HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	かび臭を産生する有害藍藻Dolichospermum crassumの細菌を用いた制御に関する研究
Author(s)	清水, 武俊
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13091号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13091
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80820
Type	doctoral thesis
File Information	Taketoshi_Shimizu.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

かび臭を産生する有害藍藻 *Dolichospermum crassum* の細菌を用いた制御に関する研究

(Studies on control of the musty odor producing cyanobacterium *Dolichospermum crassum* by using of algicidal bacteria)

北海道大学大学院水産科学院

海洋生物資源科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences

Division of Marine Bioresource and Environmental Science

清水　武俊

Taketoshi Shimizu

平成 30 年（2018）

目　次

第 1 章　序　論.....1

第 2 章　烏原貯水池から分離された *Dolichospermum crassum* に対する殺藻細菌の特性

第1節　緒　言.....6

第2節　材料および方法

2-1　試料採取.....7

2-2　理化学的水質項目の測定.....7

2-3　植物プランクトンの計数.....8

2-4　従属栄養細菌の分離.....8

2-5　殺藻試験.....9

2-6　系統解析.....9

2-7　殺藻細菌の初期添加密度の違いによる *D. crassum* の増殖への影響.....12

2-8　溶藻した培養濾液が *D. crassum* の増殖に与える影響.....13

2-9　殺藻細菌の過酸化水素生成能.....13

第3節　結　果

3-1　環境要因.....13

3-2　植物プランクトンの変動.....14

3-3　殺藻試験.....15

3-4　殺藻細菌の形態.....15

3-5　系統解析.....16

3-6　殺藻細菌の初期添加密度の違いによる *D. crassum* の増殖への影響.....17

3-7　溶藻した培養濾液が *D. crassum* の増殖に与える影響.....18
3-8　殺藻細菌の過酸化水素生成能.....18
第4節　考　察.....18

第 3 章　烏原貯水池における *D. crassum* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の季節変動
第1節　緒　言.....26
第 2 節　材料および方法
2-1　試料採取.....26
2-2　理化学的水質項目の測定.....27
2-3　植物プランクトンの計数.....27
2-4　全細菌数の計数.....28
2-5　従属栄養細菌の計数.....28
2-6　殺藻試験.....29
第 3 節　結　果
3-1　環境要因.....30
3-2　植物プランクトンの変動.....31
3-3　*D. crassum* の変動.....33
3-4　全細菌および従属栄養細菌の変動.....33
3-5　貯水池表層水における殺藻細菌および増殖阻害細菌の変動.....35
第 4 節　考　察.....38

第 4 章　水草が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響
第 1 節　緒　言.....44

第 2 節　材料および方法

2-1　試料採取.....45

2-2　理化学的水質項目の測定.....45

2-3　植物プランクトンの計数.....46

2-4　水草帯の湖水中の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響.....46

2-5　水草表面の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響..... 48

2-6　従属栄養細菌の計数.....50

2-7　殺藻試験.....51

第 3 節　結　果

3-1　環境要因.....52

3-2　水草帯の湖水中の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響.....53

3-3　水草表面の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響.....56

3-4　従属栄養細菌数の変動.....57

3-5　殺藻細菌数および増殖阻害細菌の変動.....58

第 4 節　考　察.....60

第 5 章　総合考察.....66

要　約.....72

謝　辞.....76

参考文献.....78

第1章　序　論

我が国において，高度成長に伴い，1960 年代から 1970 年代にかけて湖沼の富栄養化が進行し，アオコや淡水赤潮だけでなく，水道水のかび臭が発生した (橋本，1971；琵琶湖異臭調査小委員会，1988; Hsieh et al., 2010；小澤・宮原，2015)。利水の生物障害はその後も増加し，1990 年代前半に件数は最多となった。また，障害の内訳として，1960 年代後半までは濾過閉塞の割合が多かったが，1970 年代以降は大部分を異臭味が占めるようになり，次いで濾過閉塞や漏出が障害の原因になっている。その後も異臭味が最も高い割合を占め，2001 年 (平成 13 年度) から 2002 年 (平成 14 年度) にかけて全国の事業体に聞き取り調査を行った結果，生物障害事例数のうち，異臭味が 49%と最も多かった (日本水道協会，2006)。また，2010 年 (平成 22 年度) から 2012 年 (平成 24 年度) にかけて行われた調査によると，異臭味が 63%，次いで濾過漏出が 17%となり，10 年前に比較して，濾過閉塞の報告数が減少した一方で，異臭味や濾過漏出の報告数が増加した (秋葉ら，2015)。

厚生労働省が公表した異臭味被害事業者および異臭味被害人口の推移を Fig. 1-1 に示した (厚生労働省健康局水道課，2015)。調査を開始したのは 1983 年 (昭和 58 年度) であるが，異臭味被害人口は増加し続け，1990 年 (平成 2 年度) には 2，000 万人を超え，その後減少に転じた。これは浄水処理方法の改善が行われたことに起因しており，高度浄水処理の導入件数は 1990 年代に急増した (水道技術研究センター，2009)。しかしながら被害事業体数はあまり減少しておらず，近年は増加傾向さえも示している。これは，高度浄水処理の導入が主に大規模事業体で行われた一方で，中小規模の事業体では導入が進んでいないことが原因である。それゆえ，未だ異臭味被害は解消されていないことになる。

なお, 異臭味の内訳を Fig. 1-2 に示したが, かび臭が最も多く, 次いで魚臭が多い (厚生労働省健康局水道課, 2015)。

岸田らが全国の事業体から聞き取り調査を行った結果によると, 異臭味の発生場所として, 95%がダムや湖沼が原因であることが明らかになった (Kishida et al., 2015)。一方で, 近年は河床に付着性の糸状性藍藻類が繁殖してかび臭を発生する事例 (角田ら, 2014; 日野ら, 2015) や, 水源で発生するプランクトンの種類が変化し凝集不良 (藤原ら, 2012) や消毒副生成物の濃度上昇 (羽根ら, 2014) の例など, 新たな問題も報告されている。

異臭味原因生物の変遷

かび臭の原因生物として, 1970 年代から 1990 年代中頃までの間は *Phormidium* 属や *Oscillatoria* 属など, 付着性の糸状性藍藻類が多く報告されていた (日本水道協会, 2009)。しかしながら, *Phormidium* 属による異臭味発生件数については 1990 年 (平成 2 年度) をピークにその後減少した。一方で, この頃から浮遊性藍藻類の *Dolichospermum* (*Anabaena*) 属による異臭味発生件数が増加しており, 2001 年 (平成 13 年度) から 2002 年 (平成 14 年度) にかけて行われた全国事例調査の結果では, 異臭味被害の原因生物として, *Dolichospermum* 属が最も多くなった (日本水道協会, 2006)。なお, この傾向は現在も続いている (Kishida et al., 2015)。

神戸市の状況

国内の他の水域と同様に, 神戸市の貯水池においても植物プランクトンの遷移に伴い, 近年はさまざまな浄水処理障害が発生している。神戸市最大の水源である千苅貯水池では, 1951 年 (昭和 26 年) に国内で初めてかび臭が報告され

た (川北, 1951)。その後 1970 年 (昭和 45 年) からかび臭が頻繁に発生するようになり, 特に 1981 年 (昭和 56 年) および 1982 年 (昭和 57 年) においては, *P. tenue* が著しく増殖し, 強いかび臭 (2-MIB) が感じられた (神戸市水道局, 1982, 1984)。しかし, 近年 *Phormidium tenue* の発生頻度は減少傾向である。一方で, 1995 年 (平成 7 年) 頃から *Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann et Komárek (syn.: *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnová et Cronberg) (Wacklin et al., 2009) の増殖が確認され, 近年は高濃度のかび臭 (ジェオスミン) 発生が続いている。また, *Dolichospermum* 属については, 近年種類が多様化しており, 2000 年代初頭は検出されたのは 3 種類であったが, 現在は 10 種類も検出されるようになった (清水ら, 2016)。貯水池や浄水場において対応を行う際, 検出された *Dolichospermum* 属を正確に同定し, かび臭産生能を判断する必要がある。しかしながら, かび臭を産生する種と産生しない種の形態は酷似したものが多く, それらが同時に検出されると, 識別が困難になる。

千苅貯水池では, *Microcystis* 属によるアオコが 1973 年 (昭和 48 年) に初めて確認され, 近年は継続的に発生している (清水ら, 2016)。また, 濾過池から漏出することにより, 濾過水濁度上昇の原因となるピコプランクトン (Butcher, 1952; Sieburth et al., 1978; 一柳ら, 1999; 保尊ら, 2002; 川畑ら, 2005) については 2002 年 (平成 14 年) から監視を行っており, 毎年夏から秋にかけて発生しているが, 目立った被害は発生していない。

これらの対策として, 適切な取水口の選択取水により, 被害を低減している。また, 浄水場では, 粒状活性炭を用いることにより, 異臭味の除去を行っている。さらに, 有害藍藻類の増殖が見られた際は, 貯水池において応急的に硫酸銅を散布して殺藻を行なっているが, 予防的に発生を抑えることは現状不可能である。

殺藻細菌について

海洋や湖沼では，赤潮プランクトンやアオコの原因となる*Microcystis*属の有毒種を殺滅する殺藻細菌が存在し，これらのプランクトンの増減に影響を及ぼすことが報告されている (Imai et al., 1991, 1993, 1995, 2013; 今井, 2010; Li et al., 2015; Harvey et al., 2016)。また，沿岸域では，赤潮プランクトンと連動して殺藻細菌が増加することが観察されており，赤潮の消滅に大きな役割を果たしていることが報告されている (Imai et al., 1998, 2001; Kim et al., 1998)。さらに殺藻細菌は，海藻やアマモ葉体表面のバイオフィルム中に高密度で生息することが報告されており，藻場やアマモ場の造成が環境修復と同時に，有害有毒プランクトンの発生抑制の手段になるとして，可能性が注目されている (Imai et al., 2002, 2006, 2013, 2014; 今井ら, 2009, 2016; Onishi et al., 2014; Inaba et al., 2017)。

神戸市の貯水池において，*D. crassum* が発生し減少する際に，多数の細菌が付着し分解していく様子が日常検査の中で観察されている。また，*D. crassum* が減少する際には，動物プランクトンや原生動物，鞭毛虫など，他の生物による捕食は確認されていないことから，貯水池における *D. crassum* の動態に対して，細菌が大きく影響しているものと推察された。その後，殺藻細菌の存在が明らかになり，これらを有効に活用できれば，貯水池における *D. crassum* の増殖を制御する手段としても期待される。

これまで湖沼などの陸水生態系において，Table 1-1 に示したような藍藻類に対する殺藻細菌が分離されている。しかしながら，かび臭の原因となる *D. crassum* に対する殺藻細菌の報告例は認められず，このような機能をもつ細菌の探索は重要課題であった。

そこで本研究では，まず *D. crassum* に対する殺藻細菌を分離し，その特性を調べるとともに，貯水池における挙動を調査することを目的とした。第 2 章では，

烏原貯水池において, *D. crassum* に対する殺藻細菌の分離に成功し, 性状調査を行った結果を述べる。続いて第 3 章では, 貯水池における殺藻細菌の季節変動を調査した結果を報告する。また, 殺藻細菌は水草の表面のバイオフィルム中に高密度で生息することが近年報じられていることから, 第 4 章では水草帯における殺藻細菌の生息密度や, 水草が *D. crassum* の増殖や生残に与える影響について調査を行った。最後に第 5 章では, 烏原貯水池における調査研究結果と水草帯における結果とを比較し, かび臭発生抑制における水草の有効性について検証した。

第 2 章　烏原貯水池から分離された *Dolichospermum crassum* に対する殺藻細菌の特性

第1節　緒　言

水道事業では，安全で良質な水を供給することが第一に必要である。しかしながら，富栄養化した水源の貯水池において異常繁殖した植物プランクトンがかび臭を産生した結果，水道水に着臭する事が大きな問題となっている。その主な原因生物は藍藻類の *Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann et Komárek (syn.: *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnová et Cronberg) (Wacklin et al, 2009) である。*D. crassum* が貯水池で発生した場合，応急的に硫酸銅を散布して殺藻しているのが現状であり，予防的に発生を抑えることは難しい (清水ら, 2016)。

海洋では赤潮プランクトンを溶藻する「殺藻細菌」が単離され，それらは海藻やアマモ葉体の表面のバイオフィルム中に高密度で生息することが報告されている (Imai et al., 2002, 2006, 2013, 2014; 今井ら, 2009, 2012, 2016)。一方，*D. crassum* に対する殺藻細菌に関しては報告例が皆無であった。そこで本章では，神戸市の烏原貯水池において，*D. crassum* の減少期に表層水から殺藻細菌を単離し，その性状を調べた。

第2節　材料および方法

2-1　試料採取

試料水の採取は，神戸市の水源である烏原貯水池 (34°41'28.3" N, 135°09'30.4" E) において行った (Fig. 2-1)。烏原貯水池は，新湊川水系の石井川及び天王谷川を水源とし，神戸水道局創設時の水道施設として布引貯水池 (1900 年完成) に続いて建造され，1905 年 (明治 38 年) に完成した貯水池である。ダムの正式名称は立ヶ畑堰堤で，有効貯水量 1,350,000 m^3，最大水深 19.2 m の水道専用ダムである。なお，貯水池は富栄養化が著しく，毎年アオコやかび臭が発生している。

2010 年 4 月から 2011 年 3 月まで，貯水池取水塔前の表層水を毎月採取し，窒素，リン，クロロフィル a 濃度などの水質試験，および植物プランクトンの同定と計数に供した。また，2010 年 10 月 26 日には，滅菌した耐熱性捻口ガラス瓶に表層水を採取し，殺藻細菌の分離に供した。

2-2　理化学的水質項目の測定

採取した試料水の水質について，以下の方法により測定した。

・全窒素：紫外線吸光光度法 (上水試験方法，日本水道協会，2011)

・全リン：ペルオキソ二硫酸カリウム分解法 (上水試験方法，日本水道協会，2011)

・クロロフィル a 濃度：吸光光度法 (上水試験方法，日本水道協会，2011)

2-3　植物プランクトンの計数

採水した試料は持ち帰り後，直ちに植物プランクトンの同定と計数を行った。試料を標準計数板 (MPC-200, MATSUNAMI, Japan) に封入，静置後，光学顕微鏡 (BX-50, OLYMPUS, Japan) を用いて *D. crassum* などの植物プランクトンの観察と計数を行った。また，藍藻類の *Microcystis* 属の細胞数の計数は，以下の手順で行った (日本水道協会, 2011)。まず，10 mL の試料水を 15 mL 容遠沈管 (ポリプロピレンコニカルチューブ, FALCON, USA) に入れ，10% (vol/vol) 次亜塩素酸ナトリウム溶液を 100 µL 添加後，ボルテックス (VORTEX-2 GENIE, SCIENTIFIC INDUSTRIES, USA) により激しく攪拌した。続いて超音波処理 (IUC-7321, TOCHO, Japan) を 3 分間行った後，20 µL の試料を血球計数板 (Erma, Japan) に封入した。これを光学顕微鏡により，倍率 200 倍で計数した。

2-4 従属栄養細菌の分離

2010 年 10 月 26 日に採取した烏原貯水池表層水について，R2A 寒天培地 (Reasoner and Geldreich, 1985) を用いて従属栄養細菌の分離を行った。まず，採取した試料水を試験所に持ち帰ると，直ちに滅菌水を用いて 10 倍シリーズの段階希釈を行い，1 mL ずつ滅菌したシャーレに入れた。ここに溶解した R2A 寒天培地 (DAIGO, NIHON PHARMACEUTICAL, Japan) を約 10 mL 加え，混釈して固化させた。この寒天平板試料は温度 20℃で 14 日間培養し，増殖したコロニーを計数した。続いて各コロニーを，白金耳を用いて釣菌し，別の R2A 寒天培地に塗布後，温度 20℃で培養して純粋なコロニーを合計 47 株分離した。

2-5　殺藻試験

分離した 47 株の従属栄養細菌の *D. crassum* に対する殺藻能力を, 2 者培養により試験した (Fig. 2-2)。藍藻 *D. crassum* は 2008 年 6 月 25 日に神戸市の水源の千苅貯水池から分離し, 無菌化した株を用いた。*D. crassum* を, CT 培地 (Watanabe and Ichimura, 1977) を用いて温度 25℃, 光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 明暗周期 16 時間明-8 時間暗のサイクルで, 恒温培養庫 (NK-system, NIPPON MEDICAL & CHEMICAL INSTRUMENTS, Japan) で後期対数増殖期まで培養した。これを最終密度が 1.2×10^4 cells mL^{-1} (5×10^2 coils mL^{-1}) となるように CT 培地で希釈後, 3 mL ずつ滅菌した捻口ガラス試験管 (ST-16.5S, NICHIDEN-RIKA GLASS, Japan) に入れた。それらに分離した従属栄養細菌のコロニーを, 白金耳を用いて 1 株ずつ接種後, 上述の藍藻の培養条件で 7 日間培養し, 溶藻の有無を肉眼および顕微鏡により観察した。また, 細菌を接種しない試験管をコントロールとした。溶藻が確認された試料については, 再度同様の方法にてコロニーを *D. crassum* 培養液に接種し, 溶藻が起きることを確認した。

2-6　系統解析

2010 年 10 月 26 日に烏原貯水池の表層水から分離した合計 47 株の従属栄養細菌について, 16S rRNA 遺伝子の解析により, 同定を行った。まず, 47 株全ての細菌株について 16S rRNA 遺伝子の V3 領域 (約 500 bp) を PCR 増幅した。続いて, PCR 産物について Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE:変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)を行うことにより, 塩基対配列が同じ

菌株ごとにグループ分けした (Muyzer et al., 1993)。最後にそれぞれのグループから 1 株ずつ選び, 遺伝子解析を行った。なお, 2-5 の殺藻試験において得られた 3 株の殺藻細菌については, 改めて DNA 抽出と PCR を行い, 16S rRNA 遺伝子の全長の塩基対配列の解析を行った。

2-6-1 DNA 抽出, PCR

2-4 において R2A 寒天培地に分離した従属栄養細菌 47 株ついて, 白金耳を用いて各コロニーを釣菌した。0.2 mL 容 PCR チューブに滅菌水を 20 μL 入れ, ここに釣菌した細菌を懸濁した。懸濁液をサーマルサイクラーで 99.9℃で 15 分間加熱し, DNA を抽出した。抽出した DNA に, 10x *Ex Taq* buffer を 10 μL, dNTP mixture を 8 μL, 27f-GC primer (Table 2-1) を 50 pmoL, 517r primer (Table 2-1) を 50 pmoL, *TaKaRa Ex Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) を 0.5 μL 添加した。続いて 27f-GC および 517r を用いて以下の条件により PCR を行い, 16S rRNA 遺伝子の一部 (約 500bp) を増幅した。反応条件は 94ºC (2 分 30 秒) の熱変性, 94ºC (30 秒), 55ºC (30 秒), 72ºC (1 分) のサイクルを 25 回, 72ºC (7 分) の熱処理である。反応後, PCR 産物を 1.5% (wt/vol) アガロースで電気泳動後 (100V, 30 分) エチジウムブロマイド (最終濃度, 0.5 μg mL^{-1}) で染色し, 紫外線を照射し, 増幅された DNA バンドを確認した。

一方, 3 株の殺藻細菌 (K-12, K-28, K-44) については 16S rRNA 遺伝子の全長解析を行った。まず, DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Japan) の ATL バッファーにコロニーを懸濁後, -80℃ (3 分), 37℃ (1 分) のサイクルを 5 回繰り返しによる凍結融解法を行った。続いて Kit により DNA を抽出, 精製した。上述の 27f および 1492r のプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の全長を PCR 増幅した。反応条件は 94ºC (2

分) の熱変性, 94ºC (1 分), 55ºC (1 分), 72ºC (2 分) のサイクルを 30 回, 72ºC (8 分) の熱処理とした。

2-6-2 DGGE

PCR 増幅産物を, 変性剤の濃度勾配が 20–60%に設定されたアクリルアミドゲルを用い, 75V, 15 時間で電気泳動を行い (Muyzer et al., 1993), DNA バンドの位置およびコロニーの形態に基づき各従属栄養細菌をグループ分けした。

2-6-3 シークエンス解析

各グループの従属栄養細菌から, 1 株を選定し, 全てのグループの代表株 (計 17 株) について dideoxy 法により, ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いてシークエンス解析を行った。プライマーは 27f および 517r (Table 2-1) を用いた。なお, 3 株の殺藻細菌のシークエンス解析には, Table 2-1 に示したプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の全長を解析した。

2-6-4 BLAST 解析と系統樹の作成

シークエンス解析で得られた DNA 配列について, National Center for Biotechnology Information が提供する相同性検索ウェブサイト (NCBI database) を用いて BLAST 検索を行い, 分離した細菌を同定した。また, それぞれの配列について, 近隣結合法により系統樹の作成を行った (DNA Data Bank of Japan)。

3株の殺藻細菌の16S rRNA遺伝子の配列はGenBankに以下のaccession番号で登録した。K-12株，LC054835; K-28株，LC054836; K-44株，LC054837。

2-7 殺藻細菌の初期添加密度の違いによる*D. crassum*の増殖への影響

殺藻細菌の初期添加細胞密度と*D. crassum*の増殖の関係を調べた。まず，後期対数増殖期まで培養した*D. crassum*をプラスチック培養フラスコ (Tissue Culture Flask with Vented Cap, IWAKI, Japan) に濃度が8.7×10^4 cells mL^{-1} (3.8×10^3 coils mL^{-1}) となるように入れた。これにR2A液体培地により，20℃で後期対数増殖期まで静置培養した細菌K-44株を最終密度が10^2 cells mL^{-1}，および10^4 cells mL^{-1}となるように接種した。その後，温度25℃で光強度21 μmol m^{-2} s^{-1}，16時間明-8時間暗の明暗サイクルにて7日間培養した。試験は3本立で行った。また，細菌を添加していないものをコントロールとした。培養期間中，*D. crassum*の密度や形態の変化を光学顕微鏡を用いて観察し，同時に計数を行った。また，総細菌数は，SYBR GREEN I染色による直検法 (Noble and Furman, 1998) により計数した。すなわち，1.5 mL容の滅菌したエッペンドルフチューブに培養を1 mL取り，SYBR GREEN I (Molecular Probes, Eugene, USA) を1/10,000倍濃度となるように添加後，暗所にて30分間染色した。染色した試料を孔径0.2 μmのポリカーボネートブラックメンブレン (Whatman, UK) に濾過し，封入剤 (SlowFade Gold antifade reagent, Thermo Fisher Scientific, USA) で封入後，落射型蛍光顕微鏡 (BX-50, OLYMPUS, Japan) を用いて，B励起光を照射して倍率1,000倍にて観察と計数を行った。

2-8　溶藻した培養濾液が *D. crassum* の増殖に与える影響

上記 2-7 で *D. crassum* と K-44 株の 2 者培養により溶藻した培養を孔径 0.2 μm の PTFE メンブレン (OMNIPORE, Merck Millipore, Germany) で濾過し, 無菌の濾液を得た。後期対数増殖期まで培養した *D. crassum* の培養 0.5 mL (最終密度 : 5.0×10^{2} coils mL^{-1}) を捻口試験管に入れ, 前述の溶藻した培養濾液を 4.5 mL 添加した。その後, 温度 25℃で光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルにて 7 日間培養した。試験は 2 本立にて行った。また, 濾液の代わりに CT 培地を 4.5 mL 添加した試料をコントロールとした。培養期間中, *D. crassum* の細胞密度や形態の変化を, 光学顕微鏡を用いて観察, 計数した。

2-9　殺藻細菌の過酸化水素生成能

Prussian blue 生成試験 (Saito et al., 2007) により, 殺藻細菌 (K-44 株) の過酸化水素産生能の有無を調べた。すなわち, 前培養した K-44 株のコロニーを釣菌し, Prussian Blue 寒天培地に塗布後, 温度 20℃で培養し, コロニー周辺の色の変化を確認した。

第3節　結　果

3-1　環境要因

2010 年 4 月から 2011 年 3 月までの烏原貯水池表層水における水温の変化を Fig. 2-3 に示した。水温は 4 月から 9 月にかけて高くなる傾向が見られ, 9 月に

最高の31.1℃を記録し，その後急激に低下した。最低水温は2月の3.7℃であった。Fig. 2-4 A に貯水池表層水における全窒素および全リン濃度の変化を示した。全窒素は，6月 (0.29 mg L^{-1}) を除いて年間 0.44–0.89 mg L^{-1} と高い濃度が維持された。4 月から 6 月にかけて低下の傾向が見られたが，その後上昇し，11月には 0.89 mg L^{-1} に達した。全リンは，4 月から 6 月にかけて横這いであったが，7 月および 8 月に急上昇し，最高 0.1 mg L^{-1} に達した。その後，急激に低下し，2月には最低 0.013 mg L^{-1} となった。クロロフィル a 濃度は，5.8–130 μg L^{-1} の間で変動し，6 月に 130 μg L^{-1}，翌年 1 月には 64 μg L^{-1} と 2 回ピークが確認された (Fig. 2-4 B)。

3-2 植物プランクトンの変動

2010 年 4 月から 2011 年 3 月まで貯水池表層水中の植物プランクトンを観察，計数した結果を Table 2-2 および Table 2-3 に示した。また検出された植物プランクトンの総数と *D. crassum* の変動を Fig. 2-5 に，植物プランクトンの組成の割合については Fig. 2-6 に示した。植物プランクトンの総細胞数は，年間で 2.7×10^{2}–3.3×10^{5} cells mL^{-1} と季節により大きく変動した。また 7 月に 3.3×10^{5} cells mL^{-1}，10 月に 1.2×10^{5} cells mL^{-1} と 2 回のピークが確認された。4 月から 6 月にかけては，緑藻類が優占し，総細胞数の 78–99%を占めた。7 月から 12 月には *Microcystis* 属や *Dolichospermum* 属などの藍藻類が優占し，総細胞数の 69–99.8%を占め，この期間アオコが発生しているのが確認された。

D. crassum は 8 月から 11 月にかけて検出され，10 月 4 日には 2.8×10^{4} cells mL^{-1} と最大に達し，総細胞のうち 23%を占めたが，その後急激に減少した。顕微鏡により形態を観察したところ，10 月 4 日までの増加期間中は，トリコームに付着

した細菌は少なく, トリコームの長いものが多数を占めた。ところが減少期の 10 月 26 日および 11 月 1 日には, 多数の細菌がトリコームに付着し, トリコームの螺旋がやや収縮しているのが観察された (Fig. 2-7)。

2011 年 1 月から 2 月にかけては珪藻類が優占し, 総細胞のうち 67–92%を占めた。3 月は藍藻類の *Aphanizomenon flos-aquae* が増殖し, このとき総細胞のうち藍藻が 98%を占めた。

3-3 殺藻試験

烏原貯水池において 2010 年 10 月 26 日に採取した表層水中の従属栄養細菌数は 3.9×10^3 CFU mL^{-1} であった。ここから 47 株を分離し, 殺藻試験を行ったところ, 3 株 (K-12 株, K-28 株, K-44 株) が溶藻活性を示した。そのため, 従属栄養細菌に占める殺藻細菌の割合 (陽性率) は 6%となり, 表層水中における殺藻細菌数は 2.5×10^2 CFU mL^{-1} と算出された。

これらの細菌は *D. crassum* の栄養細胞だけでなく, アキネートも分解した (Fig. 2-8)。細菌はいずれも運動性を有し, *D. crassum* の粘質鞘に付着後, 徐々に細胞に接近して最後には溶藻した。また殺藻過程で *D. crassum* のトリコームは収縮して断片化するという形態変化が見られた。一方で, 残りの 44 株の細菌については細菌を接種しても *D. crassum* は増殖しており, 増殖と生存に影響を与えなかった。

3-4 殺藻細菌の形態

単離された 3 株の殺藻細菌の形態について, 光学顕微鏡を用いて観察した

(Fig. 2-9)。すべての株は桿菌で鞭毛による運動性を示し, 以下の特徴を有していた。

K-12 株:長径 2.0-3.2 μm, 短径 0.4-0.5 μm, 桿菌, 運動性あり。

K-28 株:長径 1.9-3.4 μm, 短径 0.3-0.4 μm, 桿菌, 運動性あり。

K-44 株:長径 2.2-3.5 μm, 短径 0.3-0.5 μm, 桿菌, 運動性あり。

コロニーの性状は 3 株とも平滑で丸く, 色素を有しなかった。なお, K-28 株のみ R2A 寒天培地上で培養を行った際, コロニーの周辺に灰色の色素を分泌し, 時間が経過するにつれてコロニー周辺がやや黒く変化した。

3-5 系統解析

2010 年 10 月 26 日に採取した烏原貯水池の表層水から分離した従属栄養細菌について, 16S rRNA 遺伝子の解析を行い同定した。まず 47 株全ての細菌について 16S rRNA 遺伝子の V3 領域 (約 500 bp) を PCR 増幅した。続いて PCR 産物を DGGE により, 遺伝子配列が同じ菌株ごとにグループ分けした。DGGE の結果, 電気泳動で検出された DNA バンドの位置から 47 株の従属栄養細菌は 17 のグループに分けられた。また, 同じグループに属する細菌のコロニーの形態が全て同一であることを確認し, DGGE による細菌のグループ分けに誤りがないことを確かめた。

遺伝子解析の結果, 47 株の従属栄養細菌のうち, 27 株が *Gammaproteobacteria* 綱 (57%), 13 株が *Bacteroidetes* 門 (28%), 6 株が *Betaproteobacteria* 綱 (13%), 1 株が *Firmicutes* 門 (2%) と同定された (Fig. 2-10)。最も多く検出された 18 株 (代表株:K-42) は *Gammaproteobacteria* 綱の *Aeromonas veronii* に 100%の相同性を示した (Fig. 2-11)。2 番目に多かった 6

株 (代表株:K-4) は *Gammaproteobacteria* 綱の *Rheinheimera* sp. (accession no. GQ240227) に一致した (identity:100%)。続いて 4 株 (代表株:K-20) が uncultured bacterium clone (accession no. JN398135) に 99%の相同性を示し, *Bacteroidetes* 門に分類された。これらの株はいずれも殺藻能力を持たなかった。

D. crassum に対して殺藻能力を有する 3 株は全て *Gammaproteobacteria* 綱クロマチウム科の *Rheinheimera* 属に分類された (Fig. 2-12)。そのうち, K-12 株は *R. texasensis* (accession no. NR 043133) に 99.4%, K-44 株は *R. texasensis* (accession no. GQ284452) に 99.7%の相同性を示した。また, K-28 株は *R. chironomi* (accession no. NR 043699) に 98.5%の相同性を示した。

3-6 殺藻細菌の初期添加密度の違いによる *D. crassum* の増殖への影響

Fig. 2-13 に殺藻細菌 K-44 株を最終密度が 10^2 および 10^4 cells mL^{-1} となるように添加した際の *D. crassum* 数の変化を示した。細菌を添加しなかった実験区では, 培養開始後 *D. crassum* は順調に増加し, 7 日目には 2.2×10^5 cells mL^{-1} (9.6×10^3 coils mL^{-1}) に達した。一方, 細菌を添加した実験区においては, 培養開始後 1 日目にはやや *D. crassum* の数が増加したものの, 2 日目以降は減少した。また細菌を 10^2 cells mL^{-1} 添加した場合よりも 10^4 cells mL^{-1} 添加した実験区の方が, *D. crassum* の減少速度は速く, 溶藻の速さは初期の殺藻細菌の密度によって影響を受けることが分かった。本細菌株は *D. crassum* のトリコームの粘質鞘に付着後, 時間の経過とともに細胞に接近し, 最終的に溶藻させていることが観察された。細菌数は培養開始と同時に急激に増加し, *D. crassum* が減少し始めた 2 日目には, 初期添加密度が 10^2 cells mL^{-1} の実験区では 6.8×10^6 cells mL^{-1}, 初期添加密度が 10^4 cells mL^{-1} の実験区では 1.2×10^7 cells mL^{-1} とピーク

に達した。その後，徐々に減少した。

3-7　溶藻した培養濾液が *D. crassum* の増殖に与える影響

溶藻後の培養濾液を *D. crassum* に添加したときの変化を Fig. 2-14 に示した。濾液を添加した実験区および無添加の実験区における *D. crassum* はいずれも培養開始後順調に増加し，両者の数にほとんど差は認められなかった。また，濾液を添加した実験区においては溶藻やトリコームの収縮などは観察されず，濾液は溶藻に影響しないことが明らかになった。

3-8　殺藻細菌の過酸化水素生成能

殺藻細菌 K-44 株について，過酸化水素の生成能を平板培養法による Prussian blue 生成試験 (Saito et al., 2007) により調査した。その結果，細菌の増殖とともに，コロニーの周辺が青く変色しているのが確認され，本細菌株が過酸化水素を生成することが明らかになった (Fig. 2-15)。

第 4 節　考　察

本研究では，殺藻細菌を分離するにあたり，烏原貯水池の水質や植物プランクトンについて通年調査を行った。貯水池では 7 月から 12 月の長期間にわたり藍藻類が優占していた。これは貯水池の富栄養化が著しく窒素とリンの濃度が高いこと，および滞留時間が長く一度形成された生物相が崩れにくいことが原因

と考えられる。烏原貯水池は，1905 年に建設された水道専用ダムであるが，流域に民家や耕地などの汚濁源が分布し，富栄養化により毎年アオコやかび臭の問題が発生している。

なお，富栄養化は建設当初から進行していたことが報告されている (神戸市水道局，2001)。それによると，もともと池底には，旧烏原村を沈めた際の泥土が多く，加えて周辺耕地からの流入もあったため，ダムが完成して 4 年後の 1909 年 (明治 42 年) には，コイ，フナ，ウナギなどが増え始めた。このような魚類の繁殖の功罪については，水道にとって好結果をもたらすという意見と悪影響をもたらすという意見の賛否両論があったため，1919 年 (大正 8 年) に当時京都帝国大学の戸田博士に調査を依頼し，微生物調査などを行った。その結果，「多種多数の魚類の繁殖は歓迎すべきで，むしろ増殖を図るべきである」との結論が出された。すなわち，魚によって餌となるものが違い，魚類が多様であればあるほど，各種の微生物が摂取されるわけで，貯水池の魚類はあくまでも保存されるべきであるというもので，神戸市もその説に従った。その後，昭和 30 年代から上流域の鈴蘭台地区で住宅化が進み，昭和 40 年代には最も水質が悪化した。

1974 年 (昭和 49 年) に下水道が整備されてから，貯水池の水質は改善されているが，依然，毎年アオコやかび臭が発生している。なお，現在は貯水池の水を浄水処理して上水としての利用はされていない。

調査期間中の烏原貯水池表層水における全リンの平均濃度は 0.042 mg L^{-1}，クロロフィル a の平均濃度は 30 µg L^{-1}，最高濃度は 130 µg L^{-1}，平均透明度は 2.5 m，最小透明度は 1.5 m であった。これは OECD (1982) の基準によれば，富栄養から過栄養に分類される。また，橋本 (1986) は，国内の湖沼および貯水池の栄養塩濃度とかび臭の発生についての調査を行ったところ，全窒素年平均濃度が 0.6 mg L^{-1} 以上および全リンの年平均濃度が 0.02 mg L^{-1} 以上でかび臭

の発生率が高くなることを報告している。調査期間中の烏原貯水池の全窒素の年平均濃度は 0.62 mg L^{-1}, 全リンの年平均濃度は 0.042 mg L^{-1} と高く, 橋本 (1986) が報告したかび臭発生基準を超過していた。また, 7 月から 10 月にかけて水温が 24–31℃と高く, 藍藻によるアオコやかび臭が発生するのに十分な環境が整っていたと考えられる。藍藻類の異常発生は, 浄水処理を行う上で, 藍藻毒やかび臭の発生, 凝集不良, 濾過水濁度の上昇など, さまざまな悪影響を及ぼす。しかしながら, 調査を行った期間は 2011 年 3 月を除いて, 導水しなかったため, 浄水処理上の問題は生じなかった。

貯水池では 7 月から 10 月にかけて藍藻類が著しく増殖したが, その主要なものとしては, 7 月は *M. aeuginosa* が優占しており, 3.2×10^{5} cells mL^{-1} と高い値で検出された。その後本種は急速に減少した。9 月から 10 月にかけては *M. wesenbergii* と *D. crassum* が同時に著しく増殖した。Li and Li (2012) は, *M. aeruginosa* と *Anabaena* sp. PCC7120 を混合培養した場合, これらは競合する傾向があり, アレロパシー物質としてミクロキスチンが作用したことを示唆している。一方, *M. wesenberigii* と *Anabaena* sp. PCC7120 の組み合わせで培養を行った場合, *M. wesenberigii* が *M. aeruginosa* に比較して低いリン濃度でも生育できるため, 大きな競合は生じなかったことを報告している。また, *M. aeruginosa* のアレロパシー作用により, *M. wesenberigii* の増殖も抑制されることが報告されている (Yang et al., 2014)。貯水池では, 2010 年 7 月の表層水における全リン濃度は 0.085 mg L^{-1} と高かったが, 9 月には 0.048 mg L^{-1} と急激に低下し, 以降減少が続いた (Fig. 2-4 A)。アオコの構成種がこのように変化した要因の一つとして, 7 月はリン濃度が高く, ミクロキスチンを産生する *M. aeuginosa* にとって有利な条件となった一方で, 9 月から 10 月にかけてはリン濃度が低下したため, 比較的低いリン濃度でも適応可能な *M. wesenbergii* と *D. crassum* が同時に増殖したものと

考えられる。

D. crassum の減少期の 2010 年 10 月 26 日 (Fig. 2-5) に貯水池表層水から従属栄養細菌を分離して, 16S rRNA 遺伝子の解析により, 同定を行った。その結果, 貯水池から分離した 47 株の従属栄養細菌のうち, *Gammaproteobacteria* 綱の *Aeromonas* 属や *Rheinheimera* 属が 57%と多数を占めた。一般に淡水では, *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, *Bacteroidetes* 門, *Actinobacteria* 門, *Verrucomicrobia* 門が主に検出されている (Zwart et al., 2002; Boucher et al., 2006)。一方で, 藍藻のブルーム時に採取した細菌相は *Gammaproteobacteria* 綱が優占しており, 中でも *Aeromonas* 属が多数であることが報告されている (Berg et al., 2009)。また, 湖水に易分解性の有機物を添加して培養を行なうと, *Gammaproteobacteria* 綱の *Aeromonas* 属や *Rheinheimera* 属が特異的に増加したと報告されており (Pinhassi and Berman, 2003), これらの細菌が水中の物質循環において重要な役割を果たしていることが示唆されている。このような傾向は今回の研究結果と一致する。貯水池において従属栄養細菌の分離を行った時期はアオコの分解期にあたり, 多量の有機物が供給されたためにこれらの細菌が増加したものと推察される。

Berg et al. (2009) は, 分離した従属栄養細菌について, *Microcystis* 属および *Dolichospermum* 属の増殖に対する影響を調べた。その結果, *Aeromonas* 属については *Microcystis* 属の増殖をわずかに促進するか影響せず, *Dolichospermum* 属の増殖には影響しなかった。一方, *Rheinheimera* 属は *Microcystis* 属の増殖には影響を与えないが, *Dolichospermum* 属の増殖を促進する結果となっており, いずれも殺藻能力を持たなかった。今回の研究においても, *Aeromonas* 属については分離された全ての株が *D. crassum* に対して殺藻活性を示さなかった。また, *Rheinheimera* 属についても分離された 9 株のうち 6

株は *D. crassum* に対して殺藻活性を示さず, 同様の傾向が見られた。したがって, アオコ末期では一部の種類の細菌が殺藻を行い, その他ほとんどの細菌は有機物分解に関与しているものと推察される。なお, 同じ *Rheinheimera* 属であっても殺藻能力を有するものと有さないものが存在する結果となったが, 殺藻能力は種や株によって異なることが報告されている (Kondo et al., 1999; Kondo and Imai, 2001)。

16S rRNA 遺伝子の解析の結果, 3 株の殺藻細菌は, *Gammaproteobacteria* 綱クロマチウム科の *Rheinheimera* 属の種と同定された。そのうち K-12 株は *R. texasensis* (accession no. NR 043133) に 99.4%, K-44 株は *R.texasensis* (accession no. GQ284452) に 99.7%の相同性を示した。また, K-28 株は *R. chironomi* (accession no. NR 043699) に 98.5%の相同性を示した。

Rheinheimera 属は海洋 (Brettar et al., 2002), 淡水 (Merchant et al., 2007; Chen et al., 2010b), 河川から採取された魚の卵 (Halpern et al., 2007) などさまざまな水環境から分離されている。

これまで湖沼における藍藻類に対する殺藻細菌として, *Agrobacterium vitis* (Imai et al., 2013), *Lysobacter* sp. (Mitsutani et al., 1987), *Myxobacter* sp. (Daft and Stewart, 1971), *Myxococcus fulvus* (Burnham et al., 1981), *Pseudomonas fluorescens* (Oshimi et al., 2005), *Xanthomonas* sp. (Walker and Higginbotham, 2000)などが報告されているが, *Rheinheimera* 属に関する報告は本研究が初である。また, *Rheinheimera* 属には過酸化水素 (Chen et al., 2010a) や colicin V (Gupta et al., 2011) などの微生物に対する拮抗物質を産生する種が報告されている。本研究において, Prussian blue 生成試験を行った結果, 殺藻細菌 K-44 株は過酸化水素を生成することが確認された。過酸化水素は強力な酸化剤であり, 殺菌剤 (Baldry, 1983) や有機物分解の促進 (Andreozzi et al., 1999; Rosal et

al., 2009) に用いられている。また, 過酸化水素の殺菌のメカニズムとして, 細胞膜の損傷や細胞内酵素を阻害することにより, 細胞を破壊することが報告されている (川崎ら, 1970)。今回の調査研究で分離された 3 株の殺藻細菌は, 栄養細胞だけでなく, アキネートも分解する強い殺藻能力を持っていた。また, 添加する細菌数が多いほど殺藻が早く進行するが, 初期の細菌添加密度が 10^2 cells mL^{-1} と少量でも十分に殺藻が起きることが明らかになった。一方で, *D. crassum* と K-44 株の 2 者培養により溶藻した培養濾液を再度 *D. crassum* に添加しても溶藻は生じず, 増殖に影響を与えなかった。これらの結果から, 殺藻が過酸化水素により行われていたものと推察される。過酸化水素は水中に放出されると速やかに反応して消失する特性を持つため, 培養濾液を添加しても溶藻が起きなかったものと考えられる。効果的に殺藻を行うには, 細菌が *D. crassum* の細胞と直接接触することが必要である。実際に, 分離した 3 株の殺藻細菌が *D. crassum* を殺藻する際, 細菌がトリコームに付着後, 粘質鞘を分解しながら内部に侵入し, 最後は栄養細胞を分解することが観察されている。また, 3 株の殺藻細菌は鞭毛による運動能力を有するため, 環境水中において宿主まで移動し, 効率よく接触するために有利である。

これまで細菌など微生物が産生する殺藻物質として, 過酸化水素 (Barroin and Feuillade, 1986; Chen et al., 2010a; Ma et al., 2015), プロテアーゼ (Lee et al., 2000; Paul and Pohnet, 2011), L-histidine (Yadava and Singh, 1979), L-phenyl alaninine (Hall and Jensen, 1980), lisine および malonic acid (Kaya and Sano, 1996), L-lisine (Takamura et al., 2004), 1-methyl-β-carboline (Kodani et al., 2002) が報告されているが, 過酸化水素は他の物質に比較して作用スペクトラムが幅広い。*R. texasensis* に関しては産生した過酸化水素が, グラム陰性細菌, 陽性細菌, 酵母, 緑藻類などの様々な微生物に対して拮抗作用

を示したことが報告されている (Chen et al., 2010a)。

一方で, *D. crassum* はこれらの殺藻細菌による攻撃に対して防御機構を有するものと考えられる。まず, *D. crassa* は栄養細胞の周りに厚い粘質鞘を作っているが (Leak, 1967), これは殺藻細菌の侵入を物理的に妨げるだけでなく, 過酸化水素が細胞に到達する前に粘質鞘の有機物と反応し消費されるため, 細胞が直接過酸化水素に接触するのを防ぐ役割を果たす。また, 過酸化水素を分解するカタラーゼやペルオキシダーゼを細胞内に産生する (Obinger et al., 1999; Bernroitner et al., 2009; Chakravarty et al., 2016)。しかしながら, 殺藻細菌は高密度でトリコームに付着し, 粘質鞘を分解しながら栄養細胞に接近するため, 最終的には細胞に到達する。また, カタラーゼやペルオキシダーゼは細胞内に存在するため, 外部からの過酸化水素の接触には耐性が低いものと考えられる。以上のような特性により, 大部分の *D. crassam* が殺藻細菌の働きにより, 溶藻するものと考えられる。

ところで, 貯水池において *D. crassum* のトリコームは, 増殖後期に細菌の侵入とともにやや収縮する傾向が見られた。このような形態変化は *D. crassum* と殺藻細菌の混合培養においても観察されたが (Fig. 2-8), これはトリコームの表面積を小さくすることで, 細菌の侵入を防ぐのに有利であると考えられる。一般に, 動物プランクトンや植物プランクトンでは, 捕食者が分泌する物質 (カイロモン) に反応して形態変化することが知られているが (Hessen and van Donk, 1993; von Elert and Franck, 1999), *D. crassum* についても同様の現象が起きている可能性がある。細菌の付着状況やトリコームの収縮の程度は, *D. crassum* の増減を予測する上で重要な情報になるものと考えられる。

日常検査において, *D. crassum* の減少期には, 細菌以外の捕食者は確認されなかったことから, 貯水池において細菌が *D. crassum* の増殖を制御する大きな

役割を担っているものと考えられる。また，多数の細菌がトリコームに付着し，内部まで侵入後，細胞を分解していることが確認されていることから (Fig. 2-7)，付着による殺藻が環境においても大きく寄与している可能性が高い。

これまでは，水道に異臭味被害をもたらす *D. crassum* に対する殺藻細菌の報告は皆無であったが，本研究によって，*D. crassum* に対する殺藻細菌を初めて分離することができた。これらは強い殺藻能力を持つことから，現場環境中において *D. crassum* の分解に重要な役割を果たしているものと考えられる。

第 3 章　烏原貯水池における *D. crassum* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の季節変動

第1節　緒　言

第 2 章では, かび臭を産生する有害藍藻 *D. crassum* の減少期に烏原貯水池から殺藻細菌を分離し, その特性を検討した。貯水池では, 富栄養化により毎年 *D. crassum* や *Microcystis* が増殖し, アオコやかび臭が発生している。これらの有害有毒藍藻類は夏から秋にかけて優占的に増殖しており, その期間は他の生物による捕食や分解などの影響をあまり受けていないものと考えられる。貯水池には殺藻細菌が生息するが, 年間を通じてどの程度の密度で存在するかは明らかでない。本章では, 烏原貯水池において殺藻細菌の季節変動について調査研究を行った結果を述べる。

第2節　材料および方法

2-1　試料採取

2013 年 4 月から 2015 年 3 月まで, 烏原貯水池の取水塔前の表層水を月 1 回採取した (Fig. 2-1)。採取した試料は, ただちに水質試験所へ持ち帰り, 試験に供した。なお, 2014 年 7 月には, 貯水池内で藍藻類によるアオコが発生したため, 対策として硫酸銅の散布を 7 月 29 日に行った。また散布前後における藍藻類の動態を監視するため, 7 月から 8 月にかけて, 試料の採取頻度を以下のとおり増やした。7 月は 7 月 1 日, 7 月 4 日, 7 月 11 日, 7 月 24 日および 7 月 30 日,

8 月は 8 月 1 日, 8 月 4 日, 8 月 8 日, 8 月 13 日および 8 月 18 日に試料水を採取した。

調査期間中, 烏原貯水池では, 池の水を河川へ放流することにより貯水池水位を満水位より約−4 m で維持する運用が行われた。また, 貧酸素化を防止するため, 4 基の全層曝気装置を稼働しており, 水温躍層は一年を通して形成されなかった。なお, 奥平野浄水場の原水として本貯水池の水の取水は行われなかった。

2-2 理化学的水質項目の測定

採取した貯水池表層水の全窒素, 全リンおよびクロロフィル a 濃度については, 第 2 章の第 2 節 2-2 と同様の方法により, 測定を行った。また, pH, アンモニア態窒素, 亜硝酸態窒素および硝酸態窒素濃度については, 以下の方法により測定した。なお, 2014 年 7 月および 8 月は 7 月 1 日および 8 月 18 日に採取した試料水について水質の測定を行った。

・pH:ガラス電極法 (厚生労働省告示第 261 号 別表第 31, 厚生労働省, 2017)

・アンモニア態窒素:イオンクロマトグラフ法 (上水試験方法, 日本水道協会, 2011)

・亜硝酸態窒素, 硝酸態窒素:イオンクロマトグラフ法 (厚生労働省告示第 261 号別表第 13, 厚生労働省, 2017)

2-3 植物プランクトンの計数

試料は持ち帰り後, 直ちに植物プランクトン計数を行った。試料水を標準計数

板 (MPC-200, MATSUNAMI, Japan) に封入, 静置後, 光学顕微鏡 (BX-50, OLYMPUS, Japan) を用いて植物プランクトンの計数を行った。また, 藍藻類の *Microcystis* 属の細胞数の計数は, 第 2 章第 2 節 2-3 で述べた手順に従った。

D. crassum の計数については, 1 mL の試料水を界線入枠付きスライドガラス (RIGO, Japan) に封入し, 光学顕微鏡を用いて計数した。計数は 3 回繰り返した。

2-4 全細菌数の計数

全細菌の計数は 2013 年 6 月から 2014 年 10 月にかけて行った。試料水は採取後, 25%グルタルアルデヒドを最終濃度が 1%になるように添加して冷蔵保存した。DAPI を最終濃度が 1 μg mL^{-1} となるように添加し, 5 分間染色後, 孔径 0.2 μm のポリカーボネートブラックメンブレン (Whatman, UK) で濾過した。封入剤 (SlowFade Gold antifade reagent, Thermo Fisher Scientific, USA) で封入後, 蛍光顕微鏡を用いて WU 励起光を照射し, 倍率 1000 倍にて 10 視野を計数した。計数は 3 回繰り返した。

2-5 従属栄養細菌の計数

従属栄養細菌の計数は 2013 年 5 月から 2014 年 10 月まで実施した。R2A 液体培地を用いて, 試料水を 10 倍シリーズで段階希釈後, それぞれの試料を 1 mL ずつシャーレに入れ, R2A 寒天培地を混釈, 固化した。なお, 2014 年 7 月から 10 月にかけての試料については, 試料水を滅菌した孔径 3 μm のポリカーボネートメンブレン (Whatman, UK) で濾過した。フィルター上の細菌を「粒子付着性

細菌 (Particle Associated Bacteria: PAB) 区分」, 濾液中の細菌を「浮遊性細菌 (Free-Living Bacteria: FLB) 区分」とした。粒子付着性細菌については, 濾過捕集したフィルターを R2A 寒天培地上に静置した。浮遊性細菌については, それぞれの試料水を 1 mL ずつシャーレに入れ, R2A 寒天培地を混釈, 固化した。培養は 3 本立で行った。各試料を温度 20℃で 14 日間培養後, 寒天平板内に生育したコロニーを計数した。なお, 粒子付着性細菌の計数については, フィルター上のコロニーが重なることが多かったことから, 全従属栄養細菌数 (無処理の試料水中の細菌) から浮遊性細菌数を差し引いて算出した。

2-6 殺藻試験

上記 2-5 で増殖したコロニーを白金耳で釣菌後, 新たな R2A 寒天培地に塗布して, 温度 20℃で培養し, 再度コロニーを形成させて株を純化した。細菌の分離は各月の試料について 100 株ずつ行なった。

殺藻試験に用いる *D. crassum* は, CT 培地を用いて温度 25℃, 光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルで後期対数増殖期まで培養後, 最終密度が 1.2×10^4 cells mL^{-1} (5×10^2 coils mL^{-1}) となるように CT 培地で希釈, 3 mL ずつ滅菌した捻口ガラス試験管 (ST-16.5S, NICHIDEN-RIKA GLASS, Japan) に入れた。これに分離した従属栄養細菌を 1 株ずつ白金耳で釣菌し, 接種した。細菌は各月の試料につき 100 株ずつ接種した。また, 細菌を接種しない培養をコントロールとした。温度 25℃, 光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルで 7 日間培養し, *D. crassum* の増殖の程度や溶藻の有無を肉眼および顕微鏡により観察した。藻体がほとんど分解したものを「殺藻陽性」, 死滅には至らないが, コントロールと比較して, 明らかに増殖が遅いものを「増殖阻

害」と判定した。なお，溶藻が確認された試料については，再度同様の方法にてコロニーを *D. crassum* の培養に接種し，培養後，溶藻が起こることを確認した。各月の試料について，100 株あたりの殺藻細菌および増殖阻害細菌を計数し，全従属栄養細菌数に陽性率を乗じることにより，それぞれの細菌数を算出した。

第 3 節　結　果

3-1　環境要因

調査期間中の貯水池における環境要因の測定結果を Fig. 3-1 および 3-2 に示した。貯水池表層の水温は，調査期間中 6.0–29.8℃の間で変動した (Fig. 3-1 A)。6 月から 10 月にかけて 20℃を上回り，最高水温は 2013 年度で 29.8℃ (2013 年 8 月)，2014 年度は 27.5℃ (2014 年 8 月および 9 月) であった。最低水温は，2013 年度は 6.0℃ (2014 年 1 月)，2014 年度は 6.4℃ (2015 年 2 月) であった。pH は期間を通じて 7.7–9.3 の間で変動した (Fig. 3-1 B)。植物プランクトンが光合成を行うことにより，水中の炭酸が消費された結果 pH が上昇するため，プランクトンの活動が活発な夏から秋にかけて高く，冬から春に低い傾向が見られた。全窒素は 0.35–0.85 mg L^{-1} の間で変動した (Fig. 3-1 C)。2013 年は 10 月に最高 0.85 mg L^{-1}，2014 年は 8 月に 0.81 mg L^{-1} となった。一方，硝酸態窒素については，2013 年は 6 月から 9 月にかけて，2014 年は 7 月，10 月および 11 月に定量下限未満となり，植物プランクトンに完全に利用されているものと考えられた。全リンは夏から秋にかけて上昇する傾向が見られ，2013 年は 7 月に最高 0.037 mg L^{-1}，2014 年は 8 月に 0.060 mg L^{-1} となった (Fig. 3-2 A)。その影響に

より TN/TP は夏から秋にかけて低下し, 2013 年は 7 月に最低値 9, 2014 年は 7 月に最低の 12 と低い値を示した (Fig. 3-2 B)。

クロロフィル a 濃度は, 年 2 回のピークが見られた。2013 年は, 6 月および 10 月にそれぞれ 41 μg L^{-1}, 22 μg L^{-1}, 2014 年は 6 月および 10 月にそれぞれ 44 μg L^{-1}, 47 μg L^{-1} と高くなった (Fig. 3-2 C)。

3–2　植物プランクトンの変動

貯水池における植物プランクトン数の変動を Fig. 3-3 に示した。また, 植物プランクトンの組成の変動については Fig. 3-4 に示した。2013 年 4 月から 2014 年 3 月までの貯水池表層水における植物プランクトン数のピークは, 8 月 (3.7×10^4 cells mL^{-1}) および 10 月 (9.4×10^4 cells mL^{-1}) の 2 回確認された (Fig. 3-3 A)。冬から春にかけては, 珪藻類や緑藻類が優占したが, 6 月から 12 月にかけては, 藍藻類が優占し, 全細胞数の 45–97%を占めた (Fig. 3-4 A)。

採取した試料水中の植物プランクトンの計数結果を Table 3-1 から 3-6 に示す。4 月は貯水池内の生物は少なく, 取水塔前の表層で 2.4×10^2 cells mL^{-1} であった (Table 3-1)。水温の上昇とともに, 5 月から大型緑藻類の *Closterium aciculare* や *Staurastrum dorsidentiferum* が増加した。6 月には *S. dorsidentiferum* がさらに増加し, 表面で 1.6×10^3 cells mL^{-1} 検出された。また, アオコの原因となる藍藻類の *Aphanizomenon flos-aquae* や *Microcystis* 属が検出され始めた。7 月はこれらに加え, かび臭の原因となる *D. crassum* が 1.6×10^2 cells mL^{-1} とわずかに検出され始めた。8 月になると *Microcystis* 属がさらに増加し, 沿岸部でアオコが確認された。9 月は, *Microcystis* 属が減少した一方で, *D. crassum* が増加し, 取水塔前の表層水で 1.5×10^3 cells mL^{-1} 検出された。10 月

には *Microcystis* 属が再び増加した (Table 3-2)。*D. crassum* は減少し，ほとんど検出されなくなった。また，大型緑藻類の *Mougeotia* sp. が増加し，表面で 4.5×10^3 cells mL^{-1} 検出された。*Microcystis* 属は 11 月においても多く，表面で 5.3×10^4 cells mL^{-1} 検出され，アオコの発生は 8 月から 11 月まで続いた。そのため，12 月上旬に貯水池上流部を中心に硫酸銅を散布した。その結果，*Microcystis* 属は殺藻され，以降は検出されなくなった。1 月から 3 月までは珪藻類および緑藻類が優占した。

2014 年 4 月から 2015 年 3 月にかけての植物プランクトン数のピークは，7 月 24 日 (1.2×10^6 cells mL^{-1})，8 月 8 日 (6.8×10^4 cells mL^{-1})，および 10 月 7 日 (4.9×10^4 cells mL^{-1}) の計 3 回確認された (Fig. 3-3 B)。また，7 月から 8 月上旬にかけて藍藻類が増殖し，全細胞数の 97–99.9%を占めた (Fig. 3-4 B)。

4 月は貯水池内の生物は少なく，取水塔前の表層水中で植物プランクトンの総数は 5.0×10^2 cells mL^{-1} であった。5 月から大型緑藻類の *Closterium aciculare* が増加した (Table 3-3)。6 月にはアオコの原因となる藍藻類の *Microcystis* 属が検出され始めた。7 月は緑藻類が減少した一方で，藍藻類が増加し，貯水池全面で *Microcystis* 属によるアオコが発生し，池周辺では腐敗臭が感じられた。この対策として，7 月 29 日に硫酸銅を散布した結果，藍藻類は散布当日中に色素が退色し，死滅した。また，当日はプランクトンの死骸が浮遊しており，池は白濁したが，3 日目の 8 月 1 日には，貯水池は透明になり，周囲では，臭気も感じられなくなった。その後，散布後 10 日目の 8 月 8 日から 20 日目の 8 月 13 日にかけて *Ankistrodesmus falcatus*, *Kirchneriella* sp. などの小型の緑藻類が急激に増加したが，その後 10 日ほどで検出されなくなった。

8 月下旬は，小型緑藻類の *Coelastrum cambricum* や *Micractinium pusillum* が多数検出された。9 月から 10 月にかけて珪藻類が増加した。特に 10 月は

Aulacoseira granulata が表層で 2.1×10^4 cells mL^{-1} と多数検出された。11 月から 1 月にかけて, 大型緑藻類の *Closterium aciculare* が継続して多数検出された。本種は 12 月には 2.4×10^3 cells mL^{-1} 検出された。2 月は黄金色藻類の *Ochromonas* sp. やクリプト藻類の *Cryptomonas caudata* など, 小型鞭毛藻類が増加した。3 月はこれらに代わり, 珪藻類の *Nitzschia acicularis* が優占し, 表層で 3.0×10^3 cells mL^{-1} 検出された。

3-3 *D. crassum* の変動

Fig. 3-5 に貯水池表層水における *D. crassum* の密度の変動を示した。2013 年において, *D. crassum* は 7 月から検出され始めた。7 月と 8 月の検出数はそれぞれ 1.6×10^2 cells mL^{-1} (7 coils mL^{-1}) および 4.6×10^1 cells mL^{-1} (2 coils mL^{-1}) と少なかったが, 9 月に増加し, 1.5×10^3 cells mL^{-1} (6.5×10^1 coils mL^{-1}) に達した。このとき, *D. crassum* 細胞数が全植物プランクトン細胞数に占める割合は 9.3%であった (Fig. 3-6)。10 月には 1.6×10^1 cells mL^{-1} (0.7 coils mL^{-1}) と減少し, その後は検出されなくなった。

2014 年は, 7 月 1 日に 9.2×10^1 cells mL^{-1} (4 coils mL^{-1}), 4 日に 1.1×10^3 cells mL^{-1} (4.8×10^1 coils mL^{-1}) 検出されたが, その後は消滅し, 発生は続かなかった (Fig. 3-5)。なお, 7 月 4 日において *D. crassum* 細胞数が全植物プランクトンの細胞数に占める割合は 0.3%と低かった (Fig. 3-6)。

3-4 全細菌および従属栄養細菌の変動

全細菌数は 2013 年 6 月から 2014 年 10 月まで計数したが, 1.6×10^6–9.9×10^6

cells mL^{-1} の間で変動した (Fig. 3-7)。全体的に夏から秋にかけて細菌数は多くなり, 冬から春にかけて低くなる傾向が見られた。2013 年 6 月から 12 月にかけての最高密度は 4.2×10^6 cells mL^{-1}（9 月 3 日）であった。2014 年は 1 月 20 日に 3.2×10^6 cells mL^{-1} と一旦増加したが, その後 2 月 17 日は 2.3×10^6 cells mL^{-1}, 3 月 4 日は 1.7×10^6 cells mL^{-1} と減少した。4 月以降は増加傾向が見られ,5 月 19 日に 1 回目の増殖ピーク (5.0×10^6 cells mL^{-1}) が確認された。また, 7 月 29 日にアオコ対策のため硫酸銅を散布したが,散布翌日の 7 月 30 日に 9.9×10^6 cells mL^{-1} と急増した。しかし, その 2 日目の 8 月 1 日には 5.5×10^6 cells mL^{-1} と半減し, その後急激に減少した。

従属栄養細菌は全細菌と概ね同様の変動を示した (Fig. 3-8)。2013 年は 5 月以降増加し, 8 月 6 日に 4.9×10^3 CFU mL^{-1} 検出され,ピークに達した。その後減少し, 11 月には 8.7×10^2 CFU mL^{-1} となった。12 月上旬にアオコ対策のため貯水池に硫酸銅を散布後, 細菌数が増加し, 2014 年 1 月には 7.9×10^3 CFU mL^{-1} 検出された。従属栄養細菌はその後減少し, 2 月から 5 月の間は, 6.5×10^2–2.5×10^3 CFU mL^{-1} の間で推移した。6 月以降は水温の上昇に伴い, 増加傾向が見られ, 7 月 24 日には 2.4×10^4 CFU mL^{-1} になった。7 月 29 日にアオコ対策のため硫酸銅を散布した結果, 従属栄養細菌数は急増し, 散布翌日の 7 月 30 日には, 3.5×10^5 CFU mL^{-1} と 14 倍に達した。しかし, 散布後 3 日目の 8 月 1 日には 1.8×10^5 CFU mL^{-1} と半減した。以降, 従属栄養細菌はさらに減少し, 8 月 18 日から 10 月 7 日までの間, 1.5×10^3–7.1×10^3 CFU mL^{-1} の密度で推移した。

全細菌数に占める従属栄養細菌数の割合 (占有率) は, 2013 年 5 月 7 日から 2014 年 7 月 24 日までは, 0.03–0.61%の間で推移した (Fig. 3-9)。2013 年は水温の上昇に伴い, 占有率が上昇する傾向が見られ, 8 月 6 日には 0.17%に達

した。その後減少したが, 12 月に硫酸銅を散布後, 再び上昇し, 2014 年 1 月 20 日には 0.25%となった。以降低い状態が続き, 2 月から 5 月までは 0.03–0.08%の間で推移した。その後, 水温の上昇に伴い占有率は高くなり, 7 月 24 日には 0.61%となった。7 月 29 日に硫酸銅を散布した結果, 散布後 1 日目の 7 月 30 日には 3.6%まで急激に上昇した。しかし, その後急激に低下し, 8 月 18 日には 0.07%となった。

全細菌について, 粒子付着性細菌 (Particle Associated Bacteria: PAB) 区分, および浮遊性細菌 (Free-Living Bacteria: FLB) 区分に分けて計数した結果を Fig. 3-10 に示す。計数は 2014 年 6 月 1 日から 10 月 7 日まで行ったが, 全体的に FLB 区分の方が多い傾向が見られた。全細菌に占める PAB 区分細菌の割合は, 2014 年 7 月から 9 月の間では, 硫酸銅散布直後の 8 月 1 日および 8 月 3 日を除き, 3.7–22%と低かった。硫酸銅散布直後は, PAB 区分 FLB 区分ともに上昇し, PAB の割合が 8 月 4 日には 51%に達した。

一方, 2014 年 7 月 1 日から 10 月 7 日にかけて従属栄養細菌について PAB 区分および FLB 区分に分けて計数した結果を Fig. 3-11 に示す。PAB 区分と FLB 区分の従属栄養細菌の動態はほぼ同様の傾向を示した。7 月 1 日以降増加傾向が見られ, 硫酸銅散布直後の 7 月 30 日に急増したものの, 散布後 3 日目からは減少した。PAB 区分が全従属栄養細菌に占める割合は 7.8–66%であった (Fig. 3-12)。

3-5 貯水池表層水における殺藻細菌および増殖阻害細菌の変動

烏原貯水池表層水における *D. crassum* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌数の変動を Fig. 3-13 に示す。殺藻細菌は調査期間中, 0–2.5×10^2 CFU

mL^{-1} の間で変動した。夏から秋にかけて増加する傾向が見られ, 2013 年は調査開始時の 5 月 7 日は 1.1×10^{1} CFU mL^{-1} であったが, その後増加し, 8 月 6 日に 2.0×10^{2} CFU mL^{-1} と最高となった。9 月 3 日には 1.2×10^{2} CFU mL^{-1} と減少し, 以降 10 月から 2014 年 3 月までは $0–9.2\times10^{1}$ CFU mL^{-1} と少なかった。なお, 2014 年 1 月に全細菌および従属栄養細菌数が一時的に増加したが, 殺藻細菌は検出されなかった。2014 年についても夏季に多い傾向が見られ, 9 月 3 日に最高 2.5×10^{2} CFU mL^{-1} 検出された。その後減少し, 10 月 7 日には 5.9×10^{1} CFU mL^{-1} となった。2013 年 5 月から 2014 年 10 月までの調査期間中の貯水池表層水における殺藻細菌の平均密度は 6.7×10^{1} CFU mL^{-1} であった。

増殖阻害細菌の変動についても殺藻細菌と同様に, 夏から秋にかけて増加する傾向が見られ, 調査期間中は, $0–2.2\times10^{2}$ CFU mL^{-1} の間で変動した。2013 年は, 5 月および 6 月はそれぞれ 1.1×10^{1} CFU mL^{-1}, 9 CFU mL^{-1} と少なかったが, その後増加し, 9 月 3 日に最高 2.2×10^{2} CFU mL^{-1} となった。以降, 増殖阻害細菌は減少し, 10 月から翌年 6 月まで $0–7.9\times10^{1}$ CFU mL^{-1} の間で変動した。2014 年は 8 月 18 日に最高 1.2×10^{2} CFU mL^{-1} 検出されたが, 9 月および 10 月は減少し, それぞれ 0 CFU mL^{-1}, 4.4×10^{1} CFU mL^{-1} と少なかった。なお, 2013 年 5 月から 2014 年 10 月までの調査期間中の貯水池表層水における増殖阻害細菌の平均密度は 4.8×10^{1} CFU mL^{-1} であった。

従属栄養細菌と殺藻細菌の密度の変動を Fig. 3-14 に示した。概ね両者は同様の変動を示した。また, 2014 年 8 月から 10 月にかけて, 殺藻細菌を FLB と PAB に分けて計数したが, この期間いずれも FLB の数が PAB の数を上回っていた。

Fig. 3-15 に貯水池表層水における殺藻細菌の密度および従属栄養細菌に占める殺藻細菌数の割合 (陽性率) を示した。両者には, ほぼ同様な変動傾向

が見られた。陽性率ついては, 調査期間中, 0–4%の間で推移し, 2013 年は 8 月および 9 月に最高 4%となった。2014 年についても, 春から夏にかけて上昇傾向が見られ, 10 月に最高 4%となった。2013 年 5 月から 2014 年 10 月までの調査期間中の陽性率の平均は 2.1%であった。

貯水池表層水における従属栄養細菌と増殖阻害細菌の密度の変動を Fig. 3-16 に示した。概ね両者は同様の変動を示した。また, 増殖阻害細菌について 2014 年 8 月から 10 月にかけて, FLB と PAB に分けて計数した結果も併せて示した。8 月は FLB 区分が PAB 区分を上回っていたものの, 10 月は PAB 区分が FLB 区分を上回って逆転しており, 一定の傾向は認められなかった。

Fig. 3-17 に増殖阻害細菌密度および従属栄養細菌数に占める増殖阻害細菌数の割合 (陽性率) の変動を示した。陽性率は, 増殖阻害細菌数の変動とほぼ連動しており, 2013 年は 9 月 3 日に最高 7%, 2014 年は 8 月 18 日に最高 6.2%となった。また, 2013 年 5 月から 2014 年 10 月までの調査期間中の陽性率の平均は 2%であった。なお, 2014 年 1 月に全細菌および従属栄養細菌数が一時的に増加したが, 増殖阻害細菌に関しては 7.9×10^{1} CFU mL^{-1} と少なく, 陽性率も 1%と低かった。

殺藻細菌と増殖阻害細菌の総数および従属栄養細菌に占めるこれらの総数の割合 (陽性率) の変動について Fig. 3-18 に示す。これらの値は夏から秋に上昇しており, 概ね同様の変動を示した。調査期間中, 両細菌の総数については, 7×10^{0}-3.4×10^{2} CFU mL^{-1} の間で変動し, 2013 年 9 月 3 日に最高 3.4×10^{2} CFU mL^{-1} 検出された。また, このとき *D. crassum* の数も最高となり, 1.5×10^{3} cells mL^{-1} 検出された。その後, 10 月 2 日には *D. crassum* および殺藻細菌, 増殖阻害細菌ともに減少し, ほとんど検出されなくなった。2014 年における両細菌の総数の最高値は 2.5×10^{2} CFU mL^{-1} (9 月 3 日) であった。陽性率については,

調査期間中 1-11%の間で変動し, 2013 年 9 月 3 日に最高 11%となった。

第4節 考　察

本章では, 2013 年 4 月から 2015 年 3 月にかけて烏原貯水池の表層水を採取し, 環境要因の測定や植物プランクトンの計数を行った。また, 殺藻細菌および増殖阻害細菌のモニタリングは, 水温が比較的高い 2013 年 5 月から 2014 年 10 月にかけて行った。水質分析の結果, 貯水池表層水の水温は 6 月から 10 月までの間 20℃を上回り (Fig. 3-1 A), 全リン濃度もその間 0.028 mg L^{-1} 以上 (Fig. 3-2 A), 全窒素/全リン濃度比は 30 を下回っていた (Fig. 3-2 B)。アオコの原因となる藍藻類が発生しやすい条件として, 水温が 20℃以上, 全リン濃度が 0.03 mg L^{-1} 以上で (Umeda and Tomioka, 2007), 全窒素/全リン濃度比が 30 未満であること (Smith, 1983; Fujimoto et al., 1995) が報告されている。したがって, 烏原貯水池ではこの期間中は, *Dolichospermum* 属や *Microcystis* 属などの有害有毒なアオコの原因となる藍藻類の増殖に適した環境になっていたと考えられる。また, 湖沼の栄養状態と植物プランクトン群集の分類群組成の関係については, 貧栄養では珪藻類が優占し, 細胞数も少ないが, 中栄養および富栄養になると, 珪藻類, 緑藻類や藍藻類など, さまざまな種類の植物プランクトンが出現し, 細胞数も多くなるが, さらに過栄養になると, *Microcystis* 属や *Dolichospermum* 属などが優占し, 多様度は低くなる傾向があるという (Tilman, 1977; Ogawa and Ichimura, 1984)。OECD (1982) の基準によれば, 烏原貯水池は, 富栄養から過栄養に分類される。実際に貯水池では, 2013 年は 6 月から 12 月にかけて藍藻類が著しく増殖し, 全細胞数の 45–97%を占め, 長期間優占する状態が続いた (Fig. 3-4 A)。また, 2014 年はアオコ対策のため 7 月 29 日に硫酸銅を散布したた

め, 8 月以降は藍藻類が少なかったものの, 散布前の 7 月から散布直後の 8 月上旬にかけては前年と同様に藍藻類が増加し, 全細胞数の 97–99.9%を占めた。なお, 貯水池で発生した藍藻類は, 主に *Dolichospermum* 属, *Aphanizomenon* 属および *Microcystis* 属であった (Table 3-1 から 3-6)。これらはいずれも細胞内にガス胞を有するため, 水中を上下移動することにより栄養塩が豊富な下層に移動することができる。さらに, *Dolichospermum* 属および *Aphanizomenon* 属は異質細胞を有するため, 水中の無機態窒素が枯渇していても, 窒素を固定できる特性をもつ。事実, 硝酸態窒素について, 2013 年は 6 月から 9 月にかけて, 2014 年は 7 月に検出限界以下であったが (Fig. 3-1 C), これらは他のプランクトンに比較して, 優位に増殖できたものと考えられる。

烏原貯水池における植物プランクトンの発生パターンの特徴の一つとして, 大型の緑藻類や珪藻類が著しく増殖することが挙げられる。2013 年は 6 月 3 日に緑藻類の *Staurastrum dorsidentiferum* が 1.6×10^3 cells mL^{-1} (Table 3-1), 10 月 2 日に緑藻類の *Mougeotia* sp. が 4.5×10^3 cells mL^{-1} 検出された (Table 3-2)。2014 年は 6 月 2 日に緑藻類の *Closterium aciculare* が 2.8×10^3 cells mL^{-1} (Table 3-3), 10 月 7 日には, 珪藻類の *Aulacoseira granulata* が 2.1×10^4 cells mL^{-1} 検出された (Table 3-5)。また, これらの植物プランクトンの増加ピークに合わせて, 高濃度のクロロフィル a が検出された。2013 年は, 6 月 3 日および 10 月 2 日にそれぞれ 41 μg L^{-1}, 22 μg L^{-1}, 2014 年は 6 月 2 日および 10 月 7 日にそれぞれ 44 μg L^{-1}, 47 μg L^{-1} と年 2 回のピークが見られた (Fig. 3-2 C)。

一方, 植物プランクトンの総細胞数に関しては, 2013 年は 8 月 6 日に 3.7×10^4 cells mL^{-1}, 10 月 2 日に 9.4×10^4 cells mL^{-1} と 2 回, 2014 年は 7 月 1 日に 1.5×10^5 cels mL^{-1}, 10 月 7 日に 4.9×10^4 cells mL^{-1} の 2 回増殖ピークが確認されたが, クロロフィル a のピークとは必ずしも一致しなかった (Fig. 3-3)。これは, ピークが

一致しなかった 2013 年 8 月 6 日および 2014 年 7 月 1 日は, 細胞サイズが小さい藍藻類の *Microcystis* 属が優占していたため, クロロフィル a 濃度の上昇にはそれほど寄与しなかった結果と考えられる。

なお, *D. crassum* は, 2013 年に 6 月から 10 月にかけて検出され, 9 月 3 日に最大となり 1.5×10^{3} cells mL^{-1} 検出された。このとき *D. crassum* は, 植物プランクトンの総細胞数に対して 9%を占めた (Fig. 3-6)。一方, 2014 年は, 7 月 1 日 (9.2×10^{1} cells mL^{-1}) から 4 日 (1.1×10^{3} cells mL^{-1}) にかけて検出されたのみで, その後は観察されなかった。植物プランクトンの総細胞数に対する *D. crassum* の割合は, 7 月 4 日で 0.3%と非常に低かった。この時期, 貯水池では *Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. wesenbergii* が増加しており, 競合してしていた可能性が高い。

貯水池表層水における細菌の変動については, 全細菌および従属栄養細菌はともに夏季から秋季にかけて増加し, 冬季から春季にかけて減少する傾向が認められた (Fig. 3-7, 3-8)。また, 全細菌数に占める従属栄養細菌数の割合は, 調査期間を通じて 0.03–3.6%の間で大きく変動したが, その割合は主に夏季に上昇する傾向が見られた (Fig. 3-9)。環境中における細菌の活性は, 水温の影響を強く受けることから (Pomeroy and Deibel, 1986; Tsuji et al., 2017), 夏季に水温の上昇に伴い貯水池内の細菌の活性が高まった結果, 細菌が増殖し, 生菌数の割合も上昇したものと考えられる。

全細菌は調査期間を通じて, 1.6×10^{6}–9.9×10^{6} cells mL^{-1} の間で変動した。湖沼や海洋における全細菌は概ね 10^{5}-10^{7} cells mL^{-1} のオーダーの密度であり (Kirchman and Mitchell, 1982; 今井ら, 2013; 大西ら, 2014), 本貯水池も同程度であるものと判断された。

従属栄養細菌については, 調査期間中 5.4×10^{2}–3.5×10^{5} CFU mL^{-1} の間で

変動した。特に 2014 年 7 月 30 日から 8 月 4 日にかけては, 1.0×10^5–3.5×10^5 CFU mL^{-1} と他の期間に比較して著しく多数検出された。また, 全細菌数に占める従属栄養細菌数の割合もこの期間は 1.9–3.6%と, 他の期間 (0.03–0.6%) に比較して高かった。これは貯水池でアオコが発生したため, 対策として 7 月 29 日に硫酸銅を散布してプランクトンを殺藻したことにより, プランクトンの細胞内から放出された易分解性の有機物や植物プランクトン自身を基質として従属栄養細菌が増殖し, 活性が高くなったためと考えられる。しかしながら, この急激な増加は一時的であり, 硫酸銅を散布してから 20 日後の 8 月 18 日には, 散布前と同程度まで従属栄養細菌数は減少した。

全細菌および従属栄養細菌について, 2014 年 7 月 1 日から 9 月 3 日までの間, 粒子付着性の PAB 区分と浮遊性の FLB 区分に分けて計数したが, いずれの割合も期間中大きく変動した。 全細菌数については, 7 月 1 日から硫酸銅を散布する前の 7 月 24 日まで PAB 区分は 8.9–21%と低かったものの, 散布後 3 日目の 8 月 1 日には 49%, 6 日目の 8 月 4 日には 51%にまで上昇した (Fig. 3-10)。このような傾向は従属栄養細菌の PAB 区分についても認められ, 7 月 24 日までは PAB 区分が占める割合は 45–52%であったのに対し, 散布後の 7 月 30 日から 8 月 4 日には 55–66%まで上昇した (Fig. 3-12)。これまで, チミジンやグルコース, あるいはグルタミン酸の同化実験により, FLB に比較して PAB はより強い活性を有しており, 水系の物質循環において PAB が大きな役割を果たすことが報告されている (Kirchman and Mitchell, 1982; Crump et al., 1999)。貯水池においても, 全体的に従属栄養細菌に占める PAB の割合が直検法で計数した全細菌に占める PAB 区分の割合を上回っていることから, PAB 区分が FLB 区分に比較して強い活性を有し, 貯水池における有機物の消費に大きく関与しているものと考えられる。また, 硫酸銅散布後に PAB 区分の割合が上昇したことについて

は, 散布により死滅したプランクトンに多数の細菌が付着して急速に分解を行ったためと考えられる。このように植物プランクトンのブルームが崩壊した後に総細菌数が増加する現象は海洋でも報告されている (今井, 2013)。実際に貯水池では, 硫酸銅散布した翌日の 7 月 30 日は, 死滅して葉緑素が退色した植物プランクトンが漂い, 池全体が白濁していたが, 3 日後の 8 月 1 日には, 大部分の植物プランクトンが分解, 沈降し, 貯水池の水は透明になり, それまで池周辺に漂っていた腐敗臭も消失したことが確認されている。

海洋では, 赤潮プランクトンと連動して, 殺藻細菌が増加することが観察されており, 赤潮の減少に大きな役割を担っていることが報告されている (Imai et al., 1998, 2001; Kim et al., 1998)。烏原貯水池においても, 2013 年に *D. crassum* の変動に連動して, 殺藻細菌や増殖阻害細菌が検出された (Fig. 3-13)。2 年間の調査期間において, 貯水池表層水における殺藻細菌数は 0–2.5×10^{2} CFU mL^{-1} の間で検出された。また, 増殖阻害細菌は, 0–2.2×10^{2} CFU mL^{-1} の間で変動した。殺藻細菌と増殖阻害細菌を合計した数は, 7×10^{0}–3.4×10^{2} CFU mL^{-1} となり, 2013 年 9 月 3 日に最大値の 3.4×10^{2} CFU mL^{-1} が検出された (Fig. 3-18)。このとき *D. crassum* の密度も 1.5×10^{3} cells mL^{-1} の最大値を示した。その後, *D. crassum* は検出されなくなっており, *D. crasssum* の減少にこれらの細菌が関わったと考えられる。これまで海洋や湖沼において, 殺藻細菌が調査されており湖沼では 10^{1}–10^{3} CFU mL^{-1} (小島ら, 2016), 海洋では 10^{1}–10^{4} CFU mL^{-1} (今井ら, 2012; 今井, 2013; 稲葉ら, 2016; Inaba et al., 2017) 検出されている。烏原貯水池における殺藻細菌や増殖阻害細菌の検出数は, これらの調査結果に比較してやや低いものである。これは, 既往の湖沼や海洋における調査は主に水草帯で行われたものであり, 水草表面に高密度に生息する殺藻細菌の影響を受けているためと考えられる。一方, 烏原貯水池は単純な環境であり, 水草は生

えておらず，殺藻細菌があまり増殖供給できない一方で，浮遊性の植物プランクトンが増殖するのに適した条件になっているものと推察される。貯水池における *D. crassum* の増殖を抑制するには，殺藻細菌が常に高密度に存在し，機能しやすい環境を整えることが必要である。そこで次章では，水草表面における殺藻細菌および増殖阻害細菌数を調査するとともに，これらが *D. crassum* の増殖に与える影響について検討することとした。

第 4 章　水草が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

第 1 節　緒　言

第 3 章では，烏原貯水池において殺藻細菌および増殖阻害細菌の季節変動を調査した結果，これらの細菌数は年間を通じて 7×10^{0}–3.4×10^{2} CFU mL^{-1} の密度で検出され，特に 7–9 月の夏季に多くなる傾向が見られた。しかしながら，貯水池では *D. crassum* が夏季に多数増殖していることから，殺藻細菌や増殖阻害細菌は *D. crassum* の増殖を十分に抑制する程には存在しなかったのであろう。ところで，アマモや海藻，水草表面のバイオフィルム中には赤潮やアオコの原因となるプランクトンに対する殺藻細菌が高密度に存在すると報告されている (Imai et al., 2002, 2006, 2013; 今井ら, 2009, 2016; 今井, 2010; 小島ら, 2016; Inaba et al., 2017)。したがって，藻場やアマモ場，水草帯を造成することにより，環境修復を行うだけでなく，赤潮やアオコなどの有害有毒植物プランクトンの増殖を抑制することが期待される。本章では，現場湖沼の水草が *D. crassum* の増殖に及ぼす影響について実験による検討を行った。まず，2016 年に琵琶湖南湖の柳が崎におけるササバモ (*Potamogeton malayanus* Miq.) の水草帯から採取した湖水を *D. crassum* に接種し，その増殖に与える細菌の影響を調べた。続いて，2017 年に同じ場所から湖水を採取し，再度同様の調査を行い再現性を確かめた。また，同時に水草や水草表面のバイオフィルムを接種した際の *D. crassum* の変化を調べた。さらに，水草帯湖水や水草表面のバイオフィルムにおける殺藻細菌や増殖阻害細菌を計数し，烏原貯水池で得られた細菌数と比較した。

第 2 節　材料および方法

2-1　試料採取

琵琶湖南湖の柳が崎湖岸の水草帯 (北緯 35°1′34″, 東経 135°52′5″) において, 2016 年 10 月 27 日に滅菌した捻口ガラス瓶を用いて湖水を採取した (Fig. 4-1)。水草帯では, ササバモ (*Potamogeton malayanus* Miq.) が群生していた (Fig. 4-2)。なお, 現場水域におけるササバモの概算密度は, 0.34 g (wet) L^{-1} であった。また, 対照として, 水草の生育がない柳川河口 (北緯 35°1′52″, 東経 135°52′11″: 水深約 1.3m) にて同様に試料を採取した (Fig. 4-3)。

2017 年 8 月 3 日に前年と同じ琵琶湖南湖の柳が崎湖岸の水草帯において, 湖水を同様な方法で採取した。また, 同時にササバモを滅菌したプラスチック袋に採取した。一方, 2016 年に対照とした柳川河口については, 2017 年は周辺で水草の生育が確認され, 対照区としては適さないと判断されたことから, 琵琶湖大橋下 (北緯 35°7′23″, 東経 135°55′52″) を対照区として, 湖水を採取した (Fig. 4-4)。それぞれの試料は採取後, 冷蔵して神戸市の水質試験所に持ち帰った。

2-2　理化学的水質項目の測定

採取した試料水の全窒素および全リン濃度については, 第 2 章第 2 節 2-2 の方法により測定した。pH, アンモニア態窒素, 亜硝酸態窒素, 硝酸態窒素濃度については, 第 3 章第 2 節 2-2 の方法により測定した。また, 濁度, 色度, 電気伝導度, リン酸態リン濃度については以下の方法により測定した。

・濁度:積分球式光電光度法 (厚生労働省告示第 261 号 別表第 41, 厚生労働省, 2017)

・色度:透過光測定法 (厚生労働省告示第 261 号 別表第 36, 厚生労働省, 2017)

・電気伝導度:電極法 (上水試験方法, 日本水道協会, 2011)

・リン酸態リン:モリブデン酸アンモニウム法 (上水試験方法, 日本水道協会, 2011)

2-3 植物プランクトンの計数

試料は持ち帰り後, 直ちに計数を行った。1 mL の試料水を界線入枠付きスライドガラス (RIGO, Japan) に封入し, 光学顕微鏡を用いて計数した。

2-4 水草帯の湖水中の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

水草帯の水が *D. crassum* の増殖に与える影響を室内実験により検討した。まず, 2016 年の調査では, 水草帯 (柳が崎) および柳川河口で採取した湖水について, それぞれ①無処理水, ②孔径 3 μm のポリカーボネートフィルター (Whatman, UK) で濾過した湖水, ③孔径 0.2 μm の PTFE メンブレン (OMNIPORE, Merck Millipore, Germany) で濾過した湖水, および④オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) した湖水の 4 種類の実験区を設けた。なお, 使用したフィルターは, 予めプラスチックホルダー (PP-47, ADVANTEC, Japan) に設置した後, オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) した。処理した各湖水を滅菌した捻口

ガラス試験管 (ST-16.5S, NICHIDEN-RIKA GLASS, Japan) に 9 mL, CT 培地にて培養した *D. crassum* の培養を 1 mL (最終密度 : 1.9×10^3 cells mL^{-1}) 入れ, 温度 25℃で光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルで 8 日間培養した。各実験区は, 3 本立とした。培養期間中, 0 日目, 1 日目, 4 日目, 6 日目および 8 日目に副試料を採取し, 試料水中の *D. crassum* を光学顕微鏡により観察, 計数した。また, 0 日目および 8 日目の試料については, 1 mL の試料水を界線入枠付きスライドガラス (RIGO, Japan) に封入し, 全ての植物プランクトンを光学顕微鏡を用いて計数した。

2017 年の実験では, 水草帯 (柳が崎) および対照の琵琶湖大橋で採取した湖水について, それぞれ①無処理水, ②孔径 1.2 μm のポリカーボネートフィルター (Isopore, Merck Millipore, Germany) で濾過した湖水, ③孔径 0.1 μm の PTFE メンブレン (OMNIPORE, Merck Millipore, Germany) で濾過した湖水, および④オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) した湖水の 4 種類の実験区を設けた。

なお, 濾過を行う際, 目詰まりを防ぐためにそれぞれの処理水について前濾過を行った。すなわち, ②孔径 1.2 μm の濾過湖水の実験区については, 湖水を孔径 10 μm のポリカーボネートフィルター (Whatman, UK) で予め濾過を行った。③孔径 0.1 μm 濾過湖水の実験区については, 湖水を孔径 0.8 μm のガラスろ紙 (GA-200, ADVANTEC, Japan) で予め濾過を行った。また, ④オートクレーブ滅菌区については, 湖水を孔径 10 μm のポリカーボネートフィルター (Whatman, UK) で予め濾過を行うことにより, 大きなプランクトンや夾雑物を取り除いた。一連の操作において使用したフィルターは, 予めプラスチックホルダー (PP-47, ADVANTEC, Japan) に設置した後, オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) した。

水草帯 (柳が崎) および琵琶湖大橋の湖水について, それぞれ処理した試

料水を容量 900 mL の組織培養用フラスコ (Tissue Culture Flask with Vented Cap, IWAKI, Japan) に 882 mL 入れ, そこに CT 培地で培養した *D. crassum* 培養を最終 2.3×10^3 cells mL^{-1} (1.0×10^2 coils mL^{-1}) となるように 18 mL 添加した。

各試料を温度 25℃で光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルで 13 日間培養した。培養期間中, 0 日目, 4 日目, 8 日目および 13 日目に副試料を採取し, *D. crassum* 数, および殺藻細菌と増殖阻害細菌数を計数した。*D. crassum* については, 1 mL の試料水を界線入枠付きスライドガラス (RIGO, Japan) に封入し, 光学顕微鏡を用いて計数した。殺藻細菌数と増殖阻害細菌については, 従属栄養細菌を分離後, 殺藻試験により計数した。詳細は 2-6 と 2-7 に記述した, また, 0 日目および 13 日目の各実験区の試料水について, 栄養塩濃度 (窒素およびリン) を 2-2 の方法で測定した。

2-5 水草表面の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

水草表面の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖や生残に与える影響を調べた。実験には, 琵琶湖南湖の柳が崎における水草帯から 2017 年 8 月 3 日に採取したササバモ (*Potamogeton malayanus*) を用い, 以下の 3 種類の実験区を設定した (Fig. 4-5)。まず, ①ササバモの一部を切り取ったものを直接 *D. crassum* に添加した「水草切片添加区」, ②ササバモ表面からバイオフィルムを剥離したものを添加した「水草バイオフィルム添加区」, 最後に③ササバモに含まれるアレロパシー物質の影響を見るために, ササバモを磨り潰した液を孔径 0.1 μm のフィルターで濾過し, 細菌を除去した溶液を添加した「水草磨り潰し-濾

液添加区」の 3 種類の実験区を設定した。

なお, それぞれの実験区において添加した水草の量は現場水域の水草密度に合わせた。すなわち, 柳が崎の水草の密度は概算であるが, 0.34 g (wet) L^{-1} 程度であったため, 今回の実験においても, 添加した水草量は,「水草切片添加区」で 0.41 g (wet) L^{-1},「水草バイオフィルム添加区」で 0.37 g (wet) L^{-1},「水草磨り潰し-濾液添加区」で 0.37 g (wet) L^{-1} と現場に近い密度に設定した。以下に操作の詳細を記す。

まず, 柳が崎で採取した水草帯湖水を孔径 10 μm のポリカーボネートフィルター (Whatman, UK) で濾過し, 大きなプランクトンや夾雑物を取り除いた。続いて濾液をオートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) した。この滅菌湖水を以下のとおり, 各実験区の調製に用いた。

①水草切片添加区については, 容量 900 mL の組織培養用フラスコ (Tissue Culture Flask with Vented Cap, IWAKI, Japan) に滅菌湖水を 882 mL と, CT 培地で培養した *D. crassum* 培養を最終 2.3×10^{3} cells mL^{-1} (1.0×10^{2} coils mL^{-1}) となるように 18 mL 添加した。そこに 0.37 g のササバモの葉の切片を加えた。

②水草バイオフィルム添加区については, 10.03 g のササバモの葉の切片を 300 mL の滅菌湖水を入れた捻口瓶に加え, 手で 600 回激しく攪拌した。そのうち 10 mL の懸濁液と 872 mL の滅菌湖水および 18 mL の *D. crassum* 培養を容量 900 mL の組織培養用フラスコに収容して混合した。

③水草磨り潰し-濾液添加区については, 1.00 g のササバモの葉の切片を乳鉢で磨り潰した後, 30 mL の滅菌湖水に懸濁した。これを 50 mL 容ポリプロピレンコニカルチューブ (FALCON, USA) に入れ, 2 分間ボルテックス処理を行った。その後, 孔径 0.1 μm の PTFE フィルター (OMNIPORE, Merck Millipore, Germany) で濾過滅菌し, 濾液 10 mL と滅菌湖水 872 mL および, 18 mL の *D.*

crassum 培養を容量 900 mL の組織培養用フラスコに収容して混合した。

各試料を温度 25℃で光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}, 16 時間明-8 時間暗の明暗サイクルで 13 日間培養した。培養期間中, 0 日目, 4 日目, 8 日目および 13 日目に試料を採取し, *D. crassum* 数, および殺藻細菌と増殖阻害細菌数を計数した。*D. crassum* の数については, 1 mL の試料水を界線入枠付きスライドガラス (RIGO, Japan) に採り, 光学顕微鏡を用いて計数した。殺藻細菌数と増殖阻害細菌数については, ①水草切片添加区および②水草バイオフィルム添加区を対象とし, 後述の 2-6 の方法により従属栄養細菌を分離後, 2-7 の殺藻試験により計数した。また, 0 日目および 13 日目の各実験区の試料水について, 栄養塩濃度 (窒素およびリン) を 2-2 に述べた方法により測定した。

2-6 従属栄養細菌の計数

前述の 2-4 および 2-5 で培養した各実験区の試料水中の従属栄養細菌の計数と分離を行った。試料は, 2017 年 8 月 3 日に採取した 2-4 の湖水 (①無処理区および②1.2 μm 濾液添加区) と 2-5 の①水草切片添加区, ②水草バイオフィルム添加区である。各処理区を, 培養後 0 日目, 4 日目, 8 日目, 13 日目に試料水を採取後, R2A 液体培地を用いて, 10 倍ずつ段階希釈した。それぞれの試料を 1 mL ずつシャーレに入れ, R2A 寒天培地を混釈, 固化した。なお, 2-4 の水草帯および琵琶湖大橋における無処理区については, さらに試料水を孔径 1.2 μm のポリカーボネートメンブレン (Whatman, UK) で濾過した。フィルター上の細菌を「粒子付着性細菌 (Particle Associated Bacteria: PAB) 区分」, 濾液中の細菌を「浮遊性細菌 (Free-Living Bacteria: FLB) 区分」とした。粒子付着性細菌 (PAB) については, 濾過捕集したフィルターを R2A 寒天培地上に静置した。全

従属栄養細菌および浮遊性細菌については，それぞれの試料を 1 mL ずつシャーレに入れ，R2A 寒天培地を混釈，固化した。一連の培養は 3 本立で行った。各試料を 20℃で 14 日間培養後，増殖したコロニーを計数した。なお，粒子付着性細菌の計数については，フィルター上のコロニーが重なることが多かったことから，全従属栄養細菌数 (無処理の試料水中の細菌) から浮遊性細菌数 (FLB) を差し引いて算出した。

2-7 殺藻試験

各実験区における従属栄養細菌の *D. crassum* に対する殺藻能力を 2 者培養実験により調べた。まず，CT 培地で培養した *D. crassum* を 2.3×10^4 cells mL^{-1} (1.0×10^3 coils mL^{-1}) となるようにCT培地を用いて調製し，48ウェルのプラスチックプレート (Non-Tissue Culture-Treated Plate, FALCON, USA) の各ウェルに 0.5 mL ずつ分注した。続いて滅菌したつまようじを用い，2-6 で生育した各実験区の従属栄養細菌のコロニーを少量釣菌し，*D. crassum* の培養に1株ずつ接種した。なお，殺藻試験は，各実験区について，50 株ずつ行った。また，細菌を接種しない *D. crassum* の培養をコントロールとした。温度 25℃，光強度 21 μmol m^{-2} s^{-1}，16 時間明- 8 時間暗の明暗サイクルで 10 日間培養し，*D. crassum* の増殖や溶藻の有無を肉眼および倒立顕微鏡 (IX70, OLYMPUS, Japan) により観察した。藻体がほとんど分解したものを「殺藻陽性」，死滅には至らないが，コントロールと比較して明らかに増殖が遅いものを「増殖阻害」と判定した。

各月の試料について，50 株あたりの殺藻細菌および増殖阻害細菌を計数し，従属栄養細菌数に陽性率を乗じることにより，それぞれの細菌数を算出した。

第 3 節　結　果

3-1　環境要因

Table 4-1 に 2016 年 10 月 27 日に採取した水草帯および柳川河口湖水の理化学的項目の分析結果を示す。水温は両地点でそれぞれ 19.5℃, 19.4℃であり, *D. crassum* やその他の藍藻類の増殖に適した値を示していた。また, 水草帯では水中にやや懸濁物が浮遊しているのが確認された。そのため, 濁度および色度に関して, 柳川河口ではそれぞれ 3.1 度, 3.8 度であったのに対し, 水草帯では, 6.4 度および 6.7 度と高くなっていた。その他の項目に関してはあまり差が見られなかった。

2017 年 8 月 3 日は, 水温が水草帯で 29.9℃, 琵琶湖大橋で 29.0℃と高く, 2016 年に比べてより藍藻類の増殖に適した環境になっていた (Table 4-2)。濁度は水草帯で 3.1 度, 琵琶湖大橋で 2.8 度と水草帯でやや高い傾向が見られた。2016 年と同様に水草帯において, 水中に懸濁物が浮遊しているのが確認された (Fig. 4-6)。全窒素および全リンは水草帯においてそれぞれ 0.40 mg L^{-1}, 0.038 mg L^{-1}, 琵琶湖大橋において 0.32 mg L^{-1}, 0.019 mg L^{-1} と水草帯が琵琶湖大橋よりも高かった。無機態窒素については, 水草帯でアンモニア態窒素が 0.02 mg L^{-1} とわずかに検出されたのみで, 両地点ともにほとんどの窒素が有機態で存在していた。リン酸態リンについても水草帯で 0.004 mg L^{-1}, 琵琶湖大橋で 0.002 mg L^{-1} と低く, 両地点においてリンに関してもほとんどが有機態で存在していた。

3-2　水草帯の湖水中の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

Fig. 4-7 A に, 2016 年 10 月 27 日に採取した水草帯の湖水を *D. crassum* に添加した時の変化を示した。無処理の湖水を添加した場合, 実験開始時に *D. crassum* 数が 1.9×10^{3} cells mL^{-1} (8.1×10^{1} coils mL^{-1}) であったが, 6 日目には 3.1×10^{2} cells mL^{-1} (1.3×10^{1} coils mL^{-1}) まで減少した。また, 培養後付着細菌の増加が見られ, 培養日数の増加に伴い, 藻体は分解され, 群体を構成する細胞の数が減少した (Fig. 4-8)。また, トリコームの収縮も観察された。この付着細菌の増加は孔径 3 μm のフィルターで濾過した実験区においても観察されており, 培養中 *D. crassum* はあまり増殖しなかった。一方, 湖水を孔径 0.2 μm のフィルターで濾過した実験区およびオートクレーブ滅菌湖水を添加した実験区では, 培養後 8 日目にはそれぞれ 3.4×10^{4} cells mL^{-1} (1.5×10^{3} coils mL^{-1}), 6.0×10^{4} cells mL^{-1} (2.6×10^{3} coils mL^{-1}) と著しく増殖した。したがって, 水草帯の湖水の無処理実験区で *D. crassum* が減少した要因がアレロパシーなどの化学物質によるものではなく, サイズが 0.2 μm 以上の微生物によることが強く示唆された。

水草の生育がなかった柳川河口の湖水を添加した際の *D. crassum* の変化を Fig. 4-7 B に示す。無処理の湖水を添加しても *D. crassum* は殺藻されず, 培養 8 日目には 1.3×10^{4} cells mL^{-1} (5.7×10^{2} coils mL^{-1}) まで増加した。その他の実験区においても *D. crassum* は増加していることが確認された。なお, オートクレーブ滅菌した湖水を添加した実験において, 培養 8 日目の *D. crassum* 数は, 水草帯湖水添加区で 6.0×10^{4} cells mL^{-1} (2.6×10^{3} coils mL^{-1}), 柳川河口湖水添加区で 5.5×10^{4} cells mL^{-1} (2.4×10^{3} coils mL^{-1}) とほとんど差は見られず, 両水域の湖水中における *D. crassum* の増殖ポテンシャルは, ほぼ同じであるものと考え

られる。

水草帯および水草が生育していない柳川河口から採取した無処理の湖水を*D. crassum* に添加した際の植物プランクトンの変化を Table 4-3 に示した。両区ともに培養後に, 植物プランクトンの総数が増加しており, 水草帯湖水の添加区で 0 日目が 5.4×10^3 cells ml^{-1} であったものが, 8 日後には, 1.8×10^4 cells mL^{-1} となった。また, 水草が生育していない柳川河口の湖水添加区においては, 0 日目が 2.5×10^3 cells mL^{-1} であったものが, 8 日後には, 1.8×10^5 cells mL^{-1} となり, 水草帯湖水を添加した場合の 10 倍までに増加した。柳川河口の湖水添加区において, 特に藍藻類の増加が著しく, *D. crassum*, *D. flos-aquae*, *Microcystis ichthyoblabe*, *M. wesenbergii*, および *Phormidium tenue* などが 8 日間で 2.2–9300 倍まで増加した。一方, 水草帯湖水の添加実験区において, 藍藻類は *D. smithii* や *M. ichthyoblabe*, *P. tenue* が増加したものの, 増殖の程度は小さかった。また, *D. flos-aquae* については, 培養中トリコームに多数の細菌が付着して分解したため減少した。

Fig. 4-9 に 2017 年 8 月 3 日に採取した湖水を *D. crassum* に添加した実験結果を示す。水草帯湖水を添加した際の *D. crassum* の変化を見ると, 孔径 0.1 μm のフィルターで濾過した湖水, およびオートクレーブ滅菌した湖水を添加した場合, 実験開始時にはそれぞれ *D. crassum* の数は 8.7×10^2 cells mL^{-1} (3.8×10^1 coils mL^{-1}), 2.0×10^3 cells mL^{-1} (8.5×10^1 coils mL^{-1}) であったものが, 13 日目には, それぞれ 1.8×10^5 cells mL^{-1} (7.9×10^3 coils mL^{-1}) および 3.1×10^5 cells mL^{-1} (1.4×10^4 coils mL^{-1}) に達し, 順調に増加した (Fig. 4-9 A)。一方で, 無処理の湖水を添加すると, *D. crassum* は減少し, 13 日目には 3.2×10^2 cells mL^{-1} (1.4×10^1 coils mL^{-1}) になった。*D. crassum* の減少は, 実験開始後 4 日目から顕著であり, トリコームに細菌が多数付着して分解する様子が検鏡により観

察された。また，孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した湖水を添加した場合，*D. crassum* は実験開始後 4 日目に 6.2×10^{3} cells mL^{-1} (2.7×10^{2} coils mL^{-1}) とやや増加し，8 日目は 6.4×10^{3} cells mL^{-1} (2.8×10^{2} coils mL^{-1}) と横ばい傾向が続いたが，13 日目には 3.9×10^{2} cells mL^{-1} (1.7×10^{1} coils mL^{-1}) と無処理区と同じ程度にまで減少した。細菌による分解は 8 日目に顕著に観察された。なお，全ての処理区において，原生動物や動物プランクトンによる *D. crassum* の捕食は確認されなかった。これらの結果は前年に採取した水草帯の湖水を添加した実験結果と同様な傾向であった。

琵琶湖大橋付近の湖水を添加した際の *D. crassum* の変化を Fig. 4-9 B に示す。孔径 0.1 μmのフィルターで濾過した湖水およびオートクレーブ滅菌した湖水を添加した場合，*D. crassum* は培養後 13 日目に，それぞれ 1.6×10^{5} cells mL^{-1} (7.0×10^{3} coils mL^{-1}) および 1.8×10^{5} cells mL^{-1} (7.9×10^{3} coils mL^{-1}) に達し，順調に増殖した。一方，無処理の湖水を添加した場合，急激に減少し，4 日目には検出されなくなった。試料水中にはアメーバが多数されたことから，*D. crassum* が捕食されたと考えられる。孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した場合，*D. crassum* は 8 日目まで増加し続け，2.5×10^{4} cells mL^{-1} (1.1×10^{3} coils mL^{-1}) になったが，その後 13 日目には 1.1×10^{3} cells mL^{-1} (4.8×10^{1} coils mL^{-1}) まで減少した。

培養前後の試料水中の栄養塩濃度を測定した結果を Table 4-4 に示した。実験区による栄養塩濃度の違いはほとんど確認されなかった。水草帯湖水および水草の生育がない琵琶湖大橋付近の湖水を添加した実験区において，培養前の全窒素濃度は 1.32–1.51 mg L^{-1}，無機態窒素については硝酸態窒素濃度が 0.67–0.70 mg L^{-1} となり，全窒素濃度の 44–52%を占めた。また，全リン濃度は 0.12–0.15 mg L^{-1}，リン酸態リン濃度は 0.038–0.046 mg L^{-1} となり，無機態リンが

29–35%を占めた。一方，培養 13 日目には，これらの栄養塩はほぼ不検出となり，実験区による違いはほとんど確認されなかった。

3-3　水草表面の殺藻細菌および増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

水草を *D. crassum* に添加した際の変化を Fig. 4-10 に示した。水草を磨り潰した後，孔径 0.1 μm のフィルターで濾過した液を添加した場合，*D. crassum* は順調に増加し，13 日目には 2.3×10^{4} cells mL^{-1} (9.8×10^{2} coils mL^{-1}) となった。一方，水草切片を添加した場合は 4 日後に 3.5×10^{3} cells mL^{-1} (1.5×10^{2} coils mL^{-1}) となった後，急激に減少し，13 日目には検出されなくなった。また，水草のバイオフィルムを添加した実験区についても同様の傾向を示し，4 日目には 7.8×10^{3} cells mL^{-1} (3.4×10^{2} coils mL^{-1}) とやや増加したものの，その後急激に減少し，8 日目には検出されなくなった。なお，全ての実験区において，原生動物や動物プランクトンによる捕食は確認されなかった。

培養前後の試料水中の栄養塩濃度を測定した結果を Table 4-5 に示した。培養前の全窒素濃度は 1.41–1.58 mg L^{-1}，無機態窒素については硝酸態窒素濃度が 0.69–0.72 mg L^{-1} となり，全窒素濃度の 46–49%を占めた。また，全リン濃度は 0.15 mg L^{-1}，リン酸態リン濃度は 0.047–0.053 mg L^{-1} となり，無機態リンが 31–35%を占めた。一方，培養 13 日目には，水草磨り潰し-濾液添加区において，無機態窒素およびリン酸態リンがわずかに検出されたが，その他の実験区において栄養塩はほぼ不検出となった。

3-4　従属栄養細菌数の変動

2017 年 8 月 3 日に採取した水草帯湖水およびササバモを *D. crassum* に添加した際の従属栄養細菌数の変化を Fig. 4-11 および Fig. 4-12 に示す。いずれの実験区においても，培養開始後 4 日目に細菌数は大きく増加した。

水草帯の無処理湖水を添加した際，実験開始時は 9.6×10^{3} CFU mL^{-1} であったが，その後急激に増加し，4 日目には 5.6×10^{4} CFU mL^{-1} に達した (Fig. 4-11 A)。その後やや減少し，13 日目には 2.8×10^{4} CFU mL^{-1} となった。また，実験期間を通して，粒子付着性の従属栄養細菌 (PAB) が多数を占めた。

孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した湖水を添加した実験区では，実験開始時は 4.8×10^{3} CFU mL^{-1} であったが，その後急激に増加し，4 日目には 5.6×10^{4} CFU mL^{-1}，13 日目には 1.0×10^{5} CFU mL^{-1} となった。

対照区の琵琶湖大橋付近の湖水 (水草なし) を添加した場合の従属栄養細菌の変化を Fig. 4-11 B に示す。無処理区については，実験開始時には 5.8×10^{3} CFU mL^{-1} であったが，その後急激に増加し，4 日目には 3.4×10^{4} CFU mL^{-1}，13 日目には 5.6×10^{4} CFU mL^{-1} に達した。実験期間を通じて，粒子付着性の従属栄養細菌 (PAB) と浮遊性の従属栄養細菌 (FLB) はほぼ同数であり，水草帯に比較して，従属栄養細菌に占める PAB の割合は低かった。また，孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した湖水を添加した場合，実験開始時は 1.4×10^{3} CFU mL^{-1} であったが，その後急激に増加し，4 日目には 4.8×10^{4} CFU mL^{-1}，13 日目には 1.0×10^{5} CFU mL^{-1} となった。

ササバモの葉の切片を添加した場合，従属栄養細菌は実験開始時に 1.9×10^{3} CFU mL^{-1} であったが，4 日目に 4.2×10^{4} CFU mL^{-1} まで増加した (Fig. 4-12)。また，バイオフィルムを添加した実験区については，1.2×10^{4} CFU mL^{-1} で

あったものが 4 日目に 2.4×10^4 CFU mL^{-1} まで増加した。その後 8 日目には両区とも一旦減少したが, 13 日目には再度増加し, 切片の添加区で 1.8×10^4 CFU mL^{-1}, バイオフィルム添加区で 1.6×10^4 CFU mL^{-1} となった。

3-5 殺藻細菌数および増殖阻害細菌の変動

培養過程における, 各実験区の殺藻細菌数および増殖阻害細菌の変動を Fig. 4-13 および Fig. 4-14 に示す。無処理の水草帯湖水を添加した際, 培養開始時は殺藻細菌が 7.2×10^2 CFU mL^{-1}, 増殖阻害細菌が 2.3×10^3 CFU mL^{-1} であったが, 4 日目には殺藻細菌が 1.9×10^3 CFU mL^{-1}, 増殖阻害細菌が 1.1×10^4 CFU mL^{-1} と急増した (Fig. 4-13 A)。この時, *D. crassum* は減少した。その後, それぞれの細菌は減少し, 13 日目には殺藻細菌が 1.6×10^2 CFU mL^{-1}, 増殖阻害細菌は不検出となった。孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した水草帯湖水を添加した試料については, 培養開始時は殺藻細菌が 2.9×10^2 CFU mL^{-1}, 増殖阻害細菌が 3.8×10^2 CFU mL^{-1} と少なかったが, 4 日目には殺藻細菌が 1.1×10^3 CFU mL^{-1}, 増殖阻害細菌が 3.4×10^3 CFU mL^{-1} まで増加した (Fig. 4-13 B)。その後, 殺藻細菌は 8 日目には不検出となったものの, 13 日目には 1.3×10^3 CFU mL^{-1} まで再び増加した。増殖阻害細菌は 8 日目に 9.8×10^2 CFU mL^{-1} まで減少した後 13 日目には検出されなくなった。*D. crassum* は 8 日目まではやや増殖したが, 13 日目には減少して 3.9×10^2 cells mL^{-1} (1.7×10^1 coils mL^{-1}) になった。

一方, 琵琶湖大橋付近の無処理湖水を添加した場合, 殺藻細菌は 0 日目は 2.3×10^2 CFU mL^{-1} であったが, 4 日目に 1.1×10^3 CFU mL^{-1} まで増加し, 13 日目には 4.3×10^3 CFU mL^{-1} に達した (Fig. 4-13 C)。増殖阻害細菌は 4 日目に 1.3×10^3 CFU mL^{-1} まで増加した後減少し, 13 日目には検出されなくなった。

孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した琵琶湖大橋付近の湖水を添加した実験区において, 殺藻細菌は培養開始時に 1.1×10^{2} CFU mL^{-1} と少なかったが, 4 日目には 9.6×10^{2} CFU mL^{-1} まで増加した後減少し, 8 日目以降は検出されなかった。 (Fig. 4-13 D)。増殖阻害細菌も同様の傾向を示し, 4 日後に 2.9×10^{3} CFU mL^{-1} まで増加したが, その後減少し, 検出されなくなった。*D. crassum* は 8 日目まで増加し, その後減少に転じた。

水草切片およびバイオフィルムを添加した実験区については, 培養 4 日目に殺藻細菌, 増殖阻害細菌が増加したが, その後も高い密度が維持された (Fig. 4-14 A, B)。水草切片を *D. crassum* に添加した場合, 殺藻細菌は, 0 日目は 2.7×10^{2} CFU mL^{-1} であったが, 4 日目には 5.0×10^{3} CFU mL^{-1} まで急激に増加した (Fig. 4-14 A)。その後, 一旦減少したものの, 13 日目には 7.6×10^{3} CFU mL^{-1} に達した。増殖阻害細菌は, 4 日目には 1.2×10^{4} CFU mL^{-1} まで急激に増加した後, 減少した 。水草バイオフィルムを添加した実験区において殺藻細菌は, 0 日目に 9.6×10^{2} CFU mL^{-1} であったが, 4 日目には 3.4×10^{3} CFU mL^{-1}, 13 日目には 5.4×10^{3} CFU mL^{-1} まで増加した (Fig. 4-14 B)。増殖阻害細菌は, 4 日目に 6.2×10^{3} CFU mL^{-1} まで増加した後, 8 日目には一旦減少したが, 13 日目に再び 2.2×10^{3} CFU mL^{-1} まで増加した。

水草帯および琵琶湖大橋付近の無処理の湖水を添加した実験区については, 殺藻細菌および増殖阻害細菌を PAB と FLB に分けて計数を行った。各実験区における PAB 区分および FLB 区分の細菌密度の変化を Fig. 4-15 に示した。また, それぞれの細菌の割合の変化を Fig. 4-16 に示した。水草帯湖水を添加した実験区においては, 培養開始後 4 日目に PAB と FLB がともに急激に増加した (Fig. 4-15 A)。しかしその後は減少した。また, 培養を開始してから 8 日目までの間, PAB 区分が 60–100%と大部分を占めた (Fig. 4-16 A)。

対照として，琵琶湖大橋付近の湖水を添加した実験区についても同様に，培養開始後 4 日目に PAB，FLB がともに急激に増加したが，水草帯湖水添加区に比較して増加の程度は低かった (Fig. 4-15 B)。また，PAB 区分の割合が培養期間を通じて 49–100%と多い傾向が認められた (Fig. 4-16 B)。

第 4 節　考　察

本章では，水草のバイオフィルムおよび水草帯の湖水中の殺藻細菌が *D. crassum* の増殖に与える影響について検討した。なお，実験材料として水草や水草帯の湖水が必要であったが，神戸市の貯水池では水草が生育していないため，琵琶湖南湖の柳が崎における水草帯から試料を採取した。琵琶湖南湖では 1994 年の大渇水以降，沈水植物が繁殖し，ほぼ全域に分布するようになった (浜端，2003)。また柳が崎では，ササバモ (*Potamogeton malayanus*) がほぼ単独で優占的に群生しており，水草の影響を解析しやすいことから，実験の対象水域に選定した。

ササバモは比較的大型の沈水植物である。ササバモは，生存限界光量域が他の沈水植物に比較して低く，23℃で 6 μmol m^{-2} s^{-1} 以下の光量域では，20 日から 50 日で枯死する (Imamoto et al., 2008)。そのため，比較的浅い水域に限定して生育が可能であり，琵琶湖においても浅水域に偏った分布をしている (Imamoto et al., 2006)。この特性から，ササバモを貯水池に適用した場合，むやみに生育面積が拡散する恐れは低い。また近年，琵琶湖では水草が流れ藻となり，湖岸に漂着して腐敗したり，航行障害となることが問題となっているが (Haga, 2009)，この多くは，水中茎が生育途中で切れる特性を有するオオカナダモ，コカ

ナダモやクロモなど特定の種類の水草によるものである。一方，ササバモに関してはこのような特性を持たない。以上の特性から，ササバモは貯水池に適用する際に扱いやすいものと考えられる。

水草帯の湖水を*D. crassum*に添加すると，まずトリコームに細菌が多数付着し，次第に内部まで侵入することにより*D. crassum*は減少した (Fig. 4-8)。なお，減少過程において，動物プランクトンや原生動物，小型鞭毛虫 (Schweikert and Schnepf, 1997) やカビ (van Donk, 1989; Wetsteyn and Peperzak, 1991; Mountfort et al., 1996) など，細菌以外による捕食は確認されなかった。また，本研究は2016年と2017年の2回にわたり実施したが，いずれも同様の結果が得られた。一方で，2016年に水草のない柳川河口付近の水を接種した場合，*D. crassum*は減少せずに順調に増殖した (Fig. 4-7 B)。また，オートクレーブ滅菌した湖水や孔径0.1 μmもしくは0.2 μmのフィルターで細菌を除去した湖水を添加した場合は，*D. crassum*が順調に増殖したことから (Fig. 4-7 A, Fig. 4-9 A)，ウィルスの感染 (Safferman and Morris, 1964; Granhall and von Hofsten, 1969; Currier and Wolk, 1979; Mole et al., 1997; Tucker and Pollard, 2005; Yoshida et al., 2006; Liu et al., 2007) や水中に溶存したアレロパシー物質 (Nakai et al., 1996, 2013) などの化学物質の影響は非常に低いものと考えられる。

2016年に行った湖水の添加培養実験において，植物プランクトンの変化を調べたところ，水草帯の水を添加した実験区においては，総植物プランクトン数が培養前で5.4×10^3 cells mL^{-1}，培養後は1.8×10^4 cells mL^{-1}と3.3倍の増加であったのに対し，水草の生育がない柳川河口 (対照区) については，培養前が2.5×10^3 cells mL^{-1}，培養後が1.8×10^5 cells mL^{-1}と72倍もの増加を示した。実験において培養液としてCT培地を全体量の10%添加しており，両実験区ともに十分な栄養塩がほぼ同じ濃度で存在していたため，水草帯の湖水を添加した実

験区における *D. crassum* の減少は，プランクトン間の競合によるものではないと考えられる。さらに，柳川河口の湖水を添加した実験区においては，特に *Dolichospermum* 属，*Microcystis* 属，および *Phormidium* 属などの藍藻類の増加が著しいことから，水草がない水域では藍藻類が増加しやすいものと考えられる。以上の結果から，水草帯の湖水は *D. crassum* の増殖を抑制し，これには細菌が大きく影響していることが明らかになった。

次に，ササバモを添加した際の *D. crassum* の変化を調べた。ここでは，まず，現場水域の水草帯の再現として，①ササバモの葉一部を切り取ったものを直接 *D. crassum* に添加した「水草切片添加区」，②ササバモのバイオフィルムの影響を確認するために，ササバモ表面からバイオフィルムを剥離したものを添加した「水草バイオフィルム添加区」，そして③ササバモに含まれるアレロパシー物質の影響を検討するために，ササバモを磨り潰した液を孔径 0.1 μm のフィルターで濾過し，葉の固形物や細菌を除去した溶液を添加した「水草磨り潰し-濾液添加区」の 3 種類の実験系を設定した。

添加実験の結果，*D. crassum* は「水草切片添加区」および「水草バイオフィルム添加区」において，8 日目には細菌によって分解し，ほぼ消滅した。なお，いずれも原生動物や動物プランクトン，小型鞭毛虫など，細菌以外の生物による有意な捕食は確認されていない。また，添加した水草の量は現場水域の水草密度に合わせたが，このときの *D. crassum* の減少速度は水草帯の湖水を添加したときよりも著しく速く，水草やバイオフィルムが直接水中に存在すると，殺藻効果が高まるものと考えられる。一方で「水草磨り潰し-濾液添加区」において，*D. crassum* は順調に増加した。これらの結果から，水草に由来するアレロパシー物質の影響は非常に小さいものと考えられる。

これまで水草による植物プランクトンに対してのアレロパシー効果が研究討さ

れており, ホザキノフサモ (*Myriophyllum spicatum*) が藍藻類の *Microcystis aeruginosa*, *Dolichospermum flos-aquae*, および *Phormidium tenue* に対し, 増殖抑制効果を示すことが報告されている (Nakai et al., 1996)。また, ホザキノフサモが産生する *Microcystis aeruginosa* に対するアレロパシー物質として, ポリフェノールの (+)-Catechin (Nakai et al., 2000), Eugeniin (Gross et al., 1996), Ellagic acid (Gross et al., 1996; Nakai et al., 2000), Gallic acid (Gross et al., 1996; Nakai et al., 2000), Pyrogallic acid (Nakai et al., 2000), 脂肪酸の *cis*-6-Octadecenoic acid (Nakai and Hosomi, 2005), *cis*-9-Octadecenoic acid (Nakai and Hosomi, 2005) や Nonanoic acid (Nakai et al., 2004; Nakai and Hosomi, 2005) 等が報告されている。なお, 増殖を抑制するために必要なホザキノフサモの量は, *M. aeruginosa* に対しては 1 g (wet) L^{-1} 以上 (Nakai et al., 1994), 0.288 g (dry) L^{-1} (Nakai et al., 2013) と報告されている。今回の研究では, 現場水域でのササバモの概算密度は, 0.34 g (wet) L^{-1} であり, 実験で添加した量はこれに合わせて 0.37–0.41 g (wet) L^{-1} とした。また, 用いたササバモの水分含量は 92.9%であったことから, 乾燥重量に換算すると, 現場水域のササバモ密度は, 0.024 g (dry) L^{-1} と試算された。さらに, 実験で添加した量は, 0.026–0.029 g (dry) L^{-1} であった。したがって, 報告された上記の密度と現場水域の密度を比較すると, アレロパシーにより藍藻類の増殖を抑制するには, 相当に高い密度の水草が必要となり, 実現性は低いものと考えられる。

水草帯の無処理の湖水を添加した実験区における殺藻細菌数および増殖阻害細菌数は, それぞれ培養開始 0 日目において, 7.2×10^{2} CFU mL^{-1} および 2.3×10^{3} CFU mL^{-1} であった (Fig. 4-13)。環境中において, 宿主プランクトンの増殖を抑制するには, 殺藻細菌数は経験的に 10^{3} CFU mL^{-1} 程度は必要であることがいわれているが, 水草帯においては, *D. crassum* の増殖を抑制するのに十分な

数の殺藻細菌が存在していたものと考えられる。一方，琵琶湖大橋の無処理区においては，殺藻細菌が 2.3×10^{2} CFU mL^{-1} ，増殖阻害細菌が 5.6×10^{2} CFU mL^{-1} と水草帯に比較して少なかった。

水草および湖水を *D. crassum* に添加した際，培養の中の従属栄養細菌数はいずれの系においても 4 日目に著しく増加した (Fig. 4-11, 4-12)。その後は横ばいか減少する傾向が認められた。また，殺藻細菌および増殖阻害細菌数もこれに連動した変動を示し，培養開始後 4 日目に急激に増加した (Fig. 4-13, 4-14)。なお，水草帯や対照区の琵琶湖大橋付近の湖水を用いた実験区においては，その後殺藻細菌が減少傾向にあったのに対し，水草切片添加区や水草バイオフィルム添加区においては，高密度の殺藻細菌数が維持されており，このことが両実験区における *D. crassum* の急激な減少をもたらしたものと考えられる。培養の中には，アメーバや繊毛虫，鞭毛虫などによる *D. crassum* の捕食が確認されず，*D. crassum* の減少期には細菌が付着して分解することが確認されたことから，減少には細菌の影響が大きかったものと考えられる。このような藍藻類に対する水草の影響については，アオコの原因となる有毒藍藻類の *Microcystis aeruginosa* に対してもヨシ帯の湖水を添加した実験で溶藻と細胞数の著しい減少が認められており (Imai et al., 2014)，水草の存在が藍藻類の増殖を抑制する上で有効であると考えられる。

なお，孔径 1.2 μm のフィルターで濾過した水草帯湖水添加区については，*D. crassum* は 8 日目までやや増加後，減少した。これは付着性の殺藻細菌が除去された結果と推測される。殺藻細菌および増殖阻害細菌が 13 日目においても合計 2.0×10^{3} CFU mL^{-1} 検出されていることから，これらが減少に関わった可能性が考えられる。

水草帯および琵琶湖大橋から得た試水の無処理区について，存在様式別に

調べたところ, 培養期間を通じて PAB 区分の殺藻細菌や増殖阻害細菌が多数を占めた。これまで, 殺藻細菌は粒子に付着した状態で検出されることが多いことが報告されている (Park et al., 2010; Inaba et al., 2014, 2017; 稲葉ら, 2016)。本研究でも, これら既往の研究結果と同様の傾向が確認された。また, 粒子付着性細菌は, 浮遊性細菌に比較して高い生理活性を有することが報じられている (Smith et al., 1992; Bidle and Azam, 1999)。*D. crassum* が減少する際は, 細菌がトリコームに多数付着して分解することが観察されたことから, 粒子付着性の殺藻細菌が溶藻に大きく関与しているものと考えられる。

本章では, 水草の表面および水草帯の湖水に, 多数の殺藻細菌や増殖阻害細菌が存在することを明らかにした。また, これらを *D. crassum* の培養に添加すると, 著しく *D. crassum* が減少したことから, 水草表面のバイオフィルムや水草帯の湖水に含まれる殺藻細菌や増殖阻害細菌が *D. crassum* の減少に強く関与することを明らかにした。

第 5 章　総 合 考 察

水道水源の貯水池や湖沼では，富栄養化に伴い，藍藻類の増殖が著しく，かび臭の発生が利水上の大きな問題となっている。その原因となる主な藍藻類は *Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann et Komárek (syn.: *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnová et Cronberg)であるが，その発生抑制に対して根本的な手立てがないのが現状である。

これまで神戸市水道局の日常検査の中で，貯水池において *D. crassum* が発生して減少する際に，多数の細菌が付着して分解していく様子が観察されていた。また，その際，動物プランクトンや原生動物，鞭毛虫など，他の生物による捕食の様子は確認されていないことから，貯水池の *D. crassum* の減少に細菌が影響しているものと推察されていた。そして 2010 年に烏原貯水池表層水から，*D. crassum* の減少期に 3 株の殺藻細菌を初めて分離することに成功した。これらはトリコームを速やかに分解する強い活性を有し，貯水池において *D. crassum* の減少に関与しているものと考えられた。

2013 年から 2014 年にかけては貯水池の表層水における殺藻細菌および増殖阻害細菌の変動を調査した。このときの殺藻細菌および増殖阻害細菌の密度について水草帯における実験結果と比較したものを Fig. 5-1 に示した。烏原貯水池では，殺藻細菌および増殖阻害細菌は *D. crassum* の変動に合わせて増加し，調査期間中の密度は 7×10^{0}–3.4×10^{2} CFU mL^{-1} で，最高は 3.4×10^{2} CFU mL^{-1} であった (2013 年 9 月 3 日)。この数は湖沼や海洋の水草帯における殺藻細菌数に比較してやや低いものであった (稲葉ら, 2016; 小島ら, 2016; Inaba et al., 2017)。貯水池では，毎年 *D. crassum* のブルームが発生していることから，殺藻細菌は存在するが，十分な数ではないため，*D. crassum* の増殖を制御するに

は至っていないものと考えられた。一方，琵琶湖南湖の水草帯湖水における殺藻細菌および増殖阻害細菌数の合計数は，3.1×10^{3} CFU mL^{-1} であり，烏原貯水池表層水における 2 年間の最大値 (3.4×10^{2} CFU mL^{-1}) を大きく上回った。さらに，水草のバイオフィルム中における殺藻細菌と増殖阻害細菌の総数は 6.4×10^{6} CFU g^{-1} (wet)と高密度であった。なお，この値は，海藻やアマモ葉体表面のバイオフィルム中に生息する殺藻細菌数と同程度であった (Imai et al., 2002, 2006; 今井ら, 2016; Inaba et al., 2017)。水草のバイオフィルムが殺藻細菌の生息場所となると同時に水中における殺藻細菌の供給源になっているものと考えられる。烏原貯水池では毎年 *D. crassum* が発生する一方，水草帯ではアオコやかび臭の発生が少ないことや，水草帯湖水を *D. crassum* に接種したところ，トリコームが分解されて減少したのは，殺藻細菌や増殖阻害細菌の働きによるところが大きいものと考えられる。

殺藻細菌および増殖阻害細菌が従属栄養細菌に占める割合について烏原貯水池表層水と水草帯を比較した結果を Fig. 5-2 に示した。従属栄養細菌に占める殺藻細菌および増殖阻害細菌数の総数の割合は，烏原貯水池の場合，調査期間中の最大値は 11%であった。一方で，水草バイオフィルムについては 20%，水草帯湖水については，最大 54%にも達し，烏原貯水池に比較して水草および水草帯湖水中の殺藻細菌や増殖阻害細菌の割合が有意に高い結果となった。したがって，水草表面のバイオフィルムおよび水草帯湖水中には，殺藻細菌および増殖阻害細菌が貯水池と比較して相対的に高密度に存在し，従属栄養細菌に占める割合も高いことが明らかになった。なお，殺藻細菌よりも増殖阻害細菌の割合が高くなる傾向が認められた。環境中における殺藻細菌は，海草の消長とともに変動することが報告されていることから (Sakami et al., 2017)，水草と両者の間には密接な関係があり，水草が殺藻細菌にとって重要な生息場

所となっているものと考えられる。

調査時，水草帯では，バイオフィルム状の懸濁物質が多数浮遊しているのが確認された (Fig. 4-6)。そのため，水草帯湖水の濁度は，水草の生育がない対照区 (2013 年：柳川河口，2014 年：琵琶湖大橋) よりもやや高くなった。水草表面のバイオフィルムにも同様の懸濁物が存在することから，これは，水草表面のバイオフィルムが剥離したものと考えられる。また，水草帯湖水中では，粒子付着性細菌 (PAB) の方が浮遊性細菌 (FLB) に比較して多く，殺藻細菌や増殖阻害細菌は，これらの懸濁物に付着して生息していると考えられる。植物プランクトンに対する殺藻効果は，担体に付着することにより促進されることが報告されており (Kang et al., 2007)，懸濁物に付着した殺藻細菌や増殖阻害細菌が *D. crassum* の増殖を抑制する上で大きな役割を果たしている可能性が高い。一般に水草には，湖水の揺動を抑制することにより，浮遊粒子の沈降を促進し，湖水の透明度を上昇させる効果がある。一方で，風が吹いたり，人為的な刈り取りなどの撹乱が生じた場合は，懸濁物の浮遊量が増加するが，この懸濁物の浮遊現象は，今後，水草を *D. crassum* の発生抑制に適用する際に，重要な要素となるであろう。

琵琶湖では，1994 年の大渇水以降，沈水植物が大繁殖し，分布域は南湖のほぼ全域に広がった (浜端，2003)。その結果，生態系のレジームシフトが起きて，透明度の高い水系に変化したことが報告されている (浜端，2005)。また，水草群落の中では，無機態窒素濃度や植物プランクトンが量が減少したことが確認されている (Okamoto et al., 2004)。石川・岡本 (2015) は長期的に琵琶湖における水草の繁茂による水質の変化を調査し，水草が繁茂することにより，クロロフィル a，BOD，SS，全窒素，全リン濃度が有意に低下したことを報告している。一方，2012 年に水草の現存量が 3 分の 1 に激減した際に，透明度は低下し，クロロフィ

ル a, BOD, SS, 全窒素, および全リン濃度が他の年に比べて高くなったと報告している。また丸野・浜端 (2016) も, 琵琶湖南湖において透明度, 全窒素, クロロフィル a 濃度が, 水草の根こそぎ刈り取り面積に応じて変化したことを報告している。さらに, 2016 年では, 水草帯の面積が大きく低下し, アオコの発生水域が 13 水域, 発生日数が 44 日と, 観測史上最多となった。これらの事象は, 水草の存在が水質や植物プランクトン量に対して大きく関与していることを表している。このような水草と植物プランクトンの拮抗関係は様々な湖で観察され, 報じられている (van Donk and van de Bund, 2002; Ruggiero et al., 2003; Hilt and Gross, 2008)。

一方で, 水草が大量に繁茂することにより, 水の動きが減少し, 湖底付近の溶存酸素濃度が低下する事象が生じたり (Haga et al., 2006), 景観の悪化, 悪臭, 航行障害, 水道障害, 漁業被害などの問題も顕在化している (Haga, 2009)。しかしながら, これらの問題は, 水草が適切な密度を超えて繁茂したことによるものと考えられる。

かつては日本各地の湖沼において, 水草は刈り取り後, 周辺の農地で肥料として盛んに利用された。なお, 水草の種類により, 肥料としての格付けが行われ, いかに水草が有用植物として扱われていたかが伺える。明治時代末の琵琶湖水産誌によると, ササバモ, バイカモ, セキショウモ, ヤナギモ, エビモ, シャジクモ, ミズユキノシタ, およびコウホネが肥料として適しているものとされた (中川・饗庭, 1911)。一方で, ヒツジグサ, ミズアオイ, オモダカ, およびヒシについては, 肥料として好ましくないものと報告されている。滋賀県の余呉湖では, 1955 年頃に 532 t もの水草が肥料として採取されており, それによる栄養塩の除去量は, 1979 年の年間流入負荷量に対して約 10%と試算されている (遊磨ら, 1998)。しかしながら, 近年は購入肥料の利用の増加や農地の減少により, 水草の利用量が大きく低

下しているのが現状である。

現在，滋賀県では水草の刈り取りや管理方法について検討すると同時に，刈り取った水草を堆肥化するなど，有効利用にも取り組んでいる (川﨑，2015)。また，海域においては，沿岸の藻場造成に向けた取り組みが行われている (環境省水・大気環境局水環境課 閉鎖性海域対策室，2017)。今後は，水草を適正に管理しながら，いかに生活の中に水草を取り入れて循環型社会を構築していくかが課題と言える。

本研究では，かび臭を産生する藍藻類の *Dolichospermum crassum* に対する殺藻細菌をはじめて分離し，その特性を明らかにした。また貯水池におけるその季節変動，さらに水草帯における密度や水草が *D. crassum* の増殖や生残に与える影響について調査研究を行った。その結果，殺藻細菌は *D. crassum* の増殖を強く抑制することが明らかになった。さらに，水草は殺藻細菌の生息の場として機能するだけでなく，周囲への供給源になっていることが明らかになった。一方，貯水池では殺藻細菌の密度が小さいことが，*D. crassum* の発生を抑制しきれない大きな要因の一つとなっており，毎年かび臭が発生しているものと考えられる。

藍藻類の発生抑制対策として，分離した殺藻細菌を直接現場に投入することが議論されているが (Ren et al., 2010; Lin et al., 2015)，一時的な細菌の投入では，他の生物との相互作用により，効果の持続性が見込めない上，根本的な解決にはならない。やはり，一次生産者である水草を導入し，環境の修復と同時に，殺藻細菌が常に高密度で生息できる場を作ることにより，藍藻類が増殖しにくい環境をつくるという，「体質改善」こそが重要と考えられる。海域においては里海構想の一環として，藻場やアマモ場を人為的に造成，管理し，それらから供給される殺藻細菌によって，有害赤潮を予防するという考えが提案されている (今井，2012, 2017; Imai, 2015; 今井ら, 2016)。湖沼の生態系においても，水草が藻場

やアマモ場と同様の機能を果たし，有害有毒なアオコの発生を予防してくれるものと期待される。

貯水池におけるかび臭対策として，殺藻細菌の研究はまだ始まったばかりである。かび臭の被害を低減できる将来に向けて，本研究がその布石になることを願ってやまない。

要　約

水道水源の貯水池や湖沼では，富栄養化に伴って，藍藻類が増殖し，かび臭の発生が利水上の大きな問題となっている。また，かび臭の発生は国内のみならず，世界各国の問題でもある。その主な原因となっているのは藍藻類の *Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann et Komárek (syn.: *Anabaena crassa* (Lemmermann) Komárková-Legnová et Cronberg) である。本種が発生した場合，対策として硫酸銅の散布による殺藻や，取水口の水深の変更による原水中のかび臭濃度の低減，粒状活性炭や粉末活性炭の投入によるかび臭除去が主なものである。しかし現時点では根本的な解決策がなく，水源で発生を抑制するのは難しいのが現状である。

海洋では，海藻やアマモ場に生育する植物体表面のバイオフィルム中に，赤潮プランクトンを殺滅する殺藻細菌が高密度に生息することが発見され報告されている。そのため，藻場やアマモ場を造成することが，環境修復を行うだけでなく，有害なプランクトンの発生を未然に防ぐ手段として注目されている。一方，*D. crassum* に対して殺藻細菌の報告例はこれまでなかった。なお貯水池では，*D. crassum* が発生し減少する際に，多数の細菌が付着し分解していく様子がこれまで神戸市の日常検査の中で観察されていた。また，*D. crassum* が減少する際，動物プランクトンや原生動物，鞭毛虫など，他の生物による明らかな捕食は確認されていないことから，貯水池の *D. crassum* の増殖や死滅において，細菌が大きく影響しているものと考えられた。そこで，*D. crassum* に対する殺藻細菌を分離し，その特性を調べるとともに，貯水池における挙動を調べた。さらに，水草帯における殺藻細菌の生息密度や水草が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響について検討し，烏原貯水池における研究結果と比較した。

1. 烏原貯水池から分離された *Dolichospermum crassum* に対する殺藻細菌の特性

神戸市の水道水源である烏原貯水池から, *D. crassum* に対する殺藻細菌を 2010 年 10 月 26 日に 3 株 (K-12, 28 および 44 株) 分離した。この時の貯水池表層水中における殺藻細菌数は 2.5×10^2 CFU mL^{-1} で, 従属栄養細菌に占める割合は 6%であった。これらは, *D. crassum* の栄養細胞だけでなく, アキネートも分解する強い活性を有していた。殺藻細菌はいずれも鞭毛を持ち, 運動性を示し, *D. crassum* の粘質鞘に付着後, 徐々に細胞に接近して溶藻した。また *D. crassum* のトリコームは, 細菌の侵入とともに収縮が観察された。細菌の付着状況や収縮等の形態変化は, 貯水池における *D. crassum* の増減を予測する上で重要な情報と考えられる。16S rRNA 遺伝子の解析の結果, 2 株 (K-12 および K-44) は *Gammaproteobacteria* 綱クロマチウム科の *Rheinheimera texasensis* と同定された。また K-28 株は *R. chironomi* と同定された。

D. crassum の溶藻に必要な細菌の初期添加量を調べたところ, 1.0×10^2 cells mL^{-1} でも数日で溶藻した。また, *D. crassum* に溶藻した培養濾液を添加しても, 溶藻やトリコームの収縮などは観察されず, 直接細菌が接触することが溶藻に必要と考えられた。さらに K-44 株について, Prussian blue 生成試験を実施した結果, 本株は過酸化水素を産生することが明らかになった。

2. 烏原貯水池における *D. crassum* に対する殺藻細菌および増殖阻害細菌の季節変動

烏原貯水池において, 2013 年 5 月から 2014 年 10 月にかけて殺藻細菌および増殖阻害細菌の季節変動を調査した。殺藻細菌は調査期間中, 0–2.5×10^2 CFU mL^{-1} の間で検出された。一方, 増殖阻害細菌は, 0–2.2×10^2 CFU mL^{-1} の

間で変動した。これらの変動は，*D. crassum* の増減と概ね一致しており，*D. crassum* 数がピークとなった 2013 年 9 月 3 日に，殺藻細菌および増殖阻害細菌数の合計は 3.4×10^{2} CFU mL^{-1} と最高値を示した。また，従属栄養細菌に占める殺藻細菌および増殖阻害細菌数の割合は調査期間中，1–11%であった。しかしながら，貯水池では毎年 *D. crassum* のブルームが発生していることから，貯水池における殺藻細菌や増殖阻害細菌の数は *D. crassum* の増殖を抑制するには不十分であると考えられた。

3. 水草が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響

水草が *D. crassum* の増殖と生残に与える影響を調査研究した。まず，水草表面のバイオフィルムや水草帯の湖水における殺藻細菌密度を調べた。調査の対象水域として琵琶湖南湖の柳が崎の水草帯を選定し，水草はササバモ (*Potamogeton malayanus* Miq.) を用いた。ササバモ表面のバイオフィルム中の殺藻細菌と増殖阻害細菌の総数は，6.4×10^{6} CFU g^{-1} (wet) と非常に高密度であった。また，水草帯の湖水においても，3.1×10^{3} CFU mL^{-1} と高い値であり，水草が殺藻細菌や増殖阻害細菌の供給源となっているものと考えられた。また，この値は，烏原貯水池におけるモニタリング期間中の最高数 (3.4×10^{2} CFU mL^{-1}) を大きく上回っていた。なお，従属栄養細菌に占めるこれらの細菌の割合についても，ササバモのバイオフィルムで 20%，水草帯湖水で 54%となり，烏原貯水池におけるモニタリング期間中の最高割合 (11%) に比較して高かった。したがって，水草や水草帯湖水中では，殺藻細菌や増殖阻害細菌が生息密度だけでなく，全細菌に占める割合も高いことが明らかになった。

水草帯の湖水における殺藻細菌や増殖阻害細菌は 67%が粒子付着性であった。水草帯の湖水には，水草由来と見られるバイオフィルム状の懸濁物が多数

浮遊しているのが観察されたことから，これらの細菌は懸濁物に付着して生息していると推察された。

次にササバモの葉の切片やバイオフィルム，および水草帯の湖水を *D. crassum* に添加したところ，本種は著しく減少したことから，水草の表面に生息する殺藻細菌が *D. crassum* の増殖を抑制することが明らかになった。一方，湖水から細菌を濾過除去した試料水や，ササバモの葉を磨り潰した後に，濾過した試料水を *D. crassum* に添加してもその増殖に影響はしなかったことから，ウィルスやササバモ由来のアレロパシー物質による影響はほとんどないものと考えられた。以上の結果から，水草帯には *D. crassum* に対する殺藻細菌が高密度で生息し，水草帯の存在がかび臭の発生を抑制するのに有効であることが明らかになった。

謝　辞

本研究を通じて御指導，御助言を賜り，本論文の御校閲を賜りました北海道大学大学院水産科学院今井一郎特任教授に謹んで御礼申し上げます。今井先生には御多忙な業務の中，終始熱心で細部にいたる御指導をいただき，ひとかたならぬお世話になりました。また，研究を進めるにあたり様々な困難に直面しましたが，いつも親身になり御相談にのっていただいたことが支えとなり，研究を継続することができました。心より御礼申し上げます。

同大学院山口篤准教授には貴重な資料や御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。また御多忙な業務の中，本論文の御校閲を賜り，丁寧な御助言をいただきました北海道大大学院水産科学院の和田哲教授，澤辺智雄教授，前述の山口篤准教授に深く御礼申し上げます。

本研究に関する貴重な御助言を頂いた北海道大学大学院海洋生物学講座浮游生物学教室の皆様に，厚く御礼申し上げます。特に夏池真史氏，大西由花氏には研究を行う上で必要な資料や御助言をいただき，多くの刺激と示唆を得ることができました。心より御礼申し上げます。

神戸市水道局の水口和彦局長，林一平事業部長，児玉成二経営企画部長，熊木芳宏配水課長におかれましては，本研究を進めるにあたり，多大な支援を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，研究環境を整え，励ましていただきました神戸市水道局事業部水質試験所の伊藤裕之所長に厚く御礼申し上げます。また，常に刺激的な議論を頂き，適切な御助言を賜りました小田琢也係長 (現 環境局所属) に心より御礼申し上げます。水質試験所の職員の皆様には，試料採取や分析など，様々な形で御協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。特に，上

城博宣氏，戎紫穂氏には，日常業務の傍ら，研究の趣旨を理解し，いつも快く御協力いただくことにより，大いに研究を進めることができました。心より御礼申し上げます。川畑良次氏には，いつも私を励まし，温かな御助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

最後に，本研究の遂行にあたり，私の仕事を理解し，終始多大な支援と励ましを賜り，支えていただきました父　清水義雄，母　清水良子に心から御礼申し上げます。妻　美穂には自らも仕事をしながら，いつも帰りが遅い私を支え，一生懸命に子供たちを育てていただきました。心から御礼申し上げます。また，私を応援し，いつも帰りを待ってくれた航と遥香に感謝します。さらに私の研究が進展することを願い，暖かく見守り，応援していただきました父　芝垣誠，母　芝垣佳美に深く感謝します。

この研究が，将来水源のかび臭を抑制することにより，水道事業に貢献できることを強く願っています。本当にありがとうございました。

参 考 文 献

秋葉道宏・岸田直裕・下ヶ橋雅樹 (2015) 国内の浄水場における生物障害の発生および対策実態の把握. pp. 17-20, 秋葉道宏, 厚生労働省科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業 水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究 平成 26 年度 総括・分担報告書, 国立保健医療科学院, 埼玉.

Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. and Marotta, A. (1999) Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catal. Today*, **53**, 51-59.

Baldry, M.G.C. (1983) The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol*., **54**, 417-423.

Barroin, G. and Feuillade, M. (1986) Hydrogen peroxide as a potential algicide for *Oscillatoria rubescens* D.C. *Wat. Res*. **5**, 619-623.

Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P. and Rapala, J. (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J*., **3**, 314-325.

Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Peschek, G.A., Obinger, C. (2009) Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J. Exp. Bot*. **60**, 423-440.

Bidle, K.D. and Azam, F. (1999) Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature*, **397**, 508-512.

琵琶湖異臭調査小委員会 (1988) 琵琶湖異臭調査 10 年史「琵琶湖のかび臭」. 淀川水質汚濁防止連絡協議会, 大阪.

Boucher, D., Jardillier, L. and Debroas, D. (2006) Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **55**, 79-97.

Brettar, I., Christen, R. and Höfle, M.G. (2002) *Rheinheimera baltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **52**, 1851-1857.

Burnham, J.C., Collart, S.A. and Highison, B.W. (1981) Entrapment and lysis of

the cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PCO_2. *Arch. Microbiol.*, **129**, 285-294.

Burnham, J.C., Collart, S.A. and Daft, M.J. (1984) Myxococcal predation of the cyanobacterium *Phormidium luridum* in aqueous environments. *Arch. Microbiol*. **137**, 220-225.

Butcher, R. (1952) Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **31**, 175-191.

Chakravarty, D., Banerjee, M., Bihani, S.C. and Ballal, A. (2016) A Salt-Inducible Mn-Catalase (KatB) Protects Cyanobacterium from Oxidative Stress. *Plant. Physiol*. **170**, 761-773.

Chen, W.M. Lin, C.Y. and Sheu, S.Y. (2010a) Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by L-lysine oxidase activity. *Enzym. Microbial. Technol*. **46**, 487-493.

Chen, W.M., Lin, C.Y., Young, C.C. and Sheu, S.Y. (2010b) *Rheinheimera aquatica* sp. nov., an antimicrobial activity producing bacterium isolated from freshwater culture pond. *J. Microbiol. Biotechnol*., **20**, 1386-1392.

Crump, B.C., Armbrust, E.V. and Baross, J.A. (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3192-3204.

Currier, T.C. and Wolk, C.P. (1979) Characteristics of *Anabaena variabilis* influencing plaque formation by cyanophage N-1. *J. Bacteriol.*, **139**, 88-92.

Daft, M.J. and Stewart, W.D.P. (1971) Bacterial pathogens of freshwater blue-green algae. *New Phytol*., **70**, 819-829.

Daft, M.J., McCord, S.B. and Stewart, W.D.P. (1975) Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters. *Freshwat. Biol.*, **5**, 577-596.

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database available at: http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/ (accessed on 20 December 2017).

van Donk, E. (1989) The role of fungal parasites in phytoplankton succession. pp. 171-194, Sommer, U. (ed), *Plankton ecology: succession in plankton communities*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

van Donk, E. and van de Bund, W.J. (2002) Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquat. Bot.*, **72**, 261-274.

von Elert, E. and Franck, A. (1999) Colony formation in *Scenedesmus*: grazer-mediated release and chemical features of infochemical. *J. Plankton Res.*, **21**, 789-804.

Fujimoto, N., Fukushima, T., Inamori, Y. and Sudo, R. (1995) Analytical evaluation of relationship between dominance of cyanobacteria and aquatic environmental factors in Japanese lakes. *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **18**, 901-908.

藤原俊一郎・小関稔・羽根康史・高寺正光 (2012) 水道原水中の障害生物の近年の動向. pp. 526-527, 第63回全国水道研究発表会要旨集, 日本水道協会, 東京.

Granhall, U. and von Hofsten, A. (1969) The ultrastructure of a cyanophage attack on *Anabaena valiabilis*. *Physiol. Plant. Physiol. Plant.*, **22**, 713-722.

Gross, E., Meyer, H. and Schilling, G. (1996) Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochem.*, **41**, 133-138.

Gupta, H.K., Gupta, R.D., Singh, A., Chauhan N.S. and Sharma, R. (2011) Genome Sequence of *Rheinheimera* sp. Strain A13L, isolated from Pangong Lake, India. *J. Bacteriol.*, **193**, 5873–5874.

Haga, H. (2009) The problems caused by biomass explosion of submerged macrophytes in Lake Biwa. *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **32**, 242-244.

Haga, H., Ashiya, M., Ohtsuka, T., Matsuda, M., Tuji, A., Baba, K., Numahata, S. and Yamane, T. (2006) Relationship between dissolved oxygen concentration of bottom water and macrophyte biomass in the southern basin of Lake Biwa, Japan. *Jap. J. Limnol.*, **67**, 23-27.

Hall, G.C. and Jensen, R.A. (1980) Enzymological basis for growth inhibition by L-phenylalanine in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 29108 *J. Bacteriol.*, **144**, 1034-1042.

Halpern, M., Senderovich, Y. and Snir, S. (2007) *Rheinheimera chironomi* sp.

nov., isolated from a chironomid (Diptera; Chironomidae) egg mass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **57**, 1872-1875.

浜端悦治 (2003) 琵琶湖における夏の渇水と湖岸植生面積の変化．滋賀県琵琶湖研究所所報, **20**, 134-145.

浜端悦治 (2005) 琵琶湖の沈水植物群落．滋賀県琵琶湖研究所所報，**22**, 105-119.

羽根康史・藤原俊一郎・中村暁彦・舩岡英彰・小倉明生・勢川利治 (2014) ラフィド藻出現時の浄水処理への影響．pp. 272-273, 第 65 回全国水道研究発表会要旨集，日本水道協会，東京.

Harvey, E.L., Deering, R.W., Rowley, D.C., Gamal, E.A., Schorn, M., Moore, B.S., Johnson, M.D., Mincer, T.J. and Whalen, K.E. (2016) A bacterial quorum-sensing precursor induces mortality in the marine coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Front. Microbiol*., **7**, 1–12.

橋本徳蔵 (1971) 相模湖 (人工湖) におけるプランクトンの永年変化．水道協会雑誌, **39**, 10-29.

橋本徳蔵 (1986) カビ臭発生湖沼の栄養塩類とプランクトン相．用水と廃水, **28**, 467-472.

Hessen, D.O. and van Donk, E. (1993) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. *Arch. Hydrobiol*., **127**, 129-140.

Hilt, S. and Gross, E.M. (2008) Can allelopathically active submerged macrophytes stabilize clear-water states in shallow lakes? *Basic Appl. Ecol*., **9**, 422-432.

日野良太・和田安弘・江種伸之 (2015) 紀ノ川上流域における栄養塩類濃度管理による水道水の異臭味問題の対策案検討．環境情報科学 学術研究論文集, **29**, 183-188.

保尊とし子・梶正一・水町昌代 (2002) ピコプランクトンの琵琶湖・淀川水系における出現状況と浄水処理プロセスで濁度に与える影響．用水と廃水，**44**, 755-762.

Hsieh, C.H., Ishikawa, K., Sakai, Y., Ishikawa, T., Ichise, S., Yamamoto, Y., Kuo T.C., Park, H.D., Yamamura, N. and Kumagai, M. (2010) Phytoplankton

community reorganization driven by eutrophication and warming in Lake Biwa, *Aquat. Sci.*, **72**, 467-483.

一柳淳一・千葉信男・後藤光亀・須藤隆一 (1999) 浄水プロセスにおける藍藻ピコプランクトンの挙動. 用水と廃水, **41**, 20-27.

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.

今井一郎 (2012) 有害有毒赤潮の発生から沿岸域を守る. pp. 29-48, 日本農学会 (編), シリーズ 21 世紀の農学 環境の保全と修復に貢献する農学研究, 養賢堂, 東京.

今井一郎 (2013) 夏季の播磨灘における*Chattonella*赤潮の発生と海洋細菌の挙動. 北海道大学水産科学研究彙報, **63**, 7-11.

Imai, I. (2015) Interactions between harmful algae and algicidal and growth-inhibiting bacteria associated with seaweeds and seagrasses, pp. 597-619, Ohtsuka, S., Suzaki, T. Horiguchi, T., Suzuki, N. and Not, F. (eds), *Marine Protists*, Springer Japan, Tokyo.

今井一郎 (2017) 具体策に移った赤潮対策 漁業被害低減はモニタリングから始まる. 養殖ビジネス, **6**, 56-59.

Imai, I., Ishida, Y., Sawayama, S. and Hata, Y. (1991) Isolation of a marine glinding bacterium that kills *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **57**, 1409.

Imai, I., Ishida, Y. and 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., Sakagami, K. and Hata, Y. (1995) Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.*, **61**, 628-636.

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. *Phycol. Res.*, **46**, 139–146.

Imai, I., Sunahara, T., Nishikawa, T., Hori, Y., Kondo, R. and Hiroishi, S. (2001) Fluctuations of the red tide flagellates *Chattonella* spp. (Raphidophyceae)

and the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. In the Seto Inland Sea, Japan. *Mar. Biol.*, **138**, 1043-1049.

Imai, I., Fujimaru, D. and 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**, 493-496.

Imai, I., Fujimaru, D., Nishigaki, T., Kurosaki, M. and Sugita, H. (2006) 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.

今井一郎・木村聡史・山本直・外丸裕司・長崎慶三・櫻田清成・村田圭助 (2009) 微生物による *Cochlodinium polykrikoides* 赤潮の防除の可能性．日本プランクトン学会報, **56**, 64-69.

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およびアオサに付着する赤潮殺藻細菌の分布．北海道大学水産科学研究彙報, **62**, 21-28.

Imai, I., Kido, T., Yoshinaga, I., Ohgi, K. and Nagai, S. (2013) Isolation of *Microcystis*-killer bacterium *Agrobacterium vitis* from the biofilm on the surface of the water plant *Egeria densa*. pp. 164-166, Pagou, K.A. and Hallegraeff, G.M. (eds), *Proceedings of the 14th international conference on Harmful Algae*, International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2013.

今井一郎・西垣友和・岡本悟・山本圭吾・竹内照文・吉永郁生・平田八郎 (2013) 和歌山県田辺湾と大阪湾における赤潮殺藻微生物の分布．北海道大学水産科学研究彙報, **63**, 23-31.

Imai, I. Ohgi, K., Mizuhara, S., Yamaguchi, A. and Kaeriyama, M. (2014) Control of *Microcystis aeruginosa* bloom by using microorganisms in waters from reed community and water plant bed. pp. 184-187, Kim, H.G., Reguera, B., Hallegraeff, G.M., Lee, C.K., Han, M.S. and Choi, J.K. (eds), *Harmful algae 2012, Proceedings of the 15th International Conference on Harmful Algae*, International Society for the Study of Harmful Algae, Maple Design Agency, Busan, Korea.

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**, 67-72.

Imamoto, H., Oikawa, T., Omura, T., Oda, M. and Washitani, I. (2006) Changes of submerged macrophytes of Lake Biwa for six years from 1997 to 2003. *Ecol. Civil. Eng*., **8**, 121-136.

Imamoto, H., Matsumoto, J., Furusato, E. and Washitani, I. (2008) Light and water temperature parameters of 6 species of submerged macrophytes in Lake Biwa. *Ecol. Civil. Eng*., **11**, 1-12.

Inaba, N., Watanabe, T., Sakami, T., Nishi, H., Tahara, Y., and Imai, I. (2014) Temporal and spatial distribution of algicidal and growth-inhibiting bacteria in the coastal sea of southwest Japan. *J. Plankton Res*., **36**, 388-397.

稲葉信晴・秋里綾乃・黒田麻美・西広海・田原義雄・坂見知子・今井一郎 (2016) 八代海における有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* に対する殺藻細菌及び増殖阻害細菌の時空間的変動. 北海道大学水産科学研究彙報, **66**, 9-18.

Inaba, N., Trainer, V.L., Onishi, Y., Ishii, K., Wyllie-Echeverria, S. and Imai, I. (2017) Algicidal and growth-inhibiting bacteria associated with seagrass and macroalgae beds in Puget Sound, WA, USA. *Harmful Algae*, **62**, 136-147.

石川加奈子・岡本高弘 (2015) 水草繁茂と琵琶湖南湖の水質. 環境技術, **44**, 488-493.

Kang, Y.H., Kim, B.R., Choi, H.J., Seo, J.G., Kim, B.H. and Han, M.S. (2007) Enhancement of algicidal activity by immobilization of algicidal bacteria antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 1983-1994.

環境省 水・大気環境局水環境課 閉鎖性海域対策室 (2017) 里海づくりに関する環境省の取り組みについて. 水環境学会誌, **40**, 385-388.

川畑良次・清水武俊・清貞久男 (2005) 千苅貯水池のピコプランクトンの挙動と浄水場での対策. pp. 142-145, 関西地方支部 第 49 回研究発表会 発表概要集, 日本水道協会 関西地方支部, 大阪.

川北四郎 (1951) 神戸市千苅貯水池の生物学的調査. 大阪市水道局水質試験所調査報告ならびに試験成績 (昭和 26 年度), 第 3 集, 101-110.

川崎近太郎・永納秀男・飯尾利弘・近藤雅臣 (1970) 過酸化水素の殺菌機構

について. 食衛誌, **11**, 155-160.

川﨑竹志 (2015) 琵琶湖の水草の順応的管理と有効利用への挑戦. 環境技術, **44**, 20-25.

Kaya, K. and Sano, T. (1996) Algicidal compounds in yeast extract as a component of microbial culture media. *Phycologia*, **35**, 117-119.

Kim, M.C., Yoshinaga, I., lmai, 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., **170**, 25-32.

Kirchman, D. and Mitchell, R. (1982) Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl. Environ. Microbiol*., **43**, 200-209.

Kishida, N., Sagehashi, M., Takanashi, H., Fujimoto, N. and Akiba, M. (2015) National survey of organism-related off-flavor problems in Japanese drinking water treatment plants (2010-2012). *J. Wat. Sup.*: *Res. Technol.*, **64**, 832-837.

神戸市水道局 (1982) 昭和56年度 水質試験成績 (第16集). 神戸市水道局, 神戸.

神戸市水道局 (1984) 昭和57年度 水質試験成績 (第17集). 神戸市水道局, 神戸.

神戸市水道局 (2001) 神戸市水道百年史. 神戸市水道局, 神戸.

Kodani, S., Imoto, A., Mitsutani, A. and Murakami, M. (2002) Isolation and identification of the antialgal compound, harmane (1-methyl-β-carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudmonas* sp. K44-1. *J. Appl. Phycol.*, **14**, 109-114.

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.

Kondo, R. and Imai, I. (2001) Polymerase chain reaction primers for high selective detection of algicidal *Proteobacteria*. *Fish. Sci*., **67**, 364-366.

Kondo, R., Imai, I., Fukami, K., Minami, A. and Hiroishi, S. (1999)

Phylogenetic analysis of algicidal bacteria (Family Flavobacteriaceae) and selective detection by PCR Using a specific primer set. *Fish. Sci.*, **65**, 432-435.

厚生労働省健康局水道課 (2015) 水質汚染事故による水道の被害及び水道の異臭味被害状況について (平成 25 年度調査). (http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000079071.pdf) (accessed on 9 June 2016).

厚生労働省 (2017) 厚生労働省告示第 261 号 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法. 別表第 13, 31, 36, 41.

Leak, L.V. (1967) Fine structure of the mucilaginous sheath of *Anabaena* sp. 1. *J. Ultrast. Res*., **21**, 61-74.

Lee, S.O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A. and Ohtake, H. (2000) Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol*., **66**, 4334-4339.

Li, Y. and Li, D. (2012) Competition between toxic *Microcystis aeruginosa* and nontoxic *Microcystis wesenbergii* with *Anabaena* PCC7120. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 69-78.

Li, Z., Geng, M. and Yang, H. (2015) Algicidal activity of *Bacillus* sp. Lzh-5 and its algicidal compounds against *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 981-990.

Lin, S., Geng, M., Liu, X., Tan, J. and Yang, H. (2015) On the control of *Microcystis aeruginosa* and *Synehococcus* species using an algicidal bacterium, *Stenotrophomonas* F6, and its algicidal compounds cyclo-(Gly-Pro) and hydroquinone. *J. Appl. Phycol*., **28**, 345-355.

Liu, X., Shi, M., Kong, S., Gao, Y. and An, C. (2007) Cyanophage Pf-WMP4, a T7-like phage infecting the freshwater cyanobacterium *Phormidium foveolarum*: complete genome sequence and DNA translocation. *Virology*, **366**, 28-39

Ma, H., Zhang, J., Tong, L. and Yang, J. Photochemical production of hydrogen peroxide from natural algicides: decomposition organic matter from straw.

Environ Sci. Process Impacts, **17**, 1455-1461.

丸野慎也・浜端悦治 (2016) 琵琶湖南湖において水草刈り取りが沈水植物群落に与える影響. 伊豆沼・内沼研究報告, **10**, 9-19.

Merchant, M.M., Welsh, A.K. and McLean, R.J. (2007) *Rheinheimera texasensis* sp. nov., a halointolerant freshwater oligotroph. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **57**, 2376-2380.

Mitsutani, A., Uchida, A. and Ishida, Y. (1987) Occurrence of blue-green algae and algal lytic bacteria in Lake Biwa. *Bull. Jap. Soc. Microb. Ecol*., **2**, 21-28.

Mole, R., Meredith, D. and Adams, D.G. (1997) Growth and phage resistance of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 in the presence of cyanophge AN-15. *J. Appl. Phycol*., **9**, 339-345.

Mountfort, D.O., Atkinson, M., Ponikla, K. Burke, B. and Todd, K. (1996) Lysis of *Gymnodium* species by the fungus *Verticillium lecanii*. *Bot. Mar*., **39**, 159-165.

Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*., **59**, 695–700.

中川源吾・饗庭喜代蔵 (1911) 琵琶湖水産誌. 滋賀県高島郡高等教育会.

Nakai, S. and Hosomi, M. (2005) Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum*. *Hydrobiologia*., **543**, 71-78.

Nakai, S., Sagehashi, M., Hosomi, M., Okada, M. and Murakami, A. (1994) Control of phytoplankton by macrophyte. *J. Jap. Soc. Wat. Environ*., **17**, 33-39.

Nakai, S., Hosomi, M., Okada, M. and Murakami, A. (1996) Control of algal growth by macrophytes and macrophyte-extracted bioactive compounds. *Wat. Sci. Tech*., **34**, 221-235.

Nakai, S., Inoue, Y. and Hosomi, M. (2000) Growth inhibition of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) by *Myriophyllum spicatum*-releasing four polyphenols. *Water Res*., **34**, 3026-3032.

Nakai, S., Yamada, S. and Hosomi, M. (2004) Cyanobacterial growth inhibition effects of fatty acids released from *Myriophyllum spicatum*. *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **27**, 125-130.

Nakai, S., Seto, N., Asaoka, S., Okuda, T. and Nishijima, W. (2013) Impact of the allelopathic effect of a submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* on the competition between the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the green alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **36**, 85-90.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch (accessed on 20 December 2017).

日本水道協会 (2006) 生物障害を起こさないための浄水処理の手引き. 日本水道協会, 東京.

日本水道協会 (2009) 生物起因の異臭味水対策に関する研究 平成 9 年度報告書. 日本水道協会, 東京.

日本水道協会 (2011) 上水試験方法 2011 年版. 日本水道協会, 東京.

Noble, R.T. and Furman, J.D. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**, 113-118.

Obinger, C., Regelsberger, G., Furtmüller, P.G., Jakopitsch, C., Rüker, F., Pircher, A. and Peschek, G.A. (1999) Catalase-peroxidases in cyanobacteria--similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radic. Res.*, **31**, 243-249.

OECD (1982) Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control.

Ogawa, Y. and Ichimura, S. (1984) Phytoplankton diversity in inland waters of different trophic status. *Jap. J. Limnol.*, **45**, 173-177.

Okamoto, T., Ichise, S., Fujiwara, N., Tsuda, T., Wakabayashi, T., Dohi, M., Kagatsune, T., Yamanaka, S. and Haga, H. (2004) Results of research on water quality conformation in submerged macrophyte (ware weeds) zone along littoral area of the southern basin of Lake Biwa. *Rep. Shiga Pref. Inst. Pub. Hlth. and Environ. Sci.*, **39**, 82-87.

Onishi, Y., Mohri, Y., Tuji, A., Ohgi, K., Yamaguchi, A. and Imai, I. (2014) The

seagrass *Zostera marina* harbors growth-inhibiting bacteria against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Fish. Sci*., **80**, 353-362.

大西由花・山口篤・今井一郎 (2014) 北海道東部厚岸湖および厚岸湾における微生物食物網を構成する微生物群の春季から初夏の変動. 北海道大学水産科学研究彙報, **64**, 45-54.

Oshimi, M., Fujimoto, N., Ohnishi, A., Suzuki, M., Akiba, M. and Kunikane, S. (2005) Isolation of bacteria lysing musty odor producing alga *Phormidium tenue* and its lytic characteristics. *J. Jap. Soc. Wat. Environ*., **28**, 379-384.

小澤秀明・宮原裕一 (2015) 長野県の湖沼環境. 水環境学会誌, **38**, 244-248.

Park, J.H., 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. *Aquat. Microb. Ecol*., **60**, 151-161.

Paul, C. and Pohnert, G. (2011) Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS ONE*, **6**, e21032.

Pinhassi, J. and Berman, T. (2003) Differential growth response of colony-forming alpha- and gamma-proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 199-211.

Pomeroy, L.R. and Deibel, D. (1986) Temperature regulation of bacterial activity during the spring bloom in Newfoundland coastal waters. *Science*, **233**, 359-361.

Reasoner, D.J. and Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol*., **49**, 1-7.

Ren, H., Zhang, P., Liu, C., Xue, Y. and Lian, B. (2010) The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake. *World J. Microbiol. Biotechnol*., **26**, 465-472.

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A. and García-Calvo, E. (2009) Oxidation of dissolved organic matter in the effluent of a sewage

treatment plant using ozone combined with hydrogen peroxide (O_3/H_2O_2). *Chem. Eng. J.*, **149**, 131-138.

Ruggiero, A., Solimini, A.G. and Carchini, G. (2003) Nutrient and chlorophyll a temporal patterns in eutrophic mountain ponds with contrasting macrophyte coverage. *Hydrobiologia.*, **506**, 657-663.

Safferman, R.S. and Morris, M.E. (1964) Control of algae with viruses. *J. Am. Water Works Assoc.*, **56**, 1217-1224.

Saito, M., Seki, M., Iida, K., Nakayama, H. and Yoshida, S. (2007) A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the Prussian blue-forming reaction. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 889-892.

Sakami, T., Sakamoto, S., Takagi, S., Inaba, N. and 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.

Schweikert, M. and Schnepf, E. (1997) Light and electron microscopical observations on *Pirsonia punctigerae* spec nov., a nanoflagellate feeding on the marine centric diatom *Thalassiosira punctigera*. *Eur. J. Protistol.*, **33**, 168-177.

Shilo, M. (1970) Lysis of blue-green algae by *Myxobacter*. *J. Bacterol.*, **104**, 453-461.

清水武俊・上城博宣・小田琢也・伊藤裕之 (2016) 水道における生物障害の変遷. 用水と廃水, **58**, 503-508.

Sieburth, J.M., Smetacek, V. and Lenz, J. (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1256-1263.

Smith, V.H. (1983) Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, **22**, 669-671.

Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L. and Azam, F. (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*, **359**, 139-142.

水道技術研究センター (2009) 厚生労働省委託費による水道事業における高度浄水処理の導入実態及び導入検討等に関する技術資料

(http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/jousui/01.html) (最終検索日: 2018 年 1 月 8 日).

Takamura, Y. Yamada, T., Kimito, A., Kanehama, N., Tanaka, T., Nakadaira, S. and Yagi, O. (2004) Growth inhibition of *Microcystis* cyanobacteria by L-lysine and disappearance of natural *Microcystis* blooms with spraying. *Microbes Environ*. **19**, 31-39.

Tilman, D. (1977) Resource competition between planktonic algae. An experimental approach. *Ecology*, **58**, 338-348.

Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T. and Yamanaka, H. (2017) Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE*, **12**(4), e0176608.

角田徳子・中東寛和・金見拓・及川智 (2014) 多摩川上流に発生したかび臭産生藍藻類の遺伝子解析結果. 水環境学会誌, **37**, 9-13.

Tucker, S. and Pollard, P. (2005) Identification of cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. *Appl. Environ. Microbiol*., **71**, 629-635.

Umeda, M. and Tomioka, S. (2007) Data analysis on relations between quality and phytoplankton growth in reservoirs. *Proc. Hyd. Eng*., **51**, 1373-1378.

Wacklin, P., Hoffmann, L. and Komárek, J. (2009) Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea*, **9**, 59-64.

Walker, H.L. and Higginbotham, L.R. (2000) An aquatic bacterium that lyses cyanobacteria associated with off-flavor of channel chatfish (*Ictalurus punctatus*). *Biol. Cont*., **18**, 71-78.

Watanabe, M.M. and Ichimura, T. (1977) Fresh- and salt- water forms of *Spirulina platensis* in axenic cultures. *Bull. Jpn. Soc. Phycol. Suppl*., **25**, (Mem. Iss. Yamada), 371-377.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*., **173**, 697–703.

Wetsteyn, L.P. and Peperzak, L. (1991) Field observations in the Oosterchelde

(The Netherlands) on *Coscinodiscus concinnus* and *Cosconodiscus granii* (Bacillariophyceae) infected by the marine fungus *Lagenisma coscinodiscus* (Oomycetes). *Hydrobiol. Bull.*, **25**, 15-21.

Yadava, P.K. and Singh, S.P. (1979) Histidine sensitive strain of the blue-green alga *Nostoc muscorum*: possible *nif-his* interactions. *Mol. Gen. Genet.*, **173**, 153-157.

Yang, J., Deng, X., Xian, Q., Qian, X. and Li, A. (2014) Allelopathic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Microcystis wesenbergii*: microcystin-LR as a potential allelochemical. *Hydrobiologia*., **727**, 65-73.

Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Hiroishi, S., and Nagasaki, K. (2006) Isolation and Characterization of a Cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol*., **72**, 1239-1247.

遊麿正秀・嘉田由紀子・中山節子・橋本文華・藤岡和佳・村上宣雄・桐畑長雄・桐畑政弘・桐畑貢・桐畑みか乃・桐畑静香・桐畑博夫 (1998) 身近な水辺環境における「人-水辺-生物」間の相互作用. 環境技術, **27**, 289-295.

Zwart, G., Crump, B.C., van Agterveld, M.P., Hagen, F. and Han, S.K. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol*., **28**, 141-155.

Table 1-1. List of cyanobacterial species those algicidal bacteria were reported.

Cyanobacterial species	References
Anabaena ambigua	Daft and Stewart, 1971
Anabaena cylindrica	Mitsutani et al., 1987
Anabaena oscillarioides	Daft and Stewart, 1971
Aphanizomenon flos-aquae	Daft et al., 1975
Cylindrospermum licheniforme	Mitsutani et al., 1987
Dolichospermum affinis	Mitsutani et al., 1987
Dolichospermum flos-aquae	Daft and Stewart, 1971; Daft et al., 1975
Dolichospermum planktonicum	Oshimi et al., 2005
Dolichospermum solitarium	Mitsutani et al., 1987
Microcystis aeruginosa	Imai et al., 2013; Li et al., 2015
Microcystis wesenbergii	Mitsutani et al., 1987
Nostoc ellipsosporum	Daft and Stewart, 1971
Oscillatoria prolifica	Shilo, 1970
Oscillatoria sp.	Walker and Higginbotham, 2000
Phormidium foveolarum	Daft and Stewart, 1971; Burnham et al., 1984
Phormidium luridum	Burnham et al., 1981, 1984
Phormidium tenue	Oshimi et al., 2005
Phormidium uncinatum	Daft and Stewart, 1971
Synechococcus sp.	Burnham et al., 1984
Trichormus valiabilis	Burnham et al., 1984; Mitsutani et al., 1987

Table 2-1. Sequences of primers used for PCR amplification.

primers	sequences	references
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Weisberg et al., 1991
517r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Muyzer et al., 1993
785f	5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3'	Weisberg et al., 1991
805r	5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TC-3'	Weisberg et al., 1991
1492r	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Weisberg et al., 1991
GC clamp	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3'	Muyzer et al., 1993

GC clamp was attached to the 5' end of 27f primer.

Table 2-2. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from April to September 2010. Values mean cells mL^{-1}.

	Apr.5	May 10	Jun. 2	Jul. 5	Aug. 2	Sep. 6
Cyanophyceae						
Aphanizomenon flos-aquae				6600	1400	
Dolichospermum crassum					230	5900
Dolichospermum mucosum					1400	
Dolichospermum sp.			330			
Microcystis aeruginosa				320000		
Microcystis ichthyoblabe						
Microcystis wesenbergii					20000	40000
Bacillariophyceae						
Asterionella formosa						
Aulacoseira distans						
Aulacoseira granulata					7300	2200
Cocconeis placentula			10	10		
Coscinodiscus lacustris						
Cyclotella spp.		150			80	
Fragilaria construens					2300	
Fragilaria crotonensis					270	
Fragilaria sp.						
Navicula sp.		10				
Nitzschia sp.						
Synedra ulna					10	
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus arcuatus						
Ankistrodesmus falcatus						10
Closterium aciculare						
Closterium sp.						
Dictyosphaerium pulchellum						130
Eudorina elegans						
Gloeocystis sp.		1500				
Kirchneriella sp.		10				
Micractinium pusillum						160
Oocystis lacustris	5500	1400			66	66
Pandorina sp.				320		
Pediastrum duplex		320				
Pediastrum simplex						
Planktosphaeria gelatinosa	400					
Quadrigula chodatii		390				
Scenedesmus disper		40				
Scenedesmus quadricauda					160	
Schroederia setigera	20					
Schroederia judayi						
Sphaerocystis shroeteri	160	880	800	80		
Staurastrum dorsidentiferum	50	410	360	20		
Tetraspora lacustris		80	240			
Chrysophyceae						
Pseudokephyrion spp.		10				
Cryptophyceae						
Cryptomonas sp.	20	40	10	20	20	
Euglenophyceae						
Trachelomonas sp.	10					
Dinophyceae						
Ceratium hirundinella	20		20	140	10	90
Glenodinium sp.	10					
Peridinium sp.		40	20	70		
Total cells	6200	5300	1500	660	10000	2700

Table 2-3. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from October 2010 to March 2011. Values mean cells mL^{-1}.

	Oct.4	Oct. 26	Nov. 1	Dec. 1	Jan. 5	Feb. 1	Mar. 1
Cyanophyceae							
Aphanizomenon flos-aquae					110		34000
Dolichospermum crassum	27000	15000	6800				
Dolichospermum mucosum							
Dolichospermum sp.							
Microcystis aeruginosa		1000					
Microcystis ichthyoblabe		6000					
Microcystis wesenbergii	90000	23000	20000	4000			
Bacillariophyceae							
Asterionella formosa							360
Aulacoseira distans				10	10		
Aulacoseira granulata		43	120	61	240		
Cocconeis placentula							
Coscinodiscus lacustris				90	4100	180	
Cyclotella spp.							120
Fragilaria construens							
Fragilaria crotonensis							
Fragilaria sp.			60				
Navicula sp.							
Nitzschia sp.							10
Synedra ulna		1					10
Chlorophyceae							
Ankistrodesmus arcuatus			20				
Ankistrodesmus falcatus	30			10	40	10	
Closterium aciculare		6		10			
Closterium sp.					10		
Dictyosphaerium pulchellum							
Eudorina elegans	180						
Gloeocystis sp.							
Kirchneriella sp.							
Micractinium pusillum							
Oocystis lacustris	66	7	130		190		
Pandorina sp.							
Pediastrum duplex							
Pediastrum simplex		32					
Planktosphaeria gelatinosa		24					
Quadrigula chodatii							
Scenedesmus disper							
Scenedesmus quadricauda							
Schroederia setigera							
Schroederia judayi	670						20
Sphaerocystis shroeteri							
Staurastrum dorsidentiferum				10		20	
Tetraspora lacustris							
Chrysophyceae							
Pseudokephyrion spp.						30	
Cryptophyceae							
Cryptomonas sp.		6	10	20		30	40
Euglenophyceae							
Trachelomonas sp.	20				10		
Dinophyceae							
Ceratium hirundinella	10				10		
Glenodinium sp.				10			
Peridinium sp.		1					20
Total cells	980	120	340	220	4600	270	580

Table 3-1. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from April to September 2013. Values mean cells mL^{-1}.

	Apr. 2	May 7	Jun. 3	Jul. 2	Aug. 6	Sep. 3
Cyanophyceae						
Aphanizomenon flos-aquae			781	77	11	
Aphanocapsa sp.				3300		1200
Aphanothece sp.				640		
Chroococcus dispersus						
Dolichospermum cucinale						2200
Dolichospermum crassum				160	46	1500
Dolichospermum flos-aquae					170	630
Dolichospermum mucosum					96	
Microcystis aeruginosa			1300	2200	7700	2600
Microcystis ichthyoblabe						1300
Microcystis wesenbergii					28000	3900
Microcystis viridis						1300
Oscillatoria splendida						
Phormidium tenue						
Bacillariophyceae						
Asterionella formosa	40					
Attheya zachariasi				50		
Aulacoseira granulata			614	3500	610	1400
Coscinodiscus lacustris						
Cyclotella spp.	50			10	170	
Cymbella sp.			20			
Fragilaria crotonensis		510	330			
Navicula spp.					250	
Nitzschia acicularis						
Nitzschia sp.	10			60		10
Synedra acus				4		
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus falcatus				40	10	
Closterium aciculare		40				
Dictyosphaerium pulchellum				520		
Elakatothrix gelatinosa		680				
Micractinium pusillum						
Mougeotia sp.						30
Oocystis lacustris		80				
Scenedesmus ecornis						
Scenedesmus denticulatus						
Scenedesmus quadricauda	40				100	
Scenedesmus spinosus						
Sphaerocystis shroeteri				40		
Staurastrum dorsidentiferum		110	1600	210		
Chrysophyceae						
Pseudokephyrion sp.	10					
Cryptophyceae						
Cryptomonas sp.	90	40		20		
Euglenophyceae						
Trachelomonas sp.						10
Dinophyceae						
Ceratium hirundinella				10		
Glenodinium sp.						
Total cells	240	1500	4600	11000	37000	16000

Table 3-2. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from October 2013 to March 2014. Values mean cells mL^{-1}.

	Oct. 2	Nov. 6	Dec. 3	Jan. 20	Feb. 17	Mar. 4
Cyanophyceae						
Aphanizomenon flos-aquae	77	570	140			
Aphanocapsa sp.						
Aphanothece sp.						
Chroococcus dispersus	17000					
Dolichospermum cucinale						
Dolichospermum crassum	16					
Dolichospermum flos-aquae	33	99	200			
Dolichospermum mucosum						
Microcystis aeruginosa	7200					
Microcystis ichthyoblabe	61200	52000	5000			
Microcystis wesenbergii	3600	510				
Microcystis viridis						
Oscillatoria splendida			3.3	6.6	33	44
Phormidium tenue		32				
Bacillariophyceae						
Asterionella formosa				80	250	100
Attheya zachariasi		60	30			
Aulacoseira granulata	61	310	61			
Coscinodiscus lacustris			20	10		
Cyclotella spp.	10	10	40			
Cymbella sp.						
Fragilaria crotonensis						
Navicula spp.						
Nitzschia acicularis					350	240
Nitzschia sp.				30	880	950
Synedra acus						
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus falcatus			10	40	50	110
Closterium aciculare		10	10	80	120	120
Dictyosphaerium pulchellum		350	210			
Elakatothrix gelatinosa						
Micractinium pusillum					40	
Mougeotia sp.	4500	680	1700	8.6	21	3
Oocystis lacustris						
Scenedesmus ecornis					1500	440
Scenedesmus denticulatus				120		
Scenedesmus quadricauda			20	160		160
Scenedesmus spinosus			80			
Sphaerocystis shroeteri						
Staurastrum dorsidentiferum		50			10	
Chrysophyceae						
Pseudokephyrion sp.						
Cryptophyceae						
Cryptomonas sp.			70	230	40	40
Euglenophyceae						
Trachelomonas sp.	10					
Euglenophyceae						
Ceratium hirundinella						
Glenodinium sp.		10			20	
Total cells	94000	55000	7600	770	3300	2200

Table 3-3. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from 2 April to 11 July 2014. Values mean cells mL^{-1}.

	Apr. 2	May 19	Jun. 2	Jul. 1	Jul. 4	Jul. 11
Cyanophyceae						
Anabaena crassa				92	1100	
Anabaena flos-aquae					260	430
Anabaena mucosa				3000	9100	96
Aphanizomenon flos-aquae						
Aphanocapsa sp.						
Microcystis aeruginosa				3000	27000	5600
Microcystis ichthyoblabe		310	21	140000	270000	370000
Microcystis wesenbergii				6000	21000	120
Oscillatoria splendida	11				22	7.7
Bacillariophyceae						
Achnanthes sp.	10	10				
Asterionella formosa	70					
Aulacoseira granulata			61	730	310	2400
Cyclotella sp.				100		
Cymbella sp.		20				20
Nitzschia acicularis						
Nitzschia spp.				50		
Stephanodiscus carconensis						10
Synedra acus	7			6	5	0.7
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus falcatus						
Chlamydomonas sp.			20	30		
Closterium aciculare	110	2400	2800	25	21	14
Coelastrum cambricum						
Coelastrum sphaericum						
Eudorina elegans						
Gloeocystis sp.						
Golenkinia sp.						
Kirchneriella sp.						
Micractinium pusillum						
Oocystis lacustris	20	150	40			
Pediastrum duplex						
Pediastrum simplex						
Scenedesmus ecornis	140					
Scenedesmus spinosus				40		
Scenedesmus quadricauda						40
Schroederia judayi			10			
Selenastrum gracile						80
Sphaerocystis shroeteri						
Staurastrum dorsidentiferum	4	37	110			
Volvox sp.						
Chrysophyceae						
Mallomonas akrokomos	10					
Ochromonas sp.						
Pseudokephyrion sp.						
Cryptophyceae						
Cryptomonas caudata			1600	110		
Cryptomonas sp.	120	10	70			
Dinophyceae						
Glenodinium sp.						
Gymnodinium spp.						
Total cells	500	2900	4700	150000	330000	380000

Table 3-4. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from 24 July to 13 August 2014. Values mean cells mL^{-1}.

	Jul. 24	Jul. 30	Aug. 1	Aug. 4	Aug. 8	Aug.13
Cyanophyceae						
Anabaena crassa						
Anabaena flos-aquae	8600	9.9				
Anabaena mucosa						
Aphanizomenon flos-aquae	680					
Aphanocapsa sp.						
Microcystis aeruginosa	100000				5400	
Microcystis ichthyoblabe	1100000	13000	5700		2300	
Microcystis wesenbergii						
Oscillatoria splendida						
Bacillariophyceae						
Achnanthes sp.						
Asterionella formosa						
Aulacoseira granulata	490	370				
Cyclotella sp.						
Cymbella sp.	10					
Nitzschia acicularis						
Nitzschia spp.	40				630	
Stephanodiscus carconensis						
Synedra acus						
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus falcatus					2900	1800
Chlamydomonas sp.	50					
Closterium aciculare	37	26	9.7	2.7	2	0.3
Coelastrum cambricum						320
Coelastrum sphaericum						160
Eudorina elegans						280
Gloeocystis sp.						3900
Golenkinia sp.						
Kirchneriella sp.					57000	260
Micractinium pusillum						
Oocystis lacustris				80	60	
Pediastrum duplex						
Pediastrum simplex						
Scenedesmus ecornis						120
Scenedesmus spinosus			40			
Scenedesmus quadricauda						
Schroederia judayi					20	210
Selenastrum gracile						
Sphaerocystis shroeteri						
Staurastrum dorsidentiferum						
Volvox sp.	1500					
Chrysophyceae						
Mallomonas akrokomos						
Ochromonas sp.						
Pseudokephyrion sp.						
Cryptophyceae						
Cryptomonas caudata					10	10
Cryptomonas sp.	10					
Dinophyceae						
Glenodinium sp.						
Gymnodinium spp.						
Total cells	1200000	13000	5800	83	68000	7100

Table 3-5. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from 18 August 2014 to 5 January 2015. Values mean cells mL^{-1}.

	Aug. 18	Sep. 3	Oct. 7	Nov. 4	Dec. 2	Jan. 5
Cyanophyceae						
Anabaena crassa						
Anabaena flos-aquae				99		
Anabaena mucosa						
Aphanizomenon flos-aquae						
Aphanocapsa sp.			20000	20000	4000	
Microcystis aeruginosa			1500			
Microcystis ichthyoblabe			4400			
Microcystis wesenbergii			2200			
Oscillatoria splendida			22			
Bacillariophyceae						
Achnanthes sp.				10		40
Asterionella formosa						
Aulacoseira granulata		120	21000	310	120	
Cyclotella sp.	10	2400		350	20	10
Cymbella sp.						
Nitzschia acicularis						
Nitzschia spp.	10	20				
Stephanodiscus carconensis					30	20
Synedra acus						
Chlorophyceae						
Ankistrodesmus falcatus	10		10	110	90	160
Chlamydomonas sp.		50	20	10	10	
Closterium aciculare			32	280	2400	1200
Coelastrum cambricum	4300					
Coelastrum sphaericum		320				
Eudorina elegans		110				
Gloeocystis sp.						
Golenkinia sp.		10				
Kirchneriella sp.						20
Micractinium pusillum	2200			110	120	
Oocystis lacustris		330			40	
Pediastrum duplex			21			
Pediastrum simplex	1300	200	64			
Scenedesmus ecornis						
Scenedesmus spinosus						
Scenedesmus quadricauda		120				
Schroederia judayi						
Selenastrum gracile						
Sphaerocystis shroeteri						
Staurastrum dorsidentiferum				70	60	
Volvox sp.						
Chrysophyceae						
Mallomonas akrokomos						
Ochromonas sp.						
Pseudokephyrion sp.						
Cryptophyceae						
Cryptomonas caudata	10	500		50	40	590
Cryptomonas sp.	10			30	60	
Dinophyceae						
Glenodinium sp.						10
Gymnodinium spp.					10	
Total cells	7900	4200	49000	21000	7000	2100

Table 3-6. Phytoplankton cell count data of surface water of the Karasuhara Reservoir from 2 February to 2 March 2015. Values mean cells mL^{-1}.

	Feb. 2	Mar. 2
Cyanophyceae		
Anabaena crassa		
Anabaena flos-aquae		
Anabaena mucosa		
Aphanizomenon flos-aquae		
Aphanocapsa sp.		
Microcystis aeruginosa		
Microcystis ichthyoblabe		
Microcystis wesenbergii		
Oscillatoria splendida		
Bacillariophyceae		
Achnanthes sp.		40
Asterionella formosa	80	200
Aulacoseira granulata		
Cyclotella sp.	30	
Cymbella sp.		
Nitzschia acicularis	90	3000
Nitzschia spp.	70	770
Stephanodiscus carconensis		
Synedra acus	4	80
Chlorophyceae		
Ankistrodesmus falcatus		150
Chlamydomonas sp.		
Closterium aciculare	600	900
Coelastrum cambricum		
Coelastrum sphaericum		
Eudorina elegans		
Gloeocystis sp.		
Golenkinia sp.		
Kirchneriella sp.		
Micractinium pusillum		480
Oocystis lacustris		
Pediastrum duplex		
Pediastrum simplex		
Scenedesmus ecornis	60	
Scenedesmus spinosus		
Scenedesmus quadricauda		
Schroederia judayi		
Selenastrum gracile		
Sphaerocystis shroeteri		
Staurastrum dorsidentiferum		10
Volvox sp.		
Chrysophyceae		
Mallomonas akrokomos		
Ochromonas sp.	800	
Pseudokephyrion sp.	10	
Cryptophyceae		
Cryptomonas caudata	1200	130
Cryptomonas sp.	50	240
Dinophyceae		
Glenodinium sp.		
Gymnodinium spp.		
Total cells	3000	6000

Table 4-1. Water Quality of lake water samples collected from water plant zone at Yanagasaki and non-water plant zone at Yanagawa River mouth in Lake Biwa on 27 October 2016.

	Water plant zone (Yanagasaki)	Non-water plant zone (Yanagawa River mouth)
Water temperature (℃)	19.5	19.4
pH	7.9	7.9
Turbidity	6.4	3.1
Color	6.7	3.8
EC（μS cm^{-1}）	121	118

Table 4-2. Water Quality of lake water samples collected from water plant zone at Yanagasaki and non-water plant zone at Biwako-oohashi in Lake Biwa on 3 Aug. 2017.

	Water plant zone (Yanagasaki)	Non-water plant zone (Biwako-oohashi)
Water temperature (ºC)	29.9	29.0
pH	8.8	8.0
Turbidity	3.1	2.8
Color	4.7	4.3
EC (μS cm^{-1})	118	112
NO_3-N (mg L^{-1})	0.00	0.00
NO_2-N (mg L^{-1})	0.000	0.000
NH_4-N (mg L^{-1})	0.02	0.00
Total N (mg L^{-1})	0.40	0.32
PO_4-P (mg L^{-1})	0.004	0.002
Total P (mg L^{-1})	0.038	0.019

Table 4-3. Changes in the cell densities of phytoplankton in samples inoculated with lake water collected from water plant zone at Yanagasaki and non-water plant zone at Yanagawa River mouth in Lake Biwa on 27 October 2016. Values mean cells mL^{-1}.

	Water plant zone (Yanagasaki)		Non-water plant zone (Yanagawa River mouth)	
	0 day	8days	0 day	8days
Cyanophyceae				
Dolichospermum crassum	1,900	230	1,900	13,000
Dolichospermum flos-aquae	1900	960	730	22000
Dolichospermum mucosum		190		
Dolichospermum smithii	160	1400	68	1100
Dolichospermum ucrainicum	38			
Microcystis ichthyoblabe	900	6000	900	2000
Microcystis wesenbergii				2000
Phormidium tenue	46	320	15	140,000
Bacillariophyceae				
Asterionella formosa			18	
Aulacoseira granulata	1900		432	2300
Aulacoseira granulata f. *spiralis*	140		86	140
Cocconeis placentula	10			
Cyclotella sp.	14	2200	23	25
Cymbella sp.	3			
Gomphonema sp.	6			
Nitzschia spp.	1	25	2	130
Stephanodiscus subsalsus				230
Synedra acus			1	1
Synedra ulna	4			
Chlorophyceae				
Ankistrodesmus falcatus		2300	4	1100
Chlamydomonas sp.				400
Closterium aciculare	5	2	2	7
Coelastrum sphaericum		800		16
Eudorina elegans	190	96	76	320
Kirchneriella sp.				800
Micrasterias mahabuleshwarensis	4	5	5	5
Micractinium pusillum	4	1800	72	1800
Mougeotia sp.	21	47	27	2400
Pandorina morum				16
Pediastrum duplex	43	350		300
Scenedesmus ecornis		100		100
Scenedesmus quadricauda		800	4	300
Staurastrum dorsidentiferum	5	23	7	8
Chrysophyceae				
Mallomonas caudata	4		3	
Cryptophyceae				
Cryptomonas sp.	6	1000	14	2400
Euglenophyceae				
Trachelomonas sp.	2			
Euglenophyceae				
Glenodinium sp.	2		13	
Total cells	5400	18000	2500	180000

Table 4-4. Change in nutrients in experimental bottles inoculated with lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (upper table), and lake water collected from non-water plant zone at Biwako-oohashi (lower table) in Lake Biwa on 3 August 2017. Values mean mg L^{-1}.

Incubation periods	Nutrients	Experiments using lake water of water plant zone (Yanagasaki)			
		Untreated lake water	Filtrate of lake water through 1.2 μm pore size filter	Filtrate of lake water through 0.1 μm pore size filter	Autoclaved lake water
0 day (start)	NO_3-N	0.67	0.69	0.69	0.69
	NO_2-N	0.000	0.000	0.000	0.000
	NH_4-N	0.00	0.00	0.02	0.02
	Total N	1.51	1.38	1.36	1.40
	PO_4-P	0.046	0.039	0.045	0.043
	Total P	0.15	0.13	0.13	0.14
13 days (finish)	NO_3-N	0.00	0.00	0.06	0.00
	NO_2-N	0.000	0.000	0.000	0.000
	NH_4-N	0.00	0.00	0.00	0.00
	PO_4-P	0.001	0.024	0.000	0.000

Incubation periods	Nutrients	Experiments using lake water of water non-water plant zone (Biwako-oohashi)			
		Untreated lake water	Filtrate of lake water through 1.2 μm pore size filter	Filtrate of lake water through 0.1 μm pore size filter	Autoclaved lake water
0 day (start)	NO_3-N	0.68	0.69	0.69	0.70
	NO_2-N	0.000	0.000	0.000	0.000
	NH_4-N	0.00	0.00	0.00	0.00
	Total N	1.40	1.32	1.38	1.35
	PO_4-P	0.039	0.038	0.040	0.041
	Total P	0.14	0.13	0.12	0.13
13 days (finish)	NO_3-N	0.00	0.00	0.00	0.00
	NO_2-N	0.000	0.000	0.000	0.000
	NH_4-N	0.00	0.00	0.00	0.00
	PO_4-P	0.001	0.002	0.000	0.001

Table 4-5. Changes in nutrients in experimental bottles inoculated with water plant *Potamogeton malayanus* collected from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017. Values mean mg L^{-1}.

Incubation periods	Nutrients	Experiments using water plant		
		a piece of *P. malayanus*	Biofilm suspension of *P. malayanus*	Filtrateof mashed *P. malayanus*
0 day (start)	NO_3-N	0.72	0.71	0.69
	NO_2-N	0.000	0.000	0.000
	NH_4-N	0.00	0.00	0.02
	Total N	1.58	1.49	1.41
	PO_4-P	0.047	0.051	0.053
	Total P	0.15	0.15	0.15
13 days (finish)	NO_3-N	0.00	0.00	0.14
	NO_2-N	0.000	0.000	0.007
	NH_4-N	0.00	0.00	0.12
	PO_4-P	0.002	0.000	0.014

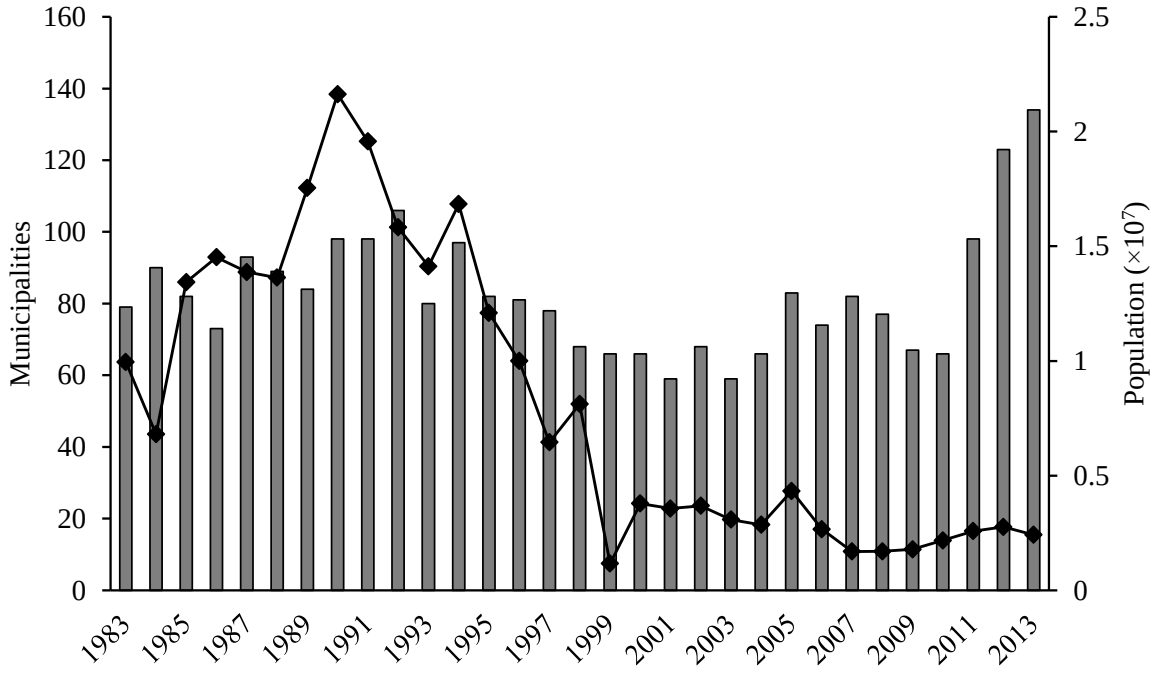


Fig. 1-1. Number of municipalities (histogram) and population (◆) suffering from offensive taste and odor in drinking water in Japan.

(http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000079071.pdf)

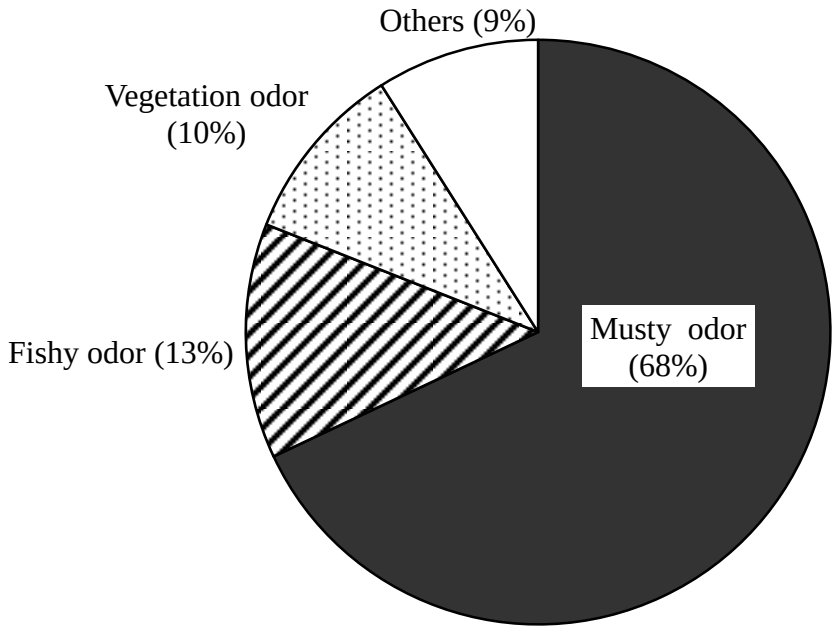


Fig. 1-2. Composition of offensive taste and odor damages in drinking water based on the national survey conducted by Ministry of Health, Labor and Welfare in 2013.

(http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000079071.pdf）

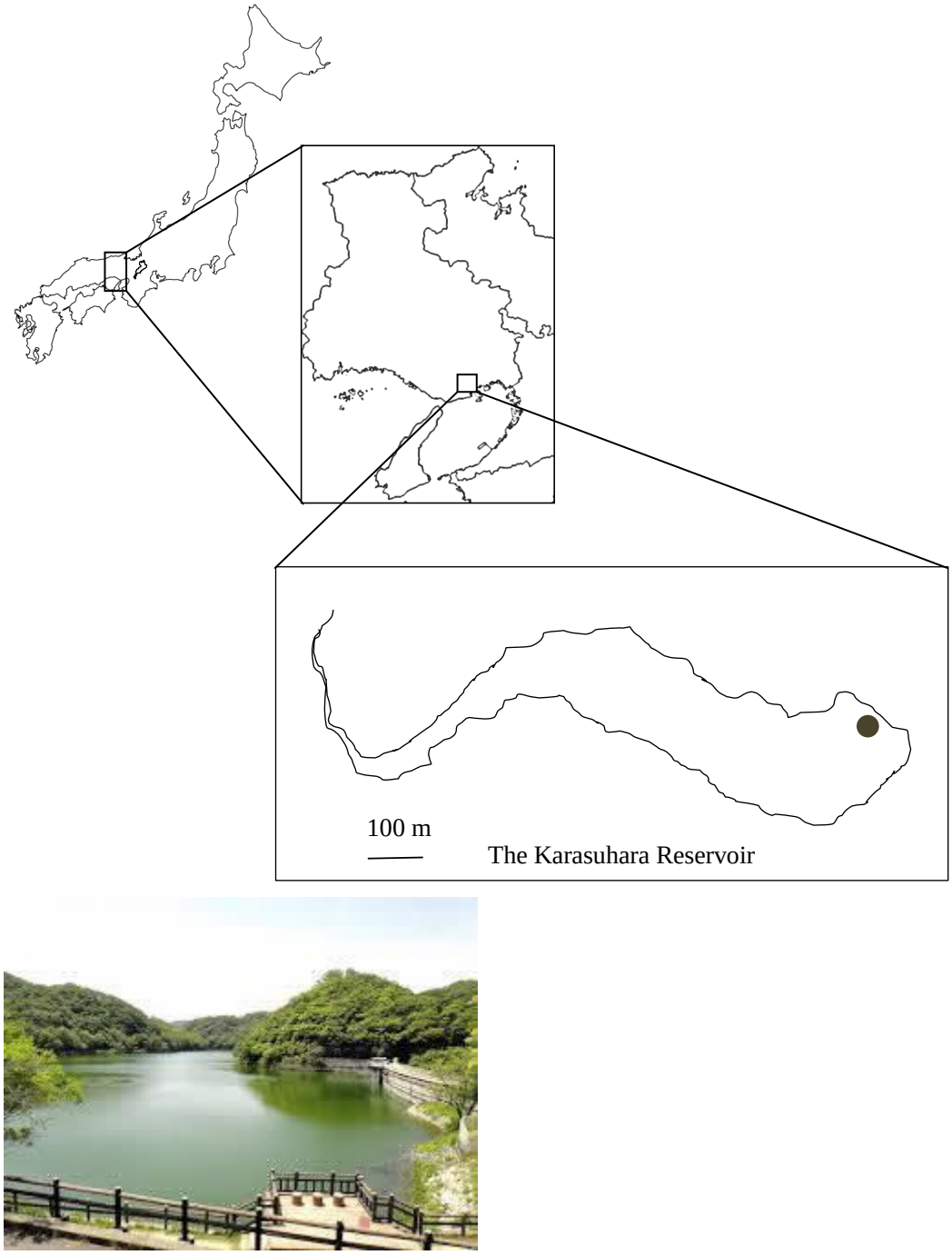
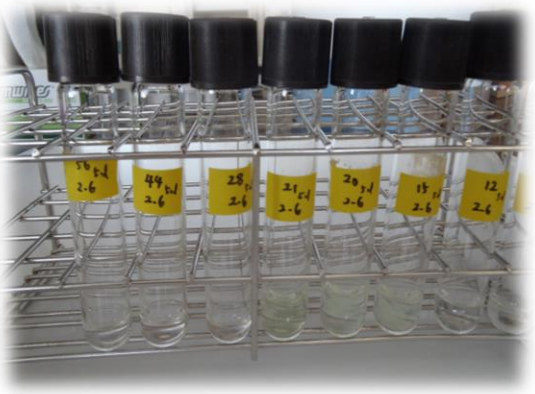
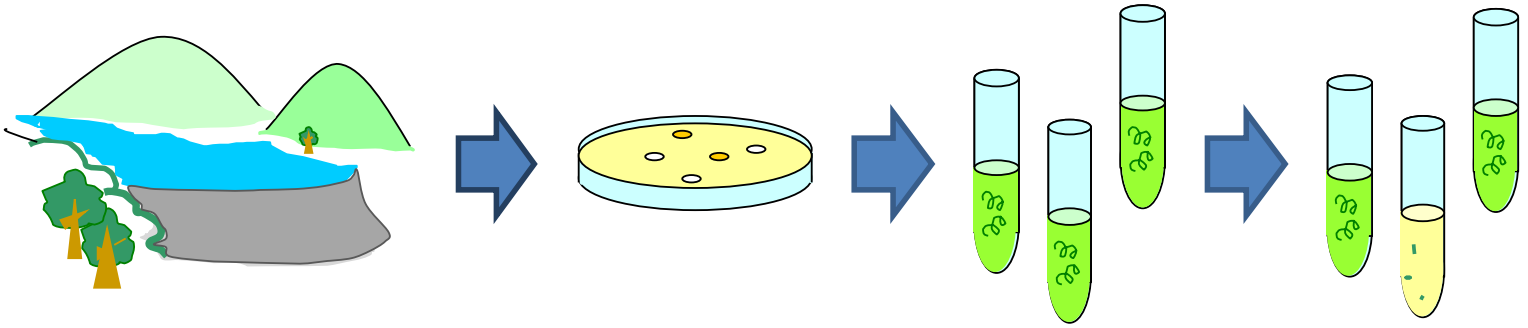


Fig. 2-1. Location of sampling point (●) of the Karasuhara Reservoir.





1. Sampling of surface water from the Karasuhara Reservoir

2. Colony formation and purification of the heterotrophic bacteria on the R2A agar plates.

3. Inoculation of each colony to *D. crassum* culture.

4. Judgement of algicidal activity. The tubes in which *D. crassum* was destroyed were regarded as algicidal positive.

Fig. 2-2. Outline of the algicidal assay for the surface water of the Karasuhara Reservoir.

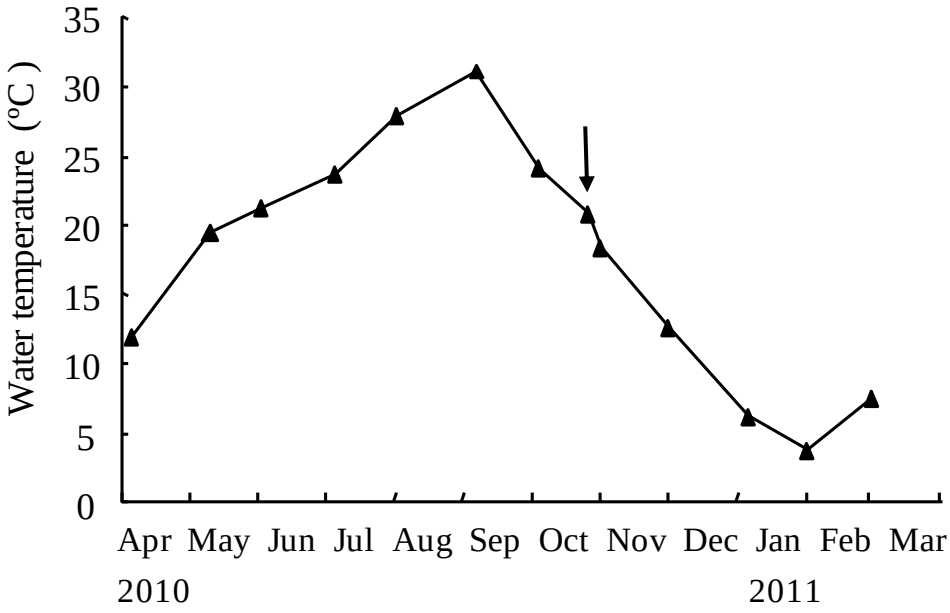


Fig. 2-3. Variation in surface water temperature in the Karasuhara Reservoir from April 2010 to March 2011. Arrow indicates the sampling date (26 October 2010) when algicidal bacteria were isolated.

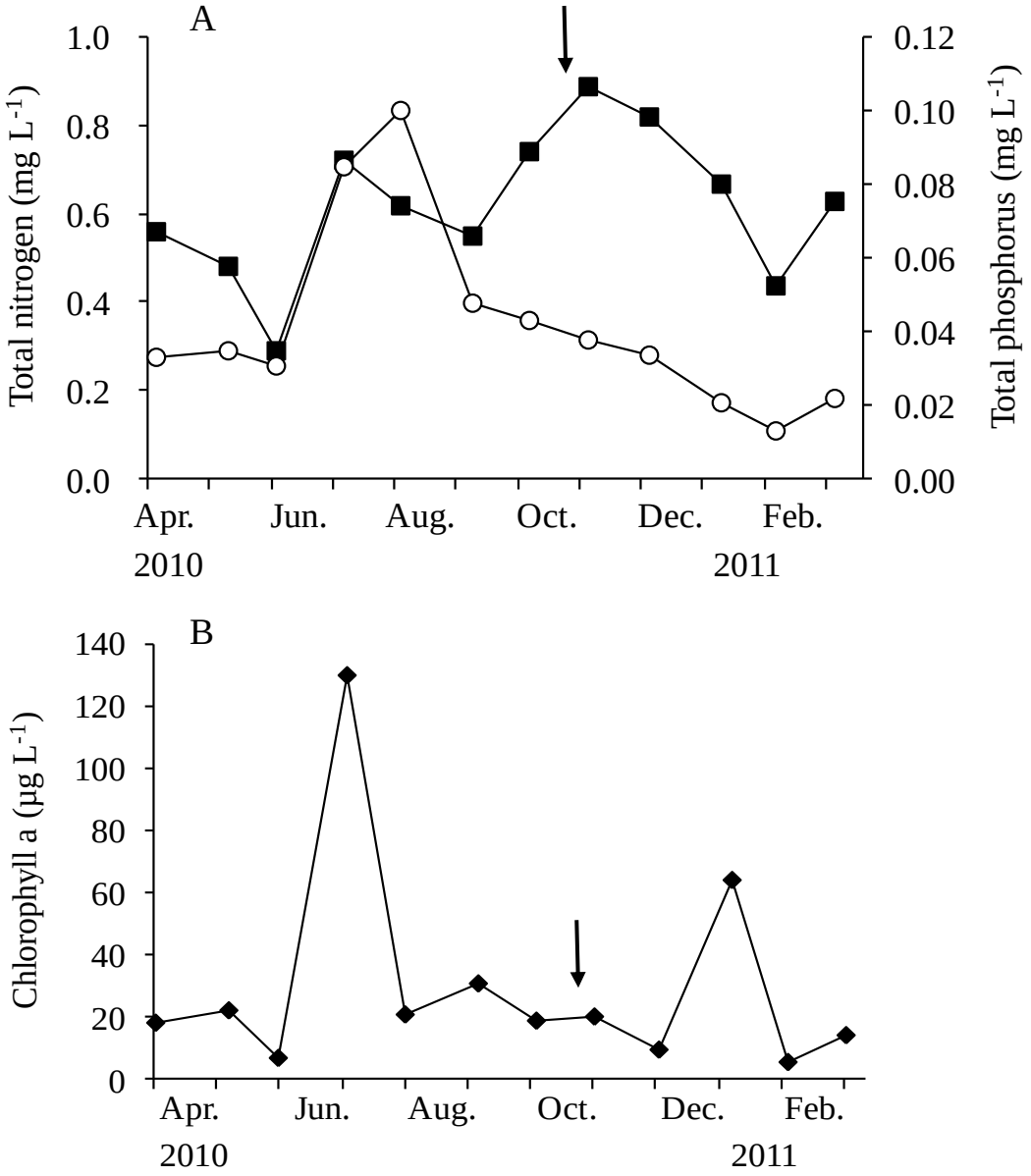


Fig. 2-4. Seasonal changes in nutrients (A) and chlorophyll a (B) of surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2010 to March 2011.

■ total nitrogen; ○ total phosphorus; ◆ chlorophyll a.

Arrow indicates the sampling date (26 October 2010) when algicidal bacteria were isolated.

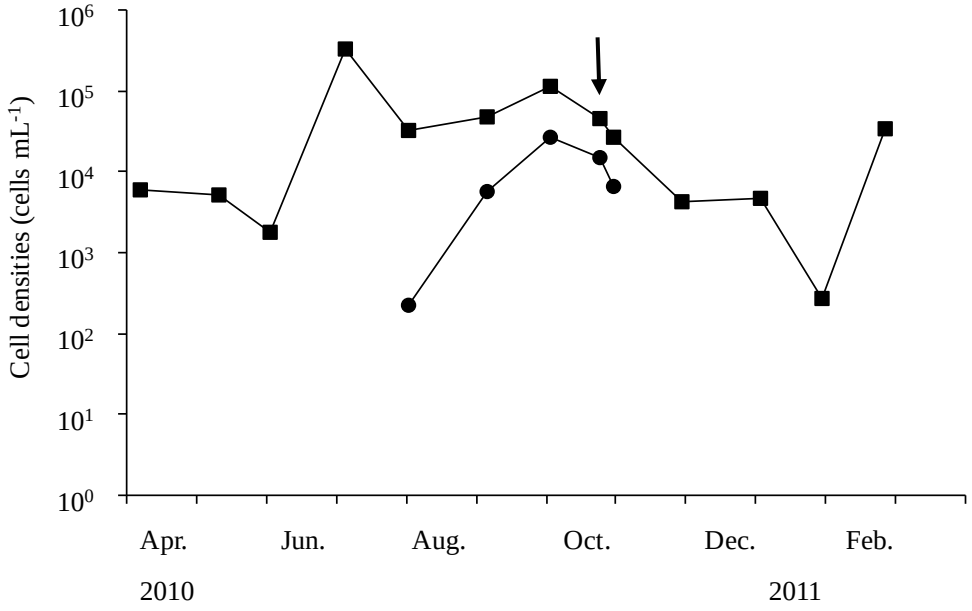


Fig. 2-5. Seasonal changes in abundance of the total phytoplankton (■), and the cyanobacterium *Dolichospermum crassum* (●) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2010 to March 2011. Arrow indicates the sampling date (26 October 2010) when algicidal bacteria were isolated.

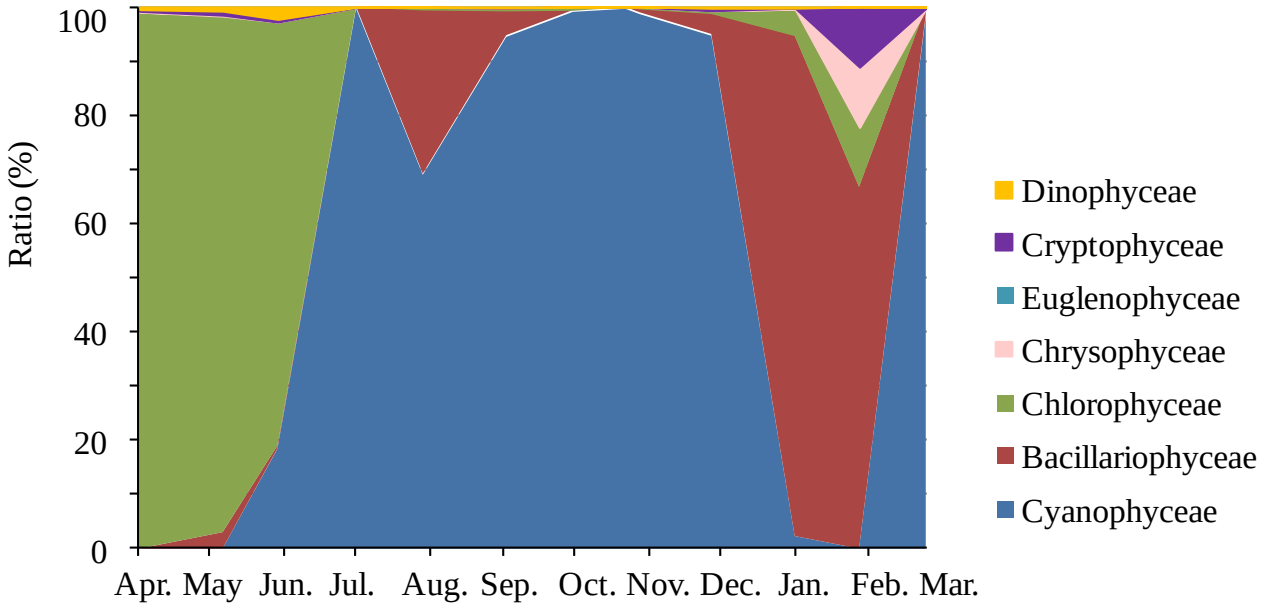


Fig. 2-6. Seasonal change in the taxa composition (%) of phytoplankton in surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2010 to March 2011.

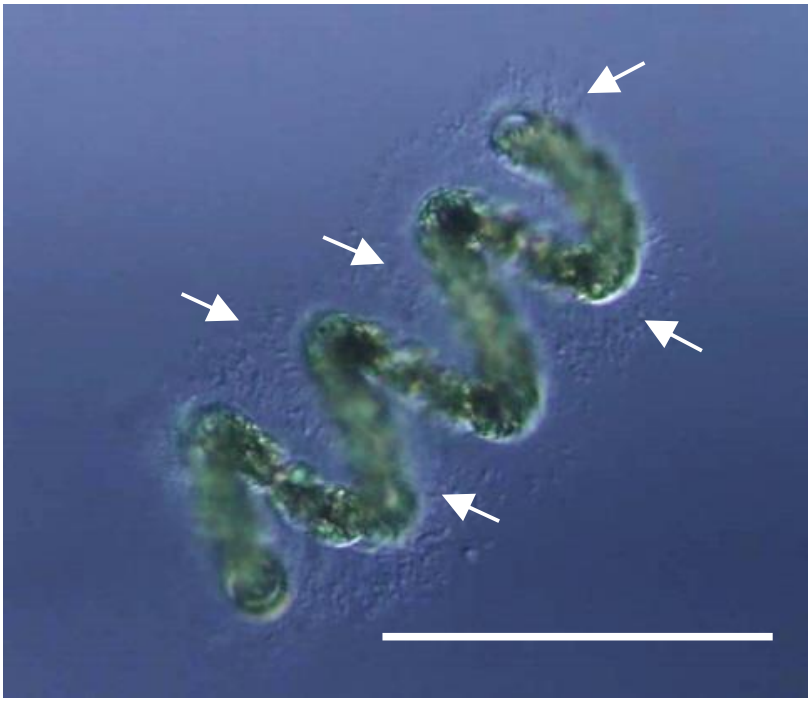


Fig. 2-7. Micrograph of *Dolichospermum crassum* in decreasing phase sampled from the surface water of the Karasuhara Reservoir on 1 November 2010. Arrows indicate bacterial cells. Bar, 100μm.

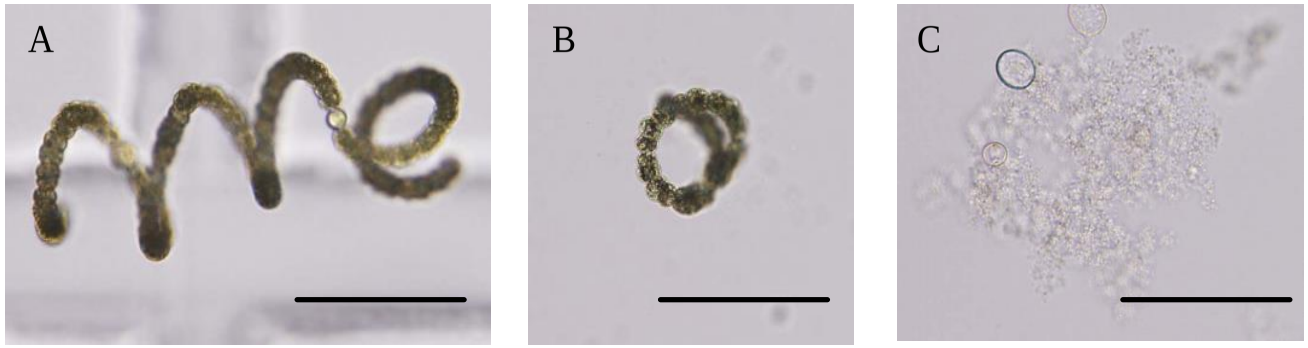


Fig. 2-8. Microscopical observations on the algicidal activity of the bacterium strain K-44 against *Dolichospermum crassum*.

A, Healthy cells of *D. crassum* before inoculation of strain K-44; B, shrinked trichomes after inoculation of strain K-44; C, killed and lysed cells of *D. crassum* by strain K-44. Bars, 100μm.

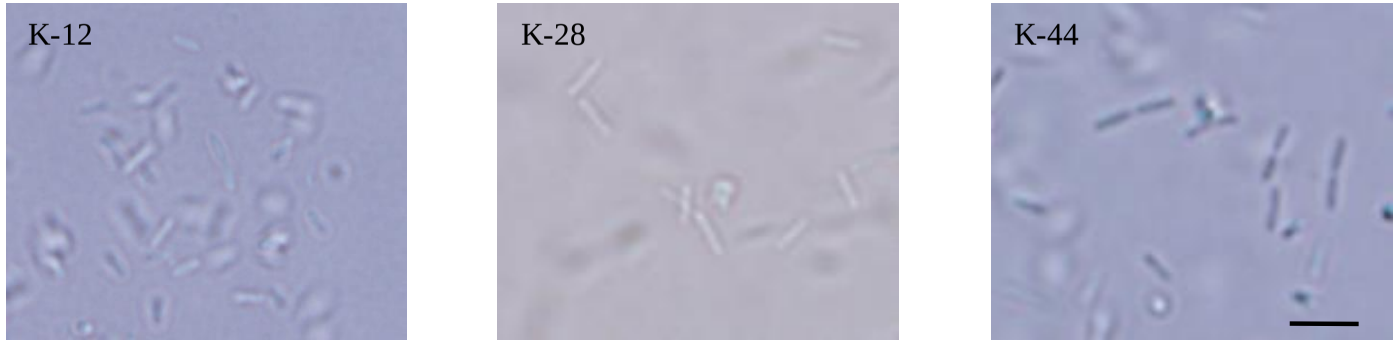


Fig. 2-9. Differential interference contrast micrographs of algicidal bacteria (strains K-12, K-28, and K-44) isolated from surface water of the Karasuhara Reservoir on 26 October 2010. Bar indicates 5 µm.

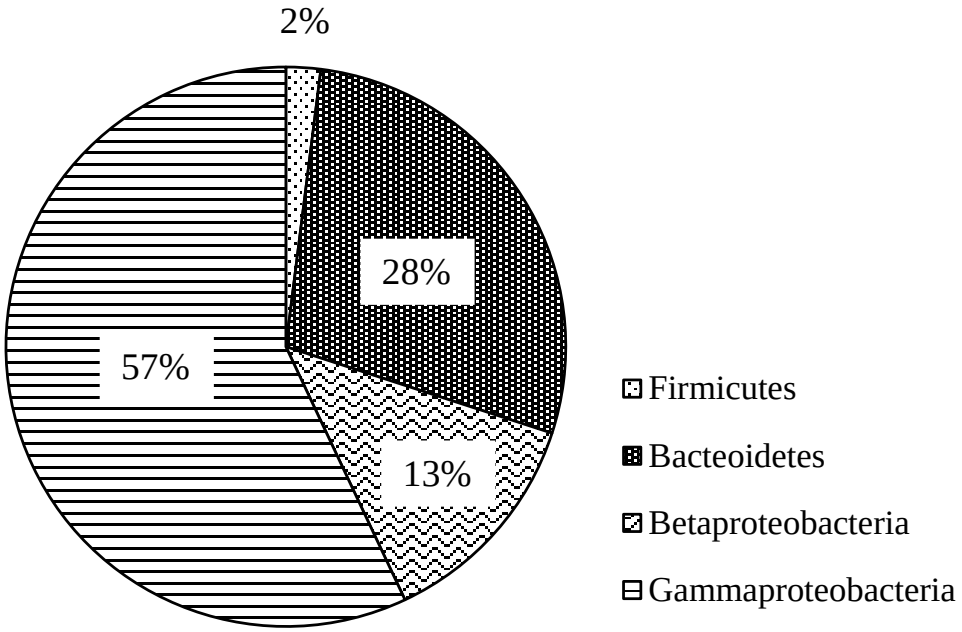


Fig. 2-10. Phylogenetic composition (%) of heterotrophic bacteria based on the analysis of 16S rDNA sequences in the surface water of the Karasuhara Reservoir collected on 26 October 2010.

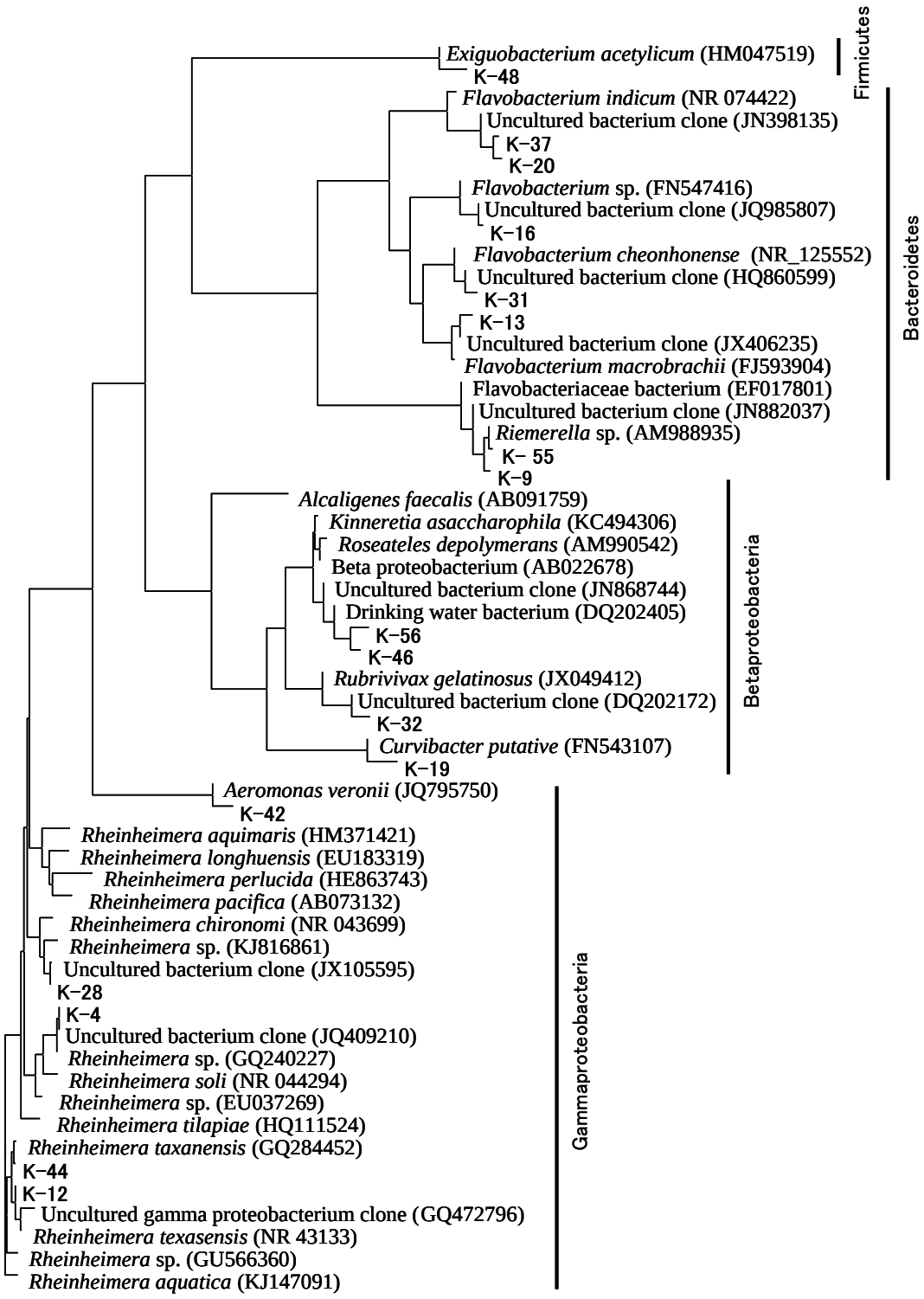


Fig. 2-11. Phylogenetic relationship between the sequences of heterotrophic bacteria isolated from the Karasuhara Reservoir and 16S rDNA sequences of reference bacteria. Total 17 strains of isolated bacteria were described as K-4 to K-56.

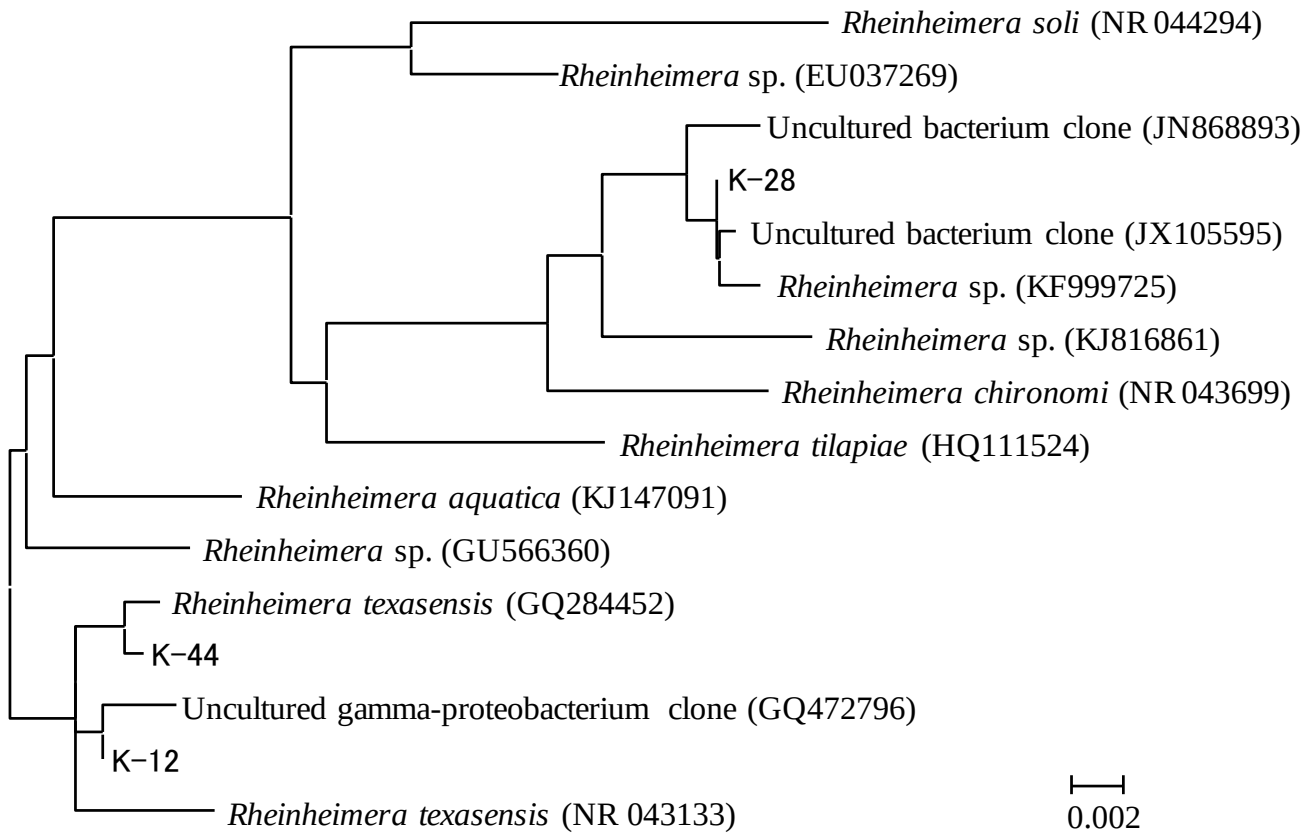


Fig. 2-12. Phylogenetic relationship between the sequences of algicidal bacteria (K-12, K-28 and K-44) isolated from the Karasuhara Reservoir and 16S rDNA sequences of reference bacteria.

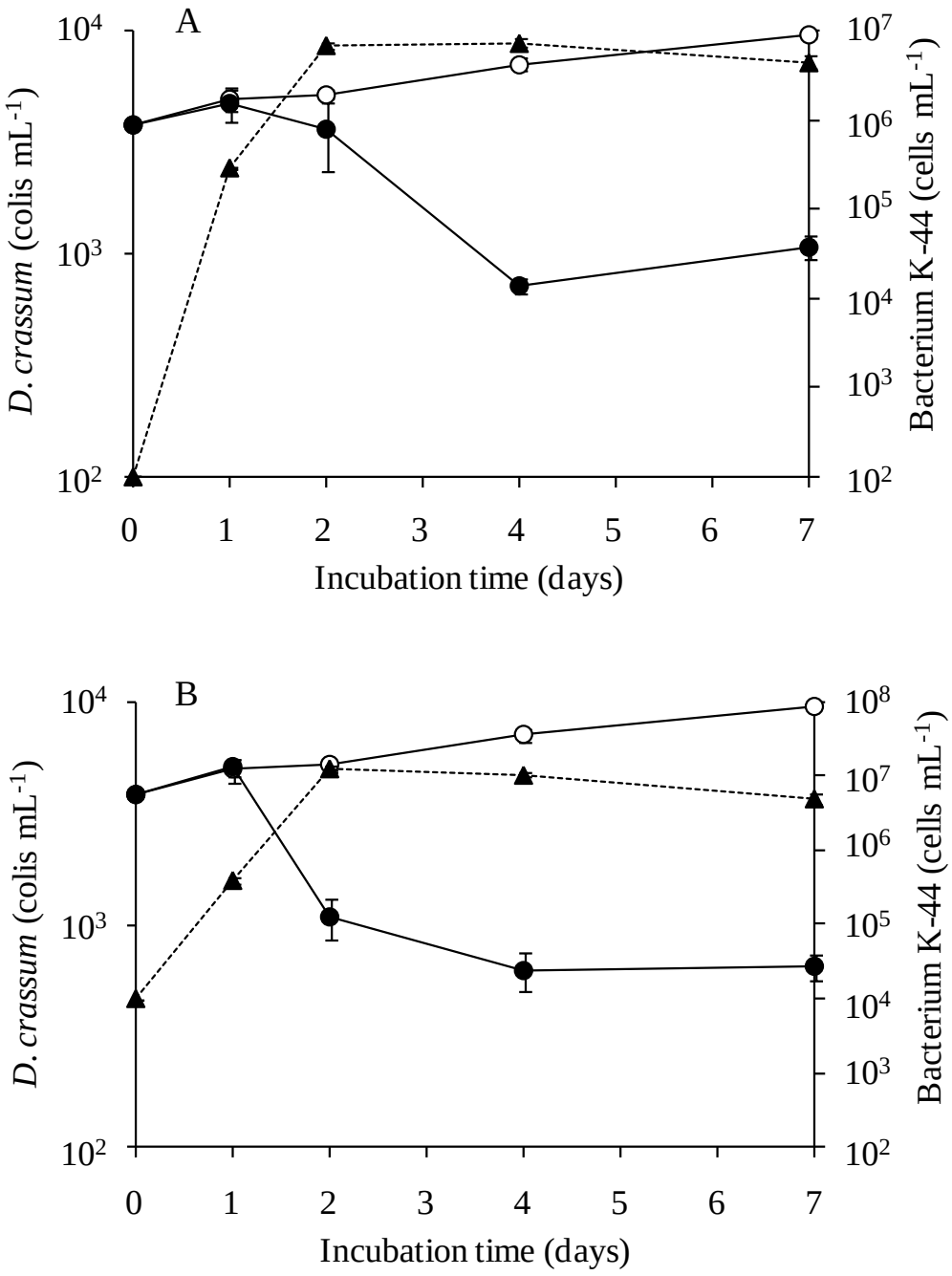


Fig. 2-13. Changes in the cell densities of *Dolichospermum crassum* and the algicidal bacterium strain K-44 during the co-culture experiments with initial inoculation densities of 1.0×10^2 cells mL^{-1} (A) and 1.0×10^4 cells mL^{-1} (B).

●, *D. crassum* with inoculation of algicidal bacteria; ○, *D. crassum* of control without bacterial inoculation; ▲, strain K-44. Bars, standard deviation.

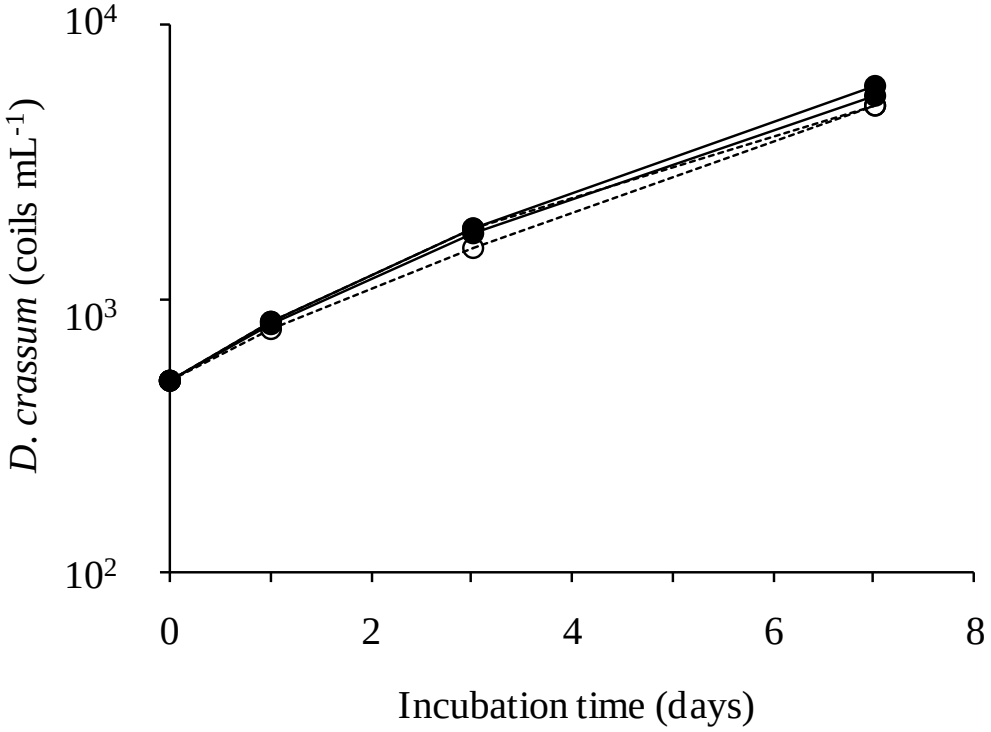


Fig. 2-14. Changes in densities of *Dolichospermum crassum* after inoculating the culture filtrate in which *D. crassum* was destroyed by the algicidal bacterium K-44.
●, *D. crassum* with the addition of bacterial culture filtrate; ○, *D. crassum* control of fresh CT medium was additioned.

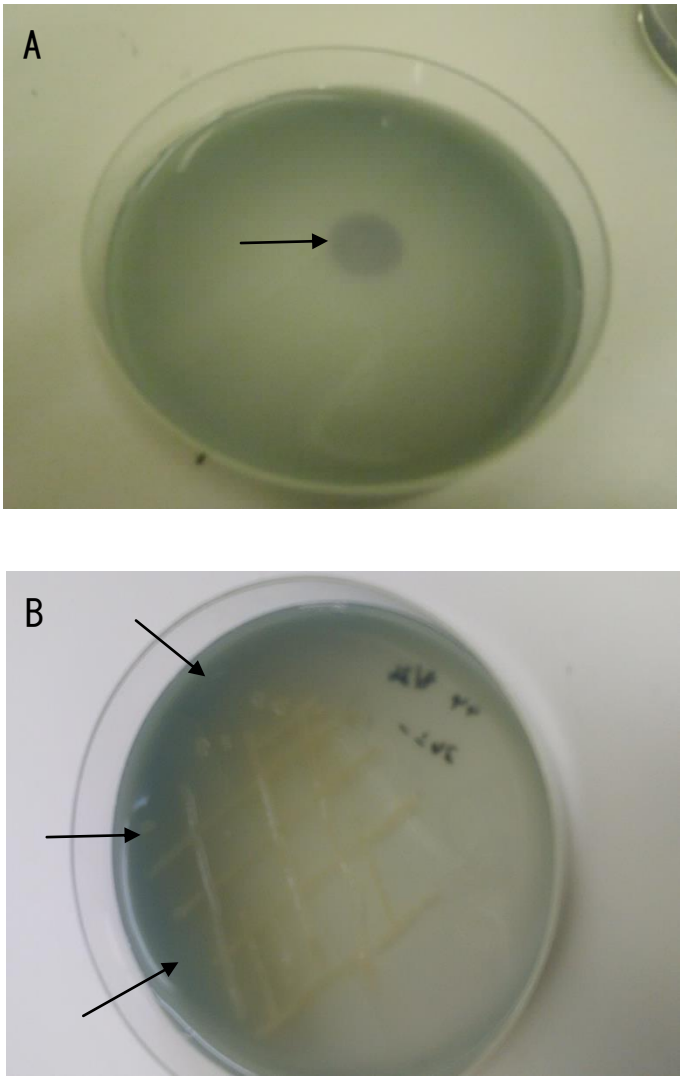


Fig. 2-15. Prussian blue assay for hydrogen peroxide production by the algicidal bacterium strain K-44. A, agar spotted with hydrogen peroxide in the center showing dark blue color; B, Positive agar plate in which dark blue color appeared around colonies after inoculation of strain K-44. Arrows indicate positive reactions which show dark blue color.

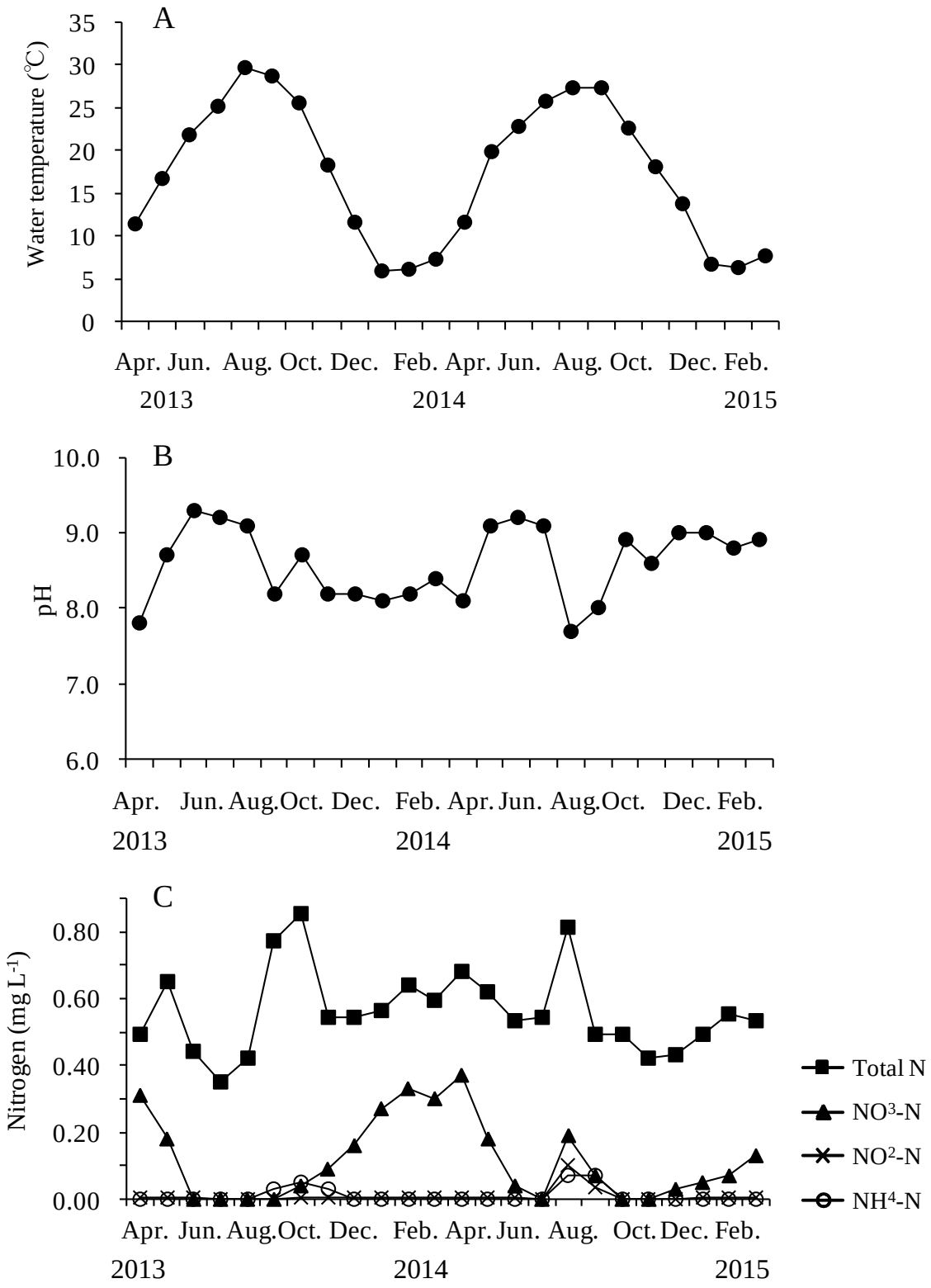


Fig. 3-1. Seasonal changes in water temperature (A), pH (B), and nitrogen (C) in surface water of the Karasuhara Reservoir collected from April 2013 to March 2015.

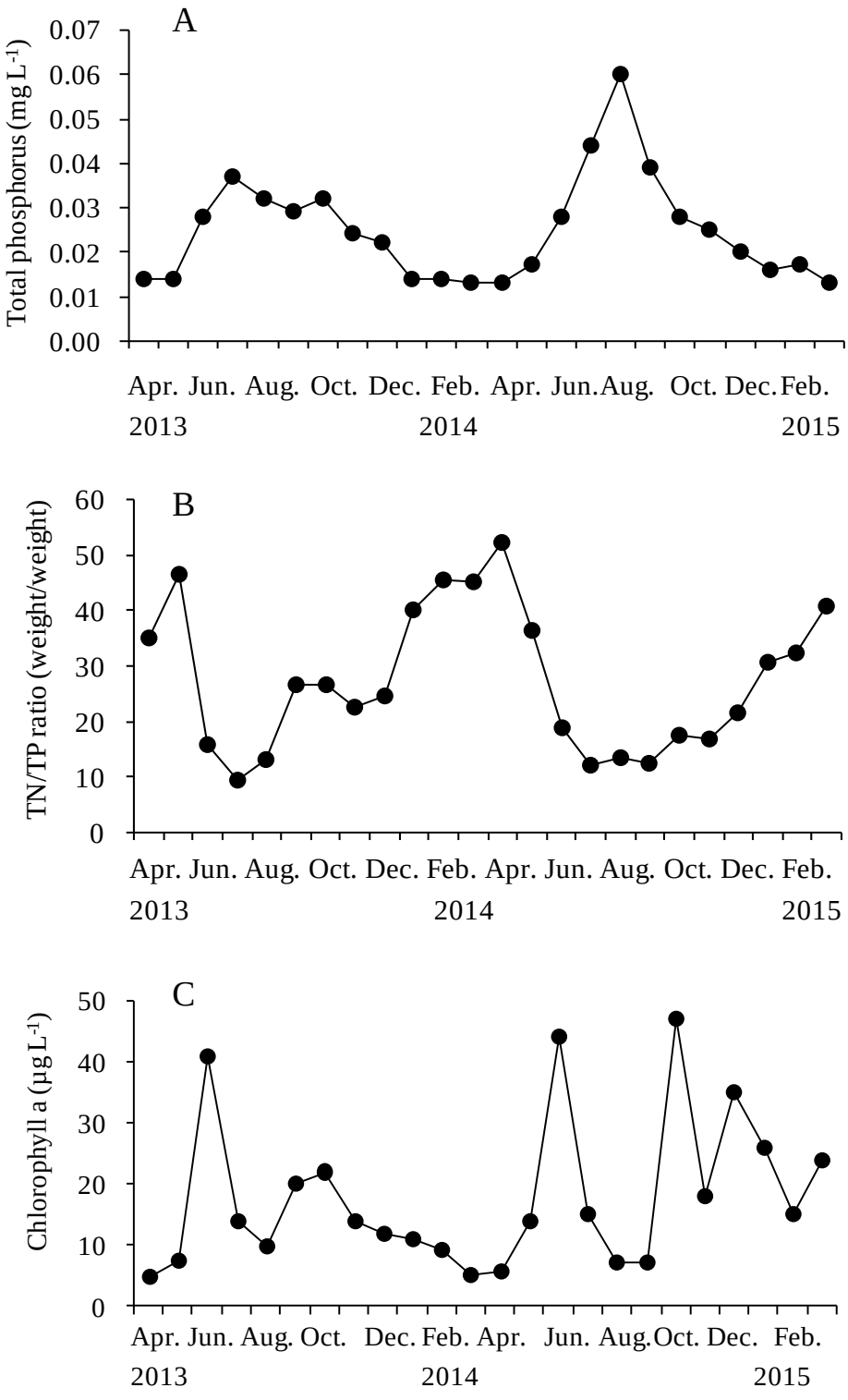


Fig. 3-2. Seasonal changes in total phosphorus (A), TN/TP ratio (weight/weight), and chlorophyll a (C) in surface water of the Karasuhara Reservoir collected from April 2013 to March 2015.

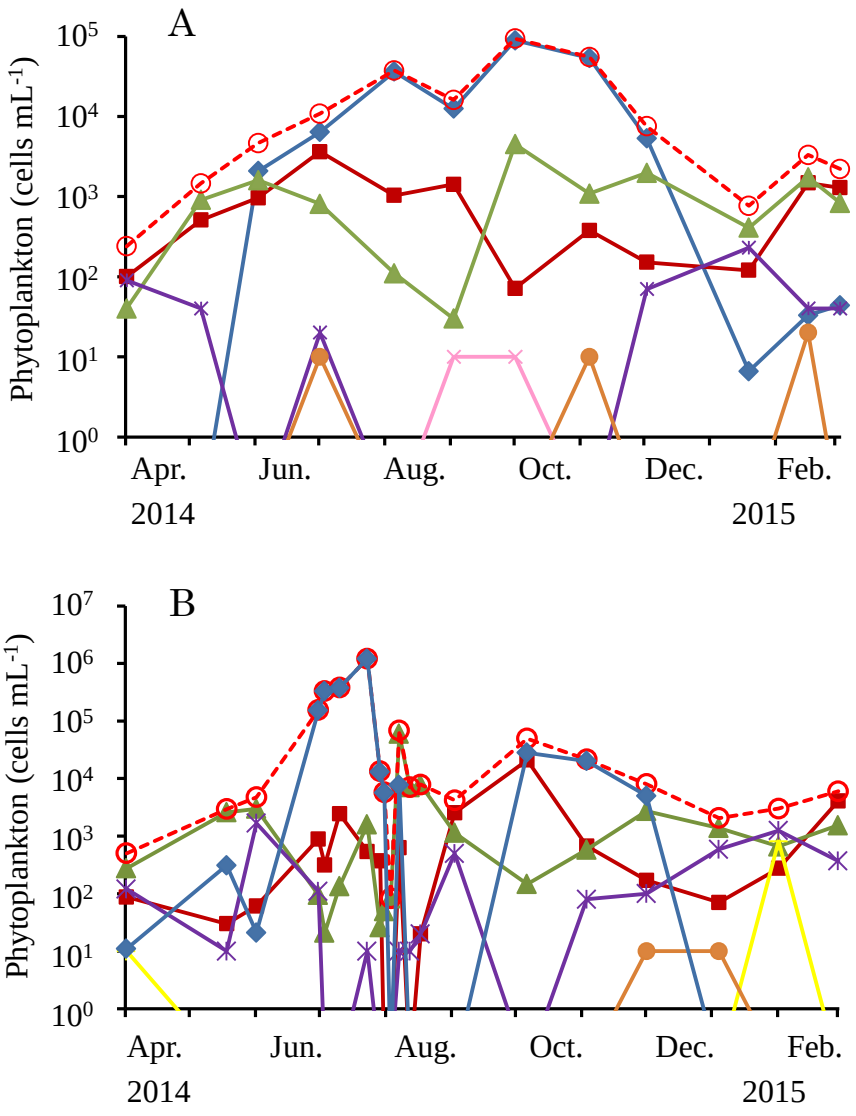


Fig. 3-3. Seasonal changes in abundance of phytoplankton in the surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2013 to March 2014 (A), and from April 2014 to March 2015 (B).

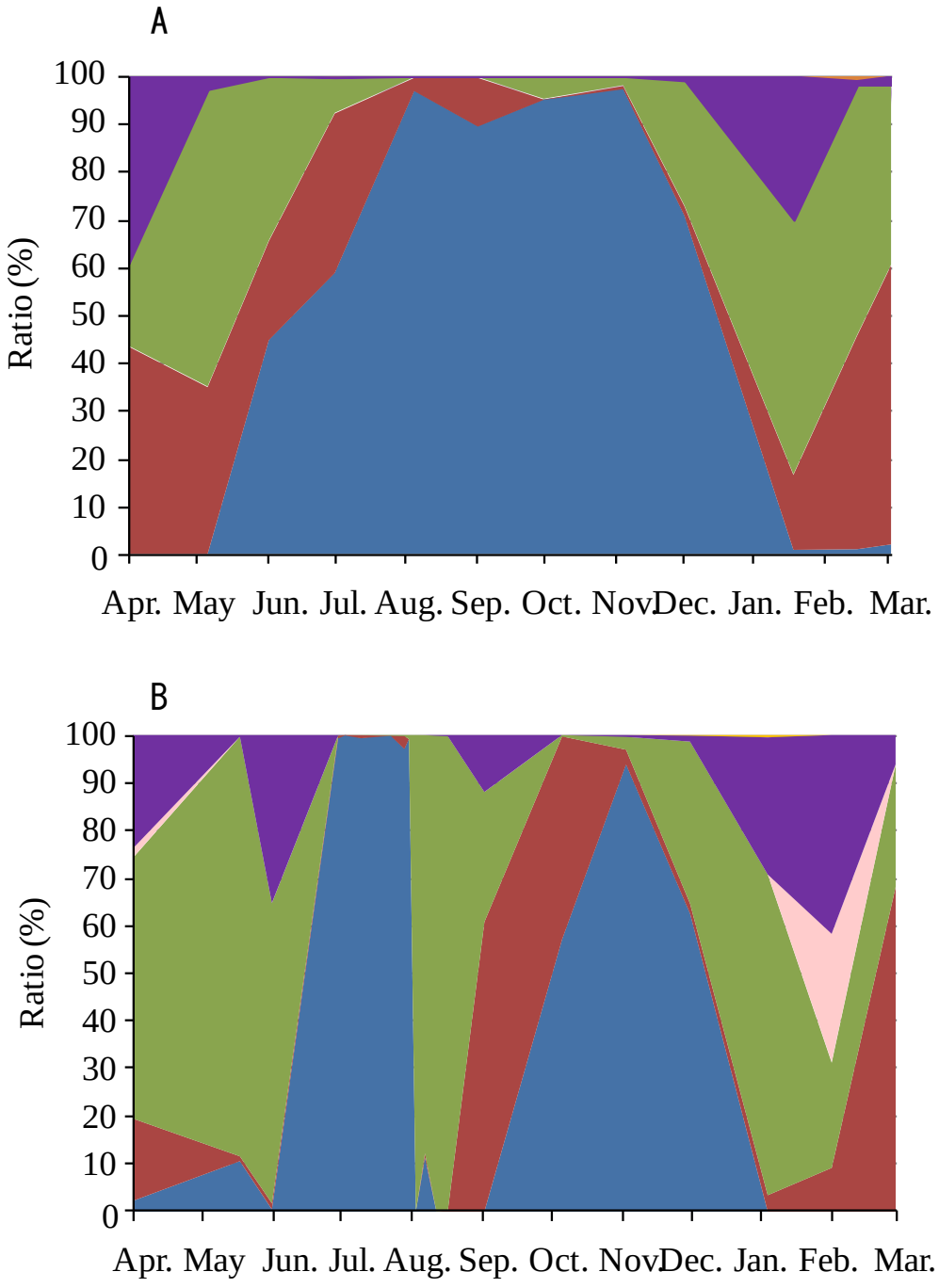


Fig. 3-4. Seasonal change in the taxa composition (%) of phytoplankton in the surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2013 to March 2014 (A), and from April 2014 to March 2015 (B).

Cyanophyceae; Chlorophyceae; Bacillariophyceae; Chrysophyceae; Euglenophyceae; Cryptophyceae; Dinophyceae

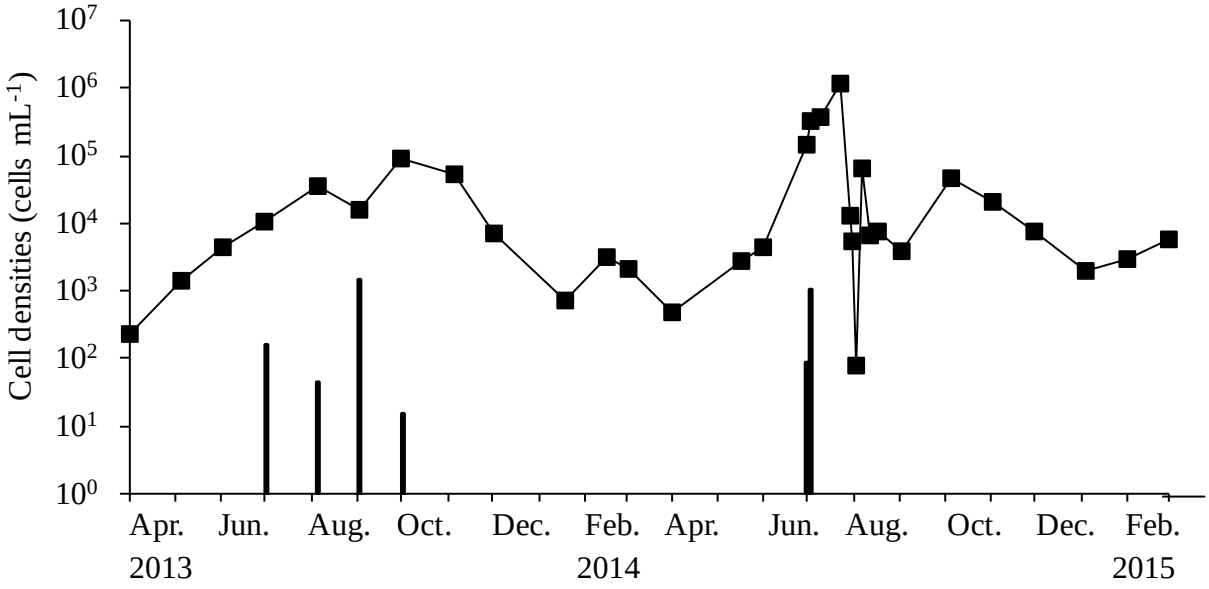


Fig. 3-5. Seasonal changes in densities of *Dolichospermum crassum* (histogram) and total phytoplankton (■) in surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2013 to March 2015.

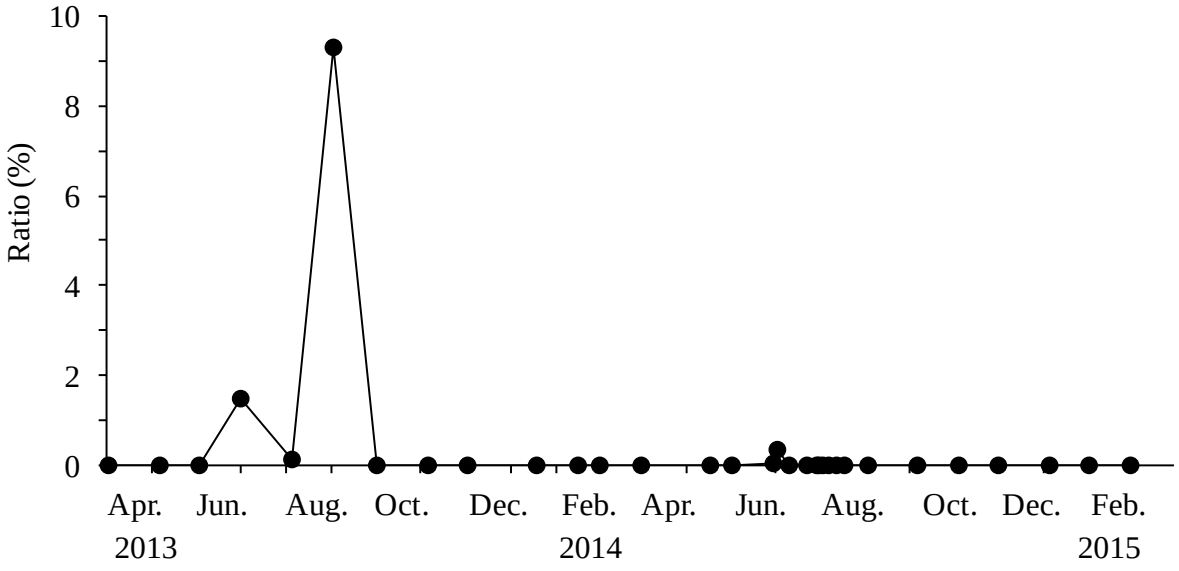


Fig. 3-6. Seasonal change in ratio (%) of cell densities of *Dolichospermum crassum* to total phytoplankton in surface water of the Karasuhara Reservoir from April 2013 to March 2015.

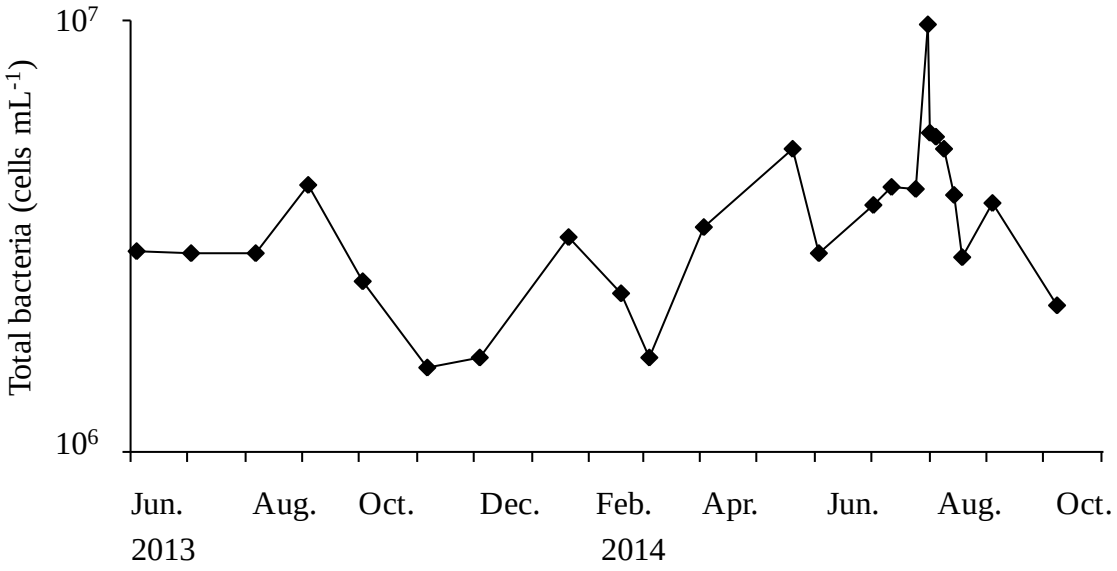


Fig. 3-7. Seasonal changes in densities of total bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir from June 2013 to October 2014.

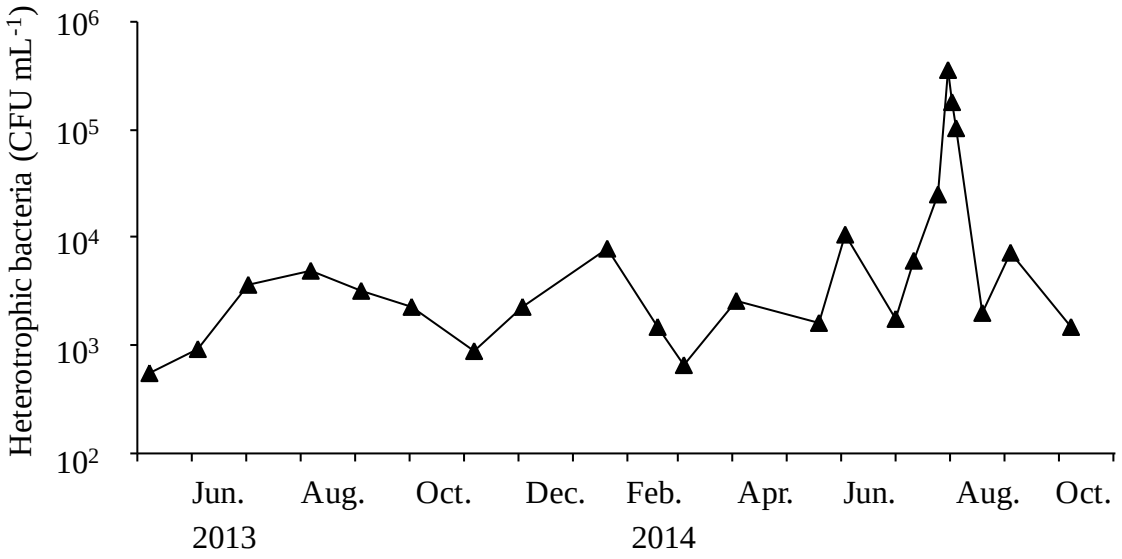


Fig. 3-8. Seasonal changes in densities of heterotrophic bacteria (colony forming units: CFU) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

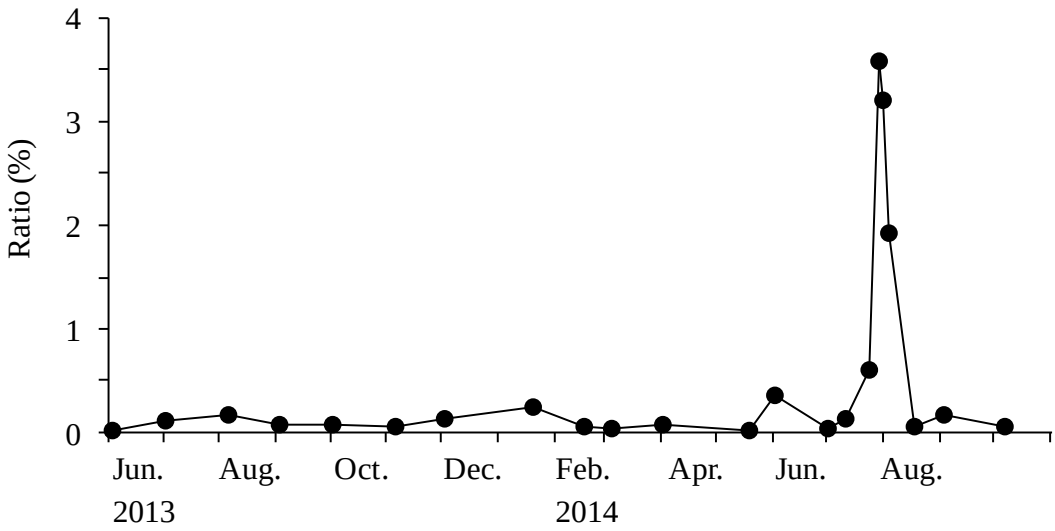


Fig. 3-9. Seasonal change in ratio (%) of heterotrophic bacteria to the total bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir from June 2013 to October 2014.

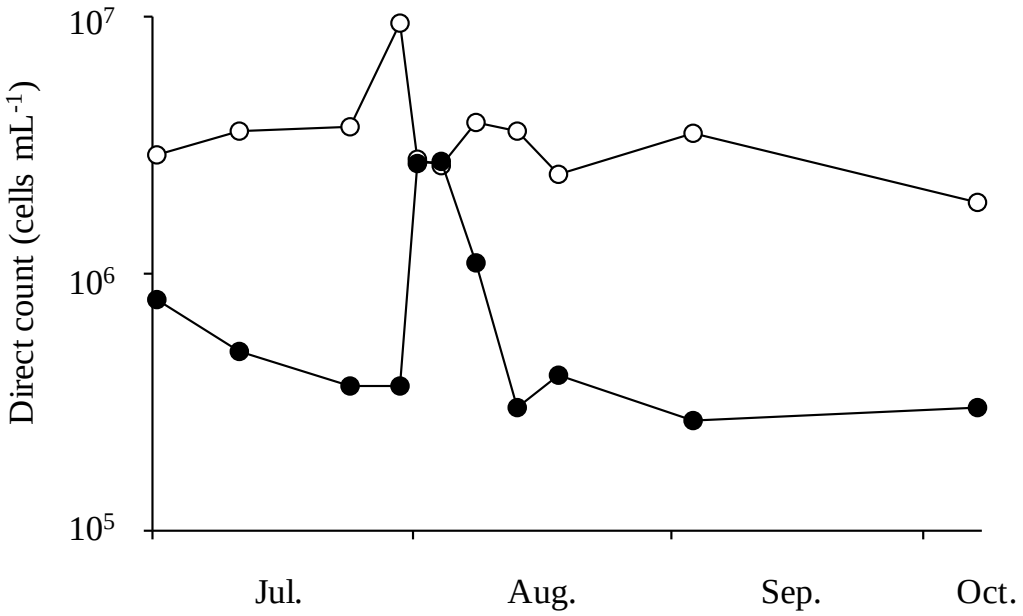


Fig. 3-10. Changes in densities of free living bacteria (FLB, ○) and particle associated bacteria (PAB, ●) by direct count method in the surface water of the Karasuhara Reservoir during the period of July 1 to October 7, 2014.

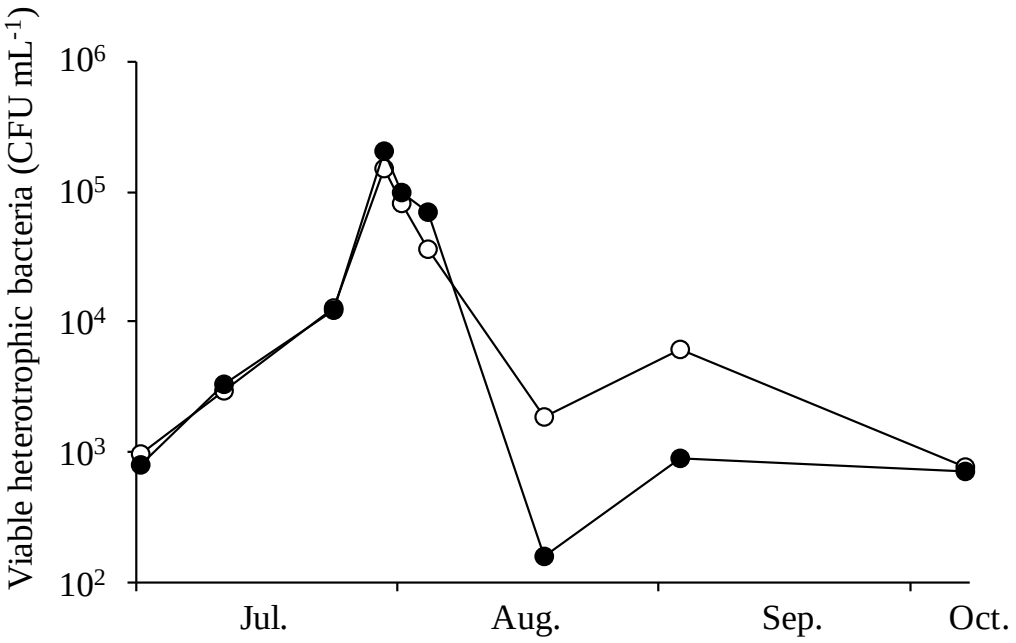


Fig. 3-11. Changes in densities of viable free living bacteria (FLB, ○) and particle associated bacteria (PAB, ●) counted by R2A plating method in the surface water of the Karasuhara Reservoir during the period of July 1 to October 7, 2014.

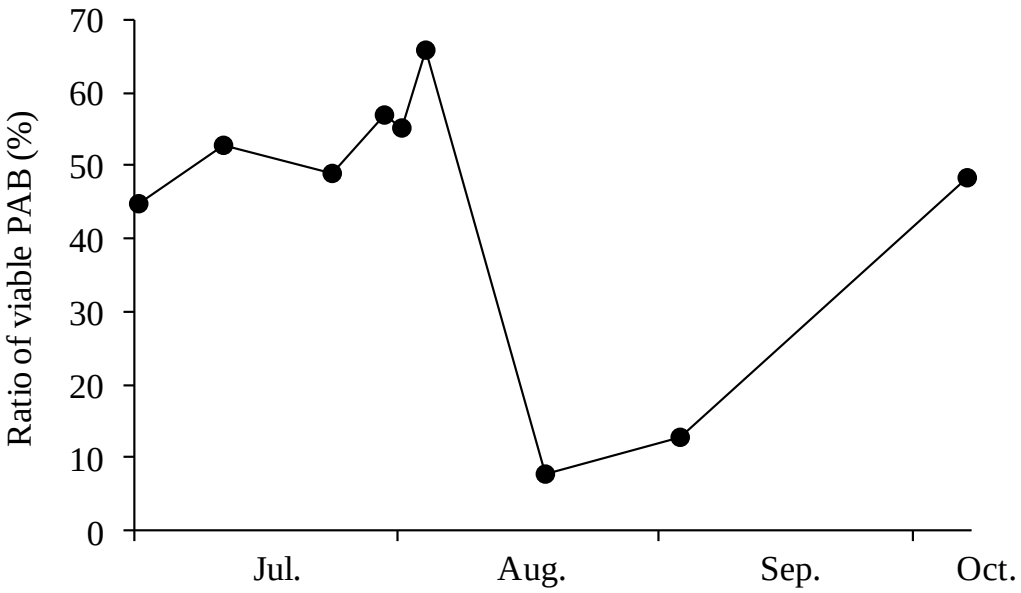


Fig. 3-12. Change in ratio (%) of viable particle associated bacteria (PAB) to total heterotrophic bacteria counted by R2A plating method in the surface water of the Karasuhara Reservoir during the period of July 1 to October 7, 2014.

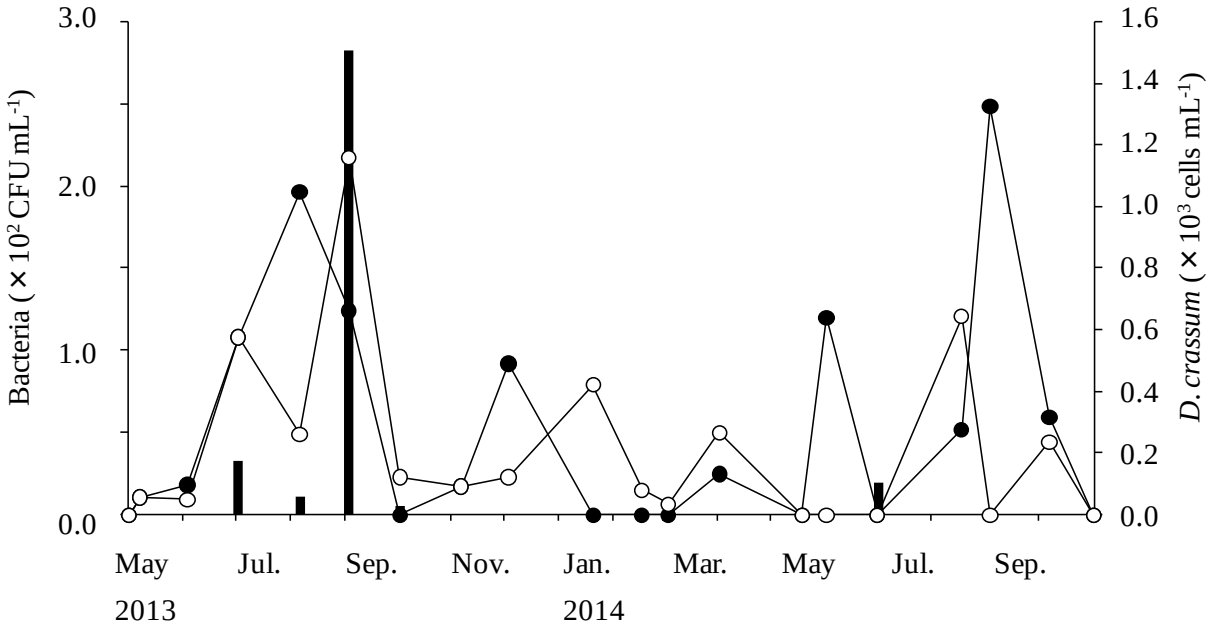


Fig. 3-13. Seasonal changes in densities of algicidal bacteria (●, $\times 10^2$ CFU mL^{-1}) and growth inhibiting bacteria (○, $\times 10^2$ CFU mL^{-1}) against *Dolichospermum crassum* (histogram) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

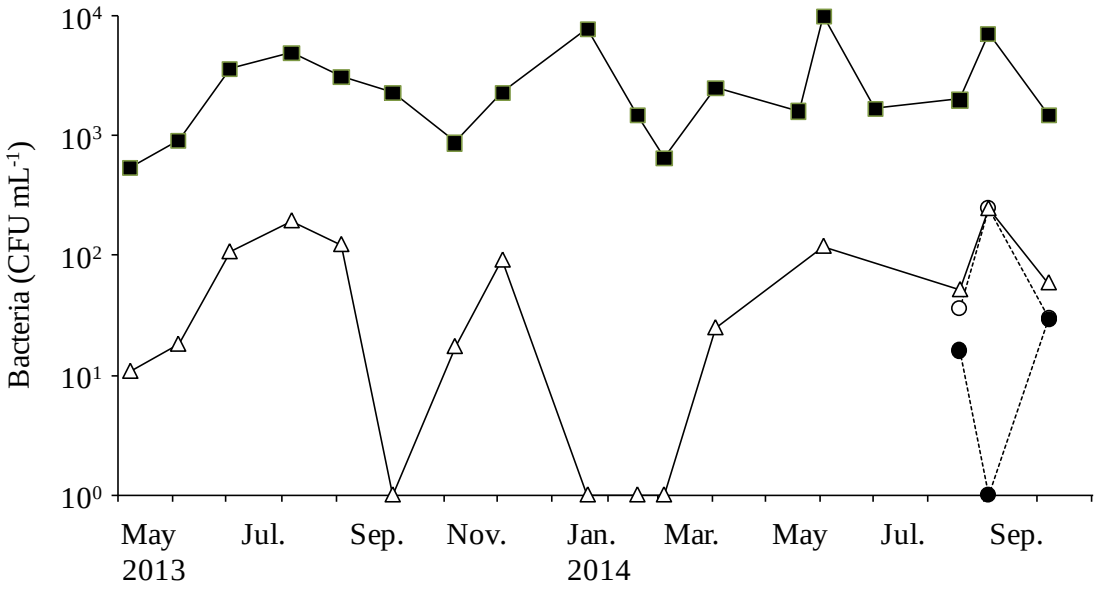


Fig. 3-14. Seasonal changes in densities of viable heterotrophic bacteria and algicidal bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

■ viable heterotrophic bacteria; △ total algicidal bacteria; ● algicidal bacteria of PAB; ○ algicidal bacteria of FLB.

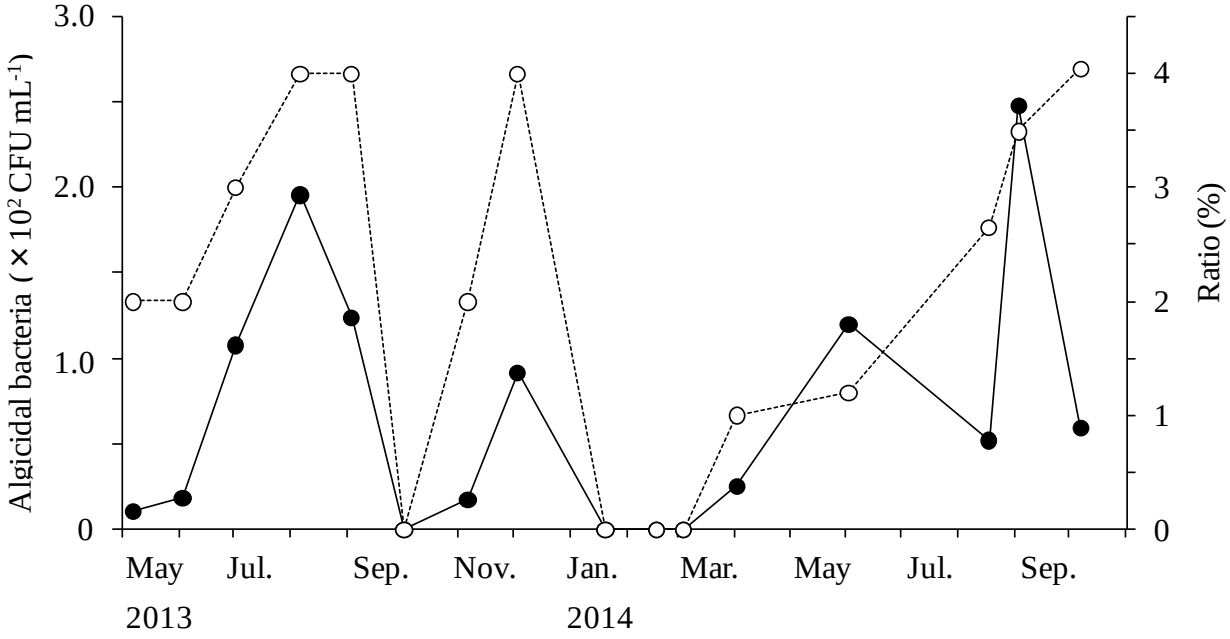


Fig. 3-15. Seasonal changes in densities of algicidal bacteria (●, $\times 10^2$ CFU mL^{-1}), and ratio of algicidal bacteria to viable heterotrophic bacteria (○, %) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

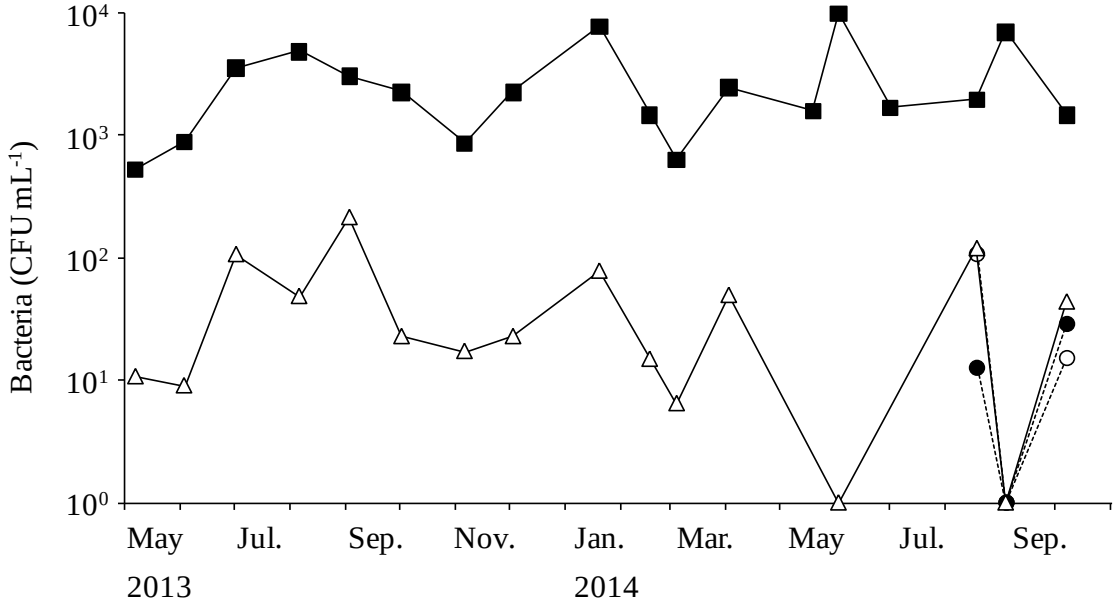


Fig. 3-16. Seasonal changes in densities of viable heterotrophic bacteria and growth inhibiting bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

■, viable heterotrophic bacteria; △, total growth inhibiting bacteria; ●, growth inhibiting bacteria of PAB; ○, growth inhibiting bacteria of FLB.

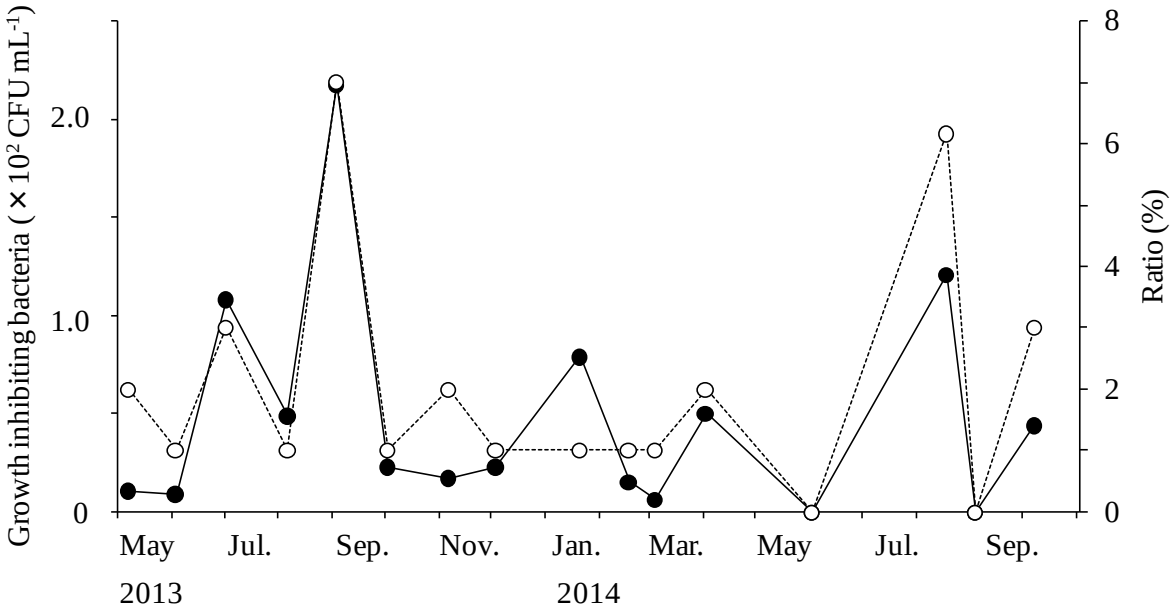


Fig. 3-17. Seasonal changes in densities of growth inhibiting bacteria (●, $\times 10^2$ CFU mL^{-1}), and ratio of growth inhibiting bacteria to viable heterotrophic bacteria (○, %) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

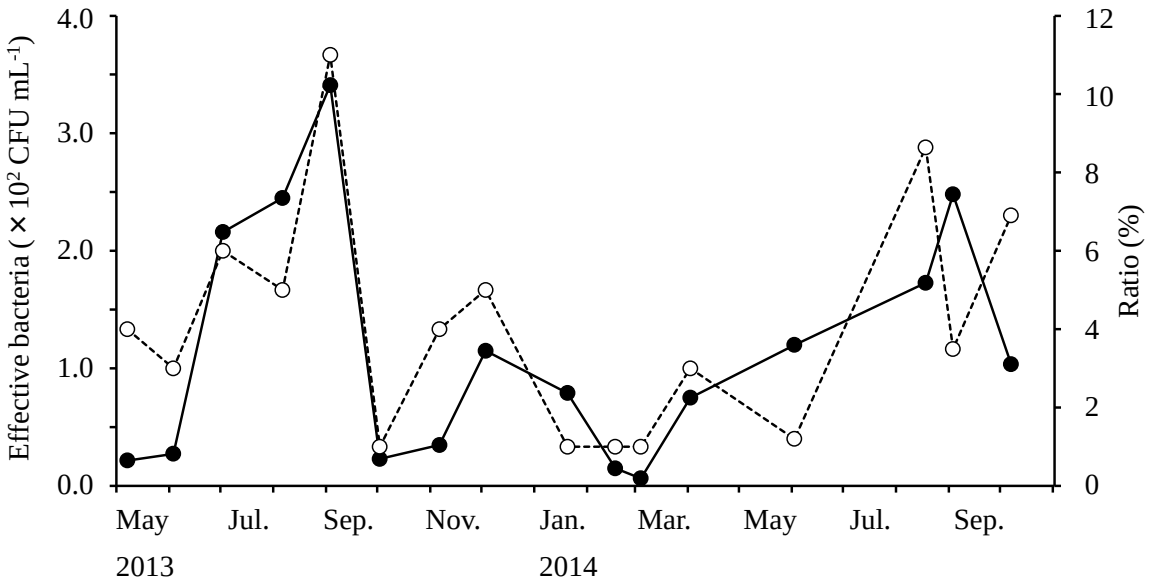


Fig. 3-18. Seasonal changes in densities of effective bacteria (sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria) (●, $\times 10^2$ CFU mL^{-1}), and ratio of effective bacteria to viable heterotrophic bacteria (○, %) in the surface water of the Karasuhara Reservoir from May 2013 to October 2014.

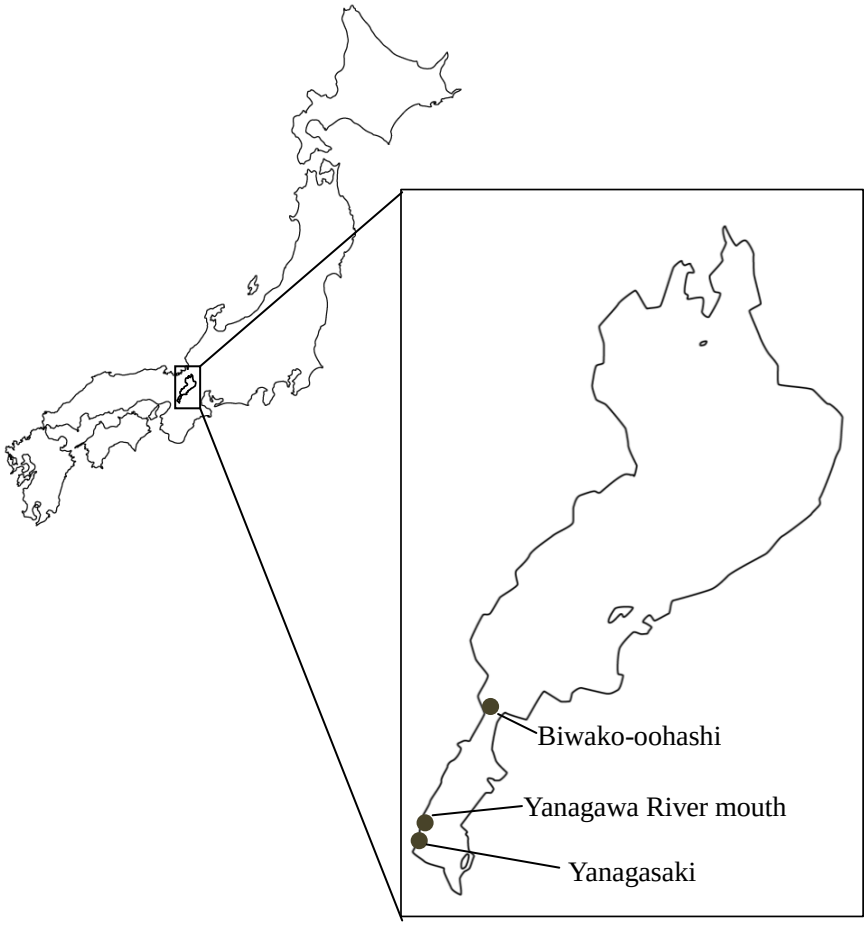


Fig. 4-1. Location of sampling points (●) in Lake Biwa.





Fig.4-2. Photographs of water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki in Lake Biwa.



Fig.4-3. Photographs of control area of non-water plant zone at Yanagawa River mouth in Lake Biwa.

A, sampling point; B, Yanagawa River which flows into sampling point, overlooking upstream direction.





Fig.4-4. Photographs of control area of non-water plant zone at Biwako-oohashi in Lake Biwa.

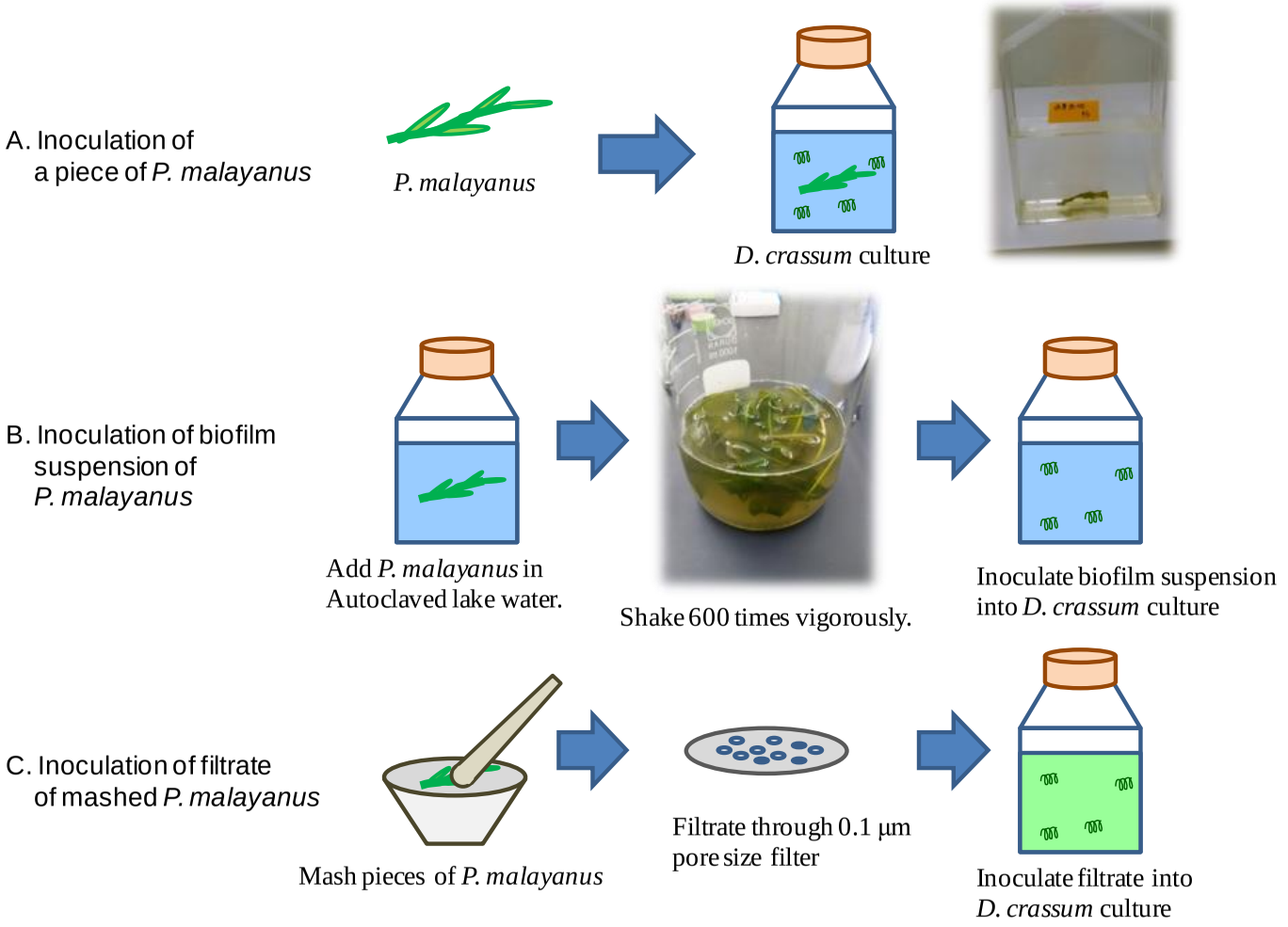


Fig. 4-5. Outline of experiments to investigate the effects of the water plant *Potamogeton malayanus* on the growth of *Dolichospermum crassum*.

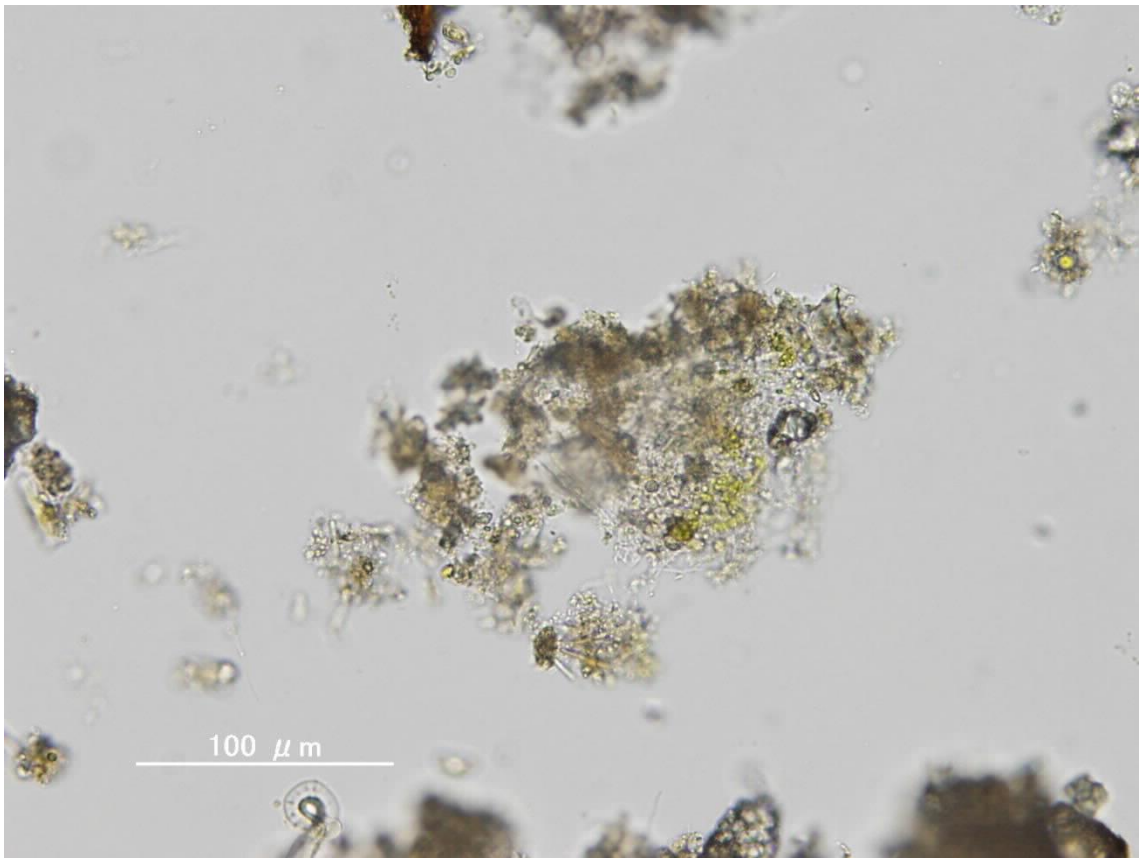


Fig. 4-6. Micrograph of suspended biofilm observed in the water sample collected from the water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

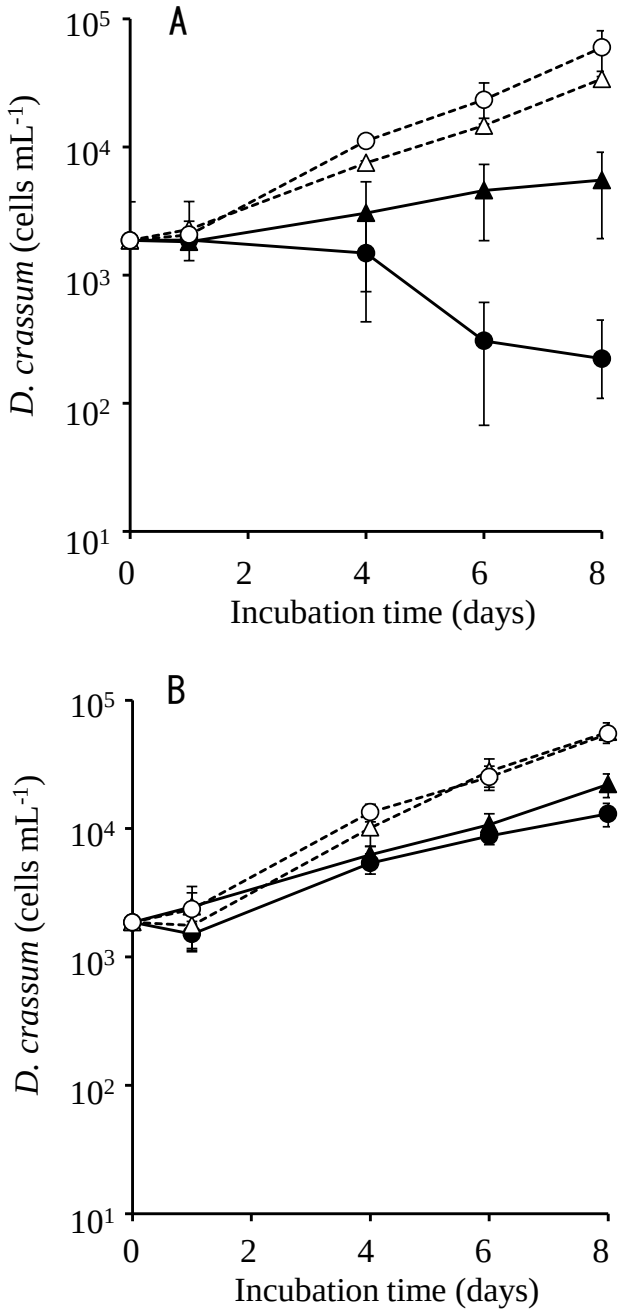


Fig. 4-7. Changes in densities of *Dolichospermum crassum* after inoculation of lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A), and non-water plant zone at Yanagawa River mouth (B) in Lake Biwa on 27 October 2016. Bars mean standard deviation.

● Non treated lake water samples; ▲ lake water samples filtered through 3 μm pore size membrane filter; △ lake water samples filtered through 0.2 μm pore size membrane filter; ○ autoclaved lake water samples.

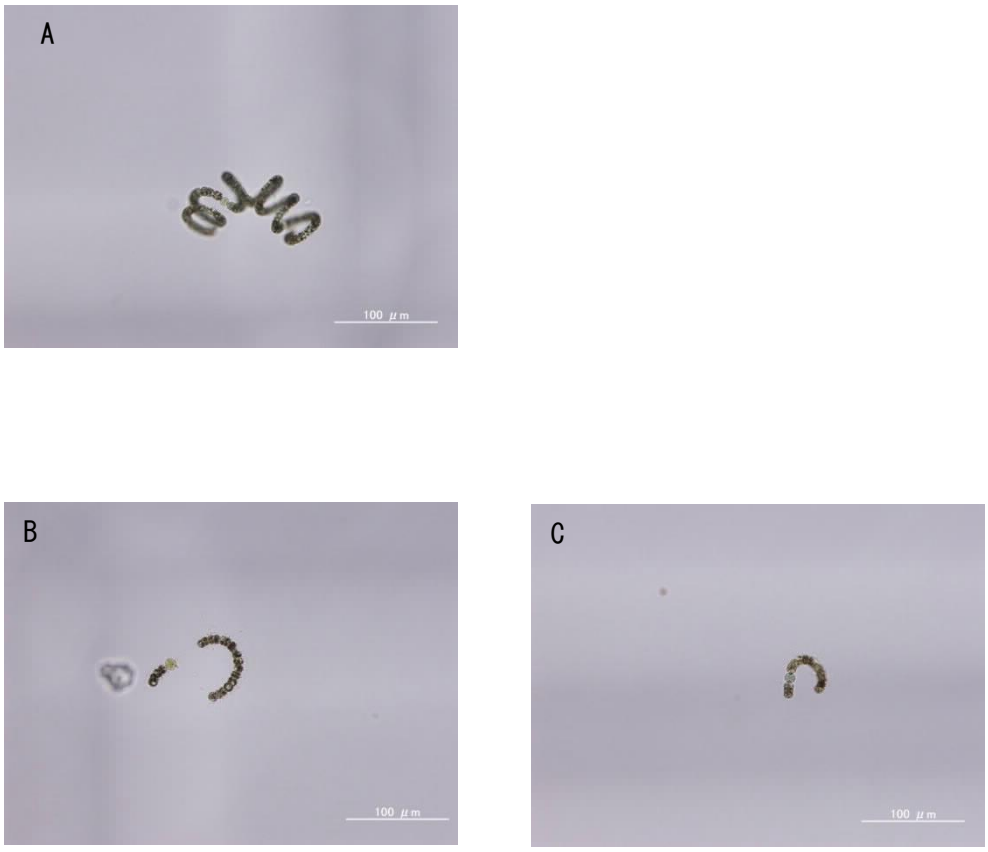


Fig. 4-8. Morphological changes of *Dolichospermum crassum* after inoculating lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki in Lake Biwa on 27 October 2016.

A, Healthy cells of *D. crassum* before inoculation; B, Degrading trichome by attached bacteria of 6 days after inoculation; C, Degrading trichome by attached bacteria of 8 days after inoculation.

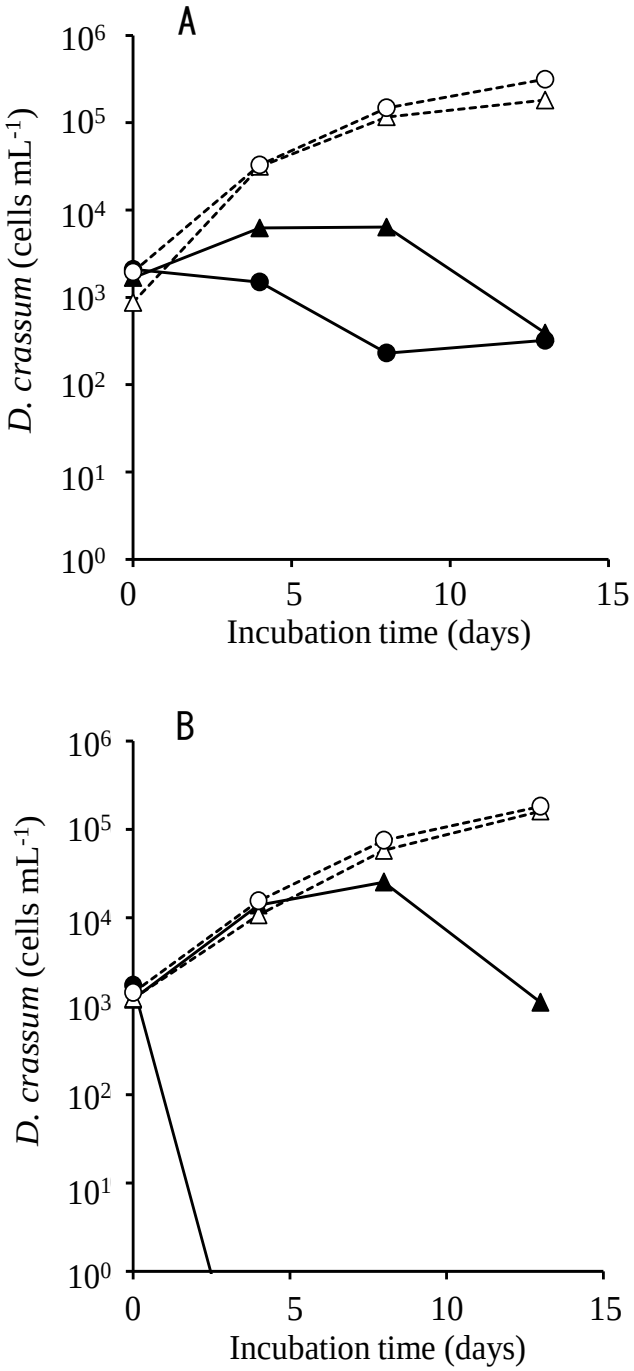


Fig. 4-9. Changes in densities of *Dolichospermum crassum* after inoculation of lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A), and lake water collected from non-water plant zone at Biwako-oohashi (B) in Lake Biwa on 3 August 2017.

● Non treated lake water samples; ▲ lake water samples filtered through 1.2 μm pore size membrane filter; △ lake water samples filtered through 0.1 μm pore size membrane filter; ○ autoclaved lake water samples.

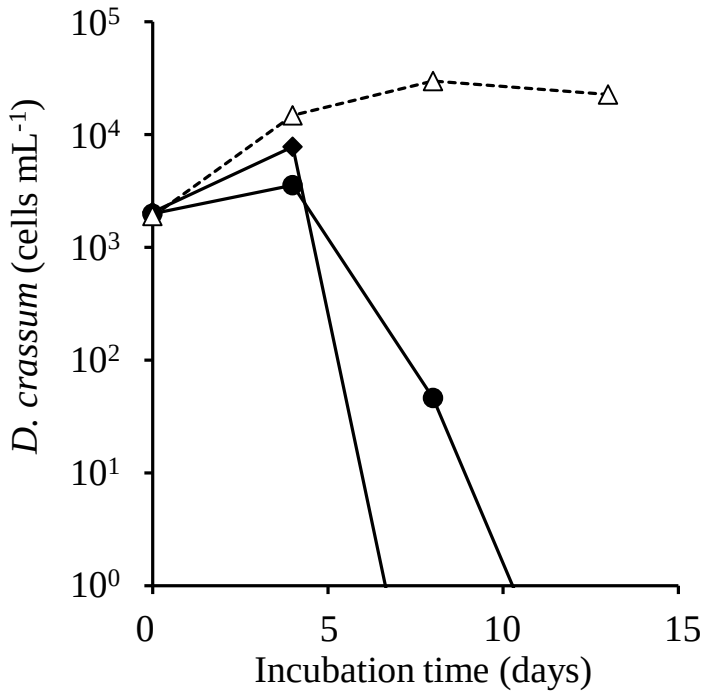


Fig. 4-10. Changes in densities of *Dolichospermum crassum* after inoculation of *Potamogeton malayanus* sampled from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

● a piece of *P. malayanus*; ◆ biofilm suspension of *P. malayanus*; △ filtrate of mashed *P. malayanus* through 0.1 μm pore size membrane filter.

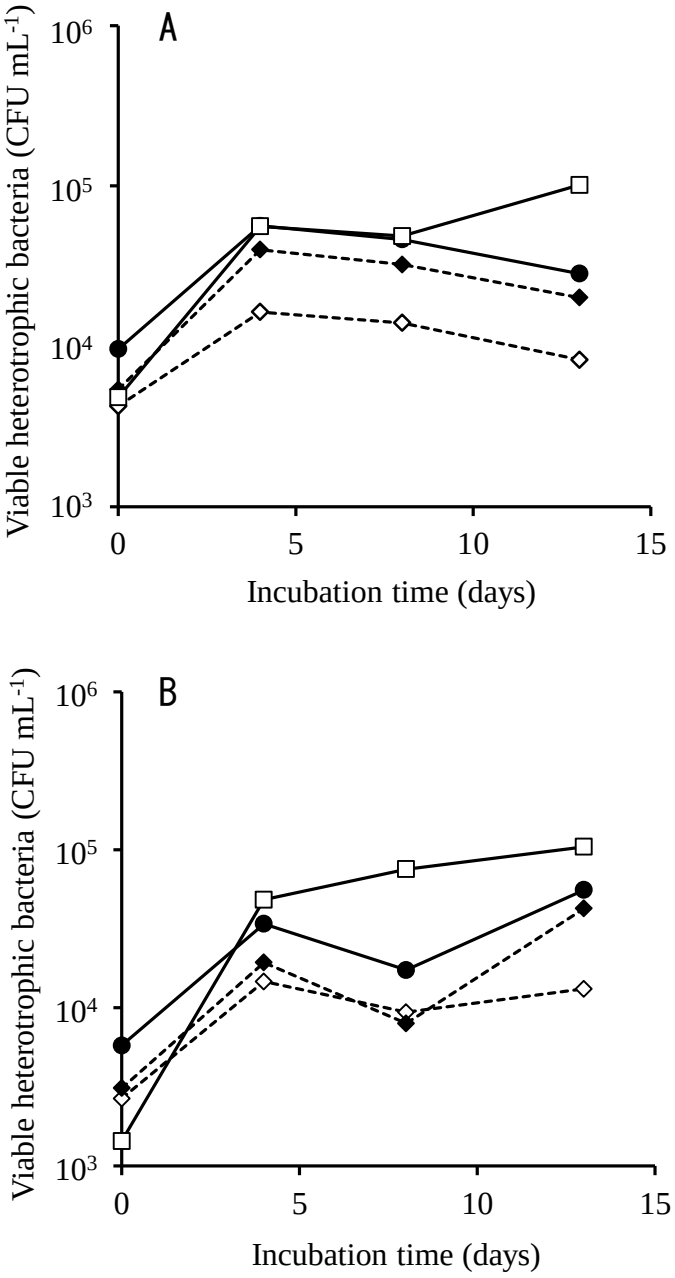


Fig. 4-11. Changes in densities of viable heterotrophic bacteria in bottles inoculated with lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A), and lake water collected from non-water plant zone at Biwako-oohashi (B) in Lake Biwa on 3 August 2017.

●: Total viable heterotrophic bacteria in the bottle inoculated with untreated lake water. Total bacteria are sum of PAB (◆) and FLB (◇).

◆: Particle associated heterotrophic bacteria (PAB) in the bottle inoculated with untreated lake water.

◇: Free living heterotrophic bacteria (FLB) in the bottle inoculated with untreated lake water.

□: Viable heterotrophic bacteria in the bottle inoculated with filtered lake water through 1.2 μm pore size membrane filter.

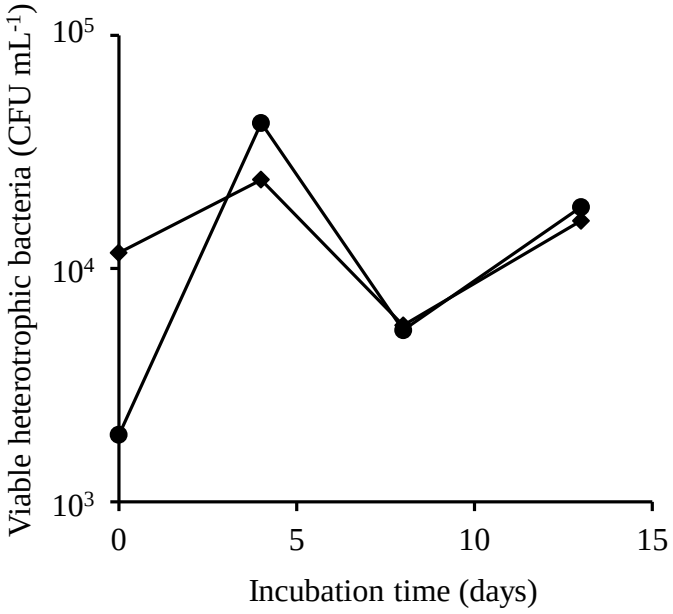


Fig. 4-12. Changes in densities of viable heterotrophic bacteria in bottles inoculated with a piece of *Potamogeton malayanus* (●), biofilm suspension of *P. malayanus* (◆) collected from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

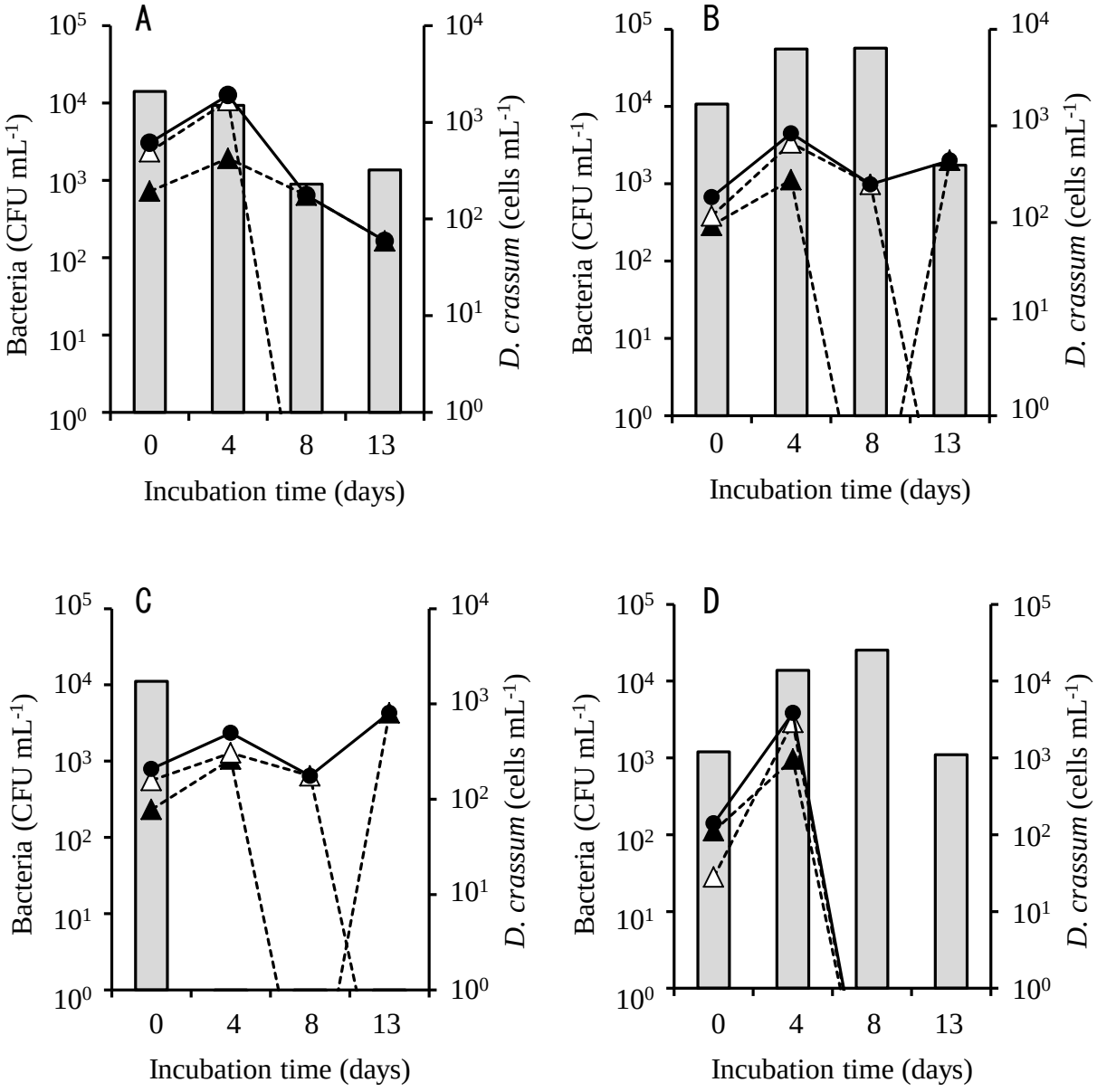


Fig. 4-13. Changes in densities of algicidal bacteria, growth inhibiting bacteria and effective bacteria (sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria) in bottles inoculated with lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A and B), and lake water collected from non-water plant zone at Biwako-oohashi (C and D) in Lake Biwa on 3 August 2017.

A and C, bottles inoculated with untreated lake water; B and D, bottles inoculated with filtered lake water through 1.2 μm pore size membrane filter.

Histogram, *Dolichospermum crassum*; ●, sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria (effective bacteria); ▲, algicidal bacteria; △, growth inhibiting bacteria.

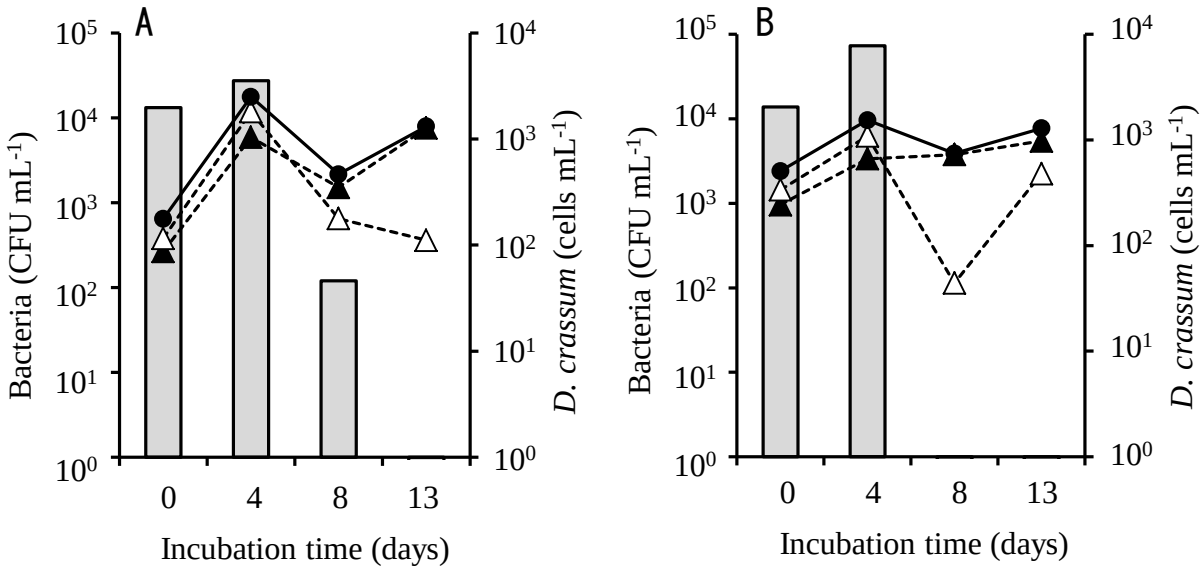


Fig. 4-14. Changes in densities of algicidal bacteria, growth inhibiting bacteria and effective bacteria (sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria) in bottles inoculated with a piece of *Potamogeton malayanus* (A), and biofilm suspension of *P. malayanus* (B) collected from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

Histogram, *Dolichospermum crassum*; ●, sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria (effective bacteria); ▲, algicidal bacteria; △, growth inhibiting bacteria.

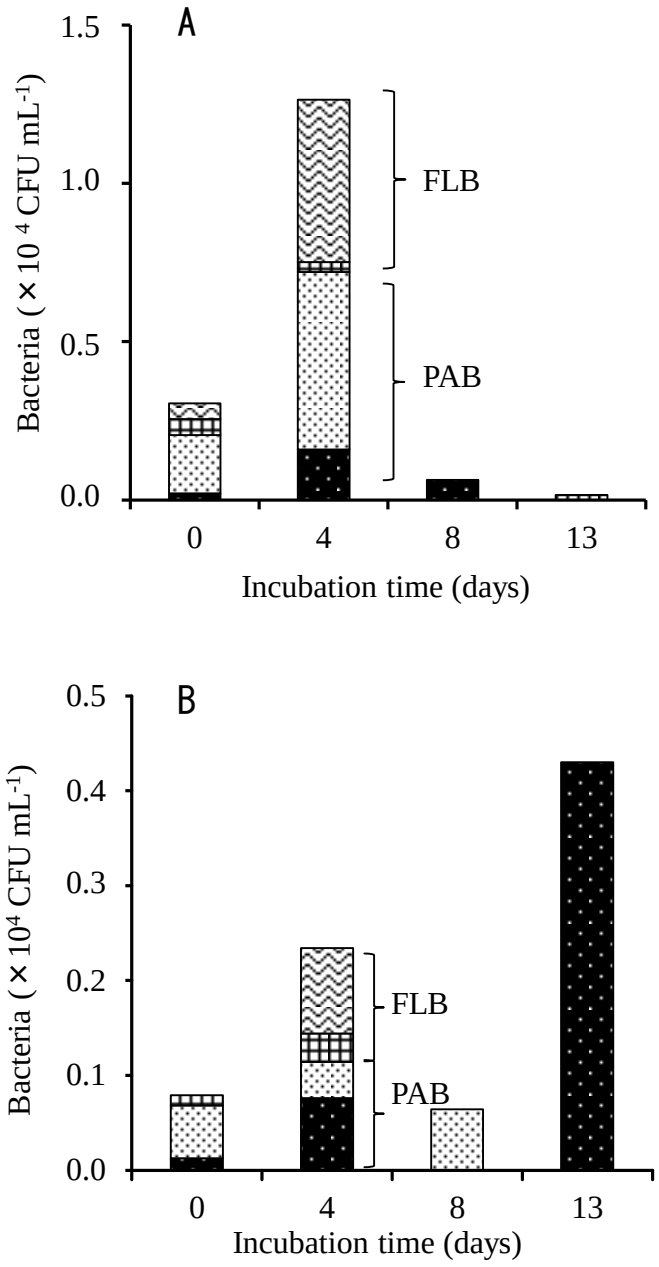


Fig. 4-15. Changes in densities of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria of particle associated form (PAB) and free living form (FLB) in bottles inoculated with untreated lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A), and non-water plant zone at Biwako-oohashi (B) in Lake Biwa on 3 August 2017.

PAB (algicidal bacteria); PAB (growth inhibiting bacteria);

FLB (algicidal bacteria); FLB (growth inhibiting bacteria)

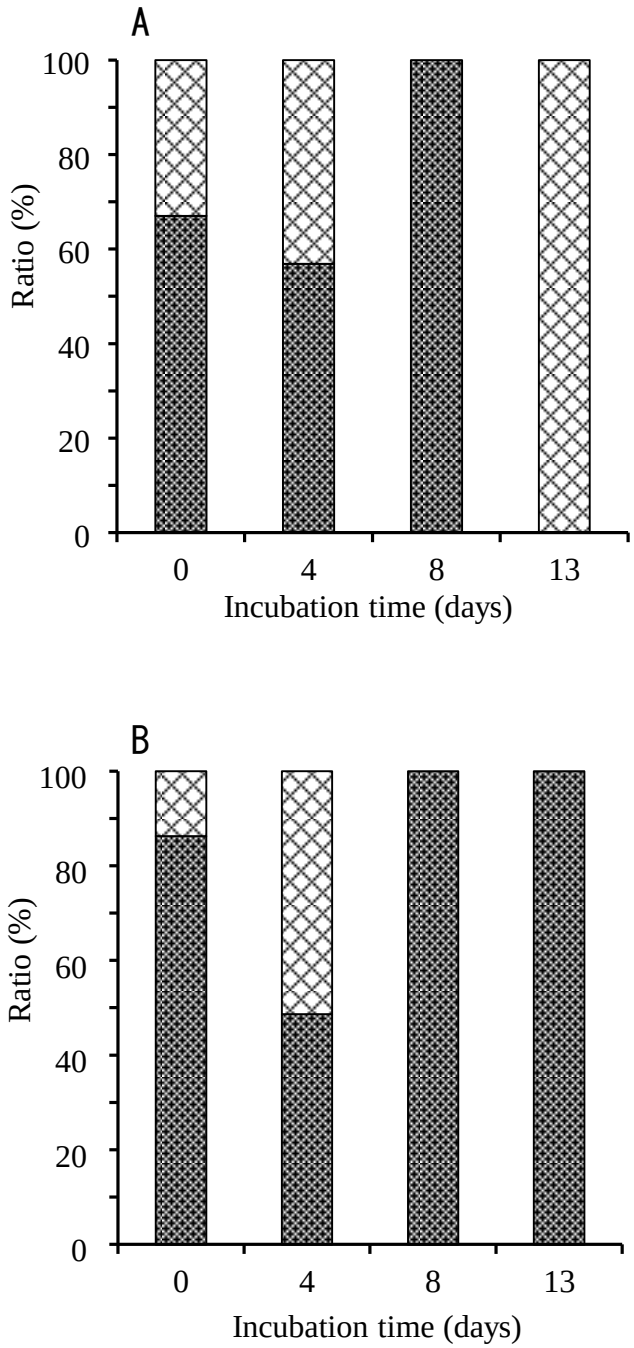


Fig. 4-16. Changes in ratio of particle associated effective bacteria ( ) and free living effective bacteria ( ) in water samples inoculated with untreated lake water collected from water plant zone of *Potamogeton malayanus* at Yanagasaki (A), and non-water plant zone at Biwako-oohashi (B) in Lake Biwa on 3 August 2017. Effective bacteria are sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria.

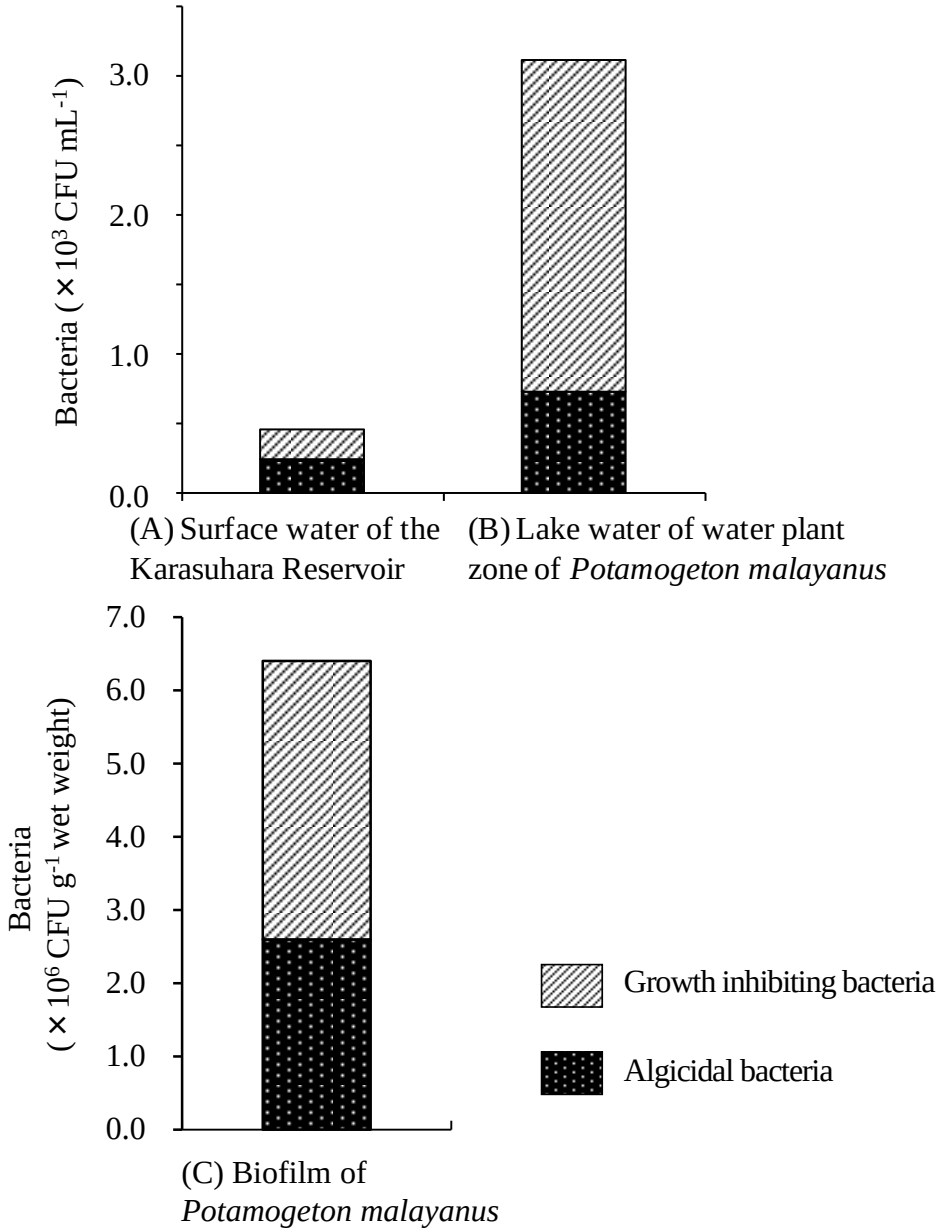


Fig. 5-1. Comparison for densities of the effective bacteria (sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria) in surface water of the Karasuhara Reservoir and water plant zone of *Potamogeton malayanus* in Lake Biwa.

A, Maximum density of effective bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir during the monitoring from May 2013 to October 2014. The water sample was collected on 3 September 2013.

B, Density of effective bacteria in lake water collected from water plant zone of *P. malayanus* at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

C, Density of effective bacteria in the biofilm of *P. malayanus* collected from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

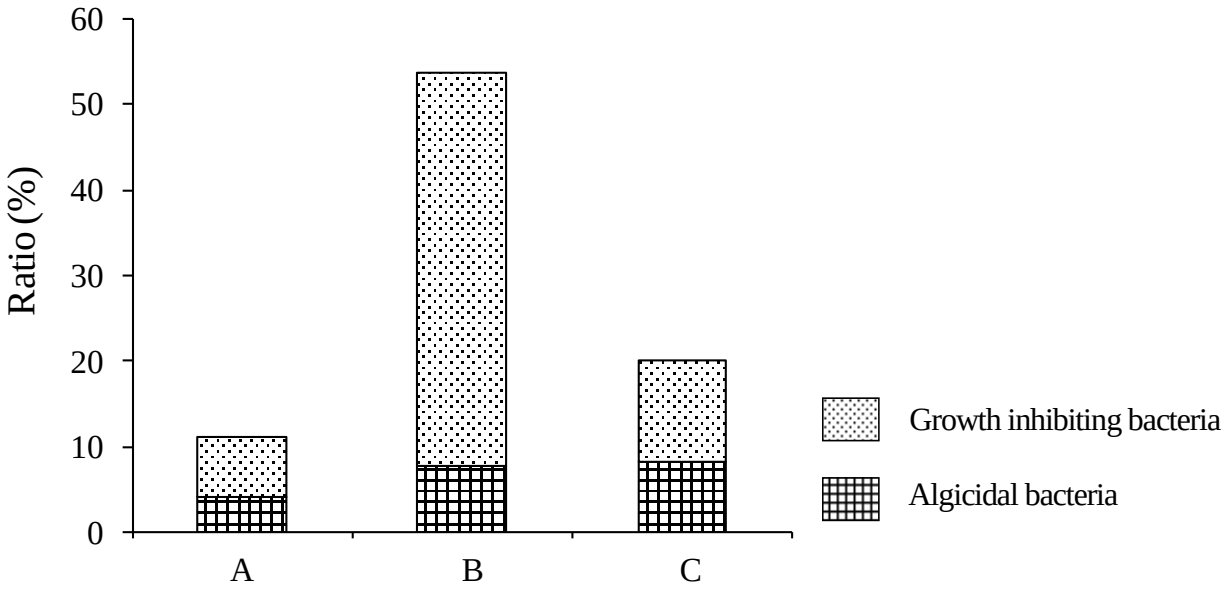


Fig. 5-2. Comparison for ratios of the effective bacteria (sum of algicidal bacteria and growth inhibiting bacteria) to viable heterotrophic bacteria in surface water of the Karasuhara Reservoir and water plant zone of *Potamogeton malayanus* in Lake Biwa.

A, Maximum ratio of effective bacteria in the surface water of the Karasuhara Reservoir during the monitoring from May 2013 to October 2014. The water sample was collected on 3 September 2013.

B, Ratio of effective bacteria in lake water collected from water plant zone of *P. malayanus* at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.

C, Ratio of effective bacteria in the biofilm of *P. malayanus* collected from water plant zone at Yanagasaki in Lake Biwa on 3 August 2017.