

B-40 金属負荷マイクロコズムにおけるDO変動に着目した数理モデルと培養モデルの比較検証

○村上 和仁^{1*} 林 秀明² 杉浦 桂³ 稲森 悠平⁴

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相模女子大学栄養科学部 (〒252-0383 神奈川県相模原市南区文京2-1-1)

⁴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

水処理における処理水の水質基準を定める上では、処理水に含有される微量物質が放流先の水圏生態系に如何なる影響を及ぼすのかを考慮することが重要である。水圏生態系は、生産者（藻類）、捕食者（微小動物）、分解者（細菌類）を主とする微生物ループを基盤として魚類等の高次捕食者を含む食物網すなわち生物間相互作用から構成されており、水圏生態系の水質浄化や物質循環には特に微生物ループが重要な役割を担っている。化学物質の負荷による生態系への影響を評価する上では、生産（production:P）／呼吸（respiration:R）比のような生態系における汎用性の高い変動パラメータを考慮することが重要であり、したがって、環境変動と微生物・高次捕食者の水圏生態系の構成生物群との関係解析による生態系リスク管理手法の確立が重要な課題となる。生態系システムに対するリスク影響評価解析においては、マイクロコズム（安定モデル生態系）を用いた微生物群集の動態解析を相補的に活用することが有効・効果的である。単一生物を活用した毒性評価・影響評価に関する研究は、従来より数多く行われてきたが、多種の生物を活用した生態系リスク評価研究はなされていないのが現状であり、マイクロコズムを活用した生態学的研究（エコシステムレベルでの環境影響評価）は国際化が重視されており、OECD試験法の検討においても、生態系システム評価の重要性が指摘されている。

本研究では、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、 Co^{2+} および Ni^{2+} の同時添加がマイクロコズム生態系のP/R比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。

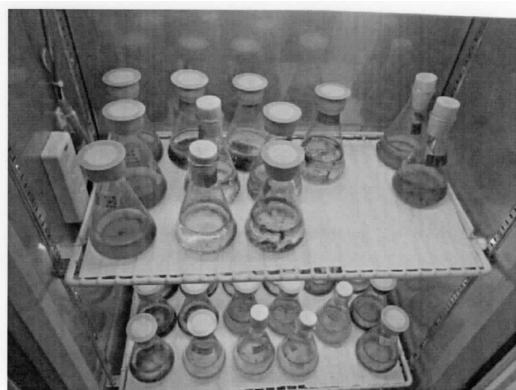


図-1 マイクロコズム（300ml容）培養風景

2. 方法

(1) 供試マイクロコズム

本研究では、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）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 Ni^{2+} および Co^{2+} を対象とし、単独および複合添加した場合の影響評価を行った。添加量（負荷量）は、0（対照系）から段階的に設定し、マイクロコズム培養開始後16日目の安定期に添加した。

(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。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) 培養モデルによる評価方法

Co^{2+} および Ni^{2+} 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_{1630}) 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。

(5) 数理モデルによる評価方法

本研究では杉浦 (1996) がOdum-Beyersを元に構築したN88BASICによる、生物間相互作用とともに代謝産物を考慮した数理モデルを使用した。モデルではマイクロコズム構成種を想定種とし、捕食者として*C. glaucoma*、*Lecane* sp.、生産者として*Chlorella* sp.、分解者としてBacteriaとした。捕食者 (*C. glaucoma*、*Lecane* sp.)、生産者 (*Chlorella* sp.)、分解者 (Bacteria) の対照系の比増殖速度は既往の文献値を参考とした。また、対照系の比増殖速度を1とし、0.1~10の範囲で数値を変えてシミュレーションを行った。

3. 結果および考察

(1) 培養モデルによる生態リスク評価

対照系 (非添加系)、低濃度添加系 (Co 1mg/l + Ni 0.1mg/l)、高濃度添加系 (Co 5mg/l + Ni 0.5mg/l) を作成し、培養16日目に Co^{2+} および Ni^{2+} を添加した。なお、添加濃度は各金属のマイクロコズム無影響濃度 (m-NOEC) を参考に決定した。

構造パラメータである個体数についてみると、添加濃度が高くなると消費者である動物プランクトンの個体数は減少していく傾向にあり、高濃度添加系においては、30日目 (添加後14日目) には*Lecane* sp.以外は消失した。低濃度添加系においても同様に添加後に個体数の減少が観察されたが、*C. glaucoma*は個体数の回復がみられた。一方、生産者である植物プランクトンには金属負荷の影響が小さく、高濃度添加系では動物プランクトンの死滅に伴う捕食圧の減少により植物プランクトンの個体数が増加する現象が観察された。また、濃度が高くなると構成生物の個体数に対する影響が早期に現れる傾向が認められた。低濃度添加系では、添加後直ちに影響が生じるのではなく、潜伏期間において個体数が減少する傾向が認められた。潜伏期間は生物種ごとに異なり、自然生態系と同様に、生態系において同じ役割を担う生物であっても影響の度合いが異なることが示された。

一方、機能パラメータであるDOについてみると、低濃度添加系では添加直後にDO値の振幅が減少し、その後、対照系と同程度にまで回復する現象が観察された。一方、高濃度添加系ではDO値の振幅が減衰していく傾向にあった。しかし、P/R比ではいずれの添加濃度においても、1付近で推移していた。このことより、低濃度添加系では系の回復、高濃度添加系では系の崩壊が生じたものと考えられた。

(2) 数理モデルによる生態リスク評価

培養モデルにおいて、低濃度添加系では終盤にDOの回復がみられ、高濃度添加系では徐々にDOが減少していくことから、低濃度添加系では後半に生産者の活性が上昇し、高濃度添加系では活性が徐々に衰退していくほどの影響が残ったと考えられることから、これらのDOの推移をシミュレーションで再現し、生物活性について検討した。その結果、植物プランクトンの比増殖速度を生産機能の活性、動物プランクトンの比増殖速度を消費機能の活性と定義すると、低濃度添加系においては、前半では植物プランクトンの比増殖速度が2、動物プランクトンの比増殖速度が1である場合に、実測値に近いグラフとなり、後半では植物プランクトンの比増殖速度が3、動物プランクトンの比増殖速度が1.2である場合に、実測値に近いグラフとなった。一方、高濃度添加系においては、添加直後では植物プランクトンの比増殖速度が

4. 動物プランクトンの比増殖速度が1である場合に、実測値に近いグラフとなり、後半では即物プランクトンの比増殖速度が0.7、動物プランクトンの比増殖速度が1である場合に、実測値に近いグラフとなった。この結果より、①生産機能に対してより大きな影響が生じていること、②消費機能の変動は小さいこと、がわかった。

(3) 単独および複合添加におけるm-NOECの比較

従来の研究成果より、 Co^{2+} のm-NOECは1mg/l、 Ni^{2+} のm-NOECは0.1mg/lであることが示されている。しかしながら、 Co^{2+} および Ni^{2+} を同時添加した場合には、いずれのm-NOECの濃度であるにもかかわらず、マイクロコズム生態系に対して、構造面、機能面のいずれに対しても影響を生じた。このことは、個々の毒性評価（影響評価）によってNOECを決定しても、実際の生態系における影響を評価することは困難であることを示している。さらに、現在の影響評価試験は、 LD_{50} や EC_{50} などの単一生物種試験によって行われており、実際の生態系との比較やデータの挿入に問題が指摘されている。このような場合に、マイクロコズムのような複数生物種の混合培養系試験が両者の橋渡し役となる可能性を有している。

また、 Co^{2+} の単独添加系の実験結果より、 Co^{2+} の影響は4mg/lまでは生産機能 $\leq$ 消費機能、8mg/l以上では生産機能 $>$ 消費機能となり、負荷濃度により生態系機能（生産機能、消費機能）に及ぼす影響の大きさが異なることが示されている。2種類以上の金属を同時添加した場合でも同様の現象が生じる可能性があり、今後、生態系機能に及ぼす影響の質が変化する可能性についても検討していく必要がある。

4. まとめ

- 1) Co^{2+} と Ni^{2+} をm-NOECの濃度（ Co^{2+} ：1mg/l、 Ni^{2+} ：0.1mg/l）で同時添加した場合、マイクロコズム生態系に影響が生じた。
- 2) Co^{2+} と Ni^{2+} の同時添加において、低濃度添加系では系の回復、高濃度添加系では系の崩壊が生じたものと考えられた。
- 3) Co^{2+} と Ni^{2+} を同時添加した場合の影響は、生産機能 $>$ 消費機能と評価された。
- 4) 異なる金属による同時負荷（複合汚染）では、単独添加（単独汚染）より低濃度で影響が生じ、さらに生態系機能に及ぼす影響の質が変化する可能性が示唆された。

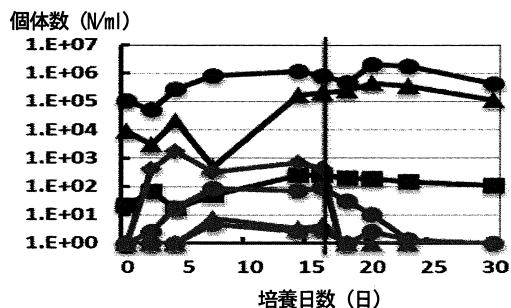


図2 高濃度添加系におけるマイクロコズム増殖曲線

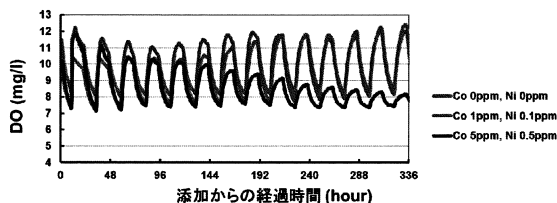


図3 マイクロコズムにおけるDOの遷移

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」および日本学術振興会平成24～26年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（挑戦的萌芽研究）（課題番号24651029）「移入種生物がもたらす生態系影響評価のためのモデルエコシステムの汎用化に関する研究」の一環として実施された。

参考文献

- 村上和仁：マイクロコズムシステムによるPR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.
- Murakami K., Hayashi H., Shimada R. : Microcosm for Impact Risk Assessment of Sediment Remediation Materials on Aquatic Ecosystem, *Journal of Water and Environmental Technology*, Vol.9, No.4, pp.401-410, 2011.
- Murakami K., Hayashi H., Inamori Y., Sugiura K. : Influence Analysis of Metal Ions on Ecosystem Function and Structure using Experimental Microcosm System, *Proceedings of IWA 8th World Water Congress & Exhibition (WWC2012)*, CD-ROM, 2012.
- Sugiura K. : Effects of Chemicals on Microcosms: Comparison with the NOECs in Experimental and Natural Ecosystems, *Japanese Journal on Environmental Toxicology*, Vol.13, No.1, pp.37-47, 2010.