

修士論文内容の要旨

ふりがな 氏名	かわぐち まりえ 川口 まりえ	
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 尾島 孝男 教授 副査 山口 篤 准教授
論文題目	藻場における有害有毒藻類に対する 殺藻細菌及び増殖阻害細菌の生態に関する研究	
<p>有害有毒藻類は魚介類の大量斃死や有用二枚貝類の毒化などを引き起こし、深刻な漁業被害を及ぼしている。北海道の沿岸でも、噴火湾やオホーツク海などでほぼ毎年ホタテガイやカキ、アサリなどで毒化が発生し出荷自主規制がなされている。赤潮については防除対策として、海面回収、超音波、粘土散布など様々な物理化学的な方法がこれまで試みられてきたが、実用的な技術がないのが現状である。近年、アナアオサやマクサなどの大型海藻表面に赤潮生物を殺滅する殺藻細菌が高密度に生息することが発見されており、藻場あるいは海藻が赤潮の防除の場として機能する可能性がある。本研究は、北海道沿岸の藻場において有害有毒藻類に対して殺藻細菌の季節的動態調査、及び様々な海藻種における殺藻細菌の探索を行い、藻場における殺藻細菌の生態を調査し、有害有毒ブルーム発生予防の場としての機能を評価することを目的とした。</p> <p><藻場における殺藻細菌の季節的動態></p> <p>試料の採集は、2011年5～9月の期間毎月1回干潮時に北海道函館市の志海苔海岸において行い、藻場の海水及び海藻4種（褐藻マコンブとウミトラノオ、紅藻ピリヒバ、緑藻アナアオサ）を採集した。海藻は500 mL滅菌容器に入れ、滅菌濾過海水を加え500回強振して海藻表面に付着する細菌を剥離し、海藻試料とした。海水試料は滅菌濾過海水にて段階希釈後に孔径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⁺寒天培地上にて二週間培養後、コロニー数を計数して生菌数とし、分離して殺藻能を調べる二者培養試験に用いた。2011年の5月と8月に分離した細菌については、対象藻類を渦鞭毛藻の <i>Alexandrium tamarense</i>, <i>Cochlodinium polykrikoides</i>, <i>Heterocapsa circularisquama</i>, ラフィド藻の <i>Chattonella antiqua</i>, <i>Heterosigma akashiwo</i>, 珪藻の <i>Ditylum brightwellii</i> の計6種とし、6, 7, 9月では、<i>A. tamarense</i>, <i>H. akashiwo</i> 及び <i>D. brightwellii</i> の計3種とした。48もしくは24ウェルマイクロプレートの各ウェルへ良好に増殖している藻類培養を入れ、細菌のコロニーを少量接種して二週間培養し、適宜倒立顕微鏡を用いて殺藻の有無を観察して殺藻細菌数のデータを得た。得られた殺藻細菌及び増殖阻害細菌24株について16S rRNAの部分遺伝子解析による同定を行った。<i>A. tamarense</i> に対しては殺藻細菌と増殖阻害細菌が検出されたが、接種密度が殺藻能及び増殖阻害能に及ぼす影響を評価するために、<i>A. tamarense</i> を対象に得られた3株の殺藻細菌及び増殖阻害細菌の二者培養試験を行</p>		

った。

藻場海水で 7 月, 8 月の夏季に殺藻細菌及び増殖阻害細菌が多く ($1.6 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^3$ CFU mL⁻¹), 海藻試料でも同じ夏季に最も多くの種数の海藻から高密度 ($4.2 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^6$ CFU g⁻¹ wet weight) で検出された (5 月, 6 月, 9 月は海藻 1 種; 7 月, 8 月は 3 種)。これらの結果から, 藻場における殺藻細菌及び増殖阻害細菌は夏季に多く存在することが分かった。これらの細菌は, 夏季に活性が低下した海藻の表面で活発に増殖していると考えられる。対象微細藻類 1 種を特異的に殺藻する細菌が, 海水及び海藻の両方から多く検出された (海水: 85.7%, 海藻: 83.3%)。二者培養試験で得られた殺藻細菌 24 株を遺伝子解析した結果, CFB グループ (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*) に 18 株, γ -Proteobacteria 綱に 3 株, α -Proteobacteria 綱に 3 株属することが判明した。微細藻類培養に細菌を $10^0 \sim 10^7$ cells mL⁻¹ の 8 段階の密度で接種した結果, 添加密度が 10^0 cells mL⁻¹ のような低密度の接種でも増殖阻害を示すことが分かった。

<様々な海藻種における殺藻細菌の探索>

試料の採集は, 2012 年 8 月 30 日の干潮時に北海道室蘭市電信浜にて行った。藻場の海水, 海藻 14 種 (褐藻 4 種, 紅藻 7 種, 緑藻 3 種), 及び海草 1 種を採集した。褐藻マコンブについては, 分解途上の葉体部と元気な葉体部の二つの部位を採取し, 殺藻細菌の存在量の相違を調べた。海水試料及び海藻試料の処理は志海苔海岸の試料と同様に行い, 生菌数の計数と同時に細菌を分離し, 分離した細菌を用いて二者培養試験を行い殺藻能の有無を確認した。対象微細藻類は *A. tamarense*, *C. antiqua*, *H. akashiwo*, *D. brightwellii* の 4 種とした。また, 二者培養試験によって得られた殺藻細菌及び増殖阻害細菌 3 株の接種密度が活性に及ぼす影響を評価するために, *A. tamarense* と *H. akashiwo* に対象に二者培養試験を行った。

二者培養試験の結果, 海水中の殺藻細菌及び増殖阻害細菌は粒子付着性画分の方が浮遊性画分より多く検出された。殺藻細菌及び増殖阻害細菌は, 海藻 15 種中 7 種の表面に高密度に生息することが見出された。マコンブでは腐食の認められる葉体部から増殖阻害細菌及び殺藻細菌が $1.6 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ CFU g⁻¹ wet weight で検出されたのに対し, 元気な葉体部からは検出されなかった。腐食中のマコンブの葉体部は, 海藻由来の有機物を利用する細菌が多く生息しており, このような細菌が, 増殖阻害細菌あるいは殺藻細菌である可能性がある。対象微細藻類 1 種を特異的に殺藻する細菌が海水及び海藻の両方に高い頻度 (海水: 50.0%, 海藻: 87.5%) で検出された。また, 藻類培養に添加する細菌密度が 10^0 cells mL⁻¹ のような低密度の条件下でも, 増殖阻害及び殺藻が起こることが見出された。

本研究により, 北海道沿岸域の藻場において増殖阻害細菌及び殺藻細菌が藻場海水や海藻の表面に存在し, 有害有毒藻類に対して特異的に働く細菌が多く生息することが判明した。また, 分解中の海藻起源の殺藻細菌が多いことから, 海藻表面から海藻の組織とともにはがれて, 藻場海水中ヘドトライタスに付着した状態で殺藻細菌が供給されると想定される。以上得られた本研究の成果から, 藻場が赤潮防除, 特に予防の有効な場として機能している可能性があり, 藻場の造成やホタテガイとコンブの複合養殖などが, 赤潮や貝毒の発生予防策として機能すると考えられる。