

八郎湖で夏と秋に発生するアオコの違いの調査

生物資源科学部 生物環境科学科

1年 長谷川 龍

1年 小西 龍斗

1年 小林 賢人

1年 渡辺 康介

指導教員 生物資源科学部 生物環境科学科

准教授 岡野邦宏

【背景と目的】

私たちは環境汚染という問題に関心があり、特に水質汚濁について強い関心があった。秋田県立大学では八郎湖のアオコによる水質汚濁についての研究を行っていると聞き、アオコについて興味をもち、問題解決に取り組みたいと考えた。

アオコとは湖沼の水面が緑色になる現象で、*Microcystis*属などのラン藻類が大量に増殖して起きる。*Microcystis*属などの一部のアオコ形成藻類には、強力な毒素であるミクロシスチンを産生する種が存在するため、アオコ問題解決は極めて重要である。アオコを形成するミクロキスティス属などの藍藻類は本来、真夏の水温を好み、7月、8月に発生が確認される。しかしながら、八郎湖では9月末から11月にかけてもアオコが確認されており、低温に適応した藻類の関与が予想されている^{1,2)}。実際に、令和2年度の自主研究では10月に発生したアオコから*Microcystis*属を単藻化して、15°Cでも増殖可能であることが明らかになった。

そこで、今回の研究では、夏季（6月～9月）に八郎湖で調査を行い、①夏と秋に発生したアオコの原因となっている藻類は何か、②夏と秋に発生したアオコの原因となっている藻類にはどのような違いが見られるか、③特に藻類の増殖温度特性や毒産生特性は異なるのか、ということを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

1. 現地調査

2022年7月8日と9月8日に秋田県八郎湖の野村港（N 39°52'48.3", E 140°02'13.4"）においてアオコを含む表層水をヒシヤクにより採取した。現地において水質チェッカーにより（東亜DKK）水温、pH、電気伝導度、濁度、溶存酸素濃度を測定した。

2. 室内培養

2-1. 培地の作製

表1のMA培地を1N NaOHによってpH8.6に調整して定容した。単藻化作業用に試験管に10 mLずつ分注するとともに、継代培養用に500 mL三角フラスコに200mLずつ分注し、オートクレープで滅菌した（120°C、15分）。なお、4. 増殖特性試験においてもMA培地を使用した。

2-2. アオコ形成藻類の単藻化

採取してきたアオコを含む湖水を光学顕微鏡（BX52, オリンパス）により観察した。採取してきたアオコを含む湖水を、先端を加工したガラスパスツールを用いてアオコ形成藻類の単藻化を行った。試験管で増殖が確認された単藻培養株“RYU株”と令和2年度に単藻化された“EfH株”を500 mL三角フラスコに継代し、20°Cの恒温室で培養した。

表 1. MA培地の組成

試薬	濃度 (mg/L)
Ca (NO3) ₂ · 4H ₂ O	50
KNO ₃	100
NaNO ₃	50
Na ₂ SO ₄	40
MgCl ₂ · 6H ₂ O	50
β -Na ₂ glycerophosphate	100
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5.0
ZnCl ₂	0.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5.0
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.8
H ₃ BO ₃	20
Bicine	500

3. 遺伝子解析

継代培養したRYU株とEfh株を2 mL採取し、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) による全DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、藍藻類の16S rRNA遺伝子特異的なプライマーセット (CYAN108F-CYAN328R)、*Microcystis*属の16S rRNA遺伝子特異的なプライマーセット (MICR184F-MICR431R) により*Microcystis*属の確認を行った³⁾。また、ミクロシスチンの産生の有無を確認するためにミクロシスチン合成酵素遺伝子の*mcyA*遺伝子と*mcyD*遺伝子の検出も行った。

すべてのPCRは、Fast Cycling PCR Kit (QIAGEN) の標準プロトコールに従い、SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific) でPCRを行った。また、増幅の有無はMultiNA (島津製作所) により行った。

4. 増殖特性試験

500 mL三角フラスコにMA培地200mL入れ、単藻化に成功したRYU株とEfh1株の前培養液を1%になるように添加した。このフラスコを15°Cと25°Cに設定した照明付きインキュベーター (FLI-2000, EYELA) で14日間培養した。なお、光条件は40 μmol/m²/s、明暗12時間とし、全て3連で行った。

藻類の増殖は、培養液の濁度 (678 nm) を分光光度計 (UV-1280, 島津製作所) により測定し、下記の式によりクロロフィルa濃度に換算して評価した。

$$\text{クロロフィルa (}\mu\text{g/mL)} = (14.79 \times A_{678\text{nm}}) - (0.615 \times A_{620\text{nm}}) \quad \dots \dots \dots \text{式}$$

【結果および考察】

1. 現地調査および単藻培養

7月8日、9月8日の両日ともアオコが発生していた (写真1)。顕微鏡観察の結果、両日とも主なアオコ形成藻類は*Microcystis*属であることが分かった (写真2)。また、湖水試料からガラスパスツールを用いて藻類が1種類で構成される単藻培養系の構築を試みた結果、緑藻類と思われる藻類が単藻化できた (写真3)。



写真1. アオコ採取の様子（2022年9月8日）

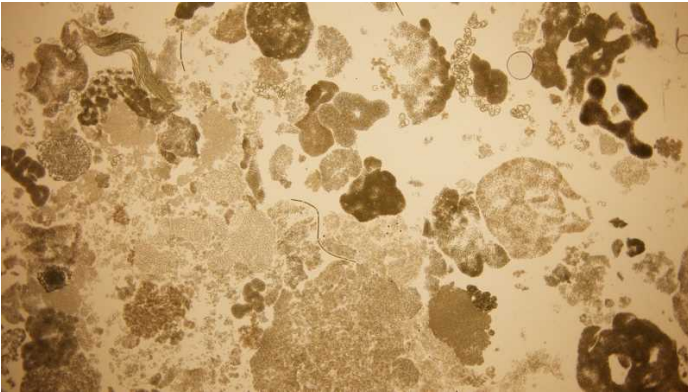


写真2. 採取したアオコの顕微鏡写真（200倍）



写真2. 単藻化したRYU株

2. 遺伝子解析

遺伝子解析の結果、RYU株は藍藻特異的および*Microcystis*属特異的プライマーセットで増幅が確認されず、アオコを形成する*Microcystis*属ではないことが分かった（図1）。一方で、EfH株は*Microcystis*属であるが、ミクロシスチンを産生しない無毒株であることが明らかになった。

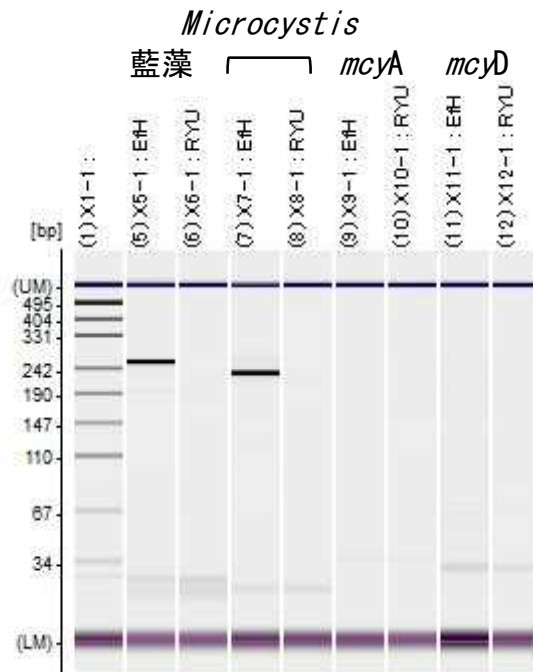


図1. PCRの結果（左からEFH株とRYU株の結果を交互に示している）

3. 単藻培養株の増殖特性試験

今回の研究でRYU株はアオコを形成する*Microcystis*属ではなかったが、EFH株と増殖の特性を比較するために15°Cと25°Cで培養試験を行った。その結果、15°Cではどちらも同じくらいの増殖速度を示した（図2）。しかしながら、25°Cでは、*Microcystis*属であるEFH株の方がRYU株と比較して増殖速度が顕著に速かった（図3）。*Microcystis*属の最適な増殖温度は25~30°Cであり、アオコ形成藻類の夏季における他の藻類種への増殖速度の優位性が改めて確認できた。また、EFH株は他の藻類種と比較すると夏季でも十分に増殖速度が速いことから、年間を通してアオコを形成する藻類として存在することが示唆された。

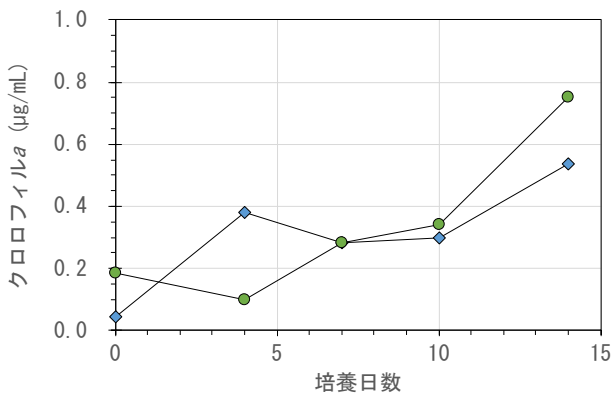


図2. 15°Cでの培養試験の結果

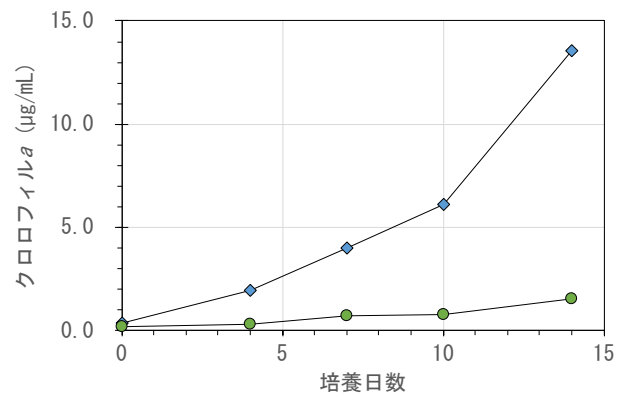


図3. 25°Cでの培養試験の結果

（それぞれ● RYU株、◆ EFH株の結果を示している。n=3）

【まとめ】

- ① 夏に発生したアオコの原因となっていたのは*Microcystis*属であった。
- ② 今回は*Microcystis*属を単藻化することが出来なかったが、令和2年度の顕微鏡写真の結果と比較すると八郎湖では夏も秋も*Microcystis*属がアオコを形成していることが確認できた。
- ③ 令和2年度に単藻化された*Microcystis*属EFH株はRYU株のような他の藻類種と比較すると25°Cで

顕著に増殖が速かった。また、Efh株はミクロシスチンを産生しない無毒株であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 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的変動. *日本水環境学会誌*, Vol. 38 (2015) 23-30.
- 2) 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*, Vol. 16(4) (2018) 175-183
- 3) Martins, A., and Vasconcelos, V.: Use of qPCR for study of hepatotoxic cyanobacteria population dynamics. *Archives of Microbiology*, Vol.193 (2011) 615-627