

窒素とリンが同時に飢餓状態に達した細胞を用いたアオコ原因シアンバクテリア *Microcystis aeruginosa* の増殖特性の検討

藤井啓子*、北口博隆、満谷 淳

アオコ原因シアンバクテリア *Microcystis aeruginosa* の細胞に貯蔵された窒素とリンを共に十分に枯渇させるための飢餓培養条件について検討した。その結果、*M. aeruginosa* NIES-102 株では N/P 比(モル比)が 80 の培地で 14 日間、*M. aeruginosa* NIES-104 株では 60 の培地で 14 日間、*M. aeruginosa* NIES-298 株では 120 の培地で 15 日間、それぞれ定常期後期まで培養を行うことで窒素とリンの双方について共に十分に飢餓状態に達した細胞が得られることを見出した。次に、溶存態無機窒素(DIN)濃度または溶存態無機リン(DIP)濃度を段階的に変化させ、その他の成分は過剰に含むように調製した一連の培地にこれらの条件で飢餓培養を行った *M. aeruginosa* の細胞を接種して培養を行い、それぞれの培地における AGP(Algal Growth Potential ; 藻類増殖潜在力)値と比増殖速度を調べた。3 株共に AGP 値は、DIN 濃度を変化させた一連の培地では初期 DIN 濃度と、DIP 濃度を変化させた一連の培地では初期 DIP 濃度と、それぞれ直線的な比例関係を示した。しかし、同一の DIN または DIP 濃度の培地に接種した場合の AGP 値と比増殖速度は共に 3 株で値が異なり、株間で増殖特性に違いがあることが明らかになった。初期 DIP 濃度に対して得られた AGP 値から導き出された回帰直線の傾きを初期 DIN 濃度に対して得られた AGP 値から導き出された回帰直線の傾きで割ることによって求めた増殖最適 N/P 比(モル比)は、NIES-102 株では 71、NIES-104 株では 101、NIES-298 株では 287 となった。これらの値は、シアンバクテリアの好む N/P 比としてこれまでに報告されてきた値(質量比で 30 未満=モル比で約 66 未満)よりも高かった。

キーワード : アオコ、*Microcystis aeruginosa*、N/P 比、飢餓培養

富栄養化した湖沼で夏季に発生する「アオコ」の原因生物はシアンバクテリア(藍藻)で、我が国では *Microcystis aeruginosa* がアオコを形成する代表的な種となっている。アオコが発生すると景観の悪化や浄水場のろ過障害、魚類の斃死等の問題が引き起こされるほか、アオコ構成種には発がん性を有する肝臓毒のミクロシスチンや神経毒のアナトキシンといったシアノトキシンを産生する種あるいは株が存在しているため、水源地で発生した場合にはヒトや家畜への影響も懸念される。そのため、アオコの原因シアンバクテリアの増殖特性を明らかにし、アオコ発生を抑制する技術を開発することが望まれている。

〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部海洋生物科学科.

*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: kfujii@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

アオコの主な発生原因としては、高水温や高照度といった物理的な条件^{1, 2)}と、富栄養化等の化学的な条件とが挙げられている。後者の条件に関して、*Microcystis* は、窒素源として溶存態無機窒素 (Dissolved Inorganic Nitrogen; DIN) を、リン源として溶存態無機リン (Dissolved Inorganic Phosphorus; DIP) を最もよく利用するが^{3, 4)}、アオコが発生する湖沼において *Microcystis* は主に湖水中のそれらの濃度によって増殖を制限されているという報告がある⁵⁾。また、湖水中における窒素とリンの存在比 (N/P 比) が *Microcystis* の増殖に影響を及ぼしていることも報告されており、湖沼の全窒素 (TN) と全リン (TP) の比である TN/TP 比とアオコ発生状況との関連がしばしば論じられてきた。例えば Smith⁶⁾ は、シアノバクテリアがブルーム (アオコ) を形成する湖沼の TN/TP 比 (質量比) は 29 未満であると報告している。また藤本ら⁷⁾ は、*Microcystis* は TN/TP 比 (質量比) 30 未満の湖沼で優占しやすいと述べている。このように、現場における窒素・リンの現存量データの解析からは、低 N/P 比、すなわちリンに対して相対的に窒素が少ない、別の表現をするとリンよりも窒素が先に枯渇するような水質の湖沼でアオコが発生しやすいという議論が多い。

一方で、人為的に N/P 比を設定した培地を用いた培養実験による *Microcystis* の増殖の検討も行われている⁸⁾。また、無菌ろ過した湖水そのものを基礎培地として用いて増殖制限物質の解析を行う AGP (Algal Growth Potential; 藻類増殖潜在力) 試験も試みられており、プライマリーな増殖制限物質は窒素やリン、鉄であったと報告されている⁹⁾。しかしながら、先行研究における培養実験や AGP 試験には方法上の問題がある可能性が考えられる。このような培養実験や AGP 試験を行う場合、湖水に藻類を接種する前に飢餓培養を行うが、これまで報告されている論文では、通常の培養にも用いる窒素とリンの濃度が極めて高い合成培地で *Microcystis* を単に定常期まで培養する⁹⁾、あるいは通常の培養に用いる培地中の窒素およびリン濃度を意図的に減少させた培地で定常期まで培養する¹⁰⁾、といった手法がとられている。*Microcystis* は細胞内にポリリン酸を貯蔵するとされているが¹¹⁾、これまで行われてきたような飢餓培養の方法では培地中の窒素・リン濃度や N/P 比の検討が充分に行われていないため、培養終了時にもリン飢餓が達成されておらず、細胞内にポリリン酸が残存していた可能性が危惧される。そのような状態の細胞を用いて AGP 試験のような培養実験を実施した場合、用いた湖水や培地中に全くリンが存在していなくても *Microcystis* が細胞内に残存していたポリリン酸を分解・利用することによってある程度増殖してしまい、あたかも湖水中あるいは培地中にリンが存在していたかのような誤った結果が得られてしまうことになる。

そこで本研究では、*Microcystis* の細胞内で窒素とリンを同時に枯渇させうる飢餓培養条件の確立を試みた。さらに、確立した飢餓培養を行なって得られた 3 株の *Microcystis* 属シアノバクテリアの細胞を用いて、株ごとにそれぞれ窒素およびリンに対する増殖特性について検討を行った。

材料と方法

供試シアノバクテリア

実験に用いるシアノバクテリアは、独立行政法人国立環境研究所の微生物研究保存施設より購入した無菌

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

培養株 *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann NIES-102 株、*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann NIES-104 株、*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann NIES-298 株の 3 株とした。なお、*M. aeruginosa* NIES-102 株は旧名 *M. viridis*、*M. aeruginosa* NIES-104 株は旧名 *M. wesenbergii* であったが、分子生物学的手法で再分類を行った Otsuka ら¹²⁾の提言によって NIES コレクションでは *M. aeruginosa* に統一された。

培地および培養条件

3 株の *Microcystis aeruginosa* の継代培養、並びに飢餓培養用培地のベースには、浮遊性シアノバクテリア用培地 CB (表) を用いた。継代培養ならびに全ての培養試験は、庫内の温度を 25°C に調整したインキュベーター (SANYO 社、GROWTH CABINET) 内で、光量子束密度 35 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、明暗周期 12L : 12D の光条件下で行った。培養中のシアノバクテリアの細胞量は、培養液の相対蛍光量をターナー蛍光光度計 (Turner designs 社、10-AU Fluorometer) を用いて測定することにより求めた。

表. CB 培地の組成

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		15.00 mg
KNO ₃		10.00 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O		4.00 mg
Na ₂ -β-glycerophosphate · nH ₂ O		5.00 mg
Vitamin B ₁		1.00 μg
Vitamin B ₁₂		0.01 μg
Biotin		0.01 μg
Bicine		50.00 mg
P-IV metal mixture*		0.30 mL
Distilled Water	up to	100.00 mL
pH		9.00
*P-IV metal mixture		
FeCl ₃ · 6H ₂ O		19.60 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O		3.60 mg
ZnCl ₂ · 7H ₂ O		2.02 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0.40 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0.25 mg
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O		100.00 mg
Distilled Water	up to	100.00 mL

飢餓培養

飢餓培養用培地としては、CB 培地、あるいは N · P 欠 CB 培地 (100 mL の CB 培地の組成のうち Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 15 mg を CaCl₂ 7.05 mg、KNO₃ 10 mg を KCl 2.02 mg にそれぞれ置換し、β-グリセロリン酸ナトリウム · n 水

和物 5 mg を除いた培地) をベースに適切な N/P 比 (モル比) となるように溶存態無機窒素 (DIN) 源として KNO_3 を、溶存態無機リン (DIP) 源として KH_2PO_4 をそれぞれ添加した培地を用いた。それぞれの株について、用意した培地の DIN と DIP の初期濃度は以下のとおりである。

NIES-102 株 : DIP は $1 \mu\text{mol/L}$ に固定。DIN は $60 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=60)、 $80 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=80)、 $100 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=100)

NIES-104 株 : DIP は $1 \mu\text{mol/L}$ に固定。DIN は $60 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=60)、 $80 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=80)

NIES-298 株 : DIN $250 \mu\text{mol/L}$ 、DIP $2.5 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=100)、DIN $240 \mu\text{mol/L}$ 、DIP $2 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=120)、DIN $150 \mu\text{mol/L}$ 、DIP $1 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=150)、DIN $200 \mu\text{mol/L}$ 、DIP $1 \mu\text{mol/L}$ (N/P 比=200)

飢餓培養試験においては、まず継代培養しておいた *M. aeruginosa* の培養液 5 mL を CB 培地 50 mL に接種し、5 日培養した (前培養)。この前培養液 30 mL を滅菌遠沈管にとり、高速冷却遠心機 (BECKMAN COULTER 社、Avanti HP-25) で 25°C 、 $10,000 \text{ g} \times 20 \text{ min.}$ の条件で遠心分離し、上清を捨て、得られた *M. aeruginosa* の細胞を 30 mL の滅菌 MilliQ 水に再懸濁した。この洗浄操作をさらに 2 回繰り返して細胞外の窒素とリンを可能な限り除去した。得られた *M. aeruginosa* の細胞懸濁液の相対蛍光量をターナー蛍光光度計で測定し、接種後の初期蛍光値が 0.1 になるように接種量を計算して細胞懸濁液を飢餓培養用培地に接種し、14-20 日間培養した。なお、接種までの操作は全てクリーンベンチ内で無菌的に行った。

飢餓状態の検定

飢餓培養の検定には CB 培地、N 欠 CB 培地 (100 mL の CB 培地の組成のうち $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 mg を CaCl_2 7.05 mg、 KNO_3 10 mg を KCl 2.02 mg にそれぞれ置換した培地)、および P 欠 CB 培地 (100 mL の CB 培地の組成のうち β -グリセロリン酸ナトリウム・n 水和物 5 mg を除いた培地) を用いた。

飢餓培養を行った培養液 30 mL をクリーンベンチ内で滅菌遠沈管にとり、前項でも述べた洗浄操作を行ったのち、得られたシアノバクテリアの懸濁液を相対蛍光量が 0.1 になるよう CB 培地、N 欠 CB 培地、および P 欠 CB 培地にそれぞれ接種して培養を行った。培養条件は継代培養や飢餓培養の場合と同様とした。培養は定常期に達するまで 5-7 日間行い、その間 1-2 日ごとに相対蛍光量を測定した。

その結果、CB 培地では良好な増殖がみられ、かつ N 欠 CB 培地と P 欠 CB 培地の両方で増殖がみられなかった場合に、窒素とリンの双方について同時に飢餓が達成されていたと判定した。なお、N 欠 CB 培地では増殖がみられ、P 欠 CB 培地では増殖がみられなかった場合には窒素について飢餓が不十分であったと、逆に N 欠 CB 培地では増殖がみられず、P 欠 CB 培地では増殖がみられた場合にはリンについて飢餓が不十分であったと、それぞれ判断した。

窒素およびリンに対する増殖特性の検討

N 欠 CB 培地 50 mL に、添加後の DIN 濃度が 20、40、60、80、及び $100 \mu\text{mol/L}$ となるように、 10 mmol/L の KNO_3 溶液を適宜滅菌 MilliQ 水で希釈したのちそれぞれ 0.5 mL 添加した培地と、P 欠 CB 培地に DIP 濃度が

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

0.2、0.4、0.6、0.8、及び1.0 $\mu\text{mol/L}$ となるように、0.1 mmol/L の KH_2PO_4 溶液を適宜滅菌 MilliQ 水で希釈したのちそれぞれ 0.5 mL 添加した培地を作成した。対照区としては MilliQ 水を 0.5 mL 添加した培地（濃度 0 $\mu\text{mol/L}$ ）を用意した。これらに、本研究で明らかにした適切な条件で飢餓培養を行ったのち前々項に記載した洗浄操作を行った 3 株の *M. aeruginosa* の懸濁液を相対蛍光量が 0.1 になるよう接種し、定常期に達するまで 10-14 日間培養した。その間 1-2 日ごとに相対蛍光量を測定して得られた最大値を AGP 値とした。また、作成した各培地の DIN と DIP の初期濃度はオートアナライザー（BLTEC 社、SWAAT）を用いて測定した。

結果

CB 培地を用いた飢餓培養

CB 培地で 5 日間培養をおこなったのち、集菌して洗浄を行った 3 株の *M. aeruginosa* の懸濁液をそれぞれ N 欠 CB 培地と P 欠 CB 培地に接種した結果を図 1 に示す。

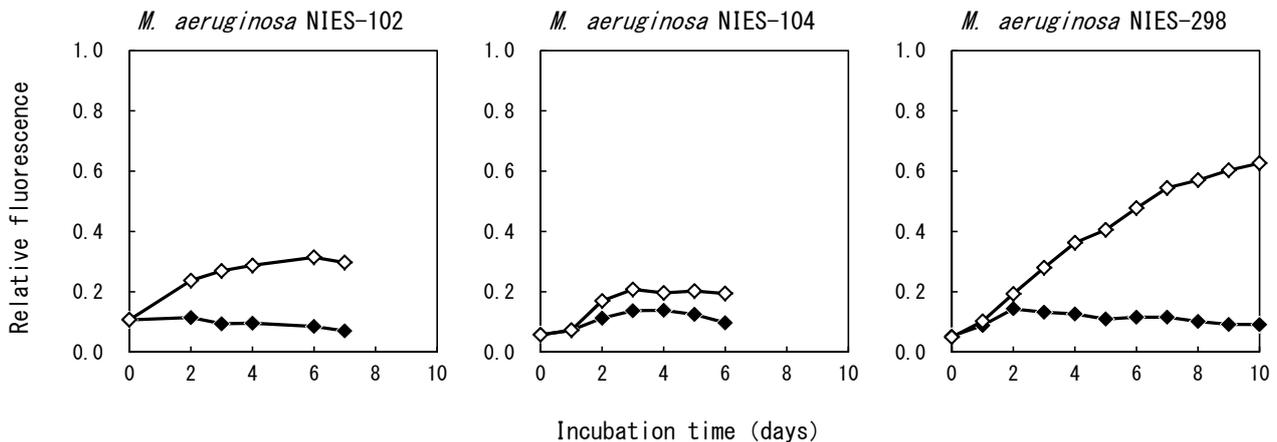


図 1. CB 培地で飢餓培養を行った細胞の飢餓状態の検定結果

◆ ; N 欠 CB 培地における増殖曲線、◇ ; P 欠 CB 培地における増殖曲線

NIES-102 株の場合には、N 欠 CB 培地では相対蛍光量の最大値がほぼ接種時に等しい 0.11 であり、増殖がほとんど見られなかったことから、窒素については飢餓状態が達成されていたと考えられた。一方、P 欠 CB 培地では、相対蛍光量の最大値が 0.29 と明確な増殖が見られたことから、リンに関しては飢餓が著しく不十分であり、飢餓培養終了時にもシアノバクテリアの細胞内に利用できるリンがかなり残存していたと判断された。また、NIES-104 株と NIES-298 株の場合は、NIES-102 株と異なり N 欠 CB 培地でも蛍光値の最大値が 0.14 と接種時より若干増加したことから、窒素に関しても飢餓が達成されていなかったと考えられた。P 欠 CB 培地においては相対蛍光量の最大値が前者で 0.21、後方で 0.66 と明確に増殖が見られたことから、NIES-102 株の場合と同様にリンに関する飢餓が不十分であり、細胞内に利用できるリンがかなり残存していたと判断された。

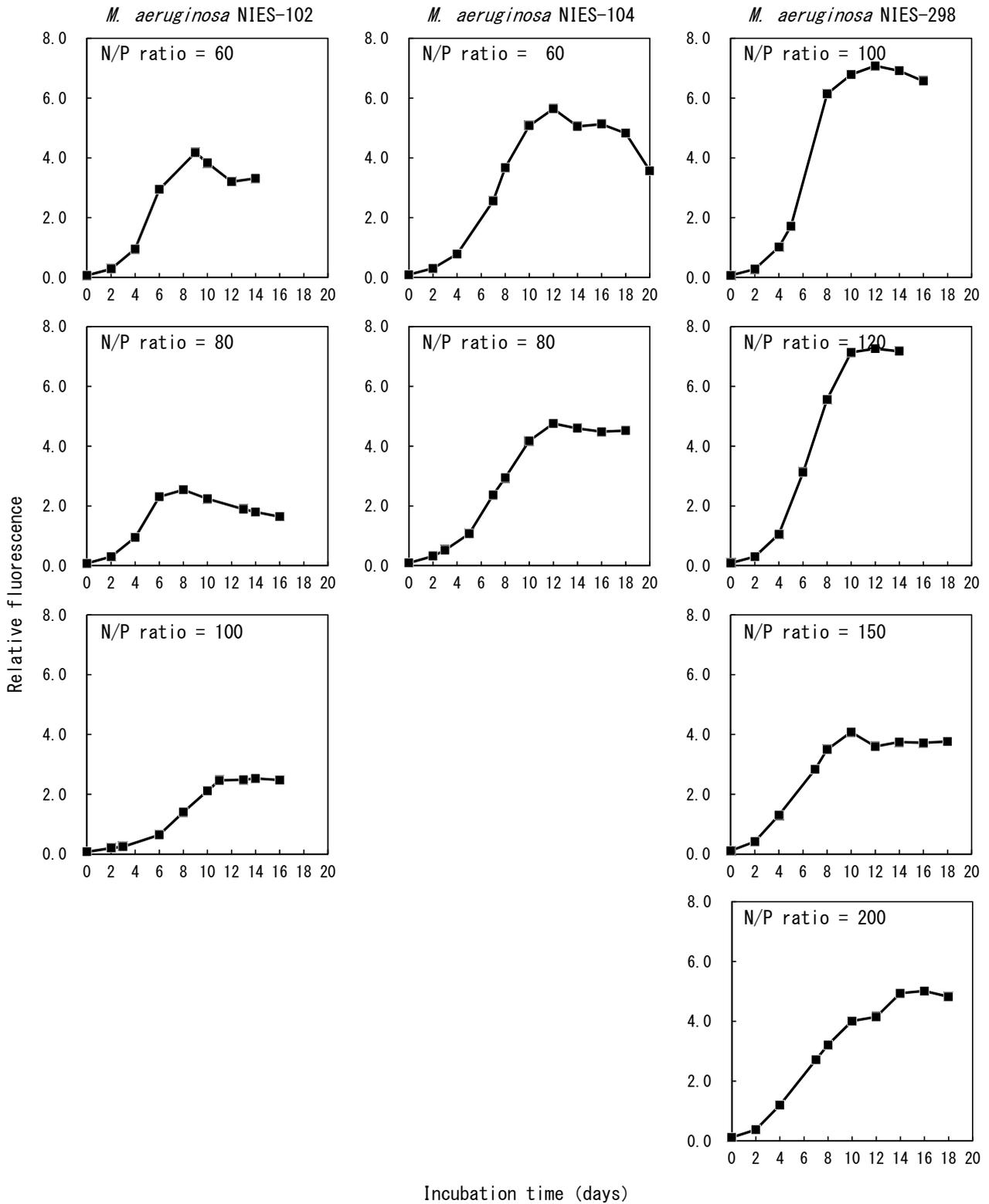


図 2. N/P 比を段階的に設定した改変 CB 培地を用いた飢餓培養時の増殖曲線

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

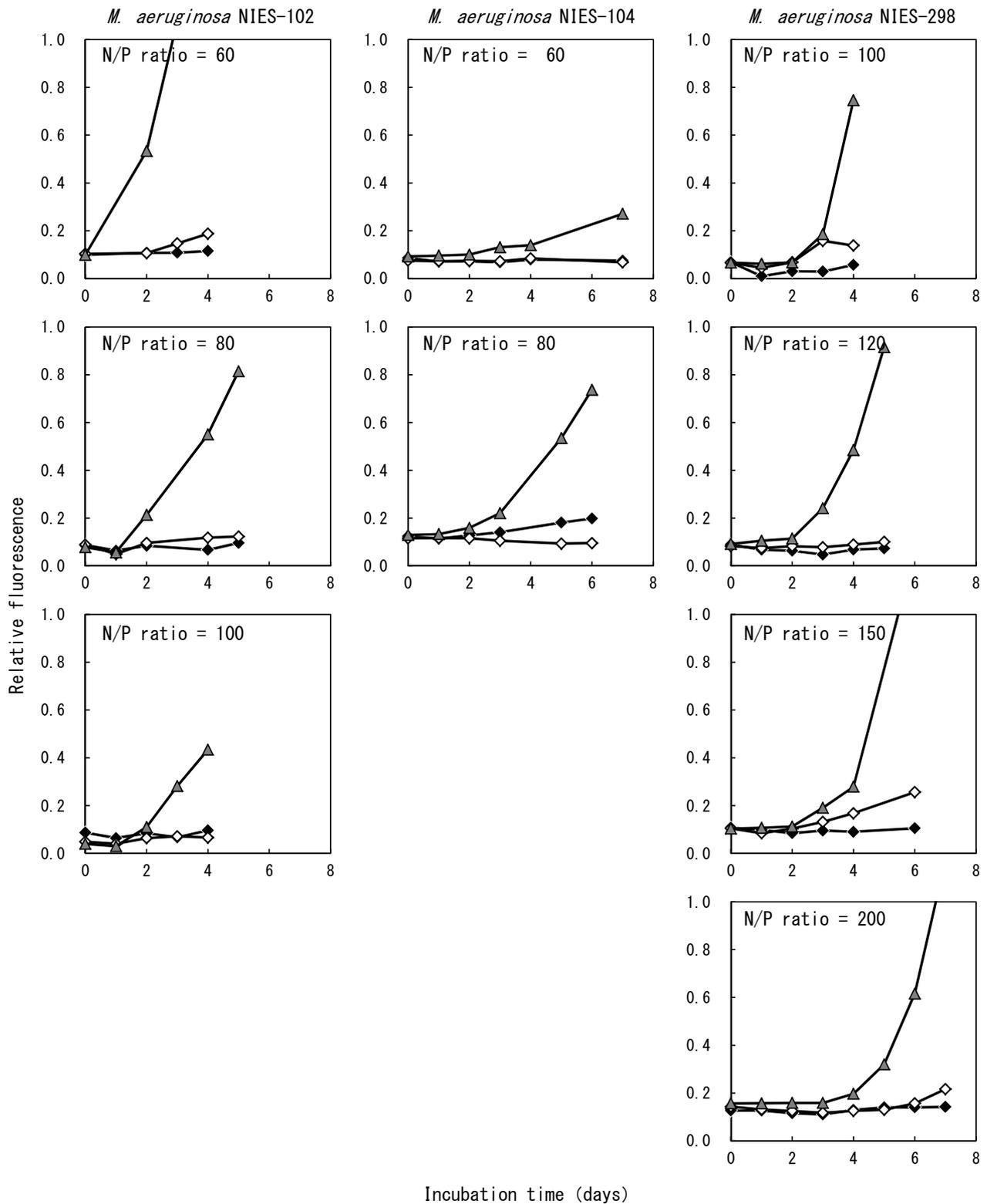


図3. N/P比を段階的に設定した改変CB培地で定常期まで培養した細胞の飢餓状態の検定結果

◆ ; N欠CB培地、◇ ; P欠CB培地、▲ ; 対照区 (CB培地)

N/P 比を段階液に設定した改変 CB 培地を用いた飢餓培養

N/P 比（モル比）を段階的に設定した種々の改変 CB 培地で 3 株の *M. aeruginosa* を培養した際に得られた増殖曲線を図 2 に示す。また、NIES-102 株では 14 日目、NIES-104 株では 14 日目、NIES-298 株では 15 日目の、それぞれ定常期に達した段階で飢餓状態の検定を行った結果を図 3 に示す。

NIES-102 株の場合、N/P 比 60 の培地で飢餓培養した細胞では P 欠 CB 培地で相対蛍光量の増加がみられ、N/P 比 100 の培地で飢餓培養した細胞では逆に N 欠 CB 培地で相対蛍光量の増加がみられた。一方 N/P 比 80 の培地では N 欠 CB 培地、P 欠 CB 培地でともに一旦相対蛍光量が減少した後にやや増加に転じたものの、接種時の値である 0.1 を超えることはなく、窒素とリン双方について飢餓が十分に達成されていたと判断された。NIES-104 株の場合、N/P 比の 80 培地で飢餓培養した細胞では N 欠 CB 培地で相対蛍光量の増加が確認されたが、N/P 比 60 の培地で飢餓培養した細胞では N 欠 CB 培地と P 欠 CB 培地でともに相対蛍光量の増加がみられず、窒素とリン双方について飢餓が十分に達成されていたと判断された。NIES-298 株の場合、N/P 比 100、150、及び 200 の培地で飢餓培養した細胞ではいずれも P 欠 CB 培地で相対蛍光量の増加がみられたが、N/P 比 120 の培地で飢餓培養した細胞では N 欠 CB 培地と P 欠 CB 培地でともに相対蛍光量の増加がみられず、窒素とリン双方について飢餓が十分に達成されていたと判断された。

培地の初期窒素・リン濃度と *M. aeruginosa* の増殖との関係

3 株の *M. aeruginosa* について、それぞれ前項で明らかになった最適 N/P 比に調整された改変 CB 培地で飢餓培養を行ったのち、窒素濃度を 6 段階に設定した培地で培養し、それぞれの濃度の培地で得られた AGP 値を培地の無機態窒素の初期濃度（実測値）に対してプロットした結果を図 4 に示す。またリン濃度を 6 段階に設定した培地で培養し、それぞれの濃度の培地で得られた AGP 値を培地の無機態リンの初期濃度に対してプロットした結果を図 5 に示す。3 株ともに、窒素とリンの双方で、培地の初期濃度と AGP 値が直線的な関係を示し、相関係数（ R^2 値）はいずれも 0.9 を大きく上回っていた。但し、得られた回帰直線の傾きは株に

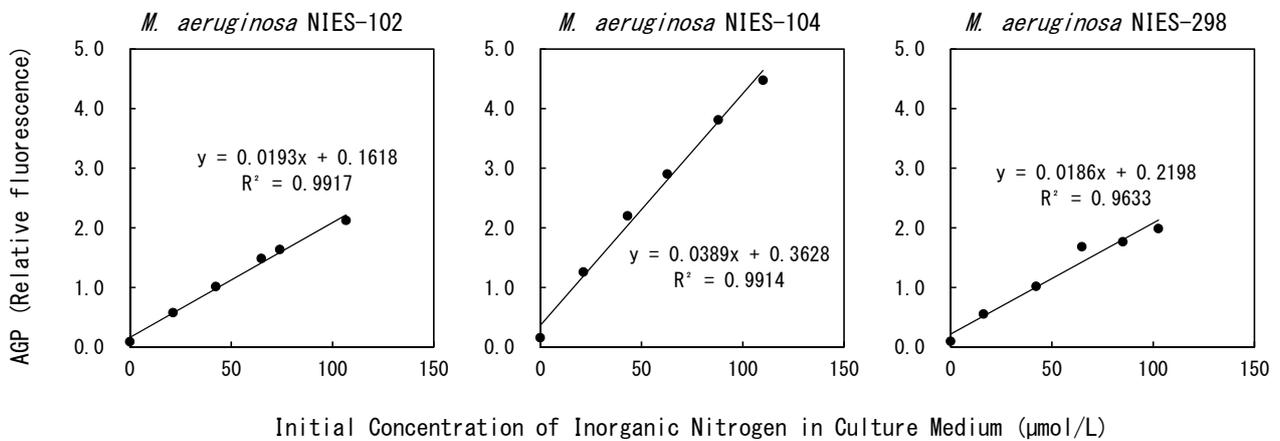


図 4. 溶存態無機窒素の初期濃度を段階的に設定した各培地における AGP 値

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

よって異なり、窒素の場合は NIES-102 株および NIES-298 株では傾きが約 0.02 とほぼ同程度であったが、NIES-104 株ではその 2 倍程度の約 0.04 であった。リンの場合は 3 株で回帰直線の傾きが大きく異なっており、NIS-102 株で値が約 1.4 と最も小さく、NIES-104 株では約 4.0、NIES-298 株では約 5.4 であった。

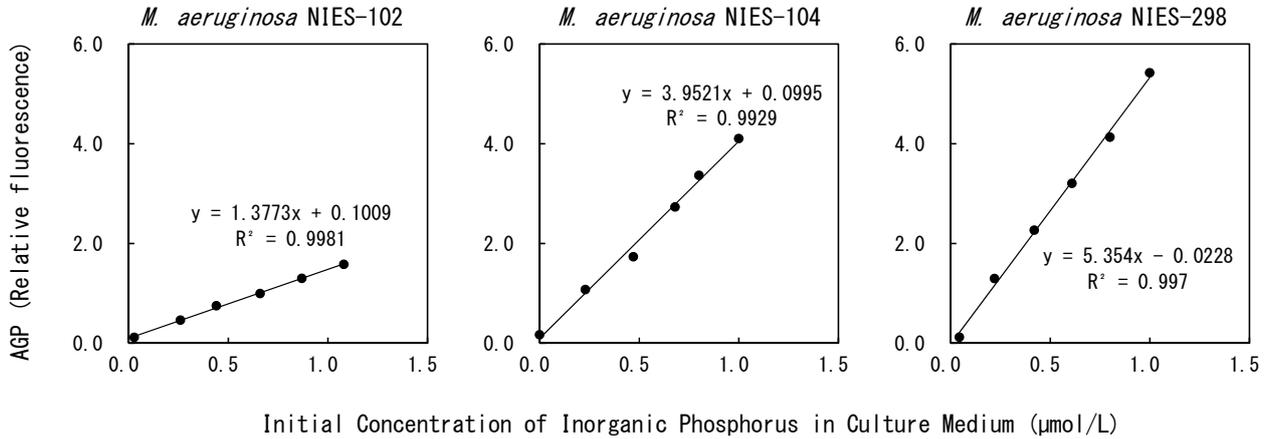


図 5. 溶存態無機リンの初期濃度を段階的に変化させた各培地における AGP 値

また、一連の無機態窒素濃度および無機態リン濃度の培地における *M. aeruginosa* の増殖曲線から得られた比増殖速度を、それぞれ図 6 と図 7 に示す。培地の無機態窒素・リン濃度が異なっても比増殖速度に大きな違いはみられなかったが、AGP 値（最大増殖量）の場合と同様に比増殖速度についても株間では明らかな差がみられた。NIES-298 株は 3 株の中で比増殖速度が最も大きかったのに対し、NIES-104 株は比増殖速度が最も小さく NIES-298 株の約 1/3 の値を示し、NIES-102 株は両者の中間程度の値を示した。

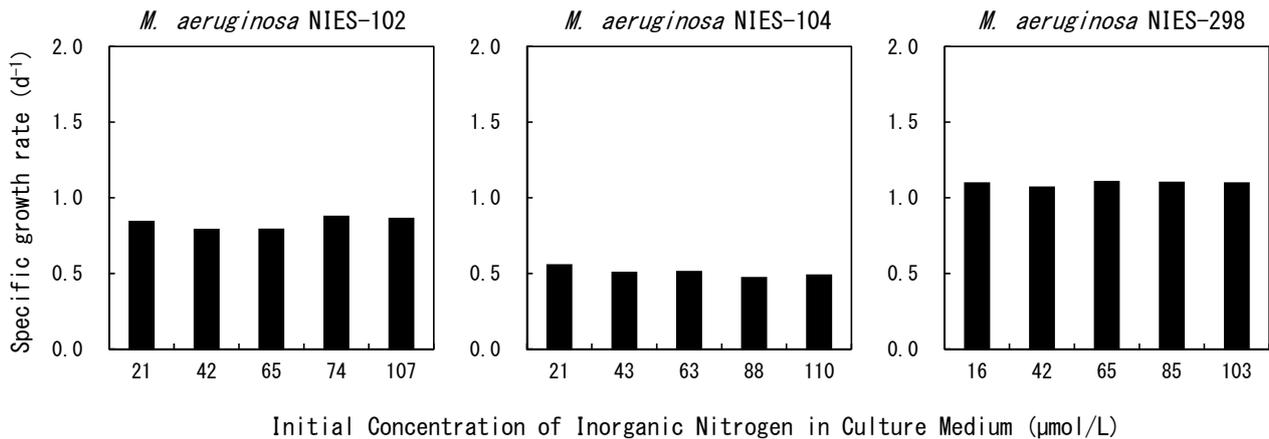


図 6. 溶存態無機窒素を段階的な初期濃度に設定した培地における比増殖速度

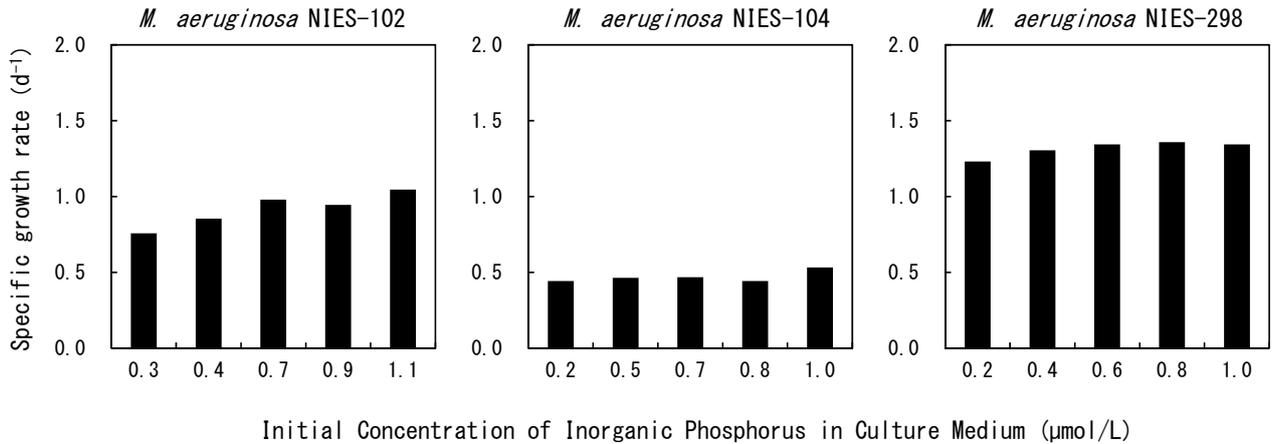


図 7. 溶存態無機リンの初期濃度を段階的に設定した各培地における比増殖速度

考 察

これまでも、*Microcystis* の増殖制限物質や増殖に最適な N/P 比を明らかとすることを目的とした AGP 試験が行われてきた^{9, 10, 13, 14)}。それらの研究では AGP 試験を実施する場合に必要なとされる飢餓状態の *Microcystis* の細胞をつくりだすために、通常の継代培養に用いる栄養塩の豊富な培地で定常期まで培養する^{9, 13)}、元の組成から一定の割合で栄養塩を削減した培地で培養する^{10, 14)}、といった手段がとられてきた。しかしながら、いずれの先行研究においても飢餓の達成度を確認する検定が行われていないため、飢餓培養後の細胞が窒素とリンの双方について十分に飢餓状態に達していたかどうかは明らかではない。飢餓培養後も *Microcystis* の細胞内に増殖に利用できる形の窒素やリンが残存していた場合、あらたな培地に接種して AGP 試験を実施した際に、例えばその培地中に利用できる形態の窒素・リンが全く存在していなかったとしても細胞に残存していた窒素・リンを利用してある程度増殖してしまうなど、結果的に誤った AGP 値が導き出される恐れがある。このため、飢餓培養後に飢餓状態の検定を行うことが絶対に必要と考えられる。

そこで本研究では、まず通常の継代培養にも使用している CB 培地で 3 株の *M. aeruginosa* を 5 日間培養したのち飢餓状態の検定を試みた。その結果、3 株いずれの場合にも、N 欠 CB 培地では全くあるいはわずかな増殖しかみられなかったのに対し、P 欠 CB 培地では明確な増殖がみられた (図 1)。*Microcystis* は細胞内にポリリン酸を貯蔵するという報告¹¹⁾があることから、細胞内にかなりのリンが貯蔵されていたのではないかと推察される。

この結果を受けて、著者らはリン飢餓状態を達成するためには、*Microcystis* が一旦ポリリン酸として貯蔵したリンを使い果たさせるような培地組成と培養時間とを設定する必要があると考えた。このため、CB 培地の組成から計算される N/P 比 (モル比; 約 10) よりもかなり高い N/P 比の、すなわち CB 培地の組成から窒素とリンを除いた N・P 欠 CB 培地に窒素源として KNO₃、リン源として KH₂PO₄ をそれぞれ添加して N/P 比 (モル比) を 60 から 200 に段階的に設定した一連の培地を作成し、それらで 3 株の *M. aeruginosa* を定常期に達するまで培養したのち、飢餓状態の検定を行った。その結果、NIES-102 株の場合は N/P 比=80 の培地で、

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

NIES-104 株の場合は N/P 比=60 の培地で、NIES-298 株の場合は N/P 比=120 の培地で、それぞれ定常期（培養 14 日目-15 日目）まで培養を行った細胞では、検定時に CB 培地では良好な増殖がみられ、かつ N 欠 CB 培地と P 欠 CB 培地のどちらに接種してもほぼ増殖がみられなかった（図 3）。この検定結果から、NIES-102 株では N/P 比 80 の培地で 14 日間の、NIES-104 株では N/P 比 60 の培地で 14 日間の、NIES-298 株では N/P 比 120 の培地で 15 日間のそれぞれ飢餓培養を行うことにより、窒素とリンの双方について十分に飢餓状態に達した細胞が得られることが分かった。

次に、これらの確立された条件でそれぞれ飢餓培養を行った 3 株の *M. aeruginosa* の細胞を、他成分は過剰に含み窒素濃度のみを 0-100 $\mu\text{mol/L}$ の 6 段階に変化させた培地、および同様にリン濃度のみを 0-1.0 $\mu\text{mol/L}$ の 6 段階に変化された培地にそれぞれ接種して培養し、得られた AGP 値と窒素、リンの初期濃度との関係について検討を行った。その結果、少なくともこの実験で設定した濃度範囲では、3 株のいずれにおいても AGP 値が初期濃度と直線的な比例関係を示すという結果が得られた（図 4 及び 5）。この結果は、生物（植物）の最大増殖量は必要とされる栄養素のうち、与えられた量の最も少ないもののみ影響されるというリービッチの最小律の法則に沿っている。

しかし一方で、ある窒素、リンの初期濃度に対する AGP 値（最大増殖量）と比増殖速度は、株ごとにかなり値が異なっていた。本研究で用いた 3 株の *M. aeruginosa* は、以前は群体の形や細胞のサイズ等の形態的特徴の違いに基づいて別種とされていたが、分子生物学的分類によって同一種に纏められた種である¹²⁾。しかしながら、同一種といっても、形態的な特徴のみならず窒素・リンに対する増殖特性にもこのように大きな違いがあることが本研究から明らかとなった。このような増殖特性の違いは、環境中におけるこれらの株によるアオコ形成リスクに関わってくる可能性が考えられる。例えば、NIES-104 株は最大増殖量が大いなのに対して増殖は遅いため、他に栄養面で競合する生物がいた場合には優占してアオコを形成するのは難しいが、他に競合する生物がいなかった場合には大きく増殖してアオコを形成する可能性が考えられる。また、NIES-298 株は増殖が速く、あるリン濃度に対する最大増殖量が他より大きいことから、窒素が一定量以上存在する環境下でリンが供給されると急速に増殖し、優占種となってアオコを形成する可能性が考えられる。

ところで、リン濃度のグラフ（図 5）で得られた回帰直線の傾きを窒素濃度のグラフ（図 4）で得られた回帰直線の傾きで割ることで、それぞれの株が増殖するために必要とする窒素とリンのモル比を求めることができる。得られた N/P 比よりも相対的に窒素が多い環境では窒素より先にリンが枯渇し、逆に相対的にリンが多い環境ではリンよりも先に窒素が枯渇することになると考えられる。この増殖に必要な窒素とリンの元素比を最適 N/P 比（モル比）と考えると、NIES-102 株では 71、NIES-104 株では 101、NIES-298 株では 287 となる。最適 N/P 比については、これまでに安定した培養下にある *Microcystis* の最適 N/P 比（モル比）は 9 であるとの報告がある¹⁵⁾。また一方で、アオコが発生する湖沼の N/P 比（質量比）は 30 未満との報告もある^{6, 7)}。この N/P 比（質量比）=30 はモル比に直すと約 66 となる。これらの知見に基づいて、*Microcystis* は比較的低い N/P 比の環境を好むという考え方がこれまで支配的であった。ところが、本研究で得られた *M. aeruginosa* の増殖最適 N/P 比（モル比）は、3 株間で値は相当に異なるものの、NIES-104 株を除いてこれま

で報告されてきたよりもかなり値が高い。このような高い値が得られた理由は現時点では明らかではないが、先行研究では湖水中の窒素として TN（全窒素）、リンとして TP（全リン）の値を使用していた場合が多いことがその一因である可能性が考えられる。アオコ発生の潜在的リスクについて長期的なフローで論じていく場合には TN と TP の値が重要な意味をもつが、ある時点におけるアオコの短期的な発生リスクについて検討する場合には、湖水中の *Microcystis* が最も利用しやすい形態の窒素とリン、すなわち DIN と DIP に注目すべきではないかと著者らは考えている。

様々な DIN/DIP 比に調整した合成培地を用意して *Microcystis* の培養を行った先行研究もいくつか存在している。例えば、緑藻、珪藻および *Microcystis* 属シアノバクテリアの三者を種々の N/P 比（モル比）の合成培地で混合培養した場合に、緑藻は N/P 比が高くなると最大増殖量および比増殖速度が共に低下し、珪藻は N/P 比=500 程度までは両者にほぼ変化がみられなかったのに対し、*Microcystis* は N/P 比が 7 から 139 の間では N/P 比が高くなるにつれて両者が上昇し、それよりも N/P 比が高くなると逆に低下に転じたと報告されている⁸⁾。この結果は、*Microcystis* の増殖には最適な N/P 比が存在することを示唆している。また一方で、様々な N/P 比（質量比）の培地と培養温度の組み合わせで珪藻と *Microcystis* を混合培養した場合に、*Microcystis* が優占するか否かは N/P 比よりも温度や DIP 濃度に依存したという報告がある^{10, 14)}。このように、培地の N/P 比と *Microcystis* の増殖との関係については未だ結論が出ていない。また考察の冒頭でも述べたように、これらの先行研究においては前培養（飢餓培養）の終了時に *Microcystis* の細胞が窒素とリンの双方について十分に飢餓状態に達していたか否かについて厳密な検定を行っていない。従って、もし適切に飢餓培養が行われた細胞を用いて同じ実験を行った場合にはまた違った結果が得られた可能性も無いとは言えない。

最後に、今後の研究の発展性について述べる。本研究により、*M. aeruginosa* NIES-102 株、*M. aeruginosa* NIES-104 株、*M. aeruginosa* NIES-298 株の 3 株について、窒素とリンの双方について十分に飢餓状態に達した *M. aeruginosa* の細胞が得られる飢餓培養の条件を確立することができた。このようにして得られた細胞を用いて次のような湖水の AGP 試験を実施することにより、*M. aeruginosa* にとって湖水中で窒素とリンのどちらがプライマリーな増殖制限要因になっているかを判定することができると考えている。すなわち、無菌ろ過湖水そのものの培地（対照区）、無菌ろ過湖水に一定量の DIN と DIP を添加した培地、無菌ろ過湖水に一定量の DIN のみを添加した培地、および無菌ろ過湖水に一定量の DIP のみを添加した培地を用意して、それらに飢餓培養した *M. aeruginosa* の細胞を接種して培養する。もし、対照区と無菌ろ過湖水に一定量の DIP のみを添加した培地でほぼ同じ AGP 値が得られ、無菌ろ過湖水に一定量の DIN のみを添加した培地で AGP 値が伸びれば、湖水中で窒素がプライマリーな増殖制限要因となっていると判断できる。逆に、対照区と無菌ろ過湖水に一定量の DIN のみを添加した培地がほぼ同じ AGP 値が得られ、無菌ろ過湖水に一定量の DIP のみを添加した培地で AGP 値が伸びれば、湖水中でリンがプライマリーな増殖制限要因となっていると判断できる。窒素がプライマリーな増殖制限要因となっていると判断される場合には湖水への DIN の加入がアオコ発生リスクとなり、逆にリンがプライマリーな増殖制限要因となっていると判断される場合には湖水への DIP

Microcystis 属シアノバクテリアの窒素およびリンに関する飢餓培養条件の検討

の加入がアオコ発生リスクにつながる。但し、本研究で用いた *M. aeruginosa* の株間で窒素・リンに対する増殖特性にかなりの違いがみられたことから、単一の株のみを用いて評価を行うのは危険であり、複数の株を用いて検討を行なっていく必要があると考えている。

著者らは現在、広島県東部を流れる 1 級河川 芦田川の中流域に位置し毎年 *Microcystis* 属シアノバクテリアによるアオコが発生している八田原ダムにおいて、このような手法を用いて窒素、リンのいずれがプライマリーな増殖制限要因となっているのかを調べ、上流域からのリンや窒素の加入がもたらすアオコ発生リスクについて検証を行なっている。今後、その調査研究で得られた成果についても公表していく予定である。

文 献

- 1) Takamura, N., Iwakuma, T., and Yasuno, M. *J. Plankton Res.*, **7**, 303-312 (1985).
- 2) Paerl, H. W., Bland, P. T., Bowles, N. D., and Haibach, M. E. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1046-1052 (1985).
- 3) Takamura, N., Iwakuma, T., and Yasuno, M. *J. Plankton Res.*, **9**, 151-165 (1987).
- 4) Heath, R. T. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**, 343-350 (1986).
- 5) Sakamoto, M. *Arch. Hydrobiol.*, **62**, 1-28 (1966).
- 6) Smith, V. H. *Science*, **221**, 669-671 (1983).
- 7) 藤本尚志・福島武彦・稲盛悠平・須藤隆一. *水環境学会誌*, **18**, 901-908 (1995).
- 8) 高橋正征. 生嶋 功(編), *水の華の発生機構とその制御*, 東海大学出版会, 66-86 (1987).
- 9) 矢木修身・萩原富司・高村義親・須藤隆一. *水質汚濁研究*, **10**, 115-122. (1987).
- 10) 関谷卓見・竹谷公貴・天野佳正・町田 基. *水環境学会誌*, **33**, 175-179. (2010).
- 11) Jacobson, L., and Halmann, M. *J. Plankton Res.*, **4**, 481-488 (1982).
- 12) Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., and Watanabe, M. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 873-879 (2001).
- 13) 南條吉之・細井由彦・城戸由能・矢木修身・稲葉一穂. *水環境学会誌*, **23**, 690-696. (2000).
- 14) Amano, Y., and Machida, M. *J. Water. Environ. Technol.*, **10**, 1-10 (2012).
- 15) Rhee, G. Y., and Gotham, I. J. *J. Phycol.*, **16**, 486-489 (1980).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (12), 43-56 (2013)

Examination of growth characteristics of a bloom-causing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by inoculating nutrient-starved cell in which intracellular storage of both nitrogen and phosphorus is exhausted

Keiko Fujii, Hirotaka Kitaguchi, and Atsushi Mitsutani

Department of Marine Bioscience, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University, Fukuyama 729-0292, Japan

Composition of culture medium for the starvation of a bloom-causing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is examined to establish the cyanobacterial cell in which intracellular storage of both nitrogen and phosphorus is exhausted (N-P-starved cell). Three strains of *M. aeruginosa* were tested, and N-P-starved cell was obtained when cultivated 14-15 days (up to late stationary phase) in the culture medium that has N/P molar ratio of 80 (strain NIES-102), 60 (strain NIES-104), or 120 (strain NIES-298), respectively. Algal growth potential (AGP) value (= maximum yield) and specific growth rate in various chemically defined culture media, in which concentration of dissolved inorganic nitrogen (DIN) or dissolved inorganic phosphorus (DIP) was gradually changed and other components were contained excessively, were also examined by inoculating N-P-starved cell of these strains. AGP value showed linear proportional relationship with the initial concentration of DIN or DIP in culture medium in all three strains tested. However, both AGP value and specific growth rate in culture medium that has the same DIN or DIP concentration were quite different between three strains. These results indicate that these strains have different growth characteristics. Optimum N/P molar ratio calculated from the results of this experiment was 71 (strain NIES-102), 101 (strain NIES-104), or 287 (strain NIES-298), respectively. These values are higher than the value < 66 (equivalent to N/P weight ratio = 30) reported in previous works as the optimum N/P ratio for the growth of cyanobacteria and their dominance in natural fresh water environment.