

## ヒシ(*Trapa japonica*) バイオフィーム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

### 【研究背景】

淡水域における有害有毒藍藻類のブルーム (アオコ) は、富栄養化した滞留性の湖沼などでしばしば発生し、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すことから、世界各地で問題となっている。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いている。また地球上に存在する水のうち、河川や湖沼の水は0.01%とされている。今後、世界人口の増加が予想されており、飲料水をはじめとする水資源、特に淡水の確保は不可欠である。したがって、淡水域におけるアオコの防除は緊急の課題といえる。

これまで、アオコの防除法としてはポンプ吸引やフィルターろ過を行う物理的防除法、硫酸銅や粘土散布を等の化学的防除法など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いる。なかでも浮葉植物ヒシ (*Trapa japonica*) の表面に形成されるバイオフィーム (BF) から、有毒アオコ原因種である *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。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由来の殺藻細菌について季節的変動の調査研究を行った。

### 【材料と方法】

試料の採取は2015年5-10月の期間、北海道渡島大沼への流入河川である荻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。

浄化池では約3 m x 3 mの区画を3つ用意し、ヒシの種子を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。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区 (Stn.P) でヒシ試料および水試料、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  $\mu\text{m}$ 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<sup>-1</sup>寒天培地上にフィルターを静置することで、FLBは濾液を塗抹することによってそれぞれコロニーを形成させた。暗所における2週間の培養後に形成されたコロニーを釣菌し、単離した。

ヒシ試料については、試料の入ったボトルに滅菌蒸留水を加え、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<sup>-1</sup>寒天培地に塗抹した後、水試料と同様に培養可能な細菌にコロニーを形成させた。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 *Microcystis aeruginosa* (Ma17株) との二者培養実験に供した。培養には48ウェルの滅菌したマイクロプレートを用いた。本実験は温度25°C、光強度約100  $\mu\text{mol photons m}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 、明暗周期14 hL : 10 hDの条件下で2週間行った。その後、倒立顕微鏡下で観察を行い、殺藻細菌および増殖阻害細菌の有無を確認した。

### 【結果と考察】

浄化池で採取したヒシ試料からは、二者培養に供した細菌株 300 株の中から 16 株の殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出され、殺藻細菌が  $1.9 \times 10^5 - 2.2 \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$ 、増殖阻害細菌が  $4.1 \times 10^7 - 5.3 \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  の高い値で変動していることが確認された。水試料からは、ヒシ高密度区で 333 株中 15 株、低密度区で 360 株中 17 株、コントロール区で 350 株中 10 株の殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出された。特に FLB についてみると、コントロール区では殺藻細菌の検出が 10 月のみであったが、高密度区では

6月と9月、低密度区では8月に殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出された。以上より、ヒシBF由来の殺藻細菌は直接BFより遊離して、FLBとして周囲の水中に供給されている可能性が強く示唆された。今後、ヒシBF中および水中の殺藻細菌の遺伝子を同定、比較する必要がある。

五稜郭公園外堀においては、Stn.Pにて採取したヒシ試料から毎月、殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出され、その割合は単離した細菌112株中22株であった。殺藻細菌は  $4.5 \times 10^5 - 6.2 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight, 増殖阻害細菌は  $1.9 \times 10^6 - 2.7 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> wet weight と算出され、浄化池に比べると値は比較的小さいものの、高密度で変動していた。しかし、水試料についてはStn.PよりもStn.Cにおいて殺藻細菌が多く検出された (Stn.P: 334株中2株, Stn.C: 289株中13株)。これは、水流の影響を受けてコントロール区に集積した細菌が、植物プランクトン由来の有機物により活性化された可能性がある。今後、水流と水中の有機物量の測定を行い、殺藻細菌との関連を検証する必要がある。

本研究では、浄化池および五稜郭公園外堀のいずれにおいても、ヒシBFから高密度に殺藻細菌が検出された。さらに、浄化池における実験から、ヒシBF由来の殺藻細菌が水中に供給されている可能性が示唆された。五稜郭公園外堀については、水生植物保護区で殺藻細菌が多く検出されるという仮説とは異なる結果が見られた。水流や植物プランクトンの活性など、水理環境と殺藻細菌の関連を検証することが今後の課題として提示された。今後は、ヒシBF中と水中の殺藻細菌の遺伝子の同定および、水流や有機物量なども含めたより詳細な水理環境の解明を行い、殺藻細菌の時空間的変動を把握していく必要がある。

本研究で注目したヒシは、高い栄養塩吸収能を持つことが知られているほか、藍藻に対してアレロパシーによる増殖阻害効果も報告されており、様々な側面からアオコ防除の可能性が注目されている。しかし、ヒシが枯死したまま放置されると、水中に再び栄養塩が放出されてしまう。刈取りを実施しても、処理にかかるコストが問題となっており、刈取り後の利用法についても検討する必要がある。現在、ヒシからポリフェノール、リンなどの資源を段階的に回収する研究が行われており、今後はこうした研究の動向にも注目していく必要がある。

大洞 裕貴