

## 底生付着珪藻 *Nitzschia* sp. の増殖に対する付着基質サイズの影響

鈴木雅巳・山本民次

広島大学大学院生物圏科学研究科，東広島市739-8528

**要 旨** 規格品のガラスビーズを用いて底生付着珪藻 *Nitzschia* sp. の増殖に対する付着基質のサイズの影響を実験的に調べた。*Nitzschia* sp. の増殖はガラスビーズを添加した方が良く，最も粒径の小さいガラスビーズ（平均直径=0.115 mm）で最高の比増殖速度  $0.39 \text{ day}^{-1}$  が得られ，最大収量  $2.2 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$  が得られた。一方，最も粒径の大きいガラスビーズ（平均直径=1.244 mm）では比増殖速度は最も低く（ $0.23 \text{ day}^{-1}$ ），ガラスビーズを加えなかった対照区の比増殖速度（ $0.25 \text{ day}^{-1}$ ）とほとんど差は無かった。本研究で得られた結果は，粒径の小さいガラスビーズが *Nitzschia* sp. の付着基質として適しているということだけではなく，付着基質のサイズが底生微細藻類の増殖に対する重要な環境因子であるということを示唆している。

キーワード：ガラスビーズ，基質サイズ，珪藻，底生微細藻類

### 緒 言

近年，沿岸海域生態系の保全において，底生生態系が重要な役割を果たしているであろうという認識が高まりつつある。すなわち，太陽光が海底に届く，いわゆる「浅海有光床」では，底生性の微細藻が光合成生産を行い，酸素を放出することで，還元的底質を酸化的にする。このことにより，底層の貧酸素化を軽減し，底生動物の生息を可能にする。このような，浅海有光床の面積は瀬戸内海全体では25%，周防灘では65%（再計算によれば78%；山本，未発表）英虞湾では85%にも及ぶ（山本，2004）。

浅海有光床に生息する底生微細藻は主に付着性珪藻であり，水柱内の浮遊藻類に比べて，弱光適応型（山本ら，2004），高栄養要求型（広島県環境保健協会，2003），であることが分かってきている。そこで，これらの特性を利用した水質・底質環境の改善が試みられている（広島県環境保健協会，2002； 2003； 2004）。底生微細藻は動物ベントスや底生魚類の餌として重要であることが指摘されており（Cahoon, 1999; Takai *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003），また，消化管内組成や安定同位体分析により懸濁物食者である貝類にとっても重要な餌であるという認識もある（小池ら，1989; Kamermans, 1994）。

これまで，浮遊微細藻については，水温，塩分，光強度に対する増殖応答や，栄養塩の取り込みなどについて数多くの研究報告がなされているのに対して，底生微細藻については，現場観測がいくつか行われているものの，増殖生理についての知見は少ない。底生微細藻の主体を占める付着珪藻は，細胞から滲出する粘液物質（extracellular polymeric substances: EPS）で砂粒などの基質に付着して生息している（Edgar and Pickett-Heaps, 1984）。付着基質の粒径（サイズ）は水温，塩分，光強度，栄養塩類濃度などとともに，付着珪藻の増殖に対する環境因子として重要であると考えられる。そこで，本研究では規格品である球形ガラスビーズを用いて，付着珪藻培養株 *Nitzschia* sp. の増殖がそれらのサイズの違いによる影響を受けるかどうかを調べることを目的とした。

## 材料と方法

### 供試株と培養液

実験には、2001年7月に海田湾（広島湾奥部の枝湾）において、水深約10mの海底から採取・分離し、培養に成功した底生性の羽状目付着珪藻 *Nitzschia* sp. のクローン株を無菌的に継代培養を繰り返したものをを用いた（山本ほか，2004）。実験期間中に測定した本種の細胞サイズは、長さ  $54.3 \pm 2.8 \mu\text{m}$ （mean  $\pm$  S.D.,  $n=20$ ）、幅  $5.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ （mean  $\pm$  S.D.,  $n=20$ ）である。実験には、広島湾の自然海水を用いて調製した f/2 培地（Guillard and Ryther, 1962）を使用した。

### 付着基質のサイズに対する増殖応答試験

試験管（直径13 mm，長さ100 mm，ガラス製）3本に *Nitzschia* sp. の付着基質として粒径の異なるガラスビーズ（井内盛栄堂，ガラスビーズ，BZ-01, 02, 04, 06, 1）をそれぞれ試験管の底から約5 mmの厚みとなるように添加した。それぞれの公称平均粒径は0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 mmであるが、実際の平均粒径と範囲はTable 1に示した通りである。以下、粒径の小さい方から順に、それぞれGB-1, GB-2, GB-3, GB-4, GB-5と呼ぶこととし、ガラスビーズを添加しないものを対照区として、これをGB-0と呼ぶこととする。これらの試験管にf/2培地を3.5 mlずつ分注し、それぞれに約2週間前培養した *Nitzschia* sp. を含む培養液を新鮮培地で10倍に希釈したものを0.5 mlずつ接種した。接種後の初期細胞密度は  $113 \pm 7 \text{ cells ml}^{-1}$ （ $n=6$ ）であった。培養期間中は試験管をバイオフィルター（三富産業，サン・バイオフィルター，pore size  $< 0.02 \mu\text{m}$ ）で蓋をし、外部からの汚染を防いだ。

Table 1. Mean diameters and ranges of glass beads used in the present study.

	Mean diameter (mm)	Range (mm)
GB-0 (no glassbeads)	-	-
GB-1	0.115	0.105~0.125
GB-2	0.214	0.177~0.250
GB-3	0.425	0.350~0.500
GB-4	0.605	0.500~0.710
GB-5	1.244	0.991~1.397

実験条件は本種の増殖至適条件である水温15℃，塩分25PSU，光強度  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ （白色蛍光灯）とした（山本ら，2004）。また，明暗周期は12 L:12 D（明期は6:00-18:00）とした。これらを1-3日おきに毎回10:00に攪拌し，蛍光光度計（Turner designs社製，Model 10）を用いて，蛍光強度を測定した。実験期間中は細胞数の計数のために試験管の蓋を開けると余計な汚染を招くうえ，サンプルを取り出すことで，培養容量が減少することは不都合と考え，このように，蛍光強度を測定することにより，*Nitzschia* sp. のバイオマスの指標とした。測定する蛍光は植物細胞が有するクロロフィル *a* が発するもので，本実験とは別に *Nitzschia* sp. を培養し，対数増殖期の細胞を希釈して様々な濃度段階の溶液を作り，蛍光光度計で蛍光強度を測定するとともに細胞数を計数して，蛍光強度と細胞数の関係を求めた（Fig. 1）。両者の間には高い正の相関が見られたので（ $r=0.994$ ），対数増殖期の細胞については，蛍光強度から細胞数を見積もることが可能であると判断した。

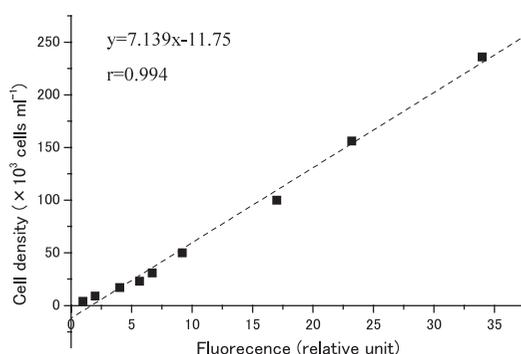


Fig. 1. Relationship between *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence and cell density.

Fig. 1より、蛍光強度から求めた細胞数を次の式にあてはめ、対数増殖期の値について最小自乗法により比増殖速度を算出した。実験は3本立て (triplicate) で行ったので、それらの平均値をとり、対数増殖の期間は蛍光強度を片対数グラフにプロットした時に得られる直線部分とした。したがって、計算対象とした期間は9～21日間と試験区により多少異なった (Table 2)。

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0}$$

ここで、

$\Delta t$ : 対数増殖の期間 (days)

$N_0$ : 対数増殖初期の細胞数 (cells  $ml^{-1}$ )

$N_t$ : 対数増殖終期の細胞数 (cells  $ml^{-1}$ )

である。

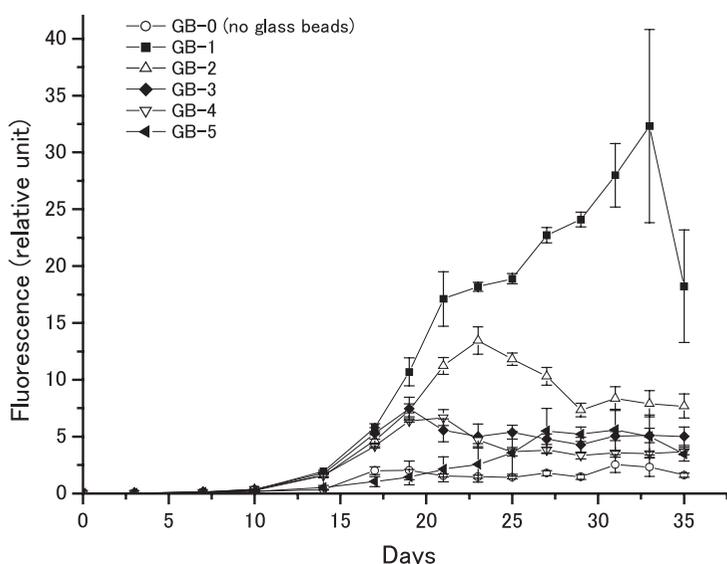
また、各試験区の比増殖速度と蛍光強度最大値について、それぞれ多重比較検定を行った。多群間の有意差検定にone-way ANOVAによるScheffe's testで検定した。なお、解析ソフトにはStat View (SAS Institute Inc.) を用いた。

## 結 果

ガラスビーズのサイズの違いによる *Nitzschia* sp. の増殖曲線を Fig. 2に、比増殖速度などを Table 2にまとめた。GB-1, GB-2, GB-3, GB-4では、0.36-0.39  $day^{-1}$ で、ガラスビーズのサイズが小さくなるほど良く増殖するという結果が得られた。一方、ガラスビーズを添加しなかった対照区 (GB-0) では比増殖速度  $0.25 \pm 0.01$   $day^{-1}$ で増殖が悪かった。また、ガラスビーズの粒径の最も大きかったGB-5での比増殖速度は  $0.23 \pm 0.03$   $day^{-1}$ で、対照区よりも小さかった。また、各試験区の比増殖速度についての多重比較検定の結果を Table 3aにまとめた。GB-1, GB-2, GB-3, GB-4は、それぞれGB-0およびGB-5と有意差があった ( $p < 0.0001$ )。

Table 2. Specific growth rates estimated from the exponential growth phase and maximum fluorescence during the experiments.

	Specific growth rate (day <sup>-1</sup> )	Maximum fluorescence (relative unit)
GB-0 (no glass beads)	0.25±0.01 (0-17 day)	2.5±0.68
GB-1	0.39±0.004 (7-19 day)	32±8.5
GB-2	0.37±0.003 (10-19 day)	14±1.2
GB-3	0.37±0.01 (3-17 day)	7.5±1.0
GB-4	0.36±0.01 (7-17 day)	6.7±0.71
GB-5	0.23±0.03 (0-21 day)	5.6±1.8

Fig. 2. Growth curves of *Nitzschia* sp. grown with glass beads in different sizes.

各実験区において培養期間中に得られた蛍光強度最大値も、比増殖速度で得られた結果と同様の傾向を示した (Table 2)。すなわち、蛍光強度最大値はGB-1, GB-2, GB-3, GB-4では粒径が小さいほどが大きく、GB-0 (2.5±0.68) やGB-5 (5.6±1.82) では小さかった。粒径の最も小さいGB-1の蛍光強度最大値は32.3±8.5で、GB-0の13倍、GB-5の5.8倍であった。また、各試験区の蛍光強度最大値についての多重比較検定の結果をTable 3bにまとめた。GB-1はGB-0, GB-2, GB-3, GB-4, GB-5のすべてと有意差があった ( $p < 0.0001 \sim 0.002$ )。また、GB-2とGB-0の間にも有意差があった ( $p = 0.0105$ )。

Table 3. Probability by Scheffe's test of one-way ANOVA for (a) specific growth rate and (b) maximum fluorescence, respectively. \*\*\*, \*\*, \* indicate significant differences at  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ , respectively.

(a)						
	GB-0	GB-1	GB-2	GB-3	GB-4	GB-5
GB-0						
GB-1	<0.0001***					
GB-2	<0.0001***	0.5959				
GB-3	<0.0001***	0.4055	0.9993			
GB-4	<0.0001***	0.1911	0.9491	0.9943		
GB-5	0.706	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	<0.0001***	

(b)						
	GB-0	GB-1	GB-2	GB-3	GB-4	GB-5
GB-0						
GB-1	<0.0001***					
GB-2	0.0105*	0.0002**				
GB-3	0.4993	<0.0001***	0.441			
GB-4	0.6675	<0.0001***	0.3163	0.9999		
GB-5	0.8713	<0.0001***	0.1853	0.9913	0.9993	

## 考 察

本実験の結果より、付着基質のサイズ（粒径）は*Nitzschia* sp.の増殖因子として極めて重要であることが示唆された。特に今回用いたガラスビーズの中で最も粒径の小さいGB-1で増殖速度、蛍光強度最大値ともに高い値が得られた。多重比較検定の結果より、粒径0.1mm（GB-1）が増殖のための付着基質のサイズとして最も適していることが示された。それぞれのガラスビーズは粒径が異なる以外に、素材や表面加工に違いはないことから、単純に粒径が小さいものの方が付着基質として適しているものと考えられる。蛍光強度最大値は収量を意味するが、これが高かった原因として、ビーズの体積が小さくなるほど付着面積が増加するので、より多くの細胞が付着して、増殖できたものと考えられる。Fig. 1の近似直線から得られた式を用いて、最も収量が高かったGB-1における最高細胞密度を求めると、約 $2.2 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup>（ $\approx 6.7 \times 10^5$  cells cm<sup>-2</sup>）となる。これは本種を採取した海田湾における現場密度（山本ら, 2004）よりも2桁以上高く、今回使用した付着基質を用い、水温、塩分、光強度を好適条件とすれば、大量培養が可能であることが示唆された。

また、ガラスビーズを添加していないGB-0においても細胞の増殖が見られたが、顕微鏡で観察したところ、細胞同士が互いに付着してからみ合っている場合が多く、試験管の内壁に付着している細胞はそれほど多くないことが分かった。一方、ビーズ粒径の最も大きいGB-5で増殖速度が低かったのは、ビーズの粒径が細胞サイズに比べて大き過ぎたために、試験管の内壁と同様に付着基質として機能しなかったものと考えられる。また、市販のガラスビーズで最も粒径の小さいものは今回用いたGB-1（平均直径0.115 mm）であり、これより小さい粒径のものについては確認できていないが、製造過程で混入したと思われるさらに細かい破片などに付着している細胞が観察されたことから、さらに粒径の小さいものでもGB-1と同等かそれ以上に付着基質として適切である可能性もある。

付着珪藻は細胞から滲出する粘液物質（extracellular polymeric substances: EPS）で基質に付着したり、基質上を滑走したりする。EPSはグルコースやグルカンなどの複数の糖類で構成されており、種によって糖類の種類やその割合が異なると言われている（de Brouwer and Stal, 2002）。本種のEPS組成や分泌量についてはまだ調べられていないが、EPSの種類と割合の違いは付着力の強さに密接に関係しているものと考えられる。

蛍光強度測定時に、攪拌することでガラスビーズから細胞を剥離させているが、顕微鏡で観察したところ翌日には再びガラスビーズに付着していることを確認している。また、培養初期から中期にかけては、ガラスビーズにまばらに付着しているが、培養後期になると細胞同士がくっついて塊を形成し、ガラスビーズから剥離する傾向が見られた。この傾向はガラスビーズの粒径の大きいものほど強かった。水深の比較的浅い沿岸域では、海水の鉛直混合などによって水柱内でも底生性付着珪藻が観察されるが（川口ら、2005）、付着基質から剥離して水中に巻き上げられた細胞は、表層付近では強光阻害を受けるだけでなく、付着基質を失っているために増殖活性が低いことが今回の実験結果から想像される。

本実験で用いた *Nitzschia* sp. は河村（1994, 1995）の付着形態の分類に当てはめると、運動性はそれほど活発ではないが、匍匐滑走型に分類されると考えられる。このグループの特徴は、好適な条件下ですばやく群落を形成して繁茂するが、付着力がそれほど強くないため、底生動物に摂食されやすい。底生動物によって好まれる餌であることは、食物連鎖を通じた生物学的浄化をねらいとする場合、好都合である。具体的には、本種を用いて効果的に酸素供給を行うとともに、食物連鎖を通じた底質浄化を図るには、光条件などが好適な場所を選定することが重要であろう。

本研究では、ガラスビーズの粒径の違いが *Nitzschia* sp. の増殖に与える影響を調べ、粒径の違いによって増殖速度や収量が異なることが示された。このことは、本種のような付着珪藻の増殖生理について培養や生理実験を試みる場合にも、付着基質のサイズを考慮することが重要であることを意味している。また、環境改善のために現場に散布する場合でも、付着基質のサイズは配慮すべき重要なポイントと言えよう。

## 引用文献

- de Brouwer, J. F. C. and Stal, L. J. (2002): Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **38**, 464-472.
- Cahoon, L. B. (1999): The role of benthic microalgae in neritic ecosystems. *Oceanography and Marine Biology in Neritic Ecosystems. Oceanography and Marine Biology, An Annual Review.*, **37**, 47-86.
- Edgar, L. A. and Pickett-Heaps, J. D. (1984): Diatoms locomotion. *Prog. Phycol. Res.*, **3**, 47-88.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, D. (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- 広島県環境保健協会（2002）：微細藻を用いた瀬戸内海の生態学的底質改善に関する研究報告書（その1）。27pp., 日本財団助成, 広島。
- 広島県環境保健協会（2003）：微細藻を用いた瀬戸内海の生態学的底質改善に関する研究報告書（その2）。22pp., 日本財団助成, 広島。
- 広島県環境保健協会（2004）：微細藻を用いた瀬戸内海の生態学的底質改善に関する研究報告書（その3）。28pp., 日本財団助成, 広島。
- Kamermans, P. (1994): Similarity and food source and timing of feeding in deposit- and suspension-feeding bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **104**, 63-75.
- Kang, C. K., Kim, J. B., Lee, K. S., Kim, j. B., Lee, P. T. and Hong, J. S. (2003): Trophic importance of benthic microalgae to macrozoobenthos in coastal bay systems in Korea: dual stable C and N isotope analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **259**, 79-92.
- 川口 修, 山本民次, 橋本俊也（2005）：周防灘における植物・動物プランクトンの時・空間的変動。2005（平成17）年度日本水産学会大会講演要旨集, p. 226, トーヨー企画, 東京。
- 河村智彦（1994）：海産付着珪藻の分類と生態。付着生物研究, **10**, 7-25.
- 河村智彦（1995）：付着珪藻群落の変動機構。月刊海洋, **27**, 591-596.
- 小池裕子, 中島 徹, 中井信之（1989）：安定同位体と消化管珪藻分析による干潟植物網の解析について一

現生生態学と古生生態学の接点ー. 日本ベントス研究会誌, **37**, 1-10.

Takai, N., Mishima, Y., Yorozu, A. and Hoshika, A. (2002): Carbon sources for demersal fish in the western Seto Inland Sea, Japan, examined by  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analyses. *Limnol. Oceanogr.*, **47**, 730-741.

山本民次 (2004) : 底生微細藻を用いた底質改善. 瀬戸内海, **40**, 45-49.

山本民次, 呉 碩津, 後藤郁恵 (2004) : 底生微細藻 *Nitzschia* sp. の増殖に及ぼす水温, 塩分及び光強度の影響. 藻類, **52**, 5-11.

## Effects of grain size of substrate on the growth of a benthic microalgae *Nitzschia* sp.

Masami Suzuki and Tamiji Yamamoto

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, 739-8528, Japan*

### Summary

Effects of grain size of substrate on the growth of a benthic microalgae *Nitzschia* sp. (diatoms) were experimentally investigated with commercial glass beads. The growth of *Nitzschia* sp. was enhanced with addition of glass beads, with the highest growth rate of  $0.39 \text{ day}^{-1}$  and the maximum estimated yield of  $2.2 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$  at the smallest glass beads (mean diameter=0.115 mm). On the other hand, with the largest glass beads (mean diameter=1.244 mm), the growth rate was lowest ( $0.23 \text{ day}^{-1}$ ), which was not significantly different from the blank experiment with no glass beads ( $0.25 \text{ day}^{-1}$ ). The results in the present study indicate that not only the small glass beads are suitable for the growth of *Nitzschia* sp. but also the size of substrate is an important environmental factor for the growth of benthic microalgae.

**Key words:** benthic microalgae, diatom, glass beads, size of substrate