

Liu, J., A. J. Lewitus, J. W. Kempton and S. B. Wilde (2008)
The association of algicidal bacteria and raphidophyte blooms in South Carolina brackish detention ponds
Harmful Algae 7: 184-193.

サウスカロライナの汽水遊水池における殺藻細菌とラフィド藻ブルームの関連性

近年、ラフィド藻ブルームは世界中の温帯域や沿岸域の至る所で発生し、養殖魚介類の大量斃死が問題となっている。そのため、殺藻細菌を用いた環境にやさしい生物学的手法が注目されている。10年以上前に、サウスカロライナで魚介類の斃死を引き起こす4種のラフィド藻 (*Heterosigma akashiwo*、*Chattonella subsalsa*、*Chattonella cf. verruculosa*、*Fibrocapsa japonica*) によるブルームが、雨水によって形成される遊水池で記録された。そこで本研究では、2002年から2004年にかけて、サウスカロライナの汽水遊水池3地点 (K1、K2、K75) にてMPN法を用いて3種類のラフィド藻 (*H. akashiwo*、*C. subsalsa*、*F. japonica*) に対する殺藻細菌の密度の変動を調べ、遺伝子解析による殺藻細菌の種同定及び殺藻細菌のラフィド藻に対する殺藻作用の検証を行った。

実験に用いた10株のラフィド藻は、塩分20、温度25°C、光強度70-80 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期12hL:12hDの条件下で、f/2-Si培地で繰り返し洗浄後、培地1 mLと改変抗生物質AM9混合物1 mLを混合して培養し、無菌培養を得た。藻類培養1-2 mLを孔径0.2 μm のフィルターで濾過し、グルタルアルデヒドで固定し(終濃度2%)DAPI染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて細菌の混入チェックを行った。植物プランクトンは光学顕微鏡を用いて種同定を行い、藻類はルゴール液で固定して計数した。MPN法には*H. akashiwo*、*C. subsalsa*、*F. japonica*の3種を用い、それぞれ 1×10^4 cells mL⁻¹、 $4-5 \times 10^3$ cells mL⁻¹、 $5-6 \times 10^3$ cells mL⁻¹に希釈した後、藻類培養1 mLを24ウェルマイクロプレートに接種した。その後、段階希釈した現場の水サンプル1 mLを各ウェルに添加し、1-2週間培養後、90%以上の殺藻が確認されたウェルを陽性として判断し、陽性のウェルから殺藻細菌195株を単離した。各藻類を殺藻した細菌をそれぞれH-、C-、F-killerとして単離し、NB培地で1週間、25°Cで培養後、液体NB培地に接種し、攪拌機(200 rpm)で12時間、25°Cで培養した。また、細菌の種同定を行うために16S rDNAの部分塩基配列の解析を行った。さらに、殺藻細菌の藻類に対する攻撃型を検証するために、10種類の藻類培養1 mLを24ウェルマイクロプレートに加え、80 μL の細菌培養または濾液を接種し2週間観察を行った。

細菌培養と濾液はどちらも殺藻作用を示したため、間接攻撃型であると考えられた。ラフィド藻と殺藻細菌の計数結果により、K1地点では2004年に最大 1×10^4 cells mL⁻¹の*F. japonica*ブルームが形成され、F-killer密度はブルーム形成前後で3.1 cells mL⁻¹から112 cells mL⁻¹に増加した。K2地点では2002年に*C. subsalsa*と*F. japonica*の混合ブルームが発生した。C-killer密度は*C. subsalsa*ブルーム発生と同時に103 cells mL⁻¹まで増加したが、対照的にF-killerは密度が減少した後に*F. japonica*ブルームが発生した。K2地点では2004年に魚介類が死亡するほどの*F. japonica*ブルームが発生した時(最大 4.1×10^4 cells mL⁻¹)、F-killer密度は3.1 cells mL⁻¹から220 cells mL⁻¹に増加した。K75地点では2002年8月上旬に*C. subsalsa*密度の減少に伴いC-killer密度は減少し、9月上旬には両者が共に増加した。細菌密度は1回目のブルームに比べて2回目のブルームの減少時に相対的に高い水準を維持した。単離した細菌195株のうち48株は死滅し、残りの147株の16S rDNAの部分塩基配列の解析を行った結果、*Cellulophaga* spp.のKMC0102株、*Bacillus* spp.のKMC0215株、*Pseudoalteromonas* spp.のKMC0223株、*Pseudoalteromonas* spp.のKMC0235株、*Flavobacterium* spp.のKMC0241株、*Vibrio* spp.のKMC7541株であることが判明し、残りの141株の解析は現在進行中である。殺藻細菌は主に γ -ProteobacteriaとCFBグループに属しており、その他はグラム陽性の*Bacillus/Clostridium*属に分類される。KMC0215株はグラム陽性細菌であり、水柱より堆積物からの報告が多いことが知られている。KMC0102株は*F. japonica*と*H. akashiwo*を殺藻、KMC0215株は*F. japonica*と*C. subsalsa*と、*H. akashiwo*の5-6種を殺藻、KMC0223株は、*C. subsalsa*を、KMC0235株とKMC0241株は*F. japonica*種のみ殺藻、KMC7541株は試験したすべてのラフィド藻類を殺藻した。

殺藻細菌と他の微生物がラフィド藻に及ぼす影響は、遊水池の栄養塩の枯渇よりもブルームの終結の重要な要因であり、トップダウン制御メカニズムになると考えられる。

横路直哉

今回のゼミ(7月22日[月]9:30~、N602にて)は、戸田くん、今井さん、小島くんをお願いしています。