

増殖末期における珪藻類の死滅と休眠期細胞形成に関する研究 (仮題)
(卒業論文中間発表)

[背景]

海産の珪藻類は有害有毒赤潮の原因種となるラフィド藻や渦鞭毛藻よりも一般的に分裂速度が大きい。しかし、実際の現場では優占していた珪藻類が減少し、その後有害有毒赤潮の原因生物が増殖し優占する事態がしばしば観察されている。このような珪藻類減少の原因の一つとして、珪藻類が放出する代謝産物である PUA (Polyunsaturated aldehydes、多価不飽和アルデヒド) が考えられている。室内実験では、海洋の珪藻類の約 1/3 の種は PUA を産生し、珪藻類の捕食者であるカイアシ類やウニ類の卵の孵化を妨害することが知られている。また、PUA は珪藻類自らにも悪影響を与え、ブルームを形成している珪藻個体群全体の死滅を誘引するという報告もある。また一方で、珪藻ブルームの終息の際には休眠期細胞の形成も頻繁に観察されている。本研究では、^①種々の珪藻類無菌株の増殖及び死滅過程の把握、^②死滅過程における生存戦略としての休眠期細胞の形成、及び^③PUA の珪藻類への添加の影響について検討した。

[材料と方法]

1. 珪藻類の無菌化: まず研究室で所有している珪藻類を無菌化するため、以下の処理作業を行った。48 ウェルマイクロプレートのウェルに改変 SWM-3 培地で培養した珪藻類を入れ、抗生物質である AM9 を濃度 10%、1%、0.1% で添加した。それらを温度 15°C、明暗周期 14hL:10hD、光強度 50-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に設定したインキュベータ中で 12 日間培養し、特に良好に増殖していることが確認された 8 個のウェルの中の培養を新しいマイクロプレートのウェルに移して新たな培地中に植え込み、前述した条件下で更に 1 週間培養した。無菌チェックにより、無菌株の作成の成否を確認した。

2. 珪藻類の増殖実験: 実験には珪藻類である *Ditylum brightwellii*、*Stephanopyxis nipponica*、*Nitzschia longissima*、*Tharassiothrix frauenfeldii* の 4 種を用いた。改変 SWM-3 培地が約 60 mL 入った三角フラスコに、細胞密度が約 100 cells/mL となるように珪藻類を添加し、インキュベータ内で培養を行った。培養条件は、明暗周期 14hL:10hD、光強度 50-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ とし、*D. brightwellii* と *S. nipponica* は 15°C、*N. longissima* は 20°C、*T. frauenfeldii* は 25°C で培養した。細胞密度の計数は倒立顕微鏡を用いて培養開始から 1 日毎に行い、計数結果から細胞密度の変化をモニターした。

[結果]

D. brightwellii の栄養細胞密度は 9 日目に最大値 9180 cells mL⁻¹ に達した後減少に転じ、21 日目には 558 cells mL⁻¹ まで減少した。また、休眠胞子と判断される形態の細胞も確認され、9 日目に最大値 1900 cells mL⁻¹ を記録した。*S. nipponica* の栄養細胞密度は 15 日目に最大値 16400 cells mL⁻¹ に達した後減少に転じ、27 日目には 5510 cells mL⁻¹ まで減少した。*N. longissima* の栄養細胞密度は 15 日目に 13400 cells mL⁻¹ に達した。*T. frauenfeldii* の栄養細胞密度は 13 日目に 17900 cells mL⁻¹ に達した後減少に転じた。

[今後の予定]

先日京都大学の石井健一郎博士より分譲頂いた珪藻 (*Chaetoceros affinis*、*C. curvisetus*、*C. didymus*、*C. vanheurckii*) について、DAPI 染色法による無菌状態を確認次第、培養実験を始め、増殖曲線を作成する。既に増殖曲線を作成した 4 種については、市販の PUA である *trans, trans-2, 4-decadienal* と *trans, trans-2, 4-heptadienal* を添加し、増殖実験を行って珪藻の挙動を観察する。また、*D. brightwellii* に関しては休眠胞子と判断される形態の細胞の発芽実験を行い、休眠胞子の形成ができていたか否かの確認を行う予定である。

横溝 岳志

次回のゼミ(11/25 [火] 13:30~, W103 にて) は成果報告です。