

大沼湖沼群のヨシ帯に生息する微生物の
アオコ予防能の評価及びアオコ予防への活用の検討
(修士論文中間発表)

【背景及び目的】

近年、アオコと呼ばれる藍藻類ブルームが世界中で発生し、水質の悪化による水資源への悪影響が著しいことから、早急な対策が必要となっている。近年、環境に優しい生物学的防除法として、アオコ形成藍藻類を殺滅する能力を持った殺藻細菌の利用が注目されている。特にヨシ茎の水中部分に形成されたバイオフィーム (BF) には、高密度で殺藻細菌が生息する事実が発見され、それらの細菌は BF から水中に供給されることから、ヨシ帯の造成を通じたアオコの予防が期待される。また、ヨシ帯の水中に設置した基質 (不織布) に形成された BF にはヨシ茎 BF よりもさらに高密度の (1桁上) 殺藻細菌が検出され、人工基質のアオコ抑制への応用が大きく期待されている。しかし、これらの研究は始めたばかりで、知見が乏しいのが現状である。そこで本研究では、①大沼湖沼群のヨシ帯におけるアオコ増殖阻害及び殺藻細菌の探索及びモニタリングを通じてヨシ帯の有するアオコ防除能の総合評価を行い②ヨシ帯に設置した基質 BF についてアオコの抑制に有用な細菌の探索およびモニタリングを通じて、基質 BF のアオコ予防能の検討を行うことを目的とした。

【材料及び方法】

① 大沼湖沼群のヨシ帯におけるアオコ増殖阻害及び殺藻細菌

北海道七飯町の大沼公園域の大沼、蓴菜沼、山水温泉に設けた3地点で2012年6月から11月に、概ね月1回の頻度でサンプリングを行った。大沼では、例年アオコの発生する OP をヨシのないコントロール地点とし、湖水を採取した。蓴菜沼及び山水温泉ではヨシ帯が発達し、それぞれ JL 及び SS としてヨシ試料及び湖水を採集し、実験室に持ち帰った。ヨシ試料は、滅菌済み歯ブラシを用いてヨシ表面の BF を剥離して滅菌蒸留水 100mL に懸濁し、BF 懸濁試料とした。剥離された BF の湿重量も測定した。BF 懸濁液は滅菌蒸留水を用いて適宜段階希釈後、0.1mL を 10^{-1} 寒天培地に塗抹し、暗条件下で温度 25°C にて2週間以上培養して、形成されたコロニーから細菌株を分離した。湖水試料については、適宜希釈後に、孔径 3 μ m のヌクレポアフィルターを用いて濾過を行い、フィルター上の細菌を粒子付着性細菌 (Particle associated bacteria : PAB) とし、寒天培地上に静置して生じたコロニーから細菌株を得た。濾液中の細菌は浮遊性細菌 (Free living bacteria : FLB) とし、0.1 mL を寒天培地に塗抹して同様に培養、分離を行った。ヨシ BF 試料及び湖水試料の全細菌数を DAPI 染色と落射蛍光顕微鏡観察により行った。分離した細菌は *Microcystis aeruginosa* 及び *Anabana crass* を対象として二者培養試験により殺藻能を評価した。CT 培地で良好に増殖している藍藻の無菌培養を、試験の1、2日前に48ウェルマイクロプレートのウェルに収容し、その中に分離した細菌のコロニーを滅菌した爪楊枝を用いてごく少量掻き取って接種し、温度 25°C、光強度 60 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ 、明暗周期 14hL : 10hD の条件下で14日間培養し、1、2、3、5、7、9、14日目に倒立顕微鏡を用いてマイクロプレート中の *M.aeruginosa* の増殖の様子或いは生死を観察した。殺藻能が認められた細菌株と実験に供した細菌株の数を基に、各サンプル中の殺藻細菌数を算出した。

② ヨシ帯に設置した人工基質に形成された BF におけるアオコの抑制細菌

大沼では、ヨシのない遊覧船着場付近 OP_船、ヨシおよび水草が繁茂している大沼内湖 ON、蓴菜沼 JL 及び山水温泉 SS の4地点において、滅菌した不織布及び炭素繊維樹脂 (ミラクル六助) の2種類の基質を設置した。2012年8月13日から9月10日、及び2012年9月26日から10月24日の期間、2シリーズの実験を行った。週1回、各地点のミラクル六助、不織布

及び湖水を採取した。ミラクル六助サンプルは滅菌した歯間ブラシを用いて BF を剥離し、不織布サンプルは 100mL の滅菌蒸留水を加えた滅菌済みのアイボーイ中で 600 回強振して BF を剥離し、100mL の BF 懸濁液を作製した。BF 懸濁液及び湖水試料は段階希釈した後、ST10⁻¹ 寒天培地に塗抹し、ミラクル六助 BF、不織布 BF 及び湖水に生息する細菌として培養、分離を行った。BF 及び湖水の全細菌数は直接計数法により求めた。基質から剥離された BF の湿重量も測定した。分離した細菌は *M.aeruginosa* を対象として二者培養実験により、殺藻能の有無を確認して生息密度を求めた。

【結果及び考察】

① 大沼湖沼群のヨシ帯におけるアオコ増殖阻害及び殺藻細菌

調査期間中、OP にはアオコが発生したが、SS 及び JL にはアオコが発生しなかった。直接計数及び培養可能細菌数の算出結果より、湖水には総細菌数は 10⁶-10⁷ cells mL⁻¹ のオーダーでの密度で、培養可能細菌数は 10⁴-10⁵ CFU mL⁻¹ で検出された。BF においては、総細菌数は 10⁸-10⁹ cells g⁻¹、培養可能細菌数は 10⁷-10⁸ CFU g⁻¹ で検出された。

M.aeruginosa を用いた二者培養実験の結果、OP の湖水試料では、殺藻細菌は PAB 画分から検出されず、FLB 画分から 6 月、8 月、10 月、11 月に検出され、密度はそれぞれ 1.28 x 10³、4.43 x 10²、1.6 x 10³、7 x 10² cells mL⁻¹ であった。SS 湖水試料に関しては、8 月には PAB 画分から 7.9 x 10³ cells mL⁻¹、FLB 画分から 7.22 x 10³ cells mL⁻¹ が検出された。SS ヨシ BF 試料では、9 月のみ密度は 9.67 x 10⁶ CFU g⁻¹ の殺藻細菌が検出された。JL において湖水試料から、PAB 画分で、殺藻細菌は 6 月から 9 月まで毎月検出され、密度はそれぞれ 6.4 x 10³、7.6 x 10²、2 x 10²、2.3 x 10² cells mL⁻¹ となった。FLB 画分については、6 月及び 8 月にはそれぞれ 1.1 x 10³、3.7 x 10² cells mL⁻¹ の殺藻細菌が検出された。JL ヨシ試料に関しては、9 月及び 11 月にはそれぞれ 4.71 x 10⁶、2.65 x 10⁴ CFU g⁻¹ の殺藻細菌が検出された。

以上の結果より、ヨシ BF 中の殺藻細菌数は湖水より 1000 倍以上高いことが解った。また、SS 及び JL には水中の殺藻増殖細菌はヨシ BF より 1 か月以上早く観察された。水中の殺藻細菌はヨシ BF に付着し、BF の中で大量に増殖し、さらにヨシ BF の表面から剥離して、水中に常に供給されると考えられる。*Anabana crass* を用いた二者培養は現在実験・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。

② ヨシ帯に設置した人工基質に形成された BF におけるアオコの抑制細菌

2 回設置した基質 BF 中の総細菌数は 10⁸-10¹⁰ CFU g⁻¹、培養可能細菌数は 10⁷-10⁸ CFU g⁻¹ の範囲で推移し、地点間に大きな差が認められなかった。*M.aeruginosa* に対する殺藻・増殖阻害細菌に関しては、各地点に設置した基質 BF から 10⁶-10⁸ CFU g⁻¹ のオーダーの密度で検出された。

以上の結果から、人工基質に新たに形成された BF (10⁶-10⁸ CFU g⁻¹) にはヨシ BF (10⁶ CFU g⁻¹) よりもさらに 1 桁~2 桁の高い密度の殺藻細菌が生息することが判明した。しかも、地点間に検出された殺藻細菌の密度には大きな差は認められなかった。ヨシ帯及び水草帯に設置した人工基質に形成された BF 中の殺藻細菌密度は、OP に設置した基質より有意に高いという結論は得られなかった。

【まとめ及び今後の予定】

本研究において、高密度な殺藻・増殖阻害細菌がヨシ BF から検出され、さらにヨシ帯がある地点にはアオコが発生していない状態で、ヨシ帯によるアオコの抑制機能の可能性が示唆された。また、人為的に設置した人工基質に形成された BF にはヨシ BF より高い密度の殺藻細菌が検出されたことから、人工基質 BF のアオコ防除への活用が大きいと期待される。今後は、*Anabana crass* を用いて二者培養を行う。また、基質 BF 中の殺藻細菌の組成を解明するため、基質 BF、ヨシ BF 及び湖水から検出された殺藻細菌の 16S rDNA 塩基配列の解析を行う予定である。

王 賢娉