

# 1. 水処理・エネルギー源として利用するための アゾラ・ラン藻共生系の改良

(Improvement of *Azolla*-*Anabaena* symbiosis and its uses as water decontaminant and energy source).

2. 研究代表者 三重大学生物資源学部 教授 渡辺巖

(Iwao Watanabe, Faculty of Bioresources, Mie University)

共同研究者 大阪府立大学先端科学研究所 助教授 汐見信行, 講師 鬼頭俊而

(Nobuyuki Shiomi, Shunji Kitoh, Res. Institute for Advanced Science and Technology, University of Osaka Prefecture)

## 3. Abstract

*Azolla* in symbiosis with nitrogen fixing cyanobacteria has been used as green manure. In Japan, the use as water decontaminant has been tried with local *Azolla* strains. The authors aimed at expanding its potential use by introducing many *Azolla* strains from International Rice Research Institute. In Mie University, about 30 introduced strains were grown in water and soil cultures to screen best growing strains. Hybrids of *A. microphylla* and *A. filiculoides* recorded superior performance. The relationship between growth and air temperature was obtained. In the Univ. Osaka Prefecture, strains were grown in secondary wastewater, and indigenous strains recorded best, but some introduced strains of *A. microphylla*, *A. mexicana*, and *A. caroliniana* (CA-ME-MI) behaved equally well. N, P, and K uptake from wastewater from some of introduced strains was recorded comparable to the previous data, using local strains. The tolerance to Ga, rare resources for semiconductor tips, and its uptake by *Azolla* were studied. The growth was inhibited 30-60 % at 26 ppm. *A. filiculoides*, and *A. microphylla* showed more tolerance and Ga accumulation than other species. Symbiotic cyanobacteria did not accumulate Ga. The growth at 20 mM ammonium was examined to see *Azolla* tolerant of high ammonium. *A. pinnata* var. *pinnata* strains were most tolerant, followed by some CA-ME-MI strains.

*Azolla* evolves hydrogen gas in the absence of dinitrogen gas owing to symbiotic cyanobacteria's nitrogenase. The ratio of hydrogen gas evolved to acetylene reduction (nitrogenase activity) was 0.4 at the maximum. This ratio increased as nitrogenase activity of *Azolla* increased.

#### 4-1. 研究目的

本研究は、国際稲研究所 (IRRI) で得られた各種アゾラの保存株やアゾラ利用、改良の技術と知識を、日本初め世界各地の環境問題の解決に役立てることを目的として、三重大学と大阪府立大学の共同でおこなった。つぎの目標を設定した。

1) IRRIより500近いアゾラの保存株の譲渡を受け、日本の環境で生育のよいものをスクリーニングする。2) 塩類や重金属に強く、特殊蓄積能力のあるアゾラを選抜する。ガンマー線照射による突然変異株の探索も行う。3) 水素生産能の高い保存株のスクリーニングと水素生成条件の検討を行う。4) 高濃度の窒素条件下で窒素固定能力のあるものを探す。

#### 4-2. 研究経過と成果

##### 4-2-1 導入アゾラの生育状況

###### 三重大学での結果

三重大学で7種・約40の株の無窒素培養液水耕によるビニールハウスでの生育試験を92年6月から94年11月の間におこなった。また湛水土壤(土耕)での生育(92年11月から93年11月まで)も調査した。1) 水耕では春から初夏が生育が良く、夏の間の生育の低下後、秋には生育回復したが、春ほどにはならなかった。真夏には生育がおとろえて、いくつかの株は枯死した。年間生育量の平均値は92-93年の試験でも、94年の結果でも *A. microphylla* と *A. filiculoides* との交雑系統(MA-1, MA-2, MI4030, MI4087)がもっとも生育が良く(4-11月の平均で65g/m<sup>2</sup>/day)、ついで *A. microphylla* でやや良いものがあった。2) 日平均気温の上限は25℃くらいで、また日平均気温が5℃を下るとほとんど生育が停止し窒素含量は3%

を下った。*A. filiculoides* は日本でもやや低い温度で生育良く、最適温度は他のものより低い傾向がみられた。窒素含量は生育量が50g/m<sup>2</sup>/day くらいをこえるとほぼ一定になった。交雑系統は窒素含量が高く、*A. pinnata* では低かった。3) 土耕でもやはり春から初夏がもっとも生育が良く、年間の平均値ではCA3005がもっとも良かった。実用を考えると春先の生育のよい日本産 *A. japonica* と高温時の生育がよく、窒素含量の高い *A. microphylla* と *A. filiculoides* との交雑系統が推薦できる。

##### 大阪府立大学での結果

網室(屋外)においてアゾラ7種、約60株の増殖を調べた。し尿二次処理水を希釈したもの(培養開始時、約3ppmのN、8ppmのPを含む)で培養した。どの株も春-初夏に良好な増殖を示し、最も良いのは日本産 *A. japonica* のFI1089(Nara)で年間(4月-11月)での平均増殖量で127g/m<sup>2</sup>.dayを示した。CA-ME-MI系統の一部は100gを越える増殖を示した。三重と大阪の結果は生育条件が違ったし(無窒素培地对窒素含有培地:ビニールハウス対網室)、共通の系統が少なかったため両者の比較は難しいが、大阪での生育のほうが良かった。三重で生育の良かった *A. microphylla* と *A. filiculoides* との交雑系統は必ずしも大阪では生育は良くなかったが、窒素含有量は高かった。在来株の一部と交雑株が有望と思われる。*A. pinnata* var. *pinnata*, *A. nilotica*, *A. rubra* はどちらでも劣った。

##### 4-2-2 大型ポットにおける二次処理排水中での増殖と栄養塩除去

アゾラ7種・10株の大型ポット(50L)中での増殖と栄養塩除去能力を調べた。培養液には二次処理排水を希釈して用いた

(N=24.5,P=8.6,K=7.8ppm)。いずれの株も5月に最も良い増殖を示し、同時に栄養塩除去能力も高かった。FI1090,1545, ME2025,CA3022,MI4030,4134 は二次処理水から、それぞれ窒素(152・182mg/m<sup>2</sup>.day)、リン(42・52mg/m<sup>2</sup>.day)、カリ(48・63 mg/m<sup>2</sup>.day)の除去能力を示した。この値はかって報告した値の最高値には及ばないものの遜色ない値であるとみてよいであろう。4-2-3 ガリウム(Ga)のアゾラへの取り込み

Gaは近年半導体の原料として重要性が増している。水性植物アゾラの濃縮特性を利用してアゾラがGaの回収資源化に利用できるかどうかの基礎資料を得る目的で実験した。アゾラは7種・10株を用いた。Gaは硫酸ガリウムを3段階の濃度(3.27,13.08,26.2ppm)で合成無機培地に添加して9日間培養した。アゾラ体内のGa含量のみでなく、共生アナベナを抽出してそれへのGaの取り込みも調べた。全体の傾向として、いずれの株も培地中の濃度が上がれば増殖は減少するが、3.27ppmではMI4035を除き対照と大きな差はなかった。26.2ppm添加すると9日目では各株とも30-60%減少した。特にRU6502,PP7002,日本産のFI1090が強く抑制された。FI1035は30%程度の抑制で、調べたアゾラの中ではもっとも耐性を示した。Gaの植物体中への取り込みは濃度が上がれば上昇する。しかし3日目までに急激に取り込みが進み、濃度表示をすれば6日目、9日目もほとんど増えていない。従って濃縮係数もいちばん低い3.27ppmで最も高く、株間ではFI1035,ME2011が高く、ついでCA3025,MI4035,FI1090であった。Gaの回収という観点からみればFI,MEは13.1ppmま

では比較的顕著な増殖を示すことから有効かも知れない。また共生アナベナへはGaはほとんど取り込まれていなかった。水田で良く見かけるウキクサ3種を採集して培養し、これらへのGaの取り込みを調べてアゾラと比較した。アゾラに比べて増殖は劣っていたが、Gaに対する感受性は低く26.2ppmの高濃度でもそれほど抑制されなかった。そのときのGaの取り込みも盛んで、9日目の含量もアゾラのどの株よりも多かった。

#### 4-2-4 高濃度のアンモニア条件下で良好な増殖を示すアゾラ株の選択

7種・117株をプラスチック容器で、窒素添加(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>として20mM)、無添加で生育比較した。この窒素濃度は窒素固定を半減させる濃度の5-10倍とみてよい。6日後に測定し、一部をそれぞれ新しい培地に移してさらに6日間培養した。増殖量(収穫されたアゾラの新鮮重/移植されたアゾラの新鮮重)を求めて比較した。窒素培地に続けて2回培養した結果からアンモニア耐性を判定した。1) *A.pinnata* var. *pinnata*の窒素培地での増殖は無窒素培地でのそれに匹敵し、最も耐性があったといえるが、無窒素においても増殖は悪く、窒素含量は低かった。2) *A.nilotica*は窒素培地ではほとんど増殖せず、第2培養の終わりには枯れて、最も耐性がなかった。3) *A.rubra* アンモニア耐性は低かった。4) 例外はあるが *A.mexicana*, *A.caroliniana*, *A.microphylla*のかかなりの株は窒素培地においても良好に増殖し、*A.filiculoides*より耐性が高いようであった。4-2-5 アゾラからの水素発生  
窒素固定菌であるアゾラの共生ラン藻はニトロゲナーゼの働きで基質の窒素ガスのないとき(窒素ガスのかわりにアルゴンを含む

気中)で水素ガスを発生する。またCOの存在下では窒素ガスがあっても水素ガスを発生する。このことをいくつかのアゾラ系統を用いて確認した。空気中で水素ガスを発生する株は無かった。理論的にはニトロゲナーゼの活性を示すアセチレン還元によるエチレン生成量と等しいモルの水素ガスを発生するはずである。このニトロゲナーゼ活性(アセチレン還元活性)に対する無窒素ガス気中の水素ガス発生比はニトロゲナーゼ活性が高いほど高くなったが、得られた最高値は0.4であった。これは吸収型ヒドロゲナーゼの存在によって発生した水素ガスの一部が酸化されるためと思われる。

#### 4-2-6 その他

本来目的としていたこと以外でつぎのような結果がえられた。

1) 福岡県農業総合試験場や福岡の農民が三重大学でスクリーニングしたアゾラや福岡産アゾラの実用試験を行い、水稲-アイガモの栽培体系に窒素肥料兼飼料兼除草剤としてのアゾラを組み込むことに成功した。2) 本邦産オオアカウキサ *A. japonica* の分類的位置を検討した結果本州中西部にすくなくとも2種類あり、ひとつは *A. filiculoides* に近いもの、もうひとつは *A. rubra* に近いものであることが判明した。

#### 4-3 今後の課題と発展

本研究によって導入されたアゾラとその利用は徐々に日本の研究者から注目されてきた。当初目的としていた突然変異などによる育種についてはいくらかの実験をおこなったが、十分な数の個体が取れなかったため、今後の課題として残されている。

#### 4-4 発表論文と口頭発表

論文

Watanabe I. (1994) Genetic Enhancement and Azolla Collection-Problems in Applying Azolla-Anabaena Symbiosis. In: Nitrogen Fixation with Non-Legumes, (Eds. Hegazi N.A., Fayed, M., and Monib M.), The American University in Cairo Press, Cairo, PP. 437-450

Kitoh S, Shiomu N. Preliminary screening of Azolla strains for tolerance to ammonium ion. Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B. 47:115-120

口頭発表

川島・杉井・渡辺 (1993) 本邦における各種アゾラの生育について、熱帯農業学会秋季大会(鹿児島)

汐見・鬼頭 (1993) 廃水および酸性雨中でのアゾラの増殖 近畿酸性雨研究会(滋賀県)

汐見・鬼頭・上田(1995) アゾラによるガリウムの吸収 日本土壌肥料学会(仙台)

鬼頭・汐見(1995) アンモニウム耐性のアゾラの選抜 日本土壌肥料学会(仙台)

Shiomu N, Kitoh S, Ueda E., and Watanabe I. (1995) Growth characterization of Azolla-Anabaena symbiosis in Osaka, 10th Internat. Congress Nitrogen Fixation (poster)(St. Peterburg)

Watanabe I (1995) Phylogenetic, molecular and breeding aspects of Azolla-Anabaena symbiosis. Internat. Pteridophyte Symposium (London)

その他 口頭発表・ポスター発表 4件