

博士論文

マイクロコズムを用いた化学物質の生態系影響評価

Assessment of Effects of Chemicals
on an Aquatic Microcosm

国立大学法人 横浜国立大学
大学院 環境情報学府

柴田 賢一
Kenichi Shibata

2014年3月

要旨

生態系影響評価は緑藻・甲殻類・魚類のうち1から3種について各1種の培養・飼育系に化学物質を加えて行われている。しかし、生態系には食物網や物質循環などの機能があり、生態系機能を含めた生態系影響評価が必要である。マイクロコズムは生産者・消費者・分解者からなり食物網などの生態系機能の一部を有することおよび制御可能なシステムであることなどから生態系影響評価に有用と考えられる。本研究では淡水マイクロコズムを用いて、生態系機能を含めた生態系影響評価手法の確立を目指して微量化学物質の生態系影響評価を行う事を目的とした。

淡水マイクロコズムを用い、富栄養湖に自然発生する藍藻毒マイクロシスチン LR (MC-LR) と人為由来の抗生物質オキシテトラサイクリン (OTC) について、生物量と群集呼吸量 (CR) および総生産量 (GPP) による生態系影響評価を行った。

MC-LR は本マイクロコズムにおいて 1 mg/L で慢性的な影響を与える事が明らかになった。MC-LR 添加 30 日後に藍藻 (*Tolypothrix* sp.) が減少しワムシ (*Philodina* sp.) とミミズ (*Aeolosoma hemprichi*) が増加した。ワムシとミミズは藍藻の死骸を餌として増えたと考えられ、間接的な影響を捉えられたと考えられる。MC-LR 1 mg/L の添加によって CR が高くなり GPP は低くなった。この結果は、ワムシおよびミミズの増加と藍藻の減少との関連があると考えられる。本マイクロコズムを用いる事で、微小生物でも MC-LR の 1 ヶ月もの長期間におよぶ慢性影響がある事が明らかにできた。

OTC の無影響濃度は本マイクロコズムでは 7 µg/L 未満であり、米国環境保護庁の掲載している生態影響評価結果の中で最も低い無影響濃度 20 µg/L (オオカナダモ) よりも更に低い事が分かった。本マイクロコズムにおいて繊毛虫 (*Cyclidium* sp.) が大幅に減少し、ワムシ (*Lecane* sp.) は増加する傾向を示した。これは、共通の生物 (細菌) を餌とする *Cyclidium* sp. の減少により *Lecane* sp. のニッチが拡大したためだと考えられ、OTC の間接的な影響を捉えられたと考えられる。CR は OTC 700–7000 µg/L で対照群の約 70% まで減少した。

生物量で評価した NOEC (無影響濃度 No Observed Effect Concentration) は *Cyclidium* sp. と *Lecane* sp. において 7 µg/L 未満であったのに対し、CR では 70 µg/L であった。これは、7–70 µg/L において群集構造の変化に伴う生態系機能 (CR) の低下を構成生物が補完したために、CR への影響が現れなかったと考えられた。OTC は実環境中の表層水 (湖沼や河川) においては、一般的に 0.1 µg/L であることが多く、このような条件では OTC の生態系への影響は限定的で、影響はほとんどないと言える。しかし、豚農場の近くの河川で 100 µg/L に近い濃度で検出される場合がある。このような条件では、高い確率で原生生物の生物量への影響およびそれに伴う間接的な影響が生じていると考えられ、また、生態系機能にも影響が出ている可能性もある。

生物量と CR の関係を明らかにするために、各従属栄養生物の 1 個体当たりの呼吸量を体の大きさ (細胞の体積又は乾燥重量) から予測し、生物量と 1 個体当たりの呼吸量の予測値 (代謝速度一定と仮定) から従属栄養生物の個体群の呼吸量を見積もった。全従属栄養生物の個体群の呼吸量の

予測値を合計し、従属栄養生物群集の呼吸量の理論値 (HR_{theo}) とした。一方、藻類の呼吸量 (AR) は $0.35 \times GPP$ で求められると言われている。そこで、CR から AR を差し引くことで、従属栄養生物群集の呼吸量の実験値 (HR_{exp}) を求めた。次に、測定値から計算した従属栄養生物の呼吸量との比 (HR_{exp}/HR_{theo}) をとった。 HR_{exp}/HR_{theo} は、 HR_{theo} が単位生物量当たりの呼吸量が一定であると仮定したときの呼吸量であるから、代謝に変化がないと仮定したときに予想される呼吸量を基準としたときの、実際の単位生物量当たりの代謝速度の変化を示している。これを RCM (相対群集代謝 Relative Community Metabolism) と呼ぶことにする。

OTC 7–70 $\mu\text{g/L}$ においては、OTC 添加 4 日後までは急激に RCM が低下したものの、7–10 日後には対照群と同じ水準まで回復した。これは OTC が分解されて濃度が低下したことが原因であり、数 $\mu\text{g/L}$ 程度まで達したために RCM が回復したと考えられた。OTC 700–7000 $\mu\text{g/L}$ においては、対照群の約 44% まで RCM が抑制され、従属栄養生物の代謝に対する影響は、CR から予想されるよりも遥かに大きかった事が明らかになった。この影響は生物量や CR および GPP だけからでは予想不可能であり、RCM を求めることで初めて明らかにできる事を見出した。

以上より、マイクロコズムを用いることで MC-LR と OTC について生態系機能 (生物間相互作用と CR および GPP) を含めた生態系影響評価を行えることを明らかにした。特に、個別に測定した生物量と呼吸量の関係を生物 1 個体当たりの代謝速度を考慮して解析することで RCM を求めることができ、生態系としての代謝機能の影響評価を行えることを初めて見出した。

Abstract

Microcosms have part of ecological functions, such as forming food webs and production-consumption cycles, and have been extensively used in ecotoxicological research. We prepared an aquatic microcosm consisting of two green algae (*Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp.), a blue-green alga (*Tolypothrix* sp.), a protozoan (*Cyclidium* sp.), two rotifers (*Philodina* sp. and *Lecane* sp.), an aquatic oligochaete (*Aeolosoma hemprichi*), and bacteria.

We investigated the effects of a cyanotoxin microcystin LR (MC-LR) on densities of organism and two ecological functions of the microcosm (gross primary productions (GPP) and community respiration (CR)). MC-LR was stable in the microcosm, and exert chronic effects on the microcosm at the concentration of 1 mg/L. A blue-green alga (*Tolypothrix* sp.) decreased and a rotifer (*Philodina* sp.) and an aquatic oligochaete (*Aeolosoma hemprichi*) increased 30 days after the addition of MC-LR. The rotifer and the aquatic oligochaete probably grew by feeding on the dead blue-green alga. CR increased and GPP decreased at 1 mg/L. The increase of CR and the decrease of GPP can be explained by the increase of animals and decrease of blue-green alga, respectively. We found that MC-LR exerts chronic effects on small organisms at 1 mg/L with a duration of 30 days.

We investigated the effects of an antibiotics oxytetracycline (OTC) on densities of organism, GPP, and CR. Additionally, we tried to link populations, GPP and CR to understand the relationship between the populations and these ecological functions. The population respiration of each heterotroph was calculated from the density and the individual respiration, which was estimated from body size. The sum of the population respirations was compared with experimental values of the heterotrophic respirations. Through comparison of the calculated and experimental values of heterotrophic respirations, we obtained relative community metabolism by which we found that the influence of OTC on the heterotrophs was far more severe than expected. Thus, we were able to link the effects of OTC on individual organisms to the community and the ecological functions. This allowed us to examine effects of OTC that cannot be established by evaluating only populations or ecological functions.

目次

要旨	I
ABSTRACT	III
目次	IV
第 1 章 緒論	1
1.1. 本研究の背景	1
1.1.1. 生態系影響評価の位置づけ	1
1.1.2. 現在の生態系影響評価手法	2
1.1.3. 複雑系としての生態系と生態系機能	3
1.1.4. メソコズムとマイクロコズム	5
1.1.5. メソコズムとマイクロコズムによる生態系影響評価	7
1.1.6. N-system による生態系影響評価	9
1.2. 本研究の目的	11
1.2.1. 環境総合推進費としての目的	11
1.2.2. 本論文独自の目的	12
1.3. 本論文の構成	13
第 2 章 マイクロコズムを用いた生態系影響評価の方法論	14
2.1. 第 2 章の概要	14
2.2. 背景	15
2.3. マイクロコズムの培養条件	15
2.4. 動物の計数と誤差に関する検討	16
2.4.1. 方法	16
2.4.2. 解析結果と考察	16
2.5. 呼吸量と総一次生産量の解析	19
2.5.1. 明暗瓶法	19
2.5.2. 水面における酸素の移動	20
2.6. 理論：大気-水の酸素の移動（移動現象論）	21
2.6.1. 移動現象論的検討	21
2.6.2. 実験による移動速度の検討	24
2.7. 酸素の移動を考慮した呼吸量と総一次生産量の求め方	26
2.7.1. 酸素の移動速度を求める	26
2.7.2. 呼吸量と総生産量の算出	29

2.8. 第2章の結論	31
第3章 オキシテトラサイクリンの生態系影響評価	32
3.1. 第3章の概要	32
3.2. 背景	33
3.3. 材料と方法	34
3.3.1. マイクロコズムの培養	34
3.3.2. OTCの添加	35
3.3.3. オキシテトラサイクリンの測定	35
3.3.4. 動物の測定	36
3.3.5. Chlorophyll a および b の測定	36
3.3.6. 生菌数および OTC 耐性細菌の測定	37
3.3.7. 呼吸量および生産量の解析	37
3.3.8. 個体数変動からの個体群呼吸量の計算	37
3.3.9. 統計解析	39
3.4. 結果と考察1: OTC 濃度の変化	39
3.5. 結果と考察2: 生物量への影響	40
3.5.1. 動物への影響	40
3.5.2. 藻類への影響	42
3.5.3. 細菌への影響	44
3.5.4. 用量反応関係	47
3.6. 結果と考察3: 呼吸量と生産量への影響	52
3.6.1. DO 濃度変化	52
3.6.2. GPP と CR への影響	53
3.7. 結果と考察4: 生物量と、GPP、CR の統合的解析	54
3.7.1. 個体数変動からの HR_{theo} の計算	54
3.7.2. HR_{exp} と HR_{theo} の比較	55
3.7.3. RCM への影響	56
3.8. 第3章の結論	57
第4章 種々の化学物質の生態系影響評価	59
4.1. 第4章の概要	59
4.2. 背景	59
4.3. 材料と方法	60
4.4. 結果と考察	60

4.4.1.	HR_{exp} と HR_{theo} の比較	60
4.4.2.	MC-LR の RCM への影響	67
4.4.3.	SDS の RCM への影響	68
4.4.4.	Simazin の RCM への影響	69
4.4.5.	Fenitrothion の RCM への影響	70
4.5.	第 4 章の結論	71
第 5 章	結論	73
5.1.	総括	73
5.2.	まとめ	76
本論文を構成する学術論文および学会発表		78
	本論文を構成する学術論文	78
	本論文を構成する学会発表	78
	国際学会	78
	国内学会	78
	その他の学会発表	78
	国際学会	78
	国内学会	78
謝辞		80
参考文献		81
付録	マイクロリズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発 — 共通マニュアル —	

第1章 緒論

1.1. 本研究の背景

1.1.1. 生態系影響評価の位置づけ

高度経済成長期においては公害や環境破壊が進行し、本国日本では 1900 年代の前半から中期にかけて水俣病やイタイイタイ病、カネミ油症などの公害を経験した。現在の先進諸国も同様に公害を経験してきた経緯があり、公害対策として、水銀やカドミウム、PCB などの環境汚染物質の規制をはじめ、環境関連政策・法案を整備してきた。アジアをはじめとする発展途上国は高度経済成長期またはそれに準ずる状態にあり、公害や環境破壊は現在でも問題となっている。日本においては「農薬取締法」と「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律」(化審法) などをはじめ、環境基本法が制定されてからは各環境関連法は同法の下位法律として位置づけられ、包括的な環境対策が進められている (Fig. 1.1.1)。このなかで、生態影響評価は農薬取締法と化審法に定められている。

Fig 1.1.1 各環境関連法の関係

		人の健康に対する毒性	生活環境への影響 (動植物を含む)	オゾン層破壊
労働環境		労働安全衛生法 農薬取締法		
消費者の健康		農薬取締法 食品衛生法 薬事法 有害家庭用品規制法 建築基準法		
環境経由	生産・輸入	農薬取締法 化審法		オゾン層保護法
	排出・蓄積汚染	大気汚染防止法 水質汚濁防止法		
		土壌汚染防止法		
廃棄	廃棄物処理法		フロン回収破壊法など	

農薬取締法と化審法は、農薬および化学物質の乱用や排出による公害を防ぎ、環境汚染を通じた人の健康や生活環境の悪化を防ぐために、新たに製造・輸入される農薬および化学物質について事

前に審査を行い、その性状に応じて必要な規制を行うことを目的としている。農薬取締法と化審法に基づく審査および登録の際には生態系影響評価（生態影響評価）の試験結果が必要とされる。また、環境省の優良試験所基準（Good Laboratory Practice: GLP）に適合している試験施設による生態影響評価試験結果は、既存化学物質等安全性点検、環境リスク初期評価、水生生物保全に係る水質目標の検討などに活用されている。

1.1.2. 現在の生態系影響評価手法

生態系影響評価手法は国際的に OECD（経済協力開発機構 Organization for Economic Cooperation and Development）のガイドラインに記載されている方法が採用されている。OECD のガイドラインには、藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）や甲殻類のミジンコ（*Daphnia magna*）、魚類のヒメダカ（*Oryzias latipes*）、昆虫のセスジユスリカ（*Chironomus yoshimatsui*）、などを用いた種々の方法があるが、多くの場合は藻類とミジンコ、ヒメダカのうち少なくとも 1 種を用いて試験を行い、試験結果のうち最も低い無影響濃度（NOEC: No-Observed Effect Concentration）に安全係数（アセスメント係数） $10^{(n-4)}$ をかけて環境基準とする方法が一般的である。ここで、 n は試験に用いた生物種数（ $1 \leq n \leq 3$ の整数）で、例えば藻類だけの時は $n=1$ で安全係数が $1/1000$ 、藻類とミジンコとヒメダカで試験した場合は $n=3$ で安全係数が $1/10$ となる。この安全係数は、個体差、種差、生物群差に対して、それぞれ $1/10$ をかけることとしている。主な試験方法を Table 1.1.1 に示した。また、生態系影響評価の分野でよく使われる化学物質の毒性の強さを示す指標を Table 1.1.2 にまとめた。

Table 1.1.1 主な生態影響試験法

	供試生物	OECD guideline	試験の概要
藻類生長阻害試験	藻類 (<i>P. subcapitata</i>)	TG 201	化学物質に暴露した際に藻類の成長に及ぼす影響を調べる (72H)
ミジンコ急性遊泳阻害試験	ミジンコ (<i>D. magna</i>)	TG 202	化学物質に暴露した際にミジンコの遊泳に及ぼす影響を調べる (48H)
ミジンコ繁殖試験	ミジンコ (<i>D. magna</i>)	TG 211	化学物質に暴露した際にミジンコの繁殖に及ぼす影響を調べる (21 days)
魚類初期生活段階毒性試験	ヒメダカ (<i>O. latipes</i>)	TG 210	受精卵を化学物質に暴露して孵化してから 30 日まで暴露し、成長や行動に及ぼす影響を調べる

Table 1.1.2 毒性の強さを示す主な指標

LC50	半数致死濃度 (50% Lethal Concentration) : 供試生物の半数が死亡する濃度を示す。
EC50	半数影響濃度 (50% Effective Concentration) : EC50 以外にも EC10 など使われる。供試生物の半数が影響を受ける濃度を示す。影響の種類は様々なので、エンドポイント (評価基準) を確認する必要がある。
LOEC	最低影響濃度 (Lowest Observed Effect Concentration) : 試験結果から、統計的に有意に影響が起こりうる最低濃度。*
NOEC	無影響濃度 (No Observed Effect Concentration) : 試験結果から、統計的に有意に影響が起こらない最高濃度。*

*LOEC も NOEC も、生態系に影響が出ない濃度と出る濃度の境界付近を示している。したがって、特に無影響濃度という言葉から安全な濃度という誤った印象を与えるが、環境中で NOEC と同じ濃度の化学物質が検出された場合、その生態系はかなりきわどい状態にあると言える。なぜなら、ほんの少し濃度が濃くなったり、他の攪乱が生じたりした場合、すぐに影響が出てしまうからである。それだけでなく、実際には 10–30% 程度の影響が出るとも言われ、NOEC や LOEC は指標として不適切であるとする意見もある (Warne and van Dam, 2008)。しかし、それは NOEC を正しく認識していれば問題ないことであり、NOEC を指標としてどのように使い、どのように規制するかという運用面の問題であって、NOEC 自体に問題はないと私は考えている。また、EC50 に安全係数をかけるよりも、NOEC に安全係数をかけた方が環境基準に適していると私は考えている。

1.1.3. 複雑系としての生態系と生態系機能

以上のように、現在の生態系影響評価試験はどの試験法も単種培養/飼育の条件下で行われている。このような現在の手法の問題点は、単種培養/飼育下では、生態系で見られるような生物間相互作用を通じた影響や、生態系機能などは無視されているという点である。生態系のような複雑なシステムでは、多様性が上がると、従って単種培養よりも種数が増えるほど系の安定性が上がるという説と、安定性が下がるという説があるが、未だ結論が出ていない (McCann, 2000)。いずれにせよ、複雑なシステムである生態系への影響を 1 種の試験に基づいて評価するという方法には無理があることは明らかである。

上記のような意見に対して、藻類・ミジンコ・魚類による試験方法は、生産者・一次消費者・二次消費者の各段階における試験を実施しており、食物連鎖を上手く反映しているという意見もあるが、これは明らかに生態系の複雑さを過小評価したものである。なぜなら、相互に作用しうる複数の要因が同時に存在するシステム (複雑系) においては、個々の要因だけからは明らかにできないと言うことが、非線形科学によって既に示されているからである。そして、生態系は多様な生物が相互に作用し合いながら存在しているシステムであり、明らかに複雑系である。

複雑系が見せる非線形現象として、パターン形成 (自己組織化) や、振動現象、多重安定、ヒステリシスなどが挙げられるが、そのどれもが実際に生態系で観察されている (Hardenberg *et al.*, 2001; Rietkerk *et al.*, 2004; Scheffer *et al.*, 2001; Blasius *et al.*, 1999) (Table 1.1.3)。これは、多様な生物が相互作用し合っているからと言う形式的な理由だけでなく、実際に生態系において起こ

っている非線形現象からも、確かに生態系が複雑系であり、従って個々の要因だけからはその挙動を明らかにできないと言うことである。つまり、1種の試験に基づいて生態系への化学物質の影響は評価できないと言うことを示している。

Table 1.1.3 生態系に見られる非線形現象

非線形現象	生態系で観察された非線形現象
パターン形成	パッチ状のパターンを始め、植物群落の空間的分布において自己組織化によるパターン形成が乾燥地帯やサバンナ、泥炭地で観察されており、数理モデルでパターンの再現が可能であるとともに、生態系の安定性との関連性も指摘されている (Hardenberg <i>et al.</i> , 2001; Rietkerk <i>et al.</i> , 2004)。
振動現象	餌生物などとの相互作用によってヤマネコの個体数に周期的な振動が現れることが知られており、ノイズによってカオスが引き起こされることが示されている (Blasius <i>et al.</i> , 1999)
多重安定・ヒステリシス	オランダのフェルウェ湖においてリンの濃度とシャジクモ群落の被度との間にヒステリシスが観察され、リンが増加する過程と、減少する過程でシャジクモ群落の被度の変化する過程が一致せず、これは多重安定性によるものであると言われている (Scheffer <i>et al.</i> , 2001)。

また、もう1つ1種の場合とシステムの場合で異なる点は、生態系機能の存在である。独立栄養生物によるエネルギーのシステムへの取り込みとその後のエネルギーの流れ、デトリタスやリターの分解による生息環境の維持および物質循環、独立栄養生物や窒素固定細菌などによるガス状物質（二酸化炭素や窒素）の同化および各種生物活動による異化（呼吸や脱窒素）、多様な生物の存在とその維持機能（安定性）、物理化学的環境の改変（反作用）、土壌の形成および土壌の保持などである。これらの生態系機能のうち、特に人間に役立つ機能を生態系サービスと呼んでいる (Table 1.1.4)。

これらの生態系機能あるいは生態系サービスの多くは、生態系を構成する生物の代謝と、生物間相互作用によって成り立っている。例えば、一次生産と二次生産、光合成と呼吸、窒素固定と脱窒素は生物の代謝そのものであり、物質循環やエネルギーフロー、土壌の形成、空間的構造（パターン）形成などは代謝や行動及び生物間相互作用によるものである。生物間相互作用は振動現象のように生物量の変化として現れることが多い。一方、物質循環や生産と消費、エネルギーフローにおいて、代謝、つまり呼吸と光合成は重要な要素となっている。

呼吸は有機物をより簡単な有機物または無機物へ異化してエネルギーを取り出す過程である。酸素を消費する好気呼吸と、酸素の消費を伴わない嫌気呼吸に大別される。本マイクロゾウムは定常期に

において好氣的な条件であり、好気呼吸が大半を占めていると考えられるため、本論文では単に呼吸と言えは好気呼吸のことを指す。

一方、一次生産とは独立栄養生物による有機物の生産のことであり、光が当たる環境では光合成による有機物生産が大部分を占める。また、光合成には植物などによる酸素の発生を伴う酸素発生型光合成と、酸素を発生しない細菌型光合成がある。本マイクロコズムでは酸素発生型光合成による有機物生産が大部分を占めていると考えられるので、本研究においては一次生産と酸素発生型光合成を同義として扱う。

生産量と呼吸量のバランスとその量は重要な生態系機能の一つである。生産量と呼吸量のバランスが変化すると、生態系全体のバイオマスが増減して、システムそのものが変化してしまう可能性がある。また、システム全体としての生産と呼吸は、観察対象となるシステムにおける炭素循環の入口と出口を示している。そのため、生産速度と呼吸速度は炭素の物質循環において炭素がシステムに同化される速度とシステムから二酸化炭素として放出される速度であり、生産速度と呼吸速度はこの意味で物質循環速度を示していると言える。

Table 1.1.4 生態系サービスの例

生態系サービス	生態系機能	例
生物資源の提供	一次生産及び二次生産	農林水産業：花粉の運搬、材木の提供、魚介類の提供
土壌浸出の防止	土壌の形成および土壌の保持	土砂崩れの予防
水資源の維持	森林における水保持機能	安定的な水の供給
廃棄物処理	物質の再循環	生物による廃棄物の分解および無毒化
遺伝子資源	生物多様性	農作物の新品種の提供および、製薬業界における新規生理活性物質や遺伝子の提供
大気環境の維持	呼吸・光合成 窒素固定・脱窒素	二酸化炭素の吸収と酸素の供給、窒素固定による土壌の田畑への養分供給
自然災害の緩衝作用	主に樹木などによる構造形成	津波被害の軽減
レクリエーション	生物による環境改変（反作用） 生物多様性	釣り、キャンプ・ハイキング・登山、潮干狩り、野鳥観察

* これら生態系サービスを維持する機能（安定性）も間接的な生態系サービスと言える。

1.1.4. メソコズムとマイクロコズム

以上のように、単種培養/飼育系での試験法では生態系への影響を予想できない。そこで、単種培養/飼育系での試験法に代わって、メソコズムやマイクロコズムによる試験法が有効であると考えられ、1975年からは野外試験法などのメソコズム関連試験法がガイドライン化され始めた。メソコズムやマイクロコズムは閉鎖実験生態系 (Enclosed Experimental Ecosystem) とも呼ばれ、動物と

生産者、微生物などが共存するシステムの事である。この中ではある種の生態系が成り立っており、条件などを人為的に制御可能であることから、H. T. Odum & C. M. Hoskin (1957)以来、物質循環、エネルギーフロー、生物間相互作用、生物と物理・化学的環境の関係など生態学的な研究に用いられてきた経緯がある。

動物と生産者、微生物などが共存する人工的な生態系である閉鎖実験生態系は、メソコズムとマイクロコズムに分けられる。メソコズムとマイクロコズムの違いは基本的にはその大きさにあるが、厳密な定義はない。一般的には、一連の実験系が机の上や一般的な実験室内に収まる程度の大きさのものをマイクロコズム

といい、1つの実験系が実験室1室分かそれ以上のものをメソコズムと呼ぶ傾向がある。もちろん、厳密な定義がないために、ある論文でマイクロコズムと言っているものが、他の論文でメソコズムと呼んでいるものよりも大きいと言うこともありうる。一般的に実験規模と実生態系の類似性には関連性があり、空間スケールと時間スケールが大きいほど実生態系に類似した、生物組成や生態系機能を示すと言われている (Petersen *et al.*, 2008) (Fig. 1.1.2)。空間的に大きい方が様々な物理的環境を再現でき、また様々な種の生物やより大型の生物を含むことができるため、実際の生態系に近づけることができる。

一般的に、池 (人工池) やタンク、区画化されたフィールドがメソコズムとして使われることが多い (Graney, 1994) (Fig. 1.1.3)。そのため、魚類や両生類なども実験系に組み込むことが可能である。メソコズムの長所は、そのスケールと、実環境との類似性、及び脊椎動物や大型の無脊椎動物もシステムの中に含めることができる事である。

メソコズムの生物組成はできるだけ多くの種が共存していて、できれば池 (人工池) や区画化されたフィールドが最も理想的である。その中には、微生物から、微小動植物、大型無脊椎動物、脊

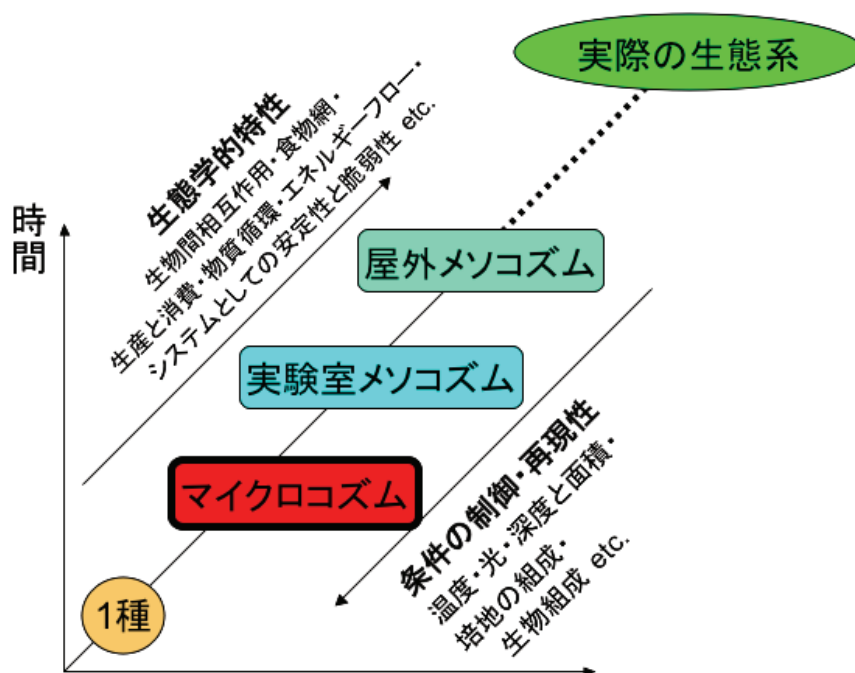


Fig. 1.1.2 閉鎖実験生態系のスケールと実生態系の関係：1種培養系からマイクロコズム、実験室メソコズム、野外メソコズムへとスケールが大きくなるにつれて、実生態系との類似性が高まる。つまり、生物間相互作用や、食物網、物質循環などがより実際の生態系に近い形で現れる。その一方で、スケールアップに伴って実験条件の制御が難しくなり、再現性も下がる。わかりやすい例として、野外は確かに実際の環境条件にかなり近いが、気象や季節に左右されやすく、したがって条件の性著は難しく再現性も低くなるが、実験室内であれば、装置や施設によってはほぼ全ての物理化学的条件をコントロールでき、その分再現性も高くなる。

椎動物、高等植物に至る非常に広い分類群の生物が存在し、多様性も高い。季節変動や場所による環境条件の違いなどを解決するために屋内や制御可能な装置・施設の内部にメソコズムを作って試験を行うこともある。

その一方で、スケールを大きくし、実験系を複雑にし、野外で実験するとなると、生物種や実験系の不確定要素が増加し、更に野外ゆえに光や温度、風邪などの影響を制御できないため、実験条件の再現性は下がる (Fig. 1.1.2)。

マイクロコズムは、メソコズムに比べて小規模であり、生物組成も比較的単純で、魚類や両生類を含めることは難しく、一般的に生物組成は微生物を除けば藻類と動物プランクトンであることが多い。組成が単純であり、小規模であることから条件の制御性が良く、不確定要素が少ないために再現性は良い。また、生物種が少ないために、網羅的な測定・解析も必要に応じて可能であり、システムの中で起こっている現象のメカニズムが解明しやすいという特徴を持っている。

1.1.5. メソコズムとマイクロコズムによる生態系影響評価

メソコズムによる試験法は農薬の生態系影響評価において活発である (Graney *et al.*, 1994) が、試験の反復などを考慮すると、メソコズム試験法では広大な面積が必要であり、試験使用した材料の処理やメソコズムの再構成など時間と労力と費用が非常にかかり、高コストである。企業が新規の化学物質や農薬を製造・輸入する際には化審法または農薬取締法に則って、生態影響評価結果を提出しなければならないが、このような試験のためにメソコズムを使う事は一般企業においては実質的に実用化不可能である。

マイクロコズムは、Odum and Hoskin (1957) などを筆頭に、同じニッチにある複数の生物種は安定に共存できないという競争排除則 (ガウゼの法則) や、生物群集の遷移、自己組織化、最大能力原理などの生態学的に重要な概念に関する先駆的な研究に使われてきた。それ以来様々な生態学的研究とツールとして利用されてきたが、最近では重金属などの汚染物質や、農薬 (殺虫剤や除草剤)、気温変化、新規化学物質、遺伝子組み換え生物の影響や運命に関する研究が盛んである。生態毒性評価手法としては、まだ日常的に使われているとはいいがたいが、1981年には US-EPA (ア

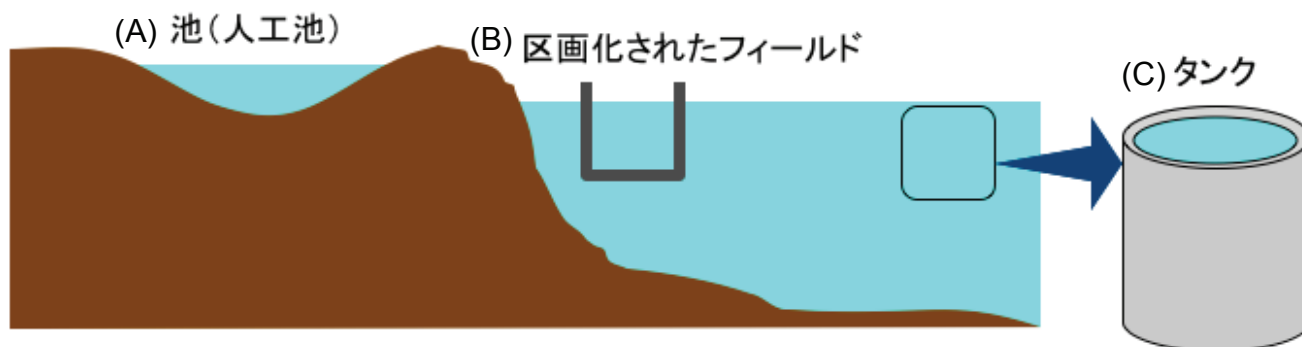


Fig. 1.1.3 一般的なメソコズムのタイプ：(A)既にある池やため池などの人工池をそのまま真メソコズムにするタイプと、(B)池や湖、草原などの一部を区画化し、そこをメソコズムとするタイプ、(C)タンクに実際の湖などから水や底質を運び込んでメソコズムとするタイプがある。

アメリカ合衆国環境保護庁)の Technical Report Data (Hendrix, 1981)として、群集構造の変化と、生産量及び呼吸量を指標として淡水マイクロコズムを用いたカドミウムの生態影響評価結果が報告されており、1996年には Ecological Effects Test Guideline (EPA, 1996)としてガイドライン化されている。

マイクロコズムにはいくつかのタイプがあり、Gnotobiotic microcosm や、Naturally-derived microcosm、Stress-selected microcosm、Standardized aquatic microcosm がある (EPA, 1996)。Gnotobiotic microcosm は完全に無菌の生物を組み合わせて作られたマイクロコズムであり全ての生物組成及び培地の化学組成が完全に分かっているマイクロコズムで、Naturally-derived microcosm は自然の河川や湖沼などの水や土を生物ごと回収して容器に移したマイクロコズム、Stress-selected microcosm は特定のストレス条件下 (e.g. 酸性条件や汚染物質)などに暴露して生き残った生物群集からなるマイクロコズムでマイクロコズムと言うより集積培養に近いタイプ、Standardized aquatic microcosm は単種培養してある無菌培養の藻類と無菌でない動物 (原生動物も”雑菌”として含まれる)を試験直前に組み合わせて化学組成の明らかな合成培地に入れて作るマイクロコズムである (Table 1.1.4)。これらの分類は体系的になされたわけではないので、分類基準に統一性はない。どのマイクロコズムであっても、メソコズムと比べて単純なシステムであるために一般的に脊椎動物を含めることが難しく、多くの場合は微生物と藻類、ワムシ、甲殻類から構成される実験閉鎖生態系である。なお、先ほどの US-EPA の Technical Report Data (Hendrix, 1981)と Ecological Effects Test Guideline (EPA, 1996)は Standardized aquatic microcosm を使用したものである。

マイクロコズムはメソコズムと1種試験法との間に位置しており (Fig. 1.1.2)、マイクロコズムはメソコズムより小規模で単純ではあるものの、生産者・消費者・分解者などが複数種の生物が共存しているために生物間相互作用や生産と消費などの生態系機能を有している。一般的に、栄養塩と、藻類、動物プランクトンにおける相互作用に関しては、小さな実験室マイクロコズムで研究可能であると言われている (Taub, 1989)。また、実験条件の制御性や再現性がメソコズムよりも高く、高い再現性を求められる生態影響試験法に向いていると言える。マイクロコズムはメソコズムに比べて小規模であり、比較的低コストで試験を行うことができる利点がある。

しかし、一般的な1t前後の大きさのマイクロコズムでは、それでもなお1種試験法に比べればコストが高く、時間がかかり、複雑で変動が大きくエンドポイントの判定に困難を生ずるという問題が依然としてある。そこで本研究では、栗原の作成した通称 N-system と呼ばれる淡水マイクロコズム (Kurihara, 1978)を用いた生態系影響評価手法に注目した。N-system は300 mL三角フラスコに収まるマイクロコズムで、メダカの飼育容器 (1匹につき少なくとも2Lの水が必要)よりもむしろ小さいくらいである。しかし、この小さなマイクロコズムは、1種の貧毛類 (ミミズ)と、2種のワムシ、1種の原生動物 (繊毛虫)、3種の緑藻、1種の藍藻、5種以上の細菌から構成され、小さな生態系を形成している。微生物種は全て明らかになっているわけではないが、原生動物を含めた全ての動物と藻類が明らかなので、Gnotobiotic microcosm に近いマイクロコズムであ

るといえる。

Table 1.1.4 マイクロコズムの種類

マイクロコズムの種類	定義
Gnotobiotic microcosm	細菌まで含めて、全ての種組成および培地の化学組成が明らかなマイクロコズム。最も人工的（自然からかけ離れている）で再現性が高いマイクロコズムと言える。例えば、分解者としての大腸菌 <i>Escherichia coli</i> と、生産者としてのユーグレナ <i>Euglena gracilis</i> 、消費者としての原生動物 <i>Tetrahymena thermophila</i> の3種のみから構成され、その他の生物が一切含まれていないマイクロコズムがある (Fuma, 2011)。
Naturally-derived microcosm	1カ所以上の河川や湖沼などの採取場所から生物を含む水や底質などを集めて容器に移したもの。最も自然に近いマイクロコズムと言える（再現性は低い）。
Stress-selected microcosm	Naturally-derived microcosm を、何らかのストレス条件下（高温・酸性・汚染物質等）において、自然選択の後にできあがるマイクロコズム。マイクロコズムと言うより、集積培養に近い（集積培養とは、目的の生物、特に微生物ができるだけ多くなるように条件を設定して培養する方法で、例えば乳酸酸性で糖が豊富な培地に適当な微生物源を入れれば酵母が優先的に増える）。
Standardized aquatic microcosm	藻類と淡水棲無脊椎動物を含み、藻類と淡水棲無脊椎動物の種組成は明らかなマイクロコズム。微生物や原生動物は必ずしも特定されない。

1.1.6. N-system による生態系影響評価

栗原によって作られたマイクロコズム N-system (Kurihara, 1978) は消費者として *Cyclidium* sp. (繊毛虫) と、*Philodina* sp. (輪形動物)、*Lecane* sp. (輪形動物)、*Aeolosoma hemprichi* (環形動物 貧毛類) が、生産者として *Chlorella* sp. (緑藻) と、*Scenedesmus* sp. (緑藻)、*Tolypothrix* sp. (糸状藻類) が、分解者として Bacteria (5 種以上) を含む。他のマイクロコズムと違い、N-system は継代培養による保存が可能であり、培養後の生物群集の遷移と組成には再現性がある。また、N-system は 300 mL 三角フラスコに収まる小さなマイクロコズムである。したがって、前述のようにメソコズムや一般的なマイクロコズムは再現性と空間スケールおよびコストがしばしば問題となるが、N-system は再現性と大きさの問題を解決している。

生産者が光合成を行い、消費者と分解者がこれを消費し、分解者がデトリタスを再利用するという、物質循環及びエネルギーフローが成り立っており、これらの生物はそれぞれにニッチを占めて互いに相互作用し合って微小な生態系を形成している。動物に甲殻類や場合によっては貝類などの

高等な無脊椎動物を含むこともある一般的なマイクロコズムに比べて、N-system は非常にシンプルなシステムである。

N-system はシンプルではあるものの、Kawabata and Kurihara (1978 a, 1978 b) は N-system の中で行われている物質循環とエネルギーフローの関係を調べ、系の中には細菌が無機塩化した栄養塩を藻類が吸収し、藻類の排泄物は細菌の栄養源となり、微小動物は藻類や細菌を捕食して排泄物を出し、藻類や細菌によって利用され、光のエネルギーを藻類が吸収し、細菌や微小動物へと食物連鎖を通じて流れ、途中で熱として大気中へ放散されていくという、複雑な相互作用が存在し、77 の相互作用が存在しているとしている。

また、N-system は培養容器の底に藻類のパッチ状のコロニーを形成することが知られている (Fig.1.1.4)。動物の存在しない藻類だけの培養系ではこのようなパターンは形成されない。このようなパターン形成 (自己組織化) は複雑系の示す特徴の 1 つであり (Table 1.1.3)、N-system が単種培養にはない特徴を有していることを示している。藻類と、細菌、ワムシの生物間相互作用の頻度や相互作用の強度がパターン形成に寄与しており、パターン形成とシステムの安定性が関係していることが数理モデル (セルオートマトン) を使用したシミュレーション研究によって示されている (Sugiura *et al.*, 2003)。つまり、N-system は複雑な生物間相互作用を有し、自己組織化などの複雑系としての機能も有し、これらの結果として生産と消費や、食物連鎖、物質循環及びエネルギーフロー、システムの安定性などの生態系機能も有しているといえる。

Sugiura *et al.* (1976 a, 1976 b) は、マイクロコズムを使って化学物質の群集レベルの影響を、総生産量と呼吸量を対照群と比較することによって評価可能であるとして、N-system を用いた毒性評価手法を提案していた。殺虫剤 β -BHC と銅イオンの N-system の生物群集と呼吸量及び生産量への影響は Sugiura *et al.* (1979) と Sugiura *et al.* (1982) によって詳細に研究され、化学的性質も毒性も異なる化学物質であっても N-system の生物群集と呼吸量及び生産量を対照群と比較することによって影響評価が可能である事を示した。Sugiura (1996) は更に、殺虫剤 β -BHC と銅イオンの影響について数理モデルを用いたシミュレーションによって解析を進め、化学物質が N-system 内の物質循環に与える影響を呼吸量の時系列変化を対照群と比較することによって見積もることができると示唆する結果を得た。したがって、呼吸量を生態影響評価の指標として用いることで、物質循環への影響を間接的に評価することができると言える。

一方、Murakami *et al.* (1992) は遺伝子組み換え微生物 (GEMs: Genetically Engineered Microorganisms) を N-system に導入し、GEMs のマイクロコズムへの定着について研究し、*E. coli* HB101 と *E. coli* HB101/pBR325 を N-system に加えたところ、低温であるほど GEMs がマイクロコズムに定着しやすいことを見いだした。また、Inamori *et al.* (1992) はより多くの GEMs (*E. coli* S17-1/pSUP104 と、S171-1/pCRO1、HB101/pBR325、及び *Pseudomonas putida* prS2000

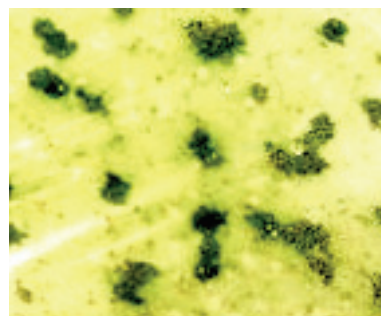


Fig. 1.1.4 N-system の培養容器の底に形成される藻類のコロニー：培養後 2 週間の N-system を白いバットに入れて、更に 2 週間静置培養したもの。藻類のコロニーがパッチ状に形成されている。

と PpY101/pSR134) について N-system と霞ヶ浦の湖水への定着を観察した結果、GEM によって 6 つのパターンで定着または衰退・消失することが観察された。また、この 6 つのパターンは、N-system と霞ヶ浦の湖水で同じ傾向を示した。これらのことから、GEMs の定着についても N-system によって評価可能であり、定着・衰退・消失パターンは実際の湖沼と一致しているとした。このように、N-system を利用することで化学物質以外の生態影響評価が可能であることが示された。

更に、Takamatsu *et al.* (1996) は LAS (Linear AlkylbenzeneSulfonate) と石けんを N-system に加えて界面活性剤の生分解性と温度の関係を検討し、低温では ATP 濃度が低いため生理活性が低いと考えられ、界面活性剤の分解が遅く、各生物個体群への影響も低温であるほど強い傾向があることを見いだした。Takamatsu *et al.* (1997) は更に、生物量と ATP 濃度に加えて生産量と呼吸量を指標に加え、N-system を用いて LAS の影響評価を行い、個体群と代謝で影響の大きさに違いがあることを見だし、個体群や呼吸量・生産量などによる影響評価が有効であることを見いだした。このように、N-system を用いることで界面活性剤のように生分解性の高い物質であっても、その生分解性と影響を観察することが可能である。

前述のように、N-system による生態影響評価はかなり前から提案されてきていた。科研費「微生物生態系マイクロコズムを用いた水質評価のための新手法開発に関する研究(H4-5)」(稲森悠平 国立環境研究所) においては、水質評価のための生態系影響評価手法の公定法化を強く意識した研究が行われた。これまでの研究を受けて、稲森 *et al.* (1998) はマイクロコズムによる生態系影響評価の重要性を改めて主張している。これらの尽力により、下水試験方法に N-system を用いた生態系影響評価試験法が記載されるに至った(日本下水道協会, 2012)。

更に、環境総合推進費「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発(H21-23)」(稲森悠平 福島大学) や、科研費「移入種生物かもたらす生態系影響評価のためのモデルエコシステムの汎用化に関する研究(H24-26)」(村上和仁 千葉工大)、新 LRI 第 1 期公募課題「マイクロコズムを活用した化学物質の生態系リスク影響評価システム手法の開発(2012 PT4-02)」を通じて、N-system を用いた生態系影響評価手法の実用化に向けた研究が進められている。

なお、博士論文は、応用を目指した環境総合推進費「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発(H21-23)」(稲森悠平 福島大学) に貢献する過程で得られた結果に、独自の考察と解析を加える事で、基礎研究として更に深化・発展させたものである。

1.2. 本研究の目的

1.2.1. 環境総合推進費としての目的

先述のように、単種培養試験では生態系への影響を予想できないにもかかわらず、現行の生態系影響評価手法は単種培養試験であり、多種共存系システムによる生態系影響評価は行われていない。生態系システム評価及び解析においては、再現性のあるマイクロコズムを用いた生物群集の動態解析を相補的に活用することが有効かつ重要である。マイクロコズムなどの多種共存系システムを活

用した生態学的研究は国際化が重視されており、OECD の試験法の検討においてもその重要性が指摘されている。

このような状況を鑑みて本プロジェクトは、農薬や、重金属、遺伝子組み換え細菌(GEM)、界面活性剤(LAS)などの生態系影響評価に関する研究をマイクロゾム構成生物の群集構造や呼吸量・生産量から評価・解析してきた N-system を用いた、リスク評価システムの確立を図ることを目的とした。

この研究プロジェクトにおいて、私は藍藻毒 Microcystin LR (MC-LR) と抗生物質 Oxytetracycline (OTC) の影響評価、及びガイドラインの青写真となるプロジェクトの共通マニュアルの作成を担当し、生物群集構造と呼吸量・生産量を指標として MC-LR と OTC の無影響濃度を明らかにして生態系影響評価手法としての評価を行うこと、及び各大学・研究施設で共通の手法で研究を行うための共通マニュアルを作成することを目的とした。

1.2.2. 本論文独自の目的

化学物質の影響が生態系全体に伝播する過程を Fig. 1.2.1 に簡潔に示した。環境へ排出・放出された化学物質は、まず各個体の代謝や行動、生殖、生命（生死）に影響を及ぼす。その結果、各個体群の繁殖力や死亡率、年齢構成が変化し、競争力や種内相互作用・種間相互作用に影響を及ぼす。この生物間相互作用の変化により、直接影響を受けていない生物群集も影響を受け、群集構造に変化をきたす。更に、これらの生物間相互作用や群集構造（生物学的環境）の変化により、個体の生理状態や行動などもフィードバックを受けて変化することも考えられる。群集構造（ $\equiv \sum$ 個体群の生物量）と各生物の生理状態及び行動の組み合わせとしての生態系レベルの現象に影響を及ぼす。

そこで本研究では、生態系の特徴である生物間相互作用や生態系機能としての呼吸量・生産量や非線形現象に着目しつつ、化学物質の影響が個体レベルから生態系レベルに至る各階層の関連性を明らかにすることを目的とした。

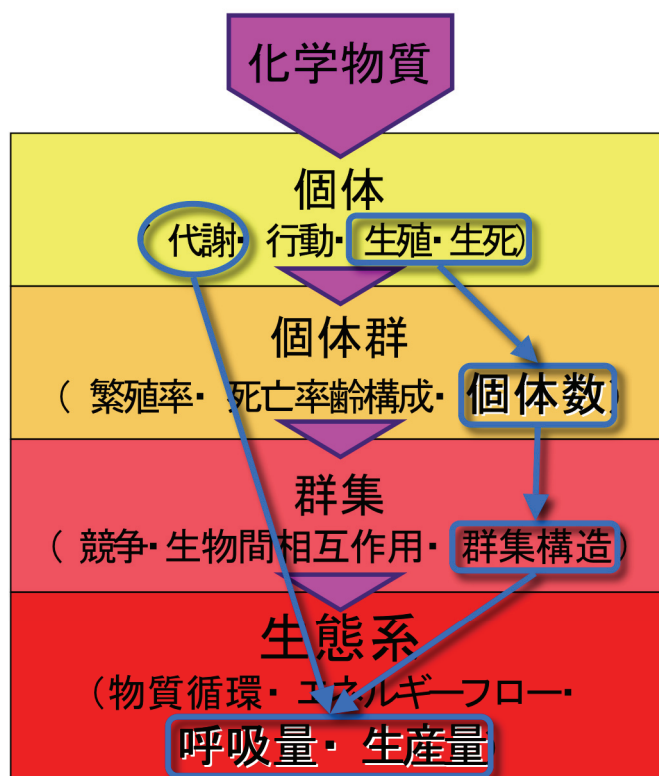


Fig. 1.2.1 環境中の化学物質の影響が生態系全体に伝播する過程の簡単な模式図：化学物質は個体の生理や行動に影響を及ぼし、それが繁殖率や死亡率、競争力に変化を与える。その結果、生物間相互作用が変化し、群集構造が変化する。生態系機能としての代謝は、個体の代謝と個体群の生物量および群集構造によって決まるため、化学物質の個体と群集構造への影響は最終的に生態系機能としての呼吸量と生産量の変化として現れる。

1.3. 本論文の構成

第1章(本章)では、緒論として生態系影響評価の社会的な位置づけから、現在の公定法である単種培養/飼育系による生態影響評価手法の問題点を提起し、メソコズムとマイクロコズムの長所と短所を明らかにした上で、小さなマイクロコズムである N-system が生態系影響評価ツールとしての実績と有効性について述べた。

第2章では、本研究において鍵となる、呼吸量と生産量を溶存酸素濃度から解析して求める方法に関して物理化学的基礎理論と実際の解析方法を中心とした各実験方法の検討及び理論的裏付けを行った。これは環境総合推進費で担当して作成した「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発 —共通マニュアル—」(付録)の内容を、独自に検討及び理論的裏付けを行ったものである。

第3章は、本博士論文の中心となる内容で、第2章で検討した方法論に基づいて抗生物質オキシテトラサイクリンの生態系影響評価を行った結果を示す。環境総合推進費としての目的は生物群集構造と呼吸量・生産量を指標とした生態系影響評価であり、第3章の結果と考察のうち「3.4 結果と考察2: 生物量への影響」と「3.5 結果特撮3: 呼吸量と生産量への影響」が環境総合推進費としての成果である。ただし、薬剤耐性細菌の出現における、非線形な挙動については独自の考察である。「3.1 結果と考察1: OTC 濃度の変化」と「結果と考察4: 生物量と、GPP、CR の統合的解析」は本博士論文独自の成果である。

第4章は、環境総合推進費に参加していた、福島大学の稲森悠平教授および賀数邦彦氏(大学院、共生システム理工学研究科)から界面活性剤の SDS (ラウリル硫酸ナトリウム Sodium Lauryl Sulfate) の生態系影響評価の実験結果を、東北大学の鹿野秀一准教授(大学院、生命科学研究科)から農薬の Simazim および Fenthothion の生態系影響評価の実験結果をそれぞれ提供して頂き、私が担当した藍藻毒 Microcystin LR の実験結果と合わせて第3章で得られた相対群集代謝(RCM)の解析を行った。

第5章は結論として、第2章から第4章までの成果を総合して考察し、主に N-system を用いた生態系影響評価手法および独自の解析手法である RCM の有効性について評価した。

最後に、環境総合推進費で担当して私が執筆した「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発 —共通マニュアル—」を付録として添付した。

第2章 マイクロコズムを用いた生態系影響評価の方法論

2.1. 第2章の概要

マイクロコズムによる生態系影響評価手法の公定法化を目指すには、実験方法を確立し、明文化する必要がある。また、その実験方法が実際に理論的に正しいものであることを示すことも重要となる。したがって、第2章ではマイクロコズムの培養方法を確認するとともに、測定方法がまだ完全に確立していない動物の計数方法と呼吸量および生産量の測定・解析方法について検討した。

動物プランクトンなどを顕微鏡で計数する方法自体は、既に各研究分野において確立されており、各種計数盤と顕微鏡を用いて計数することができる。動物の計数方法で問題となるのは、どれくらいの個体数を測定すれば十分に正確に測定できるのか、現実的にはどれくらいの個体数を計測すべきなのかという点である。そこで第2章では普段ルーチンで数えている数よりも十分多い個体数をそれぞれ計数し、そのデータからランダムに数値を取り出して取り出した組み合わせの間の相対標準偏差を求めた。相対標準偏差は誤差の指標として使用した。その時の測定個体数と相対標準偏差の関係から、測定個体数の目安と、その時のおよその精度（RSDとして）を求めることに成功した。現実的に実行可能であり、かつできるだけ精度の高い測定個体数を決定し、動物の個体数の計数方法の基礎とした。

一方、呼吸量と生産量の求め方は明暗瓶法などで既に確立されているが、これでは大気と水の間の酸素の交換が考慮されておらず、正確に算出することができない。したがって、酸素が大気と水の間でどのような仕組みで移動しているのかを、移動現象論的に検証した。移動現象論における Higbie の浸透説または Dankwerts の表面更新説によって酸素の移動現象が説明できる。これらは流束として表されているため、これを水中の溶存酸素の増加・減少速度として記述し直し、さらにこれに基づいて溶存酸素濃度が時間とともにどのように変化しうるのかを、Higbie の浸透説と Dankwerts の表面更新説の双方において予測した。本実験系がどちらの説に当てはまるのかを実験的に検証した結果、本実験系は Dankwerts の表面更新説に当てはまる形で酸素の移動が起こっていることが分かった。したがって、Dankwerts の表面更新説に基づく方法で酸素の移動速度を求める実験方法および解析方法を確立し、旧来の呼吸量および生産量を求める計算式に組み込み、マイクロコズム内の溶存酸素濃度の変化から酸素の移動を考慮して呼吸量と生産量を求める方法を確立することができた。

2.2. 背景

第2章では、N-system を用いた群集構造および GPP(総一次生産量 Gross Primary Production) と CR (群集呼吸量 Community Respiration) による生態系影響評価に先立ち、N-system の培養方法と、生物量と呼吸量・生産量の測定方法およびその理論について検討した。特に呼吸量と生産量の計算に必要な、大気と培養液の間の酸素の交換速度については、これまで計算式ではなく、表を読んで求めていたため、正確ではなかっただけでなく、計算の自動化ができなかった。大気と培養液の間の酸素の交換速度がどうしてその計算式で求めることができるのか、物理化学的にそれは正しいのかを主に検討した。

2.3. マイクロコズムの培養条件

培地は Taub の無機塩培地 (Taub, 1964) にポリペプトンを加えた TP 培地を使用し、明暗周期 = 12:12 h、温度 25 °C、照度 2400 lx (光合成光量子束密度 $36 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で N-system を培養した。光源には National (=Panasonic) FL20SS-W/18 を使用した。TP 培地の組成と詳細は、Table 2.1 およびそれ以下に示した。

Table 2.3.1 TP 培地 (Taub Polypepton Medium)

Stock solution			Volume
A	Polypepton* ¹	2.0 g / 100 mL	10.0 mL
B	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.93 g / 200 mL	2.0 mL
C	KH ₂ PO ₄	2.72 g	2.0 mL
	NaOH	0.56 g / 200 mL	
D	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7.35 g / 500 mL	40.0 mL
E	NaCl	2.92 g / 500 mL	60.0 mL
F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98 g	0.375 mL
	Na ₂ EDTA	2.72 g / 200 mL	
G	H ₃ BO ₄	0.930 g	1.0 mL
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.144 g	
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.99 g	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.012 g	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 g	
	Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.145 g / 500 mL	
蒸留水			Up to 2,000 mL

培地を調整後、300 mL フラスコに 200 mL ずつ分注してシリコ栓*²をし、オートクレーブ(121°C、20 min)。TP 培地の全窒素 (TN) と全リン (TP) は次の通りである: TN = 14.5 mg/L、TP = 1.0

(ペプトン) + 3.1 (KH₂PO₄) = 4.1 mg/L、TN / TP = 3.54。

*1 窒素含有率 14.5%、リン含有率 1.0% (w/w)。(測定方法：①濃度に段階を付けてポリペプトン水溶液を調整。②ペルオキソ二硫酸カリウム分解法で分解。これで窒素化合物およびリン化合物はすべて NO₃⁻および PO₄³⁻に分解される。④NO₃⁻を紫外線吸光光度法で、PO₄³⁻をモリブデン青吸光光度法で測定した。)

*2 株式会社 松浦製作所、品番 6-343-16、型番 C-40、300・500 mL 三角フラスコ用、通気量 2,000–4,500 mL/min。

2.4. 動物の計数と誤差に関する検討

例えば細菌数を寒天培地を使ってコロニー数として数える方法の場合、1枚の寒天培地に 30–100 個のコロニーができるプレートを選び、3枚以上の寒天培地を数えるという方法が、微生物学で一般的に採用されている。しかし、動物の *Cyclidium* sp. (繊毛虫) と、*Philodina* sp. (輪形動物)、*Lecane* sp. (輪形動物)、*Aeolosoma hemprichi* (環形動物 貧毛類) の定量をする際にはこのような一般的な方法は決まっておらず、何匹数えればどれくらい正確にデータが得られるのかが全く分からない状況にある。そこで、数えた動物の数と測定誤差に関する検討を行った。

2.4.1. 方法

Aeolosoma hemprichi と *Philodina* sp. はグリッド付き界線スライドグラス (S6117 No.2、松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) を用いて、光学顕微鏡で計数した。*Lecane* sp. と *Cyclidium* sp. は血球計算盤 (エオジノフィルカウンター、TATAI、サンリード硝子有限会社、埼玉、日本) を用いて、位相差顕微鏡で計数した。15日培養した1つのマイクロコズムについて、*A. hemprichi* と *Philodina* sp. を、1ml ずつ 10回計数した。*Lecane* sp. と *Cyclidium* sp. は、20 μ l ずつ 18回測定した。

各動物について、生データから重複を許して n 個のデータをランダムに取り出し、平均値を $2 \leq n \leq 50$ についてそれぞれ 50 個ずつ作った。これは、組成が全く等しいフラスコ 50 個について、それぞれ n 回ずつ測定して平均値を求めた場合に相当する。各 n について測定個体数を平均値 $\times n$ で求め、50 個の平均値の RSD (相対標準偏差 Relative Standard Deviation; 標準偏差 / 平均値%) を計算して、測定個体数と RSD のグラフを作った (Fig. 2.4.1)。

2.4.2. 解析結果と考察

Fig. 2.4.1 の結果は、例えば、*Cyclidium* sp. を 100 匹数えると、20%程度の誤差で測定できることを示している。近似曲線の指数はどの生物でも -0.5 であることから、測定個体数の増加に伴って精度が上昇する割合は生物種にほとんど依存せずほぼ一定であると考えられる。一方、係数については、同じ個体数を数えても係数が大きい方が測定誤差が大きく、係数が小さいと同じ個体数を数えても正確に測定できることを示している。したがって、*Philodina* sp. は係数が 0.7 と最も小さいので他の動物に比べて正確に測定しやすく、*A. hemprichi* と *Lecane* sp. は 1 前後と中程度で、

Cyclidium sp.は係数が1.8もあり測定誤差が大きいことが分かる。また、*Philodina* sp.を除いてRSD \leq 10%で測定するには100匹以上計数しなければならないことが分かる。測定時間に換算すると、1つのフラスコの1種の動物について1時間も時間がかかることになる。*A. hemprichi*と*Philodina* sp.を同時に測定するにしても、1回の実験で5から15個のフラスコで実験するので、動物の測定だけで15–45時間もかかることになり、明らかに現実的ではないことが分かる。すると、*A. hemprichi*と*Philodina* sp.、*Lecane* sp.はRSD 20%程度、*Cyclidium* sp.はRSD 30%程度で測定するのが現実的かつ正確であると考えられる。この時のRSDと測定個体数の関係をTable 2.4.1に示した。

今後、動物の測定時には、個体数が余りにも少ない場合を除いて、Table 2.4.1に示した個体数を測定して行くところにする。

Table 2.4.1 動物の測定個体数とRSDの関係

生物	RSD (%)	測定個体数 (ind.)	測定に必要なサンプルの体積の目安
<i>A. hemprichi</i>	20	30	4 mL
<i>Philodina</i> sp.	20	17	1 mL
<i>Lecane</i> sp.	20	40	140 μ L
<i>Cyclidium</i> sp.	30	45	50–200 μ L

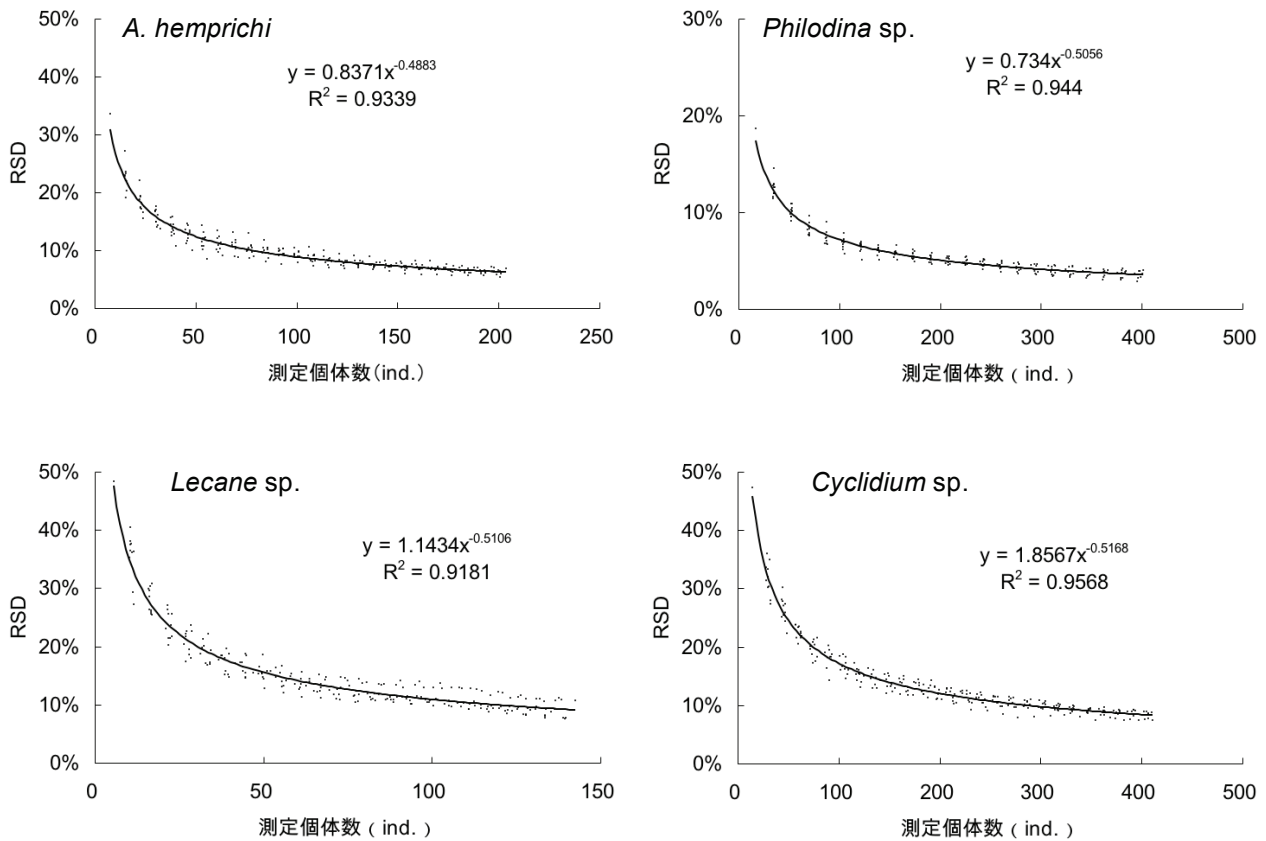


Fig. 2.4.1 各動物の測定個体数と、RSD の関係：例えば、*Cyclidium* sp.を100匹数えると、20%程度の誤差で測定できることを示している。近似曲線の指数はどの生物でも-0.5であることから、測定個体数の増加に伴う精度の上昇率は生物種に依存しないと考えられる。一方、係数が大きいほど、同じ個体数を数えても測定誤差が大きいことを示しているので、*Philodina* sp.は他の動物に比べて正確に測定しやすく、*A. hemprichi*と*Lecane* sp.は中程度で、*Cyclidium* sp.は誤差が大きいことが分かる。また、*Philodina* sp.を除いてRSD \leq 10%で測定するには100匹以上計数しなければならず、測定時間にして1つのフラスコの1種の動物について1時間も時間がかかることになる。1回の実験で5から15個のフラスコで実験するので、動物の測定だけで15-45時間もかかることになり、明らかに現実的ではないことが分かる。すると、*A. hemprichi*と*Philodina* sp.、*Lecane* sp.はRSD 20%程度、*Cyclidium* sp.はRSD 30%程度で測定するのが現実的かつ正確であると考えられる。

2.5. 呼吸量と総一次生産量の解析

一次生産には、酸素の増加量などから直接得られる純一次生産量（いわゆる見かけの光合成量）と、一次生産と同時に起こっている呼吸による酸素の減少量を考慮した総一次生産量（真の光合成量）がある。光が当たっている時間と当たっていない時間が等しい場合、群集の呼吸量 CR（Respiration）と純一次生産量 NPP（Net Primary Production）、総一次生産量 GPP（Gross Primary Production）の関係は次式で表される。

$$NPP = GPP - \frac{1}{2} CR \dots\dots\dots(2.1)$$

2.5.1. 明暗瓶法

呼吸は酸素を消費して二酸化炭素を放出し、光合成は二酸化炭素を固定して酸素を放出する過程であることから、一般的に呼吸量と一次生産量は二酸化炭素又は酸素の増加と減少によって測定される。二酸化炭素濃度は酸素濃度に比べて濃度が低く電極で簡単に測定できない。また、水中においては pH によって H_2CO_3 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} というように存在様態とその比が変わるなどの理由から、測定や解析が煩雑になりがちである。それに対して酸素は酸素電極によって簡易に測定可能であり、どの条件でも O_2 のままなので測定や解析も単純であるため、本研究では酸素濃度の変化から呼吸量と一次生産量を求める方法を採用した。

溶存酸素（DO: Dissolved Oxygen）濃度の変化から呼吸量と一次生産量を求める最も典型的な方法として、明暗瓶法がある。明暗瓶法は、Gaarder and Gran (1927)が最初に使用して以来、現在でもよく使われる。最も基本的な使い方として、以下の2通りがある。

1つは、ある場所・ある時点での呼吸量と一次生産量を測定する場合。この場合、遮光ボトルと透明のボトルにそれぞれ現地のサンプルを密封してそのまま一定時間置いておく。一定時間経過後に遮光ボトル内と透明ボトル内の DO 濃度を測定し、遮光ボトル内の酸素減少量を呼吸量、透明ボトル内の酸素増加量を純一次生産量とし、式(2.1)から総一次生産量を計算する。この方法は、密閉することによる影響以外は、現地性（温度や光条件）に優れており、正確である。実験室に持ち帰って同様に実験することも可能であるが、野外での測定に向いていると言える。しかし、ボトル内のサンプルは長持ちしないので、同一サンプルの連続測定には向かない。

もう1つの方法は、明暗瓶法の発展型である three-point oxygen method と呼ばれる McConnell (1962)の方法である。光がつく直前と、光が消える直前、次に光がつく直前の DO 濃度を測定することによって1日の呼吸量と一次生産量を求めることができる。つまり、光がつく直前から光が消える直前の間の DO 増加量が純一次生産量であり、光が消える直前から次に光がつく直前の DO 減少量が呼吸量である。仮に明期が12時間、暗期が12時間とすると、1日の呼吸量と一次生産量は次の式で計算できる。

$$CR = -2 \times \Delta DO_D \dots\dots\dots(2.2a)$$

$$NPP = \Delta DO_L \dots\dots\dots(2.3a)$$

$$GPP = NPP + \frac{1}{2}CR \dots\dots\dots(2.4a)$$

ここに、 ΔDO_D =暗期(12h)における DO の増加量、 ΔDO_L =明期(12h)における DO 増加量である。一般に $\Delta DO_D < 0$ 、 $\Delta DO_L > 0$ だから、 $CR > 0$ 、 $NPP > 0$ となる (ΔDO_D は DO の増加量であるから DO が減少すると負の数値を示す)。呼吸は 24 時間行われているので、1 日の呼吸量は 12 時間の呼吸量の 2 倍になる。明期でも呼吸が起こっているため、NPP に $\frac{1}{2}CR$ を加えることで GPP が求まる。

本論文では、同一サンプルの連続測定を行うため、McConnell の three-point oxygen method に基づいて測定した。しかし、この方法では DO 濃度が大気との平衡濃度と異なるときに起こる酸素の移動量を考慮していないので、これを補正する必要がある。次項でこれを詳しく説明する。

2.5.2. 水面における酸素の移動

酸素は大気中の約 20%であるため、大気と平衡に達したときの水中の DO 濃度は飽和濃度 (純酸素との平衡濃度) の約 1/5 である。そのため、藻類の光合成によって酸素が産生されると、その酸素は飽和濃度を超えない範囲で水に溶解し、DO が増加する。しかし、この時、DO 濃度は大気との平衡濃度よりも高くなるため水中から大気中へ酸素が移動する。同様に、呼吸によって DO が消費されて平衡濃度よりも低くなると、DO 濃度が平衡濃度よりも低くなるため大気中から水中へ酸素が移動する (Fig. 2.5.1)。その結果、典型的には、Fig. 2.5.2 に示すような DO の変動が観察されると予想される。

大気との酸素の交換があるために、DO の増減だけでは呼吸量と生産量を正しく測定でき

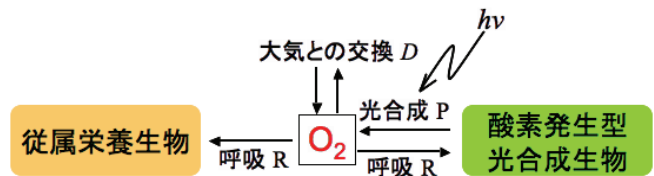


Fig. 2.5.1 DO 濃度に関わるパラメータの関係を示した図：暗期においては全ての好気性生物は呼吸をするため、DO が減少する。一方、光条件下では酸素発生型光合成生物によって光合成が行われて酸素が産生される。明期においても呼吸は行われているが、通常は光合成が呼吸速度 R を上回る速度 P で進むため、光条件下では DO が増加する。更に、培養液と大気との間の酸素の移動により、DO が平衡濃度よりも低いと酸素が系内に溶解し、DO が高いと系外に酸素が放散する。この酸素の移動速度を示す交換速度 D は物理化学的に平衡濃度より離れるほど早くなる。

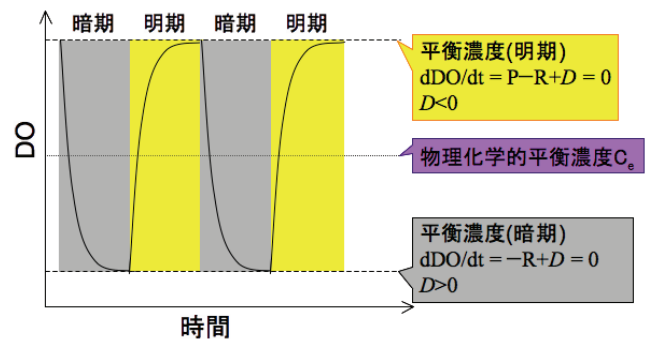


Fig. 2.5.2 暗期及び明期における DO 濃度の変化の予想図：灰色の区間が暗期を、黄色の区間が明期を示す。暗期においては呼吸速度 $R > 0$ と酸素の拡散 (溶解) 速度 $D > 0$ が釣り合う点が平衡点となり、平衡に達するまでの間は、DO は一次反動的に低下すると考えられる。明期においては光合成速度 $P > 0$ と呼吸速度 $R > 0$ 、酸素の拡散 (溶解) 速度 $D < 0$ が釣り合う点が平衡点となり、平衡に達するまでの間は、DO は一次反動的に低下すると考えられる。この繰り返しにより、DO の周期的な増減が観察されると予想される。

ない。例えば、暗期において DO が物理化学的な平衡濃度 C_e 未満で一定である場合を考える。大気との交換を考えないと、酸素の減少量が 0 であるから、この時の呼吸量 R は 0 である。しかし、Fig. 2.5.2 から暗期では $\frac{dDO}{dt} = -CR + D$ である。DO 一定より $\frac{dDO}{dt} = 0$ ゆえ $CR = D$ である。DO $< C_e$ 未満であるから、酸素が系内に溶解して DO は増加するので $D > 0$ である。したがって、 $CR > 0$ となり、実際には呼吸が起こっていることが分かる。

次に、明期において $DO > C_e$ で一定である場合を考える。大気との交換を考えないと、 $GPP - CR = 0$ から $GPP = CR$ となる。しかし、Fig. 2.5.2 から明期では $\frac{dDO}{dt} = GPP - CR + D$ である。DO 一定より $\frac{dDO}{dt} = 0$ ゆえ $GPP = CR - D$ である。DO $> C_e$ では $D < 0$ だから、拡散速度の分だけ生産量が過小評価されていることが分かる。

以上のように、大気と水の間における酸素の移動を考慮に入れた呼吸量・総生産量の測定・解析方法を確立する必要がある、酸素の物理化学的移動による溶解量を δDO とすると、式(2.2a)と、(2.3a)、(2.4a)は次のように修正しなければならない。

$$CR = -2 \times \Delta DO_D + \delta DO_D \dots\dots\dots(2.2b)$$

$$NPP = \Delta DO_L - \delta DO_L \dots\dots\dots(2.3b)$$

$$GPP = NPP + \frac{1}{2}CR \dots\dots\dots(2.4b)$$

次に、酸素の物理化学的移動とその移動量の求め方について検討する。

2.6. 理論：大気-水の酸素の移動（移動現象論）

2.6.1. 移動現象論的検討

大気-水の酸素の移動は拡散過程であり、(a)大気中・水中における拡散過程と、(b)大気から水中へ拡散する過程の 2 つに分けられる。一般に、大気や水中に対流がある場合は大気本体と水本体の濃度は均一であると仮定でき、(a)大気中・水中における拡散過程は無視できる。N-system の入った DO 測定用のフラスコには溶存酸素計が差してあるが、口の部分には隙間があり、開放されている。また、インキュベーター内の温度を均一にするために空気をファンで循環させているため、フラスコ内の気相には対流があると考えられる。また、DO 電極先端のセンサー部のみ強く攪拌しているが、電極に被せてあるキャップの穴から水の出入りがあり、キャップの外部もある程度攪拌されている。そのため、大気本体と水本体には対流があると言えて、大気本体と水本体の濃度は均一であると仮定できる。したがって、(a)大気中・水中における拡散過程を無視できる。また、このような場合、(a)大気中・水中における拡散過程と(b)大気から水中へ拡散する過程では、多くの場合後者が律速段階になっていることが移動現象論 (=輸送現象論) で知られている。

(b)物質が大気から水中へ拡散する過程は、液相とガス相の間の拡散現象として Whitman の二重境膜説によって説明される。境膜とは、固体や混ざり合わない他の流体との界面近傍において、流体の流速が急速に低下することによって形成される、対流の影響をほとんど受けない部分のことである。この部分ではほとんど拡散のみによって物質が移動するため、先に述べたように全体の拡散

過程において律速段階になっている。二重境膜説は、互いに混ざり合わない流体同士が接している時、それぞれの流体がその界面近傍においてそれぞれが境膜を形成することから「二重」境膜説と呼ばれる。

二重境膜説では境膜における流束 N ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) は次式で表される。

$$N = k(C_b - C_i) \dots\dots\dots (2.5)$$

ここで、 k はガス境膜物質移動係数、 C_b はガス相本体の溶質濃度、 C_i は液相に接しているガス相の微小部分における溶質濃度である。

しかし、液相では液はそれより質量の小さいガス体面に沿って流れるため、液側に境膜を想定することには無理があると言われており、Higbie の浸透説または Dankwerts の表面更新説によって説明される。これらの説によると、液相における流束 N は次式で表される (水科 and 萩野, 1981)。

$$\text{Higbie の浸透説: } N = 2(C_i - C_b) \sqrt{\frac{D}{\pi t_c}} \dots\dots\dots (2.6)$$

$$\text{Dankwerts の表面更新説: } N = (C_i - C_b) \sqrt{SD} \dots\dots\dots (2.7)$$

ここで、 D は拡散係数、 C_b は液相本体の溶質濃度、 C_i はガス相に接している液相の微小部分における溶質濃度、 t_c はガス相と液相の接触時間、 S は表面が単位時間に更新される分率である。

定数を 1 つにまとめて a と表すと、Whitman の二重境膜説 (2.1) と Dankwerts の表面更新説 (2.2) はどちらも次式の形で表すことができる。

$$N = a(C_i - C_b) \dots\dots\dots (2.8)$$

ただし、以上の式は流束 N ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の式であるため、溶解速度 ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ または $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$) に変換する必要がある。

ここで、体積 1 m^3 の液体が容器に入っていて気相と液相の接触面積が 1 m^2 である場合を考える (Fig. 2.6.1)。溶質が接触面から液相に移動する速度は流束に接触面積 1 m^2 を乗ずることで求められ、

$$N \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \times 1 \text{ m}^2 = a(C_i - C_b) \text{ mol s}^{-1} \dots\dots\dots (2.9)$$

となる。これが体積 1 m^3 に溶解するから、溶解速度は

$$\frac{a(C_i - C_b) \text{ mol s}^{-1}}{1 \text{ m}^3} = a(C_i - C_b) \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1} \dots\dots\dots (2.10)$$

となり、式の形には変化はないことが分かる。これは Higbie の式 (2.2) も同様である。

なお、ガス相に接している液相の微小部分における溶質濃度 C_i は瞬時にガス相と液相の平衡濃度 C_e に達すると考えられている

(水科 & 萩野, 1981) ため $C_i = C_e$ とすることができる。本研究では大気に対して開放系なので大気の溶存酸素がほぼ一定であると言えるので、

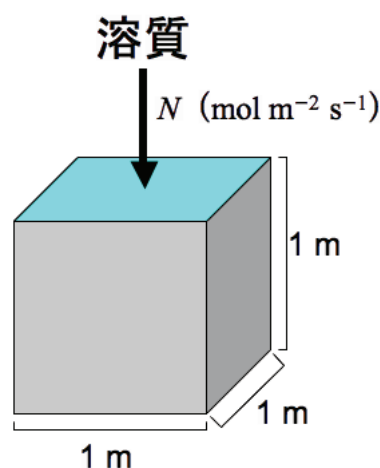


Fig. 2.6.1 体積 1 m^3 で気相との接触面積が 1 m^2 の液体に、気相から溶質が流束 $N \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で溶解する場合を示した図：1 編 1 m の立方体で、溶液は上面のみで気相と接触しており、他の 5 面では気相との接触はないとする。

$$C_i = C_e = \text{一定}$$

とすることができる。

次に、以上の溶解速度に基づいて、DOが大気との平衡濃度よりも低いとき ($DO = C_b < C_i = C_e = \text{一定}$) に、どのようにDOが変化して平衡に達するかを考える。まず、式(2.10)は溶解速度を表しているから、微小時間 dt の間に増加するDOは次の式で表せる。

$$\frac{dC_b}{dt} = a(C_e - C_b) \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1} \dots\dots\dots (2.11)$$

これを時間 t について積分すると、

$$\begin{aligned} \frac{dC_b}{dt} &= aC_e - aC_b \\ \Rightarrow \frac{dC_b}{aC_b - aC_e} &= -1 dt \\ \Rightarrow \int \frac{1}{aC_b - aC_e} dC_b &= -\int 1 dt \\ \Rightarrow \frac{1}{a} \log|aC_b - aC_e| &= -t + c \end{aligned}$$

(ここで c は積分定数)

$$\begin{aligned} \Rightarrow \log|aC_b - aC_e| &= -at + ac \\ \Rightarrow e^{-at+ac} &= |aC_b - aC_e| \end{aligned}$$

ここで $e^{ac} = C$ とおくと、

$$e^{-at+ac} = |aC_b - aC_e| \Leftrightarrow Ce^{-at} = |aC_b - aC_e|$$

$aC_b - aC_e < 0$ では、

$$C_b = -\frac{C}{a}e^{-at} + C_e \dots\dots\dots (2.12a)$$

となる。時間で積分しているので、単位は mol m^{-3} である。

ここでは簡単のために大気から水へ酸素が移動する過程について説明したが、 $aC_b - aC_e > 0$ つまり、DO濃度が大気との平衡濃度よりも高く水から大気へ移動する過程においても同じように解析可能である。つまり、

$aC_b - aC_e > 0$ では、

$$C_b = \frac{C}{a}e^{-at} + C_e \dots\dots\dots (2.12b)$$

となる。これは、DO濃度が大気との平衡濃度と異なると時間の経過とともに指数関数的に増加または減少して平衡濃度に近づくことを示している。Higbieの浸透説(式(2.6))も同様に時間 t で積分すると、

$aC_b - aC_e < 0$ では、

$$C_b = -\frac{C}{a}\exp\left(-\frac{2}{3}at^{\frac{3}{2}}\right) + C_e \dots\dots\dots(2.13a)$$

$aC_b - aC_e > 0$ では、

$$C_b = -\frac{C}{a}\exp\left(-\frac{2}{3}at^{\frac{3}{2}}\right) + C_e \dots\dots\dots(2.13b)$$

となる。

実験系が Dankwerts の表面更新説 (式(2.7)と(2.12a, b)) に当てはまるか、Higbie の浸透説 (式(2.6)と(2.13a, b)) に当てはまるかは、平衡濃度を差し引き、対数をとれば簡単に検証できる。つまり、

Dankwerts の表面更新説の場合、実験結果は式(2.12b)のように表されるはずだから、

$$C_b = \frac{C}{a}e^{-at} + C_e$$

$$\Rightarrow C_b - C_e = \frac{C}{a}e^{-at}$$

$$\Rightarrow \log(C_b - C_e) = \log\left(\frac{C}{a}e^{-at}\right)$$

$$\Rightarrow \log(C_b - C_e) = \log(e^{-at}) + \log\left(\frac{C}{a}\right)$$

$$\Rightarrow \log(C_b - C_e) = -at + \log\left(\frac{C}{a}\right)$$

と、1次式となり、グラフは直線となる。

一方、Higbie の浸透説の場合は、実験結果は式(2.13b)のように表されるはずだから、同様に

$$C_b = -\frac{C}{a}\exp\left(-\frac{2}{3}at^{\frac{3}{2}}\right) + C_e$$

$$\Rightarrow \log(C_b - C_e) = -\frac{2}{3}at^{\frac{3}{2}} + \log\left(\frac{C}{a}\right)$$

となり、グラフは曲線になる。

つまり、平衡濃度を DO 濃度の時系列変化の測定結果から差し引いて対数をとった結果、グラフが直線になれば Dankwerts の表面更新説に当てはまり、曲線になれば Higbie の浸透説に当てはまることになる。

2.6.2. 実験による移動速度の検討

300 mL 三角フラスコに 200 mL の水を入

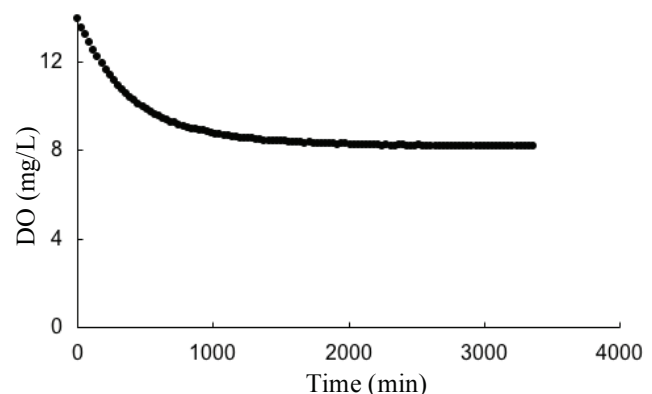


Fig. 2.6.2 酸素曝気後の DO の経時変化：DO が平衡値 8.26 mg/L に向けて指数関数的に減少している。

れ、マイクロコズムと同様に酸素電極を設置して溶存酸素を測定した。測定に先立ち、水には純酸素を吹き込み、大気との平衡濃度よりも高くしておいた。マイクロコズムの代わりに水が入っていること以外は、マイクロコズムと全く同じ条件で測定した。すなわち、明暗周期=12:12 h、温度 25 °C、照度 2400 lx (光合成光量子束密度 $36 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で実験を行った。その結果を Fig. 2.6.2 に示した。酸素曝気後、12 mg/L 以上合った DO 濃度が時間の経過とともに指数関数的に 8.26 mg/L に近づいていった。次に、DO 濃度の結果から 8.26 mg/L を差し引き、対数をとると、Fig. 2.6.3 のようになった。対数をとった結果のグラフを見ると、平衡付近では誤差が大きいものの、直線を描いており、決定係数も 0.997 と、かなり高いことから、この実験系は Dankwerts の表面更新説に当てはまると言える。

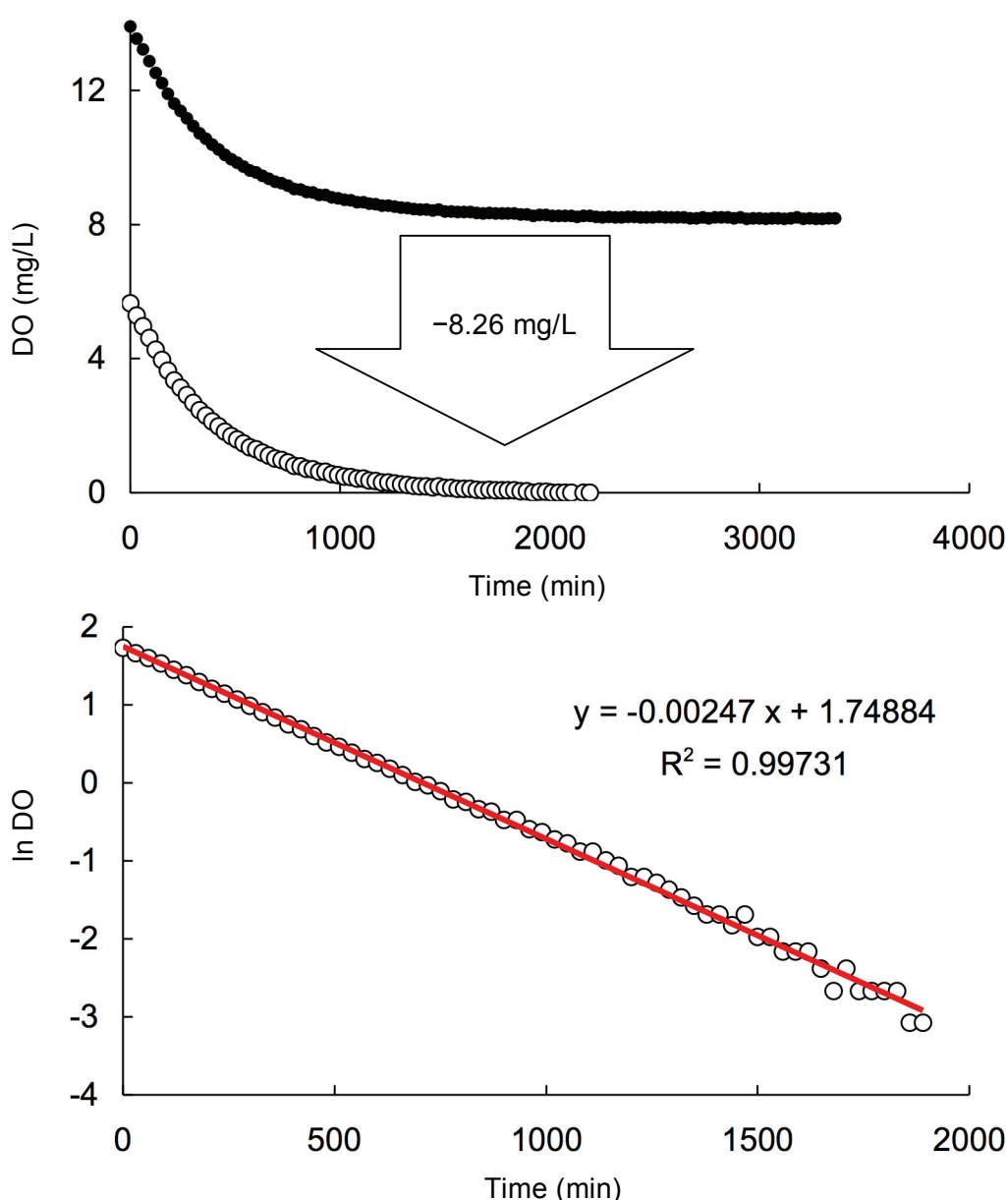


Fig. 2.6.3 DO 濃度の結果から 8.26 mg/L を差し引き、対数をとったグラフ：DO 濃度の結果から 8.26 mg/L を差し引き (上)、対数をとった (下)。下のグラフを見ると、平衡付近では誤差が大きいものの、直線を描いており、決定定数も 0.997 と、かなり高いことから、この実験系は Dankwerts の表面更新説に当てはまると言える。

2.7. 酸素の移動を考慮した呼吸量と総一次生産量の求め方

2.7.1. 酸素の移動速度を求める

2.6.2 と同じ方法で実験および解析を進める。Excel などの一般的な表計算ソフトでは、線形近似はできるが、 $y = ae^{bt} + c$ の形に近似することはできない。そこで、対数を取ることで、線形近似できる形に変換し、 a と b を求める。

両辺から c をひくと、

$$y = ae^{bt} + c$$

$$\Leftrightarrow y - c = ae^{bt}$$

となる。両辺の自然対数を取ると、 $y > c$ において、

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow \ln(y - c) &= \ln ae^{bt} \\ &= \ln a + \ln e^{bt} \\ &= \ln a + bt \ln e \\ &= \ln a + bt \dots\dots\dots(12) \end{aligned}$$

となり、時間 t の一次関数になる。

例として、解析方法 1 と同じデータから δDO を求めてみる。まず、元のデータから、平衡に達した時の DO を読み取ると、8.26 であるから、 $c = 8.26$ である。元のデータから 8.26 を引くと、Fig. 2.7.1 のようになる。

8.26 をひいたデータ (> 0) について自然対数をとって線形近似すると、Fig. 2.7.2 のようになる。

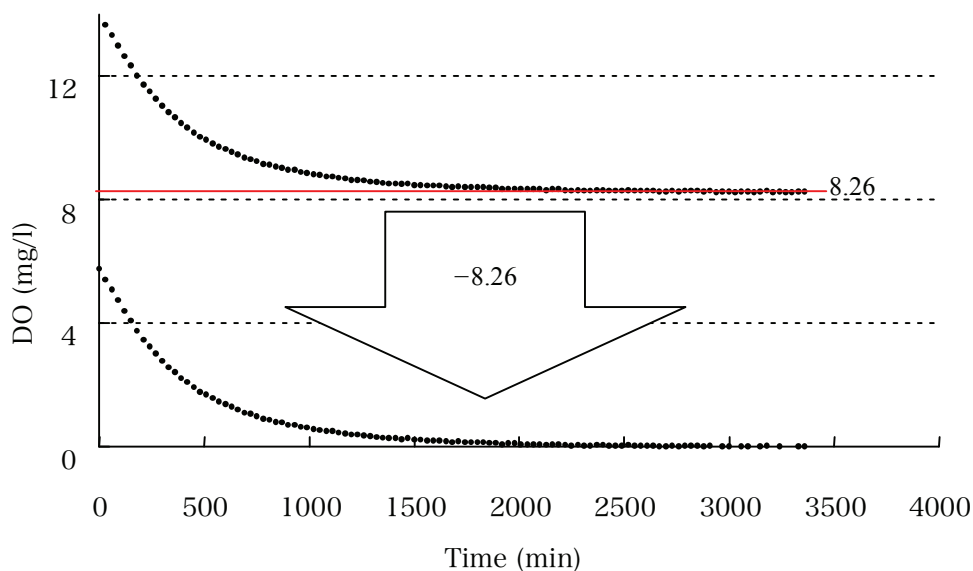


Fig. 2.7.1 DO データから平衡濃度 8.26 mg/L を差し引く

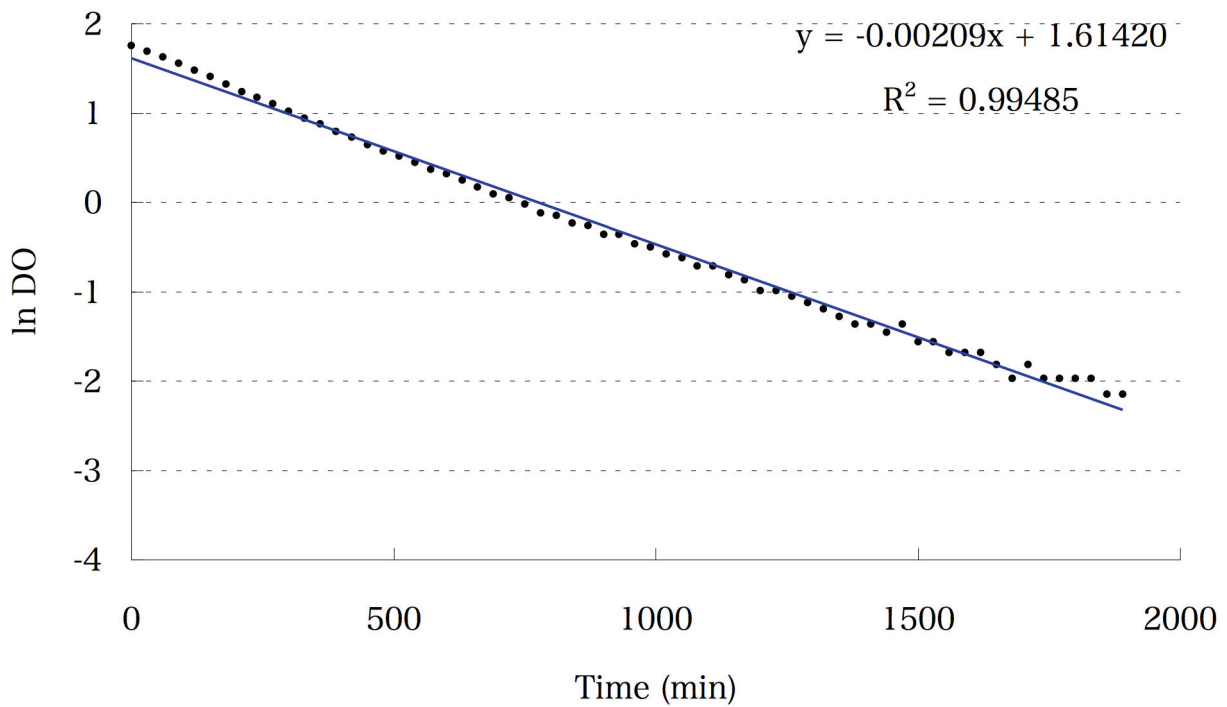


Fig. 2.7.2 平衡濃度 8.26 mg/L を差し引いた DO データの自然対数をとる

しかし、明らかに後半では誤差が大きく、うまく近似できていない。そこで、データ数ができるだけ多く、かつ $R^2 > 0.999$ となるように、適用するデータを時間の遅い方から削っていくと、Fig. 2.7.3 のようになる。

式(12)と照らし合わせると、 $b = -0.00239$ 、 $\ln a = 1.74598$ である。以上から求められた b と c を

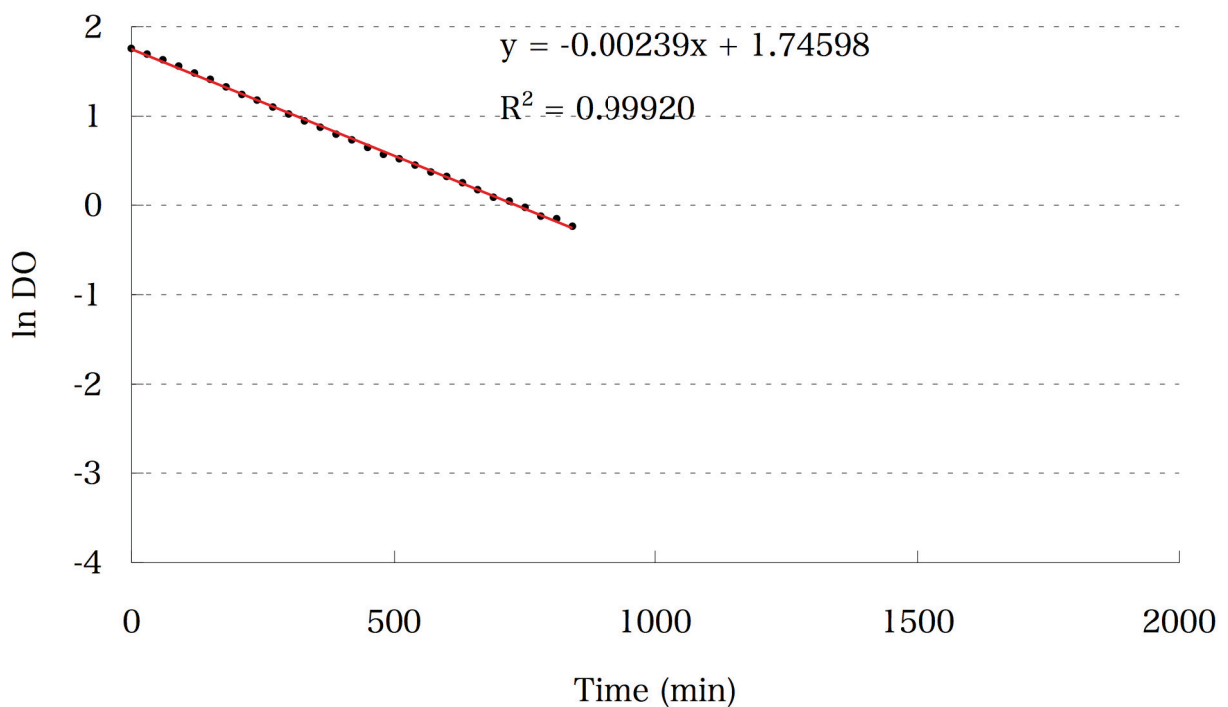


Fig. 2.7.3 誤差の大きい区間のデータを除いて近似直線を得る

式(10)に代入すると、

$$\delta DO = -0.00239 (DO - 8.26) \dots\dots\dots(13)$$

となる。最後に、 $DO > c$ の時 $\delta DO < 0$ となり、 $DO < c$ の時 $\delta DO > 0$ となることを確認する。
なお、このデータは時間の単位が分であるため、 δDO の単位は、 $\text{mg l}^{-1} \text{min}^{-1}$ である。

解析方法 1 では $b = -\frac{1}{422.28491 \pm 2.1275} \doteq -\frac{1}{422} = -0.00237$ ($-0.00236 \sim -0.00238$) で、

解析方法 2 では $b = -0.00239$ だった。その差は 1%未満であり、解析方法による差はないといえる。

2.7.2. 呼吸量と総生産量の算出

表計算ソフトを使って、実際に呼吸量と総生産量を算出する方法を示す。

例として、Table 2.7.1 のような 1 日分のデータがあるとす。13:00 から 1:00 が暗期で、1:00 から時間 13:00 が明期である。従って、13 時のデータは、ライトが消えた時の、1 時のデータはライトが点灯した時の DO である。

まず、各時間の ΔDO を算出する。例えば、13 時から 14 時の間の ΔDO は、(14 時の DO) - (13 時の DO) = $8.56 - 8.78 = -0.220$ である。同様に 13 時~14 時、14 時~15 時というように、 ΔDO を計算する。

次に、暗期の ΔDO の合計と、明期の ΔDO の合計を算出する。次項では、 δDO の計算方法を説明する。

Table 2.7.1 溶存酸素の増加量の算出

	DO (mg/l)	ΔDO (mg/l)	$\Sigma \Delta DO$ (mg/l)
	13	8.78	
暗期	14	8.56	-0.220
	15	8.32	-0.240
	16	8.16	-0.160
	17	8.00	-0.160
	18	7.86	-0.140
	19	7.78	-0.080
	20	7.70	-0.080
	21	7.64	-0.060
	22	7.62	-0.020
	23	7.58	-0.040
	24	7.56	-0.020
	1	7.52	-0.040
明期	2	8.70	1.179
	3	9.60	0.900
	4	10.03	0.440
	5	10.05	0.020
	6	9.86	-0.200
	7	9.66	-0.200
	8	9.48	-0.180
	9	9.32	-0.160
	10	9.18	-0.140
	11	9.06	-0.120
	12	8.94	-0.120
	13	8.86	-0.080

ΔDO_D
-1.26

ΔDO_L
1.34

前項と同じ DO データから、 δDO の計算をする。

例えば、13時から14時における δDO は、13時のDOと14時のDOの平均を計算し、平均値を式(13)に代入して算出する。ただし、式(13)は分速であるため、60を乗じて時速に修正する必要がある。

$$\delta DO = -\frac{1}{422}(DO - 8.26) \text{mg/l/min}$$

⇔

$$\delta DO = -\frac{60}{422}(DO - 8.26) \text{mg/l/h}$$

これに13時のDOと14時のDOの平均値8.67を代入すると-0.0583になる。右の表では、DOの値に四捨五入されて表示されていない桁も含めて計算しているため、-0.0583ではなく-0.0577となっている。

以下、同様に13時~14時、14時~15時というように、 δDO を計算し、暗期の合計と明期の合計をそれぞれ算出する。

以上より、 $\Delta DO_D = -1.26$ 、 $\delta DO_D = 0.602$ 、 $\Delta DO_L = 1.34$ 、 $\delta DO_L = -1.84$ である。

式(6)、(7)、(4)より、CRと、NPP、

GPPが計算できる。それぞれ計算すると、式(6)より、

$$CR = -2 \times (\Delta DO_D - \delta DO_D) = -2 \times (-1.26 - 0.602) = 3.72 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(7)より、

$$NPP = \Delta DO_L - \delta DO_L = 1.34 - (-1.84) = 3.18 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(4)より、

$$GPP = NPP + \frac{1}{2}CR = 3.18 + \frac{1}{2} \times 3.72 = 5.04 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

となる。

Table 2.7.1 酸素の移動速度の算出

時間	DO	平均	δDO	$\Sigma \delta DO$
13	8.78			
14	8.56	8.67	-0.0577	} δDO_D 0.602
15	8.32	8.44	-0.0250	
16	8.16	8.24	0.0034	
17	8.00	8.08	0.0262	
18	7.86	7.93	0.0475	
19	7.78	7.82	0.0631	
20	7.70	7.74	0.0745	
21	7.64	7.67	0.0844	
22	7.62	7.63	0.0901	
23	7.58	7.60	0.0944	
24	7.56	7.57	0.0986	
1	7.52	7.54	0.1029	
2	8.70	8.11	0.0219	
3	9.60	9.15	-0.1259	
4	10.03	9.82	-0.2211	
5	10.05	10.04	-0.2538	
6	9.86	9.96	-0.2410	
7	9.66	9.76	-0.2126	
8	9.48	9.57	-0.1856	
9	9.32	9.40	-0.1614	
10	9.18	9.25	-0.1401	
11	9.06	9.12	-0.1216	
12	8.94	9.00	-0.1046	
13	8.86	8.90	-0.0904	

2.8. 第 2 章の結論

第 2 章では、主に動物の計数方法と CR および GPP の求め方を検討してきた。動物の計数においては、動物の種とは無関係に、RSD が計測した個体数の約-0.5 乗に比例し、測定個々対数が多いほど正確に計測できるという関係があった。一方で、動物種により少ない測定数でも比較的正確に測定できる *Philodina* sp. のような種があったり、測定数の割にはそれほど正確に測定できない *Cyclidium* sp. のような種があったりした。いずれにしても、RSD 10% を目指して測定すると、測定時間がかかりすぎて現実的ではないことが分かった。したがって、Table 2.4.1 で示したように、*A. hemprichi* と、*Philodina* sp.、*Lecane* sp. は RSD が 20% 程度に、*Cyclidium* sp. は 30% 程度になるように、測定個体数を決定しこれを基準の動物の個体数を測定していくこととした。CR と GPP の求め方は明暗瓶法などで既に確立された式(2.2a)と、(2.3a)、(2.4a) のような計算方法があったが、大気と水の間の酸素の移動に関しては確立された方法がなかった。そのため、2.5 では酸素の移動が CR と GPP において重要であることを説明し、2.6 では酸素の移動を移動現象論によって理論的に検証した後、実験によって理論の検証を行った。その結果、本実験系においては、酸素の移動は Dankwerts の表面更新説に当てはまる形で起こっていることが実験的に示された。この理論に基づき、酸素の移動速度を求めることができる事が 2.7.1 で示された。最後に 2.7.2 で酸素の移動を考慮した CR および GPP を計算する方法を確立することができた。第 2 章に基づいて生態影響評価マニュアルを作成した (付録)。

第3章 オキシテトラサイクリンの生態系影響評価

3.1. 第3章の概要

生態系影響評価は緑藻・甲殻類・魚類のうち1から3種について各1種の培養・飼育系に化学物質を加えて行われている。しかし、生態系には食物網や物質循環などの機能があり、生態系機能を含めた生態系影響評価が必要である。マイクロコズムは生産者・消費者・分解者からなり食物網などの生態系機能の一部を有することおよび制御可能なシステムであることなどから生態系影響評価に有用と考えられる。第3章ではN-systemを用いて、生物量と群集呼吸量(CR)・総一次生産量(GPP)を指標とした生態系機能を含めた生態系影響評価手法の確立を目指して抗生物質オキシテトラサイクリン(OTC)生態系影響評価を行った。また、生物量とCR・GPPを統合的に解析することで、生物量と生態系機能(CR・GPP)の関係性を明らかにしようとした。

貧毛類 *A. hemprichi* と *Cyclidium* sp.が、それぞれ 7000 $\mu\text{g/L}$ と $>7 \mu\text{g/L}$ の OTC の添加により個体数を対照群に比べて大幅に減少した。一方で、 $>7 \mu\text{g/L}$ において *Lecane* sp.が対照群に比べて有意に増加した。これは *Cyclidium* sp.が減少したことによって、同じ細菌食性の *Lecane* sp.がそのニッチを埋める形で増加したためであると考えられた。更に、OTC 耐性細菌の増加も観察することができ、薬剤耐性細菌の出現を含めた生態系影響評価が可能であることが明らかになった。また、OTC 耐性細菌と OTC の実測値の間で、ヒステリシスと思われる現象が生じた。このように、生物間相互作用や、非線形現象を通じた生態系影響評価が可能であることが確認された。

生物量と CR の関係を明らかにするために、各従属栄養生物の1個体当たりの呼吸量を体の大きさ(細胞の体積又は乾燥重量)から予測し、生物量と1個体当たりの呼吸量の予測値(代謝速度一定と仮定)から従属栄養生物の個体群の呼吸量を見積もった。全従属栄養生物の個体群の呼吸量の予測値を合計し、従属栄養生物群集の呼吸量の理論値(HR_{theo})とした。一方、藻類の呼吸量(AR)は $0.35 \times \text{GPP}$ で求められると言われているので、CR から AR を差し引くことで、従属栄養生物群集の呼吸量の実験値(HR_{exp})を求めた。次に、測定値から計算した従属栄養生物の呼吸量との比($\text{HR}_{\text{exp}}/\text{HR}_{\text{theo}}$)をとった。 $\text{HR}_{\text{exp}}/\text{HR}_{\text{theo}}$ は、 HR_{theo} が単位生物量当たりの呼吸量が一定であると仮定したときの呼吸量であるから、代謝に変化がないと仮定したときに予想される呼吸量を基準としたときの、実際の単位生物量当たりの代謝速度の変化を示している。これを RCM (相対群集代謝 Relative Community Metabolism) と呼ぶことにする。

OTC 7–70 $\mu\text{g/L}$ においては、OTC 添加4日後までは急激に RCM が低下したものの、7–10 日後には対照群と同じ水準まで回復した。これは OTC が分解されて濃度が低下したことが原因であり、数 $\mu\text{g/L}$ 程度まで達したために RCM が回復したと考えられた。OTC 700–7000 $\mu\text{g/L}$ においては、対照群の約 44% まで RCM が抑制され、従属栄養生物の代謝に対する影響は、CR から予想されるよりも遥かに大きかった事が明らかになった。この影響は生物量や CR および GPP だけからでは予想不可能であり、RCM を求めることで初めて明らかにできる事を見出した。

3.2. 背景

獣医学分野において、抗生物質は、家畜の病気の予防や生長促進を目的として使用され、汚水タンクや廃棄物からの滲出や流出によって環境中へ放出され、水生生物や陸生生物に影響を与える (Sarmah *et al.*, 2006)。テトラサイクリン系抗生物質は最も広く使われている抗生物質の1つで、原核生物に対して広範な抗菌スペクトル (ターゲットとなる微生物の範囲) を有する。オキシテトラサイクリン (OTC) は水産業や畜産業でヨットも頻繁に使われるテトラサイクリン系抗生物質である。河川や湖沼などの地表水では、OTC 濃度は多くの場合 0.1 $\mu\text{g/L}$ 未満であるが (Sarmah *et al.*, 2006; Lin and Tsai, 2009)、豚農場の近くの河川で 100 $\mu\text{g/L}$ 近くの OTC が検出されることもある (Matsui *et al.*, 2008)。テトラサイクリン系抗生物質は、リボソームの 30S サブユニットに結合し、アミノアシル tRNA の mRNA への結合を阻害することで、タンパク質合成を阻害する。

テトラサイクリン系抗生物質は、細菌の 16S rRNA に作用するだけでなく、真核生物のミトコンドリアの 16S rRNA にも同様に作用する (Hallberg and Wilson, 1981; Kiatfuengfoo *et al.*, 1989; Mathis *et al.* 2004)。そのため、原核生物のみならず、真核生物の呼吸量を減少させる影響を与える可能性が考えられる。また、低濃度のテトラサイクリンは葉緑体の ATP 合成酵素 CF₁ にも作用して光合成効率をある程度上昇させることが知られている (Dong & Wei, 2004)。ただし、高濃度では悪影響が現れる。このため、低濃度では光合成などにプラスの影響をもたらす可能性も考えられるが、高濃度では悪影響が現れると考えられる。以上をまとめると Fig. 3.2.1 のようになる。

一方、抗生物質の環境への影響において見逃せない問題は、薬剤耐性細菌の出現である。

このように、テトラサイクリン系抗生物質は真核生物にも作用し、広範囲の生物に影響を及ぼす。しかし、個体数と生態系機能の両方を扱った、マイクロコズムや複数種混合培養系を用いた研究は少ない (Wilson *et al.*, 2004; Boleas *et al.*, 2005; Thiele-Bruhn and Beck, 2005)。そこで本章では、N-system を用いて、OTC 耐性細菌の出現を含めて、個体群および群集と、群集の呼吸量 (CR) および総一次生産量 (GPP) への OTC の影響を総合的に評価することを目的とした。

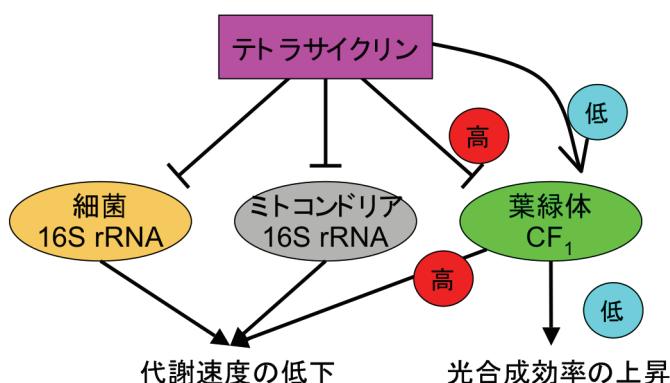


Fig. 3.2.1 テトラサイクリン系抗生物質の作用機序と、それから考えられるマイクロコズムを構成する生物への影響：テトラサイクリン系抗生物質は細菌およびミトコンドリアの 16S rRNA に結合し、タンパク質合成を阻害することにより、代謝を阻害するので、代謝速度は低下すると予想される。一方、テトラサイクリン系抗生物質は、低濃度では葉緑体の ATP 合成酵素 CF₁ にも作用して光合成効率をある程度上昇させるので、低濃度では光合成効率が上昇し、光合成色素や GPP にプラスの影響を示す可能性がある。しかし、高濃度では藻類にも悪影響を及ぼすことが知られているので、高濃度ではクロロフィルや GPP が低下すると予想される。

3.3. 材料と方法

3.3.1. マイクロコズムの培養

マイクロコズムには N-system を使用した。N-system の構成種は、下記の通りである。

- *Cyclidium* sp. (繊毛虫)
- *Philodina* sp. (輪形動物)
- *Lecane* sp. (輪形動物)
- *Aelosoma hemprichi* (環形動物 貧毛類)
- *Chlorella* sp. (緑藻)
- *Scenedesmus* sp. (緑藻)
- *Tolypothrix* sp. (糸状藻類)
- Bacteria (*Bacillus cereus* と、*Sinorhizobium* sp. または *Ensifer* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Dyella* sp. または *Luteibacter rhizovicinus* の存在が確認されている)

N-system は、TP 培地 (Table 3.3.1) で培養した。培地を調整後、300 ml フラスコに 200 ml ずつ分注してシリコ栓をし、オートクレーブ (121°C、15 min) した。C stock sol. と F stock sol. は別にオートクレーブし、オートクレーブ後に加えた。

Table 3.3.1 TP 培地の組成

Stock solution			Amount
A	ペプトン		0.1 g
B	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.2325 g / 50 ml	1.0 ml
C	KH ₂ PO ₄	0.68 g	1.0 ml
	NaOH	0.14 g / 50 ml	
D	CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.7 g / 50 ml	1.0 ml
E	NaCl	8.76 g / 50 ml	1.0 ml
F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2334 g	1.0 ml
	Na ₂ EDTA	0.1275 g	
	H ₃ BO ₄	0.0465 g	
	Mn stock sol. *	500 μl	
	Co stock sol. *	50 μl	
	Zn stock sol. *	50 μl	
	Cu stock sol. *	50 μl	
	Mo stock sol. *	50 μl / 50 ml	
Pure water			Up to 1,000 ml

*Mn、Co、Zn、Cu、Mo stock sol.の濃度は Table 3.3.2 に示した。

Table 3.3.2 Mn、Co、Zn、Cu、Mo stock sol.の濃度

	Substance	Weight	Pure water
Mn stock sol.	MnCl ₂ · 4H ₂ O	4.95	Up to 50 ml
Co stock sol.	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	7.25 g	Up to 50 ml
Zn stock sol.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7.2 g	Up to 50 ml
Cu stock sol.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.25 g	Up to 50 ml
Mo stock sol.	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.6 g	Up to 50 ml

保存培養のためには 30 ml、実験のためには 10 ml のマイクロコズム培養液をこれに加えて培養した。保存培養は、約 2 ヶ月に 1 回行った。培養条件は、明暗周期=12H/12H、温度 25°C、照度 2400 lx (光合成光量子束密度 36 μmol m⁻² s⁻¹) とした。

3.3.2. OTC の添加

オキシテトラサイクリン塩酸塩 (生化学用、95.0+%、和光純薬株式会社、大阪、日本) をミリ Q 水に溶かして孔径 0.2 μm のフィルターでろ過滅菌した。必要に応じて、これを無菌的にミリ Q 水で希釈した。この OTC 溶液 1 mL を 15 日間培養し安定期に達した N-system に加えた。対照群にはろ過滅菌したミリ Q 水を加えた。繰り返しは 3 回行った。

添加する OTC 濃度は微小生物の EC₅₀ のデータを集計し (Fig. 3.3.1)、その算術平均である約 7 mg/L を基準として、公比 10 で希釈した系列を作った。

3.3.3. オキシテトラサイクリンの測定

オキシテトラサイクリン塩酸塩 (生化学用、95.0+%) と、アセトニトリル (HPLC 用)、しゅう酸 (試薬特級、98.0+%)、メタノール (HPCL 用)、逆相カラム (Wakosil-II, 5C18 HG、内径 150×4.6 mm)、固相抽出カラム (Presep RPP、200 mg、6 mL) を和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。Na₂ EDTA を Sigma-Aldrich co. (Missouri、USA) から購入した。

デガッサーと、カラムオープン、UV-VIS 検出器から構成された HPLC システム (島津 10A シリーズ、島津製作所、京都、日本) を用いた。測定条件は Table 3.3.3 に示した。サンプルは手動でマニュアルインジェクターに注入した。クロマトグラフは C-R8A クロマトパック (島津製作所、

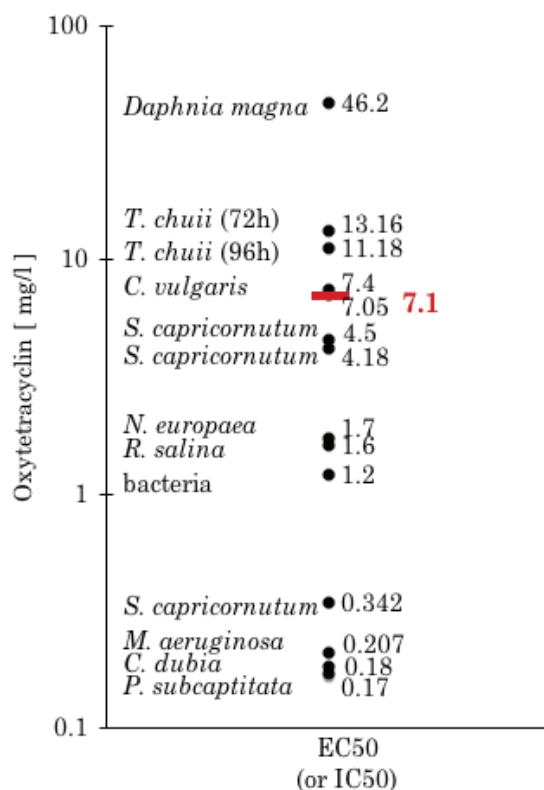


Fig. 3.3.1 微小生物の EC₅₀ のデータ：供試生物がドットの左に、その生物の EC₅₀ 値が右に書かれている。赤い棒は、これらのデータの算術平均値 (7.1 mg/L) を示す。

京都、日本) で解析した。

Table 3.3.3 HPLC の測定条件

固相	Wakosil-II 5C18 HG
移動相	アセトニトリル: 10 mM しゅう酸 (20: 80)
カラムオープンの温度	35 °C
検出波長	370 nm
移動相の流速	1.0 mL/min

OTC濃度が10 µg/L未満の場合は、以下の手順で濃縮してからHPLCで測定した。メタノール 10 mL と、水 10 mL、飽和 EDTA・2Na 5 mL をそれぞれこの順に Presep RPP に通液して、コンデューションした。サンプルを通液した後、水 20 mL を通液して洗浄した。メタノールを 5 mL を通液して OTC を溶出させ、溶出液をガラス容器に回収した。メタノールを 1 mL を通液し、共洗いをしながら溶出液を先ほどの溶出液とともにガラス容器に回収した（これを計 2 回行った）。溶出液を 35 °C、窒素気流下で濃縮し、溶媒を除去した。HPLC の溶離液 1.0 mL に再溶解した。

3.3.4. 動物の測定

Aeolosoma hemprichi と *Philodina* sp. はグリッド付き界線スライドグラス (S6117 No.2、松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) を用いて、光学顕微鏡で計数した。*Lecane* sp. と *Cyclidium* sp. は血球計算盤 (エオジノフィルカウンター、TATAI、サンリード硝子有限会社、埼玉、日本) を用いて、位相差顕微鏡で計数した。*Lecane* sp. はルゴール溶液で固定し、測定まで室温で保存した。

3.3.5. Chlorophyll *a* および *b* の測定

Chlorophyll *a* および *b* (Chl *a* および *b*) の抽出・定量方法は多種あるが、一般的に抽出効率が良く取り扱いの簡単なジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた抽出方法 (Burnison, 1980) を採用した。培養液を 2 ml、Ø25mm の GF 75 (Advantec、日本) でろ過した。濾紙を軽く丸め、2.0 mL の遠沈管に入れた。測定までの間 -20°C で保存した。DMSO (分光分析用、和光純薬株式会社、大阪、日本) を加え、30 秒の超音波処理を 3 回行った。65°C で 10 分静置し、遠心分離 (e.g. 12,000 r.p.m で 10 分) してフィルターと細胞片を除去した。上澄みのスペクトルを分光光度計 (V-550; Jasco Analytical Instruments、MD、USA) で測定し、下記の方程式 (Wellburn 1994) から Chl *a* および *b* の濃度を算出した。また、フェオフィチン化指数 PQ (Phaeophitization Quotient) も下記の式から計算した。

$$A_{\lambda} = (\text{波長 } \lambda \text{ nm における吸光度}) - (\text{波長 } 750 \text{ nm における吸光度}) \dots\dots(3.1)$$

$$\text{Chl } a = 12.19 A_{665} - 3.45 A_{649} \dots\dots(3.2)$$

$$\text{Chl } b = 21.99 A_{649} - 5.32 A_{665} \dots\dots(3.3)$$

$$\text{PQ} = A_{435} / A_{415} \dots\dots(3.4)$$

3.3.6. 生菌数および OTC 耐性細菌の測定

生菌数および OTC 耐性細菌は段階希釈法とコロニー係数法を組み合わせ測定した。Table 3.3.4 に示した培地および培養条件で培養した。PY 培地の組成は、ポリペプトン 5 g と、NaCl 4 g、酵母エキス 3 g、寒天 20 g、ミリ Q 水 1000 mL である。

Table 3.3.4 生菌および OTC 細菌の培養条件

	生菌数	OTC 細菌数
培地	PY 寒天培地	PY-OTC 寒天培地*
温度	25 °C	25°C
光条件	暗条件	暗条件
培養時間	4 日	10 日

* PY-OTC 寒天培地は、PY 寒天培地に 25 mg/L の OTC を加えたものである。PY 寒天培地をオートクレーブした後 45~50 °C まで冷却し、ろ過滅菌した OTC 水溶液を PY 寒天培地に無菌的に加えた。準備実験として、OTC の代わりにニュートラルレッドを同様に加えて混合し、均一に混合できる攪拌時間を確認し、念のため攪拌時間を 1.2 倍程度に伸ばして OTC を混合した。

3.3.7. 呼吸量および生産量の解析

溶存酸素濃度 (DO) は DO 計 ProODO (YSI/Nanotec Inc., Kawasaki, Japan) で測定・記録した。群集の呼吸量 (CR) と総一次生産量 (GPP) は第 2 章の 2.1 から 2.3 で述べた方法で DO 変化から解析した。つまり、暗期における DO 減少量を 2 倍して CR とし、明期における DO の増加量に 1/2 CR を加えて GPP とした。この時、培養液と大気の間で起こる酸素の移動も考慮した。

藻類は GPP のおよそ 1/3 を自身の呼吸に利用することが知られており、この関係性から藻類の呼吸量 (AR) を GPP から見積もることができる。Grande *et al.* (1989) は暗期における $PO^{14}C$ (12–24 h) の消失は、粒子状物質に同化された ^{14}C のうち 26–36% が暗期のうちに失われる事を見いだした。また、Kiddon *et al.* (1995) は藻類の 1 日の呼吸量を GPP の 32% と見積もった。更に、Duarte and Cebrián (1996) は 154 の報告をまとめて、平均的には GPP の 35% が独立栄養生物の呼吸に使われていると計算した。本研究では次式に示す Duarte and Cebrián (1996) の計算式を採用した。

$$AR = 0.35 \times GPP \dots\dots\dots (3.5)$$

藻類の呼吸量から群集呼吸量を引けば、従属栄養生物の呼吸量 (HR_{exp}) を求めることができる：

$$HR_{exp} = CR \times AR \dots\dots\dots (3.6)$$

藻類の呼吸量と体の大きさの研究は私の知る限り行われていないため、CR のままでは 3.2.7 に示す体の大きさから見積もった群集呼吸量の比較はできないが、 HR_{exp} を求めることによりこれと比較可能となる。

3.3.8. 個体数変動からの個体群呼吸量の計算

各従属栄養生物の個体群呼吸量は体の大きさと生物量から求めた。細菌群集はグラム陽性細菌である *Bacillus* spp. によって優占されているため、細菌群集の呼吸量は Makarieva *et al.* (2012)

に記載されているグラム陽性細菌の平均代謝速度を用いて求めた。この時、生菌数が細胞数と等しいと仮定した。*Cyclidium* sp.の呼吸速度は、Fenchel and Finlay (1983) の式を用いて細胞の体積から計算した。*A. hemprichi* と *Philodina* sp.、*Lecane* sp.の呼吸速度は、Galkovskaya (1995) の式を用いて乾燥重量から求めた。以上のように求めた1個体当たりの呼吸量 (IR) を Table 3.3.5 にまとめた。

Table 3.3.5 体の大きさから計算された IR

	体の大きさ (平均、n=20)	IR (μmol / ind. / d)	式
Bacteria	0.4 pg/cell ^a	1.17×10 ⁻⁸	
<i>Cyclidium</i> sp.	930 μm ³ /ind.	1.24×10 ⁻⁵	Fenchel and Finlay (1983)
<i>Lecane</i> sp.	0.15 μg/ind.	2.28×10 ⁻³	Galkovskaya (1995)
<i>Philodina</i> sp.	0.25 μg/ind.	3.28×10 ⁻³	Galkovskaya (1995)
<i>A. hemprichi</i>	0.33 μg/ind.	4.00×10 ⁻³	Galkovskaya (1995)

a, Makarieva *et al.* (2012) のデータより。

個体群の呼吸量は個体数に IR を乗じて求めた。これら従属栄養生物の個体群の呼吸量を合計し、従属栄養生物の呼吸量の理論値 (HR_{theo}) とした：

$$HR_{theo} = \sum (IR_i \times N_i) \dots\dots\dots(3.7)$$

ここで、IR_i は従属栄養生物 i の IR、N_i はその個体数である。

体の大きさから計算された IR は定数であり、一定の代謝状態における中間的な呼吸速度を示している。つまり、細菌については平均の代謝速度 (Makarieva *et al.*, 2012) であり、原生動物については飢餓状態と増殖中の状態のデータを集計して求めた値 (Fenchel and Finlay, 1983) であり、ワムシについては標準代謝率である。表現はそれぞれ違うが、どれも中間的な呼吸速度である。このため、HR_{theo} は個体の代謝速度が中間的な値で一定であるという仮定の下に計算されており、一方、HR_{exp} は代謝速度の実測値であり、変数である。したがって、HR_{theo} に対する HR_{exp} の比は、標準代謝率に対する群集の相対的な代謝率 (RCM: Relative Community Metabolism) を示す。ここで、RCM を一般的に次のように定義する：

$$RCM = \text{実際の群集代謝率} / \text{基準となる群集の代謝率} \dots\dots\dots(3.8)$$

RCM は様々な生物群に適用可能である。例えば、微生物の RCM や、ワムシ、甲殻類、魚類、藻類などである。基準となる群集の代謝率は、標準代謝率または基礎代謝率の実験値であることが望ましいが、本研究では個々の生物の呼吸量を実験的に求めることが難しかったため、次式で示すように体の大きさから求めた呼吸量で代用した。

$$RCM = HR_{exp} / HR_{theo} \dots\dots\dots(3.9)$$

3.3.9. 統計解析

対照群と実験群の間の有意差の検定は、Tukeyの多重比較を用いてR (version 2.10)で行った。マイクロコズムの自然変動があることと、環境保護的な観点から、90%の信頼度で検定を行った (Hoenig and Heisey, 2001)。

3.4. 結果と考察 1：OTC 濃度の変化

Fig. 3.4.1 に OTC 濃度の経時変化を示した。OTC の定量限界はおよそ $5 \mu\text{g/L}$ であった。OTC の初期値は設定濃度の 10% の誤差以内に取まっており、適切に N-system に添加されていた。70–7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では OTC が一次反動的に減少する様子が観察できた。半減期は、7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では 2.4 ± 0.23 日、700 $\mu\text{g/L}$ 添加系では 2.14 ± 0.03 日、70 $\mu\text{g/L}$ では 2.66 ± 0.18 日であった。Naturally derived 型の水系野外マイクロコズムでの OTC の半減期は 3 日未満 (Wilson, *et al.*, 2004)、自然の池を模した水系準野外マイクロコズムにおける OTC の半減期は 1.02–2.74 日

(Sanderson *et al.*, 2005) と報告されており、本実験の結果はこれらの報告とほぼ一致する。

一次反動的に減少する化合物は、二次反動的に減少する化合物よりも残存性が低い。

そのため、ごく一時的で濃度がある程度低ければ、汚染自体は一時的なもので収まると考えられる。ただし、一時的な汚染であっても、生体またはシステムとして不可逆的な影響が出ている場合にはこの限りではない。

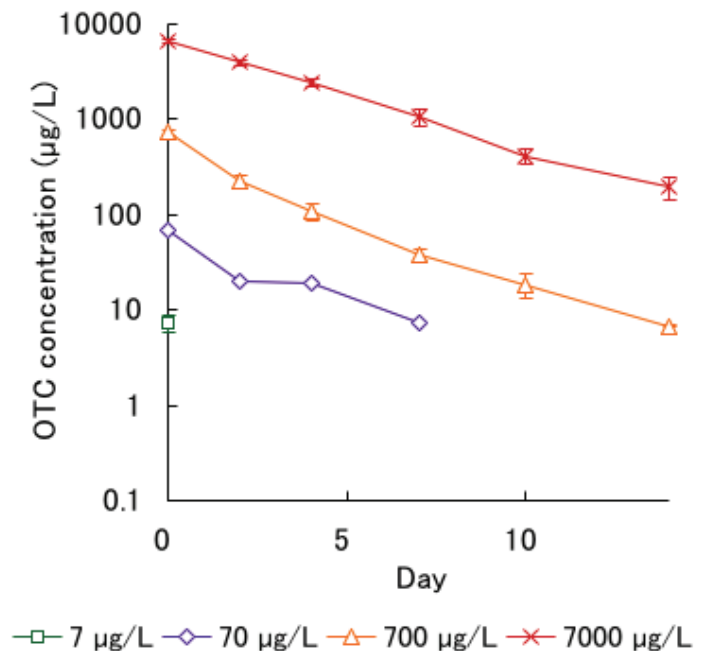


Fig. 3.4.1 OTC 濃度の経日変化：縦軸 (OTC 濃度) は対数目盛である。エラーバーは標準偏差を示している。定量限界はおよそ $5 \mu\text{g/L}$ であった。70–7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では OTC が一次反動的に減少している。半減期は、7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では 2.4 ± 0.23 日、700 $\mu\text{g/L}$ 添加系では 2.14 ± 0.03 日、70 $\mu\text{g/L}$ では 2.66 ± 0.18 日であった。

3.5. 結果と考察 2：生物量への影響

3.5.1. 動物への影響

各動物個体群への OTC の影響を Fig. 3.5.1 に示した。*Philodina* sp.には OTC の影響は観察されなかった。*A. hemprichi* は 7000 $\mu\text{g/L}$ において、統計的に有意に、大きく減少した。*Cyclidium* sp. も 7 $\mu\text{g/L}$ 以上で有意に大きく減少した。実験期間を通じて、これらの生物は対照群よりも生物量が少ないままであった。

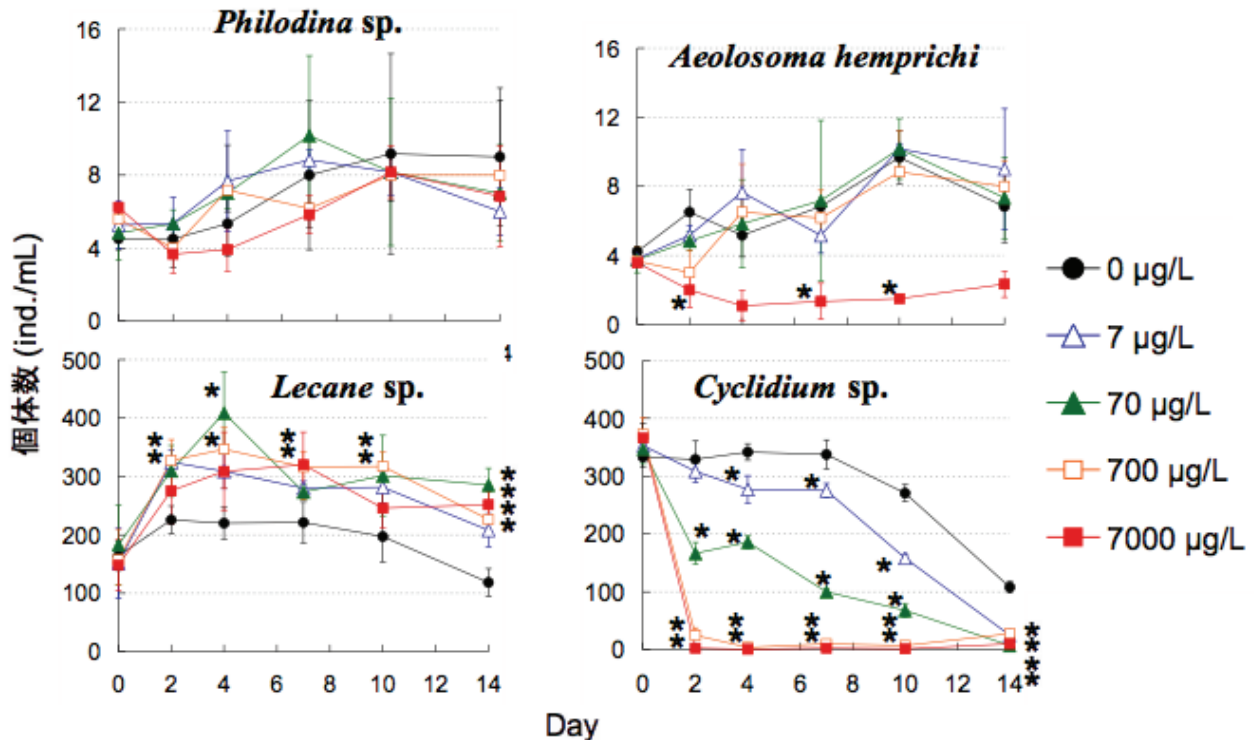


Fig. 3.5.1 OTC 添加後の動物の生物量の経日変化：エラーバーは標準偏差を示し、アスタリスク (*) は対照群に対して統計的に有意な差があることを示している (信頼度 90%)。*Philodina* sp.の個体数には OTC の影響が見られなかった。*A. hemprichi* は 7000 $\mu\text{g/L}$ の OTC で大きく減少している。*Cyclidium* sp. は濃度依存的に個体数が減少しており、特に 700–7000 $\mu\text{g/L}$ では生物量が激減している。一方、*Lecane* sp. は 70–700 $\mu\text{g/L}$ において測定期間を通じて対照群よりも生物量が多く、OTC 添加 14 日後の時点では 7 $\mu\text{g/L}$ 以上の全ての添加系で対照群よりも有意に個体数が多かった。

テトラサイクリン系抗生物質は抗菌スペクトルの広い抗生物質であり、原核生物の 30S リボソームサブユニットに結合する。テトラサイクリンはマラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のミトコンドリアに 1 μM (444.4 $\mu\text{g/L}$) で作用することが知られ (Kiatfuengfoo *et al.*, 1989)、同じテトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンも *P. falciparum* のミトコンドリアに作用することが知られている (Lin *et al.*, 2002)。また、テトラサイクリンは繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* のリボソームに結合して >100 μM で増殖を阻害することが確認されている (Hallberg and Wilson, 1981)。>3000 mg/kg とかなり高濃度の条件ではあるが、原生動物だけでなく *A. hemprichi* と同じ貧毛類の *Enchytraeus crypticus* と *Aporrectodea caliginosa* でも OTC によって負の影響を受け

ることが報告されている (Baguer *et al.*, 2000)。

添加 2 日後には 7 $\mu\text{g/L}$ 以上において、*Cyclidium* sp. は減少したが、*Lecane* sp. は対照群の約 1.5 倍まで増加したのは、*Lecane* sp. と *Cyclidium* sp. はともに細菌食性の動物であるため、*Cyclidium* sp. が減少したことによって *Lecane* sp. が空いた分のニッチを埋める形で増加したと考えられた。

顕微鏡観察をしていると、*Cyclidium* sp. は主に藻類などの他の生物の間を泳ぎ回っていることが多く、泳ぎながらプランクトン性細菌を捕食したり、アミノ酸などの溶存態の栄養源を接種したりしていると考えられる。まれに、藻類の塊の中に迷い込む形で、付着性細菌などもある程度捕食可能ではないかと考えられるが、ほとんどは自由に遊泳している。

一方 *Lecane* sp. は、プランクトン性細菌も捕食できると考えられるが、主に藻類などの塊に趾 (あしゆび) で体を固定して

藻類の表面をこそげ取るように表面に付着した何かを捕食している様子がよく観察される

(Fig. 3.5.2)。基本的には口の中に入るサイズのものは何でも食べていると考えられる。従って、藻類の塊に付着している分泌物や、藻類表面で増殖している細菌、デトリタス、口に入る程度の大きさの藻類などを食べていると考えられる。ただし、胃の内部が緑色をしているところをほとんど観察できないことから、主たる栄養源は細菌であると考えられ、*Lecane* sp. は細菌食性であると言える。

以上のように、*Cyclidium* sp. と *Lecane* sp. はともに細菌食性でありながら、

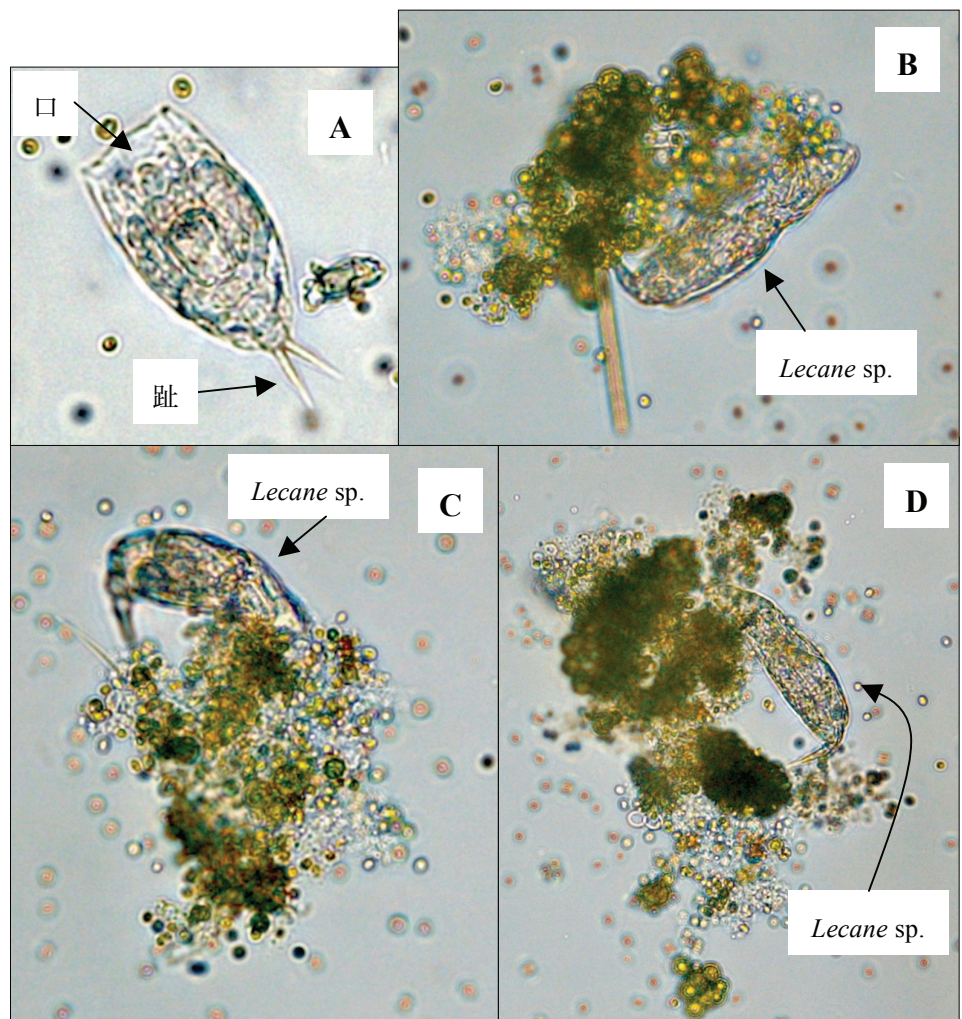


Fig. 3.5.2 *Lecane* sp. の摂食行動の様子: 保存培養しているマイクロゾウムからサンプルを取り出し、位相差顕微鏡 (200 倍) で観察した。静止中のワムシ *Lecane* sp. (A) と、尾のように見える趾 (あしゆび) で藻類の塊に付着し、藻類の表面をこそげ取るように何かを食べている *Lecane* sp. (B–D) を示す。基本的には口の中に入るサイズのものは何でも食べていると考えられる。従って、藻類の塊に付着している分泌物や、藻類表面で増殖している細菌、デトリタス、口に入る程度の大きさの藻類などを食べていると考えられる。

Cyclidium sp.はプランクトン性細菌を主食とし、*Lecane* sp.は付着性細菌を主食としつつプランクトン性細菌も捕食していると考えられる。つまり、*Cyclidium* sp.が減少したために、*Lecane* sp.がプランクトン性細菌をそれまでよりも多く捕食することで、生物量を増加させたと考えられる。

ただ、付着性細菌の捕食を得意とする *Lecane* sp.が *Cyclidium* sp.のニッチを完全に補うことはおそらくできず、そのために、*Cyclidium* sp.が濃度依存的に減少しているにもかかわらず *Lecane* sp.の増加は濃度依存的ではないのではないかと考えられる。また、7000 µg/Lにおいて *A. hemprichi* が減少したように、OTC に負の影響も同時に受けている可能性も考えられる。この場合は、*Lecane* sp.はニッチの拡大という利点とともに OTC の悪影響も同時に受けているために、これらのバランスによってこのような現象が起こっている可能性も考えられる。

3.5.2. 藻類への影響

OTC の Chl *a* と *b* への影響を Fig. 3.5.3 に示した。10 日に对照群の Chl *b* が減少しているために全ての添加系において对照群よりも Chl *b* 濃度が有意に高くなっているが、OTC 添加系では影響がなく、对照群が一時的に減少してしまっているため、これは分析上のトラブルが原因に起因するのか、本当にそうなのかは判断できない。Chl *a* も 10 日に全体的に減少していることと何らかの関係があるようにも考えられるが、10 日後の時点でのデータは判断材料には使わないことにする。

Chl *a* は、7–700 µg/L において、对照群に比べて増加し続け最終的に对照群の 1.2 倍まで増加し

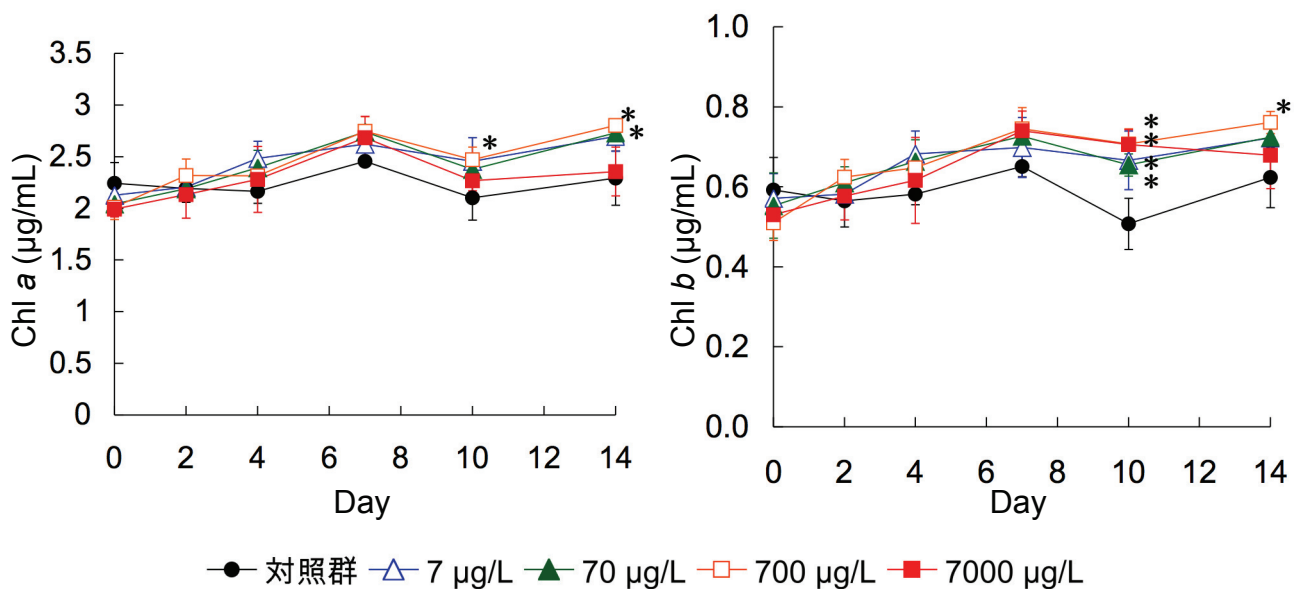


Fig. 3.5.3 OTC 添加後の Chl *a* と Chl *b* の経日変化: エラーバーは標準偏差を示し、アスタリスク(*)は对照群に対して統計的に有意な差があることを示している (信頼度 90%)。Chl *a* が 70–700 µg/L で 14 日後に对照群よりも統計的に有意に高い値を示している。Chl *b* は 10 日に对照群に比べて全ての濃度区で有意に高い数値が出たが、对照群における Chl *b* 濃度はこの日だけ下がってしまっているため、原因は分からないが測定上のトラブルによる可能性が否定できないため、今後の考察には使用しない。14 日には对照群が基の水準に戻っているため正しく測定できていると考えられる。Chl *b* が 700 µg/L で 14 日後に对照群よりも統計的に有意に高い値を示している。

た。14日後には、70–700 µg/L で Chl *a* が対照群よりも統計的に有意に増加した。7000 µg/L でも7日後には一時的に対照群の 1.1 倍まで増加したが、その後減少に転じて、14日後には対照群と同程度となった。同様に、Chl *b* も Chl *a* と同様の傾向を示した (Fig. 3.5.3)。Chl *b* は、7–700 µg/L において、対照群に比べて増加し続け最終的に対照群の 1.2 倍まで増加し、7000 µg/L でも7日後には一時的に対照群の 1.1 倍まで増加したが、その後減少に転じて14日後には対照群と同程度となった。700 µg/L において、14日に対照群よりも有意に増加した。Chl *a* は全藻類を、Chl *b* は緑藻を反映しているので、以上の結果から、緑藻も藍藻も同様に影響を受けたと言える。

このようなプラスの効果は、藍藻 *Synechocystis* sp. とウキクサ *Lemna minor* でも、それぞれ 1000µg/L と 1–10 µg/L で観察されている (Potami *et al.* 2004)。150 µM (66.6 mg/L) 未満の低濃度のテトラサイクリンで、ほうれん草の葉緑体における光リン酸化と P/O 比が向上したという Dong and Wei (2004) の報告があることから、これらのプラスの効果は OTC によって葉緑体の ATP 合成酵素 CF₁ が活性化されたことに起因すると考えられる。本実験では 70–700 µg/L でプラスの効果が生じたが、この影響が生じる濃度が、藍藻 *Synechocystis* sp. とウキクサ *L. minor*、ほうれん草の葉緑体でそれぞれ異なることから、かなりの程度、種差があると考えられる。

Chl *a* は、7000 µg/L では対照群と同水準まで低下している。これは OTC による ATP 合成酵素 CF₁ が活性化を打ち消す何らかの影響が現れたためであると考えられる。ミトコンドリアだけでなく、葉緑体も原核生物と類似したリボソーム RNA を持っていることから、ミトコンドリアと同様に悪影響を受けたと考えられる。

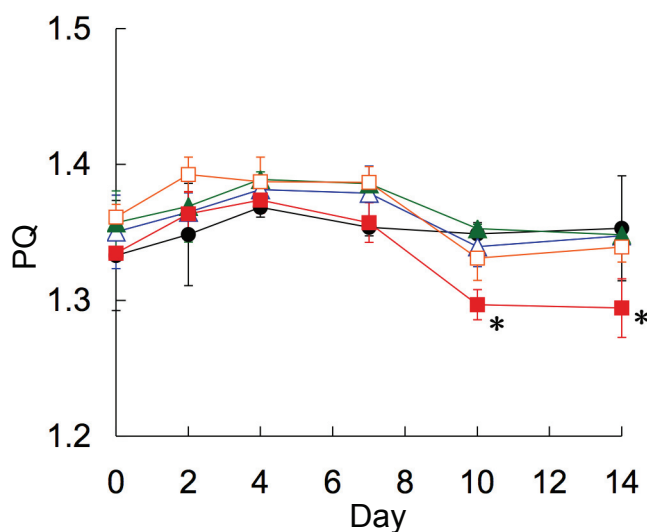


Fig. 3.5.4 OTC 添加後の PQ の経日変化：エラーバーは標準偏差を示し、アスタリスク (*) は対照群に対して統計的に有意な差があることを示している (信頼度 90%)。PQ はクロロフィルの変性具合の指標で、ストレスなどによって PQ が低下する。7000 µg/L で 10–14 日に PQ が有意に低下している。

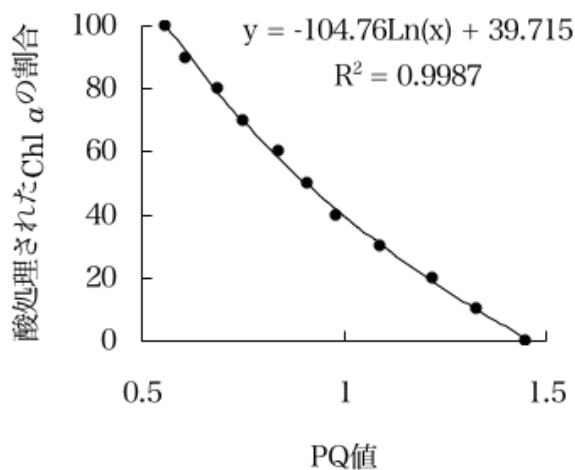


Fig. 3.5.5 フェオフィチンの割合と PQ 値の関係：酸処理された Chl *a* とはフェオフィチンの事を示している。Ronen and Galun (1984) に掲載されているデータから、フェオフィチンの割合と PQ 値を散布図として表し、指数関数に近似することでフェオフィチンの割合と PQ 値の関係式を求めた。

次に、OTC の PQ への影響を Fig. 3.5.4 に示した。PQ 値が 7000 $\mu\text{g/L}$ で低下していることは、70–700 $\mu\text{g/L}$ では Chl *a* にプラスの効果が現れていたのに、7000 $\mu\text{g/L}$ では対照群と同程度まで減少していることを裏付けている。PQ 値はクロロフィルからマグネシウムが抜けて生じるフェオフィチンが、クロロフィルとフェオフィチンの合計に比べてどれくらいあるかを反映した値で、数値が小さくなるとフェオフィチン化が進んでいることを示す (Fig. 3.5.5)。クロロフィルを人工的にフェオフィチン化させるには、酸処理をして Mg を抜けば良い。生体内においては、クロロフィルはストレスによってフェオフィチン化することが知られている (Lopez *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 1999; Megateli *et al.*, 2009) ので、PQ 値の低下は、ストレスなどに起因してクロロフィルからマグネシウムが遊離し、フェオフィチン化していることを示している。PQ 値から Fig. 3.5.5 の関係式に基づいて計算すると、OTC 7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では、およそ 5% のクロロフィルがフェオフィチン化しており、僅かではあるが有意にストレスを受けていることが分かる。

3.5.3. 細菌への影響

生菌数に影響が現れていないことから、細菌群集全体としては影響を受けていないと言える (Fig. 3.5.6)。2–7 日において、70 $\mu\text{g/L}$ 以上で OTC 耐性細菌数が有意に増加した (Fig. 3.5.6)。細菌群集全体の数の変化にはほとんど影響はないのは、OTC 耐性細菌数は生菌数の 1% に満たないためであると考えられる。本マイクロコズムを用いて遺伝子組み換え微生物の動態を観察した既往研究 (Murakami *et al.*, 1992; Inamori *et al.*, 1992) があり、外来微生物の影響の評価が可能であるこ

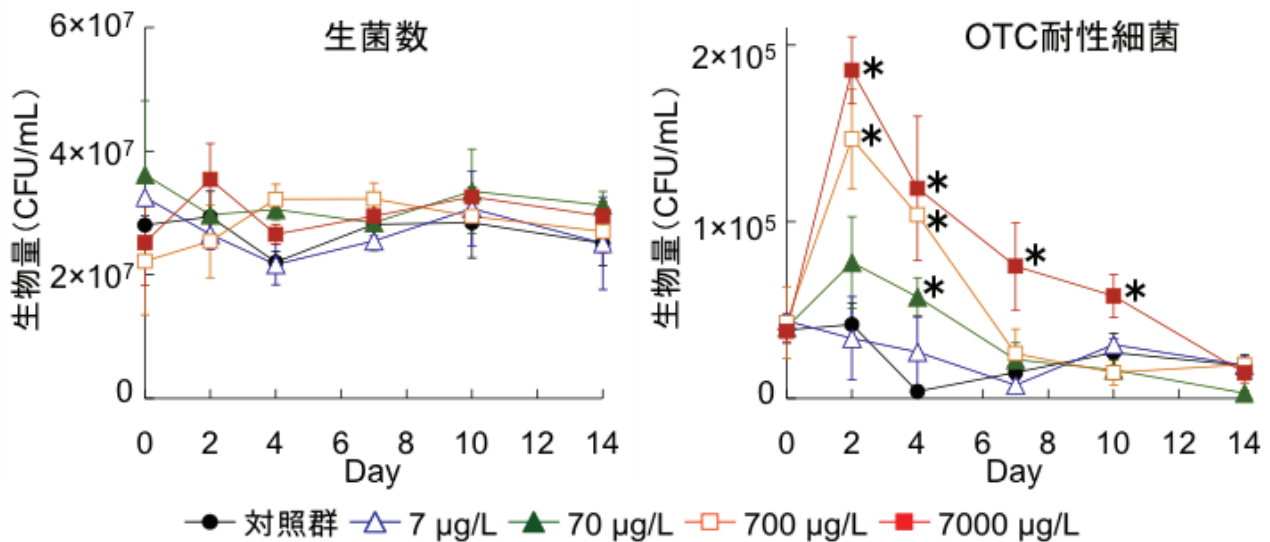


Fig. 3.5.6 生菌数と OTC 耐性細菌への OTC の影響: PY 寒天培地上にコロニーを形成する生菌数と、PY 寒天培地に 25 mg/L の OTC を加えた寒天培地にコロニーを形成する OTC 耐性細菌について、マイクロコズムに OTC を添加後の生物量の変化を示す。エラーバーは標準偏差を示し、アスタリスク (*) は対照群に対して統計的に有意な差があることを示している (信頼度 90%)。生菌数には OTC の影響が見られない。OTC 耐性細菌は 70 $\mu\text{g/L}$ 以上で対照群より有意に増加している。OTC 耐性細菌の数は 70–7000 $\mu\text{g/L}$ では OTC 添加 2 日後にピークとなり、その後 14 日後までに全ての濃度区で対照群と同程度まで減少した。OTC 耐性細菌の減少は OTC 濃度の低下と関係があると考えられる。

とは示されていたが、N-system の中に薬剤耐性菌が存在し、薬剤耐性菌の出現を定量的に評価可能であることは本研究で初めて明らかになった。OTC 耐性細菌は 2 日目に急激に増加したが、その後減少して、14 日後には全ての設定濃度区で対照群と同じ水準まで減少した。この減少は OTC 濃度の低下 (Fig. 3.4.1) と関係があると考えられるので、OTC 耐性細菌が有意に増加した 70–7000 $\mu\text{g/L}$ について、OTC の実測値と OTC 耐性細菌数の関係を示した (Fig. 3.5.7)。

70 $\mu\text{g/L}$ ではデータ数が少なく、OTC 濃度および OTC 耐性細菌数の幅が小さいため、決定係数 (R^2) は 0.574 とやや小さいが、相関係数にすれば 0.758 であり OTC 濃度と OTC 耐性細菌数の

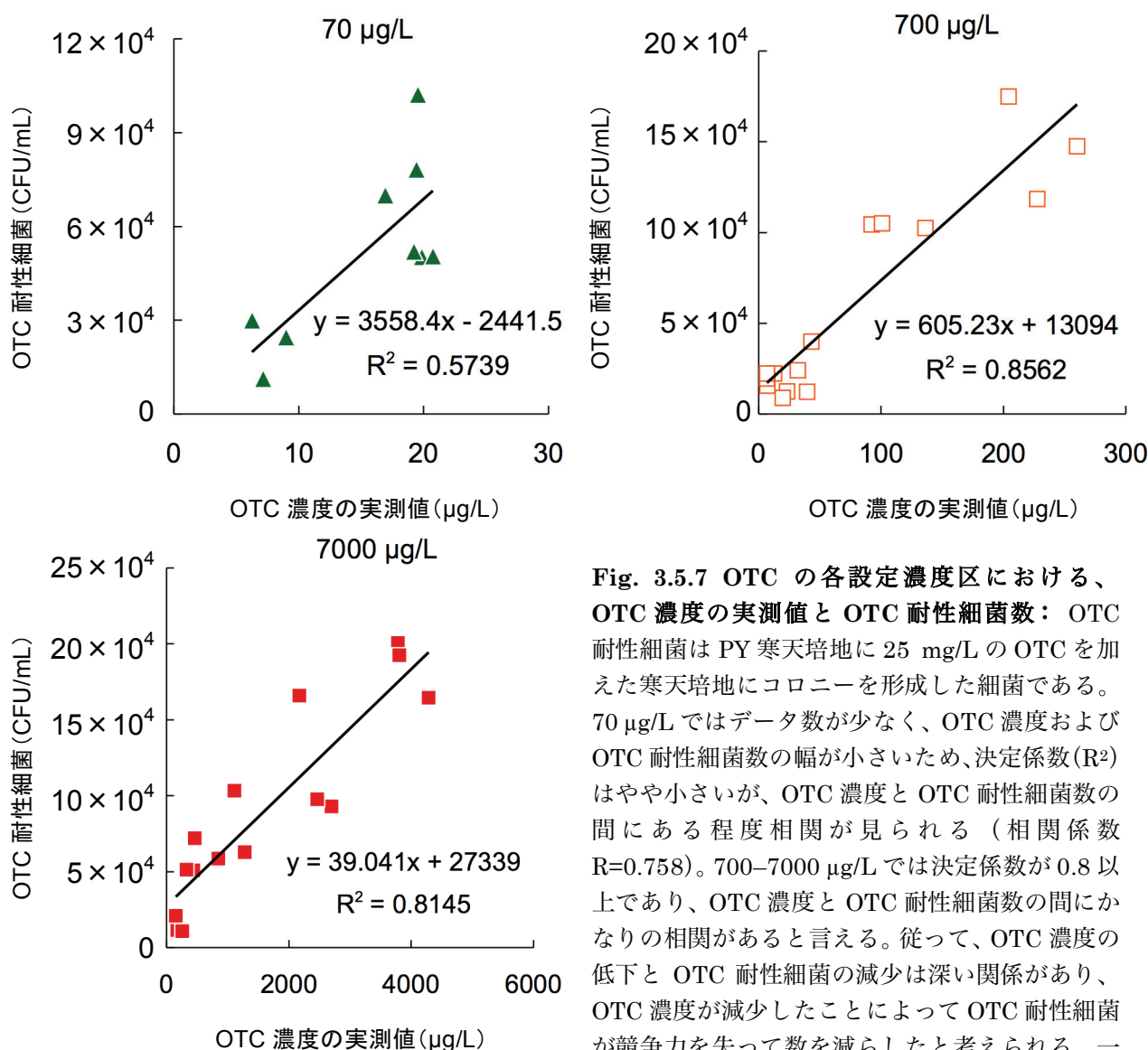


Fig. 3.5.7 OTC の各設定濃度区における、OTC 濃度の実測値と OTC 耐性細菌数：OTC 耐性細菌は PY 寒天培地に 25 mg/L の OTC を加えた寒天培地にコロニーを形成した細菌である。70 $\mu\text{g/L}$ ではデータ数が少なく、OTC 濃度および OTC 耐性細菌数の幅が小さいため、決定係数 (R^2) はやや小さいが、OTC 濃度と OTC 耐性細菌数の間にある程度相関が見られる (相関係数 $R=0.758$)。700–7000 $\mu\text{g/L}$ では決定係数が 0.8 以上であり、OTC 濃度と OTC 耐性細菌数の間にかかなりの相関があると言える。従って、OTC 濃度の低下と OTC 耐性細菌の減少は深い関係があり、OTC 濃度が減少したことによって OTC 耐性細菌が競争力を失って数を減らしたと考えられる。一方、近似曲線 (最小二乗法、線形近似) の傾きが各濃度で大きく異なる。OTC 濃度に反比例するように、OTC 濃度が一桁増える毎に傾きが一桁小さくなっている。濃度毎に、OTC 濃度と OTC 耐性細菌群集の関係性が異なっていると言える。

間に比較的強い相関があるといえる。700–7000 $\mu\text{g/L}$ では決定係数が 0.8 以上であり、OTC 濃度と OTC 耐性細菌数の間に強い相関があると言える。従って、OTC 濃度の低下と OTC 耐性細菌の減少は深い関係があり、OTC 濃度が減少したことによって OTC 耐性細菌が競争力を失って数を減らしたと考えられる。一方、近似曲線（最小二乗法、線形近似）の傾きが各濃度で大きく異なっており、OTC の設定濃度に反比例するように、OTC 濃度が一桁増える毎に傾きが一桁ずつ小さくなっている。濃度毎に、OTC 濃度と OTC 耐性細菌群集の関係性が異なっていると言える。

そこで、Fig. 3.5.7 を 1 つのグラフにまとめた (Fig. 3.5.8)。設定濃度区毎にデータポイントがクラスター化しており、明らかに、OTC 濃度と OTC 耐性細菌群集の関係性が異なっていることが分かる。しかも、200 $\mu\text{g/L}$ 付近と 20 $\mu\text{g/L}$ 付近で、7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系と 700 $\mu\text{g/L}$ 添加系および 700 $\mu\text{g/L}$ 添加系と 70 $\mu\text{g/L}$ 添加系の OTC 耐性細菌数が二重になっている。しかも、二重になっている区間では、それぞれ高濃度添加系の方が低濃度添加系よりも OTC 耐性細菌数が少なくなっている。単純に OTC 濃度依存的に OTC 耐性細菌数が変化するのであれば、全てのデータポイントがほぼ一直線上に乗るはずであり、例えば 7000 $\mu\text{g/L}$ になるように OTC を添加した系で OTC が減少していく過程で 700 $\mu\text{g/L}$ 程度まで減少した場合、700 $\mu\text{g/L}$ になるように OTC を添加した系とほぼ同じ OTC 細菌数になるはずである。これはヒステリシス現象であると考えられる。つまり、初期の OTC 濃度が違うことにより、OTC 濃度と OTC 耐性細菌数の間の関係に違いが生じたというこ

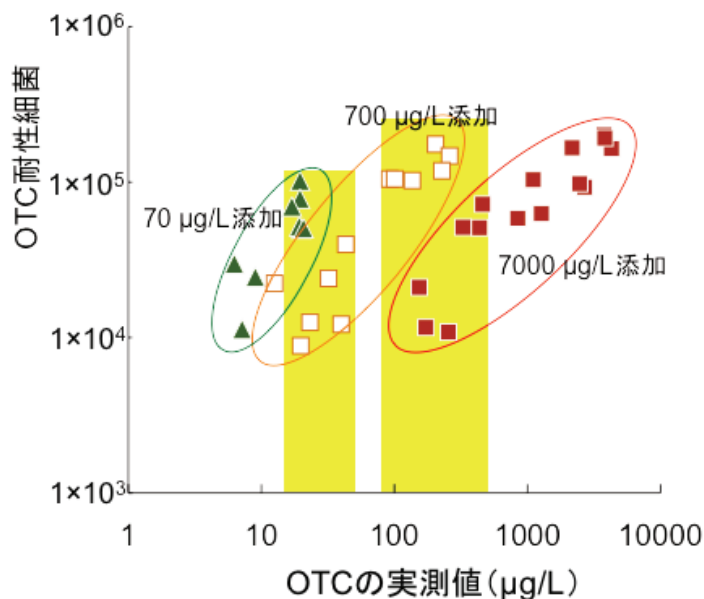


Fig. 3.5.8 OTC 濃度の実測値と OTC 耐性細菌数： Fig. 3.5.2 の 3 つのグラフを 1 つのグラフにまとめた。ただし、OTC をマイクロゾウムに添加した後、OTC 耐性細菌数がピークに達してから対照群程度に減少するまでの期間の OTC 濃度の実測値と OTC 耐性細菌数をプロットした。つまり、70 $\mu\text{g/L}$ については OTC 添加後 2–7 日後まで、700 $\mu\text{g/L}$ については 2–10 日後まで、7000 $\mu\text{g/L}$ については 2–14 日後までである。縦軸と横軸は対数目盛とした。設定濃度区毎にデータポイントがクラスター化しており、明らかに、OTC 濃度と OTC 耐性細菌群集の関係性が異なっている。しかも、200 $\mu\text{g/L}$ 付近と 20 $\mu\text{g/L}$ 付近（黄色で示した区間）で、7000 $\mu\text{g/L}$ 添加系と 700 $\mu\text{g/L}$ 添加系および 700 $\mu\text{g/L}$ 添加系と 70 $\mu\text{g/L}$ 添加系の OTC 耐性細菌数が二重になっており、それぞれ高濃度添加系の方が低濃度添加系よりも OTC 耐性細菌数が少なくなっている。これは OTC の初期値に依存したヒステリシス現象であると考えられる。

とである。この違いは、添加初期において何らかの現象が起こり、それが後々まで影響していることに由来する。

Eagle *et al.* (1952) は、1つのコロニーの中でも抗生物質に対する耐性にばらつきがあることと、抗生物質を含む寒天培地に生育したコロニーも含まない培地で生育したコロニーもばらつきの程度は同じであるが、より高濃度の抗生物質を含む培地で生育したコロニーの方が、より高い薬剤耐性を持った細菌を含んでいることを示した。つまり、致死量（全ての菌が死ぬ濃度）よりも低い濃度に晒されると、薬剤耐性細菌群集の中の薬剤耐性の分布がより高い方にシフトするということがある。しかも、致死量以下の範囲で、より高濃度に晒されたときほど、薬剤耐性の分布がより高い方にシフトする。したがって、今回の実験においても、7µg/Lと、70 µg/L、700 µg/L、7000 µg/Lでは薬剤耐性の分布が異なり、濃度が高いほど薬剤耐性の分布が高い方にシフトしていると考えられる。

一般に、薬剤耐性を持つことは生物学的にコストがかかる事が知られており、耐性が強いほどそのコストがかかり、競争力が弱い傾向があると考えられる。したがって、70 µg/Lで出現した OTC 耐性細菌よりも 700 µg/Lで出現した OTC 耐性細菌の方が、700 µg/Lで出現した OTC 耐性細菌よりも 7000 µg/Lで出現した OTC 耐性細菌の方が本来持っている競争力は弱く、生物量を高く維持するためにはより高濃度の OTC を必要となると考えられる。つまり、薬剤耐性と競争力には逆相関があると考えられる。

OTC の添加から OTC 耐性細菌が最も増加するまでの過程で、各 OTC 濃度に応じて異なる薬剤耐性の分布が形成され、その薬剤耐性の分布が実験期間中には変わらなかったと仮定すると、より高い濃度区で出現した OTC 耐性細菌は高濃度の OTC がなければ競争力を維持できないが、より低い濃度で出現した OTC 耐性細菌はそれほど OTC 濃度が高くなっても競争力が維持できると考えられる。したがって、例えば 7000 µg/L で増加した OTC 耐性細菌群集は、高濃度の OTC がなければ競争力が維持できず、200 µg/L まで OTC が減少してしまうともう対照群と同じくらいまで生物量を減らしてしまうが、700 µg/L で増加した OTC 耐性細菌群集は OTC 濃度が 200 µg/L 程度まで減ってもまだ競争力をある程度維持できているために、7000 µg/L で増加した OTC 耐性細菌よりも生物量を高く維持できているのではないかと考えられた。

3.5.4. 用量反応関係

用量反応曲線として表すことによって、濃度と影響の関係を明らかにし、無影響濃度 (NOEC) を明確に見ることができる。用量反応曲線とは、横軸に化学物質の負荷量を、縦軸に生物量などの指標をとることで、負荷量に対する各指標の応答関係を明らかにすることができるものである。OTC の設定濃度と動物および細菌、藻類 (Chl *a*&*b*) の生物量の関係を Fig. 3.5.9 から Fig. 3.5.11 に示した。急性影響 (Fig. 3.5.9) は 2–4 日の、亜急性影響 (Fig. 3.5.10) は 7–10 日のデータを合わせて解析した。慢性影響 (Fig. 3.5.11) は 14 日のデータをそのまま使用した。

急性影響から慢性影響まで全ての期間で、NOEC は *A. hemprichi* では 700 µg/L、*Lecane sp.* と

Cyclidium sp.では7µg/L未満で、OTC耐性細菌では7µg/Lであることが読み取れる。*Philodina* sp.と生菌数にはどの時点でも影響がなかった。Chl *a*のNOECは7 µg/Lで、Chl *b*のNOECは70 µg/Lであった。最も感受性の高い *Cyclidium* sp.の無影響濃度を採用すると、このマイクロコズムとしての無影響濃度は7 µg/L未満であるといえる。急性と、亜急性、慢性影響で、多くはその傾向に差がなかったが、OTC耐性細菌だけは時間が経過してOTCが分解されることで生物量を減少させていったため、急性影響が強く、亜急性影響は弱く、慢性影響はないという結果になった。

このNOECはこれまでの単種培養におけるNOECよりも低い。これまでは抗生物質にほとんど影響を受けないような、藻類や魚類、甲殻類などで影響評価されてきたが、原生動物のようなこれまでに試験に使われてこなかった生物が含まれていたためであると考えられる。

環境中でのOTC濃度は0.1 µg/L未満であることが多く、この程度であれば生態系の影響はないと考えられるが、場合によっては100 µg/Lに近い濃度で一定期間継続して検出されることもあるため、このような場合は高い確率で一部の生物に影響が出ていると考えられる。

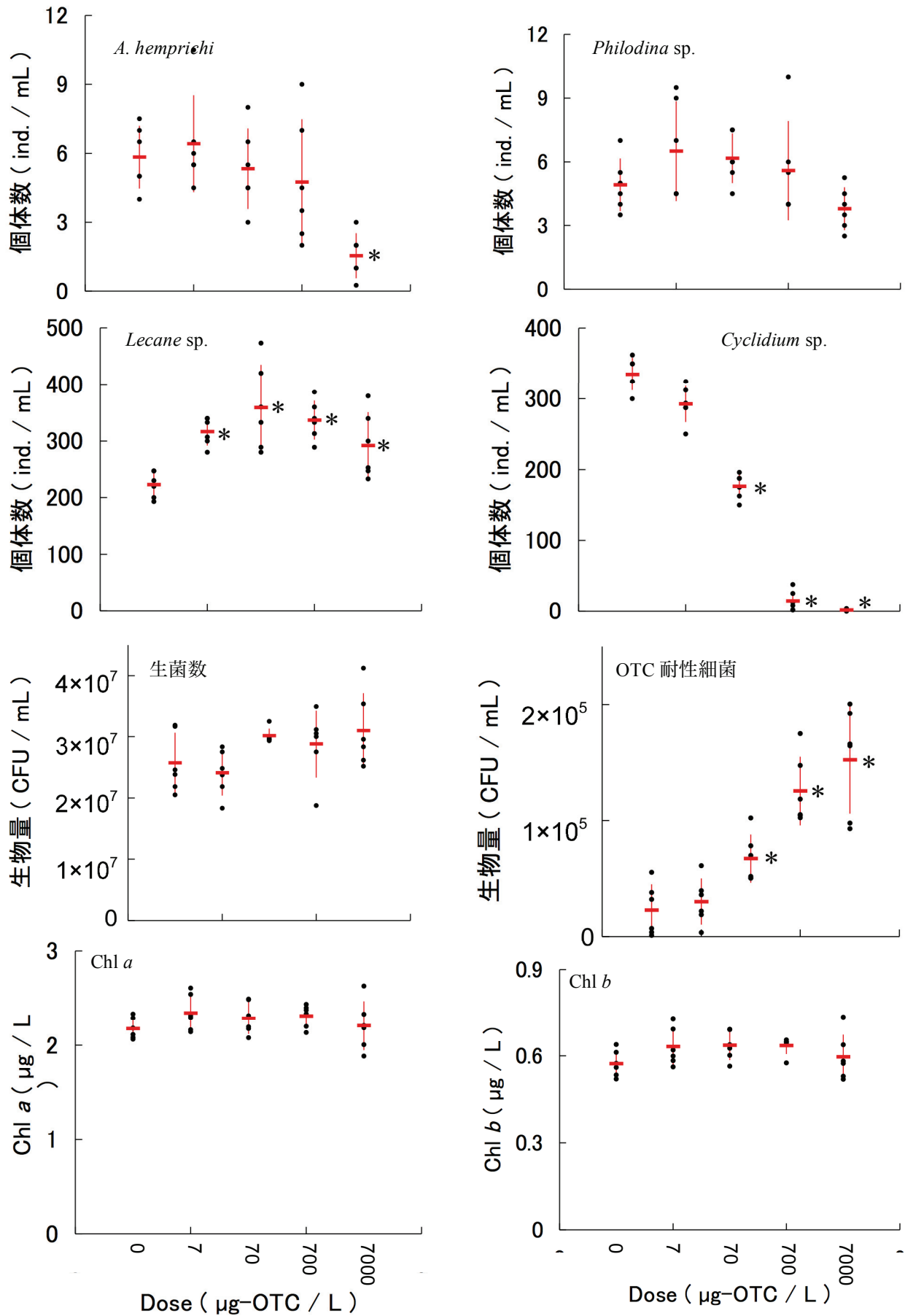


Fig. 3.5.9 OTC の動物と細菌、クロロフィルへの急性影響 (2-4 日)

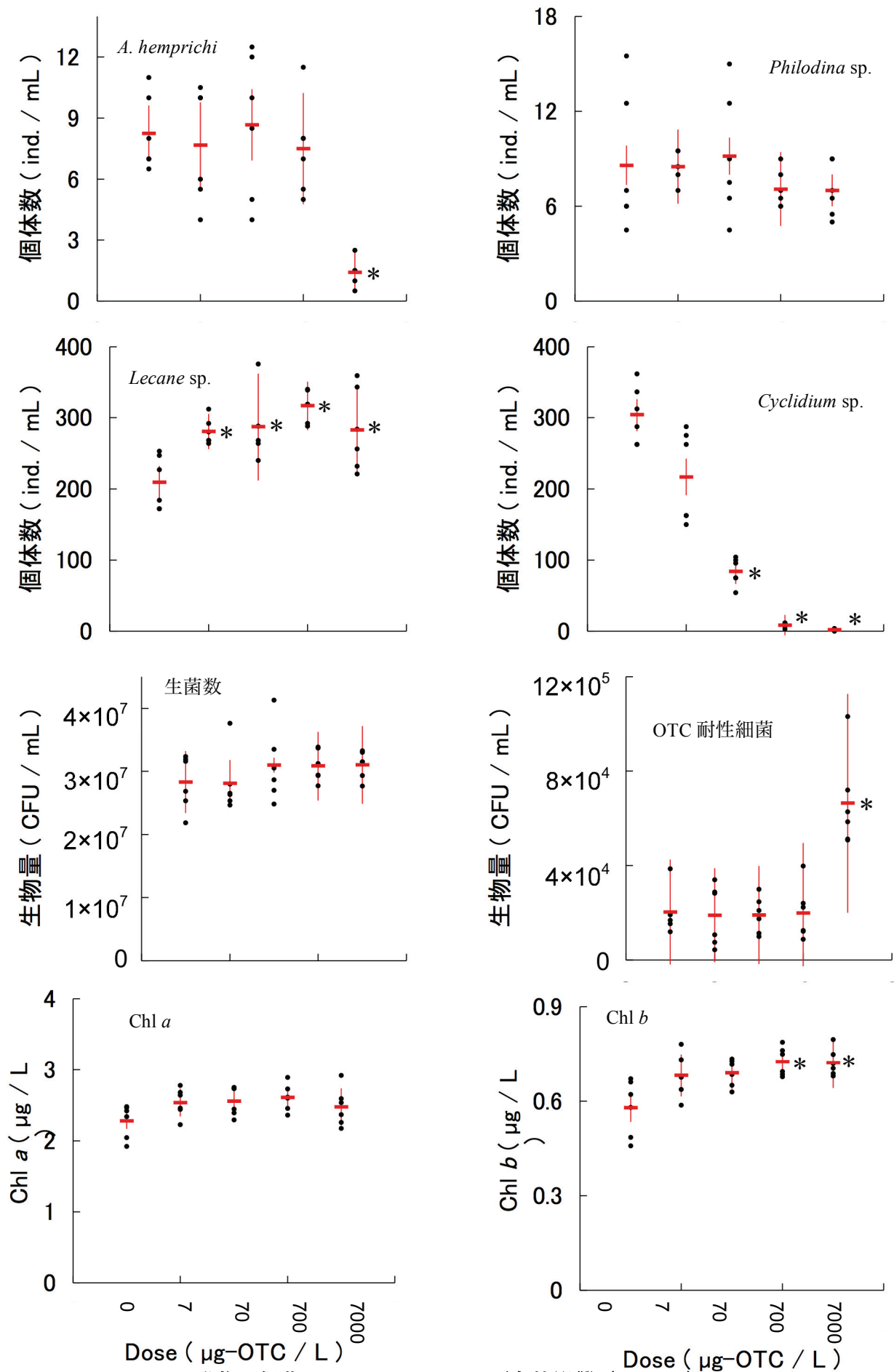


Fig. 3.5.10 OTC の動物と細菌、クロロフィルへの亜急性影響 (7-10 日)

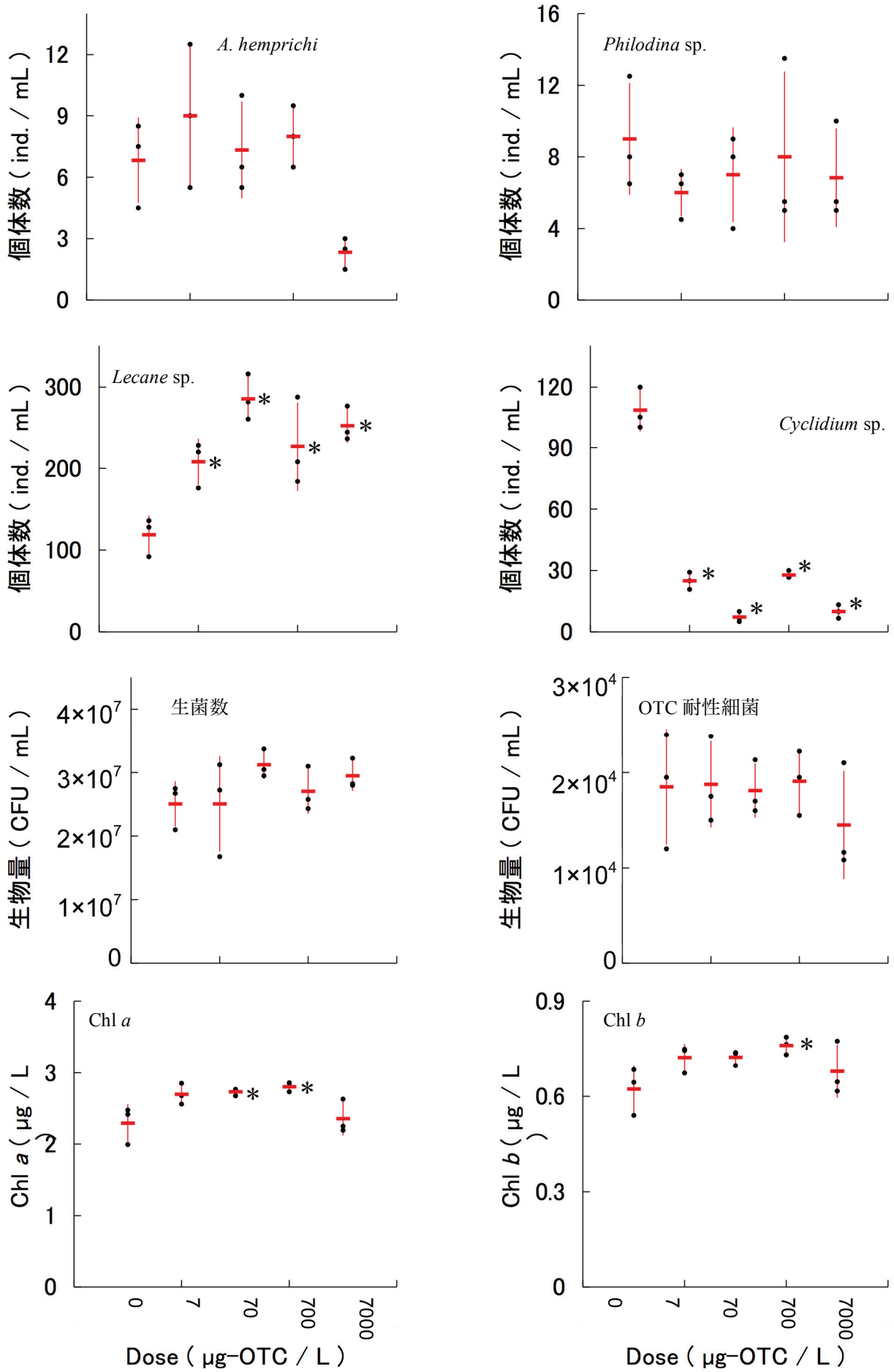


Fig. 3.5.11 OTC の動物と細菌、クロロフィルへの慢性影響 (14 日)

3.6. 結果と考察 3：呼吸量と生産量への影響

3.6.1. DO 濃度変化

対照群の OTC 添加後 4 日間の DO 変化を Fig. 3.6.1 に示した。明期から暗期に切り替わると、速やかに DO が減少した後、平衡に達した。明期から暗期に切り替わった後の DO 変化はほぼ第 2 章で予想したとおりであった。しかし、暗期から明期に切り替わった後の DO 変化は予想に反して、暗期から明期に切り替わると速やかに DO が上昇した後、一旦減少して平衡に達した。

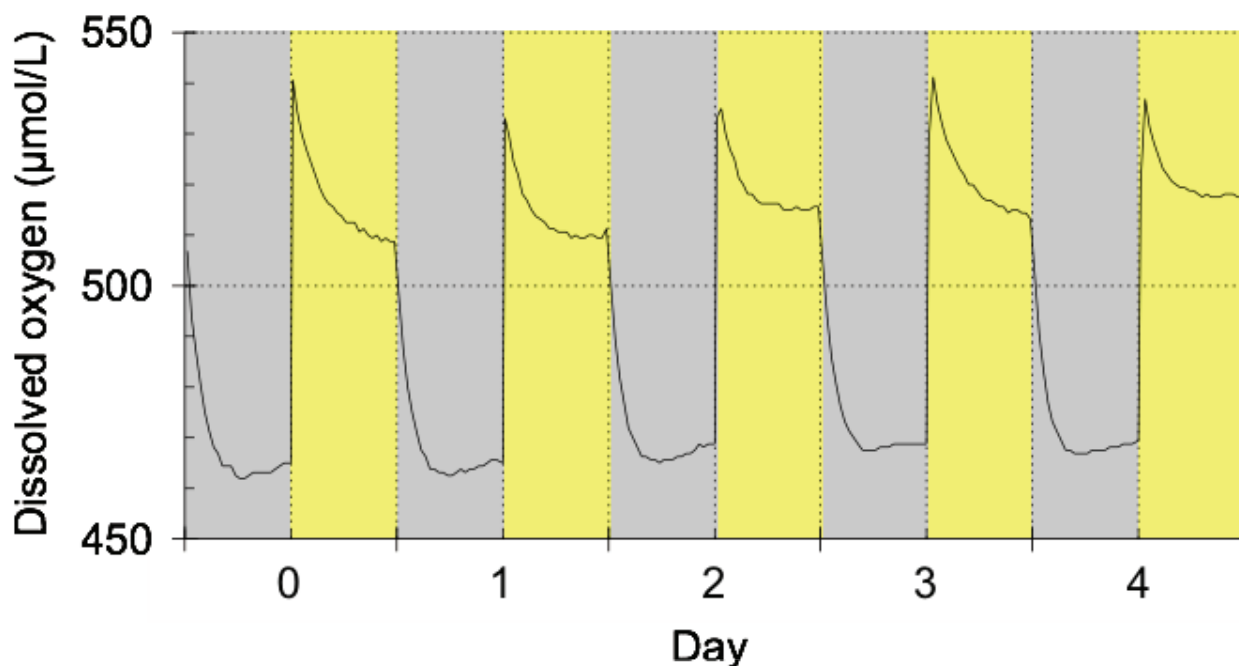


Fig. 3.6.1 対照群の OTC 添加後 4 日間の DO 変化：灰色の区間は暗期を、黄色い区間は明期を示す。明期から暗期に切り替わると、速やかに DO が減少した後、平衡に達した。暗期から明期に切り替わると速やかに DO が上昇した後、一旦減少して平衡に達した。明期における DO の減少は、光合成によって溶存態の二酸化炭素が全て消費されたために起こったと考えられる。

この明期における DO の変動は、培養液に含まれる藻類に利用可能な二酸化炭素 (CO_2 、 H_2CO_3 、 HCO_3^-) が使い尽くされたことが原因あると考えられる。二酸化炭素が消費されると pH が上昇し、溶存二酸化炭素の平衡が H_2CO_3 から、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} へと偏り、やがてほとんど CO_3^{2-} しか存在しない状態になる。こうなると、藻類は CO_3^{2-} を利用できないため、大気から CO_2 が溶け込むことで僅かに得られる CO_3^{2-} 以外の二酸化炭素を消費しなければならなくなる。

つまり、 CO_2 は水への溶解性が高いが、大気中の酸素濃度が約 20% であるのに対し、 CO_2 は 300–400 ppm (0.03–0.04%) しかないため、実際の溶解速度は遅く、光合成による CO_2 消費よりも CO_2 の溶解速度が遅いため平衡が下に移動したと考えられる。まとめると、明期初期においては二酸化炭素が十分に存在するために呼吸速度と光合成速度の間の平衡に向かって一時反動的に酸素が上昇するが、利用可能な二酸化炭素 (CO_2 、 H_2CO_3 、 HCO_3^-) が使い尽くされると光合成速

度が二酸化炭素の溶解速度に律速されて低下するために DO の平衡点が低下し、このような現象が起こったと考えられる。

3.6.2. GPP と CR への影響

Fig. 3.5.2 に OTC の GPP への影響を示した。GPP は、7–70 $\mu\text{g/L}$ では 6 日後までは減少し、その後上昇して、14 日後には対照群の約 1.1 倍まで増えた。一方、700–7000 $\mu\text{g/L}$ では実験期間を通じて GPP が減少し続け、14 日後には対照群の 84% まで減少した。ただし、統計的な有意差は得られなかった。

GPP への影響は、Chl *a* と同様に、全藻類への影響であると言える。Chl *a* は、14 日において 7–70 $\mu\text{g/L}$ で増加が見られたことから、傾向としては矛盾しない。また同様に、7000 $\mu\text{g/L}$ では PQ の低下が起こっていたため、葉緑体にストレスがかかっていたことから、やはり同様に GPP の傾向と一致する。しかし、700 $\mu\text{g/L}$ では Chl *a* は増加し、PQ の低下もなかったにもかかわらず、GPP は減少する傾向があった。ただ、Chl *a* 濃度と光合成活性との間には必ずしも相関がないことが知られているので、Chl *a* と GPP の間に矛盾があっても、現象としては起こっても不思議ではないが、PQ よりも GPP の方が感受性が高いと言うことは、ストレスの影響はまず生理現象（光合成）として現れ、その影響がある程度以上になりクロロフィルを取り囲む化学的な条件に変化を来した時にフェオフィチン化が進み PQ 値に差が出ると思われる。

Fig. 3.5.3 に OTC の CR への影響を示した。CR は 7–70 $\mu\text{g/L}$ でも一時的に減少したが、7–10 日には対照群と同程度まで回復した。一方、700–7000 $\mu\text{g/L}$ においては、7–10 日以降

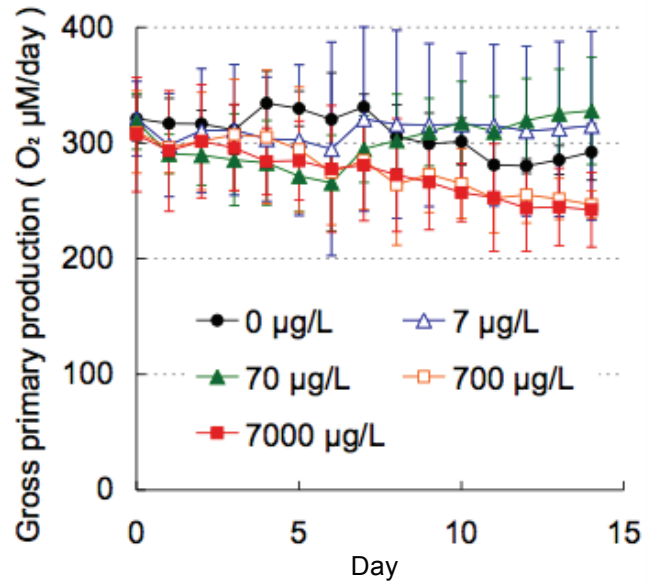


Fig. 3.5.2 OTC の GPP への影響：7–70 $\mu\text{g/L}$ において、6 日後までは減少したが、その後 14 日後までに対照群よりも僅かに高い程度まで増加した。700–7000 $\mu\text{g/L}$ においては、6 日後以降も減り続け、対照群の 84% まで減少した。しかし、どの濃度でも、統計的な有意差はなかった。

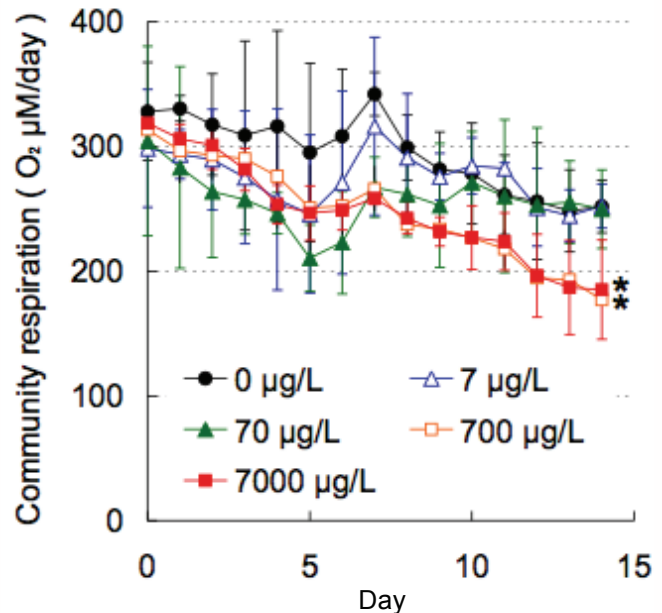


Fig. 3.5.3 OTC の CR への影響：CR は全て系で減少傾向だった。7–70 $\mu\text{g/L}$ では 5 日後までは減少したが、その後 14 日後までに対照群と同程度まで回復した。700–7000 $\mu\text{g/L}$ では 5 日後以降も減り続け、14 日後には対照群の 72% まで有意に減少した。

も CR が減少し続け、14 日後には対照群に比べて 72%まで有意に減少した。

Boleas *et al.*(2005)の、土壤微生物の呼吸量の OTC の影響についての研究で、100 mg/kg の OTC で土壤微生物の呼吸量が 16–25%まで減少したと報告している。Thiele-Bruhn and Beck (2005) も土壤微生物の呼吸量の OTC の影響について研究しており、1 $\mu\text{g/g}$ 以上の OTC によって土壤微生物の呼吸量が対照群の 80%まで減少したと報告している。

CR は対照群の 72%まで有意に減少し、GPP は対照群の 84%まで減少した（有意ではない）ことから、OTC は藻類よりも従属栄養生物に強く影響したと考えられる。これは、Chl *a* と Chl *b* には僅かに正の影響を与えたか大きな影響を与えなかったにもかかわらず、*A. hemprichi* と *Cyclidium sp.*が減少したことからもうかがえる。

3.7. 結果と考察 4：生物量と、GPP、CR の統合的解析

3.7.1. 個体数変動からの HR_{theo} の計算

生物量と、GPP、CR の変化を関連づけるために、まず、体の大きさから計算された 1 個体当たりの呼吸量 IR と生物量 *N* の変化から個体群の呼吸量を計算した。Fig. 3.7.1 に HR_{theo} における、各個体群の呼吸量の占める割合を示した。細菌群集は他の従属栄養生物よりも数桁も生物量が多いが、体が極めて小さいために IR が小さく、細菌群集の寄与率は 39%程度であった。同様に *Cyclidium sp.*も IR が小さいが、*Cyclidium sp.*の場合は体の小ささを補うほど生物量が多くないために、 HR_{theo} への寄与率は僅か 0.4%程度であった。*N*-system においては大型の生物である *A. hemprichi* と *Philodina sp.*は IR が多いが、生物量が少ないために、その寄与率は 2.3%および 2.2%と少なかった。*Lecane sp.*は中程度の IR と中程度の生物量があり、 HR_{theo} への寄与率は、条件によって 41–67%もの割合を占めた。

HR_{theo} のほとんどは細菌群集と *Lecane sp.*が占めているが、例えば 3.5.1 や 3.5.4 で *Lecane sp.* と *Cyclidium sp.*の生物間相互作用が原因とみられる *Lecane sp.*の増加が見られたように、 HR_{theo} への直接の寄与率は小さくても、生物間相互作用を通じて間接的に HR_{theo} に影響すると考えられる。

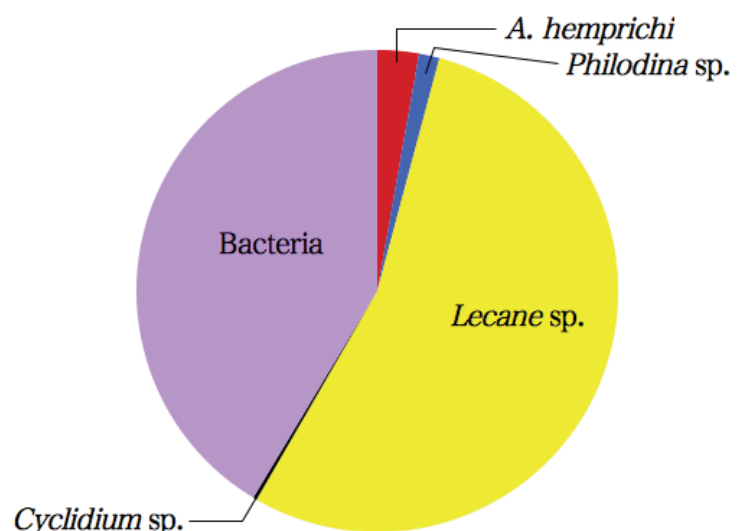


Fig. 3.7.1 対照群の 0 日後における、 HR_{theo} に占める各個体群の呼吸量の割合：IR は小さいが極めて生物用の多い細菌群集が HR_{theo} の 1/3 以上を占めている。また、IR も生物量も中程度の *Lecane sp.*が HR_{theo} の半分以上を占めている。*Cyclidium sp.*は IR が小さく、それを補うほどは生物量が多くないため、ほとんど HR_{theo} に寄与していない。*A. hemprichi* と *Philodina sp.*は IR は大きいが生体量が少ないので、やはり HR_{theo} への寄与率が低い。

そのため、 HR_{theo} への寄与率だけで判断すると細菌群集と *Lecane sp.*だけを観察しているようだが、*Cyclidium sp.*や、*Philodina sp.*、*A. hemprichi*も間接的に HR_{theo} に寄与していると言える。

3.7.2. HR_{exp} と HR_{theo} の比較

Fig. 3.7.2に HR_{exp} と HR_{theo} の解析結果を示した。 HR_{theo} は HR_{exp} のおよそ 4.5 倍も高かったが、対照群においては HR_{theo} は HR_{exp} とほぼ同じ傾向を示した。OTC 濃度 700–7000 $\mu\text{g/L}$ において、 HR_{exp} は対照群の 64%まで減少したが、 HR_{theo} は対照群の 1.5 倍まで増加した。OTC 濃度が高いほど、 HR_{exp} が増加して HR_{theo} が減少する傾向が強くなり、 HR_{exp} と HR_{theo} の差が広がる傾向があった。この HR_{exp} と HR_{theo} の違いを明確に示すために、 HR_{exp} と HR_{theo} の比をとった (Fig. 3.7.3)。対照群は、2 日後に一旦落ちた後、ほぼ一定になった。一方、添加系においては HR_{exp}/HR_{theo} が 2 日後から 4 日後までも減少した。7–70 $\mu\text{g/L}$ ではその後対照群程度まで増加したが、700–7000 $\mu\text{g/L}$ においては実験終了まで減少し続けた。700–7000 $\mu\text{g/L}$ では、最終的に対照群に比べて 44%まで減少した。

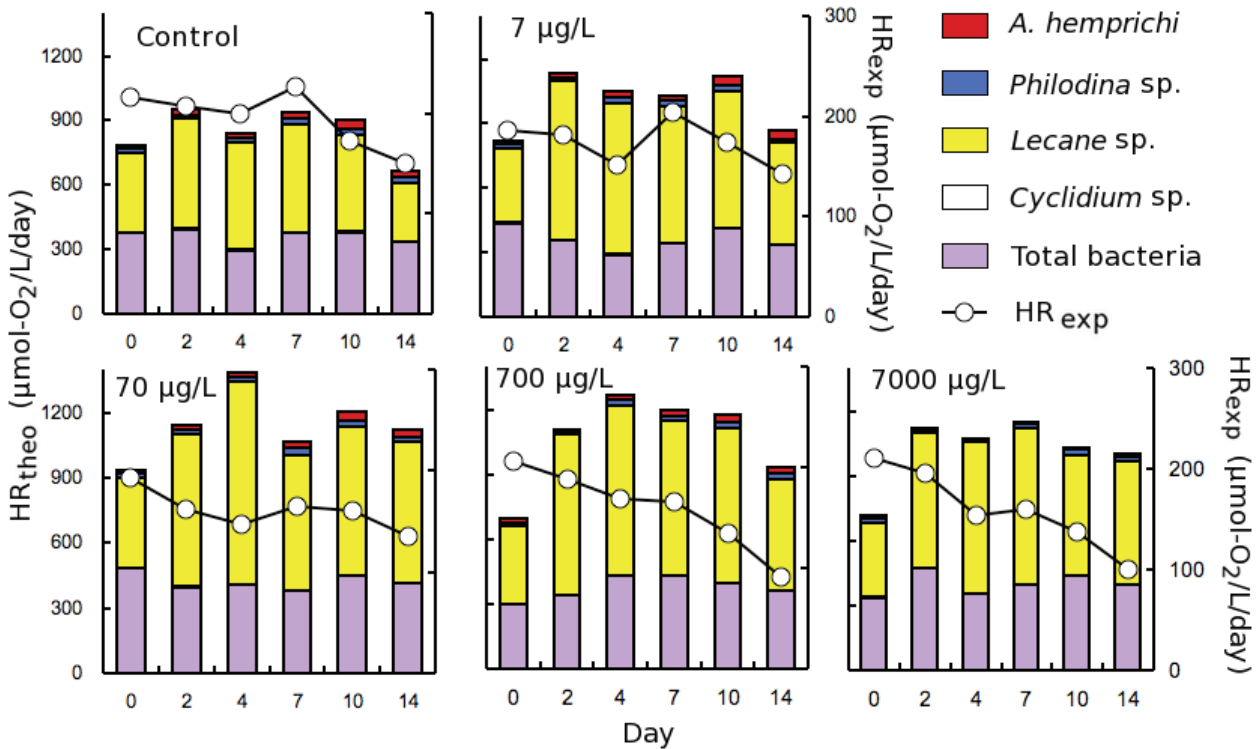


Fig. 3.7.2 HR_{exp} と HR_{theo} の経日変化：折れ線グラフが HR_{exp} を示す。積み上げ棒グラフが各従属栄養生物の個体群の呼吸量と HR_{theo} を示している。対照群においては HR_{exp} と HR_{theo} の傾向はおおよそ一致しているように見える。しかし、OTC 濃度が濃くなるほど、 HR_{exp} は減少し、 HR_{theo} は増加するため、その差が大きくなっている。

3.7.3. RCM への影響

Fig. 3.7.3 に示した HR_{exp}/HR_{theo} は、式(3.9) で示したように、RCM (相対群集代謝: Relative Community Metabolism) である。 HR_{theo} は 1 個体当たりの呼吸量が一定であると仮定したときに求められる従属栄養生物群集の呼吸量であり、 HR_{exp} はその実測値である。従って、RCM が増加又は減少するということは、それぞれ単位生物量当たりの代謝速度が増加又は減少することを示している。同時に、RCM が増加又は減少するということは、捕食や排泄などが活性化又は不活性化されているということであり、従属栄養生物群集を介した物質循環速度をも示している。そこで、今後は HR_{exp}/HR_{theo} を RCM と呼ぶことにする。

規格化する前の RCM (Fig. 3.7.3 A) では 4 日後に全ての添加系で、14 日後には 70–7000 $\mu\text{g/L}$ で有意差が出た。しかし、これは 7–70 $\mu\text{g/L}$ では RCM の初期値が対照群より低かったためであり、0 日における RCM を 1 にして規格化すると 700–7000 $\mu\text{g/L}$ でのみ有意差が出た (Fig. 3.7.3 B)。規格化した RCM では有意差がないのに、規格化する前で RCM の 7–70 $\mu\text{g/L}$ において有意差が出ていたのは単に初期値が低かったことに由来しているだけで、意味がないと考えられる。そのため、今後は規格化した RCM を採用していくことにする。

対照群における RCM の変動は、経時的にあり得る通常の代謝の変動を示している。例えば Barnes *et al.* (1993) は、Table 3.6.1 に示したような、標準代謝、通常の代謝、捕食中の代謝、活発に活動しているときの代謝などである。実際には、これらの中間的な状態を含めた、様々な代謝状態が存在していると考えられる。

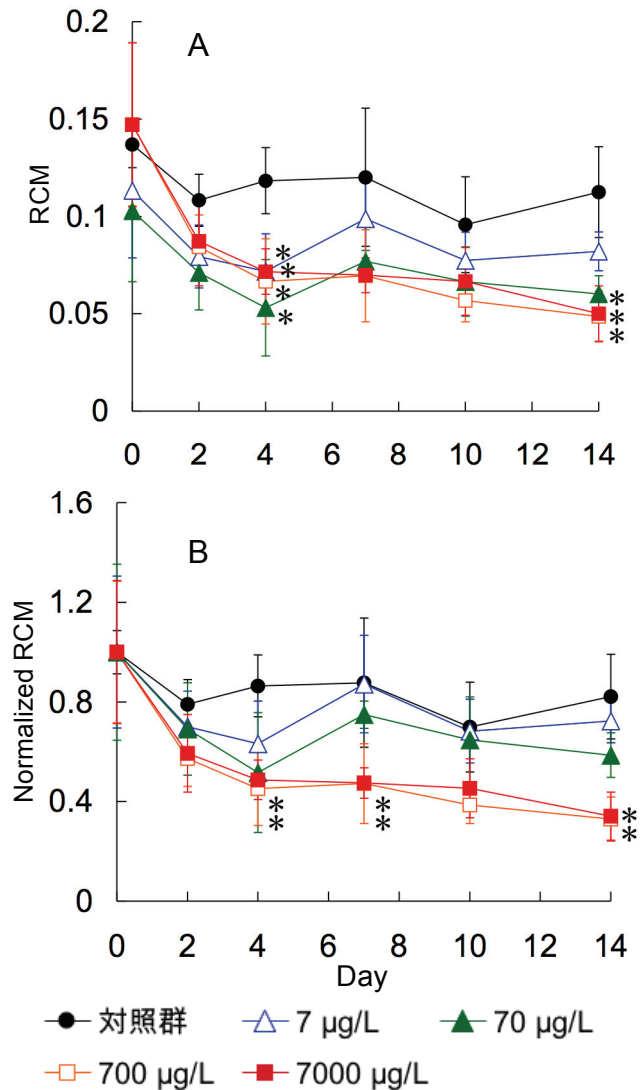


Fig. 3.7.3 OTC 添加後の RCM (= HR_{exp} / HR_{theo}) の経日変化：本論文においては HR_{exp}/HR_{theo} と RCM は同義である。エラーバーは標準偏差を示し、アスタリスク (*) は対照群に対して統計的に有意な差があることを示している (信頼度 90%)。A は RCM をそのままプロットしたグラフで、B は 0 日における HR_{exp} / HR_{theo} を 1 として規格化したグラフである。0 日における HR_{exp}/HR_{theo} は 0.184–0.256 だった。対照群は 2 日後に一旦低下した後、ほぼ安定している。7–70 $\mu\text{g/L}$ では 2–4 日後も減少を続けるが、その後、対照群とほぼ同程度まで増加している。700–7000 $\mu\text{g/L}$ では 2–4 日後以降も実験終了まで減少し続け、対照群に比べて 44% まで低下している。A では 4 日後に全ての添加系で有意差が出ているが、これは 7–70 $\mu\text{g/L}$ では初期値が対照群より低かったためで、規格化すると 700–7000 $\mu\text{g/L}$ でのみ有意差が出た。

特に、薬物や汚染などの影響で、代謝状態が薬理的又は病的に変化した場合は、通常の状態とは異なる代謝状態を示すと考えられ、生態影響評価においては病的な代謝の変化に注目することになる。

Table 3.6.1 Barnes *et al.* (1993) による代謝の分類とその定義

代謝の状態	定義
標準代謝 standard metabolism*	安静にしている動物の代謝
通常代謝 routine metabolism**	通常通りに行動している動物の代謝
捕食中の代謝 feeding metabolism	捕食中の動物の代謝
活発に活動中の代謝 active metabolism	動物がかなり活発に活動しているとき代謝

* ここでは原文を尊重して標準代謝 standard metabolism としているが、安静時の動物の代謝と定義しているため、正しくは基礎代謝 basal metabolism を示していると考えられる。

** ここでは原文を尊重して通常代謝 routine metabolism としているが、通常通りに行動している動物の代謝と定義しているため、正しくは標準代謝 standard metabolism を示していると考えられる。

OTC 添加量 7-70 µg/L での 2-7 日後における RCM の減少（有意差なし）と、700-7000 µg/L における継続的な RCM の減少（有意差あり）は、真核生物のミトコンドリアや原核生物のリボソームに OTC が結合して、タンパク質合成が阻害された結果、単位生物量当たりの代謝速度が低下したためであると考えられる。一般的に化学物質への生物の応答は、化学物質の排出・分解・順応のためにエネルギーを消費するため、代謝が活性化されると言われている。しかし、OTC の場合は排出・分解・順応する前にそのために必要なタンパク質合成を阻害してしまうという、代謝の上流に作用するため、RCM の低下が引き起こされたと考えられる。

3.8. 第 3 章の結論

畜産業や養殖業で最も使われており環境への直接の漏出が多いと考えられる抗生物質 OTC について、生物量と呼吸量・生産量の変化、およびそれらを統合的に解析することによって得られる RCM から N-system への影響を解析した。テトラサイクリン系抗生物質は原生動物や、ミトコンドリアのリボソームサブユニットに結合して原生動物や真核生物に負の影響を与える。その結果、OTC 耐性細菌の増殖と、感受性のある動物である *Cyclidium* sp. と *A. hemprichi* の減少が起こった。*Cyclidium* sp. のニッチを埋める形で *Lecane* sp. の増殖が観察された。

N-system を用いた生物量と呼吸量・生産量による生態系影響評価は、生物間相互作用を通じた間接的な影響や非線形現象のヒステリシスと思われる現象も観察され、生態系機能や複雑系としての挙動も含めて評価できることが改めて確認され、その有用性を更に補償するものとなった。また、薬剤耐性細菌を含めた影響評価が可能であることも明らかになった。

生物量と呼吸量から求められた NOEC はそれぞれ <7 µg/L と 70 µg/L であった。OTC は実環境中の表層水（湖沼や河川）においては、一般的に 0.1 µg/L であることが多く、このような条件では

OTC の生態系への影響は限定的で、影響はほとんどないと言える。しかし、豚農場の近くの河川で 100 $\mu\text{g/L}$ に近い濃度で検出される場合がある。このような条件では、高い確率で原生生物の生物量への影響およびそれに伴う間接的な影響が生じていると考えられ、また、生態系機能にも影響が出ている可能性もある。

1 個体当たりの呼吸量を一定と仮定して計算した従属栄養生物群集の呼吸量 HR_{theo} と、実験結果から得られた従属栄養生物群集の呼吸量 HR_{exp} の間には乖離が生じていた。そこで、その差を明らかにするために $\text{HR}_{\text{exp}}/\text{HR}_{\text{theo}}$ を計算すると、 $\text{HR}_{\text{exp}}/\text{HR}_{\text{theo}}$ は相対群集代謝 (RCM) を示していることが分かった。OTC の添加により 700–7000 $\mu\text{g/L}$ では対照群に比べて有意に RCM が低下しており、生物量の変化によって CR が低下したというよりは、生理活性が低下したことによって CR が低下したと考えられ、OTC によって代謝が低下したために CR が低下したという上記の考察を裏付ける結果となった。

全体の代謝量は 1 個体当たりの代謝量と生物量の組み合わせで決定されるが、直接測定できるデータは生物量と全体の代謝量だけで、1 個体当たりの代謝量に相当するパラメータはこれまでブラックボックスであった。しかし、各データを統合的に解析することにより、1 個体当たりの代謝量に相当するパラメータである RCM が求められ、しかも定量的に解析可能であり、解析ツールとして有用であることが明らかになった。

第4章 種々の化学物質の生態系影響評価

4.1. 第4章の概要

第2章で、生態系影響評価手法の方法論について検証して実験・解析方法を確立し、これに基づいてマニュアルを作成した(付録)。第3章では、このマニュアルに基づいて抗生物質 OTC の生態系影響評価を行い、生物量と呼吸量・生産量を指標とした N-system による生態系影響評価の有効性を示した。第3章では更に、相対群集代謝(RCM)が生物量とシステム全体の代謝量の関係をつなぐものであり、生態系影響評価の解析ツールとしての有用が示唆された。そこで、第4章では、付録のマニュアルに基づいて得られた藍藻毒 Microcystin LR (MC-LR) と、界面活性剤 SDS (ラウリル硫酸ナトリウム Sodium Lauryl Sulfate)、殺虫剤 Fenitrothion、除草剤 Simazin の生態影響評価実験の結果である生物量と呼吸量・生産量のデータを、それぞれ統合的に解析して RCM を求め、解析ツール・評価指標としての RCM の有用性を検証することを目的とした。

MC-LR と、SDS、Fenitrothion、Simazin すべてについて RCM の解析が可能であった。RCM の変動は、各化学物質の分解性や生物群集への影響の仕方によって異なるパターンを示し、作用機序やターゲットとなる生物種、分解性などによって生物の代謝活性に違いが現れることが分かった。

化学物質の汚染に対して、一般的に、生物は汚染物質の体内への流入を抑止・排出・分解・無害化、そして影響を受けているプロセスを迂回するメカニズムを作り出すことによって対処し、いずれにしてもエネルギーの消費を伴うため、代謝が活性化することが一般的に知られている。MC-LR と、SDS、Fenitrothion についてはこれと矛盾しない結果であったが、第3章の OTC では RCM は低下した。これは、他の化学物質と異なり、OTC はタンパク質の合成を阻害し、エネルギー(ATP)消費の主役である酵素の合成自体を阻害してしまうために、代謝が低下したと考えられた。

このように、RCM を求めることで、個体数変動による群集呼吸量(CR)の変動を除外することができ、生体内で起こっている生理現象についてよりつっこんだ議論が可能となることが分かった。また、SDS については統計的に解析可能なデータが揃っていたので、OTC と同様に有意差を検定することができた。このように定量的な解析も可能であり、統計的な有意差の検定も可能であることから、生態系影響評価の指標としても有用であることが示された。

4.2. 背景

第2章において、生態系影響評価手法の方法論について検証して実験・解析方法を確立し、付録のマニュアルを作成した。第3章においてこのマニュアルに基づいて OTC の生態系影響評価を行い、生物量と呼吸量・生産量を指標とした N-system による生態系影響評価の有効性を示した。更に、第3章で私が考案した相対群集代謝(RCM)が生物量とシステム全体の代謝量の関係をつなげるものであり、生態系影響評価の解析ツールおよび指標として有用であることが示唆された。

第4章では、付録のマニュアルに基づいて得られた藍藻毒 Microcystin LR (MC-LR) と、界面

活性剤 SDS（ラウリル硫酸ナトリウム Sodium Lauryl Sulfate）、殺虫剤 Fenitrothion、除草剤 Simazin の生態影響評価実験の結果である生物量と呼吸量・生産量のデータを、それぞれ統合的に解析して RCM を求め、解析ツールおよび指標としての RCM の有用性を検証することを目的とした。なお、藍藻毒 MC-LR の生物量と呼吸量・生産量のデータは私が測定したが、界面活性剤 SDS の生物量と呼吸量・生産量のデータは福島大学の稲森悠平教授および賀数邦彦氏（共に大学院、共生システム理工学研究科）から、殺虫剤 Fenitrothion と除草剤 Simazin の生物量と呼吸量・生産量のデータは東北大学の鹿野秀一准教授（大学院、生命科学研究科）から提供して頂いたものである。

これらの解析を通じて、第 4 章では RCM によってどのような考察ができるか、生態系影響評価における解析手法としてはどのような価値があるかを検討していく。

4.3. 材料と方法

MC-LR の生物量と呼吸量・生産量は付録のマニュアルに準じて測定・解析した。稲森悠平教授および賀数邦彦氏（福島大学、大学院、共生システム理工学研究科）と鹿野秀一准教授（東北大学、大学院、生命科学研究科）も、環境総合推進費「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発(H21-23)」(稲森悠平 福島大学)において、それぞれ SDS と Fenitrothion および Simazin の生物量と呼吸量・生産量は付録のマニュアルに準じて測定・解析しており、そのデータを提供していただいた。

MC-LR は水への溶解度が小さいので、ストック溶液はメタノール溶液とし、メタノール溶液として N-system に加えた。SDS は水溶性なので水溶液として加えた。Fenitrothion と Simazin は水に不溶または微溶なので、それぞれアセトンとメタノールに溶解して N-system に加えた。MC-LR の対照群にはメタノールを加えた。SDS の対照群には水を加えた。Fenitrothion と Simazin の場合には有機溶媒を添加した対照群と、水を加えた対照群を用意した。

MC-LR は、生物量と CR・GPP とともに 2 回繰り返した。SDS は生物量と CR・GPP とともに 3 回繰り返した。Fenitrothion と Simazin は CR・GPP は 3 回繰り返したが、生物量の測定は 1 回だった。ただし、生物量が 1 回目と同様に減少したことを定性的に 2 回確認した。

RCM の解析方法は第 3 章の 3.3.8 に準じた。つまり、代謝速度を一定と仮定して体の大きさから算出した各生物の 1 個体当たりの呼吸量を、動物の個体数および生菌数にそれぞれ乗じて合計し、従属栄養生物群集の呼吸量の理論値 (HR_{theo}) を求めた (式(3.7))。次に、群集の呼吸量 (CR) から藻類の呼吸量である $0.35 \times GPP$ を差し引き、従属栄養生物群集の呼吸量の実験値 (HR_{exp}) を求めた (式(3.6))。最後に $RCM = HR_{exp} / HR_{theo}$ を求めた (式(3.9))。

4.4. 結果と考察

4.4.1. HR_{exp} と HR_{theo} の比較

すべての実験系について、OTC の結果に比べて、*Lecane* sp.が HR_{theo} に占める割合が高く、細

菌の割合が小さかったが、その他の *A. hemprichi*、*Philodina* sp.、*Cyclidium* sp.の占める割合が小さいことは OTC と共通していた (Fig 4.4.1–4.4.4)。メタノールを添加した対照群 (Fig. 4.4.1 A、Fig. 4.4.3 B) では HR_{theo} には影響がなかったが、 HR_{exp} がシグモイド曲線を描いて増加したため、代謝活性が上昇したと予想された。メタノールは生物量には影響しないが、これはメタノールを基質とした細菌の代謝や毒物に対する従属栄養生物の応答によって代謝活性が上昇したと予想された。

HR_{exp} および HR_{theo} への藍藻毒 MC-LR の影響を Fig. 4.4.1 に示した。対照群において、2 日に *Lecane* sp.が一時的に増加したために HR_{theo} が一旦増加したが、他の日はほぼ一定だった。 HR_{exp} はメタノールの影響を受けて、シグモイド曲線を描いて $400 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加し、21 日以降は徐々に減少して 35 日には $300 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ となった。100 $\mu\text{g/L}$ 添加系においては、*Lecane* sp.の増加は 7 日目に起こり、その後 0 日程度まで下がりほぼ一定となった。 HR_{exp} はシグモイド曲線に近い形で $400 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ 近くまで増加し、21 日で一定となった。 HR_{theo} が減少して HR_{exp} が対照群より増加したため、従属栄養生物の代謝活性が上昇したと予想された。1000 $\mu\text{g/L}$ 添加系では 14 日に *Lecane* sp.が微増したほか、*Philodina* sp.と *A. hemprichi* が増加したため、 HR_{theo} が増加し、その後ほぼ一定となった。 HR_{exp} はシグモイド曲線を描いて $400 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加した。メタノール添加系では HR_{theo} は $300 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加したが、MC-LR 添加系では $400 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加したため、MC-LR の影響によって従属栄養生物の代謝活性が上昇したと予想された。しかし、 HR_{exp} には濃度依存的なあまり差はなかった。

HR_{exp} および HR_{theo} への界面活性剤 SDS の影響を Fig. 4.4.2 に示した。 HR_{theo} における細菌の割合が OTC の生態系影響評価を行ったときよりも大きく変動したが、このような現象は他の実験では観察されず、なぜ SDS の実験をしたときだけこのような現象が起きたかは分からない。4 mg/L 添加系は、2 日目に HR_{exp} が微増したこと以外は、 HR_{theo} も HR_{exp} も対照群とほぼ同じ傾向を示したため、ほとんど影響がなかったと考えられる。また、 HR_{theo} と HR_{exp} の傾向が一致しているので、従属栄養生物の代謝活性への影響はないと予想された。8 mg/L 添加系では 7–14 日に HR_{theo} が増加した。 HR_{exp} は 4 mg/L 添加系とほぼ同じであった。16 mg/L 添加系では、8 mg/L 添加系と同様に 7–14 日に HR_{theo} が増加した。2 日における HR_{exp} の増加は最も多く、 HR_{theo} にも HR_{exp} にも影響があったと言える。しかし、 HR_{theo} と HR_{exp} がともに増加したため、従属栄養生物の代謝活性への影響については分からない。

HR_{exp} および HR_{theo} への除草剤 Simazin の影響を Fig. 4.4.3 に示した。水を加えた対照群においては、14 日に HR_{exp} が増加したほか HR_{theo} と HR_{exp} は徐々に減少し同じ傾向を示した。メタノールを加えた対照群では、 HR_{theo} はほぼ一定だったが、MC-LR の実験 (Fig. 4.4.1 A) と同様に、 HR_{exp} が増加した。Simazin を 0.64 mg/L 添加した系では、 HR_{theo} と HR_{exp} ともにメタノール添加系と同じ傾向を示したが、14 日において *Lecane* sp.が増殖したため HR_{theo} が倍増した。 HR_{theo} が増加して HR_{exp} が対照群より減少したため、従属栄養生物の代謝活性が低下したと予想された。*Lecane* sp.の増加は Simazin によって死んだ *Chlorella* sp.などの死骸を捕食した結果であると考え

られた。

HR_{exp} および HR_{theo} への殺虫剤 Fenitrothion の影響を Fig. 4.4.3 に示した。水を加えた対照群においては、7日に HR_{exp} が減少したほかは、HR_{theo} と HR_{exp} は徐々に減少し、同じ傾向を示した。アセトンを加えた対照群では、*Lecane* sp.の減少に伴って HR_{theo} が徐々に減少した。HR_{exp} は14日のデータが欠落しているが、その他の日では HR_{theo} と同じ傾向を示した。生物量には僅かに影響が見られたが、HR_{theo} と HR_{exp} の傾向が一致しているため、代謝活性にはあまり影響がないと予想された。Fenitrothion を加えた系では、4日から全ての動物が減少し始め、14日には全ての動物がほぼ死滅し、従属栄養生物はほぼ細菌だけとなった。HR_{exp} は変動しつつもほぼ一定かまたは微増傾向であった。HR_{theo} が減少し HR_{exp} が増加していることから、代謝活性がかなり上がっていると予想された。

HR_{theo} と HR_{exp} を別々に示して比較しても、代謝活性に変化があったと予想される程度であって、本当に変化があったのか、どの程度変化があったのかは、これだけでははっきりしなかった。SDS 16 mg/L 添加系においては、HR_{theo} と HR_{exp} の両方が増加したため、代謝活性に影響があったのかどうか判別できなかった。これは、生物量と CR・GPP をそれぞれそのまま比較してもほぼ同じ事が言える。

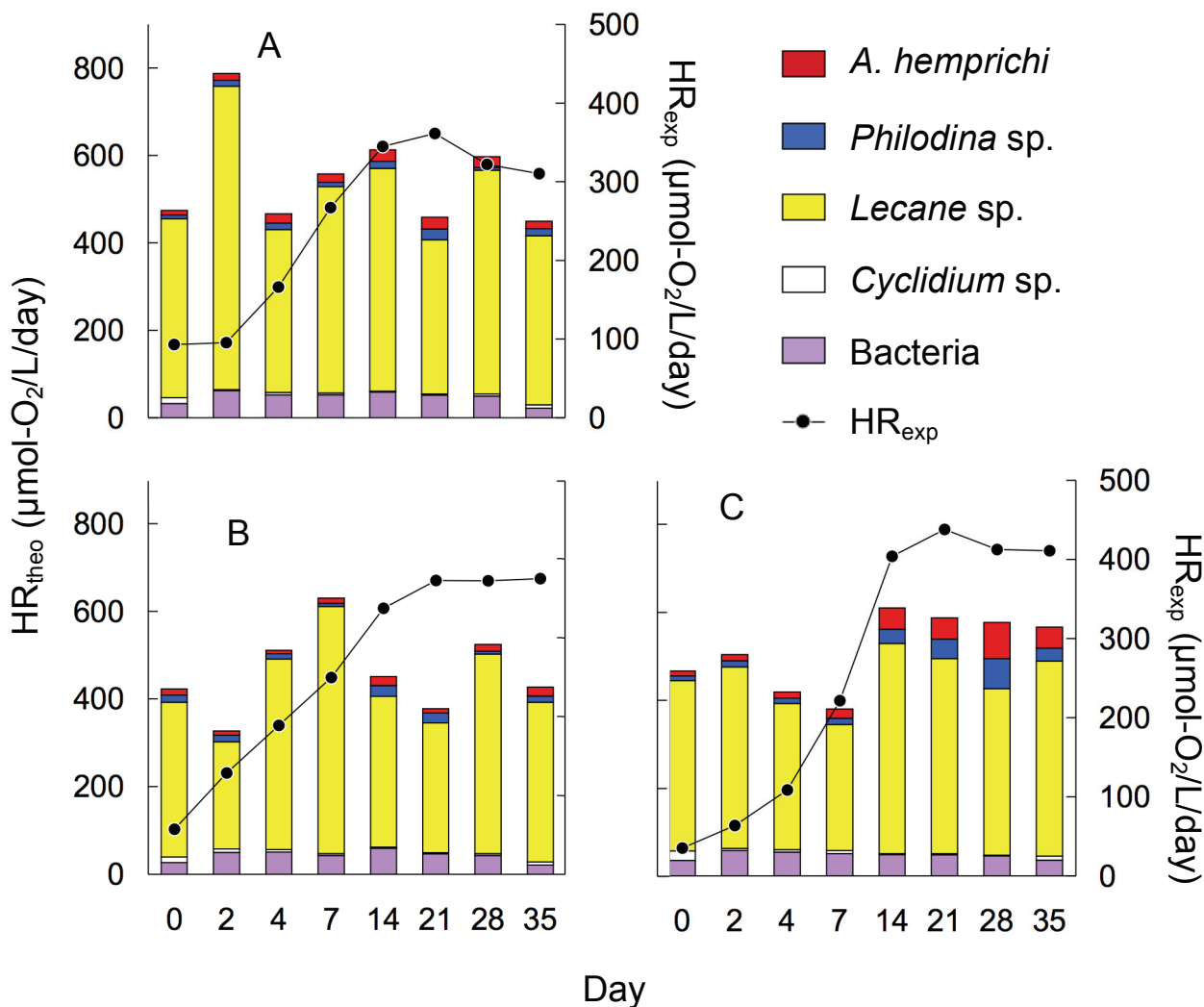


Fig. 4.4.1 HR_{exp} および HR_{theo} への藍藻毒 MC-LR の影響：(A) メタノールを加えた対照群と、(B) MC-LR 100 $\mu\text{g/L}$ 、(C) MC-LR 1000 $\mu\text{g/L}$ の結果を示した。 HR_{theo} における *Lecane* sp. の割合が OTC の生態系影響評価を行ったときよりも多く、細菌の割合が少なかった (Fig. 3.7.1 および Fig. 3.7.2 参照)。*A. hemprichi* と *Philodina* sp.、*Cyclidium* sp. の割合が少ないことは共通している。対照群 (A) において、2 日に *Lecane* sp. が一時的に増加したために HR_{theo} が一旦増加したが、他の日はほぼ一定だった。 HR_{exp} はシグモイド曲線を描いて 400 $\mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加し、21 日以降は徐々に減少して 35 日には 300 $\mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ となった。100 $\mu\text{g/L}$ 添加系 (B) においては、*Lecane* sp. の増加は 7 日目に起こり、その後 0 日程度まで下がりほぼ一定となった。 HR_{exp} はシグモイド曲線に近い形で 400 $\mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ 近くまで増加し、21 日で一定となった。1000 $\mu\text{g/L}$ 添加系 (C) では 14 日に *Lecane* sp. が微増したほか、*Philodina* sp. と *A. hemprichi* が増加したため、 HR_{theo} が増加し、その後ほぼ一定となった。 HR_{exp} はシグモイド曲線を描いて 400 $\mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ まで増加した。

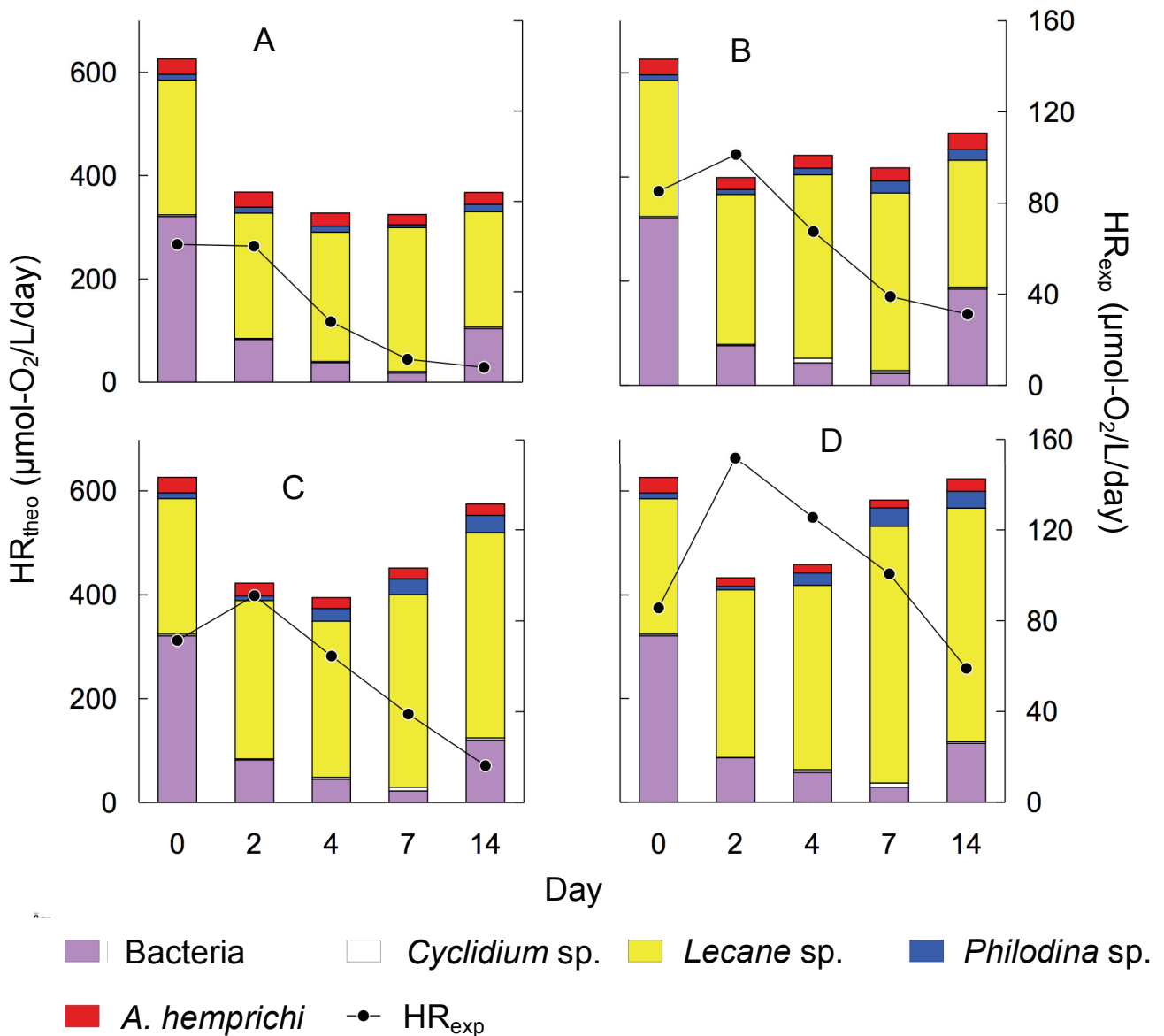


Fig. 4.4.2 HR_{exp} および HR_{theo} への界面活性剤 SDS の影響: (A) 水を加えた対照群と、(B) SDS 4 mg/L、(C) SDS 8 mg/L、(D) SDS 16 mg/L、の結果を示した。 HR_{theo} における細菌の割合が OTC の生態系影響評価を行ったときよりも大きく変動した (Fig. 3.7.1 および Fig. 3.7.2 参照)。*A. hemprichi* と *Philodina* sp.、*Cyclidium* sp. の割合が少ないことは共通している。全ての系において、2 日目に細菌が減ったために HR_{theo} が減少した。対照群 (A) において、 HR_{theo} が減少した後ほぼ一定となった。 HR_{exp} はシグモイド曲線を描くように減少した。4 mg/L 添加系 (B) も、2 日目に HR_{exp} が微増したこと以外は、 HR_{theo} も HR_{exp} も対照群とほぼ同じ傾向を示した。8 mg/L 添加系 (C) では、7-14 日に HR_{theo} が増加した。 HR_{exp} は 4 mg/L 添加系とほぼ同じであった。16 mg/L 添加系 (D) では、8 mg/L 添加系と同様に 7-14 日に HR_{theo} が増加した。ただし、2 日における HR_{exp} の増加は最も多かった。

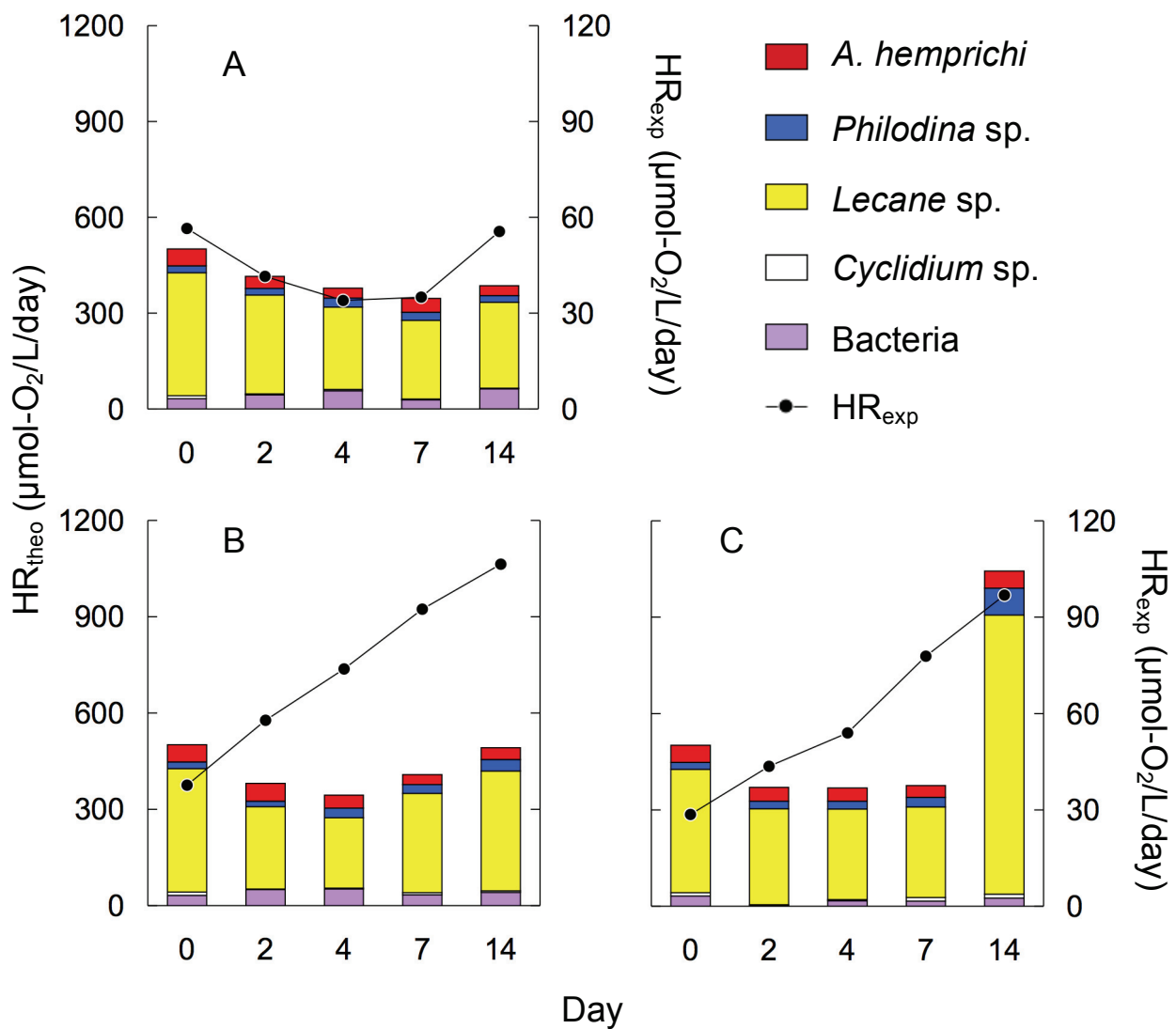


Fig. 4.4.3 HR_{exp} および HR_{theo} への除草剤 Simazin の影響：(A) 水を加えた対照群と、(B) メタノールを加えた対照群、(C) Simazin 0.64 mg/L の結果を示した。 HR_{theo} における *Lecane* sp. の割合が OTC の生態系影響評価を行ったときよりも多く、細菌の割合が少なかった (Fig. 3.7.1 および Fig. 3.7.2 参照)。*A. hemprichi* と *Philodina* sp.、*Cyclidium* sp. の割合が少ないことは共通している。水を加えた対照群 (A) においては、14 日に HR_{exp} が増加したほかは、 HR_{theo} と HR_{exp} は徐々に減少し、同じ傾向を示した。メタノールを加えた対照群 (B) では、 HR_{theo} はほぼ一定だったが、MC-LR で実験したとき (Fig. 4.4.1 A) と同様に、 HR_{exp} が増加した。Simazin を 0.64 mg/L 添加した系 (C) では、 HR_{theo} と HR_{exp} ともにメタノール添加系と同じ傾向を示したが、14 日において *Lecane* sp. が増殖したため HR_{theo} が倍増した。

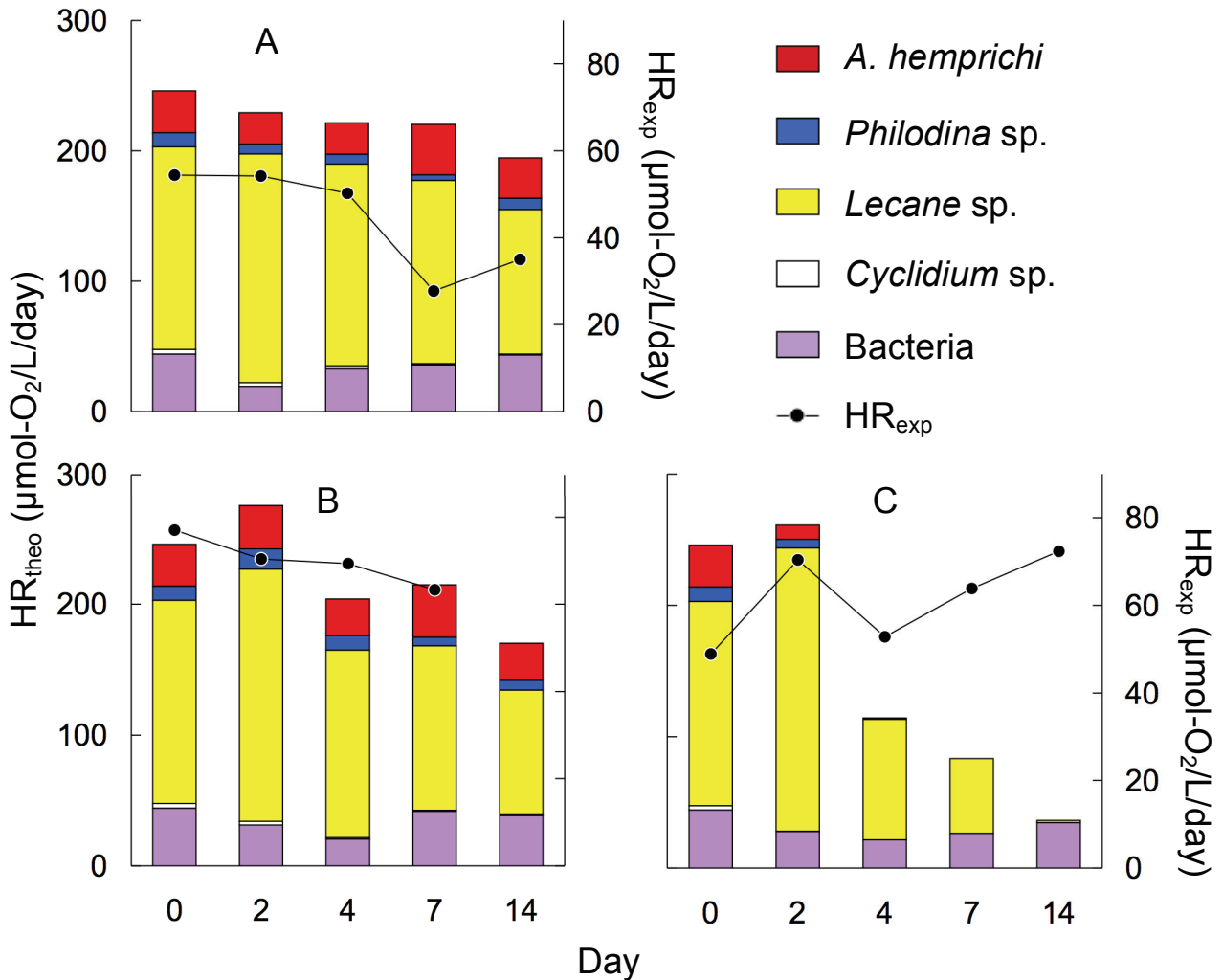


Fig. 4.4.3 HR_{exp} および HR_{theo} への殺虫剤 Fenitrothion の影響：(A) 水を加えた対照群と、(B) アセトンを加えた対照群、(C) Fenitrothion 10 mg/L の結果を示した。HR_{theo} における *Lecane* sp. の割合が OTC の生態系影響評価を行ったときよりも多く、細菌の割合が少なかった (Fig. 3.7.1 および Fig. 3.7.2 参照)。*A. hemprichi* と *Philodina* sp.、*Cyclidium* sp. の割合が少ないことは共通している。水を加えた対照群 (A) においては、7 日に HR_{exp} が減少したほか、HR_{theo} と HR_{exp} は徐々に減少し、同じ傾向を示した。アセトンを加えた対照群 (B) では、*Lecane* sp. の減少に伴って HR_{theo} が徐々に減少した。HR_{exp} は 14 日のデータが欠落しているが、HR_{theo} と同じ傾向を示した。Fenitrothion を加えた系 (C) では、4 日から全ての動物が減少し、14 日には全ての動物が死滅し、細菌だけとなった。HR_{exp} は変動しつつもほぼ一定かまたは微増傾向であった。

4.4.2. MC-LR の RCM への影響

藍藻毒 MC-LR の RCM への影響を Fig. 4.4.4 に示した。対照群において、メタノールの添加により RCM が増加し続け約 3 倍まで増加し、21 日以降はほぼ一定となった。これは、初期においてはメタノールを基質とした細菌の代謝や、動物による細菌の捕食・排泄が活発化したためであると考えられる。メタノールは生分解性と揮発性が高いので長期間残存したとは考えにくい、RCM は高いままであった。Fig. 4.4.1 で見たように HR_{theo} はほぼ一定であったから、代謝に与えるような群集構造の変化があったわけではないと考えられる。したがって、従属栄養生物の代謝活性だけが增加し、一度群集全体の代謝活性 (RCM) が活性化してしまうと、元に戻れなくなってしまうシステム的原因があると考えられる。例えば、一度緊迫した状況になってお互いに引くに引けない状況になってしまうと、何かのきっかけがなければその状況から脱することが難しくなってしまうように、捕食・被食と増殖がバランスがとれた形で一旦活発化してしまうと、何かのきっかけがなければなかなか元の状況には戻れないのではないだろうか。

なお、メタノールを加えた対照群において、21–35 日で HR_{theo} は $400\text{--}500 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ 、 HR_{exp} は $300\text{--}400 \mu\text{mol-O}_2/\text{L/day}$ と、かなり近い値を示した。これは培養条件の違いによって、代謝活性が違ったために HR_{theo} と HR_{exp} の間に大きな差があったのであって、N-system の生物も体の大きさと代謝の関係を調べた研究の基準とされている標準代謝と同程度の代謝活性を潜在的に発揮していることを示している。つまり、 HR_{theo} が間違えていたから HR_{exp} との差が生まれたのではなく、代謝状態が違ったからであると考えられる。

MC-LR 添加系では濃度依存的に RCM が増加し、21 日以降はほぼ一定となった。 HR_{theo} と HR_{exp}

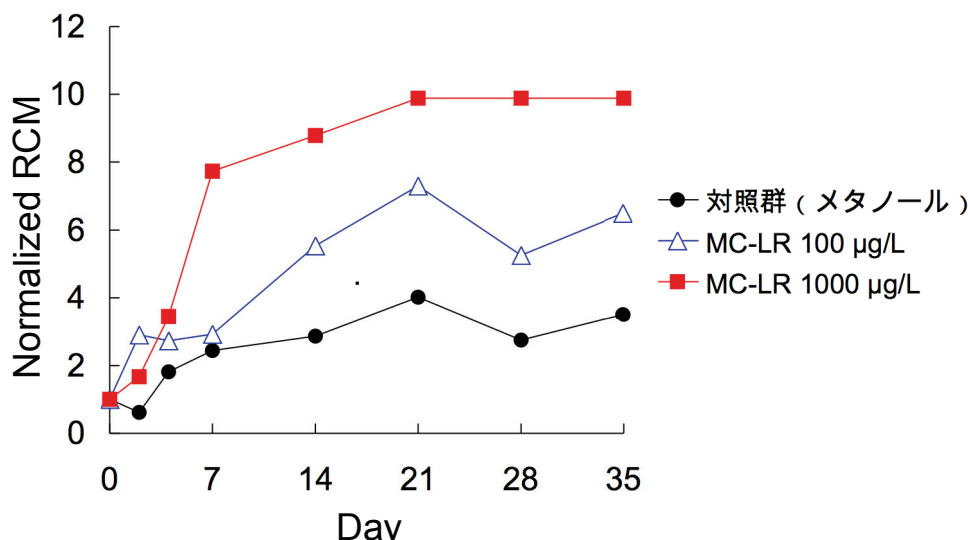


Fig. 4.4.4 MC-LR の RCM への影響：対照群において、メタノールの添加により RCM が増加し続け約 3 倍まで増加し、21 日以降はほぼ一定となった。これは、初期においてはメタノールを基質とした細菌の代謝や、動物による細菌の捕食活動が活発化したためであると考えられる。MC-LR 添加系では濃度依存的に RCM が増加し、21 日以降はほぼ一定となった。

では 100 µg/L と 1000 g/L に大きな差を見いだせなかったが、RCM で見ると 100 µg/L では初期値の約 6 倍(対照群の 2-3 倍)まで上昇し、1000 g/L では初期値の約 10 倍(対照群の約 4 倍)まで上昇し、RCM には大きな差が見られた。したがって、MC-LR は代謝活性には濃度依存的に影響があると言える。RCM を指標として用いることにより、各試験群間の差が顕著に表れることがあることが示された。

MC-LR はプロテインホスファターゼ 1 と 2A を阻害する。プロテインホスファターゼはタンパク質を脱リン酸化し、タンパク質をリン酸化するプロテインキナーゼと対をなして細胞内シグナル伝達に関わる酵素である。MC-LR は化学的に安定で分解されにくい (Fig. 4.4.5) ことから、

N-system 内の生物はプロテインホスファターゼ 1 と 2A を阻害率を上回って合成したり、プロテインホスファターゼ 1 と 2A を迂回するタンパク質リン酸化プロセスを発達させたり、MC-LR を排出する機構を発達させたりすることによって対応したと考えられる。そのため、新たな酵素を作ったり、普段使わない非効率なシステムを作ったりするために代謝活性 (RCM) が上昇したと考えられる。

繰り返し回数が少ないために有意差は出せないが、メタノールを加えて RCM が増加したとしても、濃度依存的な RCM の変化が観察でき、生態系影響評価における解析手法として有用であると言える。

4.4.3. SDS の RCM への影響

界面活性剤 SDS の RCM への影響を Fig. 4.4.6 に示した。SDS 添加系では対照群に比べて RCM が高かった。特に 16 mg/L 添加系では、2-14 日では対照群より 1.5-2 倍も代謝活性が上昇し、4 日には統計的に有意に対照群より高い値を示した。16 mg/L 添加系では HR_{theo} も HR_{exp} も増加していて、 HR_{exp} の増加が生物量の増加によるもので代謝活性には影響がなかったのかどうかは判定できなかった。しかし、RCM を用いることで、生物量のみならず、代謝活性にも影響があったことが明らかになった。

SDS は高濃度では界面活性作用により細胞膜やタンパク質を変性させる作用があるが、SDS は生分解性があるため、界面活性作用が十分に発揮できない条件では単なる炭素源になっている可能性がある。実際、Fig. 4.4.2 では HR_{theo} には負の影響が現れていなかった。したがって、SDS を分解するために、おそらく主に細菌群集の活性化が起こったと考えられる。16 mg/L では *Lecane sp.*

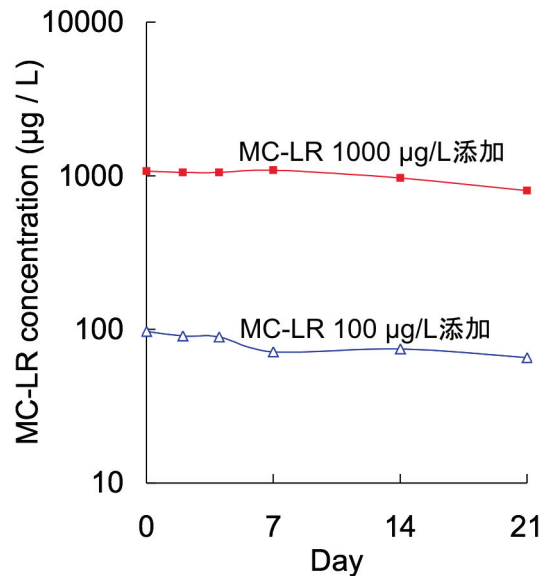


Fig. 4.4.5 N-system 中での MC-LR 濃度の変化：MC-LR は化学的に安定で、N-system の中でもほとんど分解しない。

が増加したことから、主に付着性の細菌が増殖速度を増し、高濃度では *Lecane sp.* の増加を引き起こす程度まで細菌群集の増殖率（活性）が上昇したと考えられる。

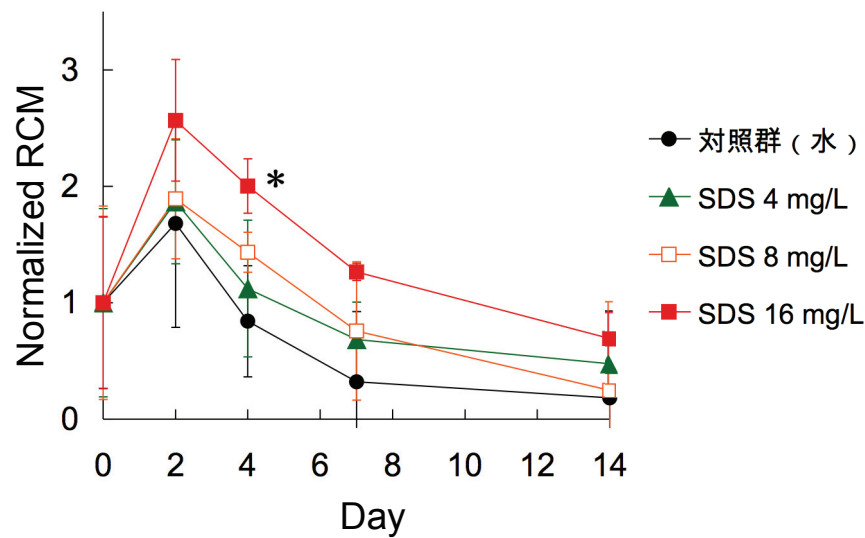


Fig. 4.4.6 SDS の RCM への影響：繰り返しが3回あるために、有意差を出すことができた。エラーバーは標準偏差を、アスタリスク（*）は対照群に対して有意差（>90%）があることを示している。SDS 添加系では対照群に比べて RCM が高くなっている。特に 16 mg/L 添加系では 4 日目に、統計的に有意に対照群より高かった。

SDS については有意差の計算をすることができ、16 mg/L において有意差を出すことができた。OTC でもこのような定量的な解析ができた。RCM は数に表れない生体内部で起こっている代謝の変化を観察できるという定性的な解析のみならず、有意差を出して定量的な解析もできる事が示された。また、濃度依存的な RCM の変化が観察でき、生態系影響評価における解析手法として有用であると言える。

4.4.4. Simazin の RCM への影響

除草剤 Simazin の RCM への影響を Fig. 4.4.7 に示した。MC-LR の時と同様、対照群（メタノール）においてメタノールの添加により RCM が初期値の 3 倍に増加した。MC-LR でもメタノールの添加により RCM が初期値の 3 倍まで増加しており（Fig. 4.4.4）、定量的にも一致している。

Simazin 添加系でも 7 日までは同様に増加したが、14 日には対照群（水）とほぼ同じ水準まで低下した。RCM が低下した 1 番の原因は *Lecane sp.* が増加したことである（Fig. 4.4.3）。除草剤の Simazin によって一部の *Chlorella* などの藻類が死滅し、その藻類を食べて *Lecane sp.* が増加したと考えられる。MC-LR の項で、捕食・被食と増殖がバランスがとれた形で一旦活発化してしまうと、何かのきっかけがなければなかなか元の状況には戻れないのではないだろうかという考察をした。*Lecane sp.* も藻類の死骸がなくなってしまうと餌がなくなって代謝を落とさざるを得ない。また、藻類の死骸が生じて *Lecane sp.* が増加したことにより、活性化してしまった細菌も *Lecane sp.* に捕食されて世代交代が進み、代謝の沈静化が加速されたのではないかと考えられる。

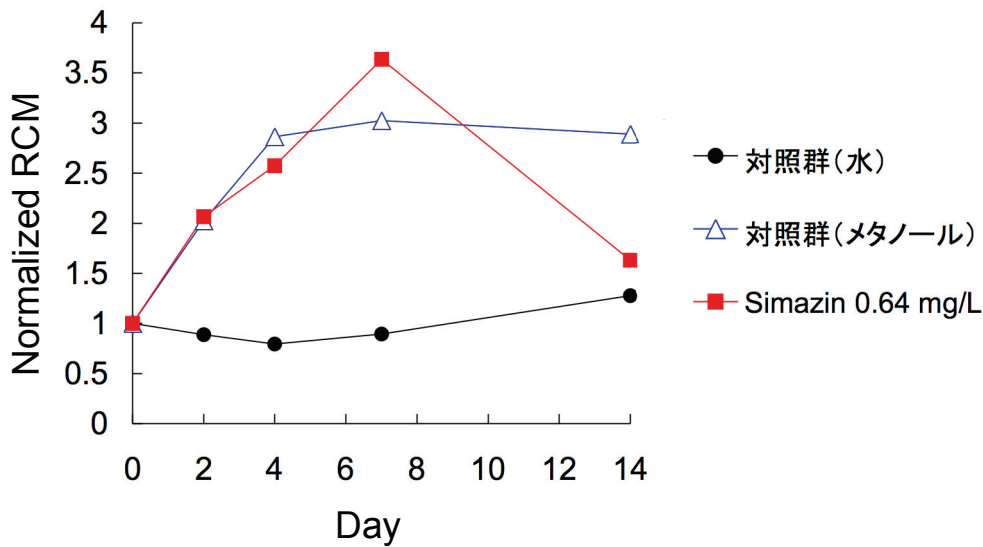


Fig. 4.4.7 Simazin の RCM への影響：MC-LR の時と同様、対照群（メタノール）においてメタノールの添加により RCM が増加した。Simazin 添加系でも 7 日までは同様に増加したが、14 日には対照群（水）とほぼ同じ水準まで低下した。

4.4.5. Fenitrothion の RCM への影響

殺虫剤 Fenitrothion の RCM への影響を Fig. 4.4.8 に示した。対照群（水）は実験期間を通じてほぼ一定であった。対照群（アセトン）と対照群（水）に差がないことから、アセトンは従属栄養生物には影響しないと言える。アセトンは、少なくとも哺乳動物においては、脂肪の酸化により正

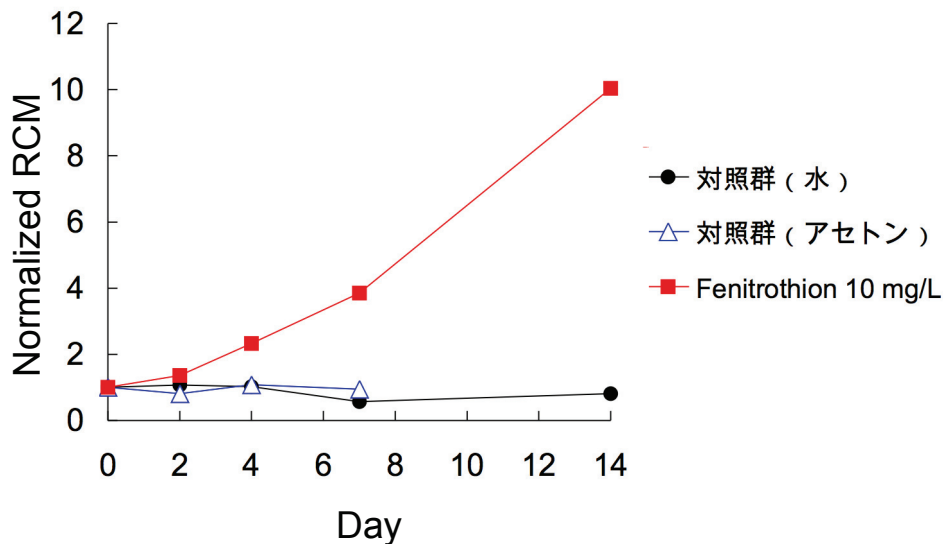


Fig. 4.4.8 Fenitrothion の RCM への影響：対照群（アセトン）と対照群（水）に差がないことから、アセトンは従属栄養生物には影響しないと言える。少なくとも哺乳動物においてはアセトンは正常な代謝プロセスとして産生される物質であることが起因していると考えられる。一方、Fenitrothion 10 mg/L 添加系では RCM が指数関数的に増加した。

常な代謝プロセスの結果として産生される物質である。また、哺乳動物への生殖毒性が低いことも明らかになっている。したがって、生態系影響評価試験において、アセトンには動物に作用する難水溶性化学物質の溶媒として有用であると考えられる。

一方、Fenitrothion 10 mg/L 添加系では RCM が 4 日で初期値の 2 倍、7 日で 4 倍、14 日で 10 倍まで増加した。これは動物が全て死滅してしまったことに起因する。マイクロコズムの種組成を操作した研究によって、8 種より 4 種の方がシステムとしての代謝が活発であり、3 種では更に活発になり、N-system の種数の低下に伴って物質循環が加速することが数理モデルによるシミュレーションで示されている (Sugiura, 2001)。そのため、*A. hemprichi* が 4 日に死滅し、*Philodina* sp. が 7 日に死滅し、*Cyclidium* sp. が 2 日から減少して 14 日には 1 ind./mL 未満となり、*Lecane* sp. が 4 日から減少して 14 日には 1 ind./mL 未満となり、徐々に種数と動物の個体数が減っていくことで、システムとしての代謝が活発になっていき、RCM が上昇したと考えられる。

RCM を使用する事により、全体の物質循環速度としてではなく、各生物が単位生物量当たりどれだけ活発に代謝しており、数ではなく生理学的な要因によって物質循環速度に寄与しているかを、モデルやシミュレーションではなく、実験結果を解析することによって検討することが可能である。これまでモデルやシミュレーションで仮想的に検討してきたこれらの内容に、RCM により実験的に迫ることができると期待される。

4.5. 第 4 章の結論

第 4 章では生態系影響評価における解析ツールおよび指標としてはどのような価値があるか、そして RCM によってどのような考察ができるかを検討していくことを目的として、新たに 4 種の化学物質について RCM による解析を行った。

第 3 章の OTC の結果と本章の LAS の結果から、RCM は定量的に解析可能であり、統計解析によって有意差を検定することができるため、生態系影響評価における毒性を示す指標である NOEC や LOEC を求めることが可能である。また、RCM は対象とした生物群集（本論文では従属栄養生物群集）の代謝活性を示しているため、RCM を利用することで個体数と生態系機能（CR と GPP）への影響だけでなく生物体内で起こっている現象についても分析することが可能である。つまり、例えば個体数には変化がなかったが生態系機能（CR と GPP）には変化があったので生物の代謝活性が変わったと考えられる、というような定性的な考察ではなく、RCM によって代謝活性が何倍に変化したかや、有意差の有無など定量的に分析・考察することが可能となり、生態系影響評価における評価指標の一つとして有効である。実際、SDS の実験結果では、 HR_{theo} も HR_{exp} も増加してしまっていて生物量の増加による HR_{exp} の増加なのか代謝活性も活性化しているのかを判定できなかったが (Fig. 4.4.2)、RCM を求めることで代謝活性も上昇したことが分かった (Fig. 4.4.6)。しかも、作業をルーチン化してしまえば、個体数と CR・GPP のデータセットから速やかに簡単に解析できる利点がある。

次に化学物質の影響について考察する。まず、MC-LR と、SDS、Fenitrothion、Simazin にお

いて RCM の変動パターンが異なった。RCM の変動は、各化学物質の分解性や生物群集への影響の仕方によって異なるパターンを示し、作用機序やターゲットとなる生物種、分解性などによって生物の代謝活性に違いが現れることが分かった。

メタノールと、MC-LR、SDS で共通して RCM が上昇した。一般に、化学物質の汚染に対して、生物は汚染物質の体内への流入を抑止し、排出し、分解・無害化し、影響を受けているプロセスを迂回するメカニズムを作り出すことによって対処する。どの方法で対処してもエネルギーの消費を伴うため、代謝が活性化することが一般的に知られている。しかし、OTC は RCM が減少していたことはこれと矛盾するようである。メタノールについては、MC-LR と Simazin の対照群（メタノール）を比べるとどちらもメタノールによって代謝活性が 14 日で約 3 倍に上昇しており、実験施設間の再現性も非常に良いと期待される。

OTC は他の化学物質と異なり RCM が低下した。OTC において重要なのは、その作用機序である。テトラサイクリン系抗生物質は、リボソームの 30S サブユニットに結合し、アミノアシル tRNA の mRNA への結合を阻害することで、タンパク質合成を阻害する。エネルギー（ATP）を消費するのは酵素であるが、テトラサイクリン系抗生物質はそもそも ATP を消費する酵素そのものの合成を阻害してしまうため、代謝を活性化しようにも元が絶たれてしまうのである。したがって、致死量以下のテトラサイクリン系抗生物質の作用では、代謝がゼロにはならないまでも、代謝活性は低下しうると考えられる。

このように RCM に基づいて考察することで、生体内で起こっている現象についてより定量的で深い考察が可能であり、その定量性から生態系影響評価の指標としても有効であることが示された。

第5章 結論

5.1. 総括

生態系影響評価手法は国際的に OECD（経済協力開発機構 Organization for Economic Cooperation and Development）のガイドラインに記載されている方法が採用されており、藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）や甲殻類のミジンコ（*Daphnia magna*）、魚類のヒメダカ（*Oryzias latipes*）、昆虫のセスジユスリカ（*Chironomus yoshimatsui*）、などを用いた種々の方法がある。多くの場合は、これらのうち藻類とミジンコ、ヒメダカのうち少なくとも1種を用いて試験を行い、試験結果のうち最も低い NOEC に安全係数をかけて環境基準とする方法が一般的である。

しかし、生態系は複雑系であり、複雑系に特徴的な現象であるパターン形成（自己組織化）や、振動現象、多重安定、ヒステリシスなどが実際に生態系で観察されている（Hardenberg *et al.*, 2001; Rietkerk *et al.*, 2004; Scheffer *et al.*, 2001; Blasius *et al.*, 1999）（Table 1.1.3）。このような複雑系の挙動は個々の要因だけでは明らかにできないと言うことが、非線形科学によって既に示されている。また、生態系には1種の培養・飼育系には存在しない、エネルギーフローや、物質循環、生物多様性、安定性などの生態系機能・生態系サービス（Table 1.1.4）がある。したがって、1種の試験に基づいた化学物質の生態系影響評価は不可能である。

この解決策として、閉鎖実験生態系を用いたメソコズム試験法やマイクロコズム試験法が提案され、一部ガイドライン化されている。しかし、メソコズムや多くのマイクロコズムは再現性に課題が残る上、規模が大きくコストがかかるため一般企業には実質的に実用化不可能であり、十分に普及しているとは言えない。

栗原によって作られたマイクロコズム N-system（Kurihara, 1978）は他のマイクロコズムと違い継代培養による保存が可能であり、培養後の生物群集の遷移と組成には再現性がある。N-system は 300 mL 三角フラスコに収まる小さなマイクロコズムでありながら、多くの相互作用を含み（Kawabata and Kurihara, 1978a & 1978b）、複雑系の特徴的な現象であるパッチ状パターン形成（自己組織化）をすることも確認されている（Sugiura *et al.*, 2003）。

このように N-system は生態系に特徴的な生態系機能や複雑系としての特徴を有しており、生態影響評価のツールとして有用であると考えられ、1976年には毒性影響評価のツールとして提案されていた（Sugiura *et al.*, 1976a & 1976b）。以来 N-system は、 β -BHC や、銅イオン、GEMs（緯線仕組み換え微生物）、LAS（Linear Alkylbenzene Sulfonate）、石けんなどの生態系影響評価に関する研究に使用されてきた（Sugiura *et al.*, 1979 & 1982; Sugiura, 1996; Murakami *et al.*, 1992; Inamori *et al.*, 1992; Takamatsu *et al.*, 1996 & 1997）。

そこで、環境総合推進費「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発（H21-23）」（稲森悠平 福島大学）では、以上の実績を有する N-system を用いて、構成生物の群集

構造と呼吸量・生産量を指標としたリスク評価システムの確立を図ることを目的として研究が行われた。このプロジェクトの中では、生物群集構造と呼吸量・生産量を指標として MC-LR と OTC の無影響濃度を明らかにして生態系影響評価手法としての評価を行うことと、各大学・研究施設で共通の手法で研究を行うための共通マニュアルを作成することを目的として私は研究してきた。

一方、化学物質は第一に個体に作用し、生物間相互作用などを通じて、個体レベルから個体群レベル、群集レベル、生態系レベルへと影響が伝播するため (Fig. 1.2.1)、生態系の特徴である生物間相互作用や生態系機能としての呼吸量・生産量や非線形現象に着目しつつ、化学物質の影響が個体レベルから生態系レベルに至る各階層の関連性を明らかにすることを本博士論文固有の目的として研究を進めてきた。

第2章では、ガイドラインの青写真となる共通マニュアルの作成を目的として、主に動物の計数方法と CR および GPP の求め方を検討した。動物の種毎に、計測個体数と相対標準偏差の関係を明らかにし、これに基づいて適切な動物個体数を設定した (Table 2.4.1)。次に、明暗瓶法による群集呼吸量 (CR) と総一次生産量 (GPP) を発展させるために、大気と水の間で起こる酸素の移動速度を移動現象論的に検討して、酸素の移動速度を含めた CR と GPP の計算方法を確立した。最後に、これらに基づいて生態影響評価マニュアルを作成した (付録)。

第3章では、畜産業や養殖業で最も使われており環境への直接の漏出が多いと考えられる抗生物質 OTC について、共通マニュアルに基づいて生物量と呼吸量・生産量の変化から N-system への影響を解析した。*Cyclidium* sp. と *A. hemprichi* が減少し、*Cyclidium* sp. のニッチを埋める形で *Lecane* sp. の増殖が観察され、生物間相互作用を通じた生態系影響評価ができたといえる。これらの結果から NOEC を求めると、*Cyclidium* sp. が最も低く、これまで単種培養・飼育系で調べられてきた値よりも低かった。これは、既存の方法には含まれない原生動物を含んでいるからであると考えられた。

OTC は実環境中の表層水 (湖沼や河川) においては、一般的に $0.1 \mu\text{g/L}$ であることが多く、このような条件では OTC の生態系への影響は限定的で、影響はほとんどないと言える。しかし、豚農場の近くの河川で $100 \mu\text{g/L}$ に近い濃度で検出される場合があり、このような条件では高い確率で原生動物の生物量への影響およびそれに伴う間接的な影響が生じていると考えられ、また、生態系機能にも影響が出ている可能性もある。

N-system を用いた生物量と呼吸量・生産量による生態系影響評価は、生物間相互作用を通じた間接的な影響の他に、OTC 耐性細菌の生物量と OTC の実測値の関係において非線形現象のヒステリシスと思われる現象も観察され (Fig. 3.5.8)、生態系機能や複雑系としての挙動も含めた評価でできることが改めて確認され、その有用性を更に補償するものとなった。また、薬剤耐性細菌を含めた影響評価が可能であることも明らかになった。

以上の環境総合推進費での研究成果を基に更に独自の解析を進め、相対群集代謝 (RCM) という概念を新たに定義し、計算によって求めることに成功した。具体的には、1 個体当たりの呼吸量を一定と仮定して計算した従属栄養生物群集の呼吸量 HR_{theo} と、実験結果から得られた従属栄養生

物群集の呼吸量 HR_{exp} の比 HR_{exp}/HR_{theo} を計算して従属栄養生物群集の RCM を求めた。RCM は代謝速度が一定であると仮定したときに各生物の生物量から求められる群集の代謝レベルと、実測値の比であり、個々の個体の代謝活性が基準に対して高いのか低いのかを示す指標である。例えば、人間が激しく運動しているときの代謝は安静時のおよそ 20 倍であると言われるが、人間を生物群集に置き換えて考えると、この 20 という数字が RCM に相当する。そのため、人間の運動においても、全ての組織や器官が活性化しているわけではなく主に骨格筋の代謝が活発になっていることによって全体としての代謝が相対的に上昇しているのと同じように、RCM が上昇または低下しても、全ての生物の代謝が一様に上昇または低下しているというわけではないことに注意が必要である。

このような RCM という新しい概念を指標として、OTC の影響評価を行った。OTC 濃度 $>7 \mu\text{g/L}$ で *Cyclidium* sp. が減少して *Lecane* sp. は増加し、 $7000 \mu\text{g/L}$ では *A. hemprichi* も減少したため、全体としての代謝である CR は減少していたが個体数の変動がどの程度 CR に影響しているのかが全く分からなかったが、RCM を用いることで代謝活性が低下していたことが明らかになった (Fig. 3.7.3)。つまり、OTC の添加によって OTC の添加により $700\text{--}7000 \mu\text{g/L}$ では対照群に比べて有意に RCM が低下していたため、生物量の変化によって CR が低下したというよりは、生理活性が低下したことによって CR が低下したと考えられ、OTC によって代謝が低下したために CR が低下したという上記の考察を裏付ける結果となった。全体の代謝量は 1 個体当たりの代謝量と生物量の組み合わせで決定されるが、直接測定できるデータは生物量と全体の代謝量 (CR と GPP) だけで、1 個体当たりの代謝量に基づく部分はこれまでブラックボックスであった。しかし、各データを統合的に解析することにより、1 個体当たりの代謝量に基づくパラメータである RCM が求められ、しかも定量的に解析可能であり、解析ツールとして有用であることが明らかになった。

第 4 章では生態系影響評価における解析ツールおよび指標としてはどのような価値があるか、そして RCM によってどのような考察ができるかを検討していくことを目的として、新たに 4 種の化学物質について RCM による解析を行った。

第 3 章の OTC の結果と第 4 章の LAS の結果から、RCM は定量的に解析可能であり、統計解析によって有意差を検定することができるため、生態系影響評価における毒性を示す指標である NOEC や LOEC を求めることが可能であることがはっきりした。また、RCM は対象とした生物群集 (本論文では従属栄養生物群集) の代謝活性を示しているため、RCM を利用することで個体数と生態系機能 (CR と GPP) への影響だけでなく生物体内で起こっている現象についても分析することが可能であることが分かった。つまり、例えば個体数には変化がなかったが生態系機能 (CR と GPP) には変化があったので生物の代謝活性が変わったと考えられる、というような定性的な考察ではなく、RCM によって代謝活性が何倍に変化したかや、有意差の有無など定量的に分析・考察することが可能となり、生態系影響評価における評価指標の一つとして有効である。実際、SDS の実験結果では、 HR_{theo} も HR_{exp} も増加してしまっていて生物量の増加による HR_{exp} の増加なの

か代謝活性も活性化しているのかを判定できなかったが (Fig. 4.4.2)、RCM を求めることで代謝活性も上昇したことが分かった (Fig. 4.4.6)。また、OTC のように群集構造と群集の代謝 (CR・GPP) の関係がはっきりしない場合でも、RCM を用いれば代謝活性が変化しているかどうか分かる。しかも、作業をルーチン化してしまえば、個体数と CR・GPP のデータセットから速やかに簡単に解析できる利点がある。

メタノールは偶然に MC-LR と Simazin で共通に使用していたので、実験施設間の再現性を検証した。メタノールについては、MC-LR と Simazin の対照群 (メタノール) を比べるとどちらもメタノールによって代謝活性が 14 日で約 3 倍に上昇しており、実験施設間の再現性も非常に良いと期待される。

OTC は他の化学物質と異なり RCM が低下した。OTC において重要なのは、その作用機序である。テトラサイクリン系抗生物質は、リボソームの 30S サブユニットに結合し、アミノアシル tRNA の mRNA への結合を阻害することで、タンパク質合成を阻害する。エネルギー (ATP) を消費するのは酵素であるが、テトラサイクリン系抗生物質はそもそも ATP を消費する酵素そのものの合成を阻害してしまうため、代謝を活性化しようにも元が絶たれてしまうのである。したがって、致死量以下のテトラサイクリン系抗生物質の作用では、代謝がゼロにはならないまでも、代謝活性は低下しうると考えられる。このように、作用機序と RCM に一定の関連性がある可能性がある。

β -BHC や、銅イオン、GEMs、LAS、石けんなどの生態系影響評価に関する研究を通じて、N-system の生態系影響評価ツールとしての有用性は既にかかなりの程度示されてきた。本研究では、*Cyclidium* sp. の現象に伴い、*Lecane* sp. がニッチを埋める形で増加するなど、生物間相互作用を通じた生態系影響評価ができていると示された。また、薬剤耐性菌の出現についても N-system で検証可能であることが本研究で初めて明らかとなった。

更に、独自の解析によって求められた RCM によって、生物量の変化による群集代謝の変化を除外して生体内の代謝活性がどう変化しているかを定量的に解析可能であることが OTC の実験データの解析から明らかになった。第 4 章では更に、OTC だけでなく、種々の化学物質の影響も評価可能であることが確認され、RCM が有効な範囲がかなり広く、作用機序に迫る深い考察が可能であることが確認された。RCM は作用機序と生物量および群集代謝を関連づけて影響を理解していくに当たって強力なツールの一つとなるだろうと期待される。

5.2. まとめ

OTC の実験において、生態系影響評価における N-system の有用性に関連して、以下のことが明らかになった。

- N-system によって、生物間相互作用を通じた間接的な影響評価が可能である (*Cyclidium* sp. のニッチを埋める形で *Lecane* sp. が増加した)
- 複雑系としての特徴であるヒステリシスと思われる現象を観察できた (OTC 耐性細菌と OTC の実測値の関係)

- 他の大規模なマイクロコズムを用いたテトラサイクリン系抗生物質の影響評価と一致する結果が得られた

独自の解析によって RCM を得ることに成功した。RCM には解析および考察において以下の利点を有することが明らかになった。

- 作業をルーチン化してしまえば、生物量と CR および GPP から簡単に導出可能である
- 個々の生物の代謝活性が変化せずに生物量が増えただけでも CR や HR_{exp} などは変化してしまうが、RCM は生物量の変化を無視して生物の代謝活性だけを見ることができる
- 上記の特徴により、化学物質の作用機序と生物量と CR の関係性を明らかにする強力なツールとなり得る

本論文を構成する学術論文および学会発表

本論文を構成する学術論文

Shibata, K., Amemiya, T., Itoh, K. (2014) Effects of oxytetracycline on populations and community metabolism of an aquatic microcosm. *Ecological Research*, in press.

本論文を構成する学会発表

国際学会

Shibata, K., Amemiya, T., Itoh, K.: Effects of the antibiotic oxytetracycline on a freshwater microcosm. *The Japanese Society of Microbial Ecology*, Nov, 2010, Tsukuba, Japan.

Shibata, K., Amemiya, T., Itoh, K.: Degradation of Microcystins by Typical Proteases and Proteolytic Microbes. *The 1st Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology*, May, 2009, Jeju Island, Korea.

国内学会

柴田 賢一, 雨宮 隆, 伊藤 公紀: マイクロコズムを用いた呼吸量と生産量によるミクロシスチンLRの生態影響評価. 第16回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 2010年9月, つくば.

柴田 賢一, 雨宮 隆, 伊藤 公紀: 微小生態系におけるコロニーパターン形成と環境影響評価. 第23回非線形反応と協同現象研究会, 2013年12月, 札幌.

その他の学会発表

国際学会

Shibata, K.: Degradation of Water Bloom by Algae Lytic Bacteria and the Effects on Lake Microbial Ecosystems. *International Symposium on Emerging Ecological Risk and Food Security in Asia*, Feb, 2008, Yokohama, Japan.

Shibata, K.: Activities of algicidal bacteria and their influences on microbial communities. *JST Presto Symposium on Mathematical Sciences towards Environmental Problems*, Jun, 2008, Sapporo, Japan.

国内学会

柴田 賢一. 溶藻細菌によるアオコの分解に関する研究. 第42回日本水環境学会年会, 2008年3月, 名古屋.

柴田 賢一. 溶藻細菌の溶藻性発現の条件検討. 平成20年度日本水産学会春季大会, 2008年3月, 静岡.

柴田 賢一. キッチン培地による殺藻細菌の単離 —スキムミルク培地との比較—. 平成21年度日本水産学会春季大会, 2009年3月, 品川.

謝辞

本研究を通して誠に多くの方々にご指導とご協力を頂きましたことに、心からお礼申し上げます。特に、始終ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました横浜国立大学の雨宮隆教授に深謝いたします。大変に貴重なご指導とご指摘を賜りました横浜国立大学の伊藤公紀教授に深謝いたします。

環境総合推進費の遂行上、有益なご助言などを賜りマイクロコズムの N-system も提供していただいた元相模女子大学教授の杉浦桂先生に心より感謝いたします。同じく、有益なご助言などを賜り実験データの提供もしていただいた福島大学の稲森悠平教授と賀数邦彦氏、及び東北大学の鹿野秀一教授に心より感謝いたします。環境総合推進費を通じて有益なご助言や資料を賜りました、総合地球環境学研究所の川端善一郎教授と、愛媛大学の中島敏幸先生、独立行政法人放射線医学総合研究所の府馬正一先生、千葉工業大学の村上和仁教授、株式会社ライオンの白井秀人様に心よりお礼申し上げます。

本研究にご理解とご助力を頂いた横浜国立大学の中島啓光先生と芹沢浩氏に心よりお礼申し上げます。本論文の執筆及び研究活動において大変なご協力をして下さった、伊藤・雨宮研究室の皆様心よりお礼申し上げます。

本論文の審査を快く引き受け貴重なご意見を下さった、笹本浜子教授、菊池知彦教授、中村達夫准教授に心より感謝いたします。

本研究の一部は環境総合推進費「マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発(H21-23)」の援助を受けて行われました。ここに感謝いたします。

最後に、生活面と経済面において研究生活を支援してくれた両親に感謝いたします。

2013年2月1日

参考文献

- Baguer, A. J., Jensen, J., and Krogh, P. H. (2000) Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere* 40:751–757.
- Barnes, C. R. S. K., Calow, P., and Olive, P. J. W. (1993) *The Invertebrates: A New Synthesis*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.
- Boleas, S., Alonso, C., Pro, J., Fernández, C., Carbonell, G., Tarazona, J. V. (2005) Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS-3) and influence of manure co-addition. *Journal of Hazardous Materials*, **122**, pp. 233–241.
- Burnison, B. K. (1980) Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, pp. 729-733.
- Burnison, B. K. (1980) Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, pp. 729-733.
- Dong, H., and Wei, J. M. (2004) Low concentrations of tetracycline enhance the photophosphorylation and P/O ratio of chloroplasts. *Photosynthesis Research*, **79**, pp. 201–208.
- Duarte, C. M., Cebrián, J. (1996) The fate of marine autotrophic production. *Limnological Oceanography*, **41**, pp. 1758–1766.
- EPA (1996) *OPPTS 850.1900 Generic Freshwater Microcosm Test, Laboratory*. EPA712-C-96-134, US EPA, DC, USA.
- Fenchel, T., Finlay, B. J. (1983) Respiration rates in heterotrophic, free-living protozoa. *Microbial Ecology*, **9**, pp. 99–122.
- Fuma, S., Kawaguchi, I., Kubota, Y., Yoshida, S., Kawabata, Z., Polikarpov, G. G. (2011) Effects of chronic γ -irradiation on the aquatic microbial microcosm: equi-dosimetric comparison with effects of heavy metals. *Journal of Environmental Radioactivity*, **104**, pp. 81–86.
- Gaarder, T. and Gran, H. H. (1927) Investigations on the production of plankton in the Oslo Fjord. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer. Rapports et Proces-Verbaux*, **42**, pp. 1–48.
- Galkovskaya, G. A. (1995) Oxygen consumption rate in rotifers. *Hydrobiologia*, **313/314**, pp. 147–156.
- Grande, K. D., Williams, P. J. LeB., Marra, J., Purdie, D. A., Heinemann, K., Eppley, R. W., and Bender, M. L. (1989) Primary production in the North Pacific gyre: A comparison of rates determined by the ^{14}C , O_2 concentration and ^{18}O methods. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*. **36**, pp. 1621–1634.
- Graney, R. L., Kennedy, J. H., and Rodgers, Jr, J. H. eds. (1994) *Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment*. CRC Press, Inc., Florida, USA.
- Hallberg, R. L., Wilson, P. G. (1981) Regulation of ribosome phosphorylation and antibiotic sensitivity in tetrahymena thermophila : a correlation. *Cell*, **26**, pp. 47–56.

- Hallberg, R. L., and Wilson, P. G. (1981) Regulation of ribosome phosphorylation and antibiotic sensitivity in tetrahymena thermophila : a correlation. *Cell*, **26**, pp. 47–56.
- Hendrix, P. F., Langner, C. L., Odum, E. P., and Thomas, C. L. (1981) Microcosms as Test Systems for the Ecological Effects of Toxic Substances: An Appraisal with Cadmium. *US-EPA Technical report data*, EPA-600/3-81-036.
- Hoening, J. M., and Heisey, D. M. (2001) The Abuse of Power: The Pervasive Fallacy of Power Calculations for Data Analysis. *The American Statistician*, **55**, pp. 19–24.
- Inamori (1992) Environmental assessment method for field release of genetically engineered microorganisms using microcosm systems. *Water Science and Technology*, **26(9-11)**, pp. 2161–2164.
- Kawabata, Z and Kurihara, Y. (1978 a) Computer simulation study on the relationships between the total system and subsystems in the early stages of succession of the aquatic microcosm. *The science reports of the Tohoku University*. **37**, pp. 179–204.
- Kawabata, Z. and Kurihara, Y. (1978 b) Computer simulation study on the nature of the steady state of the aquatic microcosm. *The science reports of the Tohoku University*. **37**, pp. 205–218.
- Kiatfuengfoo, C. R., Suthiphongchai, T., Praunwattana, P., Yuthavong, Y. 1989. Mitochondria as the site of action of tetracycline on plasmodium falciparum. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **34**, pp. 109–116.
- Kiddon, J., Bender, M. L., and Marra, J. (1995) Production and respiration in the 1989 North Atlantic spring bloom: An analysis of the irradiance-dependent changes. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*. **42**, pp. 553–576.
- Kurihara, Y. (1978) *The science reports of the Tohoku University IV (Biology)*, **37**, pp. 161–177.
- Lin, A. Y., Tsai, Y. (2009) Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment*, **407**, pp. 3793–3802.
- Lin, Q., Katakura, K., and Suzuki, M. (2002) Inhibition of mitochondrial and plastid activity of Plasmodium falciparum by minocycline. *FEBS Letters*, **515**, pp. 71–4.
- Makarieva, A. M., Gorshkov, V. G., Li, B. L. (2012) Energetics of the smallest: do bacteria breathe at the same rate as whales? *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, pp. 2219–2224.
- Mathis, A., Wild, P., Deplazes, P., Boettger, E. C. (2004) The mitochondrial ribosome of the protozoan Acanthamoeba castellanii is the target for macrolide antibiotics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **135**, pp. 223–227.
- Matsui, Y., Ozu, T., Inoue, T., Matsushita, T. (2008) Occurrence of a veterinary antibiotic in streams in a small catchment area with livestock farms. *Desalination*, **226**, pp. 215–221.
- McCann, K. S. (2000) The diversity-stability debate. *Nature*, **405**, pp. 228–233.

- McConnel, W. J. (1962) Productivity relations in carboy microcosms. *Limnology and Oceanography*, **7** (3), pp. 335–343.
- Murakami, K., Inamori, Y., Sudo, R., and Kurihara, Y. (1992) Effect of temperature on prosperity and decay of genetically engineered microorganisms in a microcosm system. *Water Science and Technology*, **26(9-11)**, pp. 2165–2168.
- Odum, H. T., and Hoskin, C. M (1957) Metabolism of a Laboratory Stream Microcosm. *Publications of the Institute of Marine Science The University of Texas Marine Science Institute, Port Aransas, Texas*, **4**, pp. 115–133.
- Petersen, J. E., Kennedy, V. S., Dennison, W. C., and Kemp, W. M. eds. (2008) *Enclosed Experimental Ecosystems and Scale: Tools for Understanding and Managing Coastal Eco- systems*. Springer, New York, USA.
- Potami, F., Netting, A. G., Calamari, D., and Neilan, B. A. (2004) Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*, **67**, pp. 387–396.
- Ronen R. and Galun, M. (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation, *environmental and Experimental Botany*, **24(3)**, pp. 239–245.
- Sanderson, H., Ingerslev, F., Brain, R. A., Halling-Sørensen, B., Bestaria, J. K., Wilson, C. J., Johnson, D. J., and Solomon, K. R. (2005) Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC–UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. *Chemosphere*, **60**, pp. 619–629.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B. A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**, pp. 725–759.
- Scheffer, M., Carpenter, S., Foley, J. A., Folke, C., and Walker, B. (2001) Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, **413**, pp.591–596.
- Sugiura, K. Sato, S., Goto, M., and Kurihara, Y. (1976 a) Toxicity assessment using an aquatic microcosm. *Chemosphere*, **5**, pp. 113–118.
- Sugiura, K., Kawasaki, Y., Kinoshita, M., Murakami, A., Yoshida, H., Ishikawa, Y. (2003) A mathematical model for microcosms : formation of the colonies and coupled oscillation in population densities of bacteria. *Ecological Modeling*, **168**, pp. 173–201.
- Sugiura, K., Sato, S., Goto, M, and Kurihara, Y. (1976 b) Effects of β -HCH on aquatic microcosm. *Chemosphere*, **2**, pp. 113–118.
- Takamatsu, O., Inamori, Y., Nishimae, H., Ebisuno, T., Sudo, R., and Matsumura, M. (1997) Environmental assessment of LAS on the aquatic ecosystem using a scale-up system. *Water*

- Science and Technology*, **36(12)**, pp. 207–214.
- Takamatsu, Y., Nishimura, O., Inamori, Y., Sudo, R., and Matsumura, M. (1996) Effect of temperature on biodegradability of surfactants in aquatic microcosm system. *Water Science and Technology*, **34(7-8)**, pp. 61–68.
- Taub, F. B. (1989) Standardized aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology*, **23(9)**, pp. 1064–1066.
- Taub, F. B., Dollar, A. M. (1964) A Chlorella – Daphnia food chain study: the design of compatible chemically defined culture medium. *Limnological Oceanography*, **9**, pp. 61–74.
- Thiele-Bruhn, S., Beck, I. C. (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, **59**, pp. 457–465.
- Warne, M. St J., and van Dam R. (2008) NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. *Australasian Journal Of Ecotoxicology*, **14**, pp. 1–5.
- Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, pp. 307-313.
- Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, pp. 307-313.
- Wilson, C. J., Brain, R. A., Sanderson, H., Johnson, D. J., Bestari, K. T., Sibley, P. K., Solomon, K. R. (2004) Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microcosms. *Environmental Science and Technology*, **38**, pp. 6430–6439.
- 稲森, Y., 高松, Y., and 須藤, R. (1998) マイクロコズムによる生態系影響評価. *廃棄物学会誌*, **9(5)**, pp. 368–378.
- 公益社団法人 日本下水道協会 (2012) 下水試験方法 下巻 -2012年版-, pp. 364–374.
- 水科, T. and 荻野, F. (1981) 輸送現象, 産業図書株式会社, 東京, 日本.
- Eagle, H., Fleischman, R, and Levy, M. (1952) Development of Increased Bacterial Resistance to Antibiotics I.: Continuous Spectrum of Resistance to Penicillin, Chloramphenicol, and Streptomycin, *Journal of Bacteriology*, **63(5)**, pp. 623–638.
- Lopez, J., Vazquez, M. D., and Carballeira, A. (1994) Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. *Freshwater biology*, **32**, pp. 185–198.
- Lopez, J., Betuerto, R., and Carballeira, A. (1997) D665/D665a index vs. frequencies as indicators of bryophyte response to physicochemical gradients, *Ecology*, **78(1)**, pp. 261–271.
- Kong, F. X., Hu, W., Chao, S. Y., Sang, W. L., and Wang, L. S. (1999) Physiological responses of the lichen *Xanthoparmelia mexicana* to oxidative stress of SO₂. *Environmental and Experimental*

Botany, **42**, pp. 201–209.

Megateli, S., Semsari, S., and Couderchet, Michel. (2009) Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, pp. 1774–1780.

付録

マイクロコズムを用いた生態系リスク影響評価システム手法の開発

-共通マニュアル-

はじめに

背景

魚類等の高次捕食者を含んだ水圏生態系は、生産者（藻類）、低次捕食者（微小動物）、分解者（細菌）を主とする微生物生態系を基盤としていることが重要であり、水圏生態系の水質浄化や物質循環には特に微生物生態系が重要な役割を担っている。微生物生態系は、光合成を行う生産者としての藻類、消費者としての微小動物、分解者としての従属栄養細菌類等からなり、窒素、リン、農薬、重金属等の化学物質の負荷による生態系の変動パラメータを考慮することが重要である。

生態系システム評価解析の上では、水圏のモニタリングデータに基づいて構成したマイクロコズム（安定モデル生態系）を用いた微生物群集の動態解析を相補的に活用することが有効・効果的であり、これがマイクロコズムの重要な意義となる。従来より行われてきた単一生物を用いた手法は、生態系機能を含めた生態系リスク評価研究がなされていないのが現状である。マイクロコズムを活用した生態学的研究は、国際化が重視されているのが現状で、OECD 試験法の検討においても、生態系システム評価の重要性が指摘されている。

目的

本試験法はマイクロコズムを用いた水圏の生態リスク評価を行うことを目的とする。対象とするマイクロコズム（N-system）には、水圏生態系に及ぼす化学物質の影響評価試験のツールとして位置づけられる生産者（藻類）、捕食者（微小動物）、分解者（細菌類）が存在し、単種培養系にはない、微生物間相互作用、物質循環、エネルギーフローなどの生態系機能を含んでいる。

N-system は、分解者として少なくとも4種の細菌類 *Bacillus cereus*、*Pseudomonas putida*、*Acinetobacter* sp.、coryneform bacteria、生産者として2種の緑藻類 *Chlorella* sp.、*Scenedesmus* sp.、1種の糸状藻類 *Tolypothrix* sp.、捕食者として1種の原生動物繊毛虫類 *Cyclidium* sp.、2種の後生動物輪虫類 *Lecane* sp.、*Philodina* sp.、1種の後生動物貧毛類 *Aeolosoma hemprichi* の組合せからなるマイクロコズムである。定常期の N-system を種として新たな培地に植え継ぐと繰り返す同様な共存系の増殖曲線が得られるという高い安定性と再現性を有するモデル微生物生態系であり、統一規格としてデータを比較解析する上ではきわめて有効なツールである。本試験法は、上記の点に鑑み、生態系機能のモデルとしてのフラスコマイクロコズムである N-system を用いた生態系リスク評価を目的としたものである。

試験法の概要

- (1) 定常期にある N-system を特定の培地に接種し、定常期に達するまで培養する。
- (2) 定常期の N-system に被験物質を添加して試験を開始する。
- (3) 添加 2 週間後の生物量と、溶存酸素 (DO) 濃度変化から算出した呼吸量 (R)、生産量 (P)、および P/R 比を対照群と比較することで無影響濃度 (NOEC) を求める。

目次

はじめに.....	1
目次.....	3
マイクロコズムの培養.....	4
培養条件.....	4
TP 培地 (<i>Taub Polypepton Medium</i>).....	4
継代培養.....	5
断熱材を敷く.....	5
生物の定量法.....	6
動物.....	6
藻類.....	6
Chlorophyll a 及び b.....	7
細菌.....	8
DGGE による原核生物群集解析.....	8
DNA の抽出.....	8
DNA の増幅.....	8
溶存酸素の測定と記録.....	9
DO メーターの校正.....	9
YSI 58 型 DO メーターとロガー (AM-8000) の接続.....	9
ロガー (AM-8000).....	9
DO メーターの出力電圧と DO.....	10
DO 電極のメンテナンス (ポーラログラフ式電極 5750).....	10
溶存酸素の測定方法.....	12
呼吸量と総生産量の算出方法.....	12
酸素が大気中から培養液中 (水中) に溶解する速度の求め方.....	12
呼吸量と総生産量の算出.....	17
試験方法.....	19
APPENDIX.....	20
Taub 培地のストックソリューション改 (全て 1000 倍濃度版).....	20

マイクロコズムの培養

培養条件

明暗周期 = 12H/12H、温度 25°C、照度 2400 lx (光合成光量子束密度 $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)。

光源には National (=Panasonic) FL20SS-W/18 を使用する。3 ヶ月ごとにすべての蛍光灯を交換するか、1 ヶ月ごとに照度または光合成光量子束密度を測定して変化した時に交換する。

TP 培地 (Taub Polypepton Medium)

Stock solution			Volume
A	Polypepton* ^{1, 2, 3}	2.0 g / 100 ml	10.0 ml
B	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.93 g / 200 ml	2.0 ml
C	KH ₂ PO ₄	2.72 g	2.0 ml
	NaOH	0.56 g / 200 ml	
D	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7.35 g / 500 ml	40.0 ml
E	NaCl	2.92 g / 500 ml	60.0 ml
F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98 g	0.375 ml
	Na ₂ EDTA	2.72 g / 200 ml	
G	H ₃ BO ₄	0.930 g	1.0 ml
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.144 g	
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.99 g	
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.012 g	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 g	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.145 g / 500 ml	
蒸留水			Up to 2,000 ml

培地を調整後、300 ml フラスコに 200 ml ずつ分注してシリコ栓*⁴をし、オートクレーブ (121°C、15 min)。

TN = 14.5 mg/l、TP = 1.0 (ペプトン) + 3.1 (KH₂PO₄) = 4.1 mg/l、TN / TP = 3.54

*1 Polypepton (和光コード (包装) : 394-00115 (500 g)、390-00117 (10 kg)) を使用する。
 なお、日本製薬の Polypepton は、「牛乳カゼインを酵素分解後、精製し、乾燥した灰黄色の粉末である。… (中略) …BD 社製の *Trypticase Peptone*、*Casitone* に相当する」(日本製薬製品要覧より)。

*2 Polypepton の添加方法は各人に任せる。e.g. (1) その都度粉末で加える。(2) ペプトン溶液を作って、オートクレーブ (121°C、15 min) して保存し、その都度無菌的に加える。ただし、

オートクレーブは品質の変化を伴うので、二重滅菌はしない。

- *3 窒素含有率 14.5%、リン含有率 1.0% (w/w)。(測定方法:①ポリペプトン水溶液を正確に 10ppm に調整。②ペルオキソ二硫酸カリウム分解法で分解。窒素化合物およびリン化合物はすべて NO_3^- および PO_4^{3-} に分解される。④ NO_3^- を紫外線吸光光度法で、 PO_4^{3-} をモリブデン青吸光光度法で測定した。)
- *4 株式会社 松浦製作所、品番 6-343-16、型番 C-40、300・500 ml 三角フラスコ用、通気量 2,000 ~4,500 ml/min。

継代培養

継代培養は、2 ヶ月に 1 回行う。細菌や真菌のコンタミには強いが、無菌操作をする。

新鮮な培地 200 ml を 300 ml フラスコに入れる。保存培養のためには 30 ml、実験のためには 10 ml のマイクロコズム培養液をこれに加える。

断熱材を敷く

スターラーなど、下部の熱源からの熱伝達を軽減するために、フラスコの下に断熱材を敷く。

断熱材にはシリコンゴムスポンジシート (SR、片面スキン付き) (タイガースポリマー株式会社) を使う。

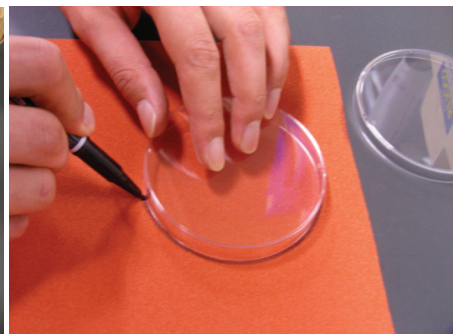
シリコンゴムスポンジシートに色があるので、反射光のスペクトルが変化してしまい、マイクロコズムに影響が出る。そのため、シートの上に白い濾紙を載せて影響を抑える。

例として断熱ユニットの作り方を載せた。断熱材の上に白い紙を置くだけでも良い。

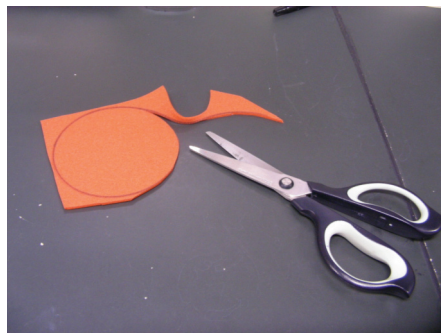
断熱ユニットの作り方



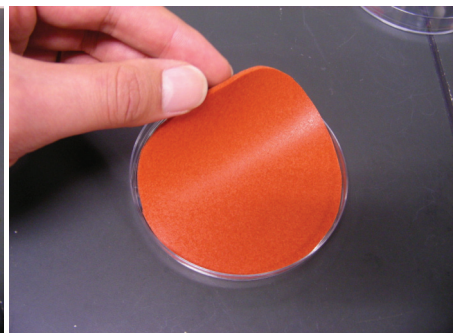
1) シリコンゴムスポンジシートと、はさみ、油性ペン、使い捨てシャーレ、濾紙を用意する。



2) シャーレの底を型にして油性ペンで線を引く。



3) 少し大きめに切り、後で微調整する。シャーレの底を型にして、そのままはさみで切っても良い。



3) 断熱材をシャーレの蓋にはめ、その上に濾紙を載せる。これに 300 ml フラスコ (マイクロコズム) を載せる。

生物の定量法

本マイクロコズムの主な構成種は、下記の通りである。

- *Cyclidium* sp. (繊毛虫)
- *Philodina* sp. (輪形動物)
- *Lecane* sp. (輪形動物)
- *Aeolosoma hemprichi* (環形動物 貧毛類)
- *Chlorella* sp. (緑藻)
- *Scenedesmus* sp. (緑藻)
- *Tolypothrix* sp. (糸状藻類)
- Bacteria (*Bacillus cereus* と、*Sinorhizobium* sp. または *Ensifer* sp.、*Pseudomonas* sp.、*Dyella* sp. または *Luteibacter rhizovicinus* の存在が確認されている)

Lecane sp. と、*Cyclidium* sp. 及び藻類は、ほとんどの固定液で保存可能である (e.g. 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (4°C保存)、ルゴール液 (室温保存))。固定液の配合割合や、保存可能期間、形態 (*Tolypothrix* sp. の長さなど) の変化に気をつけること。

藻類の生物量は Chlorophyll *a* (Chl *a*) または Chl *a* と *b* の濃度で代用しても良い (可能であれば C-Phycocyanin (C-PC) も測定すると良い)。なお、Chl *a* は全藻類、Chl *b* は緑藻類、C-PC は藍藻類が持っている。

動物

Philodina* sp. と *Aeolosoma hemprichi

Philodina sp. と *Aeolosoma hemprichi* はグリッド付き界線スライドグラスを用いて光学顕微鏡で計数する。単位は N/ml とする。

***Lecane* sp. と *Cyclidium* sp.**

先述の通り、この2種の動物は固定保存可能である。グリッド付き界線スライドグラスや、血球計算盤などで計数する。単位は N/ml とする。

藻類

***Chlorella* sp.**

血球計算盤などで計数する。単位は cells/ml とする。

Chlorella sp. は単細胞や群体状で存在しているため、計数に支障が出る。超音波処理 (20 sec.) で群体を崩してから計数する。それでも 100% 群体をなくすことはできないが、計数に支障がない程度までは分散できる。

***Scenedesmus* sp.**

Chlorella sp.以外の藻類は、前処理としてサンプルを vortex するだけでよい。単位は cells/ml とする。

***Tolypothrix* sp.**

糸状藻類は、超音波処理すると種の判別が困難になるし、測定精度が少し下がるため、前処理はサンプルを vortex するだけでよい。超音波処理する場合は、弱い出力で 10 sec 程度処理する（要検討）。超音波処理の有無及び条件は、各試験毎に統一すること。

単位は cm/ml とする。デジタル画面上で長さが測れる場合はそれで長さを測る。それができない場合は、スライドのマス目と比較して、およその長さを測る。

Chlorophyll *a* 及び *b*

Chl *a* 及び *b* の抽出・定量方法は多種あるが、一般的に抽出効率が良く取り扱いの簡単なジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた抽出方法 (Burnison 1980) を紹介する。培養液を 1~2 ml 程度、 \varnothing 25mm のガラスファイバーフィルター-GF/F (Whatman、UK) または GF 75 (Advantec、日本) でろ過する。濾紙を軽く丸め、1.5~2.0 ml の遠沈管に入れる。DMSO を加え、30 秒の超音波処理を 3 回行う。(後で測定する場合は、DMSO を加える前の状態で-20°Cで保存または、DMSO を入れて超音波処理した状態あるいは完全に抽出した状態で 4°C保存する。ただし、保存方法は全てのサンプルで統一すること。) サンプルを冷凍または冷蔵していた場合はきちんと室温に戻してから、65°Cで 10 分静置する。遠心分離 (e.g. 12,000 r.p.m で 10 分) してフィルターと細胞片を除去する。上澄みのスペクトルを分光光度計で測定し、下記の方程式 (Wellburn 1994) から Chl *a* 及び *b* の濃度を算出する。

$$A_{\lambda} = (\text{波長 } \lambda \text{ nm における吸光度}) - (\text{波長 } 750 \text{ nm における吸光度})$$

$$\text{Chl } a = 12.19 A_{665} - 3.45 A_{649}$$

$$\text{Chl } b = 21.99 A_{649} - 5.32 A_{665}$$

参考文献

- Burnison, B. K. (1980) Modified dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, pp. 729-733.
- Wellburn, A. R. (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, pp. 307-313.

細菌

細菌は、試料 0.5~1 ml をとり、超音波処理 (20 sec) を行った後、段階希釈法により菌数を調整し、生菌数 (PY 培地培地を用いたコロニー計数法) を計測する。培養時間は 5 日以上。コロニー計数法では、30~300 CFU/plate (100 CFU/plate が理想的) のプレートを選び、2~3 枚計測する。単位は CFU/ml とする。

PY 培地の組成	
Polypepton	5 g
NaCl	4 g
Yeast extract	3 g
Agar	20 g
Distilled water	1 L

DGGE による原核生物群集解析

DNA の抽出

ISOIL for Beads Beating kit または同等の Beads Beating を用いた DNA 抽出キットにより DNA を抽出する。手順は各キットの手順に従う。

DNA の増幅

Muyzer *et al.* (1995) に従って、nested touch down PCR を行う。Eu10F と Eu/Ar1500R のプライマーを用いて 16S rDNA のほぼ全領域を増幅した後、この PCR 産物を鋳型に 341F-GC と 907R のプライマーを用いて V3 領域を増幅する。

プライマーの塩基配列を下表に示す (場所は、*Escherichia coli* の 16S rRNA における位置)。

プライマー	場所	塩基配列
Eu10F	8-27	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Eu/Ar1500R	1510-1492	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
341F-GC	341~358	5'-(CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG) CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
907R	907~927	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

10~100 ng のサンプル DNA と、25 pmol の各プライマー、各 10 mmol のデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、10 ml の 10×PCR バッファー [100 mM Tris-HCl (pH 9)、15 mM MgCl₂、500 mM KCl、0.1% (w/v) gelatin、1% (v/v) Triton X-100] を混合し、最終体積を滅菌水で 50 μl に調整し、2 滴のミネラルオイルを重層する。最初の熱変性ステップ (94°C、5 min) の後に、80°C の温度で SuperTaq DNA Polymerase を加える。

PCR 条件は下記の通り。

ステップ	温度	時間
熱変性	80→60°C (1 サイクル毎に 1 度下げる)	
アニーリング		
伸長反応		
サイクル数		

--	--	--

溶存酸素の測定と記録

溶存酸素は YSI 58 型 DO メーターで測定し、AM-8000 シリーズで記録する。AM-8000 シリーズはコンパクト サーモ ロガーだが、電圧として記録すれば応用できる。必要に応じてロガーから PC にデータを送って分析する。各装置の基本的な取り扱いには各取扱説明書に譲る。以下に、特筆点等を記す。

DO メーターの校正

- 1) DO メーターの電極は 5750 を用い、メンブレンは 5775 スタンダード・メンブレンを使用する。
- 2) メンブレン・セレクター・スイッチのポジションを中央にする。メンブレン・セレクター・スイッチは、ゴム製の足と一体になっているネジを取り、DO メーターを開けてから操作する必要がある。
- 3) 約 200 ml の蒸留水を 300ml 三角フラスコに入れ、実験時と同様に、電極にキャップとカバーグラス、回転子を設置し、スターラーの上で攪拌する。スターラーの回転速度は、4 に設定する。この状態で一晩インキュベーターに入れたままにし、熱平衡にする。
- 4) 出力電圧が安定したときの溶存酸素濃度を 8.26 mg/l として校正する。
- 5) 電極のメンテナンスは 10 日ごとに行う（詳細は、後述の「DO 電極のメンテナンス」を参照）。メンテナンス後に必ず DO メーターの校正を行う。

YSI 58 型 DO メーターとロガー（AM-8000）の接続

DO メーターとロガーにはそれぞれ端子が付属している。別途リード線を購入し、各端子をつける。DO メーター側の端子は、ハンダ付けが望ましい。これを DO メーターのレコーダー出力ジャックとロガーのセンサ入力部に差し込んで接続は完了である。

ロガー（AM-8000）

- 1) MENU→SET→CHANNEL へ進み、使用するチャンネルの設定を TEMP から VOLT に変更する。その他は OFF にする。
- 2) MENU→SET→RESOL へ進み、分解能を 0.1°C に設定する。
- 3) MENU→SET→INT&MNo. へ進み、INTERVAL を 30 m 0 s 0 ms に設定する（30 分に 1

回)。全チャンネル合計で 60,000 データ保存でき、2 チャンネル使用するので、メモリーいっぱいには保存すると、30,000 回データが取れる。ただし、使用していないチャンネルを OFF にし忘れると、6 チャンネルすべてを記録してしまうので 3 倍の早さで目盛りを消費してしまう点に注意する。

- 4) MENU→SET→CLOCK へ進み、日時を設定する。
- 5) MENU→SET→MANUAL へ進み、MANUAL SET を OFF にする。
- 6) コマンド待ち画面で START を押すと記録が始まる。MENU 画面等で ESC を押すと、コマンド待ち画面に戻る。
- 7) データ収集後は速やかに PC にデータを転送する。ロガーと PC を付属の USB ケーブルで接続して、転送する（取扱説明書参照）。転送したファイルを確認したら、ロガーを操作して MENU→CLEAR→OK でロガーのデータを消去する。これを忘れると、次回ログをとった時に、途中でメモリがいっぱいになり、記録が途中で終わってしまう。

DO メーターの出力電圧と DO

ロガーへの出力は電圧で、DO は電圧として記録される。電圧を DO に換算するには次の式に代入する（YSI 社からの情報）。

$$\text{表示 DO (mg/l)} = 19.99 \text{ (mg/V)} \times \text{出力 (V)}$$

この式は常に成り立つ。

DO 電極のメンテナンス（ポーラログラフ式電極 5750）

- 1) 黒いゴムパッキンと膜、キャップを固定するための透明なパッキン（ビニールホースの切れ端）を外す。ビニールホースの切れ端は使い捨てにする。
- 2) 電極内部に満たされた塩化カリウム溶液（界面活性剤が含まれている）を廃棄する。
- 3) 軽くすすぐ。
- 4) PE 細口びん 100 ml（科学機器総合カタログ：358-22-01-03）の底を切り取り、電極に取り付けて固定する（写真）。
- 5) 約 12.5%アンモニア水（市販のアンモニア水の 1/2 濃度）を入れて 1H 放置する。PE 細口びん 250 ml（科学機器総合カタログ：

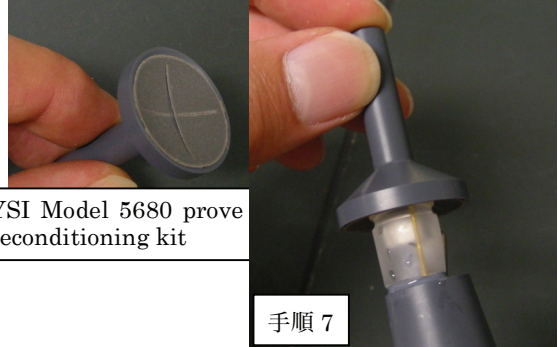


手順 4～5

358-22-01-04) の底を蓋にして使うとよい (写真)。

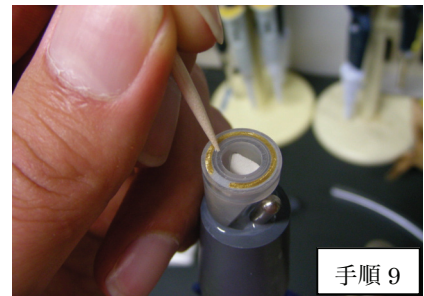
- 6) 蒸留水でアンモニア水をよく洗い流す (3 回くらいで十分だが臭いで確認すること)。臭いがなかなか取れない場合は、アンモニア水の代わりに蒸留水を入れて、手順 4~5 と同様に処理する。このとき、蒸留水に窒素をバブリングしてから使うと、電極の酸化を避けられる。

- 7) 金電極が汚れているときは、YSI Model 5680 prove reconditioning kit を用いて金電極表面を研磨する (写真)。



- 8) 電極本体 (プラスチック部) の外側の部分が角張って尖ってメンブレンが破れる原因になるので、やすりで面取りする。

- 9) 金電極の内側に溝があるので、溝にたまった削りカスを爪楊枝で取り除く (写真)。内部の三角形の電極は微粒子をスパッタして固めたようになっているため、もろい。触るとポロポロ崩れるので、触らないように気をつけること。



- 10) 蒸留水で削りカスを落とす。

- 11) 1 cm 強の長さに切ったビニールホース (内径 16 mm、外径 19 mm) を電極にはめる。

- 12) 電極に添付された塩化カリウム溶液で 3 回すすぐ。

- 13) 塩化カリウム溶液を満らし、膜を張る。このとき、パッキンを蒸留水でぬらしておくとしりゃりゃが良くなって取り付けやすくなる。界面活性剤が含まれているため、泡が入るとやり直すしかない。

- 14) パッキン部を蒸留水で濡らして滑りをよくしてから、膜を八方に引っ張り、完全に皺をなくす。

- 15) メンテナンス後は、必ず校正すること。

※ 内部の電極は使っているうちに消費されて小さくなっていく。小さくなるにつれて膜の皺に敏感になっていくので、使い込んでいる場合は特にしっかりと膜の皺を取っておくこと。



溶存酸素の測定方法

呼吸量と総生産量の算出方法

一般的に、溶存酸素濃度 (DO) の変化から下記の式により呼吸量 (R) と純生産量 (Pn)、総生産量 (Pg) を求めることができる。

$$\Delta DO_{DL} = \text{暗期/明期での DO の増加量} \dots\dots\dots (1)$$

$$R = -2 \times \Delta DO_D \dots\dots\dots (2)$$

$$Pn = \Delta DO_L \dots\dots\dots (3)$$

$$Pg = Pn + \frac{1}{2} \dots\dots\dots (4)$$

実際には、生物活動とは無関係に、大気との酸素の交換があり、下記の式のように、その分の DO 変化を補正する必要がある。

$$\delta DO_{DL} = \text{暗期/明期での酸素が大気中から培養液中に溶解する速度} \dots\dots\dots (5)$$

$$R = -2 \times (\Delta DO_D - \delta DO_D) \dots\dots\dots (6)$$

$$Pn = \Delta DO_L - \delta DO_L \dots\dots\dots (7)$$

$$Pg = Pn + \frac{1}{2}R \dots\dots\dots (4)$$

酸素が大気中から培養液中に溶解する速度 δDO は、実験的に求める必要がある。 δDO の求め方を次に示す。

酸素が大気中から培養液中 (水中) に溶解する速度の求め方

酸素が大気中から培養液中 (水中) に溶解する速度 δDO は、電極やインキュベーター、スターラーの状態、フラスコの口の開き具合などに影響されるため、セット (フラスコ、電極、スターラーなど一式) 毎に実験して求め、個別に適用するか、平均を求めて一括して適用する。

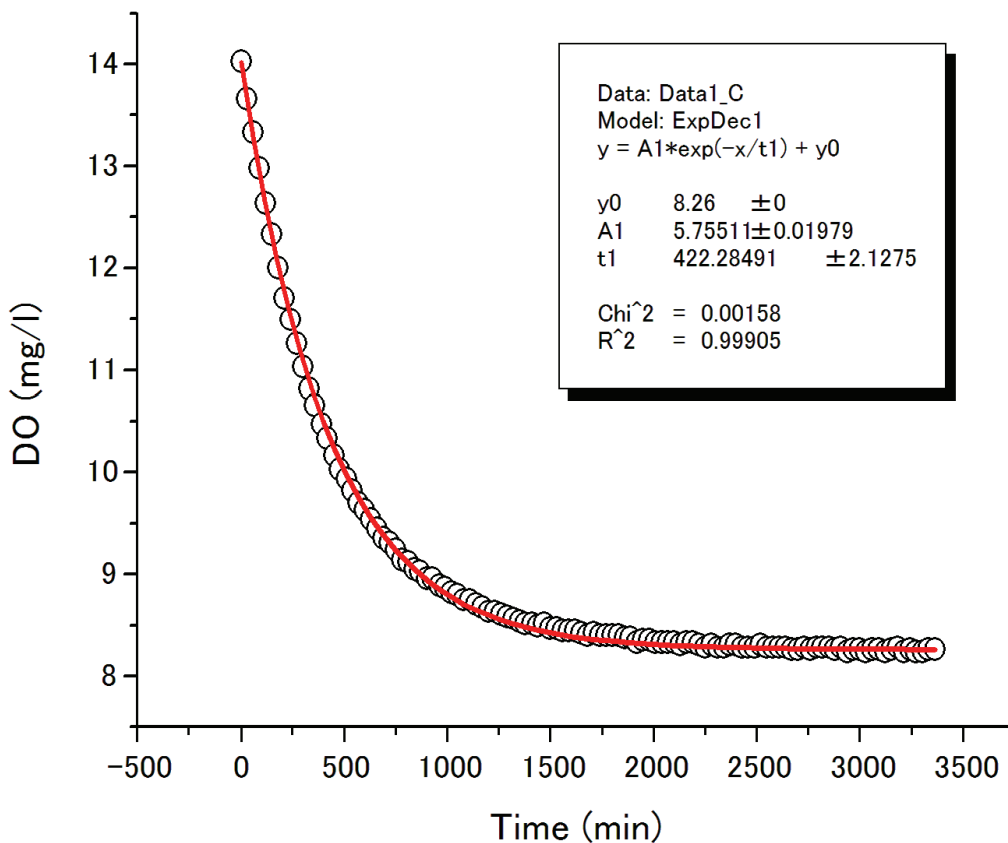
実験

三角フラスコ (300 ml) に水 (水道水または純水) を 210 ml 入れ、酸素または窒素で曝気し、溶存酸素濃度を大気との平衡値よりも高く/低くしておく。フラスコの口に息を吹きかけるなどして、気相の酸素または窒素を空気に置換し、前述の「溶存酸素の測定方法」と同様に溶存酸素を 24~48 h 測定する。

解析方法 1 (データ分析ソフトがある場合)

Origin や IGOR Pro などのデータ分析ソフトがある場合、測定データからそのまま近似式を求め、近似式から δDO を導出する。

例えば、水に酸素を曝気した場合のデータの解析例を次に示す。元データに対して、 $y = ae^{bt} + c$ の形に近似した。式における a は図中の $A1$ 、 b は $-1/t1$ 、 c は $y0$ に相当する。なお、 c の値は既知であり、大気と水の酸素濃度が平衡に達した時の DO 値 8.26 である。実際には実測値に従うこと。



適切な関数と c 値を選択すれば、 R^2 値は 0.999 以上になるはずである。上記解析結果から、この近似式の各定数の値は、 $a = A1 = 5.755$ 、 $b = -1/t1 = -1/422$ 、 $c = y0 = 8.26$ である。この式を微分すると測定時間における DO の大気中への放出速度が求められる。元の式は、

$$y = ae^{bt} + c \dots\dots\dots (8)$$

である。これを微分すると、

$$\frac{dy}{dt} = ab e^{bt} \dots\dots\dots (9)$$

となる。時間ではなく、任意の DO における δDO が知りたいから、 $\frac{dy}{dt}$ を y の関数として表すように変形すると、

$$\frac{dy}{dt} = ab e^{bt} = b(ae^{bt}) = b(ae^{bt} + c - c) = b(y - c) \dots\dots\dots(10)$$

となり、 $\frac{dy}{dt}$ は y の一次関数として表される。 $\frac{dy}{dt} = \delta DO$ と、 $y = DO$ 、 $b = -1/422$ 、 $c = 8.26$

を代入すると、

$$\delta DO = -\frac{1}{422}(DO - 8.26) \dots\dots\dots(11)$$

となる。最後に、 $DO > c$ の時 $\delta DO < 0$ となり、 $DO < c$ の時 $\delta DO > 0$ となることを確認する。なお、このデータは時間の単位が分であるため、 δDO の単位は、 $\text{mg l}^{-1} \text{min}^{-1}$ である。

解析方法 2 (一般的な表計算ソフトで解析する場合)

Excel などの一般的な表計算ソフトでは、線形近似はできるが、 $y = ae^{bt} + c$ の形に近似することはできない。そこで、対数を取ることで、線形近似できる形に変換し、 a と b を求める。

両辺から c をひくと、

$$y = ae^{bt} + c$$

$$\Leftrightarrow y - c = ae^{bt}$$

となる。両辺の自然対数を取ると、 $y > c$ において、

$$\Leftrightarrow \ln(y - c) = \ln ae^{bt}$$

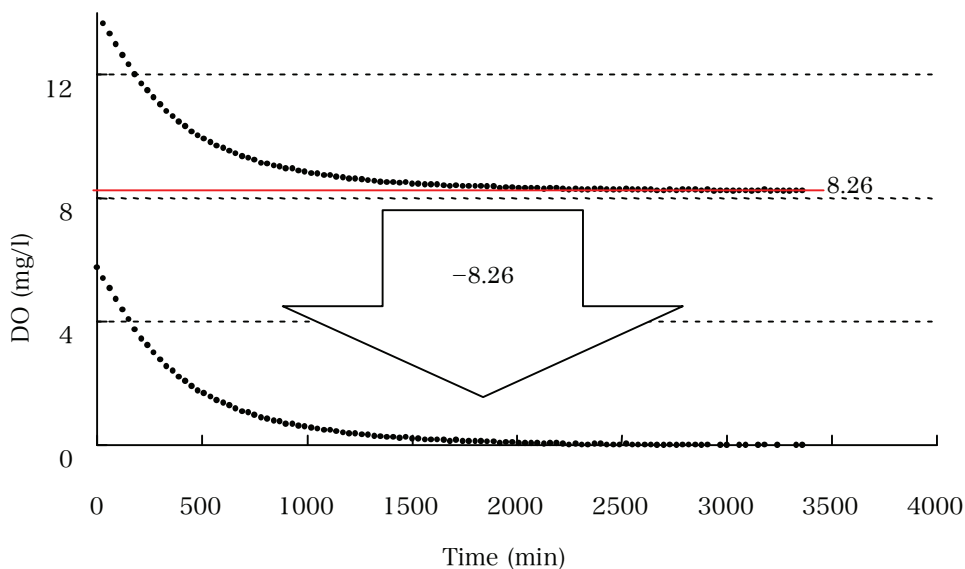
$$= \ln a + \ln e^{bt}$$

$$= \ln a + bt \ln e$$

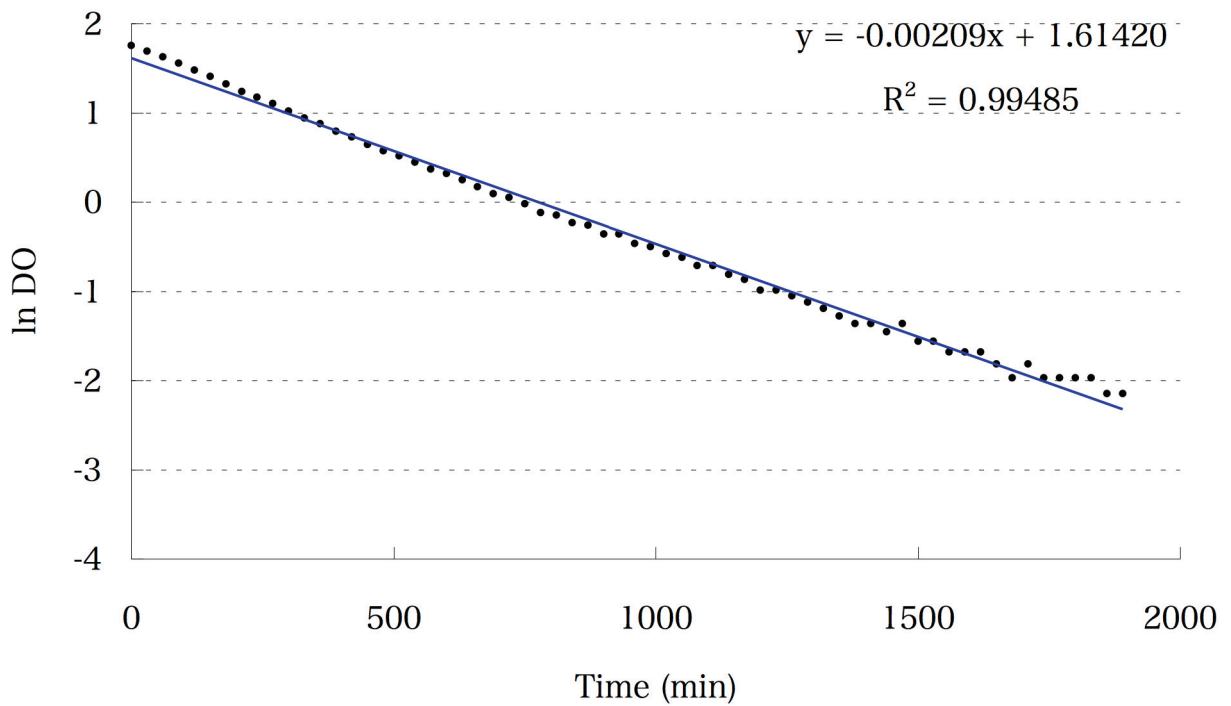
$$= \ln a + bt \dots\dots\dots(12)$$

となり、時間 t の一次関数になる。

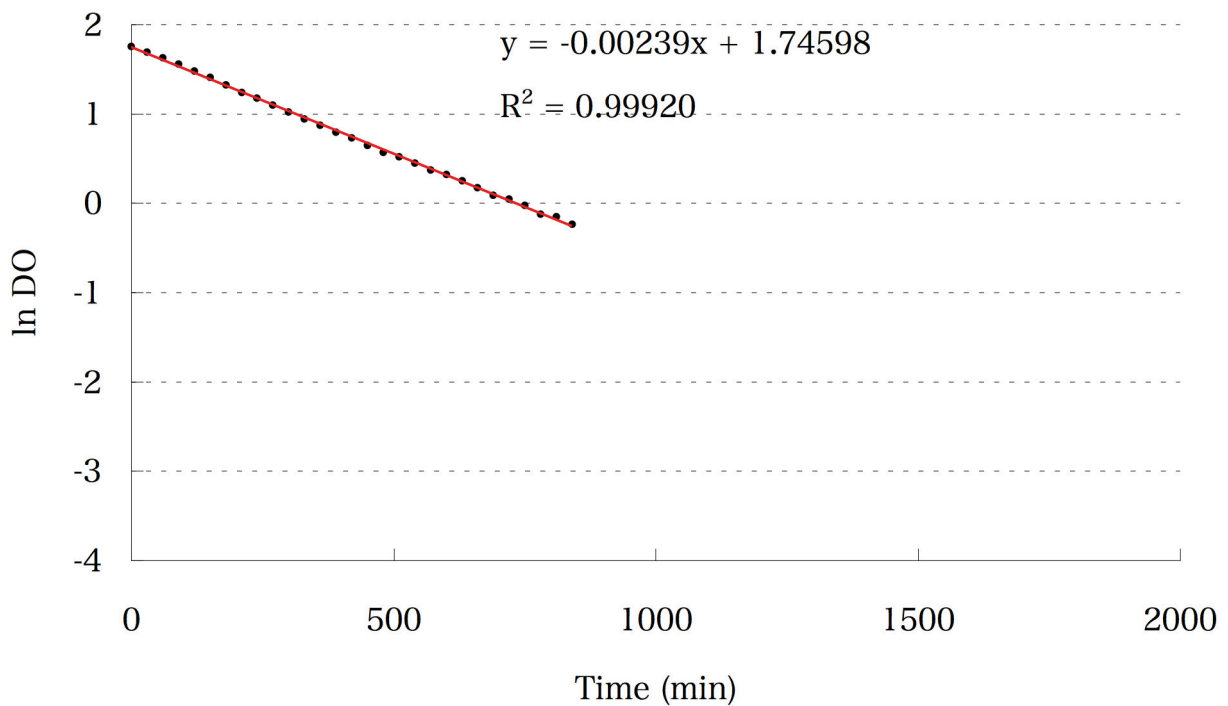
例として、解析方法 1 と同じデータから δDO を求めてみる。まず、元のデータから、平衡に達した時の DO を読み取ると、 8.26 であるから、 $c = 8.26$ である。元のデータから 8.26 を引くと、下図のようになります。



8.26 をひいたデータ (> 0) について自然対数をとって線形近似すると、下図のようになる。



しかし、明らかに後半では誤差が大きく、うまく近似できていない。そこで、データ数ができるだけ多く、かつ $R^2 > 0.999$ となるように、適用するデータを時間の遅い方から削っていくと、下図のようになる。



式(12)と照らし合わせると、 $b = -0.00239$ 、 $\ln a = 1.74598$ である。以上から求められた b と c を式(10)に代入すると、

$$\delta DO = -0.00239 (DO - 8.26) \dots\dots\dots(13)$$

となる。最後に、 $DO > c$ の時 $\delta DO < 0$ となり、 $DO < c$ の時 $\delta DO > 0$ となることを確認する。
なお、このデータは時間の単位が分であるため、 δDO の単位は、 $\text{mg l}^{-1} \text{min}^{-1}$ である。

解析方法 1 では $b = -\frac{1}{422.28491 \pm 2.1275} \doteq -\frac{1}{422} = -0.00237$ ($-0.00236 \sim -0.00238$) で、

解析方法 2 では $b = -0.00239$ だった。その差は 1%未満であり、解析方法による差はないといえる。

呼吸量と総生産量の算出

表計算ソフトを使って、実際に呼吸量と総生産量を算出する方法を示す。

例として、右表のような1日分のデータがあるとする。13:00 から 1:00 が暗期で、1:00 から 13:00 が明期である。従って、13時のデータは、ライトが消えた時の、1時のデータはライトが点灯した時のDOである。

まず、各時間の ΔDO を算出する。例えば、13時から14時の間の ΔDO は、(14時のDO)-(13時のDO) = $8.56 - 8.78 = -0.220$ である。同様に13時~14時、14時~15時というように、 ΔDO を計算する。

次に、暗期の ΔDO の合計と、明期の ΔDO の合計を算出する。次項では、 δDO の計算方法を説明する。

時間	DO (mg/l)	ΔDO (mg/l)	$\Sigma \Delta DO$ (mg/l)
13	8.78		
14	8.56	-0.220	ΔDO_D -1.26
15	8.32	-0.240	
16	8.16	-0.160	
17	8.00	-0.160	
18	7.86	-0.140	
19	7.78	-0.080	
20	7.70	-0.080	
21	7.64	-0.060	
22	7.62	-0.020	
23	7.58	-0.040	
24	7.56	-0.020	ΔDO_L 1.34
1	7.52	-0.040	
2	8.70	1.179	
3	9.60	0.900	
4	10.03	0.440	
5	10.05	0.020	
6	9.86	-0.200	
7	9.66	-0.200	
8	9.48	-0.180	
9	9.32	-0.160	
10	9.18	-0.140	
11	9.06	-0.120	
12	8.94	-0.120	
13	8.86	-0.080	

前項と同じ DO データから、 δDO の計算をする。

例えば、13時から14時における δDO は、13時の DO と 14時の DO の平均を計算し、平均値を式(13)に代入して算出する。ただし、式(13)は分速であるため、60 を乗じて時速に修正する必要がある。

$$\delta DO = -\frac{1}{422}(DO-8.26)\text{mg/l/min}$$

⇔

$$\delta DO = -\frac{60}{422}(DO-8.26)\text{mg/l/h}$$

これに 13 時の DO と 14 時の DO の平均値 8.67 を代入すると -0.0583 になる。右の表では、DO の値に四捨五入されて表示されていない桁も含めて計算しているため、-0.0583 ではなく -0.0577 となっている。

以下、同様に 13 時～14 時、14 時～15 時というように、 δDO を計算し、暗期の合計と明期の合計をそれぞれ算出する。

以上より、 $\Delta DO_D = -1.26$ 、 $\delta DO_D = 0.602$ 、 $\Delta DO_L = 1.34$ 、 $\delta DO_L = -1.84$ である。

式(6)、(7)、(4)より、呼吸量 R と、純生産量 Pn、総生産量 Pg が計算で

時間	DO	平均	δDO	$\Sigma \delta DO$	
暗期	13	8.78			
	14	8.56	8.67	-0.0577	} δDO_D 0.602
	15	8.32	8.44	-0.0250	
	16	8.16	8.24	0.0034	
	17	8.00	8.08	0.0262	
	18	7.86	7.93	0.0475	
	19	7.78	7.82	0.0631	
	20	7.70	7.74	0.0745	
	21	7.64	7.67	0.0844	
	22	7.62	7.63	0.0901	
	23	7.58	7.60	0.0944	
	24	7.56	7.57	0.0986	
	1	7.52	7.54	0.1029	
明期	2	8.70	8.11	0.0219	
	3	9.60	9.15	-0.1259	
	4	10.03	9.82	-0.2211	
	5	10.05	10.04	-0.2538	
	6	9.86	9.96	-0.2410	
	7	9.66	9.76	-0.2126	
	8	9.48	9.57	-0.1856	
	9	9.32	9.40	-0.1614	
	10	9.18	9.25	-0.1401	
	11	9.06	9.12	-0.1216	
	12	8.94	9.00	-0.1046	
	13	8.86	8.90	-0.0904	

きる。それぞれ計算すると、式(6)より、

$$R = -2 \times (\Delta DO_D - \delta DO_D) = -2 \times (-1.26 - 0.602) = 3.72 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(7)より、

$$Pn = \Delta DO_L - \delta DO_L = 1.34 - (-1.84) = 3.18 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

式(4)より、

$$Pg = Pn + \frac{1}{2}R = 3.18 + \frac{1}{2} \times 3.72 = 5.04 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$$

となる。

試験方法

- 試験物質は、培養開始 16 日目の始まり（培養開始から 360 時間後）に添加する。
- Replication または Repetition は、3 つ以上行う。
- 必ずコントロール（対照群）を立てる。試験物質の溶媒が水である時は、水だけを添加したコントロールをたてる。試験物質の溶媒が水以外の場合は、無添加のコントロールと、溶媒のコントロールをたてる。
- 生物などの測定は、試験物質添加直前及び試験物質添加 2、4、7、10、14 日後に行う。試験の結果、興味深い時期があった場合は、再実験の時に測定日を適当に設定する。（標準的なスケジュールは次項の表 1 に示した）
- 溶存酸素は、実験開始の少なくとも前日から測定する。
- 実験条件：25°C、2,400 lux（光合成光量子束密度 $36 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）、蛍光灯は National (=Panasonic) FL20SS-W/18。

表 1 標準的な実験スケジュール

1 日目 接種（培地 200ml + コズム 10ml）	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15 DO 電極設置	16 物質添加 生物測定	17	18 生物測定	19	20 生物測定	21
22	23 生物測定	24 DO 電極メ ンテナンス	25	26 生物測定	27	28
29	30 生物測定 実験終了					

Appendix

Taub 培地のストックソリューション改 (全て 1000 倍濃度版)

Stock solution			Amount
A	ペプトン		0.1 g
B	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.2325 g / 50 ml	1.0 ml
C	KH ₂ PO ₄	0.68 g	1.0 ml
	NaOH	0.14 g / 50 ml	
D	CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.7 g / 50 ml	1.0 ml
E	NaCl	8.76 g / 50 ml	1.0 ml
F	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2334 g	1.0 ml
	Na ₂ EDTA	0.1275 g	
	H ₃ BO ₄	0.0465 g	
	Mn stock sol.	500 μl	
	Co stock sol.	50 μl	
	Zn stock sol.	50 μl	
	Cu stock sol.	50 μl	
	Mo stock sol.	50 μl / 50 ml	
Pure water			Up to 1,000 ml

先述のストックソリューションは培地に対して添加する量が物質によって異なっていたが、操作の誤りの原因になりうる。そこで、すべてのストックソリューションを 1000 倍濃度とした。

	Substance	Weight	Pure water
Mn stock sol.	MnCl ₂ · 4H ₂ O	4.95	Up to 50 ml
Co stock sol.	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	7.25 g	Up to 50 ml
Zn stock sol.	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7.2 g	Up to 50 ml
Cu stock sol.	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.25 g	Up to 50 ml
Mo stock sol.	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.6 g	Up to 50 ml