

海藻を供試生物とした毒性試験法における培養条件の検討

大分工業高等専門学校 正会員○高見 徹 河村美世

1. はじめに

筆者らはこれまで下水処理水や有害物質が沿岸生物に及ぼす影響を評価するため、沿岸海域の主要な一次生産者である海藻の初期発生段階(殻胞子, 遊走子, 発芽体)や成体(葉状体)を供試生物とした毒性試験を実施してきた。有害物質の慢性毒性を評価するためには、海藻の葉状体を供試生物とした長期間の暴露試験を行う必要があるが、実験室内で葉状体を健康に培養することは難しく、実際の海域条件とはかけ離れた高濃度の栄養塩を添加したり、大量の海水を通過させるための大規模な施設を必要とする等の問題が多い。そこで本研究では、図1に示す小規模で簡易な流水式培養装置を考案し、海藻の葉状体を供試生物とした長期間暴露試験方法を確立することを目的とした。なお、本報では適切な培養条件を明らかにするため、栄養塩濃度と供試海水(試験培地)の通水量(流量)が葉状体の生育と有害物質の生育阻害濃度に及ぼす影響について検討した。

2. 材料と方法

2.1 栄養塩濃度を変量とした流水式培養実験

栄養塩濃度が海藻の生育に及ぼす影響を明らかにするため、図1の流水式培養装置を用いて次の実験を行った。供試海藻として、緑藻アオサの葉状体を用いた。試験培地として、 $0.45\mu\text{m}$ ろ過海水(塩分約30)に標準PES培地の栄養塩類(9.0mg N/l, 1.1mg P/l)を0~1/2倍の濃度になるように添加したもの(OPES~1/2PES)を作成し、培養器(200mlピーカ)内にペリスタポンプを用いて連続的に流入(流量1.0ml/min)させた。培養器内には直径約1cmに切り抜いたアオサ葉状体の葉片を1容器につき5個体ずつ投入し、スターを用いて葉片が浮遊する程度に攪拌(約720rpm)した。暴露開始から4, 7, 11, 14日後に葉片を取り出し、デジタルカメラで撮影して画像処理解析を行って所定濃度のPES培地におけるアオサ葉状体の面積増加率(=(所定時間培養後の面積-培養開始時の面積)÷培養開始時の面積)を求めた。また、実験時のアオサ葉状体の生育状態を把握するため、培養開始時と14日後にアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル(Chl-a)の含有量を測定した。

2.2 所定の栄養塩濃度条件下における塩素酸塩の毒性試験

栄養塩濃度が有害物質の生育阻害濃度に及ぼす影響を明らかにするため、前述の実験で生育速度の大きく異なった1/200PES培地と1/20PES培地において毒性試験を行った。試験物質として塩素酸カリウム(KClO_3)を用いた。図1の装置を用いて所定の ClO_3^- 添加量(0~100mg/l)となるように調整した1/200または1/20PES培地をアオサ葉状体が入った培養器内に流入させ、培養開始から14日後におけるアオサ葉状体の面積増加率に対する ClO_3^- の最小影響濃度(14d-LOEC)を求めた。

2.3 培地流量を変量とした流水式培養実験および毒性試験

試験培地の流量がアオサ葉状体の生育に及ぼす影響を明らかにするため、図1の装置において、それぞれの培養器に流入する培地の流量を0~4ml/minに調整して14日間の培養を行い、前述の実験と同様にアオサ葉状体の面積増加率と窒素およびChl-a含有量の変化を測定した。また、培地流量が有害物質の生育阻害濃度に及ぼす影響を検討するため、 ClO_3^- 添加量0.1mg/lの試験培地を作成し、所定の流量条件下でアオサ葉状体を14日間培養した。以上の流量を変量とした実験では栄養塩類無添加の培地(すなわち、ろ過海水)を用いた。

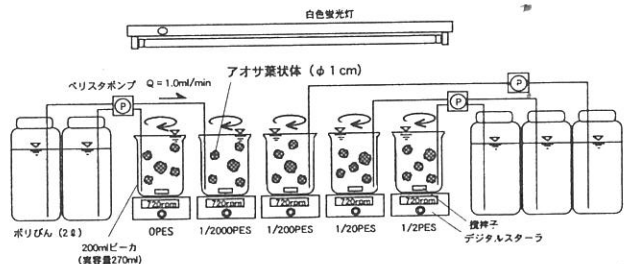


図1 流水式培養装置

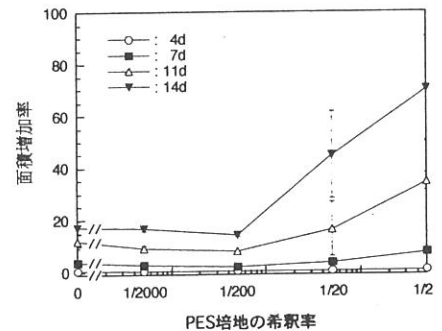


図2 アオサ葉状体の面積増加率に及ぼす培地中の栄養塩濃度の影響

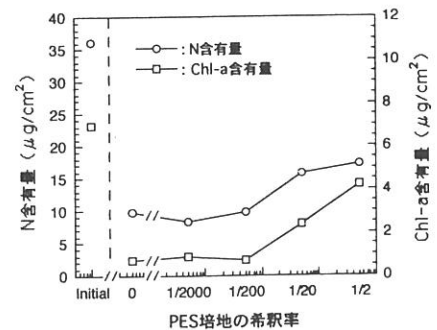


図3 培地中の栄養塩濃度とアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル含有量の関係

3. 結果と考察

3.1 栄養塩濃度がアオサ葉状体の生育に及ぼす影響

流水式培養における栄養塩濃度（PES 培地の希釈率として表す）とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図2に示す。アオサ葉状体の面積増加率は、希釈率0（0PES培地）から1/200（1/200PES培地，0.046mg N/l, 0.006mg P/l）においてはほぼ一定であったが，希釈率1/20（1/20PES培地，0.46mg N/l, 0.06mg P/l）以上では面積増加率は急激に上昇した。また，14日後におけるアオサ葉状体の単位面積当たりの窒素およびChl-aの含有量（図3）は，面積増加率と同様に1/200PES以下ではほぼ一定であり，1/20PES以上において増加した。しかしながら，14日後の窒素およびChl-a含有量は，最も値の高かった1/2PES培地（4.6mg N/l, 0.6mg P/l）においても，培養開始時の約1/2程度の低い値となり，本実験条件においてアオサ葉状体を健康に生育させるためには1/2PES以上の栄養塩濃度が必要であることがわかった。

3.2 栄養塩濃度が塩素酸塩の生育阻害濃度に及ぼす影響

1/200PES培地および1/20PES培地における培養開始から14日後の ClO_3^- 添加量とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図4に示す。1/200PES培地におけるアオサ葉状体の面積増加率は， ClO_3^- 添加量0.1mg/l以上においてコントロール（ ClO_3^- 添加量0mg/l）に対して有意に低下し（ $p < 0.05$ ），14d-LOECは0.1mg/lが得られた。これに対して，1/20PES培地における14d-LOECは10mg/lが得られ，栄養塩濃度の上昇に伴って14d-LOECが100倍に増加することがわかった。以上の結果から，本実験条件において，培地に栄養塩類を添加することは，有害物質に対するアオサ葉状体の感受性を著しく低下させることが明らかになった。

3.3 流量がアオサ葉状体の生育と有害物質の毒性評価に及ぼす影響

培地（栄養塩無添加）の流量とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図5に示す。アオサ葉状体の面積増加率は，流量0~1ml/minまでは急激に上昇したが，2ml/min以上ではほぼ一定であった。しかし，アオサ葉状体の単位面積当たりの窒素およびChl-a含有量は流量の増加に伴って増加し，流量4ml/minでの窒素含有量は初期値の82%の高い値を示した。このことから，培地に栄養塩類を添加しない場合でも，培地の流量を大きくすればアオサ葉状体を健康に生育させることができることがわかった。また，栄養塩無添加の培地に ClO_3^- を0.1mg/l添加し，所定の流量で培養した場合の14日後のアオサ葉状体の面積増加率を図7に示す。流量0ml/minでは， ClO_3^- を添加した場合の面積増加率は ClO_3^- を添加しない場合の約1/7であったが，流量4ml/minにおいては約1/30以下にまで低下することがわかった。この結果，流量の増加はアオサ葉状体を健康に生育させると共に有害物質による生育阻害影響を鋭敏に発現させることが明らかになった。

4. まとめ

以上の結果から，本研究で検討したアオサ葉状体を供試生物とした流水式培養による毒性試験においては，培地への栄養塩類の添加を必要とせず，培地の流量を増加させることで葉状体を健康に生育させることができ，加えて，有害物質に対する感受性を高めることができることが明らかとなった。なお，流量の増加によって生ずる培地の使用量増加に関する問題は，培養器あるいは供試海藻の大きさをさらに小さくすることで解決できると考えられる。

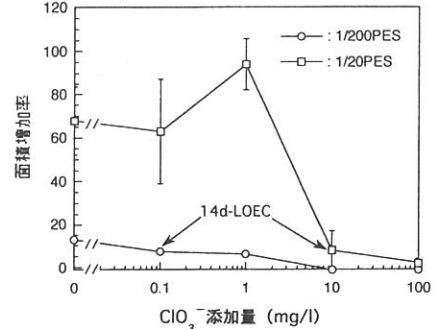


図4 栄養塩濃度の違いによる14d-LOECの比較

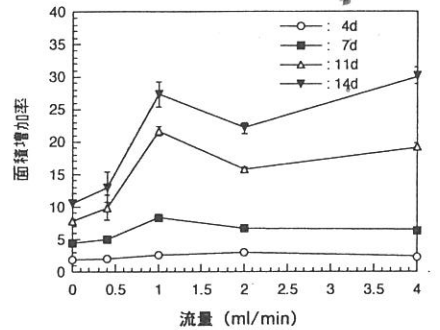


図5 流量とアオサ葉状体の面積増加率の関係

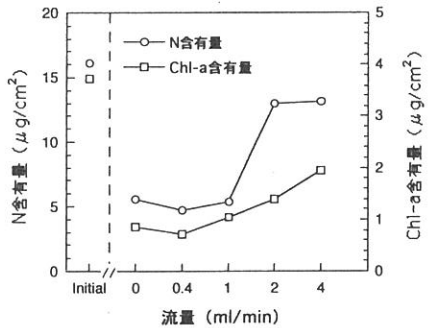


図6 所定の流量におけるアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル含有量

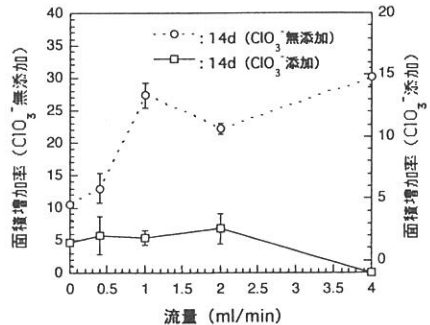


図7 所定の流量条件下での ClO_3^- 添加によるアオサ葉状体の面積増加率の低下