

有毒藍藻類に与える落葉広葉樹枯葉部由来成分による増殖抑制効果

日本大学院理工学研究科土木工学専攻 学生会員 ○大里順一

日本大学院理工学研究科土木工学専攻 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 吉田 征史

日本大学理工学部土木工学科 正会員 松島 眸

1. まえがき

近年、内陸湖沼において富栄養化に因るアオコの発生が、未解決な環境問題のひとつとなっている。アオコを形成する代表種である藍藻類 (*Microcystis* 属) は肝臓毒 Microcystin を産生するため、海外では家畜および人の死亡例が報告されている。我が国においてもこの *Microcystis* 属が優占種となる水域が多く見られ、その危険性が指摘されている。従ってこれら有毒藍藻類の大量増殖を防止または抑制することが求められており、従来、1) 直接吸引除去する手法、2) 大規模曝気などの機械的手法、3) 薬剤 (殺藻剤) 散布による手法などが行われている。しかしこれらいずれの手法にも経済性もしくは生態系への二次的な影響の懸念が残されてきた。そこで本研究では、安全かつ経済的な *Microcystis* 属の増殖抑制技術の確立を目指し、自然由来の成分として落葉広葉樹枯葉部からの抽出成分を用いた抑制効果について検証した。我々はこれまでにサクラの枯葉を用いた試験を行い、枯葉中のタンニン成分が有毒藍藻類の増殖抑制に寄与する可能性を示した¹⁾。今回は、落葉広葉樹の一種で、街路樹にも多く利用され、比較的入手が容易かつ多量に得られるトウカエデの枯葉を用いた試験の結果を報告する。

2. 実験方法

実験には、トウカエデの枯葉部を、ミキサーを用いて破碎 (7000rpm, 30 秒) し、その破碎した 5g を脱イオン水 500ml 中に 7 日間浸漬させて成分を抽出し、その濾液を用いた (これを抽出液と称す)。増殖抑制効果の検討は、表-1 に示す M-11 培地溶液 150ml を試験容器に分取し、これに表-2 に示す条件により M-11 培地で 7 日間前培養した *Microcystis* 培養液を適量植種懸濁させたものに、抽出液を適宜添加することで検討した。試験系はマグネチックスターラーで緩やかに攪拌して通風状態を保つことに留意しながら、表-2 に示す条件で行った。抽出液中のタンニン成分の分析は食品分析法²⁾に従い、硫酸-バニリン法で定量した。

表-1 M-11 培地組成

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	8.0mg
EDTA·2H ₂ O	1.0mg
脱イオン水	1000ml
	pH:8.0

表-2 前培養・試験条件

光源	白色蛍光灯
平均照度	3000lux
明条件	16時間
暗条件	8時間

試験系における *Microcystis* 細胞数の計測は、カウンティングチャンバー (Thoma 式) を用いた直接検鏡で行い、抽出液添加系を評価するため、対象系として抽出液を添加しない control 系を作成して比較した。なお、試験株には *Microcystis aeruginosa* NIES102 株 (以下 *M. aeruginosa* と表記) を用いた。

3. 実験結果

単位細胞当たりのタンニン負荷量を変化させた複数の試験系および control 系における、細胞密度の経時変化を図-1 に示す。この図より、control 系と比較してトウカエデの枯葉部抽出液を添加した系 (6.3×10^{-9} mg/cell, 9.4×10^{-9} mg/cell, 11.0×10^{-9} mg/cell) においては、48 時間経過まで *Microcystis* の増殖を抑制していることが分かる。

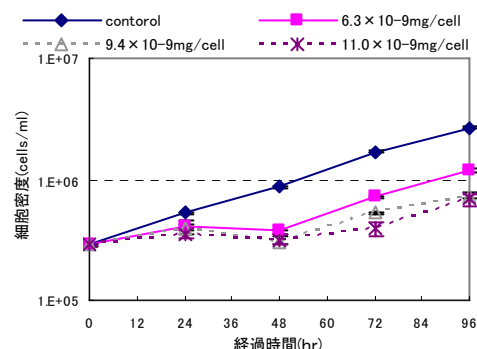


図-1 単位細胞当たりのタンニン負荷量別細胞密度の経時変化

キーワード アオコ, 藍藻, *Microcystis*, 落葉広葉樹, 肝臓毒

連絡先 101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14 日本大学大学院理工学研究科 TEL 03-3259-0673

その後、抽出液添加系においても増殖傾向に転じたが、単位細胞当りのタンニン負荷量の大小に従って抑制効果に差異が生じることが観察された。

図-2には単位細胞当りのタンニン負荷量別の細胞増加率 (d^{-1}) を示した。ここで「細胞増加率 (d^{-1}) = (n+1)回目計測細胞密度/n回目計測細胞密度」と定義する。control系の細胞増加率 $1.8 (d^{-1})$ と比較して抽出液添加系においては、48 時間まではどれも一様に低い値 ($1.2 \sim 1.4$) を示した。72 時間を経過すると、 $6.3 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の抽出液添加系はcontrol系と同様な細胞増加率 $1.9 (d^{-1})$ になったことから、*M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果が失活したものと考えられる。9.4 $\times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の抽出液添加系の細胞増加率もcontrol系に近い値 $1.7 (d^{-1})$ を示したことから 72 時間経過後には増殖抑制効果が失活された可能性が考えられる。11.0 $\times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の抽出液添加系においては、72 時間経過後においても細胞増加率 $1.2 (d^{-1})$ であり、control系の細胞増加率 $1.9 (d^{-1})$ と比較して、増殖抑制効果が依然として持続していた。しかし 96 時間経過後では細胞増加率は $1.8 (d^{-1})$ を示し、*M. aeruginosa* に対する増殖抑制効果が失活していたと考えられる。

図-3には単位細胞当りのタンニン負荷量の相違による細胞増殖抑制率の経時変化を示した。ここで「増殖抑制率 = (controlの細胞密度 - タンニン負荷系細胞密度) / controlの細胞密度 $\times 100$ 」と定義する。 $6.3 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の抽出液添加系では48 時間経過後に最大 57% の増殖抑制率を示して以降ほぼ変化しなくなったことから、この負荷量における抑制効果の持続性は48 時間までであることが確認された。一方、9.4 $\times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の系においては最大 73% の増殖抑制率を、11.0 $\times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の系においては、最大 77% の増殖抑制率を示し、これらは $6.3 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の系よりも長時間に渡って増殖抑制効果が持続した。

このため、様々なタンニン負荷量において行った増殖抑制試験の結果を、タンニン負荷量と増殖抑制期間に着目して整理すると、図-4 に示す結果を得た。この図より、タンニン負荷が $7.9 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の系から $16.4 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ の系においては、概ねタンニン負荷強度と増殖抑制期間には相関性が観られ、タンニン成分による有毒藍藻類の増殖抑制効果は、濃度依存であることが示唆された。 $16.4 \times 10^{-9} \text{mg/cell}$ より高負荷域に関しては、10 日間の試験期間中、終始抑制効果が継続した。

4. まとめ

落葉広葉樹の一種であるトウカエデ枯葉部からの抽出成分の中で、特にタンニン成分に着目し、その濃度(負荷)による *Microcystis* 属の増殖抑制効果を検討した結果、タンニン負荷強度と抑制効果には正の相関性があることが示され、自然由来の枯葉を用いることで、アオコ対策を実現し得る可能性が示唆された。この手法は、新たな環境汚染源になる可能性が少なく、生態系への二次的な影響も少ないと考えられ、安全かつ経済的な合理的手法になると考えられる。

参考文献

- 1) 喜多村延政他; 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, 第43回環境工学フォーラム
- 2) 真部孝明; フローチャートで見る食品分析の実際(2003), pp79-88

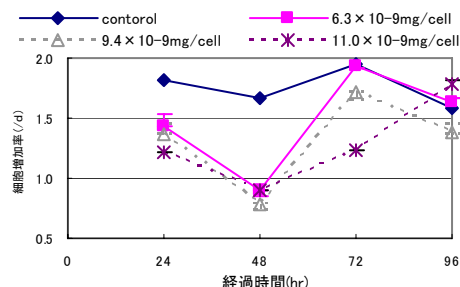


図-2 単位細胞当りのタンニン負荷量別細胞増加率

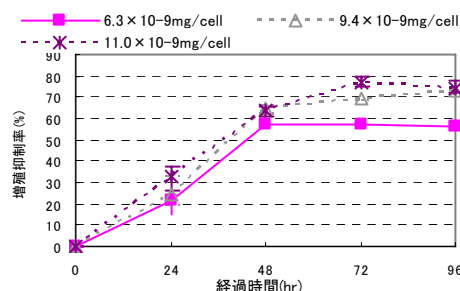


図-3 単位細胞当りのタンニン負荷量別細胞増殖抑制率

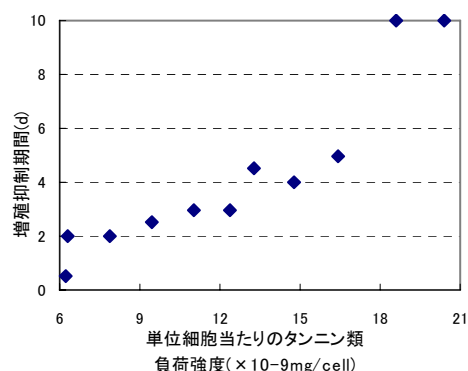


図-4 タンニン負荷別増殖抑制期間