

【研究報告】

# クビレズタの無機態窒素およびリン酸吸収特性 (海ブドウの安定生産技術開発事業)

北 朋紘\*

## Nitrogen and phosphoric acid uptake characteristics of *Caulerpa lentillifera*

Tomohiro Kita\*

三態窒素およびリン酸を単独または混合添加した水槽内にクビレズタを収容し、クビレズタの栄養塩吸収特性を明らかにした。クビレズタを収容した水槽内の栄養塩濃度は、時間経過とともに減少したことから、クビレズタは三態窒素およびリン酸の吸収能力を持つことが明らかとなった。特にアンモニア態窒素の吸収活性が高く、窒素源としてアンモニア態窒素が重要であることが示唆された。また、栄養塩を単独で添加した場合と混合で添加した場合では、すべての栄養塩で吸収量や吸収速度の推移に変化がみられ、各栄養塩の吸収特性は他の栄養塩の有無に影響を受けると考えられた。

クビレズタ *Caulerpa lentillifera* (通称 海ブドウ) は、熱帯から亜熱帯の海域に分布する食用海藻である。現在、本県の養殖品目のうち、生産量と産出額ともに第3位であり(沖縄県農林水産部, 2021)、沖縄県の重要な養殖対象種である。

クビレズタ養殖は、遮光ネットによる光量の調整とエアレーションをした水槽内に、2枚の網で挟みこんだ藻体を水面直下で固定する方法が一般的である。また、クビレズタの生長には施肥が必要であり、養殖現場で主に魚類用餌料を養殖水槽内に散布している。しかし、クビレズタの生長に必要な栄養塩の種類や量は明らかになっておらず、クビレズタ養殖の生産性向上を目指す上でクビレズタの栄養塩要求を明らかにする必要がある。また、現在用いられている魚類用餌料のような固形餌料の施肥は水質を悪化させ、細菌類や雑虫の増加を招く恐れがある。クビレズタは生食での消費が主体であることを考慮すると、細菌による食中毒や雑虫混入はアレルギーの発生につながりかねない。実際、クビレズタが原因と考えられる食中毒が数件発生している(幸喜ほか, 2004; 笠原ほか, 2006)。以上のことから、クビレズタに適した魚類用餌料に代わる肥料の開発が必要であるが、餌料開発に必要なクビレズタの栄養塩吸収に関する知見は、 $\text{NO}_3^-$ -Nと $\text{PO}_4^{3-}$ -P (Guo *et al.*, 2015)、 $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -Nおよび $\text{PO}_4^{3-}$  (Liu *et al.*, 2016)の吸収特性に限られ、三態窒素およびリン酸を複合的に評価した研究はない。そこで本研究では、クビレズタの三態窒素およびリン酸の吸収特性を明らかにし、クビレズタ専用餌料の開発に資する知見を提供することを目的とした。

### 材料及び方法

クビレズタ 100 g を 27 cm × 14 cm のトリカルネット(網目の大きさ 7.5 mm × 7.5 mm) に挟み込んだものを4つ作成した。これらを2022年3月1日から3月14日の14日間、1 t 水槽内で培養し、栄養塩吸収試験に供した。培養期間中は、マダイ用餌料 60 g を週3回施肥した。

人工海水 36 L 中にアンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+$ -N)、亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-$ -N)、硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-$ -N)、リン酸 ( $\text{PO}_4^{3-}$ -P) をそれぞれ 500  $\mu\text{M}$  になるように単独または混合で添加し、プラスチック製実験水槽 4 槽に 8 L ずつ注いだ。各栄養塩濃度は、硫酸二アンモニウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、リン酸二水素カリウムで調製した。その後、栄養塩を添加した海水で藻体を共洗いし、室温 20 °C、照度 10,000 lux 下の実験水槽に収容した。試験は、栄養塩単独添加で6時間、混合添加で7時間行い、15分間隔で10 ml 採水した。採水した海水は、オートアナライザー (QuAAtro, ビーエルテック株式会社) で栄養塩を定量した。試験終了後、藻体の水気をよく拭き取り、藻体重量を計量し、採水間隔ごとのクビレズタ 1 g 当たりの栄養塩吸収速度 ( $\mu\text{M/g/h}$ ) を算出した。さらに、水槽中の栄養塩濃度 (S) に対する栄養塩吸収速度を Michaelis-Menten 式 (反応速度  $v = V_{\text{max}} \cdot S / (K_m + S)$ ) に当てはめ、 $V_{\text{max}}$  (最大吸収速度) および  $K_m$  (ミカエリス定数: 最大吸収速度の半分の吸収速度となる栄養塩濃度) を推定した。Michaelis-Menten 式の各パラメーターは、R ver.3.5.3 (R Core Development Team) の drc パッケージ

\*E-mail : kitatomo@pref.okinawa.lg.jp 本所

により推定した。

## 結果

### (1) 栄養塩濃度と栄養塩吸収速度の経時変化

水槽中の栄養塩濃度は、単独、混合添加ともに、すべての栄養塩で時間経過に伴って減少し、クビレズタが三態窒素およびリン酸態リンを吸収していることが示された (図 1)。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の平均吸収速度は、単独、混合添加ともに最も速く、時間経過とともに減少した。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の平均吸収速度は、単独添加では時間の経過とともに減少したが、栄養塩混合添加では一定の値で推移した。ただし、試薬の調製ミスにより、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の単独添加試験では添加量は 200 μM であった。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の平均吸収速度は、単独添加では一定の値で推移したが、栄養塩混合添加では NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の吸収速度減少後、徐々に増加し、試験開始 3 時間後をピークに減少した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の平均吸収速度は、他の栄養塩よりも低い値で推移した。一方、栄養塩混合添加では試験開始 4 時間後まで一定の値で推移したが、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の吸収速度減少後、増加した。

### (2) 栄養塩濃度と栄養塩吸収速度の関係

水槽中の栄養塩濃度とクビレズタによる栄養塩吸収速度の関係は、単独、混合添加の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N と単独添加の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P のみ Michaelis-Menten 式に当てはまった (図 2)。推定された Michaelis-Menten 式の各パラメーターを表 1 に示す。栄養塩混合添加時における NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N のミカエリス定数および最大吸収速度は、それぞれ栄養塩単独添加の 3.6 倍および 1.8 倍の値を示した。

Michaelis-Menten 式に当てはまらなかった栄養塩の濃度と吸収速度の関係をみると、単独添加の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の栄養塩吸収速度は、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N で 0.00–0.22 μM/g/h、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N で 0.00–0.15 μM/g/h を示し、特徴的な傾向はみられなかった (図 2)。ただし、単独添加では、クビレズタによる NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の吸収量が少なく、濃度がほとんど減少しなかったため 400–500 μM 前後の結果しか得られなかった。一方、栄養塩混合添加時は、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の濃度と吸収速度の関係が変化した。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N では、濃度 100 μM 前後で吸収速度 0.4 μM/g/h 程度で頭打ちになり、濃度 300 μM を超えると吸収速度は徐々に減少した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N では、濃度 100 μM で吸収速度 0.4 μM/g/h を示し、濃度の増加とともに吸収速度は直線的に減少した。混合添加の PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P は、濃度の変化に伴う吸収速度の変化はみられず、吸収速度は 0.1 μM/g/h 前後であった。

## 考察

本研究の結果からクビレズタは三態窒素およびリン酸を吸収していることが明らかとなった。特に、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の吸収速度が高いことから、クビレズタは NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の要求量が最も多く、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N が重要な栄養塩と考えられた。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の濃度と吸収速度の関係をみると、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の V<sub>max</sub> と K<sub>m</sub>

は、単独添加時より栄養塩混合添加時で高かった。このことから、栄養塩の混合添加は、クビレズタの NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の吸収を促進する可能性が示唆された。しかし、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の比率を変え、同時添加した実験では、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N より NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の吸収活性が高いことを報告している (Liu *et al.*, 2016)。本研究では、施肥水槽で培養したクビレズタを試験に使用したのに対し、Liu *et al.* (2016) では無窒素水槽内で 7 日間馴致したクビレズタを試験に使用している。このことから、クビレズタの栄養塩吸収特性は、馴致条件によって変化することが示唆される。

クビレズタによる PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の吸収は先行研究でも報告されており (Guo *et al.*, 2015)、本研究の結果と一致した。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の欠乏は ATP と NADPH を還元し、光合成能力を低下させることが知られていることから (Rao *et al.*, 1989; Freden *et al.*, 1990)、クビレズタ養殖において PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P は必須の栄養塩であると考えられる。本研究では、クビレズタによる PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の吸収特性が単独添加と栄養塩混合添加で変化したことから、リンの吸収量は三態窒素の影響を受けると考えられた。実際、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P の最適濃度は、N/P 比で表される (Guo *et al.*, 2015)。また、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> の最適濃度は、環境によって異なることが示唆されているため (Guo *et al.*, 2015)、今後、沖縄県の環境条件に合った N/P 比を明らかにする必要がある。

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N と NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の吸収速度の経時変化は、単独添加では一定であったが、栄養塩混合添加時では他の栄養塩吸収速度の変化に関連した推移がみられた。加えて、栄養塩混合添加により、栄養塩濃度と栄養塩吸収速度の関係にも変化がみられた。すなわち、クビレズタの NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の吸収は、他の栄養塩の影響を受けると考えられる。栄養塩混合添加時の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N は、濃度が 300 μM 以上で吸収速度が減少する傾向があった。水槽中に NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N が 300 μM 以上存在しているのは、試験開始から 2 時間弱までであり、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N が水槽内に残存していた時間と一致する。つまり、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N が同時に存在する場合、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N が優先的に吸収されると考えられる。ただし、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N をすべて吸収した後は、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の吸収速度が増加し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 単独より吸収量が多くなったことから、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N の吸収が NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の吸収を促進する可能性がある。また、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 濃度が 300 μM 未満時の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 吸収速度は、0.4–0.5 μM で頭打ちになることから、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 吸収後の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 吸収速度は Michaelis-Menten のモデルに従う可能性がある。対して、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N も NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 残存下では一定の吸収速度を示し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 濃度が低下した後、吸収速度が上昇し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 単独より吸収量が多くなった。これらのことから、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N は三態窒素のなかで最も劣後的に吸収され、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N もしくは NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の吸収が NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N の吸収を促進すると考えられた。また、栄養塩混合添加時の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 濃度と吸収速度の関係をみると、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N や NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N の有無にかかわらず、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 濃度の低下とともに吸収速度が上昇したため、クビレズタの NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 吸収活性は低濃度ほど高くなること

が推察された。

本研究によりクビレズタの栄養塩の吸収特性が明らかとなった。しかし、クビレズタ養殖において各栄養塩の最適濃度や各栄養塩の生長への影響は未だ不明である。高濃度の  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  と  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  下では光合成が阻害される (Guo *et al.*, 2015) ことを考慮すると、今後、栄養塩濃度を制御した環境下で長期的に飼育し、各栄養塩がクビレズタの生長や形態にどのように作用するか明らかにする必要がある。また、本研究では窒素とリンに着目し試験を実施したが、その他の栄養塩 (e.g. カリウム, 硫黄など) の吸収についても検討が必要である。

文献

Freden A. L., Raab T. K., Rao I. M., 1990: Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glycine max* (L.) Merr.. *Planta*, 181 (3), 399–405.  
 Guo H., Yao J., Sun Z., Duan D., 2015: Effects of salinity and nutrients on the growth and chlorophyll fluorescence of *Caulerpa lentillifera*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33, 410–418.

笠原文子, 伊元信治, 櫻井秀樹, 吉田崇, 盛島明隆, 金城康政, 2006: 腸炎ビブリオ菌を原因とした食中毒事例について. 第 37 回沖縄県衛生監視員研究発表会抄録, 3–4.

幸喜得真, 宮平誠人, 大野明美, 小渡静男, 2004: 海ぶどうが原因と推定される有症苦情事例. 第 35 回沖縄県衛生監視員研究発表会抄録, 3–4.

Liu H., Wang F., Wang Q., Dong S., Tian X., 2016: A comparative study of the nutrient uptake and growth capacities of seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Gracilaria lichenoides*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3083–3089.

沖縄県農林水産部農林水産総務課, 2021: 沖縄の農林水産業. 沖縄, 令和 3 年 3 月, 55 pp.

Rao I. M., Arulanantham A. R., Terry N., 1989: Leaf phosphate status, photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet: II. Diurnal Changes in Sugar Phosphates, Adenylates, and Nicotinamide Nucleotides. *Plant Physiology*, 90 (3), 820–826.

表 1 栄養塩吸収モデル (Michaelis-Menten) の各パラメーター

方法	栄養塩	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{M/g/h}$ )
単独添加	$\text{NH}_4^+$	150.07	2.22
	$\text{PO}_4^{3-}$	44.22	0.36
混合添加	$\text{NH}_4^+$	540.63	3.90

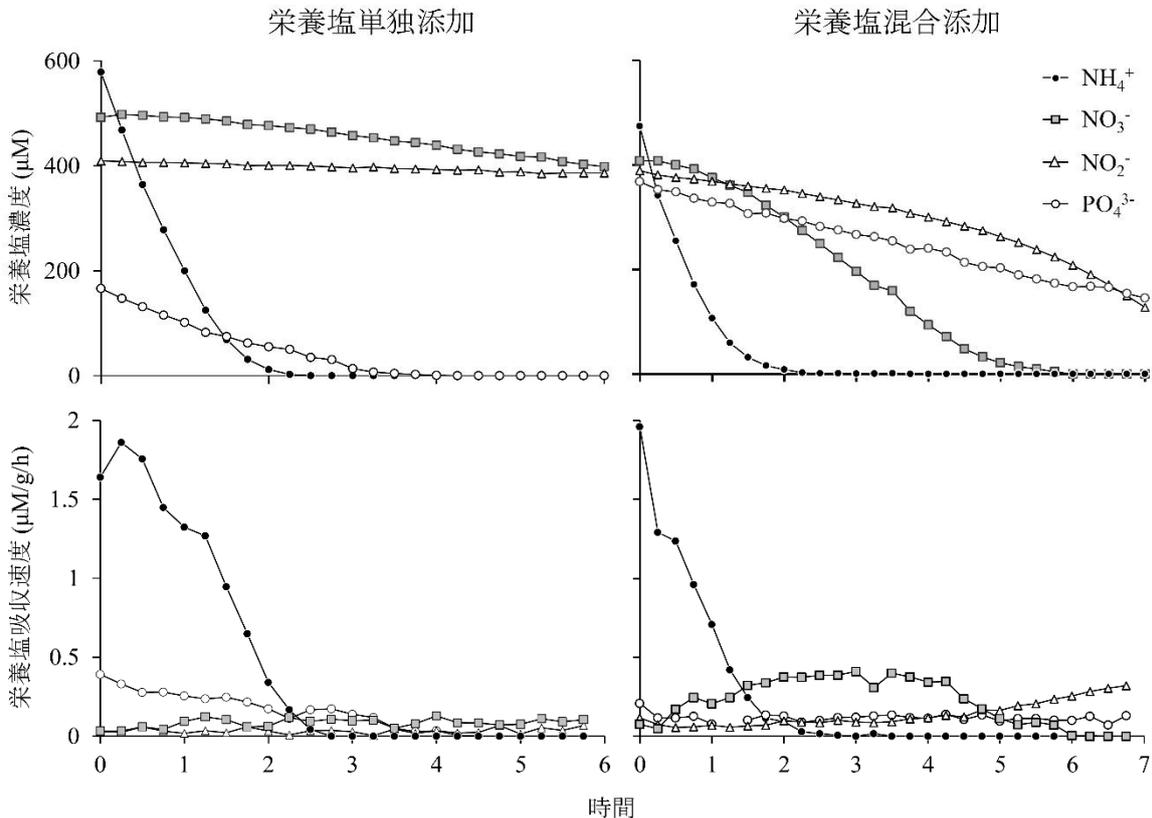


図 1 栄養塩濃度と栄養塩吸収速度の平均値の経時変化

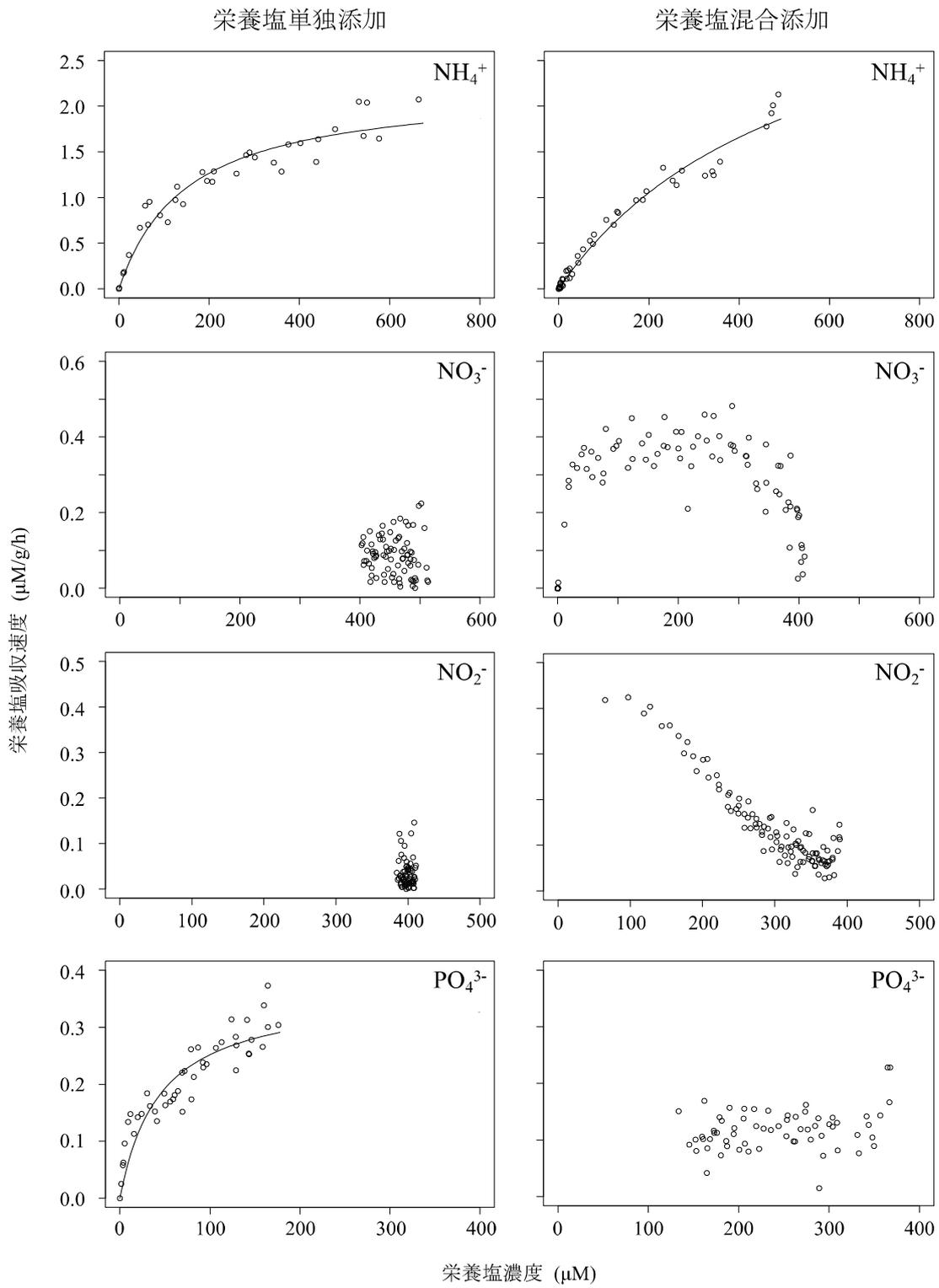


図2 試験水槽中の栄養塩濃度に対する栄養塩吸収速度。クビレズタがMichaelis-Menten式に従い吸収した栄養塩には、式(曲線)を示す。