

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580379

研究課題名（和文）磯焼けと海水の質との関連性についての研究

研究課題名（英文） Relation of the quality of seawater to the decline of seaweed populations

研究代表者

桑野 和可（KUWANO KAZUYOSHI）

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号：60301363

研究成果の概要（和文）：アラメを連続培養し、その成長から海水の質を評価することを試みた。海水に添加する栄養塩濃度は、硝酸塩で $50.4 \mu\text{M}$ 以上、リン酸塩で $2.8 \mu\text{M}$ 以上、Fe-EDTA で $0.069 \mu\text{M}$ 以上あれば、アラメの成長に十分であることがわかった。そこで、海水に硝酸塩を $100 \mu\text{M}$ 、リン酸塩を $2.84 \mu\text{M}$ 、Fe-EDTA を $0.28 \mu\text{M}$ 添加した培養液を調整し、魚類養殖用ドライペレットの影響について検討した。その結果、最も低濃度の実験区（供給液 1 L あたり 60 mg）でも、著しくアラメの成長を阻害した。

研究成果の概要（英文）：The quality of seawater was evaluated by the growth of *Eisenia bicyclis* cultured in a continuous culture system. When more than $50.4 \mu\text{M}$ nitrate, more than $2.8 \mu\text{M}$ phosphate and more than $0.069 \mu\text{M}$ Fe-EDTA were added in the supply medium, growth inhibition by nutrient deficiency did not occur during the experiment period of 4 weeks. A suspension of fish feed pellet was continuously added to the continuous culture system with the supply medium containing $100 \mu\text{M}$ nitrate, $2.84 \mu\text{M}$ phosphate and $0.28 \mu\text{M}$ Fe-EDTA. The growth of *E. bicyclis* was conspicuously inhibited even at the lowest concentration of 60 mg per 1 L of the supply medium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：海洋保全・海洋資源・水産学・海藻

1. 研究開始当初の背景

アラメ・カジメ類やホンダワラ類などの海藻は、温帯の岩礁域に藻場とよばれる濃密な海藻群落を形成し、一次生産者として沿岸生態系の中で重要な役割を果たしている。ところが、これらの海藻群落が著しく衰退したり消失したりする、いわゆる「磯焼け」とよば

れる現象が世界的に広がり、問題になっている。日本における「磯焼け」は、高度経済成長期である 1970 年代頃から問題になっていたが、この 10 年ほどの間に急速に拡大し、新たな原因が発生していることが示唆されている。「磯焼け」の原因として、これまでにいくつかの仮説が提唱されているが、残念

ながら原因の解明には至っていない。

藻場における海藻の生物量変化を考える場合、成長速度と減耗速度の両面から考察することが必要である。現在、磯焼けの原因としてウニや藻食性魚類による食害が有力な仮説として注目されているが、これらは減耗のみに焦点が当てられており、磯焼けの原因を説明する上で必ずしも十分とは言えない。アラメ・カジメ類やホンダワラ類はとても大きな海藻のため、実験室内で培養することがむずかしく、これらの海藻の成長をさまざまな条件で比較検討することはほとんど行われていない。「磯焼け」の原因解明が進まない一因として、このような研究上の障害がある。そのため、アラメ・カジメ類やホンダワラ類の室内培養系を樹立し、海水の「質」と海藻の成長の関係を調べられるようにすることが、「磯焼け」の原因究明において急務の課題となっている。

一般に行われているバッチ培養（回分培養）によってアラメ・カジメ類やホンダワラ類を培養するには、海水に高濃度の栄養塩を添加し、さらに、頻りに培養液を交換する必要がある。このような培養条件は、実際に海藻が生育する野外の条件とは、かなりかけ離れており、室内培養実験の結果の解釈をむずかしくしている。培養液を少量ずつ常時供給し続ける連続培養系は、栄養塩の添加濃度を下げることが可能で、培養液交換による急激な環境変化もないため、実際の海の環境に近い条件で培養することができる。そのため、より説得力のある結果を得ることが可能となる。

これまでに行ってきた藻場調査から、衰退しつつある藻場の海藻には、(a) 潮通しの良い場所の方が藻場の衰退が著しい、(b) 藻体は初夏から徐々に衰弱しはじめ、晩秋までに著しく不健全化する、(c) 不健全化していく過程の初期段階では、表層細胞の一部が脱落することによって形成される微小なくぼみが藻体表面に多数見られる、(d) 藻体表面に見られる傷害は、水中で上向きの面の方が下向きの面よりも重篤である、(e) 群落の中央の個体よりも端に生育する個体に見られる傷害の方が重篤であるといった特徴的な現象が見られることがわかってきた。これらの現象は、海水中に含まれる何らかの物質が海藻に触れることで海藻を衰弱させ、それが藻場を衰退させる原因となっていることを強く示唆している。

近年、使用量が増加している魚類養殖の配合飼料には多量の脂質が含まれており、これが海洋環境中に放出されれば過酸化脂質が生じる。過酸化脂質は、病気や老化の要因となる酸化ストレスの原因物質として注目されており、現時点においては、過酸化脂質が海藻を衰弱させる原因物質として最も疑わ

しい。これまでの研究において、実際に過酸化脂質が海藻に対して有害な作用をすることを実証するため、酸素を吹き込んで変性させたリノール酸メチルを脱脂綿に染みこませ、それを野外に生育するカジメの側葉に接触させる実験を行った結果、未変性のリノール酸メチルが触れた部分には、ほとんど変化が認められなかったにもかかわらず、変性させたリノール酸メチルが触れた部分の細胞は死滅し、過酸化脂質の著しい毒性が明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では磯焼けの原因を明らかにするため、連続培養による海水評価系を構築し、アラメの成長から海水の質を評価することを目的とした。海水の質を決定する要因として最も重要なのが窒素とリン酸であるが、その他にも微量金属、キレート物質、ビタミン類、さらにはさまざまな有害物質などの影響についても考慮する必要がある。窒素やリン酸などの影響を受けずに海水の質を評価するためには、これらの主要な栄養塩を培養液に添加し、成長の制限因子にならないようにする必要がある。そこで、窒素、リン酸、溶存鉄の濃度とアラメの成長の関係について検討し、これらの栄養塩が不足しなくなる濃度を決定した。その後、ブリ養殖に用いられるドライペレットを培養液に添加し、アラメの成長に現れる影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 培養藻体の用意：研究室に保存してあるアラメの配偶体を成熟させ、発生した幼体を1Lの通気培養フラスコに移し、15°Cで通気培養した。藻体の集合体が大きくなったら、仮根部をほぐして1個体ずつバラバラにし、実験に用いた。

(2) 連続培養：下図の連続培養用のフラスコ（1Lまたは2L）にチュービングポンプを用いて、1日当たり2Lの速度で培養液が供給されるようにした。排水側にも同様のポンプを設置して排水した。

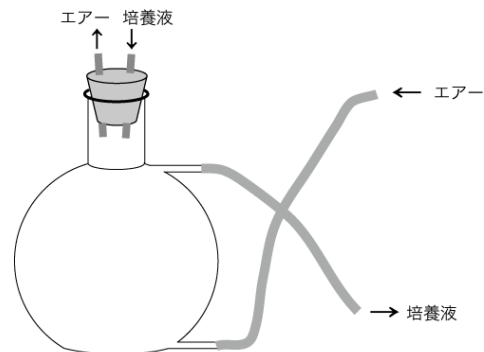


図1. 連続培養用フラスコ

(3) 主要栄養塩濃度の検討

主要な栄養塩として、窒素、リン酸、鉄について検討した。窒素源として NaNO_3 、リン酸源として NaH_2PO_4 、鉄源として Fe-EDTA を用い、藻類の培養に広く用いられる PES 培地の通常濃度 (NaNO_3 807 μM ; NaH_2PO_4 45.4 μM ; Fe-EDTA 8.8 μM) の 1/8、1/16、1/32、1/64、1/128 および 0 の合計 6 つの実験区を設けて、それぞれ実験を行った。

(4) ペレット溶液添加実験

粉碎したドライペレットを海水に 2% 懸濁させ、20 分間オートクレーブ滅菌した後、懸濁液の上澄みをオートクレーブ滅菌海水で 1.25~10 倍に希釈し、0.2~1.6% のペレット添加液を作成した。ペレット添加液はチュービングポンプを用いて、2L の連続培養用のフラスコに 1 日あたり 60mL の速度で添加した。

(5) 面積の測定と成長解析

面積を測定するため、約 1 週間ごとに 1 回、藻体を写真撮影した。PC に画像を取り込み、Photoshop (Adobe Systems) を用いて、葉状部と仮根部を切り離した。この画像データを ImageJ (NIH) でグレースケールに変換し、葉状部の面積を測定した。

成長は統計ソフト R (R Development Core Team 2010) を用いて、ゴンペルツ曲線に近似した。

4. 研究成果

(1) 硝酸塩濃度比較実験

添加した硝酸塩の濃度が 1/8 と 1/16 の場合にはアラメは良く成長したが、1/32 以下になると硝酸塩濃度が下がるにつれて成長も悪くなった。ゴンペルツ曲線に近似し、その推定最大値と硝酸塩濃度を比較した結果、濃度の上昇に伴って推定最大値も増加した (図 2)。しかし、1/16 と 1/8 では推定最大値に差は認められなかった。 α_{50} 、つまり最大値の 1/2 に達する期間と硝酸塩濃度を比較した結果、この場合も濃度の上昇に伴って α_{50} は大きくなったが、1/16 と 1/8 では差は認められなかった。

藻体の色調について観察した結果、最も硝酸塩濃度の高い 1/8 では培養期間を通じて藻体の色が濃く、退色している部分はほとんど認められなかった。それに対し最も硝酸塩濃度の薄い硝酸塩無添加区では、はじめ成長帯付近の色が落ち、その後色落ちが全体に広がって最終的には成長帯付近以外では著しく白化した。形態にも違いが認められ、1/8 では藻体が厚くなり、藻体の外縁部には鋸歯が認められ、成長帯付近が大きく横に張り出した。それに対して、硝酸塩無添加区では藻体は薄く、鋸歯は認められず、横への張り出しも少

なく全体的に細かった。

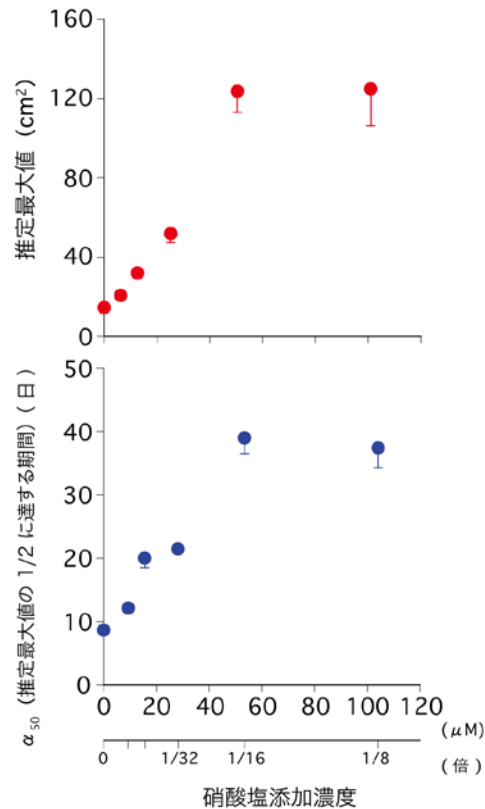


図2. アラメの成長に対する硝酸塩添加濃度の影響

(2) リン酸塩濃度比較実験

添加したリン酸塩の濃度が 1/8、1/16、1/32 はどれも良く成長し、成長曲線からは明確な差は認められなかった。しかし、1/64 以下ではリン酸塩濃度が下がるにつれて成長も悪くなった。ゴンペルツ曲線に近似し、その推定最大値とリン酸塩濃度を比較した結果、濃度上昇に伴って推定最大値も増加し、1/16 で最大となった (図 3)。しかし、1/8 では、やや低下した。 α_{50} を比較した結果、この場合も濃度の上昇と共に値は大きくなり 1/16 で最大となった。1/8 では、やや低下した。

リン酸塩無添加区と 1/16 の実験区の藻体の色調を比較すると、最も成長の良かった 1/16 では培養期間を通じて藻体の色が濃く、退色している部分はほとんど認められなかった。リン酸塩無添加区では、培養期間を通じて藻体の色はやや薄かったが、硝酸塩無添加区の場合のように著しく退色することはなかった。また、葉状部から茎への移行部の極狭い範囲で色落ちが見られた。形態についても違いが認められ、1/16 では藻体が厚くなり、藻体の外縁部には鋸歯が認められ、成長帯付近が大きく横に張り出した。それに対して、リン酸塩無添加区では藻体は薄く、鋸歯は認められず、横への張り出しも少なく全体的に細かった。

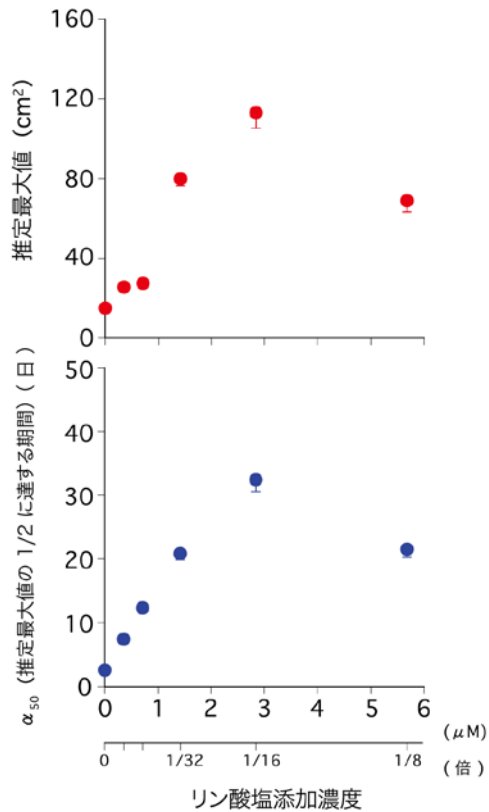


図3. アラメの成長に対するリン酸塩添加濃度の影響

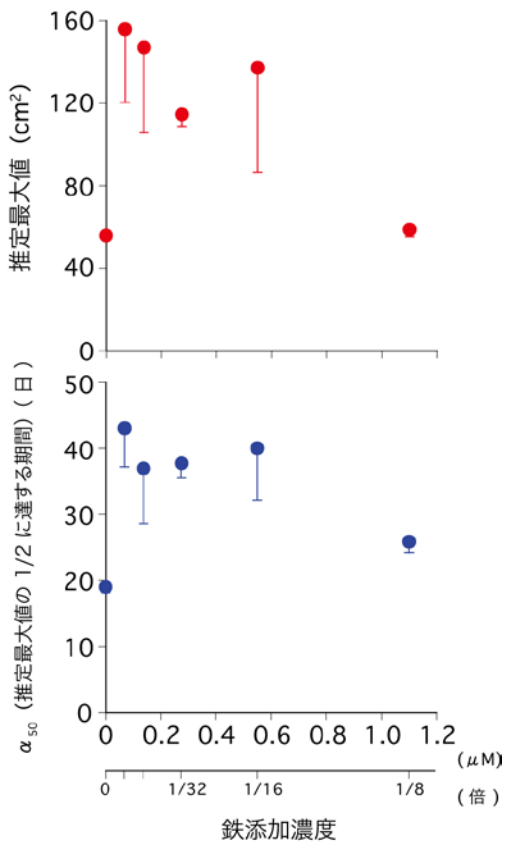


図4. アラメの成長に対する鉄添加濃度の影響

(3) 鉄濃度比較実験

無添加区も含め、全ての実験区で良く成長し、成長曲線からは鉄濃度の差による明確な影響は認められなかった。ゴンペルツ曲線に近似し、その推定最大値と鉄濃度を比較した結果、推定最大値は鉄無添加区では低くなった(図4)。鉄添加濃度が1/28から1/16の範囲では推定最大値にほとんど差はなかったが、1/8では、やや低下した。α₅₀を比較した結果、この場合も鉄無添加区は添加区に比べ、値が小さくなった。鉄濃度が1/28~1/16の範囲ではα₅₀にほとんど差はなかったが、1/8では、やや低下した。

鉄無添加区と1/64の実験区の藻体の色調を比較しても、違いは認められなかった。形態についても違いは認められなかった。

(4) ペレット添加実験

ペレット無添加区と比較して、ペレット添加区では明らかに成長が抑制されていた。ゴンペルツ曲線に近似し、その変曲点を比較した結果、ペレット無添加区では変曲点が17.1日目だったのに対し、全てのペレット添加区では負の値になった。ペレット添加区の間では、ペレット濃度が高くなると、負の値の絶対値がやや大きくなったが、その差は僅かだった。

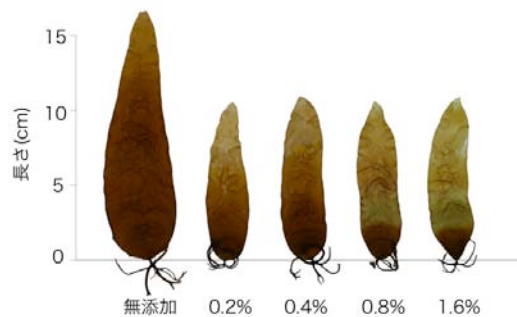


図5. ペレット添加実験の培養終了時(28日目)の各実験区の藻体

ペレット添加区とペレット無添加区の違いは成長曲線以外にも認められた。特に、藻体の色調には著しい差が生じた(図5)。ペレット無添加区では培養期間を通じて藻体の色が濃く、退色している部分はほとんど認められなかったのに対し、ペレット添加区では濃度が高くなるにつれ、藻体先端部が白くなり、さらに藻体中央部が緑色に変色した。最も濃い1.6%ペレット添加区の緑色に変色した部分の表面を光学顕微鏡で観察した結果、多くの細胞が死滅して色素を失っている様子や、葉緑体が委縮し緑色になっている細胞が認められた。最も薄い0.2%ペレット添加区の藻体中央部の表面を光学顕微鏡で観察した結果、表層細胞の一部がパッチ状に死滅しているのが認められた。形態にも違いが

認められた。ペレット無添加区では、成長帯付近が大きく張り出したのに対して、ペレット添加区では成長帯付近の横への張り出しが小さく、葉状部は細くなった。葉状部の厚みにも著しい差があり、全てのペレット添加区の葉状部は著しく薄かった。

本研究で行った実験では、各フラスコ内のペレット濃度は、60-480 mg/L に漸近する。この値は魚類養殖が近くで行われている海域と比較してもかなり高いと考えられるが、最も濃度の低い実験区でも、その抑制効果は極めて大きく、ペレットの有害性を直接説明した意義は大きい。今後、もっと低い濃度で実験を行い、どれくらいの濃度まで成長抑制効果が認められるか明らかにする必要がある。本研究ではペレット懸濁液の上清を用いて実験を行ったため、すぐに沈殿するような大きな粒子ではなく、ミセル状に懸濁した油に生成した過酸化脂質が有害物質として働いたと考えられる。今後、極低濃度の過酸化脂質を測定する方法を確立し、実際に藻場が衰退する海域あるいは消失した海域における海水中の過酸化脂質濃度と培養実験結果を比較することによって、磯焼けとの関連性を明らかにすることが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Youn Hee Choi, Taek Jeong Nam, Kazuyoshi Kuwano. Cryopreservation of gametophytic thalli of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyceae) by one-step fast cooling. J. Appl. Phycol. 25:531-535 (2013)

[学会発表] (計3件)

- ① 島岡啓一郎, 桑野和可: 連続培養による栄養塩制限下でのアラメの成長, 三学会九州合同大会, 2011年5月21日, 長崎
- ② 島岡啓一郎, 桑野和可: 連続培養系における褐藻アラメの成長と解析, 日本水産学会, 2012年3月29日, 東京
- ③ 山下昂, 桑野和可: 連続培養におけるアラメの栄養塩吸収速度の測定, 日本藻類学会, 2012年7月14日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 和可 (KUWANO KAZUYOSHI)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・准教授

研究者番号: 60301363

(2) 研究分担者
なし

(3) 研究分担者
なし