

広島湾における渦鞭毛藻類 *Alexandrium* 属のシスト形成促進細菌の個体群構造

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* と *A. tamarense* は麻痺性貝毒 (PSP) の原因種として知られ、ブルームのシードポピュレーションとして重要なシストの形成要因の解明が望まれている。近年、有害有毒藻類を増殖抑制および殺藻あるいは増殖促進細菌の存在が着目されている。前報で、広島湾の海水試料から *Alexandrium* シスト形成促進細菌 (Alex-CFPB) を単離した。本研究では、単離した Alex-CFPB の 16S rDNA を解析し、遺伝子の制限酵素断片長多型分析 (RFLP) から Alex-CFPB 群集の個体群構造の解明を目的とした。

調査は 1997 年 2 月 17 日、および 1998 年 4 月 8 日から 5 月 21 日まで、週に一回実施し、広島湾内の定点 St. 11 (水深 22m) において水深 5m から 1L 採水した。試料はグラスファイバーフィルターおよび孔径 0.8 μm ミリポアフィルターで濾過し、孔径 0.2 μm フィルターで濾過した無菌海水で 10^{-1} - 10^{-3} 乗の濃度に段階希釈し、MPN 法に供した。MPN 法には、f/2-Si 培地で、温度 20°C、光強度 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 14: 10 h の環境下で培養した *A. catenella* 6ax 株および TNY7 株の混合培養を用いた。開始から 1 ヶ月後にシストを倒立顕微鏡下で計数し、対照区 (無菌) と比較して 3 倍以上のシストを確認した場合を陽性と判断し、シスト形成促進活性 (CFPA) を算出した。また、陽性ウェルの上澄みを 10^{-1} - 10^{-3} の濃度に段階希釈し、FeTY 寒天培地に塗抹して細菌を単離した。Alex-CFPB の 16S rDNA は PCR 法で解析し、RFLP 法および直接塩基配列決定法の結果から系統樹を作成した。シスト形成環境要因を特定するために、FeTY 液体培地で培養した CFPB-A9 株および CFPB-C1 株を、終濃度 $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ で、試験管に用意した *A. catenella* のシスト形成混合培養 ($5.0 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) に加え、20°C で 15 日間培養した。後に培地中のリン酸塩、硝酸塩および亜硝酸塩濃度を測定し、試験管内のシストをへらでこそぎ落として回収して、シスト形成率を算出した。*A. tamarense* に対する分離細菌 CFPB-A9 株の CFPA を調べるために、FeTY 液体培地で培養した細菌を、終濃度 $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ で *A. tamarense* OFX191 株および HIM11 株の混合培養 ($5 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$) に加え、30 日後にシストを計数し、CFPA を算出した。また、シスト形成が細菌の生成物質によるものか否かを確かめるために、FeTY 液体培地で十分に培養した CFPB-A9 株 (0.5 mL) を孔径 0.2 μm フィルターで濾過し、その濾液を *A. catenella* の混合培養 (0.8 mL) に加え、CFPA を算出した。

現場海水と MPN 法のウェルから 31 株の細菌を単離し、うち 17 株は 1998 年 4 月 28 日の *A. tamarense* ブルーム時に単離した細菌であった。4 つの制限酵素を用いた RFLP 法により、細菌は 14 のリボタイプ (A-N) に分類され、うち 9 つが α -Proteobacteria に属することが分かった。実験に用いた CFPB-A9 株および CFPB-C1 株は、遺伝子解析から *Ruegeria gelatinovorans*、*Roseobacter gallaeciensis* が近縁種であることが分かった。この 2 株の *A. catenella* に対する CFPA を調べた結果、それぞれ対照区より 13 倍、および 16 倍のシスト形成が確認された。また、リン酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩の減少はみられなかったことから、環境要因の悪化によるシスト形成の可能性は低いと考えられた。CFPB-A9 株は *A. tamarense* に対しても高い CFPA を示した。CFPB-A9 株の濾液を *A. catenella* に加えて培養した結果、高い CFPA を示したことから、細菌が生成する化学物質によってシスト形成が促進されたと考えられた。

過去の研究から、 γ -Proteobacteria に属する *Alteromonas* 属の *Alexandrium* シスト形成阻害細菌 (Alex-CFIB) の存在が確認されており、今後は渦鞭毛藻をはじめとする有害有毒藻類ブルームに影響を与える細菌群集の相互作用の解明が重要であると考えられる。