渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* に対する 中心目珪藻類による増殖抑制作用

松原 賢,^{1a*} 長副 聡,^{2b} 山崎 康裕,^{1c} 紫加田知幸,¹
島崎 洋平,¹ 大嶋 雄治,¹ 本城 凡夫^{1d}

(2007 年 10 月 9 日受付, 2008 年 1 月 10 日受理)

¹九州大学大学院農学研究院水産生物環境学研究室,

²独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

Inhibitory effects of centric diatoms on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*

TADASHI MATSUBARA,^{1*} SOU NAGASOE,² YASUHIRO YAMASAKI,¹
TOMOYUKI SHIKATA,¹ YOHEI SHIMASAKI,¹
YUJI OSHIMA¹ AND TSUNEO HONJO¹

¹Laboratory of Marine Environmental Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, ²National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan

Results of a four-year study on phytoplankton in Hakozaki Harbor, Hakata Bay, Japan indicated that *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen *et* Moestrup was the cause of frequent blooms during the late fall period when centric diatoms such as *Skeletonema costatum* and genus *Chaetoceros* declined. In laboratory experiments, the growth of *A. sanguinea* was found to be strongly inhibited in bi-algal cultures with *S. costatum* and *Chaetoceros didymum*, but just slightly with *Asterionella japonica*. Furthermore, when *A. sanguinea* was cultured in nitrogen and phosphorus enriched filtrates with media on which *S. costatum* and *C. didymum* had grown densely, the growth rate of *A. sanguinea* in the filtrates was significantly lower than that in fresh control medium. These results suggest that in spring and summer allelopathy of bloomed centric diatoms was an important factor that inhibited the growth of *A. sanguinea* but in the late fall when the cell density of these diatoms declined, *A. sanguinea* could form blooms.

キーワード : *Akashiwo sanguinea*, アレロパシー, 増殖抑制, 中心目珪藻類

渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen *et* Moestrup は世界中の海域に広く存在する有害種である。¹⁾ Lu and Hodgkiss²⁾ は本種赤潮による魚類斃死の可能性を記述しており, また Botes *et al.*³⁾ は室内実験においてアワビの幼生や稚貝への致死作用を報告している。

さらに近年, 日本の有明海において冬季に *A. sanguinea* の赤潮がノリ漁場に発生するようになり, 本種のノリ色落ち被害への関与が懸念されている。

現場調査において, Robinson and Brown⁴⁾ は河川からの硝酸塩の供給が本種赤潮発生の引き金の役割を果た

* Tel : 81-952-66-2000. Fax : 81-952-66-4443. Email : tm4good@m3.gyao.ne.jp

^a 現所属 : 佐賀県有明水産振興センター (Saga Prefectural Ariake Fisheries Research and Development Center, Ashikari, Saga 849-0313, Japan)

^b 水産総合研究センター西海区水産研究所 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Nagasaki 851-2213, Japan)

^c 長崎大学水産学部海洋生物機能科学講座海洋生物物理化学研究室 (Division of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Bunkyo-machi 1-14, Nagasaki 852-8521, Japan)

^d 株式会社ミキモト博多真珠養殖 (Mikimoto Hakata Pearl Culturing Co., LTD., Kasuya, Fukuoka 811-0118, Japan)

していることを、Voltolina⁵⁾は泥中に休眠期細胞が存在する可能性を報告した。一方、室内実験において、鉄や窒素源、アミノ酸、およびビタミンの利用特性に関する報告、さらには本種の小型細胞に関する報告がある。⁶⁻⁸⁾ごく最近、我々は *A. sanguinea* の増殖に及ぼす光強度、水温及び塩分の影響について調べ、本種は 25°C で最大の増殖速度を示すが、非常に強い低水温耐性を有し、5°C でも長期間生存可能であることを明らかにした。⁹⁾このように本種の赤潮発生機構を解明する上で、物理的要因や化学的要因に関する情報は得られてきたが、生活史や他種植物プランクトンとの増殖競合に関する研究は不足している。

Kayser¹⁰⁾は *Gymnodinium splendens* (= *A. sanguinea*) と *Scrippsiella faeroense* 及び *Prorocentrum micans* 間における増殖競合について、関口ら¹¹⁾は *Gymnodinium sanguineum* (= *A. sanguinea*) の培養ろ液の *Alexandrium tamarense* に対する抑制作用について、Kubanek and Hicks¹²⁾は *Karenia brevis* の *A. sanguinea* に対する抑制作用について、さらに Yamasaki *et al.*¹³⁾は *Cochlodinium polykrikoides* の *A. sanguinea* に対する抑制作用について報告している。しかし、これまでに *A. sanguinea* と珪藻類間における増殖競合を調べた例はない。本研究において4年間にわたる博多湾箱崎港における植物プランクトンの調査から、*A. sanguinea* は珪藻類の出現が終息する初秋に出現し始め、晩秋にブルームを形成する傾向にあった。そこで、本種の増殖に適した水温条件である夏季に何故ブルームを形成できないのか、その原因のひとつとしてアレロパシーに着目し、*A. sanguinea* と夏季に同時に出現する珪藻種との増殖競合培養実験を行ったのでここに報告する。

方 法

植物プランクトン種組成及び栄養塩濃度調査 博多湾箱崎港 (33–62 N, 130–41 E) (水深約 3 m) において、2002 年 4 月から 2005 年 12 月にかけて原則として週 3～4 回の頻度で表層 (水深約 0.05 m) と底層 (底上約 0.2 m) の海水を各 1 L ずつ採水した。採水した海水試料は研究室に持ち帰り、1 mL 当たりの植物プランクトン種組成と細胞数を光学顕微鏡下で観察した。さらに、海水試料全量 (2 L) を孔径 5.0 μm の white SMWP Millipore filter (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) や孔径 20 μm のステンレス製のふるい (Tokyo Screen Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 3 mL にまで濃縮し、*A. sanguinea* など、大型植物プランクトンの細胞数を調べた。また、植物プランクトン種組成調査用に採水した海水試料を孔径 0.22 μm の GV filter (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) でろ過後、凍結保存した (−30°C)。そして後日、

オートアナライザー (Bran Luebbe 社 Traacs 800) を用いて無機 3 態窒素 (DIN) とリン酸塩の濃度を分析した。

増殖競合試験

1. 供試生物と培地 試験に用いた *Akashiwo sanguinea* は 2005 年 10 月に博多湾箱崎港にて単離後、ピペット洗浄法と走光性を利用した泳がせ法で得られた無菌株である。無菌の確認は STP 無菌検査培地及び DAPI 染色検査で行った。また *Skeletonema costatum* は国立環境研究所より購入した NIES-324 無菌株で、*Chaetoceros didymum* 及び *Asterionella japonica* は 2005 年に博多湾姪浜港 (33–59 N, 130–32 E) より単離した単一藻培養株を用いた。供試生物の継代培養および二者混合培養実験には伊藤、今井¹⁴⁾が報告している改変 SWM-3 培地からカルシウムパントテン、ニコチン酸、p-安息香酸、ビオチン、イノシトール、葉酸、チアミンを除いた組成¹⁵⁾からなる塩分 32 の培地を使用した。培養実験は 100 mL 容三角フラスコに 50 mL の培地を加えて行った。基本海水として福岡県沖の島 (34–24 N, 130–10 E) 周辺から採集した貯蔵海水を使用した。継代培養は水温 25°C、光源は白色蛍光灯 (約 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) を用い、12L : 12D の明暗周期条件下で行った。なお光強度の測定は Quantum Scalar Laboratory Irradiance Sensor (QSL-2100/2101: Biospherical Instruments Inc.) を用いて行った。

2. 二者混合培養実験 供試植物プランクトンの継代培養株を水温 25°C、光強度約 550 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、12L : 12D の明暗周期の条件に移した後、*Akashiwo sanguinea*

Table 1 Combinations of initial cell densities of *Akashiwo sanguinea* and other diatoms

	<i>A. sanguinea</i> (cells/mL)	Diatoms (cells/mL)
<i>A. sanguinea</i> - <i>S. costatum</i>	100	0
	0	100
	0	10,000
	100	100
	100	10,000*
<i>A. sanguinea</i> - <i>C. didymum</i>	100	0
	0	100
	100	100
	100	10,000
<i>A. sanguinea</i> - <i>A. japonica</i>	100	0
	0	100
	100	100

Asterisked combination was conducted at 25 and 15°C.

の初期細胞密度が約 100 cells/mL となるようにし、珪藻類の *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymum* 及び *Asterionella japonica* の初期細胞密度は 100~500 cells/mL となるように別々の容器に接種し、3~7 日間の馴致培養を行った。対数増殖期にある馴致培養細胞を用いて Table 1 に示すような初期細胞密度の組み合わせで二者混合培養を行った。各試験に対し 3 個の 100 mL 容三角フラスコ (液量 50 mL) に細胞を接種した。そして 1~2 日ごとに 1 mL を採取して、Sedwick-Rafter chamber を用いて *A. sanguinea* 及び珪藻類の細胞数を顕微鏡観察によって計数し、種類毎の増殖を調べた。なお、*S. costatum* 及び *C. didymum* の初期密度を 10,000 cells/mL に設定した二者混合培養において培養中の栄養塩の欠乏が懸念されたので培地と同程度の濃度となるように硝酸塩とリン酸塩をそれぞれ培養 5 日後と 6 日後に添加した。初期細胞密度 100 cells/mL の *A. sanguinea* と初期細胞密度 10,000 cells/mL の *S. costatum* との組み合わせについては 15°C で継代培養しておいた株を用いて上記と同様の方法で 15°C での二者混合培養を実施した。なお、この試験区において栄養塩の添加は行っていない。

3. 珪藻類の培養ろ液中での *Akashiwo sanguinea* の増殖実験 本実験の目的は珪藻類 *S. costatum* 及び *C. didymum* によって培地中に分泌された有機物によるアレロパシーで *A. sanguinea* の増殖が抑制されているかどうかを調べることにある。初期密度を 10,000 cells/mL に設定した *S. costatum* の 5 日目の単独培養液及び初期密度を 100 cells/mL に設定した *C. didymum* の 6 日目の単独培養液を孔径 0.22 μm の GV filter (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) でろ過し、3 個の 100 mL 容三角フラスコにろ過液を 35 mL 分注

し、培地と同程度の濃度で硝酸塩とリン酸塩を添加して培養ろ液を作製した。そして水温 25°C、光強度約 550 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 12L : 12D の明暗周期の条件下で *A. sanguinea* の初期密度を 100 cells/mL でそれぞれの培養ろ液中に接種し、増殖曲線から増殖速度を算出して、対照培地で単独に培養した時の *A. sanguinea* の増殖速度と比較した。

試験期間における培地中の微量金属類及びビタミン類の不足が *A. sanguinea* の増殖に及ぼす影響を調べるために、対照培地と同程度の濃度で硝酸塩とリン酸塩のみを加えた塩分 32 のろ過海水中における *A. sanguinea* の増殖速度も調べた。また、二者混合培養やろ液の処理過程において硝酸塩とリン酸塩を補充添加したため、硝酸塩とリン酸塩の過剰添加による増殖への影響が懸念された。そこで、硝酸塩とリン酸塩を通常の 2 倍濃度に設定した培地における *A. sanguinea* の増殖を調べた。これらの追加実験は、100 mL 容三角フラスコにろ過海水及び培地を 50 mL 加えて、水温 25°C、光強度約 550 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 12L : 12D の明暗周期の条件下で前と同様の手順で行った。

全ての試験における各株の増殖速度は Guillard¹⁶⁾の方法に従って算出した。

4. 培養液中の硝酸塩及びリン酸塩濃度の測定 硝酸塩及びリン酸塩を添加した二者混合培養中のこれら栄養塩濃度の測定を実験の終了後に行った。*Skeletonema costatum* との二者混合培養においては添加する直前の濃度も測定した。測定用の試料は三角フラスコから 10 mL 採取し、500 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を孔径 0.22 μm の GV filter (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) でろ過後、凍結保存した (-30°C)。そして後日、オートアナライザー (Bran Luebbe

Fig. 1 Seasonal changes of *Akashiwo sanguinea* (●), *Chaetoceros* spp. (Δ), *Skeletonema costatum* (□) and *Asterionella japonica* (◆) at Hakozaki Harbor in 2002 (a), 2003 (b), 2004 (c) and 2005 (d).

Fig. 2 Seasonal changes of dissolved inorganic nitrogen (DIN) and phosphate at Hakozaki Harbor in 2002 (a), 2003 (b), 2004 (c) and 2005 (d). The value is the moving average of seven days.

社 Traacs 800) で硝酸塩及びリン酸塩の濃度を測定した。

結 果

植物プランクトン種組成及び栄養塩濃度調査 博多湾箱崎港における植物プランクトン調査の結果を Fig. 1 に示す。図中の細胞密度は表層と底層の平均値である。いずれの年にも珪藻類 *Skeletonema costatum* と *Chaetoceros* 属が 6~9 月に $10\sim100\times10^3$ cells/mL に達する赤潮を形成した。また, *Asterionella japonica* は 9 月以降にしばしば 1,000 cells/mL に及ぶ細胞密度で優占した。一方, *Akashiwo sanguinea* は春から夏にかけて低密度で時折確認されるに過ぎず, これらの季節にブルームを形成することはなかった。それに対して, 珪藻類の密度が減少する初秋に *A. sanguinea* は増殖し始め, 全ての珪藻類が消えた 2002 年と 2004 年の晩秋にブルームを形成した。2003 年と 2005 年にブルームは形成されなかった。しかし, 珪藻類が衰退した秋季以降に *A. sanguinea* は低密度ながら, 両年共に観察された。Fig. 2 に各年 5 月から 12 月にかけての無機 3 態窒素 (DIN) とリン酸塩の表層と底層の平均値を 7 日間の移動平均で示す。なお, 2003 年度の 7 月中旬~8 月にかけては欠測である。DIN の値は 2002 年 6 月上旬, 8 月上旬及び 11 月から 12 月にかけて, 2003 年と 2004 年 5 月から 7 月にかけて, 2005 年 10 月から 12 月にかけてそれぞれ高い値を示した。リン酸塩濃度はいずれの年にも 10 月から 12 月にかけて $0.5\ \mu\text{M}$ 付近かそれ以上の値で推移していた。2002 年, 2003 年及び 2005 年の 5 月から 6 月にやや低い値を示したが, 7 月以降からは上昇した。しかし, 2004 年においてリン酸塩濃度は 6 月と 7 月下旬に低く, 8 月以降に上昇した。

増殖競合試験

1. 二者混合培養実験 初期密度が 100 cells/mL の *Skeletonem costatum* と混合培養すると *Akashiwo sanguinea* の増殖は *S. costatum* の細胞密度が 10,000 cells/mL 近くに達した時点から抑制を受け始め, *S. costatum* が定常期に入り, その後急速に減少した後も強い抑制を受けた (Fig. 3-a)。その際, 細胞の色が黄褐色の正常細胞 (Fig. 5-a) と比較して黒ずみかつ小~中型の形態異常細胞 (Fig. 5-b, c, d) が次第に観察され始め, 培養後期には形態及び色調異常細胞が多数を占めるようになった。我々は栄養欠乏状態の *A. sanguinea* の形態をこれまで何度も観察したが, 混合培養した際に現れる黒ずんだ色調の細胞を一度も観察していない。単独培養の *S. costatum* も混合培養とまったく同時期に急速に減少した。次に, *S. costatum* を初期密度 10,000 cells/mL で混合培養した時, *A. sanguinea* は培養初期からほとんど増殖できず, 初期密度が 100 cells/mL の *S. costatum* と混合培養した場合と同様に培養後期には大半の細胞は黒ずんでいた。この実験区では培養 5 日目に硝酸塩とリン酸が添加され, 培養 12 日目までに *S. costatum* の急速な減少は観察されなかった (Fig. 3-b)。

いずれの接種密度で *C. didymum* を *A. sanguinea* と混合培養した際にも, *A. sanguinea* の増殖は *C. didymum* の細胞が急速に減少する前から *C. didymum* の初期細胞密度に依存的な抑制を受け, その後 *C. didymum* が急速に減少した後も強い抑制を受けた (Fig. 4-a, b)。細胞形態や色調の異常も *S. costatum* と混合培養した場合と同様であった。また, 培養途中に硝酸塩及びリン酸塩を補充した *S. costatum* 及び *C. didymum* との二者混合培養において, 実験終了後に硝酸塩とリン酸塩の濃度を分析したところ Table 2 に示すように, 十分な濃度で硝酸塩とリン酸塩が残存していたにもかかわらず, *A.*

Fig. 3 Growth interactions between *Akashiwo sanguinea* and *Skeletonema costatum*. (a) Each initial cell density of *A. sanguinea* and *S. costatum* was 100 cells/mL. (b) Initial cell densities of *A. sanguinea* and *S. costatum* were 100 and 10,000 cells/mL respectively. The arrow indicates the day when nitrate and phosphate were added.

Fig. 4 Growth interactions between *Akashiwo sanguinea* and *Chaetoceros didymum*. (a) Each initial cell density of *A. sanguinea* and *C. didymum* was 100 cells/mL. (b) Initial cell densities of *A. sanguinea* and *C. didymum* were 100 and 10,000 cells/mL respectively. The arrow indicates the day when nitrate and phosphate were added.

sanguinea の増殖は回復しなかった (Fig. 3-b, 4-b)。一方, *Asterionella japonica* と混合培養した際に, *A. sanguinea* は僅かな抑制を受けるにとどまり, 培養10日目の細胞密度は単独培養の場合の60%以上に達した (Fig. 6)。また15°Cにおける *S. costatum* との二者混合

培養において, *A. sanguinea* の増殖は抑制され, 培養8日目の細胞密度は単独培養した場合の30%以下であった (Fig. 7)。

2. 珪藻類の培養ろ液中での *Akashiwo sanguinea* の増殖実験 *Akashiwo sanguinea* は *Skeletonema costatum*

Fig. 5 (a) A normal cell of *Akashiwo sanguinea*. (b, c and d) Abnormal cells of *A. sanguinea* in bi-algal culture with *Skeletonema costatum*.

及び *Chaetoceros didymum* の培養ろ液に接種すると接種開始から約 2 日間、ほとんど増殖できなかった。その後、対照培地における増殖速度（約 0.90～0.94 divisions/day）に比較してやや低い速度（*S. costatum* のろ液中で約 0.42, *C. didymum* のろ液中で 0.66 divisions/day）ではあるが、増殖を開始した（Fig. 8-a, b）。これら珪藻類の培養ろ液中で *A. sanguinea* を培養した場合には、二者混合培養実験で観察されたような外部形態や色調の異常は確認されなかった。また、硝酸塩とリン酸

Table 2 Nitrate and phosphate concentrations of bi-algal culture of *Akashiwo sanguinea* and *Skeletonema costatum* (100 cells/mL: 10,000 cells/mL) on days 5 (before enrichment) and 12, and those of bi-algal culture of *A. sanguinea* and *Chaetoceros didymum* (100 cells/mL: 10,000 cells/mL) on day 12

Experimental conditions	nutrient	day 5 (before enriched)	day 12
<i>A. sanguinea</i> : <i>S. costatum</i> (100 cells/mL : 10,000 cells/mL)	nitrate	423 $\mu\text{mol/L}$	296 $\mu\text{mol/L}$
	phosphate	4.3 $\mu\text{mol/L}$	21.6 $\mu\text{mol/L}$
<i>A. sanguinea</i> : <i>C. didymum</i> (100 cells/mL : 10,000 cells/mL)	nitrate	—	781 $\mu\text{mol/L}$
	phosphate	—	40.1 $\mu\text{mol/L}$

Fig. 6 Growth interactions between *Akashiwo sanguinea* and *Asterionella japonica*. Each initial cell density of *A. sanguinea* and *A. japonica* was 100 cells/mL.

Fig. 7 Growth interactions between *Akashiwo sanguinea* and *Skeletonema costatum* at 15°C. Initial cell densities of *A. sanguinea* and *S. costatum* were 100 and 10,000 cells/mL, respectively.

Fig. 8 Growth effects of culture filtrates of diatoms on growth of *Akashiwo sanguinea*. (a) Growth of *A. sanguinea* in nitrogen (N) and phosphorus (P)-enriched filtrate of *Skeletonema costatum* (0.42 divisions/day). (b) Growth of *A. sanguinea* in N and P-enriched filtrate of *Chaetoceros didymum* (0.66 divisions/day). Growth of *A. sanguinea* in fresh medium was 0.94 divisions/day (a) and 0.90 divisions/day (b).

Fig. 9 (a) Growth of *Akashiwo sanguinea* in N and P-enriched sea water (0.90 divisions/day). (b) Growth of *A. sanguinea* in medium (1.00 divisions/day) to which N and P were added at double concentration. Growth of *A. sanguinea* in fresh medium was 0.96 divisions/day (a) and 1.02 divisions/day (b).

塩のみを加えたる過海水中（微量金属類とビタミン類は無添加）における *A. sanguinea* の増殖速度（0.96 divisions/day）は通常の培地における増殖速度（0.90 divisions/day）と同等であった（Fig. 9-a）。さらに、硝酸塩とリン酸塩を通常の2倍濃度に調整した培地中においても *A. sanguinea* の増殖速度（1.00 divisions/day）に過剰添加の影響は見られず、通常の培地での増殖速度（1.02 divisions/day）と同等であった。（Fig. 9-b）

考 察

Akashiwo sanguinea と博多湾箱崎港における主要な珪藻類 *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros didymum* 及び *Asterionella japonica* との増殖競合試験の結果, *A. sanguinea* は *S. costatum* と *C. didymum* によって強い増殖抑制作用を受けた。この増殖抑制作用は混合培養中の珪藻類が高密度に達した際に生じるので, 両者の密度効果により *A. sanguinea* の増殖が抑制された可能性も考えられる。しかし, 栄養物質を補給した珪藻類の培養ろ液で *A. sanguinea* の増殖が抑制を受けたことから, 我々は混合培養中の増殖抑制効果は主にアレロパシーによる

ものとする。混合培養中の *S. costatum* と *C. didymum* の細胞密度が 10,000 cells/mL に達する頃から, *A. sanguinea* はほとんど増殖できず, その増殖抑制作用は二者混合培養液に硝酸塩とリン酸塩を添加した後も続いた（Fig. 3, 4）。よって, *A. sanguinea* が受けた増殖抑制は硝酸塩とリン酸塩の枯渇のためではない。硝酸塩とリン酸塩が培養5日目に補充された試験区では *S. costatum* の急速な減少はなく, 定常期が延長したことから, 他の区における珪藻類の急速な減少は栄養塩枯渇とそれに伴う自己阻害による可能性がある。

混合培養において *C. didymum* でも同様に急速な細胞密度の減少が観察された。また, *A. sanguinea* への増殖抑制作用は珪藻類が急速に減少する前に始まり, 減少した後も続いた（Fig. 3-a, 4）。さらに, 高密度に増殖した *S. costatum* 及び *C. didymum* の培養液をろ過し, 硝酸塩及びリン酸塩を添加したろ液中でも, *A. sanguinea* の増殖がある程度抑制された（Fig. 8）ことから, この抑制作用には珪藻類によって培地中に分泌された, あるいは細胞崩壊後に培地中に放出された物質によるアレロパシーの関与が示唆された。今回用いた *C. didymum* 株

は有菌株であるため *C. didymum* との混合培養区における *A. sanguinea* の増殖抑制作用には細菌の関与も考えられる。しかしながら、有菌株 *C. didymum* との混合培養において、*A. sanguinea* の増殖や形態異常細胞が無菌株 *S. costatum* と混合培養した際の状況と非常に類似していたため、我々は有菌株の *C. didymum* から受ける *A. sanguinea* の抑制作用も *C. didymum* から培地中に分泌された物質によるアレロパシーの為であると考ええる。なお、室内実験において珪藻類がアレロパシーにより鞭毛藻類の増殖速度を抑制することはこれまでも報告されている。^{11,15)}

二者混合培養において硝酸塩とリン酸塩のみを添加したので、微量金属やビタミン類の枯渇によって *A. sanguinea* が増殖できなくなったことも懸念される。しかし、同様に硝酸塩とリン酸塩のみを添加したろ過液中で *A. sanguinea* が2日間ほどの停滞の後に緩やかにではあるが増殖を開始した (Fig. 8) こと、また硝酸塩とリン酸塩のみを添加したろ過海水中でも *A. sanguinea* は高い速度で増殖した (Fig. 9-a) ことなどから、混合培養中の微量金属やビタミン類が枯渇し、それが *A. sanguinea* の増殖抑制に大きく関与しているとは考えがたい。また、*A. sanguinea* の増殖は硝酸塩とリン酸塩を通常の2倍濃度に設定した培地中でもその過剰添加の影響はまったく受けなかった (Fig. 9-b)。このことから、二者混合培養やろ液作製の硝酸塩及びリン酸塩の過剰添加の影響は受けていないであろう。Hansen¹⁷⁾ は pH の上昇に対する耐性の違いが現場において優占する植物プランクトンの種類を決定する大きな要因であると述べている。しかしながら、今回実験に用いた培地には pH の変化を抑える緩衝剤が含まれており、我々と同じ培地を使用した Yamasaki *et al.* の実験¹⁵⁾ では大きな pH の上昇は起こっていない。以上のことから、今回確認された珪藻類からの *A. sanguinea* に対する増殖抑制作用は栄養塩競合や pH の上昇によるものではないと考える。しかし、珪藻類のろ液による *A. sanguinea* に対する抑制作用は二者混合培養した時よりも弱かった。このことから、珪藻によって分泌されたろ液中のアレロパシー物質が培地中で速やかに活性を失ってしまった可能性がある。また、Uchida *et al.*¹⁸⁾ は *Gyrodinium instriatum* と *Heterocapsa circularisquama* の混合培養の結果、*H. circularisquama* による *G. instriatum* の増殖抑制作用への細胞間接触の関与を明らかにしており、今回の二者混合培養においてもアレロパシーの他に珪藻類が減少する前に *A. sanguinea* との細胞間接触作用が加わって *A. sanguinea* の増殖が抑制を受けた可能性もある。今後、Yamasaki *et al.*¹⁵⁾ が行っているように cell culture insert plate を用いて細胞間接触の有無を検討する必要がある。

我々はこれまでに *A. sanguinea* の増殖速度が最高と

なる組み合わせは水温 25℃、塩分 20 の条件であることを明らかにしており、我が国沿岸域において *A. sanguinea* の増殖に好適な条件は春から夏の季節に相当する。⁹⁾ しかし、今回の箱崎港における植物プランクトンの調査の結果、本来 *A. sanguinea* の増殖に好適な季節である春から夏にかけて *S. costatum* と *Chaetoceros* 属などの珪藻類が優占していて、*A. sanguinea* の出現はほとんど観察されず、稀に観察される場合も小型細胞かもしれない (Fig. 5-b) に示した小型で黒ずんだ細胞であった。そして、珪藻類が消滅し、水温が低下した秋以降に *A. sanguinea* は毎年規則的に出現し、しばしば高密度で発生した (Fig. 1)。植物プランクトンにはシストを形成する種が多い。シストを形成する種はその周年出現パターンがシストの発芽特性により支配されている場合が多い。例えば瀬戸内海における7月から8月にかけてのラフィド藻類 *Chattonella* 属のブルーム形成は春から夏にかけてシストからの栄養細胞の発芽に依存している。^{19,20)} 一方、*A. sanguinea* の休眠期細胞の存在を Voltolina⁵⁾ は示唆しているが、実際にシストの確認はなされていない。我々の研究室では博多湾箱崎港の底泥を用いて発芽試験を数度試みた。しかし、*A. sanguinea* の発芽を確認することは出来ず、少なくとも博多湾箱崎港の底泥中に *A. sanguinea* のシストは存在しないと考えられる。さらに、我々は博多湾湾口部において本種の栄養細胞をはば通年観察しており (松原 未発表)、湾口部由来の海水中の栄養細胞が箱崎港における本種のブルーム形成に大きく寄与していると考えられる。

Fig. 2 に示すように毎年5月から6月の珪藻類繁茂期に、現場海域のリン酸塩の濃度がやや低い時期が観測された。しかし、7月から8月にかけてリン酸塩濃度は上昇しており、珪藻類との栄養塩競合が *A. sanguinea* の出現を規制している主要因とは考えがたい。また、春から夏における珪藻類の繁茂による水中光強度の減少などによる *A. sanguinea* の増殖抑制も考えられるが、我々は今回室内実験で確認した珪藻類の強い増殖抑制作用が増殖に好適な季節にもかかわらず現場海域において *A. sanguinea* の出現を抑えた大きな要因であると考ええる。

秋に出現する *A. japonica* との混合培養で *A. sanguinea* は弱い増殖抑制作用を受けるにとどまった。*A. japonica* は箱崎港において、*A. sanguinea* の初期発生時期でもある初秋に発生した。強い抑制作用をもつ *S. costatum* と *Chaetoceros* 属のブルームから解放されて、*A. sanguinea* の増殖が可能になるこの時期に、新たに出現する珪藻 *A. japonica* によって強い増殖抑制作用を受けないことは、*A. sanguinea* にとってその後のブルーム形成を容易にする。以上のように、3種の珪藻に対して *A. sanguinea* の受ける増殖抑制作用が種特異的であることは非常に興味深いことである。

15℃における *S. costatum* との混合培養でも *A. sanguinea* の増殖は抑制された。すなわち、珪藻類からの抑制作用が低温条件下で弱くなることや抑制作用に対する *A. sanguinea* の耐性が低温下で強くなるようなことはなさそうである。故に、仮に、*S. costatum* と *Chaetoceros* 属が秋に存在すると *A. sanguinea* のブルーム形成に大きな障害を及ぼすことが予想される。しかし、箱崎港では秋になるとこれらの珪藻類は出現しなくなり、秋の水温で十分に増殖が可能な *A. sanguinea* はブルームを形成できた。今後、本港において珪藻類が秋季に増殖しなくなる理由を秋季の水温や光強度及び日長を考慮して明らかにする必要がある。

最後に、Fig. 1 に示すように1月から4月にかけて箱崎港において珪藻類が低密度であるにもかかわらず、*A. sanguinea* は2005年を除いてはほとんど確認されていない。室内実験において10℃以下で *A. sanguinea* の増殖速度は非常に低い⁹⁾ことから、1月から2月にかけて本種が出現しない第1の要因は低水温のためと考えられる。本種のシストは箱崎港において観察されていないことから、冬季に *A. sanguinea* が消滅した後、再度箱崎港で観察されるには他所からの栄養細胞の供給が必要であろう。箱崎港で *A. sanguinea* がほとんど観察されない時期に本種の栄養細胞が低密度ながら観察されるのは博多湾湾口部に限られ、湾口部の細胞が水温上昇に伴い徐々に湾全体に拡大し始め、湾岸にも補給されることになる(松原ら 未発表)。それ故に、3月から4月にかけて水温が上昇したにも関わらず箱崎港で *A. sanguinea* の生息が確認されないのは、この時期にはまだ栄養細胞の補給が少なかった(松原ら 未発表)ためと考えられる。

文 献

- Steidinger KA, Tangen K. Dinoflagellates. In: Tomas CR (ed). *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc., San Diego. 1996; 387-584.
- Lu SH, Hodgkiss IJ. Harmful algal bloom causative collected from Hong Kong waters. *Hydrobiologia* 2004; **512**: 231-238.
- Botes L, Smit AJ, Cook PA. The potential threat of algal blooms to the abalone (*Haliotis midae*) mariculture industry situated around the South African coast. *Harmful Algae* 2002; **2**: 247-259.
- Robinson MG, Brown LN. A recurrent Red Tide in a British Columbia Coastal Lagoon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1983; **40**: 2135-2143.
- Voltolina D. The origin of recurrent blooms of *Gymnodinium sanguineum* Hirasaka in a shallow coastal lagoon. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1993; **168**: 217-222.
- Doucette GJ, Harrison PJ. Aspects of iron and nitrogen nutrition in the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *Mar. Biol.* 1991; **110**: 175-182.
- Taylor FJR. Ecology of dinoflagellates. In: Taylor FJR (ed). *The Biology of Dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1987; 407-429.
- Silva ES, Faust MA. Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia* 1995; **34**: 396-408.
- Matsubara T, Nagasoe S, Yamasaki Y, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2007; **342**: 226-230.
- Kayser H. Growth interactions between marine dinoflagellates in multispecies culture experiments. *Mar. Biol.* 1979; **52**: 357-369.
- 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 tamarense* の増殖に及ぼす影響. 岩手水技セ研報 2000; **2**: 43-49.
- Kubaneck J, Hicks MK. Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.* 2005; **50**: 883-895.
- Yamasaki Y, Nagasoe S, Matsubara T, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T. Growth inhibition and formation of morphologically abnormal cells of *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) G. Hansen et Moestrup by cell contact with *Cochlodinium polykrikoides* Margalef. *Mar. Biol.* 2007; **152**: 157-163.
- 伊藤彦彦, 今井一郎. ラフィド藻. 「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編) 秀和, 東京. 1987; 304-473.
- Yamasaki Y, Nagasoe S, Matsubara T, Shikata T, Shimasaki Y, Oshima Y, Honjo T. Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2007; **339**: 83-92.
- Guillard RRL. Division rates. In: Stein JR (ed). *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. 1973; 289-311.
- Hansen PJ. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquat. Microb. Ecol.* 2002; **28**: 279-288.
- Uchida T, Toda S, Matsuyama Y, Yamaguchi M, Kotani Y, Honjo T. Interactions between the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1999; **241**: 285-299.
- Imai I, Itoh K. Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.* 1987; **94**: 287-292.
- Imai I, Itakura S, Itoh K. Life cycle strategies of the red tide causing flagellates *Chattonella* (Raphidophyceae) in the Seto Inland Sea. *Mar. Poll. Bull.* 1991; **23**: 165-170.