

農薬および重金属に対する藻類による 生物検定法の検討

日 野 修 次

要 約

農薬および重金属に対する生物検定法を検討した結果、ミカツキモを使用する方法は、検出限界値の問題や環境水中に一般的に含まれる成分（無機態窒素）による接合阻害の問題などにより生物検定法として適当な方法ではなく、他の指標生物をもちいる方がより適切であると考えられた。

1 緒 言

近年、農薬による環境影響に関する関心が高まっており、ゴルフ場の開発にともない芝の整備に使用される農薬が社会的に問題化されるようになった。しかしながら、その使用に関しては農地とは異なり現在のところ最終的な指針や規制はなく早急な対応が必要とされている。このような状況において、農薬などの水界生態系におよぼす影響に関する研究が徐々にではあるが進められている^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)}。

北海道においては、これまでにゴルフ場から流出したとされる農薬によって養魚場などの被害が数回発生しており、ゴルフ場で使用される農薬の流出は農地からの農薬類や栄養塩類の流出とともに生活環境や水界生態系へどのような影響をおよぼすかが懸念されている。これまでに得られた報告によると、除草剤や殺虫剤が水界に流入した場合、藻類や水生昆虫などを優先的に減少させることによって水界生態系を破壊し、生物の多様性を小さくしてしまうこと、すなわち単純な生態構造になってしまうことが示されている。

従来、農薬の検出にはガスクロマトグラフィー、高度液体クロマトグラフィーなどの機器分析が主体になっているが、これらの方法と併用して生物影響による検定法も研究されている。これまでに農薬に対して応用されている生物検定法としてはメダカ、グッピー、ミジンコなどの動物群⁹⁾があるが、指標生物として藻類を対象にした実験研究例は少ない。本報告では、濱田^{9,10)}が提案したミカツキモをもちいる生物検定法を行政試験法として採用し得るかどうかを検討し、農薬および重金属によって汚染された水試料を対象にその有効性について検討した。

2 調査および試験方法

2.1 使用生物種

本実験系では国立環境研究所微生物保存研究施設より分与された *Closterium ehrenbergii* Meneghini ex Ralfs の NIES-228 (+) 株と NIES-229 (-)

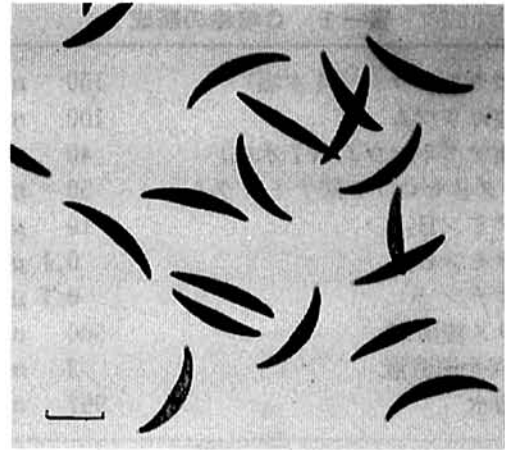


図1 ミカツキモ
(*Closterium ehrenbergii*, — 200 μm)

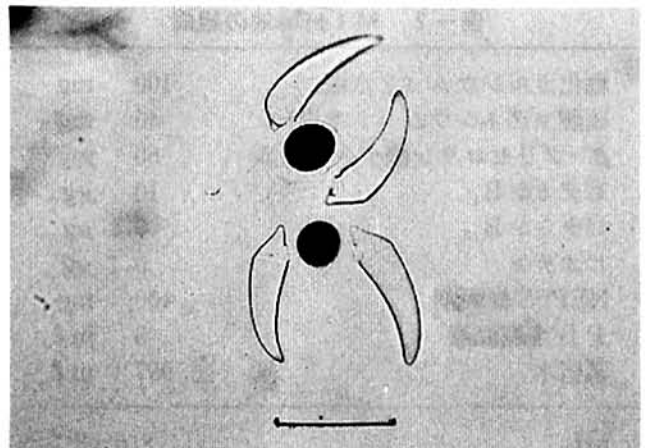


図2 ミカツキモ (*Closterium ehrenbergii*)
の接合子 (—, 200 μm)

株を使用した。当種は緑藻植物門に属するいわゆる接合藻の無菌培養株である。

ミカツキモの写真を図1に示す。当種は培養系において窒素欠乏状態となった場合、有性生殖を行い接合子を形成(図2)するが、無機態窒素濃度が増加すると発芽し栄養生殖を行う生活史(環)を有する藻類である。

2.2 培養方法

2.2.1 試験培地および藻類の保存法

試験時の基本培地および継代培養にはC培地¹¹⁾を使用し、接合試験には窒素欠乏培地であるMIH培地¹¹⁾を使用した。両培地の組成および添加用微量金属成分(P IV金属混液)は表1, 2および3に示した。

培養株の保存には10mlのC培地を分注したスクリーキャップ付き試験管をあらかじめオートクレーブで滅菌したものを使用した。試験管に無菌的に接種した後、原則として2,000lx 20°C 16時間: 8時間の明暗サイクルで培養した。

表-1 C培地の組成

硝酸カルシウム (4水塩)	150	mg
硝酸カリウム	100	mg
硫酸マグネシウム (7水塩)	40	mg
β-グリセロリン酸ナトリウム	50	mg
ビタミンB ₁	10	μg
ビタミンB ₁₂	0.1	μg
ビオチン	0.1	μg
トリス緩衝剤	500	mg
P IV金属混液	3	ml
蒸留水	997	ml
pH	7.5	

表-2 MIH培地の組成

塩化カルシウム (2水塩)	100	mg
硫酸マグネシウム (7水塩)	40	mg
β-グリセロリン酸ナトリウム	50	mg
ビタミンB ₁	10	μg
ビタミンB ₁₂	0.1	μg
ビオチン	0.1	μg
HEPES 緩衝剤	400	mg
P IV金属混液	3	ml
蒸留水	997	ml
pH	8.0-8.5	

表-3 P IV金属混液の組成

塩化第二鉄 (6水塩)	196	mg
塩化マンガン (4水塩)	36	mg
塩化亜鉛	10.5	mg
塩化コバルト (6水塩)	4	mg
モリブデン酸ナトリウム (2水塩)	2.5	mg
ナトリウムEDTA (2水塩)	1000	mg
蒸留水	1000	ml

2.2.2 ミカツキモの成長曲線

実験用培地は、スクリーキャップ付き試験管にC培地を10ml分注して、120°C 20分間滅菌し室温まで冷却後1日以上放置したものを使用した。あらかじめミカツキモの保存と同一条件で予備培養した試験藻株を試験管に1mlあたり10個体となるように接種し、20°C 5,000lx (約200 μEinst/m²/sec), 16時間: 8時間明暗サイクルで培養し、1日1回の頻度で660nmの吸光度を島津製作所Spectronic 20型光電比色計をもちいて試験管ごと測定し成長曲線を求めた。また一部の試料についてはワットマンGF/Cグラスファイバーフィルターでろ過し、フィルター試料よりメタノールでクロロフィル-aを抽出し、ターナー111型蛍光光度計によって定量した。

2.2.3 接合実験

ミカツキモの2株(NIES-228株, NIES-229株)をあらかじめ別々にC培地で予備培養し、対数増殖期中期に達した試験藻を使用した。それぞれの藻株を遠心分離法によって滅菌済みMIN培地で3回洗浄し、予備培養に使用したC培地より持ち込まれる余分な無機窒素化合物を除去したのち、6mlの滅菌MIN培地、またはろ過試水を分注したペトリシャーレ内の時計皿上にそれぞれ約100個体を接種した。

ペトリシャーレごと恒温器に入れ、20°C 5,000lx 16時間: 8時間 明暗サイクルで培養した。適宜、恒温器より取り出し、実体顕微鏡または倒立顕微鏡で観察し、全細胞数に対する接合数を計数した。また、当該種が(+)株と(-)株各々1個の栄養細胞より2個ずつの配偶子ができ、それらが接合して2個の接合子が出来ることから接合率を以下の式より求めた⁹⁾。

$$\text{接合率 (\%)} = \frac{\text{接合子数}}{\text{接合子数} + \text{栄養細胞}}$$

2.2.4 窒素化合物による接合阻害実験

窒素化合物によるミカツキモ接合阻害実験には

窒素源として硝酸カルシウム (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O) および硝酸カリウム (KNO₃) を添加した。単純に添加した場合、培地中のカルシウム濃度が高くなることによってミカヅキモの接合に影響する可能性があり、この影響を排除するため MIN 培地に含まれる塩化カルシウム (CaCl₂) 量を添加する硝酸カルシウムの量に応じて制限した。その他の条件および培養等は 2.2.3 と同様である。

2.2.5 農薬および重金属による成長および接合の阻害実験

実験に使用した農薬はダイアジノン (殺虫剤), シマジン (除草剤), オキシ銅 (殺菌剤) の 3 系列 3 種類, 重金属は塩化カドミウム, 塩化第一水銀の 2 種類である。

農薬類は難水溶性のものが多いため, 添加時には農薬試料を少量のエタノールに溶解した後に, 無機態窒素の影響のない MIN 培地によって希釈し, その 1 ml を滅菌フィルターを通し, オートクレーブ滅菌された C 培地 9 ml を含むスクリーキャップ付き試験管に添加した。重金属類も同様に水溶液として滅菌フィルターを通し, 1 ml を添加した。また, 微量なエタノールの混入による藻類への影響を考慮し, 対照区も同様の処理をした。その他の培養法, 測定法は 2.2.2 と同様であるが, 一部の実験では成長量をクロロフィル-a 量で表した。

接合実験では, 2.2.5 に記述された方法によってペトリシャーレ内の時計皿に各試料を含んだ培地を添加した。培養法, 接合子数の計数などは 2.2.4 の方法と同様である。

2.2.6 環境試料をもちいた成長および接合試験

この実験には阿寒湖, 大沼, 茨戸湖, H 町の S ゴルフコースの湖沼水, 排水を使用し, 接合阻害試験を試みた。これらの水試料はワットマン GF/C グラスファイバーフィルター (φ 1.2 μm) でろ過し, 実験に使用した。ろ過水の一部は無機態窒素の定量に使用した。他の方法は 2.2.4 と同様であるが, 成長実験では窒素とリンの不足による成長阻害をなくすため, 窒素 (硝酸ナトリウム) とリン (リン酸-カリウム) をそれぞれ 1 mgN/l, 0.1 mgP/l となるよう試験溶液に添加した。

2.2.7 ペーパーディスク法による生物影響に関する試験

実験にもちいた藻類種は *Chlorella pyrenoidosa* Chick (C-28) であり, 培地は C 培地を使用した。適当量の試験藻類を 1.5% の寒天を含む C 培

地に加えペトリシャーレ内に流し込んで固めたのちに 25°C 2,000 lx で培養し, ペーパーディスク法で判定した。

この方法は, 直径 1 cm 程度に切り抜いた濾紙に試験水をしみこませ, 藻類が増殖する予定の寒天培地あるいは藻類が増殖した寒天培地に, この濾紙をのせ一定期間培養後, その阻止円の大きさを計数し, その大きさによって試験試料中の毒性の強弱を定性, あるいは定量するものである (図 6 参照)。

3 結果および考察

3.1 ミカヅキモの成長曲線および接合実験

図 3 にミカヅキモの C 培地中での成長曲線を示す。660nm の吸光度の増減によって表された成長曲線は, NIES-228 株, NIES-229 株ともに初期に約 10 日の対数増殖期が認められ, その後は定常期となり安定した成育を示した。その後, 30-35 日程度で成育が停止し, 細胞死にともなう個体数の減少が認められ, 一般的な藻類増殖の傾向と同様な成長曲線を示した。

また, 窒素欠乏培地である MIN 培地にミカヅキモの NIES-228 株と NIES-229 株の両株をほ

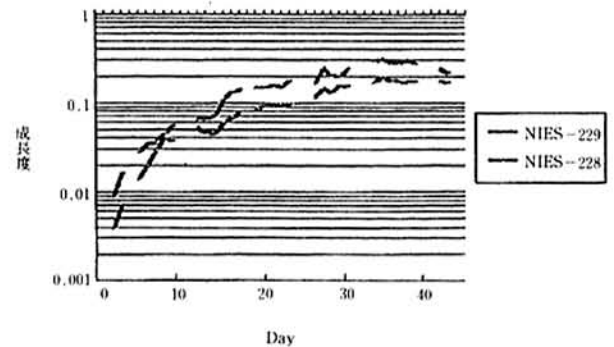


図 3 ミカヅキモ (*Closterium ehrenbergii* NIES-228 株, NIES-229 株) の成長曲線

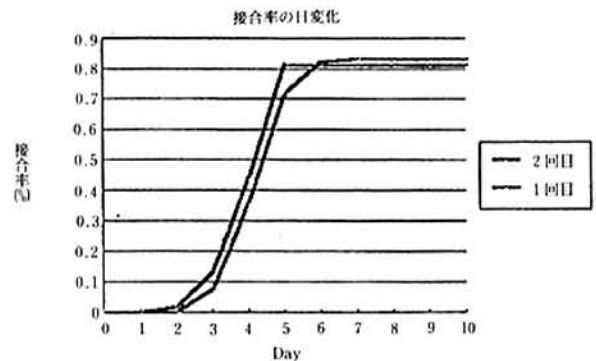


図 4 ミカヅキモ (*Closterium ehrenbergii* NIES-228 株, NIES-229 株) の接合の日変化

ほぼ同数になるようペトリシャーレ内に同時接種したところ、培養開始後3-4日目より接合をはじめ6-7日目ではほぼ終了するサイクルを示した(図4)。また、すべての栄養細胞が接合するわけではなく、全細胞の約80%が接合し、接合しなかった栄養細胞はそのまま接合子と一緒に培地中に存在していた。これらの接合に関する実験結果より、正常な接合か否かの判定は培養開始後6日目まで80%接合をめどとした。

3.2 窒素化合物の存在による接合阻害

添加した硝酸カルシウム(Ca(NO₃)₂)、硝酸カリウム(KNO₃)は、合計の窒素濃度として0-2 mmole/l (0-28 mgN/l)の範囲で6段階の濃度設定をした。表4に示したように、窒素濃度0.02 mmole/l (約0.28 mgN/l)では10%以下の接合しか認められず、かなりの低濃度でも阻害されることが明らかとなった。この窒素濃度は湖沼や河川などの自然水系では一般的によく観測される値である。

表-4 ミカズキモの接合に対する無機態窒素(硝酸塩)の影響

moel/l	0	0.0002	0.002	0.02	0.2	2
mgN/l	0	0.0028	0.028	0.28	2.8	28
1	106/131	162/185	142/184	20/153	0/142	0/174
2	112/142	156/182	154/188	10/158	0/147	0/162
平均	109/137	159/184	148/186	15/156	0/145	0/168
(%)	79.6	86.1	79.6	9.6	0.0	0.0

a/b → 接合細胞数/総細胞数

3.3 重金属による成長および接合阻害

表5にカドミウム(Cd)および水銀(Hg)による成長阻害実験の結果を示す。この成長阻害は栄養生殖(無性生殖)によって増殖する栄養細胞の増殖率を示しているが、クロロフィル法、吸光度法ともに成長に関してはカドミウム0.1 μmole/lで無添加である対照区の約60-70%, 1 μmole/lで40-50%の成育状態を示し、10 μmole/l以上ではまったく成育が認められなかった。一方、水銀はカドミウムと同様に0.1 μmole/l以上で影響が認められたが、カドミウムとは異なり、濃度に対応して増殖率が急激に減少し1 μmole/l上ではほとんど成長が認められなかった。

表6にミカズキモの接合に関する結果を示す。カドミウムと水銀では大きく異なり、カドミウム

表-5 ミカズキモに対する重金属による成長阻害

μmoel/l	0	0.01	0.1	1	10	100
1 カドミウム	0.136	0.139	0.087	0.071	0.000	0.000
(%)	(100)	(102)	(64.0)	(52.0)	(0.0)	(0.0)
2 カドミウム	2585	3045	1815	1095	0	0
(%)	(100)	(118)	(70.2)	(42.4)	(0.0)	(0.0)
1 水銀	0.136	0.123	0.005	0.005	0.005	0.000
(%)	(100)	(88.4)	(73.4)	(4.1)	(4.1)	(0.0)
2 水銀	2585	3020	2391	0	0	0
(%)	(100)	(117)	(92.4)	(0.0)	(0.0)	(0.0)

1. 660nmによる吸光度 2. クロロフィルm-a濃度(μg/l)
* Hg=200, Cd=112

表-6 ミカズキモの接合に対する重金属の影響

μmole/l	0	0.01	0.1	1	10	100
カドミウム 1	0.754	0.798	0.699	0.770	0.000**	0.000**
2	0.671	0.800	0.678	0.691	0.000**	0.000**
平均	0.713	0.799	0.689	0.557	0.000	0.000
(%)	(100)	(112)	(96.6)	(78.1)	(0.0)	(0.0)
水銀 1	0.754	0.760	0.000*	0.000**	0.000**	0.000**
2	0.671	0.708	0.000*	0.000**	0.000**	0.000**
平均	0.713	0.734	0.000	0.000	0.000	0.000
(%)	(100)	(103)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)

*: 栄養細胞は緑色, **: 白色化

の場合は1 μmole/l (112.4 μg/l)接合率78%に対して、水銀では0.1 μmole/l (20.6 μg/l)でまったく接合しなかった。また、水銀では0.01と0.1 μmole/lの間に大きな接合率の差が認められた。これらの結果から、接合に関しては水銀のほうがカドミウムより強い毒性を示すことを表している。また、カドミウム1 μmole/l存在下では接合子の膨潤と崩壊という異常をおこすものが観察された(図5)。この現象は、栄養細胞では生じていないことから減数分裂時の異常ではないかと考えられるが、詳細は明らかではない。同様なことは先に濱田^{9,10)}によって報告されており、その濃度は約0.1 μmole/lであった。

阻害または未接合の栄養細胞において水銀0.1 μmole/lでは細胞が緑色であり、その光合成活性が認められることから(データ省略)、栄養細胞自身は死滅していないと考えられる。カドミウム10 μmole/l以上、水銀1 μmole/l以上では後述するように農薬類による阻害と同様に細胞が白化し