

## アオコ原因種 *Microcystis aeruginosa* と水中および 水草ヒシの殺藻・増殖阻害細菌の季節変動

大洞裕貴<sup>1</sup>・宮下洋平<sup>1</sup>・小林淳希<sup>1</sup>・織田さやか<sup>2</sup>・田中邦明<sup>2</sup>・山口篤<sup>1</sup>・今井一郎<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究院 浮遊生物学教室 (〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1)

<sup>2</sup>北海道教育大学 教育学部 函館校 地域教育専攻 (〒040-8567 北海道函館市八幡町 1 番 2 号)

Hiroki Daido<sup>1</sup>, Yohei Miyashita<sup>1</sup>, Junki Kobayashi<sup>1</sup>, Sayaka Oda<sup>2</sup>, Kuniaki Tanaka<sup>2</sup>, Atsushi Yamaguchi<sup>1</sup> and Ichiro Imai<sup>1\*</sup>: Seasonal fluctuation of algicidal and growth-inhibiting bacteria against the toxic-bloom forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, detected from the water plant *Trapa jeholensis* (= *T. japonica*) and surrounding water. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 66: 111-117 July 10, 2018

The cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is notorious for forming toxic blooms in freshwater ecosystems. These blooms can adversely affect water quality, so environmentally friendly measures are needed to prevent the blooms. One promising tool for preventing blooms is the use of algicidal bacteria (AB) and growth-inhibiting bacteria (GIB). The present study investigated the abundances of *M. aeruginosa* as well as AB and GIB against *M. aeruginosa* in the moat at Goryokaku Park, Hakodate, Japan, in 2015. The abundance of *M. aeruginosa* in the water fluctuated between  $3.6 \times 10^2$  and  $8.4 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>. Abundances of AB and GIB were  $1.2 \times 10^3$  colony forming unit (CFU) mL<sup>-1</sup> and  $8.3 \times 10^2$ – $1.3 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, respectively, in the water, but much more abundant on the aquatic plant *Trapa jeholensis* (= *T. japonica*) ( $6.2 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> in June and  $4.5 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> in August for AB, and  $1.9 \times 10^6$ – $2.7 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> from June to September for GIB). Our results suggest that *T. jeholensis* is the source of AB and GIB to the surrounding water.

**Key Index Words:** algicidal bacteria, cyanobacterial bloom, Goryokaku Park, growth-inhibiting bacteria, *Microcystis aeruginosa*, *Trapa jeholensis*

<sup>1</sup>Plankton Laboratory, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

<sup>2</sup>Hokkaido University of Education, 1-2 Hachiman-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8567, Japan

\*Author for correspondence: imai1ro@fish.hokudai.ac.jp

### 緒言

藍藻 *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing はアオコ原因種の 1 つであり、肝臓毒である microcystin の産生種としてよく知られている。世界各地で湖沼の富栄養化が進行し、*M. aeruginosa* のアオコの発生による利水障害や健康被害が報告されている (Codd 2000)。近年では、2007 年に中国の太湖においてアオコの記録的な大量発生による利水障害が生じ、沿岸居住者の 200 万人以上に影響が及んだ (浅野ら 2011)。またアメリカ合衆国のエリー湖においても 2014 年にアオコが大発生し、沿岸の住民は湖水を水源とする水道水の飲用が数日間禁止されたことは記憶に新しい (Wilson 2014)。このようなアオコの問題を防ぐ為には、事後対策ではなく事前にアオコの発生を抑制することが効果的と考えられる。

現在アオコの防除法として、粘土や硫酸銅などの散布が提唱される一方、コストや生態系への影響の問題が懸念されている (Liu *et al.* 2010, Jančula & Maršálek 2011)。一方、水圏環境における藻類ブルームの消滅には、水中に生息する殺藻細菌の寄与が大きいと指摘されている (Imai *et al.* 1993, 1995, Doucette *et al.* 1999, Rashidan & Bird 2001)。そうした殺藻細菌は、海藻のアオサ (Imai *et al.* 2002, Imai *et al.* 2006a) や海草のアマモ (Onishi *et al.* 2014, 今井ら 2016, Inaba *et al.* 2017) 等の表面上のバ

イオフィルムに数多く存在しており、大型藻類が殺藻細菌の供給源として機能している可能性がある (Imai *et al.* 2006b, Imai & Yamaguchi 2012, Imai 2015, Sakami *et al.* 2017)。近年、陸水域においても *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌が現場の湖水中から多く検出され、アオコの防除への応用が期待されている (Tian *et al.* 2012, Li *et al.* 2014, Yi *et al.* 2015)。さらに前述の沿岸海域におけるアオサやアマモの事例と同様に、水草の表面に形成されるバイオフィルムから *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌が高密度に検出されている。例えば琵琶湖では、ヨシ茎のバイオフィルムから周囲の湖水の 1000 倍の密度で *M. aeruginosa* の殺藻細菌や増殖阻害細菌が検出されている (今井 2010)。北海道渡島大沼湖沼群においても同様にヨシ茎から殺藻細菌や増殖阻害細菌が検出され、ヨシ帯の湖水においてこうした活性を持つ細菌が高頻度で検出されている (小島ら 2016)。またオオカナダモの表面から単離された細菌 *Agrobacterium vitis* は *M. aeruginosa* に対して強い殺藻能を示すことが報告されている (Imai *et al.* 2013)。さらに近年では浮葉植物であるヒシ *Trapa jeholensis* Nakai (= *Trapa japonica* Flerow) からも *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出されている (Miyashita *et al.* 2018)。したがって *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌は、水草表面から周囲の水中へ供給されることでアオコの抑制に寄与していると考えられ

る (今井 2010, Imai *et al.* 2013)。水草由来の殺藻細菌を活用したアオコの防除策は薬剤散布などに比べて環境負荷が少ない技術だが、水草に由来する殺藻細菌の動態に関する知見は世界的にもほぼ皆無である。

五稜郭は北海道函館市の市街部に位置する稜堡式土塁であり、その周囲に表面積 56,400 m<sup>2</sup> の外堀を有する (田原 2008)。外堀の水深は 1–2 m であり、ヒシをはじめとしてスイレンやエビモ、クロモなどの水草の植生が見られる。五稜郭は公園として人々に親しまれている北海道の代表的な観光地であるが、2014 年の夏にその外堀においてアオコが大発生したことから、景観の維持のための早急なアオコ対策が望まれている。前述のように公園内の外堀にはヒシをはじめ数種類の水草が自生しているが、夏季に刈取が実施されている。本報では、刈取を調整しヒシを人為的に残した地点において *M. aeruginosa* および *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌のモニタリングを行った。そして浮葉植物ヒシのバイオフィームから *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌を検出し、五稜郭公園における殺藻細菌と *M. aeruginosa* の挙動の関係性について考察を加えた。

## 材料と方法

本研究の調査地点として、自生しているヒシを意図的に残した地点 Stn.P (水深約 1.5 m, ヒシ群落面積約 360 m<sup>2</sup>) を設定した (Fig. 1)。Stn.P における試料の採取は 2015 年 5 月から 10 月にかけて、原則として月 1 回行った。Stn.P においてヒシの試料 3.53–35.9 g を採取し、あらかじめオートクレーブ滅菌処理をしたポリプロピレン瓶に収容した。また同所の表層水 500 mL を同じくオートクレーブ滅菌処理をしたポリプロピレン瓶に採取した。またクロロフィル a, フェ

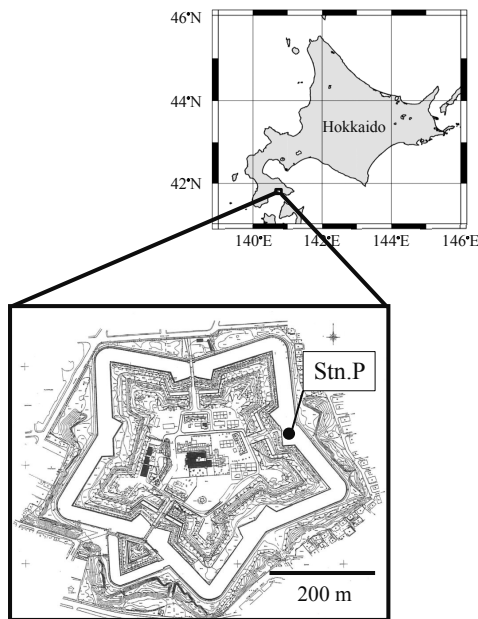


Fig. 1. Sampling site (Stn.P) in the moat of Goryokaku Park in Hakodate, Hokkaido, Japan. (Provided from Hakodate City).

オフィチンおよび各種栄養塩分析用の水試料約 500 mL についても、塩酸に浸漬したのち蒸留水で十分に洗浄したポリプロピレン瓶に採取した。全ての試料は保冷剤入りのクーラーボックスに入れて保冷し、約 1 時間後に実験室に持ち帰った。表層の水理環境の測定は原則月 2 回実施し、水温、溶存酸素量 (DO mg L<sup>-1</sup>) を蛍光式 DO/温度センサー (YSI Nanotech), pH を pH meter D-54 (HORIBA) を用いて測定した。

植物プランクトンの生物量の指標として、光合成色素のクロロフィル a およびクロロフィル a の分解過程の産物であるフェオフィチンの濃度を測定した。水試料は持ち帰り後直ちに GF/F グラスファイバーフィルター (Whatman, 直径 47 mm) を用いて 30–200 mL を濾過捕集した。その後、暗所にてフィルターを 5 mL の 90% (v/v) アセトンに 24 時間浸し色素を抽出した。蛍光光度計 (10-AU, Turner Designs Co. Ltd.) を用いて蛍光強度を測定した後、直後に少量の塩酸 (1 N) を加えて再び蛍光強度を測定した。クロロフィル a およびフェオフィチンの濃度は Parsons *et al.* (1984) に従い求めた。なおクロロフィル a (分子量 893.49) とフェオフィチン (分子量 871.2) については、分子量の相違が 2.5% 程度であることおよび測定精度を考慮して両者とも重量濃度 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) で表示した。栄養塩 (NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, SiO<sub>2</sub>-Si) については、上述の濾過処理で得られた濾液を用いた。試料は測定まで冷凍保存 (-30°C) し、測定時に室温で解凍した。解凍した試料についてはオートアナライザー (Quattro Bran Luebbe) を用いて各種栄養塩の濃度を測定した。溶存無機窒素 (Dissolved inorganic nitrogen: DIN) は NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N および NH<sub>4</sub>-N の和とした。

試料中の総細菌数は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色と落射蛍光顕微鏡を用いた直接検鏡計数法 (Porter & Feig 1980, Imai 1987) によって行った。水試料はオートクレーブ滅菌処理をした孔径 3  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (Whatman, 47 mm) 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), 濾液中に含まれる細菌を浮遊性細菌 (Free-living bacteria: FLB) とした。未濾過試料と濾液試料をグルタルアルデヒド (終濃度 1%) で固定した後、DAPI を終濃度 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  となるよう加えて 5 分以上染色した。染色した細菌は、あらかじめ 1.5 cm 四方の正方形に裁断し Sudan blackB で染色した孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のヌクレポアメンブレンフィルター (Whatman) 上に濾過捕集した (Zimmermann *et al.* 1978)。フィルターをスライドガラス上に置き、無蛍光イマージョンオイルとともにカバーガラスで封入した後、落射蛍光顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE 80i) を用いて細菌の直接計数を行った。計数は 10 視野行い、1 視野あたりの平均値から水試料 1 mL 当たりの細菌数を算出した。また未濾過試料 (PAB と FLB の和) と濾過試料 (FLB) の細菌数の差を PAB の細菌数として算出した。なおヒシ試料については、まず試料の入ったポリプロピレン瓶に滅菌蒸留水 200

mLを加え、これを手で600回強振することにより試料表面のバイオフィルムを剥離しバイオフィルム懸濁液を作製した (Miyashita *et al.* 2018)。これを水試料と同様の手法で固定して染色処理を加え、細菌の直接計数を行った。また水草1 g当りの細菌数を  $\text{g}^{-1}$  wet weight として算出した。*Microcystis aeruginosa* の同定および計数は、グルタルアルデヒド (終濃度1%) で固定した水試料 25–300  $\mu\text{L}$  を界線スライドガラス上に乗せ、倒立顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE TE200) 下で観察して行った。

培養可能細菌の計数および単離は以下の手順で行った。あらかじめ水試料を滅菌蒸留水で段階的に  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  の濃度に希釈した。各希釈段階1 mLをオートクレーブ滅菌処理済みの孔径3  $\mu\text{m}$  のヌクレポアメンブレンフィルター (Whatman, 47 mm) で濾過し、フィルター上の細菌をPAB、濾液中の細菌をFLBとした。PABについてはフィルターの濾過面を上にしてLT10<sup>-1</sup>寒天培地 (Ishida *et al.* 1980) に静置し、FLBは濾液0.1 mLを同培地に塗抹してそれぞれ培養を行った。LT10<sup>-1</sup>寒天培地はTrypticase peptone (BBL) 0.5 g, 酵母エキス B2 (オリエンタル酵母工業) 0.05 g, および15 gの寒天 (和光純薬工業) を蒸留水1 Lに加え、オートクレーブ (121°C, 20分間) して作製した。

各希釈段階において細菌を塗抹した寒天培地を3枚作製し、暗所で室温 (20–25°C) の条件にて2週間培養した。その後、各寒天培地に形成されたコロニーを計数し、コロニー数の平均値から培養可能細菌数を colony forming unit (CFU)  $\text{mL}^{-1}$  として算出した。原則として各試料について形成されたコロニー48株を、滅菌した爪楊枝を用いて無作為に少量釣菌し、48ウェルマイクロプレートの各ウェル中のLT10<sup>-1</sup>寒天培地に接種して細菌株の単離を行った。

ヒシ試料については、前述の600回強振によって得られたバイオフィルム懸濁液について、滅菌蒸留水で10倍ずつ段階的に希釈した。そのうち  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  の希釈懸濁液0.1 mLをLT10<sup>-1</sup>寒天培地に塗抹したものを各希釈段階につき3枚ずつ作製し、水試料と同様に培養した。培養を通じて形成されたコロニーを計数し、用いたヒシの湿重量から培養可能細菌数をCFU  $\text{g}^{-1}$  wet weight として算出した。細菌の単離は水試料と同様に行った。

*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の検出は、二者培養実験により行った。CT培地 (Watanabe & Ichimura 1977) で無菌的に培養し、良好に増殖した *M. aeruginosa* Ma17株 (琵琶湖より分離された無菌株: 辻村茂男博士より提供) を同培地で細胞密度が約  $1.0 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  になるよう希釈し、48ウェルマイクロプレートの各ウェルに0.8 mLずつ分注した。その後、LT10<sup>-1</sup>寒天培地上の細菌コロニー30株を滅菌した爪楊枝を用いて無作為に少量釣菌し、各ウェルに接種した。ただし、8月に採取したヒシ試料については十分な数のコロニーが得られなかったため、22株を実験に供した。培養は温度25°C, 光強度平均値  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  (約  $40\text{--}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ )、明暗周

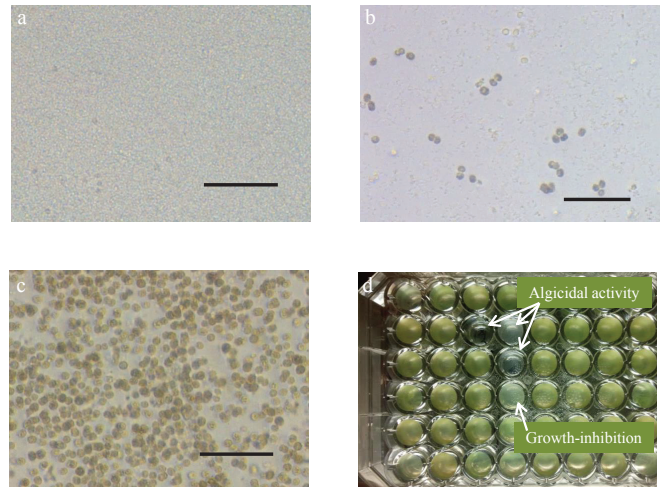


Fig. 2. Effects of algicidal and growth-inhibiting bacteria on *Microcystis aeruginosa* strain Ma17. (a) Algicidal effect, (b) growth-inhibition, (c) control (no addition of bacteria), and (d) visible algicidal and growth-inhibition effects in wells of microplate (indicated by arrows). Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

期 14h L : 10h D の条件で2週間行った。その後、各ウェルを倒立顕微鏡下で観察し、*M. aeruginosa* が90%以上死滅していた場合、細菌株を「殺藻細菌」とした。また、コントロールのウェルと比較し、*M. aeruginosa* の細胞がウェルの底に沈み、かつ細胞数が少なく、部分的に溶藻が確認された場合、その細菌株を「増殖阻害細菌」とした (Fig. 2)。なお矢木ら (1984) は *M. aeruginosa* と考えられる *Microcystis* 属の無菌株について、5,000 lux (蛍光灯が光源と仮定すると約  $66\text{--}68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  相当) 以上の光量で最大増殖量の低下が認められ、10,000 lx (同仮定で約  $130\text{--}135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  相当) 以上の光量で明らかな強光阻害が認められたと報告している。また同時に、昼夜の存在が *Microcystis* 属にとって強光阻害への防御となる可能性も指摘している。そのため本実験では、コントロールと比較して *M. aeruginosa* の顕著な減少が観察された場合は、強光阻害ではなく細菌によるものと判断した。

各試料について、*M. aeruginosa* に対する殺藻能または増殖阻害能を示した細菌の割合から、*M. aeruginosa* に対する殺藻細菌数または増殖阻害細菌数を以下の式を用いて算出した。

$$B_K = B_C \times S_A / S_T$$

$B_K$ : *M. aeruginosa* に対して殺藻能および増殖阻害能を示した培養可能細菌数 (CFU  $\text{mL}^{-1}$  or CFU  $\text{g}^{-1}$  wet weight)

$B_C$ : 培養可能細菌数 (CFU  $\text{mL}^{-1}$  or CFU  $\text{g}^{-1}$  wet weight)

$S_A$ : 殺藻細菌株数または増殖阻害細菌株数

$S_T$ : 二者培養実験に供した培養可能細菌株数

## 結果

五稜郭公園外堀の Stn.P における水理環境の変動を Fig. 3 に示した。水温は  $10.3\text{--}27.4^\circ\text{C}$ , pH は  $6.98\text{--}8.36$  の範囲で変動していた。溶存酸素量 (DO  $\text{mg L}^{-1}$ ) は  $7.6\text{--}11.3 \text{mg L}^{-1}$  の範囲で変動し、6月に最大値を記録した。DIN は  $0.24\text{--}1.44 \mu\text{M}$  の範囲の値を示し、5月下旬から6月中旬

にかけて急激な上昇傾向を示した後、減少して $0.5 \mu\text{M}$ 以下となり、以後この低い値で推移した。DIPの変動範囲は $0.06\text{--}0.28 \mu\text{M}$ であり、6月の中旬と8月末に急激な値の上昇を示した。珪酸塩 ( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ) は $81.4\text{--}239.6 \mu\text{M}$ の範囲で変動した。

植物プランクトンのクロロフィル a は $3.1\text{--}13.9 \mu\text{g L}^{-1}$ 、フェオフィチンは $2.9\text{--}12.1 \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲であり、両者の合計値は $6.0\text{--}23.2 \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲であった (Fig. 4)。また植物プランクトンの細胞数の変動は Fig. 5 に示した。植物プランクトンの総数は $6.4 \times 10^2\text{--}3.4 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ であり、特に *Microcystis aeruginosa* に注目すると $3.6 \times 10^2\text{--}8.4 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ の範囲で出現が確認され6月と8-9月に突発的に高密度になった。

水中の細菌数の動向はPABとFLBで違いが見られた (Fig. 6)。PABは $2.7 \times 10^5\text{--}1.8 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の密度の範囲であり7月に最小値、10月に最大値を記録した。FLBは $4.5 \times 10^5\text{--}4.0 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の密度の範囲でありPABとは逆に10月に最小値を記録した。なお水中の総細菌数は $1.9 \times 10^6\text{--}4.3 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の密度の範囲であった。また、ヒシのバイオフィームにおいても細菌の計数を行ったところ、調査期間を通して $3.4 \times 10^8\text{--}7.4 \times 10^8 \text{ cells g}^{-1}$  wet weightの密度の範囲で徐々に減少する傾向が認められた。

Stn.Pの水中の *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌数および増殖阻害細菌数の変動を Table 1 に示した。殺藻細菌は5

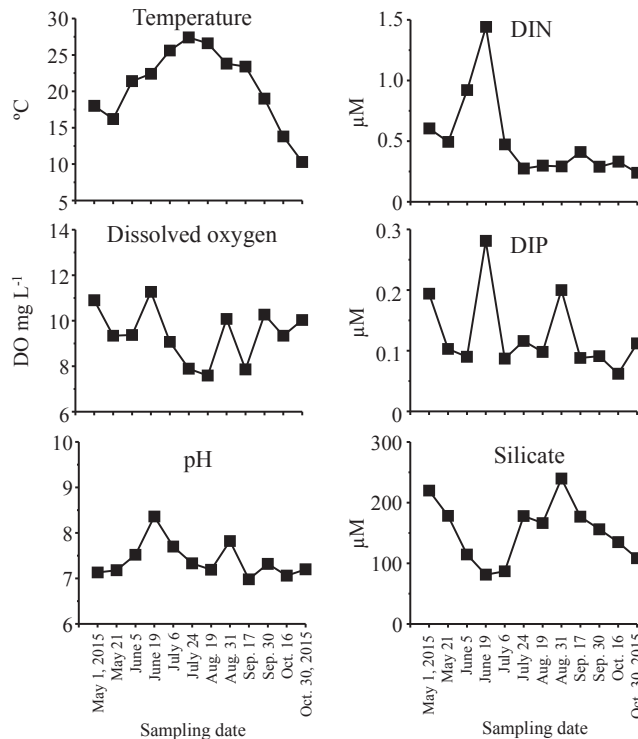


Fig. 3. Temporal changes in water temperature, dissolved oxygen, pH, dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved inorganic phosphorus (DIP,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ) and silicate ( $\text{SiO}_2\text{-Si}$ ) in the surface water collected from Stn.P from May to October, 2015.

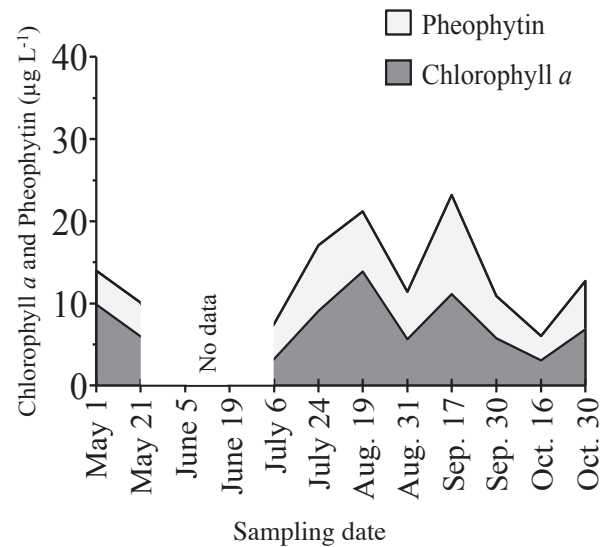


Fig. 4. Temporal changes in chlorophyll a and pheophytin in the surface water of Stn.P from May to October, 2015.

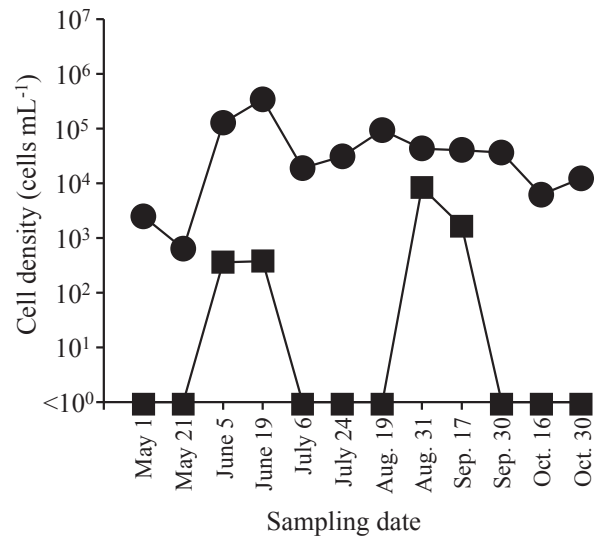


Fig. 5. Seasonal changes in cell densities of total phytoplankton (●) and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (■) in the surface water of Stn.P from May to October, 2015.

月に採取したPABから2株検出し、その密度は $1.2 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ と算定された。増殖阻害細菌について全期間を通じてみると、PABで $5.8 \times 10^2\text{--}7.8 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ 、FLBでは $8.3 \times 10^2\text{--}1.3 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ の密度で検出された。6月にはPABとFLBの両方から増殖阻害細菌が検出され、その合計値は $8.3 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ であった。よって、PABとFLBを合計した増殖阻害細菌の検出範囲は $8.3 \times 10^2\text{--}1.3 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ と算定された。また殺藻細菌と増殖阻害細菌の両者が検出されたのは5月であり、その合計値は $2.5 \times 10^3 \text{ CFU mL}^{-1}$ であった。

ヒシ試料からは6月と8月に殺藻細菌を1株ずつ検出し、

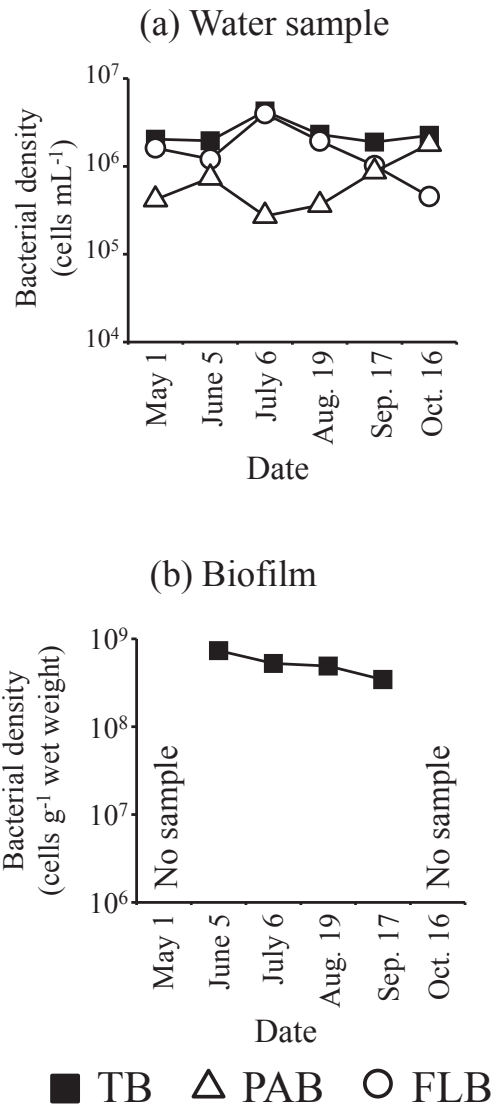


Fig. 6. Seasonal changes in the direct counts of bacteria in water samples (a) and the biofilm on the water plant *Trapa jeholensis* (b) collected at Stn.P in the moat of Goryokaku Park from May to October, 2015. TB, total bacteria (■); PAB, particle-associated bacteria (△); FLB, free-living bacteria (○).

その密度はそれぞれ  $6.2 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  wet weight,  $4.5 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  wet weight と算出された (Table 2)。また、調査期間中はヒシ試料から常に増殖阻害細菌が検出され、その密度は  $1.9 \times 10^6$ – $2.7 \times 10^7$  CFU  $g^{-1}$  wet weight の範囲で変動していた。また殺藻細菌と増殖阻害細菌の合計値は6月に  $2.5 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  wet weight, 8月に  $5.0 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  wet weight となっていた。

### 考察

現場の水中において *Microcystis aeruginosa* は6月に初めて確認され、8月31日の  $8.4 \times 10^3$  cells  $mL^{-1}$  が最大密度であった (Fig. 5)。DIN と DIP が6月に上昇しているが (Fig. 3), これは付近で行われた外堀の改修工事の影響と考えられる。梅田・富岡 (2007) はダム貯水池において、水温

Table 1. Number of algicidal bacteria and growth-inhibiting bacteria (CFU  $mL^{-1}$ ) against *Microcystis aeruginosa* detected from water samples at Stn. P in the moat of Goryokaku Park from May to October, 2015. N.D. : Not Detected.

Date	Algicidal bacteria		Total algicidal bacteria	Growth-inhibiting bacteria		Total growth-inhibiting bacteria
	PAB	FLB		PAB	FLB	
May 1	$1.2 \times 10^3$	N.D.	$1.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	N.D.	$1.2 \times 10^3$
June 5	N.D.	N.D.	N.D.	$5.8 \times 10^2$	$7.7 \times 10^3$	$8.3 \times 10^3$
July 6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	$1.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
Aug. 19	N.D.	N.D.	N.D.	$6.3 \times 10^3$	N.D.	$6.3 \times 10^3$
Sep. 17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	$8.3 \times 10^2$	$8.3 \times 10^2$
Oct. 16	N.D.	N.D.	N.D.	$7.8 \times 10^3$	N.D.	$7.8 \times 10^3$

Table.2. Number of algicidal bacteria and growth-inhibiting bacteria (CFU  $g^{-1}$  wet weight) detected from the water plant *Trapa jeholensis* samples collected at Stn.P in the moat of Goryokaku Park from May to October, 2015. N.D. : Not Detected.

Date	Algicidal bacteria	Growth-inhibiting bacteria
May 1	No sample	No sample
June 5	$6.2 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6$
July 6	N.D.	$2.7 \times 10^7$
Aug. 19	$4.5 \times 10^5$	$4.5 \times 10^6$
Sep. 17	N.D.	$1.1 \times 10^7$
Oct. 16	No sample	No sample

が  $20^\circ C$  を上回ると *Microcystis* 属が高濃度に増殖することを報告している。今回のように水温が  $20^\circ C$  を上回る時期に改修工事などが行われると、土壌起源の栄養塩が大量に供給されアオコの発生につながる可能性がある。

水中の細菌数 (直接計数值) についてみると、PAB は夏季に減少し、10月に増加していた (Fig. 6)。10月には外堀内のヒシをはじめとする水草が枯死し、枯死した水草由来の粒子態有機物を利用してPABが増加したと考えられる。立本ら (1991) は、西印旛沼で秋にヒシの近縁種であるオニビシ (*Trapa natans* L. var. *quadrspinosa* (Roxb.) Makino) が枯死し、水中の溶存態有機物量が増加する可能性を指摘している。また Findlay *et al.* (1990) は室内実験において水中の細菌がオニビシ由来の有機物を利用して増殖することを報告している。

ヒシのバイオフィーム中の細菌密度は、6–9月を通して  $3.4 \times 10^8$ – $7.3 \times 10^8$  cells  $g^{-1}$  wet weight の範囲であった (平均  $5.2 \times 10^8$  cells  $g^{-1}$  wet weight) (Fig. 6b)。よって、ヒシ1g 当たりには周囲の水約 200 mL 分の細菌が生息していたといえる。

ヨシ茎表面のバイオフィームは周囲の水中の栄養塩を吸着し、濃縮して富栄養の環境を形成するため、微生物の増殖が

促進されるとの報告 (Hiraki *et al.* 2009) がある。ヒシについても同様に、細菌の増殖に適した富栄養な環境が形成されていたと考えられる。

水中の殺藻細菌および増殖阻害細菌は  $10^2$ – $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> のオーダーの密度であり、他の水域における報告 (今井 2010, 小島ら 2016) に類する値であった。増殖阻害細菌の密度は、ヒシが繁茂する 6–8 月とヒシが枯死する 10 月に増加していた。6–8 月はヒシのバイオフィームから高密度に殺藻細菌および増殖阻害細菌が検出されていることから、ヒシのバイオフィームから剥離した細菌が水中に供給された可能性がある。10 月は PAB 画分から増殖阻害細菌が検出されており、前述の様に PAB の直接計数値も増加していた。一般的に海洋では粒子に付着した細菌が高い生理活性を示すことが知られており (Simon *et al.* 2002), 殺藻細菌も PAB の存在形態で検出されることが多い (Park *et al.* 2010)。したがって、10 月は枯死したヒシなどの水草に由来する粒子態有機物が増加し、*M. aeruginosa* に対して増殖阻害能を有する細菌がそれに付着していたと考えられる。

5 月から 10 月にかけては水試料から増殖阻害細菌が毎月検出されており (Table 1), これらの細菌によって *M. aeruginosa* の増殖が抑制されている可能性が示唆された。*M. aeruginosa* は 6 月と 8–9 月に調査地点で観察されており、特に 6 月はヒシ由来の殺藻細菌と *M. aeruginosa* が同時に検出された (Table 2, Fig. 5)。これに関しては (1) ヒシが *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌の供給源になっている可能性、および (2) *M. aeruginosa* の出現に伴い水中で増殖した殺藻細菌が、ヒシのバイオフィームに付着した可能性が指摘できる。沿岸海域では赤潮非発生時においても、沖合地点に比べてアマモやアオサが生息する沿岸地点の水中で殺藻細菌の密度が高いことが報告されている (今井ら 2012, Sakami *et al.* 2017)。したがって、殺藻細菌と *M. aeruginosa* が同時期に出現した原因として (1) の寄与が大きいと考えられる。さらにヒシ由来の増殖阻害細菌については、6–9 月に毎月検出されていた (Table 2)。よって外堀内のヒシには殺藻細菌および増殖阻害細菌が多数付着・生息しており、*M. aeruginosa* の出現がそれらの細菌の増殖を促進している可能性がある。

愛媛県松山市の淡水池においては、池水中の殺藻細菌数と *M. aeruginosa* の量的変動の間に関連性が報告されており (Manage *et al.* 2001), 五稜郭公園外堀についてもさらに知見を蓄積することで *M. aeruginosa* と殺藻細菌の出現の間に関連性を発見できる可能性がある。前述の様にヨシの茎やオオカナダモ表面のバイオフィームからも *M. aeruginosa* の殺藻細菌が分離されており (今井 2010, Imai *et al.* 2013, 小島ら 2016), ヒシをはじめとする水草は湖沼において殺藻細菌や増殖阻害細菌の供給源として機能していると考えられる。Tsuchiya *et al.* (2011) はヨシ茎の表面に形成されるバイオフィームについて、細菌相が周囲の湖水と異なることや、季節変化を示すことを報告した。ヒシのバイオフィーム中の

細菌に関しても、類似した動向を示すと考えられ、殺藻細菌の消長に大きな影響を及ぼしている可能性がある。今後はこのような知見を踏まえ、バイオフィーム中の細菌相に注目した研究を行う必要がある。

ヒシについては、藍藻類に対するアレロパシー効果 (Akao *et al.* 2014) や栄養塩吸収能力 (Iamchaturapatr *et al.* 2007, 渡部ら 2010, 宮下ら 2015) がこれまでに報告されている。それらに加えヒシに生息する殺藻細菌や増殖阻害細菌がアオコの発生抑制に貢献する可能性が示された。今後はヒシに生息する殺藻細菌の水中への供給に注目し、現場水域における *M. aeruginosa* への殺藻細菌の影響についてさらなる調査研究を行う必要がある。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、本調査における情報と便宜、および五稜郭の詳細地図の御提供を戴いた函館市土木部、ならびに函館市住宅都市施設公社の皆様にご感謝申し上げます。さらに調査において多くの有益な御助言とご協力を賜りました北海道教育大学函館校の後藤晃教授に心から御礼申し上げます。また無菌の *Microcystis aeruginosa* Ma17 株を御提供して戴いた京都学園大学の辻村茂男博士に深甚なる謝意を表します。栄養塩分析に際し、快く御協力戴いた北海道大学水産科学研究所生物地球化学研究室の太木敦之准教授ならびに所属の学生の皆様にご厚く御礼を申し上げます。最後にはなりますが、本稿の英文要旨作成にあたり、適切な助言を戴きました同大学水産科学研究所の John Richard Bower 准教授に御礼申し上げます。

## 引用文献

- Akao, S., Hosoi, Y. & Fujiwara, T. 2014. Utilization of water chestnut for reclamation of water environment and control of cyanobacterial blooms. *Environ. Sci. Poll. Res.* 21: 2249–2255.
- 浅野敏久・李光美・平井幸弘・金料哲・伊藤達也 2011. 中国・太湖の富栄養化問題と 2007 年のアオコ大発生事件 (利水障害) 後の対応. *E-journal GEO* 5: 138–153.
- Codd, G. A. 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 16: 51–60.
- Doucette, G. J., McGovern, E. R. & Babinchak, J. A. 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.* 35: 1447–1454.
- Findlay, S., Howe, K. & Austin, H. K. 1990. Comparison of detritus dynamics in two tidal freshwater wetlands. *Ecology* 71: 288–295.
- Hiraki, A., Tsuchiya, Y., Fukuda, Y., Yamamoto, T., Kurniawan, A. & Morisaki, H. 2009. Analysis of how a biofilm forms on the surface of the aquatic macrophyte *Phragmites australis*. *Microb. Environ.* 24: 265–272.
- Iamchaturapatr, J., Yi, S. W. & Rhee, J. S. 2007. Nutrient removals by 21 aquatic plants for vertical free surface-flow (VFS) constructed wetland. *Ecol. Eng.* 29: 287–293.
- Imai, I. 1987. Size distribution, number and biomass of bacteria in intertidal sediments and seawater of Ohmi Bay, Japan. *Bull. Jap. Soc. Microb. Ecol.* 2: 1–11.
- 今井一郎 2010. ヨシ帯に由来するアオコ抑制微生物の生理生態学的研究. *IFO Res. Commun.* 24: 201–212.
- Imai, I. 2015. Interactions between harmful algae and algicidal and growth-inhibiting bacteria associated with seaweeds and seagrasses. In: Ohtsuka,

- S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. & Not, F. (eds). Marine Protists: Diversity and Dynamics. pp. 597–619. Springer, Tokyo.
- Imai, I., Fujimaru, D. & Nishigaki, T. 2002. Co-culture of fish with macroalgae and associated bacteria: A possible mitigation strategy for noxious red tides in enclosed coastal sea. *Fish. Sci.* 68 (suppl.): 493–496.
- Imai, I., Fujimaru, D., Nishigaki, T., Kurosaki, M. & Sugita, H. 2006a. Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Afr. J. Mar. Sci.* 28: 319–323.
- Imai, I., Ishida, Y. & Hata, Y. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar. Biol.* 116: 527–532.
- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguchi, K. & Hata, Y. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 61: 628–636.
- Imai, I., Kido, T., Yoshinaga, I., Ohgi, K. & Nagai, S. 2013. Isolation of *Microcystis*-killer bacterium *Agrobacterium vitis* from the biofilm on the surface of the water plant *Egeria densa*. In: Pagou, P. & Hallegraeff, G. (eds.) Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae. pp. 150–152. International society for the study of harmful algae & Intergovernmental oceanographic commission of UNESCO.
- 今井一郎・岡本悟・西垣友和・吉永郁生・竹内照文 2012. 和歌山県下芳養湾における海中およびアオサに付着する赤潮藻殺藻細菌の分布. 北海道大学水産科学研究彙報 62: 21–28.
- Imai, I. & Yamaguchi, M. 2012. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae* 14: 46–70.
- Imai, I., Yamaguchi, M. & Hori, Y. 2006b. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.* 1: 71–84.
- 今井一郎・山本直・石井健一郎・稲葉信晴・山本圭吾 2016. 殺藻細菌が豊富に生息するアマモによる有害赤潮の発生予防. 用水と廃水 58: 295–300.
- Inaba, N., Trainer, V. L., Onishi, Y., Ishii, K., Wyllie-Echeverria, S. & Imai, I. 2017. Algicidal and growth-inhibiting bacteria associated with seagrass and macroalgae beds in Puget Sound, WA, USA. *Harmful Algae* 62: 136–147.
- Ishida, Y., Shibahara, K., Uchida, H. & Kadota, H. 1980. Distribution of obligately oligotrophic bacteria in Lake Biwa. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 1151–1158.
- Jančula, D. & Maršálek, B. 2011. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85: 1415–1422.
- 小島千里・宮下洋平・萩原匠・山口篤・今井一郎 2016. 北海道大沼国定公園内の湖沼群におけるヨシ由来の細菌によるアオコ発生制御の可能性. 北海道大学水産科学研究彙報 66: 19–28.
- Li, Z., Lin, S., Liu, X., Tan, J., Pan, J. & Yang, H. 2014. A freshwater bacterial strain, *Shewanella* sp. Lzh-2, isolated from Lake Taihu and its two algicidal active substances, hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione and 2,3-indolinedione. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 4737–4748.
- Liu, G., Fan, C., Zhong, J., Zhang, L., Ding, S., Yan, S. & Han, S. 2010. Using hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) modified clays to clean the *Microcystis aeruginosa* blooms in Lake Taihu, China. *Harmful Algae* 9: 413–418.
- Manage, P. M., Kawabata, Z. & Nakano, S. 2001. Dynamics of cyanophage-like particles and algicidal bacteria causing *Microcystis aeruginosa* mortality. *Limnology* 2: 73–78.
- Miyashita, Y., Hagiwara, T. & Imai, I. 2018. The existence of cyanobactericidal bacteria and growth-inhibiting bacteria on water plants in Lake Ohnuma, Japan. *Limnology* DOI: 10.1007/s10201-018-0542-6.
- 宮下洋平・小林淳希・田中邦明・今井一郎 2015. 北海道苅間川の遊水池に播種したヒシによる栄養塩の除去機能. 北海道大学水産科学研究彙報 65: 101–109.
- Onishi, Y., Mohri, Y., Tuji, A., Ohgi, K., Yamaguchi, A. & Imai, I. 2014. The seagrass *Zostera marina* harbors growth-inhibiting bacteria against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Fish. Sci.* 80: 353–362.
- Park, J. H., Yoshinaga, I., Nishikawa, T. & Imai, I. 2010. Algicidal bacteria in particle-associated form and in free-living form during a diatom bloom in the Seto Inland Sea, Japan. *Aquat. Microb. Ecol.* 60: 151–161.
- Parsons, T. R., Maita, Y. & Lalli, C. M. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.
- Porter, K. G. & Feig, Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943–948.
- Rashidan, K. K. & Bird, D. F. 2001. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microb. Ecol.* 41: 97–105.
- Sakami, T., Sakamoto, S., Takagi, S., Inaba, N. & Imai, I. 2017. Distribution of three algicidal *Alteromonas* sp. strains in seagrass beds and surrounding areas in the Seto Inland Sea, Japan. *Fish. Sci.* 83: 113–121.
- Simon, M., Grossart, H. P., Schweitzer, B. & Ploug, H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 28: 175–211.
- 田原良信 2008. 日本の遺跡 27 五稜郭 幕末対外政策の北の拠点. 同成社, 東京.
- 立本英機・服部豪夫・古川俊光・生嶋功・栗原真理・安部郁夫 1991. 浅水性湖沼(西印旛沼)水中の溶解性有機物の挙動. 日本化学会誌 1991: 852–858.
- Tian, C., Liu, X., Tan, J., Lin, S., Li, D. & Yang, H. 2012. Isolation, identification and characterization of an algicidal bacterium from Lake Taihu and preliminary studies on its algicidal compounds. *J. Environ. Sci.* 24: 1823–1831.
- Tsuchiya, Y., Hiraki, A., Kiriya, C., Arakawa, T., Kusakabe, R. & Morisaki, H. 2011. Seasonal change of bacterial community structure in a biofilm formed on the surface of the aquatic macrophyte *Phragmites australis*. *Microb. Environ.* 26: 113–119.
- 梅田信・富岡誠司 2007. 貯水池における水質環境要素と藻類増殖の関連. 水工学論文集 51: 1373–1378.
- Watanabe, M. M. & Ichimura, T. 1977. Fresh- and salt-water forms of *Spirulina platensis* in axenic cultures. *Bull. Jpn. Soc. Phycol.* 25 (suppl.): 371–377.
- 渡部正弘・小山孝昭・佐々木久雄 2010. 伊豆沼のヒシの栄養塩吸収・溶脱特性を利用した栄養塩濃度制御方法の提案. 水環境学会誌 33: 57–61.
- Wilson, E. K. 2014. Danger from microcystins in Toledo water unclear. *Chem. Eng. News*. 92: 9.
- 矢木修身・萩原富司・高村義親・須藤隆一 1984. 霞ヶ浦から分離した *Microcystis* の無菌株と単藻株の増殖特性. 水質汚濁研究 7: 496–503.
- Yi, Y. L., Yu, X. B., Zhang, C. & Wang, G. X. 2015. Growth inhibition and microcystin degradation effects of *Acinetobacter guillouiae* A2 on *Microcystis aeruginosa*. *Res. Microbiol.* 166: 93–101.
- Zimmermann, R., Iturriaga, R. & Becker-Birck, J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 926–935.

(Received Dec. 4, 2017; Accepted Apr. 27, 2018)