

## 広島湾産 *Skeletonema costatum* の リン酸塩取り込みおよび増殖の動力学

樽谷 賢治・山本 民次

広島大学生物生産学部, 東広島市 724

1994年4月25日 受付

**要旨** 広島湾より分離した *Skeletonema costatum* のリン酸塩取り込みと増殖に関する動力学の解析を行った。リン枯渇細胞を用いて解析したリン酸塩取り込みの半飽和定数は  $0.68 \mu\text{M}$ , 最大取り込み速度は  $38.4 \text{ fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 最大比取り込み速度は  $11.6 \text{ h}^{-1}$  であった。また, 半連続培養を用いて測定したところ, 最小細胞内リン含量は  $2.80 \text{ fmol cell}^{-1}$ , 最大比増殖率は  $1.25 \text{ d}^{-1}$  が得られた。以上の結果から, *S. costatum* は低濃度のリン条件下で他種よりも有利に増殖することが可能であるが, 広島湾表層海水中のリン酸塩濃度においては, 本種でさえも, その増殖をリンによって制限されているものと推察された。

キーワード: スケルトネマ, 増殖動力学, 取り込み動力学, 広島湾, リン酸塩

### 緒 言

海水中の栄養塩は植物プランクトンの増殖に必須であり, 自然環境下における種間の共存や競争の排除, ひいては種遷移機構にまで影響を及ぼす重要な要因の一つである。栄養塩をめぐる植物プランクトン種間の問題を明らかにしていくためには, 植物プランクトン各種が栄養塩を取り込む際に示す機能的応答とそれに伴う増殖特性を定量的に把握することが必要となる。

近年, 我が国では排水中のリンの除去技術の向上あるいは有機リンを含む合成洗剤の使用禁止などによって沿岸海域へのリン流入量が減少している一方で, 窒素の流入は依然漸増傾向にあることから, 海水中の N:P 比の上昇が認められている (西島・深見, 1993)。これまで, 海産植物プランクトンの栄養塩の取り込みに関する研究は, その増殖が窒素によって制限されることが多いと考えられていたため, もっぱら硝酸塩もしくはアンモニウム塩制限下で行われてきた (KILHAM and HECKY, 1988)。しかし, 我が国沿岸海域におけるリン濃度の低下は, そこに生息する植物プランクトンの増殖形態をリン濃度依存型へと移行させ, ひいては種組成にまで影響を及ぼすであろうと予想されている (山口, 1993)。したがって, 植物プランクトンの増殖を制限する因子として, リン酸塩の重要性を認識することが必要であろう。

さらに, 植物プランクトンの生理的特性は, 種間はもちろんのこと, 同一種であっても生育環境や季節などにより異なる場合のあることが指摘されている (CARPENTER and GUILLARD, 1971; GALLAGHER, 1982)。したがって, ある海域における植物プランクトンの種遷移機構を解明するためには, その目的とする海域から採取, 分離された株を用いることが必要である。

上記のような観点から, 我々は広島湾における植物プランクトンの種遷移の問題を考える第一歩として, 広島湾から採取, 分離した珪藻 *Skeletonema costatum* のリン酸塩取り込みおよびリン制限条件下における増殖の動力学的な解析を行った。

### 材料と方法

**供試株と培養条件** 1992年7月に広島湾より採取, 分離した *S. costatum* のクローン株を用いた。培地には, 濾過滅菌 (Millipore, Type GS, 孔径  $0.22 \mu\text{m}$ ) した f/2 培地 (GUILLARD, 1975) を使用した。ただし, リン酸塩濃度は, 実験に応じて適宜調整した。培養は, 前培養, 本実験とも, 温度  $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 光強度  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 12時間-12時間の明暗サイクル下 (08:00点灯, 20:00消灯) にて行った。

リン酸塩の取り込み実験 実験には、リン制限のバッチ培養（初期リン酸塩濃度  $3 \mu\text{M}$ ）で培養液中のリン酸塩が枯渇し、増殖が停止したリン枯渇細胞を用いた。このリン枯渇細胞を含む培養液を  $50 \text{ ml}$  ずつ12個の  $100 \text{ ml}$  三角フラスコに分注し、それぞれに濃度が  $1, 2, 4, 8, 15 \mu\text{M}$  となるようにリン酸塩を添加した。栄養塩の取り込みは、細胞の履歴に影響される場合があるため、制限栄養塩添加後の培養時間を長くして培養期間中に細胞の履歴が変化してしまうことは望ましくない (HARRISON *et al.*, 1989)。そこで、本実験では、培養時間を2分間とし、培養後速やかに培養液中の溶存態無機リン (DIP) 濃度を測定した。初期リン酸塩濃度は、培養液を濾過し、その濾液に同様のリン酸塩添加操作を行うことにより得た。取り込み速度は、培養液中の DIP の濃度変化から求めた。さらに、取り込み速度を初期リン酸塩濃度の関数として Michaelis-Menten 式 [式 (1)] で表すことで、そのリン酸塩濃度依存性について定量的に評価した。

$$\rho = \rho_{\max} \cdot S / (K_s + S), \quad (1)$$

ここで、 $\rho_{\max}$  : リン酸塩の最大取り込み速度

$K_s$  : 半飽和定数

である。実測値を式 (1) にあてはめ、非線形最小二乗法を適用することによって、 $\rho_{\max}$ ,  $K_s$  を算出した。  
半連続培養実験 リン制限培地（初期リン酸塩濃度  $3 \mu\text{M}$ ）で対数増殖中の *S. costatum* の培養液を  $100 \text{ ml}$  三角フラスコ12個に  $50 \text{ ml}$  ずつ分注した。翌日より毎日10:00に、希釈率 ( $D=0.2-0.7$ ) に応じて培養液を抜き取り、これと同量の新鮮培地（リン酸塩濃度  $3.5 \mu\text{M}$ ）を添加した。抜き取った培養液中の細胞数を光学顕微鏡下で計数し、細胞密度の変動が $\pm 5\%$ の相対誤差内に収まったとき、系は定常状態に達したとみなして、細胞数の計数および DIP 濃度の測定を行った。

半連続培養では、定常状態において、比増殖率 ( $\mu$ ) と希釈率 ( $D$ ) との間には次の関係がある (TILMAN and KILHAM, 1976; NAKAMURA, 1985)。

$$\mu = \ln(1-D). \quad (2)$$

また、定常状態での細胞内リン含量 ( $Q$ ) は、DIP の濃度変化から次式により求めた。

$$Q = (S_0 - S) / N, \quad (3)$$

ここで、 $S_0$  : 添加培地中のリン酸塩濃度、

$S$  : 培養液中のリン酸塩濃度、

$N$  : 細胞密度、

である。

比増殖率は、細胞内リン含量の関数として Droop の式 (DROOP, 1973) [式 (4)] で表すことで、その細胞内含量依存性について定量的に評価した。

$$\mu = \mu_m' (1 - q_0 / Q), \quad (4)$$

ここで、 $\mu_m'$  :  $Q$  が最大の時の理論的的最大比増殖率、

$q_0$  : 最小細胞内リン含量、

である。 $\mu_m'$  および  $q_0$  は、実測値を式 (4) にあてはめ、非線形最小二乗法を適用することによって算出した。

分析方法 DIP の分析は、メンブレンフィルター (Millipore, Type RA, 孔径  $1.2 \mu\text{m}$ ) で試水を吸引濾過 ( $< 30 \text{ cm Hg}$ ) 後、その濾液をモリブデンブルー法 (MURPHY and RILEY, 1962) で処理して行った。

## 結果および考察

リン酸塩取り込みの動力学 *S. costatum* のリン酸塩取り込み速度を環境水中のリン酸塩濃度の関数として Michaelis-Menten 式で表した (Fig. 1)。最大取り込み速度  $\rho_{\max}$  は  $38.4 \text{ fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、半飽和定数  $K_s$  は  $0.68 \mu\text{M}$  であった (Table 1)。

$K_s$  値は制限栄養塩に対する親和性の指標として、その生態学的重要性が指摘されてきた (DUGDALE, 1967)。本実験で得られた広島湾産 *S. costatum* の  $K_s$  値は、他の海産植物プランクトン種で得られている範囲 ( $0.5\text{--}2.0 \mu\text{M}$  程度: RIVKIN and SWIFT, 1982; NAKAMURA and WATANABE, 1983) に収まっており、しかも比較的小さいことが明らかとなった。このことから、本種はリン酸塩に対する親和性が高く、低濃度のリン酸塩条件下でも増殖可能であると推定される。

最大比取り込み速度  $V_{\max}$  (細胞内リン含量当たりの最大取り込み速度) は  $11.6 \text{ h}^{-1}$  であった (Table 1)。この値は、本種が細胞内に含まれているリン量の数倍ものリン酸塩を時間もしくは分単位で細胞内に取り込みうることを意味するものである。また、多くの植物プランクトンのリン酸塩に対する最大比取り込み速度は、 $50\text{--}200 \text{ d}^{-1}$  ( $2.1\text{--}8.3 \text{ h}^{-1}$ ) であるとされており (NAKAMURA and WATANABE, 1983)、他種と比較しても大きいことが分かる。したがって、リン枯渇状態にある *S. costatum* は、河川水の流入等によりリン酸塩の供給を受けると、それを短時間で急速に取り込み、細胞内に蓄積する能力に秀でていると言える。

リン制限条件下における増殖の動力学 半連続培養で得られた定常状態時における培養液中のリン酸塩濃度は、希釈率  $0.70$  (ca.  $0.5 \mu\text{M}$ ) を除き検出限界以下であった。また、細胞密度は、 $9.50 \times 10^4$  ( $D=0.70$ )

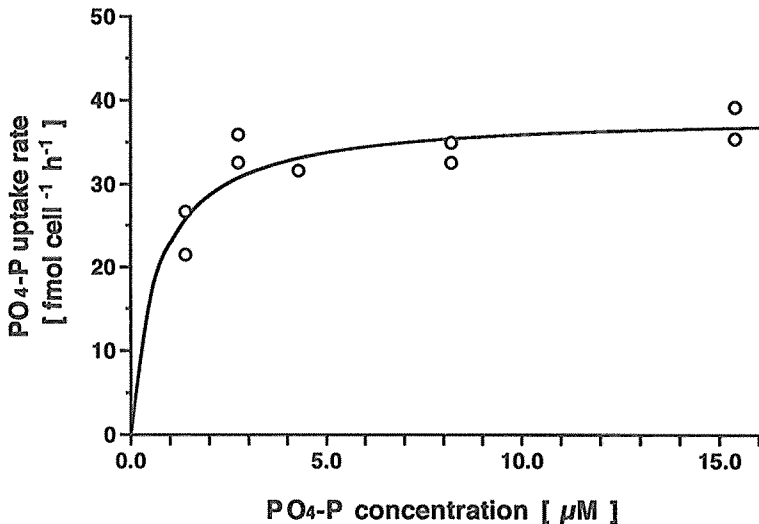


Fig. 1. Phosphate uptake rate of *Skeletonema costatum* as a function of phosphate concentration.

Table 1. Phosphate uptake kinetic parameters of *Skeletonema costatum* isolated from Hiroshima Bay.  $K_s$ : half saturation constant,  $\rho_{\max}$ : maximum uptake rate,  $Q$ : cell quota, and  $V_{\max}$ : maximum specific uptake rate.

$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )	0.68
$\rho_{\max}$ ( $\text{fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	38.4
$Q$ ( $\text{fmol cell}^{-1}$ )	3.3
$V_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	11.6

$-1.04 \times 10^6 (D=0.20)$  cells  $\text{ml}^{-1}$  の範囲にあり、希釈率が大きくなるほど減少する傾向が見られた。

一般的に栄養塩制限下にある植物プランクトンの増殖は、環境水中の栄養塩濃度に直接依存するのではなく、むしろ細胞内の栄養塩含量に依存すると考えられており、両者の関係は、Droop の式で表される (DROOP, 1973)。今回実験を行った *S. costatum* のリン制限条件下における比増殖率と細胞内リン含量との関係も Droop の式によく適合した (Fig. 2)。また、最小細胞内リン含量  $q_0$  は  $2.80 \text{ fmol cell}^{-1}$ 、最大比増殖率  $\mu_m'$  は  $1.25 \text{ d}^{-1}$  であった (Table 2)。このように、*S. costatum* は、効率的なリン利用能と高い増殖能を有することによって、低濃度のリン条件下で他種よりも有利に増殖することが可能であると推定される。

広島県水産試験場事業報告 (広島県水産試験場, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993) によると、広島湾内に設けられた 4 定点で 1988-1992 年に観測された表層海水中のリン酸塩濃度は、最大でも  $1.0 \mu\text{M}$  程度であった。今回の実験から得られた広島湾産 *S. costatum* の  $K_s$  値は  $0.68 \mu\text{M}$  であったので、 $0-1.36 \mu\text{M}$  の濃度域におけるリン酸塩取り込み速度は環境水中のリン酸塩濃度に依存する (Fig. 1)。したがって、低濃度のリン条件下で他種よりも優位にあると思われる *S. costatum* でさえ、広島湾の表層海中においては、その増殖をリンによって制限されているものと推察される。

植物プランクトンの生理的特性は、同一種であっても株の違いによって、差違が見られることが指摘されている (CARPENTER and GUILLARD, 1971)。西島・深見 (1993) は、本報と同じく半連続培養法を用いて *S. costatum* のリン制限下における増殖の動力学的解析を行い、その最大比増殖率が  $0.56-0.65 \text{ d}^{-1}$  であったと報告している。この値は、本報で得られた値の  $1/2$  程度に過ぎず、異なる生息環境から分離された株間の生理的特性の違いを顕著に表しているものと思われる。また、GALLAGHER (1980, 1982) は、Naragansett 湾から分離した *S. costatum* 個体群の間に季節によって遺伝的な違いが見られ、それが生理的

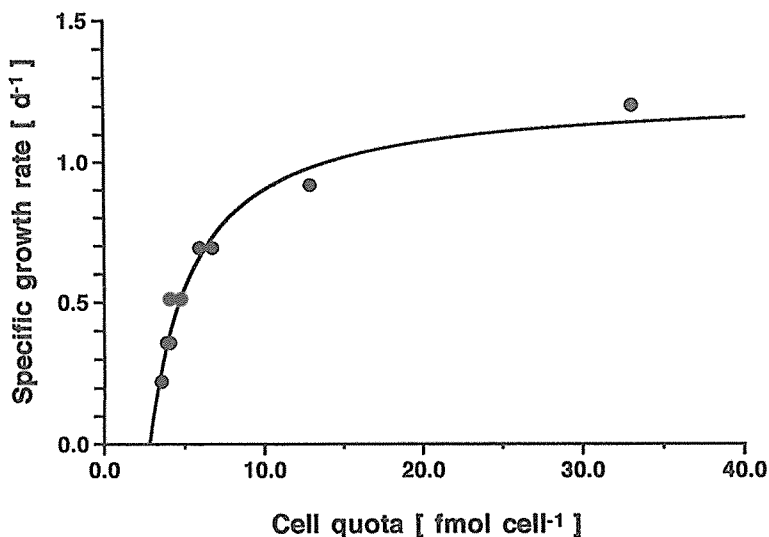


Fig. 2. Specific growth rate of *Skeletonema costatum* under phosphorus-limited conditions as a function of phosphorus cell quota.

Table 2. Growth kinetic parameters of *Skeletonema costatum* isolated from Hiroshima Bay.  $q_0$ : minimum cell quota,  $\mu_m'$ : maximum specific growth rate.

$q_0$ (fmol cell <sup>-1</sup> )	2.80
$\mu_m'$ (d <sup>-1</sup> )	1.25

性の差として発現することを報告している。広島湾においても本種はほぼ周年にわたり出現することから、このような季節による生理的特性の違いを検討することも今後の課題のひとつであろう。

謝辞 本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（一般研究C, 04806025）をうけて行われた。

### 引用文献

- CARPENTER, E. J. and GUILLARD, R. R. L., 1971, Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology*, 52 : 183-185.
- DROOP, M. R., 1973, Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9 : 264-272.
- DUGDALE, R. C., 1967, Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, 12 : 685-695.
- GALLAGHER, J. C., 1980, Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *J. Phycol.*, 16 : 464-474.
- GALLAGHER, J. C., 1982, Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 18 : 148-162.
- GUILLARD, R. R. L., 1975, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Culture of marine invertebrate animals, pp. 29-60, Plenum Publishing Corp., New York.
- HARRISON, P. J., PARSLAW, J. S. and CONWAY, H. L., 1989, Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 52 : 301-312.
- KILHAM, P. and HECKY, R. E., 1988, Comparative ecology of marine and freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 33 : 776-795.
- MURPHY, J. and RILEY, J. P., 1962, A modified single-solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta.*, 27 : 31-36.
- NAKAMURA, Y., 1985, Kinetics of nitrogen- or phosphorus-limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 41 : 381-387.
- NAKAMURA, Y. and WATANABE, M. M., 1983, Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, 39 : 167-170.
- 西島敏隆・深見公雄, 1993, 植物プランクトンの増殖に及ぼす N:P 比の影響. 2. ラフィド藻類及び珪藻類. 水域の窒素:リン比と水産生物 (吉田陽一編, 水産学シリーズ95), pp. 20-28, 恒星社厚生閣, 東京.
- RIVKIN, R. B. and SWIFT, E., 1982, Phosphate uptake by the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *J. Phycol.*, 18 : 113-120.
- 広島県水産試験場, 1989, 昭和63年度広島県水産試験場事業報告. 125 pp.
- 広島県水産試験場, 1990, 平成元年度広島県水産試験場事業報告. 157 pp.
- 広島県水産試験場, 1991, 平成2年度広島県水産試験場事業報告. 91 pp.
- 広島県水産試験場, 1992, 平成3年度広島県水産試験場事業報告. 102 pp.
- 広島県水産試験場, 1993, 平成4年度広島県水産試験場事業報告. 99 pp.
- TILMAN, D. and KILHAM, S. S., 1976, Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.*, 12 : 375-383.
- 山口峰生, 1993, 植物プランクトンの増殖に及ぼす N:P 比の影響. 1. 渦鞭毛藻類. 水域の窒素:リン比と水産生物 (吉田陽一編, 水産学シリーズ95), pp. 11-19, 恒星社厚生閣, 東京.

## Phosphate Uptake and Growth Kinetics of *Skeletonema costatum* isolated from Hiroshima Bay

Kenji TARUTANI and Tamiji YAMAMOTO

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 724, Japan*

Phosphate uptake and growth kinetics were investigated in a diatom *Skeletonema costatum* isolated from Hiroshima Bay. Phosphate uptake kinetic parameters, i.e. half saturation constant, maximum uptake rate and maximum specific uptake rate, examined using phosphorus-starved cells were  $0.68 \mu\text{M}$ ,  $38.4 \text{ fmol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $11.6 \text{ h}^{-1}$ , respectively. Growth kinetic parameters, i.e. minimum cell quota for phosphorus and maximum specific growth rate, examined by semi-continuous culture method were  $2.80 \text{ fmol cell}^{-1}$  and  $1.25 \text{ d}^{-1}$ , respectively. These results show that, even *S. costatum*, the growth might be limited by the low phosphorus concentration in the surface seawater of Hiroshima Bay, although *S. costatum* has an advantage in growth under phosphorus-limited conditions compared to other phytoplankton species.

**Key words** : growth kinetics, Hiroshima Bay, phosphate, *Skeletonema costatum*, uptake kinetics