

環境中で分解した抗菌性物質の緑藻 *Raphidocelis subcapitata* への毒性影響

岩手大学 学生会員 ○鮫島 陽太、相馬 美咲
 岩手大学 正会員 石川 奈緒、伊藤 歩

1. はじめに

抗菌性物質は人や家畜に多く使用されており、それらは一部体内で代謝をされることなく排泄され、またその一部は堆肥等として土壤環境中に移行する。土壤中でいくつかの抗菌性物質が分解されることは報告されており、粘土鉱物のイライトによりタイロシン (TYL) が分解されたとの報告がある。その分解生成物が比較的液相中に溶解しやすい場合、土壤中の分解生成物は降雨とともに水環境中に拡散する可能性があるが、水生生物への毒性影響に関する情報はほとんどない。

本研究では、抗菌性物質が土壤中に存在する鉱物と接触することにより生じた分解生成物が藻類に対して生長阻害を及ぼすのかを調査するため、イライトに接触させた後の TYL の分解生成物について、淡水単細胞緑藻 *Raphidocelis subcapitata* を被験生物として短期毒性試験を行った。

2. 実験方法

2-1 使用材料

短期毒性試験には被験生物として緑藻 *R. subcapitata* を用いた。TYL 溶液はメタノールに溶解した 1 g/L の母液から、CaCl₂(0.01 M)溶液 (イライトによりタイロシンが分解された報告と同じ条件とするため) により希釈して作成した。また、TYL の分解のために鉱物であるイライトを用いた。

2-2 実験手順

(1) 継代培養

毒性試験では継代培養を行った藻類を使用した。継代培養は室温 23 °C の恒温室で、植物育成用ランプと蛍光灯により 4,000 lx の環境下で行っており、培地は C 培地を使用した。使用器具は 121°C、20 分間のオートクレーブで滅菌し、無菌的に試験を行った。

(2) 短期毒性試験

イライトと TYL 溶液(1,10,100 mg/L)を、それぞれ固液比 1 : 100(5 g:500 mL)で混合し、5 日間振とうを行った。振とう後、この混合液を孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過した。このろ液 (イライト

接触液) の TYL 濃度を高速液体クロマトグラフ (Waters, Acuity UPLC H-Class)-タンデム質量分析装置(Waters, Xevo TQD)によって測定した。表 1 に各初期濃度条件でのイライト接触液の TYL 残留濃度を示す。

表 1 各初期濃度でのイライト接触液の残留濃度

条件	初期濃度(mg/L)	残留濃度(mg/L)
1	1	0.13
2	10	1.97
3	100	62.7

これらの結果から、各試験条件について以下の試験液を作成し、短期毒性試験を行った。

- ・滅菌水 (コントロール(水))
- ・イライトと CaCl₂(0.01M)溶液を固液比 1 : 100 で混合し、5 日間振とうした後、孔径 0.3 μm のガラス繊維ろ紙を用いてろ過した液 (コントロール(イライト))
- ・イライト接触液 (分解生成物を含む)
- ・イライト接触液と同じ TYL 濃度の CaCl₂ 溶液 (分解生成物を含まない)
- ・初期 TYL 濃度の CaCl₂ 溶液 (分解生成物を含まない)

それぞれの条件の溶液 100 mL に 10 倍濃縮培地と試験の 3 日前より前培養を行った藻類培養液を添加し、短期毒性試験を行った。培養開始後 0, 12, 24, 48, 72 時間目に試料を採取し、プランクトン計数板を用いて細胞数を計数し、細胞数濃度を算出した。さらに、相対細胞数濃度を次式により計算した。

$$\text{相対細胞数濃度(-)} = \frac{C_t}{C_0}$$

C_t : 各設定濃度における

t 時間目の藻類細胞数(cell/mL)

C_0 : 各設定濃度における

0 時間目の藻類細胞数(cell/mL)

3. 実験結果

3-1 藻類の細胞数濃度の変化

図-1, 2, 3 はそれぞれの条件での相対細胞濃度の経

キーワード : 緑藻・抗菌性物質・タイロシン・イライト・毒性試験・水環境

連絡先 : 岩手大学 (盛岡市上田 4-3-5 TEL019-621-6449)

時変化を示す。TYL の含まれていないコントロール 2 つは同じ経時変化を示し、イライトから溶出するイオンなどによる藻類への直接的な生長阻害は見られなかった。また、同じ TYL 濃度のイライト接触液と CaCl₂ 溶液（残留濃度）でもそれぞれに生長阻害の差は見られなかった。

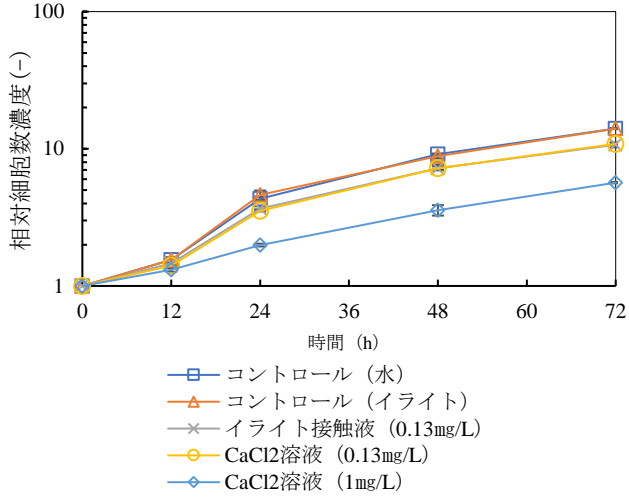


図-1 相対細胞数濃度の経時変化(条件 1)

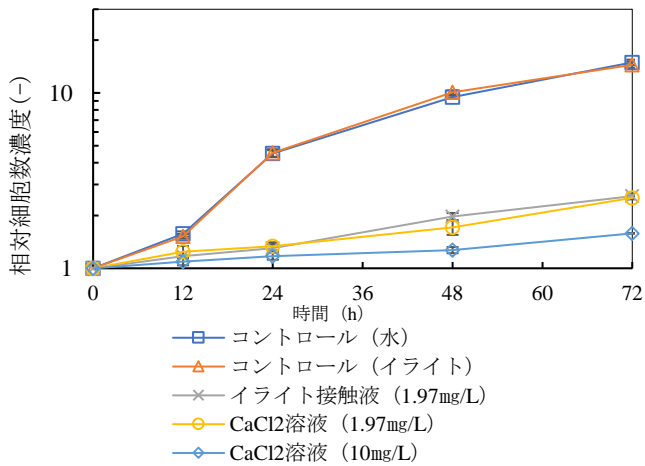


図-2 相対細胞数濃度の経時変化(条件 2)

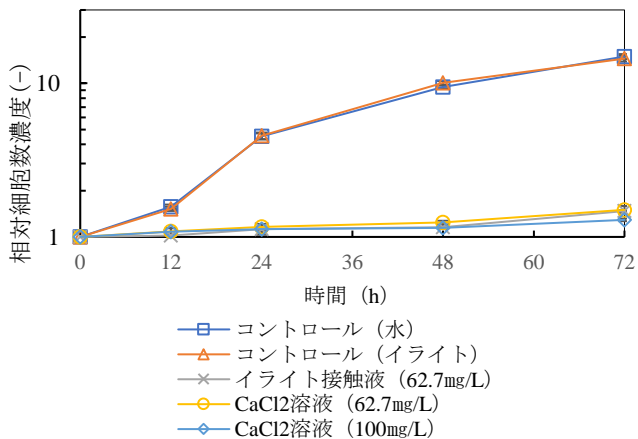


図-3 相対細胞数濃度の経時変化(条件 3)

3-2 生長阻害率

図 1～3 までの結果を用いて、各条件における比生

長速度と生長阻害率を算出した。まず次式より比生長速度 μ を求めた。

$$\mu = \frac{\log N_2 - \log N_1}{t_2 - t_1}$$

$t_2 - t_1$: 藻類細胞数が対数増殖を示す期間

N_1 : t_1 時の藻類細胞数(cell/mL)

N_2 : t_2 時の藻類細胞数(cell/mL)

μ を用いて生長阻害率 I を次式より求めた。

$$I = \frac{\mu_0 - \mu'}{\mu_0} \times 100 (\%)$$

μ_0 : コントロールの平均生長速度

μ' : 各濃度区の平均生長速度

表 2 にそれぞれの条件における生長阻害率を示す。TYL 濃度が同じであるイライト接触液と CaCl₂ 溶液（残留濃度）では生長阻害率に差はなかった(t 検定、 $p > 0.05$)ことから、今回の実験では TYL とイライトが接触したことにより生じた分解生成物による藻類への生長阻害は見られなかった。したがって、TYL がイライトに接触し分解された場合、藻類に対して生長阻害を生じない物質になっている可能性を示唆している。

表 2 各条件での生長阻害率

		I(%)
条件 1	イライト接触液	4.0
	CaCl ₂ 溶液（残留濃度）	4.5
	CaCl ₂ 溶液（初期濃度）	11.1
条件 2	イライト接触液	40.9
	CaCl ₂ 溶液（残留濃度）	46.9
	CaCl ₂ 溶液（初期濃度）	74.8
条件 3	イライト接触液	76.4
	CaCl ₂ 溶液（残留濃度）	78.6
	CaCl ₂ 溶液（初期濃度）	88.5

4. まとめ

本研究では、抗菌性物質の TYL と鋳物のイライトを接触させたことにより生じる分解生成物が緑藻 *Raphidocelis subcapitata* に対して生長阻害を及ぼすかを確認した。今回の試験の結果からは TYL の分解生成物による藻類に対する生長阻害は見られなかった。今後はイライト接触液中の分解生成物について詳細な検討が必要である。

謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP17KO6613 の助成を受け行われた。