

大規模なアマモ場に生息する微生物を用いた赤潮防除に関する基礎的研究

【研究背景】

赤潮は養殖魚介類の大量斃死を引き起こし、世界中の沿岸域で漁業被害が報告されているため、防除対策が喫緊の課題となっている。近年、赤潮の発生予防法や被害軽減策として、殺藻細菌を用いた生物学的防除が提案されている。また、最近アマモ葉体のバイオフィルムに高密度の殺藻細菌が付着生息していることが発見され、それらがデトライタス粒子を海水中へ供給しうることから、殺藻細菌の供給源としてのアマモ場の赤潮防除能が期待されている。そこで本研究では、関係者の努力により近年回復が著しい岡山県日生町鹿久居島沿岸域のアマモ場において、①海水中やアマモ葉体上に付着する殺藻細菌を探索し、有害藻類であるラフィド藻 *Chattonella antiqua* と渦鞭毛藻 *Karenia mikimotoi* 培養株に対する殺藻試験を行い、②上記 2 種の藻類を大量培養し、アマモ場海水と沖合域の海水を添加した実験系を設定した擬似現場法により、殺藻微生物の動態を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】

①海水及びアマモ葉体上に付着する殺藻細菌の探索

2013 年 6-9 月にかけて毎月 1 回、干潮時に岡山県日生町鹿久居島現寺湾にて表層海水とアマモ試料を採取した。アマモ試料は滅菌海水中で 500 回強振してバイオフィルムを剥離した後適宜希釈し、ST10⁻¹ 寒天培地へ塗抹した。その後温度 25°C の暗所で 2 週間培養し、形成されたコロニーから細菌を単離した。海水試料は、適宜希釈した後に孔径 3.0 μm のフィルターを用いて濾過を行い、フィルター上に捕集された細菌を粒子付着性細菌 (Particle associated bacteria: PAB)、濾液中の細菌を浮遊性細菌 (Free living bacteria: FLB) としてそれぞれ培養し、単離を行った。また、形成されたコロニー数から培養可能細菌数を算出した。アマモ葉体試料及び海水試料中の総細菌の計数は DAPI 染色後、落射蛍光顕微鏡を用いて行った。*C. antiqua* 及び *K. mikimotoi* に対する殺藻能は、単離した細菌と二者培養することにより確認した。培養条件は明暗周期 14 hL: 10 hD, 光強度 50-100 μmol photons m⁻²s⁻¹, 温度 20°C であり、倒立顕微鏡による観察で殺藻の有無を観察した。

②擬似現場法による殺藻微生物の動態把握

2013 年 7 月と 9 月に、岡山県日生町鹿久居島現寺湾のアマモ場と沖合の 2 地点にて海水を採取した。海水試料を孔径 10 μm, 1.0 μm 及び 0.1 μm のフィルターで濾過し、無濾過画分、10 μm 画分、1.0 μm 画分及び 0.1 μm 画分 (コントロール区) を設け、各画分ごとに 2 本作成した。1 本目には改変 SWM-3 で培養した無菌の *C. antiqua* 培養を添加し、2 本目には何も添加しなかった。また、9 月の海水については 1.0 μm 画分及び 0.1 μm 画分 (コントロール区) に *K. mikimotoi* 培養を添加した画分を作成した。実験開始時の *C. antiqua* の細胞数を 7 月は 500 cells mL⁻¹, 9 月は 700 cells mL⁻¹, *K. mikimotoi* の細胞数は 600 cells mL⁻¹ とした。全ての実験区は、温度 20°C, 光強度 40-100 μmol photons m⁻²s⁻¹, 明暗周期 14hL: 10hD の条件下で培養した。培養実験の 4 日目までは毎日、それ以降は 2 日毎にサンプルを一部採取し、藻類細胞、培養可能細菌、総細菌及び従属栄養性微小鞭毛虫 (Heterotrophic nanoflagellate: HNF) の計数を行った。培養可能細菌数は寒天平板法、総細菌数は DAPI 染色による直接計数、藻類細胞は直接計数、HNF は DAPI-FITC 二重染色後、落射蛍光顕微鏡によって観察計数した。

【結果及び考察】

①海水及びアマモ葉体上に付着する殺藻細菌の探索

直接計数した TB (全細菌数) は、アマモ葉体上には 3.5×10^8 – 2.5×10^9 cells g⁻¹ wet leaf, 海水試料では St. 1 で 1.2 – 1.4×10^6 cells mL⁻¹, St. 2 で 6.3×10^5 – 1.8×10^6 cells mL⁻¹, St. 3 で 5.7×10^5 – 2.4×10^6 cells mL⁻¹, St. 4 で 8.4×10^5 – 2.3×10^6 cells mL⁻¹, St. 5 で 6.5×10^5 – 1.2×10^6 cells mL⁻¹ であり、沖合に行くほど減少傾向にあった。6月と8月の St. 3, 8月と9月の St. 4 を除いて、全て PAB より FLB の方が多かった。培養可能細菌数は、アマモ葉体上には 1.3×10^4 – 9.3×10^5 CFU g⁻¹ wet leaf, 海水試料では St. 1 で 2.8 – 6.8×10^4 CFU mL⁻¹, St. 2 で 2.4 – 7.2×10^4 CFU mL⁻¹, St. 3 で 2.6 – 9.2×10^4 CFU mL⁻¹, St. 4 で 3.4 – 9.2×10^4 CFU mL⁻¹, St. 5 で 1.6 – 5.7×10^4 CFU mL⁻¹ であった。殺藻細菌及び増殖阻害細菌数は、アマモ葉体で 5.8×10^5 – 2.4×10^7 CFU g⁻¹ wet leaf, 海水試料は 1.7×10^2 – 3.0×10^3 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、また海水試料においても沖合よりアマモ場に近い地点の方が高頻度で検出されたことから、アマモ葉体からの影響を受けていると考えられた。さらに、どの試料においても FLB よりも PAB の方が高頻度で検出されており、殺藻細菌は粒状有機物に付着生活をしている細菌であると推察された。

②擬似現場法による殺藻微生物の動態

培養可能細菌数、総細菌数は共にすべての画分で培養 1 日後に顕著な増加が見られた。総細菌数に関しては、藻類無添加区に比べて藻類添加区の方が増加したことから、藻類起源の栄養源を利用して細菌が増殖したと考えられた。また、HNF 数は細菌数の増加と同時、またはそれ以降に増加する傾向が認められたことから、HNF が細菌を捕食して増殖したことを示している。*C. antiqua* の細胞数は 0.1 μm 画分 (コントロール区) では 2 日目から徐々に増加した。1.0 μm 画分では 7 月は 4–6 日目にピークを迎え、その後減少したが、9 月は 4 日目まで増加し、その後ほぼ横ばいまたは漸減の傾向を示した。10 μm 画分で *C. antiqua* は 2–4 日目まで増加し、その後減少した。無濾過画分では 4 日目までにピークを迎えた後、8 日目にはおおよそ検出限界以下にまで減少した。*K. mikimotoi* の細胞数は 0.1 μm 画分 (コントロール区) では 2 日目で徐々に増加する傾向を示した。1.0 μm 画分では培養 4 日目でピークを迎えた後、6–8 日目にかけて速やかに減少した。無濾過画分の海水で最も藻類の細胞数が減少したことから、各画分で細菌による殺藻が起こったとすれば、PAB (粒子付着性細菌) の役割は極めて大きいと思われる。また、アマモ場海水中から殺藻細菌及び増殖阻害細菌が高頻度かつ高密度で検出されており、殺藻細菌が対象藻類の細胞数の減少に関与していたと考えられた。

【まとめと展望】

本研究において現時湾のアマモ場に殺藻細菌が高密度で存在し、アマモ場が殺藻細菌の供給源として赤潮防除能を持つ可能性が示された。アマモ場は、潮流や波を緩衝する作用や海底泥を安定化させる作用を持ち、さらには魚類の生息場所、採餌場所、繁殖場所としての機能や、栄養塩を吸収し、水質浄化にも大きな役割を担っているので、環境修復機能も大いに期待される。これらの機能を通じて、アマモ場を涵養することは水域環境の向上に貢献すると期待され、さらに有害有毒藻類の防除に役立つならば、里海構想に基づく沿岸域保全の観点から積極的に推進して行く価値があると考えられる。

横路 直哉