

海水中とアマモ場における有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の殺藻細菌の分布と変動  
(修士論文中間発表)

【背景】

有害有毒藻類ブルーム(Harmful Algal Blooms: HABs)は世界各国の沿岸域で養殖や天然魚介類の斃死や毒化を引き起こし漁業や観光業などに悪影響を及ぼしている。養殖漁業における被害軽減対策としては、生け簀の移動や餌止め、早期出荷、粘土散布(特に韓国)などが行われている。しかし、2009年と2010年に有明海と八代海域で連続発生した大規模な *Chattonella* 赤潮は、養殖ブリの大量斃死により各々33億円と54億円という多大な漁業被害を引き起こしており、効果的な赤潮の防除策が緊要の課題となっている。近年、環境に優しい生物学的防除策として殺藻細菌の利用が有望であり、特にアマモの葉体上に高密度の殺藻細菌が付着している事が見出されアマモ場の保有する赤潮防除能が期待されている。本研究では基礎的な知見を得るため、熊本県宮津湾におけるアマモ場からアマモ試料と海水試料、鹿児島県の脇崎および脇崎沖で採水を行い、それぞれの試料から細菌を分離し、*Chattonella antiqua* に対する殺藻および増殖阻害細菌の動態把握を行った。

【材料及び方法】

2011年に熊本県大矢野島の宮津湾アマモ場からアマモ場試料(アマモ試料・アマモ海水試料)を毎月1回(5月-9月)干潮時、鹿児島県の St.1(脇崎 0m・10m・海底上 1m)、および St.10(脇崎沖 0m)では6月末から9月初旬にかけて採水を行い海水試料とした。アマモ葉体は滅菌した瓶に入れ滅菌海水中で500回強振し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。アマモの湿重量は強振後測定した。また、アマモ試料強振後の海水と未処理の海水試料をグルタルアルデヒド(終濃度1%)で固定し、DAPI染色による細菌の直接計数を落射蛍光顕微鏡で行った。

アマモ試料は適宜希釈後、ST10<sup>1</sup>寒天培地へ塗抹し、暗条件下で温度25°Cにて2週間培養して形成されたコロニーから細菌株を分離した。海水試料については、適宜希釈後に孔径3μmのメンブレインフィルターを用いて濾過し、フィルター上の細菌を粒子付着性細菌(PAB: Particle associated bacteria)、濾液中の細菌を浮遊性細菌(FLB: Free living bacteria)としてアマモ試料と同一条件下で培養、分離した。そして、形成されたコロニー数から培養可能細菌数を算出した。分離した細菌について赤潮ラフィド藻 *Chattonella antiqua* との二者培養試験を行い殺藻能を評価した。二者培養試験では改変 SWM-3培地で約10<sup>3</sup>cells/mLに希釈した *Chattonella antiqua* を48区画マイクロプレートに収容、数日間培養し良好に増殖している栄養細胞を確認後に、単離した細菌を滅菌つま楊枝で少量かきとり各ウェルに接種した。培養条件は光強度50μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、明暗周期14h L: 10h L、温度20°Cで、倒立顕微鏡にてアマモ場試料に関しては二週間(0, 1, 2, 4, 7, 10, 14日目)、海水試料は一週間(0, 1, 2, 4, 7日目)観察を行い、各サンプル中の殺藻細菌数と増殖阻害細菌数を算出した。分離した殺藻・増殖阻害細菌株全てについて16SrRNA部分塩基対配列解析による簡易同定を行った。

## 【結果及び考察】

2011年の調査期間中に八代海で *Chattonella* 赤潮の発生は確認されなかったが、クロロフィル *a* 量の変動に対応して殺藻細菌密度の変動が認められた。鹿児島県脇崎の St.1 の 0m と 10m 層において、クロロフィル *a* が最高値を示した 8 月 3 日には、殺藻細菌密度も同様に最高値を示した ( $10^4$  CFU/ mL, 培養可能細菌数の 20%)。St.1 の B-1m 層では、主に増殖阻害細菌が調査期間中継続的に検出された。沖合の St.10 の 0m に関しては、常に低濃度 ( $< 3 \mu\text{g/L}$ ) でクロロフィル *a* が変動し、8 月 10 日に比較的高い密度の増殖阻害細菌が検出されたものの殺藻細菌についてはほとんど検出されなかった。このような結果は、殺藻細菌が植物プランクトンを殺藻し自身が増殖するために有機物栄養源として利用している事を示唆している。

沿岸の St.1 (0m・10m・海底上 1m)、および沖合の St.10 (0m)からは  $\gamma$ プロテオバクテリアに属する *Alteromonas* 属, *Pseudoalteromonas* 属, *Vibrio* 属と  $\alpha$ プロテオバクテリアに属する *Shimia* 属が殺藻細菌として検出された。特に表層では殺藻細菌相が他の層や定点と比べ多様性が高い事から、より多様な餌生物 (植物プランクトン) の存在が、殺藻細菌の多様性に影響しているのではないかと考えられる。

アマモ場においては、非常に高密度の *C. antiqua* に対する殺藻細菌と増殖阻害細菌がアマモ葉体上から検出され ( $10^6$ - $10^7$  CFU/g wet leaf)、アマモ場海水からは調査期間中継続的に殺藻・増殖阻害細菌が検出された ( $10^3$ - $10^4$  CFU/ mL)。さらに、16SrRNA 解析による簡易同定結果から、アマモ葉体上から検出された殺藻細菌は *Alteromonas* 属と *Vibrio* 属と判明した。アマモ場海水から検出された殺藻細菌の 67%が同様に *Vibrio* 属であり、同時に粒子付着性細菌(Particle associated bacteria:PAB)として検出された事から、アマモ葉体上に形成されるバイオフィルム中の細菌群集がアマモ場海水中の殺藻細菌の供給源である事を示唆している。

## 【まとめと今後の予定】

今回の研究結果から、殺藻細菌は常に低密度で海水中に生息し、植物プランクトンを殺藻し有機物栄養源として利用し増殖している事が示唆された。また非常に高密度な殺藻・増殖阻害細菌がアマモ葉体から検出され、さらにアマモ場海水中には赤潮が発生していない状態で常に *Chattonella antiqua* に対する殺藻・増殖阻害細菌が確認された事から、アマモ場が殺藻細菌の供給源として有害赤潮の防除能を潜在的に保有している事が示された。今後は、2011年に分離した殺藻・増殖阻害細菌の殺藻性状の評価ならびに、2012年にワシントン州 Puget Sound のアマモ場から分離した細菌の殺藻試験を進めていく予定である。

稲葉 信晴