

## 水田や湖沼に生息する微生物の解析

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 町田 大和

1年 田村 駿介

1年 小田嶋 航希

1年 田中 滉樹

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

教授 福島 淳

助教 志村 洋一郎

### 【研究目的】

石川雅之の漫画作品『もやしもん』で、私たち人間の周りには多くの微生物が生息し、種類も多いことが描かれていることから、微生物に興味を持った。秋田県大潟村の八郎潟残存湖（八郎湖）は毎年夏にかけてアオコが発生する。そこで、アオコ発生の際どのような微生物が存在しているのかを解析することを目的とした。

### 【実験方法と結果および考察】

#### 1) サンプルング

サンプルング地点：八郎湖野村漁港

日程と内容：

2017年7月18日（火）

水質調査と水の採集を行った。この日は水の色に緑がかった様子は見られなかった。採集は20 L ポリタンク 6 本。

2017年8月7日（月）

八郎湖での水質調査と採集を行った。この日から水の色が全体的に緑色となり、アオコの減少が見られるようになった。採集は20 L ポリタンク 6 本。



図 1  
8月7日の八郎湖の様子

2017年9月14日（木）

水質調査と水の採集を行った。この日は水の色に緑がかった様子は見られなかった。採集は20 L ポリタンク 6 本。

## 2) 気温、水温、水質に関する調査結果

表1 サンプルング時の気象条件

日付	気温 (°C)	水温 (°C)	天気	前日の天気
7月18日	26.6	28.8	晴れ	曇り
8月7日	37.2	33.0	晴れ	晴れ
9月14日	22.3	23.4	晴れ	晴れ

表2 水質測定の結果

日付	濁度 (mg/L)	pH	溶存酸素量 (mg/L)	電気伝導度 (mS/L)
7月18日	18	7.62	8.06	2.05
8月7日	82	9.77	8.48	17.3
9月14日	22	7.15	7.23	18.7

気温と水温は8月7日に30°Cを超えていた。また8月にアオコ発生とともに濁度が上昇し pH、溶存酸素量も上昇したが、電気伝導度は低下していた。

## 3) サンプルング水中の微生物の培養と観察

9月14日までに計3回八郎湖へ行ったが、肉眼観察では、8月7日の八郎湖でアオコ現象が著しく見られた。また、顕微鏡観察では8月7日の観察から水中に生息している微生物に変化が見られるようになった。具体的には、8月7日までの顕微鏡観察では、アナベナ様(ネンジュモのような連結した)菌体が多く見られていたが、8月7日以降はマイクロキスティス様(群体)菌体が多く見られるようになった。また、前回の活動で96穴ディーププレートでマイクロキスティス様菌体を培養したが、10,000倍に希釈したD、Hの24枠は菌の発生は見られなかった。また、100倍に希釈したA、Eの枠では、Aの12枠では菌は腐敗していた。

9月14日以降の活動では、培養させたアオコ繁殖菌をCB培地とともに新しい容器に移し、より多く繁殖する作業を行っていた。試験管を2つのグループに分けて培養した。1つは室温増殖、もう一方はバイオトロンを用いて培養した。その後さらに増殖させるために三角フラスコを用いた。500 mL三角フラスコに試験管で培養した菌2 mLにCB培地100 mLを加えて培養を行った。



図2 アオコ繁殖菌の培養



図3 三角フラスコ内でのマイクロキスティス様菌の培養

図 4 の 10 月中頃の観察では数珠状藍藻類のアナベナ様菌体が多く見られた。その後、日を追って観察を続けていくとアナベナ様菌とともにアオコ発生の原因となる藍藻のマイクロキスティス様菌体が多く見られるようになっていった(図 5, 6)。

また、図 7, 8 はバイオトロン内で温度と光の量を調節してマイクロキスティス様菌体を培養したものである。室温で培養したものよりも一つ一つの塊が大きく観察された。

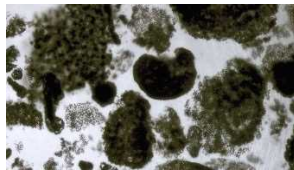


図 4 10 月 18 日の観察

図 5 10 月 25 日の観察

図 6 11 月 1 日の観察

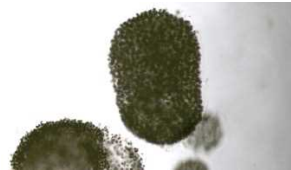


図 7, 8 バイオトロンで培養したものを観察

#### 4) 次世代シーケンサによる細菌叢の解析

7 月 18 日と 8 月 7 日のサンプルから DNA を抽出して、16S リボソーム RNA 遺伝子の V3 と V4 領域を PCR で増幅し、その配列を MiSeq により解析した。その結果を以下の表にまとめた。

表 3 ドメインの割合 (%)

	7 月 18 日	8 月 7 日
Bacteria	79.6	66.3
Archaea	0.0	0.0
Unassigned	20.4	33.7

ドメインレベルではほとんどが細菌であり、古細菌は検出されなかった。Unassigned は真核生物のミトコンドリアまたは葉緑体の可能性が考えられた。

表4 細菌の主要な門の割合 (%)

	7月18日	8月7日
Actinobacteria	5.7	3.4
Bacteroidetes	10.5	11.2
Chloroflex	0.4	0.1
Cyanobacteria	11.3	18.2
Planctomycetes	10.8	1.3
Proteobacteria	30.5	28.8
Verrucomicrobia	9.3	1.2
Unassigned	20.4	33.7

表4は検出された主要な門を表している。この中ではプロテオバクテリア門が約30%と高く、続いてシアノバクテリア門で7月の11.3%から8月には18.2%と増加していた。これはアオコの発生と関連している可能性が考えられた。

表5 シアノバクテリア門の主要な属の細菌全体に対する割合 (%)

	7月18日	8月7日
Cylindrospermopsis	1.7	0.0
Dolichospermum	3.7	1.6
Microcystis	4.0	14.1
Nostoc	0.0	0.0
Pseudanabaena	0.0	1.3
Synechococcus	0.6	0.1
Others	1.3	1.0

表5にはシアノバクテリア門の中の主要な属の割合を示した。アオコの発生が見られた8月7日にMicrocystis属が細菌全体に対して14.1%と一つの属としては非常に多くなり、アオコの発生原因になっていることが想定された。一方アナバエ様の菌体構造を

持つのはDolichospermum属であり、その割合は7月から8月にかけて減少し、顕微鏡観察の結果と一致した。

以上のようにアオコ発生環境に存在する微生物について、顕微鏡とDNA解析によりある程度解析することができた。今後はこれらの微生物の増殖過程などを調べることにより、アオコ発生との関係をさらに詳しく研究することが可能になると考えられる。