

*Shewanella* sp. IRI-160 株が生産する滲出殺藻物質が渦鞭毛藻に及ぼす影響

有害有毒藻類ブルームは二枚貝の毒化や養殖魚介類の大量斃死を引き起こし、巨額の漁業被害を与えるため、防除対策の構築が課題となっている。そこで、有害有毒藻類ブルームの発生予防法や被害軽減策として、殺藻細菌を用いた生物学的防除が注目されている。細菌*Shewanella* sp. IRI-160 株は有害渦鞭毛藻の成長を抑制することが報告されたが、具体的な殺藻範囲や殺藻様式などの詳細は解明されていない。本研究では米国のデラウェア湾のインディアン川入り江から単離した殺藻細菌IRI-160 株の殺藻作用を検証した。

実験に用いた 11 種類の藻類は、温度 18°C または 25°C、光強度 185  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12hL: 12hD の条件下で培養した。細菌 IRI-160 株は LM プレートで培養し、形成したコロニーを 100 mL の LM 培地に接種し、一晚旋回培養 (25°C、100 rpm) を行った。その上澄みを遠心分離 (2760 x g, 5 分) で回収し、再び細胞懸濁液を遠心分離 (3975 x g, 10 分) し、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のステリフリップフィルターユニットで濾過して濾液を回収した。さらに、殺藻において藻類への直接的な接触が不可欠であるか否かを検証するために以下の実験を行った。まず、細菌 IRI-160 株を 40 mL の F/2 培地で培養した。細菌培養 20 mL を渦鞭毛藻 *Karlodinium veneficum* 培養に加え、残り半分を 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過して濾液を *K. veneficum* 培養に加えた。本研究では、藻類の細胞密度は蛍光光度計を用いてクロロフィル *a* の蛍光値を測定して調べた。また、細菌の生成した化合物 IRI-160AA の熱安定性と長期安定性を検討するため、化合物 IRI-160AA を 1) 沸騰した水に 20 分間浸ける、2) -80°C で 24 時間保存する、3) 121°C で 20 分間オートクレーブにかける 3 つの処理を行った。実験時には室温に戻し、1/10 濃度で加えて作用を検討した。長期保存の影響を調べるため、濾液はそれぞれ -80°C、4°C、25°C で 21 日間保存し、*K. veneficum* 培養に添加して殺藻の様子を観察した。殺藻化合物の特徴を調べる実験では、化合物 IRI-160AA の濾液を 3 mL の 固相抽出カートリッジのセップパック tC-18 を通して溶出液を集め、濾液をカートリッジに入れた後、メタノール水の濃度を 0% から 100% まで 20% ずつ増加させ、12 mL の蒸留水で洗浄し、減圧によって濃縮した。各展開溶媒は LC-MS (液体クロマトグラフィーの質量分析) によって分析した。他種藻類に対する殺藻能を評価する実験では、無殻渦鞭毛藻類 (*K. veneficum*, *Karenia brevis*, *Gyrodinium instriatum*, *Cochlodinium polykricoides*, *Heterocapsa triquetra*)、有殻渦鞭毛藻類 (*Prorocentrum minimum*, *Alexandrium tamarense*, *Oxyrrhis marina*)、同様に緑藻の *Dunaliella tertiolecta*、クリプト藻の *Rhodomonas*.sp、珪藻の *Thalassiosira pseudonana* の培養に化合物 IRI-160AA を加えた。化合物 IRI-160AA を *A. tamarense* と *C. polykricoides* 培養に最終容量が 15% になるように加え、それ以外のすべての種には 10% になるように加えた。藻類細胞数は、光学顕微鏡と血球計算板を使って計数した。異なる増殖ステージの渦鞭毛藻に対する殺藻作用を検証する実験では、*K. veneficum* と *G. instriatum* 培養を初期細胞密度でそれぞれ  $1.52 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 、 $8.90 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$  で 240 mL の F/2 培地に準備した。対数増殖期の初期、中期、末期及び定常期に一部を取り出し、試験管に入れて細菌を 1/10 濃度で加え、藻類の増殖をモニターして評価した。

濾液 IRI-160AA の添加により 24 時間後に *K. veneficum* の細胞密度はコントロールに比べ 39% にまで減少し、4 日目で 6% となり、細菌 IRI-160 株の細胞懸濁液の添加により 24 時間後に藻類細胞密度は 23% にまで減少し、4 日目で 3.5% となった。また、化合物 IRI-160AA を含む濾液は -80°C から 121°C の温度処理でも活性は安定し、室温で保管した場合少なくとも 3 週間活性が保持された。IRI-160AA の濾液がカラムを通過した後に残った各メタノール画分は *K. veneficum* の細胞に作用を示さなかったが、通過した水画分は接種後 48 時間後に 83% の高い殺藻効果をもたらした。また、化合物 IRI-160AA の濾液は実験に用いたすべての渦鞭毛藻の増殖を妨げた。殺藻作用は無殻渦鞭毛藻への影響と比べると有殻渦鞭毛藻の方が作用は小さく、緑藻、クリプト藻には殺藻作用を示さず、珪藻にはわずかに促進作用をもたらした。化合物 IRI-160AA の作用が定常期に比べて対数増殖期の藻類培養に加えた時の方が強い効果を示したことで、早期の増殖ステージに効果的であることを明らかにした。これらの結果から、このような殺藻物質の利用は将来的に有害有毒藻類ブルームの制御における潜在的な防除処置の応用や早期のブルームの防除に有効である可能性が考えられる。

横路 直哉

\*\*\*\*\*

次回のゼミ (6 月 17 日 [月] 9:30~、N602 にて) は、萩原くん、今井 (佑) さん、小島くんをお願いしています。