

# 修士論文内容の要旨

ふりがな	おおぎ こうへい	
氏名	扇 航平	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 21 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	ヨシ帯起源の細菌を活用したアオコの発生抑制に関する生理生態学的研究	

淡水資源は人類の生命と様々な活動を支える最重要資源の一つであり、良質な淡水資源の確保は極めて重要な問題である。現在藍藻 *Microcystis aeruginosa* のブルーム (アオコ) による世界各地の湖沼や貯水池で用水の着色と毒化の問題が発生しており、アオコの発生を抑制することが強く望まれている。アオコ抑制法の一つとして、微生物を用いた生物学的防除がある。その中でも、殺藻細菌を用いる報告が多い。ごく最近、淡水域においてヨシ帯や水草帯、またこれら植物の表面のバイオフィーム (BF) において高密度に殺藻細菌が存在することが発見されたことから、このような植物を活用したアオコの防除が期待される。そこで本研究では、ヨシ帯およびヨシ BF 中に存在する細菌によるアオコの発生の抑制に関して生理・生態学的知見を得ることを目的として、以下の 2 つの室内実験を行った。すなわち、① *M. aeruginosa* 無菌株を培養し人為的にアオコ状態を再現し、そこにヨシ帯の水を導入した擬似現場法実験、②現場水域 (大沼) で発生しているアオコに対して、ヨシ帯および水草帯の水を入れた混合培養実験である。

擬似現場法実験は、2009 年 7 月 31 日に琵琶湖南湖沿岸の Biyo センターにおいてヨシ帯を人工的に植えた人工水路で採取した試水を用いて行った。採水試料は 0.1  $\mu\text{m}$  濾過、1  $\mu\text{m}$  濾過、10  $\mu\text{m}$  濾過および無濾過の 4 つの実験区を設定し、各々に *M. aeruginosa* を添加し、経時的な *M. aeruginosa* の細胞数、総細菌 (TB) 数、従属栄養性鞭毛虫 (HNF) 数および殺藻細菌 (AB) 数を計数した。*M. aeruginosa* の細胞数は落射蛍光顕微鏡を用いて計数を行った。総細菌数は DAPI 染色、HNF 数は FITC-DAPI 二重染色と落射蛍光顕微鏡観察によった。AB 数はホスト藻株を *M. aeruginosa* および *C. aciculare* としたマイクロプレート MPN 法によって計数した。

擬似現場法実験では、0.1  $\mu\text{m}$  濾過の実験区を除きいずれの実験区でも *M. aeruginosa* の減少が確認された。TB 数と HNF 数は、いずれの実験区においても TB 数のピークの後に 3 日以内に HNF のピークが見られ、その後両者は減少し、一定の値 (TB は  $10^5\sim 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , HNF は  $10^4$  cells  $\text{ml}^{-1}$  のオーダー) で安定した。AB 数は検出限界以下の値をとる場合も見られたが、4 日目から 6 日目にかけて高い値を示す傾向が認められ、特に 1  $\mu\text{m}$  濾過区 (細菌画分) で高かった。

擬似現場法実験では、いずれの実験区でも 10 日以内に *M. aeruginosa* が全滅するという非常に強力な殺藻作用が確認された。HNF 計数時の顕微鏡観察時において、体内に *M. aeruginosa* の自家蛍光を持つ

細胞が認められなかったことから、HNFは*M. aeruginosa*を摂食しなかったと考えられる。従って、本研究でみられた劇的な殺藻現象はヨシ帯起源の殺藻細菌によるものと結論できる。*M. aeruginosa*に対する殺藻細菌に関してこのような強力な殺滅作用についての報告例はほとんどなく、驚くべき結果である。また、細菌の捕食者であるHNFは繊毛虫などに補食されるが、繊毛虫はHNFより大きいので1 μm濾過区では殆ど存在しないと考えられる。従って、1 μm濾過区は細菌に対するHNFの補食圧が高い実験区である。しかしながら、このような実験区でも殺藻細菌数は高い値を示したことから、殺藻細菌はHNFによる高い補食圧にさらされながらもより高い殺藻活性の結果、増殖することが可能であることが示された。

混合培養実験は、2010年10月28日に北海道大沼国定公園域にて採取した試水を用いて行った。大沼では、天然のアオコ試料を滅菌済み500 mlポリプロピレン容器を用いて採集した。また、蓴菜沼の2地点(水草帯とヨシ帯)と大沼1地点(ヨシ帯)にて採水を行いこれをアオコ抑制実験試料とした。アオコ試料は滅菌蒸留水で洗浄したものとし新しいものを調製した。洗浄したアオコ試料については各アオコ抑制試料を終濃度 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ となるように添加して培養を行った。アオコ試料を洗浄しない実験区は終濃度 $10^{-2}$ となるようにアオコ抑制試料を添加し設定した。また、両アオコ試料についてアオコ抑制試料を添加しない実験区を対照区とした。各実験区にはCT培地を1/10強度で加え、栄養塩欠乏を解消した。培養は3週間行い、1週間おきに試料を採取し、前述の通りTB数、AB数、*M. aeruginosa*細胞数を計数した。加えて、蛍光値の測定と植物プランクトン細胞数の計数を行った。さらに、*M. aeruginosa*の1群体あたりの細胞数の計測も行った。

混合培養実験では、*M. aeruginosa*細胞数はいずれのアオコ抑制試料を添加した実験区においても減少し、実験開始後3週間目には実験開始時の71.2-98.1%が減少する結果が得られた。一方対照区では、洗浄したアオコ試料で17.8%の増加が見られ、非洗浄実験区では28.8%の減少が見られた。また、群体サイズは、対照区では実験期間中変動は小さく、アオコ抑制試料を添加した実験区では群体サイズが培養開始1週間目から小さくなっていった。総細菌数は実験期間を通じて比較的高い値を示す傾向にあり、 $2.4 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>の範囲で変動していた。殺藻細菌は多くの実験区において培養開始後2週間目にピークを示す傾向にあり、最大で78.1 MPN ml<sup>-1</sup>の値が得られた。植物プランクトン細胞数および蛍光値も多くの実験区で増加し、特に $10^{-1}$ 添加区において増加が顕著であった。また、*M. aeruginosa*細胞数の減少後、アオコを形成しない藍藻類、珪藻類や緑藻類などが増加していた。

混合培養実験においても、擬似現場法実験で見られたような強力な殺藻細菌によってアオコが減少したと考えられる。また、*M. aeruginosa*の群体サイズが小さくなり、細胞数が減少していた。それに伴って殺藻細菌の増加が見られたことから、群体の崩壊が天然のアオコの殺滅において重要な過程と考えられる。アオコの減少後、無害な植物プランクトンが増殖したことから、ヨシ帯起源の殺藻細菌を用いたアオコの発生抑制は自然環境への影響が無いだけでなく、有益な基礎生産が増大する結果をもたらす、植食性の動物プランクトンの生産量増大、あるいは植食性魚類(ヘラブナ等)の成長促進を通じて、水域の生態系の生産を豊かにする可能性がある。

以上の結果から、ヨシ帯の活用がアオコの発生抑制に有効であることが示された。ヨシ帯は様々な生物(特に稚仔)の生息養育の場として重要視されており、生態系の保全と水産資源の涵養の観点からもヨシ帯の造成と整備は、さらに重要な課題となろう。本研究の成果を元に、ヨシ帯をキーとした大沼公園などの水域再生が期待される。