

大村湾の環境修復に向けた陸起源窒素の取り込みに適した海藻の選択

豊嶋香苗^{*1}, 梅澤 有^{*1}, 中田英昭^{*1}

Selection of appropriate seaweed to absorb terrestrial nitrogen for the remediation of the coastal environment of the Omura Bay

Kanae TOYOSHIMA^{*1}, Yu UMEZAWA^{*1} and Hideaki NAKATA^{*1}

Abstract

The reduction of nutrients supply from the land area is essential management to control the surplus phytoplankton bloom and subsequently mitigate the formation of hypoxic water mass at the bottom layer in the inner bay area. In this study, we tried to clarify the ability for nitrate uptake of several seaweeds under various natural environment conditions of the Omura bay through the incubation experiments. And we tried to find the appropriate seaweed species which effectively absorb nitrate in the estuary having heavy loads of land-derived nutrients with high nitrogen and phosphorus ratio (N:P ratio). Out of six species of the seaweeds (*Chaetomorpha crassa*, *Ulva pertusa*, *Codium fragile*, *Hypnea flexicaulis*, *Padina australis*, *Sargassum fulvellum*), which are often observed in the Omura bay, *U. pertusa* and *C. crassa* showed higher removal ability of nitrate and phosphate. Moreover, it was confirmed that *U. pertusa*, which is widely distributed in the coastal areas of the Omura bay, showed higher uptake of nitrate and photosynthesis potential even in the phosphorus-limited condition, during the night time, and in the low salinity condition of 15 psu. Although *U. pertusa* is known to cause the severe damage to the coastal ecosystem due to its coverage of the sediment and deterioration-derived smells, it can be suitable seaweed to biotechnologically remediate the coastal environment.

Key Words : 藻類 Macroalgae, 硝酸塩取り込み Nitrate uptake, アナアオサ *Ulva pertusa*, 大村湾 Omura Bay, リン律速 Phosphorus limitation, 生物学的環境修復 bioremediation

長崎県に位置する大村湾（幅約11km，奥行き約26km，面積320km²，平均水深14.8m）は，針尾瀬戸と早岐瀬戸の2本の細い水路で佐世保湾に通じ，さらに外海に繋がる二重の閉鎖性海域となっている。そのため，湾内海水と外海水との海水交換が少なく，湾口付近を除き全体的に潮流が弱いため，陸域から流入した物質や湾内で生産された有機物が湾内の海底に蓄積しやすい。さらに，夏場は温度成層が形成されやすいため，海水の滞留時間が長くなる底層では有機物の分解による貧酸素化が進行し，溶出した栄養塩（特にリン酸，ケイ酸，アンモニア）は湾内の一次生産に寄与している¹⁾と考え

られている。

このように富栄養化が進行しつつあると大村湾において，陸域から流入する栄養塩供給量を抑制することは，浅海域（潮間帯～潮下帯）を覆い尽くす大型緑藻類や，湾内での過剰な植物プランクトンの生産を抑えることにつながる。特に，1980年代以降に合成洗剤の無リン化が進み，また下水処理場の高次処理化により微生物活動等の操作によって吸着しやすいリンのみを回収することに成功した²⁾ため，海へと流される排水はリンよりも窒素に富んだ水である³⁾ことが多い。実際に大村湾に流れ込んでいる主な8つの河川の各季節

* 1 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University

の栄養塩濃度を調べてみると、溶存無機態窒素 (DIN)、リン酸態リン (DIP)、DIN/DIP比、それぞれの平均値 (中央値) は、 $102.4 \mu\text{M}$ ($65.8 \mu\text{M}$)、 $1.2 \mu\text{M}$ ($0.8 \mu\text{M}$)、211.1 (80.8)⁴⁾であり、海洋の植物プランクトンの平均的な窒素リン構成比 (レッドフィールド比) が16ということも考えても、窒素過剰 (相対的なリン不足) の栄養塩が陸域から流入していることになる。過剰な一次生産の抑制は、大型藻類の被覆に伴う浅海域堆積物の還元的な環境や、植物プランクトン由来の易分解性有機物の供給が一因となる底層の貧酸素水塊の形成の緩和にもつながるため、ナマコなどの底生動物や浅海域藻場に生息する仔稚魚の生残率を上げ、系内の水産資源の維持にもつながると考えられる。

近年では沿岸域における富栄養化の対応策として、養殖場由来の過剰な栄養塩の除去を行うために、複数の栄養段階に位置する生物の栽培を組み合わせたIMTA (Integrated Multi Trophic Aquaculture)^{5), 6)}という取り組みがなされている。IMTAとは、魚の養殖場の近くで貝や海藻を共に養殖し、養殖場から出た過剰な有機物や栄養塩を貝や海藻が吸収することで汚染の拡散を防ぐことができ、また成長した貝や海藻も回収することで窒素やリンを系外に移行させ、かつ、食料や飼料として利用できる効率的な方法⁷⁾である。この方法を応用し、河口域や沿岸域で海藻を意図的に成長させることによって、海藻の機能により、陸域からの過剰な栄養塩を取り込ませて、かつ成長した海藻を回収して再利用することで環境修復に繋がると考えられる。特に、上述のように窒素過剰の栄養塩供給がある中では、リンが不足した状態で窒素を吸収することができる海藻が、沿岸域の環境修復材料として用いることに適していると考えられるが、このような観点での研究がないのが現状である。

そこで、本研究では、大村湾などの温帯域の内湾で観測される様々な環境条件において、一般的に生育する様々な海藻種の栄養塩取り込み能力と光合成能力の変化について調べ、沿岸域の環境修復に適した海藻を明らかにすること目的とした。

まず大村湾に生育する海藻の栄養塩取り込み能力を広く把握するため、大村湾に多く生育する海藻の栄養塩取り込み能力を調べた (培養実験1)。続いて、培養実験1で高い栄養塩取り込み能力が見られた特定の海藻種 (*Ulva* sp.と*Padina* sp.)を用いて、リン枯渇条件下での栄養塩 (硝酸) 取り込み能力と光合成能力について、明条件・暗条件の両方での特性を調べた (培養実験2)。最後に、河川水が流れ込む低塩分の条件下でも、比較的効率良く栄養塩を取り込む特性を持っている藻類であるか検証するため、異なる塩分条件下での*Ulva* sp.の栄養塩取り込み能力と光合成活性について調べた (培養実験3)。

方法

試料採集

培養実験1で使用した海藻種のうち、ホンジュズモ*Chaetomorpha crassa*とアナアオ*Ulva pertusa*はSt.1 (子々

川)にて、その他の海藻 (ミル*Codium fragile*, カズノイバラ*Hypnea flexicaulis*, ウ斯巴ウミウチワ*Padina australis*, ホンダワラ*Sargassum fulvellum*)はSt.2 (二島)で実験の1日前に採集し、培養実験2, 3で使用した海藻のうち、アナアオはSt.3 (長与港), ウ斯巴ウミウチワはSt.2 (二島)で、実験の2日前に採集して、順応培養に供した (Fig.1)。

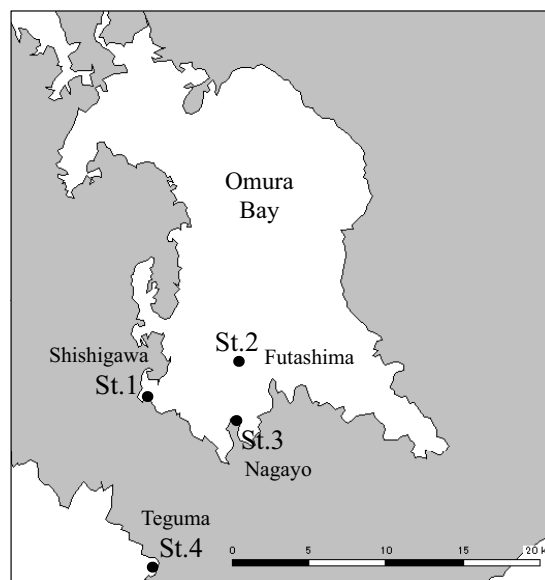


Fig.1. Macroalgae and seawater sampling location at the Omura Bay

培養実験の準備と方法

培養実験に用いる海水は、栄養塩濃度の高い河川水の影響の少ないSt.2 (二島)とSt.4 (手熊)で採取した海水 (N, P共に $0.05 \mu\text{M}$ 以下)を用い、大型藻類と同様に栄養塩を吸収して成長する植物プランクトンを除去するために、焼成したガラス繊維濾紙 (GF/F, $0.7 \mu\text{m}$ Whatman)で濾過して濾過海水を作成した。さらに濾過海水で、採集した海藻表面を洗って、栄養塩の吸収を行う付着藻類や、栄養塩の放出に関わる甲殻類などの小動物を洗い流した。異なる環境条件 (水温, 光量, 栄養塩環境)で生息していた海藻は、元々生育していた場所に特化した生理特性になっていることが考えられるため、培養実験開始前に、均一な条件に適応させるための順応培養を行った。培養実験1の順応培養では、エアレーションを行った濾過海水中に海藻を1日間入れて培養した。培養実験2, 3では2日間の順応培養を行ったが、培養実験1の条件に加えて、培養海水中の初期窒素濃度、リン濃度がそれぞれ $30 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ に近づくように、栄養塩として、硝酸カリウム溶液、リン酸二水素カリウム溶液を、12時間ごとに添加した。

栄養塩濃度測定

培養実験で得た栄養塩測定用試料は採取後速やかに冷凍保存し、後日、オートアナライザー (AACS4, BLTEC社製)を用いて、硝酸態窒素 ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2 - \text{N}$)は、全ての硝酸を亜硝酸に還元後、ナフチルエチレンジアミン法によって測定

し、リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) は、モリブデンブルー法によって測定した。⁸⁾ また、測定した栄養塩濃度のデータを元に算出した栄養塩取り込み速度の条件別の比較においては、試料数が少なく正規性の検証が十分に出来ないことから Mann-Whitney 検定を用いて、有意差検定を行った。

光合成活性測定

海藻の光合成量や炭素固定量は、酸素発生量や同位体 (^{13}C や ^{14}C) 標識法を用いた重炭酸固定量の測定などから求められてきている。⁹⁾ 前者の方法は呼吸による酸素吸収量によって相殺されるものであり、明条件での発生量は光合成機能と必ずしも一致するものでなく、また、後者の方法は、測定に時間とコストがかかり簡便でない。一方で、パルス増幅変調法 (PAM) による光合成活性の測定は1990年代後半から始められた新しい手法であるが、非破壊的な測定であるため、培養試料を用いた経時的な測定ができる利点¹⁰⁾を持っている。また、光合成活性の他にも、強光阻害の有無や、電子伝達の量子収率の変化の原因が光化学系IとIIのどちらで起きているのかの指標を示す¹⁰⁾こともできる。そこで本研究では、PAMを用いた光合成活性測定も一緒に行うことで、従来の栄養塩取り込み実験ではできなかった海藻の光合成能力の違いからの考察を加えた。

本研究において光合成活性の測定は Imaging-PAM (WALZ社製) を用いて、培養実験 2, 3 で行った。藻体が水中にあると蛍光強度が変化すること、また一方で、藻体が乾燥すると健全性が失われることから、アルミプレートの上に濾過海水で湿らせたキムタオルをのせておき、その上に暗順応させておいた海藻を重ねるように広げて蛍光値を測定した。Imaging-PAMによって測定される値のうち、本研究では、式③で求められる光化学系IIの実際の量子収率 (Y(II)) を光合成活性の指標として用いた。

$$Y(II) = qP \times (Fv'/Fm') \quad \dots \textcircled{3}$$

Y(II)のうち、光化学系IIの量子収率を示す Fv'/Fm' の値は光化学系IIの状態によって決定され、 qP (光学的消光) はシトクロム b_6/f 複合体や光化学系 I, 炭酸固定系など、光化学系IIの下流に存在するコンポーネントが機能を失った場合に値が小さくなる。¹¹⁾ そのため、このY(II)の値が低下した時、測定される qP の値を見ることで、光合成が行われている機能のうちどの部分で光合成阻害が起こっているか判別できるという原理を利用した。求められた各データ間 (培養実験前と実験後の試料間、もしくは、異なる条件での試料間) の差の有無については、試料数が少なく正規性の検証が十分に出来ないことから Wilcoxon 符号付順位和検定、もしくは Mann-Whitney 検定を用いて、有意差検定を行った。

培養実験 1. (海藻種別の栄養塩取り込み特性) の条件設定

ホソジズモ、ミル、カズノイバラ、ウスバウミウチワ、ホンダワラ、アナアオサの6種類の大型藻類を用いて、2008年と2009年の8月の計2回、4時間ずつ行った ($n=2$)。水温と光量子量を変化させて夏期晴天条件と春秋期曇天条件を設定し、夏期晴天条件は水温 $26\sim 30^\circ\text{C}$ 、光量子量 $180\ \mu\text{mol}$

$\text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$ (MQ-200, Apogee社製)、春秋期曇天条件は水温 $20\sim 22^\circ\text{C}$ 、光量子量 $20\ \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$ とした。温度管理として室内空調設備と保冷剤を用い、自然光に近い波長の可視光線を放射する70Wメタルハイドランプ (サンライト H70プラント, TWTインターナショナル社製) を用いた。

培養は容器に1.2Lの濾過海水を入れ、その中に海藻を約10wet-g入れて行った。栄養塩は培養海水中の初期窒素濃度、リン濃度がそれぞれ $30\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$ になるように、栄養塩として、硝酸カリウム溶液、リン酸二水素カリウム溶液を添加した。午前9時から測定を開始し、携行型pH/DOメーター (D-55型, HORIBA社製) を用いて光合成量の指標となる溶存酸素濃度 (DO) と水温の測定、栄養塩測定用のための採水を、9時30分、10時、11時、12時、13時の計5回行った。

培養実験 2. (リン枯渇条件下での栄養塩取り込み特性) の条件設定

培養実験 2 は、培養実験 1 の結果を参照し、硝酸の取り込み量が大きいアナアオサと、窒素とリンの取り込み量の比 (モル比) がアナアオサとは大きく異なるウスバウミウチワを実験対象種として用い、2010年の9月2日～8日の計1回、7日間の培養実験を行った。温度と光量を管理できるインキュベーター (M-230FN, TAITEC社製) を用いて、大村湾沿岸の夏の表層の平均的な水温に横した 25°C の条件で、明期 (8時～20時:12時間, $100\ \mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) と暗期 (20時～8時:12時間) を繰り返した。透明の培養容器に濾過海水0.5Lを入れ、その中に海藻約2 wet-gを入れて培養を行った ($n=4$)。栄養塩は培養海水中の初期窒素濃度が $30\ \mu\text{M}$ (初日のみ $40\ \mu\text{M}$) になるように硝酸カリウム溶液を添加しただけの条件 (リン枯渇条件) と、この条件に加えて初期リン濃度がリン $10\ \mu\text{M}$ になるようにリン酸二水素カリウム溶液をさらに添加した条件の2種類設定した。

培養開始後の1, 3, 6日目には、午前9時30分、10時、11時、12時、15時の計5回に明条件での水質計測と栄養塩測定用の試料採水を行い、21時30分、22時、23時、24時、27時の計5回に暗条件での水質計測と栄養塩測定用の試料採水を行った。環境条件に関わる水質は、隔膜電極のポータブル溶存酸素計 (DO-31P型, 東亜ディーケーケー社製) を用いて、溶存酸素濃度 (DO) の測定を行った。測定を行う日は、明条件、暗条件それぞれの実験開始直前に培養水の入れ替えを行い、新しい培養水に栄養塩を添加した。測定を行わない日にも培養条件として設定している栄養塩構成が維持されるように、午前と午後の9時に栄養塩を添加した。また、光合成活性の測定を1, 3, 6日目に行った。

培養実験 3. (異なる塩分条件下での栄養塩取り込み特性) の条件設定

湾内に流入する陸水に含まれる過剰な窒素を吸収する能力が高く、環境修復材料として適していると考えられるアナアオサ (培養実験 1, 2) を用い、異なる塩分条件で6日間

(2010年12月17日～22日)の培養実験を行った。

九州の河川の平均的な水質⁹⁾を参考に、 SiO_2 を32.2mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を36.7mg/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を22.6mg/L, KCLを3.5mg/L, Na_2SO_4 を19.4mg/L, NaHCO_3 を56.3 mg/Lを混ぜて人工的な淡水を作成し、濾過海水と混ぜて実験に用いる異なる塩分(5, 15, 25, 36psu)の培養海水を作成した。透明の培養容器に塩分調整を行った培養水0.5Lを入れ、その中に海藻約1 wet-gを入れて水温を25°Cに保って培養を行った(n=4)。

培養実験2と同様の方法で、管理した明暗条件下で、それぞれ5回ずつ水質計測と栄養塩測定用の試料採水を行い、定時での溶存酸素濃度の測定と海水の交換、栄養塩の添加(初期窒素濃度30 μM, 初期リン濃度10 μM)を行って実験の環境条件を保った。これらの観測の他に、光合成活性の測定を1, 3, 6日目に行った。

結果

培養実験1. (海藻種別の栄養塩取り込み特性)

栄養塩取り込み特性(硝酸の取り込み速度, リン酸の取り込み速度, 硝酸とリン酸の取り込み比(モル比))は、海藻種ごとに大きく異なっていた(Fig. 2)。これらの値から、

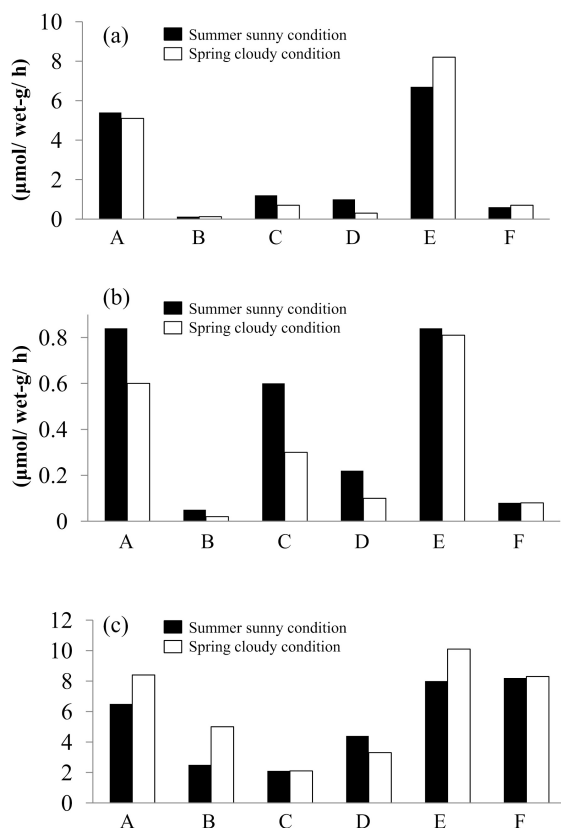


Fig.2. Comparison of (a) nitrate uptake rate, (b) phosphate uptake rate, and (c) molar ratio of nitrate and phosphate uptake rates of 6 species of macroalgae (A: *Ulva pertusa*, B: *Codium fragile*, C: *Padina australis*, D: *Sargassum fulvellum*, E: *Chaetomorpha crassa*, F: *Hypnea flexicaulis*)

アナアオサとホソジュズモは硝酸とリン酸のそれぞれの取り込み速度が共に大きく、硝酸とリン酸の取り込み比の値も大きいですが、対してウスバウミウチワはリン酸の取り込み速度は大きいですが、硝酸の取り込み速度が小さく、硝酸とリン酸の取り込み比の値も小さい値を示していた。一方カズノイバラ、ホンダワラ、ミルは、硝酸とリン酸の取り込み速度の値が共に小さかった。褐藻類のウスバウミウチワとホンダワラは、夏期晴天条件での硝酸、リン酸の取り込み速度が、春秋期曇天条件に比べて2倍程度高かったが、他の藻類では大きな違いが見られなかった。

培養実験2. (リン枯渇条件下での栄養塩取り込み特性)

光合成に伴って増加するDOの変化を海藻間で比較すると、培養3日目の明条件において、ウスバウミウチワは、リン添加条件、リン未添加条件のそれぞれで8.6mg/L (t=3.5h), 8.5mg/L (t=2.5h)の最高値をとっているのに対して、アナアオサは、リン添加条件、リン未添加条件のそれぞれで、より高い11.8mg/L (t=3.5h), 12.1mg/L (t=5.5h)の最高値をとっており、この傾向は7日目でも同じであった(Fig.3-1a)。また暗条件ではアナアオサとウスバウミウチワ間(リン添加: $P=0.264$, リン無し: $P=0.224$, n=11, Mann-Whitney検定)や、リンの有無(アナアオサ: $P=0.056$, ウミウチワ: $P=1.000$, n=11, Mann-Whitney検定)による有意な差は見られず、酸素濃度は3.0~5.0mg/Lの間で変動していた。ウスバウミウチワの培養海水中では5

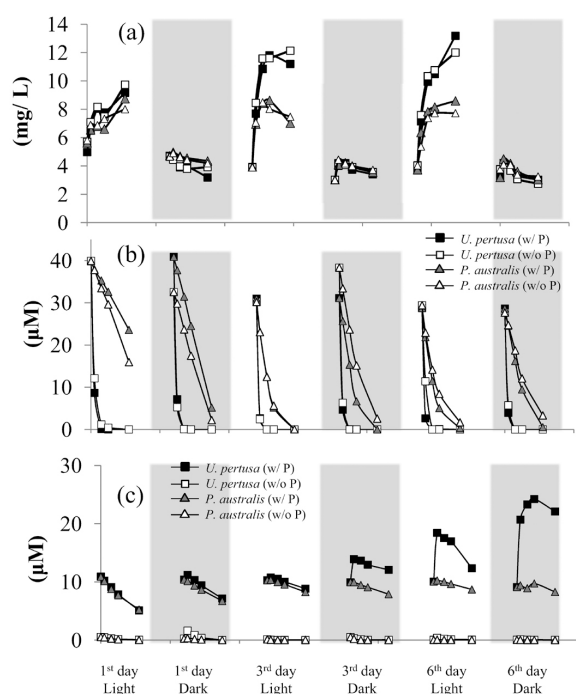


Fig. 3-1. Time series variation of (a) dissolved oxygen (DO), (b) nitrate and (c) phosphate concentrations in the culture seawater in which *U. pertusa* and *P. australis* were incubated with and without phosphate addition. Gray region indicates the period of dark condition.

時間半後も硝酸が残存していたのに対して、アナアオサの培養海水中の硝酸濃度は、リンの有無によらず開始2時間半後には値が0に達していた (Fig.3-1b)。いっぽうで、培養海水中のリン酸濃度は、ウスバウミウチワ、アナアオサ共に同程度の減少を示したが、培養3日目暗期以降では、アナアオサの培養海水中のリン酸濃度は、開始30分後の値が10.7~20.7Mまで上昇し、さらに6日目の暗期の培養においては開始3時間半後まで上昇を続けた (Fig.3-1c)。

培養海水中の硝酸、リン酸濃度変化をもとにして、Fig.3-2, 3-3, 3-4にそれぞれリン添加の有無に伴うそれぞれの海藻種の硝酸取り込み速度、リン酸取り込み速度、硝酸とリン酸の取り込み量のモル比を、(a)に明条件、(b)に暗条件として示した。硝酸の取り込み速度はアナアオサが最高14.5 $\mu\text{mol/wet-g/h}$ であるのに対してウスバウミウチワは最高1.3 $\mu\text{mol/wet-g/h}$ であり、アナアオサの方が有意に高い値を示したが ($P<0.001$)、どちらの海藻種もリン添加の有無 (アナアオサ・明条件： $P=0.150$, ウミウチワ・明条件： $P=0.818$) や、明暗条件 (アナアオサ・リン添加： $P=0.650$, ウミウチワ・リン添加： $P=0.224$) による有意な差がなかった (Fig.3-2)。リン酸の取り込み速度は、アナアオサとウスバウミウチワ共に、明条件で0.1~0.3 $\mu\text{mol/wet-g/h}$, 暗条件0.05~0.2 $\mu\text{mol/wet-g/h}$ であり、どちらの海藻種におい

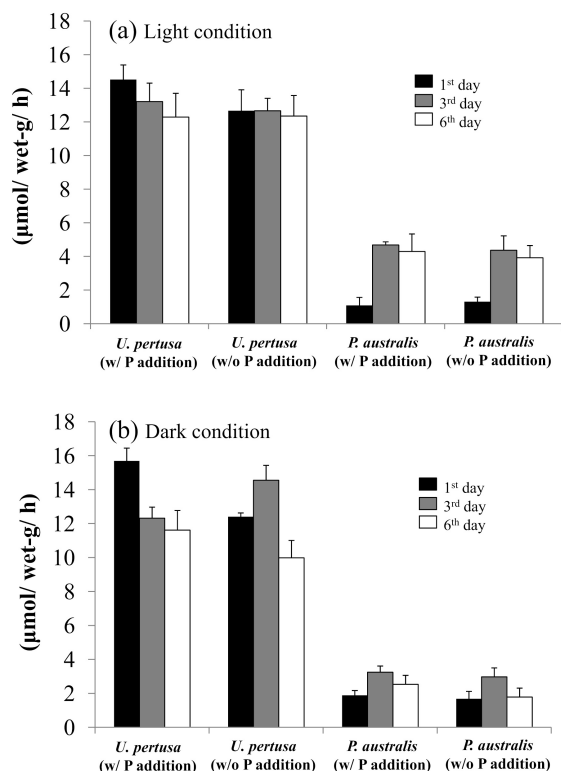


Fig. 3-2. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of nitrate uptake rates ($\mu\text{mol/wet-g/h}$) of *U. pertusa* and *P. australis* growing with and without phosphate addition during the (a) light and (b) dark condition, respectively. Nitrate uptake rate was calculated based on the decrease of nitrate during the first 30 minutes just after the incubation start time when initial nutrient concentrations are same.

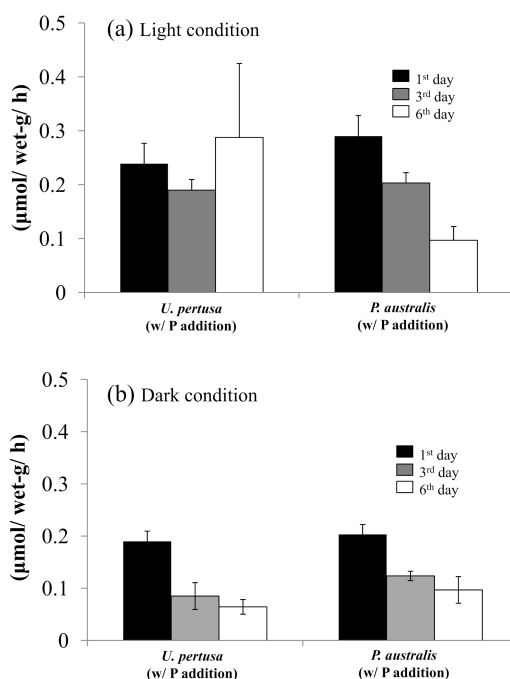


Fig. 3-3. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of phosphate uptake rates ($\mu\text{mol/wet-g/h}$) of *U. pertusa* and *P. australis* growing with nitrate and phosphate addition during the (a) light and (b) dark condition, respectively. Phosphate uptake rate was calculated based on the decrease of phosphate during the first 5 hours just after the incubation start time when initial nutrient concentrations are same. The first 30 minutes were excluded from the calculation because phosphate release was observed, probably due to some form of physiological response.

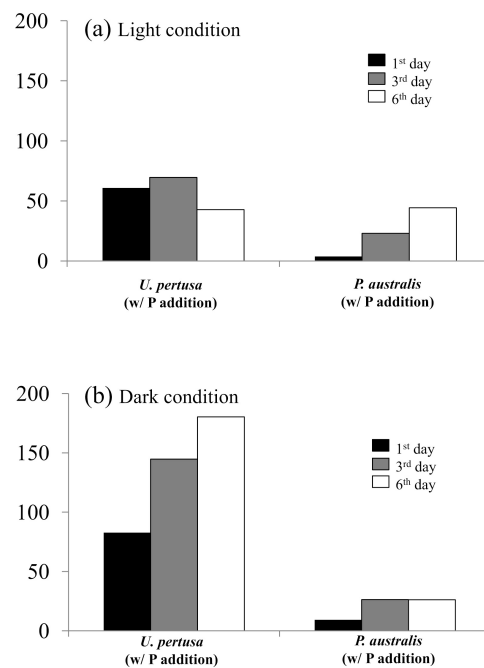


Fig. 3-4. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of the molar ratio of nitrate and phosphate uptake of *U. pertusa* and *P. australis* growing with nitrate and phosphate addition during the (a) light and (b) dark condition, respectively.

ても明条件より暗条件のリン酸取り込み速度が有意に低かった (アオサ: $P < 0.05$, ウミウチワ: $P < 0.05$) (Fig.3-3)。またこれら栄養塩の取り込み速度の結果に伴う硝酸とリン酸の取り込み量比は, アナアオサは明条件が50.9~71.0, 暗条件が90.7~170.7と暗条件の値が有意に高く ($P < 0.05$), ウ斯巴ウミウチワも明条件が1.9~4.7, 暗条件が8.9~10.0と暗条件で有意に高い値が見られた (Fig.3-4)。

リン添加の有無によるアナアオサとウ斯巴ウミウチワの PAR (光合成有効放射量) に応じた実効量子収率 $Y(II)$ の変化を Fig.3-5 に示した。初期条件 (1日目) と 6日目の $Y(II)$ の値を海藻ごとのリンの有無により比較すると, アナアオサはリンの有無によって $Y(II)$ の値に有意な差がなく (リン有り: $P = 0.492$, リン無し: $P = 0.831$, Wilcoxon検定), ウ斯巴ウミウチワはリン添加がない場合の $Y(II)$ が 6日後に初期状態よりも有意に低い値をとった (リン有り: $P = 0.022$, リン無し: $P < 0.001$, Wilcoxon検定)。また, 6日目のリン添加条件のアナアオサとウ斯巴ウミウチワの $Y(II)$ も大きな違いはなかった ($P = 0.039$, Wilcoxon検定)。

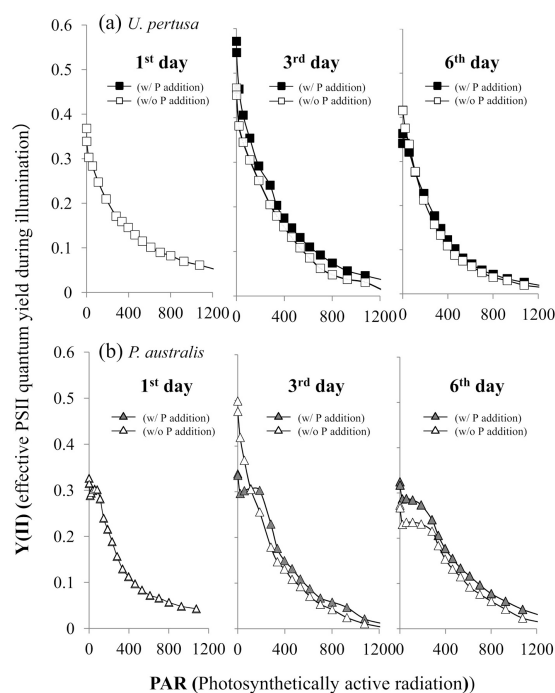


Fig. 3-5. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of the effective PSII quantum yield during illumination $Y(II)$ of (a) *U. pertusa* and (b) *P. australis* growing with and without phosphate addition, respectively.

培養実験 3. (異なる塩分条件下での栄養塩取り込み特性)

1日目の明条件におけるそれぞれの塩分条件の培養海水中の DO 濃度を比較すると, 塩分の最高値は 5 psu で 9.9 mg/L, 15psu で 12.0mg/L, 25psu で 12.0mg/L, 36psu で 11.5 mg/L であり, 他の塩分条件と比べて 5 psu 条件で低い値を取っている (Fig.4-1a)。アナアオサの培養海水中の硝酸濃度は, 1日目の明条件では, 最大でも $30 \mu\text{M}$ から $26.1 \mu\text{M}$ (36psu) までしか減少しておらず (Fig.4-1b), 高塩分の 25psu と 36psu の条件では 1日目の暗条件から徐々に

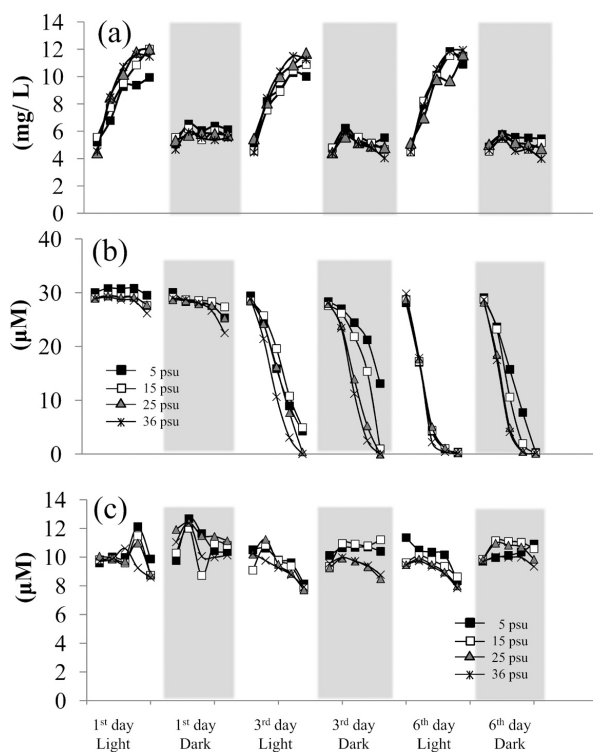


Fig. 4-1. Time series variation of (a) dissolved oxygen (DO), (b) nitrate and (c) phosphate concentrations in the culture seawater in which *U. pertusa* was incubated at different salinity conditions (5, 15, 25 and 36psu). Gray region indicate the period of dark condition.

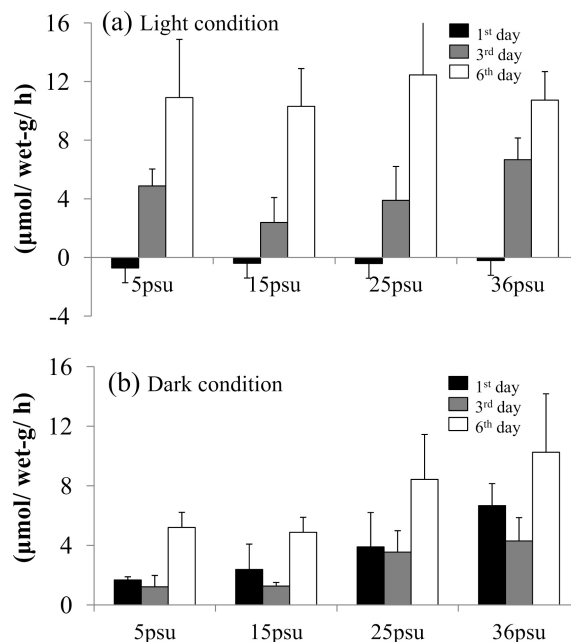


Fig. 4-2. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of nitrate uptake rate ($\mu\text{mol/wet-g/h}$) of *U. pertusa*, incubated at different salinity conditions (5, 15, 25 and 36psu) during the (a) light and (b) dark condition, respectively. Nitrate uptake rate was calculated in the same manner as explained in Fig. 3-2.

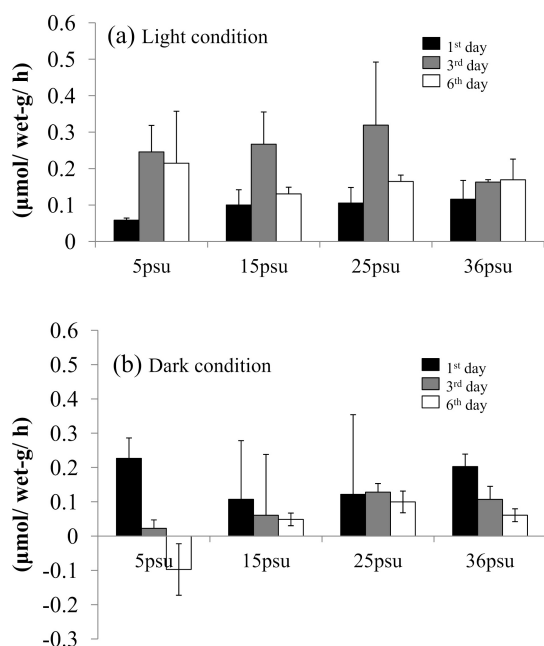


Fig. 4-3. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of phosphate uptake rate ($\mu\text{mol/wet-g/h}$) of *U. pertusa*, incubated at different salinity conditions (5, 15, 25 and 36psu) during the (a) light and (b) dark condition, respectively. Phosphate uptake rate was calculated in the same manner as explained in Fig. 3-3.

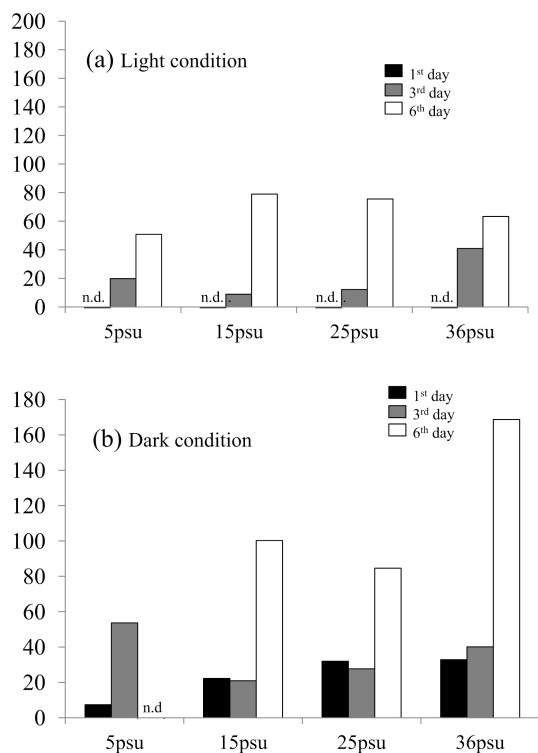


Fig. 4-4. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of the molar ratio of nitrate and phosphate uptake of *U. pertusa* incubated at different salinity conditions (5, 15, 25 and 36psu) during the (a) light and (b) dark condition, respectively. The uptake ratio was not calculated when nitrate and/or phosphate concentrations increased in the culture water.

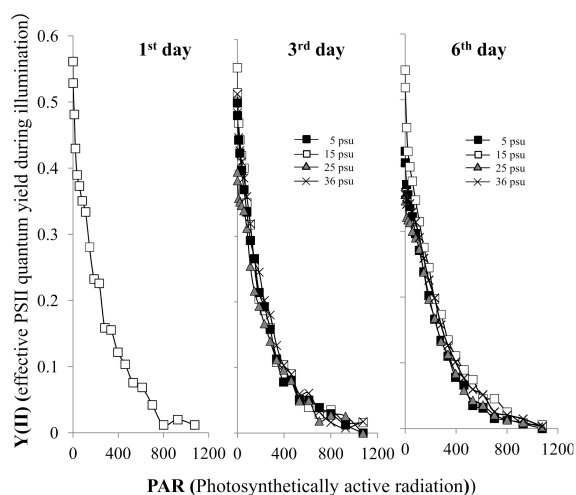


Fig. 4-5. Temporal variation (1st, 3rd, and 6th day) of the effective PSII quantum yield during illumination Y(II) of *U. pertusa* growing at different salinity conditions (5, 15, 25 and 36psu).

藻体による取り込みが見られた。高塩分の25psuと36psuの条件では、3日目の明条件の開始5時間半後において硝酸濃度が約 $0\ \mu\text{M}$ まで減少したが、低塩分の15psu条件では3日目の暗条件以降、5psu条件では6日目の明条件で、値が約 $0\ \mu\text{M}$ まで減少しており、全体的に5psu条件の硝酸取り込み量が小さいものの、低塩分条件でも徐々に順応してアオサによる硝酸取り込み量が増えてきたことが示唆された。培養海水中のリン酸濃度は、多少の増減が見られるものの、培養実験2の後半で観察されたようなリン酸濃度の急激な増加は見られなかった (Fig.4-1c)。

さらにこれらのデータを元に、Fig.4-2に硝酸の取り込み速度、Fig.4-3にリン酸の取り込み速度、Fig.4-4に硝酸とリン酸の取り込み量のモル比 (硝酸：リン酸) を、(a)に明条件、(b)に暗条件として示した。硝酸の取り込み速度は、明条件の3日目において15psu条件 ($2.4\ \mu\text{mol/wet-g/h}$) と36psu条件 ($6.7\ \mu\text{mol/wet-g/h}$) では有意な差が見られたものの ($P<0.05$)、明条件の他の条件間では有意な差は見られなかった。暗条件では、5psu条件と15psu条件の硝酸の取り込み速度が、他の塩分と比べて有意に低かった ($P<0.01$)。また、明条件、暗条件共に、どの塩分条件でも日が経過するにつれて取り込み量が増加した (Fig.4-2)。一方で、リンの取り込み速度は、ばらつきは見られたものの、塩分条件や時間の経過に伴う有意なリン酸取り込み量の違いは見られなかったが、暗条件では取り込み量は減少した (Fig.4-3)。その結果、硝酸とリン酸の取り込み量比は、硝酸とリン酸の取り込み速度の時間変化、明暗・塩分条件による違いを反映して、時間経過に伴う増加と、暗条件における増加が明瞭であった (Fig.4-4)。

塩分条件によるアナアオサのPAR (光合成有効放射量) に応じた実効量子収率Y(II)の変化をFig.4-5に示した。初期条件 (1日目) と6日目のY(II)の値の変化量を比較すると、他の条件と比べて15psuの塩分条件でY(II)が初期条件とほぼ同じ傾向がみられたが ($P=0.035$, Wilcoxon検定)、他の

塩分条件では、Y(II)の値は初期条件よりも有意に低下していた ($P < 0.001$, Wilcoxon検定)。

考 察

海藻種別の栄養塩取り込み特性

今回、培養実験1で用いた海藻と近種の海藻の最大取り込み速度 (V_{max}) と半飽和定数 (K_s : 培養液中の栄養塩濃度に比例して増加する海藻の栄養塩取り込み速度が飽和に達する時の栄養塩濃度の2分の1に相当する栄養塩濃度) の既報値をTable 1に示した。これらの報告のうち水温条件が25°C付近での K_s は、ジュズモ属であるウスイロジュズモ *Chaetomorpha linum* は57.2 μM ,¹⁵⁾ ミルは5.45 μM ,¹³⁾ イバラノリ属 *Hypnea musciformis* は4.9 μM ,¹³⁾ ホンダワラ属であるノコギリモク *Sargassum macrocarpum* は15.4 μM ,¹²⁾ アオサ属 *Ulva rigida* は17.8-33.5 μM ¹⁵⁾ であった。そのため、アオサ属であるアナアオサ、ジュズモ属であるホソジュズモ以外の海藻にとって、本研究の培養実験で用いた30 μM の硝酸態窒素濃度は飽和状態のものであると想定される。したがって、アナアオサとホソジュズモに関しては、本研究で用いた条件では取り込み速度が過小評価であった可能性もあるが、他の海藻に比べて硝酸取り込み速度が十分に高いことと、海藻間の取り込み速度の相対比較には問題はないと考えられる。

海藻は、栄養塩枯渇条件におかれた直後¹⁷⁾や、干出して短期間の乾燥状態におかれた直後¹⁸⁾に、栄養塩取り込み速度が高まることが報告されていることから、本研究で見積もられた培養開始直後の栄養塩取り込み速度 (Fig.3-2, 3-3) は、通常を取り込み量よりも過剰評価していることが想定される。いっぽうで、本研究で注目している河口域は、潮汐によって栄養塩供給量が大きく異なり、干潮時は河川から多くの栄養塩が供給されるが、満潮時には河川からの栄養塩の供給

が殆どなく低栄養塩濃度の環境になる。そのため、環境修復に利用するための海藻の栄養塩取り込み特性としては、河川からの栄養塩供給量が増加した時、いかに多くの栄養塩を取り込めるかが重要になるため、培養実験開始直後に、低栄養塩濃度から高栄養塩濃度に海藻が晒された時の瞬間的な取り込み速度について算出することは妥当である。

硝酸とリン酸の取り込み比の値が大きいこと (Fig.2c, Fig.3-4, Fig.3-5) は、窒素と共に吸収するリンが少量でも成長することができることを示唆しており、大村湾の河口域環境として特徴づけられる窒素過剰条件⁴⁾に適応できると考えられる。特にアナアオサやホソジュズモは硝酸の取り込み量も大きい (Fig.2a) ため、リンが少ない環境でも多くの硝酸を取り込むことができ、環境修復材料としての働きを十分果たすことができると推測できる。これらの結果は、アオサ科の藻類がfast-growing, opportunistic algae (早く成長する、瞬時に対応できる藻類) として報告されている¹⁹⁾ことと矛盾しない結果であった。Larned²⁰⁾においても、藻体内の全窒素:全リンの値は、ミル属である *Codium edule* が33.4, ウミウチワ属である *Padina japonica* が38.2, ホンダワラ属である *Sargassum echinocarpum* が38.2であるのに比べて、アオサ属である *Ulva fasciata* は48.3であると報告されており、アオサ属はリンの要求量が他の海藻種に比べて低いことが推測される。

カズノイバラ、ホンダワラ、ミルは、栄養塩 (硝酸とリン酸) 取り込み速度が小さい値を示した。カズノイバラやミルは、現場環境においても現存量が低いことから、栄養塩取り込み速度が遅いために成長量が遅く、分布域を広げることができていないことの一因となっていることが示唆される。一方で、大村湾で高い現存量を持つことが知られているホンダワラは、自然界では基盤に付着した状態で、かつ沿岸域の海水の攪拌が強いところに生育している。今回の培養実験では、水の流れはスターラーでの攪拌のみであり、海藻は基盤

Table 1. Maximum nitrate uptake rate (V_{max}) and half-saturation constant for substrate (K_s) of macroalgae

Alga	Temperature (°C)	NO_3^-		References
		$K_s \pm \text{SE}$ (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dry-g/h}$)	
褐藻類:				
<i>Sargassum macrocarpum</i> :ノコギリモク	25.2 - 25.3	15.4	7.5	西垣 他 (2008) ¹²⁾
<i>Sargassum patens</i> :ヤツマタモク	25.2 - 25.3	18.2	9.6	西垣 他 (2008) ¹²⁾
<i>Sargassum siliquastrum</i> :ヨレモク	25.2 - 25.3	17.4	12.6	西垣 他 (2008) ¹²⁾
紅藻類:				
<i>Hypnea musciformis</i> :カギイバラノリ	26	4.9 \pm 3.9	28.5 \pm 7.92	Hainea & Wheeler (1978) ¹³⁾
緑藻類:				
<i>Chaetomorpha linum</i> :ウスイロジュズモ	15	3 \pm 1	30 \pm 5	Pedersen & Borum (1997) ¹⁴⁾
	25	57.2	60	Lavery & McComb (1991) ¹⁵⁾
<i>Codium fragile</i> :ミル	15	5 \pm 1	9 \pm 1	Pedersen & Borum (1997) ¹⁴⁾
	18	8.81 \pm 1.80	8.99 \pm 0.91	Hanisk & Harlin (1978) ¹⁶⁾
	24	5.45 \pm 1.31	8.06 \pm 0.57	Hanisk & Harlin (1978) ¹⁶⁾
	30	10.39 \pm 0.73	6.69 \pm 0.2	Hanisk & Harlin (1978) ¹⁶⁾
<i>Ulva lactuca</i> :オオバアオサ	15	5 \pm 2	17 \pm 2	Pedersen & Borum (1997) ¹⁴⁾
<i>Ulva onoi</i> :ミナミアオサ	20	428.4 - 1356.5	520	鈴木 他 (2004) ³⁾
<i>Ulva rigida</i> :アオサリカ	25	17.8 - 33.5	58.5 - 85.2	Lavery & McComb (1991) ¹⁵⁾

から切り離し、容器内で浮遊させた状態で培養を行った。大型藻類の培養は難しい²¹⁾とされており、ホンダワラの培養を行った遠藤ら²²⁾の研究では、濾過海水をかけ流す方法（換水率が1回転/時間）で培養を行っており、基盤についた個体を新鮮な海水で培養を行わなければ正常な生理活性を示さないことも推測される。また、サンゴ礁海域においても、亜熱帯性ホンダワラは、波当たりの強い礁嶺付近に大きな群集を形成している。²³⁾ 強い流れがある環境では、乱流によって海藻群集の内部でも藻体表面の境界層（Velocity Boundary Layer）が薄くなり、低栄養塩濃度の海水であっても藻体内へのフラックスを大きくすることができる^{24), 25)}が、本実験のような流速が低い環境では、そのような自然条件の環境を再現できなかったことも考えられる。

本研究では、最終的に海藻を河川河口域に設置して栄養塩吸収材として利用するにあたり、海藻の湿重量当たりの窒素取り込み量を把握しておくことが望ましいため、培養実験1では、海藻の単位湿重量当たりとして硝酸取り込み速度を求めている。一方で、海藻は水と接する面から栄養塩を取り込んでいることや、海藻の湿重量には、光合成に関与しない器官（石灰沈着物など）も含まれているため、環境条件に応じた栄養塩吸収能力を海藻種ごとに比較する場合には、海藻の単位表面積当たりの取り込み速度で比較することも理にかなっているといえる。ただし、ホソジュズモヤカズノイバラなどの繊維状の海藻と、アナアオサやウスバウミウチワなどの葉状の海藻とでは単位重量当たりの表面積が異なると考えられるが、後者の方が単位重量当たりの表面積が小さいので、単位表面積当たりで標準化して比較した場合においても、アナアオサの窒素吸収能力が他の藻類に比べて大きいという評価は変わらない（さらに大きくなる）。

リン枯渇条件下での光合成活性と栄養塩取り込み特性

暗条件では海藻間の単位重量当たりのDOの濃度変化に有意な差が見られないことから、アナアオサとウスバウミウチワの呼吸量に大きな差はないことが想定される（Fig.3-1a）。そのため、明条件でウスバウミウチワよりもアナアオサの単位重量当たりのDOの濃度変化量が大きいことは、呼吸量を差し引いた光合成量に違いがあると示唆できる。光合成量の違いにも関わらず、実効量子収率Y(II)の値には有意な差が見られなかった（Fig.3-5）理由として、海藻間で吸光度が異なるため、電子伝達速度ETR（=Y(II)×PAR×吸収係数×0.5）の値に差が生じ、酸素生成量の違いにつながったのであろう。この吸光度の値がウスバウミウチワの方がアナアオサよりも低い可能性として、ウスバウミウチワの藻体の表面には石灰藻が付着しており、また孢子嚢なども見られることから、同じ光量でも吸収しにくくなっていることが挙げられる。

アナアオサとウスバウミウチワの双方ともに、硝酸取り込み速度に関してリン添加の影響が見られなかった仮説として、アナアオサは硝酸を液胞に貯め込むことが知られているが、リン成分も同様に液胞に貯め込んでおり、リン枯渇時にも適応できることが想定される。またリン過剰時にリン酸を

リン脂質として藻体内に蓄えておき、リン枯渇時にはこのリン脂質のリンを核酸などのリンとして転用していることも考えられる。これまで、植物プランクトンについてはリンの代替物質がある²⁶⁾ことや、藍藻が栄養飢餓時にフィコピリンを窒素の供給源にする^{27), 28)}ことが報告されており、さらに紅藻のスサビノリ *Porphyra yezoensis* についても窒素律速やリン律速時にフィコピリソームを縮小させて適応することも知られている²⁹⁾ため、藻類間の窒素・リンの取り込み量の違いには、このような生理特性の違いが影響を与えている可能性もある。

アナアオサとウスバウミウチワのどちらの藻類でも、光合成が行われない暗期においても硝酸を取り込む能力があったこと（Fig.3-2）は、昼夜を問わず陸域から流れ込んでくる栄養塩を取り込むことができると示唆される。植物プランクトンの場合、溶存無機炭素（DIC）は光合成と連動して昼間取り込むが、栄養塩は夜間に取り込みが行われている報告がある。³⁰⁾ また珪藻に関しては夜間に硝酸を大量に取り込むが、円石藻は夜間に取り込むことがない³¹⁾ことも報告されている。本実験で用いた大型藻類の場合、このような日周期性は見られず、細胞内外の栄養塩の濃度勾配に応じた受動的な取り込みがあることが想定された。また、硝酸の取り込み速度においてどちらの海藻種でもリンの有無に関して有意な差が見られなかったが（Fig. 3-3）、ウスバウミウチワのY(II)の値は、リン律速条件において有意に低い値を示していた（Fig.3-5）。光合成を行うことによって作ったエネルギーを用いて栄養塩を取り込んでいると考えられているため、さらに長い間リン律速条件に晒された場合には、アナアオサに比べてウスバウミウチワの栄養塩の取り込み速度が更に減少することが想定される。

海藻は干潮時などの滞留時に自らが分泌した化学成分などが潮汐の変化によって消失するというような海水中の化学成分変化によって時期を感じとっており、特に潮汐差の大きい大潮時に海藻の周りの海水が一気に交換されることを利用して、この時に成熟を始めて遊走子や配偶子を放出することが知られている（桑野和可 私信）。培養海水を交換する作業はこの潮汐による藻体周辺の海水の変化と同じことが起きていると海藻が感じとり、培養開始後2～3日後に成熟するという事例が報告されているほか、藻体片が小さいほど成熟しやすい³²⁾との報告もある。また平岡³³⁾は、1970年代ノルウェーのNordbyらがアオサ藻体には成熟抑制物質が含まれており、この成熟抑制物質が引き金となり成熟が誘導されると考えた、と述べており、この成熟抑制物質には少なくとも2種類ある³³⁾ことも報告されている。今回の実験において、アナアオサの藻体が一部白くなったことや培養海水が薄緑に変色したことから、培養海水の交換直後のアナアオサで見られた海水中のリン酸濃度の急上昇（Fig. 3-1c）は成熟に関係しているかもしれない。つまり、海藻は遊走子や配偶子を放出孔から放出させるが、その際、貯めていたリンも一緒に放出してしまった可能性が推測できる（桑野和可 私信）。海藻が液胞内に窒素を貯めることは知られているが、リンを貯めることはあまり研究が行われておらず、この現象により、液

胞内にリンも貯める能力を持っている可能性が高いと考えられるが、今後、詳しく調べていく必要がある。

異なる塩分条件下での光合成活性と栄養塩取り込み特性

DO値の変動から、1日目の5 psu条件では、他の塩分条件と比べて光合成に伴う生産量が低いことが示唆される (Fig.4-1a)。また、アオサ属の栄養塩の取り込みや成長率は20psuの時に最大であるとの報告^{34), 35)}があり、窒素が十分に供給されている環境では、低塩分においても耐性がある³⁶⁾ことが報告されている。栄養塩取り込み速度にはあまり表れていなかったが、15psuで最大の光合成活性を示した本実験の結果と矛盾しない。また5 psu条件において光合成活性が低かったことは、DOの変化 (Fig.4-1a) や暗条件においての栄養塩取り込み速度 (Fig.4-2, 4-3) でも値が低かったことと矛盾しておらず、この結果は他の研究においても示されている³⁴⁾ことから、5 psu程度の低塩分条件には適応できない可能性があると推測される。しかし、アナアオサは海水よりも低塩分である15psu条件も光合成を行っており (Fig.4-1, Fig.4-5)、硝酸取り込み速度も時間経過と共に増加している (Fig. 4-2) ことから、塩分が少し低くても栄養塩があれば環境に順応して光合成を行い、成長することができることが示された。このようなアオサの広塩性の特性は、河川水や下水中に含まれる多量な栄養塩を吸収して、海域への負荷を抑えるために用いる生物材料として、アナアオサが適している種であることを示していた。

1日目の培養において、アナアオサが硝酸の取り込みを行っておらず、3日目になると培養実験2と同様に取り込み始めている (Fig.4-1b) ことは、生育環境が急激に変わったことに伴い海藻が成長を止めていたことが想定される。また、栄養塩が枯渇した状態から栄養塩が豊富な環境に変化すると栄養塩を一気に取り込む¹⁷⁾ことが報告されていることから、順応培養中は栄養塩が枯渇した状態にならなかったが、1日目の明条件から1日目の暗条件にかけて、または1日目の暗条件から3日目の明条件の間に栄養塩が枯渇した状態になっていたと仮定すると、3日目以降、急激に栄養塩を取り込むようになった事象を説明できるかもしれない。

まとめ

大村湾に出現する代表的な海藻のうち今回使用した海藻種の中では、硝酸の取り込み速度が大きく、リン枯渇 (窒素の供給過剰) 状態や、光合成のできない夜間、また15psu程度の低塩分条件でも速やかに順応し、硝酸を取り込んで成長を続けることができるアナアオサが最も環境修復材料として適している可能性が高いことがわかった。このアオサは沿岸域において大繁殖する被害^{32), 37)}が報告されており、アオサの利用法についての多くの研究^{32), 38)-40)}が行われてきている。本研究の成果は、アオサの大繁殖の原因の解明に繋がるほか、実用化として河口域でアオサをカゴなどに入れて管理培養し、成長したアオサを回収して試料やバイオエタノール、メタンガスなどに利用することも想定される。

これまで大型藻類の栄養塩の取り込みに関しての研究は多く行われてきたが、本研究では栄養塩の取り込み速度と並行してPAMを用いた光合成能力の測定を行うことによって、取り込み速度に反映されるまでタイムラグがある光合成機能の変調も明らかにすることができたため、環境の変動が藻類の中長期的な生育に与える影響の予測も可能となった。

要旨

陸域からの海域への栄養塩供給量を抑制することは、内湾での過剰な植物プランクトンの生産を抑え、底層の貧酸素水塊の形成を緩和する一つの方策であると考えられる。本研究では、内湾の様々な自然環境条件下における海藻の窒素取り込み能力を明らかにし、窒素：リン比が高い河口域において、陸起源の窒素を効率的に吸収する海藻を探すことを目的として実験を行った。大村湾に多く生育する6種の海藻種を同条件で培養したところ、窒素・リンの除去能力の高かった海藻はアナアオサ、ホソジュズモであった。このうち、大村湾で長期間、広範囲で確認されるアナアオサは、リン枯渇条件や夜間、15psuもの低塩分条件でも、速やかに順応し、他の条件と同様の高い窒素除去能力と光合成能力を示した。アナアオサは環境被害をもたらすことでも知られるが、陸域からの窒素・リンの負荷を緩和する環境修復機能として利用する場合でも、適した生物であることが示された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、長崎大学環東シナ海洋資源研究センターのGregory N. Nishihara准教授には、imaging-PAMの使い方の基礎をはじめ、データの解釈に多くの助言をいただきました。長崎大学環境科学部の飯間雅文准教授、長崎大学水産学部の桑野和可准教授には、海藻の生理・生態に関する助言をいただきました。物質循環研究室の塩川麻保氏、山口聖氏、牟田直樹氏には、分析についての指導、多くの助言や協力を頂き、大変お世話になりました。本研究は、科学研究費補助金 (22248022) の助成を受けて行われました。

文献

1. 香月幸一郎, 本多邦隆, 松尾征吾: 水環境学会誌, **20**, 616-621 (1997).
2. 荒川清美, 須山晃延, 市原昭, 田中俊博: エバラ時報, **28**, 21-24 (2005).
3. 小倉紀雄 (2005): 大気・水圏の地球科学, 河村公隆, 野崎義行(編), 陸水の地球科学, 156-175頁, 東京, 培風館.
4. 牟田直樹: 過去及び現在の大村湾における栄養塩負荷量の変遷, 長崎大学大学院 水産・環境科学総合研究科 修士論文 (2013).
5. 鈴木祥広, 亀谷卓司, 丸山俊朗: 水環境学会誌, **27**, 817-824 (2004).

6. Y.H. Kang, J.A. Shin, M.S. Kim, and I.K. Chung : *J. Applied Phycol.*, **20**,183-190 (2008).
7. T. Chopin, M. Troell, G.L. Reid, D. Knowler, S.M.C. Robinson, A. Neori, A.H. Buschmann, and S. Pang : *The Global Aquaculture Advocate*, **13**, 17-20 (2010)
8. H.P. Hansen and F. Koroleff (1999) : Determination of nutrients, pp. 159-228, In K. Grasshoff, K. Kremling, and E. Ehrhardt (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Weinheim, WILEY-VCH
9. C.A.S. Hall, and R. Moll (1975) : Methods of assessing aquatic primary productivity. pp. 384-394, In H. Lieth and R.H. Whittaker (eds), *Primary Productivity of the Biosphere*, Berlin Heidelberg, Springer.
10. 園池公毅 : 日本光合成研究会会報, **42**, 19-53 (2005).
11. 園池公毅 : 低温科学, **67**, 507-524 (2009).
12. 西垣友和, 八谷光介, 和田洋藏 : 京都府立海洋センター研究報告, **30**, 21-26 (2008).
13. K.C. Haines, and P.A. Wheeler : *J. Phycol.*, **14**, 319-324 (1978).
14. M.F. Pedersen, and J. Borum : *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **161**, 155-163 (1997).
15. P.S. Lavery, and A.J. McComb : *Botanica Marina*, **34**, 251-260 (1991).
16. M.D. Hanisak, and M.M. Harlin : *J. Phycol.*, **14**, 450-454 (1978).
17. R.M. Fujita : *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **92**, 283-301 (1985).
18. T.E., Thomas, D.H. Turpin, and P.J. Harrison : *Mar. Biol.* **94**, 293-298 (1987).
19. G.Greetz-Hansen, and K.Sand-Jensen : *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **81**, 179-183 (1992).
20. S.T. Larned : *Mar. Biol.*, **132**, 409-421(1998).
21. 村上明男, 小檜山篤志 : 低温科学, **67**, 53-59 (2009)
22. 遠藤光, 山本圭吾, 西垣友和, 竹野功璽 : 京都府農林水産技術センター海洋センター研究報告, **32**, 29-32 (2010).
23. Y. Umezawa, T. Miyajima, M. Yamamuro, H. Kayanne, and I. Koike : *Limnol. Oceanogr.*, **47**,1405-1416 (2002).
24. S.T. Larned, V.I. Nikora, and B.J.F. Biggs : *Limnol. Oceanogr.*, **49**, 1992-2000 (2004).
25. G.N. Nishihara and R. Terada : *Phycological Research*, **58**, 29-34 (2010).
26. B.A.S. Van Mooy., H.F. Fredricks, B.E. Pedler, S.T. Dyhrman, D.M. Karl, M. Koblizek, M.W. Lomas, T.J. Mincer, L.R. Moore, T. Moutin, M.S. Rappe, and E.A. Webb : *Nature*, **458**, 69-72 (2009).
27. M.M. Allen and F. Hutchison : *Archives of Microbiol.*, **128**, 1-7(1980).
28. A.R. Grossman, M.R. Schaefer, G.G. Chiang, and J.L. Collier : *Journal of Bacteriology*, **175**, 575-582 (1993).
29. 植木知佳, 村上明男, 加藤敏朗, 嵯峨直恆, 本村泰三 : 日本水産学会誌, **76**, 375-382 (2010).
30. R.G. Stross and S.M. Pemrick : *J. Phycol.*, **10**, 164-169 (1974).
31. J.A. Needoba and P.J. Harrison : *J. Phycol.*, **40**, 505-516 (2004).
32. 平岡雅規 (1999) : 種と生育の特徴 (成熟と繁殖), 能登谷正浩(編), アオサの利用と環境修復, 25-32頁, 東京, 成山堂書店.
33. J. Stratmann, G. Poputsoglu, and W. Oertel : *J. Phycol.*, **32**, 1009-1021 (1996).
34. T.S. Choi, E.J. Kang, J. Kim, and K.Y. Kim : *Algae*, **25**, 17-26. (2009).
35. J. Lartigue, A. Neill, B.L. Hayden, J. Pulfer, and J. Cebrian : *Aquatic Botany*, **75**, 339-350 (2003).
36. P. Fong, K.E. Boyer, J.S. Desmond, and J.B. Zedler : *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **206**, 203-221 (1996).
37. 三河湾環境チャレンジ実行委員会 (2006) : アオサ活用に関する調査報告書,蒲郡市「愛・地球博地域連携プロジェクト事業」 (<http://www.city.gamagori.aichi.jp/kikaku/kikaku/kankyocharenji/shimpo03.html>).
38. 武田甲, 藤原俊六郎, 竹本稔 : 神奈川県農業総合研究所研究報告, **139**, 21-29 (1998).
39. 大塚耕司 : 大阪府立大学大学院工学研究科 海洋システム工学分野 テクノラボター (2006).
40. 西川智貴, 武田尚大, 矢持進 : 土木学会論文集(海岸工学), **B2-65**, 1221-1225 (2009).