

ミジンコおよび藻類を用いた市内河川水のバイオアッセイ

野見山晴美・中原亜紀子・中牟田啓子

福岡市保健環境研究所環境科学部門

Bioassay of River Water Quality in Fukuoka City by *Daphnia* and Alga

Harumi NOMIYAMA, Akiko NAKAHARA and Keiko NAKAMUTA

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

要約

本所では 2002 年より河川水のバイオアッセイを行っている。2004 年はオオミジンコ遊泳阻害試験及び藻類生育阻害試験を行い、農薬、有害金属及び非イオン界面活性剤による影響について調査を行った。室見川河川水に対する 2004 年のオオミジンコの遊泳阻害率は 0 ~ 10% であり、7 月 ~ 8 月初旬にかけての阻害率は 2002 年より年々低下していた。また、有機リン系殺虫剤である Chlorpyrifos が低濃度でもオオミジンコの遊泳阻害を引き起こすことが示唆された。2004 年の藻類生長阻害率は、2003 年の同時期よりも低下していた。農薬、有害金属、及び非イオン界面活性剤濃度と生長阻害率との間に特に相関は見られなかった。また、T-N・T-P 濃度と生長阻害率の間には負の相関が見られ、T-N・T-P を栄養源として生長が促進し、T-N・T-P の濃度によっては他の有害物質による阻害が確認しづらくなることが推測された。

Key Words : オオミジンコ *Daphnia magna*, 藻類 alga, 農薬 pesticides, 遊泳阻害 immobilization, 生長阻害 growth inhibition

はじめに

本所では、環境水（河川水）の生態系保全の観点から、水生生物への影響を把握するために河川水のバイオアッセイを行っている。2002 年にオオミジンコの遊泳阻害試験を¹⁾、2003 年から藻類生長阻害試験を併せて実施し²⁾、農薬との関係について調査を行った。2004 年はさらに有害金属及び非イオン界面活性剤による阻害についても調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料採取

福岡市西部に位置し、流域に農作地帯をもつ二級河川・室見川の下流（福重橋、Fig.1）を試料採取地点とした。2004 年の 4/30 から 11/24 にかけて 1



Fig. 1 Sampling Station

週間毎に採水を行った。

2. オオミジンコ遊泳阻害試験

試験方法は OECD テストガイドライン 202³⁾に準拠した。試験には採水直後に凍結保存した河川水を解凍して使用した。オオミジンコ (*Daphnia magna*) は休眠卵 (Creasel 製) を孵化させたものを用いた。休眠卵は飼育水中で約 20 で約 7000lux の光を 72 時間照射し、孵化させた。飼育水は Table1 に示す 1 ~ 4 の溶液を 25mL ずつ分取し、1L にメスアップして作成した。試験には孵化後 24 時間以内のオオミジンコを用い、試験 2 時間前に粉末状のスピルリナ (Creasel 製) を給餌した。河川水 20mL を入れたバイアル瓶 4 本にオオミジンコを各 5 匹ずつ分取し、暗所で 21 , 48 時間培養後遊泳阻害を観察した。オオミジンコが死亡した場合または 15 秒以上動かない場合を遊泳阻害と判定した。また、対照区には 20 で 30 分間ばっ気した飼育水を用いた。

3. 藻類生長阻害試験

試験方法は OECD テストガイドライン 201⁴⁾に準拠した。採水直後に凍結保存した河川水を解凍し、0.45 μ m の PTFE ろ紙でろ過した後、三角フラスコ 3 本に 30mL ずつ採った。21 , 8000lux で 72 時間前培養した *Pseudokirchneriella subcapitata* を約 1.0×10^4 cells/mL とするよう河川水にそれぞれ添加した。21 , 8000lux で 72 時間培養し、24 時間毎に SPECTROMETER UV-120-02 (島津製作所製) を用いて ABS₆₇₀ を測定して細胞濃度を算出した。セルは光路長 5cm のガラスセルを使用した。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 に組成を示す保存溶液 1 (10mL) および保存溶液 2 ~ 4 (各 1mL) を、滅菌蒸留水で 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 (I_A) は OECD テストガイドライン 201 に従って、対照区の生長曲線下の面積 (A_c) と各試験濃度区での生長曲線下の面積 (A_t) との間の差として下記の式 () () を用いて計算した。

4. 農薬の分析

1) 測定方法

試験方法は上水試験法 2001 に準拠した。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 製) に、採水直後の河川水 500mL を 20mL/min で通水後、蒸留水を 6mL/min 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、内部標準物質としてフルオランテン-d₁₀ (1mg/L) を 50 μ L 添加後、GC/MS-SIM 検出法で 0.01 μ g/L を検出下限として測定した。測定項目およびモニターイオンを Table 3 に示した。なお、農薬は水質環境基準、要監視項目、公共用水域の水質評価指針等の対象とされているもの、さらに室見川流域で使用されているものの中から、GC/MS で一斉分析可能な 66 種類を選定した。

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

カラム: Ultra 2 (J&W SCIENTIFIC 製)

(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

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \dots ()$$
$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \dots ()$$

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)

N_n = t_n 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

t_n = 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

A_c = 対照区の生長曲線下の面積

A_t = 各試験濃度区での生長曲線下の面積

I_A = 生長阻害率 (%)

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)

5. 有害金属,非イオン界面活性剤,T-N・T-Pの分析

有害金属7元素(Cd, Pb, Cr, As, Se, Zn, Cu)について分析を行った。試験方法はJIS K 0102に準拠した。河川水30mLに硝酸1mLを加え140℃で1時間加熱後、ICP-MS分析法により7500-ICP-MS(Agilent製)を用いて一斉分析を行った。なお検出下限は0.001mg/Lとした。

非イオン界面活性剤について、ポリオキシエチレンアルキルエーテル及びポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルを対象として分析を行った。試験方法は上水試験法2001に準拠した。採水直後の河川水350mLをトルエン7mLで抽出し、(2-ピリジアルアゾ)-レゾルシノールによる吸光度法により分析した。UV-2100PC(島津製作所製)でABS₅₁₀を測定し、試験液中の非イオン界面活性剤をヘプタオキシエチレンドデシルエーテルとして算出した。

また、栄養塩類の影響を確認するためにT-N及びT-Pの分析を行った。試験方法はJIS K 0102に準拠した。T-Nは銅・カドミウムカラム還元法、T-Pはペルオキシ二硫酸カリウム分解法にてAACCS-(ブランルーベ製)により分析した。

実験結果

1. オオミジンコ遊泳阻害試験

2002年～2004年のオオミジンコの遊泳阻害試験の結果をFig.2に示す。2002年は7/11～8/7にかけて100%の阻害率が観察されたが、2003年の同時期では10%前後、さらに2004年の同時期では5%前後の阻害率であった。

2. 藻類生長阻害試験

2003年、2004年の藻類生長阻害試験の結果をFig.3に示す。両年とも試験区全般にかけて藻類の生長阻害が観察された。2003年の平均阻害率が53%であるのに対し、2004年の同時期における平均阻害率は31%と全体的に低下しており、特に6月から7月にかけて低い値(平均15%)を示した。

3. 農薬

分析した66種類の農薬のうち、16種類(殺虫剤6種類; Chlorpyrifos, DDVP, Fenitrothion, Fenobucarb,

Fenthion, Maration, 殺菌剤6種類; Chloroneb, Flutolanil, Iprobenphos (IBP), Isoprothiolane, Metalaxyl, Pyroquilon, 除草剤4種類; Buromobutide, Cafenstrol, Mefenacet, Pretilachlor)が検出された。検出農薬はいずれも基準値・指針値以下であり、0.01µg/L～1.9µg/Lと低い濃度であった(Fig.4)。

Table 1 Composition of stock solution for *Daphnia magna*

| | g/L |
|--|-------|
| 1: NaHCO ₃ | 2.59 |
| 2: CaCl ₂ · 2H ₂ O | 11.76 |
| 3: MgSO ₄ · 7H ₂ O | 4.93 |
| 4: KCl | 0.23 |

To prepare the reconstituted water, add 25mL of each solution (1, 2, 3, 4) into 1 litre volumetric flask and fill to volume with distilled water.

Table 2 Composition of stock solution for *Pseudokirchneriella subcapitata*

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

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

Table 3 Examined pesticides and monitor ions

| Pesticides | Monitor ions | Pesticides | Monitor ions |
|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| Insecticides | | Dimepiperate | 119, 145 |
| Buprofezin | 175, 258 | Dithiopyr | 354, 286 |
| Chlorpyrifos | 197, 199 | Esprocarb | 91, 162 |
| Diazinon | 179, 137 | Mefenacet | 192, 120 |
| Dichlorvos(DDVP) | 109, 185 | Methl dymron | 107, 106 |
| Dimethoate | 87, 125 | Molinate | 126, 187 |
| disulfoton | 89, 97 | Napropamide | 72, 128 |
| EPN | 157, 185 | Oxadiazon | 175, 258 |
| Etofenprox | 163, 183 | Pendimethalin | 252, 192 |
| Fenitrothion(MEP) | 125, 109 | Piperophos | 140, 320 |
| Fenobucarb(bpmc) | 121, 150 | Pretilachlor | 162, 238 |
| Fenthion | 278, 169 | Propyzamide | 173, 175 |
| Isofenphos | 213, 121 | Pyributicarb | 165, 108 |
| Isoproc carb | 121,136 | Simazine(CAT) | 201, 186 |
| Isoxathion | 105, 177 | Simetryn | 213, 170 |
| Malathion | 127, 173 | Terbucarb(mbpmc) | 205, 220 |
| Phenthoate(PAP) | 125, 274 | Thenylchlor | 127, 288 |
| Pyridaphenthion | 199, 77 | Tolclofos methyl | 265, 267 |
| Pyriproxyfen | 136, 226 | Fungicides | |
| Thiocyclam | 71, 135 | Captan | 79, 149 |
| Herbicides | | Chloroneb | 191, 206 |
| A C N | 172, 207 | Chlorothalonil(TPN) | 266, 264 |
| Alachlor | 160, 188 | Edifenphos(EDDP) | 109, 173 |
| Atrazine | 200, 215 | Etridiazole | 211, 183 |
| Benflura l in | 292, 264 | Flutolanil | 173, 145 |
| Benthiocarb | 100, 125 | Iprobenfos(IBP) | 204, 91 |
| Bifenox | 189, 341 | Iprodione | 187, 314 |
| Buromobutide | 119, 232 | Isoprothiolane | 189, 162 |
| Butachlor | 176, 188 | Mepronil | 119, 91 |
| Butamifos | 200, 152 | Metalaxyl | 206, 160 |
| Cafenstrol | 100, 188 | Pencycuron | 125, 180 |
| Chlomethoxy nil(X-52) | 165, 108 | Phthalide | 243, 241 |
| Chlornitorfen(CNP) | 236, 319 | Procymidone | 96, 283 |
| Dichlobenil | 171, 100 | Pyroquilon | 173, 130 |
| Dichlofenthion(ECP) | 223, 279 | | |

determination limit : 0.01 μ g/L

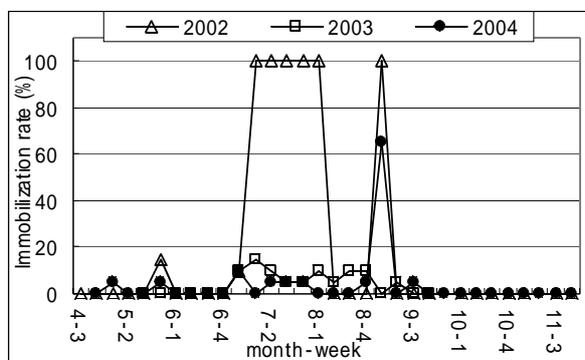


Fig.2 Immobilization rate of *Daphnia magna* in 2002, 2003 and 2004.

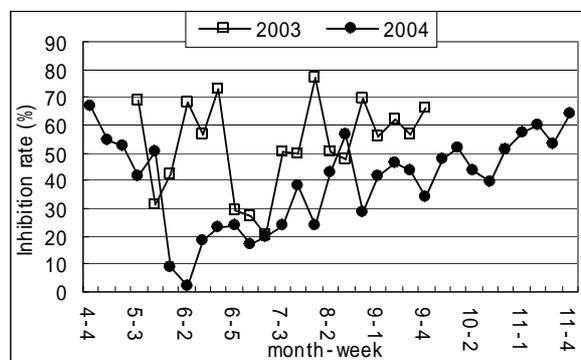


Fig.3 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* in 2003 and 2004.

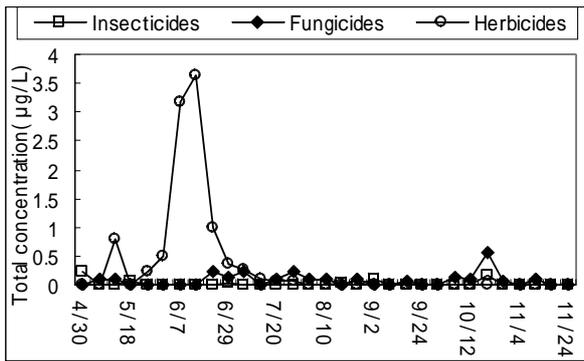


Fig.4 Total concentration of Insecticides, Fungicides and Herbicides.

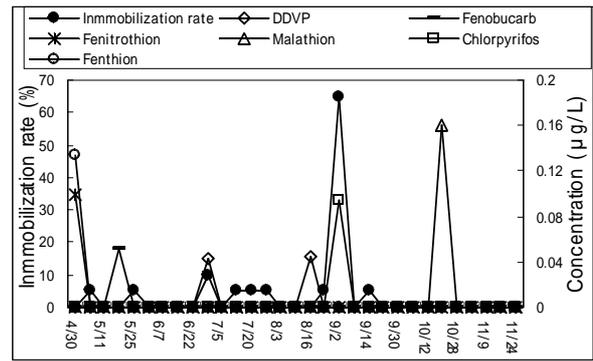


Fig.6 Immobilization rate of *Daphnia magna* and concentration of Insecticides.

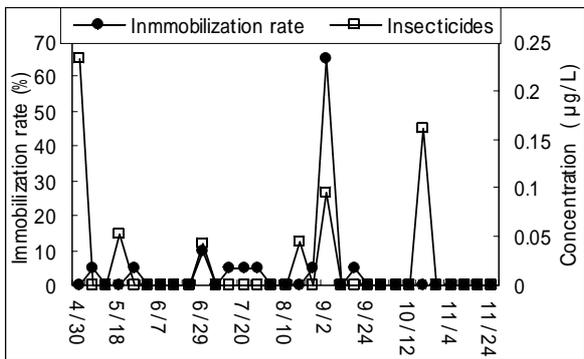


Fig.5 Immobilization rate of *Daphnia magna* and total concentration of Insecticides.

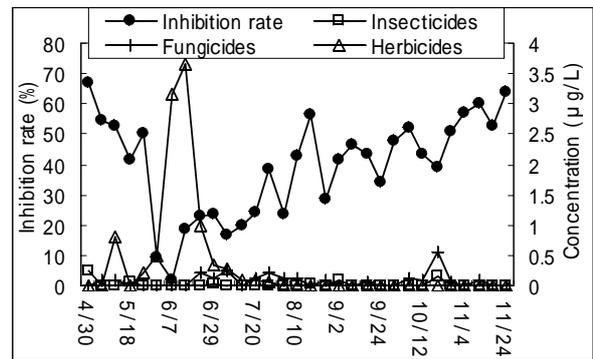


Fig.7 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and total concentration of Insecticides, Herbicides, Fungicides.

4. 有害金属, 非イオン界面活性剤, T-N・T-P

室見川河川水の有害金属濃度は, Cd, Pb, As は全て不検出, Se, Cr が 0.002mg/L 以下, Zn は 0.013mg/L 以下, Cu は 0.004mg/L 以下の低濃度であった。

次に, 界面活性剤の分析を行った。室見川河川水中の陰イオン界面活性剤はこれまでほとんど検出されていないため, 今回は分析データの少ない非イオン界面活性剤について分析した。非イオン界面活性剤濃度は 0.022mg/L 以下 (平均 0.0090mg/L) の低い値であった。

また, 河川水中の T-N・T-P 濃度を確認するため分析を行った。T-N は 0.81 ~ 1.7mg/L, T-P は 0.015 ~ 0.18mg/L であった。

考察

1. オオミジンコ遊泳阻害試験

室見川河川水のオオミジンコ遊泳阻害は, -1.で示したように, この3年間低下傾向にあるといえる。また, 2004年に確認された遊泳阻害率は, ほとんどが 0 ~ 10%

であったが, 9/2のみ65%と突出していた。

遊泳阻害と農薬との関係をもてみると, 遊泳阻害が見られた時期には低濃度であるが殺虫剤が検出されており (Fig.5), そのうち試験期間を通して 9/2にだけ有機リン系の殺虫剤である Chlorpyrifos (0.09µg/L) が検出された (Fig.6)。2003年も, Chlorpyrifos が検出 (0.02 ~ 0.05µg/L) された河川水全てについて遊泳阻害が確認された (5 ~ 15%)²⁾。オオミジンコは有機リン系の農薬に対して感受性が高いと言われており⁶⁾, Chlorpyrifos が低濃度でもオオミジンコの遊泳阻害を引き起こす可能性が示唆された。

また, 有害金属及び非イオン界面活性剤濃度と遊泳阻害率の間に相関は見られなかった。

遊泳阻害の原因が Chlorpyrifos 単独のものではなく, 複数の農薬や他の物質との相乗阻害効果である可能性も考えられるため, 今後は, 低濃度の Chlorpyrifos が単独でもオオミジンコの遊泳に影響を与えるかの確認を行うと共に, 今回検出された他の有機リン系農薬 (DDVP, Fenitrothion, Fenthion, Malathion, Iprobenphos (IBP))につ

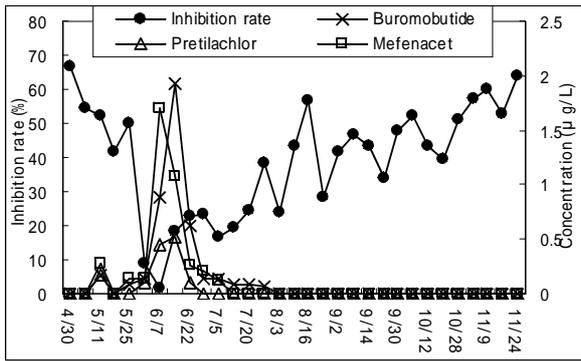


Fig.8 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and concentration of Herbicides.

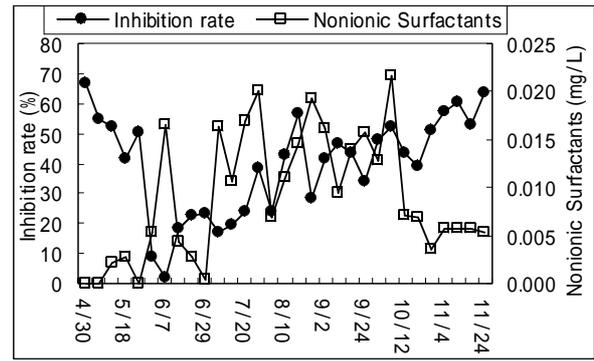


Fig.10 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and concentration of Nonionic Surfactants.

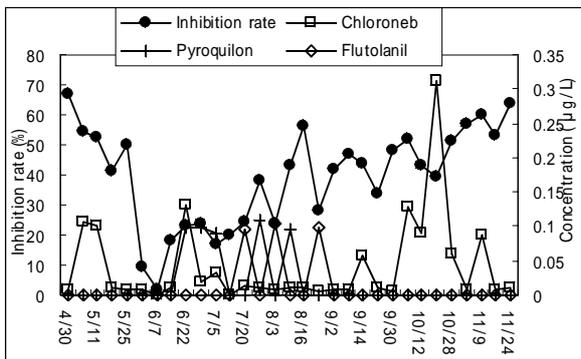


Fig.9 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and concentration of Fungicides.

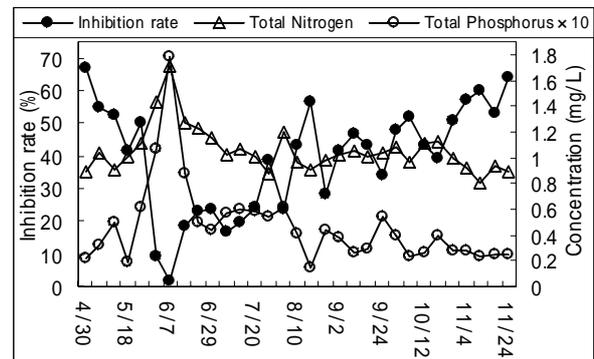


Fig.11 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata*, concentration of Total nitrogen and Total Phosphorus×10.

いても検討を行う予定である。

2. 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害と農薬との関係を見ると、農薬の中で最も高濃度に検出された除草剤 (Fig.8) との間に相関は見られず、また殺菌剤・殺虫剤濃度との間にも特に相関は見られなかった (Fig.9)。

次に、農薬以外の阻害要因として考えられた有害金属および非イオン界面活性剤について検討を行った。

室見川河川水の有害金属7元素 (Cd, Pb, Cr, As, Se, Zn, Cu) の濃度は、最も高濃度に検出された Zn でも 0.013mg/L 以下であった。*Pseudokirchneriella subcapitata* の EC₅₀ は Cu:0.03mg/L, Cd が 0.13mg/L という報告⁶⁾があり、今回分析を行った室見川河川水の有害金属濃度では藻類の生長に影響を与える可能性は低いと考えられる。

非イオン界面活性剤について、今回検出された非イオン界面活性剤濃度は最高で 0.022mg/L と低く、生長阻との間に特に相関は見られなかった (Fig.10)。非イオン界面活性剤であるポリオキシエチレンアルキルエ

ーテル害率の淡水産藻類の生長影響濃度は数～数10mg/L であるという報告もあり⁷⁾、今回分析を行った室見川河川水の非イオン界面活性剤濃度では藻類の生長に影響を与える可能性は低いと考えられる。

最後に、河川水中の T-N・T-P 濃度と生長阻害の関係について確認を行った。2004 年の藻類生長阻害率と T-N・T-P の関係を Fig.11 に示す。T-N・T-P 濃度の高い時期 (6/7 : T-N=1.7mg/L, T-P=0.18mg/L) には生長阻害率が低下する (1.8%) など、T-N・T-P 濃度と生長阻害率の間には負の相関が見られた (相関係数: $r^{T-N} = -0.78$, $r^{T-P} = -0.78$)。T-N・T-P を栄養源として藻類の生長が促進され、T-N・T-P の濃度によっては生長阻害が確認しづらくなることが推測された。今回、河川水そのものの生長阻害を調査するために栄養塩等の調整は行わなかったが、今後は T-N・T-P 等の栄養塩を調整した藻類生長阻害試験について検討を行う予定である。

また、今回分析を行わなかった有害物質による阻害も考えられるため、GC/MS では検出できない農薬についての生長阻害影響を調べるために LC/MS を用いた農薬分析を行う予定である。

まとめ

2002年のオオミジンコの遊泳阻害率はほぼ100%であったが、2003年の同時期では10%前後、さらに2004年の同時期では5%前後の低い値となり、室見川河川水におけるオオミジンコの7月～8月の遊泳阻害率はこの3年間低下傾向にあった。2004年に確認された遊泳阻害は、ほぼ0～10%の範囲であったが、9/2のみ65%と突出していた。試験期間を通して9/2にだけChlorpyrifos (0.09 μ g/L)が検出されており、有機リン系殺虫剤であるChlorpyrifosが低濃度でもオオミジンコの遊泳阻害を引き起こす可能性が示唆された。

また、藻類生長阻害試験について、2003年、2004年の両年とも試験区全般にかけて藻類の生長阻害が観察され、その平均阻害率は2003年が53%、2004年の同時期では31%であった。室見川河川水における藻類生長阻害率は昨年よりも低下していた。農薬、有害金属及び非イオン界面活性剤濃度と生長阻害率の間に相関は見られなかった。しかし、T-N・T-P濃度と生長阻害率の間には負の相関が見られ、T-N・T-Pの濃度によっては生長阻害が確認しづらくなることが推測された。

文献

- 1) 中原亜紀子・濱本哲郎：オオミジンコを用いた市内河川水の有害性評価，福岡市保健環境研究所所報，28，69～73，2003
- 2) 中原亜紀子・野見山晴美・中牟田啓子：ミジンコ及び藻類を用いた市内河川水の有害性評価，福岡市保健環境研究所所報，29，61～65，2004
- 3) OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, *Daphnia* sp., Acute immobilisation Test and Reproduction Test, 1984
- 4) OECD Guideline For Testing of Chemicals 201, Alga, Growth Inhibition Test, 1984
- 5) 佐々木裕子，木瀬晴美，松井道子，芳住登紀子，若林明子，菊池幹夫：パイオアッセイによる河川水の有害性評価，環境化学，10(1)，45-55, 2000
- 6) 日本環境毒性学会編：生態影響試験ハンドブック 30，朝倉書店(東京)，2003
- 7) 菊地幹夫：界面活性剤の生分解性および水生生物に対する毒性，水環境学会誌，16(5)，305～306，1993