

# ミジンコおよび藻類を用いた市内河川水の有害性評価

中原亜紀子・野見山晴美・中牟田啓子

福岡市保健環境研究所環境科学部門

## Evaluation of River Water Quality in Fukuoka City by *Daphnia* and Algae

Akiko NAKAHARA, Harumi NOMIYAMA and Keiko Nakamuta

Environmental Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### Summary

River water in Fukuoka City was evaluated by *Daphnia* immobilisation test from May to September in 2003. *Daphnia* immobilization and alga growth inhibition was observed at Muromi River. *Daphnia* immobilization rate in 2003 remarkably decreased as compared with 2002. 56 kinds of pesticides were examined. Among the those 16 kinds were detected as six kinds of insecticides, six kinds of herbicides, and four kinds of fungicides within guideline values. *Daphnia* immobilization trend was synchronized with concentration of insecticides in 2003. Alga growth inhibition was observed continuously from May to September, among the investigating period. It was synchronized partially with the concentration of herbicides and fungicides. *Daphnia* and alga might be affected, although the concentration of pesticides were within guideline values. Evaluation of the river water quality was possible using *Daphnia* and algae.

**Key Words** : ミジンコ *Daphnia magna*, 藻類 algae, 河川水 river water 農薬 pesticides, 遊泳阻害 immobilization 生長阻害 growth inhibitor

### はじめに

日本では、化学物質に関する規制・基準は飲料水や食品の摂取にともなう健康リスクを考慮して設定されており、生態毒性についてはほとんど考慮されてこなかった。しかし、2000年1月のOECD環境保全成果レビュー<sup>1)</sup>における勧告以降、化審法、農薬取締法が改正され動植物への影響にも着目した審査・規制が導入され始めた。さらに、2003年11月には水質汚濁に係る環境基準が一部改正され生活環境の保全に関する環境基準が動植物保護の観点から設けられるなど、化学物質のリスク管理をとりまく状況は生態に対するリスク評価が重視される方向に大きく変化しつつあるとされている。

そこで、市内河川水の現状を把握するために2002年にオオミジンコの遊泳阻害試験を実施した。その結果7月中旬から8月下旬にかけて複数の河川水でほぼ同時期にミジンコの遊泳阻害が観察された。また、一斉分析が

可能な38種類の農薬について分析を行ったが、遊泳阻害との間に相関関係は認められなかった。そこで、2003年は、流域に稲作地帯をもつ室見川に着目し、ミジンコの遊泳阻害試験に加えて藻類生長阻害試験を実施した。さらに今回は流域で使用されている農薬を調査した上で分析を行ったのでその結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. ミジンコ遊泳阻害試験

2003年5月から9月にかけて室見川下流(福重橋)で一週間毎に採水した河川水を試験に用いた。採水地点をFig. 1に示した。

試験方法はOECDテストガイドライン202<sup>2)3)</sup>に準拠した。ミジンコはCreasel社製のオオミジンコ(*Daphnia magna*)休眠卵を孵化させたものを用いた。休眠卵は飼育水中で約20で6000luxの光を72時間照射し、孵化

させた。飼育水は Table1 に示す A ~ D の溶液を 25mL ずつ分取し、1L にメスアップしたものをを用いた。また、試験には孵化後 24hr 以内のミジンコを用いた。ミジンコには試験 2 時間前に粉末状のスピルリナ(Creasel 社)を給餌した。河川水 20mL が入った 4 つのバイアル瓶に各 5 匹ずつ分取し、21℃、暗所で 48 時間培養後遊泳阻害を観察した。ミジンコが死亡した場合および 15 秒以上動かない場合を遊泳阻害と判定した。対照区には 20 分で 30 分間ばっ気した飼育水を用いた。

## 2. 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験は OECD test guidelines201<sup>4)</sup>に準拠して行った。河川水 30ml を 0.7 μ m のガラス繊維濾紙でろ過したものを試料とした。21℃、6000lux で 72 時間前培養した *Pseudokirchneriella subcapitata* を 1 ~ 3.0 × 10<sup>4</sup> cells/mL となるように試料に添加した。21℃、6000lux で 72 時間培養し、24 時間毎に SPECTROMETER UV-120-02 (島津製作所) を用いて ABS<sub>670</sub> を測定して細胞数濃度を算出した。セルは光路長 5cm のガラスセルを使用した。また、試験は 3 連で行った。なお、対照区には前培養に用いた培地を使用した。培地は Table 2 に組成を示す溶液 1 ~ 3 (各 1mL) および溶液 4 (10mL) を 0.45 μ m でろ過除菌した蒸留水で 1L にメスアップして作成した。各試験濃度区における生長阻害率 (IA) は OECD test guideline201 に従って、対照区の生長曲線下の面積 (Ac) と各試験濃度区での生長曲線下の面積 (At) との間の差として式( ) ( )を用いて計算した。

## 3. 農薬の分析

### 1) 測定方法

ジクロロメタン 5mL、メタノール 5mL および蒸留水 5mL でコンディショニングした Sep-pak PS2 (waters 社) に検水 500mL を 20mL/min で通水後、蒸留水を 6mL/min



Fig. 1 Sampling Station

で 5 分間通水し洗浄した。窒素パージにより Sep-pak カートリッジの水分を除去し、ジクロロメタン 5mL で溶出させた。窒素気流下で 0.5mL まで濃縮し、内部標準物質(フルオランテン d 10)添加後 GC/MS で分析した。測定項目およびモニタリーオンを Table 3 に示した。なお、農薬の測定項目は環境基準、水道水質基準および福岡市農業指導センターが発行している稲作ごよみ(2003 年版)における推奨農薬の中から GC/MS で一斉分析可能な農薬を選定した。

Table 1 Composition of stock solution

for <i>Daphnia magna</i>	
	g/L
A: CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	11.76
B: MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.93
C: NaHCO <sub>3</sub>	2.59
D: KCl	0.23

To prepare the reconstituted water, add 25mL of each solution (A, B, C, D) into 1 litre volumetric flask and fill to volume with distilled water.

Table 2 Composition of stock solution

for <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
Stock solution 1	
NH <sub>4</sub> Cl	1.5 g/L
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.2 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.8 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16 g/L
Stock solution 2	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	80 mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100 mg/L
Stock solution 3	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg/L
MnCl <sub>2</sub>	415 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	3 mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.5 mg/L
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.01 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	7 mg/L
Stock solution 4	
NaHCO <sub>3</sub>	50 g/L

To prepare the reconstituted water, add 1mL of each solution (1, 2 and 3) and 10mL of solution 4 into 1 litre volumetric flask and fill to volume with distilled water.

2) 装置・測定条件

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

HP6890/Automass sun300

使用カラム : Ultra2 (J&W SCIENTIFIC 社)

(0.25mm × 30m, 膜厚 0.25 μ m)

カラム温度 : 50 (0min) - 30 /min -

105 (3min) - 6 /min - 270 (2.5min)

注入口温度 : 220

インターフェース温度 : 250

イオン源温度 : 250

キャリアーガス : He (1.0mL/min)

$$A = \frac{N1 - N0}{2} \times t1 + \frac{N1+N2 - 2N0}{2} \times (t2-t1) + \frac{Nn-1 + Nn - 2N0}{2} \times (tn-tn-1) \dots ( )$$

$$IA = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100 \dots ( )$$

ここで, A = 面積

N0 = 暴露開始時 (t0) の設定細胞濃度 ( cells/mL)

N1 = t1 時の実測細胞濃度 ( cells/mL)

Nn = tn 時の実測細胞濃度 ( cells/mL)

t1 = 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

tn = 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

Ac = 対照区の生長曲線下の面積

At = 各試験濃度区での生長曲線下の面積

IA = 生長阻害率 (%)

Table 3 Examined pesticides and monitor ions

Pesticises	Monitor ions	Pesticises	Monitor ions
<b>Insecticides</b>		Esprocarb	91, 162
Buprofezin	175, 105	Mefenacet	192, 120
Chlorpyrifos	197, 314	Methyldymron	107, 119
Diazinon	179, 137	Molinate	126, 55
Dichlorvos ( DDVP )	109, 185	Napropamide	72, 128
Edifenfos ( EDDP )	109, 173	Oxadiazon	175, 258
EPN	157, 185	Pendimethalin	252, 281
Fenitrothion ( MEP )	227, 125	Pretilachlor	162, 238
Fenobucarb ( BPMC )	121, 150	Propyzamide	173, 175
Fenthion	278, 125	Pyributicarb	165, 108
Isofenphos	213, 121	Simazine ( CAT )	201, 186
Isoxathion	105, 177	Simetryn	213, 170
Malathion	125, 173	Terubucarb	205, 220
Phenthoate ( PAP )	274, 246	Thenylchlor	127, 288
Pyridaphenthion	340, 199	Tolcofos methyl	265, 267
Thiocyclam	71, 135	<b>Fungicides</b>	
<b>Herbicides</b>		Captan	79, 149
ACN	172, 207	Chloroneb	191, 206
Benfluralin	292, 264	Chlorothalonil ( TPN )	266, 264
Benthiocarb ( Thiobencarb )	100, 257	Edifenfos ( EDDP )	109, 173
Bifenox	277, 199	Etridiazole	211, 183
Butachlor	176, 160	Flutolanil	173, 281
Butamifos	200, 286	Fthalide	243, 241
Cafenstrol	100, 188	Iprobenphos ( IBP )	204, 91
Chlornitrofen ( CNP )	317, 289	Iprodione	187, 314
Chlomethoxynil ( X-52 )	165, 108	Isoprothiolane	189, 162
Dichlobenyl	171, 100	Mepronil	119, 269
Dichlofenthion ( ECP )	223, 119	Metalaxyl	206, 160
Dithiopyr	354, 286	Pencycuron	125, 180
		Pyroquilon	

determination limit : 0.01 μ g/L

## 実験結果および考察

2002 年および 2003 年の室見川河水におけるミジンコ遊泳阻害率を Fig. 2 に示す。2002 年には 7 月～9 月にかけてほぼ 100 % の遊泳阻害率が見られたのに対し、2003 年はほぼ同時期に遊泳阻害が見られたが 20 % 前後の低い値であった。従って、室見川河水のミジンコに対する毒性は昨年度と比較して低下しているといえる。次にミジンコ遊泳阻害率と検出された殺虫剤濃度の総和との関係を Fig. 3 に示す。殺虫剤濃度の和は遊泳阻害率とほぼ同期しており、遊泳阻害は殺虫剤の影響を受けている可能性が高いと考えられる。分析した 56 種類の農薬のうち 16 種類（殺虫剤 6 種類；Dichlofenthion, DDVP, Chlorpyrifos, Fenobucarb, Terubcarb, Maration, 除草剤 6 種類；Benthiocarb, Cafenstrol, Chlomethoxyinil (X-52), Mefenacet, Pretilachlor, Pyributicarb, 殺菌剤 4 種類；Captan, Chloroneb, Iprobenphos (IBP), Isoprothiolane) が検出された。その濃度は 0.01ppb ~ 2.2ppb と低い濃度であった。これらの農薬のうち、検出された殺虫剤濃度を Fig. 4 に示す。Fig. 3 と比較すると、検出された殺虫剤は遊泳阻害に対して相加的に作用していると考えられる。

2003 年に検出された 6 種類の殺虫剤のうち、Chlorpyrifos, Maration および Terubcarb は 2002 年には検

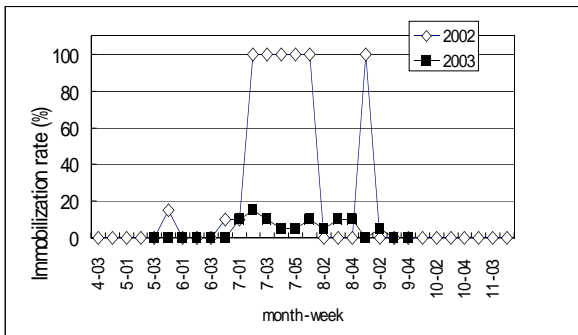


Fig. 2 Immobilisation rate of *Daphnia magna* in 2002 and 2003.

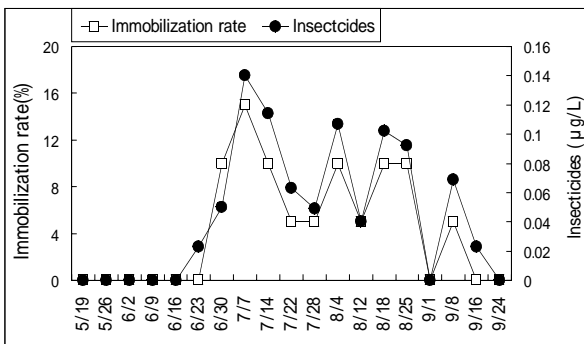


Fig. 3 Immobilisation rate of *Daphnia magna* and total concentration of insecticides.

出されなかったが Fenobucarb は同程度の濃度検出された。しかし、遊泳阻害率は 2002 年に比べ 2003 年は約 5 分の 1 に低下しており、この原因として 2002 年の遊泳阻害には今回測定していない有害物質の影響など、寄与した要因が異なる可能性が高いと考えられる。今後は農薬以外の項目や今回未測定の農薬についても検討していきたい。

藻類生長阻害試験およびミジンコの遊泳阻害試験の結果を Fig. 5 に示す。ミジンコの遊泳阻害が夏期に見られたのに対し、藻類の生長阻害は試験を実施した 5 月中旬から 9 月下旬にかけての試験期間全般にわたって 20 % ~ 80 % の範囲で観察された。藻類生長阻害率と除草剤濃度の和および殺菌剤の濃度の和を Fig. 6 に、検出された除草剤、殺菌剤の濃度を Fig. 7 に示す。藻類の生長阻害率は除草剤、殺菌剤濃度と一部同期しており、除草剤、殺菌剤の影響を受けているものと考えられる。除草剤は主に 6 月に検出され、殺菌剤は主に 7 月以降に検出された。その濃度は除草剤が 0.01 ~ 2.2ppb の範囲で検出されたのに対し、殺菌剤は 0.01 ~ 0.12ppb と低い濃度であった。殺菌剤 (Chloroneb) のみが検出された期間 (8/12, 8/18, 9/8, 9/16, 9/24) においても生長阻害が観察されており、殺菌剤は 0.1ppb 程度の低い濃度でも影響を及ぼす可能性が考えられる。一方、農薬が検出されなかった検体 (5/19, 7/14) においても生長阻害が見られており、今回分析しなかった農薬、あるいは他の要因によっても生長阻害が引き起こされている可能性

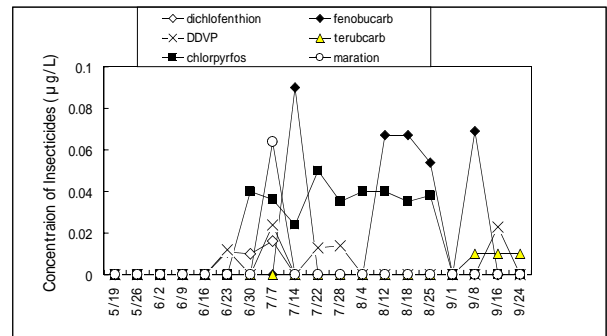


Fig. 4 Concentration of Insecticides.

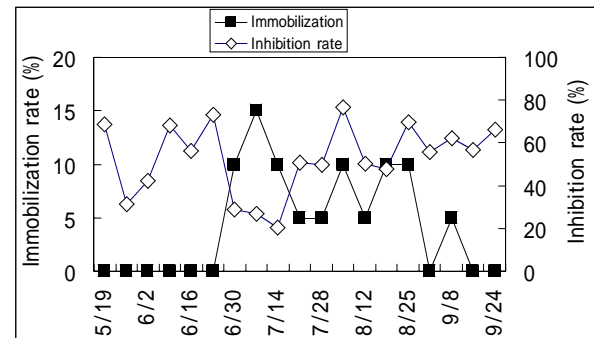


Fig. 5 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and immobilisation rate of *Daphnia magna*.

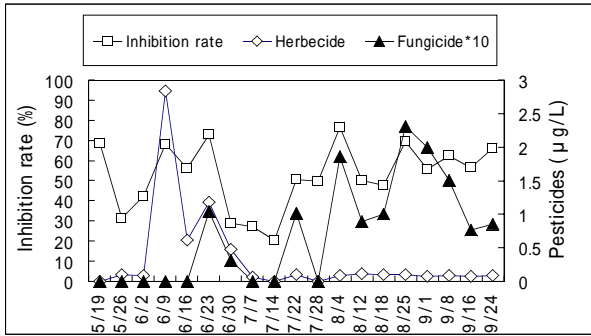


Fig. 6 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and total concentration of herbicides and fungicides.

が考えられる。今回検出された農薬はいずれも基準値・指針値以下の濃度であったが、ミジンコや藻類に影響をおよぼしている可能性が考えられる。しかしながら、それぞれの農薬により、ミジンコ、藻類に対する感受性がことなるため、農薬の影響を明らかにするためにはEC50等の値と比較検討する必要がある。

今回の試験ではミジンコおよび藻類を用いて河川水の有害性を検知することができた。この手法を用いれば原因物質を特定できない場合においても生態系への影響の有無を把握することは可能であることが確認された。現在、約4,500万種類の化学物質が登録され、このうち約10万物質が商業的に製造・販売されているといわれている。しかし、環境基準などが定められ、排出や使用の規制が行われている化学物質はごく少数であり、人体や生態系に有害な化学物質を個々にモニタリングすることは非常に困難である。現在、ミジンコや藻類を用いた試験は化学物質そのものの毒性評価に用いられることがほとんどであるが、環境水へ適用した場合でも生態系への影響をモニタリング、スクリーニングする手法のひとつとして有効であることが分かった。

### まとめ

2002年のミジンコ遊泳阻害率はほぼ100%と高い値であったのに対し、2003年は20%前後の低い値となり、室見川河川水のミジンコに対する毒性は昨年度と比較し

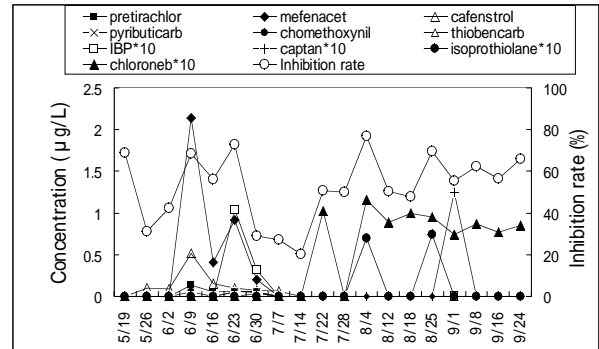


Fig. 7 Concentration of herbicides and fungicides.

て低下していた。また、藻類の生長阻害は試験を実施した5月中旬から9月下旬にかけての試験期間全般にわたって20%~80%の範囲で観察された。分析した56種類の農薬のうち16種類(殺虫剤6種類、除草剤6種類、殺菌剤4種類)が基準値・指針値以下の低濃度で検出された。殺虫剤濃度は遊泳阻害率とほぼ同期しており、遊泳阻害は殺虫剤の影響を受けている可能性が考えられた。また、藻類の生長阻害率は除草剤、殺菌剤濃度と一部同期しており、除草剤、殺菌剤の影響を受けているものと考えられる。一方、農薬が検出されなかった検体においても生長阻害が見られており、他の要因による影響も考えられる。

これらの手法は原因物質を特定できない場合においても生態系への影響の有無を把握することが可能であり、環境水へ適用した場合でも生態系への影響をモニタリング・スクリーニングする手法のひとつとして有効であると考えられる。

### 文献

- 1) OECD Environmental Performance Reviews Japan, 2002
- 2) OECD Guideline for Testing Chemicals 202, *Daphnia* sp., Acute immobilisation Test and Reproduction Test, 1984
- 3) OECD Guideline For Testing of Chemicals Revised Proposal For Updating Guideline 202, 2000
- 4) OECD Guideline For Testing of Chemicals, Alga, Growth Inhibition Test, 1984