

ホテイアオイ及びシュロガヤツリの持つ *Microcystis aeruginosa* に対する アレロパシー的増殖抑制効果の検証

九州大学大学院 学生会員 楠本勝子 九州大学大学院 正会員 久場隆広
九州大学大学院 フェロー 楠田哲也

1. はじめに

近年問題となっている閉鎖性水域の富栄養化による藍藻類の異常発生とアオコの形成は景観の悪化、ろ過閉塞などの浄水障害、カビ臭の発生などを引き起こすため、早急な問題の解決が望まれている。特にアオコの優占種となりやすい *Microcystis aeruginosa* は有毒物質 microcystin を生成し、人畜への被害が世界各国で多数報告されている。アオコの発生を抑制する手段として挙げられるのは富栄養化した水域の浄化であるが、流入河川からの栄養塩負荷量を抑制することは困難であり、既に富栄養化した閉鎖水域の物理的浄化手法はコストが高く効果が現れにくい。現在、全窒素と全燐の両項目で環境基準を達成している湖沼(公共用水域指定)は全体で40%程度と著しく低く、アオコの問題も解決されていないのが現状である。そこで我々は大型水生植物のアレロパシーを利用して、有毒藍藻である *M.aeruginosa* を抑制することを試みている。実験に利用したホテイアオイやシュロガヤツリに代表される大型水生植物は湖水中の余剰NPを吸収、除去する能力が高いことから、湖水の浄化対策として水耕栽培浄化法などが注目されており、アレロパシー効果によって藍藻類を抑制可能であるならば、栄養塩の除去と併せて有用なアオコ対策になると考えられる。筆者らは既にホテイアオイとシュロガヤツリの裁断片及び水抽出液に *M.aeruginosa* に対する強い増殖抑制効果を確認しており⁽¹⁾、本実験では生体の状態での両植物による *M.aeruginosa* に対する抑制効果を検討した。さらに、植物との競合で起こりうる微量元素の変動が *M.aeruginosa* の増殖に及ぼす影響も検討した。

2. 試供植物及び藍藻類

本実験では大型水生植物として既存の研究⁽¹⁾により、裁断片及び水抽出液に *M.aeruginosa* の増殖抑制が確認されているホテイアオイ (*Eichhorhria crassipes*, 市販)、シュロガヤツリ (*Cyperus alternifolius*, 福岡県保健環境研究所より譲渡)を使用した。藍藻類 *Microcystis aeruginosa* は国立環境研究所より分譲された単藻株(NIES-98)を一定条件(MA培地, 温度25℃, 照度2500lux, 明暗周期12時間, 振とう培養)の下、対数増殖期まで前培養したものを使用した。

3. 実験方法

3-1. 生体共生抑制実験 容量2lのガラスビーカーにMA培地を1l満たし、純水で洗浄したホテイアオイを栽培する。そこへ前培養した *M.aeruginosa* を植種し、温度25±2℃、照度5000lux(明暗周期12時間)の条件下で静置培養した。ビーカーに藍藻類が付着するのを防ぐために、根に傷がつかないようにマグネティックスターラーで緩撈拌した。シュロガヤツリも同様に、容量2lのガラスメスシリンダーにMA培地を2l満たし、純水で洗浄したシュロガヤツリを栽培した。シュロガヤツリは本来土壌に根を張る植物であるが、本研究においては実験を平易にするため水耕栽培の形で実験を行っている。どちらの実験においても増殖抑制を比較するために、同じ容器に培地のみを満たしたものの、植物のみを栽培したもの、*M.aeruginosa* のみを培養したもの、計3つの対照系を準備した。*M.aeruginosa* は経時的にバクテリア計数盤(ERMA)を用いて細胞数を計数し、増殖の様子を比較検討した。両実験とも定期的に三態窒素及びリン酸態リン濃度を測定し、窒素やリンが *M.aeruginosa* の増殖抑制の律則となっていないことを確認している。

3-2. 主要微量元素欠乏条件下での *M.aeruginosa* の培養実験 3-1. の実験終了後、ホテイアオイと *M.aeruginosa* を共生させた培地をGF/Cガラスフィルターで濾過した。誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS, 横河アナリティカルシステムズ製 PMS2000)を用いて実験終了時の、そのろ液中の微量元素残存量を測定した。その結果、Fe, Zn, Mn, Caの残存濃度が初期濃度と比較して著しく減少していた。したがって実験で確認された *M.aeruginosa* の抑制は微量元素の競合による可能性が挙げられる。そこでFe, Zn, Mn, Caをそれぞれ欠いた4種類のMA培地を作成し、前培養した *M.aeruginosa* を植種して増殖の様子を比較検討した。温度、照度などの培養条件は3-1. と同様とし、振とう培養した。

3-3. 大型水生植物の生育水による培養実験 大型水生植物から環境中に放出されるアレロケミカルによって *M.aeruginosa* が抑制されるならば、水生植物の生育水にも抑制効果が見られるはずである。そこでホテイアオイ及びシュロガヤツリを屋外で生育させ、その生育水を用いて *M.aeruginosa* の培養を試みた。ホテイアオイ及びシュロガヤツリはどちらもプラスチックのリアクターで水道水を用いて水栽培した。栽培は十分に日照量のある屋外で行った。一ヶ月ほど栽培した後、リアクター内の生育水を適量汲み上げ、GF/Cガラスフィルターでろ過したものをフラスコに100mlずつ採りMA培地と同じ組成となるように各種基質を添加した。そこへ前培養済みの *M.aeruginosa* を植種し、増殖の様子を比較検討した。3-2. で述べた微量元素との関係を補足する意味で、両植物について微量元素を除いた実験系を準備した。実験条件は3-2. と同様、藍藻類の計測は3-1. に準じた。

キーワード：アレロパシー、ホテイアオイ、シュロガヤツリ、*Microcystis aeruginosa*

連絡先：〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大学大学院工学府都市環境システム工学専攻
TEL 092-641-3131 (内線8714)

4. 結果及び考察

4-1. 水生植物の生体が *M.aeruginosa* に示す抑制効果 図-1にシュロガヤツリを用いた結果を示す。シュロガヤツリの生体は *M.aeruginosa* の増殖を抑制し完全に死滅させた。2週間培養したところ、藍藻類のみを培養した培地が真緑色を示したのに対して、シュロガヤツリと共生させた方は無色透明であり、目視しただけでもその効果は明らかであった。ホテイアオイの生体も同様の効果を示し、ホテイアオイが *M.aeruginosa* を死滅させるのに約1週間、シュロガヤツリが約3日であった。水生植物の大きさが異なるため単純には比較できないが、ホテイアオイよりもシュロガヤツリのほうが抑制力は強いと思われる。さらに実験当初ではなく藍藻類を完全に増殖させた段階でホテイアオイを添加したところ、こちらも急激に藍藻類を抑制・死滅させた。なお実験中、溶存態窒素及びリン濃度は十分量存在したことを確認しており照度も十分であったことから、培養開始直後、急激に *M.aeruginosa* の細胞数が減少し死滅した要因は大型水生植物が何らかの効果を与えたものと推定される。ただし、*M.aeruginosa* はFe, Mnの要求量が高い藻類であり、これら微量金属の競合も懸念された。

4-2. 主要微量金属の不足による *M.aeruginosa* の増殖抑制 Fe, Zn, Mn, Ca を欠乏させた培地で *M.aeruginosa* を培養した結果を図-2に示す。実験の結果、*M.aeruginosa* はZn及びMnの不足に対して顕著な反応を見せた。意外にもFe欠乏培地で培養した *M.aeruginosa* は通常の培地で培養したものと同程度の増殖を見せ、Feの存在形態についての議論が必要ではあるが、短期間であればFeの不足が増殖にあまり関わらないことを示した。共存実験終了後ICP-MSで分析したところ不足が確認された金属の中で、*M.aeruginosa* の増殖に影響を及ぼすと思われる金属元素はZnとMnであると考えられる。したがって4-1.で得られた結果はこれらの元素の競合によるものである可能性を否定できない。そこで改めてホテイアオイと *M.aeruginosa* を共存させ、初日から、*M.aeruginosa* が完全に死滅した5日目までサンプリングを行い、微量金属濃度を測定した。分析の結果、5日目までならばZn(図-3)及びMnは初期濃度とほぼ等濃度を維持していることが確認された。即ち *M.aeruginosa* の急激な抑制、死滅には金属元素の競合は関係していないと推定される。

4-3. 大型水生植物の生育水による抑制効果 実験結果を図-4に示す。ホテイアオイ、シュロガヤツリともにその生育水は *M.aeruginosa* に対して顕著な抑制効果を示した。ここで特筆すべきことはホテイアオイ、シュロガヤツリの生育水とも栄養塩のみを添加し、微量金属元素を欠いた系の方が抑制効果が小さいということである。シュロガヤツリに至っては金属元素を添加していないにも拘わらず、増殖は抑制されているが死滅させることはできなかった。この現象の要因は確定していないが、少なくとも本実験の条件下では微量金属元素濃度の多寡に関わらず、大型水生植物から環境中に放出された物質によって *M.aeruginosa* の増殖が抑制されたと言える。生育水に放出され、*M.aeruginosa* を抑制した物質はポリフェノール類と推定されるが、今後同定を試みる必要がある。

5. 結論

今回実験に利用したホテイアオイ及びシュロガヤツリは生体の状態でも *M.aeruginosa* を完全に抑制、死滅させることが確認された。またその生育水にも顕著な増殖抑制効果が見られたことから、これらの植物は環境中になんらかの化学物質を放出しており、それが *M.aeruginosa* に対して抑制効果を示すことが推定された。さらに今回のような短いスパンでの実験では微量金属の競合もとくには見られなかった。即ち栄養塩競合や遮光などと併せた間接的な影響による抑制ではなく、大型水生植物が直接藍藻類に何らかの効果を及ぼしている可能性が高く、アオコ問題に対する有効な手段となりうると考えられる。今後は抑制物質の同定など更に具体的にアレロパシー効果の有用性を検討していく。

[参考文献] (1) 楠本勝子、久場隆広、楠田哲也：大型水生植物のアレロパシーを利用した藍藻類の増殖抑制、土木学会第56回年次学術講演会概要集(2001)

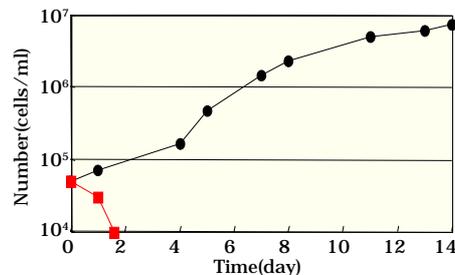


図-1 シュロガヤツリ生体による *M.aeruginosa* の抑制効果

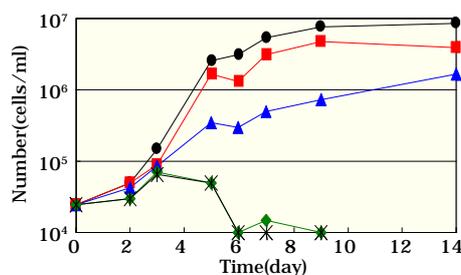


図-2 各微量金属の不足による *M.aeruginosa* の増殖変動

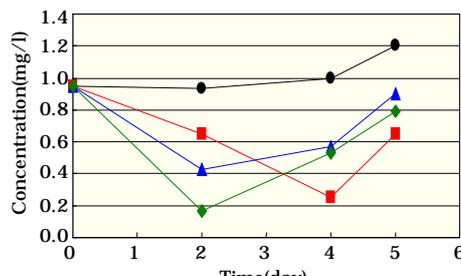


図-3 Zn濃度の変動

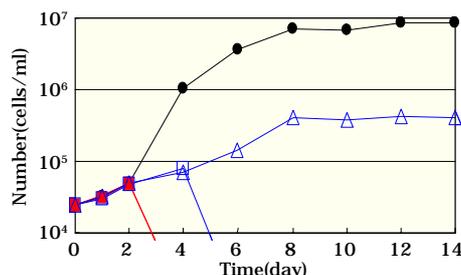


図-4 生育水による *M.aeruginosa* の抑制効果