

藻場における有害有毒藻類に対する殺藻細菌及び増殖阻害細菌の生態に関する研究
(修士論文中間発表)

【研究背景】

有害有毒藻類ブルームは魚介類の大量斃死や有用二枚貝類の毒化などを引き起こし、深刻な漁業被害を及ぼしている。北海道の沿岸でも、噴火湾やオホーツク海などでほぼ毎年貝毒が発生している。これまで特に赤潮の防除対策として、海面回収、超音波、粘土散布など様々な物理化学的な方法が試みられてきたが、実用的な対策がないのが現状である。近年、アナアオサやマクサなどの大型海藻表面に赤潮生物を殺滅する殺藻細菌が高密度に存在することが報告されており、藻場あるいは海藻が赤潮の防除法として機能する可能性がある。本研究は、北海道沿岸の藻場において有害有毒藻類に対して殺藻細菌の動態調査、及び様々な海藻種における殺藻細菌の探索を行い、藻場における殺藻細菌の生理生態を調査することを目的とした。

【材料と方法】

<藻場における殺藻細菌の動態調査>

試料の採集は、2011年5~9月の期間月1回干潮時に北海道函館市の志海苔海岸において行い、藻場の海水及び海藻4種(褐藻2種、紅藻1種、緑藻1種)を採集した。海藻は500 mL滅菌容器に入れ、濾過滅菌海水を加え500回強振して海藻表面に付着する細菌を剥離し、試料とした。強振後に海藻の湿重量を測定した。未濾過の海水試料と海藻試料をグルタルアルデヒドで固定し(終濃度1%)、DAPI染色後、落射蛍光顕微鏡を用いて細菌の直接計数を行った。植物プランクトンを計数するために、海水試料をグルタルアルデヒドで固定し(終濃度1%)、倒立顕微鏡を用い計数した。

志海苔海岸の試料を用いて、寒天平板法と二者培養試験により殺藻細菌のモニタリングを行った。海水試料は滅菌濾過海水にて段階希釈後に孔径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、ST10⁻¹寒天培地上にて二週間培養後、コロニー数を計数して生菌数とし、分離して二者培養実験に用いた。二者培養試験により、殺藻能の有無を確認した。5月と8月に分離した細菌に対しては、対象藻類を渦鞭毛藻の*Alexandrium tamarense*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Heterocapsa circularisquama*, ラフィド藻の*Chattonella antiqua*, *Heterosigma akashiwo*, 珪藻の*Ditylum brightwellii*の計6種とし、それら以外の月では、*A. tamarense*, *H. akashiwo*及び*D. brightwellii*の計3種とした。48もしくは24ウェルマイクロプレートの各ウェルへ良好に増殖している藻類培養を入れ、細菌のコロニーを少量接種して14日間培養し、2, 4, 6, 8, 10, 14日目に倒立顕微鏡を用いて殺藻の有無を確認した。用いた藻類の培養には、改変SWM-3培地を用い、条件は明暗周期14hL: 10hD, 光強度: 50~100 μmol photons m⁻² s⁻¹, 培養温度は*A. tamarense*については15°C, *Co. polykrikoides*については25°C, その他の藻類は20°Cとした。

<様々な海藻種における殺藻細菌の探索>

試料の採集は、2012年8月30日の干潮時に北海道室蘭市電信浜にて行った。電信浜では、藻場の海水、及び海藻14種(褐藻4種、紅藻7種、緑藻3種)、単子葉植物1種を採集した。褐藻のマコンブについて葉体の状態が異なる部位における殺藻細菌の存在量の相違を調べるために、古い葉体部と若い葉体部の二つの部位を採取した。海水試料及び海藻試料の処理は志海苔海岸の試料と同様に行い、生菌数の計数と同時に細菌を分離した。これらの分離した細菌を用いて二者培養試験を行い、殺藻能の有無を確認した。対象藻類は*A. tamarense*とした。

<殺藻細菌及び増殖阻害細菌の性状評価>

志海苔海岸より分離した殺藻細菌及び増殖阻害細菌について攻撃様式を調べるために TC インサート試験を行った。これらの細菌のうち、特に *A. tamarense* に対して殺藻性の強い細菌 2 株を確認し選抜した。5 mL チップと孔径 0.2 μm ポリカーボネイトフィルターを用いて TC インサートを自作した。24 ウェルマイクロプレートへ TC インサートを静置し、Inner well と Outer well へ藻類培養を分注後、Inner well へ滅菌爪楊枝を用いて細菌を接種し、二週間培養を行った。培養後、Outer well の藻類培養を DAPI 染色法による直接顕鏡観察及び ST10⁻¹ 寒天培地への塗沫を行うことにより、Outer well の実験区に細菌が混入していないことを確認した。

【結果及び考察】

<藻場における殺藻細菌及び増殖阻害細菌の動態>

直接計数及び培養可能細菌数の算出結果より、志海苔海岸では、藻場海水には総細菌数は $10^5 \sim 10^6$ cells mL⁻¹、培養可能細菌数は $10^3 \sim 10^4$ cells mL⁻¹ の密度で検出された。海藻付着細菌においては、総細菌数は $10^7 \sim 10^8$ cells g wet leaf⁻¹、培養可能細菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU g wet leaf⁻¹ で検出された。志海苔海岸における海水中の植物プランクトンは、5 月に 4.0×10^5 cells L⁻¹ で最大となり、6 月以降は 10^4 cells L⁻¹ のオーダーであった。二者培養試験の結果によると、*A. tamarense*、*H. akashiwo*、*D. brightwellii* に関しては、藻場海水試料では 7、8 月の夏季に殺藻細菌及び増殖阻害細菌が多く ($10^2 \sim 10^3$ CFU mL⁻¹)、海藻試料では同時期に最も多くの海藻種数で検出された (5 月、6 月海藻 1 種; 7 月、8 月 3 種; 9 月 2 種)。 *Co. polykrikoides*、*H. circularisquama*、*Ch. antiqua* に関しては、8 月にウミトラノオと海水試料から殺藻細菌が検出された。これらの結果から、藻場における殺藻細菌及び増殖阻害細菌は夏季に多く存在することが分かった。海藻表面に存在する殺藻細菌及び増殖阻害細菌は $10^4 \sim 10^6$ CFU g wet leaf⁻¹ であった。

<様々な海藻種における殺藻細菌の探索>

室蘭市電信浜においては、海水中の総細菌数は 4.1×10^6 cells mL⁻¹、培養可能細菌数は 4.6×10^4 CFU mL⁻¹ であった。海藻付着細菌をみると、総細菌数は $10^7 \sim 10^8$ cells g wet leaf⁻¹、培養可能細菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU g wet leaf⁻¹ で検出された。植物プランクトンの総細胞数は 7871 cells L⁻¹ であり、全体の 61.2% が付着性の羽状目珪藻であった。二者培養試験の結果、*A. tamarense* に対する増殖阻害細菌が粒子付着性画分で 5.4×10^2 CFU mL⁻¹ で検出されたが、浮遊性画分では検出されなかった。海藻表面からは、褐藻のマコンブにおいて腐食の認められる古い葉体部の表面から増殖阻害細菌が 1.3×10^6 CFU g wet leaf⁻¹ で検出されたのに対し、若い葉体部からは増殖阻害細菌は検出されなかった。その他では、紅藻のイボノリで 5.3×10^5 CFU g wet leaf⁻¹、単子葉植物のスガモで 7.5×10^5 CFU g wet leaf⁻¹ で検出された。

<殺藻細菌の性状評価>

A. tamarense に対する殺藻細菌の攻撃型は、Inner well の細胞のみが殺藻されたことから今回分離し検討されたものは直接攻撃型であると判明した。

【今後の予定】

室蘭より分離した細菌の二者培養試験について、*H. akashiwo*、*Ch. antiqua*、*D. brightwellii* の計 3 種の藻類に対して行う。また、志海苔海岸より検出した殺藻細菌及び増殖阻害細菌と、電信浜より分離した藻場の細菌を同定するために 16S rDNA の塩基配列の解析を行う予定である。TC インサート試験を行い、志海苔海岸より検出した殺藻細菌及び増殖阻害細菌の攻撃型を確認する。