

30

助成番号 0030

大量繁殖するアオサ類の繁殖特性と環境修復に関する研究

助成研究者：能登谷 正浩（東京水産大学 水産学部資源育成学科）

本研究は日本の沿岸域で大量繁殖が知られるアオサ類の種とその繁殖に係わる特性を把握するため、横浜、高知、長崎、鹿児島各沿岸域から得られた浮遊アオサ藻体を材料として形態的特徴を把握し、種の同定と室内培養によって温度、塩分、栄養塩濃度が生長におよぼす影響と栄養塩の吸収をしらべ、有効利用への方向性を考察することを目的とした。その結果、いずれの藻体も付着器を持たないことや、まったく成熟が認められなかったことから、栄養繁殖し、稔性が低い特性を持つものと考えられた。また、色彩や葉状体縁辺の鋸歯の有無や細胞の形、サイズ、細胞内に認められるピレノイドの数、藻体の厚さなどの形態的な違いから概ね3種に分けられた。横浜産藻体はアナアオサ *Ulva pertusa* に、高知産のそれは *U. lactuca* に、長崎および鹿児島産藻体はいずれも *U. scandinavica* に近い種と見なされたが、付着器や成熟細胞が観察ができなかったことや各量的な形質は、それぞれに重複が認められること、また培養条件によってそれらは大きく変化したことなどから、明確に種を同定するには到らなかった。したがって、今後、種の同定には分子情報と形態的変異の幅などの側面から精査する必要があると考えられた。

各地の葉状体の生長におよぼす各培養条件下の影響から、いずれも5℃から30℃の広い温度範囲で生育可能であったが、横浜および長崎産藻体は20℃下で、高知および鹿児島産藻体は25℃下で最も速く生長した。また、いずれの葉状体の細胞サイズも培養温度によって大きく変動することが分かった。海水濃度の影響は、いずれの葉状体も真水では生育できなかった。横浜および長崎産藻体は25-200%の下で、高知および鹿児島産藻体は50-200%下で生育可能であった。いずれの葉状体も50%から150%の広い海水濃度の範囲で比較的速い生長が認められた。栄養塩濃度の生長におよぼす影響は、いずれの種も栄養塩無添加から40倍濃度のGrund 改変培地添加までの広い濃度範囲でも生育できることが分かった。横浜、高知、長崎および鹿児島産藻体はそれぞれ4-20倍、0-10倍、8倍、1-8倍濃度下で高い生長率を示した。栄養塩の吸収におよぼす温度の影響は、いずれの藻体も15-25℃下で比較的高い窒素吸収率を示したが、中でも20℃下で最も高かった。また、リンの吸収は20℃下で横浜および鹿児島産藻体が、25℃下で高知、長崎産藻体が高い値を示した。窒素およびリンいずれも横浜産藻体が他の海域の藻体に比べ最も高率で吸収することが分かった。以上の結果から、いずれの藻体も比較的高い温度下で生育でき、また、広い塩分耐性を持ち、高栄養塩濃度下で生育できる特性が明らかになった。したがって、他の大型藻類には見られない塩分が大きく変化する沿岸や通常の沿岸に比べてかなり富栄養化した海域で、高温となる夏季でも生育可能であると推察されることから、優れた水質浄化能力を備えた大型藻類として有効利用の可能性が考えられた。

今後、種の判別を明確にし、アオサ類を用いた水質浄化の具体的な技術や装置の開発、さらに、繁殖藻体の有効利用の観点から、藻体の持つ有用成分に関する研究が必要と考えられる。

30

助成番号 0030

大量繁殖するアオサ類の繁殖特性と環境修復に関する研究

助成研究者：能登谷 正浩 (東京水産大学 水産学部資源育成学科)

1. 緒言

緑藻、主にアオサ類が浅海沿岸域で大量繁殖することを「赤潮」に対比させ「グリーン・タイド (Green Tides)」と呼ばれている。近年、世界各地の沿岸すなわち東南アジア、ヨーロッパ、アメリカ、オーストラリアなどの世界各地の沿岸でこの現象が認められ、沿岸域に集積したアオサ類葉状体の腐敗による悪臭と沿岸の生態系や環境に悪影響をおよぼしていることが報告されている (Fletcher 1996)。グリーン・タイドに係わるアオサ藻体については、日本では初期には Arasaki (1984) が外来種の日本沿岸での繁殖や右田 (1985) が長崎大村湾産でアナアオサの不稔性変異体として報告した浮遊藻体などの報告があった。しかし、1990年頃から各地沿岸で目立ちだし、地方公共団体がその対策に苦慮し、焼却処分をするなど社会問題となってきたが、それぞれの沿岸に生育する種には、これまで日本で報告されている種と異なり、栄養生殖を主体として急速に繁殖する種で、地域によって異なる数種が繁殖しているものと推察されてきた (能登谷 1999)。このような背景から繁殖種の分類学的検討がなされてきてはいるが、日本ではまだ詳細な検討はない。また、グリーン・タイドの発生原因は、陸上から農作物への肥料が河川を通して流出することや沿岸浅海域における水産動物の養殖残餌や排出物などによって沿岸域が富栄養化することが考えられている。さらに、農薬や化学物質によってアオサ藻類が変異しているのではないかと考えられている。しかし、繁殖力の旺盛なこれら浮遊栄養繁殖するアオサ類の生理的特徴は他の種に比べて栄養塩吸収速度が早いと考えられ、沿岸水の浄化や栄養塩濃度低減など環境修復の観点から、水産動物養殖場周辺海域などでの有効利用も考えられている。

本研究では、日本の沿岸域で、特に大量繁殖が認められる横浜、高知、長崎、鹿児島各沿岸域から浮遊アオサ藻体を採取し、それらの藻体の形態を観察し、種の判別を試みるとともに温度、塩分、栄養塩濃度が葉状体の生長におよぼす影響を調べ、さらに栄養塩吸収能を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2. 1 材料

横浜市海公園、高知市、長崎県大村湾、鹿児島市の各沿岸から浮遊アオサ藻体を採集し、それぞれの葉状体は数時間以内に東京水産大学の当教室に運んだ後、藻体表面を丁寧に洗浄した。その後、温度 20°C、光量 $60 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光周期 14 時間明期、10 時間暗期 (14L:10D) の条件下で数時間から数週間の予備培養を行いながら、汚染された藻体の一部を取り除くことや表面に付着する狭雑物を筆またはペーパータオルなどでふき取るなどして、清浄な葉状体を得て保存培養した。種々条件下での実験には、保存培養藻体の清浄な葉状体から

直径 1.4 cm のコルク・ホラーを用いてディスク状葉状体を摘出して培養した。

2. 2 形態観察

天然から採集されたアオサ藻体は色彩を観察するとともに顕微鏡下で葉状体縁辺の鋸歯の有無、藻体の厚さ、表面および断面からの細胞の外形と大きさ、ピレノイドの数などを測定し、葉緑体の細胞内の配置などを観察し、写真を撮影した。

2. 3 培養条件

温度、塩分、栄養塩濃度が葉状体の生長におよぼす影響を知るため、それぞれ数段階の条件を設定した。温度は 5、10、15、20、25、30℃ の 6 段階を設定した。また、細胞の大きさおよび培養温度の影響を知るため、各温度下で葉片の培養終了後に、細胞の表面から縦、横を、さらに切断面から高さを測定した。海水濃度は人工海水 (ジャマリン S) を用いて 200% 濃度の海水を作った後、蒸留水を用いて 0、25、50、75、100、150、200% 濃度となるように調整した。このときの塩分はそれぞれ 0、8.4、16.9、25.2、33.7、50.6、67.4 であった。栄養塩濃度は Grund 改変培地の栄養塩類添加量を 1 として 0、1、4、8、10、20、40 倍添加濃度を調整した。いずれの培養条件下でも光量は $40 \mu \text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期 14L:10D の下で行い。培養液の栄養塩類の添加には Grund 改変培地の処方を用いた。また、葉片はそれぞれの条件下で通気培養し、4 日目ごとに換水し、同時に葉片の面積を測定して生長量を求めた。

2. 4 栄養塩吸収量の測定

培養液には Grund 改変培地を用いて、直径 1.4cm のディスク状葉片を 1000ml 容枝つきフラスコに 3 枚を入れ、温度 10、15、20、25、30℃ の 5 条件下で、光量は $80 \mu \text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光周期 14L:10D の下で 24 時間通気培養した。培養の開始前と終了後にそれぞれ培養液中の硝酸態窒素および溶存態全リンの濃度を TECHNICON Auto Analyzer II を用いて測定して吸収量を算出した。

3. 結果

3. 1 藻体の形態

各海域から得られた藻体はいずれも浮遊藻体で、付着器は認められなかった。採集直後の葉状体の色彩、葉状体縁辺部の鋸歯の有無、細胞の形、細胞内のピレノイドの数、藻体の厚さ、細胞のサイズは Table1 に示した。藻体の断面と表面の写真を Fig. 1 に示した。

横浜産藻体の色彩は暗緑色で 4 藻体の中では最も濃く、葉状体も厚かった。高知産藻体は明るい緑色であったが、葉状体の厚さは横浜産のそれとほぼ同程度であった。長崎および鹿児島産藻体はいずれも黄色が強く、藻体はやや薄く、裂けやすい特徴があった。藻体縁辺の鋸歯はいずれの藻体にも認められなかった。細胞の形は、横浜産藻体が断面からの観察では葉状体表面側にやや尖るが、他の 3 藻体では葉状体表面および内側は比較的平坦であった。細胞内に占める色素体の量は横浜産藻体では 4 藻体中最も多かった。また、他

の3藻体はいずれも葉緑体が葉状体表面に沿って比較的薄く配置するのが特徴的であった。細胞内のピレノイドの数は藻体によって異なり1個から4個まで認められたが、同一個体でも分裂直後と見られる小さな細胞では少なく、大きな細胞では多くなる傾向が見られた。高知産藻体では概ね1-2個と少なく、他の藻体は2-4個であった。葉状体の厚さは横浜および高知産では概ね90 μm で比較的厚く、長崎および鹿児島産は約70 μm で薄い傾向が認められた。細胞の大きさは葉状体の部位によって大きく変化し、葉状体の厚さと同様に横浜および高知産では概ね大きく、長崎および鹿児島産では小さい傾向が見られた。

3. 2 葉片の生長におよぼす温度、海水濃度、栄養塩濃度の影響

生長におよぼす温度の影響の結果はFig. 2に示した。

いずれの藻体も5 $^{\circ}\text{C}$ から30 $^{\circ}\text{C}$ の間で生育可能であった。5 $^{\circ}\text{C}$ および10 $^{\circ}\text{C}$ の低温下では横浜産を除く3藻体はほとんど生長が認められなかった。反対に30 $^{\circ}\text{C}$ の高温下では横浜産藻体はほとんど生長せず、他の3藻体ではやや生長が認められた。比較的速く生長した温度は、横浜および長崎産藻体は20 $^{\circ}\text{C}$ 下で、高知および鹿児島産藻体は25 $^{\circ}\text{C}$ 下であった。また、生長率は藻体によって大きく異なり、長崎産藻体が最も速く93%/day、次いで横浜産は35%/day、高知産21%/day、鹿児島産16%/dayと順に低くなった。

細胞の大きさにおよぼす温度の影響はFig. 3に示した。

培養温度によっていずれの種も細胞の大きさは長径および短径ともに変動するが、横浜および高知産では最大12-14 μm の大きな変動が認められたのに対し、長崎および鹿児島産では最大6-8 μm とその幅は小さかった。

生長におよぼす海水濃度の影響の結果はFig. 4に示した。

いずれの藻体も真水では生育できず1-4日以内には葉片の色彩が次第に薄れて枯死した。横浜および長崎産藻体は25-200%下で、高知および鹿児島産藻体は50-200%下で生育したが、葉片の生長の状況から、いずれの藻体も50-150%下で比較的速く生長した。また、最も高い生長率を示した条件は横浜および長崎産藻体は100%下であったのに対し、高知および鹿児島産藻体は75%下のやや低塩分下で速く生長した。

生長におよぼす栄養塩濃度の影響の結果はFig. 5に示した。

いずれの藻体も栄養塩無添加条件からかなり高濃度の40倍添加濃度の下でも生長した。特に、横浜と高知産藻体はそれぞれ4-20倍、0-10倍濃度下の広い範囲でほぼ同程度の高い生長率を示し、長崎産藻体は8倍濃度で、鹿児島産藻体は1-8倍濃度で高い生長率を示した。

3. 3 栄養塩吸収特性

栄養塩類の吸収の結果についてはFig. 6に硝酸態窒素の吸収、Fig. 7に溶存態全リンの吸収におよぼす温度の影響の結果を示した。

窒素の吸収はいずれの藻体も概ね15-25 $^{\circ}\text{C}$ 下で比較的高い吸収率を示したが、中でも20 $^{\circ}\text{C}$ 下で最も高い吸収率が見られた。20-30 $^{\circ}\text{C}$ 下で4藻体の吸収率を比較すると横浜産藻体

は最も高い値を示したが、他の3藻体はいずれもほぼ同程度であった。

リンの吸収は10-15℃下ではいずれの藻体も同程度の低い吸収率であったが、20℃下では横浜産藻体が最も高く、次いで鹿児島および高知産藻体となり、長崎産藻体は最も低い値であった。25-30℃下では、高知および鹿児島産藻体は比較的高い吸収率を保ったのに対し、横浜産藻体は低下した。長崎産藻体は25℃下で最も高い吸収量を示したものの他の藻体に比べて低く、15-30℃下では概ね1/2から2/3程度の低い吸収率であった。30℃下ではいずれの藻体も20-25℃下に比べると吸収量は低下するが、高知および鹿児島産藻体はあまり低下することなく高い吸収率を維持した。

4. 考察

今回材料として用いた藻体はいずれも付着器を持たないことや、保存培養および本培養実験期間中にはまったく成熟が認められなかったことから、これら4藻体いずれも栄養的に繁殖し、稔性が低い特性を持つものと考えられた。藻体の色彩は採取直後と室内培養後では、若干変化するものの長期間の保存培養後に、各藻体葉片を比較すると概ね特性は保持され、暗緑色、明緑色、黄緑色の3通りが判別された。

最近 Coat *et al.* (1998) や Dion *et al.* (1998) はフランス沿岸でグリーン・タイドの主要な藻体である浮遊生育するアオサを新種 *U. armonicana* として報告したが、今回観察されたいずれもの藻体も葉状体縁辺に生ずる鋸歯が認められなかったことから、*U. armonicana* には同定される藻体はなかった。

細胞の形、特に断面の形から、葉状体表面側にやや尖る種と平坦な種の2型がみとめられ、横浜産の藻体は他の3藻体と区別された。細胞の大きさや厚さについては生育温度によって大きく変化することが分り、生育環境によって変化する可能性が示唆された。また、アオサ類の種を決める形質として上記のほかにピレノイドの数も採用されているが、1-2個の高知産藻体を除く他の3種はいずれも2-4個で区別された。しかし、葉状体が比較的裂けやすい特徴は長崎および鹿児島産藻体に認められたが、他の2藻体は異なっていた。

以上これまでアオサ類の種の分類に用いられている主な形質や特徴を既存の報告と比較した結果、今回採集された試料の横浜産藻体はアナアオサ *Ulva pertusa* に、高知産のそれは *U. lactuca* に、他の長崎および鹿児島産藻体はいずれも *U. scandinavica* に近い種と見なされた。しかし、いずれも浮遊藻体であり、付着器や成熟細胞や遊走子についての観察ができなかったこと、また、上記にも述べたように観察された形質の中には、種によってそれぞれ重複が認められることや培養条件によって大きく変化させる形質が認められたことなどを考慮すると、種の同定を明確にすることはできなかった。したがって、今後、分子情報の違いと形態的変異の幅などを精査する必要があると考えられた。また、今回観察した藻体の形態観察の結果と著者(能登谷 1999)がこれまで報告した種では一部に異なる結果も認められている。したがって、海域によっては異なる数種がグリーン・タイドに関与している場合もあるものと推察された。

横浜産藻体以外は10℃下でほとんど生長は認められなかったこと、また、横浜産藻体は30℃下でほとんど生長しなかったが、他の3藻体はある程度の生長したことなどを考慮すると、いずれの藻体もそれぞれの生育温度環境に合った生長特性を示したものと推察される。

また、いずれの藻体も比較的広い塩分耐性を持っていたことから、塩分がかなり大きく変化する沿岸環境下でも生育可能と推察された。栄養塩濃度の影響に関しては、いずれの藻体も栄養塩無添加から Grund 培地の 40 倍濃度下までの広い範囲で枯死することなく生育し、概ね 4-20 培の比較的高濃度下でも高い生長率を示したことは、通常の沿岸の栄養塩環境に比べ、かなり富栄養化した海域でも生育可能と推察された。さらに、水温 20℃または 25℃下の比較的高温下で高率の栄養塩吸収が認められたことから、夏季でも優れた水質浄化能力を有するものと考えられる。中でも横浜産藻体は最も高い吸収率を示したことから、この種は沿岸の水質浄化に有効と見なされた。

5. 今後の課題

日本では、これまで数年間の予備的な研究が行われており、その結果の概要は著者によって既に『アオサ類の繁殖と環境修復』として公表されている(能登谷 1999)。本研究では、日本沿岸の比較的暖かい地域沿岸に生育する藻体について、形態的特徴と種の同定を試みた結果、少なくとも 3 型が判別され、それらの生長におよぼす温度や塩分、栄養塩濃度の影響を明らかになった。しかし、アオサ類の形態的特徴は単純で種の同定は困難である。したがって、今後種を明確に同定するためには、分子情報とともに形態形質を検討し、さらにその生態および生理的特性を把握することが必須の課題と考えられる。

いずれの藻体も比較的高温、高栄養塩下で生育可能であること、広塩分耐性を持ち、比較的高温下で高率の栄養塩吸収能をもつことから、富栄養化した湾奥部や魚類養殖場周辺などの沿岸域の水質浄化には十分に利用可能であると推察される。したがって、今後は沿岸環境水をこれらアオサ類を用いて浄化する具体的な技術、装置などの研究が必要で、さらに、これまでほとんど研究が行われていない繁殖藻体の有効利用の観点から、各種の有用成分を含めた応用研究が必要と考えられる。

6. 引用文献

- Arasaki, S. (1984): A new aspect of *Ulva* vegetation along the Japanese coast. *Hydrobiologia* 116/117: 229-232.
- Coat, G., Dion, P., Noailles, M-C., De Reviens, B., Fontaine, J-M., Berger-Perrot and Loiseaux-De Goer S. (1998): *Ulva armoricana* sp. nov. (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). II. Nuclear rDNA ITS sequence analysis. *Eur. J. Phycol.* 33: 81-86.
- Dion, P., De Reviens, B. and Coat, G. (1998): *Ulva armoricana* sp. nov. (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). I. Morphological identification. *Eur. J. Phycol.* 33: 73-80.
- Fletcher, R. T. (1996): The occurrence of "Green tides" In Schramm, W. and Nieshuis, P.H. (Eds) Marine Benthic Vegetation -Recent Changes and the Effects of Eutrophication-. Springer Verlag, pp.7-43.

右田清治 (1985): 大村湾産アオサの不稔性変異種. 長崎大学水産学部研究報告 57:
33-37.

能登谷正浩 (1999):アオサの利用と環境修復. 成山堂 pp. 1-171.

Table 1. Morphological characteristics of free-living species of *Ulva* from different coasts of Japan

Location	Blade color	Denticulation of blade margin	Cell shape	Pyrenoid number per cell	*Blade thickness (mean)	*Cell size diameter × width × height (mean)
Yokohama	Dark green	No	Polygonal column with tapered ends	2-3	80.3-96.5 (90.7)	12-22 × 9-17 × 22-29 (18.3 × 12.4 × 27.3)
Kochi	Light green	No	Polygonal column with flattened ends	1-2	82.4-90.4 (86.7)	14-28 × 11.9-21.3 × 21-30 (19.3 × 14.5 × 27.1)
Nagasaki	Yellow green	No	Polygonal column with flattened ends	3-4	52.1-77.8 (65.3)	15-23 × 10-18 × 20-25 (18.8 × 12.8 × 22.3)
Kagoshima	Yellow green	No	Polygonal column with flattened ends	2-4	55.4-87.2 (71.5)	14-23 × 11-17 × 25-28 (19.5 × 13.8 × 26.8)

* : μ m

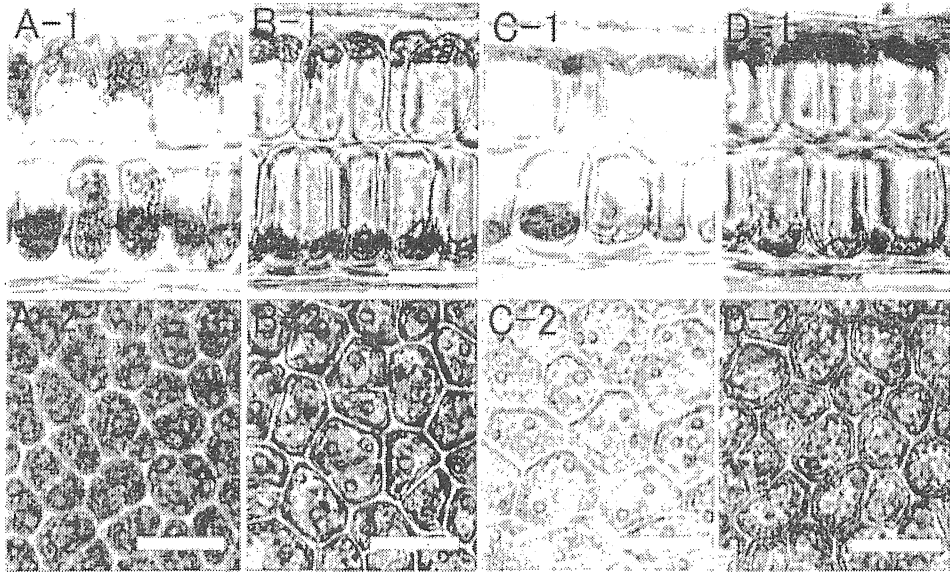


Fig. 1 Cross section (1) and surface view (2) of free-living species of *Ulva* from different coasts of Japan. A, Yokohama; B, Kochi; C, Nagasaki; D, Kagoshima. Bars, 20 μm.

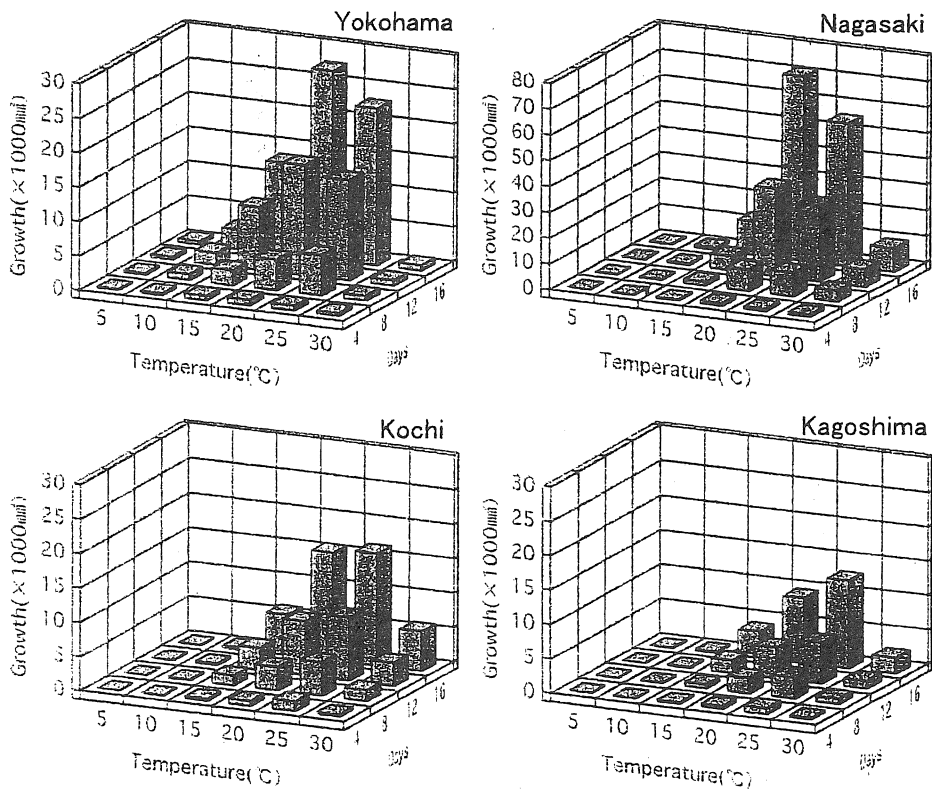


Fig. 2 Growth of blade area in free-living species of *Ulva* from different coasts under different temperatures.

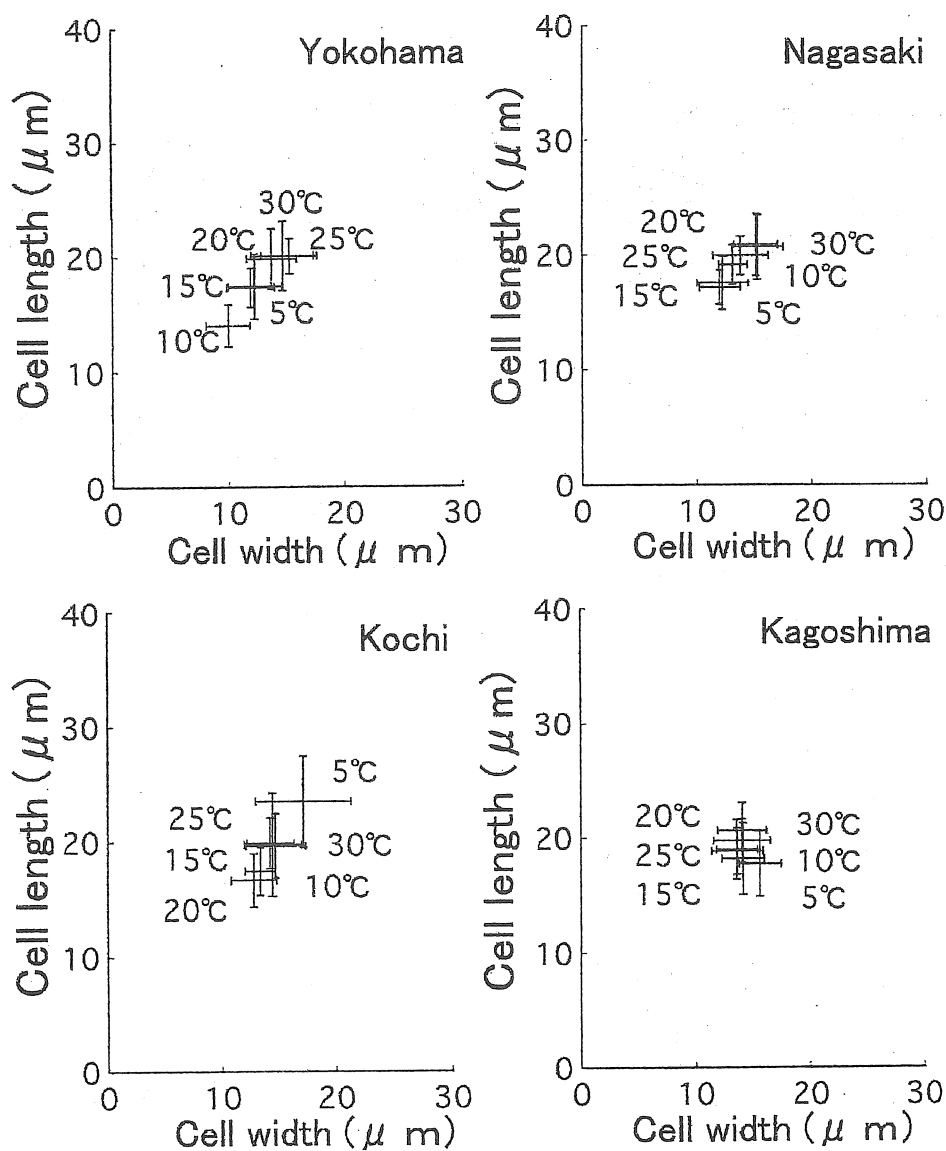


Fig. 3 Cell length and width in free-living species of *Ulva* from different coasts under different temperatures.

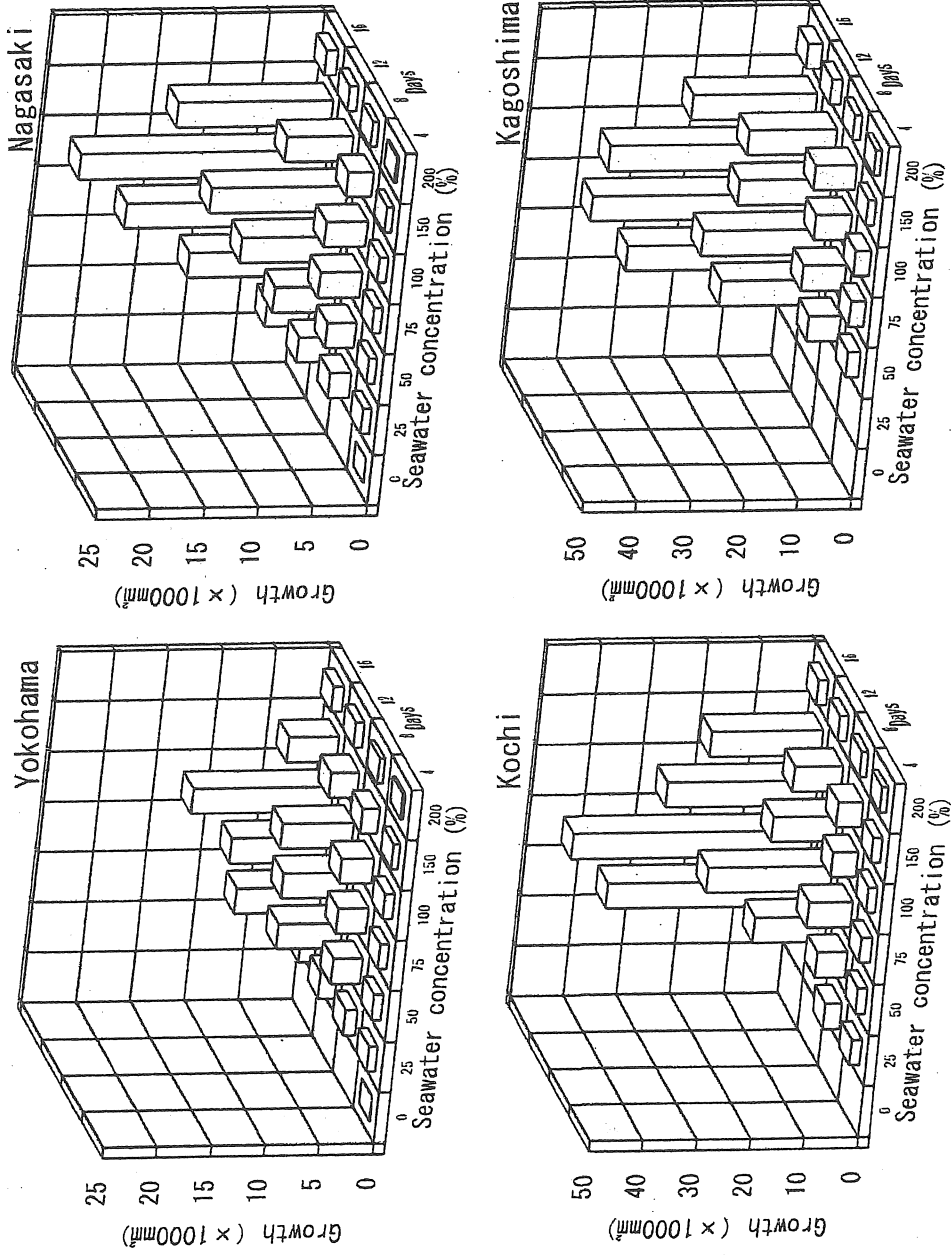


Fig. 4 Growth of blade area in free-living species of *Ulva* from different coasts under different seawater concentrations.

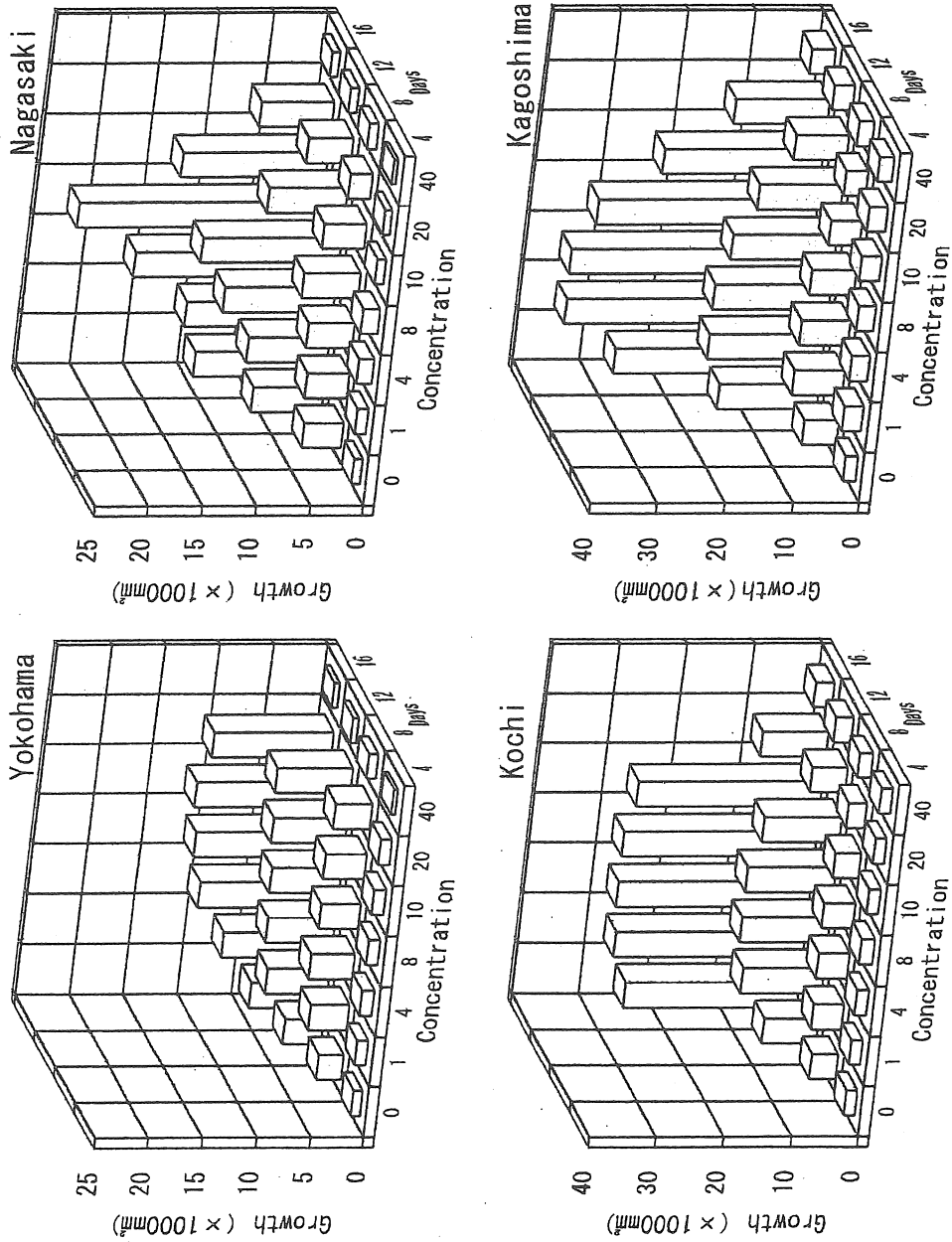


Fig. 5 Growth of blade area in free-living species of *Ulva* from different coasts under different nutrient concentrations by modified Grund medium

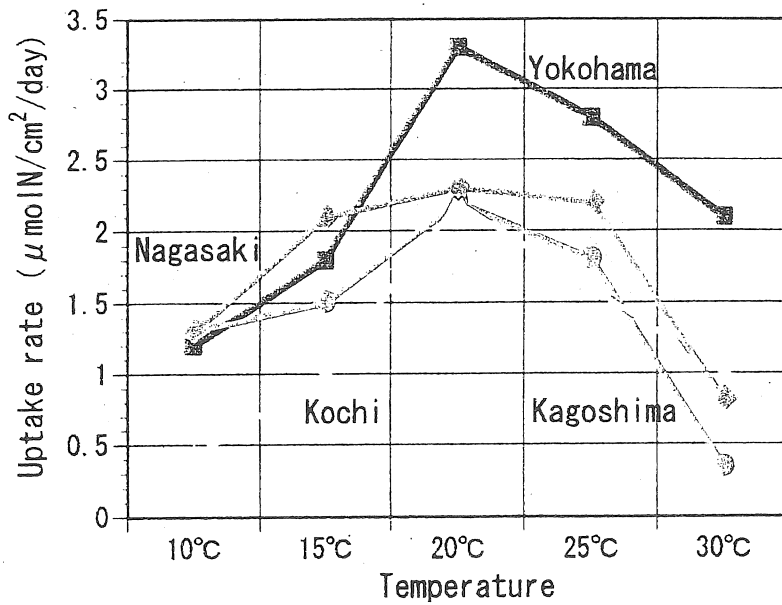


Fig. 6 Uptake rate of NO₃-N in free-living species of *Ulva* from different coasts under different temperatures.

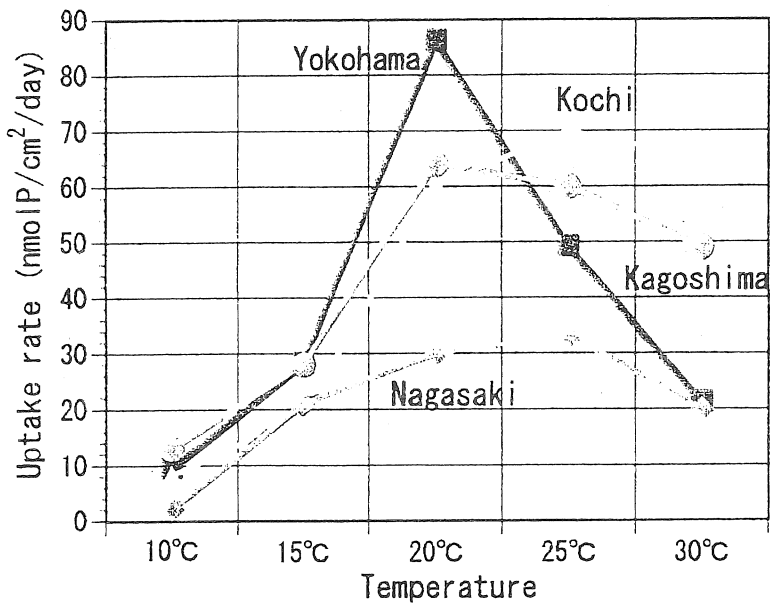


Fig. 7 Uptake rate of total P in free-living species of *Ulva* from different coasts under different temperatures.

Studies on the characteristics of free-living species of *Ulva* from different coasts of Japan.

Masahiro Notoya

Laboratory of Applied Phycology, Tokyo University of Fisheries

Summary

Morphological and physiological characteristics of free-living species of *Ulva* from four different coasts of Yokohama, Kochi, Nagasaki and Kagoshima were investigated. Morphological data on the blade color, denticulation at blade margin, pyrenoid number per cell, blade thickness, cell shape, and cell size were observed and compared with each other. *Ulva* spp. from different coasts of Japan were similar to *Ulva pertusa* in Yokohama, *U. lactuca* in Kochi, and *U. scandinavica* in both of Nagasaki and Kagoshima, respectively. But, the species could not be identified exactly because of the lack of the basal part and the reproductive cells in these blades, and the data of cell size and pyrenoid number per cell changed with the culture conditions. From these reasons, it is considered that molecular data is needed for identification of the *Ulva* spp.

All the species of *Ulva* from four sites of the coasts of Japan grew at wide range of temperature (5-30°C), seawater concentration (50-200%) and nutrient concentration (0-40 times) under laboratory culture conditions. The optimum conditions of high growth rate in all species of *Ulva* were shown at temperatures of 20-25°C, seawater concentrations of 50-15% and nutrient concentrations of 4-10 times. Uptake rate of both nutrients on NO₃-N and total P was observed at the temperatures of 10-25°C. High uptake rate of N and P in these species was shown at 20°C and 20-25°C, respectively. *Ulva* sp. from Yokohama shows the highest uptake rate of N and P among the four species. It is considered that the characteristics of *Ulva* spp. can be used in the bio-remediation for reducing high content of nutrient water at the eutrophicated shallow coastal area with high temperatures during summer seasons. Hereafter, the researches of materialization for water purification and of some useful contents for the utilization by the propagated *Ulva* blades will be needed.