

銀イオン・銀ナノ粒子のマイクロコズム試験および マイクロコズム構成種(後生動物輪虫類)による単一種試験

千葉工業大学大学院 生命環境科学専攻 学員 ○清水達也
千葉工業大学 生命科学科 正員 村上和仁

1. 目的

金属は水圏生態系において深刻な毒性を示すことが知られているが、その生態リスクについては十分な知見が得られていない。近年、抗菌剤・殺菌剤として広く利用されるようになった銀イオン・銀ナノ粒子であるが、日本では十分な規制がされておらず、使用後に排水・河川水を通じて水圏生態系に及ぼす影響については情報がほとんど得られていない。本研究では、銀イオン・銀ナノ粒子が生態系に与える影響について、標準モデルエコシステムであるマイクロコズムとマイクロコズム構成種の動物プランクトン(輪虫類)を用いた単一種試験により比較・解析することを目的とした。

2. 方法

2.1 供試マイクロコズム

分解者として4種の優占細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*coryneform bacteria*、生産者として2種の緑藻類 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus* sp.、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* の組み合わせからなる Gnotobiotic 型マイクロコズム (N-system) を用いた。なお、このマイクロコズム (N-system) は高い安定性と再現性を有することを特徴とするモデル微生物生態系である。

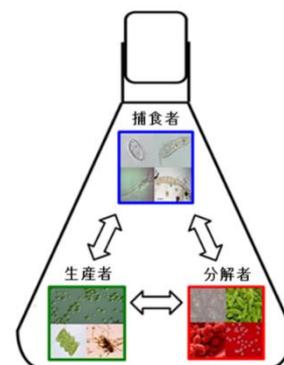


図1 マイクロコズム(イメージ)

2.2 培養方法及び測定項目

マイクロコズムの培養は、ポリペプトン濃度を 100mg/l となるよう調整した TP 培地 200ml を 300ml 容三角フラスコに入れ、継代培養しているマイクロコズムを種として 10ml 接種した後、25°C、2,400lux (明 12hr / 暗 12hr)、静置条件とした。マイクロコズム内の DO 変化 (機能パラメータ) を DO メーターにより継続的に連続測定し、P (生産量)、R (呼吸量) および P/R 比について枝分かれ型分散分析により検定を行った。同時に、培養開始後、0、2、4、7、14、16、18、20、23、30 日目にマイクロコズムからサンプリングしたプランクトンを、計数板および界線スライドグラスを用いて光学顕微鏡下で計数し、プランクトン個体数変遷 (構造パラメータ) を観察した。

動物プランクトンの培養は、TP 培地 200ml と米を 300ml 容三角フラスコに入れ、単離培養している *Philodina erythrophthalma* を接種した後、25°C、暗所で静置条件とした。培養開始後、界線スライドグラスを用いて光学顕微鏡下で計数し、個体数を測定した。

2.3 添加金属

銀イオン (Ag^+ 、日本イオン株式会社製銀イオン濃縮)、銀ナノ粒子 (AgNP、日本イオン株式会社製ナノシルバー分散液) を添加して負荷を与えた。銀イオン・銀ナノ粒子濃度は段階的に設定し、マイクロコズム試験では培養開始 16 日目の安定期に添加した。

単一種試験ではマイクロコズム構成種の後生動物輪虫類 *Philodina erythrophthalma* を接種後、添加した。

キーワード：マイクロコズム 銀イオン 銀ナノ粒子 m-NOEC 単一種試験

〒275-8588 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

2.4 評価手法

マイクロコズム試験では、試験に供する各マイクロコズムのフラスコ間差を、定数ではなく確率的に変動する量、すなわち確率変数と想定された枝分かれ型分散分析を用いて、P、Rの統計解析を行うこととしている。機能・構造パラメータの経時変化において、影響を及ぼさなかった濃度のうち最も高い濃度を最大無影響濃度（m-NOEC）とした。マイクロコズム構成種を用いた単一種試験では、銀イオン・銀ナノ粒子添加後2週間の個体数の比増殖速度を測定、50%増殖阻害濃度（EC50）を算出した。

3. 結果および考察

3.1 マイクロコズム試験のプランクトン個体数変遷（構造パラメータ）による評価

銀イオン添加系の個体数の変遷より、添加濃度 0.10mg/l 以上において *Aeolosoma hemprichi* が、10mg/l 以上において *Cyclidium glaucoma* が死滅した。このことから構造パラメータによる評価からは添加濃度 0.10mg/l 以上において影響ありと評価された。銀ナノ粒子添加系の個体数の変遷より、添加濃度 0.05mg/l 以上において *Cyclidium glaucoma* が、0.1mg/l 以上において *Aeolosoma hemprichi* が死滅した。

3.2 マイクロコズム試験の枝分かれ型分散分析（機能パラメータ）による評価

P、R、P/R 比（機能パラメータ）について枝分かれ型分散分析にて検定したところ、銀イオン添加系では 0.01mg/l において影響なし、0.02mg/l 以上において影響ありと評価された。銀ナノ粒子添加系では 0.02mg/l において影響なし、0.03mg/l 以上において影響ありと評価された。

3.3 マイクロコズム試験による生態系リスク影響評価

構造・機能パラメータからの評価より、銀イオンのマイクロコズム内の最大無影響濃度（m-NOEC）は 0.01mg/l と評価された。銀ナノ粒子の最大無影響濃度（m-NOEC）は 0.02mg/l と評価された。

3.4 単一種試験による生態系リスク影響評価

銀イオン・銀ナノ粒子添加24時間後の *Philodina erythropthalma* の個体数を測定した結果、1mg/l 添加系において影響なしと評価された。*Philodina erythropthalma* は、銀ナノ粒子のマイクロコズム試験の結果において添加後の個体数の減少がほとんどみられず、銀イオン・銀ナノ粒子に対して影響が小さいと考えられる。そのため単一種試験（急性影響）においてマイクロコズム試験より影響が小さく現れたものと考えられた。

4. まとめ

- 1) 構造パラメータにおいては、銀イオン添加系では *Aeolosoma hemprich* の死滅がみられた添加濃度 0.10mg/l 以上において影響ありと評価された。銀ナノ粒子添加系では *Cyclidium glaucoma* の死滅がみられた添加濃度 0.05mg/l 以上において影響ありと評価された。
- 2) 機能パラメータにおいては、呼吸、消費、P/R 比の枝分かれ型分散分析を行ったところ、銀イオンは 0.02mg/l 以上で影響ありと評価された。銀ナノ粒子で 0.03mg/l 以上は影響ありと評価された。
- 3) 構造・機能パラメータより、銀イオンの最大無影響濃度（m-NOEC）は 0.01mg/l と評価された。銀ナノ粒子の最大無影響濃度（m-NOEC）は 0.02mg/l と評価された。
- 4) 急性影響では後生動物輪虫類に対して影響が小さい傾向がみられたが、引き続き慢性毒性について評価を行いマイクロコズム試験と比較・解析し、マイクロコズム試験の有用性を検証する。

参考文献

- 1) 畑本一気ら：マイクロコズム試験による銀ナノ粒子の生態系影響解析 第45回土木学会関東支部技術研究発表会（2018）
- 2) 清水達也ら：銀イオン・銀ナノ粒子のマイクロコズムおよび藻類単一種試験の比較解析 日本水処理生物学会第56回大会（2019）
- 3) Inamori, Y. ed: Microcosm Manual for Environmental Impact Risk Assessment: From Chemicals to Whole Effluent Toxicity (WET), Springer, New York (2019)

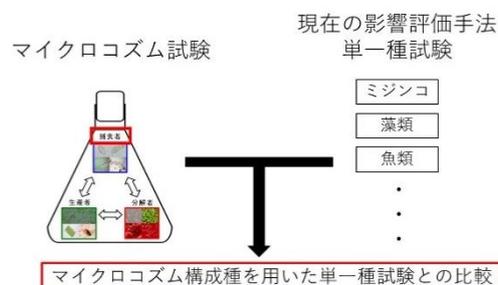


図2 マイクロコズム構成種を用いた単一種試験の概念図