

ノリ殻胞子を用いた生物検定法における培養条件が有害物質の毒性評価に及ぼす影響

大分工業高等専門学校 学生会員○亀井靖 正会員 高見徹

中園雅彦 衛藤誠士郎

1. はじめに

海藻はわが国の重要な水産資源であるだけでなく、沿岸域の主要な一次生産者であり、多様な生物を涵養する海藻群落を形成することから、保全すべき重要な生物である。しかし、海藻の生育に対する各種有害物質の影響に関する知見は極めて少なく、知見の集積が必要である。海藻は固着性生物であるため、排水や有害物質の影響を長期間連続的に受けることから、微量有害物質の長期間暴露による影響が危惧される。また他方で、藻類に対する有害物質の毒性は、栄養塩濃度の上昇に伴って緩和されることが知られている。

そこで本研究では、産業上の有用海藻である海苔(ノリ)の殻胞子を用いた生物検定によって、代表的な有害物質として、重金属である銅(Cu)、カドミウム(Cd)、および亜鉛(Zn)の毒性を評価するとともに、生物検定での培養条件(有害物質の暴露時間と試験培地中の栄養塩濃度)が重金属(Cu)の毒性評価に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 供試体

殻胞子は、大分高専土木工学科の実験室内で保存培養しているスサビノリ(*Porphyra yezoensis* Ueda U-511株)の糸状体から放出させたものを用いた。生物検定では、約100個体の殻胞子をカバーガラス(武藤化学社製、10mm×10mm)に着生させたものを供試体とした。

2.2 重金属の短期間・長期間暴露試験

暴露時間が有害物質の毒性評価に及ぼす影響を検討するため、重金属の短期間(4日間)および長期間(20日間)暴露試験を行った。重金属として、硫酸銅(CuSO_4)塩化カドミウム(CdCl_2)および硫酸亜鉛(ZnSO_4)を用いた。試験培地は、1/20PES培地(Provasoli's Enriched Seawater(標準PES培地)の栄養塩濃度が1/20濃度のもの)に所定の濃度(8濃度区, $n=3$)になるようにCu, Cd, またはZnを添加して作成した。試験培地を注入したマイクロプレート(Corning社製, 24ウェル)に供試体を暴露した。短期間試験では、暴露から4日後にカバーガラス上を顕鏡して殻胞子の発芽率を測定した。長期間試験では、試験培地を2日毎に換水しながら暴露から20日後に発芽体・幼葉の葉面積(長さ×幅, 図1)を測定した。それぞれの測定結果から50%影響濃度(50%

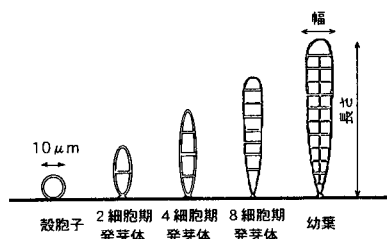


図1 スサビノリ殻胞子の発芽・生長過程

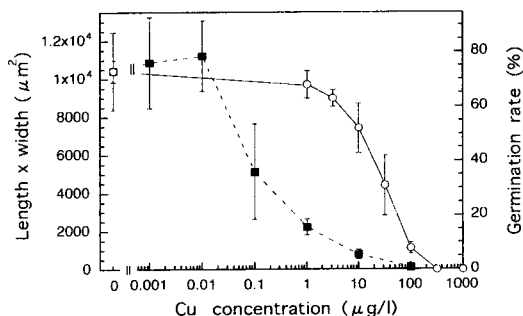


図2 Cu濃度と4日後発芽率および20日後葉面積の関係

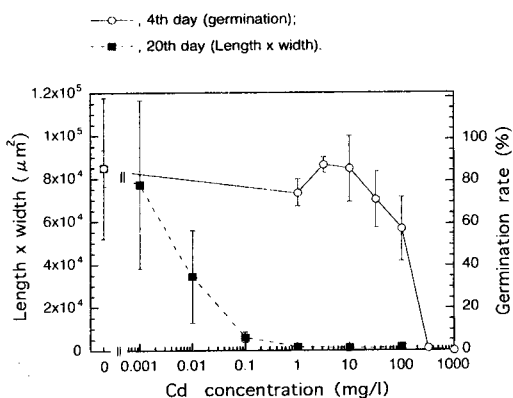


図3 Cd濃度と4日後発芽率および20日後葉面積の関係

of Effective Concentration: EC_{50}) を見積もった。

2.3 異なる栄養塩濃度でのCuの毒性評価

試験培地中の栄養塩濃度が有害物質の毒性評価に及ぼす影響を検討するため、試験培地中の栄養塩濃度をOPES培地（つまり栄養塩が無添加の海水）、1/20PES培地および標準PES培地に調整して、Cuの短期間（4日間）試験を行った。影響の判定指標は暴露から4日後の殻胞子の生残率、発芽率および生長率とした。なお、標準PES培地および1/20PES培地の窒素（N）とリン（P）濃度は、それぞれ9mg N/lと1.1mg P/lおよび0.45mg N/lと0.06mg P/lである。

3. 結果と考察

3.1 重金属の長期間暴露による影響濃度の低下

Cu, Cd, およびZnの短期間および長期間試験の結果を図2, 3, 4に示す。殻胞子の発芽率に対するCu, CdおよびZnの4日間暴露後の EC_{50} （4-d EC_{50} ）は、それぞれ23 μ g/l, 136mg/l, および19mg/lとなり、短期間暴露における3種の重金属の毒性の強さはCu > Zn > Cdの順になった。また、発芽体・幼葉の葉面積（長さ×幅）に対する20日間暴露後の EC_{50} （20-d EC_{50} ）においても、CuはCdおよびZnと比較して極めて低い値（0.1 μ g/l）となった。しかし、CdとZnは、20-d EC_{50} がそれぞれ0.006mg/lと0.04mg/lとなり、長期間暴露においては毒性の強さが逆転した。Cu, CdおよびZnの急性/慢性比（4-d EC_{50} /20-d EC_{50} とする）は、それぞれ230, 23000および480となった。このことから、3種の重金属の中で、Cdは長期間暴露によって EC_{50} が著しく低下することがわかった。

3.2 栄養塩濃度がCuの毒性評価に及ぼす影響

OPES培地と1/20PES培地によるCuの短期間試験の結果を図5に示す。殻胞子の生残率と発芽率は、OPES培地と1/20PES培地ともに対照区（0 mg/l）を含むすべてのCu濃度区において同様の値を示した。これに対して、発芽体の生長率は1/20PES培地で高く、OPES培地で低い値となった。しかしながら、OPES培地と1/20PES培地における生長率に対するCuの4-d EC_{50} は、それぞれ0.02mg/lと0.03mg/lが得られ、影響濃度のばらつきを考慮すると、両者はほぼ同等の値とみなされた。また、標準PES培地と1/20PES培地によるCuの短期間試験においても、栄養塩濃度の高い標準PES培地の生長率の方が1/20PES培地と比較して高い値となったが、両培地における生長率に対する4-d EC_{50} はほぼ同じ値（0.03mg/l）が得られた。

4. まとめ

本研究の結果、以下の知見を得た。（1）Cuは、CdおよびZnと比較して、スサビノリ殻胞子とその発芽体・幼葉の生育に対して極めて強い毒性を示す。（2）Cu, CdおよびZnは、長期間暴露することによって影響濃度が著しく低下する。特に、Cdはその低下量が極めて大きく、急性/慢性比（4-d EC_{50} /20-d EC_{50} ）は23000が得られた。（3）殻胞子の生残率と発芽率による毒性評価は栄養塩濃度の影響を受けない。また、発芽体の生長率は栄養塩濃度の上昇に伴って高くなるが、Cuの4-d EC_{50} に有意差は認められなかった。

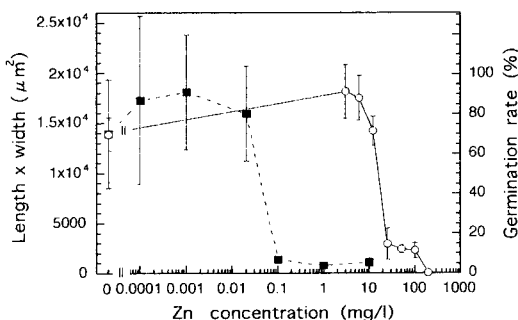


図4 Zn濃度と4日後発芽率および20日後葉面積の関係

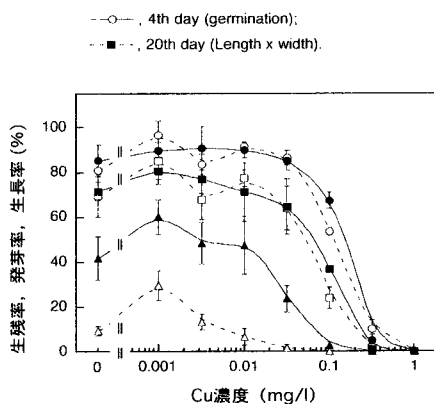


図5 OPES培地と1/20PES培地におけるCuの影響