

ミクロシスチン分解菌の検索およびバイオレメディエーションによる湖沼環境改善

千葉工業大学 生命科学科 学員 ○鈴木 烈

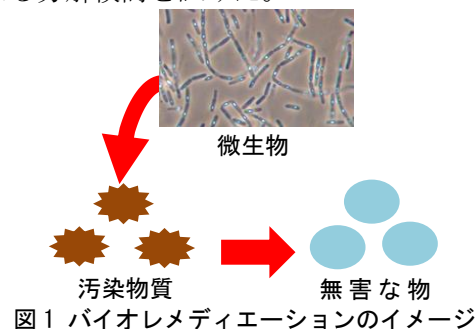
千葉工業大学 生命科学科 正員 村上和仁

1. 背景・目的

世界各地の閉鎖性水域で窒素・リン等の栄養塩の過剰流入を原因とする富栄養化が進行している。さらに、陸域から特定・非特定汚染源由来の有害物質が流入し、水域を汚染している。このような有害物質汚染対策の1つとして有用細菌を活用したバイオレメディエーションが挙げられる。特にゲノム編集等の遺伝子操作に頼らない、汚染サイトから分離した有用細菌群の活用が期待されている。本研究では、アオコ産生毒であるミクロシスチンに着目して底泥由来細菌群（細菌コンソーシアム）による分解検討を試みた。

2. バイオレメディエーション

バイオレメディエーションとは微生物等を利用して、土壌や地下水の汚染を修復・浄化する技術である。特定の微生物を既存の生態系に人為的に導入することになるため、生態系に如何なる影響を及ぼすかについては不確実な面もあるものの、安全性評価を十分に踏まえつつ実施することにより低コストで汚染を処理することが可能で、多様な汚染物質への適用可能性を有するという特徴がある。



3. 実験方法

3.1 印旛沼の概要

印旛沼は全国で11か所ある指定湖沼の1つであり8月から10月頃にアオコが発生する、また印旛沼は千葉県の水道水源として利用されており千葉県の11市で利用されている。印旛沼は北印旛沼と西印旛沼の2つに分かれており、



図2 印旛沼の航空写真



図3 印旛沼で発生したアオコ

本研究では西印旛沼の図2の赤丸で示した地点よりサンプルを採取した。図3に10月に発生したアオコの表層写真を示した。アオコ形成シアノバクテリアの優占種は *Microcystis* spp. であった。アオコ産生毒であるミクロシスチン濃度はHPLC (Shimadzu LC-20A) を用いて測定した。

3.2 有用細菌の培養

アオコが発生している図2の地点から表層水と底泥を採取し、底泥10gを強く超音波処理(100kHz)したものと弱く超音波処理(28kHz)をし、細菌を剥離浮遊させた後、30℃、暗所、110rpmで振とう培養し細菌懸濁液を作成し濁度計測および生菌数計測から評価を行った。濁度(OD₆₅₀)はデジタル濁度計を用いて0、6、12、24、36、48時間経過後に測定した。生菌数は微生物検査用フィルム培地(一般生菌数測定用)を用いて、培養開始から0、6、12、24、36、48時間経過後の生菌数を計測した。フィルム培地への滴下の際、純水を用いた10倍希釈法によって培養液1mL中の生菌数を計測した、また各条件における増殖特性は比増殖速度(μ)、最大生菌数(N_{max})で評価した。



図4 底泥由来細菌の生菌シート

キーワード：バイオレメディエーション アオコ ミクロシスチン分解菌 有用細菌コンソーシアム 培養特性

連絡先：〒275-0016 千葉県習志野市津田沼2-17-1 千葉工業大学 生命科学科 TEL：047-478-0455 FAX：047-478-0455

4. 結果および考察

印旛沼で発生したアオコからはマイクロシスチン-RR およびマイクロシスチン-LR が検出され、濃度はそれぞれ 173 $\mu\text{g/L}$ 、81.3 $\mu\text{g/L}$ であった。底泥より分離した細菌群の培養における濁度の経時変化を図 5、生菌数の経時変化を図 6 に示した。最大比増殖速度 (μ) は弱い超音波処理を施した 0 時間経過後から 6 時間経過後にて求めた 0.53/hrs、最大生菌数 (N_{max}) は強い超音波処理を施した 36 時間経過後の $1.4 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ となった。

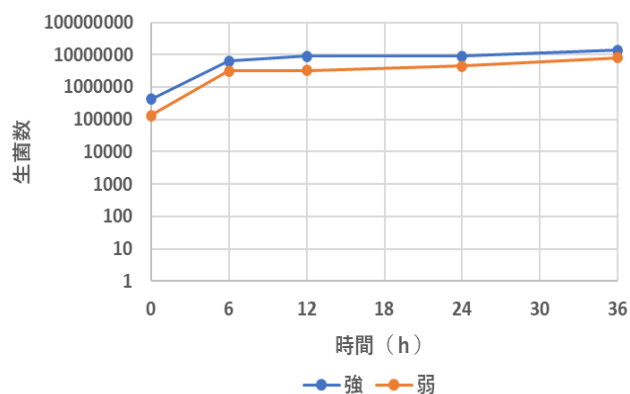


図5 各条件における生菌数の経時変化

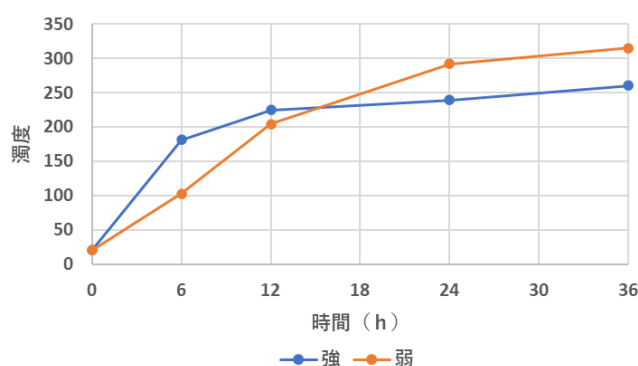


図6 各条件における濁度の経時変化

今後、マイクロシスチン添加系による分解実験を行うこととし、作成した細菌懸濁液に印旛沼から採取し単離した *Microcystis* spp. を大量培養して得たマイクロシスチンを添加し、分解菌コンソーシアムによる分解除去率を検証する。今回の実験結果より、細菌群は 12 時間経過以降安定することが示されたため、添加実験では細菌群の増殖率と分解率について着目して検討を進める。また、マイクロシスチン含有培地にて集積培養を行い、平板培養にてコロニーを釣菌しマイクロシスチン分解菌の単離を試みる。単離菌による分解実験からマイクロシスチン分解速度を算出・解析し、印旛沼由来の分解菌コンソーシアムおよび単離菌のマイクロシスチン分解特性の変化や分解に関与する細菌群の分子生物学的解析等を行う。また先行研究よりマイクロシスチン分解は特定の菌による分解ではなく、複数種の菌による共代謝で成り立っていると考えられているため、単離した複数の細菌を組み合わせる様々なコンソーシアムを作成することにより、分解に作用する菌の組み合わせを検討することとする。

5. まとめ

- 1) アオコ発生の印旛沼において、マイクロシスチン-RR 173 $\mu\text{g/L}$ 、マイクロシスチン-LR 81.3 $\mu\text{g/L}$ が検出された。
- 2) 印旛沼から底泥を採取し、底泥由来細菌コンソーシアムの分離培養に成功した。
- 3) 細菌コンソーシアムの最大比増殖速度 (μ) は弱い超音波処理を施した 0 時間経過後から 6 時間経過後にて求めた 0.53/hrs、最大生菌数 (N_{max}) は強い超音波処理を施した 36 時間経過後の $1.4 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ となった。
- 4) 今後、分解菌コンソーシアムから分解菌を単離し、マイクロシスチン分解特性について比較解析を進める。

参考文献

- 1) 村上和仁、柏木良太、稲森隆平、稲森悠平、鈴木理恵、類家 翔：いさはや新池・諫早湾から分離したマイクロシスチン分解菌コンソーシアムの増殖・分解特性、第 56 回日本水環境学会年会講演集 (2022. 3.)
- 2) 村上和仁、稲森隆平、稲森悠平、類家 翔、鈴木理恵：いさはや新池・諫早湾由来の細菌コンソーシアムおよび単離菌によるマイクロシスチン分解特性の比較解析、日本水処理生物学会第 58 回大会講演要旨集 (2022. 11.)
- 3) Takeshi Saitou, Norio Sugiura, Tomoaki Itayama, Yuhei Inamori and Masatoshi Matsumura: Degradation characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura, Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA, Vol. 52, No. 1 (2003)