



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	八代海における有害ラフィド藻 <i>Chattonella antiqua</i> に対する殺藻及び増殖阻害細菌の時空間的変動
Author(s)	稲葉, 信晴; 秋里, 綾乃; 黒田, 麻美 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 66(1), 9-18
Issue Date	2016-03-18
DOI	https://doi.org/10.14943/bull.fish.66.1.9
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61050
Type	departmental bulletin paper
File Information	bull.fish.66.1.9.pdf



八代海における有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* に対する殺藻 及び増殖阻害細菌の時空間的変動

稲葉 信晴¹⁾・秋里 綾乃¹⁾・黒田 麻美¹⁾・西 広海²⁾
田原 義雄²⁾・坂見 知子³⁾・今井 一郎⁴⁾

(2015 年 11 月 27 日受付, 2015 年 12 月 21 日受理)

Temporal and spatial dynamics of algicidal and growth-inhibiting bacteria against the fish-killing raphidophyte *Chattonella antiqua* in seawater of Yatsushiro Sea, south-western Kyushu, Japan

Nobuharu INABA¹⁾, Ayano AKISATO¹⁾, Asami KURODA¹⁾, Hiromi NISHI²⁾,
Yoshio TAHARA²⁾, Tomoko SAKAMI³⁾ and Ichiro IMAI⁴⁾

Abstract

The harmful raphidophyte *Chattonella antiqua* is known as a notorious red-tide causing autotrophic flagellate. Mass mortalities of mainly cultured yellowtails by *C. antiqua* in 2009 and 2010 at Yatsushiro Sea, located in Kyushu, the southernmost of the four main islands of Japan, reaching 8.7 billion Japanese yen (about 80 million US dollar) have been newly reported. There is an urgent need to seek strategies for reducing negative impacts by *Chattonella* red-tides. In this study, temporal and spatial fluctuations of algicidal bacteria (AB) and growth-inhibiting bacteria (GIB) against *C. antiqua* in the seawater at southwest of Yatsushiro Sea were investigated in 2012. Densities of AB or GIB ranged between $3.7 \times 10^1 - 5.6 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ at 0 m and $1.4 \times 10^1 - 8.5 \times 10^2$ CFU mL⁻¹ at 1 m above the bottom (B-1 m). Percentages of bacteria that killed or inhibited the growth of *C. antiqua* within the total culturable bacteria fluctuated between 3.3–17% (0 m) and 3.3–10% (B-1 m). AB and GIB were mostly found as particle-associated form (0 m : 71%, B-1 m : 87%). Partial 16S rRNA sequencing revealed that all of AB and GIB detected in this study were comprised of α - and γ -proteobacteria as well as the previous study conducted in 2011. This study gives an important ecological implication of algicidal and growth-inhibiting bacteria in the coastal water in relation to the occurrences and prevention of harmful red-tides by *Chattonella* spp.

Key words : *Chattonella antiqua*, Harmful algal bloom, Algicidal bacteria, Growth-inhibiting bacteria, red tide, prevention

緒 言

有害赤潮の原因種であるラフィド藻 *Chattonella antiqua* (以下, *Chattonella*) は, 日本の沿岸域で魚類の大量斃死を引き起こす悪名高い赤潮原因生物として知られている。1972 年に瀬戸内海播磨灘で 1428 万尾の養殖ハマチを斃死させ, 約 71 億円という巨額の漁業被害 (Imai et al., 2006) を与えた種として有名である。特に八代海や有明海においては 1988 年以降, 高頻度で *Chattonella* による赤潮が発生しており, 2009 年と 2010 年度に発生した大規模な赤潮は養殖ブリ斃死を中心とし, 合計総額 80 億円を超える甚大

な被害をもたらした (Onitsuka et al., 2011 ; Katano et al., 2012)。このように *Chattonella* によって引き起こされる赤潮被害額は他の赤潮生物に比べ非常に大きいことから, その被害を軽減するための技術開発が我が国の水産庁を中心とし進められてきた。*Chattonella* の生理生態学的知見に基づいた発生機構の解明により, 発生予知技術についてはかなり進展したと言える (Imai and Yamaguchi, 2012)。法的規制による河川からの栄養塩の流入や, 養殖技術の改善によって, 一定の効果が認められている (Imai et al., 2006)。直接的防除技術としてこれまでに物理・化学・生物学的防除法が検討されてきているが (Anderson et al.,

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学院海洋生物資源科学専攻海洋生物学講座浮遊生物学領域

(Plankton Laboratory, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 鹿児島県水産技術開発センター

(Kagoshima Prefectural Fisheries Technology and Development Center)

³⁾ 水産総合研究センター東北水産研究所

(Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency)

⁴⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門海洋生物学分野

(Plankton Laboratory, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

2001; Sengco and Anderson, 2004; Imai et al., 2006), 八代海域における *Cochlodinium* 赤潮に対し粘土散布が緊急対策としてのみ行われているのが現状である。

赤潮の発生や消滅過程において、食物連鎖の観点から赤潮生物捕食者の影響が重要である事は明白であるため世界中で赤潮原因種の捕食者に焦点をおいた研究が精力的に進められてきた (Sakata, 1990; Imai et al., 1991, 1993; Calbet et al., 2003; Jurkevitch and Davidov, 2007)。近年、赤潮消滅過程において殺藻細菌の存在が大きな役割を演じている事が示唆されている (Doucette et al., 1998; Kim et al., 1998; Imai et al., 1998, 2001; Mayali and Azam, 2004; Mayali, 2007; 今井, 2013)。しかし、これら細菌の生態学的研究は検出方法や培養法の技術的制限により、十分な知見がないのが現状である。特に赤潮未発生の海水中におけるこれら殺藻細菌の動態に関する知見はほとんどない。本研究では、2012年の赤潮非発生であった時期 (夏季) の八代海における海水中の *Chattonella* に対する殺藻及び増殖阻害性を示す細菌の時空間的変動を調査したので報告する。

材料および方法

サンプリング

2012年6月から9月にかけて、原則として毎週一回、鹿児島県東町脇崎沿岸 (Fig. 1) の表層 (0 m) 及び海底上 1 m (B-1 m) から採水し、海水試料とした。海水試料は、塩酸処理後、滅菌処理したポリプロピレン容器 (500 mL) にて

当日中に冷蔵の宅配便にて送付し、実験に供した。サンプリング時の水温、塩分は多項目水質モニター (6600 V2-4, YSI Japan) にて計測した。表層海水は採水後直ちにグラスファイバーフィルター (GF/C, Whatman) を用いて濾過し、90% アセトンにて一日間冷暗所で抽出を行い、蛍光光度計 (U-2010, Hitachi High-Tech Fielding Corp.) を用いクロロフィル *a* 濃度を測定した。また、栄養塩 (DIN: $\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$, PO_4 , SiO_2) はオートアナライザー (AACS-4, BL-TEC) にて測定した。

粒子付着性及び浮遊性従属栄養性細菌の分離と計数

両海水試料 (0 m 及び B-1 m) は、滅菌海水を用い 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 倍に段階希釈後、各希釈段階から 1 mL を孔径 3.0 μm のヌクレポアフィルター (Whatman) で濾過した。フィルターは ST10^{-1} 寒天培地 (0.05 g yeast extract, 0.5 g trypticase peptone 及び 15 g の寒天を 1 L の海水中に含む; Yoshinaga et al., 1997) 上に静置し、濾液 0.1 mL は ST10^{-1} 寒天平板に塗抹した。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) 画分、濾液中の細菌を浮遊性細菌 (Free living bacteria: FLB) 画分とし、暗条件にて 20°C で 2 週間培養した。未処理の海水試料 (Total bacteria: TB) 及び FLB 試料はグルタルアルデヒド (終濃度 1%) を用い固定し、細菌の直接計数用の試料とした。2 週間培養した寒天培地上に形成されたコロニー数の平均値と希釈段階、濾過量また塗抹量から培養可能細菌数 (CFU mL^{-1} [colony-forming unit: CFU]) を算出した。その後、48 コロニーを無作為に滅菌爪楊枝で釣菌し、 ST10^{-1} 寒天培

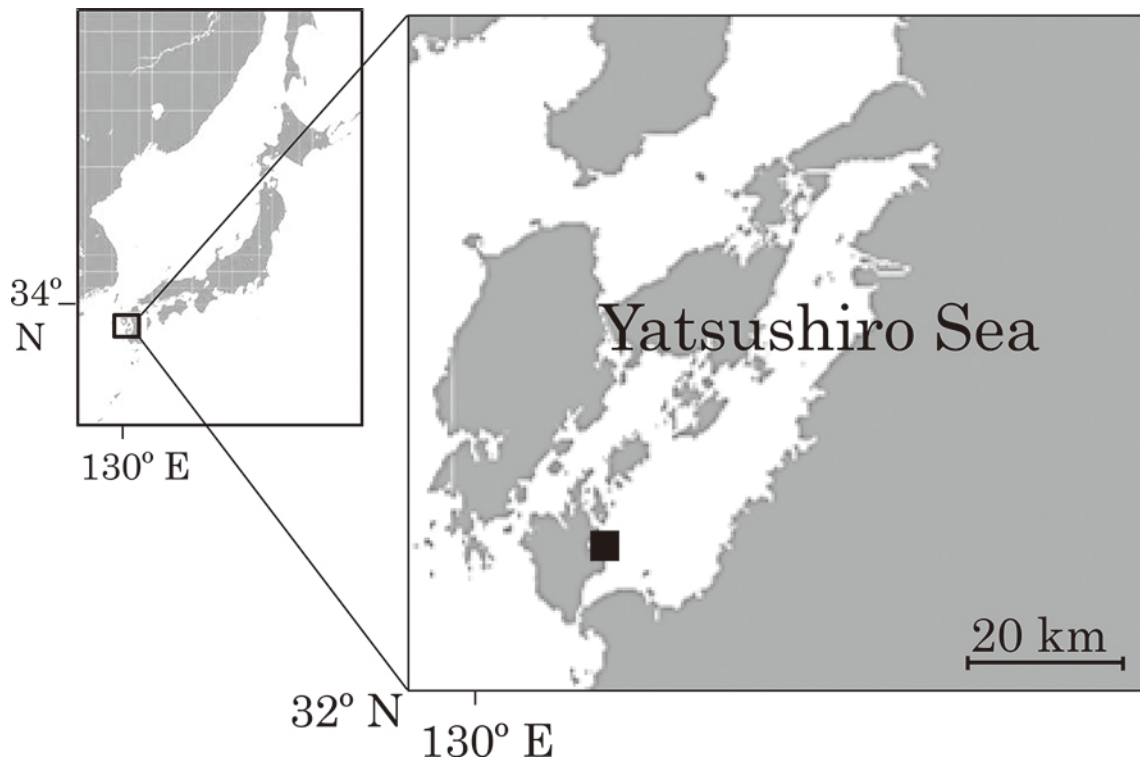


Fig. 1. Location of the sampling station (■) in the southwest Yatsushiro Sea, Kyushu, Japan.

地が入った 48 ウェルマイクロプレートのウェルに単離・培養した。

全細菌数 (TB) は上述の固定した試料を用いて、DAPI 染色法による染色後、落射蛍光顕微鏡で直接計数を行い算出した (Porter and Feig, 1980; Imai, 1987)。PAB (粒子付着性細菌) は、TB から FLB (浮遊性細菌) を差し引いた値として算出した。計数は各試料につき 15 視野以上行い、1 視野あたりの平均値と濾過量から、1 mL 中に存在する細菌数を求めた。

実験に用いた赤潮藻類の培養

有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* (NIES-1, 無菌株) は、改変 SWM-3 培地 (Chen et al., 1969; Imai et al., 1996) を用いて 20°C、光強度 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期 14 hL : 10 hD の条件下で維持培養した。

分離細菌の殺藻能の評価 (二者培養試験)

Chattonella に対する殺藻能を評価するため、分離した細菌と対象藻類との二者培養試験を行った (Fig. 2)。試験の 1, 2 日前に 48 ウェルマイクロプレートに *C. antiqua* の培養を約 1,000 cells mL⁻¹ に調整し 0.8 mL ずつ分注し、良好な増殖を確認した後、単離細菌株の PAB と FLB を滅菌爪楊枝でごく少量掻きとって各ウェルに接種した。試験は各細菌株について 2 本立てで行い、各プレートに細菌を添加しないコントロール区を 4 ウェルずつ設けた。1 週間培養し、0, 1, 2, 3, 5, 7 日目に倒立顕微鏡下で殺藻及び増殖阻害の有無を観察した。培養は上記の藻類培養と同様の条件下で行った。藻類細胞が 90% 以上死滅している場合を「殺藻細菌」(Fig. 3 B), コントロール区と比較し増殖が明らかに阻害されている (増殖能力阻害, 遊泳能力阻害, あるいは藻類の形態異常の誘発) 場合を「増殖阻害細菌」とした (Fig. 3 C and D)。増殖阻害細菌の中でも、遊泳能力に異常がみられたウェルを「球形化誘導細菌 (Nomotility-

inducing bacteria: NmIB)」(Fig. 3 C), 藻類の形状が楕円状に変異したウェルを「棒状化誘導細菌 (Elongation-inducing bacteria: EIB)」(Fig. 3 D) として識別した (Fig. 3)。殺藻また増殖阻害を起こした株数と試験に用いた細菌株数の割合と培養可能細菌数から殺藻細菌数を算出した。計算式は以下の式を用いた。

$$B_k = B_c \times S_A / S_T$$

B_k : 藻類を殺藻・増殖阻害した細菌数 (CFU mL⁻¹)

B_c : 培養可能細菌数 (CFU mL⁻¹)

S_A : 殺藻・増殖阻害を示した細菌株数

S_T : 殺藻試験に供した細菌株数 (30 株)

16S rRNA 遺伝子解析

二者培養試験にて殺藻細菌および増殖阻害細菌として分離された菌株 29 株について、16SrRNA の部分塩基配列 (約 500 bp) 解析を行った。各株は ST10⁻¹ 液体培地に増殖させ、培養を 15,000 rpm で 5 分以上遠心して細菌をペレットにして回収した。DNA 抽出は熱抽出法 (10 分間 100°C) を用い、抽出した DNA については TOYOBO blend Taq を使用し、PCR 反応により 16S rRNA の部分塩基配列を増幅した。PCR 前の初期変性は 94°C で 2 分間、PCR サイクルは 94°C で 30 秒, 58°C で 30 秒, 72°C で 1 分を 30 サイクル, 72°C で 7 分の熱処理を行った。プライマーは 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Delong, 1992) と 519R (5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3') (Stackebrandt and Goodfellow, 1991) を用いた。PCR 反応により生成した DNA 産物は、2% アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR による増幅を確認した。PCR 産物はダイレクトシーケンスを行うために、SAP (ExoSAP-IT, GE Healthcare) を添加し、37°C で 15 分、80°C で 15 分の熱処理を行い、DNA テンプレートを作成した。DNA テンプレートは、BigDye Terminator Cycle version 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用

Axenic culture of *Chattonella antiqua*

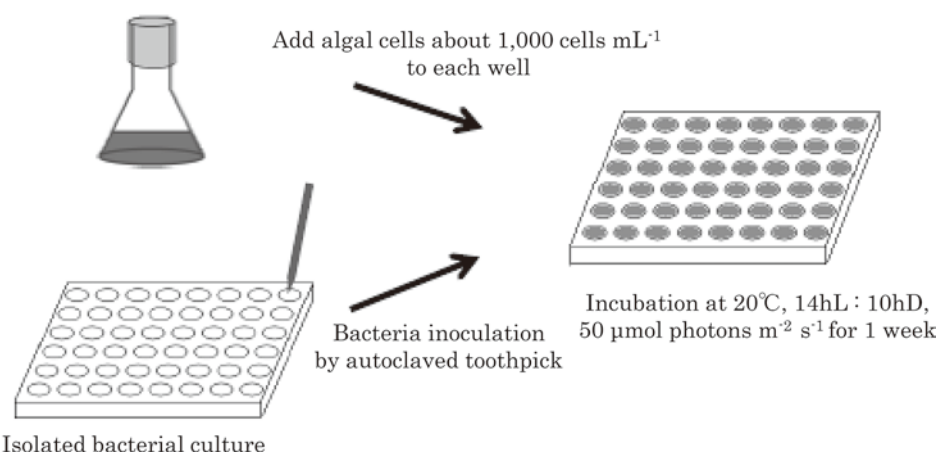
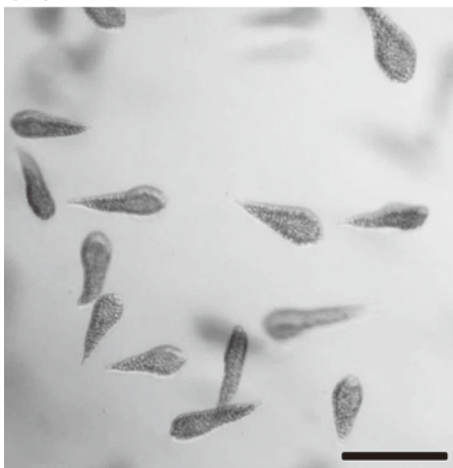
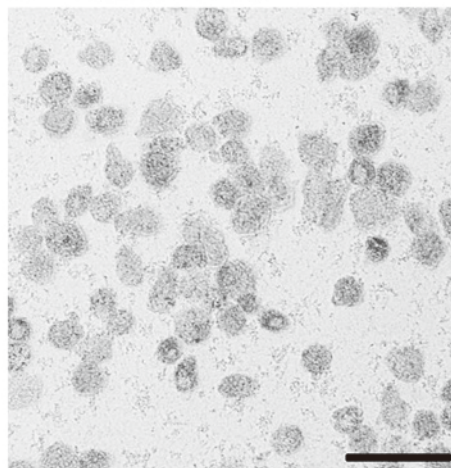


Fig. 2. Procedure of co-culture experiments to test algicidal or growth-inhibition activities of bacteria against *Chattonella antiqua*.

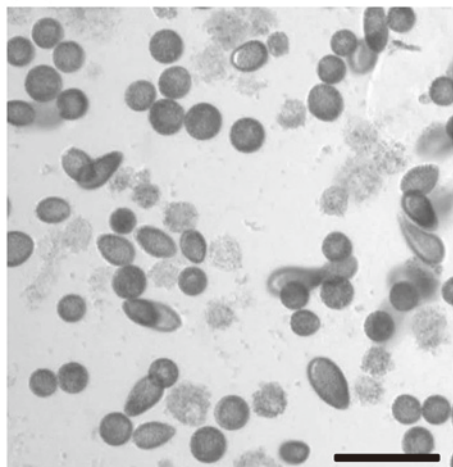
(A) Control



(B) Killed cells



(C) Roundish cells



(D) Elongated cells



Fig. 3. Activities of algicidal bacteria (AB) and growth-inhibiting bacteria (GIB) against *Chattonella antiqua*. Control (A), killed cells (B), roundish cells (C) and elongated cells (D). Scale bar = 100 μm

いて 96°C で 10 秒, 50°C で 10 秒, 60°C で 4 分を 30 サイクルの熱処理を行った。作成したテンプレートは Hi-dye ホルムアルデヒド 10 μL を添加し, キャピラリー型 DNA シークエンサー (ABI 3100, Applied Systems) を用い, DNA 塩基配列を解析した。得られた一本鎖 DNA の塩基配列を Chromas pro (ver. 1.7.1) にてアラインメントを行い, 塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列データは, NCBI の BLAST を用いて細菌の相同性検索を行い, 近縁な細菌株を調べた。複数の既知株と同値の相同性を示した場合, 配列の長さなどを考慮してもっとも相同であろう一株のみを近縁株として採用した。

結 果

水理環境

八代海脇崎 0 m における水理環境の変動を Fig. 4 に示す。水温は採水期間中徐々に上昇傾向を示した。塩分はやや大きい変動を示した後, 8 月以降は安定的に推移した。溶存無機態窒素は 0.1~2.9 μM , 溶存無機リンは 0.01~0.28 μM , ケイ酸態ケイ素は 1.1~20.9 μM の範囲で推移した。Chl. *a* は 0.7~11 $\mu\text{g L}^{-1}$ の範囲で推移し, 6 月 26 日に最高値を示した後は減少傾向にあった。

全細菌数及び培養可能細菌数の変動

サンプリング期間の両水深 (表層及び B-1 m) における全細菌数 (Total bacteria: TB) の変動を Fig. 5 に示した。TB は, 表層で $6.1 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$, B-1 m で 4.4×10^5

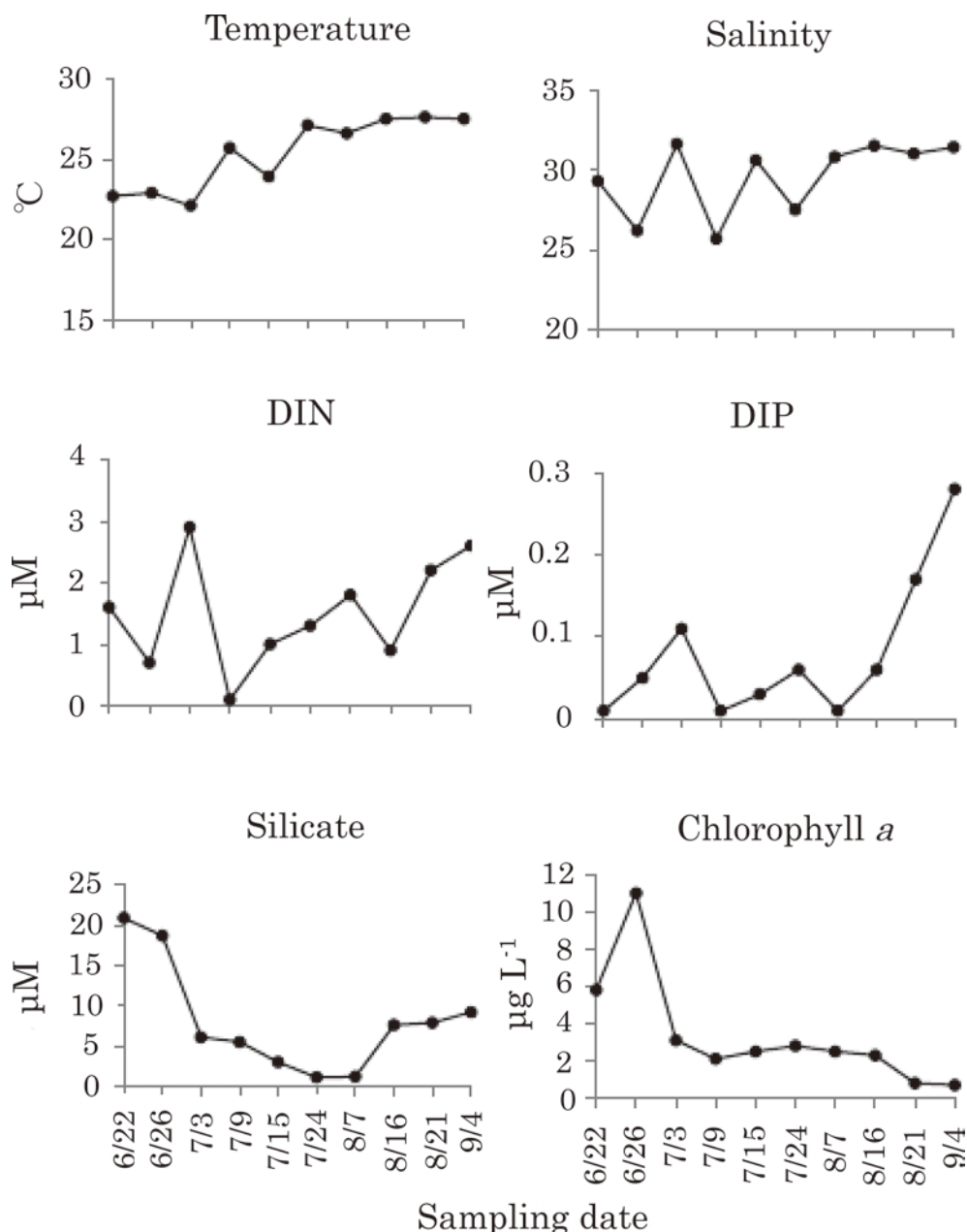


Fig. 4. Temporal changes of temperature, salinity, dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved inorganic phosphorus (DIP) and silic acid (SiO_2) in the surface water (0 m) from June 22 to September 4, 2012.

～ $1.6 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の範囲で推移した。ほとんどの採水日で B-1 m より 0 m の方が高密度であったが、大きく差が開くことは無かった。FLB (浮遊性細菌) 数は PAB (粒子付着性細菌) 数と比べ、B-1 m の 8 月 16 日を除きほぼ常に高い値を示した。

両水深における培養可能細菌数の変動は Fig. 6 に示した。表層では、全細菌数が最高値 ($3.9 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) を示した 7 月 24 日に培養可能細菌数も同様に $6.1 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ と非常に高い値を示したが、その他の期間は、概ね $10^3 \sim 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ の範囲であった。9 月 4 日を除き FLB 数の方が PAB 数より約 4～16 倍高かった。B-1 m は $10^2 \sim$

10^4 CFU mL^{-1} の範囲であり、常に FLB 数の方が 1.2～10 倍高かった。FLB 数は B-1 m より表層の方が高い値を示す傾向が認められ、表層の密度の変動と比べると B-1 m の変動は比較的安定していた。

殺藻および増殖阻害細菌数の変動

Fig. 7 に殺藻 (AB) 及び増殖阻害細菌 (球形化誘導細菌: NmIB と棒状化誘導細菌: EIB) 数の変動を示した。

表層では $3.7 \times 10^1 \sim 5.6 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、B-1 m は $1.4 \times 10^1 \sim 8.5 \times 10^2 \text{ CFU mL}^{-1}$ の範囲で殺藻及び増殖阻害細菌が検出された。どちらの水深でも 7 月 24 日に最も高い値 (表

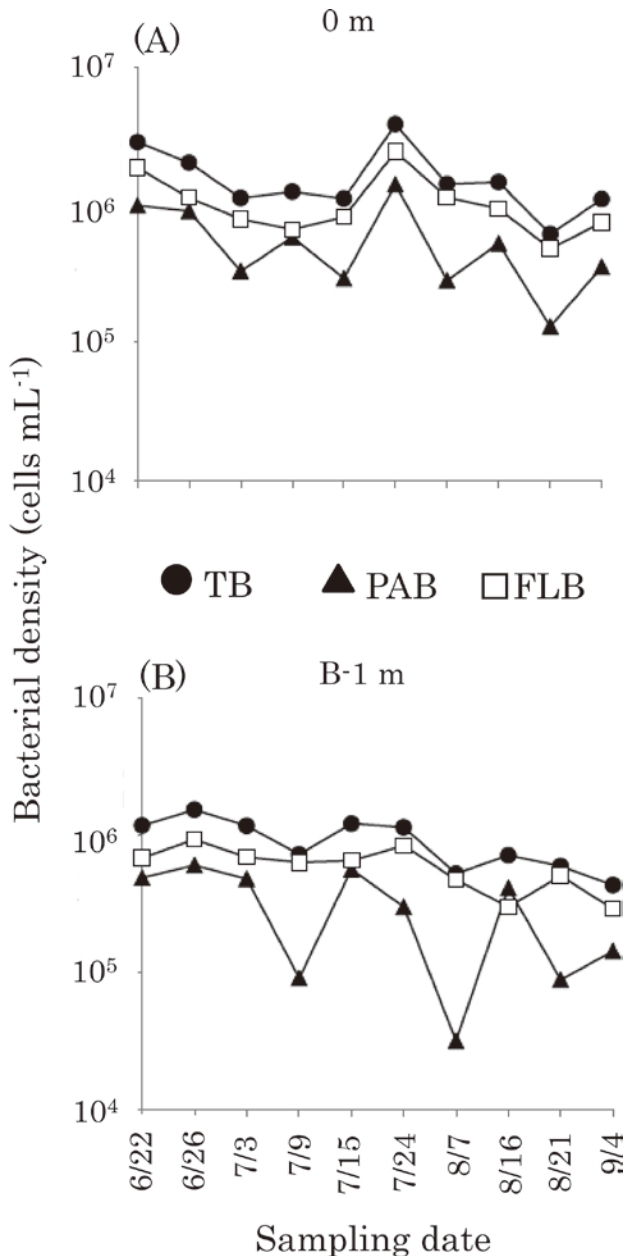


Fig. 5. Temporal changes of densities (cells mL^{-1}) of total bacteria (TB), Free-living bacteria (FLB), Particle-associated bacteria (PAB) at both layer (0 m (A) and 1 m above the seafloor (B)).

層で 5.6×10^3 CFU mL^{-1} , B-1 m で 8.5×10^2 CFU mL^{-1}) を示した。殺藻細菌は表層海水中から比較的高頻度 (5 回/10 回) で検出され, 増殖阻害細菌に関しては表層で EIB が多く検出 (4/10) され, B-1 m では NmIB が高頻度で検出 (5/10) された。表層と底層において, 殺藻細菌, 増殖阻害細菌共に, ほとんど PAB 画分から検出 (殺藻細菌: 71%, 増殖阻害細菌: 92%) された。培養可能細菌数に対する検出対象株数の割合は 0 m で 3.3~17%, B-1 m で 3.3~10% であった。

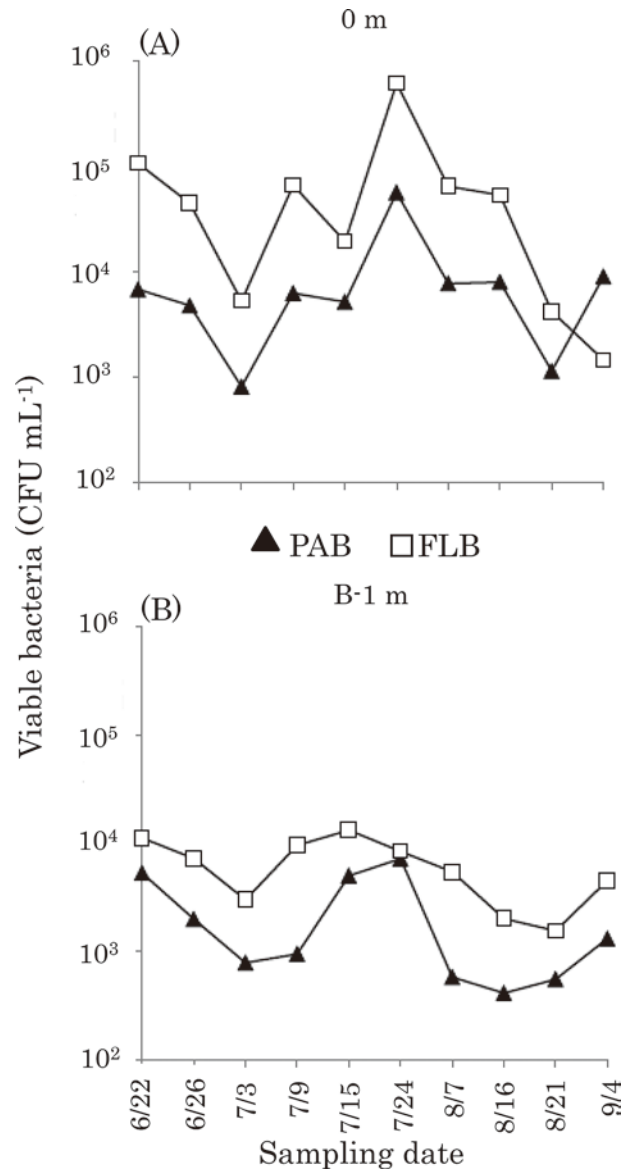


Fig. 6. Temporal changes of densities (CFU mL^{-1}) of viable bacteria (FLB: Free-living bacteria, PAB: Particle-associated bacteria) at both layer (0 m (A) and 1 m above the seafloor (B)).

殺藻及び増殖阻害細菌の種構成

殺藻及び増殖阻害細菌として分離された株と近縁と判断された細菌株のリストを Table 1 に示した。今回分離された殺藻及び増殖阻害細菌は, γ -Proteobacteria 綱あるいは α -Proteobacteria 綱に属し, γ -Proteobacteria 綱に属する細菌が 81% を占めた。特に *Alteromonas* 属に属する株が多く (21 株中 10 株), 殺藻細菌に関しては約 50% が *Alteromonas* 属の細菌であった。

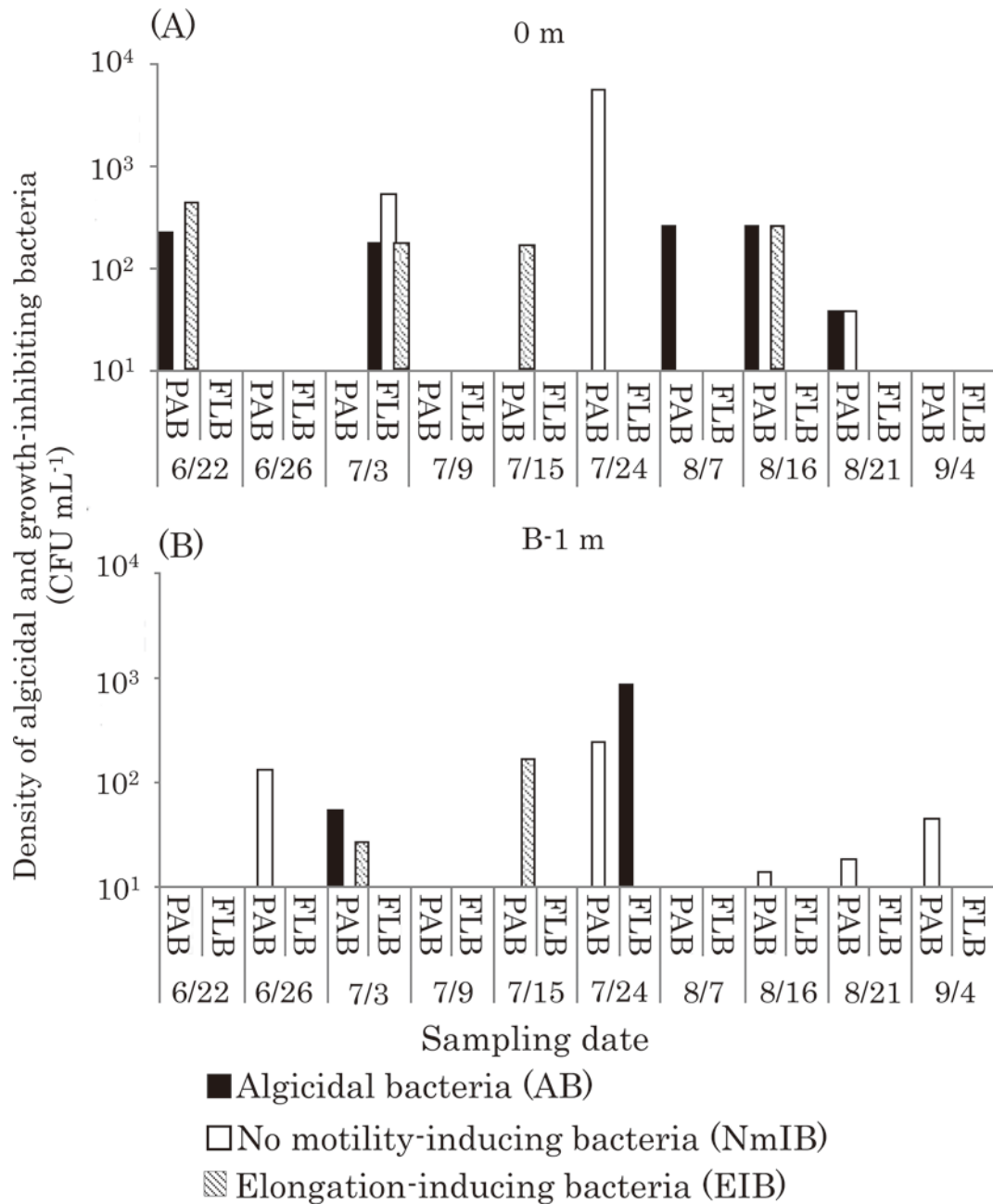


Fig. 7. Temporal changes of densities (CFU mL⁻¹) of algicidal bacteria (AB) and growth-inhibiting bacteria (No motility inducing bacteria : NmIB and Elongation inducing bacteria : EIB) at both layer (0 m (A), 1 m above seafloor (B)).

考 察

過去の研究により、赤潮発生から消滅期間における従属栄養性細菌の影響の重要性が示唆され、赤潮原因藻類を殺滅する殺藻細菌が世界中の沿岸域から分離、同定され、それら細菌の生理生態学、系統分類学的研究が行われてきた (Imai et al., 1993; Yoshinaga et al., 1995, 1997; Doucette et al., 1999; Skerratt et al., 2002; Mayali and Azam, 2004; Kim et al., 2009)。しかし、それら研究はほとんどが赤潮発生期間における海水中的の殺藻細菌の動態解明を目

的としたものがほとんどである。しかし、赤潮の生物学的防除法として殺藻細菌を利用する事を考慮した場合、赤潮発生時以外の殺藻細菌の生態に関する知見の集積も同様に不可欠である。Inaba et al. (2014) によると、赤潮非発生の海水中においてもクロロフィル *a* 量の変動と殺藻・増殖阻害細菌数の密接な関係性が示されたため、それら細菌は普遍的に海水中に存在し、植物プランクトン現存量制御の一助となり海の恒常性を保つ役割を担っている事が示唆された。本研究では、Inaba et al. (2014) と同じ時期に同じ定点にて赤潮非発生海水中の殺藻及び増殖阻害

Table 1. List of genetically closest relatives of isolated algicidal bacteria (AB) and growth-inhibiting bacteria (No motility inducing bacteria : NmIB and Elongation inducing bacteria : EIB) based on 16S rRNA gene sequences. FLB : Free-living bacteria, PAB : Particle-associated bacteria, α : α -proteobacteria, γ : γ -proteobacteria.

Depth	Fraction	Strain No.	Characteristic	Group	Closest relative	Accession NO.	Similarity (%)
0 m	FLB	WSF3-14	NmIB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.1	KC160874.1	99
0 m	FLB	WSF3-31	EIB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.1	KC160874.1	99
0 m	FLB	WSF3-30	AB	γ	<i>Halomonas</i> sp. EB359	FJ785508.1	99
0 m	FLB	WSF3-13	NmIB	γ	<i>Halomonas</i> sp. RHS-str. 203Cr B	HE586871.1	99
0 m	PAB	WSP9-16	NmIB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.13	KC160886.1	99
0 m	PAB	WSP6-10	NmIB	γ	<i>Marinomonas basaltis</i> strain LMG 25279	GU929941.1	97
0 m	PAB	WSP8-26	EIB	α	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	AB607866.1	99
0 m	PAB	WSP1-19	EIB	α	<i>Loktanella koreensis</i> strain GA2-M3	NR_043741.1	97
0 m	PAB	WSP7-15	AB	γ	<i>Marinomonas communis</i>	AB681738.1	98
0 m	PAB	WSP8-18	AB	α	<i>Thalassobius mediterraneus</i>	AB607866.1	99
0 m	PAB	WSP1-1	AB	γ	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	JX177727.1	96
B-1 m	FLB	WBF6-4	AB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.1	KC160874.1	99
B-1 m	FLB	WBF6-12	AB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.1	KC160874.1	99
B-1 m	FLB	WBF6-24	AB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.1	KC160874.1	98
B-1 m	PAB	WBP6-7	NmIB	γ	<i>Alteromonas</i> sp. SS6.13	KC160886.1	99
B-1 m	PAB	WBP9-23	NmIB	γ	<i>Vibrio harveyi</i> strain HE2	FN554591.2	97
B-1 m	PAB	WBP10-30	NmIB	γ	<i>Neptunomonas</i> sp. LHW37	JF748732.1	94
B-1 m	PAB	WBP3-45	EIB	γ	<i>Alteromonas macleodii</i>	CP003873	100
B-1 m	PAB	WBP3-46	AB	γ	<i>Alteromonas macleodii</i>	CP003873	97
B-1 m	PAB	WBP3-47	AB	γ	<i>Alteromonas macleodii</i>	CP003873	94
B-1 m	PAB	WBP2-38	AB	α	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>	CP002976	96

α : α -proteobacteria γ : γ -proteobacteria

細菌の動態を解析し、傾向を比較した。その結果、本研究においては殺藻及び増殖阻害細菌は10回のサンプリング中7回の海水試料(0 m 海水試料)から検出され、2011年の検出頻度と同じであった。検出密度を比較してみると、本研究の値は $3.7 \times 10^1 \sim 5.6 \times 10^3$ CFU mL⁻¹で変動していた。2011年は $2.7 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^4$ CFU mL⁻¹で変動し、最高値は2012年(5.6×10^3 CFU mL⁻¹)に比べ高い値であった。2011年はクロロフィル *a* が最高値(4 μ g L⁻¹)を示した8月3日に殺藻細菌密度も最大であったが、本研究ではクロロフィル *a* 量が最高値(11 μ g L⁻¹)を示した6月26日の表層海水から殺藻あるいは増殖阻害細菌は検出されなかった。しかし、本研究では *C. antiqua* に対する殺藻性あるいは増殖阻害性を示す細菌の動態について検討しているが、殺藻や増殖阻害性の種特異性を示す細菌の存在が報告されているため(Yoshinaga et al., 1995; 吉永, 2002), 現場海水で優占していた植物プランクトンを宿主生物とした検討が今後の課題であろう。

殺藻細菌は海水中の粒子に付着した状態で検出される事が多い事が知られている(Park et al., 2010; Inaba et al., 2014)が、今回の調査において分離された殺藻及び増殖阻害細菌はほとんどが粒子に付着している状態で検出(殺藻細菌: 71%, 増殖阻害細菌: 92%)された。植物プランクトンを殺藻する過程で藻類細胞と直接的な接触を必要とす

る殺藻メカニズムや(Imai et al., 1993), 殺藻物質産生がクオラムセンシングで制御されている可能性(Skerratt et al., 2002; Nakashima et al., 2006), 更に粒子付着性細菌は浮遊性細菌に比べ高い菌体外酵素活性を持つなど生理活性が異なる事も報告されている(Smith et al., 1992; Bidle and Azam, 1999)。このように物理的な環境変動が大きい海洋環境における粒子付着性は、殺藻性においても好適に働く事が予想される。本研究でB-1mの粒子付着性画分から検出されたシャットネラを殺藻する細菌は、 α -プロテオバクテリアに属する *Phaeobacter gallaeciensis* に近縁(Similarity: 96%)であった。先行研究で *Phaeobacter gallaeciensis* BS107 株は円石藻(*Emiliania huxleyi*)のブルームからも見出されている細菌である(Mohammad et al., 2011)。この細菌は、宿主生物に対してオーキシン産生、抗生物質であるトロポジチエト酸により藻類の増殖を促進する作用を示す一方で、円石藻細胞の老化に伴い増加するリグニン分解産物の *p*-クマル酸に反応し殺藻物質(Roseobactin)を産生する日和見病原性細菌となる事が知られている(Mohammad et al., 2011)。*P. gallaeciensis* BS107 株は円石藻だけでなくクリプト藻 *Rhodomonas salina* に対しても殺藻性を示し、珪藻 *Chaetoceros muelleri* 細胞の形態的変形を引き起こす事が認められている(Mohammad et al., 2011)。このような藻類細胞の生理状態を微量な化学物質を感知

する事で判断し、殺藻物質を産生するような生活史を持つ細菌にとっても粒子付着性は極めて重要であると考えられる。

今回の調査では、主に γ -プロテオバクテリアに属する *Alteromonas* 属の細菌が分離された全殺藻細菌の 50% 占めていた事が判明した。*Alteromonas* 属の細菌は世界中の沿岸海域から分離されているユニバーサルな殺藻細菌である (Imai et al., 1995; Mayali and Azam, 2004)。*Alteromonas* のような広布な殺藻細菌の分子生物学的な定量化による分布や動態把握は赤潮の生物学的防除のためだけでなく、粒子状有機物 (POM) である植物プランクトンを殺藻し、溶存有機物 (DOM) に変換する過程で極めて重要な役割を担っている可能性があり、今後解明していく必要のある重要な課題であろう。

今回、増殖阻害細菌を「球形化誘導細菌 (No motility-inducing bacteria: NmIB)」(Fig. 3 C) あるいは「棒状化誘導細菌 (Elongation-inducing bacteria: EIB)」(Fig. 3 D) として分類しているが、2011 年の調査でもシャットネラに対して同様の阻害作用を示した細菌が多く分離されている (Inaba et al., 2014)。それら阻害作用を示した細菌の組成 (表層) を比較してみると、2011 年では *Alteromonas* 属の細菌が球形化誘導細菌として全体の 15%、2012 年では 29% を占め、棒状化誘導細菌 (Elongation-inducing bacteria: EIB) は主に両年とも α -プロテオバクテリアに属する細菌が過半数を占めていた (Inaba et al., 2014; Table 1)。両タイプともにシャットネラの遊泳能への著しい阻害が認められ (Fig. 3 C, D)、棒状化誘導細菌に関しては、二者培養試験で使用したマイクロプレートウェルの底で多くの細胞が同じ場所を回転している様子が観察された。Mayali et al. (2008) は渦鞭毛藻 *Lingulodinium polyedrum* の遊泳能阻害酵素を産生する細菌について記述しているが、渦鞭毛藻やシャットネラ (ラフィド藻) といった鞭毛運動による鉛直移動を行う植物プランクトンの遊泳能が阻害される事は、鉛直移動能力に大きく影響を及ぼし、他の植物プランクトンとの栄養塩の競合や好適な光環境を獲得する上でも致命的であろう。今後、これら増殖阻害細菌の産生する阻害物質の特定や阻害メカニズム、生理生態学的研究を進めていく事は微生物間の相互作用をより深く理解する上で重要であり、シャットネラ赤潮発生における生物間メカニズムの解明に繋がると期待される。

本研究では、2012 年夏季の八代海南西部沿岸における赤潮非発生の海水中の *Chattonella* を殺藻あるいは阻害する細菌の動態、そして、その細菌組成を明らかにした。しかし、シャットネラ赤潮の生物学的防除策として殺藻細菌や増殖阻害細菌を利用する上でこれら細菌が現場海水中でどのような動態を示すのかをより解像度の高いレベルで把握する事は極めて重要である。水温や栄養塩といった物理化学的環境変化の影響や、従属栄養性鞭毛虫などの細菌捕食者、植物プランクトンや細菌間の競合といった生物学的要因の影響下での殺藻及び増殖阻害細菌

の動態解明は今後の課題である。

謝 辞

本研究において、サンプリング等にご協力戴いた鹿児島県水産技術開発センターならびに水産総合研究センター東北区水産研究所の関係職員の皆様に心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Anderson, D.M., Andersen, P., Bricelj, V.M., Cullen, J.J. and Rensel, J.E. (2001) Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters. APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, (APEC, Singapore; IOC, Paris).
- Bidle, K.D. and Azam, F. (1999) Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature*, **397**, 508-512.
- Calbet, A., Vaque, D., Felipe, J., Vila, M., Sala, M., Alcaraz, M. and Estrada, M. (2003) Relative grazing impact of microzooplankton and mesozooplankton on a bloom of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Mar. Eco. Prog. Ser.* **259**, 303-309.
- Chen, L.C.M., Edelstein, T. and McLachlan, J. (1969) *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.
- Delong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**, 5685-5689.
- Doucette, G.J., Kodama, M., Franca, S. and Gallacher, S. (1998) Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology toxigenesis and cytology. pp. 619-647, Anderson, D.M., Cembella A.D. and Hallegraeff, G.M. (eds), *Physiological ecology of harmful algal blooms*, NATO ASI Series, Vol G41, Springer-Verlag, Berlin.
- Doucette, G.J., McGovern, E.R., and Babinchak, J.A. (1999) Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinoflagellates). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.*, **35**, 1447-1454.
- Imai, I. (1987) Size Distribution, number and biomass of bacteria in intertidal sediments and seawater of Ohmi Bay, Japan. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.*, **2**, 1-11.
- 今井一郎 (2013) 夏季の播磨灘における *Chattonella* 赤潮の発生と海洋細菌の挙動. 北海道大学水産科学研究集報, **63** (2), 7-11.
- Imai, I., Ishida, Y. and Hata, Y. (1993) Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.*, **116**, 527-532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguchi, K. and Hata, Y. (1995) Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **61**, 628-636.
- Imai, I., Ishida, Y., Sawayama, S. and Hata, Y. (1991) Isolation of a marine gliding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1409.
- Imai, I., Itakura, S., Matsuyama, Y. and Yamaguchi, M. (1996) Selenium requirement for growth of a novel red tide flagellate *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) in culture. *Fish. Sci.*, **62**, 834-835.
- Imai, I., Kim, M. C., Nagasaki, K., Itakura, S. and Ishida, Y. (1998) Relationships between dynamics of red tide-causing raphido-

- phycean flagellates and algicidal micro-organisms in the coastal sea of Japan. *Phycol. Res.*, **46**, 139–146.
- Imai, I., Sunahara, T., Nishikawa, T., Hori, Y., Kondo, R. and Hiroishi, S. (2001) Fluctuations of the red tide flagellates *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) and the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. in the Seto Inland Sea, Japan. *Mar. Biol.* **138**, 1043–1049.
- Imai, I. and Yamaguchi, M. (2012) Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae*, **14**, 46–70.
- Imai, I., Yamaguchi, M. and Hori, Y. (2006) Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.*, **1**, 71–84.
- Inaba, N., Watanabe, T., Sakami, T., Nishi, H., Tahara, Y., and Imai, I. (2014) Temporal and spatial distribution of algicidal and growth-inhibiting bacteria in the coastal sea of southwest Japan. *J. Plankton Res.*, **36**, 388–397.
- Jurkevitch, E. and Davidov, Y. (2007) Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. pp. 11–56, Jurkevitch, E. (ed), *Predatory Prokaryotes – Biology, Ecology and Evolution*, Monographs volume 4, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Katano, T., Yoshino, K., Matsubara, T., and Hayami, Y. (2012) Wax and wane of *Chattonella* (Raphidophyceae) bloom with special reference to competition between *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in the Ariake Sea, Japan. *J. Oceanogr.* **68**, 497–507.
- Kim, M.C., Yoshinaga, I., Imai, I., Nagasaki, K., Itakura, S. and Ishida, Y. (1998) A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **170**, 25–32.
- Kim, J.D., Kim, J.Y., Park, J.K., and Lee, C.G. (2009) Selective control of the *Prorocentrum minimum* harmful algal blooms by novel algal-lytic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* AFMB-008041. *Mar. Biotechnol.* **11**, 463–472.
- Mayali, X. (2007) Bacterial influence on the bloom dynamics of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. Scripps Institution of Oceanography Technical Report, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego.
- Mayali, X. and Azam, F. (2004) Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51**, 139–144.
- Mayali, X., Franks, P.J.S., Tanaka, Y. and Azam, F. (2008) Bacteria-inducing motility reduction in *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **44**, 923–928.
- Mohammad, R.S., Rebecca, J., Kolter, R. and Clardy, J. (2011) The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature Chemistry*, **3**, 331–335.
- Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K. and Oda, T. (2006) Producing mechanism of an algicidal compound against redtide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 68–690.
- Onitsuka, G., Aoki, K., Shimizu, M., Matsuyama, Y., Kimoto, K., Matsuo, H., Kitadai, Y., Nishi, H., Tahara, Y., and Sakurada, K. (2011) Short-term dynamics of a *Chattonella antiqua* bloom in the Yatsushiro Sea, Japan, in summer 2010 : characteristics of its appearance in the southern area. *Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr.* **75**, 143–153.
- Park, J.H., Yoshinaga, I., Nishikawa, T. and Imai, I. (2010) Algicidal bacteria in particle-associated form and in free-living form during a diatom bloom in the Seto Inland Sea, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.*, **60**, 151–161.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943–948.
- Sakata, T. (1990) Occurrence of marine *Saprospira* sp. possessing algicidal activity for diatoms. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1165.
- Sengco, M.R. and Anderson, D.M. (2004) Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51** : 169–172.
- Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraeff, G., James, S. and Nichols, P.D. (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **244**, 1–15.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., and Azam, F. (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* **359**, 139–142.
- Stackebrandt, E and Goodfellow, M. (1991) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- 吉永郁夫 (2002) 殺藻細菌による赤潮の防除. pp. 63–80, 広石伸互・今井一郎・石丸隆 (編), 有害・有毒藻類ブルームの予防と駆除, 水産学シリーズ 134, 恒星社厚生閣, 東京.
- Yoshinaga, I., Kawai, T., Takeuchi, T. and Ishida, Y. (1995) Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay (Wakayama Pref Japan). *Fish. Sci.*, **61**, 780–786.
- Yoshinaga, I., Kawai, T. and Ishida, Y. (1997) Analysis of algicidal ranges of the bacteria killing the marine dinoflagellates *Gymnodinium mikimotoi* isolated from Tanabe Bay, Wakayama Pref, Japan. *Fish. Sci.*, **63**, 94–98.