

## 亜鉛を対象とした藻類の EC<sub>50</sub> に対するフルボ酸の影響評価 Effects of Fulvic Acid on EC<sub>50</sub> of Zinc for *Pseudokirchneriella subcapitata*

○櫻井伸治\* 瀧花真子\*\* 中桐貴生\* 堀野治彦\*

○Shinji SAKURAI\*, Mako TAKIHANA\*\*, Takao NAKAGIRI\*, Haruhiko HORINO\*

**1. はじめに** 現在, 排水管理に生態毒性評価手法(バイオアッセイ)の導入が重要とされている. バイオアッセイとは, 実際の生物種を用いた試験を行ってその応答を分析し, 水中の毒性を評価する手法である. これまで多くの化学物質の半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)が明らかにされてきたものの, 限定された条件下のものであるため, 実際の環境下では異なってくると予想される. したがって, 環境条件によって生じうる変化についての把握が重要となる. 本研究では, 食品や生活用品に広く使用されているものの生活排水中に多く含まれ, 水生生物に対するリスクが懸念されている物質の一つである亜鉛(Zn)に着目し, 重金属の毒性の緩和が期待されるフルボ酸の投与濃度に対する Zn の EC<sub>50</sub> における変動性について実験的に検討した. また, 代表的な複数の評価関数によって推定された EC<sub>50</sub> を比較し, 評価関数の算定手法に対する数値的信頼性についても検討した.

**2. 研究方法** **2.1 72 時間藻類生長阻害試験** 経済協力開発機構(OECD)が定める Test Guideline 201 を参考に, 72 時間藻類生長阻害試験を実施した. この試験は被験物質の曝露条件下で藻類を生長させ, その曝露量と阻害割合(被験物質が存在しない場合と存在する場合の増殖速度の比)の関係から, 被験物質の毒性を調べるもので, 阻害割合が 50% となるときの被験物質濃度が EC<sub>50</sub> として定められる. 本研究では, 藻類には当該試験で推奨されているムレミカヅキモ(*Pseudokirchneriella subcapitata*)を用いた. また, Zn の曝露レベルは 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μgZn/L の 8 濃度とした. 一般の河川中におけるフルボ酸濃度(0.03~4.0 mg/L)を参考に, 0 (対照試験), 1, 5, 10 mg/L の 4 条件のフルボ酸濃度を設定した. 実験中, 水温(24±2°C)および照度(4500 lux)を一定にし, **Table 1** に示す OECD が定めた培地を用いて藻類の前培養を 3 日間行った後, 各所定量の Zn (硝酸塩として) およびフルボ酸を添加し, 3 日間の曝露培養を行った. Zn およびフルボ酸の添加直後から 72 時間後まで 24 時間ごとにクロロフィル a (Chl.a) 濃度を測定し, これをムレミカヅキモの生存バイオマス量とした. **2.2 EC<sub>50</sub> の算出** 各フルボ酸濃度, Zn 曝露レベルでの培養試験結果から, まず増殖速度(Growth rate)  $\mu$  (d<sup>-1</sup>) を式(1)で求めた.

$$\mu = \frac{\ln(C_2) - \ln(C_1)}{t_2 - t_1} \dots (1)$$

ここで,  $t$  は Zn など添加からの経過日数(d),  $C_1, C_2$  はそれぞれ  $t_1, t_2$  における Chl.a 濃度(μg/L)を示す. 本研究では,  $t_1, t_2$  はそれぞれ 1 日後, 3 日後とした. 次に, 各 Zn 濃度での  $\mu$  を Zn 濃度 0 μg/L のときの  $\mu$  で割った生長率(Normal growth rate, 無次元)を算出し, Zn 濃度についての生長率曲線を, フルボ酸濃度別にエクセルソルバーを用いて作成して生長率が 0.5 となるときの EC<sub>50</sub> を特定した. **2.3 生長率曲線による比較** 生長率曲線は複数の関数で表現される. ここではその中で代表的な 3 係数ロジスティック曲線(式(2), LC3), 4 係数ロジスティック曲線(式(3), LC4), 対数直線(式(4), LL)の 3 つの式( $a, b, c, d$  はパラメータ)を用いて EC<sub>50</sub> を算出し,

**Table 1** Composition of OECD medium

Component	Concentration (mg/L)
NaHCO <sub>3</sub>	50
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18
NH <sub>4</sub> Cl	15
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.60
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.1
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.064
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.007
ZnCl <sub>2</sub>	0.003
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0015
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001

\* 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 Grad. School of Life and Environmental Sciences, Osaka Pref. University

\*\* 能勢町 Nose Town

キーワード: Zn EC<sub>50</sub> フルボ酸 藻類生長阻害試験 生長率曲線

それぞれの EC<sub>50</sub> 値の比較を行った。

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}} \dots (2) \quad y = d + \frac{a-d}{1 + (\frac{x}{c})^b} \dots (3) \quad y = a \ln(x) + b \dots (4)$$

### 3. 結果および考察 3.1 フルボ酸による増殖速度への影響

Zn 濃度と  $\mu$  の関係をフルボ酸濃度ごとに比較したものを Fig. 1 に示す。フルボ酸添加濃度 10 mg/L で、一般河川水レベルである他のフルボ酸濃度に比べて、Zn が 10  $\mu$ g/L 以下の比較的 low 濃度の時の  $\mu$  が顕著に大きい。一方、Zn が 50  $\mu$ g/L 以上の高濃度になると、各フルボ酸濃度における  $\mu$  の差は小さくなっている。これより、フルボ酸は藻類の生長に促進作用を及ぼすが、Zn による毒性作用がある程度強くなるとその効果は発揮されなくなることが示唆される。

### 3.2 フルボ酸の EC<sub>50</sub> への影響

3 種類の生長率近似曲線を Fig. 2 に示すとともに、これらの曲線から求めた EC<sub>50</sub> の値を Table 2 に整理する。まずフルボ酸濃度間で比較すると、Table 2 中の LC3, LC4, LL の近似曲線から得られる EC<sub>50</sub> の最大値と最小値は、それぞれ 91.4, 53.6, 121.9 mg/L の差が生じている。つまり、EC<sub>50</sub> の値は想定される環境によって、大きく変わり得ることが示唆される。また、3.1 における結果から、フルボ酸濃度が高いほど Zn の毒性への耐性が強くなり、EC<sub>50</sub> の値は大きくなると予想されたが、フルボ酸濃度が最も高い 10 mg/L の時よりも 5 mg/L の時の方が、EC<sub>50</sub> はむしろ大きくなるという結果になった。これは、生長促進効果のあるフルボ酸濃度が高い場合、Zn 濃度が 0  $\mu$ g/L の時の  $\mu$  が大きくなる一方、Zn 濃度が高い時は、 $\mu$  は総じて小さく、差がなくなり、結果的に、高 Zn 濃度時はより低いフルボ酸濃度での生長率と逆転が生じたことによる。

次に、EC<sub>50</sub> を 3 種類の評価法で相互比較すると、フルボ酸濃度が同じ場合での EC<sub>50</sub> の最大値と最小値は、0, 1, 5, 10 mg/L で、それぞれ 12.1, 14.9, 59.7, 6.0 mg/L の差が生じている。EC<sub>50</sub> の値は採用する近似曲線によって変動することから、今後 EC<sub>50</sub> の分析を行う際には、生長率曲線の近似法を公定化する必要がある。

### 4. おわりに

バイオアッセイは化学物質の毒性による生物種への影響を直接的に調べることができるという点でメリットがあるものの、指標に用いられる EC<sub>50</sub> の値は、環境による生物活性の違いや評価法によって大きく変動し得る場合があることが明らかとなった。そのため、EC<sub>50</sub> の値を用いた化学物質のリスク評価を行う場合は、評価対象を取り巻く環境諸要素を考慮することが肝要である。謝辞 本研究で用いたムレミカヅキモは国立環境研究所微生物系統保存施設から提供頂いた。ここに謝意を示す。

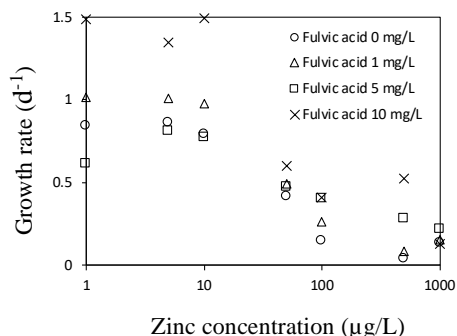


Fig. 1 Growth rates in each concentration of fulvic acid

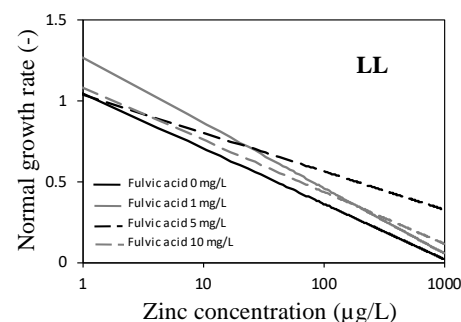
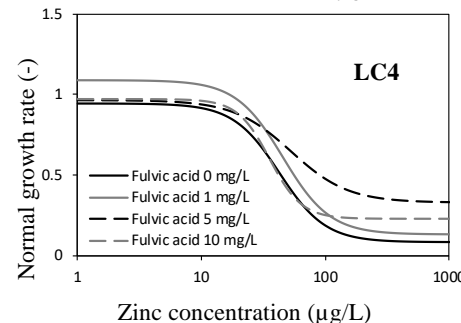
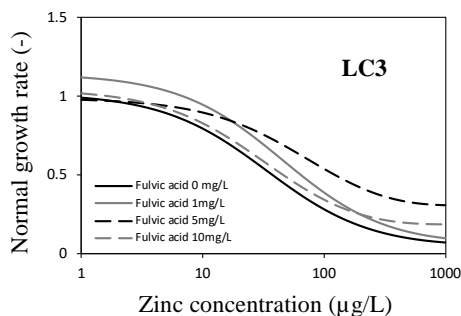


Fig.2 Comparison among growth curves using three approximations

Table 2 Comparison among EC<sub>50</sub>s with each three approximation

Fulvic acid	EC <sub>50</sub>			Max-Min
	LC3	LC4	LL	
0	35.8	46.2	34.1	12.1
1	49.2	51.3	36.4	14.9
5	127.2	96.3	156.0	59.7
10	41.4	42.7	47.4	6.0
Max-Min	91.4	53.6	121.9	—

(unit: mg/L)