

報 文

Nostoc 属シアノバクテリアが形成するアグリゲート (イシクラゲ) の
物理・化学的ストレスに対する抵抗性

横山和平¹⁾・河野伸之²⁾・丸本卓哉¹⁾

¹⁾ 山口大学農学部, 〒753-8515 山口市吉田 1677-1

²⁾ 生物系特定産業技術研究推進機構

(現, (独) 農業・生物系特定産業技術研究機構生物系特定産業技術研究支援センター)

〒331-8537 さいたま市北区日進町 1-40-2

**Persistence of viability of a cyanobacterial aggregate (Ishikurage) formed
by *Nostoc* sp. in response to physical and chemical stresses**

Kazuhira Yokoyama¹⁾, Nobuyuki Kohno²⁾ and Takuya Marumoto¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan

²⁾ Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 1-40-2, Nisshin, Kita, Saitama 331-8537, Japan

Ishikurage is the jelly aggregate formed by desiccation-tolerant cyanobacteria, *Nostoc* sp. In the present study, we examined the persistence of the viability of Ishikurage in response to physical and chemical stresses that would arise in the process of manufacturing to materials for reforestation. Wet Ishikurage lost its photosynthetic activity during storage under dark conditions. Growth of Ishikurage was delayed under low temperature conditions, while the photosynthetic activity was not affected. Photosynthesis was maintained when Ishikurage was soaked in buffer solutions adjusted between pH 3 to 9. When wet Ishikurage was strongly homogenized, the photosynthetic activity decreased. During the re-wetting process, the activity did not differ among fractions of several sizes prepared by homogenization and sieving of air-dried Ishikurage. Except for the size fraction smaller than 1 mm, Ishikurage placed on soil surface inhibited desiccation of the underlying soil. These findings could provide major data for manufacturing processes.

Key words : cyanobacterial aggregate, *Nostoc* sp., photosynthetic activity,
stress tolerance

1. 緒 言

水田では, シアノバクテリアによる窒素固定が重要な窒素供給源であることが知られている。陸生シアノバクテリアの役割は, 半乾燥地や水田土壌において定量化されており¹⁾, 一般的に土壌が湿潤状態であれば, 表層域における窒素固定に多大な寄与をされると考えられる。陸生シアノバクテリアのうち, *Nostoc commune*をはじめとする *Nostoc* 属は, 多量の細胞外多糖を分泌し肉眼的な大きさのスライム状のアグリゲート (以下, イシクラゲ) を形成する。*Nostoc* 属は強い耐乾性を持ち, ほとんど絶乾状態にさらされても, 吸水後, 速やかに活性を回復し, 増殖することが知られている²⁾。

火山性降下物や泥流に覆われた地域, あるいは崩

落や流亡などにより表土が失われた斜面では, 土壌中の養分ストックが失われると共に土壌の保水力も低下し, その後の植生回復を支えるための肥沃度が著しく低下する。特に, 養分循環の要となる土壌微生物群集の喪失は植生回復に重大な遅延をもたらす。このような地域での早急な植生回復には人為的な緑化作業が必要となり, そこでは, 植物だけでなく, その初期成長や定着を促進する土壌微生物群も同時に導入する必要がある。*Nostoc* 属をはじめとする各種シアノバクテリアが土壌の無機粒子とともに形成したシアノバクテリアクラストや生物学的土壌クラストは, 多様な土壌生物が生存・増殖する場であることが知られている^{3,4)}。従って, 土壌微生物の接種源として, 光独立栄養と窒素固定の性質をあわせ持ち, 更に強い乾燥耐性を持つイシクラゲは, 植物生育の促進だけでなく, 養分循環システムの自立した発達を促す起点としても期待される。

緑化作業に際して、緑化資材の製造、梱包、運搬あるいは散布のしやすさなどを考慮してイシクラゲを種々加工する必要がある。この際には、イシクラゲの主体をなす *Nostoc* 属シアノバクテリアの活性と生残性を損なわないことが肝要である。現在までに、各種担体による固定化や⁵⁻⁷⁾、*Nostoc* 属が形成したシアノバクテリアクラストを資材として利用すること^{8,9)}が考案されているが、イシクラゲの活性保持に着目した資材化法についての詳細な研究はなかった。本研究では、イシクラゲに対する各種物理的・化学的処理の影響を検討した。

2. 材料及び方法

1) イシクラゲの採集と取り扱い

約5 kg (湿重) のイシクラゲを山口大学構内で採取した。採取した藻体を水道水で洗浄して付着した土壌を落とした後、ペーパータオル上で数日間風乾した。風乾後、室温で保存し、適宜実験に供試した。風乾状態から吸水により湿潤化する過程での藻体重と吸水量の関係を事前に調べたところ、重量として藻体の10倍～40倍の液量では光合成活性の回復と吸水量に差はなかった。以後の実験は、特に示さない限り、この範囲で30℃で行った。培養が長期にわたる場合は、適宜水を補充した。イシクラゲ中のシアノバクテリアの活性指標として光合成活性を測定した。光合成活性 (Fv/Fm) の測定には MINI-PAM (ワルツ社) を用い、5分間暗所適応させた後に、表面の任意の10箇所について MINI-PAM で光合成活性を測定した。この値を平均したものを一藻体の光合成活性とした。吸水 pH (2 反復) 以外の実験は3反復で行い、平均値と標準偏差を図示した。

2) 光条件が湿潤イシクラゲの活性に及ぼす影響

湿潤状態のイシクラゲに対する光照射の影響を検討するため、30℃、常時明状態の人工気象器中で風乾イシクラゲに水道水を吸水させ、12時間後に光合成活性を測定した。その後、藻体を常時暗条件で培養し、24時間毎に、光合成活性を測定した。暗条件にしてから8日あるいは11日後に、再びイシクラゲを常時明状態の人工気象器に移し、24時間毎に光合成活性を測定した。

3) 吸水時の温度・pH の影響

吸水時の温度、pH の影響について以下のように調べた。風乾イシクラゲを10℃または30℃、常時明状態に設定した人工気象器中で吸水させ、経時的にイシクラゲの光合成活性と湿重量を測定した。光合成活性を測定後、イシクラゲを潰さないように注意しながらペーパータオルで水滴を除去して湿重量を測定した。測定後、藻体を培養容器に戻し、蒸発やイシクラゲによる吸水などによって減少した水を随時添加し、常にイシクラゲの周りに十分量の水があるようにした。ま

た、30℃、明条件下で、50 mM の pH3.0 (MES)、5.0 (Tricine)、7.0 (HEPES)、9.0 (MOPS) 及び11.0 (CAPS) の緩衝液¹⁰⁾ を吸水させ適宜光合成活性を測定し周囲の水の pH の影響を調べた。

4) 粉碎処理の影響

各種資材化過程において、藻体の均一な混合あるいは成型などのために藻体を粉碎すると、内部のシアノバクテリアに何らかの障害が生じる危険性がある。このため、風乾あるいは湿潤状態でイシクラゲを粉碎する処理が光合成活性に及ぼす影響を調べ、実際に土壌表面に散布して水分が保持されるかどうか検討した。風乾状態のイシクラゲをブレンダー (オスター社製、16,800 rpm) で粉碎し、2 mm 以上、1～2 mm、1 mm 以下に篩別した。それぞれの大きさの藻体について、吸水に伴う光合成活性を、30℃、常時明状態の人工気象器中で測定した。

湿潤状態での粉碎の影響を調べるために、予め1 g の藻体を24時間前吸水・培養して光合成活性を測定後、さらに水道水を3 mL 添加してブレンダーで粉碎した。この際、膨潤した藻体を篩別することは困難だったため、一定の回転速度 (16,800 rpm) での処理時間、10、30、60 秒間の影響を検討した。粉碎直後に各試料の光合成活性を測定した後、人工気象器中で培養した。風乾、湿潤いずれの場合も対照として未粉碎イシクラゲを同条件で培養した。

別途、湿潤状態で10、30、60 秒間粉碎処理を行った各試料について、経時的にイシクラゲのクロロフィル a 量を以下のように測定した。ホモジナイズしたイシクラゲ懸濁液を25 ml 容メスフラスコで定容とした。この20 μl にメタノール (99.8%) 980 μl を加えて十分に懸濁・遠心分離 (15,000 rpm, 4 分間) 後、上澄み液の吸光度 (665 nm) を測定した。ここで得られた吸光度から下記の式よりメタノール抽出液1 ml 当たりのクロロフィル a 量を算出した。なお、本試験では、Mackinney によって報告された吸光係数 (k=74.5) を用いた¹¹⁾。

$$\text{クロロフィル a 量 } (\mu\text{g ml}^{-1}) = A_{665} \times 1000/74.5$$

一方、残りのイシクラゲ細胞懸濁液約25 ml 全量の乾燥重量を求め、イシクラゲ乾物1 g 当たりのクロロフィル a 量を算出した。

5) 土壌の乾燥過程に及ぼすイシクラゲの影響

イシクラゲによる土壌被覆試験を山口大学農学部附属農場のビニールハウス内で2001年11月16日から2001年12月22日まで36日間行った。1/10,000 a ポットに充填したマサ土表面に、風乾状態で粉碎後2 mm 以上、1～2 mm、1 mm 以下に篩別した藻体あるいは未粉碎のイシクラゲを約5 g ずつ均一に散布した。イシクラゲの上方から十分量の水道水を散水し、水を張った容器にポットの底部を浸した。翌日、素焼中心が土壌表面より5 cm の深さになるように、

ポットの中心部に pF メーター (大起理化工業社製, DIK-8342) を埋設した後, 再び上方から十分散水した。この後, 経時的に土壤水分ポテンシャルを測定した。実験開始から 12 月中旬までの日平均気温と表層 1 cm の地温は, 8~14℃だったが, これ以降は 5~7℃まで低下した。処理区間の土壤温度の差は最大 1℃程度だった。一方で, ポット表面を真上から写真撮影後, 画像をパソコンに取り込み, Adobe 社の Photoshop で以下のように処理した。土壤表面全体のデータを 2 階調化した後, イシクラゲを表す黒色のピクセル数の全ピクセル数に対する割合を算出した。散水直後の割合を 100% として, 藻体の乾燥・収縮に伴う被覆面積の減少を経時的に算出した。

3. 結果及び考察

湿潤後, 明条件で培養した藻体を暗黒下におくと光合成活性の顕著な低下が認められ, やがて消失した (図 1)。この過程で藻体が褐変し, 糸状菌などの増殖が認められ, イシクラゲ中の *Nostoc* に障害が起こることが示唆された。一度活性を失った藻体を明条件下に戻したところ, 復活した光合成活性は通常のイシクラゲが示す値よりも大きくなった (F_v/F_m として平均 0.5 程度。図 2~5 参照)。この状態では, 直径 10~15 μm の球形の細胞が乱雑に存在し, *Nostoc* 属シアノバクテリアに特徴的な数珠状の菌体やヘテロシストは認められなかった。このため, 復活した光合成活性は元々イシクラゲ中に含まれていたか, あるいは操作中に汚染した小型の緑藻などによるものと考えられた。このことから, イシクラゲを湿潤状態にした後は明条件, 少なくとも日変化に応じたパルス的な明条件に置く必要が指摘できた。

低温下では吸水速度が顕著に低下した (図 2 a)。水添加後 6~8 時間までに認められる急激な重量増加は, 細胞外多糖質の膨潤に基づくものと理解できるが, より長期にわたる増加は *Nostoc* の増殖や細胞外多糖の新規な生合成に基づくと推察された。これに対して光合成活性には全期間を通して顕著な差はなかった

(図 2 b)。従って, 今回検討した温度範囲では *Nostoc* の光合成系は十分な水分供給さえあれば最大活性を示すことができたが, 増殖に関連した他の代謝系の中に温度依存性の強いステップが存在し律速段階となり増殖が劣ったことが示唆された。

種々の pH の溶液を吸収した場合, pH 3~9 の範囲で光合成活性に影響はなかった (図 3)。pH 11 では吸水直後から光合成活性を失い, 回復しなかった。また, 事前に行った希塩酸 (pH 2) でも光合成活性は消失した。*Nostoc* 属シアノバクテリアの細胞外多糖には全糖に対して 1/6 程度のウロン酸が含まれていることが知られており¹²⁾, イシクラゲ全体として強い緩衝作用を持つと考えられた。これまで, *Nostoc* 属シアノバクテリアの増殖と pH の関係については検討されており, 中性付近で最もよく増殖することが認められてきたが^{2,13)}, 光合成活性の面からは比較的広

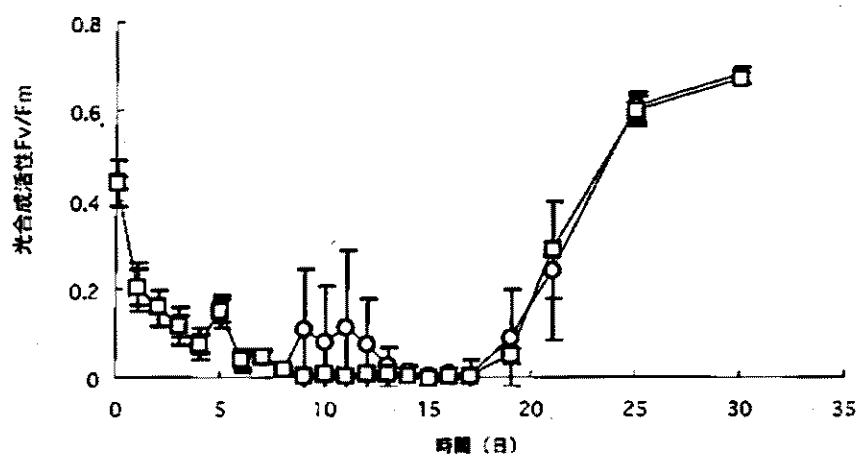


図 1 光合成活性の維持に及ぼす光照射の影響
○: 暗条件 8 日目に明条件に転換, □: 暗条件 11 日目に明条件に転換

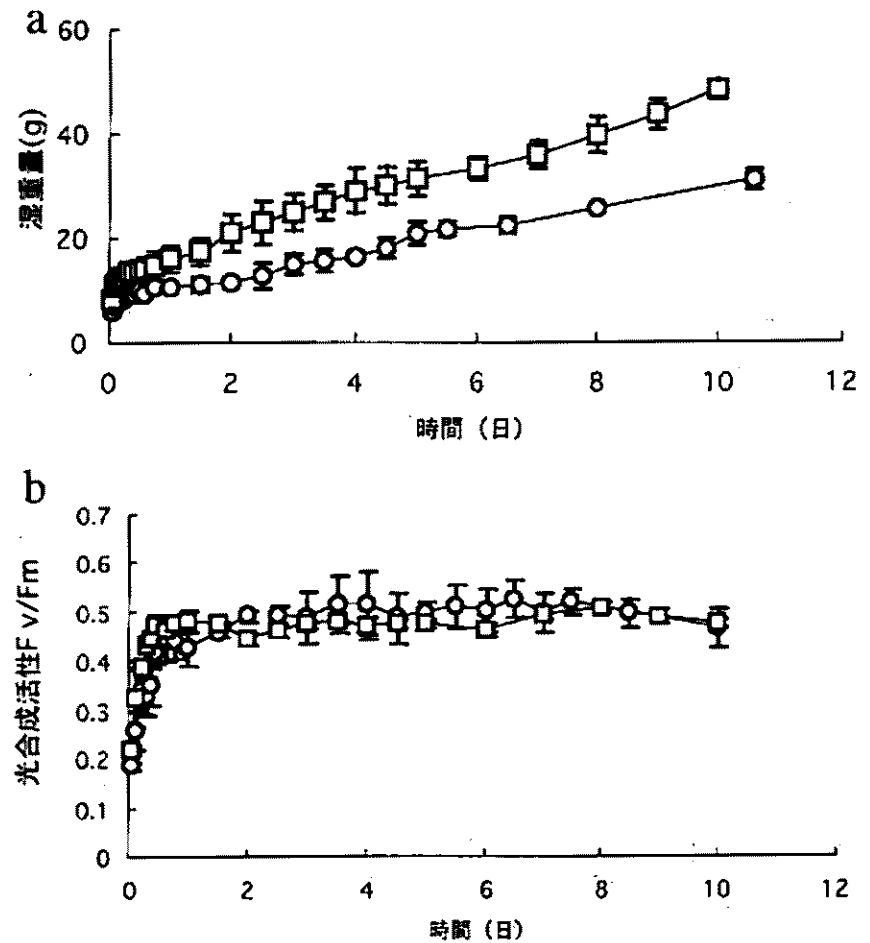


図 2 吸水時の温度がイシクラゲの湿重量と光合成活性に及ぼす影響
a: 湿重量, b: 光合成活性, ○: 10℃, □: 30℃

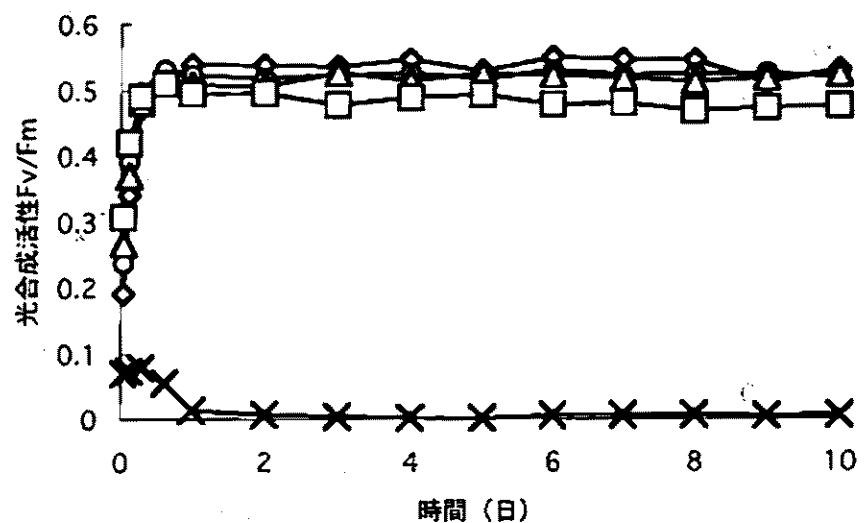


図 3 吸水 pH がイシクラゲの光合成活性に及ぼす影響
◇: pH3, ○: pH5, △: pH7, □: pH9, ×: pH11 (2 反復の平均値のみを示す)

範囲の pH 領域で安定であることが明らかとなった。なお、pH2 や 11 という極端な条件では緩衝能を越え、細胞内 pH が変化し、活性低下あるいは死滅に至るのであろう。

風乾状態で粉碎後吸水させた場合には、吸水後の光合成活性に対する阻害的影響はみとめられなかった (図 4)。湿潤状態で処理した場合には粉碎処理時間の増加による光合成活性の低下が認められた (図 5 a)。60 秒処理では、10 秒処理程度から 30 秒処理区の半分程度までと、反復間で低下の程度が異なった。この低下はクロロフィル a 含量の変化とは対応していなかった (図 5 b)。顕微鏡観察では、粉碎後には数細胞程度のごく短い *Nostoc* 菌体が観察された。即ち、菌体は粉碎処理により切断等の物理的損傷を受けており、処理時間が長くなるとその障害からの復帰が充分

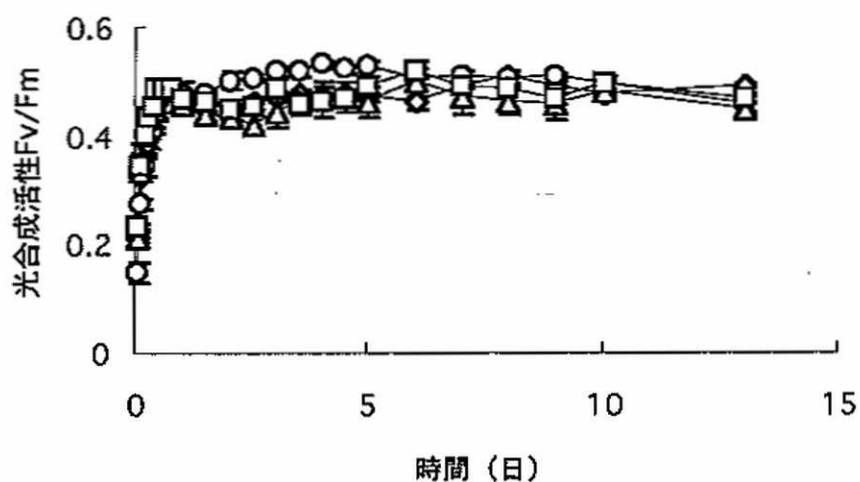


図 4 風乾状態で粉碎したイシクラゲの光合成活性の回復
◇: 未処理, ○: 1 mm 以下, △: 1~2 mm, □: 2 mm 以上

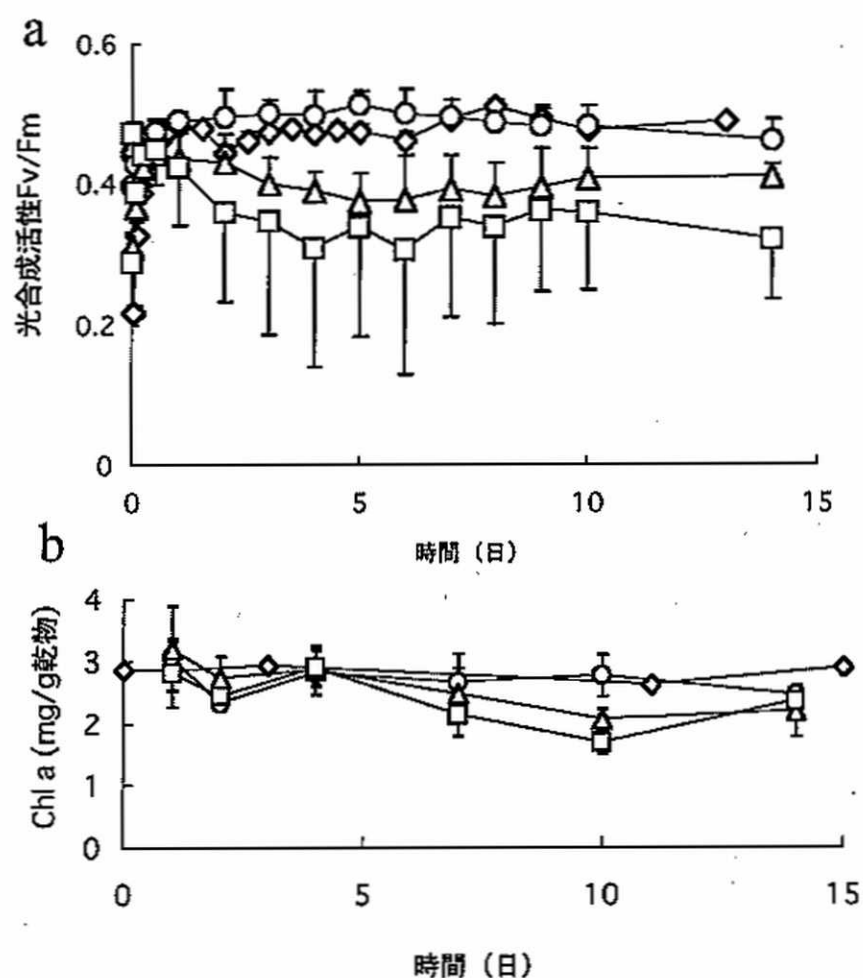


図 5 湿潤状態で粉碎したイシクラゲの光合成活性の回復
a: 光合成活性, b: クロロフィル a 含量, ◇: 未粉碎, ○: 10 秒, △: 30 秒, □: 60 秒 (a では片側の標準偏差バーのみ示した)

に行われないことが推察できた。

土壌表面に撒かれたイシクラゲは日数の経過に伴い収縮して被覆率は 70~80% に低下した。被覆率低下の割合はより大きな藻体で顕著だった (図 6 a)。イシクラゲによる被覆で、土壌の乾燥は顕著に抑制された。この時、被覆率が高いにも関わらず、1 mm 以下のイシクラゲで被覆した土壌では、他の大きさのイシクラゲで被覆した土壌に比べて、乾燥が速かった (図 6 b)。以上のことから、風乾状態での粉碎程度が異なっても湿潤化後の光合成活性には差はなかったものの、資材として荒廃土壌に投与した場合の効果を考えて、1 mm 以上の大きさが必要であると判断された。

結論として、イシクラゲを荒廃土壌の緑化資材として利用する場合には、生のを風乾して粉碎・保存した方が容易であること、過度の粉碎を避けること、また、強酸性あるいは強アルカリ性の土壌環境には適用できないこと、投入イシクラゲの速やかな増殖のために比較的高温期に目的地域に施用することが重要であることが明らかになった。

本研究では野外からイシクラゲを採集して供したため厳密には単一種の *Nostoc* 属シアノバクテリアの性状を代表する結果とは言い切れない。実際、採集したイシクラゲには湿潤状態での色調が僅かに異なる藻体も含まれていた。今後資材化を進める上では、投与地域の気候や土壌条件に適合した *Nostoc* 属シアノバクテリアを大量に純粋培養する必要があるが、本研究で得られた知見は、純粋培養藻体の処理過程にも基本的には当てはまるものと期待される。

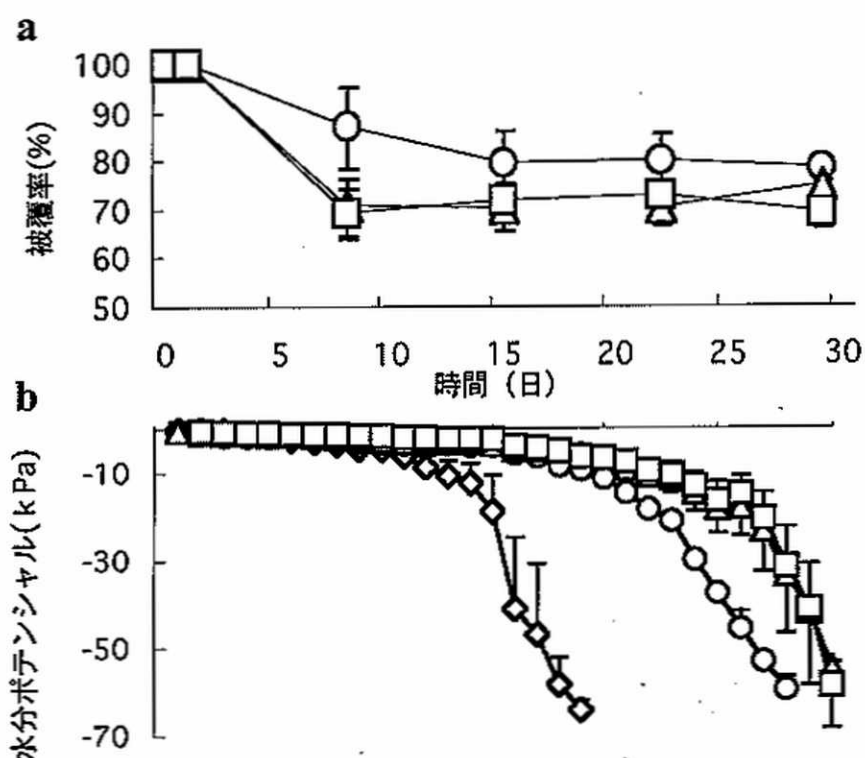


図 6 イシクラゲによる土壌表面の被覆率の変化と直下土壌の水分保持効果に及ぼす粉碎イシクラゲの大きさの影響
a: 被覆率, b: 水分ポテンシャル, ◇: 未処理, ○: 1 mm 以下, △: 1~2 mm, □: 2 mm 以上 (片側の標準偏差バーのみ示した)

謝 辞

本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構（現、（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター）の「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」による支援を得て行った。研究を遂行するに当たり、助言と機材の提供を賜った山口大学真野純一博士と技術的協力を得た内田英樹氏に謝意を表す。

要 旨

Nostoc 属シアノバクテリアは強い耐乾性を持ち、多量の細胞外多糖質を分泌し、土壤表面にゼリー状のアグリゲート（以下、イシクラゲ）を形成する。緑化資材への加工工程やその後の保存、あるいは現場での施用において考えられる各種物理的・化学的ストレスに対するイシクラゲの耐性について検討した。湿潤状態では、暗黒処理で活性が消失した。低温処理は光合成活性ではなく、増殖速度を低下させた。イシクラゲの光合成は広い範囲の pH（pH 3～pH 9）でほぼ一定だった。湿潤状態における粉碎処理はイシクラゲの活性を低下させた。風乾状態で粉碎した場合には、湿潤化後の光合成活性には影響なかった。1 mm 以下の微小な画分以外では、土壤表面にイシクラゲを散布すると土壤の乾燥が抑制された。これらの知見は、イシクラゲの加工工程を設計する上で、基本的な情報となるものである。

引用文献

- 1) 辻村茂男 (2000) 土壤藻類の働きとその利用, 新・土の微生物 (7), 日本土壤微生物学会編, p.127~158, 博友社, 東京
- 2) Katoh, H., Shiga, Y., Nakahira, Y. and Ohmori, M. (2003) Isolation and characterization of a drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc* sp. HK-01. *Microb. Environ.*, **18**, 82-88
- 3) Acea, M. J., Prieto-Fernández, A. and Diz-Cid, N. (2003) Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. *Soil Biol. Biochem.*, **35**, 513-524
- 4) Hu, C., Zhang, D., Huang, Z. and Liu, Y. (2003) The vertical microdistribution of cyanobacteria and green algae within desert crusts and the development of the algal crusts. *Plant and Soil*, **257**, 97-111
- 5) Buttars, S. M., St. Clair, L. L., Johansen, J. R., Payne, M. C., Webb, B. L., Terry, R. E., Pendleton, B. K. and Warren, S. D. (1998) Pelletized cyanobacterial soil amendments; laboratory testing for survival, escapability, and nitrogen fixation. *Arid Soil Res. Rehabil.*, **12**, 165-178
- 6) Kannaiyan, S., Aruna, S. J., Merina Prem Kumari, S. and Hall, D. O. (1997) Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. *J. Appl. Phycol.*, **9**, 167-174
- 7) Romo, S. and Perez-Martinez, C. (1997) The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudoanabaena galeata* (cyanobacteria) in the laboratory. *J. Phycol.*, **33**, 1073-1076
- 8) Roger, P. A., Tiroy, A., Santiago-Ardales, S. and Watanabe, I. (1986) Chemical composition of cultures and natural samples of N₂-fixing blue-green algae from rice fields. *Biol. Fertil. Soils*, **2**, 131-146
- 9) Roger, P. A., Santiago-Ardales, S., Reddy, P. M. and Watanabe, I. (1987) The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol. Fertil. Soils*, **5**, 98-105
- 10) 甲田誠一 (1994) 第12章 緩衝液の種類と調製法, 蛋白質・酵素の基礎実験法 改訂第2版 (堀尾武一編), p.554~559, 南江堂, 東京
- 11) Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315-322
- 12) Helm, R. F., Huang, Z., Edwards, D., Leeson, H., Peery, W. and Potts, M. (2000) Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. *J. Bacteriol.*, **182**, 974-982
- 13) Shields, L.M. and Durrell, L. W. (1964) Algae in relation to soil fertility. *Bot. Review*, **30**, 92-128