

# 水環境汚染の原因の一つである緑藻類の増殖抑制技術の開発

## タンニン酸による増殖抑制及び超音波による細胞縮小

### Development of technology to suppress the growth of *Chlorella* as a factor of environmental pollution Suppression of growth by tannic acid and reduction of cells by ultrasound

河守優香<sup>1)</sup>, 佐藤来海<sup>1)</sup>, 横山祥汰<sup>1)</sup>  
指導教員 庄司良<sup>1)</sup>

1) 国立東京工業高等専門学校 物質工学科 庄司研究室

藻類の大量発生が環境汚染の原因の一つであり、藻類の一種であるクロレラの増殖を抑制することを目的にタンニン酸による増殖抑制実験および超音波による細胞縮小実験を行った。クロレラを培養する操作の一部でタンニン酸を加え観察をした所、増殖の抑制を確認した。また、タンニン酸を添加せずに培養させたクロレラに超音波を当ててから画像解析を行うと細胞の縮小が確認された。しかし、細胞壁の強さから理由が確かなものと判断されなかつた。そのため、今後の課題として細胞縮小の原因を確かにしていく。

キーワード：緑藻類、タンニン酸、超音波、湖沼、富栄養化

#### 1. はじめに

近年、湖沼が富栄養化し、藻類が大量発生するという事象が起こっている。これにより、生態系のバランスが崩れるなどの環境問題が引き起こされている。この問題に対する研究は多くなされているが、まだ明確な解決策が見つかっていない。

富栄養化に伴い大量発生する藻類の一種にクロレラがある。クロレラは1つの個体が4つに分裂し、その分裂した個体が更に分裂するといったようく増殖している。そのため、短い期間で指數関数的に増殖することができる。また、クロレラは細胞壁がとても強く、増殖を抑制する対策を取ることが難しい。<sup>1)</sup>

本実験では藻類の引き起こす水環境問題を解決するため、藻類の一種であるクロレラを用いて、お茶に含まれる成分であるタンニン酸による増殖抑制効果実験と、超音波による細胞縮小実験を行った。タンニン酸は、同じくお茶に含まれる成分であるカテキンと構造が似ている。カテキンには藻類の成長阻害効果があることが知られているため、構造が似ておりお茶の成分であるタンニン酸にも増殖抑制効果があると考えたため、本実験で使用した。<sup>2)</sup>

#### 2. 実験材料と方法

##### 2.1. クロレラの培養

本実験では、研究室で継代培養しているものを利用した。継代培養しているクロレラを遠心分離機で分離させ、クロレラ懸濁液を取り出した。その後、市販のペットボトルに、ハイポネックス 250 μL を測りとり、イオン交換水で 500 mL とした。ハイポネックス水溶液の入ったペットボトルに、クロレラ懸濁液 2000 μL を測りとった後に攪拌させた。次に、蛍光灯を1本とアルミホイル、酸素ポンプを利用し培養装置を組み立てた。その後、1週間程度様子を見ながら培養した。

##### 2.2. タンニン酸を利用した増殖抑制実験

本実験でも上記のようにクロレラを培養するが、増殖抑制を確認するために、ハイポネックスとイオン交換水を加える操作でタンニン酸を加えた。本実験では、タンニン酸(和光純薬、化学用)を精密天秤で、0.0011 g, 0.0051 g, 0.0103 g 測りとり、ペットボトル3本にそれぞれ加えた。その後、クロレラ増殖の操作と同様に、クロレラ懸濁液を加え、攪拌させた。4本のペットボトルで比較を行うため、蛍光灯を2本と酸素ポンプを2台、アルミ

ホイルを利用し、培養した。4日間培養させ、毎日写真を撮影した。

### 2.3. 超音波を当てた細胞縮小実験

本実験では、タンニン酸を加えず、4日間培養させたクロレラを利用した。まず、タンニン酸を加えていないクロレラ 50  $\mu\text{L}$  を測りとり、マイクロスケールとカバーガラスの間に差し入れた。超音波照射前に顕微鏡を40倍にしたもので、クロレラの細胞を撮影した。その後、タンニン酸を加えていないクロレラにそれぞれ、5分、10分、15分、20分、25分、30分間超音波を当て、前述と同様の方法にてクロレラの細胞の撮影を行った。超音波は、超音波洗浄器(株式会社エスエヌディ、US-1、38 kHz)を用いて水を振動させることによって発生させた。影が終わったら画像処理ソフトであるイメージ J 利用し、細胞の直径を測定した。

## 3. 結果と考察

図1に前述と同様の方法にて培養したクロレラの0日目と4日目のRGBのグラフを示す。0日目はクロレラのペットボトル全てが同じように緑色になっていた。しかし、4日目では、タンニン酸が含まれていないクロレラは、濃い緑色になり、ペットボトルの底の部分にはクロレラの塊が沈殿している様子が観察された。しかし、タンニン酸が含まれているクロレラは、黄色のような薄い緑色になっており、クロレラの沈殿は観察されなかった。この結果により、タンニン酸には藻類の増殖抑制効果があることが確認された。また、0日目のクロレラを加えてから攪拌させて1時間ほど経過した際に、タンニン酸を加えたペットボトルがわずかに黄色っぽくなつたことが確認された。このことから、タンニン酸はクロレラに対して短時間で効果があることが分かった。今後、クロレラがどれくらい増殖したかを調べるために吸光度を測定するなどして実験精度をあげていきたい。

クロレラの細胞の直径を縦軸に、超音波を当てていた時間を横軸にして、グラフ化したものを図2に示す。このグラフより、超音波をあてると、クロレラの細胞が小さくなつた。しかし、前述通り、クロレラの細胞壁は強く、超音波ではほとんど

破壊されない。そのため、本実験でのクロレラの大きさが小さくなつた理由として、細胞壁破壊の考えとすることは難しい。しかし、本実験によって、超音波で細胞に変化を与えることができたことは確認された。そのため、今後の実験では、細胞縮小の原因を確かにしていきたい。

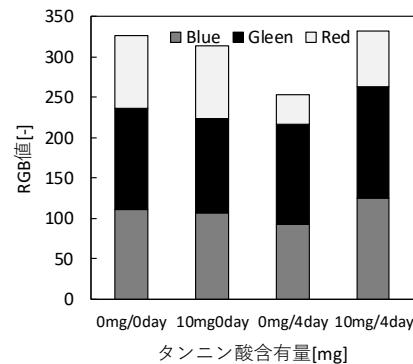


図1 クロレラの増殖によるRGB値の変化  
(細胞数が増えるとRGB値が減少する)

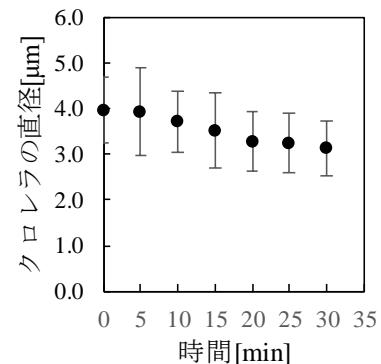


図2 クロレラ細胞の直径と超音波照射時間

## 4. 結論

本実験結果よりクロレラを増殖させる実験に、タンニン酸を添加することで、増殖の抑制が示唆された。また、増殖させたクロレラに超音波を当てることで、細胞に影響を与えていると推測できた。

## 5. 参考文献

- 1)武田宏(1983), 細胞壁のできるとき クロレラのセルサイクルからのアプローチ, 日本農芸化学会, 21(9), p618
- 2)土屋竜太, 紀平征希, 荒木利芳, 坂上優子(2015), アオコの増殖を抑制する樹木葉の特徴, 日本森林学会, 126,p665