

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 (2005)

野見山晴美・中原亜紀子・水落敏朗

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 Algae (2005)

Harumi NOMIYAMA, Akiko NAKAHARA and Toshirou MIZUOCHI

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

要約

室見川河川水について、1 年を通した水生生物への影響を確認するために、2004 年 9 月から 2005 年 9 月までバイオアッセイを行ったので報告する。

オオミジンコ遊泳阻害試験の結果、平均阻害率は 3.3 % と低いことがわかった。また、夏季の阻害率は 2002 年からの 4 年間ほぼ低下傾向にあった。

藻類生長阻害試験の結果、季節に関わらず常に一定の阻害率が確認された。しかしながら、河川水中の T-P 濃度と阻害率の間には負の相関が見られ、河川水中の T-N・T-P 等の栄養塩濃度が藻類の生長に影響を与えている可能性が高いと思われた。したがって、河川水の固相抽出液を培地に添加し栄養塩濃度を一定にして試験を行った結果、平均阻害率は 11 % と低いことが確認された。この方法は、使用した固相および溶媒によって抽出される物質が対象となるため、農薬等のモニタリングに適していると考えられた。

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*

1 はじめに

本所では、河川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⁾³⁾、農薬等との関係について調査を行った。2002 年から 2004 年までは農薬が多く散布される 4 ～ 9 月に限定して調査を行ったが、夏季だけでなく 1 年を通した水生生物への影響を確認するために、2004 年 9 月から 2005 年 9 月まで調査を行ったので報告する。また、これまでの試験より本河川水の界面活性剤及び有害金属濃度は、検出下限値以下、または検出下限付近の低濃度であり、これらの阻害影響は確認されなかったため、今回は農薬との関係に絞って調査を行った。



Fig. 1 Sampling point

II 実験方法

1. 試料採取

これまでの調査と同じく、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（福岡橋，Fig.1）を試料採取地点とした。2004年9月9日～2005年9月2日にかけて1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 202⁴⁾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 社製) 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、蒸留水で 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 社製) 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、対照区には飼育水を用いて同様に試験を行った。

3. 藻類生長阻害試験

試験方法は OECD テストガイドライン 201⁵⁾に準拠した。採水直後に凍結保存した河川水を解凍し、PTFE ろ紙 (0.45 μm, ADVANTEC 社製) でろ過した後、三角フラスコ 3 本に 30mL ずつ採った (以下「A 法」という。). 21

℃，8000lux で 72 時間前培養した *Pseudokirchneriella subcapitata* を約 1.0×10^4 cells/mL となるように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）を用いて波長 670nm の吸光度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て同様に試験を行った。培地は Table2 に示す保存溶液 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 (I) (II) を用いて計算した。

また，河川水をそのまま用いた上記の A 法では，各検体の T-N・T-P 値にばらつきがあるため，固相抽出液を用いた次の方法 (以下「B 法」という。) でも一部試験を行った。採水直後の河川水 500mL を Sep-pak PS2 (waters 社製) を用いて固相抽出し，ジクロロメタンで溶出後，ジメチルスルホキシド (DMSO) に転溶した。得られた抽出液を，抽出物が元の河川水濃度と同じになるよう培地に加えて試料とした。三角フラスコ 3 本に試料を 30mL ずつ採り，以下 A 法と同様に試験を行った。なお，対照区には検体と同濃度の DMSO を添加した培地を用いた。

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。採水直後の河川水 500mL を Sep-pak PS2 (waters 社製) を用い

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \cdots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \cdots (I)$$

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad \cdots (II)$$

ここで，A = 面積

N_0 = 暴露開始時 (t_0) の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 = t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n = t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 = 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 (%)

て固相抽出し、ジクロロメタン 5mL で溶出させた。0.5mL まで濃縮後、内部標準物質としてフルオランテン-d₁₀ (1mg/L) を 50 μ L 添加し、GC/MS-SIM 検出法で 0.05 μ g/L を検出下限として測定した。測定対象とした農薬を Table 3 に示す。農薬は室見川流域で使用されているものの中から水質環境基準項目、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おり、かつ、GC/MS で一斉分析可能な 72 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 (日本電子製)

カラム : Ultra 2 (J&W SCIENTIFIC 社製)

(0.25mm × 30m, 膜厚 0.25 μ m)

カラム温度 : 50 °C (0min) — 30 °C/min —

105 °C (3min) — 6 °C/min — 270 °C (2.5min)

注入口温度 : 220 °C

インターフェース温度 : 250 °C

イオン源温度 : 250 °C

キャリアーガス : He (1.0mL/min)

5. T-N・T-Pの分析

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。採水直後に凍結保存した河川水を解凍し、PTFE ろ紙(0.45 μ m, ADVANTEC 社製)でろ過し試験に用いた。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-II (ブランルーベ社製)により分析した。

III 実験結果

1. オオミジンコ遊泳阻害試験

2004 年 9 月 9 日～2005 年 9 月 2 日のオオミジンコ遊泳阻害試験の結果を Fig.2 に示す。1 年間の平均遊泳阻害率は 3.3 %であった。全 52 検体のうち、全く阻害が確認されなかったのは 37 検体、5～20 %の阻害率を示したのが 11 検体、20～30 %の阻害率を示したのは 4 検体であった。

次に、2002～2005 年の共通試験期間である 5 月第 3 週～9 月第 1 週の阻害試験結果を Fig.3 に示す。各年の平均阻害率は、2002 年 : 69 %, 2003 年 : 5.0 %, 2004 年 : 6.3 %, 2005 年 : 1.3 %であった。また、2002 年は 7 月第 1 週～8 月第 1 週にかけて 100%の阻害率が観察されたが、2003 年の同時期では 5～15%, 2004 年および 2005 年の同時期では 0～5%前後の阻害率であった。

Table 1 Composition of stock solution for

<i>Daphnia magna</i>	
	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.

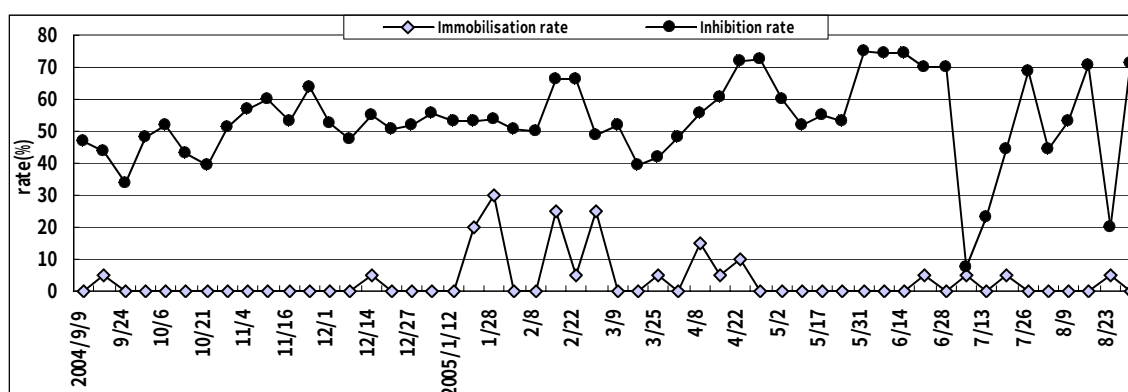
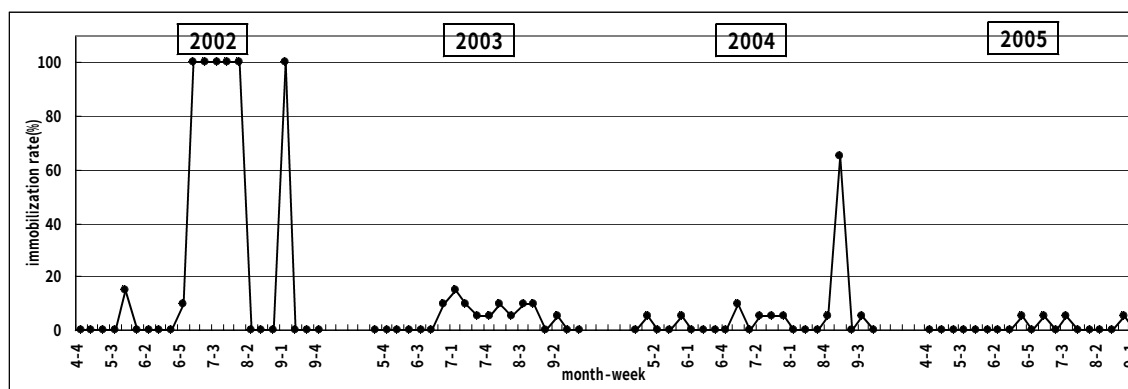
Table 2 Composition of stock solution for

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
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

Insecticides	Herbicides	Fungicides
Buprofezin	ACN	Captan
Chlorpyrifos	Alachlor	Chloroneb
Diazinon	Anilofos	Chlorothalonil(TPN)
Dichlorvos(DDVP)	Atrazine	Edifenphos(EDDP)
Dimethoate	Benfluralin	Etridiazole
Disulfoton	Benthiocarb	Flutolanil
α -endosulfan	Bifenox	Iprobenfos(IBP)
β -endosulfan	Buromobutide	Iprodione
EPN	Butachlor	Isoprothiolane
Etofenprox	Butamifos	Mepronil
Fenitrothion(MEP)	Cafenstrol	Metalaxyl
Fenobucarb(bpmc)	Chlomethoxynil(X-52)	Pencycuron
Fenthion	Chlornitrofen(CNP)	Phthalide
Isofenphos	Dichlobenil	Procymidone
Isoproc carb	Dichlofenthion(ECP)	Pyroquilon
Isoxathion	Dimepiperate	
Malathion	Dimethametryn	
Methidathion	Dithiopyr	
Phenthoate(PAP)	Esprocarb	
Pyridaphenthion	Mefenacet	
Pyriproxyfen	Methyl dymron	
Thiocyclam	Molinate	

determination limit : 0.05 μ g/LFig.2 Immobilization rate of *Daphnia magna* and inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata*.Fig.3 Immobilization rate of *Daphnia magna* in 2002, 2003, 2004 and 2005.

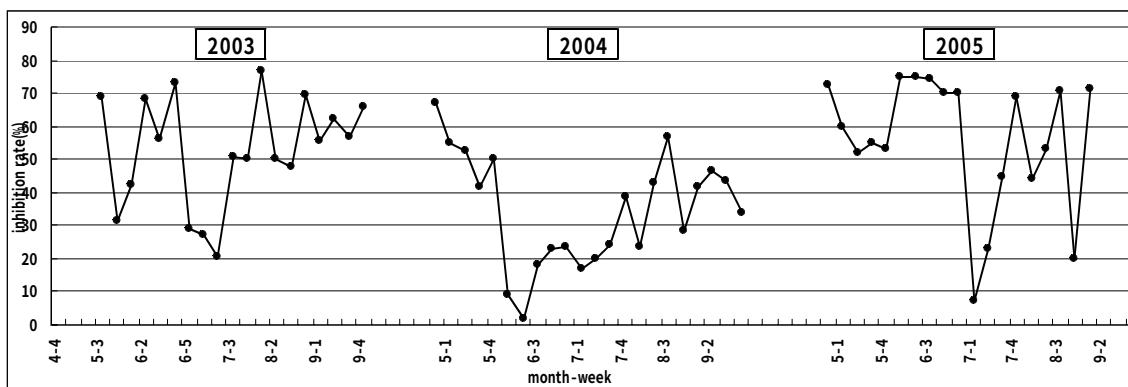


Fig.4 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* in 2003, 2004 and 2005.

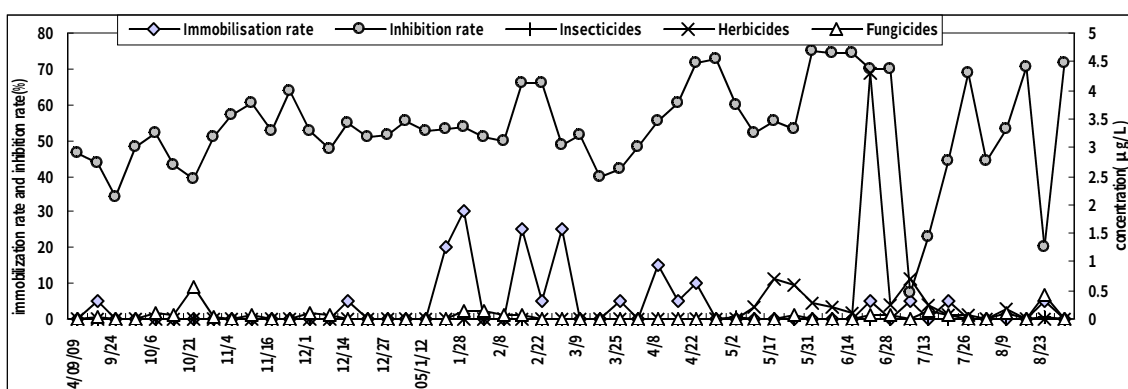


Fig.5 Immobilization rate of *Daphnia magna*, Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* and the total concentration of Insecticides, Herbicides and Fungicides.

2. 藻類生長阻害試験

2004 年 9 月 9 日～2005 年 9 月 2 日の藻類生長阻害試験 (A 法) の結果を Fig.2 に示す。試験の結果、8～75 % の阻害率が確認された。1 年間の平均阻害率は 53 % で、中でも 6 月の平均阻害率は最も高く 73 % であった。試験期間中の最高阻害率は 75 % (5/31, 6/7), 最小阻害率は 8 % (7/5) であった。

次に、2003～2005 年の共通試験期間である 5 月第 3 週～9 月第 1 週の阻害試験 (A 法) の結果を Fig.4 に示す。各年の平均阻害率は、2003 年：51%, 2004 年：29%, 2005 年：55 % であった。

また、2005 年 4 月 8 日～2005 年 9 月 2 日の藻類生長阻害試験 (B 法) の結果を Fig.8 に示す。阻害率は 2～28 % であり、試験期間の平均阻害率は 11 % であった。

3. 農薬

分析した 72 種類の農薬のうち、19 種類 (殺虫剤 6 種類；Buprofezin, Disulfoton, Fenitrothion, Fenobucarb, Fenthion, Maration, 除草剤 5 種類；Buromobutide,

Mefenacet, Napropamide, Pretilachlor, Simazine(CAT), 殺菌剤 8 種類；Chloroneb, Edifenphos(EDDP), Flutolanil, Iprobenphos(IBP), Mepronil, Metalaxyl, Pencycuron, Pyroquilon) が検出された。これらの検出濃度はいずれも基準値・指針値以下であった (3.2μg/L 以下)。

4. T-N・T-P

T-N 値は 0.22～2.0mg/L であり、平均値は 0.93mg/L であった。T-P 値は 0.0054～0.096mg/L であり、平均値は 0.020mg/L であった。

IV 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率は、III-1. で示した 2002～2005 年の共通期間の阻害試験の結果、この 4 年間はほぼ低下傾向にあるといえる (Fig.3)。

2004 年 9 月 9 日～2005 年 9 月 2 日の遊泳阻害率と農薬との関係を Fig.5 に示す。殺虫剤、除草剤、殺菌

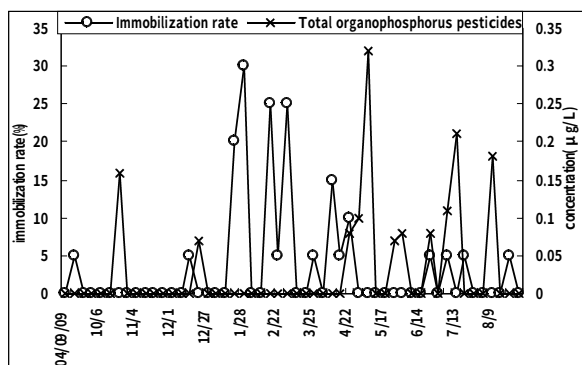


Fig.6 Immobilization rate of *Daphnia magna* and concentration of the total organophosphorus pesticides.

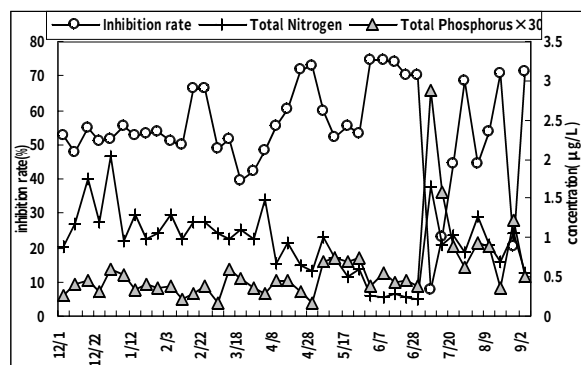


Fig.7 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata*, concentration of Total Nitrogen and Total Phosphorus $\times 30$.

剤と遊泳阻害率との間に特に相関は見られなかった。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⁾、これまでの試験で突出して高い阻害率(60～100%)を示した検体からは、有機リン系農薬である Chlorpyrifos が検出されている³⁾。今回の試験で検出された有機リン系農薬は、Disulfoton, Fenitrothion, Fenthion, Maration, Edifenphos (EDDP), Iprobenphos (IBP) の6種類であった。いずれも検出下限未満～0.32 $\mu\text{g/L}$ と低濃度で、オオミジンコに影響を与える濃度レベルではなく、遊泳阻害率との間に特に相関は見られなかった (Fig.6)。20～30%の阻害率を示した4検体は1月中旬～3月上旬のものであり、冬季にも阻害が確認されることがわかった。阻害の確認された検体からは農薬はほとんど検出されておらず、これより、今回確認された遊泳阻害の要因は今回分析した農薬以外によるものと考えられた。しかし、年間を通じた平均阻害率は3.3%と低く、試験期間における室見川河川水のオオミジンコへの生態影響は低いことがわかった。

2. 藻類生長阻害試験

室見川河川水の藻類生長阻害率は、III-2.で示した2003～2005年の共通期間の阻害試験の結果、2004年で一度低下したものの、2005年は2003年と同程度であることがわかった (Fig.4)。また、1年を通して常に一定の阻害があることが確認された。

2004年9月9日～2005年9月2日の1年間の生長阻害率と農薬との関係を Fig.5 に示す。殺虫剤、殺菌剤だけでなく、藻類の感受性が高いと言われている除草剤と生長阻害率との間にも特に相関は見られなかった。

次に、藻類生長阻害率と T-N・T-P との関係を Fig.7 に示す。T-P の最も高い検体 (7/5 : T-P = 0.096mg/L) に

おいて最も低い阻害率(8%)が確認されるなど、T-P と生長阻害率との間には負の相関が見られた (相関係数: $r^{T-P} = -0.70$)。2004年の夏季においても T-N・T-P と阻害率の間に負の相関が見られている³⁾ ($r^{T-N} = -0.78$, $r^{T-P} = -0.78$)。河川水そのものの阻害を調査するために、これまで藻類生長試験では栄養塩等の調整は行わなかったが、河川水中の T-N・T-P 等の栄養塩が藻類の生長を左右し、生長阻害率にも影響を与えている可能性が考えられた。

そこで、2005年4月8日～9月2日の河川水について、各検体の T-N・T-P 濃度による影響を除去するために行った固相抽出液を用いた B 法の結果 (B) と、これまでの生長阻害試験 A 法の結果 (A) を比較して Fig.8 に示す。試験期間における平均阻害率は (A) 57%, (B) 11% であり、(A) と比較して (B) は全検体において低い阻害率を示した。また、試験期間における (A) の T-N 値は 0.22～2.0mg/L・T-P 値は 0.0054～0.096mg/L であり、一方、(B) の T-N 値は 3.9mg/L・T-P 値は 0.34mg/L であった。これより、(A) (B) の阻害率の差は栄養塩濃度の差によるものである可能性が高い。よって (A) の阻害率は栄養塩を添加することである程度は低下すると思われた。

B 法は農薬分析と同じ方法であり、少なくとも今回分析対象とした農薬は抽出液に移行している。したがって、B 法では栄養塩類の影響は除去され、農薬等の化学物質による阻害のみを見ることが可能である。今回の結果からは、室見川河川水に含まれる農薬が藻類の生態影響を与える可能性は低いと思われた。また、(B) の阻害率と農薬との関係について Fig.9 に示す。(A) と同様に殺虫剤、殺菌剤および除草剤と生長阻害率との間に特に相関は見られなかった。

藻類は除草剤⁶⁾などの農薬の他、界面活性剤⁷⁾や有害

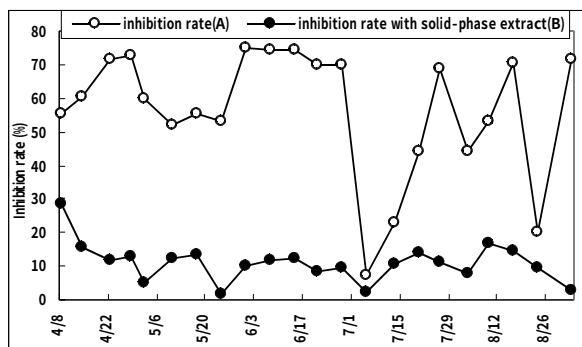


Fig.8 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata*.

金属⁸⁾にも感受性があると言われている。元の河川水に含まれている全ての阻害要因の影響を総合的に確認する場合には(A)の河川水をそのまま使用する方法が、また、農薬など溶媒で抽出できる化学物質のみを対象とする場合には(B)の固相抽出法がモニタリング手法として適していると考えられた。

V まとめ

室見川におけるオオミジンコの遊泳阻害は 2002 年からの 4 年間はほぼ低下傾向にあった。また、2004 年 9 月 9 日～ 2005 年 9 月 2 日の 1 年を通した遊泳阻害試験の結果、冬季にも阻害が確認された(0 ～ 30 %)が、年間を通じての平均阻害率は 3.3 %と低いことがわかった。

オオミジンコ遊泳阻害試験は簡便でかつ再現性もよく、特に有機リン系農薬への感受性が高い⁶⁾。また、界面活性剤への感受性もあるため⁷⁾、流域に農地や住宅地をもち、汚染の懸念がある河川等のモニタリング手法として利用するのに適していると思われる。

次に、藻類生長阻害試験について、2003 年からの 3 年間、全検体において阻害が確認された。また 2004 年 9 月 9 日～ 2005 年 9 月 2 日の 1 年を通した生長阻害試験の結果、季節に関わらず 1 年を通して常に一定の阻害があることが確認された。しかしながら、河川水中の T-P 濃度と阻害率の間には負の相関が見られ、河川水をそのまま用いた方法では、河川水中の T-N・T-P 等の栄養塩濃度が藻類の生長に影響を与えている可能性が考えられた。したがって河川水の固相抽出液を培地に添加し栄養塩類濃度を一定にした試験の結果、平均阻害率は 11 %と低いことが確認された。なお、この方法では、使用した固相及び溶媒で抽出される物質のみが

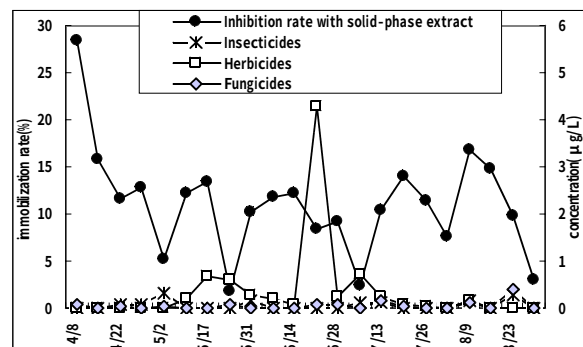


Fig.9 Inhibition rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* with solid-phase extract and the total concentration of Insecticides, Herbicides and Fungicides.

対象となるため、農薬等のモニタリングに適していると考えられた。

現在、膨大な種類の化学物質が流通しているが、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、これらの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。また近年、人間だけでなく生態系全体に対するリスク評価が重要視されている。オオミジンコや藻類を用いたバイオアッセイは、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、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非常に有効であると考えられる。

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報，29，61-65，2004
- 3) 野見山晴美・中原亜紀子・中牟田啓子：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，福岡市保健環境研究所報，30，101-107，2005
- 4) OECD Guideline for Testing of Chemicals 202, *Daphnia* sp., Acute immobilisation Test and Reproduction Test, 1984
- 5) OECD Guideline For Testing of Chemicals 201, *Alga*, Growth Inhibition Test, 1984
- 6) 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：バ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
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) , 302~307, 1993

8) 日本環境毒性学会編: 生態影響試験ハンドブック, 朝倉書店 (東京), 2003