

培養アオコの基準生長と光合成速度の関係について

赤野 誠之

1 はじめに

霞ヶ浦において、昭和48年夏期に植物プランクトンが異常発生し漁業のみならず利水関係に大きな影響を与えた¹⁾。

このような植物プランクトンの異常発生は水域の富栄養化現象としてとらえることは容易であるが、この発生機構を解析することは難かしく異常発生の予知すらできないのが現状である。

直接的に植物プランクトンの増殖状態を知る方法としては、明暗ビン法による生産力測定法があげられるが、現場法では時間的制約により測定地点と回数が限定され、又、モデル化された方法を用いたとしても生産力の意味するものが明確でない。

ここで、植物プランクトンの光合成速度(単位あたりの O_2 発生量又は CO_2 同化量)についてみると、水域又は季節により異なっているが、試水に栄養塩類を添加し一定時間培養し光合成速度を測定するとは一定値を示すことから²⁾光合成速度がその水域の動的平衡の中での栄養塩類の供給量を反映しているものと推察される。

このことから、本報では培養 *Microcystis* の生長基準と基準状態での光合成速度の関係を求め、次に光合成速度の簡易測定法を検討し、この方法により霞ヶ浦での実測値と基準生長との比較を試みた。本文に入るに先だち、アオコの培養等について御指導いただいた東京大学応微研、市村輝宣博士、渡辺真氏に感謝する次第である。

2 *Microcystis* の培養

夏期における植物プランクトンの異常繁殖は藍藻類で主として *Microcystis* に代表される。

この *Microcystis* の培養は古くから行なわれ報告も多いが、なかなか培養できないのが現状である。最近東京大学応用微生物研究所、市村・渡辺によって分離培養が成功しているため³⁾、この培養液を参考とした培養液(第1表)により分離培養を行なった。

Microcystis は霞ヶ浦高浜入で採集したものについて、*Microcystis* のコロニーで数個カバーグラスにとり 15 W 殺菌灯下に 1~5 分置き γ 線滅菌した培養液 40 cc に植えつけた。50 本ほどの培養フラスコは綿栓のうえアルミホイルで被い 25℃ のウォーターバスで 20 W 蛍光灯下に置き、毎日攪拌し 1 ヶ月ほど培養を行なった。その結果、数本のフラスコで増殖が認められたため、ピペット洗浄法により小型のコロニーを選び *Unialgal Culture* を目的として培養を繰返し保存株とした。

分離された Microcystis は 2 TYPE である (第 1 図)。市村渡辺によれば、霞ヶ浦の Microcystis は 5 TYPE に分けられているが³⁾、今回分離した Microcystis の同定は行なわなかった。

保存株は第 2 図に示した方法により通気培養を行なった。保存株も通気培養においても無菌化はされていない。

培養液組成のうちビタミン類については、Microcystis のビタミン要求の報告がないことと、今回分離した 2 TYPE とも培養液からビタミン類を除いても増殖が認められたことから Unialgal Culture のレベルでは添加する必要はないもの

第 1 表 Microcystis の培養液

	東京大学応用微生物研究所	茨城県内水面水産試験場
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	150 mg/l	150 mg/l
NaNO ₃	100 mg/l	100 mg/l
β-Na ₂ glycerophate · 5H ₂ O	50 mg/l	50 mg/l
K ₂ HPO ₄	-	40 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	40 mg/l	40 mg/l
Vitamin B ₁₂	0.1 μg/l	0.1 μg/l
Biotin	0.1 μg/l	0.1 μg/l
Thiamine	10 μg/l	10 μg/l
Ferric ammonium citrate	-	6 mg/l
EDTA	-	1 mg/l
BICIN	400 mg/l	400 mg/l
P 4 metals solution	3 ml/l	-
A 5 solution	-	1 ml/l
pH (NaOH)	9.0	8.5

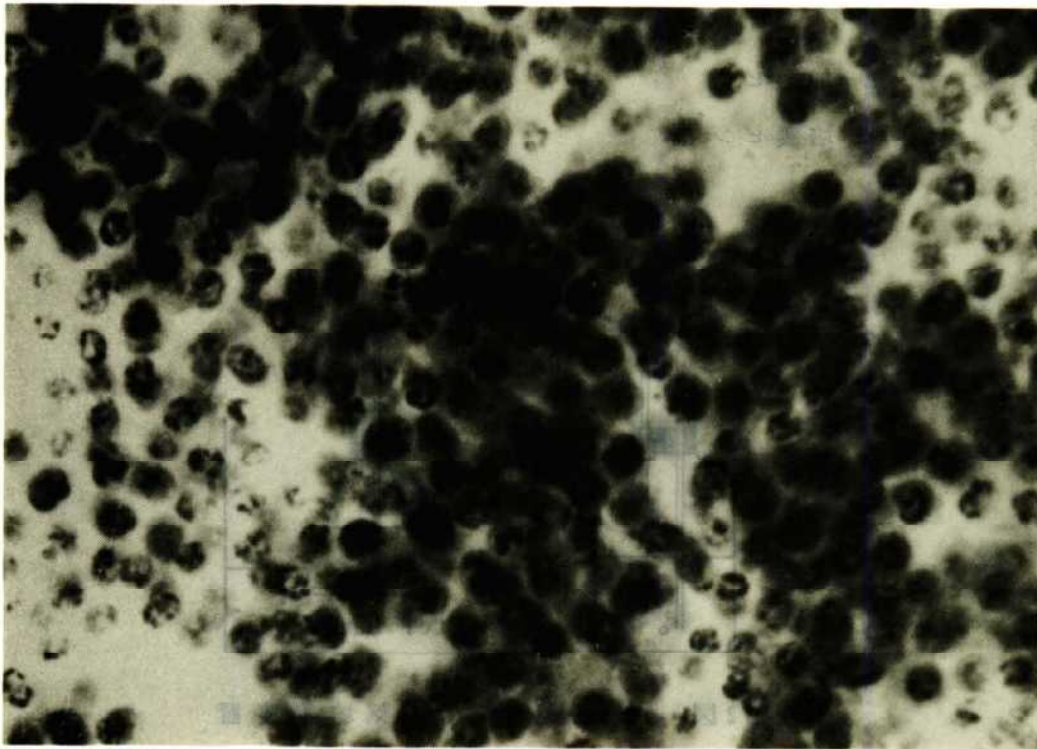
P 4 metals solution		A 5 solution	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	97 mg	H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	41 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
ZnCl ₂	5 mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2 mg	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.39 g
Na ₂ MoO ₄	4 mg	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g
Na ₂ EDTA	750 mg	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0494 g
H ₂ O	500 ml	H ₂ O	1,000 ml

と考えられたが、特にこの点について検討せずビタミン添加のみ供試した。

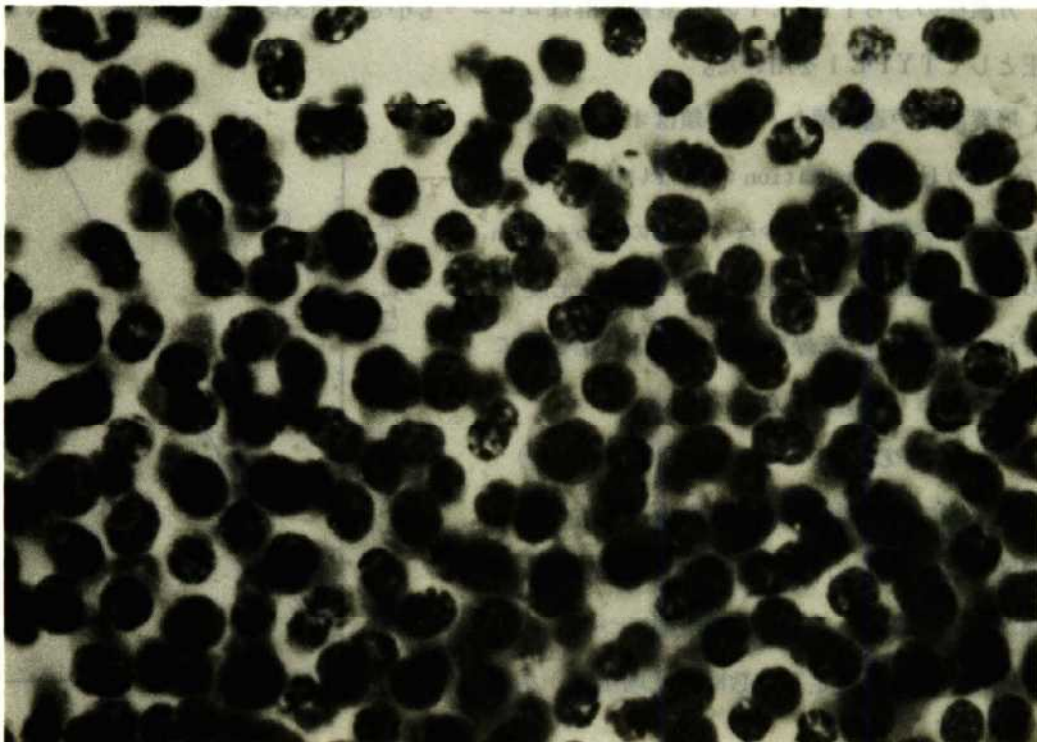
pH については 2 TYPE とも pH 8 ~ 10 において大差なく増殖が認められたが Microcystis の色調をみると pH の高い方が緑色が濃い状態を保っていたが、今回は Bicine の緩衝能から pH を 8.5 として NaOH で調整し試験を行なった。

TYPE 1

10 μ

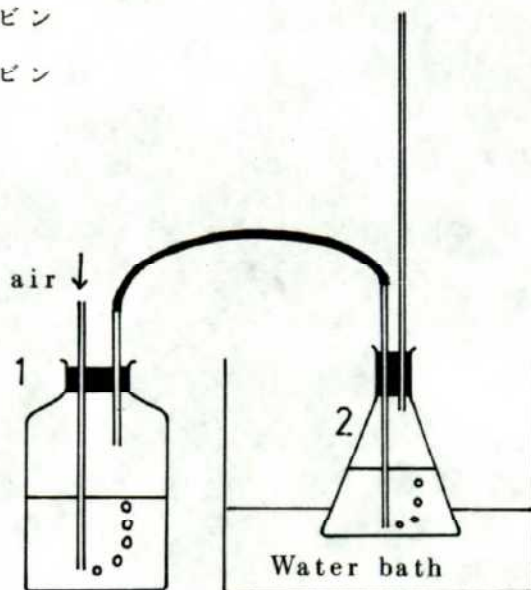


TYPE 2



第1図 Microcystis 分離株

1. 加湿ビン
2. 培養ビン



第2図 Microcystis の通気培養装置

3 培養Microcystisの成長

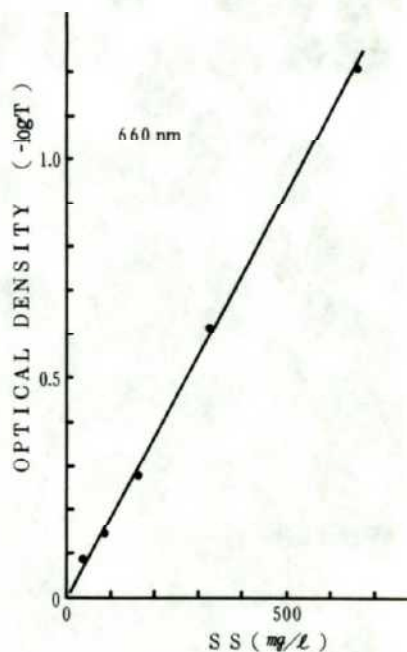
分離株のうちTYPE 1の小型細胞群はコロニーも小さく通気培養も比較的約一化するため、主としてTYPE 1を用いた。

培養液は戸過滅菌し、器具類はオートクレーブによりContaminationの少ない状態に保てば培養液が濁ることは少なく、このため660nmの吸光度を測定し定量化を計った。吸光度とMicrocystisの乾燥重量との関係は第3図に示したとおりで①式となる。

$$SS(\text{mg/L}) = 537 \times (-\log T) \dots\dots ①$$

第4図に培養開始時の濃度別生長を示したが、濃度には関係なく片対数グラフで直線となる関係が認められた。この対数増殖期について、生長式②③式と仮定し定数 K_g (比増殖度)を調

$$\frac{dN}{dt} = K_g N \dots\dots ③$$



第3図 乾燥重量と吸光度の関係

$$N = N_0 e^{Kgt} \dots \dots \dots \textcircled{3}$$

N : -logT 又は SSmg/l

t : hour

べる方法で成長を測定した。

Microcystis の生長と温度の関係をみると(第5図), 35℃以上では高温阻害のためか生長が低下し, 又, 20℃以下では生長が遅くなる。この結果は佐々木と一致している⁴⁾。霞ヶ浦での植物プランクトンの異常繁殖は夏期であるから, その温度範囲について限定するとK_gは④式となる。

$$K_g = a e^{0.046t} \dots \dots \dots \textcircled{4}$$

a : 光強度による変数

t : hour

次に明るさとK_gとの関係については, 光強度が5 Klux以上になると培養 Microcystis が黄色化する傾向が認められたが第6図に示したとおりである。ここで, K_gが近似的に⑤式に従うとすれば, ④式から⑥式が与えられる。

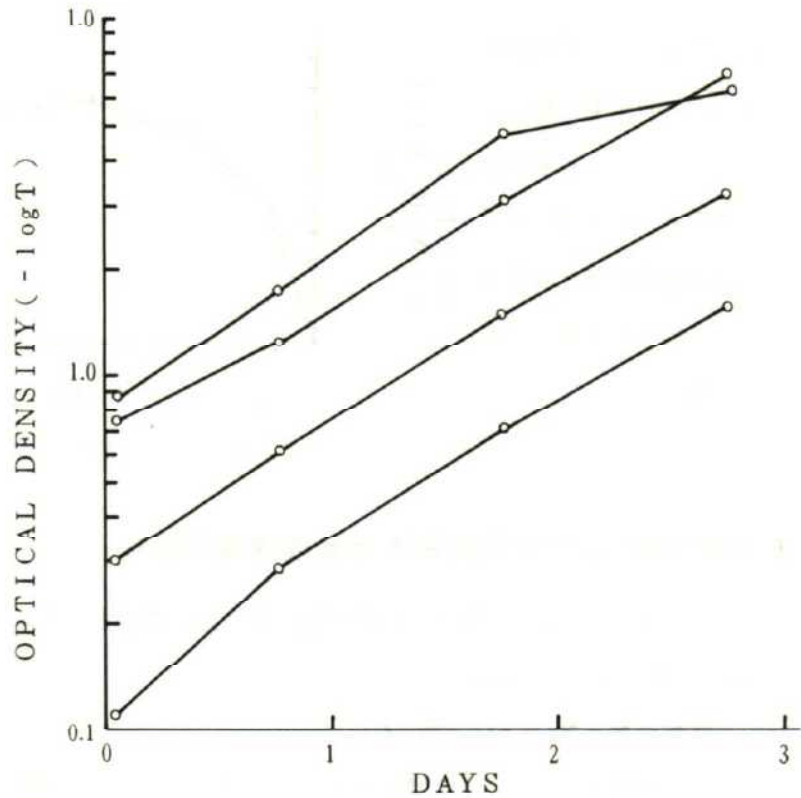
$$K_g \doteq \frac{bI}{1+aI} \dots \dots \dots \textcircled{5}$$

$$K_g \doteq \frac{0.0514 e^{0.046t} I}{1+0.807 I} \dots \dots \dots \textcircled{6}$$

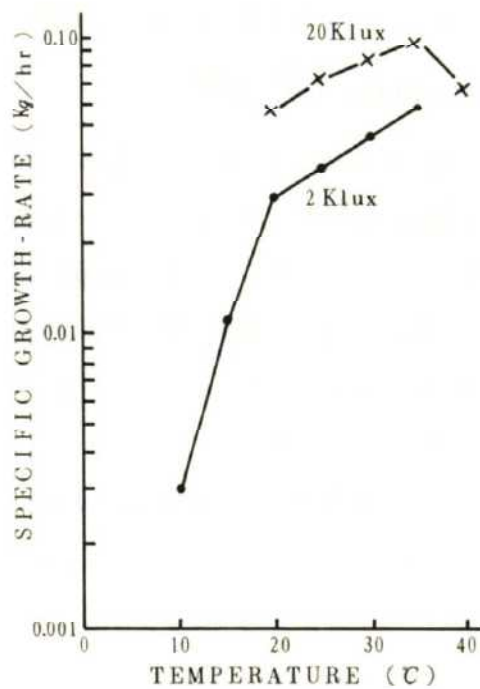
I : 光強度 Klux

a·b : 定数

⑥式から, バッチ式培養 Microcystis の生長が光強度と温度が与えられれば求めること

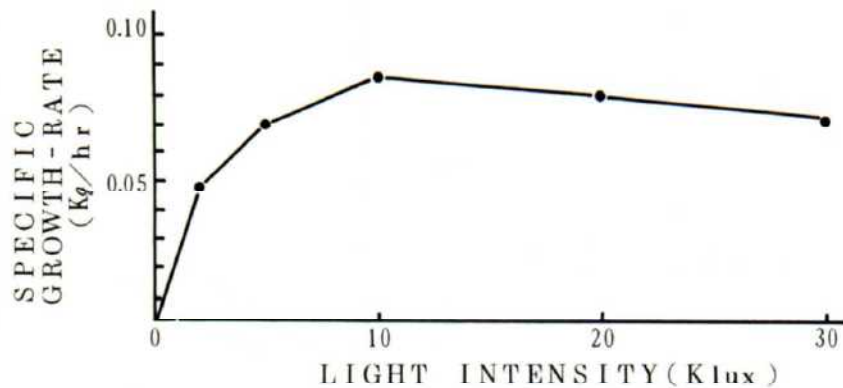


第4図 Microcystis の濃度別生長曲線



第5図 比増殖速度K_gと温照の関係
20 Klux : 500 W白色光
2 Klux : 20 W蛍光灯×2

ができる。これを *Microcystis* の基準生長とした。ただし、この基準生長は空気を CO₂ 強化するとか培養液組成を改良することに变更されうるものである。



第6図 光強度と比増殖速度Kgの関係

4 *Microcystis* の成長と光合成速度の関係

③式において N₀ から N までの増加量 ΔN と光合成量との間に当量関係がなりたつとすると、つねに⑦式がなりたてばよい。

$$\Delta N = N - N_0 = aO_2 \text{ (mg/l)} \dots\dots\dots ⑦$$

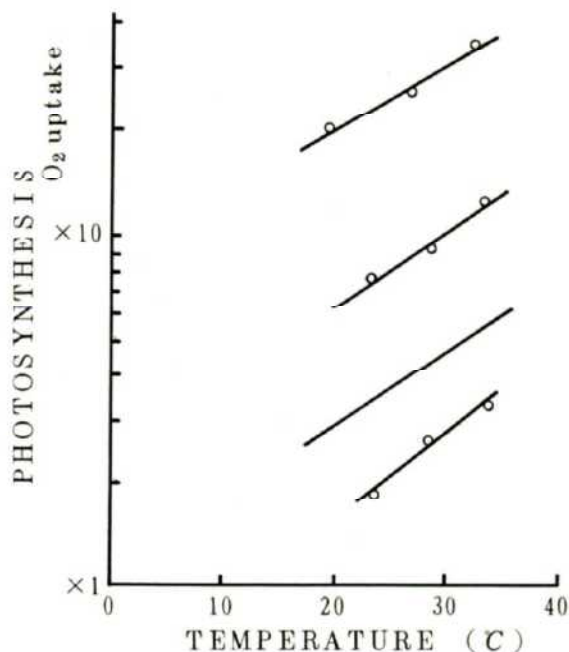
ここで光強度を一定として霞ヶ浦のプランクトンについて明暗ビン法により発生する酸素量を測定した(第7図)。

理論的には、発生する酸素量は③、⑦式から⑧式となり、光強度一定における温度と

$$O_2 \text{ uptake} = \frac{N_0}{a} (e^{Kgt} - 1) \dots\dots\dots ⑧$$

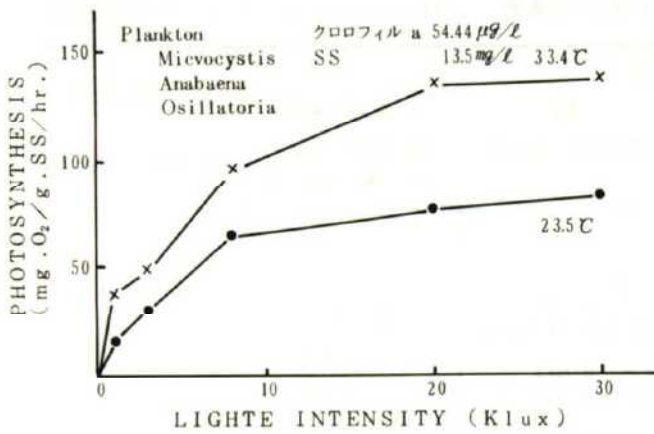
光合成量の関係は片対数グラフで直線となり、その勾配は (e^{Kg}-1) により決まり、実測値と近似している。また、光-光合成曲線(第8図)と Kg と光強度の関係(第6図)の相似から光条件の変化にも対応して⑦式を使うことができるものとした。

ここで、対数増殖期の培養 *Microcystis* の光合成量を測定すると(第9-a図, 第2表) SSあたりで a = 0.25 となった。この数値が培養 *Microcystis* の基準生長における光合成速度であるが、この理論値と霞ヶ浦での *Microcystis* を主とした試水での光

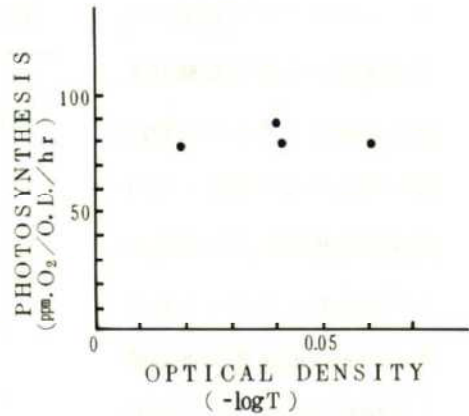


1. *Microcystis* (池) 30 Klux
2. *Microcystis* (霞ヶ浦) 20 Klux
3. " (") 3 Klux

第7図 温度と光合成量の関係



第8図 霞ヶ浦の水の光—光合成曲線

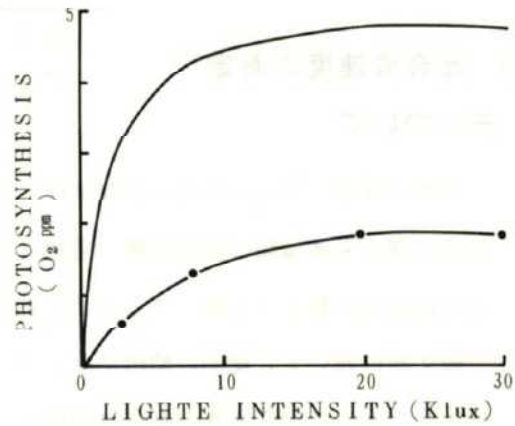


第9-a図 培養Microcystisの光合成量

第2表 培養Microcystisの光合成量と増殖量との関係

20 Klux 20 W 蛍光灯 × 2

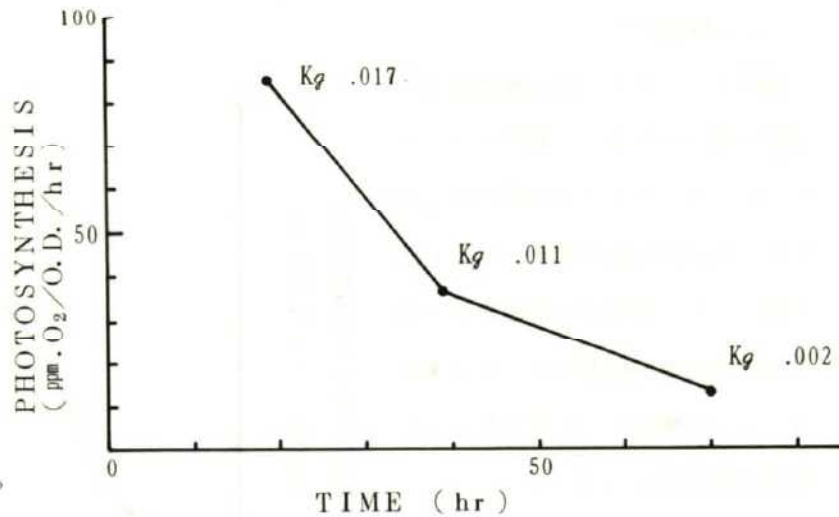
吸光度 -logT	乾燥重量 (SS) mg/l	光合成速度 O ₂ mg/l/hr	定数 a (あたり) (SS)	光合成速度 O ₂ mg/SSg/hr
.040	21.48	3.17	0.248	79.5
.041	22.02	3.28	0.246	80.0
.060	32.22	4.63	0.255	77.3
.019	10.20	1.50	0.249	78.9



第9-b図 理論値と実測値の関係

は霞ヶ浦玉造地先の表層水(昭和49年8月21日採水)で植物プランクトンの優占種はMicrocystisであり、光合成速度が一定であるとしたら理論値と一致しなければならないが、実測値では低い光合成量を示した。

ここで培養液からPを除き培養を行ないKgと光合



第10図 P欠乏培養液でのMicrocystisの生長と光合成速度

成速度を経時的に測定したのが第10図、第3表である。19時間経過で生長は低下しているが、光合成速度は完全培養液と変らない値を示し、光合成速度が低下するのは39時間培養後であっ

た。このように栄養塩の光合成速度に与える影響は光、温度の場合と異なり比較的遅い対応ではあるが、光合成速度を規制しているものと考えられ、このことが水域での光合成速度の理論値と実測値との差として表われる可能性は大きい。

第3表 P欠乏培養液でのMicrocystisの生長と光合成速度

時間	※1 Kg (吸光度 -log T)	※2 光合成速度 (吸光度 -log T) O ₂ mg/hr/l	光合成速度 O ₂ mg/SSg/hr
0			
19	0.017 (0.130 → 0.180)	2.72(.032) 049	85.0
39	0.011 (0.192 → 0.241)	1.75(.049)	35.7
71	0.002 (0.205 → 0.220)	0.68(.022)	14.1

※1 各時間内の変化

※2 原水を井水で4倍希釈して光合成を測定
25℃ 20W蛍光灯×2

5 光合成速度の測定法について

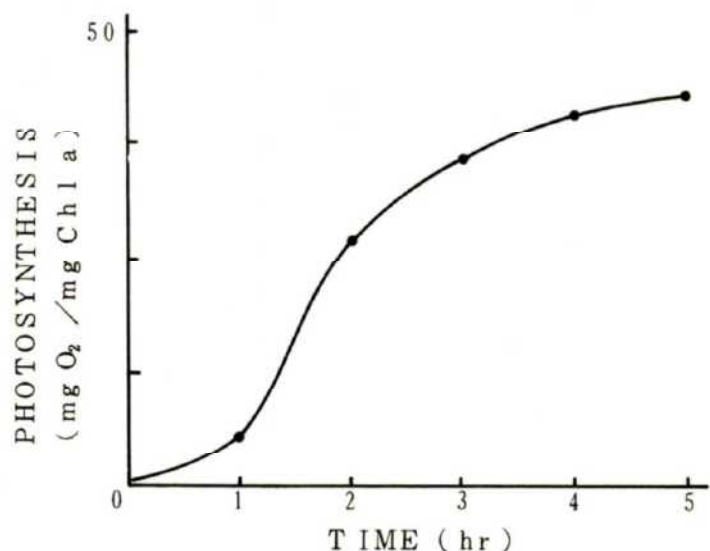
現場で採水したものを光、温度条件一定で光合成速度を測り、このことにより光合成速度への対応の遅い栄養塩類の供給状態と植物プランクトンの増殖状態を推定しようとするが、この場合光合成速度の測定法を統一する必要がある。

霞ヶ浦において、夏期の植物プランクトン濃度はクロロフィルaで40～500 μg/lと高い値を示し、その光合成速度の測定は明暗ビン法によるウインクラ法で充分測定できるが、逆に植物プランクトン濃度が高いことにより測定値になんらかの影響を与える可能性があるため測定法について検討した。

植物プランクトンは、養魚池または霞ヶ浦の水を用い、動物プランクトンおよびバクテリアが混在する条件下でO₂発生量をウインクラ法で測定した。光源は20W蛍光灯2本を用い光電池の起電力が一定の条件のところ、酸素ビンを置き測定した。照度は約2Kluxであった。

1) 光合成量と時間の関係

養魚池に発生したAnabaenaを採集し井水で希釈しクロロフィルa 90 μg/lとして測定した。測



第11図 Anabaenaの光合成量の時間変化

定は室温(22℃)であった(第11図)。

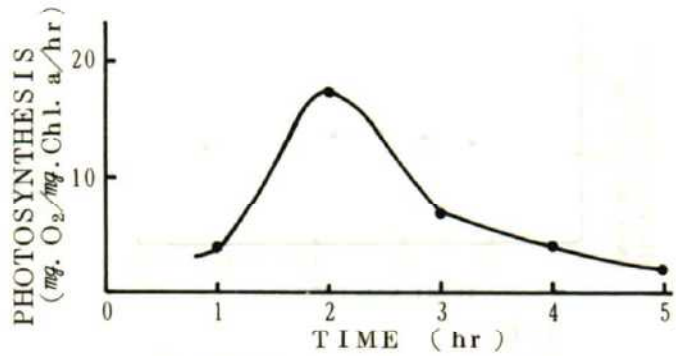
光合成量は直線とならず、初めの1時間はO₂発生量が少なく2時間で急増しその後は減少する。1時間あたりの光合成量を比較すると(第12図)、1.66 ~ 17.62 mg O₂/Chl. a mg/hr とその測定値は変動する。この試水の光合成速度を計算すると(第4表)測定時間のとりかたにより大きく変動する。

2) 植物プランクトン濃度と光合成量

植物プランクトン量の多い試水については、その濃度を無視できないため、池水を段階的に希釈し光合成量を測定した(第13図)。クロロフィルaで61 μg/lの濃度で最高値を示した。クロロフィルa濃度の高いところで低下する原因は光の透過性を無視できないが、濃度の低いところで低下した原因は不明である。

3) 全炭酸量と光合成量の関係

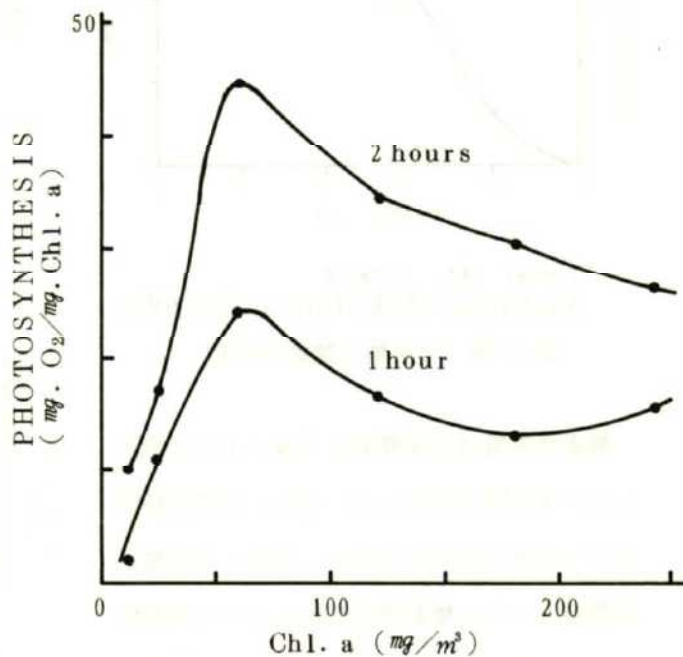
酸素ビン内の光合成は、炭素源を無視できないため、池水に炭酸ガスを溶入させて全炭酸量と光合成量の関係を調べた(第14図)。全炭酸量が10~40 mg/lの範囲で光合成量は、ほぼ一定値を示しこの範囲では光合成速度には影響を与えないものと考えられた。霞ヶ浦での実測値⁵⁾からみて10 ppm以下になることはないと考えられる。しかし、酸素ビン内での光合成によるCO₂の減少があり、この点について検討する必要がある。この酸素ビン内のガス収支を調べたのが第15~第18図である。



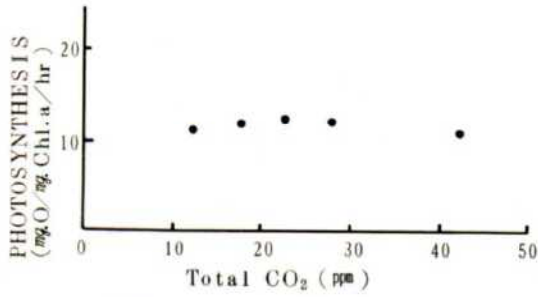
第12図 1時間あたりの光合成速度の比較

第4表 1時間あたりの光合成量と光合成速度

測定時間	光合成量 O ₂ mg/Chl. a mg	光合成速度 O ₂ mg/Chl. mg/hr
1	4.29	4.29
2	21.91	10.96
3	28.52	9.51
4	32.48	8.12
5	34.14	6.83

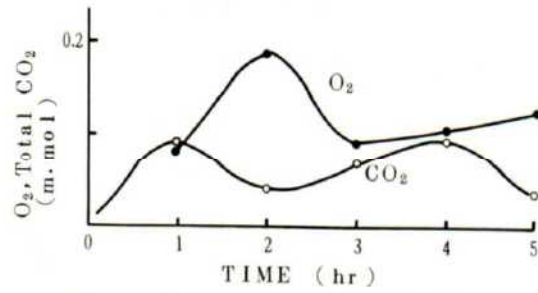


23.5℃ 原水 Chl. a 244.1 μg/l
第13図 Anabaenaの濃度別光合成量

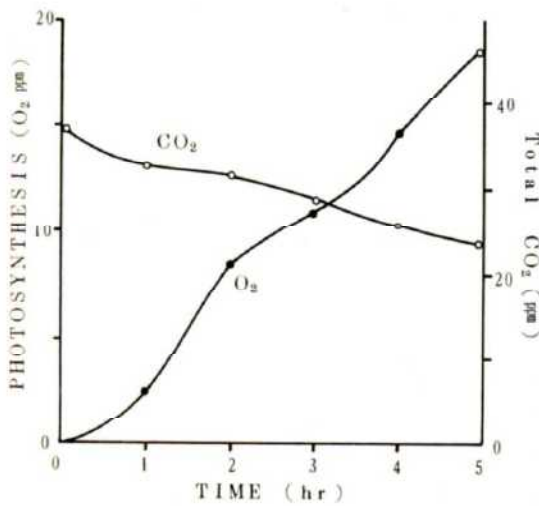


25 °C
 Anabaena Chl. a 385.1 mg/l
 pH 8.8 Total CO₂ 11.7 mg/l

第14図 全炭酸量と光合成速度

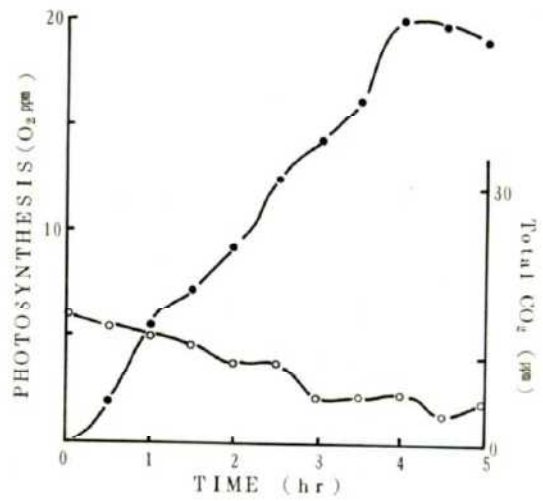


第16図 1時間あたりのガス収支



Total CO₂ 37 mg/l
 Anabaena 25.5 °C, Chl. a 257.8 μg/l

第15図 全炭酸と酸素の変化



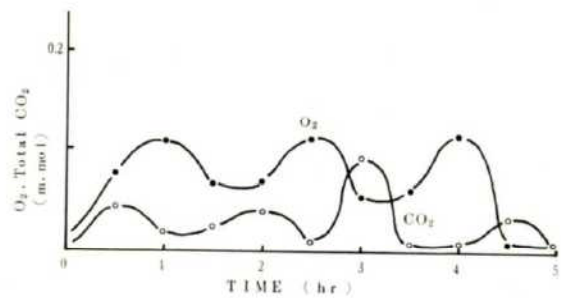
Total CO₂ 15.5 mg/l
 Anabaena 25.5 °C, Chl. a 364.1 μg/l

第17図 全炭酸と酸素の変化

酸素発生量は全炭酸量が 5 mg/l まで低下したときを除き安定しているが、各単位時間あたりのガス収支をみると、初めに全炭酸の消費があり次に酸素発生が起るといふ周期性がみられるようである。このことは、酸素ピ

ン内で光合成を始めた時点から CO₂ の吸収が起り、次に O₂ が発生となるが、CO₂ の濃度勾配の形成から光合成に必要な量を供給しえないために周期性を示すものと考えられる。

4) 攪拌法による測定について



第18図 30分あたりのガス収支

光・温度条件一定における光合成速度はCO₂の濃度勾配により制限される可能性が大きく、また植物プランクトン濃度が高くなれば光の透過性も無視できなくなるため、ビン内を攪拌し濃度勾配を解消する方法を検討した。

結果は第5表に示したとおりである。試水は霞ヶ浦の水を用いた。クロロフィルの量で49.8 μg/lで比較的プランクトンの少ないものを用い光の透過性のよい状態で測定した。攪拌方法はマグネチック・スタラーを使用した。

攪拌することにより光合成速度は止水の1.51倍と増加した。しかし、実際の測定ではマグネチック・スタラーを使用することは、測定数を増やした場合に不便であるため、簡易法として10分間に1回手で酸素ビンを上下に転倒させる方法を試みた。結果は第6表に示したとおり、マグネチック・スタラーの測定値に近似した値を示した。つぎに10分間に1回の割合で攪拌する方法で光成量の経時変化を調べたのが第19図である。

攪拌方式により測定したときの植物プランクトン濃度との関係については第20図に示した。植物プランクトンはMicrocystisを

第5表 測定法の比較

測定方法	O ₂ 発生量 mg/l/2 hours	光合成速度 O ₂ mg/Chl. a mg/hr
攪拌 マグネチック・ スタラー	2.46	24.70
止水	1.63	16.37

全炭酸量：37.0 mg/l

pH：8.9

水温：28.0℃

Chl. a：49.8 μg/l

Plankton { Microcystis
Anabaena
Osillatoria

20 W 蛍光灯 × 2

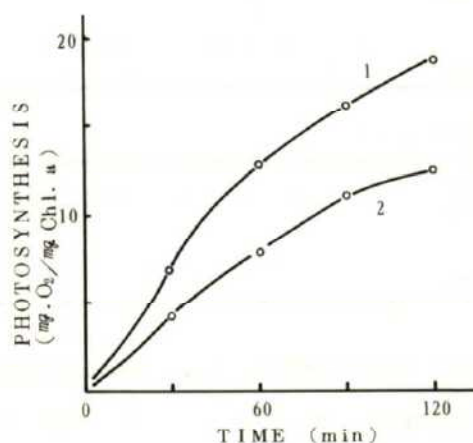
第6表 攪拌方法による光合成量の変化

測定方法	O ₂ 発生量 mg/l/2 hours	比
止水	1.37	1
攪拌 (10分に1回)	1.93	1.41
” (マグネチック・スタラー)	2.14	1.56

Chl. a：73.38 μg/l

Plankton { Microcystis
Anabaena
Osillatoria

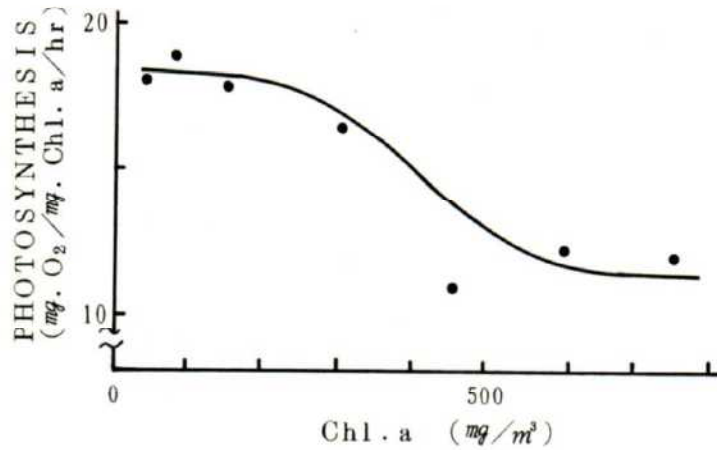
水温：28℃



第19図 光合成量の経時変化

を主とした養魚池より採取し、井水で段階的に希釈し測定した。先の止水方式(第13図)と比べるとChl. $300 \mu\text{g}/\text{l}$ 近くまで一定値を示し、高濃度のときも測定が可能となった。

これらの結果から、光合成速度を求めるには、光・温度条件を規定するほかに、測定時間を規程し攪拌しながら測定する必要があると考えられる。さらに植物プランクトン濃度が高いときには希釈し測定する必要がある。



池水: Microcystis, 水温: 28.0 °C

第20図 攪拌方式(10分に1回)による光合成量と植物プランクトン濃度の関係

6 霞ヶ浦での光合成速度測定結果について

前述の方法により、霞ヶ浦・北浦の試水について測定した光合成量は当該調査研究報告第12～第14号に報告されている。なお昭和48年8月と9月の湖沼観測結果には光合成量の記載がないので第7表に示した。

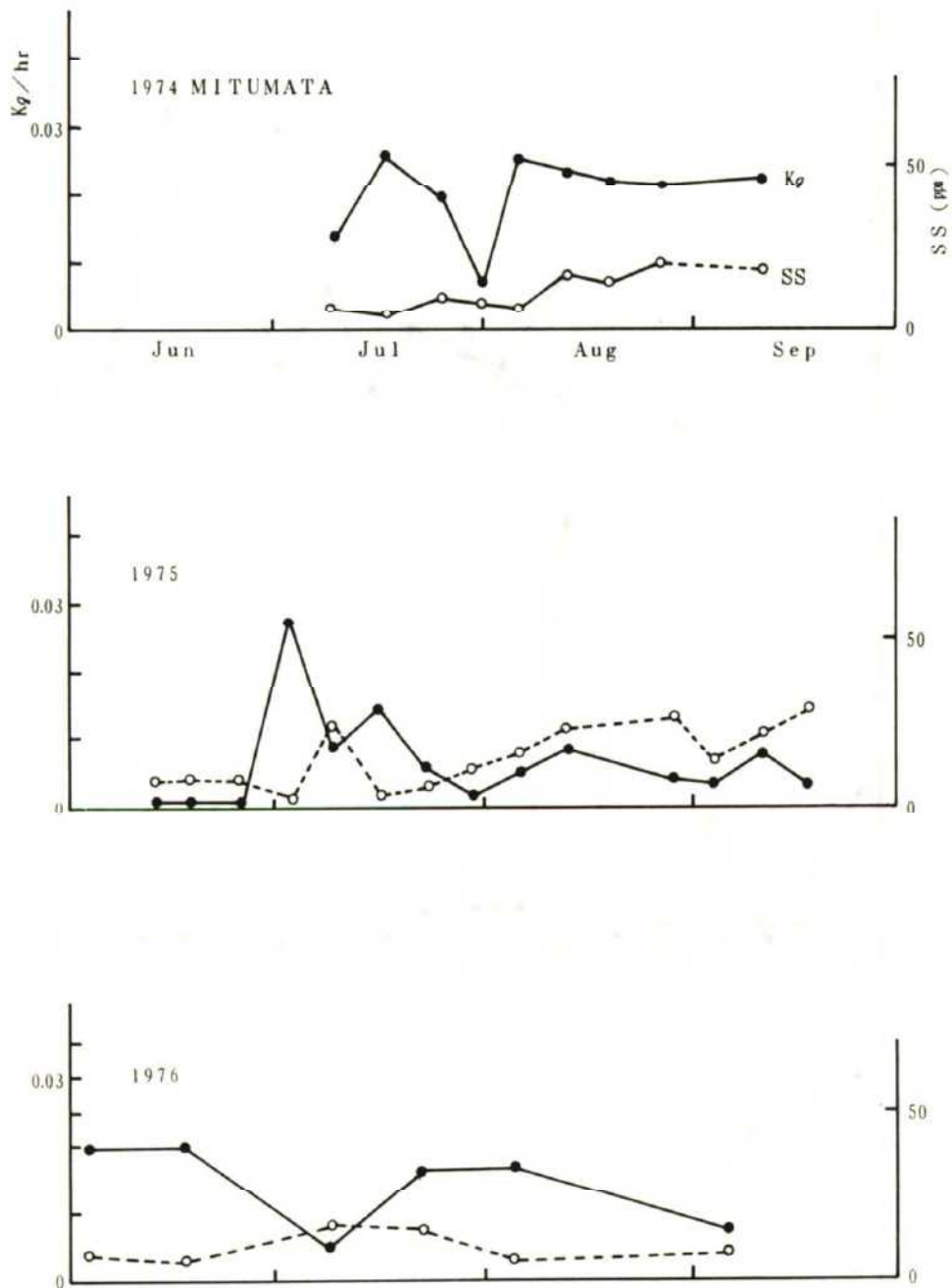
第7表 昭和48年8月9日湖沼観測結果補足表(光合成量)

昭和48年8月		沖宿	木原	三又沖	高崎	田伏	今宿	麻生	外浦	水原	白浜	江川	馬渡	安塚
Gross pr. O ₂ mg/ℓ/hr	3.02	0.94	4.65	-	3.98	1.62	-	1.36	-	2.24	-	-	3.47	3.88
Resp. O ₂ mg/ℓ/hr	2.27	0.60	1.89	-	1.94	0.89	-	0.78	-	1.23	-	-	1.52	0.72
昭和48年9月		沖宿	木原	三又沖	高崎	田伏	今宿	麻生	外浦	水原	白浜	江川	馬渡	安塚
Gross pr. O ₂ mg/ℓ/hr	-	0.40	0.12	0.37	1.91	0.04	0.27	-	-	1.43	-	-	0.48	1.66
Res. O ₂ mg/ℓ/hr	-	-	-	0.30	-	-	0.05	-	-	0.35	-	-	0.01	0.31

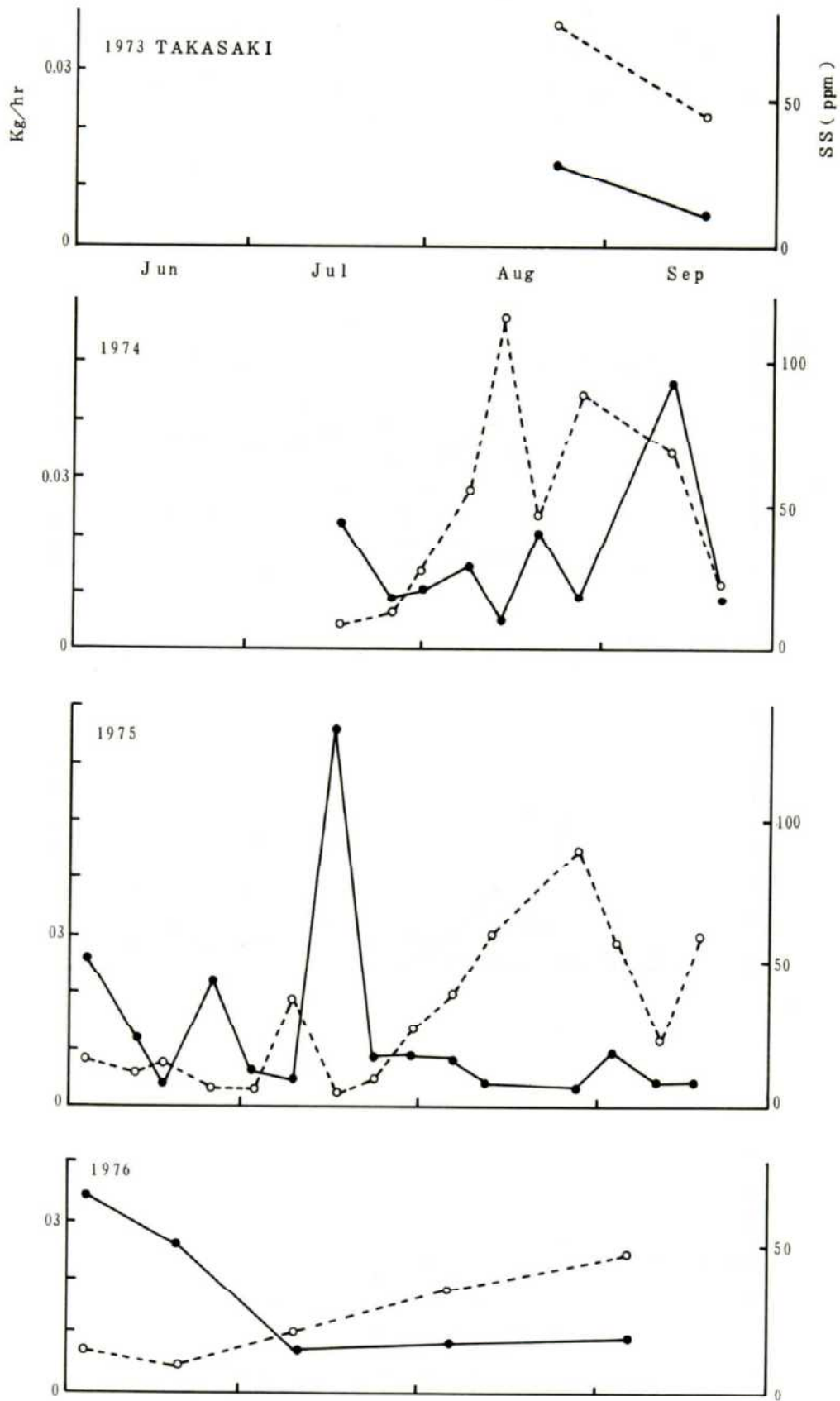
測定方法は、採水日に測定を行ない、光源は20 W蛍光灯2本で昭和49年度までは室温で測定し、昭和51年度以降は25℃インキュベーターを使った。測定時間は原則として2時間とした。GROSS-PRODUCTIONは暗ピンの酸素量からの増加量でRESPIRATIONは初めの酸素量か

らの減少量であり，単位は O_2 mg/l/hrとして示した。今回の測定は希釈したものはない。

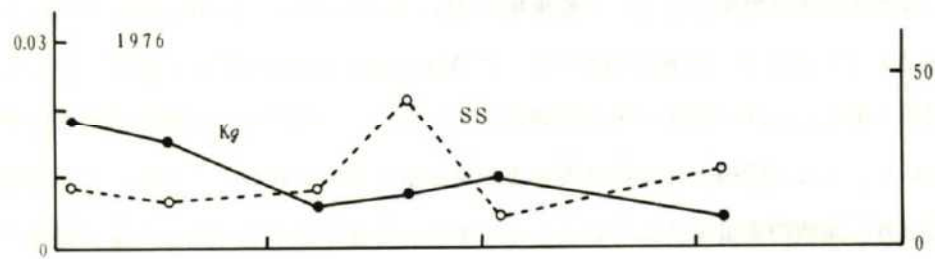
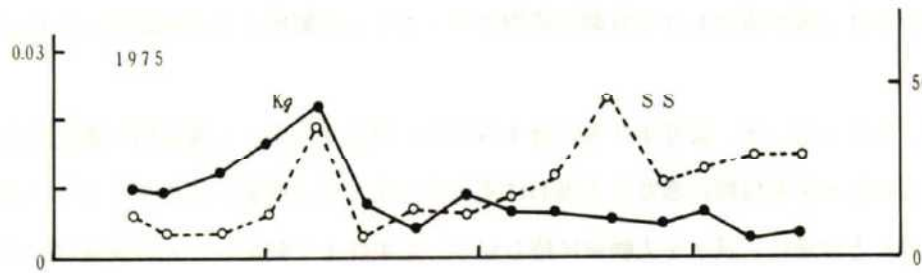
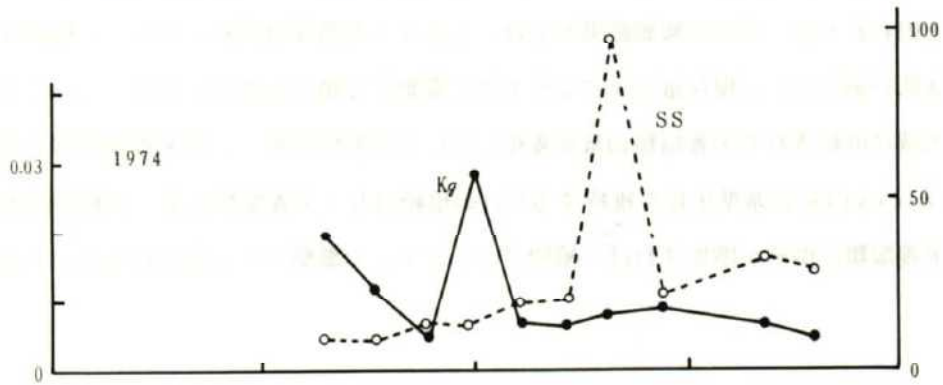
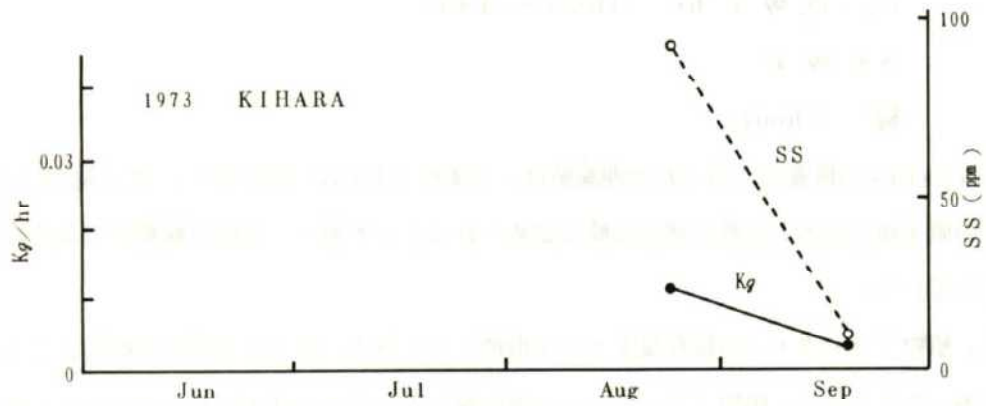
ここで，これらの測定結果から⑨式により比増殖速度 K_d を求めると第21図に示したとおりである。



第 21 図 三又沖における比増殖速度と S S



第 21-a 図 高浜における比増殖速度と S S



第 21-b 図 木原における比増殖速度と S S

$$K_g = \ln \frac{0.25 \times O_2 + S S}{S S} \dots\dots\dots (9)$$

O_2 : O_2 mg/l/hr GROSS. PRO

SS : mg/l

K_g : 1 hour

Microcystis の培養から得られた理論値は、光条件 2 Klux , 温度条件 25 °C で K_g は 0.036 である。この値を超えるものは湾入部の高崎で認められるが、木原・三又沖の観測点ではそれ以下の値を示している。

ここで、植物プランクトンの現存量を SS を指標としてみる。仮りに水域に供給される栄養源が一定であったとすると、植物プランクトンの現存量が大のときには生長が小さくなり、逆に現存量が小さいときは生長が大となると考えられ、その結果 K_g 値と現存量は逆相関にならなければならないと思われたが、今回の観測結果からは、このような関係は認められなく、 K_g 値は特異な場合を除き低い値を示し、現存量が年により大きく変動する傾向が認められた。このことは、年によって水域に供給される栄養塩類の量が増えている可能性が強く、富栄養湖の霞ヶ浦においても Microcystis の基準生長を維持するだけの供給はなく栄養塩類が第一の制限要因となっており、栄養塩類の供給が増加すれば、植物プランクトンの繁殖として現われるものと考えられる。

7 おわりに

本報においては、霞ヶ浦における夏期の植物プランクトンの繁殖を光合成速度と生長の視点から考慮した。

植物プランクトンは、光、温度条件等にはすみやかに対応するが、栄養塩類の濃度変化への対応は遅い。このため栄養塩類の濃度を人為的に変える方法で光合成量の変化をみることは不可能である。このことは逆に、試水を実験室に持ち帰り一定条件下で測定した光合成量は、その採水した地点の栄養塩類濃度を指標しているといえよう。

今回は、霞ヶ浦の異常繁殖が主として藍藻類の Microcystis , Anabaena と Oscillatoria に代表されているため、培養が可能となった Microcystis を使い、基準となる生長と光合成との関係を推定し、次に試水の光合成測定法を一定化し、霞ヶ浦での測定結果と基準生長とを比較検討した。ここで問題となる点は霞ヶ浦の現存量を SS で表わしていることで実際のプランクトン量以外に無機物重量を含んでいることである。普通にはクロロフィル量で植物プランクトンの現存量 (Standing stock) を表わすが、抽出方法と抽出時間で測定値の変動が大きいことから今回は相対的比較以外には用いなかった。今後は、クロロフィルの抽出法を明確化し利

用する必要がある。

本報においては、霞ヶ浦の植物プランクトンの繁殖は栄養塩類により律速されていると推定したが、その栄養塩類の変動する要因については、流入する量が一定であるとする、湖水等による置換率の変化、底泥からの回帰量の変化が大きな項目として挙げられるものと考えられ、これら水域の栄養塩類の供給量の変動要因を解明していく必要があり、さらに *Microcystis* の培養株によるバイオアッセイにより、栄養塩類中の欠乏要素の究明を行なう必要がある。

文 献

- (1) 赤城誠之他：霞ヶ浦における網いけす養殖ゴイのへい死について－I，1975，本誌Vol. 12
25～48
- (2) ICHIMURA, S, and ARUGA, Y: 1958, Bot Mag. Tokyo Vol 71. №84
～842, 261～296
- (3) 微細藻類研究会：昭和51年度藻類発生機構解明 調査報告.
- (4) 佐々木道也：1955,本誌Vol. 12, 17～24.
- (5) 外岡健夫他：1975, “ Vol. 12, 65～140.