

ポリフェノールの *Microcystis* に対する増殖抑制効果の生化学的影響評価

東北大学 学生会員 ○塩入万莉子

東北大学

武田文彦

東北大学 正会員 千葉信男, 野村宗弘, 中野和典, 西村修

1. はじめに

近年、湖沼の富栄養化によるアオコの発生が問題となっている。アオコの主な構成種である藍藻には有毒物質を作り出す種があり¹⁾, 作り出された有毒物質による家畜や人体への被害も報告されている¹⁾。1998 年には世界保健機関が microcystin-LR についての水質のガイドラインを設けるなど安全な水資源の確保のためのアオコ対策が重要となっている。このような社会的背景を受けて、植物体が出す化学物質によって他種または自らが影響を受ける作用であるアレロパシー²⁾が注目を集めている。アレロパシー物質は植物由来であり、また植物種や藻類種によってその増殖抑制効果が異なる種特異性³⁾からアレロパシーはアオコなどの有害藻類を特異的に制御可能な新しい対策として利用できる可能性がある。アレロパシーを実用化するためにはそのメカニズムを解明することが必要であるが、そのメカニズム解明についての研究例は未だ少ない。また、アレロパシー効果による藻類に対する影響には藻類の栄養素接種を阻害する作用と、それ以外の作用とがあると考えられる。本研究においてはアレロパシー物質が栄養素、または藻類に働きかけて栄養素接種を阻害する作用を間接的作用、アレロパシー物質が藻類に対し細胞破壊、生合成阻害などを行う栄養素接種阻害以外の作用を直接的作用と呼ぶこととする。既往のバイオアッセイ手法ではそれらを区別して評価できていない。しかし藻類の増殖特性を評価することによって増殖が栄養素条件に依存しない培養条件を確立できれば、直接的作用のみを評価できると考えられる。本研究の供試藻類 *Microcystis aeruginosa* には、その細胞外より細胞内のリン濃度に依存した速度で増殖する性質⁴⁾がある。本研究ではその性質を利用することとした。回分培養した藻類が、栄養欠乏以外の、光や CO₂ の不足等の要因で定常期に達した場合、細胞内には栄養素もしくは生合成物質が蓄積されていると考えられる。その細胞を新たな試験水に接種することで増殖を制限して

いた要因から開放することにより、その細胞は細胞外に栄養素が無くとも体内に蓄積した栄養素または生合成物質のみによってある程度の増殖が可能なのではないかと考えた。この手法では、試験水での分裂は高々1回であろうと考えられ、*M.aeruginosa* の最大比増殖速度での倍加時間はおよそ 16 時間であることから、その程度の時間で細胞内に蓄えられた栄養素もしくは生合成物質による増殖は終了すると考えられる。この考えに基づき、バイオアッセイ時に細胞外の栄養素の有無によらない増殖を可能とする条件を見出す必要がある。よって本研究では前培養、バイオアッセイ条件に着目し、*M.aeruginosa* の増殖特性を評価することにより、直接的影響評価が可能なバイオアッセイ手法を構築することを目的とした。

2. 実験材料及び実験方法

(1) バイオアッセイ手法の構築

供試藻類は藍藻類 *Microcystis aeruginosa*(NIES-87)を用いた。前培養は CB 培地で 25℃, 5000lx 明暗 12 時間周期, 90rpm 回転振盪で行った。バイオアッセイは、滅菌蒸留水に BICINE を 500mg/l となるように添加し pH を 9.0 とした栄養素無添加系と、栄養素添加系として CB 培地を用意した。これらの試験水に前培養で対数増殖期、定常期である *M.aeruginosa* の細胞を 1.0mg-dry/l となるよう接種し、25℃, 5000lx, 90rpm 回転振盪条件で培養した。バイオアッセイ継続時間は 0-12 時間と 0-24 時間を設定し、それぞれ経過した時点で測定を行った。測定は吸光度に基づいて行い、あらかじめ得た検量線から乾燥重量に換算、比増殖速度(day⁻¹)を求めた。また、対数増殖期と定常期の細胞の性質の違いを検証するために、対数増殖期と定常期のそれぞれの細胞内窒素・リン含量を測定した。

(2) ポリフェノールのアレロパシー効果の評価

ポリフェノールは沈水植物ホザキノフサモからの放出が明らかとなっている pyrogalllic acid (PA)を用いた⁵⁾。蒸留水系に PA を 1mg/l となるように添加し、(1)で構築

したバイオアッセイ手法を行った。PA の影響は比増殖速度(day^{-1})から評価した。

3. 実験結果及び考察

(1) バイオアッセイ手法の構築

培養の結果を図-1 に示す。対数増殖期からの接種ではバイオアッセイ継続時間 0-12 時間、0-24 時間のいずれの場合も栄養素添加系と無添加系の比増殖速度の間に有意差が生じた($p<0.05$)。定常期からの接種の場合、0-12 時間では栄養素添加系と無添加系の比増殖速度に有意差は生じず($p>0.05$)、かつ最大比増殖速度 $\mu_{\max}$ ($0.988 \pm 0.105 \text{day}^{-1}$ $n=3$ (CB 培地, 5,000lux, 25°C, 90rpm 回転振とうで培養)) との有意差も認められなかった($p>0.05$)。しかし 0-24 時間の比増殖速度には有意な差が生じた($p<0.05$)。つまり定常期細胞の接種で 0-12 時間培養の場合のみ、栄養素条件によらない増殖が可能であったと言える。よって前培養条件は定常期細胞の接種、バイオアッセイ条件は 25°C, 明条件 5000lx で 12 時間の培養, 90rpm 回転振盪, としてバイオアッセイ手法を構築することができた。次に細胞内窒素・リン含量測定の結果を図-2 に示す。窒素含量は細胞内最小窒素含量 $Q_{N\min}=1.01 \times 10^{-9}$ (mg/cell) と比較して対数増殖期で 36 倍, 定常期で 43 倍であった。リン含量は細胞内最小リン含量 $Q_{P\min}=7.36 \times 10^{-11}$ (mg/cell) と比較して対数増殖期で 4.6 倍, 定常期で 7.8 倍であった。なおこの $Q_{\min}$ (細胞内最小含量) は文献値⁷⁾より換算したものである。窒素・リン共に定常期細胞のほうが多く含まれており($p<0.05$)、定常期からの接種で栄養素条件によらない増殖が可能であったことはこのことに起因すると考えられる。

(2) ポリフェノールのアレロパシー効果の評価

PA を添加したバイオアッセイの結果を図-3 に示す。既往の研究においては通常バイオアッセイは藻類の増殖が栄養素条件により制限を受けないよう富栄養状態で行っているため、栄養素摂取阻害も含めたアレロパシー効果でのみの評価であったが、本研究で構築した手法により栄養素摂取阻害効果を除く評価が可能となったため、PA は直接的作用によるアレロパシー効果を持つことが明らかとなった。

参考文献

- 1) 渡辺信(1989)水環境学会誌, **12**(12), 750-756.
- 2) 沼田真 編, 生態学辞典, 築地書館.

3) 中井ほか(1994)水環境学会誌, **17**(1), 33-39.

4) 岡田ほか(1979)国立公害研究所研究報告, **6**, 293-302.

5) 中井ほか(1998)水環境学会誌, **21**(10), 663-669.

6) Nakai, S. et al. (2000)Water Research, **34**(11), 3026-3032.

7) 藤本ほか(1999)水環境学会誌, **22**(9), 749-457.

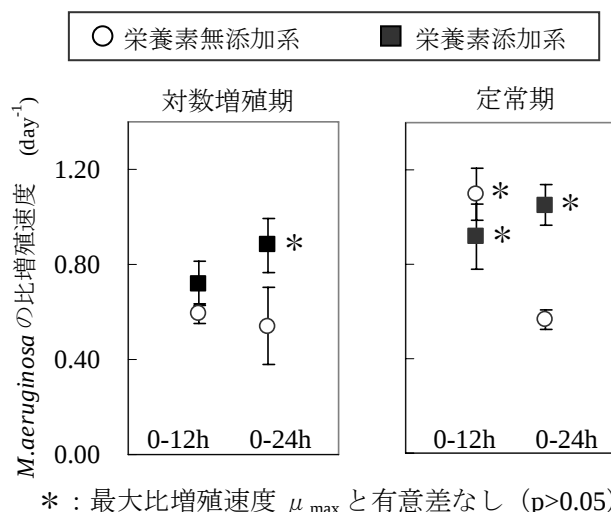


図-1 各培養時間における *Microcystis aeruginosa* 対数増殖期・定常期細胞の増殖特性

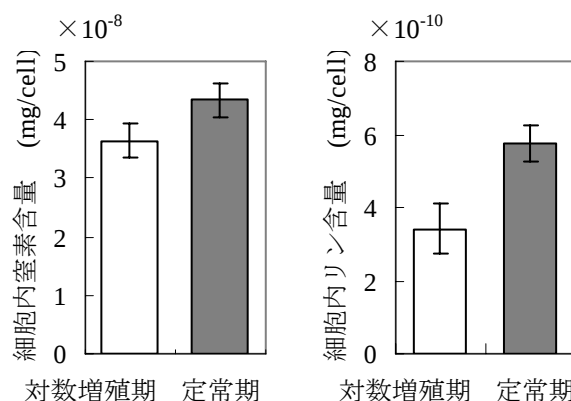


図-2 *Microcystis aeruginosa* 対数増殖期・定常期細胞内窒素・リン含量

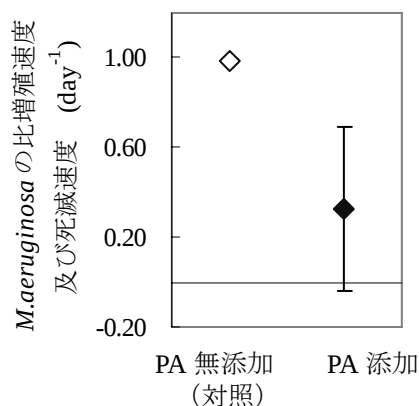


図-3 Pyrogallol acid(PA)が *Microcystis aeruginosa* の増殖に及ぼす影響