

海域における微生物フィルム of 長期成長とマガキ
(*Crassostrea gigas*) 幼生の付着過程に関する研究

Studies on the long-term growth of microbial biofilm in the sea and the settlement
process of larvae of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*

2017 年 8 月

長崎大学大学院

水産・環境科学総合研究科

橋本 京太郎

目次

第1章 緒言.....	1
第2章 海洋に垂下したガラス基盤における 微生物フィルム中の付着藻類の季節による量的変動.....	5
実験方法.....	7
実験結果.....	10
考察.....	14
図表.....	18
第3章 微生物フィルムのマガキ (<i>Crassostrea gigas</i>) 幼生 に対する付着誘起効果...	32
実験方法.....	34
結果.....	39
考察.....	41
図表.....	45
第4章 総合考察.....	53
謝辞.....	58
引用文献.....	59

第1章 緒言

海洋微生物フィルム（以下、微生物フィルム）は、水中の基質上に付着、増殖した微生物の集合体で、バクテリアや付着珪藻、原生動物などが主な構成生物であり（Wahl, 1989）、光量が十分な基質において、微生物フィルムの生物量のほとんどは付着珪藻由来である（Caron and Sieburth, 1981）。

微生物フィルムは産業に大きな関わりを持っており、微生物フィルムが金属表面で成長すると微生物腐食（Microbiologically Influenced Corrosion, MIC）や生物汚損を引き起こし、経済的損失の原因となる（Yebra *et al.*, 2004）。金属表面に微生物フィルムが形成されると、その界面で嫌気的な環境が生じ、腐食が引き起こされる。その腐食機構は、硫酸還元細菌（Sulfate Reducing Bacteria, SRB）が嫌気的条件下で電気化学的腐食反応の過程で腐食を促進しているという説が主流であるが、好気的環境でも腐食作用がみられることなどから不明な点も多い（菊池・スリクマリー, 2002）。また、発電所や大型タンカー等の主要機関である蒸気タービンの冷却水管内に微生物フィルムが形成されると、熱交換効率を低下させ、ランニングコストを増加させることが報告されており（塩田ら, 2009）、バイオサイド（殺菌剤）の投入などが実施されている（菊池・スリクマリー, 2002）。さらに微生物フィルムの成長は、多毛類やフジツボ類などの大型付着動物による生物汚損の前兆現象となっている（Yebra *et al.*, 2004）。

微生物フィルムは、無脊椎動物幼生（see review by Qian *et al.*, 2007; Dobretsov *et al.*, 2013）に対して付着誘起効果や付着忌避効果を有していることが知られる。また、微生物フィルムは、無脊椎動物幼生の付着・変態において重要な役

割を果たしており、ヒドロ虫類 *Hydractinia echinata* (Leitz and Wagner, 1993)、多毛類 *Janua brasiliensis* (Kirchman and Graham, 1982)、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* (河村・菊地, 1992)、ムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* (Satuito et al., 1995; Bao et al., 2007a)、タテジマフジツボ *Amphibalanus amphitrite* (Jouuchi et al., 2007)、ナマコ類 (Ito and Kitamura, 1997)、アカウニ *Pseudocentrotus depressus* (谷・伊東, 1979; 伊東, 1984)、バフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* (伊東ら, 1980)、ムラサキウニ *Anthocardia crassispina* (伊東, 1984) など、多くの海産無脊椎動物幼生の付着および変態を誘起することが知られている。微生物フィルムは、海産無脊椎動物幼生の付着・変態に重要な役割を担っているが、付着・変態の誘起要因には様々な報告がある。アワビ類では、幼生の着底に最適なフィルムの珪藻種と密度が報告されており (河村・菊地, 1992)、着底後には付着珪藻が幼体の餌料となる (Kawamura et al., 1995)。水産有用種の種苗生産では、幼生の付着基盤として好適なフィルムおよび幼生や幼体などの餌料として適した珪藻を中心とした微生物フィルムの確保が重要であり、付着珪藻の出現量や種の変遷などを考慮した微生物フィルムの成長過程の解明が必要となる。

微生物フィルムは、基質 (Marszalek et al., 1979; Patil and Anil, 2005)、季節 (Patil and Anil, 2005)、浸漬期間 (Nayar et al., 2005; Patil and Anil, 2005; Satheesh and Wesley, 2012)、プランクトン量の変動 (Lukatelich and McComb, 1986; Patil and Anil, 2005) など種々の環境要因の影響を受けながら常に変化している。また、微生物フィルムは、珪藻類やバクテリアの付着密度が一定以上になると、平面的な構造から立体的な構造をとるようになる (河村・菊地, 1992)。そのた

め、海洋における微生物フィルムの成長過程を観察した研究では、重量が微生物フィルムの生物量の変化の指標とされており (e.g. Chiu et al., 2005; Bao et al., 2007a)、生物量を重量で評価する場合、その大部分を占めるのは藻類である。また、海産無脊椎動物幼生に対する付着誘起効果を考慮する場合、微生物フィルム作成日数には数週間の単位を時間スケールとして用いるのが現実的といえる (Campbell et al., 2011)。一方、微生物フィルムの成長と季節の影響解明を目的とした調査では、基盤を長期間浸漬すると大型付着動物が出現し観測に影響を与えるため (Kawamura and Hirano, 1992)、ほとんどの研究例では基盤の浸漬期間を 2 週間以内にとどめており (e.g. Nayar et al., 2005; Chiu et al., 2008; Satheesh and Wesley, 2012)、それ以降の微生物フィルムの成長に関する情報は無い。

そこで第 2 章では、長崎県長崎市多以良町地先に 1 ~ 4 週間垂下したガラス基盤上に形成された微生物フィルムを 2010 年 7 月~2012 年 10 月にわたり、微生物フィルムの成長に伴う重量 (乾燥重量)、クロロフィル a、b、c 量、付着珪藻密度および種組成を調査し、微生物フィルムの長期成長を観察した。同時にクロロフィル量のフィルムの生物量の指標としての有効性を検討した。

一方、微生物フィルムの海産無脊椎動物幼生に対する付着・変態誘起効果に関しては、様々な生物を対象とした研究が行われてきたが、マガキ幼生の付着誘起効果については不明な点が多い。カキ類はわが国では北海道から九州にわたって広く養殖されている有用二枚貝であり、2014 年度の生産量は 183,685 トン (殻付き) であった (農林水産省, 2016)。我が国において広く養殖されているマガキ (*Crassostrea gigas*) の場合、種苗の入手は天然採苗が主流であるが、

一部の地域では種苗生産も行われている (大泉ら, 1976; 平田, 2005)。本種およびその近縁種について、付着・変態 (以下、付着とする) メカニズムの解明および採苗効率向上を目的に古くから多くの研究が行われてきた (Crisp, 1967; Bayne, 1969; Veitch and Hidu, 1971; Weiner et al., 1989; Fitt et al., 1990) が、詳しいメカニズムは不明である。Jones and Jones (1988) はカキ類の採苗において、あらかじめ海中に浸漬した採苗器を用いた場合、効率が向上することを報告し、幼生の付着に採苗器表面に形成した微生物フィルムの関与を示唆した。マガキ幼生の付着に対する微生物フィルムの役割の解明は、幼生の付着メカニズムの解明だけでなく採苗効率向上につながると期待される。

そこで第3章では、2009年5月~2010年1月の期間中、1~24日間垂下して作製した微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果を稚貝率で評価し、日令 (垂下日数)、重量 (乾燥重量)、バクテリア密度、付着珪藻密度の観点より検討した。また、微生物フィルムに対してホルマリン、熱、抗生物質などの処理を施し、マガキ幼生の付着誘起効果を検討した。さらに、微生物フィルムからバクテリアを単離し、マガキ幼生に対する付着誘起効果を検討するとともに、微生物フィルムと単離バクテリアフィルムの付着誘起効果を比較した。

第4章では、微生物フィルムの長期成長に伴う重量、クロロフィル量、付着珪藻密度の変化と季節の影響を考察した。また、微生物フィルムに含まれるマガキ幼生の付着誘起物質を考察するとともに幼生の微生物フィルムへの付着を考察した。

第2章 海洋に垂下したガラス基盤における微生物フィルム中の 付着藻類の季節による量的変動

海にスライドグラスなどの基盤を浸漬すると、物質の吸着による生化学的コンディショニングが起こり、以後バクテリア、珪藻、真菌類などが付着し、さらにはこれらの生物が分泌する粘液などにより、微生物フィルムが成長する (Wahl, 1989)。また、光が十分に届く基盤において微生物フィルムの生物量のほとんどは付着珪藻由来である (Caron and Sieburth, 1981)。

微生物フィルムはその成長過程において、基質 (Marszalek *et al.*, 1979; Patil and Anil, 2005)、季節 (Patil and Anil, 2005)、浸漬期間 (Nayar *et al.*, 2005; Patil and Anil, 2005; Satheesh and Wesley, 2012)、プランクトン量の変動 (Lukatelich and McComb, 1986; Patil and Anil, 2005) など種々の環境要因の影響を受けている。また、微生物フィルムは、珪藻類やバクテリアの付着密度が一定以上になると、平面的な構造から立体的な構造をとるようになる (河村・菊地, 1992)。微生物フィルムの成長過程を観察した研究では、重量が生物量の変化の指標とされているが (Chiu *et al.*, 2005; Patil and Anil, 2005; Mitbavkar and Anil, 2000; 2008)、ほとんどの場合、浸漬開始から2週間以内のみの観察である (Nayar *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2008; Satheesh and Wesley, 2012)。これは基盤を長期間浸漬すると、大型付着動物が出現し、観測に影響を与えるためである (Kawamura and Hirano, 1992)。しかし、微生物フィルムは環境に影響を受けながら常に生物量および種組成が変化しているが、海産無脊椎動物幼生に対する付着誘起効果を考慮した観察を行う場合、数週間の単位を時間スケールとして用いるのが現実的といえる (Campbell *et al.*, 2011)。

本章では、微生物フィルムの長期成長と季節との関連性を明らかにするため、長崎県長崎市多以良町地先に1～4週間垂下したガラス基盤上に形成される微生物フィルムを2010年7月～2012年10月にわたり調査した。また、微生物フィルムの重量（乾燥重量）、珪藻密度および種変遷を調査し、同時にクロロフィル a、b、c 量を測定することにより、クロロフィル量の微細藻類の指標としての有効性を検討した。

実験方法

微生物フィルムの作製

垂下実験は、長崎県総合水産試験場（長崎市多以良町）の浮き桟橋 (129°46'E, 32°48'N, Fig1) で 2010 年 7 月 ~ 2012 年 10 月にわたって行った (Fig. 1)。基盤として洗浄後のスライドガラスを半分に切断したもの (38 mm × 26 mm) を使用し、これら約 80 枚を垂下板に設置し、水深 1 m に垂下した (Fig. 2)。その後 1、2、3、4 週間で各々 20 枚を回収し、回収後、生物顕微鏡下で付着物を観察するとともに付着珪藻の組成および密度、付着物の全重量、クロロフィル a およびクロロフィル c の重量を測定した。なお、調査期間中の実験海域の水温は、長崎県総合水産試験場が同海域の筏より測定した表層水温（毎月の上旬、中旬、下旬の水温）を使用した（長崎県総合水産試験場事業報告, 2011; 2012; 2013）。

付着珪藻密度および組成の観察

回収したスライドガラスは、直ちに顕微鏡観察で付着動物の有無を観察し、優占する珪藻の判別を行った。付着珪藻は、日本海洋プランクトン図鑑 (Yamaji, 1984) および河村 (1994) に基づいて顕微鏡写真より属のレベルまで分類した。また、付着珪藻は種別ではなく全細胞数を生物顕微鏡下の 200 ~ 400 倍にて基盤上のランダム 10 ヶ所を計数し、その平均を付着珪藻密度とした。

微生物フィルム重量の測定

回収した微生物フィルムは、Bao et al. (2007a) の方法に基づき測定した。微

生物フィルム (1 ~ 10 枚) を FSW 200 mL 中にこそぎ落とし、それをあらかじめ洗浄、乾燥重量を測定した GF / C (Whatman, Φ 47 mm) に濾過し、蒸留水 (DW) 50 mL をろ過して洗浄、脱塩の後、80 °C で 2 時間、デシケーター内で室温としてから測定した。また、測定には 2 ~ 10 枚 (1 週間垂下) および 2 ~ 6 枚 (2 ~ 4 週間垂下) のフィルムを用いた。

クロロフィルの測定

クロロフィル含量はアセトン抽出法を用いて測定した。すなわち、上記と別のスライドガラス (1 週間垂下: 2 ~ 18 枚、2 ~ 4 週間垂下: 2 ~ 6 枚) から付着物をこそぎ落とし GF / C でろ過した後、90% (v/v) アセトン (ナカライテスク) を加え乳鉢で破碎し、遠沈管に移し遠心分離 (3000 rpm、10 min) した。遠心分離後の上清は全て回収し、分光光度計 (HITACHI, U - 1900) を用いて 750 nm、664 nm、647 nm、630 nm における吸光度値を測定し、クロロフィル量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) および重量あたりのクロロフィル量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$) を Jeffrey and Humphrey (1975) の式を用いて求めた。

統計解析

微生物フィルムの乾燥重量とクロロフィル a、b および c 量の関係は、それぞれの相関を調べた。また、微生物フィルムのクロロフィル a、b、c 量および付着珪藻密度について、測定値を垂下日数 (週) と垂下時期 (1~3 月、4~6 月、7~9 月、10~12 月) に分け、時間的、季節的変動を二元配置分散分析で調べた ($P < 0.05$)。垂下期間の 1、2、3、4 週間の実験回数は、それぞれ 20~22、26~28、25~27、29~30 回であり、1~3 月、4~6 月、7~9 月および 10~12 月の実験回数は

それぞれ 21~22、24~25、27~34、27 回であった。回収した 1、2、3、4 週間垂下のフィルムのうち、クロロフィル a、b、c および付着珪藻密度の最大値を 1~3 月、4~6 月、7~9 月および 10~12 月でそれぞれ抽出し、Tukey HSD で多重比較を行った。統計解析は、全て JMP™ で行い、 $P < 0.05$ を有意と判断した。

結果

海域にスライドガラスを浸漬すると、時間の経過とともに微生物フィルムが形成された。2月に回収したフィルムは Fig. 3 (A)、7月に回収したフィルムを Fig. 3 (B) に示し、2010年7月から2012年10月までの水温および塩分、スライドガラス上に形成された微生物フィルムの全付着重量を Fig. 4 に示す。28ヶ月の調査期間中の水温は1~3月に12~14℃、4~6月に16~22℃、7~9月に25~28℃、10~12月に17~23℃であり、塩分は30~34を推移した。

調査期間中の全付着重量は垂下期間とともに増加し、水温が21~29℃となった6~8月では、2週間以上垂下のフィルム上にウズマキゴカイ (*Dexiospira foraminosa*)、端脚類、タテジマフジツボ (*Amphibalanus amphitrite*)、サンカクフジツボ (*Balanus trigonus*) などの大型付着生物が出現したが、それらは計数しなかった。大型付着動物が付着した期間を含めた乾燥重量の最大は、3 mg cm⁻² (2010年)、35 mg cm⁻² (2011年)、6 mg cm⁻² (2012年)であった。一方、2011年の9月を除き、9月から翌年5月までの期間では大型付着動物は出現せず、この時の全付着重量は4週間垂下でも0.3 (2010年9月)~1.2 (2011年2月) mg cm⁻²であった (Fig. 4)。微生物フィルムは、主に珪藻類が繁茂し、ヒラアオノリ (*Ulva compressa*) も出現したが、計数は困難であった。

乾燥重量は微生物フィルムの生物量の測定手段として広く用いられており (Chiu et al., 2005; Bao et al., 2007)、それらと重量あたりのクロロフィル a、b および c 量の関係を Fig. 5、Fig. 6、Fig. 7 に示した。乾燥重量と重量あたりのクロロフィル a 量の関係は、全ての乾燥重量のデータを用いた図を Fig. 5 - A、全乾燥重量のデータより大型付着動物が出現した点を除き、微生物フィルムのみ

のデータを用いた図を Fig. 5 - B とした。大型付着動物が出現した点を含めた場合、相関がなく ($r = 0.2207$, Fig. 5 - A)、微生物フィルムのみデータを用いた場合は相関を示した ($r = 0.8575$, Fig. 5 - B)。同様に、乾燥重量と重量あたりのクロロフィル b 量の関係も全ての乾燥重量のデータを用いた図を Fig. 6 - A、全乾燥重量のデータより大型付着動物が出現した点を除き、微生物フィルムのみデータを用いた図を Fig. 6 - B として示した。大型付着動物が出現した点を含めた場合、相関はなく ($r = 0.0600$, Fig. 6 - A)、微生物フィルムのみデータを用いた場合は相関を示した ($r = 0.7221$, Fig. 6 - B)。乾燥重量と重量あたりのクロロフィル c 量の関係についても、全ての乾燥重量のデータを用いた Fig. 7 - A と微生物フィルムのみデータを用いた Fig. 7 - B を示した。クロロフィル c についても大型付着動物が出現した点を含めた場合、相関はなかったが ($r = 0.2383$, Fig. 7 - A)、微生物フィルムのみデータを用いた場合は相関を示した ($r = 0.7365$, Fig. 7 - B)。重量あたりのクロロフィル a、b および c 量の関係は、クロロフィル a、b および c 量は大型付着動物が出現しない微生物フィルムでは、微生物フィルムの乾燥重量を反映し (Fig. 5 - B、Fig. 6 - B、Fig. 7 - B)、微細藻類主体の微生物フィルムであることが示唆された。

クロロフィル a、b および c 量の測定結果は Fig. 8、Fig. 9 および Fig. 10 に示し、微生物フィルム重量に占めるクロロフィル量で表した。クロロフィル a 量は 2 ~ 3 週間ほどで最大となり、その後 4 週間にかけて一定もしくは減少する傾向がみられた。月間のクロロフィル a 量は微生物フィルムあたり $2.5 \sim 5.7 \mu\text{g mg}^{-1}$ であり、7~9 月に低い傾向があった (Fig. 8)。最大となったのは $13.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ で 2011 年 6 月の 3 週間垂下であった。重量あたりのクロロフィル c 量は 1

~4月および10~12月では、2~3週間ほどで最大となった。クロロフィルb量は微生物フィルム重量あたり0.0~4.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ であり、2011年6月の3週間垂下で4.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ と最大であった (Fig. 9)。クロロフィルc量は10~4月では、4週間で最大となった。クロロフィルc量は微生物フィルム重量あたり0.3~0.9 $\mu\text{g mg}^{-1}$ であり、2011年6月の3週間垂下で1.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ と最大であった (Fig. 10)。調査期間中に形成した微生物フィルムに出現した付着珪藻の月ごとの付着珪藻密度の変化を Fig. 11 に示した。付着珪藻密度は、垂下開始後2~4週間で最大となる傾向を示した。季節ごとの付着珪藻密度は、1~3月で $2.4 \sim 3.6 \times 10^5 \text{cells cm}^{-2}$ 、4~6月で $2.4 \sim 2.7 \times 10^5 \text{cells cm}^{-2}$ 、7~9月で $1.0 \sim 1.9 \times 10^5 \text{cells cm}^{-2}$ 、10~12月で $2.8 \sim 3.3 \times 10^5 \text{cells cm}^{-2}$ であった (Fig. 11)。垂下日数 (週) および垂下時期 (1~3月、4~6月、7~9月、10~12月) がクロロフィルa、b、cおよび珪藻密度に与える影響は、二元配置分散分析で判定し、Table 1 とした。クロロフィルaは垂下日数 ($P = 0.0021$) および垂下時期 ($P = 0.0317$) と関連がみられ、垂下日数と垂下時期の相互作用はみられなかった ($P = 0.2126$)。クロロフィルbは垂下日数 ($P < 0.0001$) および垂下時期 ($P = 0.001$) と関連がみられ、垂下日数と垂下時期の相互作用はみられなかった ($P = 0.4379$)。一方、クロロフィルcは垂下時期 ($P = 0.0114$) と関連がみられ、垂下日数 ($P = 0.3209$) および垂下日数と垂下時期の相互作用はみられなかった ($P = 0.1013$)。付着珪藻密度は、垂下日数 ($P < 0.0001$) および垂下時期 ($P = 0.0134$) と関連がみられ、垂下日数と垂下時期の相互作用はみられなかった ($P = 0.1996$)。また、クロロフィルa、b、c量および付着珪藻密度を垂下時期 (1~3月、4~6月、7~9月、10~12月) で区切り、多重比較検定を行った結果を Table 2 に示した。ク

クロロフィル a は、1~3月および10~12月で高く、クロロフィル b は1~3月で低くなった (Table 2)。クロロフィル c は1~3月に高く、季節ごとの付着珪藻密度は、7~9月で有意に低くなった (Table 2)。

また、各月ごとの付着珪藻の種の変遷を Table 3 に示した。付着珪藻の種の変遷は、各月で付着珪藻密度が最も高かったフィルムに出現したものを属のレベルで同定し、示した。調査期間中、*Navicula* 属および *Nitzchia* 属が年間を通して出現し、2012年1月を除いて *Cocconeis* 属も出現した。*Nitzchia* 属は、2011年8月および2012年6、8月を除き、優占していた。*Cocconeis* 属は2011年8月および2012年5~8月で優占し、*Nitzchia* 属は2010年8~9月、2011年4~5月、2012年4、5、10月で優占した。その他、*Amphora* 属、*Bacillaria* 属、*Rhizosolenia* 属が出現したが、*Bacillaria* 属および *Rhizosolenia* 属の出現は、1%以下であった。

考察

微生物フィルムの成長過程の調査では、1～14日間における成長に焦点が当てられており (Nayar et al., 2005; Chiu et al., 2008; Satheesh and Wesley, 2012)、微生物フィルムは環境要因によって、活発にその構造を変化させ、飽和に達した後も様々の様相を呈する (Patil and Anil, 2005; Qian et al., 2007)。また、微生物フィルムの成長と海産無脊椎動物の関係を明らかにするためには、より長期にわたる観察が必要となる (Campbell et al., 2011)。本研究は、スライドガラスを基盤として、そこに形成される微生物フィルムを観察したものであり、基盤上に主に珪藻類やヒラアオノリ (4～12月) が出現し、垂下後4週間まで重量が増加した (Fig. 4)。この結果は、海洋における微生物フィルムの成長過程の調査において、数週間単位の長期間にわたる垂下実験の必要性を支持するものであった。しかし、6～9月では大型付着動物がスライドガラス上に付着し、それらの月では付着物重量に大型付着動物が含まれた。その結果、6～9月における付着物重量による微生物フィルムの形成過程の評価は、困難となった。

これまでの微生物フィルムの成長は、直接観察による珪藻類の組成および密度 (Patil and Anil, 2005; Mitbavkar and Anil, 2008; Satheesh and Wesley, 2012) で定量されてきた。また、微生物フィルムのクロロフィル量を生物量の指標として用いた報告もあった (Patil and Anil, 2005; Mitbavkar and Anil, 2008)。クロロフィル a は全ての光合成藻類が含有しており (Dere et al., 1998)、水中 (Steele, 1962; Cullen, 1982)、堆積物 (Leach, 1970; Joint, 1978; Lukatelich and McComb, 1986) および微生物フィルム (Patil and Anil, 2005) の藻類の生物量を推定する指標として用いられてきた。しかし、Ramaraj et al. (2013) は、培養した藻類の

乾燥重量とクロロフィル量に統計的な関連がみられないとして、クロロフィル量が藻類の生物量の指標とならないことを示した。本研究では、クロロフィル a、b および c 量と微生物フィルムの乾燥重量に相関がみられ、クロロフィル a、b および c 量は、微生物フィルムの生物量の指標となることが示された (Fig. 5 - B、Fig. 6 - B、Fig. 7 - B)。

微生物フィルムのクロロフィル a および b 量は、垂下日数によって変化したが (Fig. 5,6、Table 1)、クロロフィル c では関連がなかった。Ritchie (2008) は、クロロフィル c 量が微量な場合、過大に見積もられることがあると注意を促している。これは、本研究でクロロフィル量と垂下日数の関係を攪乱する要因となっている可能性があるが、今後の詳細な調査を要する。

潮間帯の底生藻類 (*e.g.* Leach, 1970; Joint, 1978) や微生物フィルム (*e.g.* Chiu et al., 2005; Mitbavkar and Anil, 2008) の藻類の出現量については、その季節変動が報告されている。本研究においても、クロロフィル a、b および c 量の季節変動が認められた (Fig. 8, 9,10 Table 1)。クロロフィル a、b および c 量は、平均水温が 12 ~ 23 °C となる 1 ~ 3 月では、大型付着動物の付着がみられた 7 ~ 9 月 (平均水温 25 ~ 28 °C) と比較して高くなった (Table 2)。本研究における微生物フィルムのクロロフィル a および c 量の季節変動は、6 ~ 9 月に出現した大型付着動物による捕食などの攪乱 (Kawamura and Hirano, 1992) を受けた可能性が示唆されたが、付着動物の行動は直接観察できなかつたため、今後の検討を要する。

本研究では、付着珪藻の出現量についても時間的、季節的な変動が認められ、季節および垂下期間の影響を受けることが示された (Fig. 11, Table 1)。月ごと

の平均付着珪藻密度は、ほぼ一定であったが、7~9月で減少がみられ、この期間に付着した大型付着動物の影響が示唆された。付着珪藻の季節変動は、水温や塩分などの物理化学的要因 (Patil and Anil, 2005; Chiu et al., 2005)、や端脚類による摂餌圧などの生態学的要因 (Kawamura and Hirano, 1992) によって起こることが報告されているが、これらの報告も浸漬期間が数日間の微生物フィルムの観察結果であり、再度検証することによって、微生物フィルムの珪藻密度の季節変動の要因解明につながると考えられる。

一方、珪藻組成の変遷には季節性がみられ、10~3月に4~6属が出現し、3~4属が出現した4~9月と比較して、多くの種が出現した (Table 3)。過去の報告では、4日間浸漬の基盤 (Patil and Anil, 2005; Mitbavkar and Anil, 2008) で季節性が報告されたが、本研究では3週間以上の観察で珪藻組成の季節による変遷がみられた。珪藻種組成の季節変化は、夏に起こる捕食圧に対する種ごとの耐性 (Suzuki et al., 1987; Kawamura and Hirano, 1992) の差によるものと推察された。また微生物フィルム中では、*Nitzschia* 属もしくは *Cocconeis* 属が出現する5月と8月を除いて、*Navicula* 属が常に優占的に出現した (Table 3)。Satheesh and Wesley (2012) も1年間の調査で *Navicula* 属および *Nitzschia* 属が優占種であると報告している。

乾燥重量 (e.g. Chiu et al., 2005; Bao et al., 2007b)、バクテリア (e.g. Bao et al., 2007b) および珪藻の出現量 (e.g. Satheesh and Wesley, 2012) の観察は、天然環境で形成される微生物フィルム量を見積もる方法として用いられてきた。しかし、大型付着生物の付着によって乾燥重量による評価が困難となり、バクテリアおよび珪藻の計数はフィルムが成長して立体的な構造をとった場合に困難

となる。本研究では、クロロフィル量の測定により、微細藻類を中心とした微生物フィルム¹の生物量の時間的、季節的な推定が可能であることが示された。

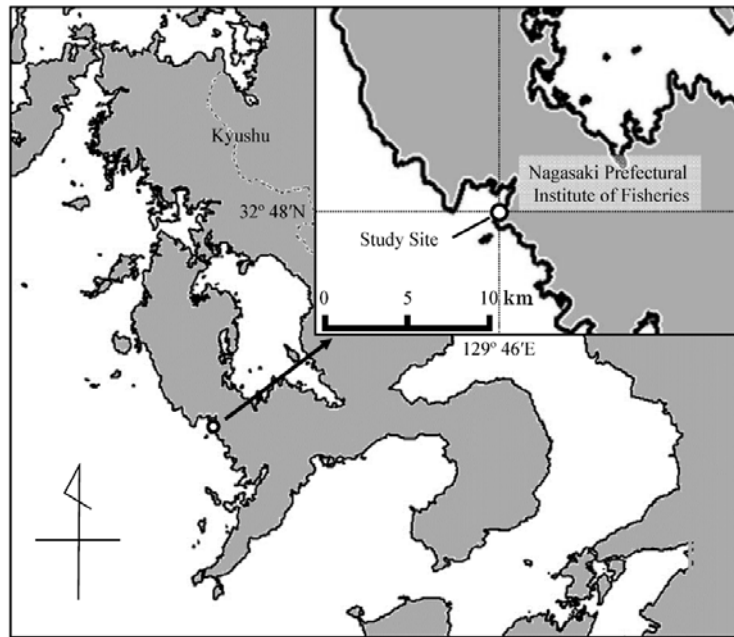


Fig. 1. Map showing the study site.

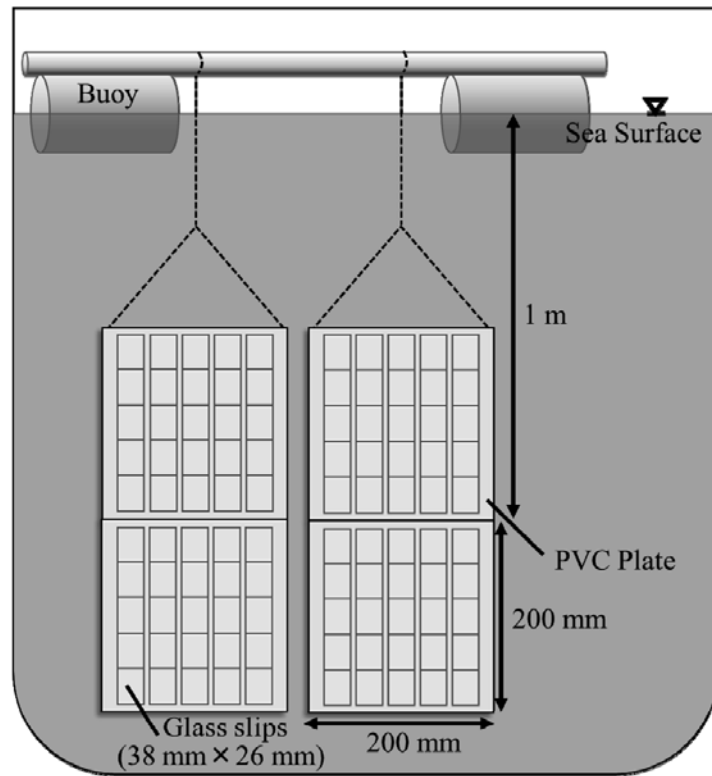


Fig. 2. Diagram of the glass slip holder submerged in the sea.

A



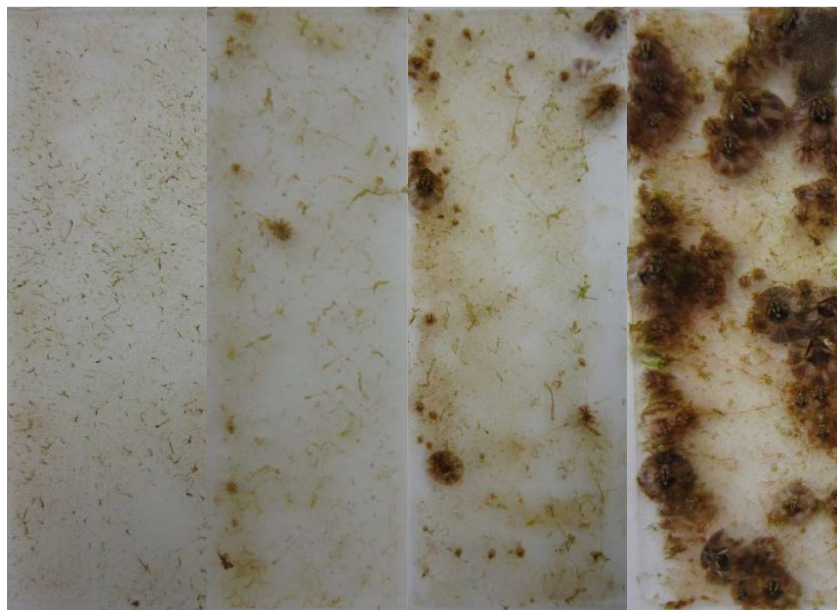
1week

2weeks

3weeks

4weeks

B



1week

2weeks

3weeks

4weeks

Fig. 3 The biofilm formed in February 2011 (A) and macrofoulers in July 2011 (B)

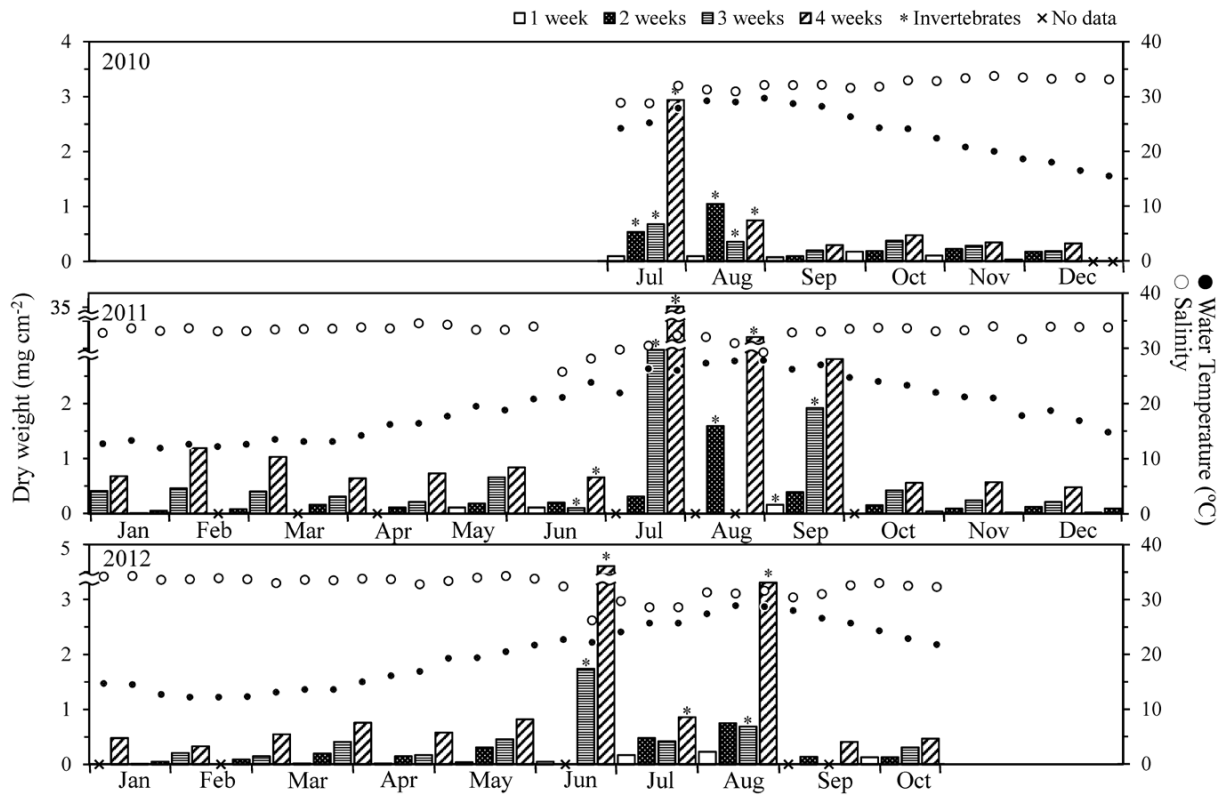


Fig. 4. Water temperatures and salinities at 10-day intervals, and the dry weights of marine biofilms and other fouling communities on glass slips submerged for 1, 2, 3 and 4 weeks every month in the sea off Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries from Jul 2010 to Oct 2012. Water temperatures and salinities were from data published by Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries (2011; 2012; 2013).

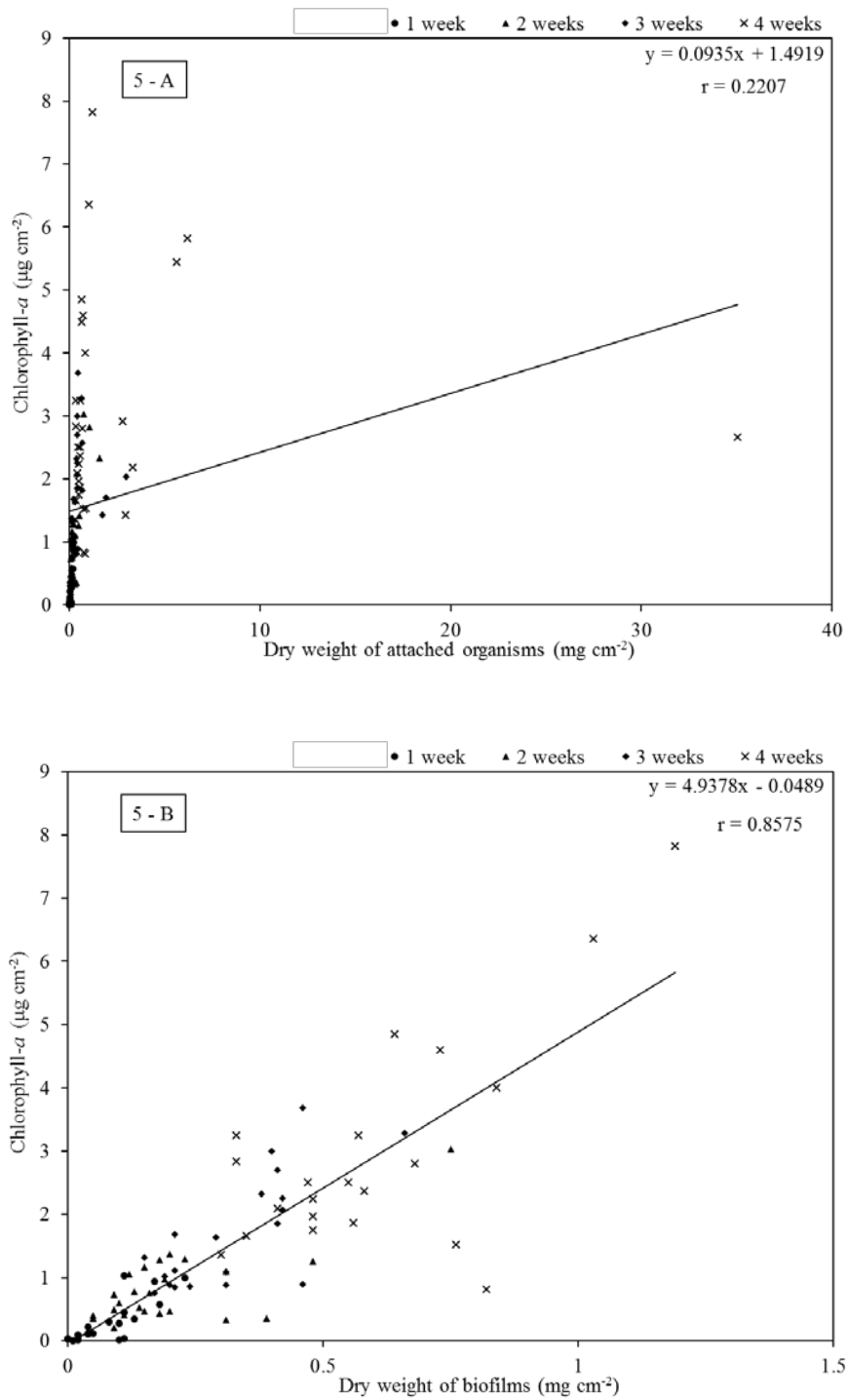


Fig. 5 Regression analyses between the dry weight and amount of chlorophyll-*a* of attached organisms (5 - A) and biofilms (5 - B) on glass slips. Dry weight and amount of chlorophyll were expressed per unit area of the glass slip. Glass slips where macro-foulers occurred were excluded from the data for biofilms (5 - B).

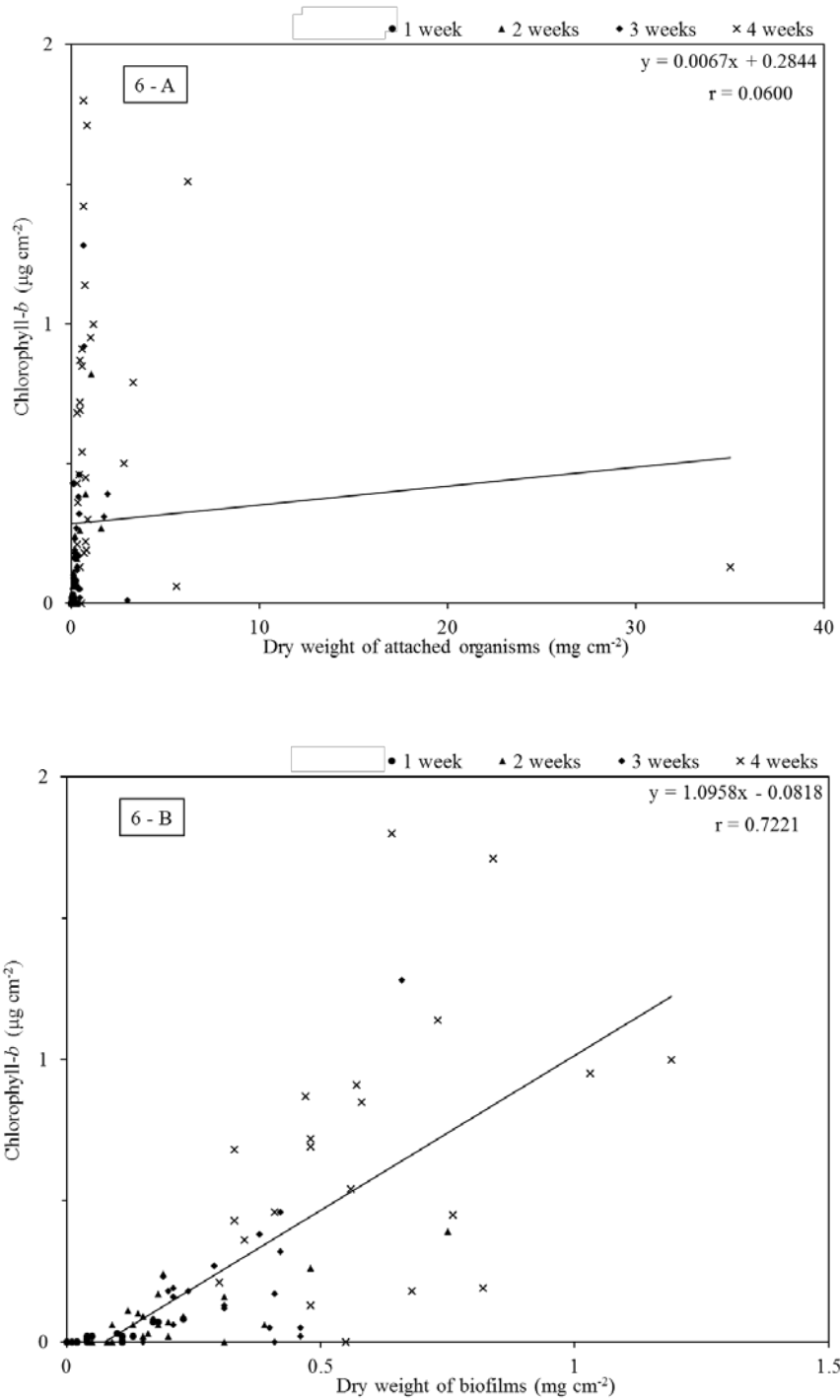


Fig. 6 Regression analyses between the dry weight and amount of chlorophyll-*b* of attached organisms (6 - A) and biofilms (6 - B) on glass slips. Dry weight and amount of chlorophyll were expressed per unit area of the glass slip. Glass slips where macro-foulers occurred were excluded from the data for biofilms (6 - B).

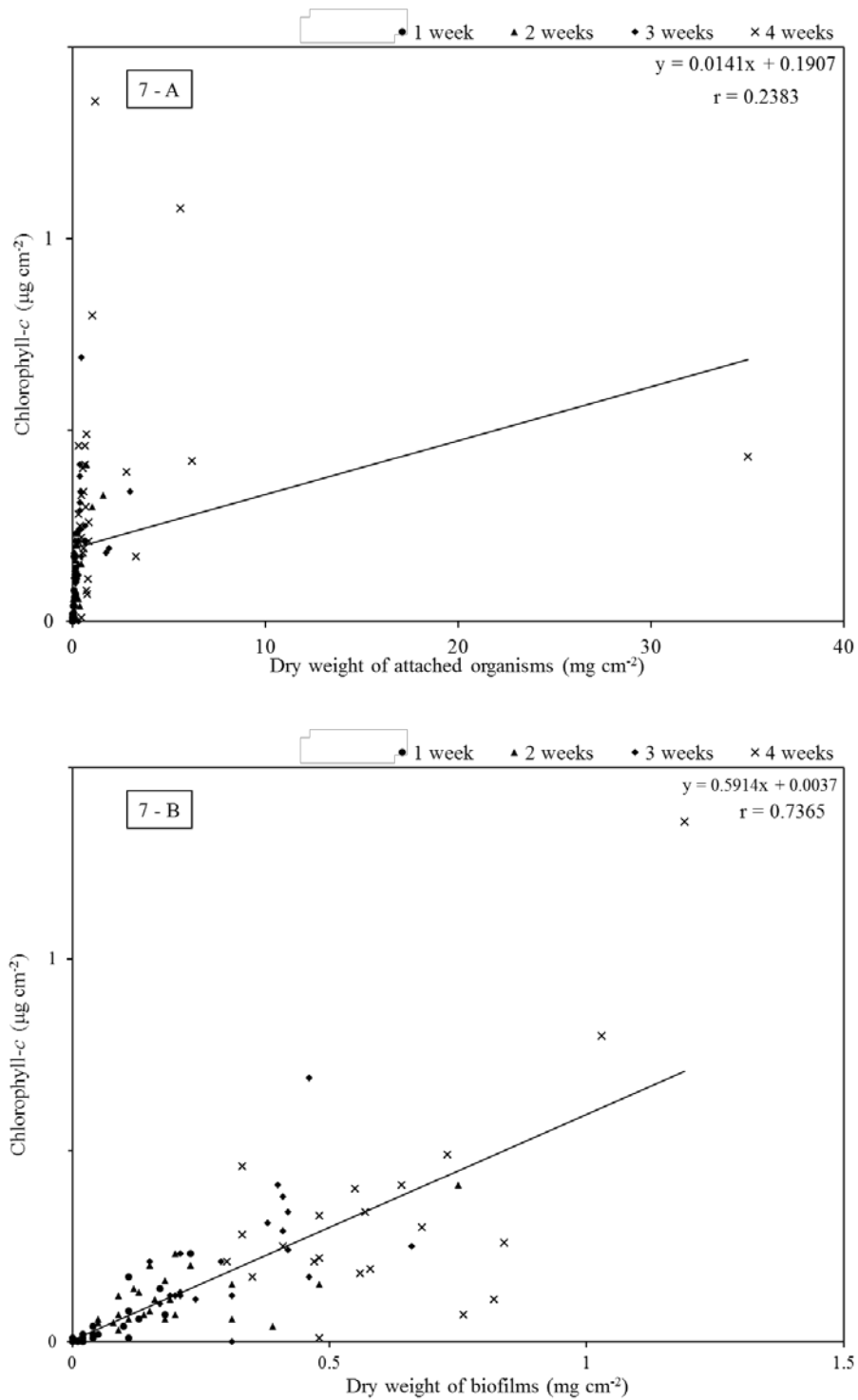


Fig. 7 Regression analyses between the dry weight and amount of chlorophyll-*c* of attached organisms (7 - A) and biofilms (7 - B) on glass slips. Dry weight and amount of chlorophyll were expressed per unit area of the glass slip. Glass slips where macrofoulers occurred were excluded from the data for biofilms (7 - B).

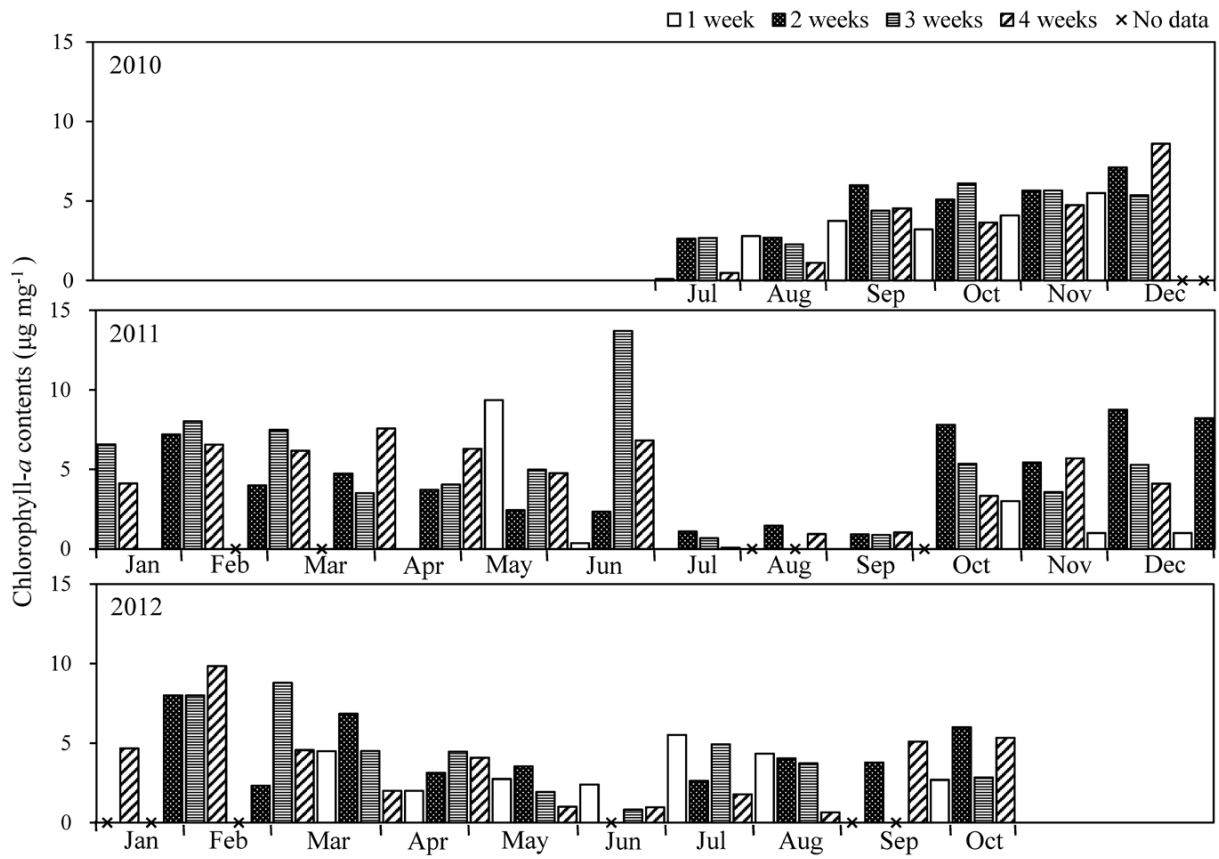


Fig. 8. Chlorophyll-*a* contents (in $\mu\text{g mg}^{-1}$) of 1-, 2-, 3- and 4-week-old biofilms collected during the study period from Jul 2010 to Oct 2012. Each column (value) relates to 1 replicate.

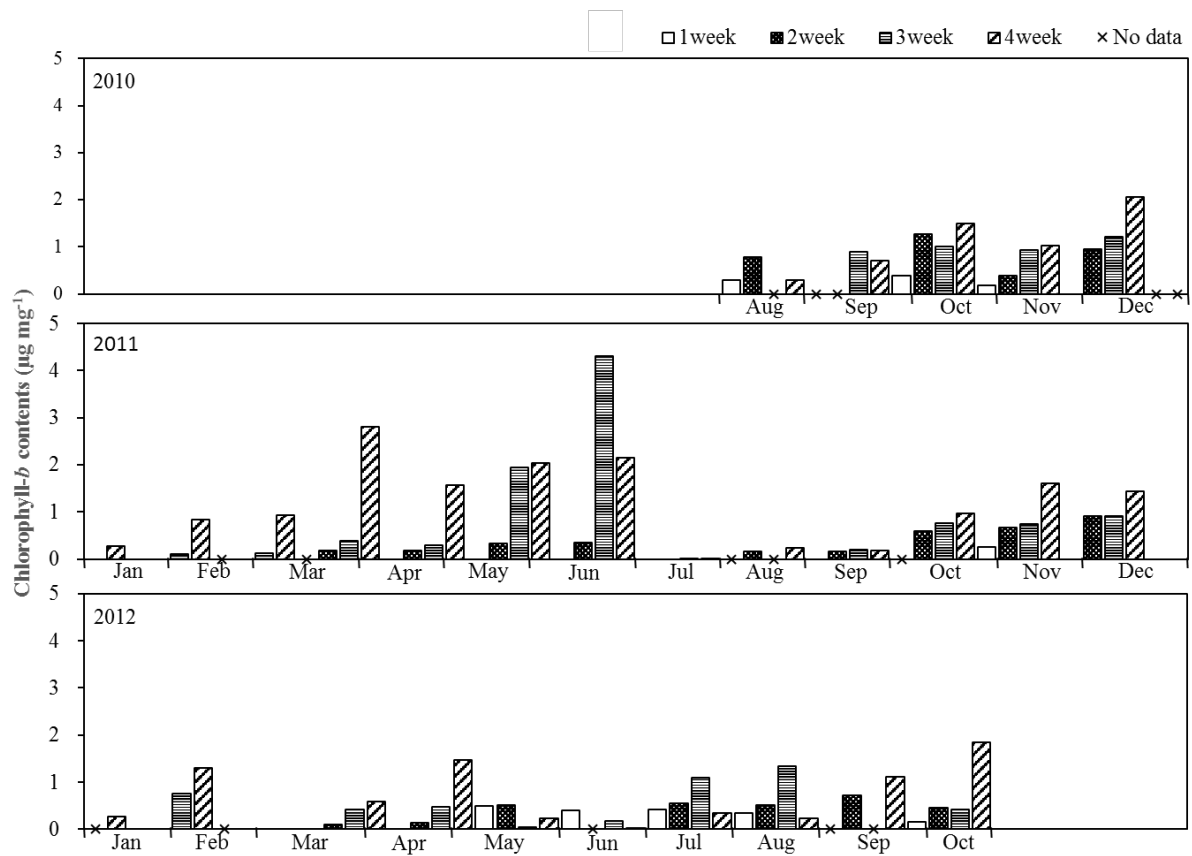


Fig. 9. Chlorophyll-*b* contents (in $\mu\text{g mg}^{-1}$) of 1-, 2-, 3- and 4-week-old biofilms collected during the study period from Jul 2010 to Oct 2012. Each column (value) relates to 1 replicate.

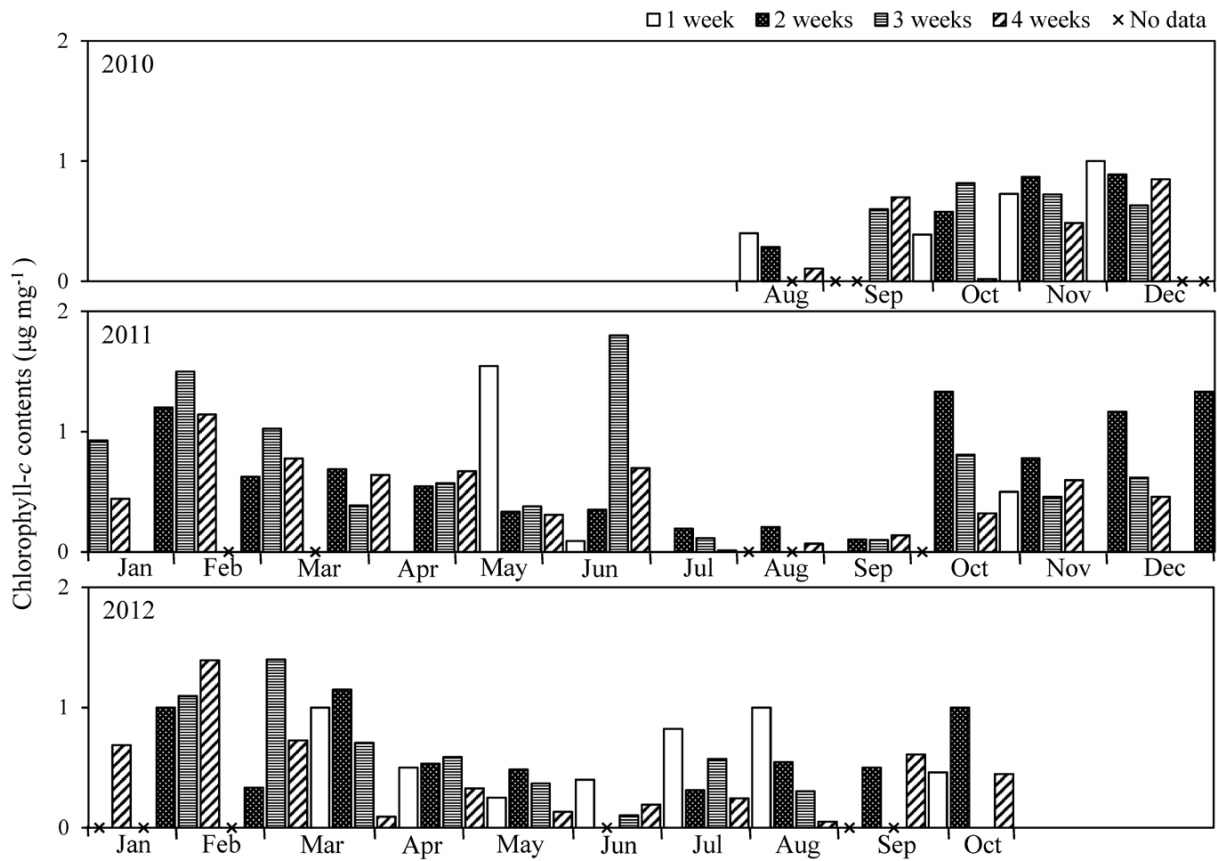


Fig. 10. Chlorophyll-*c* contents (in $\mu\text{g mg}^{-1}$) of 1-, 2-, 3- and 4-week-old biofilms collected during the study period from Jul 2010 to Oct 2012. Each column (value) relates to 1 replicate.

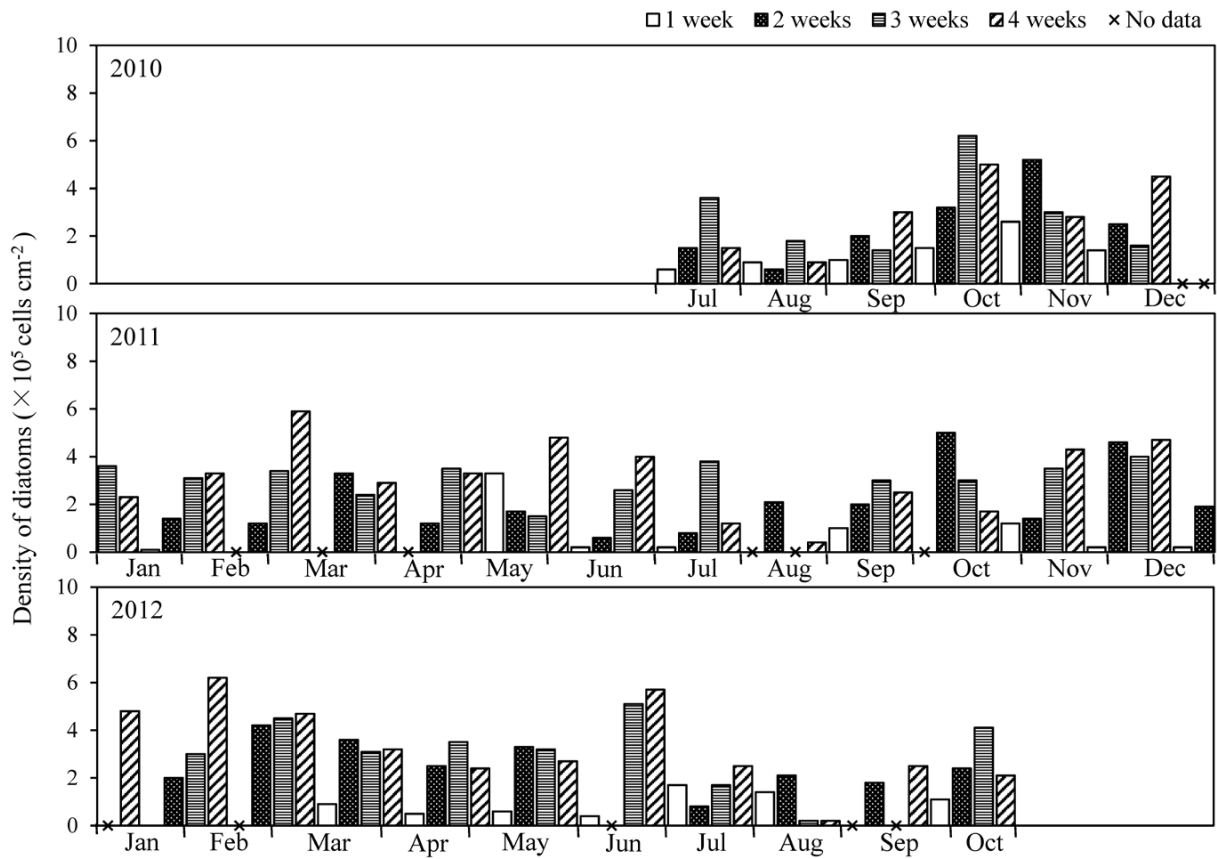


Fig. 11. Diatom densities of 1-, 2-, 3- and 4-week-old biofilms collected during the study period from Jul 2010 to Oct 2012. Each column (value) relates to 1 replicate.

Table 1. ANOVA results of the effect of immersion period and season on chlorophylls-*a*, -*b* and -*c* contents, and the density of diatoms of biofilms.

Factor	Level	Chlorophyll-a			Chlorophyll-b			Chlorophyll-c			Density of diatoms		
		df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
Week	1week, 2week, 3week, 4week	3	5.4088	0.0021	3	18.3501	<0.0001	3	1.1876	0.3209	3	21.4187	<0.0001
	Jan ~ Mar; Apr ~ Jun; Jul ~ Sep; Oct ~ Dec	3	3.1081	0.0317	3	6.0942	0.001	3	3.9656	0.0114	3	7.7105	0.0134
Week × Season		9	1.3816	0.2126	9	1.0138	0.4379	9	1.7181	0.1013	9	2.2306	0.1996

For 1, 2, 3 and 4 weeks of immersion period, the number of replicates were 20–22, 26–28, 25–27 and 29–30, respectively. For the seasons of Jan–Mar, Apr–Jun, Jul–Sep and Oct–Dec, the number of replicates were 21–22, 24–25, 27–34 and 26–27, respectively.

Table 2. Chlorophylls-*a*, -*b* and -*c* contents, and the density of diatoms of biofilms in Jan–Mar, Apr–Jun, Jul–Sep, and Oct–Dec.

	Jan - Mar		Apr - Jun		Jul - Sep		Oct - Dec	
Chlorophyll-a ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	5.74 \pm 2.36	(21) A	3.49 \pm 2.28	(21) B	3.25 \pm 1.79	(19) B	5.12 \pm 1.99	(27) A
Chlorophyll-b ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0.27 \pm 0.38	(21) B	0.66 \pm 0.80	(21) AB	0.47 \pm 0.36	(16) AB	0.82 \pm 0.57	(27) A
Chlorophyll-c ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0.87 \pm 0.39	(21) A	0.43 \pm 0.32	(21) B	0.47 \pm 0.26	(16) B	0.64 \pm 0.37	(27) AB
Density of diatoms ($\times 10^5$ cells cm^{-2})	3.05 \pm 1.68	(22) A	2.27 \pm 1.33	(20) AB	1.45 \pm 0.70	(19) B	3.05 \pm 1.59	(27) A

Values are means \pm standard deviation of all data obtained in each season. Numbers in parentheses indicate the number of replicates. Letters indicate results of the post hoc Tukey HSD test. For each item, groups connected by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Table 3. Occurrence of periphytic diatoms in biofilm samples with the highest diatom density in each month from Jul 2010 to Oct 2012.

Diatom (Genus)	Year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
<i>Amphora</i>	2010	—————											
	2011	±	+								±	±	±
	2012	+	+	+			±	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillaria</i>	2010	—————											
	2011										±		
	2012	±	±	±									—————
<i>Cocconeis</i>	2010	—————											
	2011	±	+	±	+	±	+	+		±	+	+	+
	2012	+	+	+	±	±				+	+	+	—————
<i>Navicula</i>	2010	—————											
	2011								+				
	2012					+	+		+				—————
<i>Nitzschia</i>	2010	—————											
	2011	±	+	±			±	+	+	±	±	±	+
	2012	+	+	±			±	+	+	+			—————
<i>Rhizosolenia</i>	2010	—————											
	2011										±	±	
	2012		±		±								—————

Abundance of each genus: ± indicates <1% of the total diatom count; +, 1–24% of total diatom count; ++, 25–50% of total diatom count; and +++, >50% of total diatom count. Monthly data were taken from samples with the highest diatom density of each month. Horizontal bars indicate the periods that were not included in the present study.

第3章 微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果

カキ類はわが国では北海道から九州にわたって広く養殖されている有用二枚貝であり、2014年度の生産量は183,685トンであった（農林水産省, 2016）。マガキ (*Crassostrea gigas*) 養殖では、海域で出現する浮遊幼生を採苗器に付着させる天然採苗が行われており（大泉ら, 1976）、採苗器に付着した稚貝は潮間帯に設置した抑制柵で干出をかけることにより生残率の高い種苗となる（小笠原ら, 1962）。近年、マガキの三倍体種苗や一粒単位に剝離したマガキをカゴ等に収容して養成するシングルシード養殖の需要の高まりから、飼育したマガキ付着期幼生を水槽内で付着させる人工採苗も行われている（平田, 2005）。本種およびその近縁種について、付着・変態（以下、付着とする）メカニズムの解明および採苗効率向上を目的に古くから多くの研究が行われ、付着を誘起する要因として、同種成体（Crisp, 1967; Bayne, 1969; Veitch and Hidu, 1971）、バクテリア（Weiner et al., 1989; Fitt et al., 1990）などが報告された。同種成体の貝殻からは、分子量 55 kDa の糖タンパク質が幼生の付着を誘起する物質（以下、付着誘起物質とする）として見出され（Vasquez et al., 2013）、本種の群居性に化学的根拠が示唆された。また、平田（1998）は、本種成体の飼育水槽に採苗器として用いられるホタテガイ殻を浸漬後に採苗に用いた結果、幼生の付着が向上し、本種成体が放出したアンモニア態窒素が幼生の付着を誘起するとした（平田ら, 2008）。その他の付着誘起要因に神経伝達物質である L-DOPA (Coon et al., 1985) やアドレナリン、ノルアドレナリン (Coon and Bonar, 1986) も報告されているが、これらの物質の生態学的意義は不明である。

一方、Jones and Jones (1988) はカキ類の採苗において、あらかじめ海中に浸漬した採苗器を用いた場合、効率が上がると報告し、幼生の付着誘起に採苗器表面に形成した微生物フィルムの関与を示唆した。さらに *Alteromonas colwelliana* および *Vibrio cholerae* のフィルムは、本種およびアメリカガキ *Crassostrea virginica* の付着を誘起した (Weiner et al., 1989; Fitt et al., 1990)。マガキ幼生の付着に対する微生物フィルムの役割の解明は、幼生付着のメカニズムの解明だけでなく採苗効率向上につながると期待される。

そこで本章では、2009年5月~2010年1月の期間中、1~24日間垂下して作製した微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果を稚貝率で評価し、日令(垂下日数)、重量(乾燥重量)、バクテリア密度、付着珪藻密度の観点より検討した。また、微生物フィルムに対してホルマリン、熱、抗生物質などの処理を施し、微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起物質の性質を検討した。さらに、微生物フィルムからバクテリアを単離し、マガキ幼生に対する付着誘起効果を検討するとともに、微生物フィルムの付着誘起物質を検討した。

実験方法

幼生飼育

親貝は、長崎県諫早市小長井町の養殖マガキを購入、もしくは小長井町漁港岸壁より採集したものを扱い、実験室内に持ち帰り、人工授精に供した。夏期に入手した個体は生殖巣が発達しており、直ちに人工授精に用いたが、夏季以外ではマガキ成体を水温 24 °C で畜養し、生殖巣が成熟したものを用いた。畜養の際は、毎日浮遊珪藻 *Chaetoceros gracilis* および配合飼料 M-1 (日本農産工業) を飽食量給餌し、飼育水の換水を行なった。

マガキ成体から切開法によって卵および精子を得た。卵はろ過海水 (孔径 1.0 μm カートリッジフィルター Advantec 製, FSW) に懸濁し、不純物を取り除いた後、卵懸濁液にアンモニア水 (28%, 和光純薬工業) を 30 ppm となるよう添加して卵核胞崩壊を促した (Wada, 1961)。卵核胞崩壊後の卵は球形となり、デカンテーションによって数回 FSW で洗浄し、FSW を入れた 2 L ビーカーに再度懸濁した後、精子懸濁液を加えることによって媒精した。

受精卵は目開き 20 μm のプランクトンネット上で余分な精子を FSW で洗い流してから、FSW を入れた 2 L ビーカーに收容し、 24 ± 1 °C に保った恒温槽に入れ、24 時間後に D 型幼生を得た。

D 型幼生は、目開き 40 μm のプランクトンネット上に移し、FSW で洗浄した後、FSW を入れた 2 L ビーカーに收容し、幼生密度 5 個体 / mL、水温 24 ± 1 °C で飼育した。飼育中は、毎日換水と投餌を行い、餌料および密度は、1~5 日目に *Chaetoceros calcitrans* ((株) 二枚貝養殖研究所) を $1 \sim 5 \times 10^4$ cells mL⁻¹、6

~10日目に *C. calcitrans* および *C. gracilis* をそれぞれ 2.5×10^4 cells mL⁻¹、10日目以降には *C. gracilis* のみを 5×10^4 cells mL⁻¹ とした。日齢 23~27日の幼生を生物試験に供し、試験時は幼生の殻高 (SH) が 320 μm 以上であった。

生物試験法

生物試験はガラスシャーレ (Φ6 cm) に FSW 20 mL と微生物フィルムまたは単離バクテリアフィルムを収容し行った。さらにペディベリジャー幼生 20 個体を収容し、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ で、24 時間後にセメントを放出した個体、もしくは新生殻を形成した個体を稚貝として計数し、稚貝率を求め、比較した。なお各垂下日数の稚貝率は、ガラスシャーレ 3~4 枚の平均値で示した。

また、ガラスシャーレ (Φ6 cm) に FSW 20 mL とマガキ貝殻を洗浄後破碎して 1.0mm および 0.5 mm ふるいで順次に篩い、0.5mm ふるい上に残ったもの (マガキシェルチップ) を 50 mg 入れたもの (SC 区) と入れないもの (FSW 区) の双方を対照区として設け、FSW 区、SC 区の稚貝率がそれぞれ 0% と 50% 以上の時にのみ、有効な実験結果として採用した。

実験区では、微生物フィルムとホルマリン、熱、抗生物質による処理後の微生物フィルムの付着誘起効果を検討し、単離バクテリアフィルムの稚貝率も調べた。

微生物フィルムは、半分に切断したスライドガラス (37 mm × 25 mm) を洗浄後、PVC 製の垂下ホルダーに 15~20 枚ほど収容し、長崎県総合水産試験場 (長崎市多以良町) の浮き桟橋 (129° 46' E, 32° 48' N) に水面下 1.0 m となるよう垂下し、2009 年 5 月より 2010 年 1 月の期間中 1~24 日間垂下して作製した。生物試験は、微生物フィルム上の端脚類等の二次付着動物を取り除き行った。

微生物フィルムのホルマリン処理は、ホルムアルデヒド液 (35%, ナカライテスク) を海水で 5 % (v / v) に希釈して 5 % ホルマリン溶液を調製し、回収後の微生物フィルムを浸漬した。ホルマリンで処理した微生物フィルムは、24 時間後に回収して合計 9 L の FSW で洗浄した後、実験に供した (ホルマリン処理フィルム: FA-MB)。また、微生物フィルムを 80 °C に加熱した FSW 中にフィルムを 30 分間浸漬後、常温に冷まし、それを FSW 3 L で洗浄してから熱処理の微生物フィルム (80T-MB) として実験に使用した。さらに、微生物フィルムを 10 mg mL⁻¹ のペニシリン G カリウム (ナカライテスク) と 10 mg mL⁻¹ のストレプトマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) の混合液 (AB) に 24 時間浸漬し、FSW 3 L で洗浄してから AB 処理微生物フィルム (AM-MB) として実験に用いた (Bao et al.,2007a)。なお、各種処理実験では、10 月に 20 日間、11 月に 15 日間、12 月に 18 日間垂下して得た微生物フィルムを用い、実験回数は Table 4 に示した。

さらに、10 月に 20 日間垂下で得られた微生物フィルムよりバクテリアを単離し、それぞれのバクテリア株について Bao et al. (2007b) の方法に基づき単離バクテリアフィルムを作製して実験に供した。すなわち微生物フィルムをろ過滅菌海水 (0.22µm, Millipore) 中に懸濁し、10 倍段階希釈を行った。それぞれ 1mL を Zobell 2216E 培地 (15mL) 上に接種し、25°C で 3 日間培養した後、コロニー色や形状が異なるものをスラントに 14 株移植し単離株とした。単離株は、Zobell 2216E 海水液体培地 100 mL に接種し、24 °C で 48 時間培養した後、遠心分離 (2000 × g, 10 min) によって菌体を回収した。回収した菌体をろ過滅菌海水で 2 回遠心分離 (2000 × g, 10 min) によって洗浄し、20 ~ 40 mL の滅菌

海水に再懸濁させ、1 ~ 40 mL を半分に切断したスライドガラスを予め入れたシャーレ (Φ 9 cm) に移し、24 °C で 24 時間培養することで、単離バクテリアフィルムを得た。また、付着誘起効果が高かった単離バクテリアフィルムについては、微生物フィルムと同様の方法でホルマリン処理を施し、実験に供した。単離バクテリアフィルムおよびホルマリン処理のバクテリアフィルムを用いた実験回数は、Table 4 に示した。

付着誘起効果が高かった単離株 4 株は、16 S rRNA 遺伝子の部分配列を用いた系統解析を行った。すなわち、単離株を 100 μ L の Solution A (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 中に懸濁し、-80 °C で 5 分 60 °C で 2 分の凍結解凍を 3 回繰り返した後、100 °C で 10 分加熱して DNA を抽出した。PCR 反応は 27 F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) および 1492 R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) をプライマーとして (Weisburg et al., 1991)、95 °C 60 秒、55 °C 30 秒、72 °C 90 秒を 30 サイクル行った。PCR 産物を ExoSAP-IT (Affymetrix) による酵素処理の後、北海道システム・サイエンス株式会社にシーケンスを依頼した。16 S rRNA 遺伝子のシーケンス解析結果は BLAST との比較により、近縁種を推定した。

付着珪藻、バクテリア密度および乾重量の測定

回収した微生物フィルムは、Bao et al. (2007a) の方法に基づき測定した。微生物フィルム (3~10 枚) を FSW 200 mL 中にこそぎ落とし、それをあらかじめ洗浄、乾燥重量を測定した GF / C (Whatman, 47 mm) に濾過し、蒸留水 (DW) 50 mL をろ過して洗浄、脱塩の後、80 °C で 2 時間、デシケーターで一晩乾燥し測定した。微生物フィルム重量は、ろ過前の GF / C 重量を差し引いた重量とし

た。また、フィルムを形成したスライドガラスは、5%ホルマリン溶液に浸漬して固定後、ろ過滅菌海水を用いて調製した0.1% (w/v) アクリジンオレンジ溶液 (Sigma) で5分間染色し、蛍光顕微鏡 (主励起波長: 490nm) でバクテリア密度を計数した。さらに、実験室に持ち帰った微生物フィルムは光学顕微鏡下で付着珪藻密度を計数した。バクテリアおよび付着珪藻密度は、それぞれ1000倍と200倍で観察し、フィルム中からランダムに10ヶ所を選び計数し、平均した。

統計解析

微生物フィルム、単離バクテリアフィルムおよび各種処理後のマガキに対する付着誘起効果は稚貝率によって評価した。微生物フィルムの日齢、乾燥重量、バクテリアおよび珪藻密度と付着誘起効果は、Pearson's Correlation Coefficientで相関を調べた。また、微生物フィルムの付着誘起効果に対する各種処理の影響について、Tukey-Kramer HSD 検定を行った。単離バクテリアフィルムの種類と付着誘起効果の関係は、分散分析で確認し、株間の比較を Tukey-Kramer HSD 検定を行った。また、単離バクテリアフィルムの稚貝率に対するホルマリン処理の影響、ホルマリン処理によるバクテリア密度の変化は Student *t*-検定で比較した。統計解析は、全て JMP™ で行い、 $P < 0.05$ を有意と判断した。なお、統計解析はすべての実験で得られた稚貝率を角変換してから行った。

結果

微生物フィルムの付着誘起効果

微生物フィルムの垂下日数と稚貝率の関係を Fig. 12 に示す。微生物フィルムにマガキ幼生を暴露すると、幼生が付着し稚貝へと変態した。稚貝率は微生物フィルムの垂下日数とともに上昇する傾向を示した ($r = 0.5199$, $P < 0.001$, Fig. 12)。

微生物フィルムの乾燥重量、バクテリア密度および付着珪藻密度と稚貝率の関係は Fig. 13、Fig. 14、Fig. 15 に示す。微生物フィルムは 12~1 月では乾燥重量が少なく測定できなかったが、5~11 月では乾燥重量と稚貝率に相関はみられなかった ($r = 0.2364$, $P > 0.05$, Fig. 13)。一方、微生物フィルムは、バクテリア密度の増加とともに稚貝率が上昇する傾向を示し ($r = 0.6517$, $P < 0.0001$)、バクテリア密度が 10^7 cells cm^{-2} 以上で 14 ~ 85 %の稚貝率を得た (Fig. 14)。付着珪藻密度と稚貝率には、相関がみられなかった ($r = 0.2839$, $P > 0.05$, Fig. 15)。

微生物フィルムの各種処理による稚貝率の変化

熱、ホルマリンおよび抗生物質で処理した微生物フィルムの稚貝率を Fig. 16 に示す。微生物フィルムはホルマリンで処理しても稚貝率は変わらなかったが、80 °C の熱処理および抗生物質処理で付着誘起効果が減少した。

単離バクテリアフィルムの付着誘起効果

微生物フィルムから 14 菌株を単離し、生物試験を行ったところ、稚貝率は株ごとに 0~82 %と大きくばらついた (Table5)。また、14 株中稚貝率の高かつ

た NSH-5-1 (82%)、NSH-5-2 (65%)、NSH-8-2 (43%) および NSH-5-5 (80%) について、16 S rRNA 遺伝子の部分配列を用いた系統解析を行ったところ、それぞれ *Pseudoalteromonas* sp. (98 %)、*Pseudoalteromonas tetraodonis* (99 %)、*Alteromonas macleodii* (100 %) および *Vibrio tasmaniensis* (99 %) に相同性を示した (Table 5)。

4 株のバクテリアフィルムおよびそれぞれのホルマリン処理後の稚貝率は Table 6 に示す。調製した 4 株のバクテリアフィルムの密度は、 $1.40 \pm 0.61 \times 10^7$ cells cm⁻² ~ $8.05 \pm 1.10 \times 10^7$ cells cm⁻² であった。また、バクテリアフィルムは、株によって稚貝率が異なり (ANOVA, $F = 13.7626$, $P < 0.0001$)、4 株のうち、*Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) のフィルムは、*A. macleodii* (NSH-8-2) および *V. tasmaniensis* (NSH-5-5) と比較して稚貝率は高く、46 % であった (Table 6)。一方、*Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) と *P. tetraodonis* (NSH-5-2) のフィルムの稚貝率に差はみられなかった。さらに *Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *V. tasmaniensis* (NSH-5-5) のフィルムをホルマリン処理すると、稚貝率は有意に低下した ($P < 0.05$, Student *t*-検定; Table 6)。なお、*A. macleodii* (NSH-8-2)、*Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *V. tasmaniensis* (NSH-5-5) のフィルムは、ホルマリン処理によるバクテリア密度の変化がみられなかった ($P > 0.05$, Student *t*-検定; Table 6) が、*Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *V. tasmaniensis* (NSH-5-5) は稚貝率が低下した ($P < 0.05$, Student *t*-検定; Table 6)。

考察

多くの海産無脊椎動物の幼生は、微生物フィルムに付着・変態が誘起されていることが知られており、多くの場合ではフィルム中の細菌が重要な役割を担っていることも報告されている (e.g. Lau and Qian, 2001; Rahim et al., 2004; Bao et al., 2007b)。マガキ幼生でも *A. colweliana* および *V. cholera* のフィルムが付着を誘起することが報告された (Weiner et al., 1989; Fitt et al., 1990) が、微生物フィルムがマガキ幼生の付着に与える影響の解明に必ずしもつながっていない。

本研究では、マガキ幼生の付着はスライドガラス上に形成した微生物フィルムによって誘起されることが確認され、微生物フィルムの付着誘起効果は、垂下期間 (Fig. 12)、細菌密度 (Fig. 14) と相関がみられ、乾燥重量 (Fig. 13) および付着珪藻密度 (Fig. 15) とは相関がなかった。細菌密度と稚貝率の相関 (Fig. 14) は、Bao et al. (2007a) が報告したムラサキイガイ幼生の変態率と微生物フィルムの細菌密度の相関関係と一致しており、マガキ幼生の付着に微生物フィルム中の細菌が重要な役割を担っていることが示唆された。一方、同じ細菌密度でも稚貝率にばらつきがみられ、幼生の付着に細菌の種組成など、密度以外の要因も影響していることが示唆された。

微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果は、ホルマリンで処理しても変わらなかったが、80°Cの熱と抗生物質の処理で有意に低下した (Fig. 16)。Bao et al. (2007a) は、微生物フィルムをホルマリン、グルタルアルデヒド、熱 (40, 50, 100 °C) およびエタノール (50, 100 %) で処理した結果、フィルムの構

成生物が死滅し、ムラサキイガイ幼生に対する変態誘起効果が失われたため、微生物フィルムに含まれるムラサキイガイ幼生の変態誘起物質は、水溶性の代謝産物であることを示唆し、構成生物の死滅によって付着誘起物質の生産も止まったためと推察した。また、ホルマリン、グルタルアルデヒド、UV、熱 (100 °C) で処理した微生物フィルムは多毛類カサネカンザシ (*Hydroides elegans*) に対しても付着誘起効果がみられなかったことから、Unabia and Hadfield (1999) はカサネカンザシが微生物フィルムに付着するためには、付着誘起物質の生産に関与する細菌が生存していなければならないことを示唆した。本研究の結果より、微生物フィルムに含まれるマガキ幼生の付着誘起物質は、ムラサキイガイおよびカサネカンザシの付着・変態誘起物質と異なり、基盤に蓄積するか基盤結合型の物質の関与が推察される。Jouuchi ら (2007; 2008) は微生物フィルムおよび付着珪藻 *Navicula ramosissima* フィルムがエタノールと熱 (100 °C) の二重処理によってタテジマフジツボ幼生の付着を誘起し、さらに、*N. ramosissima* フィルムに含まれる付着誘起物質は過ヨウ素酸、およびレクチン処理実験の結果より、SIPC 様の糖関連物質であると推察した (Jouuchi et al., 2007)。また、Vasquez et al. (2013) は、マガキ貝殻に含まれるマガキ幼生の付着誘起物質が、貝殻に結合もしくは封入される 55 kDa の糖タンパク質であると報告した。本研究の結果より、微生物フィルムにも潜在的に貝殻由来付着誘起物質と同様な物質が存在すると推察された。一方、微生物フィルムは熱処理によって付着誘起効果が低下し、Vasquez et al. (2013) が報告した貝殻由来の物質と必ずしも同様の結果を示さなかったことから、微生物フィルムに含まれる付着誘起物質についてさらに検討する必要がある。

微生物フィルムより単離したバクテリア株は、株によってマガキに対する付着誘起効果が異なり、稚貝率の違いはバクテリア密度と関連性がみられなかった (Table 5, 6)。単離バクテリア株による幼生の付着・変態誘起は、*H. echinata* (Leitz and Wagner, 1993)、カンザシゴカイ科*J. brasiliensis* (Kirchman and Graham, 1982) と *Hydroides elegans* (Unabia and Hadfield, 1999)、カキ類 (Weiner et al., 1989)、ムラサキイガイ (Bao et al., 2007a; 2007b) などでも報告されている。また、バクテリア由来の付着・変態誘起物質について、*H. elegans* (Unabia and Hadfield, 1999)、カキ類 (Weiner et al., 1989) およびムラサキイガイ (Bao et al., 2007a; 2007b) では、水溶性のバクテリア代謝産物が推察されたが、*J. brasiliensis* (Kirchman and Graham, 1982) ではバクテリアの生死に関係なく基盤と結合している物質の関与が報告された。

微生物フィルムおよびバクテリアフィルムをホルマリン固定する処理 (Kirchman and Graham, 1982; Unabia and Hadfield, 1999; Bao et al., 2007a; 2007b) は、フィルムの表面構造を変造することなく、微生物フィルムの構成生物あるいはバクテリアの生死の影響を確認するために用いられてきた。本研究でも *Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *V. tasmaniensis* (NSH-5-5) の付着誘起効果は、ホルマリン固定によって低下したことから、バクテリアフィルムによるマガキ幼生の付着誘起は、フィルム中のバクテリアが活着しているときにのみ起こり、誘起物質は水溶性の代謝産物であると推察された。一方、微生物フィルムと単離バクテリアフィルムの処理実験の結果は必ずしも一致しなかった。つまり、前者はホルマリン固定でもマガキ幼生の付着を誘起したが、後者はホルマリン固定によって稚貝率が低下した。これは、マガキ幼生の付着に微生物フィルムと単離バクテリアフィルムで関与した要因が異なることが考えられ

る。前述のように微生物フィルムでは、微生物フィルムの構成生物に潜在的に存在するマガキ貝殻由来物質のような基盤蓄積または結合型の物質が関わっていると考えられるが、バクテリアフィルムでは、Weiner et al. (1989) および Bao et al. (2007b) が報告した水溶性のバクテリア代謝産物が関与していると考えられる。いずれにしても微生物フィルムおよびバクテリアフィルムに含まれるマガキ幼生の付着誘起物質を特定する必要がある。

Table 4. Number of replicate experiments conducted in each experimental group for microbial biofilm (A) and bacteria film (B).

A. Microbial biofilm				
Month	MB	80T-MB	FA-MB	AM-MB
Oct	1	1	1	
Nov	2	2	2	2
Dec	3	3	3	3
B. Bacteria film				
Strain	Untreated		FA-treated	
<i>Alteromonas macleodii</i> (NSH-8-2)	11		3	
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (NSH-5-1)	14		4	
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> (NSH-5-2)	7			
<i>Vibrio tasmaniensis</i> (NSH-5-5)	14		4	

MB represents untreated microbial biofilm (control); 80T-MB, microbial biofilms heated at 80 °C for 30 min; FA-MB, microbial biofilm treated with formalin; and AM-MB, microbial biofilm treated with antibiotic mixture. Each replicate experiment was conducted using 3 to 4 petri dishes.

Table 5. Percentages of post larval settlement on the 14 bacterial isolates and result of 16 S rRNA gene sequence analyses of the 4 bacterial isolates. Data of post larvae (%) are mean \pm SD of 3 replicates.

Strain	Post Larvae (%)	Species	Accession number of the closest match in Genbank	Similarity
NS-3-1	0 \pm 0			
NS-3-2	17 \pm 6			
NS-4-1	5 \pm 5			
NS-4-2	20 \pm 0			
NS-5-1	82 \pm 19	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	(<i>flavipulchra</i> : AF297958, <i>piscicida</i> : AB090232)	742/750 (98%)
NS-5-2	65 \pm 18	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	AF214730	745/750 (99%)
NS-5-3	12 \pm 3			
NS-5-5	80 \pm 9	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	AJ316192	762/766 (99%)
NS-6-1	5 \pm 0			
NS-7-2	25 \pm 26			
NS-8-1	43 \pm 10			
NS-8-2	43 \pm 19	<i>Alteromonas macleodii</i>	Y18228	738/738 (100%)
NS-9-1	8 \pm 3			
NS-9-2	5 \pm 9			

Table 6. Bacterial density and percentage of post larvae that settled on each bacterial strain (untreated and FA-treated group).

	<i>Alteromonas macleodii</i> (NSH-8-2)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (NSH-5-1)	<i>Pseudoalteromonas tetrodonis</i> (NSH-5-2)	<i>Vibrio Tasmaniensis</i> (NSH-5-5)
A. Bacterial density ($\times 10^7$ cells cm^{-2})				
Untreated	6.31 \pm 1.21	4.96 \pm 2.24	1.40 \pm 0.61	2.09 \pm 0.45
FA	6.22 \pm 1.53	4.84 \pm 1.15	ND	2.16 \pm 0.53
B. Post Larvae (%)				
Untreated	13 \pm 23 C	46 \pm 24 A	30 \pm 29 AB	32 \pm 28 B
FA	17 \pm 18	8 \pm 11 *	ND	10 \pm 18 *

Differences in percentages of post larvae between bacterial strains were assessed by the Tukey's HSD post-hoc test, and groups not connected by the same letter are significantly different ($P < 0.05$). Differences in percentages of post larvae between the formalin (FA) -treated and untreated groups were assessed by the Student's t test, where asterisk (*) indicates significant difference at $P < 0.05$. Differences in bacterial densities between FA – treated and untreated groups were assessed by Student's t test, where * indicates significant difference at $P < 0.05$. ND denotes no data.

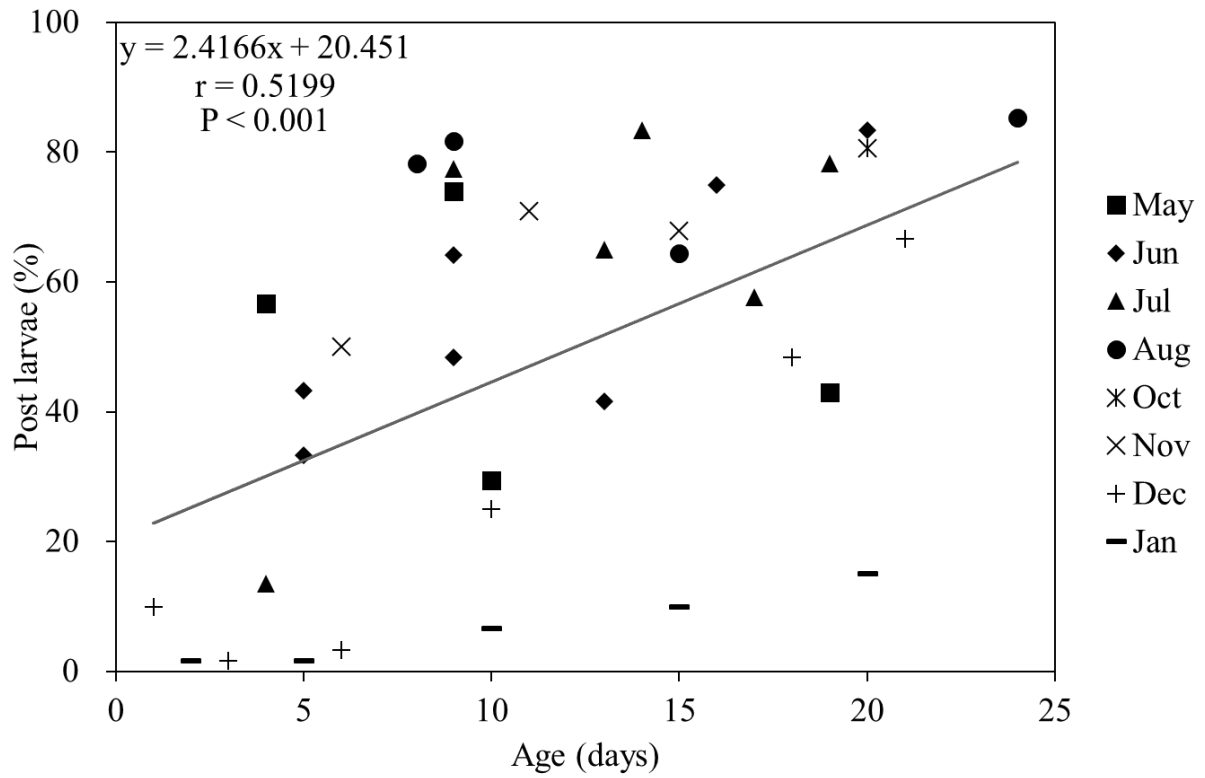


Fig. 12 Percentage of post larvae that settled on microbial biofilms of different ages formed between May 2009 and January 2010. Each value represents 1 replicate experiment (n = 1), which is the average of 3 to 4 petri dishes.

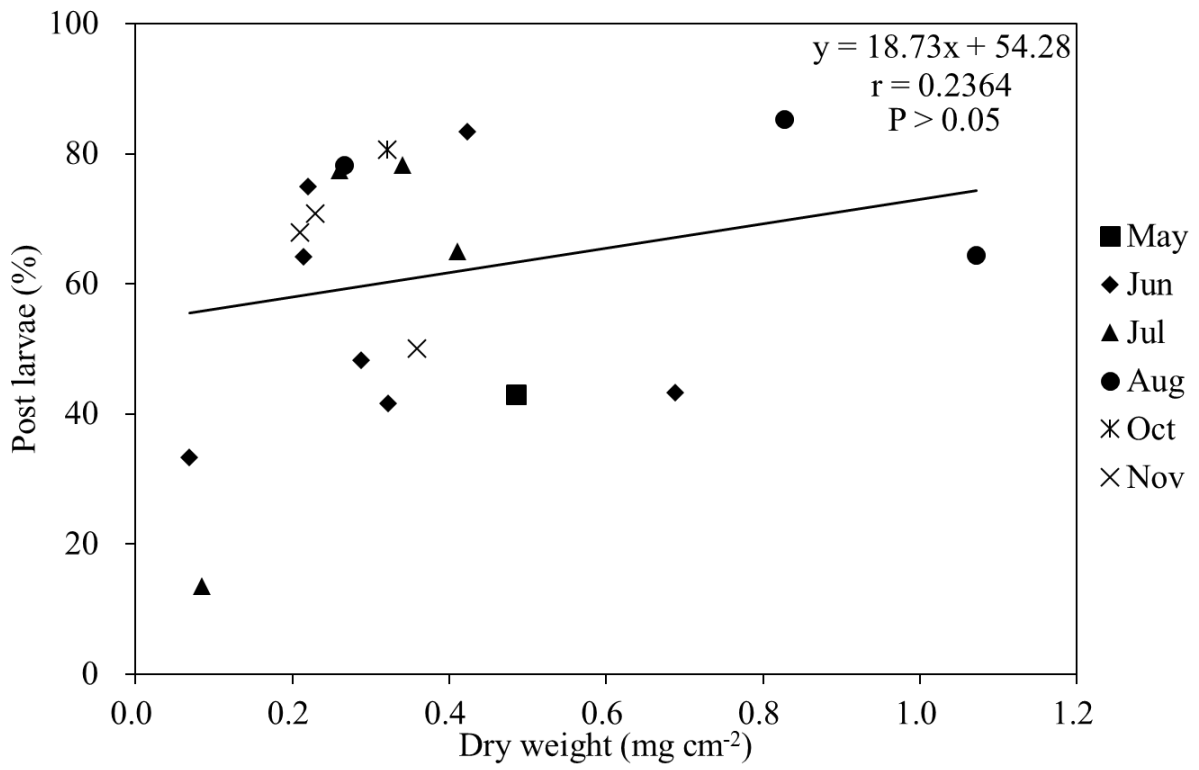


Fig. 13 Percentage of post larvae in relation to the dry weight of the microbial biofilm. Each value represents 1 replicate experiment (n = 1), which is the average of 3 to 4 petri dishes.

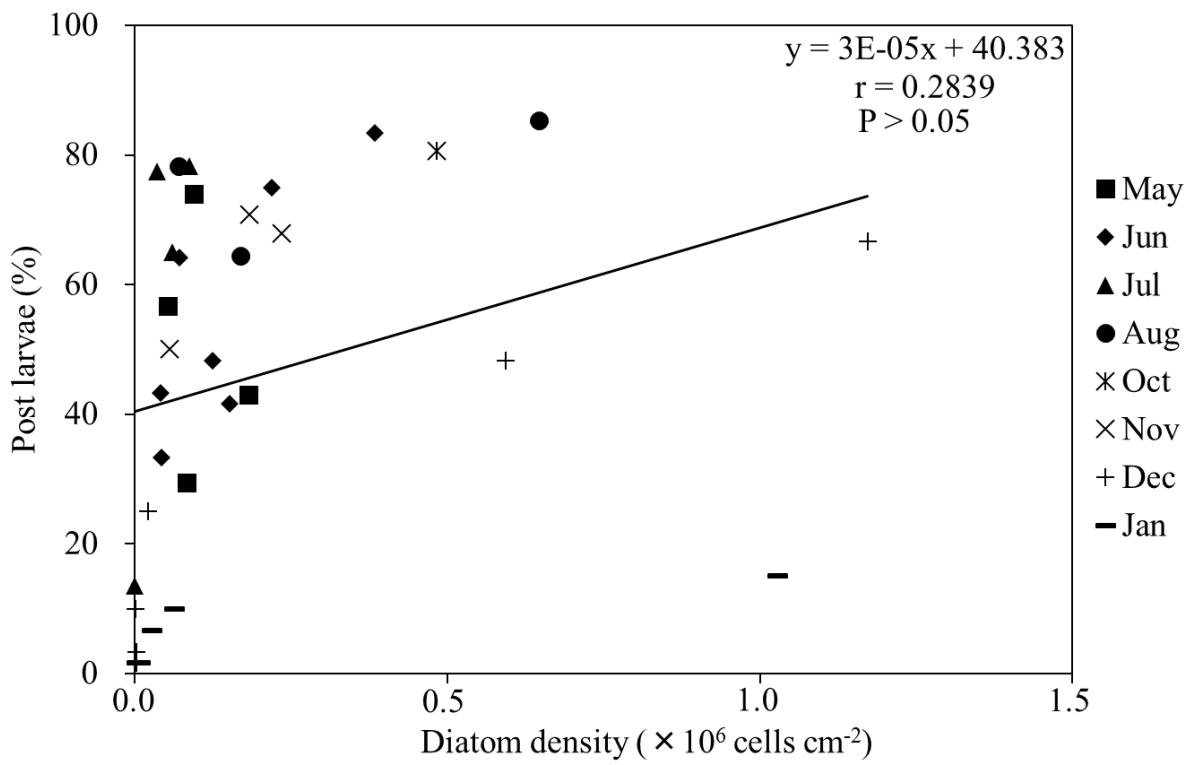


Fig. 15 Percentage of post larvae in relation to the diatom density of microbial biofilm. Each value represents 1 replicate experiment ($n = 1$), which is the average of 3 to 4 petri dishes.

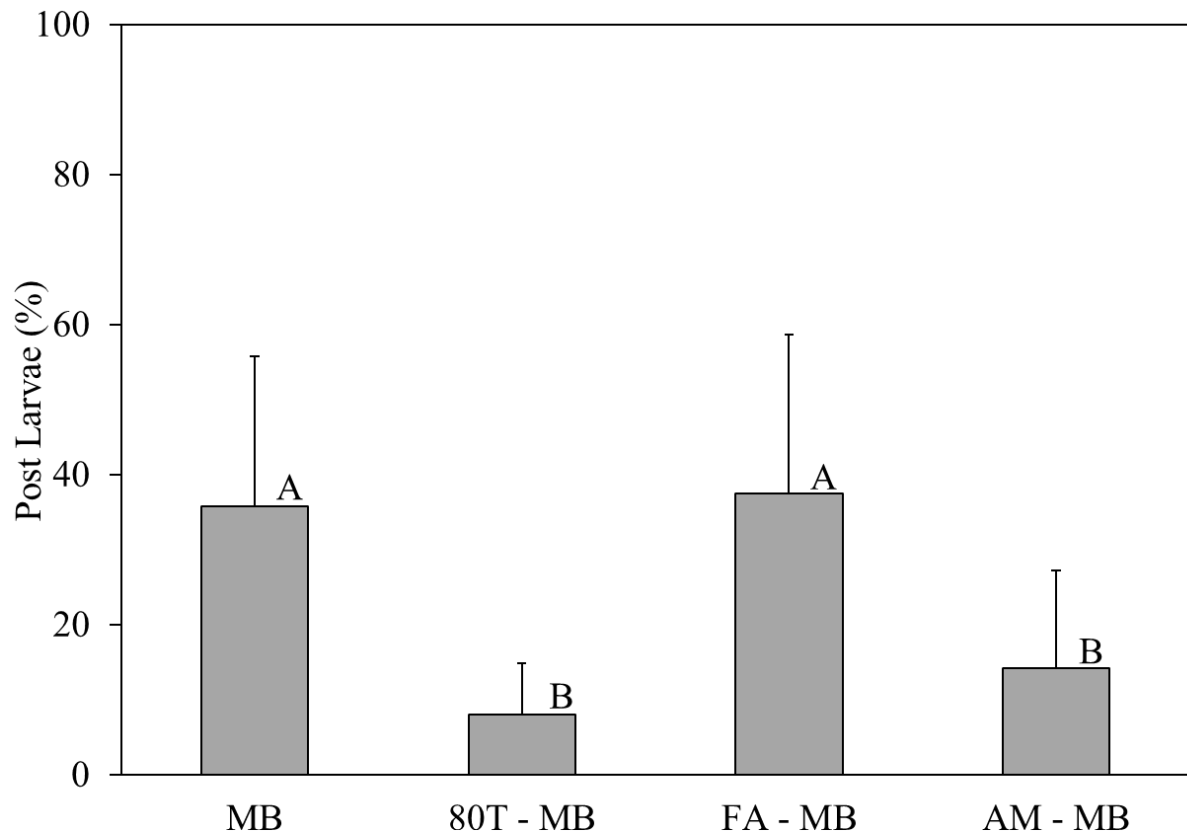


Fig. 16 Percentage of post larvae on microbial biofilms (MB), on films heated at 80 °C (80T) and on films treated with formalin (FA) and antibiotics mixture (AM). MB used in treatment experiments were those obtained after immersion of half-size glass slides in the sea for 20, 15 and 18 days in Oct, Nov and Dec, respectively. Values are means of 5 - 6 replicates. Groups not connected by the same letter are significantly different (Tukey HSD test, $P < 0.05$).

第4章 総合考察

海洋微生物フィルムの長期成長と季節による量的変動

微生物フィルムの成長過程に焦点を当てた研究では、成長に伴う構成生物の種組成の変遷、量的変化に対する各種外的要因の影響が検討されてきた (Marszalek *et al.*, 1979; Lukatelich and McComb, 1986; Nayar *et al.*, 2005; Patil and Anil, 2005; Satheesh and Wesley, 2012)。しかし、これらの研究例は、数日間から2週間以内に形成した微生物フィルムのみを観察しており、海産無脊椎動物幼生の付着・変態との関連を考えた場合、より長期の垂下で形成される微生物フィルムの観察が必要とされていたが、報告例は僅かであった。

本研究では、スライドガラスを基盤として微生物フィルムの長期成長を観察したところ、成長は数日で停滞するのではなく、垂下後4週間まで重量が増加し続けた。また、夏季に大型付着生物が出現するものの、大型付着生物が出現していない付着藻類が主体のフィルムでは、成長に伴う生物量の変化の指標として、乾燥重量だけでなくクロロフィル a、b および c 量も有効であった。微生物フィルムのクロロフィル a、b 量および付着珪藻密度は、時間的・季節的変動を示し、クロロフィル c 量は季節的変動を示した。特に7~9月にみられたクロロフィル a および c 量と付着珪藻密度の減少は、大型付着動物などによる捕食等の攪乱の影響 (Kawamura and Hirano, 1992) によるものと推察された。さらに、微生物フィルムに出現する付着珪藻には、季節的な遷移がみられ、捕食圧に対して耐性を持つ種が夏季に優勢になると推察された (Suzuki *et al.*, 1987; Kawamura and Hirano, 1992)。本研究では4週間にお

たる垂下においても *Navicula* 属、*Nitzchia* 属、*Cocconeis* 属などが出現し優占することが明らかとなった。

佐賀県では、アカウニの種苗生産において年間 100 万尾単位の稚ウニを生産するのに 30 ~ 40 日ほど培養した付着珪藻フィルムが着底板として用いられ (伊東, 1984)、着底後の稚ウニの初期餌料としても利用される (伊東, 1987)。伊東 (1987) は、アカウニの稚ウニ期の餌料として単離培養した *Navicula ramosissima* のフィルムが優れていることを示し、当初の採苗率は低かったものの、栄養塩添加量や流水条件を検討することにより自然繁殖の珪藻フィルムと同等の採苗率を得ている。今後、珪藻主体の微生物フィルムの成長に与える各種環境要因の解明が、有用無脊椎動物の種苗生産の効率化につながると考えられる。

本研究では、微生物フィルムの長期成長を評価するため、生物量の変化 (珪藻の成長) に焦点を当てて観察を行ったが、海産無脊椎動物幼生の付着・変態の観点からフィルムを考えた場合、付着珪藻のみでなく、フィルム中のバクテリアに焦点を当てた研究も必要となる。微生物フィルム中のバクテリアは、ヒドロ虫類 *Hydractinia echinata* (Leitz and Wagner, 1993)、多毛類 *Janua brasiliensis* (Kirchman and Graham, 1982)、アワビ類 (Roberts, 2001)、カキ類 (Weiner et al., 1989; Fitt et al., 1990)、ムラサキイガイ (Bao et al., 2007a) の付着・変態を誘起している。これらの例では、微生物フィルムよりバクテリア株を単離して、単離バクテリアフィルムの幼生に対する付着・変態誘起効果を追跡した。一方、微生物フィルムの成長過程において、付着珪藻同様、バクテリアもフィルムの成長とともに種の変遷、量的変化が起こっている

(Oberbeckmann et al., 2014)。バクテリアの量的変化及び生理状態の観察には、蛍光活性染色法、DVC (Direct Viable Count) 法、マイクロコロニー法が行われてきたが、特定微生物の検出および定量は PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、蛍光抗体法、FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) 法によって可能となっている (山口・那須, 2005)。

今後、蛍光抗体法や FISH 法を用いて、微生物フィルム内のバクテリアの量的変化および組成を同時に評価することにより、微生物フィルムと無脊椎動物幼生の相互関係の解明に近づくとと思われる。

微生物フィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果

本研究では、微生物フィルムがマガキ幼生の付着を誘起し、稚貝率は垂下期間とともに上昇した。バクテリア密度でも相関がみられたが、付着珪藻密度および乾燥重量とは相関がみられなかった。バクテリアにおいても同じ密度でばらつきが生じていたことから、微生物フィルムの構成生物の量的変化のみでなく種組成も季節の影響を受けたためと推察された (橋本ら, 2017)。微生物フィルムの季節による種組成の変遷については、バクテリア (Chiu et al., 2005; Oberbeckmann et al., 2014) および珪藻 (Kawamura and Hirano, 1992; Mitbavkar and Anil, 2008; Hashimoto et al., 2016) で報告がある。本研究では季節ごとのバクテリアおよび付着珪藻の組成は検討しなかったが、今後明らかにする必要がある。

また、フィルムの付着誘起効果はホルマリン処理で変わらず、熱 (80 °C) と抗生物質で有意に低下した。微生物フィルムより単離したバクテリア株で作製した単離バクテリアフィルムは、株により稚貝率が異なり、バクテリア密度の影響はみられ

なかったが、付着誘起効果をもつ *Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *Vibrio tasmaniensis* (NSH-5-5) のフィルムは、ホルマリン固定で失活した (橋本ら, 2017)。

Weiner et al. (1990) および Fitt et al. (1990) は、単離株のバクテリアフィルムがカキ類幼生の一連の付着行動において、バクテリアの代謝産物とフィルム上の EPS (Extracellular Polymeric Substance) がそれぞれ異なる経路で作用しており、アンモニア (Weiner et al., 1989) や L-DOPA (Fitt et al., 1990) が探索 (匍匐) 行動のみに作用するとした。また、EPS は、付着・変態に作用するとして、2 段階シグナルモデルを提案したが、EPS の付着・変態誘起効果については調査されていない。同様の例として Bao et al. (2007b) は、ムラサキイガイ幼生の微生物フィルムへの付着について、フィルムが放出する低分子物質とフィルムの表面に存在する LCA、WGA 結合型糖関連物質の 2 種の異なる物質が関与していることを提案しており、幼生の変態が完了するためにはこれら 2 段階のシグナルが必須と結論づけている。本研究では、作製した単離バクテリアフィルム 4 株中、*Pseudoalteromonas* sp. (NSH-5-1) および *P. tetraodonis* (NSH-5-2) で高い付着誘起効果が得られ、マガキ幼生はバクテリアフィルムでも付着を完了したが、ホルマリン処理により付着誘起効果が消失し、Weiner et al., (1989) や Fitt et al., (1990) が報告したバクテリア由来のシグナルと同様の作用が付着に関与したことが示唆された。しかし、幼生の匍匐については観察しなかったため、1 段階目のシグナルの付着への関与については更なる検討を要する。

マガキ幼生は、付着期になると基盤探索を開始し、微生物フィルムと接触した際に微生物フィルム上の基盤蓄積もしくは基盤結合型の付着誘起物質を感知し、付着する。一方、基盤結合・蓄積型の付着誘起物質は、Jouuchi et al. (2007; 2008) が微生

物フィルムの特テジマフジツボ幼生に対する付着誘起物質として、付着珪藻 *N. ramosissima* フィルムに含まれる基盤結合型の糖関連物質であると報告している。マガキ幼生の付着誘起物質に関する研究では、Vasquez et al. (2013) がマガキ貝殻に結合もしくは封入される 55 kDa の WGA 結合部位を持つ糖タンパク質を報告しており、貝殻中の付着誘起物質のみで付着は完了するとしている。本研究における微生物フィルム由来のマガキ幼生の付着誘起物質は、ホルマリン処理および処理後の洗浄の過程を経ても付着誘起効果が残存していたことから、Vasquez et al. (2013) が報告した物質や同様の要因が微生物フィルム内に潜在的に存在していることが示唆された。しかし、現状では基盤結合・蓄積型の付着誘起物質が珪藻由来であるか、バクテリア由来であるかは不明である。

これまでの微生物フィルム由来のカキ類幼生の付着誘起物質に関して、バクテリアの水溶性の代謝産物が付着行動に重要な役割を担っていると主張した研究例が多かったが、本研究では微生物フィルムの付着誘起物質として、基盤結合・蓄積型の要因が付着に関与していることが示された。今後、微生物フィルムの基盤結合・蓄積型のシグナルの解明によって、微生物フィルムの付着誘起要因の解明、マガキ種苗生産の更なる効率化につながるものと考ええる。

謝辞

本研究においてご指導いただいた長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 サトイト シリル グレン教授に深く感謝申し上げます。本論文のご校閲と研究内容に対するご助言を頂いた長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 和田 実教授、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 桑野 和可 教授に深く感謝申し上げます。本研究にご助言とご指導いただいた長崎大学水産学部 北村 等特任教授に厚く御礼申し上げます。本研究に際して、単離バクテリア株の系統解析をご指導いただいた工藤 俊章 博士（現・北里大学海洋生命科学部 特任教授）に厚く御礼申し上げます。研究の補助をしていただいた深瀬拓郎氏、実験場所、水質データの提供ならびに種々の便宜をいただいた長崎県総合水産試験場の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Bao, W. Y., C. G. Satuito, J. L. Yang and H. Kitamura (2007a). Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Mar Biol*, 150, 565-574.
- Bao, W. Y., J. L. Yang, C. G. Satuito and H. Kitamura (2007b). Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Alteromonas* sp. 1: evidence for two chemical cues?. *Mar Biol*, 152, 657-666.
- Bayne, B. L. (1969). The gregarious behavior of the larvae of *Ostrea edulis* L. at settlement. *J Mar Biol Assoc UK*, 49, 327-56.
- Campbell, A. H., D. W. Meritt, R. B. Franklin, E. L. Boone, C. T. Nicely and B. L. Brown (2011). Effects of age and composition of field-produced biofilms on oyster larval setting. *Biofouling*, 27, 255-265.
- Caron, D. A. and J. M. Sieburth (1981). Disruption of the primary fouling sequence on fiber glass-reinforced plastic submerged in the marine environment. *App. Environ. Microbiol.*, 41, 268-273.
- Chapman, A. R. O. (1981). Stability of sea urchin dominated barren grounds following destructive grazing of kelp in St. Margaret's Bay, Eastern Canada. *Mar. Biol.*, 62, 307-311.
- Chiu, J. M. Y., V. Thiyagarajan, M. M. Y. Tsoi and P. Y. Qian (2005). Qualitative and quantitative changes in marine biofilms as a function of temperature and salinity in summer and winter. *Biofilms*, 2, 183-195.
- Chiu, J. M. Y., R. Zhang, H. Wang, V. Thiyagarajan and P. Y. Qian (2008). Nutrient effect on intertidal community: From bacteria to invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*,

358, 41-50.

Coon, S. L. and D. B. Bonar (1986). Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biol Bull, 171,632-639.

Coon, S. L., D. B. Bonar and R. M. Weiner (1985). Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. J exp mar Biol Ecol, 94, 211-221.

Crisp, D. J. (1967). Chemical factors inducing settlement in *Crassostrea virginica* (Gmelin). J Anim Ecol 36, 329-335.

Cullen, J. J. (1982). The deep chlorophyll maximum: Comparing vertical profiles of chlorophyll *a*. Can J. Fish Aquat. Sci., 39, 791-803.

Dere, S., T. Günes and R. Sivaci (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll-*a*, *b* and total carotenoid contents of some algal species using different solvents. Tr. J. Bot., 22, 13-17.

Dobretsov, S., R. M. M. Abed and M. Teplitski (2013). Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. Biofouling, 29, 423-441.

Fitt, W. K., S. L. Coon, M. Walch, R. M. Weiner, R. R. Colwell and D. B. Boner (1990). Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. Mar Biol, 106, 389-394.

Fitt, W. K., M. P. Labare, W. C. Fuqua, M. Walch, S. L. Coon, D. B. Bonar, R. R. Colwell and R. M. Weiner (1989). Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. Microb. Ecol., 17, 287-298.

Hashimoto, K., H. E. Vasquez, H. Kitamura and C. G. Satuito (2016). Variation in the abundance of periphytic algae in marine biofilms on glass surfaces submerged in the sea off Shin-Nagasaki Port, Nagasaki, Japan. Sessile Organisms, 33, 29-37.

- 橋本京太郎・Hebert Ely Vasquez・北村等・Cyril Glenn Satuito (2017). 海域で形成した微生物フィルムおよび単離バクテリアフィルムのマガキ幼生に対する付着誘起効果. *Sessile Organisms*, 34, 21-27.
- 平田靖 (1998). 成貝の付着誘引効果を用いたマガキ人工採苗技術の改良. *日水誌*, 64, 610-617.
- 平田靖 (2002). マガキ成熟幼生の付着・変態誘起効果の種特異性. *広島県水産試験場研究報告*, 21, 1-3.
- 平田靖 (2005). マガキの人工採苗技術開発に関する研究. *日水誌*, 71, 725-728.
- 平田靖・田村義信・長澤和也 (2008). マガキ成貝飼育海水への採苗器の浸漬条件が幼生付着率に及ぼす影響. *日水誌*, 74, 1017-1023.
- Ito, S. and H. Kitamura (1997). Induction of larval metamorphosis in the sea cucumber *Stichopus japonicus* by periphytic diatoms. *Hydrobiologia*, 358, 281-284.
- 伊東義信 (1984). ウニ幼生に対する付着珪藻の変態促進効果. *付着生物研究*, 5, 15-18.
- 伊東義信 (1987). ウニ類種苗生産における付着珪藻の役割. 「海産付着生物と水産増殖」(梶原武 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 119-130.
- 伊東義信・伊賀田邦義・有吉敏和・西田隆英 (1980). バフンウニの種苗生産について. *栽培技研*, 9, 21-26.
- Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191-194.
- Joint, I. R. (1978). Microbial production of an estuarine mudflat. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 7, 185-195.

- Joint, I., M. E. Callow, J. A. Callow and K. R. Clarke (2000). The attachment of *Enteromorpha* zoospores to a bacterial biofilm assemblage. *Biofouling*, 16, 151-158.
- Jones, G.G. and B. L. Jones (1988). Advances in the remote setting of oyster larvae. Aquaculture Association of British Columbia, Nanaimo, BC, Canada.
- Jouuchi, T., C. G. Satuito and H. Kitamura (2007). Sugar compound products of the periphytic diatom *Navicula ramosissima* induces larval settlement in the barnacle, *Amphibalanus amphitrite*. *Mar Biol*, 152, 1065-1076.
- 城内智行・サトイト シリル グレン・北村等 (2008). 海域で形成された微生物フィルムに対するタテジマフジツボ幼生の付着. *Sessile Organisms*, 25, 31-36.
- Kawamura, T. (1994). Taxonomy and ecology of marine benthic diatoms. *Marine Fouling*, 10, 7-25.
- Kawamura, T. and R. Hirano (1992). Seasonal changes in benthic diatom communities colonizing glass slides in Aburatsubo bay, Japan. *Diatom Research*, 7, 227-239.
- 河村知彦・菊地省吾 (1992). エゾアワビ幼生の着底と変態に及ぼす付着珪藻の影響. *水産増殖*, 40, 403-409.
- Kawamura, T., T. Saido, H. Takami and Y. Yamashita (1995). Dietary value of benthic diatoms for the growth of post-larval abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 194, 189-199.
- Kirchman, D. and S. Graham (1982). Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua (Dexiospira) brasiliensis* Grube (Polychaeta: Spirorbidae). *J Exp Mar Biol Ecol*, 56, 153-163.
- Kitamura, H. and K. Hirayama (1987). Effect of Primary Films on the Settlement of Larvae of a Bryozoan *Bugula neritina*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1377-1381.

- Lam, C., T. Harder and P. Y. Qian (2003). Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by surface-associated settlement cues of marine benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 263, 83-92.
- Lam, C., T. Harder and P. Y. Qian (2005). Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by extracellular polymers of benthic diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 268, 145-154.
- Lau, S. C. K. and P. Y. Qian (2001). Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue. *Mar Biol*, 138, 321-328.
- Leach, J. H. (1970). Epibenthic algal production in an intertidal mudflat. *Limnol. Oceanogr.*, 15, 514-521.
- Leitz, T. and T. Wagner (1993). The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*. *Mar Biol*, 115, 173-178.
- Lukatelich, R. J. and A. J., McComb (1986). Distribution and abundance of benthic microalgae in a shallow southwestern Australian estuarine system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 27, 287-297.
- Marszalek, D. S., S. M. Gerchakov and L. R. Udey (1979). Influence of substrate composition on marine microfouling. *Appl. Environ. Microb.*, 38, 987-995.
- Mitbavkar, S. and A. C. Anil (2000). Diatom colonization on stainless steel panels in estuarine waters of Goa. West coast of India. *Indian Journal of Marine Science*, 29, 273-276.
- Mitbavkar, S. and A. C. Anil (2008). Seasonal variations in the fouling diatom community structure from a monsoon influenced tropical estuary. *Biofouling*, 24, 415-426.
- 長崎県総合水産試験場 (2011). 新長崎漁港観測記録. 平成 22 年度長崎県総合

- 水産試験場事業報告, 長崎県総合水産試験場, 長崎, pp.140-152.
- 長崎県総合水産試験場 (2012). 新長崎漁港観測記録. 平成 23 年度長崎県総合水産試験場事業報告, 長崎県総合水産試験場, 長崎, pp.106-118.
- 長崎県総合水産試験場 (2013). 新長崎漁港観測記録. 平成 24 年度長崎県総合水産試験場事業報告, 長崎県総合水産試験場, 長崎, p.115.
- Nayar, S., B. P. L. Goh and L. M. Chou (2005). Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary. *Estuar. Coast. Shelf S.*, 64, 241-248.
- 農林水産省 (2014). 平成 26 年漁業・養殖業生産統計 <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/Xlsdl.do?sinfid=000031352904>, 2016 年 10 月 1 日.
- Oberbeckmann, S., M. G. J. Loeder, G. Gerdts and A. M. Osborn (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol Ecol*, 90, 478-492.
- 大泉重一・伊東進・小金沢昭光・酒井誠一・佐藤隆平・菅野尚 (1976). カキ養殖の技術. 「改訂版浅海完全養殖」(今井丈夫監修), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 153-189.
- Patil, J. S. and A. C. Anil (2005). Biofilm ditatom community structure: influence of temporal and substratum variability. *Biofouling*, 21, 189-206.
- Qian, P. Y., S. C. K. Lau, H. U. Dahms, S. Dobretsov and T. Harder (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol.*, 9, 399-410.
- Rahim, S. A. K. A., J. Y. Li and H. Kitamura (2004). Larval metamorphosis of the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina* in response to biofilms. *Mar Biol*, 144, 71-78.

- Ramaraj, R., D. D. W. Tsai and P. H. Chen (2013). Chlorophyll is not accurate measurement for algal biomass. *Chiang Mai J. Sci.*, 40, 547-555.
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46, 115-126.
- Roberts, R. (2001). A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* spp.). *J Shellfish Res*, 20, 571-586.
- Satheesh, S. and S. G. Wesley (2012). Temporal changes of diatoms in marine biofilm developed on acrylic panels submerged in a tropical coast. *Ocean Sci. J.*, 47, 509-517.
- Satuito, C. G., K. Natoyama, M. Yamazaki and N. Fusetani (1995). Induction of attachment and metamorphosis of laboratory cultured mussel *Mytilus edulis galloprovincialis* larvae by microbial films. *Fish Sci*, 61, 223-227.
- Shin, H. W. (2008). Rapid attachment of spores of the fouling alga *Ulva fasciata* on biofilms. *J. Environ Biol.*, 29, 613-619.
- Silva-Aciaras, F. and C. Riquelme (2008). Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electron. J. Biotechnol.*, 11, Available online at <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue1/full/12/>
- Steele, J. H. (1962). Environmental control of photosynthesis in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, 7, 137-150.
- Suzuki, H., T. Ioriya, T. Seki and Y. Aruga (1987). Changes of algal community on the plastic plates used for rearing the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 2163-2167.

- Takami, H., T. Kawamura and Y. Yamashita (1996). Dietary value of benthic diatoms for the growth of juvenile abalone *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture Science*, 44, 211-216.
- Takami, H., T. Kawamura and Y. Yamashita (1997). Survival and growth rates of post-larval abalone *Haliotis discus hannai* fed conspecific trail mucus and/or benthic diatom *Cocconeis scutellum* var. *parva*. *Aquaculture*, 152, 129-138.
- 谷雄策・伊東義信 (1979). アカウニ幼生の付着および変態に及ぼす付着珪藻の影響について. *水産増殖*, 27, 148-150.
- Unabia, C. R. C. and M. G. Hadfield (1999). Role of bacteria in larval settlement and metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. *Mar Biol*, 133, 55-64.
- Vasquez, H. E., K. Hashimoto, A. Yoshida, K. Hara, C. C. Imai, H. Kitamura and C.G. Satuito (2013). A glycoprotein in shells of conspecifics induces larval settlement of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 8, e82358.
- Veitch, F. P. and H. Hidu (1971). Gregarious setting in the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin: I. Properties of a partially purified "setting factor". *Chesapeake Sci*, 12, 173-178.
- Wada, S. K. (1961). Fertilizability of *Crassostrea* and *Pinctada* eggs as related to germinal vesicle breakdown. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ*, 10, 1-8.
- Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar Ecol Prog Ser*, 58, 175-189.
- Weiner, R.M., M. Walch, M. P. Labare, D. B. Bonar and R. R. Colwell (1989). Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *C. virginica* (Gmelin, 1791). *J Shellfish Res*, 8, 117-123.
- Weisburg, W.G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991). 16S ribosomal

DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703.

山口進康・那須正夫 (2005). 微生物の迅速高精度検出法の現状とその可能性.

日本 PDA 学会誌 *GMP とバリデーション*, 7, 94-105.

Yamaji, I. (1984). *Illustrations of the Marine Plankton of Japan 3rd edition*. Hoikusha Publ. Co. Ltd., Osaka, 537 pp.

Yebra, D. M., S. Kiil and K. Dam-Johansen (2004). Antifouling technology-Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.*, 50, 75-104.