

枯葉抽出液を用いた *Microcystis* 増殖抑制試験における鉄制限の影響

日本大学大学院理工学研究科 学生会員 ○大里順一 喜多村延政 島田浩司

日本大学理工学部土木工学科 正会員 吉田征史 松島暁

日本大学理工学部一般教育 非会員 浅田泰男

1. 背景および目的

アオコ形成の典型的な種である *Microcystis aeruginosa* の抑制に関する研究において、ホザキノフサモ、茶葉を用いての報告がなされている。特に抑制物質としてはカテキン、タンニンなどのポリフェノールが挙げられている。我々はこれまでに落葉広葉樹であるサクラ、トウカエデ、クヌギの抽出液を用いた回分式実験により抑制効果を得ている。抑制機構についてはまだ詳らかな知見を得ていないが、これらの枯葉から溶出する成分にはタンニンが含まれていた。タンニンは抗酸化作用や抗菌作用として注目されている一方で、重金属イオンと結合して難溶性の塩を作るとされる。また、国立環境研究所の報告¹⁾によれば藍藻の増殖には重金属の中でも特に鉄成分が重要とされ、鉄制限により増殖が抑制されることが知られている。そこで本報では、我々が用いた培地に含まれる鉄イオンが、枯葉由来のタンニンと結合することによる鉄制限の可能性および影響を調べることで、枯葉成分による既存^{2),3)}の増殖抑制効果の機構を検討した。

2. 実験方法

2-1: 抽出液中のタンニンと鉄イオンの反応量

鉄イオン溶液は $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬特級) を用い作成した。試験は鉄イオン溶液とサクラ、トウカエデ、クヌギの3種類の枯葉から既報の方法によって抽出液を作成しそれぞれ混合、混合液中における鉄イオン濃度と縮合型タンニン濃度を变化させた。そして混合液を十分に攪拌後、常温で20時間静置した後に、その上澄みを4000rpm, 10分間、遠心分離した後、鉄イオン濃度を計測した。鉄イオンの計測にあたっては、 σ -フェナントロリン法で計測した。

2-2: *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制試験

増殖抑制試験には *Microcystis aeruginosa* (NIES102株) を用い、上記3種類の抽出液を $0.22\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで無菌的にろ過した後、添加した。試験条件は恒温装置内で温度を 27°C に管理し、白色蛍光灯にて照明を上部より3000luxで照射、明暗周期は明16時間、暗8時間とした。試験系は、通常のM-11培地を用いた場合とM-11培地から鉄に関する試薬を除外した系(鉄制限状態)の比較、および、枯葉由来の縮合型タンニンを細胞当りの負荷強度が変動するように添加した系を行い、細胞増殖量の変化から増殖抑制効果を評価した。なお、抽出液中のタンニン濃度はバニリン-硫酸法によって求めた。

3. 試験結果

3-1: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ で作成した Fe^{3+} と枯葉抽出液中のタンニンとの反応

図-1はサクラの抽出液を用いての、初期タンニン濃度と鉄イオンの残留率(%)を示している。タンニンと混合していない系では、 Fe^{3+} しか鉄イオンが存在していないのに対し、タンニンを添加した系では Fe^{3+} が還元されて Fe^{2+} が検出された。これは奥田らの報告⁴⁾においても同様にタンニンが重金属を還元するという知見と一致していた。また、総鉄イオン(この試験では $\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+}$) で見た場合、初期タンニン濃度の高い系ほど鉄イオンが減少している傾向が観察された。

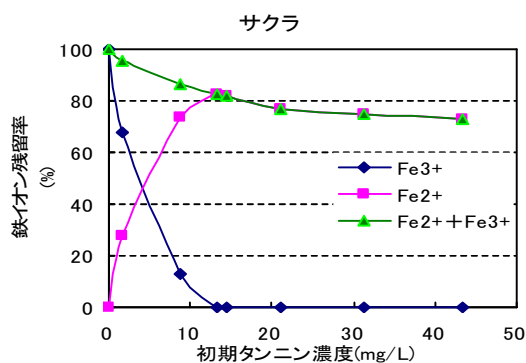


図-1 タンニン濃度-鉄イオン残留率関係

キーワード Microcystis, 鉄制限, 増殖抑制, 電子投稿, 関東支部技術研究発表会

連絡先 〒101-8308 東京都神田駿河台1-8-14 日本大学理工学部 TEL 03-3259-0673 E-mail: g-t-ojun@hotmail.co.jp

3-2 : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で作成した Fe^{2+} 溶液と枯葉含有タンニンとの反応

我々が増殖抑制試験に用いている M-11 培地の組成を表-1 に示す。M-11 培地では $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を用いているため、ここでは比較検討の対象として、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を用いて Fe^{2+} 溶液と枯葉抽出液由来のタンニンとの反応を検証した。図-2 にサクラの抽出液を用いたタンニン減少濃度と Fe^{2+} の減少濃度の関係を示す。サクラの場合、タンニン減少濃度 0.4mg/L~22mg/L の範囲において、およそその直線関係が観察された。

3-3 : 枯葉の抽出液を用いた増殖抑制試験

図-3 に鉄制限状態における *Microcystis* の増殖挙動を示す。通常の M-11 培地を用いた系 (Control) に対し、鉄成分を排除した系では細胞増殖が明らかに抑制されており、鉄制限が生じていることが確認された。図-4 にはサクラのタンニン濃度別における抑制試験結果を示す。このときの試験系において、M-11 培地中の鉄イオン濃度は表-1 から、およそ 0.2mg/L であり、タンニン濃度 0.52mg/L~1.5 mg/L のときには、図-2 から概算すると明らかに鉄制限状態が起きていると考えられるにも係らず、図-3 の鉄制限系よりも増殖していた。国立環境研究所の報告書⁵⁾によれば、*Microcystis* は生活環境が鉄欠乏状態に陥ると、「シデロフォア」というキレート作用を持つ有機物を分泌し、鉄化合物から鉄イオンを引き剥がし、増殖に必要な鉄を得ることが報告されており、このため、枯葉抽出液中には鉄化合物が存在し、そこから増殖に必要な鉄源を得て増殖していた可能性が考えられた。一方、図-5 には、より高濃度のタンニン濃度 (4.1mg/L) における増殖抑制試験の結果を示したが、このタンニン濃度域ではサクラ、トウカエデ、クヌギの枯葉抽出液系のすべてにおいて増殖抑制効果が発現していることが分かる。よって、これらの結果より、枯葉抽出液添加系においては、鉄制限状態にありながらも低濃度系では枯葉抽出液中の鉄化合物から鉄源を得て増殖するが、タンニン濃度が高濃度域になると、増殖が抑制されるという傾向が確認された。

まとめ

増殖抑制試験で用いられた抽出液では鉄制限状態を作り出している可能性が考えられた。しかし、鉄制限状態においてもタンニン濃度が低濃度であれば抽出液中の鉄化合物を鉄源として増殖している可能性が示唆され、タンニン濃度が高濃度の場合には増殖が抑制される結果を得た。以上のことから、枯葉抽出液を用いた増殖抑制機構は鉄制限では説明できず、抽出液中のタンニン負荷に従って増殖抑制効果を発現していることが示唆された。

参考文献: 1) 国立環境研究所アジアにおける水資源域の水質汚濁評価と有毒アオコ発生モニタリング手法の開発に関する研究, 2003 2) 喜多村ら, 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, 環境工学フォーラム, 2006 3) 大里ら, 有毒藍藻類に与える落葉広葉樹枯葉部由来成分の増殖抑制効果, 2007 4) 奥田ら, タンニンと共存物質との相互作用の効果 (第2報) 重金属イオンの還元および沈殿の可溶化, 薬学雑誌, 1982 5) 国立環境研究所特別研究報告, 湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究, 2001

表1 M-11培地組成			
NaNO_3	10 mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.5 mg
K_2HPO_4	1 mg	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 mg	Na_2CO_3	3 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 mg	DI水	100 ml

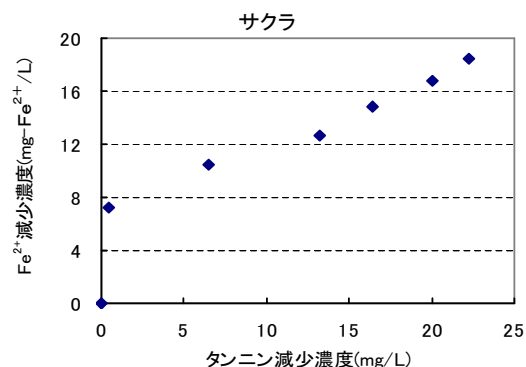


図-2 タンニン減少濃度・ Fe^{2+} 減少濃度関係

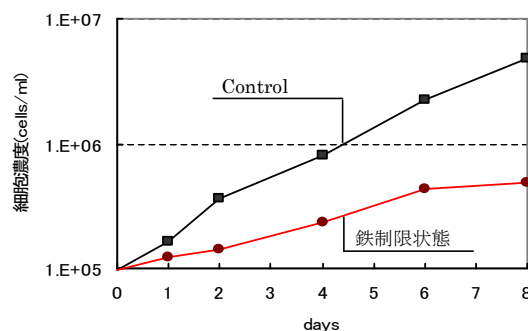


図-3 鉄制限下における *Microcystis* の挙動

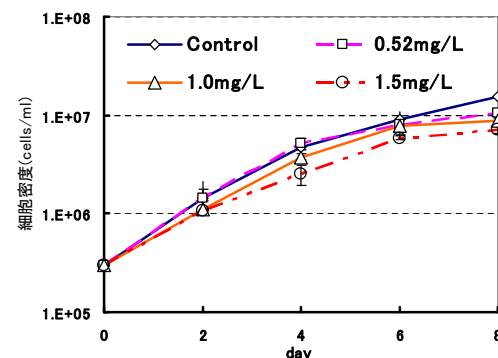


図-4 サクラのタンニン濃度別増殖抑制試験

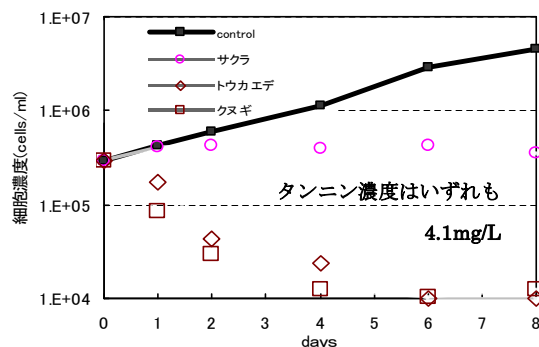


図-5 枯葉三種の抽出液を用いた増殖抑制試験結果