

# エスプレック公益信託地球環境研究・技術基金 研究報告書

**研究課題：**アオコを摂食するアメーバの生態の解明とアオコ抑制技術への応用

**研究代表者：**中野伸一（愛媛大学農学部・教授）（現在、京大大学生態学研究センター・教授）

**キーワード：**アオコ、富栄養化、アメーバ、摂食、防除

## 要旨：

富栄養化しアオコが発生する湖沼において、原生生物のアメーバによるアオコの摂食は効率が高いと報告されている。本研究では、富栄養化湖沼で発生したマイクロキスティスのアオコを摂食するアメーバにとって好適な環境条件、およびアメーバが好んで摂食するマイクロキスティスの生理活性状態を解明し、アメーバによるマイクロキスティス増殖の人為的抑制のための基礎的な情報を得ることを目的とした。アオコが大量に発生する松山市のため池において、マイクロキスティスのアオコの動態とこれを摂食するアメーバの動態を、関連する環境項目とともに季節的に測定した。アメーバの一種 *Penardochlamys* spp. は *Microcystis* を選択的に摂食することが報告されていることから、これら両者の緊密な食物連鎖が示唆されたが、Amoebida 目アメーバについてはこのような情報が無いため、本アメーバと *Microcystis* との食物連鎖について今後検討する必要がある。*Cryptodifflugia* sp. は珪藻を摂食すると思われるが、本種と珪藻の細胞密度には統計学的に有意な相関が得られなかった（スピアマン順位相関解析、 $p>0.05$ ）。室内実験では、生理活性（光合成活性）の高い *Microcystis* を餌として与えた場合に、アメーバの活発な増殖が見られた。以上の結果より、マイクロキスティスのアオコの発達の初期段階にアメーバを投入することにより、アオコの人為的抑制が可能かもしれない。しかし、アオコの発達段階ではまだマイクロキスティスの現存量が低く、投入したアメーバがマイクロキスティスと遭遇する確率が低いために、十分に機能できない可能性もある。

## 研究の目的：

現在、日本に限らず世界中の多くの湖沼において富栄養化が深刻化しており、アオコ

の大量発生がおこっている。アオコは、悪名高き湖沼の富栄養化の象徴である。とりわけミクロキスティスのアオコは、時にはクロロフィル濃度として数百・ $\text{g l}^{-1}$ 以上にも達し、強力な毒素を生産し、また数カ月間の長期間に渡ってアオコ状態が継続して環境の景観を悪化させる(Reynolds et al. 1981, Oliver & Ganf 2000, Nakano et al. 2001)。従って、ミクロキスティスのアオコを防除できれば、世界中で深刻化する湖沼の富栄養化問題の解決に大きく貢献し得る。

アオコが発生している湖沼には、ミクロキスティスを餌として生長できる生物がすでに存在し、その生物にとってミクロキスティスは重要な餌資源である。原生生物(Cole & Wynne 1974, Dryden & Wright 1987, Nishibe et al. 2002, Kim et al. 2006)・ワムシ類(Snell 1980, Fulton & Pearl 1987)・甲殻類動物プランクトン(Hanazato & Yasuno 1984, Jarvis et al. 1987)・魚類(Moriarty 1973, Kawanabe & Mizuno 1989, Miura 1990)のいくつかの種はミクロキスティスを餌資源として利用できると報告されているが、とりわけ原生生物のアメーバによるミクロキスティスの摂食は効率が高いと報告されている(Yamamoto 1981, Yamamoto & Suzuki 1984, Nishibe et al. 2004)。アメーバの摂食によるミクロキスティスのアオコの崩壊は、ミクロキスティスの現存量が高まる時期あるいはミクロキスティスが衰弱している時期に起こるとされている(Dryden & Wright 1987)。しかし、これら2つの時期は、それぞれミクロキスティスの生理状態としては逆であり、アメーバがどのような生理状態にあるミクロキスティスを摂食するのかについては、いまだに全く解明されていない。このことを解明できれば、アメーバによるミクロキスティスの摂食が最も効率的であるタイミングが明らかとなり、人為的に増殖させたアメーバによるアオコの防除が将来的に可能かもしれない。

本研究では、富栄養化湖沼で発生したミクロキスティスのアオコを摂食するアメーバにとって好適な環境条件、およびアメーバが好んで摂食するミクロキスティスの生理活性状態を解明し、アメーバによるミクロキスティス増殖の人為的抑制のための基礎的な情報を得ることを目的とした。

## 材料と方法：

調査は、愛媛県松山市内の古池(最大水深1.5 m)(図1)において、2007年8月から12月まで週1回の頻度で行った。水温、pH、溶存酸素濃度(DO)を現地でセンサーを用いて直接測定し、またカラムサンプラーで水柱全体を採水したサンプルについてクロロフィルa濃度、細菌細胞密度、植物プランクトン細胞密度、動物プランクトン個体密度、およびアメーバの細胞密度と組成を調べた。さらに、植物プランクトンの生理活性状態を、光合成活性をPulse Amplitude Modulation (PAM)により測定した。アメーバは、有殻および無殻に分けて測定し、できるだけ属レベルで同定を行った。

室内実験系において、生理状態の異なるミクロキスティスを準備し、これらを摂食す

るアメーバの増殖を検討した。野外でアオコ状態となったマイクロキスティスを含む試水を採取し、これに窒素とリンを添加した系、暗所の系、およびコントロールの合計4つの系を作成した。これら4つの系を25℃、 $60 \cdot \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度で12時間：12時間の明暗周期下（暗所の系は暗条件のまま）で培養し、マイクロキスティスの現存量および生理活性状態の変化とマイクロキスティスを摂食するアメーバの現存量と種組成を経時的に調べた。

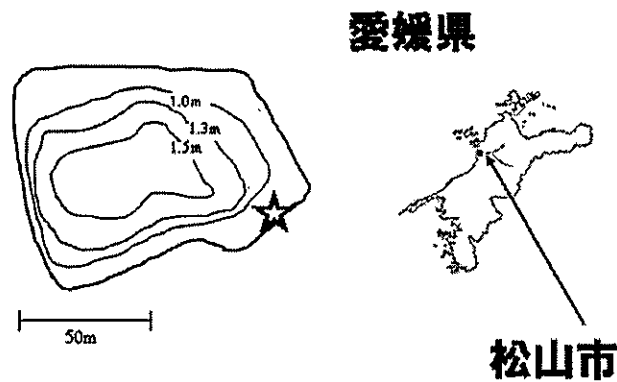


図1：調査対象の松山市、古池

**結果：**

**湖沼調査：**

調査期間中、水温は4.7℃（1月4日）から33℃（8月21日）の間で変化した（図2）。

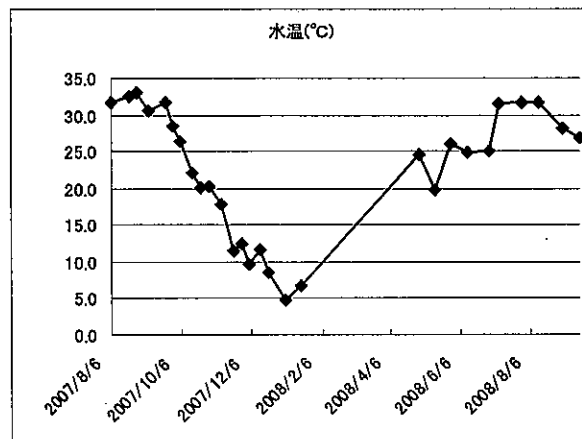


図2：調査期間中の古池表層の水温変化。

植物プランクトンの現存量の指標であるクロロフィル濃度（図3）は、8月から10月中旬にかけて比較的高い濃度であったが、それ以降は低下し、12月21日から1月18日の約一ヶ月間は低かった。その後、クロロフィル濃度は4月30日から9月にかけて大きく変動した（図3）。

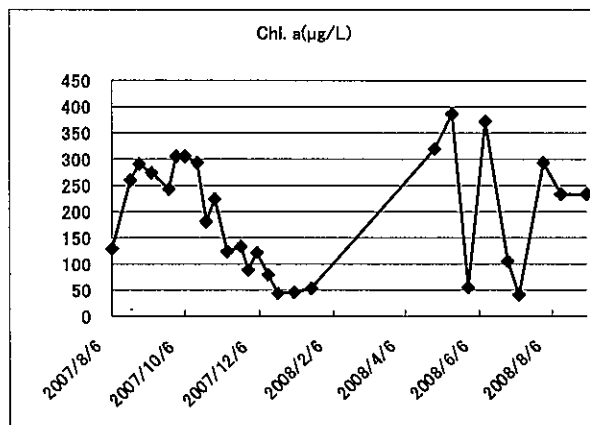


図3：調査期間中の古池におけるクロロフィル濃度の季節変化。

植物プランクトン光合成活性の指標であるPAM値（図4）は、変化のパターンはクロロフィルに類似していたが、変化の幅が小さかった。

植物プランクトンの中では、シアノバクテリアの*Microcystis*が優占しており（図5）、*Microcystis*は調査開始8月から現存量が低下して、2008年の4月に再び高い密度が検出された。植物プランクトンは、その他は同じシアノバクテリアの*Phormidium*、*Lyngbia*が優占的であり（図6）、10月末から12月中旬と5月・6月は*Phormidium*、8月から10月中旬と12月点月は*Lyngbia*が優占であった。

動物プランクトン（図7）は、明瞭な季節変動パターンを示さず、2008年4月以降に比較的高くなった。

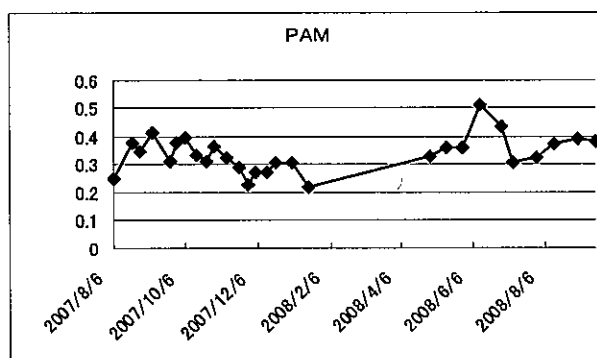


図4：調査期間中の古池における、植物プランクトン光合成活性指標（PAM値）の季節変化。

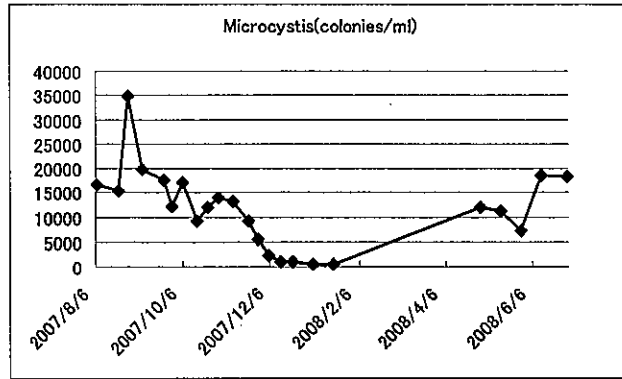


図5：調査期間中の古池における*Microcystis*属コロニー密度の季節変化。

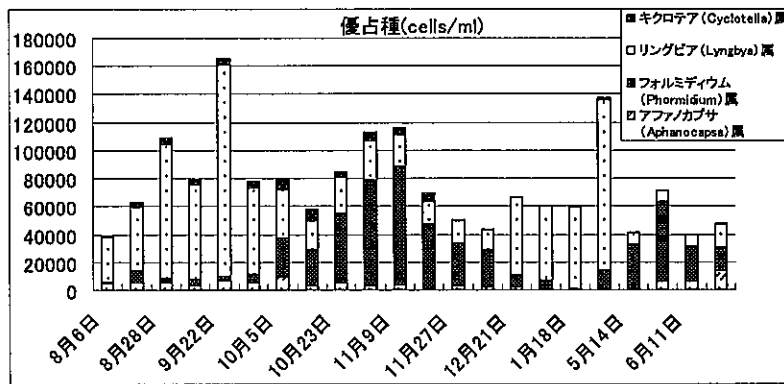


図6：調査期間中の古池における*Microcystis*属以外の優占植物プランクトン密度の季節変化。

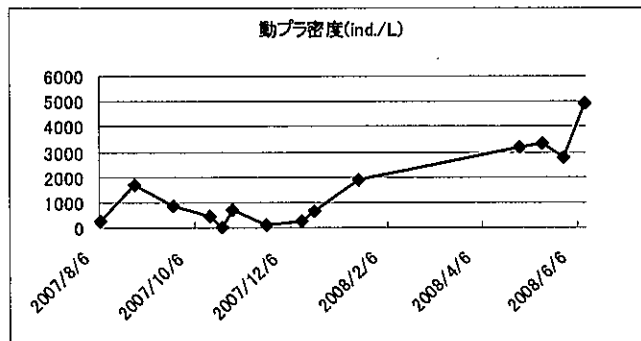


図7：調査期間中の古池における動物プランクトン個体密度の季節変化。

アメーバの細胞密度(図8)は大きく変動し、10月23日に2311 cells ml<sup>-1</sup>、6月30日に2361 cells ml<sup>-1</sup>の高い密度を検出した。アメーバ細胞密度は、冬季に低い傾向が見られた(図8)。本研究では、アメーバを殻のあるもの(有殻)と無いもの(無殻)に分けた。有殻アメーバと無殻アメーバの季節変動パターンは逆であり(図9)、8月から9月末にかけて無殻アメーバ細胞密度が高い時期は有殻アメーバの細胞密度は低く、10月中旬の有殻アメーバ細胞密度が高い時期は無殻アメーバの細胞密度は比較的 low、その後も両者の変動パターンは逆となる傾向が見られた。

本研究では、Amoebida目アメーバ、*Penardochlamys*属、*Cryptodifflugia*属、*Diffulgia*属、*Nuclearia*属、*Vahlkampfia*属のアメーバを検出したが、中でもAmoebida目アメーバ、*Penardochlamys*属、*Cryptodifflugia*属が優占的であった。Amoebida目アメーバは調査期間中つねに観察され、*Penardochlamys*属は夏季から秋季、*Cryptodifflugia*属は秋季終わりごろに多く観察された。従来の研究から、*Penardochlamys*属アメーバがアオコ摂食者として重要であるとされていることから、本研究では*Penardochlamys*属アメーバに着目した(図10)。

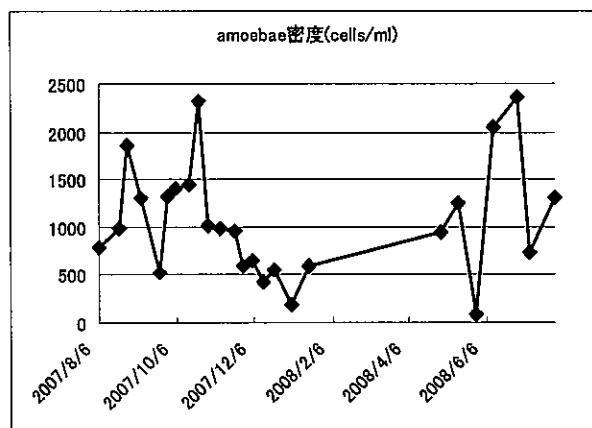


図8：調査期間中の古池におけるアメーバ細胞密度の季節変化。

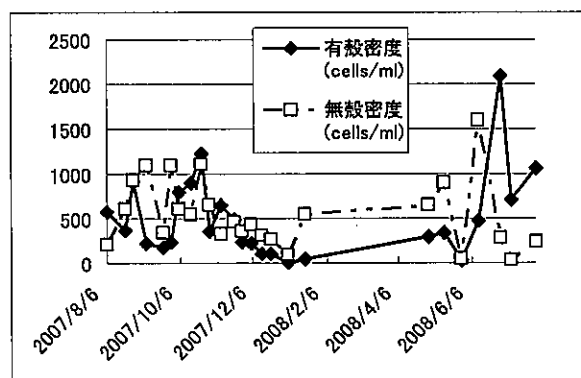


図9：調査期間中の古池における有殻・無殻アメーバの細胞密度の季節変化。

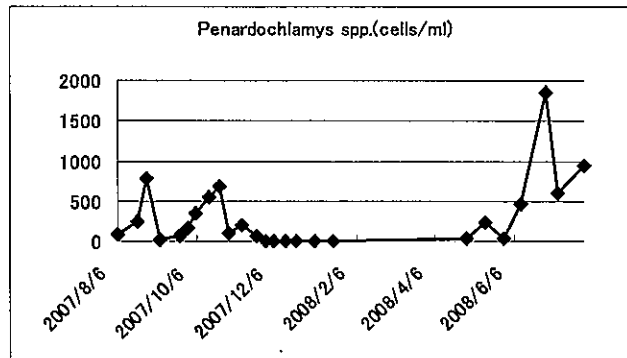


図10：調査期間中の古池における*Penardochlamys*属アメーバの細胞密度の季節変化。

*Penardochlamys*属アメーバ(図10)は、8月28日 ( $770 \text{ cells ml}^{-1}$ ) に一時的に高い細胞密度が見られた後、9月22日から9月22日から10月23日 ( $681 \text{ cells ml}^{-1}$ ) にかけて細胞密度が増加し、その後しばらく低い密度が保たれた後、6月11日以降再び細胞密度が増加し、6月30日には最大の細胞密度( $1847 \text{ cells ml}^{-1}$ )となった。

#### 室内実験：

室内実験では、全ての実験区でミクロキスティスの現存量は緩やかに低下した(図11A)。アオコの生理状態は、コントロール区と窒素・リン添加区では実験期間中ほぼ一定に保たれたのに対し、暗条件区では顕著に低下した(図11B)。アメーバの現存量は、コントロール区と窒素・リン添加区で著しく増加したが、暗条件区では6日目までは緩やかな増加傾向が見られた以降は、アメーバ現存量は低下した(図11C)。

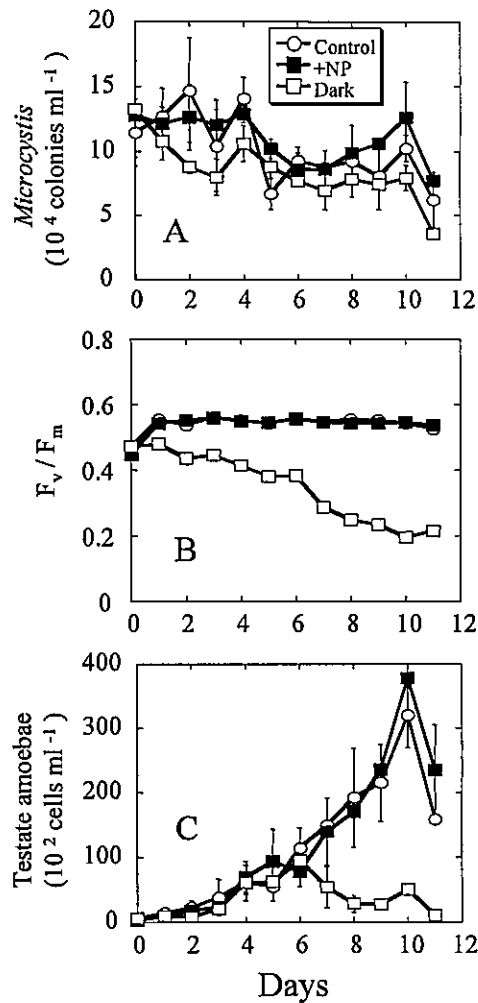


図 1 1 : 本研究の室内実験系における、*Microcystis* コロニー密度(A), 生理活性 (PAM 値) (B) および有殻アメーバ細胞密度(C)の変化。各プロットのバーは、2 連実験の差を示す。

### 考察 :

これまでの研究により、アメーバによるマイクロキスティスの摂食は、マイクロキスティスのアオコ全体を崩壊させることがあるほど強いものであることが分かっている。2007 年のデータについて解析すると、本研究では、Amoebida 目アメーバと *Penardochlamys* spp. の細胞密度の季節変動パターンは、優占植物プランクトンであるシアノバクテリアの *Microcystis* の細胞密度の季節変動パターンと一致した(スピアマン順位相関解析、 $p < 0.05$ )。 *Penardochlamys* spp. は *Microcystis* を選択的に摂食することが報告されている (Nishibe et al. 2004) ことから、これら両者の緊密な食物連鎖が示唆されたが、



Amoebida 目アメーバについてはこのような情報が無いため、本アメーバと *Microcystis* との食物連鎖について今後検討する必要がある。*Cryptodifflugia* sp. は珪藻を摂食すると思われるが、本種と珪藻の細胞密度には統計学的に有意な相関が得られなかった (スピアマン順位相関解析、 $p > 0.05$ )。

本研究における調査結果から、アメーバがどのような環境条件およびマイクロキスティスの条件で増殖し、摂食機能を発現しているかについてのおおよその知見が得られた。本研究の室内実験では、生理活性 (光合成活性) 状態の高いマイクロキスティスならば、アメーバが活発に摂食・増殖し、さらに *Penardochlamys* 属のアメーバが最も効率良くマイクロキスティスを摂食して増殖することが明らかとなった。従来、マイクロキスティス摂食アメーバの単離培養は困難であったが、本実験の室内実験でも未だ *Penardochlamys* 属アメーバの単離は実現していない。今後、*Penardochlamys* 属アメーバの単離を行い、このアメーバを人為的に増殖させ、発生したマイクロキスティスのアオコに対してより効果的に接種して、マイクロキスティスのさらなる増殖を抑制する技術の開発が重要である。

マイクロキスティスのアオコの発達の初期段階にアメーバを投入することにより、アオコの人為的抑制が可能かもしれない。しかし、アオコの発達段階ではまだマイクロキスティスの現存量が低く、投入したアメーバがマイクロキスティスと遭遇する確率が低いために、十分に機能できない可能性もある。マイクロキスティスのアオコがある程度発達しかつ十分に高い生理活性状態を保っている条件が見出され、どのような時期・状態にあるマイクロキスティスに対してアメーバを投入すれば効率良くマイクロキスティスのアオコを抑制することができるのか、さらなる研究が必要である。

## 引用文献：

- Cole GT and Wynne MJ (1974) Endocytosis of *Microcystis aeruginosa* by *Ochromonas danica*. *J Phycol* 10:397-410
- Cook WL, Ahearn DG, Reinhardt DJ, Reiber RJ (1974) Blooms of an algophorous amoeba associated with *Anabebea* in a freshwater lake. *Water Air Soil Pollut* 3:71-80
- Dryden RC, Wright SJL (1987) Predation of cyanobacteria by protozoa. *Can J Microbiol* 33:471-482
- Fulton RS, Paerl HW (1987) Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *J Plankton Res* 9: 837-855
- Hanazato T, Yasuno M (1984) Growth, reproduction and assimilation of *Moina* macrocopa fed on *Microcystis* and/or *Chlorella*. *Jpn J Limnol* 34: 195-202
- Jarvis AC, Hart RC, Combrink S (1987) Zooplankton feeding on size fractionated *Microcystis* colonies and *Chlorella* in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam,

- South Africa): implications to resource utilization and zooplankton succession. *J Plankton Res* 9: 1231-1249
- Kawanabe H, Mizuno T (1989) *Freshwater fishes in Japan*. Yama-to-Keikoku-sha Co. Ltd. Tokyo
- Kim BR, Nakano S, Kim BH, Han MS (2006) Growth and grazing of the heterotrophic nanoflagellate, *Diphyllia rotans* on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Microb Ecol* 45: 163-170
- Miura T (1990) The effects of planktivorous fishes on the plankton community in a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 200/210: 567-579
- Moriarty DJW (1973) The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *J Zool* 171: 25-39
- Nakano S, Hayakawa K, Frenette JJ, Nakajima T, Jiao C, Tsujimura S, Kumagai M (2001a) Cyanobacterial blooms in a shallow lake: a large-scale enclosure assay of the importance of diurnal stratification. *Arch Hydrobiol* 150:491-509
- Nishibe Y, Kawabata Z, Nakano S (2002) Grazing on *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in a hypertrophic pond. *Aquat Microb Ecol* 29:173-179
- Nishibe Y, Manage PM, Kawabata Z, Nakano S (2004) Trophic coupling of testate amoeba and *Microcystis* species in a hypertrophic pond. *Limnology* 5:71-76
- Oliver RL, Gunf GC (2000) Freshwater blooms. In: *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (Eds B.A Whitton & M. Potts) pp.149-194, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Reynolds CS, Jaworski GHM, Cmiench HA, Leedale GF (1981) On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. *Phil Trans R Soc Lond Ser B* 293:419-477
- Rodriguez-Zaragoza S (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20:225-241
- Snell TW (1980) Blue-green algae and selection in rotifer populations. *Oecologia* 46: 343-346
- Yamamoto Y (1981) Observation on the occurrence of microbial agents which cause lysis of blue-green algae in lake Kasumigaura. *Jap J Limnol* 42:20-27
- Yamamoto Y, Suzuki K (1984) Light and electron microscope observations and prey specificities of an algophorous amoeba from Japanese freshwater. *J Gen Appl Microbiol* 31:411-417