

修士論文内容の要旨

ふりがな	こだま いさむ	
氏名	児玉 敢	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 29 年 4 月	
指導教員名	主査 今村央 教授	副査 山口篤 准教授 副査 松野孝平 助教 副査 稲葉信晴 研究員
論文題目	藻場に分布する殺藻細菌の赤潮防除における生理生態学的研究	
<p>高度経済成長期以降、我が国の沿岸域において有害有毒藻類ブルームである赤潮が頻発し、環境・経済面に悪影響を与えていることから対策が急務となっている。従来の赤潮対策に加えて、近年では環境に配慮した方法として殺藻細菌を用いた防除方法が注目されている。殺藻細菌はアマモや海藻のバイオフィルム (BF) において多量に検出され、海藻が繁茂する藻場に高密度で分布することが知られている。藻場は近年、埋め立てや護岸工事等によって減少傾向にあり、沿岸域が有する赤潮を抑える力が弱まっていると考えられている。そのため、藻場を人為的に回復・造成することで、殺藻細菌が継続的に沿岸域を含めた海域に放出され、恒常的な赤潮防除となる可能性が挙げられている。しかし、人為的に造成した藻場における殺藻細菌の分布は明らかとなっていない。</p> <p>本研究では、海藻の浮遊担体として軽石を用いた人工藻場を作成し、海藻及び周辺の海水から殺藻細菌の検出・単離を行い、人工藻場の赤潮防除能を検証した。また、海藻上以外のバイオフィルムにおける殺藻細菌の探索を試みた。さらに、単離した殺藻細菌を対象に、殺藻機構における細菌の情報伝達機構であるクオラムセンシング (QS) の関連を調査した。</p> <p>① 和歌山県串本における人工藻場の造成及び殺藻細菌の単離・検出</p> <p>実験は和歌山県串本町の Stn. KU において行った。まず、実験区内にアナアオサ <i>Ulva pertusa</i> 又はホソジュズモ <i>Chaetomorpha crassa</i> の遊走子を付着させた軽石、及び軽石のみを入れた 3 つのかごを 2017 年 6 月から 9 月にかけて設置した。サンプリングは 9 月に行い、実験区周辺の海水と軽石やかごに付着した海藻及び実験区周辺の海藻を採取した。水理環境として水温、塩分を計測した。また、人工藻場の比較地点である和歌山県太地町の自然藻場 Stn. TA より、海水及び海藻 (緑藻 2 種、紅藻・褐藻各 1 種ずつ) を採取した。</p> <p>得られた海藻試料については BF を剥離し、BF 試料を作成した。海藻 BF 試料と海水試料は段階希釈</p>		

後、ST10⁻¹寒天培地に塗抹して暗所で2週間培養してコロニーを形成させた。寒天培地上に形成されたコロニーは、滅菌爪楊枝を用いて単離した。

各試料から単離した細菌の内、原則として40株を、微細藻類株 (*Alexandrium tamarense*, *Chattonella antiqua* NIES-1 株, *Heterosigma akashiwo* 893 株, *Heterocapsa circularisquama*, *Karenia mikimotoi* G303 株) との二者培養実験に供した。培養は、光強度 50–100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 明暗周期 14 hL: 10 hL, 温度は *A. tamarense* に対して 15°C, *H. akashiwo* に対して 20°C, その他の藻類は 25°C の条件下で2週間行った。培養期間中倒立顕微鏡で観察し、単離細菌の殺藻細菌及び増殖阻害能を検証した。また検出された細菌株は、16S rRNA 遺伝子解析により近縁種を同定した。

両地点の各試料から殺藻又は増殖阻害細菌が見られ、それらの細菌の密度は Stn. KU の海水では 10–10² CFU mL⁻¹, 海藻では 10⁵–10⁷ CFU g⁻¹ wet weight のオーダーで、Stn. TA の海水では 10–10² CFU mL⁻¹, 海藻では 10⁵–10⁶ CFU g⁻¹ wet weight のオーダーで検出され、人工藻場においても自然藻場と同様に殺藻細菌又は増殖阻害細菌が分布することが明らかとなった。一方で、検出された細菌株が、二者培養実験に供した微細藻類種5種のうち何種類を対象とするかを示した殺藻範囲は、Stn. TA と比べて Stn. KU では狭い傾向にあった。また、遺伝子解析の結果、両地点の海水及び海藻から見られた分類群が存在する一方で、Stn. TA でしか見られない分類群が存在したことから、2地点で殺藻細菌分類群が異なることが考えられた。

② 函館恵山及び志海苔における殺藻細菌の分布の調査

サンプリングは2018年7月12日に北海道函館市日ノ浜町の砂浜海岸 (Stn. ES), 志海苔海岸 (Stn. SH, 自然藻場) 及び志海苔漁港 (Stn. SHh) において行った。全地点において海水及び堆積物を直接又は採泥器により採取し、Stn. ES と SH においては礫を、Stn. ES においては海藻 (緑藻・褐藻1種ずつ, 紅藻2種) を採取した。堆積物と礫試料については試料を作成して、各試料を①と同様に処理し、*A. tamarense*, *Heteros. akashiwo* 及び *K. mikimotoi* との二者培養実験に供して殺藻細菌及び増殖阻害細菌を検出した。

砂浜海岸 Stn. ES では、全試料から殺藻細菌は検出されなかった。一方で、Stn. SH 及び SHh では殺藻又は増殖阻害細菌が、海水試料からは 10²–10³ CFU mL⁻¹, 海藻試料からは 10⁵–10⁷ CFU mL⁻¹, 礫試料からは 10⁵ CFU cm⁻², 堆積物試料からは 10⁵–10⁶ CFU g⁻¹ wet weight のオーダーで確認された。このことから、藻場が広がる海域や周囲の海域においては、海藻だけではなく様々な基質に殺藻及び増殖阻害細菌が分布することが示唆された。また、周囲に藻場が見られない Stn. ES では殺藻細菌が検出されなかったことから、殺藻細菌の分布には有機物提供などの藻場による寄与が関与している可能性が考えられた。

③ 殺藻細菌の殺藻機構におけるクオラムセンシングの関与に関する検討

殺藻細菌及び増殖阻害細菌の殺藻過程における QS の関与を検討するため、以下の2つの実験を行った。細菌株は実験①で単離し継代培養した44株を使用した。

実験-I: 各細菌株のコロニーと液体培養液における殺藻能を二者培養実験により検証した。細菌株を

ST10¹ の寒天又は液体培地で十分に培養した後、形成されたコロニー又は液体培養液を対象藻類培養液に添加し、コロニー添加区と液体培地添加区を設定した。培養は 10 日間行い、培養期間中ターナー蛍光光度計を用いて藻類の増減をモニターした。液体培地添加区よりコロニー添加区で殺藻又は増殖阻害が見られた株を、殺藻機構に QS が関与の可能性がある株とした。

実験-II: 実験-I の結果, QS の関与が見られた細菌株の殺藻機構について, 情報伝達物質としてアシルホモセリンラクトン (AHL) を介した QS との関連を検討した。QS 阻害剤として, AHL と包接錯体を形成する β -シクロデキストリン (β -CD) を終濃度 100 μmol になるよう SWM-3 培地に溶解させ, 試験管に分注した。そこに細菌株のコロニーを添加して, 実験-I と同様の条件で二者培養実験を行った。

実験-I の結果, 人工藻場と自然藻場の海藻試料から単離された細菌株 4 株 (細菌株 11, 20, 49, 50) においてコロニー添加時に殺藻が確認された。また, *Heteroc. circularisquama* と *K. mikimotoi* を殺藻する細菌株 11 については, 前者に対しては QS を介した殺藻が, 後者に対しては QS を介さない殺藻が見られたことから, 対象藻類によって殺藻機構が異なる可能性が考えられた。実験-II の結果, 細菌株 4 株において β -CD による殺藻阻害が見られなかったことから, AHL 以外の情報伝達物質を介した QS が殺藻に関与していることが考えられた。

本研究で, 人為的に造成した藻場においても殺藻細菌が分布することが明らかとなった。しかし, 多様な海藻が分布する自然藻場において人工藻場よりも多様な殺藻細菌分類群が見られたことから, 赤潮防除として人工藻場を造成する際には, 自然藻場に近い藻場を造成する事が重要であると考えられる。今後は, 藻場が赤潮防除として機能するために必要な規模, 実際の赤潮発生海域への殺藻細菌の供給量といった, 藻場による赤潮防除の実現化を視野に入れた研究が必要になってくるであろう。