

マイクロコズム WET 試験によるアオコ発生湖沼水のエコシステムレベルでの影響解析

千葉工業大学生命科学科

正員 ○村上和仁

千葉工業大学大学院生命科学専攻

学員 飯田龍介、鈴木 烈

NPO 法人バイオエコ技術研究所

稲森隆平、稲森悠平

1. 目的

アオコとは富栄養化が進んだ湖沼等においてシアノバクテリアが大発生し水面を覆いつくす状態を指す。アオコの中にはミクロキスティス属が産生するミクロキスチンなどの毒素を含有しており、海外ではアオコ毒による人間や家畜が死亡する例が報告されている。こういったアオコ毒は人間や動物などに対しての毒性影響については数多く研究されているが、生態系への影響についてはほとんど解明されていない。本研究ではアオコが発生した環境水が水圏生態系に如何なる影響を及ぼすかについて、マイクロコズム WET 試験によるエコシステムレベルでの環境毒性評価解析を行った。

2. 方法

2.1 マイクロコズム

マイクロコズムとは、制御された条件下で生産者、捕食者、分解者を含む、模擬生態系のことである。環境条件などの実験操作が可能であり、生物群集の成り立ちや関係などを明らかにすることができる。またフラスコスケールでの培養であるため、低コストかつ高い再現性と安定性を有している。図1にマイクロコズムの概念図を示す。本研究では Gnotobiotic 型マイクロコズム (N-system) を用いた。300ml 三角フラスコに TP₁₀₀ 培地 (Taub+ペプトン 100mg/l 培地) を 200ml 注いだ。継代培養されているマイクロコズムの種 10ml を添加し、温度 25℃、照度 2,400lux (明暗周期 12hrs) の条件下で 30 日間の静置培養を行った。本研究で用いた Gnotobiotic 型マイクロコズムは構成生物全てが既知であり、生産者として 2 種の緑藻 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus quadricauda*、1 種の糸状藻類 *Tolypothrix* sp.、捕食者として 1 種の原生動物 繊毛虫類 *Cyclidium glaucoma*、2 種の後生動物輪虫類 *Lecane* sp.、*Philodina erythrophthalma*、1 種の後生動物貧毛類 *Aelosoma hemprichi*、分解者として 4 種の優占細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Corynebacterium bacteria* にて構成されている。

2.2 培養方法

300mL フラスコに TP₁₀₀ 培地 (Taub+Pepton100mg/L 培地) 200mL とマイクロコズムの種 10mL を添加し、温度 25℃、照度 2,400lux、明暗周期 12 時間で 30 日間静置培養を行った。

2.3 検水

夏季 (2022 年 10 月) および冬季 (2023 年 2 月) に印旛沼臼井観測所 (千葉県) より表層水を採水した。顕微鏡観察の結果、アオコを形成していた藍藻類は *Microcystis aeruginosa* であり、HPLC による分析の結果、夏季サンプルからミクロキスチン-RR (173μg/L) と-LR (81.3μg/L) が検出された。

2.4 マイクロコズム WET 試験

マイクロコズム内の生物量が安定する培養開始 16 日目に、口径 0.45μm メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過したアオコ発生表層水、アオコ未発生湖沼水をマイクロコズムに対して 5、10、20、40、80%となるように TP₂ 培地で希釈し添加した。添加の際には、マイクロコズムを 1,500rpm×5min で遠心分離し、上澄みを採取して生物量を調整した。

2.5 評価方法

評価項目は、顕微鏡観察によるプランクトン個体数 (構造パラメータ) と DO 計測 (機能パラメータ) とした。顕微鏡観察は培養開始から 0、2、4、7、14、16、18、20、23、30 日目に行った。DO は 16 日目の農薬添加後から 30 日目まで連続的に測定し、生産量 (P) と消費量 (R) より P/R 比を算出し、枝分かれ型分散分析にて評価した。マイクロコズム内の DO を蛍光式 DO 計により経時的に連続測定し、P (生産量)、R (呼吸量) および P/R 比の推移 (機能パラメータ) を求めた。培養終了後、機能パラメータについて枝分かれ型分散分析 (branched type ANOVA) にて影響解析した。

機能・構造パラメータにおいて、b-ANOVA で影響なしと評価された最も高い濃度をマイクロコズム最大無影響濃度 (m-NOEC) とし、毒性単位 (TU) を以下の式より算出した。

$$\text{毒性単位 (TU)} = 100 / \text{m-NOEC} (= \text{希釈倍率})$$

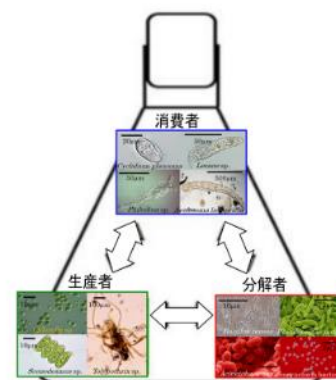


図1 マイクロコズムの概念図



図2 アオコ発生表層水の様子

表1 アオコ発生表層水の水質

COD(mg/L)	42.4
T-N (mg/L)	2.88
T-P(mg/L)	0.47
Cl ⁻ (mg/L)	11.8
NO ₃ -N(mg/L)	1.9
NO ₂ -N(mg/L)	0.0093
NH ₃ -N(mg/L)	0.09
PO ₄ -P(mg/L)	0.21

キーワード：マイクロコズム WET 試験 アオコ 環境毒性影響評価 m-NOEC TU

連絡先：〒275-8588 千葉県習志野市津田沼 2-17-1(千葉工業大学生命科学科) TEL:047-478-0455 FAX:047-478-0455

3. 結果および考察

3.1 構造パラメータによる評価

アオコ発生表層水添加後、原生動物 *Cyclidium* (一次消費者) に影響が生じ、40%以上の添加系において緑藻類 *Chlorella*, *Scenedesmus* (生産者) の個体数が低下した (図3)。一方、アオコ未発生湖沼水添加系では微小動物 (消費者)、微細藻類 (生産者) のいずれも死滅や個体数の大きな減少はみられなかった (図4)。これより、アオコ発生湖沼水に含有されるアオコ毒やアオコ代謝産物による有機物負荷、あるいはアレロパシー作用によって *Cyclidium* が減少したものと推察された。

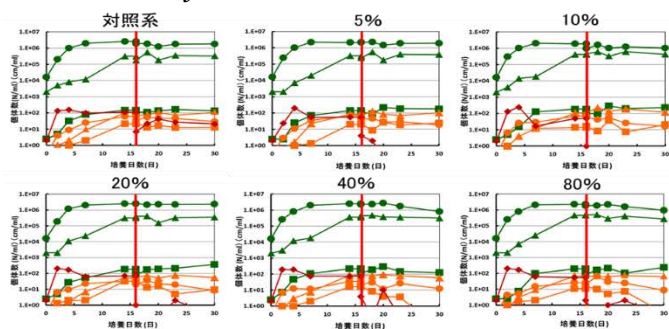


図3 アオコ発生湖沼水添加系の微生物個体数の経時変化

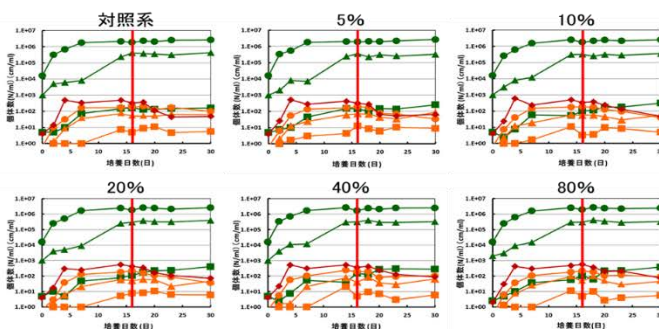


図4 アオコ未発生湖沼水添加系の微生物個体数の経時変化

3.2 機能パラメータによる評価

各添加濃度における DO の経時変化より、添加濃度が高くなるにつれてグラフの振幅が大きくなる傾向にあった。P/R 比とはマイクロコズム内における酸素の光合成による生産と呼吸による消費の比を表したものであり、マイクロコズムの P/R 比は自然生態系と同様の 1 となる性質を有する。対照系は 1 付近で安定していたが、アオコ発生表層水では 10%以上、アオコ未発生湖沼水では 20%以上の添加系で波形が大きく乱れ、生態系としての機能は安定していないと評価された (図5)。アオコ発生表層水添加系では P/R 比が大きく乱れ、生態系機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

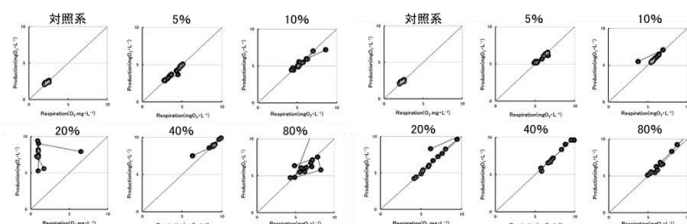


表2 枝分かれ型分散分析 (左:アオコ発生、右:アオコ未発生)

添加濃度	P/R比	消費量	生産量	評価	添加濃度	P/R比	消費量	生産量	評価
5%	群	○	○	○	5%	群	○	○	○
交互作用	×	○	○	×	交互作用	×	○	○	×
10%	群	○	×	○	10%	群	○	○	○
交互作用	×	○	○	×	交互作用	○	○	○	○
20%	群	○	○	○	20%	群	○	○	○
交互作用	×	○	×	×	交互作用	○	×	×	×
40%	群	○	○	○	40%	群	○	○	○
交互作用	○	○	×	×	交互作用	×	×	×	×
80%	群	○	○	×	80%	群	○	○	×
交互作用	×	○	×	×	交互作用	×	×	×	×

図5 各添加系の P/R 比の経時変化 (左:アオコ発生、右:アオコ未発生)

3.3 枝分かれ型分散分析による評価

枝分かれ型分散分析とは、フラスコ間差を確率変数とみなした分散分析のことである。添加系や対照系を振り分け、時間を含めた実験条件を考慮した検定方法である。すべての値の平均による分散分析を群といい、時間ごとの分散分析を交互作用という。枝分かれ型分散分析より、アオコ発生表層水の m-NOEC < 2.5%、TU より 40 倍以上希釈が必要と評価された。また、アオコ未発生湖沼水の枝分かれ型分散分析を行った結果、20%、40%、80%添加系では影響ありと評価された。アオコ未発生湖沼水の m-NOEC ≤ 5%、TU より 20 倍以上希釈が必要と評価された。

4. まとめ

- 1) 構造パラメータ (個体数) より、アオコ発生表層水添加系では 10% から 80% の添加で一次消費者 *Cyclidium* の個体数に影響が生じ、40% 以上では生産者 *Chlorella*, *Scenedesmus* の個体数が減少した。また、アオコ未発生湖沼水添加系では微小動物 (消費者)、微細藻類 (生産者) のいずれも死滅や個体数の大幅な減少はみられなかった。これより、アオコ発生湖沼水に含有されるアオコ毒、有機物負荷、代謝産物によるアレロパシー作用が影響している可能性が示唆された。
- 2) 機能パラメータ (DO, P/R 比) より、アオコ発生湖沼水、アオコ未発生湖沼水のいずれの添加系でも添加濃度が高くなるほど DO の振幅に変化が生じ、アオコ発生表層水添加系ではアオコ未発生湖沼水添加系に比べて P/R 比が大きく乱れ、生態系機能に影響を及ぼしていることが示唆された。
- 3) 枝分かれ型分散分析より有意差検定を行い、影響の有無を判定した結果、アオコ発生表層水の m-NOEC は 2.5% 未満、TU は 40 倍、アオコ未発生湖沼水の m-NOEC は 5% 以下、TU は 20 倍と評価された。この結果より、湖沼等にアオコが発生することで、水圏生態系の機能に大きな影響が生じるものと考えられた。

参考文献

- 1) Inamori, Y. ed: Microcosm Manual for Environmental Impact Risk Assessment: From Chemicals to Whole Effluent Toxicity (WET), Springer, New York (2019)
- 2) 村上和仁、鮫島正一、稲森隆平、類家 翔、稲森悠平、徐 開欽、西村 修: マイクロコズムを活用した環境リスク評価技法の開発と戦略的展開、日本水処理生物学会誌、58(3)、93-105 (2022)