

## 都市街路樹の枯葉由来成分による有毒藍藻類の増殖抑制効果の持続性の検討

日本大学大学院理工学研究科 学生会員 ○島田浩司  
 日本大学理工学部 正会員 喜多村延政 吉田征史 松島眸  
 日本大学理工学部 非会員 浅田泰男

## 1. 研究背景および目的

湖沼や貯水池などが富栄養化し発生するアオコにより、肝臓毒マイクロキスティンの水域への溶出が懸念されている。しかし、近年ホザキノフサモ<sup>1)</sup>や茶<sup>2)</sup>などの植物を用いたアオコの増殖抑制手法が注目されており、これらの手法は植物由来成分を用いるため新たな環境負荷になり難いと考えられている。そこで、我々は都市街路樹の枯葉を水に浸漬させて成分を溶出させた溶液（以下、抽出液）を用いたマイクロキスティスの増殖抑制手法を検討した。この結果、抽出液に含有されている縮合型タンニンを経験とし、単位細胞当たりの縮合型タンニン負荷量の増大に伴いマイクロキスティスの増殖が抑制され<sup>3)</sup>、そのメカニズムは光合成阻害である可能性が示された<sup>4)</sup>。しかしながら、現在までに行った抽出液によるマイクロキスティスの増殖抑制効果は回分試験で得られた結果であり、マイクロキスティスは数日間抽出液成分に曝されている。一方で、実湖沼では移流・拡散等が生じるため数日間マイクロキスティスが抽出液成分に曝されているとは考え難い。そこで本報では、試験開始前に抽出液成分をマイクロキスティスに曝露させ、一定時間後にその成分を排除してもマイクロキスティスの増殖が抑制されるか検討を行った。また、試験開始前に曝露させるタンニン負荷量や曝露時間に着目して、どの程度の負荷量や曝露時間でマイクロキスティスの増殖を抑制することが可能か検討を行った。

## 2. 試験方法

## (1) 前培養および抽出液の作成

本試験で使用したマイクロキスティスは国立環境研究所より分譲された NIES102 株を M-11 培地で 7 日間前培養したものを使用した。また、抽出液は破碎したサクラの枯葉 1.0g を蒸留水 100ml に浸漬させ、 $0.45\ \mu\text{m}$  のメンブランフィルターにて無菌ろ過して作成した。なお、抽出液中の縮合型タンニンの定量は食品分析法に準じたバニリン-硫酸法によりカテキン換算にて定量した。

## (2) 抽出液成分を短時間マイクロキスティスに曝露させる試験

前培養後のマイクロキスティス培養液と抽出液を M-11 培地にタンニン負荷量が  $15\text{pg/cell}$  および  $30\text{pg/cell}$  となるように混合し、一定時間（5 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間）インキュベーター内でマイクロキスティスに抽出液成分を曝露させた。その後、マイクロキスティスと抽出液の混合液から抽出液成分を排除するために洗浄を行った。図 1 に試験手順を示す。

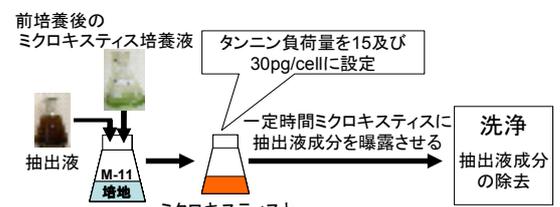


図. 1 試験手順

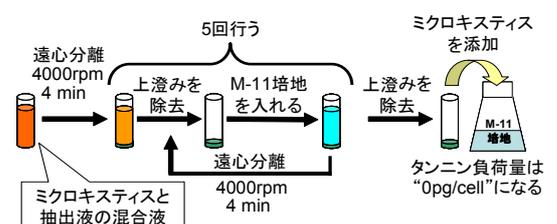


図. 2 洗浄操作

## (3) 洗浄方法（抽出液成分の除去）

洗浄はマイクロキスティスと抽出液の混合液を遠心分離（4000rpm、4min）し、マイクロキスティス層と上澄み液を分離した後、上澄みを取り除き、再度 M-11 培地を添加して遠心分離を行うという操作を 5 回行った。この操作でマイクロキスティスと抽出液の混合液から抽出液成分を排除した。図 2 に洗浄操作手順を示す。

## 3. 試験結果および考察

抽出液成分を除去する目的で遠心分離を用いて洗浄を行ったが、マイクロキスティスの増殖が洗浄により悪影響

キーワード：マイクロキスティス、都市街路樹、枯葉、増殖抑制、曝露時間

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

を受ける可能性が考えられたため、抽出液を添加せずに洗浄を行った Control 系 (Control 洗浄あり) と、抽出液を添加せずに洗浄も行わない Control 系 (Control 洗浄なし) の両者の増殖傾向を比較した。すると両者は概ね同等な増殖傾向を示した (データ省略)。したがって、遠心分離による洗浄がマイクロキスティスの増殖に与える悪影響は少ないものと考えられた。図 3 に、抽出液成分を 6 時間および 12 時間曝露させた試験の結果を示す。全ての試験系で細胞が死滅したため、マイクロキスティスの増殖抑制効果は抽出液成分を曝露させた履歴があれば、試験期間中に抽出液成分が存在しなくても発現することが確認された。また、曝露させたタンニン負荷量が 15pg/cell よりも 30pg/cell の場合の方がより多く細胞が死滅した。したがって、増殖抑制効果の発現は曝露させたタンニン負荷量の履歴がその後の増殖に継続して反映する結果が得られた。しかしながら、全ての系でマイクロキスティスの死滅が確認されたため、6 時間以上の曝露では増殖抑制効果の差異は確認出来なかった。そこで、更に短時間の曝露による試験を行った。図 4 に、抽出液成分を 5 時間および 1 時間曝露させた試験の結果を示す。曝露 1 時間の系では Control 系よりもマイクロキスティスの増殖が抑制されたが、5 時間の曝露ではマイクロキスティスの増殖抑制効果は得られなかった。したがって、極度に短い曝露時間では増殖抑制効果は得られない可能性が示唆された。そこで、図 5 に、抽出液成分を 1 時間および 3 時間曝露させた試験の結果を示す。曝露 3 時間の系では 15 日目までマイクロキスティスは死滅する傾向を示したが、その後は細胞数が増加した。また、曝露 1 時間の系では 2 日目までマイクロキスティスの増殖抑制効果が得られたが、その後は Control 系とほぼ同等に増殖した。以上のことから、今回行った負荷量の範囲では、事前に 3 時間以上抽出液成分を曝露させればマイクロキスティスの増殖を有効に抑制できることが明らかとなった。このことから、本手法は移流・拡散の生じる実湖沼であっても適用出来る可能性が示唆され、また、抽出液を連続追注することでマイクロキスティスの増殖を抑制し続けることが可能であると推測される。

4.まとめ

試験開始前に抽出液成分を曝露させた履歴があれば実際の増殖試験中に抽出液成分が無くてもマイクロキスティスの増殖抑制効果は発現し、タンニン負荷量や曝露時間の長さに伴って抑制効果が高まることが明らかとなり、今回行った負荷量の範囲では 3 時間以上の曝露があれば有効な抑制効果が得られた。今後も様々なタンニン負荷量や曝露時間で試験を重ね、同時に基質の消費量も確認することで増殖抑制や再増殖を総合的に評価し、本手法の実湖沼への適用可能性を検討する必要がある。参考文献 1) 中井ら：ホザキノフサモが放出したアレロパシー物質による藍藻類 (*Microcystis aeruginosa*)

の増殖抑制、日本水処理生物学会誌、第 34 巻、PP.159-170、1998. 2) 笹尾ら：茶抽出液によるアオコ増殖抑制への効果、陸水学雑誌、Vol.62、pp.115-122、2001. 3) 喜多村ら。(2006) . 落葉広葉樹枯葉部抽出液を用いた有毒藍藻類の増殖抑制に関する基礎的研究、環境工学研究論文集、43、543-549. 4) 島田ら (2008) 第 35 会土木学会関東支部技術研究発表会概要集 (CD-ROM)

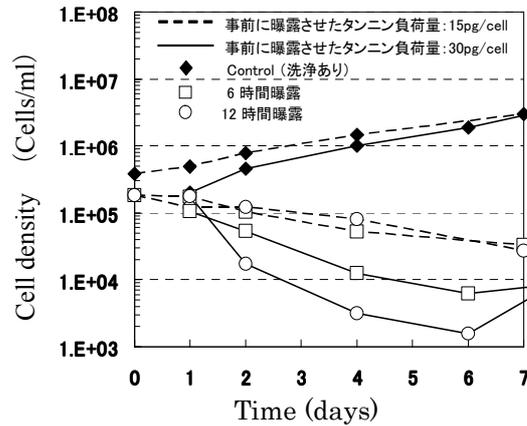


図 3. 曝露時間が 6 時間以上の細胞数の変動

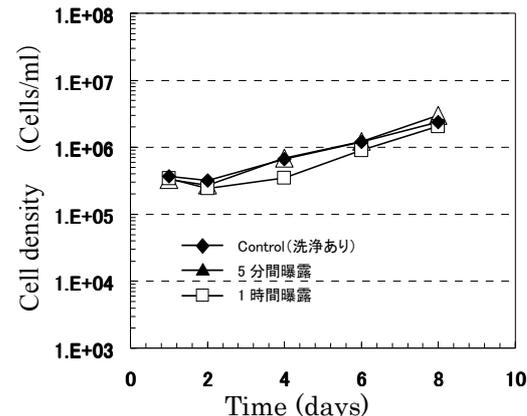


図 4. 曝露時間 1 時間以下の細胞数の変動 (曝露させたタンニン負荷量: 30pg/cell)

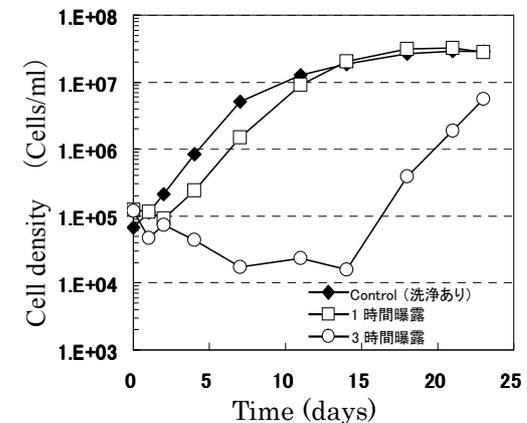


図 5. 曝露時間 3 時間以下の細胞数の変動 (曝露させたタンニン負荷量: 15pg/cell)