

有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* に対する海水及びアマモ場由来の
殺藻細菌と増殖阻害細菌の動態

有害赤潮は養殖魚介類などの大量斃死など、各地で深刻な漁業被害を招いている。中でも、ラフィド藻 *Chattonella antiqua* による有害赤潮は被害額が群を抜いて大きく、八代・有明海水域において養殖ブリを中心に 2009 年には約 33 億円、2010 年には約 54 億円もの大量斃死被害が起きた。1972 年の播磨灘における大規模な赤潮被害以降、粘土散布や餌止めなど様々な被害軽減対策が提案されたが、決定的な対策とはなっておらず被害は継続している。現在、環境への負担が小さい赤潮防除策として、微細藻類を殺滅する殺藻細菌が注目されている。特にアマモ場は安定した殺藻細菌の供給源である可能性があり、アマモ場の殺藻細菌を活用した防除策が提案されている。また、殺藻細菌については様々な研究がなされており、 γ -Proteobacteria 綱や CFB グループに多いことが判明しているが、現場海域における細菌群集の中の殺藻細菌の変動や殺藻能に関する遺伝学的な知見は少ない。そこで本研究は、海水やアマモ場から *C. antiqua* に対する殺藻細菌及び増殖阻害細菌を探索し、その分布を把握すること、および殺藻細菌やアマモ場由来細菌の遺伝子解析を行い、殺藻細菌や増殖阻害細菌の分類学的な特徴の調査研究を目的として行った。

アマモ葉体試料は、熊本県上天草市に位置する熊本県水産技術センター地先の宮津湾のアマモ場において、2012 年 6 月-9 月にかけて干潮時に毎月 1 回アマモ葉体を採取した。同一期間にアマモ場でアマモ場海水試料、ならびにアマモ場から約 2 km 離れた沖合の地点でアマモ沖海水試料を 500 mL ずつ採水した。アマモ葉体試料は 200 mL 滅菌海水が入った滅菌ボトル内で 500 回強振後、 10^{-4} 倍まで滅菌海水で希釈し、 10^{-2} 倍- 10^{-4} 倍の希釈段階のものを $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗抹した。アマモ場海水とアマモ沖海水は 10^{-3} 倍まで希釈し、 10^{-1} - 10^{-3} 倍の希釈段階のものを孔径 3.0 μm のメンブレンフィルターで濾過した後、フィルター上の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) として $ST10^{-1}$ 寒天培地上にコロニーを形成させて分離した。八代海の海水試料は、6 月-9 月にかけて毎週 1 回鹿児島県東町脇崎の 0 m、および海底上 1 m (B-1m) から 500 mL 採水し、アマモ場海水およびアマモ沖海水の場合と同じ手順で細菌を分離した。どの試料も形成したコロニーを計数し、培養可能細菌数 (Colony forming unit: CFU mL^{-1}) を算出した。コロニーをランダムに滅菌爪楊枝で釣菌し、寒天培地を分注した 48 ウェルプレートの各ウェルに単離した。また、各試料を一部グルタルアルデヒドで固定し (終濃度 1%)、DAPI 染色後、フィルターで濾過し落射蛍光顕微鏡を用いてフィルター上の細菌を計数し、全細菌数を算出した。単離した細菌は無菌の *C. antiqua* と二者培養することにより殺藻能を確認した。培養条件は明暗周期 14 hL: 10 hD、光強度 50-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、温度 20°C で、脇崎試料は 1 週間、宮津湾試料は 2 週間培養し、倒立顕微鏡で殺藻の有無を観察した。二者培養試験にて殺藻細菌および増殖阻害細菌と判明した株 36 株と宮津湾において殺藻細菌が確認された試料から分離された細菌 119 株について、細菌の系統分類の指標となる 16SrRNA 遺伝子の部分塩基配列 (500 bp) の解析を行い、BLAST で細菌の同定を行った。

宮津湾試料の全細菌数はアマモ葉体上には $3.3\text{-}9.0 \times 10^8 \text{ cells g wet leaf}^{-1}$ 、アマモ場海

水で $1.8-2.0 \times 10^6$ cells mL⁻¹ とアマモ沖海水で $8.9 \times 10^5-1.7 \times 10^6$ cells mL⁻¹ であり、沖合に行くほど減少傾向にあった。脇崎試料の全細菌数は、0 m で $6.1 \times 10^5-3.9 \times 10^6$ cells mL⁻¹、B-1 m で $4.4 \times 10^5-1.6 \times 10^6$ cells mL⁻¹ で、B-1 m の方が低い値を示す日が多かった。どの試料でも PAB より FLB が多く、本研究の対象海域では FLB が利用しやすい溶存有機物が多く存在していたと考えられた。殺藻細菌および増殖阻害細菌数は、アマモ葉体で $4.9 \times 10^3-1.6 \times 10^5$ CFU g⁻¹ wet leaf、アマモ場海水は $4.2 \times 10^2-1.6 \times 10^4$ CFU mL⁻¹、アマモ沖海水は $4.6 \times 10^2-1.9 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ の範囲であった。アマモ葉体から高密度で検出され、また海水中においてもアマモ沖と比較してアマモ場の方が高い値であったことから、アマモ場はアマモ葉体の影響を受けていると考えられる。脇崎試料について 0 m は $3.7 \times 10^1-5.6 \times 10^3$ CFU mL⁻¹、B-1 m は $1.4 \times 10^1-8.5 \times 10^2$ CFU mL⁻¹ の範囲で検出され、概ね 0 m の方が B-1 m より高い値を示した。また、どの試料についても PAB からより高い頻度で主に検出されており、殺藻細菌は粒子状有機物を利用している細菌であると推測された。

16SrRNA 遺伝子解析の結果、宮津湾と脇崎から分離された殺藻細菌はすべて α -Proteobacteria 綱と γ -Proteobacteria 綱であった。構成する属をみると、宮津湾では *Pseudoalteromonas* 属や *Gaciecola* 属、*Vibrio* 属から多く検出されたのに対し、脇崎では *Alteromonas* 属が優占しており、多くの属から少数ずつ検出された。また、宮津湾由来の殺藻細菌と脇崎由来の殺藻細菌の種を比較したところ 2 種のみ共通な種であった。以上より、殺藻細菌は生息する海域によって多少分類組成が異なることが判明した。遺伝子解析を行った全ての試料を見ると、BLAST 検索の結果、分類学のごく近縁な株でも殺藻細菌と殺藻細菌でない株があるという結果が得られた。中には、殺藻細菌、増殖阻害細菌、殺藻及び増殖阻害をしない細菌全てを含むものもあった。つまり、殺藻や増殖阻害は細菌の種によって決められているわけではないと推測された。

本研究の結果、過去の知見と同様、アマモ葉体には高密度の殺藻細菌が検出され、アマモ場の海水にも殺藻細菌が影響していると推測された。また、16SrRNA 遺伝子の解析の結果、卓越する殺藻細菌は細菌群集と同様に、季節変動がみられ、海域ごとにも異なることが判明した。加えて、殺藻は細菌の種によってのみ決められている能力ではなく、他の要因によって殺藻が起きていると考えられた。

殺藻細菌を定量的に検出するには、種特異的な遺伝子をプローブとして現場から殺藻細菌を検出する手法があるが、本研究の成果により、殺藻細菌種は季節や海域ごとに変動すると判明した。殺藻細菌の遺伝子をプローブとして利用するには、現場の細菌群集の季節変動など詳細な解析が必要となるため、さらなる改良・工夫が必要となるであろう。今後はさらに細菌の生理生態に焦点をあてた研究が必要不可欠である。

秋里 綾乃