

図5 カドミウム存在下で形成された異常な接合子  
カドミウム濃度  $1 \mu\text{mole}/\ell$  —  $100 \mu\text{m}$

ており、光合成活性も認められないことから細胞が死滅していると考えられる。

濱田<sup>9,10)</sup>はカドミウム、水銀ともに  $10 \mu\text{g}/\ell$  (約  $0.1 \mu\text{mole}/\ell$ ) 以上の濃度範囲で増殖および接合がほとんど観察されないことを報告しており、水銀存在下での接合を除いて本報告の方が一桁高い値を示した。

藻類に対する重金属の阻害は、Rai ら<sup>9)</sup>によって詳細に検討されている。主として生理生化学実験に使用される培養藻類を対象とした研究であるが、成長速度または光合成速度としての半阻害濃度(最大速度の1/2になる時の濃度)は、カドミウム  $60 \mu\text{g}/\ell - 20 \text{mg}/\ell$  (約  $0.5 - 180 \mu\text{mole}/\ell$ ) と大きな幅があることを報告している。また、高村ら<sup>13)</sup>、Takamura ら<sup>14)</sup>は主として重金属汚染河川の汚染地区と非汚染地区の付着藻類を使用して光合成活性を測定した結果、カドミウムに対する光合成阻害は半阻害濃度で  $7.5 - 2,000 \mu\text{mole}/\ell$  であったことを報告している。また非汚染地区と汚染地区では明瞭な違いが認められ、汚染地区より分離された藻類は重金属に対する耐性が強いことを示している。

光合成速度と成長速度あるいは接合度を直接比較することは問題があるが、以上の結果から当実験に使用されたミカヅキモは重金属(カドミウム、水銀)に対して耐性がない株であると考えられる。

### 3.4 農薬による成長および接合阻害

農薬によるミカヅキモに対する影響は、3種類の農薬によって明らかに異なる結果を示した。これは実験に使用された農薬が除草剤(シマジン)、殺虫剤(ダイアジノン)、および殺菌剤(オキシシン銅)であり、お互いに異なる作用機作を持っている

表-7 ミカヅキモの成長に対する農薬の影響

mg/ℓ	0.0	0.001	0.01	0.1	1	10
クロロフィル-a ( $\mu\text{g}/\ell$ )						
シマジン	3850	3240	2756	3310	2000	0.0
	3720	3860	3544	3720	2620	0.0
平均	3785	3550	3150	3520	2310	0.0
(%)	(100)	(93.7)	(83.2)	(92.9)	(61.0)	(0.00)
ダイアジノン		3690	2890	2620	989	0.0
		3030	3450	2960	1410	0.0
平均		3360	3710	2790	1200	0.0
(%)		(88.7)	(97.9)	(73.7)	(31.7)	(0.00)
オキシシン銅		3240	3790	3170	0.0	0.0
		3590	3170	2410	0.0	0.0
平均		3240	3480	2790	0.0	0.0
(%)		(85.5)	(91.9)	(73.7)	(0.00)	(0.00)

\*: 成長はクロロフィル-a 量で表している

表-8 ミカヅキモの接合に対する農薬の影響

mg/ℓ	0.0	0.001	0.01	0.1	1	10
シマジン	0.797*	0.736*	0.667*	0.319*	0.000*	0.000*
	0.803	0.715	0.735	0.400	0.015	0.000
平均	0.800	0.726	0.701	0.360	0.008	0.000
(%)	(100)	(90.8)	(87.6)	(45.0)	(0.01)	(0.00)
ダイアジノン		0.783*	0.717*	0.574*	0.298*	0.000*
		0.696	0.623	0.629	0.242	0.000
平均		0.740	0.670	0.602	0.270	0.000
(%)		(92.5)	(83.4)	(75.3)	(33.8)	(0.00)
オキシシン銅		0.673**	0.652**	0.575**	0.000**	0.000**
		0.706	0.673	0.627	0.000	0.000
平均		0.690	0.663	0.601	0.000	0.000
(%)		(86.3)	(82.9)	(75.1)	(0.00)	(0.00)

\*: 栄養細胞は色、形状とも異常が認められない  
\*\* : 栄養細胞は白色退化が認められる

るためであると考えられる。

成長に関して、シマジン、ダイアジノンの濃度が1 ml/lでも対照区(未添加)に対して30-60%の成育を示すが、オキシシン銅は同濃度ではまったく成長しなかった(表7)。また、接合に関してはダイアジノン濃度が1 ml/lでも30%接合するのに対して、シマジンとオキシシン銅はほぼ0%であった(表8)。

これらの結果から、ミカツキモの成育および接合に関してはオキシシン銅が最も高い毒性を示すのに対して、ダイアジノンが最も低い毒性を示していると考えられる。また、接合を顕微鏡で確認する際に未接合の栄養細胞が白化しているものとしていないものとが観察された。これは重金属(カドミウム、水銀)の場合と同様の現象であるが、オキシシン銅はすべての未接合の栄養細胞が白化しているのに対して、シマジン、ダイアジノンは白化しておらず、大きな違いが認められた。

ダイアジノンが殺虫剤であり、一方、シマジンは除草剤、オキシシン銅が殺菌剤であることから、シマジンはもちろんのことオキシシン銅も光合成を阻害していると考えられ、昆虫などの動物群と藻類などの植物群に対する毒性の作用機作の違いが反映していると推定される。

濱田<sup>9,10)</sup>が実験に使用した農薬のうち、本実験と共通しているものは除草剤のシマジンであるが、接合子の異常は1 mg/lで認められ、5 mg/l以上で接合、成長ともにまったく認められなくなることを報告しており、本実験結果と同様であった。

これまでに農薬による藻類に対する影響はあまり調査研究が行われてはいない。安野<sup>15)</sup>は、除草剤(オキサジアゾン、テイオベンカーブ)で混合生態系に投入した場合に、植物プランクトンの光合成活性が0.1 mg/lで抑制され1 mg/lでは40日間回復しなかったことを、また、笠井・花里<sup>2)</sup>は実験水槽をもちいて農薬の添加実験を行い、除草剤であるシメトリン1 mg/l添加で藻類の現存量は著しく低下したままであること、0.1 mg/lの添加では添加直後に著しく低下し、その後わずかに回復したのみであることをそれぞれ報告しており、農薬の水界への混入によって生態系が破壊されてしまうことを示している。

### 3.5 自然環境試料およびゴルフ場排水をもちいた接合実験

自然環境試料およびゴルフ場排水による接合実験の結果、阿寒湖、大沼の湖沼水、H町Sゴルフ

表-9 自然水、排水による接合阻害実験

	接合数/総細胞数	%	平均(%)	
対照区 (MIH培地)	1	364/518	70.3	71.2
	2	334/464	72.0	
阿寒湖	1	364/509	71.5	71.0
	2	308/437	70.5	
大沼	1	434/527	82.4	79.4
	2	318/416	76.4	
茨戸湖	1	312/624	50.0	39.3
	2	136/477	28.6	
H町Sゴルフコース	1	228/369	61.8	59.9
	2	254/439	57.9	

1,2 は2回実施したことを示す  
接合数、総細胞数は5枚のペトリシャーレの合計数

コースの排水では成長量に関して異常が認められなかったが、茨戸湖水では成長の促進が認められた(データ省略)。接合に関しては、茨戸湖とH町Sゴルフコース排水の接合率が低く(表9)、前者には無機態窒素化合物が多く接合そのものが無機態窒素によって阻害されると同時に成長が促進されたと考えられるが、後者は成長の促進も認められず、また無機態窒素濃度もあまり高くないこと、また先に実施した機器分析の結果ではオキシシン銅1 μg/lが検出されており、表8に示したようにオキシシン銅1 μg/l存在下では15%程度接合が阻害されるのに対して、実験結果からはそれを上回る接合阻害結果が得られていること、などから無機態窒素以外の何らかの接合阻害物質が存在した可能性も否定できない。

### 3.6 ペーパーディスク法をもちいた生物影響の判定

当実験では *Chlorella pyrenoidosa* 以外に *Anacystis* 属や *Anabaena* 属の藻類なども同時に使用したが成育に時間がかかり判定法には適さないと判断し、ここでは *C. pyrenoidosa* のみの結果を報告する。

ディスク上の明瞭な阻止円は水銀以外には形成されず(図6)、その限界値は0.1 μmole/l以上であった(表10)。この結果はミカツキモの接合に関する水銀のそれと同様である。しかしながら、本法は他の化合物に対しては明瞭な結果を示さないこと、また、培養に要する日数も長いこと等の短所を有していることから、事前培養によって試験

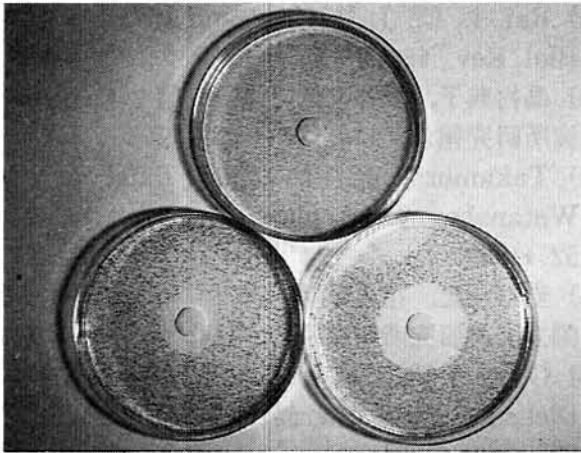


図6 ペーパーディスク法による阻止円の形成  
(上; 対照, 左下; 水銀 0.1 μmole/l, 右下;  
水銀 10 μmole/l)

表-10 *Chlorella pyrenoidosa* をもちいたペーパー  
ディスク法による生物影響の判定

mg/l, μmole/l		0.0	0.001	0.01	0.1	1	10
シマジン	L	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
平均(mm)		0	0	0	0	0	0
ダイアジノン*	L	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
平均(mm)		0	0	0	0	0	0
オキシ銅*	L	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
平均(mm)		0	0	0	0	0	0
水銀**	L	0	0	0	17	20	34
	S	0	0	0	16	25	38
平均(mm)		0	0	0	16.5	22.5	36.0
カドミウム**	L	0	0	0	0	0	0
	S	0	0	0	0	0	0
平均(mm)		0	0	0	0	0	0

L; 阻止円の長径 S; 阻止円の短径  
\*; mg/l \*\*; μmole/l

藻類をディスク上に十分に増殖したプレートをもちいて実験を実施したが、結果は事前培養のないものと同様であった。このことからペーパーディスク法は検出限界値、培養日数などからも生物影響の判定法として適当な方法ではないと考えられる。

#### 4 結 語

これまでに得られた結果を総合すると、ミカヅ

キモに対する農薬類や重金属類の影響は明瞭に現れるが、当種を試水中に含まれる成分に対する生物検定用の指標生物として利用するには以下の問題があると考えられる。

- (1) 試水中の無機態窒素の存在によってミカヅキモの接合自身が阻害されるので、環境試料中で接合が起きなかったとしても、その結果のみから試水中に何らかの阻害物質があったと判定することは極めて難しく、他の藻類または水生動物を指標にもちいる方向で検討すべきであると考ええる。
- (2) 接合の有無、あるいはその多少によって何らかの有害物質の存在を判定しようとする場合、成長は無論のこと接合を判定する場合でも約6日間要するため、緊急を要する場合には適当な判定方法ではない。
- (3) ミカヅキモは農薬、重金属に対して感度はあまり鋭敏ではなく、これを応用するよりは、機器分析を利用するほうが時間的にも有利であると考ええる。ただし、何らかのかたちで未知の毒性物質を含んでいるかもしれない環境試料(自然水など)の中の毒性を同時に、しかも多量に検索する必要がある場合には、このミカヅキモの接合実験を一次スクリーニングの形で利用することは可能であると考ええる。

以上のことから、生態系での複合した農薬汚染を考慮すれば、急性毒性を対象とした短時間で結果が得られる Gisey ら<sup>16)</sup> の ATP を測定する方法、高村ら<sup>13)</sup>、Takamura ら<sup>14)</sup> が実施した光合成活性を測定する方法、あるいは畠山・福島<sup>2)</sup> の報告した簡便な藻類増殖能 (AGP) 測定が適切であると考ええる。

#### 参 考 文 献

- 1) 国立公害研究所報告 第114号「水界生態系に及ぼす有害汚染物質の影響評価に関する研究」昭和60/61年度特別研究報告
- 2) 畠山成久, 白石寛明, 笠井文絵, 福島 悟: 日本陸水学会第56回大会講演要旨集 p.184 (1991)
- 3) 福島 悟, 畠山成久: 日本陸水学会第56回大会講演要旨集 p.185 (1991)
- 4) 笠井文絵, 花里孝幸: 日本陸水学会第56回大会講演要旨集 p.187 (1991)
- 5) 花里孝幸, 笠井文絵: 日本陸水学会第56回大

- 会講演要旨集 p.188 (1991)
- 6) Takamura, N., S. Hatakeyama, and Y. Sugaya: *Jpn. J. Limnol.*, **51**, 225-235 (1990)
  - 7) Takamura, K., S. Hatakeyama, and H. Shiraishi: *Appl. Ent. Zool.*, **26**, 321-326 (1991)
  - 8) Takamura, K., S. Nohara, T. Kariya, M. Okazaki, and K. Ito: *Jpn. J. Limnol.*, **52**, 95-103 (1991)
  - 9) 濱田 仁: 接合藻の生物学—培養, 分類, 生活史, 遺伝から環境, 公害の問題まで—(1989)
  - 10) 濱田 仁: *どんぐり通信*, **1**, 281-291(1990)
  - 11) 西澤一俊, 千原光男 編: *藻類研究法*, 294-304 (1979)
  - 12) Rai, L. C., J. P. Gaur and H. D. Kumar: *Biol. Rev.*, **56**, 99-151 (1981)
  - 13) 高村典子, 笠井文絵, 渡辺 信: 国立公害研究所研究報告, **114**, 223-232 (1988)
  - 14) Takamura, N., F. Kasai, and M. M. Watanabe: *J. Applied Phycol.*, **1**, 39-52 (1989)
  - 15) 安野正之, 花里孝幸, 宮下 衛, 高村典子: 国立公害研究所研究報告, **114**, 25-38 (1988)
  - 16) Giesy, J. P., S. R. Denzer, C. S. Duke, and G. Dickson: *Verh. Internat. Verin. Limnol.*, **21**, 205-220 (1981)

# An Examination of Algal Bioassay Method for Agricultural Chemicals and Heavy Metals in a Water Environment

Shuji HINO

## Abstract

An algal bioassay method was examined for agricultural chemicals and heavy metals using *Closterium ehrenbergii* NIES-228 and 229 strains. Although growth and conjugation of these strains were inhibited with those chemicals, the results showed a widely different order at the concentration of the chemicals, and the biological response in the process was not quick. Since these algal strains showed non-conjugation with inorganic nitrogen (*cf.* nitrate-nitrogen), the phenomenon derived can not be determined from the poison with the agricultural chemicals and heavy metals or nitrate-nitrogen. This is the most remarkable lacking regarding the algal assay as regards these strains.