

修士論文内容の要旨

ふりがな 氏名	だいでう ひろき 大洞 裕貴	
専攻名	海洋生物資源科学専攻	
入学年度	平成 28 年 4 月	
指導教員名	主査 今井一郎 特任教授	副査 澤辺智雄 教授 副査 山口篤 准教授
論文題目	有毒藍藻 <i>Microcystis aeruginosa</i> の制御に有効な 水草由来の殺藻細菌に関する研究	

有毒藍藻 *Microcystis aeruginosa* によるアオコは、世界各地で利水障害や健康被害を引き起こしている。有害有毒なアオコの防除法として粘土や硫酸銅といった化学薬品の散布が提唱されているが、コストや生態系への影響が懸念されている。一方、水草の表面に形成されるバイオフィーム (以下, BF) から *M. aeruginosa* を殺滅する殺藻細菌が高密度に検出され、生態系に配慮したアオコ防除への応用が期待されている。

そこで本研究では、主に水草ヒシに由来する殺藻細菌を用いたアオコ防除の検討を目的とし、野外調査として①北海道渡島大沼、②人工ヒシ帯、および③五稜郭公園外堀において殺藻細菌および増殖阻害細菌の挙動を観察し、室内実験として④殺藻機構におけるクオラムセンシング (以下, QS) の介在について検討を加えた。

① 北海道渡島大沼における *Microcystis aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の挙動

本研究では北海道渡島大沼の支湾にヒシ植栽実験区 (EA) を設定し、ヒシ約80株を生長させた。また EAの他に、大沼合同遊船船着き場 (OP)、東大沼キャンプ場 (OC)、湖心地点 (CL) を設定し、各地点で湖水および水草試料 (EAではヒシ、OCではヨシ茎) を採取した。調査は2017年の4月-10月の期間、毎月1回行った。

まず得られた水草試料についてはBFを剥離し、BF試料を作成した。湖水および水草BF試料は段階希釈し、 $LT10^{-1}$ 寒天培地に塗抹したのち暗所で2週間培養してコロニーを形成させた。コロニーは、滅菌爪楊枝を用いて単離した。

各試料から単離した細菌のうち原則30株を、CT培地で培養した無菌の *M. aeruginosa* (Ma17株) との二者培養実験に供し、殺藻細菌および増殖阻害細菌を倒立顕微鏡下で判定した。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。

湖水中の増殖阻害細菌の密度をみると、EAやOCといった水草帯付近の定点では 10^2-10^3 CFU mL⁻¹のオーダーの値であったのに対し、OPやCLといった水草が認められない地点では $10-10^2$ CFU mL⁻¹のオーダーの値に留まる傾向が見られた。EAのヒシからは 10^6-10^7 CFU g⁻¹ wet weight (以下、CFU g⁻¹) のオーダーの密度で増殖阻害細菌が検出され、ヨシの茎からは 10^5-10^7 CFU g⁻¹のオーダーの密度で殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出されたことから、水草がアオコの抑制作用を持つ細菌の供給源として機能することが強く示唆された。また9月はOC、CLおよびOPから殺藻細菌が検出され、その密度はヨシ帯であるOCから離れるにつれて減少した。調査時の風向を考慮すると、吹送流により殺藻細菌がヨシ帯から大沼の広域に拡散された可能性がある。

② アオコ集積時期のヒシ植栽実験区における *Microcystis aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の挙動

EA (実験区) にアオコが集積した8月21日-9月4日は、同地点にて2日おきに殺藻細菌および増殖阻害細菌の挙動の調査研究を行った。

湖水およびヒシ試料に関しては①と同様に二者培養実験に供した。また9月2日および4日は対照地点として、OPにおいて試料を採取した。

湖水中の殺藻細菌は 10^3 CFU mL⁻¹のオーダーの密度で検出された。OPで検出された殺藻細菌が 10^1 CFU mL⁻¹ のオーダーの密度であり、EAの湖水中の殺藻細菌はOPの約100倍の密度であった。またヒシの表面からも 2.6×10^7 CFU g⁻¹の密度で殺藻細菌が検出された。調査期間中は殺藻対象種である *M.aeruginosa* が出現した上、アオコ由来の有機物が豊富に供給されたため殺藻細菌が増加したと考えられる。

③ 五稜郭公園外堀における *Microcystis aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の挙動

本研究は函館市の五稜郭公園外堀で実施した。試料の採取は2016年および2017年の5-10月にかけて毎月1回行った。在来のヒシを残存させた水生植物保護区 (Stn.P) でヒシおよび湖水、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。湖水とヒシの試料に関しては①と同様に二者培養実験に供し、殺藻細菌と増殖阻害細菌を検出した。

両地点において、殺藻細菌は夏季 (7-8月) に 10^2-10^4 CFU mL⁻¹のオーダーで検出される傾向があり、その検出はchl.aとの関連性が示唆された。またヒシからも 10^5-10^6 CFU g⁻¹のオーダーの値で殺藻細菌が検出され、その出現は湖水中の *M.aeruginosa* との関連が示唆された。

さらに水草の植生が無いStn.Cについても、Stn.Pと同様の密度で殺藻細菌が検出された。2015年に外堀から採取した殺藻細菌および増殖阻害細菌について遺伝子解析による簡易同定を行った際に、Stn.Cの湖水由来の細菌とヒシ由来の細菌の塩基配列に類似性が見られ、ヒシ由来の細菌がStn.Cのような水草の植生が無い地点にも供給されている可能性が強く示された。

④ 殺藻機構におけるクオラムセンシング機構の検証

本実験では、*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の殺藻過程における QS の介在を検討した。用いた細菌株は、2015 年に五稜郭公園外堀の湖水および水草ヒシより単離したものである。

実験-I：各細菌株の殺藻過程について、細菌間の情報伝達物質としてアシルホモセリンラクトン（以下 AHL）が作用する QS の介在を検討した。QS 阻害剤として、 β -シクロデキストリン（ β -CD）を終濃度 $10^3 \mu\text{M}$ 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 $10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ 程度の密度となるように添加し、そこに各細菌株のコロニーを滅菌爪楊枝で釣菌接種した。細菌のみを添加した実験区を細菌添加区、細菌と β -CD を添加した実験区は細菌+ β -CD 添加区とした。各実験区は①の二者培養実験と同じ条件下で 14 日間培養し、*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、殺藻過程と QS の関連が示された細菌株について、 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 と同様の条件で二者培養実験を行った。

実験-I の結果、水草ヒシから単離された細菌株 1 株（細菌株 30）において、 β -CD の添加による殺藻の阻害が認められた。細菌株 30 と共培養した *M. aeruginosa* の 14 日目の蛍光値は、細菌添加区で 8.4 であったが、細菌+ β -CD 添加区においては 34.0 まで増加した。実験 II の結果、添加した CD の違いによって蛍光値に差異が認められ、 α -CD < β -CD < γ -CD の順に殺藻が阻害された。したがって、細菌株 30 の殺藻過程には比較的分子量が大きな AHL が作用する QS が関与していると考えられた。

水草ヒシは高い栄養塩吸収能や、藍藻類に対するアレロパシー効果が報告されている。本研究により、従来の知見に加えてヒシ由来の殺藻細菌がアオコ防除に有用となりうる可能性が示された。