

養殖ノリに付着する珪藻 *Tabularia affinis* を殺滅する 珪藻殺滅細菌の検索

北口博隆*, 神原摂子, 満谷 淳, 石田祐三郎

Screening of Algicidal Bacteria Against Epiphytic Diatom *Tabularia affinis*

Hiroataka Kitaguchi*, Setsuko Kambara, Atsushi Mitsutani, and Yuzaburo Ishida

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (12), 11-17 (2001)

An epiphytic diatom, *Tabularia affinis*, caused serious damage to nori (*Porphyra*) cultivation. As *T. affinis* could not be removed from *Porphyra* foliose thalli by acid treatments, a new technique to remove this diatom has been needed. So, we regarded the biological removal of epiphytic diatom. In this study, algicidal bacteria for *T. affinis* were screened. From 11 strains of diatom-lytic bacteria isolated in Ariake Sea, only one strain had an algicidal effect on *T. affinis*. A microscopic observation showed that this strain, *Pseudoalteromonas* sp. A25, lysed *T. affinis* within 48 hours when this bacterium was inoculated at the density of 1×10^6 cells/ml to *T. affinis* culture.

Key words: algicidal bacteria, epiphytic diatom, *Porphyra*, *Tabularia affinis*

海洋において重要な一次生産者である珪藻の中には、ノリ養殖場に出現し、ノリ養殖に甚大な被害を与えるものがある。例えば、有明海においては *Skeletonema costatum* などの浮遊性珪藻がしばしばブルームを形成し、ノリの成長に必要な栄養塩が大量に消費され、ノリの色落ちによる大きな被害が発生する。また、ノリの浮流養殖において、ノリ葉体やノリ網に *Licmophora* sp. などの付着珪藻が多く付着し、その結果、どたぐされ症などノリの品質低下を引き起こす^{1,2)}。これらの珪藻はノリ養殖の害藻であり、ノリ製品の品質の低下や、ノリ養殖の豊凶を左右する一つの要因となっている。

一方、ノリの病気の発生や価格低下といった被害を引き起こす付着珪藻への対策として酸処理による除去法が開発され、付着によりノリ細胞に悪影響を及ぼす珪藻の除去に大きな効果を上げてきた。ところが、近年、兵庫県をはじめとする瀬戸内海のノリ養殖場において、新種の付着珪藻による漁業被害が発生した。例えば、1シーズンに3億数千万枚、30 数億円の水揚げを誇り、瀬戸内海最大のノリ養殖で知られる兵庫県では、1995年1月下旬

海洋生物工学科(Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

*Tel: +81-849-36-2111, Fax: +81-849-36-2459, E-mail: hkita@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

頃から2月末, および3月下旬から4月上旬にかけて, 新種の付着珪藻が大発生し, 品質の低下による価格低下が引き起こされ, 全売り上げの1割以上にあたる3億数千万円の漁業被害があった。この時発生した珪藻は付着性の *Tabularia affinis* であることが判明した³⁾。*T. affinis* は酸処理ではほとんど脱落せず死滅もしないことから, 現在効果的な防除法は存在しない。また, 本種は -25°C で約3ヶ月冷凍保存をおこなっても死滅しないという高い冷凍耐性を持つ³⁾ことから, 種網にこの珪藻が付着すると長期にわたって被害が発生するおそれがある。

したがって, *T. affinis* を防除する方法を確立することは緊急の課題となっている。我々は, *T. affinis* の効果的な除去法の可能性の一つとして, 土壌の分野では実用化が進んでいる微生物農薬を用いた除去法に着目した。環境中から分離した, ノリに影響を与えずに珪藻を殺滅する細菌を用いて付着珪藻のみを殺滅する方法を確立することで, ノリおよびノリ養殖場周辺の環境に影響の少ない防除法の開発が可能になると思われる。そこで, 本研究では, 環境中から分離された珪藻殺滅細菌の中から *T. affinis* を殺滅する細菌を検索することを目的として, 有明海のノリ養殖場の周辺海域から珪藻 *S. costatum* NIES-324 株を殺滅することを指標に分離された細菌 11 株を用いて *T. affinis* を殺滅する活性を持つかどうかを検討した。

実験方法

宿主珪藻およびその培養 宿主珪藻には, 香川県赤潮研究所の吉松博士から分与された *T. affinis* 株を用いた。継代培養はP.P.キャップ付 100 ml/容の三角フラスコに改変 SWM-III 培地^{4,5)}(Table 1)を50 ml/入れたものに, 同株培養液を3 ml/接種し, これを 15°C のインキュベーター (Sanyo Growth Cabinet MLR-350) 中で $35\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}$ (12L:12D)の白色光を照射しながら一週間静置して行った。

珪藻殺滅細菌およびその培養 珪藻殺滅細菌は, 1990年から1995年に *Skeletonema costatum* NIES-324 株を宿主に用いた重層寒天平板法により有明海福岡県沿岸のノリ漁場海域から単離された細菌の中から11株を選び使用した^{6,7)}(Table 2)。なお, A25W₁, A25W₂株は, A25株の継代培養中に自然発生的に得られた変異株であり, A25株は酵母エキスとカシトン添加改変 SWM-III 寒天培地上で黄色のコロニーを形成するが, 変異株は同培地上で白色のコロニーを形成し, *S. costatum* を殺滅する能力が欠損している⁷⁾。

細菌の継代培養は, 0.1%カシトンおよび0.05%酵母エキスを添加した改変 SWM-III 平板寒天培地にこれらの菌株を接種し, 25°C のインキュベーター (Yamato Incubator IS400) 内で培養して行った。

珪藻殺滅細菌の前培養 平板寒天培地から菌体を1白金耳取り, 300 ml/容の三角フラスコに0.1%カシトンと0.05%酵母エキスを添加した改変 SWM-III 液体培地20 ml/を入れたものへ接種し, 前々培養とした。 15°C のインキュベーター内で対数増殖期後期まで巡回培養(200 rpm)し, そこから同培地50 ml/を300 ml/容の三角フラスコ入れたものへ, 660 nm (Shimadzu UV-2400PC)における濁度が0.01となるように植え継ぎ, 前培養とした。前培養は 15°C のインキュベーター内で巡回培養(200 rpm)して行った。

二者培養 対数増殖期の *T. affinis* 株の培養液を改変 SWM-III 液体培地で100倍に希釈し, 10 μl /採取して計数板上に滴下した。これを光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE E800)で計数し, 同培地50 ml/を100 ml/容の三角フラスコ入れたものへ, 2×10^4 cells/ml/になるように培養液を加え希釈した。また, 細菌も前培養後, 300 ml/容

ノリ付着珪藻殺滅細菌の検索

Table 1. Composition of modified SWM-III medium

NaNO ₃	170	mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	15.6	mg
NaSiO ₃ ·9 H ₂ O	56.8	mg
Fe-EDTA	0.842	mg
Na ₂ -EDTA	11.2	mg
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	500	mg
P-1 Metals* ¹	10.0	ml
S-3 Vitamins* ²	2.00	ml
Aged sea water	up to 1000	ml
pH	7.75	

*¹ P-1 Metals (in 1000 ml): H₃BO₃, 6.18g; MnCl₂·4H₂O, 693 mg; ZnCl₂, 54.5 mg; CoCl₂·6H₂O, 2.38 mg; CuCl₂·2H₂O, 0.0170 mg.

*² S-3 Vitamins (in 200 ml): vitamin B1, 50.0 mg; calcium pantothenate, 10.0 mg; nicotinic acid, 10.0 mg; p-aminobenzoic acid, 1.00 mg; biotin, 0.100 mg; inositol, 500 mg; folic acid, 0.200 mg; thymine, 300 mg; vitamin B12, 0.100 mg.

の三角フラスコに 0.1 % カシトンと 0.05 % 酵母エキスを添加した改変 SWM-III 液体培地 50 ml を入れたものに、660 nm における濁度が 0.01 になるように植え継ぎ、15 °C のインキュベーター内で巡回培養 (200 rpm) した。培養開始から 18 時間後に 660 nm における濁度を測定して 2×10^6 cells/ml/ になるように同培地で希釈した。

2×10^4 cells/ml/ に希釈した珪藻の培養液 2 ml/ が入った 18 mm ネジ付き試験管に、 2×10^6 cells/ml/ に希釈した細菌を、50 μ l/ 添加し、15 °C のインキュベーター内で二者培養した。対照として 0.1 % カシトンと 0.05 % 酵母エキスを添加した改変 SWM-III 液体培地を 50 μ l/ 加えた実験区を用いた。

殺藻活性の評価 培養開始から 24 時間、48 時間経過したときに、各培養液から 20 μ l/ ずつ 3 サンプルを採取し、光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE E800)を用いて 200 倍で観察した。殺藻活性は、*T. affinis* 細胞の内容物が流出したかどうかを指標として判定した。

Table 2. List of strains used in this study

Strain	Year	Date	Station	Depth	Genus	Ref.
A5	1990	Feb. 13	22	B-1	<i>Cytophaga</i>	6)
A15	1992	Jan. 28	30	0	<i>Cytophaga</i>	6)
A17	1992	Feb. 12	22	B-1	<i>Cytophaga</i>	6)
A18	1992	Feb. 12	22	B-1	<i>Pseudoalteromonas</i>	6)
A20	1993	Dec. 13	23	0	<i>Cytophaga</i>	6)
A25	1994	Jul. 12	30	B-1	<i>Pseudoalteromonas</i>	6)
A25W					<i>Pseudoalteromonas</i>	7)
A25W II					<i>Pseudoalteromonas</i>	7)
A28	1994	Aug. 22	23	B-1	<i>Pseudoalteromonas</i>	6)
A42	1994	Dec. 20	23	0	<i>Pseudoalteromonas</i>	6)
A48	1995	Jan. 24	23	0	<i>Flavobacterium</i>	6)

Table 3. Algicidal activity of bacteria tested against 7 phytoplanktons

Host algae	Strain										
	A5	A15	A17	A18	A20	A25	A25W	A25W II	A28	A42	A48
<i>Tabularia affinis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Skeletonema costatum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Thalassiosira</i> sp.	+	+	+	N. D.	+	+	N. D.	N. D.	+	+	N. D.
<i>Eucampia zodiacs</i>	N. D.	+	-	N. D.	+	+	N. D.	N. D.	+	+	N. D.
<i>Chaetoceros didymum</i>	-	-	-	N. D.	-	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
<i>Ditylum brightwelli</i>	+	+	+	N. D.	+	+	N. D.	N. D.	-	-	N. D.
<i>Chattonella antiqua</i>	+	+	+	N. D.	+	+	N. D.	N. D.	+	+	N. D.
<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	-	-	-	N. D.	-	-	N. D.	N. D.	-	-	N. D.

N. D. ; not determined.

結 果

珪藻殺滅細菌と, *T. affinis* の二者培養の結果を Table 3 に示す。*Pseudoalteromonas* sp. A25 株のみが, *T. affinis* を溶藻した。A25W₁, A25W₂, また, A25 以外の 8 株は, すべて *T. affinis* を溶藻しなかった。

T. affinis と供試菌株の二者培養を行って, *T. affinis* の変化を顕微鏡観察した際, 特徴的な形態を示したものを Fig. 1 に示した。健康な細胞 (Fig. 1A) に対して, A20 株を接種したときに培養 24 時間以降, Fig. 1B に示すような外殻から抜け出した細胞が観察された。この現象は, A25 株を含むほかのいくつかの株においても観察されたが, A25 株以外では溶藻にいたらず, またこの細胞の出現時にも健康な細胞が多数存在していた。一方, A25 株を接種して 24 時間後には, Fig. 1C に示すように細胞の内容物が流出した細胞が出現した。

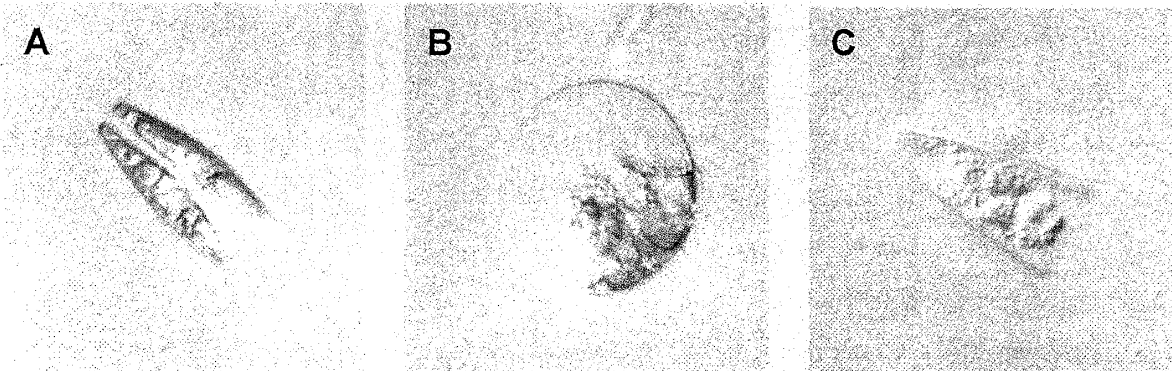


Fig. 1. Microscopic observations of dual culture of *Tabularia affinis* and algicidal bacteria. A, control (without bacteria); B, a 24 hours culture of *T. affinis* and *Pseudoalteromonas* sp. A20; C, a 24 hours culture of *T. affinis* and *Pseudoalteromonas* sp. A25.

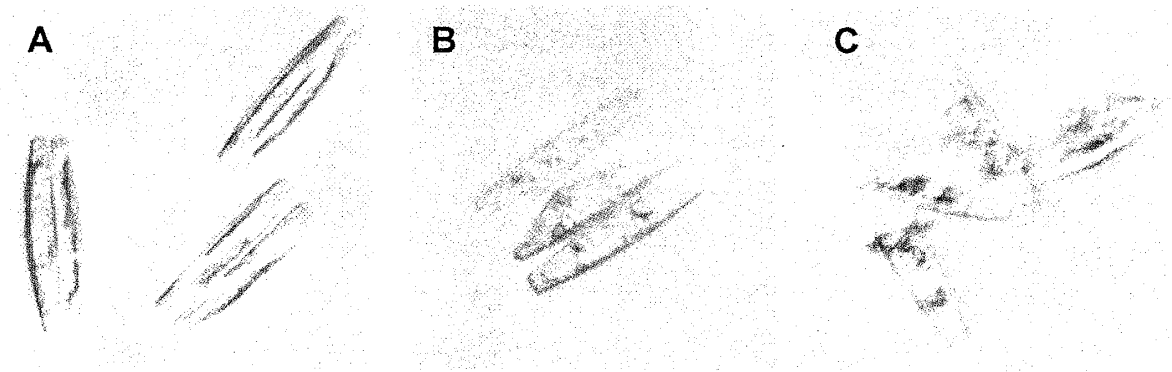


Fig. 2. Microscopic observations on algicidal activity of *Pseudoalteromonas* sp. A25 against *Tabularia affinis*. A, right after the inoculation of *Pseudoalteromonas* sp. A25; B, at 24 hours after inoculation; C, at 48 hours after inoculation.

T. affinis と A25 株を二者培養して 24 時間後、48 時間後に顕微鏡観察した結果を Fig. 2 に示す。二者培養開始後 24 時間で内容物が収縮した *T. affinis* 細胞が観察された(Fig. 2B)。培養 24 時間では正常な *T. affinis* の細胞も同時に存在した(Fig. 2B)。二者培養開始 48 時間後には、ほとんどすべての *T. affinis* の内容物が流出し、溶藻されていることが確認された(Fig. 2C)。

考 察

今回実験に用いた細菌株の中で、*T. affinis* を殺藻する活性を持つものは1株のみであった。殺藻活性を持つ *Pseudoalteromonas* sp. A25 株は、供試菌株の中で *S. costatum* に対する殺藻活性がもっとも強い株である⁶⁾。しかし、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株以外の *S. costatum* 殺藻細菌は、*T. affinis* を殺藻する活性を持たなかった。今回用いた細菌株は、数種類の珪藻およびラフィド藻を殺滅する活性を持つものが多いが、*T. affinis* は殺藻されなかったことから、本種はほかの珪藻よりも細菌の攻撃に対して強い可能性が考えられた。しかし、今回用

いたのは、浮遊性の珪藻に対する殺藻細菌であり、付着珪藻と浮遊性珪藻では殺滅機構に違いがあることも考えられるため、今後、現場環境中で *T. affinis* に対する殺藻活性を持つ細菌の割合を検討することなどによって、*T. affinis* が細菌の影響を受けにくく耐性を示すかどうかが明らかになるのではないかと考えられる。

また、各供試菌株の宿主特異性と *T. affinis* に対する殺藻活性の間の関連性については、殺藻した *Pseudoalteromonas* sp. A25 株は、もともと広いホストレンジを持つことから、*T. affinis* は珪藻全般に対して強い殺藻活性を持つ殺藻細菌にのみ殺藻される可能性がある。しかし、関連性を明確にするためには、今後、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株が *C. didymum* を殺滅するかどうか、さらにより多くの珪藻種に対して殺藻活性を持つかどうかなどを検討する必要がある。

また、宿主特異性が低い殺藻細菌においても、各宿主に対して複数の殺藻機構が存在する可能性がある。このため、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株が *T. affinis* と *S. costatum* を同じ機構で殺藻しているかどうかについても検討する必要があると考えられる。*Pseudoalteromonas* sp. A25 株が *T. affinis* と *S. costatum* を殺藻する過程は、どちらも細胞の収縮に引き続いて内容物の流出が起こることで共通しているが、*T. affinis* は収縮の度合いが小さいこと、一部の細胞は外殻から抜け出すことなど相違点も存在する。*Pseudoalteromonas* sp. A25 株については、*S. costatum* を直接接触しない場合でも細菌が近接することによって殺藻が起こることが明らかにされており⁶⁾、細胞外に殺藻に関わる物質を放出している可能性が高いと考えられる。*Pseudoalteromonas* sp. A25, A28 株が *S. costatum* を殺藻する際には、プロテアーゼが関与しているとの知見があることから^{8,9)}、プロテアーゼが *T. affinis* の殺藻に関与しているかを検討することにより、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株が同様の機構によって殺藻するのかが明らかになるのではないかと期待される。

T. affinis は酸処理にも耐性を示す非常に強い細菌であると考えられたが、今回、*T. affinis* を殺藻する細菌の存在が明らかになったため、細菌による *T. affinis* の防除法の確立の可能性が示された。*S. costatum* の様な浮遊性の珪藻を防除するために、細菌そのもの、あるいは細菌が産生する殺藻物質を海洋に散布することを考えた場合、希釈されて効果が薄れる可能性など、実用化にはまだまだ検討しなければならない課題が山積している。しかし、*T. affinis* などの付着珪藻の場合は、酸処理の代わりに細菌培養液に浸漬する、あるいは殺藻物質をノリ葉体に塗抹するなど、実用化が可能であると考えられる。また、*T. affinis* が細菌の放出する物質によって殺藻される場合、ノリにその物質の生合成系を組み込むことにより、付着耐性を付加することも可能になるかもしれない。

まず、酸処理の代わりに細菌培養液に浸漬することを考えた場合、どのぐらいの密度で培養した菌液にどのぐらいの時間浸漬するかが問題である。他の赤潮原因藻を殺滅する細菌の中には殺藻に一週間程度要するものがあるなかで、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株は *S. costatum* NIES-324 を約32時間、*T. affinis* を48時間以内と比較的短い時間で殺藻した。しかし、長時間細菌の培養液に浸漬することは技術的に困難であり、ノリ葉体に対する影響も懸念される。今回の実験では、低密度の *Pseudoalteromonas* sp. A25 株を接種したが、今後、さらに高密度で接種するなどの検討を行うことが必要であろう。あとの2つの可能性に関しては、まず、*Pseudoalteromonas* sp. A25 株の *T. affinis* の殺藻過程について明らかにしていくことが不可欠である。

今後はさらに、*T. affinis* の殺藻過程について詳細に検討するとともに、*T. affinis* が付着したノリ葉体と *Pseudoalteromonas* sp. A25 株との三者培養を行い、実際にノリに付着した *T. affinis* に効果があるか、どのぐら

ノリ付着珪藻殺滅細菌の検索

いの密度と時間が効果的であるのかなど、実用化を指向した研究が進展することが期待される。

謝 辞

本研究に用いた *T. affinis* 株は、香川県赤潮研究所の吉松定昭博士に分与していただいた。ここに謹んで感謝の意を表する。

文 献

- 1) 大貝政治: のり葉体およびのり網に着生する珪藻の生態に関する研究. 水大校研報, 34, 37-89 (1986).
- 2) 遠藤俊夫, 八十島昭, 春日 修, 野田宏行, 庵谷 晃, 三浦昭雄: スサビノリ葉体に付着する珪藻 *Licmophora ehrebergii* のタンパク質分解酵素による除去. 日水誌, 58, 113-118 (1992).
- 3) 長井 敏, 高瀬博文, 増田恵一: 1995 年冬期, 兵庫県下のノリ養殖漁場に大発生した付着珪藻 *Tabularia affinis* について. 兵庫水試研報, 33, 19-26 (1996).
- 4) L. C. M. Chen, T. Edelstein, and J. McLachlan: *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, 5, 211-220 (1969).
- 5) 伊藤克彦, 今井一郎: ラフィド藻(Raphidophyceae), 「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, 1987, pp. 122-130.
- 6) 満谷 淳: 湖沼および沿岸海域に分布する微細藻類溶解性細菌に関する生理生態学的研究. 水大校研報, 45, 165-257 (1997).
- 7) A. Mitsutani, H. Kitaguchi, and Y. Ishida: Algicidal materials produced by a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25, in "Proceedings of the Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology" (ed. by T. Imanaka, O. Yagi, H. Ohtake, G. Endo, M. Fukuda, K. Furukawa, Y. Igarashi, and R. Kurane), ISEB, Kyoto, 2001, pp. 1053-1056.
- 8) A. Mitsutani, I. Yamasaki, H. Kitaguchi, J. Kato, S. Ueno, and Y. Ishida: Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia*, 40, 286-291 (2001).
- 9) S. Lee, J. Kato, N. Taniguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani, and H. Ohtake: Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4334-4339 (2000).