

Chen, H., L. Fu, L. Luo and J. Lu, W. L. White and Z. Hu (2012)
Induction and Resuscitation of the Viable but Nonculturable State in a Cyanobacteria-Lysing
Bacterium Isolated from Cyanobacterial Bloom
Microb Ecol. **63**: 64–73.

藍藻ブルームから分離された溶藻細菌における
培養できない (VBNC) 状態への誘導及び VBNC からの蘇生の検討

近年、藍藻ブルームにおいて、溶藻細菌の変動は藍藻の細胞密度と密接に関係することが示唆された。溶藻細菌の細胞密度がブルーム消滅期間において迅速且つ大幅に変動する要因は未知である。これは休眠状態と活動状態の移行による現象と推測され、本研究では溶藻細菌の VBNC 状態への移行及び溶藻活性の関係を調べることが目的とした。

夏季に藍藻ブルームが頻繁に発生する深圳大学の浅い温山湖 (水深 1.5m) において、消滅期の藍藻ブルーム湖水から Liquid infection 法により溶藻細菌の分離を行い、3 株 (F1、F2、F3) を得た。分離された溶藻細菌の溶藻メカニズムを解明するため、以下の実験を行った。5 mL の LB 液体培地で対数増殖期 (10^8 CFU mL⁻¹) に達した各々の溶藻細菌の培養について、何も処理しない細菌培養、オートクレーブ処理した細菌培養、0.22 µm シリンジフィルタで濾過した細菌培養の濾液、及び細菌培養を遠心分離 (8228×g, 4min) で集菌後に脱イオン蒸留水 (DDW) で洗浄した細菌細胞の懸濁液を調製した。これらの 45 mL の無菌 *Microcystis aeruginosa* 905 培養に添加し、何も加えない無菌 *M. aeruginosa* 905 培養をコントロールとして、計 5 実験区を設定した。温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光強度 $20.3\text{--}27.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 14L : 10D の条件下で 1 週間培養を行った。各実験区から 24 時間毎に 1 mL 培養を採取し、*Chl. a* 濃度の変化により溶藻活性を評価した。また、溶藻細菌の VBNC 状態への移行及び溶藻活性を検討するため、分離された溶藻細菌の 1 株 (F1) を用いてさらに 3 つの実験を行った。まず、溶藻細菌を VBNC 状態に誘導させる要因を調べるため、対数増殖期の溶藻細菌を最終密度が $10^6\text{--}10^7$ CFU mL⁻¹ になるように滅菌 DDW、滅菌温山湖水、滅菌 NaCl 溶液 (濃度 1%、3%、5%)、及び無菌マイクロキスチン (MC-LR) 溶液 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g L}^{-1}$) に添加した。温度 4°C で、MC-LR 溶液区は 3 日間培養を行い、細菌数を 12h 毎に計数した。他の実験区では 24 日間培養し、細菌数は 3 日毎に計数した。生きている総細菌数は LIVE/DEAD backlight bacterial kit 法、培養可能細菌数は寒天平板法により計数し、VBNC 細菌の割合を算出した。次に、溶藻細菌の VBNC 状態からの復帰能力を検討するため、VBNC 状態に誘導した溶藻細菌を、45 mL の対数増殖期の *M. aeruginosa* 905 株の培養、細菌密度：藻類細胞密度 = 40 : 1 になるように添加、45 mL BG-11 培地及び 45 mL DDW に添加して、 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ で 3 日間培養した。毎日各実験区の総細菌数及び培養可能細菌数を計数し、VBNC 細菌の割合を計算した。3 つ目の実験では、VBNC 細菌及び培養可能細菌をそれぞれ *M. aeruginosa* 905 の培養、細菌密度：藻類細胞密度 = 40 : 1 になるように添加し、細菌無添加区をコントロール区とした。温度 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光強度 $20.3\text{--}27.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 14L : 10D の条件下で 12 日培養した。培養可能細菌については、対数増殖期の細菌培養を遠心分離で集菌し、VBNC 細菌は 4°C DDW で 6 日間培養により誘導させて得た。各実験区の溶藻活性及び VBNC 細菌の割合をモニターリングした。

湖水から分離された 3 株の溶藻細菌 F1、F2、F3 株は形態学、生理学及び生化学的特徴、並びに 16S rDNA 分析により、それぞれ *Staphylococcus* sp.、*Stappia* sp. 及び *Microbacterium* sp. と同定された。また、3 株の溶藻細菌のオートクレーブ処理した細菌培養添加区及び細菌培養濾液添加区は、遠心分離で集菌された菌体添加区より強い溶藻効果を示すことから、3 株の溶藻細菌は熱耐性のある溶藻物質により溶藻することが分かった。また、内在孢子を持たず溶藻効果が強い細菌 F1 株を用いて、溶藻細菌の VBNC 状態への移行及び溶藻活性を検討した。低温の 4°C 、DDW の条件下では、6 日でほぼ 100% の F1 株は VBNC 状態に誘導されたが、NaCl 溶液及び湖水は 18 日間が必要であった。MC-LR 溶液は最も効果が強く、最小濃度 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) の溶液でも 24 時間内で 69% の F1 株細胞を VBNC 状態に誘導させた。しかし、本研究では MC-LR の投与量と VBNC に誘導された細菌数との線形相関が見られなかったことから、*M. aeruginosa* 905 の抽出物質により調製した MC-LR 溶液の中には、藍藻細胞からの他の化学物質が混在し、F1 株を VBNC 状態に誘導させた可能性が考えられる。VBNC 細菌の復帰に関しては、全ての実験区では復帰が認められ、培養温度の上昇が原因と考えられた。一方、*M. aeruginosa* 905 培養区だけに細菌 F1 株の著しい増殖が観察された。溶藻活性に関しては、VBNC 細菌添加区の溶藻効果は培養可能細菌添加区より弱かったが、総細菌数は培養可能細菌添加区より有意に高かった。*M. aeruginosa* 905 と共培養を始めた 3 日目から 9 日目まで、培養可能細菌の割合は 40 % 前後で安定し、この値は富栄養化した太湖の湖水中の培養可能細菌の割合 (28%~34%) と似ていることが分かった。

以上の結果により、自然環境中で溶藻細菌の一部は VBNC 状態に陥っており、藍藻と溶藻細菌の間には平衡が保たれている。VBNC 細菌を活性のある状態へと復帰させる環境要因 (温度、栄養塩濃度、塩分濃度及び UV 強度など) は、溶藻活性をもたらしことにより藍藻ブルームの消滅を引き起こすというプロセスが提案できる。また、藍藻が生産した MC-LR や藍藻からの他の化学物質も、上述したようなプロセスでブルーム崩壊の役割を果たすことも示唆される。今後、藍藻ブルームの抑制に対して他の溶藻細菌でも同様の現象が存在しているのかを検討する必要がある。

王 賢娉

今回のゼミ (7月8日 [月]9:30~、N602にて) は、宮下くん、阿部くん、横路くんをお願いしています。