

多価不飽和アルデヒド (PUAs) の添加による珪藻類の増殖阻害に関する研究

海産の珪藻類は、有害有毒赤潮の原因種となるラフィド藻や渦鞭毛藻よりも一般的に分裂速度が大きく、分裂速度だけを考慮すれば現場で常に優占すると考えられる。しかし、実際の現場では優占していた珪藻類が減少し、その後有害有毒赤潮の原因生物が増殖し優占する事態がしばしば観察されている。このような珪藻類減少の原因の一つとして、個体群全体の自滅的な減少が示唆されており、そのキーとして珪藻類が放出する代謝産物である PUAs (Polyunsaturated aldehydes, 多価不飽和アルデヒド) の存在が挙げられている。この PUAs は、栄養塩の枯渇などのストレスにより誘発される珪藻の老化といった内因性の要因や、ウイルスによる攻撃などの外因性の要因によって珪藻類の細胞膜破砕が引き起こされた際に産出されると考えられている。室内実験により、海産の珪藻類の約 1/3 の種が PUAs を産生し、そのような珪藻類を捕食したカイアシ類やウニ類の卵の孵化を妨害することが知られている。PUAs は珪藻類自らにも悪影響を与えると考えられているが、全体として植物プランクトンへの PUAs の影響に関する知見は非常に少ない。本研究では、*Ditylum brightwellii*, *Nitzschia longissima*, *Thalassionema nitzschioides* の珪藻培養株 3 種に対して PUAs を添加し、珪藻に対して与える影響を明らかにすることを目的とした。

本研究での培養実験には、無菌培養株を用いる必要がある。研究室で維持している珪藻類を無菌化するため、以下の処理作業を行った。48 ウェルマイクロプレートのウェルに、改変 SWM-3 培地で培養した珪藻類を入れ、抗生物質である AM9 を濃度 10%, 1%, 0.1% で添加した。それらを温度 15°C, 明暗周期 14 h L: 10 h D, 光強度 25-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定したインキュベータ中で 12 日間培養し、特に良好に増殖していることが確認された 8 個のウェルの中の培養を新しいマイクロプレートのウェルに移して新たな培地中に植え込み、前述した条件下で更に 1 週間培養した。増殖を確認した後、DAPI 染色と直接検鏡法による無菌株の作成の成否を確認した。

次に、珪藻類 4 種について改変 SWM-3 培地における培養実験を行い、対数増殖期及び定常期の把握を試みた。改変 SWM-3 培地が 60 mL 入った三角フラスコに、細胞密度が約 100 cells/mL となるように珪藻類の細胞を接種し、培養を行った。培養条件は、明暗周期 14 h L:10 h D, 光強度 25-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とし、*D. brightwellii* と *Stephanopyxis nipponica* は 15°C, *N. longissima* は 20°C, *T. frauenfeldii* は 25°C で培養した。細胞密度の計数は倒立顕微鏡を用いて培養開始から 1 日毎に行い、計数結果から細胞密度の変化をモニターした。

続いて、PUAs の濃度調節に用いる有機溶媒のメタノールが珪藻類の増殖に影響を与えないか確かめるための予備実験を行った。実験には無菌の *D. brightwellii* を用い、メタノール濃度は 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5% の 5 段階設定した。メタノールの濃度毎にそれぞれ 4 本ずつ試験管を用意し、温度 20°C, 明暗周期 14 h L:10 h D, 光強度 25-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で培養した。培養開始日から毎日蛍光値を計測し、メタノール濃度の違いによる増殖能の違いをモニターした。

PUAs は、市販されている 2E, 4E-heptadienal, 2E, 4E-octadienal, 2E, 4E-decadienal の 3 種類を用い、添加後の培地内で濃度が 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ となるように、添加する前日に純メタノールを用いて希釈した。PUAs の添加実験では、まず改変 SWM-3 培地が 60.97 mL 入った三角フラスコに珪藻類の培養株 1 mL を添加し、温度 20°C, 明暗周期 14 h L:10 h D, 光強度 25-40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で 5 日間培養した。珪藻類の良好な増殖が確認された 5 日目に、PUAs をそれぞれのフラスコに 0.03 mL 添加し、フラスコ内でよく攪拌した後、蛍光値計測用に 20 mL を試験管に移し、残りは細胞密度計測用とした。蛍光値計測用の試験管と三角フラスコは PUAs 添加後も先述の条件下で引き続き培養し、0, 12, 24, 48, 72, 96 時間後に試験管内の蛍光値及び三角フラスコ内の細胞密度を計数し、PUAs が及ぼす影響を検討

した。

珪藻4種の改変 SWM-3 培地における培養実験では、*D. brightwellii* は9日目に最大値 9730 cells mL⁻¹, *S. nipponica* は15日目に最大値 16400 cells mL⁻¹, *N. longissima* は13日目に最大値 11950 cells mL⁻¹, *T. nitzschioides* は13日目に最大値 17900 cells mL⁻¹に達し、定常期及び死滅期を迎えた。

メタノール添加実験では、メタノール無添加区と添加区で *D. brightwellii* の増殖に差が出るのが分かり、実験開始28日目にメタノール濃度0%の区で蛍光値が55.75, 0.005%の区で23.95に達した一方で、5%の区ではほとんど蛍光値は検出されなかった。今回の実験結果は、少量のメタノールであっても *D. brightwellii* の増殖に悪影響を与えることを示しており、メタノール濃度が0.7%までであれば珪藻類の増殖率に影響を与えないという、これまでのPUAs実験の前提に疑問を提唱するものとなった。しかしながら、さらなる詳細な検討が必要と思われる。

PUAsの添加により、一部の実験区で珪藻類の増殖阻害及び死滅が観察され、*D. brightwellii* octadienal 10 µMの添加区で増殖阻害、decadienal 10 µMの実験区で死滅が認められた。また、*N. longissima* と *T. nitzschioides* は decadienal 10 µM の区で一時的な増殖阻害が引き起こされた。形態的な面では、*D. brightwellii* 及び *N. longissima* では細胞質の収縮、*T. nitzschioides* では細胞の変形が観察された。

PUAsの添加実験では、珪藻種によって応答が異なることが観察された。また、heptadienalが珪藻類の増殖に影響を及ぼさなかった一方で、decadienalは実験を行った3種全てで一時的な増殖阻害及び死滅を誘発したことから、PUAsの種類によって珪藻類への毒性に差があることが示された。今後はPUAsの影響をより広く調べるため、今回行った蛍光値や細胞密度の変化をモニターすることに加え、クロロフィル量の変化やDNAの分解といった他の点にも着目する必要があるだろう。また、栄養塩を添加した培地における室内実験の結果から、実際の自然界におけるPUAsの影響や挙動を推し量るのには限界があることから、現場の濃度に近い栄養塩の実験条件を設定し、あるいは各種栄養塩の欠乏条件を与えるなどしてPUAsの影響を評価する必要がある。

横溝 岳志