

### 第3章 大型淡水モデル池沼を用いた藍藻 *Microcystis* 属の消滅に果たす微小動物の捕食分解作用

#### 3-1 序

水域生態系の基礎生産者である藻類の増殖や消滅などの動態には、栄養塩類をめぐる各藻類の種間競争が深く関与していることが、実験的、理論的に示されてきた<sup>63),64)</sup>。しかしながら、現実の水域生態系においては、藻類に対する捕食者が存在し、捕食による調節作用が藻類の増殖や消滅に重要な因子として関係している<sup>65)</sup>。例えば、秋季の藍藻 *Microcystis* 属の急速な減少に関して、*Monas guttula* の捕食作用が重要な鍵になっている<sup>55)</sup>。したがって、富栄養化水域における *Microcystis* 属と *M.guttula* の捕食-被食関係とその動態についての知見を得ることは、優占化した *Microcystis* 属の増殖を *M.guttula* の捕食作用を利用して抑制する上で必須と考えられる。

これまで、動物プランクトンと藻類の捕食-被食関係を理解するために使われてきた古典的なモデルは、空間的に均一であると想定されてきた<sup>66)</sup>。実際に室内実験においても空間的に均一な系が用いられてきた<sup>54)-60)</sup>。しかし、自然水域では、光や温度などの物理的環境や各生物の増殖速度、個体数密度などの深さ方向に対する不均一性が大きい<sup>67)</sup>。さらに、藻類や動物プランクトンは浮上、沈降、対流拡散、走光性などに起因する動態があり鉛直分布はより複雑な構造を示す<sup>67),68)</sup>。例えば、藻類の増殖速度は光の透過する上層部で高く下層部で低い<sup>67)</sup>。とくに、本研究で着目した *Microcystis* 属は、細胞内にガス胞を有し<sup>69)</sup>、しかも、群体を形成するのでその比重はさらに軽くなり表層に浮上しやすい<sup>70)-73)</sup>。また、*Microcystis* 属が繁茂している水域はほとんど静止水塊である<sup>74)</sup>。

したがって、自然水域における *Microcystis* 属とその捕食者の相互関係を解明するためには、深さ方向の広がり、日周期、水塊の静止などの物理的環境条件を考慮した上で *Microcystis* 属の夏季から秋季にかけて起こる群体の分散化と *M.guttula* の捕食との関係に着目して実験を行い、解析する必要がある。

この場合、自然水域では気象条件などの制御不可能な因子が常に存在するの

で、詳細な動態を明らかにし、定量的仮説の立案や検証を行うことは極めて困難である。そのため、仮説の立案や検証のためには、制御された環境において実験を行う必要がある。

そこで、本章では、日周期、温度、照度などの制御ができる大型淡水モデル池沼を用いて富栄養化水域における *Microcystis* 属と *M.guttula* の捕食-被食関係とその動態を明らかにするために以下の 1) から 4) の事項を検討した。

- 1) 霞ヶ浦で増殖した *Microcystis* 属を用いて、秋季の *Microcystis* 属の群体の分散化と、分散化し単独になった細胞に対する *M.guttula* の捕食を確認する。
- 2) 秋季に *Microcystis* 属の群体が分散化したケースを自然水域で予想される深さ方向の不均一性、日周期、静止水塊などの環境条件を大型淡水モデル池沼でシミュレートし、*Microcystis* 属と *M.guttula* との捕食-被食関係の時間的-空間的動態を調べ、*M.guttula* の存在下での *Microcystis* 属時間的-空間的動態を明らかにする。
- 3) 2) と同様の環境条件下で、夏季に群体状の *Microcystis* 属が繁茂する水域を大型淡水モデル池沼でシミュレートし、*Microcystis* 属と *M.guttula* との捕食-被食関係の時間的-空間的動態を明らかにする。
- 4) *M.guttula* の増殖に有利と考えられる暗条件を大型淡水モデル池沼で設定し、*Microcystis* 属に対する *M.guttula* の捕食分解特性を明らかにする。

### 3-2 実験材料および方法

#### 3-2-1 湖沼で増殖した *Microcystis* 属の分解過程における *Monas guttula* の動態

##### 1) 大型淡水モデル池沼

本研究に用いたモデル池沼<sup>75),76)</sup>の概要を Fig.3-1 に写真を Photo3-1 示す。本

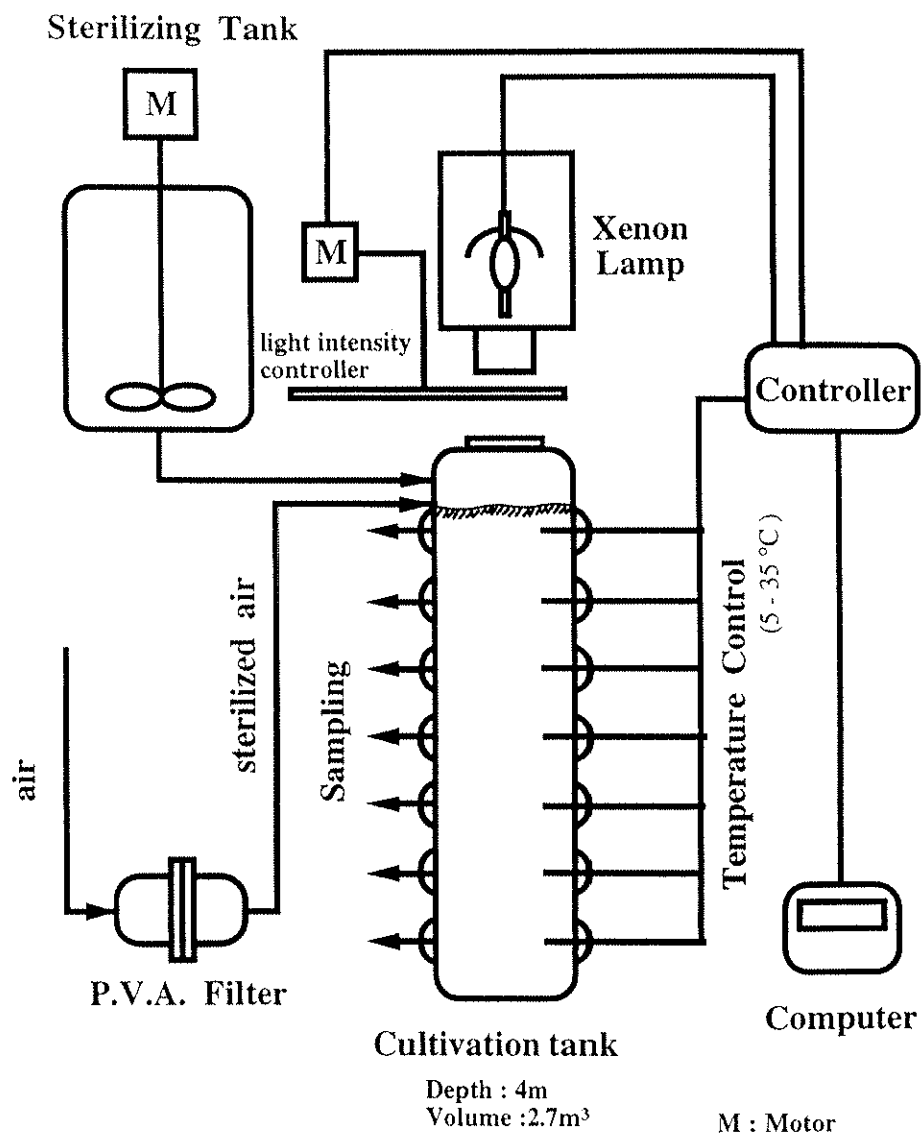


Fig.3-1 Schematic diagram of large scale lake simulator

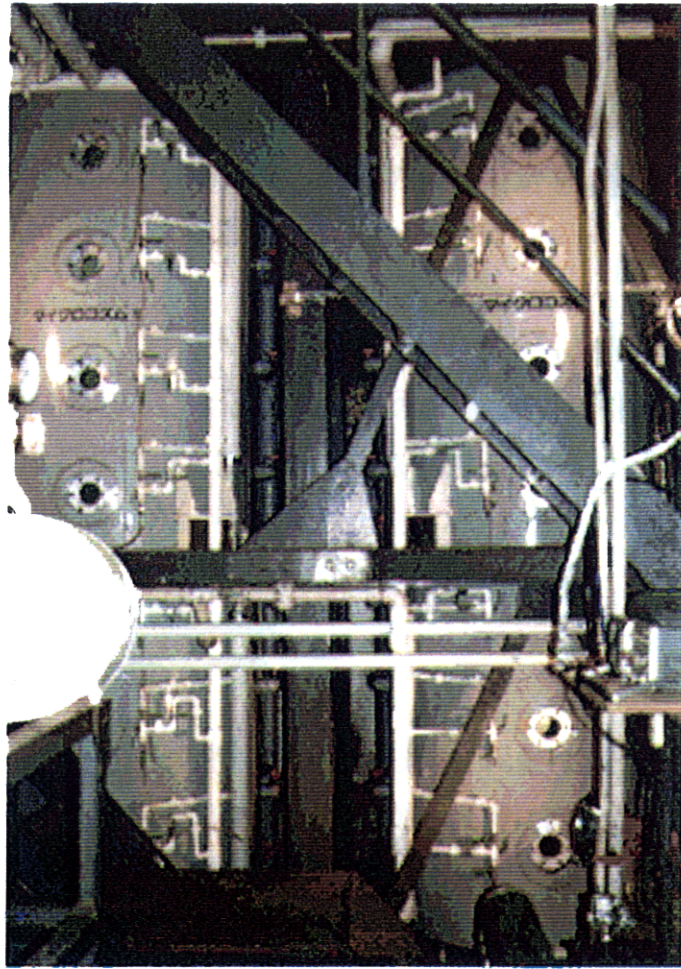


Photo.3-1 Large scale lake simulator



装置は池沼のシミュレーターとして開発されたパイロットプラントスケールの実験装置である。本体は高さ 4.0m、内径 0.95m の円筒型で外装部は鉄製、内装部はステンレス製のタンクで、深さ方向に 7 箇所の採水口が設置されている。また、内部は蒸気滅菌および除菌空気の供給により無菌状態に保持することができ、さらに、自然湖沼における温度、照度の条件設定を可能としている。なお、本体は国立環境研究所に 2 基設置されている。

## 2) 供試藻類

供試藻類には、1992 年 9 月 14 日に霞ヶ浦のアオコが集積していた土浦市の新川河口から湖水とともに採取した *Microcystis* 属を用いた。この時のアオコ形成種は *Microcystis aeruginosa* がほぼ 90% 以上を占め、その他は *Microcystis viridis* および *Microcystis flos-aquae* でいずれも群体を形成していた。

## 3) 実験方法

*Microcystis* 属を含んだ湖水を湖沼モデルに移送し、水量は 2.5m<sup>3</sup> (水深約 3.7m) とした。実験は、暗条件で水深 315cm の位置から表層に向けて無菌空気で緩やかに通気し、槽内の水を攪拌し均一にした。なお、本実験における設定水温は *Microcystis* 属の採取時と同様の 25℃ とした。

## 4) 測定項目

実験開始以後、経日的にモデル池沼内の水を槽の中央部から採水し、微小動物プランクトンの個体数を血球計算盤 (ERMA 社製) を用いて、光学顕微鏡 (Nikon 社製) で観察し計数した。pH は pH メーター (東亜電波社製 HM-30V 型) を DO (溶存酸素) は DO メーター (東亜電波社製 DDI-14 型) を用いて測定した。*Microcystis* 属のバイオマスは試水中のクロロフィル *a* 濃度で評価した。なお、クロロフィル *a* の抽出は、試料水をガラス繊維フィルター (Whatman 社製 GF/C) でろ過し、フィルター上にトラップした *Microcystis* 属をフィルターごと抽出管に入れ、90% メタノールを用いて行った。クロロフィル *a* 濃度測定は、抽出液中の懸濁物を取り除き、ダブルビーム分光光度計 (日立製作所製

150-20 型) を用い、750,665,640,630nm の波長の吸光度を測定し、次式により求めた。なお、この方法は西条の方法<sup>77)</sup>を一部改変したものである。

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\text{)} = (11.6D_{665} - 1.31D_{645} - 0.14D_{630}) \cdot f \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \quad (3-1)$$

$$f = (V/V_f) \cdot (1/L) \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \quad (3-2)$$

Chla : クロロフィル *a* ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )

$D_{665}$  = (665nm における吸光度) - (750nm における吸光度)

$D_{645}$  = (645nm における吸光度) - (750nm における吸光度)

$D_{630}$  = (635nm における吸光度) - (750nm における吸光度)

$V$  = 抽出液総量 (ml)

$V_f$  = 試水量 (l)

$L$  = セルの光路長 (cm)

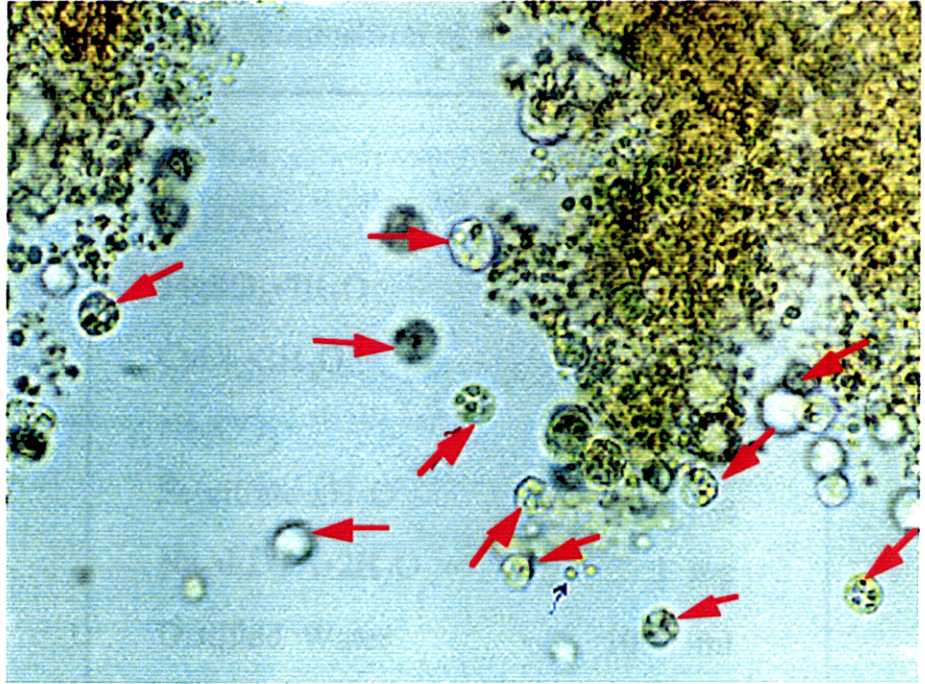
### 3-2-2 単独細胞の *Microcystis* 属と *Monas guttula* の系における捕食-被食の動態

#### 1) 供試微生物とその培養方法

供試藻類は単独細胞の藍藻 *Microcystis viridis* (NIES 102 株)<sup>78)</sup>を用い、供試微小動物は霞ヶ浦より分離した鞭毛虫 *Monas guttula* (Photo3-2) を用いた。

*M. viridis* の供試前の培養は M11 改変培地 (Table3-1) を用いて行った。培養手順は、まず、10L 容の耐熱ガラス容器に培地を 9L 作成し、オートクレーブで滅菌 (121°C、20min) した後、室温 (約 30°C) まで冷却し、無菌的に *M. viridis* を接種した。ついで、フィルター (0.2 $\mu\text{m}$ ) を通した除菌空気を 1L $\cdot\text{min}^{-1}$  の速度で容器の底部から曝気し、容器の外部から照度 2,000Lux の蛍光灯を 12 時間周期で照射し、温度 30°C で対数増殖期の後半である約 20 日目まで培養した。

一方、*M. guttula* の供試前の培養には、滅菌済み蒸留水 9L の入った 10L 容の耐熱ガラス容器に *M. viridis* (NIES 102 株) を乾燥重量で約 50mg $\cdot\text{l}^{-1}$  の濃度に懸濁させたものを用いた。培養は、この容器に *M. guttula* を無菌的に接種し、フィルター (0.2 $\mu\text{m}$ ) を通した除菌空気を 1L $\cdot\text{min}^{-1}$  の速度で容器の底部から曝気し、



40 $\mu$ m

Photo 3-2 Photomicrograph of microflagellate, *Monas guttula*

**Table 3-1 Composition of modified M11 medium**

NaNO <sub>3</sub>	100 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mg
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	75 mg
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	40 mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mg
Fe•citrate•xH <sub>2</sub> O	1 mg
Na <sub>2</sub> •EDTA•2H <sub>2</sub> O	1 mg
Distilled Water	1000 ml

\* Nitrogen : 16.5mg•l<sup>-1</sup>  
Phosphorus : 1.78mg•l<sup>-1</sup>

pH 7.5

温度 30℃、暗所にて最大個体数に達するまで行った。

## 2) 実験方法

*M.viridis* の培養はモデル池沼に模擬湖沼水として滅菌済み M11 改変培地を 2.4m<sup>3</sup> はり、前培養した *M.viridis* を初期濃度で 1.1mg・l<sup>-1</sup> 接種し、水面照度 50,000Lx、12hr の明暗周期、通気による攪拌、温度 27℃ の条件で行った。*M.viridis* の培養 16 日目 (*M.viridis* 乾燥重量 ; 16.5mg・l<sup>-1</sup>) に攪拌を止め、水流が停止したことを確認後、前培養した *M.guttula* を表層から 5×10<sup>8</sup> 個体接種し、光照射開始とともに実験を開始した。

## 3) 測定項目

測定項目は *M.guttula* 個体数、クロロフィル *a* 濃度、pH、DO とした。測定方法は 3-2-1 の 4) にしたがった。実験開始時から経時的に深さ方向 (45, 90, 135, 180, 225, 270, 315cm) に連続計測を行った。

### 3-2-3 群体形成 *Microcystis* 属と *Monas guttula* の系における捕食-被食の動態

#### 1) 供試微生物

供試藻類は 1993 年に霞ヶ浦から分離された *Microcystis aeruginosa* (群体形成株) を用いた。また、供試微小動物には *Monas guttula* を用いた。

*M. aeruginosa* の供試前の培養は 3-2-2 の 1) の *M.viridis* の培養方法にしたがった。ただし、培地組成の Fe・citrate・xH<sub>2</sub>O は 6mg・l<sup>-1</sup> に増量した。*M.guttula* の培養は 3-2-2 の 1) に従った。

#### 2) 実験方法

*M.aeruginosa* の大量培養は、モデル池沼に模擬湖沼水として滅菌済み M11 改変培地を 2.4m<sup>3</sup> はり (水深約 3.7m)、前培養した *M.aeruginosa* を初期濃度で 1.0 mg・l<sup>-1</sup> 接種し、水面照度 50,000Lx、12 時間の明暗周期、通気による攪拌、温度 27℃ の条件で行った。*M.aeruginosa* の培養 14 日目 (*M.aeruginosa* 乾燥重量 ;

14.0mg·l<sup>-1</sup>) に攪拌を止め、水流が停止したことを確認後、前培養した *M.guttula* を表層から 1.7×10<sup>8</sup> 個体接種し、光照射開始とともに実験を開始した。

### 3) 測定項目

測定項目は、*M.guttula* 個体数、クロロフィル *a* 濃度、pH、DO とした。測定方法は 3-2-1 の 4) にしたがった。上記項目について、実験開始時から経時的に深さ方向 (0~3, 180, 315cm) に連続測定を行った。

#### 3-2-4 *Monas guttula* による *Microcystis viridis* の捕食分解特性

##### 1) 供試微生物

供試藻類は単独細胞の藍藻 *Microcystis viridis* (NIES 102 株)<sup>78)</sup> を用い、供試微小動物は *M.guttula* を用いた。*M.viridis* および *M.guttula* の供試前の培養は 3-2-2 の 1) に従った。

##### 2) 実験方法

*M.viridis* の培養はモデル池沼に滅菌済み模擬湖沼水 (Table3-1) を 2.5m<sup>3</sup> はり、前培養した *M.viridis* を初期濃度で 1.1mg·l<sup>-1</sup> 接種し、水面照度 70,000Lx、12hr の明暗周期、通気による攪拌、温度 25℃ の条件で行った。培養 22 日目 (*M.viridis* 乾燥重量 ; 20.0mg·l<sup>-1</sup>) に照明を遮断し、温度を 20、25、30℃ のそれぞれに設定した。

なお、本実験では、モデル池沼の水深 30cm の位置から表層に向けて無菌空気を緩やかに通気して、池沼内を均一にした。つぎに、*M.viridis* が存在する 2 基のモデル池沼のうち一方を *M.guttula* 接種系、他方を対照系とし、実験開始時に表層から前培養した *M.guttula* を 4.8×10<sup>8</sup> 個体 (モデル池沼内の初期密度は 2×10<sup>2</sup>N·ml<sup>-1</sup>) 接種し実験を開始した。

##### 4) 測定項目

測定項目は、*M.guttula* 個体数、クロロフィル *a* 濃度、pH、DO、COD<sub>Mn</sub>、

microcystin とした。測定方法としては *M.guttula* 個体数、クロロフィル *a* 濃度、pH、DO、は 3-2-1 の 4) に、COD<sub>Mn</sub> の測定は下水試験法<sup>79)</sup> に従った。microcystin の定量分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>59)</sup> を用いて行った。分析条件は Table3-2 に示すとおりである。なお、分析試料の前処理は以下の方法で行った。まず、試料の懸濁成分を超音波で破碎した後、速やかに全量を SEP PACK カラム (Waters、ODS-C18) で分離した。次に、3ml の 100% メタノールでカラムから抽出し、その抽出物を 40℃ で蒸発乾固し、乾固物を 200μl のキャリヤーに溶解した。標準物質は *M.viridis* から抽出、精製した microcystin -RR を用いた。microcystin-YR、-LR については、クロマトグラム の 相 対 保 持 時 間 から 確 認 し た。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 湖沼で増殖した *Microcystis* 属の分解過程における *Monas guttula* の動態

新川河口で採取した湖水中の *Microcystis* 属のバイオマスは乾燥重量で 960mg·l<sup>-1</sup>、クロロフィル *a* では 5,400 μg·l<sup>-1</sup> であった。実験開始時の *Microcystis* 属は、いずれも群体を形成していた。しかし、2 日目から群体は徐々に崩壊し始め、単独となった細胞の割合が増加していた。8 日目には実験開始時のような群体状 *Microcystis* 属は、ほとんど認められなかった。クロロフィル *a* の変化を Fig.3-2 に示す。クロロフィル *a* は *Microcystis* 属のバイオマスを表す。その変化を見ると、8 日目には初期の約 50% に減少していた。実験を終了した 15 日目には、群体状 *Microcystis* 属およびその単独となった細胞もほとんど認められなかった。この時点のクロロフィル *a* は初期値のわずか 6% 程度に減少していた。

実験期間中に出現した微小動物の個体数変化を Fig.3-3 に示す。*Microcystis* 属の群体が崩壊し始めた 2 日目以後、主に出現が認められたのは鞭毛虫 *M.guttula* と縁毛類 *Vorticella* sp. であった。*M.guttula* の個体数の変化に着目すると、2 日目から 11 日目にかけて指数的に増殖している。このように *Microcystis* 属の減少とほぼ対応するように *M.guttula* が増殖したという点から、本実験系は霞ヶ浦で観察された事例と類似した動態を展開しているものと考えられた。この期間

**Table3-2 Conditions of HPLC for microcystin-RR analysis**

microcystin Standard	140 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Column	ODS ULTRON C <sub>18</sub> (Shinwa Chemical Ind, Ltd. )
Velocity	3 ml $\cdot\text{min}^{-1}$
Wave length for measurement	239 nm
Maximum peak	0.002 AUFS
Injection volume of samples	20 $\mu\text{l}$
Carrier	25 % acetonitrile 20 mM ammonium acetate



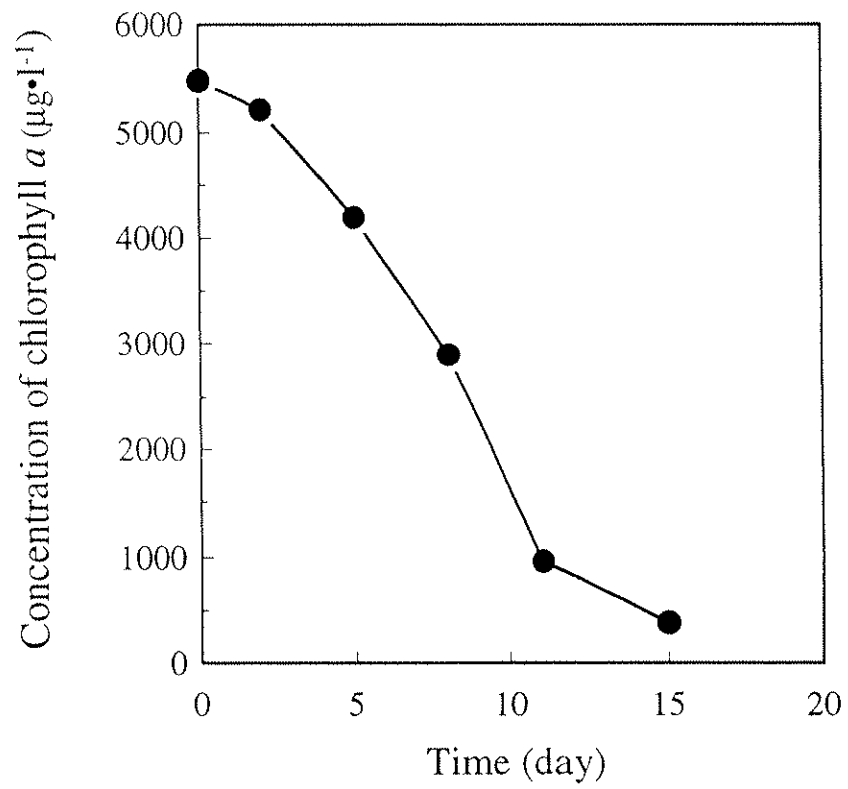


Fig.3-2 Time course of chlorophyll *a* in large scale lake simulator

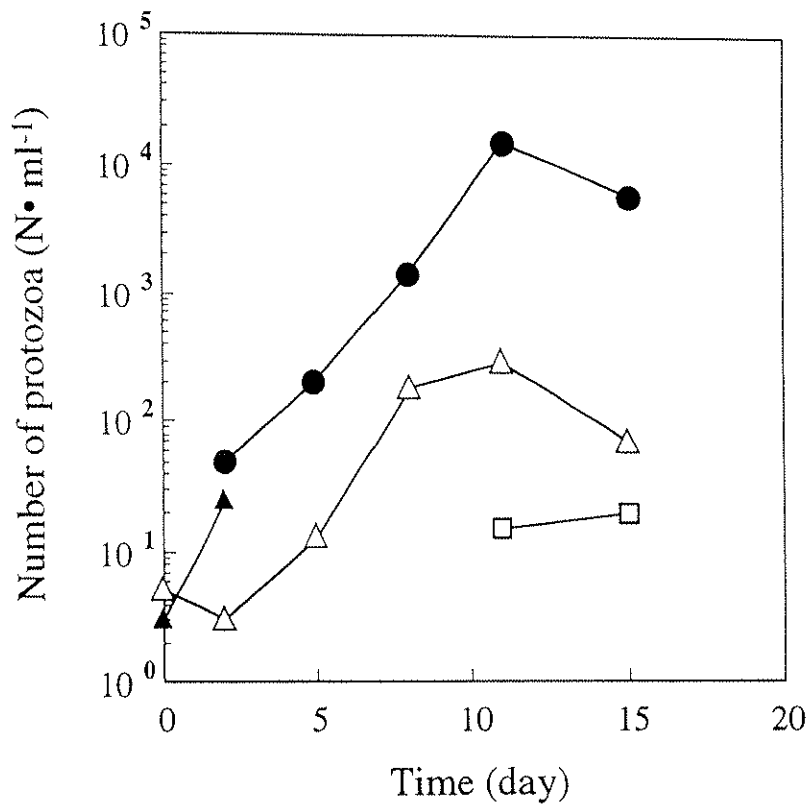


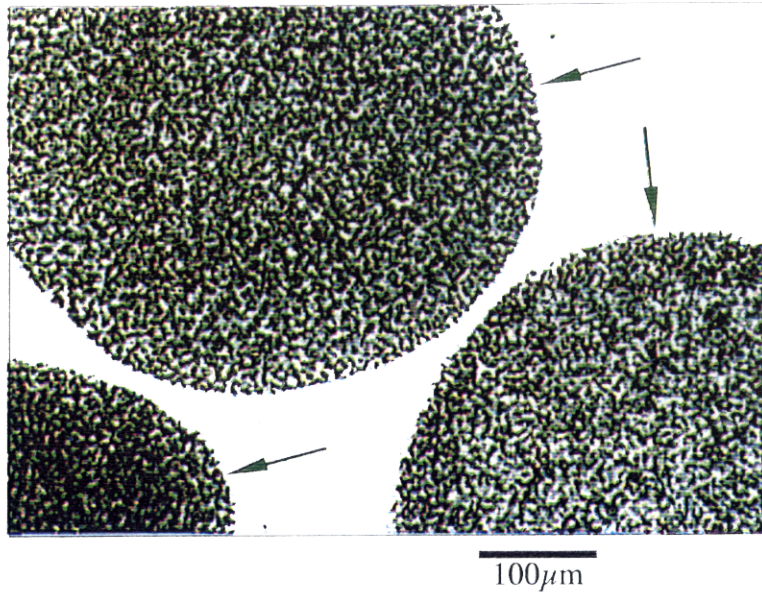
Fig.3-3 Variation of protozoa in large scale lake simulator

●—● *Monas guttula*      △—△ *Vorticella* sp.  
 ▲—▲ *Aspidisca* sp.      □—□ *Oxytricha* sp.

の *M.guttula* の体内を顕微鏡観察したところ、*M.guttula* 1 個体あたり *Microcystis* 属の細胞が  $4\sim 6\text{cell}\cdot\text{body}^{-1}$  存在していることが確認された。また、*M.guttula* と並行して *Vorticella* sp. の増殖も認められたが、*Vorticella* sp.の体内に *Microcystis* 属の細胞は観察されなかった。したがって、本実験系で出現した微小動物で *Microcystis* 属を捕食するのは *M.guttula* のみであることがわかった。

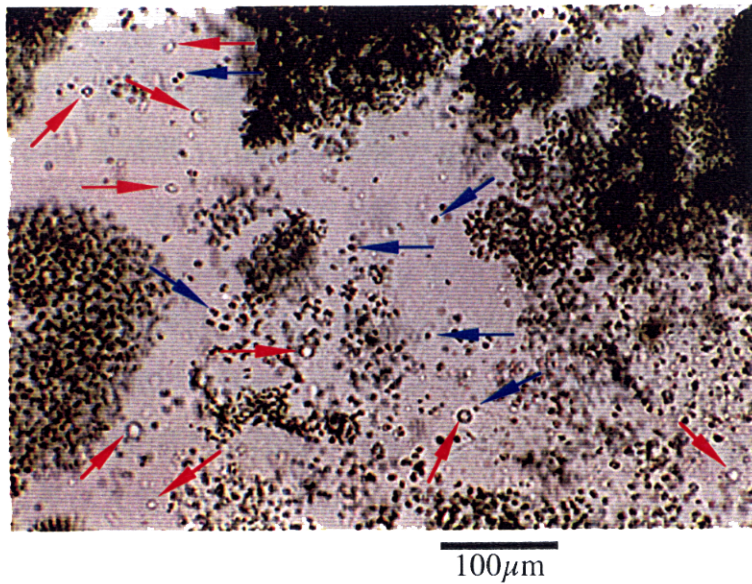
実験開始時の *Microcystis* 属および実験 5 日目の *Microcystis* 属と *M.guttula* の顕微鏡下での様子を Photo3-3 に示す。実験開始時の群体状 *Microcystis* 属に対し、実験 5 日目には *Microcystis* 属のほとんどが単独の細胞となり、その細胞のまわりに *M.guttula* が多数存在している様子が確認された。これらのことから、本実験系において *Microcystis* 属が減少したプロセスとして *Microcystis* 属の群体の単独細胞化および単独となった細胞の *M.guttula* による捕食であることが推察された。また、クロロフィル *a* の減少 (Fig.3-2) と *M.guttula* の増殖の関係 (Fig.3-3) は、回分培養において単独細胞の *Microcystis* 属を食物源としたときの *M.guttula* の典型的な被食-捕食関係のパターン<sup>54),55)</sup> とよく一致した。このことから、*Microcystis* 属が減少する過程において *Microcystis* 属の群体の単独細胞化および単独となった細胞の *M.guttula* による捕食は速やかに進行していたと考えられる。ここで、群体がどのような機構で単独細胞になるかは不明であるが、本実験より群体の単独細胞化に関して次の仮説が立てられた。一つは、*M.guttula* が *Microcystis* 属の群体を単独細胞に分散化すること、他には、*Microcystis* 属の自己分解や細菌類による分解作用が群体の崩壊を促進することなどが考えられた。もし、*M.guttula* の捕食と増殖に対して *Microcystis* 属の群体形成が障害となるならば、群体の単独細胞化に関する知見を得る必要がある。さらに、自然界においては日照があるため、*Microcystis* 属の増殖とそれによる水域の高 pH 化が *M.guttula* の増殖に不利な環境を形成することが予想される。したがって、実水域での *Microcystis* 属に対する *M.guttula* の捕食作用の基礎的知見を得るためには、*Microcystis* 属の群体形成や実水域の環境条件を考慮したモデル実験を行い解析する必要がある。

(a) at 0 day



← Colony forming *Microcystis*

(b) after 5 days



← *Monas guttula*

← Dispersed single viable cell of *Microcystis*

Photo 3-3 Photomicrograph of *M.guttula* preying on dispersed single viable cells of *Microcystis* at 5days

### 3-3-2 単独細胞の *Microcystis* 属と *Monas guttula* の系における捕食-被食の動態

実験期間中、*M. viridis* の増殖に必要な窒素およびリン濃度は各々  $\text{NO}_3\text{-N}$  として  $12.3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  として  $1.4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  存在していた。一方、本実験系において *M. guttula* の増殖に必要な DO (溶存酸素) は常に  $3.7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  以上存在した。また、本実験と同一条件下での *M. viridis* の単独培養では、今回の実験期間、すなわち *M. guttula* を接種した 16 日目から 19 日目の期間は、*M. viridis* は増殖期間であった。また、*M. guttula* の増殖を阻害すると考えられるアンモニア性窒素の増加は認められなかった。

#### 1) 明期 1 (0~12hr) における動態

クロロフィル *a*、*M. guttula* の個体数および pH の変化を各々 Fig.3-4a, Fig.3-4b, Fig.3-4c に示す。ここで、クロロフィル *a* は *M. viridis* のバイオマスと比例することからクロロフィル *a* を *M. viridis* のバイオマスと定義した。また、0~12hr を明期 1、12~24hr を暗期 1、24~36hr までを明期 2、36~48hr までを暗期 2、48~60hr までを明期 3、60~72hr までを暗期 3 とした。

Fig.3-4a より、明期 1 におけるクロロフィル *a* は光が透過する 45~135cm の上層部で増加し、藻類自身により光が遮蔽されている 180~315cm の下層部ではほぼ一定値を示し、増加は認められなかった。この期間の pH は、上層部では光合成時に  $\text{CO}_2$  が吸収されるため、表層付近の 45cm で著しく上昇し 10.5 に達した。pH の上昇は光合成速度の増加を示すもので、*M. viridis* の増殖は表層付近で活発に進行していることがわかった。この表層での著しい pH の上昇は、*M. guttula* の増殖を抑制する条件である<sup>56)</sup>。一方、水深 45cm 以下では pH はさほど上昇せず、*M. guttula* は *M. viridis* を食物源として増殖した。ただし、初期の各層の *M. guttula* 個体数密度の大きな変化 (Fig.3-4b) には、接種した表層からの移動の影響があった。また、*M. guttula* 個体数密度は低いので、*M. viridis* に対する捕食量は少なく、ここでは主に被食者である *M. viridis* 単種の動態が顕著に現れていたと考えられる。Fig.3-4a に示した結果から、上層部の、45cm, 90cm の水深では 0~12hr の間でクロロフィル *a* の顕著な増加が見られ、光合成速度

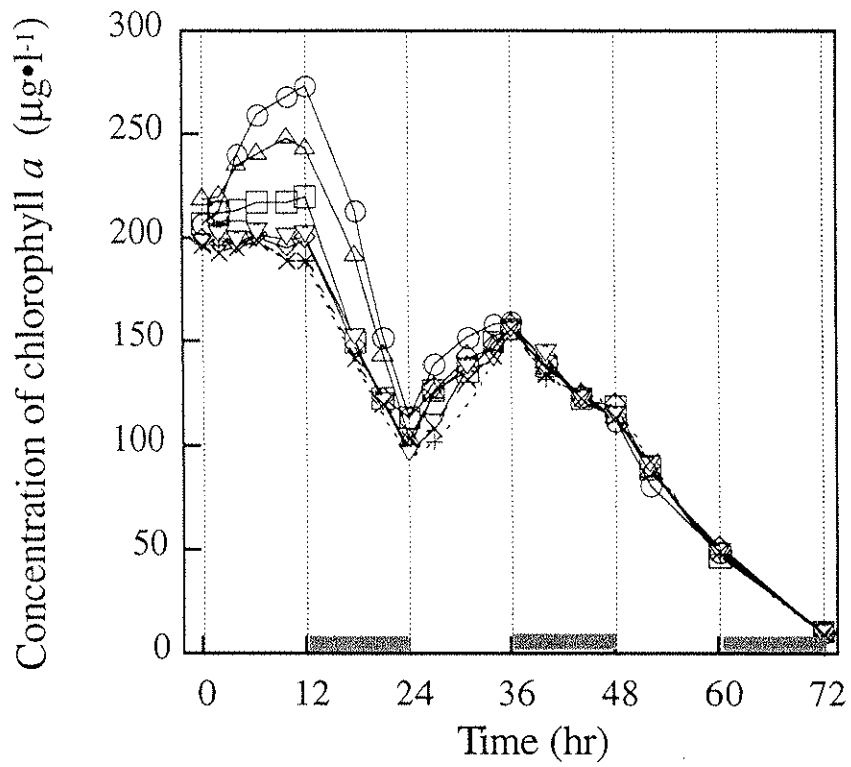
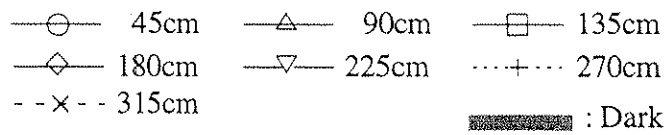


Fig.3-4a Change of chlorophyll *a* in large scale lake simulator



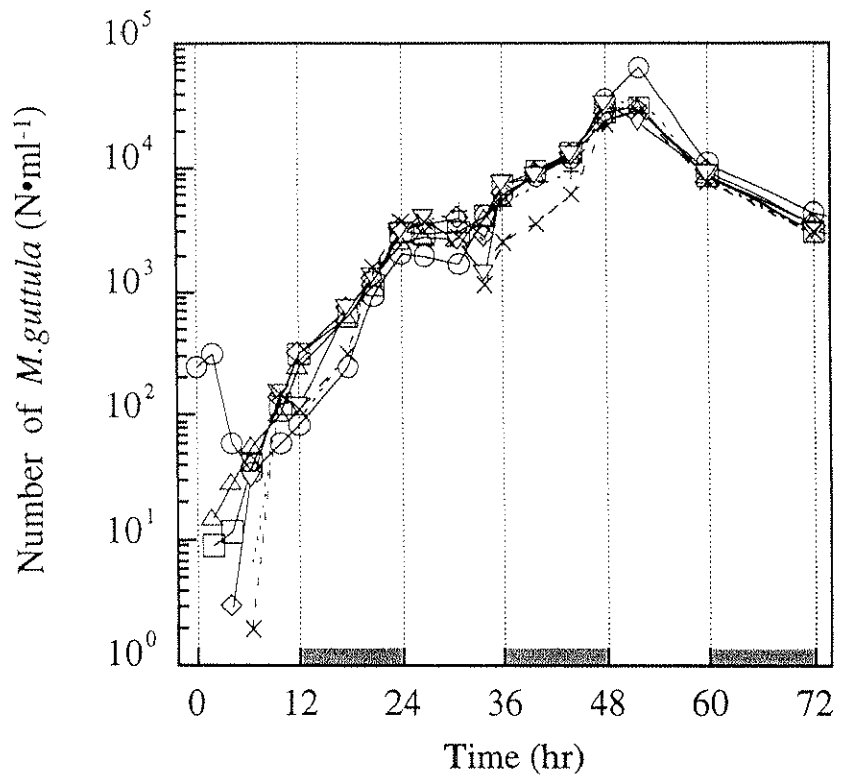
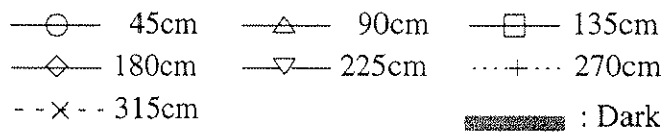


Fig. 3-4b Changes of *M. guttula* in large scale lake simulator



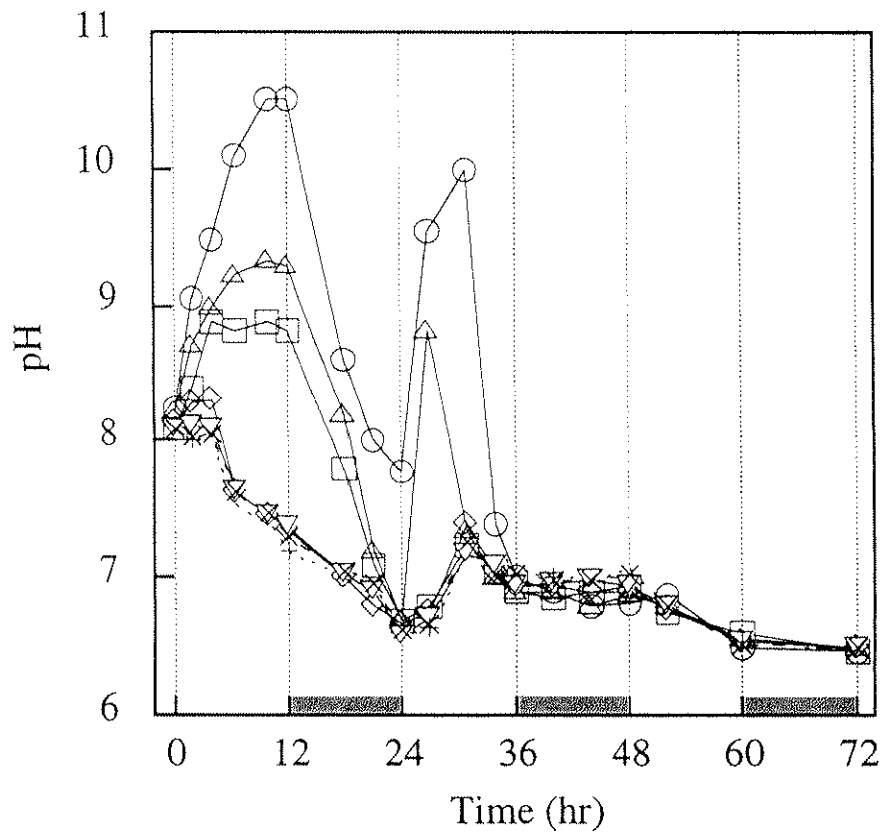
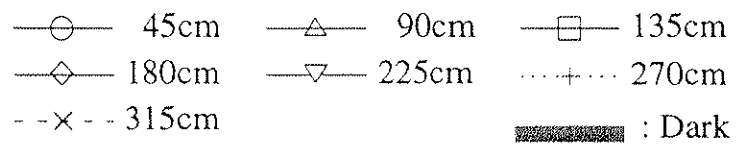


Fig. 3-4c Change of pH in large scale lake simulator





の指標となる pH も 9.0 以上に増加していた (Fig.3-4c)。一方、光の自己遮蔽効果により、水深 135cm ではクロロフィル *a* の増加量は少なく、pH も約 8.7 程度にとどまっていた。180cm より深い層ではクロロフィル *a* の増加はほとんど認められず、また pH も 4hr までは 8 程度と一定であったので、180cm より深い層では、光合成に十分な光は到達していないと考えられる。さらに 6hr 以後では、180cm より深い層で pH は 7.5 以下まで急速に低下した。これは下層に移動した *M.guttula* の呼吸による CO<sub>2</sub> 量の増加が主な原因と考えられた。

## 2) 暗期 1 (12~24hr) における動態

Fig.3-4a, Fig.3-4b によると、暗期 1 ではクロロフィル *a* は各層ともに速やかに減少し、同時に、*M.guttula* は各層で増加した。このことは、*M.guttula* による *M.viridis* の捕食が活発に行われていることを示している。また *M.guttula* の空間分布は Fig. 3-4b に示されているように、暗期 1 の開始時点では *M.guttula* は表層付近の 45cm と底層付近の 225~315cm で少なく 90~180cm で多い。しかし、暗期 1 の終わり (明期 2 の始まり) の時点では *M.guttula* は 45cm の表層から底層へ向かって増加する傾向であった。以上のことをより明確にするために、暗期の開始直後 (12hr) と暗期終了直前 (24hr) の時点における鉛直方向に対するクロロフィル *a* の分布を Fig.3-5a に示し、Fig.3-5b には暗期 1 (12~24hr) における *M.guttula* の増加率の鉛直分布を示した。

Fig.3-5a より、暗期の開始直後 (12hr) の時点で、クロロフィル *a* は表層で多く、深くなるにつれて減少し、180cm より下層ではほぼ一定となった。この鉛直分布は、前の明期において、表層部で *M.viridis* の増殖が多く下層部で光の自己遮蔽により増殖が少なかったため形成された。一方、暗期 1 の終了時点 (24hr) では、*M.guttula* が *M.viridis* を捕食した結果、クロロフィル *a* は各層とも減少しその分布はほぼ一様になった。Fig.3-5b によると、捕食に伴う *M.guttula* の増加率は、食物源となる *M.viridis* が最も多い水深 45cm では約 6.6d<sup>-1</sup> となったが、水深 90cm、135cm、180cm では徐々に低下し 4.5d<sup>-1</sup> 程度となった。しかし、*M.viridis* がさらに少ない水深 225cm、270cm、315cm で再び増大し、それぞれ 6.4d<sup>-1</sup>、7.1d<sup>-1</sup>、7.2d<sup>-1</sup> となった。このことは *M.viridis* と *M.guttula* の被食-捕食に

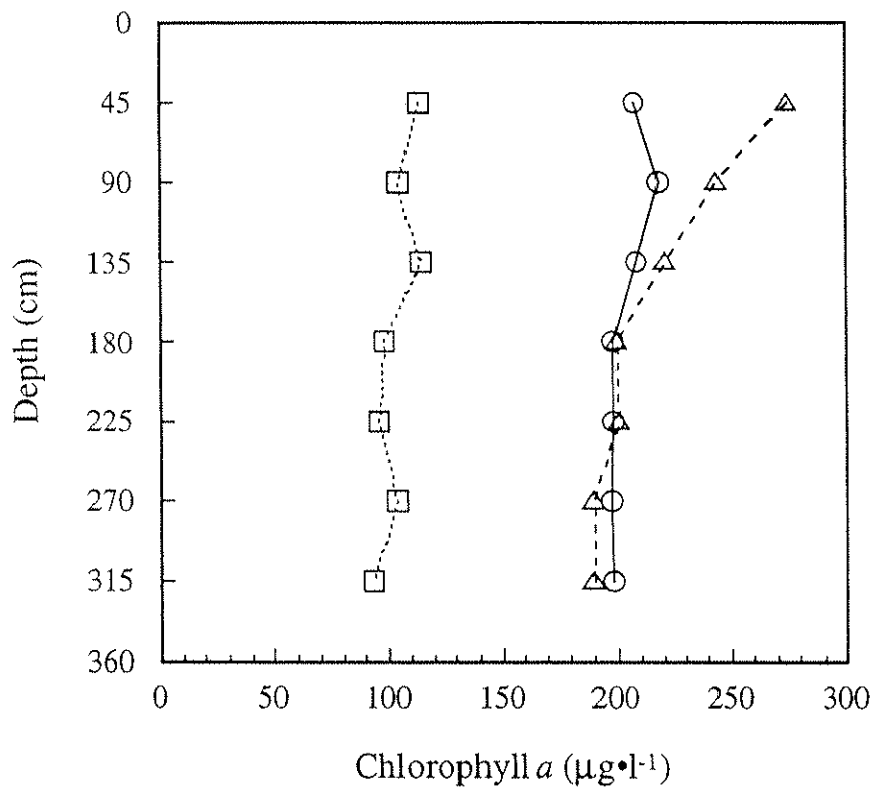


Fig. 3-5a Distribution of chlorophyll *a* in large scale lake simulator at 12 hr and 24 hr

—○— 0hr    -△- 12hr    ···□··· 24hr

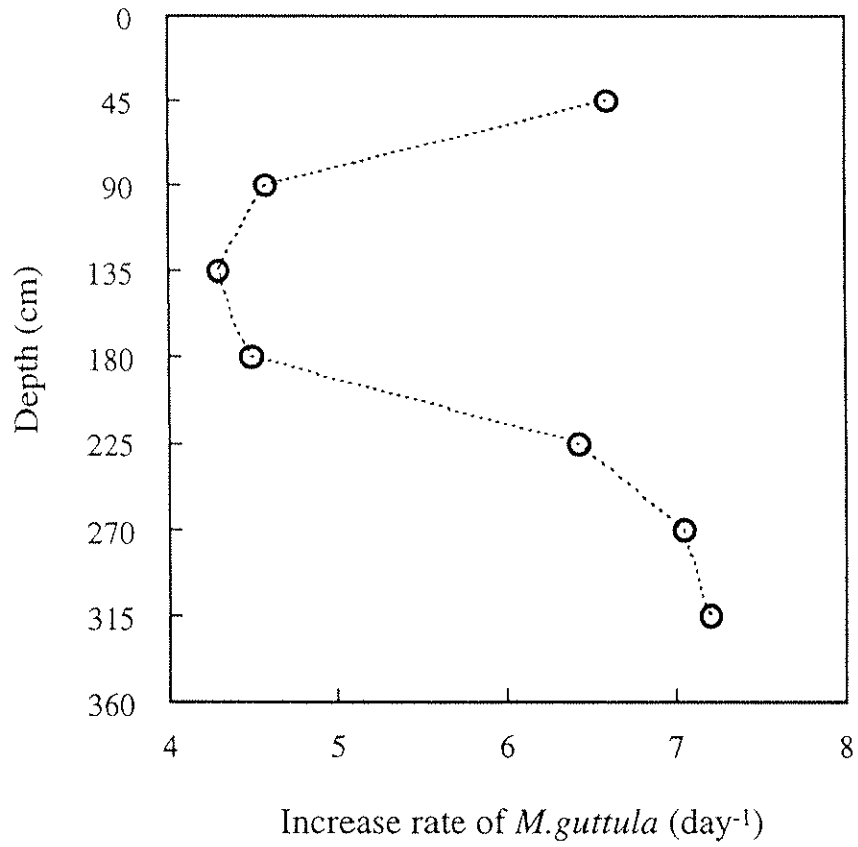


Fig. 3-5b Increase rate of *M.guttula* in the large scale lake simulator from 12 hr to 24 hr

基づく議論からでは下層（225～315cm）での *M.guttula* の増加速度の増大を説明することができない。この原因として、表層で増殖した *M.guttula* の沈降および高 pH となった表層からの回避による底層への移動が考えられた。

捕食者の増加率に影響を及ぼす因子としては、食物源密度や種々の増殖抑制因子が考えられる。食物源密度と捕食者の増殖率は正の相関を示す。また、食物源と捕食者に空間分布がある場合では、食物源に対する捕食者の走性も局所的な捕食者の増加速度に大きな影響を与える。*M.guttula* に対する増殖抑制因子として、表層での *M.viridis* の光合成に伴う高い pH が考えられる。さらに高い pH は *M.guttula* に対する負の走性の原因とも成りうる。明期 1 では、とくに表層部での高い pH で *M.guttula* の増殖が抑制され、さらに、次の暗期 1 でも表層部は初期に pH が高かったため、*M.guttula* は抑制を受けたはずである。しかし、実験の結果、水深 45cm の増加速度はその下層よりも高い値を示した (Fig.3-5b)。このことは、*M.guttula* の増殖に不利となる pH10 という条件と増殖に有利となる食物源密度の高い条件が同時に形成されたなかで、*M.guttula* の増殖が高 pH による抑制を上回ったためと解釈できる。しかも、後の暗条件では *M.viridis* および自己の呼吸による pH の低下も *M.guttula* の増殖に有利に展開されたと考えられた。

### 3) 明期 2 (24～36hr) における動態

各水深におけるクロロフィル *a* の経時変化を Fig.3-6a に示す。暗期 1 で *M.viridis* は *M.guttula* により捕食された結果、明期 2 の開始時点でのクロロフィル *a* は明期 1 の開始時点の約 50% に低下したが、各層ともに増加した。水深 45cm～180cm では、24～27hr における増加率が 27hr～31hr の増加率よりも大きく、底層に近い 225～315cm の深さではこの逆の傾向を示した。

各水深における pH の経時変化を Fig.3-6b に示す。*M.viridis* の増殖にとって、光が十分に達する水深 45cm では、明期 2 の初期の 24hr の時点で、pH は 7.8 であったが光合成が開始されると pH は上昇し、27hr の時点で 9.6 に達した。さらに、31hr の時点では pH は 10 まで上昇した。しかし、その後 pH は 7.0 まで低下した。水深 90cm においても、24hr の時点で pH は 6.7 であったが、27hr の

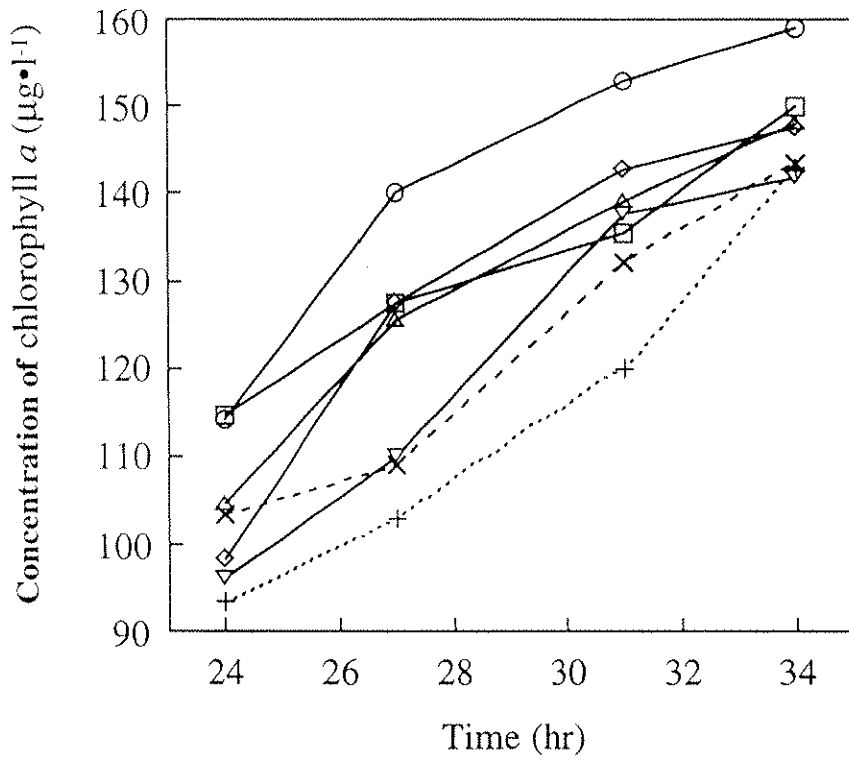


Fig. 3-6a Chlorophyll *a* for light period 2 at each depth in large scale lake simulator

—○— 45cm      —△— 90cm      —□— 135cm  
 —◇— 180cm    —▽— 225cm    - - × - - 270cm  
 ···+··· 315cm

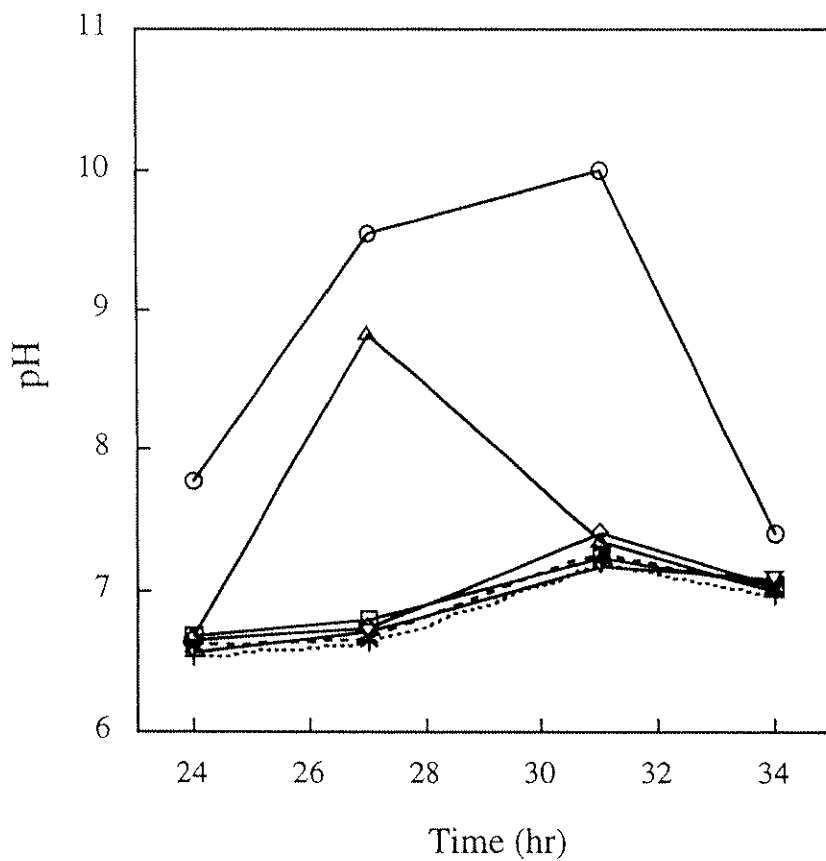
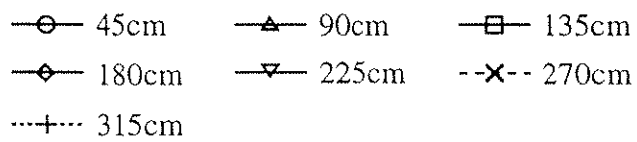


Fig. 3-6b pH for light period 2 at each depth in large scale lake simulator



時点では 8.8 に上昇し、31hr の時点で 7.4、34hr の時点では 7.0 に低下した。

このように *M. viridis* の光合成活性を示す pH は水深 45cm と 90cm のみで顕著に上昇しており、水深 135cm 以下では、pH は上昇していなかった。一方、クロロフィル *a* の時間変化が示すように、各層ともに *M. viridis* は増加していた。このことから、*M. viridis* の増殖は表層付近で起こり、下層のクロロフィル *a* の増加は表層で増殖した *M. viridis* の沈降によるものと考えられる。

各水深における *M. guttula* の個体数の経時変化を Fig.3-6c に示す。*M. guttula* の個体数密度は 24hr の時点で下層に向かって高かった。この時点からの *M. guttula* の時間的变化を見ると、水深 45, 90, 135cm では、31hr までさほど変化はなかったが、31~34hr の間で増加が認められた。とくに、水深 45cm では急激な増加を示した。光合成活性が低く pH が上昇していない水深 180cm および 270cm では、31hr まで増加したが、その後減少した。また、水深 225cm では、27hr まで増加した後、27~34hr では減少した。水深 315cm では 27hr までの変化はなかったが、27~34hr の間で急激に減少した。

この期間の *M. guttula* の動態をより詳細に検討するために、各水深における *M. guttula* の個体数の 27~24hr, 31~27hr, 34~31hr の差分をそれぞれ水深に対してプロットした (Fig.3-7)。*M. guttula* は明期 2 の 24~27hr では、水深 45cm~180cm および 315cm では各層とも増加せず、225cm、270cm の各層では明期 2 の初期の個体数に比べ  $800\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$  程度の増加が認められた。これは、表層から 45cm, 90cm の深さでは pH が 9.0 程度まで上昇していたため、この高い pH により増殖が抑制されたものと考えられた。しかしながら、その下層の 135cm, 180cm, 315cm では pH は増殖抑制が生じるほど上昇していなかった。この抑制要因としては pH の上昇以外の原因を考慮する必要がある。27hr~31hr の間では、24hr~27hr と同様に 45cm~180cm の各層はさほど変化していない。底層付近の水深 225cm と 315cm では大きく減少に転じている一方、水深 270cm では増加していた。31hr~36hr においては、45cm, 90cm, 135cm の深さで *M. guttula* は増加し、180cm~315cm では減少を示していた。27~34hr の *M. guttula* 個体数の全層での平均密度の変化は  $\pm 200\text{N}\cdot\text{ml}^{-1}$  以内であったので、この期間の各層の個体数の変化は、主に *M. guttula* の移動とみなすことができる。とくに、31~34hr に

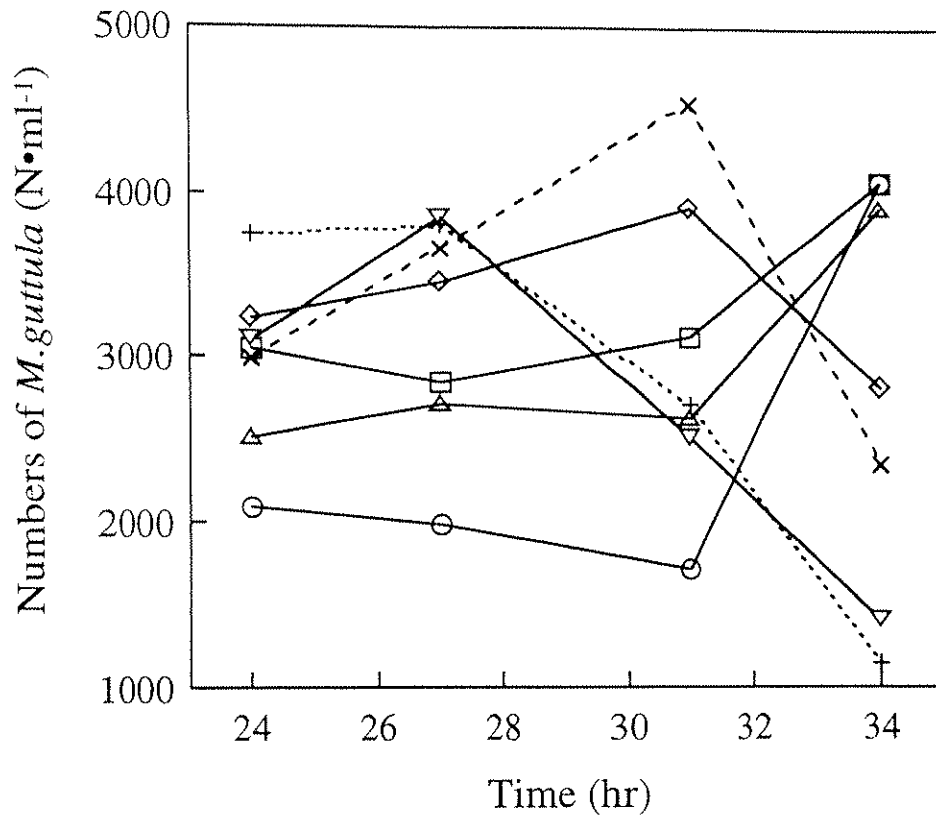


Fig. 3-6c Change of *M. guttula* for light period 2 at each depth in large scale lake simulator

—○— 45cm      —△— 90cm      —□— 135cm  
 —◇— 180cm    —▽— 225cm    --X-- 270cm  
 ....+.... 315cm



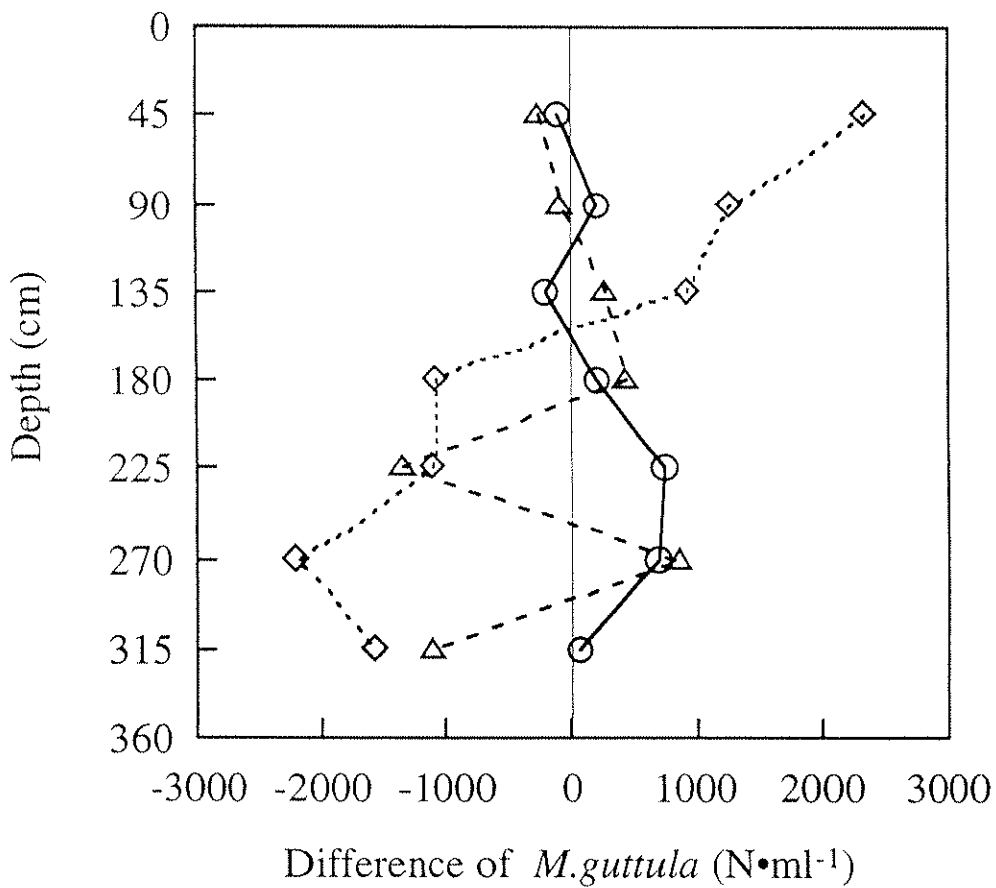


Fig. 3-7 Difference of *M.guttula* between each sampling time for light period 2 at each depth in large scale lake simulator

—○— between 24hr~27hr      - -△ - - between 27hr~31hr  
 ...◇... between 31hr~34hr

においては、*M.guttula* の増減個体数が表層から底層に向かってほぼ単調に増加から減少に変化していることから、*M.guttula* は下層から上層へ移動していると判断される。

明期 2 においても、初期 (24~31hr) には、表層での高い pH (9.5~10) により、*M.guttula* の増殖が抑制されていたと考えられる。とくに、表層ではこの抑制が強いにもかかわらず、*M.guttula* は後期には上層に向かって移動している。この移動は、下層から上層に向かい *M.viridis* のバイオマスが多くなるという密度勾配が形成されることから、*M.guttula* の食物源に対する正の走性であることが示唆された。また、31hr~36hr の間に水深 45cm で pH が急速に低下したのは、この移動により表層付近で増加した *M.guttula* の呼吸で放出された CO<sub>2</sub> 量が、*M.viridis* の光合成で吸収された CO<sub>2</sub> 量より多かった、すなわち、*M.viridis* の増殖より *M.guttula* の捕食と増殖が優位となったことが原因であると考えられる。pH が低下すると、*M.guttula* への高 pH による抑制作用が緩和されるので、*M.viridis* が増殖する表層付近でも *M.guttula* の増殖が活発となる。結局、この pH の低下は、*M.guttula* の個体数の増加に対する正のフィードバック作用として捉えることができる。

### 3) 暗期 2 (36hr~48hr) ,明期 3 (48hr~60hr) ,暗期 3 (60hr~72hr) における動態

Fig.3-4a より、各層ともにクロロフィル *a* は減少していた。暗期 2 では、*M.guttula* は各層とも活発に増殖していた (Fig.3-4b) 。したがって、このクロロフィル *a* の減少は明らかに *M.viridis* を *M.guttula* が捕食したためである。明期 3 (48hr~60hr) におけるクロロフィル *a* の減少は、*M.guttula* の個体数が 10<sup>4</sup>N・ml<sup>-1</sup> 程度と多いので、*M.viridis* の増殖を上回る捕食圧が作用したためであると考えられる。*M.guttula* は明期 3、暗期 3 で減少していた。これは、10<sup>4</sup>N・ml<sup>-1</sup> もの *M.guttula* の個体数を維持するだけの食物源がなかったことが原因であると考えられた。

結局、*M.guttula* は温度 27℃、照度 50,000Lx (12 時間の明暗周期) という *M.viridis* が活発に増殖できる条件下において、実験開始時の *M.viridis* の単独細胞に比べて 95% 以上を 3 日間で捕食することがわかった。

### 3-3-3 群体形成 *Microcystis* 属と *Monas guttula* の系における捕食-被食の動態

#### 1) 明期 1 [0~12hr] における動態

実験期間中、*M.aeruginosa* の増殖に必要な窒素およびリンは増殖制限にならない量存在していた。一方、本実験系において *M.guttula* の増殖制限因子として考えられる DO は十分に存在し、*M.guttula* が正常に増殖できる条件であった。

*M.guttula* の個体数、クロロフィル *a* および pH の変化を各々 Fig.3-8a, Fig. 3-8b, Fig. 3-8c に示す。ここで、クロロフィル *a* は *M.aeruginosa* のバイオマスと比例することからクロロフィル *a* を *M.aeruginosa* のバイオマスと定義した。また、0~12hr を明期 1、12~24hr を暗期、24~30hr を明期 2 とした。

Fig. 3-8b より、明期 1 におけるクロロフィル *a* は 0~3cm の表層部で増加し、180cm では、6 時間目まではほぼ一定で、12 時間目には減少した。315cm では、6 時間目、12 時間目のいずれも減少が認められた。0 時間目、6 時間目、12 時間目の鉛直方向におけるクロロフィル *a* の分布変化を Fig.3-9a に示す。0 時間目から 12 時間目の間の下層部での減少率と上層部の増加率とを比較すると下層部での減少率よりも上層部での増加率が高い。ここで、*M.guttula* の個体数変化 (Fig.3-8a) を見ると、*M.guttula* は急激に減少しているので *M.aeruginosa* の捕食による減少は考えられない。この期間の pH の変化 (Fig.3-8c) を見ると、上層部では 0 時間目の 9.5 から 12 時間目には 10.6 に上昇した。Gerloff ら<sup>80)</sup>によると *Microcystis* 属の最大成長が得られる pH は 10 付近であり、この時の成長速度は pH7 の時の 10 倍になることを報告している。以上のことから、明期 1 における *M.aeruginosa* の動態は、浮上による表層部への移動と上層部での光合成による増殖が活発に進行したものと推定できる。

一方、*M.guttula* の動態としては、*M.guttula* の初期個体数は水深 0~3cm で 68 N•ml<sup>-1</sup>、180cm で 56 N•ml<sup>-1</sup>、315cm では 63 N•ml<sup>-1</sup>であったが 6 時間目には、いずれの水深でも 10 N•ml<sup>-1</sup> 程度に減少した。6 時間目から 12 時間目にかけては、6 時間目とほぼ同じ個体数で存在していた。この *M.guttula* の急速な減少は、実験開始時に pH9.4 の高 pH 条件下に曝露されたことと、*M.aeruginosa* を捕食していないために増殖できないということがあげられる。杉浦ら<sup>57)</sup>は、暗条件下

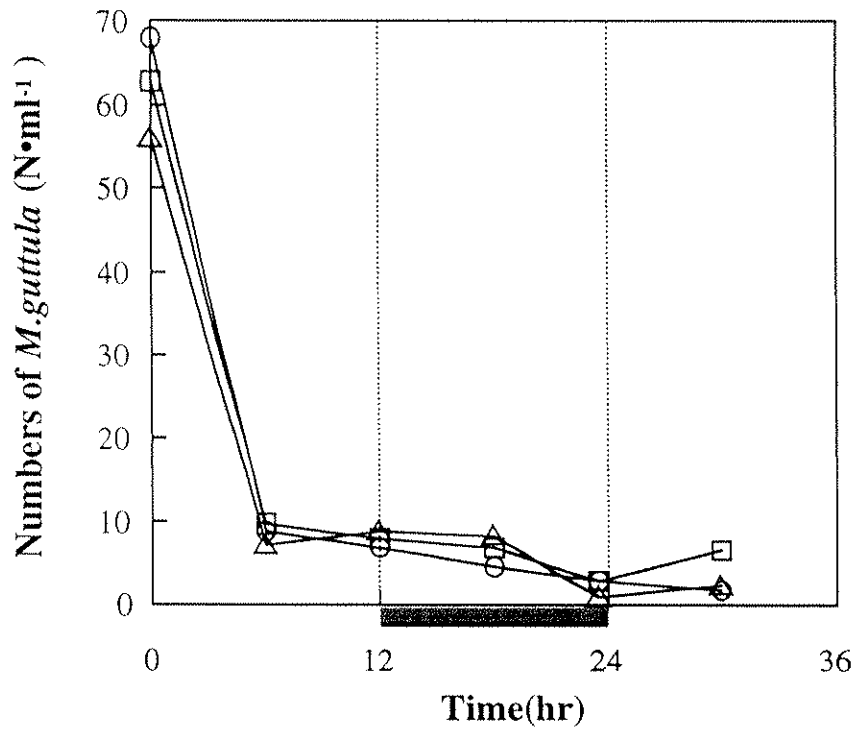


Fig.3-8a Change of *M.guttula* in large scale lake simulator

○—○ 0~3cm      △—△ 180cm      □—□ 315cm  
 ■ Dark

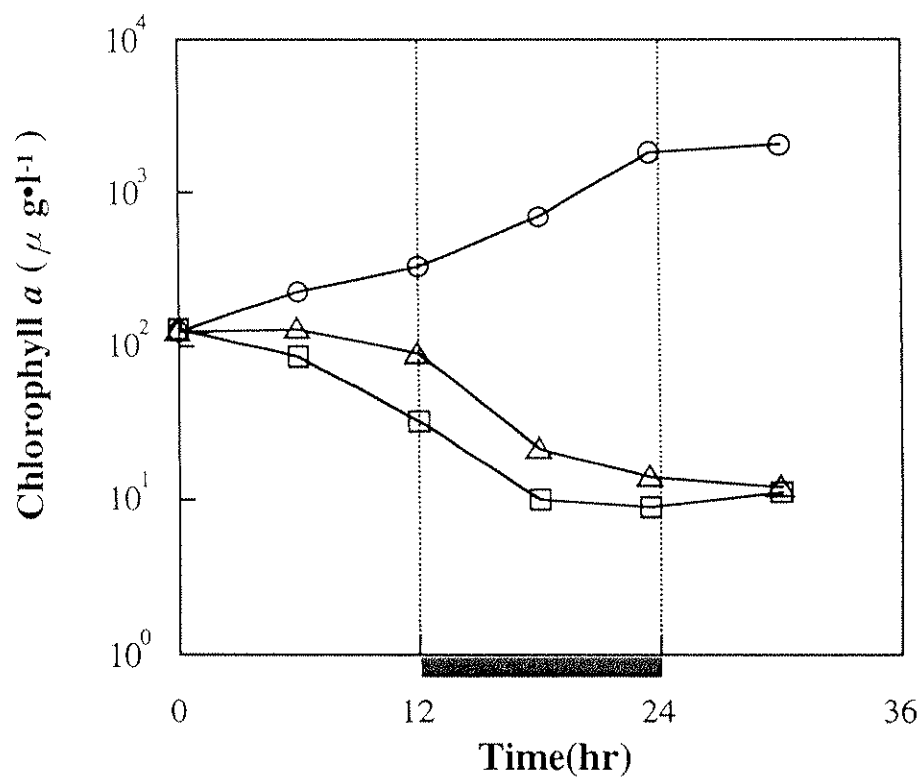


Fig.3-8b Change of chlorophyll *a* in large scale lake simulator

○—○ 0~3cm    △—△ 180cm    □—□ 315cm  
 ■ Dark

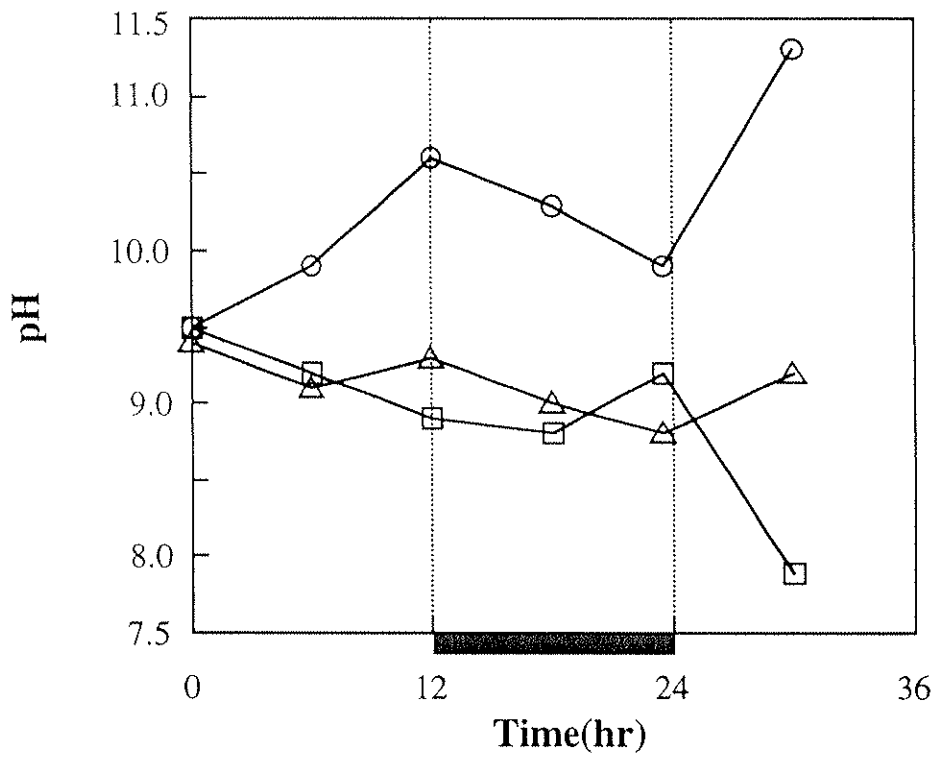


Fig.3-8c Change of pH in large scale lake simulator

○—○ 0~3cm      △—△ 180cm      □—□ 315cm  
 ■ Dark

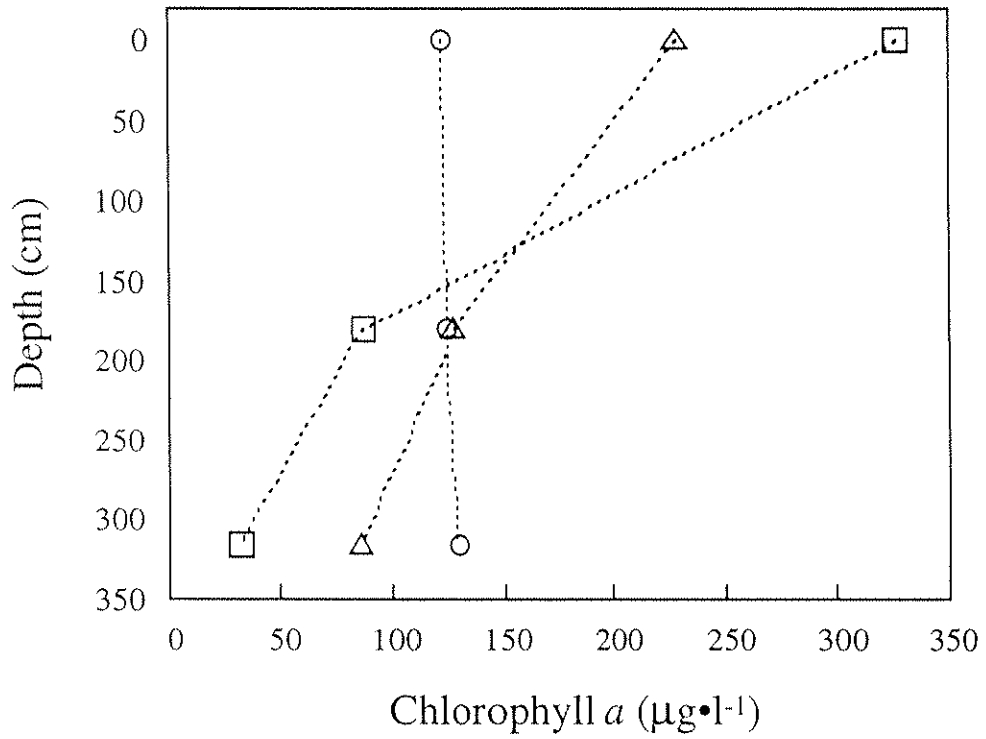


Fig.3-9a Distribution of chlorophyll *a* in large scale lake simulator at 0hr, 6hr and 12hr

○-----○ 0hr    △-----△ 6hr    □-----□ 12hr

において、単独となった *M.aeruginosa*, *M.viridis*, *M.wesenbergii*, の細胞は *M.guttula* によって 90%以上も捕食されることを報告している。したがって、*M.aeruginosa* が食物源として利用できないということではなく、ここではむしろ、全層で高 pH であったことが *M.guttula* が増殖できない主要因であると考えられるべきである。

結局、この明期 1 においては、*M.aeruginosa* の浮上による上層部への移動と光合成による高 pH 化により、*M.aeruginosa* の増殖に優位な条件が形成され、*M.guttula* の増殖に不利な条件が形成されたものと考えられた。

## 2) 暗期 [12~24hr] における動態

暗期に入ると *M.aeruginosa* は明期に引き続き表層部で増加し中層部および下層部で減少した (Fig.3-8b)。ここで、12 時間目、18 時間目、23.5 時間目の深さ方向におけるクロロフィル *a* の増減を Fig.3-9b に示す。各水深のクロロフィル *a* は、時間経過とともに、とくに上層部で高密度となった。この時点で DO は *M.guttula* が増殖する上で十分量存在していたものの *M.guttula* の個体数は上層部および各水深で  $3 \text{ N}\cdot\text{ml}^{-1}$  程度までさらに減少した (Fig.3-8a)。 *M.aeruginosa* が高密度で存在している上層部の pH は 10 付近であった (Fig.3-8c)。23.5 時間目の上層部の *M.aeruginosa* は群体を形成していた。

## 3) 明期 2 [24~30hr] における動態

明期 2 はで、*M.aeruginosa* の多い上層部では光合成が開始され、pH は再び上昇した。なお、30 時間目の *M.aeruginosa* は 23.5 時間目とほぼ同様の形状の群体を形成していた。このときの水面は、*M.aeruginosa* が高密度に集積して、夏季の富栄養湖沼でしばしば観察される Water-bloom が形成されていた。*M.guttula* は、暗期に引き続き上層部でさらに減少した。一方、下層部では *M.aeruginosa* は減少し、pH は 7.8 に低下していたが、*M.guttula* の増加はほとんど確認されなかった。下層部での pH の低下の原因は *M.guttula* の呼吸ではなく、*M.aeruginosa* の呼吸と沈降した *M.aeruginosa* のデトリタスの細菌による分解が開始されたためと考えられた。この pH の低下した中層部から下層部にかけては *M.guttula* の生息環境として比較的有利な条件であるが、*M.guttula* の増殖は認められなかつ



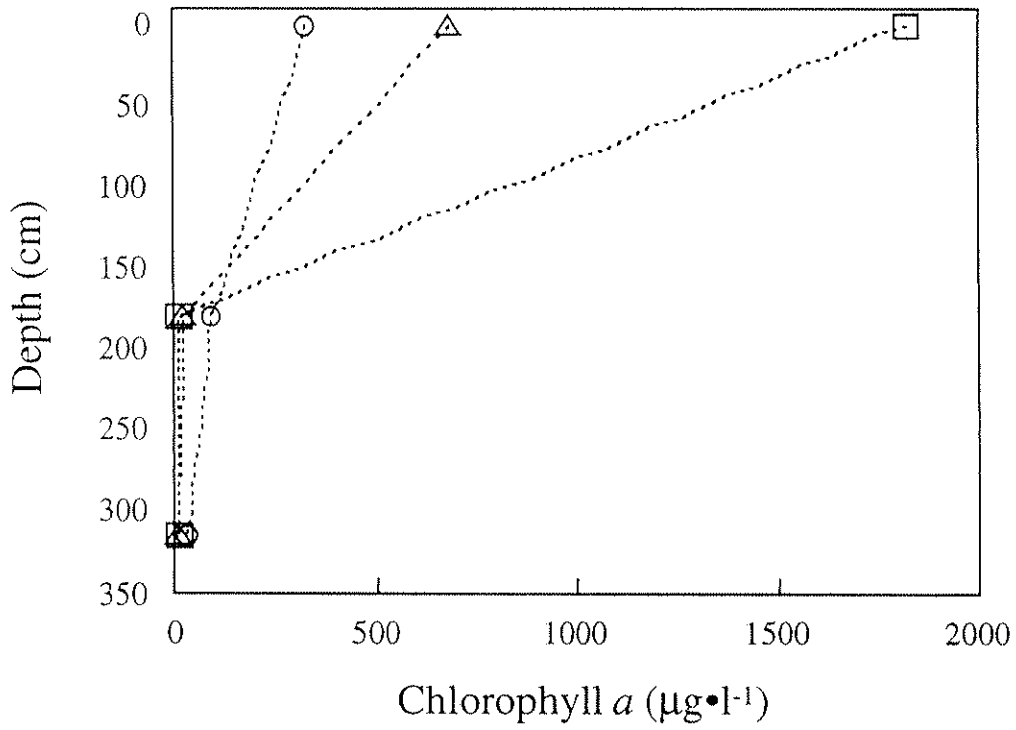


Fig.3-9b Distribution of chlorophyll *a* in large scale lake simulator at 12hr, 18hr and 23.5hr

○-----○ 12hr    △-----△ 18hr    □-----□ 23.5hr

た。

以上の結果から、*M.guttula* は群体状 *M.aeruginosa* を捕食できないことが判明した。

### 3-3-4 *Monas guttula* による *Microcystis viridis* の捕食分解特性

#### 1) *M.guttula* による *M.viridis* の捕食特性

本実験では、*M.guttula* による *M.viridis* の捕食分解特性を検討することが目的であるので、深さ方向に微生物の個体数が均一となるように水流を与えた。池沼内の均一性を確認するために深さ方向（水深 45,180,315cm）の *M.guttula* の個体数および *M.viridis* の細胞数を調べたところ、いずれも均一に分布していることがわかった。各温度における *M.viridis* の細胞数の経日変化を Fig.3-10 に示す。対照系の *M.viridis* は実験期間の 8 日間で細胞数の変化は認められず、初期細胞数の  $8.0 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$  を維持した。それに対し *M.guttula* 接種系では各温度ともに *M.viridis* の減少が認められ、とくに、30℃で速やかであった。

*M.guttula* の経日変化を Fig.3-11 に示す。*M.guttula* は 20℃から 30℃の温度範囲で指数的に増殖したことから、この増殖期には *M.viridis* の含有する microcystin や自己の代謝産物の影響はほとんど受けないと考えられた。ここで、各温度における対数増殖期の比増殖速度 ( $\mu$ ) を次式により算出した。

$$\mu = 2.303 \log (N/N_0) / (t - t_0) \quad \dots \dots (3-3)$$

$N$  =  $t$  時間後の個体数

$N_0$  = 0 時間の個体数

$t$  = 対数増殖期の終了時間

$t_0$  = 対数増殖期の開始時間

その結果、20℃で  $1.3\text{d}^{-1}$ 、25℃で  $1.9\text{d}^{-1}$ 、30℃では  $2.7\text{d}^{-1}$  となり、とくに、30℃で高かった。このことは、*M.guttula* は *Microcystis* 属の増殖速度が高い 30℃<sup>81)</sup>で、活発に捕食分解できることを示している。

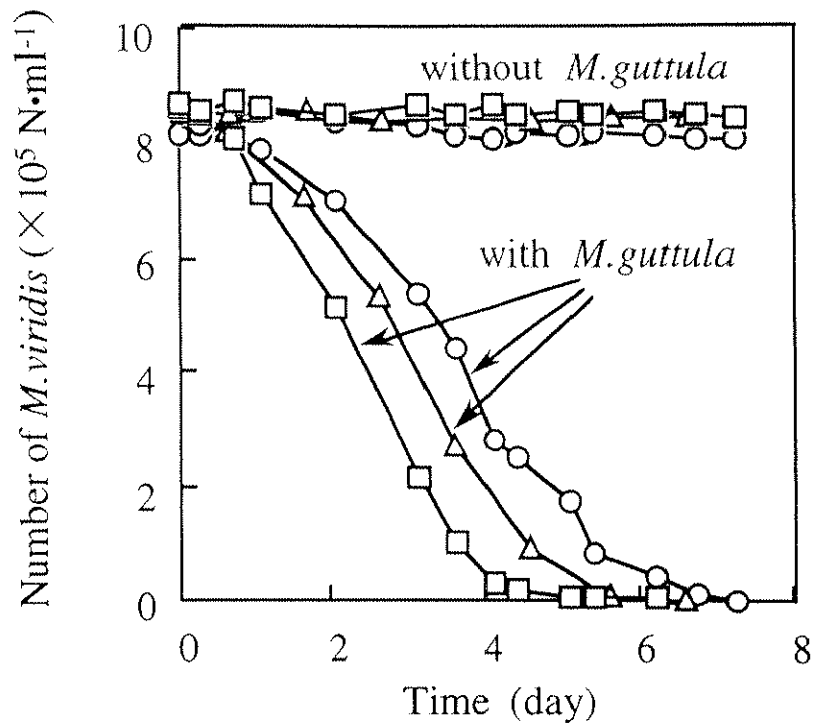


Fig.3-10 Effect of temperature on decrease in viable cells of *M.viridis*

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C

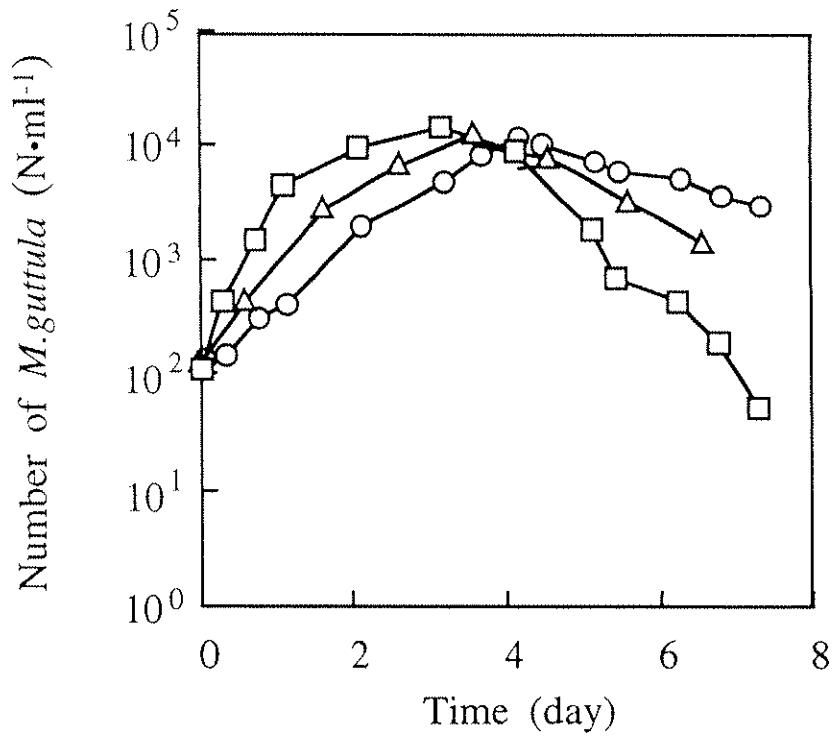


Fig.3-11 Effect of temperature on growth of *M.guttula*

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C

つぎに、*M.guttula* による *M.viridis* の分解性を評価するためにクロロフィル *a* についても検討した。クロロフィル *a* の分解状況を Fig.3-12 に示す。対照系のクロロフィル *a* は実験期間の 8 日間で全く減少は見られなかった。一方、接種系のクロロフィル *a* は各温度とも速やかに減少を示し 20℃で 8 日目、30℃で 5 日目には 90%以上が分解された。ここで、*M.viridis* の細胞数に対しクロロフィル *a* の濃度を各温度のデータを合わせて Fig.3-13 にプロットした。その結果、高い正の相関が得られた。したがって、*M.viridis* は *M.guttula* に取り込まれた後、体内で速やかに消化されるものと判断された。さらに、*M.viridis* の細胞数密度はクロロフィル *a* の濃度でも評価できることがわかった。

## 2) *M.guttula* の捕食分解作用による COD<sub>Mn</sub> 除去特性

湖沼、内湾等の環境基準として、有機汚濁は COD<sub>Mn</sub> で評価されている。湖沼でアオコが発生すると COD<sub>Mn</sub> は著しく上昇する。このように、藻類の現存量と COD<sub>Mn</sub> の間には密接な関係がある<sup>82)・84)</sup>。したがって、藻類が効率よく分解されれば COD<sub>Mn</sub> の減少すると考えられる。そこで、*M.guttula* の *M.viridis* 捕食による COD<sub>Mn</sub> 除去効果を調べた。懸濁性 COD<sub>Mn</sub> (以下 PCOD<sub>Mn</sub> と略す)の変化を Fig.3-14 に示す。初期の PCOD<sub>Mn</sub> はほとんどが *M.viridis* が影響するものである。PCOD<sub>Mn</sub> の初期値は 5.0mg・l<sup>-1</sup> であったが、*M.viridis* の分解にともない減少傾向を示した。最も減少が顕著に見られた 30℃に着目すると、その除去率は 5 日目に約 50%、7 日目には約 80%に達した。この結果から、*M.guttula* の捕食分解過程において PCOD<sub>Mn</sub> も減少することがわかった。

*M.viridis* の分解後には、溶解性有機物や代謝物質などが増加すると考えられたが、Fig.3-15 に示すように溶解性 COD<sub>Mn</sub> の増加はほとんど認められなかった。この増加の抑制には共存する細菌類が大きく関与しているものと考えられたので、*M.guttula* による *M.viridis* の分解除去におよぼす細菌類の役割についても検討した。すなわち、実験は *M.guttula* および細菌類を接種したものと細菌類のみを接種したものとで行った。ここで、30℃における好気性従属栄養細菌数の経日変化を Fig.3-16 に示す。*M.guttula* が共存しない系すなわち、細菌類のみを接種した系では、この実験期間中において *M.viridis* の細胞数および COD<sub>Mn</sub>、クロ

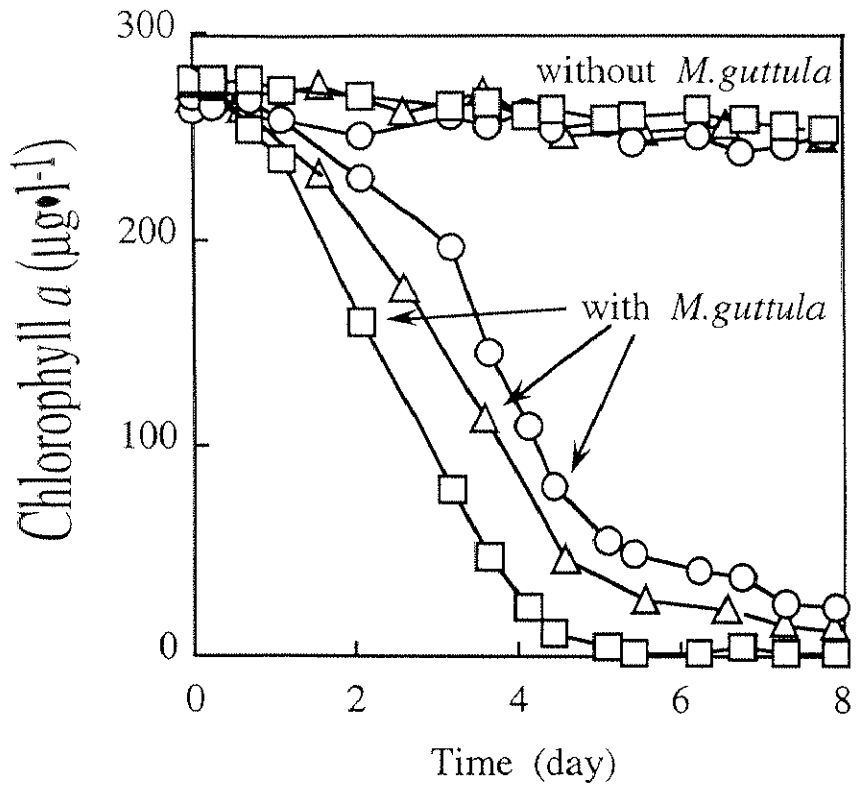


Fig.3-12 Effect of temperature on decrease in chlorophyll *a*

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C

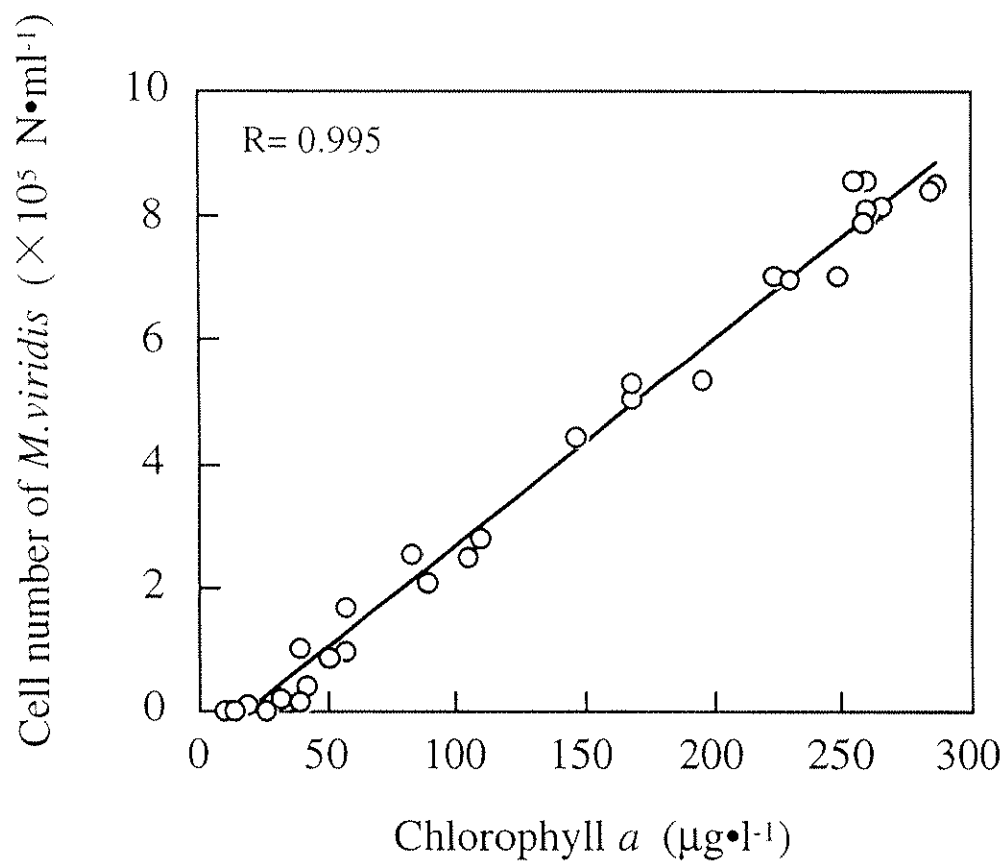


Fig.3-13 Correlation between cells of *M. viridis* and chlorophyll *a*

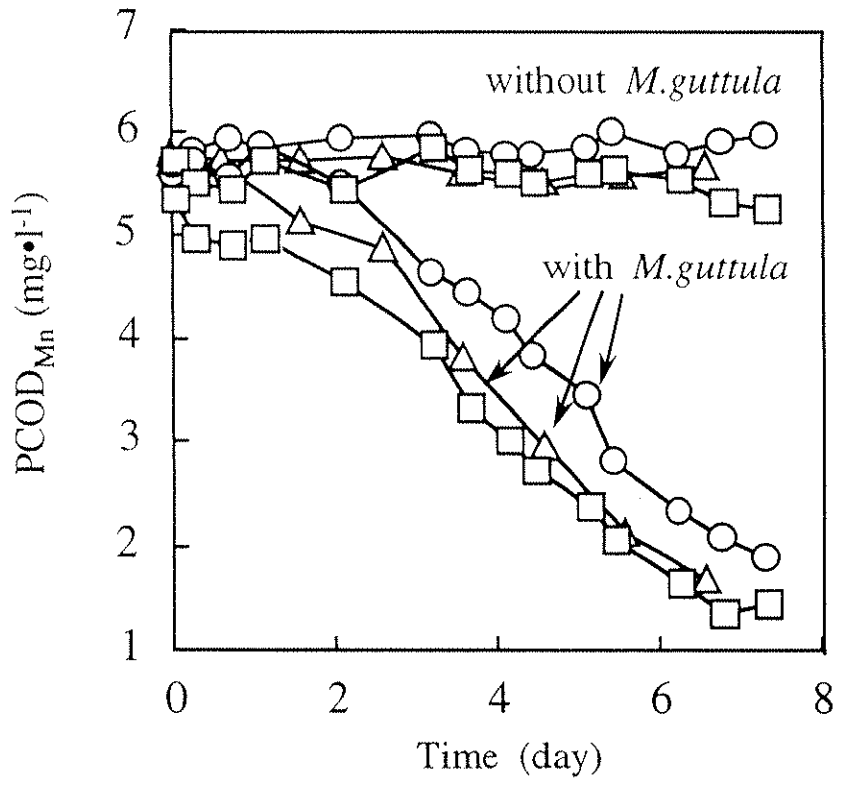


Fig.3-14 Effect of temperature on decrease in PCOD<sub>Mn</sub>

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C



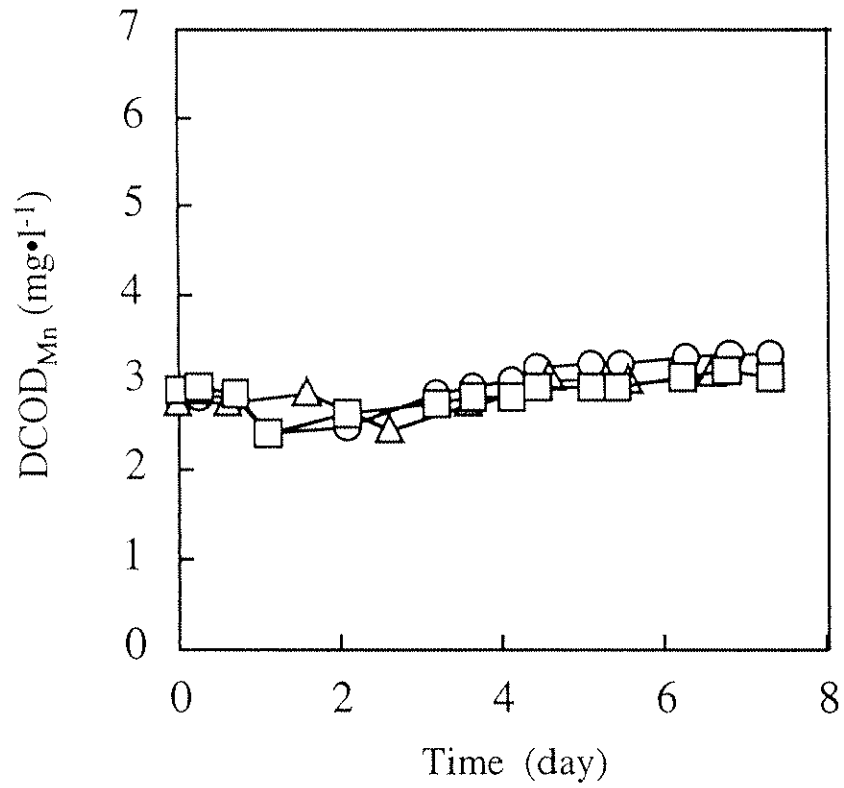


Fig.3-15 Effect of temperature on decrease in DCOD<sub>Mn</sub>

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C

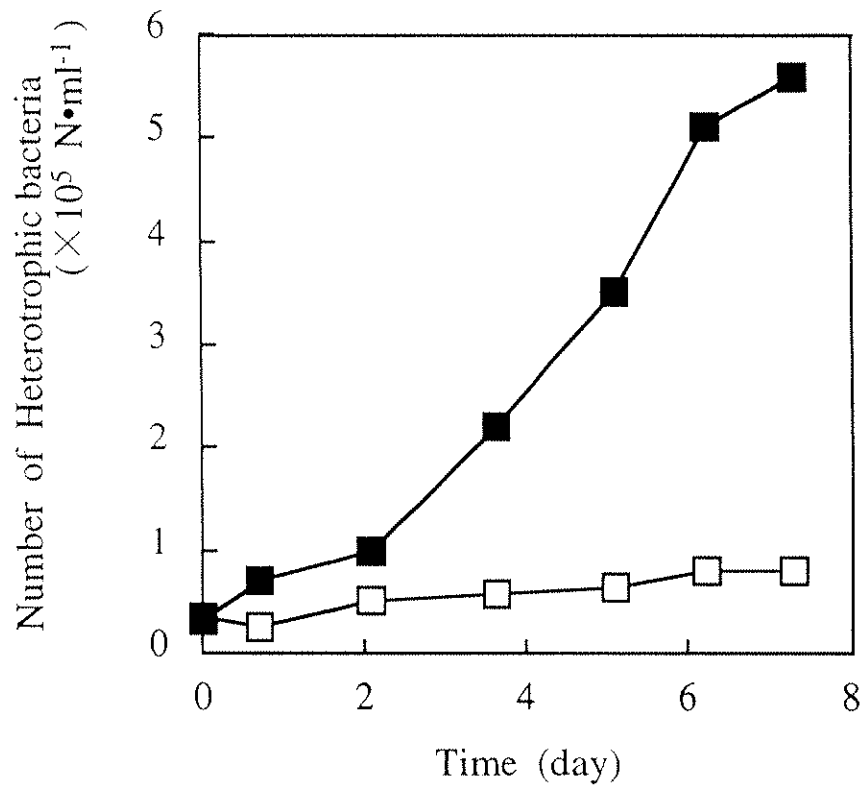


Fig.3-16 Growth of heterotrophic bacteria at 30 °C

■—■ with *M.guttula*      □—□ control

ロフィル *a* の減少は全く認められなかった。一方、*M.guttula* の共存する系では *M.viridis* の分解とともに細菌類も活発な増殖を示し、この過程において  $COD_{Mn}$  の減少が認められた。以上のことから藻類由来の  $COD_{Mn}$  は *M.guttula* による *M.viridis* の捕食分解、溶解有機物質の細菌類による分解、*M.guttula* による細菌類の捕食分解という食物連鎖により減少したものと考えられた。

### 3) *M.guttula* の存在の有無における有毒物質 microcystin の消長

現在まで、家畜類、魚類および人間に対しての有毒あるいはその可能性が示唆されている淡水産藍藻類は 12 属 23 種に及んでおり、これらの藍藻類の毒が水生生物に濃縮・蓄積されている可能性がある<sup>85)</sup>。稲森ら<sup>58,59,60)</sup>は、*Philodina erythrophthalma*, *Aeolosoma hemprichi* が生息する生物膜で有毒 *Microcystis* 属は分解され、有毒物質 microcystin-RR も生物濃縮されることなく効果的に分解されることを報告している。一方、*Microcystis* 属は捕食するが、その細胞内の microcystin は分解せずに体外に放出する鞭毛虫が確認されている<sup>86-88)</sup>。

今後、安全に水利用していく上では上水道において有毒物質が水界微生物、とくに微小動物の食物連鎖の過程を経ることによって分解・消失されるか否かを明らかにしておく必要がある。

そこで *M.guttula* による *M.viridis* が産生する有毒物質 microcystin の分解除去効果について評価検討を行った。ここで用いた *M.viridis* が産生する microcystin はペプチド環を形成する一部のタンパク質の種類が違ふことで -LR, -YR, -RR などに分けられる<sup>89)</sup>。なかでも毒性の強いものは -LR, -RR で、これらのマウスに対する毒性を半数致死量 (LD50) で表すと -LR は  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>90)</sup> または  $32.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>91)</sup> で -RR は  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>92)</sup> である。

霞ヶ浦や諏訪湖で発生する有毒 *Microcystis* 属は *M.aeruginosa* や *M.viridis* が主で、これらから検出される主要毒は -RR である<sup>92)</sup>。このような理由から microcystin-RR に着目した。*M.viridis* の分解が最も顕著であった 30℃における HPLC 分析結果のクロマトグラムを Fig.3-17 に、各温度における microcystin-RR の経日変化を Fig.3-18 に示した。クロマトグラムの R.T.(保持時間) 20 分に認められるピークは microcystin-RR であり、R.T.17 分のところは microcystin-LR,-

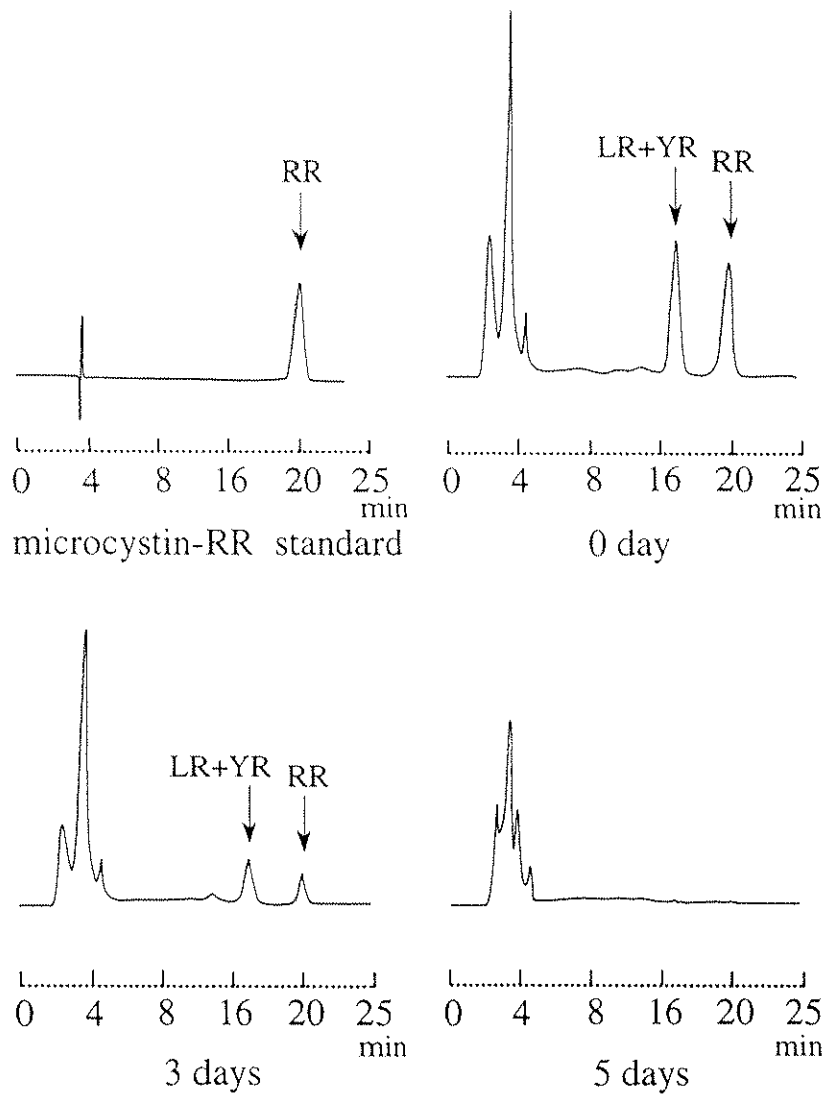


Fig.3-17 Chromatograms for authentic sample of microcystin and *M.viridis*-extract at 30°C

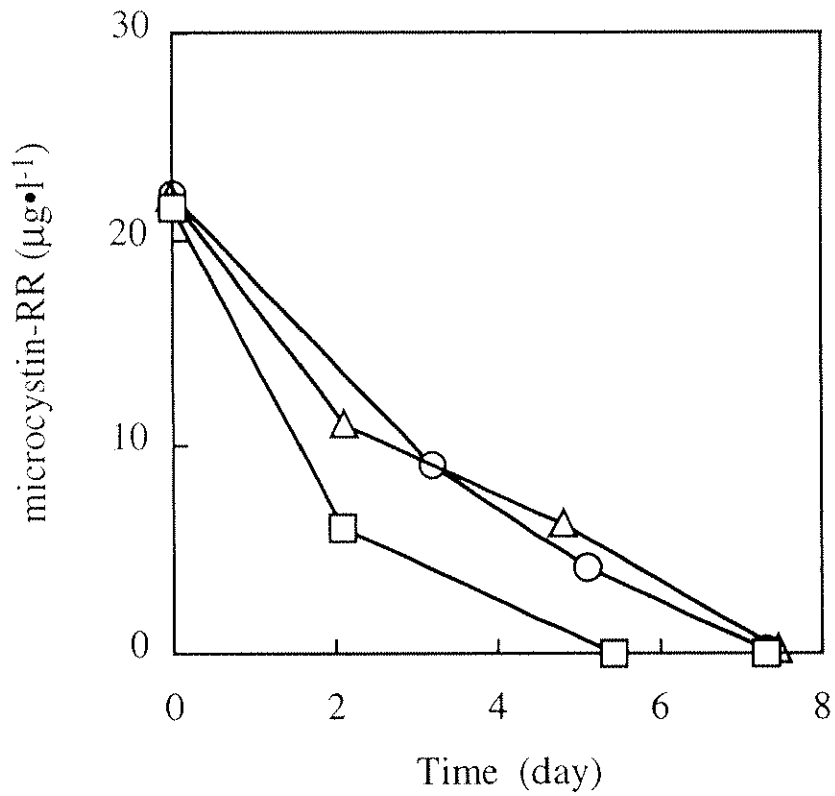


Fig.3-18 Effect of temperature on decrease in microcystin-RR

○—○ 20°C    △—△ 25°C    □—□ 30°C

YR の混合ピークである。microcystin-RR は初期の *M.viridis* から  $22 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  で検出されたが、*M.guttula* 接種系では *M.viridis* の分解に伴い細胞数が半減した約 2 日目には  $6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  に減少し 5 日目には検出されなかった。一方の対照系では 8 日目にも初期濃度のまま残存していた。さらに、細菌のみを接種した場合でも microcystin-RR は初期濃度のまま残存した（データは示さず）。一方、*M.guttula* 接種系では各温度において microcystin-RR は *M.viridis* の細胞の減少とほぼ同時に分解され、完全に消失した（Fig.3-18）。以上のことから *M.guttula* の捕食作用は有毒物質 microcystin の分解促進因子として重要であることがわかった。

### 3-3-5 *Monas guttula* による *Microcystis* 属の捕食分解特性の数理解析

3-3-2 および 3-3-4 の結果より分散状の *Microcystis* 属に対する *M.guttula* の捕食作用の有用性が示された。この *M.guttula* の捕食作用を *Microcystis* 属の増殖抑制のバイオマニピュレーションに応用していくには、*M.guttula* の捕食特性とその効果を数理解析により整理しておく必要がある。そこで、*M.guttula* の増殖と *M.viridis* の減少のデータをもとにシミュレーションを行い、*M.guttula* と *M.viridis* の捕食被食の特性を解析することとした。ここで、*M.guttula* の捕食作用は Fig.2-1 (b) の構想に基づきリアクターのような分解槽で利用することとし、*Microcystis* 属の捕食に有利な環境条件として、*Microcystis* 属の生産が無いこと、および *Microcystis* 属の群体は単独の細胞に分散化されていることを想定した。また、*Microcystis* 属の異常発生は水温の高い夏季に多いことを考慮し、*M.guttula* は Fig.3-11、*Microcystis* 属は *M.viridis* (Fig.3-10) のいずれも  $30^{\circ}\text{C}$  の実験データを用いた。まず、*M.guttula* と *Microcystis* 属の捕食・被食の特性を解析するために一般的な捕食被食モデルを仮定した。ここで、*M.guttula* は *Microcystis* 属を捕食し増殖するので、*Microcystis* 属の細胞は *M.guttula* の個体を増加させることになる。しかし、実際の実験系では細菌類の増殖が認められている (Fig.3-16)。ここで、Fig.3-11 に示した *M.guttula* の個体数のトレンドと Fig.3-16 に示した細菌数のトレンドをみると、*M.guttula* の増殖因子として細菌類の寄与は *Microcystis* 属よりも極めて少ないと考えられる。このことから、細菌類は考慮

せず *M.guttula* と *Microcystis* 属の捕食被食関係をつぎのモデル式から解析することとした。

$$\frac{dA}{dt} = -f(A)\frac{M}{Y} \dots \dots \dots (3-4)$$

$$\frac{dM}{dt} = f(A)M - \delta M \dots \dots \dots (3-5)$$

ここで、*A:Microcystis* 属の細胞数(N・ml<sup>-1</sup>)、*M:M.guttula* の個体数(N・ml<sup>-1</sup>)、*Y:M.guttula* の収率、 $\delta$ : *M.guttula* の死亡率(day<sup>-1</sup>)、 $\mu$ : *M.guttula* の比増殖速度(day<sup>-1</sup>)である。

つぎに、シミュレーションを行うにあたり、*f(A)*、*Y*、 $\delta$ の各パラメータを実験データの解析結果から求めることとした。

まず、*f(A)*を求めるために、*M.guttula* の死亡率 $\delta$ として、ここでは $\delta$ を一定(定数)と仮定した。4日目以降の*M.viridis*の細胞数の変化をみると(Fig.3-10)、*M.viridis*はほとんど0であるが、*M.guttula*が*M.viridis*のみを食物源としているならば、*f(0)*であるので、4日目以降の(3-5)式は、

$$\frac{dM}{dt} = -\delta M \dots \dots \dots (3-6)$$

となる。つまり、 $M \propto e^{-\delta t}$ となるので、4日目以降の*M.guttula*の対数プロット(Fig.3-19)から $\delta$ を求め、 $\delta=1.51\text{day}^{-1}$ を得た。この $\delta$ を使えば(3-5)式より、

$$f(A) = \frac{1}{M} \frac{dM}{dt} + \delta \dots \dots \dots (3-7)$$

となるので、*Microcystis* 属の細胞数密度に対して*M.guttula*の比増殖速度*f(A)*をプロットし(Fig.3-20)、そのプロットを一次式 $\mu A$ で近似して以下の値を得た。

$$\mu=6.85 \times 10^{-6} (\text{N} \cdot \text{m}^{-3})^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$$

一方、収率*Y*は、

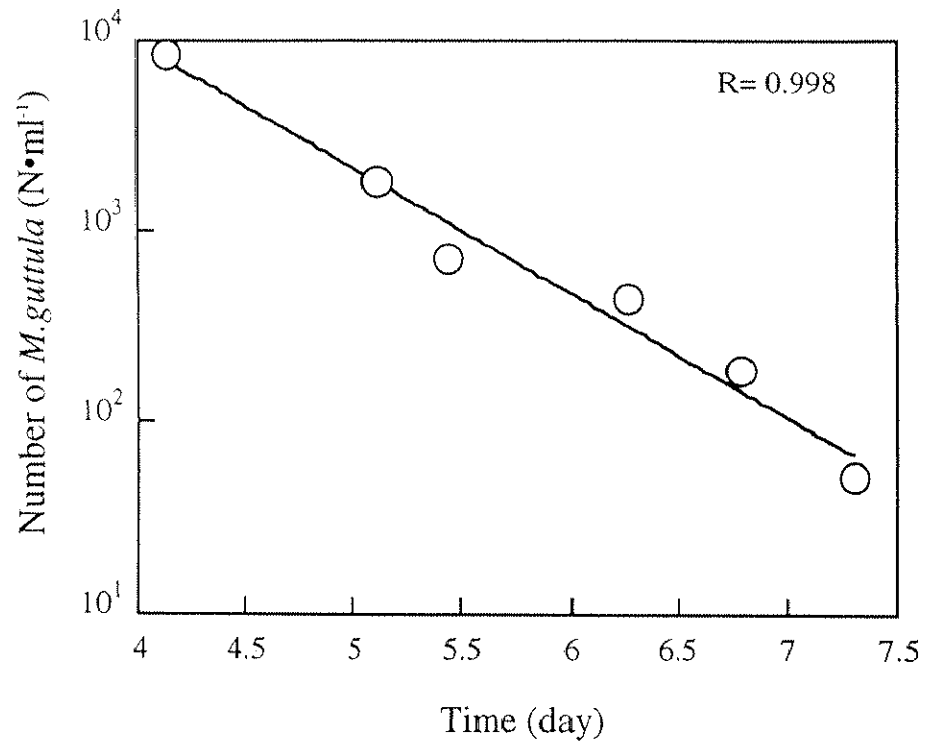


Fig.3-19 Decrease in *M.guttula* in large scale lake simulator at 30 °C



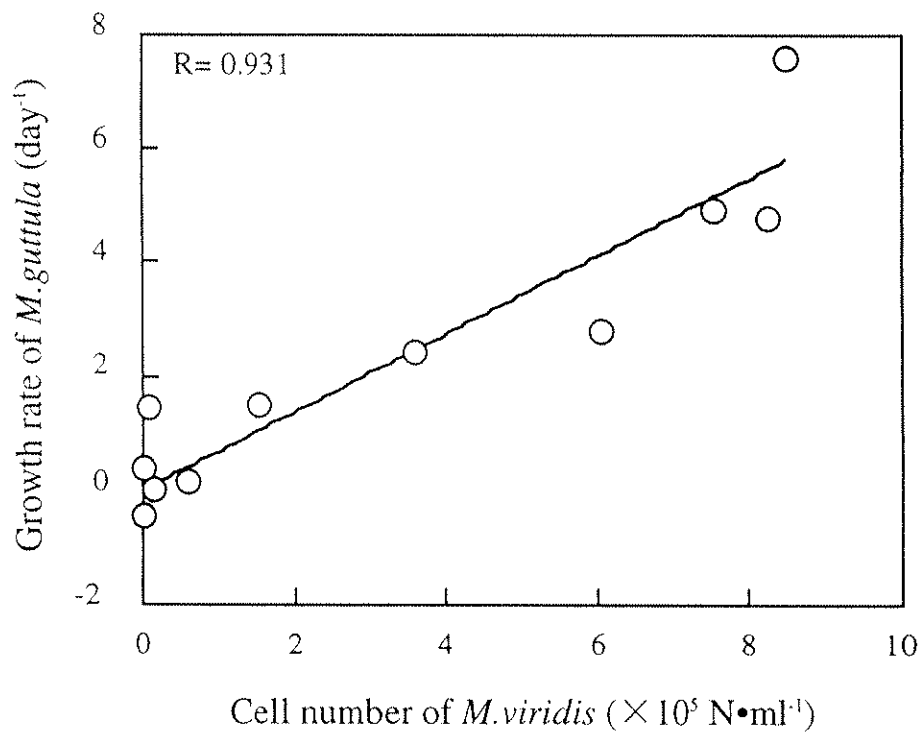


Fig.3-20 Relation between density of *M. viridis* cells and growth rate of *M. guttula*

$$\frac{\frac{dM}{dt} + \delta M}{\frac{dA}{dt}} = -Y$$

..... (3-8)

として、*M. viridis* の減少量に対して、増殖した *M. guttula* の個体数の積算値をプロットし (Fig.3-21)、そのプロットを一次式  $\mu A$  で近似して  $Y=0.0976$  を得た。

以上のパラメータを (3-4) 式と (3-5) 式に代入し、*M. guttula* の個体数変化と *Microcystis* 属の細胞数変化のシミュレーションを行った。*M. guttula* の個体数変化および *Microcystis* 属の細胞数変化のシミュレーションの結果をそれぞれ Fig.3-22 と Fig.3-23 にプロットした。*M. guttula* の増殖は、1 日目までシミュレーションと実験値はほぼ一致しているが、それ以降の最大個体数に達するまでのトレンドをみると、シミュレーションは指数的に増殖しているのに対し、実験値は徐々に緩やかとなり、増殖率は低下した。最大個体数に達するまでの日数をみると、実験値は 3.2 日目であるのに対し、シミュレーションは 1.8 日目となり、増殖曲線のピークはシミュレーションが実験値よりも実験の前半にシフトした。また、最大個体数は、シミュレーションが実験値を上回った。さらに、実験後半の *M. guttula* の個体数変化をみると、実験値はシミュレーションよりも急速に減少した (4.1 日目から 5.3 日目)。一方、*M. viridis* の結果も 1 日目までシミュレーションと実験値はほぼ一致しているが、1 日目から 3.6 日目までの実験値の *M. viridis* の減少率は、シミュレーションよりも低くなった。*M. viridis* は *M. guttula* に捕食されて減少するが、この期間は、ほぼ *M. guttula* の増殖率が低下した時期 (Fig.3-22) に対応している。このように、*M. viridis* の減少がシミュレーションと一致なかったのは、*M. guttula* の増殖率の低下、すなわち死亡率  $\delta$  の上昇が原因と考えられた。

以上より、*M. guttula* の死亡率  $\delta$  は実験の前半は低く、後半にいくにしたがい高くなる傾向があることが推測できる。そこで、*M. guttula* の死亡率  $\delta$  は一定ではなく、*M. guttula* の個体数密度変化の関数、すなわち時間の関数であるとして解析することとした。まず、増殖初期 (1 日目) では  $\delta$  は小さく、(3-5) 式で  $\delta=0$  できることを仮定した。このことより (3-5) 式は、

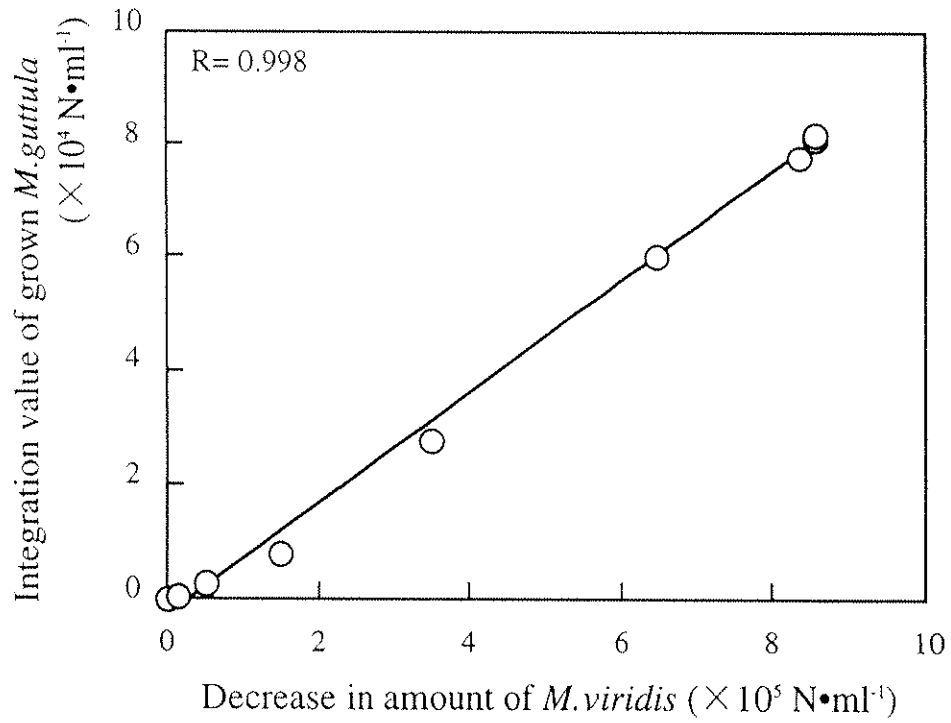


Fig.3-21 Relation between integration value of grown *M. guttula* and decrease in amount of *M. viridis*

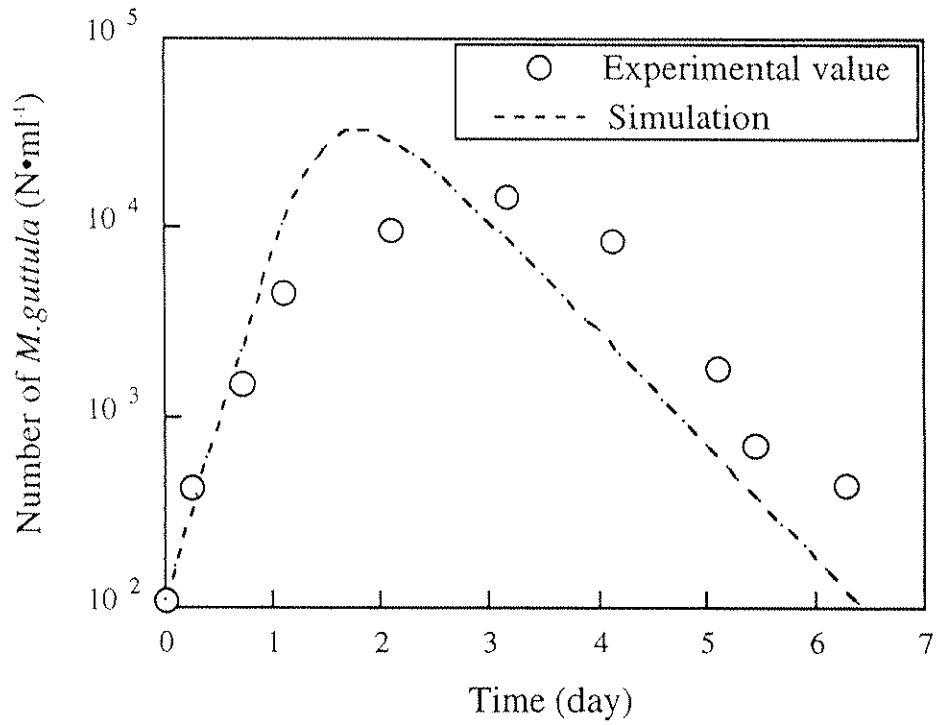


Fig.3-22 Growth curve of *M.guttula* in model lake at 30°C. Symbol;○,Experimental value. The line shows the result of numerical calculation.

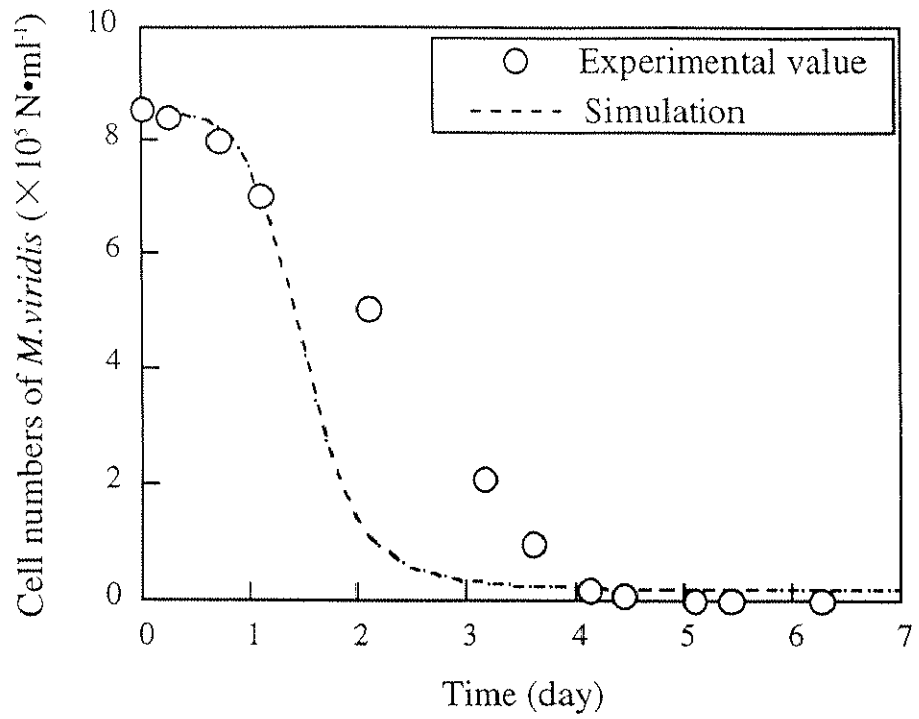


Fig.3-23 Decrease in *M.viridis* in model lake at 30 °C. Symbol;○,Experimental value. The line shows the result of numerical calculation.

$$\frac{dM}{dt} = f(A)M \quad \dots \dots \dots (3-9)$$

と近似することができる。したがって、(3-5) 式 / (3-4) 式から、

$$\frac{dM}{dA} = -Y$$

となり、つまり、

$$\Delta M = -Y \cdot \Delta A \quad \dots \dots \dots (3-10)$$

であるので、*Microcystis* 属の細胞の減少量に対して、*M.guttula* の個体数の増加量をプロットして (Fig.3-24)、収率  $Y=0.027$  を得た。

つぎに、*M.guttula* は増殖するにしたがって *M.guttula* 自身の死亡率  $\delta$  が上昇すると仮定し、 $\delta$  の経時変化を実験データから求めることとした。収率  $Y$  が一定であるとすれば、(3-4) 式と (3-5) 式から、

$$\begin{aligned} \frac{dM}{dt} + Y \frac{dA}{dt} &= \delta(t)M \\ \delta(t) &= \frac{1}{M} \left( \frac{dM}{dt} + Y \frac{dA}{dt} \right) \end{aligned} \quad \dots \dots \dots (3-11)$$

となり、この式より  $\delta(t)$  を求めることができる。

ここで、*M.guttula* の増殖と  $\delta(t)$  の関係を知るために、*M.guttula* の個体数の積算値、

$$\int_0^t M(t) dt$$

に対して、減少率を対数プロットした (Fig.3-25)。その結果、ほぼ直線となっているので、

$$\delta(t) = \delta(0) e^{k \int_0^t M(t) dt} \quad \dots \dots \dots (3-12)$$

の関係式で  $\delta$  の変化を記述することができ、その指数回帰から、 $k=9.2 \times 10^{-5} M^{-1} \text{day}^{-1}$  と  $\delta(0)=0.071 \text{day}^{-1}$  を得た。この  $\delta(t)$  を用いて、再び  $f(A)$  を求めると、Fig.3-26 のようになる。この  $f(A)$  は  $\delta(0) \neq 0$  であり、かつ、 $A=6 \times 10^5 \text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$  で急速に増加していることが特徴である。そこで、

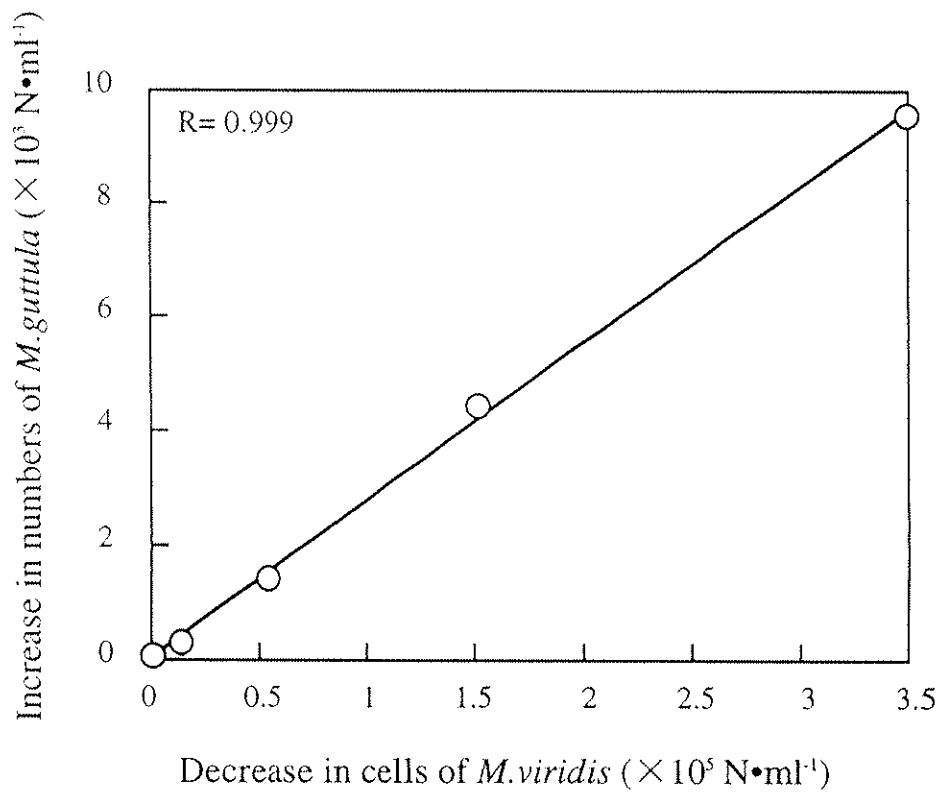


Fig.3-24 Relation between decrease in cells of *M.viridis* and increase in numbers of *M.guttula*

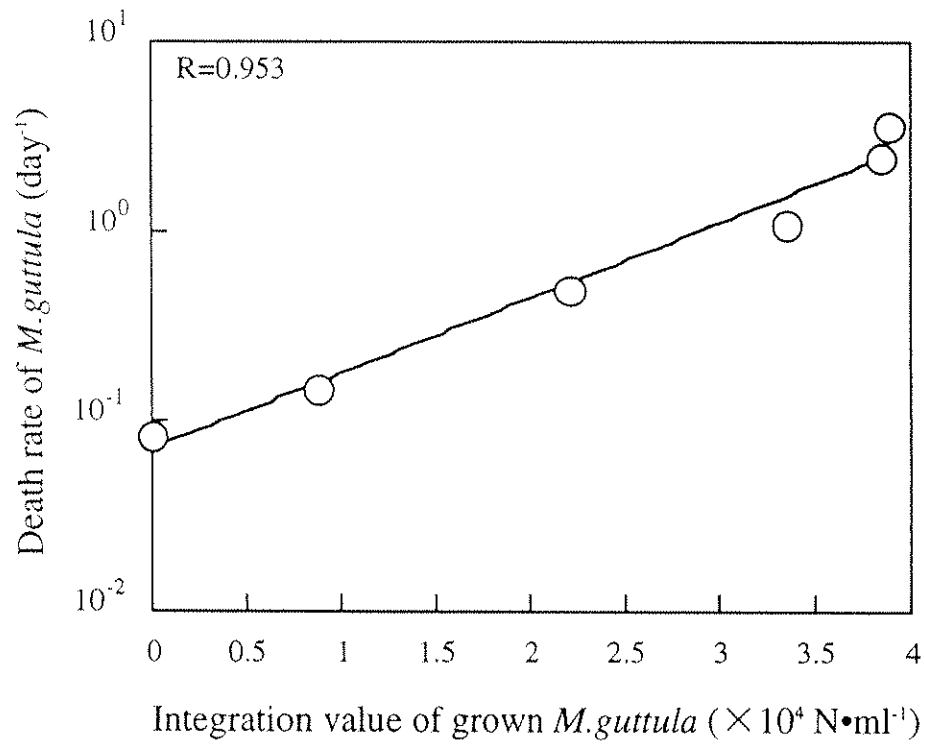


Fig.3-25 Relation between integration value of grown *M.guttula* and death rate of *M.guttula*



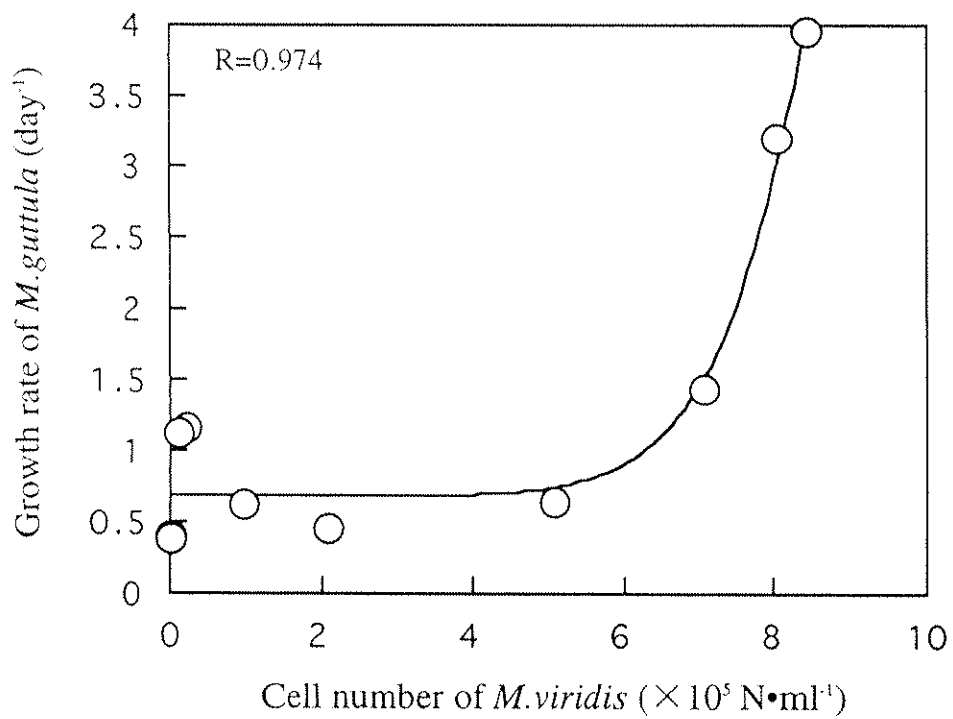


Fig.3-26 Relation between cell-density of *M. viridis* and growth rate of *M. guttula*

$$f(A) = \mu_0 + \mu_1 A^n$$

のかたちで、回帰した結果、

$$f(A) = 0.68 + 13.48 \times 10^{-46} \cdot A^8$$

と近似することができた。

つぎに、(3-12) 式を (3-5) 式に代入すると、

$$\frac{dM}{dt} = f(A) \cdot M - \delta(0) e^{k \int_0^t M(t) dt} \cdot M \quad \dots \dots (3-13)$$

となるが、この式はまた、

$$\frac{dM}{dt} = f(A)M - \delta M \quad \dots \dots (3-14)$$

$$\frac{d\delta}{dt} = kM\delta \quad \dots \dots (3-15)$$

の2つに分けることもできる。

以上より、 $f(A)=0.68+13.48 \times 10^{-46} \cdot A^8$  を (3-4) 式と (3-13) 式に、 $Y=0.027$  を (3-4) 式に代入して、再度シミュレーションを行った。*M.guttula* の個体数変化と *Microcystis* 属の細胞数変化のシミュレーションと実験データをそれぞれ Fig.3-27 と Fig.3-28 にプロットした。その結果、シミュレーションと *M.guttula* の個体数の実験値はよく一致した (Fig.3-27)。このことから、*M.guttula* の捕食により *Microcystis* 属の分解が進行する過程で、*M.guttula* の死亡率を高める物質が蓄積されていくと推定された。一方、*Microcystis* 属の細胞数については、2日目までは実験値とシミュレーションがよく一致したが、それ以降は実験値からはずれ、3.5日目から  $0N \cdot ml^{-1}$  以下となった (Fig.3-28)。このことは、 $f(0)=\mu_0 \neq 0$  であることに起因しており、*M.guttula* の食物源が *Microcystis* 属以外に存在することを暗示している。その食物源としては、Fig.3-16 に示されたように、*M.guttula* の死亡や *Microcystis* 属の分解などで残存したデトリタスや溶解有機物を利用して増殖した細菌類であると考えられた。

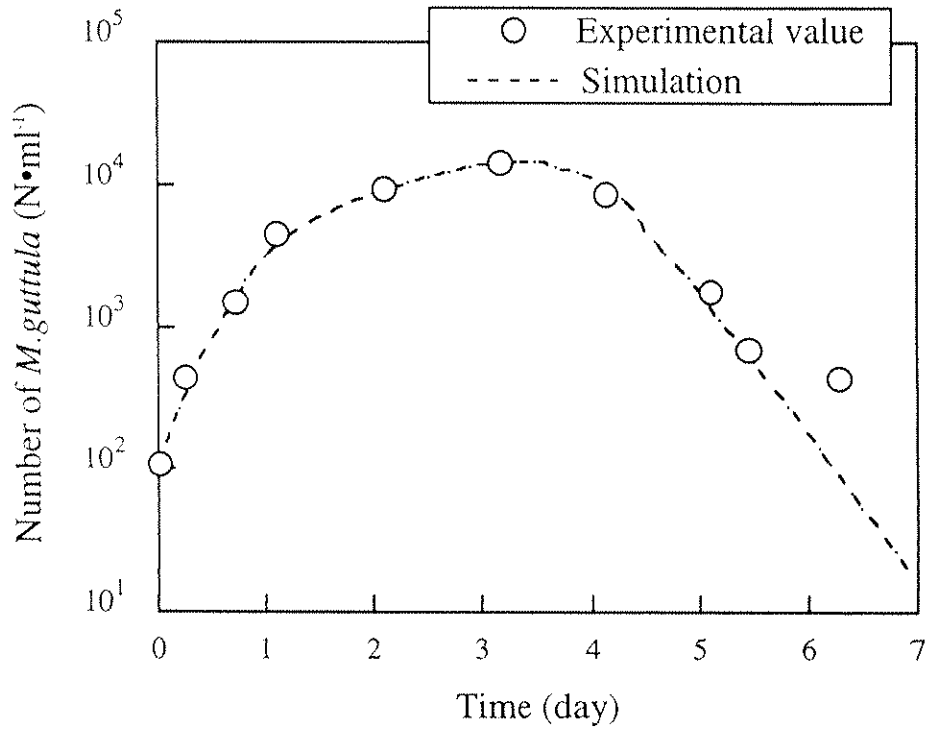


Fig.3-27 Growth curve of *M.guttula* in model lake at 30°C. Symbol;○,Experimental value. The line shows the result of numerical calculation.

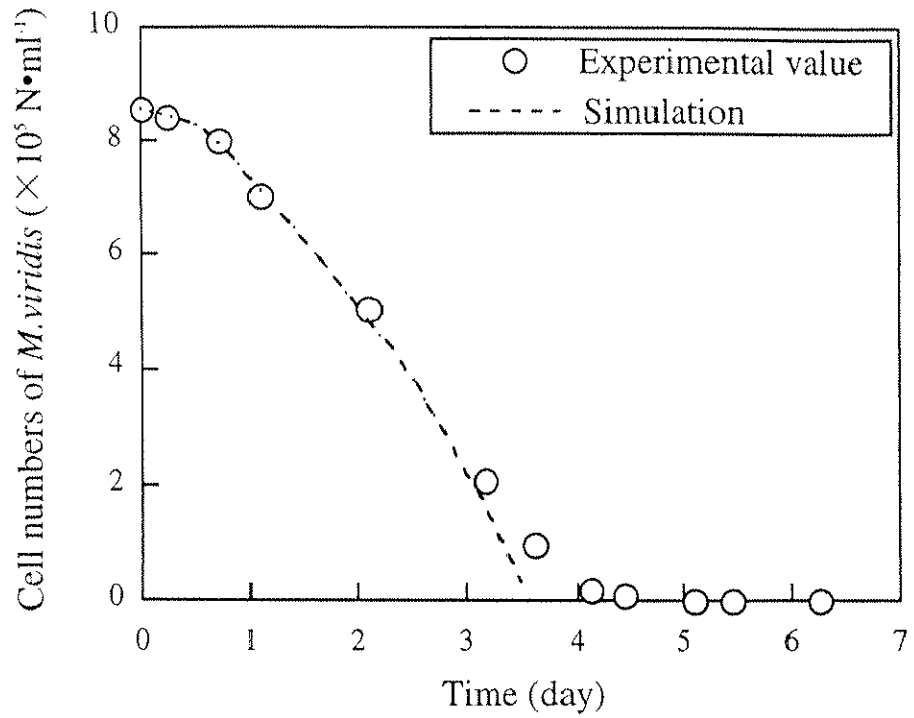


Fig.3-28 Decrease in *M.viridis* in model lake at 30°C. Symbol;○,Experimental value. The line shows the result of numerical calculation.

### 3-4 結論

大型淡水モデル池沼を用いて、*Microcystis* 属の消滅過程における *M.guttula* の捕食-被食関係とその動態を調べ、さらに、*M.guttula* による有毒物質産生 *Microcystis* 属の捕食分解特性を調べ、以下の結論を得た。

- 1) 大型淡水湖沼モデルにおいて、*Microcystis* 属の群体の単独細胞化、さらに分散し単独の細胞になった *Microcystis* 属の *M.guttula* による捕食が観察され、*Microcystis* 属の消滅過程と *M.guttula* の動態は、秋季の霞ヶ浦のアオコ集積域におけるアオコの消滅現象と類似した。
- 2) *M.guttula* の増殖に不利な pH10 という条件と分散状 *Microcystis* 属の密度が高い条件が同時に重なった場合、とくに暗期で *M.guttula* による捕食分解、すなわち呼吸量が増加し、それに伴い pH も中性化されるという *M.guttula* の増殖に有利な環境条件にシフトしていくことがわかった。
- 3) *M.guttula* は、水深や日周期がある条件下でも分散状 *Microcystis* 属の増殖を上回り、実験開始時点に比べて 95%以上の *Microcystis* 属を 3 日間で捕食することがわかった。
- 4) *M.guttula* は 20~30°Cの広範囲の温度条件下でも *M.viridis* をほぼ完全に捕食分解でき、その捕食作用は *Microcystis* 属由来の  $COD_{Mn}$  および有毒物質 microcystin の分解促進因子として重要であることがわかった。
- 5) *M.guttula* は群体状の *Microcystis* 属の細胞を捕食できないことがわかった。
- 6) *M.guttula* の捕食により *Microcystis* 属の分解が進行する過程で、*M.guttula* の死亡率を高める物質が蓄積し、*M.guttula* 自身の増殖が抑制され、*Microcystis* 属の分解率が低下することがシミュレーションの結果から推定された。
- 7) *Microcystis* 属を削減可能な微小動物として、*M.guttula* の有用性を明らかにしたが、*M.guttula* の捕食圧を高めるためには *Microcystis* 属の群体の単独細胞化を促進させるための操作方法を開発し、さらに、その操作方法と *M.guttula* の捕食との組み合わせで *Microcystis* 属が削減可能か否かを検証していく必要がある。