

氏 名	HELAYAYE DAMITHA LAKMALI ABEYNAYAKA
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記号番号	博理工甲第 1040 号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	EFFECTS OF HIGH PRESSURE ON GROWTH, SECONDARY METABOLITES FORMATION AND BUOYANCY REGULATION OF FRESHWATER CYANOBACTERIA (淡水シアノバクテリアに対する圧力増加および長期暗条件の影響について)
論文審査委員	委員長 教 授 浅枝 隆 委 員 教 授 川合 真紀 委 員 教 授 金子 康子 委 員 准教授 藤野 毅

論文の内容の要旨

Understanding about the tolerance, responses and bio and physiological variations of cyanobacterial species is important to evaluate better biohazards controlling mechanisms in water resources. High pressure induced variations of fresh water cyanobacteria were studied at laboratory scale. Cyanobacteria growth is governed by many factors in natural waters and the responses of cyanobacteria for the different environmental conditions are complex bio-chemical phenomena. Not like other phytoplanktons, cyanobacteria have unique morphological and physiological features such as accessory pigments and gas vesicles to endure severe environmental conditions. Application of controlling measures with less of concern about cyanobacterial ecology could be realize as the main reason for the failure of most controlling mechanisms. Developing better understanding about effects of different environmental factors on cyanobacteria is necessary in this field. Light irradiance level, nutrient conditions and temperature were main governing factors of most cyanobacterial growth but most environmental factors such as ultra violet radiation, water turbulence, anoxic condition and hydrostatic pressure condition in deep water are still remaining uncertain. Among them deep water conditions hydrostatic pressure have clear effects on growth, photosynthesis pigments, cell morphology and biosynthesis of secondary metabolites of fresh water cyanobacteria.

According to the observed results, effects of high pressure on cyanobacteria can divided to two parts as acute and prolonged effects. Fresh water filamentous cyanobacterium *Pseudanabaena galeata* (*P. galeata*) which was grown under prolonged hydrostatic pressure more than 35 days shows clear reduction of cell growth rates, even with sufficient irradiance level. Prolonged darkness combined with high pressure made more large adverse effects on cell growth and pigmentation of cyanobacteria prolonged response. However at the early stage of high pressure application, main photo energy harvesting pigment chlorophyll-a (chl-a) and accessory pigments including carotenoids and phycobilisomes concentrations of *Pseudanabaena galeata* slightly increased in lower pressure values (0.2 MPa) as an acute response. This

pigmentation provided high survival capacity to pressure treated cyanobacterial cell, hence even with very high and prolonged pressure condition they can propagate. In contrast to that with dark condition, growth of cyanobacterial cells was very low. Yet when cyanobacteria are facing to a high pressure and darkness in cyclic pattern, percentage of survival cells from initial cell amount is gradually increased. Cyanobacteria are reducing during the high pressure and dark period and cells were able to re-grow during the light exposure period with higher increasing rate than control. These results suggest that *P. galeata* have an adequate tolerance to moderate pressure and fluctuating conditions of irradiance.

2-Methylisobornel (2-MIB) is a major cause of musty odor in water resources contaminated with *Pseudanabaena galeata* (*P. galeata*). The effect of hydrostatic pressure and darkness on variation of growth, pigmentation and 2-MIB synthesis in *P. galeata* were reduced significantly ($f= 98.911$, $p= 0$) while all the pigments concentrations inside the cell have increased significantly (Chl-a $f= 6.52$ $p=0.015$; Car $f= 24.433$ $p=0$; PC $f= 11.864$ $p=0.003$; PE $f= 9.38$ $p=0.005$). The decrease of 2-MIB per cell was caused by inhibition of 2-MIB synthesis in side cells by hydrostatic pressure. Further observation was obtained by Q-PCR analyses of genes related with 2-MIB synthesis were supported to this 2-MIB reduction. Relative gene expression has also being affected both light and pressure. Movement of cyanobacteria *P. galeata* to deep water could limit the production of 2-MIB significantly.

The effects of sudden high pressure on the morphology of gas vacuole and settling velocity (V_s) of *Pseudanabaena galeata* (*P. galeata*), a filamentous freshwater cyanobacterium, and *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*), which is a scum forming toxic cyanobacterium were significant. Observed V_s of acute pressurized cells, under several pressure values from 0.05 to 0.5 MP were increased gradually with increasing applied external pressure. Application of pressure altered the buoyancy state of the cells to average V_s of up to 0.05 mm/s (maximum V_s were observed at 0.5 MPa). Increase of pressure caused deformations and collapses of cyanobacterial gas vesicles. An apparent relationship between V_s and gas vacuole volume change could be observed in this study.

Moreover, the effects of prolonged pressure on the protein and polysaccharide contents were decreased, which reduce the cell ballast weight and V_s . This study, tested to obtain the effective sedimentation of cyanobacteria cells. Comparison of settling velocities of cells grown under two naturally available treatments (external pressurization relevance with hydrostatic pressure in deep water; ultra violet-A (UVA)) and one artificial treatment (ultra-sonication) were significantly varied with treatment method. Increasing external pressure ($f=136$, $p<0.05$), ultra-sonication ($f=127$, $p<0.05$) and UVA ($f= 133$, $p<0.05$) have significant negative effect on V_s . UVA treatment has minimum effect on settling while ultra-sonication has much higher effect. Yet the destruction of cell integrity by sonication raises the turbidity of water. However the pressurization treatment shows rapid sedimentation of cells compared to other treatments. Hydrostatic pressure is naturally occurred while the water depth increases therefore application of high pressure on cyanobacterial cells using pressurization vessel or pumping of upper cyanobacterial scum to deep water layer can be improved farther as a controlling technique of *M.aeruginosa*.

論文の審査結果の要旨

貯水池において藍藻が大増殖を行うアオコ現象は、飲料水の確保、景観の維持、安全な水域の維持等において世界中で大きな問題である。アオコ対策はこれまで貯水池内で、曝気循環法とよばれる、上下方向に流動を生じさせ、藻類を移動させる対策が有効とされてきている。この理由として、表層の有光層中の藻類を深部の無光層中に移動させ、光合成を抑制、これによって増殖を抑えると考えられてきた。しかし、一方では、藻類が浅層から深層に移動する過程においては、藻類に掛かる圧力も大きく変化する。この圧力変化が藻類の生理特性に大きく影響を与えることも十分考えられ、また、もしこの影響があるとすれば、流動速度を上げて、圧力変化速度を上げることによって、より効率的な対策法の開発も可能になる。本研究は、こうした仮説のもと始められたものである。実際の貯水池において、起こされる上下方向の流動は10-20 mに及ぶ。これによって、変化する水圧変化は0.1-0.2MPaである。従って、こうしたスケールで実験を行うためには極めて大規模な実験装置が必要になり、こうした中では、通常、藻類の細胞構造の観察や藻類の微妙な挙動の観察は不可能である。本研究ではこうした問題を解決するために、直径1mm程度のガラス管を用い、これに水を満たし圧力を掛けるという形で実験を行っている。そのため、負荷すべき全圧力も小さく、手軽に室内で実験を行うことが可能になる。藻類をこのガラス管内で培養、横から顕微鏡で観察を行うという、画期的な方法を編み出して研究が行われており、これによって、これまでほとんど研究が進んでこなかった現象の解析を進めている。

研究では、藻類としては、*Pseudoanabaena galeata*、*Micocystis aeruginosa* を用い、圧力負荷を与える速度、光の有無を変化させて培養実験を行い、それぞれに、沈降速度影響、色素含有量、細胞内の気泡量や大きさ、細胞内構造を走査型電子顕微鏡によって可視化、考察を進めている。

主たる、研究成果は以下のような点である。

P. galeata、*M. aeruginosa* 共、深部に移動し、無光状態になると、光合成ができなくなることから、増殖速度が減少することはいうまでもない。しかし、一方で、細胞体積に比較して、細胞中の気泡の体積が減少、浮力が減少して沈降速度が増加する。気泡体積の減少は加圧によって生じているため、加圧強度が大きいほど沈降速度が大きくなる。また、この傾向は、暗状態においてより顕著である。さらに、加圧強度が大きい場合には、加圧期間に応じて、気泡が更に縮小することも示された。すなわち、これらの効果によって、一旦、深部に贈られた細胞は、時間と共に更に深い場所に沈降していくことになり、最終的には枯死に至る。さらに、沈降速度は加圧速度が速いほど大きくなることも示された。これらは、これまで経験的に行われてきた、曝気循環法の効果の理由を明確に証明したものであり、新しい発見である。また、この発見によって、通常は、緩い上昇流を生じさせることで周囲に下降流を生じさせるという方法で行われていた曝気循環法よりも、機械的により急速に下降流を生じさせた方が効果が大きいことが示唆され、この原理を応用したシステムが開発され、実用化されている。

次に、色素含有量については、加圧強度に応じて、クロロフィル a の量は明条件、暗条件共に減少することが示された。これが、増殖速度の減少をもたらしていると考えられる。一方で、特に、フィコビリソームについては、加圧によって、ある期間増加することが示された。これは、加圧されることが深部に移動したと感知され、深さによる強度の減少がより少ない波長帯の光を吸収するフィコビリソームの増加につながったと考えられる結果である。生態学的にも重要な発見である。

最後に、加圧が、水道水として供給する上で問題となるカビ臭の原因物質、ジメチルイソボルネオール（2 MIB）に対する影響も調べられた。結果は、加圧によって2 MIB 自体、また、2 MIB 生成に関与する遺伝

子である MIBS 共に、加圧によって減少すること、また、暗条件の場合には更に低い値になることが示された。この結果は、曝気循環法等、現対策法はカビ臭の生成は抑制する方向にあることが示され、こうした方法が、カビ臭対策に対しても問題のないことが初めて示された。

論文自体、上記の内容が、順序よく論理的に記述されており、また、記述等も独自なものであり、全く問題ないものであった。