

### 3 ホテイアオイのつくるバイオループ

#### 1. はじめに

ホテイアオイ（以後は英語名がWater HyacinthよりWHと表記）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。麻機遊水地はその中流に位置し、総面積は86haである。遊水地では、水面の3割がWHで覆われている。WHが大繁殖している水域（以後は密集域と表記）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。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、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<sup>2)</sup>の代りにWH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1に示す循環を「ホテイアオイのつくるバイオループ」（以降はBLと表記）と定義した上で、密集域においてBL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した。

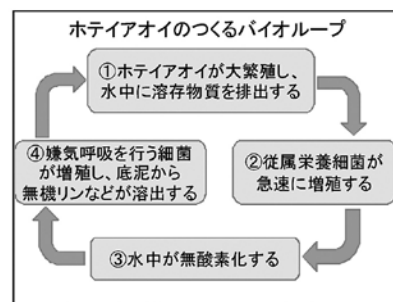


図1 バイオループの定義

#### 2. ホテイアオイのつくるバイオループの検証

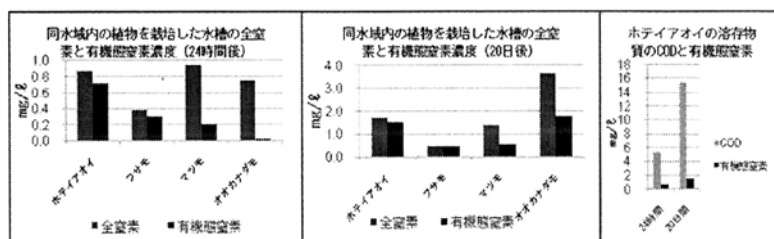
##### (1)ホテイアオイが水中に溶存物質を排出することの検証

採取したWHを水道水で洗浄後、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、WH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、WH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。

検証1 WHが排出する溶存物質の特徴を知る。

方法1 密集域にあるWH、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0.22μmフィルタで濾過後、全窒素（TN）、アンモニア態窒素（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）、COD値（化学的酸素要求量）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。

結果1 WH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。CODと有機態窒素濃度の比較から、栽培水中の有機物



に占める窒素の割合が約1割を占めることが分かった。文献<sup>1)</sup>によると、WHの全糖濃度は27～36%、WH100g中にはアミノ酸が0.2～1.5g含まれるため、これらの有機態窒素はアミノ酸であり、COD値を上昇させた主な有機物は糖であると推理した。

##### (2)従属栄養細菌の急速な増殖によりホテイアオイが大繁殖した水中が無酸素化することの検証

遊水地からWH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3.0 mg/ℓ以下、そのうち2つが、1.0mg/ℓ以下に減少した（図2）。このことから、WHがDOを低下させる一因であることが確かめられた。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検証2を行った。

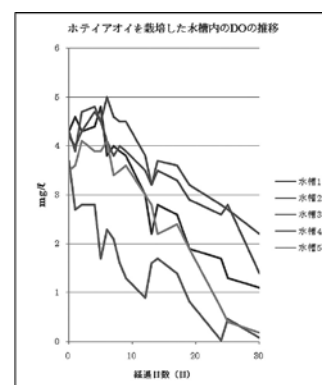


図2 水槽内のDOの推移

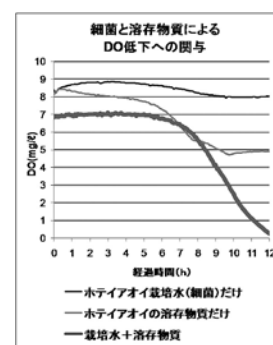
検証2 WHからの溶存物質と従属栄養細菌によって急速なDO低下が起きることを検証する。

方法2 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WH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。

準備1 図2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。

準備2 WH40g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。攪拌した溶液を孔径0.2μmフィルタで濾過滅菌し、WHの溶存物質だけを抽出した。

結果2 従属栄養細菌とWH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。WH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、WH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。

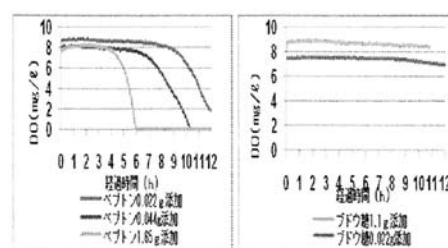


検証3 DO低下に関するアミノ酸と糖の関与を調べる。検証1と2よりWHの溶存物質にアミノ酸と糖が含有されること、WHの溶存物質を細菌が消費し、無酸素化することが示唆された。検証3では検証2の実験セットでWHの溶存物質の代りにアミノ酸と糖を添加し、これらのBLにおける水中の無酸素化への関与を明確にする。

方法3 滅菌した5つのフラスコに準備1で抽出した従属栄養細菌と下記の準備3のアミノ酸溶液とブドウ糖溶液とWH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、密封する。30℃で培養し、培養期間中のDOの変化を測定した。

準備3 イオン交換水1ℓにペプトンをそれぞれ0.022g、0.044g、1.65gに加え、実験時に0.02g/ℓ、0.04g/ℓ、1.5g/ℓの濃度になるアミノ酸溶液をつくった。同様にブドウ糖をそれぞれ0.022g、1.1gを加え、実験時に0.02g/ℓ、1.0g/ℓの濃度になるブドウ糖溶液をつくった。

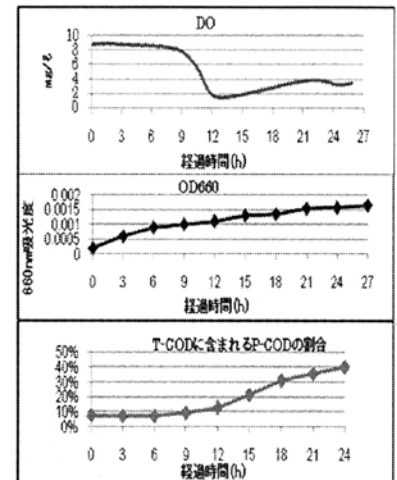
結果3 アミノ酸濃度が高いほどDOの低下速度が大きい。ブドウ糖濃度を変えてもDO低下が緩やかなことから、糖の関与は低いことが分かった。以上から、WH栽培水から抽出した細菌は糖よりもアミノ酸を多く消費する、または、WHが排出する成分は糖がアミノ酸より圧倒的に多く、WH栽培水には糖が十分にある可能性がある。どちらの場合でも、溶存アミノ酸が従属栄養細菌の増殖を制限している要因になっていると考えられた。



検証4 「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る。

方法4 検証3のペプトン濃度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（以降はP-CODと表記）を3時間ごとに測定した。①懸濁態濃度（OD）は紫外線可視分光光度計で測定した660nmの吸光度と定義した。②P-COD = 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。

結果4 ODは白濁の度合いを定量化している。フラスコ内に入れた有機物はWH栽培水中の溶存物質と細菌、ペプトンであるため、P-COD値は細菌起因の有機物の濃度である。DO低下は培養を開始してから6～12時間後が顕著である。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、WH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。検証1よりWHが排出する溶存物質にはアミノ酸が含まれているので、密集域では、WH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。

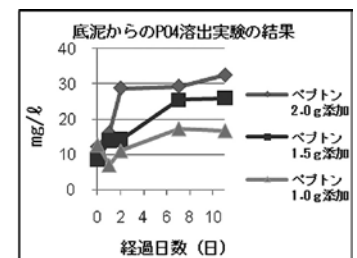


### (3)水中が無酸素化することにより無機リンが溶出することを検証する。

検証5 無酸素化することによって遊水地の底泥から無機リンが溶出することを検証する。

方法5 遊水地の底泥と水、WH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泥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<sub>4</sub>濃度の変化を測定した。

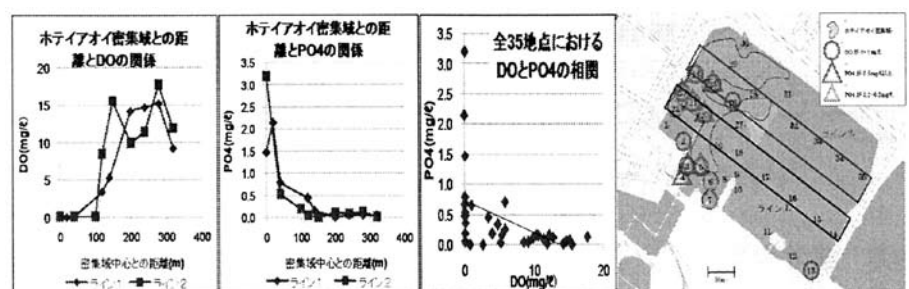
結果5 添加したアミノ酸の量に比例して、PO<sub>4</sub>の溶出量が増加したことから以下の①～③が分かった。①結果3より嫌気状態が保持された時間が長いほど、溶出する無機リンの量が増加する。②結果4より従属栄養細菌が多いほど溶出した無機リンの量が増加する。③遊水地の底泥には大量のリン酸が蓄積されている可能性がある。



検証6 遊水地の密集域がつくる貧酸素状態と無機リン濃度の関連性を明確にする。

方法6 密集域と周辺の35地点のDOとPO<sub>4</sub>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<sub>4</sub>を測定した。



結果6 35地点のDOとPO4濃度には負の相関が見られた。密集域ではDOが0～1mg/ℓ かつPO4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ことが明確である。また、DOは密集域に近付くにつれて減少し、PO4濃度の増加から、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分かった。結果5より、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。

### 3. ホテイ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

検証6ではBL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3は遊水地における流入から放流までのリン酸態リン（以降はPO4-Pと表記）濃度の変化を晴天時と降雨後に調査した結果である。密集域付近である流入地点AとBでは晴天時の方がPO4-P濃度が高く、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PO4-P濃度が高くなっていることから、BL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4に遊水地の流入から放流までのCOD値とNO3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。図4より、密集域に流入前の濃度より密集域から流出後のNO3濃度が低下する傾向があることから、WH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NO3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、密集域では、窒素濃度の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。

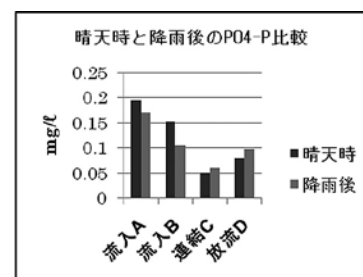


図3 PO4-P濃度比較

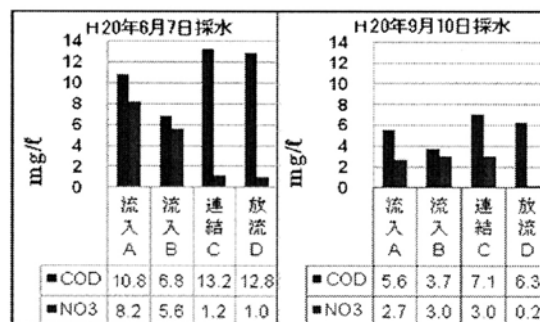
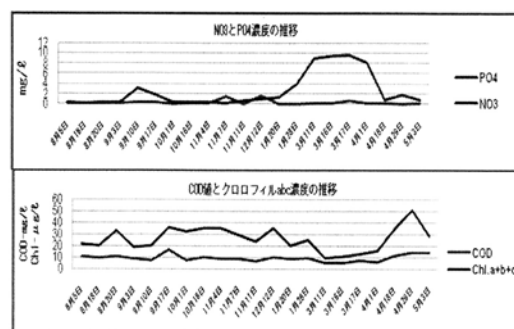


図4 遊水地の流入から放流までのCOD値とNO3

検証7 WH繁殖時期と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。

方法7 麻機遊水地では4～12月にWHが繁殖する。密集域から200m離れている水域で、NO3とPO4濃度、COD値とクロロフィル濃度を約一年間測定し、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。

結果7 WHが大繁殖しなかった1～3月とNO3濃度が高い期間が一致したことから、遊水地に流入するNO3が年間を通して一定であると仮定すると、WH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WH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、WH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、WH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。

検証8 WH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。検証7では、栄養塩濃度上昇による植物プランクトンが大増殖する可能性があることを述べた。この検証では、2で検証したBLの起点であるWH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について検証する。

方法8 密集域から200m離れた水域から採水した。N:Pを10:1に調整後、検証2の準備2で抽出したWHの溶存物質を添加したものとし、しないものを、水温30℃、14W蛍光灯8本照射を保ち、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。

結果8 WH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WH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WH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WH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、WH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。

#### 4. まとめ

本稿では、WHが排出す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し、DO低下が起きることを明らかにした。更にDO低下が進み、水中の無酸素化により底泥から無機リンが溶出し、WHの繁殖を促進する一因になることを示した。これらの一連の循環を本稿では「ホテアオイのつくるバイオループ」と定義した。WHが大繁殖した水域とその付近水域では、BLの影響によって窒素制限と無機リン濃度上昇が起きるため、窒素固定ができるアナベナ等の藍藻類が大繁殖する可能性がある。また、WHの溶存物質を添加した培養実験の結果から、大繁殖したWH群を駆除した直後には、遮光や窒素制限が解除され、特定の植物プランクトンだけが増殖する可能性がある。特定の植物プランクトンだけに限定された水域に、土壌から溶出した無機リンとBLに閉じ込められていた無機窒素が流入すれば、特定の種の植物プランクトンだけが増殖する危険性が高い。培養実験の結果から、WHの異常繁殖とアオコ発生を関連付ける手掛かりを得た。

#### 5. 今後の課題

密集域の周囲の水質と植物プランクトン相の調査を継続することにより、実験室で起きたアオコ発生が遊水地で起きている証拠を収集し、WH大繁殖とアオコ発生の因果関係を明確にする。更に、「ホテアオイのつくるバイオループ」を考慮したWHの駆除方法や水質環境改善策を考案したい。

#### 6. 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.