

D-4 サンゴ礁生態系の維持機構の解明とその保全に関する研究

(1) 飼育系による環境ストレスがサンゴに及ぼす影響の解明

① 共生褐虫藻の生育に及ぼす影響

研究代表者 養殖研究所環境管理部 坂見知子

水産庁 養殖研究所 環境管理部 環境動態研究室 坂見知子

平成6-8年度合計予算額 6,100千円

(平成8年度予算額 2,209千円)

要旨

サンゴ共生藻の単離培養株を用いて、水温、光強度、塩分、無機栄養塩濃度の変化が共生藻の増殖や光合成活性等に与える影響を調べた。その結果、温度については、増殖速度は32℃で最大であったが、光合成活性は28～32℃でも阻害的な影響を受け始めた。その際の細胞当りのクロロフィルaの含有量や、細胞径は増加する傾向があった。光強度低下の影響は、3～6 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で顕著に見られた。塩分については、温度や光の条件が適当であれば、20psu程度まで増殖速度や光合成活性の顕著な低下は見られなかったが、温度や光の条件が悪くなると、25psu程度の塩分で藻の活性は阻害された。

低濃度の無機窒素塩を含む海水中で共生藻を培養すると、2 $\mu\text{M}/\text{day}$ のアンモニウム塩の添加で増殖速度は1.5倍になり、細胞当たりのクロロフィルa量は1.3倍に増加した。アンモニウム塩添加量を増やすと、細胞当たりのクロロフィルa量は増加するが、細胞当たりの光合成量はアンモニウム塩を5 $\mu\text{M}/\text{day}$ 以上にしても余り変わらず、光合成活性は20 $\mu\text{M}/\text{day}$ ではむしろ低下した。さらに、アンモニウム塩を単独で添加した場合には共生藻内のクロロフィルa量は増加しても光合成活性は5 $\mu\text{M}/\text{day}$ 以上で低下し、その原因はビタミンや金属のような微量栄養素の枯渇によるものであることが示唆された。

キーワード サンゴ、共生藻、環境ストレス、富栄養化

序

熱帯、亜熱帯海域に存在するサンゴ礁は、貧栄養な熱帯海域の中で特異な高い生産性を持ち多様な種を維持している貴重な生態系である。また二酸化炭素ガスを系内に固定する機能を持ち地球規模の気候変動にも関わっていると考えられている。しかし、近年エルニーニョによる海水温度の上昇や、沿岸海域の汚染、富栄養化等によって、サンゴ礁生態系は大きな打撃を受けており、その保全が緊急の課題である。

サンゴの生育する海中環境では、海況変動による海水温の上昇、淡水流入による塩分低下、水中懸濁物の増加に伴う光照度低下や、海水の富栄養化による栄養塩濃度の変化等の様々な環境ストレスが考えられる。本課題は、これらの要因がサンゴの生物活性に与える影響を調べることを目的とする。サンゴは刺胞動物であるサンゴ虫とその体内に共生する渦鞭毛藻である共生褐虫藻の2種類の生物の共生体であるため、上記の各種環境ストレスから受ける影響を明らかにするためには、それぞれの生物について分けて考える必要がある。そこで本研究では、単

離した共生藻株を用いた培養実験を行い、サンゴ虫の影響を排除した状態での共生藻の各種環境ストレスに対する応答を調べた。

材料及び方法

共生藻株 試験には、造礁サンゴの *Pocillopora damicornis* と *Montipora verrucosa* から単離された共生藻を用いた。これらの株はハワイ大学海洋研究所のキンジー博士から分与された。株の継代培養は海水強化培地である E S M 培地を用い、24℃、光強度約 $20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、14時間明10時間暗周期で行った。

温度、光強度、塩分の影響 培養温度は、24、28、32、36℃の4段階に設定した。光強度は白色蛍光灯を光源に用い、14時間明10時間暗周期で、3、6、12、 $24 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ に設定した。培地の塩濃度は、*Pocillopora* 由来の共生藻 (P株) で20、25、30、35、*Montipora* 由来の共生藻 (M株) で5、15、25、35、に設定した。それぞれの4段階の条件を組み合わせ、培養試験を行った。

保存株を E S M 培地で28℃光強度 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で2週間前培養したものを試験に用いた。24穴のマルチウェルプレートに細胞を接種し上記の条件下で培養した。倒立顕微鏡下で細胞数の増加を確認し、対数増殖期の藻細胞を明周期の中期に回収して、光合成活性、クロロフィル a 含有量、細胞径を測定した。

増殖速度は、対数増殖期の細胞数を片対数グラフにプロットし、最小2乗法による回帰直線の傾きから計算した。光合成活性 (F R I) は、光合成阻害剤のジメチル尿素を用いた方法で測定した¹⁾。細胞当たりのクロロフィル a 含有量は、細胞懸濁液全体のクロロフィル a 量を蛍光法で求め²⁾、さらに懸濁液の細胞密度を血球計数板を用いて求めて、両者から算出した。遊泳細胞の割合は対数増殖期の明周期中期に倒立顕微鏡下で求めた。

無機窒素栄養塩濃度の影響 熟成海水に1) 藻類保存用 E S M 培地、2) アンモニウム塩、3) アンモニウム塩+リン酸塩 (N : P = 14 : 1)、4) アンモニウム塩+リン酸塩+ビタミン+微量金属混液、を窒素塩濃度が0~ $20 \mu\text{M}/\text{day}$ になるように希釈して加えたものと、富栄養化海水にアンモニウム塩を0~ $2 \mu\text{M}/\text{day}$ 加えたものを培地として用いた。富栄養化海水は、1995年8月7日に三重県五ヶ所湾で採取し、GF/C フィルターでろ過し1週間おいたものを、熟成海水の代わりに培地に用いた。熟成海水の無機窒素塩 ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3 + \text{NH}_4$) 及びリン酸塩濃度はそれぞれ $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.12 \mu\text{M}$ 、富栄養化海水では $7.1 \mu\text{M}$ 、 $0.63 \mu\text{M}$ であった。

熟成海水で2回前培養した共生藻を、ろ過滅菌した上記の各培地 100ml に $1 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ の密度で接種し、28℃、約 $20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、明暗12時間周期の光条件下で、半連続培養 (希釈率0.1/日) した。

海水のみ及び $2 \mu\text{M}/\text{day}$ のアンモニア塩又はリン酸塩添加試験区では、交換した培養液中の藻細胞数を血球計数板で数えて2日目から4日目の細胞数増加の最小2乗法による回帰直線の傾きから増殖速度を求めた。

培養液中の細胞数が定常状態になった培養開始後7~8日目の藻細胞を用いて、細胞当たりのクロロフィル a 含有量及び光合成活性を測定した。光合成活性は酸素電極 (Y S I model 5300) を用い、28℃、光飽和条件下 ($3000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) における酸素発生量と、光合成阻害剤のジメチル尿素を用いた方法 (F R I) で測定した。F R I 値及び細胞当たりのクロロフィル a 含有量

は、上記と同様の方法で求めた。

培養終了時に、培養液中の無機窒素及びリン酸塩の濃度を常法に従って測定した。

サンゴ虫内共生藻の光合成活性 (F R I) の測定 1997年3月11日に石垣島浦底湾において、水中懸濁物が多くサンゴにとって劣悪な生息環境の湾奥部から、アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* 2個体、パラオクサビライシ *Heliofungia actiniformis* 2個体、及び3月12日にサンゴの被度が高く良好な生息環境の湾口部からハナガササンゴ属 *Goniopora* spp. (種は未同定) 5個体、アザミサンゴ3個体を採捕し、流水下で2~3日飼育して試験に用いた。アザミサンゴは、ろ過海水中で骨格ごと組織をピンセットで碎き、共生藻をピペットで吸い取り藻体を集めた。ハナガササンゴとパラオクサビライシは、ポリプを少量切り取り、ろ過海水中でホモジナイザーで破碎し、藻体を集めた。これらを遠心分離 (1000 r p m x 5 m i n) して上清を除き、さらにろ過海水で2回洗浄して、共生藻の懸濁液を調製した。光合成活性値 (F R I) の測定は培養株と同様に行った。

結果

光強度と水温が増殖速度に及ぼす影響

2株の共生藻の増殖速度に及ぼす光強度と水温の影響をFig. 1、2に示す。M株 (Fig. 1) では、各水温とも、 $24 \mu E/m^2/s$ 以下では最大速度には達していなかったが、とくに6~ $3 \mu E/m^2/s$ の光強度の低下で、増殖速度が大きく低下した。24~36°Cの範囲での水温の影響について、28~32°Cで増殖速度が大きく、24、36°Cでは低下する傾向が見られたが、その差は顕著ではなかった。一方P株 (Fig. 2) では、 $6 \mu E/m^2/s$ 以上で光強度は飽和していた。水温の影響については、各光強度とも、32°Cで増殖速度は最大になり、36°Cでは急に低下した。

水温が光合成活性、クロロフィル a 含有量、細胞径及び遊泳細胞の割合に及ぼす影響

2株の共生藻を $12 \mu E/m^2/s$ の光強度下で培養した場合の、光合

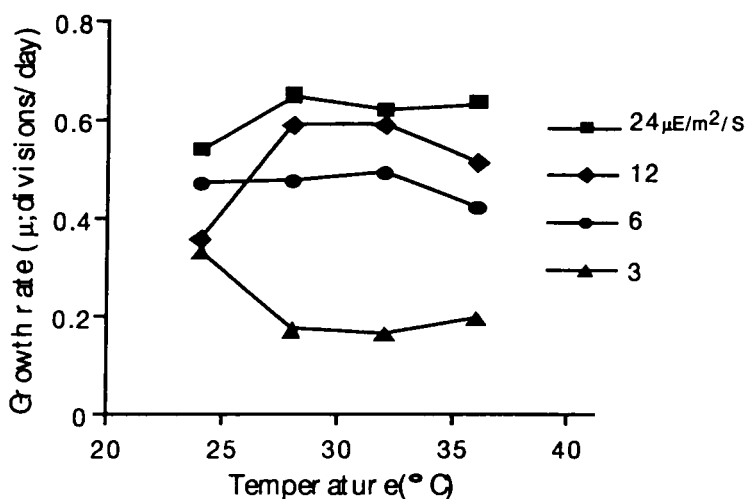


Fig.1 Effects of temperature on growth of symbiotic algae strain M in various light intensity.

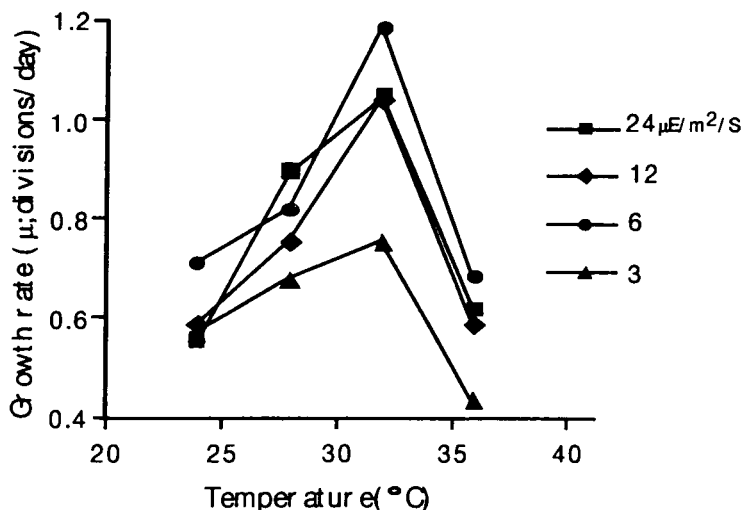


Fig.2 Effects of temperature on growth of symbiotic algae strain P in various light intensity.

成活性、クロロフィルa含有量、細胞径及び遊泳細胞の割合に及ぼす水温の影響をFig. 3、4に示す。光合成活性は、P株 (Fig. 3)、M株 (Fig. 4) とともに、28°Cで最大で、32°Cでは低下に転じた。細胞あたりのクロロフィルa含有量は、高温になると増加する傾向が見られた。遊泳細胞

の割合は、3~12 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ では、28~32°Cで高く、24°Cと36°Cで減少したが、24 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ では、24°Cが最大で温度とともに低下していた。

塩分が増殖速度、光合成活性に及ぼす影響

2株の共生藻の増殖速度、光合成活性に及ぼす塩分の影響をFig. 5、6に示す。M株では (Fig. 5)、塩分25psu以下で増殖速度がやや低下した。光合成活性は36°Cの場合は塩分20psuで低下したが、32°C以下では塩分35psuの場合と変わらなかった。P株では (Fig. 6)、水温が32°C以下では塩分25psuまで増殖速度、光合成活性とも変わらなかった。塩分が15psuになると増殖速度は変わらないが増殖を開始するまでの停滞期間がかなり長くなり、塩分が5psuになると共

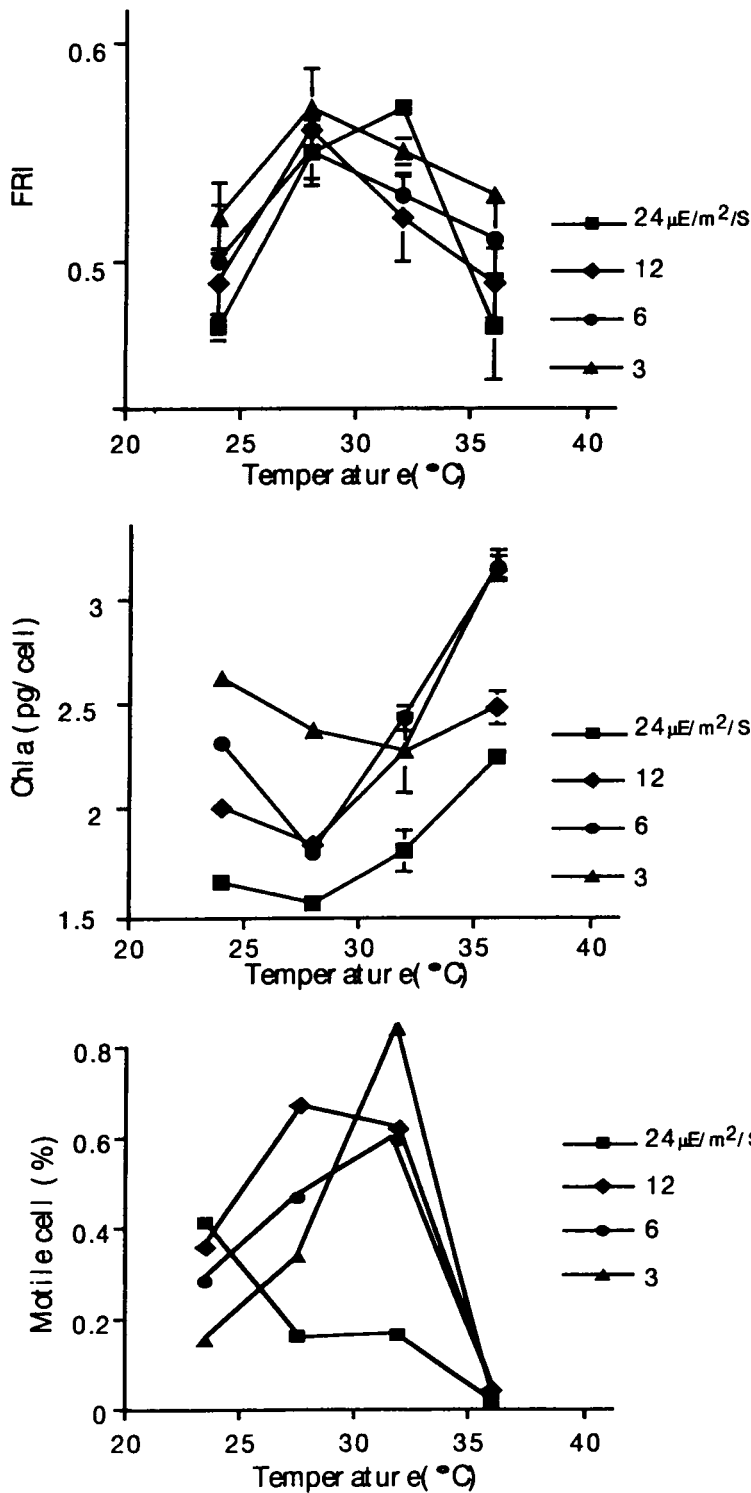


Fig.3 Effects of temperature on the photosynthetic activity (FRI), cellular chlorophyll a contents, and cell motility of symbiotic algae strain P in various light intensity.

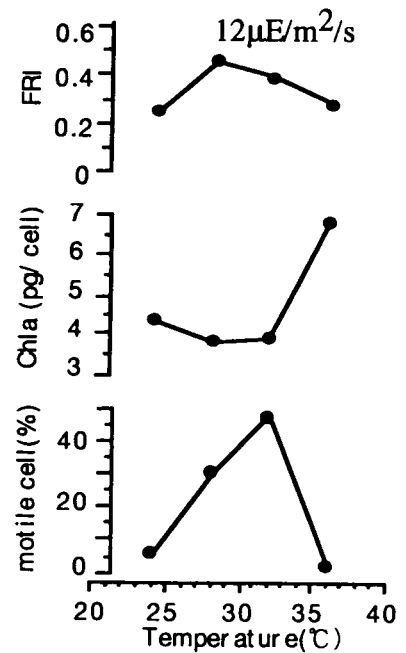


Fig.4 Effects of temperature on photosynthetic activity (FRI), cellular chlorophyll a contents, and cell motility of symbiotic algae strain M.

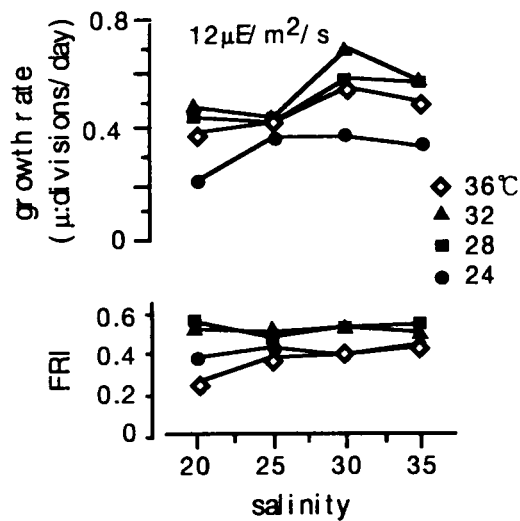


Fig.5 Effects of salinity on growth and photosynthetic activity (FRI) of symbiotic algae strain M in various temperature.

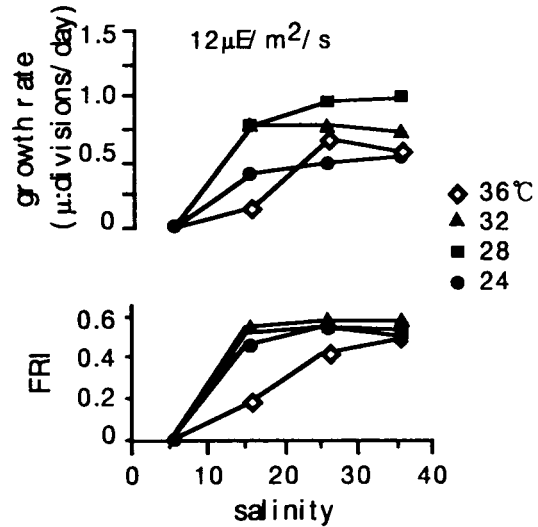


Fig.6 Effects of salinity on growth and photosynthetic activity (FRI) of symbiotic algae strain P in various temperature.

生藻は全く増殖しなかった。36℃の場合は、塩分15psuで増殖速度、光合成活性とも低下した。両株とも36℃での塩分低下による活性阻害の程度が、光強度が低いと顕著であった (Fig. 7)。無機窒素栄養塩濃度が増殖速度、クロロフィル a 含有量、光合成活性に及ぼす影響

培養器中の細胞数は培養開始後3日目まで増加し、4日目以降はほぼ定常状態となった。培養終了時の培地中に残存していた無機窒素塩の濃度は、アンモニウム塩を単独で20 μM添加した場合にのみ6.1 μM認められ、他の試験区ではいずれも0.5 μM以下であり、藻細胞は添加した栄養塩を全て取り込んでいたと考えられる。

株の維持に用いている E S M培地を希釈して海水に添加し共生藻 P 株を培養した場合には (Fig. 8)、窒素塩濃度0~20 μM/日の添加では培養液中の細胞密度と細胞中のクロロフィル a 含有量は窒素塩

が濃いほど増大した。しかし、細胞当たりの光合成活性は5 μM以上では変わらず、クロロフィル a 当たりの活性を表す FRI 値はむしろ20 μMでは低下した。培養系全体としての光合成活性は15 μMと20 μMでは変わ

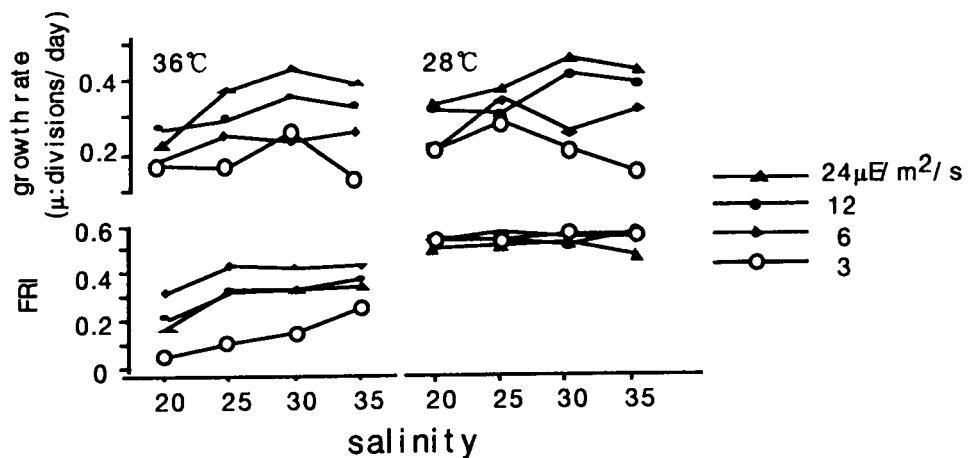


Fig.7 Interactive effects of salinity, temperature and light intensity on the growth and photosynthetic activity (FRI) of symbiotic algae strain M.

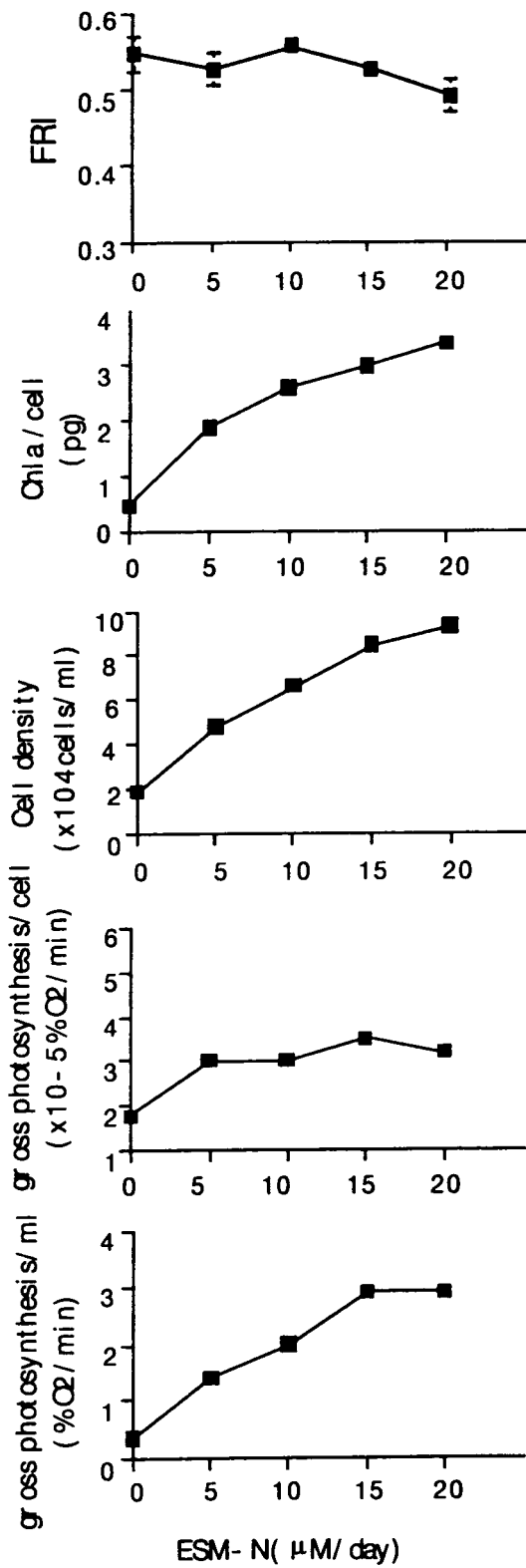


Fig.8 Effects of inorganic nitrogen concentration of modified ESM medium on symbiotic algae strain P.

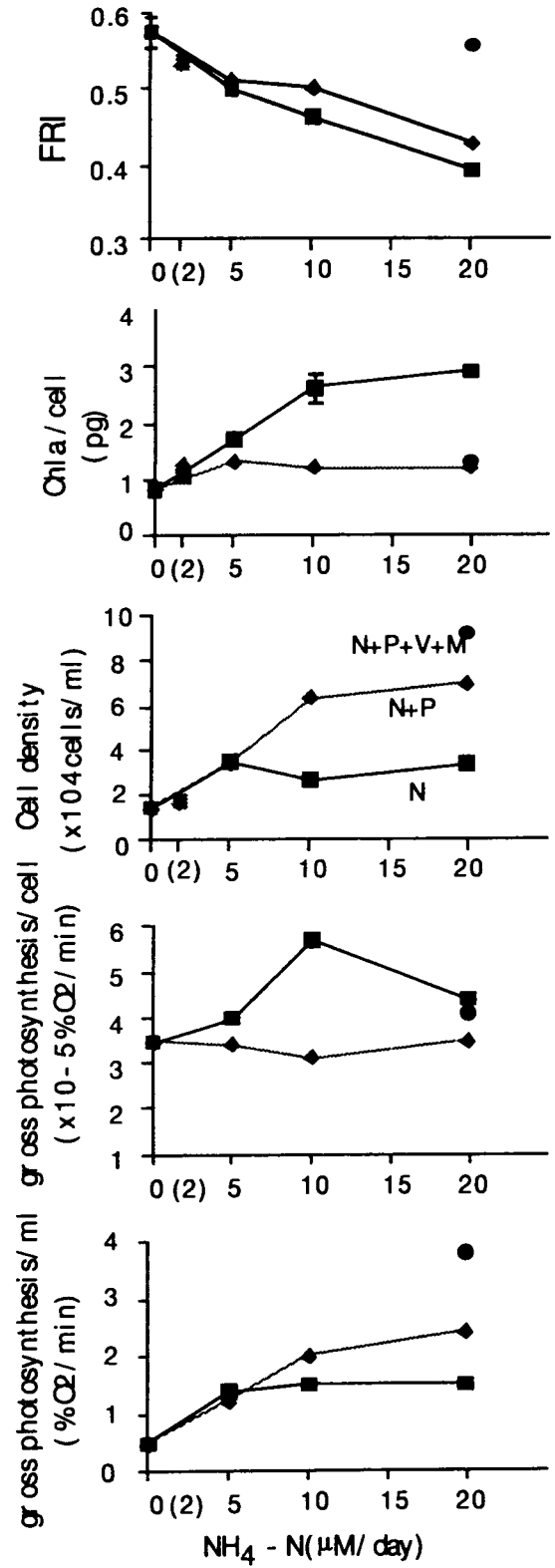


Fig.9 Effects of inorganic nitrogen concentration of definite enrichment on symbiotic algae strain P.

Table 1 Growth rate, cellular chlorophyll a contents, photosynthetic activity (FRI) of symbiotic algae under low inorganic nitrogen concentrations.

media	growth rate (μ ;divisions/day)		cellular chlorophyll a contents (pg/cell)		photosynthetic activity (FRI)	
	strain P	strain M	strain P	strain M	strain P	strain M
SW	0.098 \pm 0.013*	0.092 \pm 0.029	0.88 \pm 0.03	1.3 \pm 0.05	0.53 \pm 0.008	0.50 \pm 0.02
N	0.15 \pm 0.011	0.13 \pm 0.015	1.1 \pm 0.07	1.5 \pm 0.17	0.54 \pm 0.013	0.52 \pm 0.005
P	0.10 \pm 0.009	0.058 \pm 0.050	0.81 \pm 0.13	1.3 \pm 0.02	0.51 \pm 0.027	0.48 \pm 0.015
NP	0.15 \pm 0.025	0.15 \pm 0.012	1.3 \pm 0.09	1.5 \pm 0.12	0.54 \pm 0.018	0.49 \pm 0.012
GSW	0.110 \pm 0.015		1.1 \pm 0.04		0.55 \pm 0.006	
GSWN	0.11 \pm 0.003		1.4 \pm 0.13		0.53 \pm 0.020	

*average \pm s.d.(n=2-4)

らなかった。

一方、無機窒素塩を単独で添加し共生藻P株を培養した場合には (Fig. 9;N)、光合成効率の低下がより低濃度でも顕著に見られた。5 μ M以上では細胞収量、培養液当たりの光合成量は変わらずクロロフィルa当たりの光合成活性 (FRI) は大きく低下した。リン酸塩が同時に培地中に添加された場合は (Fig. 9;N+P)、細胞密度が増大したが細胞当たりのクロロフィル量は増加せず、細胞当たりの光合成量も海水と変わらず、FRI値は窒素だけの場合と同様の低下を示した。一方、これにさらにビタミンと金属の混液を加えると (Fig. 9; N+P+V+M)、細胞数が増加し、かつFRI値の低下は見られなかった。

熟成海水または富栄養化海水に2 μ M/dayのアンモニウム塩、リン酸塩を添加した試験区での共生藻2株の増殖速度、細胞中のクロロフィルa含有量、FRI値をTable 1に示す。富栄養化海水中で培養した共生藻は、細胞中のクロロフィルa含有量は熟成海水より高く、またアンモニウム塩添加の影響も見られたが、増殖速度は熟成海水よりはやや高かったが、アンモニウム塩添加の影響が見られなかった。

サンゴ虫内の共生藻の光合成活性

各サンゴから得られた活性値をTable 2に示す。得られた数値は0.4~0.6付近で、共生藻培養株を用いた室内実験で得られた数値とほぼ等しかった。採集した当日 (3/12) と翌日 (3/13) で活性値を比較すると、パラオクサビライシ *Heliofungia actiniformis* とハナガササンゴ *Goniopora* spp.、湾口部採取のアザミサンゴ *Galaxea fascicularis* では値に差が見られなかった。一方、湾奥部採取のアザミサンゴは、採取翌日 (3/12) の値が0.42だったのに対して、翌々日 (3/13) では0.52と高くなり、湾口部採取個体の値と有意な差は見られなくなった。湾奥部採取のアザミサンゴについて、3月13日に8:50~17:50の間に3回測定を行ったが、測定値に日内変動は見られなかった。ハナガササンゴ1種についても10:30~17:50に行った3回の測定値はほぼ等しかった。

各サンゴ種間の活性値を比較すると、ハナガササンゴ属5個体の全測定値をまとめると0.54~0.63 (平均0.58)、アザミサンゴで0.42~0.54 (同0.50)、パラオクサビライシでは0.38~0.44 (同0.40) となり、3つの群で有意な差がみられた。

Table 2 Photosynthetic activities (FRI) of symbiotic algae in corals

sampling date	coral species	sample name	date and time of measurement					average \pm s.d.			
			3/12		3/13						
			13:00	16:00	8:50	10:30	12:50		14:30	17:50	
3/11	<i>Galaxea fascicularis</i>	Ga1	0.42		0.49		0.50		0.50	0.50 \pm 0.04 n=7	
		Ga2			0.50		0.54		0.54	(Ga1+Ga2)	
	<i>Heliofungia actiniformis</i>	He1	0.38					0.44		0.40 \pm 0.03 n=3	
		He2	0.39							(He1+He2)	
3/12	<i>Galaxea fascicularis</i>	Ga3	0.51				0.52	0.51		0.52 \pm 0.01 n=5	
		Ga4					0.51			(Ga3~Ga5)	
		Ga5					0.54				
	<i>Goniopora</i> spp.	Go1	0.55			0.63		0.57	0.62		0.59 \pm 0.04 n=4
		Go2				0.59					(Go1)
		Go3				0.58					
		Go4				0.56					0.59 \pm 0.04 n=8
		Go5				0.54					(Go1~Go5)

考察

サンゴに対する海水温の上昇の影響は、サンゴ虫内の共生藻が体外に放出される”白化現象 (bleaching)”として広く観察されており、この現象の起こる温度は、現場観察や飼育実験から30℃付近³⁾とされている。本実験で用いた共生藻2株については、水温28~32℃は増殖にとって適温であった。しかし、36℃になると増殖速度は大きく低下し、また光合成活性は32℃になると低下する傾向が見られたことから、32℃は増殖速度は最大になるものの、生理活性は高温によるストレスを受け始めている温度と考えられた。

光合成活性測定に用いたDCMUは光合成の光化学系II (PS2) による酸素発生を阻害する薬品であり、FRI値はPS2の蛍光の量子収量を相対的に表す数値と考えることができる。高温や紫外線による光合成の阻害は、光合成の電子伝達が減少して、励起エネルギーの吸収が多くなり、PS2が不活性化したり損傷を受けたりすることによるものであるが、その原因は酸素の散在下での励起エネルギーの吸収によって活性酸素が発生して、PS2あるいはRubisco酵素のような細胞内の標的に作用するためであることが知られている⁴⁾。培養した共生藻についても、高水温と紫外線について、それぞれ、あるいは両者の複合による光合成の阻害が同様の機構によるものであることが示されている^{5) 6)}。

高水温による白化の場合は、サンゴの表面積あたりの共生藻密度が減少するが、共生藻細胞の色素含有量は変化しない。一方、紫外線の影響による退色の場合は、共生藻細胞の色素含有量が減少しサンゴ虫内の共生藻密度は変わらないことが報告されている⁷⁾。本実験に用いた共生藻株でも、細胞あたりのクロロフィルa含有量は、水温が28~32℃の間では変わらず、水温が上昇すると増加する傾向が見られ、紫外線や強光によるストレスに対する共生藻培養株の対

応⁹⁾と逆であった。また、28~32℃では、鞭毛をもつ遊泳細胞が高い割合を示したが、共生状態にある褐虫藻は鞭毛を持たない球形をしており、遊泳形態のものは通常観察されない。培養株では、遊泳形態は対数増殖期に多く見られ、定常期にはやや大型で球形の非運動型の細胞が多く見られるようになることが報告されている⁹⁾。サンゴ虫内部の共生藻の比増殖速度は0.04~0.08/day程度と計算されており、培養株で得られる値(0.3程度)よりも非常に小さく、藻が何らかの増殖阻害を受けていると考えられている¹⁰⁾。定常期の細胞も栄養枯渇等の増殖阻害を受けている状態であることから、非運動性の球形の細胞が増殖阻害下にあるときに見られるものとするれば、28~32℃では温度ストレスによる増殖阻害をあまり受けていないことが示唆される。これらの結果から、高水温による白化が共生藻の生息適温をはずれたためにおこる現象であるとは考え難く、むしろ共生藻は白化の起こる高水温下でも活発に分裂増殖することが示唆される。

サンゴ虫は共生藻に窒素分や炭酸塩を提供し光合成の代謝産物を受け取り栄養共生を行っているが^{11) 12)}、一方で、不足しがちな窒素の取り合いや、共生藻が光合成に際して発する活性酸素の毒性から身を守る必要がある¹³⁾等の競合関係にもあり、利害の複雑な共生系を形成している。そのためサンゴ虫は常に体内の共生藻密度を分解消化¹⁴⁾や体外への放出¹⁵⁾を通じてコントロールしていることが明らかになってきている。高水温による白化は、共生藻の増殖速度が大きくなりすぎたり¹⁶⁾、光合成系での活性酸素の生産が増えたりして⁹⁾サンゴ虫が共生系を制御しきれなくなり、均衡関係が崩れて共生藻が一気に体外へ放出された可能性が考えられる。

低塩分の影響に関して、M株の単離源と同じサンゴ *Montipora verrucosa* を用いた実験では塩分20psuで生存率が大きく低下したことが示されている¹⁷⁾。今回の結果では、適温下では両株とも塩分20psu程度では増殖速度がやや低下するが死滅にはいたらず、光合成活性の低下も見られなかった。サンゴ虫単独の耐塩分性は不明であるが、共生藻がサンゴ虫よりも塩分低下の影響を強く受ける可能性は低いと考えられる。なお、光や温度が適当な範囲をはずれると、低塩分による影響は顕著に現れた。M株で培養条件が36℃、光強度が3 μ E/m²/sの場合には、塩分30psuでも光合成活性が低下しており、他の環境要因が複合して共生藻の活性の低下に関与してくることが示唆された。Coles and Jokielの実験でも同様に、高温、強光下では低塩分の影響がより強く現れることが示されており¹⁷⁾、特に光は共生藻にのみ影響する要因であることから、共生藻の活性が塩分低下に対するサンゴの耐性に影響を与えていることが示唆される。

無機窒素塩濃度が1 μ M以下であるような貧栄養な熱帯の海洋環境でサンゴは良好な生育をすることから、サンゴ虫と共生藻は窒素を共生系内で循環させることによって、高い生産性を維持していると考えられてきている。サンゴ虫が動物プランクトン等を捕食して取り込む窒素分はまずサンゴ虫が利用し、代謝、排出した残りを共生藻が利用する。光が充分であれば共生藻は窒素制限下におかれていて、藻が固定した有機炭素の余剰分がサンゴ虫に渡されて炭酸カルシウム骨格の形成やサンゴの粘液分泌に使われると考えられる¹²⁾。しかし一方で、サンゴ虫内の共生藻は海水中から無機窒素塩を取り込む能力をもっていて、サンゴの飼育海水へ無機窒素塩を添加すると共生藻の密度や細胞あたりのクロロフィルa含有量が増加することが知られている^{18) 19) 20) 21)}。海水から取り込まれた窒素分は共生藻が直接利用するため、共生藻が固定する有機炭素が藻の細胞分裂に使われて、サンゴ虫に渡される余剰分がなくなり、サンゴ全体として炭素制限状態になり骨格形成等が阻害されると考えられている¹²⁾。これらの点から、海

水の富栄養化（無機窒素塩増加）は共生藻にとっては良好でも、サンゴ全体としては正常なバランスが崩れる環境の悪化であると考えられる。なお、天然の富栄養化した海水を用いて共生藻を培養した試験では、無機窒素塩以外に共生藻の増殖に影響を与える要因があることが示唆されており、サンゴに対する富栄養化の影響は無機栄養塩以外にも広く捉える必要があることは言うまでもない。

サンゴの飼育海水へ無機窒素塩を添加する試験では、 $20\mu\text{M}$ 程度以上に設定されている例が多い^{18) 19) 20) 21)}。サンゴ虫から取り出した共生藻のアンモニウム塩の取り込み半飽和定数は、 $5\text{--}7.3\mu\text{M}$ であり²²⁾、また刺胞動物の細胞質中のアンモニウム濃度は最大 $50\mu\text{M}$ と見積もられていることから²³⁾、サンゴ虫内の共生藻は窒素塩濃度のかなり高い環境にいることが示唆される。しかし、 $50\mu\text{M}$ のアンモニウム塩はサンゴにとって阻害的な作用を及ぼすことが報告されており¹⁰⁾、また、海水中のアンモニウム塩濃度が $20\mu\text{M}$ 程度の富栄養化が進んだ水域ではサンゴの生育は見られないことから（私信）、海水中の窒素塩はより低い濃度でも共生藻に影響を与えると考えられる。本試験では、 $2\mu\text{M/day}$ のアンモニウム塩の添加で増殖速度は1.5倍になり、希釈率0.1で定常状態にした培養系の細胞密度は1.1倍、細胞当たりのクロロフィルa量は1.3倍に増加した。細胞当たりの光合成量はアンモニウム塩を $5\mu\text{M}$ 以上にしても余り変わらず、光合成活性（F R I 値）は $20\mu\text{M}$ ではむしろ低下した。さらに、アンモニウム塩だけを添加した場合には共生藻内のクロロフィルa量は増加しても全体の光合成活性は $5\mu\text{M}$ 以上では低下した。この時リン酸塩を同時に加えると細胞数は増えるが、ビタミンや金属のような微量栄養素の枯渇によってやはり光合成活性（F R I 値）が低下していることが示された。窒素塩の添加によって共生藻の細胞密度が高くなると細胞当たりの光合成が低下することはサンゴ内の共生藻でも観察されている^{7) 21)}。この場合は炭素塩の欠乏によるためであるとされているが、本試験の結果からは、窒素、リンの投与実験をする際には、微量栄養素についても考慮する必要があることが示唆される。

サンゴ虫内の共生藻の光合成活性を測る場合、酸素収支による方法はサンゴ虫の呼吸の影響を大きく受ける可能性があり、放射性同位元素 ^{14}C を用いる方法では、操作が煩雑になる。それに対してDCMUを用いるPS2の活性の測定は、クロロフィルの自家蛍光に依っているので、酸素収支と異なりサンゴ虫組織の影響を無視して共生藻だけの活性を測定でき、また操作も非常に簡便であるという利点がある。しかし、一方でこの数値は光合成量としての数値は得られないため、その解釈は共生藻の状態を示唆するに留まり、他の方法との比較は困難である。本研究で様々な条件下で培養した共生藻のF R I 値を測定した結果、高温条件下や窒素過剰、微量栄養素不足下ではF R I 値の低下が見られることが示され、この数値が共生藻の状態を示す指標になりうることが示唆された。その上で、野外のサンゴ内の共生藻についてF R I 値を測定すると、培養株を用いた室内実験で得られた数値とほぼ等しい範囲の値が得られ、当測定法がサンゴ体内の共生藻にも使用できる可能性が示された。

ただし、F R I 値をサンゴ虫内共生藻の生理状態の比較に用いるためには、サンゴ種による数値の特性や、数値の季節変動等を充分検討する必要がある。今回の実験でも、サンゴの種類によって共生藻のF R I 値が異なる結果が得られた。数値の高かったハナガササンゴはいずれも水がきれいで浅いところに生息しており、日中も触手を伸ばし盛んに光合成を行っていたと推測されるが、数値の低かったパラオクサビライシは水深が深いところに生息していたことが

ら、この数値がサンゴの生態を反映している可能性が考えられる。これより、本数値によるサンゴ種間の比較は不適当であるが、同種内において生息場所の変化等による共生藻の生理状態変化の指標として利用できる可能性は考えられる。異なる生息環境から採集したアザミサンゴについてF R I値を比較してみたが、湾奥部採取個体で採取2日後にやや低い数値が得られたものの、採取後3日目では両者のF R I値に差が見られなかったことから、数値の安定性や保存性についてはさらにより詳細な検討が必要である。

引用文献

1. 山口峰生, 赤潮鞭毛藻の光合成活性測定法の検討および現場海域における光合成活性、赤潮発生予知技術の開発に関する研究 昭和60年度研究報告書, 61-71 (1986).
2. R. Suzuki, T. Ishimaru, An improved method for the determination of phytoplankton chlorophyll using N,N-dimethylformamide, J. Oceanogr. Soc. Jap. 46, 190-194 (1990).
3. L. Roberts, Coral Bleaching threatens Atlantic reefs, Science 238, 1228-1229 (1987).
4. C. B. Osmond, Photorespiration and photoinhibition; some implications for the energetics of photosynthesis, Biochem. Biophys. Acta. 639, 77-98 (1981).
5. R. Iglesias-Prieto, J. L. Matta, W. A. Robins, R. K. Trench, Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10302-10305 (1992).
6. M. P. Lesser, Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates, Limnol. Oceanogr. 41, 271-283 (1996).
7. O. Hoegh-Guldberg, G. J. Smith, The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Sylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 129, 279-303 (1989).
8. M. P. Lesser, J. M. Shisk, Effects of irradiance and Ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoadaptation, and enzymic defenses against oxygen toxicity, Mar. Biol. 102, 243-255 (1989).
9. S. L. Domotor, C. F. D'elia, Cell-size distributions of zooxanthellae in culture and Symbiosis, Biol. Bull. 170, 519-525 (1986).
10. O. Hoegh-Guldberg, Population dynamics of symbiotic zooxanthellae in the coral *Pocillopora damicornis* exposed to elevated ammonium[(NH₄)₂SO₄], Pac. Sci. 48, 263-272 (1994).
11. V. M. Weis, G. J. Smith, L. Muscatine, A CO₂ supply mechanism in zooxanthellate cnidarians: role of carbonic anhydrase, Mar. Biol. 100, 195-202 (1989).
12. Z. Dubinsky, P. L. Jokiel, Ratio of energy and nutrient fluxes regulates

symbiosis between zooxanthellae and corals, *Pac. Sci* 48, 313-324 (1994).

13. A. Dykens, J. M. Shick, Oxygen production by endosymbiotic algae controls superoxide dismutase activity in their animal host, *Nature* 297, 579-580 (1982).
14. E. A. Titlyanov, T. V. Titlyanova, V. A. Leletkin, J. Tsukahar, R. van Woelik, K. Yamazato, Degradation of zooxanthellae and regulation of their density in hermatypic corals, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139, 167-178 (1996).
15. J. Stimson, R. A. Kinzie III, The temporal pattern and rate of release of zooxanthellae from the reef coral *Pocillopora damicornis* under nitrogen-enrichment and control conditions, *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 153, 63-74 (1991).
16. Suharsono, B. E. Brown, Comparative measurements of mitotic index in zooxanthellae from a symbiotic cnidarian subject to temperature increase., *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 158, 179-188 (1992).
17. S. L. Coles, P. L. Jokiel, Synergistic effects of temperature, salinity and light on the hermatypic coral *Montipora verrucosa*, *Mar. Biol.* 49, 187-195 (1978).
18. O. Hoegh-Guldberg, G. J. Smith, Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57, 173-186 (1989).
19. A. Snidvongs, R. A. Kinzie III, Effects of nitrogen and phosphorus enrichment on in vivo symbiotic zooxanthellae of *Pocillopora damicornis*, *Mar. Biol.* 118, 705-711 (1994).
20. L. Muscatine, P. G. Falkowki, Z. Dubinsky, P. A. Cook, L. R. McCloskey, The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in a reef coral, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 236, 311-324 (1989).
21. Z. Dubinsky, N. Stambler, M. Ben-Zion, L. R. McCloskey, L. Muscatine, P. G. Falkowski, The effect of external nutrient resources on the optical properties and photosynthetic efficiency of *Stylophora pistillata*, *Proc. R. Soc. Lond. B* 239, 231-246 (1990).
22. S. L. Domotor, C. F. D'Elia, Nutrient uptake kinetics and growth of zooxanthellae maintained in laboratory culture, *Mar. Biol.* , 80, 93-101 (1984).
23. F. P. Wilkerson, L. Muscatine, Uptake and assimilation of dissolved inorganic nitrogen by a symbiotic sea anemones, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* , 71-86 (1984).

研究発表の状況；坂見知子・サンゴ共生藻に対する水温、塩分、光の影響・日本水産学会平成6年度秋季大会講演発表