

Notice on Plankton Seminar

#17009

9:30-11:00, 26 June (Mon.) 2017 at room #W103

\*\*\*\*\*

Imai, I., D. Fujimaru and T. Nishigaki (2002)

Co-culture of fish with macroalgae and associated bacteria:

A possible mitigation strategy for noxious red tides in enclosed coastal sea

*Fish. Sci.* **68** (Suppl): 493–496

Imai, I., D. Fujimaru, T. Nishigaki, M. Kurosaki and H. Sugita (2006)

Aigicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds

from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan

*Afr. J. Mar. Sci.* **28**: 319–323

細菌の付随する海藻と魚類の混合養殖: 閉鎖的な沿岸域における有害赤潮防除の可能性  
瀬戸内海大阪湾沿岸域における海藻表面より単離された殺藻細菌

近年, 世界中の沿岸域において海洋生物の斃死や毒化をもたらす有害有毒藻類の赤潮 (HABs) が頻繁に発生し, 養殖漁業や海洋環境に甚大な被害と重大な悪影響を及ぼしている。HABs 対策として物理・化学的防除方法が試みられてきたが, コストや現場環境への悪影響から, その殆どが実用化に至っていない。そこで HABs 形成藻類を殺滅する細菌やウイルスなどの海洋微生物を用いた, 環境にやさしい生物学的防除方法が提案されている。特に殺藻細菌は沿岸域の藻場において高頻度に分布することが著者らによって発見されており, 本研究では, 海藻表面や藻場周辺の海水に分布する殺藻細菌を検出・単離し, 単離した殺藻細菌に対しては種同定及び殺藻レンジの検証を行い, 藻場が有する HABs 抑制効果について考察した。

調査は瀬戸内海大阪湾の大阪府岬町沿岸において, 1999年4月26日から11月25日にかけて月に一度, 大潮の際に行った。海藻種は緑藻 *Ulva* sp., 紅藻 *Gelidium* sp., 褐藻 *Sargassum thunbergii* 及び *S. muticum* の計4種を対象とした。各種海藻及び周辺海水は, それぞれ500 mL 滅菌アイボーイ瓶に入れ, 冷蔵にて5時間以内に実験室に持ち帰った。海藻試料は滅菌海水300 mL を加えた後, 100回強振して表面に付着する微生物を剥離した。処理試料は0.8 µm スクレポアフィルターで濾過し, 大きい粒子を除去した後に実験に供した。細菌の殺藻能の検証にはマイクロプレート MPN 法を用いた。まず, 赤潮藻類培養を48 ウェルマイクロプレートに0.5 mL 分注し, 滅菌濾過海水で適宜段階希釈した試料を0.5 mL ずつ5連でウェルに分注した。また, 滅菌濾過海水と藻類培養を添加したウェルをコントロールとした。対象赤潮藻類はラフィド藻 *Chattonella antiqua* NIES-1株, *C. marina* MS-3-P株, *C. ovata* HR-93-P株, *Fibrocapsa japonica* Fib-1株及び *Heterosigma akashiwo* (893株と IWA株), 渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* HU9433株及び *Karenia mikimotoi* G303株の計7種8株を用いた。各実験区のプレートを温度22°C, 光強度100–150 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 明暗周期14 h: 10 h L: D で2週間培養し, 培養期間中2日おきに倒立顕微鏡にて検鏡し, コントロールと比較して99%の殺藻が見られたウェルの数から, 殺藻細菌数を最確数 (MPN) 法より算出した。

マイクロプレート MPN 法の結果より、藻場海水中の各赤潮藻類に対する最大殺藻細菌数は、*K. mikimotoi* に対して  $4.3 \times 10^3$  MPN mL<sup>-1</sup>, *F. japonica* に対して  $4.3 \times 10^2$  MPN mL<sup>-1</sup>, *H. akashiwo* IWA 株に対しては  $1.6 \times 10^2$  MPN mL<sup>-1</sup> となったが、他の藻類を対象とした殺藻細菌は、調査期間を通じて  $3.3 \times 10^1$  MPN mL<sup>-1</sup> 以下となった。また、海藻類より検出された最大殺藻細菌数は、*Ulva* sp. 表面から *C. marina* に対して  $1.4 \times 10^2$  MPN g<sup>-1</sup>, *C. ovata* に対して  $2.4 \times 10^2$  MPN g<sup>-1</sup> となり、*Gelidium* sp. 表面から *C. antiqua* に対して  $2.6 \times 10^3$  MPN g<sup>-1</sup>, *F. japonica* に対して  $1.3 \times 10^6$  MPN g<sup>-1</sup>, *H. akashiwo* 893 株に対して  $4.7 \times 10^3$  MPN g<sup>-1</sup>, *H. akashiwo* IWA 株に対して  $2.6 \times 10^5$  MPN g<sup>-1</sup>, *K. mikimotoi* に対しては  $4.9 \times 10^5$  MPN g<sup>-1</sup> となった。

また、4-9月にかけて得られた試料で殺藻がみられたウェルについて、寒天平板法を用いて細菌の分離を行った。ペプトン寒天培地上に形成された細菌のコロニーを、ウェルに添加した藻類と同様の藻類培養に添加することで、細菌の殺藻能の検証を行い、殺藻細菌を単離した。単離した殺藻細菌はペプトン液体培地にて温度 22°C で培養し、細菌密度が  $10^8$  cells mL<sup>-1</sup> に達したものを殺藻対象藻類の検証実験に供した。改変 SWM-3 培地で希釈した殺藻細菌培養を、各藻類培養株 ( $10^3$  cells mL<sup>-1</sup>) が 5 mL 分注された試験管に 0.5 mL ずつ添加した (細菌の最終濃度  $10^3$  cells mL<sup>-1</sup>)。各実験区は 5 本立てとし、8 日間培養を行い、蛍光光度計を用いて藻類の増減をモニターした。また、本実験及び過去の研究で褐藻 *Ectocarpus siliculosus* の表面及び赤潮発生時の瀬戸内海より単離された殺藻細菌株を 16S rRNA 遺伝子解析に供し、殺藻細菌の種同定及び系統樹を作成した。

殺藻細菌の単離実験で *Ulva* sp. より 6 株、*Gelidium* sp. より 3 株、海水より 1 株の計 10 株が単離された。分離された 10 株の細菌のうち、8 株で殺藻レンジを検証した結果、最大で 3 種の藻類を殺藻した。また *K. mikimotoi* を対象とする殺藻細菌株が 6 株と最も多く、次いで *F. japonica*, *H. akashiwo* IWA 株及び *C. ovata* 対象が 3 株となった。16S rRNA 遺伝子解析の結果、海藻類及び藻場周辺や赤潮発生時の海水より単離された殺藻細菌株は  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria 及び *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* の 3 グループに分類された。

本研究より、藻場において海藻表面や周辺海水中に殺藻細菌が高密度で分布し、また多様な種が存在することが明らかとなった。これは、藻場が沿岸域において HABs の抑制又は制御に重要な役割を持つことを示唆している。近年、経済成長に伴って沿岸域の藻場が縮小傾向にあり、それによって赤潮発生頻度が増加したことが考えられる。そのため、藻場を人工的に造成・復活させることが HABs の抑制に繋がる可能性がある。また、魚介類の養殖に海藻類を組み込んだ混合養殖を行うことで、海藻類から放出された殺藻細菌によって HABs による漁業被害が軽減されることが考えられる。以上のことから、殺藻細菌が HABs 抑制に有効な手段であることが示されたが、HABs 防除方法として利用するにはさらなる研究が必要である。

児玉 敢