

光強度, 明暗周期, 栄養塩濃度が, カワシオグサ *Cladophora glomerata* の増殖に及ぼす影響

The influence of light intensity, photoperiod and nutrients on growth of
Cladophora glomerata in culture

内田朝子¹⁾・飯間雅文²⁾

Asako UCHIDA・Masafumi IIMA

要 約

- 1) *Cladophora glomerata* の成長の特性を把握するため, 光強度, 明暗周期, 栄養塩濃度の3つの環境要因と成長の関係について室内培養実験を試みた.
- 2) *Cladophora glomerata* の成長は, 最も強い光強度 $150\sim 180\mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ で促進された
- 3) *Cladophora glomerata* の成長は, 長日(16時間明期, 8時間暗期)および中日(12時間明期, 12時間暗期)の明暗周期で促進された.
- 4) *Cladophora glomerata* は, 栄養塩無添加の滅菌河川水のみでの培養では成長が抑制されたのに対して, 栄養塩を過剰に添加した培養では促進されたことから貧栄養に適した藻類でないと推察された.

キーワード: 大型糸状緑藻 *Cladophora glomerata*, 光強度, 明暗周期, 栄養塩濃度, 成長比

はじめに

矢作川の中流域で顕著に発生する(内田ら, 2002, 2004)大型糸状緑藻 *Cladophora glomerata* を抑制するためには, 種の繁殖戦略を知ることが重要であると考え, 2004年11月より室内培養実験を継続している. これまでに, *C. glomerata* の初期発生過程(内田・飯間, 2005)および遊走細胞の特性(内田・飯間, 2006)について報告した.

本邦における *C. glomerata* の先行研究では, 分類学的研究として新山(1986), 谷口(1992), 生態学的研究には Okada and Watanabe(2002, 2005)が, 光合成活性に関する研究には野崎ら(2003), 野崎(2004)がある. これらの研究では, 個体群の成長に大きく影響する要因については明らかにされていない. その大きな理由は, 培養条件下での実験的な解析が進んでいない点にある.

野外では様々な環境要因が複雑に絡み合っており, *C. glomerata* の成長と各要因との関係を明らかにするのは困難であることが多い. そこで, 室内培養において, 藻類の成長を大きく左右する光強度, 明暗周期, 栄養塩濃度をコントロールし, これらの要因と成長との関係を検討した.

1 室内培養実験の材料と方法

材料: 室内培養実験には, 2005年11月14日に豊田市扶桑町(北緯35度6分37秒, 東経137度11分34秒)で採取した天然藻を培養庫で成熟させたF3, F4, F5(それぞれ3, 4, 5世代目)の培養藻を用いた.

方法: 実験に用いた藻体は, F2, F3, F4の培養藻からほぼ同時期に放出された遊走子の発芽体を用いた. 発芽体の集合体小片を, 培養液40mlを入れた試料カップ(ポリエチレンテレフタレート樹脂, ケニス株式会社製, 径6.0cm, 高さ3.5cm)に分離し, 実験用藻体とした. 藻体が成長し, 細胞壁が肥厚し天然藻体と同様の形態になった時点で実験を開始した. 実験は全て静置培養で行い, エアレーションは行っていない. 藻体の成長の測定には湿重量を用いた. 湿重量の測定は, 各試料カップの藻体を培養液で湿らせたワイパー(キムワイプ)上に3秒程置き, 藻体表面の水分を除去し, 天秤に載せ行った. 測定後, 藻体は速やかに新たな培養液を満たした培養カップに移した. 藻体の湿重量は実験開始時と実験開始後から7日目毎を目安に測定した.

培養液は淡水PES(プロバゾリの栄養補強海水 Provasoli's Enriched Seawater 原液を滅菌河川水に添加したものを『淡水PES培養液』と呼称(内田・飯間, 2005))

を用いた。河川水の滅菌は表流水を採取し、フィルター（保留粒径 $5 \mu\text{m}$, ADVANTEC No. 2）ろ過した後、2 Lの三角フラスコに入れ、オートクレーブで 120°C 、20分間処理した。PES原液は、オートクレーブで滅菌し、室温に戻した後、滅菌河川水1000mlに20mlの割合で加えた（栄養塩濃度を変えた実験を除く）。珪藻の成長抑制には、二酸化ゲルマニウム（ GeO_2 ）を用いた（館脇1979）。 GeO_2 250mgを1000mlの蒸留水に加え原液とし、試料カップ40mlの培地に1 ml（ GeO_2 0.25mg）を添加した。

培養は人工気象器（東京理化器械株式会社, FLI-301N型）を用い、温度は矢作川産 *C. glomerata* の光合成活性が最適となる 15°C （野崎, 2004）で行った。光強度は光量子計（光量子データロガー HOGA製）を用いて測定した。

実験の設定条件：光強度、明暗周期、栄養塩濃度の3項目を対象に培養実験を行った（表1）。

(1) 光強度

光強度は、自然状態を再現するには困難なため、従来の培養例では、 $800\sim 1500\text{lux}$ （光強度換算概算値 $13\sim 84 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）の範囲にあること（館脇, 1979）を参照し、次に示す3段階を設定した。

- a $150\sim 180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$
 - b $90\sim 120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$
 - c $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$
- aは実験時に培養カップ直上で得られた上限の光強度

とし、bおよびcの光強度は対象カップをメッシュ1 mmの黒いネットを一重、二重に覆うことによって調整した。室内培養実験に供した培養藻は、2005年11月14日に豊田市扶桑町で採取した天然藻のF3を用いた。明暗周期は15時間明期・9時間暗期とした。実験に供した試料はa, b, c条件とも $n=24$ とした。

なお野外に届く太陽光の光強度は、曇天時、豊田市扶桑町における矢作川の水深20cmで $180\sim 200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、水深30~40cmで $90\sim 150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ であった（2006年4月25日午前10:00）。晴天時の光強度は、水深20cmで $1100\sim 1250 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、水深0cmで $1000\sim 1200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ であった（2006年6月1日午前10:00）。

(2) 明暗周期

明暗周期は夏期、春期・秋期および冬期の3条件を設定した。

- a 長日条件（明期：16時間 暗期：8時間）
- b 中日条件（明期：12時間 暗期：12時間）
- c 短日条件（明期：8時間 暗期：16時間）

培養庫内の明暗周期は長日条件（明期：9:00~1:00までの16時間、暗期：1:00~9:00までの8時間）に設定し、中日条件の試料カップは9:00~13:00の間、短日条件の試料カップは9:00~17:00の間、それぞれ蓋付きの紙箱に入れて遮光した。室内培養実験に供した培養藻は、2005年11月14日に豊田市扶桑町で採取した天然藻のF5を用いた。光強度は $50\sim 65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ とした。実験に供した試料はa, b, c条件とも $n=20$ とした。

表1 室内培養実験の設定条件.

コントロールした条件		光強度($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$)	明暗周期	淡水PES添加	温度($^\circ\text{C}$)	実験開始時の平均湿重量(g)	実験終了時の増加湿重量(g)	実験期間	実験に供した培養藻の世代	培養藻の実験開始時における発芽後の日数	
光強度	a $150\sim 180 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$	-	明期：19h 暗期：5h	1/1	15	平均	0.002	0.022	2006/5/11-6/1	F3	約35日目
	標準偏差					0.001	0.009				
	平均					0.002	0.021				
b $90\sim 120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$	標準偏差	0.001	0.009								
c $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$	平均	0.003	0.008								
						標準偏差	0.001	0.004			
明暗周期	a 長日 明期：16h 暗期：8h	50-65	-	1/1	15	平均	0.001	0.019	2006/9/4-9/27	F5	約41日目
	標準偏差					0.001	0.013				
	平均					0.001	0.014				
b 中日 明期：12h 暗期：12h	標準偏差	0.001	0.011								
c 短日 明期：8h 暗期：16h	平均	0.001	0.010								
						標準偏差	0.001	0.004			
PES濃度	a 淡水PES添加量 1/1	150-180	明期：19h 暗期：5h	-	15	平均	0.005	0.022	2006/7/13-8/1	F4	約39日目
	標準偏差					0.002	0.009				
	平均					0.006	0.014				
b 淡水PES添加量 1/2	標準偏差	0.003	0.006								
c 淡水PES添加なし	平均	0.005	0.006								
						標準偏差	0.002	0.003			

※淡水PES添加量1/1は河川滅菌水1000mlに対し、淡水PES20mlを添加、1/2は河川滅菌水1000mlに対し淡水PES10mlを添加。

(3) 栄養塩濃度

栄養塩濃度は培養液に添加する淡水PESの量を次の3段階に調整した。

- a 滅菌河川水1000mlに対して20mlを添加（通常の培養液）
- b 滅菌河川水1000mlに対して10mlを添加（通常添加量の1/2）
- c 添加なし

室内培養実験に供した培養藻は、2005年11月14日に豊田市扶桑町で採取した天然藻のF4を用いた。光周期は15時間明期・9時間暗期とした。光強度は150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ とした。実験に供した試料はa, b, c条件とも $n=21$ とした。なお、各培養液のT-NおよびT-P濃度は、表2に示すとおりである。

表2 各培養液におけるT-NとT-Pの濃度。

	T-N (mg/l)	T-P (mg/l)
a	19.8	0.86
b	9.5	0.53
c	0.6	0.02

なお、培養液のpHの変化は、培養藻体を入れた試料カップで、実験開始前7.4~7.5、開始後7日目7.7~7.8、開始後14日目7.6~7.7と変化した。滅菌河川水のみを試料カップの培養液のpHは、実験開始前7.5~7.9、開始後7日目7.7~7.8、開始後14日目7.7~7.8であった（14日間、培養液の交換は行わずに測定）。本実験で培養液を取り替えた7日間では両者ともに大きな変化はなかった。

2 結果と解析

各室内培養実験による *Cladophora glomerata* の成長比（実験後の湿重量/実験開始時の湿重量）を図1~3に示した。実験開始および実験終了時の培養藻体の平均湿重量を表1に示した。各実験の3群の成長の比較は分散分析およびポストホックテストとして Fisher のPLSD法を用いて統計解析を行った（図4~6）。

(1) 光強度

各光強度における成長比を図1に示した。実験開始後22日目の平均成長比は、150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ で培養したaで約12倍、90~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ のbで約10倍、60

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ のcで約4倍であった。設定した光強度の範囲においては、光強度の最も高い150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ で大きな成長比を示した。

実験開始後22日目の成長比を3群で比較すると、a（150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）とc（60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）およびb（90~120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ）とcとの間に有意な差が認められ、aとbの間では有意な差は認められなかった（図4）。

(2) 明暗周期

日長条件の違いによる成長比を図2に示した。長日および中日条件で培養したa, bの平均成長比は、実験開始後15日目で約10倍、実験開始後21日目で約20~25倍に達した。一方、短日条件で培養したcの平均成長比は小さく、長日および中日の成長比の1/2程度にとどまった。実験開始後22日目の成長比を3群で比較すると、a（長日条件）とc（短日条件）およびb（中日条件）とcの間に有意な差が認められたが、aとbの間に有意な差は認められなかった（図5）。

(3) 栄養塩濃度

培養液に添加する栄養補強液（淡水PES）の量の違いによる成長比を図3に示した。培養開始後13日目の成長比は、通常の添加量で培養したaで6倍であったのに対し、添加量を1/2としたbの平均成長比は約4倍、添加なしのcでは2倍と小さくなった。

実験開始後13日目の成長比を3群で比較すると、a（通常の添加量）とb（通常の添加量の1/2）、aとc（添加なし）およびbとcのそれぞれ間に有意な差が認められた（図6）。

3 考察

(1) 光強度

*Cladophora glomerata*の光合成活性と温度および光強度に関し、Graham *et al.* (1982)は、ヒューロン湖に生育する*C. glomerata*を用いた実験で、光合成活性は13℃から15℃、300~600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ の光強度で高まることを報告している。この結果は、本種が強光を好むことを示している。ただし、光合成と増殖のための最適光強度は必ずしも一致するとは限らない（岩崎, 1979）。矢作川中流域の河川水は、地元住民が「ささにごり」と表現する、うっすらと白濁した状態が継続することが観察されていることから、*C. glomerata*の成長は、より弱い

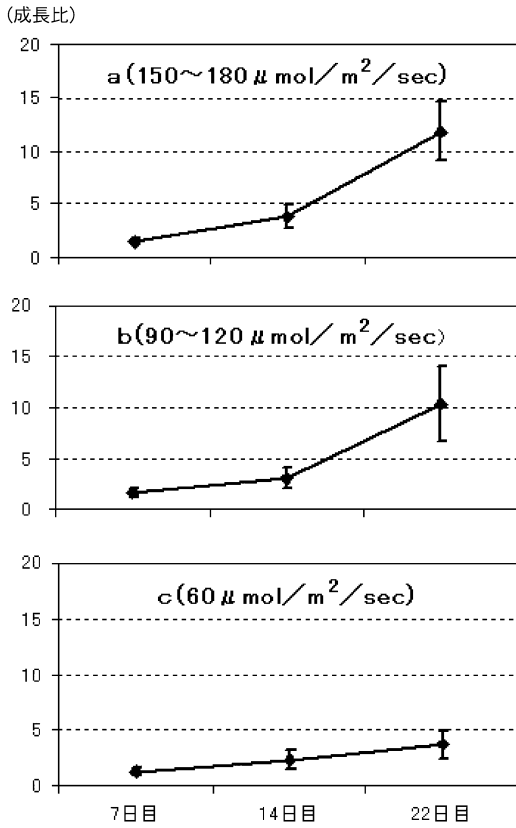


図1 光強度と成長比。
(日長条件: 15時間明期・9時間暗期, n=24, 15°C)

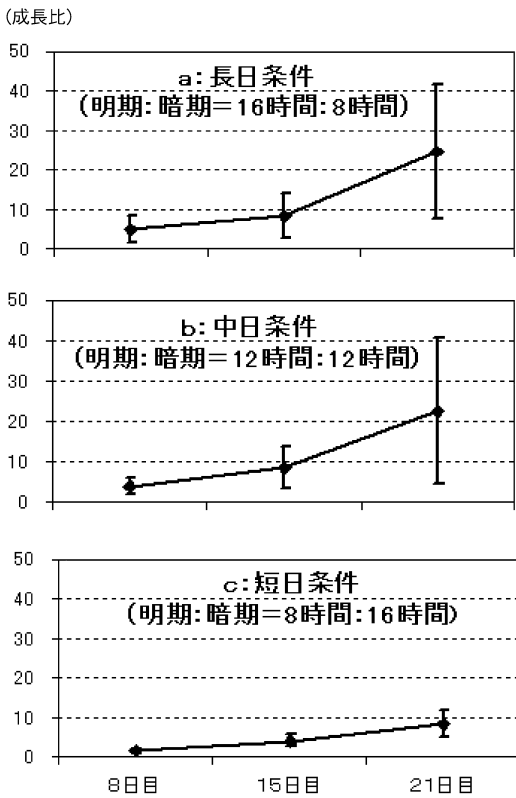


図2 明暗周期と成長比。
(光強度 50~65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, n=20, 15°C)

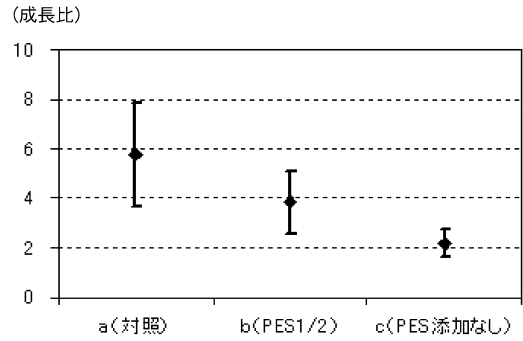


図3 栄養塩濃度と成長比 (培養開始後13日目).
(光強度 150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, n=21, 15°C, 日長条件: 15時間明期・9時間暗期)

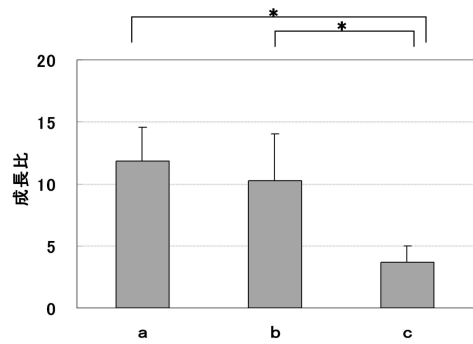


図4 光強度の違いによる成長比 (22日目) の比較。
分散分析およびポストホックテストとしてFisherのPLSD法を用いた統計解析の結果, aとc間, bとc間に差が認められた (ANOVA; $F(2,69) = 59.85$, $p < 0.001$)

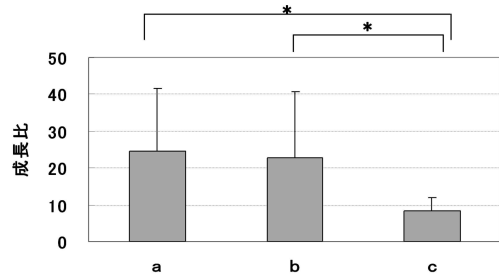


図5 明暗周期の違いによる成長比 (21日目) の比較。
分散分析およびポストホックテストとしてFisherのPLSD法を用いた統計解析の結果, aとc, bとcに差が認められた (ANOVA; $F(2,57) = 7.40$, $p = 0.014$)

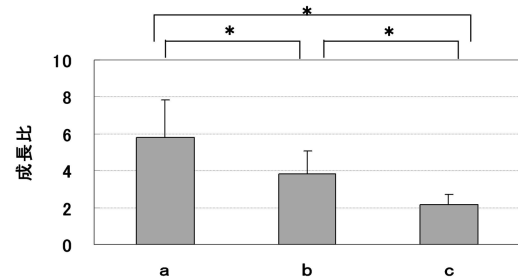


図6 栄養塩濃度(淡水PES)の違いによる成長比(13日目)の比較。
分散分析およびポストホックテストとしてFisherのPLSD法を用いた統計解析の結果, aとc間, aとb間, bとc間に差が認められた (ANOVA; $F(2,60) = 33.79$, $p < 0.001$)

光強度下で促進されることが期待された。しかし, 本実験の結果では, 設定した範囲の中で最強の光強度150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ で成長が最も大きくなった。

Taylor *et al.* (2001) によると, 室内培養実験下において, 海産 *Cladophora dalmatica* の成長率は, 15°C, 175 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ で最も高い結果を得ており, 本研究結果と類似している。*C. dakimatica* と *C. glomerata* の室内実験の成長率は, ともに設定された最高の光強度180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 付近で高まっているが, 種によって光飽和に達する光強度は異なる (Kirk, 2002) こと, 矢作川に生育する株を用いた光合成活性の室内実験では, 50,000lux (およそ840 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ に相当) の強光下でも光阻害がみられていないことから矢作川産 *C. glomerata* の成長の最適光強度を把握するには, 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 以上の光強度における成長率の検証も必要である。

一方で, ミシガン湖のミルウォーキー地方の水深10m付近に生育する *C. glomerata* は70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 付近で光飽和に達する (Bootsma *et al.*, 2006) という報告もあり, 生息場所の環境によって成長に適した光強度は大きく異なると推察される。本実験で設定した最大の光強度150~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ は, 河川水中に届く曇天時 (4月) の太陽光の光強度と同程度であり, 晴天時の1/6程度と弱いものである。今後, 矢作川の河床に届く光強度の経年変化の把握も課題としたい。

(2) 明暗周期

明暗周期が藻類の成熟に影響を与えることは, *Porphyra tenera* (紅藻アサクサノリ) や *Undaria pinnatifida* (褐藻ワカメ) で明らかにされているが, いくつかの藻類では成長とも関係があるとされている (岩崎, 1979)。例えば, *Blidingia minima* (緑藻ヒメアオノリ) では, 短日と長日条件下では成長が異なり, 長日条件で成長・成熟が促進されることが知られている (Iima, 1989)。

矢作川中流域における *C. glomerata* の繁茂は初夏と秋にピークが観察されていることから, 中日条件に適した藻類である可能性が期待された。本実験では明期が12時間以上の中日と長日条件でともによい成長を示し, 2つの条件間で成長差がみられなかった。このことから, 12時間以上の明期は *C. glomerata* の成長に促進効果をもたらさないと推察された。

(3) 栄養塩濃度

C. glomerata は β 中腐水性から貧腐水性の水質の指標とされている (渡辺, 1975)。しかしながら, 本実験に

おいて, *C. glomerata* の成長は栄養塩を十分に添加した培養液で促進され, 栄養塩を全く添加していない培養液で抑制されたことから, *C. glomerata* は成長に関し, ある程度の栄養要求性を持っていると推察される。本実験の環境は, 栄養塩が連続して供給される河川と大きく異なることを考慮すれば, 栄養塩無添加の培養では, 野外よりもかなり低濃度の環境にあると推測される。従って, *C. glomerata* は, 少なくとも貧栄養に適した藻類でないと考えられる。

本実験では, 淡水PESの添加量を調整した簡易な方法によるものであったが, 今後, さらに, *C. glomerata* の栄養要求性について, 培地組成成分の分析を試みて明らかにするとともに, 矢作川の中流域で繁茂する他の糸状緑藻 *Spirogyra* (アオミドロ) の一種や *Cloniophora plumosa* (トゲナシツルギ) の栄養要求についての比較実験を行い, *C. glomerata* の成長特性を明確にしたいと考えている。

謝 辞

本研究の実験における光強度の調整に関しては相山女学園大学の野崎健太郎博士に, 統計解析の方法については, 豊田市矢作川研究所の洲崎燈子主任研究員にご指導をいただきました。培養液のT-NおよびT-Pの濃度は愛知工業大学大学院の永野真理子さんに分析していただきました。また, 室内培養実験に関し, 豊田市矢作川研究所の皆さまには多大なご協力をいただきました。さらに, 野崎健太郎博士には多くの有益な助言をいただきました。以上の方々に心からの謝意を表します。

引用文献

- Bootsma, H. A., E.B. Young, and J.A. Berges (2006) *Cladophora* abundance and physical / chemical conditions in the Milwaukee Region of Lake Michigan. Great Lakes WATER Institute Technical Report No.2005 - 02.
- Graham, J.M.・Auer M.T., , Canale R.P., Hoffman J.P. (1982) Ecological studies and mathematical modeling of *Cladophora* in Lake Huron : 4. Photosynthesis and respiration as functions of light and temperature. Journal of the Great Lakes Research, 8 : 100 - 111.
- Iima, M. (1989) Geographical variation of development and life history of *Blidingia minima* (Chlorophyceae) from Japan. Scientific Papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science, Hokkaido University, Vol. VIII. No. 2 : 157 - 185.
(日本語名: 北海道大学理学部海藻研究施設欧文報告)
岩崎英雄 (1979) 第2章 藻類の分離と培養法 (2.3.D 培養の一般操作). 藻類研究法, 西澤一俊・千原光雄 (編) : 189 - 194. 共立出版.
- Kirk, J.T.O. (2002) 水圏の生物生産と光合成. 山本民次(訳) 恒星社厚生閣, 東京.
- 新山優子 (1986) 北海道産カモジシオグサ *Cladophora glomerata* (L.) KÜTZINGの形態と季節的变化. 藻類, 34 : 216 - 224.
- 野崎健太郎・神松幸弘・山本敏哉・後藤直成・三田村緒佐武 (2003) 矢作川中流域における糸状藻類 *Cladophora glomerata* の光合成活性. 矢作川研究, 7 : 169 - 176.
- 野崎健太郎 (2004) 矢作川中流域から採集された糸状緑藻 *Cladophora glomerata* の光合成活性と水温との関係 (予報). 矢作川研究, 8 : 85 - 88.
- Okada, H., Y. Watanabe (2002) Effect of physical factors on the distribution of filamentous green algae in the Tama River. Limnol. 3 : 121 - 126.
- Okada, H., Y. Watanabe (2005) Factors affecting the tearing-off process of benthic algae in shallow river. Ver. Inter. Vere. Limnol. 29 : 694 - 697.
- Taylor, R., R.L. Fletcher and J.A. Raven (1961) Preliminary studies on the growth of selected Tide algae in laboratory culture : Effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate. botanica marina, 44 : 327 - 336.
- 谷口一登 (1992) 長野市北部河川におけるシオグサ属の細胞分類学的研究. 信州大学修士論文.
- 館脇正和 (1979) 第2章 藻類の分離と培養法 (2.2.B 予備培養 (粗培養)). 藻類研究法, 西澤一俊・千原光雄 (編) : 61 - 69. 共立出版.
- 内田朝子・藤井勇・山戸孝治 (2002) 矢作川における大型糸状緑藻の時空間変動. 矢作川研究, 6 : 113 - 124.
- 内田朝子・近藤和広・竹内康之・永田直人 (2004) 矢作川, 豊川, 長良川における大型糸状緑藻の発生状況. 矢作川研究, 8 : 89 - 98.
- 内田朝子・飯間雅文 (2005) 培養下における大型糸状緑藻 *Cladophora glomerata* (カワシオグサ) の初期発生. 矢作川研究, 9 : 79 - 83.
- 内田朝子・飯間雅文 (2006) 室内培養における大型糸状緑藻 *Cladophora glomerata* (カワシオグサ) の初期発生における成長量と遊走細胞の特性. 矢作川研究, 10 : 43 - 50.
- 渡辺仁治 (1975) 指標生物としての藻類 (珪藻を除く). 環境と生物指標 2 - 水界編 -, 津田松苗・菊池泰二 (編著) : 61 - 88. 共立出版.

1) 豊田市矢作川研究所 :
〒471-0025 愛知県豊田市西町2-19 豊田市職員会館1F
2) 長崎大学環境科学部自然環境保全講座 :
〒852-8521 長崎県長崎市文教町1-14