

アオコ原因種 *Microcystis aeruginosa* に有効な水草ヒシ由来の殺藻細菌に関する研究 (仮)
(修士論文中間発表)

【背景および目的】

藍藻 *Microcystis aeruginosa* は代表的なアオコ原因種であり、世界各地で本種のアオコの発生に伴う利水障害や健康被害が報告されている。現在アオコの防除法として、粘土散布や、硫酸銅などの化学薬品の散布による防除が提唱されているが、コストや生態系への影響の懸念から実用には至っていないのが現状である。

近年、水生植物の表面に形成されるバイオフィーム (Biofilm : BF) から *M. aeruginosa* を殺滅する殺藻細菌が高密度に検出され、アオコの防除への応用が期待されている。そこで本研究では、浮葉植物であるヒシ (*Trapa japonica*) に由来する殺藻細菌を用いたアオコ防除を目的とし、北海道渡島大沼および五稜郭公園外堀において殺藻細菌と増殖阻害細菌の動態に関する調査研究を行った。さらに五稜郭公園外堀にて単離した細菌株を対象に、その殺藻機構における細菌の情報伝達機構であるクオラムセンシング (QS) の関連を調査した。

【材料と方法】

① 渡島大沼に設置したヒシ植栽実験区の殺藻細菌および増殖阻害細菌のモニタリング

実験は北海道渡島大沼の内湾の一部に設置した実験区 (EA) において行った。まず実験区内にヒシの種子を1714個播種し、発芽・生育させた。なお発芽率は4.4%であった。調査は2017年の4月-10月の期間、毎月1回行い、湖水とヒシ試料を採取した (4月はEAと後述のOPのみ)。水理環境として、水温、pH、溶存酸素、各種栄養塩濃度を測定し、Chl. *a*濃度、総細菌数、従属栄養性鞭毛虫 (HNF) 密度も併せて測定した。また比較地点として、大沼合同遊船 (株) 船着き場 (OP)、東大沼キャンプ場 (OC)、湖心地点 (LC) においても同様に湖水 (OCでは湖水とヨシ茎試料) を採取した。また、EAにアオコが吹送されて流入した期間 (8月21日-9月4日) は、EAにおいて2日おきにモニタリングを実施した。

湖水については適宜段階希釈後、孔径3.0 μm のヌクレポアメンブレン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することで、また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。暗所で2週間の培養後に形成されたコロニーを計数し、釣菌して細菌株を単離した。水草試料については、試料の入ったボトルに滅菌蒸留水200 mLを加え、600回の強振によって表面バイオフィーム (BF) を剥離させた。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な細菌にコロニーを形成させた。

各試料から単離した細菌のうち原則30株を、CT培地で無菌培養した *M. aeruginosa* (Ma17株) との二者培養実験に供した。共培養は温度25°C、光強度約50-100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 、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。

② 五稜郭公園外堀における殺藻細菌および増殖阻害細菌のモニタリング

試料の採取は2016-2017年の5-10月の期間、五稜郭公園外堀において毎月1回行った。自生しているヒシを残存させた水生植物保護区 (Stn.P) にてヒシおよび湖水、ヒシの自生していないコントロール区 (Stn.C)では湖水を採取した。水理環境の測定は原則毎月2回、①と同様に行い、湖水およびヒシ試料に関しても①と同様の条件と手順で二者培養実験に供した。

③ 殺藻細菌の殺藻機構におけるクオラムセンシングの関与に関する検討

本実験では、*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌として、2015年に五稜郭公園外堀の湖水およびそこに自生する水草ヒシの表面バイオフィームより単離した細菌株を使用した。

実験-I：各細菌株の殺藻機構について、情報伝達物質としてアシルホモセリンラクトン

(AHL) を介した QS との関連を検討した。QS 阻害剤として, AHL と包接錯体を形成する β -シクロデキストリン (β -CD) を終濃度 1 mM となるよう CT 培地に溶解させ試験管に分注した。そこに無菌の *M. aeruginosa* (Ma17 株) を約 10^5 cells mL⁻¹ 程度の密度となるように添加し, さらに各細菌株のコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌接種した。また, 細菌を添加していない細菌無添加区, および β -CD を添加していない β -CD 無添加区を準備した。各実験区を温度 25 °C, 光強度約 50-100 μ mol photons m⁻² sec⁻¹, 明暗周期 14 hL : 10 hD の条件下で 14 日間培養し, ターナー蛍光光度計を用いて *M. aeruginosa* の増減を蛍光値によりモニタリングした。

実験-II : 実験 I の結果, 殺藻機構と QS の関連が示唆された細菌株に対し, β -CD のほか α -CD と γ -CD をそれぞれ QS 阻害剤として用いた実験区を設け, 実験 I と同様の条件で細菌株と *M. aeruginosa* の二者培養実験を実施した。

【結果および考察】

① 渡島大沼に設置したヒシ植栽実験区の殺藻細菌および増殖阻害細菌のモニタリング

EA について 4-8 月の試料を二者培養に供したところ, 湖水からは増殖阻害細菌が 2.1×10^2 - 1.1×10^3 CFU mL⁻¹ の密度で検出された。ヒシからは増殖阻害細菌が 6 月と 8 月にそれぞれ 6.9×10^6 CFU g⁻¹ wet weight, 3.2×10^7 g⁻¹ wet weight の密度の範囲で検出された。アオコ流入時期についてみると, 8 月 23 日と 29 日に採取した湖水の PAB 画分から, それぞれ 2.3×10^3 CFU mL⁻¹, 6.0×10^3 CFU mL⁻¹ の密度で殺藻細菌が検出された。

OC においては 8 月の PAB 画分から殺藻細菌が 2.6×10^2 CFU mL⁻¹ の密度で検出された。また OC では, ヨシ茎試料からも 6 月と 7 月にそれぞれ 7.2×10^5 CFU g⁻¹ wet weight, 7.3×10^6 CFU g⁻¹ wet weight の密度で殺藻細菌が検出された。

地点別に増殖阻害細菌の密度を比較すると, EA と OC では増殖阻害細菌が 10^2 - 10^3 CFU mL⁻¹ のオーダーの密度であったが, LC と OP では 10^1 - 10^2 CFU mL⁻¹ の比較的低いオーダーの密度に留まった。これらの結果に関しては, EA と OC には水草帯が存在すること, いずれもアオコが滞積しやすい地点であることを考慮して考察を進める予定である。

② 五稜郭公園外堀における殺藻細菌および増殖阻害細菌のモニタリング

Stn.P におけるヒシ由来の殺藻細菌についてみると, 2016 年は 5 月と 6 月にそれぞれ 1.0×10^5 CFU g⁻¹ wet weight, 1.7×10^6 CFU g⁻¹ wet weight の密度で検出された。2017 年のヒシ試料のうち, 5-8 月分の試料を二者培養に供したところ 8 月に 6.8×10^6 CFU g⁻¹ wet weight の密度で殺藻細菌が検出された。水中の殺藻細菌は 10^2 - 10^4 CFU mL⁻¹ のオーダーの密度で検出され, 特に 7-8 月に出現する傾向が見られた。

③ 殺藻細菌の殺藻機構におけるクオラムセンシング関与の可能性

実験-I の結果, 水草ヒシの表面から単離された *Pseudomonas* 属の細菌株 1 株 (GR-30) において, β -CD の添加による殺藻活性の阻害が顕著に認められた。GR-30 株と共培養した *M. aeruginosa* の増減を表す蛍光値は, β -CD 無添加区では最大で 8.4 の値で推移していたが, β -CD 添加区においては最大値 34.0 まで増加した。さらにこの細菌株に対して実験 II を実施したところ, 添加した CD の違いによって殺藻の阻害効果に差異が認められ, α -CD < β -CD < γ -CD の順に殺藻活性が阻害される傾向を示した。したがって GR-30 株の殺藻機構には AHL を介した QS が関与しており, 比較的分子量が大きな AHL を情報伝達物質として用いていると考えられた。

【今後の予定】

今後は残りの試料に関して二者培養実験を進めていくほか, 栄養塩分析等を行い, 水環境と殺藻細菌・増殖阻害細菌の動態との関連を考察する予定である。

大洞裕貴

今回のゼミ (11月27日 (月) 13:30-, N204にて) は卒論中間発表です。