シンポジウム アオコの特性とその発生機構

アオコ群体に共存する細菌とその役割*1

石田祐三郎*2 (福山大工), 吉田陽一*3 (水環微研)

藍藻と細菌の共生関係は、普通細胞外共生であり、Lange^{1,2,3)}による増殖促進効果、Bjalfve⁴⁾の *Nostoc* や Paerl⁵⁾の *Anabaena* などの窒素固定における好気性細菌の役割、さらに、熊谷ら⁶⁾による有機物存在下の無菌培養 *Microcystis aeruginosa* への細菌添加による増殖促進効果などが主なものである。

吉田ら,⁷⁾ 吉田、沖野⁸⁾は予てより、*M. aeruginosa* などの藍藻のブルームが、DIN(溶存無機態窒素)、TN(全窒素)/TP(全リン) 比および DIN/DIP(溶存無機態リン) 比が低く、水温、TN/DIN 比および TP/DIP 比が高い水域に高頻度で出現すること、ときには TN/DIN 比が 100 を越える場合も少なくなかったことを見出した。このことは、アオコの中でも、とりわけ有機物を利用できない *M. aeruginosa* が DIN の非常に少ない水域でも DON(溶存有機態窒素)を何らかの手役で利用している可能性を示すものであり、強いて推測すれば、アオコの群体に共存している細菌による DON の DIN への分解とそれに依るアオコへの「供給システム」がアオコ群体を取り巻くスライムに存在することになる。その可能性は、*M. aeruginosa* の無菌培養に成功し、その栄養要求において有機態窒素を唯一の窒素源として利用できないことを証明した高村グループ⁹⁾によると、保存培養用の無機培地に 20 mg/l 以上の nutrient broth を添加すると、*M. aeruginosa* の増殖が著しい阻害を受けるが、特定の細菌 *Moraxella nonliquifaciens* を加えた二者培養を行なうと、nutrient broth 20~80 mg/l の範囲内では増殖が促進し、最大増殖の 3~5 倍、比増殖速度の約 1.5 倍の増加が認められたことから推察できる。

一方、アオコのスライムの構成成分についての高村ら、⁹⁾ Nakagawa *et al.*,¹⁰⁾ Amemiya and Nakayama¹¹⁾の報告によると、炭水化物として酸性多糖のウロン酸、中性糖のラムノース、キシロースなど 7 種のほか、ガラクトツロン酸を含むヘテロポリマーと 20% 程度の蛋白質が含まれている。また、その蛋白質には酸性および中性アミノ酸が多く、スライムは全体としてマイナスにチャージしていることから、細菌は斥力を受けていることになる。しかるに、アオコのスライムをクリスタルバイオ

レットや墨汁を用いて染色したところ、*M. aeruginosa* の群体スライムの中層付近に形態の類似した長桿菌(分類的に似ているという意味ではない)が多数分布し、スライム外側の遊離の細菌群と顕微鏡的に区別出来ることを示した。^{7,8)} それらは DAPI, CTC および CFDA 染色による顕微鏡観察では living cells と推定された。

まず、スライム内と遊離の細菌をなるべく定量的に分離し、両者の分類学的差異の有無を 16SrDNA の PCR/RFLP(制限酵素断片長多型)によって識別した。試料は、*M. aeruginosa* および *M. viridis* のブルームが発生している丹波池(京都)から、それぞれ 1 群体をキャピラリー法によって十分洗浄した後、0.2 g C/l を含む湖水添加希釈平板培地(LW⁻¹ medium)を用いて、スライム中に存在する全細菌数(DAPI)にはほぼ近い従属栄養細菌数(細胞数 100 前後の 1 群体当たり約 400 cells)を分離することに成功した(表 1)。スライム内と遊離の細菌をそれぞれ無作為に約 20 株を選び、制限酵素 Rsa I と Mbo I による RFLP を調べた。それによると、9 タイプに分けられ、スライム内細菌(結果の出たもの 20 株)は、その約 50% がタイプ I に属し、残りはタイプ II, III, IV, V, VI と IX に分布したのに反して、遊離細菌(結果の出たもの 13 株)は、50% 以上がタイプ VI に属し、多くは蛋白分解能(スキムミルク)を有した。他はタイプ II, VII と VIII に属し、また、全体的にグラム陽性菌が多かった。このようなスライム内の選択性は、*M. aeruginosa* の生産する抗菌物質(石田ら、H8 秋季大会講演要旨)によるのか、スライム分解可能な細菌の選択性によるのかなどの可能性が推定される。

次に、アオコの有機物利用に関わる共存細菌の役割を明確にすべく、図 1 に示すように、藍藻用無機培地 MA medium¹²⁾から窒素源を除いた培地に、有機窒素源として trypticase (100 mg/l) と yeast extract (5 mg/l) を添加した培地(MA-OR medium)を調製し、附着細菌 24 株および遊離細菌 17 株をそれぞれ、*M. aeruginosa* NIES 87 と共存培養した。その結果、アオコに *M. aeruginosa* の増殖促進効果を示した株は、附着細菌 2 株、遊離細菌 2 株であり、両者の差は観察されなかつ

*1 Hypothesis on Some Role of Bacteria Associated with *Microcystis*.

*2 Yuzaburo Ishida (Faculty of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan).

*3 Yoichi Yoshida (Laboratory of Fisheries and Environmental Microbiology, Hiyoshidai, Otsu, Shiga 520-0112, Japan).

表1 アオコ *M. aeruginosa* 群体スライムに付着した細菌の計数

1 群体中の <i>M. aeruginosa</i> cells 数	アオコ 1 群体の細菌数 CFU*		群体を除いた池水 1 ml 中のCFU*
	LT-medium**	LW ⁻¹ medium***	
1. 大群体 (5-600 cells)	40	168	—
2. 小群体 (ca 50 cells)	—	28	20
3. 中群体 (ca 100 cells)	—	356(分離株 A1-A20)#	40(分離株 Y1-Y20)#
4. 中群体 (ca 100 cells)	35	420(分離株 a1-a10)#	40

* CFU : コロニー数 (Colony Forming Units), 20°C で 20 日培養。

** LT-medium : 水道水 1 リッターに Trypticase 5 g; Yeast extract 1 g; Agar 12 g を溶かし, オートクレーブした (pH 7.5)。

*** LW⁻¹ medium: GF/F でろ過した池水 (弁慶池) 1 リッターに Trypticase 0.5 g; Yeast extract 0.1 g; Agar 12 g を溶かし, オートクレーブした。

付着株 A1-A20 と a1-a10 および遊離株 Y1-Y20 : 分離した細菌株番号。

図1 *M. aeruginosa* に付着または遊離した細菌との共存下で *M. aeruginosa* を培養した実験スキーム

MA-OR medium : 無機窒素欠乏 MA medium + trypticase 100 mg/l + yeast extract 5 mg/l

た。

これらの結果は, 付着細菌と遊離細菌の間には分類学的には明白な相違があったが, 付着細菌がスライム中で有機物の分解に大きな寄与をしているという仮説に関しては, 明確な答えは得られなかった。更なる詳細な検討が必要である。

文 献

- 1) W. Lange: Cyanophyta-bacteria systems: Effects of added carbon compounds or phosphate on algal growth at low nutrient concentrations. *J. Phycol.*, **6**, 230-234 (1970).
- 2) W. Lange: Enhancement of algal growth in cyanophyta-bacteria systems by carbonaceous compounds. *Can. J. Microbiol.*, **17**, 303-314 (1971).
- 3) W. Lange: Chelating agents and blue-green algae. *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1311-1321 (1974).
- 4) G. Bjalfve: Nitrogen fixation in cultures of algae and other microorganisms. *Physiol. Plant.*, **15**, 122-129 (1962).
- 5) H. W. Paerl: Specific associations of the blue-green algae *Anabaena* and *Aphanizomenon* with bacteria in freshwater blooms. *J. Phycol.*, **12**, 431-435 (1976).
- 6) 熊谷光彦, 高村義親, 矢木修身, 須藤隆一: 藍藻 *Microcystis aeruginosa* と細菌 *Moraxella nonliquifaciens* との相互関係. 陸水学雑誌, **47**, 219-228 (1986).
- 7) 吉田陽一, 中原紘之, 桑江朝比呂: 琵琶湖北湖諸港におけるアオコの異常発生機構. 日本誌, **62**, 230-235 (1996).
- 8) 吉田陽一, 沖野外輝夫: 諏訪湖におけるアオコの発生と DON : DIN 比等との関係. 日本誌, **62**, 631-637 (1996).
- 9) 高村義親, 仲川道夫, 矢木修身, 須藤隆一: *Microcystis aeruginosa* K-3A 無菌株の生産する粘質多糖の研究. *Res. Report Nat. Inst. Environ. Stud.* **94**, 209-234 (1986).
- 10) M. Nakagawa, Y. Takamura and O. Yagi: Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 329-337 (1987).
- 11) Y. Amemiya and O. Nakayama: Separation and sugar composition of gelatinous sheath carbohydrates produced by *Microcystis*. *Jpn. J. Phycol.*, **37**, 253-262 (1989).
- 12) 市村輝宜: 藻類の分離と培用法; 淡水藻類, 「藻類研究法」(西沢一俊・千原光雄編), 共立出版, 東京, 1979, pp. 294-305.