

アマモ場から分離された有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の増殖阻害細菌に関する研究
(修士論文中間発表)

【序論】

渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* は麻痺性貝毒の原因種として知られ、食用二枚貝を含む濾過食生物を毒化させ食中毒を引き起こすことから、世界中の沿岸域において問題となっている。北海道では、噴火湾およびオホーツク海に面した養殖場で、ほぼ毎年規制値以上の毒化が確認されており、その発生予防策が待望されている。近年、赤潮の生物学的防除法の1つとして殺藻細菌が着目され、赤潮海域から様々な殺藻細菌が単離されている。しかし、本種に対する殺藻細菌の報告は極めて少なく、実際に現場で応用できる可能性のある強力な細菌はいまだ報告されていない。近年、殺藻細菌がアマモ表面のバイオフィルム中に非常に高密度に存在するという新事実が明らかにされた。本研究では、アマモに着目して探索を行った結果、*A. tamarense* に対する強力な増殖阻害細菌を単離したので、その作用について様々な検討を行った。

【材料及び方法】

試料の採集は2009年10月15日、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター白尻水産実験所および恵山海浜公園にて行った。前者ではアマモとチガイソおよび藻場の海水を採集し、後者では藻場やアマモ場の無い場所として浜辺の海水を採集した。試料は滅菌したショット瓶に入れ、実験室へ持ち帰った。海水試料はそれぞれ孔径3.0 μm ヌクレポアフィルターで濾過を行い、フィルター上の細菌を $\text{ST}10^{-1}$ 寒天培地に静置し(粒子付着性細菌: PAB)、濾液は塗抹して(浮遊細菌: FLB)、コロニーを形成させた。アマモ・チガイソ試料はショット瓶に滅菌濾過海水200 mLを加えて500回強振し、バイオフィルムと共に細菌を剥離した。滅菌濾過海水を用いて 10^1 - 10^3 倍に希釈し、それぞれを $\text{ST}10^{-1}$ 寒天培地に塗抹して培養し、培養温度 25°C 、暗所の環境下で培養を行い、コロニーを形成させて計数を行うと同時に単離した。強振後にアマモ・チガイソの湿重量を測定した。また、未処理の海水試料およびアマモ・チガイソ試料強振後の海水をグルタルアルデヒドで固定し(終濃度1%)、DAPI染色による細菌の直接計数を行った。

海水試料およびアマモ・チガイソ試料強振後の海水を孔径1.0 μm のフィルターでろ過し、渦鞭毛藻 *A. tamarense*、ラフィド藻 *Fibrocapsa japonica* および *Heterosigma akashiwo* (IWA株) を対象にマイクロプレートMPN法に供し、殺藻細菌数を算出した。用いた藻類の培養には改変SWM-3培地を用い、明暗周期14h L:10h D、光強度 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、*A. tamarense* については培養温度 15°C 、その他の藻類については 20°C の環境下で培養を行った。殺藻あるいは著しい増殖阻害が確認されたウェルの培養から白金耳を用いて $\text{ST}10^{-1}$ 寒天培地に塗抹し、培養してコロニーを形成させた後に細菌を単離した。*A. tamarense* を用いたMPN法で、殺藻あるいは増殖阻害を示したウェルの培養を *A. tamarense* 培養に注ぎ、再び殺藻させるという過程を3回繰り返して集積培養を行い、その後白金耳を用いて寒天培地に塗抹して細菌を単離した。

以上の方法で細菌184株を単離し、上記3種の藻類に *Heterosigma akashiwo* (893株) を加えた4株を用いて二者培養に供した。その結果 *A. tamarense* に対する増殖阻害細菌46株を選出し、さらに阻害活性の高いものを選抜するためにスクリーニングを行った。*A. tamarense* を $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ の細胞密度で試験管に用意し、細菌を $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ の接種密度になるよう加え、一週間、蛍光光度計で蛍光値を測定し、増殖を経時的に調べた。また、細菌を簡便に同定するために16S rDNAの部分塩基配列の解析を行った。以上の結果 *A. tamarense* に対する増殖阻害細菌E8株、E9株、それらとほぼ同じ塩基配列

を示しながら阻害を示さなかった細菌 E5-1 株、E11 株、および *A. tamarensis* の運動性を阻害する細菌 A2-1 株の計 5 株を実験に用いることとした。

まず、増殖阻害細菌 E8 株、E9 株をそれぞれ 10^8 cells mL⁻¹ まで培養したものを、滅菌濾過海水を用いて 10^0 - 10^7 cells mL⁻¹ のオーダーになるよう段階希釈し、試験管に 3.6×10^3 cells mL⁻¹ の細胞密度で用意した *A. tamarensis* 培養に加え、蛍光光度計で蛍光値を測定し、増殖を経時的に調べた。測定の頻度は、はじめの 4 日間は毎日、8 日目まで 2 日ごと、それ以降は 3 日ごととした。次に、*A. tamarensis* を 3.0×10^4 cells mL⁻¹ の細胞密度で三角フラスコに用意し、E8 株、E9 株を接種密度 10^4 cells mL⁻¹ になるよう加え培養した。3 日後に細菌が 10^8 cells mL⁻¹ のオーダーまで増殖したことを確認した後に、孔径 0.1 μm シリンジフィルターでろ過し、濾液を 50%、80% の濃度に調整して、細胞密度 3.0×10^3 cells mL⁻¹ の *A. tamarensis* 培養に加え、蛍光光度計で蛍光値を測定し、増殖を経時的に調べた。最後に、上記の藻類 3 種 4 株に *Chattonella antiqua*, *Heterocapsa circularisquama* を加えた 6 株を、試験管に細胞密度 10^3 cells mL⁻¹ のオーダーで用意し、*A. tamarensis* に対して増殖阻害作用を示さない細菌および運動性を阻害する細菌を加えた 5 株を、それぞれ細菌接種密度 10^4 cells mL⁻¹ になるよう加え、蛍光光度計で蛍光値を測定し、増殖を経時的に調べた。

【結果及び考察】

DAPI 染色による細菌の直接計数の結果および培養可能性菌数の算出結果より、総細菌数では藻場で採集した海水 (1.2×10^6 cells mL⁻¹) よりも浜辺で採集した海水 (7.7×10^6 cells mL⁻¹) の方が多かったが、培養可能細菌数は浜辺 (3.6×10^2 cells mL⁻¹) よりも藻場で採集した海水 (8.0×10^3 cells mL⁻¹) の方が多かった。藻場は PAB (5.0×10^2 cells mL⁻¹) より FLB (8.0×10^4 cells mL⁻¹) の方が多く、浜辺は FLB (1.0×10^2 cells mL⁻¹) より PAB (3.6×10^2 cells mL⁻¹) の方が多かった。総細菌数ではアマモ (4.6×10^7 cells g wet leaf⁻¹) の方がチガイソ (2.7×10^7 cells g wet leaf⁻¹) よりもわずかに多かったが、培養可能細菌数ではアマモ (4.5×10^6 cells g wet leaf⁻¹) の方がチガイソ (1.8×10^5 cells g wet leaf⁻¹) よりも大きく上回った。藻類 3 種を用いたマイクロプレート MPN 法により、殺藻細菌数が最も高かったのは *H. akashiwo* (IWA 株) であり、次いで *F. japonica*, *A. tamarensis* という順の結果であった。*A. tamarensis* に対する増殖阻害細菌 46 株の DNA 解析の結果、Proteobacteria に属する細菌が 28 株、CFB に属する細菌が 18 株であった。スクリーニングにより選抜した強力な *A. tamarensis* 増殖阻害細菌 2 株に遺伝子の配列が最も近いと判断されたのは、α-Proteobacteria に属する *Ruegeria atlantica* (E8 株、E5-1 株共に相同性 99.36%)、および CFB group に属する *Flavobacterium* sp. 5N-3 (E9 株の相同性 96.56%、E11 株の相同性 96.74%)、運動性を阻害する株は CFB group に属する *Orabacterium aurantiaca* (相同性 93.32%) であった。細菌の接種密度による増殖阻害能の違いを実験した結果、どの細菌添加区においても強力な増殖阻害能が確認された。細菌の濾液を添加した実験の結果、増殖阻害が生じ、これらの細菌はどちらも増殖阻害物質を生産する間接攻撃型の細菌であることが分かった。しかし、時間の経過と共に増殖を示すようになったことから、増殖阻害物質は比較的不安定な物質と考えられる。また、蛍光光度計を用いた二者培養実験の結果、増殖阻害細菌 2 株は *A. tamarensis* を 36 日以内に 90% 以上殺滅するという著しく強い増殖阻害活性を示した。また、*H. circularisquama*, *C. antiqua*, *H. akashiwo* (IWA 株) に対しても増殖阻害作用を示した。

今後は、熱を加えた濾液が同様に増殖阻害作用を示すか否かの実験を行い、細菌の生成する増殖阻害物質が酵素か否かを判断する実験等を行い、増殖阻害過程に関する詳しい観察を実施する予定である。