

都市街路樹の枯葉を用いたアオコの発生抑制に関する検討

日本大学大学院	学生会員	○喜多村	延政
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
日本大学理工学部一般教育	非会員	浅田	泰男

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が藍藻類の増殖を抑制する可能性があることを示唆する報告^{1,2)}があり、筆者らはこれまでに広葉樹の落葉部に着目し、アオコの発生抑制の可能性について検討した結果、*Microcystis aeruginosa* (以下*M.aeruginosa*と示す)の増殖抑制傾向が観察され、増殖抑制因子にはポリフェノールの中でも縮合型タンニン類が関与している可能性を示した^{3,4)}。そこで本報では、試験1として単位細胞当たりの縮合型タンニン類負荷量により*M.aeruginosa*の比増殖速度係数にどのような影響を与えるかを調べ、増殖抑制効果を検討した。また試験2として、このような知見を実湖沼におけるアオコの発生抑制に応用する際、水系への浸漬により枯葉に含まれる全縮合型タンニン類の内、どの程度が溶出するのかについて検討するため、煮沸による強制抽出とD.I.水抽出の結果を比較した。

2. 試験方法**試験1：比増殖速度係数の算定**

試験試料は、日本国内において街路樹としての植生需要が高い、サクラ及びトウカエデの枯葉を東京都内の住宅地近傍で採取し用いた。風乾状態の試料をミキサーで破碎(7000rpm、30sec)し、D.I.水 100mlに破碎試料 1.0gの割合で混合させたものを7日間静置し、縮合型タンニン類を溶出させた。この溶液をメンブランフィルター(0.22 μ m、ミリポア社)でろ過したものを抽出液とし、抽出液中の縮合型タンニン類はバニリン-硫酸法⁵⁾によって定量した。試験株には国立環境研究所より委譲された*M. aeruginosa* NIES102株を、M-11培地を用いて対数増殖期まで前培養したものを用いた。一連の試験は500 mlの三角フラスコを試験容器として回分式で行い、M-11培地溶液 150mlに*M.aeruginosa*培養液を初期細胞濃度が 3.0×10^5 (cells/ml)程度となるように懸濁させ、各系の縮合型タンニン類の負荷が異なるように、抽出液の液量を段階的に変化させて添加した後、シリコセンにて栓をした。試験中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、白色蛍光灯を用いて平均照度 3000 lux、明 16 時間/暗 8 時間の日照周期で上部より照射、試験容器内の細胞数の経時変化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り測定した。また、対照系として抽出液を添加しないControl系を作成し、増殖抑制効果を評価した。予備試験の結果から、Controlは試験開始後2~4日までが対数増殖期であると考えられたため、比増殖速度係数 μ は試験開始4日間の範囲で算出した。具体的には、初期細胞濃度を N_0 、時間 t における細胞濃度を N として、これらの比の対数($\ln(N/N_0)$)を求め、縦軸を $\ln(N/N_0)$ 、横軸を時間 t としてプロットし、その勾配を比増殖速度係数 μ (d^{-1})とした。

試験2：水系への浸漬による縮合型タンニン類の抽出率の検討

本試験における試料は試験1で用いたサクラの枯葉を使用し、試験1同様にミキサーで破碎したものを含水エタノール(以下Et-OHと示す)を用いて煮沸による強制的な抽出⁵⁾とD.I.水による抽出を行い、抽出された縮合型タンニン類量を比較した。Et-OH濃度は、予備試験の結果から、最も縮合型タンニン類の抽出量が多かった50%Et-OHを採用し、1~2時間煮沸還流後、上澄みを回収、再度50%Et-OHを添加する作業を数回繰り返した。回収液の合液の縮合型タンニン類濃度を測定し、枯葉重量で除することで枯葉に含有される全縮合型タンニン量を算出した。

キーワード：アオコ、縮合型タンニン類、増殖抑制、比増殖速度係数

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

3. 結果および考察

試験 1：前述した方法に従って算出した比増殖速度係数の一例を図-1 に示し、算出した比増殖速度係数 μ (d^{-1}) と縮合型タンニン類負荷量との関係を図-2 に示す。この結果によればサクラ及びトウカエデのいずれの試料とも、縮合型タンニン類負荷量の増加に伴い μ は低下する傾向にあり、負荷量が 15×10^{-9} (mg/cell) 付近までは直線的に減少した。しかし、同程度の負荷量であっても、増殖抑制効果はトウカエデの方が強く発揮される傾向が観察された。この理由として枯葉に含まれる縮合型タンニン類の組成の差異などが考えられ、高速液体クロマトグラフィーによる詳細な分析を今後検討している。

試験 2：D.I.水抽出及び50%Et-OH抽出における縮合型タンニン類の抽出量を表-1 に示す。50%Et-OH抽出系では煮沸還流3回目の上澄み液において塩化鉄(III)水溶液の滴下による縮合型タンニン類特有の呈色反応⁶⁾が見られなかったため、試料中の縮合型タンニン類をほぼ全量抽出できたと仮定した。表-1によれば、D.I.水抽出系では枯葉単位重量当り12.7~20.0 (mg/g)、平均では14.7 (mg/g)であった。一方、50%Et-OH抽出系では枯葉単位重量当り18.6~24.9 (mg/g)、平均21.1 (mg/g)であった。そこで、式-1で定義する抽出率を算出するとD.I.水抽出による縮合型タンニン類の抽出率は、60.2~94.8%であり、平均は約70%であった(図-3)。この結果から、有毒藍藻類の増殖抑制に効果があると考えられる縮合型タンニン類は、枯葉が水系に混入するだけでも比較的高い抽出率が得られ、本検討の結果を実湖沼へ応用することの有効性が示された。

4. まとめ

本検討で得られた知見をまとめると以下のようなものである。

試験 1：サクラ及びトウカエデを用いた抽出液はいずれも単位細胞当りの縮合型タンニン類負荷量の増加に伴い μ が低下する傾向にあり、負荷量が 15×10^{-9} (mg/cell) 程度までは直線的に減少した。しかし、その減少傾向はサクラと比較してトウカエデの方が顕著であったため、トウカエデはサクラよりも *M.aeruginosa* に対して強い増殖抑制効果を有すると考えられた。

試験 2：試験に用いた枯葉単位重量当りに概ね21 (mg/g) の縮合型タンニン類が含まれていることが確認され、D.I.水抽出系では、バラつきはあるものの単位重量当り約15 (mg/g) の縮合型タンニン類が抽出された。また、50%Et-OH抽出系との比較から、D.I.水抽出においても枯葉中の約70%の縮合型タンニン類が抽出されることが示唆され、本研究結果を実湖沼へ応用することの有効性が示された。しかしながら、実際の湖沼では例えば溶存鉄など重金属の影響により、見かけ上抽出率が低下する可能性も考えられることから、今後、更なる検討が必要である。

<参考文献> 1) 中井ら(1998)水環境学会誌、第21巻、pp.663-669 2) 笹尾ら(2001)陸水学雑誌、Vol.62、pp.115-122 3) 喜多村ら(2006)環境工学研究論文集 vol43 pp543-549 4) 長川ら(2006)第40回日本水環境学会年会講演集 p 128 5) 真部孝明(2003)食品分析の実際 pp79-82 6) 川崎ら(1986)天然薬物化学 p124

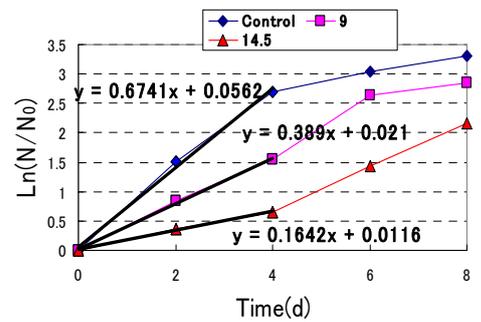
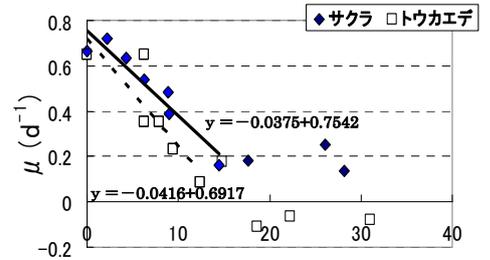


図-1 比増殖速度係数の算出例



縮合型タンニン負荷量

($\times 10^{-9}$ mg/cell)

図-2 縮合型タンニン類負荷量と比増殖速度

表-1 各方法による縮合型タンニン類の抽出量

試料No	抽出量 (mg/g)	
	D.I.水抽出系	50%Et-OH抽出系
1	13.0	19.0
2	13.2	21.2
3	20.0	21.9
4	14.4	18.6
5	12.7	24.9
6	—	21.2
平均	14.7	21.1

式-1 抽出率の算出式

$$\text{抽出率} = \frac{\text{D.I.水抽出量}}{\text{50\%Et-OH抽出量}} \times 100(\%)$$

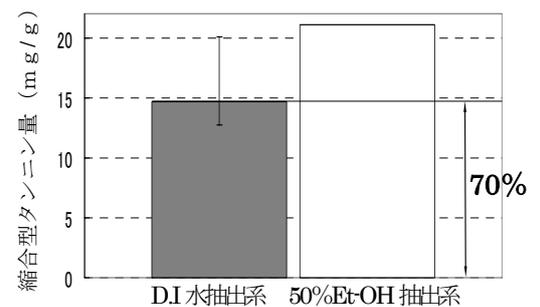


図-3 縮合型タンニン類の抽出率