

水田除草剤に対する植物種毎の生態毒性影響の違い

木更津工業高等専門学校専攻科 学生会員 ○小森 瑞樹
木更津工業高等専門学校 正会員 湯谷 賢太郎

1. はじめに

現行の水質汚濁に係る環境基準や、化管法などの化学物質管理に関する法律では、化学物質の水生生物への影響評価が不十分であったり、基準が細かく分析が困難であったりといった問題がある。また、いくつかの化学物質が混ざったときの複合的な影響の評価もできない。そこで近年バイオアッセイを用いた生態毒性評価が注目を集めており、これらを用いることで試料が持つ毒性の複合影響を総合的に評価することができる。従来の生態毒性評価は、OECDのテストガイドラインに準拠した藻類・甲殻類・魚類による急性、あるいは慢性試験によって行われてきた。しかし、実環境の農薬類の汚染状況とそこに生息すべき様々な生物を考えると、それら3種の試験結果のみで様々な生態リスクを評価するのは困難であると言われている¹⁾。

調査対象に入っておらず、国内各地で減少が危惧されている生物に水草類がある。レッドデータブック²⁾には87種の水草がリストアップされており、これは国内在来種の40.5%に相当する。減少の要因としてこれまで考えられていたものに、物理的な要因、水質悪化の要因、生物的な要因があるが、これらの問題は徐々に環境保護への意識の高まりから改善されつつある。しかし依然として、水路や河川に見られた水草は数を減らしていたり、外来種などのこれまでに見られなかった種に取って代わられたりと、本来の状態に回復しているとは言い難い。そういった状況から、新たな環境リスクとして全国の水環境を広範囲に汚染する除草剤の環境リスクも十分検討がなされるべきであると報告がなされている³⁾。

除草剤が水草に及ぼす影響については、国内外を問わず多くの報告がなされている^{4, 5, 6)}。Cedergreenら⁴⁾は、10種類の水草を同条件下で、除草剤についての影響を調査し、マツモの一種が最も影響を受けることを明らかにした。また、2種類の除草剤で影響の傾向や大きさが異なるということも明らかにした。Vanら⁵⁾は、除草剤ベンスルフロンメチル(以下、BSM)が水草類に及ぼす影響は、同じ種内であっても異なることを明らかにした。Panら⁶⁾は、4種の水田除草剤が水草に及ぼす影響を、クロロフィルa量によって調査した。以上のような種々の研究がなされているが、実験条件や使用する水草、除草剤の種類が異なるため、それらの結果を並べて比較することは難しい。さらに、農薬の種類が異なると、影響が異なるため、ある除草剤の調査結果は他の除草剤の評価

に用いることができない。

そこで本研究では報告事例の少ないBSMに着目し、複数の水草で同一の条件下で実験を行うことで、水草種毎のBSMによる生態影響を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 対象水草

試験は6種の水草に対して行った。まず、代表的な水草としてマツモ(*Ceratophyllum demersum*)と各地で大増殖し問題を引き起こしている外来種であるオオカナダモ(*Egeria densa*)を選定した。次に、各地の湖沼や河川で減少を続けているヒルムシロ科ヒルムシロ属の水草からエビモ(*Potamogeton crispus*)とヤナギモ(*Potamogeton oxyphyllus*)を選定した。最後に、我が国の代表的な浮草であるウキクサ(*Spirodela polyrrhiza*)とアオウキクサ(*Lemna aoukikusa*)を選定した。マツモとオオカナダモはペットショップで購入したためその由来は不明であるが、エビモとヤナギモは木更津市内の水路より、ウキクサとアオウキクサは木更津市内の溜池と水田よりそれぞれ採取した。

(2) 水草に対する除草剤の生態毒性試験

購入または採取した水草は、実験室内で実験条件と同じ培地を用いて1週間程度の培養を行い、環境に順化させたものを実験に用いた。培地にはASTM培養液(Modified Andrews' Medium)⁷⁾を用いた。

実験では、除草剤濃度を4段階に分けて徐々に高くしていった培地を100 ml入れたガラス瓶に、水草の生長点を投入した。除草剤にはBSM(和光純薬工業)を用いた。また、除草剤以外の条件が同じ培地を用意し、対照とした。1~2週間培養した後、水草の種類に合わせて全長もしくは葉面積の相対生長率及び、クロロフィルa量、フェオ色素量を測定した。クロロフィルa量とフェオ色素量の比をC/Pと表し、水草の葉の光合成活性を見る指標とした。なお、面積はデジタルカメラで撮影した画像を画像解析ソフトLia32 for Win32⁸⁾を用い測定した。クロロフィルa量、フェオ色素量は、アセトン抽出したものをロレンツェン法⁹⁾に従って測定した。各濃度および対照につき5サンプルずつ、計25サンプルに対して試験を行った。

実験は気温23 ± 1 °Cに調整された室内で行った。光源に白色蛍光灯を用い光量子束密度50.4 μmol/m² sの条件で実験を行った。また、実験期間中に培地の水深が視認できる程度に減少した場合は、実験開始時と同じ水深になるように蒸留水を添加した。

キーワード 水草, 水田除草剤, バイオアッセイ

連絡先 木更津工業高等専門学校 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東 2-11-1

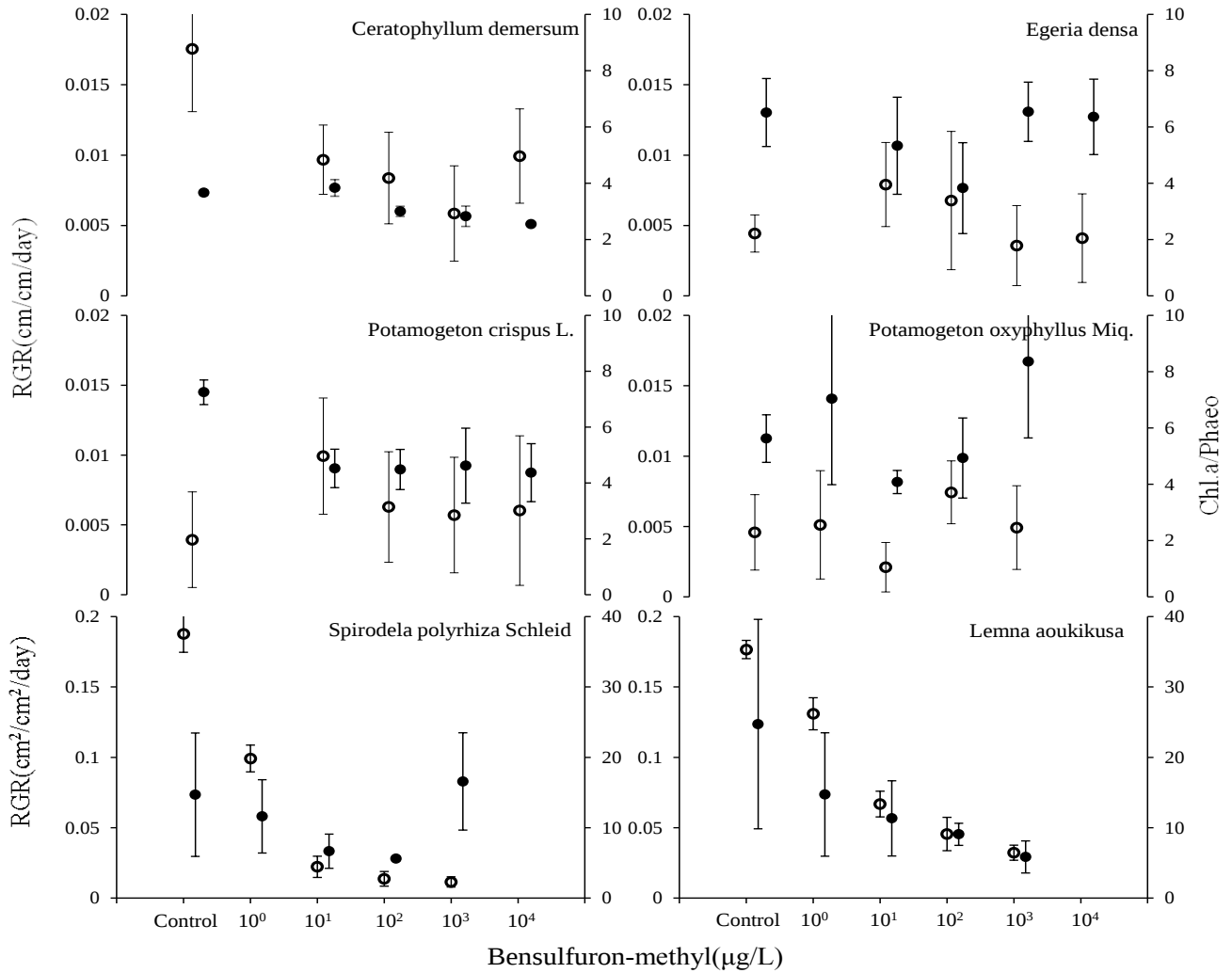


図-1 除草剤濃度の上昇が相対成長率とクロロフィル a/フェオ色素量に及ぼす影響
○は RGR, ●は C/P を表す

(3) 用量反応曲線と相対影響度の算出

Seefeldt ら¹⁰⁾の方法を用い、各実験結果について用量反応曲線を決定した。用量 (x) に対する反応 (y) の式は以下の様に書ける。

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(I_{50}))]} \quad (1)$$

ここに、Cはyの最小値、Dはyの最大値、bは曲線の勾配、 I_{50} は50%影響濃度 (EC_{50}) である。Dの値は対照の結果を用いた。最初に、 I_{50} 、bの値は実験結果に合うように設定し、Cの値を決定した。その後、設定したCの値を用いて I_{50} を再設定し、bの値を実験結果に合うように再設定した。以上の試行を数回繰り返して、各実験の用量反応曲線を決定した。

本研究では、全長、葉面積の相対生長率やクロロフィル a 量など、異なった指標に対する影響度を比較するため、相対影響度という指標を定義した。これは、上記の用量反応曲線の決定により求められた

C、D の値を用い、それぞれを 0、1 となるように実験結果の値を等比配分して求めた値である。

3. 結果

(1) 各水草のBSMに対する影響

BSM濃度と、体長または葉面積の相対生長率 (RGR) 及びクロロフィルa量とフェオ色素量の比 (C/P) の関係を図-1に示した。

マツモではBSM濃度の増加に伴って全長のRGRが44%程度減少した。また、C/Pにおいても30%程度減少した。相対影響度による検討には全長のRGRを用いた。本実験より求められたマツモのBSMに対する EC_{50} は3.0 µg/lであった。

オオカナダモでは個体毎のばらつきが大きく一概には言えないものの、全長のRGRとC/Pのどちらの項目においても有意な傾向を見出すことが出来なかった。そのため、相対影響度による検討からは除外した。

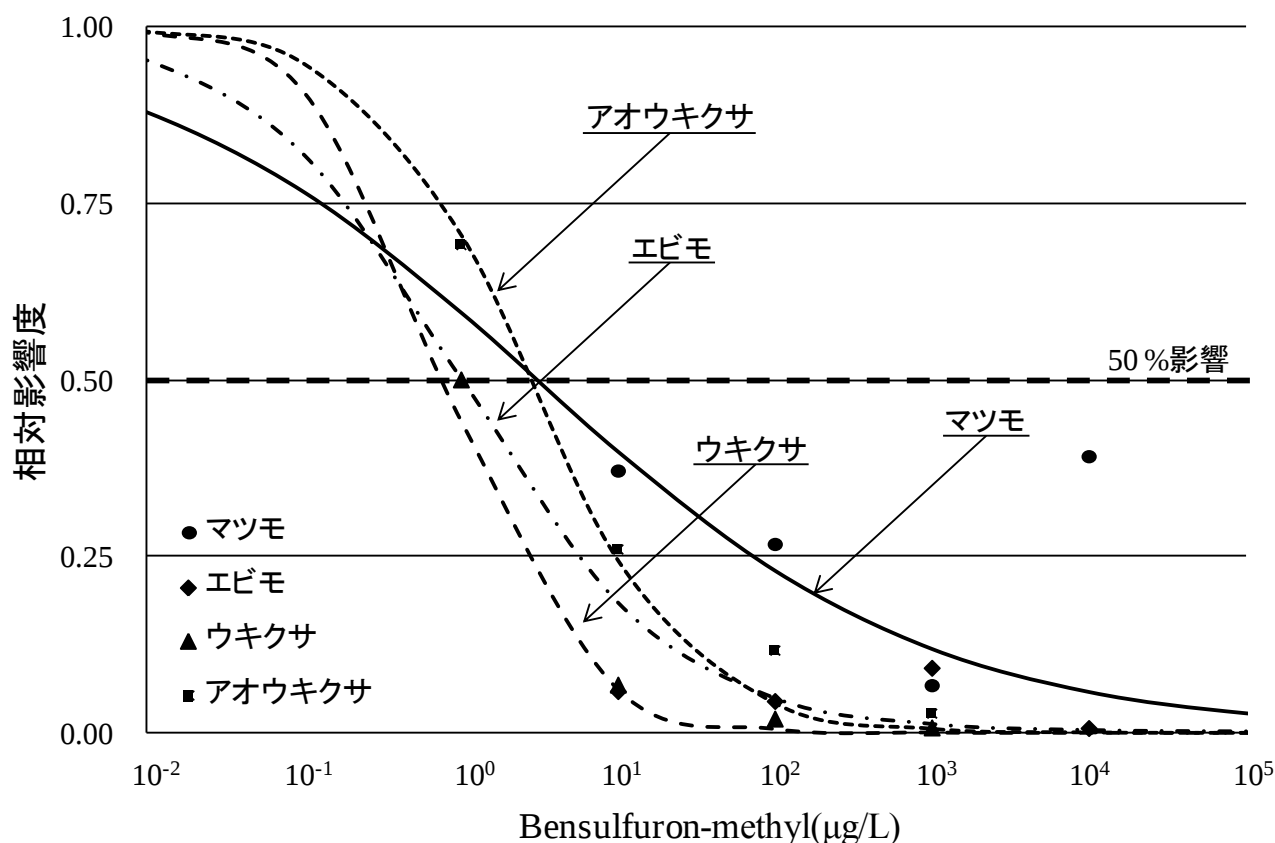


図-2 BSM 濃度と相対影響度

エビモは全長のRGRに関しては有意な傾向が見られなかったが、C/Pに関してはBSM濃度の増加により減少が見られ、40 %程度光合成活性が低下した。そのため、相対影響度による検討にはC/Pの値を用いた。本実験より求められたエビモのBSMに対するEC₅₀は1.0 µg/lであった。

ヤナギモについては、オオカナダモの場合と同様に全長のRGRとC/Pのどちらの項目においても有意な傾向を見出すことが出来なかった。そのため、相対影響度による検討からは除外した。

ウキクサでは、BSM濃度が1000 µg/lで対照と比較して94 %程度葉面積RGRの減少が見られた。C/Pに関しても同様に、BSM濃度の増加に伴い値が低下し、濃度100 µg/lで対照と比較して62 %程度減少した。相対影響度の検討では葉面積RGRの結果を用いた。本実験より求められたウキクサのBSMに対するEC₅₀は0.8 µg/lであった。

アオウキクサでは、ウキクサと近い傾向を示し、BSM濃度1000 µg/lで葉面積RGRは対照と比較して82 %程度減少し、C/Pは76 %程度減少した。相対影響度の検討ではRGRの結果を用いた。本実験より求められたアオウキクサのBSMに対するEC₅₀は2.7 µg/lであった。

(2) 相対影響度によるBSMの各水草に対する影響の比較

BSMに対して全長RGR、葉面積RGR、C/Pのいずれかで確かな影響の見られたマツモ、エビモ、ウキクサ、アオウキクサの4種に対して、相対影響度を計算してBSMに対する影響を比較した (図-2)。

マツモは4種の中で最も低濃度で影響を受ける種であるが、曲線の傾きが小さく、影響度が小さいことが分かる。BSM濃度1×10⁻¹ µg/l以下ではマツモは最もBSMの影響を受けるが、逆に高濃度の1×10¹ µg/l以上では他の3種と比較して影響は小さい。

ウキクサとアオウキクサでは用量反応曲線の傾きが大きく、ある濃度を超えると強い影響を受けることが分かる。どちらもBSM濃度1×10⁻¹ µg/l程度から影響が出始め、ウキクサでは1×10¹ µg/l程度、アオウキクサでは1×10² µg/l程度のBSM濃度になると生長はほぼ期待できない。

エビモはEC₅₀で見るとウキクサとほぼ同程度であることが分かる。しかし、影響が出始める濃度はマツモに次いで低く、1×10⁻² µg/l程度のBSM濃度で既に相対影響度が0.9程度となり、影響が出始めていることが分かる。

4. 考察

本研究ではマツモ (*Ceratophyllum demersum*) と外来種であるオオカナダモ (*Egeria densa*)、各地の湖沼や河川で減少を続けているヒルムシロ科ヒルムシロ属の水草からエビモ (*Potamogeton crispus*) とヤナギモ (*Potamogeton oxyphyllus*)、我が国の代表的な浮草であるウキクサ (*Spirodela polyrhiza*) とアオウキクサ (*Lemna aoukikusa*) の6種について実験を行った。

BSM を用いて行なわれた Pan ら⁶⁾の研究ではマツモ、ネジレモ (*Vallisneria natans*)、コカナダモ (*Elodea nuttallii*) のすべてにおいて、21 日間の培養によって BSM 濃度 0.5 µg/l で 50 % 以上の生長抑制効果が見られた。本研究で求められた EC₅₀ はアオウキクサの 0.8 µg/l から、マツモの 3.0 µg/l であり、本研究で得られた値は妥当性があるものと考えられる。

オオカナダモとヤナギモを除く 4 種に関しては、除草剤 BSM の濃度の上昇に伴い相対生長率やクロロフィル a 量が減少することがわかった。しかし、既往の研究⁴⁾において除草剤テルブチラジンをを用いた場合では、オオカナダモの生長が阻害されるとの報告がなされている。一方でエゾミクリ (*Sparganium erectum*) に関しては、影響が見られなかった。また、同研究において、コウキクサ (*Lemna minor*) に対して 2 種類の除草剤の影響を調べたところ、実験条件や種類が同じであっても、除草剤の種類の違いによって影響の出方に差が出るという結果が得られている。そのため、本研究においてオオカナダモとヤナギモでは除草剤 BSM の影響が見られないという結果が得られたため、これら 2 つの種は BSM の影響を受けづらい種であると考えられる。

実河川で行なわれた研究¹¹⁾によると、除草剤が流入し始める 5 月の初旬から、ウキクサの生長には著しい阻害が見られ、特にアオウキクサの生長に関してはほぼ完全に阻害されたとの報告がなされている。また、BSM の河川における最高検出濃度は 2.3 µg/l であったとの報告¹²⁾もある。この値は本研究によって得られたウキクサやコウキクサの EC₅₀ にも近い値であり、実環境中において、これらの水草が生長阻害を受けている可能性が考えられる。

一方で、実河川での農薬、除草剤の流出は、短期間で低濃度であるという報告もある¹¹⁾。しかし、EC₅₀ に満たなくても水草の生長は阻害される。さらに、水草の種類によって、影響の大きさは異なる。そのため、生態系内において、他の水草との競合が起これば、除草剤濃度が低濃度であっても、優占種の置き換わりが起こる可能性があり、注意が必要である。

5. 結論

本研究により得られた主な結論を以下に列挙する。

- ① 除草剤による毒性は、見た目には現れなくても光合成活性を低下させるなど、内部に影響を及ぼすことがある。
- ② 水草の種類ごとに除草剤が効いてくる濃度や、効き方に差がある。
- ③ 相対影響度を用いることで、複数の水草の影響の度合いを比べることができた。
- ④ 河川に流出した除草剤は、そこに生息する水草に対して、生長を阻害している可能性がある。

参考文献

- 1) 畠山成久編：化学物質の生態リスク評価と規制－農薬編－，pp.117-127, 2006.
- 2) 環境庁自然保護局：改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物レッドデータブック，Vol.8 植物 I, 2000.
- 3) 角野康郎，1-2-1 水草の減少・絶滅，pp.26-32, 2003.
- 4) Cedergreen, N., Spliid, N.H. and Streibig, J.C. : Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicide, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol.58, pp.314-323, 2004.
- 5) Van, T.K. and Vandiver, V.V.JR., : Response of Hydrilla to Various Concentrations and Exposures of Bensulfuron Methyl, *J. Aquat. Plant Manage.*, Vol.32, pp.7-11, 1994.
- 6) Pan, H., Li, X., Xu, X. and Gao, S. : Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria natans* and *Elodea nuttallii*, *Journal of Environmental Sciences*, Vol.21, pp.307-312, 2009.
- 7) ASTM, E1913-04, p.12.
- 8) <http://www.vector.co.jp/soft/dl/win95/edu/se033430.html>, (2011.09.10 閲覧)
- 9) 西條八束，三田村緒佐武：新編湖沼調査法，pp.191-192, 1995.
- 10) Seefeldt, S.S., Jensen, J.E. and Fuerst, E.P. : Log-Logistic Analysis of Herbicide Dose-Response Relationships, *Weed Technology*, Vol.9, pp.218-227, 1995.
- 11) Hatakeyama, S., Inoue, T., Suzuki, K., Sugiya, Y. and Kasuga, S. : Assessment of overall herbicide effects on growth of duckweed in a flowthrough aquarium carrying pesticide polluted river water, *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, Vol.2(1), pp.65-75, 1999.
- 12) Okamoto, Y., Fisher, R.L., Armbrust, K.L. and Peter, C.J. : Surface Water Monitoring Survey for Bensulfuron Methyl Applied in Paddy Fields, *J. Pesticide Sci.*, Vol.23, pp.235-240, 1998.