

富栄養湖におけるヒシ由来の殺藻細菌と増殖阻害細菌によるアオコ防除能に関する研究
(修士論文中間発表)

【背景及び目的】

近年、日本の湖沼は周辺地域の開発や護岸工事等により、劇的な環境の変化を遂げてきた。湖沼の観光利用や農業用水、生活水の供給源として利用されるようになり、生活排水、農業排水の流入が増加し、湖水の富栄養化が進行するにつれて、湖沼に自生する水生植物は減少の一途を辿った。それにより、アオコと呼ばれる藍藻類のブルームがしばしば見られるようになった。アオコは湖沼の水質悪化を誘引し、異臭、景観の悪化、ヘラブナ等の有用生物の斃死等を招くため早急な対策が必要である。様々な対処法が検討、実施されているが、物理化学的な手法は環境に負荷が大きいことから、生物学的防除法が環境に配慮された技法として関心が寄せられている。

ごく最近、ヨシやヒシをはじめとする水生植物由来の細菌集合体(バイオフィーム)からアオコを殺滅する細菌(殺藻細菌)が高密度で検出されたことから、これらを活用したアオコ防除技術の確立が期待できる。しかしながら、バイオフィームの殺藻細菌の生態については、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、①北海道渡島大沼におけるヒシ由来の殺藻細菌の生息密度に関する季節的なモニタリング、②ヒシのバイオフィームの殺藻細菌の付着プロセスの調査研究、③人為的なアオコ防除の技術開発についての検討、④茨城県霞ヶ浦におけるヒシ及び人工基質の殺藻細菌に関する研究を通じてヒシバイオフィーム由来の殺藻細菌を用いたアオコ防除について検討した。

【材料と方法】

①北海道渡島大沼におけるヒシ由来の殺藻細菌の季節的モニタリング

試料のヒシは大沼国定公園内にある山水温泉付近の内湖、および蓴菜沼で、2012年と2013年の6月から9月まで各年3ヶ月間採取した。採取した試料は、葉及び水中葉にそれぞれ分けて以下の実験に供した。各試料に滅菌蒸留水を加え、600回強振することにより表面バイオフィームを剥離し、適宜段階希釈後 $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗抹して細菌コロニーを形成させ分離した。その後、CT培地で培養した*Microcystis aeruginosa* (Ma17株)を約 1.0×10^5 cells mL⁻¹となるよう48ウェルプレートの各ウェルに0.8 mLずつ分注し、分離培養した細菌のコロニーを滅菌爪楊枝で少量掻き取り各ウェルの*M. aeruginosa*に添加した。温度25°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週間培養した後、倒立顕微鏡を用いた観察によって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。

②ヒシのバイオフィーム由来の殺藻細菌の付着プロセス、及びアオコ防除技術の検討

2013年9月9日から1週間、大沼国定公園内流山温泉のヒシが密生する調整池にて、バイオフィーム由来の殺藻細菌の人工基質への移行付着の実験を行った。あらかじめ滅菌処理した炭素繊維樹脂と不織布をそれぞれ調整池に設置後、1, 2, 3, 5, 7日目にそれぞれ回収採集した。得られた試料は速やかに実験室に持ち帰り、①と同様の実験に供した。バイオフィーム湿重量、培養可能細菌数、総細菌数と共に、殺藻細菌数を算出した。

③茨城県霞ヶ浦におけるヒシ、及び人工基質の殺藻細菌の研究

調査は2014年9月5日から5日間茨城県霞ヶ浦の西浦及び北浦にて実施した。各調査地点からヒシと湖水の試料をそれぞれ採取し速やかに実験室に持ち帰り、ヒシについては葉と水中葉を込みで同様の実験に供した。また、あらかじめ滅菌処理した炭素繊維をヒシの密集する北浦の地点と水生植物の繁茂していない西浦の地点にそれぞれ設置し、設置開始より1, 2, 3, 5

日目にそれぞれ回収採集した。湖水試料は適宜希釈した後、孔径 3.0 μm の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) としてそれぞれ 10^{-1} 寒天培地で培養、分離した。その後ヒシ同様の二者培養実験に供した。

【結果及び考察】

①北海道渡島大沼におけるヒシ由来の殺藻細菌の季節的モニタリング

殺藻細菌密度は、ヒシの葉について 2012 年は 6 月から 8 月にかけて 1.0×10^6 CFU g^{-1} wet weight のオーダーで、2013 年は 7 月及び 9 月に 1.0×10^6 CFU g^{-1} wet weight のオーダーで検出された。ヒシの水中葉を見ると、2012 年は 6 月及び 8 月にそれぞれ 1.5×10^5 CFU g^{-1} wet weight, 7.8×10^7 CFU g^{-1} wet weight を示したのに対し、2013 年は 6 月にのみ 2.5×10^6 CFU g^{-1} wet weight の結果となった。

蓴菜沼における殺藻細菌密度は、ヒシの葉では 2012 年は 6 月から 9 月まで毎月 1.0×10^6 CFU g^{-1} wet weight のオーダーで検出されたのに対し、2013 年は一度も検出されなかった。水中葉については、2012 年に 6 月から 8 月におよそ 1.0×10^6 CFU g^{-1} wet weight のオーダーで検出されたのに対し、2013 年ではヒシの葉と同様に殺藻細菌が検出されなかった。

②ヒシのバイオフィルム由来の殺藻細菌の付着プロセス、及びアオコ防除技術の検討

バイオフィルム湿重量は、炭素繊維においては実験開始 3 日後に 6.5 mg cm^{-2} と飽和状態となり、その後緩やかな減少が見られた。一方、不織布については 3 日目に 2.1 mg cm^{-2} と一時飽和状態が認められたものの、7 日目に 3.9 mg cm^{-2} と急激な増加が観察された。培養可能細菌数は炭素繊維において、2 日目に 1.5×10^6 CFU cm^{-2} と急激な増加を示した後、緩やかに増加を続け 5 日目に最大細菌数 3.1×10^6 CFU cm^{-2} となった。不織布においても 5 日目に最大値 1.9×10^6 CFU cm^{-2} を示したことから、培養可能細菌は約 5 日で飽和状態となることが示唆された。総細菌数は炭素繊維において 3 日目に 1.8×10^8 Cells cm^{-2} と飽和状態となり、また不織布においては実験開始後 2 日で最大値 4.2×10^6 Cells cm^{-2} を示した後変化はあまり見られなかった。殺藻細菌数は炭素繊維においては実験開始から一貫して検出されなかったが、不織布については 2 日目、および 5 日目にそれぞれ 1.0×10^4 CFU cm^{-2} のオーダーで検出された。

③茨城県霞ヶ浦におけるヒシ、及び人工基質の殺藻細菌の研究

西浦におけるヒシ由来のバイオフィルムの培養可能細菌数は 3.1×10^8 CFU g^{-1} wet weight であった。北浦では 2.3×10^8 CFU g^{-1} wet weight であり、両地点の培養可能細菌数はほぼ同密度であった。炭素繊維の培養可能細菌数はヒシ繁茂地では初日から 4 日目までそれぞれ 6.3×10^7 , 1.8×10^9 , 7.0×10^8 , 3.4×10^8 CFU g^{-1} wet weight と推移した。一方水生植物の繁茂しないコントロール地点では、 7.5×10^5 , 3.2×10^7 , 6.4×10^7 , 8.7×10^7 CFU g^{-1} wet weight の値で推移し、ヒシの群落では水生植物の存在しない地点と比べ、人工基質へ移行付着する細菌が約 10-100 倍多く存在していることが明らかとなった。

【今後の展望】

栄養塩分析、二者培養試験、DAPI による総細菌数の算出を行い、殺藻細菌とヒシのバイオフィルムの関係性について水理環境を含む多方面から考察する予定である。

宮下 洋平

次回のゼミ(11/10 [月] 9:30~, W103 にて) は卒論中間発表です。