

マイクロコズムを活用した WET 試験法の開発—培地基質濃度の検討—

千葉工業大学 学員 ○土屋友美
 千葉工業大学 正員 村上和仁
 国際科学振興財団 稲森隆平
 国際科学振興財団 稲森悠平

1. 目的

現在日本では WET 試験の導入が検討されている。しかし、この試験方法は単一種に対する試験方法であるため生物間相互作用などは考慮されておらず、実際の生態系とは異なる結果になる可能性を否定できない。

そこで模擬生態系であるマイクロコズムを用いて WET 試験を行うことで、より現実的に影響を評価することが可能となると考えられる。本研究では、マイクロコズムを用いた WET 試験において排水と共に添加する培地のペプトン量について検討し、試験法の適正化を図ることを目的とした。

2. 方法

2.1 培養方法

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、低コストかつ再現が可能である。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 TP 培地 (Taub+ペプトン培地) 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。

本研究で用いたマイクロコズムは構成生物が既知であり、Gnotobiotic 型は、生産者として 2 種の緑藻類 *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 *Aeolosoma hemprichi*、分解者として 4 種の細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Coryneform bacteria* にて構成されている。

2.2 添加物質

本研究では、マイクロコズムに添加操作を行う 16 日目の培地中の TOC を参考に、ペプトン量が 0mg/l・5mg/l・10mg/l・20mg/l・40mg/l となるように調整した TP 培地を添加した。

2.3 添加方法

培養 16 日目に、マイクロコズムに対して調整した TP 培地を、WET 試験の最大設定濃度である 80%となるように設定し、添加を行った。

添加の際、マイクロコズムを遠沈管に移し 1,500rpm で 10 分間の遠心分離を行い、マイクロピペットを用いて上澄みを取り、生物量を調整した。

2.4 評価方法

個体数 (構造パラメータ) 及び DO (機能パラメータ) から評価を行った。個体数は光学顕微鏡を用いて、培養開始から 0、2、4、7、14、16、18、20、23、30 日目に同定、計測を行った。DO は培養 16 日目から 30 日目まで連続的に測定し、生産量 (P)、消費量 (R) から P/R 比を算出した。

2.5 統計処理手法

構造パラメータ及び機能パラメータにおいて、統計処理により影響の有無を判定した。本研究で用いたマイクロコズム (N-system) は 40 年以上に亘り継代培養しながら高い再現性と安定性を維持していることから、構造パラメータでは、16~30 日目の現存量比 (B_{16-30}) と 30 日目の個体数比 (N_{30}) の値が正規分布していると仮定した。機能パラメータでは、得られた DO の変動を x 成分 (回帰直線の傾き a) と y 成分 (振幅の変動係数 cv) に分け、それぞれの数値が正規分布していると仮定した。これらが平均値の $\pm 1\sigma$ 内に収まる確率は 68.26%であるため、 B_{16-30} 、 N_{30} 、a、cv が、それぞれの対照系値の $\pm 34.13\%$ に収まれば影響なし (対照系と等価) と評価した。

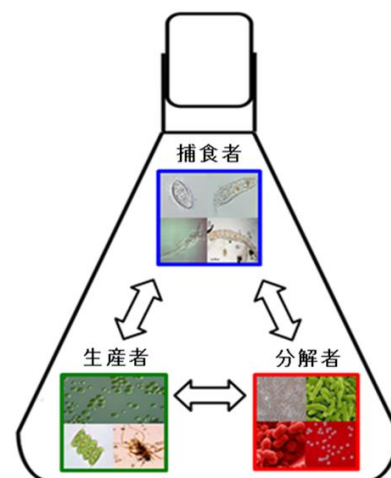


図 1 マイクロコズムの概念図

キーワード マイクロコズム, 全排水毒性 (WET) 試験, 培地基質濃度, ペプトン, 標準試験法

連絡先 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 千葉工業大学生命環境科学科 TEL : 047-478-0455 FAX : 047-478-0455

3. 結果および考察

3.1 個体数（構造パラメータ）による評価

10mg/l 培地添加系から、捕食者である動物プランクトン3種が増殖し、特に *Cyclidium glaucoma* は高い応答性を示した（図2）。動物プランクトンは有機物を栄養源としているため有機物であるペプトンを添加したことにより、個体数は増加したと考えられる。

統計処理の結果、5mg/l 培地添加系において、高い応答性を示した *Cyclidium glaucoma* が対照系値の±34.13%の範囲に収まった。このことから、構造パラメータによる評価では5mg/l 培地添加系が適当であると評価した。

3.2 DO、P/R 比（機能パラメータ）による評価

DOの振幅は培地中の基質濃度が高くなるにつれ

大きくなった。このことから、マイクロコズム内の活性は上昇していると考えられる（図3）。

P/R比は全ての添加濃度において1付近で安定していた。これは、植物プランクトン、動物プランクトン共に増殖したためマイクロコズム内の生態系機能のバランスが保たれた結果と考えられる。

統計処理の結果、5mg/l 培地添加系において a、cv の値共に対照系値の±34.13%の範囲に収まった。このことから、機能パラメータによる評価では5mg/l 培地添加系が適当であると評価した。

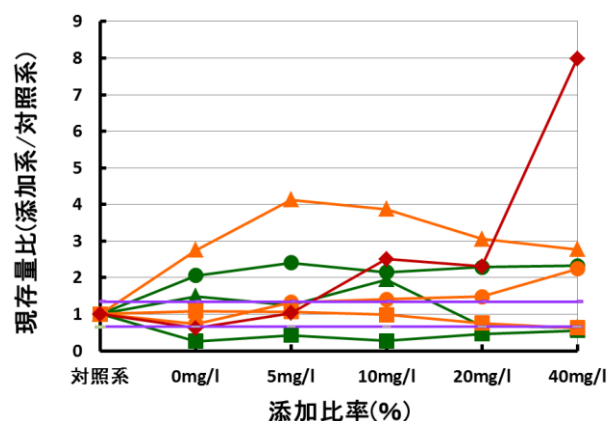


図2 各系における16～30日目の現存量比(B₁₆₋₃₀)

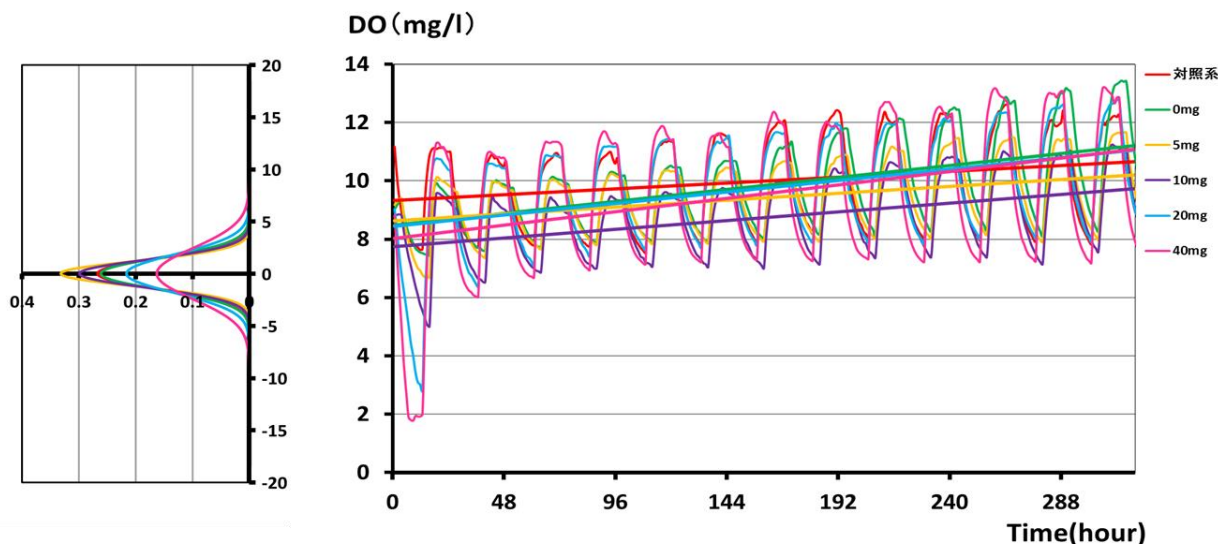


図3 各系におけるDO値の経日変化と正規分布

3.3 基質濃度影響評価

構造・機能パラメータからの評価より、統計処理において±1σの範囲に収まったのは5mg/lのペプトンを含むTP培地であった。これより、マイクロコズムを用いたWET試験において排水と共に添加する培地のペプトン量は5mg/lが適当であると考えられる。

4. まとめ

1) 構造パラメータにおいては、20mg/l・40mg/l 培地添加系において、動物プランクトン3種が増殖した。

統計処理の結果、5mg/l 培地添加系が適当であると評価した。

2) 機能パラメータにおいては、培地基質濃度が高くなるにつれ活性が上昇し、P/R比は安定していた。

統計処理の結果、5mg/l 培地添加系が適当であると評価した。

3) 構造・機能パラメータより、マイクロコズム WET 試験において、排水と共に添加する培地に含まれるペプトン量は5mg/lが適当であると評価された。

4) 今後、実際の排水を対象とした解析・評価を行い、マイクロコズム WET 試験法の実用性について検討する予定である。