

マイクロコズム WET 試験によるアオコ発生表層水の環境毒性評価

千葉工業大学 生命科学科 学員 ○飯田龍介
 千葉工業大学 生命科学科 正員 村上和仁
 NPO バイオエコ技術研究所 稲森隆平
 NPO バイオエコ技術研究所 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する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°C、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 種の原生動物絨毛虫類 *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 種の優占細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Coryneform bacteria* にて構成されている。

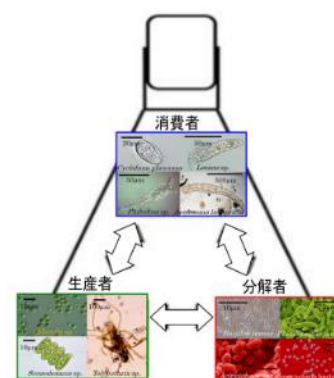


図1 マイクロコズムの概念図



図2 アオコ発生表層水の様子

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°C、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 添加物質

2022 年 10 月に印旛沼白井観測所でアオコ発生表層水を採水し夾雑物を取り除くために濾過を行い作成した。

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、底質溶出水の希釈倍率である毒性単位 (TU) を以下の式より算出した。

表1 アオコ表層水の水质

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

毒性単位 (TU) = 100 / m-NOEC (=希釈倍率)

なお、先行研究より m-NOEC をアセスメント係数 200 で除することで、実際の生態系を保護可能であることが示されている。

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 *Chlorella*, *Scenedesmus* (生産者) の個体数が低下した (図 3)。このことから、アオコの代謝産物によるアレロパシー作用がマイクロコズム内の生産者である植物プランクトンに影響を及ぼしていると考えられた。

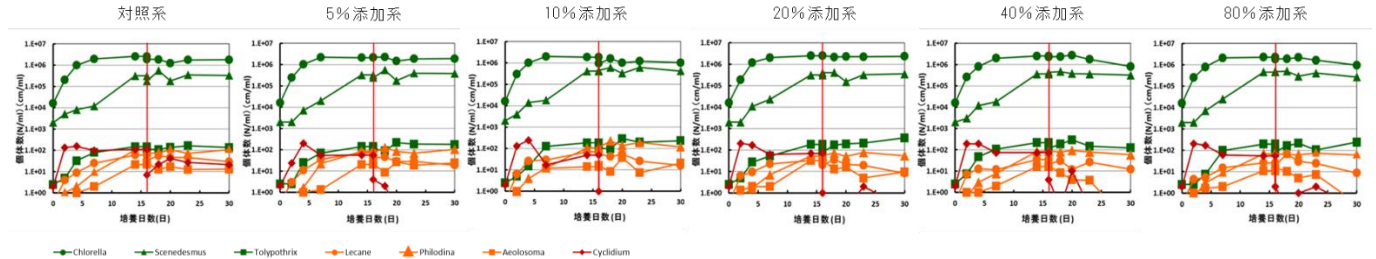


図 3 各添加系の微生物個体数(構造パラメータ)の経時変化

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 (図 4)。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。対照系と比較して 10%以上の添加系で波形が大きく乱れたため、生態系としての機能は安定していないと考えられた (図 5)。

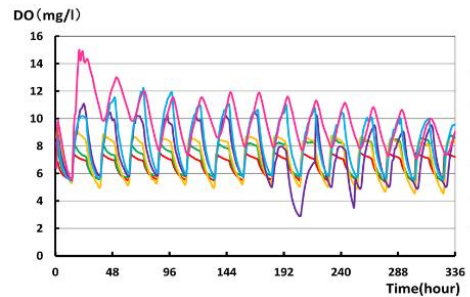


図 4 各添加濃度における DO の経時変化

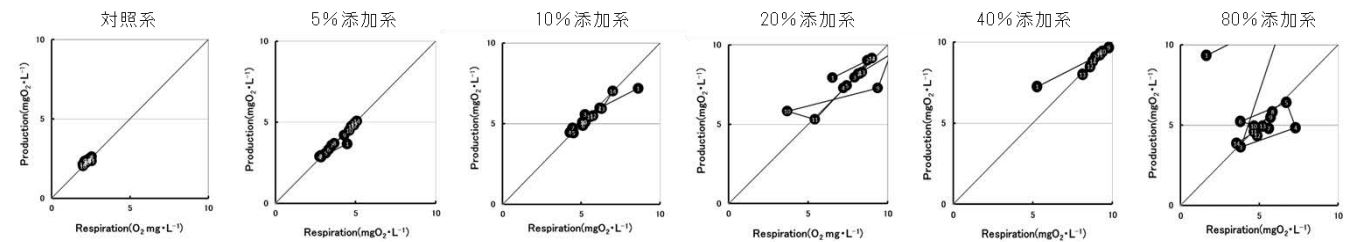


図 5 各添加系の P/R 比(機能パラメータ)

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、すべての添加濃度で影響ありと評価された。そのためアオコ発生表層水の m-NOEC は 2.5%未満と評価された (表 2)。

4. まとめ

- 1) 構造パラメータ (個体数) からの解析では、5%から 80% の添加系では *Cyclidium* 個体数が低下した。40%以上では、*Chlorella*, *Scenedesmus* (生産者) の個体数が減少した。このことからアオコの代謝産物によるアレロパシー作用の影響の可能性が示唆された。
- 2) 機能パラメータ (DO、P/R 比) からの解析では、対照系では P/R 比は 1 付近で安定していたが、添加濃度が高くなるほど DO の振幅に変化が生じた。
- 3) 枝分かれ型分散分析により有意差検定を行い影響の有無を判定した結果 m-NOEC は 2.5%未満、TU から 40 倍以上の希釈が必要と評価され、アオコ発生表層水は水圏生態系に影響を及ぼしていると考えられた。

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)

表 2 アオコ表層水の枝分かれ型分散分析

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