

スサビノリ *Porphyra yezoensis* 葉体のアンモニア態および 硝酸態窒素の取り込みに及ぼす温度の影響

山本民次・高尾允英

愛知県水産試験場 (443 愛知県蒲郡市三谷町若宮97)

YAMAMOTO, T. and TAKAO, M. 1988. Effects of temperature on the uptake kinetics of ammonia-N and nitrate-N by *Porphyra yezoensis* thalli. Jpn. J. Phycol. 36: 37-42.

The uptake kinetics for ammonia-N and nitrate-N by *Porphyra yezoensis* thalli were examined under various temperatures (4-18°C). The carbon and nitrogen contents of the frond were 341.9 ± 24.8 and 52.5 ± 10.4 mg·g dry wt⁻¹, respectively, and the C/N ratio was 6.80 ± 1.58 . The uptake parameter, Ks, for ammonia-N varied from 48.3 to 182.7 μgN·l⁻¹, and Vm was from 0.0033 to 0.0082 h⁻¹. The Ks for nitrate-N varied from 10.1 to 53.9 μgN·l⁻¹, and the Vm was from 0.0005 to 0.0013 h⁻¹. These parameters both for ammonia-N and nitrate-N showed the maxima at 14°C. Comparing the Vm of ammonia-N with that of nitrate-N under the same temperature, ammonia-N was taken 6.3-9.4 times faster than nitrate-N by the frond. These parameters expressed in common logarithms were converted by the quadratic equations to absolute temperatures; for ammonia-N, $V_A = S \times 10^{-29.642(10^3/T)^2 + 206.93(10^3/T) - 363.23} / (S + 10^{-39.556(10^3/T)^2 + 276.17(10^3/T) - 479.77})$ and for nitrate-N, $V_N = S \times 10^{-32.464(10^3/T)^2 + 227.45(10^3/T) - 401.36} / (S + 10^{-37.051(10^3/T)^2 + 257.50(10^3/T) - 445.69})$. These equations consisting of the major factors such as ammonia-N and nitrate-N concentrations and temperature which are controlling the growth of Nori frond are considered to be useful in estimating the production capacity of Nori cultural ground.

Key Index Words: ammonia—nitrate—Porphyra—temperature—uptake.

Tamiji Yamamoto and Masahide Takao, Aichi Prefectural Fisheries Experimental Station, 97 Wakamiya, Miya-cho, Gamagori, Aichi 443, Japan

ノリ養殖業においては、ノリ網の浮き流し養殖法や冷蔵網の利用など、近年の技術開発によって、生産が需要を上回るようになり、量を採るより質の向上を考えて、漁場を適正に行使する必要が叫ばれるようになってきた。

ノリ漁場内にはノリ以外に植物プランクトンやその他の海藻類など、ノリと生態的地位(ニッチ)を同じくする生物が生息し、一つの生態系をなしているのので、他種生物の存在を無視してはノリ漁場の適正行使は語れないであろう。つまり、各種生物の環境要因に対する機能的応答、あるいは各種生物間の関係が明らかにされた上で、それらを系全体として把握し、その中におけるノリの位置を理解する必要がある。

その前段階としてまず、ノリそのものの環境要因に対する応答を調べねばならない。ノリの栄養塩の取り込みに関しては、培養液中の濃度に変化する中での実験が従来行われてきており(岩崎, 1965; 松原ら, 昭和61年度地域重要新技術開発促進事業

1965), 定常状態を仮定した生態系の中におけるある時間断面での取り込み速度に関する情報は欠如している。

一方、安定同位体 ¹⁵N を使って植物体内の窒素代謝を明らかにしようとする試みは、陸上植物においては1950年代から行われてきており(渋谷, 1980)、海洋の分野では1960年代から植物プランクトンを対象として栄養塩の取り込み速度に関する研究が進められてきている(DUGDALE and GOERING, 1967; EPPLEY and THOMAS, 1969; CARPENTER and GUILLARD, 1971; MCCARTHY, 1981; MCCARTHY *et al.*, 1982; GLIBERT *et al.*, 1982)。

本研究ではスサビノリ *Porphyra yezoensis* を用いて、ノリ漁期間の現場水温を網羅した条件下で、アンモニア態および硝酸態窒素の取り込み速度を同位体窒素 ¹⁵N を用いて測定し、それらのパラメーターを算出したので報告する。

材料と方法

実験には1986年5月にフリーリビングの糸状体をカキ殻に移植し、10月まで室内の水槽で培養管理し、そこから放出された殻胞子をノリ網に付着させて愛知県水産試験場尾張分場地先で生長させたスサビノリを用いた。

上記のノリ葉体のうち、葉長 5—10 cm で、肉眼的に正常なものを選び、1.5 cm ϕ (面積 1.766 cm 2) のポンチで打ち抜いた。天然状態で生育したノリ葉体には、リクモフォラ *Licmophora* spp. 等珪藻類の付着が見られるため、これらの葉片をろ過海水を入れた三角フラスコにいれ、栓をして激しく振とうした。これによって、付着珪藻類は完全に葉体表面から除去できた (TANAKA, 1986)。

次にこれらの葉片を窒素源のみ除いてオートクレーブ滅菌した人工海水 1/20 ASP $_{12}$ (PROVASOLI *et al.*, 1957; ただし NaCl, MgSO $_4$ ·7H $_2$ O, MgCl $_2$ ·6H $_2$ O, KCl, CaCl $_2$, TRIS は原記載濃度, 他は 1/20濃度, pH 8.0) に24時間浸漬した。この時の水温と照度は次に行う ^{15}N 取り込みの実験と同じに設定した。

24時間の予備培養後、300 ml の栓付き三角フラスコに上記と同様の人工海水を 200 ml ずつ入れ、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ および K^{15}NO_3 をそれぞれ10段階の濃度で添加したものを用意した。 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ の濃度は 0, 6.9, 13.8, 20.7, 34.4, 68.9, 103.3, 137.7, 172.1, 206.6 $\mu\text{gN}\cdot\text{l}^{-1}$, また、 K^{15}NO_3 の濃度は 0, 7.3, 14.7, 22.0, 36.7, 73.5, 110.2, 147.0, 183.7, 220.5 $\mu\text{gN}\cdot\text{l}^{-1}$ とした。

これらに上記の葉片を3枚ずつ入れ、白色蛍光灯で 8000 lx の照度を与えながら、1時間の処理を行った。なお、光合成の日周リズムを考慮して、正午を中心とした2時間の間に実験を行った。スサビノリの場合、海産植物プランクトンのある種で見られるようなアンモニア態窒素の短時間での急速な取り込み (CONWAY *et al.*, 1976; McCARTHY and GOLDMAN, 1979; GOLDMAN and GLIBERT, 1982) が見られない上に、2時間までは時間とともに取り込み量が直線的に増加することが確認されているので (高尾ら, 1986), 以上のような処理時間とした。実験時の処理温度は愛知県多地区のノリ漁期に通常みられる現場水温 4—18°C を考慮し、この範囲で 2°C の間隔に設定した。

取り込み実験終了後、各実験区3枚ずつの葉片をあらかじめ 400°C で2時間空焼きしたグラスファイバー紙にのせ、60°C で6—8時間乾燥後、粉砕して均一化して測定を行った。これらの一部は CHN コーダー

(Yanaco MT-3 型) を用いて葉体中の炭素と窒素含有量を求めた。残りの一部は熊沢 (1980) に従って処理し、N-15 アナライザー (日本分光 NIA-1 型) で得られる $^{28}\text{N}_2$ と $^{29}\text{N}_2$ ガスの輝線スペクトルから、ノリ葉体中の ^{15}N atom% を求めた。

ノリ葉片に取り込まれた窒素全量 ($^{14}\text{N}+^{15}\text{N}$) は $n=N(A-a_0)/(a-A)$ として算出した。ここで、n は実験時間中に増加したノリ葉片中の窒素量、N はノリ葉片がもともと持っていた窒素量 (CHN コーダーで得られた値)、 a_0 は自然界の ^{15}N atom% (=0.3663), a は試水に添加された ^{15}N の atom% (ここでは99%のものを使用)、A は実験後のノリ葉片中の ^{15}N atom% である。

結果と考察

1. 炭素および窒素含有量

炭素含有量は 341.9 ± 24.8 (249.3—464.8) $\text{mg}\cdot\text{g}$ dry wt^{-1} , 窒素含有量は 52.5 ± 10.4 (27.2—76.1) $\text{mg}\cdot\text{g}$ dry wt^{-1} であった (表1)。また、C/N 比は 6.80 ± 1.58 (4.25—12.53) であった。

今回の実験に用いたノリ葉体は自然海中で育成させたものであるため、その表面に付着している生物による実験結果への影響には十分注意せねばならないであろう。その一つ付着珪藻類は前述の方法で完全に除去した。また、バクテリアについては、それぞれの実験後に付着数を調べたところ、平均直径 0.8 μm のものが $1.0-19.3 \times 10^6$ cells/cm 2 程付着しているのが確認された。これらの比重を1.07, 乾重量/湿重量比を0.23 (Bowden, 1977), 炭素/乾重量比を0.4 (深見私信), 炭素/窒素比を3.5 (WHEELER and KIRCHMAN, 1986) とすると、ノリ葉体に対するバクテリアの窒素量は0.01—0.16%と見積もられる。また、WHEELER and KIRCHMAN (1986) の報告のように、バクテリアによる硝酸態窒素の取り込みは非常に小さく、アンモニアに対してもノリと同程度なので (0.0026—0.0133 h^{-1}), バクテリアによる N 吸収量は、本実験で得ら

Table 1. Carbon and nitrogen contents of *Porphyra yezoensis* thalli, and the C/N ratio. $n=160$.

	炭素量 ($\text{mg}\cdot\text{g}$ dry wt^{-1})	窒素量 ($\text{mg}\cdot\text{g}$ dry wt^{-1})	C/N
範 囲	249.3—464.8	27.2—76.1	4.25—12.53
平均± 標準偏差	341.9 ± 24.8	52.5 ± 10.4	6.80 ± 1.58

れた結果を大きく左右するものではない、と判断し、前処理は一切行わなかった。

2. アンモニア態および硝酸態窒素の取り込み

アンモニア態および硝酸態窒素の取り込みは次の MICHAELIS-MENTEN の速度式に従った。

$$V = V_m \cdot S / (K_s + S)$$

S : 培養液中の窒素濃度 ($\mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$)

V : 取り込み速度 (h^{-1})

K_s : 半飽和定数 ($\mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$)

V_m : 最大取り込み速度 (h^{-1})

上式からアンモニア態窒素の取り込みを例えば 4°C について見ると、その K_s 値と V_m 値はそれぞれ $48.3 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0033h^{-1} であった (図 1)。同様の方法で各温度での値を求めてゆくと、温度の上昇とともに双方とも次第に大きくなり、14°C で最大 $182.7 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0082h^{-1} となった。また、18°C では再び下

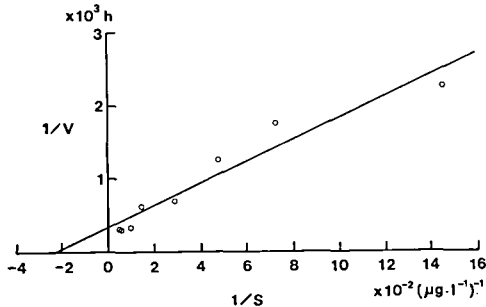
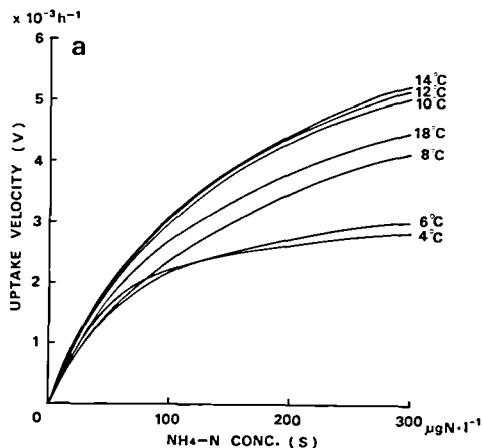


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot ($1/V$ vs. $1/S$; V: uptake velocity, h^{-1} ; S: ammonia-N concentration, $\mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$) of the uptake of ammonia-N by *Porphyra yezoensis* thalli. 4°C, 8000 lx, 1/20 ASP₁₂ culture medium.



がって $143.8 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0066h^{-1} となった (表 2, 図 2 a)。

硝酸態窒素の取り込みにおいても同様に, K_s , V_m とも 4°C で最小 $10.1 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0005h^{-1} , 14°C で最大 $53.9 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0013h^{-1} を得, 18°C では $43.3 \mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$, 0.0007h^{-1} に低下した (表 2, 図 2 b)。両者ともに, 14°C で K_s , V_m の値が最大となったが, この結果は, 15°C 付近で光合成量が最大となるという報告 (木下・寺本, 1958 a, 1958 b; 岩崎, 1965) と一致する。

アンモニア態窒素と硝酸態窒素の V_m 値を各温度ごとに比較すると, アンモニア態窒素の方が 6.3–9.4 倍速い速度で取り込まれることがわかる。硝酸態窒素が取り込まれる場合には, 硝酸還元酵素の関与によ

Table 2. The uptake parameters, K_s (half-saturation constant, $\mu\text{gN} \cdot \text{l}^{-1}$) and V_m (maximum uptake velocity, h^{-1}) for ammonia-N and nitrate-N in *Porphyra yezoensis* thalli under various temperature conditions.

Temp. (°C)	NH ₄ -N		NO ₃ -N	
	K_s	V_m	K_s	V_m
4	48.3	0.0033	10.1	0.0005
6	77.9	0.0038	20.8	0.0006
8	164.5	0.0064	ND	ND
10	150.2	0.0077	33.0	0.0009
12	164.0	0.0081	ND	ND
14	182.7	0.0082	53.9	0.0013
16	ND	ND	ND	ND
18	143.8	0.0066	43.3	0.0007

ND: no data.

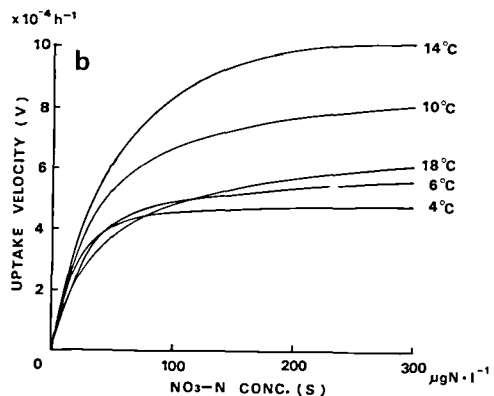


Fig. 2. Changes in uptake kinetics of ammonia-N (a) and nitrate-N (b) in *Porphyra yezoensis* thalli under various temperature conditions.

り、亜硝酸を経てアンモニアに還元されてから代謝系に入ることが取り込み速度を遅くしている一つの理由かもしれない(野沢, 1959)。

荒木ら(1979)は *P. yezoensis* f. *narawaensis* から抽出した硝酸還元酵素の硝酸に対する K_s 値は NADH を電子供与体とした場合, $120 \mu\text{gN}\cdot\text{l}^{-1}$ であったと報告している。これは今回ノリ生体で得られた硝酸の取り込みに関する K_s 値より大きい, 生体内におけるその他の酵素や補酵素による律速によるものと解釈できるであろう。

アンモニア態窒素と硝酸態窒素が共存した場合にノリがどのような取り込み形態を示すかは興味ある問題である。武居・宥沢(1959)はアンモニア態窒素と硝酸態窒素 5 ppm ずつの混合培養液中ではアンモニア態窒素が培養初期に選択的に取り込まれ, その後硝酸態窒素が取り込まれることを報告しているが, 硝酸態窒素の取り込みを阻害するアンモニア態窒素の濃度は正確には求められていない。植物プランクトンの自然

群集では $14\text{--}21 \mu\text{gN}\cdot\text{l}^{-1}$ のアンモニア態窒素の存在で硝酸態窒素の取り込みが妨げられることが知られている(McCARTHY, 1981)。アンモニアや硝酸, あるいはその他の形態の窒素源が共存する海に成育するノリを対象とする以上, これらのことは今後研究されねばならない課題の一つであろう。

3. パラメーター K_s , V_m の温度の関数としての表現

ここでは各実験温度で得られた K_s および V_m の値を使って, アンモニア態と硝酸態の取り込み速度を温度の関数として表現する。これによって, 他種の生物の窒素の取り込み形態との比較が容易となり, 生物間の窒素をめぐる競争の問題を論ずる上で有益となる。

生体内の酵素反応系の関与する栄養塩の取り込みは, 一般に Q_{10} の法則に従うものと思われる。従って, K_s と V_m のそれぞれについてアレニウスプロットを行ったが, 今回の結果では高温域での頭打ちのた

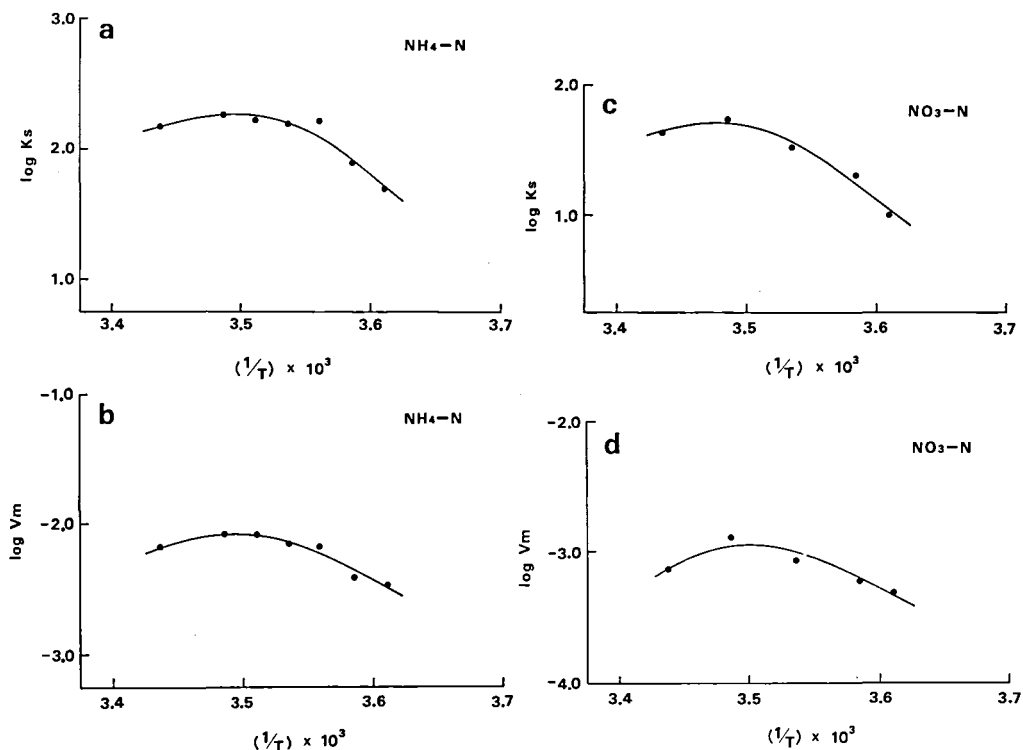


Fig. 3. Effects of the temperature on the uptake parameters, K_s (half saturation constant) and V_m (maximum uptake velocity) for ammonia-N and nitrate-N by *Porphyra yezoensis* thalli. (a) K_s for ammonia-N, $Y = -39.556X^2 + 276.17X - 479.77$; (b) V_m for ammonia-N, $Y = -29.642X^2 + 206.93X - 363.23$; (c) K_s for nitrate-N, $Y = -37.051X^2 + 257.50X - 445.69$; (d) V_m for nitrate-N, $Y = -32.464X^2 + 227.45X - 401.36$. Y means $\log K_s$ or $\log V_m$, and X is $(1/T) \times 10^3$ (T is the absolute temperature).

め、二次関数で近似した(図 3 a-d)。最終的にこれらの二次関数を再度、MICHAELIS-MENTEN の式に代入して以下の式を得た。

$$V_A = S \times 10^{-29} \cdot 642X^2 + 206 \cdot 93X - 363 \cdot 23 / (S + 10^{-39} \cdot 556X^2 + 276 \cdot 17X - 479 \cdot 77)$$

$$V_N = S \times 10^{-32} \cdot 464X^2 + 227 \cdot 45X - 401 \cdot 36 / (S + 10^{-37} \cdot 051X^2 + 257 \cdot 50X - 445 \cdot 69)$$

V_A : アンモニア態窒素の取り込み速度 (h^{-1})

V_N : 硝酸態窒素の取り込み速度 (h^{-1})

S : 栄養塩濃度 ($\mu gN \cdot l^{-1}$)

X : $(1/T) \times 10^3$, T は絶対温度

ところで、近年では赤潮プランクトンの発生がノリ漁期である冬季にも見られるようになり(宮本ら, 1987), ノリ漁場の無機窒素の変動はこれらの植物プランクトンによって大きく左右される(YAMAMOTO and FUJISAKI, in prep.)。プランクトンの増殖による現場の栄養塩類の濃度の低下はノリ葉体の色落ちを招くため、施肥が行われる場合もあるが、それによってプランクトンの増殖も助長されるため、悪循環となっている。

冬季の赤潮を形成するプランクトンの代表種である *Skeletonema costatum* の K_s 値は EPPLEY *et al.* (1969) によればアンモニアで $11.2-50.4 \mu gN \cdot l^{-1}$ ($18^\circ C$), 硝酸で 0 ± 7.0 ($8^\circ C$), $5.6-6.0$ ($18^\circ C$), $14 \pm 6.0 \mu gN \cdot l^{-1}$ ($28^\circ C$) であり、今回得られたノリの K_s 値に比べていずれも小さい。従って低濃度の無機窒素環境においてはプランクトンに有利となることが予想される。

ノリ葉体の生長を左右する主要因である、アンモニア態あるいは硝酸態窒素濃度と温度とによって表現された上記の式は、窒素をめぐる多種生物間の競合のみならず、対象とする漁場内のノリの生産可能量を見積もる上でも非常に有効であろう。また、生態系内の窒素の循環という概念は、ノリ漁場の適正な行使を考える際の論理的裏付けの一つとして重要であり、これらの式はこの点において基本となろう。

最後に、今回の実験を行うにあたり、 ^{15}N アナライザーを快く使用させて下さった、東海区水産研究所海洋部の杉浦健三部長および佐々木克之博士に深く感謝する。また、バクテリアの計数および有益な助言をくださった、京都大学水産微生物学講座の深見公雄博士に心から感謝する。

引用文献

荒木 繁・猪川倫好・大房 剛・西沢一俊 1979. ナラワサビノリにおける硝酸還元酵素の 2, 3 の

性質. 日水誌 45 : 919-924.

- BOWDEN, W.B. 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1229-1232.
- 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.
- CONWAY, H.L., HARRISON, P.J. and DAVIS, C.O. 1976. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. II. Transient response of *Skeletonema costatum* to a single addition of the limiting nutrient. *Mar. Biol.* 35: 187-199.
- DUGDALE, R.C. and GOERING, J.J. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.* 12: 196-206.
- EPPLEY, R.W., ROGERS, J.N. and MCCARTHY, J.J. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 14: 912-920.
- EPPLEY, R.W. and THOMAS, W.H. 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 5: 375-379.
- GLIBERT, P.M., BIGGS, D.C. and MCCARTHY, J.J. 1982. Utilization of ammonium and nitrate during austral summer in the Scotia Sea. *Deep-Sea Res.* 29: 837-850.
- GOLDMAN, J.C. and GLIBERT, P.M. 1982. Comparative rapid ammonium uptake by four species of marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 27: 814-827.
- 岩崎英雄 1965. アサクサノリの生理・生態に関する研究. 広大水産産学部紀要 6 : 133-211.
- 木下祝郎・寺本賢一郎 1958 a. "アサクサノリ" の光合成に関する二, 三の知見. 藻類 1 : 11-15.
- 木下祝郎・寺本賢一郎 1958 b. "アサクサノリ" の生長に対する光及び水温の影響. 日水誌 24 : 326-329.
- 熊沢喜久雄 1980. 発光分光分析法による重窒素定量法. 重窒素利用研究法, 三井進午・吉川春寿・中根良平・熊沢喜久雄編, 学会出版センター, pp. 17-45.
- 松原孝之・三井所正英・平野哲美・中尾義房・宮崎征男・中島 浩 1965. ノリ施肥試験-IV. 佐賀養殖試験報 3 : 31-47.
- MCCARTHY, J.J. 1981. Uptake of major nutrients by estuarine plants. *In Estuaries and Nutrients*, ed. B.J. Neilson and L.E. Cronin, The Humana Press, pp. 139-163.
- MCCARTHY, J.J. and GOLDMAN, J.C. 1979. Nitrogenous nutrition of marine phytoplankton in nutrient-depleted waters. *Science* 203: 670-672.
- MCCARTHY, J.J., WYNNE, D. and BERMAN, T. 1982.

- The uptake of dissolved nitrogenous nutrients by Lake Kinneret (Israel) microplankton. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 673-680.
- 宮本淳司・土屋晴彦・水質調査船乗組員 1987. 昭和61年 伊勢湾・三河湾の赤潮発生状況. 愛知水試研究業績Cしゅう **70**: p. 58.
- 野沢治治 1959. ノリの養分吸収と施肥. 水産増殖 **7**: 1-12.
- PROVASOLI, L., McLAUGHLIN, J.J.A. and DROOP, M.R. 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* **25**: 392-428.
- 渋谷政夫 1980. 農業試験研究における ^{15}N の利用と展望. 重窒素利用研究法, 三井進午・吉川春寿・中根良平・熊沢喜久雄編, 学会出版センター, pp. 137-140.
- 高尾允英・横江準一・鈴木輝明・山本民次・俵佑方人・土屋晴彦・中村総之・日比野 光 1986. ノリ品質向上のための漁場行使に関する研究. 愛知水試研究業績Cしゅう **68**: p. 57.
- 武居 薫・宮沢 正 1959. アサクサノリの施肥に関する研究-I. 農水講研報 **8**: 199-207.
- TANAKA, N. 1986. Adhesive strength of epiphytic diatoms on various seaweeds. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **52**: 817-821.
- WHEELER, P.A. and KIRCHMAN, D.L. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 998-1009.
- YAMAMOTO, T. and FUJISAKI, K. Prompt information on red-tides in the cultural grounds of Nori (edible laver). (in prep.).