

修士論文内容の要旨

ふりがな	こじま せんり	
氏名	小島 千里	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 26 年 4 月	
指導教員名	主査 今井一郎 教授	副査 和田哲 准教授 副査 山口篤 准教授
論文題目	アマモ場に生息する植物プランクトン及び殺藻細菌の生態に関する研究	
<p>赤潮とは植物プランクトンの大量増殖や集積によって発生する海水の着色現象であるが、原因種によっては養殖魚の大量斃死等を招くため、深刻な漁業被害を与えている。赤潮対策としては、養殖魚の餌止めなどが挙げられるが、実質的な赤潮防除に繋がる手法は確立されていないのが現状である。そこで近年では環境に配慮された方法として、現場環境中に生息する殺藻細菌を用いた防除法が注目を集めている。特に殺藻細菌はアマモ葉体上に高密度で生息することが明らかになったため、アマモ場が殺藻細菌の供給源として大きな赤潮防除能を保有することが予想される。しかし、アマモ場に生息する植物プランクトンや殺藻細菌の分布の変動は未だ調査されておらず、アマモ場の微生物群集の動きが明らかになっていないことから、アマモ場の赤潮防除能の評価が出来ていないのが現状である。本研究ではアマモ場の赤潮防除能の評価を最終的な目標として、(1) 潮の干満に伴う植物プランクトンと殺藻細菌の調査を行うことにより、アマモ場における植物プランクトンと殺藻細菌の分布や両者の関係性を評価した。次に (2) 小規模なアマモ場において潮位に伴った植物プランクトンや殺藻細菌の時間的変動を追跡し、(3) アマモ場の堆積物中の休眠期細胞や水中の細菌捕食者の調査を行い、アマモ場内の微生物群集を評価した。</p> <p>(1) アマモ場における植物プランクトン及び殺藻細菌の分布と潮の干満の関係</p> <p>調査は岡山県日生町鹿久居島現寺湾のアマモ場 (Stn. 1) とその周辺海域に設けた 4 地点 (Stns. 2-5) において、2014 年 7 月 25 日 (大潮) の満潮時と干潮時の 2 回行った。各地点で表層水を採取し、Stn. 1 ではアマモ (<i>Zostera marina</i>) を採取した。得られたアマモはバイオフィルム (BF) を剥離させ、BF 試料を作成した。各試料は PHEM buffer を緩衝液とした固定液で固定し、植物プランクトンの同定・計数を行った。また、Stn. 1 及び Stn. 5 の海水試料と BF 試料は $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗抹し、形成されたコロニーから細菌を単離し、対象藻類との二者培養試験を行った。対象藻類は、<i>Chattonella antiqua</i>, <i>Heterosigma akashiwo</i>, <i>Heterocapsa circularisquama</i>, <i>Ditylum brightwellii</i>, <i>Chaetoceros didymus</i> 及び <i>Nitzschia longissima</i> の</p>		

6種類を用いた。二者培養試験は改変 SWM-3 培地を用いて温度 25°C, 光強度 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 明暗周期 14 hL: 10 hD の条件下で 2 週間行い, 殺藻の有無を観察し, 殺藻及び増殖阻害細菌を検出した。*Chattonella antiqua* との二者培養試験で検出された細菌は, PCR 法による 16S rRNA の部分塩基配列 (約 500 bp) の解析を行い, 得られた塩基配列から近縁の細菌株を調べた。

沿岸海域である Stns. 2-5 の植物プランクトンの密度は満潮時, 干潮時共に $1.6-2.5 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ であったのに対し, アマモ場の Stn. 1 の満潮時では $7.1 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$, 干潮時では $1.1 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ と非常に低い値を示し, ほとんどが *Nitzschia* spp. などの付着珪藻であった。BF 試料中からはすべての藻類に対して高密度の殺藻及び増殖阻害細菌が検出された ($10^5-10^6 \text{ CUF g}^{-1} \text{ wet leaf}$)。Stn. 1 の海水試料からは *Heterocapsa circularisquama* 及び *Nitzschia longissima* を除き, 殺藻及び増殖阻害細菌が高密度に検出され, Stn. 5 においても干潮時により多くの活性を持つ細菌が検出されるという結果が得られた。*Chattonella antiqua* に対する殺藻及び増殖阻害細菌は主に *Vibrio* 属や *Shingobium* 属であり, BF 試料と海水試料で類似した組成を示していた。また同じ属同士の細菌は塩基配列の類似度が高いもの (>98.5%) が多かったため, 同種と見なすことが出来る。

以上の結果より, アマモ場では植物プランクトンが非常に少なく, そのほとんどがアマモ場起源の付着珪藻であり, 殺藻及び増殖阻害細菌が高密度で生息していることが明らかになった。そのためアマモ場に生息している植物プランクトンはこれらの細菌の影響を受けている可能性が大きい。また沿岸域の海水は満潮時から干潮時かけて沖合に流されることが予想されるため, 潮流によってアマモ場から沖合へと殺藻細菌が供給されていることが示唆された。

(2) アマモ場における植物プランクトン及び殺藻細菌の時間的変動

試料採集は岡山県水産研究所付近の小規模なアマモ場と隣接するアマモ場の無い 2 地点で行った。この 2 地点は突き出した石垣で区切られており, アマモ場を有する地点を Stn. A, アマモ場が無い地点を Stn. B とした。この 2 つの地点において 2014 年 7 月 28 日 (大潮) の 9 時から 18 時の 1 時間毎に表層水を採取した。Stn. A では満潮時 (11 時) と干潮時 (18 時) にアマモ葉体を採集し, BF 試料を作成した。これらの試料から, 植物プランクトンの計数や DAPI 染色法や DAPI-FITC 二重染色法による細菌, HNF (Heterotrophic nanoflagellates) 及び ANF (Autotrophic nanoflagellates) 数の計数, 及び *Chattonella antiqua* を対象にした二者培養試験を通じて殺藻及び増殖阻害細菌の計数を行った。

Stn. A では潮位, 水温, 塩分, 栄養塩の変動間で様々な相関関係がみられ, 海底湧水の存在が示唆された。また, 満潮時には植物プランクトンの密度が高く (約 $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$), *Chaetoceros* spp. などの浮遊性の中心目珪藻が優占していたが, 干潮時には植物プランクトンの密度が減少し (約 $10^2 \text{ cells mL}^{-1}$), 優占種は BF 試料に高密度で生息していた *Navicula* spp. に替わっていた。殺藻及び増殖阻害細菌は満潮時より干潮時でより多く検出された。一方, Stn. B では海底湧水の影響は確認されなかった。また植物プランクトン数の変動は Stn. A と類似していたが, 優占種が付着藻類になることはなく, 殺藻及び増殖阻害細菌も Stn. A のように干潮時で多く検出されることはなかった。以上のことにより石垣のみで区切られている隣接した地点であるものの, アマモ場の存在の有無により潮位の変化に伴って植物プランクトンや

殺藻細菌の生息状況が大きく異なっていることが明らかになった。

(3) アマモ場における植物プランクトンと微生物群集の解析

試料採集は2015年6月15日に、鹿久居島周辺海域の Stn. 1 と Stn. 4 に加えて、黒島付近のアマモ場 (KS) と沖合域である OY-3 及び OY-5 で行った。各地点において表層水、KS 及び Stn. 1 ではアマモ葉体を採取した。KS, Stn. 1, OY-3 では採泥を行い、表層から 1 cm 深の堆積物試料を得た。海水試料は植物プランクトン、細菌、HNF、ANF 及び ND (Nano diatom) を計数し、BF 試料と共に *Chattonella antiqua* 及び *Alexandrium tamarense* を対象にした二者培養試験によって殺藻及び増殖阻害細菌を検出した。固定した海水試料の一部は沈殿濃縮を行い、繊毛虫の計数とカルコフルオール溶液を用いた有殻渦鞭毛藻類の計数を行った。海泥試料は、終点希釈法 (MPN 法) を用いて発芽・復活の可能な休眠期細胞を計数した。

黒島及び Stn. 1 のアマモ場ではその他の海域と比較し、周辺海域に生息していた赤潮原因藻類などの植物プランクトン及び ND が少なく、細菌、HNF、ANF 及び繊毛虫が多く、殺藻及び増殖阻害細菌が高密度であるという結果が得られた。また MPN 法の結果は、KS と Stn. 1 でそれぞれ 1.7×10^5 , 2.1×10^5 MPN g^{-1} wet sediment であったのに対し、OY-3 では 5.4×10^5 MPN g^{-1} wet sediment であり、アマモ場で低い値を示した。これらのことから、アマモ場は付着藻類が主要な一次生産者であり、赤潮原因藻類である浮遊珪藻や鞭毛藻の分布が制限されていること、殺藻及び増殖阻害細菌を含めた細菌や HNF などの微生物ループを構成する生物にとって好適な環境であり、微生物ループが卓越している可能性が示唆された。

本研究において、アマモ場由来の殺藻細菌は潮流により沖合域へと供給されていること、小規模なアマモ場においても植物プランクトンや細菌に影響を与えていること、アマモ場では微生物ループが卓越し、殺藻細菌を含む細菌群集は微生物ループに組み込まれていることが示唆された。以上のことから、アマモ場を用いた赤潮防除法は、自然の微生物の活動を利用した環境に配慮された有用な方法であるといえる。