

熊本県水産研究センター研究報告

第6号

目次

| | | |
|---|-------------------------------|-----|
| 熊本県沿岸域に出現する稚仔魚の群集構造 | 山下博和・平山 泉・鳥羽瀬憲久 | 1 |
| 八代海・牛深市沿岸域におけるヒラメの放流効果試算 | 山下博和・平山 泉・鳥羽瀬憲久 | 13 |
| 1992年から2003年にかけての緑川河口域のアサリ分布状況 | 那須博史・平山 泉・中原康智・陣内康成・鳥羽瀬憲久 | 15 |
| 熊本県天草沿岸に出現したメジロザメ属 | 川崎信司・野村昌功・前田健作 | 31 |
| 水温と光周期調整によるブリ (<i>Seriola quinqueradiata</i>) の早期自然採卵試験 | 木村武志・菊川里香・山下幸久・倉田清典・藤田忠勝・浜田峰雄 | 39 |
| 熊本県有明海域のノリ養殖漁期における栄養塩の季節変動 | 吉田雄一・黒木善之・吉村直晃・小山長久 | 45 |
| 有明海における溶存酸素の季節変化と底泥からの栄養塩の溶出 | 吉村直晃・吉田雄一・黒木善之・小山長久 | 51 |
| 2003年に八代海で発生した <i>Chattonella antiqua</i> の発生状況の検討 | 黒木善之・吉田雄一・吉村直晃・小山長久 | 59 |
| 2003年に八代海で発生した <i>Chattonella antiqua</i> の有害性の検討 | 黒木善之・吉田雄一・吉村直晃・小山長久・木村武志 | 69 |
| 褐藻中の抗酸化性物質とそれらの抗微生物活性 | 長山公紀 | 75 |
| 熊本県御船川における水生生物の物理的生息環境について | 松尾竜生・大塚保邦・清田季義・栃原正久 | 115 |
| アユとオイカワから分離された冷水病菌の DNAgyrase 遺伝子型と病原性の関係 | 木下裕一・栃原正久・増田雄二 | 123 |

平成16年3月

熊本県水産研究センター

熊本県水産研究センター研究報告第6号

正 誤 表

| ページ | 行 | 誤 | 正 |
|-----|--------|--|--|
| 56 | 左列 29行 | DINが <u>25</u> kg、PO ₄ -Pが <u>3.75</u> kg程度 | DINが <u>350</u> kg、PO ₄ -Pが <u>116</u> kg程度 |
| 56 | 左列 32行 | 海底面積約 <u>13~16</u> km ² | 海底面積約 <u>160~250</u> km ² |

熊本県沿岸域に出現する稚仔魚の群集構造

山下博和、平山 泉、鳥羽瀬憲久

Occurrence of fish larvae and juveniles in coast of Kumamoto Pref.

Hirokazu Yamasita, Izumi Hirayama, Norihisa Tobase

キーワード：稚魚ネット、群集構造、主成分分析、クラスター分析

緒 言

本県は九州中西部に位置し、有明海、八代海、天草西海の異なった性格の海域を要し、その海岸線の総延長は約1,100kmに及ぶ、また、海域毎に異なった漁業形態が発達しており、干満差が大きく、内湾性の強い熊本有明海域と八代海湾奥海域、対馬暖流に隣接する外洋性の強い天草海及び両者の混合域である天草有明海域、八代南部海域を有し、生産力の高い好漁場に恵まれている。沿岸域における稚仔魚の研究は、魚類の産卵習性或初期生活史に関する知見ならびに稚仔魚の時空間的な分布生態や量的動態評価など、資源補給機構に関する知見を集積し今日に至っている。これらの知見は、有用魚類の資源変動機構解明や漁海況予報の精度向上にも寄与し、また、昨今の資源管理・栽培漁業の社会的要求に伴い、仔稚魚の研究は、これらの水産振興策推進のための基礎資料として重要視されてきている。そこで、本県沿岸域での稚仔魚の出現状況を把握し、群集構造について明らかにした

材料及び方法

調査は調査船「ひのくに」を使用し、1998年4月～2001年3月にかけて原則月1回、図1に示す本県沿岸域に設定した3海域22定点において稚魚ネット（口径130cm、測長450cm、モジ網部300cm、網地部150cm、網地部のオープニング334 μ m）を用いて仔稚魚を採集した。採集は、昼間に約2ノットで5分間の水平曳き（表層と中底層）を行った。

採集したサンプルは、船上において直ちに10%ホルマリンで固定した。なお、同定は委託で行った。魚類の採集尾数は各曳網時の濾水量に基づいて1,000m³あたりの採集個体数に換算した。年別月別の曳網回数は表1に示した。

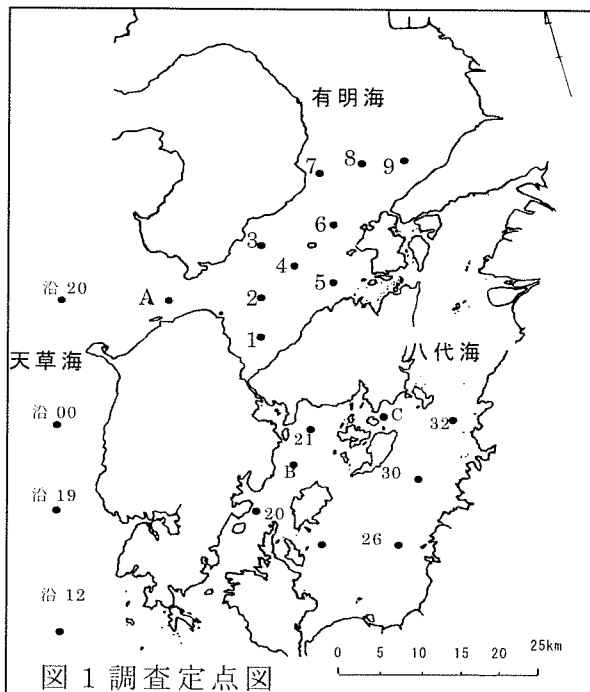
なお、曳網層は水深40m以深の調査定点は3層水平曳き（表層、中層、底層）を曳網していたが、2000年6月以降全定点を2層曳き（表層、底層）で調査した。また、採集時には各定点においてSTDにより水温と塩分の測定を行った。

表1 年別月別曳網回数

| Year | Month | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Jan | Feb | Mar | Apr | May | Jun | Jul | Aug | Sep | Oct | Nov | Dec |
| 1998 | 0 | 0 | 0 | 59 | 59 | 51 | 51 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 |
| 1999 | 59 | 59 | 59 | 59 | 51 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 | 700 |
| 2000 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 44 | 603 |
| 2001 | 44 | 44 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 132 |
| Total | 162 | 162 | 162 | 177 | 169 | 153 | 153 | 162 | 162 | 162 | 162 | 1950 |

結 果

物理環境 各定点の3カ年における表層水温平均値（図2）は天草海が14.4℃（2月）から28.5℃（8月）の間、八代海は11.2℃から27.9℃（9月）の間、有明海は11.2℃（2月）から27.3℃（9月）の間で推移した。



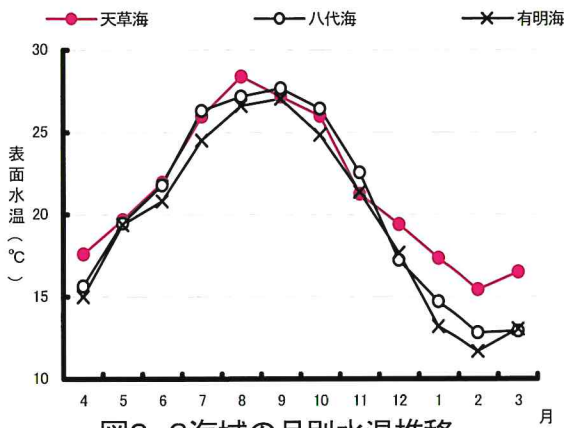


図2 3海域の月別水温推移

また、塩分(図3)は天草海が最低32.9PSUから最高34.7PSUの間、八代海は27.7PSUから最高34.5PSUの間、有明海は27.4PSUから最高33.6PSUの間を推移した。

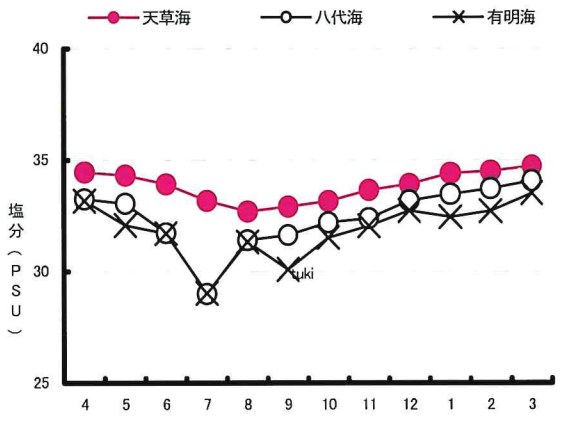


図3 3海域における月別塩分推移

定点間の水温塩分差(図4)は天草海の有明海灣口近く(St-沿20)と有明海灣中央部のSt-8で最低は-0.02°C(9月)から最高で4.5°C(2月)の間で変動し、平均で1.9°Cの水温差があった。また、塩分は1.3PSU(10月)から5.4PSU(7月)の間で変動し2.3PSUの塩分差があった。水温は常に有明海が低く冬季(12月~3月)に水温差が大きくなった。塩分は常に有明海が低く春夏期(6月~8月)にその差が顕著となった。

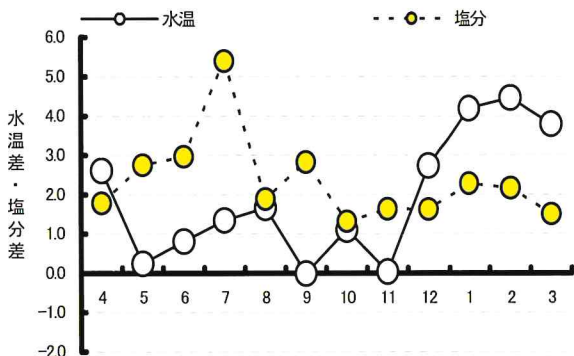


図4 天草有明海灣口(沿20)一有明灣中央(8)の水温・塩分差

天草海の八代海灣口付近のSt-沿12と八代海灣奥のSt-32では最低-0.8°C(9月)から最高2.6°C(3月)の間を推移し平均0.5°Cであった。また、塩分は最低0.8PSUから最高5.2PSUの間を変動し、平均1.7PSUの差があった。水温は5月~7月、9月~12月は八代海が高く、その他の月は低くなり、12月以降にその差は顕著となった。塩分は常に八代海が低く夏期にその差が顕著となった。

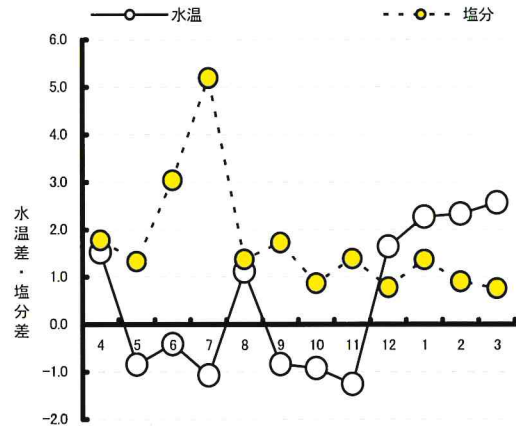


図5 天草海八代海灣口(沿12)一八代海灣奥(32)の水温・塩分差

天草海、八代海、有明海の代表点としてSt-沿00、St-32、St-8を選び、表層水のハイドロクライモグラフ(図6)で比較した。

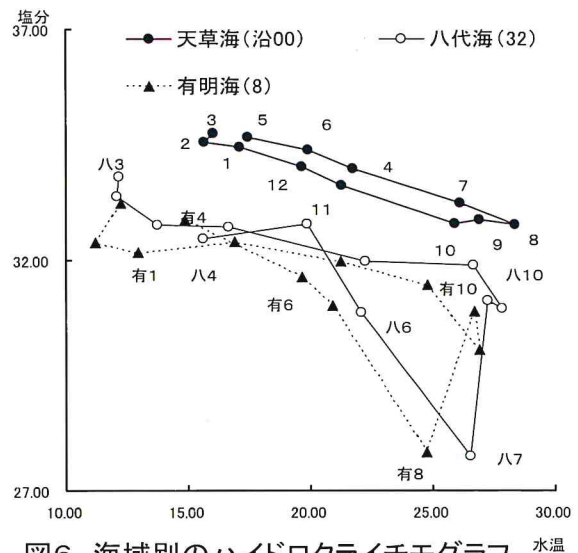


図6 海域別のハイドロクライモグラフ

天草海は水温・塩分ともに他の海域と比較して常に高く、水温・塩分の季節変動は逆相関を示している。八代海、有明海は水温差が天草海と比較して大きく、塩分は高温期に低く、低水温期に高い、特に6、7月の梅雨時期に塩分低下が著しい。

魚類の組成 3年間の曳網回数は計1,950回で76科124分類群に属する魚類が採集された。

(付表1: 稚魚リスト、付表2: 出現状況)

採集された魚類は浮游期生活期のものが大部分を占め、

これらの分類群のうち57群が種、13群が属、47群が科レベル、1群が目まで同定された。科内の出現種類(表2)が最も多かったのはハダカイワシ科で種不明の群を含む9群がこれに含まれた。次いで多かった科はアジ科、フサカサゴ科(6群)、ニシン科、タイ科、ヒラメ科(5群)であった。

表2 科内出現種が多かった群の名称

| 科名 | 群数 | 群名 |
|---------|----|--|
| ハダカイワシ科 | 9 | イタハダカ属、ススキハダカ、アラハダカ、ヒサハダカ、ウスハダカ、トンガリハダカ属、ハダカイワシ属、オオクテイワシ属、タカハダカ属 |
| アジ科 | 6 | ブリ、アイブリ、マアジ、ムロアジ属、マルアジ、カイワリ |
| フサカサゴ科 | 6 | フサカサゴ科、メバル、ウスメバル、ムラソイ、カサゴ属、カサゴ、 |
| ニシン科 | 5 | ウルメイワシ、キビナゴ、マイワシ、サツパ、コノシロ |
| タイ科 | 5 | タイ科、チダイ、マダイ、クロダイ、キチヌ |
| ヒラメ科 | 5 | ヒラメ科、ヒラメ、テンジクガレイ、ガンゾウヒラメ属、アラメガレイ属 |

科毎の個体数割合(図7)はカタクテイワシ科が26.7%と最も多く、次いでニシン科(23.0%)、フサカサゴ科(17.9%)、イカナゴ科(5.00%)、ハゼ科(4.9%)、タチウオ科(3.3%)、テンジクダイ科(1.9%)、サギフエ科(1.5%)の順に多かった。種毎の個体数割合(図8)が多かった種はカタクテイワシが26.7%と最も多く、次いでコノシロ(21.1%)、カサゴ(17.4%)、イカナゴ(5.0%)、ハゼ科(4.5%)、タチウオ(3.2%)、テンジクダイ科(1.8%)、カワハギ科(1.5%)、サギフエ科(1.5%)であった。

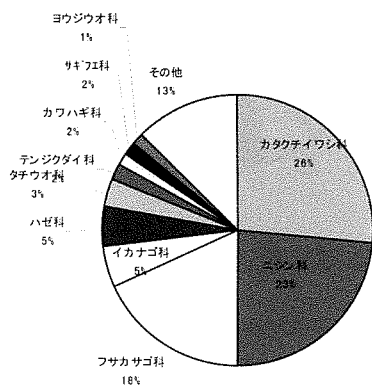


図7 科毎の個体数割合

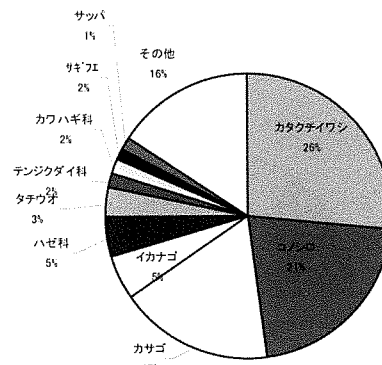


図8 種毎の個体数割合

調査年度毎には1998年4月から1999年3月は科内の出現種類(表3)が最も多かったのは採集した80科中ニシン科、ヒラメ科、フサカサゴ科(4群)で次いでヨコエソ科(3種)であった。

表3 科内出現種が多かった群の名称(1998・4-1999・3)

| 科名 | 群数 | 群名 |
|--------|----|---------------------------|
| ニシン科 | 5 | ウルメイワシ、キビナゴ、マイワシ、サツパ、コノシロ |
| タイ科 | 4 | タイ科、マダイ、クロダイ、キチヌ |
| ヒラメ科 | 4 | ヒラメ科、ヒラメ、ガンゾウヒラメ属、アラメガレイ属 |
| フサカサゴ科 | 4 | フサカサゴ科、メバル、ムラソイ、カサゴ属、カサゴ、 |
| ヨコエソ科 | 3 | ヤベウキエソ、ヨコエソ、オニハダカ属、キュウリエソ |

また、科での個体数割合(図9)はニシン科(31.6%)が最も多く、次いでフサカサゴ科(17.8%)、ハゼ科(9.9%)、イカナゴ科(9.2%)、タチウオ科(3.7%)、テンジクダイ科(2.3%)であった。

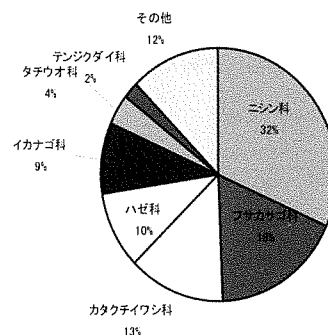


図9 科毎の個体数構成比(1998.4~1999.3)

種毎の出現割合(図10)はコノシロが31.1%と最も多く、次いでカタクテイワシ(13.3%)、カサゴ(17.5%)、ハゼ科(9.9%)、イカナゴ(9.2%)、タチウオ(3.7%)、

テンジクダイ科 (2.3%) ネズツポ科 (1.6%)、カワハギ科 (1.2%)、タツノオトシゴ属 (1.0%) の順であった。

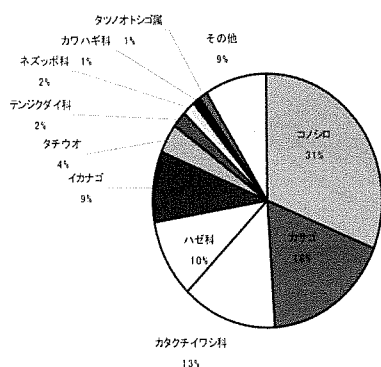


図10 種毎の個体数構成比(1998.4-1999.3)

1999年4月から2000年3月は科内の出現種類(表4)が最も多かったのは88科中ハダカイワシ科(6種)と最も多く、次いでアジ科、タイ科、ニシン科(5種)、サバ科、ヒラメ科(4種)カレイ科、フサカサゴ科、ヨコエソ科(3種)があった。

表4 科内出現種が多かった群の名称(1999.4-2000.3)

| 科名 | 群数 | 群名 |
|---------|----|--|
| ハダカイワシ科 | 6 | ススキハダカ、アラハダカ、トンガリハダカ属、ハダカイワシ属、オオクチイワシ属 |
| アジ科 | 5 | ブリ、アイブリ、マアジ、マルアジ、カイワリ |
| タイ科 | 5 | タイ科、チダイ、マダイ、クロダイ、キチヌ |
| ニシン科 | 5 | ウルメイワシ、キビナゴ、マイワシ、サツパ、コノシロ |
| サバ科 | 4 | サバ科、サバ属、サワラ、ソウダガツオ |
| ヒラメ科 | 4 | ヒラメ科、ヒラメ、ガンゾウビラメ属、アラメガレイ属 |
| カレイ科 | 3 | メイタガレイ、マコガレイ、イシガレイ |
| フサカサゴ科 | 3 | フサカサゴ科、メバル、カサゴ |
| ヨコエソ科 | 3 | ヤベウキエソ、ヨコエソ、オニハダカ属、キュウリエソ |

また、科の個体数割合(図11)はカタクチイワシ科(37.6%)が最も多く、次いでフサカサゴ科(17.1%)、ニシン科(9.6%)、ハゼ科(6.3%)、テンジクダイ科(2.5%)、タチウオ科(2.2%)、サイウオ科(1.7%)、ヒメ科(1.6%)、カワハギ科(1.4%)であった。

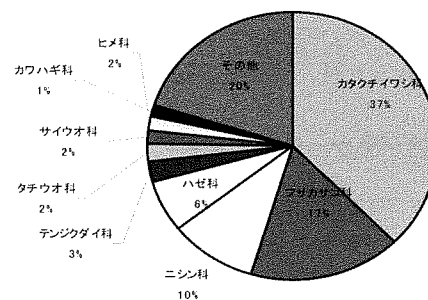


図11 科毎の個体数構成比(1999.4-2000.3)

種毎の個体数割合(図12)が多かった種はカタクチイワシ(37.6%)、カサゴ(16.3%)、ハゼ科(6.3%)、キビナゴ(5.1%)、コノシロ(3.1%)、テンジクダイ科(2.5%)、タチウオ(2.2%)、サイウオ科(1.7%)、エソ科(1.6%)、カワハギ科(1.4%)、ワニギス属(1.3%)、ニベ科(1.3%)、ネズツポ科(1.3%)、ホウボウ科(1.1%)であった。

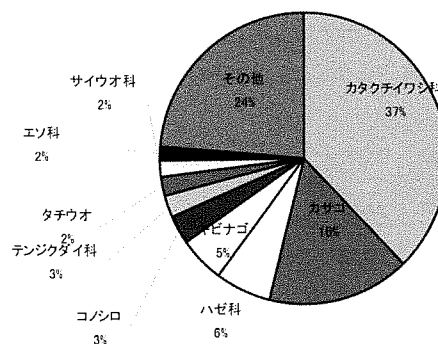


図12 種毎の個体数構成比(1999.4-2000.3)

2000年4月から2001年3月は科内の出現種類(表5)が最も多かったのは103科中ハダカイワシ科が最も多く8種で次いでニシン科、フサカサゴ科、ヒラメ科(5種)次いでアジ科(4種)、ヨコエソ科、イソギンポ科、ヨウジウオ科(3種)の順であった。

表5 科内出現種が多かった群の名称(2000.4-2001.3)

| 科名 | 群数 | 群名 |
|---------|----|--|
| ハダカイワシ科 | 8 | アラハダカ、トンガリハダカ属、ウスハダカ、ヒサハダカ、ハダカイワシ属、オオクチイワシ属、タカハダカ属 |
| フサカサゴ科 | 6 | フサカサゴ科、メバル、ウスメバル、ムラソイ、カサゴ属、カサゴ、 |
| ニシン科 | 5 | ウルメイワシ、キビナゴ、マイワシ、サツパ、コノシロ |
| ヒラメ科 | 5 | ヒラメ科、ヒラメ、テンジクガレイ、ガンゾウビラメ属、アラメガレイ属 |
| アジ科 | 4 | ブリ、マアジ、マルアジ、カイワリ |

| | | |
|--------|---|---------------------------|
| ヨコエソ科 | 4 | ヤベウキエソ、ヨコエソ、オニハダカ属、キュウリエソ |
| イソギンポ科 | 3 | イソギンポ科、イソギンポ属、ナベカ属 |
| ヨウジウオ科 | 3 | ヨウジウオ科、ヨウジウオ、タツノオトシゴ |

また、科の個体数割合(図13)はカタクチイワシ科が34.2%と最も多く、フサカサゴ科(17.9%)、ニシン科(13.1%)、ハゼ科(7.8%)、サギフエ科(3.3%)、テンジクダイ科(3.2%)、タチウオ科(2.4%)、カワハギ科(1.7%)、ベラ科(1.6%)、サイウオ科(1.4%)の順であった。

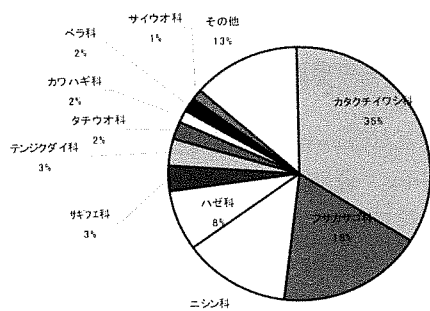


図13 科毎の個体数構成比(2000.4-2001.3)

種毎の個体数割合(図14)が多かった種はカタクチイワシ(34.2%)、カサゴ(17.3%)、コノシロ(10.5%)、ハゼ科(7.0%)、サギフエ(3.3%)、テンジクダイ科(3.2%)、サッパ(2.5%)、タチウオ(2.2%)、カワハギ科(1.7%)、ベラ科(1.6%)であった。

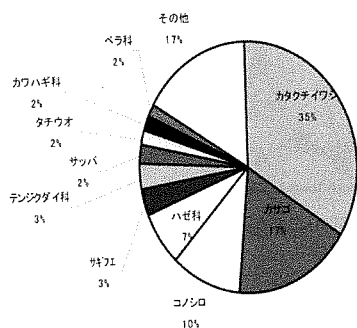


図14 種毎の個体数構成比(2000.4-2001.3)

海域別年度別の出現頻度 海域別の分類群別出現種数(表6)は天草海が102群中43群(42.2%)が毎年採集され、29群(28.4%)が2年間採集され、30種(29.4%)が1年のみ採集された。八代海は96群中40群(50.0%)が毎年採集され19群(19.8%)が2年、37群(38.5%)が1年のみ採集され、有明海では83種中36種(43.4%)が毎年、21種が2年(25.3%)、26種(31.3%)が1年のみ採集された。

表6 海域別年度別の出現頻度

| | 天草海 | | 八代海 | | 有明海 | |
|-------------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| | 種数 | 構成比(%) | 種数 | 構成比(%) | 種数 | 構成比(%) |
| 常に出現(3年採集) | 43 | (42.16) | 40 | (41.67) | 36 | (43.37) |
| よく出現(2年採集) | 29 | (28.43) | 19 | (19.79) | 21 | (25.30) |
| まれに出現(1年採集) | 30 | (29.41) | 37 | (38.54) | 26 | (31.33) |

また出現パターン毎の種類は3海域すべてに出現した群はカタクチイワシ、エソ科、マダイ、ヒラメ、カサゴ、メバル等66群で内27群が3年間を通じて採集された。天草海、八代海で出現するが有明海で出現しない群はウルメイワシ、ソコイワシ属、キュウリエソ、タチウオ科、シイラ、チダイ、ムロアジ属等16群で天草海、有明海で出現するが八代海で出現しない群はトリハダカ属、サンマ、キアンコウ、サバ属の4群であった。また、八代海、有明海で出現するが天草海で出現しない群はサッパ、ブリ、マルアジ属、ムラソイ、アイナメ属の4種で天草海のみ出現する種はホウライエソ、ホテイエソ、ススキハダカ、ウスハダカ、アイブリ、サワラ等16群で八代海のみ出現する群はダツ科、タカベ、キチヌ、マナガツオ、ウスメバル等9種で有明海のみ出現する種はイタハダカ属、ヒサハダカ、トウゴロイワシ科、マツダイ、テンジクガレイ等8種であった。

出現期(表7) 周年出現する群はカタクチイワシ、ハダカイワシ科、ハゼ科、ネズッポ科、ダルマガレイ科の5群で4月から6月までの春期を中心に出現する群はオキエソ、サンマ、サバ科、フグ科、クロダイ、夏期(7月~9月)はナベカ属、シイラ、イソギンポ、テンジクガレイ、ヒイラギで秋期(10月~12月)はアシロ、キアンコウ、タチウオ科、冬期はウルメイワシ、メジナ、チダイ、イカナゴ、ヒラメ、マダイであった。また周年出現しないが6ヶ月以上の長期間出現する群はウルメイワシ、キビナゴ、コノシロ、アラハダカ、ヤガラ、サギフエ、チゴダラ科、ハタ科、マアジ、イソギンポ、フサカサゴ科、カサゴ、ホウボウ科、ササウシノシタ科であった。

表7 主要魚種別の出現期

| | | |
|-----------|---------|---|
| 周年 | 4月~3月 | カタクチイワシ、ハダカイワシ科、ハゼ科、ネズッポ科、ダルマガレイ科 |
| 春期 | 4月~6月 | オキエソ、サンマ、サバ科、フグ科、クロダイ |
| 夏期 | 7月~9月 | ナベカ属、シイラ、イソギンポ、テンジクガレイ、ヒイラギ |
| 秋期 | 10月~12月 | アシロ、キアンコウ、タチウオ科 |
| 冬期 | 1月~3月 | メジナ、チダイ、イカナゴ、ヒラメ、マダイ |
| 6ヶ月以上の長期間 | | ウルメイワシ、キビナゴ、コノシロ、アラハダカ、ヤガラ、サギフエ、チゴダラ科、ハタ科、マアジ、イソギンポ、フサカサゴ科、カサゴ、ホウボウ科、ササウシノシタ科 |

年度別海域別の種数、密度の季節変化

1998年4月~1999年3月 出現種数(図15)は天草海が平均21.4群で最低が1月に3群、最高が6月で31群出現し、八代海が平均19群で最低が2月で13群、最高が11月で26群で

あった。有明海は平均20群で最低が6群（9月）最高が31群（7月）であった。密度（図16）は天草海が平均332.0尾/1000m³で最低が1月に2.5尾/1000m³で最高が5月で1,197.7尾/1000m³であった。

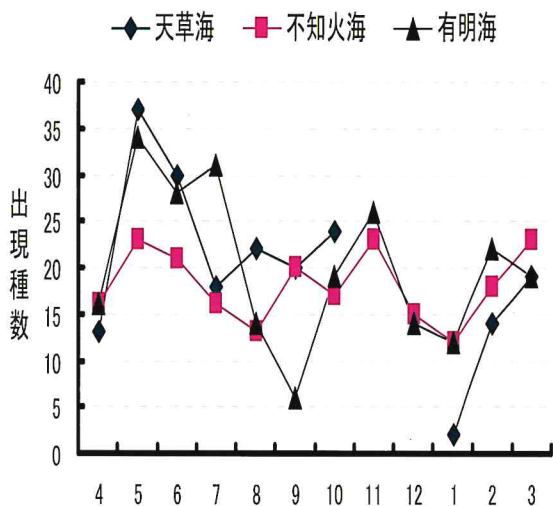


図15 海域別出現種類数(1998.4~1999.3)

八代海は平均615.2尾/1000m³で最低43.2尾/1000m³（12月）、最高2,627.3尾/1000m³（4月）、有明海は平均1,794.9尾/1000m³で最低99尾/1000m³、最高10,434.9尾/1000m³（5月）であった。

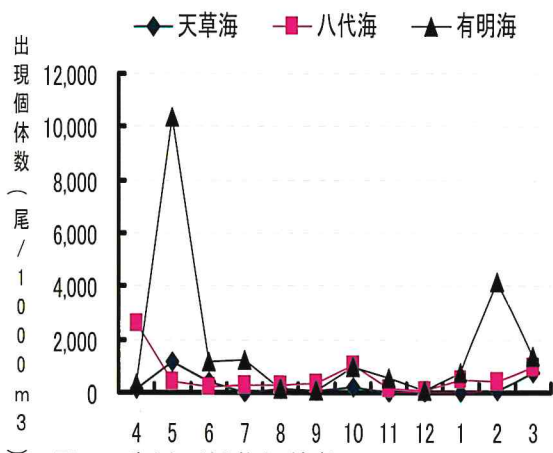


図16 海域別採集個体数(1998.4~1999.3)

1999年4月~2000年3月 出現種数（図17）は天草海が平均28.36群で最低が2月に16群、最高が7月・9月で40群出現し、八代海が平均24.8群で最低が2月で20群、最高が11月で28群であった。有明海は平均23.9群で最低が10群（1月・2月）最高が33群（8月）であった。

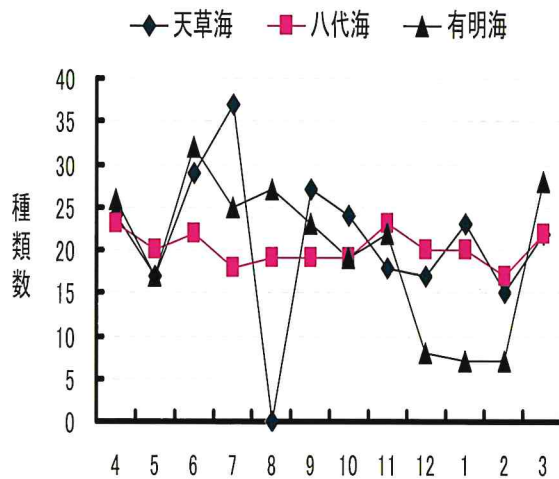


図17 海域別出現種類数(1999.4~2000.3)

密度（図18）は天草海が平均205.7尾/1000m³で最低が12月に38.7尾/1000m³で最高が3月で854.3尾/1000m³であった。八代海は平均160.3尾/1000m³で最低74.6尾/1000m³（1月）、最高472.2尾/1000m³（1月）、有明海は平均92.8尾/1000m³で最低15.2尾/1000m³（12月）、最高322.5尾/1000m³（1月）であった。

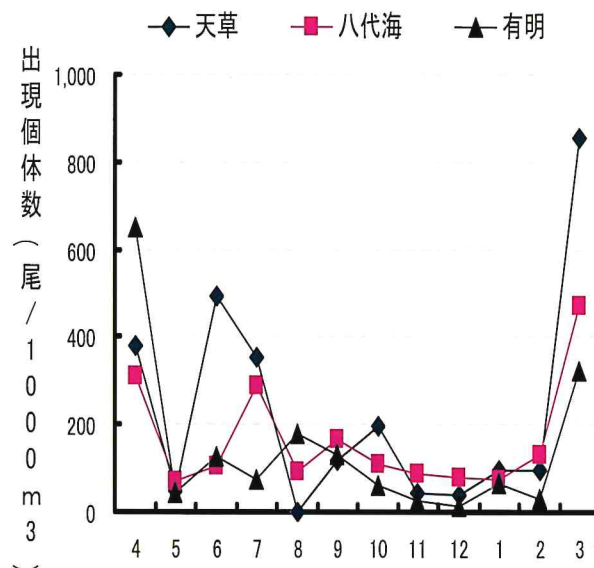


図18 海域別採集個体数(1999.4~2000.3)

2000年4月~2001年3月 出現種数（図19）は天草海が月平均21.67群出現し、最低が4月に8群、最高が7月で32群出現し、八代海が平均20群で最低が4月で19群、最高が8月で37群であった。有明海は平均22.08群で最低が9群（1月）最高が34群（10月）であった。

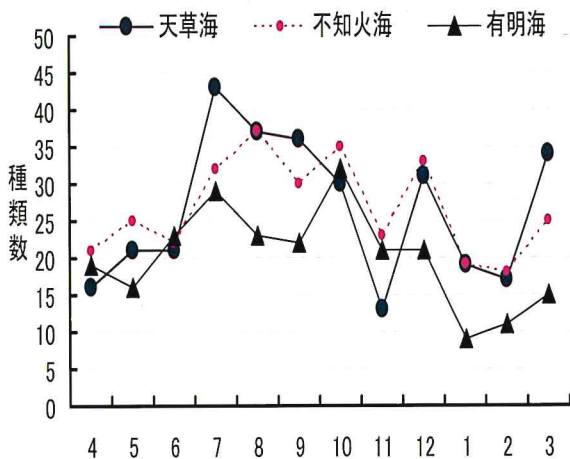


図19 海域別出現種数(2000.4~2001.3)

密度(図20)は天草海が平均315.77尾/1000m³で最低が1月に88.06尾/1000m³最高が7月で993.01尾/1000m³であった。八代海は平均683.92尾/1000m³で最低が84.70尾/1000m³(12月)、最高が1,388.4尾/1000m³(4月)、有明海は平均683.92尾/1000m³で最低82.7尾/1000m³(1月)最高3,422.3尾/1000m³(7月)であった。

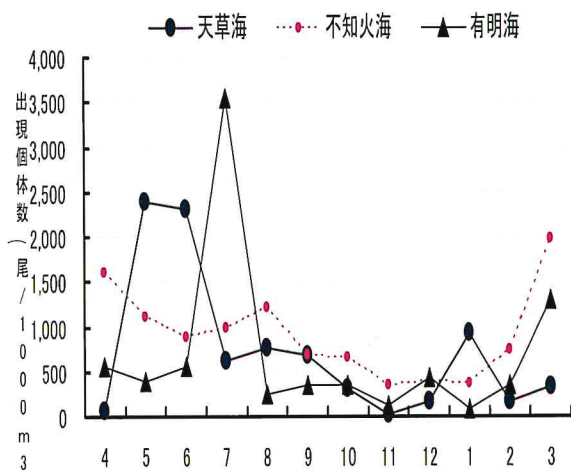


図20 海域別出現個体数(2000.4~2001.3)

考察

定点毎の類型化 調査定点を類型化するため水温、塩分、稚魚の群集構造(代表20種)を用いてクラスター分析を行った。クラスター分析は水温・塩分は月別定点の平均値、群集構造は定点別平均採集密度を用い、非類似度ユークリッド距離、クラスター化は階層的とし、ワード法により合併後の距離を求め、デンドログラムを作成した。なお、解析にはMS-エクセルを用いた。表面水温は6区分に類型化され、天草海は沿20と沿00、沿19、沿20の2区分に八代海はSt-BとSt-32, 30, 26, 20, 22の2区分に有明海はSt-7, 8, 9及びその他のSt-1, 2, 3, 4, 5, 6, Aの2区分に分けられた。塩分区分は6区分に類型化され、天草海の4定点が1区分、八代海がSt-32, C, 30とSt-21, B, 20の2区分に有明海はSt-7, 8, 9とSt-3, 6及びSt-1, 2, 4, 5, Aに区分された。稚魚の群集

構造は6区分に類型化され天草海は沿00, 19, 20に、天草海の沿20と有明海のSt-St-A, 4が同一グループに、さらに有明海湾奥のSt-7, 8とSt-5, 6, 1及び八代海のSt-Cがグループ化された。また、八代海湾奥のSt-30, 32が区分され、それ以外の定点が同一グループとなった。これは、表面水温と塩分は海域毎に区分され、海域特性に特性づけられるが、稚魚群集はそれぞれの海域毎でなく、外海性、内湾性の魚群構造が混在するため、海域を越えた群集構造が形成されていると考えられる。

魚類群集の主成分分析 群集毎の種組成を特徴づけるkey-となる種を検索するため、主成分分析による検討を行った。第1主成分の寄与種はカタクチイワシ、ワニギス属、サギフエ、サイウオ等を寄与成分とし、これらの種を主要種として構成され、第2主成分はカサゴ、ホウボウ、カワハギ科、キビナゴを寄与成分であった。この2つの主成分の固有値寄与率は第1主成分が68.6%と第2主成分が17.8%で累積86.4%と群集特性を2つの成分で説明できることから群集構成の要因となるKey種はカタクチイワシ、カサゴであると考えられる。

この2つの成分で分布図(図21)を作成したところ、第1正弦はカタクチイワシとカサゴが優占する海域、第2正弦がコノシロ、ハゼ科とカサゴが優占する海域、第3正弦がカタクチイワシとコノシロ、ハゼ科が優占する海域、第4正弦はコノシロ、ハゼ科が優占する海域を意味すると考えられ、定点別では第1正弦が有明海のSt-A, St-4、天草海のSt-沿20及び八代海のSt-Bが、第2正弦は八代海のSt-22, 23, 26, 21及び有明海のSt-9が位置し、第3正弦は天草海のSt-沿00, 12, 19及び有明海のSt-7, 8が、第4正弦は八代海がSt-30, 32, C及び有明海のSt-1, 5, 6が位置した。

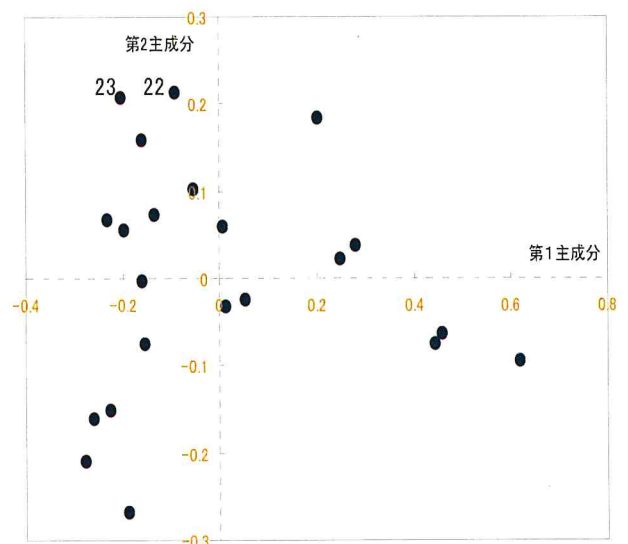


図21 主成分得点分布図

種組成にみられる特徴 本県海域の特徴は、過去に年間を通して稚仔魚の採集が行われた山口県油津湾²⁾や岩手県大槌湾³⁾、瀬戸内海⁷⁾での調査結果と同様に内湾性海域で優先するハゼ科仔魚の出現順位が上位である点が共通し

ている。また、本調査結果に認められるもう一つの特徴として、西日本の内湾性水域の代表種であるコノシロの割合が23.9%と高いが、同様に南西外海⁵⁾や黒潮域等⁶⁾の外洋的水域の代表種であるカタクチイワシも優占している点や外洋的水域を特徴づけるハダカイワシ科、ヒメジが採集されることにある。これは本県海域、特に有明海、八代海が油津湾、大槌湾などと同様に内湾的水域でありながら外洋域からの輸送による仔稚の補給が顕著に影響する魚群集構造に特徴付けられる海域特性を有していると考えられる。

要約

- 1) 1998年4月から2001年3月に月1回、天草海、八代海、有明海において丸稚ネットにより、仔稚魚を採集し、出現種と個体数について検討した。
- 2) 総計で計1,950回曳網し、76科124分類群に属する魚類が採集された。
- 3) 種組成の上位種はコノシロが23.9%と最も多く、次いでカタクチイワシ(17.8%)、カサゴ(16.3%)、ハゼ科(8.8%)、イカナゴ(6.9%)、タチウオ(3.5%)、テンジクダイ科(2.3%)、サギフエ(2.1%)、ネズッコ科(1.5%)、カワハギ科(1.3%)であった。
- 4) クラスタ分析の結果、水温、塩分は海域毎にグループ化され、それぞれの海域特性を特徴づけていたが稚魚の群集構造は、海域を越えてグループ化された。
- 5) 主成分分析の結果、カタクチイワシ、コノシロ、ハゼ科、カサゴが群集構成のKeyとなる種であると考えられる。
- 6) 本県の魚類群集構造の特徴はハゼ科魚類やコノシロハゼ科の内湾成魚類とカタクチイワシ、ハダカイワシの外洋・南方系魚類の仔魚が混在する点である。

謝辞

本調査実施にあたり稚仔魚の採集作業と海洋観測に従事された調査船「ひのくに」の船長浦壁英輔氏(当時)、機関長笥司氏(当時)、機関長岩崎直人氏はじめ乗組員の各位に心から感謝する。

文献

- 1) 沖山宗雄編.「日本産稚魚図鑑」東海大学出版会、東京.1998
- 2) 森慶一郎.山口県油津湾における魚類の生態的研究.中央水研報 1995;7:277-388
- 3) Yamashita Y, Aoyama T. Ichthyoplankton in Ot suchi Bay on northeastern with reference to the time-spacesegreatin of their habitats. *Nippo n Suisan Gakkaisi*1984; 50:189-198
- 4) 千田哲資.西日本海域における魚卵・稚魚の分布の研究.岡山県水産試験場昭和39年度臨時報告,岡山県水産試験場、岡山.1964;1-80.
- 5) 松田星二.南西海区水域に出現する魚卵・稚魚の研究 - I.南西水研報 1969;2:49-83.

- 6) 服部茂昌.黒潮ならびに隣接海域における稚魚の研究.東海水研報 1964;40:1-158
- 7) 唐川純一.備讃瀬戸及び播磨灘北西部に出現する魚卵・仔稚魚,岡山県水産試験場、岡山 2001;10-23
- 8) 堀木信男.紀伊水道および紀南沿岸海域における魚卵・稚仔魚の出現・分布と海況の関係についての研究.和歌山県水産試
- 9) 験場特別研究報告 1995

付表1-1 1998年4月から2001年3月にかけて本県沿岸域において稚魚ネットでは採集された仔稚魚リスト

| 目 | 亜目 | 科 | 科2 | 亜科 | 亜科2 | 属 | 種 | 属名 | 和名 |
|---------------------|------|-----------------|-------|----|-----|-------------------------|-----------------------|------------------|----------|
| Clupeiformes | ニシン目 | Clupeidae | ニシン科 | | | <i>Etrumeus</i> | <i>teres</i> | ウルメイワシ属 | ウルメイワシ |
| | | | | | | <i>Spratelloides</i> | <i>delicatulus</i> | キビナコ属 | キビナコ |
| | | | | | | <i>Sardinops</i> | <i>melanostrictus</i> | マイワシ属 | マイワシ |
| Anguilliformes | ウナギ目 | Clupeinae | ニシン亜目 | | | <i>Sardinella</i> | <i>zunasi</i> | サツハ属 | サツハ |
| | | | | | | <i>Dorosomatinae</i> | コノロ亜科 | コノロ属 | コノロ |
| | | | | | | <i>Engraulis</i> | カタクチイワシ科 | カタクチイワシ属 | カタクチイワシ |
| | | | | | | <i>Glossanodon</i> | | ニギス属 | ニギス |
| | | | | | | <i>Bathylagrus</i> | ニギス科 | semifasciatus | |
| | | | | | | <i>Vinciguerrria</i> | ソコイワシ科 | nimbará | |
| | | | | | | <i>Gonostoma</i> | ヨコエソ科 | Gracile | |
| | | | | | | <i>Oryzias</i> | | atris | |
| | | | | | | <i>Muraoleus</i> | | Muelleri | |
| | | | | | | Myctophiformes | ハダカイワシ目 | Chauliognathidae | ホウライエソ科 |
| <i>Digenichthys</i> | | イサガ属 | | | | | | | |
| <i>Myctophum</i> | | nitidulum | | | | | | | |
| | | asperum | | | | | | | |
| | | obtusirostre | | | | | | | |
| | | orientale | | | | | | | |
| <i>Lampanyctus</i> | | | | | | | | | |
| <i>Diaphus</i> | | | | | | | | | |
| <i>Symbiolophus</i> | | | | | | | | | |
| <i>Notoscopeus</i> | | | | | | | | | |
| Belontiiformes | ダツ目 | Scomberesocidae | サンマ亜目 | | | <i>Cololabis</i> | <i>salra</i> | サンマ属 | サンマ |
| | | | | | | <i>Macrorhamphosus</i> | | ヤガラ属 | ヤガラ |
| | | | | | | <i>Syngnathus</i> | | schlegeli | |
| | | | | | | <i>Hippocampus</i> | | coronatus | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Gadiformes | タラ目 | Gadidae | タラ亜目 | | | <i>Moridae</i> | | チゴダラ科 | |
| | | | | | | <i>Braegmacarotidae</i> | | サイオオ科 | |
| | | | | | | <i>Carapodidae</i> | | カクレオオ科 | |
| | | | | | | <i>Ophidiidae</i> | | アシロ科 | |
| | | | | | | <i>Lophidae</i> | | アンコウ科 | |
| | | | | | | <i>Zenidae</i> | | マントウイ科 | |
| | | | | | | <i>Pristigasteridae</i> | | キントウイ科 | |
| | | | | | | <i>Atherinidae</i> | | トウゴロウイ科 | |
| | | | | | | <i>Mugilidae</i> | | ボラ科 | |
| | | | | | | <i>Sphyraenidae</i> | | カマス科 | |
| Lophiloiformes | アソコ目 | Ophidiidae | アソコ亜目 | | | <i>Sphyraena</i> | | カマス属 | |
| | | | | | | <i>Lateolabrax</i> | | スズキ属 | スズキ |
| | | | | | | <i>Syngnops</i> | | スズキ科 | |
| | | | | | | <i>Serranidae</i> | | ハタ科 | |
| | | | | | | <i>Apogonidae</i> | | テンジクダイ科 | |
| | | | | | | <i>Sillaginidae</i> | | キス科 | |
| | | | | | | <i>Malacanthidae</i> | | アマダイ科 | |
| | | | | | | <i>Labracoglossidae</i> | | タカベ科 | |
| | | | | | | <i>Carangidae</i> | | アジ科 | |
| | | | | | | <i>Conrhaenidae</i> | | シイ科 | |
| Perciloiformes | スズキ目 | Mugilidae | ボラ亜目 | | | <i>Callanthis</i> | | シマシキハナダイ属 | シマシキハナダイ |
| | | | | | | <i>Gymnapogon</i> | | クダリボウズギス属 | シロギス |
| | | | | | | <i>Sillago</i> | | Japonicus | |
| | | | | | | <i>Labracoglossa</i> | | Argentintris | |
| | | | | | | <i>Seriola</i> | | quinqueradiata | |
| | | | | | | <i>Seriola</i> | | nigrofasciata | |
| | | | | | | <i>Trachurus</i> | | Japonicus | |
| | | | | | | <i>Decapterus</i> | | ムロアジ属 | |
| | | | | | | <i>maruadsi</i> | | equula | |
| | | | | | | <i>Kauiaricus</i> | | カイワリ属 | |
| <i>Coryphaena</i> | | シイラ属 | | | | | | | |
| <i>Mene</i> | | hippurus | | | | | | | |
| <i>misculata</i> | | キンカガミ属 | | | | | | | |
| <i>Lobotes</i> | | surinamensis | | | | | | | |
| <i>surinamensis</i> | | マツダイ属 | | | | | | | |

付表1-2 1998年4月から2001年3月にかけて本県沿岸域において稚魚ネットでは採集された仔稚魚リスト

| 目 | 亜目 | 科 | 科2 | 亜科2 | 属 | 属名 | 和名 | |
|-------------------|------------|---------------|----------|--|---|---|---------------------------|---------|
| Gobiocouiformes | ウバウオ目 | Garreidae | クロウギ科 | | | | | |
| | | Sciaenidae | ニベ科 | | | | | |
| | | Mullidae | ヒメジ科 | | | | | |
| | | Girellidae | メジナ科 | | | メジナ属 | | |
| | | Lutjanidae | ウエダイ科 | | | | | |
| | | Sparidae | タイ科 | | | | | |
| | | Pagrinae | マダイ亜科 | | | Erynus japonicus Pagrus major Acanthopagrus schlegelii latus | チダイ マダイ クロダイ キチヌ | |
| | | Sparinae | ヘダイ亜目 | | | Chaetodontobus septentrionalis | キンチヤウダイ属 | キンチヤウダイ |
| | | Lethrinidae | ウエフキダイ科 | | | | | |
| | | Pomacentridae | キンチヤウダイ科 | | | | | |
| Pomacentridae | スズメダイ科 | | | | | | | |
| Labridae | ベラ科 | | | | | | | |
| Chelodactylidae | タカハダイ科 | | | | | | | |
| Cepolidae | アカタチ科 | | | | | | | |
| Champsodontidae | ワニギス科 | | | Champsodon shyeri Embolichthys mitsukuri Ammodytes persianus | ワニギス属 タイワンイカナゴ属 イカナゴ属 | タイワンイカナゴ イカナゴ | | |
| Anmodytidae | イカナゴ科 | | | | | | | |
| Scombroidei | サハ亜目 | | | | | | | |
| Scombridae | サハ科 | | | Scomber Scomberomorus niphonius Auxis | サハ属 サワラ属 ソウダカツオ属 | サワラ | | |
| Gempylidae | クロタチカマス科 | | | | | | | |
| Trichiuridae | タチウオ科 | | | Trichiurus lepturus | タチウオ属 | タチウオ | | |
| Acanthuridae | ニサダイ科 | | | | | | | |
| Siganidae | アイゴ科 | | | | | | | |
| Centrolophidae | イボダイ科 | | | Pseudopsis anomala Pampus argenteus | イボダイ属 マナカツオ属 | イボダイ マナカツオ | | |
| Stromateidae | マナカツオ科 | | | | | | | |
| Gobiidae | ハゼ科 | | | Taeniodes rubicundus | ワラス属 | ワラス | | |
| Bleniidae | キンボ亜目 | | | | | | | |
| Mugilidae | トラギス科 | | | | | | | |
| Trichonitidae | ハラキンボ科 | | | Parapercis trichonotus | トラギス属 ハラキンボ属 | ハラキンボ | | |
| Uroscopidae | ミンマオコゼ科 | | | | | | | |
| Bieniidae | イソギンボ科 | | | Piciblenius yatabei Omobranchini | イソギンボ属 ナベカ属 | イソギンボ | | |
| Stichaeidae | クウエゴジ科 | | | | | | | |
| Scorpaenidae | フサカサゴ科 | | | | | | | |
| Scorpaeniformes | カサゴ目 | | | | | | | |
| Sebastinae | メバル亜科 | | | Sebastes inermis thompsoni pachycephalus marmoratus Otaki | メバル属 メバル属 メバル属 メバル属 メバル属 | メバル ウスメバル ムロイ カサゴ アイナメ | | |
| Hexagrammidae | アイナメ科 | | | | | | | |
| Pterycephalidae | コナ科 | | | | | | | |
| Hoplichthyidae | ハリコチ科 | | | | | | | |
| Triglidae | ホウボウ科 | | | | | | | |
| Liparidae | クサウオ科 | | | | | | | |
| Gobiesocidae | ウバウオ科 | | | | | | | |
| Callionymidae | ネズツボ科 | | | | | | | |
| Paralichthyidae | ヒラメ科 | | | | | | | |
| Gobiesociformes | ウバウオ亜目 | | | | | | | |
| Callionymoidaei | ネズツボ亜目 | | | | | | | |
| Pleuronectiformes | カレイ目 | | | | | | | |
| Bothidae | カラムカレイ科 | | | | | | | |
| Pleuronectidae | カレイ科 | | | Paralichthys olivaceus Pseudorhombus arsius Pseudorhombus tarphops | ヒラメ属 ガンゾウヒラメ属 ガンゾウヒラメ属 アラマカレイ属 | ヒラメ テンジクカレイ | | |
| Soleidae | ウシガレイ亜目 | | | | | | | |
| Cynoglossidae | ウシガレイ科 | | | | | | | |
| Monacanthidae | カワハギ科 | | | | | | | |
| Tetraodontidae | フグ科 | | | | | | | |
| Pleuronectiformes | フグ目 | | | | | | | |
| Balistoidaei | モンガラカワハギ亜目 | | | | | | | |
| Tetraodontidae | フグ亜目 | | | | | | | |
| Pleuronectinae | カレイ亜目 | | | Pleuronichthys cornutus Limanda yokohamae Kareius bicoloratus | メイトカレイ属 マコカレイ属 イシカレイ属 | メイトカレイ マコカレイ イシカレイ | | |
| Soleidae | ウシガレイ亜目 | | | | | | | |
| Balistoidae | モンガラカワハギ亜目 | | | | | | | |
| Tetraodontidae | フグ亜目 | | | | | | | |

付表2-1 種別の出現状況(総括表)

| 和名 | 出現海域 | | | | 採集個体数 | | | | | | 合計 | |
|------------|------|-----|-----|-------------|---------------|--------|---------------|---------|---------------|--------|-----------|--------|
| | 天草海 | 八代海 | 有明海 | 出現月 | 1998.4~1999.3 | | 1999.4~2000.3 | | 2000.4~2001.3 | | 個体数 | 割合 |
| | | | | | 個体数 | 割合 | 個体数 | 割合 | 個体数 | 割合 | | |
| ウルメイワシ | ● | ● | | 1-4,12 | 4.70 | 0.04% | 4.44 | 0.20% | 28.98 | 0.22% | 38.12 | 0.13% |
| キビナゴ | ◎ | ● | ● | 4-10,12 | 91.96 | 0.71% | 333.42 | 15.10% | 19.58 | 0.15% | 444.96 | 1.55% |
| マイワシ | ◎ | ● | ◎ | 1-4,12 | 19.83 | 0.15% | 12.12 | 0.55% | 1.17 | 0.01% | 33.12 | 0.12% |
| サツバ | | ◎ | ● | 7-10 | 19.55 | 0.15% | 78.43 | 3.55% | 673.36 | 5.01% | 771.34 | 2.69% |
| コノシロ | ◎ | ● | ● | 2-7 | 9,698.68 | 74.74% | 2.80 | 0.13% | 2,825.13 | 21.02% | 12,526.61 | 43.76% |
| カタクチイワシ | ● | ● | ● | 周年 | 4,137.23 | 31.66% | 2,465.66 | 111.69% | 9,241.25 | 68.77% | 15,844.14 | 55.35% |
| レプトセファルス幼生 | ◎ | ◎ | ◎ | 7-12 | 1.48 | 0.01% | 18.77 | 0.85% | 314.37 | 2.34% | 334.62 | 1.17% |
| ニギス | ○ | ○ | ○ | 4.8,10 | | | 0.76 | 0.03% | 7.54 | 0.06% | 8.30 | 0.03% |
| ヤベウキエソ | ◎ | ○ | ◎ | 1,3,9,12 | 4.59 | 0.04% | | 0.00% | 4.59 | 0.03% | 9.18 | 0.03% |
| ソコイワシ属 | ◎ | ○ | | 11,2,3 | 0.97 | 0.01% | 2.20 | 0.10% | 3.39 | 0.03% | 6.56 | 0.02% |
| ヨコエソ | ○ | ● | ◎ | 12,1,3 | 1.40 | 0.01% | 7.51 | 0.34% | 1.57 | 0.01% | 10.48 | 0.04% |
| オニハダカ属 | ○ | | | 3 | | | | 0.00% | 0.99 | 0.01% | 0.99 | 0.00% |
| キュウリエソ | ○ | ○ | | 2,3 | 1.58 | 0.01% | 5.24 | 0.24% | | | 6.82 | 0.02% |
| ホウライソ科 | ○ | | | 10 | | | | | 1.19 | 0.01% | 1.19 | 0.00% |
| ホテイエソ科 | ○ | | | 9 | | | | | 0.85 | 0.01% | 0.85 | 0.00% |
| エソ科 | ● | ● | ● | 4-11 | 89.66 | 0.69% | 11.22 | 0.51% | 371.29 | 2.76% | 472.17 | 1.65% |
| ヒメ科 | ○ | | | 10 | | | | | 1.19 | 0.01% | 1.19 | 0.00% |
| オキエソ | ◎ | ○ | ○ | 4-6 | 7.51 | 0.06% | 2.15 | 0.10% | | 0.00% | 9.66 | 0.03% |
| アオメエソ科 | ○ | | | 3 | 0.90 | 0.01% | | | 1.47 | 0.01% | 2.37 | 0.01% |
| イハダカ属 | | | ○ | 3 | | | 0.84 | 0.04% | | 0.00% | 0.84 | 0.00% |
| ススキハダカ | ◎ | | | 3,10 | | | 0.89 | 0.04% | 0.97 | 0.01% | 1.86 | 0.01% |
| アラハダカ | ● | ● | ◎ | 3-7,11,1 | 19.85 | 0.15% | 13.20 | 0.60% | 26.37 | 0.20% | 59.42 | 0.21% |
| ウスハダカ | ○ | | | 3 | | | | | 0.99 | 0.01% | 0.99 | 0.00% |
| ヒサハダカ | | | ○ | 11 | | | | | 1.28 | 0.01% | 1.28 | 0.00% |
| トンガリハダカ属 | ◎ | | ○ | 3 | | | 0.93 | 0.04% | 3.28 | 0.02% | 4.21 | 0.01% |
| ハダカイワシ属 | ● | ○ | ● | 周年 | 21.90 | 0.17% | 12.37 | 0.56% | 5.90 | 0.04% | 40.17 | 0.14% |
| オオクチイワシ属 | ◎ | ○ | | 1,2,10 | | | 3.66 | 0.17% | 28.82 | 0.21% | 32.48 | 0.11% |
| ナガハダカ属 | ○ | | | 6,12 | | | | | 7.41 | 0.06% | 7.41 | 0.03% |
| ダツ科 | | ○ | | 8 | | | | | 1.41 | 0.01% | 1.41 | 0.00% |
| サンマ | ○ | | ○ | 4,5 | | | 2.23 | 0.10% | | | 2.23 | 0.01% |
| サヨリ科 | ○ | ○ | ○ | 5 | 2.94 | 0.02% | 2.94 | 0.13% | | | 5.88 | 0.02% |
| トビウオ科 | ◎ | ○ | | 5-8 | | | 3.63 | 0.16% | 2.23 | 0.02% | 5.86 | 0.02% |
| ヤガラ | ○ | ○ | ○ | 7-10,12 | | | | | 33.74 | 0.25% | 33.74 | 0.12% |
| サギフエ | ● | ◎ | ◎ | 1-4,8-12 | 3.65 | 0.03% | 3.85 | 0.17% | 888.72 | 6.61% | 896.42 | 3.13% |
| ヨウジウオ科 | ○ | ◎ | ○ | 5,7-12 | | | 18.74 | 0.85% | 14.42 | 0.11% | 33.16 | 0.12% |
| ヨウジウオ | ◎ | ● | ● | 4-12 | 132.47 | 1.02% | 29.87 | 1.35% | 73.83 | 0.55% | 236.17 | 0.83% |
| タツノオトシゴ属 | ● | ◎ | ● | 5-12 | 319.69 | 2.46% | 36.9 | 1.67% | 214.21 | 1.59% | 570.80 | 1.99% |
| チゴダラ科 | ◎ | ● | ○ | 1-6,10-12 | 7.36 | 0.06% | 18.25 | 0.83% | 8.74 | 0.07% | 34.35 | 0.12% |
| サイウオ科 | ● | ● | ◎ | 7-12 | 18.29 | 0.14% | 18.29 | 0.83% | 379.43 | 2.82% | 416.01 | 1.45% |
| カクレウオ科 | ○ | | | 6,8 | | | | | 2.33 | 0.02% | 2.33 | 0.01% |
| アシロ科 | ○ | ○ | | 9,10 | | | | | 2.76 | 0.02% | 2.76 | 0.01% |
| キアンコウ | ◎ | | ○ | 9-11 | 2.46 | 0.02% | 3.57 | 0.16% | | | 6.03 | 0.02% |
| マトウダイ | ● | | | 4,11,12 | 1.87 | 0.01% | 0.78 | 0.04% | 1.17 | 0.01% | 3.82 | 0.01% |
| トウゴロウイワシ科 | | | ○ | 1,5,7,11 | 89.32 | 0.69% | | | | | 89.32 | 0.31% |
| トウゴロウイワシ | | | ○ | 7 | 0.27 | 0.00% | | | | | 0.27 | 0.00% |
| ボラ科 | ○ | ◎ | ◎ | 2-5,10 | 3.66 | 0.03% | 21.29 | 0.96% | 5.50 | 0.04% | 30.45 | 0.11% |
| カマス属 | ● | ○ | ◎ | 6-8 | 5.65 | 0.04% | 1.88 | 0.09% | 9.48 | 0.07% | 17.01 | 0.06% |
| スズキ | ● | ● | ● | 1-3,12 | 57.36 | 0.44% | 46.39 | 2.10% | 144.73 | 1.08% | 248.48 | 0.87% |
| スマイウオ属 | ● | ◎ | ● | 6-12 | 18.56 | 0.14% | 14.90 | 0.67% | 13.13 | 0.10% | 46.59 | 0.16% |
| ハタ科 | ● | ● | | 1-3,8-11 | 4.51 | 0.03% | 17.10 | 0.77% | 71.64 | 0.53% | 93.25 | 0.33% |
| シキマハナダイ | ◎ | ◎ | | 6,9,11,12,3 | 0.91 | 0.01% | 4.77 | 0.22% | 7.53 | 0.06% | 13.21 | 0.05% |
| キントキダイ科 | ○ | | | 7 | | | | | 1.54 | 0.01% | 1.54 | 0.01% |
| テンジクダイ科 | ● | ● | ● | 6-12 | 71.49 | 0.55% | 164.47 | 7.45% | 854.12 | 6.36% | 1,090.08 | 3.81% |
| クダリボウズギス属 | ○ | | ○ | 7,9,10 | | | | | 21.73 | 0.16% | 21.73 | 0.08% |
| シロギス | ● | ● | ● | 6-10 | 169.66 | 1.31% | 49.74 | 2.25% | 174.72 | 1.30% | 394.12 | 1.38% |
| アマダイ科 | ○ | | | 11 | | | | | 1.18 | 0.01% | 1.18 | 0.00% |
| タカベ | | ○ | | 11 | | | | | 1.12 | 0.01% | 1.12 | 0.00% |
| ブリ | | ○ | ○ | 6,8 | | | 0.69 | 0.03% | 1.20 | 0.01% | 1.89 | 0.01% |
| アイブリ | ○ | | | 6 | | | 0.89 | 0.04% | | | 0.89 | 0.00% |
| マアジ | ● | ● | ● | 1-8,10-12 | 12.14 | 0.09% | 34.61 | 1.57% | 52.63 | 0.39% | 99.38 | 0.35% |
| ムロアジ属 | ○ | ○ | | 3,4,6-8,10 | | | | | 55.87 | 0.42% | 55.87 | 0.20% |
| マルアジ属 | | ○ | ○ | 6-10 | | 0.00% | 6.65 | 0.31% | 8.17 | 0.06% | 15.02 | 0.05% |
| カイワリ | ○ | | | 12 | | 0.00% | 0.95 | 0.04% | | | 0.95 | 0.00% |
| シイラ | ◎ | ○ | | 7,6,10 | | 0.00% | 4.56 | 0.21% | 7.53 | 0.06% | 12.09 | 0.04% |
| ギンカガミ | ○ | | | 5 | | | | | 1.00 | 0.01% | 1.00 | 0.00% |

付表2-2 種別の出現状況(総括表)

| 和名 | 出現海域 | | | 出現月 | 採集個体数 | | | | | | 合計 | |
|----------|----------------------------|-----|-----|-------------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|-----------|---------|
| | 天草海 | 八代海 | 有明海 | | 1998.4~1999.3 | | 1999.4~2000.3 | | 2000.4~2001.3 | | 個体数 | 割合 |
| | | | | | 個体数 | 割合 | 個体数 | 割合 | 個体数 | 割合 | | |
| ヒラギ科 | ◎ | ◎ | ◎ | 7-9 | 2.71 | 0.02% | 8.19 | 0.37% | 1.33 | 0.01% | 12.23 | 0.04% |
| マツダイ | | | ○ | 10 | 1.77 | 0.01% | | | | | 1.77 | 0.01% |
| クロサギ科 | | ○ | | 9 | | | | | 2.77 | 0.02% | 2.77 | 0.01% |
| ニベ科 | ● | ● | ● | 3.5-10 | 84.58 | 0.65% | 82.21 | 3.72% | 219.97 | 1.64% | 386.76 | 1.35% |
| ヒメジ科 | ◎ | ◎ | ○ | 6-8,10-12 | 11.44 | 0.09% | 21.72 | 0.98% | 21.74 | 0.16% | 54.90 | 0.19% |
| メジナ属 | ● | ● | ● | 1-4,6 | 66.43 | 0.51% | 21.72 | 0.98% | 15.58 | 0.12% | 103.73 | 0.36% |
| フェダイ科 | | ○ | | 8 | | | | | 1.12 | 0.01% | 1.12 | 0.00% |
| タイ科 | ● | ● | ● | 1,3-7,10-12 | 34.46 | 0.27% | 4.89 | 0.22% | 5.86 | 0.04% | 45.21 | 0.16% |
| チダイ | ◎ | ○ | | 12,1 | | | 2.80 | 0.13% | 11.11 | 0.08% | 13.91 | 0.05% |
| マダイ | ● | ● | ● | 2-7 | 28.47 | 0.22% | 22.95 | 1.04% | 23.79 | 0.18% | 75.21 | 0.26% |
| クロダイ | ◎ | ○ | ◎ | 4-6 | 3.39 | 0.03% | 4.10 | 0.19% | 2.62 | 0.02% | 10.11 | 0.04% |
| キチヌ | | ◎ | | 11 | 4.68 | 0.04% | 4.68 | 0.21% | | 0.00% | 9.36 | 0.03% |
| フェエキダイ科 | ○ | ○ | | 8 | | | | | 21.46 | 0.16% | 21.46 | 0.07% |
| キンチャウダイ | ○ | | | 8 | | | | | 1.22 | 0.01% | 1.22 | 0.00% |
| スズメダイ科 | ◎ | ○ | ◎ | 7-10 | 3.63 | 0.03% | 14.12 | 0.64% | 13.13 | 0.10% | 30.88 | 0.11% |
| ベラ科 | ● | ● | ● | 1,4-12 | 179.59 | 1.38% | 54.30 | 2.46% | 429.40 | 3.20% | 663.29 | 2.32% |
| タカノハダイ科 | ○ | ○ | ○ | 3,11,12 | | | | | 38.41 | 0.29% | 38.41 | 0.13% |
| アカタチ科 | ● | ● | ◎ | 3,7-12 | 24.91 | 0.19% | 13.33 | 0.60% | 62.18 | 0.46% | 100.42 | 0.35% |
| ワニギス属 | ● | ● | ● | 5-12,1-3 | 129.34 | 1.00% | 85.77 | 3.89% | 219.97 | 1.64% | 435.08 | 1.52% |
| タイワンイカナゴ | ○ | | | 9 | | | | 0.00% | 1.22 | 0.01% | 1.22 | 0.00% |
| イカナゴ | ◎ | ○ | ● | 12,1-3 | 2,868.49 | 22.10% | 37.93 | 1.72% | 61.12 | 0.45% | 2,967.54 | 10.37% |
| サハ科 | | | ○ | 4 | | | 0.79 | 0.04% | | | 0.79 | 0.00% |
| サハ属 | ◎ | | ◎ | 2-4 | 3.65 | 0.03% | 4.85 | 0.22% | 0.97 | 0.01% | 9.47 | 0.03% |
| サワラ | ○ | | | 7,8 | | | 3.67 | 0.17% | | | 3.67 | 0.01% |
| ソウダガツオ属 | ● | ○ | | 5,6,8 | 0.89 | 0.01% | 0.89 | 0.04% | 8.25 | 0.06% | 10.03 | 0.04% |
| クロタチカマス科 | ○ | | | 8,11 | | | | 0.00% | 14.15 | 0.11% | 14.15 | 0.05% |
| タチウオ科 | ○ | ○ | | 9,10 | | | | | 57.72 | 0.43% | 57.72 | 0.20% |
| タチウオ | ● | ● | ● | 1,5-12 | 1,166.20 | 8.99% | 145.24 | 6.58% | 581.29 | 4.33% | 1,892.73 | 6.61% |
| ニザダイ科 | ○ | | | 8 | | | | | 8.92 | 0.07% | 8.92 | 0.03% |
| アイゴ科 | ○ | | | 7 | | | | | 3.98 | 0.03% | 3.98 | 0.01% |
| イボダイ | ● | ● | ● | 2,4-12 | 173.39 | 1.34% | 17.64 | 0.80% | 119.58 | 0.89% | 310.61 | 1.09% |
| マナガツオ | | ○ | | 7 | | 0.00% | | 0.00% | 6.44 | 0.05% | 6.44 | 0.02% |
| ハゼ科 | ● | ● | ● | 周年 | 386.36 | 2.98% | 411.92 | 16.66% | 1,898.65 | 14.13% | 2,696.93 | 9.42% |
| ウラス木属 | | ○ | | 6,10 | | 0.00% | | 0.00% | 219.97 | 1.64% | 219.97 | 0.77% |
| トラギス科 | ● | ◎ | ● | 2-7,9,10 | 14.18 | 0.11% | 6.11 | 0.28% | 21.65 | 0.16% | 41.94 | 0.15% |
| トラギス属 | ○ | | | 5 | 1.00 | 0.01% | | | | | 1.00 | 0.00% |
| ヘラキンボ | ◎ | ◎ | | 3,7-10,12 | 4.76 | 0.04% | | | 11.36 | 0.08% | 16.12 | 0.06% |
| ミンマオコゼ科 | ◎ | | | 11,12 | 4.96 | 0.04% | | | 3.50 | 0.03% | 8.46 | 0.03% |
| イソギンボ科 | | | ○ | 6,7,9 | | | | | 11.37 | 0.08% | 11.37 | 0.04% |
| イソギンボ | ● | ● | ● | 3-12 | 4.76 | 0.04% | 46.23 | 2.09% | 22.52 | 0.17% | 73.51 | 0.26% |
| ナベカ属 | ○ | ○ | | 7-9 | | 0.00% | | 0.00% | 39.76 | 0.30% | 39.76 | 0.14% |
| タウエガジ科 | ● | ● | ◎ | 1-6 | 6.48 | 0.05% | 19.89 | 0.90% | 47.75 | 0.36% | 74.12 | 0.26% |
| フサカサゴ科 | ● | ● | ● | 1,3,6-12 | 48.60 | 0.37% | 24.49 | 1.11% | 87.36 | 0.65% | 160.45 | 0.56% |
| メバル | ● | ● | ● | 1-4,12 | 41.30 | 0.32% | 31.23 | 1.41% | 75.88 | 0.56% | 148.41 | 0.52% |
| ウスメバル | | ○ | | 2 | | | | | 1.23 | 0.01% | 1.23 | 0.00% |
| ムラソイ | | ○ | ◎ | 1-3,6 | 7.50 | 0.06% | | | 1.82 | 0.01% | 9.32 | 0.03% |
| カサゴ | ● | ● | ● | 1-5,12 | 5,458.90 | 42.07% | 165.63 | 7.50% | 4,676.58 | 34.80% | 10,301.11 | 35.99% |
| アイナメ属 | | ◎ | ◎ | 1-3 | 5.62 | 0.04% | | | 7.96 | 0.06% | 13.58 | 0.05% |
| コチ科 | ◎ | ◎ | ◎ | 1-3,5-12 | 4.19 | 0.03% | 16.81 | 0.76% | 78.78 | 0.59% | 99.78 | 0.35% |
| ハリゴチ科 | ● | ◎ | ○ | 9, 2-4 | 4.58 | 0.04% | 2.78 | 0.13% | 15.23 | 0.11% | 22.59 | 0.08% |
| ホウボウ科 | ● | ● | ● | 1-7,10-12 | 156.76 | 1.21% | 72.10 | 3.27% | 271.92 | 2.02% | 500.78 | 1.75% |
| クサウオ属 | ○ | ○ | ○ | 3,4,6,12 | | | 14.33 | 0.65% | | | 14.33 | 0.05% |
| ウバウオ科 | | ○ | | 8,10 | | | | | 3.22 | 0.02% | 3.22 | 0.01% |
| ネズツボ科 | ● | ● | ● | 周年 | 485.28 | 3.74% | 82.70 | 3.75% | 35.72 | 0.27% | 603.70 | 2.11% |
| ヒラメ科 | ● | ● | ● | 1-8,10,11 | 23.57 | 0.18% | 29.57 | 1.34% | 42.58 | 0.32% | 95.72 | 0.33% |
| ヒラメ | ● | ● | ● | 1-4 | 27.32 | 0.21% | 6.36 | 0.29% | 42.34 | 0.32% | 76.02 | 0.27% |
| テンジクガレイ | | | ○ | 7,8 | | | | | 2.99 | 0.02% | 2.99 | 0.01% |
| ガンゾウビラメ属 | ◎ | ○ | ○ | 1,3-7,9 | 21.90 | 0.17% | 2.57 | 0.12% | 23.34 | 0.17% | 47.81 | 0.17% |
| アラメガレイ属 | ● | ◎ | ◎ | 3-7,9 | 6.79 | 0.05% | 9.30 | 0.42% | 8.49 | 0.06% | 24.58 | 0.09% |
| タルマガレイ科 | ● | ● | ◎ | 周年 | 25.56 | 0.20% | 29.68 | 1.34% | 1.41 | 0.01% | 56.65 | 0.20% |
| メイタガレイ | | ● | ● | 1-4,12 | 6.20 | 0.05% | 21.52 | 0.97% | 22.26 | 0.17% | 49.98 | 0.17% |
| マコガレイ | ○ | ○ | | 2,4 | 2.58 | 0.02% | 0.98 | 0.04% | | | 3.56 | 0.01% |
| イシガレイ | ○ | ◎ | ○ | 1,3 | | | 2.19 | 0.10% | 9.65 | 0.07% | 11.84 | 0.04% |
| ササウシノシタ科 | ◎ | ◎ | ◎ | 4-7,9-11 | 1.20 | 0.01% | 23.32 | 1.06% | 111.51 | 0.83% | 136.03 | 0.48% |
| ウツノタ科 | ● | ● | ● | 2-4,6-12 | 75.89 | 0.58% | 4.16 | 0.19% | 119.58 | 0.89% | 199.63 | 0.70% |
| カワハギ科 | ● | ● | ● | 2,5-11 | 365.20 | 2.81% | 91.76 | 4.16% | 446.27 | 3.32% | 903.23 | 3.16% |
| フグ科 | ● | ● | ● | 4-9 | 74.82 | 0.58% | 32.13 | 1.46% | 64.61 | 0.48% | 171.56 | 0.60% |
| 合計 | ●: 3年間出現 ◎: 2年間出現 ○: 1年間出現 | | | | 12,976.74 | 100.00% | 2,207.89 | 100.00% | 13,438.36 | 100.00% | 28,622.79 | 100.00% |

八代海・牛深市沿岸域におけるヒラメの放流効果試算

山下博和、平山 泉、鳥羽瀬 憲久

The Stocking Efficiency for Japanese Flounder of the Coast of Yatushiro and Ushibuka in Kumamoto Pref.
Hirokazu Yamashita, Izumi Hirayama, Norihisa Tobase

キーワード：ヒラメ、放流効果

本県におけるヒラメ *Paraichthys olivaceus* の種苗放流は1976年から始まり、熊本県栽培漁業協会の発足後は、種苗生産体制の整備と安定した種苗供給、中間育成により2001年には年間約43万尾以上を放流している。

また、ヒラメの技術的側面は技術開発事業による成果を踏まえ、国庫の補助を受け、1990年度～1995年度は八代・芦北・水俣地域を対象に栽培漁業事業化促進事業が、さらに1996年度～1999年度までは対象地域をより八代海全域と牛深市（市町村）まで拡大し、30万尾以上を放流する体制整備としてヒラメパイロット事業を実施し、現在は、前述の事業終了後に栽培漁業地域展開事業として事業展開している。

1990年～1995年の放流事業の効果試算については、梅本ら³⁾が報告しているが、今回、対象地域の拡大及び放流量が増加した1995年以降の放流効果について報告し、今後の放流事業推進と受益者負担体制への移行の一助とする。

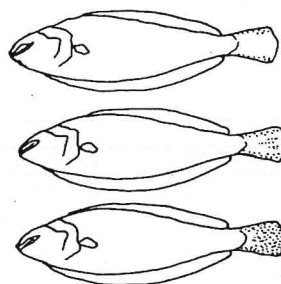
材料及び方法

市場調査 市場調査は1996～1999年まではヒラメパイロット事業事務局、2000年以降は地域展開協議会ヒラメ部会にて調査を実施している。測定項目は既報¹⁾により全長、体重、体色異常の有無とし、1995年4月～2000年3月の調査データを使用した。各市場における年度別測定結果を表1に示した。なお、漁獲量は各調査市場において伝票調査により漁獲量を明らかにした。

表1 年度別市場別調査日数及び調査尾数

| 市場 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 |
|-------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 八代魚市場 | 調査日数 12 調査尾数 814 | 10 661 | 42 949 | 21 406 | 42 925 | 26 344 |
| 日奈久漁協 | 調査日数 6 調査尾数 705 | 7 423 | 12 203 | 12 410 | - | - |
| 田浦漁協 | 調査日数 6 調査尾数 466 | 2 40 | 54 212 | 52 734 | 156 780 | 100 289 |
| 芦北漁協 | 調査日数 12 調査尾数 363 | 14 288 | 13 312 | 17 258 | 21 278 | 21 199 |
| 津奈木漁協 | 調査日数 9 調査尾数 115 | 13 250 | 12 274 | 14 130 | 12 150 | 12 94 |
| 水俣漁協 | 調査日数 6 調査尾数 374 | 29 393 | 86 772 | 80 928 | 117 1,229 | 105 804 |
| 松合漁協 | 調査日数 5 調査尾数 309 | 18 314 | 24 94 | 24 141 | 23 146 | 22 100 |
| 大矢野漁協 | 調査日数 6 調査尾数 399 | - | 13 454 | 17 505 | 20 986 | 22 464 |
| 松島漁協 | 調査日数 6 調査尾数 383 | 21 623 | 12 309 | 12 497 | 12 528 | 12 269 |
| 姫戸漁協 | 調査日数 6 調査尾数 291 | 12 203 | 12 205 | 15 244 | 13 243 | 12 161 |
| 榑島漁協 | 調査日数 6 調査尾数 273 | 23 106 | 12 104 | 12 134 | 12 128 | 12 110 |
| 本渡市漁協 | 調査日数 6 調査尾数 773 | 10 439 | 23 1,354 | 12 538 | 12 368 | 13 386 |
| 牛深漁協 | 調査日数 6 調査尾数 835 | 12 837 | 12 2,019 | 12 1,042 | 12 1,211 | 13 1,148 |
| 合計 | 調査日数 80 調査尾数 4,622 | 154 3,715 | 292 5,704 | 280 5,019 | 440 6,604 | 357 3,962 |

放流魚 天然魚と放流魚の識別は、標識の有無及び体色異常を用いた。すなわち、標識、有眼側体色異常及び無眼側体幹部体色異常を有する個体、そして図1に示したパターンの++以上に該当する個体を放流魚とした。



+: 尾鰭にわずかに褐色、斑点が見られる。斑点は縁辺部に多い。
++: 斑点はかなり多いか小さな斑紋がある。斑点は中央部に及ぶ。
+++ : 褐色斑点が鰭全体に分布する大きな斑紋があり鰭面積の1/3以上に及ぶ。

図1 ヒラメの標識パターン

混獲率 混獲率の推定は、広域資源培養管理対策推進事業²⁾で定めた種々のパラメータを用いて、天然魚と放流魚に分けて図2に示した方法で年別市場別に行った。

なお、パラメータでのヒラメ加入月は3月であるが、計算は年度別に行った。

市場調査結果（全長組成） 混獲率

↓←全長別雌雄比

雌雄別全長別推定調査尾数

↓←AGE-LENGTH-KEY（体長組成を年齢組成に変換）

市場別年齢別雌雄別推定尾数

↓←雌雄別全長・体重関係式

市場別年齢別雌雄別推定重量

↓←市場別伝票調査

市場別年齢別雌雄別漁獲量

↓←雌雄別全長・体重関係式

市場別年齢別雌雄別漁獲尾数

図2 混獲率推定フロー

回収状況及び投資効果 事業効率の試算には、前記「混獲率」の項で導いた各地区の各年における年齢別放流魚の漁獲量と伝票調査にて調査した年度市場別平均単価を乗じ

て回収金額を算出した。投資効果は回収金額を放流事業経費から徐して算出した。

結果及び考察

混獲率 表3に各地区の推定漁獲尾数を合計して算出した混獲率を示した。6カ年の集計結果では、各年齢における混獲率は年度年齢毎にバラツキがあるが、0歳～2歳は比較的安定している傾向にあり、ヒラメ種苗は順調に資源添加されていると考えられる。

回収状況及び投資効果 放流魚の推定回収状況を表3に示す。1995年に放流された人工種苗437,203尾の6年間での回収尾数は10,787尾で回収率は10.4%、回収重量は36,090kgで金額は73,908千円であった。

また投資効果を表5に示す。1995年の放流事業費は37,331千円（人件費は含まない）であったことから事業の投資効果は2.0であった。また、種苗放流後およそ3カ年で回収金額が放流事業費を上回ると思われる。

(1) 1996年から2000年までの八代海・牛深地域におけるヒラメの放流効果を推定した。

(2) 漁獲されたヒラメの各年齢における混獲率は安定しており、ヒラメ種苗は順調に資源添加されていると考えられた。

(3) 1995年放流群は6カ年で回収率が10.4%、回収金額は73,908千円と推定された。

(4) 1995年放流群では、およそ3カ年で放流経費を回収していたものと思われた。

文 献

- 1) 熊本県：昭和59年度放流技術開発事業報告書（ヒラメ班），253-254（1985）。
- 2) 九州西ブロック熊本県：熊本県広域資源管理推進指針，19-30（1992）。
- 3) 熊本県：熊本県水産研究センター研究報告第3号，29-30（1996）。

要 約

表3 年齢別混獲率

| 年度 | 1995 | | | 1996 | | | 1997 | | | 1998 | | | 1999 | | | 2000 | | | 合計 | | |
|----|---------|---------|-------|---------|---------|-------|---------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|---------|-------|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|
| | 放流 | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 | 放流(尾) | 天然(尾) | 混獲率 |
| 0 | 34,148 | 99,462 | 25.6% | 24,507 | 130,261 | 15.8% | 25,385 | 149,192 | 14.5% | 20,205 | 66,750 | 22.7% | 12,904 | 42,726 | 23.2% | 10,263 | 34,798 | 22.8% | 127,412 | 525,188 | 19.5% |
| 1 | 58,582 | 189,060 | 23.7% | 61,711 | 256,027 | 19.4% | 51,828 | 290,178 | 15.2% | 44,288 | 133,429 | 24.9% | 29,732 | 96,623 | 23.5% | 20,771 | 77,637 | 21.1% | 266,912 | 1,042,955 | 20.4% |
| 2 | 12,100 | 77,487 | 13.5% | 14,252 | 95,099 | 13.0% | 9,243 | 91,027 | 9.2% | 9,562 | 47,018 | 16.9% | 6,277 | 38,136 | 14.1% | 6,335 | 35,748 | 15.1% | 57,770 | 384,516 | 13.1% |
| 3 | 3,032 | 35,594 | 7.8% | 3,482 | 36,028 | 8.8% | 3,325 | 40,357 | 7.6% | 2,776 | 13,878 | 16.7% | 1,684 | 12,287 | 12.1% | 1,786 | 11,564 | 13.4% | 16,085 | 149,709 | 9.7% |
| 4 | 1,121 | 17,168 | 6.1% | 1,125 | 15,480 | 6.8% | 1,453 | 19,950 | 6.8% | 1,173 | 5,386 | 17.9% | 640 | 4,423 | 12.6% | 724 | 4,201 | 14.7% | 6,235 | 66,608 | 8.6% |
| 5 | 315 | 8,317 | 3.6% | 223 | 5,072 | 4.2% | 589 | 11,518 | 4.9% | 480 | 2,121 | 18.5% | 180 | 1,589 | 10.2% | 269 | 1,240 | 17.8% | 2,056 | 29,857 | 6.4% |
| 6 | 50 | 113 | 30.6% | 2 | 264 | 0.7% | 195 | 941 | 17.2% | 112 | 498 | 18.4% | 24 | 60 | 28.3% | 53 | 196 | 21.2% | 435 | 2,072 | 17.4% |
| 合計 | 109,347 | 427,203 | 20.4% | 105,301 | 538,231 | 16.4% | 117,743 | 429,511 | 21.5% | 83,672 | 310,288 | 21.2% | 40,201 | 165,383 | 19.6% | 463,661 | 2,335,335 | 16.6% | 919,925 | 4,205,951 | 17.9% |

4 放流魚の推定回収状況

| | 1995年 | 1996年 | 1997年 | 1998年 | 1999年 | 2000年 | 計 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1995年放流群再捕尾数(尾) | 34,148 | 61,711 | 9,243 | 2,776 | 640 | 269 | 108,787 |
| 1996年放流群再捕尾数(尾) | | 24,507 | 51,828 | 9,562 | 1,684 | 724 | 88,305 |
| 1997年放流群再捕尾数(尾) | | | 25,385 | 44,288 | 6,277 | 2,111 | 78,061 |
| 1998年放流群再捕尾数(尾) | | | | 20,205 | 29,732 | 6,335 | 56,273 |
| 1999年放流群再捕尾数(尾) | | | | | 12,904 | 20,771 | 33,675 |
| 2000年放流群再捕尾数(尾) | | | | | | 10,679 | 10,679 |
| | | | | | | | 375,780 |
| 1995年放流群漁獲重量(kg) | 3,756 | 16,662 | 8,134 | 4,636 | 1,727 | 1,175 | 36,090 |
| 1996年放流群漁獲重量(kg) | | 2,696 | 13,993 | 8,415 | 2,812 | 2,390 | 30,307 |
| 1997年放流群漁獲重量(kg) | | | 2,792 | 11,958 | 5,524 | 3,525 | 23,799 |
| 1998年放流群漁獲重量(kg) | | | | 2,223 | 8,028 | 6,131 | 16,381 |
| 1999年放流群漁獲重量(kg) | | | | | 1,419 | 6,089 | 7,509 |
| 2000年放流群漁獲重量(kg) | | | | | | 1,175 | 1,175 |
| 1995年放流群回収金額(千円) | 11,177 | 28,356 | 18,782 | 10,533 | 2,810 | 2,250 | 73,908 |
| 1996年放流群回収金額(千円) | | 8,147 | 24,428 | 16,549 | 5,095 | 4,209 | 58,427 |
| 1997年放流群回収金額(千円) | | | 8,487 | 15,553 | 9,527 | 6,774 | 40,341 |
| 1998年放流群回収金額(千円) | | | | 4,554 | 10,153 | 11,748 | 26,456 |
| 1999年放流群回収金額(千円) | | | | | 2,911 | 8,409 | 11,321 |
| 2000年放流群回収金額(千円) | | | | | | 2,866 | 2,866 |

表5 放流群別回収率及び事業投資効果

| | 回収率 | 投資効果 |
|----------|-------|------|
| 1995年放流群 | 10.4% | 2.0 |
| 1996年放流群 | 8.1% | 2.4 |
| 1997年放流群 | 10.1% | 1.6 |
| 1998年放流群 | 6.0% | 1.0 |
| 1999年放流群 | 3.1% | 0.5 |
| 2000年放流群 | 1.4% | 0.1 |

1992年から2003年にかけての緑川河口域のアサリ分布状況

那須博史、平山 泉、中原康智*¹、陣内康成*²、鳥羽瀬憲久

* 1 熊本県八代地域振興局水産課、 * 2 熊本県林務水産部漁政課

Studies on the distribution of a short-necked clam in 1992 to 2003,
at the mouth of Midori river.

Hirofumi Nasu, Izumi Hirayama, Yasutomo Nakahara,

Yasunari Jinnai, Norihisa Tobase

キーワード：アサリ、干潟、分布状況、漁獲量

全国の干潟の40%を占める有明海では、各地でアサリ採貝漁業が営まれてきた。中でも本県海域は、砂泥質または砂質の干潟を多く有することから、1970年代には日本一の漁獲量を誇っていた。しかし、1977年に65,273tを記録した後減少を続け、近年は1,000~2,000tと低迷している(図1)。

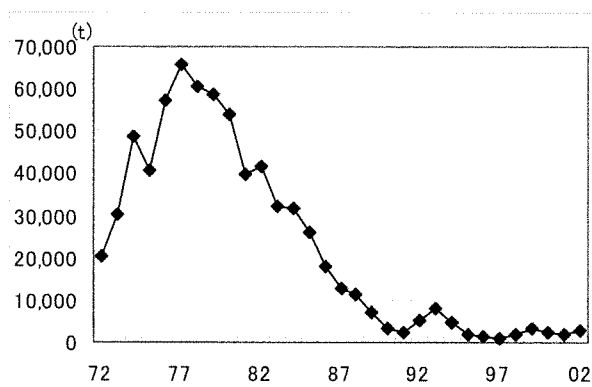


図1 熊本のアサリ漁獲量の推移 (1972~2002 農林水産統計)

有明海熊本県海域のアサリ漁場は、その成り立ち、影響する河川等から大きく荒尾地先、菊池川河口域、白川河口域、緑川河口域の4つに大別される(図2)。

なかでも緑川河口域は、熊本県におけるアサリ漁獲が最盛期だった時の主産地で、さらに全国有数の

稚貝産地でもあった。最盛期には本地域だけで40,000t以上が漁獲されていたが、1980年以降急激に減少し、1990年から1997年にかけては資源状況が極端に悪化した。熊本県のアサリ漁獲量の急激な減少は、緑川河口域での漁獲量減少に起因するところが大きい。ところが、1998年以降資源状況は回復傾向に

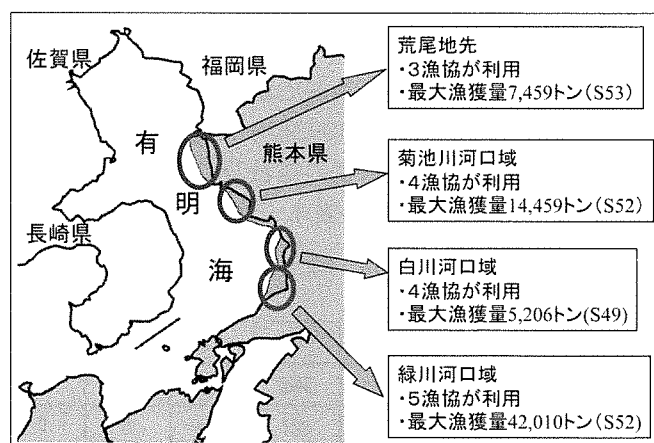


図2 熊本県有明海沿岸の主要漁場

あり、漁獲量も増加傾向を示していた(図3)。

このような状況の中、2002年に主要産地である緑川河口域、白川河口域、菊池川河口域において殻長10mm以下の稚貝(以下稚貝という)の大量発生が認められ、この稚貝はその後順調に生育し、2003年の春から漁獲され始め、聞き取り調査によると約8,5

00tが漁獲されている。

当県では主要漁場である緑川河口域のアサリ分布状況を把握するために調査を継続しており、1992年から2003年までの本漁場におけるアサリ分布状況の変化についてとりまとめたので報告する。

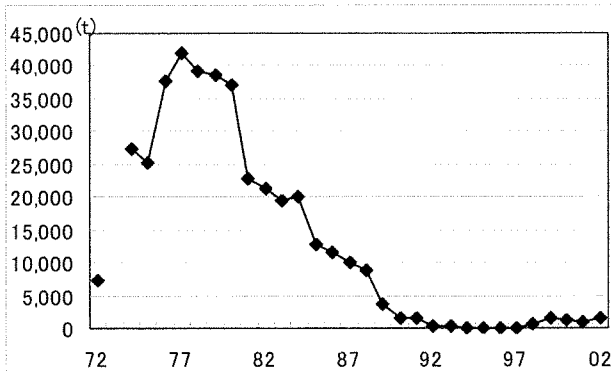


図3 緑川河口域のアサリ漁獲量の推移 (1972～2002 農林水産統計)

材料および方法

調査は毎年6月及び8から9月の2回、大潮時に3から4日かけて実施した。

干潟上に設定した調査点74～93定点で25cm方形枠による枠取りを2回実施し、1mmメッシュのふるいでふるい分けて資料とした。資料から得られたアサリについては、個体数の計数及び殻長の計測を行った(図4)。

結果および考察

各年度のアサリ分布状況の調査結果及び殻長組成を図5～28に示した。1992年から継続している調査点74点の平均分布密度の推移及び殻長10mm以下の平均分布密度の推移を表1、2に示した。

表1 緑川河口域のアサリ平均分布密度の推移

(単位 分布密度:個/m² 漁獲量:トン)

| | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|------|
| 第1回調査 | 257 | 562 | 50 | 19 | 52 | 90 | 221 | 445 | 316 | 191 | 1,215 | 295 |
| 第2回調査 | 117 | 121 | 234 | 8 | 7 | 34 | 155 | 83 | 30 | 87 | 337 | 60 |
| アサリ漁獲量 | 411 | 338 | 43 | 20 | 22 | 4 | 509 | 1,418 | 1,119 | 840 | 1,532 | 未公表 |

表2 緑川河口域のアサリ平均分布密度の推移 (殻長 10mm 以下)

(単位 分布密度:個/m² 漁獲量:トン)

| | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|------|
| 第1回調査 | 254 | 552 | 49 | 6 | 48 | 90 | 207 | 405 | 286 | 169 | 1,153 | 228 |
| 第2回調査 | 31 | 117 | 126 | 4 | 3 | 1 | 8 | 1 | 1 | 2 | 12 | 16 |
| アサリ漁獲量 | 411 | 338 | 43 | 20 | 22 | 4 | 509 | 1,418 | 1,119 | 840 | 1,532 | 未公表 |

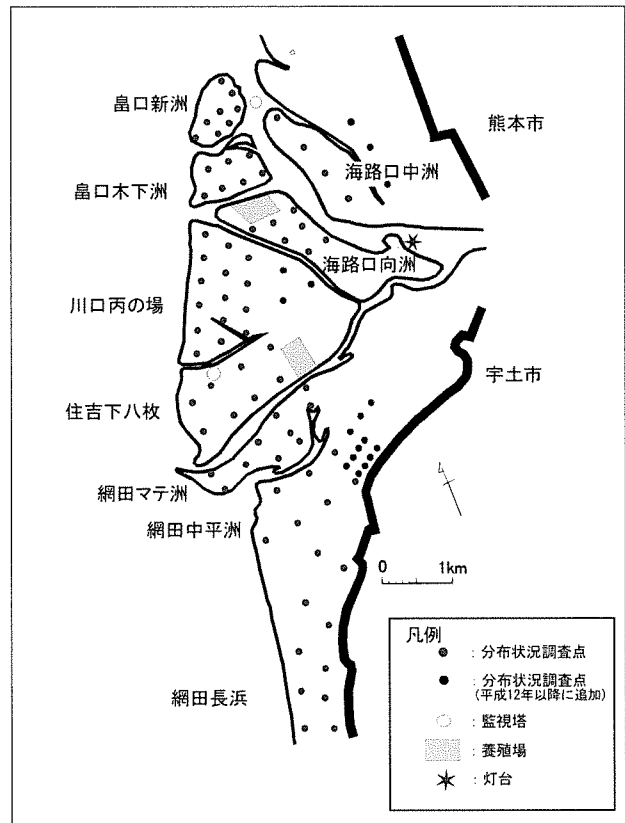


図4 緑川河口域アサリ分布状況調査定点図

資源が減少傾向にあった1992～1994年の調査では、稚貝の発生は認められるものの、漁獲には結びついていなかった。特に1993年は、1992年以降では2番目の発生量にもかかわらず、翌年の漁獲量は43トンと非常に減少した。主たる減少要因としては、ツメタガイによる食害が報告されているが、その他の要因については不明である¹⁾。

資源量が低位となった1995から1997年は、稚貝の発生量も少なく、漁獲量は1997年には4トンと最盛期の約1/10,000まで激減した。特に1995年は殻長1

0mm以下の平均分布密度が第1回調査で6個/m²、第2回調査で4個/m²と非常に少なかった。この年の要因としては、夏場に主要漁場全域に大雨による土砂の堆積による影響が考えられた²⁾。

資源回復傾向が認められた1998年からの調査では、殻長10mm以下の平均分布密度で、第1回調査時に150個/m²以上の稚貝が確認されるようになった。特に2002年の調査では、殻長10mm以下の平均分布密度で、第1回目調査時に1,153個/m²の分布が確認され、1992年以降では最高の分布を確認した。この群はその後順調に生育し、翌年の春には殻長30mm前後に成長し漁獲され始め、2003年は、聞き取り調査によると約5,000トンの漁獲があった。

各年の殻長10mm以下のアサリ平均分布密度は、資源減少期であった、1992年から1994年の調査では、第2回調査時にも31~234個/m²で確認できたが、それ以降では、最高で16個/m²とあまり確認できなくなった。このことから、1995年以降は、稚貝の加入状況が変化していることが示唆された。

緑川河口域でのアサリ資源は、現在回復傾向に向かっていると考えられるが、稚貝の発生は気候条件、環境条件に左右され、毎年安定した加入がある訳ではない。資源回復傾向にある1998年以降においても、稚貝の加入が多かった年は、1999年、2002年であり、数年に1回卓越年級群が発生していることが示唆された。

また、1995年以降は、第2回調査の平均分布密度と翌年の漁獲量には、非常に高い相関がみられた(図29)。第2回調査時の殻長組成はモードが20mm前後であり、このサイズに成長すれば、1998年以降の緑川河口域では、その後は大きな減少はなく漁獲に結びつくことが示唆された。

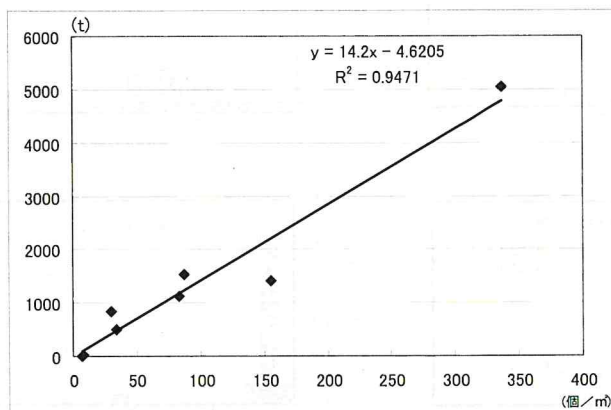


図29 1995年以降の第2回調査時の平均分布密度と翌年の漁獲量との関係

* 1995~2001の漁獲量は農林水産統計、2003年の漁獲量は聞き取り調査結果を使用した

なお、今後アサリを安定的に漁獲するためには、数年に1回発生する卓越年級群を、数年かけて漁獲する体制を整備する必要があり、そのためには、漁協・漁業者による資源管理の推進を徹底しなければならない。残念ながら、現在は採り尽くし型の漁業が行われたおり³⁾、このような状況では、また1995から1997年のような状況に戻る恐れもあるため、母貝集団を残しながら、適量漁獲していく方法を考える必要がある。

要約

- 1) 1992年から2003年までの緑川河口域のアサリ分布状況を把握した。調査は毎年6月と8月から9月の2回、緑川河口域に設定した約80定点で実施した。
- 2) 1995年から1997年にかけて資源状況は極端に悪化したが、1998年以降増加傾向にある。
- 3) 1995年以降の第2回調査時の平均分布密度と翌年の漁獲量には高い相関がみられた。第2回調査時の殻長組成はモードが20mm前後であり、このサイズに成長すれば、1998年以降の緑川河口域では、その後は大きな減少はなく漁獲に結びつくことが示唆された。

謝辞

本調査実施にあたり協力頂いた畠口漁業協同組合、海路口漁業協同組合、川口漁業協同組合、住吉漁業協同組合、網田漁業協同組合、熊本県漁業協同組合連合会、宇土市農林水産課、熊本市水産振興課の職員並びに関係者の各位に心から感謝します。

また、当センターでアサリ担当として従事された、石田宏一氏に心から感謝します。

文献

- 1) 平山 泉、石田宏一、鳥羽瀬憲久：資源管理型漁業推進総合対策事業、平成5年度熊本県水産研究センター事業報告書、56-61 (1993)
- 2) 中原康智、鳥羽瀬憲久：アサリ増殖試験Ⅰ、平成7年度熊本県水産研究センター事業報告書、20-24 (1995)
- 3) 中原康智、那須博史：主要アサリ産地からの報告—有明海熊本県沿岸、日本ベントス学会誌 57、139-144 (2002)

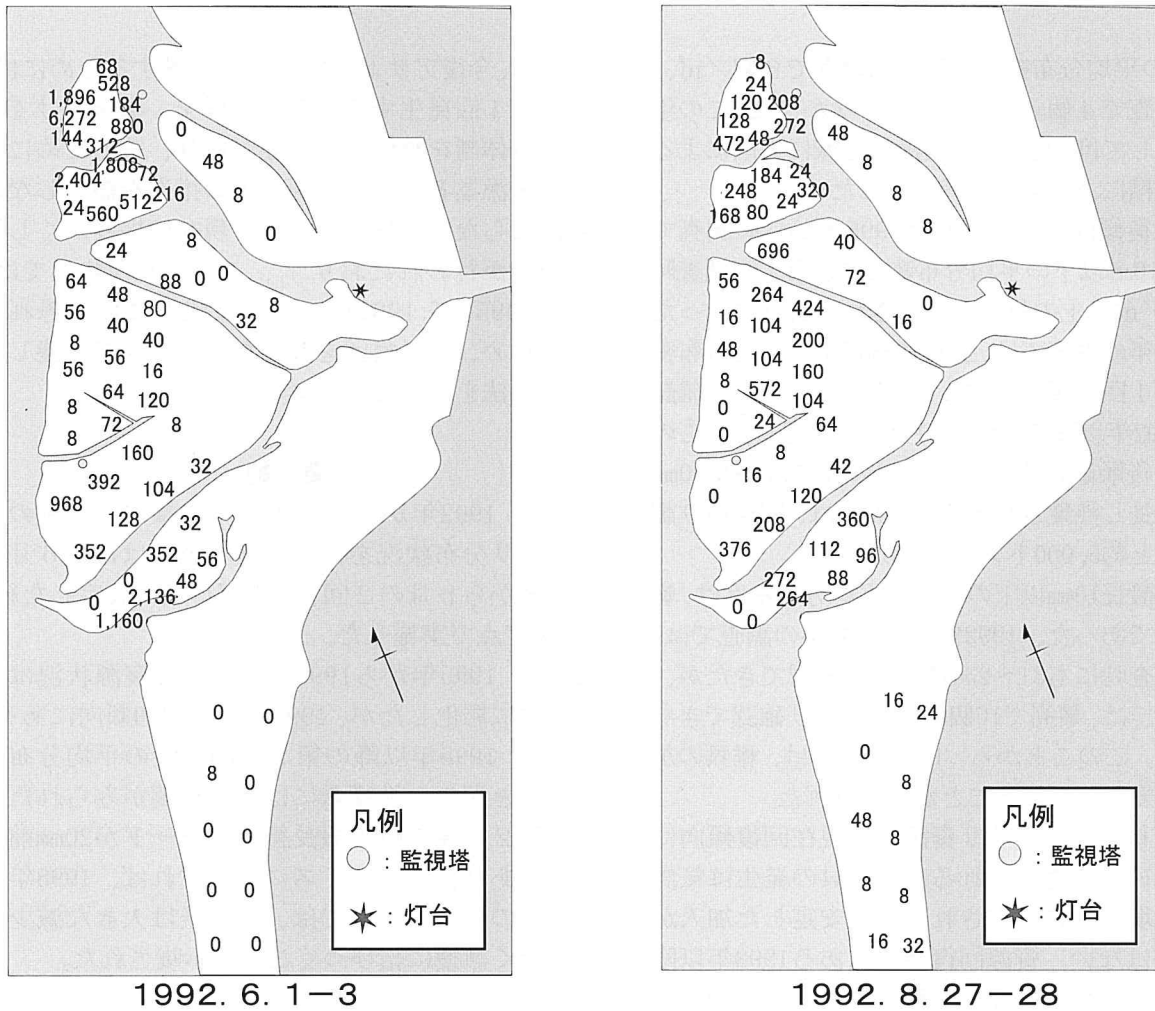


図5 1992年緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

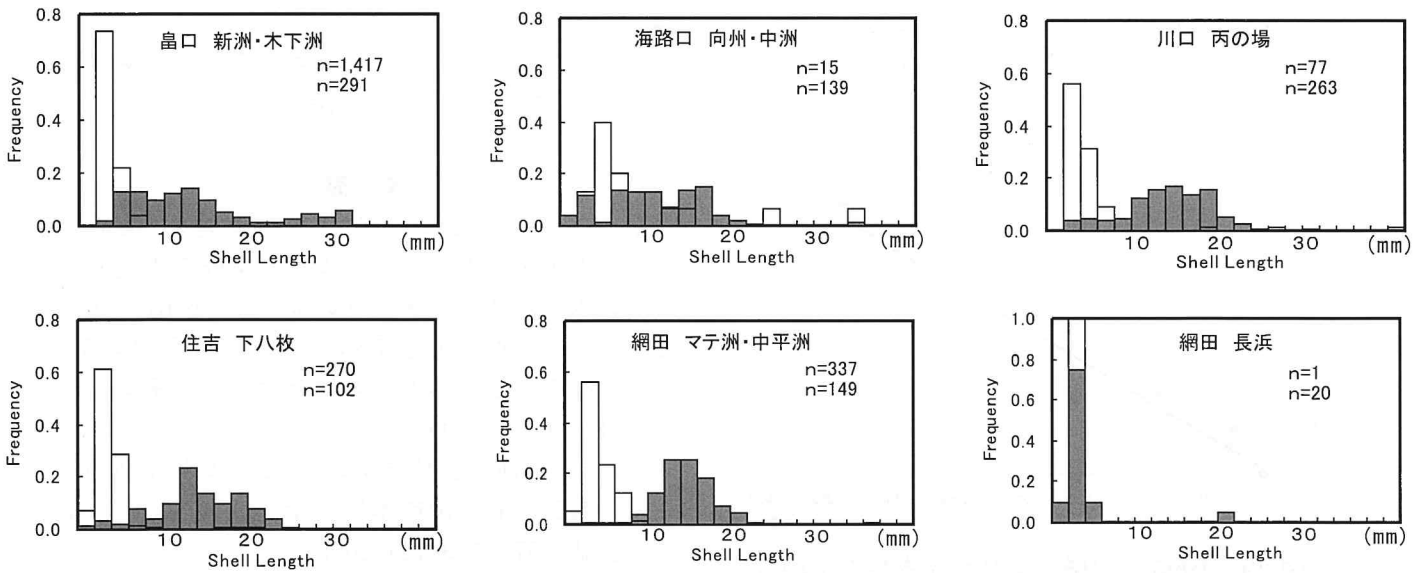
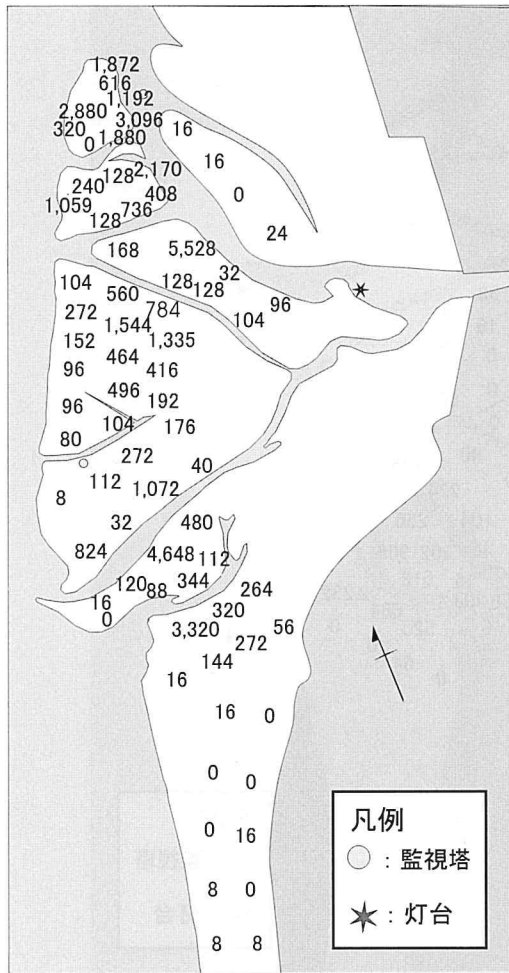
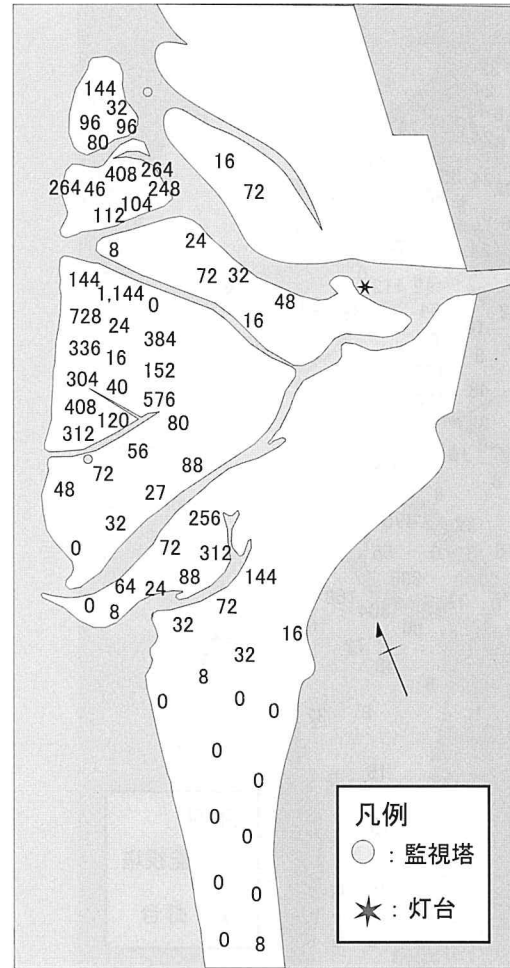


図6 1992年分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1992.6 ■ 1992.8 上段n:6月調査、下段n:8月調査)



1993. 6. 3-4



1993. 8. 17-19

図7 1993年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

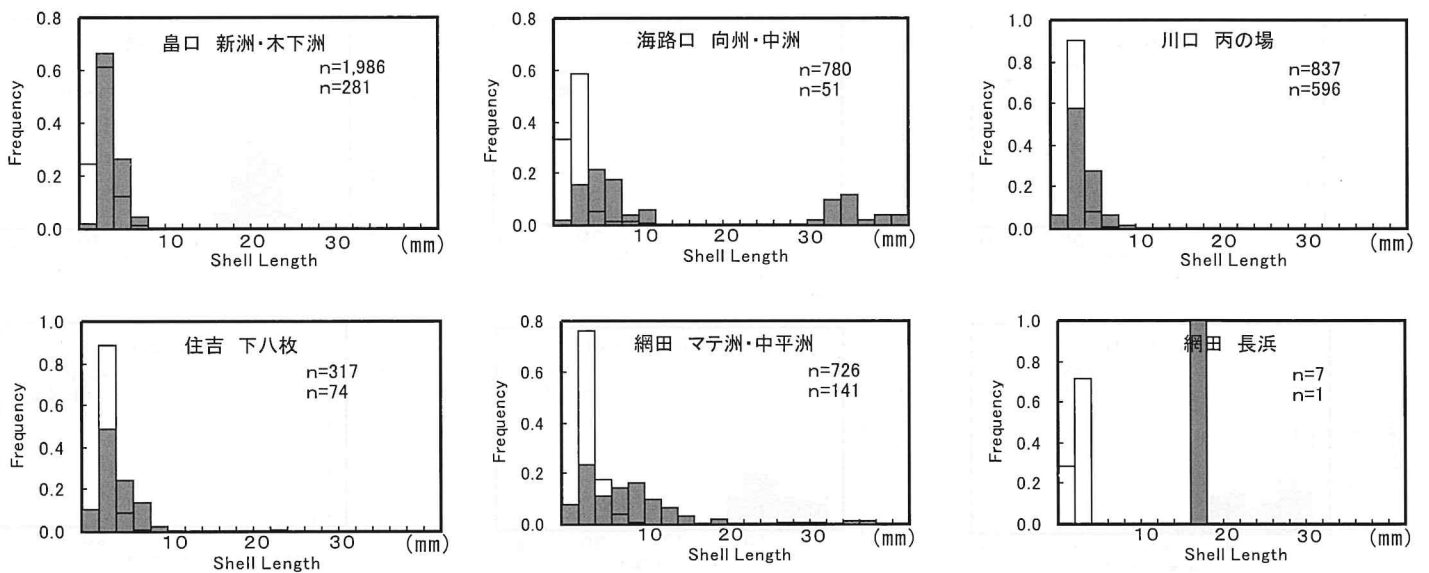
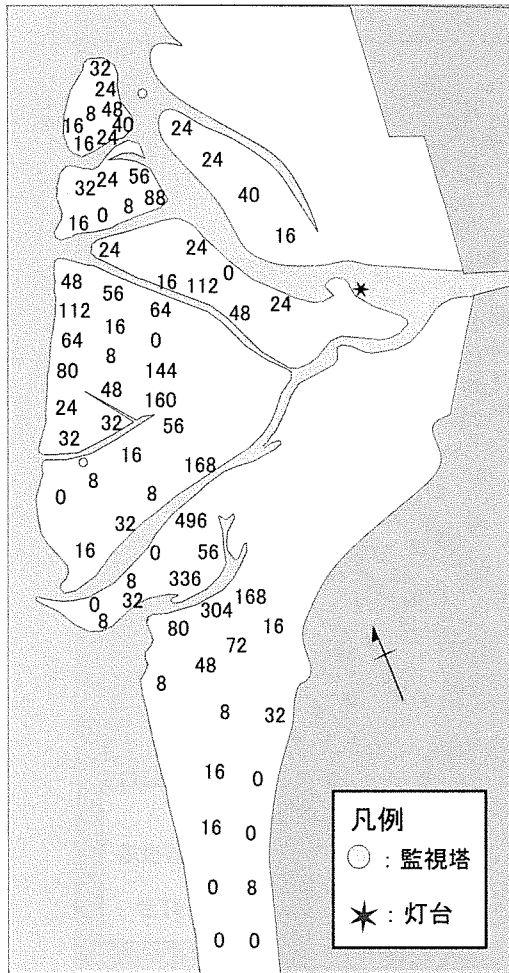
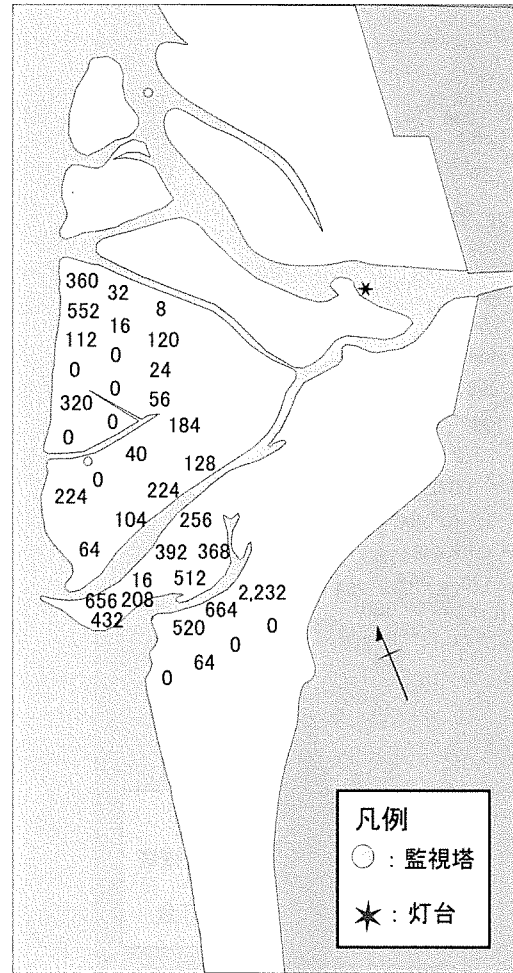


図8 1993年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1993.6 ■ 1993.8 上段n:6月調査、下段n:8月調査)



1994. 6. 22-24



1994. 8. 8-9

* 新洲・木下洲・向州・中洲・長浜は未調査

図9 1994年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

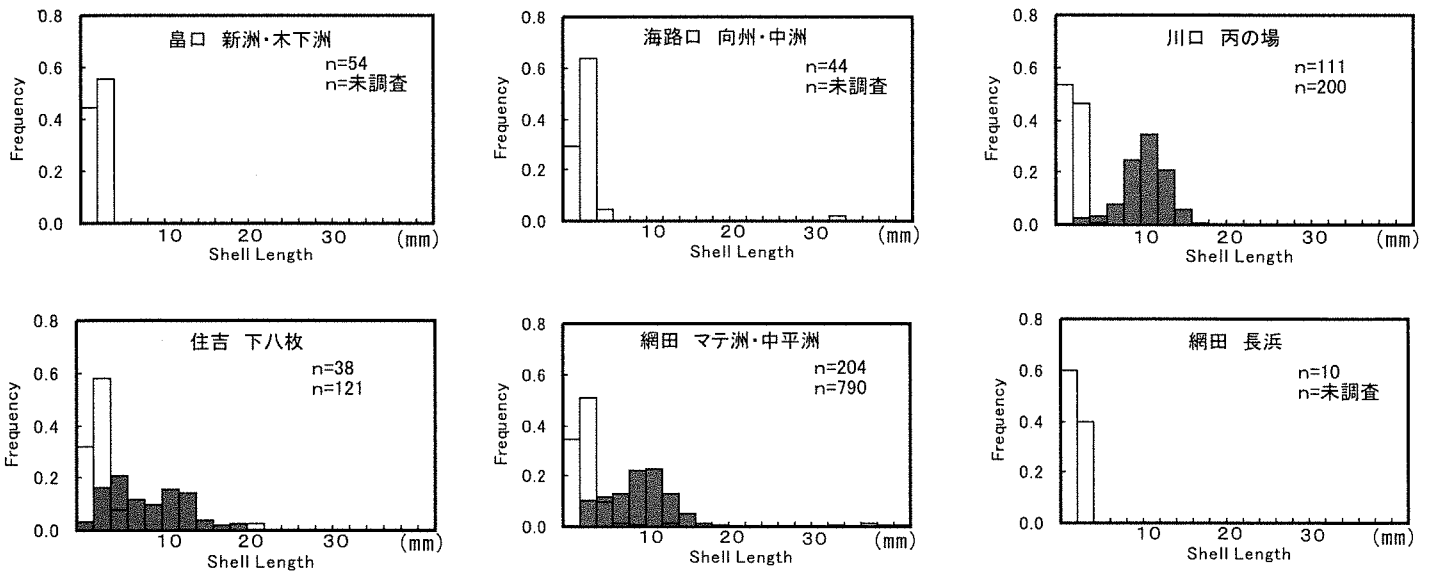


図10 1994年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1994.6 ■ 1994.8 上段n:6月調査、下段n:8月調査)

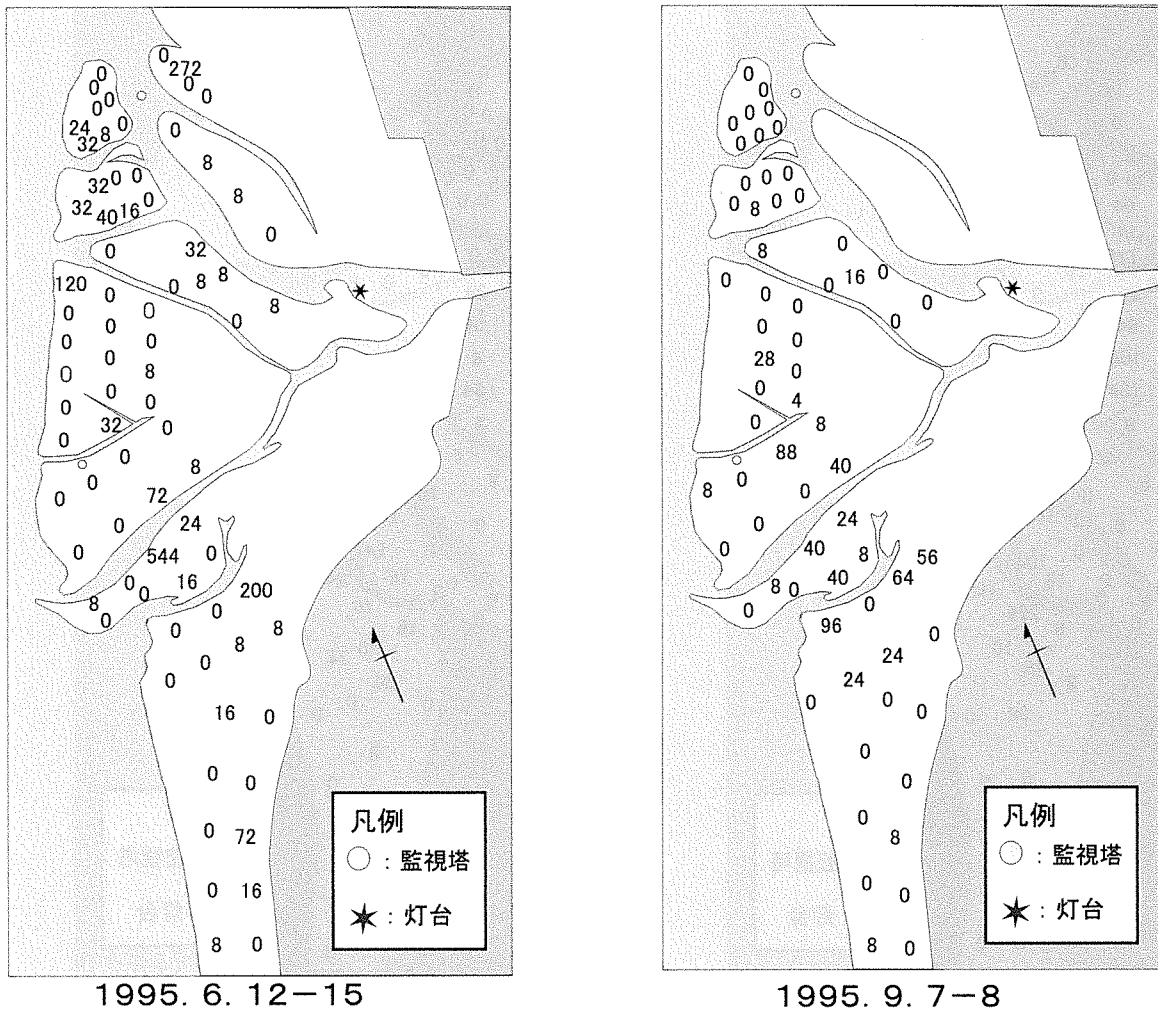


図11 1995年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

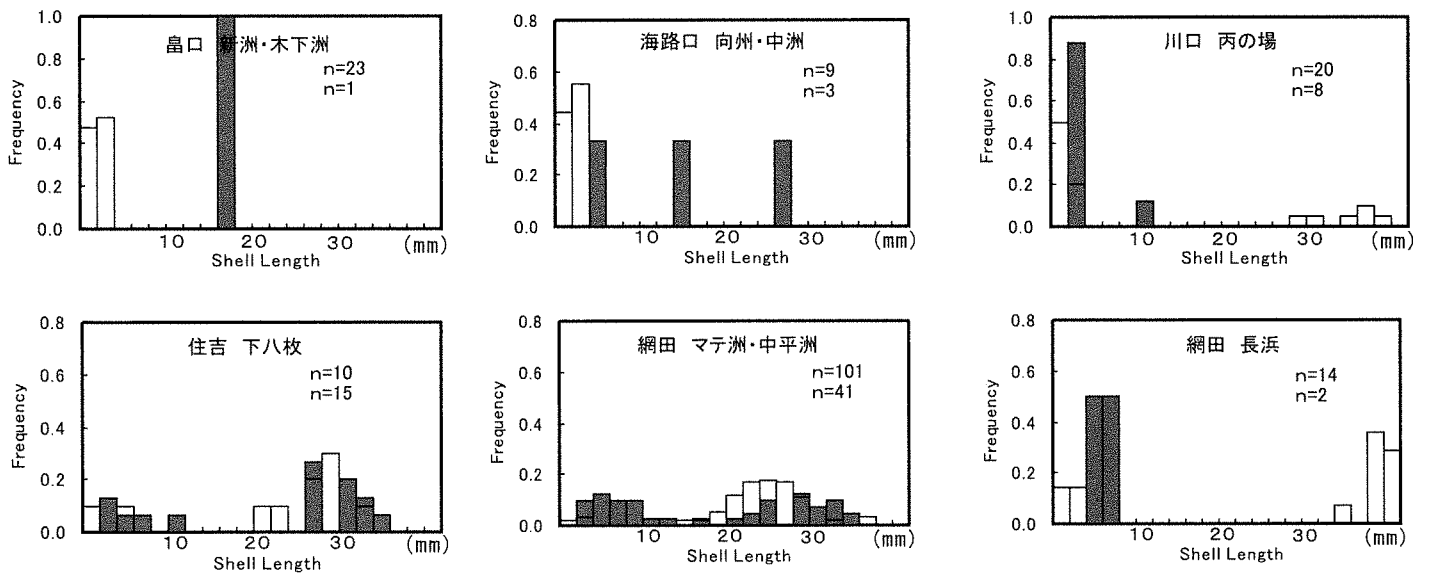


図12 1995年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1995.6 ■ 1995.9 上段n:6月調査、下段n:9月調査)

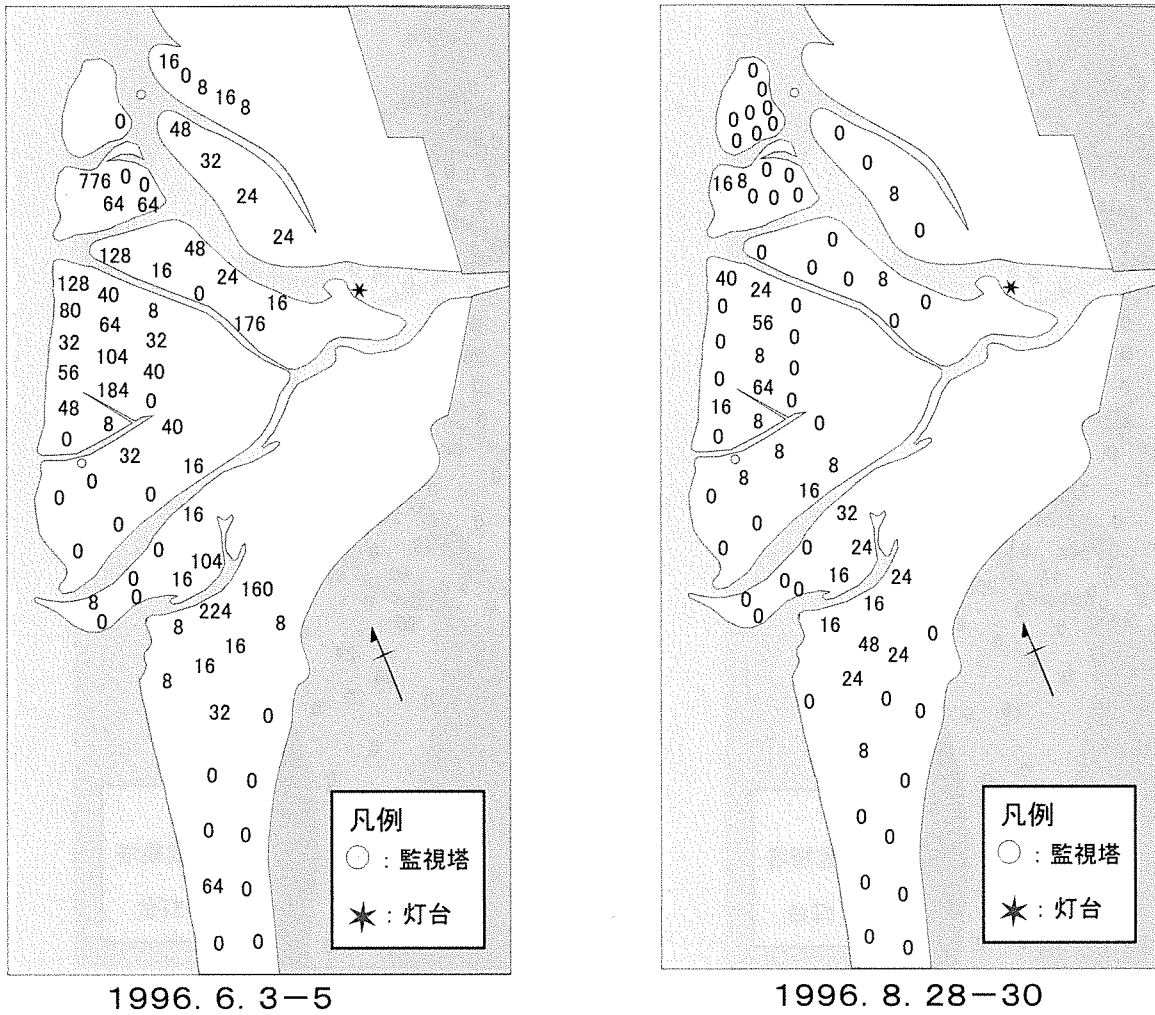


図13 1996年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

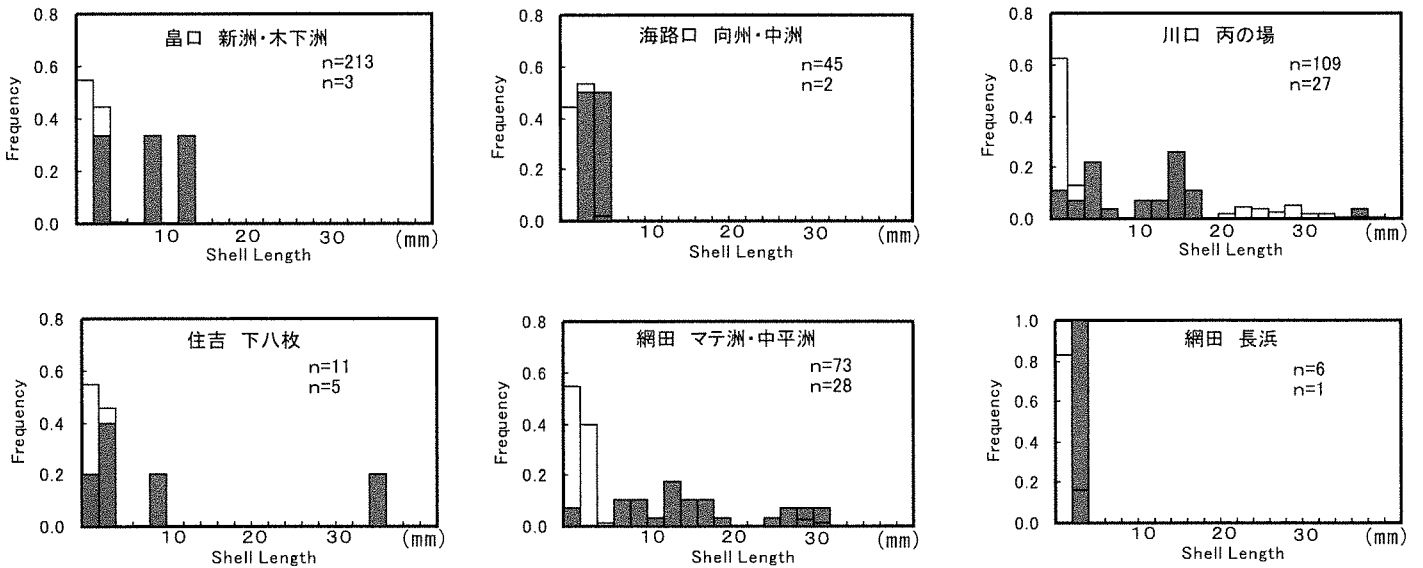
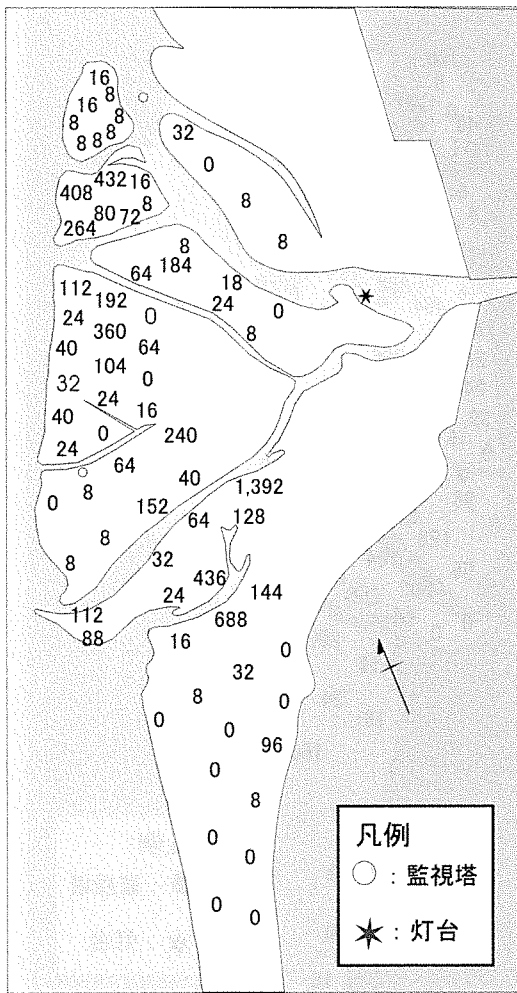
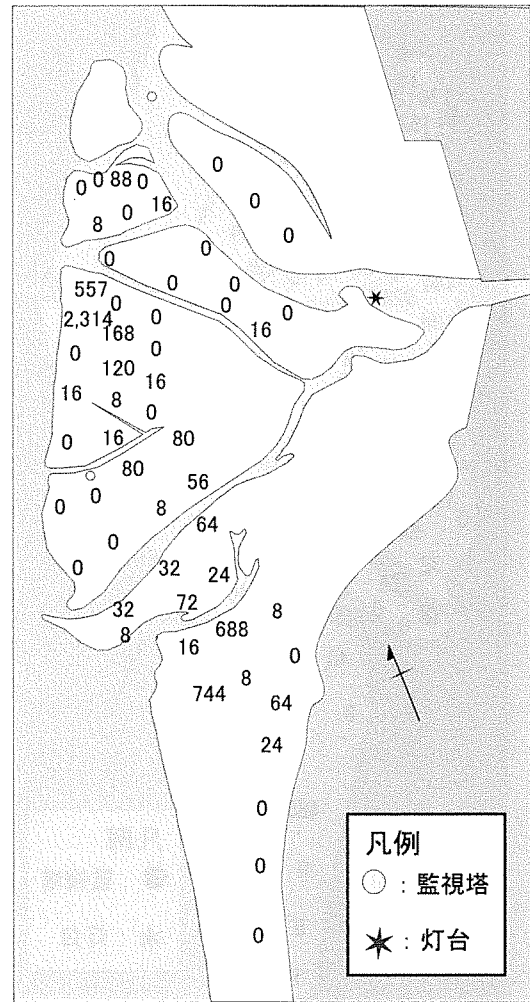


図14 1996年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1996.6 ■ 1996.8 上段n:6月調査、下段n:8月調査)



1997. 6. 3-5



1997. 9. 17-19, 10. 16

図15 1997年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

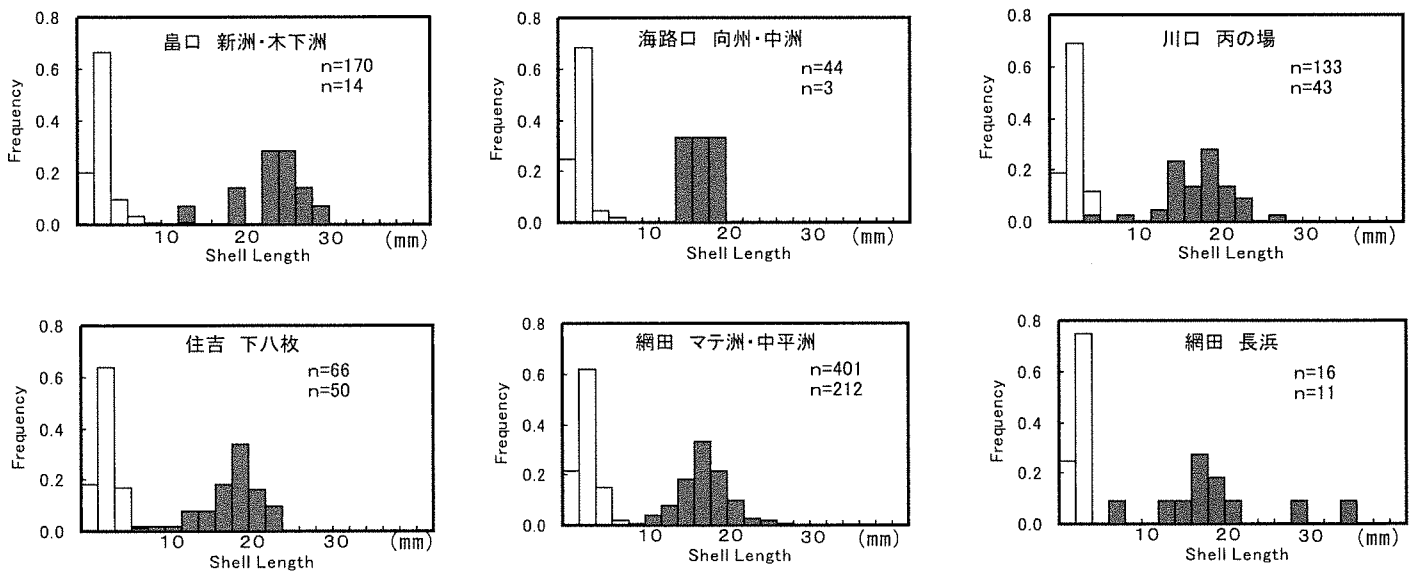


図16 1997年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(◻ 1997.6 ◼ 1997.9-10 上段n:6月調査、下段n:9月調査)

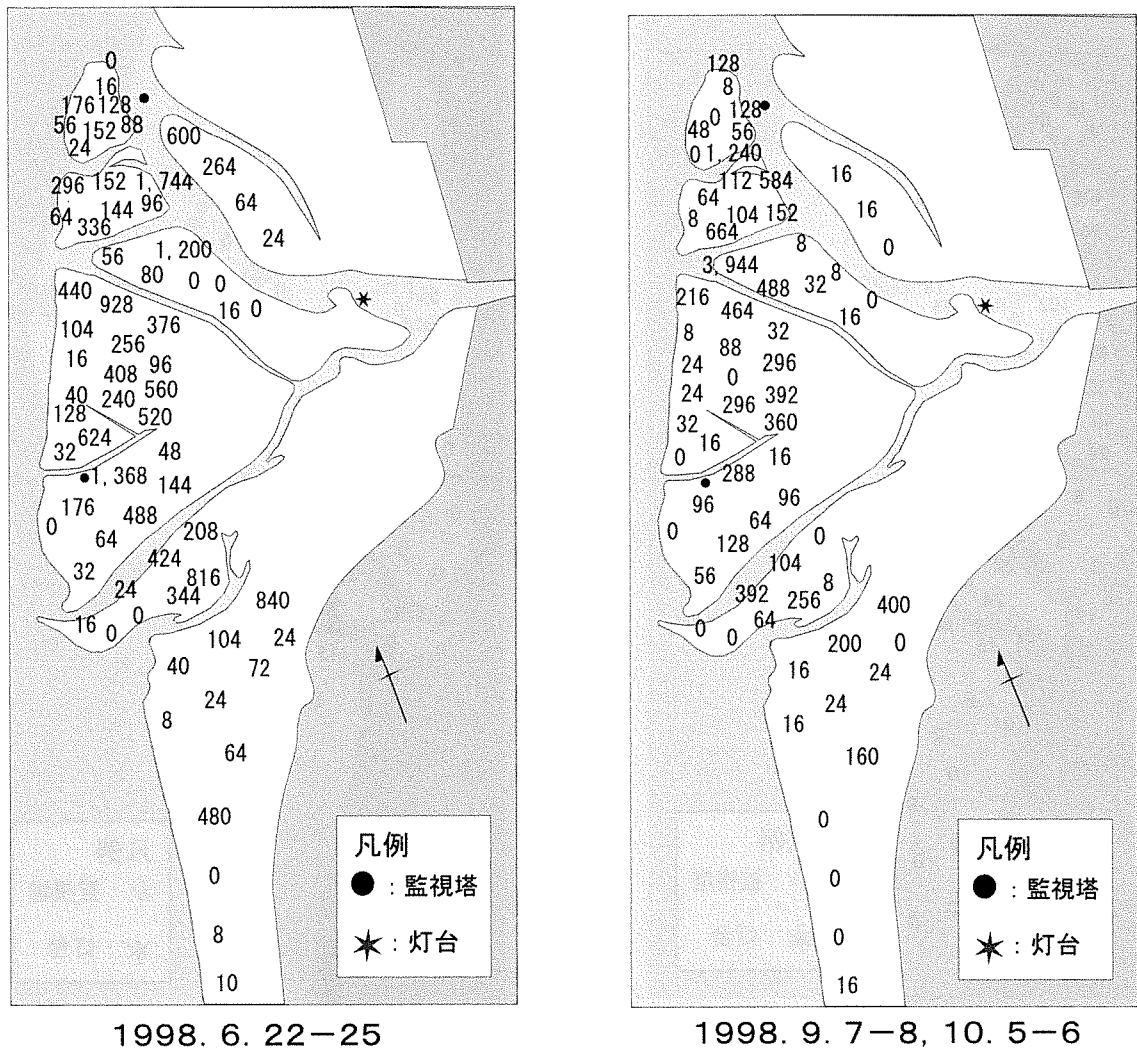


図17 1998年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

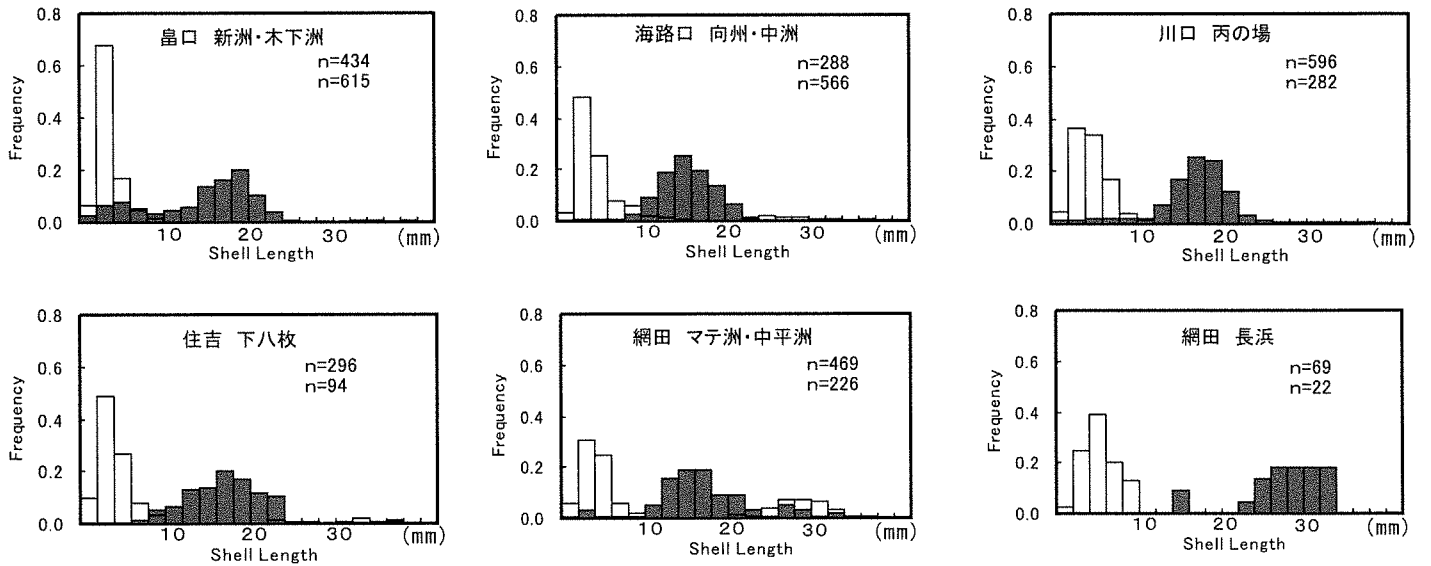
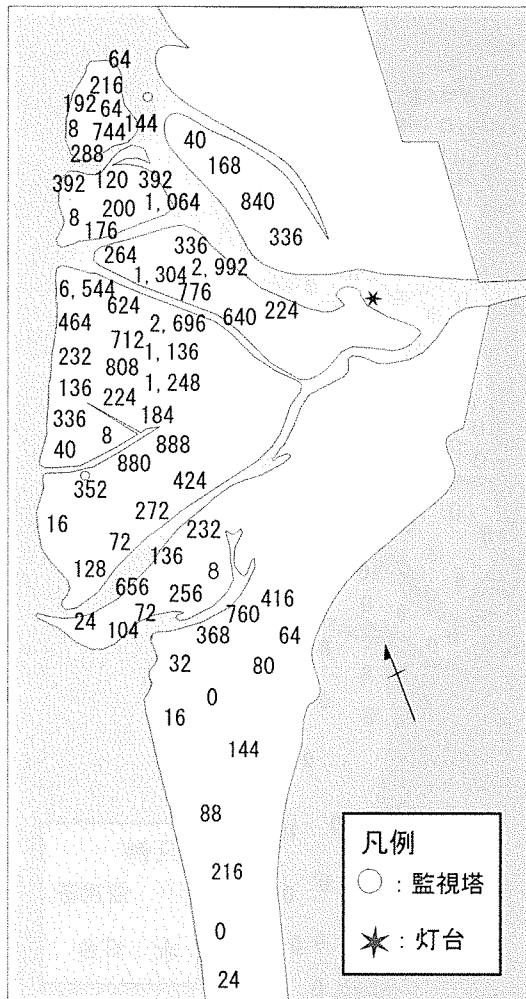
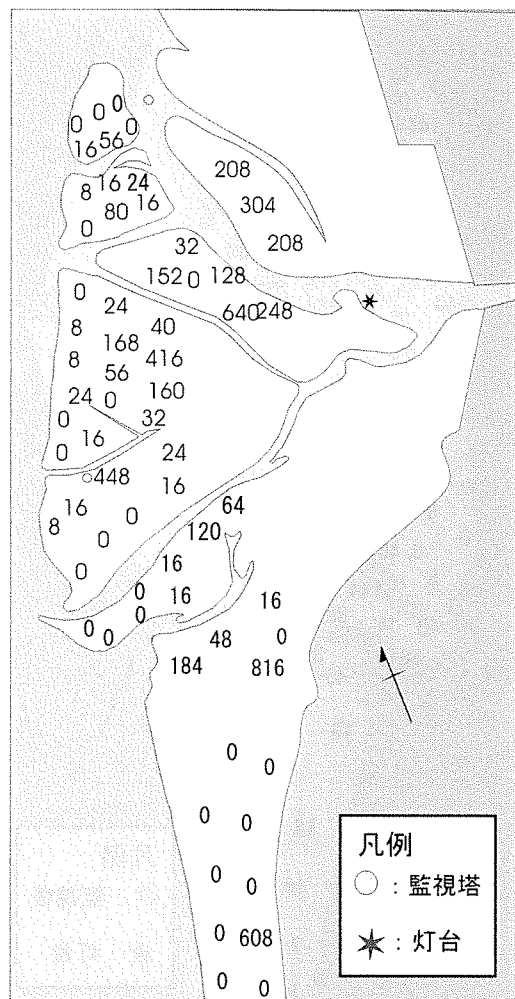


図18 1998年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 1998.6 ■ 1998.9 上段n:6月調査、下段n:8月調査)



1999. 6. 14-17



1999. 9. 27, 10. 8, 10. 25

図19 1999年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

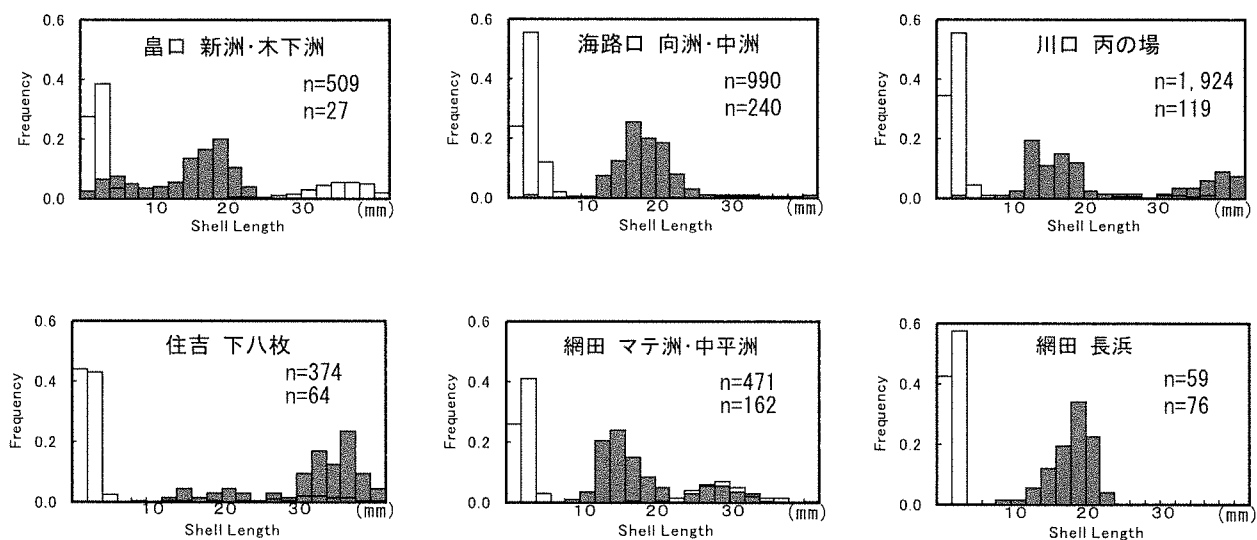


図20 1999年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(1999. 6 1999. 9, 10, 上段 n : 6月調査、下段 n : 9・10月調査)

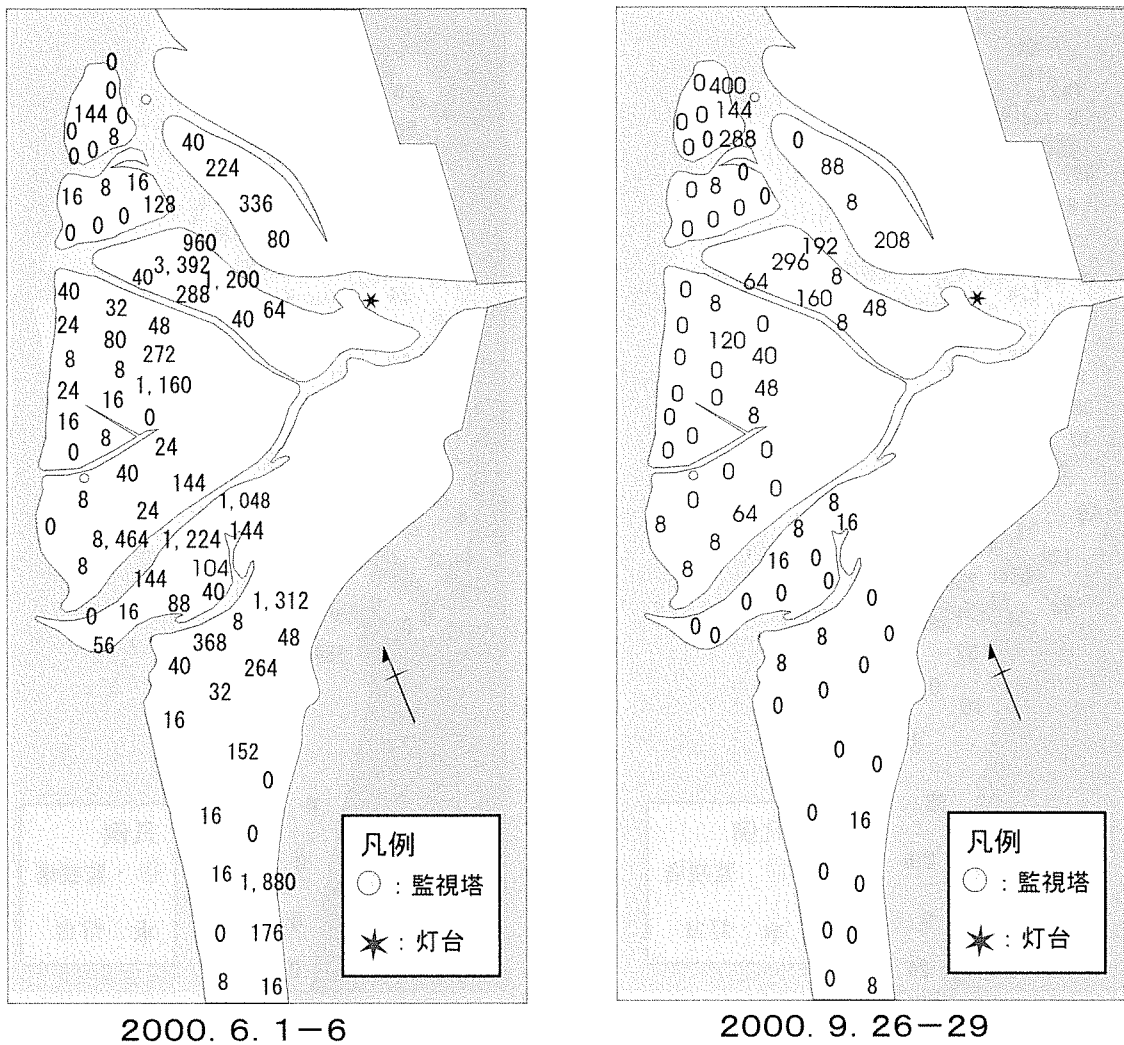


図21 2000年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

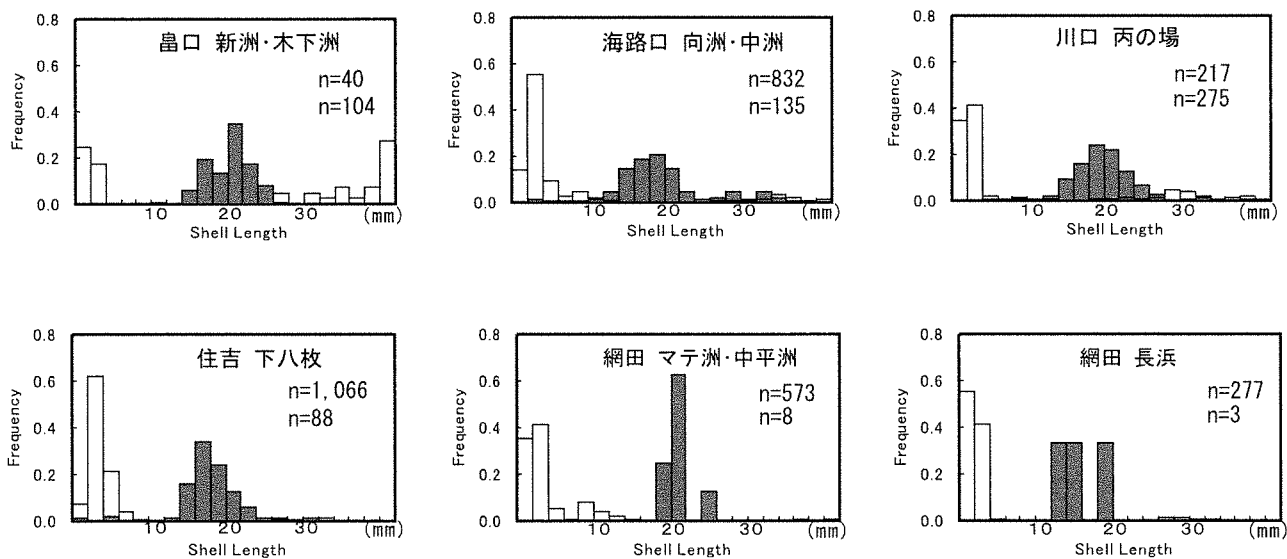
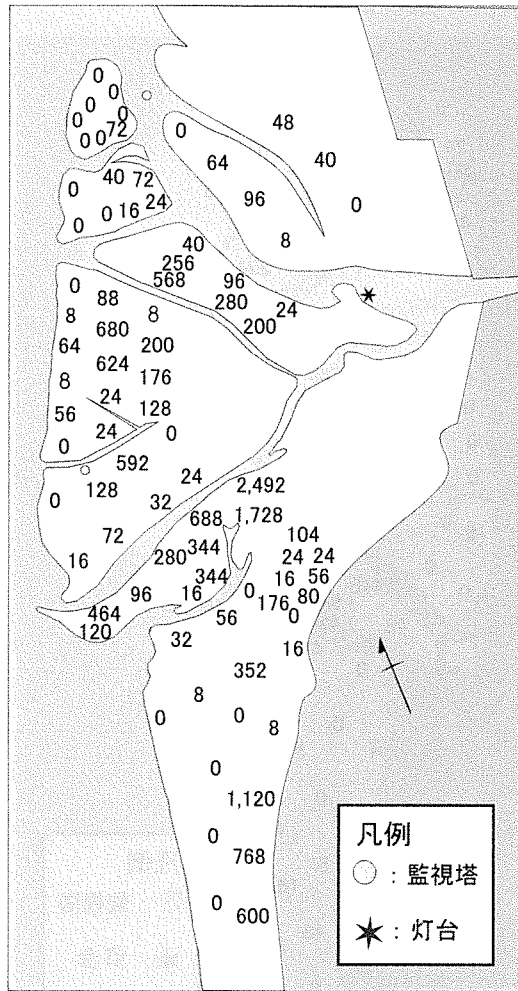
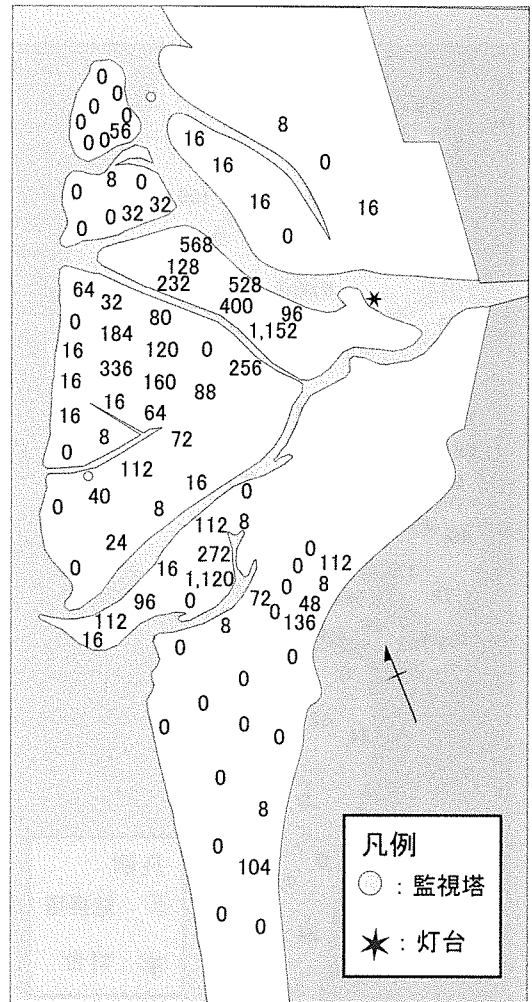


図22 2000年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(□ 2000. 6、■ 2000. 9 上段 n : 6月調査、下段 n : 9・10月調査)



2001. 6. 19-22, 6. 25, 7. 6



2001. 9. 4, 9. 17-19

図23 2001年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

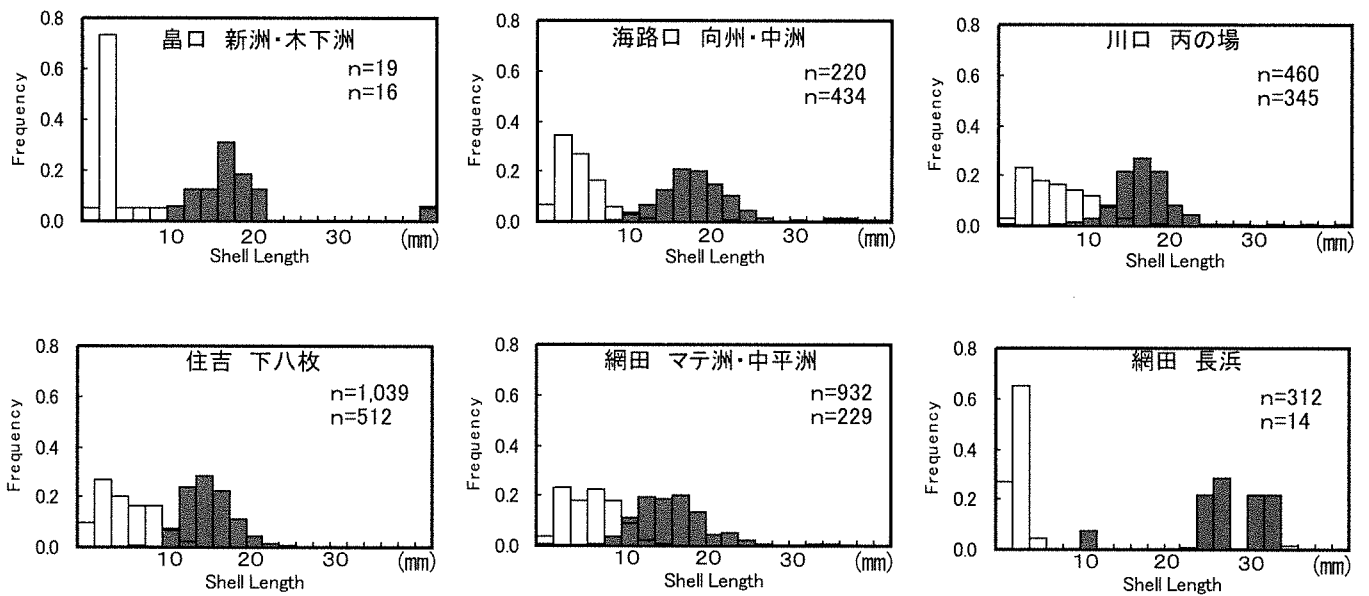
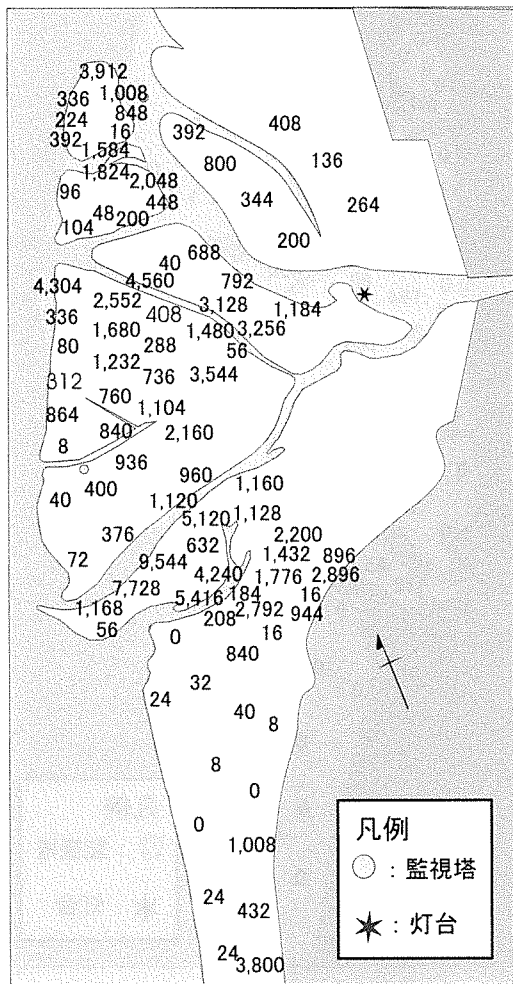
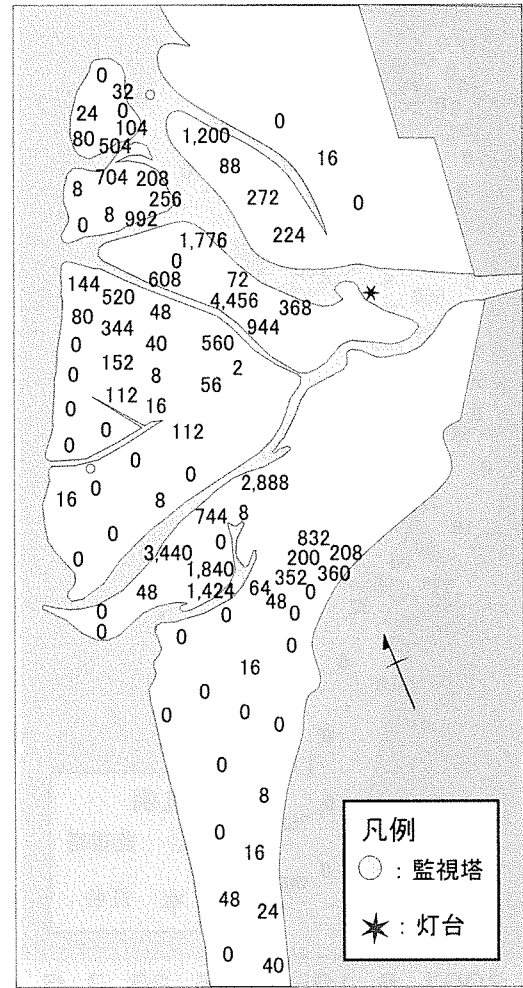


図24 2001年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(2001.6-7 2001.9 上段n:6-7月調査、下段n:9月調査)



2002. 6. 10-13



2002. 9. 5-6、9. 9-10

図25 2002年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

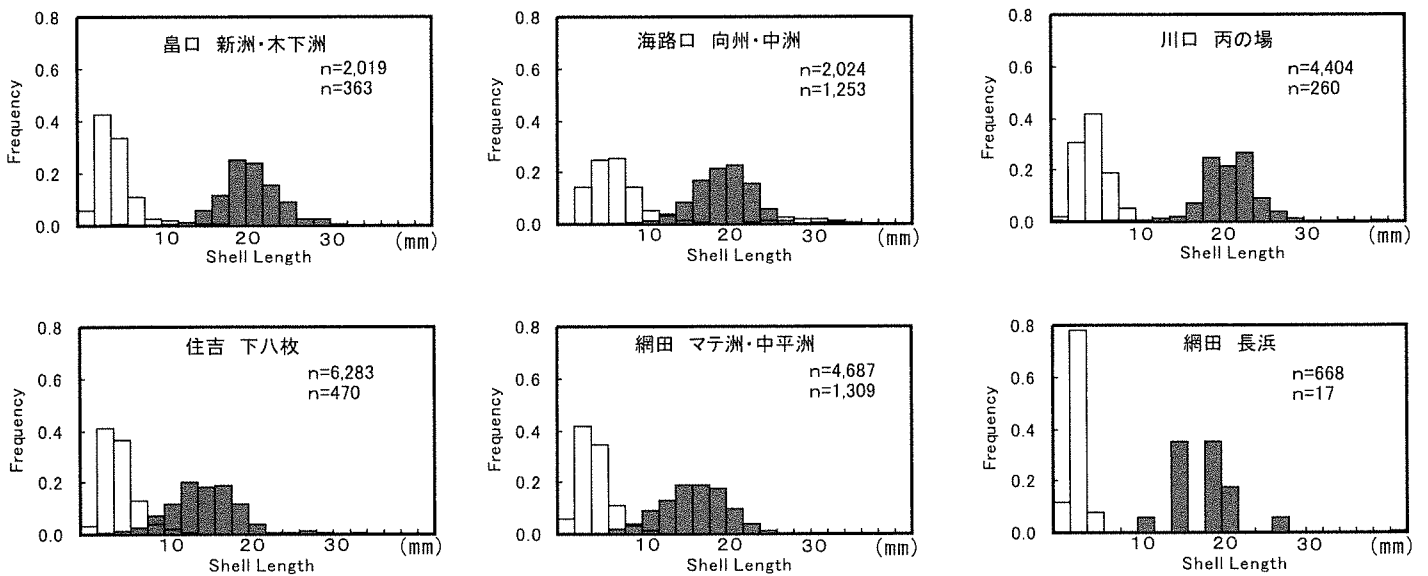


図26 2002年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(2002.6 2002.9 上段n:6月調査、下段n:9月調査)

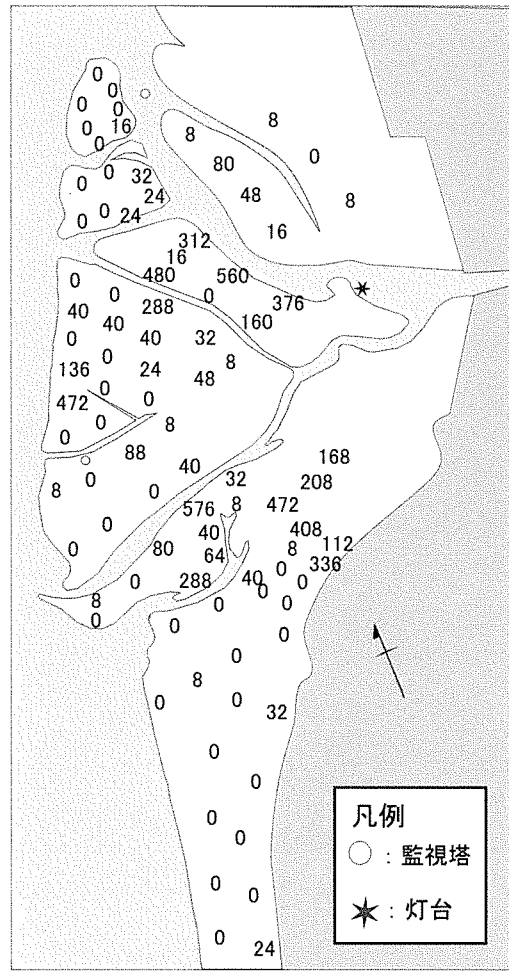
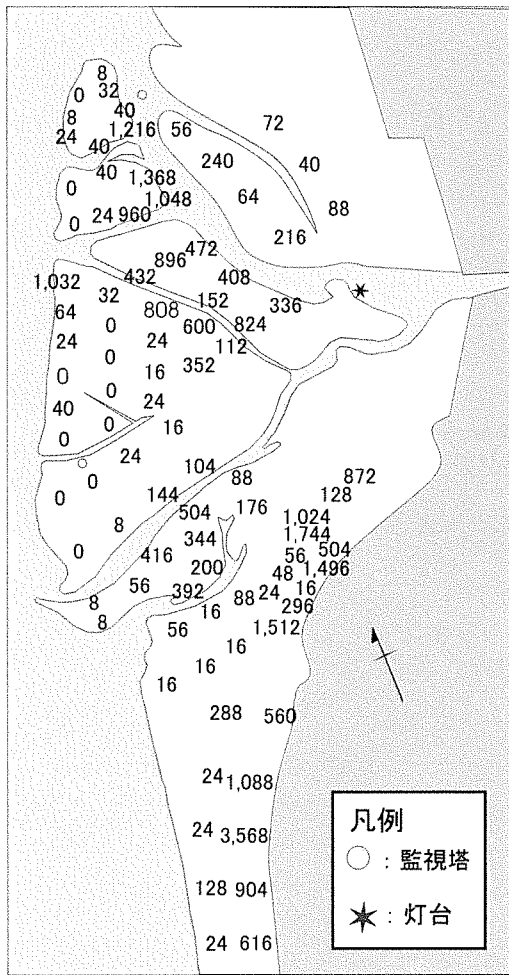


図27 2003年度緑川河口域アサリ分布状況(単位:個/m²)

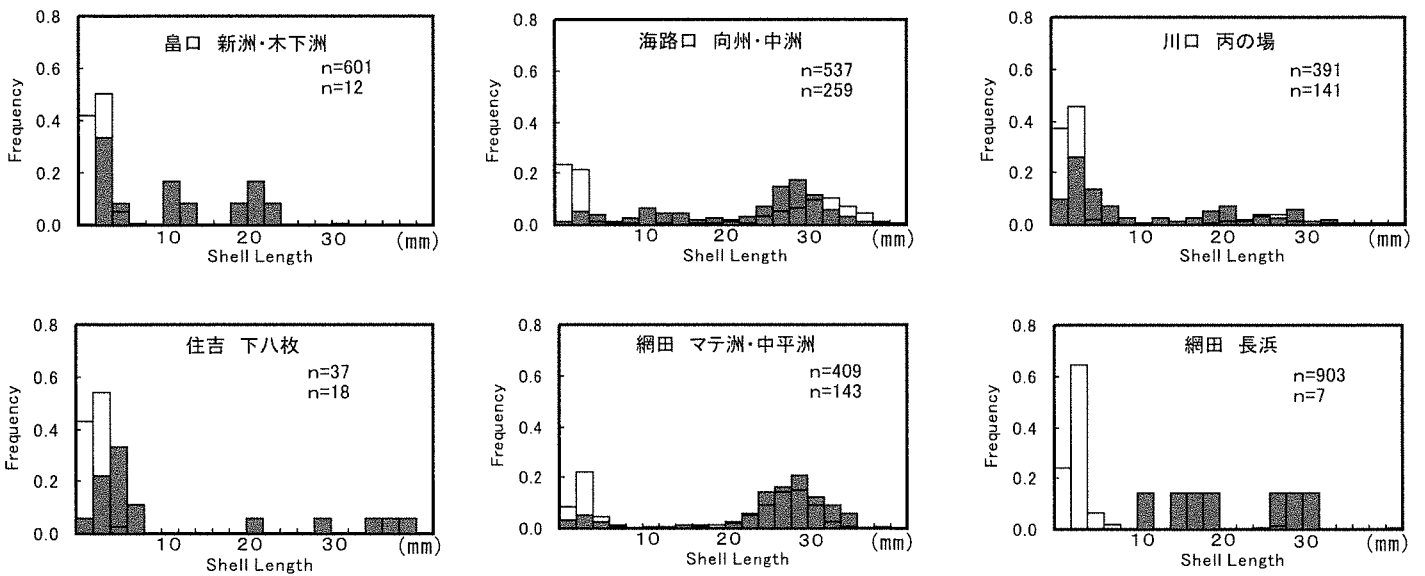


図28 2003年度分布状況調査での各干潟のアサリ殻長組成

(2003.6 2003.9 上段n:6月調査、下段n:9月調査)

熊本県天草沿岸に出現したメジロザメ属

川崎信司、野村昌功、前田健作

The appearance of sharks of the genus *Carcharhinus*(Elasmobranchii:

Carcharhiniformes : Carcharhinidae) on the coastal sea surrounding

Amakusa island Kumamoto prefecture, Japan.

Shinji Kawasaki, Yoshinori Nomura, Kensaku Maeda

キーワード：メジロザメ属、熊本県、歯

緒言

大型のサメ類であるメジロザメ属は、世界に約 30 種類ほどが知られており、日本沿岸にも 15 種類ほどが出現するとされている(中谷 1992)。

本県沿岸においては、苓北町や大矢野町における釣り漁業に被害を及ぼす外敵駆除を目的とした延縄が実施され、サメの捕獲の記録がある(昭和 26・34・35 年度熊本県水産試験場事業報告)ものの、サメの種類について、十分に精査されたデータは残されていない。これら、本県沿岸に出現する大型サメ類のうち、特に主要な組成をなすメジロザメ属については、典型的なサメ類の形態をしており、外部形態からの種類の同定は一般には困難であるといえ、今後少しずつでもデータを蓄積していく必要がある。

今回、本県沿岸に出現したメジロザメ属について、分類の重要な形質とされる歯の標本を得、5 種類について確認したので報告する。

材料及び方法

材料 今回調査対象としたのは、2000 年～2003 年に本県の漁業者から標本の提供を受けた 15 尾のメジロザメ属のサメである。その出現海域について、図 1 に示す。また、捕獲日・捕獲場所及び全長等について、表 1 に示す。

八代海本渡市地先(図 1. A) 八代海の中央部。島に囲まれ、穏やかであるが、長島海峡から流入する外海の影響を受ける。本地点沿岸部では、マダイ・ブリ等の魚類養殖が行われている。標本とした個体は沖合養殖施設の養殖生簀に侵入し、捕獲された。

牛深市大島地先(図 1. B) 牛深市大島の南西海域。

外海に面しており、一本釣り・刺し網漁業・潜水漁業等の優良漁場である。標本個体は、漁業被害の防止のため牛深市漁協等が実施したサメ類を対象とした「延縄」にて捕獲された。

有明海湯島地先(図 1. C) 有明海中央部の湯島の西部海域。早崎瀬戸から流入する外海の影響を受け、マダイの一本釣り漁業等が行われている。標本個体は、漁業被害の防止のため、大矢野町漁協等が実施したサメ類を対象とした「延縄」にて捕獲された。

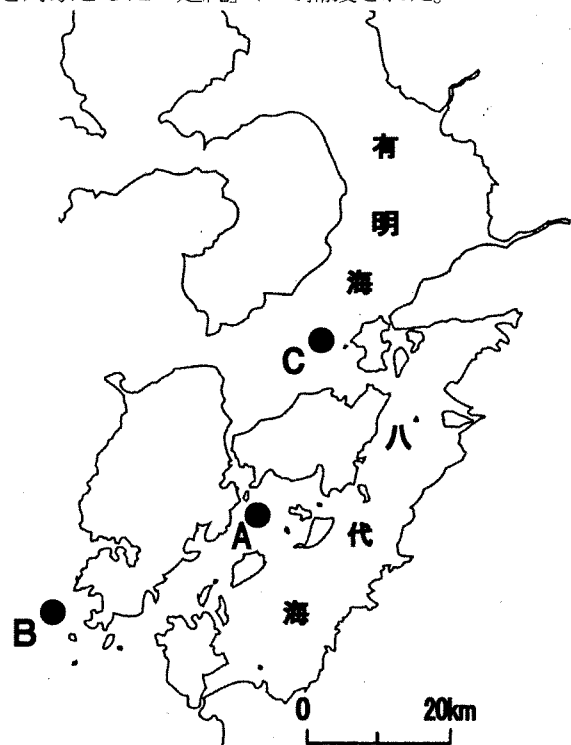


図 1 出現海域図

表1 提供された標本の捕獲日及び捕獲場所等

| 捕獲日 | 場所 | 種類 | 和名 | 全長(cm) | 雌雄 | 標本番号 |
|------------|----|----------------------------------|-----------|--------|----|------------|
| 2000.06.23 | C | <i>Carcharhinus limbatus</i> | カマストガリザメ | 263 | ♀ | |
| 2000.06.24 | C | <i>Carcharhinus brachyurus</i> | クロヘリメジロザメ | 190 | ♂ | |
| 2001.09.10 | A | <i>Carcharhinus galapagensis</i> | ガラパゴスザメ | 187 | ♀ | KMSJ-01-01 |
| 2001.09.10 | A | <i>Carcharhinus galapagensis</i> | ガラパゴスザメ | 159 | ♀ | |
| 2002.07.18 | B | <i>Carcharhinus limbatus</i> | カマストガリザメ | 253 | ♀ | KMSJ-02-01 |
| 2002.07.18 | B | <i>Carcharhinus limbatus</i> | カマストガリザメ | 190 | ♂ | |
| 2002.07.18 | B | <i>Carcharhinus altimus</i> | ハビレ | 190 | ♀ | KMSJ-02-02 |
| 2003.06.24 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 92 | ♀ | KMSJ-03-01 |
| 2003.06.24 | C | <i>Carcharhinus brachyurus</i> | クロヘリメジロザメ | 297 | ♂ | KMSJ-03-02 |
| 2003.06.25 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 92 | ♀ | |
| 2003.06.25 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 100 | ♀ | |
| 2003.06.25 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 110 | ♀ | |
| 2003.06.25 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 104 | ♀ | |
| 2003.06.25 | C | <i>Carcharhinus dussumieri</i> | スミツキザメ | 119 | ♀ | |
| 2003.07.09 | B | <i>Carcharhinus brachyurus</i> | クロヘリメジロザメ | 274 | ♂ | |

標本の処理 サンプルは頭部又は顎の部分を保丁等で切り落とした状態で提供をうけた。そのうち比較的損傷の少ないサンプルについて、歯及び顎骨を残し肉をメス等で削ぎ落とし、暗所でゆっくりと乾燥させた標本を作成した(図2)。

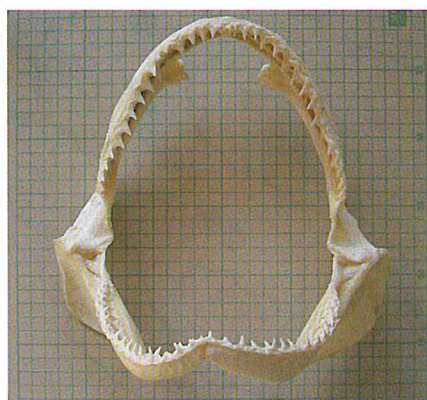


図2 顎骨標本(KMSJ-03-2)

種類の検索 前述の標本を詳細に検討し、また外部形態の写真や聞き取り等から、種類の検索を行った。歯の形態と用語については、久家・後藤(1980)に、分類については、Garrick(1982)によった。

結果と考察

同定された種類 15尾のサンプルから、ガラパゴスザメ・カマストガリザメ・ハビレ・スミツキザメ・クロヘリメジロザメの5種類が分類された。

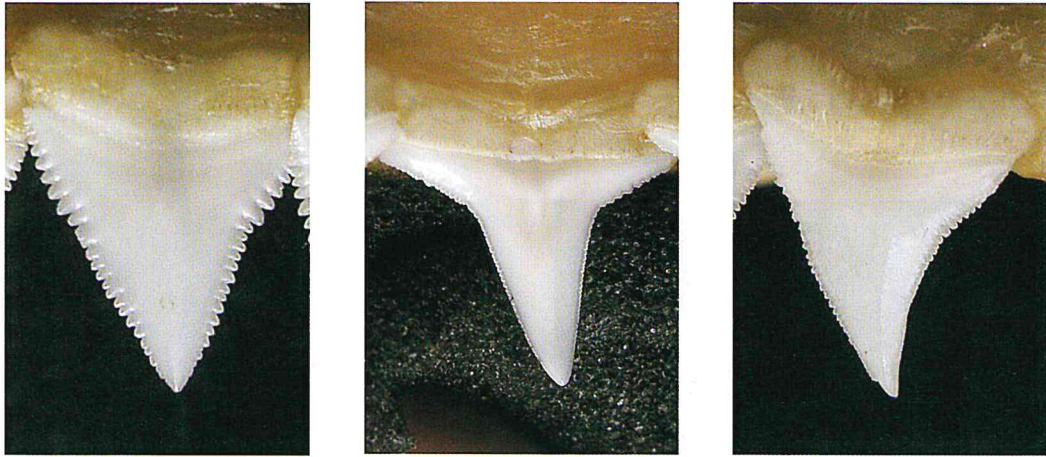
いずれの種類も、上顎の側歯が特徴的であった(図4)。

ガラパゴスザメ *Carcharhinus galapagensis* A地点で捕獲されたサメは、2尾ともガラパゴスザメであった。外部形態は典型的なメジロザメ属である(図3)。

上顎の中位の側歯は、2等辺三角形をしており、歯冠基部から咬頭の切縁部にかけて明瞭な鋸歯がある(図4. 9. 10)。



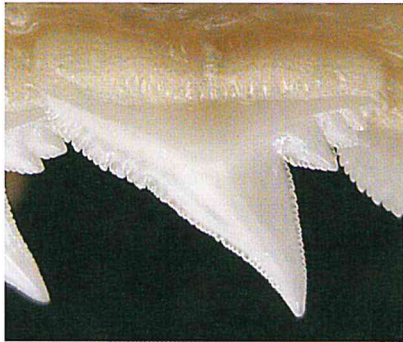
図3 ガラパゴスザメ(01.09.10 A地点)



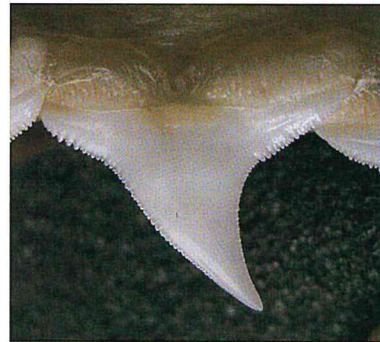
ガラパゴスザメ KMSJ-01-01
(L-3 H10.42mm w13.16mm)

カマストガリザメ KMSJ-02-01
(L-5 H13.65mm W15.10mm)

ハビレ KMSJ-02-02
(L-4 H10.12mm W10.05mm)



スミツキザメ KMSJ-03-02 L-4
(L-6 H5.74mm W8.77mm)



クロヘリメジロザメ KMSJ-03-02
(L-9 H9.52mm W15.18)

図4 顎骨標本の上左側歯

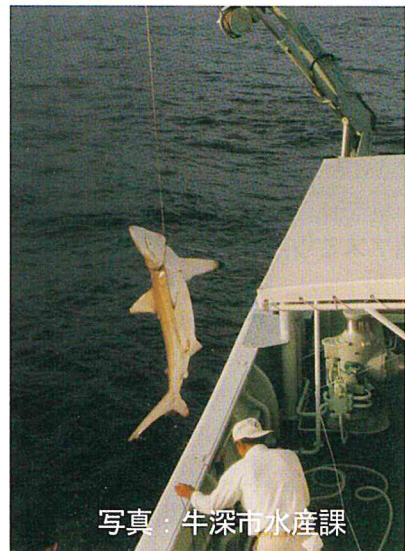
カマストガリザメ *Carcharhinus limbatus* C点
で1尾、B点で2尾のカマストガリザメが捕獲された。

形態は典型的なメジロザメ属である。背鰭、胸鰭、
尾鰭下葉のそれぞれの先端部が黒い特徴がある。この
ため、天草地方の漁業者からは「ツマグロ」と呼ばれ
ている(図5)。

上顎歯の歯冠は、一見細いが、歯根側1/4程で急
に幅広くなり、基底部の幅は高さより大きい。鋸歯はこ
の幅が広がっている部分に肉眼ではわずかに観察され
る程度である(図4、11、12)。

ハビレ *Carcharhinus altimus* 今回の調査対象15
尾のうち1尾のみ確認された。

外部形態は典型的なメジロザメ属である。第一背鰭
の基底部分が胸鰭後端より前で始まる。各鰭に色彩的な
特徴は見られない(図6)。



写真：牛深市水産課

図5 カマストガリザメ(02.07.18 B地点)

上顎側歯の近心付近は2等辺三角形で、ガラパゴスザメに近似しているが、より細く高い。歯冠部の、咬頭から基部にかけてほぼ全域に鋸歯が存在するが、中位で大きく、咬頭部及び基部では僅かに確認される程度である(図4.13.14)。



図6 ハビレ(02.07.18 B地点)

スミツキザメ *Carcharhinus dussumieri* C地点で、'03年にまとめて6尾が採捕された。本種も体型的には他のメジロザメ属と同様であるが、平均全長102.5cmと、本属としては比較的小型である。また、第二背鰭先端に、明瞭な黒斑がある(図7)。

上顎歯は、大きな主咬頭に加え、切縁遠心側の基部に2~3の遠心副咬頭が存在する。主咬頭の近心側切縁及びそれぞれの遠心副咬頭には鋸歯が確認される(図4.15.16)。



図7スミツキザメ(03.06.25 C地点)

クロヘリメジロザメ *Carcharhinus brachyurus* B地点で1尾、C地点で2尾が採捕された。典型的なメジロザメ属の形態で、色彩的な特徴も少ない(図8)。

上顎側歯の歯冠は幅が狭いが、カマストガリザメと同様に、歯根付近で急に幅広くなる。カマストガリザメの上顎の遠心に近い側歯では、歯冠が全体に遠心側に傾くが、クロヘリメジロザメでは、歯冠中ほどから切縁が弧を描いて傾く(図4.17.18)。



図8 クロヘリメジロザメ(00.06.24 C地点)

要約

熊本県沿岸に出現した、15尾のメジロザメ属の顎骨の標本・写真等を得て、種の検索を行った。

その結果、

ガラパゴスザメ *Carcharhinus galapagensis*

カマストガリザメ *Carcharhinus limbatus*

ハビレ *Carcharhinus altimus*

スミツキザメ *Carcharhinus dussumieri*

クロヘリメジロザメ *Carcharhinus brachyurus*
の5種を確認した。

謝辞

本研究を行うにあたり、標本を提供いただいた牛深市漁協、大矢野町漁協、パイロットファーム及び写真を提供いただいた牛深市水産課に感謝いたします。

また、本稿を取りまとめるにあたり、熊本博物館の北村直司学芸員、清水稔学芸員、神奈川県小田原市の田中猛氏に、多くのご指導・ご助言をいただいた。厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) Compagno, L. J. V.: FAO species catalogue, sharks of the world. FAO Fisheries Synopsis No125, Vol. 4, Part2: 449-503 (1984)
- 2) J. A. F. Garrick: NOAA Technical Report NMFS Circular 445: Sharks of the Genus *Carcharhinus* (1982)
- 3) 久家直之・後藤仁敏: 「板鰐類の歯の形態と用語」海洋と生物 VOL. 2-No5: 383-387、(1980)

- 4) 矢住邦平・市来忠彦・浦田勝喜・須川与次郎：「フカ延縄漁業試験」熊本県水産試験場事業報告(昭和26年)
- 5) 山本和平・市来忠彦・光永敦司：「フカ駆除試験」熊本県水産試験場事業報告(昭和34・35)
- 6) ビクター・スプリンガー、ジョイ・ゴールド：中谷一宏訳：「世界のサメ全種分類表」サメ・ウォッチング：平凡社：245-262、(1992)

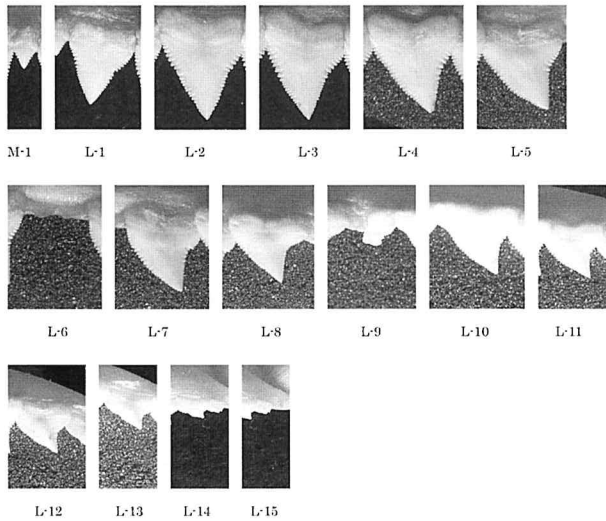


図9 ガラバゴスザメ *C. galapagensis* (KMSJ-01-01) 左上顎の各歯

表2 ガラバゴスザメ *C. galapagensis*(KMSJ-01-01)左上顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|------|-------|-------|------|-------|-------|
| 歯冠高 | 2.62 | 7.45 | 9.08 | 9.36 | 9.09 | 8.77 |
| 歯冠幅 | 2.98 | 7.54 | 8.71 | 9.71 | 10.32 | 10.59 |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | L-11 |
| " | - | 8.58 | 8.17 | - | 7.67 | 7.09 |
| " | - | 11.03 | 11.80 | - | 9.05 | 9.05 |
| " | L-12 | L-13 | L-14 | L-15 | | |
| " | 5.57 | 4.27 | 3.05 | 1.43 | | |
| " | 8.67 | 7.85 | 6.54 | 3.21 | | |

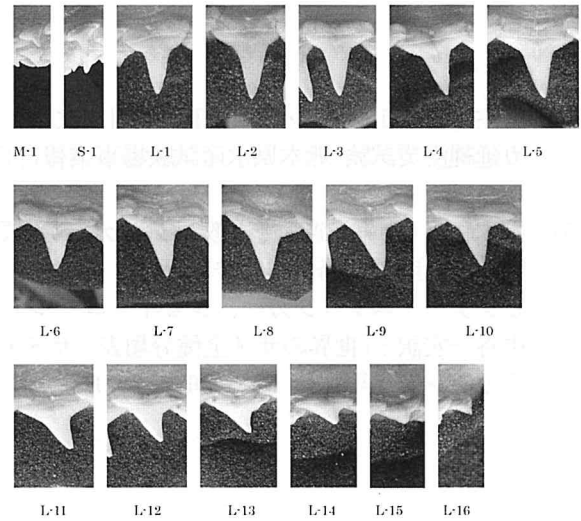


図11 カマストガリザメ *C. limbatus* (KMSJ-02-01) 左上顎の各歯

表4 カマストガリザメ *C. limbatus* (KMSJ-02-01)左上顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 歯冠高 | 3.44 | 5.17 | 10.95 | 12.30 | 13.07 | 13.74 | 13.65 |
| 歯冠幅 | 4.45 | 6.14 | 10.31 | 12.06 | 14.89 | 18.25 | 15.10 |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | | |
| " | 12.79 | 12.42 | 11.96 | 11.25 | 10.56 | | |
| " | 18.67 | 18.04 | 16.72 | 16.52 | 16.43 | | |
| " | L-11 | L-12 | L-13 | L-14 | L-15 | L-16 | |
| " | (8.94) | (7.87) | 7.22 | (4.08) | (2.77) | 2.74 | |
| " | 15.20 | 13.88 | 12.09 | 11.70 | 8.69 | 5.14 | |

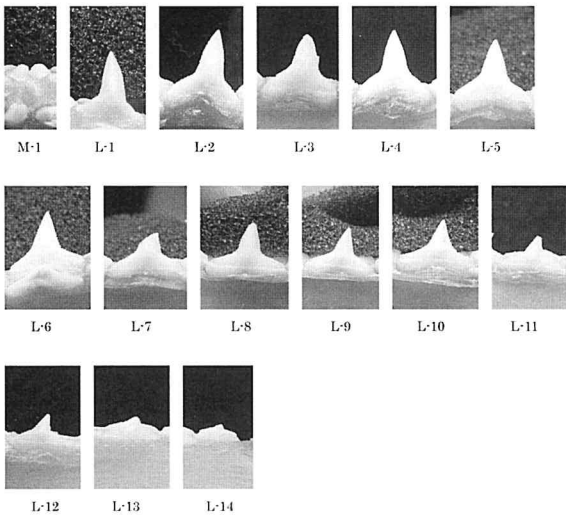


図10 ガラバゴスザメ *C. galapagensis*(KMSJ-01-01)左下顎の各歯

表3 ガラバゴスザメ *C. galapagensis*(KMSJ-01-01)左下顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|------|--------|--------|--------|------|------|
| 歯冠高 | 1.56 | 6.28 | 7.86 | (6.75) | 7.53 | 7.38 |
| 歯冠幅 | 1.59 | 5.49 | 7.73 | 8.15 | 8.86 | 8.61 |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | L-11 |
| " | 7.12 | (4.51) | (5.54) | 5.63 | 5.41 | 3.63 |
| " | 8.76 | 9.03 | 9.21 | 8.92 | 8.60 | 7.94 |
| " | L-12 | L-13 | L-14 | | | |
| " | 3.53 | (2.35) | 1.64 | | | |
| " | 6.67 | 6.79 | 4.25 | | | |

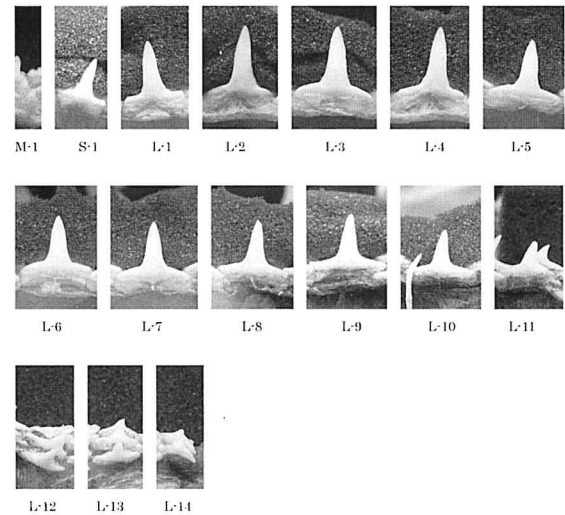


図12 カマストガリザメ *C. limbatus* (KMSJ-02-01) 左下顎の各歯

表5 カマストガリザメ *C. limbatus* (KMSJ-02-01)左下顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|-------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|
| 歯冠高 | 3.12 | 7.72 | 12.29 | 13.41 | 13.24 | 13.03 | 12.27 |
| 歯冠幅 | 3.04 | 8.05 | 11.98 | 13.15 | 14.57 | 15.01 | 15.63 |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | L-11 | |
| " | 12.25 | 12.11 | (11.26) | 10.46 | 9.79 | 7.48 | |
| " | 14.33 | 15.55 | 15.41 | 14.54 | 14.75 | 11.48 | |
| " | L-12 | L-13 | L-14 | | | | |
| " | 6.82 | (4.44) | 4.36 | | | | |
| " | 9.58 | 9.20 | 7.06 | | | | |

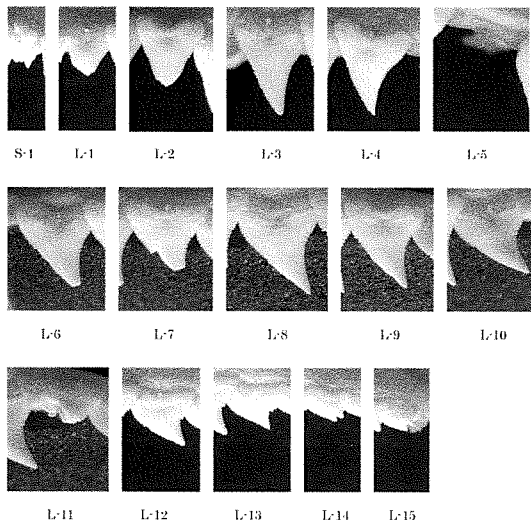


図13 ハビレ *C. altimus* (KMSJ-02-02) 左上顎の各歯

表6 ハビレ *C. altimus* (KMSJ-02-02) 左上顎の歯冠幅及び高さ(単位: mm)

| 歯番号 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|--------|--------|--------|-------|-------|-----|
| 歯冠高 | 3.35 | (4.70) | (6.99) | 10.17 | 10.12 | - |
| 歯冠幅 | 3.50 | 7.26 | 9.03 | 9.05 | 10.05 | - |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | |
| " | (8.77) | (6.36) | 8.98 | 8.72 | 7.74 | |
| " | 10.53 | 11.20 | 10.49 | 9.37 | 9.03 | |
| " | L-11 | L-12 | L-13 | L-14 | L-15 | |
| " | - | 5.64 | 4.03 | 2.59 | 1.75 | |
| " | 8.74 | 7.61 | 6.29 | 5.74 | 4.10 | |

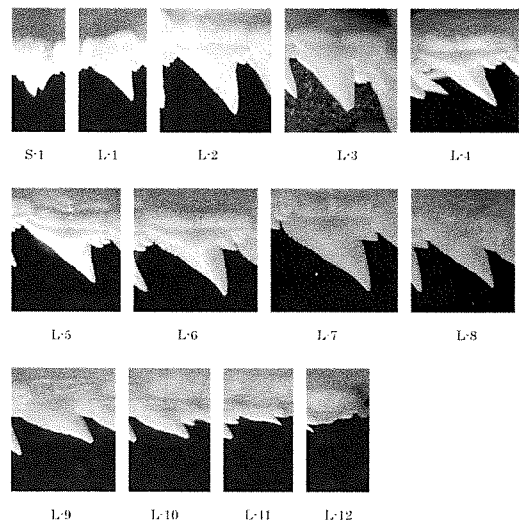


図15 スミツキザメ *C. dussumieri* (KMSJ-03-01) 左上顎の各歯

表8 スミツキザメ *C. dussumieri* (KMSJ-03-01) 左上顎の歯冠幅及び高さ(単位: mm)

| 歯番号 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 |
|-----|--------|------|------|--------|------|
| 歯冠高 | 2.48 | 3.87 | 4.33 | (5.61) | 5.23 |
| 歯冠幅 | 2.44 | 4.25 | 5.58 | 7.09 | 8.37 |
| " | L-5 | L-6 | L-7 | L-8 | |
| " | 5.41 | 5.74 | 5.25 | 4.47 | |
| " | 9.26 | 8.77 | 8.10 | 7.20 | |
| " | L-9 | L-10 | L-11 | L-12 | |
| " | (3.66) | 2.79 | 1.90 | - | |
| " | 7.12 | 6.27 | 5.28 | 5.07 | |

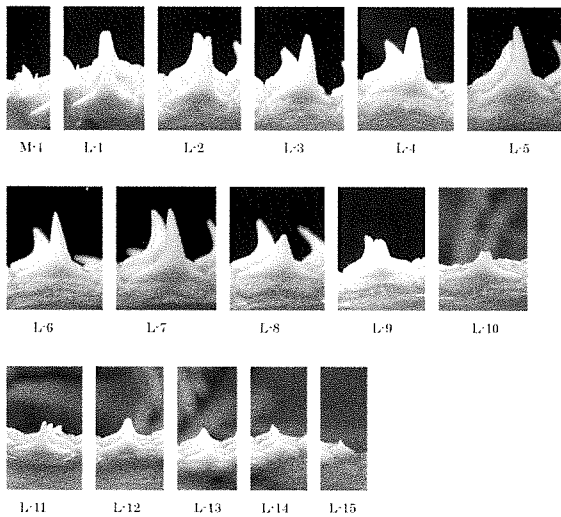


図14 ハビレ *C. altimus* (KMSJ-02-02) 左下顎の各歯

表7 ハビレ *C. altimus* (KMSJ-02-02) 左下顎の歯冠幅及び高さ(単位: mm)

| 歯番号 | M-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | L-5 |
|-----|------|--------|--------|--------|--------|------|
| 歯冠高 | 2.85 | (5.78) | (7.05) | 7.12 | 6.51 | 6.63 |
| 歯冠幅 | 2.21 | 6.30 | 7.00 | 7.71 | 8.28 | 8.02 |
| " | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 | |
| " | 6.56 | 6.15 | (4.01) | (4.53) | (3.39) | |
| " | 8.32 | 8.06 | 8.54 | 8.11 | 8.08 | |
| " | L-11 | L-12 | L-13 | L-14 | L-15 | |
| " | 4.15 | (2.51) | (2.30) | 2.36 | 1.55 | |
| " | 7.15 | 6.48 | 5.81 | 4.69 | 3.55 | |

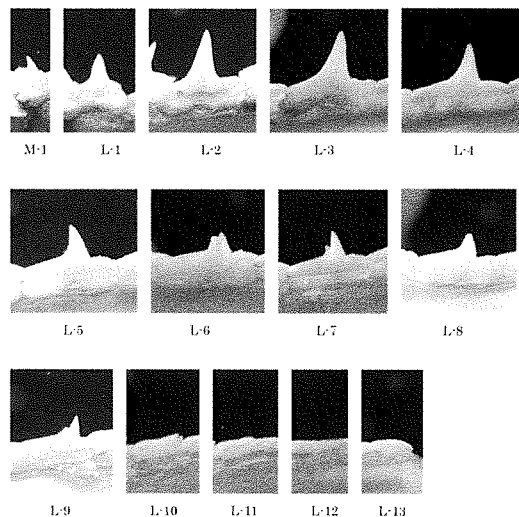


図16 スミツキザメ *C. dussumieri* (KMSJ-03-01) 左下顎の各歯

表9 スミツキザメ *C. dussumieri* (KMSJ-03-01) 左下顎の歯冠幅及び高さ(単位: mm)

| 歯番号 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 |
|-----|------|--------|------|--------|------|
| 歯冠高 | 2.39 | 3.98 | 4.66 | 4.24 | 3.65 |
| 歯冠幅 | 2.51 | 4.68 | 5.67 | 6.04 | 7.24 |
| " | L-5 | L-6 | L-7 | L-8 | |
| " | 3.62 | (2.65) | 3.17 | (2.39) | |
| " | 7.28 | 7.23 | 3.69 | 6.26 | |
| " | L-9 | L-10 | L-11 | L-12 | L-13 |
| " | 2.28 | 1.13 | 0.78 | 0.77 | 0.60 |
| " | 5.11 | 4.37 | 3.77 | 3.65 | 3.35 |

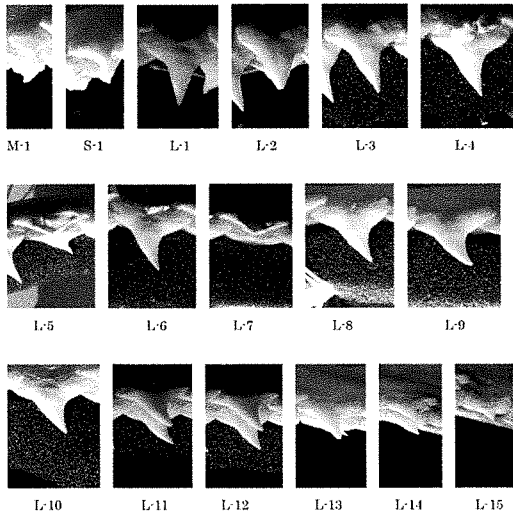


図 17 クロヘリメジロザメ *C. brachyurus* (KMSJ-03-02) 左上顎の各歯

表 10 クロヘリメジロザメ *C. brachyurus* (KMSJ-03-02) 左上顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 |
|-----|--------|------|-------|--------|-------|-------|
| 歯冠高 | (2.42) | 6.47 | 8.85 | (8.25) | 10.42 | 10.47 |
| 歯冠幅 | 5.46 | 8.14 | 10.28 | 11.02 | 13.16 | 14.61 |

| " | L-5 | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| " | - | 10.82 | - | 9.96 | 9.52 | 8.73 |
| " | 15.10 | 15.58 | 16.30 | 15.18 | 15.18 | 14.51 |

| " | L-11 | L-12 | L-13 | L-14 | L-15 |
|---|--------|-------|--------|------|------|
| " | (8.61) | 7.32 | (5.52) | - | 3.54 |
| " | 13.40 | 12.57 | 10.57 | 9.80 | 8.54 |

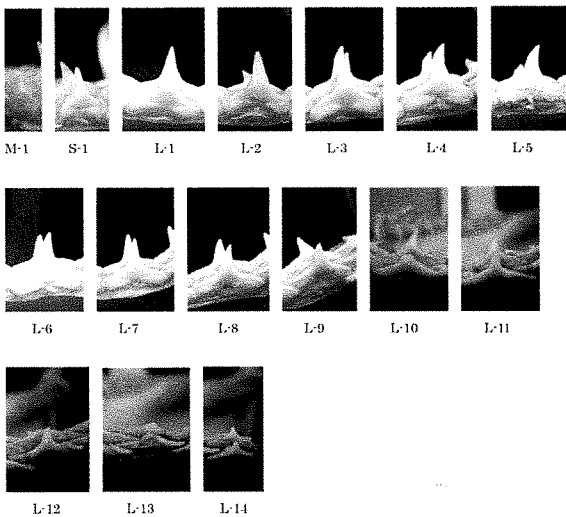


図 18 クロヘリメジロザメ *C. brachyurus* (KMSJ-03-02) 左下顎の各歯

表 11 クロヘリメジロザメ *C. brachyurus* (KMSJ-03-02) 左下顎の歯冠幅及び高さ(単位 mm)

| 歯番号 | M-1 | S-1 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 |
|-----|------|------|--------|--------|-------|-------|
| 歯冠高 | 3.44 | 6.22 | (6.78) | (8.85) | 9.22 | 8.83 |
| 歯冠幅 | 2.79 | 8.01 | 10.97 | 11.44 | 11.79 | 12.37 |

| " | L-5 | L-6 | L-7 | L-8 | L-9 | L-10 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| " | 7.91 | 8.89 | 8.32 | 7.93 | 6.27 | - |
| " | 12.64 | 12.69 | 13.19 | 14.47 | 13.67 | 14.52 |

| " | L-11 | L-12 | L-13 | L-14 |
|---|---------|---------|---------|------|
| " | - | - | - | - |
| " | (11.96) | (12.44) | (11.98) | 7.84 |

水温と光周期調整によるブリ (*Seriola quinqueradiata*)

の早期自然採卵試験

木村武志・菊川里香・山下幸久・倉田清典・藤田忠勝

浜田峰雄

Experiment of Spawning in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) by

Manipulation of Water Temperature and Photoperiod.

Takeshi Kimura, Rika Kikukawa, Yukihisa Yamasita, Kiyonori Kurata,

Tadakatu Fujita, Mineo Hamada

キーワード：ブリ、産卵制御

緒言

養殖ブリは平成13年に全国で153,075トン(平成13年漁業養殖業生産統計年報ブリ類)が生産され、日本における海産養殖魚の58%を占める生産量第1位の魚種である。また本県においても、5,121トン(同年報)と、海面養殖魚種の35%を占めている。しかし、その種苗は、東シナ海で2~3月に天然に発生した稚魚を5~6月に日本沿岸で採捕して用いられており、年毎の好不漁に左右されている。また、流れ藻に着生する他魚種の幼稚魚で、同時に採捕され利用されないまま放棄される魚種があることや、十分な再生産を行う前に出荷されることから、天然ブリ資源の減少の一因となる等の問題がある。

このため養成親魚から採卵し、人工種苗を生産することで養殖用種苗の一部を確保することは持続的な養殖推進や、資源管理上において重要な意義を持っている。このため養成した親魚から受精卵を得る必要があるが、本県の天然海域がブリの産卵水温である19~20℃に達するのは5月下旬から6月となり、本県における天然稚魚採捕時期と重なり、養成親魚を用いて早期に採卵させることは、養殖用人工種苗としての利用を図るために必要な事項である。これまで、(社)日本栽培漁業協会等では、ブリ人工種苗生産を実施するに当たり、1月下旬から2月上旬にかけて養成親魚から採卵する早期採卵法を確立してきた¹⁾。これは水温と光周期を制御し、熟度が適期になった時点でHCGを用いて排卵促進を行い、人工搾出で卵を得るという手法である²⁾。これは一時期に少ない親魚から多量の受精卵を得るには有効な手法であるが、養殖用種苗を大量に生産するために、多数の親魚を扱う場合には作業的

負担が大きいと考えられる。このため(社)日本栽培漁業協会の手法を参考に、水温と光周期の制御によって、水槽内で1月下旬から2月上旬の早期自然産卵により受精卵を得る試験を実施したので報告する。

材料及び方法

試験期間 平成11年度から平成14年度にかけて4回の試験を、いずれも11月上旬から翌年の3月中旬にかけて実施した。

供試魚 4回の試験のいずれも、県内の養殖業者によって飼育された養殖3年目のブリ(平均尾差長60~65cm)を年毎に購入して用いた。4月~5月にかけて腹部を圧迫し、精液が搾出された個体を雄として、雌雄20尾ずつを購入した。試験に用いるまでは、(財)熊本県栽培漁業協会牛深事業場の7×7×5m(水深)の底面に金網を設置した海面生け簀でモイストペレットを用いて飼育を行った。

早期採卵方法

①成熟促進

牛深事業場の海面水温が19℃台に下降した11月上旬に、図1に示す、水産研究センターの100kLコンクリート楕円形循環水槽に移送し、試験終了の3月まで19℃台の水温を維持した。搬入の際に、平成11年~13年の試験においては、LHRHを背筋部に1mg/尾を目安に、コレステロールペレットを作成して埋め込んだ。併せて、11月~12月は午後10時まで、1月以降は午前0時まで40W蛍光灯8本での電照による長日処理を行った。



図1 陸上 100kL コンクリート製楕円循環水槽

②産卵促進

陸上水槽に搬入後、一月毎にカニューレにより卵巢内卵を取り出し、20個程度について卵径を測定し、直径が700 μ mを超えた時点で、飼育水温を一時的に低下させる産卵刺激を実施した。この刺激により受精卵が得られない場合は600 IU/kg・魚体重を目安に、HCGを背筋部に打注し、産卵を促した。

飼育餌料及び給餌方法 陸上水槽に収容するまでは表1に示すモイストペレットにより飼育を行い、収容後は、甲殻類の割合を5%程度増量したモイストペレットにより飼育を行った。給餌は原則として、海面飼育中は週2日間、陸上水槽に収容後は週のうち6日間行い、1日1回、凍結状態のまま飽食量を午前中に与えた。用いた餌料の一般成分分析結果を表2に示した。

表1 モイストペレットの内容

| 原材料 | 割合 (%) |
|---------|--------|
| アミ | 57.8 |
| アジ | 14.4 |
| イワシ | 7.2 |
| 市販配合飼料 | 19.3 |
| フィードオイル | 0.5 |
| 総合ビタミン剤 | 0.8 |

表2 モイストペレットの一般成分分析結果

| 成分 | 割合 (%) |
|-------|--------|
| 水分 | 71.3 |
| タンパク質 | 19.0 |
| 脂質 | 3.0 |
| 炭水化物 | 2.3 |
| 灰分 | 4.4 |

※ 計算上のC/P比は61.0であった

飼育時の管理及び測定項目 給餌の前の午前9時及び午後4時の2回、水温・溶存酸素・pHを測定した。給

餌後は、排水バルブから約1/3量を排水し、換水を行った。注水量は加温設備の関係上、4回転程度とし、砂濾過器を用いた循環水を併用して用いた。

卵巢内卵の成熟度確認のため、水槽収容時と1月毎にカニューレによる卵巢内卵径調査と体重・尾叉長の測定を行った。その際にハダムシ (*Benedenia seriolae*) の寄生が見られた場合にはプラジクアンテル製剤を規定量投与した。また週に2~3回程度、サイフォンを利用した底掃除を行い、糞等の沈殿物の除去を行った。

結果

親魚の成長 各年度毎の親魚の陸上水槽収容後の成長について表3に示した。飼育期間中に、体表のスレや、飛び出しによる数尾の斃死が発生した他は、異常な斃死は発生しなかった。収容時の肥満度は16~17の間であったが、飼育が進むにつれて、産卵時の目標とする肥満度20に近づいた。平成11及び12年度は雌雄ともに、1月17日に肥満度20に達したが、平成13及び14年度は20未満であった。また雌・雄数の変動は収容時に明確に雌雄の判別がつかなかったが、卵巢内卵の確認によって判別されたことによるものである。平成14年度の試験において産卵が終了した以降の肥満度が19から16へ急激に低下することが観察された。

卵巢内卵の成熟度 各年度毎のカニューレによる卵巢内卵径の変化を表4に、平成14年度試験の結果を図2に示した。

いずれの年度も11月の水槽収容から、順調に卵巢内卵径は拡大し、収容から2ヶ月後の1月に、第三次卵黄球期と考えられる600~700 μ mになった。その後卵径は縮小に移行し、退行の状態が伺われた。

摂餌量の変化 全試験期間を通じて、基本的に図3に示す平成14年度試験の摂餌量の変化と同様の傾向を示した。飽食量を給餌したことにより、成熟に伴う摂餌量の低下が明確に観察された。平成14年度試験では、12月下旬に摂餌量は最大となり、総魚体重の約6.7%を摂餌した。それ以降減少していき、卵巢内卵径が600~700 μ mを示し、一時的な水温低下刺激を実施した1月中下旬以後は急激に減少し、産卵中は総魚体重の約2.2%と、最大時の30%程度の摂餌状況となった。

環境変化 4回の試験中の飼育環境変化はほぼ同傾向を示した。

図4に平成14年度試験の水温変化を示した。水温は温

水ボイラ配管を用いて 19°Cで一定になるように加温を実施したが、能力的に 18.7°C~20°Cの範囲で変化した。

表3 ブリ親魚の成長状況

| 平成 11 年度 | 11月26日 | 12月20日 | 1月17日 | |
|----------------|--------|--------|-------|-------|
| 尾数 | 15 | 15 | 15 | |
| 雌 平均尾叉長(cm) | 69.8 | 70.5 | 71.2 | |
| 平均体重(g) | 5,763 | 6,671 | 7,206 | |
| 平均肥満度 | 16.9 | 19.0 | 20.1 | |
| 雄 尾数 | 18 | 18 | 18 | |
| 平均尾叉長(cm) | 68.6 | 69.1 | 70 | |
| 平均体重(g) | 6,550 | 7,241 | 6,925 | |
| 平均肥満度 | 17.2 | 22.3 | 20.1 | |
| 平成 12 年度 | 11月28日 | 12月27日 | 1月16日 | |
| 尾数 | 21 | 21 | 21 | |
| 雌 平均尾叉長(cm) | 76.9 | 76.9 | 76.9 | |
| 平均体重(g) | 8,114 | 9,125 | 9,605 | |
| 平均肥満度 | 17.8 | 19.1 | 21.5 | |
| 雄 尾数 | 14 | 14 | 14 | |
| 平均尾叉長(cm) | 74.3 | 77.2 | 77.3 | |
| 平均体重(g) | 7,210 | 8,822 | 9,550 | |
| 平均肥満度 | 17.6 | 20.1 | 20.6 | |
| 平成 13 年度 | 11月27日 | 12月27日 | 1月29日 | 2月12日 |
| 尾数 | 19 | 17 | 16 | 16 |
| 雌 平均尾叉長(cm) | 72.2 | 73 | 73.0 | 73.5 |
| 平均体重(g) | 6,607 | 6,674 | 7,448 | 7256 |
| 平均肥満度 | 17.6 | 17.1 | 19.2 | 18.2 |
| 雄 尾数 | 17 | 17 | 18 | 18 |
| 平均尾叉長(cm) | 71.7 | 72.4 | 72.6 | 72.2 |
| 平均体重(g) | 6,490 | 6,621 | 7,432 | 7,126 |
| 平均肥満度 | 17.6 | 17.5 | 19.4 | 18.8 |
| 平成 14 年度 | 11月27日 | 12月25日 | 1月27日 | 3月14日 |
| 尾数 | 17 | 16 | 14 | 14 |
| 雌 平均尾叉長(cm) | 73.9 | 74.3 | 74.6 | 75.2 |
| 平均体重(g) | 6,750 | 7,161 | 7,917 | 6945 |
| 平均肥満度 | 16.7 | 17.5 | 19.0 | 16.3 |
| 雄 尾数 | 20 | 20 | 22 | 21 |
| 平均尾叉長(cm) | 73.4 | 73.8 | 73.8 | 74.5 |
| 平均体重(g) | 6,424 | 6,724 | 7,449 | 6,566 |
| 平均肥満度 | 16.2 | 16.7 | 18.5 | 15.9 |

表4 卵巣内卵径の変化

| 年度 | 調査日 | 卵径 (μm) |
|----------|--------|---------------|
| 平成 11 年度 | 11月26日 | 92~118 |
| | 12月20日 | 470~660 |
| 平成 12 年度 | 11月28日 | 115 (207) |
| | 12月27日 | 583 (800) |
| | 1月16日 | 退行卵 |
| 平成 13 年度 | 11月27日 | 152.9 |
| | 12月27日 | 707 |
| 平成 14 年度 | 1月29日 | 473 |
| | 2月12日 | |
| 平成 14 年度 | 11月27日 | 152.3 (163.0) |
| | 12月25日 | 167.6 (189.0) |
| | 1月27日 | 657 (785.5) |
| | 3月14日 | 249.5 (772.5) |

()は最大値

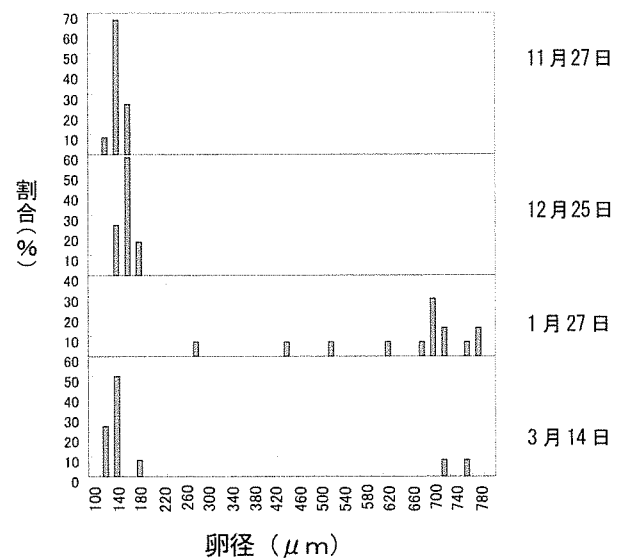


図2 カニューレによる卵巣内卵径の変化

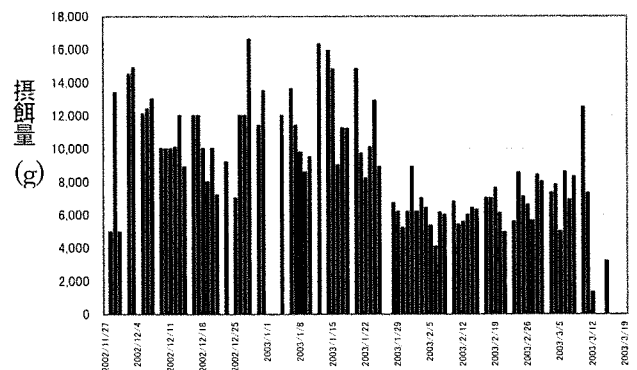


図3 試験期間中の摂餌量の変化

飼育環境の変化としては、pHと溶存酸素量の低下が給餌後に見られ、最低値でpHが7.50、溶存酸素が6.2ppmとなった。平成13年度試験で給餌時間を中心とした経時的な水質変化について分析した値を表5に示したが、摂餌時の食べこぼしや排泄物により、飼育水から腐敗臭がしたり、透明度の低下を招く濁りが発生するなど、かなりの水質悪化が認められた。このため、状況に応じて換水量を増加し、溶存酸素の低下はY社製酸素発生装置を用いて改善を図ったところ、環境悪化を原因とする摂餌不良や異常な遊泳を示すことはなかった。

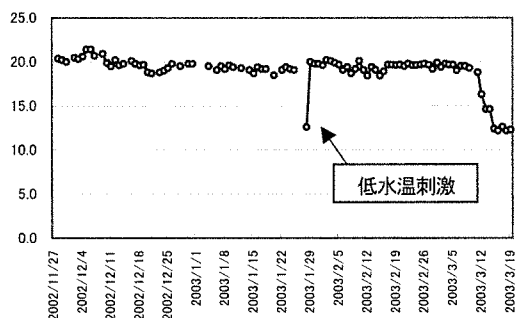


図4 平成14年度試験の飼育水温変化

産卵量及びふ化率 産卵は表6に示すように、平成11、平成13及び平成14年度試験で観察された。

平成11年度試験の産卵は、1月17日～18日の一

時的な水温低下刺激実施後から7日目に始まり約10日間継続した。期間中の総採卵量は浮上卵が 103×10^4 粒、沈下卵が 70×10^4 粒で、卵の観察結果からほぼ100%受精卵であった。受精卵は平均の卵径が1.12mm、油球1個で、1月30日の受精卵のふ化率は50%と低調であった。しかし、ふ化率はブリ受精卵の特徴である、卵発生段階での比重変化に伴う沈降³⁾の影響で明らかな値を求めることができなかったと考えられる。

平成12年度は、11年度の再現を行うため、1回目の一時的な水温低下刺激を1月16日に試みたが、産卵が観察されず、1月29日に再度同様の刺激を与えたが、やはり産卵は観察されなかった。このため2月中旬にHCGを打注し、人工搾出を試みたが 1×10^4 粒程度の受精卵が得られたにすぎなかった。

平成13年度は一時的な水温低下刺激を1月29日～30日にかけて行ったが、10日間経過しても産卵行動が観察されなかったため、刺激後12日目の2月12日にカニューレにより卵巣内卵径を調査したところ、卵径が小さくなり、卵の退行が考えられた。そのためHCGを打注したところ、打注翌日に産卵行動を開始し、2月21日までの9日間継続した。期間中の総採卵量は浮上卵が 291×10^4 粒、沈下卵が 246×10^4 粒で、受精卵の卵径は1.19～1.26mmで、観察結果からほぼ100%受精卵であり、ふ化率は2月13日が67.9%、14日が58.9%であった。

表5 給餌前後の飼育水の水質変化 (NH₄-N, PO₄-P, NO₃+NO₂-Nの単位はμg-at/l)

| | 時刻 | D. O. (mg/l) | 水温 (°C) | pH | NH ₄ -N | PO ₄ -P | NO ₃ +NO ₂ -N |
|-------|-------|--------------|---------|------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 給餌前 | 9:53 | 6.6 | 19.5 | 7.84 | 23.05 | 3.48 | 25.48 |
| 給餌 | 9:58 | | | | | | |
| 給餌直後 | 10:20 | 6.8 | 19.5 | 7.77 | 22.88 | 3.84 | 24.72 |
| 換水終了時 | 11:03 | 5.9 | 19.5 | 7.76 | 22.72 | 3.81 | 24.08 |
| 満水時 | 16:53 | 6.8 | 19.6 | 7.80 | 88.90 | 4.60 | 48.30 |
| 生海水 | 15:43 | 8.5 | 11.7 | 8.35 | 1.36 | 0.58 | 5.42 |
| 濾過海水 | 15:45 | 7.1 | 11.9 | 8.38 | 0.66 | 0.58 | 5.95 |

表6 各年度毎の産卵状況

| 試験年度 | 低水温刺激日 | 産卵開始日 | 産卵終了日 | 産卵日数 | 浮上卵数 (万粒) | 沈下卵数 (万粒) | ふ化率 (%) |
|--------|-------------|-------|-------|------|-----------|-----------|--------------|
| 平成11年度 | 1月17～18日 | 1月25日 | 2月4日 | 10日 | 103 | 70 | 50 (1月31日) |
| 平成12年度 | 1月16～17日 | 産卵なし | | | | | |
| | 1月29～30日 | 産卵なし | | | | | |
| 平成13年度 | 1月29～30日 | 産卵なし | | | | | |
| | 2月12日 HCG打注 | 2月13日 | 2月21日 | 9日 | 291 | 246 | 67.9 (2月13日) |
| 平成14年度 | 1月27～28日 | 2月3日 | 3月3日 | 30日 | 592 | 846 | 40～90 |

平成 14 年度は、陸上水槽搬入時の LHRH 投与は、卵巣内卵の成熟度が卵黄形成の中期以前であることから考えて、その効果が期待できないと判断し⁴⁾、供試魚への投与は行わなかった。他はこれまでと同様の管理を行った。その結果、図 5 に示すように、1 月 27 日～28 日にかけて一時的な水温低下刺激を実施したところ、1 週間後の 2 月 3 日から産卵が始まった。産卵は 3 月 3

日まで 1 ヶ月間続き、その間 16 回の産卵が見られた。この産卵期間の間に得られた卵は、浮上卵 592×10^4 粒、沈下卵 846×10^4 粒であり、合計 $1,439 \times 10^4$ 粒であった。単純に総産卵数を雌親魚数で割った数値は $1,000 \times 10^4$ 粒程度となり、これは魚体重が 10kg 前後のブリにおいては 1 尾当たりの産卵数が 100～200 $\times 10^4$ 粒と報告があることや、産卵終了後の雌親魚の約 8 割の肥満度が低下していることから、ほぼ全ての雌親魚が産卵に参加していると考えられた。また、

(社) 日本栽培漁業協会と長崎県総合水産試験場で検討したふ化率算出のための卵管理法⁵⁾を用いて、受精卵のふ化率を求めたところ、40%～90%の間で変化した

が、産卵期間や浮上卵の割合との間に関連は見られなかった。

考 察

4 年間における 4 回の試験で、産卵が観察されたのは 3 回であった。産卵行動が観察されなかった平成 12 年度の試験は、雌 21 尾、雄 14 尾と、雄が少ない状態であったことがその要因と考えられ、自然産卵を行わせるには、飼育期間中の減耗を考慮し、あらかじめ雄を多めに用いることが重要であると考えられた。

また、4 年間の試験期間中、水温と光周期の調整のみにより自然産卵が観察されたのは平成 14 年度試験のみで、平成 13 年度試験においては一時的な水温低下刺激のみでの産卵行動誘発には至らず、HCG の投与を行った。

ここで水温低下刺激時の水温変化の差異について、平成 11、13、14 年度の比較を行った。各年度の一時的な水温低下刺激時の水温の経時変化を表 7 に、平成 13、14 年度試験の水温変化を図 6 に示した。これによると、平成 14 年度試験では、12℃まで水温が低下しているのに対して、平成 13 年度試験は水温が 15℃までしか低下しておらず、また、最低水温の時間帯も 15 時間と短く、供試魚への十分な刺激が与えられていないと考えられた。また平成 11 年度は水温は

15℃までしか低下させなかったものの、15℃の時間帯が 17 時間と長く、このことが産卵誘発につながったと考えられる。しかし、この一時的な水温低下刺激の有効性については、低下させる最低水温と最低水温の維持時間について十分な検討を行う必要がある。

この水温低下刺激は、魚類の排卵誘発に利用される HCG (human chorionic gonadotropin) と同等の働きをするが、その効果は HCG が数十時間で排卵に至らせるのに対し、水温刺激の場合はほぼ 1 週間を要することから、緩やかな排卵促進作用と考えられる。このことから、刺激を行う前後の供試魚体内で排卵に関与する生殖腺刺激ホルモンの動向等の供試魚体内の変化を詳細に検討する必要があると考えられる。

本試験で開発された手法は、これまで (社) 日本栽培漁業協会等で実施されてきた、HCG を用いた早期搾出法に比べ、

- ① 薬剤を用いない
- ② 搾出法に比べ自然産卵であるため作業性が良い
- ③ 魚体への負担が軽い

の 3 点において優れていると考えられる。①については、薬剤の使用について法的な規制が厳しくなる中で、有効と考えられる。また、②については、今後、人工種苗としての優位性を高めるためにマダイで行われているような、選抜育種による高成長品種を開発することが考えられるが、近交弱勢を防ぐためにも多数の親魚を用いねばならないと考えられ、自然産卵による本手法は、各親魚間の成熟度合いが同調すればほぼ用いる全親魚が産卵に参加する等、遺伝的多様性及び採卵作業性の面から有効であると考えられる。

また、卵質については今回の試験では十分な検討ができなかったが、親魚の成熟への影響や、ふ化率のみならず、種苗生産時に発生する形態異常魚防止対策も含めて、高度不飽和脂肪酸を含む良質なフィード・オイルの餌料への利用と、受精卵への影響を検討することが必要であると考えられる。

養殖用種苗として優位性を目指し、(社) 日本栽培漁業協会ではさらに早期の 12 月に受精卵を得る手法の開発に成功している (参考：平成 15 年 4 月 9 日水産庁プレスリリース)。しかし本県における現場海水温を考慮した種苗生産を実施する場合に、2 月中下旬以前の早期採卵は必要ないと考えられる。これは本県において現場海水の水温が 19～20℃に達するのは 5 月中下旬であることから、ブリの種苗生

産期の水温（20℃程度）からスムーズに沖出しするためには2月中下旬の採卵で十分であることによる。陸上水槽と現場水温の差が大きい場合には、水温馴致時の摂餌低下及びビルナウイルスによる腹水症の発生が危惧され、養殖用種苗として優位であるとは考えづらい。それより形態異常発生率の低減及び集群性を中心にした摂餌性と成長性の向上といった、種苗の質的な優良化を図ることが重要と考えられる。

要 約

ブリ親魚を用いて、水温と光周期の調整のみにより自然産卵が誘導できた。その手法は、以下のようによまとめられる。

- ① 然水温が 19℃に低下する 11 月上旬に陸上水槽に収容し、19～20℃の水温で飼育する。
- ② 陸上水槽収容後、12 月までは日没から午後 10 時まで、1 月以降は午前零時まで電照による長日処理を行う。

- ③ 1 月に肥満度を 20 に近づけるように給餌を行う。
- ④ 卵巣内卵径が 600～700 μm になり摂餌量が低下したら、飼育水温を 12℃まで低下させる。
- ⑤ 飼育水温低下刺激は、13 時間かけて 12℃まで低下させ、12℃を 7 時間程度維持し、さらに 8 時間かけて 19～20℃に上昇させる。
- ⑥ 水温低下刺激後、約 1 週間で産卵が始まるが、産卵行動が観察されない場合は、HCG を打注することにより、自然産卵が誘発される。

謝 辞

本試験を実施するにあたり、供試魚搬入から、陸上水槽搬入までの海面生け簀における飼育管理にご協力いただいた（財）熊本県栽培漁業協会職員の皆様に礼申し上げます。

文 献

1) ～ 5)

社団法人日本栽培漁業協会（1999）：栽培漁業技術シリーズ No. 5 ブリの親魚養成開発技術

表 7 各年度の低水温刺激状況

| 試験年度 | 刺激時の最低水温 (°C) | 最低水温保持時間(h) | *水温刺激にかかった時間(h) |
|----------|---------------|------------------|---------------------|
| 平成 11 年度 | 15 | 17 (16:00～9:00) | 27 (13:00～翌日 16:00) |
| 平成 12 年度 | 15 | 17 (16:00～9:00) | 27 (13:00～翌日 16:00) |
| 平成 13 年度 | 15 | 15 (21:00～12:00) | 27 (15:00～翌日 17:00) |
| 平成 14 年度 | 12 | 7 (4:00～10:00) | 27 (12:00～翌日 20:00) |

15℃以下の時間帯は 18 時間

* 水温低下を開始して、元の水温に戻るまでの時間

図6-1 低水温刺激中の水温変化(平成13年度試験)

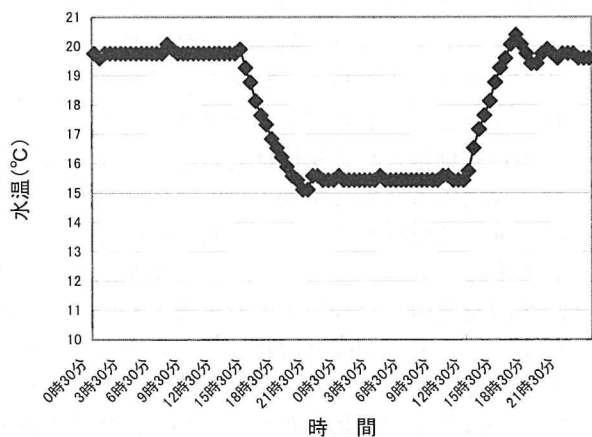
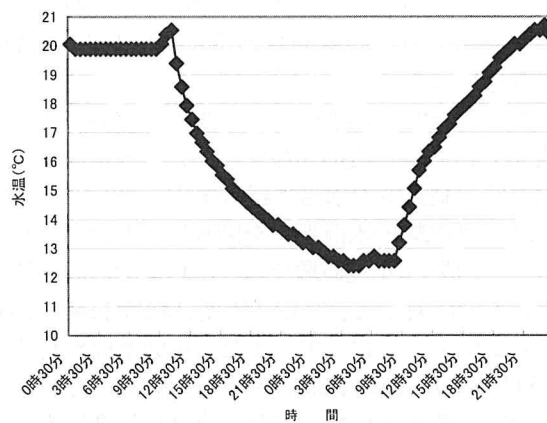


図6-2 低水温刺激中の水温変化(平成14年度試験)



熊本県有明海域のノリ養殖漁期における栄養塩の季節変動

吉田雄一 黒木善之 吉村直晃 小山長久

The seasonal changes of nutrients in Ariake Bay of Kumamoto Prefectural area
during the laver culture season

Yuichi Yoshida Yoshiyuki Kuroki Naoaki Yoshimura and Nagahisa Oyama

キーワード: 栄養塩、有明海、ノリ養殖

ノリ養殖において、葉体の成長や乾海苔の黒み度合いなどの品質に影響を与える環境項目として、DIN (溶存態無機三態窒素量)や $PO_4\text{-P}$ (溶存態無機リン酸量)があげられる。当センターは、毎年、ノリ養殖漁期に、これらの栄養塩について調査し、その結果をノリ生産者や業界に養殖管理の参考にするため「ノリ栄養塩情報」にまとめて提供してきた。¹⁻¹²⁾ 健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量は、本県では、DINで $7\mu\text{g}\cdot\text{at}/\text{L}$ 以上、 $PO_4\text{-P}$ で $0.5\mu\text{g}\cdot\text{at}/\text{L}$ 以上としており、これらの値を「期待値」と呼んでいる。今回は、「DINと $PO_4\text{-P}$ の両方の値が期待値以上である割合」、言い換えれば「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」を旬別、地区別に整理して、栄養塩の経時的、地区的傾向などの特徴について報告する。

材料及び方法

1991年(H3)から2002年(H14)にかけて、毎年、原則として、9月下旬から11月末までは毎週、12月以降翌3月上旬までは隔週、有明海の荒尾市・長洲町・大浜町・岱明町・熊本市河内町・熊本市松尾町・熊本市畠口(又は熊本市海路口)・宇土市網田の8地区の支柱式漁場と浮き流し式漁場について、合計16地点を調査した(図1)。試水の採取は、各地区のノリ生産者に依頼し、原則として昼間の満潮時、バケツ又はポリ容器で表層水を採取した。試水は500mlのポリ容器に封入後保冷し、翌日に回収して分析した。試水は、ガラス繊維フィルタ(Whatman GF/C)にてろ過したのち、 $NH_4\text{-N}$ (溶存態アンモニア態窒素量)はインドフェノール青吸光光度法、 $NO_2\text{-N}$ (溶存態亜硝酸態窒素量)

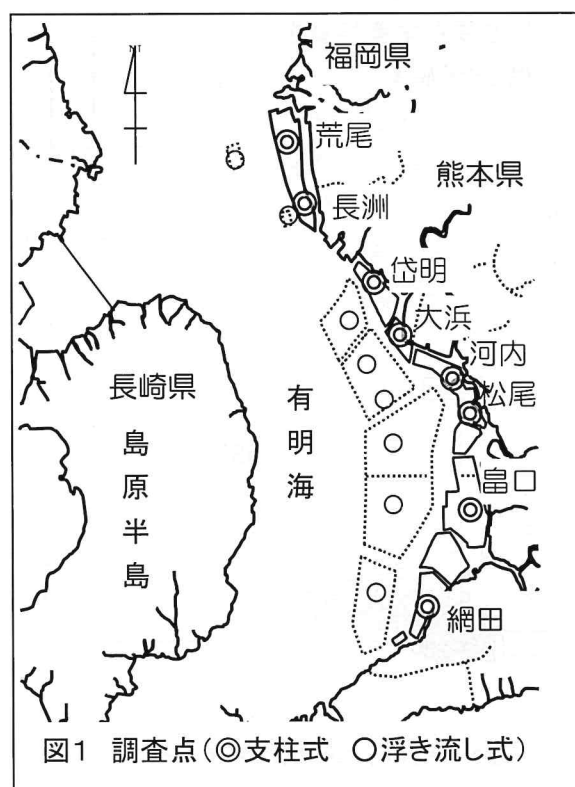


図1 調査点(◎支柱式 ○浮き流し式)

はナフチルエチレンジアミン吸光光度法、 $NO_3\text{-N}$ (溶存態硝酸態窒素量)は銅・カドミウムカラム還元・ナフチルエチレンジアミン吸光光度法により分析¹³⁾し、これらの値を合計してDINを求めた。 $PO_4\text{-P}$ は、モリブデン青(アスコルビン酸)吸光光度法により分析¹⁴⁾した。

得られた2,093件のデータについて、調査日を日単位から旬単位に変換・整理し、解析に供した。前述の「DINと $PO_4\text{-P}$ の両方の値が期待値以上である割合」すなわち「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」を算出するとともに、クラスター分析(群平均法)による解析を行った。

結果及び考察

1) 栄養塩濃度の変化

支柱式漁場におけるDINは、最小・最大値の巾が大きく、バラツキが大きい傾向を示した。(図2)

また、浮き流し式漁場は、支柱式漁場ほどではないが、同様にバラツキが大きい傾向を示した。(図3)

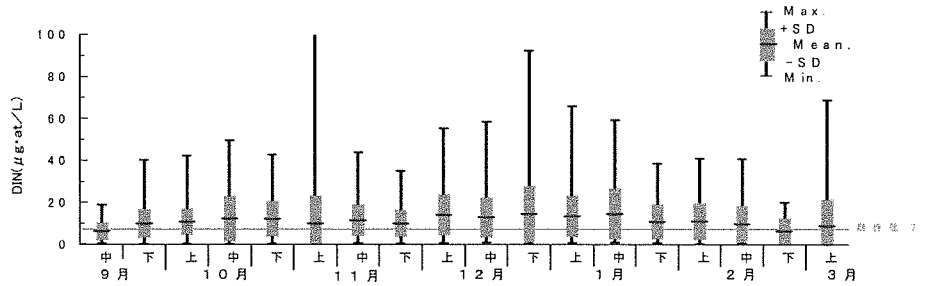


図2 支柱式漁場におけるDINの経時変化(1991~2002年)

2) 健全なノリを育成するのに必要な栄養塩量を確保できる確率

11年間の支柱式漁場におけるDINとPO₄-Pの関係を図3に示した。健全なノリを育成するのに必要な栄養塩量を確保できる確率は、58%であった。

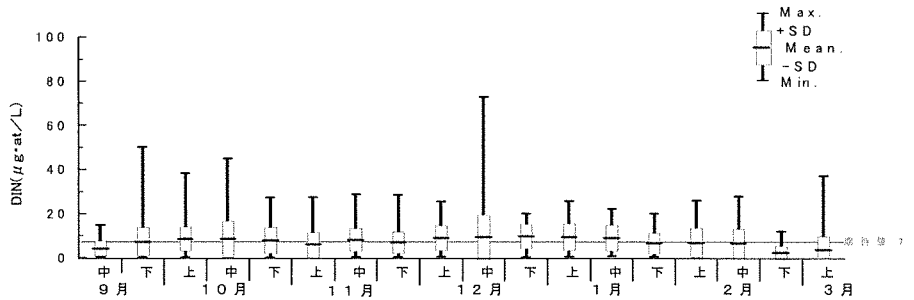


図3 浮き流し式漁場におけるDINの経時変化(1991~2002年)

支柱式漁場は、浮き流し式漁場よりも19ポイント高かった。

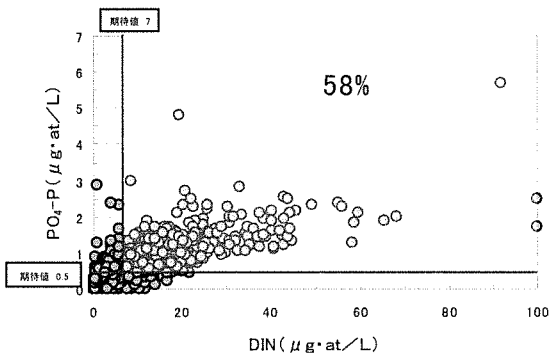


図3 DINとPO₄-Pの関係(支柱式漁場)

同様に浮き流し式漁場をDINとPO₄-Pの関係を図4に示す。健全なノリを育成するのに必要な栄養塩量を確保できる確率は、39%であった。

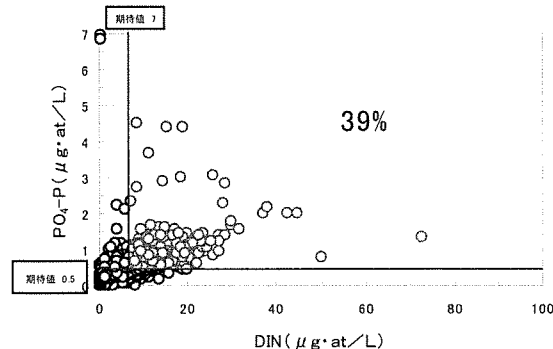


図4 DINとPO₄-Pの関係(浮き流し式漁場)

3) 地区の類型化と特徴

海域区的特徴を調べるため、「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」について、地点別旬別データをもとにクラスター法(群平均法)により解析した。その結果、図5及び図6に示すように、調査地点は、3海域に大別され、その特徴は次のとおりであった。

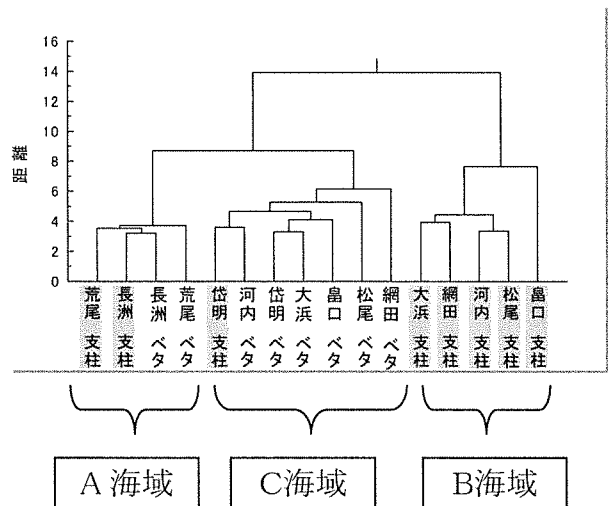
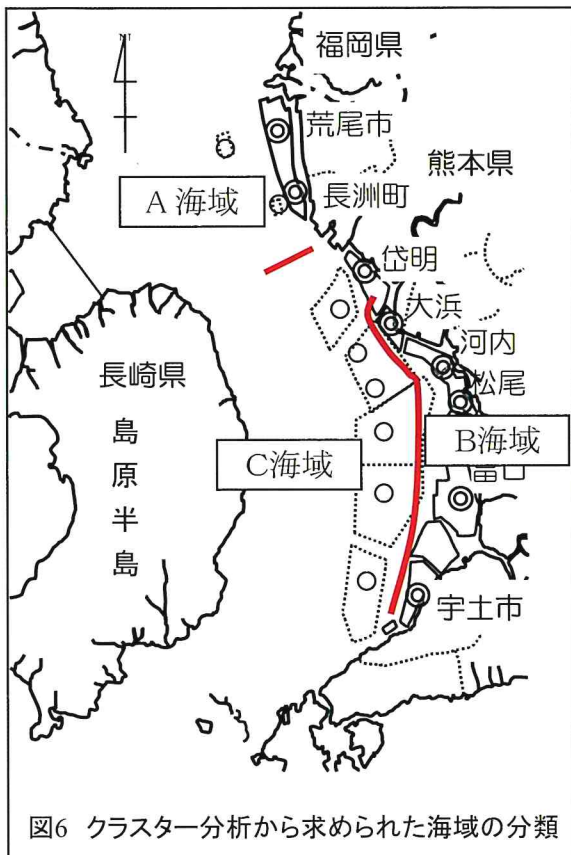


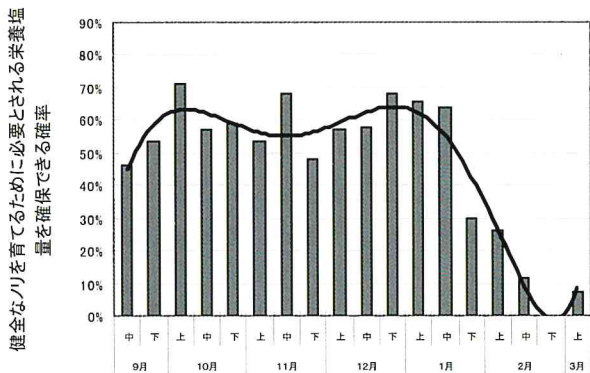
図5 クラスター分析結果

※ ベタ : 浮き流し式



A 海域(長洲町以北の支柱・浮き流し式漁場)

「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、50%であり、B 海域に次いで高い。同確率は、9 月中旬は低く、1 回目のピークは 10 月上旬頃に現れる。11 月下旬頃に若干低くなり、12 月下旬頃に 2 回目のピークが見られる。その後、急激に低下し、2 月下旬頃に最も低くなる傾向を示した。(図 7)

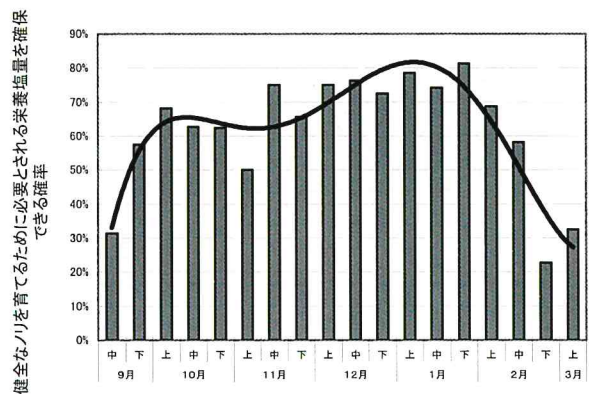


B 海域(玉名市大浜以南の支柱式漁場)

「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、62%と海域の中で最も高い。

同確率は、9 月中旬は低く、1 回目のピークは 10 月上旬頃に現れる。11 月上旬頃に低くなり、12 月下旬頃に 2 回目のピークが見られる。その後、2 月下旬頃

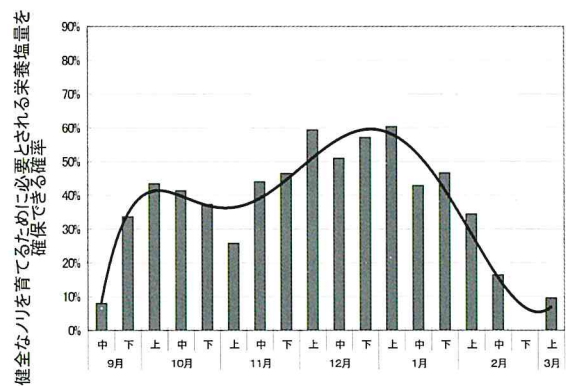
に最も低くなる傾向を示した。(図 8)



C 海域(岱明町の支柱式漁場、岱明町以南の浮き流し式漁場)

「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、38%と最も低い。

同確率は、9 月中旬は低く、第 1 回目のピークは 10 月上旬頃に現れる。11 月上旬頃に低くなり、1 月上旬頃に 2 回目のピークが見られ、その後、急激に低下し、2 月下旬頃に最も低くなる。なお、C 海域の殆どは浮き流し式漁場であるが、唯一支柱式漁場として岱明町地区が含まれた。



以上を表 1 に整理した。

表1 3海域の特徴

| 海 域 | 割合 (平均) | 経時変化 | | | | |
|---------------------|------------|------|-------|-------|------|-----------------|
| | | (低) | ピーク1 | 谷 | ピーク2 | (低) |
| B 大浜以南の支柱漁場 | 62% | 9月中旬 | 10月上旬 | 11月下旬 | 1月上旬 | 2月下旬 |
| A 長洲以北の支柱・浮き流し漁場 | 50% | | | 11月上旬 | | 2月下旬 (急激な低下) |
| C 岱明の支柱、岱明以南の浮き流し漁場 | 38% | | | | | |

＜松尾地区における生産性向上の可能性＞

「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、支柱式漁場で 58%、浮き流し式漁場で 39%であり、19 ポイントの差があり、このことが生産性に大きく関与している。養殖現場においては、浮き流し式漁場で生産した黒み度の低いノリ葉体を栄養塩の多い支柱式漁場に移動して、黒み度を増すなど、漁場の特性を活かして、生産性を高める工夫がなされている。しかし、それでも支柱式漁場でも「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、58%であり、別の言い方をすれば、「確保できない確率」は 42%もある。このことは、安定な養殖経営を行う上での障害になっている。

従って、生産性を高めるためには、栄養塩の経時的、あるいは海域の特徴を十分に把握して、栄養塩を効率的に利用することが重要である。

そこで、今回得られた栄養塩の特徴と実際の生産状況をもとに、栄養塩をより効果的に利用して生産性を高めることの可能性の有無について、B 海域に該当する松尾地区を例に考察した。

B 海域における「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」の経時変化及び平成 14 年度松尾地区入札結果から推定した生産状況を図 10 に示した。

松尾地区の生産は、10 月下旬から 11 月上旬をピークとする秋芽網期とそれ以降、12 月下旬から 2 月上旬頃をピークとする冷凍網期に分けられる。

「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」のピークと生産量のピークにズレが生じている。

ノリ入札単価は、入札時期が早いほど高いことから、生産時期のピークが 1 月上旬となるよう、生産を早

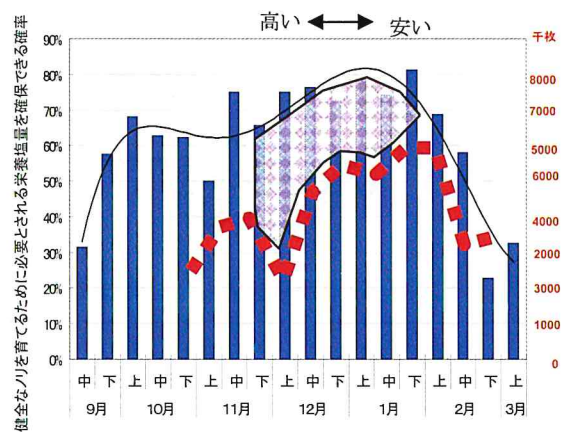


図10 松尾地区における生産状況(入札結果から推定)と栄養塩(毎月の関係)

図 10 松尾地区における生産状況と栄養塩の関係

- ■ ■ ■ H14 年度生産枚数(入札結果から推定)
- ■ ■ ■ 有効活用の可能性

めるような管理を行うことで、栄養塩を効率的に利用できると考えられた。

要約

- 1 有明海の支柱式漁場及び浮き流し式漁場の栄養塩調査を行い、経時的、地区的な傾向を検討した。
- 2 「健全なノリを育てるために必要とされる栄養塩量を確保できる確率」は、支柱式漁場で 58%、浮き流し式漁場で 39%であり、前者の方が 19 ポイント高かった。
- 3 クラスター分析により、(A)長洲以北の支柱式・浮き流し式漁場、(B)大浜以南の支柱式漁場、(C)岱明の支柱式漁場と岱明以南の浮き流し式漁場の 3 つの海域に分類された。
- 4 同確率は、B、A、C 海域の順に高く 50%、62%、38%であった。

- 5 同確率は、3 海域とも 9 月下旬に低く、10 月上旬と 12 月下旬にピークが見られ、2 月下旬に低くなる傾向を示した。
- 6 同確率は、B、C 海域で 11 月上旬、A 海域で 11 月下旬に低下がみられた。
- 7 同確率の 2 月下旬までの低下の度合いは、B 海域より A、C 海域の方が著しかった。
- 8 C 海域は殆どが浮き流し式漁場であるが、岱明の支柱式漁場が含まれた。
- 9 栄養塩の特徴と生産状況から生産性を向上させることができないか松尾地区を例に検討したところ、冷凍網期の生産を早めることでそれが可能になると考えられた。

謝辞

これまで海水の採取に協力していただきました多くの各地区のノリ生産者や漁協職員の方、また、その連絡調整に協力していただきました熊本県海苔生産者連絡協議会、及び同協議会の事務局である漁業協同組合連合会に深く感謝いたします。

得られた海域の栄養塩の特性から、採苗や育苗、冷凍網の入庫、一斉撤去後の栄養塩回復の予測、主要生産時期、終期などの決定など、ノリ養殖管理を行う際の参考になれば幸いです。

文献

- 1) 山野耕一・平見哲朗・中原康智・渡辺裕倫・鳥羽瀬憲久、漁場環境保全対策事業(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 3 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1991,128-141
- 2) 山野耕一・平見哲朗・中原康智・渡辺裕倫・鳥羽瀬憲久、漁場環境保全対策事業(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 4 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1992,157-172
- 3) 山野耕一・石田宏一・渡辺裕倫・鳥羽瀬憲久、漁場環境保全対策事業(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 5 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1993,147-158
- 4) 吉田雄一・石田宏一・宮本雅秀・鳥羽瀬憲久、漁場環境保全対策事業(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 6 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1994,139-153
- 5) 吉田雄一・河邊博・宮本雅秀・小山長久、漁場環境保全対策事業(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 7 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1995,143-156
- 6) 向井宏比古・河邊博・宮本雅秀・小山長久、漁場環境保全対策事業Ⅱ(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 8 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1996,139-151
- 7) 向井宏比古・加来照雄・宮本雅秀・小山長久、漁場環境保全対策事業Ⅱ(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 9 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1997,120-129
- 8) 安東秀徳・加来照雄・向井宏比古・小山長久、漁場環境保全対策事業Ⅲ(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 10 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1998,122-132
- 9) 安東秀徳・加来照雄・向井宏比古・小山長久、ノリ養殖総合対策試験(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 11 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,1999,99-111
- 10) 吉村直晃・木村武志・安東秀徳・小山長久、ノリ養殖総合対策試験(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 12 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,2000,127-139
- 11) 吉村直晃・吉田雄一・安東秀徳・小山長久、ノリ養殖総合対策試験(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 13 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,2001,131-146
- 12) 黒木善之・吉田雄一・吉村直晃・小山長久、有明海漁業生産力調査事業Ⅳ(ノリ養殖漁場海況観測調査).平成 14 年度熊本県、熊本県水産研究センター事業報告書,2002,182-198
- 13) 日本規格協会,工場排水試験法 JIS K0102,1986,134-145
- 14) 日本規格協会,工場排水試験法 JIS K0102,1986,160-161

有明海における溶存酸素の季節変化と 底泥からの栄養塩の溶出

吉村直晃 黒木善之 吉田雄一 小山長久

Seasonal changes of dissolved oxygen and the release of nutrients from
the bottom sediments in Ariake Bay

Naoaki Yoshimura Yoshiyuki Kuroki Yuichi Yoshida and Nagahisa Oyama

キーワード：溶存酸素、栄養塩、溶出、有明海

平成 12 年度ノリ漁期、有明海で発生した大規模なノリ色落ちによる記録的な不作は、ノリ生産者に経済的損失を与えただけでなく大きな社会的問題となった。また有明海では近年になって、アサリやタイラギのへい死が発生しており、海域環境の悪化が懸念されている。これらの問題が大きく取り上げられるようになったことをきっかけに、有明海に面する 4 県の水産試験研究機関による沖合モニタリング調査、独立行政法人水産総合研究センターによる行政対応特別研究「有明生物」（平成 13 年度から）が実施され、その原因究明に取り組んできた。その結果、有明海湾奥部の広い範囲で夏季に底層が貧酸素化し、潮汐に伴って移動する現象が確認された⁽¹⁾⁽²⁾。

底層水の貧酸素化は、その水域に存在する魚類及び二枚貝類などの生物に対して生理的変化を引き起こし、様々な悪影響を及ぼす。また底泥から窒素・リン・微量金属など植物プランクトン増殖因子の溶出を促し、赤潮発生の引き金になるなど二次的な問題を引き起こすとも言われているが、本県海域における底層の溶存酸素 (DO) と栄養塩の溶出の関係についてはほとんどわかっていない。

そこで本研究では、有明海における DO の分布状況について調べ、水塊構造変化に伴う季節変動について把握することをまず試みた。また、底層水の DO 変化に伴い、底質環境がどのように変化するののかについても明らかにし、両者の関係について考察した。

方 法

水質調査

水質調査は宇土市から大牟田市三池港沖にかけての南北ライン上に設けた 6 定点 (St. 1~St. 6) について、平成 15 年 4 月から 11 月まで月 1 回行った。また、成層が発達する 6 月~9 月にかけては週 1 回調査を行った (図 1)。

調査定点に到着すると、船上から水質計測器 (クロロテック AAQ1183-PDA) を降下し、水温、塩分、クロロフィル及び溶存酸素濃度 (DO) の鉛直プロファイルを取得した。また、バンドーン採水器で鉛直的に海水を採取し、実験室に持ち帰った後、オートアナライザー (TRAACS 2000: ブラン・ルーベ社製)

により三態窒素 (DIN: $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$)、リン酸態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$) 及び珪酸態珪素濃度 ($\text{SiO}_2\text{-Si}$) の測定を行った。

底質調査

底質調査は前述の 6 定点に岸側 4 定点を追加した 10 定点 (St. 1~St. 10)

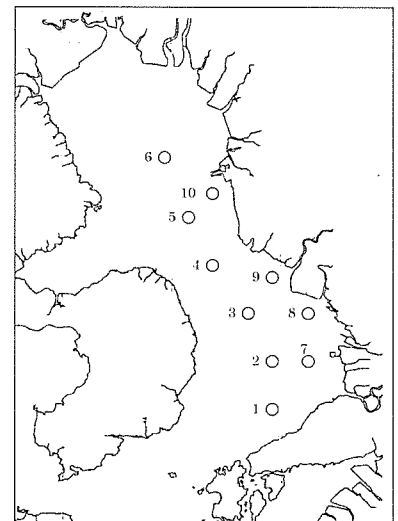


図 1 調査定点図

において、5月、8月及び11月に行った(図1)。柱状採泥器(改良型簡易コアサンプラー)で底泥を採取し、実験室に持ち帰った後、直上水(底泥表面から10cmまでの水)をシリコンチューブを用いて抜き取った。その後底泥を鉛直的に4層(0-1cm層、2-3cm層、5-6cm層及び9-10cm層)に切り分け、有機物量の指標となる化学的酸素要求量

(COD)及び全硫化物(TS)を測定した。また、遠心分離(10000rpm, 5min)することにより間隙水を取り出し、直上水とともにDIN、PO₄-Pを測定した。

底泥からの窒素及びリン溶出速度(溶出量)の算出

底泥からの栄養塩の溶出は、底泥直上水と間隙水との物質拡散過程において起こる物理化学的反応であるとみなすことができる。底泥にはその水域で生産された、あるいは河川などから流入した懸濁態有機物が堆積し、主として微生物による分解が進行するので、間隙水中の栄養塩濃度は直上水と比較して一般に非常に高濃度である。そのため両者の間に濃度勾配が生じ、それによって発生する物質の拡散作用により間隙水から直上水に移行する(つまり溶出する)。環境条件が変化しない限り、間隙水の栄養塩の出入りには一定の平衡が成立しており、“定常状態”が保たれていると考えられている。しかし、底泥中ではその2割ほどを底泥粒子が占めることから、物質の移行がかなり制限される。従って、本報告における底泥からの物質の溶出速度は、間隙水と直上水の間で生じる栄養塩の濃度勾配と分子拡散係数の積で算出する従来の拡散方程式から求める方法⁽³⁾で行った。

結 果

DOの季節変化

魚類、甲殻類及び二枚貝類等の水生生物は、水中の溶存酸素濃度(DO)が4.3mg/L(3ml/L)未満に低下した場合に生理的変化を生じることが報告されて

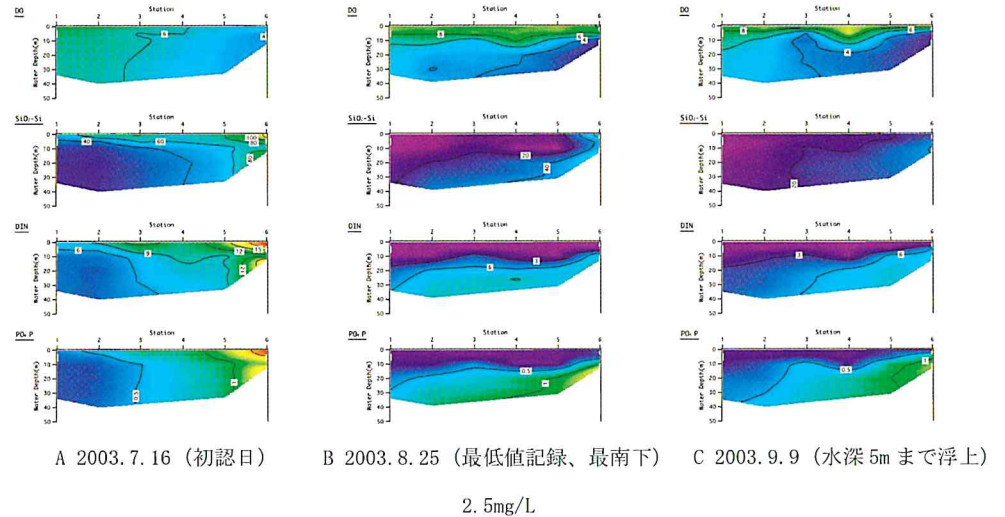


図2 DO, SiO₂-Si, DIN及びPO₄-Pの鉛直分布

いる。水産用水基準では、夏季の内湾域底層における基準値としてこの値を定めていることから、ここではDOが4.3mg/L未満の水塊の挙動に注目した。

DOが4.3mg/L未満の水塊は、平成15年7月16日にSt.6(三池港沖)で観測され始め(図2-AのDO鉛直分布図)、9月18日まで調査した日は全て観測された(図3-AのDO鉛直分布図)。同時に底層のDIN及びPO₄-P濃度の上昇が見られた(図2, 3-AのDIN及びPO₄-P鉛直分布図)。8月25日には今期の最低値2.5mg/L(St.6・10m)を記録し、DOが4.3mg/L未満の水塊はSt.2(熊本港沖)にまで南下した(図2-BのDO鉛直分布図)。

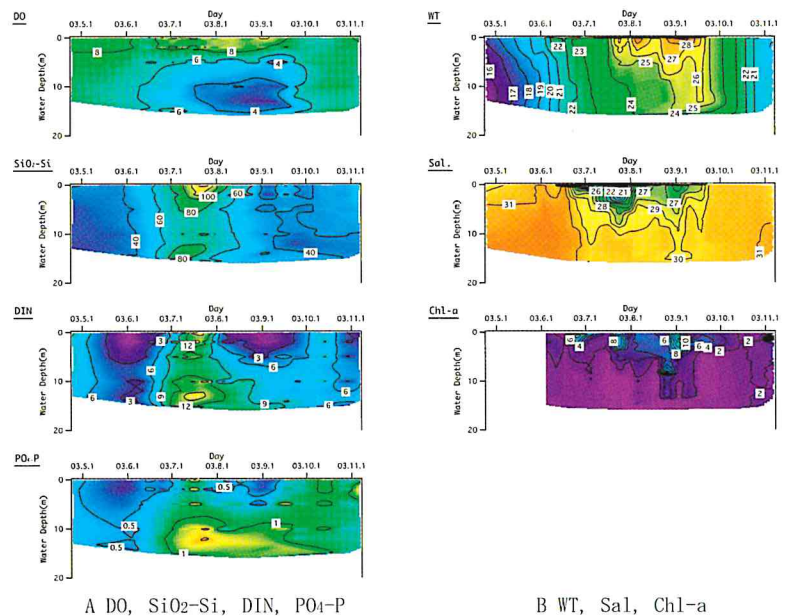


図3 St.6における鉛直分布の季節変化

また、このような水平方向の移動だけでなく、水深5mにまで上昇したことから、鉛直方向への移動もあることがわかった(図2-CのD0鉛直分布図)。

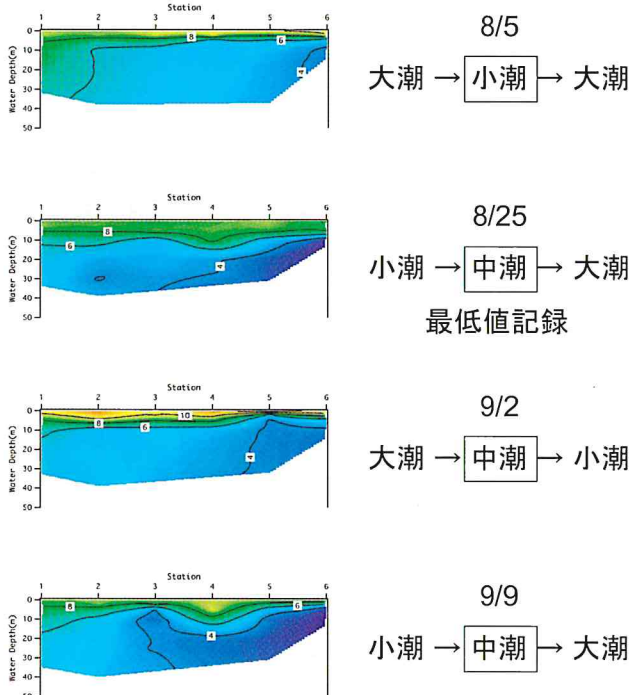


図4 潮汐変化に伴うD04.3mg/L未満の水塊の南下現象

D0が4.3mg/L未満の水塊の南下規模は、潮汐差が縮小傾向にあるとき(小潮時あるいは小潮に向かうとき)は小さく、逆に潮汐差が拡大傾向にあるとき(大潮に向かうとき)に最も南下した。また、前述の今期最低値は後者で観測された(図4)。

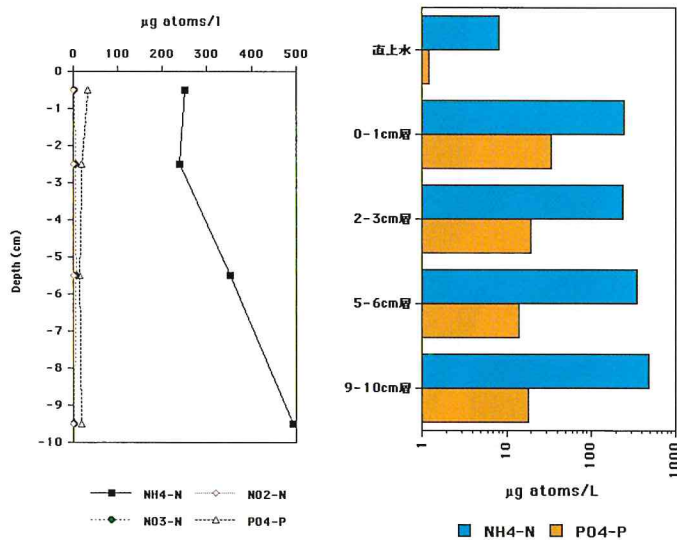


図5 底泥間隙水中における三態窒素及びリン酸態リンの鉛直変化

底泥間隙水の栄養塩組成

間隙水中のDINについて測定したところ、NO₂-N及びNO₃-Nは大部分が10µg atoms/L未満であるのに対して、NH₄-Nの濃度は100~500µg atoms/L程度検出されることから、そのほとんどが還元型で存在することがわかった。また、PO₄-Pは10~30µg atoms/L検出された(図5)。

底泥直上水と間隙水のN,P濃度差(NH₄-N及びPO₄-P)

間隙水に存在するDINのほとんどを占めるNH₄-Nについて直上水の濃度と比較したところ、直上水には数µg atoms/Lしか存在しないことから、間隙水には直上水の約100倍のNH₄-Nが蓄積されていることがわかった。また、PO₄-Pについても同様の傾向が見られた(図6)。

直上水及び間隙水(0-1cm層)におけるNH₄-N濃度の季節変化

図7に直上水におけるNH₄-N濃度の季節変化を示す。春季は調査した海域全体として2µg atoms/L程度で推移していたが、夏季においては3倍に増加した。

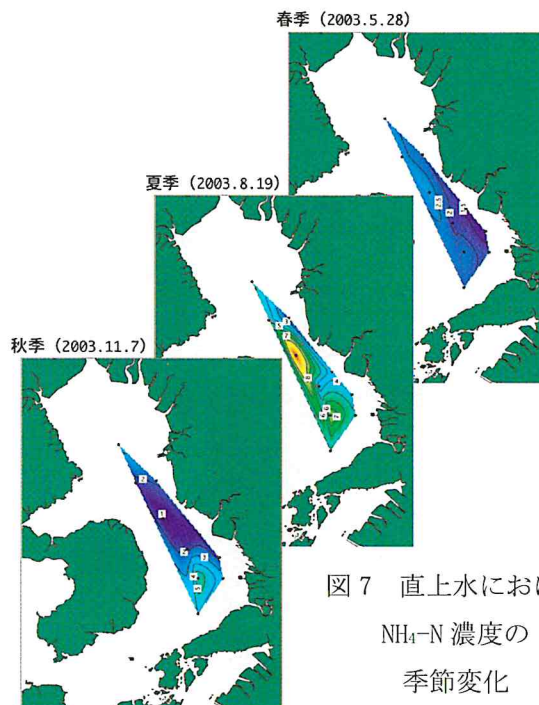


図7 直上水におけるNH₄-N濃度の季節変化

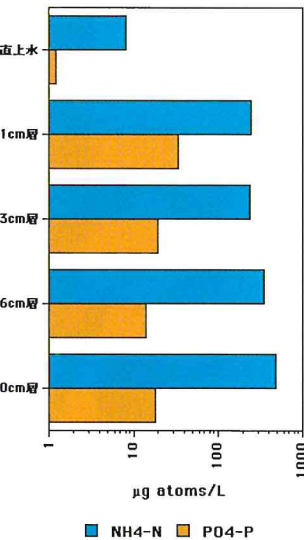


図6 直上水及び間隙水におけるNH₄-N、PO₄-Pの比較(St.2・8月19日)

図8に間隙水におけるNH₄-N濃度の季節変化を示す。前述の直上水では明確に季節変化が見られたが、間隙水では比較的安定しており、年間を通して100~250µg atoms/Lで推移していた。その一方で地域的な差は見られ、熊本市沖で常に高い値を示す傾向があった。

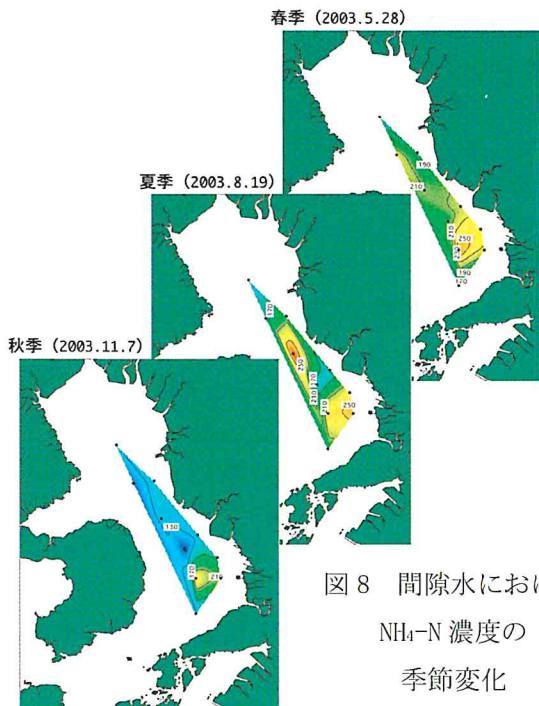


図8 間隙水における
NH₄-N 濃度の
季節変化

底泥からの NH₄-N の溶出速度 (溶出量) の季節変化

図9にNH₄-N溶出速度の季節変化を示す。NH₄-Nの溶出速度は熊本市沖(St.2及びSt.7)で常に高く、250~350 μg atoms/m²/dayの速度を常に維持していた。それに比較して長洲沖以北の海域では総じて低く、100~150 μg atoms/m²/day程度であった。このようにNH₄-Nの溶出速度は、地域差は大きいものの季節変化はほとんど見られなかった。

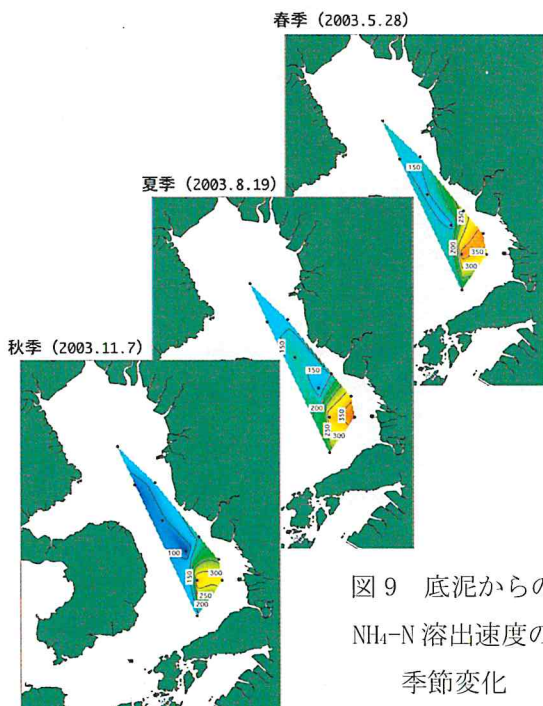


図9 底泥からの
NH₄-N 溶出速度の
季節変化

直上水及び間隙水 (0-1cm 層) における PO₄-P 濃度の季節変化

図10に直上水におけるPO₄-P濃度の季節変化を示す。春季及び秋季は全域で0.5~0.75 μg atoms/L程度であったが、夏季になるとNH₄-Nと同様に3倍に増加した。

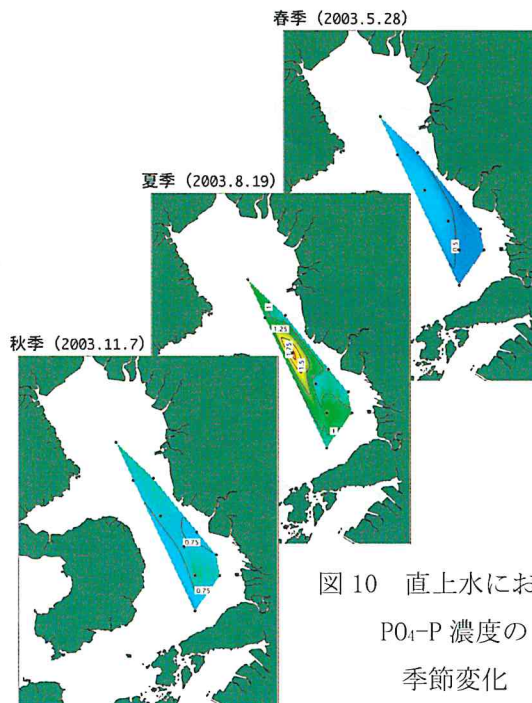


図10 直上水における
PO₄-P 濃度の
季節変化

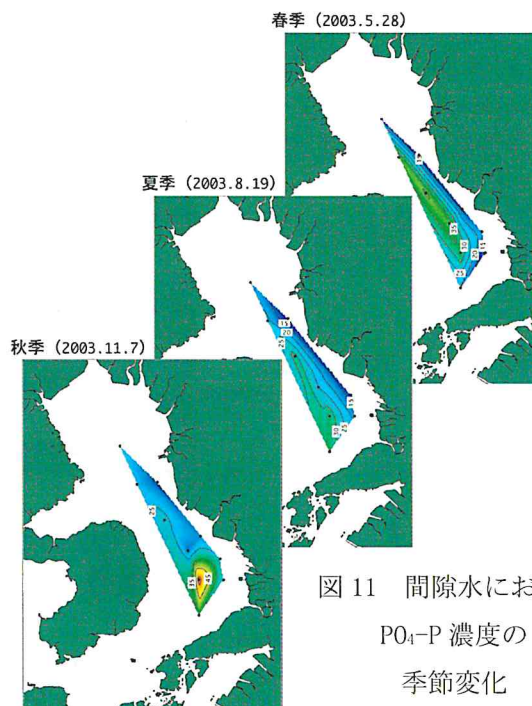


図11 間隙水における
PO₄-P 濃度の
季節変化

図11に間隙水におけるPO₄-P濃度の季節変化を示す。直上水で確認されたような季節変化は、NH₄-Nと同様に間隙水では見られず、常に15~45 μg atoms/L程度で推移していた。その一方で平面分布

状況には差が見られ、熊本市沖 (St. 2) では常に $30 \mu\text{g atoms/L}$ 以上の値を維持し、その他の海域では総じて低い傾向 ($10\sim 20 \mu\text{g atoms/L}$) を示した。

底泥からの $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出速度 (溶出量) の季節変化

図 12 に $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出速度の季節変化を示す。 $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出速度は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 溶出速度と同様の傾向を示した。熊本市沖 (St. 2 及び St. 7) で高く ($40\sim 70 \mu\text{g atoms/m}^2\text{/day}$)、他海域では低い傾向を示し、長洲以北では $20 \mu\text{g atoms/m}^2\text{/day}$ 以下であり、地域的な差が常に見られた。しかし季節変化は見られなかった。

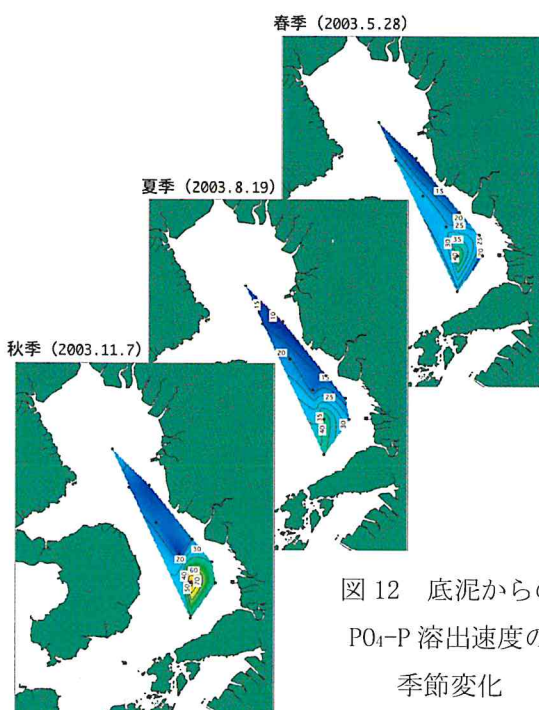


図 12 底泥からの $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出速度の季節変化

考 察

底泥間隙水中に溶存する DIN の大部分は還元型 ($\text{NH}_4\text{-N}$) で存在する。これは底泥中では、分子状酸素が検出される層 (酸化層) が表面から数ミリメートル程度と非常に薄く、それより深いところでは分子状酸素が存在しない⁽⁴⁾ ため硝化が進行せず、結果的に $\text{NH}_4\text{-N}$ が蓄積したためであると考えられる。また、間隙水には直上水の約 100 倍の溶存無機態窒素が存在する。リンについても同様である。このことは、陸水 (主として河川水) 由来の懸濁態有機物及び海域内で生産されたプランクトン粒子等が底泥上に堆積し、分解され再び栄養塩に回帰するが、その大部分は底泥に蓄積されていることを示している。このことはすなわち、底泥が栄養塩の供給源として、非常に重要であるということを示している。

一般に底泥内に蓄積された $\text{NH}_4\text{-N}$ 及び $\text{PO}_4\text{-P}$ は、底泥表面の酸化層によるバリアー的作用により直上

水への溶出が抑制されている。例えばリンは酸化層が存在する環境下では、間隙水中において第一鉄イオンが酸化されることで生ずる水酸化第二鉄にほとんどが吸着し、溶出が抑えられていると考えられている^{(5) (6)}。また、酸化層の存在は、好気性細菌による有機物の分解を促し、その過程で生じた $\text{NH}_4\text{-N}$ は速やかに $\text{NO}_2\text{-N}\rightarrow\text{NO}_3\text{-N}$ へと硝化が進むため、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出は起こらない。

しかし、底層が貧酸素化した場合、酸化層によるバリアー的機能が失われる。底層で有機物の酸化的分解が進み、酸素濃度が低下すると嫌気性細菌の活動が活発になる。これらの生物群は有機酸を生成するので底泥が酸性に偏る。リンが吸着している水酸化第二鉄は酸可溶性であるため、このような環境下ではイオン化し間隙水中の $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度が上昇する。結果として生ずる直上水との濃度勾配に従い、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は直上水へと拡散・移行する (すなわち溶出する)。貧酸素化した水塊が発生する海域ではこのようにして $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出が盛んになると考えられる。このとき同時にイオン化する鉄についても溶出が盛んになるであろう。また、前述のように直上水に比べて間隙水中に常に高濃度に存在する $\text{NH}_4\text{-N}$ は硝化が阻害され、そのまま直上水へと拡散するためこのような条件下で溶出が盛んになると考えられる。

これらの現象は、水深が浅く閉鎖性の強い海域ではよく見られ、有機物付加が強い海域ほどより顕著である。つまり底泥からの栄養塩溶出は、底質の悪化により促進され、貧酸素化した水塊が発生する海域では他海域に比較してかなり高い値となると考えられる。今回の観測で本県海域において確認された底層水の DO 低下は、底質とどのような関係があるのであろうか。

DO が 4.3mg/L 未満に低下するとともに底層における DIN 及び $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の上昇が顕著に現れたことから、DO 低下により底泥からの栄養塩溶出が上昇した海域があるのは間違いないようである。しかし調査した海域における $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出速度は地域的な差があるものの、DO が 4.3mg/L 未満の水塊が確認された期間中に極端な上昇は見られず、季節変化はほとんど確認されなかった。 $\text{PO}_4\text{-P}$ についても同様である。これらのことから今回確認された DO 低下は、本海域の底質悪化によるものではないと考えられる。このことは以下のことから説明できる。

DO が 4.3mg/L 未満の水塊の南下規模が潮汐差に比例する現象が見られたことから、水産用水基準を下回る水塊の挙動は潮汐の動向に依存することが示唆

された。この DO 低下が、調査した海域の底質悪化により発生したことによるとすれば、DO 最低値は少なくとも小潮時に観測されるはずである。しかし実際には小潮から大潮に移り変わる途中、すなわち潮汐差が拡大傾向にあるときに観測された。

以上のことから現段階での結論として言えることは、今回観測された底層水の DO 低下は、少なくとも調査した海域以外で発生し、潮流によってこの海域に影響を及ぼした可能性があるということである。このことは、有明海で行った別の調査（貧酸素水塊共同調査：有明海周辺の 4 県と西海区水産研究所による共同観測）で、湾奥部西側の複数箇所で見つかった貧酸素化水塊が発生することをつかんでおり、これらが引き潮に伴って南下する現象が確認されている⁽¹⁾ことから、十分ありうるのではないだろうか。

今回の観測結果から、本県海域における水塊構造変化に伴う DO の水平及び鉛直方向の挙動がある程度明らかとなった。また、底泥が栄養塩の供給源として重要な役割を果たしていることもわかった。有明海をはじめとする閉鎖性の強い内湾域に供給される栄養塩としては、河川から流入するものが代表的である。我々が菊池川河口域で行った別の調査結果によると、河川が降雨等で増水していない場合、河口域では表層で DIN が $10 \mu\text{g atoms/L}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ が $1.5 \mu\text{g atoms/L}$ 程度の水が流入している（平成 13 年度水産研究センター研究報告会資料より）。菊池川の流量は 1 日あたり約 $2.5 \times 10^6 \text{t}$ である⁽⁷⁾。このことから単純に計算すると、少なくとも 1 日あたり DIN が 25kg、 $\text{PO}_4\text{-P}$ が 3.75kg 程度流入していることになる。この海域における溶出速度は $\text{NH}_4\text{-N}$ で $150 \mu\text{g atoms/m}^2/\text{day}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ で $15 \mu\text{g atoms/m}^2/\text{day}$ 程度であることから、海底面積約 $13 \sim 16 \text{km}^2$ で 1 日の河川からの流入量に相当する溶存無機態の窒素・リンを溶出していることになる。広大な河口域の面積を考えると、溶出による供給がかなりのウエイトを占めていることを示している。しかし河川水の流入量は変動が大きいため、単純な計算によって求めたこれらの値が現場の状況をそのまま表しているとは言えない。また、他の河川、例えば熊本市など人口密集地を流れる白川、坪井川の河口域では状況が全く異なると考えるべきであろう。

今回調査した海域を発生源とした貧酸素化した水塊の痕跡は見られていない。しかし、最近の研究で、夏季の有明海湾奥部において発生しているのはたしかである。前述のように底層水の貧酸素化は、その水域の生物活動に大きく影響を及ぼす。これまでの

ところ夏場におけるタイラギの大量死との関係については、直接的なへい死の原因ではないとの見解に落ち着いている。しかし、貧酸素化した水塊に暴露されることで貝自体の抵抗力が低下することにより、間接的にへい死に関係していることも考えられることから、今後も議論する必要があるであろう。底泥からの栄養塩の溶出と赤潮発生との関係についても調べる必要がある。もし何らかの関係を見出せたならば、溶出速度の変化を赤潮発生予測の指標の一つとして用いることが出来るかもしれない。また栄養塩の溶出が、冬場の有明海における主要産業であるノリ生産にどの程度貢献しているのかについて明らかにする必要があるだろう。

今後はこれらに取り組み、本研究によって得られたデータが、漁家経営の安定と今後の水産業の発展に寄与できることを期待する。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、協力していただいた当センター調査船「あさみ」船長・門秀喜氏、調査員が足りないときに同行していただいた同「ひのくに」乗組員の皆様、サンプルの前処理、調査の準備等をしていただいた臨時職員の皆様に厚くお礼を申し上げます。

要 約

1. D04 3mg/L （水産用水基準の下限値）未満の水塊は 7 月 16 日に三池港沖で観測され始め、9 月 18 日まで継続した。
2. 底層 DO が 4.3mg/L を下回ると同時に底層の DIN 及び $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の上昇が見られたことから、底泥からの栄養塩溶出が促進されたことが伺われた。
3. D04 3mg/L 未満の水塊の南下は、潮汐差が縮小傾向にあるとき（小潮時あるいは小潮に向かうとき）は小さく、逆に潮汐差が拡大傾向にあるとき（大潮に向かうとき）に最も大きかった。
4. $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出速度は、地域差は大きいものの季節変化はほとんど見られないということがわかった。
5. 本県海域における水塊構造変化に伴う DO の水塊の水平及び鉛直方向の挙動がある程度明らかと

なった。また、底泥が栄養塩の供給源として重要な役割を果たしていることもわかった。

文 献

- 1) 木元克則・西内耕・岡村和麿. 有明海における溶存酸素分布. 月刊海洋. 2003 ; 35(4) : 261-265
- 2) 独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県. 平成 14 年度閉鎖性海域赤潮被害防止対策事業報告書 (有明海)
- 3) 神山孝吉・奥田節夫・河合章. 水域底泥中のアンモニア態窒素の分布と水中への溶出. 用水と排水. 1979 ; 21(3) : 285-291
- 4) 和田実・中島美和子・前田広人. 粘土散布による赤潮駆除. 水産学シリーズ 134 : 121-133
- 5) 小林節子. 湖沼底泥からのリンの溶出機構. 千葉県水質保全研究所資料. 1991 ; 55
- 6) Mortimer, C. H. : Chemical exchange between sediments and water in the Great lakes -Speculations on probable regulatory mechanisms-, *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 16. pp378-404. (1971)
- 7) 水産庁増殖推進部 (平成 13 年 7 月) 農林水産省有明海ノリ不作等対策関係調査検討委員会資料集 (1). Pp463-485.

2003年に八代海で発生した *Chattonella antiqua* の 発生状況の検討

黒木善之 吉村直晃 吉田雄一 小山長久

Studies on *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) in Yatushiro Sea
in 2003

Yoshiyuki Kuroki Naoaki Yoshimura Yuichi Yoshida and
Nagahisa Oyama

キーワード：赤潮、*Chattonella antiqua*、八代海

緒言

Chattonella antiqua (以下シャットネラ) は同属の *Chattonella marina* と共に 1969 年に広島湾で初めて発生して以来、現在まで西日本の沿岸海域に置いて被害を与え続けている。本県八代海においても、1989 年以降 6 件発生しており、そのうち 1990、1998、2002 年にはブリ、シマアジなどの漁業被害が報告されている。

2003 年 7 月及び 9 月に、天草上島周辺を中心とした八代海全域でシャットネラが、広範囲かつ濃密に発生した。本報では、その発生状況を報告するとともに、気象や海況との関係について 2002 年と比較検討した。

方法

赤潮の発生状況や海況については、6 月から 9 月にかけて、図 1 に示す 9 点を試験船「ひのくに」により定期的に調査した。測定項目は、水温、塩分、透明度、水色、溶存酸素量 (DO)、クロロフィル a 量、栄養塩 ($\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$)、プランクトン組成 (10 m 柱状採水) とした (表 1)。赤潮発生時には調査船「あさみ」及び「つぐみ」による臨時調査を行い、発生海域、赤潮生物種、細胞密度について調査した。

八代海の連続的な水温及び塩分データは、芦北郡田浦町沖に設置した自動観測装置を用いて海面下 0.5m 層を 1

時間毎に測定し、日平均算出したものを用いた。気象データは、熊本地方気象台の八代地点の観測結果を用いた。

これらの調査に加え、養殖業者から当センターに持ち込まれた海水の赤潮計数結果、御所浦町水産研究センター、熊本県養殖漁業協同組合、大道漁業協同組合、楠浦湾の魚類養殖業者による赤潮計数結果を用いた。

結果

気象 図 2 に 6 月から 9 月にかけての八代市における旬別平均気温の変化を示した。2003 年 6 月中旬及び 7 月中旬から 8 月中旬は、平年 (1979~2000) に比べて 0.2~1.2°C、2002 年に比べて 0.6~3.2°C 低めに推移した。

図 3 に 6 月から 9 月にかけての八代市における旬別降水量の変化を示した。2003 年は 6 月中旬及び 7 月中旬から 8 月中旬にかけて平年に比べて 43~101mm、2002 年に比べ 106~253mm 多めに推移した。

図 4 に 6 月から 9 月にかけての八代市における旬別の日照時間の変化を示した。2003 年は 6 月中旬から 8 月中旬にかけて 2002 年に比べ 3.0~72.0 時間少なめに推移し、平年を下回る期間が長かった。

また、2002 年 7 月 5 日から 6 日にかけて台風 5 号の影響により牛深で 49.5mm の降水量、18.0m/s の最大瞬間風速を観測し、2003 年 6 月 19 日には台風 6 号の接近により、

牛深で 24.6m/s の最大瞬間風速を観測した。

水温及び塩分の鉛直的な変化 図 5、6 に 2002 年 6 月 21 日から 10 月 1 日、2003 年 6 月 4 日から 9 月 18 日にかけて実施した定期調査の定点 6 及び定点 9 における水温、塩分の鉛直変化を示した。

水温について、定点 6 における 2002 年の表層水温は、7 月に 24.1~28.0°C、8 月に 26.7~28.0°C であり、2003 年の表層水温は 7 月が 23.5~26.6°C、8 月が 25.9~28.6°C であった。底層水温については、2002 年 7 月に 22.6~24.6°C、8 月に 25.2~26.1°C であったのに対し、2003 年 7 月には 22.1~22.5°C、8 月に 23.7~24.1°C であった。2002 年に比べて、2003 年は 6 月中旬から 8 月中旬にかけて全層で水温が低めに推移し、水温上昇も比較的緩やかであった。定点 9 でも同様の変化を示した。

塩分について、定点 6 で表層が 32psu を下回った期間を 2002 年と 2003 年で比較すると、2002 年が 7 月 2 日から 10 日及び 9 月 3 日であったのに対し、2003 年は 6 月 18 日から 9 月 18 日であり、2003 年は長期間低めに推移した。定点 9 でも同様の傾向であった。

栄養塩の鉛直的な変化 図 7~10 に 2002 年、2003 年の定点 6 及び S 定点 9 における DIN ($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$)、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ 、 $\text{DIN} / \text{PO}_4\text{-P}$ の鉛直変化を示した。

DIN は、定点 6 では 2002 年 7 月 10 日~9 月 12 日に全層で低めに推移したのに対し、2003 年には 6 月 26 日以降 10m より深い層で 2002 年よりも高めで、9 月 3 日には 10m 層までより高い値を示した。 $\text{PO}_4\text{-P}$ は、2003 年 9 月 3 日以外は、2003 年は 2002 年同様、底層に比べ 10m 以浅の層では低めに推移した。N/P 比は 2002 年 7 月 2 日、2003 年 7 月 23 日には表層から底層まで比較的高い値を示し、2003 年 7 月 23 日には表層で最大 36.5 と高い値を示した。DIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$ が高い値を示した時に、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ も比較的高い値を示した。定点 9 では、DIN と $\text{PO}_4\text{-P}$ の濃度の変化が 2002 年と 2003 年とでは大きな違いは見られなかったが、定点 6 と同様 DIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$ が高い値を示した時に、 $\text{SiO}_2\text{-Si}$ も比較的値を示した。

発生状況 図 11、12 に 2003 年 7 月及び 9 月のシャットネラの細胞密度の変化を示した。

6 月 24 日に葦北郡津奈木町沖、天草郡御所浦島周辺海域、本渡市楠浦湾でシャットネラが初認され、6 月 30 日に天草郡御所浦島周辺海域及び河浦町船津沖で本県の警報細胞数である海水 1mL あたり 10 細胞を超えた。7 月 2 日には本渡市楠浦湾で警報細胞密度を超え、7 月 4 日午後にはシャットネラによる赤潮が確認された。この頃 7 月 1 日~12 日にかけて八代海の葦北郡津奈木町沖及び天草郡御所浦島周辺の海域でアレキサンドリウム アフィネによる赤潮が発生し、シャットネラも本赤潮中に混在して

いた。天草郡大矢野島周辺では 7 月 7 日~8 日にかけて警報細胞密度を超えた。シャットネラの発生前には、6 月 23 日~30 日にかけて天草郡大矢野島周辺海域~天草上島東岸を中心とした八代海湾奥部でスケルトネマ コスタータム及びキートセロス属数種類による珪藻赤潮が発生していた。天草下島周辺については、6 月 30 日以降宮野河内湾、7 月 6 日以降牛深市久玉湾、7 月 18 日以降牛深市浅海湾で警報細胞密度を超えていたものの、天草上島周辺に比べると細胞密度は比較的少なめに推移した。ただし、7 月 21 日、22 日に宮野河内湾及び浅海湾で一時的に濃密化した。7 月 14 日頃から八代海全域でシャットネラが増加し、本種による赤潮が広範囲で確認された。7 月 23 日から天草郡御所浦島周辺海域で、7 月 24 日には天草下島周辺海域で減少傾向であったが、本渡市楠浦湾や大矢野島周辺海域~龍ヶ岳町鶴島沖の海域ではシャットネラが引き続き高密度に確認された。その後 7 月 28 日に八代海の全域でシャットネラがみられず、終息を確認した。

シャットネラの終息後、8 月中旬~下旬にかけて、大矢野島周辺の海域及び天草郡御所浦島周辺を中心に八代海でコックロディニウム ポリクリコイデスによる赤潮が確認された。

その後、9 月 10 日に天草郡御所浦島周辺でシャットネラが警報細胞密度を超え、9 月 16 日に天草上島東岸~天草下島東岸に掛けての広範囲で高密度に確認され、9 月 18 日、19 日には全域で終息を確認した。

2003 年 7 月 16 日に御所浦町水産研究センターが実施した天草郡御所浦町嵐口地区におけるシャットネラの鉛直的な動向を調査した査結果を図に示した。午前 5 時の調査では 10m 層までシャットネラが海水 1mL 当たり 10 細胞を超え、5m 層でも 174 細胞/mL 確認された。その後、午前中の調査では比較的まばらにシャットネラが確認されたが、13 時の調査では 2m 層で 519 細胞/mL 確認されるなど比較的表層付近で高密度に確認された。

考 察

これまで八代海の本県海域におけるシャットネラの発生は 7 月下旬から発生していたが、2003 年はそれより 1 ヶ月も早く発生した。

山口ら⁵⁾ (1991) が行った無菌培養株を用いた室内培養実験結果から、シャットネラは温度 15~30°C、塩分 10~35psu で増殖可能で、最大増殖速度を与える条件の組み合わせは 25°C と 25psu であることが明らかになっており、また、実際の海域の一例として播磨灘では、遊泳細胞が水温 19.2~28.8°C で確認されている(吉松、小野 1986)。シャットネラ赤潮は、水温上昇期及び高水温期における

比較的低塩分な海況を好むと考えられている。

2003年は2002年に比べ、6月～8月にかけて気温が約1℃低めに推移し、比較的多めの降雨による冷却もあり、水温は定点6及び定点9の全層で19.4～29.1℃の範囲で推移し、水温上昇も比較的緩やかであった。また降雨と河川水の流入によると考えられる塩分の低下が起こり、水深の約1/4～1/2より浅い層で、比較的低塩分の海況が長期間継続していたことが確認された。これらのことから、2003年は2002年に比べ、よりシャットネラの増殖に適した海況が長期間継続したことが、今回の高密度に発生した要因の一つではないかと考えられた。

珪藻などの赤潮が発生し、プランクトンにより栄養塩が消費されたと考えられ、2003年6月23日には表層近くのDINが0.4～1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{at}/\text{L}$ と低い値を示した。表層の栄養塩が低いと、珪藻などの植物プランクトンの増殖には適していなかったと考えられる。しかし、シャットネラは鉛直運動することが確認されており⁶⁾(渡辺ら1991)、比較的高濃度の底層の栄養塩を消費したことで、6月30日の発生以降、長期間連続して増殖、維持できたと考えられる。なお、1987年8月上旬に播磨灘でシャットネラが高密度に出現した際、DIN及び $\text{PO}_4\text{-P}$ が低濃度で、DIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$ が高くなっていることが報告されている¹⁾(小野ら1999)が、2003年6月下旬～7月上旬の八代海でも、同様にDIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$ が高い値を示していた。なお、同じような傾向が2002年にも2003年ほどではないが確認されていることから、今後シャットネラの発生及び高密度化とDIN/ $\text{PO}_4\text{-P}$ 比の関係について検討する必要があると考えられる。

シャットネラは、その生活環にシスト(休眠孢子)段階があり、海底のシストの分布は、赤潮発生を予察する指標になっている。山口・板倉ら(2002)によると八代海におけるシャットネラのシストは、湾奥部から御所浦島周辺東側の中部海域に限定されており⁴⁾、この海域を中心にモニタリングを行うことで、赤潮の初期発生を迅速かつ効率的に把握することができると考えられる。

なお、シストの発芽条件としては底層水温が20℃前後に達することが報告されており、シャットネラの初期発生の予知指標の一つとなりうると考えられている。

以上のことから、2003年八代海におけるシャットネラの発生について以下のことを推察した。シストは湾奥部から中央部にかけて分布している。6月19日に接近した台風により海水が攪拌され、シストが海底から巻き上げられた。その頃の水温や塩分は、21.6～24.7℃、21.0～33.5psuであり、増殖条件に適していたと考えられる。また、これ以前に発生していた珪藻赤潮やアレキサンドリ

ウム アフィネなどにより栄養塩は消費され、赤潮も終息していたことからシスト巻き上げ時期の競合種は殆どなかったと考えられた。7月5日から6日にかけて49.5mmの降水量により栄養塩が供給され、急激に増殖したものと考えられる。その後も断続的かつ長期間の降雨があり、海域ではシャットネラによる栄養塩消費を繰り返し、特に密度の低い表層で栄養塩が低下したときでも、鉛直運動により下層の栄養塩を利用して増殖又は維持したものと考えられる。珪藻などは一般に鉛直運動はせず、栄養塩不足により増殖できなかったため、競合種が殆どなかったこともシャットネラが長期間発生した理由の一つであると考えられた。ただし、シャットネラの初期発生については、巻き上げによる底層からの鉛直的なシャットネラの供給だけでなく、他海域からの水平的な加入もあったと考えられる。このため、シストの動向を追跡する鉛直的なモニタリングだけでなく、水平的な広範囲のモニタリングも引き続き必要であると考えられる。

シャットネラの増殖速度は、好適環境条件下においても1分裂/日であるため⁵⁾(山口ら1991)、増殖に適した海況が長期間形成されたとしても、赤潮化するには時間がかかるため、2003年のように短期間で赤潮化する要因としては、鉛直運動の他、潮流や潮汐、風などによる集積についても今後より検討する必要がある。

シャットネラは赤潮を形成しないような低密度でも漁業被害を引き起こした報告³⁾もあるため赤潮化する前段階まで、すなわち着色しないときのプランクトンをモニタリングすることも重要である。

要約

1. シャットネラは、2003年6月30日に天草郡御所浦島周辺海域及び宮野河内湾で本県の警報細胞数を超えた後、大矢野島周辺の八代海湾奥部から牛深市沖にかけて広範囲で確認及び赤潮化した後、7月28日まで確認された。その後、9月10日に天草郡御所浦島周辺海域でシャットネラが本県の警報細胞数を超え、天草上島東側から天草下島東側の広い範囲で赤潮化した後、9月19日に終息が確認された。
2. 2003年の気象・海況はシャットネラが八代海全域で比較的低密度に発生した2002年に比べ、6月～8月にかけて気温が約1℃低め、降水量が約2倍であったことから、現場海域では水温が低めで水温上昇も比較的緩やかに推移し、塩分は10m以浅の層で比較的長期間低めに推移した。
3. 2002年に比べ、2003年は、6月から8月にかけて水温が低めに安定し、低塩分の海況が長期間形成され、

過去の発生で八代海の湾奥部から中部を中心とした海域の底泥に蓄積されたシストが発芽した後、遊泳細胞が生残、増殖に適していたと考えられる。

4. 今後の対応

- ・シャットネラのシストが多いと報告された八代海湾奥部から中部海域を中心に鉛直的なプランクトンモニタリングを実施すると共に、広い範囲で水平的な分布についてもモニタリングする必要がある。
- ・今回検討した水質、気象データに加え、風、潮流及び潮汐についてのデータも検討することで、濃密化及び終息・消失した要因についても検討する必要がある。

文 献

- 1) 小野知足, 吉松定昭, 吉田陽一: 播磨灘南西域における *Chattonella antiqua* の高密度発生と水質、気象要因等との関係, Nippon Suisan Gakkaishi, 65(4), 665-672(1999)
- 2) 今井一郎: ラフィド藻赤潮の発生機構と予知, 有害・有毒赤潮の発生と予知・防除 (石田優三郎, 本城凡夫, 福代康夫, 今井一郎編), 水産研究叢書 48, (社) 日本水産資源保護協会, 29-70(2000)
- 3) 水産庁九州漁業調整事務所: 平成元-14年九州海域の赤潮, (1990-2004)
- 4) 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: 赤潮プランクトンのシスト調査、赤潮の発生機構解明, 平成14年度閉鎖性赤潮海域被害防止対策事業 (八代海、鹿児島湾) 報告書, 3-7 (2003)
- 5) 山口峰生, 今井一郎, 本城凡夫: 有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* と *C. marina* の増殖速度に及ぼす水温、塩分および光影響の影響, Nippon Suisan Gakkaishi, 57(7), 1277-1284(1991)
- 6) Watanabe, M.M., Y.Nakamura and K. Kohata: Diel vertical migration and nocturnal uptake of nutrients by *Chattonella antique* under stable stratification, Limnol. Oceanogr., 36, 593-602(1991)

表-3 調査項目および測定方法

| 調査項目 | 測定方法 | 使用機器 |
|---------|------------------------------|------------------------------------|
| 水温 | 白金測温抵抗体 | メモリークロロテック モデル ALC208(アレック電子株式会社製) |
| 塩分 | 電磁誘導型セル | メモリークロロテック モデル ALC208(アレック電子株式会社製) |
| クロロフィル | 蛍光強度測定法 | メモリークロロテック モデル ALC208(アレック電子株式会社製) |
| 濁度 | 赤外後方散乱式 | メモリークロロテック モデル ALC208(アレック電子株式会社製) |
| 透明度 | セッキー板法 | セッキー板 |
| NH4-N | インドフェノール青法 | TRAACS 2000(ブラン・ルーベ株式会社製) |
| NO2-N | ジアゾ化法 | TRAACS 2000(ブラン・ルーベ株式会社製) |
| NO3-N | Cd-Cuカラム還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法 | TRAACS 2000(ブラン・ルーベ株式会社製) |
| PO4-P | モリブデン青法 | TRAACS 2000(ブラン・ルーベ株式会社製) |
| SiO2-Si | モリブデン青法 | TRAACS 2000(ブラン・ルーベ株式会社製) |



図1 調査定点

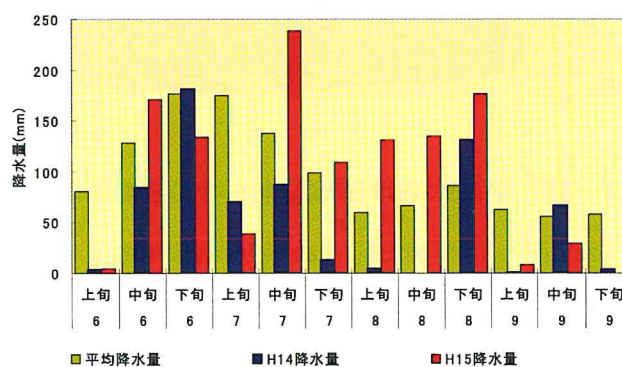


図3 降水量の変化

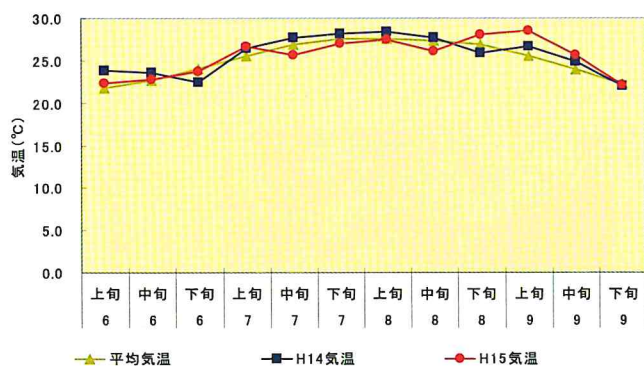


図2 気温の変化

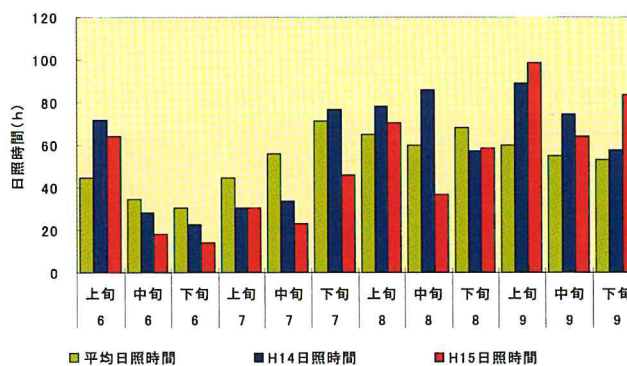


図4 日照時間の変化

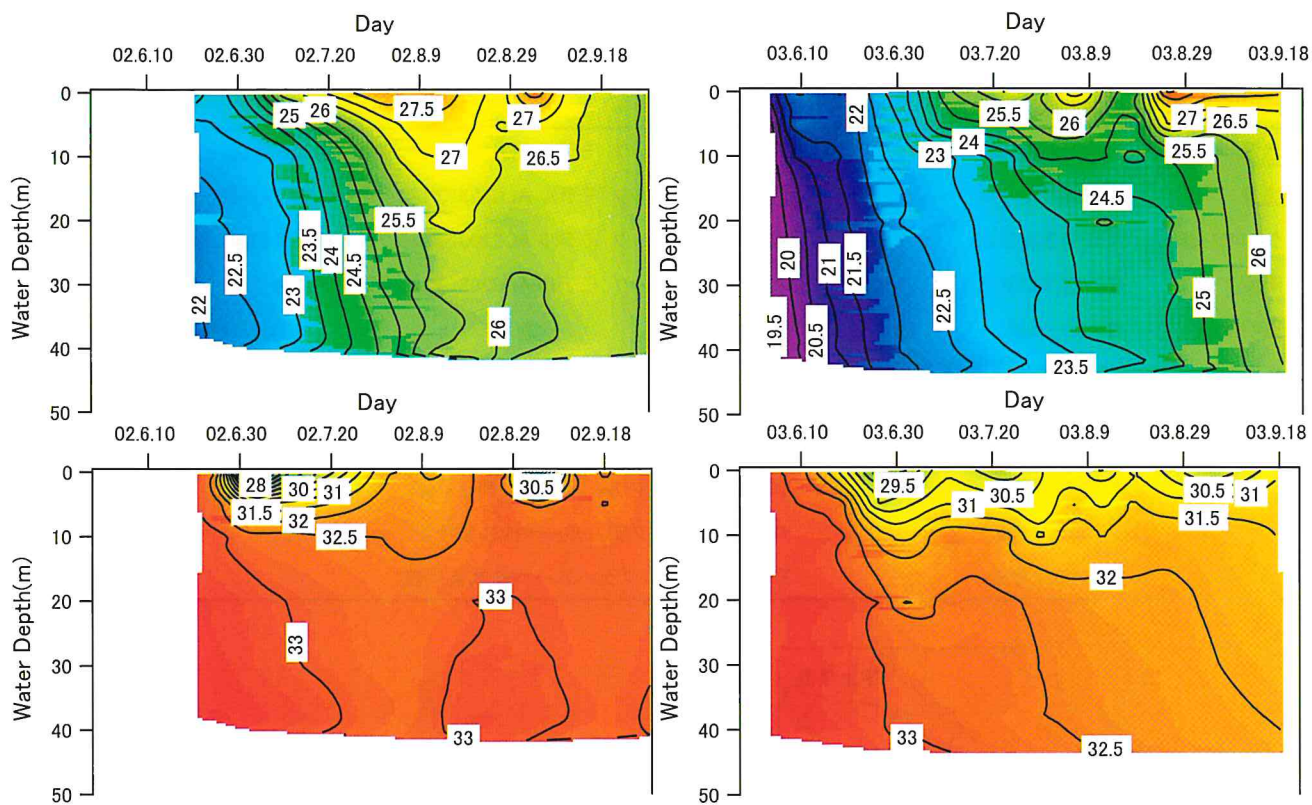


図5 定点6における水温、塩分の鉛直変化(上段:水温-下段:塩分、左側:2002年-右側:2003年)

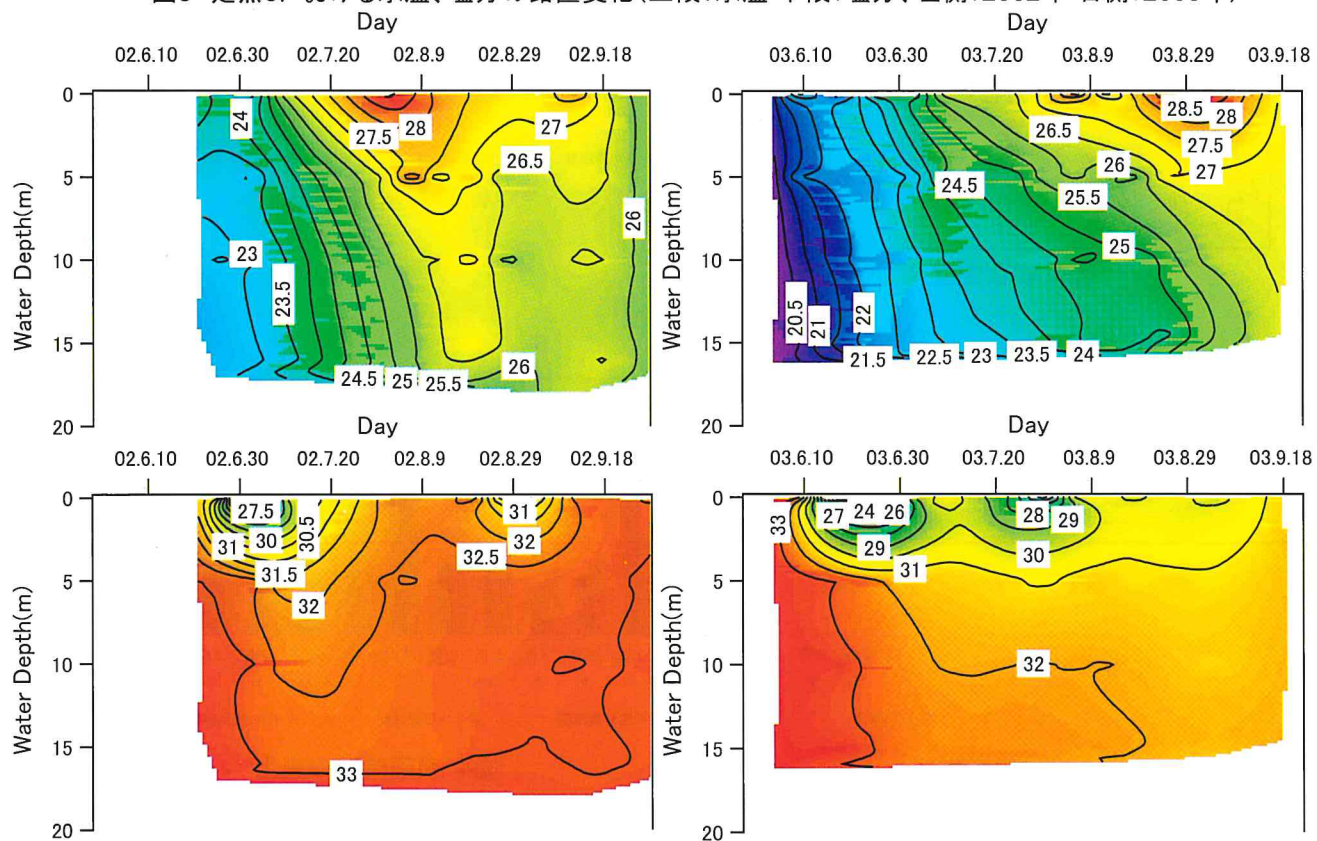


図6 定点9における水温、塩分の鉛直変化(上段:水温-下段:塩分、左側:2002年-右側:2003年)

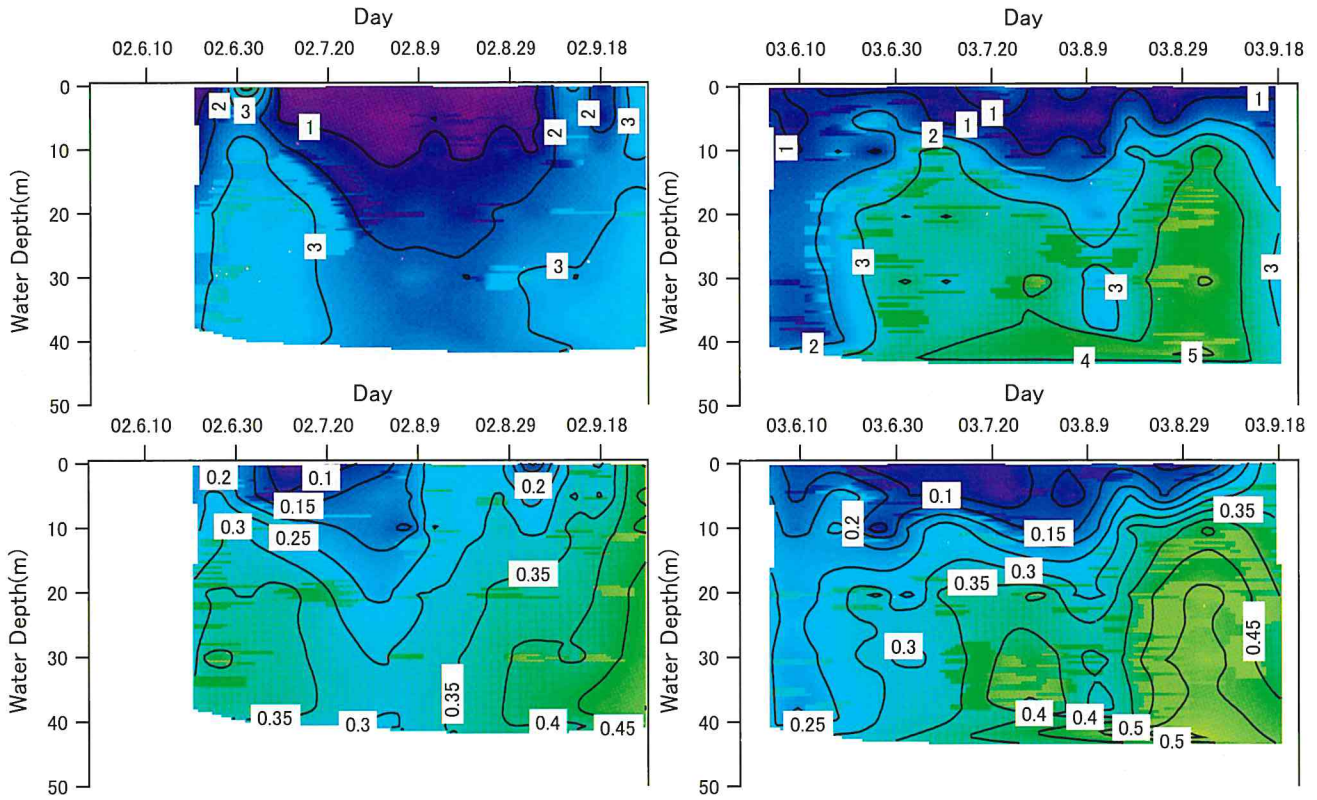


図7 定点6におけるDIN、PO4-Pの鉛直変化(上段: DIN -下段: PO4-P、左側:2002年-右側:2003年)

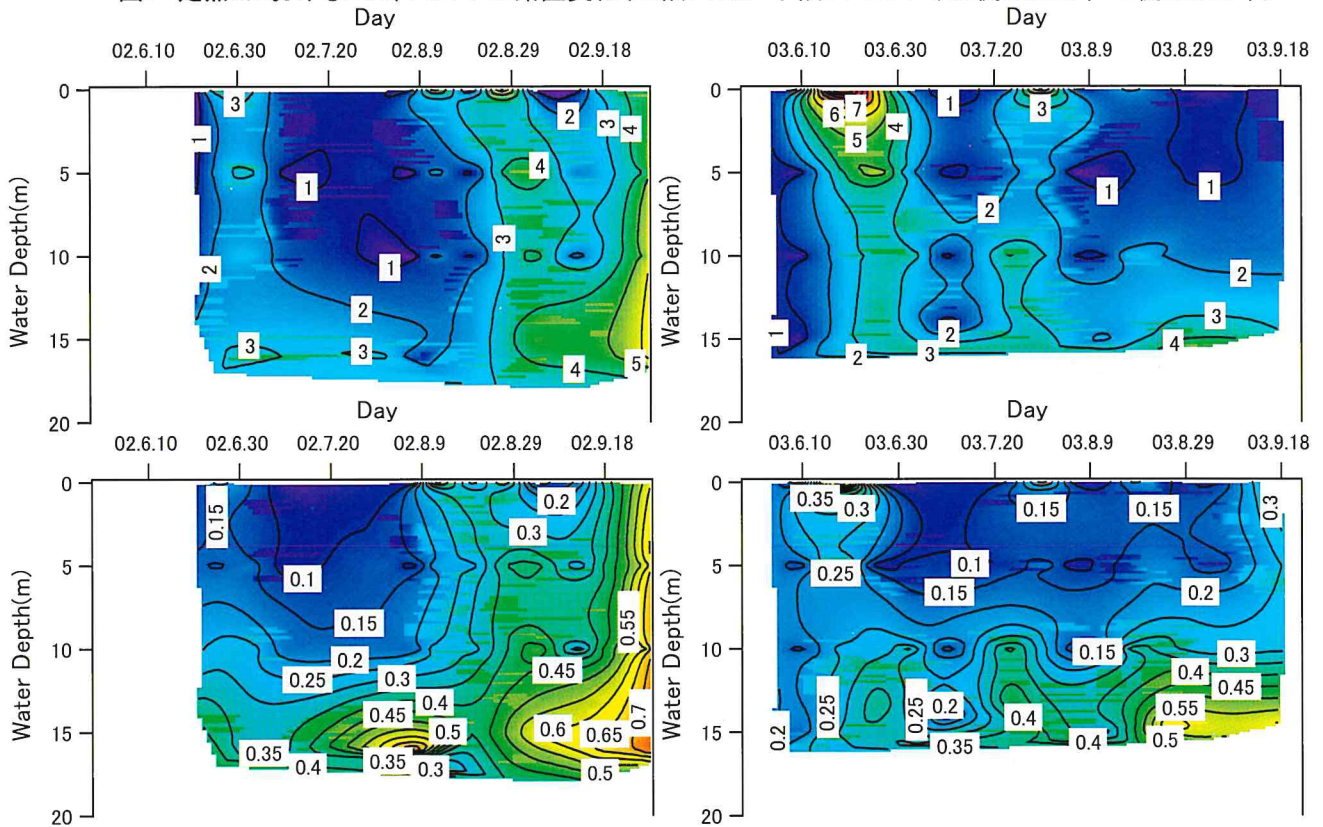


図8 定点9におけるDIN、PO4-Pの鉛直変化(上段: DIN -下段: PO4-P、左側:2002年-右側:2003年)

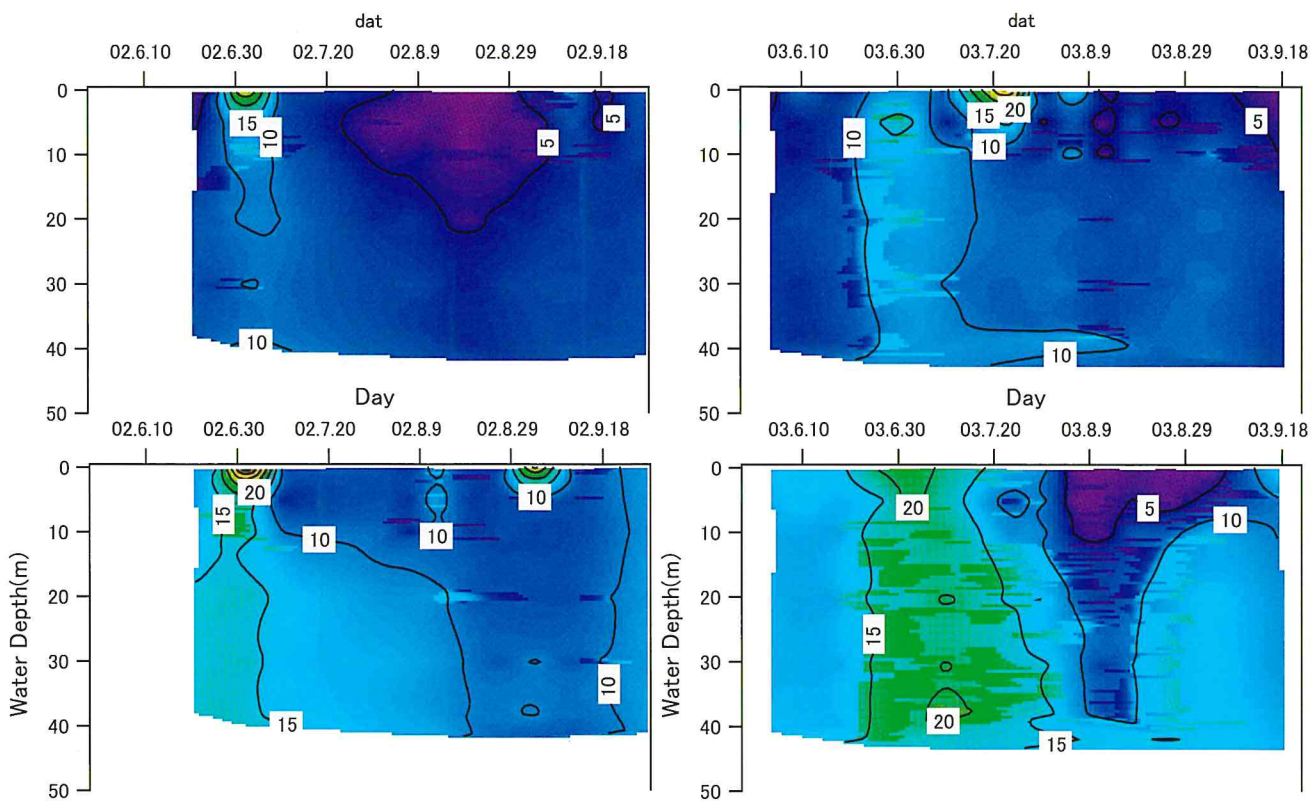


図9 定点6におけるDIN/PO4-P、SiO2-Siの鉛直変化(上段: DIN/PO4-P-下段: SiO2-Si、左側: 2002年-右側: 2003年)

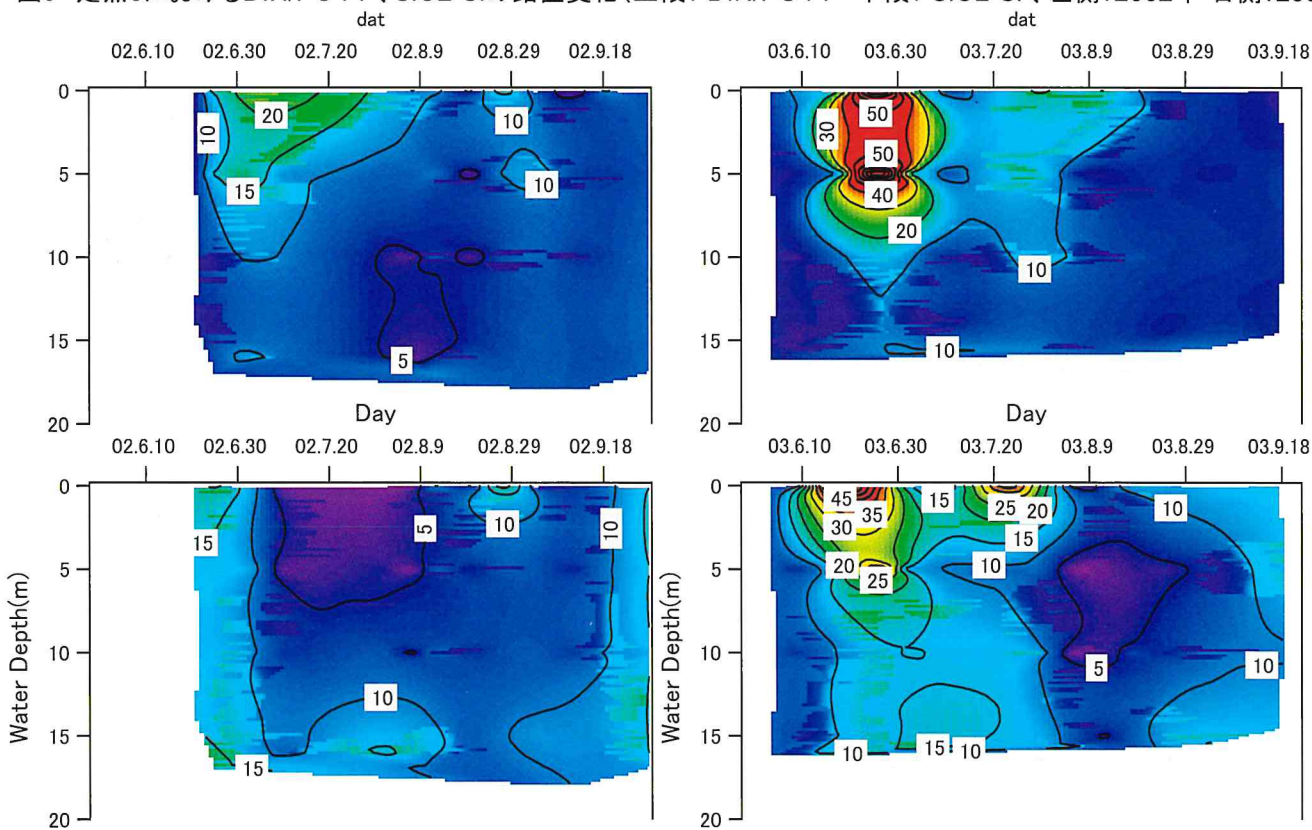


図10 定点9におけるDIN/PO4-P、SiO2-Siの鉛直変化(上段: DIN/PO4-P-下段: SiO2-Si、左側: 2002年-右側: 2003年)

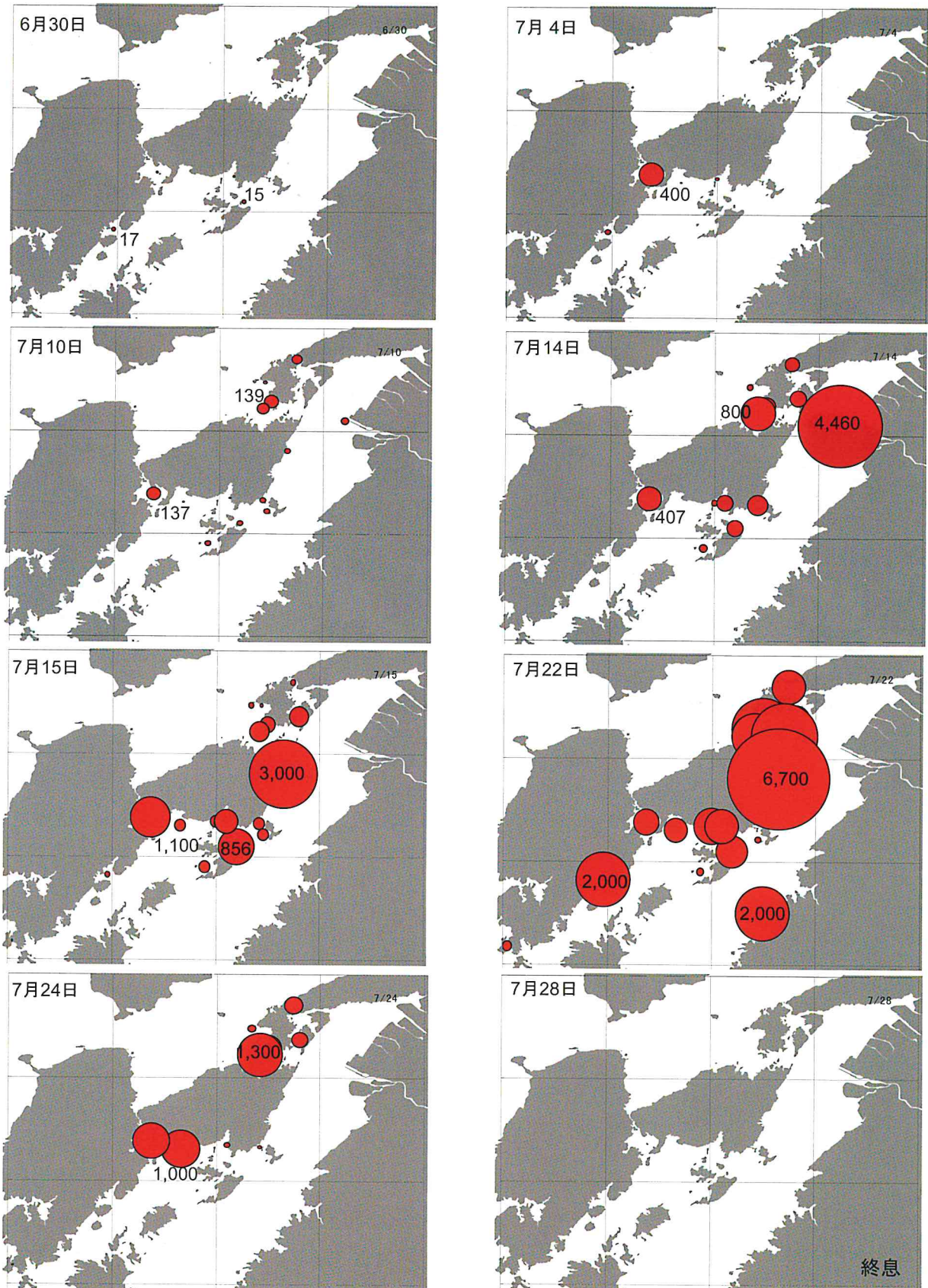


図11 6月30日～7月28日のシャットネラの細胞密度の変化
 (図中のバブルの大きさは細胞密度の度合い、数字は細胞密度[細胞/ml]を示す。)

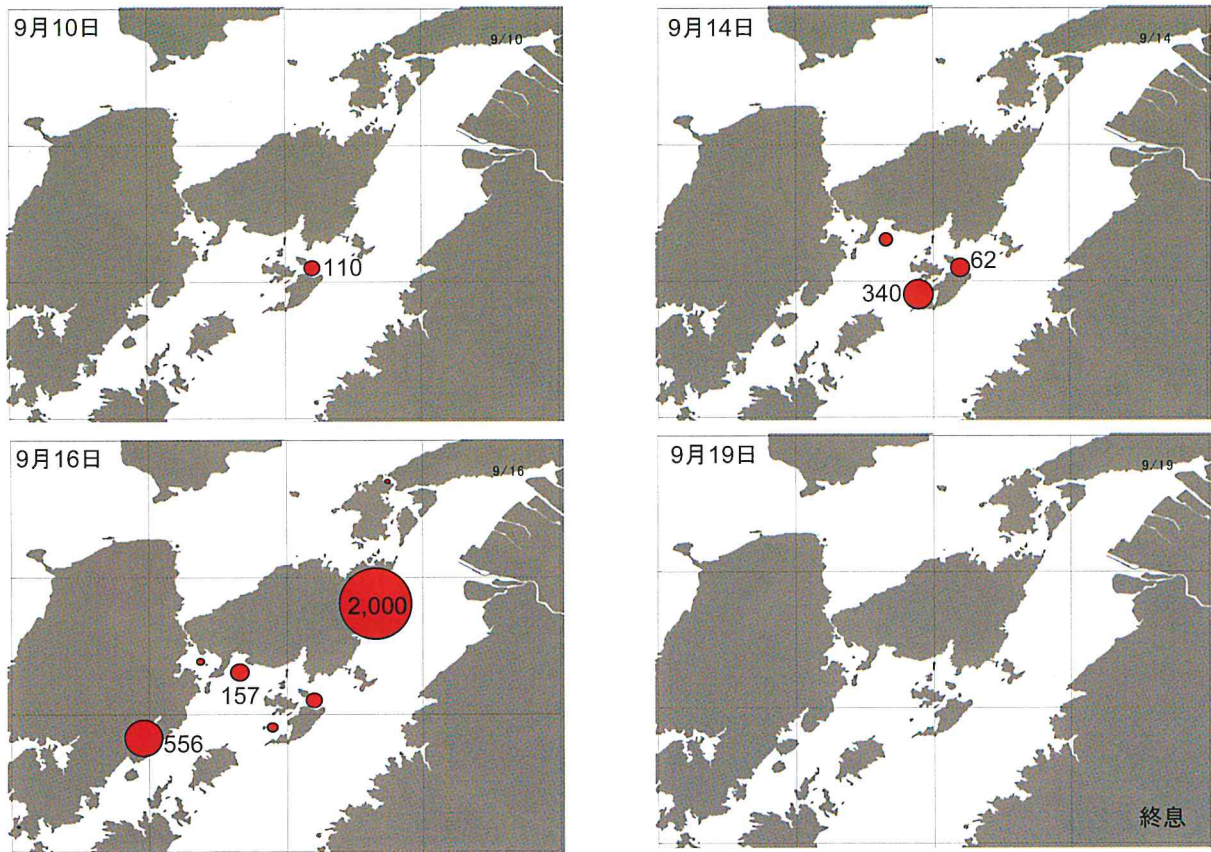


図12 9月10日～9月19日のシャットネラの細胞密度の変化
 (図中のバブルの大きさは細胞密度の度合い、数字は細胞密度[細胞/ml]を示す。)

2003年に八代海で発生した *Chattonella antiqua* の 有害性の検討

黒木善之 吉村直晃 吉田雄一 小山長久 木村武志

Studies on harmful effect of *Chattonella antiqua*

(Raphidophyceae) in Yatushiro Sea in 2003

Yoshiyuki Kuroki Naoaki Yoshimura Yuichi Yoshida Nagahisa Oyama and
Takeshi Kimura

キーワード：赤潮、*Chattonella antiqua*、八代海

緒 言

Chattonella antiqua (以下シャットネラ) は1969年に広島湾で初めて発生して以来、現在まで西日本の沿岸海域において被害を与え続けている。特に1972年には播磨灘で養殖ハマチ1,400万尾がシャットネラによる赤潮で斃死し、被害額71億円を超える漁業被害が発生したことは有名である。

1989年以降八代海の熊本県海域で発生した6件のうち、1990、1998、2002年にはブリ、シマアジなどに漁業被害を与えている。2003年の発生時にもブリ、トラフグなどで約3億円の漁業被害が報告されている。

漁業被害が発生した時の最大細胞数は、海水1mlあたり数百から数千細胞という報告が多いものの、1988年に鹿児島県東町で養殖ブリの被害が発生したときは海水1mlあたり41細胞、2000年に熊本県大矢野町で養殖シマアジの被害が出たときには海水1mlあたり39細胞という報告¹⁾もあり、シャットネラの有害性についての報告には大きなバラツキがある。

そこで今回、シャットネラの有害性を検討するために、ブリ稚魚、トラフグ稚魚及びクルマエビの稚エビを用いてシャットネラの赤潮海水による曝露試験を行った。

材料及び方法

ブリ稚魚の曝露試験 1) 供試魚には平均尾叉長18.1cm、平均魚体重84.6gのEP飼料を給餌後1時間経過したブリ稚魚を用いた。

2003年7月23日に天草郡大矢野島周辺海域で採取したシャットネラの赤潮海水(25,000細胞/ml)を実験室に持ち帰り、濾過海水を用いて、細胞密度が海水1mlあたり3,600細胞、1,800細胞、500細胞、130細胞になるように段階的に希釈した4つの試験区とした。濾過海水のみの区を対照区とした。ただし、500細胞/ml区、130細胞/ml区については、開始時のシャットネラの細胞密度を、それぞれ5,000細胞/ml、1,000細胞/mlに設定したが、供試魚投入後にシャットネラの細胞がフロック状になってしまったので、試験終了時の遊泳細胞密度を試験区として報告する。

供試尾数は、各区5尾とし、これを30Lパンライト水槽に入れ、通気を十分しながら、水温、DO(溶存酸素量)、pH、死亡数を計測した。

ブリ稚魚の曝露試験 2：餌止め効果の検討) 供試魚として平均尾叉長18.1cm、平均魚体重84.6gのEP給餌食後のものと、24時間絶食させたものと2種のブリ稚魚を用いた。

2003年7月23日に天草郡大矢野町周辺海域で採取したシャットネラの赤潮海水(25,000細胞/ml)を実験室に持ち帰り、濾過海水を用いて、細胞密度が海水1mlあたり500細胞、100細胞になるように段階的に希釈し、前述の供試魚を入れ、計4つの試験区を設定した。

供試尾数は、各区4尾とし、これを30Lパンライト水槽に入れ、通気を十分しながら、水温、DO(溶存酸素量)、pH、死亡数を計測した。

トラフグ稚魚の曝露試験 供試魚として平均体長 5.4cm、平均魚体重 5.3g のトラフグ稚魚を用いた。

2003 年 7 月 16 日に天草郡松島町阿村のエビ生け簀で採取したシャットネラの赤潮海水(3,000 細胞/ml)を濾過海水を用いて、細胞密度が海水 1ml あたり 3,000 細胞、1,000 細胞、300 細胞になるように段階的に希釈した 4 つの試験区と、濾過海水のみの対照区を設定した。

赤潮海水及び濾過海水を入れた 8L 水槽に供試魚を各区 3 尾ずつ収容した。実験中通気を十分に施し、試験終了まで細胞数、水温、pH、死亡数を計測した。

クルマエビの稚エビの曝露試験 供試魚として平均体長 5.0cm の 24 時間絶食したクルマエビの稚エビを用いた。

2003 年 7 月 23 日に天草郡大矢野町周辺海域で採取されたシャットネラの赤潮海水(25,000 細胞/ml)を濾過海水を用いて、細胞密度が海水 1ml あたり 20,000 細胞、10,000 細胞、5,000 細胞、2,000 細胞、1,000 細胞、500 細胞になるように段階的に希釈した 6 つの試験区と、濾過海水のみの対照区を設定した。

供試尾数は、各区 5 尾とし、これを 8L アクリル水槽に入れ、通気を十分しながら、水温、DO (溶存酸素量)、pH、死亡数を計測した。

結果及び考察

ブリ稚魚の曝露試験 1 表 1 及び図 1 に試験中の水温、DO、pH 及びへい死状況について示す。

各区の死亡尾数は、3,600 細胞/ml 区では曝露後 11 分後に 1 尾、13 分後に 1 尾、18 分後には全てのブリ稚魚が死亡した。1,800 細胞/ml 区では曝露後 19 分後に 1 尾、27 分後に 1 尾、30 分後には全てのブリ稚魚が死亡した。500 細胞/ml 区では曝露後 30 分後に 1 尾、1 時間後に全てのブリ稚魚が死亡した。

平成 4 年度に長崎県水産試験場が実施した曝露試験では、ハマチ当歳魚(平均尾叉長 19.6cm、平均体重 93g)は 400 細胞/ml の曝露後 8 時間で供試魚が全て死亡し、200 細胞/ml 区でも曝露後 29 時間後に 60% の供試魚が死亡している。今回 500 細胞/ml でも 1 時間で死亡が見られていることから、これより低密度でも長時間曝露させることで、供試魚が死亡する可能性が十分考えられた。

死亡魚は全て鰓蓋を開いたまま死亡したが、DO の最低値を観測した対照区ではモジャコの死亡は確認されなかったため、これらの死亡原因が環境水中の酸素欠乏によるとは考えられない。よって、今回のブリ稚魚

の死亡はシャットネラの影響によるものだと考えられ、少なくとも 500 細胞/ml でブリ稚魚を 1 時間以内に死亡させる有害性があると考えられる。

ブリ稚魚の曝露試験 2 : 餌止め効果の検討

表 2 及び図 2 に試験中の水温、DO、pH 及びへい死状況について示す。

各区の死亡尾数は、500 細胞/ml 区では、給餌直後のブリ稚魚は、64 分後、66 分後、72 分後、88 分後、93 分後に 1 尾ずつ死亡した。24 時間絶食したブリ稚魚は、68 分後に 1 尾死亡し、以後試験終了の 1.5 時間後まで死亡しなかった。100 細胞/ml 区では、給餌直後のブリ稚魚及び 24 時間絶食したブリ稚魚とも試験終了まで死亡や嘔吐は確認されなかった。500 細胞/ml 区、100 細胞/ml 区とも給餌直後のモジャコは、ともに赤潮海水への曝露直後、EP 飼料を嘔吐したが、DO 及び pH の値から嘔吐した餌による水質悪化の影響は低いと考えられる。

以上の結果から、ブリ稚魚への影響が考えられる 500 細胞/ml 区では、給餌直後のブリ稚魚と 24 時間絶食のブリ稚魚とで、シャットネラの有害性に対する耐性が異なることが示唆され、24 時間の絶食・餌止めはシャットネラによる被害を軽減させる効果があると考えられた。

トラフグ稚魚の曝露試験

表 3 及び図 3 に試験中の水温、pH 及びへい死状況について示す。

各区の死亡尾数について見てみると、3,000 細胞/ml 区では 3 時間後に 1 尾、5 時間後には全て死亡した。1,000 細胞/ml 区、300 細胞/ml 区では試験終了の 9 時間後まで死亡は確認されなかった。また、試験中に水温及び pH の急激な変化が見られなかったことから、今回のトラフグ稚魚の死亡はシャットネラによるものと考えられた。3,000 細胞/ml 以上のシャットネラ赤潮はトラフグ稚魚を短時間で死亡させたが、1,000 細胞/ml 区及び 300 細胞/ml 区では長時間死亡しなかったものの、遊泳異常が確認され、低密度であっても長時間曝露された場合、魚体へのダメージによりその後の成長に何らかの影響が懸念された。

クルマエビの稚エビの曝露試験

表 4 及び図 4 に試験中の水温、pH 及びへい死状況について示す。

各区の死亡尾数について見てみると、20,000 細胞/ml 区では 1 時間後に 1 尾、2 時間後に 1 尾、3 時間後に 2 尾、4 時間後には全ての稚エビが死亡した。10,000 細胞/ml 区では 1 時間後に 2 尾、2 時間後に 1 尾、3 時間後に 1 尾、4 時間後には全ての稚エビが死亡した。

5,000 細胞/ml 区では、4 時間後に 1 尾、7 時間後に 3 尾、19 時間後には全ての稚エビが死亡した。2,000 細胞/ml 区では、6 時間後に 1 尾、24 時間後に 3 尾の稚エビが死亡した。1,000 細胞/ml 区では、24 時間後に 1 尾死亡した。500 細胞/ml では稚エビの死亡は確認されなかった。

試験中に急激な水温及び pH の変化がなく水産用水基準で定められた範囲内であったことから、死亡の原因はシャットネラであり、2,000 細胞/ml 以上で 24 時間以内に死亡させる高い致死能力を有していることが確認された。

総合考察

今回、ブリ稚魚、トラフグ稚魚及びクルマエビの稚エビを用いて、大矢野町及び松島町周辺海域で発生したシャットネラの有害性を検討したところ、シャットネラは 3 種全てを死亡させる、極めて有害なプランクトンであることがわかった。

シャットネラによる最低致死細胞密度及び曝露時間の組み合わせは、ブリ稚魚に対して 500 細胞/ml で 1 時間、トラフグ稚魚に対して 3,000 細胞/ml で 5 時間、クルマエビの稚エビに対して 2,000 細胞/ml で 24 時間であった。

今回の魚種のうち、ブリ稚魚は他の魚種より低密度で死亡しており、シャットネラ耐性が最も低かった。

長崎県水産試験場が実施した曝露試験では、当歳魚（平均尾叉長 19.6cm）に比べ 1 歳魚（平均尾叉長 32.9cm）は異常遊泳や斃死の弊害を受けやすいことが報告されている⁵⁾。本県でも現場ではブリ稚魚より大型のブリの方がシャットネラに対しては耐性が低い。この理由については、十分に解明されておらず、今後、生態的・生理的な特性を明らかにし、被害の大きいブリへ被害を軽減する可能性について、検討する必要がある。

シャットネラによる魚類斃死作用については、窒息死によるものという点では共通の意見があり、曝露による鰓表面の形態の変化が報告されている。その作用因子として、シャットネラに含まれる高度不飽和脂肪酸¹⁾ やリポ多糖類³⁾、シャットネラが産生する活性酸素（小田、石松ら²⁾）によって鰓表面が損傷を受けることが報告されている。また、小田、石松らはシャットネラの持つ活性酸素産生能が、超音波処理で破壊した細胞や死細胞では有害性を示さないことや、活性酸素産生能が著しく低いシャットネラの培養株はブリに対する毒性も低いことを確認している²⁾。

今回モジャコを用いた曝露試験結果から、少なくとも

も 24 時間以上の絶食によってシャットネラによる被害が軽減されることが確認され、今後も赤潮被害防除策の一つとして指導していくと共に、その効果の機構について解明していかなければならない。

要約

1. 今回大矢野町及び松島町周辺で発生したシャットネラはブリ稚魚、トラフグ稚魚及びクルマエビの稚エビに対して極めて有害な赤潮原因プランクトンであった。
2. 3 魚種を死亡させるシャットネラの細胞密度と曝露時間は少なくとも、モジャコに対して 500 細胞/ml で 1 時間、トラフグ稚魚に対して 3,000 細胞/ml で 5 時間、クルマエビの稚エビに対しては 2,000 細胞/ml で 24 時間が必要であった。
3. ブリ稚魚は、少なくとも 24 時間以上の絶食によって、シャットネラによる被害を軽減することができるかと推察された。

文献

- 1) 岡市友利, 鷹野洋: 赤潮生物による魚類のへい死, 魚毒成分の検討, 昭和 57 年度赤潮対策技術開発試験報告書 (7) 魚類のへい死防止に対する技術開発試験, 香川県水産試験場, 41-46 (1983)
- 2) 小田達也, 石松淳: 赤潮プランクトン、シャットネラによる活性酸素産生と毒性発現機構 (別刷), マリンバイオテクノロジー研究会報, 8(1)
- 3) 鹿児島大学: 昭和 60 年度赤潮対策技術開発試験報告書, 4-漁場環境保全技術開発総合試験, (1) 内湾における漁場環境の総合的保全技術の開発 (D), 24-29 (1986)
- 4) 水産庁九州漁業調整事務所: 平成元-14 年九州海域の赤潮, (1990-2004)
- 5) 長崎県水産試験場: 平成 4 年度長崎県水産試験場事業報告書, 134-178 (1994)

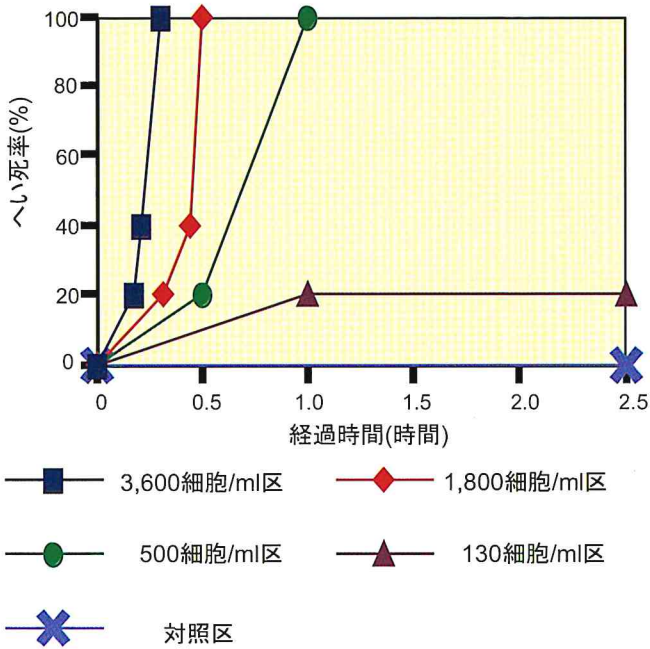


図1：モジャコの曝露試験1におけるへい死率の変化

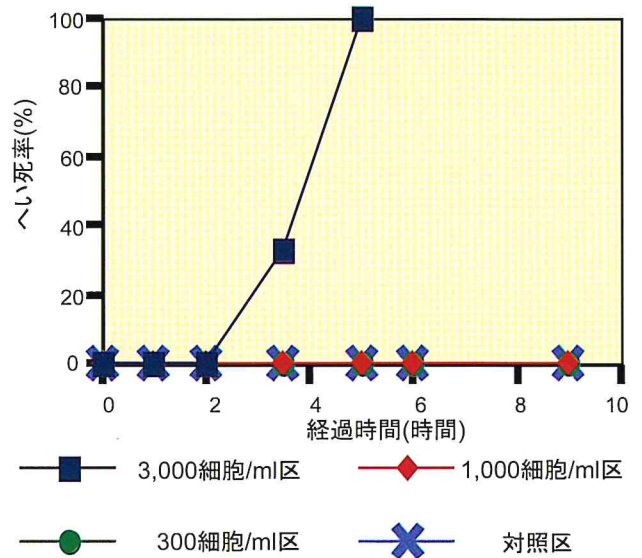


図3：トラフグ稚魚の曝露試験におけるへい死率の変化

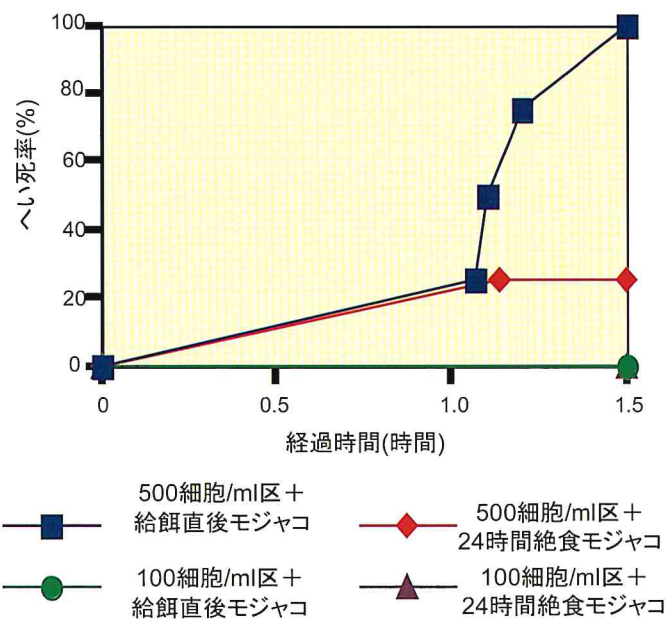


図2：モジャコの曝露試験2におけるへい死率の変化

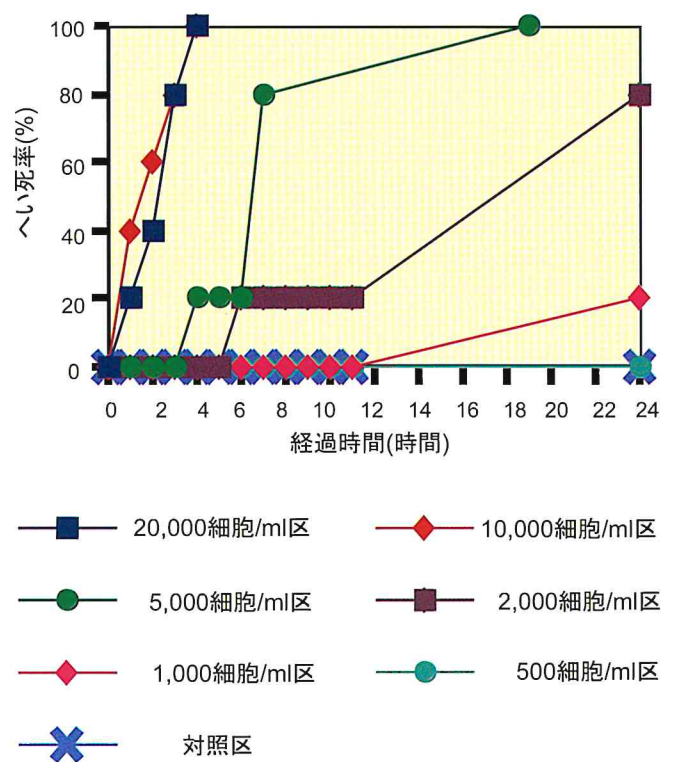


図4：クルマエビの稚エビの曝露試験におけるへい死率の変化

Antioxidative Substances in Brown Algae and Their Antimicrobial Activity

Koki Nagayama

褐藻中の抗酸化性物質とそれらの抗微生物活性

長山公紀

キーワード：海藻、抗酸化性物質、クロメ、ポリフェノール、フロロタンニン

Abbreviation

BHA: 2[3]-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole
BHI: brain heart infusion
BHIA: BHI agar
BHT: 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol
BHQ: *tert*-butylhydroquinone
CFU (cfu): colony-forming unit
COLOC: long-range shift correlation spectra
EGCG: epigallocatechin gallate
EIMS: electron impact mass spectra
FABMS: fast atom bombardment mass spectra
GLC: gas liquid chromatography
HPLC: high performance liquid chromatography
ICR: institute of cancer research
MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MBC: minimum bactericidal concentration
NMR: nuclear magnetic resonance
ODTA: 6Z, 9Z, 12Z, 15Z-octadecatetraenoic acid
PBS: phosphate-buffered saline
StB: sensitivity test broth
TCBS: thiosulfate citrate bile saccharose
TLC: thin-layer chromatography
Toc: tocopherol
UV: ultraviolet

Chapter 1. General Introduction

Algae have long been recognized as very important marine bioresources for use as both food products and animal feeds, and for their mineral or polysaccharide contents (Gregorio, 1972; Nishiide, 1993; Jensen, 1998). In Japan, some species of algae; wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (*Laminaria* spp.), hiziki (*Hizikia fujiiformis*) and nori (*Porphyra* spp.), are very popular foods and they are consumed on a daily basis (Sato *et al.*, 1976; Iwaki *et al.*, 1983; Ohno *et al.*, 1998). Algal polysaccharides, such as fucoidan, alginic acid, carraginnan etc. are utilized as drink and food additives of functional foods, and antitumor activity of fucoidan and its oligomers has also been reported (Yamamoto *et al.*, 1981; Chida *et al.*, 1987; Zhuang *et al.*, 1995). Furthermore, in some regions of Japan, a new project of the farming of algae, such as *Ulva*, *Laminaria* or *Ecklonia* spp. is now under investigation (Hirata, 1999; Maruyama, 1999). The algae are expected to purify the polluted seawater around fish nursery ground by absorbing nutrients. However, many kinds of and large masses of algae, which are barely utilized, are still distributed throughout the littoral zone of Japan and in spite of much research, very few of the biologically active substances in algae are currently being utilized. Two of the possible reasons for this are insufficient research into all the effective activities of algal substances, and lack of steady supply of the alga itself.

To promote the utilization of algae, the biological

activities of algae have been increasingly studied, especially during the last few decades (Fukuyama *et al.*, 1985; Kakizawa *et al.*, 1988; Nishibori *et al.*, 1988; Horikawa *et al.*, 1999). One of the most promising targets could be their antioxidative activity. Although some kinds of synthetic or natural antioxidants are already being used to prevent the autoxidation of lipids, the development of more effective and/or economical antioxidants is anticipated. Moreover, there are some questions concerning the safety of the synthetic antioxidants currently in use. For example, Ito *et al.* (1985) discussed the possible carcinogenicity of BHA and BHT. Accordingly, there have been many studies which have investigated natural antioxidative substances (McLaughlin *et al.*, 1979; Miyashita *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 2002). In addition, the roles of antioxidative substances *in vivo* have recently been attracting special interest; free radicals are now thought to cause several diseases, such as cancer, ischemic heart disease and brain disease (Yang *et al.*, 1989; Peterson *et al.*, 1990; Luo *et al.*, 1995). The results of these studies suggest that antioxidative substances are useful for maintaining good health or for medical use. Several kinds of terrestrial plant extracts, tocopherols, carotenoids, catechins and other polyphenols are known to be as such antioxidative substances and some of them are used today. However, the number of reports which discuss the antioxidative substances present in algae is extremely small when compared with those dealing with terrestrial plants. Furthermore, none of the substances in algae are currently used for their antioxidative activity. Ando *et al.* (1968) first reported the presence of phospholipids as an antioxidative substance in algae. Nishibori *et al.* (1988) identified pheophytin a as an antioxidative substance, which has the same structure as that of porphyrin in chlorophyll, in the lipid of Aonori (*Enteromorpha* sp.).

Another target, antimicrobial activity may also be promising. Infections caused by pathogenic bacteria, e.g. food-borne illnesses, are still major problems throughout the world today (Giessen *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1997; Takeda, 1997). To prevent and to treat these illnesses, synthetic or natural antibiotics or antibacterial substances have been used. However, under certain circumstances, natural antibiotics are

preferred over synthetic antibiotics for the reasons explained above in the discussion of antioxidants. Hence, many researchers have been studying the antimicrobial effects of various substances in plant extracts (Caccamese *et al.*, 1981; Burapadaja *et al.*, 1995; Bennamara *et al.*, 1999; May *et al.*, 2000). Barley and tea leaf extracts are now used for the antibacterial activity of polyphenols. Algicidal activity against harmful microalgae may also be an interesting target, especially in fisheries science. As for antialgal (allelopathic) activity of algal products, the activity of mucilage and a fatty acid have been reported (Kakizawa *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1988). However, in spite of many studies on killing or inhibiting the growth of red tide microalgae (Fukami *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1993; Lovejoy *et al.*, 1998), only natural clay is currently used for reducing red tide of *Cochlodinium polykrikoides* in a region of Japan. Therefore, the development of natural products which have an immediate lethal effect on red tide microalgae is urgently needed.

Phlorotannins, polymers of phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) are algal polyphenols characteristically found in several species of brown algae. Their biological roles in algae are reported to be to deter feeding or inhibit the growth of a variety of marine herbivores as a form of chemical defence (Altena *et al.*, 1992; Boettcher *et al.*, 1993; Targett *et al.*, 1995). Taniguchi *et al.* (1992a) reported that phlorotannins from *E. kurome* and *E. cava* showed potent feeding-deterrent activity against ezo-abalone (*Haliotis discus hannai*). On the other hand, studies into other biological activities of phlorotannins remain sparse. Fukuyama *et al.* (1985, 1989a, 1989b) and Nakayama *et al.* (1989) reported that phlorotannins from *E. kurome* act as anti-plasmin inhibitors, however phlorotannins are not currently used for this purpose. To our knowledge, when the author began this thesis study, neither the antioxidative nor the antimicrobial activity of phlorotannins had been previously reported.

The purpose of this study is to develop new uses of brown algal substances with the useful biological activities in order to increase the utilization of algae. In particular, the author focuses his attention on brown algal phlorotannins which have antioxidative and

antimicrobial activities. Chapter 2 describes the development of a rapid, simple and sensitive method with which to specifically detect antioxidative substances. In Chapter 3, the author identifies the antioxidative substances detected in algae, and the contents of these antioxidants are quantitatively determined. In Chapter 4, the author isolates and identifies phlorotannins from the brown alga *Eisenia bicyclis* as antioxidative substances. Moreover the antioxidative activity of phlorotannins is determined. In Chapter 5, the author describes the algicidal effect of phlorotannins on harmful red tide microalgae. In Chapter 6, the author demonstrates that phlorotannins show bactericidal activity against a range of pathogenic bacteria. For the practical utilization of phlorotannins, it is necessary to investigate not only their useful activities, but also their safety and toxicity. In Chapter 5, the influences of phlorotannin exposure on fish are described, in consideration of the spraying of phlorotannins over coastal areas that are used for aquaculture. Furthermore, in Chapter 6, the effect of the oral administration of phlorotannins on mice is investigated, in order to confirm the safety of phlorotannins for mammals. Finally, in Chapter 7, the author investigates the utilization of phlorotannins with antibacterial activity. Namely, the author studies the bactericidal activity of phlorotannins against harmful *Vibrio* that have adhered to the surface of fish, in consideration of their practical use during the preservation or transportation of fish.

Chapter 2. A Rapid and Simple Method to Detect Antioxidative Substances on a Thin-Layer Chromatography Plate

2-1. Introduction

To facilitate the search for new antioxidants, a simple and rapid method for screening or monitoring of antioxidative substances is needed. Usually, after extraction and chromatographic purification, antioxidative activity of the preparations is evaluated by measuring the retardation of the oxidation of the lipids. The thiobarbituric acid or iodometric method has been used for this purpose (Palmateer *et al.*, 1960; Kawashima *et al.*, 1977; Aoyama *et al.*, 1982; Ramarathnam *et al.*, 1989). However, some of these methods are tedious and the latter method requires a relatively large sample size. The weighing method, originally developed by Olcott *et al.* (1958), is simple but time consuming; the test requires days or weeks until an expected weight gain could be obtained (Fujimoto *et al.*, 1980; Ishikawa *et al.*, 1984). Other methods, measuring of bleaching time of carotenoids in oil solution (Bickoff, 1951; Pratt, 1965; Marco, 1968), oxygen uptake of the lipid in a Warburg apparatus and the like (Quencer *et al.*, 1964; Niki *et al.*, 1984), intensity of chemiluminescence (Niki *et al.*, 1982), or of amounts of specified hydroperoxides by high performance liquid chromatography (Stocker *et al.*, 1987; Kohen *et al.*, 1988; Terao, 1989), have also been used. All these methods are suitable for a quantitative and comprehensive evaluation of the antioxidant activity of the preparations. However, the methods described are complicated, tedious and/or time-consuming for use in rapid screening or monitoring of unknown antioxidants in preparations containing large amounts of impurities.

Thin-layer chromatography (TLC) is a simple and excellent method for separation of complicated constituents in preparations. However, few detection methods specific universally for a wide range of antioxidative substances are available. Seino *et al.* (1971) detected tocopherols and their dimers in the sludge of soybean oil using TLC and a newly-devised method: the TLC plate was sprayed with linoleic acid,

then, exposed to UV light (365 nm) for 10 min, and finally sprayed with 1% *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride in ethanol. Pratt (1980) used another spray reagent made up of β -Carotene and linoleic acid to detect antioxidative substances on a TLC plate or filter paper. These methods utilizing oxidation of the linoleic acid are simple and resourceful, however, their time is required to oxidize the unsaturated acids and/or to bleach the carotene ("usually within 3 h", described in the text). Furthermore, the resultant yellowish color of the antioxidant spots obtained by the latter method is not sensitive enough to distinguish colored spots from other spots than the antioxidative substances.

The author describes here the development of a more rapid and sensitive method to specifically detect antioxidative substances, using a combination of TLC and subsequent bleaching of sprayed pigments by ultraviolet (UV) irradiation.

2-2. Materials and Methods

2-2-1. Antioxidative Substances 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT), *tert*-butylhydroquinone (BHQ), 2[3]-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), and ethoxyquin were purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co. (Tokyo, Japan). Ascorbic acid, carnosine, capsaicin, glutathione, *D*-mannitol, *DL*- α -tocopherol and uric acid were obtained from Wako Pure Chemical Ind. (Osaka, Japan). Bilirubin and indomethacin, and hydroquinone were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and Kishida Chemical Co. (Osaka, Japan), respectively.

2-2-2. Pigments Paprika pigment, commercially available as a food additive, was donated by Takeda Pharmaceutical Ind. (Osaka, Japan). Astaxanthin and canthaxanthin, and shikonin were donated by Dr. Y. Tanaka (Kagoshima University, Japan) and Mitsui Petrochemical Ind. (Tokyo, Japan), respectively. β -Carotene, purpurin, cochineal pigment, monascus pigment and seven other water soluble pigments were purchased from Wako Pure Chemical Ind., and capsanthin was obtained from Tokyokasei Kogyo Co. Forty-four artificial pigments of food additives were obtained from commercial sources.

Corn oil was purchased from Wako Chemical Ind.

Lipids were extracted from a brown alga *Ishige okamurae* by the method using $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) (Folch *et al.* 1957). All other chemicals were of either first class grade or extra pure grade.

2-2-3. Detection of Antioxidative Substances

The pigments described were dissolved either in benzene, chloroform, ethanol or in deionized water (1-5 mg/mL). After spraying the pigment solution uniformly onto the TLC plate and removing the solvent by air blowing with a hair dryer, the plate was exposed for an appropriate time to UV light (254 nm) with a UV illuminator (7000 μW , model 20-TC, Atto Co. Tokyo, Japan). The optimum exposure time was determined by regular interval irradiation. TLC was carried out on a silica gel plate (Silica Gel 60 plate, 250 μm , E. Merck, Darmstadt, Germany).

2-3. Results

2-3-1. Selection of Pigments After spotting the antioxidants (2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ CHCl_3) onto Silica gel plates, each of the pigment solutions was sprayed, uniformly. The plates were dried with a hair dryer and exposed to UV light, separately and for suitable time. As the background pigment was bleached by UV light, the antioxidant spots were gradually embossed. As shown in Fig. 2-1, paprika pigment (mainly capsanthin), capsanthin, and canthaxanthin were excellent, and β -Carotene and astaxanthin were suitable as spray reagents. Although β -Carotene was able to be sprayed homogeneously, the yellowish color was less clear than the reddish colors of the others. When these carotenoid reagents were used, a few minutes of UV irradiation were sufficient to detect the antioxidant spots. Since the purpurin is more stable than the carotenoids described above, much more time was needed for the background color to fade out on the silica gel plate. The cochineal, monascus and other water soluble pigments were not suitable for detection of the lipoidal antioxidants, though some antioxidant spots were detectable. The shikonin and the artificial pigments (food additives) tested faded little within time of

experiment.

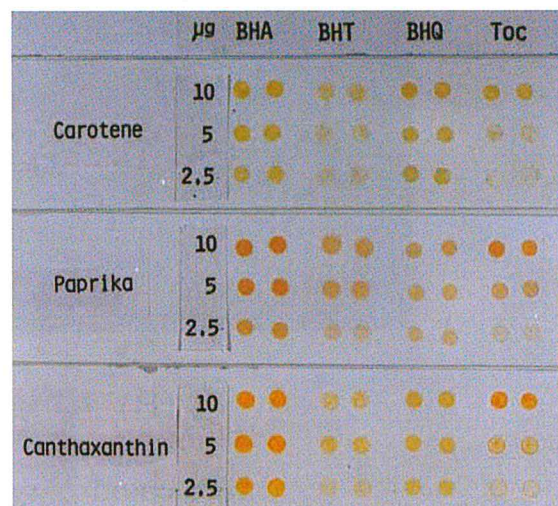


Fig. 2-1. Screening of pigments to detect antioxidative substances on a TLC plate. Antioxidants, 2.5, 5 and 10 μg in 2.5 μL chloroform, were spotted onto a silica gel plate. After spraying the pigment solution and drying with a hair dryer, each plate was exposed to UV light for a suitable time. BHA: 2[3]-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole, BHT: 2, 6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol, BHQ: *tert*-butyl-hydroquinone, Toc: α -tocopherol.

2-3-2. Application for TLC Olive oil (100 μg), containing authentic antioxidants (0.5 or 2 μg) was separated on a pair of silica gel plates using *n*-hexane/diethyl ether/acetic acid (70:30:1, v/v/v) as the developing solvent. One plate was sprayed with a pigment solution and the other was charred with 50% sulfuric acid. As shown in Fig. 2-2 (A), using the paprika pigment solution (5 mg/mL CHCl_3), even 0.5 μg of the antioxidants of reddish brown spots was clearly detected without disturbance of olive oil; the larger amounts of triglycerides were detected only on the plate charred with the sulfuric acid. This method using the paprika pigment solution, usually was more sensitive than that using sulfuric acid and was also applied to screen or monitor antioxidative substances in algae. As in Fig. 2-2 (B), three colored bands of antioxidative substances were detected in the extracted lipids of a brown alga *Ishige okamurae*.

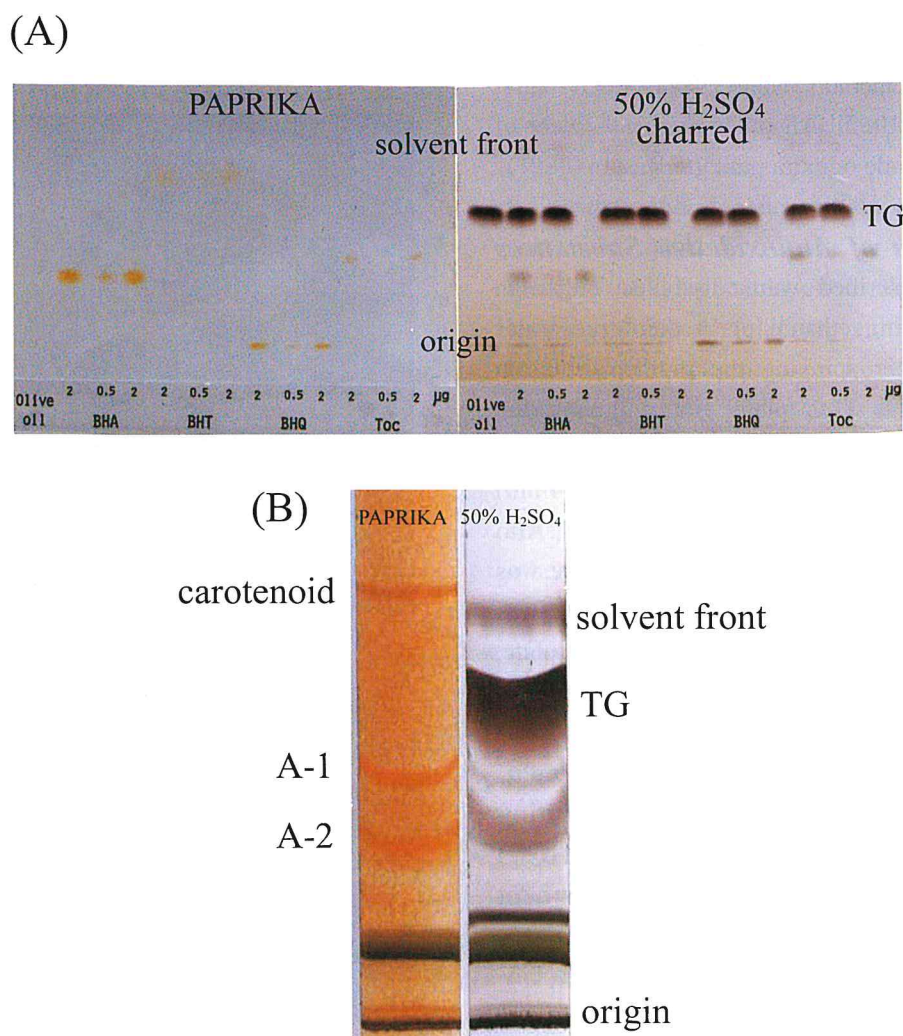


Fig. 2-2. Separation and detection of antioxidants by TLC and by the combined use of pigment-spraying and UV light bleaching. (A): Olive oils (100 µg) containing 0.5 and 2 µg antioxidants, (B): Lipids of a brown alga *Ishige okamurae*. Both were developed with n-hexane/ethyl ether/ acetic acid (70:30:1, v/v/v) on duplicate silica gel plates (Silicagel 60, 250 µm) respectively. After removing the solvent, one plate was sprayed with 50% H₂SO₄ and charred, while the other was sprayed with a paprika pigment solution (5mg/mL CHCl₃) and exposed to UV light. Abbreviations used in the figures are the same as in Fig. 2-1. TG: triglycerides, A-1 and A-2: antioxidative substances.

2-4. Discussion

Authentic antioxidants other than shown in the figures were also tested with the paprika reagent. Colored spots of ascorbic acid, capsaicin, ethoxyquin, hydroquinone and indomethacin were clearly visible. Spots of biological antioxidants, bilirubin (Stocker, 1987) and uric acid (Ames, 1981) were obscure because of their inferior solubility. However, those of other radical scavengers found in biological systems, carnosine (Kohen *et al.*, 1988), glutathione (Tirmenstein *et al.*, 1989) and mannitol (Misra *et al.*,

1976) were not detected as colored spots. Possible reasons for this discrepancy may be due to lack of affinity between the hydrophilic antioxidant and the lipophilic spray reagent, differences of scavenging specificity to the radicals produced or to lower antioxidative activities of the biological antioxidants than that of the carotenoid in the spray reagent; carotenoids have long been known as antioxidants, scavengers of singlet molecular oxygen in plants (Foote, 1976). Further studies using another pigments are in progress.

Thus, with the combined use of TLC and UV light bleaching of sprayed carotenoids of less than one μg of antioxidative substances led to a clear detection on the TLC plate with few exceptions. The paprika pigment used in this study is a low priced food additive commercially available in Japan. The UV illuminator is a popular equipment used in laboratories to detect fluorescent substances on chromatograms or electrophoresis patterns.

2-5. Summary

A simple, rapid and sensitive method was devised to detect specifically antioxidative substances on a TLC plate. After chromatography on a silica gel plate, the plate was sprayed with a pigment solution and irradiated with ultraviolet light. Only the spots of antioxidative ability were embossed as the background pigment was bleached. Among the pigments tested, paprika pigment (mainly capsanthin), capsanthin, and canthaxanthin were excellent, and β -Carotene and astaxanthin were adequate for the spray reagents. Using the paprika spray reagent, antioxidants added to olive oil and antioxidative substances in a brown alga *Ishige okamurae* were clearly detected on the TLC plates. Generally, a few minutes of ultraviolet light irradiation with a commercially available illuminator (2000 μW) were sufficient, and less than one μg of antioxidative substances on a silica gel plate was detectable.

Chapter 3. High Tocopherol Content in a Brown Alga *Ishige okamurae*

3-1. Introduction

Using a newly devised screening method as described in Chapter 2 (Nakamura *et al.*, 1991) the author found remarkable amounts of antioxidative substances in a brown alga, *Ishige okamurae*. This chapter describes the identification and distribution of the antioxidative substances in the alga and twenty-three other algae.

3-2. Materials and Methods

3-2-1. Materials Algae collected from the intertidal zone of Shikanoshima Island and its vicinity in Fukuoka City were washed with fresh water, air-dried and pulverized. Tocopherol (Toc) standards were kindly donated by Eizai Co. (Tokyo, Japan).

3-2-2. Extraction and Separation of Antioxidative Substances Five grams of each pulverized algae were homogenized with 100 mL of CHCl₃-methanol (2:1, v/v) for 3 min with an Ultra disperser (LK-21, Yamatokagaku, Tokyo, Japan). The mixtures were filtered and the solvents removed under reduced pressure to yield crude lipid extracts. The extract was fractionated by chromatography on Wakogel C-300 (Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan). Elution was at first performed with ethyl ether-n-hexane (5:95, v/v) to remove pigments such as chlorophylls and carotenoids. Then antioxidative substances were eluted with ethyl ether-n-hexane (25:75, v/v) and the solvents removed under reduced pressure. These compounds were fractionated by Sephadex LH-20 (Pharmacia Co., Tokyo, Japan) with CHCl₃-methanol (1:1, v/v). Each 150 drops fraction was collected and evaporated *in vacuo*. Consecutive fractions that showed antioxidative activity were pooled and purified by HPLC on μ -Porasil (Waters Assoc. Inc., Milford, MA, USA) with n-hexane-2-propanol (99:1, v/v) as eluent.

3-2-3. Structural Analysis of Antioxidative Substances Antioxidative substances (A-1, A-2; see Fig. 2-2B in Chapter 2) were identified by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) with a JEOL JNM-GX400 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) with tetramethylsilane as an internal standard. Negative fast atom bombardment mass spectra (FABMS) were obtained on a JMS-DX300 (JEOL Ltd.) at an ion source accelerating voltage of 10 kV, with glycerol as the matrix. Electron impact mass spectra (EIMS) were recorded with a GC-MS QP-1000 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). Trimethylsilyl ether derivative of Tocs were prepared by treatment with *N,O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide in pyridine (Green *et al.*, 1978).

3-2-4. Quantification of Antioxidative Substances in Algae To 5 g of freshly harvested and pulverized algae, one mg aliquot of 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman (PMC; internal standard, Tokyo Kasei Kogyo Co., Tokyo, Japan) was added. About one fifth of the crude lipid extract obtained by the same extracting method described above (3-2-2) was applied on a small column packed with 2 g Florisil (Florisil Co.) and eluted with 30ml of ethyl ether-n-hexane (25:75, v/v). Tocs in the fraction were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) on μ -Porasil with n-hexane-dioxane-2-propanol (985:10:5, v/v/v). Each Toc was eluted and monitored with a variable fluorescence spectrometer (821-FP, JASCO, Tokyo, Japan), excitation 296 nm, emission 323 nm, and was quantified using the calibration curve for the corresponding Toc.

3-3. Results

3-3-1. Isolation and Characterization As shown in Fig. 2-2B in Chapter 2, two antioxidative bands (A-1, A-2) were detected in the CHCl₃-methanol extract from *I. okamurae*. They were purified successively by chromatography on Wakogel C-300, Sephadex LH-20, and on μ -Porasil.

The two antioxidative substances were identified as follows. *Structure of A-1*

HRMS: m/z 430.38142 (M^+ C₂₉H₅₀O₂, calcd. as 430.38082); EIMS (70 eV): m/z 430 (100%), 165 (71),

205 (6), 281 (4); TMS derivative: m/z 502 (100%), 237 (66), 277 (4) (Fig. 3-1); NMR δ_H ($CDCl_3$): 0.80-0.93 (12H, m), 1.23 (3H, s), 1.0-1.6 (21H, m), 1.72-1.85 (2H, m), 2.11 (6H, s), 2.16 (3H, s), 2.58-2.62 (2H, m), 4.17 (1H, s) (Fig. 3-2a); NMR δ_c ($CDCl_3$): 11.3, 11.8, 12.2, 19.7, 19.8, 20.8, 21.0, 22.6, 22.7, 23.8, 24.5, 24.8, 28.0, 31.6, 32.7, 32.8, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 39.8, 74.5, 117.4, 118.5, 121.0, 122.6, 144.5, 145.5 (Fig. 3-2b). This compound was identified as α -tocopherol (α -Toc).

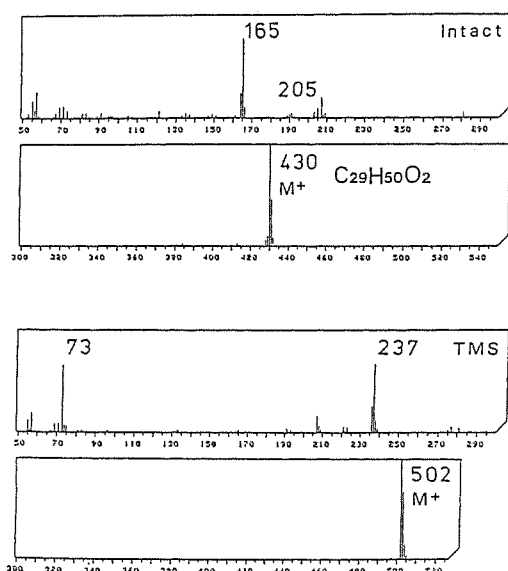


Fig. 3-1. Mass spectra of antioxidant substance (A-1) in *Ishige okamurae*. TMS: trimethylsilyl derivative.

Structure of A-2

HRMS: m/z 402.35107 (M^+ $C_{27}H_{46}O_2$, calcd. as 402.34954); EIMS (70 eV) m/z 402 (100%), 137 (62), 177 (25); TMS derivative: m/z 474 (100%), 209 (20), 249 (9) (Fig. 3-3); NMR δ_H ($CDCl_3$): 0.80-0.90 (12H, m), 1.24 (3H, s), 1.68-1.82 (2H, m), 1.0-1.6 (21H, m), 2.12 (3H, s), 2.66-2.70 (2H, m), 4.4 (1H, s), 6.37 (1H, m), 6.47 (1H, m) (Fig. 3-4a); NMR δ_c ($CDCl_3$): 16.1, 19.7, 19.8, 21.0, 22.5, 22.6, 22.7, 24.1, 24.5, 24.8, 28.0, 31.3, 32.7, 32.8, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 39.9, 75.6, 112.6, 115.6, 121.3, 127.4, 146.1, 147.6 (Fig. 3-4b). This compound was identified as δ -Toc.

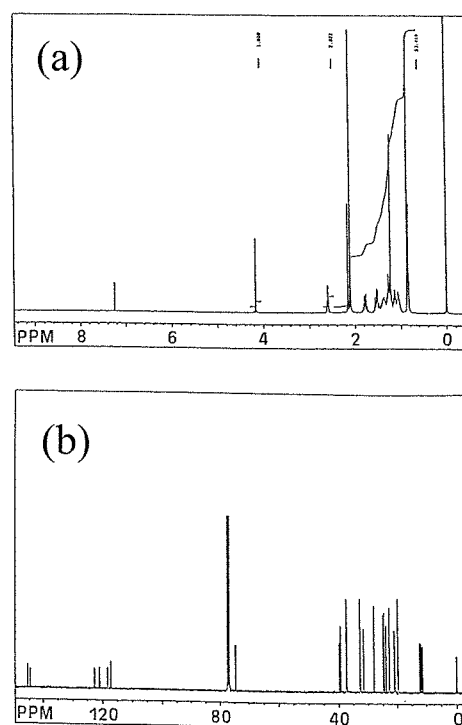


Fig. 3-2. NMR spectra of antioxidant substance (A-1) in *Ishige okamurae*. (a), 1H -NMR; (b), ^{13}C -NMR.

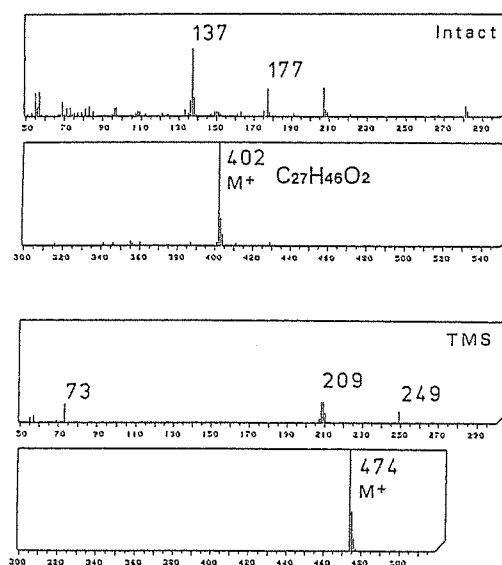


Fig. 3-3. Mass spectra of antioxidant substance (A-2) in *Ishige okamurae*. TMS: trimethylsilyl derivative.

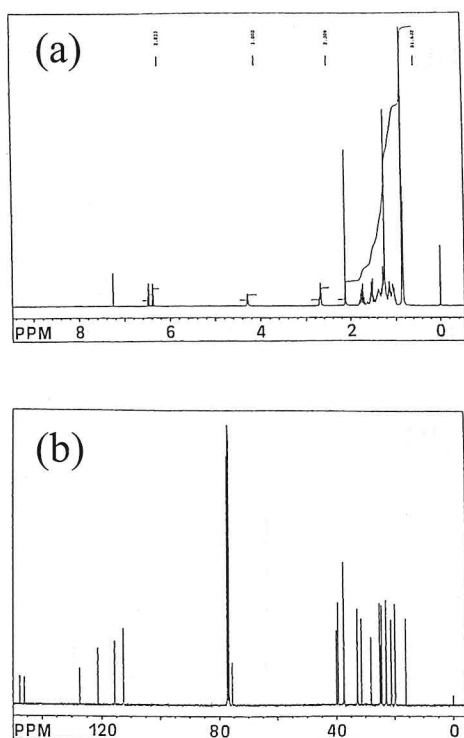


Fig. 3-4. NMR spectra of antioxidative substance (A-2) in *Ishige okamurae*. (a), ^1H -NMR; (b), ^{13}C -NMR.

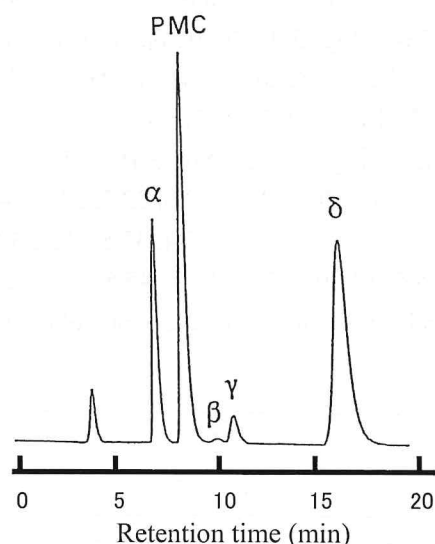


Fig. 3-5. Separation of tocopherols in *I. okamurae* by HPLC on μ -Porasil column. Elution was performed at a flow rate of 3.0 mL/min using n-hexane-dioxane-2-propanol (985:10:5, v/v/v) with a variable fluorescence spectrometer, excitation 296 nm, emission 323 nm. α : α -tocopherol, β : β -tocopherol, γ : γ -tocopherol, δ : δ -tocopherol, PMC: 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman (internal standard).

3-3-2. Distribution of Antioxidative Substances in algae

Separation of Tocs in *I. okamurae*, harvested in September 1991, by HPLC is shown in Fig. 3-5. Among Tocs and PMC, α -Toc was at first eluted and followed by PMC, β -, γ -, and δ -Tocs, successively. Toc contents in twenty-four algae are shown in Table 3-1. Relatively higher amounts were found in the Phaeophyta, while lower amounts were found in the Rhodophyta and Chlorophyta. In *Ishige okamurae*, remarkably high amounts of α - and δ -Tocs, and a total of 28-41 mg/100g dry matter all year round and the highest amount in September were observed.

3-4. Discussion

In the present study, the author found remarkably high amounts of α - and δ -Tocs in *Ishige okamurae*, and relatively higher amounts were found in the Phaeophyta than those in the Rhodophyta or Chlorophyta. Interestingly, the highest amounts of Tocs in *I. okamurae* in September were five to six times higher than the amount in *Hizikia fusiformis*

known as the highest content species in algae (Miyashita *et al.*, 1987; Kanematsu *et al.*, 1983) and also greatly exceeded the amount of soybean (McLaughlin *et al.*, 1979). Since the lipid contents in the brown alga were 0.40-1.05% of the dry matter, the Toc content reached 2.7 to 8.3% of the crude lipid extracts.

Table 3-1. Tocopherol contents in algae.

| Algae | Date collected | Contents (mg/100 g dry matter) | | | | |
|--|----------------|--------------------------------|---------|----------|----------|-------|
| | | α | β | γ | δ | Total |
| Phaeophyta | (1991) | | | | | |
| <i>Ishige okamurae</i> | Mar. | 14.86 | 0.52 | 1.50 | 12.96 | 29.84 |
| | June | 13.38 | 0.24 | 1.14 | 13.30 | 28.06 |
| | Sept. | 21.40 | 0.37 | 2.02 | 17.46 | 41.25 |
| | Dec. | 18.04 | 0.46 | 1.84 | 12.90 | 33.24 |
| <i>Ishige sinicola</i> | Mar. | 4.58 | 0.20 | 0.22 | 4.49 | 9.49 |
| <i>Petrospongium rugosum</i> | Mar. | 3.04 | 0.21 | 5.22 | 0.58 | 9.05 |
| <i>Endarachne binghamiae</i> | Mar. | 4.49 | 0.16 | 2.55 | 0.79 | 7.99 |
| <i>Hizikia fusiformis</i> | Sept. | 4.36 | - | 0.44 | 0.86 | 5.66 |
| <i>Scytosiphon lomentaria</i> | Mar. | 2.49 | 0.01 | 0.36 | 0.21 | 3.07 |
| <i>Sargassum ringgoldianum</i> ssp. <i>coreanum</i> | Jan. | 2.91 | - | - | - | 2.91 |
| <i>Sargassum thunbergii</i> | Jan. | 1.84 | - | 0.46 | - | 2.30 |
| <i>Myelophycus simplex</i> | Jan. | 0.91 | - | 0.30 | - | 1.21 |
| <i>Ecklonia kurome</i> | Mar. | 0.94 | - | - | - | 0.94 |
| <i>Eisenia bicyclis</i> | Mar. | 0.87 | - | - | - | 0.87 |
| Rhodophyta | | | | | | |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | Jan. | 0.71 | - | - | - | 0.71 |
| <i>Gracilaria asiatica</i> | Mar. | 0.64 | - | - | - | 0.64 |
| <i>Carpopeltis affinis</i> | May | 0.50 | - | - | - | 0.50 |
| <i>Gloiopeltis complanata</i> | May | 0.37 | - | - | - | 0.37 |
| <i>Plocamium telfairiae</i> | Jan. | 0.27 | - | - | - | 0.27 |
| <i>Gymnogongrus flabelliformis</i> | May | 0.17 | - | - | - | 0.17 |
| <i>Gloiopeltis furcata</i> | Feb. | 0.13 | - | - | - | 0.13 |
| <i>Grateloupia filicina</i> | Feb. | 0.07 | - | - | - | 0.07 |
| <i>Corallina pilulifera</i> | Feb. | 0.05 | - | - | - | 0.05 |
| <i>Polysiphonia senticulosa</i> | Feb. | 0.09 | - | - | - | 0.09 |
| Chlorophyta | | | | | | |
| <i>Cladophora</i> sp. | Apr. | 0.80 | - | - | - | 0.80 |
| <i>Enteromorpha linza</i> | May | 0.18 | - | - | - | 0.18 |
| <i>Monostroma nitidum</i> | Feb. | 0.08 | - | - | - | 0.08 |

3-5. Summary

Using a newly devised screening method, the author found remarkable amounts of antioxidative substances in a brown alga, *Ishige okamurae*. This chapter describes the identification and distribution of the antioxidative substances in the alga and twenty-three other algae.

Antioxidative substances in the extract from *I. okamurae* were purified by chromatography on Wakogel C-300, Sephadex LH-20 and on μ -Porasil, and were then identified as Tocs by GC-MS and NMR. Tocs in the alga were quantified by HPLC.

Toc contents in twenty-four algae were quantitatively determined, and relatively higher amounts were found in the Phaeophyta. In *I.*

okamurae, remarkably high amounts of α - and δ -Tocs, and a total of 28-41 mg/100g dry matter all year round and the highest amount in September were observed. These were five to six times higher than the amount in *Hizikia fusiformis* known as the highest content species in algae and also greatly exceeded the amount of soybean. Since the lipid contents in the brown alga were 0.40-1.05% of the dry matter, the Toc content reached 2.7 to 8.3% of the crude lipid extracts.

Chapter 4. Antioxidant Activity of Phlorotannins Isolated from the Brown Alga *Eisenia bicyclis*

4-1. Introduction

The literature on algal antioxidants is sparse. Fujimoto *et al.* (1980) investigated antioxidative substances of the brown alga *Eisenia bicyclis* and found phosphatidylethanolamine to be an antioxidant. Later, they reported bromophenols, 5-bromo-3,4-dihydroxybenzaldehyde as the main constituent and 5-bromo-benzylalcohols, in the red alga *Polysiphonia urceolata* (Fujimoto *et al.*, 1985, 1986). Nishibori *et al.* (1988) studied antioxidative substances of a green alga *Enteromorpha* sp., and identified pheophytin a, one of the Mg-free chlorophylls, as the main component. Cahyana *et al.* (1992) found a related compound, pyropheophytin a, in the brown alga *Eisenia bicyclis* and showed its higher antioxidant activity than that of α -tocopherol. Tocopherols, which are popular antioxidants in terrestrial organisms, are also present in algae (Brown, 1953; McLaughlin *et al.*, 1979; Miyashita *et al.*, 1987). In Chapter 3, the author described an extremely high content of tocopherols in the brown alga *Ishige okamurae* and their wide distribution in Phaeophyta, Rhodophyta and Chlorophyta.

These antioxidative substances described above are usually isolated from the lipid fraction of algal extracts. However, using a TLC-screening method shown in Chapter 2 (Nakamura *et al.*, 1991), the author detected prominent antioxidative bands in the non-lipid fraction (Folch *et al.*, 1957) of the brown alga *Eisenia bicyclis*. The author describes here the isolation and identification of the antioxidative substances in the alga and their potent antioxidant activity.

4-2. Materials and Methods

4-2-1. Materials The brown alga *Eisenia bicyclis* collected from the coast of Tsuzumi Island, Fukuoka Prefecture in July 1992 was washed with tap water, air-dried, and pulverized. The algal powder was stocked at -40°C until use.

4-2-2. Extraction and Separation of Antioxidative Substances The algal powder (100 g) was extracted with methanol (800 mL) in an iced bath using an Ultra disperser (LK-21, Yamatokagaku, Tokyo, Japan). The extracts were concentrated to ca. 200mL, to which were added CHCl_3 (400mL) and deionized water (150 mL). The upper layer, corresponding to the non-lipid fraction (Folch *et al.*, 1957), was extracted with ethyl ether (2×150 mL). The ether extract was fractionated by silicic acid chromatography on a column of Wakogel C-300 (10 mm i.d. \times 30cm, Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan) with CHCl_3 -methanol- water (50:30:7, v/v) as eluent. The eluates were monitored by UV absorption at 310 nm using a Hitachi L-400 UV detector. If necessary, preparative TLC was used under the conditions mentioned below.

4-2-3. Structural Analysis of Antioxidative Substances ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR), and ^1H - ^{13}C long-range shift correlation spectra (COLOC) were measured with a JEOL FX-400 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) with tetramethylsilane as an internal standard. Negative fast atom bombardment mass spectra (FABMS) were obtained on a JMS-DX300 (JEOL Ltd.) at an ion source accelerating voltage of 10 kV, with glycerol as the matrix.

Electron impact mass spectra (EIMS) were recorded with a GC-MS QP-1000 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). Gas liquid chromatography (GLC) was carried out using a Shimadzu GC-14A gas chromatograph on a capillary column (DBP-1, $30\text{m} \times 0.25$ mm i.d. Shimadzu Co.). IR spectra were measured in KBr tablets with a Hitachi EPI-G21 spectrometer. Trimethylsilyl ether derivative of phloroglucinol was prepared by treatment with *N,O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide in pyridine (Green *et al.*, 1978).

4-2-4. Antioxidant Assay TLC plates (Silica Gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck Co., Darmstadt, Germany), which had been activated at 110°C for 1 h before use,

were developed with CHCl_3 -methanol-water-acetic acid (50:25:4:3, v/v). One plate was sprayed with 50% sulfuric acid and charred on a hot plate. Another plate was sprayed with a paprika pigment solution (10 mg/mL benzene) and exposed for several minutes to UV light (254 nm) using a UV illuminator (7000 μW , model 20-TC, Atto Co.) after removal of the solvent (Nakamura et al., 1991). Antioxidative substances appeared as colored spots. A paprika pigment, the main component of which is capsanthin, was donated by Takeda pharmaceutical Ind. Antioxidant activity was measured by the weighing method developed by Olcott *et al.* (1958). Mixtures of methyl α -linolenate (200 mg) and aliquot amounts of phlorotannins in Petri dishes (i.d. 36 mm) were left in an incubator at 40°C. Increasing weight was measured at appropriate intervals.

Phloroglucinol was purchased from Wako Pure Chem. Ind., while methyl α -linolenate was from Tokyo Kasei Ind. (Tokyo, Japan). All reagents used in this experiment were of analytical grade.

4-3. Results

4-3-1. Isolation and Characterization

Antioxidative substances in the ether extract, 0.90 g from 100 g of the dry alga, were separated on TLC plates. As shown in Fig. 4-1, five antioxidative bands (T-1~5) were detected with little contaminants other than antioxidative substances. An upper band of T-1 is a pigment since the color was apparent before spraying the paprika pigment solution. These five antioxidative substances were isolated by column chromatography on a Wakogel C-300 and preparative TLC. T-1, T-4, and T-5 were successfully isolated only by column chromatography, while T-2 and T-3 were finally purified by preparative TLC. About 20 mg of T-1 and 100 to 150 mg for each of T-2~5 were obtained from 100 g of the dry alga.

IR spectra (KBr) of the purified T-2~5 were similar to each other, showing bands at 3400 (OH), 1650-1450 (phenyl), 1200 and 1050 (ether), and 820 cm^{-1} (1,3,5-substituted phenyl). These results suggested that they were phloroglucinol derivatives (Ragan, 1985).

T-2 showed an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak at m/z 371 (rel. int. 100%) in negative FABMS, matching a formula of

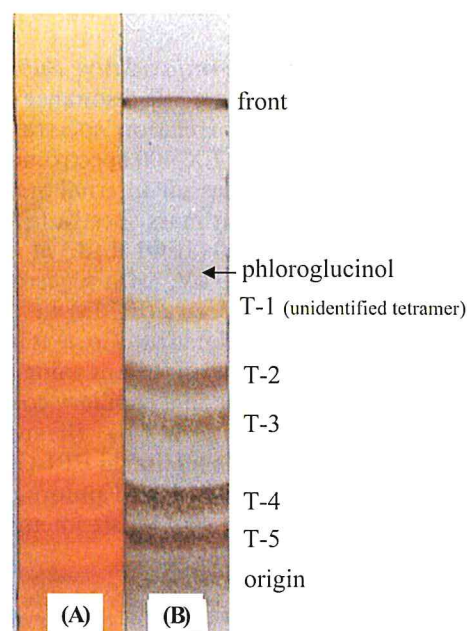


Fig. 4-1. Separation and detection of antioxidative substances in the brown alga *Eisenia bicyclis* by thin layer chromatography. Ether extract was applied onto a pair of plates (Silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck Co.) and developed with CHCl_3 -methanol-water-acetic acid (50:25:4:3, v/v). After removal of the solvent, one plate (A) was sprayed with a paprika pigment solution followed by exposure to UV-light, while the other plate (B) was sprayed with 50% H_2SO_4 and charred on a hot plate.

$\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{O}_9$, along with fragment ions m/z 355 (M-17, 3.9), 263 (M-109, 12.3), 247 (M-125, 5.3), and 139 (M-233, 6.5). The ^{13}C NMR spectrum measured in CD_3OD exhibited signals at δ 95.4 (C6), 95.8 (C2', C6'), 97.8 (C4'), 99.5 (C3), 99.9 (C8), 124.6 (C4a), 124.9 (C9a), 125.6 (C1), 138.6 (C10a), 143.4 (C4), 144.3 (C5a), 147.1 (C2), 147.3 (C9), 154.6 (C7), 160.2 (C3', C5'), and 161.9 (C1'). In addition, NMR data obtained in $\text{DMSO}-d_6$ were in good agreement with those of eckol, T-2 in Fig. 4-2. Thus, T-2 was identified with eckol reported by Fukuyama *et al.* (1985, 1989a).

T-3 exhibited an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak at m/z 601 (rel. int. 100%), matching a formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{17}\text{O}_{14}$, and fragment ions m/z 585 (M-17, 8.0), 492 (M-109, 21.3),

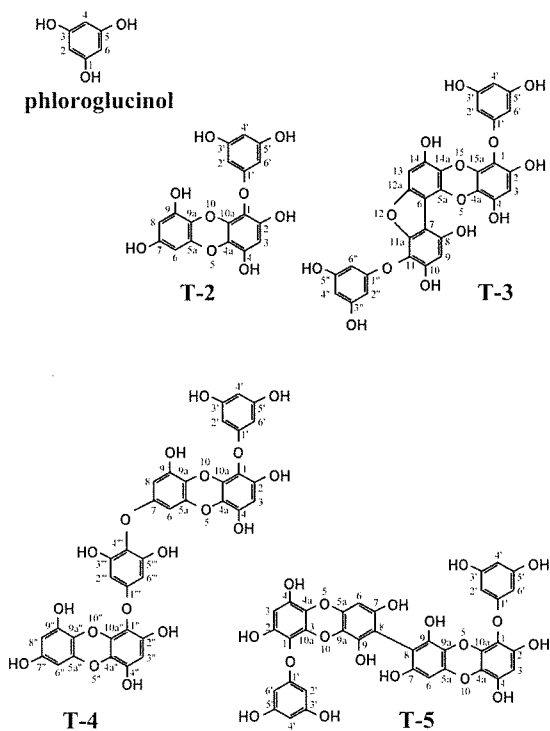


Fig. 4-2. Structure of phlorotannins found in *Eisenia bicyclis*.

476 (M-125, 7.1), 369 (M-233, 10.6), 353 (M-249, 6.6), and 339 (M-263, 6.5) in negative FABMS. The ^{13}C NMR spectrum measured in CD_3OD contained signals at δ 95.5 (C2', C6', C2'', C6''), 96.2 (C13), 97.7 (C4'), 97.8 (C4''), 99.5 (C3), 100.0 (C9), 105.3 (C6, C7), 122.4 (C11), 124.7 (C1), 125.0 (C4a), 128.1 (C14a), 135.4 (C5a), 138.4 (C15a), 144.0 (C4), 146.0 (C14), 148.3 (C2, C8), 151.2 (C11a), 151.7 (C10), 153.2 (C12a), 160.1 (C3', C5', C3''), 160.2 (C5''), 161.8 (C1'''), and 161.9 (C1). NMR data obtained in $\text{DMSO}-d_6$ were in good agreement with those of phlorofucofuroeckol A (Fukuyama et al., 1990). Thus, T-3 was phlorofucofuroeckol A.

T-4 revealed an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak at m/z 741 (rel. int. 4.6%), matching a formula of $\text{C}_{36}\text{H}_{21}\text{O}_{18}$, and fragment ions m/z 725 (M-17, 0.7), 633 (M-109, 0.6), 617 (M-125, 0.4), 495 (M-247, 0.7), 479 (M-263, 0.3), 387 (0.7), 371 (1.2), and 355 (0.5) in negative FABMS. The ^{13}C NMR recorded in CD_3OD showed signals at δ 95.4 (C6), 95.8 (C2'), 95.9 (C6', C6''), 96.2 (C2''', C6'''), 97.7 (C4'), 99.4 (C3'''), 99.5 (C3), 99.8 (C8), 99.9 (C8''), 124.6 (C4a), 124.7 (C4a''), 124.9 (C9a''),

125.6 (C1'''), 125.7 (C1), 126.2 (C9a), 126.5 (C4'''), 138.5 (C10a''), 138.7 (C10a), 143.3 (C4), 143.4 (C4''), 144.2 (C5a), 144.3 (C5a''), 146.9 (C9), 147.1 (C9''), 147.3 (C2), 147.4 (C2''), 152.4 (C3''', C5'''), 154.5 (C7'''), 156.0 (C7), 157.8 (C1'''), 160.1 (C3', C5'), and 161.8 (C1'). NMR data obtained in $\text{DMSO}-d_6$ were in good agreement with those of dieckol (Fukuyama et al., 1989b). COLOC data also suggested the dimeric structure of eckol. Therefore, T-4 was identified as dieckol.

T-5 gave an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak at m/z 741 (rel. int. 1.8%), matching a formula of $\text{C}_{36}\text{H}_{21}\text{O}_{18}$, and fragment ions at m/z 725 (M-17, 0.3), 633 (M-109, 0.3), 617 (M-125, 0.3), 509 (M-233, 0.2), 493 (M-249, 0.3), and 477 (M-265, 0.2). The ^{13}C NMR spectrum measured in CD_3OD revealed signals at δ 95.4 (C2', C6'), 95.9 (C6), 97.8 (C4'), 99.4 (C3), 105.4 (C8), 124.6 (C4a), 125.2 (C9a), 125.6 (C1), 138.4 (C10a), 143.4 (C5a), 143.5 (C4), 145.4 (C9), 147.2 (C2), 152.8 (C7), 160.2 (C3', C5'), and 161.8 (C1). NMR data obtained in $\text{DMSO}-d_6$ were in good agreement with those for 8,8'-bieckol (Fukuyama et al., 1990). COLOC data suggested the symmetrical structure. Thus, T-5 was 8,8'-bieckol.

The identification of T-1 was not conducted in this study.

4-3-2. Antioxidant Activity of Phlorotannins

The antioxidant activity of T-2~5 was examined by the weight gain test (Fig. 4-3). At a concentration of 0.05% addition, a mixture of T-2 and 3 was as effective as α -tocopherol. Although phloroglucinol showed a low activity at 0.05%, it was most effective at 0.5%; the induction period was elongated more than 700 h at 40 °C. The antioxidant activity of phlorotannins seems to depend on the degree of polymerization of phloroglucinol. Generally, phlorotannins of lower molecular weights were more effective than those of higher weights.

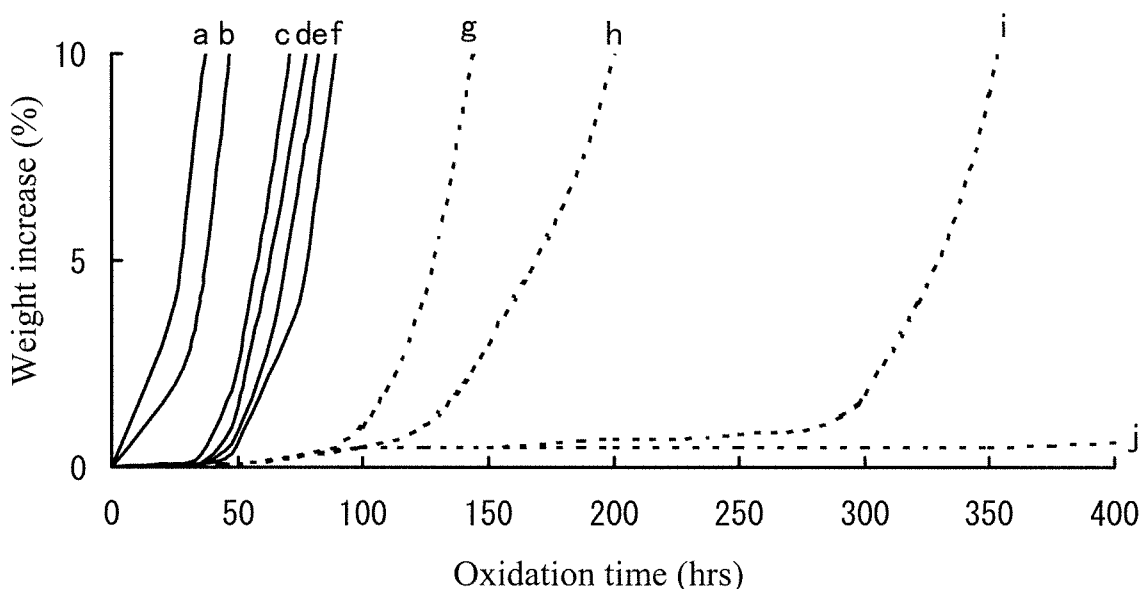


Fig. 4-3. Antioxidant activity of isolated phlorotannins. a: methyl α -linolenate, b: 0.05% phloroglucinol, c: 0.05% T-4 (dieckol), d: 0.05% T-5 (8, 8'-bieckol), e: 0.05% α -tocopherol, f: 0.05% T-2+3 (mixture of eckol and phlorofucofuroeckol A), g: 0.5% T-5, h: 0.5% T-4, i: 0.5% T-2+3, j: 0.5% phloroglucinol.

4-4. Discussion

It has long been known that brown algae contain phlorotannins, phloroglucinol and its polymers, in subcellular bodies called physodes (Ragan, 1976; Pellegrini, 1980). In the present study, phloroglucinol and four phlorotannins: eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol, 8,8'-bieckol were identified from *Eisenia bicyclis*. These compounds were firstly detected in *Ecklonia kurome* as anti-plasmin inhibitors (Fukuyama *et al.*, 1985, 1989a, 1989b, 1990; Nakayama *et al.*, 1989).

Studying the inhibitory spectra of eckol derivatives, Nakayama *et al.* (1989) suggested that the dibenzo 1,4-dioxane skeleton was necessary for the inhibition of a plasmin inhibitor. Geiselman *et al.* (1981) and Taniguchi *et al.* (1991, 1992a, 1992b) reported that phlorotannins of various molecular weights played important roles in chemical defenses against marine herbivores. However, with the exception of phloroglucinol, the same compounds described in the present paper were not reported. Kita *et al.* (1990) identified eckol and its dimeric compounds (not identified) as oral deodorants in *E. bicyclis*. However,

there is no documented research on the antioxidant activities of polyphloroglucinols of isolated compound.

In this chapter, the author described the antioxidant activities of polyphloroglucinols and their possible usefulness as antioxidants. The method of preparation used in this experiment is simple and convenient for preparing phlorotannins since most of the contaminant lipids were removed before the chromatographic purification.

4-5. Summary

Five antioxidative substances in the brown alga *Eisenia bicyclis* were isolated by silicic acid column chromatography and thin-layer chromatography. They were identified to be polymers of phloroglucinol, namely eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol, and 8,8'-bieckol on the basis of spectroscopic evidence (IR, FABMS, and ^1H and ^{13}C NMR). Their potent antioxidant effect extended the induction time of autoxidation of methyl α -linolenate.

Chapter 5. Algicidal Effect of Phlorotannins on Red Tide Microalgae (Nagayama *et al.*, 2003)

5-1. Introduction

Extreme blooms of some microalgae which induce mass mortalities of cultured fish or shellfish cause serious damage to aquaculture industries. Especially the blooms of *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi*, *Cochlodinium polykrikoides* and/or *Chattonella antiqua* cause heavy damage almost every year in Japan and other countries. Because of these problems, many studies about the red tide microalgae have been conducted. Global overviews about harmful algal blooms are described in the Manual on Harmful Marine Microalgae (Hallegraeff *et al.* Eds., 1995). Rensel (1995) described several techniques to mitigate the effects of harmful algal bloom on finfish aquaculture in the book. Many studies on killing or inhibiting the growth of red tide microalgae have been conducted. In particular, several groups have focused on bacteria with algicidal or inhibitory activities against the microalgae (Fukami *et al.*, 1991, 1992; Imai *et al.*, 1993, 1995; Yoshinaga *et al.*, 1995, 1997; Kim *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998). Since bacteria play important roles in the development and decline of red tide in the sea and some of them kill or inhibit the growth of harmful microalgae without affecting other phytoplankton, they may be valuable biotic agents for controlling red tide. However, bacterial methods need several days to kill microalgae. Hence, in spite of these *in vitro* studies, little information is available on practical methods for reducing red tide. Natural clay is used in a region of Kyushu Island in Japan because of its ability to rapidly kill or agglutinate and precipitate some species of red tide microalgae. However, no natural products except the clay have been used in practice. Kakizawa *et al.* (1988) reported that 6Z, 9Z, 12Z, 15Z-octadecatetraenoic acid (ODTA) from the brown alga *Cladosiphon okamuranus* has an immediate lethal effect on some microalgae. However, Kakizawa *et al.* (1988) did not investigate algicidal substances other than unsaturated fatty acids in a methanol extract from *C. okamuranus*. In addition, they did not test the algicidal activity of ODTA against *C. polykrikoides*.

Phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* or those from *Eisenia bicyclis* are known as anti-plasmin inhibitors (Fukuyama *et al.*, 1985, 1989a, 1989b, 1990; Nakayama *et al.*, 1989), glycosidase and hyaluronidase inhibitors (Shibata *et al.*, 2002a, 2002b) or as antioxidants (described in Chapter 4; Nakamura *et al.*, 1996). In addition, phlorotannins deter feeding or inhibit growth of a variety of marine herbivores as chemical defences (Altena *et al.*, 1992; Boettcher *et al.*, 1993; Hay *et al.*, 1988; Steinberg, 1992; Targett *et al.*, 1995). On the other hand Jennings *et al.* (1997) suggested that phlorotannins are less likely to be effective defences against epiphytes than non-polar metabolites, which can adhere to the surface of the producing organism. However, to our knowledge, no reports have found an algicidal effect of the phlorotannins.

In the present study, crude and isolated phlorotannins from the brown alga *E. kurome* were assessed for algicidal effects on *K. mikimotoi*, *C. polykrikoides*, and *C. antiqua*. In addition, the influences of phlorotannin exposure on red sea bream, tiger puffer, and larval blue crab were preliminarily investigated in consideration of spraying of phlorotannins over coastal areas that are used for aquaculture.

5-2. Materials and Methods

5-2-1. Red Tide Microalgae Red tide samples of *K. mikimotoi* ca. 20,000 cells/mL seawater and *C. polykrikoides* ca. 3,000 cells/mL seawater used in the experiment were collected from the surface of the Ariake Sea and Shiranui Sea, respectively in July 2000 (wild microalgae). They were cultured in modified SWM-3 medium (Chen *et al.*, 1969) until the algae were in the logarithmic growth phase (cultured microalgae). *C. antiqua* was collected from seawater in the Ariake Sea containing about 10 cells/mL in August 2000. It was cultured in SWM-3 medium until the alga was in the logarithmic growth phase for use in the experiment. Incubation temperature was 25°C, and photoperiod in the incubator was regulated under a 12L:12D cycle. Light intensity during the light period was about 60 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ on the surface of the culture flasks and tubes.

5-2-2. Preparation of Phlorotannins In this chapter, phlorotannins were prepared from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura that are more readily available than *E. bicyclis* in Kumamoto Prefecture. The composition of phlorotannins in *E. kurome* was previously confirmed to be similar to that in *E. bicyclis*.

E. kurome was collected near Tsuji Island, Kumamoto Prefecture in May 2000. The alga was washed with tap water to remove sediments and epiphytes, dried indoors by air-blowing, and pulverized. The algal powder was stored at -40°C until use. The algal powder (moisture *ca.* 10%, 800 g) was extracted with methanol (2,400 mL) with stirring at 5°C for 1 day. The extracts were concentrated *in vacuo* to a small volume, and to which was added methanol (240 mL), CHCl_3 (480 mL) and deionized water (180 mL). The upper layer, corresponding to the non-lipid fraction (Folch *et al.*, 1957), was extracted with ethylacetate (2×300 mL). The ethylacetate fraction was dried under reduced pressure (crude phlorotannins). The yield of the crude phlorotannins was about 3% of the algal powder.

The crude phlorotannins were composed of phloroglucinol (2%), eckol (9%), phlorofucofuroeckol A (28%), dieckol (24%), 8,8'-bieckol (7%), and others (30%); it was determined by using high performance liquid chromatography (Inertsil ODS column, 6×150 mm, GL Science Co., Tokyo, Japan). Elution was performed at a flow rate of 1.0 ml/min using a linear gradient from 30% to methanol with UV detection at 290nm. These compounds were fractionated by silicic acid chromatography on a column (15mm i.d. \times 150cm, Wakogel C-300HG, Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan) with CHCl_3 -methanol-water (80:20:2, v/v) as eluent. Each 5 mL fraction was collected and evaporated *in vacuo*. Purity checks were carried out using TLC (Nakamura *et al.*, 1996). Consecutive fractions that showed the same single spot on TLC were pooled. Namely eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol, and 8,8'-bieckol were isolated.

Phloroglucinol (as dihydrate, above 98% purity) was obtained from Wako Pure Chemical Ind. Terrestrial polyphenols, catechin (above 90% purity) and epigallocatechin gallate (EGCG, above 95% purity) were obtained from Kurita Water Ind.

(Tokyo, Japan).

5-2-3. Bioassays The isolated or crude phlorotannins and catechins were dissolved in 70% methanol, and aliquots in the 25 μL solutions were added to 20 mL of microalgal suspensions in test tubes. The cells were then cultured under the conditions described above. Cell numbers were counted with a microscope at 0.1, 0.5, 1, 2, 3, and 24 h after the addition of the polyphenols. Control tests with the same methanol amount were conducted simultaneously.

5-2-4. Acute Toxicity Test of Phlorotannins on Fish and Crab Red sea bream *Pagrus major*, 13.4 ± 1.3 (mean \pm SD) g and larval blue crab *Portunus trituberculatus*, carapace length *ca.* 2 mm were kindly provided by Kumamoto Prefectural Farming Fisheries Association in Japan. Tiger puffer *Fugu rubripes rubripes*, 102.2 ± 9.1 (mean \pm SD) g were purchased from a local mariculturist. The fish were acclimated to 25°C in filtered seawater in the laboratory for at least 14 days prior to use. For the experiments, red sea bream ($n=7$) and tiger puffer ($n=7$) were placed in two separate containers with 15 L filtered seawater and crude phlorotannins (200 mg/L). Blue crab ($n=7$) were placed in a container with 2 L filtered seawater and crude phlorotannins (200 mg/L). Parallel control tanks (without crude phlorotannins) were set up for each species. Water temperature was kept at 25°C . Dissolved oxygen was enhanced by air bubblers. The number of fish and crabs that survived after the 0.5 h-exposure were counted. All fish used in this experiment were free from any visible disease before the test.

5-3. Results

5-3-1. The Effects of the Crude Phlorotannins

The effects of the crude phlorotannins on cultured *K. mikimotoi* at different concentrations are shown in Fig. 5-1(a). In the 150 mg/L concentration medium, phlorotannins significantly inhibited swimming of *K. mikimotoi*. More than 98% of the cells of *K. mikimotoi* lost their motility within 0.5 h after the phlorotannins were added. At a phlorotannin concentration of 100 mg/L, over 90% of the cells changed to immotile cells

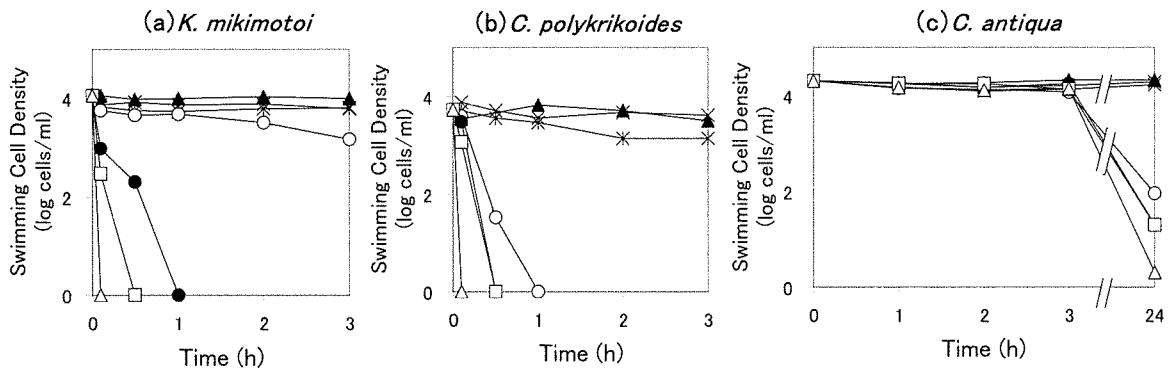


Fig. 5-1. Effects of phlorotannins on the motilities of cultured dinoflagellates, *K. mikimotoi* (a) and *C. polykrikoides* (b), and a raphidophyceae, *C. antiqua* (c). ▲, without phlorotannins; ×, 20 mg/L; *, 50 mg/L; O, 100 mg/L; ●, 150 mg/L; □, 200 mg/L; △, 500 mg/L crude phlorotannins.

within 3 h. At 50 mg/L, all motile cells were still swimming, but their moving speed decreased to a quarter of that of the control. After losing their motility, almost all of the immotile cells became round, and then expanded and burst (Fig. 5-2, 5-3). As time passed, the burst cells fragmented and became difficult to count. Hence, the ratio of burst cells shown in Fig. 5-3 is underestimated in the later period of the experiment, especially at 3 h. A half hour after the phlorotannin addition (150 mg/L in the medium), 24 round cells were transplanted into the normal medium.

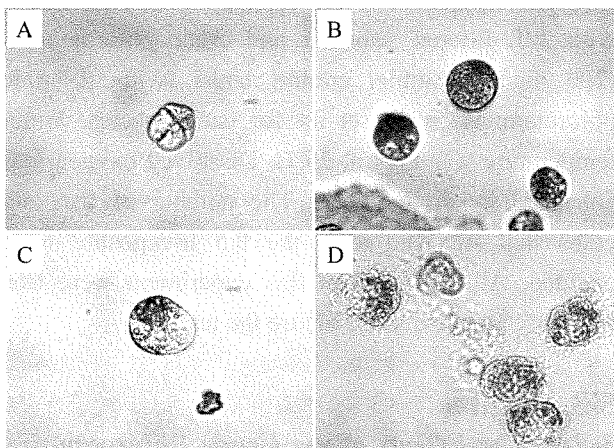


Fig. 5-2. Algalicidal process of phlorotannins against cultured *K. mikimotoi*. A, normal vegetative cell; B, rounded cells; C, expanded cell; D, burst cells.

No cells recovered to normal vegetative cells within 24 h; 60% of the cells burst and the rest remained round.

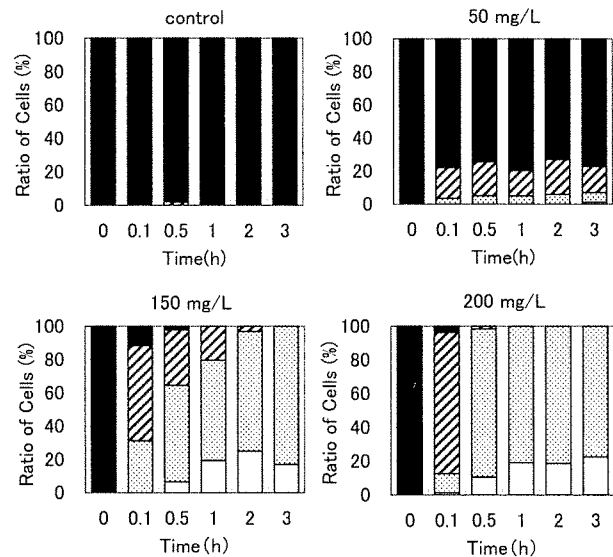


Fig. 5-3. Change in degraded cell ratio of *K. mikimotoi* after addition of phlorotannins. ■, swimming cells; ▨, immotile cells; ▩, rounded or expanded cells; □, burst cells.

The effects of the crude phlorotannins on cultured *C. polykrikoides* at different concentrations are also shown in Fig. 5-1(b). In the 100 mg/L concentration medium, 98% of the *C. polykrikoides* lost their motility within 0.5 h. Like *K. mikimotoi* cells, almost all of immotile *C. polykrikoides* cells became round, and then expanded and burst, successively (Fig. 5-4). On the other hand, the effects of the crude phlorotannins on cultured *C. antiqua* were much weaker (Fig. 5-1(c)). At a concentration of 500 mg/L, phlorotannins only slightly inhibited the swimming of

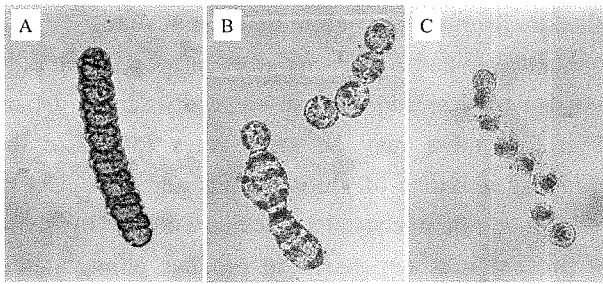


Fig. 5-4. Algicidal process of phlorotannins against cultured *C. polykrikoides*. A, normal vegetative cells; B, expanded cells; C, burst cells.

C. antiqua within 3 h. However, by the end of the 24 h incubation, over 99% of the cells were destroyed even with the 100 mg/L concentration .

The effects of the phlorotannins on wild (not cultured) *K. mikimotoi* and *C. polykrikoides* were also tested. Although there were some discrepancies, e.g., a stronger effect on wild *K. mikimotoi* and a weaker effect on wild *C. polykrikoides*, than on the respective cultured ones (Fig. 5-1, 5-5), almost all cells of *K. mikimotoi* and of *C. polykrikoides* lost their motility within 1 h in the medium containing 150 mg/L of crude phlorotannins.

5-3-2. The Effects of Isolated Phlorotannins

The effects of five isolated phlorotannins (phloroglucinol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol and 8, 8'-bieckol), and catechin and EGCG on cultured *K. mikimotoi* and *C. polykrikoides* are illustrated in Fig. 5-6. Among the isolated phlorotannins and the catechins tested, phlorofucofuroeckol A and EGCG showed the most potent algicidal activities against both microalgae. In the 100 mg/L concentration of phlorofucofuroeckol A, *K. mikimotoi* stopped swimming immediately. In the 50 mg/L concentration, *C. polykrikoides* stopped swimming within 0.5 h. No effects were observed with catechin or phloroglucinol during the test periods.

5-3-3. Acute Toxicity Test of Phlorotannins

Acute toxicity of phlorotannins on red sea bream (ca. 13 g), tiger puffer (ca. 102 g) and blue crab (ca. 2 mm) were investigated. Throughout the 0.5 h exposure period no fish or crab died. However, immediately

after red sea bream and tiger puffer were exposed to phlorotannins, the fishes writhed with gasping for several seconds or more, and then they eventually calmed down. Some of them ejected oral mucus. No effects were observed on the crab.

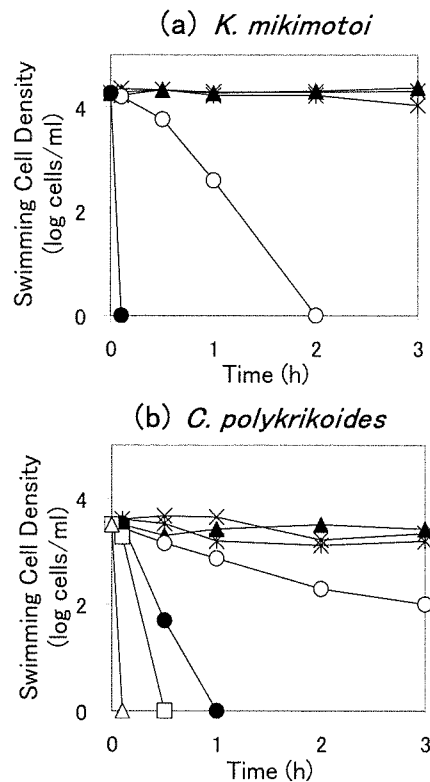


Fig. 5-5. Effects of phlorotannins on the motilities of wild dinoflagellates, *K. mikimotoi* (a) and *C. polykrikoides* (b). ▲, control; ×, 20 mg/L; *, 50 mg/L; ○, 100 mg/L; ●, 150 mg/L; □, 200 mg/L; △, 500 mg/L crude phlorotannins.

5-4. Discussion

In this chapter the author demonstrated that phlorotannins, especially phlorofucofuroeckol A, a pentamer of phloroglucinol, from *E. kurome* were very effective at killing or inhibiting the swimming of red tide dinoflagellates. Once microalgae became rounded by the addition of phlorotannins, they could not be restored to swimming cells. These effects were more immediate than those of bacteria (Fukami *et al.*, 1991, 1992; Imai *et al.*, 1993, 1995; Yoshinaga *et al.*, 1995, 1997; Kim *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998). The bacterial method needs at least several days to kill or

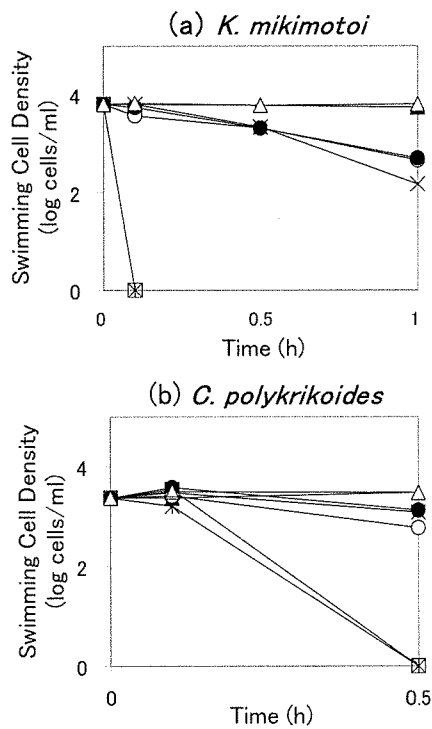


Fig. 5-6. Effects of isolated phlorotannins, catechin and epigallocatechin gallate on cultured *K. mikimotoi* and *C. polykrikoides*. ▲, phloroglucinol; ×, eckol; *, phlorofucofuroeckol A; ○, dieckol; ●, 8,8'-bieckol; △, catechin; □, epigallocatechin gallate (EGCG). Each polyphenol concentration in the medium was 100 mg/L for *K. mikimotoi*, and 50 mg/L

inhibit the growth of microalgae. Furthermore, the problem of how to multiply the bacteria to the levels needed to kill microalgae in the field (ca. 10^6 cells/mL) remains to be solved. In this study, the toxicity of phlorotannins was preliminarily tested, and no fish were killed by 0.5 h exposure to 200 mg/L phlorotannins. Although prolonged toxicity tests on fishes (e.g. different species, size and sex) are essential, the application of phlorotannins would be useful near the nursery. Moreover, the application may be more effective in the case of the red tide dinoflagellates congregating at the surface of the sea in the daytime. However the most effective and practical method in each case should be devised. Also, it will be essential to investigate the impact of treatments on many other marine animals including

planktonic organisms before field application.

E. kurome and *E. bicyclis* grow in the sea naturally and are used as foodstuff in some districts in Japan. Therefore there may be safer ways to utilize the algicidal activities of phlorotannins and/or EGCG to reduce red tide in coastal aquaculture areas. However, at present it is expensive to produce phlorotannins from algae. One solution might be to use crude extract directly.

The algal-killing mechanism of phlorotannins remains to be elucidated. Schulz *et al.* (1992) suggested that the antimicrobial activity of polyphenols might result from their interaction with bacterial enzymes and proteins. Ikigai *et al.* (1993) reported that catechins damage bacterial membranes. Furthermore, strong interactions between algal phlorotannins and proteins have been reported by Stern *et al.* (1996). It can therefore be presumed that the interactions of phlorotannins with microalgal proteins play important roles in the algicidal actions of phlorotannins. Especially, interactions with channel proteins in membranes may disturb the control of osmotic pressure, because after losing their motility, almost all of non-motile cells expanded and burst.

The author found a threshold of algicidal effect of phlorotannins. Namely, lower concentrations less than 50 mg/L had little effect on *K. mikimotoi* and *C. polykrikoides*, but there were large differences at the 100 mg/L concentration (Fig. 5-1, 5-5). A similar threshold of antibacterial effect of tea extracts (contains tannins) was pointed out by Nishiyama (1974). This tendency might be characteristic among tannins in inhibiting or killing microorganisms.

5-5. Summary

The algicidal effects of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on three species of red tide microalgae (*Karenia mikimotoi*, *Cochlodinium polykrikoides* and *Chattonella antiqua*) were examined. Swimming cell density of *K. mikimotoi* and *C. polykrikoides* decreased to less than 2% of the initial density within 30 min in medium containing 150 mg/L crude phlorotannins. After losing their motility, almost all of the cells became round. They then expanded and burst. Once cells had become

round, none of them recovered to normal vegetative cells within 24 h even if they were transplanted to normal medium. On the other hand, no change was observed on *C. antiqua* in the 500 mg/L medium within 3 h after inoculation. However, by 24 h, over 99% of the cells were destroyed even in the 100 mg/L medium.

Among the five phlorotannins isolated from *E. kurome*, phlorofucofuroeckol A, a pentamer of phloroglucinol, had the strongest algicidal activity, which was comparable to that of EGCG.

No mortality was observed among red sea bream *Pagrus major*, tiger puffer *Fugu rubripes rubripes* (body weights *ca.* 13 g and 102 g, respectively) or larval blue crab *Portunus trituberculatus* (total carapace length *ca.* 2 mm) which were exposed to 200 mg/L phlorotannins for 30 min.

Chapter 6. Bactericidal Activity of Phlorotannins (Nagayama *et al.*, 2002)

6-1. Introduction

Food-borne illnesses and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections are still a major problem in the world today. To help prevent and to treat these illnesses, many researchers have been studying the antimicrobial effects of various plant extracts, such as essential oils and tannins (May *et al.*, 2000; Burapadaja *et al.*, 1995). Recently the antimicrobial activities of tea (*Camellia sinensis*) extracts and/or tea catechins have attracted special interest (Yam *et al.*, 1997; Kolodziej *et al.*, 1999; Amarowicz *et al.*, 2000). Among tea catechins, epigallocatechin gallate (EGCG) has been shown to have the strongest antimicrobial activity (Amarowicz *et al.*, 2000; Mabe *et al.*, 1999). Similarly, several papers have described antimicrobial activity in algae (Caccamese *et al.*, 1981; Bennamara *et al.*, 1999). Horikawa *et al.* (1999) reported significant anti-MRSA activity by crude methanol extracts from 11 species of Japanese marine algae, and they isolated four bromindoles from the red alga *Laurencia brongniartii* as antibacterial substances. However, their study did not investigate the antibacterial substances of brown algae. To our knowledge, the antibacterial or bactericidal activities of marine tannins against food-borne pathogenic bacteria and MRSA have yet to be reported.

Ecklonia kurome has been utilized as a food product in Japan, and phlorotannins, which are oligomers of phloroglucinol, have been reported to be both anti-plasmin inhibitors (Nakayama *et al.*, 1989; Fukuyama *et al.*, 1990) and antioxidants (described in Chapter 4; Nakamura *et al.*, 1996). They have also been found to have algicidal activities against red tide microalgae (described in Chapter 5).

The present study was undertaken in order to examine the bactericidal effects of crude and purified phlorotannins from the brown alga *E. kurome* on pathogenic bacteria, primarily including food-borne pathogenic bacteria and MRSA. In addition, the effect of the administration of phlorotannins on male and female mice was investigated in order to confirm the safety of phlorotannins for mammals.

6-2. Materials and Methods

6-2-1. Bacterial Strains and Growth Conditions for Preincubation

Bacillus cereus (two strains), MRSA (nine strains), *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter fetus*, *C. jejuni* (three strains), *Escherichia coli* (three strains), *Salmonella enteritidis* (nine strains), *S. typhimurium* (four strains) and *Vibrio parahaemolyticus* (two strains) were obtained from our collection or from clinical isolates held within The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Japan.

The reference strains used in tests comprised: *S. aureus* Smith, *S. aureus* ATCC 25923 (MRSA), *S. pyogenes* ATCC 19615, *B. cereus* ATCC 19637, *C. fetus* CIP 53105, *C. jejuni* CIP 702, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* NIHJ JC-2, *S. enteritidis* S-48, *S. enteritidis* L-248, *S. enteritidis* L-540, *S. typhimurium* L-719, *S. typhimurium* L-767, *S. typhimurium* SIC-8401 and *S. typhimurium* ATCC 14028.

All the bacteria except for *Campylobacter* spp. were cultured aerobically without shaking in 10 mL of brain heart infusion (BHI) broth (Nissui, Tokyo, Japan), at 37°C for 18 h. NaCl (2.5%) was added to the medium used for *V. parahaemolyticus*. *Campylobacter* spp. were grown on fresh Skirrow agar plates (Merck, Tokyo, Japan), at 37°C for 48 h in a Campy Pouch (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

6-2-2. Preparation of Phlorotannins

The brown alga *Ecklonia kurome* Okamura was collected from an undersea forest of algae near Tsuji Island, Kumamoto, Japan, in May 2000 and washed with tap water to remove sediment and epiphytes, before being air-dried and pulverized. The algal powder (800 g, moisture *ca.* 10%) was extracted with methanol (2400 mL) with shaking (90 rpm) at 5°C for 48 h. The extracts were concentrated *in vacuo* to a small volume before methanol (240 mL), chloroform (480 mL) and deionized water (180 mL) were added, and then the upper and lower layers were separated (Folch *et al.*, 1957). The upper layer was extracted twice with ethylacetate (300 mL). The ethylacetate fraction was evaporated *in vacuo*. The extract is hereafter referred to as crude phlorotannins. The algal powder produced a yield of phlorotannins of about 3%.

The crude phlorotannins were composed of phloroglucinol (2%) and its oligomers: eckol (trimer, 9%), phlorofucofuroeckol A (pentamer, 28%), dieckol (hexamer, 24%), 8,8'-bieckol (hexamer, 7%) and others (unidentified tetramer etc., 30%). The components were identified by TLC (Nakamura et al., 1996) and determined quantitatively by HPLC (Inertsil ODS column, 6 × 150 mm, GL Science, Tokyo, Japan). Elution was performed at a flow rate of 1.0 mL/min using a linear gradient of 30-100% methanol with UV detection at 290 nm. These compounds were fractionated by silicic acid chromatography on a column (15 mm i.d. × 150 cm, Wakogel C-300HG; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) with chloroform:methanol:water (80:20:2, v/v) as the eluent. Each 5 mL fraction was collected and evaporated *in vacuo*. Consecutive fractions that showed a single spot representing eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol or 8,8'-bieckol on TLC were pooled (>90% purity). Phloroglucinol (as dihydrate, >98% purity) was obtained from Wako Pure Chemical Industries. Terrestrial polyphenols, catechin (>90% purity) and EGCG (>95% purity) were obtained from Kurita Water Industries (Tokyo, Japan).

6-2-3. Determination of Bactericidal Effects

The minimum bactericidal concentration (MBC) of the phlorotannins, taken as the lowest concentration that could kill 99.9% of the initial inoculum within 24 h, was determined using a broth microdilution method. All tests were performed in sensitivity test broth (StB; Eiken Chemical, Tokyo, Japan) in 24-well microtitre plates. All cultured cells were suspended in StB to give a concentration of 10^4 - 10^5 cfu/mL, and 1 mL of broth culture was pipetted into each well. The concentration of each inoculum was determined using viable counts on BHI agar (BHIA) plates for bacteria. Fresh Skirrow agar plates or 2.5% NaCl-added BHIA plates were used for *Campylobacter* or *Vibrio* spp., respectively. The isolated or crude phlorotannins and catechins were dissolved in 70% methanol, and 20 µL of the solution was added to each well, before being incubated with shaking (60 rpm) aerobically at 37°C for 24 h. To determine the MBCs, 20-200 µL of culture was removed from each well at various time points and incubated in BHIA. After aerobic

incubation at 37°C for 24 h, the colonies were enumerated. *V. parahaemolyticus* was tested in medium supplemented with 2.5% NaCl. Fresh Skirrow agar plates were used for *Campylobacter* spp. instead of BHIA, and these were incubated for 72 h. The microtitre and fresh agar plates seeded with *Campylobacter* spp. were incubated in a Campy Pouch. The methanol (final concentration, 1.4%) in the medium, did not affect the growth of the strains during the experiments. The experiments were repeated two or three times.

6-2-4. Administration of Crude Phlorotannins to Mice

Two hundred inbred 4-week-old ICR (Institute of Cancer Research) mice were obtained from Japan SLC (Shizuoka, Japan). After they had been acclimatized for 1 week, they were maintained throughout the study in a specific pathogen-free environment with a temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$, a humidity of $60 \pm 15\%$ and a 12 h light-dark cycle. The mice were housed in aluminum cages, each of which held 10 mice and they were provided with the pellet diet CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) *ad libitum*. In Experiment 1, crude phlorotannins were freely available. The mice were provided with the phlorotannins in solution (5000, 2500, 1250, 625 or 0 mg/L in tap water) *ad libitum* in 200-mL plastic water bottles. In Experiment 2, the crude phlorotannins were administered only once. After intragastric administration of 1 mL of the phlorotannin solution (5000, 2500, 1250, 625 or 0 mg/L in phosphate buffered saline), the mice were allowed free access to food and tap water. Each group comprised 10 male and 10 female mice. Body weights were recorded every 2 or 3 days: the initial weights of the male and female mice were 30.1 ± 1.6 and 25.8 ± 1.4 g (mean \pm SD), respectively. The consumption of the phlorotannin solution was measured every day in Experiment 1. The experiments continued for 14 days. This study was approved by the Ethical Committee for Animal Experiments, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute.

6-3. Results

6-3-1. Bactericidal Activity of Crude Phlorotannins

The crude phlorotannins showed bactericidal activity against all 35 strains tested: *S. aureus* (MRSA) (MBCs, 100-200 mg/L), *S. aureus* (MBC, 100 mg/L), *S. pyogenes* (MBC, 400 mg/L), *B. cereus* (MBCs, 200-400 mg/L), *C. fetus* (MBC, 50 mg/L), *C. jejuni* (MBC, 50 mg/L), *E. coli* (MBCs, 200-400 mg/L), *S. enteritidis* (MBCs, 200-800 mg/L), *S. typhimurium* (MBC, 200 mg/L) and *V. parahaemolyticus* (MBC, 200 mg/L). Overall, *Campylobacter* spp. was most susceptible followed by *S. aureus*. There was considerable variation in the MBCs among the different strains of *S. enteritidis*. Of all the bacteria tested, only two strains of *Vibrio* were killed within 2 h at twice the MBC. The other bacteria were largely unaffected by this concentration, even at 4 h (data not shown).

6-3-2. Bactericidal Activity of Purified Phlorotannins

The MBCs of five purified phlorotannins (phloroglucinol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol and 8, 8'-bieckol), catechin and EGCG against six reference strains and the clinical isolate of *V. parahaemolyticus* were determined (Table 6-1). For all the polyphenols, the MBCs were lowest for *C. jejuni*

among the bacteria tested. The lowest MBCs against *C. jejuni* and the other bacteria were, 0.03 and 0.13-0.54

$\mu\text{mol/mL}$ for both dieckol and 8,8'-bieckol; 0.08 and 0.33-1.08 $\mu\text{mol/mL}$ for both eckol and phlorofucofuroeckol A; and 0.03 and 0.44-1.75 $\mu\text{mol/mL}$ for EGCG, respectively. On the whole, the bactericidal effects of eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol and 8, 8'-bieckol were more pronounced than those of the catechins, although EGCG had a similar MBC to both dieckol and 8,8'-bieckol against *C. jejuni*.

Like the crude phlorotannins, the purified phlorotannins killed only *V. parahaemolyticus* within a short time (Figure 6-1). At twice the MBCs, eckol,

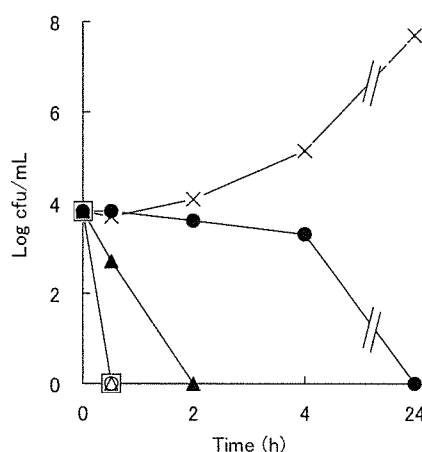


Fig. 6-1. Time-kill curve for *V. parahaemolyticus* KR1151 obtained using purified phlorotannins and EGCG at twice the MBCs. ×, without phlorotannins; □, eckol; △, phlorofucofuroeckol A; ○, dieckol; ▲, 8,8'-bieckol; ●, EGCG.

Table 6-1. MBCs of five purified phlorotannins, catechin and EGCG against seven strains of pathogenic bacteria.

| Strain | MBC ($\mu\text{mol/mL}$) | | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------|-----------------------|---------|--------------|----------|-------|
| | phloroglucinol | eckol | phlorofucofuroeckol A | dieckol | 8,8'-bieckol | catechin | EGCG |
| Gram-positive bacteria | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923(MRSA) | >6.35 | 0.54 | 0.33 | 0.13 | 0.13 | >2.76 | 0.44 |
| <i>B. cereus</i> ATCC 19637 | >6.35 | 1.08 | 0.66 | 0.54 | 0.54 | >2.76 | >1.75 |
| Gram-negative bacteria | | | | | | | |
| <i>C. jejuni</i> CIP702 | 0.79 | 0.08 | 0.08 | 0.03 | 0.03 | 0.34 | 0.03 |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | >6.35 | 0.54 | 0.66 | 0.27 | 0.27 | >2.76 | 1.75 |
| <i>S. enteritidis</i> S-48 | >6.35 | 0.54 | 0.33 | 0.27 | 0.27 | >2.76 | 1.75 |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 | >6.35 | 0.54 | 0.33 | 0.27 | 0.27 | >2.76 | 1.75 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> KR1151 | >6.35 | 1.08 | 0.33 | 0.27 | 0.27 | >2.76 | 0.44 |

phlorofucofuroeckol A and dieckol all killed the bacteria within 0.5 h, and 8, 8'-bieckol killed them within 2 h; on the other hand, EGCG did not show any bactericidal activity, and yet it inhibited the growth of the bacteria within 4 h.

6-3-3. Administration of Crude Phlorotannins to Mice

In Experiment 1, the maximum daily intake of phlorotannins was 1500 mg/kg of initial body weight in males and 1286 mg/kg in females. In Experiment 2, the maximum dose of phlorotannins was 168.2 mg/kg in males and 193.7 mg/kg in females. Survival in all groups at the end of 14 days was 100% (Table 6-2). Moreover, no harmful effects were observed even with the largest administration of crude phlorotannins, and the rate of weight gain in all groups was no less than that of the controls. No signs or symptoms of disorders were observed in any of the groups, in either experiment.

activity of brown algal phlorotannins against a range of pathogenic bacteria. All the crude and purified phlorotannins, with the exception of phloroglucinol, showed bactericidal activity against all the strains tested.

Several studies have found that catechins exhibit stronger antibacterial effects on Gram-positive than on Gram-negative bacteria (Ikigai *et al.*, 1993; Toda *et al.*, 1990). However, in the present study, we could not find any remarkable difference in susceptibility to phlorotannins between Gram-positive and Gram-negative bacteria. For example, *Campylobacter* spp, which are Gram-negative, were the most sensitive among the bacteria tested. Moreover, the species specificity of the bactericidal effect of the phlorotannins may be smaller than that of EGCG (Table 6-1). However, since the sample size (the number and kinds of strains) was small, further experiments may be necessary to confirm these tendencies.

Table 6-2. Effect of phlorotannins on weight gain in mice.

| Experiment ^a | Sex | Concentration of crude phlorotannins (mg/L) | Intake of phlorotannins ^b (mg/kg) | weight gain (%) ^c | |
|-------------------------|---------------|---|--|------------------------------|------------------------|
| | | | | 7days | 14days |
| Expt. 1 | male (n=10) | 5000 | 1500 | 116.9±1.1 | 127.1±2.9 |
| | | 2500 | 680 | 116.5±0.9 | 127.4±1.6 |
| | | 1250 | 347 | 115.0±0.7 | 125.5±1.1 |
| | | 625 | 170 | 115.0±1.4 | 124.7±1.5 |
| | | control | 0 | 117.3±0.6 | 128.7±1.1 |
| | female (n=10) | 5000 | 1286 | 110.6±2.8 | 120.1±1.3 |
| | | 2500 | 619 | 107.3±0.9 | 117.0±1.6 |
| | | 1250 | 345 | 107.9±1.4 | 115.4±2.4 |
| | | 625 | 199 | 108.8±0.9 | 119.6±2.3 |
| | | control | 0 | 109.2±1.3 | 118.1±1.3 |
| Expt. 2 | male (n=10) | 5000 | 168.2 | 115.6±1.0 | 126.6±1.4 |
| | | 2500 | 80.7 | 115.2±0.9 | 126.7±1.3 |
| | | 1250 | 42.3 | 118.9±1.8 | 130.1±1.8 ^d |
| | | 625 | 20.8 | 114.3±0.5 | 125.5±1.0 |
| | | control | 0 | 114.7±1.0 | 125.1±1.2 |
| | female (n=10) | 5000 | 193.7 | 107.7±0.8 | 117.9±1.1 |
| | | 2500 | 92.0 | 106.1±0.9 | 115.8±2.0 |
| | | 1250 | 49.3 | 109.2±0.9 | 121.3±1.8 |
| | | 625 | 24.5 | 108.1±1.2 | 116.4±1.8 |
| | | control | 0 | 108.0±1.4 | 116.2±1.4 |

^aIn Experiment 1, the mice were provided with phlorotannins in solution ad libitum. In Experiment 2, the mice were administered 1mL with phlorotannin solution. ^bDaily intake of phlorotannins per initial weight in Experiment 1.

^cWeight gain is shown as the mean ± S.E. of 10 mice. ^dSignificantly different from control (P<0.05, Student's t-test).

6-4. Discussion

This is the first study to demonstrate bactericidal

Moreover, tests to determine whether or not mutants resistant to the phlorotannins can be generated need to

be performed in the future.

Interestingly, the phlorotannins killed *V. parahaemolyticus* within 0.5-2 h when administered at twice the MBCs (Fig. 6-1). The reason for this is unclear, however, a similar effect of phlorotannins was found against other *Vibrio* spp., *V. vulnificus*, *V. cholerae* and *V. anguillarum* (data not shown).

In this chapter, the MBCs of polyphenols are expressed as $\mu\text{mol/mL}$ to allow a comparison of activities per molecule (Table 6-1). The bactericidal effects of phlorotannins tend to increase with polymerization of phloroglucinol. This tendency is different from the case of tea catechins, whose effects are augmented with the addition of gallate-group.

Schulz *et al.* (1992) suggested that the antimicrobial activity of polyphenols may result from their interaction with bacterial enzymes and proteins. Ikigai *et al.* (1993) reported that catechins damage bacterial cell membranes. Furthermore, strong interactions between algal phlorotannins and proteins have been reported by Stern *et al.* (1996) Although the mode of the activity of phlorotannins is still obscure, the interactions of phlorotannins with bacterial proteins may play an important role in the bactericidal action of phlorotannins.

E. kurome as well as *Eisenia bicyclis* is used as a food product in some areas of Japan. Accordingly, it is of interest to note that no harmful effects were observed on oral administration of a large quantity of phlorotannins in mice: 90.0 g/60 kg per day in males and 64.3 g/50 kg per day in females, or a single dose of 10.1 g/60 kg at in males and 9.7 g/50 kg in females.

The results obtained in the present study suggest that phlorotannins have pronounced bactericidal activity against pathogenic bacteria. Therefore phlorotannins as well as *E. kurome* and *E. bicyclis* may be useful as a food product or as a drug with antibacterial activity.

6-5. Summary

The bactericidal activity of phlorotannins from brown algae against food-borne pathogenic bacteria (25 strains), MRSA (nine strains) and *Streptococcus pyogenes* (one strain) was examined and compared

with that of catechins. In addition, the effect of the oral administration of phlorotannins on mice was investigated.

Phlorotannins, which are oligomers of phloroglucinol, were extracted from thalli of the brown alga *Ecklonia kurome* and prepared by silicic acid chromatography. The bactericidal activity of polyphenols was determined using a broth microdilution method.

Of the bacteria tested, *Campylobacter* spp. were the most susceptible to the phlorotannins. MBCs of the crude phlorotannins, dieckol and 8,8'-bieckol (hexamers), and that of EGCG against *C. jejuni* were 50 mg/L, 0.03 $\mu\text{mol/mL}$ and 0.03 $\mu\text{mol/mL}$, respectively. On the whole, the bactericidal effects of the phlorotannins were more pronounced than those of the catechins. The phlorotannins were as effective against MRSA as against the other bacteria tested. At twice the MBCs, all *Vibrio parahaemolyticus* were killed within 0.5-2 h. However, at the same concentration, catechins showed little bactericidal activity within 4 h. No effect on mice was observed with oral administration of the phlorotannins under the conditions tested.

Chapter 7. Bactericidal Effect of Phlorotannins on *Vibrio* spp.

7-1. Introduction

Vibrio spp. are ubiquitous within the marine environment. Several of these are recognized as human pathogens and are considered to be one of the major causes of food-borne illnesses today (Pan *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 1999; Ministry of Health and Welfare 2000; Ministry of Health, Labor and Welfare 2001). *Vibrio parahaemolyticus* is a halophilic pathogen found on fish and seafoods. In Japan, 50-70% of the outbreaks of bacterial food-borne infections are caused by *V. parahaemolyticus* (Sakazaki *et al.*, 1986). *V. vulnificus* is an emergent and virulent human pathogen (Blake *et al.*, 1979; Tacket *et al.*, 1984), and the bacteria is a well-known cause of septicemia, especially in patients with liver disease (Tacket *et al.*, 1984; Morris, 1988). In addition to food-borne illnesses, wound infections can result from the handling of shrimp (Hoffmann *et al.*, 1988; Chuang *et al.*, 1989). To help prevent infections with *Vibrio* spp., numerous investigations have focused on their inhibition. Kaspar *et al.* (1993) and Motes *et al.* (1998) reported the influence of water temperature and salinity on the growth and survival of *V. vulnificus* in seawater. Toda *et al.* (1989, 1991) reported significant antibacterial activity of tea extracts against *V. parahaemolyticus* and/or *V. cholerae* O1. On the other hand, in the previous chapter, the author described how *V. parahaemolyticus* is sensitive to phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*, and how it was killed within 0.5-2 h at twice the MBC (described in Chapter 6; Nagayama *et al.*, 2002). However to date, no reports have described the antibacterial effect of catechins or phlorotannins on *V. vulnificus*.

Some fish, shrimp, crab and shellfish are transported while still alive. Ozone, ultraviolet (UV) rays, and/or artificial seawater are sometimes used to kill or inhibit the multiplication of pathogenic or spoilage bacteria in seawater during the preservation or transportation of fishes. However ozone is foul-smelling, while UV rays and artificial seawater are not able to kill bacteria on the surface of the fish. Moreover, such equipment is expensive.

In the present study, the antibacterial activity of

phlorotannins against *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* was investigated at various temperatures. Furthermore, the application of the activity of phlorotannins to live fish and shrimp was investigated with regard to the practical use of phlorotannins during their preservation or transportation.

7-2. Materials and Methods

7-2-1. Bacterial Strains and Growth

Conditions for Preincubation *Vibrio parahaemolyticus* (4 strains), *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* (non-O1), used in the present study were clinical isolates held within The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Japan. The bacteria were cultured aerobically without shaking in 10 mL of brain heart infusion (BHI) broth from Nissui, Japan, at 37°C for 18 h. 2.5 % NaCl was added to the medium used for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*.

7-2-2. Preparation of Crude Phlorotannins

The brown alga *Ecklonia kurome* Okamura was collected from an undersea alga forest near Tsuji Island, Kumamoto, Japan in July 2000. Preparation of phlorotannins from the alga was performed as previously described (Nagayama *et al.*, 2002). The yield of phlorotannins was about 3% of the algal powder (moisture *ca.* 10%). The phlorotannins were composed of phloroglucinol (2%), eckol (9%), phlorofucofuroeckol A (28%), dieckol (24%), 8,8'-bieckol (7%), and others (30%); this was determined by using high-performance liquid chromatography (Inertsil ODS column, 6 × 150 mm, GL Science Co., Tokyo, Japan) as described in Chapter 5.

7-2-3. Determination of the Bactericidal Effect on *Vibrio* in PBS

The *Vibrio* culture was sedimented by centrifugation (8,000 rpm × 5 min), washed with phosphate buffered saline (PBS, Nissui), then resuspended in PBS to give a concentration of 10³-10⁴ cells/mL. 2.1% NaCl was added to the PBS for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. The MBC of the phlorotannins, that is the lowest concentration which is capable of killing 99.9% of the initial

inoculum within 24 h, was determined. All tests were performed in PBS for *V. cholerae* or 2.1% NaCl-added PBS for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in 24-well microtitre plates. All cultured cells were suspended in PBS or 2.1% NaCl-added PBS to give a concentration of 10^3 - 10^4 cells/mL, and 1 mL of the samples was pipetted into each well. The concentration of each inoculum was confirmed using viable counts on BHI agar (BHIA) plates for bacteria. 2.5% NaCl was added to the BHIA used for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. Positive growth controls were incubated in every test. The phlorotannins were dissolved in 70% ethanol, and 20 μ L of the solution were added to the well, and incubated with shaking (60 rev min⁻¹) aerobically at 4°C, 25°C or 37°C for 24 h. To determine the MBCs, 20-200 μ L of the culture were removed from each well at various time points, and incubated in BHIA. After aerobic incubation at 37°C for 24 h, the colonies were enumerated. 2.5% NaCl was added to the medium used for *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. The ethanol (final concentration, 1.4%) in the medium, did not affect the growth of the strains during the experiments.

7-2-4. Determination of the Bactericidal Effect on *V. vulnificus* Adhering to the Body of Tiger Shrimp Tiger shrimp *Penaeus japonicus*, 26.2 ± 2.1 (mean \pm SD) g were purchased from a local mariculturist. The shrimp were contaminated by being dipped into a diluted culture of *V. vulnificus* (3×10^5 CFU/mL) for 10 min. Then, the shrimp were transferred to filtered seawater containing the phlorotannins (0, 100 or 400 mg/L) and removed after 5 min. The water temperature was kept at 25°C for this test, and dissolved oxygen was enhanced by air bubblers. The shrimp were subsequently packed into a paper box with sawdust and kept at 15°C. At 1, 24 and 48 h after being packed into the box, the surface of the body of the shrimp (n=3) was wiped with a piece of sterilized gauze soaked in 2.1% NaCl-added PBS and a piece of dry sterilized gauze, successively. To determine the bactericidal effect of phlorotannins, these pieces of gauze were washed in 20 mL PBS with 2.1% NaCl, and 50-1,000 μ L of the sample were

incubated in thiosulfate citrate bile saccharose (TCBS) agar (Nissui). After aerobic incubation at 37°C for 24 h, the dark-green colonies were counted.

All the shrimp used in this experiment were free from any visible disease before the test. Few colonies were detected in the seawater or on the shrimp in the pilot study with TCBS agar.

7-2-5. Determination of the Bactericidal Effect on *V. parahaemolyticus* Adhering to the Body of Red Sea Bream

Red sea bream *Pagrus major*, 21.6 ± 5.1 (mean \pm SD) g were kindly provided by the Kumamoto Prefectural Farming Fisheries Association in Japan. The fish were contaminated by being dipped into a diluted culture of *V. parahaemolyticus* (5×10^4 CFU/mL) for 15 min. Then, 25 fish were transferred into separate containers with 25 L filtered seawater containing the phlorotannins (0, 25, 50 or 75 mg/L). The water temperature was kept at 25°C for this test, and dissolved oxygen was enhanced by air bubblers. At 3, 6, 12 and 24 h after the transfer of the fish, the surface of the body of the fish (n=5) was wiped with a piece of sterilized gauze soaked in 2.1% NaCl-added PBS and a piece of dry sterilized gauze, successively. To determine the bactericidal effect of phlorotannins, these pieces of gauze were washed in 20 ml PBS with 2.1% NaCl, and 50-1,000 μ L of the sample were incubated in TCBS agar (Nissui). After aerobic incubation at 37°C for 24 h, the dark-green colonies were counted.

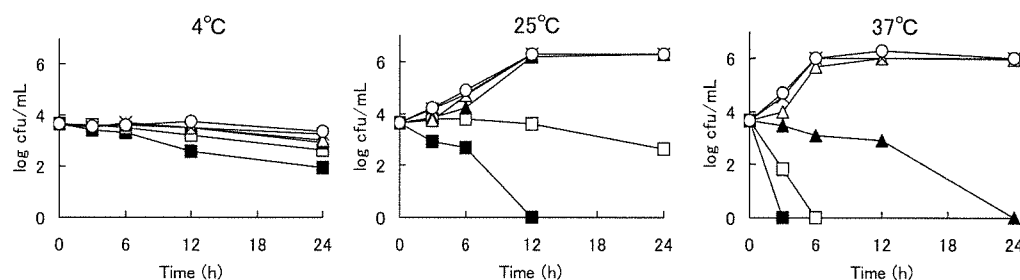
All the fish used in this experiment were free from any visible disease before the test. Few colonies were detected in the seawater or on the fish in the pilot study with TCBS agar.

7-3. Results

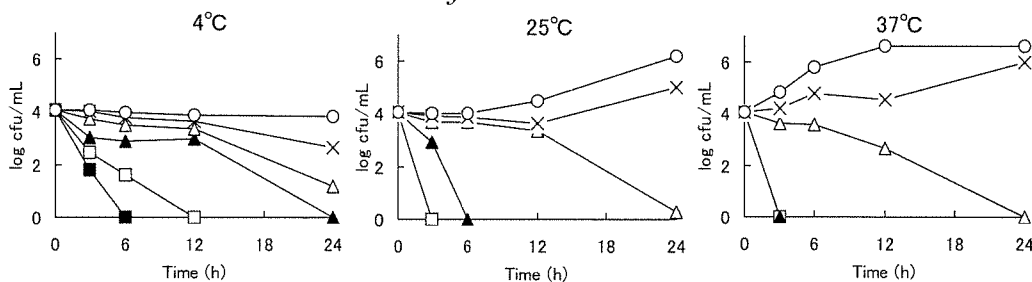
7-3-1. Bactericidal Effect on *Vibrio* in PBS

The bactericidal effect of phlorotannins on 3 species of *Vibrio* at various temperatures is shown in Fig. 7-1. Overall, all the strains were most susceptible at 37°C and most resistant at 4°C. The MBCs of the phlorotannins against *V. parahaemolyticus* KR1151 at 4, 25 and 37°C were more than 100, 100 and 25 mg/L, respectively. 100 mg/L of phlorotannins killed more

V. parahaemolyticus KR1151



V. vulnificus KR061759



V. cholerae KR080023

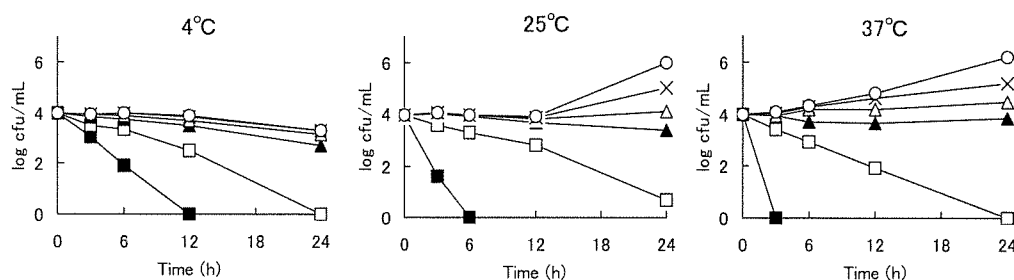


Fig. 7-1. Time-kill curve for *V. parahaemolyticus* KR1151, *V. vulnificus* KR061759, and *V. cholerae* KR080023 at 4, 25 and 37°C. ○, without phlorotannins; ×, 6.25 mg/L; △, 12.5 mg/L; ▲, 25 mg/L; □, 50 mg/L; ■, 100 mg/L phlorotannins.

than 99.9% of the bacteria within 3 h at 37°C and within 12 h at 25°C, but did not show any bactericidal effect within 24 h at 4°C. The bactericidal effect on the other 3 strains of *V. parahaemolyticus* (KR1109, KR1613, and KR1645) was approximately the same as that on *V. parahaemolyticus* KR1151 (data not shown). On the other hand, the MBC of the phlorotannins against *V. vulnificus* KR061759 at the 3 temperatures was 12.5 mg/L. Moreover, 25 mg/L of phlorotannins killed more than 99.9% of the bacteria within 3 h at

37 °C and within 6 h at 25°C. As in the case of *V. vulnificus*, the phlorotannins showed the same MBC (50 mg/L) at all 3 temperatures against *V. cholerae* KR080023. Moreover, 100 mg/L of phlorotannins killed more than 99.9% of the bacteria within 3 h at 37°C, within 6 h at 25°C, and within 12 h at 4°C. The bactericidal effect of the phlorotannins in a short time on the most susceptible strain (*V. vulnificus* KR061759) was investigated (Fig. 7-2). 800 mg/L of phlorotannins killed all the bacteria within 0.5 h, while

400 mg/L and 200 mg/L killed all within 1 h, and 100 mg/L killed all within 2 h at 37°C.

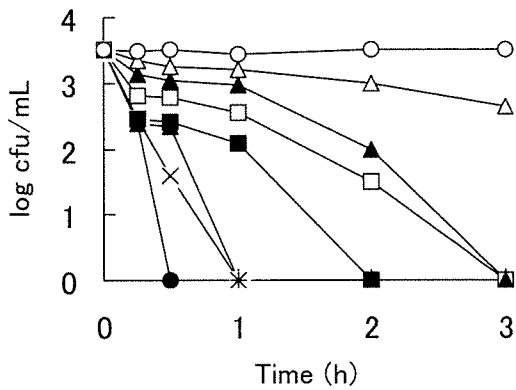


Fig. 7-2. Time-kill curve for *V. vulnificus* KR061759 at 37°C. ○, without phlorotannins; △, 12.5 mg/L; ▲, 25 mg/L; □, 50 mg/L; ■, 100 mg/L; +, 200 mg/L; ×, 400 mg/L; ●, 800 mg/L phlorotannins.

7-3-2. Bactericidal Effect on *V. vulnificus* Adhering to the Body of Tiger Shrimp The bactericidal effect of phlorotannins on *V. vulnificus* KR061759 attached to the surface of tiger shrimp is shown in Fig. 7-3. Over 99% of the bacteria on the surface of the body of the shrimp was killed within 1 h after 5-min exposure to the phlorotannins (400 mg/L), however the phlorotannins showed little bactericidal effect at the concentration of 100 mg/L. By 24 h after the 5-min exposure, the number of the bacteria had decreased in the control group, however 2.6×10^3 CFU of bacteria per shrimp was detected. On the other hand, no colonies were detected on the surface of the shrimp that were exposed to the phlorotannins (400 mg/L).

7-3-3. Bactericidal Effect on *V. parahaemolyticus* Adhering to the Body of Red Sea Bream The bactericidal effect of phlorotannins on *V. parahaemolyticus* KR1151 attached to the surface of the body of red sea bream is shown in Fig. 7-4. After transfer of the fish to the

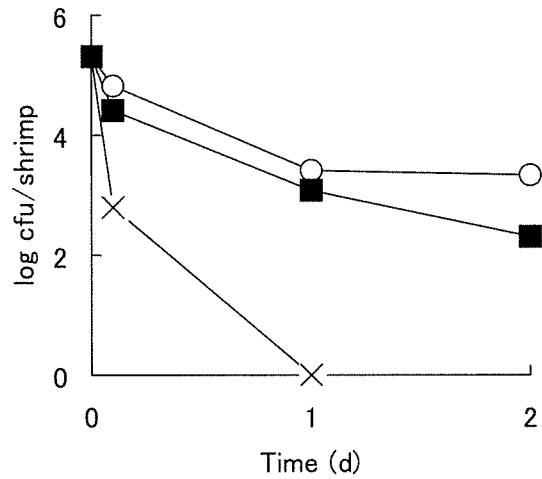


Fig. 7-3. Bactericidal effect of phlorotannins on *V. vulnificus* KR061759 adhering to the surface of tiger shrimp. ○, without phlorotannins; ■, 100 mg/L; ×, 400 mg/L phlorotannins.

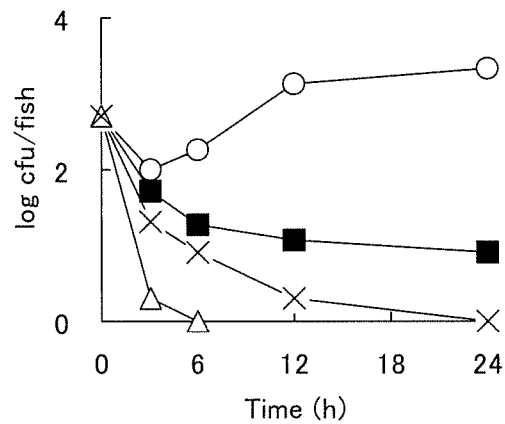


Fig. 7-4. Bactericidal effect of phlorotannins on *V. parahaemolyticus* KR1151 adhering to the surface of red sea bream. ○, without phlorotannins; ■, 25 mg/L; ×, 50 mg/L; △, 75 mg/L phlorotannins

seawater with or without phlorotannins, some of the bacteria on the surface of the fish left the fish and moved into the water. Therefore, in all groups, the number of bacteria on the surface of the fish at 3h was less than that at 0 h. However the bacteria at a phlorotannin concentration of 0 mg/L began to multiply after 3 h. At the concentration of 75 mg/L, bacteria were not detected on the surface of the fish

within 6 h. At 50 and 25 mg/L, the number of detected bacteria was less than 1% that of the control after 12 h. Namely, the phlorotannins showed a bactericidal effect at 75 and 50 mg/L and an antibacterial effect at 25 mg/L.

7-4. Discussion

This is the first study to demonstrate the bactericidal activity of phlorotannins against *V. vulnificus* and *V. cholerae*. As in the case of *V. parahaemolyticus* (Nagayama *et al.*, 2002) phlorotannins killed these *Vibrio* strains within a short time. The activity was more pronounced at a high temperature than at a low temperature (Fig. 7-1). Although the reason for this is unclear, this result would seem to suggest that it is preferable to use phlorotannins with bactericidal activity against *Vibrio* at a higher temperature. On the other hand, the MBC of phlorotannins against *V. parahaemolyticus* in PBS was lower than that in the medium used in the experiment in Chapter 6 (Nagayama *et al.*, 2002). The reason for this difference may be that strong interactions between phlorotannins and proteins present in the medium results in a reduction in phlorotannins (Stern *et al.*, 1996).

Many researchers have published reports about controlling *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and/or *V. cholerae*, and some of them have described the applications of their data. Koo *et al.* (2000) reported the acid sensitivity of *V. vulnificus*, and described the applications of their data to clarify the survival of *V. vulnificus* in acid-containing foods and in the gastrointestinal tract. Toda *et al.* (1992) investigated the protective activity of catechins against *V. cholerae* O1 using mice and rabbits, and suggested the possibility that catechins demonstrate oral therapeutic activity against *V. cholerae* O1. However, no application studies have demonstrated the ability of natural antibacterial substances to reduce the number of *Vibrio* bacteria on the surface of live fish.

In the present study, the applications of the bactericidal activity of phlorotannins were investigated. Exposure of tiger shrimp to phlorotannins for only 5 minutes accelerated the decrease in the number of *V. vulnificus* adhering to the body of the shrimp. Even though the 5-min exposure of shrimp to phlorotannins may not be completely

effective on *Vibrio* (e.g. in the alimentary canal of the shrimp), the exposure of shrimp to phlorotannins may be effective for decreasing the risk of food-borne infections of *Vibrio* and in particular, the wounding infections of *V. vulnificus*. On the other hand, 3-12-h exposures of red sea bream to phlorotannins (25-75 mg/L) showed either a bactericidal or an antibacterial effect on *V. parahaemolyticus* on the surface of the body of red sea bream. These results suggest that phlorotannins may be useful since they have an antibacterial effect, thereby killing harmful *Vibrio* or inhibiting the multiplication of bacteria adhering to the body of fish or shrimp during their preservation or transportation.

7-5. Summary

The bactericidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* was examined. All the strains were most susceptible at 37°C and most resistant at 4°C under the conditions tested. The MBCs of the phlorotannins against *V. parahaemolyticus* at 4, 25 and 37°C were more than 100, 100 and 25 mg/L, respectively. 100 mg/L of phlorotannins killed more than 99.9% of the bacteria within 3 h at 37°C. The MBC of the phlorotannins against *V. vulnificus* at the 3 temperatures was 12.5 mg/L. However, 25 mg/L of phlorotannins killed more than 99.9% of the bacteria within 3 h only at the condition of 37°C. As in the case of *V. vulnificus*, the phlorotannins showed the same MBC (50 mg/L) at all 3 temperatures against *V. cholerae*. However, 100 mg/L of phlorotannins killed more than 99.9% of the bacteria within 3 h only at 37°C. With 5-min exposure to the phlorotannins (400 mg/L), over 99% of the *V. vulnificus* adhering to the surface of the body of the tiger shrimp was killed within 1 h and no colonies were detected within 24 h. At a phlorotannin concentration of 75 mg/L, *V. parahaemolyticus* was not detected on the surface of the body of red sea bream within 6 h. At 50 and 25 mg/L, the number of detected bacteria was less than 1% of that of the control after 12 h.

Chapter 8. General Discussion

In this thesis, the author described the development of a method to detect antioxidative substances, and then identified the detected substances in algae. Moreover, the author investigated the antimicrobial activity of these substances against harmful microorganisms.

In Chapter 2, the author described the development of a new method to specifically detect antioxidative substances, using a combination of TLC followed by the subsequent bleaching of sprayed pigments by UV irradiation. The method is not only rapid and simple, but also sensitive. Less than one μg of antioxidative substances is detectable with this method. Using this method, the authors detected remarkable amounts of antioxidative substances in the extracted lipids of the brown alga, *Ishige okamurae*.

In Chapter 3, the author identified the antioxidative substances which had been detected in *Ishige okamurae* in Chapter 2 as being tocopherols. Moreover, the contents of α , β , γ and δ -tocopherols in *I. okamurae* and twenty-three other algae were quantitatively determined. Of all the algae examined, higher amounts of tocopherols were found in *I. okamurae*. These were five to six times higher than the amount of tocopherols in *H. fusiformis*, hitherto known as the alga with the highest content of tocopherols (Kanematsu *et al.*, 1983; Miyashita *et al.*, 1987). The author also detected some antioxidative substances in methanol extracts from the brown alga *E. bicyclis*.

In Chapter 4, the author isolated and identified phlorotannins from the brown alga *E. bicyclis* as being antioxidants. The identified phlorotannins were phloroglucinol and its oligomers: eckol (trimer), phlorofucofuroeckol A (pentamer), dieckol (hexamer) and 8,8'-bieckol (hexamer).

In Chapter 5, the author showed that phlorotannins, especially phlorofucofuroeckol A, a pentamer of phloroglucinol, from *E. kurome* are very effective at killing or inhibiting the swimming of fish-killing dinoflagellates. Similarly, the author confirmed that phlorotannins are effective at inhibiting the swimming of *Heterocapsa circularisquama*, which is known as a

novel shellfish-killing dinoflagellate. After losing its motility, at 50 mg/L phlorotannins *H. circularisquama* became a temporary cyst. It was then consumed and digested by the pearl oyster (*Pinctada martensii*). In addition, most of the cells of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium catenella*, shellfish-poisoning dinoflagellates, changed to immotile cells within 0.5 h at 50 mg/L and 100 mg/L phlorotannins, respectively (data not shown). These results suggest that the algicidal effect of phlorotannins may be useful for protecting not only finfish, but also shellfish, from the harmful effects of algal bloom near nurseries. In addition, the algicidal effect may be useful for preventing shellfish-poisoning.

In Chapter 6, the author demonstrated that phlorotannins showed bactericidal activity against a range of pathogenic bacteria, and noted that no harmful effects were observed upon oral administration of a large quantity of phlorotannins in mice. Of all the bacteria tested, only two strains of *Vibrio* were killed within 2 h at twice the MBC. The other bacteria were scarcely affected by this concentration, even at 4 h. Therefore, subsequent experiments regarding the bactericidal activity of phlorotannins against 3 species of *Vibrio* were carried out in Chapter 7.

In Chapter 7, the author showed that *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* were most susceptible at 37°C and most resistant at 4°C. Most of the *V. vulnificus* on the surface of the body of tiger shrimp was killed within 1 h after 5-min exposure to the phlorotannins (400 mg/L). Moreover 3-12-h exposures of red sea bream to phlorotannins (25-75 mg/L) showed either a bactericidal or an antibacterial effect on *V. parahaemolyticus* on the surface of the body of red sea bream. These data suggest that phlorotannins may be effective for killing *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* and for inhibiting the multiplication of these bacteria adhering to the body of fish or shrimp during their preservation or transportation.

In this research, the author has described some of the useful physiological activities of phlorotannins; antioxidant, algicidal and bactericidal activities. Moreover the author has confirmed that phlorotannins show antiviral activity against 19 species of harmful

virus (data not shown). However, with regard to the practical use of phlorotannins, some problems still need to be solved. Nevertheless, the author expects this study about phlorotannins from brown algae to contribute towards the utilization of some species of brown algae as a source of phlorotannins.

Acknowledgments

The author wishes to express his healthy gratitude to Dr. Takashi Nakamura, Emeritus Professor of Kyushu University who gave useful advice in many ways throughout this study.

The author also wish to express my deep sense of gratitude to Dr. Makoto Ito, Professor of Laboratory of Marine Resource Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

The author acknowledge with great appreciation Professor Dr. Tsuneo Honjo of Laboratory of Marine Environmental Science, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, for useful advice and for critical review of the manuscripts.

The author thanks Professor Dr. Masayoshi Iio of Laboratory of Food Hygienic Chemistry, for critical review of the manuscripts and helpful discussions.

The author also wishes to express his sincere appreciation to I. Hirayama of Kumamoto Fisheries Research Center for helpful discussions and kindness.

The author thanks Y. Masuda, K. Kurata, all members of Kumamoto Fisheries Research Center, Y. Iwamura, and all members of The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute for their help and kindness.

Thanks are also due to Assistant Professor Dr. K. Yamaguchi and all members of Laboratory of Marine Resource Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, for their help and kindness.

References

- Altena, A., and Steinberg, D. (1992) Are differences in the responses between North American and Australian marine herbivores to phlorotannins due to differences in phlorotannin structure? *Biochem. Syst. Ecol.*, 20, 493-499.
- Amarowicz, R., Pegg, B.R., and Bautista, A.D. (2000) Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K12. *Nahrung*, 44, 60-62.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in human against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6858-6862.
- Ando, H., Kaneda, T. (1968) Component lipids of purple laver and their antioxygenic activity. *J. Jpn. Soc. Food. Nutr.*, 21, 245-248.
- Aoyama, T., Nakakita, Y., Nakagawa, M., and Sakai, H. (1982) Screening for antioxidants of microbial origin. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2369-2371.
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M., and Garneau F.X. (1999) Methoxybifurc- arenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, 52, 37-40.
- Bickoff, E.M. (1951) Phenolic antioxidants for carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 28, 65-68.
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., and Heublein, P.C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*: clinical characteristics and epidemiology. *Engl. J. Med.*, 300, 1-5.
- Boettcher, A., and Targett, M. (1993) Role of polyphenolic molecular size in reduction of assimilation efficiency in *Xiphister mucosus*. *Ecology*, 74, 891-903.
- Brown, F. (1953) The occurrence of δ -tocopherol in seaweed. *Chem. Ind.*, 21, 174.
- Burapadaja, S., and Bunchoo, A. (1995) Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Med.*, 61, 365-366.
- Caccamese, S., Azzolina, R., Furnari, G., Cormaci, M., and Grasso, S (1981) Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily.

- Bot. Mar., 14, 365-367.
- Cahyana, A.H., Shuto, Y., and Kinoshita, Y. (1992) Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, arame (*Eisenia bicyclis*). Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1533-1535.
- Chen, L.C.M., Edelstein, T., and McLachlan, J. (1969) *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. J. Phycol., 5, 211-220.
- Chida, K., and Yamamoto, I. (1987) Antitumor activity of a crude fucoidan fraction prepared from the roots of kelp (*Laminaria species*). Kitasato Arch. Exp. Med., 60, 33-39.
- Chuang, Y.C., Young, C.D., and Chen, C.W. (1989) *Vibrio vulnificus* infection. Scand. J. Infect. Dis., 21, 721-726.
- Danakusumah, E., Kadowaki, S., and Hirata, H. (1991) Effects of coexisting *Ulva pertusa* on the production of Kuruma prawn. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 57, 1597.
- Folch, J., Less, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. J. Biol. Chem., 36, 93-98.
- Foote, C.S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In "Free Radicals in Biology", Vol. II, Pryor, W.A. (Ed.), Academic press Inc., New York, pp. 85-133.
- Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1980) Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 46, 1125-1130.
- Fujimoto, K., Ohmura, H., and Kaneda, T. (1985) Screening for antioxidigenic compounds in marine algae and bromophenols as effective principles in a red alga *Polysiphonia ulceolata*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51, 1139-1143.
- Fujimoto, K., Ohmura, H., and Kaneda, T. (1986) Biological antioxidant activities of bromophenols and certain other antioxidants. Agric. Biol. Chem., 50, 101-108.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., and Hata, Y. (1991) Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 57, 2321-2326.
- Fukami, K., Yuzawa, A., Nishijima, T., and Hata, Y. (1992) Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 58, 1073-1077.
- Fukuyama, Y., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Kido, M., Nakayama, Y., Takahashi, M., and Ochi, M. (1985) Eckols, novel phlorotannins with a dibenzo-*p*-dioxin skeleton possessing inhibitory effects on α_2 -macroglobulin from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. Chem. Lett., 739-742.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Kido, M., Mori, H., Nakayama, Y., and Takahashi, M. (1989a) Structure of an anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA and inhibitory activities of its derivatives on plasma plasmin inhibitors. Chem. Pharm. Bull., 37, 349-353.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M. (1989b) Anti-plasmin inhibitor V. Structures of novel dimeric eckols isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. Chem. Pharm. Bull., 37, 2438-2440.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nakayama, Y., and Takahashi, M. (1990) Anti-plasmin inhibitor VI. Structure of phlorofucofuroeckol A, a novel phlorotannin with both dibenzo-1, 4-dioxin and dibenzofuran elements, from *Ecklonia kurome* OKAMURA. Chem. Pharm. Bull., 38, 133-135.
- Geiselman, J.A., and McConnell, O.J. (1981) Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail *Littorina littorea*. J. Chem. Ecol., 7, 1115-1133.
- Giessen, A.W.V.D., Bloemberg B.P., Ritmeester, W.S., Tilburg, J.J., and McConnell, O.J. (1996) Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broiler flocks. Epidemiol. Infect., 117, 245-250.
- Green, K., Hamberg, M., Samuelsson, B., Smigel, M., and Florich, J.C. (1978) Measurement of prostaglandins, thromboxanes, prostacyclin and

- their metabolites by gas liquid chromatography-mass spectrometry. *In*: Florich, J.C. (Ed.), *Advances in prostaglandin and thromboxan research*, vol. 5., Reven Press, New York, pp. 39-94.
- Gregorio, T.V. (1972) Studies and Utilization of the Philippine Marine Algae. *In*: Nishikawa, K. *et al.* (Eds.), *Proceedings of the 7th International Sea weed Symposium*, University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 62-65.
- Hallegraeff, G.M. *et al.* (Eds.) (1995) *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Paris.
- Hay, M.E., and Fenical, W. (1988) Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defence. *Annu Rev. Ecol. Syst.*, 19, 111-145.
- Hirayta, H. (1999) Yousyoku gyokairui eno jiryuu. *In*: Notoya, M. (Ed.), *Aosa no riyuu to kankyuu shufuku*. Seizandou shoten, Tokyo, pp 106-117.
- Hoffmann, T.J., Nelson, B., Darouiche, R., and Rosen, T. (1988). *Vibrio vulnificus* septicemia. *Arc. Intern. Med.*, 148, 1825-1827.
- Horikawa, M., Noro, T., and Kamei, Y. (1999) In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity found in extracts of marine algae indigenous to the coastline of Japan. *J. Antibiot.*, 52, 186-189.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., and Shimamura, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1147, 132-136.
- Imai, I., Ishida, Y., and Hata, Y. (1993) Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolation from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, 116, 527-532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguchi, K., and Hata, Y. (1995) Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay. *Fish. Sci.*, 61, 624-632.
- Ishikawa, Y., Morimoto, K., and Hamasaki, T. (1984) Flavoglucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, it's antioxidation and synergism with tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1864-1868.
- Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H. (1985) Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit. Rev. Toxicol.*, 15, 109-150.
- Iwaki, M., Fukuda, N., Matsui, K. Noda, H., and Amano, H. (1983) Storage of dried laver 'Nori'. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49, 933-938.
- Jennings, J.G., and Steinberg, P.D. (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, 109, 461-473.
- Jensen, A. (1998) The seaweed resources of Norway. *In*: Critchley, A.T., and Ohno, M. (Eds.), *Seaweed resources of the world*. Kanagawa International Fisheries Training Center, JICA, Yokosuka., pp 200-209.
- Kakizawa, H., Asari, F., Kusumi, T., Toma, T., Sakurai, T., Oohusa, T., Hara, Y., and Chihara, M. (1988) An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *Phytochemistry*, 27, 731-735.
- Kanematsu, H., Ushigusa, T., Maruyama, T. Niya, I., and Matsumoto, T. (1983) Contents and compositions of tocopherols in fish, shellfish, other marine animals and seaweeds. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 36, 239-245.
- Kaspar, C.W., and Tamplin, M.L. (1993) Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2425-2429.
- Kawashima, K., Itoh, H., and Chibata, I. (1977) Antioxidant activity of browning products prepared from low molecular carbonyl compounds and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 202-204.
- Kim, M.C., Yoshinaga, I., Imai, I., Nagasaki, K., Itakura, S., Uchida, A., and Ishida, Y. (1998) A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 25-32.
- Kita, N., Fujimoto, I., Nakajima, I., Hayashi, R., and Shibuya, K. (1990) Screening test for deodorizing substances from marine algae and identification of phlorotannins as the effective ingredients in *Eisenia bicyclis*. *J. Appl. Phycol.*, 2, 155-162.
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., and Ames, B.N. (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3175-3179.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Latte, K.P., and Ferreira, D. (1999). Evaluation of the antimicrobial potency of

- tannins and related compounds using the microdilution broth method. *Planta Med.*, 65, 444-446.
- Koo, J., DePaola, K., and Marshall, D.L. (2000) Impact of acid on survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phase. *J. Food Prot.*, 63, 1049-1052.
- Lovejoy, C., Bowman, P.J., and Hallegraeff, M.G. (1998) Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2806-2813.
- Luo, Z., Harada, T., London, S., Gajdusek, C., and Mayberg, M.R. (1995) Antioxidant and iron-chelating agents in cerebral vasospasm. *Neurosurgery*, 37, 1154-1159.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., and Takahashi, T. (1999) *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1788-1791.
- Marco, G.J. (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 594-598.
- Maruyama, T., and Suzuki, Y., (1999) Yousyokujou no suishitu jouka. In: Notoya, M. (Ed.), *Aosa no riyou to kankyō shufuku*. Seizandou shoten, Tokyo, pp 76-93.
- Matsuzaki, T., and Hara, Y. (1985) Antioxidative activity of tea leaf catechins (in Japanese). *Nippon nogeikagaku kaishi*, 59, 129-134.
- May, J., Chan, C.H., King, A., Williams, L., and French, G.L. (2000) Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45, 639-643.
- McLaughlin, P.J., and Weihrach J. L. (1979) Vitamin E content of foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, 75, 647-665.
- Ministry of Health and Welfare (2000). The epidemiological data of food poisoning in Japan 1999. *Food Sanit. Res.*, 50, 118-195 (in Japanese).
- Ministry of Health, Labor and Welfare (2001). The epidemiological data of food poisoning in Japan 2000. *Food Sanit. Res.*, 51, 110-195, (in Japanese).
- Misra, H.P. and Fridovich, I. (1976) Superoxide dismutase and the oxygen enhancement of radiation lethality. *Arch. Biochem. Biophys.*, 176, 577-581.
- Miyashita, K., and Takagi, T. (1987) Tocopherol content of Japanese algae and its seasonal variation. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 3115-3118.
- Morris, J.G.Jr. (1988) *Vibrio vulnificus* - a new monster of the deep? *Ann. Intern. Med.*, 109, 261-263.
- Motes, M.L., DePaola, A., Cook, D.W., Veazey, J.E., Hunsucker, J.C., Garthright, W.E., Blodgett, R.J., and Chirtel, S.J. (1998) Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1459-1465.
- Nagayama, K., Shibata, T., Fujimoto, K., Honjo, T., and Nakamura, T. (2003) Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. *Aquaculture*, 218, 601-611.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, Y., and Nakamura, T. (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50, 889-893.
- Nakamura, T., Mukaiyama, T., and Nagayama, K. (1991) A rapid and simple method to detect antioxidative substances on a thin-layer chromatography plate. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 36, 93-98.
- Nakamura, T., Nagayama, K., and Kawaguchi, S. (1994) High tocopherol content in a brown alga *Ishige okamurae*. *Fish. Sci.*, 60, 793-794.
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., and Tanaka, R. (1996) Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish. Sci.*, 62, 923-926.
- Nakayama, Y., Takahashi, M., Fukuyama, Y., and Kinzyo, Z. (1989) An anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Agric. Biol. Chem.*, 63, 3025-3030.
- Niki, E., Tanimura, R., and Kamiya, Y. (1982) Oxidation of lipids. II. Rate of inhibition of oxidation by α -tocopherol and hindered phenols measured by chemiluminescence. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 55, 1551-1555.
- Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, Y. (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in

- solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.*, 259, 4177-4182.
- Nishibori, S., and Namiki, K. (1988) Antioxidative substances in the green fractions of the lipid of Aonori (*Enteromorpha* sp.) (in Japanese), *J. Home Econ. Jpn.*, 39, 1173-1178.
- Nishiide, E. (1993) Kaisou no riyou kougyou. *In*: Oishi, K. (Ed.), *Kaisou no kagaku*, Asakura shoten, Tokyo, pp 182-183.
- Nishiyama, R., and Kozaki, M. (1974) Substances in green tea inhibiting the growth of lactic acid bacteria (I) (in Japanese). *Nippon nogeikagaku kaishi*, 48, 83-89.
- Ohno, M., and Largo, D.B. (1998) The seaweed resources of Japan. *In*: Critchley, A.T., and Ohno, M. (Eds.), *Seaweed resources of the world*. Kanagawa International Fisheries Training Center, JICA, Yokosuka., pp 1-14.
- Olcott, H.S., and Einset, E. (1958) A weighing method for measuring the induction period of marine and other oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 35, 161-162.
- Palmateer, R.E., Yu, T.C., and Sinnhuber, R.O. (1960) An accelerated oxidation method for the estimation of the storage life of frozen seafoods. *Food Technol.*, 14, 528-532.
- Pan, T.M., Wang, T.K., Lee, C.L., Chien, S.W., and Horng, C.B. (1997) Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1260-1262.
- Paterson, J.R., Oldroyd, K.G., Rumley, A.G., Eteiba, H., Rae, A.P., Hutton, I., and Cobbe, S.M. (1990) Free radical activity during percutaneous trans-luminal coronary angioplasty. *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 1183-1184
- Pellegrini, L. (1980) Cytological studies on physodes in the vegetative cells of *Cystoseira stricta* SAUVAGEAU (Phaeophyta, Fucales). *J. Cell Sci.*, 41, 209-231.
- Pratt, D.E. (1965) Lipid antioxidants in plant tissue. *J. Food Sci.*, 30, 737-741.
- Pratt, D.E. (1980) Natural antioxidants of soybeans and other oil-seeds. *In*: Simic, M.G. and Karel, M. (Eds.), *Autoxidation in Food and Biological Systems*, Plenum Press, New York. pp. 283-293.
- Quencer, R.M., Buck, P.A., and Mattick, L.R., (1964) The kinetics of autoxidation of methyl linoleate. The effect of added antioxidants and a new method for the evaluation of antioxidants. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 41, 650-653.
- Ragan, M.A. (1976) Physodes and the phenolic compounds of brown algae. Composition and significance of physodes *in vivo*. *Bot. Mar.*, 19, 145-154.
- Ragan, M.A. (1985) The high molecular weight polyphloroglucinols of the marine brown alga *Fucus vesiculosus* L.: degradative analysis. *Can. J. Chem.*, 63, 294-303.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M., and Kawakishi, S. (1989) Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 316-319.
- Rensel, J.E. (1995) Management of finfish aquaculture resources. *In*: Hallegraeff G.M. *et al.* (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Paris, pp 463-474.
- Sakata, T. (1990) Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 56, 1165.
- Sakazaki, R., and Shimada, T. (1986) *Vibrio* species as causative agents of food-borne infection. *In*: Bobinson, R.K. (Ed), *Developments in Food Microbiology-2*. Elsevier Applied Science, London, pp 123-151.
- Sato, S., Miyata, Y., and Kunitomi, S. (1976) Physical properties of "Narutowakame" and ITS alginates and metal contents. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 42, 337-341.
- Schulz, J., Hunter, M., and Appel, H. (1992). Antimicrobial activity of polyphenols mediates plant-herbivore interactions. *In*: Hemingway, R.W. and Lakes, P.E. (Eds.), *Plant Polyphenols*, Plenum Press, New York, USA, pp. 621-637.
- Seino, H., Watanabe, S., and Abe, Y. (1971) Studies on the antioxidative compounds in the deodorizer sludge of soybean oil. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 20, 24-29.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K., and Nakamura, T. (2002a) Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 703-709.

- Shibata, T., Yamaguchi, K., Nagayama, K., Kawaguchi, S., and Nakamura, T. (2002b) Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against glycosidases from the viscera of the turban shell *Turbo cornutus*. *Eur. J. Phycol.*, 37, 493-500.
- Steinberg, P.D. (1992) Geographic variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. *In*: Paul V.J. (Ed), Ecological roles of marine natural products. Cornell University Press, Ithaca, pp 51-92.
- Stern, J., Hagerman, A., Steinberg, P., and Magon, P. (1996) Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.*, 22, 1877-1899.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B. N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235, 1043-1046.
- Tacket, C.O., Brenner, F., and Blake, P.A. (1984) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect. Dis.*, 149, 558-561.
- Takeda, Y. (1997) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *World Health Stat. Q.*, 50, 74-80.
- Tanaka, N., and Asakawa, A. (1988) Allelopathic effect of mucilage released from a brown alga *Sargassum horneri* on marine diatoms. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 54, 1711-1714.
- Taniguchi, K., Kurata, K., and Suzuki, M. (1991) Feeding-deterrent effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia stolonifera* against the abalone *Haliotis discus hannai* (in Japanese). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2065-2071.
- Taniguchi, K., Kurata, K. and Suzuki, M. (1992a) Feeding-deterrent activity of some laminariaceous brown algae against the Ezo-abalone (in Japanese). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 577-581.
- Taniguchi, K., Akimoto, Y., Kurata, K., and Suzuki, M. (1992b) Chemical defense mechanism of the brown alga *Eisenia bicyclis* against marine herbivores (in Japanese). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 571-575.
- Targett, M., Boettcher, A., Targett, E., and Vrolijk, H. (1995) Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia*. 103, 170-179.
- Terao, J. (1989) Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24, 659-661.
- Tirmenstein, M. and Reed, D. J. (1989) Effects of glutathione on the α -tocopherol dependent inhibition of nuclear lipid peroxidation. *J. Lipid Res.*, 30, 959-965.
- Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., and Shimamura, T. (1989) The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17, 123-125.
- Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., and Shimamura, T. (1990) Antibacterial and anti-hemolysin activities of tea catechins and their structural relatives. *Jpn. J. Bacteriol.*, 45, 561-566.
- Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Shimamura, T. (1991) The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 109-112.
- Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Hara, Y., and Shimamura, T. (1992) The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.*, 36, 999-1001.
- Wallace, B.J., Guzewich, J.J., Cambridge, M., Altekrose, S., and Morse, D.L. (1999) Seafood-associated disease outbreaks in New York, 1980-1994. *Ame. J. Prev. Med.*, 17, 48-54.
- Wu, P.L., Lin, S.B., Huang, C.P., and Chiou, R.Y. (2002) Antioxidative and cytotoxic compounds extracted from the sap of *Rhus succedanea*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1719-1721.
- Yam, T.S., Shah, S., and Hamilton-Miller, J.M.T. (1997) Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea compounds. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152, 169-174.
- Yamamoto, I., Nagumo, T., Takahashi, M., Fujihara, M., Suzuki, Y., and Iizima, N. (1981) Antitumor effect of seaweeds. III. Antitumor effect of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. *Jpn. J. Exp. Med.*, 51, 187-189.
- Yang, K.,C., Li, X., and Tsui, Z.,C. (1989) The relationship between nutritional antioxidants and serum lipid peroxides in cancer patients. *In Vivo*, 3, 211-214.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Ishida, Y., Takeuchi, T., and Ishida, Y. (1995) Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe

- Bay (Wakayama Pref., Japan). Fish. Sci., 61, 780-786.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., and Ishida, Y. (1997) Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref., Japan. Fish. Sci., 63, 94-98.
- Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T., and Ito, H. (1995) Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 563-567.

和文要旨

本研究は、未・低利用海藻の用途開発を目的として行なわれ、褐藻中に含まれる抗酸化性物質に注目してその簡易検出法を開発後、検出した物質を分離同定し、それらの微生物阻害活性と利用までを検討したものである。最初に抗酸化性物質の簡易検出法を開発し、その方法で検出した褐藻中の抗酸化性物質を分離同定し、トコフェロールとフロロタンニンであることを明らかにした。次に、フロロタンニンが赤潮微細藻類の阻害作用と食中毒菌やMRSAの殺菌作用を持つことを示し、マウスへの経口投与でも悪影響を及ぼさないことを確認した。その後、活クルマエビやマダイの体表に付着した病原菌数の低減にフロロタンニン処理が有効であること示した。

※本論文は2003年3月九州大学大学院生物資源環境科学研究科学位論文である。

熊本県御船川における水生生物の物理的生息環境

松尾竜生*¹・大塚保邦*²・清田季義*³・栃原正久

Physical habitation environment of the aquatic living thing in the Kumamoto Mifune river

Ryuusei Matsuo, Yasukuni Ootsuka, Sueyosi Kiyota, Masahisa Tochiyara

キーワード:生息環境、河川

近年、河川環境への関心の高まりから、景観に配慮し、水生動植物が住みやすい自然と調和した川づくりが求められている。

県内の各河川においても、水生動植物に配慮した河川工法が進められているが、水生生物の物理的生息環境については、知見収集の機運は高まっているものの、依然として少ない状況である。

このことから、河川の物理的な環境要因と魚類の好適な生息環境を把握し、河川環境整備を行うための基礎資料を得る目的で調査を行った。

材料及び方法

調査日 調査は、1999年8月3日、2000年12月15日に実施した。

調査地点 調査は、1級河川緑川支流の御船川中流域

「思い出橋」付近（区間長約55m×区間幅約15m）で実施した（図1）。本調査区間は、河川環境に瀬と淵が存在するため、水生生物の生息に関わる多くの物理的生息環境の選択肢があると推察し、選定した。

方法 調査地点を下流から上流に向かって潜水目視観察を実施し、約2m間隔で、種名、個体、体長、生息場所の物理量（水深、流速〔CR-7:コスモ理研〕、底質、カバー〔避難・隠れ場所〕）を記録した。

その後、記録した全箇所物理量（水深、流速、底質、カバー）の頻度分布を作成した。また、水生生物が存在した場所の物理量の頻度分布を種別（5尾以上の種を対象）に作成した。さらに、オイカワについてはサイズ別に物理量の頻度分布を作成した。

結果及び考察

表1に調査日の水温、確認した水生生物及びその個体数を示した。

また、5個体以上の確認された水生生物について、個体数のヒストグラムを図2に示した。1999年8月3日の調査は、水温22.3℃で、10種、合計1370個体の水生生物が確認され、2000年12月15日は、水温8.2℃、8種、合計106個体の水生生物が確認された。両調査で共に確認された水生生物は、オイカワ、カワムツ、ムギツク、カマツカ、モクズガニの5種であった。また、オイカワ、カワムツについては、各々体長2.0～3.0cm、1.0～2.0cmにモードが見られ、小型個体とその中心であった。

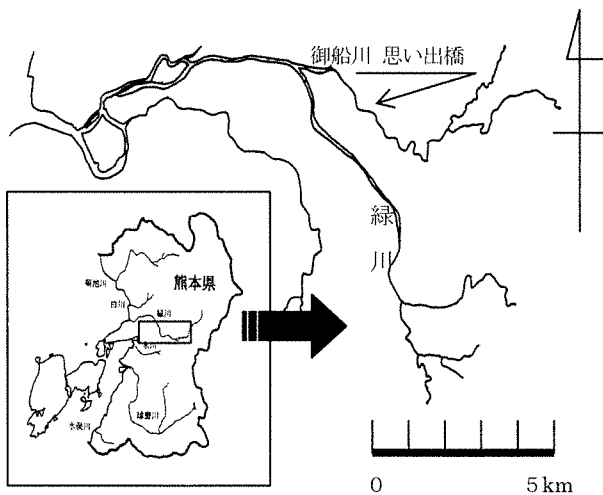


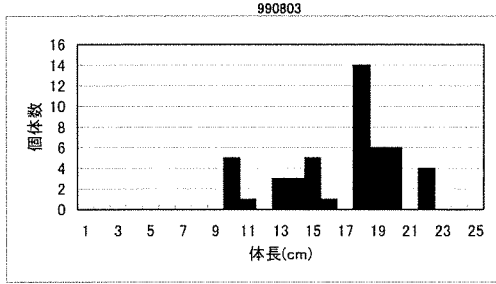
図1 調査地点

*1:玉名地域振興局農林水産部水産課

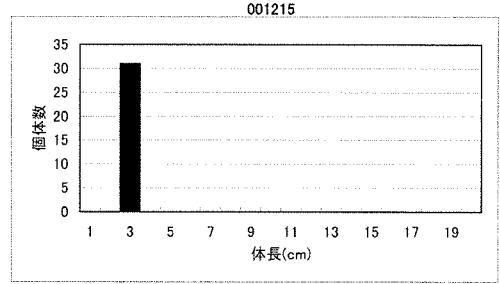
*2:熊本県企業局工務課調査建設係

*3 熊本県林務水産部漁政課組合経営強化室

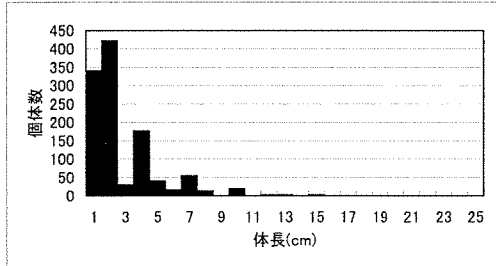
アユ
n=48



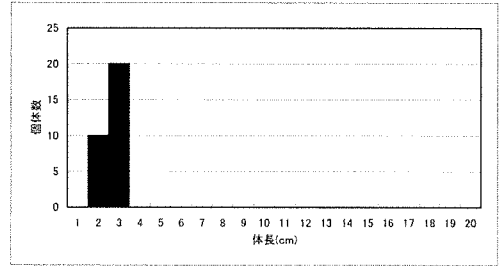
ウグイ
n=31



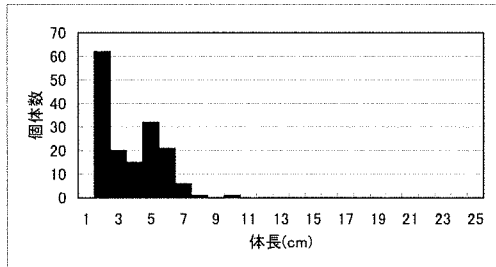
オイカワ
n=1121



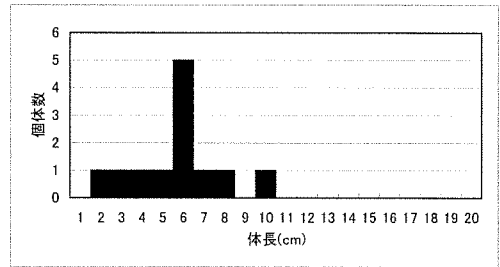
オイカワ
n=30



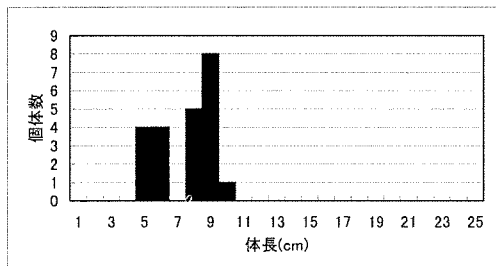
カワムツ
n=158



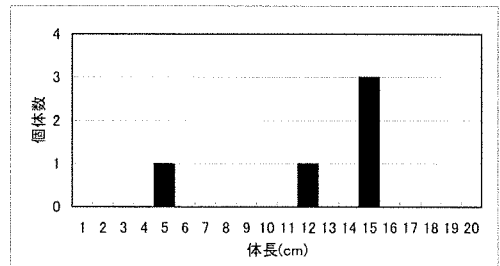
ムギツク
n=12



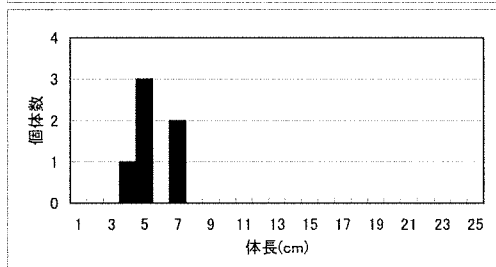
ムギツク
n=22



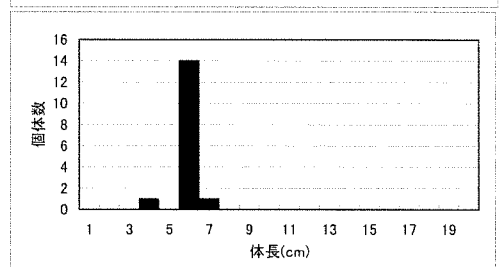
カマツカ
n=5



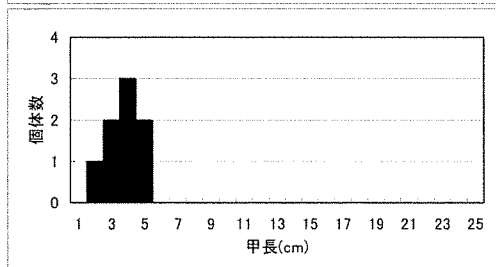
トクヨシホリ
n=6



イトモロコ
n=16



モクスガニ
n=8



モクスガニ
n=10

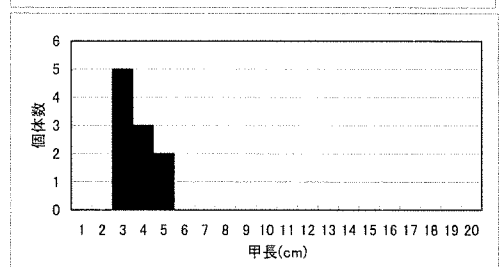


図2 魚種別確認個体数

表1 魚種別確認個体数

| 魚種 | 調査時期 | |
|--|---------------|-----------------|
| | 1999年 8月3日 | 2000年 12月15日 |
| | 水温 22.3°C | 8.2°C |
| アユ (<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>) | 48 | |
| ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>) | | 31 |
| オイカワ (<i>Zacco platypus</i>) | 1121 | 30 |
| カワムツ (<i>Zacco temminckii</i>) | 158 | 1 |
| ムギツク (<i>Pungtungia herzi</i>) | 22 | 12 |
| カマツカ (<i>Pseudogobio esocinus esocinus</i>) | 1 | 5 |
| イトモロコ (<i>Squalidus gracilis gracilis</i>) | | 16 |
| フナ類 (<i>Carassius sp.</i>) | 1 | |
| アブラボテ (<i>Tanakia limbata</i>) | 4 | |
| ナマス (<i>Silurus asotus</i>) | 1 | |
| ドンコ (<i>Odontobutis obscura</i>) | | 1 |
| トウヨシノボリ (<i>Rhinogobius sp. OR</i>) | 6 | |
| モクスガニ (<i>Eriocbie japonicus</i>) | 8 | 10 |
| 合計 | 1370 | 106 |

図3に1999年8月3日の調査区間全体の物理環境（河川環境）と水生生物の物理環境（生息環境）の頻度分布を示した。河川環境は、水深は0.2~0.9m、流速は0~1.2 m/sの範囲にあり、底質はコンクリート、岩盤、中石(≥30cm)、小石(13~30cm)、レキ(6~13cm)、砂レキ(<6cm)、砂で構成されていた。また、カバーは水中巨石、水中植生、岸辺植生、カバー無し、が認められた。次に、アユの生息場所の環境について、河川環境の流速は0~0.1m/sにモードがあるが、アユの生息環境は0.9~1.0 m/sで確認魚種中、最も早い流速にモードが認められた。また、オイカワ及びカワムツについては、流速が0~0.1m/sにモードがあったが、今回確認されたオイカワ、カワムツは小型個体が大部分を占めているため、生息場所は魚体の大きさを反映したものと考えられた。トウヨシノボリのカバーは「な

し」が68%を占めていたが、潜水目視観察時には、全ての個体がレキや流木を、緊急時における避難場所として活用している様子が観察された。また、モクスガニについては、調査区間全体の70%がカバー「なし」であったが、モクスガニの生息場所は88%が水中巨石下にあり、確認された水生生物中最も高い割合を示した。

次に、2000年12月15日の調査結果を図4に示した。河川環境は、水深は0~0.75m、流速は0~1.2 m/sの範囲にあり、底質はコンクリート、岩盤、巨石(≥50cm)、中石(≥30cm)、小石(13~30cm)、レキ(6~13cm)、砂レキ(<6cm)、砂、シルトで構成されていた。また、カバーは水中巨石、水中植生、岸辺植生、大木・日陰など、カバー無し、が認められた。ウグイについては、河川環境の水深は0.3~0.4mにモードがあるのに対し、生息環境は水深0~0.1mで、確認された水生生物中、最も浅い水深にモードが認められた。イトモロコについては水深0.7~0.8mで、最も深い水深にモードが認められた。また、イトモロコは、全ての個体が「砂礫」の底質で、水中巨石下で確認された。次に、オイカワ、ムギツク、モクスガニのカバーでは、「水中巨石」がそれぞれ100%、92%、90%を占め、多くの個体が水中巨石を活用していた。

表2に各水生生物の検定結果を示した。検定の結果、有意水準5%で有意差が認められた物理環境については、表3に水生生物毎に物理量を示した。

アユは、流速とカバーに選択性が認められ、特に流速については平均0.72m/sで、今回確認された水生生物中、最も流速の早い環境を選択していた。ウグイ、オイカワ、カワムツ、イトモロコについては、全ての物理量に選択性が認められ、特にオイカワは、冬季は夏季に比べ、流れの緩やかな浅い場所を選択し、水中

表2 水生生物の生息物理環境と調査区間の物理環境との比較

| 調査日 | 魚種 | 物理環境 | | | | | | | | | | | |
|--------|---------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|-------------------|-------|--------|-------------------|-------|--------|
| | | 水深 | | 流速 | | 底質 | | カバー | | | | | |
| | | 検定種類 | 統計量 | P値 | 検定種類 | 統計量 | P値 | 検定種類 | 統計量 | P値 | | | |
| 990803 | アユ | Welch検定 | 0.07 | 94.46% | t検定 | 5.41 | 0.00% | χ ² 検定 | 14.28 | 7.47% | χ ² 検定 | 18.52 | 0.10% |
| | オイカワ | Welch検定 | 9.24 | 0.00% | Welch検定 | 14.62 | 0.00% | χ ² 検定 | 93.28 | 0.00% | χ ² 検定 | 25.29 | 0.00% |
| | カワムツ | t検定 | 6.53 | 0.00% | Welch検定 | 8.87 | 0.00% | χ ² 検定 | 57.34 | 0.00% | χ ² 検定 | 9.95 | 4.12% |
| | ムギツク | Welch検定 | 2.90 | 0.81% | t検定 | 1.45 | 14.95% | χ ² 検定 | 11.15 | 19.34% | χ ² 検定 | 5.52 | 23.83% |
| | トウヨシノボリ | t検定 | 0.47 | 64.16% | t検定 | 0.10 | 92.11% | χ ² 検定 | 2.87 | 94.24% | χ ² 検定 | 2.06 | 72.41% |
| | モクスガニ | t検定 | 0.48 | 63.09% | t検定 | 0.79 | 42.99% | χ ² 検定 | 6.40 | 60.23% | χ ² 検定 | 26.74 | 0.00% |
| 001215 | ウグイ | Welch検定 | 22.75 | 0.00% | Welch検定 | 16.15 | 0.00% | χ ² 検定 | 67.03 | 0.00% | χ ² 検定 | 83.67 | 0.00% |
| | オイカワ | Welch検定 | 21.96 | 0.00% | Welch検定 | 16.10 | 0.00% | χ ² 検定 | 76.09 | 0.00% | χ ² 検定 | 31.25 | 0.00% |
| | ムギツク | t検定 | 2.30 | 2.24% | Welch検定 | 0.08 | 93.90% | χ ² 検定 | 24.20 | 0.21% | χ ² 検定 | 10.33 | 3.52% |
| | カマツカ | t検定 | 1.04 | 29.91% | t検定 | 0.87 | 38.75% | χ ² 検定 | 11.95 | 15.36% | χ ² 検定 | 4.42 | 35.16% |
| | イトモロコ | t検定 | 6.91 | 0.00% | Welch検定 | 7.37 | 0.00% | χ ² 検定 | 57.73 | 0.00% | χ ² 検定 | 17.64 | 0.14% |
| | モクスガニ | t検定 | 2.84 | 0.50% | t検定 | 0.25 | 80.10% | χ ² 検定 | 16.06 | 4.16% | χ ² 検定 | 12.07 | 1.68% |

モクスガニ

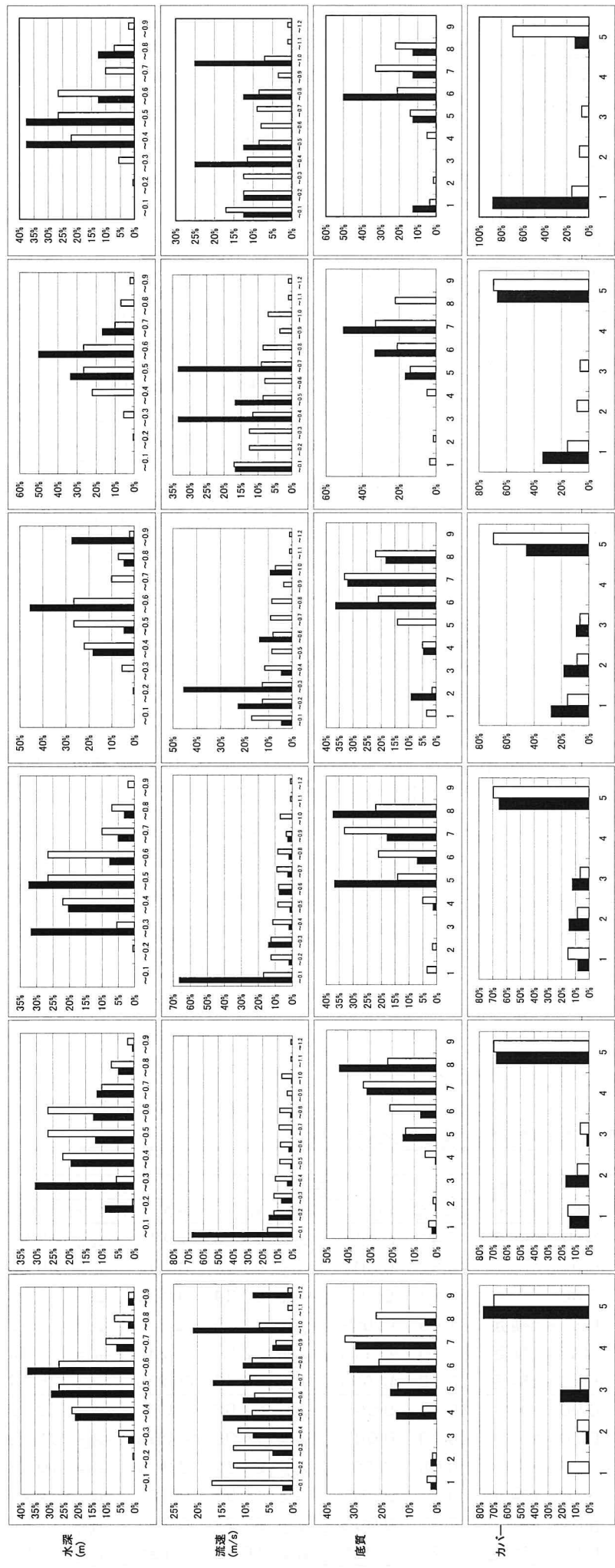
トウヨシノボリ

ムギツク

カワムツ

オイカワ

アユ



魚類の生息環境 :
 調査区間の河川環境

底質
 1 岩塊
 2 岩盤
 3 巨石(≥50cm)
 4 中石(30-50cm)
 5 小石(13-30cm)

カバ
 1 水中巨石
 2 水中樹生
 3 岸辺樹生
 4 大木・日陰など
 5 なし

図3 1999年8月3日における魚種別の物理量頻度分布

モクスガニ

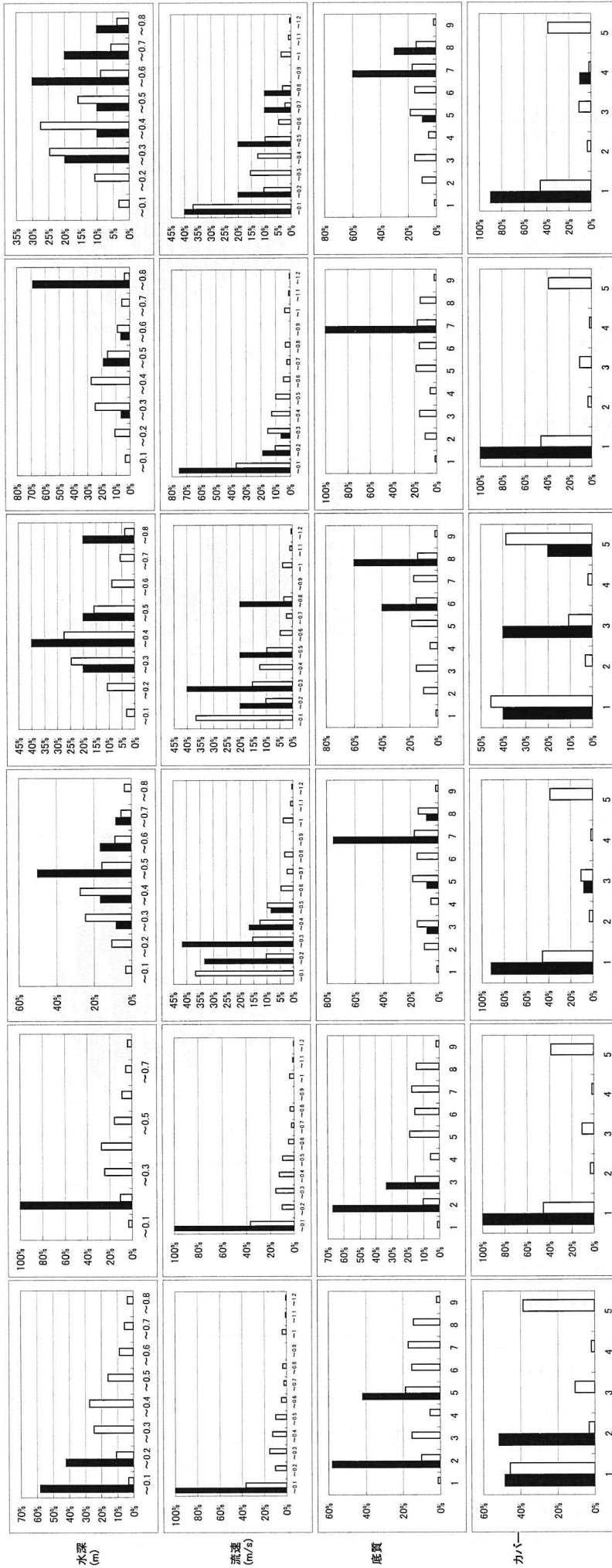
イトモロコ

カマツカ

ムギツク

オイカフ

ウグイ



魚類の生息環境 : ■
調査区間の河川環境 : □

底質
1 コンクリート
2 岩盤
3 巨石(≧50cm)
4 中石(≧30cm)
5 小石(13~30cm)
カハ
6 レキ(6~13cm)
7 砂レキ(<6cm)
8 砂
9 シルト
10 水中巨石
11 水中樹生
12 岸辺樹生
13 大木・日陰など
14 草

図4 2000年12月15日における魚種別の物理量頻度分布

表3 水生生物の生息物理環境

| 魚種 | 物理環境 | | | | |
|---------|--------|-------|---------|-------|-----------|
| | 水温(°C) | 水深(m) | 流速(m/s) | 底質 | カバー |
| アユ | 22.3 | — | 0.72 | — | なし |
| ウグイ | 8.2 | 0.12 | 0.00 | 岩盤、小石 | 水中巨石、水中巨石 |
| オイカワ | 22.3 | 0.43 | 0.12 | 砂、砂礫 | なし |
| | 8.2 | 0.15 | 0.00 | 岩盤、巨石 | 水中巨石 |
| カワムツ | 22.3 | 0.44 | 0.20 | 小石、砂 | なし |
| ムギツク | 22.3 | 0.65 | — | — | — |
| | 8.2 | 0.49 | — | 砂礫 | 水中巨石 |
| カマツカ | 8.2 | — | — | — | — |
| トモロコ | 8.2 | 0.67 | 0.13 | 砂礫 | 水中巨石 |
| トウヨシノボリ | 22.3 | — | — | — | — |
| モクスガニ | 22.3 | — | — | — | 水中巨石 |
| | 8.2 | 0.53 | — | 砂礫 | 水中巨石 |

※「—」: 選択性なし

※水深、流速値は平均値を、底質、カバーについては、主要な要素を示した。

巨石をカバーとして利用しており、夏季と冬季で生息場所が異なる結果となった。次に、ムギツクでは、夏季に水深のみに選択性があつたが、冬季には、流速以外の全ての物理環境で選択性が認められた。このことは、夏季に比べ冬季定着性が強いことが検定結果に現れたと推察され、活動範囲が狭まることが示唆された。また、カマツカ、トウヨシノボリには、生息環境の選択性は認められなかった。モクスガニについては、夏季、冬季共に、主に水中巨石をカバーとして活用しており、その有効性が示された。次に、カバーについては、夜行性のモクスガニを除いて、選択性が認められた全ての魚種は、冬季に水中巨石をカバーとしており、その場の水深は0.12~0.67m、流速は0.00~0.13m/sの範囲にあつた。このことは、確認された魚種の多くが、冬場の比較的緩やかな流れの箇所における水中巨石付近を好む傾向を示しており、水中巨石の重要性を示唆していると言える。

次に、1999年8月3日に確認されたオイカワについて、サイズ別の頻度分布を図5に示した。

水深では、体長2cm未満で0.2~0.3mに、体長2cmを超えるサイズでは0.4~0.6mにモードが見られた。また、流速については、体長2cm未満のモードは0.1m/s以下、体長2~4cmは0.1~0.2m/s、体長4~6cmは0~0.1m/s、体長6~8cmは0.3~0.4m/s、体長8.1cm以上は0.3~0.4m/sとなり、成長に従い選好する流速が異なつた。底質については、小型個体は砂地を好み、大型個体は砂レキやレキを好む傾向が見られたが、底質は流速の影響により、その組成を変化させることから、その選好性については再検討が必要である。また、カバーについては、全ての体サイズにおいてカバー「なし」が最も多く、開けた場所を好むオ

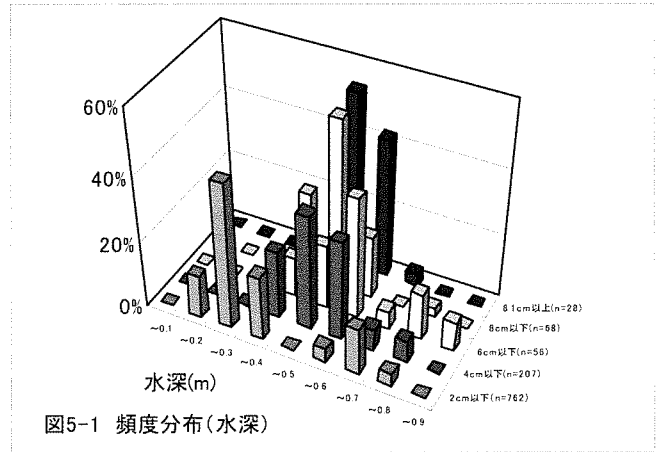


図5-1 頻度分布(水深)

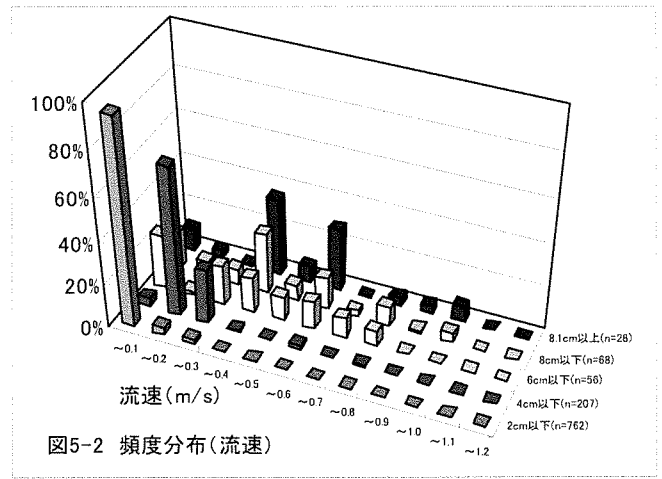


図5-2 頻度分布(流速)

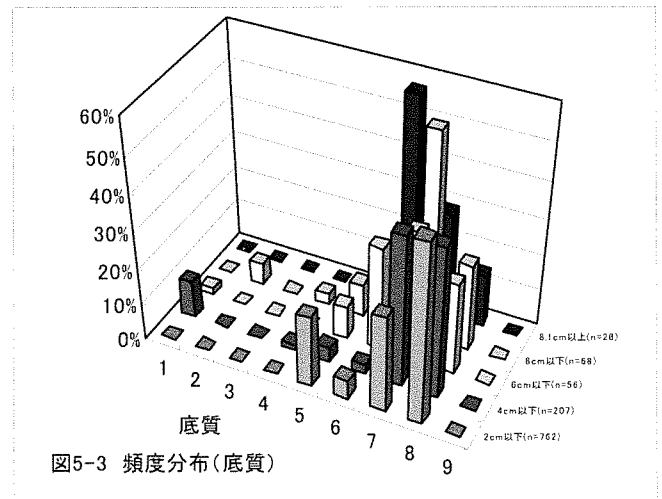
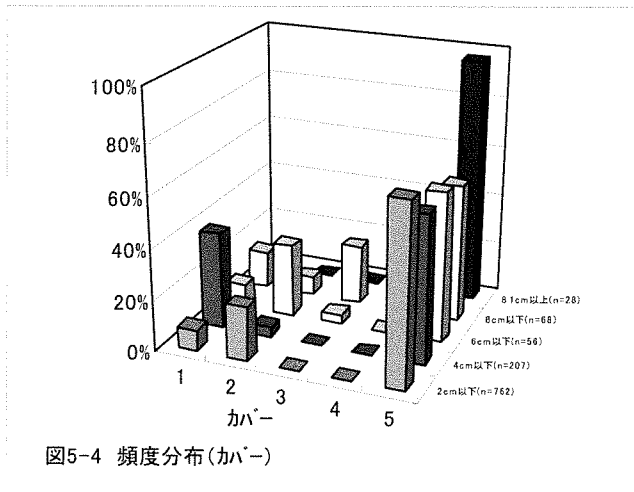


図5-3 頻度分布(底質)

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1. コンクリート | 6. レキ (6~13cm) |
| 2. 岩盤 | 7. 砂レキ (<6cm) |
| 3. 巨石 (≥50cm) | 8. 砂 |
| 4. 中石 (≥30cm) | 9. シルト |
| 5. 小石 (13~30cm) | |

イカワの特性が示された。このようなことから、オイカワは、体サイズ別に選好する生息場所が異なることが推察され、開けた場所の中で各個体は水深や流速によって生息場所を選択している可能性が示唆された。

今後、他の魚種について四季を通じて、また、成長に従い変化する生息状況を的確に捉え、昼夜の検討事



| | |
|---------|-----------|
| 1. 水中巨石 | 4. 大木・日陰等 |
| 2. 水中植生 | 5. なし |
| 3. 岸辺植生 | |

例も交えながら、可能な限り数値的に生息環境を示し、完成度の高い水生生物の物理的生息環境データを河川管理者へ提示していく必要がある。

要 約

- 1) 1級河川緑川支流の御船川中流域「思い出橋」付近（区間長約55m×区間幅15m）で潜水目視観察を行い、1999年8月3日に10種、2000年12月15日に8種の水生生物を確認した。
- 2) 魚種毎に生息特性が異なっており、夏季と冬季の調査で共に確認された魚種は、夏季と冬季で選好する物理的生息環境が異なった。また、冬季における比較的緩やかな流れの箇所における水中巨石の重要性が示された。
- 3) オイカワについては、体サイズ別に選好する水深、流速が異なっていた。

参 考 文 献

- 1) 中村俊六：IFIM入門。（財）リバーフロント整備センター，pp166-171(1999)。
- 2) 岩手県内水面水産技術センター・埼玉県水産試験場・長野県水産試験場佐久支場・宮崎県水産試験場小林分場：河川構造物と地域重要魚種の生態との関係に関する研究総括報告書。中央水産研究所内水面利用部，pp46-55(2000)。
- 3) 松尾竜生・南部豊揮・清田季義・岩村征三郎・栃原正久：内水面生態系保全対策事業。平成12年度熊本県水産研究センター事業報告書，pp220-222(2000)。

アユとオイカワから分離された冷水病菌の DNA gyrase 遺伝子型と病原性の関係

木下裕一・栃原正久・増田雄二

Relationship between genotype of DNA gyrase in *Flavobacterium psychrophilum* and pathogenicity isolated Ayu and Oikawa

Yuichi Kinoshita, Masahisa Tochihara, Yuuzi Masuda

キーワード：冷水病菌、アユ、オイカワ、遺伝子型

アユの冷水病は、近年全国的に養殖場のみならず天然河川での発生が見られ、本県でも 1999 年から天然河川において発生¹⁾が確認された。2000 年には、アユ以外のオイカワ、ウグイに保菌及び発病魚²⁾が確認されるなど、河川における異魚種間での冷水病菌の病原性の解明は急務と考えられる。

また、泉ら⁴⁾により、冷水病菌には DNA ジャイレース (gyrase) の遺伝子に多型が存在することが明らかにされている。

そこで、河川へ放流される稚アユ、成長したアユ及び常在する複数魚種の感染状況を調査した。このうち、アユとオイカワについて分離された冷水病菌の遺伝子型の分析と併せて、感染試験を行い、2 魚種間における冷水病の病原性を検討した。

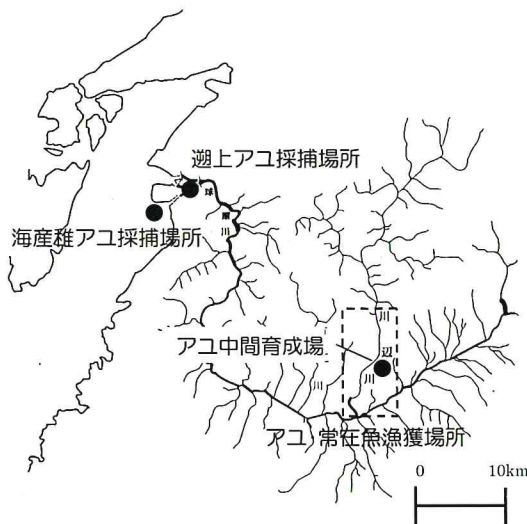


図1 川辺川における冷水病保菌調査位置

材料及び方法

河川における冷水病菌の分離と遺伝子型の検出

2002 年 3 月～2003 年 2 月にかけて、図 1 に示す川辺川で漁獲されたアユ及び常在魚を、2002 年 3 月～5 月にかけて、同河川に放流されるアユ種苗の保菌調査を行った。細菌の分離は、腎臓と鰓などから改変サイトファーガー培地 (以下「改変 CY 培地」) により 15°C 及び 5°C (鰓など) で分離培養した後、得られた菌体を用いて PCR 法³⁾で冷水病菌の判定を行った。

また、アユとオイカワから分離された冷水病菌については、泉ら⁴⁾の方法に従い、DNA ジャイレース (gyrase) の遺伝子領域 (以下「gryB 領域」) を標的とした PCR-RFLP 法により多型の検出を試みた。gryB 領域のユニバーサルプライマーセット GYR-2、GYR-1R を用いて、増幅した PCR 産物を制限酵素 *Hinf*I で RFLP 分析を行い、A 型と B 型を検出した。次に、冷水病菌の gryB 領域に特異的なプライマーセット PSY-G1F、PSY-G1R を用いて、増幅した PCR 産物を制限酵素 *Rsa*I で RFLP 分析を行い、R 型と S 型を検出した。これにより分離された冷水病菌の遺伝子型を AR 型、AS 型、BR 型及び BS 型の 4 型に分けた。

遺伝子型の異なる冷水病菌による感染試験

①アユ発病魚を用いた感染試験

感染源としてアユ由来冷水病菌 (菌株 KM020530、KM020521P (共に AR 型)) を改変 CY ブロスで $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml に調整し、1 尾あたり 0.05ml を尾鰭基部前方の筋肉に接種した人為感染アユと、自然発病冷凍アユ⁵⁾ (分離菌 AS 型) を 2～3 日毎に 5～6 尾を、100L・FRP 水槽に収容して感染源水槽とし、その排水を感染水槽

(100L・FRP 水槽) に注水する方法 (以下「魚病排水感染」) により感染を行った。感染供試魚には、当研究所内で飼育した人工産アユ (平均体重 9.8 g) 及び河川産オイカワ (平均体重 10.5 g) を 10 尾ずつ用いた。

感染源水槽には 1 週間毎に 5~6 尾の健康なアユ及びオイカワを投入し、常に発病魚を維持した。感染水槽での飼育は、病魚排水を 5 回/日、地下水を 5 回/日の計 10 回/日の換水を行い、給餌 (給餌率 1~2%/日) を行いながら、18 日間行った。この間の水温は平均 19.1°C で推移した。

死亡魚は、顕微鏡検査、BHI 培地及び改変 CY 培地による細菌検査を行い、冷水病による死亡を判断した。

感染試験は表 1 に示すように 3 回行った。

② オイカワ発病魚を用いた感染試験

感染源としてオイカワ由来冷水病菌 (菌株 KM020521Z、HG020220 (共に BS 型)) を用い、改変 CY プロスで $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml に調整し、1 尾あたり 0.05ml を尾鰭基部前方の筋肉に接種し、人為感染させた。

なお、魚病排水感染及び細菌検査法はアユと同様に行った。

表 1 感染試験の概要

| 試験法 | 感染源 | 遺伝子型 | 供試魚 | 供試尾数 | 飼育期間 | |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|-----|------|------|----|
| 病魚排水感染 | アユ由来冷水病菌株 KM020530 | AR | アユ | 10 | 18日間 | |
| | アユ由来冷水病菌株 KM020521P ¹⁾ | | アユ | 10 | | |
| | 自然発病冷凍アユ ²⁾ | AS | アユ | 10 | | |
| | | | アユ | 10 | | |
| | オイカワ由来冷水病菌株 | 人為発病アユ | アユ | 10 | | |
| | | | アユ | 10 | | |
| | | KM020521Z ¹⁾ | BS | アユ | | 10 |
| | | | | アユ | | 10 |
| | HG020220 | | アユ | 10 | | |
| | | | アユ | 10 | | |

1) 2002年5月21日に同じ場所で漁獲されたアユ・オイカワから分離された冷水病菌
2) -80°Cで約1ヵ月保存、5~6尾を2~3日ごとに取り替えた。

結 果

河川における冷水病菌の分離と遺伝子型の検出

川辺川に放流されるアユ種苗 (遡上稚アユ及び人工種苗) の保菌検査結果を表 2 に示した。

4 月に球磨川河口沖で混獲された海産稚アユ及び 3、4 月に球磨川漁協らが中間育成した人工種苗には、冷水病菌は検出されなかった。

3 月に球磨川で採捕された遡上稚アユの腎臓に 1 検体、5 月に採捕された遡上稚アユの腎臓に 3 検体、鰓に 4 検体の冷水病菌が検出され、発病魚が 2 個体確認された。また、同時期の他県産遡上稚アユにも腎臓及び鰓に冷水病菌が検出され、発病魚も 5 個体確認された。

表 2 放流アユ種苗の保菌状況

| 種類 | 調査時期 | 検査尾数 | 腎臓 | 鰓 | 外部症状 |
|-------|--------|------|-----|---|------|
| 海産稚アユ | H14 4月 | 60 | - | - | |
| | | 60 | - | - | |
| | 3月 | 60 | 1 | - | |
| 遡上稚アユ | 球磨川産 | 4月 | - | - | |
| | | 5月 | 60 | 3 | 4 |
| | 他県産 | 4月 | 120 | 1 | 23 |
| 人工種苗 | 3月 | 60 | - | - | |
| | 4月 | 60 | - | - | |

次に、川辺川におけるアユ及び常在魚の保菌検査結果を表 3 に示した。5、6、10 及び 12 月にアユ、オイカワ、ウグイに発病魚が確認され、特に 5 月は、発病したアユとオイカワが同じ場所で確認された。

アユとオイカワから分離された冷水病菌について、PCR-RFLP 分析を行い、冷水病菌の遺伝子型を表 4 に示した。

放流アユ由来の冷水病菌 20 株のうち、19 株が AR 型、1 株が AS 型であった。川辺川で漁獲されたアユ由来の冷水病菌 23 株のうち、4 株が AR 型、18 株が AS 型、1

表 3 川辺川のアユ及び常在魚の保菌状況

| 調査時期 | 検査尾数 | 腎臓 | 鰓 | 発病状況など | |
|------|------|-----|----|--------|--------------------------------------|
| H14 | 3月 | 22 | - | - | |
| | 5月 | 57 | 8 | 5 | アユ5尾 (発病 ¹⁾)、オイカワ3尾 (発病) |
| | 6月 | 72 | 1 | - | カワムツ、ウグイ各1尾 (発病)、オイカワ1尾 (保菌) |
| | 7月 | 46 | - | - | |
| | 10月 | 140 | 16 | - | アユ16尾 (発病) |
| | 12月 | 100 | 1 | - | オイカワ1尾 (保菌 ²⁾) |
| H15 | 2月 | 80 | - | - | |

1) 発病: 病的特徴 (体側穴あき、吻部欠損など) を示し、冷水病菌に感染している。
2) 保菌: 冷水病菌の感染を受けているが、病的特徴を示さない。

株が BS 型であった。

一方、川辺川で漁獲されたオイカワ由来の冷水病菌 5 株は、すべて BS 型であり、2001 年 3 月に同河川で漁獲されたオイカワから分離した冷水病菌株も BS 型であった。

表 4 アユ及びオイカワ由来冷水病菌株の遺伝子型

| 魚種 | 冷水病菌株数 | 遺伝子型 | | | |
|------|--------|------|----|----|----|
| | | AR | AS | BR | BS |
| 放流アユ | 20 | 19 | 1 | - | - |
| アユ | 23 | 4 | 18 | - | 1* |
| 合計 | 43 | 23 | 19 | - | 1 |
| オイカワ | 5 | - | - | - | 5 |
| 合計 | 5 | - | - | - | 5 |

* 患部から分離 (同一アユの腎臓・鰓から分離菌: AR型)

遺伝子型の異なる冷水病菌による感染試験

発病魚を感染源にした病魚排水感染によるアユ及びオイカワの死亡状況及び結果を表 5、6 に示した。

アユ病魚排水感染では、アユが 7~8 日目から死亡が始まり 17 日目まで死亡が発生した。死亡率は 80~100% であり、典型的な冷水病の病徴を示す病魚 (写真 1) が観察された。また、冷水病菌も高率に分離され、この遺伝子型も供試菌株 (発病冷凍アユ) を強く反映しているものであった。一方、オイカワは試験期間を通して、死亡がなく生残魚からも冷水病菌は分離されなかった。

オイカワ病魚排水感染では、オイカワが 2~3 日目が

ら死亡が始まり 7~8 日間死亡魚が観察された。死亡率は 80~90%であり、冷水病以外の死亡が多く見られたが、5~6 日目以降は冷水病魚（写真 2）が観察され、BS 型の冷水病菌が分離された。アユは、4 日目、6 日

目に死亡魚が観察されたが、冷水病菌は分離されず、真菌症などによるものと考えられた。また、生残魚からの保菌も確認されなかった。

表 5 病魚排水感染によるアユ及びオイカワの死亡状況

| 感 染 源 | 遺伝子型 | 供試魚 | 供試尾数 | 経 過 日 数 | | | | | | | | | | | | | | 計 | 死亡率 (%) | | | | | |
|--------------------------|-------|--------------|------|---------|---|---|---|-------|---|---|---|---|-------|-------|----|----|----|---|---------|----|----|----|----|-----|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | 15 | 16 | 17 | 18 | |
| アユ由来冷水病菌株 KM020530 | 筋肉注射 | アユ | 10 | | | | | | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 (1) | 1 | | | | | | | | | 8 | 80 |
| | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| アユ由来冷水病菌株 KM020521P | 筋肉注射 | 人為発病アユ | 10 | | | | | | | | 4 | 2 | 2 | | | | | | | | | 8 | 80 | |
| | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| 自然発病冷凍アユ | 水槽内収容 | AS | 10 | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 (1) | | 3 | | | | | | 1 | 10 | 100 |
| | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| オイカワ由来冷水病菌株 KM020521Z | 筋肉注射 | 人為発病 オイカワ | 10 | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | 2 | 20 | |
| | | | 10 | | 3 | 2 | 1 | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | 9 | 90 |
| オイカワ由来冷水病菌株 HG020220 | 筋肉注射 | AS | 10 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | 1 | 10 | |
| | | | 10 | | | 1 | 2 | 2 (1) | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | 8 | 80 |

* 死亡個体数の下線は冷水病菌分離（腎臓）個体数を示す。

表 6 病魚排水感染結果

| 感 染 源 | 供試魚 | 供試尾数 | 死亡尾数 | 死亡率 (%) | 原因別死亡数 | | | 生残魚保菌数 | 遺伝子型 | | |
|--------------------------|------|------|------|---------|--------|-----|----|--------|------|----|----|
| | | | | | 冷水病 | 真菌症 | 不明 | | AR | AS | BS |
| アユ由来冷水病菌株 KM020530 | アユ | 10 | 8 | 80 | 6 | 1 | 1 | 0 | 6 | - | - |
| | オイカワ | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| アユ由来冷水病菌株 KM020521P | アユ | 10 | 8 | 80 | 8 | 0 | 0 | 1 | 9 | - | - |
| | オイカワ | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| 自然発病冷凍アユ | アユ | 10 | 10 | 100 | 9 | 0 | 1 | - | 2 | 7 | - |
| | オイカワ | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| オイカワ由来冷水病菌株 KM020521Z | アユ | 10 | 2 | 20 | 0 | 1 | 1 | 0 | - | - | - |
| | オイカワ | 10 | 9 | 90 | 3 | 3 | 3 | 1 | - | - | 4 |
| オイカワ由来冷水病菌株 HG020220 | アユ | 10 | 1 | 10 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - | - |
| | オイカワ | 10 | 8 | 80 | 4 | 1 | 3 | 1 | - | - | 5 |



写真1 病魚排水感染アユ
鰓蓋の出血・下顎の出血



写真2 病魚排水感染オイカワ
体側の潰瘍・出血

考 察

今回、川辺川に放流されたアユ種苗と同河川で漁獲されたアユや常在魚から分離された冷水病菌株の遺伝子型を比較したところ、アユから分離された冷水病菌株は、主としてA型（AR型、AS型）であり、5月に川辺川で漁獲されたアユの患部から分離されたBS型も、そのアユの腎臓、鰓から分離された冷水病菌株は、AR型であったことから、発病原因としてはAR型冷水病菌と考えられた。これに対して、オイカワから分離された冷水病菌株は、すべてBS型であった。

泉ら⁴⁾は、オイカワから分離された冷水病菌株は、すべてBS型であり、A型（AR型、AS型）は、アユのみから検出されたことを報告しており、今回の調査でもこの報告を支持する結果が得られた。

また、発病魚の排水を用いた感染試験では、アユ由来冷水病菌で発病させたアユの飼育排水を用いると、アユは発病し死亡するが、オイカワには感染しない。オイカワ由来冷水病菌で同様の試験を行うとオイカワのみに発病し死亡することが明らかになった。

これらのことからそれぞれに由来する冷水病菌のア

ユ及びオイカワに対する病原性に違いがあり、オイカワの冷水病菌は、河川におけるアユの冷水病に対して重要な役割を担っていないと思われた。

一方、今回の調査では放流アユ種苗及びアユの冷水病菌の遺伝子型が、放流アユが AR : AS = 19 : 1 であるのに対し、アユが 4 : 18 と、構成に違いがあるものの、河川におけるアユ冷水病の感染源になり得ると思われた。また、「おとりアユ」に由来する冷水病の発生⁶⁾も報告されていることから、河川におけるアユ冷水病の拡大を防止するためには、放流種苗やおとりアユによる冷水病菌の混入を防ぐ対策が必要であると考えられる。さらに、今回の感染試験のように、アユ冷水病は、病魚排水を介した感染が容易に成立することから、アユが生息する河川へ用水を排水しているアユ養殖場についても適切な排水処理対策が必要と考えられた。

要 約

- 1 川辺川に放流されたアユ種苗と同河川で漁獲されたアユや常在魚から分離された冷水病菌株の遺伝子型を PCR-RFLP 法を用いて調査した。
- 2 アユから分離された冷水病菌株は、主として A 型 (AR 型、AS 型) であり、オイカワから分離された冷水病菌株は、すべて BS 型であった。
- 3 病魚排水を用いた感染試験により、それぞれに由来する冷水病菌のアユ及びオイカワに対する病原性に違いがあり、オイカワの冷水病菌は、河川におけるアユの冷水病に対して重要な役割を担っていないと思われた。

文 献

- 1) 松尾竜生・清田季義・宮原才郎・岩村征三郎・栃原正久 (2000) : 内水面魚類養殖対策試験 I 平成 11 年度熊本県水研七事報, 171-172
- 2) 松尾竜生・清田季義 (2002) : 熊本県主要河川における冷水病の発生状況について 熊本県水研七事報, 5, 43-45
- 3) S. Izumi and H. Wakabayasi (1997) : Use of PCR Detect *Cytophaga psychrophila* from Apparently Healthy Juvenile Ayu and Coho Salmon Eggs. Fish Pathology, 32 (3), 169-173
- 4) S. Izumi et al. (2003) : Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. Diseases of Aquatic Organisms, 56, 207-214
- 5) 山本充孝・二宮浩司 (2001) : 凍結病魚を用いた冷水病人為感染試験 平成 12 年度滋賀県水試事報, 106-107

6) 沢本良宏・伝田郁夫 (2003) : アユ冷水病対策協議会調査研究部会第 1 グループ報告会資料

熊本県水産研究センター
研究報告第6号

編集・発行

熊本県水産研究センター

熊本県上天草市大矢野町中2450-2

TEL 0964-56-5111

REPORT OF KUMAMOTO PREFECTURAL FISHERIES RESEARCH CENTER

No.6 MARCH 2004

| | |
|--|-----|
| Hirokazu Yamashita, Izumi Hirayama, Norihisa Tobase | 1 |
| Occurrence of fish larvae and juveniles in coast of Kumamoto Pref. | |
| Hirokazu Yamashita, Izumi Hirayama, Norihisa Tobase | 13 |
| The stocking Efficiency for Japanese Flounder of the Coast of Yatushiro and Ushibuka in Kumamoto Pref. | |
| Hirofumi Nasu, Izumi Hirayama, Yasutomo Nakahara, Yasunari Jinnai, Norihisa Tobase | 15 |
| Studies on the distribution of a short-necked clam in 1992 to 2003, at the mouth of Midori river. | |
| Shinji Kawasaki, Yoshinori Nomura, Kensaku Maeda | 31 |
| The appearance of sharks of the genus <i>Carcharhinus</i> (Elasmobranchii: Carcharhiniformes : Carcharhinidae) on the coastal sea surrounding Amakusa island Kumamoto prefecture, Japan. | |
| Takeshi Kimura, Rika Kikukawa, Yukihiisa Yamasita, Kiyonori Kurata, Tadakatu Fujita, Mineo Hamada | 39 |
| Experiment of Spawning in Yellowtail (<i>Seriola quinqueradiata</i>) by Manipulation of Water Temperature and Photoperiod. | |
| Yuichi Yoshida, Yoshiyuki Kuroki, Naoaki Yoshimura, Nagahisa Oyama | 45 |
| The seasonal changes of nutrients in Ariake Bay of Kumamoto Prefectural area during the laver culture season . | |
| Naoaki Yoshimura, Yoshiyuki Kuroki, Yuichi Yoshida, Nagahisa Oyama | 51 |
| Seasonal changes of dissolved oxygen and the release of nutrients from the bottom sediments in Ariake Bay. | |
| Yoshiyuki Kuroki, Naoaki Yoshimura, Yuichi Yoshida, Nagahisa Oyama | 59 |
| Studies on <i>Chattonella antiqua</i> (Raphidophyceae) in Yatushiro Sea in 2003. | |
| Yoshiyuki Kuroki, Naoaki Yoshimura, Yuichi Yoshida, Nagahisa Oyama, Takeshi Kimura | 69 |
| Studies on harmful effect of <i>Chattonella antiqua</i> (Raphidophyceae) in Yatushiro Sea in 2003. | |
| Koki Nagayama | 75 |
| Antioxidative Substances in Brown Algae and Their Antimicrobial Activity. | |
| Ryuusei Matsuo, Yasukuni Ootsuka, Sueyosi Kiyota, Masahisa Tochiara | 115 |
| Physical habitation environment of the aquatic living thing in the Kumamoto Mifune river. | |
| Yuichi Kinoshita, Masahisa Tochiara, Yuuzi Masuda | 123 |
| Relationship between genotype of DNAGyrase in <i>Flavobacterium psychrophilum</i> and pathogenicity isolated Ayu and Oikawa. | |