

沿岸性海草種アマモ *Zostera marina* の幼体による鉛の蓄積

広海十朗¹、高田英士¹、荒 功一¹、世良耕一郎²

¹ 日本大学大学院生物資源科学研究科
252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

² 岩手医科大学サイクロトンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

海藻や海草に蓄積される重金属類の濃度を測定する研究例は比較的多い。例えば、顕花植物であるアマモは Co、Fe、Mn、Zn を比較的高濃度に蓄積し、これはこの種が堆積物から直接元素を取込むことに起因する。また、海草は根を経由して堆積物より直接金属類を取込み、葉からは水中の金属イオンを吸収するために重金属汚染の進んだ海域ほど植物体内の濃度が高くなることが分かっている (例えば、Phillips 1977、Villares et al. 2005)。Rigollet et al. (2004) は、アマモ *Zostera* 属の根-地下茎システムが金属吸収ポンプとして機能しているものと推察している。海藻の *Caulerpa taxifolia* や顕花植物の *Posidonia oceanica* は海洋環境におけるバイオモニターとして優れていること(Warnau et al. 1996)、また顕花植物の *Posidonia oceanica* ならびに *Cymodocea nodosa* は、Hg や Zn について草体内と堆積物中の濃度との間に正の相関性のあること、さらには海藻の *Caulerpa prolifera* は上記の2元素に加え Pb についても相関性が見られることを明らかにした(Sanchiz et al. 2000)。以上のように、海藻・海草はともに生息場での重金属の濃度勾配に応じて蓄積していることが想像されるものの、どれほどまでに取込み、蓄積できるのかなど、いわゆる蓄積能に関わる実験的知見は極めて乏しい。

本研究は、海草・海藻をバイオモニターとしてではなく、重金属を除去するファイトリメディエーターとしてその可能性を評価するという視点に立つものである。後述するような理由から、筆者らは本邦沿岸域で最も代表的な海草であるアマモ *Zostera marina* に着目した。本論文では、重金属耐性に低いことが予想される幼体に Pb を暴露し、暴露濃度と蓄積能と関係を把握するとともに本金属に対する耐性について実験的に明らかにすることを目的とした。

2 材料ならびに方法

2.1 アマモの培養

神奈川県葉山町の真名瀬にて2005年6月に採集したアマモの種子を採集した後、培養に先立ち暗所20°Cで保存した。培養法については山木ほか(2004)の方法に準拠したが簡単に述べると、種子を底質に播種し暗所10°Cで12時間淡水処理したものを塩分22 psuの海水に移して発芽させた。なお、発芽とは上胚軸の出現と定義する。発芽後、およそ10本の苗を1セットとして植物用ポットに移し、水温15°C、照度2000から3000 lx、明暗周期12時間にて培養した。葉の出現を確認した後は塩分33 psu、20°Cで培養した。暴露実験には3枚以上の葉が出たものを使用した。この時点でアマモの根が十分に伸び、円滑に金属を吸収できると見なしたからである。なお、培養中は底質として川砂にバーク堆肥を30%混ぜたものを使用した。

2.2 Pb 暴露濃度

実験には硝酸鉛 ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: $\text{Pb} = 1000 \text{ ppm}$)を用いた、上述したアマモ生息場での海水中の平均的なPb濃度である0.05 ppm(広海未発表)を基準として設定された暴露濃度は0.25、0.5、2.5および5 ppmの4段階である。実験条件は、OECD 221のガイドラインに基づき、水温20°C、照度2000から3000 lx、明暗周期12時間で、実験期間は1週間とした。

2.3 試料の前処理ならびにPb濃度の測定

実験終了後、プラスチック製のピンセットおよびブラシを用いて葉の付着生物を除去したものをテフロン製の蒸発皿に移し、定温乾燥器内で60から70°C、48時間かけて乾燥させた。その後、プラスチック製のハサミを用いて細かくカットし、デシケータにて保存した。この乾燥試料の酸分解法は阿部ほか(2003)に従った。すなわち、PCTFE製のマイクロスペーテルを用いて粉末試料を50 mg秤量しPFA製容器に移した。これに濃硝酸(超微量分析用)を1 mlと内部標準元素としてIn標準液(1000 mg/l)を試料の乾燥重量に対して1000 ppmになるように添加した。試料を入れたPFA容器をポリプロピレン製外装容器に封入し、電子レンジにて200Wに1分50秒加熱した後、0Wで10分間、再び200Wに1分50秒加熱し、その後0Wに1時間置いた。プラスチック製ターゲットホルダーに厚さ4 μm のポリプロピレン製パッキングフィルムを糊で貼付けて、フィルムの両面をアセトンで洗浄したものをサンプルホルダーとした。そこに調整した試料溶液5 μl を滴下し、クリーンベンチ内で風乾させたものをPIXE分析に充てた。

3 結果

3.1 海藻・海草類のPb濃度に関する既往の知見

本論に先立ち海藻・海草類中のPb濃度について既往知見を整理したうえで、Pbのファイトリメディエーターとしてアマモに着目するに至った根拠の一つを以下に示す。表1に示されるとおり、アマモなど海草中の蓄積濃度は海藻類に比べ高い傾向が認められる。この中でWard(1987)のオーストラリアにおける*Posidonia australis*の結果は注目すべきものである。すなわち、Pbを379 ppmも蓄積しているが、この種が生息する河口の上流部にはPbの製錬所があるという。

表 1 海藻・海草類の Pb 濃度に関する既往の知見

種	学名	Pb	場所	文献
ウミトラノオ	<i>Sargassum thunbergii</i>	1.3	Uchiura bay	Hirao,1986
ホンダワラ	<i>Sargassum fulvellum</i>	0.3	Uchiura bay	Hirao,1986
アズマネジモク	<i>Sargassum yamadae</i>	0.4±0.2	Uchiura bay	Hirao,1986
マメダワラ	<i>Sargassum piluliferum</i>	0.5	Uchiura bay	Hirao,1986
ノコギリモク	<i>Sargassum macrocarpum</i>	0.1	Uchiura bay	Hirao,1986
ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	0.4	Uchiura bay	Hirao,1986
アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>	0.2	Uchiura bay	Hirao,1986
カジメ	<i>Ecklonia cava</i>	0.2	Uchiura bay	Hirao,1986
アミジグサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	0.4	Uchiura bay	Hirao,1986
アオサ属	<i>Ulva</i>	7.3±6.4	Venice	Caliceti, 2002
オゴノリ科	<i>Gracilaria</i>	6.9±6.2	Venice	Caliceti, 2002
ムカデノリ属	<i>Grateloupia</i>	3.0±2.7	Venice	Caliceti, 2002
アマノリ属	<i>Porphyra</i>	2.7±1.0	Venice	Caliceti, 2002
ワカメ属	<i>Undaria</i>	2.2±2.5	Venice	Caliceti, 2002
ヒバマタ科	<i>Fucus</i>	1.6±0.6	Venice	Caliceti, 2002
ウガノモク科	<i>Cystoseira</i>	3.2±2.0	Venice	Caliceti, 2002
褐藻	<i>Desmarestia menziesii</i>	9.4±7.6	Antarctica	Runcie, 2004
褐藻	<i>Durvillaea antarctica</i>	0.5±0.4	Antarctica	Runcie, 2004
褐藻	<i>Himantothallus grandifolius</i>	6.2±6.3	Antarctica	Runcie, 2004
紅藻	<i>Iridaea mawsonii</i>	4.5±4	Antarctica	Runcie, 2004
紅藻	<i>Iridaea cordata</i>	8.3±4.4	Antarctica	Runcie, 2004
紅藻	<i>Palmaria decipiens</i>	2.3±0.7	Antarctica	Runcie, 2004
緑藻	<i>Monostroma hariotii</i>	21.5±16.3	Antarctica	Runcie, 2004
ケルプ	<i>Ascophyllum nodosum</i>	6.9	Galicia	Villares, 2005
ヒバマタ科	<i>Fucus ceranoides</i>	4.4	Galicia	Villares, 2005
ヒバマタ科	<i>Fucus spiralis</i>	5.7	Galicia	Villares, 2005
アオノリ属	<i>Enteromorpha</i> spp.	10.6	Galicia	Villares, 2005
アオサ属	<i>Ulva</i> spp.	4.6	Galicia	Villares, 2005
アマモ (葉のみ)	<i>Zostera noltii</i>	7.0	Galicia	Villares, 2005
ポジドニア(葉)	<i>Posidonia australis</i>	0.2-379	Australia	Ward, 1987
アマモ(葉)	<i>Zostera marina</i>	2.9-30.4	North Sea	Lyngby, 1989
アマモ(地下茎)	<i>Zostera marina</i>	1.5-5.2	North Sea	Lyngby, 1989
アマモ(根)	<i>Zostera marina</i>	40.6	North Sea	Lyngby, 1989
ポジドニア(葉)	<i>Posidonia oceanica</i>	10.5-123	Antikyra gulf	Malea, 1994
ポジドニア(葉+付着藻類)	<i>Posidonia oceanica</i>	5.96-8.35	Mediterranean	Warnau, 1995
ポジドニア(地下茎)	<i>Posidonia oceanica</i>	10.2-14.5	Mediterranean	Warnau, 1995
ポジドニア(根)	<i>Posidonia oceanica</i>	10.5-15.4	Mediterranean	Warnau, 1995
ポジドニア(葉)	<i>Posidonia oceanica</i>	1.5-31	Mediterranean	Sanchiz, 2000
ポジドニア(地下茎)	<i>Posidonia oceanica</i>	1.5-9	Mediterranean	Sanchiz, 2000
ポジドニア(根)	<i>Posidonia oceanica</i>	4-23	Mediterranean	Sanchiz, 2000
シオニラ(葉)	<i>Cymodocea nodosa</i>	2-126	Mediterranean	Sanchiz, 2000
シオニラ(地下茎)	<i>Cymodocea nodosa</i>	1-10	Mediterranean	Sanchiz, 2000
シオニラ(根)	<i>Cymodocea nodosa</i>	2-40	Mediterranean	Sanchiz, 2000
アマモ(葉)	<i>Zostera noltii</i>	2.5-5	Mediterranean	Sanchiz, 2000
アマモ(地下茎)	<i>Zostera noltii</i>	1.5-3	Mediterranean	Sanchiz, 2000
アマモ(根)	<i>Zostera noltii</i>	7.5-27	Mediterranean	Sanchiz, 2000
カワツルモ(葉)	<i>Ruppia cirrhosa</i>	3-30	Mediterranean	Sanchiz, 2000
カワツルモ(地下茎)	<i>Ruppia cirrhosa</i>	3-12	Mediterranean	Sanchiz, 2000
カワツルモ(根)	<i>Ruppia cirrhosa</i>	13-38	Mediterranean	Sanchiz, 2000
ポジドニア(葉)	<i>Posidonia oceanica</i>	0.7-10	Mediterranean	Campanella, 2001
ポジドニア(地下茎)	<i>Posidonia oceanica</i>	2.8-16.9	Mediterranean	Campanella, 2001
トチカガミ(葉)	<i>Thalassia testudinum</i>	0.8-1.3	Gulf of Mexico	Whelan, 2005
トチカガミ(地下茎-根)	<i>Thalassia testudinum</i>	0.8-1.2	Gulf of Mexico	Whelan, 2005

3. 2 PIXE 測定精度

測定精度の確認のために標準物質 (Certified Reference Material) に所定の前処理を施した後に PIXE 法にて測定し、回収率を求めた。その結果は表 2 に示すとおりで、誤差は 5%程度であり、PIXE 法は Pb の測定に対し適法であるといえる。

表 2 PIXE 法による Pb 標準物質(ERM-CE278)の回収率

Pb	既知濃度(ppm)	分析濃度(ppm)	回収率(%)	n
	2.00±0.04	2.11±0.24	105.5	7

3. 3 アマモ幼体における Pb 濃度および暴露耐性

対照区で 1 週間培養したアマモの平均濃度は 2.4±2.2 ppm であり、この値は葉山における天然アマモの葉の平均濃度とほぼ同じであった (高田ほか準備中)。実験区における各暴露濃度に対する葉での蓄積濃度との関係は図 1 に示すとおりである。暴露濃度が 2.5 ppm から 5 ppm にかけて 1 週間後の蓄積濃度は指数関数的に上昇することが特徴的なことで、両者の間の関係は以下のような回帰式で表現される。すなわち、

$$AC = 2.107 e^{1.202EC}$$

ここで、AC ならびに EC は、それぞれ葉ならびに暴露した Pb 濃度 (ppm) を示す。

実験終了後および非汚染海水での 1 か月間培養後の葉の目視観察によれば、暴露濃度 5 ppm ではわずかに黒変が認められたものの枯死は確認されなかったことから、アマモの幼体の Pb に対する耐性は高いものと判断される。

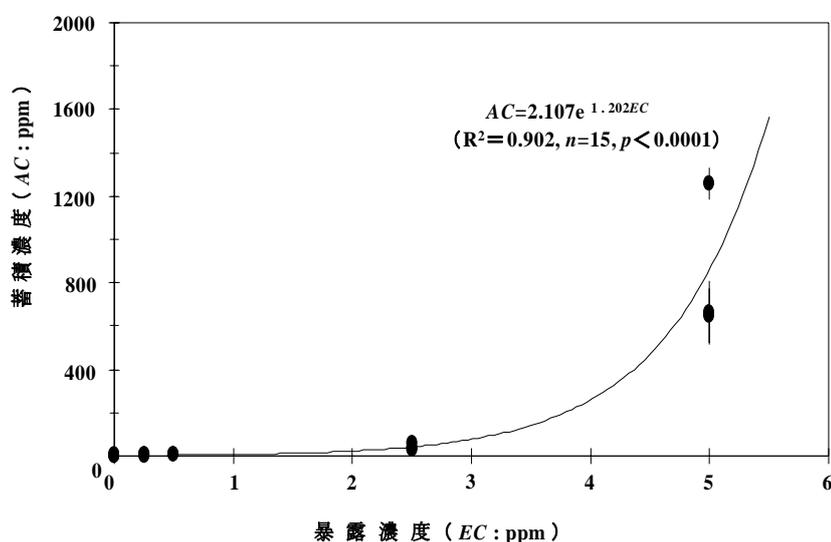


図 1 アマモ幼体における Pb 暴露濃度と草体蓄積濃度との関係

4 考察

本研究で得られた暴露濃度と蓄積濃度との間に見られた指数関数的な関係は、あくまでも暴露濃度が 0 から 5 ppm 間での範囲に限定されるものと見るべきであろう。幼体における暴露濃度と蓄積濃度をともに対数

変換して関係を見てみると図2に示すとおりである。得られた回帰式は次のとおりである。

$$\log AC = 1.61 \log EC + 1.41$$

汚染された海域での海水中のPb濃度は、せいぜい0.1 ppmであるが(平尾ほか1984)、堆積物中の濃度は上限で50 ppm(伊勢湾)、72 ppm(東京湾ならびに大阪湾)であることが知られている(海上保安庁2006)。堆積物中の濃度を考慮すれば、5 ppmを超える暴露濃度での蓄積濃度を調べることは今後必要とある。

Lyngby & Brix (1984)は天然のアマモ *Zostera marina* (平均323 mg d.w)を使ってPb暴露実験を行っている。彼らは、最高50 μM (=10.3 ppm)にて20日間培養して草体の各部位毎(葉、地下茎および根)の蓄積濃度を測定した。これによれば、50 μMに暴露した5日後の葉の蓄積濃度は4 μM/g dw (=800 ppm)であったが、この結果は本研究での5 ppm暴露時の1週間後の蓄積濃度とほぼ同様である。彼らの結果に基づいて、各暴露濃度と1週間後の蓄積濃度を図から読み取って両者の関係を図2上でプロットしてみると直線性が認められる。Lyngby & Brix(1984)の回帰式は、以下のとおりである。

$$\log AC = 0.92 \log EC + 2.45$$

両回帰式の傾きならびに切片の高さを比較すれば、本研究結果のものの方が傾きは高いが切片は低い、これは本研究で用いたアマモの方がより若く、より成長していたことによるものであろう。また、両回帰直線は暴露濃度が約10 ppmでともに蓄積濃度が1000 ppmに一致するように見える、すなわち、1000 ppmでほぼ飽和しているものと思われるが、幼体に対する暴露追加実験を今後行い、この点を確認する必要がある。

アマモをファイトリメディエーターとして将来利用するためには、1) 本種の種子(花枝)の形成や、その発芽も含めた全生活史について重金属耐性を把握し、2) 種苗生産や移植技術の開発が必要となる。1)については既に述べたように、検討すべき課題は多く残されているが、高い蓄積能と耐性能を持っている可能性が示唆された。一方、2)について移植技術の確立までは近い(例えば、山木ほか2006)。

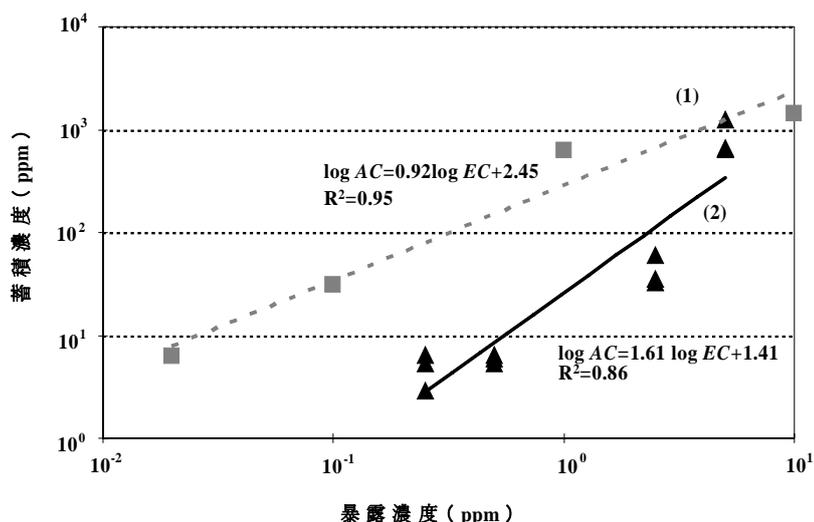


図2 アマモ草体(葉)へのPb暴露濃度と蓄積濃度との関係

(1)式はLyngby & Brix(1984)の結果に基づき得られた回帰式。(2)式は本研究結果の図1を書き換えたもの。

稿を終えるにあたり、アマモの採集や飼育に際し貴重なアドバイスなどを賜った鹿島建設(株)葉山水域環境研究室の山木克則氏、越川義功氏、林文慶博士および中村華子氏に対し深謝したい。また、アマモの試料の採取を許可して頂いた真名瀬漁協の皆様方に謝意を表す。

引用文献

- 阿部尚人, 須藤重人, 世良耕一郎, 斉藤義弘, 吉田尚弘, 工藤孝浩 (2003) : 海藻に濃縮される微量元素の PIXE 分析. NMCC 共同利用研究成果報文集 2003, 70-77.
- Caliceti, M., E. Argeese, A. Sfriso, B. Pavoni (2002) : Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere* 47, 443-454.
- 平尾良光, 越川雅之, 本田美幸, 島 一男, 草津敬子, 福田悦子, 木村 幹 (1984) 多摩川における鉛分布 地球化学 18, 1-13.
- 平尾良光, 山川紘, 前田勝, 松本哲一, 奈良志伸, 花見英俊, 薦田康夫, 木村幹 (1986) : 海藻における鉛の分布. 地球化学 20, 29-38.
- 海上保安庁海洋情報部 (2006) : 海洋汚染調査報告第 32 号, pp7-9, 16-19.
- Lyngby, J. E., H. Brix (1984) : The uptake of heavy metals in eelgrass *Zostera marina* and their effect on growth. *Ecological Bulletins* 36, 81-89.
- Malea, P., S. Haritonidis, T. Kevrekidis (1994) : Seasonal and local variations of the metal concentrations in the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile in the Antikyra Gulf, Greece. *The Science of the Total Environment* 153, 225-235.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2002) : Revised proposal for a new guideline 221 *Lemna* sp. Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Draft Guideline 221.
- Phillips, D. (1977) The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments- a review. *Environmental Pollution* 13, 281-317.
- Rigollet, V., A. Sfriso, A. Marcomini and M. L. De Casabianca (2004) : Seasonal evolution of heavy metal concentrations in the surface sediments of two Mediterranean *Zostera marina* L. beds at Thau lagoon (France) and Venice lagoon (Italy). *Bioresource Technology* 95, 159-167.
- Runcie, J. W. and M. J. Riddle (2004) : Metal concentrations in macroalgae from East Antarctica. *Marine Pollution Bulletin* 49, 1109-1126.
- Sanchiz, C., A. M. Garcia-Carrascosa and A. Postor (1999) : Bioaccumulation of Hg, Cd, Pb, and Zn in four marine phanerogams and alga *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux from the east coast of Spain. *Botanica Marina* 42, 157-164.
- Sanchiz, C., A. M. Garcia-Carrascosa and A. Postor (2000) : Heavy metal contents in soft-bottom marine macrophytes and sediment along the Mediterranean coast of Spain. *Marine Ecology* 21, 1-16.

- Villares, R., E. Carral, X. Puente and A. Carballeira (2005) : Metal levels in estuarine macrophytes : differences among species. *Estuaries* 28, 6, 948-956.
- Ward, T. J. (1987) : Temporal variation of metals the seagrass *Posidonia australis* and its potential as a sentinel accumulator near a lead smelter. *Marine Biology* 95, 315-321.
- Warnau, M., G. Ledent, A. Temara, J. M. Bouquegneau, M. Jangoux and P. Dubois (1995) : Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *The science of the Total Environment* 171, 95-99.
- Whelan III, T., J. Espinoza, X. Villarreal, M. CottaGoma (2005) : Trace metal partitioning in *Thalassia testudinum* and sediment in the Lower Laguna Madre, Texas. *Environment International* 31, 15-24.
- 山木克則, 小河久朗, 難波信由, 林文慶, 越川義功, 田中昌宏 (2004) : アマモ場造成に向けた新しい種苗生産技術. 月刊海洋 36(11), 846-850.
- 山木克則, 新保裕美, 田中昌宏, 三富龍一, 小河久朗 (2006) : アマモ場拡大の実態把握と種苗移植による新規群落形成の試み. 海岸工学論文集 53, 1006-111.

Bioaccumulation of lead in young leaves of eelgrass *Zostera marina* L.

J. Hiromi¹, E. Takada¹, K. Ara¹ and K. Sera²

¹Graduate School of Biorresource Sciences, Nihon University
1688 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

To evaluate the possibility of the eelgrass *Zostera marina* as a phyoremediator for a metal pollution of lead (Pb) in neritic environments, bioaccumulation by young leaves of the eelgrass was studied laboratory experiments. Eelgrass plants were incubated up to 7 days in 0.25, 0.5, 2.5 and 5 ppm-seawater concentrations of Pb. The concentrations of the metal in young leaves were 4.9 ± 2.9 , 5.9 ± 2.8 , 39.6 ± 20.3 and 786.6 ± 282 ppm at the respective exposed concentrations. This result shows that young leaves accumulate the metal exponentially from 2.5 to 5 ppm. The relationship between the metal accumulation (AC) at 7 days after the initial exposure and exposed concentration (EC) was described as $\log AC = 1.61 \log EC + 1.41$. The present result was compared with the previous study on the accumulation of Pb in the same eelgrass, and it was revealed that the expected AC at the EC of 10 ppm was similar to the previous study. No significant effects on the growth of eelgrass were observed in all experiments.