

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24560669

研究課題名(和文) ミクロシステイスの群体構造の人為的解体による捕食圧の変化と出現捕食者の特性解析

研究課題名(英文) Characterization of changes in predation pressure and occurrences predator by artificial disassembling of Microcystis cell colony

研究代表者

岩見 徳雄 (IWAMI, norio)

明星大学・理工学部・准教授

研究者番号：00353532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Microcystisの細胞群体を個々の細胞へと解体することで出現する微小動物の特定とその捕食圧を検討した。加えて、微小動物の捕食作用でMicrocystisを低減するプロセスも検討した。その結果、群体が解体されたMicrocystisの捕食者は原生動物鞭毛虫Monas sp.であることが集積培養系により推定された。Microcystisの細胞群体を個々の細胞に解体すればMonas sp.の捕食圧は上昇することが2者混合培養系により確認された。細胞群体解体とMonas sp.の捕食作用を組み合わせたモデル実験により小規模池のMicrocystis抑制を達成できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined an appearing micro-fauna and an impact to predation pressure by artificial disassembling of Microcystis cell colony. Furthermore, we considered a process of reducing Microcystis in predation pressure of the identified micro-fauna. As a result, protozoan flagellate Monas sp. as a predator of singly disperse cells of Microcystis was estimated by enrichment culture system. In addition, it was confirmed by the combined culture system that the predation pressure of isolated Monas sp. is increased by artificially disassembling colony formed Microcystis to single cells. It was suggested that suppression of Microcystis on small pond was achieved by results of the model experiment which the small scale pond combined with the predation effect of Monas sp. and the system of artificially disassembling Microcystis cell colony.

研究分野：生態工学

キーワード：Microcystis 細胞群体解体 捕食微小動物 個体群動態 捕食圧

1. 研究開始当初の背景

富栄養化をもたらす *Microcystis* の大発生は景観質の悪化や水利用の安全面で様々な問題となっておりその防除対策が急がれる。こうした問題は飲料水源である天然の湖やダム湖のみならず、東南アジア諸国の食用淡水魚の養殖池や公園池などでも顕在化している。申請者は、養殖池や公園池などの小規模な池を対象に、*Microcystis* の捕食微小動物を高密度に棲息させた場を設けることで *Microcystis* を抑制する生態工学的な手法開発を進めてきている。この手法では *Microcystis* に対する微小動物の捕食圧をいかに高めるかが重要なキーポイントになる。しかしながら、*Microcystis* は細胞群体を形成することで捕食を妨げる自己防衛能を持っており、これが周囲の微小動物の捕食圧を低くする要因の一つとして挙げられる¹⁾。実際の水域で *Microcystis* が増加する時期は強固な細胞群体を形成しており、明らかに捕食圧が低い状態にあると考えられる。実際、*Microcystis* の集積域で鞭毛虫が細胞群体の周辺や内部で観察されるものの、*Microcystis* の増殖を抑制するほどの捕食作用は認められない²⁾。ところが、*Microcystis* の群体構造が自然崩壊し消滅していく過程で、原生動物鞭毛虫類 *Monas guttula* の個体数の増加が認められ、*Microcystis* の単独細胞を捕食する状況が霞ヶ浦の土浦入りで確認された³⁾。この現象を *Microcystis* の細胞群体の崩壊によって特定の微小動物の捕食圧が高まったものと捉えらるとすると、*Microcystis* の細胞群体を個々の細胞に解体すれば周囲の微小動物の捕食圧は高まり、その捕食作用によって *Microcystis* を抑制できる可能性はあると考えられる。この可能性を実用技術として具現化できれば養殖池や公園池など小規模な池の *Microcystis* 抑制対策につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、小規模な池のモデル実験ヤードとして東京都井の頭公園池(井の頭池)を選定し、*Microcystis* の細胞群体を個々の細胞に解体処理することによって出現する微小動物群集の個体群動態を調べ、*Microcystis* を捕食する微小動物をスクリーニングすることと、その微小動物を単離し、細胞群体を解体した *Microcystis* に対する捕食能を把握するとともに、こうした微小動物の捕食作用を利用して *Microcystis* を抑制するためのプロセスを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Microcystis* の細胞群体解体による捕食微小動物のスクリーニング

モデル実験ヤードを対象に *Microcystis* の細胞群体の人為的解体により出現する捕食者のスクリーニングを以下の手順(①~④)で行った。

①細胞群体形成 *Microcystis* の培養と細胞群体

解体処理

実験ヤードである井の頭池から単離した4種の細胞群体形成 *Microcystis* のうち優占種であった *Microcystis viridis* (IP-FJ株)を、滅菌済み M11 培地を用い温度約 25℃、照度 2,000Lx 下で培養した。培養後の *M. viridis* を回収・濃縮した後、その容器を超音波水槽に入れ高周波出力 100W、40min で細胞群体を解体した。解体前後の *M. viridis* の顕微鏡写真を写真1に示す。

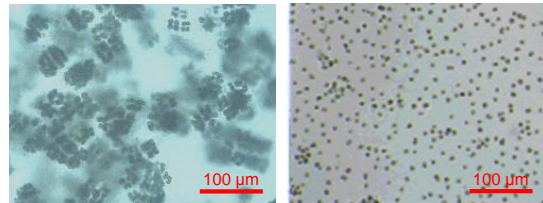


写真1a: 解体前

写真1b: 解体後

写真 1 細胞群体解体前後の *Microcystis viridis* の顕微鏡写真

②微小動物のプレスクリーニング

細胞群体を形成しない *Microcystis viridis* (NIES 102株, 現在では *Microcystis aeruginosa* に改名)を懸濁させた滅菌済み M11 培地に井の頭池からプランクトンネットで採取した試料をシーディングした培養器を、温度約 25℃、暗所にてインキュベートし、この *M. viridis* を食物源として増殖する微小動物をスクリーニングした。

③微小動物のスクリーニング [本実験]

「①」で準備した細胞群体解体後の *M. viridis* を懸濁させた滅菌済み M11 培地の入った培養器に、「②」でプレスクリーニングされた微小動物群をシーディングして温度約 25℃、暗所にてインキュベートし、この *M. viridis* を食物源として増殖する微小動物をスクリーニングした。

④微小動物の単離

「③」で増殖が確認された微小動物を単離し、細胞群体解体後の *M. viridis* を懸濁させた M11 培地で継代培養した。

(2) スクリーニング系から単離した *Monas* sp. の *Microcystis* 捕食能の評価

「(1)」で単離された *Monas* sp. について細胞群体を解体した *Microcystis* に対する捕食能を 2 者混合培養実験 (以下、①、②) により調べた。

① *Microcystis* の培養と細胞群体解体処理

「(1)」の「①」と同条件で培養した *M. viridis* (IP-FJ株)を回収・濃縮した後、その容器を超音波水槽に入れ高周波出力 100W、85 分間で細胞群体を解体した。

② *Microcystis* の細胞群体解体の有無における *Monas* sp. の捕食実験

「①」で準備した細胞群体解体後の *M. viridis* を懸濁させた培養器に、前培養しておいた *Monas* sp. を接種して温度約 25℃、暗所、振盪 (レシプロ振盪, 100 rpm) にてインキュ

べートし、定期的に各種の個体数を計数した。なお、以上の操作は無菌的に行った。

(3) 細胞群体解体と微小動物の捕食作用を組み合わせた *Microcystis* 抑制プロセスの検証
 小規模池において *Microcystis* を抑制しようとする場合、*Microcystis* を含む池水の一部を超音波ホモジナイザーなどの細胞群体を物理的に解体する装置に引き込み、その水を再び池に戻すというプロセスが挙げられる。しかしながら、物理的衝撃を与えると、引き込まれた池水中の微小動物を死滅させてしまうことが考えられる。そこで、池水を群体解体システムに引き込み、その群体解体処理後の水を微小動物の高密度化が可能な分解槽に引き込み、その処理水を池に戻すプロセスを考案した (図 1)。

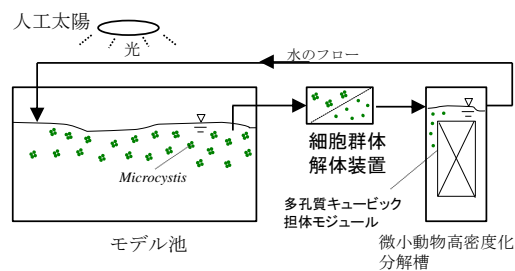


図 1 細胞群体解体と微小動物高密度化分解槽を組み付けた *Microcystis* 抑制プロセスのフロー

「(2)」で捕食能が確認された *Monas* sp. の捕食能を *Microcystis* 抑制に活用していく上でこうしたプロセスが適用できるか否かについて事前検証しておく必要がある。そこで、図 1 に示すプロセス構築し *Microcystis* 抑制をモデル実験により評価した。プロセスの設定と実験条件は以下の①～④に記したとおりである。

① *Microcystis* の細胞群体解体装置

本実験では細胞群体解体装置として超音波ホモジナイザーの振動子 (高周波出力 100W) を取り付けられた 0.5L 容のモジュールを用いた。細胞群体の解体率が 90% 以上となるよう超音波出力と時間を調整した。

② 微小動物高密度化分解槽

分解槽のスケールはモデル池の水量の約 1/80 に設定した。分解槽には微小動物を保持するための多孔質キュービック担体 (5mm 角) を充填し、水理的滞留時間は 4.0 hr に設定した。なお、分解槽には実験開始の 4 日目から池水を流入させた。

③ モデル池

池水として M11 培地を用い、水深を約 70cm に設定し、水面平均照度は約 20,000Lx で明暗周期を 12 hr とした。

④ 実験方法

実験開始時にモデル池には細胞群体を形成する *Microcystis* を注入した。分解槽には *Monas* に加え、他の微小動物としてワムシ類、貧毛類も接種した。

4. 研究成果

(1) *Microcystis* の細胞群体解体による捕食微小動物のスクリーニング

プレスクリーニングした微小動物群集は、原生動物として *Monas* sp.、*Bodo* sp. などの鞭毛虫類と、*Colpidium* sp.、*Coleps* sp. などの繊毛虫類、他、根足虫類 *Amoeba* sp. の計 19 属に加え、微小後生動物として *Colurella* sp. をはじめ計 6 属のワムシ類が占めていた。

プレスクリーニングした微小動物群集をシーディング後の各培養系における微小動物の個体数変化を図 2a (群体解体系) および図 2b (対照系) にそれぞれ示した。シーディングした微小動物のうちの数属の増殖が両系ともに認められた。なかでも、*Monas* sp. (写真 2) の増殖は群体解体系で顕著であり、最大 9.7×10^3 N/mL に達した。一方の対照系でも *Monas* sp. は増殖したが、最大個体数は群体解体系に比べ明らかに少なかった。他の微小動物としては、両系に共通して *Coleps* sp.、*Colpidium* sp.、*Bodo* sp.、*Amoeba* sp.、*Colurella* sp. がほぼ同数で確認された。*M. viridis* に対する捕食状況を各微小動物の体内観察によって調べたところ、*M. viridis* の細胞が確認されたのは *Monas* sp. のみであった。また、単離された微小動物のうち細胞群体を解体した *M. viridis* を食物源として継代培養が可能であった種は *Monas* sp. のみであった。以上より、群体解体された *M. viridis* の細胞を捕食できる種は *Monas* sp. はであると判断された。

(写真 2) の増殖は群体解体系で顕著であり、最大 9.7×10^3 N/mL に達した。一方の対照系でも *Monas* sp. は増殖したが、最大個体数は群体解体系に比べ明らかに少なかった。他の微小動物としては、両系に共通して *Coleps* sp.、*Colpidium* sp.、*Bodo* sp.、*Amoeba* sp.、*Colurella* sp. がほぼ同数で確認された。*M. viridis* に対する捕食状況を各微小動物の体内観察によって調べたところ、*M. viridis* の細胞が確認されたのは *Monas* sp. のみであった。また、単離された微小動物のうち細胞群体を解体した *M. viridis* を食物源として継代培養が可能であった種は *Monas* sp. のみであった。以上より、群体解体された *M. viridis* の細胞を捕食できる種は *Monas* sp. はであると判断された。

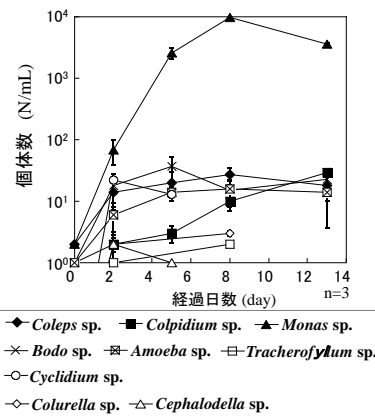


図 2a 細胞群体解体系における出現微小動物の個体数変化

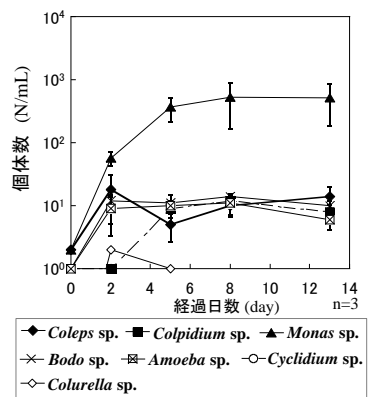


図 2b 対照系 (無解体系) における出現微小動物の個体数変化

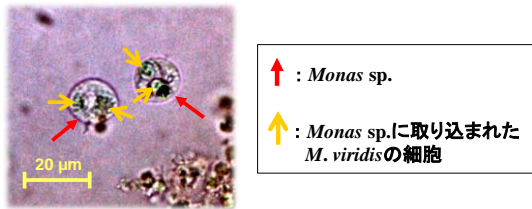


図 2 増殖が顕著に認められた原生動物 鞭毛虫類の *Monas* sp.

両系における *M. viridis* の細胞数の変化を図 3 に、群体解体系における *M. viridis* の全細胞数・解体(分散)細胞数・凝集細胞数の変化を図 4 に示した。図 3 より、*M. viridis* の減少が顕著である系は群体解体系であることがわかった。また、図 4 より、細胞群体解体によって個々に分散された細胞は、全細胞数の減少傾向におおむね対応して減少した。

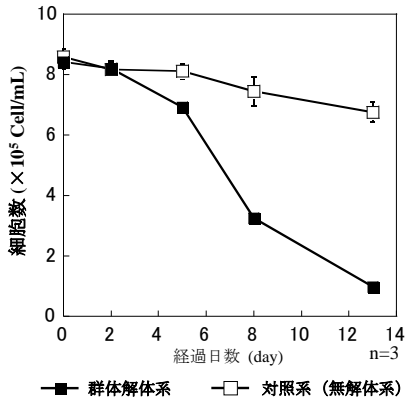


図 3 両系における *M. viridis* の細胞数の変化

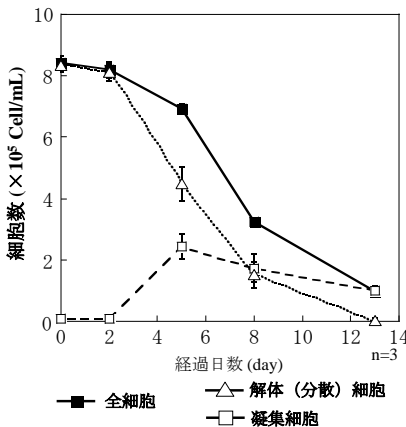


図 4 群体解体系における *M. viridis* 全細胞数・解体(分散)細胞数・凝集細胞数の変化

(2) スクリーニング系から単離した *Monas* sp. の *Microcystis* 捕食能の評価

M. viridis の細胞群体解体の有無における *Monas* sp. の個体数の経日変化を図 5 に示した。

群体解体系の *Monas* sp. の個体数は 4 日目には初期値の 1.6×10^3 N/ml から 1.1×10^5 N/ml へと約 70 倍に増加し、以降、*M. viridis* の細胞数の減少とともにその個体数は減少していった。

細胞群体解体系における *M. viridis* の細胞数は、図 6 に示されたように対照系に比べ、*Monas* sp. 接種系では明らかに減少しており、*Monas* sp. は群体が解体された *M. viridis* の

個々の細胞を捕食できることが明らかとなった。しかしながら、4.5 日目以降はその減少速度が低下した。この理由として、観察記録ではあるが、*M. viridis* の細胞群体を覆っていたスライム状の物質と同様のものが個々の細胞の周囲を覆っており、これが *Monas* sp. の捕食回避にはたらいたものと考えられた。

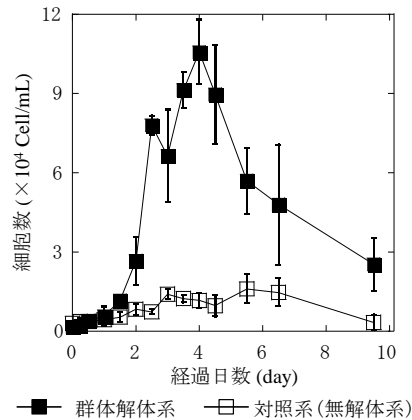


図 5 *M. viridis* の細胞群体解体の有無における *Monas* sp. の個体数の経日変化

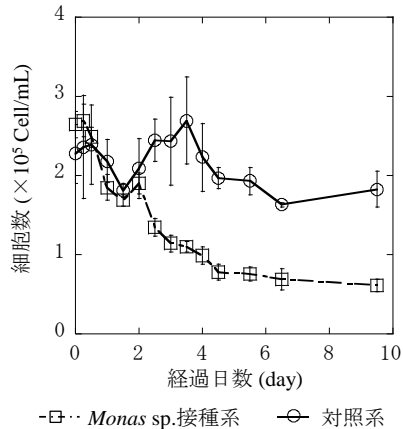


図 6 細胞群体解体系における *M. viridis* の細胞数の変化

(3) 細胞群体解体と微小動物による捕食作用を組み込んだプロセスの *Microcystis* 抑制の評価

Microcystis 抑制プロセス検証実験の細胞群体解体系におけるクロロフィル *a* の変化を図 7 に示した。*Microcystis* のバイオマスはクロロフィル *a* 量とほぼ正比例の関係にある。図 7 より、対照系のクロロフィル *a* 濃度は 25 日目まで上昇し、以降、ほぼ同じ濃度で推移しているのに対し、群体解体装置と分解槽を組み付けた系におけるクロロフィル *a* 濃度は、5 日目から対照系に比べ徐々に低い値を示すようになり、22 日目以降からは明らかに低下する傾向が認められた。この結果は、細胞群体を解体する装置と、単独となった *Microcystis* の細胞を捕食する微小動物の高密度化分解槽とを直列に繋いだプロセスが *Microcystis* 抑制にとって有効であることを裏付けた。微小動物の高密度化分解槽においては *Monas* と競合するワムシ類や貧毛類が存在しても *Monas* の高密度化が図れることがわかった (図 8)。

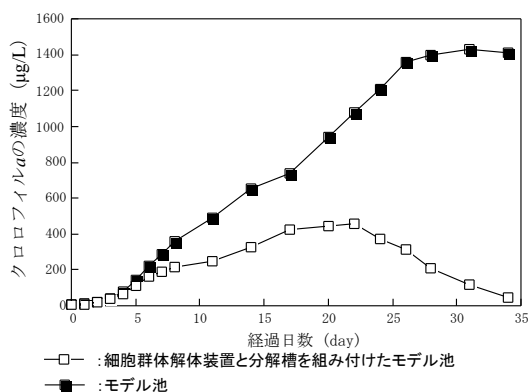


図 7 *Microcystis* 抑制プロセス検証実験の細胞群体解体系におけるクロロフィル a の変化

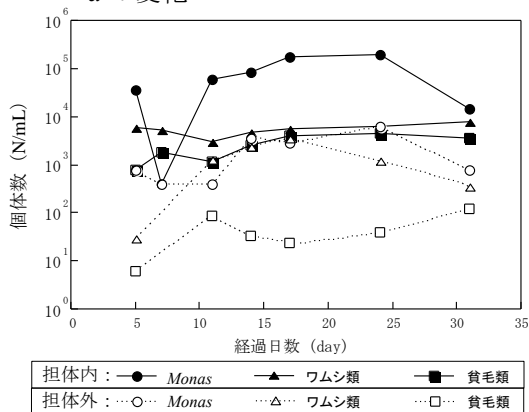


図 7 微小動物高密度化分解槽内の微小動物の個体数の変化

備考

小規模な池のモデル実験ヤードとして選定した井の頭池で本研究実施期間である2013年度と2015年度の2回にわたり“かいぼり”が実施されることとなった。そのため井の頭池の管轄機関より池内への構造物設置の見送りに係る指導があったため隔離水界は設置できず、やむなく計画を中断した。そのため、(3)の「細胞群体解体と微小動物の捕食作用を組み合わせた*Microcystis*抑制プロセスの検討」は、モデル実験ヤードの規模を縮小した実験室内でのモデル実験に切り替えることとなった。

(4) まとめ

- ①細胞群体を人為的に解体した*Microcystis*の単独細胞を捕食する*Monas sp.*を単離した。
- ②*Monas sp.*の*Microcystis*に対する捕食能を把握した。
- ③細胞群体解体と*Monas*をはじめとする微小動物高密度化分解槽を組み付けたプロセスで*Microcystis*抑制が図れることの裏付けが得られた。

<引用文献>

- 1) Bernardi, R. and Giussani, G: Are blue-green algae a suitable food for zooplankton? An overview, *Hidrobiologia*, 200/201, 1990, 29-41.
- 2) Nishibe, Y., Kawabata, Z. and Nakano, S.:

Grazing on *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in a hypertrophic pond, *Aquat. Microb. Ecol.*, 29, 2002, 173-179.

3) 杉浦則夫, 稲森悠平, 一条悟朗, 須藤隆一: アオコを分解する鞭毛虫類, 水道協会雑誌, 680, 1991, 2-9.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

岩見徳雄, 板山朋聡: 富栄養化池沼におけるシアノバクテリア抑制への取り組み-シアノバクテリア抑制の生態工学研究-, 土木技術, 査読無, Vol. 68, No. 10, 2013, PP. 53-57.

[学会発表] (計 9 件)

①岩見徳雄 他: タイ王国の環境保全対策戦略, 第 18 回日本水環境学会シンポジウム, 2015 年 9 月 14 日-9 月 16 日, 長野(信州大学).

②Kazune Shioya et al.: Characteristics of Water Quality and Occurrence Microalgae in Central Tokyo Peripheral Ponds, Meeting on the title with Water Environment of "Glocalization" Era, in Nagasaki Univ., 20 Mar. 2013, Nagasaki (Nagasaki Univ.).

③Chunyan Liu et al.: 木炭担体を用いたバイオフィENSEの有毒藍藻除去機構の解析, 第 48 回日本水環境学会年会, 2014 年 3 月 17 日- 3 月 19 日, 仙台(東北大学).

④岩見徳雄 他: *Microcystis* の細胞群体解体による捕食微小動物のスクリーニング, 第 47 回日本水環境学会, 2013 年 3 月 11 日-3 月 13 日, 第 47 回日本水環境学会年会, 大阪(大阪工業大学).

⑤板山朋聡 他: バイオフィENSEを用いた水域部分浄化手法の解析, 日本水環境学会, 2013 年 3 月 11 日-3 月 13 日, 第 47 回日本水環境学会年会, 大阪(大阪工業大学).

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩見 徳雄 (IWAMI, norio)
研究者番号: 00353532
明星大学・理工学部・准教授

(2)研究分担者

板山 朋聡 (ITAYAMA, tomoaki)
長崎大学大学院・工学研究科・教授
研究者番号: 80353530
清水 和哉 (SHIMIZU, kazuya)
東洋大学・生命科学部・准教授
研究者番号: 10581613

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

塩谷 和音 (SHIOYA, kazune)
明星大学大学院・理工学研究科・研究生