

B-72 各種水系マイクロコズムによる ニッケルの生態リスク評価

村上 和仁^{1*} 林 秀明² 島田 諒司¹ 稲森 悠平³

¹千葉工業大学工学部生命環境科学科（〒275-8588 千葉県習志野市津田沼2-17-1）

²千葉工業大学大学院工学研究科生命環境科学専攻（〒275-8588 千葉県習志野市津田沼2-17-1）

³福島大学共生システム理工学類（〒960-1296 福島県福島市金谷川 1 番地）

* E-mail: kaz_murakami@sky.it-chiba.ac.jp

1. はじめに

ニッケル (Ni) は合金やメッキに使用され、鉱山廃水やニッケルメッキからの溶出により、水道水に混入することがある。ニッケルは水質汚濁に係る要監視項目としてリストアップされており（平成5年3月環水規21号，改正平成11年2月22日環水規121号），また，水道水質基準（水質管理目標設定項目）としてニッケル及びその化合物について，ニッケルの量に関して，0.01mg/L（暫定）が目標値として定められている（平成15年10月10日健発第010004号）。ニッケルの毒性は化学形態とその物性で異なり，経口毒性は比較的低く，銅，コバルト，亜鉛など必須金属と同程度であるが，吸入ではニッケルカルボニルの毒性が大きく，ヒトにとっての致死量は30ppm・30分と推定されている。しかしながら，ニッケルをはじめとする金属類の生態リスクについては十分な知見が得られていないのが現状である。現在，OECD等にて記載されている毒性評価試験法は，個々の生物種に対する影響評価試験であり，個々の生物種に対する毒性リスク評価ではなく複雑な生物間相互作用を有する生態系システムに対する生態リスクを評価する上では，生産者・消費者・分解者からなるモデル微生物生態系であるマイクロコズムが有用なツールとなり得る。

本研究では，上記の点を鑑み，汎用化可能なP/R比（生産量／呼吸量比）等を評価指標とした水圏の生態リスク評価手法を開発し，金属類の生態リスク影響評価に供するための基礎的知見の集積を目的として，ニッケルの添加が各種の水系マイクロコズム生態系のP/R比および生物相の推移に如何なる影響を及ぼすかについて検討をおこなった。

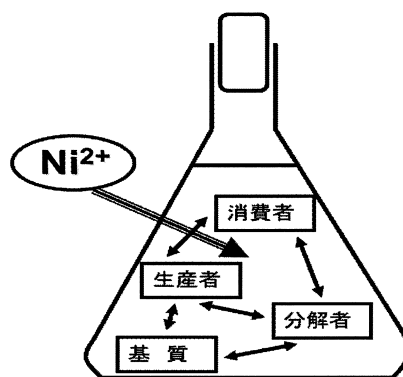


図-1 マイクロコズムの概要

表-1 各種マイクロコズムの種構成

	Naturally derived型 マイクロコズム	Stress selected 型 マイクロコズム	Gnotobiotic 型 マイクロコズム
生産者 (植物プランクトン)	27種	23種	3種
消費者 (動物プランクトン)	9種	3種	4種
分解者 (細菌類)	複数種	複数種	4種

2. 方法

(1) 供試マイクロコズム

本研究では，現場の環境下の群集をそのまま維持した Naturally derived型（手賀沼湖水），自然群集をある条件下で培養しある特定の生物群集に維持発展させた Stress selected型（手賀沼湖水），および完全種構成既知で各種の個体数が単独に計測可能で各種の性質が単独に解析可能な Gnotobiotic型（栗原type）⁵⁹⁾のマイクロコズムを用いた。本研究で用いたマイクロコズムの概要を図1に，各マイクロコズムの種構成を表1に示した。

(2) 金属負荷

公共用水域における水質基準が検討されているニッケルを対象とし、添加量（負荷量）は、0（対照系）、0.1、0.2、0.5、1.0、5.0mg/Lに設定し、マイクロコズム培養開始後16日目の安定期に $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ として添加した。

(3) 培養方法及び測定項目

マイクロコズムの培養は、25℃、2800lux（L/D＝12/12hr.）、静置条件とした。Naturally derived型マイクロコズムは採水した環境水を均一に攪拌した後、大きな夾雑物を除去して、また、Stress selected型とGnotobiotic型マイクロコズムは、ポリペプトン濃度を100mg/Lとなるよう調整したTP培地（Taub's solution + polypeptone）200mLを300mL容三角フラスコに入れ、種を10mL接種して培養を開始した。

測定項目として、データロガーに接続したDOメーターを用いて、マイクロコズム内のDO変化を経時的に連続測定し、P（生産量）、R（呼吸量）およびP/R比の推移を求めた。同時に、培養開始後、0、2、4、7、14、16、18、20、23、30日目にマイクロコズム構成微生物の個体数を計測した。細菌類は希釈試料を作成して平板希釈法にてCFU（colony forming unit）を計数し、微細藻類は試料をホモジナイザーで処理して血球計数板にて、微小動物はグリッド付き界線スライドグラスを用いて、生物顕微鏡（Nikon Eclipse E800）にて計数した。

(4) 影響評価方法

ニッケルがマイクロコズム生態系に及ぼす影響については、機能パラメータとしてのP/R比（DO）の経時変化、および構造パラメータとしての生物相の経時変化より評価することとした。すなわち、①P/R比からの評価：添加後14日間のP/R比の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して評価、②添加後の挙動パターンからの評価：添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して評価、③安定期の個体数（ N_{30} ）からの評価：培養開始後30日目（添加後14日目）における各構成微生物の個体数を対照系（非添加系）と比較して評価、および④添加後の現存量（ $B_{16,30}$ ）からの評価：添加後14日間の各構成微生物の現存量（面積個体数密度）を対照系（非添加系）と比較して評価、から解析評価をおこなった。

3. 結果および考察

(1) Naturally derived型マイクロコズムによる影響評価

富栄養化湖沼であり、プランクトンの種類・量ともに豊富である手賀沼の湖水を充填したNaturally derived型マ

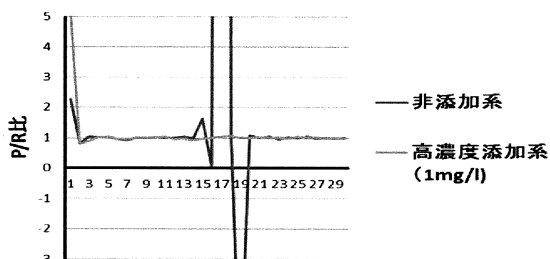


図-2 Naturally derived型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

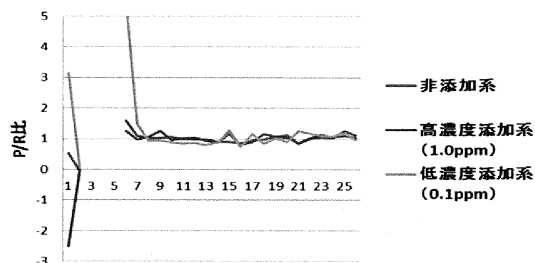


図-3 Stress selected型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

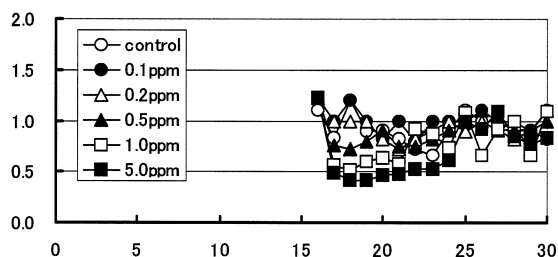


図-4 Gnotobiotic型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

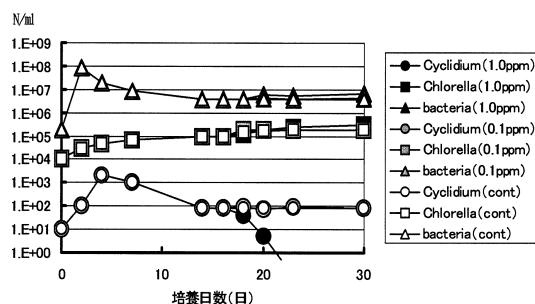


図-5 Gnotobiotic型マイクロコズムにおける代表的な構成種の挙動パターンの比較

イクロコズムに、ニッケルを添加して生態リスク影響を評価した。その結果、機能パラメータであるP/R比はほぼ1に収束して推移したが、対照系（非添加系）の生物相が安定せず、系ごとに構造パラメータである出現生

物（＝生物相）が異なり、再現性が維持されなかった。培養期間中は、*Chlorella* sp., *Nitzschia* sp., *Monoraphidium contortum*, *Aulacoseira granulata* が経常的に出現したが、ニッケル添加と連動した生物相の特徴的な挙動は観察されなかった。

(2) Stress selected型マイクロコズムによる影響評価

手賀沼の湖水を種としてTP培地に接種して培養した Stress selected型マイクロコズムに、ニッケルを添加して生態リスク影響を評価した。その結果、P/R 比はニッケル添加にかかわらず大きな変化はみられず、P/R＝1付近で安定して推移した。しかし、生物相では、1.0mg/L添加系で明らかな個体数の減少が生じ、特に*Nitzschia* sp.と*Monoraphidium contortum*に影響が生じており、*Nitzschia* sp.はニッケル添加濃度が高くなるほど個体数が減少していることから、ニッケル添加により、緑藻類よりも珪藻類に対して影響が生じている可能性が示された。

(3) Gnotobiotic型マイクロコズムにおける影響評価

生産者として3種の微細藻類、消費者として4種の微小動物、分解者として4種の細菌類から構成される Gnotobiotic型マイクロコズムに、ニッケルを添加して、機能パラメータとしてのP/R比の推移から生態リスク影響を評価した。その結果、 N_{30} と B_{1630} において生物群が二分され、生態系機能パラメータであるP/R比をみると、ニッケル添加に伴いP/R比が低下していることから、ニッケルは系の呼吸量を増加させる方向に作用しているものと考えられた。しかしながら、現存量（ B_{1630} ）はニッケル添加に伴い消費者である微小動物の減少を示していることから、生物現存量あたりのDO変化量から評価すると、ニッケルの負荷が大きくなるほど、微小動物個体数あたりの呼吸活性が上昇し、微細藻類個体数あたりの生産活性が低下することを示していると考えられる。ニッケルの生物毒性については、知見が十分に得られておらず²⁰⁾、今後さらなる検討が必要である。

(4) 生態リスク評価におけるマイクロコズムシステムの有効性

従来の単種生物試験と比較して複数種共存系であるマイクロコズム試験の利点は、生態系回復過程の評価が可能になるという点である。例えば、界面活性剤LASのように生態系内で分解され系が再生する過程を評価することができる。また、同一の評価対象物質での無影響濃度の精度（バラツキ）を比較すると、単種生物試験＞マイクロコズム試験となり、得られるリスクは同程度である場合、バラツキの小さいマイクロコズムでの高精度な生態リスク評価が重要となる。これらについては今後、文

献調査等により、さらなる情報収集を行い、精査する必要がある。また、本マイクロコズムを複数種共存系システムのスタンダードとして位置づけ、評価試験の規格を標準化することで、従来、湖沼や河川等の自然環境水を用いて実施されてきた評価試験に伴っていた未知の共存微量物質や生物種の差異による影響といった問題が排除される利点がある。

4. まとめ

- 1) Naturally derived型マイクロコズムによる影響評価では、構造パラメータである生物相が系ごとに異なり、再現性が維持されず、ニッケル添加に連動した変化はみられなかった。
- 2) Stress selected型マイクロコズムによる影響評価より、緑藻類よりも珪藻類に対して影響が生じている可能性が示されたが、評価システムとしての安定系の構築は不確実であった。
- 3) 標準試験法としてのマイクロコズムは、完全種構成既知で、高い安定性と再現性を示すGnotobiotic型マイクロコズムが適していることが示された。
- 4) ニッケルのマイクロコズム無影響濃度（m-NOEC）は、0.1～1.0 mLと見積もられ、ニッケル添加に伴いP/R比が低下していることから、ニッケルは系の呼吸量を増加させる方向に作用し、ニッケルの負荷が大きくなるほど、微小動物個体数あたりの呼吸活性が上昇し、微細藻類個体数あたりの生産活性が低下することが示された。
- 4) マイクロコズムを活用したP/R比に着目した機能パラメータからの生態リスク評価は、有効な手段となることが示された。

謝 辞：本研究を遂行するにあたり、相模女子大学 杉浦桂名誉教授に有益なる討議を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

追 記：本研究は、環境省平成21～23年度環境研究総合推進費課題「（S2-09）マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発」の一環として実施された。

参考文献

- Sugira K.: Effects of Chemicals on Microcosms: Comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems, *Japanese Journal on Environtal Toxicology*, Vol.13, No.1, pp.37-47, 2010.
- 村上和仁：マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価，環境情報科学論文集，Vol.24, pp.399-404, 2010.

(2) 金属負荷

公共用水域における水質基準が検討されているニッケルを対象とし、添加量（負荷量）は、0（対照系）、0.1、0.2、0.5、1.0、5.0mg/Lに設定し、マイクロコズム培養開始後16日目の安定期に $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ として添加した。

(3) 培養方法及び測定項目

マイクロコズムの培養は、25℃、2800lux（L/D＝12/12hr.）、静置条件とした。Naturally derived型マイクロコズムは採水した環境水を均一に攪拌した後、大きな夾雑物を除去して、また、Stress selected型とGnotobiotic型マイクロコズムは、ポリペプトン濃度を100mg/Lとなるよう調整したTP培地（Taub's solution + polypeptone）200mLを300mL容三角フラスコに入れ、種を10mL接種して培養を開始した。

測定項目として、データロガーに接続したDOメーターを用いて、マイクロコズム内のDO変化を経時的に連続測定し、P（生産量）、R（呼吸量）およびP/R比の推移を求めた。同時に、培養開始後、0、2、4、7、14、16、18、20、23、30日目にマイクロコズム構成微生物の個体数を計測した。細菌類は希釈試料を作成して平板希釈法にてCFU（colony forming unit）を計数し、微細藻類は試料をホモジナイザーで処理して血球計数板にて、微小動物はグリッド付き界線スライドグラスを用いて、生物顕微鏡（Nikon Eclipse E800）にて計数した。

(4) 影響評価方法

ニッケルがマイクロコズム生態系に及ぼす影響については、機能パラメータとしてのP/R比（DO）の経時変化、および構造パラメータとしての生物相の経時変化より評価することとした。すなわち、①P/R比からの評価：添加後14日間のP/R比の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して評価、②添加後の挙動パターンからの評価：添加後14日間の各構成微生物の挙動パターンを対照系（非添加系）と比較して評価、③安定期の個体数（ N_{30} ）からの評価：培養開始後30日目（添加後14日目）における各構成微生物の個体数を対照系（非添加系）と比較して評価、および④添加後の現存量（ $B_{16,30}$ ）からの評価：添加後14日間の各構成微生物の現存量（面積個体数密度）を対照系（非添加系）と比較して評価、から解析評価をおこなった。

3. 結果および考察

(1) Naturally derived型マイクロコズムによる影響評価

富栄養化湖沼であり、プランクトンの種類・量ともに豊富である手賀沼の湖水を充填したNaturally derived型マ

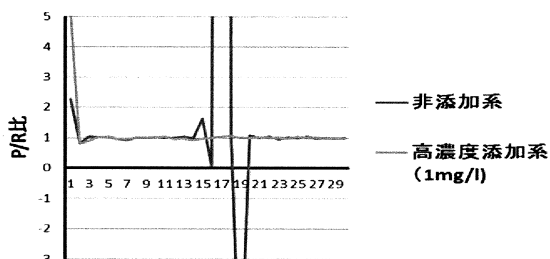


図-2 Naturally derived型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

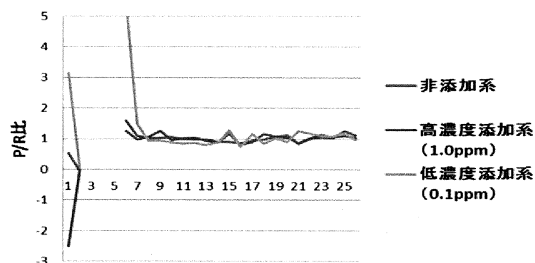


図-3 Stress selected型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

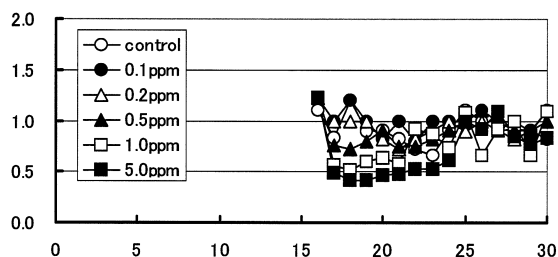


図-4 Gnotobiotic型マイクロコズムにおけるP/R比の推移

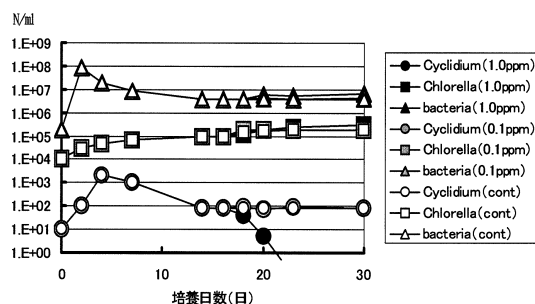


図-5 Gnotobiotic型マイクロコズムにおける代表的な構成種の挙動パターンの比較

イクロコズムに、ニッケルを添加して生態リスク影響を評価した。その結果、機能パラメータであるP/R比はほぼ1に収束して推移したが、対照系（非添加系）の生物相が安定せず、系ごとに構造パラメータである出現生

物（＝生物相）が異なり、再現性が維持されなかった。培養期間中は、*Chlorella* sp., *Nitzschia* sp., *Monoraphidium contortum*, *Aulacoseira granulata* が経常的に出現したが、ニッケル添加と連動した生物相の特徴的な挙動は観察されなかった。

(2) Stress selected型マイクロコズムによる影響評価

手賀沼の湖水を種としてTP培地に接種して培養した Stress selected型マイクロコズムに、ニッケルを添加して生態リスク影響を評価した。その結果、P/R 比はニッケル添加にかかわらず大きな変化はみられず、P/R＝1付近で安定して推移した。しかし、生物相では、1.0mg/L添加系で明らかな個体数の減少が生じ、特に*Nitzschia* sp.と*Monoraphidium contortum*に影響が生じており、*Nitzschia* sp.はニッケル添加濃度が高くなるほど個体数が減少していることから、ニッケル添加により、緑藻類よりも珪藻類に対して影響が生じている可能性が示された。

(3) Gnotobiotic型マイクロコズムにおける影響評価

生産者として3種の微細藻類、消費者として4種の微小動物、分解者として4種の細菌類から構成される Gnotobiotic型マイクロコズムに、ニッケルを添加して、機能パラメータとしてのP/R比の推移から生態リスク影響を評価した。その結果、 N_{30} と B_{1630} において生物群が二分され、生態系機能パラメータであるP/R比をみると、ニッケル添加に伴いP/R比が低下していることから、ニッケルは系の呼吸量を増加させる方向に作用しているものと考えられた。しかしながら、現存量（ B_{1630} ）はニッケル添加に伴い消費者である微小動物の減少を示していることから、生物現存量あたりのDO変化量から評価すると、ニッケルの負荷が大きくなるほど、微小動物個体数あたりの呼吸活性が上昇し、微細藻類個体数あたりの生産活性が低下することを示していると考えられる。ニッケルの生物毒性については、知見が十分に得られておらず²⁰⁾、今後さらなる検討が必要である。

(4) 生態リスク評価におけるマイクロコズムシステムの有効性

従来の単種生物試験と比較して複数種共存系であるマイクロコズム試験の利点は、生態系回復過程の評価が可能になるという点である。例えば、界面活性剤LASのように生態系内で分解され系が再生する過程を評価することができる。また、同一の評価対象物質での無影響濃度の精度（バラツキ）を比較すると、単種生物試験＞マイクロコズム試験となり、得られるリスクは同程度である場合、バラツキの小さいマイクロコズムでの高精度な生態リスク評価が重要となる。これらについては今後、文

献調査等により、さらなる情報収集を行い、精査する必要がある。また、本マイクロコズムを複数種共存系システムのスタンダードとして位置づけ、評価試験の規格を標準化することで、従来、湖沼や河川等の自然環境水を用いて実施されてきた評価試験に伴っていた未知の共存微量物質や生物種の差異による影響といった問題が排除される利点がある。

4. まとめ

- 1) Naturally derived型マイクロコズムによる影響評価では、構造パラメータである生物相が系ごとに異なり、再現性が維持されず、ニッケル添加に連動した変化はみられなかった。
- 2) Stress selected型マイクロコズムによる影響評価より、緑藻類よりも珪藻類に対して影響が生じている可能性が示されたが、評価システムとしての安定系の構築は不確実であった。
- 3) 標準試験法としてのマイクロコズムは、完全種構成既知で、高い安定性と再現性を示すGnotobiotic型マイクロコズムが適していることが示された。
- 4) ニッケルのマイクロコズム無影響濃度（m-NOEC）は、0.1～1.0 mLと見積もられ、ニッケル添加に伴いP/R比が低下していることから、ニッケルは系の呼吸量を増加させる方向に作用し、ニッケルの負荷が大きくなるほど、微小動物個体数あたりの呼吸活性が上昇し、微細藻類個体数あたりの生産活性が低下することが示された。
- 4) マイクロコズムを活用したP/R比に着目した機能パラメータからの生態リスク評価は、有効な手段となることが示された。

謝 辞：本研究を遂行するにあたり、相模女子大学 杉浦桂名誉教授に有益なる討議を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

追 記：本研究は、環境省平成21～23年度環境研究総合推進費課題「（S2-09）マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発」の一環として実施された。

参考文献

- Sugura K.: Effects of Chemicals on Microcosms: Comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems, *Japanese Journal on Environtal Toxicology*, Vol.13, No.1, pp.37-47, 2010.
- 村上和仁：マイクロコズムシステムによるP/R比からみた金属類の生態リスク評価，環境情報科学論文集，Vol.24, pp.399-404, 2010.