

蛍光マイクロプレートアッセイを用いた各種除草剤に対する河川付着藻類の感受性差の評価

*永井孝志、多屋清志、依田育子（独立行政法人農業環境技術研究所）

1. はじめに

除草剤は藻類に対する毒性が強いため、田んぼから河川に流出した際の影響が懸念される。これまで農薬を含む化学物質の生態影響評価に用いられてきた藻類は、ノルウェー原産の浮遊緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* であるが、日本にはこの種は生息しておらず、そもそも農薬の濃度が比較的高くなる河川において浮遊緑藻はほとんど生息しない。一方、日本の河川生態系の重要な生産者である珪藻などの付着藻類種に対する毒性データは、これまでほとんど整備されていない。

そこで本研究では、複数の付着藻類の試験生物種の選定を行い、生物種による感受性の変動性を明らかにすることを目的とした。しかしながら、OECD テストガイドラインに代表される従来の毒性試験法では、複数の藻類種に対し多数の試験を行うには労力がかかりすぎ、そもそも付着藻類の試験には適さない。そこで、マイクロプレートの底に藻類を付着させて培養し、ボトムリードの蛍光プレートリーダーを用いてバイオマスの測定を行う、ハイスループットの試験系を構築した。

2. 材料と方法

試験生物種は、①日本の河川に広く分布している種であること、②幅広い分類群からの種を含むこと（実際の河川における種構成を反映させる）、③幅広い適応環境から種を選定すること、等を考慮して以下の5種類とした：緑藻 *Desmodesmus subspicatus* NIES-797、珪藻 *Nitzschia palea* NIES-487、珪藻 *Achnanthes minutissimum* NIES-71、珪藻 *Navicula pelliculosa* UTEX-B673、シアノバクテリア

Pseudanabaena galeata NIES-512。

蛍光マイクロプレートアッセイを応用した5種同時毒性試験を行った。試験対象物質として、表1に示す15種類の水稲用除草剤を使用した。基本的な試験設計はOECDテストガイドライン201（藻類生長阻害試験）に従った。ただし、容器として96穴マイクロプレート、光強度は3000 lux、温度は22°C、培地はCSi培地を用いて、4日間の培養試験を行った。緑藻と珪藻はクロロフィル蛍光、シアノバクテリアはフィコシアニン蛍光をバイオマスの指標として、培養期間の増殖速度を測定した。各試験において増殖速度に対する半数影響濃度（EC50）を決定した。

また、除草剤の作用機作を Herbicide Resistance Action Committee の分類に従って分類し、作用機作と感受性の関係について考察した。

3. 結果と考察

15種類の除草剤を用いた5種同時毒性試験の結果を表1に示す。EC50値は大きな種間差があり、特にALS阻害系、PPO阻害系、VLCFA阻害系の除草剤では種間差が大きい傾向が見られた。感受性の順序も作用機作によって異なる傾向を示し、ALS阻害系ではシアノバクテリア、PPO阻害系とVLCFA阻害系では緑藻、4-HPPD阻害系では珪藻が最も高感受性であった。ACCase阻害系、脂質生合成阻害系、その他の作用機作では種間差が小さく明確な傾向はみられなかった。すなわち、特性の生物種が最も高い感受性を示すことは無く、複数種の試験結果を用いた生態影響評価が必要となることが示唆された。

表1. 15種類の除草剤の作用機作と5種の付着藻類に対する感受性（EC₅₀値, μg/L）

農薬	作用機作	<i>P. galeata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>A. minutissimum</i>	<i>N. palea</i>	<i>N. pelliculosa</i>
シハロホップブチル	ACCase阻害	>233	>233	>233	>233	>233
ベンスルフロンメチル	ALS阻害	4.1	148	>6020	>6020	>6020
ペントキサゾン	PPO阻害	>220	0.1	>220	5.7	59
ピラクロニル	PPO阻害	>4960	1.0	1260	58	1050
テフリルトリオン	4-HPPD阻害	>101000	>101000	9980	22630	23000
ベンゾフェナップ	4-HPPD阻害	>238	>238	132	66	15
ベンゾビシクロン	4-HPPD阻害	>182	>182	>182	>182	>182
プレチラクロール	VLCFA阻害	>4000	62	5070	15100	1300
ブタクロール	VLCFA阻害	>3580	38	5120	6210	947
メフェナセット	VLCFA阻害	>10500	624	>3030	>3200	5810
カフェンストロール	VLCFA阻害	>11100	8.3	8600	5690	9540
フェントラザミド	VLCFA阻害	>4100	50	11000	3580	54800
ベンフレセート	脂質生合成阻害	>23000	21700	9950	76000	95000
エスプロカルブ	脂質生合成阻害	1560	349	>3180	4090	1760
ピリミスルファン	その他	154	118	>5370	4390	>5370