、いくつかの鉛直次元モデルが考案され(Niiler & Kraus, 1977の総説)外洋や湖沼、貯水池などの水温予測には成功している。しかしながら、内湾のように、河川流入による横からの浮力負荷が大きい海域においては、本報で述べたような過程が重要であることが考えられ、今後現実の海域データによる、両過程のオーダーエスティメイトが必要である。

また、図1に模式的に示した各モデルとの対応については次のようである。本実験系においても図1-1から図1-3と同等のパターンの転換が起こることが確かめられた。ただし浮力の決定が水温のみの場合(Run 2)においては図1-2のような、湾奥側の水塊の停滞を経由するのに対し、熱塩系の場合(Run 1)には図1-1から図1-3の転換が急激に起こり、図1-2のような状態が安定して存続できないことが確認された。図1-2中に記した各モデルは、熱と塩分の乱流拡散係数に同じ値を用いているため、本質的には単一浮力系であり、Run 1よりもRun 2との整合性がよいのは当然とも考えられる。また、図1-2には表現されていないが、Run 2においては湾

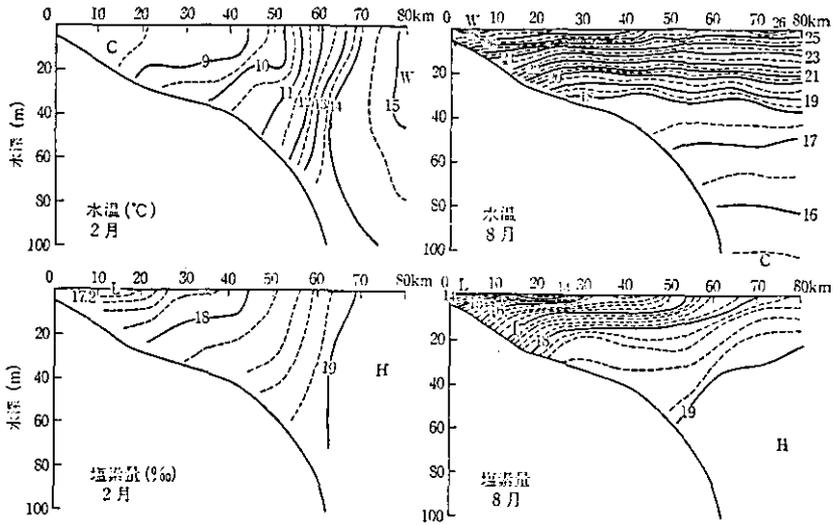


図 10 2月と8月の東京湾における水温と塩素量の縦断面分布
1947-72年の平均, 宇野木・岸野 (1976) による。

Fig. 10 Distribution patterns of temperature and chlorinity in February (left) and August (right) in Tokyo Bay averaged over 1947~1972. (From Unoki & Kishino, 1976)

奥側の鉛直循環流は完全には閉じておらず、外洋起源の鉛直循環流の下層部に加わって外洋模倣部に流出する部分があることも確認された。

Run 1において、overturningの前後にそれぞれ diffusive interface と salt finger interface が形成されたことは二重拡散効果によるものであるし、図 1-2 のような状態が安定に存在できない理由も、二重拡散効果によるものであることは推測される。ただしそのメカニズムの詳細と、現実の海洋における役割の軽重は今後明らかにしてゆく必要がある。日本のような中緯度地域の内湾においては、低温・低塩分の水が高温・高塩分の層の下を流れることは観測されていない。また海洋の拡散現象は乱流拡散が主であるから塩分と熱の分子拡散の差異など問題にならないという考えも存在する。一方で、近年、熱塩海洋前線において、局所的な相互貫入が水塊間の海水交換の問題としてクローズアップされ (例えば Joyce *et al.*, 1978) 塩分と砂糖の分子拡散係数の差異を用いた実験も行われはじめている (Ruddick & Turner, 1979; Maxworthy, 1983; 吉田・長島, 1984; 馬ら, 1984)。我々が熱塩系で得た知見は、前線近傍においては相互貫入がしばしば起こりやすいという Joyce らの観測結果と結びつく可能性は大きく、今後の海域における物質交換過程の明確化に寄与することを望むものである。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、助言をしていただいた国立公言研究所竹下俊二博士、実験及びデータ

処理の補助をしていただいた日本情報サービスの伊藤唯司, 松山正弘両氏に感謝いたします。

引用文献

- Endoh, M. (1977) : Formation of the thermohaline front by cooling of the sea surface and inflow of the fresh water. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **33**, 6-15.
- Friedrich, H. and S. Levitus (1972) : An approximation to the equation of state for sea water, suitable for numerical ocean models. *J. Phys. Oceanogr.*, **2**, 514-517.
- Harashima, A., Y. Oonishi and H. Kunishi (1978) : Formation of water masses and fronts due to density-induced current system. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **34**, 57-66.
- 原島 省・渡辺正孝 (1984 a) : 内湾における重力対流の実験的研究. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 135-165.
- 原島 省・渡辺正孝 (1984 b) : 実験系における重力対流の数値モデル. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 167-183.
- Huppert, H.E. and J.S. Turner (1981) : Double-diffusive convection. *J. Fluid Mech.*, **106**, 299-329.
- Joyce, T.M., W.E. Zenk and J. Toole (1978) : The anatomy of the Antarctic Polar Front in the Drake Passage. *J. Geophys. Res.*, **83**, 6093-6113.
- Kao, T.W., C. Park and H.P. Pao (1977) : Buoyant surface discharge and small-scale oceanic fronts ; a numerical study. *J. Geophys. Res.*, **82**, 1747-1752.
- 馬文駒・吉田次郎・長島秀樹 (1984) : Lock exchange 型流れにおける二重拡散の影響(2), 1984年度日本海洋学会秋季大会講演要旨集, 7-8
- Maxworthy, T. (1983) : The dynamics of double diffusive gravity currents. *J. Fluid Mech.*, **128**, 259-282.
- Niiler, P.P. and E.B. Kraus (1977) : One-dimensional models of the upper ocean, Modelling and prediction of the upper layers of the ocean. Proceedings of NATO Advanced Study Institute.
- Oonishi, Y. (1975) : Development of the current induced by the topographic heat accumulation (I) — the case of she axisymmetric basin — . *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **31**, 17-28.
- Pingree, R.D., P.M. Holligan, G.T. Mardell and R.N. Head (1976) : The influence of physical stability on spring, summer and autumn phytoplankton blooms in the Celtic Sea. *J. Mar. Res.*, **56**, 845-873.
- Ruddick, B. and J.S. Turner (1979) : The vertical length scale of double-diffusive intrusions. *Deep-Sea Res.*, **26**, 903-913.
- Simpson, J.E. (1982) : Gravity currents in the laboratory, atmosphere and ocean. *Ann. Rev. Fluid Mech.*, **14**, 213-234.
- Turner, J.S. (1973) : Buoyancy Effects in Fluids. Cambridge Univ. Press.
- Turner, J.S. (1974) : Double-diffusive phenomena. *Ann. Rev. Fluid Mech.*, **6**, 37-56.
- 宇野木早苗・岸野元彰 (1976) : 東京湾海洋構造調査報告書, 第二港湾建設局, 1-45.
- 吉田次郎・長島秀樹 (1984) : Lock exchange 型流れに対する二重拡散の影響, 1984年度日本海洋学会春季大会講演要旨集, 82-83

II-9

鞭毛藻による生物対流の数値実験的研究

A Numerical Experiment on the Bioconvection in the Culture of a Flagellate

原島 省¹・渡辺正孝¹・藤代一成²

Akira HARASHIMA¹, Masataka WATANABE¹ and Issei FUJISHIRO²

要 旨

鞭毛藻培養の際形成される生物対流に関して数値実験を行った。支配方程式系は、時間依存の渦度方程式と、微生物の個体数密度の輸送方程式、及び個体数密度に依存する状態方程式からなる。

個体数密度が均一な、静止した流体と仮定した初期条件から出発し、時間積分を行うと、微生物の上方遊泳により、表層に相対的に比重の大きな層が形成される。この状態が臨界状態を越えたとき、対流セルが形成され、その下降流の部分にフィンガー状のパッチが形成される。このパッチは培養液中の鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の形成するフィンガーと定性的により類似を示す。

また、流動状態に関しては、表層の比重の大きな層が形成された直後の、Rayleigh-Taylor instability に類似した時期と、現象がさらに進行して Bénard 対流に類似した時期が存在することが数値実験から予測される。また、相対的に微生物の鉛直拡散効果が小さい場合には、現象の非常定性が顕著になり、上方集積期と、下降フィンガー期が間欠的に現れる。

Abstract

Several cases of numerical experiments are performed on the problem of bioconvection in the culture of flagellates. The governing equations are time dependent transport equations for the vorticity and the microorganisms' population density and an equation of the fluid density dependent on the population density.

Starting from the uniformly populated, still water condition, a densely populated upper layer is formed owing to the upward swimming of the microorganisms. When

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和53年度 国立公害研究所共同研究員 (筑波大学電子情報工学系 〒305 茨城県新治郡桜村)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies, Institute of Information Science and Electronics, Tsukuba University, Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki 305, Japan.

this state exceeds the critical condition, convection cells are formed in which the 'falling fingers' locate at the places of downwelling. This pattern of the fingers is qualitatively alike to the one that appears in the cultures of a flagellate *Heterosigma akashiwo*.

Furthermore the flow system shows a two distinct stage. After the formation of densely populated upper layer, convection due to Rayleigh-Taylor instability is excited. Then the flow pattern changes its characteristics to form convection cells similar to the stationary Bénard convection. In a cases based on the small diffusivity of the microorganisms the phenomena retain time dependency and 'gathering up phase' and 'falling finger phase' can be distinguished. In this case, the flow system is characterised by the intermittent Rayleigh-Taylor instability that arises after the gathering up phase.

1 はじめに

水生微生物のなかには、それ自体の比重は周囲の液体より大きいものの、走光性あるいは反走重力性により上方に遊泳しているものが多い。このような微生物の培養液中の水表面に、微生物を濃密に含む部分が筋状に垂れ下がることがしばしば報告されている (Robins, 1952; Loeffler & Mefferd, 1952; Wille & Ehret, 1968; Winet & Jahn, 1972; Plesset & Winet, 1974; Harada, 1976)。

Platt (1961)はこれらの現象を、流体表面が冷却されたときに起こる Bénard 型対流とのアナロジーにより“生物対流 (bioconvection)”と名付けた。

この現象は次のような点で重要な意味をもつ。まず第一に、生物の群集が周囲の流体と相互作用を及ぼしあう数少ないケースのうちの一つであることである。しばしば例にあげられるサバクトビバッタの移動においては、大気の流れと飛行運動の線型結合が分布パターンを決定するが(大久保, 1975)、生物の飛行行動が、分布パターンにとって有意な大気運動を引き起こすことは報告されていない。また、魚の遊泳行動は周囲の水との間に相互作用を引き起こすが、魚は1個の剛体として、水は魚と分離した液体としてそれぞれの運動方程式に従うと考えるのが自然であろう。

これに対し、生物対流においては、もし Platt (1961) の仮定が正しいとするならば、個々の微生物のレイノルズ数が小さく、周囲の水に緊密に懸濁しているため、また個体数密度が大きいいため、あたかも微生物の個体数密度が塩分などの溶質のように、流体の浮力決定要因となる。また、微生物の個体数密度が、他の非生物学的なトレーサーと異なって力学的に活性をもつ点はもう一つのユニークな点である。

この現象のモデル化における最初のアプローチは Plesset & Winet (1974) 及び Plesset & Whipple (1974) によって行われたように、微生物の表層集積を上が重い二層流体の Rayleigh-Taylor 不安定問題とみなすことである。渡辺・原島(1982) は、鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の培養液中におけるパターン形成に関してこの方法を用い、理論的に最も速く発達すると予測され

る不安定波の波長が、培養液中におけるフィンガー状の筋の間隔とほぼ一致することを確認した。

第二のアプローチは、Childressら(1975)によって行われた。彼らは、微生物の個体数密度の輸送方程式の移流項に、微生物の上方遊泳項を加え、運動方程式と連立させた。そして解析的手法により、生物対流が起こる臨界パラメーターを求めた。

以上二系統の解析的研究は、現象の基礎的な理解において成功を収めているが、現象が線型領域、すなわち微少かく乱の範囲にある場合の議論に中心をおいている。したがって現実の生物対流とモデルの整合性を議論するためには、非線型の方程式を数値的に時間積分し、予測される分布パターンと培養液中のフィンガーのパターンとの比較を行う必要がある。本論文においては現象を鉛直二次元断面(x - z 平面)内において数値モデル化し、シミュレーションを行った。したがって紙面に直角方向の現象の変化は無視されている。一般的な Rayleigh-Bénard 対流現象においては、三次元効果が臨界パラメーター値を変化させることが報告されており、理想的には三次元モデルが必要なことはいうまでもない。しかしながら、現時点において、ばく大な CPU 時間を要する三次元モデルを駆動するよりも、二次元のモデルにおいてフィンガーの構造及び流動場の基本像を把握することが重要であると考えられる。

2 問題の定式化と数値スキーム

図1に本数値モデルの概念図を示す。深さ H 、幅 L の容器の表面左端に直角座標系 (x, z) の原点 O を置く。 L には H に比べ、1 オーダー以上大きな値を与える。これは、モデル領域に、ある特定の水平波数のモードを課することなく、アスペクト比が1程度の対流セルが複数個、内部的な波数選択のプロセスで形成されることを念頭においたものである。個々の微生物の遊泳運動は時間平均成分とランダムな変動成分からなる。本モデルでは、前者が上方に向かって W_p [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$] の速度で、後者はそれぞれ水平、鉛直方向に κ_H, κ_V の拡散係数で評価されるものと考えられる。また微生物のどの個体も V_p [cm^3] の体積及び ρ_p [$\text{gr} \cdot \text{cm}^{-3}$] の密度をもつとすると、単位体積当たり、 n_p の微生物を含む流体要素の密度 ρ は $\rho = \rho_p V_p n_p + \rho_o (1 - V_p n_p) = (1 + \alpha n_p) \rho_o$ で表

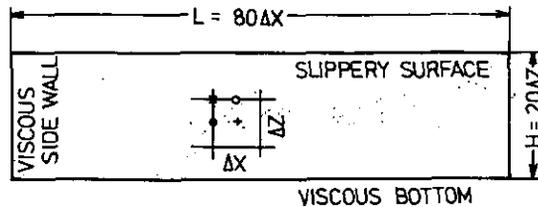


図 1 数値計算領域の模式図及び差分変数の定義点
+, O, ●, × はそれぞれ n_p, w, u, ψ と ζ の定義点を示す。

Fig. 1 A schematic diagram of the computing domain and the points for the definition of the variables
+: n_p , O: w , ●: u , ×: ψ and ζ .

現される。ただし ρ_0 は微生物を含まない培養液の密度である。

ここで

- i) Boussinesq 近似
- ii) 流れの非圧縮性
- iii) 現象は y 方向に均一
- iv) 表面張力の無視
- v) rigid lid

を仮定すれば、流体の運動の Navier-Stokes 方程式と微生物の移動の方程式は次のように記述される。

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -\frac{1}{\rho_0} \frac{\partial p}{\partial x} - u \frac{\partial u}{\partial x} - w \frac{\partial u}{\partial z} + \nu_H \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \nu_V \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \quad (2-1)$$

$$\frac{\partial w}{\partial t} = -\frac{1}{\rho_0} \frac{\partial p}{\partial z} - u \frac{\partial w}{\partial x} - w \frac{\partial w}{\partial z} + \nu_H \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + \nu_V \frac{\partial^2 w}{\partial z^2} - \frac{\rho}{\rho_0} g \quad (2-2)$$

$$\frac{\partial n_p}{\partial t} = -u \frac{\partial n_p}{\partial x} - (w + W_p) \frac{\partial n_p}{\partial z} + \kappa_H \frac{\partial^2 n_p}{\partial x^2} + \kappa_V \frac{\partial^2 n_p}{\partial z^2} \quad (2-3)$$

ここで圧力は重力下では

$$p = -\int \rho g dz \quad (2-4)$$

である。一方連続の条件は

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial w}{\partial z} = 0 \quad (2-5)$$

である。密度は上で説明したように次式で表現する。

$$\rho = \rho_0 (1 + \alpha \cdot n_p) \quad (2-6)$$

ただし (u, w) , (ν_H, ν_V) はそれぞれ (x, z) 方向の流速及び粘性係数である。

ii) の仮定より、運動量の方程式 (2-1), (2-2) は渦度 $\xi (\equiv \partial w / \partial x - \partial u / \partial z)$ の輸送方程式と流線関数 $\psi (-\partial \psi / \partial x = w, \partial \psi / \partial z = u)$ に関するポアソン方程式に置き換えられ、

$$\frac{\partial \xi}{\partial t} = J(\psi, \xi) + \nu_H \frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2} + \nu_V \frac{\partial^2 \xi}{\partial z^2} + \frac{1}{\rho_0} \frac{\partial \rho}{\partial x} \quad (2-7)$$

$$\Delta \psi = -\xi \quad (2-8)$$

となる。ただし J はヤコビアン演算子である。

境界条件は以下のとおりである。

i) 液体の表面 ($z=0$) において

$$\psi = 0$$

$$\xi = 0 \quad (2-9)$$

$$n_p W_p + \kappa_v \frac{\partial n_p}{\partial z} = 0$$

ii) 底面 ($z=-H$) において

$$\psi = 0 \quad (2-10)$$

iii) 側壁 ($x=0, H$) において

$$\psi = 0$$

$$\xi = -\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} \quad (2-11)$$

$$\frac{\partial n_p}{\partial x} = 0$$

初期条件は、全域にわたって流体は静止し ($(u, w) = (0, 0)$), 細胞数密度は均一 ($n_p \equiv n_{p0}$) とした。ただし、不安定問題において一般的なことであるが、初期の微小攪乱を与える必要がある。この目的のため、渦度の初期値に正規乱数による白色雑音を与えた。

差分変数の定義点は図1中に示した。すなわち流速成分 u, w はそれぞれ差分面積要素の左辺、上辺で定義し (staggered scheme) ψ, ξ は左上端で、 n_p は中央で定義する。 n_p の移流項は空間的中央差分による。また (2-7) 中の $J(\psi, \xi)$ は Arakawa スキームによって表現した。このスキームは、運動エネルギー、渦度、エンストロフィを保存する。また (2-3), (2-7) の二階微分の項は通常三点差分によった。

(2-7) の時間積分により ξ が求まると、(2-8) のポアソン方程式の解として ψ が得られる。この過程では SOR 法を用いた。 ψ から求められる (u, w) は (2-3) の時間積分に供せられる。時間積分スキームに関しての詳細は原島・渡辺 (1984) に述べた。

3 数値実験の結果

本章においては、パラメーターを変化させた複数ケースの数値実験 (表1参照) と、培養系における鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の集積パターンを比較し、この現象にかかわる物理的なブ

ロセスを議論する。表1に示したパラメーター値のうち、 α は渡辺(1982)による細胞比重の測定値からの算出値であり、 n_{p0} は培養液かくはん直後の細胞数計測値に基づいた概算値である。また、 ν_H 、 ν_V には、常温における水の分子粘性値を採用した。 W_p 、 κ_H 、 κ_V については測定が困難であるが以下のような考えに基づいて決定した。矢持ら(1982)は現場海域において *Heterosigma akashiwo* の分布極大層が約 1 mh^{-1} ($\approx 0.03 \text{ cms}^{-1}$) の速度で上昇することを報告している。また、実験室内の十分な光の照射のもとでは 0.1 cms^{-1} に達することもあり(渡辺・原島, 1982), Run 1, Run 2 でこれらの値に近い2とおりの値を与えた。 κ_H 、 κ_V の値は、Run 1, Run 2においてプラントル数 Pr が1になるように、Run 3においては10になるような値を採用し、現象の感度を調べる。

表 1 パラメーター値
Table 1 Parameter values

	Run1	Run2	Run3	UNIT
H	2	2	2	[cm]
L	16	16	16	[cm]
α	0.5×10^{-9}	0.5×10^{-9}	0.5×10^{-9}	[cells $^{-1}$ m l]
n_{p0}	10^6	10^6	10^6	[cells m l^{-1}]
W_p	0.01	0.1	0.01	[cm s $^{-1}$]
$\nu_H = \nu_V$	0.01	0.01	0.01	[cm 2 s $^{-1}$]
$\kappa_H = \kappa_V$	0.01	0.01	0.001	[cm 2 s $^{-1}$]
Raf	7.84×10^4	7.84×10^5	7.84×10^6	
Pr	1	1	10	

この現象が対流現場であるからには、 Pr ともう一つのパラメーター、すなわち何らかの浮力条件から導出されたレイリー数が現象の特性を記述するはずである。通常対流問題では、上下境界において浮力値が規定されているのに対し、上記の定式化においては、微生物の上方遊泳による下向きの浮力輸送量 $F_b (= \alpha g n_{p0} W_p)$ が規定されている。そこでフラックス型のレイリー数 Raf ($\equiv g n_{p0} W_p H^4 / \kappa_V^2 \nu_V$) が定義されるであろう。 Raf の値も各Runについて表1に示す。

図2はRun1における n_p と ψ の分布の時間変化を示す。初期に均一に分布していた n_p は、その上方遊泳により表層に不安定密度成層を形成する。そして $t=120 \sim 180$ sにかけて対流セルがみられるようになる。このとき、対流の下降部、上昇部では、それぞれ n_p の等値線の下方、上方への変形が起り、下降部の n_p 分布はフィンガー状の形をなすといつてよいであろう。また、ここで全領域にわたって平均された運動エネルギーの平方根として流速のスケール値 W が定義される。図3は W の時間変化を示す。 $t=0$ sにおける W の値は、初期に正規乱数として与えた白色雑音の強度を示している。 W は粘性効果のために $t=30$ s付近まで減少し、それからは上方遊泳によるポテンシャルエネルギーから運動エネルギーへのエネルギーの移行のために増大をはじめる。 $t=$

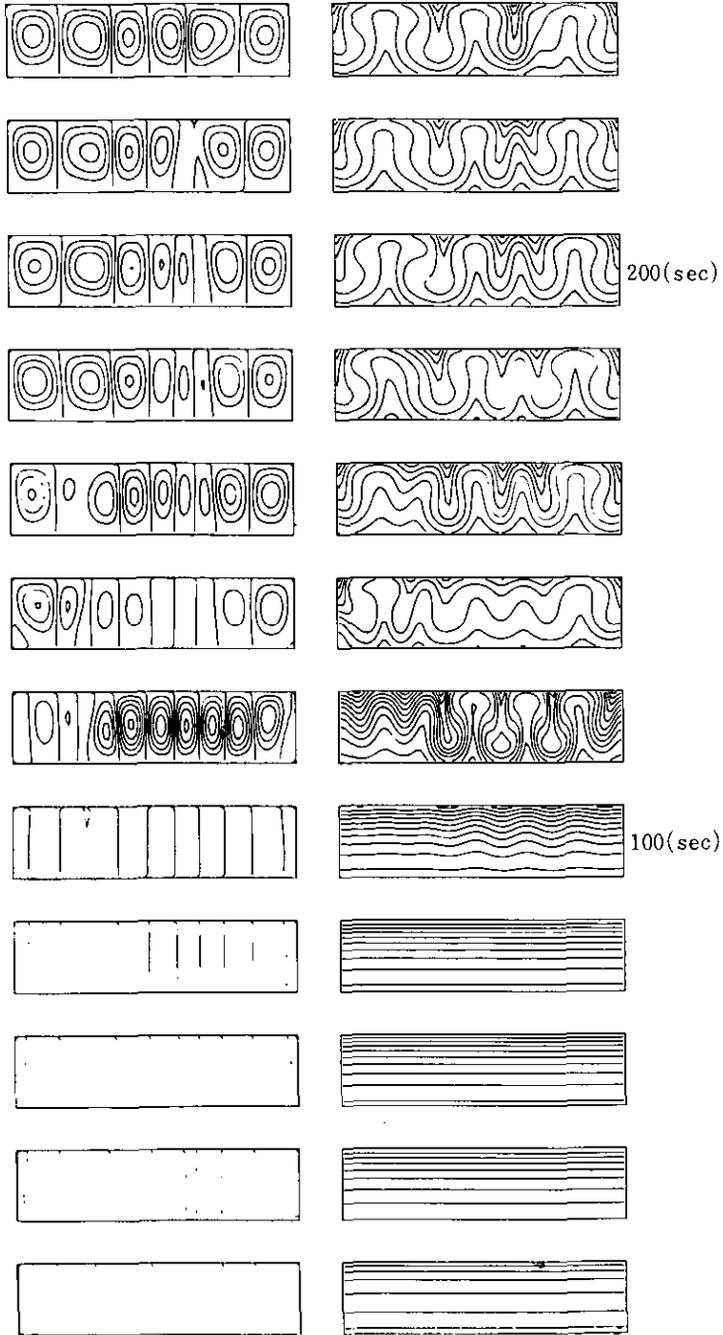


図 2 Run 1 における, 流線函数 ψ と微生物細胞数密度 n_p の時間変化
等値線の間隔はそれぞれ $0.02 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ 及び $2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

Fig. 2 Transition of the distribution of ψ and n_p in Run 1
Contour intervals are $0.02 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $2 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$, respectively.

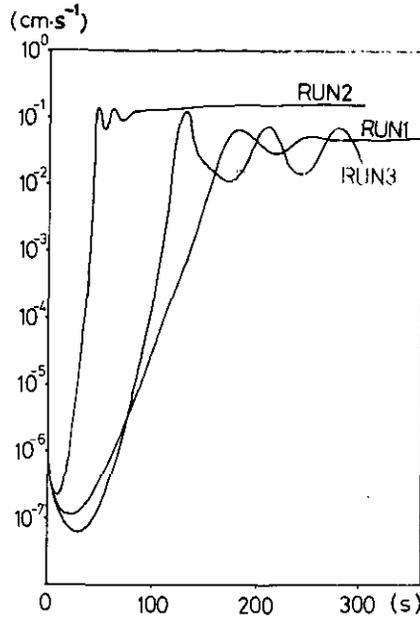


図 3 $W = \sqrt{(u^2 + w^2)}/2$ の時間変化

Fig. 3 Transition of $W = \sqrt{(u^2 + w^2)}/2$

60~150s においては W の増大は指数関数的である。線型理論による解析解は微少かく乱の指数関数的な増大を仮定しており、図3の結果は、このステージにおける解析的な取り扱いを支持するものであるというよう。 $t=180s$ において W は最大値を示し、それからは減衰振動を行いながら定常値に達する。ここで W が最大値を示すときと定常値を示す時では ψ と n_p の分布が顕著な差異をもつことが注目される。前者においては $L=16cm$ の水平距離に約6個のフィンガーが形成される。したがって、対流セルのアスペクト比を $\sigma (\equiv \lambda/H)$ で定義すると、 $\sigma=1.33$ 程度になる。ただし、 λ は対流セルの水平波長あるいはフィンガー間の平均的な距離である。これに対し、定常状態に達すると、隣接するセルの間で統合がおこり、セル数は3~4、 σ は2.3~2.6程度になる。

この特性は W_p を Run 1 のその10倍に変えた Run 2 においてより顕著になる。 W の時間変化と ψ 、 n_p の時間変化をそれぞれ図3、図4に示す。このケースでは、水面近傍の微生物を濃密に含む層（以後高密度層と呼ぶ）は Run 1 よりも短い時間で形成される。この時間スケールはほぼ H/W_p であることは容易に推測されることである。高密度層の厚さ h は Run 1 よりも小さく、この層における n_p は Run 1 よりも大きい。微生物の上方遊泳と下向きの拡散とが平衡に達しているとすれば、 h は κ_V/W_p なる特性量で表現されるはずであるから、Run 2 において、微生物が表層のより薄い層に、より濃密に集積することが説明がつく。

$t=60s$ において W は最大に達し、比較的小きな波長 ($\lambda=1.78cm$) とアスペクト比 ($\sigma=0.89$)

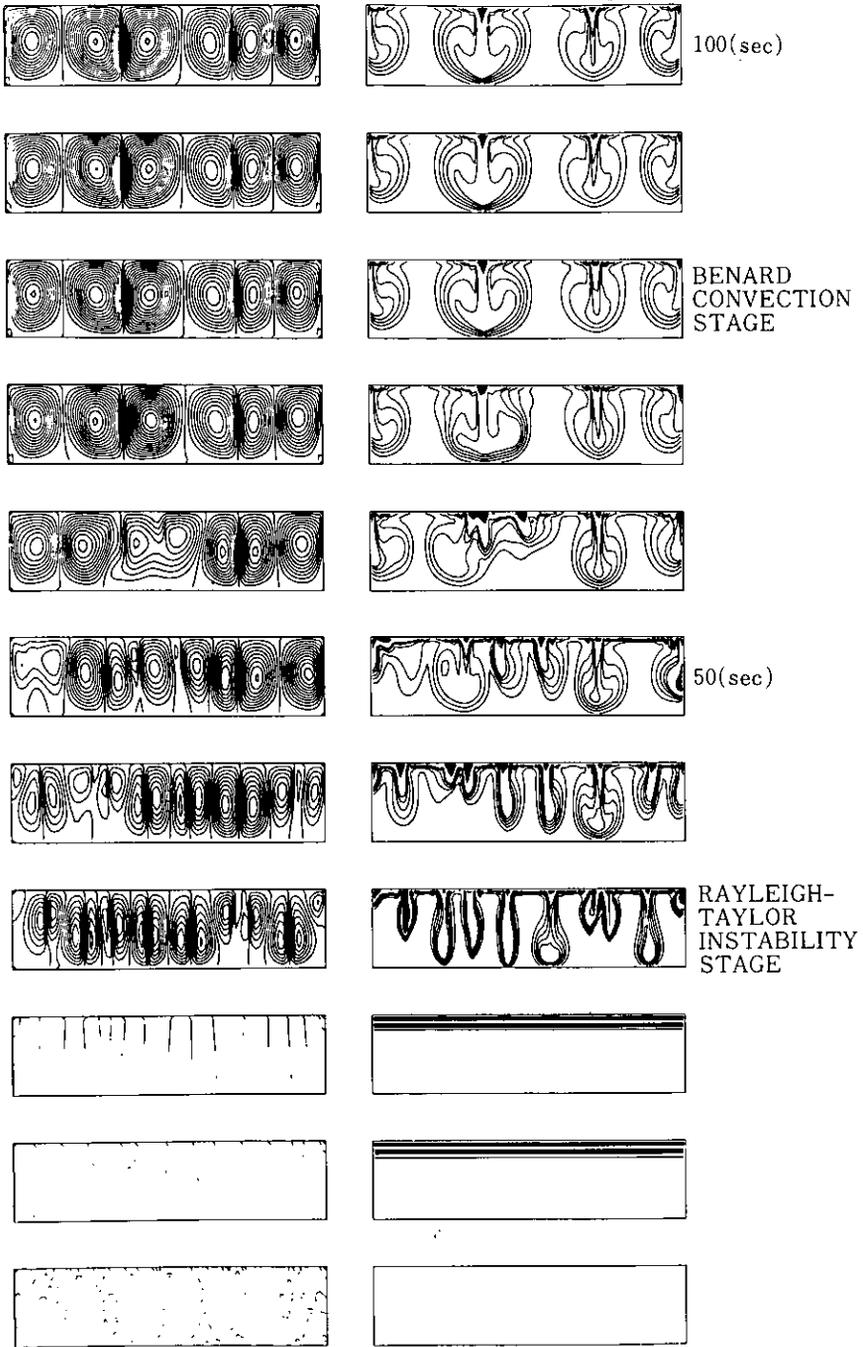


図 4 Run 2 における ψ と n_p の時間変化
 等値線の間隔はそれぞれ $0.02\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 及び $2 \times 10^4 \text{cells} \cdot \text{m}^{-1}$ 。ただし等値線の混雑を避けるため、 $10^5 \text{cells} \cdot \text{m}^{-1}$ 以上は $10^6 \text{cells} \cdot \text{m}^{-1}$ 間隔とする。

Fig. 4 Transition of the distribution of ψ and n_p in Run 2

をもつ対流セルとフィンガーが形成される。そして、この時点においては、フィンガー一部において、対流セルの下降流速は微生物の上方遊泳速度よりはるかに大きいため、フィンガー全体が下降している。したがってこの時点でのフィンガーは相対的に密度の大きな流体が下方に降下してゆく、すなわち Rayleigh-Taylor 不安定現象と類似していることがわかる。さらに、形成された高密度層の厚さが小さい Run 2 において、より大きな波数（より小さな波長）が形成されることは、Chandrasekhar (1961) や Plesset ら (1974) の Rayleigh-Taylor 不安定に関する解析的議論とよく合致する。

この時点からさらに時間が経過すると、Run 1 と同様にセルが統合され、フィンガーの個数も減ってゆく。最終的には λ と σ はそれぞれ 5.2, 2.6 程度になる。これらの値は Run 1 における値と異ならない。すなわち、定常状態におけるフィンガーの間隔は微生物による浮力輸送量には依存せず、対流セルのアスペクト比の規定条件を通じて容器の水深 H に束縛されるのみであることが推測される。

ちなみに、Chandrasekhar (1961) の記述による Bénard 対流の線型理論は、上方、下方がそれぞれ自由、摩擦境界の場合に対流セルのアスペクト比が約 2.3 であることを示している。この値は Run 1, Run 2 の定常状態における σ の値と小さな差異を除いて一致している。この差異は、一部は左右の境界の存在に由来すると考えられるが、また一部は、最適規模の対流セルでなくても初期のセルからの履歴により生き残ることに由来しているとも考えられる。Bénard 対流における波数選択の物理実験（例えば Chen & Whitehead, 1968）においても、選択される波数にやや幅のあることが報告されている。そしてこの傾向は比較的レイノルズ数の低い帯域で顕著であり、本数値実験の場合に該当する。以上のような結果及び考察から、現象を初期の W が最大値を示す時点と定常期の二つに分けてそれぞれ Rayleigh-Taylor instability stage（以後簡単のために RTIS と記す）と Bénard convection stage（同様に BCS）と呼ぶことができよう。両者の定性的な差異は、前者においてはフィンガーの波数選択が表層の高密度層の属性のみによって決まるのに対し、後者においては、フィンガーが底の存在を感知し、アスペクト比の束縛条件により波数選択が行われることにある。

ここで、培養系における生物対流のパターン（図 5, 図 6, 図 7 の写真）と数値実験の結果を比較してみよう。写真の濃色の部分が鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の集積している場所である。図 5, 図 6 は比較的浅い（それぞれ 0.2cm, 0.4cm）深度の培養液を直径 15cm のシャーレに静置したものである。また図 7 は、比較的深い容器（横 15cm, 奥行 3 cm, 高さ 20cm）中に形成されたフィンガーを横から写したものである。

数値実験で得られたフィンガーの形状は、図 7 中のフィンガーにほぼ類似しているといつてよい。フィンガー間の間隔、あるいは波数選択については、次に示すように、数値実験の結果と符合する興味深い特性が存在する。図 5, 図 6, 図 7 におけるフィンガー間の平均的な間隔は、それぞれ 0.4, 0.8, 1.0cm である。比較的浅い場合と深い場合の相違は明らかである。浅い場合に

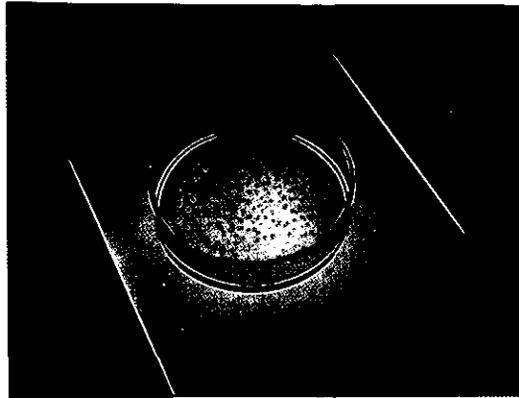


図 5 浅い培養液 (2 mm) 中における鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の分布
シャーレの直径は15cm

Fig. 5 Distribution of a flagellate *Heterosigma akashiwo* in a relatively shallow (2mm) basin, whose diameter is 15 cm.

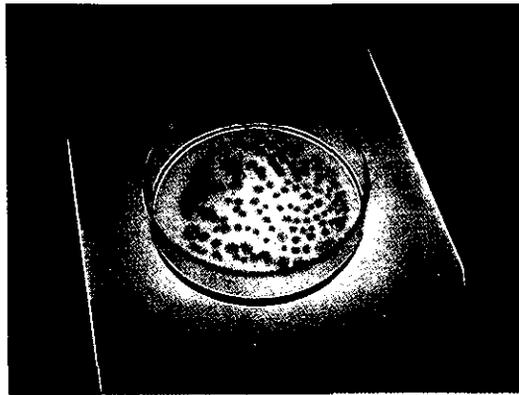


図 6 浅い培養液 (4 mm) 中における鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の分布

Fig. 6 Distribution of a flagellate *Heterosigma akashiwo* in a relatively shallow (4mm) basin, whose diameter is 15 cm.

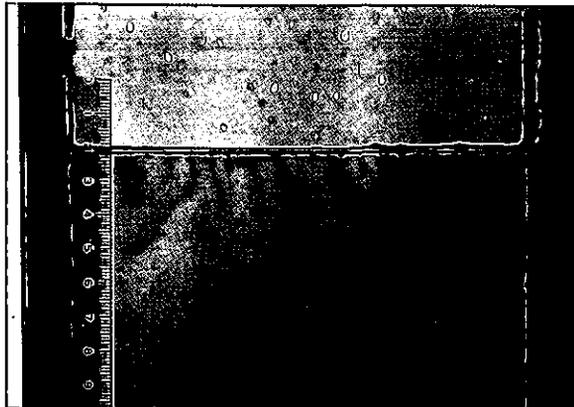


図 7 深い培養容器における鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* の下降フィンガーの形状

Fig. 7 A side view of the falling fingers of *Heterosigma akashiwo* in a relatively deep basin.

は、フィンガー間隔は培養液の水深とともに増大する。この事実は数値実験のBCSにおけるアスペクト比の束縛条件を支持する。これに対して、図7においては、水深が20cmに拡大したのに対応してフィンガー間隔が拡大するという事はない。そして、フィンガーは底から離れ、表層から2~3 cm 垂れ下がっているのみである。このような状況からみて、波数選択は主に表面の高密度層の層性によって規定されていると考えられ、前述のRayleigh-Taylor instability に類似した構造になっていると推測される。

ところで、注意を要することはRayleigh-Taylor instability は原理的に高密度層の流体が下方に転落してゆく現象であることである。したがって上記の深い培養系において、フィンガーが常に表層に位置するためには、それなりの説明を要するであろう。ここで κ_H , κ_V をRun 1の1/10にしたRun 3の計算結果について検討を加える。このケースの W は、図3に示されるように計算継続時間中には定常に達せず、顕著な振動を示す。この振動は多かれ少なかれRun 1, Run 2にも見られたが、Run 3において特に長時間継続する理由は次のように考えられる。一般に移流・拡散が伴う系においては、系の概要が定まるのに移流時間スケールを要し、さらに完全な定常状態に達するには拡散時間スケールを要する場合が多い。Run 3においては、 H , W_p から見積もられる鉛直移流時間スケール H/W_p はRun 1と同等であるが、鉛直拡散時間スケール H^2/κ_V はRun 3より大きいいため、振動の継続時間が長いのである。図8では、基本的には前2ケースと同様に対流セルとフィンガーが形成されている。ただし、 W の大小の時点に対応して、下降するフィンガーが顕著なとき(falling finger phaseと呼ぶ)と微生物が上方に集積しなおす時期(gathering up phaseと呼ぶ)が明りょうに判別できる。前者においては対流セルが顕著であり、後者においては弱い。したがって、拡散時間スケールが経過するまでは、このような現象の間欠性が微生物が断続的に表層に集積するのを許し、RTISを断続的に現出しているのであると考えられる。

Run 3のような状態が形成しうるには微生物の拡散係数が小さなことが条件であった。この可能性を、図5の浅い容器の例について吟味してみよう。もし、 $H=0.2\text{cm}$, $W_p=0.05\text{cms}^{-1}$, $\kappa_H=\kappa_V=0.01\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ とするなら Rf は3.9となる。この値は 10^3 程度の値を示すと考えられる臨界レイリー数よりはるかに小さいにもかかわらず、生物対流はおこっているのである。 Raf ($\equiv \alpha n_{p0} W_p H^4/\kappa_V^2 \nu_V$)を構成する個々のパラメーターのうちで α , n_{p0} , W_p のアンダーエスティメイトあるいは ν_V のオーバーエスティメイトがそれほど大きいとは考えにくい。したがって残る可能性は $\kappa_V=0.01$ がかなりオーバーエスティメイトである場合である。このような推論から実際の培養系においては κ_V は小さく、Run 3で示されたような間欠性をもつ生物対流が起こりうる事が考えられる。

4 結 論

本論文で述べた定式化の数値実験により得られた微生物個体数密度の分布パターンは、鞭毛藻

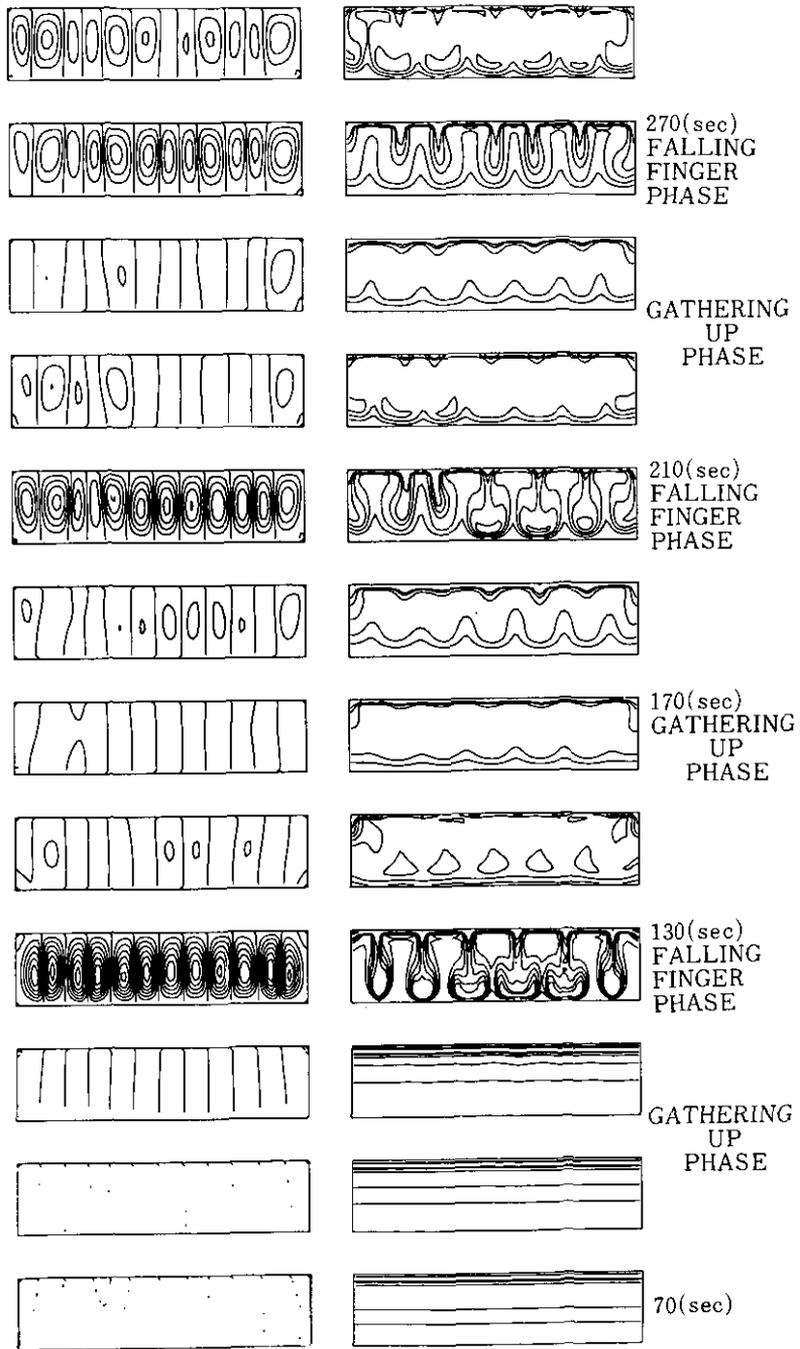


図 8 Run 3 における ψ と n_p の分布の時間変化

Fig. 8 Transition of the distribution of ψ and n_p in Run 3

Heterosigma akashiwo の培養液中におけるフィンガー状のパッチと定性的によい一致を示すことが確かめられた。また、初期には、Rayleigh-Taylor instability に類似した現象が励起されるが、水深が浅い場業には定常的な Bénard 対流に類似した現象に移行し、それぞれの時期に応じた対流セルの波数選択が行われることが確認された。また水深が深い場合あるいは鉛直拡散時間スケールが大きい場合には、現象は定常に達しにくく、間欠的な Rayleigh-Taylor instability で特徴づけられるといえる。

水域における拡散現象においては、その空間スケールあるいは波数構造が重要な意味をもっている。ある量が大きな波数の分布構造をもつほど、周囲の媒体との交換現象が速やかに起こることは明らかである。微生物の分布は、水塊間の潮目、ラングミュア循環流の収束域等の、空間的階層性をもつ各物理機構によって規定されていると考えられる。生物対流による分布構造はおそらくその中で最大の波数構造（最小の空間スケール）をもった現象であり、微生物と環境との諸量の交換に重要な役割をはたしていると考えられるが、その生態学的意義づけはいまだ明らかではない。今後は、微生物の行動に関する各物理量の定量的把握とともに、水域における生物対流現象の役割を明確にする必要があると考えられる。

謝 辞

本研究の過程で有益な助言をいただいた大阪府公害監視センターの藤田真一氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- Chandrasekhar, S. (1961): Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability. chap. 2. Oxford Univ. Press.
- Chen, M. M. and J. A. Whitehead (1968): Evolution of two-dimensional periodic Rayleigh convection cells of arbitrary wavenumbers. *J. Fluid Mech.*, **31**, 1-15.
- Childress, S., M. Levandowsky and E. A. Spiegel (1975): Pattern formation in a suspension of swimming microorganisms: equations and stability theory. *J. Fluid Mech.*, **63**, 591-613.
- Harada, E. (1976): Notes on aggregation behaviour of free-swimming sea-urchin larvae, *Physiol. Ecol. Jpn.*, **17**, 579-582.
- 原島 省・渡辺正孝(1984): 実験系における重力対流の数値モデル. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 167-183.
- Loeffer, J. B. and R. B. Mefferd (1952): Concerning pattern formation by free-swimming microorganisms. *Am. Naturalist*, **86**, 325-329.
- 大久保明(1975): 生態学と拡散. 築地書館.
- Platt, J. R. (1961): "Bioconvection patterns" in cultures of free-swimming microorganisms. *Science*, **133**, 1766-1767.
- Plesset, M. S. and C. G. Whipple (1974): Viscous effects in Rayleigh-Taylor instability. *Phys. Fluids*, **17**, 1-7.

原島 省・渡辺正孝・藤代一成

Plesset, M. S. and H. Winet (1974): Bioconvection patterns in swimming microorganism cultures as an example of Rayleigh-Taylor instability. *Nature*, **248**, 441-443.

Robbins, W. J. (1952): Patterns formed by motile *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. *Bull. Torrey Bot. Club*, **79**, 107-109.

渡辺正孝(1982) : *Olisthodiscus luteus* と *Skeletonema costatum* の細胞密度の日周運動. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 143-173.

渡辺正孝・原島 省(1982) : 鞭毛藻 *Olisthodiscus luteus* による生物対流と Rayleigh-Taylor Instability. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 155-173.

Wille, J. J. and C. F. Ehret (1968): Circulation rhythm of pattern formation in populations of a free-swimming organism, *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, **15**, 789-792.

Winet, H. and T. L. Jahn (1972): On the origin of bioconvective fluid instabilities in *Tetrahymena* culture systems. *Biorheol.*, **9**, 87-94.

矢持 進・安部恒久・城 久(1982) : 大阪谷川港に於ける *Olisthodiscus luteus* の赤潮発生機構に関する研究—出現特性と日周鉛直移動について—. 国立公害研究所研究報告, 第30号, 191-214.

II-10

現場マイクロコズムにおける *Heterosigma akashiwo* の増殖
In Situ Microcosm Culture for Growth of *Heterosigma akashiwo*

渡辺正孝¹・渡辺 信¹・木幡邦男¹・中村泰男¹・原島 省¹

Masataka WATANABE¹, Makoto M. WATANABE¹, Kunio KOHATA¹,
Yasuo NAKAMURA¹ and Akira HARASHIMA¹

要 旨

現場海域の環境をよく再現し、かつ動物プランクトンによる捕食、他の藻類種との競合の影響、流動に伴う集積・分散の影響を除外した現場設置型の透析培養装置（現場マイクロコズム）を製作した。大阪湾泉佐野食品港に設置し、*H. akashiwo* の増殖実験及び野外観測を実施した。培養状態から現場海水と急激な環境の変化に対しても *H. akashiwo* は良く順応し、良好な増殖が得られた。その結果、(1)マイクロコズム内外の物質移動量によって系内は栄養塩が *H. akashiwo* の増殖にとって制限状態になり得ること、(2)現場での増殖に及ぼす照度の影響が顕著なこと、(3)培養結果をもとに水温・照度・塩分の関数として表現された増殖モデルを、それらの現場環境因子の日平均値を用いてシミュレーションした結果とマイクロコズム実験結果との間に良好な一致を得た。

Abstract

In situ cage culture (field microcosm) was made and it can eliminate the effects of (i) grazing due to zooplankton, (ii) competition with other phytoplanktons, and (iii) accumulation or dispersion due to flow fields. These field microcosms were installed in Izumisano Harbor, Osaka Bay, and growth experiments of *H. akashiwo* and field survey were conducted. In spite of drastic change from incubated condition to field condition, *H. akashiwo* showed rapid adaptation to the field environment and satisfactory growth was obtained. The following results were obtained, namely (i) in a field microcosm, nutrient could be a limiting factor for the growth of *H. akashiwo*, depending on the rate of mass transfer through filters, (ii) the effect of underwater irradiance on growth of *H. akashiwo* was significant in the field, (iii) growth model based on experimental data of temperature, light and salinity simulated the variation

1. 国立公害研究所 水質土壌環境部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Water and Soil Environment Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

of cell number of *H. akashiwo*, using daily averaged values of these environmental factors, and satisfactory results compared with the results of field data were obtained.

1 はじめに

Heterosigma akashiwo は大阪湾で夏季赤潮を形成するラフィド藻である (渡辺・中村, 1984 a)。我々は本種の増殖に及ぼす水温, 照度, 塩分, 栄養塩の効果を実験室培養系及び室内マイクロコズムを用いて解析してきた (渡辺・中村, 1984, b, c; 木幡・渡辺, 1984, 1985)。それは, 基本的には培養実験により得られた赤潮原因生物と環境因子との定性的, 定量的関係は現場海域に対しても適用しようという考え方に基づくものである。しかし, 純粋培養下で, 水温・照度・塩分等環境因子を一定に制御して得られた, 種と環境因子との定量的関係を対象海域での赤潮発生過程の解析に適用する場合, 大きな問題となるのは対象海域においては環境因子が時間とともに大きく変動していることである。このため現場海域の環境をよく再現し, なおかつ動物プランクトンによる捕食, 他の藻類種との競合の影響, 流動に伴う集積・分散の影響等を除外している系で *H. akashiwo* の増殖過程を明らかにする必要がある。このような観点から, 現場設置型透析培養装置 (現場マイクロコズム) を試作した。そして1983年8月に *H. akashiwo* 赤潮の頻発海域である大阪湾泉佐野食品港に現場マイクロコズムを設置し, この中での *H. akashiwo* の増殖実験並びに野外観測を実施した。

本報においては, そこで得られた結果をまとめ, 室内培養実験結果から予想される結果との対比を試みた。

2 実験及び現場観測

現場型マイクロコズムを用いた現場培養実験は, 昭和58年8月1日-21日まで大阪府泉佐野市の食品コンビナート漁港において実施した。本港は水深6-11m, 面積440000m²の港で, 船舶停留用棧橋に現場マイクロコズムを設置して実験を行った。

2.1 現場マイクロコズム

対象とする藻類種を, 現場海域に近似した環境条件 (水温・塩分・照度・栄養塩類) のもとで, その増殖過程を解析することを目的とした透析培養装置である (図1)。直径20cm, 幅10cmの透明なアクリル製円筒の両側面をアクリル板で貼り合わせ, 両側面に直径1mmの穴を多数開けてある。この側面に同様の穴を開けたアクリル板を重ね合わせ, その間にフィルター (ミリポア, 0.8 μ m pore size) をはさみ込み, テフロン製リングとアクリル製ボルト・ナットにより固くしめつけ, 内部の藻類が外部に漏れる構造になっている。外部の環境の変化に対して, 直ちに内部の環境が同様に变化するようなフィルターを通しての物質交換が理想であるが, 内部の藻類が外部

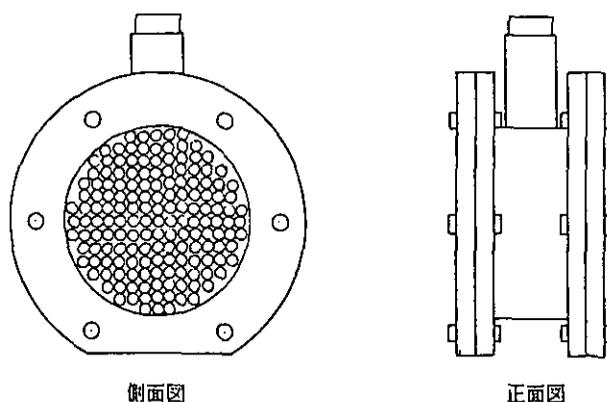


図 1 現場マイクロコズムの概略図

Fig. 1 Schematic view of field microcosm

に漏れないよう、また外部の微細藻類が混入しないよう孔径 $0.8\mu\text{m}$ のフィルターを用いているため、実際上は物質移動はかなり限定されたものになっている。このフィルターを通しての物質移動については次論文に譲りたい。

2.2 現場マイクロコズムにおける培養実験

現場マイクロコズムは港内の船舶用棧橋からブイにより海中に吊され、(1)0.5m層、(2)2m層、(3)3m層に設置された。さらに赤潮鞭毛藻の日周鉛直移動性をシミュレートするため、(4)07:00-18:00は0.5m層、18:00-07:00は底層上0.5m層に設置した。実験開始に当たり、各マイクロコズムは対応する深度のろ過海水((4)では0.5m層)を満たし、これに $f/2$ 培地(Guillard & Ryther, 1962)で培養した対数増殖期にある *H. akashiwo* (clone OHE-1; 渡辺・中村, 1984b)を接種した。初期細胞濃度は $2 \times 10^2 - 1 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ である。毎日13:00に現場マイクロコズムを海水より引き上げ、約20mlを採取し、2時間以内にこの中に含まれる細胞濃度を1mlカウンティングチェンバーを用いて光学顕微鏡下で計数した。

2.3 現場観測

実験期間中は現場マイクロコズム設置場所での水温、空中・水中照度、塩分、透明度、栄養塩を測定した。

水温：サーミスタ水温計を使用し、毎日4回(07:30, 10:00, 13:00, 16:00)、表層より0.5m間隔で底層まで測定した。

塩分：水温と同時刻にEIL塩分計を用いて表層より0.5m間隔で底層まで測定した。

照度：水中照度計を使用し、水温と同時刻表層より0.5m間隔で底層まで測定した。

透明度：Secchi disk を用い水温と同時に測定した。

栄養塩：バンドン採水器を用い13：00に0.5m層及び底層上0.5m層から採水を行った。試水はただちにGF/Cフィルターにてろ過後凍結保存した。保存試料は凍結したまま持ち帰り、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} の分析に供した。 NO_3^- 及び NO_2^- はWoodらの方法(1967)、 NH_4^+ はSolórzanoの方法(1969)、 PO_4^{3-} はMurphy & Riley(1962)の方法に基づき、テクニコンオートアナライザーII型で測定した。

3 実験結果

現場マイクロコズム内の *H. akashiwo* の増殖実験の結果の概要を表1に、細胞数変化を図2に示す。なおここで求めた増殖速度(μ)は、対数増殖期での値である。以下において現場マイクロコズム内での *H. akashiwo* の増殖を、水温、塩分、照度、栄養塩とのかかわりあいでも論じる。

i) 水温：図3に実験期間中の表層0.5mと底層0.5mでの水温変化を示す。8月3日—8月15日までの間は強い成層状態が保たれ、表層においては28—32°Cと非常に高い値を示している。室内培養実験によると27.5°Cと30°Cでの *H. akashiwo* の増殖速度はそれぞれ0.4d⁻¹及び0.2d⁻¹で

表 1 現場マイクロコズム実験のまとめ

Table 1 Summary of field microcosm experiments

Series	Run No.	Location	Duration	Initial conc. (mg/l)			Initial cell No. (cells/ml)	μ (d ⁻¹)
				PO ₄ -P	NO ₃ -N	NH ₄ -N		
(A)	Run 1	surface	8/7—8/12				195	0.28
	Run 2	vertical migration	8/7—8/15	0.020	0.024	0.019	617	0.53
(B)	Run 3	surface	8/10—8/15				821	0.55
	Run 4	surface	8/10—8/15				1055	0.72
	Run 5	vertical migration	8/10—8/15	0.024	0.016	0.186	1324	0.32
	Run 6	vertical migration	8/10—8/15				1221	0.55
(C)	Run 7	2 m	8/11—8/15	0.007	0.021	0.012	506	0.30
	Run 8	2 m	8/11—8/15				708	—
(D)	Run 9	surface	8/17—8/21				1390	0.31
	Run 10	surface	8/17—8/21				998	0.48
	Run 11	vertical migration	8/17—8/21				1136	0.36
	Run 12	vertical migration	8/17—8/21	0.042	0.044	0.053	1163	0.43
	Run 13	2 m	8/17—8/21				1159	—
	Run 14	2 m	8/17—8/21				1030	0.13
	Run 15	3 m	8/17—8/21				1374	—
	Run 16	3 m	8/17—8/21				1103	—

あって、最適温度 (15°C~25°C) での値 ($0.64d^{-1}$) に比べ低下することが知られている (渡辺・中村, 1984 b)。一方, (A), (B) シリーズ実験期間中は表層水温は30°Cを越えていたが, 表層設置及び鉛直移動させたマイクロコズム実験では, 6例中4例までが増殖速度 (μ) が $0.53d^{-1}$ 以上となり, 培養実験結果から予測される値 ($0.2d^{-1}$) よりもはるかに大きな値を示した。この差が何に由来するものかは現在検討中である。(D) シリーズの実験期間中は, 表層で25°C~28°C, 底層で23°Cの範囲にあった。表層設置の場合増殖速度 (μ) は0.31及び $0.48d^{-1}$ という結果になり, 室内培養実験結果を良く再現している。鉛直移動の場合増殖速度 μ は0.36及び $0.43 d^{-1}$ となり, ほぼ室内培養実験結果と合っていることがわかる。

ii) 塩分: 図3に実験期間中の塩分濃度変化を示す。*H. akashiwo* は9~30‰の広い範囲で最

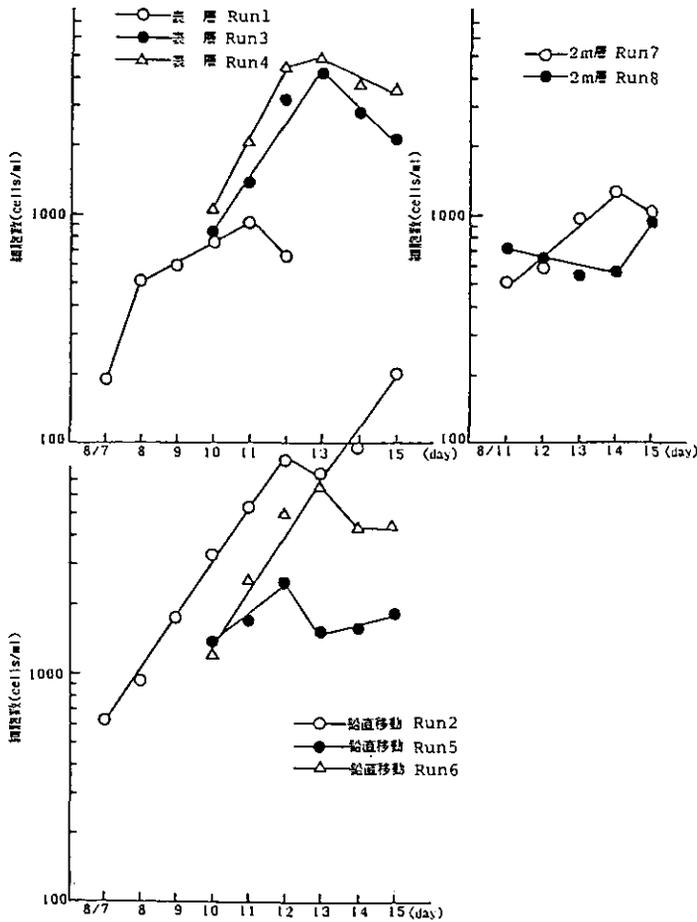


図 2-1 現場マイクロコズム実験における細胞数の変化 (Run 1~8)

Fig. 2-1 Variation of cell number in field microcosm experiments (Run 1-8)

大増殖速度を示すことが知られている（渡辺・中村，1984 b）。実験期間中の表層塩分は約25—32 %とほぼ好適な塩分濃度範囲にあったと考えられる。一方底層の塩分濃度は32%とほぼ一定値を保っており，室内培養実験からは約 0.6 d^{-1} という増殖速度が予想され，マイクロコズム実験結果と比較して，塩分は好適範囲にあったと考えられる。

iii) 照度：室内培養実験結果によれば， $0.022 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$ で増殖可能となり， $0.034 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上で最大増殖速度に達する（渡辺・中村，1984 b）。図4に実験期間中の照度変化を示す。マイクロコズム実験期間中表層では日平均照度（1日に4回測定した照度の平均値*）は $0.045 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上であり，増殖に好適な照度となっていた。深度2 m層では急激に照度は減衰し，増殖可能な限界値（ $0.022 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$ ）附近の値となっている。マイクロコズム実験の(C)シリーズでは $\mu=0.3$

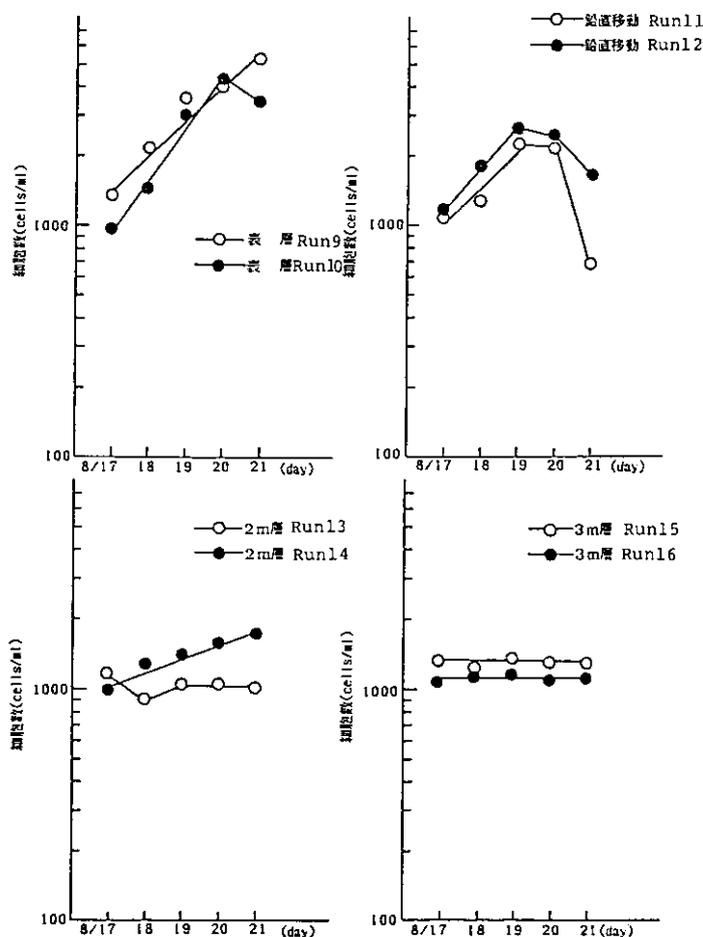


図 2-2 現場マイクロコズム実験における細胞数の変化 (Run 9~16)
 Fig 2-2 Variation of cell number in field microcosm experiments (Run 9-16)

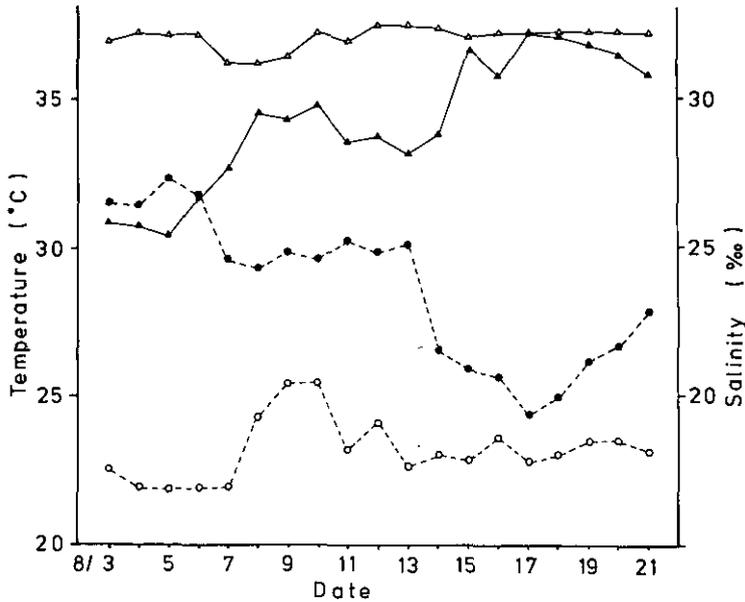


図 3 泉佐野港での水温と塩分の日変化
(●: 表層水温, ○: 下層水温, ▲: 表層塩分, △: 下層塩分)

Fig. 3 Daily variation of water temperature and salinity in Izumisano Harbor
(●: surface temp., ○: bottom temp., ▲: surface salinity, △: bottom salinity)

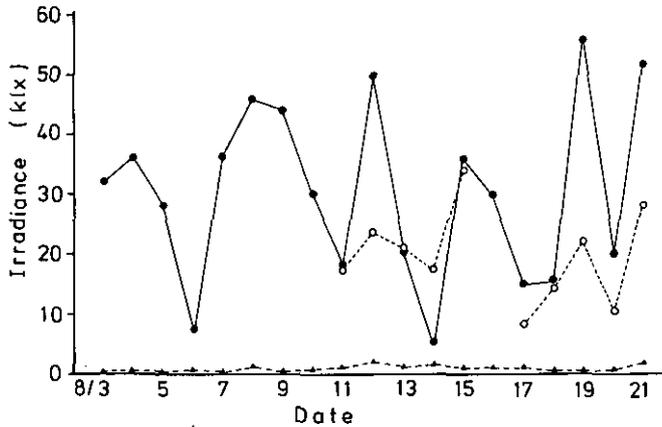


図 4 泉佐野港での水中照度の日変化
(○...○: 表層, 日平均, ●—●: 表層, 13:00測定, ▲...▲: 下層, 13:00測定)

Fig. 4 Daily variation of underwater irradiance in Izumisano Harbor
(○...○: surface, daily average, ●—●: surface, measured at 13:00pm, ▲...▲: bottom, measured at 13:00pm)

d^{-1} , (D)シリーズでは $\mu = 0.13d^{-1}$ と低くなっており、照度による増殖速度への影響ははっきり示されている。深度 3 m 層では照度は増殖可能限界値をはるかに下回っており (平均 $0.0087ly \cdot min^{-1}$) マイクロコズム内での増殖は認められなかった。

iii) 栄養塩：図 5 に実験期間中のリン酸塩濃度変化を示す。表層で平均 $0.01-0.02mg-P \cdot l^{-1}$ 、下層で約 $0.1mg-P \cdot l^{-1}$ のリン酸塩が存在している。図 5, 6 及び図 7 にそれぞれアンモニウム塩及び硝酸塩の濃度の変化を示す。アンモニウム塩濃度が下層で $0.1-0.5mg-N \cdot l^{-1}$ と高く、表層では $0.01-0.2mg-N \cdot l^{-1}$ の間を変動している。一方硝酸塩は表層・下層とも平均 $0.01mg-N \cdot l^{-1}$ と変わらない。このように実験海域での栄養塩濃度の鉛直分布は水温・塩分による成層構造の強い影響を受けて、栄養塩も成層構造を示している。

現場マイクロコズム内での *H. akashiwo* の増殖過程と海域での栄養塩状態との関連を解析することが現場マイクロコズム実験の一つの大きな目的であった。しかしその解析のためには、以下の点を改良しなければならない。(A) f/2 培地による培養株を培地とともに現場マイクロコズムに注入しているため、高濃度の栄養塩を持ち込んでいる。従って現場海水を用いて十分な期間予備培養をする必要がある。(B) フィルターを通しての現場マイクロコズム内外間の物質移動量の推定を行う必要がある。本実験においては、以上の 2 点が未解決であったため、現場海水の栄養

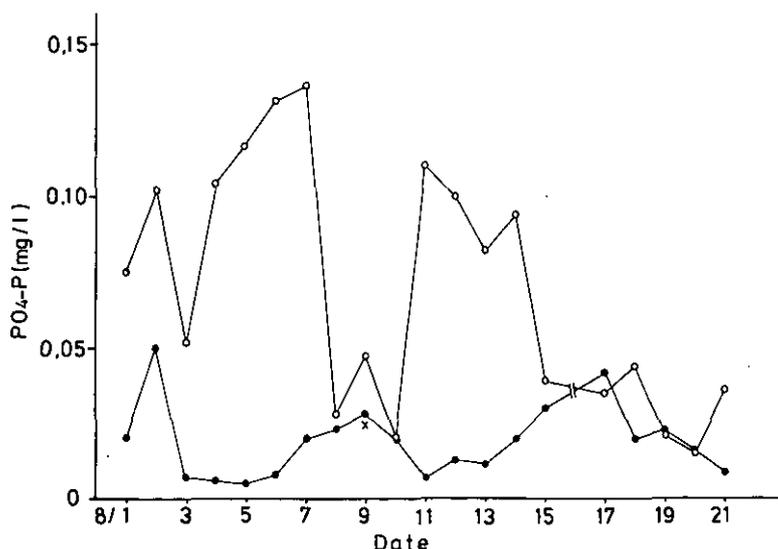


図 5 泉佐野港でのリン酸塩濃度の日変化
(●-●：表層, ○-○：下層, X：マイクロコズム内)

Fig. 5 Daily variation of PO₄-P concentration in Izumisano Harbor
(●-●：surface, ○-○：bottom, X：inside of microcosm)

• 換算式として $1 ly \cdot min^{-1} = 1.8 \times 10^5 lx$ (ルクス) を用いている。

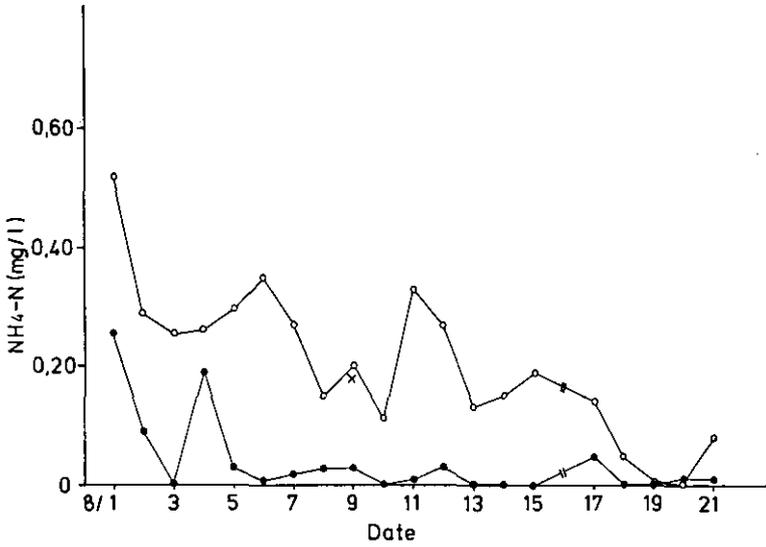


図 6 泉佐野港でのアンモニウム塩濃度の日変化
(●-●: 表層, ○-○: 下層, ×: マイクロコズム内)

Fig. 6 Daily variation of NH₄-N concentration in Izumisano Harbor
(●-●: surface, ○-○: bottom, ×: inside of microcosm)

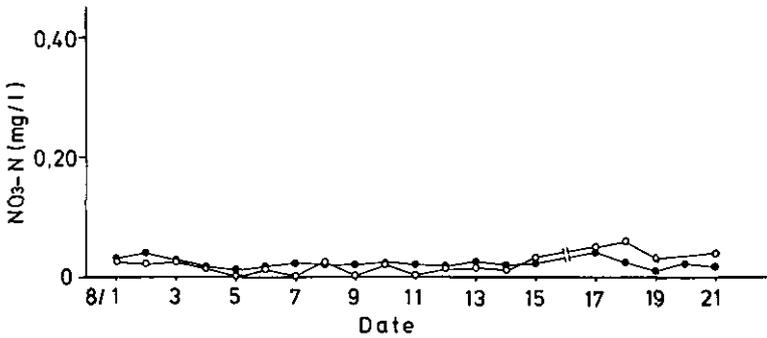


図 7 泉佐野港での硝酸塩濃度の日変化
(●-●: 表層, ○-○: 下層)

Fig. 7 Daily variation of NO₃-N concentration in Izumisano Harbor
(●-●: surface, ○-○: bottom)

塩濃度と *H. akashiwo* 増殖との関連を論じることができなかった。後述するごとく、現場実験結果の中でも多くの場合に接種後 4-5 日後には増殖速度の低下もしくは落下が見られ、現場マイクロコズム内の栄養塩制限の可能性が示唆されている。このような問題点については今後明らかにしていく予定である。

4 *H. akashiwo* の増殖モデル

現場マイクロコズムを用いた増殖実験により、培養株 *H. akashiwo* を現場海域に接種しても室内培養実験結果と同等の増殖が得られた。このことは、現場海水の増殖ポテンシャルを現場海域で直接測定することができるという一面を持っていると同時に、室内培養実験結果の現場海域への適用性の検証という側面を持ち合わせている。ここでは培養実験結果を用いて *H. akashiwo* の増殖モデルを作成し、その現場マイクロコズムへの適用を試みた。

一般に増殖速度は制限要因となっている因子の量によって規定されている。すなわち

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(\text{環境因子 } 1, 2, \dots) \quad (1)$$

ここでは f は水温、照度、塩分、栄養塩類等の関数であり、藻類種によってそれぞれ異なる。ここでは窒素・リンの制限は考慮しないと仮定し、増殖速度を照度(I)・水温(T)・塩分(S)のみの関数として解析する。すなわち

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f_1(T) \cdot f_2(I) \cdot f_3(S) \quad (2)$$

増殖に対する水温・照度・塩分の依存関数 $f_1(T)$, $f_2(I)$, $f_3(S)$ はそれぞれ培養実験結果(渡辺・中村, 1984b)より求める。なお *H. akashiwo* については $\mu_{\max} = 0.65 \text{d}^{-1}$ が得られている。

4.1 水温モデル

従来より藻類の増殖における温度関数としては、Chen & Orlob (1975), Lassiter & Kearns (1974), Lehmanら(1975), Jorgensen (1976), Lamanna & Malette (1965), Parkら(1979), 等の研究がある。ここでは Lamanna & Malette (1965)が用いた温度関数によって培養実験結果を近似する。

$$f_1(T) = \left(\frac{T - T}{T_{opt} - T} \right)^n \exp \left[1 - \left(\frac{T - T}{T_{opt} - T} \right)^n \right] \quad T \leq T \leq T_{opt} \quad (3)$$

$$f_1(T) = 1 - \left(\frac{T - T_{opt}}{T_{max} - T_{opt}} \right)^m \quad T_{opt} \leq T \leq T_{max}$$

ここで T = 増殖率に対する水温しきい値

T_{opt} = 最大増殖率を与える水温

T_{max} = 増殖可能な最大水温

n, m = 藻類種に固有の定数

図8に $T = 5^\circ\text{C}$, $T_{opt} = 20^\circ\text{C}$, $T_{max} = 31^\circ\text{C}$, $n = 1.2$, $m = 4.0$ の場合の $\mu_{\max} \cdot f_1(T)$ と培養実験結果との比較を示す。 n, m という二つのパラメーターによって良く実験結果を説明し得るモデルに

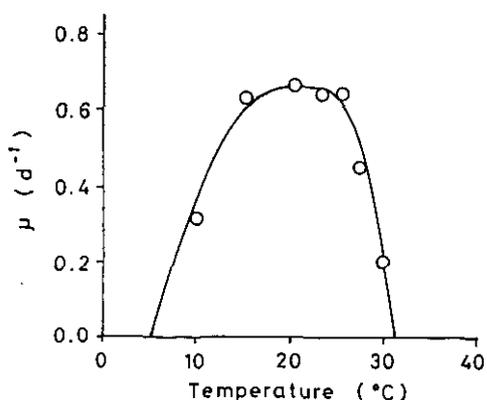


図 8 *H. akashiwo* の増殖速度と温度との関係
(○:実験結果 (渡辺・中村, 1984b), —:(3)式を用いた計算結果)

Fig. 8 The relation between growth rate and temperature for *H. akashiwo*
(○: Experimental data (Watanabe & Nakamura, 1984b), —: Calculated value from eq. (3))

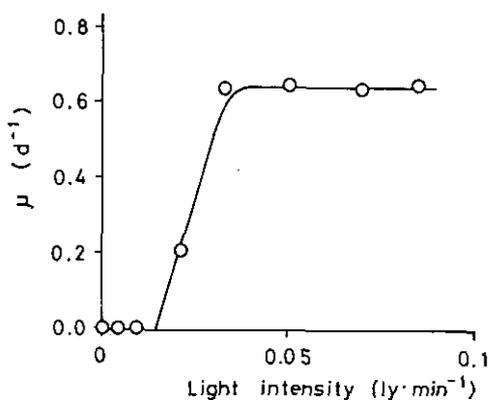


図 9 *H. akashiwo* の増殖速度と照度との関係
(○:実験結果 (渡辺・中村, 1984b), —:(4)式を用いた計算結果)

Fig. 9 The relation between growth rate and irradiance for *H. akashiwo*
(○: Experimental data (Watanabe & Nakamura, 1984b), —: Calculated value from eq. (4))

なっていることがわかる。

4.2 照度モデル

藻類の増殖と照度に関する研究は従来多くなされている。照度のモデルについては, Bannister

(1919), Webbら (1974), Jassby & Platt (1976), Vollen weider (1965), Plattら (1980), Parker (1973), Jørgensen (1976), Talling (1957), Takahashiら (1978) その他によって、種々の関数型が提示されている。ここでは培養実験より得られた増殖速度の照度依存性を最も良く説明し得るモデルとして Bannister (1979) のモデルを修正して用いている。すなわち

$$f_2(I) = \frac{i/i_h}{[1 + (i/i_h)^m]^{1/m}} \quad (4)$$

ここで $i = I - I_k$

$$i_h = I_k - I$$

I_k = 増殖率に対する照度のしきい値

I_k = 最初に最大増殖速度 μ_{max} に達する照度.

m = 藻類種に固有の定数

図9に $I_k = 0.034 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$, $I = 0.015 \text{ ly} \cdot \text{min}^{-1}$, $m = 10$ の場合の $\mu_{max} \cdot f_2(I)$ と実験結果との比較を示す。これより $f_2(I)$ は m という単一のパラメーターによって実験結果を良く説明することがわかる。

4.3 塩分モデル

H. akashiwo の増殖に及ぼす塩分濃度の影響については 9-30‰ の塩分範囲で最大増殖速度

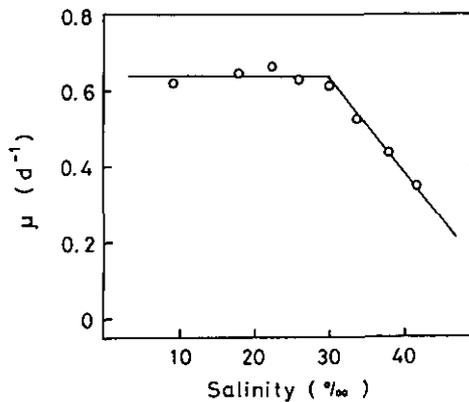


図 10 *H. akashiwo* の増殖速度と塩分との関係

(○ : 実験結果 (渡辺・中村, 1984b), — : (5)式を用いた計算結果)

Fig. 10 The relation between growth rate and salinity for *H. akashiwo*

(○ : Experimental data (Watanabe and Nakamura, 1984b), — : Calculated value from eq. (5))

($\mu=0.64d^{-1}$)が得られている。30%以上の塩分では増殖速度は直線的に減少している。このことにより、増殖速度に及ぼす塩分依存性の関数は以下のように与えられる。

$$f_s(S) = \begin{cases} 1 & S < 30\% \\ 1 - 0.039(S - 30) & S \geq 30\% \end{cases} \quad (5)$$

図10に培養実験結果との比較を示すが、(5)式は実験結果を良く再現していることがわかる。

4.4 現場マイクロコズム実験への適用

表1に示された Run 1-Run 16について、現場マイクロコズム内の *H. akashiwo* の個体数変化の数値シミュレーションを行った。ここでは *H. akashiwo* の増殖は水温、照度、塩分によるのみ影響を受けていると仮定している。

$$\frac{dN}{dt} = (\mu - D)N \quad (6)$$

ここで N : *H. akashiwo* 個体数 (cells \cdot m $^{-3}$)

μ : 増殖速度 (d^{-1})

D : 死亡率又は補食率 (d^{-1}) = 0.0 と仮定

増殖速度 μ は(2), (3), (4)及び(5)式より、日平均の水温、照度、塩分濃度を用いて計算した。但し表層、2 m 層、3 m 層については、それぞれの層で観測された日平均の水温、照度、塩分を用いた。また上下鉛直移動を行ったものについては、上層と下層の水温、塩分観測値から日平均水温・塩分を求め、表層の照度測定値より日平均照度を求めた。

実測値と計算値との比較を図11に示すが、以下のことが結論づけられる。

(1) 表層設置の場合

Run 1, Run 9, Run 10について、増殖モデルは現場での *H. akashiwo* 個体数の変化を良く説明している。特に環境因子(水温、照度、塩分)の大きな変化にもかかわらず、日平均値を用いることにより現場で得られた増殖速度に非常に近い値が計算されている。

一方 Run 3, Run 4 については個体数の計算結果は実測値を大きく下まわっている。これは培養実験結果では水温30°C近傍では増殖速度(μ)は $0.2d^{-1}$ であるのに対し、現場海域ではそれぞれ $\mu=0.55d^{-1}$ (Run 3) 及び $\mu=0.72d^{-1}$ (Run 4) と非常に良好な増殖結果が得られているためである。このように *H. akashiwo* については、水温30°C近傍においては現場海域の方が培養実験よりも良好な増殖が得られるという結果になっており、この原因が何に起因するか検討中である。

現場マイクロコズム内の実測値においては、3-5日目ごろに個体数が減少もしくは増殖速度

が低下する様子が示されている (Run 1, Run 3, Run 4, Run 9, Run 10)。現場海水と現場マイクロコズム内との海水交換は十分あるという仮定のもとに実験を行ってきたが、かなり富栄養化した海域であり、数日の内に膜表面に付着物が被膜し海水交換・栄養塩交換が著しく阻害されるものと考えられる。このため現場マイクロコズム内の栄養塩が制限要因になっている可能性がある。

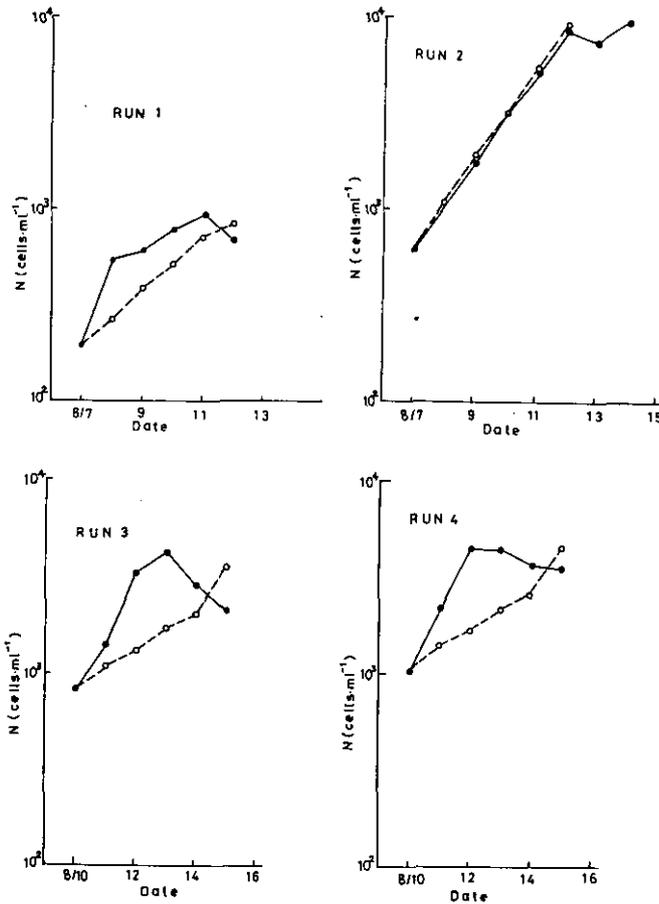


図 11 現場マイクロコズム実験結果と *H. akashiwo* 増殖モデルによる計算結果との比較(a) Run 1~4 (●—●: 観測データ, ○—○: 計算結果)

Fig. 11 Comparison between experimental data obtained from field microcosm and calculated results obtained from growth model of *H. akashiwo* (Run 1~4) (●—●: observed data, ○—○: calculated data)

(2) 上下鉛直移動の場合

Run 2, Run 5, Run 6, Run 11, Run 12のいずれの場合も、現場マイクロコズムは昼間は表層、夜間は底層に置かれている。現場マイクロコズムでの *H. akashiwo* 個体数の変化は、*H. akashiwo* 自身が経験する日平均の照度、水温、塩分に対して非常に良く対応していることがわかる。ただし Run 5 については現場マイクロコズム内に動物プランクトンが混入していたため、第3日目より急激な個体数の減少が見られた。Run 5 と Run 6 は同時に同条件下で行った鉛直移動実験であり、Run 6 についてはモデルと実測値との良好な一致が得られている。このことより

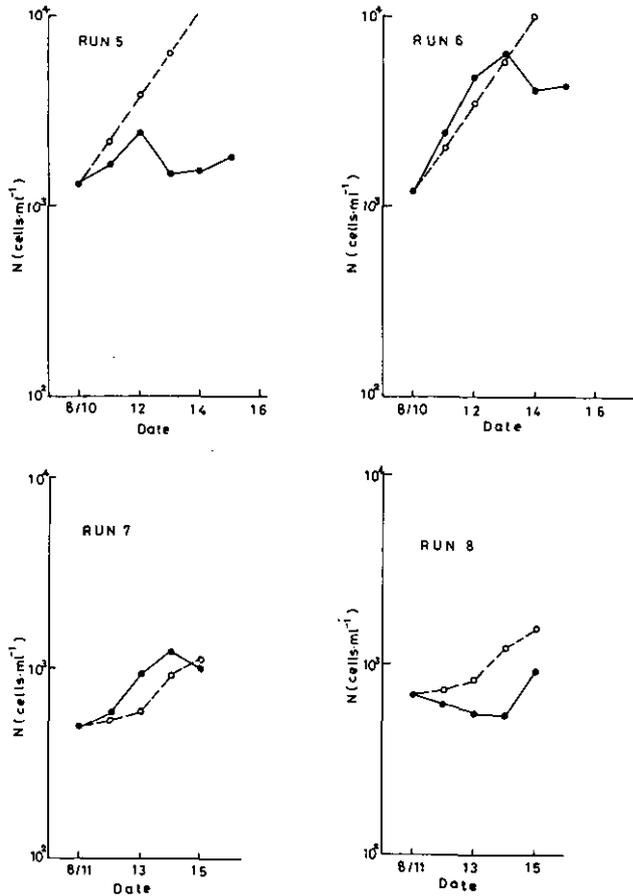


図 11 現場マイクロコズム実験結果と *H. akashiwo* 増殖モデルによる計算結果との比較(b) Run 5~8 (●—●: 観測データ, ○—○: 計算結果)

Fig. 11 Comparison between experimental data obtained from field microcosm and calculated results obtained from growth model of *H. akashiwo* (Run 5 ~ 8) (●—●: observed data, ○—○: calclated data)

逆に Run 5 については動物プランクトンによる捕食効果を推定することが可能と考えられる。

Run11, Run12については、珪藻類が混入しており、この影響によるものと考えられる。初期の増殖速度は良い一致が得られている。

(3) 2 m 層, 3 m 層の場合

Run 7, Run 8, Run 13, Run 14, Run 15, Run 16については照度制限による影響が良く再現されており、実測値との非常に良い一致が得られている。特に Run 8 については、多少の時間

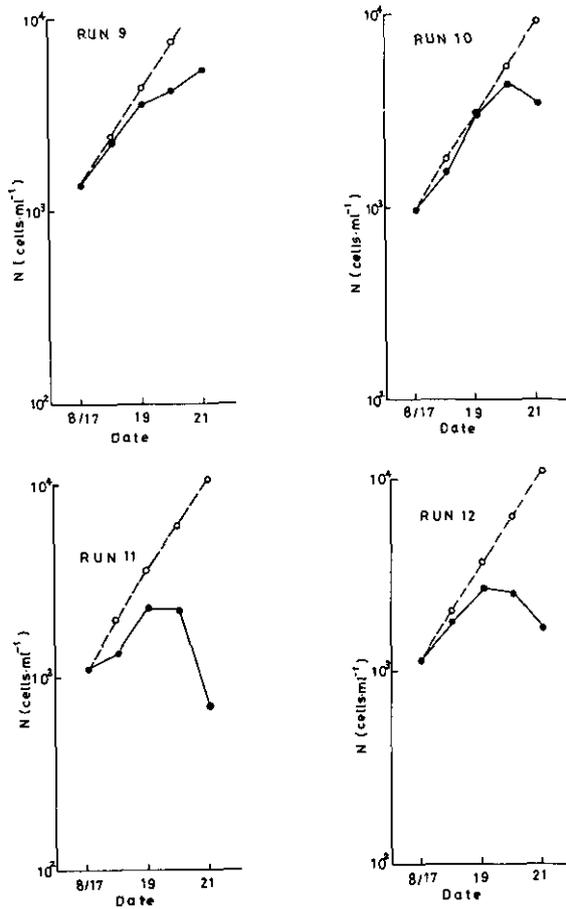


図 11 現場マイクロコズム実験結果と *H. akashiwo* 増殖モデルによる計算結果との比較(c) Run 9~12 (●—●: 観測データ, ○—○: 計算結果)

Fig. 11 Comparison between experimental data obtained from field microcosm and calculated results obtained from growth model of *H. akashiwo* (Run 9~12) (●—●: observed data, ○—○: calculated data)

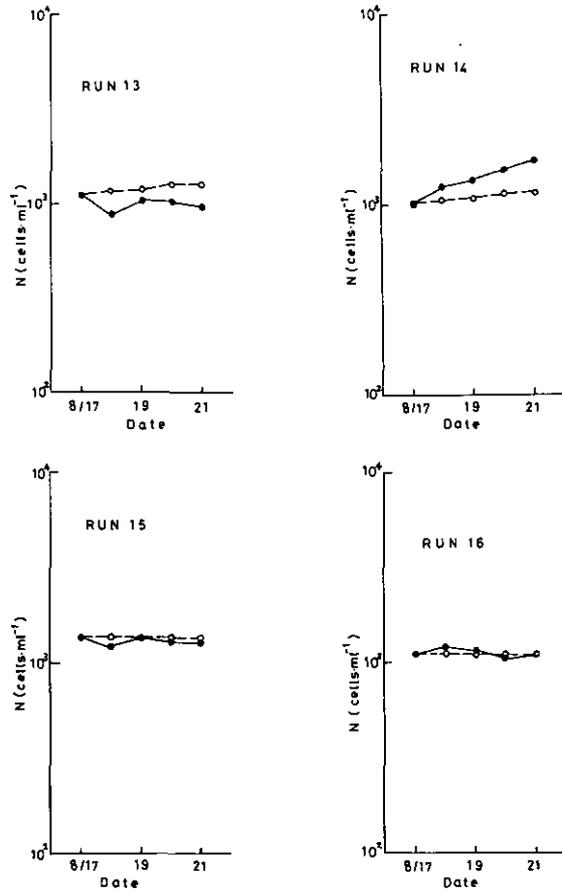


図 11 現場マイクロコズム実験結果と *H. akashiwo* 増殖モデルによる計算結果との比較(d) Run 13~16 (●—●: 観測データ, ○—○: 計算結果)

Fig. 11 Comparison between experimental data obtained from field microcosm and calculated results obtained from growth model of *H. akashiwo* (Run 13~16) (●—●: observed data, ○—○: calculated data)

的ずれはあるものの、環境の大きな変化に対しても *H. akashiwo* 個体数の経時変化を良く再現していることがわかる。

5 考 察

大阪湾谷川港から分離・培養した *H. akashiwo* を、再び大阪湾泉佐野港に設置された現場マイクロコズム内に接種し、増殖実験を行った。f/2培地に保存されていた *H. akashiwo* は、急激な環境変化にもかかわらず、現場海水に順応し、非常に良好な増殖を示した。この実験の成功により、

現場海域での *H. akashiwo* 単一種の増殖過程を、環境因子の変動とともに詳細に計測することが可能になった。今回の実験と第一段階の解析により今後改良しなければならない点はいくつか挙げられる。第1の点はフィルターを通しての外との海水交換の推定を正確に行う必要がある。現場マイクロコズム内の栄養塩濃度が増殖の制限要因となっていないかどうかは、この海水交換能力に依存している。従来の dialysis culture において最も欠如していたのもこの点に関するものであった。今回の実験においても、培養途中から個体数増加率の減少が見られるのは、海水交換性の低下に伴う栄養塩制限が原因ではないかと考えられる。第2の点は現場海水からの動・植物プランクトンの混入防止を行う必要がある。特に動物プランクトンの混入により、かなりの *H. akashiwo* が補食されてしまった。逆にこのことは、現場マイクロコズム内に注入する動物プランクトンの種名と数が既知であれば、現場において補食圧を計測することの可能性を示している。第3の点として現場マイクロコズムに、f/2培地で培養した保存株と培地とともに注入しているため、高濃度の栄養塩が持ち込まれたことになる。このため現場海水の栄養塩状態を評価することができなかった。現場海水を用いた予備培養期間を十分持つことにより、栄養塩持ち込みの影響をなくすようにする必要がある。

本論文に提示された現場マイクロコズムの概念と技術は今後多くの改良を必要とするが、第1段階としての現場での増殖実験については成功したと言える。本実験結果及び今後の研究展望も含めて、現場マイクロコズムを以下のように位置づけることができる。

i) 本論文に述べられたごとく、水温・照度・塩分・栄養塩等環境因子を一定に制御した実験室培養系で得られた藻類と環境因子との定量的関係を、対象海域に適用する場合の現場での検証方法論として位置づけられる。この場合一つの解析の方向としては、現場マイクロコズムよりサンプリングを行い、室内実験で行っているような生理特性を現場において把握する。もう一つの解析の方向としては、室内培養実験結果をもとに数字モデルを作成し、現場海域への適用を試みることである。

ii) 従来の AGP は、試水を基礎とした培養液を用い一定の制御環境条件下で藻類の培養を行い、その増殖量から試水の藻類生産の潜在力を分析した一種の生物検定 (Bioassay) であった。これに対し現場マイクロコズムは現場海域の水温・照度・塩分・栄養塩等の環境因子をそのまま反映させながら、動物プランクトンの補食や他の藻類種との競合の影響を除外した系であり、現場海域での藻類の生産力を直接計測し得る可能性がある。すなわち“現場 AGP 法”又は“現場生産力測定法”とも言うべきものである。

iii) 種類及び個体数が既知な動物プランクトンを藻類と混合することにより、逆に動物プランクトンの補食圧を現場において測定することが可能であると思われる。ただしこの場合は十分な容量が必要である。

iv) 他の藻類種との混合培養を現場マイクロコズム内で行うことにより、藻類の種間競合関係の現場での評価を行うことが可能と思われる。

本論文は以上の研究展開を行うための基礎実験の第1歩であると考えている。

謝 辞

本研究を遂行に当たり御協力戴いた岡山大学河原長美助教授及び中島重信君に感謝致します。また大阪湾泉佐野港での現場実験の許可を得るに当たり、大阪府水産試験場矢持進氏、大阪府佐野漁港管理事務所の方々に感謝致します。

引 用 文 献

- Bannister, T.T. (1979): Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 76-96.
- Chen, C.W. and C.T. Orlob (1975): Ecological simulation for aquatic environments. *In*: B.C. Patten (eds.) *System analysis and simulation in Ecology*. vol. III. Academic Press, New York, 476-587.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gram. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- Jassby, A.D. and T. Platt (1976): Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 540-547.
- Jensen, A., B. Rystad and L. Skoglund (1972): The use of dialysis cultures in phytoplankton studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **8**, 241-248.
- Jensen, A. and B. Rystad (1973): Semi-continuous monitoring of the capacity of sea water for supporting growth of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **11**, 275-285.
- Jensen, A. B. Rystad and S. Melson (1974): Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. 1. The tolerance of three algal species to zinc in coastal seawater. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **15**, 145-157.
- Jensen, A., B. Rystad and S. Melson (1976): Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. 2. Copper tolerance of three species in dialysis and batch culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **22**, 249-256.
- Jørgensen, S.E. (1976): An eutrophication model for a lake. *Ecological Modelling*, **2**, 147-165.
- Lamanna, C. and M.F. Mallette (1965): *Basic Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Lassiter, R.R. and D.K. Kearns (1974): Phytoplankton population changes and nutrient fluctuations in a simple aquatic ecosystem model. *In* E.J. Middlebrooks, D.H. Falkenberg and T.E. Maloney (Eds.) *Modeling the Eutrophication Process*. Ann Arbor Science, MI., 131-138.
- Lehman, J.T., D.B. Botkin and G.E. Likens (1975): The assumptions and rationales of a computer model of phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, **20**, 343-364.
- Murphy, J. and J.P. Riley (1962): A modified single-solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **27**, 31-36.
- Park, R.A., T.W. Gorden and C.J. Desormeau (1979): Modification to model CLEANER, requiring further research. *In*: D. Scavia and A. Robertson (eds.), *Perspectives on Lake Ecosystem Modeling*. Ann Arbor Science, MI., 87-108.
- Parker, R.A. (1973): Some problems associated with computer simulation of an ecological system. *In*:

- M.S. Bartlett and R.W. Hiorns (eds.) The mathematical theory of the dynamics of biological populations. Academic Press, New York, 269-288.
- Platt, T., C.L. Gallegos and W.G. Harrison (1980): Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **38**, 687-701.
- Sakashaug, E. (1977): Limiting nutrients and maximum growth rates for diatoms in Narragansett Bay. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **28**, 109-123.
- Solórzano, L. (1969): Determination of ammonium in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 799-801.
- Takahashi, M., K. Fujii and T.R. Parson (1973): Simulation study of phytoplankton photosynthesis and growth in the Fraser River Estuary. *Mar. Biol.* **19**, 102-116.
- Talking, J.F. (1957): The phytoplankton populations as a compound photosynthetic system. *New Phytology*, **56**, 133-149.
- Vargo, G. (1976): The influence of grazing and nutrient excretion by zooplankton on the growth and production of the marine diatom, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, in Narragansett Bay. Ph. D. thesis, Univ. Rhode Island. 216p.
- Vollenweider, R.A. (1965): Calculation models of photosynthesis-depth curves and some implications regarding day rate estimates in primary production measurements. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Suppl.*, **18**, 425-457.
- Watanabe, M.M., Y. Nakamura, S. Mori and S. Yamochi (1982): Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Jpn J. Phycol.*, **30**, 279-288.
- 渡辺 信・中村泰男 (1984 a) : 瀬戸内海大阪湾と播磨灘における *Heterosigma akashiwo* Hada と *Chattonella antiqua* (Hada) Ono の赤潮. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 41-50.
- 渡辺 信・中村泰男 (1984 b) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性. 1. 増殖に及ぼす水温, 塩分, 照度, pH の影響. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 51-58.
- 渡辺 信・中村泰男 (1984 c) : 赤潮鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* Hada の増殖特性. 2. 栄養塩の利用. 国立公害研究所研究報告, 第63号, 59-68.
- Webb, W.L., M. Newton and D. Starr (1974): Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*; A mathematical model. *Oecologia*, **17**, 281-291.
- Wood, E.P., F.A. Armstrong and F.A. Richards (1967): Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **47**, 23-31.
- Yoder, J.A. (1979): A comparison between the cell division rate of natural populations of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve grown in dialysis culture and that predicted from a mathematical model. *Limnol. Oceanogr.*, **24**, 97-106.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 — 霞ヶ浦を対象域として — 昭和51年度. (1977)
第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51, 52年度 研究報告.
(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- ※ 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和52年度 中間報告. (1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素-窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究 — 昭和51, 52年度 研究報告. (1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II) — 霞ヶ浦を中心として. — 昭和53年度. (1979)
- ※ 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- ※ 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和52, 53年度 研究報告. (1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和53年度 中間報告 (1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51~53年度 特別研究報告. (1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
— 第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係 —
— 第2報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の20種について —)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53, 54年度 特別研究報告. (1980)
- ※ 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和54年度 特別研究報告. (1980)
- 第 16 号 計測車レーザレーダーによる大気汚染遠隔計測. (1980)
- ※ 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果 — 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 昭和53, 54年度 特別研究報告. (1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- ※ 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅲ) — 霞ヶ浦 (西浦) の湖流 — 昭和53, 54年度.
(1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅳ) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅴ) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅵ) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅶ) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅷ) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅸ) — [*Microcystis*] (藍藻類) の増殖特性 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅹ) — 藻類培養試験法による A G P の測定 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 (Ⅺ) — 研究総括 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告. (1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
— 第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthoclaadiinae 各種の記載と, その分布の下水汚染度との関係について —
— 第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載 —)
- ※ 第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和55年度 特別研究報告. (1981)
- 第 32 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究1) — 昭和54年度 特別研究報告. (1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 大気運動と大気拡散過程のシミュレーション — 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究. (1982)
- 第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究 — 昭和55, 56年度 特別研究報告. (1982)
- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究. (1982)
- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
(環境標準試料「池底質」の調製, 分析及び保証値)
- 第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和56年度 特別研究報告. (1982)

- 第 40 号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和56年
別研究報告。(1983)
- 第 41 号 土壤環境の遠隔計測と評価に関する統計学的研究。(1983)
- ※ 第 42 号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究。(1983)
- ※ 第 43 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with
description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream
in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
— 第 5 報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する 6 月の調査成績とユスリカ亜科に属す
る 15 新種等の記録 —
— 第 6 報 多摩本流より 6 月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について —
— 第 7 報 多摩本流より 3 月に採集されたユスリカ科の各種について —)
- 第 44 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中におけ
る光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) — 昭和54年度 特別研究中間報告。
(1983)
- 第 45 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭
和53~55年度 特別研究報告。(1983)
- 第 46 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭
和54, 55年度 特別研究報告 第 1 分冊。(1983)
- 第 47 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭
和54, 55年度 特別研究報告 第 2 分冊。(1983)
- 第 48 号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析。(1983)
- 第 49 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 50 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (I) — 霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価 — 昭和
55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 51 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (II) — 霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子
— 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 52 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (III) — 霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した
富栄養化防止手法の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 53 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (IV) — 霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化
と富栄養化 — 昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 54 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (V) — 霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化 — 昭和
55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 55 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VI) — 富栄養化防止対策 — 昭和55~57年度 特
別研究報告。(1984)
- 第 56 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VII) — 湯ノ湖における富栄養化とその防止対策 —
昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第 57 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VIII) — 総括報告 — 昭和55~57年度 特別研究報
告。(1984)
- 第 58 号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究 — 昭和55~57年度 特別研究総
合報告。(1984)

- 第 59 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学スモッグチャンバーによる
オゾン生成機構の研究 — 大気における有機化合物の光酸化反応機構の研究 — 昭和55~57
年度 特別研究報告 (第1分冊). (1984)
- 第 60 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学エアロゾル生成機構の研究
— 昭和55~57年度 特別研究報告 (第2分冊). (1984)
- 第 61 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気における光化学二次汚
染物質生成機構の研究 (フィールド研究1) — 昭和55~57年度 特別研究報告 (第3分冊).
(1984)
- 第 62 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究 — 昭和56~58年度 特別研
究中間報告. (1984)
- 第 63 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和56年度 特別研究報告.
(1984)
- 第 64 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合報告. (1984)
- 第 65 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第1分冊)
- 第 66 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第2分冊)
- 第 67 号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合
報告. (1984)
- 第 68 号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究 — 昭和56~57年度 特別研究総合報告. (1984)
- 第 69 号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究. (1984)
- 第 70 号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes
in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
— 第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究 —
— 第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的, 形態学的研究 —)
- ※ 第 71 号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析. (1984)
- 第 72 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究. 環境大気における光化学二次汚染物
質生成機構の研究 (フィールド研究2) — 昭和55~57年度 特別研究報告 (第4分冊). (1985)
- 第 73 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 昭和55~57年度 特別研究総合報告.
(1985)
- 第 74 号 都市域及びその周辺に自然環境に係る環境指標の開発に関する研究. 環境指標—その考え方と
作成方法—昭和59年度 特別研究報告. (1984)
- 第 75 号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)
- 第 76 号 Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第 77 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和58年度 特別研究報告. (1985)
- 第 78 号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明. (1985)
- 第 79 号 Studies on the method for long term environmental monitoring — Research report 1980-1982.
(1985)
(環境汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)

- 第 80 号 海域における赤潮発生のモデル化に関する研究 — 昭和57/58年度 特別研究報告. (1985)
- 第 81 号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究 — 地方公共団体の制度運用を中心として. (1985)
- 第 82 号 植物の大気環境浄化機能に関する研究 — 昭和57~58年度 特別研究報告. (1985)
- 第 83 号 *Studies on chironomid midges of some lakes in Japan.* (1985)
(日本の湖に発生するユスリカ類の研究)

※ 残部なし

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

No. 1* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1976. (1977)

No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- ※ No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※ No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- ※ No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
 - Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
 - Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No.14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※ No.15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1980)
- No.16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※ No.17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- ※ No.19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)

- No.21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of algal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of researches – 1978-1979. (1981)
- No.28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)
- No.29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
 Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
 Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※ No.30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1979-1980. (1982)
- No.31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1980. (1981)
- No.32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). (1982)
- No.33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Simulation of atmospheric motions and diffusion processes – Progress report in 1980. (1982)
- No.34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1980. (1982)
- No.35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No.36* Studies on the method for long term environmental monitoring – Progress report in 1980-1981. (1982)
- No.37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy – The evaluation laboratory of Man-environment Systems. (1982)
- No.38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
- No.39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1981. (1983)
- No.40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1981. (1983)
- No.41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical condition of soil. (1983)
- ※ No.42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics of mud transportation. (1983)
- ※ No.43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)

Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June, with description of 15 new species.

Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.

Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.

- No.44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No.45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Outlines of special research project – 1978-1980. (1983)
- No.46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 1. (1983)
- No.47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 2. (1983)
- No.48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No.49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental pollution – Research report in 1982. (1984)
- No.50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Estimation of input loading of Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – The function of the ecosystem and the importance of sediment in national cycle in Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacea in Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Measures for eutrophication control. – 1980-1982. (1984)
- No.56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Eutrophication in Lake Yunoko. – 1980-1982. (1984)
- No.57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Summary of researches. – 1980-1982. (1984)
- No.58* Studies on the method for long term environmental monitoring – Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No.59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber – Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds – Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No.60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Formation mechanisms of photochemical aerosol – Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No.61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1) – Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)
- No.62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems – Progress report in 1980-1983. (1984)

- No.63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1981. (1984)
- No.64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Final report in 1979-1981. (1984)
- No.65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 1. (1984)
- No.66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 2. (1984)
- No.67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques – Project research report in 1979-1981. (1984)
- No.68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil – Research report in 1981-1982. (1984)
- No.69* Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji – Basic research report. (1984)
- No.70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park – Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park. – Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※ No.71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No.72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. —Research report in 1980-1982. (1985)
- No.73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Final report in 1980-1982. (1985)
- No.74* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality. Environmental indices-basic notion formation—Research report 1984. (1984)
- No.75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No.76 Study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- No.77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution. (1985)
- No.78* Study on citizens' role in conserving the living environment. (1985)
- No.79 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report 1980-1982. (1985)
- No.80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea—Research report 1982-1983. (1985)
- No.81* A study on effects of implementing environmental impact assessment procedure—With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- No.82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Research report in 1982-1983. (1985)
- No.83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)

* in Japanese

※ out of stock

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

No. 80

国立公害研究所研究報告 第80号

(R-80-'85)

昭和60年3月15日発行

編集 国立公害研究所編集委員会

発行 環境庁 国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 勝美印刷株式会社

文京区小石川1-3-7

Published by the National Institute for Environmental Studies

Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

March 1985