

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510042

研究課題名(和文) rRNA/rDNA比を用いた富栄養湖霞ヶ浦におけるアオコの動態評価に関する研究

研究課題名(英文) A study on dynamic phase evaluation of the Microcystis in the eutrophic lake Lake Kasumigaura using the rRNA/rDNA ratio

研究代表者

富岡 典子 (TOMIOKA, Noriko)

独立行政法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：40168399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：培養系及び環境中の*M. aeruginosa* の16S rRNA 及び16S rDNA 濃度を正確に測定することにより、rRNA/rDNA比が高い場合に高い比増殖速度を示すことが明らかとなった。また、夏の*M. aeruginosa*によるブルームは増殖した菌体の表層への集積と空間的な移動により引き起こされることを垂直方向のrDNA濃度分布と、クローン分布及びrRNA/rDNA比から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：16S rRNA and the 16S rDNA density of *M. aeruginosa* in environment was measured exactly. It was correlative between the rRNA/rDNA ratio and the specific growth rate of *M. aeruginosa*. In addition, the bloom by summer *M. aeruginosa* was caused by the accumulation to the surface and spatial movement of the cell.

研究分野：環境微生物学

キーワード：アオコ 定量PCR *M. aeruginosa* 16S rRNA 遺伝子 藍藻 浮上沈降

1. 研究開始当初の背景

富栄養湖沼霞ヶ浦では1970年代から1986年まで毎年の様に *Microcystis aeruginosa* によるアオコが発生していたが、1987年～2004年までは全くブルームが認められなかった。その原因は濁度の上昇に伴う光量の不足によるものであると推定され、濁度が減少した2005年以降再びアオコが発生するようになった。また、1999年以降 *M. aeruginosa* の濃度測定に導入した定量PCRによって、2006年以降、冬の間湖水中に存在する *M. aeruginosa* 濃度も上昇傾向にあること、*M. aeruginosa* 濃度の年ごとの増加は、早ければ3月から、遅くとも6月から始まることが明らかになった。一方、1986年までのアオコのピークは9月に現れることが多かったが、2005年以降は最大濃度の出現時期は7月～8月中と早まっている。これらの変化と環境因子の関連はいまだ明らかになっていない。*M. aeruginosa* の増殖開始時期、減少開始時期に関連する環境因子を明らかにできれば、ブルーム発生予測、的確な対応が可能となるため、アオコの増殖因子に基づいた増殖と環境因子の関連把握は必須である。

2. 研究の目的

M. aeruginosa の rRNA 及び rDNA 濃度を正確に測定することにより、その増殖(死滅)速度と rRNA/rDNA の関連について明らかにする。

ブルーム時における *M. aeruginosa* の光に対する応答について検討を加える。

M. aeruginosa の春から夏の増殖及び秋の実環境中での挙動を詳細に調査し、*M. aeruginosa* の増殖、表層集積、減衰に及ぼす環境因子(光環境、温度、栄養塩等)の影響を明らかにする。

M. aeruginosa を含む藍藻類の夏期富栄養子に於ける挙動について明らかにする。

3. 研究の方法

M. aeruginosa を特異的に増幅するPCRプライマー(Micro233f-Cyano338r)⁽¹⁾を用いて、培養系及び環境中の *M. aeruginosa* 16S rDNA 濃度及び 16S rRNA 濃度及び Tm 値を正確に測定し、*M. aeruginosa* の存在量、増殖活性及び Tm 値を用いた *M. aeruginosa* 群集内のクローンの変遷観測の可能性について検討した。培養は、無菌株を用いて、培養経過に於ける rRNA/rDNA 比の変化を測定した。また、アオコ発生湖水を用いて光環境をコントロールした環境で *M. aeruginosa* の増殖速度について検討を行った。環境中での *M. aeruginosa* の挙動の調査は、霞ヶ浦西浦小野川河口付近の国立環境研究所・臨湖実験施設附属船着き場において実施した。2012年度には、濁度計の設置及び採水方法の開発を行い、2013年及び2014年の夏に現場での調査を実施した。2013年度は6月～8月に掛けてサンプリングを行い、*M. aeruginosa* の

rDNA 濃度及び rRNA/rDNA 比の変遷を明らかにすると共に、*M. aeruginosa* 株の変化の指標として Tm 値の有効性について検討した。2014年度は同船着き場に自動昇降式水質計を設置し、環境因子及び藍藻類濃度の連続観測を行うと共に、優占する藍藻類の種の特定を行った。

4. 研究成果

環境中での *M. aeruginosa* の増殖活性の指標として rRNA/rDNA 比を用いるために培養系に於いて、比増殖速度と rRNA/rDNA 比との関連について調べた。その結果、rRNA/rDNA 比が高いときには比増殖速度も高い傾向が認められた。(図1)

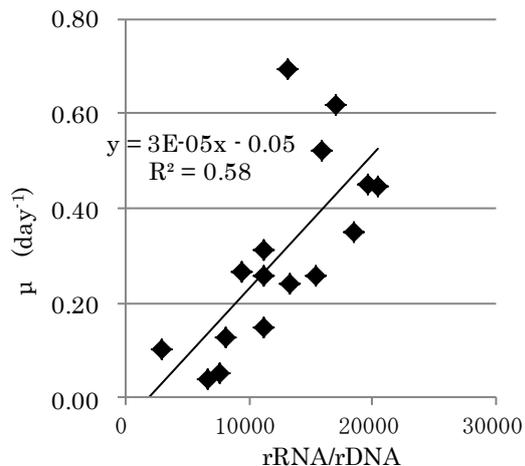


図1. *M. aeruginosa* の rRNA/rDNA 比と増殖速度の関係

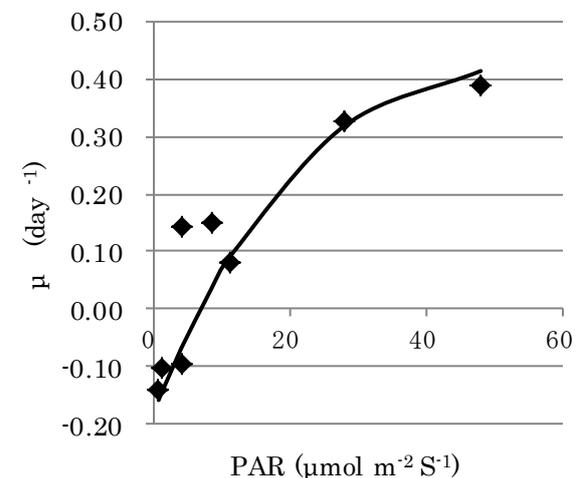


図2. アオコ発生湖水の *M. aeruginosa* 増殖速度と PAR の関連

一方、アオコが発生している湖水を採水して、種々の光条件で32時間培養した結果、光の供給量が増殖速度を支配していることが明らかとなった(図2)。

2013年夏に霞ヶ浦臨湖実験施設附属の護岸の湾外及び湾内において、表層～下層までの湖水のサンプリングを行い、*M.*

aeruginosa の rRNA 及び rDNA 濃度と Tm 値の測定を実施した。その結果、8 月 4 日には、湾内・湾外とも *M. aeruginosa* の rDNA が全層均一に 1×10^5 copies ml⁻¹ 存在していたのが 8 月 10 日には、湾内、湾外共に表層の濃度が急激に増加していた。湾内では表層に中層・下層の 8 倍の濃度の DNA が検出された (図 3)。表層と下層の Tm 値に大きな変化はなく、湾内で増殖した *M. aeruginosa* が表層に集積したと推定される。また、表層の rRNA/rDNA 比は 1,000 と培養系に比して低く、表層に集積した *M. aeruginosa* は増殖活性が低いか、死菌を多く含んでいると考えられた。

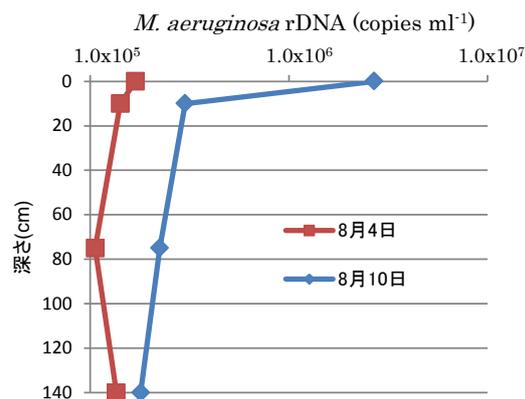


図 3. 湾内における *M.aeruginosa* の挙動

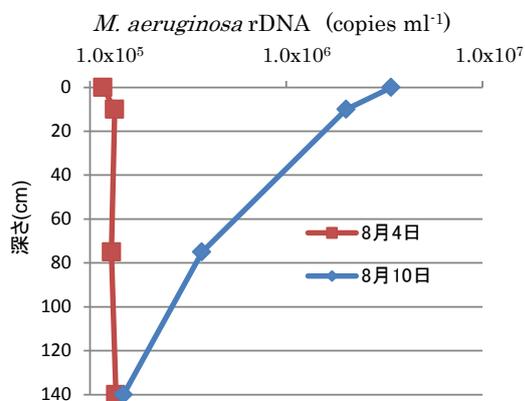


図 4. 湾外における *M. aeruginosa* の挙動

一方、湾外では底層から表層に向かって *M. aeruginosa* 濃度が増加し、底層と表層の濃度の差は 20 倍以上及んだ(図 4)。また、8 月 10 日の表層の *M. aeruginosa* rDNA の Tm 値は水面下 10cm 以深の Tm 値、8 月 4 日の表層から低層までの *M. aeruginosa* の rDNA が示した Tm 値よりも 0.5°C 低く、8 月 10 日に表層に集積したクローンは 8 月 4 日に存在した及び、表層以深に存在するクローンとは異なると考えられた。また、湾外の rRNA/rDNA 比は 2800 と湾内の 3 倍あり、湾外の菌体の増殖状態は湾内よりも良いと推定された。環境中の *M. aeruginosa* の rRNA/rDNA 比が培養系に比べて著しく低いのは、培養系に比べて光、栄養塩の供給量が少なく、増殖速度が遅い

ためと判断できるかどうかは、今後精査する必要がある。一方、湾外の濃度の増加は、最適条件で培養した場合の *M. aeruginosa* の増殖速度よりも早く、8 月 10 日に表層で確認された菌体は、別の場所で増殖した細胞が風または流れによって集積した可能性が高いと思慮された。

2014 年度は湾内において *M. aeruginosa* の増殖調査を実施した。また、2014 年度は現場データの取得のために、水質計自動昇降式システムを設置し、7 月～9 月の 3 ヶ月間 1 時間おきに水温、pH、濁度、溶存酸素、Chl_a 濃度、及び藍藻類濃度の深さ方向プロファイルを取得した。その結果、7 月には午前 7 時から 10 時まで藍藻類が表層付近 (水深 10cm) に集積し、13 時～16 時までは底層付近(底層から 10cm) に集積する傾向が示された。8 月以降は 7 時～11 時までの表層付近への集積は認められたが、午後の底層付近への集積は認められず、9 月には 8 時に表層付近に集積した藍藻は、18 時まで表層付近に留まる傾向があった。また、全期間を通して 8 時～18 時には表層の水温が以深よりも高い傾向があり、それ以外の時間帯は水温差が少ないか表層の水温が低い傾向が認められた。特に 9 月の 19 時以降は表層の水温が底層より低い傾向が認められた。これらのことから、7 月の藍藻は表層と深層の間を数時間で移動し、8 月以降は表層に集積した藍藻は沈降せず、水温の逆転、風波により混合されたものと推測された。さらに、16S rDNA 解析の結果、7 月から 8 月上旬にかけて表層付近に集積した藍藻類は *M. aeruginosa* であり、8 月中旬から 9 月にかけて、表層付近に集積した藍藻類は *Synechococcus* sp. であることが明らかになった。

<引用文献>

(1) Tomioka N., Imai A., Komatsu K. (2011) Effect of light availability on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow hypereutrophic Lake Kasumigaura. J. Plankton Res., 33(8) 1263-1273

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 田辺雄彦, 富岡典子 (2014) 遺伝マーカーを用いたアオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の多様性解明と定量評価. 水環境学会誌, 査読無, 37(A) (5), 164-168

[学会発表] (計 3 件)

- ① 富岡典子, 今井章雄, 小松一弘, 高津文人, 篠原隆一郎, 佐藤貴之 (2014) 霞ヶ浦におけるアオコ発生時の *Microcystis aeruginosa* の挙動について. 日本陸水学会第 79 回大会, つくば市, 2014 年 9 月

12 日, 同講演要旨集, 69

- ② 篠原隆一郎, 今井章雄, 富岡典子, 高津文人, 小松一弘, 佐藤貴之, 佐野友春, 三浦真吾, 霜鳥孝一 (2014) 霞ヶ浦懸濁物中に含まれる核酸に含まれるリンの動態について. 日本陸水学会第 79 回大会, つくば市, 2014 年 9 月 11 日, 同予稿集, 121
- ③ 坪井隼, 今井章雄, 稲葉一穂, 山村茂樹, 高津文人, 小松一弘, 富岡典子, 岩崎一弘 (2013) 霞ヶ浦底泥表層の細菌群集構造とその経時的変動. 日本水環境学会第 47 回年会, 大阪市, 2013 年 3 月 11 日, 同予稿集, 140

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡典子 (TOMIOKA Noriko)
国立環境研究所・地域環境研究センター・
主任研究員
研究者番号: 40168399