

# 修士論文内容の要旨

ふりがな	みやした ようへい	
氏名	宮下 洋平	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 25 年 4 月	
指導教員名	主査 今井 一郎 教授	副査 澤辺 智雄 教授 副査 山口 篤 准教授
論文題目	北海道渡島大沼における水草ヒシのアオコ防除能に関する研究	

21 世紀は「水の世紀」と称されている。水資源の確保は極めて重要な課題であるが、世界中の湖沼で特に富栄養化が問題となっている。湖沼の富栄養化は *Microcystis aeruginosa* をはじめとする有毒藍藻類ブルーム (アオコ) を引き起こし、上水確保の障害のみならず生態系の破壊等、様々な問題を引き起こしている。北海道渡島大沼においても湖水の富栄養化により、毎年夏季にアオコが発生することから早急な対策が必要である。近年、アオコの防除法として、殺藻細菌の活用が環境に優しい生物学的防除手法として提案されている。そして水生植物の表面から *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌 (Algicidal-bacteria: AB) や増殖阻害細菌 (Growth-inhibiting bacteria: GIB) が発見され、その応用が期待されているが、水草の AB や GIB に関する知見は圧倒的に不足している。そこで本研究では、ヒシに注目し、表面バイオフィルムに生息するアオコの AB や GIB について研究を行い、ヒシの持つ潜在的なアオコ防除能を評価することを目的とした。

2012 年及び 2013 年の 6 月から 9 月に毎月 1 回、大沼国定公園湖沼群内の山水温泉前と蓴菜沼の 2 定点でヒシを採取した。また、2013 年 9 月 9 日から 5 日間、ヒシの群生する流山温泉調整池に炭素繊維基質及び不織布を設置し、これら人工基質への AB や GIB の付着を調べた。さらに 2014 年の 5 月から 10 月、七飯町の造成した荻間川浄化池に播種して生長したヒシ及び湖水試料を採取した。ヒシ試料に滅菌蒸留水を加え、600 回強振して表面バイオフィルムを剥離し、適宜希釈後  $ST10^{-1}$  寒天培地に塗抹して細菌コロニーを形成させ分離した。湖水試料は段階希釈後に孔径  $3.0 \mu\text{m}$  のヌクレポアフィルターで濾過し、フィルター上の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) として培養、分離した。CT 培地で培養した無菌の *M. aeruginosa* (Ma17 株) を密度約  $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  で 48 ウェルプレートの各ウェルに 0.8 mL ずつ分注し、細菌コロニーを滅菌爪楊枝で各ウェルの *M. aeruginosa* に添加した。温度  $25^\circ\text{C}$ 、光強度  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 、明暗周期 14 hL : 10 hD の条件下で 2 週間培養し、殺藻の有無を確認し、*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌を検出・計数した。

山水温泉のヒシの AB 密度は、葉では 2012 年 6–8 月に  $1.5 \times 10^5 - 3.5 \text{CFU} \times 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ wet weight}$  のオー

ダーで、2013年は7月と9月に $5.9 \times 10^6$  及び $1.6 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度でそれぞれ検出された。GIBは、2012年は6月、7月及び9月にそれぞれ $2.2 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$ , 及び $1.6 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で検出されたのに対し、2013年は6月、7月及び9月に検出された ( $2.2 \times 10^5$ ,  $2.4 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight)。水中根では2012年にABが6月及び8月に検出され各々 $1.5 \times 10^5$ ,  $7.8 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight であり、GIBは調査期間中毎月検出された ( $2.2 \times 10^5$ ,  $5.8 \times 10^6$ ,  $5.8 \times 10^7$ ,  $9.0 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight)。一方2013年のABは6月に $2.5 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で、GIBは9月に $7.7 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で検出された。蓴菜沼では、葉由来のABは、2012年の6月から9月まで $3.2 \times 10^5$  –  $3.2 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で検出された。GIBも毎月検出され、それぞれ $8.9 \times 10^5$ ,  $6.4 \times 10^5$ ,  $5.2 \times 10^6$ ,  $6.3 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度であった。一方2013年のABは検出限界以下であり、GIBは9月に $6.3 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で検出された。水中根については、2012年6–8月にABは $6.3 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $4.1 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight の密度で、GIBは、 $8.9 \times 10^5$ ,  $4.6 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight でそれぞれ検出されたが、2013年はABが検出されず、6月にGIBが $4.0 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight で検出された。

流山温泉調整池では、炭素繊維基質からABは、実験開始から一貫して検出されなかったが、GIBについては実験開始3日目以降に $9.0 \times 10^3$ ,  $2.2 \times 10^4$ ,  $7.5 \times 10^4$  CFU cm<sup>-2</sup>の密度で検出された。不織布ではABが2日目、及び5日目にそれぞれ $3.2 \times 10^4$ ,  $6.9 \times 10^4$  CFU cm<sup>-2</sup> のオーダーで検出され、GIBは実験開始2日目以降毎日検出された ( $1.6 \times 10^4$ ,  $2.3 \times 10^4$ ,  $7.0 \times 10^4$ ,  $1.4 \times 10^5$  CFU cm<sup>-2</sup>)。

荇間川浄化池から採集した湖水のAB及びGIBの結果をみると、粒子付着性細菌 (PAB) のABは、10月に $5.2 \times 10^2$  CFU mL<sup>-1</sup> の値で検出され、GIBは、8月に $3.2 \times 10^2$  CFU mL<sup>-1</sup> の密度で見出された。浮遊性細菌 (FLB) のABは、7月–9月の間に毎月 $4.0 \times 10^3$ ,  $4.5 \times 10^2$ , 及び $2.3 \times 10^2$  CFU mL<sup>-1</sup> の値で検出された。GIBは7月に $4.0 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> の値で検出された。

荇間川浄化池のヒシの葉からはAB及びGIBが7月と8月に検出された。ヒシの水中根のABについては、7月に $4.9 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight で検出された。GIBについては7月及び8月にそれぞれ検出された。

山水においてヒシの葉と水中根から検出されたAB及びGIBの密度の変動には、特定の傾向は認められなかった。ヒシの高密度群生地に設置した炭素繊維基質及び不織布に形成されたバイオフィームから、AB及びGIBが低密度で検出されたが、ヒシとの基質の性質の相違が影響した可能性がある。人工池に播種したヒシの葉及び水中根から*M. aeruginosa* に対するAB及びGIBは、7月から9月に集中的に検出されたが、渡島大沼でのアオコの発生時期と一致していた。したがって、ヒシ由来の殺藻細菌によるアオコ防除の可能性が示唆された。

本研究によりヒシは栄養塩の吸収能だけでなく、植物体表面のバイオフィーム由来の殺藻細菌によってアオコ防除にも大変有用である可能性が高く、理想的な環境配慮型のアオコの防除技法として提唱することができる。しかし秋にはヒシの枯死の際に大量の栄養塩が湖水中に放出されるので、枯死前にヒシを刈り取る等、総合的かつ計画的な湖沼の管理が必要である。現在、里山・里海といった人間の管理で良好な状態を創出、維持するという概念が提案されており、湖沼においては里湖構想という総合的な湖沼管理の一環として水草の活用がアオコの防除が提案できる。今後の検討すべき大きな課題であろう。

