ポリフェノールの藍藻類への増殖抑制効果とオオミジンコへの影響

鳥取大学　学生会員　○坂口　昂希
鳥取大学　正会員　増田　貴則
鳥取大学　正会員　高部　祐剛
鳥取大学　正会員　星川　淑子

1. 序論

我が国の湖沼における水質悪化の一つに，富栄養化が挙げられる．湖沼が富栄養化すると，藍藻や緑藻等が異常発生し，アオコと呼ばれる現象が起こる．アオコは景観の悪化や異臭の発生、魚の斃死などの問題を引き起こす．

アオコ対策として，水草の水質浄化作用を利用したものがある．水草は藻類の増殖を抑制するアレロパシー物質を放出することが分っている．しかし近年，水草の異常繁殖が問題視[(1)]されており，水草を植栽することはリスクを伴う．そこで，水草が放出するアレロパシー物質を直接散布することによる藻類の増殖抑制効果に着目した．しかしアレロパシー物質が動物プランクトンに与える影響に関しての知見は少ない．

本研究では沈水植物ホザキノフサモが放出するアレロパシー物質として，2 種のポリフェノールを取り上げた．水草はアレロパシー物質を連続的に放出しているとされている．よって，それらを断続的に添加することによる藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制効果を評価するとともに，2 種のポリフェノールが動物プランクトン *Daphnia magna* へ与える影響を，繁殖阻害実験を行って評価した．

2. 研究方法

2.1　アレロパシー物質の選定

本研究では，複数の藻類に対して顕著に増殖抑制効果が認められている沈水植物ホザキノフサモが放出するアレロパシー物質の 4 種のポリフェノールのうち，最も増殖抑制効果が高かった Pyrogallic acid[(2)]と，それに対して相乗効果を示す(+)-Catechin[(3)]を選定した．

2.2　実験概要

Pyrogallic acid と(+)-Catechin の 2 種のポリフェノールを断続的に添加することによる *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制効果を評価する実験を行った．100mL 三角フラスコに M-11 培地を 15mL 入れ，表 1 の濃度となるように 2 種のポリフェノールを添加する．その後 *Microcystis aeruginosa*(NIES-102 株)を初期クロロフィル a 濃度が 5μg/L となるように植え継いだ．植え継ぐ液量は 5mL とした．温度 25℃, 照度 3000lux～4000 lux, 明暗周期 16L:8D, 振とう速度を 80rpm に設定し, 8 日間振とう培養を行った．3, 4, 5 日目にポリフェノールを同濃度に設定した M-11 培地を 10mL ずつ追添加した．そして, 培養 8 日目にクロロフィル a 濃度を測定した．

表 1　*Microcystis aeruginosa* の生長阻害実験の試験濃度区

	PA(mg/L)	CAT(mg/L)
blank	0	0
濃度区A	3.50	1.83
濃度区B	0.88	0.46
濃度区C	0.44	0.23

次に動物プランクトンへの影響を調べるため，オオミジンコを用いた繁殖阻害実験（OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test,No. 211）を行った．100mL 三角フラスコにカルキを抜いた水道水を 50mL 入れ，Pyrogallic acid 及び(+)-Catechin を表 2 に示す濃度となるように添加した(各濃度区につき三角フラスコ 10 個)．そこに親個体から生まれた，初産個体ではない生後 24 時間以内の個体 50 匹を 1 匹ずつ三角フラスコに移した．温度 20℃±2℃で明暗周期

表 2　*Daphnia magna* の繁殖阻害実験の試験濃度区

	PA(mg/L)	CAT(mg/L)
blank	0	0
濃度区A	7.00	3.66
濃度区B	3.50	1.83
濃度区C	1.75	0.91
濃度区D	0.87	0.46

を 16L：8D に設定したインキュベータ内で 10 日間観察を行った．給餌は毎日行い，3 日毎に水替えを行った．試験期間中の親ミジンコの生死と状態，産仔数とその状態，NOEC(無影響濃度)を算出した．

3. 実験結果

各濃度区におけるクロロフィル a 濃度を図 1 に示す．濃度区 A に関しては藻類の生長が見られなかった．また Tukey 法を用いて検定を行った結果，blank 及び濃度区 B，C において有意差は見られなかった．これらの結果から，*Microcystis aeruginosa* の増殖を抑制する各ポリフェノールの濃度は，Pyrogallic acid が 0.88mg/L~3.50mg/L，(+)-Catechin が 0.46mg/L~1.83mg/L にあることが示唆された．

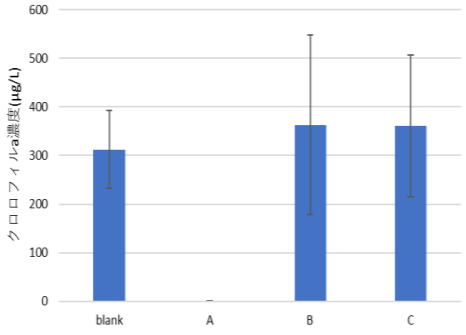

図 1　各濃度区におけるクロロフィル a 濃度
エラーバー：標準誤差（n=3）

Daphnia magna の繁殖阻害実験の結果を図 2 に示す．すべての濃度区において遊泳阻害は見られなかったが，濃度区 D において 1 匹が斃死した．各濃度区と blank において有意差があるか調べるために Steel 法を用いて多重比較検定を行った．その結果，blank と濃度区 A には有意差が見られ，産仔数への影響があることが分かった．一方で *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制実験結果から得た，*Microcystis aeruginosa* の増殖を抑制するポリフェノールの濃度帯(Pyrogallic acid =0.88mg/L~3.50mg/L,(+)Catechin=0.46mg/L~1.83 mg/L)と blank とでは有意差は見られなかったため，*Daphnia magna* の産仔数には影響を及ぼさないことが示唆された．これらより NOEC は Pyrogallic acid が 3.5mg/L，(+)-Catechin が 1.83mg/L となった．

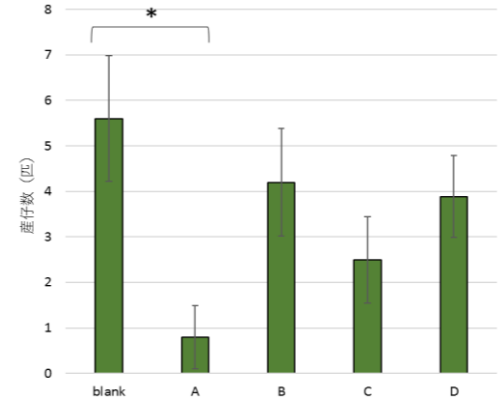

図 2　*Daphnia magna* の産仔数
エラーバー：標準誤差(n=10)

4. 結論

本研究では，沈水植物ホザキノフサモが放出するアレロパシー物質を断続的に散布することによる，藻類の増殖抑制の可能性，動物プランクトンへの影響を検討した．

実験結果より，藻類の増殖が抑制されるポリフェノールの濃度は Pyrogallic acid が 0.88mg/L~3.50mg/L，(+)-Catechin が 0.46mg/L~1.83mg/L にあり，その濃度帯では *Daphnia magna* の産子数に影響が出ない可能性が示された．

しかし，藻類の生長阻害実験においてはデータに大きなばらつきが見られた．また，影響が示された濃度区間の幅が広いため，実用的な知見ではない．そのため濃度区間の設定を見直し，繰り返し数を増やして再実験を行う必要がある．さらに，*Daphnia magna* への長期的な影響を調べるために 10 日間の繁殖阻害実験を行ったが，より長期的な影響を調べるために 10 日目以降も実験を続ける必要がある．今回の実験では，無影響濃度のみ算出できたが半影響濃度の算出もできるように，濃度区間を決定しなおすことも必要である．

5. 参考文献

(1)浜端悦治(2007) 琵琶湖とじ海における沈水植物群落と水質の変化，滋賀県琵琶湖環境科学研究センター試験研究報告，Vol.2，pp78-88

(2)中井智司，井上豊，細見正明，村上昭彦(1998)，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，Vol.34，No.3，pp159-170

(3)中井智司，山根小雪，細見正明(2000)，ホザキノフサモが放出した 4 種のアレロパシー物質(ポリフェノール)の藻類に対する増殖抑制効果，水環境学会，Vol23，No11，pp726-730