

珪藻Cylindrotheca closteriumが産生する赤潮ラフィド藻Heterosigma akashiwōに対するアレロパシー物質の同定

誌名	日本プランクトン学会報
ISSN	03878961
著者名	内田, 直行 小島, 崇宏 中園, 金吾 片桐, 律子 荒, 功一 広海, 十朗
発行元	日本プランクトン学会
巻/号	57巻1号
掲載ページ	p. 13-20
発行年月	2010年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



珪藻 *Cylindrotheca closterium* が産生する赤潮ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* に対するアレロパシー物質の同定

内田直行^{1)*}・小島崇宏^{1), 2)}・中園金吾³⁾・片桐律子³⁾・荒 功一¹⁾・広海十朗¹⁾

¹⁾ 日本大学生物資源科学部 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

²⁾ 株式会社プラントバイオ 〒250-0042 神奈川県小田原市荻窪 464

³⁾ 財団法人化学物質評価研究機構 〒112-0004 東京都文京区後楽 1-4-25

Identification of allelopathic substances secreted from the bacillariophycean *Cylindrotheca closterium* inhibiting the growth of the red-tide raphidophycean flagellate *Heterosigma akashiwo*

NAOYUKI UCHIDA^{1)*}, TAKAHIRO KOZIMA^{1), 2)}, KINGO NAKAZONO³⁾, RITUKO KATAGIRI³⁾, KOICHI ARA¹⁾, AND JURO HIROMI¹⁾

¹⁾ Department of Marine Science and Resources, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

²⁾ Plant Bio PLC, Ogikubo 464, Odawara, Kanagawa 250-0042, Japan

³⁾ Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, Kouraku 1-4-25, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0004, Japan

*Corresponding author: E-mail: naoyukiu@brs.nihon-u.ac.jp

Abstract We previously proposed that growth inhibition of *Heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) during mixed cultured with *Cylindrotheca closterium* (bacillariophyceae) might be brought about by an allelopathic substance produced by *C. closterium*. In this paper, we reconfirmed the allelopathic phenomenon to be caused by an algicidal substance secreted from *C. closterium* and then identified the allelopathic substances to be fatty acids such as *cis*-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid (ODTA).

The cell numbers of *H. akashiwo* in a unialgal-culture in medium filtrated with a glass fiber filter from a unialgal cultures of *C. closterium* under the initial stages of the stationary growth phase (non-treated medium) decreased significantly to approximately 5% of that in Erd-Schreiber modified medium (control) within 72 hours after the beginning of culture. The growth inhibition was unaffected when the culture mediums were autoclaved or nutritive salts were added to the non-treated medium, and when both treatments were combined. From these results, together with the failure to detect eicosapentaenoic acid in the non-treated medium, it was strongly suggested that the growth inhibition of *H. akashiwo* was caused by an allelopathic substance secreted from *C. closterium*.

The fractions (Rt53 and Rt55) with algicidal activity were purified to chromatographic homogeneity on HPLC by sequential procedures consisting of chromatography on a reverse phase cartridge (Oasis HLB), HPLC on a gel filtration column (Superdex peptide), a reverse phase preparative column (L-column), and a reverse phase analytical column (L-column) from the non-treated medium. The 24 h LC₅₀ of Rt53 and Rt55 for *H. akashiwo* were 50 ng mL⁻¹ and 47 ng mL⁻¹, respectively, which is similar to the 24 h LC₅₀ of ODTA (72 ng mL⁻¹).

LC/MS analysis by electrospray-ionization (negative) revealed that Rt53 consisted of two

components with a precursor ion ($M-1$)⁻ of m/z 249 (Rt53a) and 275 (Rt53b). The precursor ion of m/z 275 generated product-ions with m/z 231 (corresponding to the molecular formula of $M-COOH$) and 177 ($M-C_4H_6COOH$) by LC/MS/MS analysis, of which the profile was the same as that of a commercial ODTA. From these results and the acute toxicity to *H. akashiwo*, Rt53b was identified as ODTA. The precursor ion of m/z 249 generated product-ions with m/z 205 ($M-COOH$) by LC/MS/MS analysis, suggesting that Rt53a was a fatty acid of $C_{16:3}$ and molecular weight of 250, specifically hexadecatrienoic acid (HDTA). Rt55 presented a precursor ion with m/z 283 by LC/MS analysis and no product-ion was revealed by LC/MS/MS analysis. Rt55 was speculated to be stearic acid because of the molecular weight of 284, specific fragmentation of the saturated fatty acid, and similarity to Rt53 in the chromatographic behaviors on reverse phase HPLCs. However, the commercial stearic acid did not possess acute toxicity towards *H. akashiwo*. Therefore, Rt55 was presumed to be a stearic acid-like fatty acid such as 10- or 16-methylheptadecanoic acid.

Key words: allelopathic substance, *Cylindrotheca closterium*, *Heterosigma akashiwo*, ODTA, HDTA, stearic acid-like fatty acid. 24 h LC₅₀

はじめに

プランクトンの異常発生に起因する赤潮は魚介類の大量斃死や毒化を招き産業上大きな損害をもたらす。我が国の代表的な閉鎖海域である瀬戸内海での赤潮発生頻度は1970年代にピークに達し、その後減少しているものの続発している(本城1999)。このため、赤潮発生機構の早期解明とともに赤潮防除対策の確立が望まれ、赤潮生物に関する生理学および生態学的な立場から研究が進められさまざまな赤潮防除方法が発表されている。しかし、現状では粘土散布による赤潮生物凝集沈殿法が実用化されたのみであり、いずれの方法も経済性、生態系および環境への二次的影響などの問題から実用には至っていない(Shirota 1989, 和田ほか2002, 前田ほか2009)。

近年、環境にやさしい赤潮防除法として生物学的手法の確立が提唱されている。その一つに細菌やウイルスなどの殺藻微生物を用いる方法があり、その確立に向かって研究が進められている(今井2008)。殺藻細菌による殺藻機構は直接攻撃型と殺藻物質によるものに大別され、殺藻物質としてプロテアーゼ(加藤ほか2003)およびプロジギオンに属する赤色色素であるPG-L-1(Nakashima et al. 2006)などが明らかにされている。

他の方法として植物と植物間のアレロパシーを利用する方法が注目されている。淡水性大型水生植物のアレロパシーを利用した藻類制御は古くから提唱されている(中井ほか1998, 辻村ほか2000)。海藻においても大型海藻抽出物あるいは乾燥粉末が赤潮藻類(平田ほか1986, Wang et al. 2007)あるいは着生珪藻(Lam et al. 2008)の生育を制御することが知られている。また、

Chattonella 赤潮と珪藻の増減には負の相関があること(大塚ほか1994)、渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* と他種植物プランクトンとの混合培養により、*H. circularisquama* が他種鞭毛藻類を殺藻し、自身は珪藻などの存在下で底生期細胞を形成すること(内田1998)などから赤潮制御に藻類間の相互作用の利用が有効であることが示唆されてきた。

このような観点から、赤潮藻類と珪藻類の相互作用が検討され、ラフィド藻 *Chattonella antiqua* が珪藻 *Amphiprora hyalina* との混合培養により(宮下ほか1994)、珪藻 *Skeletonema costatum* が *Heterosigma akashiwo* などのラフィド藻の培養濾液で増殖阻害されることが報告されている(松山ほか2000)。また、*S. costatum* と *H. akashiwo* は混合培養により高密度のものが他方の成長を抑制することが Yamasaki et al. (2007) により、渦鞭毛藻 *Akashiwo sunguinea* の増殖が珪藻類の培養ろ液で抑制されることが松原ほか(2008)により見いだされている。これらの相互作用にはアレロパシー物質の関与が示唆されるが、その物質については不明である。

広海ほか(1995)は、*H. akashiwo* の成長が珪藻 *Cylindrotheca closterium* との混合培養により著しく阻害されることを見だし、これは *C. closterium* が *H. akashiwo* に対するアレロパシー物質を産生しているためと推測した。本研究では、この現象がアレロパシー物質に起因することを実証し、さらにアレロパシー物質を同定した。

材料と方法

材料

珪藻 *Cylindrotheca closterium* は東京湾より採取し、

終点希釈法により単離、無菌化したクローン株を、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* は国立環境研究所・微生物系統保存施設より分譲された無菌クローン株を使用した。Oasis HLB カートリッジ (50 mg) はウォーターズ社製 (Mass, USA), ゲルろ過カラムはアムシャムバイオサイエンス社製 (Nj, USA) の Superdex peptide HR 10/300GL, 逆相カラムは化学物質評価研究機構製 (東京, 日本) の L-column ODS, およびシス-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸 (ODTA) はシグマ-アルドリッチ社製 (Mo, USA) を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業 (株) 製 (大阪, 日本) の得られる最高純度のものを用いた。

藻類の培養

C. closterium の単種大量培養は、容量 3 L のガラス製三角フラスコに 2 L の Erd-Schreiber 改変培養液 (中島 1988) を入れ、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分間) 後、 1.2×10^6 細胞の *C. closterium* を無菌的に接種し、照度 8,000 Lux, 温度 $23.5 \pm 1^\circ\text{C}$, 明暗周期 12 時間で行った。*H. akashiwo* は、容量 200 mL のガラス製三角フラスコを用い 150 mL の Erd-Schreiber 改変培養液中で同様に培養した。なお、Erd-Schreiber 改変培養液用の海水として神奈川県水産技術センター (三崎) より譲渡されたる過海水を用いた。藻類の無菌状態は、保存株リスト第 8 版に記載の方法 (笠井ほか 2009) に準拠して確認した。すなわち、Bf/2 改変型培養液に藻類を 2×10^3 細胞 mL^{-1} になる様に接種し、照度 3,000 Lux, 温度 $23.5 \pm 1^\circ\text{C}$, 明暗周期 12 時間で 1~4 週間培養後の細菌による白濁の発生状況により判断した。

殺藻活性の測定

3 本のガラス製ネジ口試験管のそれぞれに 10 mL の Erd-Schreiber 改変培養液を入れ、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 分間) 後、*H. akashiwo* を 2×10^3 細胞 mL^{-1} になるように無菌下で接種した。これに 20 μL のジメチルスルフォオキシド (DMSO) 試料溶液を添加し、照度 8,000 Lux, 温度 $23.5 \pm 1^\circ\text{C}$, 明暗周期 12 時間で培養した。適当な培養時間後の生残細胞数を顕微鏡下で測定し、コントロール (無添加培養) との細胞数の比から生存率を算出して活性として表した。なお、ここでの生存率は $n=3$ の平均値として示した。

クロマトグラフィー

クロマトグラフィーは、日本分光 (株) 製 JASCO GULLIVER SERIES (ポンプ: PU-980, 検出器: UV-

970) を用いて行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは Superdex peptide HR10/300 を用い、移動相は 85% メタノール (MeOH), 流速は 0.5 mL min^{-1} で行った。分取用逆相クロマトグラフィーは L-column (10 \times 250 mm) を用い、溶出は 80 分間で 85~87% MeOH の直線グラジエント, 流速は 2.0 mL min^{-1} で行った。分析用逆相クロマトグラフィーは L-column (4.6 \times 150 mm) を用い、溶出は 65 分間で 80~90% MeOH の直線グラジエント, 流速は 0.8 mL min^{-1} で行った。また、いずれの場合も溶出液は 215 nm の吸光度でモニターし、室温で行った。

LC/MS 分析

質量分析は、Hewlett Packard 社製 (Ca, USA) の HPLC (HP1100) を装備した Micromass 社製 Quattro II (Mass, USA) を用い、ESI (negative) 法により行った。HPLC は、分析用 L-column (1.5 \times 150 mm) を用い、移動相は MeOH/CH₃CN/10 mM CH₃COONH₄ = 76:20:4 (v/v), 流速: 0.1 mL min^{-1} , カラム温度: 40°C , Scan range: m/z 50~400 で行った。

結 果

アレロパシーの確認

広海ほか (1995) は、観察した *C. closterium* と *H. akashiwo* の混合培養における *H. akashiwo* の増殖阻害には ① *C. closterium* あるいは共存微小生物による *H. akashiwo* への直接的攻撃, ② 混合培養による栄養源の不足, ③ 培養液中に存在する物質 (アレロパシー物質) の可能性を挙げたが, ③ がもっとも確からしいものと考えたとどまった。そこで *C. closterium* の定常期初期の単種培養液からガラスファイバーフィルター (ADVANTEC 75) により藻体をろ別した培養液 (無処理培養液) に, a) 栄養源の再添加, b) オートクレーブ滅菌, c) オートクレーブ滅菌および栄養源の再添加という 3 種類の処理を施し, *H. akashiwo* の単種培養を行った。その結果, Erd-Schreiber 改変培養液 (コントロール) で培養した *H. akashiwo* は 72 時間後には約 5 倍に増殖したが, a)~b) の処理を施した培養液では細胞数は著しく減少し, 72 時間後にはコントロールの約 5% にも達せず, *H. akashiwo* の増殖は無処理培養液とほぼ同様に阻害された (Fig. 1)。この結果は, 両者の混合培養における *H. akashiwo* の増殖阻害は *C. closterium* が産生するアレロパシー物質に起因することを強く示唆した。

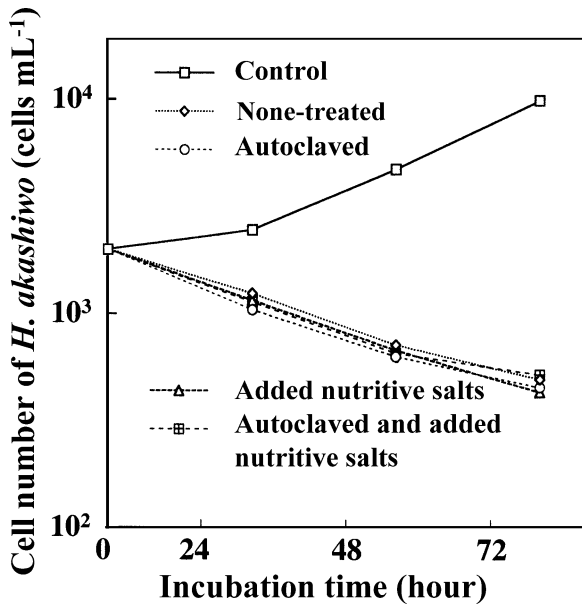


Fig. 1. Growth of *Heterosigma akashiwo* in a unialgal-culture using Erd-Schreiber modified medium (□, control), medium filtrated with a glass fiber filter from unialgal cultures of *C. closterium* under the initial stages of the stationary growth phase (◇, none-treated medium), the non-treated medium sterilized by autoclave (○, autoclaved), the non-treated medium with added nutritive salts (△, added nutritive salts), and the non-treated medium sterilized by autoclave and then with nutritive salts added (×, autoclaved and added nutritive salts).

Cell number indicated with open symbol is shown for the mean of triplicate determinations ± mean deviation that is included within the symbol.

殺藻物質の分離精製

C. closterium の無処理培養ろ液を Oasis HLB カートリッジに付し、固相抽出された殺藻物質を 100% メタノールで溶出した。活性画分を減圧下、ロータリーエバポレータにより 40°C 以下で乾固した。乾固物を適量のメタノールに溶解し、ゲルろ過クロマトグラフィーに付した。その結果、三つのピークに分離された。このうち図中バーで示す保持時間 (Rt) 約 37 分の主要ピークのみが殺藻活性を示した (Fig. 2)。このピークの分子量は、分子量既知のペプチドから見積もったところ約 300 であった。分離された活性画分をさらに分取用逆相クロマトグラフィーにより精製した。Fig. 3 のように複雑な溶出図を示し、約 53 および 55 分に溶出される二つのピークのみが殺藻活性が認められた。それぞれを同条件による再クロマトに付して精製し Rt53 および Rt55 成分とした。この 2 成分を分析用逆相クロマトグラフィーによりさらに精製した結果、それぞれほぼ単一の活性ピークを呈した (Figs. 4, 5)。最終的に約 100 L の培養液

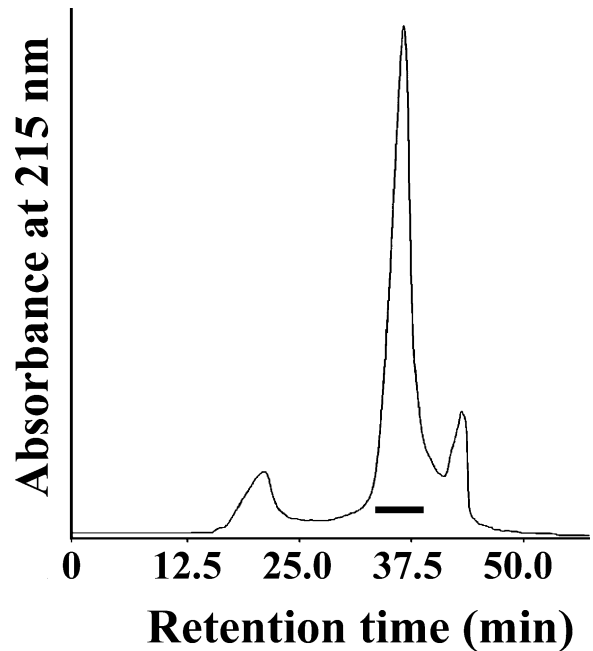


Fig. 2. Gel filtration chromatography of the fraction extracted with a reverse phase cartridge on a Superdex peptide column.

The fraction indicated with a solid bar possesses algal activity

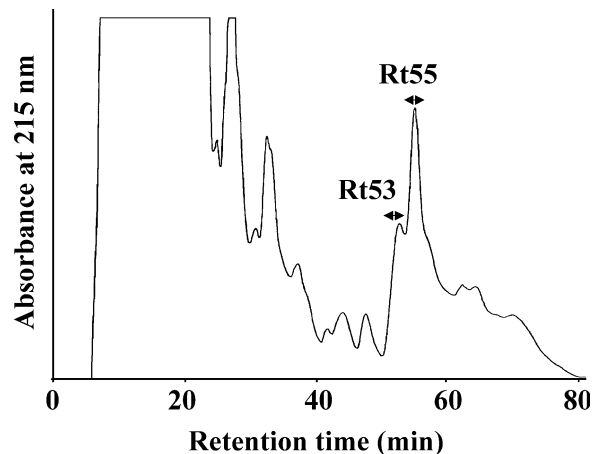


Fig. 3. Reverse phase preparative column chromatography of the fraction indicated with a solid bar in Fig. 2.

The algal fractions eluted at retention time of 53 min (Rt53) and 55 min (Rt55).

から Rt53 は約 20 μ g, Rt55 は約 10 μ g 得られた。

殺藻物質の同定

Rt53 成分は 215 nm の吸光度で検出したクロマトグラフィーで単一と見なされたが、LC/MS 分析した結果、 m/z 249 および 275 をプレカーサーイオンとする二つのピークが混在していることが認められた。そこで、

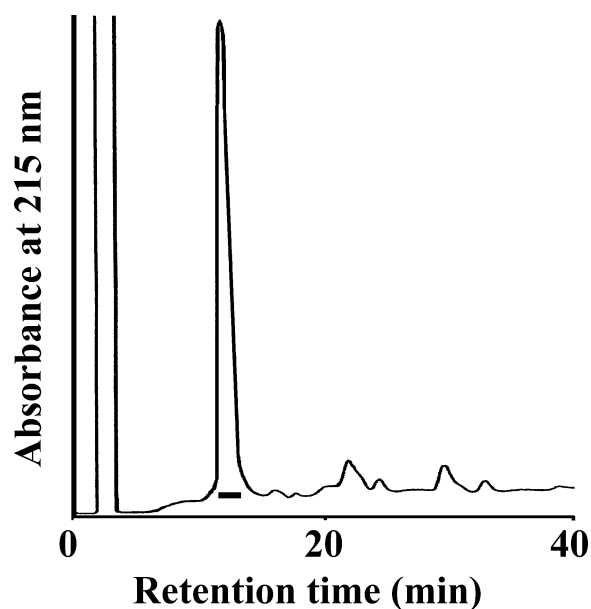


Fig. 4. Reverse phase analytical column chromatography of the Rt53. The algicidal fraction is indicated with a solid bar.

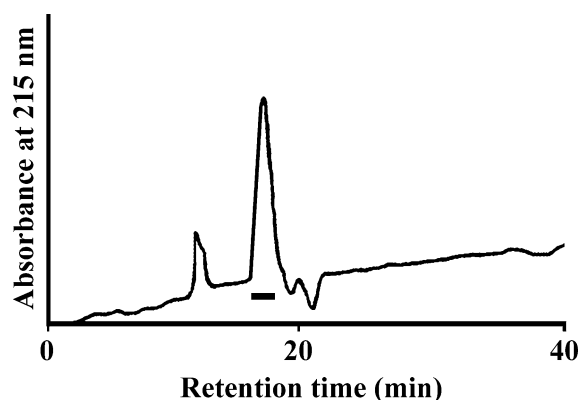


Fig. 5. Reverse phase analytical column chromatography of the Rt55. The algicidal fraction is indicated with a solid bar.

m/z 249 および 275 のマスクロマトグラムを得たところ、それぞれが個別のピーク (Rt 2.94 分および 3.11 分) を呈した (Fig. 6)。このことから Rt53 成分には保持時間が酷似したプレカーサーイオンを m/z 249 (Rt53a) および 275 (Rt53b) とする 2 成分が混在しているものと判断した。

Rt53a, Rt53b および Rt55 のマススペクトルを Fig. 7A, B および C に示す。それぞれ、M-H であるプレカーサーイオン m/z 249, 275 および 283 を呈し、それぞれの分子量は 250, 276 および 284 であることが判明した。 m/z 249, 275 および 283 を MS/MS 分析したところ (Fig. 8), Rt53b は、プレカーサーイオンの m/z 275

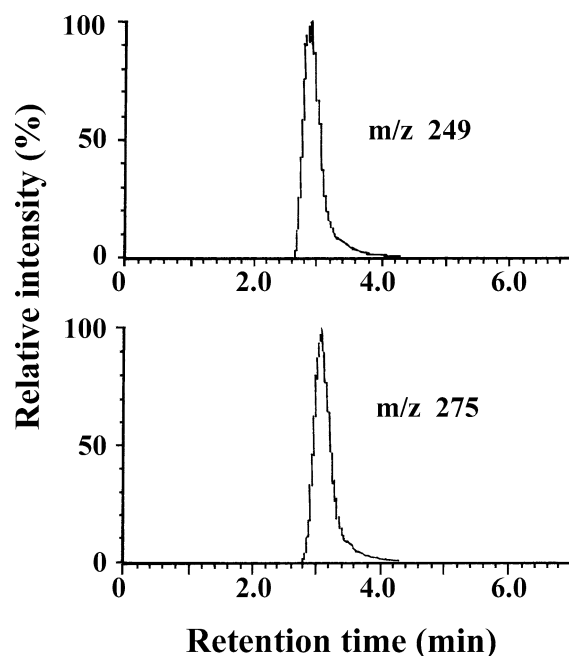


Fig. 6. Mass chromatogram of Rt53 detected with m/z 249 (Rt53a) and 275 (Rt53b).

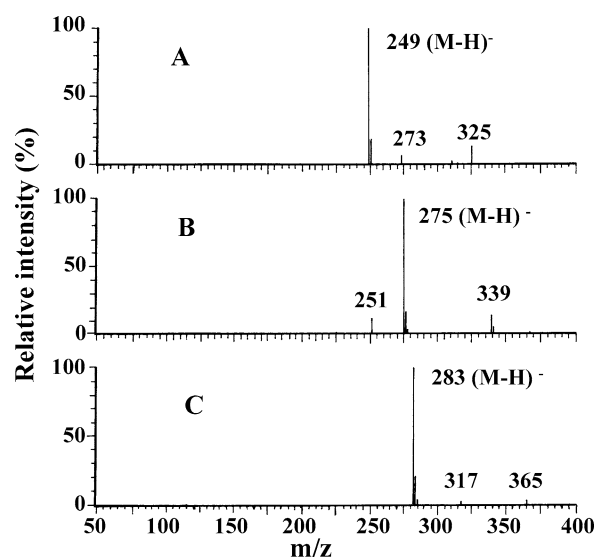


Fig. 7. LC/MS of Rt53a (A), Rt53b, and Rt55 by electrospray-ionization (negative).

と m/z 231 および m/z 177 のプロダクトイオンを生成した (Fig. 8B'). m/z 231 は $276-45$ (M-COOH) に相当し、 m/z 177 は $276-99$ (M-C₄H₆COOH) に相当する。これらのことから Rt53b は、C_{18:4} の不飽和脂肪酸であると推測された。そこで、市販の ODTA のマススペクトルと比較したところ m/z 275 をプレカーサーイオンとする類似したスペクトルを示した (Fig. 9)。さらに、この m/z 275 の MS/MS 分析の結果は Rt53b のそれとほぼ完全に一致した (Fig. 10)。このことから、Rt53b は

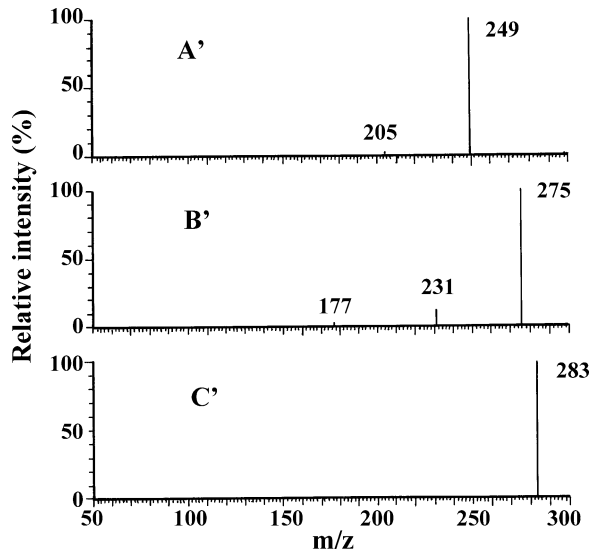


Fig. 8. LC/MS/MS of precursor ions of m/z 249 (A'), 275 (B'), and 283 (C').

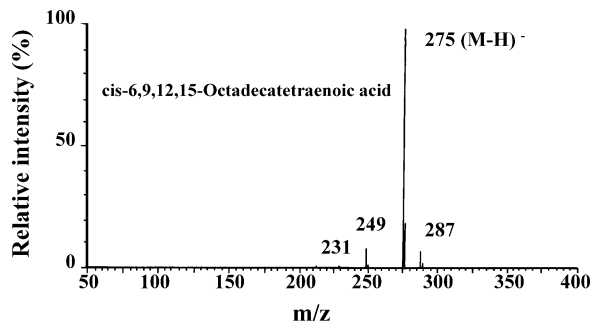


Fig. 9. LC/MS of commercial *cis*-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid (ODTA).

ODTA であると考えられた。Rt53a および b の 2 成分を分取することが困難であったため、この 2 成分の混合物である Rt53 と市販 ODTA の *H. akashiwo* に対する毒性を比較した (Fig. 11)。その結果、Rt53 の 24 時間 LC_{50} は 50 ng mL^{-1} 、ODTA の 24 時間 LC_{50} は 72 ng mL^{-1} であり両者ともに強い毒性を有しわずかに Rt53 が強かった。このことから *C. closterium* が産生するアレロパシー物質の一つは ODTA であると断定できた。また、Rt53a の混入により毒性は低下せずむしろ上昇傾向にあることから、Rt53a の毒性は、Rt53b の毒性と同等以上と推測された。

Rt53a の m/z 249 の MS/MS 分析の結果、 m/z 205 (M-COOH) のプロダクトイオンを生成し、Rt53a は Rt53b と同様に脂肪酸であり、ODTA より炭素数が 2 個、二重結合が 1 個少ないヘキサデカトリエン酸 (HDTA, $C_{15}H_{25}COOH$, 分子量: 250) と推測された。市販の HDTA が入手できないため最終的な確認はできな

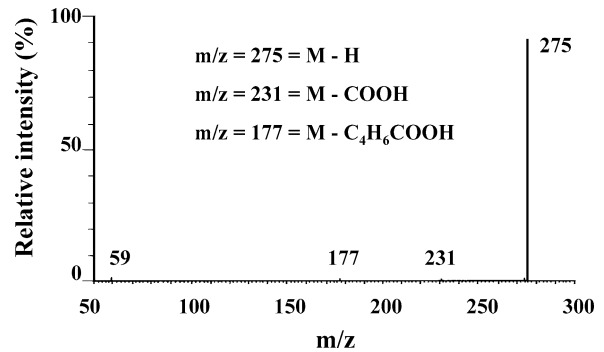


Fig. 10. LC/MS/MS of precursor ions of ODTA (m/z 249) and molecular formulas corresponding to product-ions.

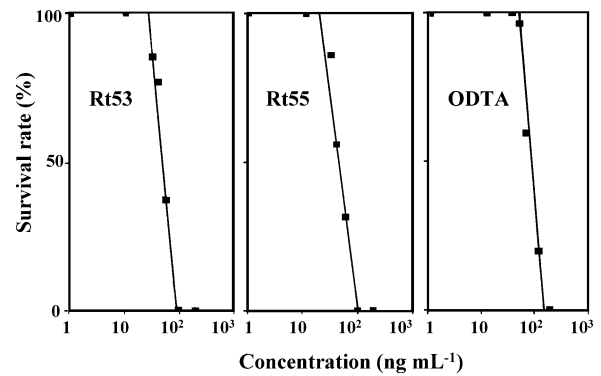


Fig. 11. Acute toxicity of allelopathic substances towards *H. akashiwo*. *H. akashiwo* ($2 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) is exposed for 24 hours to 0 – 10^3 ng mL^{-1} of Rt53, Rt55, and commercial ODTA in Erd-Schreiber modified medium at $23.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Survival rate indicated with closed square is shown for the mean of triplicate determinations \pm mean deviation that is included within the symbol.

かったが、そのクロマト的性質が ODTA と非常に類似していることからこの推測が妥当であると考えられる。

Rt55 は MS/MS 分析により明確なプロダクトイオンを生成しなかった。また、逆相クロマトグラフィーにおける挙動が Rt53a および b と類似していることから (Figs. 3–5), Rt55 は極性が両物質と近似しているが両者より低いと判断され、また、イオン化し難いことから飽和脂肪酸の可能性が推測され、分子量 284 のステアリン酸と予測された。このことは、日立ハイテクノロジー社のデータ集に記載されているステアリン酸のマスペクトル (www.hitachi-hitec.com/science/apli/pdf/lcms/ms070008.pdf) と酷似していることから推測される。しかし、Rt55 の *H. akashiwo* に対する毒性は 24 時間 $LC_{50} = 47 \text{ ng mL}^{-1}$ (Fig. 11) と高いにもかかわらず、市販ステアリン酸は全く毒性を示さなかった。この

ことから、Rt55はステアリン酸の異性体である10-または16-methylheptadecanoic acidなどのステアリン酸様物質であると予想されるが、この詳細についてはさらに検討する必要がある。

考 察

ある種の植物や微生物が分泌もしくは排出した有機化合物により、離れて生育する他種植物や微生物の成長や増殖を制御する現象をアレロパシー（他感作用）と呼ぶ。水生生物においても種々のアレロパシーが観察されており、その有効利用の見地から広く調査されている（本城ほか1990）。このアレロパシーを起こす物質（アレロパシー物質）はある特定の生物種の制御など、各方面での応用が期待され、その構造、生理作用および作用機序の解明が待たれている。

水生植物に由来するアレロパシー物質についても同定例がある。たとえば、Suzuki et al. (1996)は*Neodilsea yendoana*などの紅藻類による緑藻類の成長および孢子沈降抑制がエイコサペンタエン酸(EPA)に起因すること、また、ホザキノフサモ(*Myriophyllum spicatum*)が放出する飽和脂肪酸Nonanoic acidがシアノバクテリア(*Microcystis aeruginosa*)に対してアレロパシーを示すこと(中井ほか2004)。ほかにも、Kakisawa et al. (1988)は、褐藻のオキナワモズク(*Cladosiphon okamuranus*)から赤潮原因藻類である*H. akashiwo*および*Chattonella antiqua*を殺藻する物質としてオクタデカテトラエン酸を単離・同定した。この様に、藻類間の相互作用(アレロパシー)には脂肪酸、特に高度不飽和脂肪酸が重要な意味を持つと考えられる。

本研究では、広海ほか(1995)が報告した珪藻*C. closterium*による*H. akashiwo*の成長阻害は*C. closterium*の単種培養液中に存在するODTA, HDTAおよびステアリン酸類似物質によることを明らかにした(Figs. 7~11)。しかし、本研究では分離精製用出発物質を*C. closterium*の定常初期の培養液としたため、これら殺藻物質が真に*C. closterium*によりアレロパシー物質として分泌されたものか、あるいは*C. closterium*の破壊により培養液に溶出したものかは明確でない。この点については、脂質組成から同じカテゴリーに属する3種の海洋性植物プランクトン(*C. closterium*, *Chattonella antiqua*および*Thalassiosira nordenskioeldii*) (望月ほか1999)および*C. closterium*の近縁種と思われる*Cylindrotheca fusiformis* (Graeme et al. 1994)の主要脂肪酸であり、藻類に対するアレロパシー物質の可能性がある

EPA (Suzuki et al. 1996)が培養液に検出できなかったことから、これら殺藻物質は細胞崩壊による溶出物質ではなく、分泌された物質と考えられる。この点については*C. closterium*の藻体内殺藻物質との関連をさらに検討し、次報告にて明らかにする。

引用文献

- Graeme, A. D., K. V. John, M. B. Stephanie, L. Jeannie-Marie & S. W. Jeffrey 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry* **35**: 155-161.
- 平田八郎・末原裕幸・川口智治 1986. 赤潮生物の繁殖抑制に関する試み. 水産増殖 **34**: 61-68.
- 広海十朗・今西大介・門田定美 1995. 赤潮ラフィド藻*Heterosigma akashiwo*に対する珪藻*Cylindrotheca closterium*の増殖阻害効果. 日大農獣医学報 No. 52: 122-125.
- 本城凡夫・浅川牧夫 1990. アレロパシー物質, pp. 41-53, 海洋生物の生理活性物質「安元健編」水産学シリーズ (恒星社厚生閣, 東京).
- 本城凡夫 1999. 有害赤潮による被害と対策. 水産増殖 **47**: 165-171.
- 今井一郎 2008. 赤潮の対策を考える 環境への負荷が少ない微生物を用いた赤潮防除策. 養殖 **45**: 26-29.
- Kakisawa, H., F. Asari, T. Kusumi, T. Toma, T. Sakurai, T. Oohusa, Y. Hara & M. Chihara 1988. An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *Phytochemistry* **27**: 731-735.
- 笠井文絵・河地正伸・恵良田眞由美・森 史・湯本康盛・佐藤真由美・石本美和編 2009. NIES コレクション 保存株リスト第8版, 藻類, 57 (増補) 1-350.
- 加藤純一・李宣沃・大竹久夫 2003. 海洋微生物-II—基礎応用研究とその利用—2章 生態研究 赤潮を殺藻する海洋性細菌とその活用をめざした基礎研究. 月刊海洋 号外 **35**: 155-159.
- Lam, C., A. Grage, D. Schulz, A. Schulte & T. Harder 2008. Extracts of North Sea macroalgae reveal specific activity patterns against attachment and proliferation of benthic diatoms: a laboratory study. *Biofouling* **24**: 59-66.
- 前田広人・程川和宏・奥西将之・日高正康 2009. 薬剤による赤潮駆除. 日本プランクトン学会報 **56**: 69-73.
- 松原 賢・山崎康裕・紫加田知幸・島崎洋平・大嶋雄治・本城凡夫・長副 聡 2008. 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. 日水誌 **74**: 598-606.
- 松山幸彦・内田卓志・小谷祐一 2000. ラフィド藻*Heterosigma akashiwo*および*Chattonella antiqua*の培養液が珪藻*Skeletonema costatum*の増殖に及ぼす影響. 瀬戸内海区水産研究所研究報告 2号: 57-66.
- 宮下一明・木幡邦男・広海十朗・門田定美 1994. 赤潮ラフィド藻*Chattonella antiqua*に対する珪藻*Amphiprora hyalina*の増殖阻害効果. 日大農獣医学報 No. 51: 158-163.
- 望月美里・竹永章生・伊藤真吾・露木英男 1999. 海洋性植物プランクトンの脂質および脂肪酸組成. 日本食品科学工学会誌 **46**: 29-33.
- 中井智司・細身正明・村上明彦 1998. 大型水生植物のアレロパシー. 用水と排水 **40**: 113-118.
- 中井智司・山田信吾・細身正明 2004. ホザキノフサモが放出する脂肪酸のシアノバクテリアに対する増殖抑制効果. 水環境学会誌 **27**: 125-130.

- 中島敏光 1988. 海産珪藻 *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす海洋深層水の影響. 日本プランクトン学会報 **35**: 45-55.
- Nakashima, T., W. Muraoka, K. Yamaguchi & T. Oda 2006. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 684-690.
- 大塚弘之・萩平将・吉田正雄・北角 至 1994. 種の遷移機構の解明 植物プランクトン種の短期交代と環境変動 (水産庁南西海区水産研究所). 有害赤潮の生態学的制御による被害防除技術の開発に関する研究5ヵ年の研究報告書 平成6年: pp. 71-76.
- Shirota, A. 1989. Red tide problem and countermeasures. II. *Int. J. Aquat. Fish. Technol.* **1**: 195-223.
- Suzuki, M., T. Denboh, I. Wakana, M. Tatewaki 1996. An allelopathic polyunsaturated fatty acid from red algae. *Phytochemistry* **43**: 63-65.
- 辻村茂男・早川和秀・中島拓男 2000. 水草からのアレロパシー物質によるアオコ抑制の可能性. アオコ発生機構に関連した隔離水塊実験研究成果報告書 平成7~9年度 特定研究: pp. 138-140.
- 内田卓志 1998. 貝類養殖業を脅かすヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ赤潮 他種植物プランクトンとの相互作用. 瀬戸内海 No. 14: 13-17.
- 和田 実・中島美和子・前田広人 2002. 粘土散布による赤潮防除. 有害・有毒藻類ブルームの予防と駆除, pp. 121-133. 「広石伸互・今井一郎・石丸 隆編」. 水産学シリーズ (恒星社厚生閣, 東京).
- Wang, R., H. Xiao, P. Zhang, L. Qu, H. Cai & H. Tang 2007. Allelopathic effects of *Ulva pertusa*, *Corallina pilulifera* and *Sargassum thunbergii* on the growth of the dinoflagellates *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. *J. Appl. Phycol.* **19**: 109-121.
- Yamasaki, Y., S. Nagasoe, T. Matsubara, T. Shikata, Y. Shimasaki, Y. Oshima & T. Honjo 2007. Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **339**: 83-92.