

修士論文内容の要旨

ふりがな	いなば のぶはる	
氏名	稲葉 信晴	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 23 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	有害ラフィド藻 <i>Chattonella antiqua</i> と <i>Heterosigma akashiwo</i> の殺藻細菌の 海水中とアマモ場における分布と動態	

有害有毒藻類の赤潮による被害は世界各国の沿岸域で発生しており、養殖や天然魚介類の斃死だけでなく、魚介類の毒化を引き起こし漁業や観光業などにも様々な悪影響が及ぶことから問題視されているが、未だ効果的な防除対策は確立されていない。例えば八代海において2009年と2010年に連続発生した*Chattonella*赤潮は、各々33億円と54億円という多大な漁業被害をもたらした。また、米国北西部に位置するピュージェット湾では頻繁に*Heterosigma*赤潮の発生が報告されており、養殖及び天然のサケの斃死被害が起きているため、実効的かつ実用的な赤潮防除策の確立は喫緊の課題である。近年、環境に優しい生物学的防除策として殺藻細菌の利用が有望であり、特にアマモの葉体上に高密度の殺藻細菌が付着している事が見出され、アマモ場の保有する赤潮防除能が期待されている。本研究では、有害ラフィド藻*Chattonella antiqua*に対する殺藻及び増殖阻害細菌について、熊本県宮津湾のアマモ場で探索を行い、そして鹿児島県脇崎および脇崎沖の海域における殺藻及び増殖阻害細菌の経時的変動を調査した。更に、米国ワシントン州ピュージェット湾のアマモ場において*Heterosigma akashiwo*に対する殺藻及び増殖阻害細菌の探索と分布の把握を行った。

2011年に熊本県宮津湾のアマモ場からアマモ場試料(アマモ試料・アマモ海水試料)を毎月1回(5月-9月)干潮時、鹿児島県のSt.1(脇崎0m・10m・海底上1m)及びSt.10(脇崎沖0m)では6月末から9月初旬にかけて採水を行い海水試料とした。そして、2012年6月から7月にかけてピュージェット湾のアマモ場と藻場からアマモ試料、海藻試料、ならびに海水試料を採取した。アマモ葉体及び海藻は滅菌した瓶に入れ滅菌海水中で500回強振してバイオフィルムを剥離し、アマモ試料及び海藻試料として実験に供した。また、アマモ・海藻試料強振後の海水と未処理の海水試料をグルタルアルデヒド(終濃度1%)で固定し、DAPI染色による細菌の直接計数を落射蛍光顕微鏡で行った。アマモ及び海藻試料は適宜希釈後、 $ST10^{-1}$ 寒天培地へ塗抹し、暗条件下で温度25°Cにて2週間培養して形成されたコロニーから細菌株を分離した。海水試料については、適宜希釈後に孔径3 μ mのメンブレインフィルターを用いて濾過し、フィルター上の細菌を粒子付

着性細菌 (PAB: Particle-associated bacteria)、濾液中の細菌を浮遊性細菌 (FLB: Free-living bacteria)としてアマモ・海藻試料と同一条件下で培養、分離した。宮津湾と脇崎から分離した細菌について赤潮ラフィド藻 *C. antiqua*、ピュージェット湾から分離した細菌については *H. akashiwo* と二者培養試験を行って殺藻能を評価し、殺藻能または増殖阻害能を示し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と増殖阻害細菌数を算出した。宮津湾と脇崎の全定点から分離した殺藻・増殖阻害細菌株 85 株全てについて 16SrRNA 部分塩基対配列解析による簡易同定を行った。

アマモ場においては、非常に高密度の *C. antiqua* に対する殺藻細菌と増殖阻害細菌がアマモ葉体上から検出され (10^6 - 10^7 CFU g⁻¹ wet leaf)、アマモ場海水からは調査期間中継続的に殺藻・増殖阻害細菌が検出された (10^3 - 10^4 CFU mL⁻¹)。さらに、アマモ葉体上から検出された殺藻細菌は *Alteromonas* 属と *Vibrio* 属と判明し、アマモ場海水から検出された殺藻細菌の 71%が同様に *Vibrio* 属であり、同時に粒子付着性細菌 (Particle associated bacteria : PAB) として検出されたことから、アマモ葉体上に形成されるバイオフィルム中の細菌群集がアマモ場海水中の殺藻細菌の供給源である事が強く示唆された。

2011 年の調査期間中に八代海で *Chattonella* 赤潮の発生は確認されなかったが、クロロフィル *a* 量の変動に対応して殺藻細菌密度の変動が認められた。鹿児島県脇崎の St.1 の 0m と 10m 層において、表層でクロロフィル *a* が最高値を示した 8 月 3 日には、殺藻細菌密度も同様に最高値を示した (10^4 CFU mL⁻¹, 培養可能細菌数の 20%)。St.1 の B-1m 層では、主に増殖阻害細菌が調査期間中継続的に検出された。沖合の St.10 の 0m に関しては、常に低濃度 (<3μg L⁻¹) でクロロフィル *a* が変動し、8 月 10 日に比較的高い密度の増殖阻害細菌が検出されたものの、殺藻細菌はほとんど検出されなかった。遺伝子解析によると、St.1 の表層からは他の水深に比べ殺藻細菌と増殖阻害細菌共に高い多様性が認められ、また St.10 においても増殖阻害細菌で同様の傾向が確認された。殺藻細菌及び増殖阻害細菌が検出された調査日に確認された表層の植物プランクトンの多様性は他の水深と比べ高く、それらを殺藻し増殖する細菌の多様性も同様に高くなったと考えられる。

ピュージェット湾において、アマモ葉体上から *Heterosigma* 殺藻細菌が検出されたのは North Padilla Bay (2.8×10^6 CFU g⁻¹ wet leaf) のみであった。一方アマモ場の海水中からは Jackles Lagoon (FLB: 1.6×10^3 CFU mL⁻¹)、Dumas Bay (FLB: 1.6×10^2 CFU mL⁻¹)、Potlatch (FLB: 4.2×10^2 CFU mL⁻¹) の 3 定点から殺藻細菌が分離され、増殖阻害細菌では South Carkeek (PAB: 4.2×10^2 CFU mL⁻¹) と Dumas Bay (PAB: 2.6×10^3 CFU mL⁻¹, FLB: 1.6×10^2 CFU mL⁻¹) の 2 定点から検出された。Dumas Bay からは全定点中最高密度の増殖阻害細菌と同時に殺藻細菌も検出された。極度に富栄養化の進行する Holmes Harbor と Blaine Bay の二定点を除き、Dumas Bay ではクロロフィル *a* 量も全定点中最高値を示した。このようにピュージェット湾のアマモ場海水中においてもクロロフィル *a* 量との関係性が示唆される場所が認められた。

本研究において、殺藻細菌は常に低密度で海水中に生息し、植物プランクトンを殺藻し有機物栄養源として利用し増殖している事が示唆された。また高密度の殺藻・増殖阻害細菌がアマモ葉体から検出され、さらにアマモ場海水中には赤潮が発生していない状態でも *Chattonella antiqua* や *Heterosigma akashiwo* に対する殺藻・増殖阻害細菌が確認されたことから、アマモ場が殺藻細菌の供給源として有害赤潮の防除能を潜在的に保有している事が示された。