

アオコ形成藍藻 *Anabaena* の休眠細胞の栄養塩濃度変化による発芽特性の評価

環境計画研究室 片岡怜二

1.はじめに

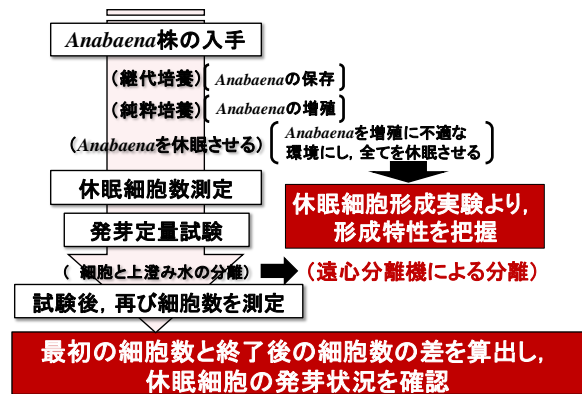
湖沼のアオコ現象は、水道水のろ過障害、水産物の被害の増加、美観の低下を引き起こす。これに伴い、1982年には植物プランクトンの栄養源となる窒素、リンの環境基準へ追加され、その後も湖沼の水質保全策が制定された。しかし、日本の多くの湖沼では、藍藻類によるアオコ現象が毎年発生している現状にある。

Anabaena 属は、アオコ現象の主要な構成種であり、増殖に不適な環境になると休眠細胞を形成・分離し、増殖可能な環境条件が整うと再び発芽し、そして増殖するという生理的特徴を持つ。*Anabaena* 属によるアオコの形成には、休眠細胞から発芽する過程とその後の増殖という2つの過程がある。休眠細胞の発芽の影響因子には、休眠細胞の発芽の影響因子には、既存文献により照度、温度が挙げられているが、増殖時に影響する湖沼水中の栄養塩濃度については、発芽への影響因子としていまだ評価されていない。そこで、本研究では栄養塩による休眠細胞の発芽特性を明らかにする上で必要な休眠細胞を、确实、最適に入手する方法を明らかにする。その後、休眠細胞を再び発芽させるための培地を湖沼の栄養塩濃度に基づいて作成し、発芽率を測定することで、栄養塩による休眠細胞の発芽特性の評価を試みた。

2.研究方法

図1に本研究の研究フローを示す。はじめに国立環境研究所より *Anabaena* 株(無菌クローン株の *Anabaena planctonica Brunthaler NIES-814*)を入手した。入手後2日以内に、*Anabaena* 株を長期間保存する目的で、継代培養を行った。同時に入手株の細胞数を確認した。続いて、株を増殖させるために、純粋培養を行った。その後、純粋培養より増殖させた *Anabaena* 株の一部を増殖に不適な環境下におき、休眠状態にさせた。ここで、最適かつ完全に休眠状態にする方法を解明した。その結果に基づいて *Anabaena* 株の休眠細胞を測定し、休眠細胞数の現存量を把握した。現存量測定には、土田ら(2009)の発芽試験を用い、休眠細胞数の計測には、MPN法(日本水道協会 2003)を用いた。ここで測定した休眠細胞数を初期値とした。

その後、上記で用いた *Anabaena* の休眠細胞を湖沼の窒素、リン濃度を元に作成した培養液を用いる事で、発芽試験を行った。試験後、試料から上澄み水、生殖細胞を取り除き、休眠細胞を取り出した後、休眠細胞数をMPN法より再び測定し、休眠細胞数を確認した。予め求めた初期値より発芽試験後の休眠細胞数を差し引く事で、発芽量を測定し、リン、窒素濃度変化による休眠細胞の発芽への影響を評価した。



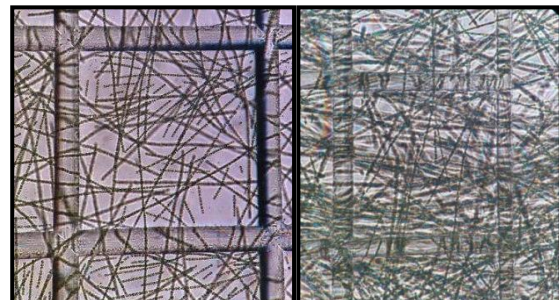
3.研究結果

3.1 株の入手

表1に *Anabaena* 株入手時の細胞数の結果を示す。本研究では、合計2回株を入手した。1回目に入手したものよりも、2回目に入手した株が1ml当たりの個数が多いことが分かる。また、図2に入手株を顕

表1 入手株の細胞数

株入手	<i>Anabaena</i> の細胞数	単位
1回目	180000	(個/ml)
2回目	404000	(個/ml)



(a)1回目

(b)2回目

図2 入手株の様子

顕微鏡により観察したものの様子を示す。初期に入したものより、2 度目に入手したものが目視による判断でも細胞数が多いことが分かる。

3.2 継代培養

表 2 に継代培養後の培養状態を示す。株の保存条件は、温度が 20℃、光量子密度が 12-22 ($\mu\text{mol photons /m}^2/\text{s}$)で明暗周期は 12hL-12hD で管理しなければならない。本研究では、*Anabaena* の休眠細胞数を測定する際の照明の単位は照度で表現するため、継代培養の細胞数測定時の照明の単位も光量子束密度から照度に変換した。光量子束密度から照度への変換式を、位以下に示す。

$$\text{照度} = \text{光量子束密度} \times 74 \dots (1)$$

照度:(lux), 光量子束密度:($\mu\text{mol photons /m}^2/\text{s}$)

式は、園池(1997)の式を用いた。(1)式より照度に変換すると、888~1628 (Lux)であるため、良い培養状態といえる。表 3 に本研究で行った継代培養の回数、及び経過日数に応じた *Anabaena* の細胞数を示す。継代培養回数の 1 回目、2 回目はそれぞれ 2 回の株到着後に行った。結果、1 回目の培養後 24 日後、2 回の培養後 15 日後とも、細胞数が減少しており、生育状況が悪く、3 回目の継代培養を 2 回目に入手した株を用いて、培養を行った。

表 2 継代培養時の状態

温度(°C)	照度(Lux)	
20.5	Max	1280
	Min	1197
	Ave	1239

表 3 継代培養の回数、及び経過日数に応じた

<i>Anabaena</i> の細胞数				
継代培養回数	経過日数	<i>Anabaena</i> 細胞数	単位	詳細
1回目	0	1800	(個/ml)	継代培養開始時
	24	0	(個/ml)	24日後
2回目	0	4040	(個/ml)	継代培養開始時
	15	4000	(個/ml)	15日後
3回目	0	12000	(個/ml)	継代培養開始時

3.3 純粋培養

表 4 に純粋培養の回数、及び経過日数に応じた *Anabaena* の細胞数を示す。純粋培養 1 回目は、継代培養の生育がおもわしくなかったため、入手株の一部を用いて培養を行った。その後、休眠細胞数測定で用いられる照度条件の 5000(lux)下で行った。その結果、24 日後まで待ったが、色づきが確認されず、細胞数を確認したところ、*Anabaena* 細胞が確認されなかったため、ここで打ち切った。2 回目も同様

に入手株の一部を用いた。1 度に植え継ぐ量を 2 倍に増やし、培養フラスコに色づきが確認されるまで、継代培養と同じ条件下で培養し、色づきの確認後、培地のボリュームを増やすといった手法に変更した。培養 15 日目に生育状態を顕微鏡にて確認した際には、計数自体は把握していないが、多くの生殖細胞が確認された。また、それと同時に 2 回目の余った入手株で新たに純粋培養を開始した。

表 4 純粋培養の回数、及び経過日数に応じた *Anabaena* の細胞数

純粋培養回数	経過日数	<i>Anabaena</i> 細胞数	単位	詳細
1回目	0	7200	(個/ml)	純粋培養開始時
	24	0	(個/ml)	24日後
2回目	0	16160	(個/ml)	純粋培養開始時
	15	-	(個/ml)	15日後
3回目	0	8000	(個/ml)	純粋培養開始時

3.4 休眠細胞形成予備実験

純粋培養 2 回目の試料を用いて休眠細胞形成実験を行った。表 5 に休眠細胞形成実験の経過日数とそれに応じた *Anabaena* 細胞と休眠細胞の数とそれぞれの培養条件を示す。結果、いずれも休眠細胞、生殖細胞ともに確認されなかった。

表 5 休眠細胞形成予備実験経過日数に応じた *Anabaena* 細胞数、休眠細胞数と培養条件

経過日数(日)	<i>Anabaena</i> 細胞数	単位	<i>Anabaena</i> 休眠細胞数	単位	培養条件		
					温度(°C)	培地	照明
2	0	(個/ml)	0	(個/ml)	5	CT	暗
1	0	(個/ml)	0	(個/ml)		調整	
2	0	(個/ml)	0	(個/ml)	20	CT	暗
1	0	(個/ml)	0	(個/ml)		調整	
1	0	(個/ml)	0	(個/ml)	20	調整	明

4.まとめ

本研究では、*Anabaena* 休眠細胞の発芽特性の解明に取り組んだ。その過程の休眠細胞数形成実験では、1, 2 日経過後には形成されず、この原因として、コンタミネーションあるいは純粋培養 2 回目の *Anabaena* 細胞数の数が極少量であったことが考えられる。

参考文献

土田幹隆, 野村宗弘, 増田周平, 千葉信男, 藤本尚志, 中野和典, 西村修(2009)ダム貯水池におけるアオコ発生に及ぼす *Anabaena* spp.の休眠細胞の影響, 環境工学研究論文集, No.46, pp.75-79
 日本水道協会(2003) 上水試験方法 2001 年版
 園池 公毅(1997) 光合成の森, URL : <http://www.photosynthesis.jp/light.html>