

(10) 海域における赤潮生物生産能力の評価

広島大学工学部 岡 務
" 寺 西 靖 治
国立公害研究所 矢 木 修 身
" 須 藤 隆 一

1. はじめに

瀬戸内海を始めとしてわが国沿岸域で多発する赤潮は、大きな社会問題となっているが、その発生機構については今なお不明な部分が多く、したがって有効な対策が立てにくいのが現状である。赤潮生物の多くは窒素・リンなどの栄養物質とともに鉄・ビタミンなど微量の増殖刺激物質を要求し、それらが発生への引き金的な役割を果たしていることが指摘されている。それゆえ、赤潮の発生を予測あるいは制御するためには、窒素・リン濃度だけではなく、増殖刺激物質にも着目して、海水のもつ赤潮生物生産能力を正しく評価する必要がある。藻類培養試験法は、試水に含まれる種々の栄養物質を反映した潜在的な藻類生産能力(Algal Growth Potential, AGP)の測定を目的のひとつとしており、富栄養化の評価の一手法として最近よく用いられるようになった。これまでに、湖沼や河川などの自然水のAGPならびに都市下水および処理水のAGPが数多く報告されているが、多くの場合は、Selenastrum や Chlorella など比較的培養の容易な淡水性の藻類を用いて測定したものであり、海水のAGPを測定した報告は少ない。現在、海域で問題となっている藻類はHornellia および Perdinium などの鞭毛藻であり、赤潮発生の予測および制御を行うためにはこれら問題となっている藻類でのAGP測定が必要となってくる。しかしながら、これらの鞭毛藻は一般に培養が困難とされており、鞭毛藻を用いた培養試験法も確立されていない。そこで、本研究では、Hornellia sp., Heterosigma sp. の2種の赤潮鞭毛藻と珪藻である Skeletonema costatum を用いた藻類培養試験法の確立ならびに海域および都市下水のAGP測定を実施したので、その結果について報告する。

2. 実験方法

(1) 供試藻類

培養試験には、播磨灘赤潮海水から分離した Hornellia sp. ならびに東京湾海水から分離した Heterosigma sp., Skeletonema costatum を用いた。保存培養には表-1に示すS-5培地を用い、培養試験の前培養には栄養塩の持ち込みの影響を小さくするためにS-5培地中の窒素、リンをそれぞれ1.0mg-N/l, 0.1mg-P/lとしたS-11培地を用いた。

(2) 培養条件

AGPの測定を目的とした培養試験は、供試藻類の増殖に最適な条件下で行う必要がある。そこで、3種の赤潮生物に対する温度および照度の影響について検討を行った。照度は500~15000 lux, 温度は10~30℃の条件下で実施した。さらに、振とうの効果ならびに表-2に示す人工海水培地を用いてのキレート物質の添加効果についても検討を加えた。

(3) 試料

培養試験に用いた海水は、茨城県大洗、播磨灘および広島湾から採取したものである。試水の前処理として、1.2 μのメンブレンフィルターによって汙過処理を行った場合(汙過法)とオートクレーブ(120℃, 15分間)による熱分解後、汉過処理をした場合(熱分解法)について実験を行った。

(4) 培養試験

Table 1		
Composition of S-5 Medium		
Reagent	Amount	
NaNO ₃	100	mg
K ₂ HPO ₄	10	mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	10	mg
FeCl ₃	1	mg
Thiamine-HCl	0.2	mg
Biotin	0.1	μg
Vitamin B ₁₂	0.1	μg
Sea water	750	ml
Deionized water	250	ml

培養試験は、藻類培養試験法 (Algal Assay Procedure)

に準じて行った。すなわち、S-11培地を用いた赤潮生物の前培養液をオートクレーブ滅菌した人工海水によって3倍に希釈し、Hornellia sp.の場合は、1000rpmで1分間、Heterosigma sp.の場合は4000rpmで4分間それぞれ遠沈した後、上澄み液を捨て残った濃縮液を人工海水によって5倍程度に希釈したものを植種液とした。S. costatumの場合は3000rpmで10分間遠沈し、上澄み液を捨てた濃縮液を人工海水によって元の量に希釈した後、遠沈を繰り返す。3回の遠沈後、5倍程度に希釈した懸濁液を植種液として用いた。次に、前処理をした海水100mlを300mlの3角フラスコに入れ、上述した赤潮生物の懸濁液を、初期濃度がHornellia sp., Heterosigma sp.の場合はそれぞれ、20 cells/ml, 150 cells/ml, S. costatumの場合は0.1^{mg}/lとなるように接種した。培養は20℃, 4000lux, 静置培養で行った。赤潮生物の増殖量は、コルターカウンタを用いて細胞数と平均細胞容積を測定し、これらの値より乾燥重量として求めた。

同時に海水への栄養塩添加実験を行ったが、添加した栄養塩は次のとおりである。窒素： $\text{NO}_3\text{-N}$ 1^{mg}/l, リン： $\text{PO}_4\text{-P}$ 0.1^{mg}/l, 鉄： $\text{FeCl}_3\text{-Fe}$ 1^{mg}/l
ビタミン：チアミン塩酸塩 0.2^{mg}/l, ビオチン 0.1^{μg}/l, ビタミンB₁₂, 0.1^{μg}/lである。

3. 実験結果

(1) 赤潮生物の増殖特性

S-11培地を用いて、20℃, 4000luxの条件下で静置培養した場合の増殖曲線を図-1に示した。Hornellia sp., Heterosigma sp., Skeletonema. costatumの比増殖速度(μ)はそれぞれ、0.77, 0.63, 1.16 day⁻¹でS. costatumが最も高い μ を示した。増殖量が最大になるのに、Hornellia sp., Heterosigma sp., S. costatumはそれぞれ、3週間、2週間、10日間を要した。3種の中でHornellia sp.が最も高い最大増殖量を示した。

(2) 培養条件の検討

20℃でS-5培地を用いて、500, 1000, 2000, 4000, 8000, 15000 luxと照度を変えて培養した場合の最大増殖量を図-2に示した。Hornellia sp.は500~8000luxの範囲で高い最大増殖量が得られた。しかしながら4000luxの場合には3週間で増殖量が最大となったのに対し、500~1000luxの低照度の場合には最大増殖量を得るのに40~50日間の長時間の培養が必要であった。Heterosigma sp.の場合500~1000luxの低照度における最大増殖量は低く、2000~8000luxで高い最大増殖量が得られた。S. costatumの場合、500~8000luxと幅広い範囲で高い増殖量を示した。いずれの藻類も15000luxでは最大増殖量が著しく低下したが、これは強光阻害によるものと考えられる。

3種の赤潮生物の最大増殖量に及ぼす温度の影響について、検討した結果を図-3に示した。いずれの藻類も、20℃で増殖量が最大となり、30℃では増殖量がやや減少し、14℃以下では増殖量が著しく低下した。

Table 2. Composition of Artificial Sea Water Medium

Reagent	Amount
NaNO_3	1.0 mg-N/l
K_2HPO_4	0.1 mg-P/l
FeCl_3	1.0 mg/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg/l
Thiamine-HCl	0.2 mg/l
Biotin	0.1 μg/l
Vitamin B ₁₂	0.1 μg/l
trace metals*	1 ml
ASW**	750 ml
Deionized water	250 ml

*trace metals : $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.208g, H_3BO_3 92.8mg
 ZnCl_2 16mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.714mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0107mg
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.63mg, to H_2O 500 ml

**ASW : NaCl 23.48g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.61g, Na_2SO_4 3.92g
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.47g, KCl 0.66g, NaHCO_3 0.19g, KBr 0.10g
 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04g, H_3BO_3 0.04g, to H_2O 1000 ml

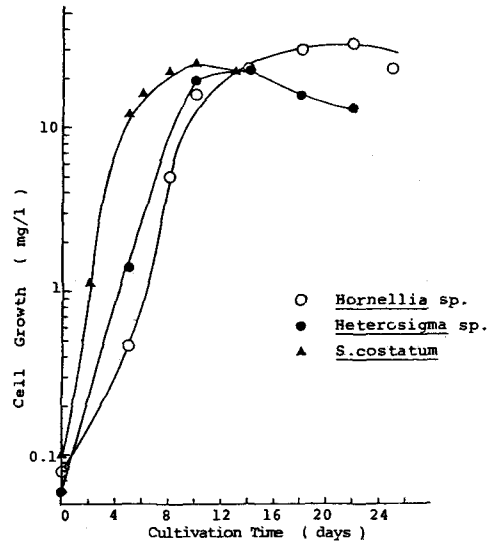


Fig.1 Growth of red tide organisms in S-11 medium

次に、最大増殖量に及ぼす振とうの効果について検討を加えた。1分間に70および90回転の条件で振とう培養を実施し、静置培養と比較を行った。その結果を図-4に示した。Heterosigma sp.の場合は振とう培養と静置培養とほぼ等しい最大増殖量が得られた

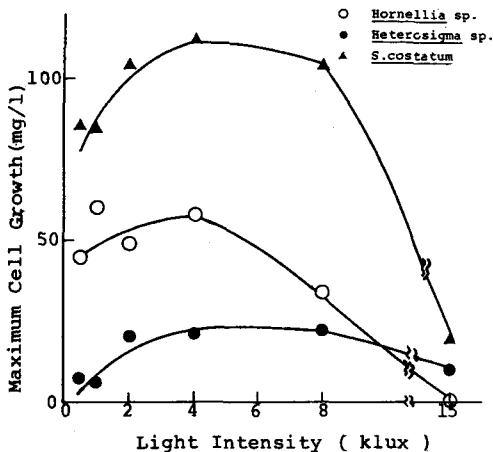


Fig.2 Effect of light intensity on maximum cell growth of red tide organisms.

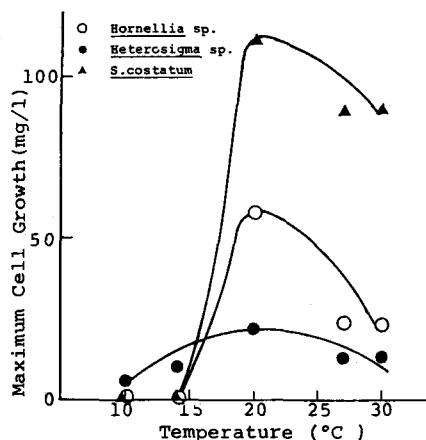


Fig.3 Effect of temperature on maximum cell growth of red tide organisms.

が、Hornellia sp.とS.costatumの場合は、振とうして培養するとフロックの形成が認められ、また、最大増殖量もかなり低いものであった。培養試験は、供試藻類を最適条件下で培養することが好ましいと考えられる。したがって、以上の結果を考え、照度4000Lux、温度20℃、静置培養で培養試験を実施することとした。

(8) キレート物質および微量金属の最大増殖量に及ぼす影響

赤潮生物の中には、その増殖に窒素、リンなどの栄養塩以外に微量の増殖刺激物質を要求するものが知られている。刺激物質としては、NTA, EDTAなどのキレート物質、微量金属類およびTrisなどが知られているが、ここでは、NTA, Trisおよび微量金属の増殖に及ぼす効果について検討した。培地としては、刺激物質の混入を防ぐため、人工海水培地を用いた。添加量はNTA 70mg/l, Tris 1g/lであり、微量金属は人工海水培地の微量金属の10倍量を添加した。これらを添加して培養した結果を図-5に示した。Heterosigma sp., S.costatumは人工海水培地で良好な増殖が認められたのに対し、Hornellia sp.は、人工海水培地では増殖が認められなかった。Hornellia sp.はTrisを添加することにより、増殖が可能となった。しかしながら、Trisの添加は、S.costatumに対してはやや阻害的に働いた。微量金属の添加は、いずれの藻類に対しても特別の影響を与えなかったことから、微量金属量は人工海水培地中の量で充分であると思われる。

(4) 培養試験結果

大洗の海水を用いてHornellia sp.による培養試験を行った結果を図-6に示した。大洗海水のろ過法に

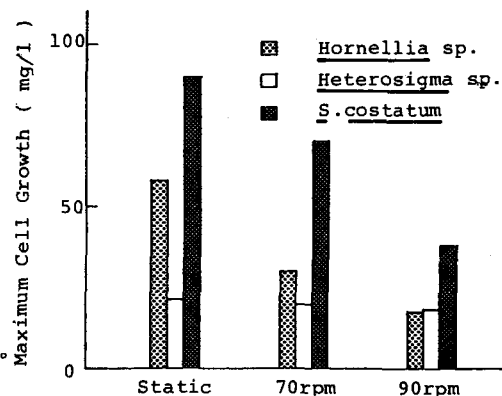


Fig.4 Effect of shaking on maximum cell growth

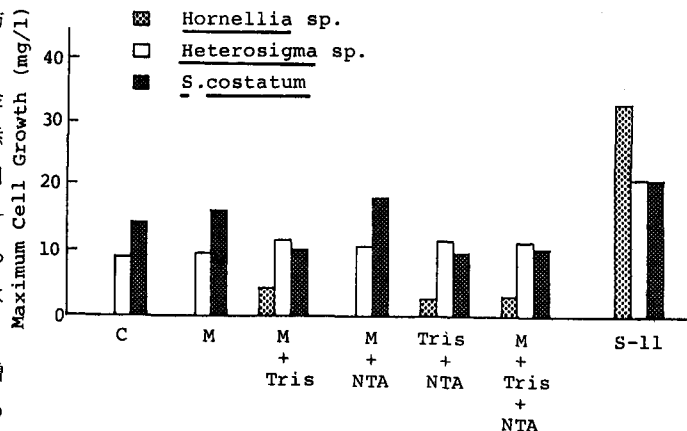


Fig.5 Effect of NTA, Tris and trace metals on maximum cell growth. C:Control M:Trace metals

よるAGPは5mg/lであった。また、栄養塩の添加実験において、リン添加により無添加の場合の約3倍の最大増殖量が得られたことから、大洗の海水はリン制限であると判定された。さらに、窒素とリンを同時に添加した場合その最大増殖量は約30mg/lと非常に高い値となり、リンに次いで窒素が制限栄養塩となっていると言える。鉄およびビタミンの効果は認められなかった。

図-7は大洗の海水を用いた *Heterosigma* sp. の培養試験結果を示したものである。*Heterosigma* sp. による戸過法のAGPは3.3mg/lと *Hornellia* sp. に比べてやや低い値を示した。*Hornellia* sp. の場合と同様に、リン添加により最大増殖量が増大したことから、この海水はリン制限になっているといえる。また、窒素・リン・鉄添加および窒素・リン・ビタミン添加を行った場合、窒素・リンのみを添加した場合の約2倍の最大増殖量が得られ、鉄とビタミンによる二次的な増殖促進効果が認められた。熱分解法では、*Hornellia* の場合と同様に戸過法とほぼ等しい結果が得られ、オートクレーブの効果は認められなかった。

図-8に広島湾の海水を用いて行った *Hornellia* sp. の培養試験結果を示した。*Hornellia* sp. による戸過法でのAGPは表層(0m)で7.6mg/l、中層(6m)で10.3mg/l、下層(11m)で8.9mg/lであった。表層水にリンを添加した場合、その最大増殖量は無添加の場合の2倍以上になり、リン制限であると推定された。熱分解法の場合は、表層水、下層水ともに戸過法とほぼ同じAGPを示したが、中層水ではやや低いAGPを示した。なお熱分解法では、窒素およびリンの添加による増殖量の増加は上層水のリン添加を除いてほとんど認められなかった。

播磨灘の海水を用いて行った *Hornellia* sp. ならびに *Heterosigma* sp. の培養試験結果を図-9、図-10に示した。戸過法の場合 *Hornellia* sp. 289mg/l *Heterosigma* sp. で113mg/lと非常に高いAGPが得られた。また、*Hornellia* sp.、*Heterosigma* sp. とともに窒素、

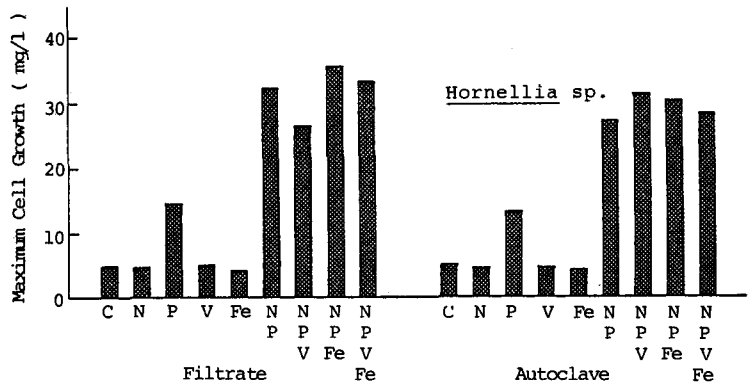


Fig.6 Effect of nutrient additions as compared with control samples on maximum cell growth of *Hornellia* sp. in filtrated and autoclaved-filtrated Charai samples.

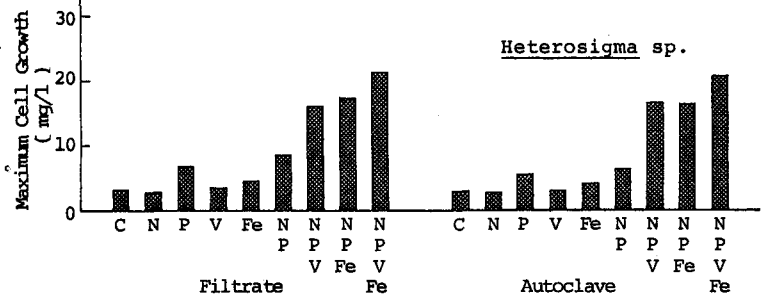
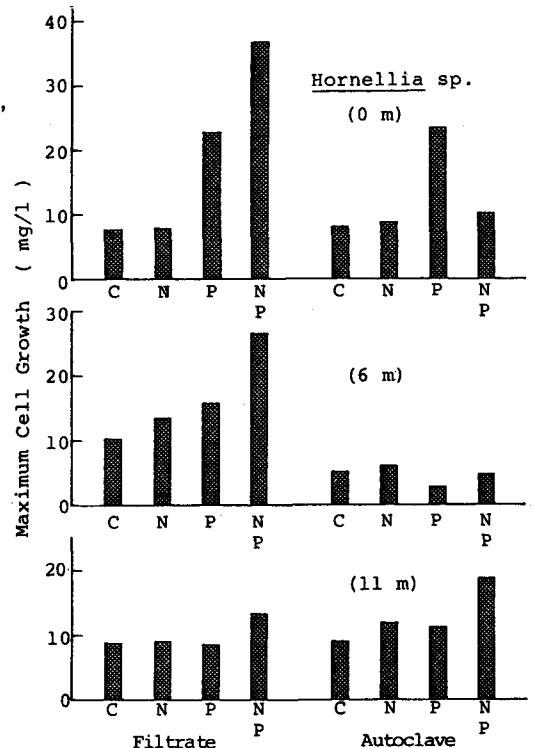


Fig.7 Effect of nutrient additions as compared with control samples on maximum cell growth of *Heterosigma* sp. in filtrated and autoclaved-filtrated Charai samples.



Effect of nutrient additions as compared with control samples on maximum cell growth of *Hornellia* sp. in filtrated and autoclaved-filtrated Hiroshima Bay samples.

リンを添加しても、あまり増殖量が増大しなかったことから、窒素、リン以外の物質が制限栄養塩になっている可能性もあると考えられる。一方、熱分解法によるAGPは、*Hornellia* sp. で 10.9 mg/l 、*Heterosigma* sp. で 4.3 mg/l と濾過法に比べ著しく低く、窒素、リンの添加による増殖量の増加もほとんど認められなかった。

4. 考 察

赤潮生物を用いる培養試験に関しては、岡市が *Euterpia* sp., *Heterosigma inlandica* を用いて各種工場廃水の増殖刺激効果を調べた報告がある¹⁾。また、海水のAGPの測定については林らによる *Gymnodinium* sp., *Hemietreptia antiqua*, *Chlamydomonas* sp., *Skeletonema* sp., *Navicula* sp. を用いた広島湾の報告²⁾、あるいは堀江らによる *Skeletonema costatum*, *Heterosigma inlandica*, *Dunaliella tertiolecta* を用いた東京湾のAGP分布についての報告がある程度である。藻類培養試験法によるAGPは、海水が藻類をどの程度生産するかの潜在力を示すものであるから、窒素、リンの化学的水質分析と比較し、再現性にやや欠ける欠点はあるが、試水の全体的な栄養状態を評価することが可能であり、赤潮発生の予測や制御の一手法として有効なものと考えられる。

AGPを測定する際にまず問題になるのは如何なる藻類種を用いるかである。MAAP (Marine Algal Assay Procedure)³⁾では *Dunaliella tertiolecta* と *Thalassiosira pseudonana* を標準種として推奨している。しかしながら 一般には用いる藻類が対象とする水域で問題となっているかどうか、評価の上で重要なことになってくると考えられる。今回用いた赤潮生物は、*Hornellia* sp., *Heterosigma* sp., *S. costatum* の3種であるが、*Hornellia* sp. は養殖ハマチへの死の原因種として、現在わが国で最も問題となっている赤潮生物である。また、*Heterosigma* も瀬戸内海を始めとして各地で発生が認められている。*S. costatum* はわが国沿岸域における最も一般的な珪藻である。

これら赤潮生物の増殖特性に関してはあまり明らかにされておらず、まずこれらの赤潮生物を用いるAGPの測定法を確立することを目的として実験を行った。*Hornellia* sp., *Heterosigma* sp., *S. costatum* のいずれも、S-11培地で前培養を行い、次いで20℃、4000 lux、静置培養の条件で、AGPが再現性よく測定できることが判明した。これまでに、赤潮生物を用いた培養試験によりAGPが測定されているが、いずれも増殖量が単位体積当りの細胞数あるいは細胞容量で表わされているため、藻種間の比較が困難である。細胞の大きさは藻類によってかなり異なり、同じ藻類であっても培養時期により細胞の容量の変動が認められる。したがって、AGPの測定の場合、増殖量は乾燥重量として示すことが望ましいと思われる。本研究では藻類増殖量を、コールターカウンタにより細胞数と平均細胞容積を求め、得られた細胞容積全量を乾燥重量に換算する方法を採用した。乾燥重量と全細胞容積量との相関は非常に高く、*Hornellia* sp. *Heterosigma* sp., *S. costatum* でそれぞれ、0.96, 0.94, 0.97 が得られた。この関係から、対数増殖期における細胞1個当りの乾燥重量を求めると、*Hornellia* sp. は $6.5 \times 10^{-6} \text{ mg/cell}$ 、*Heterosigma* sp. は $2.5 \times 10^{-7} \text{ mg/cell}$ であった。

今回の実験に用いた海水中の窒素およびリン含量と培養試験によって得られたAGPを表-3に示した。瀬戸内海という閉鎖性海域にある広島湾および播磨灘のAGPは太平洋沿岸である大洗の海水に比べてかな

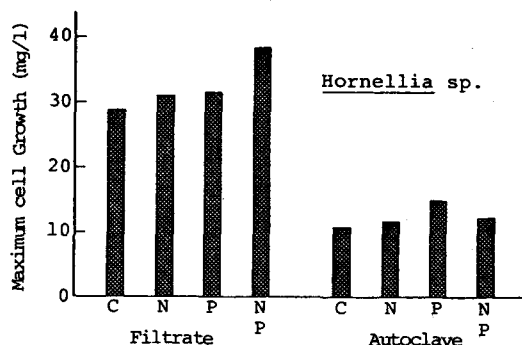


Fig.9 Effect of nutrient additions as compared with control samples on maximum cell growth of *Hornellia* sp. in filtrated and autoclaved-filtrated Harima-nada samples.

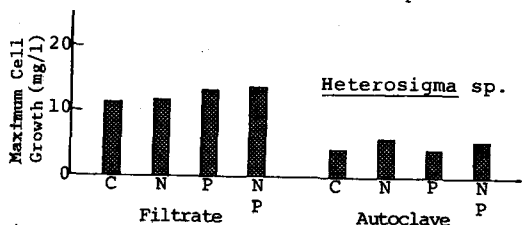


Fig.10 Effect of nutrient additions as compared with control samples on maximum cell growth of *Heterosigma* sp. in filtrated and autoclaved-filtrated Harima-nada samples.

り高く、とくに戸過法による播磨
 灘の海水のAGPはHornellia
 sp.の場合で大洗の約6倍、Heterosigma
 sp.の場合では3倍以上
 の値を示している。一方、海水
 中の栄養塩濃度は、播磨灘でNH₄
 -N 0.40mg/l, NO₂-N + NO₃-Nが
 0.26mg/l, PO₄-Pが0.09mg/lと
 大洗海水に比べ著しく高い値を示
 した。また、大洗の海水に窒素と
 リンを添加すると藻類の増殖量が
 著しく増大することから、AGP
 は、窒素およびリン含量により大
 きく左右されるものと考えられる。

海域への窒素およびリンの負荷
 源としては、工場排水、生活排水
 畜産排水、農業排水などが考えら
 れるが、この中で最近とくに問題
 となっている生活排水のAGPに

ついて検討を加えた。その結果を表-3に示した。生活排水のAGPの測定方法は以下のとおりである。す
 なわち、人工海水に試水を10%添加して、これに赤潮生物を接種し、培養して得られた最大増殖量を10
 倍し、AGPを算出した。Hornellia sp., Heterosigma sp., S. costatum を用いた生下水のAGPはそれ
 ぞれ、133~198mg/l, 132~159mg/l, 136mg/l, また2次処理水のAGPはそれぞれ、85~340mg/
 l, 30~78mg/l, 109~135mg/lと高い値を示し、都市下水および2次処理水がこれらの赤潮生物の増殖に
 大きな影響を与えていることが判明した。これに対して、K処理場の2次処理水を硫酸バン士、カルシウム
 塩、鉄塩および晶析法により脱リン処理した水のAGPを、表-3に示したが、脱リン処理水のAGPは4
 mg/l以下に低下し、大洗の海水のAGPよりも低い値となった。この結果から、脱リン処理は2次処理水
 のもつ赤潮生物生産能力の低下に大変有効であると考えられる。広島湾、播磨灘の海水は赤潮生物の増殖に
 対して、リン制限となっていることが本研究で認められており、陸部からのリンの供給がこれらの海域にお
 ける赤潮発生の危険性を高めることは容易に予測されることである。したがって、都市下水の脱リン処理は
 赤潮現象の制御に対して有効な手段となり得る可能性は大きいと言えよう。

<引用文献>

- (1) 岡市友利 環境技術 Vol.5.No9 770~777 (1976)
- (2) 林光則他 水質汚濁研究 Vol.1.No3 199~208 (1978)
- (3) 堀江毅他 第14回水質汚濁研究会講演集 79~80 (1980)
- (4) EPA Marine Algal Assay Procedure Bottle Test EPA-660/3-75-034 (1975)

Table 3 AGP and Nutrient Concentration of Sea Water and Wastewater

Sample		N-compound		P-compound		A G P		
		NH ₄ -N	NO ₂ -N NO ₃ -N	T-P	PO ₄ -P	Hor.	Het.	Ske.
Sea water								
OKARAI	F	0.00	0.18	-	0.013	5	3	-
	A	0.00	0.18	-	0.016	5	3	-
HARIMA-NADA	F	0.40	0.26	-	0.090	29	11	-
	A	0.42	0.03	-	0.108	11	4	-
HIROSHIMA-BAY								
depth : 0 m	F	0.43	0.02	-	0.022	8	-	-
	A	0.42	0.03	-	0.024	8	-	-
6 m	F	0.13	0.02	-	0.032	10	-	-
	A	0.15	0.02	-	0.037	5	-	-
11 m	F	0.07	0.02	-	0.033	9	-	-
	A	0.08	0.00	-	0.038	9	-	-
Wastewater								
Raw sewage								
O plant	F	18.10	0.09	1.042	0.880	133	144	-
	A	14.50	0.10	1.163	0.909	198	132	-
K plant*	F	7.44	0.36	2.481	2.090	-	159	136
2nd effluent								
O plant	F	19.50	0.38	0.421	0.353	85	33	-
	A	20.00	0.59	0.493	0.431	124	30	-
K plant*	F	2.67	0.06	2.504	2.418	107	54	109
K plant**	F	0.39	6.57	2.254	1.824	340	78	135
3rd effluent*** (F removed)								
(1)	F	0.43	6.39	0.021	0.010	1	1	3
(2)	F	0.36	6.39	0.031	0.009	1	1	3
(3)	F	0.46	6.30	0.039	0.012	1	1	4
(4)	F	0.37	6.56	0.034	0.008	1	1	2

* Jun. 16 1980, ** Jul. 10 1980.

(mg/l)

*** (1): Al₂(SO₄)₃·18H₂O (2): Ca(OH)₂, (3): FeCl₃·6H₂O,
 (4): Crystallization method.

F: Filtrated sample, A: Autoclaved-filtrated sample.