

Notice on Plankton Seminar.  
#17017

9:30-11:00, 23 Oct (Mon.) 2017 at room # N204

\*\*\*\*\*

Sakami, T., S. Sakamoto, S. Takagi, N. Inaba and I. Imai  
Distribution of three algicidal *Alteromonas* sp. strains  
in seagrass beds and surrounding areas in the Seto Inland Sea, Japan

瀬戸内海のアマモ場及び周辺海域における殺藻細菌 *Alteromonas* 属 3 株の分布

近年、我が国では富栄養化した沿岸域で、有害有毒藻類ブルーム (HABs) の発生頻度が増加し、養殖漁業に甚大な被害をもたらしている。HABs 抑制方法として、アマモや海藻表面のバイオフィーム中に多量に分布し、微細藻類を効率的に攻撃・殺滅する殺藻細菌が注目されている。殺藻細菌の検出・評価法として最確数 (MPN) 法が挙げられるが、殺藻細菌数の過小評価及び細菌種ごとの生物量の評価が困難であり、新たな手法が望まれる。本研究では、瀬戸内海のアマモ場及び周辺海域における殺藻細菌の分布を MPN 法により調査し、分離株を得て分類群を調べた。また、殺藻細菌 *Alteromonas* 属 3 株の分布及び生物量 (DNA コピー数) を定量的 PCR (qPCR) を用いて評価した。

調査研究は瀬戸内海北東部に位置し、アマモ場を有する A1 (現寺湾: 半閉鎖的, 小湾) と A2 (開放的な島の沿岸), 及び現寺湾湾口に位置する R1 と R1 付近の 2 地点 (R2, R3) にて行った。また、アマモ場から離れた場所に位置する 2 地点 (R4, R5) においても調査を行った。サンプリングは 2013 年 7 月 3 日, 2014 年 7 月 25 日及び 2015 年 6 月 15 日と 9 月 10 日に行い、各地点において表層の物理環境 (水温, 塩分, Chl. *a*) を RINKO-Profiler を用いて測定し、表層海水を滅菌プラスチックボトルにて直接採集し、冷暗所に保存して 8 時間以内に持ち帰った。試料は 4°C で一晩保存し、MPN 法により殺藻細菌の検出と計数を行った。対象の HABs 種はラフィド藻 *Chattonella antiqua* NIES-1 株を用い、f/2 培地で培養したものを 48 ウェルプレートに分注し実験に供した。実験は温度 20 °C, 光強度 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 明暗周期 14-h/10-h L/D で 2 週間行い、倒立顕微鏡下で検鏡して殺藻が見られたウェル数から殺藻細菌数を MPN 表より算出した。2013 年の試料で陽性が見られたウェル中の培養は、海水寒天培地に塗抹し、1 プレートにつき 5-10 の細菌株を単離し、*C. antiqua* との二者培養実験に供して細菌株の殺藻能を検証し、殺藻細菌を単離した。得られた細菌株は 16S rRNA 遺伝子の塩基対配列の解析を行い、種同定を行った。また、各試料を、1991 年に広島湾で単離された既報の殺藻細菌株である *Alteromonas* 属 S 株, K 株及び D 株を対象とした qPCR アッセイに供した。まず、試料を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターで濾過捕集した。2015 年 6 月の A1, A2 及び R3 のサンプルに関しては、副試料を孔径 2 及び 0.22  $\mu\text{m}$  のヌクレオポアフィルターで濾過捕集し、粒子付着性細菌区分 (>2  $\mu\text{m}$ ) と浮遊性細菌区分 (0.22-2  $\mu\text{m}$ ) に分画した。試料を濾過捕集したフィルターは -30 °C で保存し、FAST DNA-SPIN kit for soil を用いて DNA を抽出した後、*Alteromonas* 属 3 株の各株を対象として作成した特異的プライマーを用い qPCR アッセイを行い、試料中の各株の DNA 量を測定した。

MPN 法の結果より、各地点での殺藻細菌数は、2015 年 9 月 (アマモが減衰) を除いて半閉鎖的なアマモ場である A1 で多く、最大で 2013 年 7 月に 96 MPN / mL 検出された。一方で、2015 年 9 月には A1 で最も MPN 値が小さかった。また、開放的なアマモ場である A2 では、他の地点と殺藻細菌数の差は見られなかった。また、二者培養実験及び 16S rRNA 遺伝子解析の結果より、*Alteromonas* 属 3 株を含む計 12 株の殺藻細菌株が検出された。qPCR の結果、*Alteromonas* 属 3 株を合計した細胞密度は、6, 7 月の A1 において  $1.0-3.5 \times 10^2$  cells/ mL と算出された。また、K 株と S 株は 2015 年 9 月を除いて A1 で DNA 量が最も大きく、7 月においてはアマモ場から離れるほど DNA 量が減少する傾向にあり、2015 年 9 月には全地点で DNA 量が減少した。一方で D 株は、2013 年及び 2014 年の 7 月において、アマモ場と周辺海域間で DNA 量に変化は見られなかったが、2015 年 6 月にはアマモ場 (A1, A2) において DNA 量が大きかった。また、全細菌数に対する粒子付着性区分の殺藻細菌の割合は 0-19% の間で変化し、*Alteromonas* 属各株及び採集地点間で存在量に明確な傾向は見られなかった。

本研究により、沿岸海水中に存在する殺藻細菌 *Alteromonas* 属 3 株は、アマモが繁茂する 6, 7 月にアマモ場に高密度に分布し、アマモが減衰する 9 月に減少することが明らかとなり、殺藻細菌の増殖はアマモによって促進されることが示唆された。また、qPCR は MPN 法と比較して、現場の殺藻細菌の細胞密度及び分布を評価するのにより有効な手法であることが明らかとなった。今後は、殺藻細菌が HABs 発生に与える影響を調査するために、潮流による細菌細胞の分散や海水中における殺藻能の有無等について検証する必要がある。

児玉 敢