

Notice on Plankton Seminar

#13003

9:30-13:00, 13 May (Mon.) 2013 at Room N602

\*\*\*\*\*

Lee, B., T. Katano, S. Kitamura, M. Oh and M. Han (2008)

Monitoring of Algicidal Bacteria, *Alteromonas* sp. Strain A14 in its Application to Natural *Cochlodinium polykrikoides* Blooming Seawater Using Fluorescence *In Situ* Hybridization

*J. Microbiol.* Vol. 46: 274-282.

*Cochlodinium polykrikoides* ブルーム海水における殺藻細菌 *Alteromonas* sp. A14株の FISH 法による  
検出

有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* は韓国南部の沿岸域において1995年以降ほぼ毎年のように発生しており、1995年には *C. polykrikoides* による漁業被害額は6000万 USD を記録した。この種による漁業被害は主に東アジアの温帯域や中央アメリカの亜熱帯域で発生が報告されてきたが近年世界中に広がりつつあるため、有害有毒藻類ブルーム (HAB) の防除法の確立は喫緊の課題である。近年殺藻細菌を用いた生物学的防除法が注目を集めており、世界中の沿岸域から様々な殺藻細菌が分離され、それらの殺藻範囲や殺藻様式、殺藻活性といった面から研究が進んでいる。一方で、殺藻細菌の効力を無効化する海洋細菌などの報告もあるため、本研究では実際に殺藻細菌 A14株を赤潮状態の天然海水に添加し、どのような挙動を示すか FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法を用いてモニタリングを行った。

実験に使用した藻類は f/2培地で温度20C°、光強度50 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/sec、明暗周期12:12h で維持培養した。実験に使用した *Alteromonas* sp. A14株は韓国麗水の海底泥から、*Alteromonas* sp. A18株と *Glaciecola* sp. G20株は馬山湾の海水から *Heterosigma akashiwo* を宿主生物として分離し、*Alteromonas* sp. JC2043株はソウル国立大学から譲り受け、10%Zobel 培地を用い温度20 C° で維持培養した。A14株については殺藻範囲、*C. polykrikoides* に対する殺藻活性を三段階の密度で調査した。本研究では、16S rRNA 遺伝子解析によって A14株と A18株、G20株の同定を行い、A14株の rRNA の塩基配列に特異的な蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブ (ALTERO14) を設計し、更に HRP (Horse Radish Peroxidase) の酵素反応を利用し蛍光色素を活性化させたプローブを用いた TSA-FISH 法を細菌計数に適用した。採取した *C. polykrikoides* ブルーム海水は栄養塩を強化し六本のフラスコに分注後、10<sup>6</sup> cells/ mL の A14株を添加し温度25 C°、光強度約40 – 80 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/sec、明暗周期12:12h で振とう機 (35 rpm) 上で6日間培養した。フラスコ内のクロロフィル *a*、植物プランクトン細胞数及び細菌数は毎日測定し、鞭毛藻は0,2,5日目に計数した。A14株は TSA-FISH 法により蛍光顕微鏡で毎日計数を行った。

A14株は渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea*, *C. polykrikoides*, *Gymnodinium catenatum*, *Heterocapsa triquetra* に対して殺藻能を示したが、*Prorocentrum minimum* に関しては増殖を促進し、*Prorocentrum micans* と珪藻 *Nitzschia* sp.と *Skeletonema costatum* は殺藻しなかった。殺藻活性は細胞密度10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cells/mL で確認された。A14株を添加した *C. polykrikoides* ブルーム海水中では4日以内に *C. polykrikoides* の細胞密度が1830cells/ mL から700cells/ mL に減少が確認され、その減少は A14株の添加によるものであると多重比較検定によって示された。A14株添加区のクロロフィル *a* 濃度は1日目は増加したものの、その後減少し、4日目から再び増加した。総細菌数は4.6 $\times$ 10<sup>6</sup> – 1.4 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/ mL の間で変動し、A14株の細胞密度は約9.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ mL (0日目) から1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ mL (2日目) に増加したが、その後減少し5日目には3.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ mL の密度で検出された。鞭毛藻の細胞密度は2日目に最高値 (2.34 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ mL) を示したが、その後減少した。

本研究は天然海水に殺藻細菌 (A14株) を添加し、植物プランクトン群集構造の遷移、殺藻細菌 (A14株) の動態把握を目的として行い、細菌の殺藻範囲が海水中での植物プランクトンの遷移に大きな影響を及ぼす事が示唆された。A14株細胞数は添加後 *C. polykrikoides* 細胞数の減少と同時に増加したが、その後減少した。これはおそらく鞭毛藻による捕食が原因であると考えられる。このように天然海水に添加した殺藻細菌がどのような挙動を示すかを評価する事は殺藻細菌を有害有毒藻類ブルームのバイオコントロールとして利用するためには必要不可欠な知見であり、FISH 法の有効性が示された。