



Title	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
Author(s)	小島, 千里; 宮下, 洋平; 萩原, 匠 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 66(1), 19-28
Issue Date	2016-03-18
DOI	https://doi.org/10.14943/bull.fish.66.1.19
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61051
Type	departmental bulletin paper
File Information	bull.fish.66.1.19.pdf



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

小島 千里¹⁾・宮下 洋平¹⁾・萩原 匠¹⁾・山口 篤²⁾・今井 一郎²⁾

(2015 年 11 月 30 日受付, 2015 年 12 月 21 日受理)

Possible control strategy of cyanobacterial blooms by bacteria from reed (*Phragmites australis*) communities in lakes of Ohnuma Quasi-National Park, Hokkaido

Senri KOJIMA¹⁾, Yohei MIYASHITA¹⁾, Takumi HAGIWARA¹⁾, Atsushi YAMAGUCHI²⁾ and Ichiro IMAI²⁾

Abstract

Toxic blooms of cyanobacteria have negative impacts on fresh water ecosystems, and there is an urgent need to develop strategies to control those blooms. Algicidal bacteria that kill noxious species of cyanobacteria are expected as tools for mitigating impacts of the toxic cyanobacterial blooms. This study carried out to search algicidal bacteria against toxic cyanobacteria from biofilm on reeds and water samples in reed communities in Ohnuma Quasi-National Park and evaluated for control ability of cyanobacterial bloom by bacteria from reeds. Bacteria were isolated from the biofilm on reed and water samples, and the algicidal ability was examined using *Microcystis aeruginosa* by co-culture experiments. Algicidal bacteria were detected in high densities (order of 10^5 – 10^6 CFU g⁻¹ wet reed weight) from the biofilm of reeds including artificially planted reeds. Water samples from reed communities also contained more algicidal bacteria than those samples from no reed communities. The results suggested a possibility that reeds supply algicidal bacteria to adjacent water and reed communities have high potential ability to control toxic cyanobacterial blooms via bacteria possessing algicidal and growth-inhibiting activities.

Key words : Cyanobacterial blooms, *Microcystis aeruginosa*, algicidal bacteria, growth-inhibiting bacteria, *Phragmites australis*, Ohnuma Quasi-National Park, prevention, mitigation

緒 言

近年の世界的な人口の増加に伴って、世界各地において生活排水、工業排水、農業排水などの量が増加した。これらの排水にはリンや窒素などの栄養塩類が多量に含まれており、河川を通じて流れ込むため、湖沼の富栄養化を招いている。富栄養化が進んだ湖沼では、植物プランクトンが著しく増加し、水面が着色される「水の華」と呼ばれる現象が発生しやすくなる。特に藍藻類の大量増殖によるものは「アオコ」と呼ばれ、水面にペンを撒いたようになり、ひどい場合は水面に集積して、厚い層(スカム)が形成される。アオコは、原因種によっては湖水の毒化、カビ臭など、様々な問題を引き起こしている(渡辺, 1994; Herry et al., 2008; 田中, 2011)。

本研究の対象である大沼国定公園は北海道西南部渡島半島に位置する。主に大沼、小沼、蓴菜沼の3つの湖沼からなり、1958年に国定公園に指定され、2012年にはラムサール条約登録湿地に指定された。駒ヶ岳を背景に大

沼と小沼の湖内には「流山(ながれやま)」と呼ばれる大小120あまりの小島が浮かび、その風光明媚な景観が特徴的で、年間約200万人もの観光客が訪れている(環境省, 2013)。しかし、近年の大沼及び小沼では、富栄養化が進行しており(Yoshimura et al., 2000)、さらにはアオコが発生しているため(高野ら, 1998)、悪臭や景観悪化などの問題が懸念されている。

アオコは一般的に富栄養化した湖沼に発生するので(Reynolds et al., 2002)、湖沼への栄養塩の流入を低減することが根本的な解決策である。しかしながら、栄養塩の流入の低減は下水道設備や水処理施設などを要するためコストが高く、解決するまで長い時間を要する。また、湖沼においては農業や都市活動などによる非特定汚染源負荷(nonpoint source)による影響が大きく(Carpenter et al., 1998)、湖沼への栄養塩の流入を管理するのは非常に困難である。その他のアオコの防除方法としては、濾過によるアオコ回収、底泥の浚渫、曝気循環装置の使用、粘土散布などが挙げられるが(Liu et al., 2010; 農林水産省,

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学院海洋生物資源科学専攻海洋生物学講座浮遊生物学領域
(Laboratory of Marine Biology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門海洋生物分野
(Laboratory of Marine Biology, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

2012), 費用や生態系への悪影響が不安材料となっており, 環境に配慮された有効な手段が確立されていないのが現状である。

そこで近年では環境に配慮された方法として, 現場環境に生息する生物を利用した方法が注目を集めている。海洋の植物プランクトンの大量発生により引き起こされる赤潮では, 赤潮原因藻類を殺滅する殺藻細菌を用いた防除法について研究が展開されており, 将来の実用化に期待が寄せられている (今井・吉永, 2002; 今井ら, 2012)。殺藻細菌とは植物プランクトンを攻撃し殺滅することにより, その有機物を利用して増殖する細菌であり (今井, 2011), 赤潮の消滅において重要な役割を果たす (Imai et al., 1998; Kim et al., 1998)。特にアマモ表面及びアマモ場には殺藻細菌が高密度に生息するため, アマモ場が赤潮防除能を有し, 殺藻細菌の供給源になっていることが示唆されている (Imai et al., 2009)。

湖沼においても, アオコ原因藻類に対する殺藻細菌は, 抽水植物のヨシ (*Phragmites australis*) の茎表面に形成されるバイオフィーム (BF) に高密度で生息するという新事実がごく最近発見された。そのため, アマモ場と同様にヨシ帯が湖沼における殺藻細菌の供給源であり, ヨシ BF 中に生息する細菌がアオコ防除において有効に働くことが期待されている (木原, 2009; 今井, 2010; 扇, 2011)。

しかし, ヨシ BF 中に生息する殺藻細菌に関する研究例は端緒についたばかりであり, データの蓄積が必要である。そこで本研究では, ヨシ BF に生息する細菌のアオコ防除に対する有用性を検討することを目的とし, 大沼国定公園域において湖水及びヨシ BF から有害毒藍藻類に対する殺藻細菌の探索を行い, モニタリングを行うことでアオコ防除能の評価を行った。

材料および方法

大沼国定公園の概要

渡島大沼は北海道南部の渡島半島に位置する堰止湖であり, 大沼, 小沼と呼ばれる2つの湖から成り立っており, 小沼の北西に位置する葦菜沼と複数の湖沼群を含めた周辺地一帯が大沼国定公園に指定されている。大沼, 小沼, 葦菜沼は, 例年12月上旬から中旬に全面結氷し, 3月下旬から4月上旬にかけて解氷されるために初春と秋以降に湖水の鉛直循環が起きる湖沼である (石川, 2000)。大沼は湖沼群の中で最も大きく, 面積は5.12 km², 平均水深は6.4 mである。大沼の主な流入河川は宿野辺川, 荻間川, 軍川であり, セバットと呼ばれる導水路を通じて小沼と繋がっている。小沼は面積3.80 km², 平均水深2.3 mであり, 小沼の流入水のほとんどは大沼からである。これらの湖水は小沼南端の発電所取水口に取り込まれた後, 久根別川を経由して函館湾に注ぐ (石川, 2000)。葦菜沼は小沼の北西に位置し, 面積0.66 km², 平均水深3.0 mである。大沼, 小沼との水の交換はなく, 宿野辺川及び横川の2河川が

流入しており, 流出水は認められていない (高野ら, 1998)。

試料採集

大沼国定公園域において, 2013年5月から10月の下旬に毎月1回の頻度でサンプリングを行った。船着き場として利用され水草の植生が無く, 例年アオコの発生している地点 (OP) と, 大沼と水路で繋がる内湖で湧水が流入している山水温泉前の地点 (SS), アオコの発生事例のない葦菜沼 (JL), 及び七飯町の「大沼湖沼自然浄化活用事業」として2011年から大沼北東部に注ぐ荻間川の一部を引水し, 人工的にヨシ帯を造成した遊水池 (KR) (北海道七飯町, 2013) をサンプリング地点に設定した (Fig. 1)。SS, JL, KRの3地点はヨシが繁茂しているため, ヨシ帯を有する地点として扱った。

各地点においてバケツ採水により表層水を採取し, 滅菌済みポリプロピレン容器中に収容した。また, 水温は現場にて測定した。さらに SS, JL 及び KR の3地点では, ヨシ (*P. australis*) の水面下の茎を3-4本採取し, 滅菌済みポリプロピレン容器中に収容した。サンプルはクーラーボックスにて速やかに研究室に持ち帰り, 実験に供した。pH は pH meter D-51 (HORIBA) を用いて測定した。クロロ

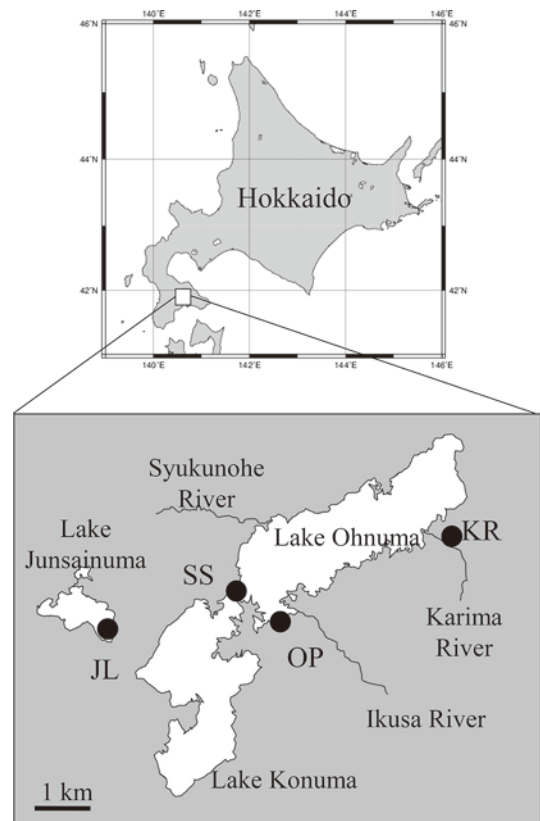


Fig. 1. Location of the sampling sites of Lake Ohnuma, Konuma and Junsainuma in Hokkaido, Japan. OP, Ohnuma port; SS, Sansui pond; JL, Lake Junsainuma and KR, Karima River site.

フィル a 濃度については、湖水試料 50-200 mL を GF/F フィルターで濾過捕集し、90% アセトン中で約 1 日間暗所に静置して抽出した。蛍光光度計を用いて蛍光値を測定した後、少量の塩酸を加え、再度蛍光光度計を用いて蛍光値を測定し、フェオフィチン濃度を算出した (Parsons et al., 1984)。栄養塩は、オートアナライザー (Bran Luebbe Quattro) を用いて硝酸塩、亜硝酸塩、アンモニウム塩、リン酸塩、ケイ酸塩濃度を測定した (Parsons et al., 1984)。硝酸塩、亜硝酸塩及びアンモニウム塩濃度の和を DIN (Dissolved Inorganic Nitrogen: 溶存無機窒素)、リン酸塩濃度を DIP (Dissolved Inorganic Phosphorus: 溶存無機リン) として算出し、DIN: DIP 比を求めた。なお KR の栄養塩の結果は 6, 8, 10 月のみとなっている。

ヨシ及び湖水試料の処理及び培養可能細菌の計数

ヨシ茎は、滅菌済み歯ブラシと滅菌蒸留水を用いて表面に付着しているバイオフィルムを剥離させ、ヨシ BF 試料を得た。ヨシ BF 試料は滅菌蒸留水を用いて 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 及び 10^{-4} と段階的に希釈を行い、各希釈段階について 0.1 mL を ST10⁻¹ 寒天培地 (Ishida et al., 1986) に塗抹し (3 本立て)、温度約 20°C の暗所で 2 週間培養した。またヨシ茎は処理後に湿重量を測定した。湖水試料は滅菌蒸留水を用いて同様に 10^{-1} , 10^{-2} 及び 10^{-3} と段階的に希釈を行い、各希釈段階の 1.0 mL を滅菌済みの孔径 3.0 μm のヌクレポアフィルターで濾過した。フィルターは ST10⁻¹ 寒天培地上に静置し、濾液は 0.1 mL を ST10⁻¹ 寒天培地に塗抹した。フィルター、濾液共に各希釈段階において 3 本立てで処理を行った。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、ヨシ BF 試料と同様の条件で培養した。

2 週間の静置培養後、寒天培地上に形成されたコロニーを計数し、形成されたコロニー数の平均値と希釈段階、濾過量または塗抹量を基に培養可能細菌数 (CFU mL⁻¹ or CFU g⁻¹ wet weight) を算出した。その後、各試料のシャーレから 48 個の細菌コロニーを無作為に滅菌爪楊枝で釣出し、48 ウェルマイクロプレートの各ウェル中に作成した ST10⁻¹ 寒天培地にそれぞれ 1 株ずつ接種し、分離培養を行った。

また、ヨシ BF 試料、未処理の湖水試料、及び FLB 画分の湖水試料の一部をグルタルアルデヒドにて固定し (終濃度 1 %), 後に *Micocystis aeruginosa* 及び総細菌数の計数を行うまで冷暗所に保存した。

Micocystis aeruginosa の計数

日本国内に広く分布する有毒アオコ原因藻類である藍藻 *M. aeruginosa* は、固定した湖水試料の 0.1-1.0 mL をスライドガラスにとり、倒立顕微鏡下 (100-600 倍) で計数を行った。*M. aeruginosa* の細胞数は、あらかじめ 1 群体とカウントする平均細胞数を決めておき、群体数を計数す

ることにより算出した (一瀬ら, 2001)。

DAPI 染色法による細菌の直接計数

総細菌数は DAPI 染色と落射蛍光顕微鏡観察を用いた直接計数により求めた。グルタルアルデヒドで固定したヨシ BF 試料、湖水試料及び FLB 画分の湖水試料を、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 溶液でこれらの試料を 5 分間以上染色し (終濃度 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Sudan Black B であらかじめ染色した孔径 0.2 μm のヌクレポアフィルター上に濾過捕集した (Zimmermann et al., 1978)。細菌が捕集されたフィルターはスライドガラスに乗せ、無蛍光イマージョンオイルと共にカバーガラスで封入し、プレパラートを作成した。その後、落射蛍光顕微鏡を用いて UV 励起光下で観察し、細菌の計数を行った (Porter and Feig, 1980; Imai, 1987)。計数は 10 視野以上を行い、1 視野あたりの平均値と濾過量から 1.0 mL 中に存在する細菌数を算出した。ヨシ BF 試料についてはヨシ茎の湿重量から単位湿重量あたりの細菌数を算出した。また湖水中の総細菌数から FLB の細菌数の差を求め、PAB の細菌数とした。

分離細菌のアオコ原因藻類に対する殺藻及び増殖阻害能の評価

細菌の殺藻能の評価のため、分離した細菌と *M. aeruginosa* (MA17 株) との二者培養試験を行った。藻類は CT 培地 (Watanabe and Ichimura, 1977) 中で温度 25°C, 光強度約 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 明暗周期 14 hL: 10 hD の無菌条件下で維持培養したものを用いた。試験の 1-2 日前に良好に増殖した藻類培養を約 $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ の濃度に滅菌 CT 培地で調製後、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、藻類培養を同じ条件下で 14 日間二者培養試験を行った。分離細菌は各試料画分から 7 月及び 8 月は 48 株、その他の月では 32 株接種した。また、各プレートには細菌を添加しないコントロール区を 4 ウェル設けた。二者培養試験の開始後、0, 1, 3, 7, 10, 14 日目に、倒立顕微鏡下で殺藻の有無を観察した。藻類の大部分 (90 % 以上) が死滅しているものを「殺藻細菌」、増殖が起こらず、コントロール区のウェルと比較して明らかに細胞の数が少ないものを「増殖阻害細菌」とした (Fig. 2)。殺藻あるいは増殖阻害を起こした細菌株数と試験に用いた細菌株数の割合及び培養可能細菌数から、殺藻細菌と増殖阻害細菌の数を算出した。計算式は以下の通りである。

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

B_K : 対象の藻類に殺藻または増殖阻害を示した細菌数 (CFU mL⁻¹ or g⁻¹ wet weight)

B_C : 培養可能細菌数 (CFU mL⁻¹ or g⁻¹ wet weight)

S_A : 殺藻あるいは増殖阻害を示した細菌株数

S_T : 試験に供した細菌株数

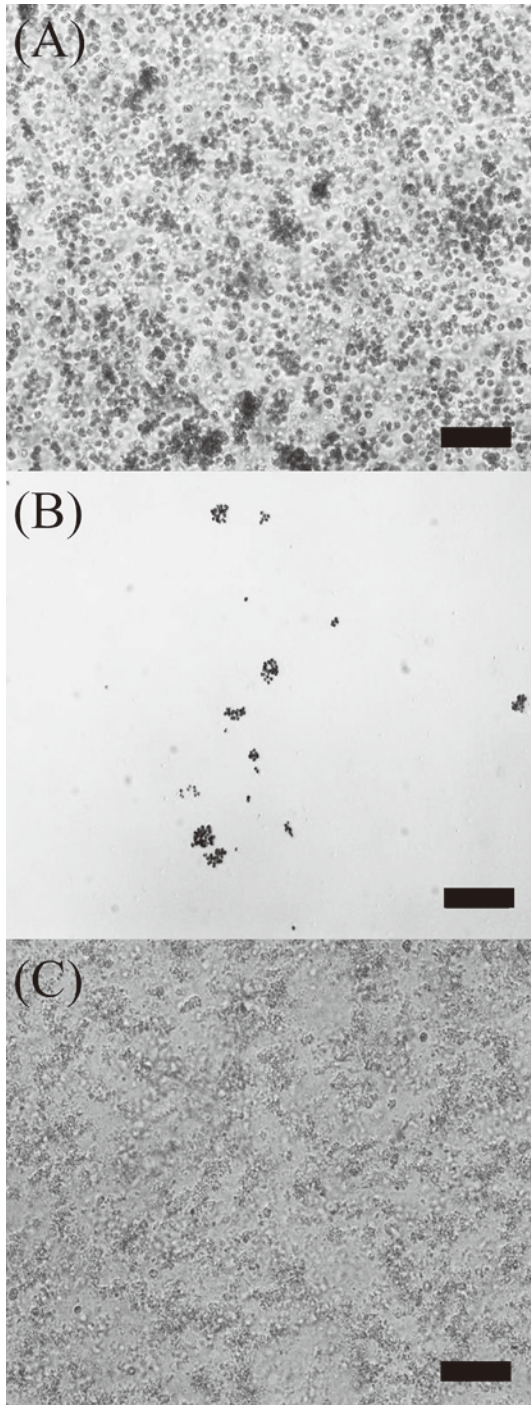


Fig. 2. Microscopic observations of *M. aeruginosa* on growth-inhibition and algicidal activity by tested strains of bacteria. (A) no addition of bacteria (control), (B) growth inhibited cells, (C) killed cells. Bars = 50 µm.

結 果

水理環境と有毒藍藻 *Microcystis aeruginosa* の変動

調査期間中の水温と pH の変化を Fig. 3 に示した。水温は 10.3–25.0°C の範囲で変動し、JL では 8 月、他の地点では 7 月に最高水温を示し、すべての地点において 10 月に

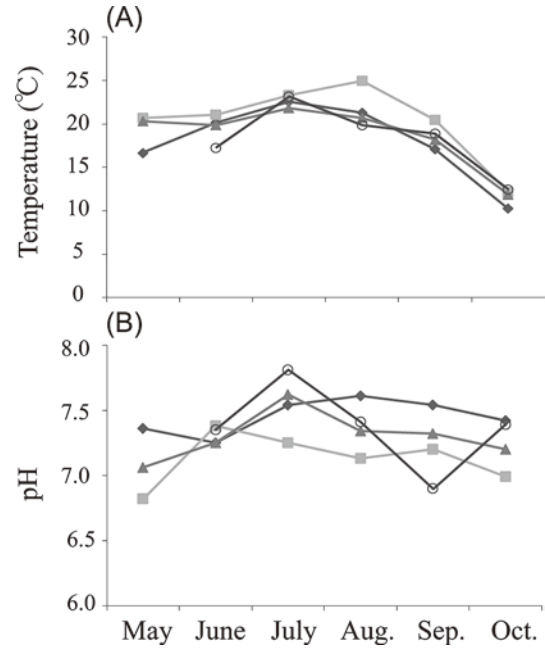


Fig. 3. Seasonal changes of (A) water temperature (°C) and (B) pH from May to October, 2013 in surface water at OP (◆), SS (■), JL (▲), and KR (○).

最低水温を示した。pH については 6.90–7.81 の範囲で変化した。水温及び pH において各地点で突出した値は示さず、地点間に大きな差は見られなかった。

栄養塩については Fig. 4 に示した。DIN は JL で 0.18–0.93 µM と低い値を示したのに対し、KR では 57.51–67.45 µM と高い値を示した。OP と SS は 0.47–29.14 及び 3.19–16.51 µM と季節による変動が大きく、春季と秋季に高い値が認められた。DIP は OP 及び JL でそれぞれ 0.09–0.13, 0.05–0.14 µM と全体的に低い値であった。SS では 7–9 月に高い値を示し、9 月に 0.93 µM と突出した値となった。KR は 0.17–0.46 µM と全体的に高い値であった。SiO₂-Si 濃度は各地点で 76.71–612.84 µM と全体的に大きな値を示した。DIN : DIP 比については、OP の 7 月と SS の 7, 8 月で Redfield 比の DIN : DIP=16 を下回る窒素欠乏状態となっていたが、その他の月はリン欠乏状態であった。一方、全調査期間にわたって JL では窒素欠乏状態であり、KR ではリン欠乏状態であった。

クロロフィル *a*、フェオフィチン濃度及び *M. aeruginosa* の細胞密度の変動を Fig. 5 に示した。クロロフィル *a* 濃度は各地点において 0.37–9.45 µg L⁻¹ で推移した。OP では 8 月、SS で 5, 9 月、JL で 6, 9 月に高い値がみられ、KR では全体的に低い値であった。フェオフィチン濃度は、検出限界以下–4.76 µg L⁻¹ の値が得られた。OP と SS では 5 月、JL と KR では 6 月に低い値を示した。*M. aeruginosa* は、OP, SS, JL で観察され、特に OP の 8 月に最も高い細胞密度となった。この 8 月の OP の湖水試料からは *Dolichospermum* spp. や *Aphanizomenon* spp. など、*M. aeruginosa* 以外の有害有毒藍藻類も確認され、現場においてパッチ状

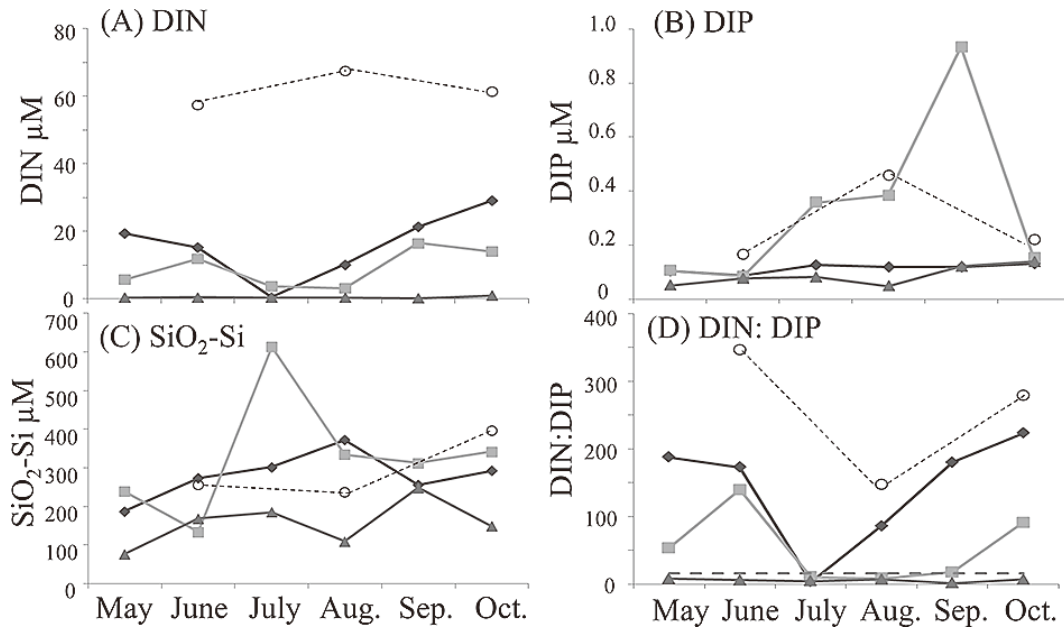


Fig. 4. Seasonal changes of inorganic nutrients (μM) from May to October in surface water at OP (◆), SS (■), JL (▲), and KR (○). (A) DIN : Dissolved Inorganic Nitrogen, (B) DIP (Dissolved inorganic phosphorus), (C) SiO₂-Si, (D) DIN : DIP ratio. Dashed line in (D) represents the Redfield value of 16 (N : P).

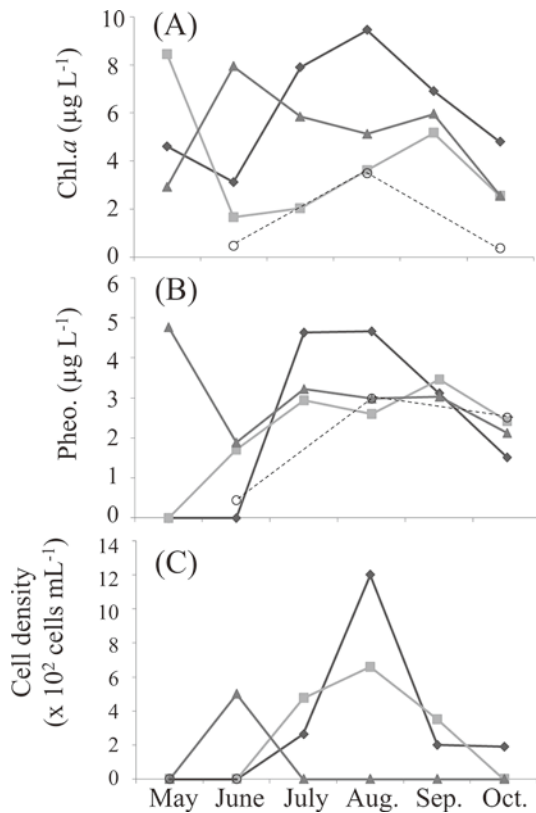


Fig. 5. Seasonal changes of (A) chlorophyll *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$), (B) pheophytin ($\mu\text{g L}^{-1}$) and (C) cell densities of *Microcystis aeruginosa* from May to October, 2013 in surface water at OP (◆), SS (■), JL (▲), and KR (○).

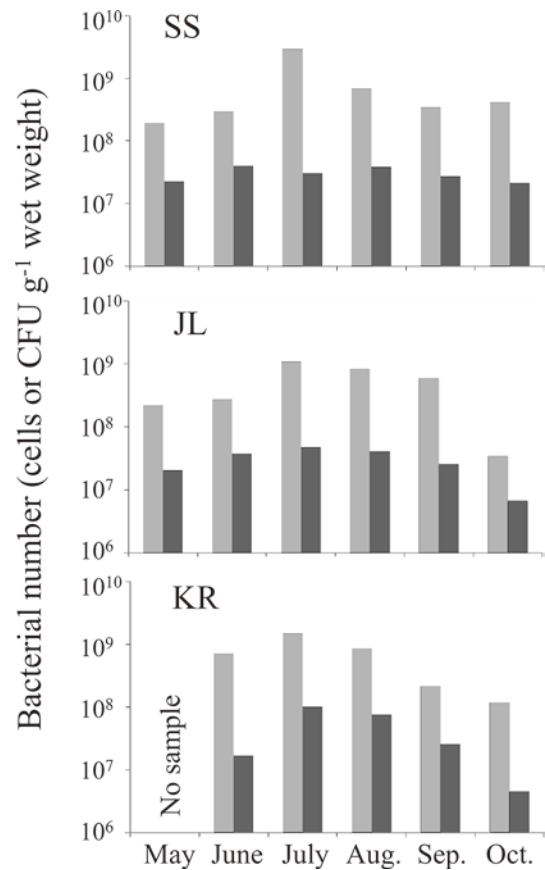


Fig. 6. Number of total bacteria of direct count (■ : cells g^{-1} wet weight) and viable bacteria (■ : CFU g^{-1} wet weight) from biofilm of reed samples collected at SS, JL and KR. CFU : colony forming units.

のアオコが観察された。

ヨシ及び湖水試料中の総細菌数及び培養可能細菌数

ヨシ BF 試料の総細菌及び培養可能細菌の密度の推移を Fig. 6 に示した。各地点において総細菌数は 3.4×10^7 – 2.9×10^9 cells g⁻¹ wet weigh, 培養可能細菌数は 4.6×10^6 – 1.0×10^8 CFU g⁻¹ wet weight で推移した。各地点共に総細菌は 7 月に最大値を示し、培養可能細菌も SS を除いて 7 月に最大値を示した。

湖水試料の総細菌の密度を Fig. 7, 培養可能細菌の密度の推移を Fig. 8 に示した。総細菌数は調査期間中に 7.5×10^5 – 8.6×10^6 cells mL⁻¹ で推移した。OP では 5 月に最大値を示し、その後減少したが、SS, JL, KR ではヨシ BF 試料同様 7 月に最大値を示した。また総細菌のうち、FLB が PAB より大きい値を示すことが多かったが、特定の傾向は認められなかった。培養可能細菌数は、PAB で 2.7×10^3 – 1.2×10^5 CFU mL⁻¹, FLB は 2.2×10^3 – 1.6×10^5 CFU mL⁻¹ であった。総細菌数と同様に FLB が PAB より高い値を示す場合が多かったが、特定の傾向は確認されなかった。

アオコ原因菌 *M. aeruginosa* に対する殺藻細菌及び増殖阻害細菌の変動

ヨシ BF 試料で検出された *M. aeruginosa* に対する殺藻及び増殖阻害活性を示す細菌の密度を Fig. 9 に示した。SS では殺藻細菌が 8 月に、増殖阻害細菌が調査期間におけ

るすべての月で検出され、JL は殺藻細菌が 5, 6 月、増殖阻害細菌が 7–9 月に検出された。KR においては、殺藻細菌で 6 月、増殖阻害細菌が 6–8 月に検出された。これらの細菌は調査期間に渡って全体的に検出され、各地点ともに特定の傾向はみられなかった。検出された細菌の密度は 5.2×10^5 – 4.8×10^6 CFU g⁻¹ wet weight (ヨシ茎) であった。

湖水試料における殺藻及び増殖阻害細菌の検出密度を Fig. 10 に示した。OP の PAB 及び FLB から 7, 8 月の夏季に殺藻及び増殖阻害細菌が検出された。SS では PAB, FLB 共に 5, 7, 9 月に検出され、JL の PAB, FLB では 5, 8, 10 月に殺藻及び増殖阻害細菌が検出された。また KR の PAB と FLB では 7, 8 月に殺藻及び増殖阻害細菌が検出された。これらの細菌の密度は 4.3×10^1 – 2.4×10^3 CFU mL⁻¹ であり、PAB と FLB からは同程度検出された。

考 察

大沼国定公園の水理環境

石川 (2000) によると大沼は 4 月に解氷して、表面水温は 4 月中には 5°C に達する。それ以後は変動しながら、ほぼ 1 ヶ月毎に 5°C 前後上昇し、7 月後半から 8 月上旬に 25°C 前後の最大水温を迎える。pH はほぼ 6.0–8.5 前後にあり、著しい酸性或いはアルカリ性は示されないとされている。本研究においても水温及び pH は石川 (2000) の報

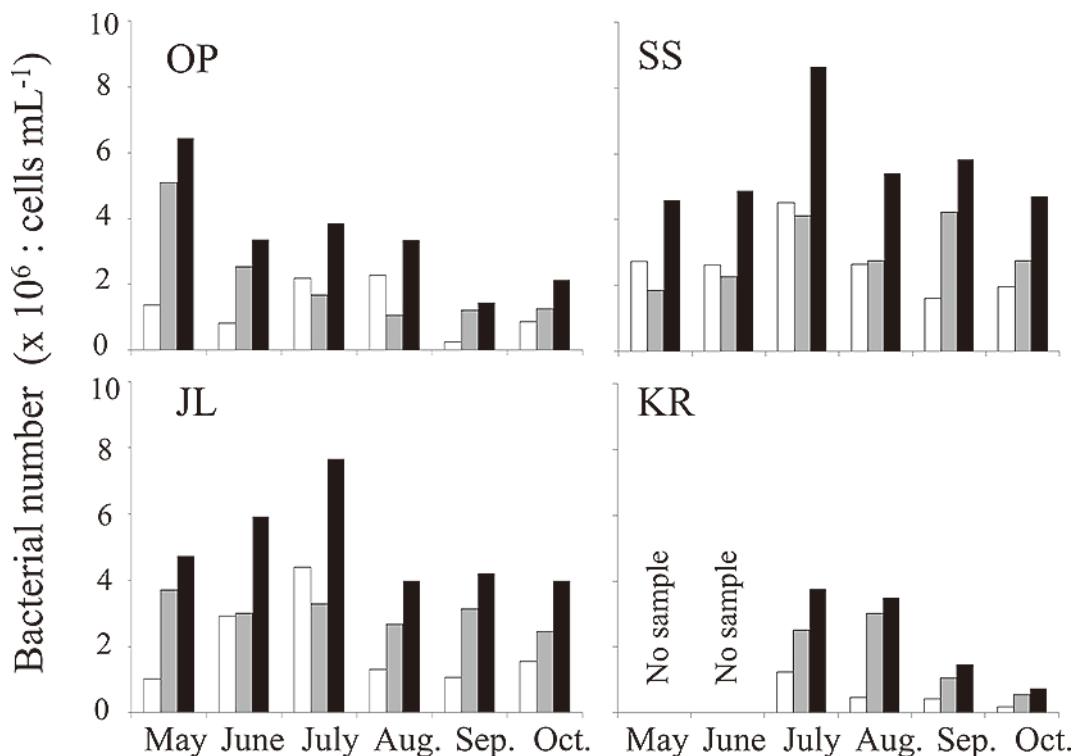


Fig. 7. Number of total bacteria of direct count from water samples collected at OP, SS, JL and KR. PAB : Particle associated bacteria (□), FLB : Free living bacteria (■), TB : Total bacteria (■).

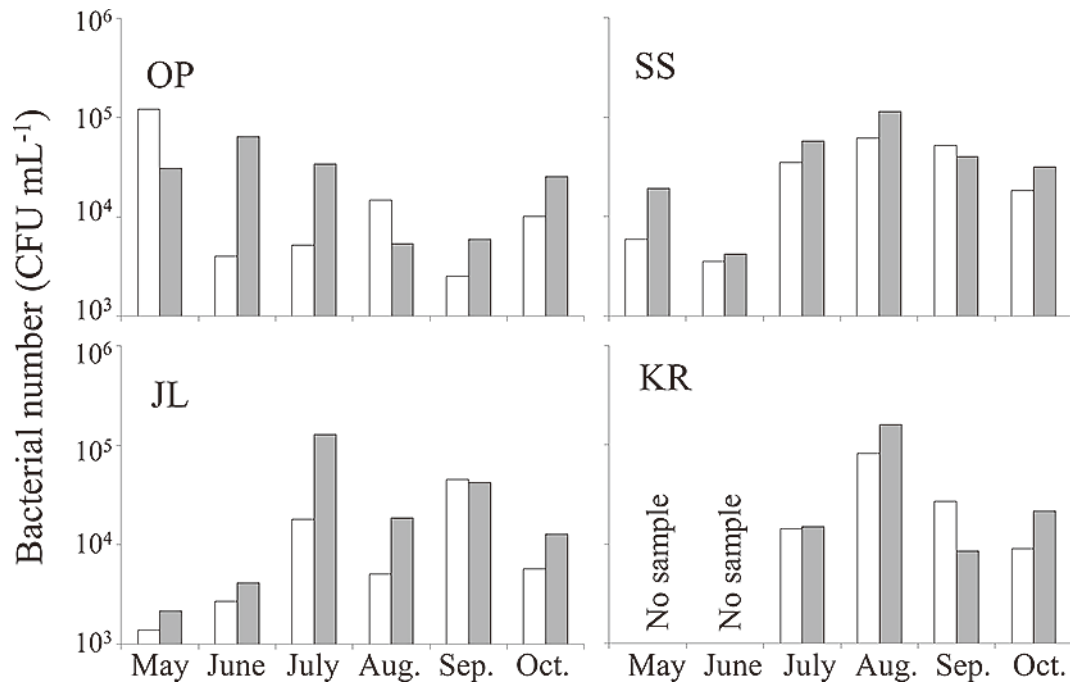


Fig. 8. Number of viable bacteria (CFU : colony-forming units) in water sample fractions of PAB (□) and FLB (■) collected at OP, SS, JL and KR. PAB, Particle associated bacteria ; FLB, Free living bacteria.

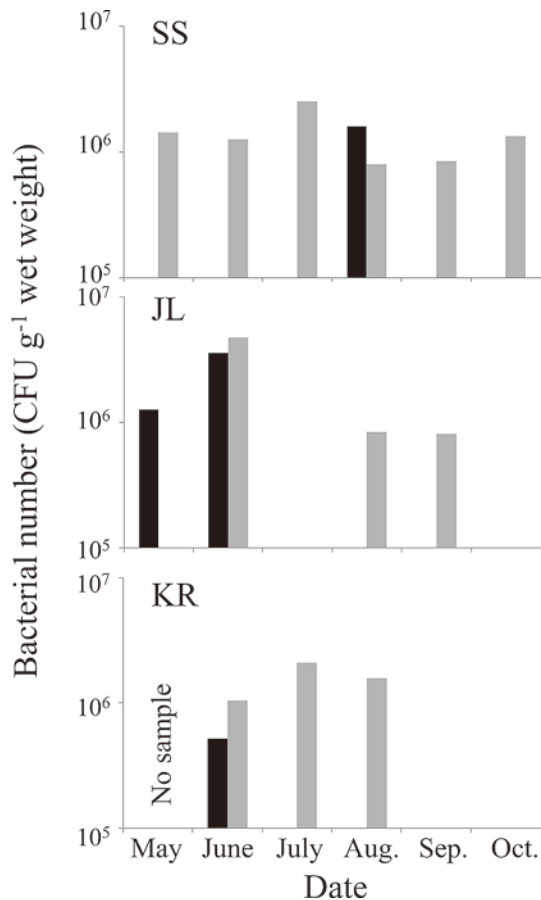


Fig. 9. Number of algicidal bacteria (■) and growth-inhibiting bacteria (■) against *M. aeruginosa* detected from the biofilm of reed samples collected at SS, JL and KR.

告と合致した結果となった。

栄養塩に関してみると、大沼では一年を通して窒素は多量に存在し、リンの量が非常に少ないが、リン制限の程度は季節により大きく異なると報じられている(芳村・工藤, 2001)。また、大沼の湖水はリン制限であるが、その理由は河川から供給される濃度の傾向が反映されているためと報告されており(北海道, 1982), 石川(2000)によると、春季には融雪、秋季に台風などにより流入負荷量が増加すると述べられている。以上のことから、春季や秋季の OP や SS, 調査期間中のすべての月の KR がリン欠乏状態であったのは、DIN の濃度が高い河川水などの流入負荷量が多かったためと考えられる。特に KR では河川の影響が直接的であったため、調査期間を通じてリン欠乏状態であったと考えられる。一方、夏季の OP や SS, 調査期間を通じた JL が窒素欠乏状態であった要因は、相対的に流入負荷の影響が小さかったためと考えられる。特に JL では、流入源のほとんどが湧水であり、大沼や小沼ほど河川の影響が直接的ではないため、窒素欠乏状態が顕著であったと思われる。珪酸塩に関しては、日本の湖沼水の珪酸の濃度は一般に高く、 $10\text{--}50\text{ mg L}^{-1}$ 程度存在するとされ、珪酸が植物プランクトンの増殖の制限因子になることは少ないとされており(西条・三田村, 1995), 本研究においてもその範囲から大きく逸脱する値を示すことはなかった。

クロロフィル *a* 濃度は SS と JL で春季や秋季に高くなる傾向が見られた。大沼の植物プランクトンの変動は、春季や秋季に大きく、その要因は栄養塩と同様に河川からの流入負荷量が増すことに加え、秋季に捕食者である

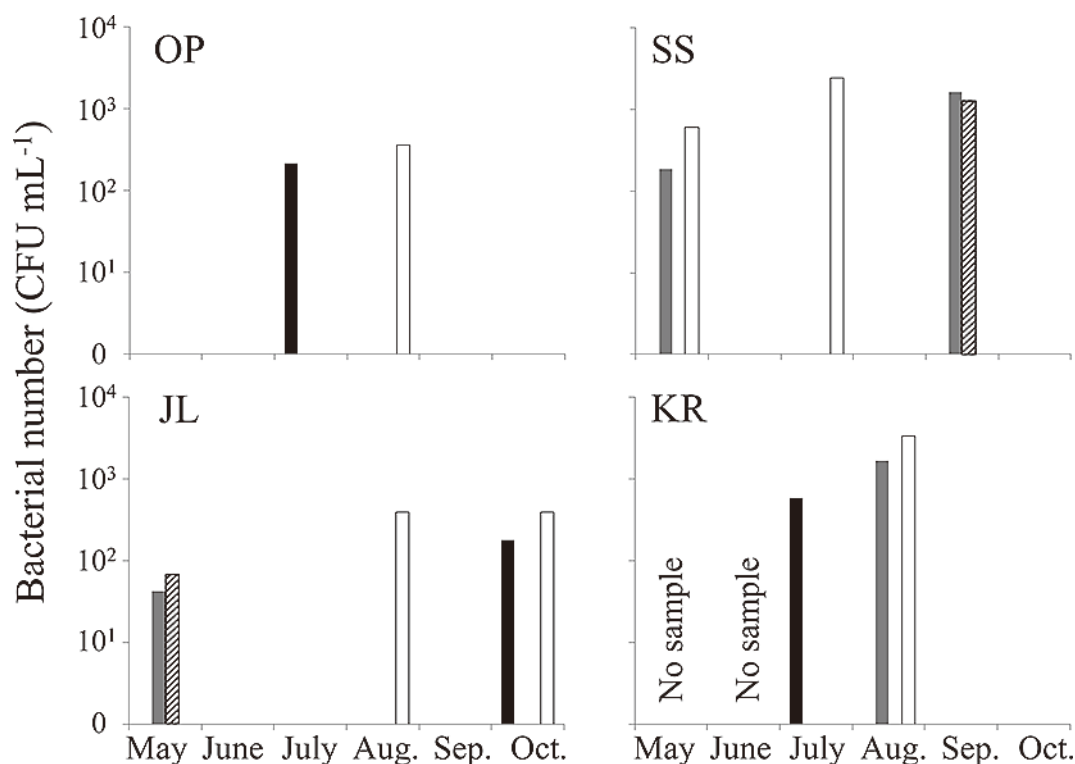


Fig. 10. Number of algicidal bacteria (PAB : ■, FLB : ▨) and growth-inhibiting bacteria (PAB : ■, FLB : □) against *M. aeruginosa* from the water samples collected at OP, SS, JL and KR.

動物プランクトンがワカサギの捕食を受けて、大きく減少していることが知られており、これらが相乗的に作用すると考えられている(石川ら, 1998; 石川, 2000)。特に湧水の影響が強い SS では流入負荷量の影響が強く、流入負荷量が少ない JL ではワカサギの影響が相対的に強かったと考えられる。OP ではクロロフィル *a* 濃度が 8 月に最大値を示した。これは *M. aeruginosa* などによる小規模なアオコ発生時期と重なっており、8 月の OP では SS や JL におけるクロロフィル *a* の変動要因以上にアオコの発生の影響が強かったと考えられる。高野ら(1998)は、大沼の植物プランクトンの増殖はリンによって制限されていると考える一方で、藍藻類の増殖および集積に適した物理的条件が整った場合には、特に 8 月前後にアオコの大量発生が認められる可能性を指摘しており、今回のパッチ状のアオコの発生は水温や光強度の上昇によって引き起こされたと考えられる。KR のクロロフィル *a* 濃度は、他の地点より栄養塩が豊富であったのにもかかわらず、格段に低い値を示した。宮下ら(2015)によると KR のヒシ帯の河川水における植物プランクトンのほとんどが付着珪藻類であり、密度は $100 \text{ cells mL}^{-1}$ 以下と低く、これらはヒシ BF 由来の珪藻であることが示されている。2013 年時の KR の面積は約 $10,000 \text{ m}^2$ で処理水量は $3,600 \text{ m}^3/\text{day}$ とされているため(北海道七飯町, 2013), KR の平均水深を 1 m とした場合、滞留時間は約 2.78 日と見積もられる。一般的にアオコは数日間、淡水赤潮は 1 週間程度

で倍増するといわれ、滞留時間が 5 日間程度以下のダム貯水池では、水の華の発生は少ないとされる(井芹, 1998)。そのため、KR ではプランクトンが増殖する前に流されてしまい、クロロフィル *a* 及び植物プランクトンが少なかった可能性が考えられる。

細菌の生息密度

湖水中の総細菌数は一般的に貧-中栄養の水域で 10^5 - $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 、富-汚染水域においては 10^6 - $10^7 \text{ cells mL}^{-1}$ であり(吉永・前田, 2000), ヨシ BF に生息する総細菌数は周りの湖水中のおよそ 200 倍以上に達するとされている(Yamamoto et al., 2005; 奥西, 2005)。本研究の結果はこれらの知見とほぼ一致していた。総細菌のうち培地にコロニーを形成することができるものの割合は非常に小さく、ほとんどは生きているが培養できない(viable but nonculturable: VBNC または VNC)状態であると報告されている(Olson and Bakken, 1987)。本研究においても、総細菌に占める培養可能細菌の割合はヨシ BF 試料で 1-20%、湖水中の PAB で 0.1-17%, FLB は 0.05-5 % であった。自然環境中において殺藻細菌の一部は VBNC 状態に陥っており、アオコを形成する藍藻類との間には平衡状態が保たれているなどの報告があるが(Chen et al., 2012), VBNC 状態の細菌に関しては不明な点が多く、今後は水理環境やアオコの発生との関係性を解明していく必要がある。

アオコの制御と殺藻微生物

二者培養試験の結果、大沼国定公園内の各定点におけるヨシ BF 中に *M. aeruginosa* に対する殺藻及び増殖阻害細菌が高密度で生息することが確認された。特筆すべきは、人工的に植栽したヨシ (KR) から、自生するヨシの BF と同様に高密度で殺藻及び増殖阻害細菌が生息することが確認された。人工水路やポットなど、人工的な環境下で栽培されたヨシの BF から殺藻細菌が検出されており (今井, 2010; 扇, 2011), 今回は荻濶川で栽培されたヨシ BF から殺藻細菌が検出されたため、ヨシの造成が細菌を通じたアオコ防除能を発揮する可能性がより大きく示唆された。検出された殺藻細菌に関しては明瞭な季節変動は確認されず、調査期間を通じて全体的に高密度で検出された。ヨシ BF に生息する微生物は水温と光強度の上昇により、種類も数も多くなると報告されており (Yamamoto et al., 2005; 奥西, 2005), ヨシ帯によるアオコ防除能も季節変動する可能性が考えられる。今後は周年を通じた精度の高い調査が必要である。

湖水試料に関しては、ヨシ帯である SS, JL, KR の3地点において PAB と FLB からヨシ帯が存在しない OP よりも高頻度で殺藻及び増殖阻害細菌が検出された。ヨシ BF 試料から高密度で殺藻及び増殖阻害細菌が検出されたことから、湖水試料で検出された細菌はヨシ BF 由来の可能性が考えられる。また FLB と PAB からは同程度に殺藻及び増殖阻害細菌が検出されたが、殺藻細菌は PAB として水中により多く存在すると報じられている (Park et al., 2010; 扇, 2011)。そのため、ヨシ帯付近ではヨシ BF が剥離した際に一部が FLB となって湖水中に存在している可能性が考えられ、今後の調査研究が必要である。

まとめと展望

本研究では、大沼国定公園内の湖沼でアオコを抑制する殺藻細菌及び増殖阻害細菌を探索した。その結果、ヨシ BF やヨシ帯の湖水からそのような活性を有する多くの細菌が検出された。特に KR のヨシ BF 及び湖水試料からでも検出されたことから、人工的に造成したヨシ帯でも細菌を通じてアオコを抑制する働きを保有することが示された。今井 (2010) によると、琵琶湖のヨシ茎 BF 中には水中の 1,000 倍程度の密度の殺藻及び増殖阻害細菌が検出されたこと、ポットや人工水路で栽培したヨシ BF の微生物によってアオコが抑制されたこと、ヨシ帯の無い湖水では、殺藻及び増殖阻害細菌がヨシ帯の湖水の 1/10 以下であったことが報告されている。これらのことは本研究とほとんど一致し、琵琶湖の場合と同様、大沼国定公園のヨシ帯にも大きなアオコ防除能が保有されていることを支持する結果となった。従って、ヨシ帯によるアオコ防除の実用化には、VNC 状態である細菌の評価やアオコ防除能の季節変動、ヨシ由来の細菌と他の植物プランク

トンの関係、ヨシ BF の捕食者 (巻貝など)、アオコ防除能の定量化など今後解決すべき課題があり、さらなる研究が必要である。しかしながら、ヨシ帯が保有するアオコ防除能の有用性が高いことが示唆された。

ヨシは湖沼や河川の沿岸部に生息する抽水植物であり、根を通じて窒素やリンを吸収するため水質浄化機能を保有していること、湖岸の浸食防止に有用なこと、水鳥や魚の産卵、生息の場を提供するなど、沿岸域の生態系の維持に大きく貢献すると位置づけられ、ヨシ帯の保全及び植栽活動は推奨されている (水産庁, 2009)。ヨシ BF 起源の殺藻細菌や増殖阻害細菌によるアオコの発生予防は環境に優しい優れたアオコ対策になるものと大いに期待されるため、今後は殺藻細菌の供給源としてアオコを防除する新たなヨシの可能性をふまえつつ、地域にあったヨシ帯と人間の適度な関係の創造が望まれる。

謝 辞

大沼国定公園での調査において、数々の貴重なデータ及び御助言を賜りました北海道教育大学教育学部の田中邦明教授、七飯町環境生活課自然環境係の小林 暁係長及び小林 卓主事、ならびに大沼合同遊船 (株) の代表者である小泉 真様を始めとする同社の皆様に心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Shapley, A.N. and Smith, V.H. (1998) Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, **8**, 559-568.
- Chen, H., Fu, L., Luo, L., Lu, J., White, W. L. and Hu, Z. (2012) Induction and resuscitation of the viable but nonculturable state in a cyanobacteria-lysing bacterium isolated from cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology*, **63**, 64-73.
- Herry, S.E., Fathalli, A., Rejeb, A.J. and Bouaicha, N. (2007) Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia. *Water Research*, **42**, 1263-1273.
- 北海道 (1982) 湖沼水質管理指針策定調査一大沼一。
- 北海道七飯町 (2013) 平成 24 年度湖沼自然浄化活用事業委託業務 (北海道七飯町大沼) 報告書。
- 一瀬 諭・若林徹哉・藤原直樹・水嶋清嗣・伊藤 貢 (2001) 琵琶湖における植物プランクトン現存量の変遷について。滋賀県立衛生環境センター所報, **36**, 29-35.
- Imai, I. (1987) Size distribution, number and biomass of bacteria in intertidal sediments and seawater of Ohmi Bay, Japan. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, **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 Research Communications*, **24**, 201-212.
- 今井一郎 (2011) 有害有毒赤潮の生物学 (15) 殺藻細菌による赤潮プランクトンの殺藻機構-I. 海洋と生物 **194**, **33**, 254-259.
- 今井一郎・吉永都生 (2002) 微生物利用の大展開。赤潮の

- 予防と駆除. pp. 881-888, 今中忠行・加藤千明・加藤暢夫・倉根隆一郎・西山 徹・矢木修身(編), エヌ・ティー・エス, 東京.
- Imai, I., Kim, M.C., Nagasaki, K., Itakura, S. and Ishida, Y. (1998) Relationships between dynamics of red tide-causing raphidophycean flagellates and algicidal micro-organisms in the coastal sea of Japan. *Phycological Research*, **46**, 139-146.
- Imai, I., Yamamoto, T., Ishii, K. and Yamamoto, K. (2009) Promising prevention strategies for harmful red tides by seagrass beds as enormous sources of algicidal bacteria. Proceeding of 5th World Fisheries Congress, Tokyo. 6C_0995_133.
- 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水中及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.
- 井芹 寧(1998) ダム貯水池における淡水赤潮とアオコの発生機構および対策について. 九州技報, **23**, 33-40.
- Ishida, Y., Eguchi, M. and Kadota, H. (1986) Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, **30**, 197-203.
- 石川 靖(2000) 北海道渡島大沼の環境の長期的変遷. 国立環境研究所研究報告, **153**, 98-123.
- 石川 靖・三上英敏・斉藤 修・坂田康一・今田和史・安富亮平・竹内勝巳・高野敬志・檜垣直幸・伴 修平・吉田丈人・竹内泰介・青野哲大・高山恵理子(1998) 環境保全と魚類生産に対する水生植物の寄与に関する研究. 平成9年度共同報告書.
- 環境省(2013) 日本のラムサール条約湿地-豊かな自然・多様な湿地の保全と賢明な利用. 環境省, 東京.
- 木原一樹(2009) ヨシ帯におけるアオコ原因藍藻 *Microcystis aeruginosa* 増殖阻害細菌に関する研究. 京都大学農学研究科修士論文.
- Kim, M.C., Yoshinaga, I., Imai, I., Nagasaki, K., Itakura, S. and Ishida, Y. (1998) A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series*, **20**, 1069-1078.
- Liu, G., Fan, C., Zhong, J., Zhang, L., Ding, S., Yan, S. and 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.
- 宮下洋平・小林淳希・田中邦明・今井一郎(2015) 北海道荊間川の遊水池に播種したヨ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.
- 農林水産省(2012) 農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書. pp. 34-72, 農村復興局農村環境課 農林水産省, 東京.
- 扇 航平(2011) ヨシ帯起源の細菌を活用したアオコの発生抑制に関する生理生態学的研究. 北海道大学大学院水産科学院海洋生物資源科学科修士課程論文.
- 奥西将之(2005) バイオフィーム入門 環境の世紀の新しい微生物像. pp. 93-112, 日本微生物生態学会バイオフィルム研究部会(編), 日科技連, 東京.
- Olsen, R.A. and Bakken, L.R. (1987) Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology*, **13**, 59-74.
- Park, J., Yoshinaga, I., Nishikawa, T. and Imai, I. (2010) Algicidal bacteria in particle-associated form and in free-living form during a diatom bloom in the Seto inland Sea, Japan. *Aquatic Microbial Ecology*, **60**, 151-161.
- Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. (1984) Determination of Chlorophylls and Total Carotenoids: Spectrophotometric Method. In A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, 101-112. Pergamon Press, New York.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, **25**, 943-948.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. and Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, **24**, 417-428.
- 西条八東・三田村緒佐武(1995) 新編 湖沼調査法, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 水産庁(2009) 環境・生態系保全活動の手引き. pp. 8-9, 水産庁, 東京.
- 高野敬志・石川 靖・三上英敏・伴 修平・今田和史・安富亮平・竹内勝巳(1998) 渡島大沼, 小沼, 蕁菜沼の底泥表面から抽出されたリン濃度と植物プランクトン現存量. 北海道衛生研究所所報, **48**, 55-60.
- 田中義人(2011) 富栄養化した湖沼でみられるアオコ問題について. 九州環境管理協会会報 環境管理, **40**, 29-38.
- 渡辺泰徳(1994) アオコの生物学と生態学. pp. 1-24, 渡辺真利代・原田健一・藤木博太(編), アオコ water bloom その出現と毒素, 東京大学出版会, 東京.
- Watanabe, M.M. and Ichimura, T. (1977) Fresh and salt-water forms of *Spirulina platensis* in axenic cultures. *Bulletin Japanese Society for Phycology*, **25**, 371-377.
- Yamamoto, M., Murai, H., Takeda, A., Okunishi, S. and Morisaki, H. (2005) Bacterial Flora of the Biofilm Formed on the Submerged Surface of the Reed *Phragmites australis*. *Microbes and Environments*, **20**, 14-24.
- 芳村 毅・工藤 勲(2001) 渡島大沼における栄養塩濃度の季節変化と植物プランクトンの生長制限要因. 陸水学会誌, **62**, 206-217.
- Yoshimura, T., Kudo, I., Yanada, M. and Matsunaga, K. (2000) Change in the water quality in Lake Ohnuma, Hokkaido, Japan: a comparison of 1977 and 1996. *Limnology*, **1**, 63-68.
- 吉永郁生・前田俊道(2000) 直接計数法. pp. 81-84, 石田祐三郎・杉田治男(編), 海洋環境アセスメントのための微生物実験法, 恒星社厚生閣, 東京.
- Zimmermann, R., Iturriaga, R. and Becker-Birck, J. (1978) Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, 926-935.