

富山湾深層水のかけ流し条件における スラグ系施肥材のマコンブに対する効果実証実験

Effects of an iron-enriched fertilizer on *Saccharina japonica* in tank with
running Toyama Bay deep seawater

小杉知佳¹・熊谷敬之²・小林美樹³・藤田大介³

Chika KOSUGI, Takayuki KUMAGAI, Miki KOBAYASHI and Daisuke FUJITA

Abstract

To test the effects of the iron-enriched fertilizer (mixture of converter-derived steelmaking slag and humus soil), young sporophytes and immature gametophytes of *Saccharina japonica* were cultured in outdoor tanks with running deep seawater (DSW) pipelined from 394 m in Toyama Bay, which is known as clean, stable, and nutrient-rich with less iron concentration than surface water. DSW was poured through the 1st collecting tank (50 L in volume) prior to pumping into two 2nd tanks (80 L in volume, one with 2 kg fertilizer every 2 d and another without fertilizer as the control). DSW from the 2nd tanks was piped and allowed to overflow in three aquaria (70 L in volume, two fertilized and one control) for culture. As the result, young sporophytes grew with no significant differences in the thallus length and width among aquaria, but thallus thickness, SPAD value, and chlorophyll *a* contents at thallus tips were significantly higher in fertilized aquaria. In fertilized aquaria, some sporophytes formed sori. Immature gametophytes matured in all aquaria, but density and early growth of young sporophytes were significantly higher and faster in fertilized aquaria. These results confirmed the positive effect of iron enrichment even in nutrient-rich condition.

Key Words: Deep seawater, Diatom, *Saccharina japonica*, Fertilization, Converter-derived steelmaking slag

要 旨

スラグ系施肥材の海産藻類への影響を調べるため、入善町アワビ養殖施設で、清浄、水質安定、栄養塩豊富で鉄濃度が低い富山湾深層水（水深394 mから取水）を用い、マコンブの孢子体と配偶体の屋外流水培養を行った。深層水は1次水槽（容量50 L）から2次水槽（80 L、1基に施肥材2 kgを2日おきに投入）に分水し、各々から培養水槽（70 L、施肥した実験区2基と対照区1基）に注水してオーバーフローさせた。実験区と対照区の間、孢子体（葉長10 cm以上）では葉長や葉幅に有差はなかったが、実験区では葉厚、SPAD値（体色の指標）と藻体中のChl. *a*量が有意に高い値を示し、一部の孢子体が成熟した。配偶体は両区とも成熟し、得られた幼孢子体の密度と初期生長は実験区で有意に大きかった。

キーワード： 海洋深層水、珪藻、マコンブ、施肥、転炉系製鋼スラグ

¹ 新日鐵住金株式会社技術開発本部（〒293-8511 千葉県富津市新富町20-1）

² 富山県入善漁業協同組合（〒939-0667 富山県下新川郡入善町芦崎338）

³ 東京海洋大学海洋科学部（〒108-8477 東京都港区港南4-5-7）

1. 緒 言

日本の沿岸各地で藻場の衰退・消失，すなわち磯焼け域の拡大が問題となっており（水産庁，2007），その発生または持続の原因として，海水温の上昇（例えば，Serisawa *et al.*, 2004），ウニや植食性魚類による食圧の増加（藤田ら，2006, 2008）などとともに，海水中の鉄濃度の低下も懸念されている（畠山，2008; 松永，1993）．鉄は，海藻の生育には不可欠な微量元素の1つで（Lobban and Harrison, 1994），コンブ配偶体の成熟（Motomura and Sakai, 1981, 1984）や，紅藻スサビノリ *Pyropia yezoensis* の色彩の維持，特にクロロフィル *a* の生合成（植木ら，2010）に必要であることなどが示されている．近年，磯焼けにおける鉄不足仮説（Matsunaga *et al.*, 1994, 1998）に着目し，鉄分を多く含有する転炉系製鋼スラグや腐植酸（キレーター）を含む腐植物質を混合した鉄分供給材（以下，スラグ系施肥材）が開発され（木曾ら，2008; 加藤ら，2008; 堤ら，2008），北海道増毛町で行われた大規模な海域実験では，海域の優占種ホソメコンブ *Saccharina japonica* var. *religiosa* が繁茂した事例も報告された（木曾ら，2008）．しかし，海域では，海藻の生育に対して，光，水温，栄養塩，海水流動，植食動物，競合生物など多くの要因が変動しながら複雑に関与するため，海藻の繁茂が鉄分供給による効果かどうかを厳密に判定するのは困難である（藤田ら，2010）．そこで，植木ら（2012）は，表層海水と比較して，清浄で，水質が安定し，栄養塩が十分に存在する一方で鉄濃度が1/2~1/10程度と極めて低い富山湾深層水（松永，2001）に着目し，屋内および屋外に設置した大型水槽を使って，マコンブの孢子体と配偶体のバッチ培養試験（止水条件）を行った．この実験では，スラグ系施肥材からは鉄をはじめ，窒素，リン，ケイ素が溶出することを確認したほか，マコンブ配偶体の成熟とこれに由来する孢子体の初期生長，そして，微細藻類の増殖が促進されることを明らかにした．しかし，実海域は，潮汐等により常に新鮮な海水が供給され続け，栄養塩も補給される環境条件下である．そこで，本研究では，屋外水槽において，富山湾深層水の「か

け流し」を行い，新鮮な海水とスラグ系施肥材からの溶出液が常に混ざり合う環境を創出して，スラグ系施肥材のマコンブ孢子体への生長および微細藻類の増殖に対する影響について調べたので報告する．

2. 材料と方法

本研究では，2つの「かけ流し」実験を行い，葉長約10 cm以上のマコンブ孢子体と未成熟の配偶体に対する施肥の効果を検証した．両実験とも，水深394 mから深層水を取水している富山県入善漁協あわび蓄養施設にて行った．

2.1 スラグ系施肥材，実験装置および水質分析

スラグ系施肥材は，炭酸化処理を施した転炉系製鋼スラグと人工腐植物質を重量比2:1で混合したものを使用し，これを1 kgずつナイロン製のメッシュ袋に小分けして水槽投入時まで冷暗所で保管した．実験区の投入量は，施肥材からの溶出液を安定的に供給するために，植木ら（2012）の結果を参考にした．また，これまでの実海域実験では，スラグ系施肥材は1~2 t規模で使用されており（木曾ら，2008），施肥材近傍での溶出挙動に近似するように，原則2日おきに2 kgを，実験区の2次受けタンク（後述）に投入した．

実験装置は，1次受けタンク（水量調整タンク），2次受けタンク（実験区，対照区），およびコンブを培養する水槽3基（実験区2基，対照区1基）で構成されている（Fig. 1）．培養水槽内には，温度計（ティアンドデイ社製，RTR-502）を設置し水温の連続データを取得した．

深層水を受け入れる1次受けタンクには，50 L容プラスチック製蓋付きバケツを使用した．その上部にはオーバーフロー用にチューブで2次受けタンクと連結し，サイフォンの原理によって，2次受けタンクから培養水槽に供給された分の深層水が，1次受けタンクから2次受けタンクに供給されるようにした．

2次受けタンクには，80 L容プラスチック製蓋付きバケツ2基（実験区と対照区）を使用し，実験区には2日おきに施肥材2 kgを投入し，定量ポンプ（Grund-

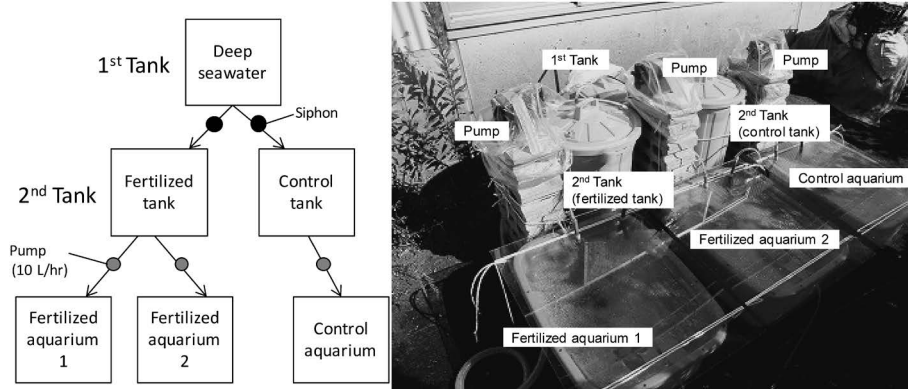


Fig. 1. Diagram (left) and photo (right) of the culture equipment composed of the primary tank for pooling deep seawater, two secondary tanks (with and without fertilizer) and three culture aquaria (two for fertilization and one for control) with each pump.

ofos社製、DME-12-6A-PP型)を経由して施肥成分が溶出した深層水(以下、施肥深層水)を培養水槽(実験区2基)に供給した。一方、2次受けタンクの対照区には施肥材は投入せずに、定量ポンプで深層水のみを培養水槽(対照区1基)に送水した。なお、本実験は「かけ流し」ではあるが、実験区における施肥材の溶出により実験区水槽の栄養塩濃度が、対照区以上に維持されるように、培養水槽への送水速度は10 L/hに抑え、対照区も同じ送水速度とした。

培養水槽には、プラスチック製の箱型容器(約70 L, 840×640×320 mm)を使用し、2次受けタンクの実験区および対照区よりそれぞれ施肥深層水と深層水をビニールチューブで水槽底に送水し、水槽上部にオーバーフローを設けて水位を一定に保ち、2次受けタンクからの供給容量分のみ排水されるようにした。水槽の内部には散気管を設置し、空気ポンプ(テクノ高槻社製、SPP-3GA型)の曝気によって水流を起こした。なお、降雨、降雪、落ち葉の舞い込み等を避けるために、水槽の上面は透明なアクリル板(厚さ5 mm)で覆い、アクリル板上への積雪が見られた時は、速やかにこれを取り除いた。

実験期間中の水質の変化を把握するため、1次受けタンク、2次受けタンク2基、培養水槽3基から週1回250 mLの試水を採水し、孔径1 μmのメンブランフィルター(アドバンテック社製)でろ過後、オートアナライザー(ブランベール社製、TRAA-CS2000)で、硝酸態窒素($\text{NO}_3\text{-N}$)、亜硝酸態窒素($\text{NO}_2\text{-N}$)、アンモニア態窒素($\text{NH}_4\text{-N}$)、リン酸態リ

ン($\text{PO}_4\text{-P}$; 以下DIP)について分析を行い、溶存態ケイ素(以下DSi)は分光光度計を用いてモリブデン青法で分析を行った。本稿では、硝酸、亜硝酸、アンモニア態窒素の和を溶存態無機窒素(DIN)として表記する。水素イオン指数(pH)は、pHメーター(東亜DKK社製、HM-25R型)で測定した。また、鉄については、相本ら(2010)に従い、採水後、静置し、上澄み液を分取し、全鉄(以下、T-Fe)としてICP-MSによって分析を行った。

2.2 マコンブ胞子体を用いた実験

実験は、2011年10月26日~11月30日の35日間に実施した。使用した胞子体は、あわび蓄養施設においてアワビの餌用に栽培されていた北海道南茅部産マコンブで、葉長10~35 cmの15個体(Fig. 2A)を選別して用いた。藻体は、ペーパータオルで藻体全体を拭き、胞子体に付着した微細藻類の除去後に培養水槽に設置した。各水槽では胞子体の葉長のばらつきが均等となるように5個体ずつ振り分け、重りとビニールロープによって茎状部が直立するように設置した。

各水槽の胞子体は個体識別し、実験開始時(0日目)と終了時(35日目)に葉長(付着器~葉状部の先端)および葉幅(最大幅広箇所)を測定した。また、実験終了時には葉厚(中帯部)も計測した。コンブは葉状部と茎状部の間で介生成長を行うため、真の生長量を求めるには葉状部の先端における先枯れを考慮しなくてはならず、通常、小さな穴をあけ

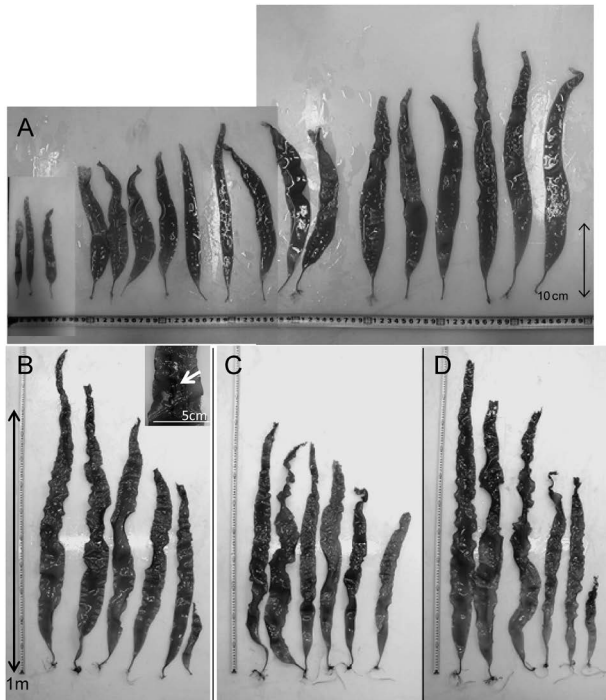


Fig. 2. *Saccharina japonica* sporophytes before the culture experiment (A) and those cultured for 35 days in fertilized aquaria 1 (B) and 2 (C) and a control aquarium (D) shown in Fig. 1.

てその移動量から先枯れ量を求めるが(例えば, 松村・藤田, 2002), このような損傷は成熟にも影響を及ぼすので, 今回は先枯れを無視して見かけの相対生長量を求めた。

実験終了時には, 藻体表面に付着した微細藻類の影響を低減するため, 藻体をペーパータオルでよく拭いてから, 葉緑素計(コニカミノルタ社製, SPAD-502Plus)を用いて藻体表面の色彩をSPAD値として測定した。さらに, 実験区および対照区の各3藻体について, 分裂組織付近, 中央部, 先端部に分けて, クロロフィル a (以下Chl. a)をアセトン抽出し(Jones *et al.*, 1996), 分光光度計(HITACHI社製, U-3310)を用いて吸光度法で測定し(Jeffrey and Humphrey, 1975), さらに単位重量当たりのChl. a 含有量を求めた。

水槽内に増殖した浮遊性微細藻類の量は, 多波長励起蛍光光度計(bbe社製, Algae Online Analyzer(AOA))を用いて, Chl. a 濃度として測定した。本機器は, Chl. a だけでなく, 藻類が有するアンテナ色素を識別し, 珪藻類, クリプト藻類, 緑藻類, ラ

ン藻類の4分類群に分別することができる。浮遊性の微細藻類は, 1次受けタンク, 2次受けタンクの実験区, 培養水槽3基から週1回採水し, 測定に供した。また, 培養水槽内壁等の付着性微細藻類は, 実験開始時に塩化ビニール製の板(10×16 cm, 厚さ1 mm)8枚を水槽底に敷設しておき, 採水と同時に1枚ずつ回収し, 板の付着物をゴムベラでそぎ落とし, 滅菌ろ過海水に懸濁させ, 前述と同じ手法でChl. a 量を測定した。

2.3 マコンブ配偶体を用いた実験

実験は2011年12月1日～2012年2月21日に実施した。2011年11月20日に宮城県女川町地先で成熟したマコンブ孢子体を採取し, 実験室に持ち帰った後, 子嚢斑形成部分を3 cm角に切り取り, 滅菌海水で洗浄後に水気をペーパータオルで十分に拭き取り, ガラス製シャーレに入れて暗保存(4℃, 一晚)した。翌日, 十分に冷やした海水の中で遊走子の放出を促進し, 得られた遊走子を塩化ビニール製の板(10×16 cm)にナイロン製メッシュを巻きつけた着生板に植え付け, 恒温器内で10℃, 長日条件(明期:暗期=14 h:10 h)で培養した。遊走子の放出から培養まで, 配偶体が成熟ないように, ASP₁₂-NTA(Provasoli, 1963)を改変した鉄源を除いた人工合成培地(Fe free ASP₁₂-NTA)を使用した。実験前には, 配偶体が成熟していない(造卵器や造精器が形成されていない状態)ことを光学顕微鏡下で確認した。

マコンブ配偶体を植え付けた着生板は培養水槽(実験区1, 2, 対照区)内に1枚ずつ設置した。実験開始後26日目と終了時の83日目に, 着生板の一部を実験室に持ち帰り, 発芽した孢子体の状態, 正常に発芽しているかなどについて観察し, 個体数および葉長を計測した。また, 実験終了時には着生板を実験室に持ち帰り, 出現量の多かった付着珪藻を光学顕微鏡で検鏡し, 種の同定を行った。

水温は, 水温記録計の故障のためデータ欠測となった。前年のほぼ同時期(2010年12月13日～2012年1月6日)における屋外水槽実験(止水条件)では, 水温は-1.0～14.9℃で推移し, 気温の影響を大

大きく受けていた(植木ら, 2012). 本実験は70 L培養槽に対して, 2次タンクからの流水速度は10 L/hであり, 培養層内における平均滞留時間は7時間と推定されるため, 前年並みに影響を受けていたことが想定される.

マコンプ胞子体の葉長, 葉幅, 葉厚, SPAD値, Chl. *a*含有量, およびマコンプ配偶体から発芽した幼胞子体の個体数, 葉長の計測値は t 検定により統計処理をした.

3. 結果

3.1 マコンプ胞子体を用いた実験

実験期間中における培養水槽の水温変化をFig. 3

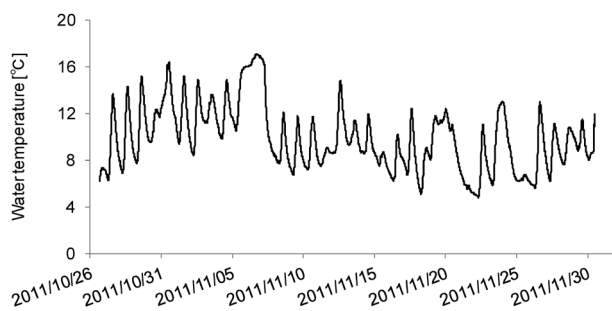


Fig. 3. Water temperature recorded at control culture tank (see Fig. 1) during the *S. japonica* sporophyte culture experiment.

に示す. 培養水槽の容量に対して2次タンクからの送水速度が少ないため, 培養水槽の水温は気温の変動による影響を大きく受けていた. 実験開始後, 水温は上昇傾向にあり, 11月6日(10日目)に17.1°Cの最高値を記録した後, 緩やかに低下し, 11月22日(26日目)に4.9°Cの最低水温を記録した.

実験期間中の深層水(1次受けタンクから取水)の水質変化をFig. 4に示す. DINは, 0.28~0.36 mg/L, DIPは0.05~0.14 mg/L, DSiは0.59~2.07 mg/Lで変動し, いずれも大きな変動は見られなかった. T-Feは, 1日目に4.6 μ g/Lと若干高い値を示したが, その後は2.6~3.7 μ g/Lで推移し, 変動幅は小さかつ

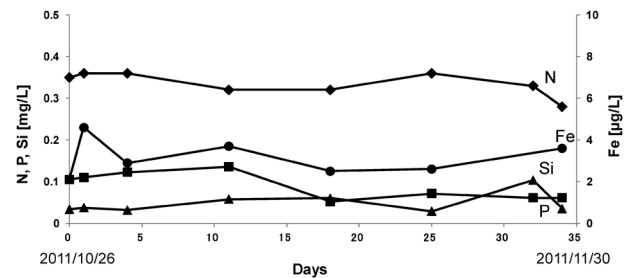


Fig. 4. Time course changes in nutrient levels of deep seawater pumped from a depth of 394 m through a pipeline and sampled from the 1st tank (See Fig. 1) during the *S. japonica* sporophyte culture experiment
◆: dissolved inorganic nitrogen (N), ●: T-Fe (Fe), ▲: dissolved-Si (Si) and ■: phosphate-P (P)

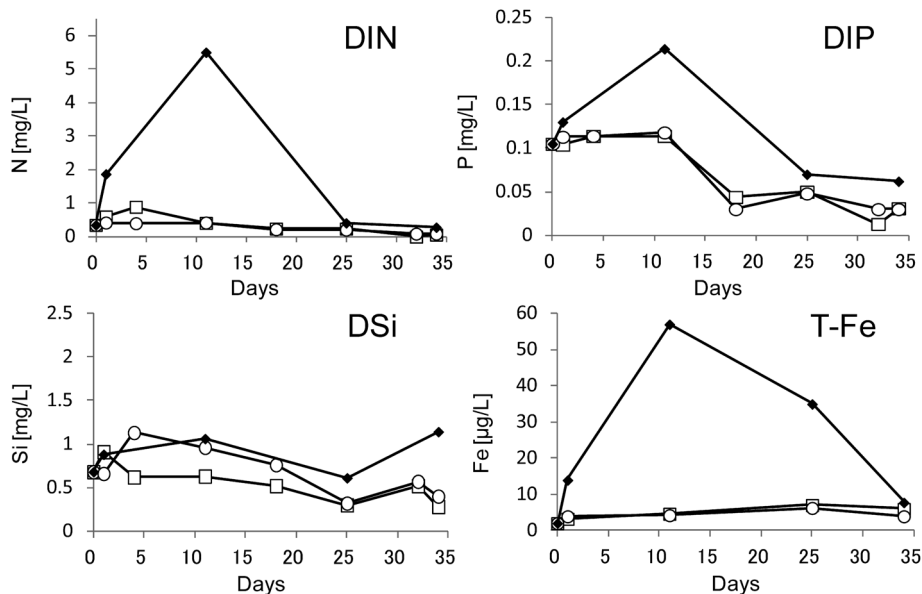


Fig. 5. Time course changes of N, P, Si and Fe concentration in the 2nd tank (with fertilizer, ◆) and its downstream aquaria 1 (□) and 2 (○) during the *S. japonica* sporophyte culture experiment.

た. なお, pHは6.9~7.6で, いずれの値も前年度の分析値(植木ら, 2012)と近似しており安定していた.

2次受けタンクの実験区および培養水槽の実験区2基における各種栄養塩の変動をFig. 5に示した. DINは, 2次受けタンクでは施肥材投入直後から濃度が上昇し, 11日目に5.73 mg/Lの最大値を記録し, その後に減少し, 33日目には1次受けタンクの深層水中の濃度と同程度(0.28 mg/L)になった. これに対し, 培養水槽の実験区2基では, 11日目までは0.42 mg/Lとやや高め濃度を示したが, その後, 0.2 mg/Lに減少し, 2次受けタンク中の濃度が減少した実験後期には検出下限値(0.01 mg/L)を下回った. DIPは, 2次受けタンクではDINの変動に類似した傾向を示し, 11日目まで上昇した後に減少し, 33日目には0.06 mg/Lとなった. 培養水槽の実験区2基では, 11日目までは約0.1 mg/Lで推移し, その後, 0.03~0.04 mg/Lまで減少した. DSiは, 2次受けタンクでは, 施肥材投入後にやや濃度上昇が見られたが, 実験期間中の最大値は0日目の2倍程度に留まっていた. 培養水槽実験区では, 25日目まで2水槽実験区間で比較的大きな差が認められたが, その後はほぼ同じ濃度で推移した. T-Feについては, 2次受けタンク中の濃度が11日目に57.0 $\mu\text{g/L}$ の最大値となった後に減少し, 実験終了時の33日目には

7.8 $\mu\text{g/L}$ (1次受けタンクの深層水濃度の約2倍)となった. 培養水槽の両実験とも緩やかな上昇傾向にあり, 25日目には6.3~7.1 $\mu\text{g/L}$ となった.

2次受けタンクと培養水槽の対照区における各種栄養塩の変動をFig. 6に示した. DINは, 2次受けタンクでは約0.3 mg/L前後で推移したが, 培養水槽では11日目(0.24 mg/L)以降は検出下限値を下回った. DIPは, 2次受けタンク中の濃度の変動(0.05~0.14 mg/L)に同調して培養水槽内の濃度も変動したが, 実験開始5日以降は培養水槽内の濃度は2次受けタンクより顕著な低濃度を示した. DSiは, 2次受けタンクと培養水槽ともに変動が大きかったが, 実験期間を通じて両者は同調的な変動を示した. 培養水槽では11日目まで2次受けタンクよりもやや高い濃度を示したが, その後は実験終了時まで2次受けタンクよりも明らかに低濃度であった. T-Feは, 2次受けタンクで2.1~4.6 $\mu\text{g/L}$, 培養水槽で1.7~2.6 $\mu\text{g/L}$ で推移し, 終始低濃度であった.

マコブ胞子体は, 実験区, 対照区ともに枯死することなく, 実験終了時には開始時の葉長の3~6倍にまで生長した(Fig. 2B-D). このうち, 実験区1の胞子体2個体において, 小規模であるが子嚢斑が形成された(Fig. 2Bの挿入写真). 各水槽の胞子体の葉長および葉幅に関する見かけの相対生長量(ARGR)をTable 1に示した. 葉長と葉幅は各区間で

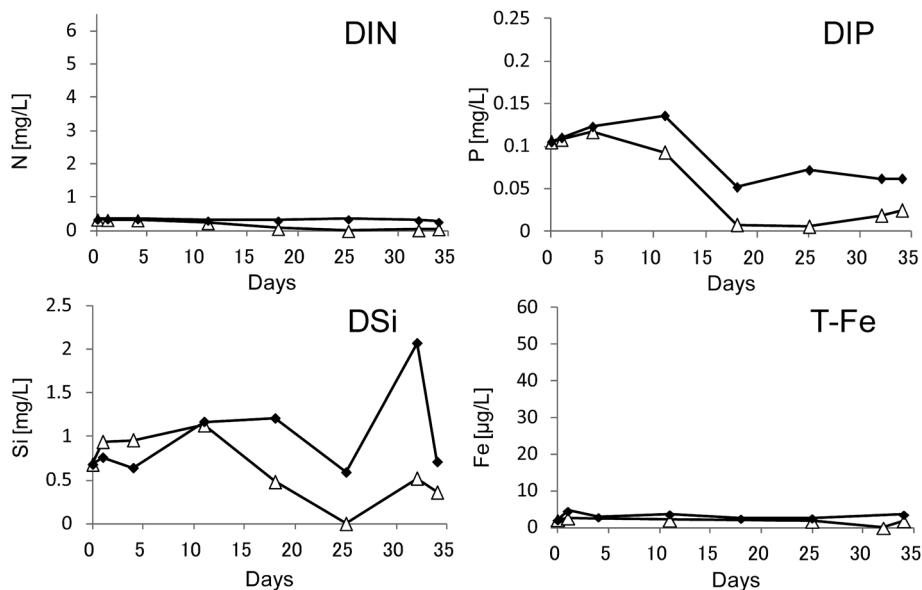


Fig. 6. Time course changes of N, P, Si and Fe concentration in the 2nd tank (without fertilizer, ◆) and its downstream control aquarium (△) during the *S. japonica* sporophyte culture experiment.

Table 1. Apparent relative growth rates (ARGR) in length and width and thickness of *S. japonica* sporophytes in the three culture aquaria.

<i>n</i> = 6	Fertilized aquarium 1	Fertilized aquarium 2	Control aquarium
ARGR in length* [—]	2.77 ± 3.15	2.72 ± 2.81	2.76 ± 3.15
ARGR in width* [—]	0.32 ± 0.60	-0.01 ± 0.25	0.19 ± 0.57
Thickness (after 35 d) [mm]	0.44 ± 0.10	0.46 ± 0.05	0.32 ± 0.14

*ARGR in length (or width) = $L_n(L_2 - L_1) / 35$, L1: initial length (or width), L2: (length or width) after 35 d culture.

Table 2. SPAD values and concentration of Chl. *a* in *S. japonica* sporophytes after 35 d culture.

	Fertilized aquaria 1 and 2			Control aquarium		
	Meristem area	Central area	Tip area	Meristem area	Central area	Tip area
SPAD value (<i>n</i> = 20)	7.5 ± 1.0	9.0 ± 0.8	—	4.0 ± 0.7	6.4 ± 1.3	—
Chl. <i>a</i> [μg/wet g] (<i>n</i> = 3)	247.16 ± 24.78	944.38 ± 102.27	1369 ± 24.94	248.30 ± 39.73	932.38 ± 123.42	983.82 ± 89.71

有意な差は見られなかった。一方、実験終了時に測定した葉厚は、両実験区ともに対照区を上回り、実験区2と対照区の間で有意差が認められた ($p < 0.05$)。

実験終了時における各水槽のマコンブ胞子体のSPAD値とChl. *a*量をTable 2に示した。SPAD値は胞子体の中央部と分裂組織付近ともに実験区で有意に高かった ($p < 0.01$)。特に、分裂組織付近における実験区と対照区との差は中央部における差よりも大きかった。一方、Chl. *a*の量は、中央部と分裂組織付近では実験区と対照区との間に有意な差は認められなかったが、先端部では実験区で有意に高かった ($p < 0.001$)。実験区および対照区の全測定値について *t*検定を行った結果、対照区よりも実験区において有意にChl. *a*濃度が高かった ($p < 0.005$)。

各培養水槽における浮遊性藻類と付着性藻類の変化をChl. *a*を指標としてFig. 7に示した。浮遊性藻類は、11日目以降、実験区1において顕著に増殖し、33日目には対照区の2.5倍にまで達した。実験区2では、対照区とほぼ大差なく推移したが、33日目には、対照区の約1/3となった。一方、付着性藻類は、18日目まで実験区1, 2および対照区で同調的に変化したが、33日目には対照区で最も増殖し、実験区1の約1.8倍、実験区2の約1.3倍となった。また、33日目に各培養水槽の微細藻類の組成を比較した結果、浮遊性藻類では、対照区および実験区1で珪藻が色素量比で70%以上、実験区2では約40%で、珪藻類の占める割合が高かった。一方、付着性藻類で

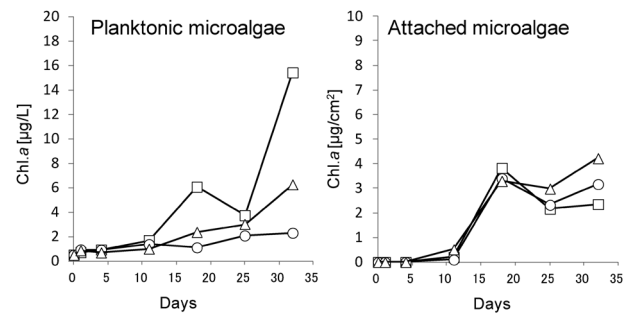


Fig. 7. Time course changes in Chl. *a* indicating densities of planktonic (left) and attached (right) microalgae in fertilized aquaria 1 (□) and 2 (○) and a control aquarium (△) during the *S. japonica* sporophyte culture experiment.

は、すべての培養水槽において珪藻類が色素量比で75%以上を占めた。

3.2 マコンブ配偶体を用いた実験

未成熟のマコンブ配偶体を用いた実験における2次受けタンクおよび培養水槽の実験区における栄養塩濃度の推移をFig. 8に示した。DINは、2次受けタンクで12日目まで急激に濃度が上昇して2.15 mg/Lとなり、56日目までほぼ変動なく推移した後、減少した。培養水槽では、両実験区ともに約0.40 mg/Lから0.03 mg/Lまで緩やかに減少した。DIPは、2次受けタンクで12日目に最大0.12 mg/Lとなり、DINと同様に、56日目までほぼ変動なく推移した後、減少した。培養水槽では約0.05 mg/Lで推移したが、実験区2では26日目以降、濃度が低下した。DSiは、他の栄養塩類ほど実験区と対照区の間で顕著な差がな

く、同調的に変化した。T-Feは、2次受けタンクにおいて実験開始直後に急激な濃度上昇が見られ、最大170 $\mu\text{g/L}$ となった。35日目までは100 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度で推移したが、その後、減少した。培養水槽では、両実験区ともに10~20 $\mu\text{g/L}$ で推移し、実験後半の56日目以降は減少した。

2次受けタンクおよび培養水槽の対照区における栄養塩の推移をFig. 9に示した。

DINは、2次受けタンクでは約0.3 mg/Lで安定的

に推移していたのに対し、培養水槽では19日目以降に減少し、約0.1 mg/Lで推移した。DIPは、2次受けタンクで0.05~0.10 mg/Lで推移したのに対し、培養水槽では19日目以降に減少し、実験終了時には0.02 mg/Lとなった。DSiは、実験区 (Fig. 8) と同様に、2次受けタンクと培養水槽はほぼ同調的に変動した。T-Feは、実験区 (Fig. 8) と比べて際立って低濃度で、2次受けタンクでは1.4~3.6 $\mu\text{g/L}$ 、培養水槽では0.6~3.6 $\mu\text{g/L}$ で推移し、両者の差は小さかった。

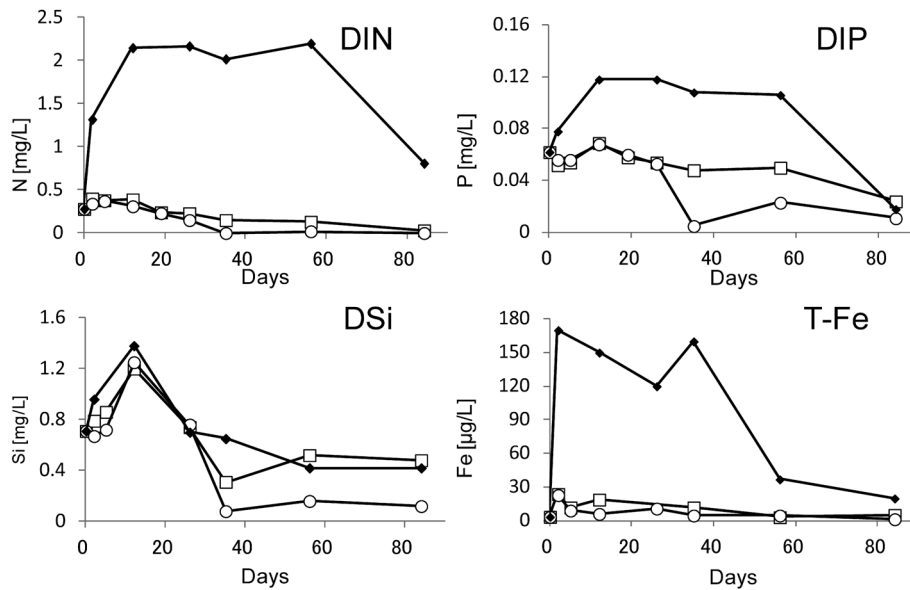


Fig. 8. Time course changes of N, P, Si and Fe concentration in the 2nd tank (with fertilizer, ◆) and its downstream aquaria 1 (□) and 2 (○) during the *S. japonica* gametophyte culture experiment.

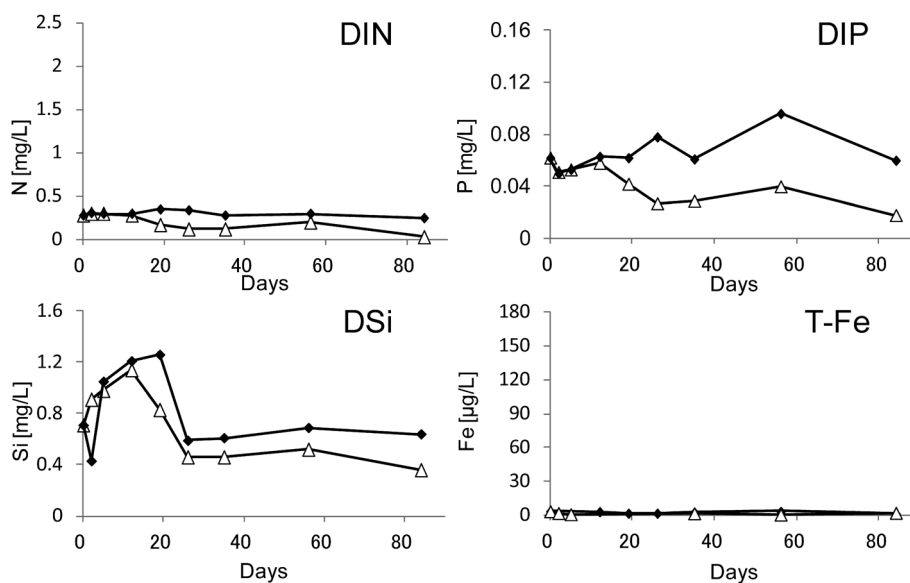


Fig. 9. Time course changes of N, P, Si and Fe concentration in the 2nd tank (without fertilizer, ◆) and its downstream control aquarium (△) during in the *S. japonica* gametophyte culture experiment (◆: 2nd tank (control tank) and △: control aquarium).

マコンブ配偶体の成熟によって得られた孢子体の密度(ナイロンメッシュ20 mmあたりの個体数)と葉長をFig. 10に示した。2011年12月26日(遊走子放出36日後, 現地培養開始25日後)には, 実験区1で16.0個体の孢子体が観察され, 実験終了時(遊走子放出94日後, 現地培養開始83日後)には, 24.5個体と増加した。実験区2では, 25日目に49.3個体, 83日目に49.0個体となり, 全区で最も高密度となった。対照区は, 25日目に17.8個体, 83日目に12.8個体と減少した。83日目の孢子体密度について t 検定を行った結果, 25日目の実験区1と対照区の間には有意差は認められなかったが, 83日目には有意差が認められた($p < 0.01$)。実験区2と対照区の間には25日目, 83日目ともに有意差が認められた($p < 0.01$)。

葉長(83日目)に関しては, 実験区1で平均0.87 mm,

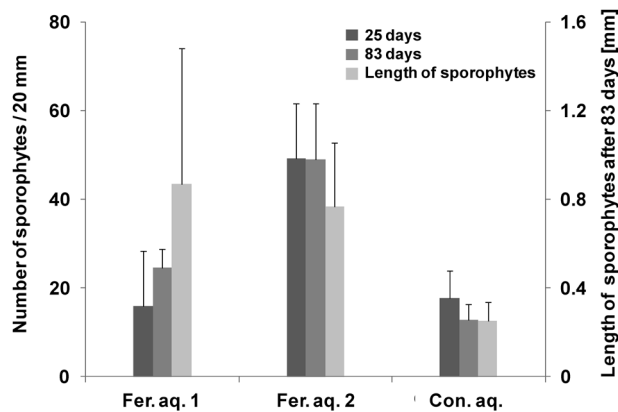


Fig. 10. Number of sporophytes/20 mm mesh net after 25 and 83 days ($n=5$) and the length of sporophytes after 83 days ($n=26$) in the *S. japonica* gametophyte culture experiment.

Fer. aq.: fertilized aquarium, Con. aq.: control aquarium

実験区2で平均0.77 mm, 対照区で平均0.25 mmとなった(Fig. 10)。実験区1では, 目視で容易に確認できる葉長約2 mmにまで生長した孢子体も確認できた(Fig. 11)。 t 検定の結果, 両実験区ともに対照区との有意差が認められた($p < 0.005$)。

各培養水槽における浮遊性藻類および付着性藻類の変化をChl. *a*を指標としてFig. 12に示した。浮遊性藻類では, 19日目以降にすべての培養水槽において増殖傾向を示した。その後, 実験終了時の83日目には, 実験区1で最も多く増殖し, 実験区2では実験区1の約1/10, 対照区では約1/6となり, 各培養水槽でばらつきが大きかった。付着性藻類は, 13日目以降にすべての培養水槽において増殖傾向を示し, 実験終了時には, 対照区で最も増殖し, 実験区1で対照区の約1/6, 実験区2で対照区の約1/3となった。また, 実験終了時の各培養水槽における微細藻類の種類を比較した結果, 浮遊性藻類, 付着性藻類のいずれについても珪藻類が卓越し, 浮遊性藻類において色素量比で65~72%, 付着性藻類において67~77%となった。2月の実験終了時に, 付着性の珪藻の種を同定した結果, 実験区, 対照区ともに*Navicula directa*がほとんどを占め, 実験区では*Tabularia investiens*が, 対照区では*Melosira nummuloides*と*Pseudoleyanella lunata*が若干観察された。これらは, すべて滑川市の富山県試験場(鈴木ら, 2000)および入善(鈴木ら, 2005)の深層水施設で繁茂が確認されてきた珪藻であった。

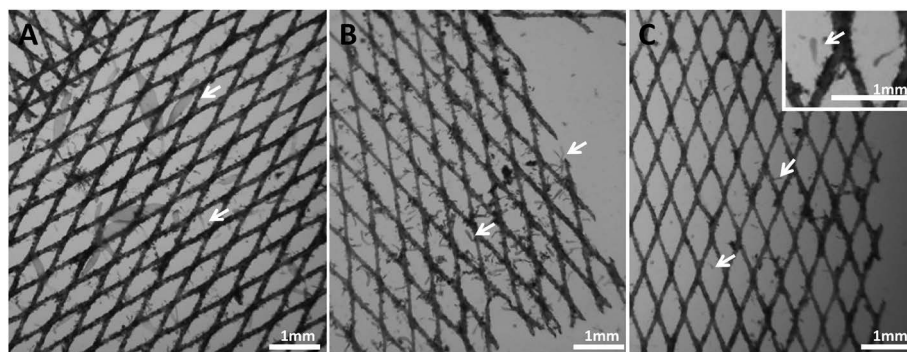


Fig. 11. Sporophytes (arrows) of *S. japonica* after 84 d in the gametophyte culture experiment.

A: fertilized aquarium 1, B: fertilized aquarium 2 and C: control aquarium

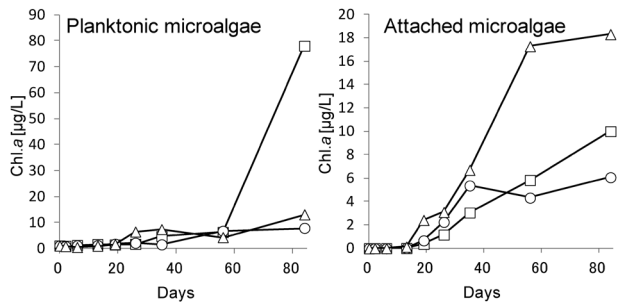


Fig. 12. Time course changes in Chl. *a* indicating densities of planktonic (left) and attached (right) microalgae in the *S. japonica* gametophyte culture experiment.

□: fertilized aquarium 1, ○: fertilized aquarium 2 and △: control aquarium

4. 考 察

本研究では、富山湾の深層水を用い、屋外水槽において疑似的な「かけ流し」条件下で、マコンブ胞子体および配偶体に対するスラグ系施肥材の効果を確認した。

マコンブの配偶体を用いた実験では、施肥材からの栄養成分 (DIN, DIP, T-Fe) の溶出が約2ヵ月間継続したのに対し、胞子体を用いた実験では11日目以降に濃度の低下が見られた。この違いに関しては、施肥材を調整した時期の違いが影響したと考えられる。施肥材に用いる腐植物質は、保管状況や保管期間による変質 (有機成分の分解など) が想定され、腐植物質起因のDINやDIPの溶出に影響を及ぼしたと思われる。また、T-Feに関しても、腐植物質中の有機配位子の変化によって、転炉系製鋼スラグ起因のFeイオンとの錯体形成に影響が現れたと考えられる。本実験結果から、スラグ系施肥材の実用化にあたっては、栄養塩の溶出速度および効果の安定化に向けて腐植物質の品質管理が重要課題であると推察された。

今回、上記のような実験材料としての施肥材自体の課題が見出されたが、施肥材投入後の一定期間において栄養塩溶出が認められたため、マコンブ生活環における配偶体と胞子体 (葉長10~35 cm) の2ステージに対する施肥効果を検証できたと考えられる。配偶体を用いた実験では、配偶体の成熟に基づく胞子体の出現と初期生長において、「止水」条件

で行った先の実験結果 (植木ら, 2012) と同様、明確な施肥の効果が確認できた。また、葉長10~35 cmの胞子体を用いた実験では、葉長および葉幅の増大に施肥による明確な効果は認められず、葉厚の増加にその効果が認められた。冒頭に述べたように、鉄はコンブなど海藻の生育には不可欠であるが、その生活環の中で鉄添加による著効が認められているのは配偶体の成熟 (Motomura and Sakai, 1981, 1984) だけで、これまで胞子体、特に大型化した胞子体の生長に関する報告は知られていない。配偶体の成熟は、生殖器官である造卵器や造精器の分化であり、胞子体の生長とは全く異なる作用によると考えられる。本研究で得られた結果は、マコンブの生活環の中で鉄の要求性が異なることを示唆するものである。

マコンブ胞子体を用いた実験では、実験後半に、大きく生長した藻体が空中に飛び出すことはなかったものの、互いに絡まり合って密生していた。ある程度生長したコンブ類の胞子体の生長や光合成活性には海水の流動環境の影響が大きいことが明らかとなっているが (例えば, Gerard and Mann, 1979; Wheeler, 1980), 本研究では、用いた水槽の大きさが限られていたため、実験期間を通して理想的な培養条件を維持できなかった。

しかし、マコンブ胞子体の葉厚には実験区と対照区との間で有意差が認められ、実験区1では2個体で子嚢斑が形成されたことは特筆に値する。コンブ目植物の胞子体では、富栄養条件下で子嚢斑の形成が促進されることが明らかにされている (赤池ら, 1998; Mizuta *et al.*, 1999)。富山湾深層水では、施肥をしない「かけ流し」条件でもマコンブの葉片が成熟することが報告されているが (松村・藤田, 2002), 比較的若い胞子体を用いた今回の実験で、実験区の胞子体にのみ子嚢斑が形成されたこと、そして、実験区で葉厚が有意に大きな値を示したことは、スラグ系施肥材の添加によって深層水に栄養塩類 (窒素, リン, 鉄) が付加されたことによる効果と考えられる。天然海域においても、子嚢斑の形成の兆候として、藻体の肥大度 (重量/面積) の上昇が知られている (赤池・津田, 2005)。本研究では、

コンブを基質に固定させ、附着器が根付いた状態で培養しているため、重量を測定しておらず、肥大度を計測できなかったが、同じ葉長・葉幅での重量増加には葉厚の増大が不可欠であり、実験区における藻体の肥厚も、子嚢斑の形成に向けた変化の一つと考えられる。富山湾深層水を用いたマコンブの培養では、切り取った葉片による成熟誘導法が確立しており(松村・藤田, 2002), この方法を用いてスラグ系施肥材の有無で成熟の遅速を比較すれば、効果のさらなる確認ができるであろう。

本実験によってスラグ系施肥材のもう一つの効果として考えられたのが、マコンブ胞子体の体色の改善である。富山湾深層水は鉄濃度が低い(松永, 2001), 深層水のみで培養されたマコンブ幼胞子体は体色が薄くなること知られている(藤田, 2000; 植木ら, 2012)。本研究においては、スラグ系施肥材の有無によって体色の濃さに違いがみられた。フコキサンチン等の補助色素についての量的変動は不明であるが、Chl. *a*の量的指標であるSPAD値、さらに、藻体中のChl. *a*含有量を調べた結果では、実験区において有意に高かった。紅藻の例ではあるが、スサビノリでは鉄欠乏によってChl. *a*が減少することが確かめられていることから、藻体中のChl. *a*の生合成が鉄と密接に関わることは明らかであり(Spiller *et al.*, 1982; 植木ら, 2010), スラグ系施肥材中の鉄分がマコンブ胞子体の色彩の維持に効果的であることが示唆された。なお、SPAD値とChl. *a*含有量とで対照区との有意差が見られた部位が異なっていた。SPAD値は藻体表面に蛍光を照射し、その反射量をChl. *a*量として換算し求められるため、光合成色素を多く含む表層細胞中の色素量を反映しやすいという特性があるが、単位重量当たりのChl. *a*含有量では、葉厚が厚くなった実験区の藻体において表層細胞の割合が減少したと推察される。その結果、葉厚の増加が顕著であった分裂組織付近、中央部ではChl. *a*量の差が明確でなかった一方で、先端部では葉厚の影響が小さかったため、実験区で有意にChl. *a*量が多いという結果になったと考えられる。

培養水槽中の微細藻類の増殖に関しては、今回、

「かけ流し」条件であったことから、「止水」条件での実験(植木ら, 2012)で認められたような施肥の効果は認められなかったと考える。しかし、実験区の2次受けタンクでは、スラグ系施肥材からの栄養成分の溶出を確認している。したがって、「止水」条件での増殖促進効果を踏まえると、浮遊性藻類、附着性藻類のいずれに関しても、施肥によって一定の増殖効果はあるものの、「かけ流し」条件では、常に新しい海水が培養水槽に供給され続け、浮遊性藻類は培養水槽内に滞留することなく流されたと考ええる。加えて、附着性藻類では、大きく生長したマコンブ胞子体による被陰や通気が引き起こす藻体の揺れによる擦り落としもあって、基質面で生育しづらく、留まりにくいために、顕著な増殖効果として確認できなかったと考えられる。

先の「止水」条件の実験では、微細藻類とマコンブ幼胞子体との間で、施肥材からの溶出成分を巡る競合が生じ、栄養塩類に対して迅速に応答する微細藻類(特に附着性藻類)の卓越が懸念された。今回の「かけ流し」条件においても、配偶体の培養試験では実験終了時に水槽内が一面附着性藻類に覆われたことによる光環境の悪化と微細藻類との栄養塩類の摂取競合の影響があったと考えられる。しかし、本実験において葉長10 cm以上の藻体が順調に生育できたことで、「かけ流し」条件でマコンブの大型藻体を用いれば、また、海水流動条件を改善して速やかにある程度まで生長させることができれば、附着性藻類との栄養塩を巡る競合を回避できるであろう。速やかに生長させるべき、附着性藻類との競合に打ち勝てるマコンブ胞子体の大きさに関しては、本研究で用いた最も小さい胞子体の葉長10 cmを目安にして、今後、検討していく予定である。

本研究において、マコンブ胞子体(葉長10 cm以上)の生長(葉長、葉幅の増大)に関しては、顕著な効果は認められなかったものの、施肥による胞子体の成熟、葉厚の増加、そして、Chl. *a*量の増加が確認された。これらは、植木ら(2012)が報告したマコンブ配偶体の成熟、胞子体の初期生長に加えて、スラグ系施肥材の効果として今後注目すべき視点と考えられる。マコンブ胞子体の生長段階によっ

てスラグ系施肥材の効果が異なることが示唆されたことから、実海域にスラグ系施肥材を施用する最も効果的な時期は、胞子体の生長期である冬季～春ではなく、胞子体の成熟および配偶体の成熟時期である秋～初冬と考えられた。

植木ら(2012)と本研究の結果により、貧鉄海水である海洋深層水を用いた屋外水槽実験で、スラグ系施肥材による藻類増殖の効果をある程度認めることができたが、天然海域での施肥の基礎資料とするにはpHに留意すべきと考える。海洋深層水は、表層海水(pH 8.2~8.4)と比較してpHが8以下と低い。鉄鋼スラグからの鉄の溶出はpHが低いほうが有利とされており(三木ら, 2003), 天然海域での施肥試験よりは施肥効果が高まった可能性がある。

今後は、磯焼け海域(たとえば、北海道南西岸)の貧栄養海水を用いた「かけ流し」試験を行い、スラグ系施肥材による栄養塩添加技術の有効性を明らかにしていきたい。また、ごく最近、鉄が配偶体の卵形成に及ぼす効果は、コンブ目内の分類群によって異なることが示されているので(Lewis *et al.*, 2013), スラグ系施肥材による施肥効果を高めるためには、国内でも各種コンブについて鉄の効果を確かめる必要がある。

参考文献

相本道宏・加藤敏朗・木曾英滋・堤直人・三木理(2010) 固相キレート抽出-誘導結合プラズマ試料分析法による海水中極微量Feの分析. 新日鐵技報, 390, 89-95.

赤池章一・菊地和夫・門間春博・野澤靖(1998) 1年目リシリコンブ胞子体の生長に及ぼす窒素, リン施肥の影響. 水産増殖, 46, 57-65.

赤池章一・津田藤典(2005) 北海道岩内沿岸における2年生コンブの成長と成熟. 北水試研報, 69, 151-158.

藤田大介(2000) 海洋深層水を利用した藻類の培養. 月刊海洋/号外, 22, 76-80.

藤田大介・町口裕二・桑原久実(2008) 磯焼けを起こすウニ—生体・利用から藻場回復まで—. 成山堂書店, 東京, 296 pp.

藤田大介・村瀬昇・桑原久実(2010) 藻場を見守り育てる知恵と技術. 成山堂書店, 東京. 278 pp.

藤田大介・野田幹雄・桑原久実(2006) 海藻を食べる魚たち—生態から利用まで—. 成山堂書店, 東京, 261 pp.

Gerard, V. A. and K. H. Mann (1979) Growth and production of *Laminaria longicruris* (Phaeophyta) populations exposed to different intensities of water movement. J. Phycol., 15, 33-41.

畠山重篤(2008) 鉄が地球温暖化を防ぐ. 文藝春秋, 東京, pp. 55-70.

Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen., 167, 191-194.

Jones, A. B., W. C. Dennison and G. R. Stewart (1996) Macroalgal responses to nitrogen source and availability: Amino acid metabolic profiling as a bioindicator using *Gracilaria edulis* (Rhodophyta). J. Phycol., 32, 757-766.

加藤敏朗・相本道宏・三木理・中川雅夫(2008) 製鋼スラグ等の海域施肥試験における海域Fe濃度分布に関する検討—転炉系製鋼スラグ等を用いた藻場造成技術開発(2)—. 第20回海洋工学シンポジウム, OES-17.

木曾英滋・堤直人・渋谷正信・中川雅夫(2008) 海域施肥時のコンブ等の生育に関する実海域実験—転炉系製鋼スラグ等を用いた藻場造成技術開発(1)—. 第20回海洋工学シンポジウム, OES-23.

Lewis, R. J., M. K. Green and M. E. Afzal (2013) Effects of chelated iron on oogenesis and vegetative growth of kelp gametophytes (Phaeophyceae). Phycol. Res., 61, 46-51.

Lobban, C. S. and P. J. Harrison (1994) Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, New York, 366 pp.

松村航・藤田大介(2002) 海洋深層水培養コンブの介生生長に基づく自給型アワビ養殖の提案. 海深研, 3, 53-63.

松永明信(2001) 富山湾深層水利用研究会編, 21世紀の資源 富山湾深層水, 深層水の成分及び清浄性. 桂書房, 富山, pp. 4-5.

松永勝彦(1993) 森が消えれば海も死ぬ 陸と海を結ぶ生態学. 講談社, 東京, 194 pp.

Matsunaga, K., J. Nishioka, K. Kuma, K. Toya and Y. Suzuki (1998) Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesenuma Bay (Japan). Water Res., 11, 3436-3442.

Matsunaga, K., Y. Suzuki, K. Kuma and I. Kudo (1994) Diffusion of Fe (II) from an iron propagation cage and its ef-

- fect on tissue iron and pigments of macroalgae on the cage. *J. Appl. Phycol.*, 6, 394–403.
- 三木貴博・桑田清輝・佐間田優輔・長坂徹也・日野光元 (2003) 海水中相安定図を用いたスラグ成分溶出挙動の解析. *鉄と鋼*, 89, 388–392.
- Mizuta H., K. Nimura and H. Yamamoto (1999) Inducible conditions for sorus formation of the sporophyte discs of *Laminaria japonica* Areschoug (Phaeophyceae). *Fish. Sci.*, 65, 104–108.
- Motomura, T. and Y. Sakai (1981) Effect of chelated iron in culture media on oogenesis in *Laminaria angustata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 1535–1540.
- Motomura, T. and Y. Sakai (1984) Regulation gametogenesis of *Laminaria* and *Desmarestia* (Phaeophyta) by iron and boron. *Jpn. J. Phycol.*, 32, 209–215.
- Provasoli, L. (1963) Growing marine seaweeds. In “Proc. IVth Int. Symp. 1961” (ed. by A. D. DeVerville and J. Feldmann), Pergamon Press, Oxford, pp. 9–17.
- Serisawa, Y., Z. Imoto, T. Ishikawa and M. Ohno (2004) Decline of the *Ecklonia cava* population associated with increased seawater temperatures in Tosa bay, southern Japan. *Fish. Sci.*, 70, 189–191.
- Spiller S. C., A. M. Castelfranco and P. A. Castelfranco (1982) Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol.*, 69, 107–111.
- 水産庁 (2007) 磯焼け対策ガイドライン. 水産庁, 199 pp.
- 鈴木秀和・藤田大介・南雲 保 (2005) 富山県入善町の海洋深層水アワビ養殖施設に出現した付着珪藻. *日本歯科大学紀要 (一般教育系)*, 34, 55–62.
- 鈴木秀和・南雲 保・藤田大介 (2000) 富山湾深層水で自然繁茂する付着珪藻. *富山県水産試験場報告*, 12, 33–42.
- 堤 直人・加藤敏朗・本村泰三・中川雅夫 (2008) 海域施肥時のコンブ等の生育に及ぼす施肥原料成分の影響に関する水槽実験結果—転炉系製鋼スラグ等を用いた藻場造成技術開発 (3)—. 第20回海洋工学シンポジウム, OES-9.
- 植木知佳・熊谷敬之・藤田大介 (2012) 富山湾深層水を用いたスラグ系施肥材の海産藻類に対する効果実証実験. *海深研*, 13, 7–16.
- 植木知佳・村上明男・加藤敏朗・嵯峨直恆・本村泰三 (2010) 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答. *日水誌*, 76, 375–382.
- (2014年3月24日受付; 2015年12月7日受理)