

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02245

研究課題名(和文) 藍藻に対する次世代型環境ストレス評価手法の開発とカビ臭対策の新技术への展開

研究課題名(英文) New technology to evaluate the environmental stresses of cyanobacteria and treatment system

研究代表者

浅枝 隆 (Asaeda, Takashi)

埼玉大学・理工学研究科・名誉教授

研究者番号：40134332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：藍藻は過剰な光強度の下では藍藻体内に活性酸素が生成、枯死に至る。そのため、水温、栄養塩濃度の他に光もストレスになる。本研究では、まず、代表的な活性酸素である過酸化水素濃度が、それぞれのストレス強度と高い相関があることを明らかにし、細胞内の過酸化水素量を用いてストレスを定量化する指標を開発した。次に、枯死に至る細胞内の過酸化水素量を求めた。また、異なるストレスが複合的に負荷する場合には、それら個別の生成量の和で表せることを示した。さらに、光強度に依る過酸化水素量は、光強度だけでなく細胞濃度にも依存して増加することを示し、夏季における水面近傍で強い光強度の下での増殖機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

藍藻は水域で毒性物質やカビ臭物質を産出するため、増殖を防止する対策が必要である。他方、藍藻は光合成で増殖するため、光強度を抑制すれば増殖を防止できると考えられ、対策が進められてきた。しかし、近年、強光ストレスの下で、藍藻体内に産出される活性酸素を利用する方がより効果的なことが明らかになった。光阻害とよばれる現象である。本研究では、ストレス下で藍藻体内に発生する代表的な活性酸素である過酸化水素の濃度と藍藻の生理特性との関係を、室内実験及び野外観測で明らかにした。この性質は他の植物にも利用可能な性質であることも示した。さらに、これを利用し、光阻害を利用して対策を進めるための定量的な条件を求めた。

研究成果の概要(英文)：Under stressed condition, including high light (photoinhibition), reactive oxygen species (ROS) is generated in cyanobacteria body, deteriorates the physiological condition, and inhibits cyanobacterial blooming. Hydrogen peroxide(H2O2), a major ROS, was applied to evaluate the stress intensity of cyanobacteria, obtaining the relationships between H2O2 per cell protein content, and the intensity of different types of stresses, such as temperature, nutrient depletion, and light intensity. They elucidate that H2O2 per cell protein becomes a good indicator to show the effect of stresses; when H2O2/protein ~ 4 is the threshold to survival of cyanobacteria, the total H2O2/protein under combined stresses is obtained by the sum of the component of each stress, etc. H2O2/protein under high solar radiation is proportionate with light intensity times 2/3 power of protein content, then the mechanism of the blooming without photoinhibition under high solar radiation was elucidated.

研究分野：水域生態学

キーワード：シアノバクテリア カビ臭 活性酸素 過酸化水素 環境ストレス 光阻害 アオコ対策 貯水池管理

1. 研究開始当初の背景

カビ臭、藍藻毒を産出することから、安価に藍藻を制御することは重要な課題である。しかし、現状では、曝気循環装置の導入といった、藍藻の増殖する表層の水を下層に輸送することで藍藻を減らそうとする対策が主流である。ところが、近年の研究では、表層の強い光の方が、藍藻に対しては、よりネガティブに働く(強光阻害)といったことが知られ、曝気循環で表層の藍藻を深層に輸送することの是非が問われる状況にある。他方、強光阻害の仕組みは明らかになってはきているものの、定量評価等はなされていないことから、強光阻害の特性を把握し、藍藻対策に利用する方法等については何も明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

以上の背景より、強光阻害の定量化やその特性を把握することは、藍藻対策を進める上で極めて重要である。しかし、この仕組みの解明には、実験室内での詳細な分析を必要とし、定量化、屋外も含めた実用化に向けた検証はほぼ不可能であった。そうした中、光を含む環境ストレスが付加されると藍藻体内に主要な活性酸素である過酸化水素が産出されることが示され、この過酸化水素濃度を利用することで、ストレスとしての影響の定量化が可能になることが考えられる。これまで難しい課題であった、強光阻害の特性を解明できる可能性がでてきたといえる。本研究では、この仕組みを活用することで、強光阻害の特性を明らかにし、藍藻対策に役立てることを目的としている。

3. 研究の方法

研究は、以下のように進められた。

野外観測： 強光阻害は、夏季の日中に生ずるといわれ、一日において定期的な観測が必要である。そのため、日の出前に、上方からの光を通すガラス瓶を複数作成、表層の水で満たし、いくつかの深度に固定、3時間ごとに一定数ずつ回収、水サンプルの OD730、クロロフィル濃度、プロテイン濃度、さらに、過酸化水素濃度を分析した。同時に、それぞれの時間に、水温、光強度の深さ方向の分布を測定した(図1)。

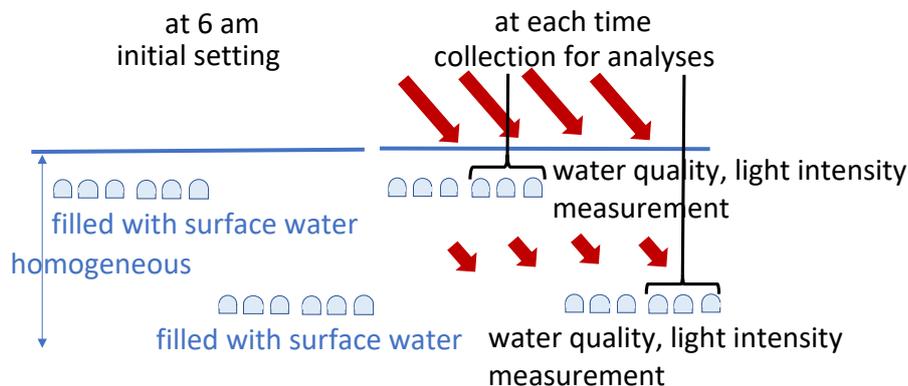


図1 野外観測の模式図

室内実験： 異なるタイプのストレスが同時に付加される場合に、それぞれのストレスの影響が過酸化水素濃度に与える影響の評価を行った。

まず、栄養塩律則によるストレス強度の測定を行った。藍藻体内の窒素、リン比は概ね 10 : 1 であることから、窒素濃度を 3000 $\mu\text{g/L}$ で一定に保ち、リン濃度 0.1–1000 $\mu\text{g/L}$ の範囲で変えた *Phormidium ambiguum* のサンプルを、培養器において、0–200 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ の異なる光強度 (PAR) で一定期間培養、OD730、クロロフィル濃度、プロテイン濃度、過酸化水素濃度、さらにカタラーゼ活性を分析した。

次に、*Microcystis aeruginosa* 及び *Phormidium ambiguum*、*Pseudoanabaena foetida* のそれぞれの種を 10 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ の水温に固定し、一定の異なる光強度で培養、分析を行うことで、水温と強光ストレスが同時に付加された場合の評価を行った。

さらに、10 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ の水温に設定、光強度を 1 時間ごとに 0 から 600 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ の範囲で増加、減少させ、3 時間ごとにサンプルを採取、上記の分析を行った。

これらの実験により、種ごとに対するストレスの影響を把握、野外観測の結果と比較した。

4. 研究成果

まず、過酸化水素濃度の一般的な特性として、以下のような結果が得られた。

1) 植物にストレスが付加されることで、細胞内に、ストレスの強度に応じた過酸化水素濃度が

産出され、細胞内の組織を破壊する。過酸化水素は、抗酸化活性によって一部は分解されるものの、ストレス強度に応じた過酸化水素濃度が検出される。これを用いることで、負荷されているストレスの強度を把握することが可能になる。

- 2) 複数のストレスが付加される場合、ストレス全体に対して検出される過酸化水素濃度は、それぞれのストレスに対して検出する過酸化水素濃度の和で得られる。
- 3) 全体の過酸化水素濃度がある限界値を超えると、植物の生長は阻害され、代謝機能が低下することから、過酸化水素濃度も低下する。また、その状態が継続すると、その個体は枯死する。
- 4) 以上より、過酸化水素は異なるタイプのストレスの影響を一義的に表す指標とすることができ、異なるストレスの影響度の評価や、枯死の条件等を与える有用なパラメータとなることがわかった。

次に、藍藻に対し以下のような結果が得られた。

- 1) 一日の内で藍藻体内の過酸化水素濃度は光強度に比例して変化するものの光強度の変化に対し2-3時間程度遅れて変化する(図2)。

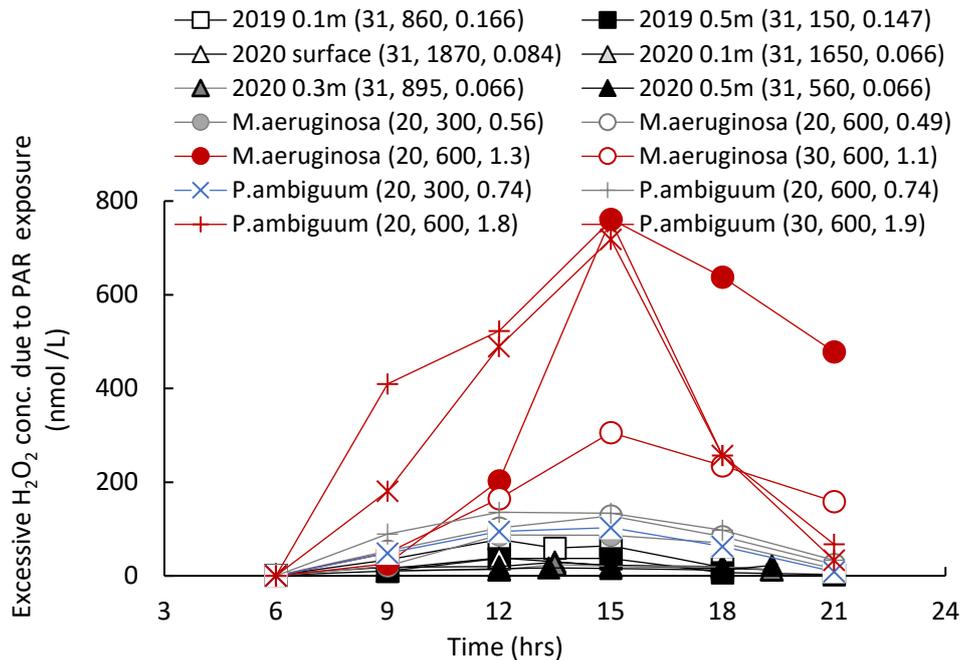


図2 野外観測及び実験における一日の内のH₂O₂濃度の変化
()内は、水温、PAR、OD730の値を示す

- 2) 藍藻に産出される過酸化水素濃度は、一定の光条件の下では、栄養塩の律速の程度に比例する。ただし、変化の傾向は光条件に応じて平行に変化することから、光強度による過酸化水素量と栄養塩の律速によるものは、独立で評価できると考えられる(図3)。
- 3) 藍藻細胞中に産出される過酸化水素(活性酸素)によって、比較的低い50μmol/m²/s程度の低い光強度でクロロフィルaは破壊され、濃度は低下する。
- 4) 他方、バイオマス(プロテイン濃度)は、それよりも高い光強度でも維持され続ける。しかし、光強度で200μmol/m²/s程度を超えると過酸化水素濃度の許容範囲を超え、減少する。(図4、5)
- 5) 過酸化水素濃度は、周辺の光強度ではなく、細胞表面に照射された光量に依存する。そのため、濃度が高い場合には、単純に光強度そのものではなく、光強度にバイオマス(プロテイン濃度)の2/3乗を掛けた値に依存することになる(図6)。
- 6) 以上の事より、過酸化水素濃度は、藍藻濃度が低い場合には、光強度の高い表層においても強光阻害を受けにくく増殖が可能である。しかし、ある藍藻の濃度が一定量を超えると、ストレス(H₂O₂濃度)が増加し、強光阻害のために、それ以上の増殖が困難になる。夏季に、水面に藍藻の枯死体が大量に浮遊した状態がこれにあたる。

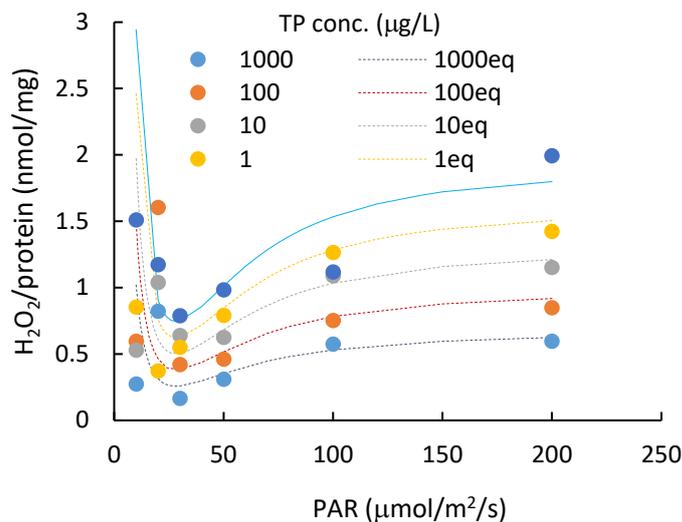


図3 異なるリン濃度、光強度で培養を行った際のバイオマスあたりのH₂O₂量
Phormidium ambiguumを使用

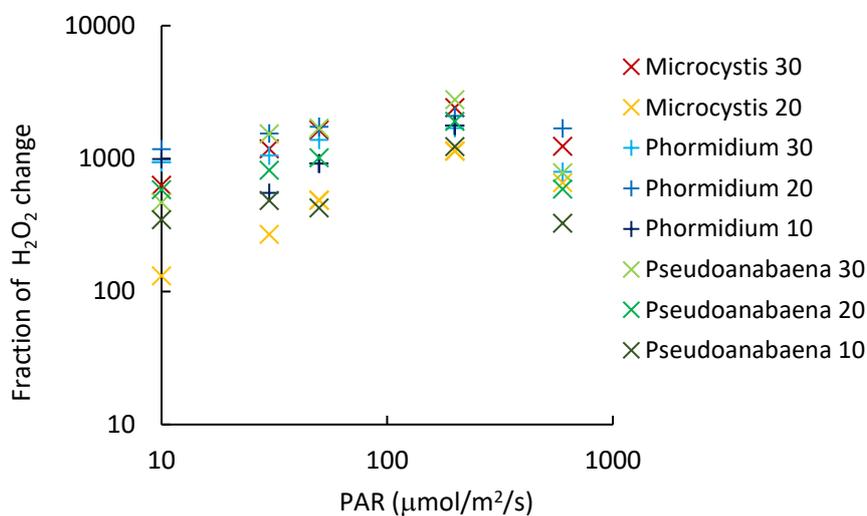


図4 1週間異なる光条件、水温（属名の後に記載 °C）で培養した際の
H₂O₂濃度の変化量の初期地に対する割合

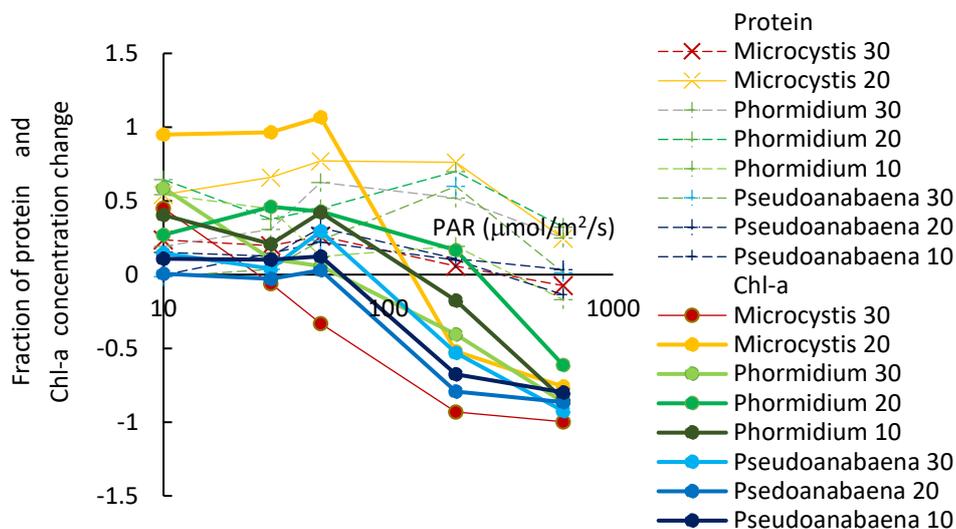


図5 異なる光条件、水温（属名の後に記載 °C）で1週間培養した際のプロテイン及びクロロ
フィルaの変化量の初期地に対する割合

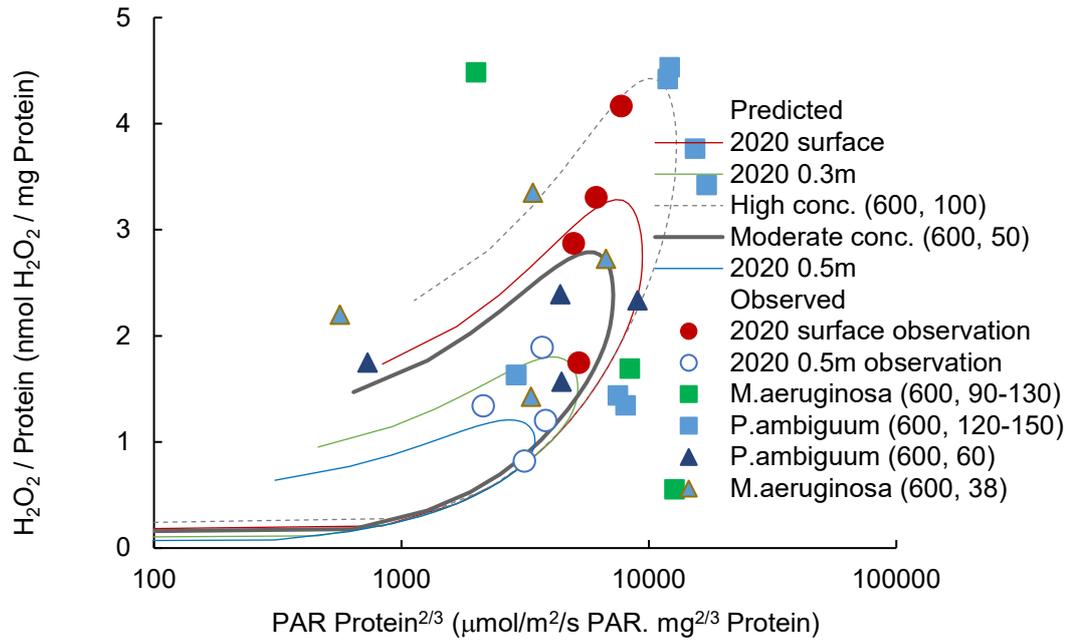


図6 PAR x Protein^{2/3}に対するバイオマスあたりのH₂O₂量の日変化とモデルによる予測結果

- 7) 強光阻害の仕組みに従って、定量的把握が可能なモデル化を行い、実用化を可能にした。なお、このモデルは従来の生態系モデルに容易に導入が可能である。
- 8) 藍藻は、他の光合成生物と比較して強光阻害を受けやすく、強光阻害は、藍藻の増殖を抑制する仕組みである。現在、藍藻対策として曝気循環を用いて表層水を深層に輸送することで、藍藻の光合成量を抑制する対策がとられている。しかし、この対策は、一方では強光阻害を抑制するシステムでもある。条件によっては増殖を加速させる可能性もあり、十分な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 12件/うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 T. Asaeda, M. Rahman, H. D. L. Abeynayaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Hydrogen peroxide can be a plausible biomarker in cyanobacterial bloom treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-02970-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 T. Asaeda, M. H. Rashid, X. Liping, L. Vamsi-Krishna, A. Barnuvo, C. Takeuchi, M. Rahman	4. 巻 13
2. 論文標題 The distribution of submerged macrophytes in response to intense solar radiation and salinity reveals hydrogen peroxide as an biotic stress indicator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-3048-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 T. Asaeda, M. Rahman, L. Vamsi-Krishna, J. Schoelynck, M. H. Harun	4. 巻 12
2. 論文標題 Measurement of foliar H ₂ O ₂ concentration can be an indicator of riparian vegetation management	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17658-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 T. Asaeda, M. Rahman, X. Liping, J. Schoelynck	4. 巻 13
2. 論文標題 Hydrogen peroxide variation patterns as abiotic stress responses of <i>Egeria densa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 855477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.855477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 T.Asaeda, M.D.H. Jayasanka, L. Vamsi Krishna	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of habitat preferences of invasive macrophytes <i>Egeria densa</i> in different channel slopes using hydrogen peroxide as an indicator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.0042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 A.Herbst, V. Ranawakage, T. Asaeda, H. Schbert	4. 巻 70
2. 論文標題 Immediate response of <i>Chara braunii</i> exposed to zinc and hydrogen peroxide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 57-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 L.Vamsi Krishna, M. H. Rashid, T.Asaeda	4. 巻 17
2. 論文標題 Spatial pattern of foliar hydrogen peroxide concentration and its implication in riparian vegetation treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Landscape and Ecological Engineering	6. 最初と最後の頁 471-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11355-021-00464-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T.Asaeda, M.H. Rashid, J.Schoelynck	4. 巻 8
2. 論文標題 Tissue hydrogen peroxide concentration can explain the invasiveness of aquatic macrophytes: A modeling perspective	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Environmental Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fenvs.2020.516301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 V.P. Ranawakage, T.Asaeda	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of the physiologivcal alterations in Ceratophyllum demersum L along a diurnally changing solar irradiance gradient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Interactions	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17429145.2020.1719223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ranawakage VP, Asaeda T	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of the physiological alterations in Ceratophyllum demersum L along a diurnally changing solar radiance gradient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Interactions	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17429145.2020.1719223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 G.Nuhetaer, T.Asaeda, S.M.D.H.Jayasanka, M.B.Banya,H.D.L. Abeynayaka, M.H. Rashid, H.Y. Yan	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of light intensityand exposure period on the growth and stress responses of two cyanobacteria species: Pseudanabaena galeata and Microcystis aeruginosa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 article 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/w12020407	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 D.D. Shao, W.W. Zhou, T.J. Bouma, T. Asaeda, Z.B. Wnag, X.L. Liu XL, T. Sun, B.S. Cui	4. 巻 125
2. 論文標題 Physiological and biomechanical reponses of the salt-marsh plant Spartina alterniflora to long-term wave exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 291-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcz067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 M.H. Rashid, M.N. Uddin, A. Sakar, M. Parveen, T. Asaeda	4. 巻 35
2. 論文標題 The growth and nutrient uptake of invasive vines on contrasting riverbank soils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 River Research and Applications	6. 最初と最後の頁 749-758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rra.3435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 T. Asaeda, M. Rahman, J. Schoelynck
2. 発表標題 A new methodology to evaluate the stress intensity and the colonization zone of aquatic plants, as an ecohydraulics tool
3. 学会等名 40th IAHR World Congress Viena (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Asaeda, M. Rahman, A. Nohara, M. Matsubayashi
2. 発表標題 Cyanobacterial characteristics evaluation using hydrogen peroxide in diurnal light intensities
3. 学会等名 6th Water Resources and Wetlands, Tulcea Romania (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Asaeda
2. 発表標題 Evaluation of the habitat preferences of submerged macrophytes under various environmental stresses: A model perspective
3. 学会等名 39th IAHR World Congress, Granada, Spain, From Snow to Sea 19-24 June 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 T. Asaeda, M.H. Rashid, M. Rahman, F. Imamura
2 . 発表標題 New method to identify the colonization level of riparian vegetation species
3 . 学会等名 5th International Conference "Water Resources and Wetlands" (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M. Rahman, T. Asaeda, H.D.L. Abeynayaka
2 . 発表標題 Hydrogen peroxide can be a plausible biomarker in cyanobacterial responses to photosynthesis
3 . 学会等名 5th International Conference "Water Resources and Wetlands" (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 T.Asaeda
2 . 発表標題 New method to identify the colonization level of riparian vegetation species using stress analysis
3 . 学会等名 35th Congress of the International Society of Limnology (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 T. Asaeda
2 . 発表標題 Longitudinal dsitribution of Egeria densa in a gravel river channel and the ecosystem engineering process for the higher colonization
3 . 学会等名 6th International River Science Society Symposium (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Asaeda
2. 発表標題 Application of hydrogen peroxide indicator to evaluate the habitat preference of plant species in the riparian zone
3. 学会等名 6th International River Science Society Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 史子 (Imamura Fumiko) (50568459)	日本工営株式会社中央研究所・先端研究センター・専門部長 (92103)	
研究分担者	セナヴィラタナ ジャヤサンカ (Senavirathna Jayasanka) (70812791)	埼玉大学・理工学研究科・助教 (12401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------