

Lee, B.-K., T. Katano, S.-I. Kitamura, M.-J. Oh and M.-S. Han (2008)
Monitoring of algicidal bacterium, *Alteromonas* sp. strain A14 in its application to natural
Cochlodinium polykrikoides blooming seawater using fluorescence *in situ* hybridization
J. Microbiol. **46**: 1-9.

殺藻細菌のモニタリングと FISH を用いる殺藻細菌 A14 株の
自然環境下 *Cochlodinium polykrikoides* 赤潮に対する効果

Cochlodinium polykrikoides は主要な有害赤潮渦鞭毛藻類の一種で、しばしば沿岸域で深刻な漁業被害を及ぼす。殺藻細菌を用いた生物学的防除は有害藻類細胞を除去する有効な方法の一つである。現在までの殺藻細菌の研究は殺藻範囲、殺藻活性、殺藻形式の解明がほとんどであり、自然環境の赤潮に対する効果の知見が少ない。本研究では、*C. polykrikoides* への殺藻細菌による効果を検討するために、*C. polykrikoides* 赤潮が発生中の現場海水に殺藻細菌 *Alteromonas* sp. A14 株を接種し、(TSA)-FISH を用いて細菌細胞密度の計数を行った。また、それに加えて、微生物群集への影響を調べるため、総細菌、従属栄養性微小鞭毛虫、植物プランクトンの細胞密度も計数した。

採水は *C. polykrikoides* ブルームが発生していた 2006 年 8 月 12 日に韓国の南部沿岸域で行われ、サンプルはブルーム時の状態を維持するために 60 $\mu\text{mol N/L}$ 、4 $\mu\text{mol P/L}$ の濃度となるように栄養塩を加えた。単離された藻類は温度 20°C、光強度 50 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期 12:12 の環境下で培養した。殺藻細菌は韓国の南部沿岸域の堆積物中から分離し、10%Zobell 寒天培地で温度 20°C、70 rpm の振盪条件下で培養した。A14 株の殺藻活性はクロロフィル蛍光光度計でモニターし、対照実験区と A14 接種区の藻類の増殖を比較した。単離された殺藻細菌は PCR 法により 16S rDNA の塩基配列を解析し、プローブを設計して TSA-FISH で A14 株を検出する処理を行った。クロロフィル a 濃度はサンプルを GF/F フィルターでろ過し、色素を 90%アセトンで抽出して計測した。植物プランクトン細胞は、サンプルを最終濃度 1%Lugol 溶液で固定し、冷蔵保存後、光学顕微鏡で計数した。細菌細胞は DAPI 染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて計数した。A14 株の細菌細胞は FISH 処理後のプローブ陽性細胞を蛍光顕微鏡で計数し、少なくとも 400 細胞をそれぞれのサンプルで計数した。従属栄養性微小鞭毛虫細胞は 0、2、5 日目のサンプルをプリムリンで染色し、蛍光顕微鏡で計数した。処理（対照実験と A14 接種処理）と培養時間（日）のデータの差を検証するため、植物プランクトン細胞密度とクロロフィル a 濃度のデータから分散分析を行った後に、それらが Turkey's の検定で $p < 0.05$ のレベルで有意差を検定した。

殺滅活性は最終細菌細胞密度が 10^7 cells/ml で最も高かった。また遺伝子解析の結果、A14 株は溶存化学物質を用いて間接的に攻撃する *Alteromonas* 属に属することが判明した。天然赤潮海水に単離した A14 株を細胞密度 9.0×10^5 cells/ml で接種すると、*C. polykrikoides* は 4 日目までに 1830 cells/ml から 700 cells/ml に減少した。珪藻類の細胞密度は 3 日目から急激に増加した。A14 株と他の細菌の密度が 1 日目まで増加したが、2 日目から細菌捕食者である従属栄養性微小鞭毛虫の密度増加によってそれらの細菌密度が減少した。最終的に 5 日目には A14 株の密度は 3.5×10^4 cells/ml まで減少した。溶存有機物 (DOM) が A14 株による *C. polykrikoides* 細胞の殺滅溶解を通じて供給されるため、A14 株より効率的に利用する他の細菌が増加したと思われる。また、細菌密度の減少と鞭毛虫密度の増加が同時に起こるのは鞭毛虫による捕食が原因である。このことから、有害藻類ブルームの生物学的防除では対象藻類の密度に加えて、微生物ループを構成する生物も重要である。この研究は自然赤潮海水への殺藻細菌の利用において対象細菌のモニタリングの重要性を強調している。また、無害な珪藻類が殺藻されず増殖できたことは、珪藻による有害渦鞭毛藻の赤潮抑制が期待できるので重要である。

川口まりえ

次回のゼミ（5月17日 [月] 9:30-, N407にて）は齋藤さん、塩田君、水原君です。