

フルボ酸を用いたミジンコの繁殖試験について

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター

○廣瀬佳則、古田世子、藤原直樹、早川和秀、一瀬諭

1. はじめに

琵琶湖における有機物の環境基準である COD については、1979 年から 1984 年までは減少し、その後増加に転じ、1998 年から現在までは横ばい傾向を示し減少しないという状況にある。一方、有機物指標の一つである BOD は減少傾向を示しており、微生物では分解されにくい有機物（難分解性有機物）の増加が懸念されるとともに、湖水中の有機物が質的に変化してきた可能性が高いと考えられている。しかし、これらの変化が生態系に与える影響については明らかにされていない。

環境中に生息している水生生物への影響を直接かつ包括的に測定する手法の一つとしてバイオアッセイがある。この手法では、食物連鎖のなかでそれぞれ一次生産者、一次消費者及び高次消費者に位置づけられる藻類、甲殻類及び魚類の 3 生物種を用いることが一般的である。

本研究では、その中で近年注目が集められている WET(Whole Effluence Toxicity) 試験および OECD の化学品テストガイドラインに準じた手法により難分解性有機物の一種であるフルボ酸のミジンコに対する阻害影響の検討を試みたので報告する。

2. 方法

(1)ニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験

(1)-1. 試験生物

欧州、北米、アフリカなどに生息している外来種であるニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を使用した。

(1)-2. 試験方法

表 1 にニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験の方法と条件について示す。

(1)-3. 希釈水

希釈水は飛騨銘水株式会社製造の飛騨の水（硬度 85.9 mg/L、ナトリウム 1.1 mg/L、マグネシウム 4.2 mg/L、カルシウム 2.8 mg/L、カリウム 0.2 mg/L）を

使用した。

(1)-4. 試験条件

試験に使用するミジンコは、生後 1 週間以上経過し、累計産仔数が 15 匹以上かつ産仔回数が 4 回以上の親から 24 時間以内に生まれた仔虫を使用した。

ミジンコ数は 1 試験濃度につき 10 頭を 1 頭ずつ 10 群に分けて使用した。

試験では濃度比（公比）を 10 にして広い範囲（0.2 mg/L～200 mg/L）で検討を行った。

試験期間は 7 日間とし、観察は毎日行い、親ミジンコの生死、休眠卵の有無、仔ミジンコの数を記録し、換水前後には、水温、D0、pH の測定を行った。

試験の結果から環境毒性学会提供ソフト ECOTOX¹⁾ を使用し、NOEC を求めた。

表 1. 繁殖試験の方法および条件

項目	方法および条件
生物種	ニセネコゼミジンコ
試験濃度	BL, 0.2 mg/L, 2 mg/L, 20 mg/L, 200 mg/L
開始時	生後 2 4 時間以内
試験期間	7～8 日
生物数	10 頭×5 濃度
試験方式	半止水式（2 日に 1 度換水）
温度	25° C ± 1° C
照明	16 時間明 8 時間暗の周期
餌	YCT およびクロレラ
測定	・親ミジンコの生死と状態 ・産仔数とその状態
試験成立条件	・対照区のミジンコ（親）の死亡率が 20% を超えない事 ・8 日間で対照区の少なくとも 60% が 3 腹以上産んでいる事 ・対照区における生存仔虫数が最初の 3 腹で平均して 15 を超える事 ・対照区において休眠卵の生産が確認されない事
結果の算出	NOEC

(2) ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験

(2)-1. 試験生物

OECDのテストガイドラインの中で使用されているダフニア マグナ (*Daphnia magna*)²⁾ および北欧から約20年前に琵琶湖に入ってきて、琵琶湖の深層に分布しているダフニア プリカリア (*Daphnia pulicaria*) を使用した。

(2)-2. 希釈水

希釈水はサントリー社製造の天然水 (硬度約30 mg/L、ナトリウム4.9 mg/L、マグネシウム1.4 mg/L、カルシウム9.7 mg/L、カリウム2.8 mg/L) を使用した。また、試験中には試験水の交換は行わず、餌も与えなかった。

(2)-3. 試験方法

試験方法は、OECDの生態影響試験法テストガイドライン202³⁾、ミジンコ類急性遊泳阻害試験法に準じて行った。

(2)-4. 試験条件

試験開始2日前に体に幼体が詰まった親ばかりを、500mL用ビーカーに分離し、1日前に産仔した幼体はすべて除去した。その後、24 時間以内に産仔した120頭を用いた。培養条件はプレハブ型培養室を使用し、水温は20±1 °C、照度1000 ~ 2000 lux (16 時間明/8 時間暗条件) に設定し、開始時と終了時にpHおよび溶存酸素量を測定した。試験には100 mL用ビーカーを用いた。ミジンコ数は1 試験濃度につき20頭を5頭ずつ4群に分けて使用した。試験では濃度比 (公比) を10 にして広い範囲で検討を行った。試験の結果から環境毒性学会提供ソフトECOTOX¹⁾ を使用し、プロビット法等で半数遊泳阻害24hrEC₅₀ および48hrEC₅₀ を求めた。遊泳阻害の基準としては、試験容器を穏やかに動かした後、ミジンコが遊泳しないか、触角は動かせていても正常に遊泳できない状態を遊泳阻害とした。

両試験とも試験化学物質としては国際腐植物質学会で頒布するスワニー川フルボ酸を使用した。フルボ酸は水酸化ナトリウム溶液を用いて溶解し、塩酸を用いてpHを調節し、試験に使用した。

3. 結果

(1) ニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験

繁殖試験の結果を図 1 に示した。20 mg/L、

200mg/L の濃度区では、試験中に親ミジンコが死亡したため平均産仔数が低い値となったが、全濃度区において 19 匹以上の産仔が確認された。濃度区間の有意差は確認されず、今回の試験結果からフルボ酸はミジンコの繁殖には影響しないと考えられる。

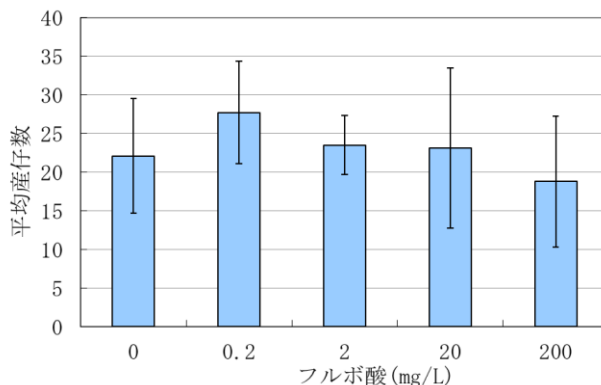


図1. フルボ酸に対するミジンコ繁殖試験の結果

(2) ミジンコを用いた急性遊泳阻害試験

フルボ酸の急性遊泳阻害試験は0.2 mg/L~200 mg/Lの範囲において5濃度区で行った。ダフニア マグナへの阻害は20 mg/L以下ではほとんど見られなかったが、200 mg/Lと非常に高い濃度区において確認された。プロビット法によりミジンコ遊泳阻害EC₅₀を算出すると、48hrEC₅₀で82.6 mg/Lと弱い阻害が確認された。一方、琵琶湖の深層に分布しているダフニア プリカリアに対する阻害は全濃度区においてほとんど認められなかった。

溶存酸素濃度およびpHに関して試験前後に大きな変化は確認されなかった。

通常、琵琶湖に存在する難分解性有機物の濃度は1 mg/L程度であり、今回の結果を琵琶湖に当てはめると現状においてはフルボ酸がミジンコに与える影響は少ないことが考えられる。

4. 文献

- 1) www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm
- 2) 田中晋: 富山大学教育学部紀要B, 48, 37-42 (1996)
- 3) Draft OECD test Guideline 202 part , *Daphnia magna* reproduction test to be used in the fin a lring test (1994)