

修士論文内容の要旨

ふりがな	くろだ あさみ	
氏名	黒田 麻美	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 22 年4月	
指導教員名	主査 今井 一郎 教授	副査 澤辺 智雄 教授 副査 山口 篤 准教授
論文題目	アマモ場に生息する微生物による赤潮防除能の評価	
<p>赤潮は養殖魚類や二枚貝の大量斃死を引き起こし、水産業に大きな影響を与えることから、これまでに様々な被害軽減策が提案されてきた。しかし実効的な対策はなく、有明・八代海域において2009年と2010年に連続発生した大規模な <i>Chattonella</i> 赤潮により33億円、53億円にも及ぶ被害を受けており、有効な赤潮の防除策が望まれている。このような背景の中、大阪湾や噴火湾において有害有毒藻類に殺藻効果を示す殺藻細菌がアマモの葉体に多く付着生息することが発見され、アマモ場の殺藻細菌による赤潮防除能が期待できる。本研究は、熊本県宮津湾のアマモ場において、現場の <i>Chattonella</i> 赤潮海水及び <i>Chattonella antiqua</i> 培養株に対するアマモ場や海水の殺藻能を評価し、殺藻細菌の探索とその殺藻性状の解析を行い、アマモ場の有する赤潮防除能の総合的な評価を行うことを目的とした。</p> <p>試料の採集は、熊本県上天草市の熊本県水産研究センター前のアマモ場（宮津湾）で行った。2010年5~8月、2011年5~10月に原則として月1回干潮時、熊本県水産研究センターの協力によって、アマモ葉体とアマモ場の表面海水を採集した。アマモ葉体は滅菌海水中で500回強振してバイオフィルムを剥離し、アマモ試料として実験に供した。</p> <p>2010年の試料を用いて、寒天平板法と二者培養試験、及びマイクロプレートMPN法による殺藻細菌のモニタリングを行った。海水試料は、適宜希釈した後に孔径3.0 µmのフィルターを用いて濾過を行い、フィルター上の細菌を粒子付着性細菌（Particle associated bacteria: PAB）、濾液中の細菌を浮遊性細菌（Free living bacteria: FLB）として、ST10⁻¹寒天平板培地で培養、コロニー計数、分離を行った。また、DAPI染色と落射蛍光顕微鏡観察により、アマモ試料と海水試料中の総細菌数を直接計数した。分離した細菌は二者培養試験により殺藻能を評価した。48ウェルマイクロプレートのウェルに予め収容した対象藻類（ラフィド藻の <i>C. antiqua</i> と <i>Heterosigma akashiwo</i> IWA株及び渦鞭毛藻の <i>Cochlodinium polykrikoides</i>）に、細菌のコロニーを少量接種し14日間培養した。数日毎にプレートのウェル中の藻類の生死を観察し、殺藻能が認められた細菌株数と実験に供した細菌株数を基に、各サンプル中の殺藻細菌数を算出した。また、未濾過のアマモ試料と海水試料、孔径1.0 µmのフィルターで濾過を行ったアマモ試料と海水試料を用い、マイクロプレートMPN法に供し試料中の殺藻細菌数を推定した。殺藻が確認されたウェルからは細菌を分離し、二者培養試験により殺藻能を確認した。そして、2011年の試料については孔径1.0 µm濾過試料のマイクロプレートMPN法による殺藻細菌の推定と、植物プランクトン、HNF（従属栄養性微小鞭毛虫）、ANF（独立栄養性微小鞭毛藻）、ND（微小珪藻）の計数を行った。これらはDAPI-FITC二重染色後の落射蛍光顕微鏡観察により計数した。</p> <p>2010年の海水試料の総細菌数は $1.1 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^7$ cells mL⁻¹、アマモ葉体の総細菌数は $3.0 \times 10^8 \sim 6.7 \times 10^8$ cells g wet leaf⁻¹であった。殺藻細菌についてはアマモの葉体表面に $3.9 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^6$ CFU g wet leaf⁻¹の密度で存在し、マイクロプレートMPN法で、10^3 MPN g wet leaf⁻¹以上もの殺藻細菌が検出さ</p>		

れた。2011年の試料について、植物プランクトンの細胞密度は $10^5 \sim 10^6$ cells L^{-1} の範囲にあり、珪藻類が優占した。HNF, ANF, NDは約 10^3 cells mL^{-1} で推移し、植物プランクトンの変動とANF及びNDの変動は概ね一致していた。

次に、現場赤潮海水に対するアマモ場試料の赤潮防除能を評価するために、2010年に混合培養実験を行った。有明海で発生した*Chattonella*赤潮において、2010年7月28日に赤潮海水試料を採取した。同日にアマモ場から採集した海水試料とアマモ試料を濾過し、未濾過区、 $10 \mu m$ 濾過区、 $1 \mu m$ 濾過区、 $0.1 \mu m$ 濾過区を設け、各々に現場の赤潮海水試料を加えた。また、栄養塩欠乏の影響を除くために改変SWM-3培地を1/10強度で添加し、適宜*Chattonella*の細胞数、細菌数、HNF数、ANF数を計数した。

*Chattonella*の細胞数はすべての試験区で1日目(800 cells mL^{-1})から急激に減少し、8日目には検出限界以下となった。1日目には細菌数、2日目にはHNF数が増加したことから、死滅した*Chattonella*の有機物を栄養源として細菌数が増加、さらにその細菌を捕食してHNFが増殖したと考えられる。また、赤潮海水中から殺藻及び増殖阻害細菌が検出されたこと、採取した赤潮海水が赤潮形成後期のものであったことから、赤潮海水中の殺藻細菌も細胞数の減少に関与していたと推察される。

2011年には*C. antiqua*培養株に対するアマモ場試料の赤潮防除能を評価するために、疑似現場法による共培養試験を行った。海水試料(7月1日、8月3日、8月26日採集)を濾過し、未濾過区、未濾過+ GeO_2 区、 $1 \mu m$ 濾過区、 $1 \mu m$ 濾過区(藻類非添加)、 $0.1 \mu m$ 濾過区(control区)を設けた。8月26日の海水試料は、 $1.0 \mu m$ 濾過区、 $1.0 \mu m$ 濾過区(藻類非添加)、 $0.1 \mu m$ 濾過区(control区)のみ設定した。アマモ試料(8月3日採集)は1/20倍に希釈し、同様の試験区を設けた。また希釈しない試料を用いた未濾過区、未濾過+ GeO_2 区も設けた。各試験区に*C. antiqua* NIES-1株を 10^3 cells mL^{-1} のオーダーの密度になるよう接種し、さらに改変SWM-3培地を1/10強度で添加して10日間程度培養した。原則2日に1回*C. antiqua*細胞数と細菌数を計数した。7月1日の海水試料については、マイクロプレートMPN法による*C. antiqua*を対象とした殺藻細菌数(Ca-killer)の見積もりも行った。

海水試料について、7月1日では、2つの未濾過区で4日目(約 3000 cells mL^{-1})以降に*C. antiqua*細胞数が減少し、10日目には検出限界以下となった。6日目には高密度のCa-killerが検出された(10^5 MPN mL^{-1} 以上)。8月3日の未濾過区(GeO_2 なし)についても、*C. antiqua*細胞数は6日目(5300 cells mL^{-1})以降に減少し10日目には 50 cells mL^{-1} となった。8月26日では、 $1.0 \mu m$ 濾過区に顕著な殺藻効果はみられなかった。アマモ試料については、両方の未濾過区で4日目以降に*C. antiqua*細胞数が減少し、希釈をしていない試料については8日目にはほぼ全滅に至った。以上から、未濾過の海水及びアマモ試料が*C. antiqua*に対する赤潮抑制効果をもつこと、未濾過の海水試料についてはその要因が殺藻細菌にあることがわかった。

分離した細菌のうち、短時間で殺藻作用が起こった株(ab2株・ab3株)について殺藻性状を解析した。まず殺藻レンジを検討するためラフィド藻*H. akashiwo* 893株、渦鞭毛藻*Heterocapsa circularisquama*、中心目珪藻*Ditylum brightwellii*、羽状目珪藻*Navicula* sp.に対して二者培養試験を行った。次に殺藻に対する細菌の接種密度の影響を評価した。*C. antiqua*を培養した試験管に細菌を接種したのち、殺藻が確認された培養中の細菌数をDAPI染色により直接計数し、マイクロプレートMPN法により推定した培養中の殺藻細菌数と比較した。そして、殺藻様式を調べるためにTCインサート試験を行った。また $0.1 \mu m$ 濾過滅菌海水中での増殖を調べ、さらに殺藻細菌と*C. antiqua*の二者培養における両者の変動を調べた。

ab2株、ab3株は共に5~7種の藻類に対して殺藻及び増殖阻害能を示した。*C. antiqua*に対しては1細胞の細菌接種で殺藻が起こった。また、これらの細菌2株と*C. antiqua*との二者培養では培養1日目からの細胞数は急減し、3日目には全滅した。それに伴い細菌数は増加した。そして、TCインサート試験からは、両株が殺藻物質を産生していないことが示された。これより、ab2株及びab3株は殺藻レンジが広く、強力な殺藻能をもつ直接攻撃型の殺藻細菌であることが判明した。

本研究において、宮津湾のアマモ場においても殺藻細菌が存在し、そこから得られた海水及びアマモ葉体試料に*C. antiqua*培養株に対する殺藻効果のあることが明らかになった。よって、宮津湾のアマモ場は殺藻細菌の供給源として赤潮防除能を発揮できる可能性があるといえる。