

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510015

研究課題名（和文） 水環境を改善する高機能植生帯を創出するための沈水植物の化学生態学的特性の評価

研究課題名（英文） Investigation on the chemical ecology characteristics of submerged macrophytes to establish the vegetation for improvement of water quality

研究代表者

中井 智司（NAKAI Satoshi）

広島大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80313295

研究成果の概要（和文）：

ホザキノフサモからのアレロケミカル(ピロガロール、没食子酸、(+))カテキン、オイゲニン、エラグ酸、ノナン酸、オクタデセン酸)の放出速度を把握した。さらに、シアノバクテリアと競合緑藻類の混合培養系やアオコが発生する実際の池沼水の系に対し、現実的な植生密度のホザキノフサモから放出されるアレロケミカルを作用させることで、シアノバクテリアが優占する温度・光条件であっても、シアノバクテリアの優占を抑止しうることを実験的に示した。

研究成果の概要（英文）：

The release rates of 8 anti-cyanobacterial allelochemicals from *Myriophyllum spicatum* were determined. By adding the compounds to (i) a cyanobacterial medium where a cyanobacterium and green algae were inoculated or (ii) pond water including cyanobacteria on the basis of their release rates so as to simulate their excretion by *M. spicatum*, the cyanobacterial dominance was prevented, though the culture conditions are more preferable for the cyanobacterial growth.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：アレロパシー、植生帯、シアノバクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

人為的活動によりダメージを受けた沿岸植生帯の再生と修復は現代の責務である。植生帯は水質浄化において重要な役割を果たすが、植生帯が喪失し水質が悪化した湖、池沼ではアオコが発生し、水道水の異臭味発生などの問題が起こっている。一方、水資源の利用のため、アオコの発生抑制等の水環境

の改善はわが国のみならず、世界各国での喫緊の課題である。

そこで本研究では、沈水植物のアレロパシーに着目した。沈水植物と藻類は拮抗的關係にあり、栄養塩や光の競合、そしてアレロパシーがある。また、動物プランクトンの増加に伴う間接的な効果もある。実際の水環境中では、このような効果が複合的に作用してい

ると考えられるが、特に藍藻類に対するアレロパシー効果が強い沈水植物を植栽する場合、藍藻類の増殖を直接抑制することにより、藻類の種構成をアオコが発生しないものに変遷させられると期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、藍藻類が優占しないように藻類の種構成を変遷させる沈水植物の化学生態学的特性を明らかにする。まず、沈水植物ホザキノフサモからのアレロパシー物質 (+) catechin, CAT; eugeniin, EUG; ellagic and, EA; gallic acid, GA; pyrogallic acid, PA; nonanoic acid, NA; cis-6-octadecenoic, 6OA; cis-9-octadecenoic acid, 9OA) の放出速度を把握し、放出速度に基づいてアレロパシー物質を藍藻類と池沼に一般的な他藻類との混合培養系、藍藻類を含む実際の池沼の水に作用させ、アレロパシー効果の種特異性とアレロパシーによる藻類の種構成の変遷を確認することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) アレロケミカルの放出速度

三角フラスコに滅菌済みの Gorham 5 倍希釈培地を入れ、これにミリ Q 水で洗浄したホザキノフサモを 720 g dry wt m<sup>-3</sup> となるように投入した。そして、25°C, 60 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> の連続光照射条件下で 70 rpm にて振盪培養した。培養期間中、培養液を濃縮してジアゾメタンにより誘導体化後、GC/MS にて測定した。

### (2) 混合培養系での評価

Gorham 25 倍希釈培地または 25 倍希釈培地にシアノバクテリア (*Microcystis aeruginosa*)、緑藻 (*Scenedesmus obliquus*) 各々、あるいはそれらを混合したもの を植種した。温度を 20~30°C に設定し、光量 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、70 rpm 回転振盪培養した。培養期間中、水深 0.5~1 m にて植生密度 0~288 g dry wt m<sup>-2</sup> (0~288 g dry wt m<sup>-3</sup>) のホザキノフサモが放出する量のアレロケミカルを毎日培地に添加し、各系列のシアノバクテリア、緑藻の生物量を顕微鏡で計測、増殖速への影響を評価した。

### (3) 池沼水を用いた評価

アオコが発生する東広島市七つ池より池水を採取し、濃縮した藻類を用いて混合培養を行った。濃縮池水中の各藻類の濃度は、シアノバクテリアで 52×10<sup>4</sup> cells·ml<sup>-1</sup>、緑藻で 84×10<sup>4</sup> cells·ml<sup>-1</sup> であった。混合培養実験は採取した緑藻が 1×10<sup>4</sup> cells·ml<sup>-1</sup> となるように植種し、そこに別途室内にて培養しておいたシアノバクテリア (*M. aeruginosa*) を 1×10<sup>4</sup> cells·ml<sup>-1</sup> を追加で添加して培養を行った。なお、培養期間中は 720 g dry wt m<sup>-3</sup> に相当する 8 種のアレロケミカルを添加した。

## (4) 実池沼での評価

光や栄養塩、動物プランクトンによる捕食圧も作用する条件下において、実際に植生帯を創出した際の改善効果を評価するため、ホザキノフサモ 370 dry wt m<sup>-3</sup>、1110 dry wt m<sup>-3</sup> を植栽した水槽 (図 1) をアオコが発生する池沼 (埼玉県川越市伊佐沼) に設置し、水槽内の藻類をモニタリングした。



図 1 伊佐沼に設置した水槽

## 4. 研究成果

### (1) アレロケミカルの放出速度

アレロケミカルの放出速度を表 1 に示す。8 種のアレロケミカルの中で、最も放出速度が大きかったのはオイゲニン (EUG) であった。なお、6OA と 9OA については、GC/MS 上で分離できなかったため、各々が放出されていると仮定した値を最大値として示した。

表 1 ホザキノフサモ 720 g dry wt m<sup>-3</sup> からのアレロケミカルの放出速度  
括弧内は標準偏差 (n=5, EA, 6OA, 9OA; n=6, CAT, EUG, GA, PA; n=15, NA)

| アレロケミカル<br>(分子量) |             | 放出速度<br>[nmol g dry wt <sup>-1</sup><br>h <sup>-1</sup> ] |
|------------------|-------------|---|
| ポリフェノール          | CAT (290.3) | 0.55 (0.28)   |
|                  | EA (302.2)  | 11 (16)   |
|                  | EUG (938.7) | 22 (7.7)  |
|                  | GA (170.1)  | 2.5 (0.72)  |
|                  | PA (126.1)  | 2.4 (1.5)   |
| 脂肪酸              | NA (158.2)  | 5.3 (6.6)   |
|                  | 6OA (282.5) | < 7.1 (1.8)   |
|                  | 9OA (282.5) | < 5.3 (1.7)   |

### (2) 混合培養系に於けるアレロパシー効果

図 2 に Gorham 25 倍希釈培地を用い、温度 30°C で培養を行った混合培養の比増殖速度を示す。また、アレロケミカル無添加と植生密度 288 g dry wt m<sup>-3</sup> 相当分のアレロケミカル添加の系の増殖挙動の結果を図 3 に示す。なお、図中の 4 kg-wet·m<sup>-3</sup> は 288 g dry wt m<sup>-3</sup>、2 kg-wet·m<sup>-3</sup> は 144 g dry wt m<sup>-3</sup> に相当する。

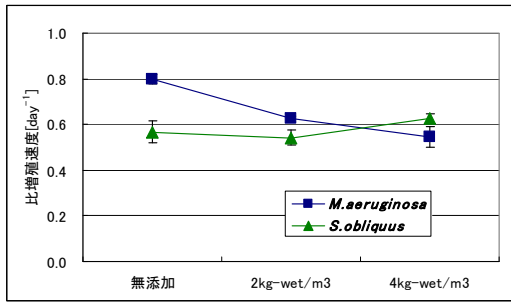


図2 Gorhan25倍希釈培地において温度30°Cで混合培養した *M. aeruginosa* と *S. obliquus* との比増殖速度の比較

アレロケミカルを加えない場合、*M. aeruginosa* の比増殖速度が *S. obliquus* に勝った(図2)。しかしながら、植生密度 288 g dry wt m<sup>-3</sup> に相当するアレロケミカル添加のとき比増殖速度が逆転した。さらに、図3に示すように、*M. aeruginosa* と *S. obliquus* との混合培養系において、アレロケミカルを添加しない対照系においては、*M. aeruginosa* の増殖が突出しており、*S. obliquus* の最大増殖量はその1/10程度であった。これに対し、ホザキノフサモ 288 g dry wt m<sup>-3</sup>相当のアレロケミカルを加えると、*M. aeruginosa* の最大増殖量は *S. obliquus* を下回った。この結果から、*M. aeruginosa* が優占する条件であってもホザキノフサモ 288 g-dry/m<sup>3</sup>のアレロパシーを利用することでその優占を抑止できることが確認できた。

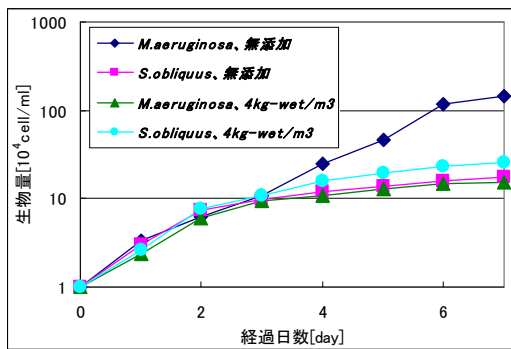


図3 Gorhan25倍希釈培地において温度30°Cで混合培養した *M. aeruginosa* と *S. obliquus* の増殖曲線

次に温度による影響を評価した。図4に示すように、144、288 g dry wt m<sup>-3</sup>に相当するアレロケミカルによって *M. aeruginosa* の比増殖速度は低下した。増殖抑制効果は温度によって異なり、144、288 g dry wt m<sup>-3</sup>に相当するアレロケミカルを加えた場合、比増殖速度は30°Cで対照系の83%、76%、25°Cでは65%、53%となった。これより、*M. aeruginosa* のアレロケミカルに対する感受性は温度により変化することが認められた。

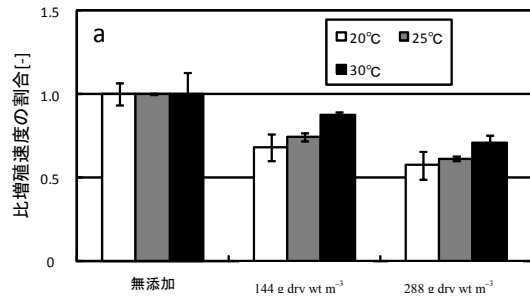


図4 ホザキノフサモのアレロケミカルによる *M. aeruginosa* に対する増殖抑制作用への温度の影響

### (3) 池沼水を用いた評価

アレロケミカルを加えない場合は、シアノバクテリアが優占したが(図5)、アレロケミカルを加えると緑藻の細胞数がシアノバクテリアの細胞数を上回った(図6)。これより、実際の池沼において当該植生帯を創出することにより、種構成を変遷させられることを確認した。

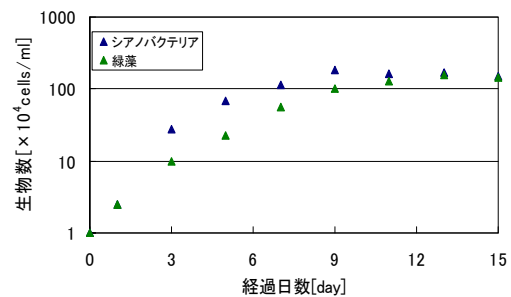


図5 池沼水を用いた評価結果(アレロケミカル非添加)

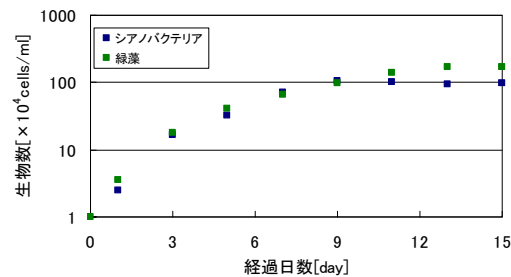


図6 池沼水を用いた評価結果(アレロケミカル添加)

### (4) 実池沼での評価

図7に示すように、ホザキノフサモを植栽した水槽のクロロフィル a は植栽しない水槽以下となり、藻類の増殖抑制作用を確認した。また、目視ではあるが、アオコ状態となることは認められなかった。但し、実験は秋～冬にかけてしか行えておらず、春～夏においても同様の効果が得られるか否かを確認する必要がある。

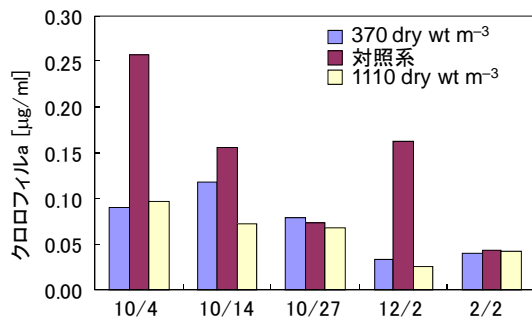


図7 各槽におけるクロロフィル a 濃度

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. S. Nakai, et al.: Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*, *Water Science & Technology*, 査読有り, in press.
2. Satoshi NAKAI, et al.: Anti-cyanobacterial allelopathic effects of plants—used for artificial floating islands, *Allelopathy Journal*, 査読有り, 2010, 26, 113-122.

[学会発表] (計6件)

1. S. Nakai et al.: Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of a submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*. 14th World Lake Conference, 2011年11月1日, Austin, Texas USA
2. S. Nakai et al.: Feasibility of using the allelopathic effect of *Myriophyllum spicatum* for control of cyanobacterial growth, The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2011年10月3日, Tokyo, JAPAN
3. 瀬戸範彦他: シアノバクテリアの増殖抑制への沈水植物のアレロパシーの利用可能性の評価, 第45回日本水環境学会年会, 2011年3月19日, 北海道大学
4. 瀬戸範彦ら: ホザキノフサモの *Microcystis aeruginosa* に対するアレロパシー効果への影響因子, 第14回日本水環境学会シンポジウム, 2011年9月11日, 宮城県仙台市
5. Satoshi Nakai, et al.: Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of a submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*, World Water Congress and Exhibition, 2010年9月5日, カナダ, モントリオール

[図書] (計2件)

1. Satoshi Nakai: Fundamental study on the aquatic environment restoration using

allelopathic effects caused by plants, Ann. Rep. Interdisciplinary Res. Inst. Environ. Sci., 28, 45-55 (2009.12). (報告書)

2. Sheng Zhou, Satoshi Nakai, Megumi Nishikawa, Masaaki Hosomi: The functional role of *Phragmites australis* in the inhibition of cyanobacterial growth and the transition of plant species, Aquatic Ecosystem Research Trends, (G. H. Nairne, Ed.), 187-216, Nova Science Publishers, N.Y. (2009.6). (著書)

[その他]

ホームページ

<http://environ.hiroshima-u.ac.jp/HPmain/projects/pdf/allelopathy.pdf>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中井 智司 (NAKAI Satoshi)

広島大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80313295

##### (2)研究分担者

西嶋 渉 (NISHIJIMA Wataru)

広島大学・環境安全センター・教授

研究者番号：20243602

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：