

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

【背景と目的】

沿岸域においては、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。赤潮による養殖魚の斃死においては、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、赤潮の防除策の開発が望まれている。そこで、環境に優しい赤潮対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* を除いて殆ど研究例はなく、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 原因藻と、その殺藻細菌および増殖阻害細菌について、それらの動態を把握することを目的とした。現場で有害渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* 赤潮が発生した試料を得られたことから、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付着性の殺藻細菌にとって好適な環境を与え、潜在的な殺藻細菌の活性を誘導、増幅する試みを行った。

【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から得た赤潮海水の送付を受け、翌日から実験を行った。得られた海水試料については、栄養塩、珪藻増殖阻害剤として 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関して、それぞれの添加の有無で6つの培養実験区を設け、無添加区として実験区1、栄養塩添加区として実験区2、栄養塩と GeO_2 添加区として実験区3、実験区1, 2, 3にセルロースを添加した区をそれぞれ実験区4, 5, 6とした。全ての試料を温度 25°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*、および栄養塩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^{-1} 寒天培地上で培養を行った。各試料とも、温度 25°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^{-1} 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。単離した細菌株は、無菌の *K. mikimotoi* 培養株との二者培養試験に供し、殺藻能を評価した。

【結果および考察】

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 $3.9 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ まで増加した後、減少した。Chl. *a* 濃度は栄養塩非添加区では4日目まで変化が見られなかつた。

ったのに対し、栄養塩添加区では4日目まで増加し続け最大 $210 \mu\text{g L}^{-1}$ となった。4日目以降はすべての実験区で減少し、10日目には $10 \mu\text{g L}^{-1}$ 前後まで減少した。各試料の全細菌数は、実験区1で $5.7\text{--}8.4 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 、実験区2で $5.7\text{--}9.0 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 、実験区3で $4.5 \times 10^6\text{--}1.6 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ 、実験区4で $3.4\text{--}8.4 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 、実験区5で $4.5 \times 10^6\text{--}1.3 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ 、実験区6で $5.7 \times 10^6\text{--}1.6 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。実験開始時はPABよりもFLBの方が多かったが、実験4日目においては全ての培養実験区においてPABがFLBを上回った。これは*K.mikimotoi* が死滅していく中で、有機物粒子が増加したことが原因ではないかと推測される。殺藻細菌数及び増殖阻害細菌数の密度はFLBで $1.3 \times 10^4\text{--}6.2 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、PABで $1.8 \times 10^3\text{--}1.8 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ で変動し、すべての試料においてFLBの方が高頻度で検出された。過去の知見において殺藻細菌はFLBよりもPABの方が高い頻度で検出されたと報じられてきたが、本実験では逆の結果となった。赤潮が発生した現場のような有機物粒子が多い海域においては、FLBにおいても殺藻能を持つ細菌が増加する可能性が示唆された。また*K.mikimotoi* の細胞数が減少し始めた培養実験の4日目の細菌において、殺藻細菌及び増殖阻害細菌の出現頻度 (%) がセルロース添加区の方がセルロース未添加区よりもPAB, FLB両方で高かった。このことから、セルロース粒子が殺藻細菌及び増殖阻害細菌の殺藻能を効率よく活性化させる可能性が示唆された。

本研究において、*K.mikimotoi* の赤潮が発生した現場海水中の殺藻細菌と増殖阻害細菌の挙動が解明された。今後、本研究で検出された殺藻細菌及び増殖阻害細菌の16S rDNA分析による株の同定を行うことにより、*K. mikimotoi* 赤潮が発生した海域における殺藻細菌と増殖阻害細菌の分布や動態について更なる研究の進展が期待される。本実験により、殺藻能の活性化においてセルロース粉末の添加が効果的である可能性が示されたが、赤潮が発生していない海水を用いた同様の培養実験などにより、更なる研究が必要である。

田村 航士