

平成 21 年度 コウノリ野生復帰学術研究補助制度 報告書

豊岡市の様々な水田に生息する藻類の除草剤に対する感受性
～コウノリ保護と農業の持続的な共存を目指して～

島根大学大学院 生物資源科学研究科 環境資源科学専攻

微生物生態学研究室

宮部 智代

第1章 背景および目的

人間にとって食料は生命を維持し、健康で充実した生活を送るための基礎となる重要なものである。この食料を生産・供給する農業のうち、特に日本の伝統的な稲作については、戦後の食料不足を補うため、機械化や農薬使用等の技術革新によって米の収量を飛躍的に増加することができたが、同時に水田環境を単純な生態系へと変化させた。一方、近年では、遺伝子組み換え食品、残留農薬の問題等、メディアを通じて様々な食の安全に関わるニュースが頻繁に報道され、消費者の食への安全性への意識が高まりつつある。また、環境は農業生産の基盤としても人間の生存にとっても重要であるという意識の高まりもあいまって環境問題や環境保全が社会的な関心事となり、農業においても水田生態系の多様性が重視されるようになってきている。これら「食の安全」と「環境保全」と2つの観点から、日本の稲作において減・無農薬栽培などが盛んになりつつある。

本論文の著者の出身地である兵庫県豊岡市では一度絶滅したコウノトリを再び野生復帰させるために市民も参加した保護活動が盛んで、「大きな食物連鎖ピラミッドの復活」、「暮らしの見直しと価値観の再構築」等、コウノトリが悠然と舞うふるさとにするために様々な取り組みが行われている。稲作においても、慣行の除草剤使用を続けている農家もあるが、農薬の散布をしない又は控える等の協力をしている農家もある。しかし、除草剤を使用しない稲作は労力やコストの面で容易ではないため、将来、除草剤の使用が再開される可能性も考えられる。

一方、藻類は水田においては土壌の表層剥離などの弊害をもたらすものとして除草

剤による防除対象の一つとされてきたが、水田を「コウノトリを育む場」としても位置付けられた時には、その餌である魚類や貝類等の餌であり、生産者として重要な役割を持っていると評価できる。よって、そのような価値観の下では、雑草を防除し、また、表層剥離などの弊害を最小限にしつつも、一定量の藻類を維持できるような除草剤の使用が望ましいと言えるであろう。水田で使用される除草剤については農薬取締法に基づく登録時にリスク評価が行われているが、それは公共用水域を想定したものである上、*Pseudokirchneriella subcapitata* 等の限られた指標種を用いた評価に過ぎないことから、水田水中に生息する藻類、ましてや豊岡市の水田水中に生息する藻類への影響を必ずしも示すものではないと言える。つまり、豊岡市の慣行水田でどのような除草剤を使用することが、また、無農薬水田でその使用を再開する際にどのような種類の除草剤を選択することが「コウノトリを育む場」としての水田生態系の保全にとってより望ましいかは明らかではない。

本研究では兵庫県豊岡市の様々な管理方法で稲作が行われている水田の土壌表面、植物遺体、植物の根元付近より様々な藻類を分離した後、各種除草剤に対する感受性を明らかにし、慣行水田においても藻類により影響の少ない除草剤を選択して使用する等の提案をすることを一つの目的とする。一方、除草剤を使用しない稲作では感受性の高い藻類が多く生息しているならば、除草剤の使用を再開すると藻類の受ける影響は大きいかもしれない。そのため、除草剤を使用しない稲作から使用する稲作に変更する時、どのような除草剤使用がより藻類への影響が少ないかを予測することも目的である。

第2章 採取地として選定した水田等の所在地と管理歴

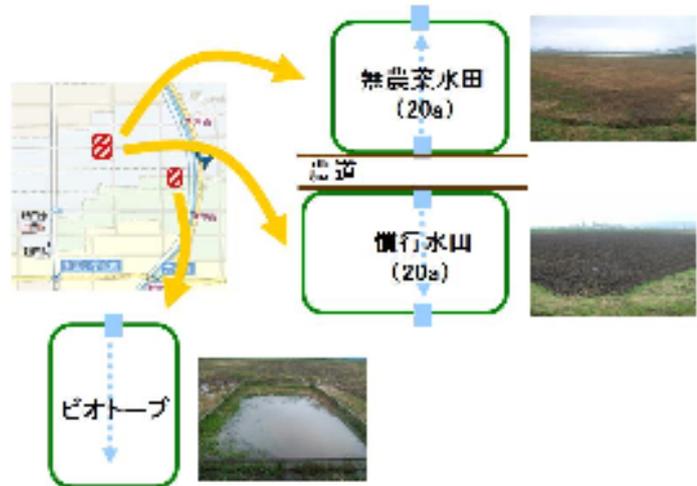
藻類を含む懸濁物の採取地として、兵庫県豊岡市の中谷地区のビオトープおよび河谷地区の慣行水田と無農薬水田を選定した。それらの管理歴を下に示す。

■ビオトープ

平成14年以前:慣行水田

平成15年:ビオトープ開始

平成18年:放鳥拠点施設設置



■慣行水田

開始年は不明であるが、長年にわたり一般的な農法で稲作が行われて、除草剤も使用されている。

田植え時期は無農薬栽培水田よりもはやい。

■無農薬水田

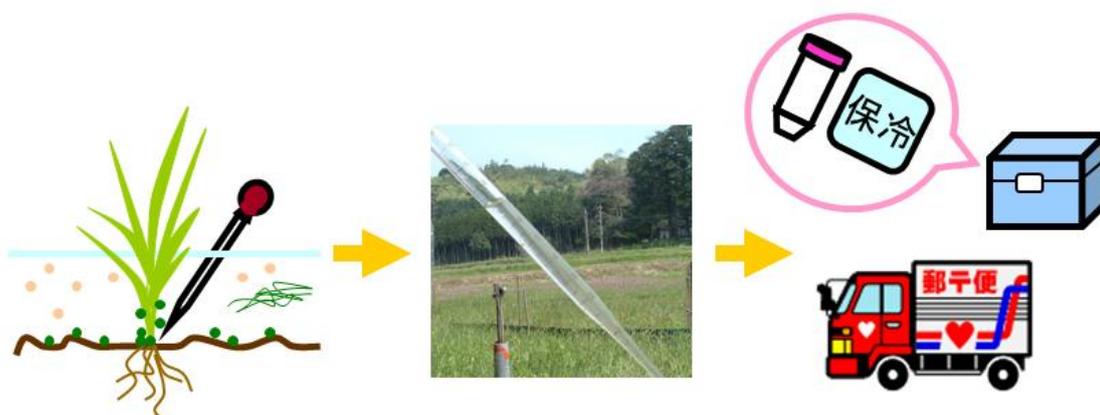
平成15年以前:慣行水田

平成16年:無農薬栽培開始、冬期も湛水が行われている

第3章 藻類を含む懸濁物(試水)の採取

第1節 藻類の採取方法

土壌の表面部分、植物の遺体、植物の根元付近に薄く色づく程度に生えている藻類を見つけ、駒込ピペットを斜めにして土壌ごと吸い取った。駒込ピペットをルーペで観察し、緑色が確認できたら遠沈管に採取した。これを保冷剤の入ったクーラーボックスに入れて3℃の状態が保たれるクール宅急便で大学へ送った。実験を行うまでは8℃の冷蔵庫で保存した。



第2節 藻類の採取時に測定した水温、pH、水深

水温(°C)

	ビオトープ	慣行水田	無農薬水田
2009年5月7日	20.7	—	—
2009年6月6日	28.4	24.8	—
2009年7月5日	23.2	23.4	25.0
2009年8月1日	28.9	28.7	29.1

pH

	ビオトープ	慣行水田	無農薬水田
2009年5月7日	6.03	—	—
2009年6月6日	6.76	6.69	—
2009年7月5日	6.40	6.81	6.72
2009年8月1日	6.34	6.47	6.17

水深(cm)

	ビオトープ	慣行水田	無農薬水田
2009年5月7日	6.0	—	—
2009年6月6日	6.0	8.0	—
2009年7月5日	—	—	—
2009年8月1日	10.8	1.5	6.4

第4章 水田等から採取された懸濁物からの藻類の分離

藻類に及ぼす農薬の影響を試験する場合、2種以上の藻類が混在しているような純粋でない株を用いると、それらが試験結果に何らかの影響を及ぼす可能性があり、農薬の影響評価に用いるのは不適切である。そこで本章では農薬に対する感受性を調べることを前提として兵庫県豊岡市の水田から藻類を分離し、単独培養株を得ることを目的とした。

第1節 培養法(希釈平板法)による分離

材料および方法

BBM 液体培地(表2) 9mL を入れた滅菌済み遠沈管に試水1mL を入れた。これを1次希釈液とし、同様の操作をあと2回繰り返して、2次、3次希釈液を作成した。このようにして作成した希釈液1mL を直径 90mm のシャーレ内に作成しておいた BBM 寒天平板培地上に流し入れ、全体に広げ培養した。培養条件は 20°C、照度は 900～1200lux、12 時間 12 時間の明暗周期とした。培地上に形成されたコロニーを白金耳で別の新しい平板培地に移植した。それを上述の条件で培養した。

なお、予備実験においては、シャーレ内の結露水が培地上に落ちることでコロニーの拡散等が起こらないようにするため、フタを下にして培養したが、流し入れた希釈液の量が多かったためか、フタに溜まった希釈液の中で藻類がより多く増殖していた。そこで、次の5通りの希釈液量と培養方法について検討した。

- ① 0.1mL の希釈液を流し入れてフタを下にして培養

- ② 0.5mL の希釈液を流し入れてフタを下にして培養
- ③ 1mL の希釈液を流し入れてフタを下にして培養
- ④ 1mL の希釈液を流し入れてクリーンベンチ内で水分をある程度乾燥させてからフタを下にして培養
- ⑤ 1mL の希釈液を流し入れてフタを上にして培養

その結果、第1表に示す通り、⑤の場合はフタに結露が多く、コロニー形成が遅く、コロニーが計数出来なかった。また、③の場合はフタに水滴が多かった。一方、①、②、④のうち、コロニー形成までの時間が早く、コロニー数も多く現れたのは④であった。よって、1mL 添加しクリーンベンチ内で水分をある程度乾燥させてから裏返して培養したものが培養に最も適している方法と結論づけた。

第1表 シャーレに流し入れる希釈液量とフタの向きが結露と藻類のコロニー形成に及ぼす影響

		水滴		コロニー		
		フタ	培地	数	形成までの時間	
フタが下	0.1mL	なし	なし	少ない	遅い	
	0.5mL	なし	なし	少ない	遅い	
	1mL	あり	なし	少ない	遅い	
	乾燥	1mL	なし	なし	多い	早い
フタが上	1mL	あり(多い)	あり(多い)	無し	遅い	

結果および考察

これまでに 32 個体分離した(最大で 26 回新しい培地に継代した)。これらはまだ藻

類のみのコロニーにはなっておらず、細菌のコロニーが混在しているものも多く見られた。また、比較的藻類のコロニーのみとなっているシャーレのコロニーより藻類を白金耳で DW 数滴添加したスライドガラス内に白金耳で入れ顕微鏡 (OLYMPUS DP12) 観察すると、藻類以外に細菌が見られた。まだ無菌だとはいえないため、引き続き分離操作を行うこととした。

第2節 直接法(ピペット洗浄法)による分離

材料および方法

パスツールピペットの先をアルコールランプの火であぶり、柔らかくなったらピンセットで引き伸ばした(=キャピラリーピペット)。5ツ穴ガラス血液反応板の各ホールにパスツールピペットを用いてホールいっぱいより1mmほど少ない量の BBM 液体培地を入れた。試水をシャーレに移し、実体顕微鏡の倍率 10~60 で見ながら藻類1個体をキャピラリーピペットを用いて吸い上げ、シャーレ内の BBM 液体培地の中に移した。BBM 液体培地内で藻体を毛細管現象を利用して吸い上げたり出したりして、表面の土壌や植物の遺体、粘質をよく洗浄し、新たな BBM 液体培地に移した。これを 10 回繰り返し、汚れの落ちた藻体を BBM 液体培地の入った試験管に入れ、シリコ通気栓をして 20°C、照度は 900~1200lux、12 時間 12 時間の明暗周期で静置培養した。

結果および考察

ピペット洗浄法によって計 216 個体の藻類を試験管に入れて培養し、顕微鏡で観

察したところ、そのうち慣行水田由来の K6-5、K6-23、K6-26、K6-52、K6-53、K7-15 の 6株が単独で分離できていた。これらはある程度増殖させた後、それぞれ 10 個体ずつ再度ピペット洗浄を行い、無菌化を試みた。

これら6株以外のほとんどの試験管には2種以上の藻類が混在していたため、それらについては単独の藻類のみを分離できていなかったと考えられた。また、増殖が確認できなかった試験管もあった。その理由としては、試験管内の培地に移植されていなかった可能性も考えられたが、多くの試験管でそのような操作ミスをすることは考えにくい。そのため、ピペット洗浄時に藻体に傷をつけてしまう等、藻類を増殖できないほど弱らせてしまった可能性や、培地が適していなかった可能性が考えられた。

第3節 分離された藻類の無菌検査

材料および方法

ZoBell 2216E 培地(表2)を試験管に5mL と分離した藻類の培養液を 100 μ L 添加し、シリコ通気栓をして 20 $^{\circ}$ C、暗所で培養した。検査はそれぞれの藻類株について3連で行った。

結果および考察

分分離後の全ての培養液について肉眼で色彩や濁りを観察したところ、いずれも細菌の繁殖と思われる色の濁りが生じたため、無菌化できていないと考えられた。元々は同じ株の継代クローンを複数の試験管に移植し、無菌かどうか確認したが、培養し

ている試験管によっては色のつき方が濃く濁るものから、薄く色がつくものまで様々であった。これは、ピペット洗浄法によるバクテリアや粘質等の汚れの落ち具合が不均一であったための現象だと考えられた。また、同一種の株の濁度を比較しても濁度に違いがあり、付着していた細菌の種類に違いがあった可能性も考えられた。

表2 本研究に供試した培地の組成

BBM培地		OECD培地	
NaNO ₃	250mg	H ₃ BO ₃	0.185mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25mg	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75mg	ZnCl ₂	0.003mg
K ₂ HPO ₄	100mg	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08mg
KH ₂ PO ₄	175mg	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1mg
NaCl	25mg	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015mg
Na ₂ EDTA	50mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007mg
KOH	31mg	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98mg	CaCl ₂ ·2H ₂ O	18mg
H ₂ SO ₄	0.001mL	NH ₄ Cl	15mg
H ₃ BO ₄	11.42mg	KH ₂ PO ₄	1.6mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82mg	NaHCO ₃	50mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15mg
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49mg	蒸留水	1000ml
MoO ₃	0.71mg		pH8.0
蒸留水	999.999mL		
	pH約6.2		
ZoBell 2216E培地			
Peptone	5.0g		
Yeast Extract	1.0g		
FePO ₄	0.1g		
蒸留水	1000ml		
	PH7.6~7.8		

第5章 藻類生長阻害試験のための条件設定

本章では、藻類生長阻害試験を行うにあたって必要だと考えられる条件を設定することを目的とした。本研究で得られた藻類は、農薬取締法に基づく登録時のリスク評価に用いられる *Pseudokirchneriella subcapitata* と比較すると細胞の長さや幅が 100 倍以上大きいものが多かった。そのため個体数の計数方法について、それぞれ大きさに適した方法を検討する必要性が生じた。また、本研究で得られた藻類の増殖速度が *Pseudokirchneriella subcapitata* と比べて極めて遅く、生長阻害試験を行うために必要な量の藻類細胞を得る方法について検討する必要性が生じた。一方、異なる藻類を数種用いて培養試験などを行う場合、細胞初期密度あるいはバイオマスなどを統一することがデータを比較する上で望ましいが、本研究において、株の個体サイズは様々であったため、細胞初期密度 (cells/mL) を統一することには問題がある。すなわち、農林水産省の藻類成長阻害試験によると *Pseudokirchneriella subcapitata* を試験に用いる場合、細胞初期密度は 10^4 cells/mL とされているが、K6-23、K6-26 等は細胞の長さや幅が 100 倍以上も大きく異なり、同じ初期密度ではすでに細胞数が飽和状態となるためそれ以上の増殖が望めない可能性が高い。そこで、光合成の直接の担い手として大きな役割を果たしているクロロフィルに着目し、なかでも特に全ての藻類に含まれているとされているクロロフィル a の含有量を求め、その値をバイオマスの指標として細胞初期密度を設定することを検討した。また、生長阻害試験に用いる各種除草剤の暴露濃度の設定のための予備実験も行った。

第1節 細胞の計数方法の検討

■藻体が小さい場合

Thoma 血球計算盤に 20 μ L のせて、プレパラートを作成し、実体顕微鏡で検鏡することで、個体数を計数した。

■藻体が大きい場合

培養液を1mL ファンネルに入れ、減圧ろ過によって罫線入りのメンブランフィルター (ADVANTEC、直径 25mm、孔径 0.8 μ m) 上に集めた。次に、フィルターをスライドグラスに乗せ、実体顕微鏡の 10~40 倍にてフィルターのマス4個分 (36mm²) 上にある藻類を全て計数した。

これらの作業を3回繰り返し、その平均値をもとに細胞密度を算出した。

第2節 阻害試験に必要な量の藻類を得る方法

材料および方法

100mL 容三角フラスコに液体培地 50mL、300mL 容三角フラスコに液体培地 150mL、500mL 容三角フラスコに液体培地 250mL を入れ、経代培養しておいた培養株をそれぞれに5mL ずつ接種した。接種した培養株は第4章で単独で分離出来ていた K6-5、K6-23、K6-26、K6-52、K6-53 および K7-15 の6株である。培養条件は20 $^{\circ}$ C、照度は 4800~5000lux、12 時間 12 時間の明暗周期、静置培養とした。その後、毎日増殖の程度を肉眼で評価した。

結果および考察

K6-5、K6-52、K7-15 については、培養後一週間以内から白濁が見られ、藻類は増殖していないようだった。これは、細菌等、別の微生物がコンタミし、接種した藻類が淘汰されたものと考えられた。一方、K6-23、K6-26、K6-53 に白濁は見られず、顕微鏡でも観察したが目的の藻類のみが増殖したと推察された。

肉眼観察の結果、特に 500mL 容三角フラスコで培養したものが、藻類の量が多いと推察された。これは、3条件の中では 500mL 容三角フラスコが最もサイズが大きく、その分培養液に当たる光の量が多いことや、空気に触れる面が多いことが理由ではないかと考えられた。よって、藻類を早く大量に得るためにこの条件で培養することが望ましいと考えられた。しかし、500mL 容三角フラスコ全体が緑色に色づくまでには 1 ヶ月ほどかかり、迅速性に欠けるため、500mL フラスコの数を増やして培養を行った後、数本のフラスコ内の培養液を混合して濃縮したものを生長阻害試験の接種源として使用することにした。

第3節 細胞初期密度の設定

材料および方法

試験管に保存していた供試藻類を BBM 培地が 50mL 入った 100mL 容の三角フラスコに接種し、2週間培養した。培養条件は 20°C、照度は 900~1200lux、12 時間 12 時間の明暗周期とした。

50mL 容の遠沈管にそれぞれ全量を移し、遠心分離(800×g、20 分)した後、上澄み

を捨てた。その後、遠沈管の沈殿を30mL程度の蒸留水で懸濁させ、再び遠心分離した。上澄みを捨て、沈殿にアセトン5mLを加え、ボルテックミキサーで約1分間攪拌してクロロフィルを抽出し、直ちに分光光度計(SHIMADZU、UV-1700 PharmaSpec、UV-VIS SPECTROPHOTOMETER)を用いて、波長750、663、645、630nmにおける上澄みの吸光度を測定した。対照区としてアセトンを設定した。

クロロフィル a 量は次式によって求めた。

$$\text{Chl.a}(\mu\text{g/mL}) = (11.64E663 - 2.16E645 + 0.10E630) \times A/V$$

※11.64E663、2.16E645、0.10E630は波長663、645、630nmの吸光度の値から750nmの吸光度の値を差し引いたものである。

結果および考察

Pseudokirchneriella subcapitata と他の藻類の細胞あたりのクロロフィルa量を比べると $10^4 \sim 10^5$ 倍ほどの差が認められ、*Pseudokirchneriella subcapitata* の初期細胞密度を 10^4 cells/mL を基本としてクロロフィルa量で接種量を統一した場合、他の藻類の初期細胞密度は 10 cells/mL 以下でも十分だと考えられる。しかし、密度が低すぎると、藻類をフラスコに接種したり細胞数を計数するためにサンプリングしたりする際に生じるバラツキを無視できなくなり、さらに農薬の影響による細胞数の増減なのか操作上の誤差なのか区別できなくなる可能性がある。そこで今回は K-23、K-26、K-53 の初期細胞密度をその可能性が低い 10^2 cells/mL とすることとした。

第4節 暴露濃度の設定

対照区、0ppb 区、10ppb 区、100ppb 区、1000ppb 区の5濃度区を設けた。なお、対照区以外、アセトンの濃度は 0.03mL/L となるようにした。

最高濃度を 1000ppb とした理由は下記の2点である。

①化合物の水溶解度や有機溶剤への溶解度を考慮すると、1000ppb 以上の設定は不可能ではないが事実上困難であること

②環境中で検出される農薬の濃度はほとんどの場合で数 10ppb であること

また、今回の実験では供試化合物の純度を 100%として濃度を計算した。

第6章 分離された藻類の増殖に及ぼす除草剤の影響(藻類生長阻害試験)

ピペット洗浄法によって分離された藻類の増殖に及ぼす **mefenacet**、**oxaziclomefone**

および **thiobencarb** の影響

材料および方法

1) 供試藻類

この実験にはピペット洗浄法によって分離された6株のうち K6-53 株のみを供試した。

その理由は、これまでピペット洗浄法によって K6-5、K6-23、K6-26、K6-52、K6-53、

K7-15 の6株が単独で分離できたが、第5章の第2節の方法で継代培養をしていると、

K6-53 以外は白化して死滅してしまったためである。

2) 供試化合物

この実験では、下表に示す3種を供試化合物とした。

	適用雑草	作用機作
mefenacet	水田一年生雑草およびマツバイ	生長点における制止期・代謝期の細胞に作用し、細胞分裂・肥大を阻害
oxaziclomefone	ノビエ(発生前から2.5葉)、一年生カヤツリグサ科およびマツバイ	植物内生ジベレリンの代謝活性阻害
thiobencarb	ノビエ、ミズガヤツリ(出芽直前~2葉期)、ホルタイ、マツバイ	タンパク質合成阻害とオーキシン活性阻害

これらは全てわが国で除草剤として広く使用されているもので、特に **thiobencarb** は環境省による水質保全対策の一つとして定められた環境基準項目の一つに挙げられており、**mefenacet** も要監視項目の一つに挙げられている物質である。

3) 供試化合物の希釈および培地への添加方法

供試化合物の標準品 30mg を1mL のアセトンに溶解させ(30,000ppm)、このうち0.1mL をアセトン 0.9mL に加えることで1/10 に希釈し、3,000ppm 溶液を調整した。さらに、このうち0.1mL をアセトン 0.9mL に加えることで1/10 に希釈し300ppm 溶液を調整した。

4) 供試藻類の接種、培養および計数方法

まず、前培養した供試藻類の密度を計数し、供試藻類の初期細胞密度が 10^2 cells/mL 程度となるような量の接種源を 100mL 容三角フラスコに入れ、そこに BBM 培地を加えて約 30mL に調整した。そこに 30,000ppm、3,000ppm 及び 300ppm 溶液を1 μ L 加えて約1/30,000 に希釈し、1000ppb、100ppb 区及び 10ppb 区とした。また、アセトンによる影響を調べるため、各農薬添加区における最終アセトン濃度と同じになるようにアセトンのみを1 μ L(0.03mL/L) 添加した区を設けた(0ppb 区)。さらに、アセトンも加えずに藻類の接種のみを行った区(対照区)も設けた。培養条件はいずれも 20 $^{\circ}$ C、照度は 4800~5000lux、12 時間 12 時間の明暗周期とした。培地中の藻類密度の計数は 0、24、48 および 72 時間後に5章1節に述べた方法で行った。

なお、農薬の影響評価試験でよく使われる OECD 培地を用いて同様の実験を行ったところ、0ppb 区や対照区においても BBM 培地に比べて増殖が顕著に遅かったため、今後の実験には BBM 培地を使用することにした。

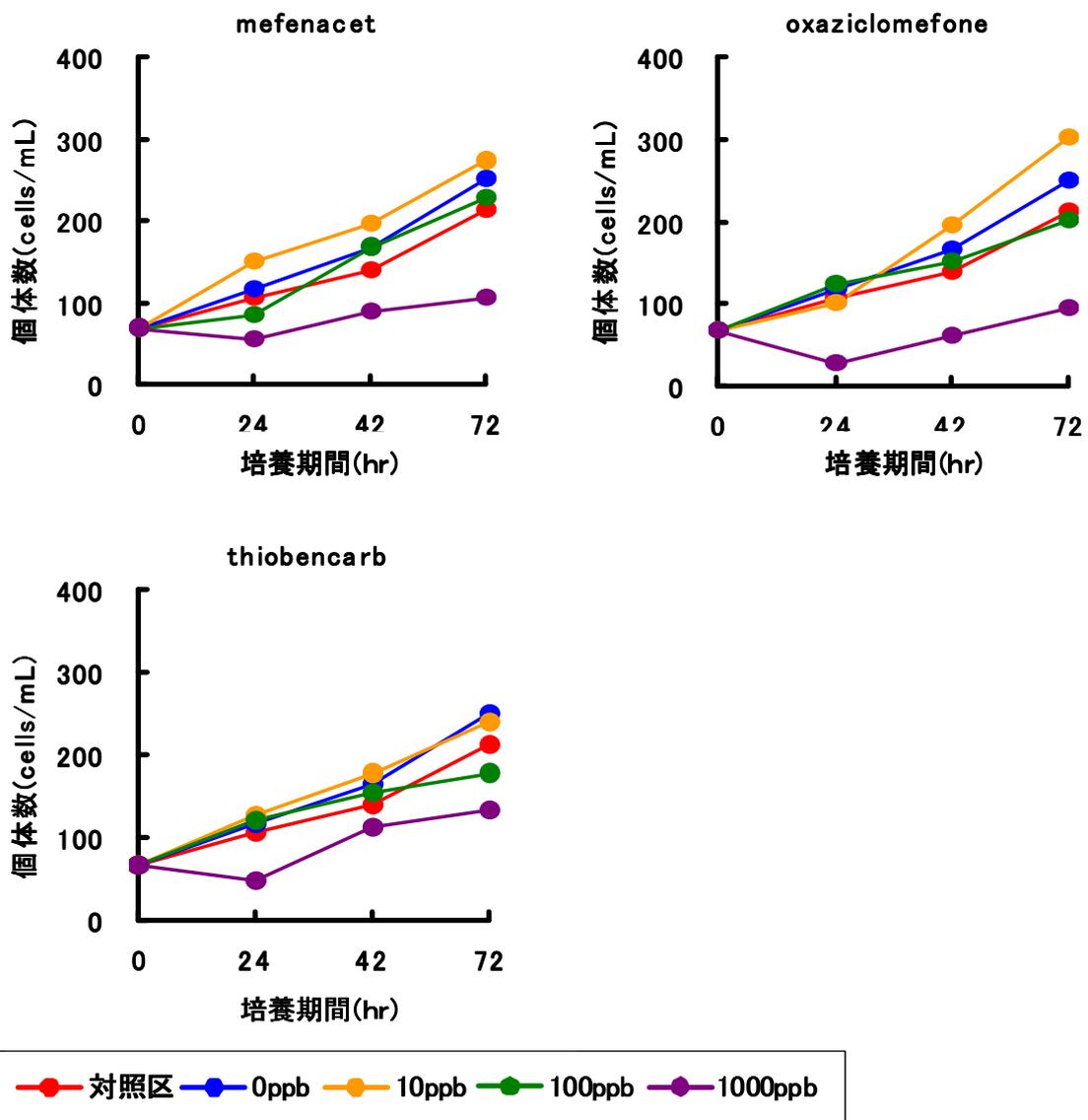
結果および考察

K6-53 株は、どの供試化合物でも 1000ppb 区では 24 時間後には増殖が抑制されたが、その後は 0ppb 区よりも概ね緩やかに増殖した。したがって、mefenacet、oxaziclomefone および thiobencarb が 1000ppb 存在しても、K6-53 株は完全に死滅するのではなく、増殖の開始が遅れ、また、増殖速度が低下するものと考えられた。

また、どの供試化合物でも 0 時間後と 72 時間後を比較すると、対照区よりも 0ppb 区で、また、0ppb 区よりも 10ppb 区でそれぞれ増殖が促進された。このようなアセトンのみの添加区や農薬の低濃度区で増殖が促進される現象は本研究室の過去の修士論文、山田正二郎(2000)などにより報告されているが、そのメカニズムは不明である。ともあれ、0ppb 区よりも mefenacet では 9%、oxaziclomefone では 20% および thiobencarb では 4% の促進が認められたことから、いずれの薬剤も 10ppb であれば、K6-53 株の増殖に抑制的な影響は示さない上に、促進的な影響があり得ると考えられる。

一方、72 時間培養後について 100ppb 区に着目すると、0ppb 区よりも mefenacet では 9%、oxaziclomefone では 20%、thiobencarb では 29% 抑制されたことから、100ppb という条件に限れば、3 剤の中で K6-53 株の増殖への影響がより少ないのは mefenacet であると考えられた。

また、1000ppb 区に着目すると、0ppb 区よりも mefenacet では 58%、oxaziclomefone では 62%、thiobencarb では 47% 抑制されており、1000ppb という条件に限れば、3 剤の中で K6-53 株の増殖への影響がより少ないのは thiobencarb であると考えられた。



第1図 豊岡市の水田等から分離された K6-53 株の BBM 培地中における増殖に及ぼす mefenacet、oxaziclomefone および thiobencarb の影響