

Notice on Plankton Seminar

#10018

13:30-16:30, 19 Oct. (Tue.) 2010 at Room # N407

ヨシ帯起源の細菌を活用したアオコの発生抑制に関する生理生態学的研究
(修士論文中間発表)

【背景および目的】

現在、世界各地の富栄養化した湖沼において、藍藻の *Microcystis* 属はアオコと呼ばれるブルームを形成して多大な被害を与えており、アオコの抑制手段の開発は急務となっている。近年、生態系への影響が少ない生物学的防除について、特に *Microcystis* 属に対するウィルスや殺藻細菌の存在が報告され、それらの有効活用が期待されている。ところで海洋生態系で、沿岸域においてアマモや大型藻類の表面、その藻場海水中に殺藻細菌が高密度に生息しているとの報告があるが、淡水では知見が乏しいのが現状である。そこで本研究では、ヨシ帯のヨシ茎表面に付着するバイオフィルムの細菌群集によるアオコ抑制機能を評価するために、以下の4つについて検討を行った。すなわち、①人工水路のヨシ帯における殺藻細菌について、②様々な殺藻細菌による殺藻様式、③人工水路のヨシ帯より単離された δ -Proteobacteria に属する殺藻細菌に関する研究、④自然環境下 (大沼、小沼および蓴菜沼) における殺藻細菌についての4つである。

【材料及び方法】

<①人工水路のヨシ帯における殺藻細菌について>

2009年7月~2009年9月にかけて、琵琶湖南湖沿岸の共同実験施設 Biyo センター (草津市) に設けられた人工水路において実験を行った。ヨシを植えた状態によって4つの実験区を設けた。すなわち、1) ヨシ茎表面にバイオフィルムが付着している実験区 (Mature), 2) ヨシ茎表面のバイオフィルムをふき取った実験区 (Forming), 3) ヨシの地下茎のみを残して上部を切除した実験区 (Roots), そして4) ヨシを植えない実験区 (Control) である。採水は各実験区の上流、中流および下流にて行った。また、Mature および Forming では水面下 10 cm のヨシを切断し、その表面に付着するバイオフィルムを採取した。試料については、総細菌 (Total bacteria, TB) 数と殺藻細菌の計数を行った。さらに、ヨシ帯人工水路におけるアオコ防除能を評価するために、2009年7月30日に Forming 中流の試水を用いて擬似現場法による実験を行った。採水試料は 0.1 μ m 濾過, 1 μ m 濾過, 10 μ m 濾過および無濾過の4つの実験区を設定し、各々に *M. aeruginosa* を添加し、経時的な *M. aeruginosa* の細胞数、TB 数、細菌捕食者の従属栄養鞭毛虫 (HNF) 数および殺総細菌数を計数した。TB 数は DAPI 染色、殺藻細菌数はホスト株を *M. aeruginosa* および緑藻の *Closterium aciculare* としたマイクロプレート MPN 法によった。また、HNF 数の計数は FITC-DAPI 二重染色によった。*M. aeruginosa* の細胞数は落射蛍光顕微鏡を用いて計数した。

<②様々な殺藻細菌による殺藻様式>

2007年6月~2009年8月にかけて、琵琶湖沿岸および Biyo センター実験水路から単離された殺藻細菌について、16S rDNA 塩基配列解析およびその殺藻能について検討を行った。用いた殺藻細菌は全部で 127 株であり、実験を行うまで冷凍保存 (-80 または -30°C) を行った。16S rDNA 塩基配列解析は、27-F および 530-R プライマーを用いて、PCR およびシーケンス反応によって各殺藻細菌株の塩基配列を入手した。得られた塩基配列は DDBJ の BLAST を用いて近縁株の検索を行った。さらに、MEGA4.0 を用いて N-J 法により系統樹を作成した。これらの殺藻細菌は二者培養による殺藻能の評価を行った。また、強力な殺藻能を示した細菌について TC インサートを用いた殺藻試験を行った。

<③人工水路のヨシ帯より単離された δ -Proteobacteria に属する殺藻細菌に関する研究>

前項において、*M. aeruginosa* に対して格段に強力な殺藻能を示した Wc090809d 株についてより詳細

な殺藻試験を行った。本株は2009年8月6日にBiyoセンター実験水路から単離された殺藻細菌である。実験は 10^5 cells ml⁻¹の*M. aeruginosa*培養に初期濃度 10^2 ~ 10^5 cells ml⁻¹となるように細菌株を接種し落射蛍光顕微鏡、ターナー蛍光度計を用いて*M. aeruginosa*の変動およびDAPI染色によって本細菌株細胞数の変動を観察した。

<④自然環境下(大沼、小沼および蓴菜沼)における殺藻細菌について>

2010年9月17日に大沼、小沼および蓴菜沼において滅菌したポリカーボネート製ボトルを用いて採水を行った。採水試料は3 μm濾過を行い、そのフィルターを直接ST10⁻¹寒天培地に載せた粒子付着性細菌(PAB)とその濾液をST10⁻¹寒天培地に塗抹した浮遊性細菌(FLB)の二種に分けて処理を行った。PABおよびFLBは2週間以降にコロニー数を計数して従属栄養細菌数を求め、二者培養によってPAB・FLBにおける殺藻細菌数を算出した。

【結果及び考察】

<①人工水路のヨシ帯における殺藻細菌について>

いずれの人工水路においても、TB数は 10^6 cells ml⁻¹前後で安定していた。殺藻細菌はヨシのバイオフィルムより*M. aeruginosa*については検出された。水中の殺藻細菌数は検出限界以下~10 MPN ml⁻¹で検出された。擬似現場法実験では、0.1 μm濾過の実験区を除きいずれの実験区でも各微細藻類が減少した。総細菌数およびHNF数は、いずれの実験区においても、TBのピークの後に3日以内のHNFのピークとTB数の減少が観察され、その後一定の値(TBは 10^5 cells ml⁻¹のオーダー、HNFは 10^4 cells ml⁻¹のオーダー)で安定していた。また、擬似現場法実験において、殺藻細菌数は人工水路よりも高い値(10^1 ~ 10^2 MPN ml⁻¹)で検出され、特に4日目から6日目にかけて高かった。

<②様々な殺藻細菌による殺藻様式>

16S rDNA塩基配列によって殺藻細菌はα-, β-, γ-, δ-Proteobacteria綱、CFB group、および少数ではあるがグラム陽性菌に属することが明らかとなった。採集地点ごとにみると、いずれの採集地点においてもProteobacteria綱に属する細菌が多く見られ、自然にヨシ帯に存在する細菌群集が殺藻能を持っていると考えられる。しかしながら、多くの分離保存細菌株が当初示した殺藻能を失っており(127株中81株)、冷凍保存または継代培養が殺藻能の保持に与える影響を与える可能性がある。また、TCインサート試験による結果では、CFB groupとδ-Proteobacteria綱に属する細菌は直接攻撃型であり、その他の細菌株は間接攻撃型であった。このような結果は過去の報告とよく一致する。

<③人工水路のヨシ帯より単離されたδ-Proteobacteriaに属する殺藻細菌に関する研究>

細菌を接種した実験区では、いずれも蛍光値の減少および*M. aeruginosa*細胞数の減少が見られたものの、完全な殺藻(溶藻)を示した実験区は見られなかった。細菌数は接種後いずれの実験区でも 10^7 cells ml⁻¹のオーダーまで増殖しその後一定の値で推移した。本実験の結果では、殺藻は示されなかったものの、 10^2 cells ml⁻¹のオーダーと非常に低い濃度で細菌株を接種した場合でも増殖阻害を引き起こしたことから、現在報告のある*M. aeruginosa*殺藻細菌の中でも格段に優れた殺藻能を持つ可能性が示唆された。今後より低濃度で細菌株を接種すると共に、詳細な殺藻様式について研究を進めていく予定である。

<④自然環境下(大沼、小沼および蓴菜沼)における殺藻細菌について>

現在実験・解析を行っており、今後方法に記述したような実験を行う予定である。

<総合考察>

以上の得られた結果から、ヨシ帯によるアオコ抑制機能の可能性が示唆された。一方で、淡水域においても沿岸域同様に水生植物に高密度に殺藻細菌が存在する可能性も考えられる。また、大沼および蓴菜沼では天然のヨシ帯を使ったアオコ防除方法の良いモデルケースとなりうる可能性があり、今後の解析が期待される。