

ホンダワラ属海藻3種の硝酸態窒素吸収特性について

西垣友和, 八谷光介, 和田洋藏

Nitrate Uptake Characteristics of Three *Sargassum* Species.

Tomokazu Nishigaki, Kousuke Yatsuya* and Yoza Wada

The characteristics of nitrate uptake of three *Sargassum* species, *Sargassum macrocarpum*, *S. patens*, and *S. siliquastrum*, from western Wakasa Bay were investigated in summer. Relationships between the rate of nitrate uptake and nitrate concentration were deduced from Michaelis-Menten curves, and uptake kinetic parameters (V_{max} : maximum uptake rate, and K_s : half saturation constant) were estimated. V_{max}/K_s , calculated as V_{max}/K_s of the three seaweeds, as an indicator of the uptake ability at low concentrations, were high (1.38-2.05). The results indicate that these seaweeds show characteristics of nitrate uptake adaptive to conditions of low nitrate availability.

キーワード: ホンダワラ属海藻, 硝酸態窒素, 吸収特性

ホンダワラ属海藻は温暖帯域の岩礁帯でガラモ場と呼ばれる藻場を形成している。ガラモ場には生物生産機能の他に、二酸化炭素や栄養塩を吸収する環境保全機能がある。

海藻類の栄養塩吸収能力について、栄養塩吸収速度と栄養塩濃度の関係が調査されている。そのうち褐藻綱海藻による硝酸態窒素吸収については、吸収速度と濃度の関係がミハエリス-メンテンの式で表され、推定された吸収パラメータ(最大吸収速度 V_{max} および半飽和定数 K_s)を用いて、硝酸態窒素吸収特性が検討されている(Harlin and Craigie, 1978; 町口ら, 1985; Kocczak, 1994; Phillips and Hurd, 2004)。しかし、これまで大規模なガラモ場を形成するホンダワラ属海藻の硝酸態窒素吸収能力を調査した例は、著者らがヤツマタモク *Sargassum patens* およびヨレモク *S. siliquastrum* による硝酸塩吸収速度を推定しただけである(西垣ら, 2004)。その研究では吸収パラメータを推定しておらず、吸収特性を検討していない。

本研究では、若狭湾西部海域でガラモ場を形成するホンダワラ属海藻3種を対象とし、硝酸態窒素濃度の異なる培養液中で藻体の一部を培養して、硝酸態窒素濃度の減少率から海藻類による硝酸態窒素の吸収速度を求め、濃度との関係を調べた。さらに、吸収パラメータを推定し、これまでに他の褐藻類で報告されている値と比較し、若狭湾西部海域におけるホンダワラ属海藻3種の硝酸態窒素の吸収特性を検討したので報告する。

材料および方法

試料および前培養 試料とした藻体は、2004年9月8日に若狭湾西部海域に位置する京都府宮津市養老地先の

ガラモ場から採集した。同ガラモ場のノコギリモク *Sargassum macrocarpum*, ヤツマタモク, ヨレモクを25個体程度ずつ採集し、クーラーボックスに収容して、京都府立海洋センターに持ち帰った。また、ガラモ場の表層の海水を1 L採取し、持ち帰った。ガラモ場のおよそ100 m沖の地点で、STD(アレック電子社, AST-1000)を用いて水深1 mごとの水温を記録した。

藻体の主枝の先端5 cm程度を切り取り、体表面の付着物をピンセットで除去し試料とした。濾過海水(1 μ mフィルター)をかけ流した水槽に試料を収容し、水槽上部に蛍光灯を吊るし、水面での光量子量が150 μ mol m⁻² s⁻¹になるように調節して、吸収実験まで20時間培養した。ガラモ場で採取した海水は凍結保存し、後日オートアナライザー(Technicon社, AutoAnalyzer)で硝酸態窒素濃度を測定した。

吸収実験 容量1 Lのガラス瓶に濾過海水を600 mlずつ入れ、2, 5, 10, 15, 20 μ M相当量の硝酸ナトリウムを添加した培養液を実験区とし、各濃度3区ずつ設定した。また、濾過海水600 mlに2 μ Mおよび15 μ M相当量の硝酸ナトリウムを添加したものを対照区とした。実験期間中に培養液のリン酸塩を枯渇させないために、各実験区に100 μ M相当量のリン酸水素二ナトリウムを添加した。実験期間中、ガラス瓶を角形水槽に並べ、水槽内に濾過海水をかけ流すことで実験区の水温をできるだけ一定に保った。光量子量は培養液表面で150 μ mol m⁻² s⁻¹とし、培養液を攪拌するために、各ガラス瓶内に通気を行った。

培養液を入れたガラス瓶に試料を5本ずつ(湿重量4~5 g)入れて2時間培養し、培養開始直後(0分)および30, 60, 120分後に各実験区から培養液を9 mlずつ採水した。ただし、ヤツマタモクの2 μ M区および

*西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, 1551-8 Taira-machi, Nagasaki, 851-2213, Japan)

5 μ M区の1実験区で、水槽の濾過海水がガラス瓶内に混入したため採水しなかった。採水後直ちに凍結保存し、後日硝酸態窒素濃度を測定した。実験終了後に試料を乾燥機で70℃、20時間乾燥させて、重量を測定した。なお、採水時に棒状温度計で15 μ M対照区の水温を測定した。

吸収パラメータの推定 各実験区で採水間隔ごとの硝酸態窒素濃度の減少量と実験終了時の試料の乾燥重量から、採水間隔ごとの硝酸態窒素の吸収速度 (V) を求めた。後述するように、多くの実験区では0~30分の吸収速度 (V₀₋₃₀) が最も大きくなったが、30~60分の吸収速度 (V₃₀₋₆₀) あるいは60~120分の吸収速度 (V₆₀₋₁₂₀) が最大値を示した実験区も見られた。そこで、全ての実験区の実験開始から最大値を示した期間までの吸収速度 (例えば、V₃₀₋₆₀が最大値を示した実験区ではV₀₋₆₀) と実験開始直後の硝酸態窒素濃度から、Microsoft-Excelのソルバーを用いて、ミハエリス-メンテンの式(1)のV_{max}とK_sを推定した。得られたV_{max}とK_sから (V=V_{max}/K_s) を求めた。

$$V = V_{\max} \cdot S / (K_s + S) \quad (1)$$

Vは吸収速度 ($\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$), Sは硝酸態窒素濃度 (μM), V_{max}は最大吸収速度 ($\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$), K_sは半飽和定数 (μM) を表している。

結 果

硝酸態窒素吸収速度 吸収実験中のガラス瓶内の水温は25.2~25.3℃で、ほとんど変化しなかった。実験期間中の対照区の硝酸態窒素濃度の減少は0.3~0.6 μM と小さかったので、海藻を加えた実験区の硝酸態窒素

の減少は海藻の吸収だけによるものと見なした。なお、海藻採集時の表層の水温は25.3℃、海水中の硝酸態窒素濃度は0.5 μM であった。

各実験区における採水間隔ごとの硝酸態窒素の吸収速度をTable 1に示した。ノコギリモクの2~15 μM 区の全ての実験区でV₀₋₃₀が最大値を示したが、20 μM 区では、1実験区ずつでV₃₀₋₆₀あるいはV₆₀₋₁₂₀が最大値を示した。V₆₀₋₁₂₀が最大値を示した実験区では、全区間の吸収速度の変動幅が小さく、吸収速度の最大値 (6.89 $\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$) は他の2実験区の値 (10.60, 12.24 $\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$) よりかなり低かった。ヤツマタモクの2~15 μM 区では、10 μM 区の1実験区を除いた全ての実験区でV₀₋₃₀が最大値を示したが、20 μM 区では全ての実験区でV₃₀₋₆₀が最大値を示した。ヨレモクでは、20 μM 区の1実験区でV₃₀₋₆₀が最大値を示したが、それ以外の全ての実験区でV₀₋₃₀が最大となった。

ホンダワラ属海藻3種の吸収パラメータ ノコギリモク、ヤツマタモク、ヨレモクそれぞれの硝酸態窒素の吸収速度 ($\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$) と濃度の関係をFig. 1に示した。ノコギリモクでは15 μM 以下の全ての実験区で、濃度が高いほど吸収速度は大きくなったが、20 μM 区の吸収速度は6.40~12.2となり、15 μM 区と同等かあるいはそれより低い値を示した。ヤツマタモクの2 μM 区および5 μM 区の吸収速度は、それぞれ4.04~5.50および7.89~8.53であり、2 μM 区より5 μM 区の方が高い値を示したが、10 μM 以上の実験区の吸収速度は9.70~13.2の範囲であり、濃度による吸収速度の違いは見られなかった。ヨレモクでは、5 μM 区および20 μM 区のそれぞれ1実験区を除いて、濃度が高くなるほ

Table 1 Nitrate uptake rate of three species of Sargassaceae at specified time intervals and nitrate concentrations.

NO ₃ ⁻	<i>Sargassum macrocarpum</i>			<i>S. patens</i>			<i>S. siliquastrum</i>		
	V ₀₋₃₀	V ₃₀₋₆₀	V ₆₀₋₁₂₀	V ₀₋₃₀	V ₃₀₋₆₀	V ₆₀₋₁₂₀	V ₀₋₃₀	V ₃₀₋₆₀	V ₆₀₋₁₂₀
2 μM	3.90	1.58	0.23	5.50	1.22	0.00	3.94	0.94	0.00
	3.15	1.17	0.13	4.04	2.45	-0.12	3.48	1.19	0.17
	4.77	1.70	0.11				3.98	1.16	0.12
5 μM	8.87	2.62	0.46	8.53	4.37	0.17	9.81	4.11	0.48
	8.61	2.21	0.26	7.89	4.02	0.07	7.23	3.59	0.32
	8.76	2.74	0.35				7.48	3.02	0.53
10 μM	9.84	6.24	0.50	10.30	8.09	0.77	8.33	5.49	0.30
	10.72	6.42	0.75	12.22	8.30	0.18	8.04	5.62	0.85
	8.95	5.93	0.54	9.35	10.86*	1.49	7.75	6.44	1.00
15 μM	11.76	9.23	2.57	11.18	9.54	4.51	9.15	7.35	2.21
	11.28	7.64	1.39	12.35	10.39	3.81	9.97	5.07	2.41
	11.45	7.83	1.89	10.52	10.18	4.22	9.35	6.89	2.11
20 μM	10.02	10.60*	5.55	7.09	12.30*	4.88	7.92	9.83*	4.56
	6.88	4.96	6.89*	11.41	12.58*	3.12	12.38	7.26	4.02
	12.24	11.46	3.61	10.68	15.77*	6.61	10.80	8.35	4.36

For example, V₀₋₃₀ represents nitrate uptake ($\mu\text{mol gdw}^{-1} \text{h}^{-1}$) from 0 to 30 minutes.

*: V₃₀₋₆₀ or V₆₀₋₁₂₀ > V₀₋₃₀

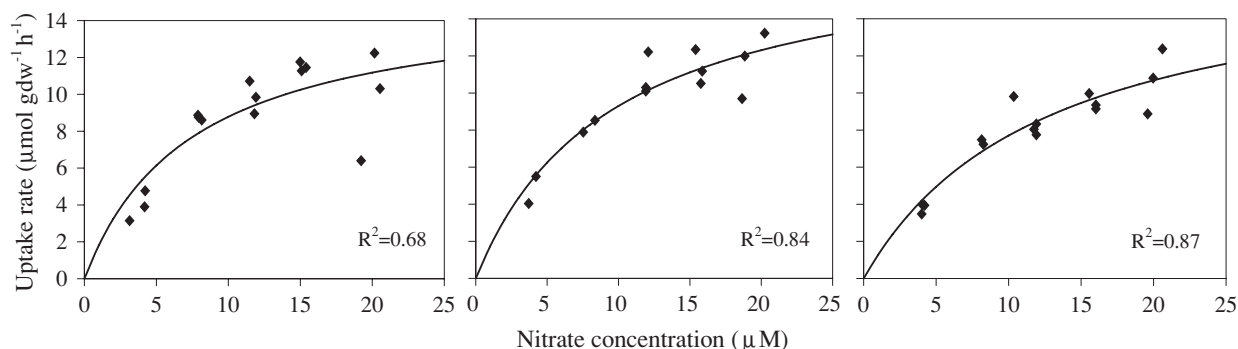


Fig. 1 Relationships between the rate of nitrate uptake and nitrate concentration of three species of Sargassaceae (left: *Sargassum macrocarpum*, center: *S. patens*, right: *S. siliquastrum*). Solid lines represent Michaelis-Menten curves. Estimates of kinetic parameters are given in Table 2.

Table 2 Kinetic parameters of nitrate uptake of three *Sargassum* species collected from Yoro.

	V_{max} ($\mu\text{mol gdw}^{-1}\text{h}^{-1}$)	K_s (μM)	α
<i>Sargassum macrocarpum</i>	15.4	7.5	2.05
<i>S. patens</i>	18.2	9.6	1.90
<i>S. siliquastrum</i>	17.4	12.6	1.38

V_{max} and K_s are the maximum rate of nitrate uptake and half saturation constant, respectively. α , calculated as V_{max}/K_s , represents the initial slope of the rate of uptake - nitrate concentration curve.

ど吸収速度は大きくなった。3種とも飽和型の曲線となるミハリス - メンテンの式に良く当てはまったので ($R^2=0.68 \sim 0.87$), 硝酸態窒素濃度と吸収速度の関係を示すパラメータである V_{max} と K_s を推定し, 得られたパラメータをTable2に示した。ノコギリモク, ヤツマタモク, ヨレモクの V_{max} ($\mu\text{mol gdw}^{-1}\text{h}^{-1}$) はそれぞれ15.4, 18.2, 17.4, K_s (μM) はそれぞれ7.5, 9.6, 12.6であった。はそれぞれ2.05, 1.90, 1.38であり, ノコギリモクおよびヤツマタモクの値はヨレモクの1.5倍および1.4倍であった。

考 察

異なる硝酸態窒素濃度の培養液中で海藻を培養し, 濃度の減少率から海藻による吸収速度を求める実験では, 吸収速度は実験開始直後に最高値を示し, 時間の経過に伴い低下するので, 開始から短時間の減少率から吸収速度を求めるのがよいとされている (Loban and Harrison, 1994)。そのような考え方からこれまでの報告では, 全ての濃度で実験開始から一定の培養時間の減少率から吸収速度が求められている (Harlin and Craigie, 1978; Phillips and Hurd, 2004)。本研究では, 2時間の培養期間の間に4回採水し, 培養液中の硝酸態窒素濃度の減少率から採水間隔ごとの硝酸態窒素の吸収速度を求めたところ, 多くの実験区では V_{0-30} が最大値を示し, 時間とともに吸収速度が低下したが, 主に高濃度の実験区では V_{0-30} よりも V_{30-60} あるいは V_{60-120} が

高い値を示す場合が見られた。

これと同様の現象は紅藻綱の *Gracilaria gracilis* で報告されており, 前培養で十分に硝酸態窒素を与えられていた藻体では吸収実験開始時の培養液の硝酸態窒素の濃度が $50\mu\text{M}$ 程度でも吸収速度は開始直後が最大になっているが, 硝酸態窒素が制限された状態で前培養された藻体では, 開始時の濃度が $30 \sim 55\mu\text{M}$ の場合に開始から35分以上経過してから吸収速度が上昇している (Smit, 2002)。本研究では, 藻体を採集した海域の硝酸態窒素濃度について長期的に調査していないが, 採集時には低い濃度であったことから, 試料とした藻体は硝酸態窒素が制限された環境下に生育していたのではないかと推察され, このような現象は硝酸態窒素濃度の低い環境下で生育していた藻体でよく見られる現象ではないかと考えられる。

このように, 硝酸態窒素濃度の低い環境下で生育していた海藻を用いた場合の高濃度の実験区で, 実験開始直後ではなく, 30分以上経過してから吸収速度が最大値を示した理由について考察する。Tischner (2000) は, 植物による硝酸態窒素の吸収機構には構造的と誘導性の2種類の機構があり, 誘導性の機構では硝酸態窒素により, 硝酸態窒素を吸収するための輸送体 (carrier) の生成が促進され, 輸送体の量が増加すると報告しており, 今回の現象は, 実験前の藻体には輸送体の量が少なく, 培養液の硝酸態窒素によって輸送体の量が徐々に増加したために起こったと考えられる。また, 同種の海藻を用いた高濃度の実験区で, 吸収速度が最大値を示す区間が異なったことや, 吸収速度が大きく異なったことから, 輸送体の生成速度や量は個体間で大きく異なるのではないかと考えられる。したがって, 硝酸態窒素濃度の低い環境下で生育していたと考えられる海藻の吸収速度を求める実験では, 培養液の硝酸態窒素濃度と培養時間によっては, 吸収速度は実験開始直後に最大値を示すとは限らないことから, 実験期間中の硝酸態窒素濃度の変化を調べて, 各実験区で実験開始時から吸収速度が最大となった時

Table 3 Kinetic parameters of nitrate uptake by various Phaeophyceae species.

Species	Temperature (°C)	V _{max} (μmol gdw ⁻¹ h ⁻¹)	K _s (μM)	α	Reference
<i>Scytothamnus australis</i> *	12	13.13±1.44	15.86±2.88	0.83	Phillips and Hurd, 2004
<i>Scytothamnus australis</i> **	12	6.43±2.24	20.24±10.37	0.32	Phillips and Hurd, 2004
<i>Xiphophora gladiata</i> *	12	6.93±0.97	22.11±3.42	0.31	Phillips and Hurd, 2004
<i>Xiphophora gladiata</i> **	12	1.72±1.09	18.69±5.17	0.09	Phillips and Hurd, 2004
<i>Macrocystis pyrifera</i>	17	7.0±0.6	9.2±2.1	0.76	Kopczak, 1994
<i>Laminaria longissima</i>	15	9.70±0.23	29.62±1.43	0.33	Machiguchi et al., 1985
	5	5.45±0.46	11.69±2.67	0.47	Machiguchi et al., 1985
<i>Laminaria longicruris</i>	15	9.6	4.1	2.34	Harlin and Craigie, 1978
	10	7.0	5.9	1.19	Harlin and Craigie, 1978

α was calculated as V_{max}/K_s, with these values being taken from references.

*: summer tissue, **: winter tissue.

までの吸収速度から吸収パラメータを推定する必要があると考えられる。

海藻類の栄養塩の吸収速度に影響を与える要因としては、光、温度、流動などの物理的要因、表面積と体積の比、年齢、栄養塩履歴などの生物的要因があり (Loban and Harrison, 1994), コンブ科海藻のナガコンブ *Laminaria longissima* (町口ら, 1985) や *L. longicruris* (Harlin and Craigie, 1978) では、培養温度を高くすると V_{max} も高くなることが報告されている。本研究で得られたホンダワラ属海藻3種の吸収パラメータを、これまで報告のある褐藻綱海藻の値 (Table 3) と比較したところ、V_{max} はこれまで報告されている褐藻綱海藻の値 (5.5 ~ 13.1 μmol gdw⁻¹ h⁻¹) より高かった。このことは、今回の培養温度がこれまでの報告より 10 ~ 20 °C 高かったことによるものではないかと考えられる。この理由以外にも、複雑な形態をしているホンダワラ属海藻は表面積と体積の比が大きいと考えられるので、今後ホンダワラ属海藻の表面積と体積の比と吸収速度との関係についても検討したい。

低い栄養塩濃度における吸収効率を海藻種間で比較するために K_s を用いることがあるが、K_s は水温によって変化するため、K_s より α (=V_{max}/K_s) を用いるほうがよいとされている (Harrison et al., 1989)。α は (1) 式で表される曲線の S=0 における接線の傾きであり、α の値が高いことは低い栄養塩濃度での吸収効率がよいことを示している (Cochlan and Harrison, 1991)。これまでの褐藻綱海藻の報告には α は記載されていないため、著者らが V_{max} と K_s から計算したところ、α は 0.09 ~ 2.34 となり (Table 3), 今回得られた α の値は、その範囲内ではあるが高いほうに位置した。このことから、ホンダワラ属海藻ノコギリモク、ヤツタモク、ヨレモクは、低い硝酸態窒素濃度での吸収効率が良く、硝酸態窒素濃度の低い環境に適した吸収特性を備えていることが明らかになった。

西垣ら (2004) は京都府沿岸の3地点で、ヨレモクおよびヤツタモクを採集し、生育場所および種による硝酸態窒素の吸収速度の違いを検討し、生育場所や種により吸収速度が異なることを指摘している。本研

究で α を比較した結果からも、ノコギリモクおよびヤツタモクはヨレモクより低い硝酸態窒素濃度での吸収効率がよく、種による吸収特性の違いが示唆された。本研究は主枝の先端部を用いて、硝酸態窒素吸収特性を夏季に調べたものであり、今後、季節や藻体部位による吸収パラメータの違いを検討する必要があると考えられる。さらに、海域ごとのガラモ場の環境保全機能を明らかにするために、海域ごとに栄養塩濃度の変動やそこに生育するホンダワラ属海藻の栄養塩吸収特性を検討する必要がある。

引用文献

- Cochlan W., Harrison P. 1991. Kinetics of nitrogen (nitrate, ammonium and urea) uptake by the picoflagellate *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **153**: 129-141.
- Harlin M., Craigie J. 1978. Nitrate uptake by *Laminaria longicruris* (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, **14**: 464-467.
- Harrison P., Parslow J., Conway H. 1989. Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **52**: 301-312
- Kopczak C. 1994. Variability of nitrate uptake capacity in *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyta) with nitrate and light availability. *J. Phycol.*, **30**: 573-580.
- Loban C., Harrison P. 1994. Nutrients: Seaweed ecology and physiology. 163-209. Cambridge University Press, Cambridge.
- 町口裕二, 三本菅善昭, 岡田行親. 1985. 再生期におけるナガコンブの無機態窒素吸収と生長について. *北水研報告*, **50**: 45-61.
- 西垣友和, 八谷光介, 道家章生, 和田洋蔵. 2004. ヤツタモク, ヨレモクの栄養塩吸収能力. *京都海洋セ研報*, **26**: 21-29.
- Phillips J., Hurd C. 2004. Kinetics of nitrate, ammonium, and urea uptake by four intertidal seaweeds from New Zealand. *J. Phycol.*, **30**: 573-580.

- Smit A. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): adaptations to a temporally variable nitrogen environment. *Botanica Marina*, **45**: 196-209.
- Tischner R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*, **23**: 1005-1024.