

\*\*\*\*\*

Roth, P. B., M. J. Twiner, C. M. Mikulski, A. B. Barnhorst, and G. J. Doucette (2008)

Comparative analysis of two algicidal bacteria active against

the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*.*Harmful Algae* 7: 682–691.赤潮渦鞭毛藻 *Karenia brevis* に対する 2 種の殺藻細菌の活性の比較

アメリカ南東部メキシコ湾沿岸域では、渦鞭毛藻 *Karenia brevis* による赤潮が毎年発生し、魚類の大量死や二枚貝の毒化と、それに伴う観光への悪影響により、経済と公衆衛生に悪影響を及ぼしている。近年、殺藻細菌が微細藻類の増殖を阻害する場合があることが分かり、本海域からも過去に *K. brevis* に対する殺藻細菌 41-DBG2 株が単離された。本研究では、新たに単離された殺藻細菌 S03 株の殺藻能と攻撃型を調べ、*K. brevis* と他の微細藻類に対する殺藻力を 41-DBG2 株と比較し、また培養の中に共存する細菌群集の影響を評価し、殺藻菌を HAB 制御に用いるための基礎的知見を得ることを目的とした。

採水は 2001 年 9 月 20-26 日、10 月 20-26 日に、フロリダ西部沿岸域において、海面、中間層、海底上 1 m で行われた。試料は 80  $\mu\text{m}$  のふるいにかけて後、最終濃度が 10 % になるようグリセロール (耐凍結剤) を加えて濾液を凍結保存し、実験室に持ち帰った。実験には珪酸塩を含まない f/2 培地にて、温度 20°C、明暗周期 16hL: 8hD、光強度 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件下で培養した植物プランクトンを用いた。増殖はクロロフィル量をターナー蛍光光度計を用い、48 時間おきに測定した。このとき、蛍光値が対照区の 10 % 以下になった場合に殺藻と判断した。採水試料はグリセロールを除去するために 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターにて滅菌海水を用いて洗浄し、100  $\mu\text{L}$  と 200  $\mu\text{L}$  の細菌混濁液を *K. brevis* の培養に加えた。殺藻が生じた培養は、すぐに新たな *K. brevis* の培養に加え、これを繰り返すことによって殺藻細菌を集積してから DBG/5 または SWC 寒天培地に塗抹、植菌した。寒天培地上に形成されたコロニーを単離し *K. brevis* の培養に加えて観察し、殺藻細菌 S03 株を得た。殺藻細菌の DNA 抽出には CTAB 法を用い、16S rDNA を調べて系統解析を行った。次に S03 株の殺藻能が密度に依存しているか否かを確かめるために、 $10^2$ - $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  までの 5 段階の濃度を、それぞれ *K. mikimotoi* の培養に加え、2 日間おきに蛍光値を測定した。S03 株と 41-DBG2 株が他の植物プランクトンに対して殺藻能を示すか否か、11 種 23 株を対象に、それぞれ  $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  の濃度で細菌を加え、蛍光値を測定し調べた。S03 株の攻撃型については、*K. brevis* の培養に S03 株を  $10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  の濃度で加え、殺藻が生じた後に 5  $\mu\text{m}$  および 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過を行い、濾液を再び藻類の培養に加えて殺藻の有無を検討した。最後に、*K. brevis* の無菌株および有菌株の培養に、S03 株と 41-DBG2 株をそれぞれ  $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  の濃度で加えて、7 日間観察し、DGGE 法を用いてゲノム DNA の解析を行って、これら殺藻菌の消長と殺藻現象の関係を把握した。

DNA の解析結果より、S03 株と 41-DBG2 株は共に CFB グループに属することが分かった。S03 株の殺藻力は細菌の濃度に依存したが、最終的には低密度に添加しても殺藻が起こった。他の藻類に対しては、S03 株は実験した 18 株のうち 4 株に、41-DBG2 株は 23 株のうち 9 株に殺藻能を示した。また、S03 株は直接攻撃型であった。S03 株と 41-DBG2 株を *K. brevis* の培養に加えたところ、両者とも無菌株では 7 日目までに殺藻がみられたが、有菌株ではみられない場合があった。DGGE 法によるゲノム DNA の解析により、殺藻がなかった有菌株の実験では S03 株と 41-DBG2 株のバンドが確認されず、共にほとんど消滅していることが分かった。

今回の研究により、殺藻細菌の作用が他の細菌の存在によって阻害される場合のあることが示された。現場で殺藻細菌を用いる場合にはこの点を考慮する必要がある。今後は、フィールドに基づく殺藻細菌と微細藻類の複雑な相互作用の解明が必要である。