

植物プランクトン (藍藻類) 増殖抑制手法の検討 (室内培養試験)

豊村 誠, 神崎 正太, 浦 伸孝, 粕谷 智之

Examination of Phytoplankton (Cyanobacteria) Growth Suppression method (laboratory culture test)

Makoto TOYOMURA, Syota KANZAKI, Nobutaka URA, Tomoyuki KASUYA

キーワード: 藍藻、遮光、室内培養試験

Key words: cyanobacteria, shading, laboratory culture test

はじめに

「植物プランクトン (藍藻類) 増殖抑制手法の検討 (現場試験)」において、小規模の遮光施設による実証試験では、遮光面積が小さく、遮光効果が確認できなかった。そこで、遮光による植物プランクトン (アオコ) の成長抑制効果を確認するために、遮光条件下での植物プランクトンの室内培養を行い、遮光効果を検証した。

材料と方法

1 植物プランクトンの培養

小ヶ倉ダムの洞仙橋で採取した *Microcystis aeruginosa* を単離培養して、実験に用いた。培地は、半造川の嘉一橋で採水した河川水をガラス繊維ろ紙 (GF/B 孔径1.0 μm) でろ過し、121 °Cで20分間高圧蒸気滅菌を行ったものであり、栄養塩類の添加は行わずに使用した。

2 培養条件

*M. aeruginosa*を添加した3 Lの培地から50 mLを61 mL容量の試験管10本それぞれに分注した後、インキュベータ内に静置して、一定の温度及び照度下で数日~2週間程度培養した。インキュベータ内の温度設定は、32°C、28°C、24°Cの3条件、照度設定は、2440 Lx (インキュベータ中心部における照度) で常時点灯状態とした。遮光は、寒冷紗 (遮光率: 約51%) を使用し、「遮光なし」、「寒冷紗1枚で被覆 (遮光率51%)」、「寒冷紗2枚で被覆 (理論上の遮光率76%)」の3条件とした (図1)。

実験開始時と終了時のChl.a及びその他の項目の水質分析を行い、実験途中にも適宜分析を行った。

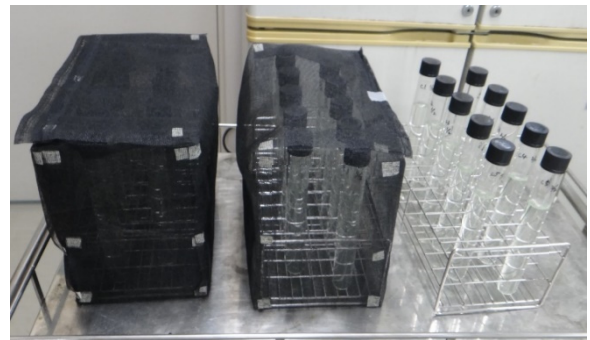


図1 遮光条件 (右から 、 、)

3 水質分析

水質の分析方法は、表1に示したとおり。

表1 水質分析項目及び分析方法

| 項目 | 分析方法 |
|--------------------|---------------|
| COD | JIS K 0102 |
| T-N | JIS K 0102 |
| NO ₃ -N | Mullin-Riley法 |
| NO ₂ -N | JIS K 0102 |
| T-P | JIS K 0102 |
| PO ₄ -P | JIS K 0102 |
| Chl.a | 海洋観測指針 |

4 細胞数の計数

培養した *M. aeruginosa* は群体とならずに1細胞ずつ単離していたため、試験管中の培養液を1 mL抽出し、その中の *M. aeruginosa* の細胞を光学顕微鏡 (200倍) で計数した。培養液はChl.a濃度に応じて最大50倍まで希釈した。

結果と考察

1 培養条件の検討

インキュベータ内の温度を32°Cに設定して、*M. aeruginosa*の初期濃度を見た目アオコ指標レベル¹⁾1程度に調整して培養した結果(培養試験)、最終的なChl.*a*濃度が > > の順に高い値を示すことを想定していたが、実際には、5日後の培養終了時のChl.*a*濃度は > > となった(表2)。培養液を攪拌する際の目視観察においては、培養途中までは が最も成長速度が速い様子であったが、次第に培養液の色が緑から黄緑、白へと変わっていき、培養終了時は白く脱色していた。目視観察及び分析結果を合わせて状況を考えると、遮光率が低い条件ほど*M. aeruginosa*の成長が速いため、成長に必要な栄養塩類を早く消費してしまい、結果として*M. aeruginosa*が死滅し、Chl.*a*濃度が減少していったものと考えられる。

表2 Chl.*a*分析結果(培養試験)

| 培養日数 | Chl. <i>a</i> [µg/L] | | |
|------|----------------------|----|-----|
| 0 | 73 | 73 | 73 |
| 5 | 22 | 79 | 160 |

そこで、遮光以外の増殖制限要因を排除するために、温度及び照度条件は同様で、*M. aeruginosa*の初期濃度をより低くして培養した(培養試験)。また、Chl.*a*濃度の変化を確認するために、5日後の培養終了時に加えて、培養3日後にもChl.*a*濃度の測定を行った(表3)。

目視観察において、培養3日後までの*M. aeruginosa*の成長速度は > > の順に速い様子であったが、培養3日後のChl.*a*濃度は、と が同等であった。また、培養終了後のChl.*a*濃度は、が最も低い値を示し、と が同等の値を示した。Chl.*a*濃度について、では増加した後に減少、では培養3日後まではと同程度増加し、そこから培養5日後まではほぼ横ばい、では培養5日後まで少しずつ増加し続ける、という結果が得られたことから、遮光率が低い条件ほどChl.*a*濃度の増加ピークを早く迎えているものと考えられる。つまり、培養試験と同様に遮光率が低い条件ほど*M. aeruginosa*の成長が速いため、成長に必要な栄養塩類を早く消費してしまい、*M. aeruginosa*が成長できなくなっている状況を示しているものと考えられる。

そこで、培養試験では、培養開始時と培養終了時における培養液中の栄養塩類(項目:全窒素(T-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)、全リン(T-P)、リン酸態リン(PO₄-P))の変化を確認した(表4)。その結果、T-N、T-Pについて、培養開始時と終了時でほとんど変化は見られなかった。これは、T-N、T-Pの分析が*M. aeruginosa*が生体内に貯留した窒素・リンを含めて培養液中の窒素・リンの測定を行うものであり、また、培養中に栄養塩類の添加を行っていないためと考えられる。

一方で、溶存態無機栄養塩類(NO₃-N、NO₂-N、PO₄-P)については、~ すべての培養条件で開始時から終了時にかけて、濃度が減少している状況が見られ、特にNO₂-Nについては、すべての培養条件で終了時に定量下限値未満(<0.02 mg/L)となった。NO₃-Nについては、と ではNO₃-Nはほとんど消費されて、定量下限値(0.02 mg/L)付近の値を示しているのに対して、では開始時の濃度の3割程度残っている状態(0.38 mg/L)であった。また、PO₄-Pについては、では定量下限値(0.003 mg/L)、では開始時の濃度の1割程度(0.009 mg/L)であるのに対して、では開始時の濃度の6割程度(0.062 mg/L)であった。よって、培養液中の栄養塩の枯渇が増殖の制限要因となっていることが示唆された。

表3 Chl.*a*分析結果(培養試験)

| 培養日数 | Chl. <i>a</i> [µg/L] | | |
|------|----------------------|-----|-----|
| 0 | 14 | 14 | 14 |
| 3 | 110 | 110 | 64 |
| 5 | 82 | 120 | 120 |

表4 栄養塩類の分析結果(培養試験)

| 培養日数 | T-N [mg/L] | | | | | | | | |
|------|---------------------------|-----|-----|---------------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| | NO ₃ -N [mg/L] | | | NO ₂ -N [mg/L] | | | | | |
| 0 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 5 | 1.2 | 1.3 | 1.2 | 0.02 | <0.02 | 0.38 | <0.02 | <0.02 | <0.02 |

| 培養日数 | T-P [mg/L] | | | | | |
|------|---------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | PO ₄ -P [mg/L] | | | | | |
| 0 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| 5 | 0.12 | 0.12 | 0.11 | 0.003 | 0.009 | 0.062 |

そこで、温度及び照度は同様で、開始時の植物プランクトンの量をさらに減らして培養を実施するとともに（培養試験 ）、Chl.a濃度の測定を行う頻度を増やして、濃度変化を細かく確認した（図2）。

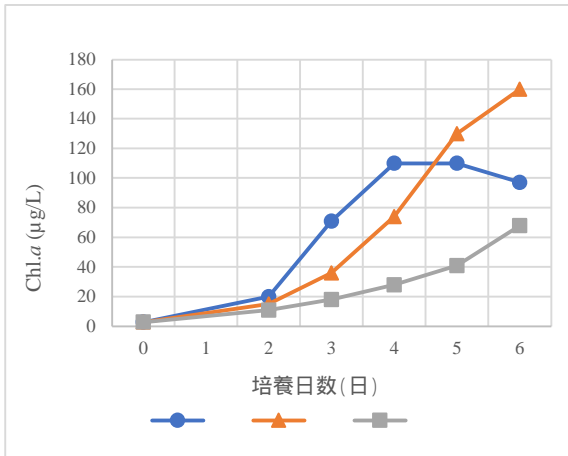


図2 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

Chl.a濃度の増加速度は、培養3日後まで遮光率が低い順に速く（ > > ）、培養4日後までは、
 が他の遮光条件と比べて最も高い値を示した。培養5日後以降、Chl.a濃度は、
 では減少し始めたが、
 と では増加し続けており、
 が最も高い値を示した。培養試験 では、*M. aeruginosa*の初期濃度を下げて、Chl.a濃度の測定頻度を増やしたことにより、各遮光条件間でのChl.a濃度の増加速度の差を確認することができた。よって、以後の培養試験は、培養試験 と同程度の*M. aeruginosa*の初期濃度 (Chl.a濃度 2.9 µg/L) で行うこととした。また、培養後4～6日目までの増加速度で水温の影響を比較する。

2 水温の影響

設定温度を32°Cとして、培養試験 と同様の条件で*M. aeruginosa*の培養試験を2回実施した（培養試験 、 ）。また、培養開始から終了にかけて、Chl.a濃度の測定を複数回行った（図3,4）。培養試験 では、培養4日後まで のChl.a濃度が最も高い値を示し、次に 、 の順であった。培養試験 についても、培養試験 と同様の傾向が見られた。これにより、遮光率が高い条件ほど*M. aeruginosa*の成長速度が抑制されている状況が確認された。

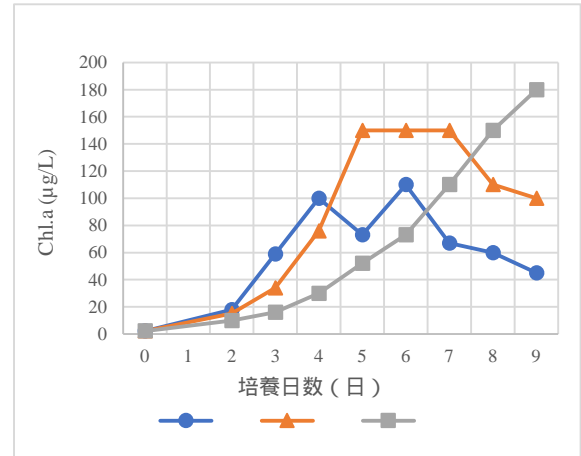


図3 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

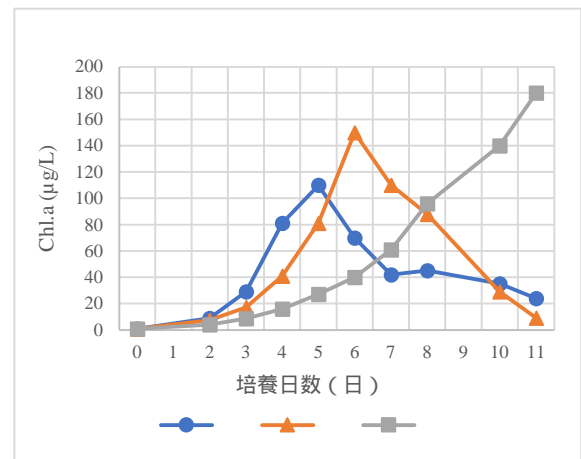


図4 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

次に、設定温度28°Cにおける培養試験を2回行った（培養試験 、 ）。培養試験 、 において、Chl.a濃度は、培養3日後までは遮光条件間で大きな差は見られなかった（図5,6）。培養3日後～6日後にかけては、
 のChl.a濃度が最も高い値を示し、次に
 の順となったことから、設定温度32°Cの培養試験結果と同様に光が制限要因となっていると考えられる。しかし、32°Cの結果と比較すると、Chl.a濃度がピークに達するまでの日数が1～2日程度長いことから、温度が下がったことにより、*M. aeruginosa*の活性が落ちていることが影響しているものと考えられる。

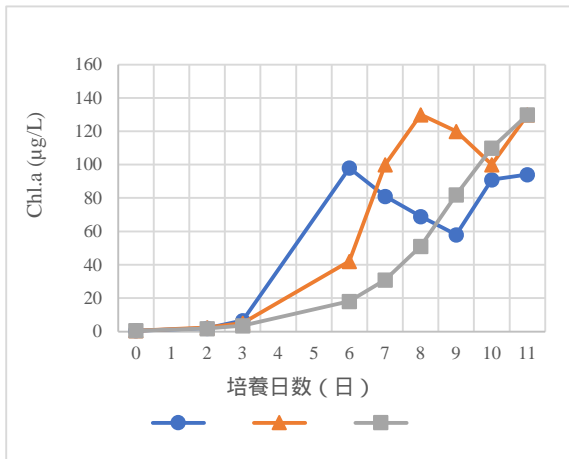


図5 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

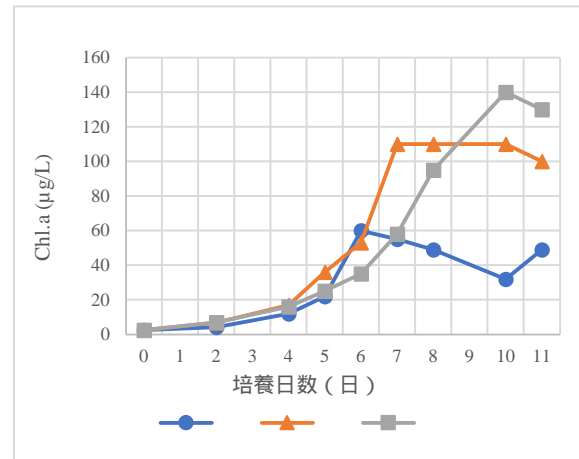


図8 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

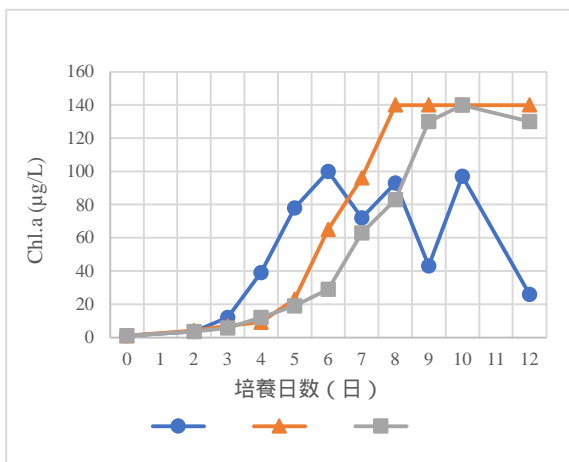


図6 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

そこで、インキュベータ内の設定温度をさらに下げて、24℃で同様の試験を2回行った (培養試験、)。Chl.a濃度の測定結果を図7及び図8に示す。についてはChl.a濃度の増加が、と比べて大きな差は見られなかった。水温24℃では、遮光よりも水温が増殖を制限する要因となった可能性が考えられる。

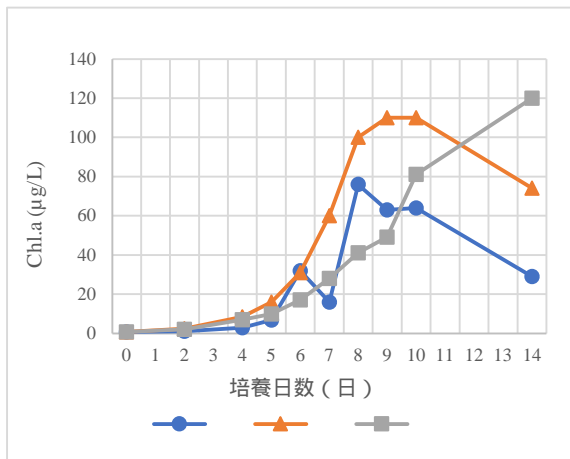


図7 Chl.a濃度の変化 (培養試験)

3 細胞数とChl.a濃度の関係

インキュベータ内の温度を 32℃として、培養を行い、培養初日～4日後までの培養液について、藻類分析 (細胞密度) 及び水質分析 (Chl.a 分析等) を行った (培養試験)。

細胞密度の増加は、培養試験～におけるChl.a濃度の傾向と同様に、遮光率が低い順に細胞の増殖速度が速い傾向が見られた (>>) (図9)。

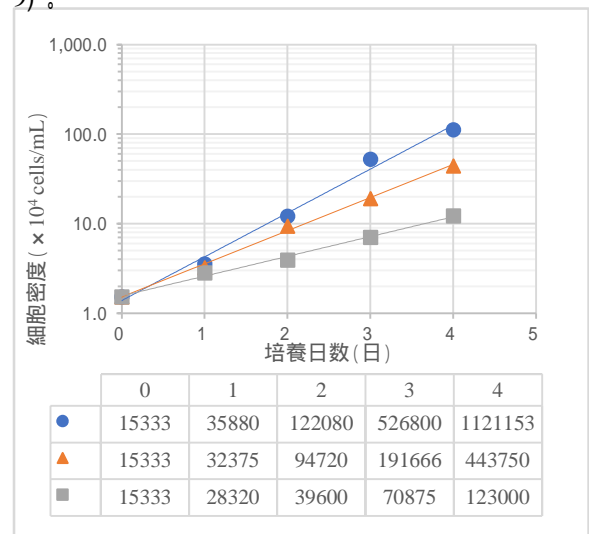


図9 細胞密度の変化 (培養試験)

表中の数値は細胞密度 (cells/mL) である。

培養試験で得られた細胞密度について、対数増殖期における各遮光条件での比増殖速度 μ を算出した²⁾ (は培養1～3日後、 μ は、では培養1～4日後を対数増殖期とした)。その結果、 μ は、が 1.34 day^{-1} 、が 0.87 day^{-1} 、が 0.48 day^{-1} であり、倍加時間 (世代時間) は、が 0.52 日 (約 12 時間)、が 0.79 日 (約 19 時間)、が 1.42 日 (約 34 時間) となった。

まとめ

培養開始から成長ピークまでの Chl.*a* 濃度の増加速度は、培養温度が28°C・32°Cの場合、(遮光なし) > (寒冷紗1枚) > (寒冷紗2枚) の順に速く、遮光による植物プランクトン (*M. aeruginosa*) の増殖抑制効果が確認された。また、培養温度が24°Cでは、遮光による抑制効果が見られなかったことから、遮光効果は水温が24°C以上となる期間に実施することが有効である。一方、
、
の培養条件では、長期にわたって培養を行っていくと、Chl.*a* 濃度は上がり続けた。これは、競争相手となる他の植物プランクトンがないことや、遮光の効果があくまで増殖速度の抑制であり、植物プランクトンを死滅させる効果ではないためであると考えられる。したがっ

て、遮光は、他の対策と合わせて実施する必要がある。

本年度の調査では、遮光による抑制効果を確認することを目的としていたため、明暗周期等は考慮せずに培養試験を行ったが、今後の調査では、実際の遮光施設を想定して、より細かい温度や照度(明暗周期等)の条件下での培養試験を行う必要がある。

参考文献

- 1) 農林水産省, 農業用貯水施設におけるアオコ対応参考図書 (平成24年3月)
- 2) 小西正朗, 他: 細胞の増殖を捉える 計測法から比速度算出まで, *生物工学会誌*, 93, 149-152 (2015)