

# 修士論文内容の要旨

|            |                                    |                           |
|------------|------------------------------------|---------------------------|
| ふりがな<br>氏名 | おう けんひ<br>王 賢娉                     |                           |
| 専攻名        | 海洋生物資源科学専攻                         |                           |
| 入学年度       | 平成 24 年 4 月                        |                           |
| 指導教員名      | 主査 今井 一郎 教授                        | 副査 関 秀司 教授<br>副査 山口 篤 准教授 |
| 論文題目       | ヨシ帯起源の殺藻細菌を用いたアオコの抑制技術の開発に関する基礎的研究 |                           |

近年、アオコと呼ばれる藍藻類ブルームが世界中で発生し、水質の悪化による水資源への悪影響が著しいことから、早急な対策が必要となっている。近年、環境に優しい生物学的防除法として、アオコ形成藍藻類を殺滅する能力を持った殺藻細菌の利用が注目されている。特にヨシ茎の水中部分に形成されたバイオフィーム (BF) には、高密度で殺藻細菌が生息する事実が発見され、それらの細菌は BF から水中に供給されることから、ヨシ帯の大規模な造成を通じたアオコの予防が期待される。しかし、これらのヨシ BF に関する研究は始まったばかりで、知見が殆どないのが現状である。そこで本研究では、大沼湖沼群のヨシ帯におけるアオコ増殖阻害及び殺藻細菌の探索及びモニタリングを通じてヨシ帯の有するアオコ防除能の総合評価を行い、ヨシ帯に人為的に設置した人工基質に形成される BF について、アオコの抑制に有用な細菌の探索及び経時的なモニタリングを通じて、人工基質 BF の発揮するアオコ予防能の検討を行うことを目的とした。得られた成果は、以下のように要約される。

## 1. 大沼湖沼群のヨシ帯におけるアオコ殺藻細菌及び増殖阻害細菌のモニタリング

北海道七飯町の大沼国定公園域の大沼、蓴菜沼、山水内湖に設けた3地点で各々、OP、JL、SS において、2012年6月から11月に、概ね月1回の頻度でサンプリングを行った。大沼では、例年アオコの発生する OP をヨシの殆どないコントロール地点とし、湖水を採取した。蓴菜沼 (JL) 及び山水内湖 (SS) ではヨシ帯が発達しており、ヨシ試料及び湖水を採集して実験室に持ち帰った。ヨシ試料は、滅菌済み歯ブラシを用いてヨシ表面の BF を剥離して滅菌蒸留水100 mL に懸濁し、BF 懸濁試料とした。剥離された BF の湿重量も測定した。BF 懸濁液は滅菌蒸留水を用いて適宜段階希釈後、0.1 mL を  $ST10^{-1}$  寒天培地に塗抹し、暗条件下で温度25℃にて2週間以上培養して、形成されたコロニーから細菌株を分離した。湖水試料については、適宜希釈後に、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、フィルター上の細菌を粒子付着性細菌 (Particle-associated bacteria : PAB) とし、寒天培地上に静置して生じたコロニーから細菌株を得た。濾液中の細菌は浮遊性細菌 (Free-living bacteria : FLB) として、0.1 mL を寒天培地に塗抹して同様に培養、分離を行った。ヨシ BF 試料及び湖水試料の総細菌数の計数は DAPI 染色と落射蛍光顕微鏡観察により行った。分離した細菌に関しては、すべてのヨシ及び湖水試料のものは *Microcystis aeruginosa* との二者培養試験に供し、また JL 湖水以外の試料は *Dolichospermum crassum* を対象として二者培養実験を行った。CT 培地で良好に増殖している藍藻株の無菌培養を、実験の1、2日前に48ウェルマイクロプレートのウェルに収容し、その中に分離した細菌のコロニーを滅菌した爪楊枝を用いてごく少量掻き取って接

種し、温度 25℃、光強度60  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、明暗周期14hL : 10hD の条件下で14日間培養し、1、2、3、5、7、9、14日目に倒立顕微鏡を用いてマイクロプレート中の藍藻の増殖の様子或いは生死を観察した。殺藻能が認められた細菌株と実験に供した細菌株の数(原則として30株)を基に、各サンプル中の殺藻細菌及び増殖阻害細菌数を算出した。

湖水において、総細菌数は $10^6 \sim 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ のオーダーで推移しており、季節による変動は小さかった、培養可能細菌数 $10^4 \sim 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ の値であった。ヨシ BF における総細菌数及び培養可能細菌数はそれぞれ $10^8 \sim 10^9 \text{ cells g}^{-1} \text{ wet weight}$ 、 $10^7 \sim 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  の値で計算された。*M. aeruginosa* を用いた二者培養実験の結果に関しては、殺藻細菌は OP 湖水からは検出されず、SS 湖水及び JL 湖水の PAB 画分から $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、FLB 画分から $10^2 \text{ CFU mL}^{-1}$ のオーダーの密度で検出された。増殖阻害細菌は地点 OP の湖水、SS 湖水及び JL 湖水の PAB 画分から $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、FLB 画分から $10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ のオーダー密度で認められた。ヨシ BF における殺藻細菌及び増殖阻害細菌はそれぞれ $10^7$ 、 $10^4 \sim 10^6 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  のオーダーの値で確認された。*D. crassum* を用いた二者培養実験でも類似の結果が得られた。殺藻細菌は地点 OP 湖水及び SS 湖水の PAB 画分から $10^3 \sim 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、FLB 画分から $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、増殖阻害細菌は PAB 画分から $10^3 \sim 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、FLB 画分から $10^2 \sim 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ のオーダーの密度で検出された。ヨシ BF における殺藻細菌及び増殖阻害細菌はそれぞれ $10^4 \sim 10^7$ 、 $10^6 \sim 10^7 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  の値を示した。以上の結果により、ヨシ BF における殺藻細菌及び増殖阻害細菌の密度は湖水より $10^2 \sim 10^5$ 倍高いことがわかった。また、地点 SS 及び JL 湖水の殺藻細菌及び増殖阻害細菌は、FLB より PAB の画分からより高い頻度で検出された。ヨシ帯のある SS 及び JL ではアオコの発生がなかったことから、ヨシ BF 及びヨシ帯の水を使って自然環境下のアオコを抑制できる可能性が示された。

## 2. 大沼湖沼群のヨシ帯に設置した人工基質へのアオコ殺藻細菌及び増殖阻害細菌の付着

大沼では、ヨシの殆ど生えていない遊覧船発着場付近 OPs、ヨシおよび水草が繁茂している大沼の内湖 ON、葦菜沼 JL 及び山水内湖 SS の4地点において、滅菌した不織布及び炭素樹脂ミラクル六助(後は六助と略する)の2種類の人工基質を設置した。2012年8月13日から9月10日、及び2012年9月26日から10月24日の期間、2 シリーズの実験を行い、週1回各地点の六助、不織布を採取した。六助サンプルは滅菌した歯間ブラシを用いて BF を剥離し、不織布サンプルは100 mL の滅菌蒸留水を加えた滅菌済みのアイボーイ中で600回強振して BF を剥離し、各々の BF 懸濁液を作製した。BF 懸濁液は段階希釈した後、ST10<sup>1</sup>寒天培地に塗抹し、六助 BF 及び不織布 BF に生息する細菌として培養、分離を行った。BF の総細菌数は直接計数法により求めた。基質から剥離された BF の湿重量も測定した。分離した細菌は *M. aeruginosa* を対象として二者培養実験により、殺藻能及び増殖阻害能の有無を確認して生息密度を求めた。

2回設置した人工基質 BF 中の総細菌数は $10^8 \sim 10^{10} \text{ cells g}^{-1} \text{ wet weight}$ 、培養可能細菌数は $10^7 \sim 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  の範囲で推移しており、地点間に大きな差は認められなかった。*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌及び増殖阻害細菌は各地点に設置した人工基質 BF から $10^6 \sim 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$  のオーダーの密度で検出され、人工基質 BF ( $10^6 \sim 10^8 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$ ) はヨシ BF ( $10^6 \sim 10^7 \text{ CFU g}^{-1} \text{ wet weight}$ ) 遜色のない密度の殺藻細菌及び増殖阻害細菌が生息することが判明した。以上のことにより、人工基質 BF はアオコ抑制への有効性が示唆され、殺藻細菌及び増殖阻害細菌を基質 BF に固定して、将来アオコ抑制への応用が大きく期待される。

本研究において、ヨシ BF 及びヨシ帯の水を使って自然環境下のアオコを抑制できる可能性が示された。また、人工基質においてもヨシ BF より密度の高いアオコ抑制微生物が存在していることが判明し、殺藻細菌及び増殖阻害細菌を固定した人工基質 BF は、アオコ抑制に対して迅速かつ環境に優しい手法として実用性が高いと考えられる。