

腐敗アオサ溶出液および腐敗底泥間隙水のマイクロコズム WET 試験法による環境毒性評価

千葉工業大学大学院 先進工学研究科 学員 ○佐藤颯介
 千葉工業大学 先進工学部生命科学科 正員 村上和仁
 NPO 法人バイオエコ技術研究所 稲森隆平
 NPO 法人バイオエコ技術研究所 稲森悠平

1. 目的

千葉県習志野市に位置するラムサール条約登録湿地である谷津干潟では、夏季に異常繁茂したアオサ (*Ulva* spp.) が腐敗することで底泥が嫌気化し、干潟生態系を支える重要な生物であるマクロベントスに影響を及ぼしている。しかし、腐敗アオサおよび腐敗底泥からの溶出水が生態系機能に及ぼす具体的な影響は未知数である。そこで本研究では模擬生態系であるマイクロコズムを用いた WET 試験により腐敗アオサ溶出水および腐敗底泥間隙水の生態系影響および環境毒性についてエコシステムレベルで評価解析す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℃、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 種の優占細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、*Coryneform bacteria* にて構成されている。

2.2 腐敗アオサ溶出水・谷津干潟底泥間隙水

谷津干潟に繁茂したアオサ (図2) およびアオサが腐敗して嫌気化した谷津干潟の表層泥 (図3) を採取して試料とし、試験原液を作成した。腐敗アオサ溶出水は、アオサを純水で洗浄したのち湿重量を計測 (292g) し、水槽に移して TP₂ 培地 2000ml を加えて 30℃ で 7 日間放置し腐敗させ、固形物を除去して試験原液とした。谷津干潟底泥間隙水は環境省：底質調査方法に準じ、試験原液を作成した。供試底泥を 2mm 目のふるいに通し、溶媒 (TP₂ 培地) との比率を 1:10 とし、毎分約 200 回転で 6 時間攪拌した後 30 分静置し抜き取った上澄み液を、さらに 24 時間静置して懸濁物沈降させ、試験原液とした。

2.3 添加方法

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 0.45μm メンブレンフィルターを用いて谷津干潟底泥溶出水を吸引ろ過した後、マイクロコズムに対して試験原液が 5、10、20、40、80% となるように TP₂ 培地で希釈し添加した (図4)。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、上澄みを除去し、生物量を調整した。

2.4 評価方法

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

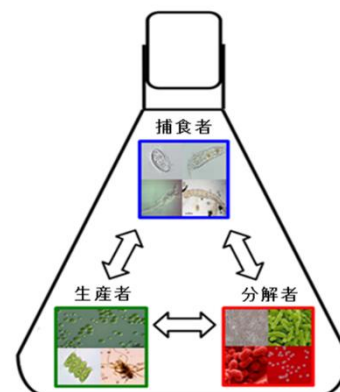


図1 マイクロコズムの概念図



図2 供試アオサ



図3 供試谷津干潟底泥

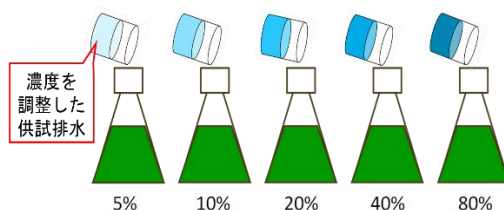


図4 マイクロコズム WET 試験の概念図

キーワード：マイクロコズム WET 試験 生態系影響評価 腐敗アオサ溶出液 腐敗底泥間隙水 m-NOEC TU

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

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。

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

3. 結果および考察

3.1 機能パラメータ (P/R 比、枝分かれ型分散分析) による評価

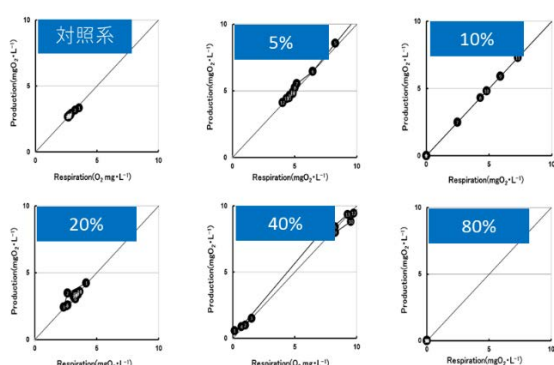


図5 腐敗アオサ溶出水添加系のP/R比経時変

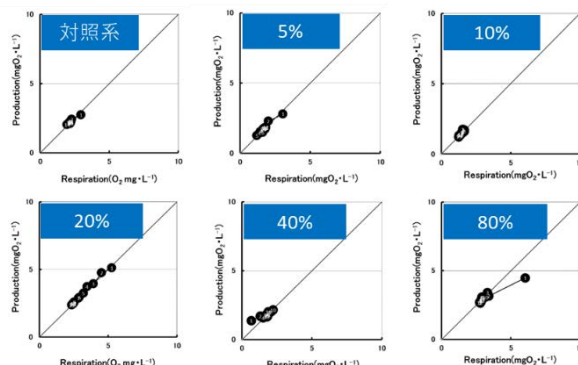


図6 腐敗底泥間隙水添加系のP/R比経時変化

P/R比は全ての添加濃度において1付近で安定しており (図5・図6)、これは植物プランクトン、動物プランクトンのいずれも活性が低下したためマイクロコズム内のP/R比のバランスが保たれたと考えられた。また、機能パラメータにおいて、P/R比・呼吸量・生産量について枝分かれ型分散分析による検定から影響の有無を判定した結果、両試験原液のm-NOECは2.5%未満、TUは40以上と推測された。

3.2 構造パラメータ (個体数) による評価

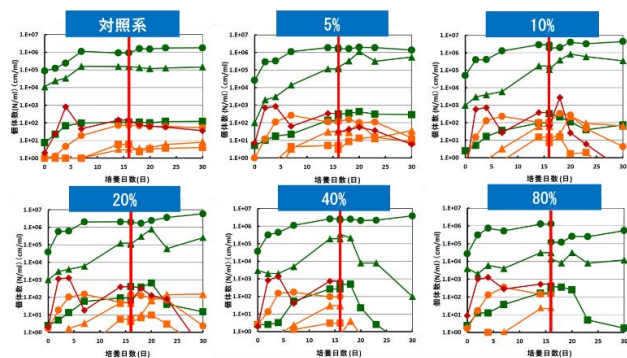


図7 腐敗アオサ溶出水添加系の個体数経時変化

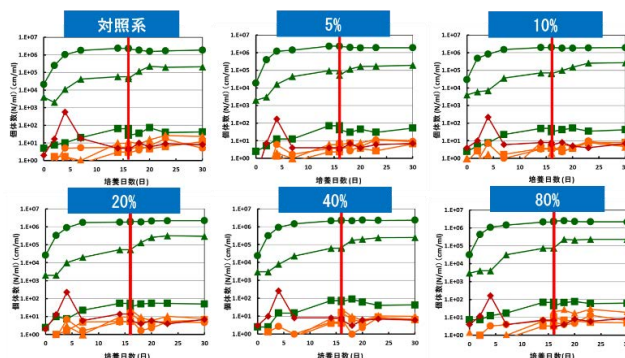


図8 腐敗底泥間隙水添加系の個体数経時変化

腐敗アオサ溶出水添加系 (図7) において、10、20%添加系で捕食者となる動物プランクトンが減少した。40、80%添加系では一部動物プランクトンに死滅がみられた。また、40、80%添加系において生産者となる植物プランクトンの一部に減少傾向がみられた。腐敗底泥間隙水添加系 (図8) においては20、40、80%添加系において添加直後に減少がみられたが、時間経過に伴い回復しているのを確認した。植物プランクトンにおいては有意な増減は確認されなかった。

4. まとめ

- 1) 機能パラメータにおいては、すべての添加系においてP/R比は安定していたが、系の活性に影響が生じた。
- 2) 構造パラメータにおいては、腐敗アオサ溶出水の高濃度添加系においてプランクトンの死滅または減少が確認され、マイクロコズム内の生態系は維持されていないと評価された。
- 3) マイクロコズムWET試験の結果、腐敗アオサ溶出水および腐敗底泥間隙水のm-NOECはともに2.5%未満、TUから40倍以上の希釈が必要と評価され、干潟生態系の基盤を構築する微生物生態系に大きな影響を及ぼしているものと考えられた。
- 4) 底泥の吸着機能により毒性の低減がなされている可能性が考えられる一方、異なる毒性物質が底泥から溶出している可能性を考慮する必要がある。
- 5) 今後、底質改善材等を用いた干潟生態系の改善効果の検討を進める予定である。

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、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)

付記：本研究の一部は鐵鋼スラグ協会からの受託研究として実施したものである。