*Chlorella vulgaris*を指標とした複合重金属による毒性評価

岩手大学　学生会員　○千葉遼太郎　阿部紘太
岩手大学　正会員　　石川奈緒　伊藤歩　海田輝之

1.はじめに

河川生態系において，付着藻類は生産者としてその基礎をなしている．近年，重要性が認識されている河川環境下の生態系の保全などを目的として，重金属の毒性影響が藻類を使用して検討されている．

本研究で対象とする重金属は，鉱山廃水処理水や酸性雨による土壌浸出水に含まれるため，河川生態系への悪影響が懸念される．しかし，重金属単独の場合における影響に比べて重金属が複合して存在する場合での知見がはるかに少ないのが現状である．

以上の背景から，本研究では弱酸性の水環境下で，Zn, Cu, Cd 単独の場合，それらの 2 種の重金属が複合した場合での緑藻の室内培養試験を行い，水環境中における重金属の藻類に対する生態影響について検討した．

2. 実験材料及び実験方法

(1) 実験材料

本研究で使用した供試藻類は，国立環境研究所微生物系統保存施設から入手した緑藻の *Chlorella vulgaris*（NIES-642）であり，試験前に C 培地 [1]で継代培養して使用した．原子吸光分析用の金属標準溶液を用いて，Zn, Cu, Cd 各々を含む溶液と，金属を含まない溶液（対照系）を作成した．また，Zn, Cu, Cd のうち 2 種類の金属を混合した試験液を作成し，一方の金属の濃度を 0.05mg/L に設定した．全試験液の pH は 6 とし，試験中における pH の変化を防ぐために，緩衝剤として 2-Morpholinoethanesulfonic acid を 1.68mM 添加した．試験前に，ICP 質量分析装置及び ICP 発光分析装置により各試験液中の金属濃度を測定した．

(2) 実験方法

上記の各試験液を 1L の振とうフラスコ（酸洗浄し超純水で再度洗浄）に移し，イオン交換水で 3 回洗浄し，遠心分離により濃縮した *Chlorella vulgaris* の植種液を同量ずつ添加した．培養条件は，室温 25℃，照度 4000lx の 12h/12h の明暗条件及び一日数回の撹拌とした．サンプリングは 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間目に撹拌しながら行い，Chlorophyll *a* 濃度を河川水質試験方法（案）[2]に従い測定した．なお，試験液中の錯体や沈殿物の形成を防ぐため，栄養塩類は添加せずに培養を行い，対照系の Chlorophyll *a* 濃度を基準とし，異なる条件でその基準より低い場合は金属イオンによる急性毒性的な影響があると判断した．試験中において各試験液の pH の変化はほとんどなかった．

3. 実験結果及び考察

図-1 に各試験液中の Chlorophyll *a* 相対濃度の経時変化の一例として，Cd 単独と Cd と Cu（0.05mg/L）が混合した条件での相対濃度の経時変化を，初期相対濃度を 100%としてそれぞれ示す．なお，凡例中の数値は溶液の Cd の濃度の設定値である．

図-1 より，Cd の設定濃度が大きいほど Chlorophyll *a* 相対濃度の減少が早く，大きかった．特に，設定濃度が 0.5mg/L ではその減少量は他の設定濃度での条件と比べて増大した．また，Cd 単独の条件と比較して Cd と Cu が複合した条件の方が Chlorophyll *a* 相対濃度は大きく減少した．

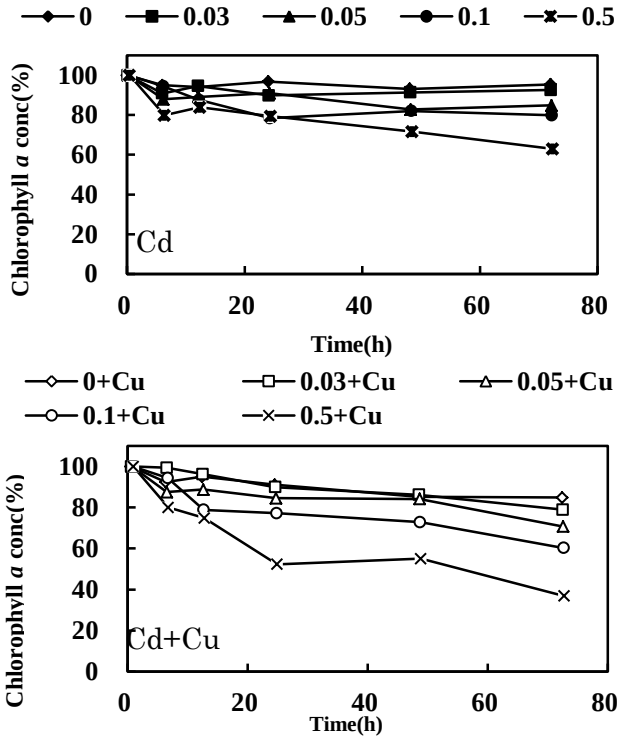

図-1 Cd単独及びCdとCu複合条件における Chlorophyll *a*相対濃度の経時変化

図-2 に Cd と Cu（0.05mg/L）の複合影響の程度を把握するために，まず各条件で実験開始直後の Chlorophyll *a* 相対濃度の値($C_{i,0}$)と 72 時間目の相対濃度($C_{i,72}$)の比率 R($C_{i,72}$/ $C_{i,0}$)をとり，Cd のみを含む条件での比**率を** R(x)**とし**，各金属双方を含む条件での比率を R(y)**とし**，**各々の比率の差**（**比率差**= R(x)- R(y)）**を**，プロットしたものを示す．

この図において，比率差が Cd 濃度 0mg/L の場合のものより大きい場合は相乗的な影響，等しい場合

キーワード：Zn, Cu, Cd, 緑藻，複合影響
連絡先　　：岩手大学（〒020-8551 岩手県盛岡市上田 4-3-5　TEL：(019)621-6449　FAX：(019)6449）

は相加的な影響，小さい場合はいずれかの金属，あるいは双方の影響が緩和された効果であり，比率の差が 0 の場合は Cd 単独の影響であると考えられる．

図-2 より，全ての Cd 濃度において相乗的に影響しており，Cd 濃度が高くなるほどその影響は増大した．

同様に，異なる重金属の混合条件における複合影響の程度を把握するために，図-3〜5 にそれぞれ Cd と Zn（0.05mg/L），Zn と Cu（0.05mg/L），Cu と Zn（0.05mg/L）を混合した場合での比率差をプロットしたものを示す．

図-3 より，Zn 濃度を 0.05mg/L とし，Cd を添加した場合，Cd 設定濃度が 0.03mg/L では，いずれかあるいは双方の金属の影響が緩和され，この濃度よりも高くなるほど相乗的に影響しその影響は増大した．

図-4 より，Cu 濃度を 0.05mg/L とし，Zn を添加した場合，Zn 設定濃度が 0.5mg/L 以下ではいずれかあるいは双方の金属の影響が緩和され，低濃度ほど大きく緩和された．また Zn 設定濃度が 1.0mg/L では，相加的に影響した．

図-5 より，Zn 濃度を 0.05mg/L とし，Cu を添加した場合，全ての Cu 濃度において相乗的に影響したが，0.1mg/L 以下の濃度にはその影響にあまり差が見られなかった．しかし，それらの濃度と 0.5mg/L での場合とを比較すると大きな差が見られた．

ここで，図-4 と図-5 はどちらも Cu と Zn を混合した条件での複合影響を示しているにも関わらず，異なる影響を及ぼしたことを示している．このことから図-4 と図-5 より Zn に比べ Cu の方が *Chlorella vulgaris* に対する毒性影響が強いことがわかる．

4. まとめ

本研究では，*Chlorella vulgaris* の生息に及ぼす Zn, Cu, Cd 単独影響と複合影響について検討した．以下に得られた知見を示す．

1. Cd と Cu（0.05mg/L）の複合影響において，Cd の設定濃度が高いほど *Chlorella vulgaris* の生息に及ぼす相乗的な毒性影響が大きくなった．
2. Cd と Zn（0.05mg/L）の複合影響において，Cd の設定濃度 0.03mg/L ではいずれかあるいは双方の金属の影響が緩和され，0.05mg/L 以上では相乗的に影響した．
3. Zn と Cu（0.05mg/L）の複合影響において，Zn 設定濃度 0.5mg/L 以下ではいずれかあるいは双方の金属の影響が緩和され，1.0mg/L で相加的に影響した．
4. Cu と Zn（0.05mg/L）の複合影響において，全ての Cu 設定濃度で相乗的に影響した．しかし 0.1mg/L 以下ではその影響にあまり差はないが，0.5mg/とでは大きな差が見られた．
5. Zn よりも Cu の方が *Chlorella vulgaris* の生息に対する毒性影響が大きい．

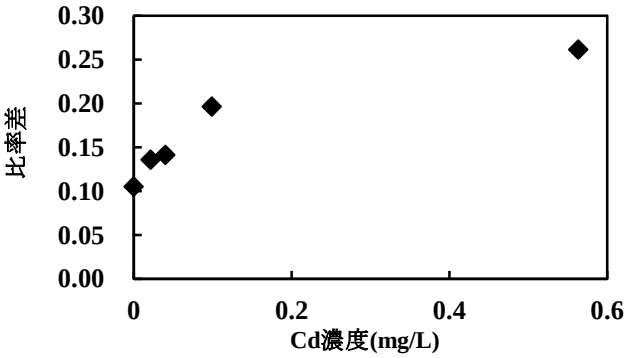

図-2　CdとCu(0.05mg/L)の複合影響

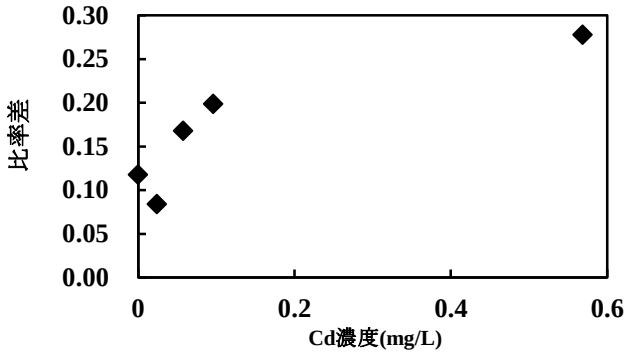

図-3　CdとZn(0.05mg/L)の複合影響

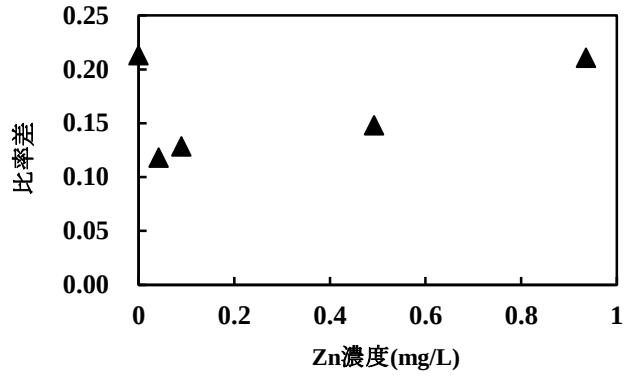

図-4　ZnとCu(0.05mg/L)の複合影響

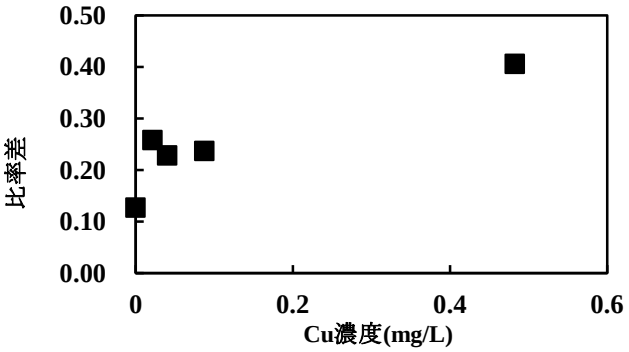

図-5　CuとZn(0.05mg/L)の複合影響

参考文献

1) NIES，LIST OF STRAINS Seventh Edition 2004 Microalgae and protozoa，2004
2) 建設省河川局監修：河川水質試験方法（案）－試験方法編－，技報堂出版，1997.