

## 微細藻類の培養ろ液が*Alexandrium tamarensense*の増殖に及ぼす影響-II

関口勝司・加賀新之助・高木稔・松山和弘・緒方武比古<sup>\*1</sup>

### Effect of culture filtrates of various microalgae on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensense* - II

Katsushi Sekiguchi, Shinnosuke Kaga, Minoru Takagi, Kazuhiro Matsuyama, and Takehiko Ogata<sup>\*1</sup>

#### Abstract

Following the previous report, filtrates of 17 species of phytoplankton collected from the coast of Iwate Prefecture were examined for the effect on the growth of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensense*. As the results, those filtrates of 4 species (*Thalassiosira* sp., *Heterocapsa* sp., *Prorocentrum dentatum*, *P. compressum*) reduced the growth rate of *A.tamarensense* by above 20 %, comparing with control. Among them, *Heterocapsa* sp. and *Prorocentrum compressum* reduced the growth rate of *A.tamarensense* by above 30 %. Since these inhibiting effect on the growth of *A.tamarensense* could not be elucidated with nutrients concentration in those filtrates, we estimated that these phenomena were due to allelopathy effect of those filtrates. Hereafter, it will be necessary to pursue the inhibiting component on the growth of *A.tamarensense*.

**Key words** : allelopathy, *Alexandrium tamarensense*, inhibition, dinoflagellate

**キーワード**：アレロパシー, *Alexandrium tamarensense*, 増殖抑制, 渦鞭毛藻

#### はじめに

前報<sup>1)</sup>で我々は、フィールドから採集した珪藻11属15種および渦鞭毛藻2属2種の培養ろ液が有毒渦鞭毛藻*Alexandrium tamarensense*の増殖速度に及ぼす影響について検討し、これら17種のうち3種(*Chaetoceros decipiens*, *Thalassiosira* sp., *Gymnodinium sanguineum*)では対照区に比べ1割程度、また1種(*Heterocapsa* sp.)では6割程度それぞれ増殖速度を低下させる事実を認め、この現象が栄養塩類(NおよびP)の制限によるものではなくアレロパシーによるものと推定されることを報告し、併せて、より強力に*A.tamarensense*の増殖に作用するプランクトンが存在する可能性も提起した。

そこで本報では、今後の貝類毒化対策の進展に寄与するべく、より多くの知見の蓄積を目指し、前報<sup>1)</sup>で*A.tamarensense*の増殖速度を低下させる作用が認められたプランクトンの近縁種、および以前に我々がフィールドにおける*A.tamarensense*の動向に関連がある可能性を提起した*Prorocentrum*属<sup>2, 3)</sup>などに対象を拡大して検討を行い、若干の補足るべき知見を得たので報告する。

#### 材料と方法

試験IおよびIIの2回に分けて試験を行ったので、そ

れぞれについて以下に述べる。

#### 試験I

##### *A.tamarensense* 培養株

大船渡湾より採取したもの(株名OF935AT6)を、SW II培養液<sup>4)</sup>中、 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12時間毎の明暗周期)の条件で培養したものを用いた。

##### 藻類培養ろ液の調製

2001年5月～12月に、岩手県沿岸の大船渡湾他3湾から採取した海水試料より、*Thalassiosira*属4種および*Prorocentrum*属4種(Table1-1)を毛細管で分離し、前報<sup>1)</sup>に準じて培養を行った。すなわち、海水より分離した細胞を滅菌したSW II中で洗浄後、1細胞ずつ、SW II 1mlを入れたマルチウエルプレート(24穴、ポリスチレン製)に接種、 $15 \sim 18^\circ\text{C}$ ,  $30 \sim 40 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12時間毎の明暗周期)の条件で培養し、増殖を確認後、SW II 50mlを入れたポリスチレン製培養瓶に移し替え、同様に培養し各藻類の培養株を調製した。これら培養液の一部を取り分け、SW II 300mlを入れたガラス製培養瓶に加え、同様の条件で培養を継続した。この間、数日おきに培養液の一部を取り、顕微鏡下で細胞数の計測を行い、ほぼ定常期に到達したことを確認した時点で培養を終了し、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターによりアスピレーターで減圧(20cmHg)しながらろ過を行い、

\*1 北里大学水産学部 (School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Ofunato, Iwate 022-0101, Japan)

**Table 1-1.** Microalgal cultures used for experiment I.

Species	Date	Sampling	Cell density*
		Location	(cells/m <sup>l</sup> )
<i>Thalassiosira</i> sp. 1	21-May-01	Ofunato Bay	2000
<i>Thalassiosira</i> sp. 2	27-Jun-01	Yamada Bay	7000
<i>Thalassiosira</i> sp. 3	24-Oct-01	Kamaishi Bay	5000
<i>Thalassiosira</i> sp. 4	24-Oct-01	Kamaishi Bay	12000
<i>Prorocentrum minimum</i>	21-Jun-01	Miyako Bay	17000
<i>Prorocentrum balticum</i>	26-Jun-01	Yamada Bay	26000
<i>Prorocentrum triestinum</i>	16-Jul-01	Ofunato Bay	20000
<i>Prorocentrum dentatum</i>	3-Dec-01	Ofunato Bay	37000

\* Cell density of each species was measured microscopically at when its culture was harvested for experiment.

清澄なろ液を得た。得られたろ液の一部を取り、常法<sup>5)</sup>に従ってNO<sub>2+3</sub>-NおよびPO<sub>4</sub>-Pの分析を行い、残液は塩酸によりpH8.00～8.03に調整した後、使用するまでの間-30℃で凍結保管した。

#### 藻類培養ろ液を用いた *A.tamarensense* の培養

ポリスチレン製培養瓶(50mL容)に藻類培養ろ液30mLとSW II(pH8.00に調整)3mLを取り、これに*A.tamarensense* 培養株1mLを添加し、15±1°C、80 μ mol photon·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>(12時間毎の明暗周期)の条件下で培養を行った。この間、数日おきに0.5mLを取り光学顕微鏡下で*A.tamarensense* 細胞数の計測を行い、各試験区が対数増殖期を過ぎ定常期に到達した時点で培養を終了した。試験はすべて3本立てとし、対照区には藻類培養ろ液の代わりにSW IIを加えたもの(SW II 100%区)およびSW II調製に用いたろ過海水(pH8.00に調整)を加えたもの(SW II 9%区)を用いた。

#### 試験II

##### *A.tamarensense* 培養株

試験Iと同一株を用い、また培養条件も光強度を80 μ mol photon·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>としたことを除き試験Iと同様である。

##### 藻類培養ろ液の調製

2002年6月～11月に岩手県沿岸の山田湾他3湾から採取した海水試料より、渦鞭毛藻8種(*Heterocapsa*属2種、*Prorocentrum*属3種、*Protoceratium reticulatum*、*Gonyaulax*属1種、*Scrippsiella trochoidea*)およびラフィド藻1種(*Fibrocapsa japonica*) (Table1-2)を分離し、試験Iとほぼ同様に処理して培養ろ液の調製およびNO<sub>2+3</sub>-N·PO<sub>4</sub>-Pの分析を行った。なお、培養条件のうち光強度については50～60 μ mol photon·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>とした。

##### 藻類培養ろ液を用いた *A.tamarensense* の培養

試験Iとほぼ同様の方法により、藻類培養ろ液添加区と対照区について*A.tamarensense* の増殖状況を観察したが、

**Table 1-2.** Microalgal cultures used for experiment II.

Species	Date	Sampling	Cell density*
		Location	(cells/m <sup>l</sup> )
<i>Heterocapsa triquetra</i>	28-Jun-02	Toni Bay	23000
<i>Heterocapsa</i> sp.	31-Oct-02	Kamaishi Bay	32000
<i>Prorocentrum micans</i>	6-Aug-02	Yamada Bay	11000
<i>Prorocentrum gracile</i>	20-Aug-02	Yamada Bay	11000
<i>Prorocentrum compressum</i>	7-Nov-02	Yamada Bay	1000
<i>Protoceratium reticulatum</i>	6-Aug-02	Yamada Bay	6000
<i>Gonyaulax</i> sp.	6-Aug-02	Yamada Bay	7000
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	19-Aug-02	Ofunato Bay	16000
<i>Fibrocapsa japonica</i>	6-Aug-02	Yamada Bay	14000

\* Cell density of each species was measured microscopically at when its culture was harvested for experiment.

試験Iにより、今回用いている*A.tamarensense* 株の増殖特性が前報で用いたものよりも優れていることがうかがわれたことから、増殖に際し栄養塩類が制限要因となる可能性を排除するため、本試験では藻類培養ろ液30mLに補強添加するSW IIの液量を試験Iよりも增量し6mLとした。これに伴い、対照区は藻類培養ろ液の代わりにSW IIを加えたもの(SW II 100%区)およびSW II調製に用いたろ過海水を加えたもの(SW II 16%区)とし、なお参考のため試験Iと同様に補強添加するSW IIの液量を3mLとしたもの(SW II 9%区)も対照区に加えた。

## 結果

##### 藻類培養ろ液

試験IおよびIIにおけるろ液調製時の各藻類の細胞密度をTable1-1～2にそれぞれ示す。細胞密度は1,000～37,000 cells/mLと種により大きく異なっていた。これは前報<sup>1)</sup>で述べたように、種によって生長の最適条件(栄養要求を含めて)および細胞サイズが大きく異なることに起因するものと考えられる。

それぞれの培養ろ液に含まれるNO<sub>2+3</sub>-NおよびPO<sub>4</sub>-P濃度をFig.1-1～2およびFig.2-1～2にそれぞれ示す。

試験Iでは、培養に用いたSW IIに比べ、各ろ液のN·Pは1～2割程度の低下にとどまっていた。一方試験IIでは、ろ液調製時の細胞密度が1,000 cells/mLと低かった*Prorocentrum compressum*を除けば、2～4割程度低下していた。この違いは、試験Iで用いた藻類が平板状かつ小型のものであったのに対し、試験IIで用いた藻類は紡錘形あるいは球形のものが多いため、1細胞当たりの体積が大きく栄養要求量が大きいことによるものと考えられる。なお、ろ液のN/P比(モル比)についてはほとんどが9～11の範囲にあった。

##### 藻類培養ろ液添加溶液中における *A.tamarensense* の増殖状況

試験Iでは*A.tamarensense* 細胞密度160cells/mLで試験を開

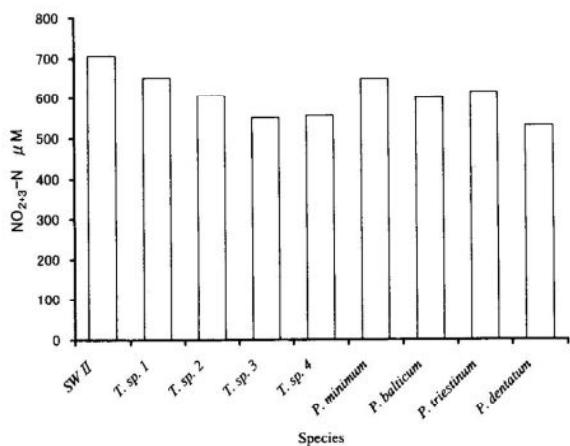


Fig.1-1.  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3 - \text{N}$  concentration of culture filtrates of various algae in experiment I.

Culture conditions : SW II medium, 15~18°C, 30-40  $\mu\text{mol}$  photon  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12:12h light and dark cycle).

SW II : intact SW II medium.

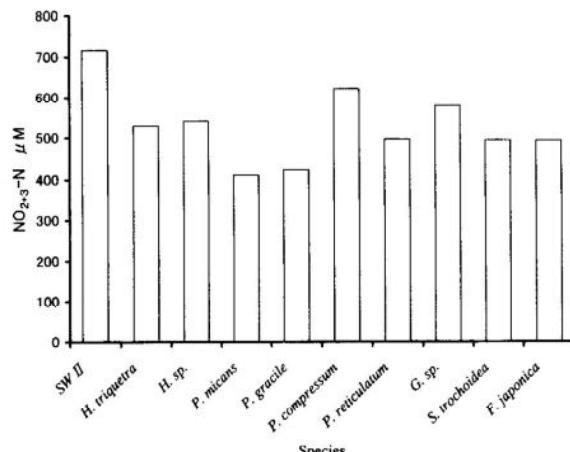


Fig.2-1.  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3 - \text{N}$  concentration of culture filtrates of various algae in experiment II.

Culture conditions: SW II medium, 15~18°C, 50-60  $\mu\text{mol}$  photon  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12:12h light and dark cycle).

SW II : intact SW II medium.

始した。その結果約3週間後にはほとんどの試験区で定常期に達し、その時の細胞密度は約5,000~12,000 cells/ml であった。各試験区の対数増殖期における1日当たりの分裂回数をFig.3-1に示す。対照区としたSW II 100%区では $0.300 \pm 0.021$ 回（平均±標準偏差）であり、過半の試験区がほぼ同様の値を示したが、*Thalassiosira* sp. 3区および、*Prorocentrum dentatum* 区では2割程度低い値となった。なお本試験におけるもう一方の対照区であるSW II 9%区は $0.234 \pm 0.038$ 回とSW II 100%区の8割弱の値を示した。前報<sup>1</sup>ではSW II 100%区とSW II 9%区との間に大きな違いは認められなかったのに、今回両者で大きな違いが認められたことについての理由は不明である。

試験IIでは *A.tamarens*e 細胞密度約60cells/mlで試験を

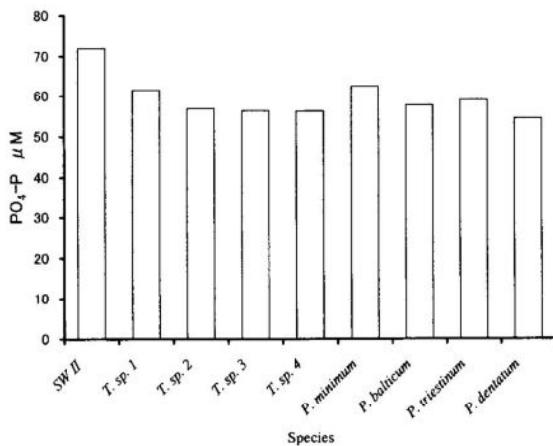


Fig.1-2.  $\text{PO}_4 - \text{P}$  concentration of culture filtrates of various algae in experiment I.

Culture conditions: same as in Fig.1-1.

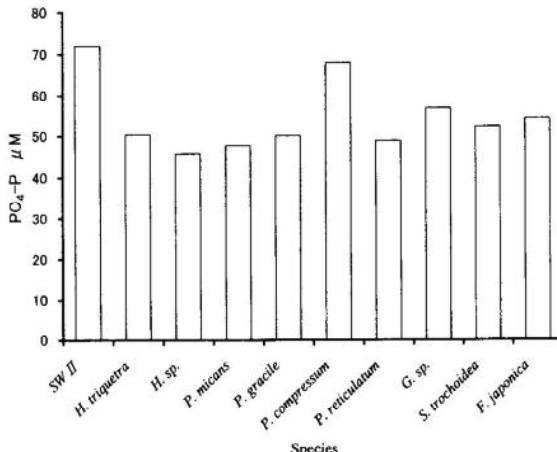


Fig.2-2.  $\text{PO}_4 - \text{P}$  concentration of culture filtrates of various algae in experiment II.

Culture conditions: same as in Fig.2-1.

開始した。試験Iに比べ増殖は活発で、2~3週間後に全試験区が定常期に達し、その時の細胞密度は約5,000~16,000 cells/mlであった。各試験区の対数増殖期における1日当たりの分裂回数をFig.3-2に示す。対照区としたSW II 100%区では $0.532 \pm 0.020$ 回であり、ほとんどの試験区がほぼ同様の値を示したが、*Heterocapsa* sp.区では $0.351 \pm 0.018$ 回、また*Prorocentrum compressum* 区では $0.298 \pm 0.013$ 回とそれぞれ対照区に比べ3~4割低い値を示した。なお、本試験では対照区3区(SW II 100%区、16%区、9%区)の増殖速度には大きな違いは認められなかった。

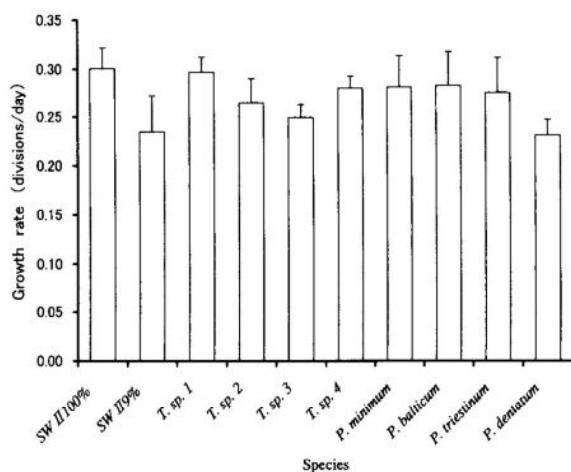


Fig.3-1. Growth rate of *A.tamarensis* cultivated in the medium containing culture filtrates of various algae (Exp. I). *A.tamarensis* cells were grown in the mixture of each culture filtrate (30 ml) and SW II (3 ml).

Initial cell density of *A.tamarensis* was adjusted to 160 cells/ml.

Culture conditions:  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $80 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12 : 12h light and dark cycle).

Vertical bars show standard deviation of triplicate.

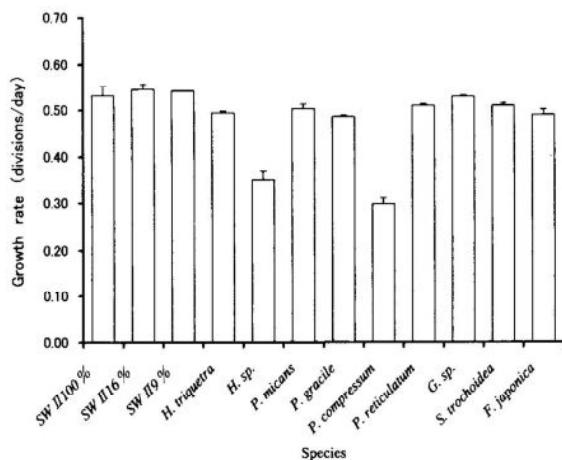


Fig.3-2. Growth rate of *A.tamarensis* cultivated in the medium containing culture filtrates of various algae (Exp. II). *A.tamarensis* cells were grown in the mixture of each culture filtrate (30 ml) and SW II (6 ml).

Initial cell density of *A.tamarensis* was adjusted to ca. 60 cells/ml.

Culture conditions and vertical bars: same as in Fig.3-1.

## 考 察

前報<sup>1)</sup>で *A.tamarensis* の増殖速度を低下させる作用が認められた *Thalassiosira* 属および *Heterocapsa* 属には多くの種が含まれることから<sup>6~8)</sup>、今回採取する時期や場所を変えて両属の近縁種を採取し検討を行った。

*Thalassiosira* 属について 4 種 (sp. 1~4) を調べたところ、うち 1 種 (*T. sp. 3*) が対照区に比べ約 2 割増殖速度を低下させた。本種は釜石湾から *T. sp. 4* と一緒に採取したものであり、培養ろ液調製後の N・P 濃度 (Fig.1-1~2) には両種ともほとんど差が無いにもかかわらず、*A.tamarensis* の増殖に及ぼす影響には違いが認められた。

また前報<sup>1)</sup>で、6 月に大船渡湾から採取した *Heterocapsa* 属の 1 種が対照区に比べ 6 割減と顕著な増殖抑制作用を示したことから、今回大きな期待を持って、6 月に採取した *H. triquetra* および 10 月に採取した *H. sp.* の 2 種について試験を行った。その結果、後者にのみ増殖抑制作用が認められた。上記 *Thalassiosira* 属の場合と同様に、これら 2 種の培養ろ液に含まれる N・P 濃度には大きな差が認められていない (Fig.2-1~2)。

今回新たに検討対象に加えた *Prorocentrum* 属については、我々は以前<sup>2, 3)</sup>に、フィールドにおける観察結果から、*A.tamarensis* 発生群の消長と *Prorocentrum* 属 3 種 (*balticum*, *compressum* および *triestinum*) の動向とが関連する可能性を提起してきたことから取りあげたものであ

る。今回はこれら 3 種に加え、岩手県沿岸に出現するほとんどの種を網羅しようとと考え、計 7 種について検討を試みた。その結果、*P. dentatum* および *P. compressum* の 2 種の培養ろ液に *A.tamarensis* の増殖速度を 2~4 割低下させる作用が認められた。特に後者は、ろ液調製時の細胞密度 (1,000 cells/ml) が同属の他種に比べ低く、ろ液に N・P が豊富に含まれているにもかかわらず、対照区の 4 割減と顕著な抑制作用を示したことから、本種はこれまでに同様な作用が認められた種の中でも強力な増殖抑制成分を分泌する、あるいは 1 細胞当たりの分泌量が多い種と考えられる。

上記のように、*A.tamarensis* の増殖に顕著な抑制作用が認められた種と認められない種とでは、培養ろ液の栄養塩類 (N・P) 濃度に大きな違いがないことから、これら抑制作用は、前報<sup>1)</sup>で述べたように、特定種が分泌する成分によるもの、すなわちアレロパシーと考えられる。

以上、前報<sup>1)</sup>の知見を引き継ぎ、さらに対象種を広げて、*A.tamarensis* の増殖に影響を及ぼす植物プランクトンの探索を行った結果について述べた。前報<sup>1)</sup>と今回の結果を併せて考えると、残念ながら *A.tamarensis* の増殖を完全に抑制する生物種を見出せていない。今後、より強い抑制作用を示す生物種の探索を継続するとともに、これまでの試験により顕著な増殖抑制作用が認められた *Heterocapsa* 属や *Prorocentrum* 属を用い、増殖抑制

関連成分の追究にも歩を進めて行く必要があると考える。

## 要 約

- 貝類毒化対策の進展に資するため、前報に引き続き、珪藻1属4種、渦鞭毛藻5属12種およびラフィド藻1種の培養ろ液が *A.tamarensense* の増殖に及ぼす影響について、室内における培養実験により検討し、以下の結果を得た。
- 1 硅藻 *Thalassiosira* 属の1種は、対照区に比べ、2割程度増殖速度を低下させた。
  - 2 渦鞭毛藻12種のうち、*Heterocapsa* 属の1種および *Prorocentrum* 属の2種は、対照区に比べ2~4割程度増殖速度を低下させた。このうち、*P. compressum* は他種に比べ低密度の増殖でも顕著な増殖抑制作用を示した。
  - 3 これら *A.tamarensense* の増殖速度を低下させる藻類の培養ろ液の栄養塩(N・P)濃度は、低下させない藻類のそれと比べて大きな違いがないことから、今回認められた増殖抑制作用は、前報と同様に特定の藻類が分泌する物質によるもの、すなわちアレロバシーによるものと考えられる。
  - 4 今後、これまでの試験により顕著な増殖抑制作用を示すことが明らかとなった *Heterocapsa* 属および *Prorocentrum* 属を用い、抑制作用の確認や抑制作用関連成分の追究を進める必要がある。

## 謝 辞

本研究の遂行に当って、関係する漁業協同組合には試料採集などに便宜を図っていただいた。ここに記して感謝申し上げる。

## 引用文献

- 1) 関口勝司・加賀克昌・加賀新之助・緒方武比古:微細藻類の培養ろ液が *Alexandrium tamarensense* の増殖に及ぼす影響. 岩手水技セ研報, **2**, 43-49(2000).
- 2) 齊藤 覚・関口勝司・渡部茂雄・清水道彦 : *Protogonyaulax tamarensis* の出現機構及び貝類の毒化レベルの解明に関する研究. 昭和59年度重要貝類毒化対策事業報告書(毒化予知手法開発研究), 岩手県水産試験場, 1985, pp.50.
- 3) 関口勝司・菊池達也・井ノ口伸幸: 岩手県における麻痹性貝毒研究の現状と問題点. 平成8年度東北ブロック水産業関係試験研究推進会議増養殖部会報告書, 東北区水産研究所, 21-32(1998).
- 4) H.Iwasaki:The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull.*, **121**, 173-187(1961).
- 5) 海洋観測指針(第1部): 第5章水質の観測, 5.5 栄養塩(気象庁編), (財)気象業務支援センター, 東京, 1999, pp.63-98.
- 6) 高野秀昭:珪藻綱、「日本産海洋プランクトン検索図説」(千原光雄・村野正昭編), 東海大学出版会, 東京, 1997, pp.169-260.
- 7) M. Iwataki, H. Takayama, K. Matsuoka, and Y. Fukuyo : *Heterocapsa lanceolata* sp. nov. and *Heterocapsa horiguchii* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae), two new marine dinoflagellates from coastal Japan. *Phycologia*, **41**, 470-479(2002).
- 8) M. Iwataki, L. Botes, T. Sawaguchi, K. Sekiguchi, and Y. Fukuyo: Cellular and body scale structure of *Heterocapsa ovata* sp. nov. and *Heterocapsa orientalis* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae). *Phycologia*, **42**, 629-637(2003).