

## 外洋域と沿岸域に生息する殺藻細菌の比較に関する研究

有害有毒藻類ブルームは魚介類の大量斃死や有用二枚貝類の毒化などを引き起こし、深刻な漁業被害を及ぼす。現在、赤潮の防除あるいは予防法として、藻類を殺滅する微生物を用いる生物学的防除法が注目されている。これまでに沿岸域の海水から多種多様な殺藻細菌が分離され、殺藻細菌の多様性や殺藻メカニズムが明らかとなってきた。また、海水中の殺藻細菌群集が赤潮藻類の動態に影響を及ぼしている可能性も指摘されている。しかし、近年、殺藻細菌が粒子に多く付着生息する傾向があることが見出されたが、未だ殺藻細菌の生態、特にそれらの分布や生息場所に関する知見は乏しい。また、これまでの調査海域は有害有毒藻類が大量に発生する沿岸域であり、外洋域における殺藻細菌の存在について調べた研究例はない。そこで本研究では、外洋域と沿岸域の海水から粒子付着性細菌 (Particle associated bacteria: PAB) および浮遊性細菌 (Free living bacteria: FLB) を分離し、有害有毒藻類を含む植物プランクトンとの二者培養試験を通じて、外洋域と沿岸域のそれぞれに生息する殺藻細菌について分布と殺藻範囲を中心に比較研究を行った。

海水試料の採集は、外洋域では2010年6月に西部北太平洋の St. 1 (北緯 30 度、東経 142 度)、St. 2 (北緯 20 度、東経 142 度) の 2 地点にて行った。沿岸域では、同年6月に米国グアム島のアウトハウスビーチ (St. 3)、8 月には北海道北斗市の七重浜海水浴場 (St. 4) の 2 地点において表層から採水を行った。滅菌済み 500 mL ポリプロピレン容器で得られた海水試料は、実験室へ持ち帰った。また採水と同時に、水温と塩分を測定した。未処理の海水試料および孔径 3.0  $\mu\text{m}$  ヌクレポアフィルターで濾過した濾液を、それぞれグルタルアルデヒドで固定し (終濃度 1%)、DAPI 染色を行い、落射蛍光顕微鏡を用いて細菌の直接計数を行った。また海水試料を、滅菌海水を用いて  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  に段階希釈し、それぞれ孔径 3.0  $\mu\text{m}$  ヌクレポアフィルターで 1 mL ずつ濾過後、フィルターは濾過面を上にして ST10<sup>-1</sup> 寒天培地上で培養し (PAB)、濾液は 0.1 mL を塗沫 (FLB) して培養を行った。温度 20~25°C の暗所で 2 週間培養後、コロニーを計数し、各試料から計 263 株の細菌株を単離した。その後、微細藻類の増殖阻害および殺藻作用の有無を調べるために、単離した細菌 263 株を用いて、有害有毒種を含む 4 種の微細藻類との二者培養試験を行った。対象藻類としては、養殖と天然の魚介類の大量斃死を引き起こすラフィド藻 *Chattonella antiqua* と渦鞭毛藻 *Cochlodinium polykrikoides*、麻痺性貝毒で有用二枚貝を毒化させる渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense*、海洋生態系の通常的基础生産者の 1 種である珪藻 *Chaetoceros didymus* を用いた。これらの藻類はすべて無菌培養であり、改変 SWM-3 培地を用いて培養実験を行った。これらの藻類の維持培養と二者培養試験の条件は、光強度 50~100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、明暗周期 14hL: 10hD、温度は、*C. antiqua* と *C. didymus* は 20°C、*C. polykrikoides* では 25°C、*A. tamarense* については 15°C であった。*C. polykrikoides* は 24 ウェルマイクロプレートの各ウェルへ 1.5 mL ずつ、その他の藻類は、48 ウェルマイクロプレートの各ウェルへ藻類培養を 0.5 mL ずつ分注し、細菌を滅菌爪楊枝でごく少量を掻き取って各ウェルへ接種した。

コントロールとしては、藻類培養に改変 SWM-3 培地のみを分注したものを設定した。初期細胞密度は、*C. antiqua* は  $2.0 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>、*C. polykrikoides* は  $5.5 \times 10^2$  cells mL<sup>-1</sup>、*C. didymus* は  $1.1 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>、*A. tamarensis* は  $5.5 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> であった。培養は 2 週間行い、1 から 4 日目までは毎日、それ以降は 6、8、10、14 日目に倒立顕微鏡を用いて観察し、殺藻についての判定を行った。

環境要因をみると、南方へ向かうほど高温高塩分となった。外洋域の採水場所は北太平洋の亜熱帯循環域に位置し、赤道域からの暖流が流れる貧栄養域の海域である。海水中の総細菌数では、沿岸域の方が外洋域より 2~3 倍程度高い値を示した。外洋域では有機物の供給源が限られており、沿岸域では生活排水や産業廃水の流入により海水中の有機物が多く、細菌が比較的高密度で生息すると考えられる。また栄養塩の流入で沿岸域は基礎生産が高く、その影響で細菌数が多かったと考えられる。海水中には、直接計数法によるならば、外洋域と沿岸域の両方で FLB が PAB の 1.5~3 倍高い値を示したのに対し、従属栄養性の培養可能な細菌は PAB が FLB の 6~40 倍高い値を示し、逆の結果となった。浮遊性細菌は低濃度の溶存態有機物を利用するのに対し、粒子付着性細菌は付着する有機物粒子が主な栄養源であり、粒子付着性細菌の方が栄養的に好ましい環境と考えられる。貧栄養な外洋域においては、細菌の大半は浮遊状態で存在するが、粒子付着細菌の方が様々な活性が高いことが報じられている。植物プランクトンに対する増殖阻害細菌および殺藻細菌は、沿岸域だけでなく、外洋域でも粒子付着性細菌に多い傾向のあることが判明した。沿岸域の付着基質の起源としては、海藻や海草由来のデトライタスも貢献すると想定され、動植物プランクトン起源のものと併せて重要な役割を演ずると考えられる。また、細菌群集の中で植物プランクトンの増殖阻害細菌および殺藻細菌は沿岸域の方で密度が高く、*C. antiqua* と *C. polykrikoides* に対しては、外洋域で増殖阻害細菌あるいは殺藻細菌は全く検出されなかった。外洋域においては、植物プランクトンが少なく、それを攻撃して殺藻する細菌が少ない結果と考えられる。一方で、外洋域で *A. tamarensis* と *C. didymus* に対する増殖阻害細菌および殺藻細菌が発見された。珪藻は海洋域で広範囲に分布することから、珪藻を殺滅対象とする細菌が広く生息している可能性が考えられる。あるいは *C. antiqua* と *C. polykrikoides* の 2 種は細菌に対する抵抗性の強い種であるのかもしれない。これについては多くの種を対象に殺藻試験を行うことにより、手掛かりが得られると思われる。外洋域で *A. tamarensis* に対する増殖阻害細菌が確認された要因は不明である。植物プランクトンの形態や運動性によって殺藻細菌の殺滅様式が異なることから、*A. tamarensis* に対する増殖阻害細菌の特性を検討することは重要である。殺藻細菌の生息場所や分布密度などの生態を把握することは、殺藻細菌の生理特性ならびに殺藻メカニズムの解明につながる。今後も、実用的な赤潮防除と予防法の確立に向けて、殺藻細菌と有害有毒植物プランクトンとの相互関係を検討していく必要がある。