アマモ場に生息する微生物による赤潮防除能の評価
（修士論文中間発表）

【背景】有害有毒藻類ブルーム（Harmful Algal Blooms: HAB）は養殖魚類や二枚貝の大量斃死を引き起こし，水産業に大きな影響を与えている。被害軽減の対策としては，養殖魚類の早期出荷や生け簀の移動，餌止め，粘土散布などが行われている。しかし，2009 年と 2010 年の有明・八代海域において発生した *Chattonella* 赤潮は，養殖ブリの大量斃死を引き起こし漁業者に大きな打撃を与えた。そのため、有効な赤潮の防除策が望まれている。近年では殺藻細菌が環境にやさしい生物学的防除法として注目されており，有害有毒藻類に有効な殺藻細菌がアマモの葉体に多く付着していることが見い出された。また，海水中の殺藻細菌は粒子付着性のものが多いことが報告されている。アマモ場は大量のデトライタス粒子を海水中へ供給しうることから，アマモ場の殺藻細菌の供給源としての赤潮防除能は大いに期待できる。本研究では，熊本県宮津湾のアマモ場において，①アマモ場の海水中，アマモ葉体上に付着する殺藻細菌の探索を行い，②アマモ場から得られた試料の現場の *Chattonella* 赤潮海水及び *Chattonella antiqua* 培養株に対する殺藻能の評価，③アマモ場から分離した殺藻細菌の性状評価を行い，アマモ場の有する赤潮防除能の総合的な評価を行うことを目的とした。

【材料及び方法】

①アマモ場に生息する殺藻細菌の探索

試料の採取は，熊本県上天草市の宮津湾に面した熊本県水産研究センターのアマモ場で行った。2010 年 5 月から 8 月に原則として毎月 1 回干潮時，熊本県水産研究センターの協力によって，アマモ葉体とアマモ場の表面海水を採取した。アマモ葉体は滅菌海水中で 500 回強振してバイオフィルムを剥離し，アマモ試料として実験に供した。

寒天平板法により，試料から増殖能を有する細菌の分離と計数を行った。アマモ試料を適宜希釈し，$ST10^{-1}$ 寒天培地へ塗抹，温度 25℃ にて 2 週間程度培養し，形成されたコロニーから細菌を分離した。海水試料については，適宜希釈した後に孔径 3.0 μm のフィルターを用いて濾過を行い，フィルター上の細菌を粒子付着性細菌（Particle associated bacteria: PAB），濾液中の細菌を浮遊性細菌（Free living bacteria: FLB）として，それぞれ同様に培養，分離を行った。また，形成されたコロニーの数から培養可能細菌数を算出した。なお，アマモ試料及び海水試料中の総細菌数の計数を，DAPI 染色と落射蛍光顕微鏡観察により行った。分離した細菌は二者培養試験により殺藻能を評価した。培養液中で良好に増殖している赤潮プランクトンをマイクロプレートのウェルに収容し，その中に細菌のコロニーを無菌的に少量掻きとって接種し 14 日間培養した。実験対象としてラフィド藻の *C. antiqua* と *Heterosigma akashiwo* ,及び渦鞭毛藻の *Cochlodinium polykrikoides* を用いた。培養は，光強度約 50 μmol photons m^{-2} s^{-1}，明暗周期 14h L: 10h D，*C. antiqua* 及び *H. akashiwo* は温度 20℃，*Co. polykrikoides* は温度 25℃ の条件で行い，0，1，2，4，7，10，14 日目に倒立顕微鏡を用いプレート中の藻類の生死を観察した。殺藻能が認められた細菌株数と実験に供した細菌株数を基に，各サンプル中の殺藻細菌数を算出した。

未濾過のアマモ試料と海水試料，孔径 1.0 μm のフィルターで濾過を行ったアマモ試料と海水試料についてそれぞれマイクロプレート MPN 法に供し試料中の殺藻細菌数を推定した。殺藻が確認されたウェルから細菌を分離し，二者培養試験による殺藻能の評価を行った。

②アマモ場から得られた試料の現場の *Chattonella* 赤潮海水及び *C. antiqua* 培養株に対する殺藻能の評価

＜現場赤潮海水に対するアマモ場試料の赤潮防除能＞

2010 年 7 月 28 日，*Chattonella* 赤潮が発生した八代海の 1 定点から赤潮海水試料を確保した。同日にアマモ場から採集した海水試料とアマモ試料について孔径 10.0 μm，1.0 μm，0.1 μm のフィルターで濾過を行い，未濾過区，10.0 μm 濾過区，1.0 μm 濾過区，　0.1 μm 濾過区（コントロール区）を設け，各々に赤潮海水試料を加えた。また，栄養塩欠乏の影響を除くために改変 SWM-3 培地を 1/ 10 強度で添加した。培養実験の 4 日目までは毎日，以降 2 日毎に *Chattonella* の細胞数を計数した。0，1，2，4，8，10 日目にサンプルを一部採取し，細菌及び従属栄養性微小鞭毛虫（HNF）の計数をそれぞれ DAPI 染色，DAPI-FITC 二重染色後に落射蛍光顕微鏡観察で行った。

＜*C. antiqua* 培養株に対するアマモ場試料の赤潮防除能の評価＞

2011 年 7 月 1 日及び 8 月 3 日，26 日にアマモ場からアマモと海水の試料を採集し，*C. antiqua* NIES-1 株と共培養試験を行った。7 月 1 日と 8 月 3 日の海水試料については，未濾過区，1.0 μm 濾過区，0.1 μm 濾過区（コントロール区）を設け，各々に *C. antiqua* NIES-1 株を 10^3 cells/ mL のオーダーになるよう収容した。1.0 μm 濾過区では藻類非添加区を設けた。さらに，改変 SWM-3 培地を 1/ 10 強度で添加し，10 日間程度培養した。8 月 3 日のアマモ試料

については滅菌海水にて 1/ 20 に希釈した後，海水試料と同様の試験区を設けた。8 月 26 日の試料は，海水試料について 1.0 μm 濾過区及び 0.1 μm 濾過区のみ設定して実験を行った。どちらの実験においても，原則 2 日に 1 回 *C. antiqua* 細胞数と細菌数を計数した。

③アマモ場から分離した殺藻細菌の性状評価

分離した細菌のうち，短期間で殺藻作用が起こった強力な株については，*C. antiqua* の殺藻に対する細菌の接種密度の影響を評価した。*C. antiqua* を培養した試験管に細菌を接種したのち，殺藻が確認された培養を 10^0～10^{-6} 倍に段階希釈し，*C. antiqua* を収容したマイクロプレートに 0.1 mL ずつ接種し，殺藻作用を確認した。殺藻が確認されたウェル数の組み合わせから MPN 値を見積もった。また，実験に用いた培養中の細菌数を DAPI 染色により直接計数し，その細菌数と MPN 値を比較した。さらに，殺藻様式を検討するため，殺藻が確認された培養を孔径 0.1 μm のフィルターで濾過を行い，同様にマイクロプレートへ接種し，殺藻作用を確認した。

【結果及び考察】

①アマモ場に生息する殺藻細菌

アマモ場海水には総細菌数で 10^5～10^6 のオーダー，培養可能細菌数で 1 mL あたり 10^3～10^5 のオーダー，アマモの葉体には葉体の湿重量 1 g あたり，総細菌数で 10^7～10^8 のオーダー，培養可能細菌数では 10^6～10^7 のオーダーの密度で細菌が検出された。海水試料中の殺藻細菌数は月毎にばらつきがあり，*H. akashiwo* に対する殺藻細菌は検出されなかったが，*C. antiqua* と *Co. polykrikoides* に関しては殺藻細菌が検出された。アマモの葉体表面については湿重量 1 g あたり 10^4～10^6 のオーダーの密度で殺藻細菌が存在すると見積もられた。

②アマモ場の赤潮防除能

＜現場赤潮海水に対するアマモ場の殺藻効果＞

実験開始時の *Chattonella* の細胞数は 800 cells/ mL であった。*Chattonella* の細胞数は 1 日目から急激に減少し，8 日目には検出限界以下となった。細菌数はこの減少に伴い 1 日目に増加し，その後減少した。HNF はどの処理区においても 2 日目に増加する傾向にあり，細菌の減少には従属栄養性微小鞭毛虫（HNF）などの細菌捕食者の影響が考えられた。なお，コントロール区において *Chattonella* の細胞数が減少したことから，赤潮海水中の殺藻細菌も細胞数の減少に関与していたと推察される。

＜*C. antiqia* 培養株に対するアマモ場の赤潮防除能＞

7 月 1 日の海水試料を用いた実験では，コントロール区（0.1 μm 濾過区）の *C. antiqua* 細胞数は 6 日目までに 3.0 x 10^3 cells/mL まで増加しその後減少した。未濾過区では 4 日目から *C. antiqua* 細胞数が減少し、10 日目までに検出限界以下となった。8 月 3 日の海水試料のコントロール区では，培養 12 日目まで *C. antiqua* 細胞数は増加し，1.6 x 10^4 cells/ mL に達した。一方で，他の試験区では 6 日目以降に *C. antiqua* 細胞数が減少した。このとき，細菌数は 2 日目にわずかに増加を示した。20 分の 1 に希釈したアマモ試料については，コントロール区はゆるやかに増殖し，8 日目から細胞数が減少した。他の試験区では 4 日目以降に *C. antiqua* 細胞数が減少した。アマモ試料については，アマモ由来の何らかの物質が *C. antiqua* の増殖に影響を与えた可能性が考えられる。8 月 26 日に採集したアマモ場海水試料については，コントロール区では培養 10 日目まで増加し，1.0 μm 濾過区では 7 日目以降 *C. antiqua* 細胞数の増加はみられなかった。細菌数は 2 日目に増加した。藻類非添加区では細菌数の増加はみられなかった。これより，アマモ場海水には *C. antiqua* に対する増殖抑制能をもっていることが示唆された。

③アマモ場から分離した殺藻細菌の性状評価

MPN 法により，著しい殺藻のみられたウェルから分離した細菌は培養 1 日目で殺藻作用を発揮し，細菌の接種密度が少ない場合も殺藻性は変わらなかった。殺藻は全てのウェルでおこり，MPN 値が算出できなかったが（> 2.4 x 10^7 MPN/ mL），海水中にありうる密度で接種しても殺藻が可能であることが示された。また，0.1 μm の濾液添加区においては殺藻が確認されなかったことから，これらの細菌が直接攻撃型の殺藻細菌であることが考えられた。

【まとめ及び今後の予定】

今回の実験結果によると，宮津湾のアマモ場の海水に *C. antiqua* に対する増殖抑制作用が認められた。また，強力な殺藻細菌が実際に分離されたことから，宮津湾のアマモ場は殺藻細菌の供給源として赤潮防除能を発揮できる可能性がある。今後は，2011 年度に新たに分離した細菌の殺藻試験と殺藻性状の評価を行う。また，アマモ場に生息する微小生物群に関する知見を得るため，海水中の植物プランクトン，HNF，繊毛虫などの計数を行う予定である。

黒田　麻美