

微細藻類に対する増殖抑制細菌の単離および その産生物質の特性

持田 和男*・尾添 嘉久*・中村 利家*・
松田 俊一*・山口 典生*

Isolation of a Bacterium Inhibiting the Growth of Microalgae
and Characterization of the Produced Inhibitors

Kazuo MOCHIDA, Yoshihisa OZOE, Toshiie NAKAMURA
Shun-ichi MATSUDA and Norio YAMAGUCHI

A bacterium which inhibited the growth of a green alga *Chlorella* sp. was isolated from upper-layer water of the brackish lake Nakanoumi and identified as *Enterobacter aerogenes*. The bacterium produced relatively stable algal growth inhibitors (AGI) which decreased dramatically the chlorophyll content of *Chlorella* in the initial growth stage under continuous illumination although the cell number was unchanged. The partially purified AGI also inhibited the growth of other green algae and diatoms as well as *Chlorella*. From the behavior in gel filtration (Sephadex G-100 and Sepharose 4B), paper partition chromatography, and ion-exchange chromatography (DEAE Sephadex A-50), it was suggested that these AGI were high molecular substances containing saccharides as the constituent.

緒 言

水圏の微細生物類は、物質循環における低次の生産者および分解者として重要な役割を担っているだけでなく、それぞれの産生物質または代謝物質を通じて相互に密接な関係を保っている。これらの物質の中には、他の生物種に対する増殖制御物質が存在し、水圏微細生物類の動態に直接的な影響を及ぼしている¹⁾。そのような制御物質を介した生物間の相互作用はアレロパシー (allelopathy, 他感作用) と呼ばれている^{2,3)}。微細藻類と細菌間にもアレロパシーの存在が知られており、石尾は渦鞭毛藻に対する増殖阻害物質を産生する *Vibrio* 菌を単離した⁴⁾。

水圏微細生物間のアレロパシーは、生化学的立場だけでなく環境科学的立場からも興味のある課題である。例えば、湖沼や内湾など閉鎖性水域で頻発している微細藻

類の異常増殖現象に対し、このアレロパシーがどのように関わっているか、またその異常増殖の制御にこの他感作用物質 (allelochemicals) が利用可能かなど興味ももたれた。

著者らは、かかる水圏における微細藻類を中心とした微細生物間アレロパシーに関する一連の研究に着手することとした。本報告では *Chlorella* sp. を用い、藻類に対する増殖抑制物質 (algal growth inhibitor: AGI) を産生する細菌を単離・同定し、その産生物質の特性を検討した結果について述べる。

実験材料および方法

1. 供試藻類

供試藻類としては、本学部農芸化学工学研究室より分離された緑藻 (4種) *Chlorella* sp., *Planktonema lauterbornii*, *Selenastrum capricornutum* および *Scenedesmus dimorphus*, 珪藻 (2種) *Cyclotella nana* および *Skeletonema costatum*, および藍藻 *Microcystis*

* 生物汚染化学研究室

Table 1. Composition of BBM*

(1) NaNO ₃	10.0g/H ₂ O 400ml
(2) KH ₂ PO ₄	7.0g/H ₂ O 400ml
(3) K ₂ HPO ₄	3.0g/H ₂ O 400ml
(4) MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0g/H ₂ O 400ml
(5) CaCl ₂ ·2HO	1.0g/H ₂ O 400ml
(6) NaCl	1.0g/H ₂ O 400ml
(a) EDTA 50g, KOH 31 g, H ₂ O 1,000ml	
(b) FeSO ₄ ·7H ₂ O 4.98 g, H ₂ O 999ml, H ₂ SO ₄ 1ml	
(c) H ₃ BO ₃ 11.42g, H ₂ O 1,000ml	
(d) ZnSO ₄ ·7H ₂ O 8.82g, MnCl ₂ ·4H ₂ O 1.44g, MoO ₄ 0.71g, CuSO ₄ ·5H ₂ O 1.57g, Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O 0.49g, H ₂ O 999ml, H ₂ SO ₄ 1ml	

* (1)~(6) each 10ml + (a)~(d) each 1ml + H₂O 936ml

aeruginosa, ならびに大阪府立大学農学部食品化学研究室より分譲された緑虫 *Euglena gracilis* を用いた.

これら藻類の培養には, *Chlorella* および *Scenedesmus* については BBM 培地 (第1表), *Planktonema*, *Cyclotella* および *Skeletonema* については 須藤培地 (第2表), *Microcystis* については Fitzgerald 培地 (第3表) ならびに *Euglena* については MAL 培地 (第4表) を用いた.

Table 2. Composition of Sudo's medium

NaCl	20.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8.0g
KCl	0.7g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.37g
NaNO ₃	0.1g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.0125g
NaHCO ₃	0.168g
Na ₂ SiO ₃	0.008g
Reformed P1*	1.0ml
Vitamin B ₁₂	0.002μg
H ₂ O	1,000ml

*Reformed P1 solution

EDTA	3.0g
Fe(Cl)	0.08g
Mn(Cl)	0.12g
Zn(Cl)	0.015g
Co(Cl)	0.003g
Cu(SO ₄)	0.0012g
B(H ₃ BO ₃)	0.6g
Mo(Na ₂ MoO ₄)	0.05g
H ₂ O	1,000ml

Table 3. Composition of Fitzgerald medium

NaNO ₃	0.496g
K ₂ HPO ₄	0.039g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075g
CaCl ₂	0.025g
FeC ₆ H ₅ O ₇	0.006g
C ₆ H ₅ O ₇	0.006g
NaHCO ₃	0.046g
Na ₂ SiO ₃	0.008g
EDTA	0.001g
PIV solution*	3ml
H ₂ O	1,000ml

* PIV solution

FeCl ₃ ·6H ₂ O	194mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	82mg
ZnCl ₂	10mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4mg
NaMoO ₄	8mg
EDTA	1,500mg
H ₂ O	1,000ml

Table 4. Composition of MAL medium

KH ₂ PO ₄	0.4g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
CaCO ₃	0.2g
DL-Maleic acid	2.0g
Na glutamate	5.0g
Na ₂ EDTA	50.0mg
ZnSO ₄	22.0mg
MnSO ₄	5.8mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3.99mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.5mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.58mg
H ₃ BO ₃	11.4mg
Vitamin B ₁	2.5mg
Vitamin B ₁₂	0.001mg
H ₂ O	1,000ml

2. 藻類増殖阻害物質 (AGI) 産生菌の検索, 同定および阻害活性の測定法

細菌用の酵母エキス培地 (第5表) を用いた通常の平板稀釈法 (30℃) によって, 中海の表層水から細菌を単離した. 単離細菌の同定は, Bergey's Manual 第8版の分類表や記載事項に従って行った. また単離細菌の藻

類増殖阻害活性の測定は、酵母エキス培地を用いて液体培養して得た培養濾液を検定用試料とする下記の方法によった。すなわち、

阻害活性は、試験管 (1.2φ×9 cm) に *Chlorella* 添加 BBM 培地 (3.0 ml) および検定用試料 (0.5 ml) を加えて、25°C、4,000 lux 常時照明下で静置培養後、*Chlorella* の増殖度を Chlorophyl の蛍光強度を測定 (Turner 社蛍光光度計, Model 111 または日立蛍光光度計, F-3000) することによって求め、0 日目を基準とする相対増殖度で表示した。必要に応じて、haemocytometer を用いた顕微鏡下での細胞数計測法も併用した。

3. AGI 産生条件の検討

(1) AGI 産生培地

本検討には、酵母エキス培地の他に、普通寒天培地；buillon 0.5 g, peptone 1.0 g, NaCl 0.5 g, H₂O 100 ml, 乾燥ブイヨン培地；buillon 0.5 g, peptone 1.0 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, H₂O 100 ml, 標準寒天培地；yeast extract dried 0.25 g, peptone 0.5 g, glucose 0.1 g, H₂O 100 ml, Spizizen 培地；K₂HPO₄ 1.4 g, KH₂PO₄ 0.6 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.02 g, glucose 0.5 g, H₂O 100 ml, Drigalski 培地；bouillon 0.5 g, peptone 1.0 g, lactose 1.0 g, H₂O 100 ml, を用いた。各培地に単離細菌 (*E. aerogenes*, E-1-1) を接種し、30°C で

Table 5. Composition of Yeast extract medium

KH ₂ PO ₄	3.4g
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	2.52g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0g
Yeast extract dried	1.0g
Glucose	0.8g
Mineral stock solution*	10ml
H ₂ O	1,000ml

* Mineral stock solution

MgSO ₄	3.0g
MnSO ₄	0.5g
NaCl	1.0g
CaCl ₂	0.1g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10.0mg
K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O	10.0mg
H ₃ BO ₃	10.0mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10.0mg
H ₂ O	1,000ml

4日間静置培養後、遠心分離 (3,000 rpm, 20分) して得た上澄液の AGI の活性を前述の方法に従って測定した。

(2) 培地中の AGI 産生因子

酵母エキス培地の構成成分中からグルコース、乾燥酵母エキスおよび微量要素 (mineral stock solution) のそれぞれを除いた各培地に、単離細菌 (*E. aerogenes*, E-1-1) を接種して 30°C で 4日間静置培養後、遠心分離 (3,000 rpm, 20分) して得た上澄液の AGI の活性を前述の方法に従って測定した。また乾燥酵母エキスの添加濃度を 0.25, 0.5, 0.75, 1.0あるいは 2.0% とした時の AGI の活性も同様に測定した。

4. 産生 AGI の特性

(1) 熱安定性

単離細菌 (*E. aerogenes*, E-1-1) を酵母エキス培地を用いて 30°C、7日間培養した後、遠心分離 (7,000 rpm, 20分) して得た培養上澄液を湯浴中 (50, 70 および 90°C) で加熱 (30分, 1時間および 3時間) し、残存活性を測定した。

(2) 藻類に対する作用スペクトル

単離細菌 (*E. aerogenes*, E-1-1) を酵母エキス培地を用いて 30°C、7日間培養した後、遠心分離 (7,000 rpm, 20分) して得た培養上澄液を硫酸塩析 (硫酸飽和度 20-80%) 後、蒸留水に対して 24時間透析 (SPECTRA PORE 3,500[®], SPECTRUM 社製) した。その透析内液の凍結乾燥標品 (以下透析乾燥標品と称する) を用い、前述の活性測定法と類似の方法 (培養規模を 3倍にした振とう培養法) で各藻類に対する作用スペクトルを作成した。

(3) カラムクロマトグラフ的挙動

1) Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー

上記透析乾燥標品 200 mg を 2 ml の蒸留水に溶解した後 Sephadex G-100 カラム (3φ×98 cm) に充填し、蒸留水で溶出 (流速 0.4 ml/min) した。各画分 (2g) は AGI の活性を測定した後、活性画分 (No. 60-100) を集めて凍結乾燥した。

2) Sepharose 4B カラムクロマトグラフィー

上記 1) の凍結乾燥標品 (82.5 mg) を 2.5 ml の蒸留水に溶解した後 Sepharose 4B カラム (2.5φ×90 cm) に充填し、蒸留水で溶出 (流速 0.4 ml/min) した。各画分 (2g) について上記と同様に AGI の活性を測定した後、活性画分 (No. 36-167) を集め凍結乾燥した。

3) DEAE Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー

上記 2) の活性画分 (53.5 mg) を少量の 0.02 M リン

酸緩衝液 (pH 7) に溶解し, DEAE Sephadex A-50 カラム (2.5φ×50 cm) に充填した後, 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解した 0-1 M NaCl による linear gradient 法で溶出した. 各画分 (2 g) について上記と同様に AGI の活性を測定し, さらにフェノール硫酸法による糖の定量 (O. D. 480 nm にて表示) を行った. 活性画分 (No. 90-124) を集め, 透析して NaCl を除いた後凍結乾燥した.

実験結果および考察

1. 藻類増殖阻害物質 (AGI) 産生細菌の同定

緑藻 *Chlorella* に対する AGI 産生菌を, 通常の平板希釈法によって, 中海の表層水から単離した. この菌 (E-1-1) の電子顕微鏡写真を第 1 図に示した. 本菌の同定は, Bergey's Manual 第 8 版の分類表や記載事項に従って行い, その結果を第 6 表にとりまとめた. 本菌は, 幅が 0.5-0.8 μm, 長さが 1.2-2.5 μm の短桿菌で, 胞子を形成しない. またグラム染色は陰性で, 酸素に対しては通性嫌気性を示す. 以上から本菌は分類表の Part 8 に相当する. 運動性や各種の生理試験の結果を, Part 8 記載の該当種と比較し, 本菌を腸内細菌の一種である *Enterobacter aerogenes* と同定した.

2. 産生 AGI の作用性

本菌の生産する AGI の作用性には, 第 2 図に示した様に, 明条件下での *Chlorella* の増殖初期において



Fig. 1. Electron micrograph of the isolated bacterium, E-1-1.

chlorophyll 含量の急激な低下をもたらす反面, 細胞数にはさほどの変化を及ぼさないと言う特徴があった. すなわち細胞数の変化に先立って chlorophyll 量が低下することから, 本物質は光合成機能に重大な影響を及ぼしていると思われた. しかもその作用は暗条件下では緩やかであるので, 光の照射下で促進されると考えられる.

3. AGI 産生培地

本 AGI の産生に適した培地を選択するために, 6 種類の培養基を用いて本菌を培養し培養濾液の AGI の活性を調べた (第 3 図). 標準寒天培地と酵母エキス培地に AGI の活性を認めたが, 後者の方が強かった. 両者に共通する成分である乾燥酵母エキスが本 AGI 産生因子である可能性が考えられた. このことを確かめるために, 酵母エキス培地の構成成分からグルコース, 乾燥酵母エキスまたは微量要素をそれぞれ除いた培地を調整

Table 6. Microbiological properties of the isolated bacterium, E-1-1.

Item	Property
Morphology :	
Shape	Rod
Dimension	0.5-0.8 by 1.2-2.5 μm
Spore	-
Gram's method	-
Culture :	
Action for oxygen	Facultatively anaerobic
Gelatine liquefaction	-
Catalase	+
Starch hydrolysis	-
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	+
Citrate usage	+
Nitrate reduction	+
H ₂ S from TSI agar	-
Acetoin from glucose	+
Acid formation from	
Glucose	+
Lactose	+
Glycerol	+
Sorbitol	+
Gas formation from	
Glucose	+
Lactose	+
Glycerol	+
Sorbitol	+

+ : Positive, - : Negative

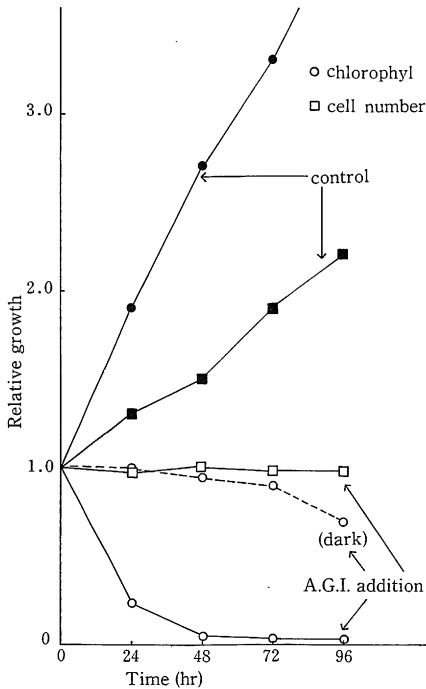


Fig. 2. Effect of A. G. I. on the cell number and chlorophyll amount of *Chlorella* sp.

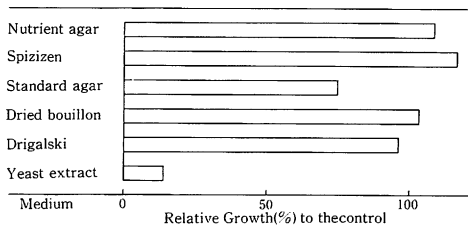


Fig. 3. Influence of media on the A. G. I. productivity of *E. aerogenes*.

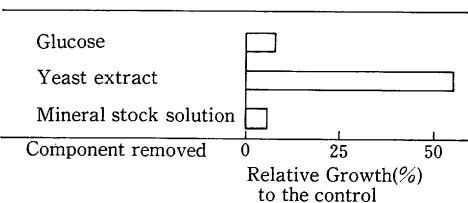


Fig. 4. Influence of components of Yeast extract medium on the A. G. I. production.

し、各成分の AGI 産生への影響を調べた (第 4 図). 乾燥酵母エキスを除いた培養基で AGI の活性が消失した. なおこの培養基でも本菌はよく生育した. また AGI 産生のための乾燥酵母エキスの適正濃度は、第 5 図から

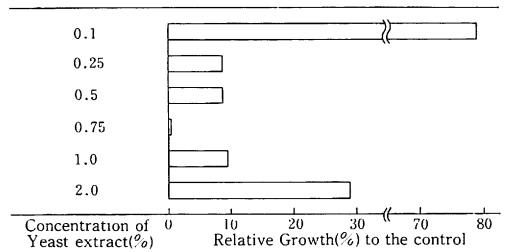


Fig. 5. Influence of concentration of Yeast extract on the A. G. I. production.

明らかな様に 0.75% であった. さらに詳細な検討の結果から、以後の実験では乾燥酵母エキスの濃度は 0.7% とした.

4. 産生 AGI の特性

(1) 熱安定性

本 AGI は、50°C 以下ではその活性をほとんど消失せず比較的熱に安定であるが、70°C を超えると時間の経過と共にかなり速かに活性を消失した (第 7 表).

(2) 藻類に対する作用スペクトル

透析乾燥標品を用いて、本 AGI の藻類に対する作用スペクトルを作成した (第 6 図). 本 AGI は、検討した 4 種の緑藻全てに増殖抑制活性を示し、中でも *Chlorella* に対して強い活性を示した. 2 種の珪藻にも増殖抑制活性があり、とくに *Cyclotella* に対しては 1 ppm でも活性を示した. しかし *Euglena* と *Microcystis* に対しては全く活性を示さなかった. 本物質は後述のとおりかなりの高分子物質であると推測されることから、藻類の細胞膜構造の相違が活性発現に影響しているであろう. なお別途求めた *Chlorella*, *Selenastrum* および *Scenedesmus* に対する透析乾燥標品の 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) は、それぞれ 2.6, 104.7 および 60.6 ppm であった.

(3) カラムクロマトグラフ的挙動

透析乾燥標品を用いた Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーにおいて、活性画分は void volume 付

Table 7. Thermo-stability of A. G. I.

Time (hr)	Residual activity (%)		
	50°C	70°C	90°C
0.5	90	80	55
1	90	70	25
3	80	55	<10

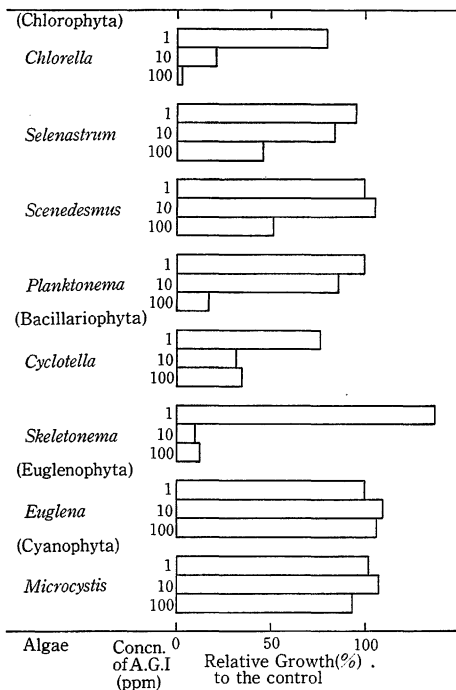


Fig. 6. Algal growth inhibitory activity to some algae.

近に溶出された。そこで分画範囲のより大きい Sepharose 4B を用いて、その活性画分の再クロマトグラフィーを行った(第7図)。しかしこのカラムでも活性画分(No. 36-167)は void volume 付近に溶出され、AGI がかなりの高分子物質であることを示唆した。また活性画分を 4N HCl で24時間加熱した加水分解物は、*n*-BuOH/AcOH/H₂O (4/1/5, v/v/v) を展開溶媒とするペーパークロマトグラフィーにおいて、アニスアルデヒド発色剤に対して陽性な単一スポット ($R_f=0.19$) を与えた。すなわち本 AGI は構成成分として糖を含有す

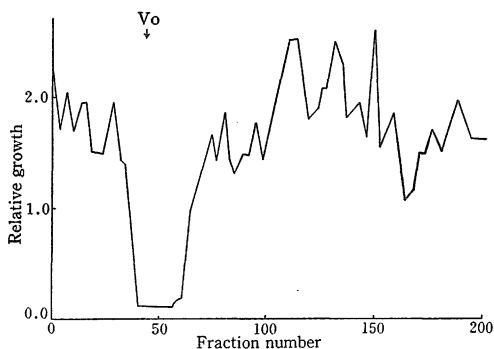


Fig. 7. Sepharose 4B gel filtration column chromatogram

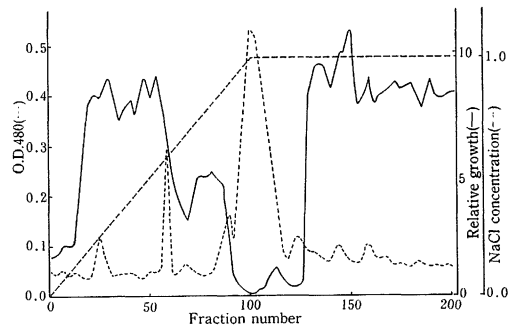


Fig. 8. DEAE Sephadex A-50 ion-exchange column chromatogram.

る可能性がある。そこで分離不十分なゲル濾過法に変えて DEAE Sephadex A-50 を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行い、分離をより完全にすると共に活性画分がフェノール硫酸法で定量した糖のピークと一致するか否かを検討した(第8図)。活性画分は、未吸着部分と思われる画分(No. 1-7)のほか、糖の溶出ピークと一致する2つの画分(No. 90-113 および No. 114-124)に分離した。これらの結果から、本菌の産生する AGI の主体は糖をその構成成分とするかなりの高分子物質であることが強く示唆された。

謝辞 藻類を分譲して戴いた本文中に記載の各研究機関ならびに電子顕微鏡写真を撮影して戴いた本学部野津幹雄教授に深謝の意を表す。また本実験に協力した元専攻生、故寺内義治君に感謝すると共に哀悼の意を表す。なお本研究の一部は文部省科学研究補助金(課題番号 61440096)により行われたことを記し、感謝の意を表す。

引用文献

1. UCHIDA T.: Jap. J. Ecol. 27: 1-4, 1977.
2. RICE E. L.: Allelopathy, 2nd ed., Academic Press Inc., London, 1984, p. 189-205.
3. MOON R. E. and MARTIN D. F.: The Chemistry of Allelopathy, ed. by A. C. THOMPSON, American Chemical Society, Washington, 1985, p. 370-380.
4. 石尾真弥: 昭和57年度赤潮対策技術開発試験報告書 1-内湾海域赤潮生物挙動試験(12), 水産庁, 1983, P. 1-38.
5. BREED, R. S. MURRAY E. G. D. and HITCHENS A. P.: BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., WILLIAMS & WILKINS, Baltimore, 1974.
6. 福井作蔵: 生物化学実験法 A-1 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 東京, 1971, P. 45-47.