

## 大沼公園域の湖沼及び人工湖沼八郎沼における植物プランクトンと殺藻細菌の季節変動

近年、世界的な人口の増大と同時に、世界各地で急速な都市開発が進んでいる。その結果、生活排水や工業排水、農業排水が増加し、それらが河川を通じて湖沼に流れ込むため、湖沼の富栄養化を招いている。富栄養化した湖沼では、そのような環境に適応した藍藻類等の植物プランクトンのブルームがしばしば発生する。水面が濃い青緑色を呈するほどの藍藻類のブルーム（アオコ）は、その臭気や毒性、景観の悪化等により、観光業、漁業、水資源利用等に多大な被害を与えることから、早急な対策が必要とされている。アオコの中でも有毒藍藻の *Microcystis aeruginosa* によるブルームは、世界各地の湖沼や貯水池で発生が確認されており、渡島地方大沼でも近年その規模は拡大の一途をたどっている。現在行われている硫酸銅散布などの物理化学的防除では生態系の影響が大きいため、影響の小さい生物学的防除が模索されており、近年そのような方法として殺藻細菌の研究が進んでいる。アオコに対する殺藻細菌に関する知見は近年増えてきたが、未だ実用化には至っていない。そこで本研究では、函館郊外の大沼湖沼群を対象として、殺藻微生物の可能性を評価するために、各湖沼においてアオコを含む植物プランクトンの動態を把握し、同時に細菌の分布を把握する。そして培養の *M. aeruginosa* を用いて、対象水域の各地点から単離した細菌のアオコ殺藻能力の検証を行った。

2011年6-11月に大沼公園域の大沼国立公園（OP）、東大沼キャンプ場（OC）、水草とヨシの繁茂する蓴菜沼（JL）、および人工湖沼の八郎沼（HR）においてバケツで表層水を採取し、水温、pHを現場で測定後、ただちに冷暗所保存し、研究室に持ち帰った。試水はGF/Fガラス繊維濾紙で濾過し、栄養塩（硝酸塩、亜硝酸塩、リン酸、ケイ酸塩、アンモニウム塩）濃度、クロロフィル $a$ 濃度の測定に供した。採集した試料を20 $\mu\text{m}$ メッシュのネットを用いて、50倍に濃縮したものをネットサンプル、未濃縮のものを水サンプルとして、終濃度1%のホルマリンで固定し、倒立顕微鏡を用いて植物プランクトンの計数を行った。同時に滅菌したポリプロピレン製アイボーイを用いて表層水を採集し、これを細菌試料とした。細菌試料の一部は12mL遠沈管に分取し、終濃度1%グルタルアルデヒドで固定後、DAPI染色を行い、落射蛍光顕微鏡下で総細菌数の計数を行った。また細菌試料は3本立てで滅菌蒸留水を用いて段階希釈（ $10^{-1}$ – $10^{-3}$ 倍）を行い、希釈したそれぞれの段階の試料1mLを孔径3 $\mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターを用いて濾過を行い、3 $\mu\text{m}$ 以上の粒子を捕集した。粒子が捕集されたフィルターを $ST10^{-1}$ 寒天培地上に載せることにより、フィルター上に濾し取られた粒子に付着した細菌にコロニーを形成させる。これを粒子付着性細菌（Particle-Associated Bacteria: PAB）として、室温（20–25 $^{\circ}\text{C}$ ）の暗条件下で培養を行った。また各段階の希釈試料の濾液0.1mLを $ST10^{-1}$ 寒天培地上に塗抹することで、これを浮遊性細菌（Free Living Bacteria: FLB）とし、PABと同様の条件下で培養、計数後に滅菌爪楊枝を用いて単離を行った。その後単離した細菌を、無菌の *M. aeruginosa* に添加し、細菌の殺藻能を確かめる二者培養実験を行った。

調査した湖沼の水理環境を比較した。水温は湖沼によって差異が見られなかった。pHはOPとOCが8月にpH8以上を示し、他の季節ではpH7–7.5の値を取るなど同程度の値を取る傾向を示した。JLでは他よりも低い値で推移し、調査期間中、pH

7-7.5 の範囲で変動した。HR において夏季に pH 9.5 という高い値を示した。栄養塩濃度は、OP と OC が全体的に似た値の傾向を示した。JL では常に低い値を示した。HR では秋季に硝酸塩の値が大きく上昇した。

同定した植物プランクトンの種数は全 44 種であり、緑藻類 14 種、珪藻類 14 種（中心目 4 種、羽状目 10 種）、藍藻類 10 種、その他 6 種であった。また OP と OC では藍藻が主に優占し、JL では緑藻と珪藻、HR では珪藻が主に優占した。JL や HR ではアオコは発生しなかった。JL では全細胞数も少なかったが、HR では非常に多くの珪藻が見られた。

アオコの発生した地点は 8-9 月の OP と、7-9 月と、11 月の OC であり、それぞれ主に *Anabaena* spp.、*M. aeruginosa* により構成されるアオコであった。8 月の OC で *M. aeruginosa* は最大細胞数  $1.0 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>、*Anabaena* spp. は  $2.9 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> を記録した。一方で、8 月の OP では *M. aeruginosa* の細胞数は、 $9.1 \times 10^2$  cells mL<sup>-1</sup> が最大値であり、*Anabaena* spp. の  $1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> が顕著であった。OC と比較して、OP では *M. aeruginosa* は優占しなかった。

各地点の総細菌数、従属栄養細菌数の値には大きな差異は見られなかった。どの地点でも総細菌数は夏季に高くなる傾向があった。8-9 月に分離培養した従属栄養細菌を用いて *M. aeruginosa* との二者培養実験を行った結果、8 月の OP と JL で単離された従属栄養細菌から、多くの殺藻細菌が検出された。特に、8 月の OP の FLB から最も多くの殺藻細菌が検出された。OC において、アオコを主に形成していた植物プランクトンの種組成が OP と異なった要因として、OP に比較的高い密度で存在した *M. aeruginosa* を殺滅する殺藻細菌が影響を及ぼした可能性がある。これらの殺藻細菌は、8 月に多く、アオコの消長し始めている 9 月に少なかったことから、アオコの発生により増殖できたものと考えられるが、さらに詳しい調査が必要である。一方で、アオコが発生しなかった JL でも殺藻細菌が見つかった要因として、JL に多数生えるヨシ茎のバイオフィルムの存在があげられる。

本研究の結果、単離細菌による二者培養により、ヨシの生えた JL に殺藻細菌が存在することが実証された。これにより、ヨシ帯の起源の細菌が、高い殺藻効果を示し、アオコの発生を抑制できると考えられる。

今後、人口の増加や産業の発展に伴い、栄養塩の湖沼への流入量の増加が予想され、アオコの発生する事例は増えると考えられる。アオコの対策として、ヨシの茎にバイオフィルム形成させることにより、その特異な環境に生息する殺藻細菌を活用する手段は有用な手段になるだろう。しかし、単純な殺藻細菌の添加という手段に関して、対象の有毒藻類を殺滅することは可能かもしれないが、殺滅されない別の有毒種によるアオコ発生が起こる可能性がある。根本的な解決策である栄養塩の除去のためにも、水生植物の利用やそれが生態系に与える影響を、さらに詳しく研究していく必要がある。また、様々なアオコに対して活性の高い様々な殺藻細菌の研究を進めていくことも重要な課題である。