

北海道渡島大沼国定公園域の湖沼群における
ヨシ由来の細菌によるアオコの発生制御に関する研究

近年、世界各地の富栄養化した湖沼において、有害有毒藍藻類のブルーム（アオコ）が頻繁に発生している。アオコは湖水の毒化、カビ臭、コイやフナといった有用生物への悪影響など、様々な問題を引き起こしている。渡島大沼においても、近隣の農地や牧草地の拡大の結果、肥料などの流入を通じて富栄養化が進行しており、1980年代以降小規模ではあるもののアオコが発生するようになってきているため早急な対策が必要となっている。

アオコの対策として、直接アオコを取り除く方法や薬品投与等でアオコを殺滅する方法が挙げられるが、環境に配慮された有効な手段が確立されていないのが現状である。そこで、環境に優しい技法として、アオコ原因藻類を殺滅する能力を持った殺藻細菌を用いた生物学的な方法が有望と期待される。特に殺藻細菌はヨシの茎表面に形成されるバイオフィルム（BF）中に高密度で生息するという新事実が発見されたため、ヨシ BF に付着する細菌がアオコ防除において有効であることが期待されている。そこで本研究では、ヨシ BF に付着する細菌のアオコ防除に対する有用性を検討するため、渡島大沼におけるヨシ BF の殺藻細菌の探索及びアオコ防除能の評価を行った。

2013年5-10月の間に月1回、北海道南西部渡島にある大沼国定公園内の山水温泉（SS）、蓴菜沼（JL）、人工的にヨシを植栽した荻間川ヨシ浄化池（KR）、の3定点のヨシ帯において、湖水とヨシを採取した。ヨシは水面下の茎を採取し、湖水は各定点でバケツ採水を行った。採取した試料は滅菌したポリプロピレン容器に収容し、研究室に持ち帰り速やかに実験に用いた。

ヨシは滅菌した歯ブラシを用いて表面に付着している BF を剥離し、滅菌蒸留水で懸濁した BF 試料を作成した。BF 試料は滅菌蒸留水を用いて適宜段階希釈を行い、 $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗抹後、暗所で2週間培養した。その後、形成されたコロニーの計数を行い、培養可能細菌数を算出した。また、滅菌した爪楊枝を用いてコロニーを形成した細菌株を分離した。湖水は適宜希釈後、孔径 $3.0 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過を行い、フィルター上に捕集された細菌を粒子付着性細菌（Particle associated bacteria: PAB）、濾液中の細菌を浮遊性細菌（Free living bacteria: FLB）とした。PAB は $ST10^{-1}$ 寒天培地上にフィルターを静置して培養し、形成されたコロニーを計数と分離を行った。FLB については寒天培地に塗抹して得られたコロニーから計数と分離を行った。また、BF 試料と湖水試料の一部はグルタルアルデヒドで固定後、DAPI 染色を行い、落射蛍光顕微鏡を用いて総細菌数を計数した。

分離した細菌は有害有毒アオコ原因藻類である *Microcystis aeruginosa* 及び *Dolichosperum crassum* の2種を対象に二者培養試験を行い、細菌の殺藻能を評価した。48 ウェルマイクロプレートに CT 培地で無菌培養した *M. aeruginosa* 及び *D. crassum* を約 $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ となるように各ウェルに 0.8 mL ずつ分注した。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少量掻き取り、接種した。温度 25°C 、光強度約 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 、明暗周期 14hL:10hD の条件下で2週間培養し、各ウェルを倒立顕微鏡下で観察を行い、殺藻の有無を確認した。細菌株数と実験に供した細菌株数を基に殺藻細菌及び増殖阻害細菌の密度を算出した。

M. aeruginosa に対し、殺藻・増殖阻害能を示した細菌は BF 試料において、SS で 13 株、JL で 11 株、KR で 5 株であり、計 29 株が検出された。密度は 5.2×10^5 - $4.8 \times 10^6 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$ と高い値であった。湖水試料においては、SS の FLB で 4 株、PAB で 2 株が検出され、JL では FLB で 4 株、PAB で 2 株が検出された。また KR の FLB で 1 株、PAB では 3 株が検出された。

密度は、 4.3×10^1 - 3.3×10^3 CFU mL⁻¹ という値で推移した。

D. crassum に対し、殺藻・増殖阻害能を示した細菌は BF 試料において、SS で 6 株、JL で 9 株、KR で 5 株であり、計 20 株が検出された。密度は 1.4×10^5 - 5.6×10^6 CFU g⁻¹ wet weight で *M. aeruginosa* と同程度の値であった。湖水試料において、SS の FLB で 3 株、PAB で 6 株が検出され、JL では FLB で 2 株、PAB で 3 株が検出された。また KR の FLB で 1 株、PAB で 6 株が検出された。密度は 4.3×10^1 - 3.3×10^3 CFU mL⁻¹ で BF 試料と同様に *M. aeruginosa* と同程度の値であった。

二者培養試験の結果より *M. aeruginosa* 及び *D. crassum* の殺藻細菌は同程度検出され、BF 試料から多くの殺藻細菌が確認された。また *M. aeruginosa* 及び *D. crassum* の両方の藻類に殺藻能を示す細菌は少なかったことから (85 株中 3 株のみ) 種特異的な殺藻能を持つ細菌が多い可能性が示された。ヨシ BF 内は特異的な環境で複雑な生物相互作用が働き、細菌が豊富に存在していることから、様々なアオコ原因藻類に対して殺藻能を持つ細菌が存在する可能性がある。さらに、ヨシ帯起源の殺藻細菌を用いたアオコの発生予防は自然環境への影響が少なく、有益な基礎生産が増大するため、自然環境下のアオコ防除に非常に有効であると考えられる。また地点の差は認められず、BF 試料から多くの殺藻細菌が検出されたことから自生するヨシ、植栽したヨシに問わずヨシ BF には多くの殺藻細菌が存在することが示された。従って、ヨシを人工的に植栽することはアオコ防除に有効であるといえる。

本研究により殺藻細菌という観点からヨシ帯の活用がアオコ防除に有効であることが示された。元来、ヨシ帯は水質浄化や生物の生息場として重要視されており、保全や植栽が行われてきた。今後はヨシ BF の殺藻細菌という観点も新たに加えて、ヨシ帯を用いた水域再生が期待される。

小島 千里