

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510008
 研究課題名（和文） 池沼の藻類種の構成を積極的に改善する沈水植物帯の再生のための基礎的研究
 研究課題名（英文） Studies on reestablishment of the submerged aquatic plant vegetation for control of algal species in ponds
 研究代表者
 中井 智司（Satoshi NAKAI）
 広島大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：80313295

研究成果の概要：

ホザキノフサモのアレロケミカルである脂肪酸について、放出速度を把握した。放出速度に基づいて脂肪酸とポリフェノールをシアノバクテリアの培地に連続添加し、シアノバクテリアの増殖への影響を評価した結果、脂肪酸とポリフェノールによってホザキノフサモのシアノバクテリアに対するアレロパシーを概ね説明しうることを見出した。さらに、緑藻や珪藻よりもシアノバクテリアの方がアレロケミカルに対して敏感である可能性を認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境動態解析・環境計測

キーワード：アレロパシー、植生浄化、藍藻類、増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

富栄養化が進行した湖沼において、シアノバクテリア（藍藻類）の異常増殖により、水の華（water-bloom）と呼ばれる「アオコ」が形成され、水質の悪化、酸素欠乏などによる魚のへい死、藻類の腐敗による悪臭の発生、景観の悪化、水道水の異臭・異味、浄水処理における濾過閉鎖などの問題の要因となっている。さらに、アオコを形成するシアノバ

クテリアの中にはミクロキスチンなどの有毒物質を産出するものがあり、これによる家畜のへい死が報告されている。1998年には、世界保健機関（WHO）が飲料水および環境水中に含まれるミクロキスチンの濃度について勧告がなされた。このように、アオコは解決すべき重要な環境問題の1つとなっており、シアノバクテリアの増殖抑制対策が必要となっている。

本研究では、沈水植物と藻類間のアレロパ

シー（生物間相互作用）に着目した。アレロパシーとは、植物が放出した化学物質（アレロケミカル）が他の生物に阻害的あるいは促進的な影響を与えることであり、本研究ではシアノバクテリアの増殖を抑制する効果を狙う。

既往の研究では、実際に植生しているホザキノフサモの最大密度 10 kg-wet/m² をもとに、ホザキノフサモと *Microcystis aeruginosa* とを培養すると、*M.aeruginosa* の増殖を最大増殖量のほぼ 100%抑制できることが実証されている。また、ホザキノフサモのアレロケミカルとして、ポリフェノール 5 種 (Pyrogallol, Gallic acid, (+)-Catechin, Ellagic acid, Eugenin) と脂肪酸 3 種 (Pelargonic acid, Oleic acid, Petroselinic acid) が同定されている。

実際の湖沼には多数の藻類が共存している。アレロパシーを利用する場合、アレロパシーを説明できる物質を明らかにすると同時に他の藻類への影響も検討する必要がある。

2. 研究の目的

まず、ホザキノフサモからの脂肪酸の放出速度の把握を行うこととした。さらに、得られた脂肪酸の放出速度、及び報告されたポリフェノールの放出速度に基づき、アレロケミカル（ポリフェノール及び脂肪酸）をシアノバクテリア培養液に添加することにより、アレロケミカルによるシアノバクテリアへの増殖抑制効果を評価した。さらに、アレロケミカルのシアノバクテリア・緑藻・珪藻の増殖速度への影響を評価する。

3. 研究の方法

○脂肪酸放出速度の測定

沈水植物は、日本の河川や湖沼において一般的に見られる水草であるホザキノフサモ (*Mriophyllum spicatum*) を対象とした。ホザキノフサモは日野市栄町（日野下堤用水）の用水路より採取した。培養液は、採取したホザキノフサモを 10 g-wet/L の濃度で Gorham5 培地に入れ、温度 25 °C、光量 5000 lux、70 rpm で回転振盪培養して作成し、これをホザキノフサモ培養液（以下培養液と示す）とした。

脂肪酸の放出速度は、2 日ごとの培養液中の脂肪酸濃度の経時変化より求めることとした。栽培液中の脂肪酸存在量は微量であるため、分析の際には濃縮を行う必要がある。以下に実験手順を示す。

栽培液を予め超純水を通液した GF/F フィ

ルターで濾過した。次に、メタノール/ジエチルエーテル、メタノール、0.01 mol/L HCl により固相カートリッジ (OASIS HLB) をコンディショニングした。そして、固相カートリッジに培養液を通液した。0.01 mol/L HCl にて洗浄した後、メタノール/ジエチルエーテルで抽出物を溶出させた。溶出液を無水硫酸ナトリウムで脱水処理し、窒素ガスによってパージした後、ジアゾメタンで誘導体化して GC/MS にて分析した。

ホザキノフサモ培養液中の脂肪酸濃度の物質収支は以下の式（式 1）で表される。

$$\text{脂肪酸の存在量の変化} \\ \text{放出速度} - \text{消失速度} \quad (\text{式 1})$$

培養液中の脂肪酸は自動酸化しにくいことから、消失速度は 0 であると近似した。よって、培養液からの脂肪酸の放出速度は培養液の脂肪酸濃度変化となる。

○アレロケミカルの寄与の評価

アオコの代表的な構成種の 1 つであるシアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* (NIES-87) を対象とした。*M.aeruginosa* は湖沼において一般的に見られるシアノバクテリアであり、霞ヶ浦などでアオコ形成による被害が報告されている。

まず、放出速度に基づき、アレロケミカルのメタノール溶液を作成した。次に、三角フラスコに Gorham5 培地を 80 mL 入れ、オートクレーブにより 121 °C で 15 分間加熱殺菌した後、*M.aeruginosa* を植種した（以下、シアノバクテリア培養液と示す）。植種後シアノバクテリア培養液を温度 25 °C、光度 5000 lux の光を照射し、回転数 70rpm で回転振盪培養を行った。

培養開始から 1 日ごとにアレロケミカル及び Gorham5 培地 5mL を添加した。なお、Gorham5 培地シアノバクテリア培養液中のメタノール濃度が高くなることを防ぐために添加している。系列としては、ポリフェノールを添加した系、脂肪酸を添加した系、ポリフェノールと脂肪酸を添加した系、対照系としてメタノールを添加した系を対象とした。さらに 2 日ごとにシアノバクテリア培養液の濁度を積分球式デジタル濁度計 (ANA-108、東京光電株式会社) によって測定した。

培養開始から 1 日ごとにアレロケミカル及び Gorham5 培地 5mL を添加した。なお、アレロケミカルについては標準物質を入手できなかった Eugenin を除くポリフェノール 4 種及び脂肪酸 3 種を添加した（濃度及び添加量は表 3-1 と同様）。さらに 1 日ごとに

各培養液の濁度及び細胞数を測定した。

○藻類の増殖速度に対するホザキノフサモのアレロケミカルの影響の評価

三角フラスコに Gorham5 培地を入れ、オートクレーブにより 121 °C で 15 分間加熱殺菌した後、シアノバクテリア、緑藻、珪藻をそれぞれ植種した。植種後、各培養液を温度 25 °C、光度 5000 lux の光を照射し、回転数 70rpm で回転振盪培養を行った。

4. 研究成果

○脂肪酸放出速度の測定

植生濃度 10 g-wet/L ホザキノフサモ培養液中の Pelargonic acid、Petroselinic acid、Oleic acid 濃度の経時変化をモニタリングできた。なお、GC/MS で分析を行う際、Oleic acid 及び Petroselinic acid のピーク分離は困難であったため、これらの濃度はそれぞれが最大限放出された場合の値を示している。上の図では時間に比例的な濃度の経時変化がみられたが、繰り返し測定を行うと栽培液によって濃度にばらつきがみられた。そこで、これらの値を平均して放出速度を算出した。

これら脂肪酸の放出速度はポリフェノール Eugeniiin 及び Ellagic acid よりは低いものの、Pyrogalllic acid、Gallic acid 及び (+)-Catechin よりも高レベルであることが示唆された。

○アレロケミカルの寄与の評価

算出された放出速度に基づき、アレロケミカルの添加実験を行った際の *M.aeruginosa* の濁度の経時変化を示す。また、対照系の最大増殖量を 100%としたときの添加系の最大増殖量の増殖割合をまとめたものも示す。

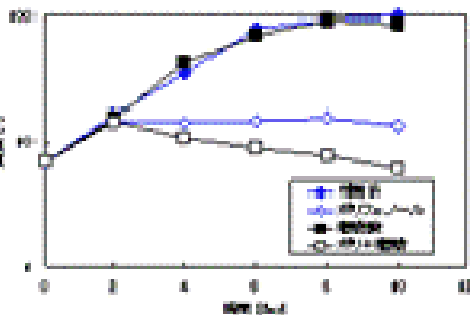


図 アレロケミカル添加における *M.aeruginosa* の増殖曲線

ポリフェノールを添加した系についてはおよそ 50%程度の増殖を抑制した。脂肪酸についてはバラツキがあるため、増殖抑制効果の数値化は困難であるが、脂肪酸のみでも強い増殖抑制効果を示す可能性がある。また、ポ

リフェノールと脂肪酸を組み合わせて添加することで、ポリフェノールを単独で添加したときよりも強い増殖抑制効果を示した。また、濁度はポリフェノールと脂肪酸を組み合わせて添加することで徐々に下がっていている。これはシアノバクテリアが死滅したためと考えられる。これらのことから、10 g-wet/L ホザキノフサモ培養液が 99%の増殖を抑制するとの報告と比較すると、アレロケミカルによりシアノバクテリアに対するホザキノフサモのアレロパシーの大部分を説明しうると考えられた。

○藻類の増殖速度に対するホザキノフサモのアレロケミカルの影響の評価

表に初期増殖段階における各藻類の比増殖速度を評価した結果、緑藻・珪藻では対照系とアレロケミカルを添加した系において、アレロケミカルによる増殖速度への影響はみられず、シアノバクテリアの増殖速度のみが低下している。このことから、シアノバクテリアが緑藻・珪藻に比べて、アレロケミカルに敏感である可能性があることが明らかになった。

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 3 件)

1. 松嶋夏希, 山田信吾, 周 勝, 中井智司, 細見正明, アレロケミカルである 5 種のポリフェノールのホザキノフサモからの放出挙動と *Microcystis aeruginosa* に対する増殖抑制効果、水環境学会誌、査読有、31、2008、763-767
2. S. Nakai, T. Okuda, W. Nishijima, M. Okada, Anti-cyanobacterial allelopathic effects of plants-used for artificial floating islands, Proceedings of 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 査読有、1, 2008, 284-289
3. S. Nakai, G. Zou, X. Song, Q. Pan, S. Zhou, and M. Hosomi, Release of anti-cyanobacterial allelochemicals from aquatic and terrestrial plants applicable for artificial floating islands, J. Water Environ. Technol., 査読有、6, 2008, 55-63

[学会発表] (計 4 件)

1. 中西 秀文ら、ホザキノフサモのアレロケミカルによる藻類への増殖抑制効果、第 11 回化学工学会学生発表会、2009.3.7、岡山
2. S. Nakai et al., Anti-cyanobacterial

allelopathic effects of plants-used for artificial floating islands, 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control, 2008.11.3, Lisbon Portugal

3. 中井智司ら, ホザキノフサモのアレロパシー効果を利用したシアノバクテリアの増殖抑制, 第 42 回日本水環境学会年会, 2008.3.19, 愛知
4. S. Nakai et al., Allelopathic growth inhibition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by aquatic and terrestrial plants, 16th Korea-Japan Symposium on Water Environment, 2007.10.18., Busan, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 智司 (Satoshi NAKAI)
広島大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号 : 80313295

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者