

窒素制限下における藍藻類 *Microcystis aeruginosa* および 珪藻類 *Cyclotella* sp. の増殖および競合特性

高橋康成¹・天野佳正^{1,2}・町田 基^{1,2}

¹千葉大学大学院工学研究科 (〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33)

²千葉大学総合安全衛生管理機構 (〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33)

Kosei Takahashi¹, Yoshimasa Amano^{1,2}, Motoi Machida^{1,2}: Growth and competitive characteristics of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Cyclotella* sp. under nitrogen limitation. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 60: 1-8, March 10, 2012

The blue-green alga *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Cyclotella* sp. were grown in batch cultures with various nitrate-nitrogen concentrations ($N = 0.1-5.0 \text{ mg L}^{-1}$). In monoculture experiment, *M. aeruginosa* was favored at nitrate-nitrogen concentration of 0.5 mg-N L^{-1} or more, whereas nitrate-nitrogen concentrations of 2.5 and 5.0 mg-N L^{-1} favored the growth of *Cyclotella* sp. Final cell density of *M. aeruginosa* was higher than that of *Cyclotella* sp. at all nitrate-nitrogen concentrations. This result suggests that *M. aeruginosa* is able to grow favorably under nitrogen limited condition. Nitrogen uptake patterns at 2.5 mg-N L^{-1} of both species were also observed. Nitrate-nitrogen concentration in the culture medium of *Cyclotella* sp. decreased more rapidly than that of *M. aeruginosa*. In competitive culture experiment, *Cyclotella* sp. dominated at nitrate-nitrogen concentration of 2.5 mg-N L^{-1} . *Cyclotella* sp. could uptake large amounts of nitrogen in early stage of growth and also obtain high cell density, whereas the total amount of nitrogen absorbed by *M. aeruginosa* was lower than that of *Cyclotella* sp., hence the growth of *M. aeruginosa* was limited. In competitive condition, nutrient uptake ability plays an important role to determine the dominant species.

Key Index Words: *Cyclotella* sp., growth characteristics, *Microcystis aeruginosa*, nitrogen

¹ Graduate School of Engineering, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522, Japan

² Safety and Health Organization, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522, Japan

緒言

富栄養化した湖沼で水の華が形成されると、悪臭や景観の悪化に加え、水中の溶存酸素濃度の低下や遮光をもたらす他の生物に被害を与えるだけでなく、飲料水の異臭味など我々の生活に関わる問題を引き起こすこともある (Pearl 1988, 徐 2008)。さらに、Chen *et al.* (2009) は藍藻類 *Microcystis aeruginosa* が産生する毒素ミクロシスチンの慢性的な暴露によるヒト肝細胞への障害が見られたことを報告しており、人体への健康被害も懸念される。水の華は特定藻類の大量発生によるものであるため、その増殖特性を理解することが発生条件の解明および発生時の対策に必要である。

植物プランクトンの増殖は栄養塩濃度、日照および水温といった種々の環境因子に影響される (Tilman 1981, Rhee & Gotham 1981a, b, 矢木ら 1981)。栄養塩においては特に窒素およびリンが頻繁に植物プランクトンの増殖を制限する (Heckey & Kilham 1988, Sommer 1989)。制限された栄養塩に対する藻類種間の競合能力が他の種より優れていると優占化が生じ、またその差が著しい場合には大量発生の原因となる。

日本の富栄養湖のひとつに、千葉県の手賀沼がある。手賀沼はかつて夏季に *M. aeruginosa* を主とする水の華が頻繁に生じていたが、2000 年に北千葉導水路が完成し、利根川の水を手賀沼へ導水したところ、夏季において *M. aeruginosa* の水の華は見られなくなり、優占種は主として珪藻類

Cyclotella sp. に変化した。手賀沼における導水前 (1998 ~ 1999 年平均) および後 (2009 ~ 2010 年平均) での全窒素濃度はそれぞれ 3.9 および 2.5 mg-N L^{-1} 、全リン濃度はそれぞれ 0.35 および 0.15 mg-P L^{-1} であった (千葉県, 2011)。Amano *et al.* (2009, 2010) はこれらの栄養塩のうちリンに着目し、*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. に対しリン制限下での培養実験を行ったが、*M. aeruginosa* のリンに対する半飽和定数および取り込み速度はいずれも *Cyclotella* sp. に勝っており、2 種間競合実験においても $0.01 \sim 0.5 \text{ mg-P L}^{-1}$ のいずれのリン濃度でも *M. aeruginosa* の優占化が見られたことを報告している。Dos Santos & Calijuri (1998) はブラジルの貯水池における水温や栄養塩濃度の経時変化を観察するとともに、藻類に対する現地での囲い込み実験を行うことで藻類の増殖特性を分類した。*M. aeruginosa* は静的な環境条件で有利に増殖し、窒素やリンなど主要な栄養塩の欠乏状態に強いことを特徴としている。一方で *Cyclotella stelligera* の特徴は増殖速度が速いことと、高濃度の窒素およびリンを要求し、栄養塩の豊富な条件で優占化する能力に優れていると報告している。このように、藻類の優占種の変化は、湖水の栄養塩濃度のみでは説明できず、藻類種間の栄養塩に対する取り込みや貯めこみ能力が重要な因子であると考えられる。

一般に湖沼における存在量は窒素よりもリンのほうが多く、環境中ではリン制限となることが多いとされて

いる(岡田・須藤 1980)。しかし一方で、富栄養湖沼においては窒素制限となることが多数報告されている(Haande *et al.* 2011, Moisaner *et al.* 2009, Tsukada *et al.* 2006)。さらに富栄養湖沼ではN/P比の増加、つまり窒素濃度の増加あるいはリン濃度の減少に伴い藍藻類の優占率が高まるという報告もある(藤本ら 1995)。上記の手賀沼では、導水により窒素およびリンの両栄養塩濃度が減少し、またN/P比の増加が見られている。このうちリン濃度の影響については、*M. aeruginosa*の減少および*Cyclotella* sp.の優占化に影響を及ぼしていないことが分かっている(Amano *et al.* 2009, 2010, 関谷ら 2010)。このため手賀沼における導水に伴う優占種の変化は窒素濃度の減少、両種の窒素制限下における増殖特性、および窒素の取り込みや貯めこみ能力の差などの要因が関与していると考えられる。

本研究では藻類の増殖に及ぼす窒素濃度の影響を調べるため、藍藻類*M. aeruginosa*およびその比較対照として珪藻類*Cyclotella* sp.を用いて、単種培養実験により窒素に対する増殖特性および取り込み特性について検討した。さらに2種間競合培養を行い、窒素濃度と優占種変化の関連性について考察した。

材料および方法

試料

M. aeruginosa および *Cyclotella* sp. はそれぞれ、米国のテキサス大学・藻類コレクション(UTEX 2061)および英国の藻類・原生動物コレクション(CCAP 1070/4)から入手したものを用いた。両種ともに群体を形成しておらず単体細胞の状態であった。それぞれの藻類はオートクレーブで滅菌した改変WC培地(関谷ら 2010)によって培養温度20°C、光強度27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で培養した。0.5 mol L⁻¹ 塩酸および0.05 mol L⁻¹ NaOH水溶液により使用する培地のpH値を8.0に調整した。

前培養

それぞれの藻類を窒素制限条件に順応させるため前培養を行った。硝酸態窒素濃度を0.1 mg-N L⁻¹に調整したWC培地を500 mL三角フラスコに200 mL充填し、滅菌処理の後*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. をそれぞれ別々のフラスコを用いて、試料の項で述べた温度および光強度条件下で培養した。培養期間は培地の色調から判断し2~7日間行った。窒素濃度はNaNO₃の添加量を変えることで調整し、本来のWC培地におけるNaNO₃の添加量と比較して、調整により不足したナトリウムはNaOHを添加することで補った。なお、培地に添加する栄養塩の窒素はNaNO₃であるため、以降窒素は硝酸態窒素を示すものとして記述する。

単種培養実験

増殖特性実験

M. aeruginosa および *Cyclotella* sp. の窒素濃度に応じた

増殖特性を調べるためバッチ式単種培養実験を行った。窒素濃度を0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 および 5.0 mg-N L⁻¹ に調整したWC培地200 mLを500 mL三角フラスコに充填した。それぞれの培地を滅菌処理した後、前培養で得られた*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. を、初期細胞密度がそれぞれ10,000 および 5,000 cells mL⁻¹ となるように接種した。培養温度20°C、光強度27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期は14時間明期、10時間暗期、n=2の条件で培養し、藻体数から算出した細胞密度の経時変化を調べた。細胞密度の測定方法は測定の項に示すとおりである。フラスコは光の当たり方に偏りが出ないように1日1回位置を変え、藻体および培地中の栄養塩を均一に分散混合させるために手で攪拌した。

窒素取り込み特性実験

M. aeruginosa および *Cyclotella* sp. における窒素の取り込みを調べるためバッチ式単種培養実験を行った。Amano *et al.* (2009) の報告を参考に、窒素濃度を2.5 mg-N L⁻¹ に調整したWC培地800 mLを1,000 mL三角フラスコに充填した。培地を滅菌処理した後、前培養で得られた*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. を、初期細胞密度がそれぞれ10,000 cells mL⁻¹ となるように接種した。単種培養実験と同様の条件で培養し、藻体数から算出した細胞密度および培地中の窒素濃度の経時変化を調べた。窒素濃度の測定方法は測定の項に示すとおりである。

競合培養実験

M. aeruginosa および *Cyclotella* sp. による窒素濃度に応じた優占種変化の挙動を調べるためバッチ式2種間競合培養実験を行った。窒素濃度を0.1, 0.5 および 2.5 mg-N L⁻¹ に調整したWC培地200 mLを500 mL三角フラスコに充填した。それぞれの培地を滅菌処理した後、前培養で得られた*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. を、初期細胞密度がそれぞれ5,000 cells mL⁻¹ となるように同一の培地に接種した。単種培養実験と同様の条件で培養し、それぞれの藻体数から算出した細胞密度の経時変化を調べた。

測定

培養期間中1~2日おきに培地を1~2 mL採取し適宜希釈した後、藻体数を顕微鏡下でプランクトン計数板(Matsunami MPC-200)を用いて計数し細胞密度を算出した。窒素濃度は採取したサンプルを孔径0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過し、工場排水試験方法 紫外吸光度法(日本工業標準調査会 2010: JIS K0102 45.2)に従い定量した。測定は採取した1サンプルにつき2回行いその平均値を各実験における測定結果とした。

比増殖速度および窒素取り込み速度の算出

それぞれの藻類の増殖特性を比較するため、細胞密度の測定結果から比増殖速度 μ (day⁻¹)を(1)および(2)式によ

り算出した (American Public Health Association 1989)。

$$\frac{dC}{dt} = \mu C \quad (1)$$

$$\mu = \frac{\ln C_2 - \ln C_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

ここで C_1 および C_2 はそれぞれ、培養時間 t_1 および t_2 (day) における細胞密度 (cells mL⁻¹) である。

(2) 式で求めた μ を用いて、Baldia *et al.* (2007) の報告を参考に、(3) 式に示す Monod 式を (4) 式のように変形し、Hanes-Woolf プロットにより最大増殖速度 $\mu_{\max}$ (day⁻¹) および窒素に対する半飽和定数 K_N (mg-N L⁻¹) を算出した。

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [N]_0}{K_N + [N]_0} \quad (3)$$

$$\frac{[N]_0}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} [N]_0 + \frac{K_N}{\mu_{\max}} \quad (4)$$

ここで $[N]_0$ は培地における初期の窒素濃度 (mg-N L⁻¹) である。

さらに、それぞれの藻類における窒素の取り込み特性を比較するため、Amano *et al.* (2009) の報告を参考に、細胞密度および培地中の硝酸態窒素濃度の測定結果から窒素取り込み速度 V_N (pg-N cell⁻¹ day⁻¹) を (5) 式により算出した。

$$V_N = \frac{[N]_1 - [N]_2}{t_2 - t_1} \cdot \frac{1}{C_2 - C_1} \cdot 10^6 \quad (5)$$

ここで $[N]_1$ および $[N]_2$ はそれぞれ、培養時間 t_1 および t_2 (day) における培地中の硝酸態窒素濃度 (mg-N L⁻¹) である。

Table 1. Growth parameters of *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. for nitrogen at monoculture experiment.

Parameter	<i>M. aeruginosa</i>	<i>Cyclotella</i> sp.
Maximum growth rate $\mu_{\max}$ (day ⁻¹)	0.37	0.42
Half saturation constant K_N (mg-N L ⁻¹)	0.050	0.340
Maximum cell density (cells mL ⁻¹)	7.5×10^6	1.3×10^6
Nitrogen uptake rate V_N (pg-N cell ⁻¹ day ⁻¹)*	1.7×10^{-1} (day 1-15) 8.3×10^{-2} (day 15-25)	3.2×10^{-1}

*observed at 2.5 mg-N L⁻¹.

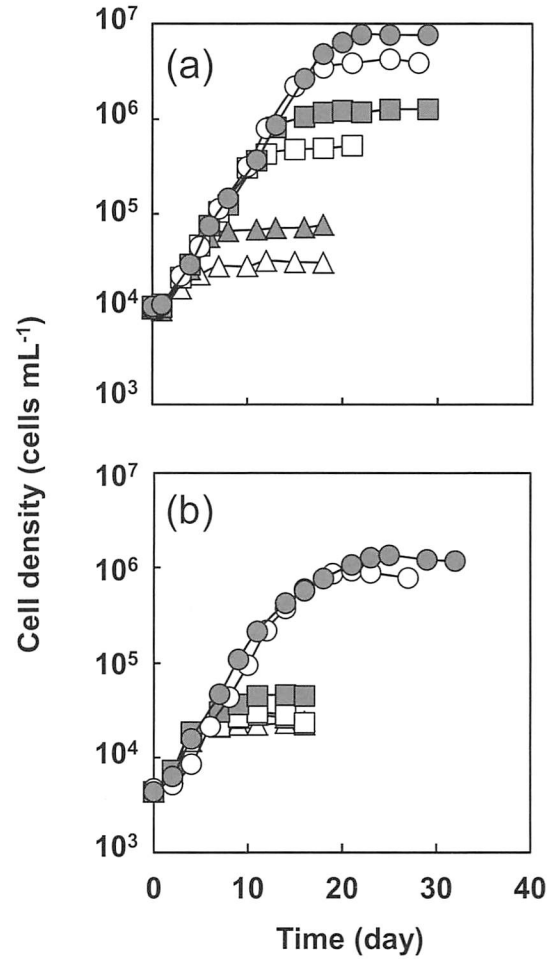


Fig. 1. The growth curves for (a) *Microcystis aeruginosa* and (b) *Cyclotella* sp. at various nitrogen concentrations in monoculture experiments. Symbols: ● 5.0 mg-N L⁻¹, ○ 2.5 mg-N L⁻¹, ■ 1.0 mg-N L⁻¹, □ 0.5 mg-N L⁻¹, ▲ 0.25 mg-N L⁻¹, △ 0.1 mg-N L⁻¹.

結果

単種培養実験

増殖特性実験

異なる窒素濃度条件下における *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. の増殖特性をそれぞれ Fig. 1 (a) および (b) に示す。*M. aeruginosa* においては、窒素濃度が 0.1 および 0.25 mg-N L⁻¹ では最大細胞密度が 10^5 cells mL⁻¹ 以下であったのに対し、0.5 mg-N L⁻¹ では 4.5×10^5 cells mL⁻¹ に達し、以降濃度上昇とともに著しい増殖が見られ、5.0 mg-N L⁻¹ において最大細胞密度は 7.5×10^6 cells mL⁻¹ となった。一方で *Cyclotella* sp. においては 1.0 mg-N L⁻¹ 以下の濃度では増殖に差が見られず、最大細胞密度も 10^5 cells mL⁻¹ 以下であったのに対し、2.5 mg-N L⁻¹ では 9.3×10^5 cells mL⁻¹ と著しく増加し、5.0 mg-N L⁻¹ において最大細胞密度は 1.3×10^6 cells mL⁻¹ となった。

最大細胞密度と窒素濃度の関係を Fig. 2 に示す。*M. aeruginosa* の細胞密度は低い窒素濃度から増加したが、飽

和には至らなかった。一方で *Cyclotella* sp. は 1.0 から 2.5 mg-N L⁻¹ の間に著しい変化を生じ、5.0 mg-N L⁻¹ において増殖の飽和がみられた。

実験方法の (2) 式により算出した *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. における増殖速度と窒素濃度の関係をそれぞれ Fig. 3 (a) および (b) に示し、単種培養実験により得られた窒素に対する最大増殖速度 $\mu_{\max}$ および半飽和定数 K_N を Table 1 に示す。*M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. において、実験方法の (4) 式から算出された $\mu_{\max}$ はそれぞれ 0.37 および 0.42 day⁻¹, K_N はそれぞれ 0.050 および 0.340 mg-N L⁻¹ であった。

窒素取り込み特性実験

窒素濃度 2.5 mg-N L⁻¹ における *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. の増殖曲線および培地中の窒素濃度の変化をそれぞれ Fig. 4 (a) および (b) に示す。*M. aeruginosa* においては培養 15 日目に細胞密度が 2.8×10^5 cells mL⁻¹ に達し、窒素濃度はおよそ 0.5 mg-N L⁻¹ 減少した。培養 15 日目以降も増殖曲線は一定の傾きを見せたのに対し、窒素濃度の変化は培養 1 ~ 15 日目に比べ大きくなり、培養 25 日目では検出限界を下回った。一方で *Cyclotella* sp. においては細胞密度が 5.0×10^4 cells mL⁻¹ に達した培養 4 日目を降から培地中の窒素濃度は著しく減少し、培養 11 日目には検出限界を下回った。いずれの藻類も窒素濃度が検出限界を下回ると増殖は見られなくなった。

実験方法の (5) 式から算出された窒素の取り込み速度 V_N は Table 1 に示すとおりであり、*M. aeruginosa* の培養 1 ~ 15 および 15 ~ 25 日目に、それぞれ 1.7×10^{-1} および 8.3×10^{-2} pg-N cell⁻¹ day⁻¹ であった。一方 *Cyclotella* sp. は

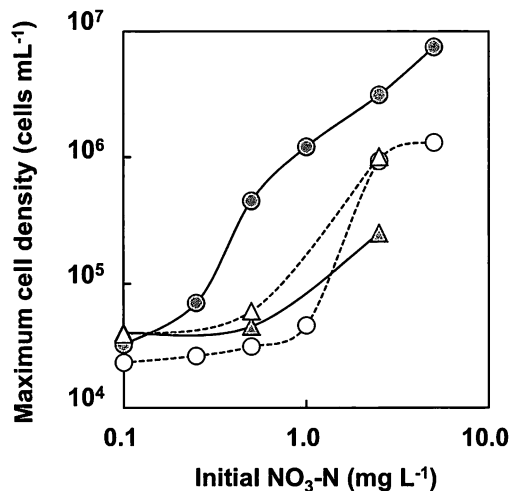


Fig. 2. Relationship between maximum cell densities of *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. and nitrogen concentrations. Symbols: ● *M. aeruginosa* (monoculture), ○ *Cyclotella* sp. (monoculture), ▲ *M. aeruginosa* (competitive culture), △ *Cyclotella* sp. (competitive culture).

培養 4 ~ 11 日目において 3.2×10^{-1} pg-N cell⁻¹ day⁻¹ であった。

競合培養実験

競合培養下、異なる窒素濃度条件における *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. の増殖曲線をそれぞれ Fig. 5 (a) ~ (c) に示し、各窒素濃度における最大細胞密度を Fig. 2 および Table 2 に示す。窒素濃度 0.1 mg-N L⁻¹ におけるそれぞれの増殖および最大細胞密度は単種培養実験の結果と差が見られなかった。一方 0.5 mg-N L⁻¹ では、*M. aeruginosa* の最大細胞密度が単種培養実験の結果に比べ 90% 低下したのに対し、*Cyclotella* sp. は単種培養実験とほぼ同じ増殖を見せ、それぞれの藻類の最大細胞密度は同程度となった。さらに 2.5 mg-N L⁻¹ では、*Cyclotella* sp. の最大細胞密度が *M. aeruginosa* を上回り、全体の細胞数の 80% を占めた。このとき *M. aeruginosa* は単種培養実験の結果と比較すると最大細胞密度が 92% 低下したのに対し、*Cyclotella* sp. はほぼ同じであった。

実験により得られた増殖速度を Table 2 に示す。*M. aeruginosa*

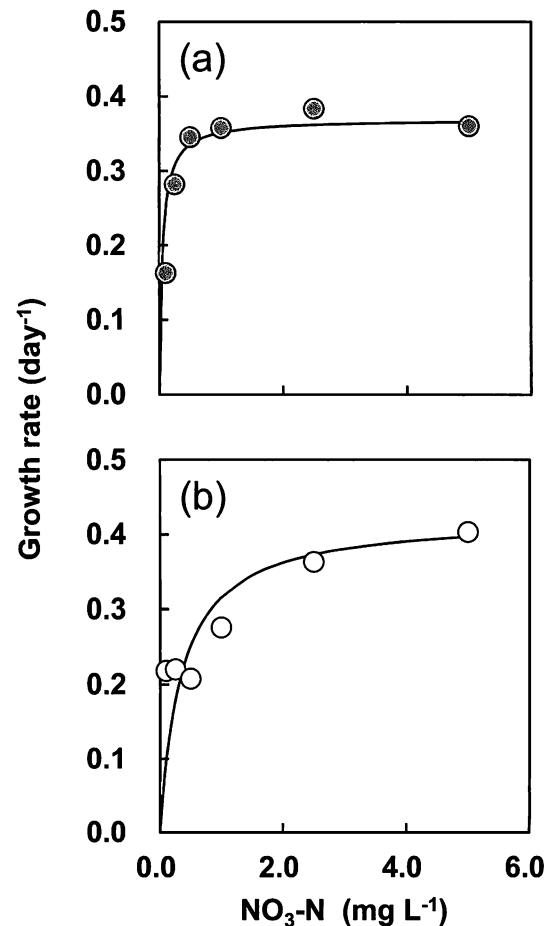


Fig. 3. The growth rates for (a) *Microcystis aeruginosa* and (b) *Cyclotella* sp. at various nitrogen concentrations in monoculture experiments. Symbols: ● *M. aeruginosa*, ○ *Cyclotella* sp..

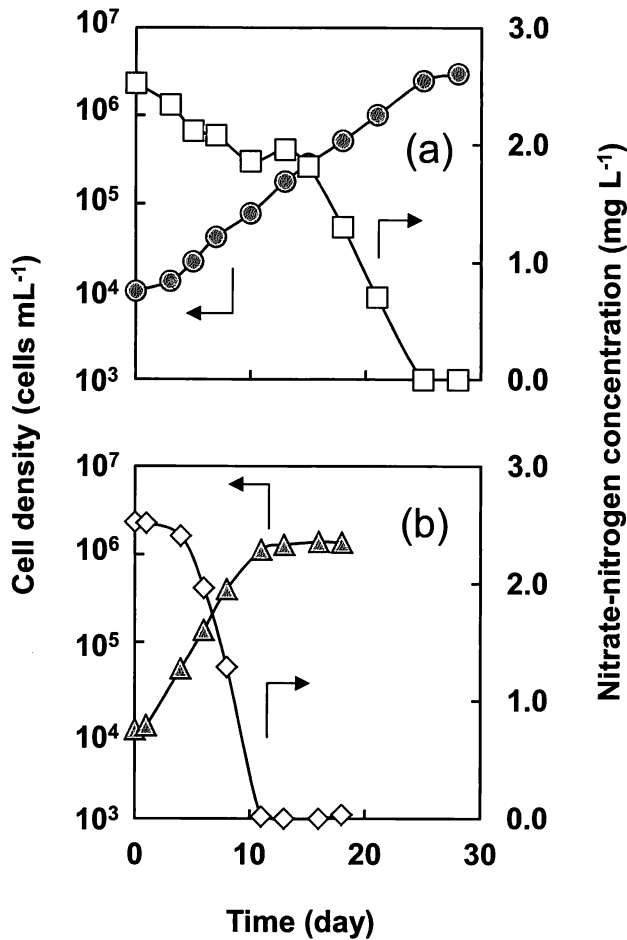


Fig. 4. Changes in cell density and nitrogen concentration with growth of (a) *Microcystis aeruginosa* and (b) *Cyclotella* sp. at 2.5 mg-N L⁻¹ in monoculture experiments. Symbols: ● cell density (*M. aeruginosa*), ▲ cell density (*Cyclotella* sp.), □ NO₃-N concentration (*M. aeruginosa*), ◇ NO₃-N concentration (*Cyclotella* sp.).

および *Cyclotella* sp. における競合培養実験時の増殖速度は、それぞれ 0.2 ~ 0.3 および 0.3 ~ 0.4 day⁻¹ であり、*M. aeruginosa* は単種培養実験の結果と比較すると全体的に低い値を示した。

考察

Table 1 から単種培養における *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. の増殖特性を比較すると、*M. aeruginosa* は窒素に対する K_N が *Cyclotella* sp. より 7 倍低く、低い窒素濃度でも比較的増殖しやすいといえる。一方で μ_{max} は *Cyclotella* sp. のほうが大きく、十分な窒素が存在する条件下では *Cyclotella* sp. のほうが速く増殖できることが示唆される。Dos Santos & Calijuri (1998) の *M. aeruginosa* および *C. stelligera* に対する特徴づけも、本研究の結果と一致した傾向がみられる。

窒素制限下における *M. aeruginosa* の μ_{max} は Baldia *et al.* (2007) が 0.67 day⁻¹、矢木ら (1981) が 0.24 day⁻¹ と報

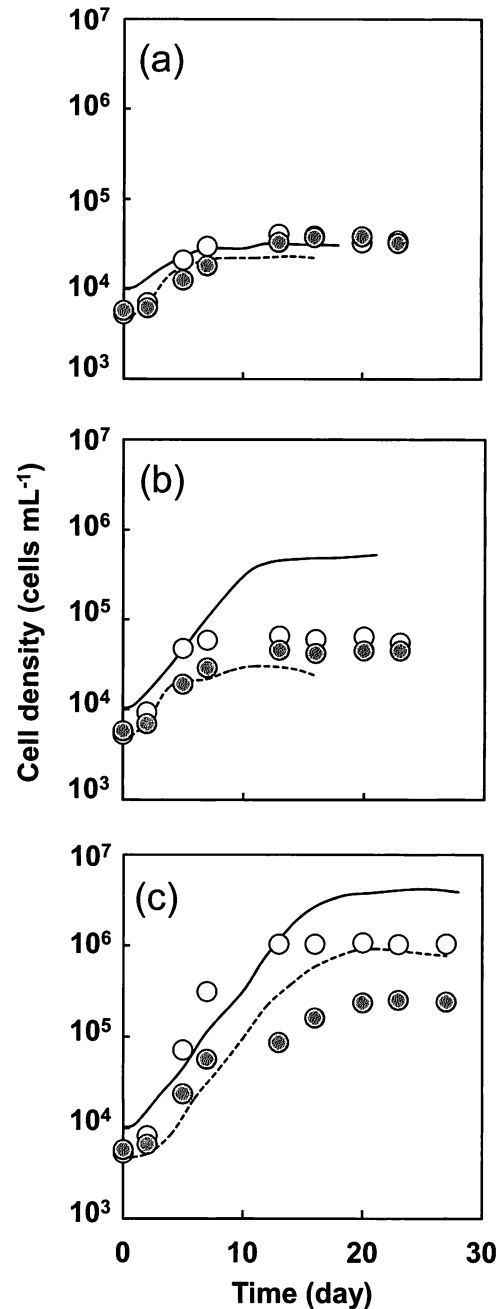


Fig. 5. The growth curves for *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. at (a) 0.1 mg-N L⁻¹, (b) 0.5 mg-N L⁻¹ and (c) 2.5 mg-N L⁻¹ in competitive culture experiments. Symbols: ● *M. aeruginosa*, ○ *Cyclotella* sp., — *M. aeruginosa* (monoculture), - - *Cyclotella* sp. (monoculture)

告している。また K_N は 0.53 mg-N L⁻¹ (Baldia *et al.* 2007) と報告されている。Baldia *et al.* (2007) の実験で用いられた *M. aeruginosa* は実湖沼から単離されたものであり、本実験とは違い群体形成能を有している。群体を形成している *M. aeruginosa* は窒素の取り込み量を多くすることで、全細胞に栄養塩を行き渡らせていると考えられるため、結果的に半飽和定数が本研究で得られた値より大きくなったと推察される。同じ株でも群体形成能の有無により窒素の取り込み能

力に差を生じることがあるため（国立公害研究所 1986），これも K_N に差が見られた原因と考えられる。一方 Shuhua & Da-Yong (1993) の報告によると *Cyclotella* sp. の $\mu_{\max}$ および K_N はそれぞれ、 1.22 day^{-1} および $0.013 \text{ mg-N L}^{-1}$ と報告されており，本研究で得られた結果と比較すると $\mu_{\max}$ は高く， K_N は低い値を示している。しかしながら Sarthou *et al.* (2005) の報告によると一般的な珪藻の $\mu_{\max}$ は $0.4 \sim 3.3 \text{ day}^{-1}$ ， K_N は $0.02 \sim 10.2 \text{ mg-N L}^{-1}$ であり，本研究の結果はおおむね範囲内にある。

窒素取り込み実験において，*M. aeruginosa* の培地中の窒素減少量は，細胞密度が $2.8 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ に到達するまでは小さく，以降細胞密度が高くなるにつれて大きくなった（Fig. 4 (a)）。これは Philip & Gary (1998) の報告における，窒素制限下での *M. aeruginosa* 培養中の窒素濃度変化と同様の傾向を示している。単位細胞あたりの V_N は培養初期（1～15 日目）が培養後期（15～25 日目）の 2 倍ではあるが（Table 1），培地中の濃度変化からは，少量の窒素でも増殖し，細胞密度が高い状態であれば環境中の窒素を大きく減少させることで他の種の増殖を抑制することが推察される。一方で *Cyclotella* sp. は細胞密度が低いうちから窒素濃度の著しい減少がみられ（Fig. 4 (b)）， V_N は *M. aeruginosa* の培養初期に対して 2 倍，培養後期に対して 4 倍であった（Table 1）。したがって環境中では細胞密度が低くても窒素の取り込み量は大きく，*M. aeruginosa* より窒素を早く取り込めることが示唆される。

Marinho & Azevedo (2007) は *M. aeruginosa* および珪藻類 *Aulacoseira distans* の培養実験を通じ，培地中における硝酸態窒素濃度の変化を調べた。その結果 *A. distans* における増殖初期の単位バイオマスあたりの窒素量は *M. aeruginosa* より大きく，珪藻類の取り込み量が藍藻類に勝っているという同様の傾向を示している。Egge (1998) は細胞の大きさにより栄養塩の吸収量が異なることを報告している。この報告に基づく *Cyclotella* sp. は *M. aeruginosa* より細胞の表面積が大きく栄養塩と接触できるため V_N が高いと予想される。一方で細胞体積は *M. aeruginosa* のほうが小さく，より低い窒素濃度でも増殖できることが推察される。Sommer (1984) は植物プランクトンの栄養塩獲得戦略とし

て，（1）最大増殖速度および栄養塩の最大取り込み速度が高く栄養塩をすぐに増殖に利用できるもの，（2）最大増殖速度は小さいが栄養塩の最大取り込み速度は大きく蓄えに優れるもの，および（3）半飽和定数が小さく，栄養塩の制限に強いものの 3 つを挙げている。本研究の結果からは，窒素に対して *M. aeruginosa* は（3）に，*Cyclotella* sp. は（1）に該当すると考えられる。

単種培養実験の結果からは *M. aeruginosa* のほうが *Cyclotella* sp. よりも低い窒素濃度から $10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ を超える高い細胞密度を得ることができ，また最大細胞密度も *Cyclotella* sp. の 6 倍であったため（Table 1），2 種間競合培養において *M. aeruginosa* のほうが増殖に有利であると予想された。しかし競合培養では *M. aeruginosa* はいずれの濃度でも優占することができず， 2.5 mg-N L^{-1} の条件では *Cyclotella* sp. の優占が見られた（Fig. 5 (a)～(c) および Table 2）。窒素濃度 0.1 mg-N L^{-1} において，*M. aeruginosa* の最終的な細胞密度はわずかに *Cyclotella* sp. より高かったが（Fig. 5 (a)），単種培養実験での増殖は *Cyclotella* sp. と同程度であった（Fig. 2）。*M. aeruginosa* は半飽和定数に優れていても， 0.1 mg-N L^{-1} では十分な増殖ができないため，優占化には至らなかったと考えられる。 0.5 mg-N L^{-1} における 2 種の細胞密度は同程度であるが，*M. aeruginosa* は単種培養実験と比較すると細胞密度に著しい低下がみられた（Fig. 5 (b)）。競合条件下では種によって培地中の窒素の取り込み量が異なるため，藻類の増殖特性は見かけの濃度ではなく取り込んだ窒素に応じたものとなる。多くの珪藻類は暗期においても窒素を取り込み，同化することが知られている（Clark *et al.*, 2002）。このことも *Cyclotella* sp. が *M. aeruginosa* の増殖を抑制できた理由と考えられる。*Cyclotella* sp. は細胞密度が低くても窒素の取り込み速度が大きいので（Table 1），増殖には至らなくとも，*M. aeruginosa* が利用できる窒素の量を減らし，その結果 *M. aeruginosa* の増殖が抑制されたと推察される。また Fig. 1 (a) および Fig. 2 からわかるように，*M. aeruginosa* は 0.25 から 0.5 mg-N L^{-1} の間で細胞密度の変化が大きく，この濃度範囲においては取り込み量が強く影響すると考えられる。単種培養において *Cyclotella* sp. は 2.5 mg-N L^{-1} で *M. aeruginosa* より培地中の窒素を早

Table 2. Growth parameters of *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. for nitrogen at competitive culture experiment.

Nitrogen concentration (mg-N L ⁻¹)	competition		monoculture	
	<i>M. aeruginosa</i>	<i>Cyclotella</i> sp.	<i>M. aeruginosa</i>	<i>Cyclotella</i> sp.
	Growth rate (day ⁻¹)			
0.1	0.18	0.26	0.16	0.22
0.5	0.29	0.37	0.36	0.21
2.5	0.34	0.44	0.38	0.36
	Maximum cell density (cells mL ⁻¹)			
0.1	4.0×10^4	3.9×10^4	3.2×10^4	2.3×10^4
0.5	4.5×10^4	6.0×10^4	4.5×10^5	3.1×10^4
2.5	2.5×10^5	1.0×10^6	3.1×10^6	9.3×10^5

く減少させ (Fig. 4 (a), (b)), *M. aeruginosa* より最大細胞密度は低い十分な増殖が可能である (Fig. 1 (b), Fig. 2)。したがって *Cyclotella* sp. は窒素を独占し高い細胞密度を得られたのに対し, *M. aeruginosa* は少量の窒素でも増殖できるものの *Cyclotella* sp. の細胞密度に到達するには至らず, *Cyclotella* sp. の優占化が生じたと考えられる。

本研究から, *Cyclotella* sp. は窒素濃度が $2 \sim 3 \text{ mg-N L}^{-1}$ までの環境において窒素を独占することで *M. aeruginosa* に対し優占化する。また低い濃度でも増殖には至らないものの, 窒素の取り込みによって *M. aeruginosa* の増殖を抑制しうることが推察された。この結果は, 前述の手賀沼における導水後の状況をよく反映しており, 手賀沼における *M. aeruginosa* から *Cyclotella* sp. への優占種変化に対し, 窒素濃度の減少は大きな原因の 1 つであることが推察される。一方本研究での競合実験における窒素濃度範囲では *M. aeruginosa* の増殖が抑制され *Cyclotella* sp. の優占が見られたが, *M. aeruginosa* の細胞密度は 5.0 mg-N L^{-1} 以降の濃度でさらに増大するのに対し, *Cyclotella* sp. の増殖は飽和するものと推測される (Fig. 1 (a), (b))。窒素の取り込みが増殖に伴って生じる場合, 高窒素濃度条件下で増殖が飽和すると窒素が残余する可能性がある。この場合, 窒素の取り込み速度だけではなく, 取り込んだ窒素量に対する細胞の収量によって優占種が変化すると考えられる。*Cyclotella* sp. の取り込み容量以上の窒素が存在していれば, 最大の細胞密度に勝る *M. aeruginosa* が *Cyclotella* sp. の細胞密度に迫いついていき, 優占種の逆転を生じると推察される。窒素濃度 5.0 mg N L^{-1} は, 手賀沼における導水前の濃度を反映しており, 過去の手賀沼において *M. aeruginosa* が優占化していた事実を考慮すると, 上述の現象は起こりうるものであるといえる。

実湖沼では流入河川の影響を受け, 湖水の滞留時間が変化しており, 本研究で用いた 2 種の藻類の競合にも大きな影響を及ぼすと考えられる。また, 窒素やリンなど栄養塩制限下での藻類の増殖, 栄養塩の吸収あるいは貯め込み能力は, 栄養塩の濃度, 照度, 温度などの環境因子によって大きく変化するため, これも藻類の優占化を左右する因子であると言える。このため, 今後は *M. aeruginosa* および *Cyclotella* sp. の種間競合に対する水の滞留時間, 栄養塩濃度, 照度, あるいは温度などといった環境因子についての検討が求められる。

謝辞

本研究を進めるにあたり, 多岐にわたってご援助くださいました千葉大学総合安全衛生管理機構の長尾啓一機構長 (教授, 医学博士) に感謝申し上げます。研究において貴重なご意見をいただきました木更津工業高等専門学校の相川正美教授に厚くお礼申し上げます。

引用文献

Amano, Y., Sakai, Y., Sekiya, T., Qian, X., Fujimura, Y., Taki, K. &

- Machida, M. 2009. Influence of phosphorus and silicon on competitive interaction between *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. by Monoculture and competitive biculture experiments. *Japanese Journal of Water Treatment Biology* 45: 193-200.
- Amano, Y., Sakai, Y., Sekiya, T., Takeya, K., Taki, K. & Machida, M. 2010. Effect of phosphorus fluctuation caused by river water dilution in eutrophic lake on competition between blue-green alga *Microcystis aeruginosa* and diatom *Cyclotella* sp. *Journal of Environmental Sciences* 22: 1666-1673.
- American Public Health Association 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington, D. C.
- Baldia, S. F., Evangelista, A. D., Aralar, E. V. & Santiago, A. E. 2007. Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines. *Journal of Applied Phycology* 19: 607-613.
- Chen, J., Xie, P., Li, L. & Xu, J. 2009. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicological Sciences* 108: 81-89.
- 千葉県環境生活部水質保全課 2011. 公共用水域測定結果データベース 千葉県 HP: <http://www.pref.chiba.lg.jp/suiho/kasentou/koukyouyousui/data/ichiran-koshou.html> (2011.11 月現在).
- Clark, D. R., Flynn, K. J. & Owens, N. J. P. 2002. The large capacity for dark nitrate-assimilation in diatoms may overcome nitrate limitation of growth. *New Phytologist* 155: 101-108.
- Dos Santos, A. C. A. & Calijuri, M. C. 1998. Survival strategies of some species of the phytoplankton community in the Barra Bonita Reservoir (São Paulo, Brazil). *Hydrobiologia* 367: 139-152.
- EGGE, J. K. 1998. Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations? *Journal of Marine Systems* 16: 191-198.
- 藤本尚志・福島武彦・稲森悠平・須藤隆一 1995. 全国湖沼データの解析による藍藻類の優占化と環境因子の関係. *水環境学会誌* 18: 901-908.
- Haande, S., Rohrlack, T., Semyalo, R. P., Brettum, P., Edvardsen, B., Lyche-Solheim, A., Sørensen, K. & Larsson, P. 2011. Phytoplankton dynamics and cyanobacterial dominance in Murchison Bay of Lake Victoria (Uganda) in relation to environmental conditions. *Limnologia* 41: 20-29.
- Heckey, R.E. & Kilham, P. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33: 796-822.
- 徐 開欽 2008. 中国における水環境の現状と深刻さ増す湖沼のアオコ問題. *科学* 78: 756-759.
- 国立公害研究所 1986. アオコの増殖及び分解に関する研究. 国立公害研究所研究報告: 7-17.
- Marinho, M. M. & Azevedo, S. M. F. O. 2007. Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquatic Ecology* 41: 525-533.
- Moisander, P. H., Ochiai, M. & Lincoff, A. 2009. Nutrient limitation of *Microcystis aeruginosa* in northern California Klamath River reservoirs. *Harmful Algae* 8: 889-897.
- 日本工業標準調査会 2010. JIS K0102 45.2 紫外吸光光度法. 工場排水試験方法: 168-170.
- 岡田光正・須藤隆一 1980. そう類増殖とリン. 用水と廃水 22: 891-896
- Pearl, H. W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal estuarine island waters. *Limnology and Oceanography* 33: 823-847.
- Philip, T. O. & Gary, J. J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa*. *Limnology and Oceanography* 43: 1604-1614.
- Rhee, G. Y. & Gotham, J. J. 1981a. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Light and the interactions of light with nitrate

- limitation. *Limnology and Oceanography* 20: 649-659.
- Rhee, G. Y. & Gotham, J. J. 1981b. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 26: 635-648.
- Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S. & Tréguier, P. 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research* 53: 25-42.
- 関谷卓見・竹谷公貴・天野佳正・町田基 2010. 藍藻類 *Microcystis aeruginosa* と珪藻類 *Cyclotella* sp. の増殖に及ぼす N/P 比および温度の影響. *水環境学会誌* 33: 175-179.
- Shuhua, H. & Da-Yong, Z. 1993. The effects of initial population density on the competition for limiting nutrients in two freshwater algae. *Oecologia* 96: 569-574.
- Sommer, U. 1984. The paradox of the plankton: Fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography* 29: 633-636.
- Sommer, U. 1989. Nutrient status and nutrient competition of phytoplankton in a shallow, hypertrophic lake. *Limnology and Oceanography* 34: 1162-1173.
- Tilman, D. 1981. Tests of resource competition theory using four species of Lake Michigan algae. *Ecology* 62: 802-815.
- Tsukada, H., Tsujimura, S. & Nakahara, H. 2006. Effect of nutrient availability on the C, N, and P elemental ratios in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Limnology* 7: 185-192.
- 矢木修身・岡田光生・須藤隆一・萩原富司・高村義親 1981. *Microcystis* の増殖特性. 国立公害研究所研究報告 25: 47-58.

(Received Apr. 8, 2011; Accepted Feb. 10, 2012)