

荇間川浄化池および五稜郭公園外堀におけるヒシ (*Trapa japonica*) 由来の細菌を用いた
アオコ形成藍藻類の防除に関する研究 (仮題)
(卒業論文中間発表)

【研究背景】

有害有毒藍藻類のブルーム (アオコ) は、富栄養化した湖沼などの滞留する淡水域においてしばしば発生し、景観の悪化、悪臭、藍藻毒による水生生物の斃死等を引き起こし、問題となっている。そのためアオコの発生は水資源供給の弊害になる他、観光業、漁業をはじめとする産業の経済的損失を招く恐れがある。

これまで、アオコの防除法として、ポンプ吸引とフィルターろ過を行う物理的防除法や、硫酸銅や粘土の散布を行う化学的防除法が提案されているが、高コストであることや他の有用水生生物への悪影響が懸念されており、実用には至っていないのが現状である。

近年、低コストかつ湖沼生態系に配慮した防除法として、藍藻類に対して殺藻能をもつ細菌 (殺藻細菌) を用いた生物学的防除法が注目されており、中でも浮葉植物ヒシ (*Trapa japonica*) の表面に形成されるバイオフィーム (BF) から、*Microcystis aeruginosa* に対する殺藻細菌が高密度に検出され、アオコ防除への実用化が期待されている。(宮下, 2013; 小林, 2015) さらに、ヒシならびにヒシ表面 BF に付着した珪藻類による栄養塩を吸収に起因する水質改善効果も期待されている。(宮下, 2015)

そこで本研究では、ヒシ表面 BF 由来の殺藻細菌を用いたアオコ防除法の検討を目的とし、人工的にヒシを播種した実験区およびヒシが自生している水域において、ヒシ表面 BF 由来の殺藻細菌 (アオコ原因生物がターゲット) の季節的変動を観察した。

【材料と方法】

試料の採取は 2015 年 5 - 10 月にかけて、北海道渡島大沼への流入河川である荇間川に設置された浄化池および五稜郭公園外堀において毎月 1 回行った。

荇間川浄化池では約 3 m x 3 m の区画を 3 つ用意し、ヒシ種子を 800 個播種した高密度区、200 個播種した低密度区、播種を行わなかったコントロール区を設定した。また、高密度区と低密度区については播種から 2 か月後に、発芽した株を計数し、各区画における発芽率を算出した。

五稜郭公園外堀では、自生しているヒシを残存させた水生植物保護帯 (Stn.P) でヒシおよび水試料を、ヒシの自生していないコントロール区 (Stn.C) で水試料を採取した。

水試料については適宜段階希釈後、孔径 3.0 μm フィルターでろ過を行い、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)、ろ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、FLB は濾液を塗抹することでそれぞれコロニーを形成させた。暗所での 2 週間の培養後に、コロニーの計数を行い培養可能細菌数 (CFU mL⁻¹) を算出した。

ヒシ試料については、滅菌蒸留水を加え、600 回の強振によって表面 BF を剥離した。得られた BF 懸濁液は適宜段階希釈し、ST10⁻¹寒天培地に塗抹した後、水試料と同様に培養可能細菌数 (CFU g⁻¹ wet weight) を求めた。その後、各試料から単離した細菌 30 株を、CT 培地で無菌培養したアオコ原因種である *Microcystis aeruginosa* (Ma17 株) との二者培養実験に供した。二者培養実験は温度 25°C、光強度約 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、明暗周期 14 hL : 10 hD の条件下で 2 週間行った。その後、倒立顕微鏡を用いて観察を行い、殺藻細菌および増殖阻害細菌の有無を確認した。

各試料の総細菌数についてはグルタルアルデヒドで固定した試料について DAPI 染色を施し、落射蛍光顕微鏡を用いて直接計数した。

【結果】

1. 荻間川浄化池 培養可能細菌

各実験区における試水中の培養可能細菌数は PAB, FLB とともに約 $10^3 - 10^4$ CFU mL⁻¹のオーダーの密度で推移した。ヒシ高密度区では PAB, FLB とともに 10 月に最大密度を記録し、PAB は 6.2×10^4 CFU mL⁻¹, FLB は 1.7×10^4 CFU mL⁻¹であった。細菌の最小密度についてみると、PAB は 5 月の 4.5×10^3 CFU mL⁻¹, FLB は 6 月の 1.8×10^3 CFU mL⁻¹であった。ヒシ低密度区において、PAB の最大密度は 7 月の 6.0×10^4 CFU mL⁻¹, FLB は 5 月の 1.5×10^4 CFU mL⁻¹であり、最小密度は PAB は 5 月の 1.4×10^3 CFU mL⁻¹, FLB は 9 月の 1.7×10^3 CFU mL⁻¹であった。コントロール区では、PAB の最大密度が 7 月の 8.6×10^4 CFU mL⁻¹, FLB は 10 月の 2.5×10^4 CFU mL⁻¹であり、最小密度は PAB は 5 月および 9 月の 1.3×10^3 CFU mL⁻¹, FLB は 6 月の 1.3×10^3 CFU mL⁻¹であった。

ヒシ表面 BF 由来の培養可能細菌は、 $10^6 - 10^8$ CFU g⁻¹ wet weight のオーダーの密度で推移していた。ヒシ高密度区の最大密度は、10 月の 4.0×10^8 CFU g⁻¹ wet weight であり、最小密度は 6 月の 4.4×10^6 CFU g⁻¹ wet weight であった。ヒシ低密度区の最大密度は 10 月の 3.1×10^8 CFU g⁻¹ wet weight であり、最小密度は 8 月の 5.2×10^6 CFU g⁻¹ wet weight であった。また、ヒシ種子の発芽率は、高密度区で約 32%、低密度区で約 47%であった。

2. 五稜郭公園外堀 培養可能細菌

五稜郭公園外堀における試水中の培養可能細菌数は約 $10^2 - 10^4$ CFU mL⁻¹のオーダーの密度で推移していた。水生植物保護帯 (Stn.P) において PAB の最大密度は 9 月の 4.1×10^4 CFU mL⁻¹, FLB は 7 月の 9.5×10^4 CFU mL⁻¹であり、最小密度をみると PAB は 7 月の 5.7×10^3 CFU mL⁻¹, FLB は 5 月の 9.2×10^2 CFU mL⁻¹であった。コントロール区 (Stn.C) では PAB, FLB とともに 7 月に最大密度を記録し、それぞれ 6.9×10^4 CFU mL⁻¹, 1.5×10^4 CFU mL⁻¹であった。最小密度は PAB, FLB とともに 5 月に記録され、PAB が 3.6×10^3 CFU mL⁻¹, FLB が 2.5×10^2 CFU mL⁻¹であった。

水生植物保護帯 (Stn.P) のヒシ表面 BF 由来の培養可能細菌数は約 $10^7 - 10^8$ CFU g⁻¹ wet weight のオーダーの密度で推移していた。最大密度は 7 月の 4.1×10^8 CFU g⁻¹ wet weight であり、最小密度は 8 月の 1.0×10^7 CFU g⁻¹ wet weight であった。

【今後の予定】

今後は DAPI 染色による月毎の総細菌数の計数、および *Microcystis aeruginosa* (Ma17 株) との二者培養実験による殺藻細菌、増殖阻害細菌の検出を進めていく予定である。また、湖水中の植物プランクトン組成の分析を行い、水理環境とともに細菌の動態との関連を考察していく予定である。

大洞 裕貴