

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月2日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18738

研究課題名(和文)除草剤が藻類種間競争に及ぼす影響：赤潮発生のトリガーとなる除草剤の網羅的探索

研究課題名(英文)Effect of herbicides on competition between marine diatoms and flagellates: A comprehensive search of herbicides causing trigger the flagellates blooms.

研究代表者

隠塚 俊満 (Onduka, Toshimitsu)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：00371972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：作用機序の異なる11種の除草剤の珪藻キートセロスおよび鞭毛藻ヘテロシグマに対する急性毒性を検討した結果、珪藻はプロマシルなど光合成の光化学系 阻害剤に対してより高い感受性を示した。また、近年赤潮が頻発している福山港の環境水中除草剤濃度を測定した結果、環境水中濃度は毒性値より50倍以上低い濃度であった。さらに、福山港表層の微細藻類計測値から微細藻類の多様度変化検討し、多様度を説明する環境パラメータを検討した結果、プロマシル濃度は多様度変化と有意な相関が認められた。そのため、除草剤は実環境中で鞭毛藻赤潮の発生を含む微細藻類の群集構造に影響を及ぼしている可能性が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本近海では鞭毛藻による有害赤潮が頻発しており、甚大な漁業被害をもたらされている。本研究では、鞭毛藻が優占する機構について除草剤の影響の観点から検討し、毒性試験を実施するような藻類の増殖に適した条件下では少なくとも単独の薬剤では影響が認められないものの、実環境中では除草剤が微細藻類群集の変化に影響を及ぼす可能性を示した。また、作用機序の異なる除草剤の中で光合成の光化学系 阻害剤がより低濃度で藻類に影響を及ぼし、実環境中の微細藻類群集の変化とも相関が認められた。そのため、これらの除草剤の使用の制限や、他の作用機序の除草剤への置き換えにより、赤潮による漁業被害の軽減が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The acute toxicities of eleven herbicides having different action mechanisms to a diatom *Chaetoceros* sp. and a flagellate *Heterosigma akashiwo* were assessed, *Chaetoceros* sp. was more sensitive to inhibitors of photosystem II in photosynthesis such as bromacil than *H. akashiwo*. In addition, ten kind of herbicides were identified in environmental water in Hukuyama Port where flagellate blooms were generated in recent years, concentration of the herbicides in environmental water over 50 times lower than the acute toxicity values. Moreover, diversity of marine microalgae in surface water in Fukuyama Port was calculated, and relationships between the diversity and environmental parameters were investigated, there was a significant correlation between bromacil concentration and the community structure of marine microalgae. Herbicides may therefore influence the community structure of marine microalgae including generation of flagellate blooms in the environment.

研究分野：環境毒性学、環境化学

キーワード：珪藻 鞭毛藻 プランクトン遷移 福山港

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本近海では、シャットネラ等の鞭毛藻による有害赤潮が頻発しており、甚大な漁業被害がもたらされている。これまでに、水温・塩分・栄養塩など、様々な観点から赤潮発生原因を巡る研究が行われ、鞭毛藻による赤潮が発生する際、生態学的競合関係にある珪藻が特異的に減少することが指摘されているが、鞭毛藻が優占する機構は未だ十分に解明されていない。

鞭毛藻による赤潮は春から夏に発生することが多く、この時季は水稲用など除草剤の使用量が増加する時季とオーバーラップする。使用された除草剤等の農薬の一部は河川等を通じて沿岸域に流入し、これらの除草剤等の農薬の一部は藻類に対して極めて強い毒性を示す。また、近年、環境中で検出された除草剤の曝露により、数種の珪藻及び鞭毛藻のうち珪藻の生長が選択的に抑制され、珪藻から鞭毛藻への優占種の変化が促されることが明らかとなった。赤潮の原因となる鞭毛藻と生態学的競合関係にある珪藻に除草剤など有害化学物質による選択的減少起きた場合、鞭毛藻による赤潮や貝毒が誘発される可能性が想定される。

2. 研究の目的

本研究では、赤潮・貝毒の原因となる鞭毛藻及び珪藻の感受性の差異から、作用機構の異なる除草剤が藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性を検討する。

作用機構の異なる除草剤を選定し、マイクロプレートを用いた簡易毒性試験法を用いて、赤潮・貝毒の原因となる鞭毛藻及びその競合生物である珪藻に対する各種除草剤の毒性を測定して感受性の差異を明らかにする。また、赤潮頻発海域における除草剤濃度を測定し、主に検出される除草剤の濃度レベルを明らかにするとともに、浮遊性藻類の種組成の変化に及ぼす影響についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 環境水試料

平成 28 年 6 月から平成 30 年 3 月にかけて、近年赤潮が頻発している芦田川河口域 (St. 1) 福山港 (St. 2) および芦田川河口堰上流域 (St. A) において (図 1) 赤潮が発生しやすい 6 月から 8 月を中心に計 23 回環境水を採水すると共に、St. 2 においては底層水についても採水し、海水中の珪藻及び鞭毛藻を顕鏡によりカウントした。

(2) 試験生物

福山港海水及び底質から鞭毛藻 *Heterosigma akashiwo* 及び珪藻 *Chaetoceros* sp.2 株を分離した。ネジ口試験管 (φ24×200 mm、容量 64 mL) に 30 mL の SWM3 培地を収容し、培地中で試験生物を継代培養した。培養にはグロースチャンパー (MLR-350、三洋電機) を用い、照明には紫外線をカットした蛍光灯 (FL40S・N-EDL・NU、松下電器産業) を 3 本使用し、明期 14 h 暗期 10 h、光合成量子束密度 40-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 、温度 23 の条件で実施した。

(3) 被験物質及び試験液

ハロスルフロンメチル、オキサジアゾン、シハロポップブチル、ジクアトジプロミド水合物 (ジクワット)、チオベンカルブ、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、アイオキシニル、トリフルラリン、アトラジン、シアナジン、アラクロール、シマジン、シメトリン、メフェナセット、及びプロモブチドは和光純薬工業から、プロマシル、及びプレチラクロールはシグマ社から、イルガロールはチバ・スペシャルティ・ケミカルズからそれぞれ購入した。

アラクロール、シマジン、シメトリン、メフェナセット、プロモブチド、プロマシル、プレチラクロール、イルガロールのヘキサソール溶液を調製し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 用の標準液を調製した。内部標準物質として、フェナントレン、フルオランテン、及びクリセンの重水素体 (林純薬工業) を用いた。

影響試験における試験原液はジウロン、プロマシル、プレチラクロール、チオベンカルブ、アイオキシニル、オキサジアゾン、シハロポップブチル、ハロスルフロンメチル、2,4-D、トリフルラリン、ジクワットをジメチルスルホキシド (DMSO, シグマ社) に溶解して作製した。この試験原液を DMSO で必要な濃度に希釈した後、SWM3 培地で 1 万倍希釈し、試験液を調製した。

(4) 微細藻類の除草剤に対する感受性差異の検討

OECD 法を海産藻類の試験に合わせて一部改変し、以下の方法で藻類急性生長阻害試験を行



図 1. 調査実施地点

った。試験容器は96穴プレート(AGCテクノグラス、IWAKI、1860-096)を用い、200 μ LのSWM3培地を収容し、上記培養条件と同様の条件下で、100rpmで振とうしながら96時間の毒性試験を行った。被検物質濃度は、0.32-1000 μ g/L(公比 $\sqrt{10}$ 、8濃度区)とし、試験原液を各濃度区に所定の濃度となるよう添加した。各濃度区のDMSOの濃度は一定(100mg/L)とし、助剤対照区、および無添加対照区を設けた。なお、各実験区はそれぞれ6wellずつ設けた。試験開始0、24、48、72および96時間目にマルチラベルカウンタ(Amersham Pharmacia Biotech, Wallac1420 ARVOsx)を用いて、クロロフィルの自家蛍光(励起波:430nm、蛍光波長:680nm)を測定し、予め測定しておいたそれぞれの藻類の細胞数と相対蛍光値の関係から各試験区の細胞数を推定し、生長曲線に基づいて生長速度を算出した。試験開始時の細胞濃度は約 10^3 cells/mLとした。急性毒性値は96時間の試験で生長速度が半減した除草剤濃度(96-h EC₅₀)とした。この値は、対照区に対する試験区の1日あたりの生長速度、および設定測除草剤濃度からプロビット法により算出した。

(5)除草剤の分析

環境水1Lをジクロロメタンで2回抽出後、1mLまで濃縮し、ヘキサンに転溶した。内部標準物質としてフェナントレン、フルオランテン、及びクリセンの重水素体を添加後、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いて除草剤濃度を測定した。

(6)微細藻類の多様度指数の検討

2015年から2018年の福山港表層の微細藻類の計測結果をRのveganパッケージを用いて多様度指数であるBray-Curtis指数を計算し、多次元尺度法(MDS)で関係性を検討した。また、envfit関数でBray-Curtis指数と環境パラメータとの関係性を検討した。環境パラメータは水温、塩分、および除草剤濃度を用いた。除草剤濃度は福山港表層において検出された、プロマシル、プロモブチド、プレチラクロール、シアナジン、イルガロール濃度を用い、未検出の場合は定量下限値の半値を用いて計算した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 微細藻類の除草剤に対する感受性差異

作用機序の異なる11種の除草剤の珪藻、および鞭毛藻に対する急性毒性を検討した(表1)。プレチラクロール、チオベンカルブ、シハロポップブチル、ハロスルフロメチル2,4-D、およびジクワットについては、何れの微細藻類に対して、最高濃度区においても生長速度を半減させる影響は認められなかった。ジウロン、プロマシル、アイオキシニル(いずれも光合成光化学系阻害剤)、およびトリフルラリン(微小管重合阻害剤)については、*H. akashiwo*.に対する毒性値よりも*Chaetoceros sp.*に対する毒性値が小さくなり、珪藻に対してより強い影響を及ぼすことが想定された。オキサジアゾン(プロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害剤)については、逆に*H. akashiwo*.に対する毒性値よりも*Chaetoceros sp.*に対する毒性値が大きくなり、鞭毛藻に対してより強い影響を及ぼすことが示唆された。

これらの除草剤は珪藻および鞭毛藻のいずれか一方により強く作用するため、これらの除草剤の曝露により藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性が想定された。また、ジウロンやプロマシルなど光合成光化学系阻害剤は比較的低い濃度で影響を及ぼすことから、除草剤の中でも光合成光化学系阻害剤の影響を詳細に検討する必要があると考えられた。

(2)環境水中の除草剤濃度の測定

10種の除草剤について環境水中濃度を測定した結果、プロマシル、プロモブチド、プレチラクロール、シアナジンの順に検出頻度が高かった。シマジン、アトラジン、シメトリン、アラクロール、イルガロール、メフェ

表1. 微細藻類に対する除草剤の急性毒性値

	急性毒性値(96h-EC ₅₀ , μ g/L)	
	<i>H. akashiwo</i>	<i>Chaetoceros sp.</i>
ジウロン	4.8(4.3-5.4)	3.1(2.5-3.8)
プロマシル	19(14-28)	10.7(9.3-12.3)
プレチラクロール	>1000	>1000
チオベンカルブ	>1000	>1000
アイオキシニル	>1000	690(520-980)
オキサジアゾン	3.5(3.1-4.0)	86(64-115)
シハロポップブチル	>1000	>1000
ハロスルフロメチル	>1000	>1000
2,4-D	>1000	>1000
トリフルラリン	>1000	820(790-860)
ジクワット	>1000	>1000

括弧内は95%信頼区間を示す。

表2. 除草剤の検出範囲(ng/L)及び頻度

	プロモブチド	シマジン	アトラジン	シメトリン
検出範囲	<30-222	<29	<14	<32
検出頻度	11/97	0/97	0/97	0/97
	アラクロール	プロマシル	シアナジン	イルガロール
検出範囲	<7.4-25	<56-179	<39-95	<17-30
検出頻度	1/97	21/94	4/97	2/97
	プレチラクロール		メフェナセット	
検出範囲	<15-86		<46-53	
検出頻度	9/97		1/97	

ナセットについては検出頻度が低く、また、最高検出濃度が 100 ng/L 未満であるため、藻類間競合関係に影響を及ぼす可能性は低いと推測された(表 2)。

今回得られた毒性値と環境水中濃度を比較すると、環境水中濃度は毒性値より 50 倍以上低い濃度であった。そのため、少なくとも単独で鞭毛藻赤潮発生を誘導する可能性は低いと想定され、低栄養塩など他の要素との複合影響の可能性を引き続き検討する必要があると考えられた。

検出頻度の高い除草剤について季節変化を検討した。物質の種類によっては、他の時期でも高濃度の時期があるものの、6 月から 8 月付近で比較的濃度が高い傾向が認められた(図 2)。また、この図に鞭毛藻ヘテロシグマやシャット

トネラが検出された時期を重ねると、比較的除草剤濃度が高い時期に鞭毛藻が検出され(図 2)、鞭毛藻赤潮の発生に除草剤が影響を及ぼす可能性が想定された。

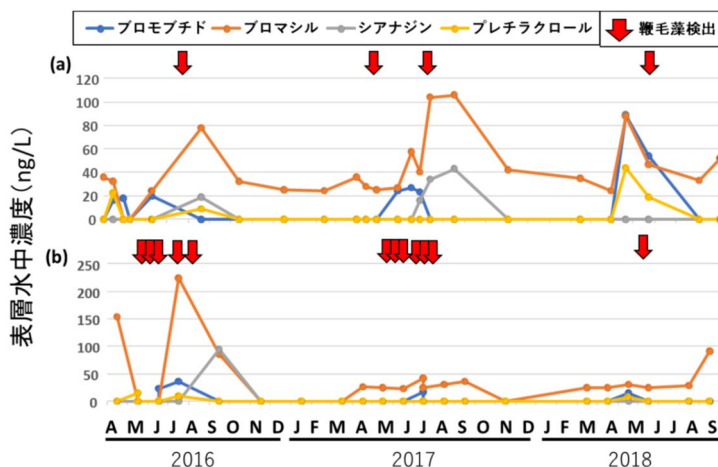


図 2. (a) St.1, (b) St.2 における表層水中除草剤濃度の季節変化及び鞭毛藻赤潮検出時期

(3) 微細藻類の多様度指数の検討

鞭毛藻赤潮が発生した福山港表層の微細藻類計測結果を用いて、Bray-Curtis 指数を計算し、多次元尺度法で関係性を検討した(図 3)。その結果、あまり明確ではないものの、多様度変化の年周期性が確認された。また、多様度指数と環境パラメータとの関係を検討した結果、水温 ($P=0.500$)、塩分 ($P=0.109$)、プロモブチド ($P=0.110$) および除草剤濃度、プレチラクロール ($P=0.821$)、シアナジン ($P=0.238$)、イルガロール ($P=0.094$) については微細藻類群集の多様度変化と有意な相関は認められなかった。しかし、検出頻度が低いものの光合成光化学系 阻害剤であるプロマシルの環境水中濃度 ($P=0.032$) については微細藻類群集の多様度変化と有意な相関が認められ、実環境中における微細藻類群集の多様度変化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

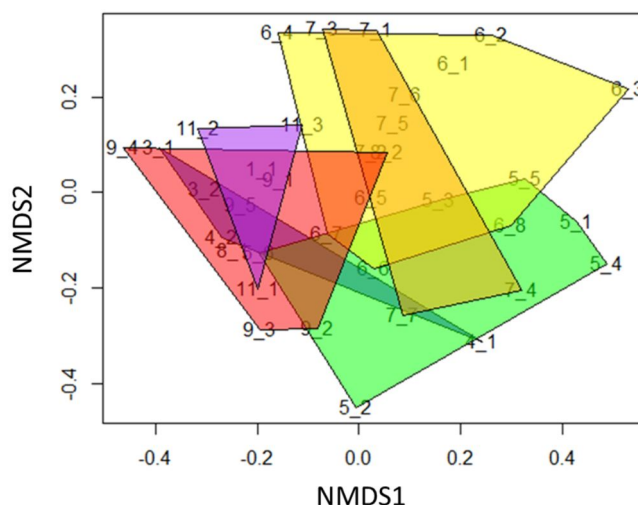


図 3. 非計量多次元尺度法 (NMDS) による群集の空間配置。Bray-Curtis 指数利用。青: 3, 4 月、緑: 5 月、黄色: 6 月、橙: 7 月、赤: 8, 9 月、紫: 11, 1 月のデータをそれぞれ示す。

(4) まとめ

除草剤の毒性値と環境水中濃度を比較すると、毒性値よりも環境水中濃度が 50 倍以上低く、少なくとも単独で鞭毛藻赤潮を誘導する可能性は低いと想定された。しかし、福山港表層のデータを用い、微細藻類の多様度変化を説明するパラメータを検討した結果、プロマシルの環境水中濃度は微細藻類群集の多様度変化と有意な相関が認められた。

これらの結果は、毒性試験を実施するような藻類の増殖に適した環境下では、少なくとも単独の薬剤では影響が認められないものの、実環境中では除草剤だけでなく低栄養塩や温度等他のストレスも複合的に作用し、鞭毛藻赤潮発生を含む微細藻類群集の変化に影響を及ぼしている可能性が想定された。

そのため、プロマシルなどの光合成光化学系 阻害剤は比較的低濃度で藻類に影響を及ぼすことから、これらの除草剤と低栄養塩など他の要素との複合影響の可能性を引き続き検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

1. 隠塚俊満, 除草剤ジウロンの海産底生微細藻類に及ぼす毒性影響, 平成 30 年度日本水産学会

- 春季大会，平成 29 年 3 月 27 日，東京海洋大学品川キャンパス（東京都・港区）
2. 隠塚俊満，海産微細藻類および甲殻類を用いた WET 試験の試み，第 20 回日本水環境学会シンポジウム，平成 29 年 9 月 27 日，和歌山大学（和歌山県・和歌山市）
 3. 隠塚俊満，中山奈津子，伊藤克敏，持田和彦，海域から検出された除草剤に対する珪藻および鞭毛藻の感受性比較，第 22 回日本環境毒性学会研究発表会，平成 28 年 9 月 7 日，愛媛大学城北キャンパス（愛媛県・松山市）

6．研究組織

(1)研究代表者

隠塚 俊満（ONDUKA TOSHIMITSU）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：00371972

(2)連携研究者

中山 奈津子（NAKAYAMA NATSUKO）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：20612675

伊藤 克敏（ITO KATSUTOSHI）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員
研究者番号：80450782

持田 和彦（MOCHIDA KAZUHIKO）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・環境保全センター長
研究者番号：00371964