秋田県八郎湖で採取した底質からの藍藻回帰に及ぼす低温処理と培養温度の影響

Effect of Low Temperature Treatment and Incubation Temperature on the Recruitment of Cyanobacteria Cells from the Bottom Sediments Collected at Lake Hachiro, Akita

荒木美穂¹, 岡野邦宏^{2*}, 藤林 恵², 宮田直幸²

¹秋田県立大学大学院生物資源科学研究科／〒010-0195 秋田県秋田市下新城中野字街道端西241-438

²秋田県立大学生物資源科学部／〒010-0195 秋田県秋田市下新城中野字街道端西241-438

MIHO ARAKI¹, KUNIHIRO OKANO², MEGUMU FUJIBAYASHI², and NAOYUKI MIYATA²

¹Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University / Akita 010-0195, Japan

²Department of Biological Environment, Akita Prefectural University / Akita 010-0195, Japan

Abstract

In Lake Hachiro, Akita, algal blooms occur every summer. Cyanobacteria such as *Microcystis* sp. and *Anabaena* sp. precipitate on the bottom sediments in autumn and overwinter. In this study, we carried out the recruitment experiments at 10°C, 15°C, and 20°C using the bottom sediments collected in November 2016 in order to evaluate whether the precipitated cyanobacteria recruit from the sediments. While the amounts of recruited *Microcystis* cells tended to increase during the incubation of 10 days as the temperature increased from 10°C to 20°C, *Anabaena* cells did not recruit at 20°C. In the sediment samples treated at 4°C for 20 weeks, the amounts of recruited *Microcystis* and *Anabaena* cells at 20°C were significantly larger than at 10°C. The low temperature treatment of sediment samples obviously promoted the recruitment of *Anabaena* cells, suggesting the importance of low water temperature in winter for germination and recruitment of *Anabaena* dormant cells. This study showed that the low temperature treatment of the sediments as well as setting of temperature condition was an important item for evaluating the recruitment of cyanobacteria from lake sediment samples.

Key words: Lake Hachiro, algal blooms, recruitment, overwintering, low temperature treatment

1. はじめに

近年、世界中の富栄養湖でアオコの発生が深刻化している。アオコ形成藻類の中には強力な肝臓毒マイクロシチンを産生するものが存在するため、アオコの防除や発生予測が重要な課題になっている。マイクロシチンには多くの類縁体が存在するが¹⁾、その中で最も毒性の強いマイクロシチン-LRは、世界保健機構（WHO）により飲料水の暫定ガイドライン値が1.0 µg/Lに設定されている²⁾。

最近では2014年にErie湖（アメリカ合衆国）でアオコが大量発生し、近隣の浄水場より1.0 µg/L以上のマイクロシチン-LRが検出され、Ohio州の住民40万人が取水制限の被害を受けた³⁾。

秋田県西部に位置する八郎湖は、かつては琵琶湖に次ぎ日本で第二位の面積（220.24 km²）を有していたが、戦後の食糧不足解消のため1957年に八郎潟干拓事業を開始し、1977年干拓工事終了後には、湖面積が当時の5分の1程度となった。農業用水の循環利用や流域からの栄

* Corresponding author: k_okano@akita-pu.ac.jp

養塩負荷などにより富栄養化が深刻化し、2006年にはCOD75%値が全国ワースト3となった^{4),5)}。同年8月には河口付近に浄水の取水口がある馬場目川においてアオコが遡上して取水制限がされている^{5),6)}。

八郎湖のアオコ形成藻類の代表種は、藍藻の*Microcystis*属および*Anabaena*属であることが明らかとなっている^{5),7),8)}。これらの藍藻は、代謝や増殖に適さない冬季は湖沼底質中で越冬することが知られている^{9),10)}。筆者らはごく最近、八郎湖全域の底質を調査し、八郎湖でも底質中に*Microcystis*属細胞が越冬していることを示唆している¹¹⁾。このような湖沼底質中での*Microcystis*属細胞^{9),12)~15)}や*Anabaena*属休眠細胞^{16),17)}の堆積は多くの研究事例があり、最近国内では、古田ら¹⁸⁾が琵琶湖で、長濱ら¹⁹⁾が霞ヶ浦で調査、報告を行っている。

1980年にPrestonおよびStewartらは¹⁵N標識した*M. aeruginosa*が底質に沈降した後、翌年再び水柱に回帰することを証明した¹⁰⁾。また、現地における回帰トラップ²⁰⁾や室内試験^{20)~22)}により、*Microcystis*属細胞の底質からの回帰を示した研究は多い。*Microcystis*属細胞の室内回帰試験の多くは、環境要因として温度、光、底質攪乱の影響が検討されている。例えばSuらは、異なる温度(10℃、20℃)、照度(50 lx、2000 lx)、底質攪乱(あり、なし)および栄養塩濃度(ろ過湖水、BG11培地)の影響を調べ、*Microcystis*属細胞の回帰量は20℃、2000 lx(概算で約20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)、底質攪乱ありの場合に最大になることを報告している²¹⁾。一方で、BenjaminおよびLatourらは、温度(4℃、7℃、17℃)、光(あり、なし)、底質攪乱(あり、なし)の影響を調べ、底質攪乱が回帰を促進する唯一の要因であると結論付けている²²⁾。このように室内試験における回帰を促進する要因は試験条件により様々だが、越冬自体、例えば長期間の低温状態が回帰に与える影響については検討されていない。

八郎湖は平均水深が2.8 mと浅いため、波浪による巻き上げ、攪乱は湖内全域で頻繁に起こっていると推察される。Wexhenmeyerは、Erken湖(スウェーデン王国)で水深12 mの底質が波浪によって懸濁されることを報告している²³⁾。上層部に巻き上げられた底質は表層で受光する。このことから、八郎湖底質は凍結する冬季を除くと、年間を通じて攪乱と受光の影響を受けていると推察され、藍藻類の越冬や回帰、増殖といった季節変動に及ぼす攪乱や光量の影響は限定的となる可能性がある。一方で、冬季は表層が凍結して底質は低温に晒されるほか、夏季の水温が20℃~25℃の時期にアオコの発生が観察される^{5),8)}。八郎湖において藍藻類は幅広い温度領域の中で

生息していることから、藍藻類の季節変動を明らかにするためには、環境要因として温度の影響を調査することが重要な検討課題であるといえる。

本研究では、八郎湖において秋季に底質に沈降した藍藻類の回帰ポテンシャルを評価することを目的として、室内試験で回帰に及ぼす温度条件の影響を調査した。また、実際の八郎湖での越冬を想定して、採取した底質試料に結氷前である11月から解氷後の4月までと同じ2週間間の低温処理を施した後、回帰試験を行い、低温暴露の影響を検討した。さらに、八郎湖内で越冬後の時期となる2017年4月~6月にかけて藍藻の挙動をモニタリングし、実際に水温が重要な環境要因として働いているか考察を加えた。

2. 試験方法

2.1 調査地点および試料採取

2016年11月7日に八郎湖のSt. A、B、C、D、E、F、G、Hの8地点で採泥を湖心(St. CL)で採水を実施した(Fig. 1、Table 1)。エクマンバージ採泥器(15 cm角、Rigo)を用いて各地点の底質を採取し、表層1 cmを殺菌

Fig. 1 The schematic diagram of Lake Hachiro. Sediment samples were collected from stations A to H and surface water sample was from station CL.

Table 1 Latitude and longitude of sampling stations

Station	latitude	longitude
A	39°55'15.60" N	139°58'40.60" E
B	39°55' 5.10" N	139°58' 7.40" E
C	39°56' 1.70" N	139°57'43.50" E
D	39°54'45.10" N	140° 0'43.10" E
E	39°55'46.30" N	140° 1'55.50" E
F	39°54'16.40" N	140° 2'16.00" E
G	39°53'21.80" N	140° 2'11.50" E
H	39°53' 2.90" N	140° 2'16.20" E
CL*	39°53'25.60" N	139°59'42.00" E

* Center of Lake Hachiro

したブラサジでジップロックに回収した。また、St. CLにおいて底質直上水をバンドーン採水器（3 L容、Rigo）で約20 L採水した。これらの試料をクーラーボックスに入れて実験室に持ち帰り、底質直上水はGF/Cガラス繊維ろ紙（Whatman）で前ろ過後、メンブレンフィルター（0.45 μm 、Advantec）でろ過し、プランクトンや細菌などを除去した。直上水のろ液および底質試料は試験開始まで4℃にて暗所で保存した。なお、底質を低温処理せずに回帰試験に用いる場合は、4℃にて暗所で保存し、底質を採取した2日後より試験を開始した。

八郎湖湖心における水温データの一部は、秋田県健康環境センターから提供されたものを使用した。

2.2 底質の強熱減量と藍藻細胞の計数法

各地点で採取した底質の総重量（湿重量）を測定後、約20 gを秤量瓶に測り取った。これらを105 $\pm$ 5℃で24時間乾燥させ、デシケーター中で放冷後に質量を測定し、含水率を算出した。含水率の測定に供試した乾燥試料約2 gをろつばに測り、マッフル炉中で750 $\pm$ 5℃で約1時間強熱後、強熱減量を算出した。

底質中の藍藻細胞数は既往の方法¹⁸⁾に従い計数した。各地点の底質約0.1 gを15 mL容遠沈管に測り取りSt. CLで採水した湖水からプランクトンを除去したろ液（GF/F、Whatman）10 mLに再懸濁させた。この懸濁液1 mLを計数盤（20 $\times$ 50 mm、Matsunami）に添加し、落射蛍光顕微鏡（BX50、Olympus）を用いて、可視光とG励起（U-MWIG3、510–560 nm、Olympus）を併用しながら200倍で計数した。各地点につき10視野分の藻類細胞を計数し、底質乾燥重量当たりの藻類細胞数を算出した。藍藻類の同定は細胞やコロニー形態の観察により行った。

2.3 回帰試験方法

1) 未処理底質を用いた回帰試験

2016年11月7日に8地点（St. A、B、C、D、E、F、G、H）より採取した底質をそれぞれよく混合した後、約20 gを滅菌した100 mL容メジウム瓶に入れた。さらに、ろ過した50 mLの直上水を底質を攪乱しないようにシリンジでゆっくりと添加した。なお、直上水は添加前に光学顕微鏡で観察し、藻類を含まないことを確認した。このメジウム瓶を10℃、15℃、20℃に設定した恒温器中で10日間培養した。各地点の試料とも、それぞれの温度において1連で試験した。なお、光量子量は39.9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ （LI-192 SA、LI-COR）とし、12時間の明暗周期で行った。回帰した藻類の増殖や動物プランクトンによる捕食を避けるために培養開始後2、4、6、10日目に直上水全量を滅菌チューブでゆっくりと採取し、新たにろ過した直上水50 mLを添加した。採取した直上水300 μL をプランクトン計数盤（MPC-200、Matsunami）に添加し、光学顕微鏡（BX51、Olympus）を用いて200倍で計数した。*Microcystis*属細胞数は計数時にコロニーの直径を計測し、直径100 μm あたり200細胞（*M. wesenbergii*、*M. novacekii*、*M. viridis*）、500細胞（*M. aeruginosa*）、1000細胞（*M. ichthyoblabe*）を基準として換算した。また、計数は3連で行った。

なお、水温ごとの細胞数の有意差検定はJMP13（SAS Institute）を使用し、正規性の適合度を検定後、Kruskal-Wallis testとPared-Wilcoxon testにより行った。

2) 低温処理底質を用いた回帰試験

2016年11月7日に採取した底質試料の一部を動物プランクトンの増加や他の細菌類の汚染を避けるためにジップロックにて20週間、4℃で保存して低温処理を行った。また、八郎湖では結水中は底層への波浪の影響が小さくなり、巻き上げによる受光はないことが予想されるため、暗条件で低温処理を行った。保存後の底質試料を用いて2.3 1)と同様の試験を行った。

2.4 湖水中の藍藻細胞の計数

2017年4月9日、5月24日、5月30日、6月23日に八郎湖湖心のSt. CL（Fig. 1、Table 1）で表層水を採水し、顕微鏡観察に供試した。試料の顕微鏡観察および細胞計数は2.3で記載した方法で行った。なお、5月24日の表層水は秋田県健康環境センターから提供されたものを使用した。

3. 結果

3.1 底質の強熱減量と藍藻細胞数

2016年11月7日に採取した底質の強熱減量と藍藻細胞数の測定結果をTable 2に示す。目視で砂質であったSt. A～Dの底質では強熱減量が0.7～1.8%と低く、有機物含量は少ないことが確認できた。一方、St. E～Hの底質は泥質で、強熱減量も9.2～10.8%と高いことが示された。これらの底質中には、*Microcystis*属として*Microcystis aeruginosa*、*M. ichthyoblabe*、*M. novacekii*、*M. viridis*の4種が検出され、本研究ではこれらをまとめて*Microcystis*属細胞とした。底質中の*Microcystis*属細胞数は、砂地のSt. A～Dで $2.8 \times 10^6 \sim 9.3 \times 10^6$ cells/g、泥地のSt. E～Hでは $4.5 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ cells/gの範囲で検出され、泥地において*Microcystis*属細胞はより高密度で存在していた。St. A、B、DおよびFの底質中からは、ネンジュモ目の休眠細胞も検出された。休眠細胞を形成する種には*Anabaena*属や*Aphanizomenon*属、*Gloeotrichia*属が挙げられるが、休眠細胞の形態から^{1), 24)}、底質中で検出されたのは*Anabaena*属の休眠細胞として扱った。休眠細胞数は $1.1 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^4$ cells/gの範囲で検出され、砂地と泥地で分布に違いは認められなかった。

3.2 藍藻回帰に及ぼす培養温度の影響

2016年11月7日に八郎湖の8地点より採取した底質を用いて回帰試験を行った。底質中の*Microcystis*属細胞数は砂地と泥地で大きく異なったため (Table 2)、砂地と泥地で回帰試験の結果を分けて解析した (Fig. 2)。砂地 (St. A～D) では試験開始後4日目までに、10℃で平均 1.6×10^6 cells/g、15℃で平均 2.6×10^6 cells/g、20℃で平均 7.4×10^5 cells/gまで増加したが、それ以降はほぼ一定

であった (Fig. 2A)。一方、泥地 (St. E～H) では、4日～6日目の間に10℃で平均 1.9×10^6 cells/g、15℃で平均 7.4×10^6 cells/g、20℃で平均 1.6×10^7 cells/gまで増加した (Fig. 2B)。全温度において、10日間の*Microcystis*属回帰量が泥地の方が多かったのは、初発の細胞数が多かったためと考えられた (Table 2)。

本試験で回帰した*Microcystis*属のうち、直径50 μm未

Fig. 2 Temporal changes in the cumulative recruitment amount of recruited *Microcystis* cells from sand samples (A) and mud samples (B) and recruited *Anabaena* cells from sand samples (C) and mud samples (D). Closed diamond, closed square, and closed triangle represent the data for 10℃, 15℃, and 20℃, respectively. Error bars represent standard deviation (n = 4).

Table 2 Ignition loss of sediment samples and the number of cyanobacteria cells

Station*	Ignition loss (%)	<i>Microcystis</i> cells (cells/g)	<i>Anabaena</i> dormant cells (cells/g)
A	1.7	8.3×10^6	1.1×10^4
B	1.5	5.3×10^6	1.1×10^4
C	1.8	9.3×10^6	0
D	0.7	2.8×10^6	1.8×10^4
E	10.8	1.0×10^8	0
F	9.3	4.5×10^7	5.3×10^4
G	9.2	9.1×10^7	0
H	9.9	6.5×10^7	0

*St. A-D, sand area; St. E-H, mud area

満のコロニーは全体の56%、直径50 μm 以上のFig. 3Aに示すようなコロニーは44%であった。また、回帰した*Microcystis*属として、元の底質で観察された*M. aeruginosa*、*M. ichthyoblabe*、*M. novacekii*および*M. viridis*の4種に加えて、*M. wesenbergii*が同定された。

全底質試料における*Microcystis*属細胞回帰量を温度ごとにまとめた結果をFig. 4Aに示す。*Microcystis*属の回帰量の中央値は、10℃で 1.4×10^6 cells/g、15℃で 7.3×10^5 cells/g、20℃で 2.9×10^6 cells/gであった。この試験では、各温度での回帰量に有意差は認められなかったが、20℃で中央値が最も高く、また他の温度と比較して底質間のばらつきが小さかったことから、20℃で回帰量が多くなる傾向が示された。

*Anabaena*属については、砂地では2日目までに10℃で平均 2.0×10^4 cells/g、15℃で平均 1.1×10^3 cells/gの回帰が観察されたが20℃では検出されなかった (Fig. 2C)。本試験で回帰した*Anabaena*属は、Fig. 3Bに示したような成熟した糸状体であり、形態から*A. crassa*と同定された。また、泥地では*Anabaena*属の回帰は全温度で全く観察されなかった (Fig. 2D)。

全地点における*Anabaena*属の回帰量をまとめた結果をFig. 4Bに示す。*Anabaena*属の回帰は限られた砂質試料および培養温度10℃、15℃でのみ観察された。このため回帰量の平均値は*Microcystis*属と比較して極めて低値であり (それぞれ 9.8×10^3 cells/gおよび 5.3×10^2 cells/g)、本試験の条件では*Anabaena*属の回帰はほとんど認められなかった。

3.3 藍藻回帰に及ぼす低温処理の影響

2016年11月7日に採取した底質試料を2週間低温処理して、回帰試験を行った結果をFig. 5に示す。*Microcystis*属細胞に関して、砂地では何れの温度でも試験開始直後から回帰が認められ、10日目までに回帰量は10℃で平均 6.3×10^3 cells/g、15℃で平均 1.2×10^4 cells/g、20℃で平均 5.6×10^4 cells/gに達した (Fig. 5A)。一方で泥地では、砂地4地点と比較して回帰開始時期が遅れる傾向が示された。15℃では試験開始直後から回帰が始まっていたが、10℃と20℃では6日目以降に回帰した (Fig. 5B)。10日間での総回帰量は、10℃、15℃、20℃でそれぞれ平均 1.6×10^2 cells/g、 9.2×10^3 cells/g、 6.0×10^3 cells/gであった。本試験で回帰した*Microcystis*属のコロニーのうち、Fig. 6Aに示すように直径50 μm 程度かそれ未満のコロニーが86%、直径50 μm 以上のコロニーが14%であり、低温処理を施さずに試験したとき (Fig. 3) と比較して小径

Fig. 3 Photograph of *Microcystis* colony (A) and *Anabaena* filament (B) observed in the recruitment experiment with sediment samples collected in November 2016.

Fig. 4 Total amount of recruited *Microcystis* (A) and *Anabaena* cells (B) during 10-day incubation with sediment samples collected in November 2016. Error bars represent maximum and minimum values ($n = 8$). In Fig. 4B, the median was not displayed because *Anabaena* cells recruited only two sites at 10°C and 15°C.

のコロニーの割合が多かった。これらのコロニーは10細胞程度であるため種の同定が困難であったが、少なくとも *M. ichthyoblabe*、*M. viridis* および *M. wesenbergii* の3種は確認できた。

全地点における *Microcystis* 属細胞の回帰量を温度ごとにとまとめた結果を Fig. 7A に示す。 *Microcystis* 属回帰量

Fig. 5 Temporal changes in the cumulative recruitment amount of recruited *Microcystis* cells from sand samples (A) and mud samples (B) and recruited *Anabaena* cells from sand samples (C) and mud samples (D) in the recruitment experiment with low temperature treatment. Closed diamond, closed square, and closed triangle represent the data for 10°C, 15°C, and 20°C, respectively. Error bars represent standard deviation (n = 4).

Fig. 6 Photograph of *Microcystis* colony (A) and *Anabaena* filament (B) observed in the recruitment experiment using sediment samples collected in November 2016 with low temperature treatment.

Fig. 7 Total amount of recruited *Microcystis* (A) and *Anabaena* cells (B) during 10-day incubation with sediment samples collected in November 2016 with low temperature treatment. Error bars represent maximum and minimum values (n = 8). The different lowercase letters show significant difference by the paired Wilcoxon test.

の中央値は、10℃で 3.4×10^1 cells/g、15℃で 4.1×10^3 cells/g、20℃で 2.3×10^4 cells/gとなり、10℃と比較して15℃と20℃で回帰量は著しく増加していた。10℃と15℃の回帰量に有意差は認められなかったが、20℃では有意な増加が認められたことから ($p < 0.05$)、回帰量は20℃でも最も増加したと結論づけた。

低温処理底質を用いたときの *Anabaena* 属の回帰量の経時変化を Fig. 5 に示す。砂地試料では何れの温度条件でも10日目まで回帰量は増加し、累積回帰量は10℃、15℃、20℃においてそれぞれ平均で 8.7×10^2 cells/g、 2.7×10^3 cells/g、 5.5×10^3 cells/gであった (Fig. 5C)。泥地試料では、20℃で2日目から回帰量が顕著に増加していた (Fig. 5D)。10日間では10℃で平均 1.8×10^2 cells/g、15℃で 1.5×10^3 cells/g、20℃で 4.8×10^3 cells/gの回帰が観察された。本試験で初期に回帰した *Anabaena* 属は Fig. 6B に示したような発芽したての栄養細胞であり、種の同定が困難であった。10日目に検出された *Anabaena* 属には、フィラメントの形態から同定できた個体もあり、*A. crassa* や *A. fros-aquae*、および *A. affinis* であった。

全地点試料における *Anabaena* 属回帰量を温度ごとにまとめた結果を Fig. 7B に示す。10℃～20℃におけるそれぞれの中央値は、 1.1×10^2 cells/g、 1.5×10^3 cells/g、 5.2×10^3 cells/g であった。温度の上昇とともに回帰量が有意に増加することが明らかになった (15℃、20℃でそれぞれ $p < 0.1$ 、 $p < 0.05$)。

3.4 八郎湖湖心における水温と藍藻細胞数の変動

八郎湖湖心 (Fig. 1) の表層水および底質直上水の水温の変動を Fig. 8A に示す。2017年4月上旬に表層水温は10℃前後であったが、その後5月9日には16.3℃、5月24日には19℃に達し、6月19日に20℃を超えていた。底質直上の水温は表層よりわずかに低い温度で推移し、6月23日に20℃を超えていた。同地点の表層水における藍藻細胞数の変動を Fig. 8B に示す。水温が19℃に上昇した5月24日の観測時に、僅かな *Microcystis* 属細胞と *Anabaena* 属細胞が検出された (両属とも3.3 cells/mL)。この時の *Microcystis* 属細胞と *Anabaena* 属細胞は、回帰試験における Fig. 6 に類似した小径のコロニーと発芽したての栄養細胞が占めており種同定できなかった。その後、この地点では *Anabaena* 属は観察されなかった。 *Microcystis* 属細胞は水温が20℃を超えた6月23日の観測時に 3.3×10^2 cells/mL と顕著に増加していることが示された。

Fig. 8 Seasonal variations of water temperature (A), number of cyanobacterial cells in the surface water at CL (B). Open and closed diamonds denote water temperature of the water just above the sediment and the surface water, respectively. Open and closed circles denote numbers of *Anabaena* and *Microcystis* cells, respectively. Error bars represent standard deviation ($n = 3$).

4. 考察

未処理の底質試料を用いた回帰試験では、*Microcystis* 属細胞は砂地試料、泥地試料ともに試験開始直後 (2日目) から回帰し、4日～6日目には回帰量は一定レベルに達していた (Fig. 2A, B)。全地点の試料の結果を併せて温度ごとに比較すると、20℃で回帰量が増加する傾向が示されたものの有意な差はなく (Fig. 4A)、温度による明確な影響は認められなかった。このとき、回帰した細胞は底質に含まれていたコロニーと同様に、直径50 μ m 以上のコロニーを多く形成していた。このことから、用

いた底質試料は2016年11月に採取されたものであるが、この時期は夏季から秋季にかけて発生したアオコが底層部に沈降した直後で、藍藻は比較的新鮮な状態で含まれていた可能性が高い。このため、回帰試験開始直後に沈降していた*Microcystis*属コロニーが再浮上し、回帰細胞として計数されたものと推察された。

幾つかの底質試料中には*Anabaena*属の休眠細胞が観察されたが、砂地試料を用いた10℃と15℃での回帰試験では、2地点において開始直後からの*Anabaena*属(*A. crassa*)の回帰が認められた(Fig. 2C)。回帰した細胞はFig. 3Bに示すような成熟した糸状体であり、温度依存性もなかったことから秋季に沈降した直後の*Anabaena*属が試験初期に再浮上したと推察された。また、泥地で回帰しなかった要因として砂地との物性の違いが考えられ、砂地の方が*Anabaena*属は浮上しやすいと推察された。

一方で、湖沼での越冬期間を想定して低温処理した底質試料を用いて回帰試験を行った結果、*Microcystis*属では多くの試験区において時間経過とともに回帰量が増加するとともに、直径50 µm程度かそれ以下の小径のコロニーが多く観察された(Fig. 6A)。低温処理前の試験結果と比較して10日間の回帰量は2～3オーダー程度減少していたことを併せて考察すると、低温処理中に*Microcystis*属細胞の著しい減衰が起こるものの一部は生残し、回帰試験の水温上昇時に小径のコロニーを形成しながら回帰しているものと推察された。Reynoldsらは、回帰した*Microcystis*属は親コロニーの粘質鞘内で細胞分裂した新たな細胞であると報告しており²⁵⁾、本研究で観察されたFig. 6Aのような小径のコロニーは劣化した粘質鞘が回帰時に分離して形成された可能性が考えられた。

低温処理した底質試料では、*Anabaena*属も同様に多くは発芽した後の栄養細胞であった(Fig. 6B)。このことから、低温処理により休眠細胞からの発芽が促進されたことが推測された。特に泥地試料では、未処理の場合に全く回帰していなかったが、低温処理により何れの試料からも回帰するようになり、処理の効果が顕著に認められた。泥地では、試料採取時に休眠細胞が検出されなかった地点が多かったが(Table 2, St. E, G, H)、低温処理後にはそれらの試料からも回帰が観察された。これらの結果から、*Anabaena*属の休眠細胞は低密度ながら全地点に沈降していることが明らかとなり、さらにそれらの発芽、回帰には一定の低水温期を経ることが重要であることが示唆された。

低温処理後の藍藻回帰に及ぼす培養温度の影響に関して、*Microcystis*属細胞の回帰量は温度の上昇とともに増

加し、20℃で最も多くなることが明らかとなった($p < 0.05$, Fig. 7A)。この結果は、*Microcystis*属の回帰の最適温度が20℃であると結論付けたSuら²¹⁾や*Microcystis*属の回帰が15℃以上で促進することを示したYamamotoの報告¹²⁾と一致していた。さらに、低温処理後の*Anabaena*属の回帰では、10℃と比較して15℃および20℃で回帰量は有意に増加し(それぞれ $p < 0.1$ 、 $p < 0.05$)、明確な温度依存性が認められた(Fig. 7B)。これらの結果は、室内試験の限定的な条件下で得られたものであるが、実際の八郎湖における越冬後(4月以降)のアオコ形成藍藻の挙動と矛盾していなかった(Fig. 8)。2017年6月23日の観測時に湖心で底質直上水温と表層水温の両方が20℃を超えていたが、はじめて湖心表層水で*Microcystis*属細胞数の著しい増加が観測された。この時期に*Microcystis*属細胞が越冬後の水温上昇により底質から回帰していた可能性が示されたため、今後詳細に検証する必要がある。

5. まとめ

これまでに、アオコ形成藍藻の底質からの回帰に及ぼす環境要因の影響が研究されてきたが、八郎湖底質を用いた本研究では、*Microcystis*属および*Anabaena*属において底質の低温処理と回帰時の水温が回帰量に影響を与え、低温処理後には10℃～20℃の範囲では20℃で回帰量が最大となることを明らかにした。さらに、低温処理は*Anabaena*属の回帰を促進することが明らかになった。また、本研究の結果は室内試験で底質試料からの藍藻類の回帰を評価する際に、低温処理の有無や温度条件の設定が重要な検討項目であることを示している。同時に、八郎湖において、底質中で越冬し回帰した藍藻類がその年のアオコ発生に寄与している可能性が示され、湖内におけるアオコ形成藻類の挙動解明に向けて重要な知見を得ることができた。

謝辞

本研究の回帰試験の実施にあたり、滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 一瀬 諭氏、古田世子氏にご協力頂いた。また、秋田県健康環境センター 玉田将文氏には湖心における湖水試料と水温データをご提供頂いた。この場を借りて深謝します。なお、本研究はJSPS科研費JP16K16206の助成により行われた。

参考文献

- 1) 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太: アオコ その出現と毒素, 東京大学出版会, 118-123 (1994)
- 2) World Health Organization: Guidelines for drinking-water quality 3rd edition, 515 (2006)
- 3) Smith, D. R., King, K. W., Williams, M. R.: What is causing the harmful algal blooms in Lake Erie?, Journal of Soil and Water Conservation, 70(2), 24-29 (2015)
- 4) 秋田県: 八郎湖に係る湖沼水質保全計画 第1期, 16 (2008)
- 5) 岡野邦宏, 鈴木英治, 太田 栞, 宮田直幸, 谷 幸則, 尾崎保夫: 秋田県八郎湖における藍藻毒ミクロシスチンと有毒藍藻の季節変動, 日本水環境学会誌, 38(1), 23-30 (2015)
- 6) 近藤 正: 八郎湖の水門・水環境特性の変遷と課題, 水環境学会誌, 33(9), 292-298 (2010)
- 7) 林 紀男, 岡野邦宏, 尾崎保夫: 八郎湖における浮遊性藍藻類アオコの多様性, 秋田自然史研究, 63, 7-9 (2013)
- 8) Araki, M., Okano, K., Ohta, S., Suzuki, E., Fujibayashi, M., Miyata, N.: Characteristics of harmful algal blooms during a low-water temperature season in Lake Hachiro, Journal of Water and Environment Technology, in press (2018)
- 9) Takamura, N., Masayuki, Y., Sugahara, K.: Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kutz. in a shallow lake, Journal of Plankton Research, 6(6), 1019-1029 (1984)
- 10) Preston, T., Stewart, W. D. P.: Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface, Nature, 288, 365-367 (1980)
- 11) 荒木美穂, 岡野邦宏, 藤林 恵, 宮田直幸: 日本水処理生物学会誌, 別巻37, 63 (2017)
- 12) Yamamoto, Y.: Effect of temperature on recruitment of cyanobacteria from the sediment and bloom formation in a shallow pond, Plankton Benthos Research, 4(3), 95-103 (2009)
- 13) Brunberg, A. K., Blomqvist, P.: Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions, Plankton Research, 24(11), 1247-1252 (2002)
- 14) Tsujimura, S., Tsukada, H., Nakahara, H., Nakajima, T., Nishino, M.: Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan, Hydrobiologia, 434(1-3), 183-192 (2000)
- 15) Tsukada, H., Tsujimura, S., Nakahara, H.: Seasonal variation in standing crops of bloom-forming cyanobacteria in water and sediment in Lake Yogo, Japan, Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie, 29(3), 1651-1656 (2006)
- 16) Livingstone, D., Jaworski, G. H. M.: The viability of akinetes of blue-green algae recovered from the sediments of rosthorne mere, British Phycological Journal, 15(4), 357-364 (1980)
- 17) Benjamin, L., Jeune, A. H. L., Colombet, J., Thouvenot, A., Latour, D.: Are akinetes representative of past nostocalean bloom? A case study of their benthic spatio-temporal distribution and potential for germination in a eutrophic lake, Applied and Environmental Microbiology, 83(23), e01571-17 (2017)
- 18) 古田世子, 一瀬 諭, 馬場大哉, 岸本直之: 琵琶湖沿岸帯における底泥環境の評価, 日本水処理生物学会誌, 53(1), 23-32 (2017)
- 19) 長濱祐美, 中川圭太, 菅谷和寿, 富岡典子, 相崎守弘: 霞ヶ浦底泥における *Microcystis* rDNA の分布と季節変動, 水環境学会誌, 40(12), 183-188 (2017)
- 20) Rengefors, K., Gustafsson, S., Stahl-Delbanco, A.: Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments, Aquatic Microbial Ecology, 36(3), 213-226 (2004)
- 21) Su, Y., You, X., Lin, H., Zhuang, H., Weng, Y., Zhang, D.: Recruitment of cyanobacteria from the sediments in the eutrophic Shanzhi Reservoir, Environmental Technology, 37(6), 641-651 (2016)
- 22) Benjamin, M., Latour, D.: Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of the benthic life phase on the benthic recruitment of *Microcystis*, Journal of Plankton Research, 34(2), 113-119 (2012)
- 23) Wexhenmeyer, G. A.: The influence of stratification on the amount and distribution of different settling particles in Lake Erken, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 53(6), 1254-1262 (1996)
- 24) 渡邊真之: 日本アオコ大図鑑, 誠文堂新光社, p.159 (2007)
- 25) Reynolds, C. S., Jaworeski, G. H. M., Cmiech, H. A., Leedale, G. F.: On the annual cycle of the blue green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin, Philosophical Transactions of the Royal Society London B, 293(1068), 419-477 (1981)

(受付 2018. 2. 2)

(受理 2018. 3. 5)