

アマモ場に生息する微生物による赤潮防除に関する研究 (仮題)
(卒業論文中間発表)

【背景】有害有毒藻類ブルーム(Harmful Algal Blooms: HABs)は二枚貝の毒化や養殖魚介類の大量斃死を引き起こし、世界中の沿岸域で漁業被害が報告されているため、防除対策が喫緊の課題となっている。そこで、有害有毒藻類ブルームの発生予防法や被害軽減策として、殺藻細菌を用いた生物学的防除が環境にやさしい技法として提案されている。また、近年アマモ葉体のバイオフィルムに高密度の殺藻細菌が付着生息していることが発見され、それらデトライタス粒子を海水中へ供給しうることから、殺藻細菌の供給源としてのアマモ場の赤潮防除能が大いに期待されている。そこで本研究では、近年アマモ場の回復が著しい岡山県日生町鹿久居島沿岸域において、①海水中やアマモ場、アマモ葉体上に付着する殺藻細菌を探索し、有害藻類である *Chattonella antiqua* と *Karenia mikimotoi* 培養株に対する殺藻能の評価を行い、②上記2種の藻類を用い人為的に赤潮発生を再現し、アマモ場海水と沖合域の海水を添加した実験系を設定した擬似現場法により殺藻微生物の動態を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

①海水及びアマモ葉体上に付着する殺藻細菌の探索

2013年6月～9月にかけて月1回、干潮時に岡山県日生町鹿久居島現寺湾にて表層海水とアマモ試料を採取した。アマモ試料は滅菌海水中で500回強振してバイオフィルムを剥離した後適宜希釈し、 $ST10^{-1}$ 寒天培地へ塗抹した。その後温度25°Cの暗所で2週間培養し、形成されたコロニーから細菌を単離した。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、フィルター上に捕集された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)としてそれぞれ同様に培養、単離を行った。また、形成されたコロニー数から培養可能細菌数を算出した。アマモ試料及び海水試料中の総細菌の計数はDAPI染色後、落射蛍光顕微鏡を用いて行った。

②擬似現場法による殺藻微生物の動態把握

2013年7月と9月に岡山県日生町鹿久居島現寺湾のアマモ場と沖合の2地点にて海水を採取した。海水試料を孔径10 μm、1.0 μm、0.1 μmのフィルターで濾過し、未濾過画分、10.0 μm画分、1.0 μm画分、0.1 μm画分(コントロール区)を設け、各画分ごとに2本作成した。1本目には改変SWM-3で培養した*C. antiqua*培養を添加し、2本目には何も添加しなかった。また、9月の海水については1.0 μm画分と0.1 μm画分(コントロール区)に*K. mikimotoi*培養を添加した画分を作成した。実験開始時の*C. antiqua*の細胞数を7月は500 cells mL⁻¹、9月は2000 cells mL⁻¹、*K. mikimotoi*の細胞数は1500 cells mL⁻¹とした。全ての実験区は温度25°C、明暗周期14hL:10hDの条件下で培養した。培養実験の4日目までは毎日、それ以降は2日毎にサンプルを一部採取し、赤潮藻、培養可能細菌、総細菌及び従属栄養性微小鞭毛虫(HNF)の計数を行った。培養可能細菌数は寒天平板法、総細菌数はDAPI染色法、赤潮藻は直接計数、HNFはDAPI-FITC二重染色後、落射蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果及び考察】

①海水及びアマモ葉体上に付着する培養可能細菌及び総細菌数

海水では総細菌数は 10^5 - 10^6 cells mL⁻¹、培養可能細菌数は 10^3 - 10^5 CFU mL⁻¹、アマモの葉体では総細菌数は 10^8 - 10^9 cells g⁻¹ (wet leaf)、培養可能細菌数は 10^6 - 10^8 CFU g⁻¹ (wet leaf)のオーダーで細菌が検出された。

②擬似現場法による殺藻微生物の動態把握

*C. antiqua*の細胞数は0.1 μm画分(コントロール区)では2日目から徐々に増加する傾向を示した。1.0 μm画分では7月は4-6日目にピークを迎え、その後減少したが、9月は4日目まで増加し、その後ほぼ横ばいまたは漸減の傾向を示した。10.0 μm画分で*C. antiqua*は2-4日目まで増加し、その後減少した。未濾過画分では4日目までにピークを迎えた後、8日目にはおおそ検出限界以下にまで減少した。*K. mikimotoi*の細胞数は0.1 μm画分(コントロール区)では2日目以降徐々に増加する傾向を示した。1.0 μm画分では培養4日目でピークを迎えた後、6-8日目にかけて速やかに減少した。培養可能細菌数、総細菌数はすべての画分で培養1日後に顕著な増加が見られた。HNF数は培養可能細菌数、総細菌数の増加と同時またはそれ以降に増加する傾向が見られたことから、HNFが細菌を捕食して増殖したと考えられる。

【今後の予定】

今後は8月と9月に分離した細菌を用いて*C. antiqua*、*K. mikimotoi*の2種を対象に二者培養試験を行い、二者培養対象細菌株のDNA解析を実施する予定である。また、擬似現場法に関してはアマモ場と沖合域の海水、赤潮藻添加画分と非添加画分、2種の藻類の挙動と環境要因と照らし合わせた各データの比較考察を行う予定である。

横路 直哉

次回のゼミ(12月2日(月),9:30~,N602)は、有馬君、小島君、佐藤さんの予定です。