琵琶湖水中のフルボ酸のOECD試験法による水生生物への急性毒性評価

Acute Toxicity Evaluation of Fulvic Acid in Water of Lake Biwa on Aquatic Organisms by OECD Chemical Tests

早川和秀¹、廣瀬佳則¹、一瀬 諭¹、岡本高弘¹、古田世子¹、田中 稔¹、藤嶽暢英²、田中仁志³

¹滋賀県琵琶湖環境科学研究センター／〒520-0022 滋賀県大津市柳が崎5-34

²神戸大学大学院農学研究科／〒657-0013 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1

³埼玉県環境科学国際センター／〒347-0115 埼玉県加須市上種足914

KAZUhide HAYAKAWA¹, YOSHINORI HIROSE¹, SATOSHI ICHISE¹, TAKAHIRO OKAMOTO¹, SEIKO FURUTA¹, MINORU TANAKA¹, NOBUHIDE FUJITAKE², and HITOSHI TANAKA³

¹Lake Biwa Environmental Research Institute/5-34 Yangasaki, Otsu, Shiga 520-0022

²Graduate school of Agricultural Sciences, Kobe University/1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-0013

³Center for Environmental Science in Saitama/914 Kamitanadare, Kazo, Saitama 347-0115

Abstract

Lake Biwa has an increase of recalcitrant dissolved organic matter in the water. We examined acute toxicity of fulvic acid extracted from the lake by algal growth inhibition, crustacean immobilization, and reproduction tests to evaluate impact of recalcitrant dissolved organic matter on aquatic organisms. The results of these tests showed that present concentration of fulvic acid (FA) in Lake Biwa water did not inhibit growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*, did not immobilize two *Daphnia* spp. and did not limit reproduction of *Ceriodaphnia dubia*.

Key words: fulvic acid, recalcitrant dissolved organic matter, lake water, toxicity test

1. はじめに

琵琶湖のCODは1984年以降に増加して以来、高止まりが続いている。この原因には微生物にとって難分解性の溶存有機物が蓄積している可能性が指摘されている¹⁾。原因の全容解明には、難分解性溶存有機物の正体およびその蓄積原因を科学的に解明することが求められるが、水環境中に存在する難分解性有機物は多種多様な有機分子の混合物とされ、その化学的同定は容易でない。化学的同定を続ける一方で、水環境行政で優先すべき課題は、難分解性溶存有機物が湖沼の水生生物にとって影響を及ぼすかどうかであり、影響があるなら対策を講じなければならない点にある。したがって、難分解性溶存有機物

の湖沼の生態系への影響を明らかにすることが水環境行政にとって対策の要否をふくめた判断基準となる喫緊の課題である。

今井ら (1998)²⁾によれば、琵琶湖水中の溶存有機物を樹脂への吸着性により分画すると、疎水性酸（フミン物質）と親水性酸が多いとしており、霞ヶ浦ではそれらの分画は難分解性有機物に関係が強いとしている。親水性酸はその抽出法がまだ確立されていないのに対して、フミン物質は国際腐植物質学会の推奨する方法が確立している³⁾。フミン物質はさらにフルボ酸とフミン酸に分けられるが、水中ではフルボ酸が多いことが知られている。水中のフミン物質は、水域によりその特性が異なる。

フミン物質と水生生物の関係は、その分野で多くの著

書があるSteinbergによると、フミン物質は生物に直接的間接的に相互作用があり、生物に対して阻害することも逆に良い効果をもたらすこともあり判然としていない⁴⁾。フミン物質は、細胞膜での過酸化物質や活性酸素種を形成して生体への直接の悪影響をもたらすだけでなく、近年は細胞膜を透過して光合成メカニズムへの阻害や化学ストレス作用を及ぼすこともわかってきた。一方で、フミン物質は水中において、pHの変化に対して緩衝剤として働いたり、重金属との錯体結合や農薬や毒性化学物質の吸着によってその毒性を下げたりすることから、間接的に水生生物に対して生息環境を保つ働きがある。植物プランクトンとフミン物質の關係に着目して概観しても正負の影響がみられる。水溶したフミン物質が示す褐色は、植物プランクトンの光合成にとって光を阻害するので負の影響をもたらす⁵⁾。一方、低分子量のフミン物質は、栄養塩やビタミンと同じように植物プランクトンが直接吸収できるため、栄養塩の代わりとなることがある⁶⁾。また、直接的な作用でなくとも、フミン物質には、植物プランクトンの増殖にとって重要な微量元素やリン酸との結合によって間接的な影響を及ぼすこともある⁵⁾。

細胞レベルから個体レベルまでフミン物質の様々な毒性影響が考えられる中で、我々は個体の生長や行動変化に現れる直接的な影響に焦点を絞った。先に挙げたフミン物質の間接的な影響には、植物プランクトンの鉄利用との關係を指摘する国内の研究例もみられる^{7),8)}。しかし、それらの結果は植物プランクトンの群集組成の変化を促すものであり、フミン物質の存在が植物プランクトンの生存を脅かすものではない。また、琵琶湖では溶存鉄濃度が海洋より高い濃度にあり、リンが植物プランクトンの栄養制限元素になっている状況下で、鉄は特筆すべき生長制限元素となっていない。それらの理由から、琵琶湖においてフミン物質の間接的影響は優先度の低い課題とみなした。一方で、琵琶湖に含まれるフミン物質の生物への直接的な影響については情報がなく、難分解性有機物の水生生物への影響について議論が進んでいなかった。

本研究では、生物への直接的な影響評価の方法として生態急性毒性試験を行った。化学物質による人間または生態系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生態影響試験（バイオアッセイ）がある。この化学物質のバイオアッセイには国際的に合意された試験方法として経済協力開発機構（OECD）の化学品テストガイドラインがあり、環境省でも同ガイドラインに基づく化学物質の生態影響試験を設定している⁹⁾。それらによる

と、生態毒性試験として藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、ミジンコ繁殖阻害試験、魚類急性毒性試験、魚類初期生活段階毒性試験、底質添加によるユスリカ毒性試験をあげている。

本研究では、琵琶湖における難分解性溶存有機物の生物影響を評価するため、湖水のフミン物質の中でも存在量の多いフルボ酸を抽出して、生分解性試験を行うとともに、難分解性有機物の代表として藻類と甲殻類に対する毒性影響評価を試みた。

2. 実験と方法

2.1 琵琶湖フルボ酸の抽出と生分解試験

毒性影響試験に使用するフルボ酸は、2011年11月琵琶湖北湖の湖心局S局（北緯35°11'09"、東経135°58'21"）の水深2.5 mにて、非イオン性樹脂DAX-8による吸着回収装置¹⁰⁾を用いて採取した。本装置は、湖水を0.45 μm フィルターでろ過した後、塩酸性（pH < 2）にしてDAX-8樹脂に通水して湖水中のフミン物質を吸着する。これを研究室に持ち帰り、研究室にてアルカリ溶出してフミン物質を回収し、さらに精製してフルボ酸とフミン酸に分離した¹⁰⁾。

抽出した琵琶湖フルボ酸は、難分解性を確かめるため生分解性試験を行った。試験は、OECD化学品テストガイドライン301A¹¹⁾に基づくDOC die away生分解性試験により行った。同ガイドラインが定める培養水800 mlに、前述の琵琶湖産フルボ酸14 mgを溶かし、ガラス繊維ろ紙GF/Fで粒子を除いたら過湖水1 ml（2012年1月北湖にて採水）を添加して細菌を接種した後、1 lに定容した。これを20℃で暗条件にて100 rpmで振とうしながら、28日間の分解試験を行った。ただし、本研究では、試験開始当初に試験水の窒素不足を憂慮したため、塩化アンモニウムの添加量を増やしてOECD生分解試験法の1つである301C（MITI test）に合わせ、窒素濃度を4.4 mgN l⁻¹とした。比較試験として、グルコースと国際腐植物質学会で頒布するスワニー川フルボ酸（14 mg l⁻¹）を添加したものも行った。試験開始後、時間経過にともない試水を採取し、以下の化学分析を行った。試水中の細菌密度は吸光度より推定した。吸光度は紫外可視分光光度計U-2001（日立製作所）を用いて、610 nmの波長（光路長50 mm）で計測した。この波長でのフルボ酸の吸収は細菌細胞による吸収散乱に比べて十分に低く、吸光度は細胞濃度に依存している。試水の溶存態有機炭素濃度（DOC）は、試水をWhatman GF/Fフィルターによりろ

過後、全有機炭素計TOC-V（島津製作所）により測定した。

2.2 生態毒性試験

藻類生長阻害試験は、OECDテストガイドライン201¹²⁾に基づき、フルボ酸に72時間暴露した際の藻類の増殖速度に対する50%阻害濃度（ ErC_{50} ）、無影響濃度（NOEC）を求めた。試験物質にはスワニー川フルボ酸と、本研究で採取された琵琶湖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を調節して試験に使用した。藻類には、緑藻*Pseudokirchneriella subcapitata*（ATCC22662）を用いた。フルボ酸の曝露濃度を、0、16、31、130、250 $mg\ l^{-1}$ として、試験の詳細はOECDテストガイドラインに準じた（Table 1）。250 $mg\ l^{-1}$ ではフルボ酸の着色遮光により400 nm付近の波長で10%程度の光減衰があり、光減衰による増殖阻害を避けるため液量を通常の半分量に減らして光減衰を抑え、試験に支障がないことを確認して実施した。各濃度における増殖阻害率は、培養時間経過に伴う生物量の変化から増殖曲線を描き、0-1日、0-2日、0-3日間の増殖速度を算出し、これを対照に対する増殖速度の低下率として求めた。

また、補足試験として、実験中の培養光によりフルボ酸の光分解産物が増殖阻害を引き起こす可能性がある。例えば、琵琶湖水中の溶存有機物には光照射により蛍光強度が減少する現象が報告されている¹³⁾。したがって、72時間光照射後のフルボ酸培養液に試験藻類を添加する試験も行った。フルボ酸には琵琶湖フルボ酸250 $mg\ l^{-1}$ を

用いた。

ミジンコ類急性遊泳阻害試験は、OECDテストガイドライン202 ミジンコ類急性遊泳阻害試験法¹⁴⁾に準じて行った。供試ミジンコ類には、OECDテストガイドラインに挙げられている*Daphnia magna*および琵琶湖北湖の深層に分布している*Daphnia pulicaria*を使用した。試験条件はTable 2のとおりであり、開始時と終了時にpHおよび溶存酸素量を測定して培養条件を確認した。フルボ酸の濃度比（公比）を10にして、0および0.2、2.0、20、200 $mg\ l^{-1}$ の5濃度区で行った。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、ミジンコ類が遊泳しない、もしくは触角は動かしても正常に遊泳できない状態を遊泳阻害とした。試験の結果から環境毒性学会提供ソフトECOTOXを使用し、プロビット法で24時間後と48時間後の半数遊泳阻害（24h EC_{50} 、48h EC_{50} ）を求めた。

ミジンコ類の繁殖阻害試験は、WET（Whole Effluence Toxicity）試験を行った。試験には、*Ceriodaphnia dubia*を用い、生後1週間以上経過し、累計産仔数が15頭以上かつ産仔回数が4回以上の親個体から24時間以内に生まれた仔虫を使用した。試験の条件はTable 3のとおりであり、環境省で検討中のWETガイドライン及びカナダ

Table 1 Materials and conditions in algal growth inhibition test of fulvic acids

Substances and condition	
Alga	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ATCC22662)
Test substances and concentration range	Fulvic acids from Lake Biwa and Suwanee River Control (0 $mg\ l^{-1}$), 16, 31, 130, 250 $mg\ l^{-1}$
Culture medium	OECD TG201 medium
Test duration	72 hours
Incubation style	Rotary shaking
Number of replicates	6 replicates for control Triplicate for test concentrations
Temperature	21-24°C
Light	Fluorescent lamps: 90 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$
Measurement	Cell number by a coulter counter

Table 2 Materials and conditions in *Daphnia* spp. acute immobilization test of fulvic acids

Substances and condition	
Test species	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia pulicaria</i>
Test substances and concentration range	Fulvic acids from Lake Biwa and Suwanee River Control (0 $mg\ l^{-1}$), 0.2, 2, 20, 200 $mg\ l^{-1}$
Generation	less than 24 hours old at the beginning of the test
Test duration	24, 48 hours
Number of test animals	4 groups consisting of 5 animals each for all test concentration including the control
Water	Natural water provided by Suntory Co.* No exchange during the test
Temperature	20 $\pm$ 1°C
Light	1,000~2,000 lux, 8 hours darkness and 16 hours light
Feeding	None
Evaluation	Observation on immobilization reaction against physical stimulation

*Chemical properties of water presented by the manufacturer: Hardness: 30 $mg\ l^{-1}$; pH: 7; Na^+ : 4 ~ 10 $mg\ l^{-1}$; Mg^{2+} : 1~3 $mg\ l^{-1}$; Ca^{2+} : 6~15 $mg\ l^{-1}$; K^+ : 1~5 $mg\ l^{-1}$

Table 3 Materials and conditions in *Ceriodaphnia dubia* reproduction test of fulvic acids

Substances and condition	
Test species	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Test substances and concentration range	Fulvic acids from Lake Biwa and Suwanee River Control, 0.2, 2, 20, 200 mg l ⁻¹
Generation	less than 24 hours old at the beginning of the test
Test duration	7–8 days
Number of test animals	10 animals each for all test concentration including the control
Water	Natural water provided by Hida Meisui Co.** One time exchange in two days
Temperature	25 ± 1°C
Light	1,000–2,000 lux, 8 hours darkness and 16 hours light
Feeding	YCT and <i>Chlorella</i> (Ecogenomics Inc.)
Evaluation	Counts of juveniles and observation of their mobility (dead or alive) Lethality of adults

**Chemical properties of water presented by the manufacturer: Hardness: 85.9 mg l⁻¹; pH: 7.8; Na⁺: 1.1 mg l⁻¹; Mg²⁺: 4.2 mg l⁻¹; Ca²⁺: 27.5 mg l⁻¹; K⁺: 0.2 mg l⁻¹

環境省ガイドライン¹⁵⁾に準じた。観察は毎日行い、親個体の生死、休眠卵の有無、産仔数を記録し、換水前後には、水温、DO、pHを測定して条件の確認をした。試験の結果から環境毒性学会提供ソフトECOTOXにより等分散性の検定および多重比較検定等を実施し、ミジニコ類の繁殖に及ぼす影響（無影響濃度NOEC）を求めた。

3. 結果

3.1 フルボ酸の抽出と分解試験結果

湖心局における採水量は8,600 lで、フルボ酸およびフミン酸の粉末試料それぞれ1.7 gおよび0.5 gを得た。このとき抽出されたフルボ酸の有機炭素含量は40%であったので、観測時の湖水中のDOC濃度（1.19 mgC l⁻¹）に対して、抽出したフルボ酸は約7%に相当した。Kida *et al.* (2015)¹⁶⁾は、フミン物質の簡易定量法により、琵琶湖のフミン物質（フルボ酸+フミン酸）濃度を定量的に計測しており、DOCに対して32–65%（平均44%）であると報告している。その平均値より本試験でのフミン物質の収率を計算すると20%であった。ただしこの低い収率は、装置の特性によるものでフルボ酸の性状に影響はない。

Fig. 1 a) Changes in the DOC concentrations of glucose, Lake Biwa fulvic acid (FA), and Suwanee River FA during the OECD DOC die-away test. b) Changes in the absorbance at 610 nm as an indicator of bacterial cell density during the OECD DOC die-away tests

生分解試験の結果（Fig. 1a）、グルコースの試験では系内のDOC濃度が時間経過とともに徐々に減少したのに対して、琵琶湖フルボ酸、スワニー川フルボ酸ではDOC濃度の目立った減少は見られなかった。吸光度の変化から（Fig. 1b）、時間経過とともに各試験水にて細菌増殖があったが、フルボ酸ではDOCの顕著な減少にはつながらなかったと考えられる。以上のことから、琵琶湖水のフルボ酸は難分解性であることを確認した。

3.2 藻類生長阻害試験の結果

スワニー川フルボ酸に曝露した各試験濃度での増殖曲線は、増殖阻害が認められるものの、曝露のない（0 mg l⁻¹）試験に近い対数増殖を示した（Fig. 2）。スワニー川フルボ酸では、3日間の増殖阻害率の最大は250 mg l⁻¹試験で8%であった（Fig. 3）。試験濃度内に50%の阻害率は現れなかったため、各試験濃度より計算した増殖速度に対する50%阻害濃度ErC₅₀は250 mg l⁻¹以上と算出さ

Fig. 2 Growth of green alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) under the different concentration of Suwanee River fulvic acid (FA) or Lake Biwa FA during the 3 days culture test.

Fig. 3 Inhibition to the algal growth rates by the different concentration of Suwanee River fulvic acid (FA) or Lake Biwa FA during the 3 days culture test. Error bars mean standard deviations. The asterisks and double asterisks denote statistical significant differences from a control test (no FA addition) at the 0.05 level ($p < 0.05$) and 0.01 level ($p < 0.01$), respectively.

れた。63 mg l^{-1} 以上では濃度の増加にともなう阻害率の増加がみられ、統計的に有意な阻害と認められた (16 mg l^{-1} では $p < 0.05$, 63 mg l^{-1} 以上では $p < 0.01$)。16 mg l^{-1} では阻害率は低いことからNOECは31 mg l^{-1} と判定された。

琵琶湖フルボ酸に曝露した各試験濃度での増殖曲線には、増殖阻害が認められるものの、曝露のない (0 mg l^{-1}) 試験に近い対数増殖を示した (Fig. 2)。琵琶湖フルボ酸では、3日間の増殖阻害率の最大は16 mg l^{-1} 試験で4%であり (Fig. 3)、 ErC_{50} は同じく250 mg l^{-1} 以上と算出された。130 mg l^{-1} を除く各試験濃度の増殖速度はフルボ酸添加濃度0 mg l^{-1} 試験に比べて、統計的に有意な差が認められた (31, 63 mg l^{-1} では $p < 0.05$, 16, 250 mg l^{-1} では $p < 0.01$) が、阻害率は低く、阻害率の濃度依存性も認

められなかった。250 mg l^{-1} 未満では阻害率は低いことから、NOECは130 mg l^{-1} と判定された。

曝露0-1日間と0-3日間の阻害率を比較すると、琵琶湖フルボ酸では0-1日間に比べ、0-3日間の阻害率が著しく低い。曝露初期には増殖が阻害されるが、3日後には藻類細胞が適応している様子がうかがえる。

あらかじめフルボ酸を光照射した後に行った生長阻害試験では (Fig. 4)、曝露0-1日目には有意な阻害があった ($p < 0.01$) が、2日目以降は有意な阻害がなかった。光照射のない場合と比較すると、曝露0-1日目から阻害率が低下する様子がみられ、光照射によってフルボ酸の阻害効果は減弱されたと考えられた。

3.3 ミジンコ類急性遊泳阻害試験の結果

試験前後の溶存酸素濃度およびpHに大きな変化は確認されなかった。スワニー川フルボ酸による *D. magna*

Fig. 4 Influence of prior light-irradiation to inhibitory of Lake Biwa fulvic acid (FA) (250 mg l^{-1}) to the algal growth rate. The asterisks and double asterisks denote the same as the caption in Fig. 3.

への統計的に有意な ($p < 0.05$) 遊泳阻害は 20 mg l^{-1} 以上の高い濃度区において確認された。プロビット法により算出した48h EC_{50} は 83 mg l^{-1} であった (Table 4)。一方、*D. pulicaria*に対して全濃度区において24h EC_{50} もしくは48h EC_{50} が決定されるほどの有意な遊泳阻害は認められなかった。琵琶湖フルボ酸による *D. magna*への試験では、 200 mg l^{-1} の試験区で有意な ($p < 0.05$) 遊泳阻害が確認された (Fig. 5)。 *D. pulicaria*への試験では、 20 mg l^{-1} 以上の高い濃度区において遊泳阻害が確認され ($p < 0.05$) (Fig. 5)、*D. magna*よりも *D. pulicaria*の遊

Table 4 Results of *Daphnia* spp. acute immobilization test of fulvic acids

	<i>Daphnia magna</i>		<i>Daphnia pulicaria</i>	
	24h EC_{50} (mg l^{-1})	48h EC_{50} (mg l^{-1})	24h EC_{50} (mg l^{-1})	48h EC_{50} (mg l^{-1})
Suwanee River FA	990	83	ND	ND
Lake Biwa FA	ND	ND	ND	200

FA: fulvic acids, ND: Not determined statistically

Fig. 5 Immobility rates of two daphnids (*Daphnia magna* and *Daphnia pulicaria*) exposed to different concentration of two fulvic acids (FA). Immobility of Suwanee River FA on a) *D. magna* and b) *D. pulicaria*. Immobility of Lake Biwa FA on c) *D. magna* and d) *D. pulicaria*. Open diamonds denote the immobility rates after 24 hours, and closed circles denote the immobility rates after 48 hours. Error bars mean standard deviations. Solid lines denote curve fittings to estimate 24h EC_{50} and 48h EC_{50} calculated by ECOTOX. Horizontal dot lines denote 50% of immobility.

泳阻害率は高かった。*D. pulicaria*による琵琶湖フルボ酸の試験では、48h EC_{50} 値が 200 mg l^{-1} と算定された (Table 4)。

3.4 繁殖阻害試験の結果

試験前後の溶存酸素濃度およびpHに大きな変化は確認されなかった。スワニー川フルボ酸に暴露した繁殖試験では、 20 mg l^{-1} 、 200 mg l^{-1} の濃度区で試験中に親個体が死亡したため、平均産仔数が低い値となったが、全濃度区において19頭以上の産仔が確認された。濃度区間の有意差は確認されなかった (Fig. 6)。琵琶湖フルボ酸の 0.2 、 2 mg l^{-1} の濃度区では、試験中に親個体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17頭以上の産仔が確認された。濃度区間の有意差は確認されなかった。

4. 考察

4.1 植物プランクトンへの影響

琵琶湖水のDOC濃度は、通常、 $1 \sim 2 \text{ mgC l}^{-1}$ の範囲にあり、フルボ酸を含むフミン物質は今井らによればDOCの25%程度²⁾、最大50%¹⁶⁾と報告されている。よって琵琶湖のフルボ酸は最大で見積もっても 1 mgC l^{-1} (炭素含有率を50%と仮定すると 2 mg l^{-1})であり、藻類生長阻害試験で得られたフルボ酸のNOECとは2桁の差がある。安全係数10倍をみてもその差は大きい。現在の琵琶湖水中のフルボ酸濃度では、植物プランクトンへの増殖阻害はないと考えられる。

フミン物質が植物プランクトンに対して及ぼす直接的な効果には光遮光効果や化学的な作用がある⁵⁾。特にフミ

ン物質の有色性は水中光を減衰することから植物プランクトンにとって光合成が制限されるため生長阻害となる。化学的な作用では、細胞膜や細胞内部に対して化学的なストレスを及ぼすが、植物プランクトンはフミン物質の含有が多い腐植栄養湖でも存在することから、フミン物質が植物プランクトンの生長を阻害する化学物質であるとする見方は少数である。例えば、光環境を除いたフミン物質への曝露の報告では、影響なし¹⁷⁾、弱い生長促進効果¹⁸⁾などがある。しかし、Bährs and Steinberg (2012)¹⁹⁾では、*Pseudokircheriella subcapitata*と*Microcystis aeruginosa* (PCC7806)において、フミン物質の曝露が低濃度では生長を刺激するが、高濃度では生長を阻害すると報告している。Bährsらは、その効果についてフェノール化合物の過酸化物等による植物プランクトンの光合成阻害であると推定している。

本研究において、生長阻害試験の0-1日に比較的阻害率の高い値が確認され、時間経過とともに阻害性が改善された状況は、細胞の適応が起こったものと推察され、阻害効果に示唆を与えるものである。もし、化学的な作用であるなら細胞の適応に時間がかかるものであり、1-2日での改善は考えにくい。一方で、光環境の変化に対する細胞適応と考えれば、説明は容易である。例えば、Hessen and Færøvig (2001)²⁰⁾は、*Selenastrum capricornutum* (*Pseudokircheriella subcapitata*)を紫外線に曝露した際に、初めの10時間に細胞の活性が低下したことを見出している。しかし、その後の培養時間の経過とともに細胞の活性は回復しており、本研究でもこれと同じ現象が起こっているものと推察される。一方、スワニー川フルボ酸では適応の度合いが低く、結果的に3日目には琵琶湖フルボ酸よりも阻害率が高い結果となった。

Fig. 6 Influence of Suwannee River fulvic acid (FA) and Lake Biwa FA on the reproduction of a daphnid *Ceriodaphnia dubia*.

スワニー川フルボ酸と琵琶湖フルボ酸では、その化学構造が大きく異なっており¹⁰⁾、スワニー川フルボ酸が芳香環やカルボキシル基を多く含むのに対して、琵琶湖フルボ酸ではより脂肪族炭素を多く含む。こうした化学構造の違いから、スワニー川フルボ酸の方が過酸化物の生成などに富むことが推定され、阻害率が高いとする試験結果の要因の一つと考えられる。

フルボ酸を照射した後にを行った生長阻害試験で、曝露0-1日での阻害率が照射のない試験区に比べて低かったことや、0-2日目以降は有意な阻害がなかったことは、照射によってフルボ酸の有色性や毒性の低減が起きたものと推察された。琵琶湖の溶存有機物は、光反応によって紫外吸収や蛍光が減少することが報告されている¹³⁾。琵琶湖の溶存有機物の光反応による化学構造の変化の詳細は不明であるが、DOC濃度が減ることはなく、脱色等の化学的変質が起こると考えられている¹³⁾。本試験で得られた結果は、フルボ酸の化学構造と阻害のメカニズムの関係を考えていく上で何らかの示唆を与える。

4.2 動物プランクトンへの影響

ミジンコ類への20 mg l^{-1} 以上のフルボ酸の曝露では遊泳阻害が見られたことは、過去の報告と調和的である。例えば、スワニー川フルボ酸を *D. magna* へ曝露した報告では、50-100 mg l^{-1} のスワニー川フルボ酸の曝露で10-20%の遊泳阻害が確認された²¹⁾。琵琶湖の環境でみれば、*Daphnia* 属2種の試験結果で得られた24h EC_{50} もしくは48h EC_{50} と琵琶湖水中のフルボ酸濃度には2ケタ以上の差があることから、現在の琵琶湖水中のフルボ酸濃度では、遊泳阻害は起こらないと考えられる。同様に、繁殖阻害試験結果からも琵琶湖水中のフルボ酸濃度では繁殖阻害は起こらないと考えられる。

通常、腐植栄養湖には動物プランクトンが豊富に存在するため、フミン物質が動物プランクトンの阻害となるとは考えられず、そのような研究例は多くない²²⁾。むしろ、腐植栄養湖では流入するフミン物質が動物プランクトンの食物源となっていると考えられてきた²³⁾。しかし、1980年代以降の酸性雨や気候変動が腐植栄養湖に及ぼす影響を評価する上で、フミン物質と動物プランクトンの関係は見直されてきた。水中のフミン物質の濃度変化やpHの変化が細胞の膜浸透性などの点でリスクとなり得る^{22, 24)}。例えば、pHが低下することにより、それまで動物プランクトンに毒性を示さなかったフミン物質が毒性を示すこともある²⁴⁾。今後の気候変動や環境の変化によるpHの変化やフミン物質の濃度が劇的に変化する場合

には、阻害を再確認する必要がある。

本試験結果では、スワニー川フルボ酸では *D. magna* において24h EC_{50} および48h EC_{50} の算出可能な有意な阻害が確認され、琵琶湖フルボ酸では *D. pulicaria* において有意な阻害が確認された。過去の文献には、亜鉛の毒性について *D. magna* より *D. pulicaria* で感受性が高いとする報告があり²⁴⁾、プランクトンの体長差と毒性の関係が議論されている²⁵⁾。一方、本研究において *D. magna* と *D. pulicaria* の耐性の違いは判然としなかった。Ferraõ-Filho *et al.* (2000)²⁶⁾ はミクロキスチンの毒性をミジンコ類6種で試験しているが種による耐性の違いはなかったと報告している。種類による毒の感受性の違いはさらに検討が必要である。

D. magna の繁殖阻害は、幼若ホルモン様作用物質への曝露によって通常は雌仔虫しか生まない *D. magna* を雄仔虫に偏らせる内分泌攪乱によって起こることが知られる²⁷⁾。フミン物質には内分泌攪乱作用の報告例もあり⁴⁾、上記作用の可能性はあった。しかし、本研究では琵琶湖フルボ酸による *C. dubia* の繁殖阻害を見出すことはなかった。

4.3 今後の課題

本研究では、琵琶湖フルボ酸の現濃度における毒性は確認されなかったが、この結果のみで難分解性溶存有機物による生物影響のすべてを否定するものではない。例えば、本研究ではフミン酸や親水性酸を検討していない。琵琶湖においてフミン酸の存在量はフルボ酸の1/5程度(藤嶽私信)であることから、生態毒性試験に用いる必要量を集めることが至難であった。フミン酸の毒性については今後の検討課題である。

しかしながら、フルボ酸、フミン酸が生態系に及ぼす影響という観点からみると、本研究のような曝露実験による供試生物の繁殖や行動阻害に及ぼす影響の直接観察は、極めて限定的なアプローチと考えるべきであろう。欧米では高緯度、高山に腐植栄養湖が多く存在し、フミン物質の生物へ及ぼす影響評価の研究は進んでいる^{4), 5)}。フミン物質の生物に対する化学的な作用は個体の生長や行動変化に現れるようなものではなく、細胞膜やDNAの損傷などの細胞レベルでの影響や免疫学的変化を示す報告例が多い。Steinbergらは、フミン物質の阻害について、細胞膜での相互作用、擬似ホルモン作用、化学ストレス及び化学ストレスへの防御作用の低下、酵素反応の阻害などを挙げている⁴⁾。このような効果は、生物に対して直接的な阻害とならず、個体の飢餓や生息環境の変化

といった他の要因と絡み合った際に発揮される間接的な阻害である。それゆえ、本研究のアプローチでは生物影響評価に限界がある。琵琶湖水中に存在する難分解性有機物が微生物へ及ぼす影響を評価するためには、難分解性有機物の成分について未解明な部分をさらに明らかにして、それらがもたらす微生物への影響を考慮しながら、一方で琵琶湖の微生物に現れる生態の変化を調べ、難分解性有機物と微生物の関係を考えていくべきである。

5. まとめ

水環境における難分解性溶存有機物の生物への影響を評価するために、湖水のフルボ酸を難分解性有機物の代表として抽出して、化学物質の生態影響試験法である藻類生長阻害試験と甲殻類の遊泳阻害試験、繁殖阻害試験を行った。藻類生長阻害試験結果から、現状の琵琶湖の水中フルボ酸の濃度は明確な阻害を示す範囲になかった。*Daphnia* 属 2 種による遊泳阻害試験では、阻害率の濃度依存性が見られたが、現状の湖水フルボ酸の濃度は明確な阻害を示す範囲ではなかった。*C. dubia* を用いた繁殖阻害試験でも影響は確認されなかった。

スワニー川フルボ酸と琵琶湖フルボ酸を比較すると、藻類生長阻害試験ではスワニー川フルボ酸の方が強い毒性がみられた。ミジンコ類遊泳阻害試験では *D. magna* と *D. pulicaria* で結果が別れ、最も低い半数遊泳阻害濃度は *D. magna* へのスワニー川フルボ酸曝露で得られた 48h EC₅₀ の 83 mg l⁻¹ であった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、京都大学大学院工学研究科の清水芳久教授、日下部武敏研究員、三崎健太郎研究員、滋賀県琵琶湖政策課の三和伸彦氏、廣田大輔氏に活発なご議論いただいた。ここに記して深く謝意を表します。本研究は JSPS 科研費 24510044 の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) 岡本高弘、早川和秀：琵琶湖における溶存有機物の現状と課題。水環境学会誌、34(5)、151-157 (2011)
- 2) 今井章雄、福島武彦、松重一夫、井上隆信、石橋敏昌：琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画。陸水学雑誌、59、53-68 (1998)
- 3) 渡辺彰、藤嶽暢英、長尾誠也：腐植物質分析ハンドブック — 標準試料を例にして —、三恵社、名古屋、142p (2008)

- 4) Steinberg, C. E. W., Kamara, S., Prokhotskaya, V. Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T. A., Timofeyev, M. A., Jie, Z., Paul, A., Neinel, T., Farjalla, V. F., Matsuo, A. O., Burnison, B. K., Menzel, R.: Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? Freshwater Biol., 51(7), 1189–1210 (2006)
- 5) Jones, R. L.: Phytoplankton, primary production and nutrient cycling. In Hessen, D. O., and Tranvik, L. J. (eds) Aquatic Humic Substances: Ecology and Biogeochemistry, Springer-Verlag, Berlin, 145–175 (1998)
- 6) Tulonen, T., Salonen, K., Arvola, L.: Effect of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. Hydrobiologia, 229, 239–252 (1992)
- 7) 福岡康司、内藤佳奈子、吉岡崇仁、澤山茂樹、今井一郎：腐植物質が有害ラフィド藻 *Chattonella antiqua* の増殖に与える影響。北海道大学水産科学研究彙報、61(1)、23–28 (2011)
- 8) Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K.: Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 56(10), 1929–1937 (1999)
- 9) 環境省：化学物質の環境リスク評価、第 7 巻。
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h21-01/pdf/chpt2/2-1-1.pdf>(2009)
- 10) Fujitake, N., Kodama, H., Nagao, N., Tsuda, K., Yonebayashi, K.: Chemical properties of aquatic fulvic acids isolated from Lake Biwa, a clear water system in Japan. Humic Substances Res., 5/6, 45–53 (2009)
- 11) OECD: Test No.301: Ready Biodegradability. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Degradation and Accumulation, OECD, Paris (1992)
- 12) OECD: Test No.201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition. Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. OECD, Paris (2011)
- 13) Mostofa, K. M. G., Yoshioka, T., Konohira, E., Tanoue, E., Hayakawa, K., Takahashi, M.: Three-dimensional fluorescence as a tool for investigating the dynamics of dissolved organic matter in the Lake Biwa watershed. Limnology, 6, 101–115 (2005)
- 14) OECD: Test No.202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Test OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Effects on Biotic Systems. OECD, Paris (2004)
- 15) Environmental Canada: Biological test method: Test of reproduction and survival using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Report EPS 1/

- RM/21 Second edition, Ontario, Canada. 100p (2007)
- 16) Kida, M., Maki, K., Takata, A., Kato, T., Tsuda, K., Hayakawa, K., Sugiyama, Y., Fujitake N.: Quantitative monitoring of aquatic humic substances in Lake Biwa, Japan, using the DAX-8 batch. *Org. Geochem.*, 83-84, 153-157 (2015)
 - 17) Arvola, L., Kankaala, P., TOLONEN, T., Ojala, A.: Effects of phosphorus and allochthonous humic matter enrichment on metabolic processes and community structure of plankton in a boreal lake (Lake Pääjärvi). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(7), 1642-1662 (1996)
 - 18) Carlsson, P., Graneli, E., Tester, P., Boni, L.: Influence of riverine humic substances on bacteria, protozoa, phytoplankton, and copepods in a coastal plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127, 213-221 (1995)
 - 19) Bährs, H., Steinberg, C. E. W.: Impact of two different humic substances on selected coccal green algae and cyanobacteria — changes in growth and photosynthetic performance. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 335-346 (2012)
 - 20) Hessen, D. O., Færøvig, P. J.: The photoprotective role of humus-DOC for *Selenastrum* and *Daphnia*. *Plant Ecol.*, 154, 263-273 (2001)
 - 21) Meems, N., Steinberg, C. E. W., Wiegand, C.: Direct and interacting toxicological effects on the waterflea (*Daphnia magna*) by natural organic matter, synthetic humic substances and cypermethrin. *Sci. Total Environ.*, 319, 123-136 (2004)
 - 22) Steinberg, C. E. W.: Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Springer-Verlag, Berlin. 440p (2003)
 - 23) Hessen, D. O.: Food web and carbon cycling in humic lakes. In Hessen, D. O., and Tranvik, L. J. (eds) *Aquatic Humic Substances: Ecology and Biogeochemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 285-315 (1998)
 - 24) Petersen Jr., R. C., Persson, U.: Comparison of the biological effects of humic materials under acidified conditions. *Sci. Total Environ.*, 62, 387-398 (1987)
 - 25) Vesela, S., Vijverberg, J.: Effect of body size on toxicity of zinc in neonates of four differently sized *Daphnia* species. *Aquat. Ecol.* 41, 67-73 (2007)
 - 26) Ferraõ-Filho A. S., Azevedo, S. M. F. O., DeMott, W. R.: Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biol.*, 45, 1-19 (2000)
 - 27) 鑑迫典久、小田重人、阿部良子、森田昌敏、井口泰泉：ミジンコを用いた甲殻類に対する内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法開発. *環境科学会誌* 17(6)、439-449 (2004)

(受付 2015. 6. 9)

(受理 2015.11. 2)