

## ホテイアオイが生産する藍藻類増殖抑制物質の季節変動に関する考察

九州大学大学院 学生会員 宮市 哲 (株)荏原製作所 非会員 楠本勝子  
九州大学大学院 正会員 久場隆広 九州大学大学院 フェロー 楠田哲也  
九州大学大学院 非会員 森本 聡

### 1. はじめに

閉鎖性水域に流入する栄養塩が高濃度化すると、富栄養化してアオコが発生し易くなる。アオコは景観障害や悪臭を引き起こし、水道水源の場合は浄水障害、異臭味やトリハロメタン生成の原因となる。また、デトリタス化したアオコの分解によって引き起こされる貧酸素水塊の発生、栄養塩の溶出といった悪循環は、生態系を劣化させ、単調にさせることが危惧される。富栄養化の対策は、水域への流入負荷の削減や系内からの窒素、リンの除去が一般的である。近年、水生植物のアレロパシー的忌避作用による藍藻類の増殖抑制効果が報告されているが、水生植物の栄養塩除去能力と併せて考えると、水生植物は富栄養化によるアオコ対策に有効であると考えられる。

ホテイアオイを栽培した水は藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の増殖を抑制し、死滅させる<sup>1)</sup>ことが報告されている。しかしながらホテイアオイが環境中に放出するアレロケミカルは非常に低濃度であるために分析が困難である。そこで本研究はホテイアオイ抽出液に含有される藍藻類の増殖抑制物質の検索を試みた。検索は抽出液をゲルろ過クロマトグラフィーにかけて分画し、得られた画分の薄層クロマトグラフィー(TLC)による成分分析及び *M. aeruginosa* の増殖抑制実験結果から行った。次に、生育状態が異なるホテイアオイ抽出液を使用して *M. aeruginosa* の増殖抑制実験及び TLC による成分分析を行い、藍藻類の増殖抑制効果を示す成分の季節変動について考察した。

### 2. 実験方法

#### 2.1. ホテイアオイ抽出液をゲルろ過した画分による *M. aeruginosa* の増殖抑制実験

(ゲルろ過クロマトグラフィーによる抽出液の分画) 夏季に採取したホテイアオイを根・葉・茎に分け、それぞれ湿潤質量で10gずつ90mLの蒸留水と共にミキサーで20秒間破碎・混合した。これに蒸留水を加えて混合液体積を100mLとし、冷暗所で24時間抽出した。混合液をGF/Cフィルターでろ過して根・葉・茎の抽出原液を作成し、これら3種の抽出原液をゲルろ過クロマトグラフィー(Sephadex-LH20)に付した。移動層は蒸留水、メタノール、水性アセトン(50%)とし、この順に流下させた。得られた9種の画分を *M. aeruginosa* の増殖抑制実験に使用した。有機溶媒が *M. aeruginosa* の増殖に影響を及ぼさないようにメタノール及び水性アセトンで流下させた画分はエヴァポレーターで有機溶媒を完全に蒸発させた。

(RUN1)ゲルろ過クロマトグラフィーによって得られた9種の画分にMA培地を添加し、TOC濃度を約50mg/Lに調製した。これらをL字管に9.5mLずつ添加し、対数増殖期まで前培養した *M. aeruginosa* を0.5mL植種した。これらを温度  $25 \pm 1$  °C、照度4500lux(明暗周期12時間)の条件下で14日間培養し、chl-a濃度を測定した。

(RUN2)RUN1で各画分が示した抑制効果の持続性を確認するために、RUN1終了時の培養液をGF/Cフィルターでろ過して再度 *M. aeruginosa* を植種し、RUN1と同様の実験を行った。

#### 2.2. ゲルろ過した画分のTLCによる成分分析

ゲルろ過クロマトグラフィーで得られた画分が含有するアレロケミカルを簡便に推定するために、各画分をTLCに付した。展開液としてタンニン等のポリフェノール類の分析に使用されるベンゼン、ギ酸エチル、ギ酸を体積比で2:7:1に混合した溶媒を用いた。各画分を展開したプレートはUV光及びp-アニスアルデヒド硫酸試薬で発色させた。UV光はプレート上に展開した全ての物質を発色させる。p-アニスアルデヒド硫酸試薬はベンゼン環に結合した活性の高いメチレン(活性メチレン)に反応し発色させる試薬であり、タンニン類に強く反応する。

#### 2.3. 生育状態の異なるホテイアオイ抽出液による *M. aeruginosa* の増殖抑制実験及びTLCによる成分分析

実験には秋季(10月下旬)になって成長しなくなった状態のホテイアオイと、その状態から温室( $25 \pm 2$  °C、自然光)で1ヶ月間生育して再び成長するようになったホテイアオイを使用した。

(*M. aeruginosa* の増殖抑制実験)ホテイアオイを蒸留水とともに湿潤質量で100g-wet/Lとなるようにミキサーで20秒間破碎・混合した。冷暗所で24時間抽出した後にGF/Cフィルターでろ過し、抽出液を作成した。300mLフラスコにMA培地を133mLを分注し、抽出液を15mL添加した。そこへ対数増殖期まで前培養した *M. aeruginosa* 培養液を2mL植種し、RUN1と同様の条件で培養して経時的にchl-a濃度を測定した。このときの三角フラスコ内のホテイアオイ抽出液濃度は10g-wet/Lである。

(TLCによる成分分析)2.1の手順で作成した葉・茎・根の抽出原液を直接TLCに付し、2.2と同じ溶媒で展開させた後にp-アニスアルデヒド硫酸試薬で発色させた。この結果から、ホテイアオイの生育状態による抽出液成分の違いを考察した。

キーワード：アレロパシー，アレロケミカル，ホテイアオイ，藍藻類，*Microcystis aeruginosa*

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎6丁目10番1号 九州大学大学院 工学研究科 都市環境工学講座

TEL : (092)642-3303

FAX : (092)642-3322

3. 実験結果

3.1. ゲルろ過した画分による *M.aeruginosa* の増殖抑制実験

表1はRUN1及びRUN2の結果である。この表から、RUN1では全ての画分に*M.aeruginosa*の増殖抑制効果が確認された。増殖抑制効果の持続性を確認するRUN2では、水性アセトン溶脱の画分だけが強い増殖抑制効果を示しており、エタノール溶脱画分及び蒸留水溶脱画分は増殖抑制効果が減少していた。特に蒸留水溶脱画分はメタノール溶脱画分と比較すると増殖抑制効果の減少が著しかった。

3.2. ゲルろ過した画分の TLC による成分分析

写真1及び写真2は、ゲルろ過によって得られた各画分(各レーンの番号は表1のサンプル番号に対応)をTLCに付して、UV光及びp-アニスアルデヒド硫酸試薬で発色させたものである。UV光を照射したプレートには様々なスポットが確認されるのに対して、p-アニスアルデヒド硫酸試薬で発色させると全ての画分で原点のスポットのみが発色した。

3.3. 生育状態の異なるホテイアオイ抽出液による *M.aeruginosa* の増殖抑制実験及び TLC による成分分析

図1(a)及び(b)は、秋季のホテイアオイと、その状態から温室で1ヶ月間生育したホテイアオイの抽出液による*M.aeruginosa*の増殖抑制実験結果である。これらの図から、秋季のホテイアオイの抽出液を添加した系では*M.aeruginosa*は死滅しなかったが、温室で生育して成長するようになったホテイアオイの抽出液を添加した系では*M.aeruginosa*は死滅した。

写真3及び写真4は、それぞれのホテイアオイの葉・茎・根の抽出原液をTLCに付してp-アニスアルデヒド硫酸試薬で発色させたものである。これらの図から、秋季のホテイアオイ抽出液はRf値が0.1~0.2付近でスポットが発色しているのに対して、ホテイアオイが成長する状態では原点付近にのみ強い発色が確認された。

4. 考察

*M.aeruginosa*の増殖を抑制した画分や抽出液は、全てに共通してTLCの原点付近のスポットがp-アニスアルデヒド硫酸試薬によって発色した。このことから、この原点付近で発色した物質が*M.aeruginosa*の増殖抑制に関与していると考えられる。活性メチレンを持つ物質としてはタンニン類が挙げられるが、発色した全てのスポットの位置が原点付近であったことから、増殖抑制効果を有する物質は重合度の高い縮合型タンニンであると推察された。

また、生育状態の異なるホテイアオイを使用した実験から、*M.aeruginosa*の増殖を抑制する物質はホテイアオイが成長する時期に生産されている結果が得られた。よって、ホテイアオイは春から夏にかけて成長する時期にアレロケミカルを生産していることが推察された。

今後は抽出液のより詳細な分析を行うとともに、ホテイアオイを栽培した水を分析することによって環境中に放出する物質を検索する予定である。

5. 参考文献

1) 楠本勝子, 久場隆広, 楠田哲也, ホテイアオイ及びシロコガヤツリの持つ *Microcystis aeruginosa* に対するアレロパシー的増殖抑制効果の検証, 第57回年次学術講演会講演概要集, -207, 2002.

表1. *M.aeruginosa* の増殖抑制実験の結果  
(Chl-aの初期値 RUN 1 0.02mg/L, RUN 2 0.04mg/L)

Sample			RUN1	RUN 2
			Chl-a (mg/L)	Chl-a (mg/L)
1	根	蒸留水	0.00	1.08
2		メタノール	0.00	0.56
3		水性アセトン	0.00	0.08
4	葉	蒸留水	0.01	1.14
5		メタノール	0.00	1.09
6		水性アセトン	0.00	0.03
7	茎	蒸留水	0.02	1.38
8		メタノール	0.00	0.16
9		水性アセトン	0.00	0.01
Control			1.67	1.41

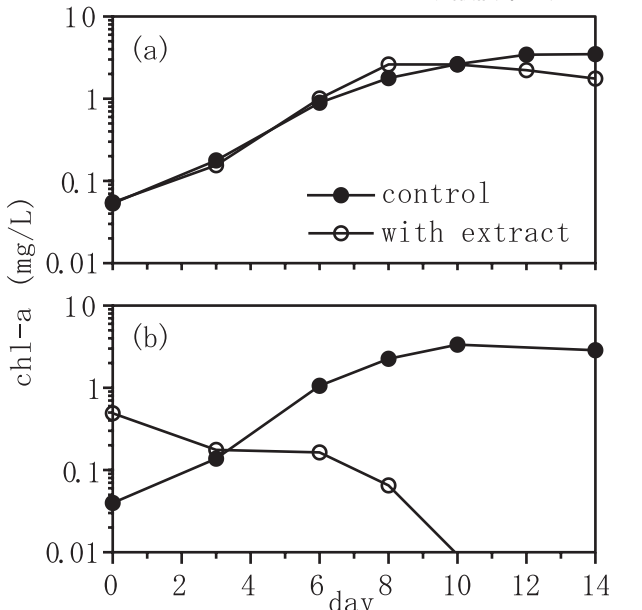
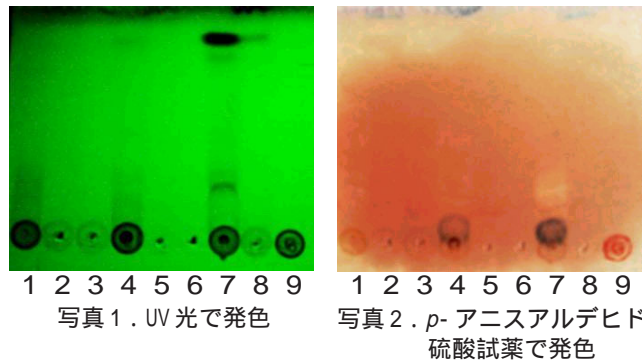


図1. ホテイアオイ抽出液による *M.aeruginosa* の増殖抑制実験  
(a): 秋季のホテイアオイ (b): 温室で生育させたホテイアオイ

