

赤潮発生現場海水内の殺藻細菌を用いた赤潮防除に関する研究 (仮題)  
(卒業論文中間発表)

【背景と目的】

有害有毒藻類ブルーム (Harmful Algal Bloom: HAB) により、魚介類の毒化や大量斃死などが起こり、漁業に深刻な被害が生じている。現行の対策として、養殖魚類の早期出荷や生簀の移動、餌止め等が行われているが、これらは一時的で受動的な回避策であり、赤潮の防除には至っていないため防除策の開発が望まれている。そこで、環境に優しい防除策として生物学的防除策、中でも殺藻細菌を用いた手法が期待されている。しかしながら、赤潮発生現場海域における殺藻細菌の動態はラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* を除いて殆ど研究はなく、不明な点が多い。そこで本研究では、赤潮が実際に発生している現場海水中のHAB原因藻 *Karenia mikimotoi* と、その殺藻細菌および増殖阻害細菌について、動態を把握することを目的として、現場の赤潮海水を培養し *K. mikimotoi* とこれらの細菌の経時的変動を追究した。また、赤潮海水へ人工デトライタスを添加することにより殺藻細菌が付着細菌として生活できる場を多く提供し、潜在的な殺藻細菌の活性を誘導する試みを行った。

【材料と方法】

2014年8月7日に大分県豊後高田市の高田港の表層0 m から海水を採水し、翌日にはクール便で研究室に届けられた。採水した海水試料は栄養塩、珪藻増殖阻害剤として  $\text{GeO}_2$ 、および人工デトライタスとしてのセルロース粉末について、それぞれの添加の有無で6つの培養実験区を設け、全ての試料を温度  $25^\circ\text{C}$ 、明暗周期 14 hL:10 hD 光強度  $50\text{--}100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の条件下で10日間培養した。海水試料は1日おきに取り出し、Chl. *a*、栄養塩の濃度の測定を行った。また、同時に *K. mikimotoi* の計数、細菌の分離および計数を行った。分離した細菌株については、後に *K. mikimotoi* との二者培養試験に供した。実験ボトルの海水試料は適宜希釈後、孔径  $3.0 \mu\text{m}$  のヌクレポアフィルターを用いて濾過し、フィルター上に捕集された細菌を粒子付着性細菌 (PAB: Particle-associated bacteria)、濾液中の細菌を浮遊性細菌 (FLB: Free-living bacteria) とし、それぞれ ST10<sup>-1</sup> 寒天培地上で培養を行った。各試料とも、温度  $25^\circ\text{C}$  の暗条件下にて2週間培養し、形成したコロニーを計数することで培養可能細菌数を算出した。計数後、コロニーをランダムに滅菌爪楊枝で釣菌し、ST10<sup>-1</sup> 寒天培地を分注した48 ウェルマイクロプレートの各ウェルに単離した。また各実験試料の一部はグルタルアルデヒドで固定し (終濃度1%)、DAPI染色法による総細菌数の直接計数を落射蛍光顕微鏡を用いて行った。単離した細菌は無菌株の *K. mikimotoi* との二者培養試験により殺藻能を評価した。

【結果】

*K. mikimotoi* の細胞数は培養実験開始時に  $3.3 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  であり、二日目に  $3.9 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$  まで増加し、以降減少を示した。Chl. *a* 濃度は栄養塩非添加区では4日目まで変化は見られず、栄養塩添加区では4日目まで増加し最大  $210 \mu\text{g L}^{-1}$  となり、その後減少し、10日目にはすべての実験区で  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  前後まで減少した。培養可能細菌数はFLBで  $1.0 \times 10^5\text{--}10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、PABで  $1.0 \times 10^4\text{--}10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$  のオーダーの密度で変動が見られた。

【今後の予定】

今後は、DAPI染色法による細菌数の直接計数を完了させる。次に、*K. mikimotoi* を対象とした二者培養実験を分離培養した細菌株と行い、殺藻細菌と増殖阻害細菌の密度を算出し、栄養塩やChl. *a* 濃度などのデータと合わせて考察を行う予定である。得られた殺藻細菌や増殖阻害細菌は凍結保存し、将来的に16S rDNA解析による簡易同定を行う。

田村 航士