

Notice on Plankton Seminar.

#18008

9:30-11:00, 9 Jul (Mon.) 2018 at room #N604

Lee, B., T. Katano, M. Oh and M. Han (2008)

Monitoring of algicidal bacterium, *Alteromonas* sp. strain A14 in its application to natural *Cochlodinium polykrikoides* blooming seawater using fluorescence *in situ* hybridization
J. Microbiol. **46**: 274-282.

Cochlodinium polykrikoides 優占の自然海水における蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた殺藻細菌 *Alteromonas* 属 A14 株の動態のモニタリング

1990年代以降、韓国南部の沿岸において有害渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides* のブルーム (有害有毒藻類ブルーム: HAB) が頻発し、甚大な漁業被害をもたらしている。HAB 対策として特定の微細藻類種を攻撃・殺滅する殺藻細菌を用いた生物学的方法が注目されているが、環境中の HAB 海水における殺藻細菌の動態や他生物種との関係に関しては知見が乏しいのが現状である。本研究では、HAB 発生海域より殺藻細菌株を検出・単離して HAB 海水とのマイクロコズム実験に供し、チラミドシグナル増幅蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (TSA-FISH) を用いて殺藻細菌細胞数の変動をモニタリングすることで、殺藻細菌の動態、他生物種との関係及び TSA-FISH の有用性を評価した。

殺藻細菌の検出・単離は 2005 年に行い、韓国南部の Masan 湾で採取した海水 (9 月 30 日) 及び Yeosu 沿岸で採泥した泥 (10 月 1 日) を実験に供した。海水試料は GF/C フィルターで濾過し、泥試料は 1 g を f/2 培地 10 mL で希釈した後、それぞれを 24 穴ウェルプレート中の対数増殖期の *Heterosigma akashiwo* 培養 2 mL に 0.2 mL 添加した。実験は温度 20°C、光強度 50 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、明暗周期 12 h: 12 h L: D で行い、顕微鏡下で殺藻が確認されたウェル中の培養液を再度 *H. akashiwo* 培養に添加した。その培養液を 10%Zobell 寒天培地に塗抹して 20°C、暗所下で 2 週間培養し、形成されたコロニーを単離して 10%Zobell 液体培地で培養した。定常期の単離細菌株培養を *H. akashiwo* との二者培養実験に供し、上記の藻類培養条件で 7 または 15 日間培養し、蛍光光度計で藻類の増減をモニターして単離株の殺藻能を検証した。その結果、泥試料より殺藻細菌 A14 株 (*Alteromonas* sp.) を検出し、殺藻レンジ実験及びマイクロコズム実験に供した。殺藻レンジ実験では、対象微細藻類として渦鞭毛藻 *Akashiwo sanguinea* GnSg02 株と GnSg03 株、*C. polykrikoides*、*Gymnodinium catenatum*、*Heterocapsa triquetra*、*Prorocentrum minimum*、*P. micans*、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* NFHTS-AK-1 株と CCMP1912 株及び珪藻 *Nitzschia* sp. と *Skeletonema costatum* を用いた。各藻類培養 30 mL に A14 株培養を細胞密度が 10^7 cells/mL になるように添加し、温度 20-25°C、光条件と明暗周期は上記の条件で 4-5 日間培養し、蛍光値から各藻類に対する殺藻率を算出した。次に A14 株の HAB 海水中における細胞数の変動を調べるために、マイクロコズム実験を行った。2006 年 8 月 12 日の韓国南部の沿岸において *C. polykrikoides* が優占している海水を採取し、持ち帰って 1 L のフラスコ 6 本に 600 mL ずつ分注した。各フラスコに栄養塩を添加し、3 本には A14 株の培養を細胞密度が 10^6 cells/mL になるように分注した (A14 株添加区)。各培養は温度 25°C、光強度 40-80 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、明暗周期 12 h: 12 h L: D、35 rpm で 6 日間振盪培養を行い、培養期間中毎日副試料を採取し、chl. *a* 濃度測定、微細藻類及び鞭毛虫細胞数計数を行った。また、全細菌数は DAPI 染色法によって、A14 株細胞数は TSA-FISH を用いて計数した。

A14 株の殺藻レンジ実験の結果、*A. sanguinea*、*C. polykrikoides*、*G. catenatum* 及び *H. triquetra* には殺藻が、*P. minimum* には増殖促進が見られたが、珪藻類及び *P. micans* の増殖には影響しなかった。*H. akashiwo* に対しては、株によって殺藻率が異なった。マイクロコズム実験の結果、A14 株添加区では A14 株細胞数が 1 日目までに 9.0×10^5 cells/mL から 1.5×10^6 cells/mL に増加した後、 3.5×10^4 cells/mL に減少し、*C. polykrikoides* は培養 4 日目までに 1830 cells/mL から 700 cells/mL に減少し、殺藻が確認された。珪藻類は 3 日目以降急激な増加が見られた。全細菌数は両実験区とも培養 1 日目には極大を示し、2 日目以降は減少したが、A14 株添加区では 5 日目に増加が見られた。鞭毛虫はコントロール区では 690 cells/mL から 3300 cells/mL まで緩やかに増殖したが、A14 株添加区では 2 日目にかけて 690 cells/mL から 23400 cells/mL に急激に増殖した後、5 日目には 8850 cells/mL まで減少した。

本研究により、HAB 海水中において殺藻細菌 A14 株の細胞数増加に伴い *C. polykrikoides* の減少が見られ、A14 株は自然環境中에서도殺藻能を保持することが示された。また、増殖した細菌は鞭毛虫の捕食によって速やかに減少し、海水中に溶存無機物が放出されることで無害な珪藻類の増殖を促進することが示唆された。加えて TSA-FISH は特定の殺藻細菌細胞数の測定に有効な手段であることが示されたが、殺藻細菌を HAB 制御方法として用いるには細菌動態のモニタリングを含めたさらなる研究が必要である。

児玉 敢