

落葉広葉樹枯葉部を用いたアオコの増殖抑制に関する試験的考察

日本大学大学院 学生会員 ○喜多村 延政

日本大学大学院 非会員 長川 時生

日本大学理工学部土木工学科 正会員 松島 眸

日本大学理工学部土木工学科 正会員 吉田 征史

1.はじめに

アオコの発生抑制に関する近年の研究結果によれば、植物由来のポリフェノール類（タンニン類等）が藍藻類の増殖を抑制する可能性のあることを示唆する報告がある（中井ら 1998, 笹尾ら 2001）。筆者らは、植物由来のタンニン類が多く含有されていると考えられる広葉樹の落葉部に着目し、その枯葉部を用いたアオコの増殖抑制の可能性について検討する試験を行った^{1,2)}。その結果、枯葉の抽出液の添加によって *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制傾向が観察された。この方法では天然に存在する樹木の枯葉部を用いることから環境中に残存しても新たな汚染源になり得ないと考ええる。

2. 試験方法

落葉広葉樹の枯葉部によるアオコの増殖抑制効果を試験するために筆者らは試料としてカキ・サクラ・トウカエデ・カエデの一種（未同定）の4種類の落葉広葉樹の風乾状態の枯葉を用意した。試料はいずれも東京都内の住宅地近傍で採取したものである。試料をミキサーで破碎し、脱イオン水に浸漬させ、水溶性成分を抽出した。浸漬時間は7日間とした。このものをメン

表-1 M-11 培地の組成

NaNO ₃	100.0mg
K ₂ HPO ₄	10.0mg
MgSO ₄ ・7H ₂ O	75.0mg
CaCl ₂ ・2H ₂ O	40.0mg
Na ₂ CO ₃	20.0mg
C ₆ H ₅ FeO ₂	6.0mg
EDTA・2H ₂ O	1.0mg
Deionized Water	1000ml

ンブランフィルター（0.22 μm、ミリポア社）でろ過したものを抽出液とした。抽出液中の総ポリフェノール量の定量にはFolin-Denis法を、タンニンの定量には硫酸-バニリン法を用いた。タンニンの定性は塩化第二鉄水溶液との呈色反応によって判断した。アオコとしての試験株には国立環境研究所より委譲された *Microcystis aeruginosa* (NIES102 以下 *M. aeruginosa*) を供し、M-11 培地を用い対数増殖期まで前培養した。

一連の試験は500 mlのフラスコを試験容器として用い回分式で行い、試験容器にはM-11 培地溶液150mlに *M. aeruginosa* 培養液をかすかに色付く程度懸濁させ、しかる後抽出液を適量添加し綿栓した。フラスコ内の混合液はマグネチックスターラーで適度に連続攪拌し、明16時間/暗8時間の日周期で平均照度3000 luxの白色蛍光灯を上部より照射した。試験容器内の細胞数の経時変化についてはカウンティングチャンバー（Thoma式）を用いた直接検鏡によって測定し、増殖抑制効果の評価は抽出液を添加しないCONTROLの結果と比較することで行った。

3. 結果および考察

4種類の落葉広葉樹の枯葉より作成した抽出液中の総ポリフェノール濃度の分析結果を表-2に示す。カキの場合は0.17 (mg/ml)、サクラの場合は0.22 (mg/ml) トウカエデには0.41 (mg/ml)、カエデの一種では0.19 (mg/ml) となり、トウカエデは多くのポリフェノールを含むことが推察された。また、抽出液に塩化第二鉄水溶液を添加したところ全ての抽出液においてタンニン特有の呈色が見られた³⁾。抽出液添加量は50mlとした。抽出液を添加

表-2 抽出液中のポリフェノール濃度

落葉樹の種類	総ポリフェノール濃度 (mg/ml)
カキ	0.17
サクラ	0.22
トウカエデ	0.41
カエデの一種	0.19

キーワード：アオコ、増殖抑制、タンニン

連絡先〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台1-8-14 TEL 03-3259-0673

した場合の *M.aeruginosa* 増殖曲線を図-1 に示す。この結果によれば抽出液を添加した全ての系において *M.aeruginosa* の増殖が抑制される傾向にあった。増殖抑制効果が約 7 日間継続するものと考えられ、試験開始 7 日を経過すると *M.aeruginosa* は増殖を開始した。これはポリフェノールの分解や酸化などによってその効果が維持されなかったためと推察できる。

この試験から落葉広葉樹の枯葉部による *M.aeruginosa* の増殖抑制効果は確認できたが、増殖抑制因子がタンニンであるかは判別ができなかった。そこで枯葉に分類されるものではないが市販のタマネギの鱗茎の外皮を用いて枯葉部と同様に抽出液を作成した。塩化第二鉄水溶液による呈色反応を確認したところ呈色は見られなかったため、タンニンが含まれないと考えられた。そこでこのものを増殖抑制試験に供し、タンニンを含まないとみなされる抽出液による増殖抑制効果について検討した。比較のため落葉樹にはサクラを用いた。硫酸-バニリン法によって求めたサクラの枯葉部より作成した抽出液中のタンニン濃度は 0.13 (mg/ml) であった。Folin-Denis 法によって求めた総ポリフェノール量に関して両者に大きな差は見られなかった。図-2 にサクラとタマネギから作成した抽出液を供した増殖抑制試験の結果を示す。この試験の結果より、抽出液中にタンニンを含まないタマネギ系では何も添加していない CONTROL と同様の増殖傾向を示した。一方抽出液中にタンニンを含むサクラ系では若干の増殖は示したものの、その後は減少傾向を示した。これらのことから、*M.aeruginosa* の増殖抑制にはタンニンが関与している可能性は高いことが示唆された。

4.まとめ

本試験の結果から落葉広葉樹の枯葉部には *M.aeruginosa* の増殖を抑制する成分が含まれていることが確認された。タンニン含有抽出液とタンニン非含有抽出液の 2 種類の抽出液を試験に供した結果、タンニン含有抽出液を添加した系では増殖が抑制されたことから、増殖抑制因子には落葉広葉樹枯葉部に含まれるポリフェノール成分のひとつであるタンニンである可能性が高い結果を得た。

<参考文献>

- 1) 喜多村、松島：落葉広葉樹葉部を用いた有毒藍藻類の増殖抑制に関する研究 日本水処理生物学会誌別巻 第 25 号 2005
- 2) 長川、喜多村：落葉広葉樹の枯葉部を用いた *Microcystis* の増殖抑制-カエデ科植物による増殖抑制傾向- 第 40 回日本水環境学会年會講演集 p 128 2006
- 3) 川崎敏男・西岡五夫・編：天然薬物化学 廣川書店 p 124 1986

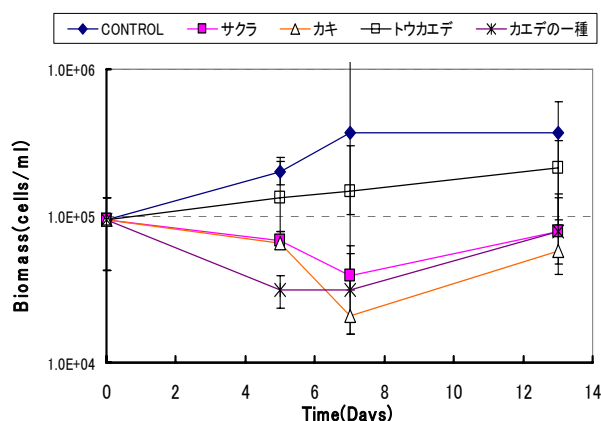


図-1 抽出液添加による増殖曲線

表-3 サクラおよびタマネギ抽出液中のタンニン濃度

	サクラ	タマネギ
総ポリフェノール	0.54	0.41
タンニン※	0.13	-
単位	mg/ml	

※タンニン量はカテキン換算量として算出した

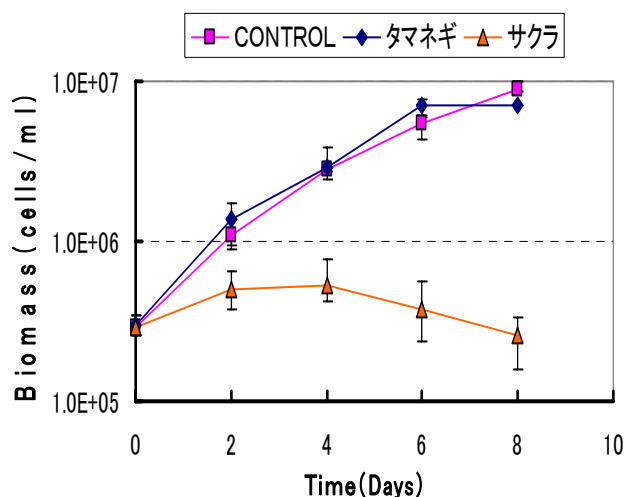


図-2 サクラ抽出液添加系とタマネギ抽出液添加系における *M.aeruginosa* の増殖曲線