

# 巴川水域環境研究 ～ホテイアオイのつくるバイオループ～

学校法人 静岡理科大学 静岡北高等学校 科学部水質班

## 1. 序論

ホテイアオイは南米原産の多年草であり、7ヵ月で200万倍<sup>1)</sup>になる異常繁殖が報告されている。巴川は全長18kmの2級河川である。麻機遊水地はその上流に位置し、総面積は86haである。遊水地は、水面の3割がホテイアオイで覆われている。ホテイアオイが大繁殖している水域の水が異様に透き通って見えたことが本研究のきっかけである。



図1 ホテイアオイと麻機遊水地のホテイアオイ繁殖水域

更に、溶存酸素濃度（以降はDOと表記）の異常な低さに着目し、ホテイアオイの密集域では、植物プランクトンの減少により捕食食物連鎖が弱まり、植物プランクトンが排出する有機物の代替として、ホテイアオイが微生物食物連鎖の起点となる溶存物質を排出し、細菌による著しいDO低下が起こるのではないかと考えた。図2に示す循環を「ホテイアオイのつくるバイオループ」と定義した上で、ホテイアオイの密集域においてバイオループが形成されるという独自の仮説を立てた。本稿では、この仮説の検証結果と周囲の水環境に与える影響を考察結果について報告する。

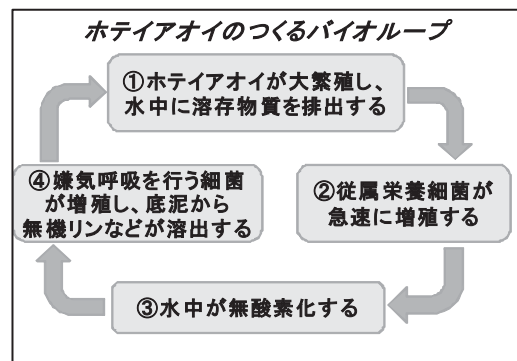


図2 バイオループの定義

## 2. ホテイアオイのつくるバイオループの検証

### (1) ホテイアオイによる溶存物質の排出

採取したホテイアオイを洗浄後、水道水を入れた水槽に入れ、室内で30日間栽培した。2週間目頃から、ホテイアオイの葉柄や根に沿って細菌のコロニーと思われる白い物質が現れ、30日後には明確化したことから、ホテイアオイは水に接している部分から溶存物質を排出する可能性があると考えた。ホテイアオイが排出する溶存物質の特徴を知るために、ホテイアオイの密集域にあるホテイアオイ、フサモ、マツモ、オオカナダモを水道水で20日間栽培し、栽培水に含まれる溶存物質を分析した。栽培水を孔径0.22 μmフィルタで濾過後、全窒素 (TN)、アンモニウム態窒素 (NH<sub>4</sub>-N)、亜硝酸態窒素 (NO<sub>2</sub>-N)、硝酸態窒素 (NO<sub>3</sub>-N) を測定した。有機態窒素濃度は TN-(NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N) で算出した。その結果、ホテイアオイ栽培水の窒素成分は、24時間後と20日後共に全窒素中の有機態窒素の割合が大きいことが分かった (図3)。文献<sup>1)</sup>によると、ホテイアオイの全糖濃度は27~36%、ホテイアオイ100g中にはアミノ酸が0.2~1.5g含まれる。更に、ホテイアオイの栽培水は、フェーリングテストとニンヒドリンテストに対して陽性であったため、ホテイアオイが排出する溶存物質には、糖とアミノ酸が含まれていることが分かった。

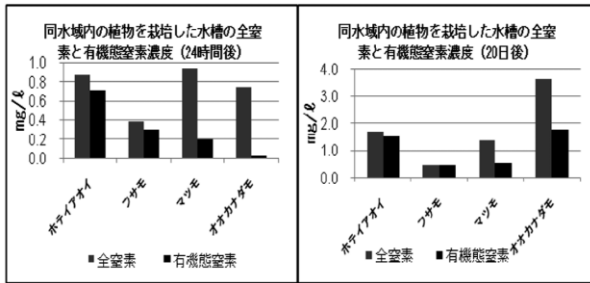


図3 ホテイアオイ密集域の他の水生植物との比較

## (2) 従属栄養細菌の急速な増殖による無酸素化

遊水地からホテイアオイを採取し、洗浄後、不透明な5つの20ℓ水槽の表面に隙間なく入れ、室内に設置し、水道水で30日間栽培した。その結果、全ての水槽でDOが3.0mg/ℓ以下、そのうちの2つが、1.0mg/ℓ以下に減少した(図4)。このことから、ホテイアオイがDOを低下させる一因であることが確かめられた。

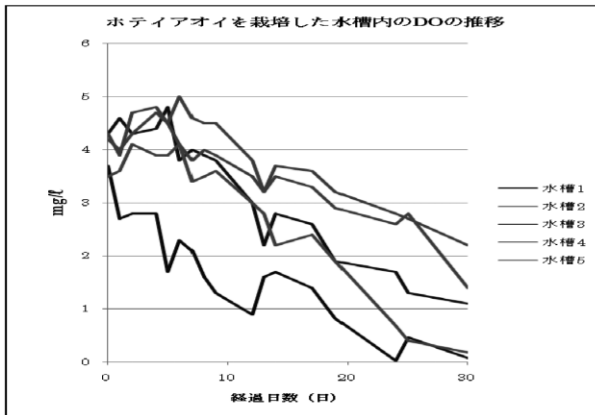


図4 ホテイアオイを栽培した水槽内のDOの推移

このDOの降下が従属栄養細菌の増殖によるものであることを確かめるために、ホテイアオイからの溶存物質と従属栄養細菌によって急速なDO低下が起きることを検証した。滅菌したフラスコに栽培水から抽出した従属栄養細菌とホテイアオイから溶出した溶存物質を入れ、DO計をフラスコに挿入した後、密封した。30℃で培養し、培養中のDOの変化を測定した。対照実験として、細菌のみと溶存物質のみのサンプルを同条件で培養した。従属栄養細菌は、図4の5つの水槽のうち、最も無酸素化が進行した水槽3から採水し、その水を孔径6μmフィルタで濾過した。濾液を孔径0.7μmフィルタで0.1ℓ濾過し、細菌のみを抽出した。溶存物質は、40gのホテイアオイをミキサーで粉碎し、イオン交換水1ℓに加え、900rpmで1時間攪拌した後、攪拌した溶液を

孔径0.2μmフィルタで濾過滅菌し、ホテイアオイの溶存物質だけを抽出した。その結果、従属栄養細菌とホテイアオイから抽出した溶存物質を共に入れた場合のみ、急激なDO低下が起きた(図5)。ホテイアオイの溶存物質のみの場合のDO低下はわずかなため、溶存物質が化学的に酸化する際に起きたと考えられる。細菌だけを入れた場合のDOはほとんど変化しなかった。以上から、ホテイアオイの溶存物質を従属栄養細菌が消費する際に水中の酸素を消費し、急速なDO低下が起きることが示唆された。

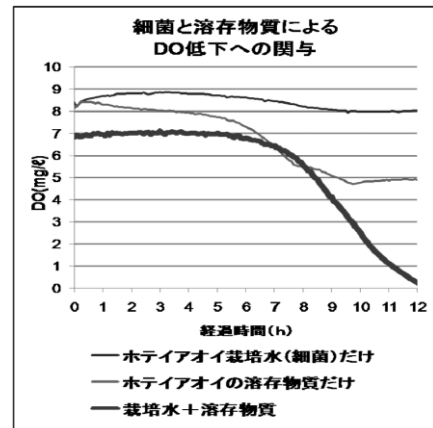


図5 ホテイアオイの溶存物質と従属栄養細菌がDO低下へ関与することの検証結果

次に、DO低下に関するアミノ酸と糖の関与を調べた。(1)よりホテイアオイの溶存物質にアミノ酸と糖が含有されること、ホテイアオイの溶存物質を細菌が消費し、無酸素化することが示唆されたため、前述した同様の実験セットでホテイアオイの溶存物質の代替として、アミノ酸と糖を添加し、水中の無酸素化への関与を検証した。滅菌した5つのフラスコに抽出した従属栄養細菌とアミノ酸溶液とブドウ糖溶液とホテイアオイの溶存物質をそれぞれ入れ、DO計をフラスコに挿入した後、密封した。30℃で培養し、培養期間中のDOの変化を測定した。アミノ酸溶液の濃度は、0.02g/ℓ、0.04g/ℓ、1.5g/ℓの濃度になるようにした。ブドウ糖溶液濃度は、0.02g/ℓ、1.0g/ℓの濃度になるようにした。その結果(図6)、アミノ酸濃度が高いほどDOの低下速度が大きいため、DO低下へのアミノ酸の関与が分かった。ブドウ糖濃度を変えてもDO低下が緩やかなことから、糖の関与は低いことが分かった。以上から、ホテイアオイの栽培水から抽出した細菌は糖よりもアミノ酸を多く消費する、または、ホテイアオイが排出する成

分は糖がアミノ酸より圧倒的に多く、ホテイアオイの栽培水には糖が十分にある可能性がある。どちらの場合でも、溶存アミノ酸が従属栄養細菌の増殖を制限している要因になっていると考えられた。

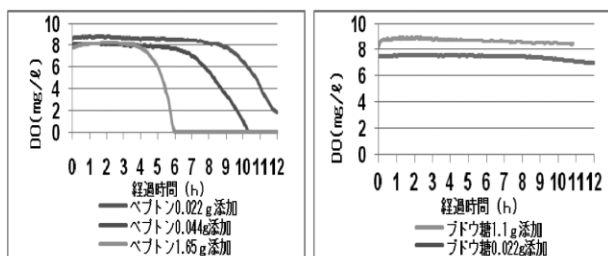


図6 アミノ酸と糖のDO低下への関与の有無

更に、「ホテイアオイのつくるバイオループ」における無酸素化が従属栄養細菌の増殖によって起きることを確かめた。前述したペプトン濃度0.02g/ℓの実験セットを用い、懸濁態濃度と懸濁態起因のCOD値（CODは化学的酸素要求量、以降はP-CODと表記）を3時間ごとに測定した。懸濁態濃度（OD）は光度計で測定した660nmの吸光度と定義した。P-CODはT-COD-D-CODと定義した。T-COD（Total COD）はフラスコから採水した溶液のCOD値、D-CODは同サンプルの孔径0.22μmフィルタによる濾液のCOD値である。その結果、DO低下は培養を開始してから6～12時間後が顕著である（図7）。ODとP-CODはその前後6時間である18時間後までに増加が確認できた。以上から、ホテイアオイ栽培水から抽出した細菌にアミノ酸を与えると細菌の個体数が増加し、DOが低下することが分かった。（1）よりホテイアオイが排出する溶存物

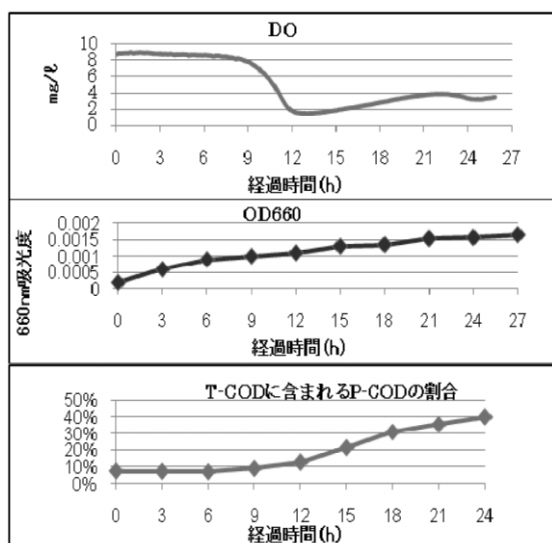


図7 細菌濃度とDO低下の関係

質にはアミノ酸が含まれているので、ホテイアオイの密集域では、ホテイアオイが排出する溶存物質によって従属栄養細菌の増殖し、無酸素化が起きることが指示された。

### (3) 無酸素化による無機リンの溶出

無酸素化することによって遊水地の底泥から無機リン（ $PO_4$ ）が溶出することを検証するために、遊水地の底質と水、ホテイアオイを採取し、40ℓの樽に入れ、屋上で1ヶ月栽培した後、栽培した水を採取、孔径6μmフィルタで濾過し、従属栄養細菌を含んだ水を300g抽出した。滅菌した1ℓフラスコに遊水地の底質30gと抽出した水300g、イオン交換水800gを入れ、ペプトンを添加し、密封した。30℃で培養し、 $PO_4$ 濃度の変化を測定した。その結果、添加したアミノ酸の量に比例して、 $PO_4$ の溶出量が増加したことから、嫌気状態が保持された時間が長いほど、溶出する無機リン濃度増加することが分かった（図8）。

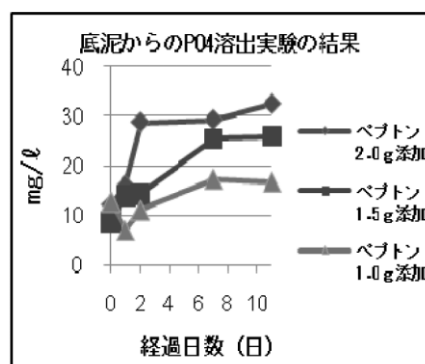


図8 嫌気状態の長さにおける溶出するリン酸濃度変化

次に、ホテイアオイの密集域が形成する貧酸素状態と無機リン濃度の関連性を明らかにするために、図9の35地点のDOと $PO_4$ 濃度を測定した。底泥付近からバンドン採水器を用いて嫌気を保持しながら採水後、ゴムチューブを装着したシリンジと0.2μmフィルタ濾過器を用いて濾過し、濾液の $PO_4$ を測定した。その結果、35地点のDOと $PO_4$ 濃度には負の相関が見られた。ホテイアオイの密集域ではDOが0~1mg/ℓかつ $PO_4$ 濃度が0.5mg/ℓ以上であり、他の水域と比較すると貧酸素かつ無機リン濃度が高い。また、DOは密集域に近づくにつれて減少し、 $PO_4$ 濃度の増加から、ホテイアオイの密集域がDO低下と無機リン濃度上昇に関与していることが明らかになり、密集域では安定した嫌気状態が長時間保たれていることが分かった。（図9）

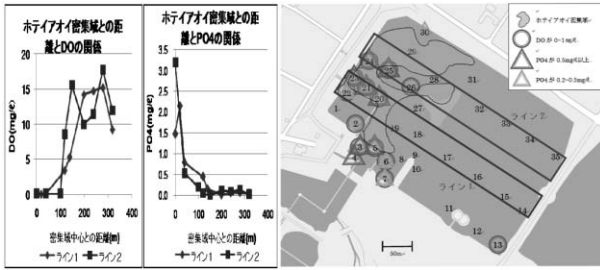


図9 ホテアオイ密集域との距離とDOおよびPO<sub>4</sub>濃度の関係

### 3. ホテアオイのつくるバイオループが周囲の水環境に与える影響

2ではバイオループにより底泥付近から高濃度の無機リンが溶出していることが分かった。図10は遊水地における流入から放流までのリン酸態リン(PO<sub>4</sub>-P)濃度の変化を晴天時と降雨後に調査した結果である。ホテアオイの密集域付近である流入地点AとBでは晴天時の方がPO<sub>4</sub>-P濃度が高く、ホテアオイの密集域から離れた連結地点Cと放流地点Dでは降雨後の方がPO<sub>4</sub>-P濃度が高くなっていることから、バイオループによって溶出した無機リンが他の水域や河川へ負荷を与えていることが分かった。図11に遊水地の流入から放流までのCOD値とNO<sub>3</sub>濃度を示した。流入地点AとB付近に密集域があり、流入地点AとBからの流入水は密集域を通り、遊水地の他の水域へ流出している。ホテアオイの密集域に流入する前より密集域から流出した後のNO<sub>3</sub>濃度が低下する傾向があることから、ホテアオイまたは従属栄養細菌によって消費または脱窒された可能性が示唆された。COD値はNO<sub>3</sub>濃度の変化と反対に、密集域から流出後の方が高いことから、密集域から流出した無機栄養塩により植物プランクトン等が増殖することで有機物濃度を高めていると推測された。以上から、ホテアオイの密集域では、窒素濃度の

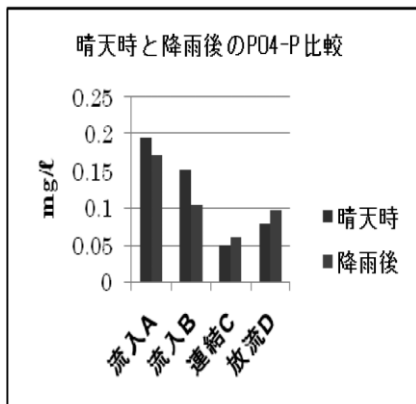


図10 遊水地における晴天時と降雨後の無機リン濃度の比較

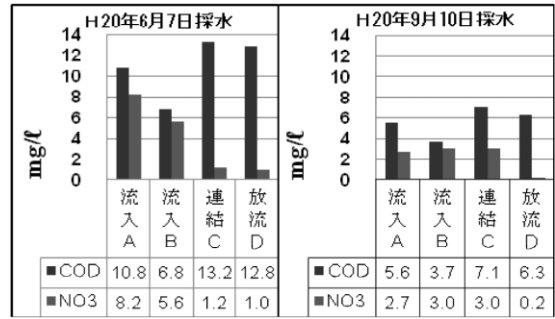


図11 遊水地の流入から放流までのCOD値とNO<sub>3</sub>

低下と遮光により植物プランクトンの増殖が抑えられているが、その周囲の水域では、植物プランクトンが増殖する状況になりやすいという仮説を立てた。

麻機遊水地では4～12月にホテアオイが繁殖する。ホテアオイの繁殖時期とホテアオイの密集域の周囲の無機栄養塩濃度と植物プランクトン増殖の関係をみるために、ホテアオイの密集域から200m離れた水域で、NO<sub>3</sub>とPO<sub>4</sub>濃度、COD値とクロロフィル濃度を1年間測定し、無機栄養塩と植物プランクトン濃度を比較した。クロロフィル濃度の算出は三波長吸光度法を用いた。その結果(図12)、ホテアオイが大繁殖しなかった1～3月とNO<sub>3</sub>濃度が高い期間が一致したことから、遊水地に流入するNO<sub>3</sub>が年間を通して一定であると仮定すると、ホテアオイの大繁殖が、窒素濃度を低下させる一因になっていると考えられる。一般的に、植物プランクトンは組成比(N:P=16:1)に近い栄養塩を含有する水域において増殖が著しい。1～3月以外の遊水地において、リン濃度に対して窒素濃度が16倍に満たない状態(以降は窒素制限と表記)のため、植物プランクトンの増殖が抑制されていると考えられる。1～3月以外のCODとクロロフィル濃度がほぼ一定になっていることから、窒素制限のために植物プランクトンの増殖が抑制されていることが分かった。1～3月はホテアオイの減少により窒素制限が解除されたが、水温の低下により増殖が抑制されたと考えた。以上より、現状は、ホテアオイの大増殖により無機栄養塩が密集域で止められているが、ホテアオイを駆除すると、植物プランクトンが増殖して淡水赤潮やアオコを引き起す危険性があると示唆された。

更に、ホテアオイが排出する溶存物質が植物プランクトンの増殖に与える影響をみるために、ホテアオイの密集域から200m離れた水域から採水し、N:Pを10:1に調整後、ホテアオイの溶存

物質を添加したものとし、水温30℃、5,000luxで、2週間培養し、植物プランクトンの増殖の様子を顕微鏡で比較した。その結果、ホテイアオイから抽出した溶存物質を添加したフラスコにおいて、特定の植物プランクトンだけが増殖する現象が起きた。5月の遊水地からの採水にホテイアオイから抽出した溶存物質を添加した結果、ミカヅキモだけが増殖し、単離された状態になった。6月と7月の遊水地からの採水にホテイアオイから抽出した溶存物質を添加した結果、それぞれアオコの原因となるミクロキスティスと同目である藍藻や窒素固定ができるアナベナと同目である藍藻だけが増殖した。どの場合もホテイアオイの溶存物質を添加していないサンプルでは、植物プランクトンは増殖したが、単離された状態にはならなかったため、ホテイアオイの溶存物質が特定の植物プランクトンの増殖を促進または抑制する効果があると推測された。

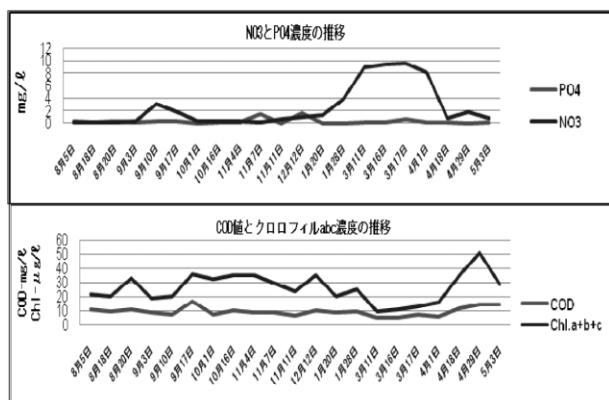


図12 遊水地のWH水域付近の年間NO<sub>3</sub>とPO<sub>4</sub>の推移 (上)  
CODとクロロフィルの推移 (下)

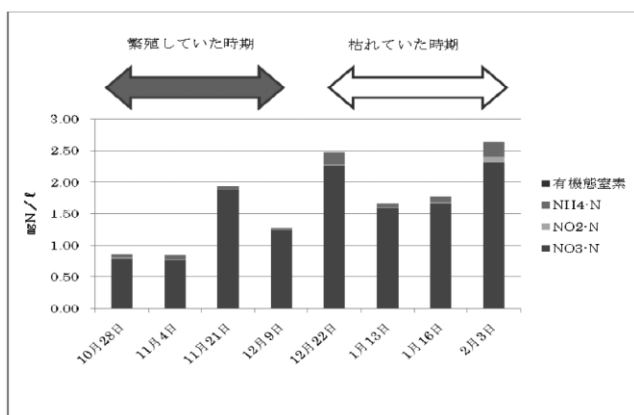


図13 ホテイアオイの繁殖時期と枯れていた時期の水質の窒素構成

図13は、ホテイアオイの密集域において、ホテイアオイが繁殖していた時期と枯れていた時期の水質の窒素構成を比較した図である。ホテイアオ

イが繁殖していた時期と枯れていた時期と比較すると、枯れていた時期の方がNH<sub>4</sub>やNO<sub>2</sub>濃度が高い傾向が見られる。

ホテイアオイの密集域から採取した細菌をホテイアオイから抽出した溶存物質を入れた密閉容器で60日間、常温で培養した結果、底付近から徐々に赤い懸濁液が拡大した。更に、ホテイアオイを粉砕したペースト20gとイオン交換水1ℓを密閉可能な容器に入れ、この懸濁液を0g、50g、100gを加え、10日間の水質を比較した (図14)。ここで、溶存態窒素濃度 (DTN) とは、孔径0.22μmフィルターによる濾液に含まれる全窒素濃度である。開始時は3つのサンプルのDTNに含まれる有機態窒素が95%であった。3日後までは、3つのサンプルの全窒素濃度とその構成には大きな差異がなかった。7日後、懸濁液を50g、100g加えた培養液では、どちらもDTNに含まれる無機態窒素が95%になったことから、懸濁液中のバクテリアによって、ホテイアオイが含有する有機態窒素が無機態窒素に変換された可能性が考えられた。この実験より、ホテイアオイに起因する有機態窒素が効率良く無機態窒素に転換され、ホテイアオイの成長を加速させることが示唆された。

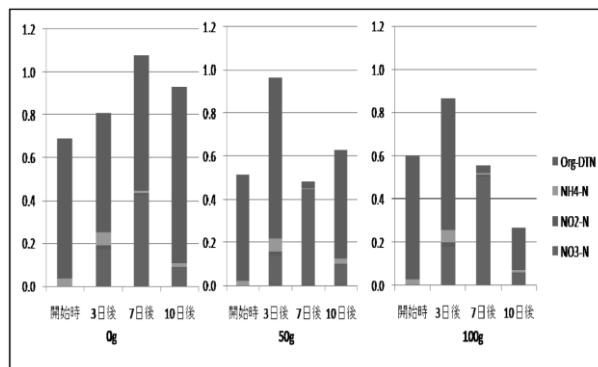


図14 懸濁液添加量別の窒素構成の変化 (単位はmgN/ℓ)

#### 4 結論

本研究では、ホテイアオイが大繁殖した水域では、ホテイアオイから排出される溶存物質が微生物食物連鎖の起点となり、従属栄養細菌が急速に増殖することによりDOの低下を引き起こすことを明らかにした。更に、ホテイアオイが大繁殖した水域とその周囲の水質調査結果から、ホテイアオイの大繁殖が形成する貧酸素は長期間、安定した状態で継続していることを検証した。一方、ホテイア

オイの従属栄養細菌は有機態窒素を無機態窒素に高い効率で分解する能力が高いことを明らかにし、この無機態窒素がホテアオイの成長を加速させることが支持された。従来、ホテアオイが大繁殖した際の対策は駆除が行われているが、本研究では、駆除後も強い富栄養化が継続する調査結果を得た。

## 5 今後の課題

現在は、ホテアオイが密集した水域の富栄養化を軽減する方法の開発に取り組んでいる。図14では、懸濁液を添加したサンプルでTNが減少したことから、懸濁液中に脱窒能力をもつ細菌が存在することが示唆された。そのため、懸濁液のクロロフィルやカロテノイドの測定を行い、バクテリオクロロフィルa、Spirilloxanthin、Anhydrorhodopinが検出され、紅色細菌の存在が確認できた。更に、PCR (Touch Down) により亜硝酸還元酵素遺伝子nirSとnirKが検出され、紅色細菌の脱窒能力が明らかになった。これらの結果をもとに、この脱窒紅色細菌をアルギン酸カルシウムで包括固定した担体を用いて、水中の窒素を除去するBio-reactor実験に取り組んでいる。

### 参考文献

- 1) 石井猛.ホテアオイは地球を救う.増補1版,内田老鶴圃,1996,126p.
- 2) 日本微生物生態学会教育研究部会.微生物生態学入門.日科技連,2004,273p.

執筆者 五島 菜々、鈴木 圭祐、高橋 周平