

植物プランクトン数種の増殖に及ぼす攪拌の影響

山本民次・鈴木雅巳

広島大学大学院生物圏科学研究科 (〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4)

Tamiji Yamamoto and Masami Suzuki: Effects of agitation on growth of several phytoplankton species. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 52: 1 - 4, Mar. 10, 2004

Effects of agitation on the growth of the diatom *Skeletonema costatum* and the dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Heterocapsa circularisquama* were examined using a magnetic stirrer at 100, 200 and 300 rpm. The growth of *S. costatum* was enhanced with agitation level at 100 rpm or more. The growth of *A. tamarense* was clearly suppressed at 200 and 300 rpm while it was enhanced at 100 rpm. On the other hand, the growth of *H. circularisquama* was suppressed apparently in the initial lag growth phase then recovered 7 days later. Thus, the responses of phytoplankton to agitation are different in different taxonomic group and even in species of the same taxonomic group. The results obtained in the present study suggest that we must be careful on growth experiments of phytoplankton in terms of mixing conditions in the experimental design.

Key words: agitation, diatom, dinoflagellate, growth, phytoplankton, turbulence

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

植物プランクトンによる栄養塩の取り込みは細胞表面で行われるので、水が常に細胞表面で新鮮なものに入れ替われば、細胞の増殖速度は大きくなる。珪藻類は遊泳能力が無く、海水より比重が大きいため、沈降して細胞表面の海水が更新されることで栄養塩を取り込む。しかし、細胞が有光層に留まるためには適度な鉛直混合が必要である。一方、鞭毛藻類は遊泳能力を有するので、海水の鉛直混合が無くても能動的に鉛直移動を行うことで、環境水中からの栄養塩類の摂取および有光層に留まることができる。このように、海水の混合に対する植物プランクトンの応答のしかたはさまざまであり、進化の歴史の中でそれぞれが選んだ生態学的戦略とも言える。細胞の沈降や遊泳によって、細胞表面の海水を入れ替えることで得られる栄養塩取り込みの利得としては、Berg & Purcell (1977) と Munk & Riley (1952) のデータを Lazier & Mann (1989) が計算し直したところ、 $1 \times D \text{ s}^{-1}$ と $10 \times D \text{ s}^{-1}$ (D は細胞の直径) の速度で遊泳あるいは沈降する場合には、それぞれ細胞サイズが大きくなるにつれて細胞に取り込まれる栄養塩フラックスが増加するという結果を得た。また、Sommer (1988) の計算では、遊泳にともなう栄養塩フラックスは $5 \mu\text{m}$ の鞭毛藻類に対して約 50% の増加であるのに対して、 $1 \mu\text{m}$ の鞭毛藻類では 5-20% 程度の増加であった。これらのことから、細胞サイズの大きい藻類ほど沈降や遊泳による栄養塩取り込み増加の利得は大きいと結論されている。

擾乱に対する感受性は分類群で異なるので、単に栄養塩取り込みの観点からのみ考えていたのでは解釈を誤る。例えば、鞭毛藻類の一部には擾乱に対する感受性が強く、しばしば増殖が抑制されることが報告されている (White 1976, Berdalet 1992, Gibson 1995)。したがって、常時攪拌を行うサイクロスタット連続培養のような実験方法は、それらの鞭毛藻類の

増殖実験には適用できない。しかしながら、いずれの種に対してどの程度の攪拌がどの程度の増殖阻害を引き起こすかということについては、十分な検討はなされていない。例えば、我々のグループも含めて、海洋の一次生産の向上と資源の再利用の両立を目指して、植物プランクトンの増殖の促進に製鋼スラグを利用して成果を上げているが (中村ら 2003, 原口・谷口 2003, 山本ら 2003)、これらの実験ではスラグから栄養塩類を溶出させるために攪拌を行う必要があるが、攪拌の影響自体が植物プランクトンの増殖に対して正負いずれに作用したかについてはよく分かっていない。

そこで本研究では、瀬戸内海で比較的よく出現する珪藻 *Skeletonema costatum* および渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense*, *Heterocapsa circularisquama* を用いて、スターラーによる攪拌がそれらの増殖に及ぼす影響を評価することを目的とした。

材料と方法

実験には呉港表層海水をベースに調整した海水強化培養液 f/2 medium (Guillard 1975) を用いた。2 L 三角フラスコを 3 個用意し、それぞれに同培養液を入れ、これに培養した *S. costatum*, *A. tamarense*, *H. circularisquama* を添加し、最終液量が 2 L になるようにした。初期細胞数は *S. costatum*, *A. tamarense*, *H. circularisquama* それぞれについて 3 回計数した平均で 64, 128, 215 cells mL^{-1} であった。これを恒温器 (東京理化機器, FLI-160) に入れ、それぞれの種のほぼ至適増殖条件で培養した。つまり、*A. tamarense* と *S. costatum* は水温 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ 、塩分 30psu、光強度 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (山本ら 1999, 山口 1992, 山口 1993)、*H. circularisquama* では、水温 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、塩分 30psu、光強度 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

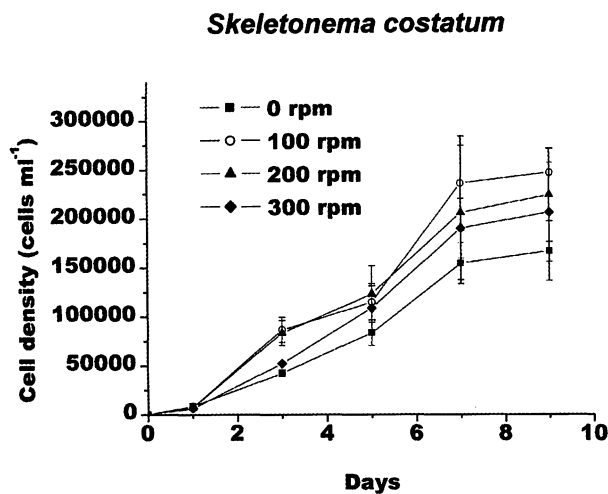


Fig. 1. Variation in cell densities of *Skeletonema costatum* agitated with a magnetic stirrer at 100, 200 and 300 rpm. 0 rpm is the results with no agitation.

とし(山口 1996, 山口 2000), すべて明暗周期は12L:12D(6:00点灯-18:00消灯)とした。

それぞれについてスターラー(ヤマト科学, MS500D)を用いて3段階(100, 200, 300 rpm)の攪拌レベルを与えた。また、攪拌を行わない実験区(0 rpm; コントロール)も設けた。以下, *S. costatum*についてはSc0, Sc100, Sc200, Sc300, *A. tamarens*についてはAt0, At100, At200, At300, *H. circularisquama*についてはHc0, Hc100, Hc200, Hc300と呼ぶこととする。

一日おきにそれぞれ5 mLずつ試水を採取した。これらに12.5%グルタルアルデヒドを最終濃度約1%になるように添加して固定し, 0.02~1 mLをSedgewick-Rafter計数板に採取し, 光学顕微鏡を用いて細胞数を3回計数して平均値を算出した。また, 鞭毛藻2種については攪拌を与えることで擾乱の弱い壁面へ細胞が移動すると言われており(Berdalet & Estrada 1993), 予備的な観察においてもそのような状況が確認されたので, 計数誤差をできるだけ小さく押さえるため, スターラーを停止させて細胞が培養器内で均一になった時点でサンプルを採取するようにした。培養実験はすべて9日間行った。細胞数に対してt-検定($p=0.05$)を行うことで, 増殖の違いの有意性を検討した。

結果

Skeletonema costatum

*S. costatum*ではすべての攪拌条件で細胞密度の増加が見られ, 培養後期のDay7からDay9では細胞密度の高い順からSc100, Sc200, Sc300, Sc0となった(Fig. 1)。ただし, それぞれ2つずつの実験区間のt-検定を行ったところ, 実験終了時(Day9)の細胞密度はSc0-Sc100を除き, 有意差は無かった(Table 1)。したがって, *S. costatum*の増殖は攪拌しなかったSc0よりも少し攪拌を与えた100 rpmで促進されたが, 攪拌が強すぎる場合には抑制されると言える。

Alexandrium tamarens

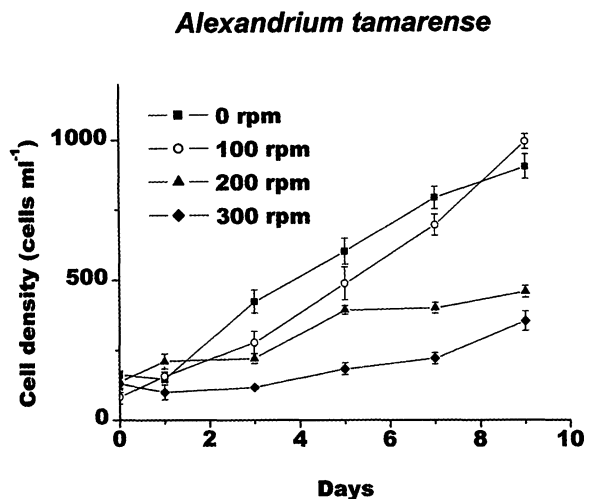


Fig. 2. Variation in cell densities of *Alexandrium tamarens* agitated with a magnetic stirrer at 100, 200 and 300 rpm. 0 rpm is the results with no agitation.

At0, At100とも細胞密度はDay9まで漸次上昇し, 最終的にAt100がAt0をわずかに凌いだ, それ以前ではAt0の方が増殖が良く, これらからは両者には有意な差がないと結論できる(Fig. 2)。一方, At200とAt300は終始細胞密度は低く, これらのうちAt300はAt200よりも有意に細胞密度が低かった($p_{200-300} < 0.05$)。このように, *A. tamarens*の増殖に対して, 攪拌はAt100ではやや増殖促進に作用し, At200, At300では増殖抑制に作用した。

Heterocapsa circularisquama

Hc0は実験開始から細胞数の速やかな増加が見られ, Day7で細胞数が最大となり, その後減少した(Fig. 3)。Hc100, Hc200, Hc300は実験開始からDay5まではあまり増加せず, Day5からDay7にかけて急激に増加した。Day7からDay9にかけてはHc100とHc200ではさらに増加してコントロール(0 rpm)の細胞数を上回ったが, Hc300では減少に転じた。t-検定の結果, Day5ではHc100, Hc200, Hc300はHc0に対し

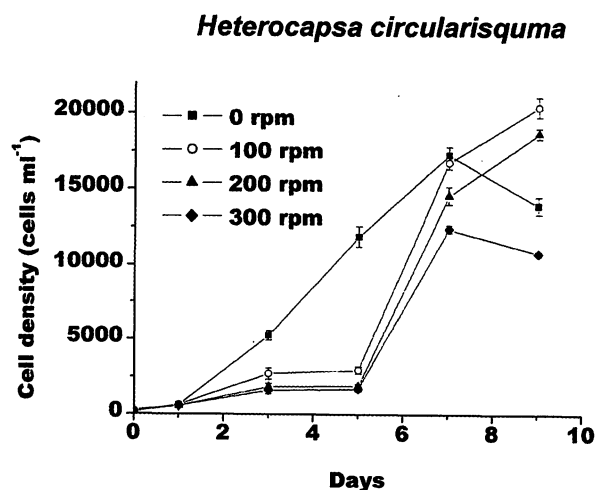


Fig. 3. Variation in cell densities of *Heterocapsa circularisquama* agitated with a magnetic stirrer at 100, 200 and 300 rpm. 0 rpm is the results with no agitation.

Table 1. Summary of statistical analyses for the growths of three species (*Skeletonema costatum*, *Alexandrium tamarense* and *Heterocapsa circularisquama*) examined in this study under different agitation levels (0, 100, 200 and 300 rpm by a magnetic stirrer). The t-test was applied to the data on Day9 for both *S. costatum* and *A. tamarense*, and to those on Day5, Day7 and Day9 for *H. circularisquama*, respectively. * indicates significant difference at $p=0.05$.

		0-100	0-200	0-300	100-200	100-300	200-300
<i>Skeletonema costatum</i>	Day 9 t	3.5533	1.7526	1.1615	-0.7339	-1.2488	-0.4419
	p	0.0237*	0.1545	0.3100	0.5037	0.2798	0.6814
<i>Alexandrium tamarense</i>	Day 9 t	3.0572	-15.8965	-16.9153	-27.4398	-25.0795	-4.3841
	p	0.0377*	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*	0.01184*
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	Day 5 t	-21.5337	-25.1150	-25.2582	-7.0148	7.5901	-1.5785
	p	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*	0.00217*	0.00162*	0.1896
	Day 7 t	-1.2818	-5.8354	-13.9454	-5.3172	15.5694	-5.9146
	p	0.2692	0.0043*	0.0002*	0.0060*	< 0.0001*	0.0041*
	Day 9 t	12.9688	12.3459	-9.2581	-4.0759	24.7310	-35.5929
	p	0.0002*	0.0002*	0.0008*	0.0152*	< 0.0001*	< 0.0001*

て有意に細胞密度が低かったが（すべて $p < 0.001$ ）、Day7ではHc100はHc0と有意差が無くなり、さらに、実験終了時（Day9）ではHc100とHc200がHc0の細胞数を上回った（ $p_{0-100} = 0.0020$, $p_{0-200} = 0.0025$ ）（Table. 1）。

考察

*S. costatum*の増殖は適度な攪拌（Sc100）で促進された（Fig. 1）。このことは、珪藻類にとっては、ある程度の擾乱がある方が増殖が促進されるというこれまでの報告と一致する（Schöne 1970, Thomas *et al.* 1995）。一方、攪拌が強すぎる場合（Sc200, Sc300）にはSc100に比べて増殖が抑制された。このことは、Pasiack & Gavis (1975)が実験的に示したように、攪拌レベルがある程度以上になると細胞にダメージを与えるものと考えられる。以上、増殖には一般に攪拌が必要であると考えられている珪藻類についても、最適な攪拌レベルがあるということが示唆された。攪拌レベルは同じ珪藻類であっても種によって異なることが想像され、今後、さまざまな種について比較検討されることが望まれる。

今回実験に供した渦鞭毛藻2種では、明らかに攪拌に対する増殖の応答が異なった。*A. tamarense*の増殖は100 rpmではコントロールと違いが見られなかったが、200 rpmと300 rpmの攪拌レベルでは阻害された（Fig. 2）。一方、*H. circularisquama*では、攪拌の影響は実験初期では抑制に作用し、誘導期を長くしたが、実験後半では急激な増殖が見られ、Day7あたりでは各実験区の細胞密度にそれほど大きな開きは無くなった（Fig. 3）。White (1976)は*A. tamarense*の増殖が攪拌により阻害されることを報告しているが、実際の海洋で起こりうる攪拌レベルでは*A. tamarense*の増殖には顕著な影響は見られないという報告もなされている（James & Elijah 2003）。前者の実験では $\epsilon \geq 10^{-2} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$ （ここで、 ϵ は乱流エネルギー逸散率）の攪拌で得られた結果であり（Thomas *et al.* 1997をもとに125 rpmの水平攪拌から算出した値）、後者は音響式ドップラー流速計によって得られた $\epsilon \sim 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$ までの攪拌で得られた結果である。いずれにせよ、渦鞭毛藻

類は珪藻類よりも擾乱に対して敏感であり、それらの応答は同じ分類群でも種によって異なるようである。

James & Elijah (2003)の報告によると、全ての種に当てはまるわけではないが、*Alexandrium fundyense*, *Gymnodinium catenatum*, *Lingulodinium polyedrum*といった比較的細胞サイズの小さい種（直径：25-50 μm ）では、攪拌レベルが強い場合（ $\epsilon \sim 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-3}$ ）でも増殖が促進されている。ただし、攪拌によって流体が動く場合、実際には粘性によって細胞も同時に動かされることになるので、細胞表面での海水交換の効率が必ずしも良くなるわけではない。本実験で用いた渦鞭毛藻2種については、両種で増殖速度は異なるものの、本実験で与えた最も強い攪拌レベルの300 rpmでは、*H. circularisquama*と*A. tamarense*の実験終了時（Day9）における細胞数は約10,000 cells mL^{-1} と約350 cells mL^{-1} であり、これらはそれぞれ初期細胞数の約43倍と約2.7倍に相当する（Figs. 2, 3）。*H. circularisquama*は18-30 $\mu\text{m} \times 12-22 \mu\text{m}$ 程度で*A. tamarense*（長さ：25-48 μm , 幅：25-48 μm ）に比べて小型であり、強い攪拌レベルにおいて*H. circularisquama*の増殖がより促進されたことはこれまでの報告と一致する。

攪拌による渦鞭毛藻の増殖の阻害は、単に栄養塩の取り込み生理に影響を与えた結果によるものではない。強い擾乱により鞭毛を失って遊泳が困難になるなどの物理的損傷を受けたり（Thomas & Gibson 1990a）、形態的な変化や細胞核の変化が起こり、細胞分裂（核分裂）が阻害されたりするためであるという報告もある（Berdalet & Estrada 1993）。また、Pollinger & Zemel (1981)は、実験により攪拌が*Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.)の核分裂にとまらう有糸分裂期に影響を与えていることを観察している。このように、攪拌による影響は単に栄養塩の取り込み効率以外の点で細胞の生理その他に影響を与えることもある。今回の実験結果や過去の多くの研究例から分かるように、攪拌が増殖に与える影響は無視できるものではなく、実験結果の解釈を誤る要因ともなり得るものである。したがって、これまで報告されてい

る実験データの解釈に注意を払うとともに、今後の実験ではこの点を考慮した設定を行う必要がある。

本研究も含め、植物プランクトンに対する攪拌の影響を調べた研究において、それらの結果の相互比較は困難である。近年では、音響式ドップラー流速計による実測を行うことにより、エネルギー逸散レベルとして攪拌レベルを定量的に評価する試みがなされるようになってきたが (Gibson 2000, James & Elijah 2003), 用いた容器の形や大きさ, 与える攪拌の種類 (上下振盪攪拌, 水平攪拌, シリンダー攪拌, ロッド攪拌など) や強さ (振盪速度, 回転数など) などが異なっているため (White 1976, Thomas & Gibson 1990b, Berdalet & Estrada 1993, Thomas *et al.* 1997), 過去のデータとの比較はやはり困難である。今後は攪拌による擾乱の物理的な評価手法に, 植物プランクトンの生理的な評価手法を組み合わせることや, 標準的な実験設定や評価項目基準を設けることが必要であろう。

謝辞

本研究を行うにあたり, 培養株を分与頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科の赤根幸子女史, 瀬戸内海区水産研究所の松山幸彦博士に厚く御礼申し上げます。有益な御助言を頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科の川口 修, 岸上智子両院生に感謝致します。最後に, 原稿に対し有益なコメントを頂いた査読者の方々に感謝いたします。

引用文献

- Berg, H. C. & Purcell, E. M. 1977. Physics of chemoreception. *Biophys. J.* 20: 193-219.
- Berdalet, E. 1992. Effects of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *J. Phycol.* 28:267-272.
- Berdalet, E. & Estrada, M. 1993. Effects of turbulence on several dinoflagellate species. p.737-740. In: T. J. Smayda & Y. Shimizu, (eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier. Amsterdam.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. p.26-60. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrates*. Plenum Publ. Corp. New York.
- 原口浩一・谷口 旭 2003. 脱りんスラグおよび都市廃水同時添加が植物プランクトン群集の増殖と種組成に及ぼす効果. *鉄と鋼* 89: 430-437.
- Lazier, J. R. N. & Mann, K. H. 1989. Turbulence and diffusive layers around small organisms. *Deep-Sea Res.* 36: 1721-1733.
- Munk, W. H. & Riley, G. A. 1952. Absorption of nutrients by aquatic plants. *J. Mar. Res.* 11: 215-240.
- 中村恵江・佐藤智希・桑田清輝・斎藤喜久・中田 等・谷口 旭 2003. 大容量タンクで観察された自然植物プランクトン群集の製鋼スラグ添加に対する増殖応答: 物理化学環境とクロフィルの変化. *鉄と鋼* 89: 438-445.
- Pasiack W. J. & Gavis J. 1975. Transport limited nutrient uptake rates in *Ditylum brightwellii*. *Limnol. Oceanogr.* 20: 605-617.
- Pollinger, U. & Zemel, E. 1981. *In situ* and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division processes of *Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.) Lefevre. *Br. Phycol. J.* 16: 281-287.
- Schöne, H. 1970. Untersuchungen zur ökologischen Bedeutung des Seegangs für das Plankton mit besonderer Berücksichtigung mariner Kieselalgen. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 55: 595-677.
- Sommer, U. 1988. Some size relationship in phytoflagellate motility. *Hydrobiologia* 161: 125-131.
- Thomas, W. H. & Gibson, C. H. 1990a. Quantified small-scale turbulence inhibits a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *Deep-Sea Res.* 37: 1583-1593.
- Thomas, W. H. & Gibson, C. H. 1990b. Effects of small-scale turbulence on microalgae. *J. Appl. Phycol.* 2: 71-77.
- Thomas, W. H., Tynan, C. T. & Gibson, C. H. 1997. Turbulence-phytoplankton interrelationships. *Prog. Phycol. Res.* 12: 283-284.
- Thomas, W. H., Vernet, M. & Gibson, C. H. 1995. Effects of small-scale turbulence on photosynthesis, pigmentation, cell division, and cell size in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 31: 50-59.
- White, A. W. 1976. Growth inhibition caused by turbulence in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *J. Fish Res. Bd. Can.* 33: 598-602.
- 山口峰生 1992. 有毒赤潮鞭毛藻の競合種としての珪藻類の増殖特性. 有毒赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. 南西海区水産研究所平成2年度研究報告書. 55-65.
- 山口峰生 1993. 珪藻類の増殖に及ぼす光強度と栄養塩の影響. 有毒赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究. 南西海区水産研究所平成3年度研究報告書. 49-62.
- 山口峰生 1996. 新型赤潮生物の増殖に及ぼす水温と塩分の影響. 渦鞭毛藻・ラフィド藻等新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究. 南西海区水産研究所平成6年度研究報告書. 7-12.
- 山口峰生 2000. 生理学的特性に基づく新型赤潮プランクトン優占化機構の解明. 渦鞭毛藻・ラフィド藻等新型赤潮の発生機構と予測技術の開発に関する研究. 南西海区水産研究所5ヶ年の研究報告書. 7-20.
- 山本民次・鈴木雅巳・呉 碩津・松田 治 2003. 製鋼スラグからのりん, 珪素の溶出とそれらが植物プランクトン自然群集の増殖に及ぼす影響. *鉄と鋼* 89: 482-488.
- 山本民次・樽谷賢治 1997. 広島湾産有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響. *藻類* 45: 95-101.

(Received 1 Aug. 2003; Accepted 6 Feb. 2004)