

マイクロコズム WET 試験法および単一種試験による実排水の生態系影響評価の比較

千葉工業大学大学院 学員 ○土屋友美
千葉工業大学 正員 村上和仁

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であるため、実際の生態系とは異なる影響評価となる可能性を否定できない。そこで、生産者・捕食者・分解者を含む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、より現実的な影響評価が可能になると考えられる。先行研究ではマイクロコズム WET 試験法の開発や実排水を用いた検証を行った。そこで、本研究では、実排水を対象としてマイクロコズム WET 試験および従来の単一種試験との比較・検証を行うことで、エコシステムレベルでの毒性評価が可能なマイクロコズム WET 試験の有効性について検討した。

2. 方法

2.1 培養方法

2.1.1 マイクロコズム WET 試験

マイクロコズムとは制御された条件下培養を行うモデル微生物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、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 注ぎ、継代培養しているマイクロコズムの種 10ml を添加した後、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、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*、分解者として優占 4 種の細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Corynebacterium* sp. にて構成されている。また、高い再現性と系の安定性を特徴としている。

2.1.2 単一種試験

マイクロコズム構成種内の捕食者である *Philodina erythrophthalma* および生産者である *Chlorella* sp. に対して単一種試験を行った (図 2)。*Philodina erythrophthalma* は高い遊泳能力を有する濾過摂食者であり、成長速度は 0.28day^{-1} で細菌類や緑藻類を捕食している。温度 25℃、暗期 24hrs の条件下で 10 日間の培養後に添加を行い、顕微鏡を用いて 48 時間の個体数計測を行った。*Chlorella* sp. は緑藻類である、倍加時間 2~6 時間であり、培地内の有機物を栄養源としている。温度 25℃、照度 5000lux (明期 24hrs) の条件下で 2 日間培養後に添加し、顕微鏡を用いて個体数の計測を 96 時間行った。

2.2 添加方法

2.2.1 マイクロコズム WET 試験

本研究では、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 $0.45\mu\text{m}$ メンブレンフィルターを用いて大学構内の実験棟排水の処理施設からの処理水を採水し、処理水を吸引ろ過した後、マイクロコズムに対して排水が 5、10、20、40、80% となるように希釈し添加した (図 3)。添加の際、マイクロコズムを遠沈管に移し 1,500rpm で 5 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。

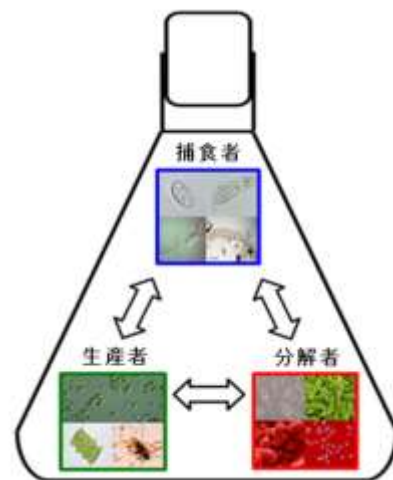


図 1 マイクロコズムの概念図

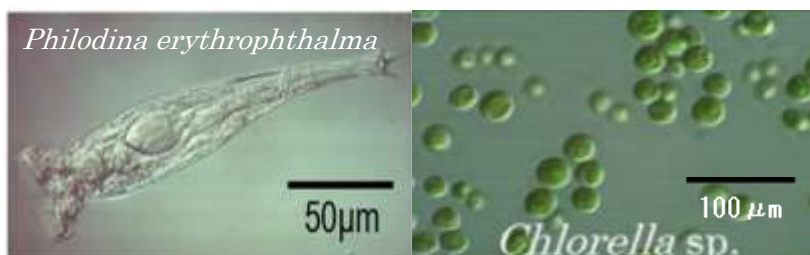


図 2 単一種試験の対象生物

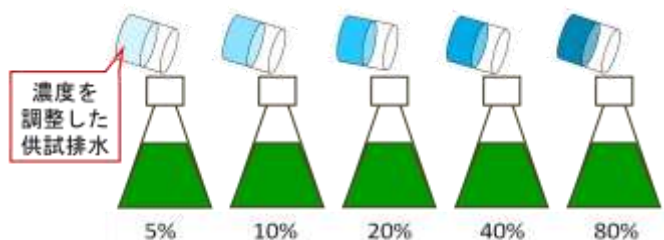


図 3 マイクロコズム WET 試験の概念図

キーワード：マイクロコズム WET 試験，単一種試験，標準試験法，枝分かれ型分散分析，実験棟排水

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

2.2.2 単一種試験

Philodina erythrophthalma を用いた単一種試験
実験棟からの処理排水を 5、10、20、40、80% となるようにリン酸緩衝液にて希釈し、単離培養している *Philodina erythrophthalma* の添加を行った。24 時間ごとに顕微鏡を用いて個体数の計数を行った。

Chlorella sp. を用いた単一種試験

実験棟からの処理排水を *Chlorella* sp. 培養培地を用いて濃度ごとに希釈を行った。希釈をした排水に単離培養している *Chlorella* sp. を 10mg/l を添加し、24 時間ごとに光学顕微鏡を用いて個体数を計測した。

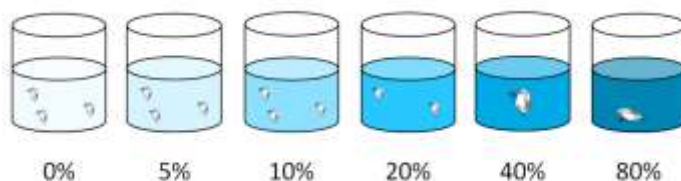


図4 従来の WET 試験（単一種試験）法の概念図

2.3 評価方法

2.3.1 マイクロコズム WET 試験

個体数（構造パラメータ）および 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）、呼吸量（R）から P/R 比を算出した。また機能パラメータの経時変化において、枝分かれ型分散分析を行った。枝分かれ型分散分析では各系の全ての値による分散分析である「群」と時間ごとの分散分析である「交互作用」の 2 項目から評価を行った。これらの結果による評価から最大無影響濃度（m-NOEC）を算出し、以下の式より毒性単位（TU）を算出した。

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

2.3.1 単一種試験

Philodina erythrophthalma を用いた単一種試験は、0% 添加系である対照系と比較し、成長阻害率を算出し評価の決定を行った。

Chlorella sp. を用いた単一種試験は、0% 添加系である対照系との比較および増殖阻害率を算出し、評価の決定を行った。

3. 結果および考察

3.1 添加排水の水質

大学構内の実験棟の排水処理施設からの処理水の、ろ過後の水質は、pH : 7.26、COD : 33.2mg/l、T-N : 8.4mg/l、T-P : 0.54mg/l、SS : 8.6mg/l であった。

3.2 マイクロコズム WET 試験による結果

構成生物の活性の変化により、大学構内の実験棟からの処理排水中には水溶性の残留性有害化学物質がむくまれている可能性が考えられた。

3.3 単一種試験による結果

急性毒性による評価ではマイクロコズムにて確認された結果と同程度の毒性が確認された。

3.4 総合評価

従来法である単一種試験での急性毒性による評価とマイクロコズム WET 試験の急性毒性による評価の比較においては差異がみられない。しかし、マイクロコズム WET 試験では慢性毒性の評価も含んでいることから、マイクロコズム WET 試験は有効であると検討することができた。今後、マイクロコズム WET 試験を含む排水管理システムの構築に向けて、試験実排水によるデータの集積および標準化を行う必要がある（図 5）。

4. まとめ

- 1) マイクロコズム WET 試験では、生物の活性の変化より、水溶性の残留有害物質が存在していることが考えられた。
- 2) マイクロコズム構成生物による単一種試験ではマイクロコズム試験の急性毒性と同程度の毒性が確認された。
- 3) マイクロコズム WET 試験の有効性について検証を行うことができた。今後、実排水を用いた検証を重ねることで、データの蓄積およびマイクロコズム WET 試験の有効性の検討を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) 土屋友美、村上和仁：マイクロコズムを活用したエコシステムレベルでの全排水毒性試験法の開発と検証、環境情報科学学術研究論文集、33 巻、pp31-36 (2019.12)
- 2) Inamori, Y. ed: Microcosm Manual for Environmental Impact Risk Assessment: From Chemicals to Whole Effluent Toxicity (WET), Springer, New York (2019)

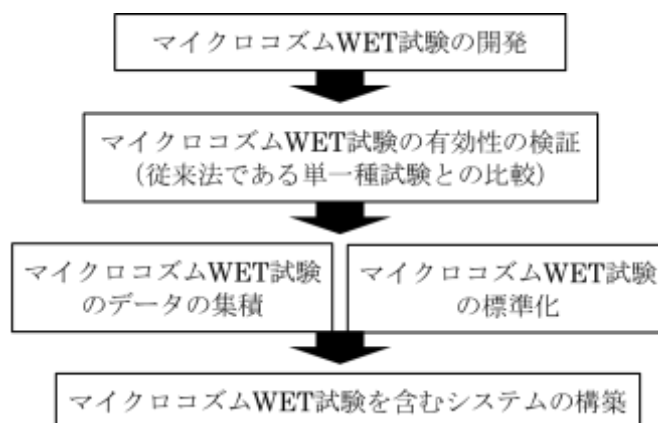


図5 マイクロコズム WET 試験の標準化に向けて