

アオコの除去法とその肥料化の開発（その2）

Development of a method to remove blue algae and to make it fertilizer (part2)

*加納義彦Yoshihiko KANOH・

古原翔Syuu KOHARA・安達翔馬Syouma ADACHI・**横田大直Daichi YOKOTA・

池永明史Akifumi IKENAGA・高野良昭Yoshiaki TAKANO

*（大阪経済法科大学教養部教授）・**（清風学園生物部）・***（清風学園生物部顧問）

目 次

要旨

研究の経緯と目的

- 1 八尾市高安地域のため池におけるアオコの発生状況
- 2 アオコMCの分解実験
- 3 アオコの肥料化
- 4 まとめ

キーワード：アオコの肥料化、ミクロシスチン（MC）、MC分解菌

要旨

アオコが生成する毒性物質ミクロシスチン（MC）を無毒化する方法を調べた。アオコを燃焼させる、塩素処理をする、長期間（4か月半）天日干しをすることによってMCを無毒化できることがわかった。さらに、諏訪湖などでMC分解菌が単離され、その分解菌ではほぼMCが100%分解されることが報告されているので、MC分解菌を単離することを試みた。その結果、楽音寺総池のアオコが発生している池の水からMC分解菌を単離することに成功した。

そして、この分解菌を利用してアオコを肥料化する方法の開発を試みた。肥料として利用するためには、前回の研究で凝集剤として用いたミョウバンはアルミニウムを含むため適さない⁷⁾。そこで、代替の凝集剤として硫酸第二鉄を用いて凝集条件を調べた。その結果、硫酸第二鉄と炭酸カルシウムを質量比1：2の割合で入れると中和することが明らかになった。これによって、アオコを凝集・浮上させることができた。この凝集させたアオコから溶出させたMCを、単離した分解菌を用いて、分解させることができた。これでアオコの

肥料化の可能性が見えてきた。つまり、アオコを凝集・浮上させ回収したら、アオコの細胞を破碎し、MCを溶出させてからMCを分解すればよい。アオコの細胞は凍結溶解、超音波によって破碎されるが、実際に野外で用いるには、回収したアオコをコンポストなどに入れておいて、そこに分解菌を混ぜる方法が適切ではないかと考えられる。

MC：ミクロシスチン（アオコが生成する毒性物質）

研究の経緯と目的

我々は、絶滅危惧種であるニッポンバラタナゴの保護活動を行っている。その中で、ため池にアオコなどの藍藻が発生するとニッポンバラタナゴの産卵母貝であるドブガイが繁殖できないことがわかった²⁾。河川や湖沼におけるアオコの異常発生は世界的な問題である。アオコが発生すると水質や景観を悪化させ、河川や湖沼に生息する生物多様性は減少し、さらにはアオコ（ミクロキスティス）が作る強い毒（ミクロシスチン：MC）によって海外では人間や家畜等の死亡の被害が報告されている^{1,5,6,9)}。アオコの防除は世界中の富栄養化した湖沼で緊急課題となっているが、未だに解決されていない問題である。

2013年の報告⁸⁾では、八尾市高安地域のアオコが発生しているため池では、栄養塩類の窒素とリンの濃度が高い傾向が見られた。しかし、アオコが増殖することによってその濃度は減少した。そして、アオコを凝集・浮上・除去するために次の実験を行った。1) 凝集剤としては食品添加物として使われているカリミョウバンAIK (SO_4)₂を、中和剤としてはホタテチョークの粉末を選択した。混合比は1:1が最も適当であることが分かった。2) 水温が15℃～35℃で強い光(10000Lx)を当てると凝集アオコは光合成で発生してくる酸素で浮上し、水温が30℃を超えると暗所(0Lx)でもホタテチョークの粉を用いたときには浮上することが明らかになった。3) この凝集・除去過程でホタテチョークを加えることによって99.7%以上の除菌効果が現れた。2011年8月に八尾市のため池で野外実験を行ったところ、ほぼアオコを凝集・浮上・除去することに成功したので、さらに除去したアオコの肥料化を検討した。アオコを肥料化するためには、細胞内で生成される毒性物質であるミクロシスチン(MC)を分解するか除去しなければならない。MCは7個のアミノ酸からなる環状ペプチドで、ベンゼン環を含むAdda部分が、生理活性の面で重要と考えられている¹¹⁾。天日干しした凝集アオコおよび生アオコには栄養塩類であるリンが多く含まれていたが、毒性物質であるミクロシスチン(MC)は20日間の天日干しではほとんど分解されなかった。しかし、炭化することでほぼ完全に毒性が消失すること、凍結溶解後ろ過した水溶液中で、25℃で3日間放置すると溶出したミクロシスチンがMC分解菌によって生分解されることが明らかになった⁸⁾。

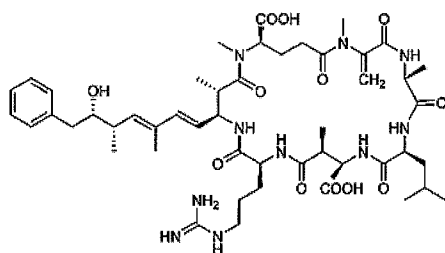


図1 ミクロシスチンの構造

一般にMCは塩素処理やオゾン処理、紫外線処理、活性炭による吸着処理によって無毒化、吸着除去できることが知られている¹⁾。大阪市の浄水場では塩素処理やオゾン処理および活性炭による吸着処理によって、MCはほぼ100%分解・除去されている。また、諏訪湖や霞ヶ浦に異常発生したアオコの毒性物質（MC）については、それぞれで分解菌が単離され、その分解菌ではほぼ100%MCが分解されることも報告されている^{5,6)}。

そこで、今回の研究では、アオコが出すMCを無毒化する方法を検討すること、特にMCの分解菌を見つけること、そして、アオコを凝集・浮上・除去し、含まれている栄養塩類である窒素・リンを肥料として利用できるようにすることを目的とした。

1 八尾市高安地域のため池におけるアオコの発生状況

1-1 水温について

シアノバクテリアが水面に集積している状態をアオコと呼んでいる。アオコの中でもミクロキスティスは高水温（15℃以上で増殖可能で、最適温度は25℃以上）を好むため、熱帯から温帯まで広く分布している¹⁾。高安地域のため池の月平均温度は4月で15℃を超え、11月には15℃を下回るので、富栄養化が進行する楽音寺池では、2012年4月からアオコ（ミクロキスティス・エルギノーザ *Microcystis aeruginosa*）が発生し、11月に観察できなくなった。今年度も5月2日にアオコが観察され現在（2013年10月31日）まで観察されている（写真1, 2）。



写真1 アオコが発生している楽音寺池（2013年7月9日）



写真2 ミクロキスティス・エルギノーザ (*Microcystis aeruginosa*)

1-2 栄養塩濃度とアオコの関係

2010年～2011年にかけて高安地域のため池の水質と生態調査を毎月定期的実施してきた。水質については共立理化学研究所水質分析機ラムダ9000を用いて、アンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、リン酸態リン、ケイ酸などの濃度を測定した。同じため池においても、栄養塩類濃度は常に変動している。流入された栄養塩類濃度はアオコが異常発生することによって、アオコに吸収され水質が回復すると考えられる。家庭廃水が流入する松井池の水質は、2010年1月から2011年8月までに、隣接する用水路の水を取り込むとケイ酸濃度が上昇すると同時に栄養塩類も上昇するが、次第にアンモニア態窒素や硝酸態窒素が減少し、リンも減少することが分かった⁸⁾。

2 アオコMCの分解実験

アオコ（ミクロシスティス）が生成する毒素ミクロシスチン（MC）を無毒化できるかを調べた。

（実験1）様々な処理条件によるMCの分解能の比較

（方法）ミクロシスチン（MC）の相対量の測定方法はELISA法⁴⁾を用いた。ミクロシスチンELISA法とは、毒素ミクロシスチンに対する抗原抗体反応を利用して発色させ、その吸光度でMCの量を測定する方法である。毒性が強いほど吸光度は低くなる。測定に用いたのは常盤化学工業のミクロシスチンELISAキットである。

次のような処理を行ったときのMCの濃度を測定した。

- ①アオコ水からアオコを凝集、除去して活性炭に15分間漬ける。
- ②凝集させ、アオコを除去したアオコ水を85℃に加熱する。
- ③乾燥させたアオコをるつぽに入れ、1分・3分と時間を変えて燃焼する。

（結果）毒性物質のミクロシスチン（MC）については吸光度が低いほど毒性が高いことを示す（図2）。アオコが大量発生している池の水やそれを加熱したり、乾燥させた粉末アオコを1分燃焼させただけのものからはMCが検出されたが、そのアオコ水を活性炭に通したり3分間燃焼し炭化させたアオコからはMCはほぼ消えていた。

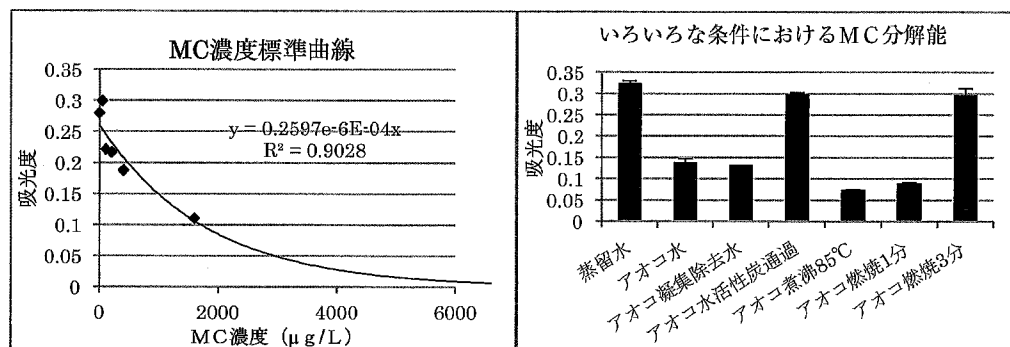
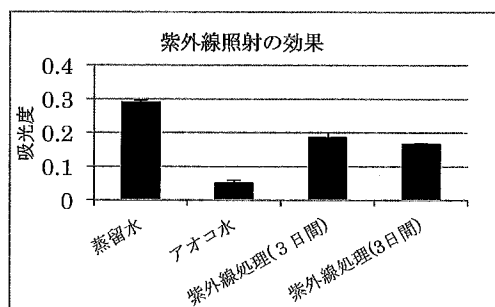


図2 MC濃度標準曲線と各水溶液に含まれるMCの濃度

*吸光度の値が低いほど毒性が高い

（実験2）紫外線照射によるMCの分解能の比較

（方法）アオコを凝集・浮上させた後の液体を紫外線灯下に3日間置いた。



（結果）紫外線を照射することによって、MCは減少した（図3）。

図3 紫外線を照射したときのMCの相対量

*吸光度の値が小さいほど毒性が高い

(実験3) 塩素処理でミクロシスチン (MC) は分解されるか。

(方法) ミョウバンと炭酸カルシウムを用いてアオコを凝集させたのち、アオコを除去したアオコ水に約5ppmの濃度になるよう塩素を加え、数日放置して塩素を抜いた後の水を測定する。

(結果) 塩素処理によってMCはほとんど検出されず、ほぼ蒸留水と同じ値になった。

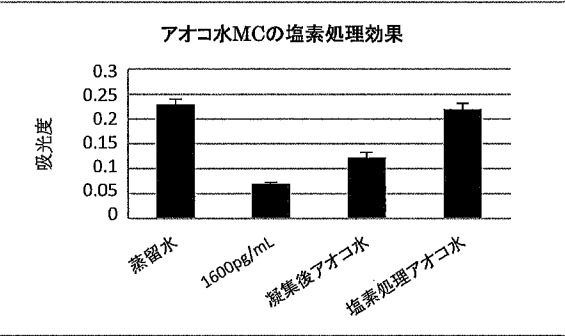


図4 塩素処理したアオコ水に含まれるMCの相対量
*吸光度が小さいほど毒性が強い

(実験4) 長期天日干しでミクロシスチン (MC) は分解されるか。

(方法) 天日干しの日数を4ヶ月半まで伸ばしてMCを測定した。

(結果) 天日干しによって、アオコのMCは2か月半ではほぼ減少しなかったが、3か月を過ぎ急激に減少した。4か月半の天日干しではほぼMCは無毒化されるレベルまで減少した(図5)。

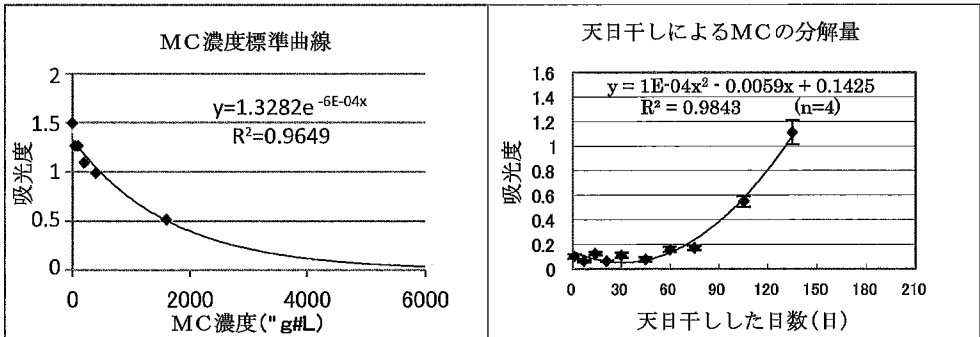


図5 MC濃度標準曲線と天日干しによるMC濃度の変化

(実験5) アオコのMCはアオコ水から単離した細菌コロニーで生分解されるか。

(方法) アオコ水を標準寒天培地に撒き、目視で確認した、出現した細菌のコロニーを白金耳で採取して最少培地 (MC分解菌を培養させる液体培地) 5 mLに入れた。そしてそこに、乾燥アオコを冷凍・解凍させてMCを出した溶液 5 mLを加えて2倍に希釈し、数日後に毒素の減少度合いを測定した。最少培地の組成は、NH₄NO₃ 1.00g/L, K₂HPO₄ 1.50g/

$\text{L,Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L である。

(第1回及び第2回の実験結果) 2度にわたり、合計10種のコロニーを試してみたがMCが分解されたという結果は見られなかった。また、使用する乾燥アオコを作った水とコロニーを採取するアオコ水が異なっていたため、次の実験から同じ場所のアオコ水から作った乾燥アオコを用いて溶出させたMCと、採取したコロニーを使用することにした。

(第3回の実験結果) コロニーNo.9を入れた場合と生の濾過したアオコ水を入れた場合においてMCが分解されている傾向があり、No.8についても分解されている可能性があった(図6、写真3)。

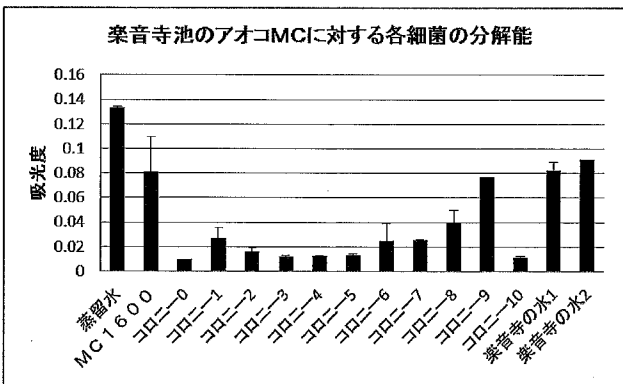


図6 楽音寺池のアオコMCに対する楽音寺池細菌コロニーの分解作用
* 吸光度が小さいほど毒性が強い

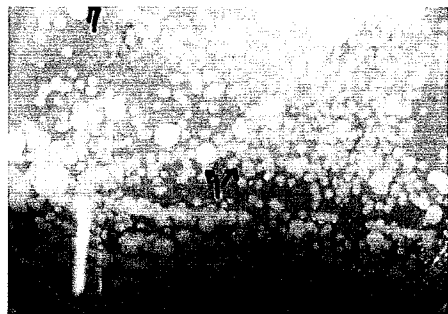
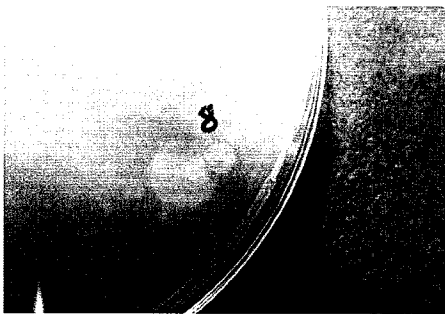


写真3 第3回の実験で使したコロニー8, 9

(実験6) アオコMCの分解菌単離

第3回の実験により、コロニーNo.8とNo.9が分解菌である可能性が高いと思われたため、特定の菌を探すために単離することにした。

(方法) 実験に使用したNo.8, No.9の試験管の水を5000倍に希釈して標準寒天培地に撒いた。

(結果) No.8, No.9両方において3種ずつコロニーが出現した(写真4)。

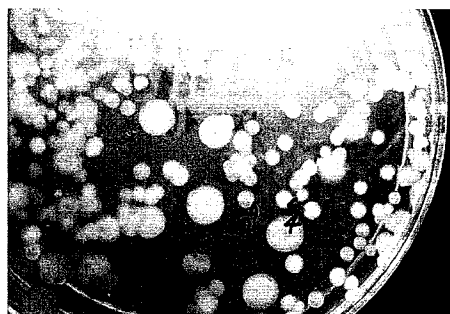


写真4 楽音寺池の細菌コロニーNo.8に含まれていた細菌2,3,4とNo.9に含まれていた細菌5,6,7

(実験7) アオコのMCは単離した分解菌で生分解されるか。

(方法) アオコ水を標準寒天培地に撒き、目視で確認した、出現した菌のコロニーを白金耳で採取して最少培地5 mLに入れた。そしてそこに、乾燥アオコを凍結溶解させてMCを出した溶液5 mLを加えて2倍に希釈し、4日後に毒素の減少度合いを測定した。

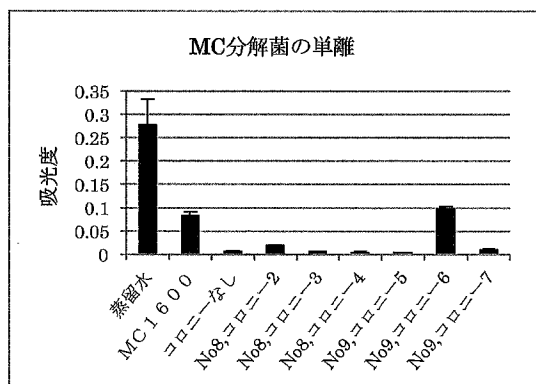


図7 単離した細菌6のMC分解作用

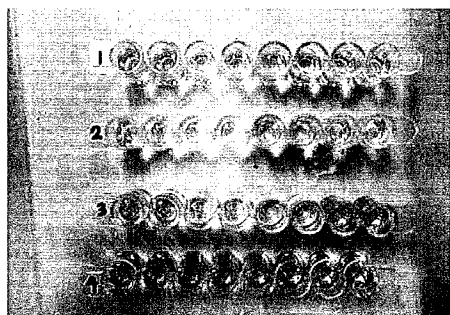


写真5 実験7の発色結果
色が薄いほど毒性が強い

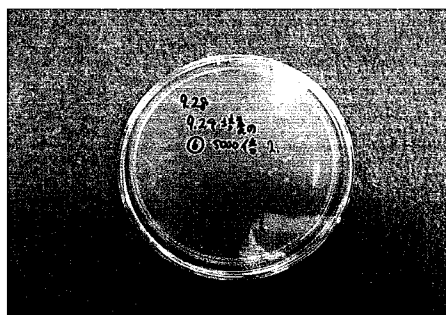


写真6 単離されたMC分解菌
No.9のコロニー6

(結果と考察) コロニーNo.9に含まれていた細菌6を使用し、実験したところMCが減少したことが確認できた(図7、写真5)。このことから、コロニーNo.9に含まれていた細菌6がMC分解菌であり、これでMC分解菌が単離できたと考えられる(写真6)が、確認のため、この細菌6をコロニーNo.9-6と名付け、もう一度単離を行うことにした。

(実験8) MCの分解能があったコロニーNo.9-6が本当に1種類の細菌か。

(方法) 実験に使用したコロニーNo.9-6が含まれている試験管の水を5000倍に希釈して標準寒天培地に撒いた。

(結果) コロニーNo.9-6から2種類のコロニーが出現した(写真7)。

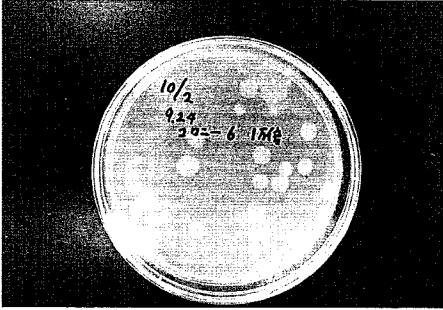


写真7 No.9-6のコロニー
大小2種類が出現

(実験9) 実験8で出現したコロニーのどちらがMC分解菌か。

(方法) コロニーNo.9-6から出現した2種類のコロニーをそれぞれNo.9-6-1, No.9-6-2とし、白金耳で採取して最少培地5mLに入れた。そしてそこに、乾燥アオコを凍結溶解させてMCを出した溶液5mLを加えて2倍に希釈し、1週間後に毒素の減少度合いを測定した。

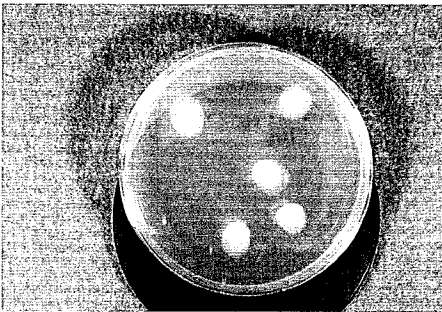


写真8 コロニーNo.9-6-1



コロニーNo.9-6-2

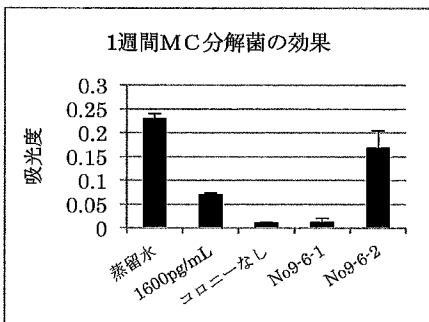


図8 2つのコロニーの比較

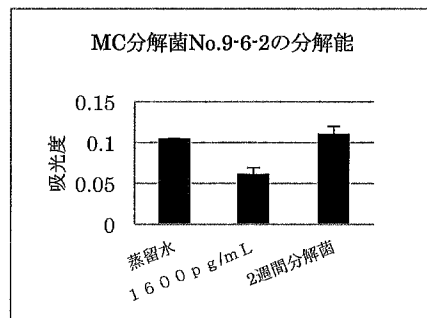


図9 No.9-6-2を2週間作用させた結果

(結果と考察) MCの分解実験の結果からNo.9-6-2のコロニーがMCの分解菌であると考えられる(図8)。また、今回の測定で使用した、No.9-6-2とMCが入っている試験管の水を14日後に再度測定したところ、蒸留水に近い値にまでMCが減少していた(図9)。

3 アオコの肥料化

(実験1) アオコの除去方法

アオコの肥料化を考慮し、ため池から栄養塩類を除去するためにアオコを凝集させ沈降・分解させるのではなく、浮上・除去する方法を考えた。さらに除去後の肥料化を考慮し、凝集剤としてアルミニウムを含まない硫酸第二鉄を使い、実験を開始した。

(1) 化学反応式の特定と凝集構造

凝集剤として硫酸第二鉄と中和剤としてチョークの粉（主成分は炭酸カルシウム）を使うことにし、化学反応や凝集の構造を解明するため、以下の予備実験を純正の炭酸カルシウム（CaCO₃）を用いて行った。

硫酸第二鉄とCaCO₃の反応式は、

- ① 硫酸第二鉄が加水分解する。
$$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 6\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{Fe}(\text{OH})_3 + 3\text{H}_2\text{SO}_4$$
- ② ①で生成する硫酸とCaCO₃が反応する。
$$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaSO}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$$

また、②の化学反応が進むことで、①の平衡も右に移動する
以上、①②を1つにまとめると、



(2) 中和点と混合比の決定

硫酸第二鉄とCaCO₃の量とpHの関係

(方法) 硫酸第二鉄水（ $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ）10mLに、CaCO₃の懸濁液（ $1.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ ）を0mL、10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL、80 mL、90ml、100ml、混ぜ、そのときのpHを調べた。

(結果と考察) CaCO₃懸濁液を30mL入れ完全に中和させた時のpHは3.81である。中和点が酸性になるのは、発生するCO₂が溶けてH₂CO₃になるためと考えられる。さらに、グラフからFe₂(SO₄)₃水10mLに対し、CaCO₃水80mLを加えたとき、モル比が1：8で、つまり質量比が1：2のとき、pHが5分後に6.96になることから、Fe₂(SO₄)₃とCaCO₃を質量比1：2の割合で入れることに決定した（図10）。

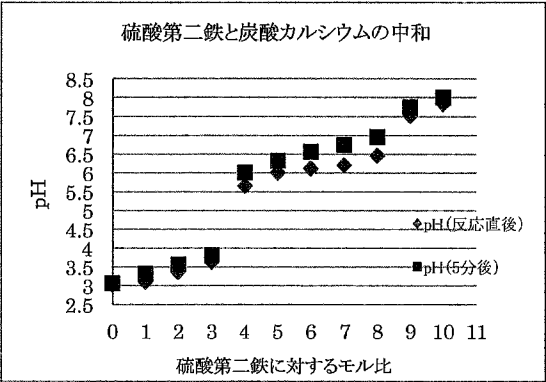


図10 硫酸第二鉄と炭酸カルシウムの中和

(実験2) どうすればアオコを肥料化できるか。

凝集・除去したアオコを実際に肥料化するためには、アオコの細胞を破壊し、溶出される毒性物質(MC)を分解する必要がある。凝集したアオコに様々な操作をして実験を行った。

(1) 単離したMC分解菌No.9-6-2の分解能

単離したMC分解菌No.9-6-2が、実際に凝集させたアオコから溶出させたMCを含む液に入れて分解作用が働くかどうかを調べた。

(方法) 硫酸第二鉄とチョークの粉で凝集させたアオコを含むアオコ水20mLを4日間凍結させ、その後融解させてアオコ細胞からMCを溶出させたところに、MC分解菌No.9-6-2を培養した最少培地を200 μ L入れた。アオコ水は、蒸留水を加えてアオコの濃度を一定にした。その後、25℃で3日間放置し、MCの分解度合いを調べた。比較のため、1週間凍結してから溶解したもの、4日間凍結し溶解してから分解菌を入れずに25℃で3日間放置したものも調べた。

(結果と考察) MC分解菌No.9-6-2はかなりのMCを分解しており、その効果が確認できた(図11)。

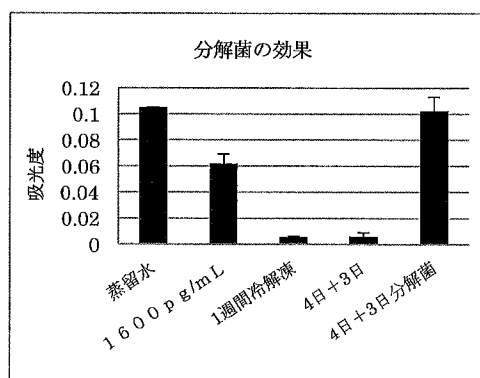


図11 No.9-6-2分解菌の効果

(2) 超音波でアオコは破碎できるか。

これまでの実験で行っている凍結溶解は、アオコの細胞を破碎できることが分かっている。これ以外にアオコの細胞を破碎する方法として、超音波を用いてみた。

(方法) 硫酸第二鉄とチョークの粉で凝集させたアオコを含むアオコ水20mLをビーカーに入れ、超音波洗浄機の中にビーカーを入れて36,000Hzの超音波を30分間かけた。アオコ水は、蒸留水を加えてアオコの濃度を一定にした。比較のために、超音波をかける前の水と、凍結溶解したアオコ水も調べた。

(結果と考察) 超音波をかけた方がかける前よりも多くのMCが検出された(図12)。このことから、超音波によりアオコの細胞は破碎されていると考えられる。しかし、凍結溶解したものよりはMCの量が少ないので、振動数や時間についてはさらに検討する必要がある。

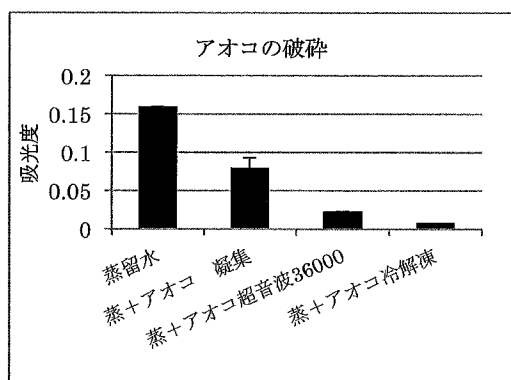


図12 超音波によるアオコの破碎

4 まとめ

アオコの異常発生は世界的な問題である。アオコは、湖水中のアオコ原因植物プランクトンが大量に増殖して起こり、世界各地の富栄養化が進行した湖沼に普遍的に見られる。アオコが発生すると水質や景観を悪化させ、腐敗したアオコが悪臭を放ち、さらにはアオコ（ミクロキスティス）が作る強い毒（MC）によって海外では人間や家畜等の死亡の被害が報告されている^{15,69)}。東南アジア諸国やアフリカではアオコの発生が深刻化しており、アフリカでも多くの人が良質な水を利用できない状態が続いている。このように、アオコの防除は世界中の富栄養化した湖沼で緊急課題となっているが、未だに解決されていない問題である。

今回研究したアオコの凝集・浮上・除去方法で、硫酸第二鉄とチョークの粉を用いたことでアオコ（シアノバクテリア）を、アルミニウムを発生させることなく除去できる。さらに、アオコにはリンが多く含まれ肥料として利用できるが、MCが生成されているので、MCの無毒化が必要である。長期間天日干しをすることによってかなりのMCが減少し、天日干しが効果的であると確認できた。かつて行われていた池干しでは、農閑期の11月～3月までため池は4ヶ月ほど干されており、実験によってMCが減少した期間と重なる。池干しが水質保全に重要な役割をしていたのだと示唆される。また、アオコ水を活性炭で濾過することによってMCが減少することも明らかになった。浄水場で行われている塩素処理もMC分解には効果的であることが確認できた。何より、今回の研究で最も注目すべき点はアオコ水中からMCを分解する細菌を発見できたことである。一度、MCが分解されたという結果が出た細菌でもう一度実験を行ったところ、全く効果がなかったこともあり、その時は、実験失敗で一からやり直しだと思った。しかし、そこであきらめることなく研究を進めると、1種類だと思っていたコロニーから数種類の細菌が見られ、それが最終的にはMC分解菌発見のもととなった。実際、この分解菌の生分解能力については詳細を追って調べていく必要があるが、かなり効果的ではないかと思われる。その後の肥料化においてもMC分解菌を使用することによって実現できる可能性が見えてきた。凝集・浮上させたアオコをネットで除去し、MC分解菌を利用したコンポストに入れることで栄養塩類を含んだ肥料が完

成し、アオコを除去したあとのアオコ水については、活性炭で濾過し、塩素処理することによってMCを無毒化することができる。最終的に、除去したアオコをその地域で肥料化し、利用できるシステムが構築できればいいと考えている。国内にとどまらず、これからも世界人口が増え続ける中で、懸念されているリン鉱石の枯渇という問題にも対処できるかもしれない。

謝辞

今回MC分解菌培養のための最少培地の作成方法並びに助言をくださった、信州大学の朴虎東先生に感謝する。また、共に生態調査に参加した大阪経済法科大学学生および清風高校・中学生物部の部員に感謝する。

参考文献

- 1) 彼谷邦光『有毒シアノバクテリア』裳華房、2001年
- 2) 木村諭史・松葉成生・辻井悠希「キンタイを救う“池干し”の謎 —ニッポンバラタナゴの産卵床となるドブガイの繁殖に影響を及ぼす伝統的な“池干し”の効果—」第9回日本水大賞受賞活動集、2007年、100-108頁
- 3) 山本鎔子、山本桐子「溶藻性微生物による藍藻毒ミクロシスチンの分解」『陸水学雑誌』第64号、2003年、21-25頁
- 4) Nagata S., Soutome H., Hasegawa A., Sekijima M., Harada K., Suganuma M. and Ueno Y., *Novel Monoclonal Antibodies Against Microcystin and Their Protective Activity for Hepatotoxicity*. Natural Toxins 3 1995, pp.78-86
- 5) 朴虎東、林秀剛『アオコ』—その出現と毒素、渡辺真利代・原田健一・藤木博大（編）東京大学出版会、1996年、75-99頁
- 6) 朴虎東「環境水中のミクロシスチンの動態と生体蓄積」『海洋』第37号（5）2005年、325-334頁
- 7) Pei Sun, Qiu-Ying Tian, Jie Chen and Wen-Hao Zhang, *Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin*, Journal of Experimental Botany 61, 2009, 347-356
- 8) 加納義彦、山中智樹、益田拓実、水木満佐成、中藤邦彦、徳田章、倉坪真木也、竹森智大、高野良昭「アオコの凝集・浮上・除去方法の開発」『大阪経済法科大学 21世紀社会研究所紀要』2013年
- 9) Watanabe M., Oishi F., Watanabe S., and M. Watanabe J. Phycol. 22, 1986, 552-556.
- 10) 渡辺泰徳「アオコの生物学と生態学」『アオコ』—その出現と毒素、渡辺真利代・原田健一・藤木博大（編）東京大学出版会、1999年、1-24頁
- 11) 渡辺真利代「有毒藍藻の出現」『アオコ』—その出現と毒素、渡辺真利代・原田健一・藤木博大（編）東京大学出版会、2002年、55-73頁