

北海道大沼における水草由来の細菌によるアオコの抑制に関する研究

近年、世界中の湖沼において、生活排水や農業排水などが河川を通じて湖沼に流入することにより、富栄養化が進行している。湖沼の富栄養化は植物プランクトンのブルームを招き、中でも *Microcystis aeruginosa* をはじめとする藍藻類のブルームはアオコと呼ばれ、湖水の毒化やカビ臭など、様々な問題を引き起こしている。北海道渡島大沼においても例外ではなく、アオコが発生しており、美しい景観を損ね、コイやフナ、ワカサギといった有用生物に悪影響を与えている。アオコに対する取り組みとして化学的防除法や機械的防除法が挙げられるが、未だ問題点が多く、実用的な対処法として確立していない。

アオコに対する新しい防除法として、殺藻細菌を用いた環境に配慮された生物学的防除法が注目を集めている。殺藻能を持つ細菌はこれまでに報告されていたが、実用の目処は立っていなかった。近年、殺藻細菌がヨシの茎に付着するバイオフィルムに高密度で存在することが新たに発見された。この発見により、ヨシを通じたアオコの防除法の実用化に展望が生まれた。また、ヨシ以外に可能性のあるものとしては、水草の有用性が予想される。そこで本研究は水草に着目し、すなわち北海道に自生するヒシ (*Trapa japonica*)、フサモ (*Myriophyllum verticillatum*)、タヌキモ (*Utricularia vulgaris*) の表面に付着するバイオフィルムから細菌を分離し、殺藻細菌を確認すると同時に、各水草の殺藻細菌密度の季節変化を把握することを目的とした。

試料採集は2012年6月から11月まで毎月1回、北海道南西部渡島にある大沼国定公園内の山水温泉前の定点、蓴菜沼定点の2地点で行った。水草試料としては、山水温泉においてヒシとタヌキモ、蓴菜沼においてはヒシとフサモをそれぞれ採集し、滅菌したアイボーイ瓶に入れた。また各地点においてバケツ採水を行い、滅菌アイボーイ瓶に入れて研究室に持ち帰り速やかに実験に用いた。なお6月の各ヒシ試料は根と葉を分けずに実験に供したが、7月以降は分けて実験に用いた。

滅菌した蒸留水をアイボーイ瓶中の水草試料に加え、600回強振することにより水草表面に付着しているバイオフィルムを剥離した。その後、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈を行い、 $ST10^{-1}$ 寒天培地に塗沫し、暗所で2週間培養した。形成されたコロニーの計数を行い、従属栄養細菌数 (CFU mL or g^{-1} wet weight) を算出した。また、滅菌した爪楊枝を用いてコロニーを形成した細菌株を分離した。水試料も同様に適宜希釈して、孔径 3.0 μm のフィルターで濾過し、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) として、それぞれ $ST10^{-1}$ 寒天培地で培養、形成されたコロニーを分離した。また、水草試料および水試料中の総細菌数を計数するために DAPI 染色を行った後に、落射蛍光顕微鏡を用いて直接計数を行った。

M. aeruginosa に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の検出と計数は以下のようにして行った。まず、48ウェルマイクロウェルプレートに CT 培地で培養した無菌の *M. aeruginosa* を、約 1.0×10^5 cells mL^{-1} となるように各ウェルに 0.8 mL ずつ分注した。数日間培養し、良好に *M. aeruginosa* が培養されているのを確認した後、 $ST10^{-1}$ 寒天培地上に増殖している細菌のコロニー30個を、滅菌した爪楊枝を用いてそれぞれ少量掻き取り、これら藍藻の各ウェルに接種した。接種したプレートを温度 25°C、光強度約 100 $\mu mol m^{-2} sec^{-1}$ 、明暗周期 14hL:10hD の条件下で2週間培養した後、各ウェルを倒立顕微鏡で観察し、殺藻の有無を確認した。その結果を基に、*M. aeruginosa* に対して殺藻能および増殖阻害能を持つ従属栄養細菌数を算出した。

山水において採集したヒシに関しては、根と葉を分けずに細菌を分離したサンプルから殺藻細菌と、増殖阻害細菌が発見され、細菌密度はそれぞれ 1.5×10^5 , 2.2×10^5 CFU g^{-1} wet weight という結果となった。ヒシの葉については、7月と8月にも殺藻能を有する細菌が見つかり、細菌密度はそれぞれ 2.5×10^6 , 3.5×10^6 CFU g^{-1} wet weight 検出された。増殖阻害細菌は、7月、9月に検出され、その密度はそれぞれ 2.45×10^6 , 1.16×10^7 CFU g^{-1} wet weight となった。ヒシの根に関しては、殺藻細菌が8月に見つかり、細菌密度は 7.8×10^7 CFU g^{-1} wet weight という値が得られた。増殖阻害細菌は7月から10月まで毎月検出され、細菌密

度はそれぞれ、 5.8×10^6 , 5.8×10^7 , 9.0×10^6 , および 2.1×10^8 CFU g wet leaf⁻¹ という結果となった。

蓴菜沼において根と葉を分けずに細菌を分離したサンプルから、殺藻細菌と増殖阻害細菌は共に検出され、細菌密度はそれぞれ 6.3×10^5 , 8.9×10^5 CFU g⁻¹ wet weight というが得られた。その後のヒシの葉に関しては、殺藻細菌が7月から9月にかけて検出され、細菌密度はそれぞれ、 3.2×10^5 , 2.6×10^6 , 3.2×10^6 CFU g⁻¹ wet weight となった。また、増殖阻害細菌は7月から9月にかけて検出され、細菌密度は 6.4×10^5 , 5.2×10^6 , 6.3×10^6 CFU g⁻¹ wet weight となった。また、ヒシの根に関しては、殺藻能を持つ細菌は7月および8月に検出され、細菌密度はそれぞれ 1.5×10^6 , 4.1×10^6 CFU g⁻¹ wet weight であった。増殖阻害能を有する細菌は7月と8月、10月に検出され、細菌密度はそれぞれ 4.6×10^6 , 1.2×10^7 , 3.1×10^6 CFU g⁻¹ wet weight と算出された。

タヌキモについて、従属栄養細菌数は 3.4×10^7 - 1.1×10^9 CFU g⁻¹ wet weight の間で変動し、総細菌数は 1.2×10^9 - 2.6×10^{10} cells g⁻¹ wet weight の間で推移した。殺藻細菌については検出されず、増殖阻害能を有する細菌が6月から8月に検出され、細菌密度はそれぞれ 2.3×10^6 , 6.2×10^6 , 9.2×10^6 CFU g⁻¹ wet weight と記録された。

フサモについては、殺藻細菌および増殖阻害細菌は6月、7月にそれぞれ検出され、その密度はそれぞれ 5.4×10^6 , 2.5×10^6 CFU g⁻¹ wet weight であった。増殖阻害能を有する細菌は6月と8月に認められ、細菌密度は 5.4×10^6 , 1.0×10^7 CFU g⁻¹ wet weight となった。蓴菜沼において採集したフサモおよび山水で採集したタヌキモでは、従属栄養細菌数や総細菌数が各地点のヒシの根、および葉の従属栄養細菌数、または総細菌数とほぼ同程度もしくは多い結果となったにも関わらず、殺藻細菌および増殖阻害細菌数が少なかった。これらに加えて、褐藻類のアラメ表面は抗菌作用があるにも関わらず、アラメの体外分泌物質により葉上付着細菌の増殖促進効果があるという報告があることから、ヒシが殺藻細菌を対象とする分泌物質により殺藻細菌がより多く集まって検出された可能性がある。その場合、ヒシはアオコの防除に向けて大変有望な潜在的可能性の高い水草であると考えられる。

殺藻細菌および増殖阻害細菌について、湖水サンプルでは山水において、PAB 画分から殺藻細菌は6月および8月に検出され、細菌密度は 1.5×10^4 , 3.2×10^4 CFU mL⁻¹ であった。また、増殖阻害細菌は6月から10月まで毎月検出され、小さい値であった。

山水における湖水試料中の FLB 画分においては殺藻細菌は10月にのみ検出され、密度は 6.2×10^2 CFU mL⁻¹ であった。増殖阻害細菌は、9月と10月に検出され、密度はそれぞれ 4.5×10^3 , 1.2×10^3 CFU mL⁻¹ となった。蓴菜沼の湖水サンプルについて PAB 画分では、殺藻細菌は6月および8月に検出され、密度はそれぞれ 2.3×10^3 と 1.0×10^2 CFU mL⁻¹ であった。増殖阻害細菌は6月から9月まで毎月検出され、得られた細菌密度はそれぞれ 4.1×10^3 , 7.6×10^2 , 1.0×10^2 , 2.3×10^2 CFU mL⁻¹ となった。FLB 画分については、殺藻能を有する細菌は8月のみ検出され、細菌密度は 3.7×10^2 CFU mL⁻¹ であった。また、増殖阻害能を有する細菌は6月にのみ検出され、密度は 1.1×10^3 CFU mL⁻¹ であった。どちらの地点においても湖水サンプルでは、FLB よりも PAB の方が *M. aeruginosa* に対する殺藻および増殖阻害細菌が多く確認された。最近の知見として、湖沼沿岸に自生するヨシ由来、あるいは水草由来のバイオフィームから殺藻細菌および増殖阻害細菌が高密度で検出されていることから、この湖水中に存在する PAB 画分の殺藻細菌は、水草由来のバイオフィームにより供給されている可能性が示唆された。

本研究により、渡島大沼において、特にヒシの根および葉由来のバイオフィームから、*M. aeruginosa* に対する殺藻能あるいは増殖阻害能を有する細菌を高密度に検出し分離することに成功した。このことから水生植物に付着するバイオフィームが、殺藻細菌および増殖阻害細菌の供給源となっている可能性が示唆された。しかしながら、ヒシのバイオフィームになぜ殺藻細菌の密度が高いのかという事については今後の検討が必要であると考えられる。