

# フミン酸の与える銅イオン生態毒性の緩和効果

## 藻類生長阻害試験に対するフミン酸の影響

### The Palliative Effect of Humic Acid to Ecotoxicity of Copper Ion Using Green Algae Growth Inhibition Test

鈴木大輔<sup>1)</sup>, 庄司良<sup>1)</sup>, 岩田孝樹<sup>1)</sup>, 沖田尚久<sup>2)</sup>

指導教員 庄司良<sup>1)</sup>

1)国立東京工業高等専門学校 物質工学科 庄司研究室

2)東京農工大学大学院 工学研究院 応用化学部門

キーワード: Humic acid, NICA-Donnan model, Bioassay, *Pseudokirchneriella subcapitata*

#### 1. はじめに

重金属である銅は生態毒性を有し、水環境に悪影響を与える。重金属の生態毒性は、液中の水素イオン濃度、共存イオン、溶存有機物の影響を受けて変化することが知られている<sup>1)</sup>。このように、周辺環境によってバイオアベイラビリティが変化する銅イオンであるが、実環境を想定した生態毒性に関する研究はあまり進んでいない。

実環境中に広く存在する溶存有機物として、フミン酸(Humic Acid)がある。フミン酸は腐植物質(Humic Substances, HS)の一種で、動植物の遺骸が微生物による分解・縮合によって変性、生成される天然有機物である。フミン酸は、カルボキシル基やフェノール基などのプロトン解離性を示す官能基を有しており、故にアルカリ可溶という性質を示す。プロトン解離によりフミン酸自身は負に帯電しており、銅イオンを含む陽イオンの吸着能を有する。また、負に帯電した官能基の周囲では電気二重層に類似した構造が形成され、実効的な体積が増大する。これを Donnan 体積と呼ぶが、ここでも重金属イオンの吸着が起こる。以上のフミン酸における銅イオン吸着能は、環境中での銅イオンの生態毒性を緩和することが期待される。

本研究では、生長阻害試験によって水環境中で発現する銅イオンの生態毒性を調べた。また同一系内にフミン酸を添加することで生じる、毒性発

現の変化を調べた。供試生物は、緑藻類でミカヅキモの一種である *Pseudokirchneriella subcapitata* または *Chlorella* を用いた。フミン酸には、多摩川の底質を IHSS 法に準拠して抽出したものと、和光純薬(株)フミン酸を使用した。

#### 2. 実験材料と方法

##### 2.1 フミン酸抽出

本試験で使用した多摩川底質由来のフミン酸は、IHSS(International Humic Substances Society)(Swift, 1996)法に準拠して抽出した。フミン酸の性質は生成環境に依存するので、多摩川底質フミン酸の他に、和光純薬(株)フミン酸でも実験を行った。

##### 2.2 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験は、OECD テストガイドライン 201 に準拠した。試験時間は 72 時間、温度は 23°C、照度 3000 lx の連続照明であった。緩衝液は 0.75g·LMOPS<sup>-1</sup>(3-N-morpholinopropanesulfonic acid)を用いて pH は 7.0±0.1 とした。対数増殖期の供試生物を初期細胞密度 1.0×10<sup>5</sup> cells·L<sup>-1</sup> となるように調節し、濃度区 5×10<sup>-8</sup>~1×10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 塩化銅水溶液を曝露溶液とした。フミン酸の影響を調べるために、対照区、10 mg·L<sup>-1</sup> 多摩川底質フミン酸を含む曝露溶液、10 mg·L<sup>-1</sup> 和光純薬(株)製フミン酸を含む曝露溶液のそれぞれで試験を行った。曝露開始 24 時間後、72 時間後に吸光光度計(UV-1200,

SHIMADZU)より 655 nm の吸光度を測定, 検量線より藻類の細胞密度を求めた. (1), (2), (3)式を用いて, 生長速度 $\mu(\text{cells} \cdot (\text{hour} \cdot \text{L})^{-1})$ および生長阻害率 $I_\mu(\%)$ を算出した.

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1} \quad (1)$$

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

$$y = \frac{100}{1 + (x/x_{50})^\beta} \quad (3)$$

ここで,  $N_n$ は曝露開始後 $t_n$ 時(72 時間後)の藻類の細胞密度,  $N_1$ は曝露開始後 $t_1$ 時(24 時間後)の藻類の細胞密度,  $\mu_c$ は対照溶液の生長速度の平均値,  $\mu_T$ は各試験濃度区の生長速度の平均値,  $y$ は生長阻害率,  $x$ は曝露薬品濃度,  $x_{50}$ は藻類  $EC_{50}$  値,  $\beta$ はシグモイド曲線の形状係数を示す.

### 3. 結果と考察

Table 1 に, 生長阻害試験のフミン酸添加に対する銅における  $EC_{50}$  値と Control の  $EC_{50}$  値との比である  $\text{Ratio}(EC_{50})$ を示す. Control はフミン酸無添加の  $EC_{50}$  値, PTHA(Purified Tama river Humic Acid)は多摩川底質フミン酸添加時の  $EC_{50}$  値, WHA(Wako Humic Acid)は和光純薬(株)フミン酸添加時の  $EC_{50}$  値を示す. フミン酸無添加の場合と比べて, フミン酸を添加すると  $EC_{50}$  値はいずれも増大する結果となった.  $\text{Ratio}(EC_{50})$ より, PTHA を添加時に 5.30 倍, WHA を添加時に 15.8 倍  $EC_{50}$  値が大きくなった. これは, PTHA(10 mg/L)では 5.30 倍, WHA(10 mg/L)では 15.8 倍, 銅の発現する生態毒性を緩和したと考えられる.

**Table 1 Relationship between the different type of humic acids and negative control in terms of  $EC_{50}$  and  $\text{Ratio}(EC_{50})$  in case of copper exposure<sup>1)</sup>**

	$EC_{50}(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{Ratio}(EC_{50})$
Control	$2.79 \times 10^{-7}$	1.00
PTHA 10 mg/L	$1.48 \times 10^{-6}$	5.30
WHA 10 mg/L	$4.42 \times 10^{-6}$	15.8

Table 2 に, 生長阻害試験のフミン酸添加に対する,

銅イオンにおける  $EC_{50}$  値と  $\text{Ratio}(EC_{50})$ を示す. こちらも銅と同じくフミン酸を添加することで  $EC_{50}$  値が増大し, 特に WHA において著しい増大が確認された.  $\text{Ratio}(EC_{50})$ より, PTHA(10 mg/L)は 1.30 倍, WHA(10 mg/L)は 23.3 倍, 銅イオンの生態毒性を緩和したと考えられる.

**Table 2 Relationship between the different type of humic acids and negative control in terms of  $EC_{50}$  and  $\text{Ratio}(EC_{50})$  in case of copper ion<sup>1)</sup>**

	$EC_{50}(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$\text{Ratio}(EC_{50})$
Control	$1.22 \times 10^{-9}$	1.00
PTHA 10 mg/L	$1.58 \times 10^{-9}$	1.30
WHA 10 mg/L	$2.84 \times 10^{-8}$	23.3

フミン酸は, 液中銅イオン濃度の上昇に伴って, フミン酸中フェノール基の銅イオン吸着率が大きくなることが知られている<sup>1)</sup>. 銅イオン高濃度域では, 依然としてカルボキシル基の寄与は大きい, フェノール基の寄与も大きくなる. Table 2 における  $EC_{50}$  値の銅イオン濃度域では, フェノール基銅イオン吸着率は PTHA と比較して WHA が大きい. 反対に, カルボキシル基銅イオン吸着率は WHA と比較して PTHA が大きい.  $\text{Ratio}(EC_{50})$ から WHA の生態毒性緩和効果が大きいと考えられるため, カルボキシル基に比べてフェノール基の銅イオン吸着性が大きいと推測される. 発表当日に詳細なデータを示す.

### 4. 結論

本研究では, 銅イオン存在下の藻類生長阻害試験に, フミン酸を添加することで,  $EC_{50}$  値の増大即ち生態毒性の緩和効果が確認された. 緩和効果の程度はフミン酸の種類に依存し, フミン酸中の官能基が寄与していると推測された.

### 5. 参考文献

1) 庄司良, 沖田尚久, 中西弘貴(2013), NICA(non-ideal competitive adsorption)-Donnan model による銅のミカヅキモ生長阻害性に対する多摩川底質フミン酸の影響の解析, 水環境学会誌, 36(1), 1-9