褐藻アラメ藻体外分泌物質による新葉上付着細菌の増殖促進効果

坂見知子, 杉山元彦, 蔵多一哉

(1994年4月25日受付)

Growth-stimulating Effects of Algal Excreted Substances on Bacteria Isolated from Algal Blade Surface of the Brown Alga *Eisenia bicyclis*Tomoko Sakami,*¹ Motohiko Sugiyama,*¹ and Kazuya Kurata*²

Growth of bacteria isolated from a new blade surface of the brown alga *E. bicyclis* was stimulated by algal excreted organic matter (EOM). The bacteria utilized some major algal components such as mannitol, fucoidan and alginate, but failed to utilize laminaran. Two fractions of EOM were obtained by elution on an activated charcoal column. The effect of these two fractions on growth was different. The first fraction caused bacterial cell density to increase linearly with concentration, whereas the second fraction stimulated bacterial growth at low concentration, yet increasing concentrations did not cause an increase in cell density. From the result of ¹H-NMR, the second fraction seemed to consist of some sugars and phenolic substances.

キーワード: 海洋細菌, 褐藻, 分泌有機物

褐藻類の付着細菌の制御機構として、藻が体外に分泌するフェノール化合物などの抗菌物質による細菌の排除が知られており、藻体からはさまざまな抗菌物質が単離されている。^{1,2)} さらに、褐藻類の付着細菌数は緑藻類などに比べて少なく、コンブの仲間などでは、同一の個体内でも側葉の成長点に近い基部付近では少なく、先端部付近では増加するといった変動が見られる。また、多様化した細菌群には、高分子の藻体成分を分解する能力を持った菌が現れる。³⁻⁷⁾ このような細菌相の変化の初期に現れる菌は、葉上の抗菌的な環境に適応した性質を持っていると考えられる。筆者等は前報で、コンブ科褐藻アラメ *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell の成長点に近い新しい側葉上に、走査型電子顕微鏡などによる直接観察で多数の細菌様の粒子が存在することを確認するとともに、この新しい側葉上の細菌群は藻の体外分泌物を増殖に必要としていることを明らかにした。そこで本報ではアラメの新しい側葉上から単離した上記の性質を持つ細菌を用いて、その基質の利用性とアラメ分泌物に含まれる細菌の増殖を促進する物質の性質について調べた。

材料と方法

細菌株の分離と同定 アラメの新葉上から前報⁸⁾ に従って採取した細菌を、アラメ分泌物培地 (EOM 培地)

に接種し、20℃で48時間培養した。この培養液を1/10-ZoBell 寒天平板に画線した。次に出現したコロニーから釣菌して、再度 EOM 培地に接種し48時間培養後、寒天平板に再画線して均質なコロニーが得られたものを単離株とした。

得られた細菌株について、常法⁹⁾ に従ってグラム染色、グルコース醗酵、運動性、色素生産、オキシダーゼ活性、好塩性を調べ、清水-絵面のスキームに従い属の同定を行った。¹⁰⁾

試験培地の作製 アラメ分泌物培地 (EOM 培地): 生きたアラメの側葉を数時間浸漬した熟成海水を0.22 μm マイレックスフィルターでろ過滅菌したものを実験用培地とした。培地の保存はろ過滅菌前の分泌物入りの熟成海水を-20℃で凍結した。全有機炭素測定装置 (島津製作所 TOC-5000) で測定した EOM 培地の有機物濃度は、約2.4 mgC/l であった。

ペプトン培地: 熟成海水にバクトペプトン (Difco) 0.5% と、0.05% の酵母エキス (Difco) を添加したものを培地原液とし、試験にはこれを熟成海水で適宜希釈して用いた。

藻体成分培地: マンニトール (和光純薬)、グルコース (和光純薬)、ラミナリン (SIGMA)、フコイダン (SIGMA)、アルギン酸ナトリウム塩 (SIGMA) を各50

*¹ 水産庁養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan).

*² 函館工業高等専門学校 (Department of Industrial Chemistry, Hokkaido Technical College, Hakodate, Hokkaido 042, Japan).

mg/l の濃度で、熟成海水に添加し加熱滅菌した。

アラメ分泌物分画培地：水溶性の画分は 5 g/l の濃度で蒸留水に溶解後、ろ過滅菌したものを凍結保存し、細菌接種時に滅菌熟成海水に必要濃度になるように添加した。脂溶性画分は *N,N*-ジメチルホルムアミドに 50 g/l の濃度で溶かし、細菌接種時に滅菌熟成海水に 1/1000 量加えた。対照区には、水溶性画分の試験には熟成海水を滅菌しただけのものを、脂溶性画分の試験には *N,N*-ジメチルホルムアミドだけを加えたものを設定した。

以上の培地すべてには、細菌接種時に 1/100 量のペプトン培地原液が添加された。

増殖測定 細菌を寒天平板で培養し、コロニーをかきとって集菌した。これをペプトン培地原液に約 1×10^7 cells/ml になるように懸濁し、 -85°C で凍結保存して接種源にした。増殖試験は、各培地に 1/100 量の凍結細菌懸濁液を加え、 20°C の振とう培養下で行った。24 時間毎に試料を採取し、2% ホルマリンで固定後、DAPI 法¹¹⁾で細菌数を直接計数し、最大細胞収量を比較に用いた。

アラメ分泌物の分画 材料のアラメは 1992 年 8 月に、三重県五ヶ所湾湾口の葛島の磯から採取した。この採取直後の藻体（湿重量約 7 kg）を使い、分泌粘液を室温下で約 1 時間採取後（約 1.4 l）、 -15°C で凍結保存し分画用試料にした。これを、エーテル/水で分配して脂溶性部（NA: 114 mg）と水溶性部の粗画分を得た。水溶性部を活性炭カラムに吸着後、メタノール、メタノール/アンモニア/水（8:1:1）で逐次溶出し、水溶性活性炭通過部（WP: 8.6 g）、水溶性メタノール溶出部（WM: 0.04 g）、および水溶性メタノール/アンモニア溶出部（WMA: 0.781 g）に分けた（第 1 次分画）。

次に WMA 画分（700 mg）を水に溶解後、酢酸エチルおよび 1-ブタノールで順次抽出し、酢酸エチル可溶部（WMAAc: 8 mg）、1-ブタノール可溶部（WMABu: 84 mg）、および水可溶部（WMAH: 608 mg）に分けた（第 2 次分画）。

さらに水可溶部（WMAH: 300 mg）を、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー（ 3.0×60 cm: 溶媒 H_2O ）を行い、溶出順に 290 nm における UV 吸収を指標として四つの画分に分けた（画分 1: 71 mg, 画分 2: 1 mg, 画分 3: 53 mg, 画分 4: 34 mg, 第 3 次分画）。これらの 4 画分のなかで、検定用細菌が最も高い増殖活性を示したのは最初に溶出した画分 1 であった。このため、画分 1 の $^1\text{H-NMR}$ を測定することにより、含有成分の推定を行った。

結 果

アラメ新葉表面から分離された細菌の増殖曲線の例を Fig. 1 に示した。この細菌は EOM 培地では、24 時間で

Fig. 1. Growth curve of isolated bacteria in EOM medium and 1/100 peptone medium.

Fig. 2. Effects of algal carbohydrates on bacterial growth.

Vertical bars indicate SD. Man, mannitol; Lam, laminaran; Alg, sodium alginate; Fuc, fucoidan; Glc, glucose; C, control; E, EOM medium.

顕著な増殖を示し、細胞収量は対照区（1/100 ペプトン培地）よりも約 1 桁高く、それぞれの培地の全 7 回の試験の平均（±標準偏差）は $1.3 (\pm 0.16) \times 10^7$ および $1.8 (\pm 0.83) \times 10^6$ cells/ml であった。この株を簡易同定した結果、グラム陰性の短桿菌で、グルコース酸酵能、運動性、菌体色素は無く、オキシダーゼテストは陽性で好塩性であった。これらの特性から、この細菌は海洋型の *Moraxella* 属の菌と同定された。

アラメ藻体の主要な成分である 4 種の糖類について、それらが細菌の増殖に与える影響を Fig. 2 に示した。各物質が 50 mg/l で添加された培地の細胞収量は、EOM

Fig. 3. Effects of peptone and EOM concentration on bacterial growth. Vertical bars indicate SD.

Fig. 4. Effects of algal exudates with first fractionation on bacterial growth. Vertical bars indicate SD. C, control; E, EOM medium; other symbols for the fractions are defined in the text.

培地のものと比較して、マンニトールでは同等もしくは2倍程度、フコイダンは同等、アルギン酸は約半分であった。ラミナリン添加培地の細胞収量は無添加の対照区のものと同しく、グルコース添加培地では細菌は増殖しなかった。また、マンニトールを添加した培地では、細菌は多糖を生産して培地は粘稠の白濁した状態になった。

培地に加えたペプトンの量を変えた場合と、EOM培地を海水で希釈した場合の細菌の増殖結果を Fig. 3 に示

Fig. 5. Effects of algal exudates with second fractionation on bacterial growth. Vertical bars indicate SD. C, control; E, EOM medium; other symbols for the fractions are defined in the text.

Fig. 6. Effects of algal exudates with third fractionation on bacterial growth. Vertical bars indicate SD. C, control; E, EOM medium; other symbols for the fractions are defined in the text.

した。ペプトン濃度が50～550 mg/lの範囲内では、ペプトン濃度に応じて細菌の細胞収量は増加した。また、EOM培地の希釈に伴って細胞収量は減少し、1/81希釈で対照区と差がなくなった。

アラメ分泌物の分画過程における各画分の生物試験の結果を Fig. 4～6 に示した。第1分画で得られた四つの画分の重量含有比率は、NA:WP:WM:WMA=1:86:0.4:8であり、水溶性活性炭通過部(WP)が最も多く含まれていた。それぞれを50 mg/lの濃度で培地に添加した時の細菌の増殖結果を Fig. 4 に示した。脂溶性部(NA)と、含有比が最も高かったWPは、細菌の増殖に大きな影響はなかったが、活性炭カラムに吸着した二つの画分(WM, WMA)で顕著な細菌の増殖促進が認めら

れた。この二つの画分について、培地への添加濃度を10～100 mg/lの範囲で4段階に変えて試験を行った結果、メタノール溶出部(WM)は、添加濃度によって細菌の細胞収量が変化し、10 mg/lで対照区と差がなくなった。一方、メタノール/アンモニア/水(8:1:1)溶出部(WMA)は、100 mg/lでの細胞収量はWM画分よりも低かったが、10 mg/lでも細胞収量が変わらず対照区よりも高い増殖が見られた。WMA画分について酢酸エチルとブタノールで溶媒抽出を行った第二次分画で得られた3種類の画分について細菌の増殖結果をFig. 5に示した。酢酸エチル可溶部(WMAAc)では細菌の増殖が阻害され、ブタノール可溶部(WMABu)では対照区と変わらず、水溶部(WMAH)にのみ細菌増殖が認められた。WMAHの添加濃度を減じた場合、6.25 mg/l以上の添加では濃度に関係なく細胞収量は変わらなかったが、3.13 mg/lでは増殖効果が認められなかった。次にWMAH画分をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーで四つに分画して(第三次分画)、それぞれの画分を50 mg/l培地に添加した場合と、四つの画分を分離前のWMAH画分50 mg/l中の含有比に応じた濃度(画分1:7 mg/l, 画分2:9 mg/l, 画分3:24 mg/l, 画分4:12 mg/l)を加えた培地での細菌の増殖結果をFig. 6に示した。四つの画分とも細菌の増殖促進効果を持ち、細菌の細胞収量が最も大きかった画分1の最小有効濃度は、分離前と同様の 8×10^6 cells/ml程度の細胞収量が得られた値は、6.25 mg/lで分離前のWMAH画分と変わらなかった。

この画分1をD₂O溶媒で¹H-NMRを測定した結果、6 ppm付近の芳香族水素と3.8 ppm付近のメチン水素のピークが認められた。この画分1は水溶性画分の中で最も極性が高いものであることから、これらのピークは前者はポリフェノール系化合物、後者は糖に由来するものと推定された。

考 察

今回、分離して実験に用いた細菌株は、Fig. 1に示したように藻の体外分泌有機物によってその増殖が促進された。新葉上の細菌群を採取してそのまま接種した場合も同様に、藻の体外分泌有機物が添加された培地で細菌の増殖が促進されたことから、⁸⁾ この細菌株は新葉上に生息している細菌を代表する種の一つと推定される。この細菌は、寒天平板上では数回植え継ぎを行うとコロニーを形成しなくなった。分離された海藻の葉上細菌には、寒天平板で植え継いでいくうちに死滅してしまうものが多いことが多賀ら⁶⁾によって報告されており、この菌を含め葉上細菌には生存に必須な何らかの栄養素を海藻から得ているものが多いと考えられる。今回

分離した細菌は*Moraxella*属の菌であった。褐藻の葉上細菌相はいくつかの種類で報告されているが、^{3,7)} *Moraxella*属が優占種であったという報告は知られていないことから、この菌は葉の若い時期に一時的に優占種になるものか、あるいは通常の寒天平板法では検出できない性質を持った菌であるとも推測される。

この細菌の増殖には既知のアラメの成分のうち、マンニトールがよく利用された。マンニトールは褐藻の体内に多く含まれる主要な成分の一つで、また褐藻の藻体外分泌物中にも多量に含まれている。¹²⁾ 褐藻の細胞間多糖成分であるアルギン酸とフコイダンも増殖に利用されたが、貯蔵多糖であるラミナリンは利用されなかった。フコイダンは、藻体表面の保護作用も持っていると考えられる多糖で、葉上細菌が利用する機会の多い物質であること、およびラミナリンは藻の細胞内に貯蔵される物質であることから、この細菌は藻体から外に分泌される物質を主に利用していることが推測される。一方、グルコースを加えた培地では細菌の増殖が全く見られなかったことについて、グルコースは窒素や磷が欠乏した環境で単独で投与されると細菌の生残に阻害効果を持つことが報告されており、本細菌の増殖に対しても何らかの阻害効果を持っていたものと考えられる。

また、この菌はマンニトールを加えた培地で多量の多糖を生産した。細菌の細胞外多糖生産はその付着性¹³⁾や、抗生物質に対する耐性¹⁴⁾に関係があるといわれ、また*Enteromorpha linza*に優先してみられる*Flavobacterium-Cytophaga*属の菌が強い付着性を持っていることが報告されている。¹⁵⁾ 透過型電子顕微鏡による直接観察でも、アラメの葉上細菌は菌が分泌したと思われる粘質物に埋没している様子が観察されている。これらのことから、この細菌が藻が分泌するマンニトールを利用して多糖を生産する能力を持っていることはアラメ葉上に固着して生活する上で重要な性質の一つであると推測される。

この細菌は培地に加えたペプトンの濃度が高ければ、アラメの分泌物を増殖に必要としなかった。しかし、ペプトンとアラメ分泌物について、有機物濃度を有機炭素量として比較すると、ペプトンが500 mg/lの濃度で約200 mgC/lになるのに対して、EOM培地中のアラメ分泌物は2.4 mgC/lであった。両培地の細胞収量が同程度であったことから、細菌の増殖基質としての有機炭素当たりの効率は、アラメ分泌物の方がペプトンよりも2桁近く高くなる。また、EOM培地を1/3に希釈しても細菌の増殖が認められた。この希釈培地に添加されたアラメ分泌物量は、0.8 mgC/lという低い濃度であることからアラメ分泌物中には有機物源としての働き以外に、微量で細菌の増殖を促進させる物質が含まれているものと

考えられる。

アラメ分泌物を分画して細菌に対する増殖促進効果を調べた実験で、活性炭カラムによる最初に分画操作で、濃度の増加とともに細菌の最大細胞収量が増加する成分(WM)と、添加量と細胞収量が相関せず、より低い濃度で増殖促進作用を持つ成分(WMA)に分かれた。WMA画分では、添加量が10~100 mg/lまでの範囲で細菌の細胞収量が変わらなかったことから、有機物源としてはすべての培地に50 mg/lの濃度で含まれているペプトンが利用されたと考えられ、この画分には有機物源以外の増殖促進因子が含まれていたことが示唆される。このWMA画分は褐藻が分泌する抗菌物質のポリフェノールをおもに含む画分であるにもかかわらず、¹⁶⁾ この細菌の増殖に対しては抗菌的な影響よりも促進作用の方が強く現れた。

今回、アラメの分泌物から分離した藻体付着細菌の増殖を促進する成分について、得られた画分の最小有効濃度は6.25 mg/lであり、¹⁾H-NMRの結果から、糖とフェノール性化合物が主に含まれると推測された。今回分離されたアラメの付着細菌が、他の細菌が排除されている新葉上の抗菌的な環境に生息している理由の一つとして、この細菌が藻からの分泌物中に含まれるわずかな糖やフェノール性化合物を利用して増殖促進をはかる性質を持つことが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、¹⁾H-NMRの測定をしていただいた北海道大学理学部の鈴木 稔助教授に厚く御礼申し上げます。また、数々の教示を頂き、便宜を図っていただいた東北海区水産研究所の谷口和也室長に厚く御礼申し上げます。本研究は農林水産省の大型別枠研究「バイオコスモス計画」の一環として行われたことを記して関係各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) J. M. Sieburth and J. T. Conover: Sargassum Tannin, an

- Antibiotic Which Retards Fouling. *Nature*, **208**, 52-53 (1965).
- 2) 越智雅光: 抗菌性成分, 「海藻の生化学と利用」(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1983, pp. 101-119.
- 3) E. C. S. Chan and Elizabeth A. McManus: Distribution, Characterization, and Nutrition of Marine Microorganisms from the Algae *Polysiphonia lanosa* and *Ascophyllum nodosum*. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 409-420 (1969).
- 4) R. A. Laycock: The Detrital Food Chain Based on Seaweeds. I. Bacteria associated with the Surface of *Laminaria* Fronds. *Mar. Biol.*, **25**, 223-231 (1974).
- 5) M. K. Kong and Ywong-Yu Chan: A Study on the Bacterial Flora Isolated from Marine Algae. *Bot. Mar.*, **22**, 83-97 (1979).
- 6) T. Shiba and N. Taga: Heterotrophic Bacteria Attached to Seaweeds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **47**, 251-258 (1980).
- 7) A. Maruyama, M. Maeda, and U. Simidu: Distribution and classification of marine bacteria with the ability of cytokinin and auxin production. *Bull. Jap. Soc. Microbiol. Ecol.*, **5**, 1-8 (1989).
- 8) 坂見知子, 杉山元彦: アラメ葉状部付着細菌の増殖に与える藻体外分泌物の影響. 日水誌, **60**, 473-477 (1994).
- 9) 門田 元, 多賀信夫編: 海洋微生物研究法, 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 277-286.
- 10) 清水 潮: 海洋細菌の分類と同定, 「海洋微生物とバイオテクノロジー」(清水潮編著), 技報堂出版, 東京, 1991, pp. 226-241.
- 11) K. G. Porter and Y. S. Feig: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948 (1980).
- 12) R. C. Newell, M. I. Lucas, B. Velimirov, and L. J. Seiderer: Quantitative significance of dissolved organic losses following fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2**, 45-49 (1980).
- 13) D. G. Davis, A. M. Chakrabarty, and G. G. Geesey: Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1181-1186 (1993).
- 14) J. W. Costerton, K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie: Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 435-464 (1987).
- 15) T. Shiba and N. Taga: Attachment properties of *Flavobacterium-Cytophaga*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 1199-1203 (1981).
- 16) 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻ツルアラメのポリフェノール化合物によるエゾアワビに対する摂食阻害作用. 日水誌, **57**, 2065-2071 (1991).