

海藻（海苔）を供試生物とした有害物質の生物検定法の開発

大分工業高等専門学校 正会員 高見 徹

1. はじめに

近年、排水中に含まれる有害物質または排水そのものの毒性を定量的に評価するため、各種の水生生物を用いた生物検定法が開発されている。しかし、各種生物検定法の中で海産生物を用いた試験法は少なく、さらに沿岸域の主要な一次生産者である海藻を供試生物とした試験法は極めて少ない。海藻は多様な生物の生息場となる海藻群落を形成する。また、海藻は固着性生物であるため、排水の影響を長期間連続的に受けやすい。これらの点から、海藻は生物検定の供試生物として欠くことのできない生物の一つであると考えられる。

そこで本研究では、わが国の産業上の重要種である海苔（スサビノリ、図1）の殻胞子を供試生物とした生物検定法を確立することを目的として、（1）殻胞子を適時必要数入手できる糸状体の培養条件、（2）有害物質の影響を明確に評価するための暴露時間と判定指標について検討した。

2. 実験方法

2.1 殻胞子入手のための糸状体の培養条件の検討

殻胞子を適時必要数入手できる糸状体の培養条件を明らかにするため、糸状体からの殻胞子放出数の経日変化を求めた。実験にはスサビノリ（*Porphyra yezoensis* Ueda U-511 株）のフリー糸状体と貝殻糸状体を用いた。短日高温条件（10hL:14hD, 23℃）で成熟したフリー糸状体（湿重量約0.3g）または貝殻糸状体（表面積約50cm²）を200mlまたは300mlの1/20PES培地に入れ、短日低温条件（10hL:14hD, 15℃）で通気培養した。1日毎に新たに準備した培地に糸状体を移し換え、取り替えられた培地を検鏡して、培地中の殻胞子密度（細胞/ml）を求めた。

2.2 暴露時間と判定指標の検討

有害物質の影響が短期間に明確に現れる適切な暴露時間と影響の判定指標を検討するため、標準有害物質として重金属の銅（Cu、硫酸塩）を用いて、120時間（5日間）の暴露試験を行った。試験培地（塩分30）は、1/20PES培地をベースとして、Cu濃度0~1mg/lの範囲で10濃度区（n=3）になるように調整した。この試験培地に予め準備した供試体（カバーガラスに着生させた約100細胞の殻胞子）を暴露した。暴露から24時間毎に倒立顕微鏡を用いてカバーガラス上を検鏡して影響を判定した。影響の判定指標は、殻胞子の生残率、発芽率、および細胞分裂速度（生長率）とし、それぞれの判定指標について24時間毎の最小影響濃度（Lowest-Observed-Effect Concentration, LOEC）を求めた。以上の試験を5回繰り返し、それぞれの濃度・反応関係の経時変化と所定の暴露時間におけるLOECから適切な暴露時間と判定指標を決定した。

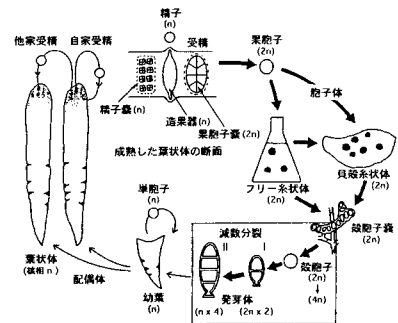


図1 スサビノリ（*Porphyra yezoensis*）の生活環

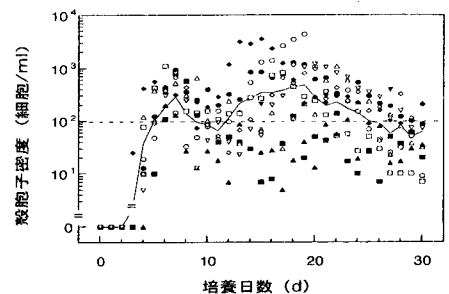


図2 フリー糸状体からの殻胞子放出数の経日変化（実線は10回の繰り返し実験の平均値を示す）

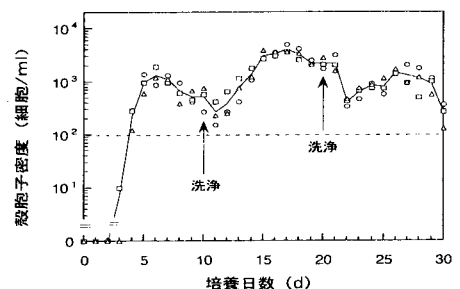


図3 貝殻糸状体からの殻胞子放出数の経日変化（実線は3回の繰り返し実験の平均値を示す）

3. 結果と考察

3.1 殻胞子入手のための糸状体の培養条件

フリー糸状体を短日低温条件で30日間培養した結果、殻胞子の放出はフリー糸状体の培養条件を短日高温から短日低温に移行させてから約4日後に始まり、7日後には約100細胞/ml以上の殻胞子を放出することがわかった。さらに、その放出は30日後まで続くことがわかった。(図2)。生物検定には試験の操作上約100細胞/ml以上の殻胞子懸濁液が必要なことから、フリー糸状体を短日低温条件で培養を始めてから7日以降に殻胞子懸濁液を採取すれば、適時確実に生物検定を開始できることが明かとなった。また、貝殻糸状体では、培養10日毎に貝殻表面に生長した糸状体をブラシで洗い落とす(洗浄する)ことで、フリー糸状体よりも安定して約100細胞/ml以上の殻胞子を手取できることがわかった(図3)。

3.2 適切な暴露時間と判定指標

殻胞子の生残率はCu濃度0.03~0.05mg/l以上において時間の経過とともに低下し、96時間以降はほぼ一定となった(図4)。さらに、5回の繰り返し試験の結果、生残率、発芽率、および生長率のすべての判定指標において、暴露から96時間後のLOEC(96-h LOEC)の値が最も小さい値となった(表1)。生残率、発芽率、および生長率に対する96h-LOECは、それぞれ $0.046 \pm 0.026\text{mg/l}$ ($n=5$)、 $0.033 \pm 0.027\text{mg/l}$ ($n=5$)、および $0.021 \pm 0.019\text{mg/l}$ ($n=5$) が得られ、発芽率と生長率に対する96-h LOECは生残率と比較して小さい値となることがわかった。以上の結果から、Cuの毒性を評価する場合には、暴露から96時間後に影響を判定するのが最適であること、発芽率と生長率による判定は生残率と比較して影響の検出感度が高いことが明かとなった。

4. まとめ

本研究の結果、以下の知見を得た。(1) 殻胞子の放出は成熟した糸状体を短日低温条件で培養後約4日後から始まり、7日後には培地中の殻胞子密度が約100細胞/ml以上となる。さらに、その放出は30日後まで継続する。(2) 貝殻糸状体は定期的に貝殻表面を洗浄することでフリー糸状体よりも安定して殻胞子を手取できる。(3) 殻胞子の生残率、発芽率および生長率に対するCuのLOECはすべて暴露から96時間後に最小となる。(4) 発芽率と生長率による判定は生残率と比較して影響の検出感度が高い。以上のことから、海苔(スサビノリ) 殻胞子を供試生物とした生物検定法は、供試体の入手に制限を受けることなく、かつ、極めて簡易な操作で有害物質の毒性を評価することのできる手法であるといえる。

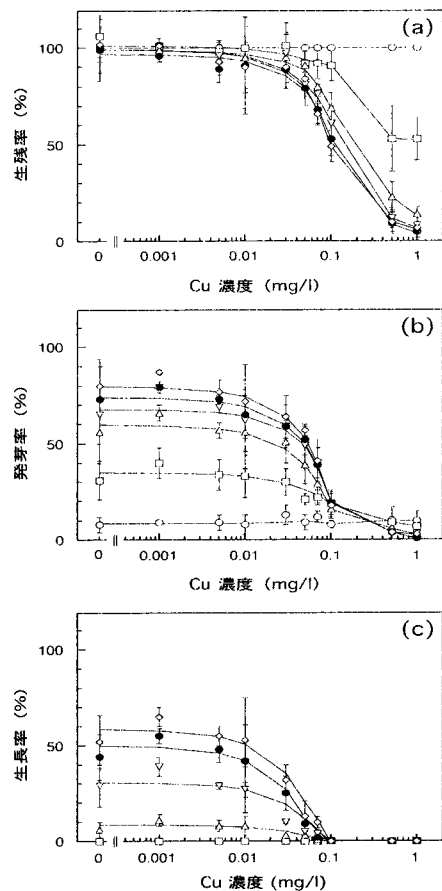


図4 生残率、発芽率および生長率に対するCuの影響(○:0h, □:24h, △:48h, ▽:72h, ●:96h, ◇:120h)。

表1 生残率、発芽率、および生長率に対するCuのLOEC(平均値±SD, n=5)

暴露時間	生残率に対するLOEC (mg/l)
24h	0.158 ± 0.192
48h	0.050 ± 0.020
72h	0.054 ± 0.017
96h	0.046 ± 0.026
120h	0.046 ± 0.026
暴露時間	発芽率に対するLOEC (mg/l)
24h	0.401 ± 0.221
48h	0.054 ± 0.022
72h	0.041 ± 0.032
96h	0.033 ± 0.027
120h	0.033 ± 0.027
暴露時間	生長率に対するLOEC (mg/l)
24h	-
48h	≥ 0.005
72h	0.029 ± 0.021
96h	0.021 ± 0.019
120h	0.021 ± 0.019