HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	下北半島沿岸域の細菌相調査
Author(s)	小幡, 智美; 澤辺, 智雄; 田中, 礼士; 谷内, 喜一; 生地, 暢; 田島, 研一; 絵面, 良男
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 50(2), 115-122
Issue Date	1999-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24189
Type	bulletin (article)
File Information	50(2)_P115-122.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
50(2), 115-122, 1999.

下北半島沿岸域の細菌相調査

小幡　智美[1)]・澤辺　智雄[1)]・田中　礼士[1)]・谷内　喜一[1)]
生地　　暢[1)]・田島　研一[1)]・絵面　良男[1)]

Bacteriological Study on the Coastal Area of the Shimokita Peninsula

Tomomi OBATA[1)], Tomoo SAWABE[1)], Reiji TANAKA[1)], Yoshikazu TANIUCHI[1)], Masashi ONJI[1)], Kenichi TAJIMA[1)] and Yoshio EZURA[1)]

Abstract

A nuclear power station is under construction on the west coast of the Shimokita Peninsula, and the power station will be run in 2005. Bacteriological study was conducted to evaluate the normal bacterial flora at the coastal area of the Shimokita Peninsula around the power station from May 1998 to January 1999. Nine sampling sites indicated that bacterial flora of the coastal area was consisted of marine bacteria belonging to the genera *Vibrio, Alteromonas* and *Pseudomonas*. Terrestrial bacteria were identified in some sampling sites. As the power station will use seawater for cooling the nuclear reactor, then the warmed up seawater will be back to the coastal area around the power station, and seawater temperature should be raised. Therefore, the rate of the isolates with psychrophilic and mesophilic growth was investigated in each sampling site. The bacterial isolates, which were able to grow at 4°C, were commonly distributed around the coastal area, but the isolates, which were able to grow at 40°C, were only isolated from seawater samples collected at September.

Key words: The Shimokita Peninsula, Nuclear power station, Bacterial flora, Marine bacteria

緒　　言

平成17年の運転を目指し，下北半島北部の東通村に東北電力東通原子力発電所の建設が計画され，本原子力発電所は平成10年12月に着工された。原子力発電所の建設に際しては，国や地方自治体などの条例に基づき，建設工事の段階から，環境への影響を最小限にすることが強く求められている。たとえば，3号機増設予定中の北海道電力泊発電所の建設における環境調査報告書[2)]のように，原子力発電所建設では，周辺環境への影響評価を常に配慮しなければならない。東通発電所においても，建設工事開始前からの周辺環境調査が計画され，当研究室では，東通原子力発電所周辺の生物相調査の一環として，周辺海域の細菌相を調査することとなった。

原子力発電所では，冷却水に海水を利用することから，発電所周辺海域の温度上昇が懸念される。泊原子力発電所の例では，北海道条例に基づき，周辺海域の温度上昇を1°C以下に設定する配慮が計画されている[2)]。東通発電所でも厳しい条例のもと，温排水管理がなされるが，発電所が適

[1)] 北海道大学水産学部　生物海洋学講座　微生物学研究室
(*Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

[2)] ほくでん泊発電所3号機増設計画と環境影響調査の概要。北海道電力ホームページ (http://www.hepco.co.jp/japanese/index.html) から入手可能。

正に運転されていることをモニタリングするために，発電所建設以前の，各季節における周辺海域の正常な細菌数および細菌相，水温との相関関係を知ることも重要である。そこで，本論文では，東通原子力発電所稼動以前の発電所周辺海域における細菌相調査を行った結果を報告する。

材 料 と 方 法

調査地点および海水試料の採取

1998年5月29日，1998年9月18日，1999年1月14日の3回にわたり，下北半島大間町，佐井村，風間浦村沿岸の9つの地点 (St. 1，桑畑；St. 2，蛇沼；St. 3，大間崎；St. 4，フェリー乗り場；St. 5，奥戸；St. 6，材木漁港；St. 7，原田；St. 8，佐井；St. 9，願掛岩) (Fig. 1) で，海水試料の採取を行った。海水試料は，滅菌ポリビンにて採水し，氷冷しながら当研究室に持ち帰り，直ちに細菌の培養を行った。採集地点の水温および pH は，投げ込み式水環境測定装置 (ホリバ) を用いて測定した。

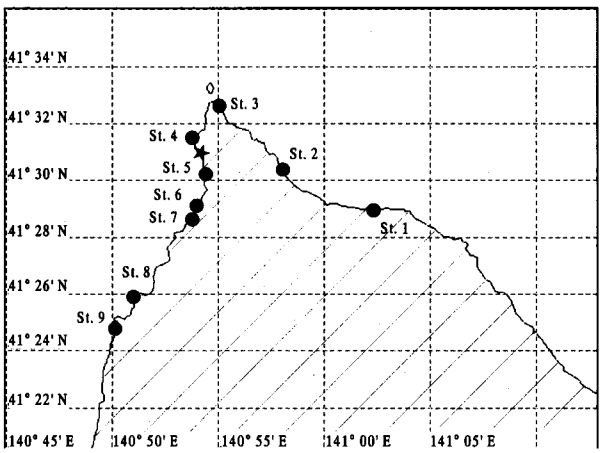

Fig. 1. Sampling sites for the bacteriological study. Nine sampling stations (●) and the power station (★) were shown in the figure.

総菌数および生菌数の計数

各地点の海水試料は，試料原液 9 ml に対して 10% グルタールアルデハイド溶液を 1 ml 加えたものを各地点の試料 2 本づつ調製し，染色操作を行うまで，4°C で保存した。この固定試料に，100 μg/ml の 4′, 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 溶液を 50 μl 加えて 1 時間染色した。その後，予めズダンブラックで一晩染色し，洗浄液でよく洗っておいた 0.2 μm Nuclepore フィルターを，光沢のある面を上にして専用ホルダーにセットし，試料を全てろ過した (Kepner et al., 1994)。非蛍光オイルを一滴垂らしたスライドグラス上にフィルターをのせ，さらに非蛍光オイルをフィルター上に一滴垂らし，その上にカバーグラスをのせて蛍光顕微鏡下 (Axioscope, No. 1 フィルターセット，Zeiss) で，フィルターの 1/4 視野の細菌数を計数した。1 視野当たりの平均細菌数からフィルター全面に補足された細菌細胞数を推定し，海水 1 ml 当たりの総菌数を算出した (Kepner et al., 1994)。

また，生菌数の計数は常法に従い，各海水試料を原液とし，原液，10 倍希釈試料，100 倍希釈

試料を，有機物濃度を半分に希釈した海水寒天培地 (1/2 SA) (Yamamoto et al., 1982) 2 枚に 0.1 ml づつ塗抹し，20°C で 1 週間培養した後，平板培地に生じたコロニーを計数し，海水 1 ml 当たりの生菌数として算出した。

分離株の性状検査

生菌数測定に用いた平板培地から，ランダムに 30 株釣菌し，純粋分離を行った約 800 株の供試菌株について，常法に基づき性状検査を行い (Sawabe et al., 1995)，海洋細菌の簡易同定図式 (絵面・清水，1990；Sawabe et al., 1995) に従い属レベルの同定を行った。また，同供試菌株について，ゼラチン，デンプン，アルギン酸ナトリウム，セルロースの高分子分解性試験，および 4°C と 40°C での発育の有無を観察した。

マコンブ種苗糸赤変原因菌の検出

北海道南西部のコンブ養殖施設において，促成マコンブ種苗糸上に赤斑を生じさせ，芽胞体の芽落ちを引き起こす赤変病原因菌が分離され (絵面ら，1988)，本菌は *Pseudoalteromonas bacteriolytica* と命名された (Sawabe et al., 1998)。本菌は，水温が 10°C 以下になると検出されなかったことから，水温はこの菌の分布を特定する一要因であると考えられている (Yumoto et al., 1989)。従って，発電所からの温排水排出水域の調査には有効な指標細菌となり得る可能性があることから，本菌の分布と季節変動を調べた。赤変原因菌の検出は山田ら (1990) の手法に基づいて行った。すなわち，大腸菌菌体を，滅菌した糸巻きスライドグラスに，寒天を介して付着させた後，この糸巻きスライドグラスを滅菌大試験管に入れ，各地点の海水試料を糸巻きスライドグラスが浸る程度まで入れた。その後，20°C で一週間培養を行い，クレモナ糸の赤色化の有無を観察した。なお，海水試料は，各地点 2 本づつ培養試験を行った。

結　　果

各定点での総菌数と生菌数の変動

下北半島沿岸域の 9 つの地点から，1998 年 5 月 29 日，1998 年 9 月 18 日，1999 年 1 月 14 日の 3 回に亙って採集した海水の総菌数，生菌数の計数結果 および，水温，pH の値は，それぞれ Table 1, 2, および 3 に示した。1998 年 5 月 29 日に採集した海水試料の総菌数は，すべての地点で 10^5 cells/ml のオーダーであり，生菌数は，10^3-10^4 CFU/ml の範囲であった (Table 1)。5 月の海水温は，13.2°C (St. 1) から 17.9°C (St. 9) の範囲，pH は 7.8-8.4 であった (Table 1)。また，1998 年 9 月 18 日に採集した海水試料の総菌数は，10^5-10^6 cells/ml のオーダーであり，生菌数は，10^2-10^4 CFU/ml の範囲であった (Table 2)。9 月の海水温は 17.8°C (St. 6) から 21.0°C (St. 4) の範囲，pH は 8.1-8.5 であった (Table 2)。さらに，1999 年 1 月 14 日に採集した海水試料の総菌数は，10^5 cells/ml のオーダーであり，生菌数は 10^2-10^3 CFU/ml の範囲であった (Table 3)。1 月の海水温は 4.0°C (St. 8) から 6.5°C (St. 4) の範囲，pH は 7.1-7.8 であった。

総菌数および生菌数の結果を基に培養可能菌数の割合 (Culturability) を算出した結果を Table 1-3 にあわせて示した。1998 年 5 月の試料では，St. 1, 2, 3, 4 および 9 の海水試料で Culturability が高く，1.3-6.4% の間であった。その他の定点では 0.3-0.6% であった。また，1998 年 9 月の試料では，5 月の試料に比べ Culturability が低く，0.1-1.2% の範囲であった。さらに，1999 年 1 月の試料では，Culturability がさらに低くなり，0.018-0.65% の範囲であった。

Table 1. Bacterial counts of seawater sample collected on 19 May 1998.

Station	Water quality		Total bacterial counts (cells/ml)	Viable bacterial counts (CFU/ml)	Culturability (%)
	pH	Temp. (°C)			
1	7.8	13.2	2.7×10^5	7.7×10^3	2.9
2	7.9	14.5	7.3×10^5	9.6×10^3	1.3
3	7.9	13.5	5.3×10^5	3.4×10^4	6.4
4	8.0	17.8	2.5×10^5	4.9×10^3	2.0
5	7.8	15.3	6.4×10^5	2.5×10^3	0.39
6	8.0	17.0	6.6×10^5	3.8×10^3	0.58
7	8.0	17.2	6.7×10^5	3.4×10^3	0.51
8	8.2	16.8	7.0×10^5	2.3×10^3	0.33
9	8.4	17.9	4.0×10^5	8.8×10^3	2.2

Table 2. Bacterial counts of seawater sample collected on 18 September 1998.

Station	Water quality		Total bacterial counts (cells/ml)	Viable bacterial counts (CFU/ml)	Culturability (%)
	pH	Temp. (°C)			
1	8.4	19.5	5.2×10^5	6.3×10^3	1.2
2	8.2	19.4	1.0×10^6	4.8×10^3	0.48
3	8.4	20.3	1.5×10^6	1.0×10^4	0.67
4	8.1	21.0	1.7×10^6	2.4×10^3	0.14
5	8.2	18.2	1.8×10^6	1.1×10^4	0.61
6	8.4	17.8	1.7×10^6	1.9×10^4	1.1
7	8.4	20.1	1.9×10^6	3.5×10^3	0.18
8	8.4	20.8	1.4×10^6	1.9×10^3	0.14
9	8.5	20.5	7.6×10^5	8.6×10^2	0.11

Table 3. Bacterial counts of seawater sample collected on 14 January 1999.

Station	Water quality		Total bacterial counts (cells/ml)	Viable bacterial counts (CFU/ml)	Culturability (%)
	pH	Temp. (°C)			
1	7.8	4.5	2.6×10^5	8.1×10^2	0.31
2	7.1	5.8	3.0×10^5	8.9×10^2	0.30
3	7.4	4.4	5.4×10^5	1.7×10^3	0.31
4	7.6	6.5	5.3×10^5	2.3×10^2	0.043
5	7.7	4.8	4.6×10^5	5.0×10^2	0.11
6	7.5	5.0	8.5×10^5	2.9×10^2	0.034
7	7.4	5.5	5.1×10^5	1.4×10^3	0.27
8	7.4	4.0	4.6×10^5	3.0×10^3	0.65
9	7.4	6.3	5.5×10^5	1.0×10^2	0.018

細菌相の変動

下北半島沿岸域の9定点から分離された菌株を属レベルで簡易同定し，各定点，各時期毎に各属の占める割合をFig. 2にまとめて示した。いずれの定点においても，季節に関係なく，*Alteromonas, Pseudomonas, Vibrio* に属する海洋性細菌が多く，この3属で50%以上を占めていた。中でも *Alteromonas* と海洋性 *Pseudomoans* 属の好気性細菌の占める割合が高い傾向が認められた。また，陸性の *Aeromonas, Pseudomonas, Bacillus* 属細菌と球菌も各定点分離株から同定され，St. 1, 2, 5，および6の分離株で占有率が高かった。各定点別の細菌相の変動では，St. 4, 8，および9の9月の試料分離株で *Vibrio* 属細菌の割合が増加した。St. 1, 2，および5では，1999年1月の試料分離株で陸性の *Pseudomonas* 属細菌の割合が上昇する傾向にあった。なお，St. 9では，コロニーが20株しか生じなかったため，20株中の割合を示した。

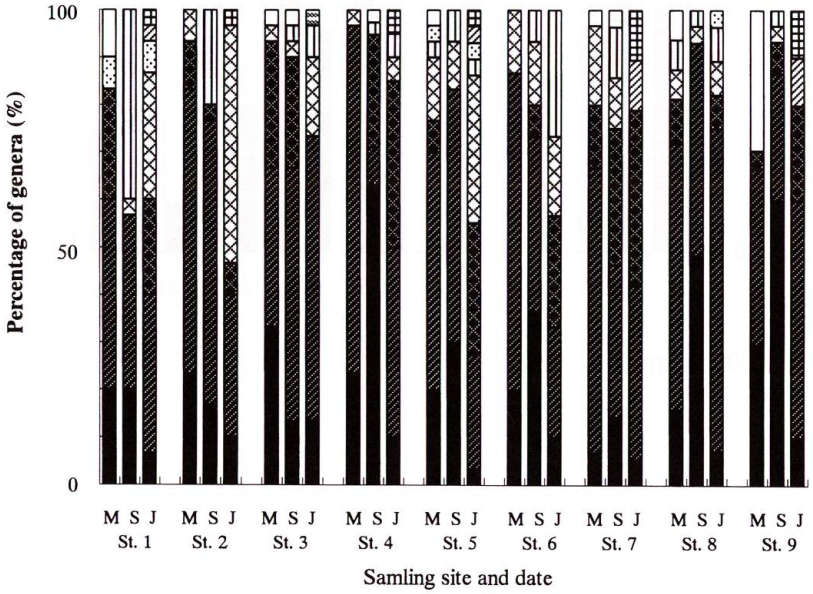

Fig. 2. Bacterial flora of the sampling sites. M ; May, S ; September, J ; January, ■; *Vibrio*, ■; *Alteromonas*, ■; *Pseudomonas* (M), ⊠; *Pseudomonas* (T), ▥; *Aeromonas* (T), ▤; *Cytophaga* (M), ⊡; *Flavobacterium* (M), ▨; *Bacillus*, ▦; coccus (T), □; unidentified. "M" indicates marine and halophilic bacteria, and "T" indicates terrestrial bacteria.

下北半島沿岸域分離株の高分子分解能および4°Cと40°Cでの発育

各地点，各時期の海水試料分離株について，3種類の高分子物質（アルギン酸，デンプン，ゼラチン）の分解性を調べた。まず，アルギン酸分解性細菌の各定点分離株に占める割合は，5月および9月の試料から分離された株で高く，特にSt. 1, 2, 4, 5, 6, 8および9で高く60-90%を占めていた。デンプン分解性細菌は5月の試料分離株で多く見出され，St. 2, 3, 4, 5，および6で70%と高い割合であったが，冬期である1月の試料分離株からはほとんど見出されなかった。また，ゼラチン分解性細菌はいずれの定点，いずれの時期の試料分離株の少なくとも30%を占めており，比較的多く認められた。

次に，分離株の中で，4°C および 40°C で発育できる細菌の割合を調べた結果を，Fig. 3 に示した。4°C で発育できる分離株の割合は St. 3, 8, および 9 の 5 月および 9 月の菌株で若干低かったが，全体的に 50% 以上と高かった。特に，厳冬期の 1 月の試料分離株では，4°C で発育できる菌株の割合は高かった (Fig. 3-(A))。これとは対照的に，40°C で発育できる菌株の割合は，きわめて低い傾向にあり，5 月および 1 月の試料分離株では，いずれの定点分離株とも，20% 以下であった。しかしながら，9 月の試料分離株では 40°C で発育できる菌株の割合が高くなり，St. 1, 2, 5 および 6 では 40% を超えていた (Fig. 3-(B))。

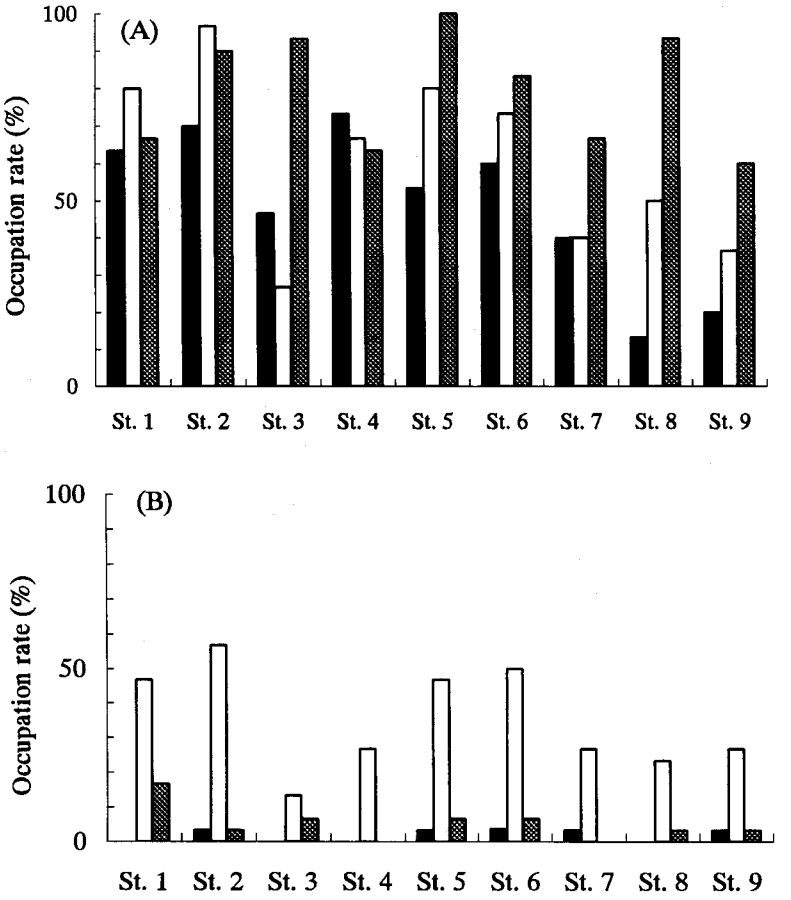

Fig. 3. Occupation rates of bacterial isolates with psychrophilic (A) and mesophilic (B) growth. ■; the strains isolated on May 1998, □; on September 1998, ▒; on January 1999.

赤変原因菌の検出状況

下北半島沿岸域の 9 定点の海水から，赤変原因菌の検出を行った結果を採取した時の水温とあわせて，Fig. 4 にまとめて示した。5 月の海水試料では，St. 9 の 1 本の培養管で赤変原因菌が検出されなかったのみで，これ以外全ての定点で検出された。5 月の各定点の水温は 15°C 前後であっ

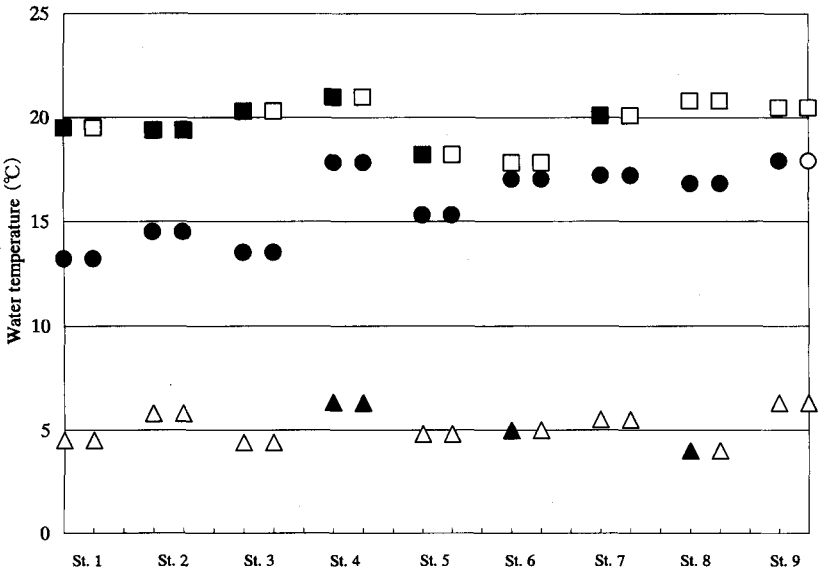

Fig. 4. Detection of *Pseudoalteromonas bacteriolytica* like-red pigment producing bacteria. Circles, squeres, and triangles indicated the seawater samples collected on May 1998, September 1998 and January 1999, respectively. Closed symbol indicated the samples detected the red pigment producing bacteria, and the open indicated not to be detected.

た (Fig. 4, Table 1)。9月の海水試料では，St. 2の2本の培養管とも赤変原因菌が検出されたのみであった。St. 6, 8, および9で2本の培養管とも赤色斑が検出されず，その他の定点試料では1本のみで赤色斑が観察された。さらに，水温が10°C以下となった1月の海水試料では，St. 4, 6, および8を除く定点で赤変原因菌は検出されなかった。

考　　察

東通原子力発電所はSt. 4とSt. 5の間に建設される。温排水排出口の詳細な位置は不明であるが，St. 4およびSt. 5が温排水の排出による水温上昇の影響をもっとも受けると考えられる。総菌数，生菌数および細菌相が，発電所の稼動に伴い若干変化することも予想されるが，その結果は稼動後の調査を待たねばならない。ただし，稼動後に微生物量および細菌数に大きな変化が観察された場合は，社会的な問題となりうるので注意が必要であろう。

発電所稼動後の温排水流出に伴う，周辺海域の水温温度上昇シュミレーション結果は公開されていないが，泊発電所増設計画報告書にあるように，1-2°Cの上昇範囲に留める計画となっていると考えられる。本調査では，4°Cおよび40°Cで増殖できる細菌の割合を各定点毎に調べ，下北半島沿岸域の傾向として4°Cで発育できる低温性菌の割合が1年を通じて高く，40°Cで発育できる中温性菌の割合が秋期を除いて低いことが明らかとなった。原子力発電所が稼動すれば，St. 4およびSt. 5付近に温排水が拡散するため，両定点での低温性菌と中温性菌のバランスが鋭敏に変化する可能性がある。また，海水試料では，平板法で生じるコロニー数，すなわちCulturability，が，同じ試料の総菌数の0.001-0.1%であることが観察されている (Amann et al., 1995)。本調査結果で得られた割合を比較すると，0.02-6.3%の間であり，春から秋にかけてこの値は高く，厳冬期で

ある1月の試料において低い傾向にあった (Tables 1-3)。水温上昇に伴い，冬場における Culturability に変化が認められる可能性もある。さらに，水温上昇時の微生物指標として，10°C 以下では検出が難しくなる赤変原因菌の分布調査を行い，発電所からの温排水の排出に際しての指標として用いることが可能か検討した。調査したいずれの定点からも赤変原因菌は検出されたが，水温が 5-6°C の厳冬期でも赤変原因菌が検出された定点があった (Fig. 4)。従って，本菌を指標とした水温上昇の評価は現実的には難しいと考えられたが，発電所建設予定地周辺の St. 5 では，厳冬季に赤変原因菌は検出されなかった。発電所稼動後の St. 5 での赤変原因菌の検出は有効であると考える。

下北半島北部に建設予定の原子力発電所は，平成 10 年 12 月から着工されており，平成 17 年 7 月に運転開始予定である。運転開始後の下北半島沿岸海域の細菌相が変化するか否かは，非常に興味深い。

謝　　辞

本調査は，下北半島地域総合環境調査の一環として行った。ここに，謝意を表する。

文　　献

Amann, R.I., Ludwing, W. and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultiration. *Microbial. Rev*, **59**, 143-169.

絵面良男・清水　潮 (1990). 水質・微生物編. pp. 9-20, 日本海洋学会(編), 沿岸環境調査マニュアル II. 恒星社厚生閣, 東京.

絵面良男・山本啓之・木村喬久 (1988). 促成マコンブ種苗糸赤変原因菌の分離. 日水誌, **54**, 665-672.

Kepner, JR., R.L. and Pratt, J.R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbial. Rev.*, **58**, 603-615.

Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y. and Ezura, Y. (1995). Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microb. Ecol.*, **30**, 193-202.

Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, T., Iqbal. M. M., Yumoto, I., Ezura, Y. and Christen, R. (1998). *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **48**, 769-774.

山田　毅・吉水　守・絵面良男・木村喬久 (1990). マコンブ種苗糸赤変原因菌 *Alteromonas* sp. の北海道沿岸における分布. 北大水産研究彙報, **41**, 221-226.

Yamamoto, H., Ezura, Y. and Kimura, T. (1982). Effect of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1427-1431.

Yumoto, I., Ezura, Y. and Kimura, T. (1989). Distribution of the *Alteromonas* sp., the causative agent of red-spots on the culture bed of Makonbu *Laminaria Japonica*, in the coastal area of Funka Bay. *Nippon Suisan Gakkaisi*, **53**, 453-462.