

水田除草剤に対する植物種毎の 生態毒性影響の違い

小森 瑞樹¹・湯谷 賢太郎²

¹学生会員 木更津工業高等専門学校専攻科 環境建設工学専攻

(〒292-0041 千葉県木更津市清見台東二丁目11-1)

E-mail:m.komori1989@gmail.com

²正会員 木更津工業高等専門学校講師 環境都市工学科 (同上)

E-mail:yutani@c.kisarazu.ac.jp

本研究では、除草剤ペンシルフロンメチルが水草類に及ぼす生態毒性影響の種類による違いを調査した。6種の水草について調査を行なった結果、除草剤濃度の上昇に伴い体長や葉面積の相対生長率が低下する種や、生長には影響が見いだせないものの、クロロフィルa、フェオフィチン量に有意差が見られ、光合成活性が低下した種、除草剤による影響が見られなかった種など、植物種毎に除草剤に対する反応や感受性に差があることがわかった。このことから、除草剤の影響は体長や質量、見た目には現れなくても、植物の細胞内部に現れることがわかった。

最終的に、複数の水草の除草剤に対する影響を相対影響度によって比較した。

Key Words : bioassay, herbicides, aquatic plants, ecotoxicity

1. はじめに

現行の水質汚濁に係る環境基準や、化管法などの化学物質管理に関する法律では、化学物質の水生生物への影響評価が不十分であったり、基準が細かく分析が困難であったりといった問題がある。また、いくつかの化学物質が混ざったときの複合的な影響の評価もできない。

そこで近年バイオアッセイを用いた生態毒性評価が注目を集めており、これらを用いることで試料が持つ毒性の複合影響を総合的に評価することができる。

従来の生態毒性評価は、OECD のテストガイドラインに準拠した藻類・甲殻類・魚類による急性、あるいは慢性試験によって行われてきた。

しかし、実環境の農薬類の汚染状況とそこに生息すべき様々な生物を考えると、それら3種の試験結果のみで様々な生態リスクを評価するのは困難であると言われている¹⁾。また、感受性が高いとされている種が必ずしも最も感受性が高い種ではない²⁾、と既往の研究でも言われていることから、一般的な生物の他にも地域毎の固有種や希少種での調査も同時に行い、より現状に即した評価をするべきである。

調査対象に入っておらず、国内各地で減少が危惧され

ている生物に水草類がある。レッドデータブック³⁾には87種の水草がリストアップされており、これは国内在来種の40.5%に相当する¹⁾。

減少の要因としてこれまで考えられていたものに、物理的な要因、水質悪化の要因、生物的な要因がある⁴⁾が、これらの問題は徐々に環境保護への意識の高まりから改善されつつある。

しかし依然として、水路や河川に見られた水草は数を減らしていたり、外来種などのこれまでに見られなかった種に取って代わられたりと、本来の状態に回復しているとは言い難い。そういった状況から、新たな環境リスクとして全国の水環境を広範囲に汚染する除草剤の環境リスクも十分検討がなされるべきであると報告がなされている⁴⁾。

除草剤が水草に及ぼす影響については、国内外を問わず多くの報告がなされている^{5,6,7)}。Cedergreenら⁵⁾は、10種類の水草を同条件下で、除草剤についての影響を調査し、マツモの一種が最も影響を受けることを明らかにした。また、2種類の除草剤で影響の傾向や大きさが異なるということも明らかにした。Vanら⁶⁾は、除草剤ペンシルフロンメチル(以下、BSM)が水草類に及ぼす影響は、同じ種内であっても異なることを明らかにした。

Pan ら⁷⁾は、4種の水田除草剤が水草に及ぼす影響を、クロロフィルa量によって調査した。以上のような種々の研究がなされているが、実験条件や使用する水草、除草剤の種類が異なるため、それらの結果を並べて比較することは難しい。さらに、農薬の種類が異なると、影響が異なるため、ある除草剤の調査結果は他の除草剤の評価に用いることができない。

そこで本研究では報告事例の少ないBSMに着目し、複数の水草で同一の条件下で実験を行うことで、水草種毎のBSMによる生態影響を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 対象水草

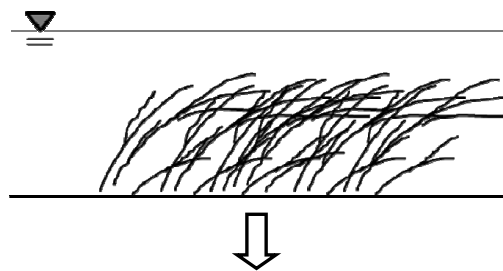
試験は6種的水草に対して行った。まず、代表的な水草としてマツモ (*Ceratophyllum demersum*) と各地で大増殖し問題を引き起こしている外来種であるオオカナダモ (*Egeria densa*) を選定した。次に、各地の湖沼や河川で減少が続いているヒルムシロ科ヒルムシロ属の水草からエビモ (*Potamogeton crispus*) とヤナギモ (*Potamogeton oxyphyllus*) を選定した。最後に、我が国の代表的な浮草であるウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) とアオウキクサ (*Lemna aoukikusa*) を選定した。オオカナダモとマツモはペットショップで購入したため、その由来は不明である。エビモとヤナギモは木更津市内の水路より採取し、研究室に持ち帰った。ウキクサとアオウキクサは木更津市内の溜池と田んぼよりそれぞれ採取した。

(2) 水草に対する除草剤の生態毒性試験

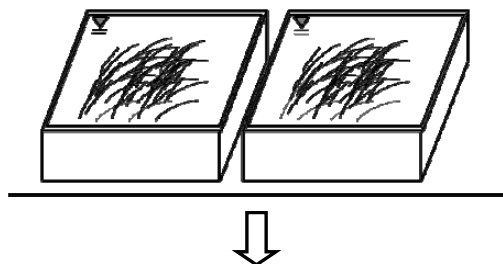
購入または採取した水草は、実験室内で実験条件と同じ培地を用いて1週間程度の培養を行い、環境に順化させたものを実験に用いた。また、その際に予備実験として栄養塩濃度を变化させた複数の培地で培養実験を行い、問題なく水草が生長した濃度を実験での培地濃度とした。培地にはASTM培養液(Modified Andrews' Medium)⁸⁾を用いた。

実験では、除草剤濃度を4段階に分けて徐々に高くしていった培地を100 ml入れたガラス瓶に、水草の生長点を投入した。農薬にはBSM (和光純薬工業) を用いた。BSMはアセトニトリル10 mlに溶かした後、培地と混合して最終的な濃度を調整した。また、農薬以外の条件が同じ培地を用意し、対照とした。その後、1~2週間培養した後、水草の種類に合わせて全長もしくは葉面積の相対生長率及び、クロロフィルa量、フェオ色素量を測定した。クロロフィルa量とフェオ色素量の比をC/Pと表し、水草の葉の光合成活性を見る指標とした。なお、面積は

①河川や水路からの採取



②室内で順化及び予備実験(1週間程度)



③本実験(1~2週間)

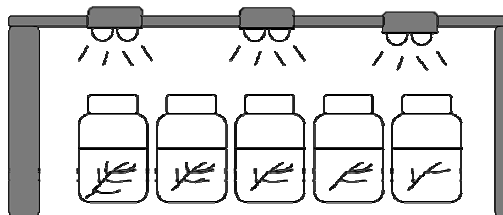


図-1 実験の流れ

デジタルカメラで撮影した画像を画像解析ソフトLia32 for Win32⁹⁾を用い測定した。クロロフィルa量、フェオ色素量は、アセトン抽出したものをロレンツェン法¹⁰⁾に従って測定した。各濃度および対照につき5サンプルずつ、計25サンプルに対して試験を行った(図-1)。

実験は気温 23 ± 1 °Cに調整された実験室内で行った。光源には白色蛍光灯を用い、光量子束密度 $50.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ の条件で実験を行った。実験期間中に培地の水深が視認できる程度に減少した場合は、実験開始時と同じ水深になるように蒸留水を添加した。

(3) 用量反応曲線と相対影響度の算出

Seefeldtら¹¹⁾の方法を用い、各実験結果について用量反

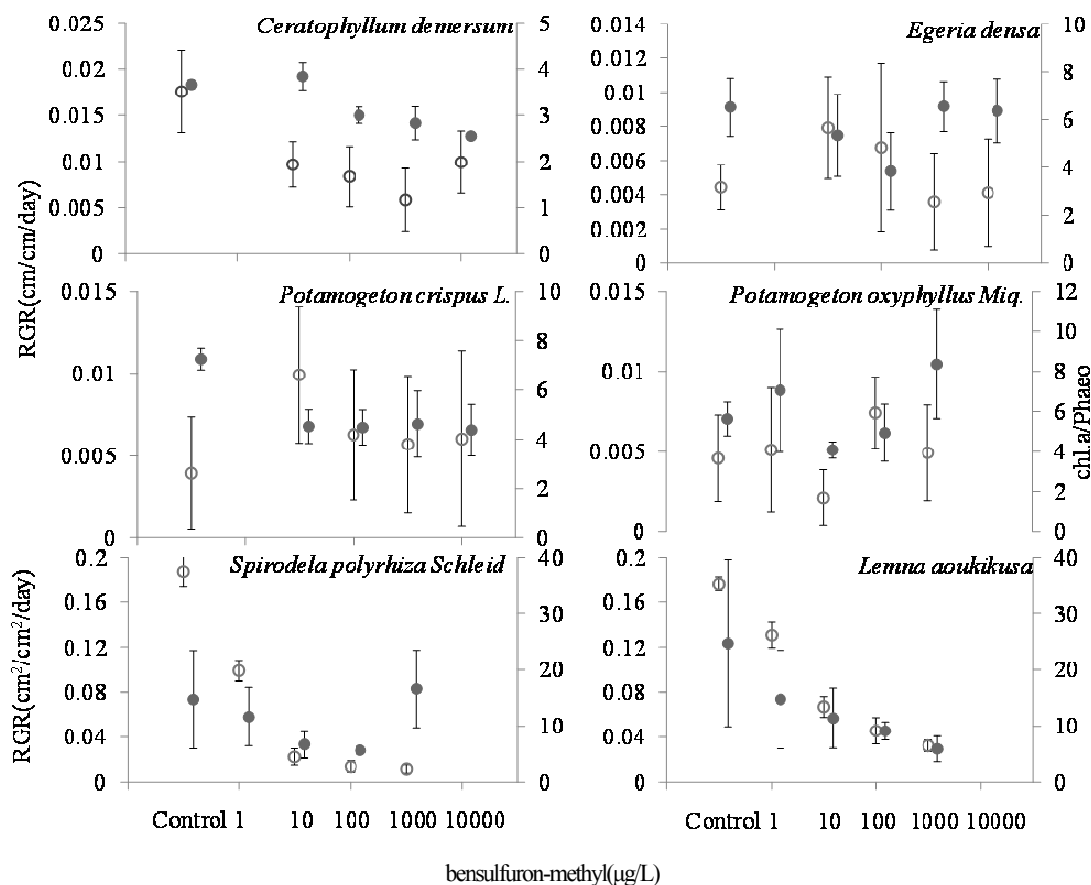


図-2 除草剤濃度の上昇に伴う反応。○はRGR, ●はC/Pを表す。

応曲線を決定した。用量 (x) に対する反応 (y) の式は以下の様に書ける。

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(I_{50}))]} \quad (1)$$

ここに、Cはyの最小値、Dはyの最大値、bは曲線の勾配、 I_{50} は50 %影響濃度 (EC_{50}) である。Dの値は対照の結果を用いた。最初に、 I_{50} 、bの値は実験結果に合うように設定し、Cの値を決定した。その後、設定したCの値を用いて I_{50} を再設定し、bの値を実験結果に合うように再設定した。以上の試行を数回繰り返し、各実験の用量反応曲線を決定した。

本研究では、全長や葉面積の相対生長率やクロロフィルa量など、異なった指標に対する影響度を比較するため、相対影響度という指標を定義した。これは、上記の用量反応曲線の決定により求められたC、Dの値を用い、

それぞれを0、1となるように実験結果の値を等比配分して求めた値である。

3. 実験結果

(1) 各水草のBSMに対する影響

ベンスルフロンメチル (BSM) 濃度と、体長または葉面積の相対生長率 (RGR) 及びクロロフィルa量とフェオ色素量の比 (C/P) の関係を図-2に示した。

マツモではBSM濃度の増加に伴って体長のRGRが0.018から0.010 cm/cm/dayに減少した。また、C/Pにおいても同様の傾向が見られ、BSM濃度の増加に伴って、C/Pが3.66から2.55に減少した。相対影響度による検討には体長のRGRを用いた。本実験より求められたマツモのBSMに対する EC_{50} は3.0 µg/lであった。

オオカナダモでは個体毎のばらつきが大きく一概には言えないものの、体長のRGRとC/Pのどちらの項目にお

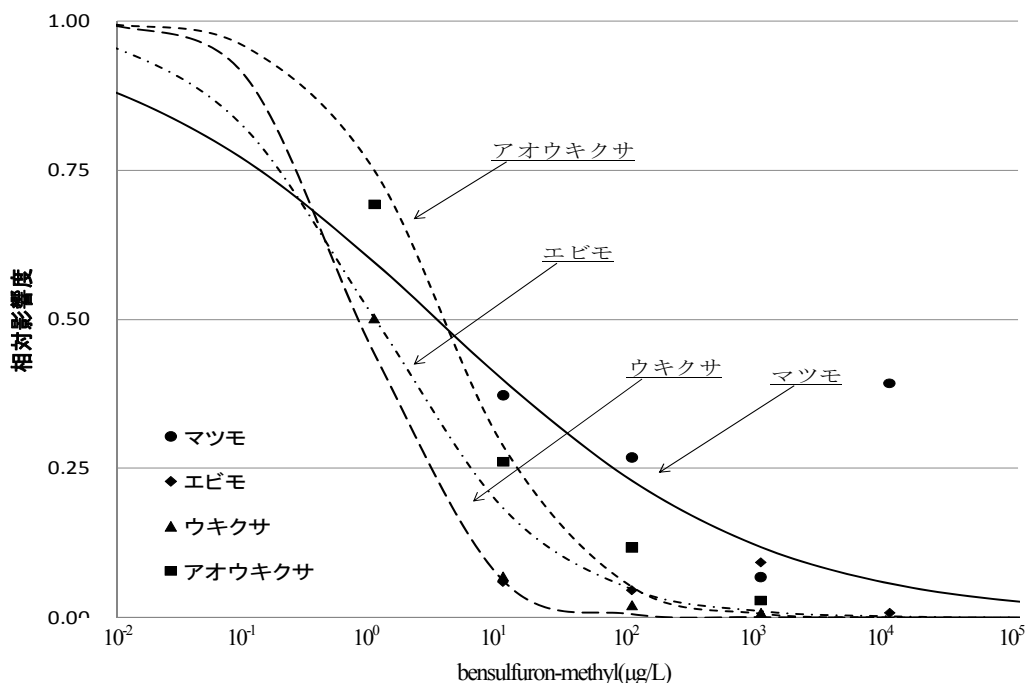


図-3 BSM 濃度と相対影響度

いても有意な傾向を見出すことが出来なかった。そのため、相対影響度による検討からは除外した。

エビモは体長のRGRに関しては有意な傾向が見られなかった。一方で、C/Pに関してはBSMの添加により減少が見られ、7.25から4.52まで約40 %程度光合成活性が低下した。そのため、相対影響度による検討にはC/Pの値を用いた。本実験より求められたエビモのBSMに対するEC₅₀は1.0 μg/lであった。

ヤナギモについては、オオカナダモの場合と同様に体長のRGRとC/Pのどちらの項目においても有意な傾向を見出すことが出来なかった。そのため、相対影響度による検討からは除外した。

ウキクサでは、BSM濃度が0.1 μg/lで対照と比較して56 %の葉面積RGRの減少が見られた。C/Pに関しては、BSM濃度の増加に伴い単調に値が低下し、BSM濃度1.0 μg/lで対照と比較してC/Pが30 %減少した。この際、濃度1000 μg/lでC/Pの増加する結果が得られたが、この値はエラーとして用量反応曲線の算出には用いていない。相対影響度の検討ではC/Pの結果を用いた。本実験より求められたウキクサのBSMに対するEC₅₀は0.8 μg/lであった。

アオウキクサでは、ウキクサと近い傾向を示し、BSM濃度の増加に伴い、葉面積RGR及びC/Pの値はどちらも低下した。BSM濃度1.0 μg/lで葉面積RGRは対照と比較して25 %減少し、C/Pは44 %減少した。相対影響度の

検討ではRGRの結果を用いた。本実験より求められたアオウキクサのBSMに対するEC₅₀は2.7 μg/lであった。

(2) 相対影響度によるBSMの各水草に対する影響の比較

BSMに対して全長RGR、葉面積RGR、C/Pのいずれかで確かな影響の見られたマツモ、エビモ、ウキクサ、アオウキクサの4種に対して、相対影響度を計算してBSMに対する影響を比較した(図-3)。

マツモは4種の中で最も低濃度で影響を受ける種であるが、曲線の傾きが小さく、影響度が小さいことが分かる。BSM濃度1×10¹ μg/l以下ではマツモは最もBSMの影響を受けるが、逆に高濃度の1×10⁴ μg/l以上では他の3種と比較して影響は小さい。

ウキクサとアオウキクサでは用量反応曲線の傾きが大きく、ある濃度を超えると強い影響を受けることが分かる。どちらもBSM濃度1×10¹ μg/l程度から影響が始め、ウキクサでは1×10¹ μg/l程度、アオウキクサでは1×10² μg/l程度のBSM濃度になると生長はほぼ期待できない。

エビモはEC₅₀で見るとウキクサとほぼ同程度であることが分かる。しかし、影響が開始する濃度はマツモに次いで低く、1×10² μg/l程度のBSM濃度で既に相対影響度が0.9程度となり、影響が開始していることが分かる。

4. 考察

本研究ではマツモ (*Ceratophyllum demersum*) と外来種であるオオカナダモ (*Egeria densa*)、各地の湖沼や河川で減少を続けているヒルムシロ科ヒルムシロ属の水草からエビモ (*Potamogeton crispus*) とヤナギモ (*Potamogeton oxyphyllus*)、我が国の代表的な浮草であるウキクサ (*Spirodela polyrrhiza*) とアオウキクサ (*Lemna aoulukusa*) の6種について実験を行った。

BSMを用いて行なわれたPanらの研究ではマツモ、ネジレモ (*Vallisneria spiralis*)、コカナダモ (*Elodea nuttallii*) のすべてにおいて、21日間の培養によってBSM濃度0.5 µg/lで50 %以上の生長抑制効果が見られた。本研究で求められたEC₅₀はアオウキクサの0.8 µg/lから、マツモの3.0 µg/lであり、本研究で得られた値は妥当性があるものと考えられる。

オオカナダモとヤナギモを除く4種に関しては、除草剤BSMの濃度の上昇に伴い相対生長率やクロロフィルa量が減少することがわかった。しかし、既往の研究⁹⁾において除草剤テブチラジンを用いた場合では、オオカナダモの生長が阻害されるとの報告がなされている。一方でエゾミクリ (*Sparganium erectum*) に関しては、影響が見られなかった。また、同研究において、コウキクサ (*Lemna minor*) に対して2種類の除草剤の影響を調べたところ、実験条件や種類が同じであっても、除草剤の種類の違いによって影響の出方に差が出るとの結果が得られている。そのため、本研究においてオオカナダモとヤナギモでは除草剤BSMの影響が見られないという結果が得られたため、これら2つの種はBSMの影響を受けづらい種であると考えられる。

実河川で行なわれた研究¹²⁾によると、除草剤が流入し始める5月の初旬から、ウキクサの生長には著しい阻害が見られ、特にアオウキクサの生長に関してはほぼ完全に阻害されたとの報告がなされている。また、BSMの河川における最高検出濃度は2.3 µg/lであったとの報告¹³⁾もある。この値は本研究によって得られたウキクサやコウキクサのEC₅₀にも近い値であり、実環境中において、これらの水草が生長阻害を受けている可能性が考えられる。

一方で、実河川での農薬、除草剤の流出は、短期間で低濃度であるという報告もある¹²⁾。しかし、EC₅₀に満たなくても水草の生長は阻害される。さらに、水草の種類によって、影響の大きさは異なる。そのため、生態系内において、他の水草との競合が起こると、除草剤濃度が低濃度であっても、優占種の置き換わりが起こる可能性があり、注意が必要である。

5. 結論

本研究により得られた主な結論を以下に列挙する。

- ① 除草剤による毒性は、見た目には現れなくても光合成活性を低下させるなど、内部に影響を及ぼすことがある。
- ② 水草の種類ごとに除草剤が効いてくる濃度や、効き方に差がある。
- ③ 相対影響度を用いることで、複数の水草の影響の度合いを比べることができた。
- ④ 河川に流出した除草剤は、そこに生息する水草に対して、生長を阻害している可能性がある。

参考文献

- 1) 畠山成久編：化学物質の生態リスク評価と規制－農薬編－，pp.117-127，2006。
- 2) 石原悟，堀尾剛，石坂真澄，小原裕三，大津和久，横山淳史，遠藤正造，日本陸水学会講演要旨集，Vol.69，3A32，2004。
- 3) 環境庁自然保護局：改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物レッドデータブック，Vol.8 植物 I，2000。
- 4) 角野康郎，1-2-1 水草の減少・絶滅，pp.26-32，2003。
- 5) Cedergreen, N., Spliid, N.H. and Streibig, J.C. : Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicide, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol.58, pp.314-323, 2004。
- 6) Pan, H., Li, X., Xu, X. and Gao, S. : Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria spiralis* and *Elodea nuttallii*, *Journal of Environmental Sciences*, Vol.21, pp.307-312, 2009。
- 7) Van, T.K. and Vandiver, V.V.JR., : Response of *Hydrilla* to Various Concentrations and Exposures of Bensulfuron Methyl, *J. Aquat. Plant Manage.*, Vol.32, pp.7-11, 1994。
- 8) ASTM, E1913-04, p.12。
- 9) <http://www.vector.co.jp/soft/dl/win95/edu/se033430.html>, (2011.09.10 閲覧)
- 10) 西條八東，三田村緒佐武：新編湖沼調査法，pp.191-192，1995。
- 11) Seefeldt, S.S., Jensen, J.E. and Fuerst, E.P. : Log-Logistic Analysis of Herbicide Dose-Response Relationships, *Weed Technology*, Vol.9, pp.218-227, 1995。
- 12) Hatakeyama, S., Inoue, T., Suzuki, K., Sugiya, Y. and Kasuga, S. : Assessment of overall herbicide effects on growth of duckweed in a flowthrough aquarium carrying pesticide polluted river water, *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, Vol.2(1), pp.65-75, 1999。
- 13) Okamoto, Y., Fisher, R.L., Armbrust, K.L. and Peter, C.J. : Surface Water Monitoring Survey for Bensulfuron Methyl Applied in Paddy Fields, *J. Pesticide Sci.*, Vol.23, pp.235-240, 1998。

(2)

DIFFERENCES IN ECOTOXIC EFFECTS OF PADDY FIELDS HERBICIDE ON SEVERAL AQUATIC MACROPHYTES

Mizuki KOMORI, Kentaro YUTANI

Differences in ecotoxic effects of paddy field herbicide bensulfuron-methyl on 4 aquatic macrophytes and 2 floating plants were tested in the laboratory.

In results, relative growth rate of stem length or leaf area were reduced in some macrophytes. Even though there were no effects on the growth of plants, chlorophyll-a and pheo-pigments concentrations were influenced by the herbicide in some plants, the others were not affected by the herbicide. It is found that the response and sensitivity on the herbicide is different among plant species. Therefore the effects of herbicide on the aquatic plants appeared in the cells of plants, however there were no alterations to look at.

At last, the parameter “relative influence” was defined to compare among 4 plant species that some effects were appeared by the herbicide.