

信州大学審査学位論文

界面活性剤による誘導防御の攪乱が
水生生物の捕食被食関係と
個体群動態に及ぼす影響

学位授与年月：2023年3月

総合医理工学研究科

総合理工学専攻

小田 悠介

目次

	頁
表紙	1
序論	8
化学物質が水生生物群集に及ぼす影響と生態リスク評価	8
化学物質による誘導防御の攪乱	10
誘導防御の攪乱が個体群と群集に及ぼす影響	13
生態リスク評価の枠組みにおける誘導防御の攪乱	17
本研究の目的	20
本研究の構成	25
参考文献	26
PART I 界面活性剤に対するイカダモとミジンコ類の感受性：直接影響（生長阻害及び遊泳阻害）と間接影響（群体形成の攪乱）の濃度関係	30
第1章 界面活性剤によるイカダモの生長阻害及びミジンコ類の遊泳阻害影響	31
1-1. はじめに	31
1-2. 材料と方法	33
1-2-1. 試験生物	33
1-2-2. 試験物質	34
1-2-3. 藻類生長阻害試験	34
1-2-4. ミジンコ類急性遊泳阻害試験	36
1-2-5. 界面活性剤の定量分析	37
1-3. 結果と考察	39
1-3-1. 藻類生長阻害試験	39
1-3-1-1. 陰イオン界面活性剤（SDS 及び SOS）	39
1-3-1-2. 陽イオン界面活性剤（BZK-Br）	43
1-3-2. ミジンコ類急性遊泳阻害試験	45
1-4. まとめ	51
1-5. 参考文献	52
第2章 界面活性剤によるイカダモの群体形成の誘導と抑制	54
2-1. はじめに	54
2-2. 材料と方法	56
2-2-1. 試験生物及び試験物質	56
2-2-2. 群体形成に対する陰イオン界面活性剤（SDS 及び SOS）の影響	57

2-2-3. 群体形成に対する陽イオン界面活性剤 (BZK-Br) の影響	57
2-3. 結果	58
2-3-1. SDS 及び SOS が群体形成に及ぼす影響	58
2-3-2. BZK-Br が群体形成に及ぼす影響	60
2-4. 考察	62
2-4-1. 陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導	62
2-4-2. 陽イオン界面活性剤による群体形成の抑制	63
2-4-3. 藻類の生長と群体形成に対する界面活性剤の影響の比較	64
2-4-4. 実環境中における界面活性剤の影響リスク	65
2-5. 参考文献	67

PART II 陰イオン界面活性剤に誘導された群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響 ----- **69**

第3章 SDS に誘導されたイカダモ 3 種の群体形成が <i>Daphnia</i> の摂食率に及ぼす影響	-
-----	70
3-1. はじめに	70
3-2. 材料と方法	72
3-2-1. 実験生物及び試験物質	72
3-2-2. 摂食実験	72
3-3. 結果	74
3-3. 考察	76
3-4. 参考文献	80

第4章 SOS に誘導された群体形成による <i>Daphnia</i> と <i>Bosmina</i> の摂食阻害	-----	82
4-1. はじめに	-----	82
4-2. 材料と方法	-----	84
4-2-1. 実験生物及び試験物質	-----	84
4-2-2. 摂食実験	-----	84
4-3. 結果	-----	88
4-4. 考察	-----	96
4-5. 参考文献	-----	101

PART III 界面活性剤による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響 ----- **104**

第5章 界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱が 2 栄養段階 (藻類-ミジンコ類) 構成種の個体群動態に及ぼす影響	-----	105
5-1. はじめに	-----	105

5-2. 材料と方法	109
5-2-1. 実験生物及び試験物質	109
5-2-2. 2 栄養段階での個体群レベル実験	109
5-2-3. 界面活性剤の定量分析	111
5-3. 結果	112
5-4. 考察	121
5-5. 参考文献	126
6. 総合考察	129
6-1. 研究成果の概要	129
6-2. PART I 界面活性剤に対するイカダモとミジンコ類の感受性：直接影響（生長阻害及び遊泳阻害）と間接影響（群体形成の攪乱）の濃度関係	129
6-3. PART II 陰イオン界面活性剤に誘導された群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響	133
6-4. PART III 界面活性剤による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響	137
6-5. 水生生態学分野における本研究の意義	140
6-6. 結論	142
6-7. 謝辞	146
6-8. 参考文献	147

Tables

Table 1 各 PART (章付け) に対応する既存研究の課題と本研究の位置づけ.	25
Table 1-1 藻類生長阻害試験の対照区および最高濃度区での水温, pH, DO 濃度の変化.	40
Table 1-2 藻類生長阻害試験における SDS, SOS, BZK-Br の設定濃度, および測定濃度の初期値および最終値 (72-h 後).	41
Table 1-3 藻類生長阻害試験における SDS, SOS, BZK-Br の 72-h EC ₅₀ および EC ₁₀ とそれらの 95%信頼区間のまとめ.	43
Table 1-4 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における対照区および最高濃度区での水温, pH, DO 濃度の変化.	46
Table 1-5 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における SOS, BZK-Br の設定濃度, および測定濃度の初期値および最終値 (48-h 後).	47
Table 1-6 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における <i>B. longirostris</i> のトラップ数.	48
Table 1-7 ミジンコ類遊泳阻害試験における BZK-Br および SOS の 72-h EC ₅₀ および EC ₁₀ とそれらの 95%信頼区間のまとめ.	50

Table 2-1 イカダモ類の生長に対する界面活性剤の 72-h EC ₁₀ と群体形成比に対する最低影響濃度 (LOEC) の比較. -----	65
Table 3-1 イカダモ類の単一細胞及び群体 (2-8 細胞) の表面積 (μm ² , 平均±標準偏差, N = 5). -----	73
Table 4-1 摂食実験の開始時における対照区または処理区における <i>D. subspicatus</i> の初期細胞密度, 粒子密度および形態 (群体形成比). 値は平均値±標準偏差 (N = 3)を示す.	85
Table 4-2 SOS 非曝露下 (対照区) および曝露下 (処理区) における <i>D. subspicatus</i> の単一細胞および群体の長さおよび幅の平均値 (±標準偏差, N = 10). -----	85
Table 4-3 摂食実験の終了時における各条件下 (齢×餌タイプ×餌密度) でのミジンコ類 (<i>D. galeata</i> , <i>B. longirostris</i> , <i>B. fatalis</i>) の平均体長 (±標準偏差). -----	87
Table 4-4 三元配置分散分析による摂食実験での処理条件 (餌タイプ, 餌密度, 齢) がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響の解析結果. -----	90
Table 5-1 イカダモとミジンコの 2 種培養実験において観察された群体形成比に及ぼすミジンコ/藻類の密度比の単一効果及び SOS, BZK-Br との交互作用に対する GLM 解析による評価. -----	119
Table 6-1 本研究で得られたイカダモ類 3 種 (<i>D. subspicatus</i> , <i>S. acutus</i> , <i>T. dimorphus</i>) およびミジンコ類 2 種 (<i>D. galeata</i> , <i>B. longirostris</i>) に対する界面活性剤の 72-h および 48-h EC ₁₀ (95%信頼区間) とイカダモ類の群体形成を攪乱する LOEC, および環境中での最大検出濃度 (文献値) の比較. EC ₁₀ および LOEC の単位は, SDS および SOS については mg L ⁻¹ , BZK-Br については μg L ⁻¹ で示す. -----	131
Table 6-2 Morphology-based functional groups (MBFG) に基づく藻類の分類. -----	142

Figures

Fig. 1. プランクトン (左図, ミジンコ類; 右図, イカダモ類) において観察される誘導防御と化学物質による攪乱. -----	12
Fig. 2. 数理モデルにより予測された環境収容力によって異なる捕食者と被食者の個体群変動サイクル. 変動サイクルが大きい場合, 2 種の全滅リスクが高まる. -----	14
Fig. 3. 本研究で用いたイカダモ類 3 種. -----	20
Fig. 4. 本研究で用いた界面活性剤及びミジンコ由来のカイロモンの化学構造. ---	22
Fig. 5. 本研究で用いたミジンコ類 3 種. -----	23

Fig. 1-1. ミジンコ類急性遊泳阻害試験における *B. longirostris* のトラップ数と(a) BZK-Br

(a) および SOS (b) の関係. ----- 49

Fig. 2-1. 単一細胞および 2, 4, 8 細胞の群体を形成したイカダモ(*D. subspicatus*). -- 55

Fig. 2-2. SDS の曝露による *D. subspicatus* (a), *S. acutus* (b), *T. dimorphus* (c) の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. ----- 59

Fig. 2-3. SOS の曝露による *D. subspicatus* の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. 60

Fig. 2-4. BZK-Br と *D. galeata* カイロモン(a), または *B. longirostris* カイロモン(b)の複合曝露による *D. subspicatus* の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. ----- 61

Fig. 3-1. SDS 非曝露 (対照区) または曝露後 (処理区) の *D. subspicatus* (a), *S. acutus* (b), *T. dimorphus* (c)を給餌した幼若齢および成熟齢の *D. galeata* の摂食率 (mL h^{-1} , 平均±標準偏差, N=3) の比較. ----- 75

Fig. 3-2. 摂食実験の開始時における対照区と処理区 (SDS 曝露区) におけるイカダモ類の群体形成比 (平均±標準偏差, N = 3, a-c), およびそれらにおける単一細胞と群体 (2, 3, 4, 6, 8 細胞) の割合 (平均±標準偏差, N = 3, d-f) の比較. *D. subspicatus* (a, d), *S. acutus* (b, e), *T. dimorphus* (c, f). ----- 76

Fig. 4-1. 摂食実験において異なる条件 (餌密度, ミジンコ類の齢) で対照区と処理区のイカダモを給餌した *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C) の摂食率 (平均±標準偏差, N = 3) の比較. ----- 91

Fig. 4-2. 摂食実験の終了時において各餌条件 (CL, 対照区×低餌密度; CH, 対照区×高餌密度; TL, 処理区×低餌密度; TH, 処理区×高餌密度) 下でのミジンコの非存在下 (Absent) および存在下 (Neonate, 幼若齢; Adult, 成熟齢) で得られた群体形成比 (平均±標準偏差, N = 3). *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C). ----- 93

Fig. 4-3. 摂食実験の終了時において各餌条件 (CL, 対照区×低餌密度; CH, 対照区×高餌密度; TL, 処理区×低餌密度; TH, 処理区×高餌密度) でのミジンコの非存在下 (Absent) および存在下 (Neonate, 幼若齢; Adult, 成熟齢) で観察された単一細胞 (Unicell) および群体 (2-, 3-, 4-, 8-celled) の割合 (平均±標準偏差, N = 3). *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C). ----- 94

Fig. 4-4. 摂食実験において異なる条件下 (餌密度および齢) でのミジンコ各種 (*D. galeata*, *B. longirostris*, *B. fatalis*) の摂食阻害率 (% , 平均±標準偏差, N = 3) の比較. - 95

Fig. 5-1. 個体群レベル実験におけるイカダモの前培養期間での各処理区の増殖率 (a, 平均±標準偏差, N = 3) および群体形成比 (b, 平均±標準偏差, N = 3) の比較. --- 112

Fig. 5-2. 個体群レベル実験におけるイカダモ (a, b, *D. subspicatus*) とミジンコ類 (c, *D. galeata* または d, *B. longirostris*) の各処理区での密度の経時変化 (平均±標準偏差, N =

10). -----	114
Fig. 5-3. 個体群レベル実験における各処理区での水温 (a, b), pH (c, d), DO 濃度 (e, f) の経時変化 (平均±標準偏差, N = 10). -----	116
Fig. 5-4. 個体群レベル実験における各処理区での BZK-Br 濃度 (a, b), SOS 濃度 (c, d) の経時変化. -----	117
Fig. 5-5. 個体群レベル実験における各処理区での群体形成比の経時変化 (平均±標準偏差, N = 10). <i>D. galeata</i> が消費者の系 (a), <i>B. longirostris</i> が消費者の系 (b). -----	118
Fig. 5-6. 個体群レベル実験における各種の密度変動から算出した各処理区での変動係数 (a, b), 最大振幅 (c, d), および最低密度 (e, f) の比較. 値は全て平均±標準偏差で示す (N = 3). -----	120
Fig. 6-1. 化学物質による群体形成の誘導①, 抑制②作用を検出する試験法. -----	133
Fig. 6-2. イカダモの密度とミジンコの齢によって異なる群体形成の誘導と抑制の影響. -----	135
Fig. 6-3. 陰イオン・陽イオン界面活性剤の曝露タイミング (矢印) に応じたイカダモ, <i>Daphnia</i> 属ミジンコ, <i>Bosmina</i> 属ミジンコの個体群動態. -----	136
Fig. 6-4. 系の安定性に対する BZK-Br (群体形成の抑制) と SOS (群体形成の誘導) の相対的な影響のリスクと消費者に依存する系の影響の受けやすさ, および攪乱による優占のシフトが群集構造に及ぼす影響. -----	138
Fig. 6-5. 個体群動態 (系の安定性) と食物網構造 (捕食-被食関係のリンクや結合度) を指標とした群体形成を攪乱する物質の影響評価の概念図. -----	140
Fig. 6-6. 化学物質による群体形成の攪乱を群集レベルで評価する段階的フロー. -----	144

序論

化学物質が水生生物群集に及ぼす影響と生態リスク評価

人間活動に由来する化学物質の多くは、未処理のまま水圏環境に流入し、水生生物の成長、生存、繁殖に影響を及ぼす。化学物質によって生物種の感受性は異なり、例えば農薬には除草剤、殺虫剤、殺菌剤があり、それぞれ藻類や水生植物、節足動物、菌類に強く作用する。また、生物種に対する化学物質の毒性は濃度だけでなく、化学物質の残留性や物理化学的特性（溶解性や土壌吸着性）、水質条件（生物利用能の変化）、及び種の生活史や特性（世代期間や発育段階、代謝機能など）によっても変化する（e.g., 早坂ら, 2013）。従って、化学物質の影響を評価する際は、同一条件下で生物種の感受性の違いを調べ、毒性に関わる諸要因を実際の環境条件に照らし合わせて考える必要がある。

国内における化学物質の生態リスク評価では、制御条件下で OECD 等により標準化された毒性試験（急性、慢性毒性試験）を行い、化学物質が影響を及ぼす濃度（最小影響濃度 LOEC や 50%影響濃度, EC_{50} ）や影響を及ぼさない濃度（無影響濃度 NOEC）を求める。これを、栄養段階が異なる生物（藻類、ミジンコ、魚類）について実施し、その中で最も感受性が高い種について不確実係数やアセスメント係数（環境条件により毒性が変化することを考慮した係数）を乗じた値が予測無影響濃度（PNEC）として算出される（山崎, 2003）。これに対し、環境中での曝露量（環境モニタリングの結果や化学物質排出把握管理促進法に基づく排出量の公表データ）から推定した予測環境濃度

(PEC) との比 (ハザード比, PNEC/PEC) を取り, これが 1 を超えるかどうかで有害性 (リスク) の有無を判定する (眞道, 2013)。

一方, 欧州や米国では, 事業所排水や河川水等の環境試料を生物への有害性に関わる総体と捉える総排水毒性試験 (Whole Effluent Toxicity testing; e.g., Chapman, 2000) や, その毒性に関わる要因を生物試験と化学分析から解析する影響指向型解析 (Effect-directed analysis; e.g., Hecker and Hollert, 2009) などがリスク評価に活用されている。また, 様々な生物種について得た試験データ (EC₅₀ 等) を用い, 化学物質の濃度と複数種の感受性の関係を対数正規分布で表し (種の感受性分布, Species Sensitivity Distribution (SSD), Posthuma et al., 2002) , これを基に算出した生物群全体の 5% の種が影響を受ける濃度 (HC₅) を基準としたリスクの判定も行われている。

上記で挙げた生態リスク評価の手法は, 全て化学物質に対する種の感受性を基準に影響を捉えたものである。しかし, 野外の水生生物は他種と関わり合いながら群集を形成しており, 餌競争や捕食-被食関係等の生物間相互作用は群集動態を決定づける重要な要素である。化学物質の生態リスク評価の目的は生物群集への影響の評価であり, 種の多様性や持続的な生態系機能の保全・確保まで視野に入れていることを考慮すると, 化学物質の影響と生物間相互作用の関係を軽視することはできない (早坂ら, 2013)。従って, 生態リスク評価の対象を個体から個体群, 群集へと広げることが必要になる。

この背景をもとに, 複数種を含むモデル生態系 (マイクロコズムやメソコズム) を用

いた化学物質の影響評価手法が開発されている (Riebesell et al., 2007)。マイクロコズムは微生物群集やプランクトン群集などの小型のモデル生態系を対象とし、メソコズムは魚類等の脊椎動物を含むものや多数の分類群を内包した大型のモデル生態系である。系のサイズが大きくなるほど食物網の複雑さや生物間の相互作用が増えるため、より現実的な生態系への影響が反映されるが、実験のコストや再現性は低下するという特徴がある (早坂ら, 2013)。化学物質の影響は、曝露による群集構造の変化 (各種の個体群動態) をもとに解析され、曝露後の種多様性の変化や個体群の回復特性、各生物種の機能的特性の損失等が評価の指標となる (Van den Brink and Ter Braak, 1999; Tanaka, 2012)。

EUにおける農薬のリスク評価では段階的な評価 (Tier system) がなされており、モデル生態系を用いた試験が第3段階での評価として既に組み込まれている (EFSA, 2013)。

一方、坂本ら (2013) は SSD をもとに得られた NOEC とモデル生態系での試験から得られた NOEC が異なるケースも多いことから (Del Signore et al., 2016) , 生物間相互作用を考慮した場合は化学物質の影響が異なることを強調している。

化学物質による誘導防御の攪乱

水生生物の多くは、捕食者の存在下で行動や形態、生活史特性等の表現型を柔軟に変化させることで食われるリスクを低減する。このような応答は誘導防御と呼ばれ、植物プランクトンや動物プランクトン、魚類を含む多様な分類群で観察される (Brönmark

and Hansson, 2017)。例えば、緑藻や珪藻、藍藻等の植物プランクトンは、群体形成や粘液排出、毒素の産生などにより消費者による摂食への抵抗性を示す (Hessen and Van Donk, 1993; Malej and Harris, 1993; Jang et al., 2006)。ミジンコやワムシ等の動物プランクトンは、無脊椎捕食者に捕食されにくい形態 (頭頂部の形や尾棘の長さ、吻の角度) を発達させ、視覚的に捕食を行う魚類に対しては成熟サイズを小さくし、日周期鉛直移動を行うことで捕食から逃れている (Fig. 1, Marinone and Zaragase, 1991; Stibor, 1992; Hanazato, 2001; Chang and Hanazato, 2004)。これらの防御応答は、捕食者による物理的刺激 (Sakamoto et al., 2007) や、捕食者が放出する情報化学物質 (カイロモン) に曝露されることで誘導される (Lass and Spaak, 2003; Van Donk, 2007)。これらの被食リスクに関する手掛かりを捕食される前に感知し、迅速に防御応答を発現できている場合に、誘導防御は適応的な応答となる (Miner et al., 2005)。

誘導防御は、農薬や重金属、界面活性剤、医薬品などの化学物質により攪乱 (誘導あるいは抑制) されることが広く報告されており (Hanazato, 2001; Lürding and Scheffer, 2007; Boyd, 2010; Van Donk et al., 2016) , 水生生物間の捕食-被食関係に影響を及ぼすことが危惧されている (Fig. 1)。例えば、フサカ幼虫のカイロモンにより誘導されるミジンコ類の形態変化は、カーバメイト系殺虫剤により誘導が促進され (Hanazato and Dodson, 1993) , 反対に銅の曝露下では誘導が抑制される (Mirza and Pyle, 2009)。またミジンコ類のカイロモンにより誘導される緑藻類のイカダモで観察される群体形成は、極性の異

なる界面活性剤に曝露されると導あるいは抑制されることが報告されている (Zhu et al., 2020)。防御の発現と維持には物質やエネルギーを消費するため、体成長や再生産に対してトレードオフの関係がある (Oda et al., 2021)。従って、捕食者の不在化で化学物質により防御が誘導されると、餌生物に不適応な結果 (成長や繁殖の制限) をもたらすと考えられる。また、捕食者の在/不在と関係しない時空間的な防御発現の不一致は、被食者の全滅リスクを高める要因となる (Miner et al., 2005)。

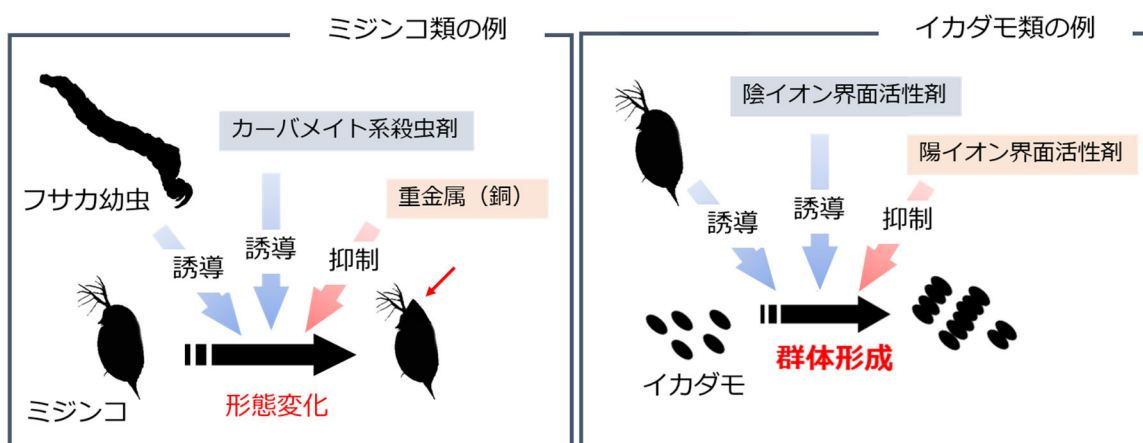


Fig. 1. プランクトン (左図, ミジンコ類; 右図, イカダモ類) において観察される誘導防御と化学物質による攪乱。

化学物質による防御応答の誘導は、捕食者のカイロモンと化学物質が構造的に類似していることや (Yasumoto et al., 2005), 防御の発現に関わる物質 (幼若ホルモン等) の内分泌が化学物質により促進されることに起因する可能性がある (Oda et al., 2010; Weiss et al., 2015)。反対に、捕食者の存在下で防御の誘導が抑制されると、餌生物が食われやすくなり、個体群が全滅するリスクが高まる (Pan et al., 2020)。誘導防御の抑制に

については、化学物質がカイロモンを吸着し、水中でのカイロモンの利用可能性が低下すること（Zhu et al., 2020）や、内分泌系の攪乱による結果などが要因と考えられている。また Trotter et al.（2019）は、マツモムシの放出するカイロモンに誘導される *Daphnia longicephala* の形態変化（後頭部の肥大化）が、ポリエチレン（PE）やポリエチレンテレフタレート（PET）等の材質でできた廃棄物が水中に混入する場合に抑制されたことを報告しており、カイロモンは疎水性の物質であり、プラスチック素材へ吸着されやすいことを指摘している。

誘導防御の攪乱が個体群と群集に及ぼす影響

誘導防御の攪乱を個体レベルで報告した例は多いが、攪乱がもたらす生態影響を個体群・群集レベルで評価した研究例は少ない。まずは餌生物で観察された防御の攪乱が、捕食者を含めた2栄養段階でどう影響するか、またその結果として餌競争種やより高次栄養段階の捕食者がどう応答するかなど、基礎的な知見を集めることが重要である。

個体群や群集の動態と誘導防御の関係については、生態学的研究から多くの知見が得られている。群集動態における誘導防御の役割は、栄養が豊富で生産性の高い条件では複数の生物種が共存できないという理論的予測が、野外では観察されないという「濃縮のパラドックス, paradox of enrichment」を説明する際によく取り上げられてきた（Roy and Chattopadhyay, 2007）。Rosenzweig（1971）による捕食者-被食者モデルを用いた理

論的予測によると、環境収容力（つまり、餌資源量）の増加は、周期的な個体群の振動を強め、被食者及び捕食者の存在量をゼロに近づけると予測している。これは、餌資源が過剰に供給されると、個体群動態が不安定化し、確率的に種が全滅するリスクが高まることを意味している（Fig. 2）。

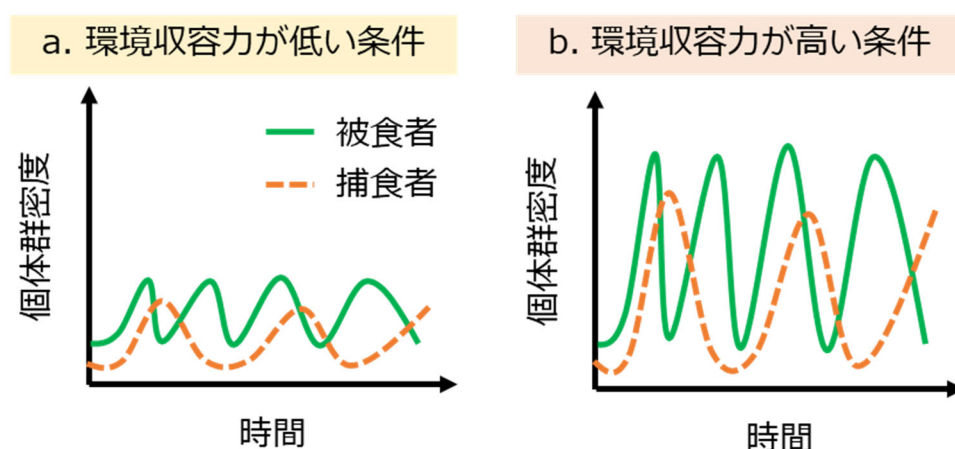


Fig. 2. 数理モデルにより予測された環境収容力によって異なる捕食者と被食者の個体群変動サイクル. 変動サイクルが大きい場合, 2種の全滅リスクが高まる.

一方で、野外での観察や室内実験から得られた多くの結果は、栄養塩が過剰に供給される条件でも餌生物と捕食者が安定して共存するケースが多いことを示した（Roy and Chattopadhyay, 2007）。例えば、McCauley and Murdoch（1990）は、栄養塩レベルが異なる様々な湖や池の藻類とミジンコの個体群密度（バイオマス）の間に大きな振幅は検出できないことを発見した。さらに、彼らは藻類とミジンコを培養タンクで共存させた系を用いて、栄養塩を異なる濃度で添加して個体群の変動サイクルを観察したが、個体群

変動は栄養塩レベルに違いがあっても安定しており、大きな振幅はやはり検出できないことを実験的に示した。しかし、McCauley et al. (1999) によるその後の研究では、藻類とミジンコの個体群動態は大きな振幅と小さな振幅を示す場合が見られることを発見した。大きな振幅が観察される個体群動態には、藻類群集にミジンコに摂食されやすい藻類が多く含まれている点と、ミジンコが密度に依存して休眠卵を生産していないという特徴が見られた。これは、藻類が過剰に摂食され、消費者（ミジンコ）の個体群成長が高い場合に個体群動態が不安定になることを意味している。この結果は、餌藻類の防御が個体群動態の安定性に寄与する可能性を浮き彫りにした。

その後、Vos et al., (2004) は、2—3 栄養段階の捕食者-被食者のモデルを用い、餌生物が誘導防御を示す場合に個体群の安定性が高まることを予測した。これについて、Verschoor et al. (2004) は、ミジンコ類やワムシ等の存在下で誘導防御（群体形成）を示すイカダモ（Hessen and Van Donk, 1993）を用いて、その消費者ツボワムシとの 2 栄養段階、及び捕食者フクロワムシを含めた 3 栄養段階の系で個体群変動を観察し、イカダモが群体形成を示す場合に構成種の個体群振幅が安定化し、全滅リスクが低くなることを実証した。従って、誘導防御は個体群の存続性や種の共存を促進する役割を持つという可能性が支持された（Miner et al., 2005）。

上述した個体群動態の安定化メカニズムは、誘導防御が餌生物や捕食者の密度に応じて柔軟に発現されることが重要であるため、化学物質により誘導防御の発現が攪乱され

ると系の安定性が影響を受けることが危惧される。Pan et al. (2020) は、イカダモ *Scenedesmus obliquus* とクロレラ *Chlorella vulgaris* の2種を餌藻類、オオミジンコ *Daphnia magna* を消費者とした2栄養段階の系に対して、イカダモの群体形成を抑制するキノロン系の抗生物質であるノルフロキサシンを曝露したところ、群体形成が顕著に抑制された濃度区では構成種の密度変動が最も大きく、対照群と比べて系の安定性が大きく低下したことを報告した。また、この系ではクロレラとイカダモは餌（栄養塩）競争の関係にあるが、対照群ではイカダモが優占していたことに対して、群体形成が抑制された処理区ではイカダモの存在量がクロレラと同等となった (Pan et al., 2020)。これは、防御が抑制されたイカダモがオオミジンコに摂食されやすくなり、消費される藻類細胞の量がクロレラと近くなったためと考えられた。同様に、Wan et al. (2020) は、イカダモ *S. quadricauda* あるいはクロレラ *C. vulgaris* を餌藻類として、オオミジンコ *D. magna* を消費者、その捕食者としてイトトンボの幼虫 *Ischnura rufostigma* を組み込んだ3栄養段階の食物連鎖系を用いて、ノルフロキサシンの曝露影響を餌藻類の違いで比較した。ノルフロキサシンの添加濃度の増加はオオミジンコの遊泳行動を制限したため、イトトンボの幼虫によりオオミジンコが捕食されやすくなった結果、藻類の生長率が増加した (Wan et al., 2020)。一方、群体形成が抑制される低い濃度では、オオミジンコの摂食率が増加し、イカダモの生長が抑制された (Wan et al., 2020)。このように、誘導防御の抑制は系の安定性を低下させるとともに、見かけの競争関係や栄養カスケード効果を変化

させることにより、生物群集の種組成を改変しうる。

生態リスク評価の枠組みにおける誘導防御の攪乱

以上のように、誘導防御の攪乱は生物間相互作用を変化させ、結果的に系の安定性や種組成に影響を与えることが危惧されるが、化学物質の生態リスク評価において考慮されていないのが現状である。以下では、誘導防御の攪乱をリスク評価の枠組みで対象とする上で課題となる点を整理する。

第一に、誘導防御の攪乱は生物の生存・成長・繁殖に影響を与えない濃度で起こるケースが多く（坂本・河, 2013）、急性・慢性毒性試験におけるエンドポイント（生死や産仔数）では検出することが難しい。従って、誘導防御と関連付けられた形態や行動、生活史特性などの応答をエンドポイントとした検出系の開発が必要となる。化学物質の生態リスク評価では野外個体群への悪影響を最終的な評価対象とするため、観察される形質や応答は個体群の増減（死亡率や繁殖率の変化）と関連している必要がある（A. W. OECD, 2018）。例えば、昆虫の成長制御剤として用いられる農薬は非標的種であるミジンコ類に対して低濃度でも内分泌攪乱（幼若ホルモン様）作用を示すことが知られており、仔虫の性比への影響がエンドポイントの1つとなっている（OECD, 2012; Abe et al., 2015）。農薬による性比の攪乱は、繁殖率の低下と同様に個体群成長率を減少させることが数理モデルにより示されている（Tanaka et al., 2018）。このように、誘導防

御に関連する形質についても、化学物質による攪乱が系を構成する種の現存量や密度の減少に繋がるという因果関係を明らかにすることが重要となる。

第二に、化学物質による誘導防御の攪乱は、形質が攪乱された種だけでなく、生物間相互作用の変化を介して他種の個体群動態にも影響を及ぼしうるため、影響は群集動態を考慮して評価する必要がある。ただし、複数種を想定する場合、生物種によって化学物質に対する感受性も異なるため、影響の解釈はさらに複雑になる。例えば、モデル生態系を用いた実験では、群集動態が感受性の高い構成種の消長により他種との相互作用に影響を及ぼした結果なのか、誘導防御の攪乱を介して生物間相互作用が変化した結果なのか判別しにくい（坂本・河, 2013）。このような問題に対処するためには、化学物質に対する生物種の感受性について生存や繁殖と防御形質に及ぼす濃度関係を整理し、また構成種を段階的に増やして生物間相互作用の寄与を考慮しながら評価していくことが重要となる。

第三に、誘導防御の攪乱が及ぼす影響は、個体レベルでの観察例に対して、個体群・群集レベルでの知見は乏しい。イカダモの群体形成の攪乱に着目した群集実験による報告があるが（Pan et al., 2020; Wan et al., 2020）、これらの例では群体形成の抑制作用のみが評価されており、群体形成を誘導する物質の影響は未解明である。化学物質の内分泌攪乱作用においてアゴニスト作用（受容体結合による応答の誘導や促進）とアンタゴニスト作用（受容体結合あるいは結合阻害による応答の抑制）が認められるように

(Schug et al., 2013) , 誘導防御の攪乱パターンは捕食者の非存在下における発現の誘導と、捕食者の存在下における発現の抑制に分けられる。誘導防御による系の安定化機構は捕食者と餌生物の動的な密度変動に依存するため (Miner et al., 2005) , 誘導と抑制はどちらも個体群動態に影響を及ぼす可能性が高い。特に、イカダモにおける群体形成を誘導する物質は、生長阻害に対する NOEC と比べて非常に低い濃度 (約 1/00 から 1/1000 倍, e.g., Lüring et al., 2011) で作用することが知られており、実環境中の濃度を考慮した場合に生態影響が大きいことが懸念される。

また、捕食者によっても好適な餌生物は異なり、餌生物の形態や行動などに対する捕食者の応答も異なるため (e.g., Kopp and Tollrian, 2003; Kishida et al., 2009) , 着目する種間関係によっても誘導防御の攪乱が個体群動態に及ぼす影響は変化しうる。Pan et al.

(2020) および Wan et al. (2020) による個体群動態実験では、イカダモの消費者としてオオミジンコ (*D. magna*) が用いられているが、オオミジンコはイカダモの群体形成の誘導に関する研究で頻繁に用いられてきた一方で、国内に生息する種ではない。このことは、国内種を含む環境や群集における攪乱影響については未だ不確実性が大きいことを意味する。また、特定種を対象とする評価のみでは、誘導防御の攪乱と個体群動態の関係に対する一般化を大きく制限する。したがって、誘導防御の攪乱による群集動態の変化を正確に評価する上で、これらの知見の収集は重要な課題となる。

本研究の目的

本研究では、化学物質による淡水プランクトン種間における誘導防御の攪乱が個体群及び群集レベルで及ぼす影響の解明を目的とした。プランクトンの世代時間は短く、Verschoor et al. (2004) で用いられたイカダモの群体形成は、化学物質による誘導防御の攪乱が個体群動態に及ぼす影響を短時間でも評価可能なモデルといえる。また、除草剤、重金属、界面活性剤、医薬品など、様々な化学物質が生長に影響を及ぼさない濃度 (NOEC 以下) でイカダモの群体形成を誘導、または抑制することが示されており (Lüring et al., 2011; Huang et al., 2016; Pan et al., 2017; Yasumoto et al., 2005; Zhu et al., 2016; Zhu et al., 2019; Zhu et al., 2020) , 群体形成の攪乱は広範な物質による水環境汚染で共通する可能性が高い現象といえる。以上の点から、イカダモの群体形成に及ぼす化学物質の攪乱作用を評価の対象とした。また、イカダモの種によっても単一細胞のサイズや通常時 (カイロモンに曝露されていない条件) で群体が占める比率も異なることから、本研究では属の異なる 3 種のイカダモを実験に用いた (Fig. 3)。

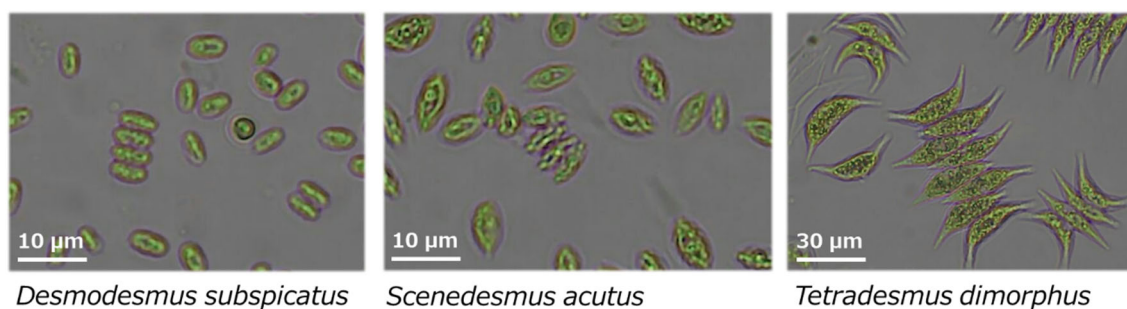


Fig. 3. 本研究で用いたイカダモ類 3 種.

本研究では、イカダモの群体形成を攪乱する化学物質として、界面活性剤を選択した (Fig. 4)。界面活性剤は、工業製品（染料や洗浄剤、農薬の補助剤）や生活用品（洗剤や化粧品、食品の乳化剤）、医療製品（医薬品や殺菌剤）など、広い用途で用いられている一般的な化学物質である。界面活性剤は、極性の違いによりイカダモの群体形成を攪乱するパターンが異なる；陰イオン界面活性剤は群体形成を誘導し、陽イオン界面活性剤や非イオン界面活性剤は群体形成を阻害する (Zhu et al., 2020)。また、界面活性剤がイカダモの群体形成を攪乱するメカニズムは他の化学物質と比べて知見が多い。例えば、陰イオン界面活性剤のドデシル硫酸塩 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) やオクチル硫酸塩 (Sodium octyl sulfate, SOS) はミジンコ類のカイロモンと構造的に類似しているため (Fig. 4) 群体形成を誘導する (Yasumoto et al., 2005)。陽イオン界面活性剤の臭化ベンザルコニウム (Benzalkonium bromide, BZK-Br) は水中でイオン化すると正の電荷を帯びる (ベンザルコニウムイオン) ため、負の電荷を帯びるカイロモンとイオン結合することでイカダモに対するカイロモンの利用能が低下し、群体形成の誘導を抑制すると考えられている (Zhu et al., 2020)。群体形成の攪乱影響を、誘導と抑制の2パターンから評価することができる点で、界面活性剤を対象の化学物質とするメリットがある。

イカダモの誘導防御（群体形成）を攪乱する界面活性剤

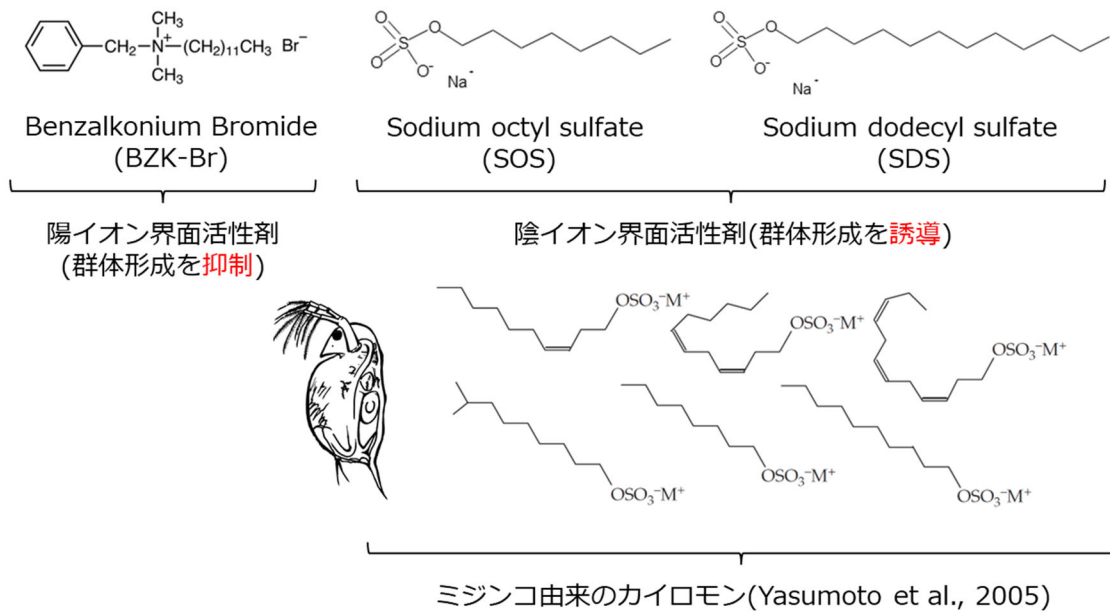


Fig. 4. 本研究で用いた界面活性剤及びミジンコ由来のカイロモンの化学構造.

群体形成が消費者に及ぼす影響は、主に *Daphnia* 属ミジンコで調べられており、イカダモに対する摂食率の低下と、これによる体成長や再生産率の低下が報告されている (Hessen and Van Donk, 1993; Lürding and Van Donk, 1996)。また、群体形成の攪乱がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響や、それが個体群動態に及ぼす影響を評価した研究はオオミジンコ *Daphnia magna* を対象としたものに限られている (Lürding et al., 2011; Pan et al., 2020; Wan et al., 2020)。 *D. magna* は OECD 等の生態毒性試験におけるガイドライン種であるが、国内には生息していないため、実環境における化学物質の生態影響を必ずしも反映するものではない。また、動物プランクトンは種によって餌のサイズや形態に対して異なる餌選択性を示すため (e.g., Porter et al., 1983; Sommer et al., 2003) , 群体形成の

攪乱を介した影響が全てのミジンコ種に対して有効であるとは限らない。この種特異的な餌生物への応答を考慮すると、群体形成の攪乱は動物プランクトン群集の構造を変化させる可能性も高い。消費者の種による攪乱影響の違いについて検討するため、本研究では既に知見が豊富である *Daphnia* 属と、摂食様式や餌選択性が *Daphnia* 属と大きく異なることが示されている *Bosmina* 属 (Bleiwass and Stokes, 1985) の2種を消費者として用いた (Fig. 5)。

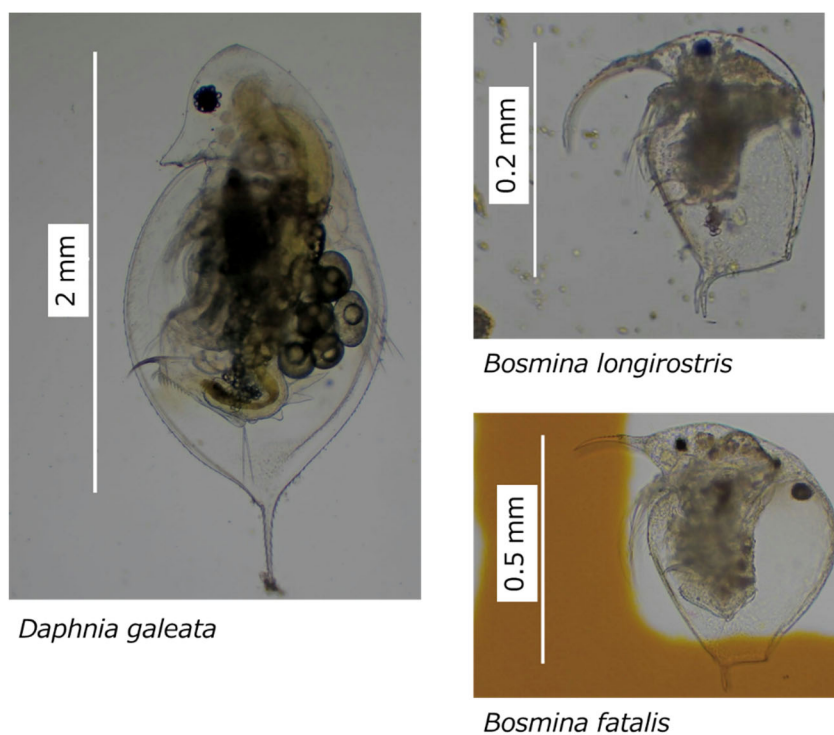


Fig. 5. 本研究で用いたミジンコ類3種.

カブトミジンコ *Daphnia galeata* は国内の多くの湖沼 (諏訪湖や霞ヶ浦, 琵琶湖など)

で普遍的に出現する *Daphnia* 属ミジンコである (Takamura et al., 2017; Oh et al., 2019; Nagata, 2020)。また, ゾウミジンコ *B. longirostris* やニセゾウミジンコ *B. fatalis* も諏訪湖や霞ヶ浦等の浅い湖沼で優占するケースが多い (Takamura et al., 2017; Oh et al., 2019)。

これら国内種について群体形成の攪乱影響を評価することで, 国内の実環境中での界面活性剤の影響について具体的な示唆を得ることに繋がる。

本論文の構成

本論文では、第1章および第2章を PART I、第3章および第4章を PART II、第5章を PART IIIに大別した (Table 1)。

Table 1 各 PART (章付け) に対応する既存研究の課題と本研究の位置づけ。

PART、章付け	既存研究の課題	本研究の位置づけ
I. 界面活性剤に対する感受性の比較 第1章：遊泳/生長を指標とする評価 第2章：群体形成を指標とする評価	<ul style="list-style-type: none"> ・国内種に関する試験データの欠落 ・イカダモやミジンコの種間差 	<ul style="list-style-type: none"> ・国内環境を想定した影響の評価 ・感受性が高い種の選定 ・濃度関係の整理による群体形成の攪乱を指標とした影響評価法の精査
II. 群体形成の攪乱がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響に関わる条件の検討 第3章：イカダモ種およびミジンコの齢の検討 第4章：ミジンコの種、齢(体長)、餌条件の検討	<ul style="list-style-type: none"> ・限定的な条件下での評価 ・一部の種間関係でのみ評価 	<ul style="list-style-type: none"> ・個体群動態における攪乱影響を決定する条件依存性の解明 ・ミジンコ種間で異なる餌選択性と攪乱の結果の関連性の解明
III. 群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響の評価 第5章：イカダモ-ミジンコ類の2種培養系を用いた評価	<ul style="list-style-type: none"> ・異なる攪乱パターン (誘導/抑制) が及ぼす影響に関する知見の不足 ・消費者依存的な攪乱影響に対する系の応答性に関する知見の不足 	<ul style="list-style-type: none"> ・攪乱パターンに依存する影響の解明 ・国内の優占種に依存する群集構造を反映した攪乱影響の解明

PART I では種・個体レベルでの実験を行い、イカダモやミジンコ類に対して界面活性剤が直接影響（遊泳や生長への影響, 第1章）と間接影響（群体形成の攪乱, 第2章）を及ぼす濃度を整理し, その濃度関係や感受性の種間差から野外環境中で群体形成の攪乱が及ぼす影響のリスクについて議論した。

PART II では, 界面活性剤による群体形成の攪乱がイカダモとミジンコ間の捕食-被食関係に及ぼす影響について詳細な知見を得るため, 群体形成がミジンコ類の摂食率に影響を及ぼす諸条件（イカダモやミジンコ類の種間差, ミジンコ類の齢や餌密度など）について実験的な検討を行った（第3章, 第4章）。これらの結果より, 群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響の条件依存性や, ミジンコ種間での餌サイズ選択性の違いを考慮した場合の影響の違いについて議論を行った。

PART III では, 異なるミジンコ種（*Daphnia* 属と *Bosmina* 属）を消費者とする2栄養段階の系を用いて界面活性剤の曝露実験を行い, 群体形成の攪乱パターンの違いや系を構成する消費者（ミジンコ類）の違いから, 群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響を解析した（第5章）。

総合考察では, 以上の計3 PART（計5章）で得られた結果をもとに, 誘導防御の攪乱を生態リスク評価の枠組みで評価していくための問題点や発展について議論した。

参考文献

- 眞道幸司. (2013). 水域における化学物質の生態影響リスク推定の現状と水産環境保全に向けた課題. 海洋生物環境研究所研究報告, 29-50.
- 坂本正樹, 河鎮龍. (2013) 食物網を考慮したリスク評価. 環境毒性学会誌, 16, 49-57.
- 早坂大亮, 永井孝志, 五箇公一. (2013) 農薬による生物多様性影響評価の重要性: 個体評価から群集評価へ: 生物多様性に配慮した農薬管理の在り方. 日本生態学会誌, 63, 193-206.
- 山崎邦彦 (2003). 生態リスクの評価の方法. 「生態影響試験ハンドブック-化学物質の環境リスク評価-」(日本環境毒性学会編), 朝倉書店, 東京, 314-318.
- Abe R, Watanabe H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N. (2015) Establishment of a short-term, in vivo screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult

- Daphnia magna*. Journal of Applied Toxicology, 35, 75–82.
- Bleiwas AH, Stokes PM. (1985) Collection of large and small food particles by *Bosmina*¹. Limnology and Oceanography, 30, 1090–1092.
- Boyd RS. (2010) Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. Journal of Chemical Ecology, 36, 46-58.
- Brönmark C, Hansson LA. (2017) The biology of lakes and ponds. Oxford University Press. USA.
- Chang KH, Hanazato T. (2004) Predation impact of *Leptodora kindtii* on population dynamics and morphology of *Bosmina fatalis* and *B. longirostris* in mesocosms. Freshwater Biology, 49, 253-264.
- Chapman PM. (2000) Whole effluent toxicity testing—usefulness, level of protection, and risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 19, 3-13.
- Del Signore A, Hendriks AJ, Lenders HR, Leuven RS, Breure AM. (2016) Development and application of the SSD approach in scientific case studies for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry, 35, 2149–2161.
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR) (2013) Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. EFSA J, 11, 3290.
- Hanazato T. (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. Environmental Pollution, 112, 1–10.
- Hanazato T, Dodson SI. (1993) Morphological responses of four species of cyclomorphic *Daphnia* to a short-term exposure to the insecticide carbaryl. Journal of Plankton Research, 15, 1087–1095.
- Hecker M, Hollert H. (2009) Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. Environmental Science and Pollution Research, 16, 607-613.
- Hessen DO, Van Donk E (1993) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. Archiv fur Hydrobiologie, 127, 129-129.
- Huang Y, Nan H, Zhu X, Li B, Zhang Z, Yang Z. (2016) Waterborne copper impairs grazer-induced colony formation and photosynthetic efficiency in *Scenedesmus obliquus*. Limnology and Oceanography, 61, 625–634.
- Jang MH, Ha K, Jung JM, Lee YJ, Takamura N. (2006) Increased microcystin production of *Microcystis aeruginosa* by indirect exposure of nontoxic cyanobacteria: potential role in the development of *Microcystis* bloom. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76, 957-962.
- Lass S, Spaak P. (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. Hydrobiologia, 491, 221-239.
- Lürling M, Scheffer M. (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. Trends in Ecology & Evolution, 22, 374-379.
- Lürling M, Van Donk E. (1996) Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. Oecologia, 108, 432–437.
- Malej A, Harris RP. (1993) Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? Marine Ecology Progress Series, 33-42.
- Marinone MC, Zagarese HE. (1991) A field and laboratory study on factors affecting polymorphism in the rotifer *Keratella tropica*. Oecologia, 86, 372-377.
- McCauley E, Nisbet RM, Murdoch WW, de Roos AM, Gurney WS. (1999) Large-amplitude cycles of *Daphnia* and its algal prey in enriched environments. Nature, 402, 653.
- McCauley E, Murdoch WW. (1990) Predator–prey dynamics in environments rich and poor in nutrients. Nature, 343, 455.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. Trends in Ecology & Evolution, 20, 685-692.
- Mirza RS, Pyle GG. (2009) Waterborne metals impair inducible defences in *Daphnia pulex*: morphology, life-history traits and encounters with predators. Freshwater Biology, 54, 1016-

1027.

- Nagata T. (2020) 2.5. 6 (1) Cladocera of Lake Biwa. Lake Biwa: Interactions between Nature and People, 157.
- Oda S, Kato Y, Watanabe H, Tatarazako N, Iguchi T. (2011) Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. Environmental Toxicology and Chemistry, 30, 232-238.
- Oda Y, Nakamura H, Tokishita S, Mano H, Chang KH, Sakamoto M. (2021) Phenotypic changes in *Daphnia pulex* under oxygen deficiency, resource limitation and predation risk. Ecological Research, 36, 533-544.
- Oh HJ, Oda Y, Ha JY, Nagata T, Hanazato T, Miyabara Y, Sakamoto M, Chang KH. (2019) Responses of daphnids and other zooplankton populations to massive fish kill in Lake Suwa. Ecological Research, 34, 856-863.
- OECD (2018). Revised Guidance Document 150 On Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals For Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing. OECD, Paris.
- Pan Y, Yan SW, Li RZ., Hu YW, Chang XX. (2017) Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. Scientific Reports, 7(1), 1-10.
- Pan Y, Dong J, Wan L, Sun S, MacIsaac HJ, Drouillard KG, Chang X. (2020) Norfloxacin pollution alters species composition and stability of plankton communities. Journal of Hazardous Materials, 385, 121625.
- Porter KG, Feig YS, Vetter EF. (1983) Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, and *Bosmina* fed natural bacteria. Oecologia, 58, 156–163.
- Posthuma L, Suter II GW, Traas TP. (2002). Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
- Riebesell U, Schulz KG, Bellerby RGJ, Botros M, Fritsche P, Meyerhöfer M, Neill C, Nondal G, Oschlies A, Wohlers J, Zöllner E. (2007). Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. Nature, 450, 545-548.
- Rosenzweig ML. (1971) Paradox of enrichment: destabilization of exploitation ecosystems in ecological time. Science, 171, 385-387.
- Roy S, Chattopadhyay J. (2007) The stability of ecosystems: a brief overview of the paradox of enrichment. Journal of Biosciences, 32, 421-428.
- Schug TT, Abagyan R, Blumberg B, Collins TJ, Crews D, DeFur PL, et al. (2013) Designing endocrine disruption out of the next generation of chemicals. Green Chemistry, 15(1), 181-198.
- Sommer U, Sommer F, Santer B, Zöllner E, Jürgens K, Jamieson C, Boersma M, Gocke K. (2003) *Daphnia* versus copepod impact on summer phytoplankton: functional compensation at both trophic levels. Oecologia, 135, 639–647.
- Stibor H. (1992) Predator induced life-history shifts in a freshwater cladoceran. Oecologia, 92, 162-165.
- Takamura N, Nakagawa M, Hanazato T. (2017) Zooplankton abundance in the pelagic region of Lake Kasumigaura (Japan): monthly data since 1980. Ecological Research, 32, 1-1.
- Tanaka Y. (2012) Trait response in communities to environmental change: effect of interspecific competition and trait covariance structure. Theoretical Ecology, 5, 83-98.
- Tanaka Y, Nakamura K, Oda S, Watanabe H, Tatarazako N. (2018) Estimation of population-level effect of the endocrine disruptor pyriproxyfen in *Daphnia magna* by using changes in sex ratio and reproductive output. Ecotoxicology and Environmental Safety, 156, 463–475.
- Van Wijngaarden RPA, Arts GHP, Belgers JDM, Boonstra H, Roessink I, Schroer AFW, Brock TCM (2010) The species sensitivity distribution approach compared to a microcosm study: A case study with the fungicide fluazinam. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 109-122.
- Van den Brink PJ, Ter Braak CJF. (1999) Principal response curves: analysis of time-dependent

- multivariate responses of biological community to stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 138-148.
- Van Donk E. (2007) Chemical information transfer in freshwater plankton. *Ecological Informatics*, 2, 112-120.
- Van Donk E, Peacor S, Grosser K, Domis LNDS, Lüring M. (2016) Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 238, 91-105.
- Verschoor AM, Vos M, Van Der Stap I. (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters*, 7, 1143-1148.
- Vos M, Kooi BW, De Angelis DL, Mooij WM. (2004) Inducible defences and the paradox of enrichment. *Oikos*, 105, 471-480.
- Wan L, Long Y, Hui J, Zhang H, Hou Z, Tan J, Pan Y, Sun S. (2020) Effect of norfloxacin on algae–cladoceran grazer–larval damselfly food chains: Algal morphology-mediated trophic cascades. *Chemosphere*, 256, 127166.
- Weiss LC, Leese F, Laforsch C, Tollrian R. (2015) Dopamine is a key regulator in the signalling pathway underlying predator-induced defences in *Daphnia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20151440.
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46, 4765-4767.
- Zhu X, Sun Y, Zhang X, Heng H, Nan H, Zhang L, Huang Y, Yang Z. (2016) Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 162, 243–251.
- Zhu X, Wang Y, Hou X, Kong Q, Sun Y, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2019) High temperature promotes the inhibition effect of Zn²⁺ on inducible defense of *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 216, 203–212.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.

PART I.

界面活性剤に対するイカダモとミジンコ類の感受性：

直接影響（生長阻害及び遊泳阻害）と間接影響（群体形成の攪乱）の濃度関係

第1章 界面活性剤によるイカダモの生長阻害及びミジンコ類の遊泳阻害影響

第2章 界面活性剤によるイカダモの群体形成の誘導及び抑制作用

第1章

界面活性剤によるイカダモの生長阻害及びミジンコ類の遊泳阻害影響

Part of data from

Oda Y, Sakamoto M, Miyabara Y. (2022) Colony formation in three species of the family Scenedesmaceae (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus acutus*, *Tetradesmus dimorphus*) exposed to sodium dodecyl sulfate and its interference with grazing of *Daphnia galeata*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 82, 37–47.

Oda Y, Miyabara Y. Grazing inhibition in *Daphnia* and *Bosmina* by colony formation of *Desmodesmus subspicatus* triggered by octyl sodium sulfate. submitted.

小田 悠介, 宮原 裕一. (2022) 界面活性剤に対する藻類とミジンコ類の感受性. 環境毒性学会誌, 25, 61-71.

1-1. はじめに

合成洗剤や化粧品, 農薬, 医薬品など, 様々な製品に含まれる界面活性剤は, 生活排水や産業廃水の流出, 土壌からの浸出などを介して非意図的に水圏環境に流入する (Rebello, 2014)。直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) や第四級アンモニウム塩 (QAC), ノニルフェノール (NP) などの世界的にも使用頻度が多い界面活性剤については河川水中から検出されており, LAS は最大で約 0.4 mg L^{-1} に達する場合もあるが (Ivanković and Hrenović, 2010), QAC や NP は $0.01\text{—}100 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ の範囲である (González et al., 2010; Zhang et al., 2015)。日本国内においては, NP や LAS については水生生物の保全に係る水質環境基準値が設定されており, 都市域や有機汚濁の進行した河川では, LAS の濃度 (年平均値) が基準値 (0.02 mg L^{-1}) を超える場合も多い (岩崎ら, 2019)。水生生物に対する界面活性剤の急性・慢性毒性値は, 細菌類, 藻類, 甲殻類, 魚類で広く

調べられており、界面活性剤の極性や化学構造（炭素鎖長など）によって大きく異なるが、0.1—100 mg L⁻¹ の範囲にある場合がほとんどである（Ivanković and Hrenović, 2010; Jackson et al., 2016）。

界面活性剤は、その特異的な化学的特性や構造により、藻類細胞の構造変性作用や光合成阻害（Lewis, 1990）、甲殻類の発生・生殖阻害など（LeBlank et al., 2000）、非致死濃度でも水生生物の体内組織や生理機能に影響を及ぼすことが知られている。また、増殖速度に影響が見られない濃度でも、緑藻イカダモで観察される群体形成（ミジンコ類等の放出するカイロモンによって誘導される防御形態への変化）など、環境依存的な表現型応答（表現型可塑性）を攪乱する事例も報告されている（Yasumoto et al., 2005; Zhu et al., 2020）。低濃度の界面活性剤が示すこれらの作用は、遺伝毒性や多世代影響、生物間相互作用の変化などを介し、個体群・群集レベルで長期的な影響を及ぼす可能性がある。

藻類とミジンコ類に対する界面活性剤の毒性は、分類群と界面活性剤の極性により異なる傾向が見られる。例えば、陰イオン界面活性剤ドデシル硫酸塩（sodium dodecyl sulfate, SDS）は、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）において標準試験生物として用いられている藻類ムレミカツキモ（*Pseudokichneriella subcapitata*）とオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対して、それぞれ増殖阻害濃度（50%影響濃度, 72h-EC₅₀）が 3.8 mg L⁻¹（Shedd et al., 1999）、また遊泳阻害濃度（50%致死濃度, 48h-LC₅₀）が 9.6 mg L⁻¹（Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez, 1994）と報告されている。一方、陽イオン界面活性剤ベンザルコニウム塩化物（benzalkonium chloride, BAC）は、*P. subcapitata* への EC₅₀ 値が 255 µg L⁻¹（Elersek et al., 2018）であるのに対し、*D. magna* に対する LC₅₀ 値が 38 µg L⁻¹（Lavorgna et al., 2016）と報告されている。これらの結果は、陽イオン界面活性剤は陰イオン界面活性剤の毒性値の 1/100—1/10 倍程度であり、また界

面活性剤の極性によっても藻類とミジンコ類の感受性が異なることを示している。一方、生物種の感受性は試験条件によっても異なり、同一条件下で藻類やミジンコ類に対する界面活性剤の毒性を比較した研究例は少ない。また、既存の毒性試験報告例は標準試験生物に関するものがほとんどであり、これは国内における実環境中での水生生物への影響について知見が不足していることを意味する。

陰イオン界面活性剤の SDS やオクチル硫酸塩 sodium octyl sulfate (SOS) , また陽イオン界面活性剤のベンザルコニウム臭化塩 (BZK-Br) について、緑藻イカダモの群体形成を攪乱する作用が報告されており (Yasumoto et al., 2005; Zhu et al., 2020) , これらの物質はイカダモ類とミジンコ類の生物間相互作用に対して間接的な影響を及ぼす可能性がある。本研究では、後の章においてイカダモの群体形成の攪乱物質として用いるこれらの界面活性剤について、藻類の生長やミジンコ類の遊泳に対する直接的な影響 (毒性) を整理するため、同一条件下で種レベルでの毒性試験を実施した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 試験生物

藻類は、国立環境研究所から入手した *Desmodesmus subspicatus* (NIES-802 株) , *Scenedesmus acutus* (NIES-95 株) , 及び *Tetradesmus dimorphus* (NIES-119 株) のイカダモ 3 種を用いた。イカダモの培養にはオートクレーブで滅菌した COMBO 培地 (Kilham et al., 1998) を用い、水温 22 ± 1 °C, 光周期 16 時間 : 8 時間 (明期 : 暗期) , 光子密度 $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の実験室条件下で継代培養した。ストック培養は 200 mL 容量の蓋付き (シリコセン, AS ONE, 大阪) 三角フラスコで行い、100 mL の藻類懸濁液を週に 1 回クリーンベンチ内で新たな培地に植え継いだ。培養は静置して行い、懸濁状態及び対数増殖を維持するため、日に 2 回は三角フラスコを穏やかに振盪した。

ミジンコ類は、長野県木崎湖（緯度 36°33'N, 経度 137°50'E）から単離したカブトミジンコ（*Daphnia galeata*）, 及び長野県諏訪湖（緯度 36°2'N, 経度 138°5'E）から単離したゾウミジンコ（*Bosmina longirostris*）の単一クローンを実験に用いた。ミジンコ類のストック培養には 1 L 容量のビーカーを用い、滅菌済み COMBO 培地で行った。クロレラ工業株式会社から購入した *Chlorella vulgaris* をカブトミジンコに対して 5.0×10^5 cells mL⁻¹, ゾウミジンコに対して 2.0×10^5 cells mL⁻¹ の餌密度で 2 日ごとに与え、週に 1 回培地を換水した。培養は、イカダモと同様の実験室条件下で行った。

1-2-2. 試験物質

本研究では、陰イオン界面活性剤のドデシル硫酸塩 sodium dodecyl sulfate (SDS; Merck KGaA, Darmstadt, Germany, <https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/sds/sigma/13771>) およびオクチル硫酸塩 octyl sodium sulfate (SOS; Alfa aesar by Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, <https://www.alfa.com/ja/msds/?language=JP&subformat=JPG4&sku=A11786>) , および陽イオン界面活性剤のベンザルコニウム臭化塩 benzalkonium bromide (BZK-Br; 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を試験物質として用いた。各界面活性剤のストック溶液は、各試薬を蒸留水に溶かし、最終濃度 1 g L⁻¹ で調整した。

1-2-3. 藻類生長阻害試験

各試験は OECD のテストガイドライン No. 201 (OECD, 2006) に準拠し、継代培養と同様の実験室条件下で行った。SDS に対する試験は *D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus* について行い、SOS 及び BZK-Br に対する試験は *D. subspicatus* についてのみ行った。

界面活性剤のストック溶液を COMBO 培地に添加し、最高濃度を希釈することで各試

験濃度区を作製した。SDS の処理区は 0.01—1000 mg L⁻¹ (6 濃度区, 公比 10) , SOS の処理区は 0.02—200 mg L⁻¹ (5 濃度区, 公比 10) , BZK-Br の処理区は 10—160 µg L⁻¹ (5 濃度区, 公比 2) で作成し, それぞれに対照区を設けた。なお, SDS と SOS の曝露濃度は Yasumoto et al. (2005) , BZK-Br は Zhu et al. (2020) の結果を参考に設定した。200 mL 容量の三角フラスコに藻類を 2.0—5.0 × 10³ cells mL⁻¹ となるように添加し, 全量を 100 mL として, 対照区, 処理区ともに 3 連で試験を開始した。試験期間中, 藻類懸濁液は手で日に 2 回緩やかに振盪した。試験は 72 時間行い, 24 時間おきに 0.3 mL の藻類試料を採取した。藻類試料は, プランクトン計数盤 (松浪硝子工業株式会社, 大阪) を用いて光学顕微鏡下で細胞数を計数した。試験開始時と終了時に, 対照区と最大濃度区における水温, pH, 溶存酸素 (DO) 濃度を測定した: 各試験における水温は 21.5—22.7 °C, pH は 7.0—8.9, DO 濃度は 6.0—8.9 mg L⁻¹ の範囲で変化し, 試験プロトコルにおける範囲内であった。また, 濃度に合わせて 50—300 mL の水試料を採取し, GF/C フィルター (孔径 1.2 µm) でろ過したものを後述する界面活性剤の分析に供した。

得られた細胞密度をもとに, 3 日間での増殖速度 (μ , day⁻¹) を以下の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln(V_t) - \ln(V_0)}{\Delta t}$$

ここで, Δt は試験日数 (3 日) , V_t は 3 日後における細胞密度, V_0 は初期密度である。

統計ソフト R (ver 4. 1. 3) の drc パッケージ (Ritz et al., 2016) を用い, BZK-Br が *D. subspicatus* の増殖速度に及ぼす 72 時間 10% および 50% 影響濃度 (72-h EC₁₀ および 72-h EC₅₀) を 95% 信頼区間 (95 % C. I.) とともに推定した。

72-h EC₁₀ および 72-h EC₅₀ は, 増殖速度に対する BZK-Br の初期濃度の用量反応関係を以下の three-parameter log-logistic model に当てはめることで算出した。

$$f(x) = \frac{c}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

ここで、 $f(x)$ は増殖速度、 x は BZK-Br 実測濃度、 b は反応点での曲線の傾き、 c は増殖速度の最大値（切片）、 e は反応点での用量（EC₁₀または EC₅₀）である。

SDS 及び SOS について得られた 72-h EC₅₀は、drc package の EDcomp 関数による比率検定（Ritz et al. 2006; Wheeler et al. 2006）によって統計的な比較を行った。

1-2-4. ミジンコ類急性遊泳阻害試験

D. galeata および *B. longirostris* に対する BZK-Br, SOS の急性遊泳阻害試験は、OECD テストガイドライン No. 202（OECD, 2004）に準拠して行ったが、*B. longirostris* については試験容器や曝露方法に関して修正を加えた。試験には、ストック培養において各種 3 腹目あるいは 4 腹目に産まれた仔虫（産後 24 時間未満）を用いた。BZK-Br の設定濃度は *D. galeata* に対して 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ （6 濃度区、公比 2）、*B. longirostris* に対して 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ （5 濃度区、公比 2）、また SOS の設定濃度は 2 種ともに 62.5, 125, 250, 500, 1000 mg L^{-1} （5 濃度区、公比 2）とし、全てに対照区を設けた。なお、これらの曝露濃度は、BZK-Br は 10, 100, 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ 、SOS は 100, 500, 1000 mg L^{-1} の 3 濃度で予備曝露試験を事前に行い、遊泳阻害率（遊泳阻害数を総試験個体数で除算したもの）が最低濃度で 0 %、最大濃度で 100 %であることを確かめた上で設定した。*D. galeata* の試験には 50 mL 容量のビーカーを用い、試験水 50 mL に仔虫を 5 匹入れ、各処理区 4 連で試験を開始した。*B. longirostris* の試験には、12 mL 容量の蓋付きバイアルを用い、試験水で満たしたバイアルに仔虫を 5 匹入れた後、バイアル内に気泡が入らないよう注意深く蓋をして、各処理区 10 連で試験を開始した。この際、バイアルに蓋をして連数を *D. galeata* より多くした理由は、*B. longirostris* が水面でトラップされやすいため、これを防ぎ、またトラップされない個体数を確保するためである。全ての試験は餌を与えずに行い、曝露開始から 48 時間後における仔虫の遊泳阻害数及びトラップ数を記録

した。遊泳阻害数については、試験容器を手動で緩やかに振とうした際に 15 秒以上動かない個体を計数した。OECD TG-202 (OECD, 2004) における試験中の水質変動基準に対する要件及び界面活性剤の添加による大幅な水質変化を確認するため、試験開始時及び終了時において対照区及び最高濃度区における水温, pH, DO 濃度を測定した。その後, SOS の試験では各処理区から 50 mL, BZK-Br の試験では 100–200 mL を採取した。

D. galeata および *B. longirostris* に対する BZK-Br と SOS の 48 時間 10% および 50% 影響濃度 (48-h EC₁₀ および 48-h EC₅₀) を、95% 信頼区間とともに統計ソフト R (ver 4. 1. 3) の *drc* パッケージ (Ritz et al., 2016) を用いて推定した。

48-h EC₁₀ および 48-h EC₅₀ は、BZK-Br および SOS の実測濃度に対する遊泳阻害率を、以下の two-parameter log-logistic model に当てはめて算出した。

$$f(x) = \frac{1}{1 + \exp\{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

ここで、 $f(x)$ は遊泳阻害率、 x は SOS または BZK-Br の実測濃度、 b は反応点での曲線の傾き、 e は反応点での用量 (EC₁₀ または EC₅₀) である。なお、ここで当てはめた実測濃度は、各試験で試験開始時及び終了時における測定結果が得られていたため、2 点の幾何平均とした。*B. longirostris* の試験データについては、試験個体数からトラップされた個体数を差し引いて計算を行った。また、トラップ数が界面活性剤の濃度に依存する可能性を考慮し、トラップ数と濃度の相関関係について無相関検定を適用し、これを検証した。

BZK-Br 及び SOS の試験ごとに得られた各種の 72-h EC₅₀ について、*drc package* の EDcomp 関数による比率検定 (Ritz et al. 2006; Wheeler et al. 2006) を行い、統計的な比較を行った。

1-2-5. 界面活性剤の定量分析

BZK-Br の試験で得た水試料は、GF/C フィルター (孔径 1.2 μm, Cytiva, Tokyo, Japan)

でろ過した後、高濃度の試料は $10\text{--}100\ \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲になるよう希釈した。C₁₈ カラム (Bond Elut, Agilent technologies, USA) による固相抽出を行い、メタノールで溶出後、分析まで冷凍保存した。なお、固相抽出による BZK-Br の回収率は、添加回収試験により $10, 50, 100, 200\ \mu\text{g L}^{-1}$ (各 1 L, 各 1 点) を検討した結果、それぞれ 98 %, 104 %, 122 %, 95 %であった。回収率が一部 120 %を超過していたが、その他は $\pm 10\%$ 未満の良好な回収率が得られていることから、回収試験での試料濃度の調整時におけるバラつきと判断し、 $10\text{--}100\ \mu\text{g L}^{-1}$ の範囲では回収率による濃度補正は行わなかった。試料は窒素ガスで乾固した後、最終濃度で $2\text{--}10\ \text{mg L}^{-1}$ となるようアセトニトリルに再溶解した。BZK-Br の定量分析は、分析カラムとして野村化学製 ODS-UG-3 (内径 2.0 mm \times 100 mm) , 10 mM ギ酸 : アセトニトリル (3 : 7) を移動相とした HPLC 分析を行い、検出波長 220 nm におけるピーク面積を求めた。定量は BZK-Br の標準試料 ($1, 2, 5, 10\ \text{mg L}^{-1}$) をもとに絶対検量線法で行い、本分析における定量下限値は $0.3\ \text{mg L}^{-1}$ であった。最大試料量 (200 mL) 及び最低の分析必要量 (0.5 mL) を考慮すると最大濃縮率は 400 倍となり、この場合の試料濃度の定量下限値は $0.7\ \mu\text{g L}^{-1}$ であった。

SDS 及び SOS については、試料中に含まれる陰イオン界面活性剤の絶対量を対象に、メチレンブルー吸光度法 (Aomura et al. 1981) により定量分析を行った。SDS 及び SOS の標準試料 $2, 5, 10, 20\ \text{mg L}^{-1}$ (添加量は各 1 mL, 絶対量でそれぞれ $2, 5, 10, 20\ \mu\text{g}$) をもとに検量線を作成し、その濃度範囲内となるよう試料の希釈を行い、分析に供した。本分析における SOS の定量下限値は、絶対量で $0.5\ \mu\text{g}$ であり、最大添加量 (50 mL) では $0.01\ \text{mg L}^{-1}$ であった。

1-3. 結果と考察

1-3-1. 藻類生長阻害試験

1-3-1-1. 陰イオン界面活性剤 (SDS 及び SOS)

各試験中の水温変動は 21.9—22.7 °C, 対照区における pH は 7.0—8.9 の範囲で変動しており (Table 1-1), OECD TG-201 の試験基準 (OECD, 2006) を満たしていた。SDS の初期濃度は, 試験終了時において, 10 mg L⁻¹ 以上では最大 44 %, 1.0 mg L⁻¹ 以下では 81—100 % の減少が見られた (Table 1-2)。一方, SOS の試験終了時の濃度は設定濃度 20 mg L⁻¹ 以上で定量下限を上回っており, 減少率は 98—100 % 以上であった (Table 1-2)。陰イオン界面活性剤の濃度減少は藻類粒子への吸着が主な要因と考えられ, 藻類粒子は分析前に GF/C フィルターにより試料から除去したことで濃度減少が起きた可能性が高い。

Table 1-1 藻類生長阻害試験の対照区および最高濃度区での水温, pH, DO 濃度の変化.

Species	Surfactants	Treatment	Time (h)	WT ^a (°C)	pH	DO ^b (mg L ⁻¹)	
<i>D. subspicatus</i>	SDS	Control	0	22.5	7.0	7.8	
			72	21.9	8.4	8.4	
		(1000 mg L ⁻¹)	0	22.5	7.0	7.8	
			72	22.2	7.4	6.0	
		SOS	Control	0	22.1	8.1	7.0
				72	22.0	8.5	8.2
	(200 mg L ⁻¹)		0	22.0	8.1	7.5	
			72	21.9	8.3	7.9	
	BZK-Br	Control	0	21.0	8.7	7.2	
			72	21.5	7.3	7.8	
		(320 µg L ⁻¹)	0	20.9	8.1	7.1	
			72	21.5	7.3	7.7	
<i>S. acutus</i>	SDS	Control	0	22.5	7.0	7.4	
			72	22.3	8.9	8.5	
		(1000 mg L ⁻¹)	0	22.5	7.0	7.4	
			72	22.7	7.8	6.0	
<i>T. dimorphus</i>	SDS	Control	0	22.2	7.0	7.0	
			72	22.2	8.5	7.7	
		(1000 mg L ⁻¹)	0	22.2	7.0	7.0	
			72	22.0	7.0	6.6	

Table 1-2 藻類生長阻害試験における SDS, SOS, BZK-Br の設定濃度, および測定濃度の初期値および最終値 (72-h 後).

Species	SDS (mg L ⁻¹)			SOS (mg L ⁻¹)			BZK-Br (μg L ⁻¹)		
	Nominal	Initial	Final	Nominal	Initial	Final	Nominal	Initial	Final
<i>D. subspicatus</i>	0	a	a	0	a	a	0	b	b
	0.01	1.19 × 10 ⁻²	0.07 × 10 ⁻²	0.02	1.32 × 10 ⁻²	a	10	10.7	b
	0.1	1.07 × 10 ⁻¹	0.08 × 10 ⁻¹	0.2	1.55 × 10 ⁻¹	a	20	21.6	b
	1	1.05 × 10 ⁰	0.11 × 10 ⁰	2	1.71 × 10 ⁰	a	40	40.9	b
	10	0.99 × 10 ¹	0.61 × 10 ¹	20	2.17 × 10 ¹	0.01 × 10 ¹	80	113	b
	100	0.98 × 10 ²	0.86 × 10 ²	200	1.50 × 10 ²	0.03 × 10 ²	160	147	b
	1000	1.04 × 10 ³	0.93 × 10 ³						
<i>S. acutus</i>	0	a	a						
	0.01	1.17 × 10 ⁻²	a						
	0.1	1.09 × 10 ⁻¹	0.19 × 10 ⁻¹						
	1	1.07 × 10 ⁰	0.18 × 10 ⁰						
	10	1.14 × 10 ¹	0.82 × 10 ¹						
	100	1.07 × 10 ²	0.95 × 10 ²						
	1000	1.03 × 10 ³	1.03 × 10 ³						
<i>T. dimorphus</i>	0	a	a						
	0.01	1.02 × 10 ⁻²	0.07 × 10 ⁻²						
	0.1	0.99 × 10 ⁻¹	0.17 × 10 ⁻¹						
	1	1.08 × 10 ⁰	0.20 × 10 ⁰						
	10	1.03 × 10 ¹	0.57 × 10 ¹						
	100	1.06 × 10 ²	0.79 × 10 ²						
	1000	1.12 × 10 ³	0.87 × 10 ³						

^a BZK-Br の定量下限 (HPLC 分析で 0.28 mg L⁻¹, 濃縮前の試料濃度換算で 0.7 μg L⁻¹) 未満.

^b SDS 及び SOS の定量下限 (メチレンブルー吸光度法で絶対量 0.5 μg および濃度換算で 0.01 mg L⁻¹) 未満.

SDS に対する試験で得られた各 72-h EC₁₀ および 72-h EC₅₀ は, *D. subspicatus* で 8.75 mg L⁻¹ (95 % C.I. 4.68—12.8 mg L⁻¹) および 27.7 mg L⁻¹ (95 % C.I. 17.9—37.5 mg L⁻¹) , *S. acutus* で 6.01 mg L⁻¹ (95 % C.I. -1.19—13.2 mg L⁻¹) および 162 mg L⁻¹ (95 % C.I. 90.8—234 mg L⁻¹) , *T. dimorphus* で 12.5 mg L⁻¹ (95 % C.I. 1.42—23.7 mg L⁻¹) および 55.5 mg L⁻¹ (95 % C.I. 34.2—76.8 mg L⁻¹) であった (Table 1-3)。比率検定では各種の 72-h EC₅₀ が有意に異なっており ($P < 0.05$, Table 1-3) , SDS に対する感受性の高さは *D. subspicatus* > *T. dimorphus* > *S. acutus* であることが明らかになった。OECD の試験ガイドライン種であるムレミカヅキモ *Raphidocelis subcapitata* の SDS に対する 72-h EC₅₀ は 36.6 mg L⁻¹ であり (Liwarska-Bizukojc et al., 2005) , *D. subspicatus* 及び *T. dimorphus* と同等であるが, *S. acutus* よりも低い。陰イオン性界面活性剤では FFD-6 に対する *S. obliquus* の感受性が極端に低い (NOEC = 1000 mg L⁻¹) ことを報告した Lüring (2006) を除き, イカダモ科 *Scenedesmaceae* における SDS に対する感受性の違いを説明する他の報告例は無い。陰イオン性界面活性剤は, 細胞壁のタンパク質 (内因性チラコイドタンパクなど) を変性させて結合し, クロロフィル合成に影響を与える (Chawla et al. 1987; Lewis 1990)。細胞壁が厚い藻類ほど界面活性剤の影響を受けにくい傾向がある (Lweis 1990) ため, イカダモ科 3 種の SDS に対する種特異的な感受性は, 種間の形態的な違いに起因する可能性がある。

Table 1-3 藻類生長阻害試験における SDS, SOS, BZK-Br の 72-h EC₅₀ および EC₁₀ とそれらの 95%信頼区間のまとめ. 表中の記号 (a, b, c) が異なる場合, 統計的有意差があることを示す ($P < 0.05$).

Species	Endpoint	SDS	SOS	BZK-Br
		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(μg L ⁻¹)
<i>D. subspicatus</i>	72-h EC ₁₀	8.75 [4.68—12.8]	1.16 [0.268—2.06]	34.8 [24.2—45.4]
	72-h EC ₅₀	27.7 [17.9—37.5] ^c	14.1 [9.82—18.4] ^b	60.3 [46.4—74.2]
<i>S. acutus</i>	72-h EC ₁₀	6.01 [-1.19—13.2]		
	72-h EC ₅₀	162 [90.8—234] ^a		
<i>T. dimorphus</i>	72-h EC ₁₀	12.5 [1.42—23.7]		
	72-h EC ₅₀	55.5 [34.2—76.8] ^b		

SOS に対する *D. subspicatus* の 72-h EC₅₀ は 60.3 mg L⁻¹ (95 % C.I. 46.4—74.2 mg L⁻¹) であり, 比率検定の結果から SDS と比べて感受性が低いことが明らかになった (Table 1-3)。SOS と SDS の構造的な違いはアルキル鎖長のみであり, SOS は C₈, SDS は C₁₂ である。藻類についてはアルキル硫酸塩に対する毒性試験結果が C₁₂ から C₁₅ の範囲で報告されているが, アルキル鎖長に依存して感受性が異なる傾向はないと議論されている (Könnecker et al., 2011)。C₈ について試験報告例は無いが, C₈ は C₁₂ と比べて脂溶性の指標となる水-オクタノール分配係数 (Log K_{ow}) が約 1 低いことから (Könnecker et al., 2011), 藻類細胞への吸着性が低い可能性があり, これが感受性の違いを説明するかもしれない。

1-3-1-2. 陽イオン界面活性剤 (BZK-Br)

BZK-Br に対する試験では, 試験終了時の BZK-Br 濃度は全ての処理区で定量下限未満となった (Table 1-2)。正に荷電する陽イオン界面活性剤は, 試験容器のガラス表面や藻類細胞などの負に荷電している試験材料とイオン結合により吸着するため (OECD,

2019) , 試験中における BZK-Br の損失が起きたと考えられる。なお, 試験中における水温は 20.9—21.5 °C, および対照区における pH は 7.3—8.7 の範囲で変動しており (Table 1-1) , OECD TG-201 の試験基準 (OECD, 2006) を満たしていた。

濃度反応曲線から推定された 72-h EC₁₀ 及び 72-h EC₅₀ は, それぞれ 34.8 µg L⁻¹ (95 % C. I. 24.2—45.4 µg L⁻¹) 及び 60.3 µg L⁻¹ (95 % C. I. 46.4—74.2 µg L⁻¹) となった (Table 1-3)。Zhu et al. (2020) は, BZK-Br をイカダモ *Scenedesmus obliquus* に 192 時間曝露して影響を評価しており, 曝露初期 (96 時間以内) では 100 µg L⁻¹ の濃度で増殖速度と光合成活性が顕著に低下することを示した。一方, 曝露後 144 時間を過ぎると増殖速度が回復する傾向が見られ, 藻類細胞への吸着による BZK-Br の損失と影響後の藻類の代償性増殖を理由に挙げている (Zhu et al., 2020)。Zhu et al. (2020) の実験でも試験中における BZK-Br 濃度の動態は示されていないが, 試験容器や培地容量等の実験条件は本研究と類似しており, 72 時間での増殖阻害影響では BZK-Br の損失や藻類の回復性等の介入効果は小さいと考えられる。

藻類に対する BZK-Br の毒性試験結果は無いが, BZK-Br と同様に第四級アンモニウム塩 (QAC) に含まれる benzalkonium chloride (BZK-Cl) については *R. subcapitata* に対して OECD TG-201 に準拠した試験報告がある (Elersek et al., 2018)。*R. subcapitata* に対する BZK-Cl の 72-h EC₅₀ は設定濃度で 255 µg L⁻¹ であり, 本研究で得られた *D. subspicatus* に対する BZK-Br の 72-h EC₅₀ (初期測定濃度で 60.3 µg L⁻¹) と比較すると感受性は 4 倍ほど低い。BZK-Br に対する *S. obliquus* と *D. subspicatus* の感受性は 100 µg L⁻¹ 以下である点を考慮すると, イカダモ科は *R. subcapitata* より感受性が高い傾向があると考えられる。QAC の毒性は水中で電離したフリー態イオン (benzalkonium⁺) の濃度に依存するため (Chen et al., 2014) , BZK-Br と BZK-Cl の毒性値が大きく乖離することは考えにくい。そのため, 藻類種間の感受性差は種特異的な特性・形質の違いに依存すると考えら

れる。例えば、陽イオン界面活性剤の膜透過性は細胞壁の厚さや化学的組成（脂質やタンパク質の含有量など）によって異なる（Lewis, 1990）。

1-3-2. ミジンコ類急性遊泳阻害試験

BZK-Br 及び SOS 各試験における対照区の pH 変動は 0.1—1.4 の範囲であり、また対照区と処理区における DO 濃度は 7.1—8.5 の範囲で変動したため（Table 1-4）、OECD TG-202 の試験基準（OECD, 2004）を満たしていた。BZK-Br の初期濃度は、*D. galeata* では全体の 7.0—44%、*B. longirostris* では全体の 21—45%まで 48 時間後に低下する傾向が見られた（Table 1-5）。一方で、SOS については試験開始時と比べて大幅な濃度減少は見られなかった。BZK-Br の濃度低下は試験容器（ガラス表面）への吸着が要因と考えられ、初期濃度が同一であるにも関わらず *B. longirostris* と比べて *D. galeata* の試験における濃度低下が大きい（Table 1-5）ことから、試験容器の表面積の違いによるものと考えられる。一方、SOS は曝露濃度を高く設定した（62.5 mg L⁻¹以上）ため濃度減少は少なかった可能性がある。

Table 1-4 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における対照区および最高濃度区での水温, pH, DO 濃度の変化.

Species	Surfactants	Treatment	Time (h)	WT ^a (°C)	pH	DO ^b (mg L ⁻¹)
<i>D. galeata</i>	BZK-Br	Control	0	21.0	8.7	7.1
			48	20.8	7.3	7.5
		Treatment (400 µg L ⁻¹)	0	21.0	7.9	7.8
			48	20.8	7.3	7.6
	SOS	Control	0	21.2	8.6	8.3
			48	21.3	8.3	8.5
		Treatment (1000 mg L ⁻¹)	0	21.3	7.7	7.9
			48	21.1	6.8	7.2
<i>B. longirostris</i>	BZK-Br	Control	0	21.0	8.7	7.1
			48	21.4	7.3	7.7
		Treatment (400 µg L ⁻¹)	0	21.0	7.9	7.8
			48	21.3	7.3	7.7
	SOS	Control	0	21.4	8.3	8.2
			48	21.6	8.2	8.2
		Treatment (1000 mg L ⁻¹)	0	21.4	7.8	7.8
			48	21.5	6.8	7.4

Table 1-5 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における SOS, BZK-Br の設定濃度, および測定濃度の初期値および最終値 (48-h 後).

Species	BZK-Br ($\mu\text{g L}^{-1}$)				SOS (mg L^{-1})			
	Nominal	Initial	Final	Geometric mean	Nominal	Initial	Final	Geometric mean
<i>D. galeata</i>	0	a	a		0	b	b	
	12.5	16.9	1.25	4.59	62.5	102.9	48.16	70.39
	25	33.1	4.56	12.3	125	125.1	119.4	122.2
	50	51.7	4.60	15.4	250	191.0	195.9	193.5
	100	98.5	15.4	39.0	500	580.7	579.5	580.1
	200	139	41.1	75.7	1000	1002	974.6	988.4
	400	405	177	268				
<i>B. longirostris</i>	0	a	a		0	b	b	
	25	33.1 (132)	8.29	16.6	62.5	65.02 (104)	51.45	57.84
	50	51.7 (103)	11.0	23.8	125	85.60 (68.5)	62.57	73.19
	100	98.5 (98.5)	30.9	55.2	250	143.3 (57.3)	95.52	117.0
	200	139 (69.7)	58.7	90.4	500	727.6 (146)	638.7	681.7
	400	405 (101)	181	271	1000	1054 (105)	902.2	975.0

^a BZK-Br の定量下限 (HPLC 分析で 0.28 mg L^{-1} , 濃縮前の試料濃度換算で $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$) 未満.

^b SDS 及び SOS の定量下限 (メチレンブルー吸光度法で絶対量 $0.5 \mu\text{g}$ および濃度換算で 0.01 mg L^{-1}) 未満.

試験中における *B. longirostris* のトラップ数は、BZK-Br の試験では最大 7 個体、SOS の試験では最大 6 個体であり、それぞれ対照区で観察された (Table 1-6)。一般に、界面活性剤は臨界ミセル濃度未満では濃度が高いほど水面の表面張力を低下させる作用を持つため、界面活性剤の曝露区においてトラップ数が低下したと考えられる。一方、曝露濃度に対するトラップ数の相関関係は負となったが、相関係数への無相関検定では BZK-Br および SOS の試験ともに有意水準 5 % で帰無仮説 (相関係数が 0 と異なる) が棄却されなかった (Fig. 1-1)。そのため、ここでは界面活性剤によるトラップ数への影響は小さく、濃度依存的にトラップ数が低下したわけではないと考えられる。また、BZK-Br および SOS を用いた試験ともに、対照区における遊泳阻害は観察されなかったため、試験結果は界面活性剤による遊泳阻害影響を反映できていたと考えられる。

Table 1-6 ミジンコ類急性遊泳阻害試験における *B. longirostris* のトラップ数.

Surfactants	Concentration	Number of trapped
BZK-Br ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0	7
	25	6
	50	3
	100	7
	200	5
	400	0
SOS (mg L^{-1})	0	6
	62.5	3
	125	3
	250	4
	500	1
	1000	2

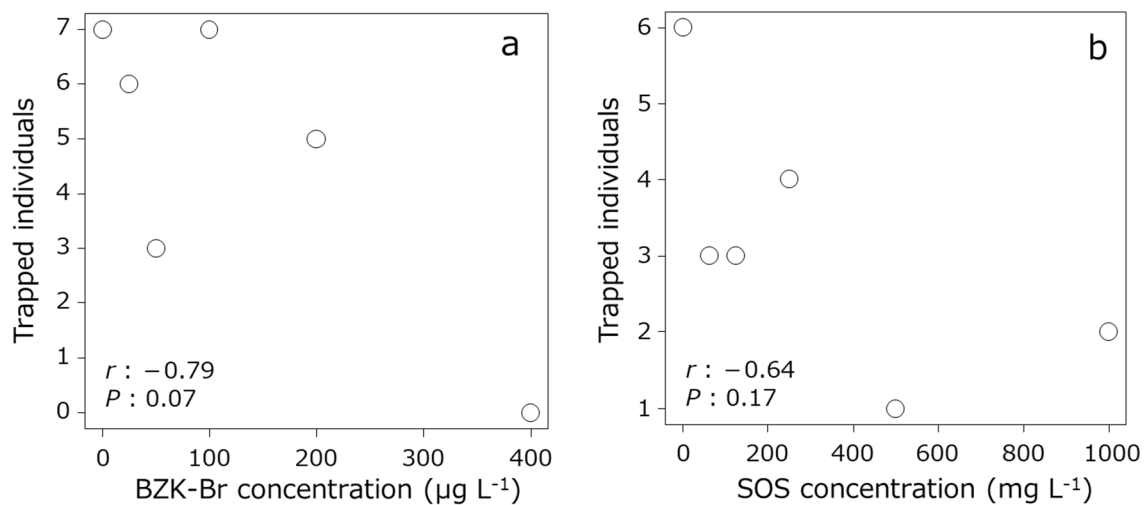


Fig. 1-1. ミジンコ類急性遊泳阻害試験における *B. longirostris* のトラップ数と(a) BZK-Br (a) および SOS (b) の関係。

BZK-Br に対する 48-h EC_{50} (幾何平均) は, *D. galeata* ($40.9 \mu\text{g L}^{-1}$, 95 % C. I. 33.0— $48.8 \mu\text{g L}^{-1}$) より *B. longirostris* ($80.1 \mu\text{g L}^{-1}$, 95 % C. I. 68.1— $92.0 \mu\text{g L}^{-1}$) が 2 倍ほど高く (Table 1-7), 比率検定でも有意差が検出されたため, 2 種間では *D. galeata* の感受性が高いと解釈できる。ただし, 2 種の試験では異なる試験容器を用いており, 容器内の表面積にも違いがあったと考えられるため, BZK-Br 濃度の変動は異なっていた可能性がある。Lavorgna et al. (2016) は, BZK-Br の同属化合物である BZK-Cl について, *D. magna* に対する 48-h EC_{50} が $38.2 \mu\text{g L}^{-1}$, *Ceriodaphnia dubia* に対する 24-h LC_{50} が $404 \mu\text{g L}^{-1}$ と報告している。*D. galeata* に対する BZK-Br の 48-h EC_{50} と *D. magna* に対する BZK-Cl の 48-h EC_{50} は同等であることから, QAC に属する化合物に対する感受性は *Daphnia* 属内で大きな差はなく, これは BZK-Br や BZK-Cl の作用機序 (細胞膜機能阻害) が共通するためと考えられる (Wessels and Ingmer, 2013)。一方, *B. longirostris* や *C. dubia* は *Daphnia* 属より QAC に対する感受性が低い傾向があり, BZK-Cl による繁殖毒性や遺伝毒性 (DNA 鎖切断活性) についても *C. dubia* と *D. magna* で約 10 倍の感受性差があることが示されている (Lavorgna et al., 2016)。QAC に対するミジンコ類の感受性差に関わる

要因は不明であるが、例えば物質の取り込み量や速度が種間で異なる可能性なども考えられる。

Table 1-7 ミジンコ類遊泳阻害試験における BZK-Br および SOS の 72-h EC₅₀ および EC₁₀ とそれらの 95%信頼区間のまとめ。表中の記号 (a, b) が異なる場合、統計的有意差があることを示す ($P < 0.05$).

Species	Endpoint	BZK-Br ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SOS (mg L^{-1})
<i>D. galeata</i>	48-h EC ₁₀	22.7 [15.5—30.0]	226.9 [156.7—297.1]
	48-h EC ₅₀	40.9 [33.0—48.8] ^b	335.9 [248.5—423.3]
<i>B. longirostris</i>	48-h EC ₁₀	36.5 [27.9—44.9]	149.4 [106.3—192.5]
	48-h EC ₅₀	80.1 [68.1—92.0] ^a	280.0 [211.1—348.9]

BZK-Br と異なり、SOS に対する 48-h EC₅₀ は *D. galeata* (335.9 mg L⁻¹, 95 % C. I. 248.5—423.3 mg L⁻¹) と *B. longirostris* (280.0 mg L⁻¹, 95 % C. I. 211.1—348.9 mg L⁻¹) の間には大きな差がなかった (Table 1-7)。化学物質に対する *Daphnia* と *Bosmina* の感受性差は体サイズや摂餌 (取り込み) 速度の違いから説明できる場合が多いが、本結果はこれらの要因が SOS の毒性を決定したとは考えにくい。SOS の毒性メカニズムは不明であるが、例えば SOS と炭素鎖長のみが異なるドデシル硫酸塩 (SDS) は枝角類においてアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性を阻害することが *In vitro* での研究で示されており (Guilhermino et al., 2000), AChE 活性阻害剤に対する枝角類の応答 (AChE 活性) には種間・種内でも差異が見られるため (Ishimota et al., 2020), 今後はこのような分子マーカーを用いた評価により説明できるかもしれない。また、試験例の多い LAS や SDS などは *D. magna* に対する 48-h EC₅₀ が約 10 mg L⁻¹ と報告されており (Lechuga et al.,

2016; Martínez-Jerónimo and García-González, 1994) , SOS はこれらと比べて非常に毒性が低いといえる。毒性の強さは C₈ から C₁₆ までの範囲でアルキル鎖長と正の関係にあり、例えば *D. magna* に対する硫酸アルキル塩の 24-h EC₅₀ はアルキル鎖長 C₈ と C₁₃ で約 100 倍の差がある (Könnecker et al., 2011)。SOS はアルキル鎖長が C₈ であるため、C₁₂ 以上の SDS や LAS とは毒性に大きな差があると考えられる。

1-4. まとめ

本研究では、イカダモ類の群体形成の攪乱を介して生物間相互作用に間接的な影響を及ぼしうる物質として、SDS, SOS, BZK-Br の各種界面活性剤が、イカダモ類 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) やミジンコ類 (*D. galeata*, *B. longirostris*) における増殖及び遊泳行動に及ぼす影響を整理した。ここで得られた各界面活性剤に対する各種の感受性 (72-h EC₁₀ や 72-h EC₅₀) は、既存の生態リスク評価における指標であるため、実環境中で実際に影響を及ぼしうるかを考察する上で重要な結果となる。今後は、これらの界面活性剤による群体形成の攪乱影響を検証し、実環境中の濃度を含め、界面活性剤が水生生物種に及ぼす直接影響と間接影響の相対的なリスクの違いについて検討することが必要となる。

1-5. 参考文献

- 岩崎雄一, 本田大士, 西岡亨, 石川百合子, 山根雅之. (2019) LAS 濃度が高い河川地点はどんな特徴があるか?: 水生生物保全を目的とした水環境管理への示唆. 水環境学会誌, 42(5), 201-206.
- Aomura K, Ashidate N, Aisawa T, Fujita M, Goto K, Hasebe K, Hikime S, Ikehata A, Kawamura S, Kimura M et al. (1981) Mizu no Bunseki. The Japan Society for Analytical Chemistry, Hokkaido, Kagaku-Dojin, Kyoto, pp 374-378
- Chawla G, Viswanathan PN, Devi S (1987) Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture. Environmental and Experimental Botany 27, 311-323
- Chen Y, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JL, Droge ST (2014) Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: How test design affects bioavailability and effect concentrations. Environmental Toxicology and Chemistry, 33, 606-615.
- Elrsek T, Ženko M, Filipič M (2018) Ecotoxicity of disinfectant benzalkonium chloride and its mixture with antineoplastic drug 5-fluorouracil towards alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. PeerJ, 6, e4986.
- González MM, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2010) Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. Science of the Total Environment, 408, 563-570.
- Guilhermino L, Lacerda MN, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000) In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. Science of the Total Environment, 247, 137-141.
- Ishimota M, Tajiki-Nishino R, Fukuyama T, Tomiyama N, Sakamoto M, Ohyama K (2020) Long-term tolerance acquisition and changes in acetylcholinesterase activity in three cladoceran species after a 48-h pulsed exposure to pirimicarb. Water, Air, & Soil Pollution, 231, 1-17.
- Ivanković T, Hrenović J (2010) Surfactants in the environment. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 61, 95-109.
- Jackson M, Eadsforth C, Schowanek D, Delfosse T, Riddle A, Budgen N (2016) Comprehensive review of several surfactants in marine environments: fate and ecotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, 35, 1077-1086.
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. Hydrobiologia, 377, 147-159.
- Könnecker G, Regelman J, Belanger S, Gamon K, Sedlak R (2011) Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: Physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 1445-1460.
- Lavorgna M, Russo C, D'Abrosca B, Parrella A, Isidori M (2016) Toxicity and genotoxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride (BAC) using *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* as model systems. Environmental Pollution, 210, 34-39.
- LeBlanc GA, Mu X, Rider CV (2000) Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. Environmental Health Perspectives, 108, 1133-1138.
- Lechuga M, Fernández-Serrano M, Jurado E, Núñez-Olea J, Ríos F (2016) Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. Ecotoxicology and Environmental Safety, 125, 1-8.
- Lewis MA (1990) Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety, 20, 123-140.
- Liwerska-Bizukojc E, Miksch K, Malachowska-Jutysz A, Kalka J (2005) Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. Chemosphere 58, 1249-1253

- Lüring M (2006) Effects of a surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* morphology and growth under different nutrient conditions. *Chemosphere* 62, 1351–1358
- Martínez-Jerónimo F, García-González R. (1994) Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, 247-253.
- OECD (2004) OECD guidelines for the testing of chemicals: 202 *Daphnia* sp., acute immobilization test. OECD Publishing, Paris.
- OECD (2006) OECD guidelines for the testing of chemicals: 201 Freshwater alga and cyanobacterial growth inhibition test. OECD Publishing, Paris.
- OECD (2019) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, Paris.
- Rebello S, Asok AK, Mundayoor S, Jisha MS. (2014) Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 275–287.
- Ritz C, Cedergreen N, Jensen JE, Streibig JC (2006) Relative potency in nonsimilar dose–response curves. *Weed Sciences*, 54, 407–412
- Ritz C, Streibig JC, Ritz MC (2016) Package ‘drc.’ Mountain View, CA, USA, Creative Commons
- Shedd TR, Widder MW, Toussaint MW, Sunkel MC, Hull E. (1999) Evaluation of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* as a tool for rapid acute toxicity screening. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18, 2258-2261.
- Wessels S, Ingmer H (2013) Modes of action of three disinfectant active substances: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67, 456–467.
- Wheeler MW, Park RM, Bailer AJ. (2006) Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1441-1444
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46, 4765–4767.
- Zhang C, Cui F, Zeng GM, Jiang M, Yang ZZ, Yu ZG, Zhu MY, Shen LQ (2015) Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518, 352–362.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.

第2章

界面活性剤によるイカダモの群体形成の誘導と抑制

Part of data from

Oda Y, Sakamoto M, Miyabara Y. (2022) Colony formation in three species of the family *Scenedesmaceae* (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus acutus*, *Tetradesmus dimorphus*) exposed to sodium dodecyl sulfate and its interference with grazing of *Daphnia galeata*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 82, 37–47.

Oda Y, Miyabara Y. Grazing inhibition in *Daphnia* and *Bosmina* by colony formation of *Desmodesmus subspicatus* triggered by octyl sodium sulfate. submitted.

小田 悠介, 宮原 裕一. (2022) 界面活性剤に対する藻類とミジンコ類の感受性. 環境毒化学会誌, 25, 61–71.

小田 悠介, 坂本 正樹, 宮原 裕一. 界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱が2栄養段階（イカダモ, ミジンコ類）構成種の個体群動態に対する影響. in preparation.

2-1. はじめに

湖沼や水田に生息する淡水性の緑藻イカダモは、ミジンコやワムシ、カイアシ類等を含む植食性プランクトンが放出する情報化学物質（カイロモン）に曝されると、2–8細胞が連結した群体を形成する（Fig. 2-1）。群体形成は、親細胞が内生胞子を形成し、2–16の細胞に分裂する無性生殖による増殖過程において、分裂の際に細胞壁が結合することで起こる（Zhu et al., 2016）。単一細胞と比べ、群体のイカダモは細胞外多糖類や細胞内脂質の量が多いため、群体形成の発現や維持には生理学的なコストが掛かると考えられている（Zhu et al., 2021）。また、群体は単一細胞よりも比重が大きいため、沈降速度が

増加し、水面からの光が届きにくい湖底に沈みやすくなることもコストの1つであると考えられている (Lürling, 2003)。それにも関わらず、群体はミジンコやワムシ等に対して摂食されにくい (Van Donk, 2007) , 摂食圧の高い条件下では群体形成は適応的な応答といえる。

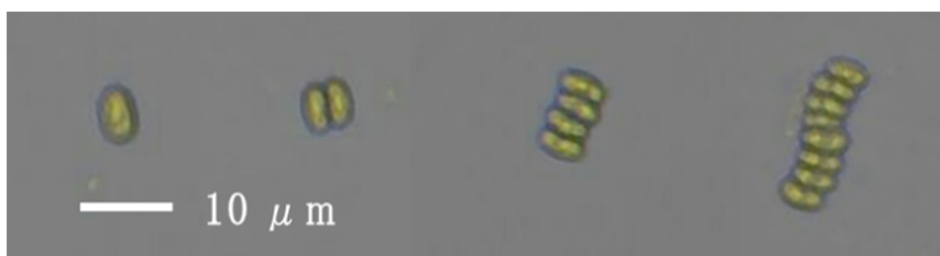


Fig. 2-1. 単一細胞および2, 4, 8細胞の群体を形成したイカダモ(*D. subspicatus*).

イカダモの群体形成は、様々な界面活性剤により誘導あるいは抑制されることが報告されている。ドデシル硫酸塩 (SDS) やその類似構造化合物 (Yasumoto et al., 2005) , モノ-ジドデシルジスルファン化ジフェニルオキシド (FFD-6) (Lürling, 2006) 等の陰イオン界面活性剤は、イカダモの群体形成を誘導する。陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導は、イカダモに不必要なコストを課し、また恒常的に植食性プランクトンによる摂食が制限されるため、生産者から消費者への食物連鎖を介したエネルギー伝達効率が低くなることが指摘されている (Lürling et al., 2011)。反対に、陽イオン界面活性剤ベンザルコニウム臭化塩 (BZK-Br) や非イオン界面活性剤ノニルフェノールエーテル (NPE) は、ミジンコ由来のカイロモン存在下での群体形成の誘導を抑制した (Zhu et al., 2020)。群体形成の阻害はイカダモが消費者により食い尽くされるリスクを高め、結果として消費者も餌不足となり個体群を維持できなくなり、生産者と消費者が共存する系の崩壊を招くことが危惧されている (Verschoor et al., 2004; Pan et al., 2020)。これら

の界面活性剤による群体形成の攪乱は、イカダモの増殖に影響するよりも低い濃度で起こることが示されており、化審法や OECD 等の公定法で定められる標準試験では検出できないことが問題視されている。

群体形成の発現性は、イカダモの種や遺伝子型、培養条件、カイロモンを放出する消費者の種によっても異なる (Lürling, 2003)。しかし、陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導が報告されている種は限られており、それらの結果は同一条件で得られたものではない (Yasumoto et al., 2005; Lürling, 2006)。また、群体形成の抑制に関わる先行研究では、*Daphnia* 属ミジンコ (*D. magna*) のカイロモンを用いて群体形成を誘導した条件下で行われたものであり、他種のミジンコ類由来のカイロモン存在下でどの程度の抑制影響が見られるかは明らかにされていない。これらの知見不足を考慮し、本研究では陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導を異なるイカダモ種で評価し影響の一般性を検証すること、及び陽イオン界面活性剤による群体形成の抑制影響を異なるミジンコ種が放出したカイロモンの存在下で比較することを目的とし、実験を行った。また、第 1 章で得られた藻類の生長に対する影響との濃度関係や、実環境中での界面活性剤の濃度について文献を整理し、群体形成の攪乱による潜在的な影響リスクについて考察した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 試験生物及び試験物質

本試験で用いたイカダモ類 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) およびミジンコ類 (*D. galeata*, *B. longirostris*) の入手元および培養条件は、第 1 章に記載した通りである。また、本試験で用いた試験物質 (SDS, SOS, BZK-Br) の入手元およびストック溶液の調製法は第 1 章に記載した通りである。

2-2-2. 群体形成に対する陰イオン界面活性剤（SDS 及び SOS）の影響

第 1 章の藻類生長阻害試験で観察・計数した試料について、最低 100 藻類粒子の単一細胞と 2—8 細胞群体の数を記録した。Yasumoto et al. (2005) に従い、細胞数を群体数で除算した値を群体形成比 ($N=3$) として以下の式より算出した。

$$MCP = \frac{N_C}{N_P}$$

ここで、 MCP は群体形成比 (Mean cells per particle) , N_C は細胞数, N_P は群体数である。

統計解析には R software ver. 4.0.2 [R development Core Team, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org/>)] を使用した。24 時間おきに得られた群体形成比の平均値について、Bartlett's 検定で処理区間の等分散性を確かめた後、等分散が仮定できる場合は Dunnett's 検定、等分散が仮定されない場合は Welch の t 検定により対照区との比較を行った。比較する際、Holm 法に従って有意水準を補正した。Dunnett's 検定には package multcomp (Hothorn et al., 2016) を使用した。

2-2-3. 群体形成に対する陽イオン界面活性剤（BZK-Br）の影響

群体形成の誘導要因として、*D. galeata* 及び *B. longirostris* のカイロモンを用いた。*D. galeata* を 200 inds L⁻¹, *B. longirostris* を 500 inds L⁻¹ の密度で餌を与えずに 1 L の COMBO 培地で 24 時間静置し、メンブレンフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過した。各種ろ液を実験における陽性対照区 (*Daphnia* water, DW 及び *Bosmina* water, BW) として用いた。

第 1 章で得られた結果を参考に、*D. subspicatus* の増殖に影響しない濃度 (< 72-h EC₁₀) として、10, 20 μg L⁻¹ を BZK-Br の曝露濃度とした。BZK-Br のストック溶液を COMBO 培地で 10, 20 mg L⁻¹ に希釈し、これらを各陽性対照区に添加することで処理区を作成した。200 mL 容量の蓋付き（シリコセン, AS ONE, 大阪）三角フラスコを用い、藻類を約 2—5 × 10³ cells mL⁻¹ となるように添加して全量を 100 mL とし、対照区、陽性対照区、およ

び BZK-Br 添加処理区について 3 連で実験を開始した。実験は 72 時間行い, 24 時間おきに 0.3 mL の試料を採取した。プランクトン計数盤 (松浪硝子工業株式会社, 大阪) を用い, 試料中の 100 藻類粒子以上を顕微鏡下で観察して細胞数及び群体数を計数した。実験は, イカダモのストック培養と同様の実験室条件で行った。

24 時間おきに得られた群体形成比の平均値について, Bartlett's 検定で処理区間の等分散性を確かめた後, 等分散が仮定できる場合は Tukey HSD 検定, 等分散が仮定されない場合は Welch の t 検定により全群比較を行った。全群比較では, Holm 法に従って有意水準を補正した。Tukey HSD 検定には package multcomp (Hothorn et al., 2016) を使用した。

2-3. 結果

2-3-1. SDS 及び SOS が群体形成に及ぼす影響

SDS の曝露下におけるイカダモ各種の群体形成比は時間経過及び濃度に伴って変化した。*D. subspicatus* では 24 時間後から 0.01—100 mg L⁻¹ で対照区に対して群体形成比が有意に増加した ($P < 0.05$) が, 72 時間後の時点では 0.1—100 mg L⁻¹ でのみ有意差が検出された (Fig. 2-2a, $P < 0.05$)。 *S. acutus* では 48 時間後において 1—100 mg L⁻¹ で群体形成比が有意に増加しており ($P < 0.05$) , 72 時間後では 1000 mg L⁻¹ においても有意差が検出された (Fig. 2-2b, $P < 0.05$)。 *T. dimorphus* では 48 時間後に 0.1 mg L⁻¹ でのみ群体形成比の有意な増加が検出され ($P < 0.01$) , 72 時間後では 0.1—1000 mg L⁻¹ で有意差が検出された (Fig. 2-2c, $P < 0.05$)。しかし, 高濃度 (100—1000 mg L⁻¹) では群体形成比は対照区より低い値となった (Fig. 2-2c)。イカダモ各種における群体形成比の最大平均値は, *D. subspicatus* で 2.4 (± 0.1) , *S. acutus* で 2.2 (± 0.2) , *T. dimorphus* では 6.2 (± 0.1) であった (Fig. 2-2a, b, c)。

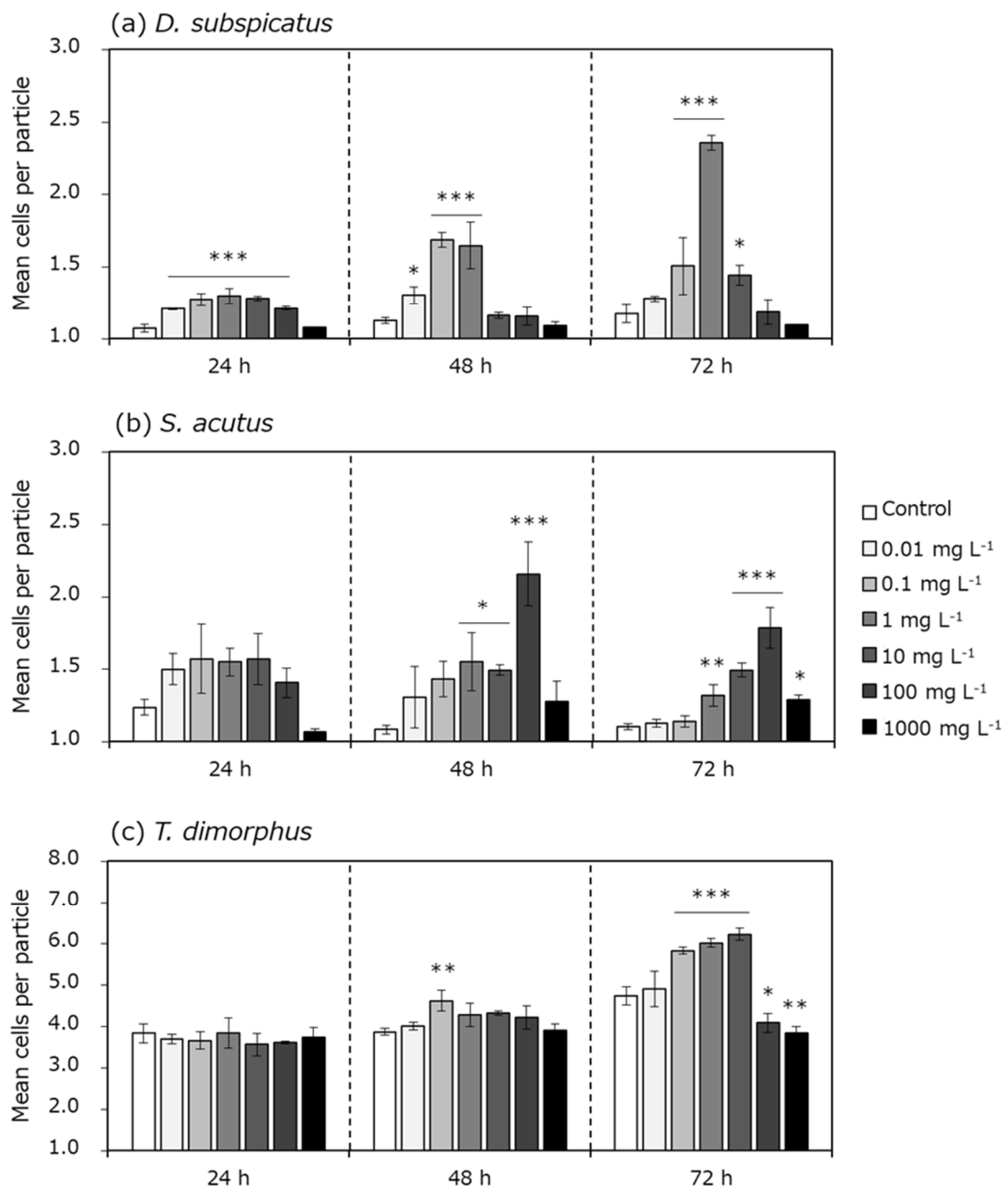


Fig. 2-2. SDS の曝露による *D. subspicatus* (a), *S. acutus* (b), *T. dimorphus* (c) の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. 各濃度区に付したアスタリスクは対照区と各濃度区の間 に統計的有意差があることを意味する(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

SOS の曝露 24 時間後において, *D. subspicatus* の群体形成比は全ての処理区 (0.02—200 mg L⁻¹) で対照区に対して有意に増加し ($P < 0.01$), 48 時間以降においても 0.2 mg

L⁻¹以上で有意差が検出された (Fig. 2-3, $P < 0.05$)。0.2 mg L⁻¹及び2 mg L⁻¹では48時間後に群体形成比が最大になり (2.5 ± 0.5 及び 3.3 ± 0.5) , それ以上の濃度 (20 mg L⁻¹ 及び 200 mg L⁻¹) では72時間後に最大 (3.1 ± 0.7 及び 2.7 ± 0.5) となった (Fig. 2-3)。

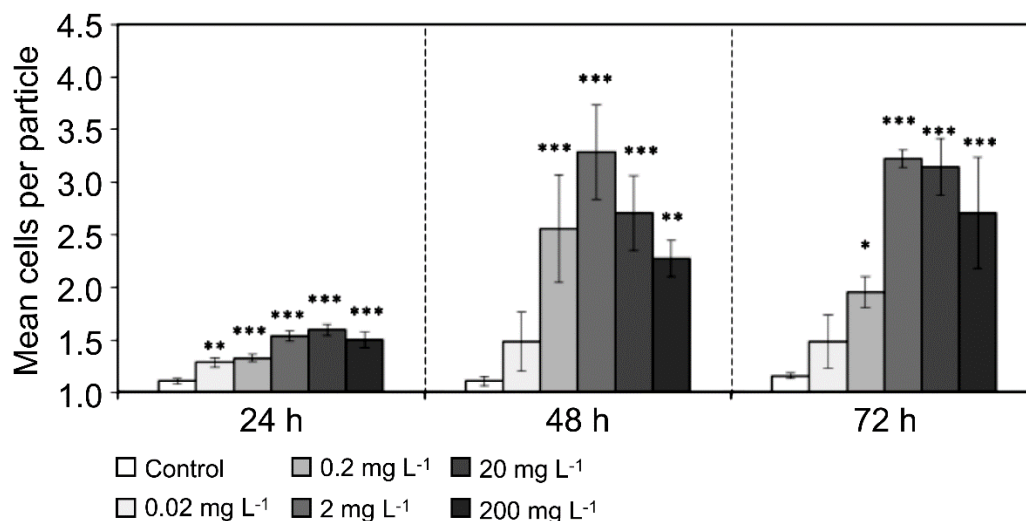


Fig. 2-3. SOS の曝露による *D. subspicatus* の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. 各濃度区に付したアスタリスクは対照区と各濃度区の間統計的有意差があることを意味する (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

2-3-2. BZK-Br が群体形成に及ぼす影響

D. subspicatus の群体形成比は, カイロモンの存在下 (陽性対照区) で対照区より有意に増加し ($P < 0.001$) , 48 時間後に DW で最大 2.5—3.0, BW では最大 1.5—2.0 に達した (Fig. 2-4a, b)。DW 条件において, BZK-Br 曝露区では, 48 時間以降において群体形成比が陽性対照区より低くなっており (Fig. 2-4a, $P < 0.001$) , BZK-Br による群体形成の抑制作用が検出できた。一方, BW 条件では, 48 時間後に 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ の BZK-Br 曝露区において群体形成比が陽性対照区よりも低くなったが (Fig. 2-4b, $P < 0.01$) , 72 時間後では大きく変わらなかった。

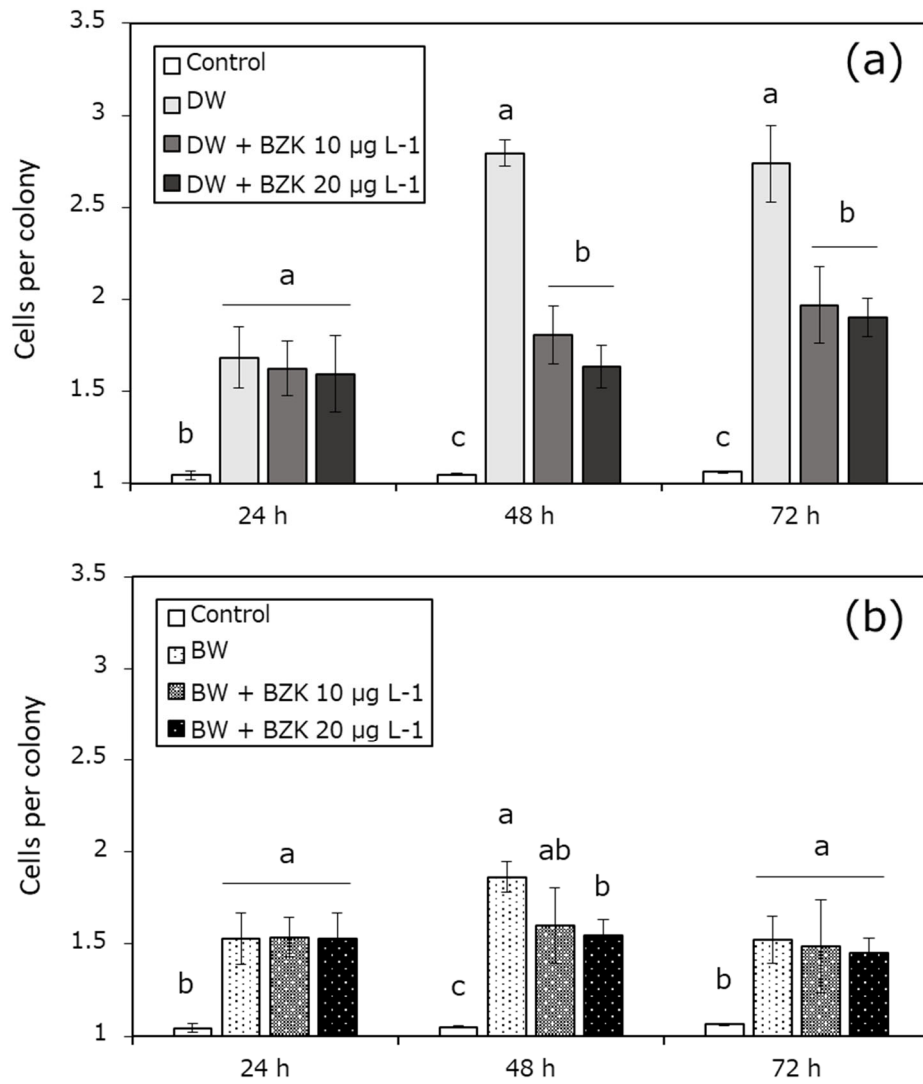


Fig. 2-4. BZK-Br と *D. galeata* カイロモン(a), または *B. longirostris* カイロモン(b)の複合曝露による *D. subspicatus* の群体形成比 (平均±標準偏差) の経時変化. 図中の記号 (a, b, c) が異なる場合, 処理区間に統計的有意差があることを示す ($P < 0.05$).

2-4. 考察

2-4-1. 陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導

陰イオン界面活性剤（SDS 及び SOS）は、全てのイカダモ種において群体形成を促進した（Fig. 2-2）。同様の結果は *D. subspicatus* 及び *S. obliquus* において報告されており（Lürling and Beekman, 2002; Lürling, 2006; Yasumoto et al., 2005）, 陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導はイカダモ科（少なくとも, *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Tetradesmus* 属）で一般的であることを示唆する。

SDS による *D. subspicatus* の群体形成の誘導レベルは、群体形成比が約 1.5—2.5 と報告した以前の研究と一致する（Yasumoto et al., 2005）。これは *S. obliquus* に対して報告された SDS の活性（群体形成比 2.0—2.5）とも一致する（Zhu et al., 2020）。一方、この群体形成比は、*Daphnia* の培養水で観察されたものよりも低かった（最大 2.8 ± 0.1 , Fig. 2-4a）。*S. acutus* 及び *T. dimorphus* についても、ミジンコ培養水中で観察された群体形成比（*S. acutus* は最大 3.0, *T. dimorphus* は最大 7.0）に対し（Lürling and Van Donk, 1996; Ha et al., 2004）, SDS 曝露下では群体形成比が低い傾向にあった（*S. acutus* では最大 2.1, *T. dimorphus* では最大 6.2, Fig. 2-2b, c）。これらの結果は、イカダモ科の群体形成に対する SDS の活性がミジンコ類のカイロモンより低いことを意味している。一方、*D. subspicatus* に対する SOS の活性は *Daphnia* 培養水よりも高く（Fig. 2-3, Fig. 2-4a）, 他の報告例でも SOS は *Daphnia* 属のカイロモンと同等の活性を示していた（Yasumoto et al., 2005; Yokota and Sterner, 2011）。群体形成に対する陰イオン界面活性剤の活性を決定する要因については、二重結合の数やメチル基末端の有無、アルキル鎖長など、部分的な化学構造の違いが重要である可能性が示されている（Yasumoto et al., 2005）。

SDS 及び SOS による群体形成比の増加は、高濃度（特に 72-h EC_{50} 以上, 第 1 章参照）では観察されない傾向が見られた（Fig. 2-2, Fig. 2-3）。濃度に依存する限定的な群体形

成の誘導は、他の陰イオン界面活性剤でも報告されている（FFD-6, Lürling 2006; Lürling et al. 2011）。イカダモの群体は、指数関数的な細胞増殖期における自己胞子形成の無性生殖プロセス（娘細胞の産生）で形成される（Lürling, 2003）。したがって、群体形成に及ぼす陰イオン界面活性剤の干渉作用は、増殖阻害の結果である可能性がある。

2-4-2. 陽イオン界面活性剤による群体形成の抑制

D. galeata 及び *B. longirostris* 由来のカイロモンはイカダモの群体形成を誘導することが既に報告されているが（Lürling, 2003）, カイロモンの抽出条件（密度や培養時間, 餌の有無など）や, 実験に用いられるイカダモの種や遺伝子型によっても群体形成の応答は異なる。*Bosmina* 属は *Daphnia* 属より個体当たりのバイオマスが低いため（Watokins et al., 2011）, 本研究では *B. longirostris* のカイロモン抽出時の密度を *D. galeata* の 2.5 倍（500 inds L⁻¹）としたが, それにも関わらず *B. longirostris* カイロモンと比べて *D. galeata* カイロモンは *D. subspicatus* の群体形成を強く誘導する傾向が見られた（Fig. 2-4a, b）。両種のカイロモンが同一物質であるかどうかは未解明であるが, 本結果は *B. longirostris* より *D. galeata* の個体当たりのカイロモン放出量が多いことを示唆しており, カイロモンの存在量の差が群体形成比の違いを決定した可能性がある。

D. galeata カイロモンと BZK-Br の複合曝露では, BZK-Br の曝露濃度に関係なく, 48 時間後から群体形成比が陽性対照区より低くなっており（Fig. 2-4a）, BZK-Br による群体形成の抑制作用が確認できた。Zhu et al.（2020）は, *D. magna* から抽出したカイロモンの曝露下で観察されるイカダモ *S. obliquus* の群体形成が 10 µg L⁻¹ の BZK-Br 曝露下でも抑制されたことを報告しており, カイロモンを放出する種やイカダモ種に関わらず抑制作用は共通することを支持する。*Daphnia* 属由来のカイロモンについては脂肪族硫酸塩のグループであることが既に同定されており（Yasumoto et al., 2005）, 水中では陰イオ

ンとして存在している。そのため、カイロモンは陽イオン界面活性剤である BZK-Br とイオン結合することにより、イカダモに対する生物利用能が低下し、群体形成は抑制されると考えられている (Zhu et al., 2020)。BZK-Br との複合曝露下では、カイロモンの種類に関わらず、群体形成比は対照区より高い値を示していた (Fig. 2-4a, b)。また、*B. longirostris* カイロモンの曝露下では、陽性対照区で最も群体形成比が高くなった 48 時間後において、 $20 \mu\text{g L}^{-1}$ の BZK-Br との複合曝露でのみ群体形成の抑制が観察された (Fig. 2-4b)。これらの結果は、群体形成比の低下は、カイロモンの存在量や BZK-Br の曝露量に依存することを示しており、BZK-Br とのイオン結合によるカイロモンの生物利用能の低下が群体形成の抑制要因であることを支持する。したがって、水中に存在するカイロモンと BZK-Br の物質量の差が、群体形成の抑制の程度を決定すると考えられる。

2-4-3. 藻類の生長と群体形成に対する界面活性剤の影響の比較

Table 2-1 において、本研究で得られたイカダモ類各種の群体形成を攪乱する界面活性剤各種の最低影響濃度 (LOEC) と、第 1 章において得られた増殖を指標とした 72-h EC_{10} をまとめた。*S. acutus* のみ 72-h EC_{10} における信頼区間の下限値が負の値を示したため正確ではないが、SDS 及び SOS では 72-h EC_{10} が LOEC の約 10—100 倍以上、BZK-Br では 72-h EC_{10} が LOEC の 2 倍以上であった (Table 2-1)。72-h EC_{10} は無影響濃度 (NOEC) に対して高い相関を持ち、水温や pH, 硬度などの水質条件の違いに対して変化しにくい (Beasley et al., 2015) ため、NOEC の代替値として用いられている。そのため、界面活性剤による群体形成の攪乱は、藻類の生長阻害よりも低い濃度で起きうることが実証された。他の界面活性剤やイカダモ種を扱った研究例においても、界面活性剤による群体形成の攪乱は藻類の生長阻害が検出される曝露濃度未満 (NOEC 未満) で観察されることが報告されている (e.g., Lürling, 2006; Zhu et al., 2020)。化学物質の有害

性評価において、藻類では生長阻害試験で得られた LOEC や 72-h EC₅₀ が用いられるため (OECD, 2006) , 標準化された試験では群体形成の攪乱をほとんど検出できないことを示唆する。

Table 2-1 イカダモ類の生長に対する界面活性剤の 72-h EC₁₀ と群体形成比に対する最低影響濃度 (LOEC) の比較.

Surfactants	Species	Growth	Colony formation ratio
		72-h EC ₁₀ [95% C.I.]	LOEC
SDS	<i>D. subspicatus</i>	8.75 [4.68—12.8] mg L ⁻¹	0.01 mg L ⁻¹
	<i>S. acutus</i>	6.01 [-1.19—13.2] mg L ⁻¹	1.00 mg L ⁻¹
	<i>T. dimorphus</i>	12.5 [1.42—23.7] mg L ⁻¹	0.10 mg L ⁻¹
SOS	<i>D. subspicatus</i>	1.16 [0.268—2.06] mg L ⁻¹	0.02 mg L ⁻¹
BZK-Br	<i>D. subspicatus</i>	34.8 [24.2—45.4] µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹

2-4-4. 実環境中における界面活性剤の潜在的な影響リスク

SDS は、水環境中で一般に 0.5 mg L⁻¹ 未満で存在する (Bondi et al., 2015; Jackson et al., 2016)。一方、環境水から BZK-Br 及び SOS を直接定性・定量した報告例は無い。ただし、BZK-Br は殺生物剤などで頻繁に用いられる QAC のグループに属し、SOS も使用頻度の高い SDS などの線形アルコール硫酸塩と同様の用途 (家庭用洗剤および工業用洗剤) で用いられることを考慮すると、それぞれ類似化合物と共に一定量が水環境中に排出されている可能性がある。

環境水中での QAC の検出例はほとんどが BZK-Cl を対象にしたものであり、生活排水により汚染された台湾の河川水中では総濃度で最大 65 µg L⁻¹ が検出された例 (González et al., 2010) もある。BZK-Br の 72-h EC₁₀ は、藻類では 34.8—69.7 µg L⁻¹ (Table 1-3) , ミジンコ類では 22.7—36.5 µg L⁻¹ であり (Table 1-7) , 必ずしも影響がないとは限らない。ただし、QAC は底質や水中の有機物質 (フミン酸など) に強く吸着するため、環境中で

は生物利用能も低くなる可能性が高いことにも留意すべきである (Chen et al., 2014)。一方, 陰イオン界面活性剤の総濃度は, 環境水中で 0.5 mg L^{-1} を超えることはほとんどなく (Ivanković and Hrenović, 2010; Jackson et al., 2016), 使用量の多い SDS や LAS と比べても SOS の毒性は 10 分の 1 以下であることから, 水生生物に直接影響を及ぼすリスクは低いと考えられる。

ここで試験した SDS, SOS, BZK-Br が水生生物に直接影響 (生長や生存への影響) を与える可能性は低いと考えられるが, 群体形成の攪乱を介した間接的な影響は環境水中の濃度でも起こることが懸念される。SDS や SOS は $0.01\text{--}0.1 \text{ mg L}^{-1}$ で群体形成を誘導することが示され (Table 2-1), これは環境中濃度でも陰イオン界面活性剤として検出されうる濃度である (Jackson et al., 2016)。BZK-Br による群体形成の抑制は, 群体形成の誘導要因であるミジンコ由来のカイロモンと benzalkonium⁺ がイオン結合し, イカダモに対するカイロモンの生物利用能が低下することに起因する可能性が高い (Zhu et al., 2020)。これを考慮すると, BZK-Cl 等の類似物質も同様の抑制作用を示すと考えられ, この場合は benzalkonium⁺ の総濃度が影響の有無を決定する。一方, Yasumoto et al. (2005) は市販の冷凍ミジンコ (*D. pulex*) 10 kg からカイロモンと考えられる陰イオン界面活性剤を抽出し, その総濃度が約 $8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ であったことを報告している。湖沼では *Daphnia* 属ミジンコのバイオマスが $0.5 \text{ mg dry weight L}^{-1}$ を超えることはほとんどないため (Isermann et al., 2004; Prater et al., 2018), 環境中でカイロモンは数 pg L^{-1} から数 ng L^{-1} 程度で存在すると考えられる。BZK-Cl については数 $\text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ で検出されるケースが多いため (González et al., 2010), カイロモンより $10^3\text{--}10^6$ 倍ほど高い濃度で存在すると考えられ, 生物利用可能なカイロモン濃度が低下する可能性は高い。従って, SDS や SOS, BZK-Br 及びその類似物質は水生生物に直接影響を及ぼす濃度以下または環境中濃度で群体形成を攪乱する可能性があるとし唆される。

2-5. 参考文献

- Beasley A, Belanger SE, Brill JL, Otter RR (2015) Evaluation and comparison of the relationship between NOEC and EC10 or EC20 values in chronic *Daphnia* toxicity testing. *Environmental Toxicology*, 34(10), 2378–2384.
- Bondi CA, Marks JL, Wroblewski LB, Raatikainen HS, Lenox SR, Gebhardt KE (2015) Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): evidence for safe use in household cleaning products. *Environ Health Insights* 9:EHI-31765
- Chen Y, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JL, Droge ST (2014) Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: How test design affects bioavailability and effect concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(3), 606–615.
- González MM, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2010) Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. *Science of the Total Environment*, 408(3), 563–570.
- Ha K, Jang MH, Takamura N (2004) Colony formation in planktonic algae induced by zooplankton culture media filtrate. *Journal of Freshwater Ecology* 19(1):9–16
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P, Heiberger RM, Schuetzenmeister A, Scheibe S, Hothorn MT (2016). Package ‘multcomp’. Simultaneous inference in general parametric models. Project for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Isermann DA, Chipps SR, Brown ML (2004) Seasonal *Daphnia* biomass in winterkill and nonwinterkill glacial lakes of South Dakota. *North American Journal of Fisheries Management*, 24(1), 287–292.
- Ivanković T, Hrenović J (2010) Surfactants in the environment. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(1), 95–109.
- Jackson M, Eadsforth C, Schowanek D, Delfosse T, Riddle A, Budgen N (2016) Comprehensive review of several surfactants in marine environments: fate and ecotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(5), 1077–1086.
- Lürling M, Beekman W (2002). Extractable substances (anionic surfactants) from membrane filters induce morphological changes in the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(6), 1213-1218.
- Lürling M. (2003) Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 39:85–101.
- Lürling M (2006) Effects of a surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* morphology and growth under different nutrient conditions. *Chemosphere* 62:1351–1358.
- Lürling M, Van Donk E (1996) Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. *Oecologia* 108(3):432–437
- Lürling M, De Lange HJ, Peeters ETHM (2011). Effects of an anionic surfactant (FFD-6) on the energy and information flow between a primary producer (*Scenedesmus obliquus*) and a consumer (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology*, 20(8), 1881-1889.
- Pan Y, Dong J, Wan L, Sun S, MacIsaac HJ, Drouillard KG, Chang X. (2020) Norfloxacin pollution alters species composition and stability of plankton communities. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121625.
- Prater C, Wagner ND, Frost PC (2018) Seasonal effects of food quality and temperature on body stoichiometry, biochemistry, and biomass production in *Daphnia* populations. *Limnology and Oceanography*, 63(4), 1727–1740.
- Van Donk E. (2007) Chemical information transfer in freshwater plankton. *Ecological Informatics*, 2(2), 112-120.
- Verschoor AM, Vos M, Van Der Stap I. (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters*, 7, 1143-1148.

- Watkins J, Rudstam L, Holeck K. (2011) Length-weight regressions for zooplankton biomass calculations—A review and a suggestion for standard equations. Cornell Biological Field Station Publications and Reports.
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46(28), 4765–4767.
- Yokota K, Sterner RW (2011) Trade-offs limiting the evolution of coloniality: ecological displacement rates used to measure small costs. *Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences* 278(1704):458–463
- Zhu X, Sun Y, Zhang L, Wang J, Gu L, Huang Y, Yang Z. (2021) Multi-omics reveal the pathways involved in induced defensive colony formation of *Tetradesmus obliquus* in response to *Daphnia* grazing cues. *Limnology and Oceanography*, 66(5), 1819-1831.
- Zhu X, Wang J, Chen Q, Chen G, Huang Y, Yang Z. (2016) Costs and trade-offs of grazer-induced defenses in *Scenedesmus* under deficient resource. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.

PART II.

陰イオン界面活性剤に誘導された群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響

第 3 章 SDS に誘導されたイカダモ 3 種の群体形成が *Daphnia* の摂食率に及ぼす影響

第 4 章 SOS に誘導されたイカダモの群体形成による *Daphnia* と *Bosmina* の摂食阻害

第3章

SDS に誘導されたイカダモ 3 種の群体形成が *Daphnia* の摂食率に及ぼす影響

Part of data from

Oda Y, Sakamoto M, Miyabara Y. (2022) Colony formation in three species of the family Scenedesmaceae (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus acutus*, *Tetradesmus dimorphus*) exposed to sodium dodecyl sulfate and its interference with grazing of *Daphnia galeata*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 82, 37–47.

3-1. はじめに

ドデシル硫酸塩 (sodium dodecyl sulfate, SDS) は、洗浄剤や農薬補助剤、医薬品、化粧品等のさまざまな用途で使用される一般的な陰イオン界面活性剤である。SDS は、下水や廃水の直接排出または土壌浸出によって水系に流入する (Rebello, 2014)。水生生物に対する SDS の毒性は、1990 年代から調査されている。例えば、魚、無脊椎動物 (主にミジンコ類)、藻類に対する SDS の 50% 影響濃度 (EC₅₀) または 50% 致死濃度 (LC₅₀) は、それぞれ 7.3—48 mg L⁻¹ (e.g., Arezon et al., 2003; Hemmer et al., 2010; Reátegui-Zirena et al., 2013), 7.4—48 mg L⁻¹ (e.g., Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez, 1994; Bulus et al., 1996; Shedd et al., 1999), 及び 4.8—36.6 mg L⁻¹ (Liwarska-Bizukojc et al., 2005; Mariani et al., 2006) である。SDS は 1 mg L⁻¹ を超える濃度で水生生物に影響を与えるが、生分解性が高いため、環境水中では一般に 0.5 mg L⁻¹ 未満で存在する (Bondini et al., 2015; Jackson et al., 2016)。

水生生物に対する影響のリスクが低いにも関わらず、SDS は生物間の相互作用を攪乱することで水圏生態系へ影響を及ぼしうることが危惧されている (Lürling and Beekman 2002; Yasumoto et al., 2005; Zhu et al., 2020)。沖帯の淡水システムでは、緑藻イカダモ

(Scenedesmaceae) とその消費者であるミジンコの関係は、化学的に誘導された防御の重要性を説明するためのモデルとしてよく使用される (Van Donk, 2007)。例えば, *Desmodesmus* 属と *Scenedesmus* 属は, ミジンコ類から放出される情報化学物質 (カイロモン) に応答して多形態 (単一細胞から多細胞群体への変化) を示し, 群体を形成したイカダモの被食リスクは低くなる (Lürling, 2003)。Yasumoto らによる一連の研究 (2005, 2006, 2008a, 2008b) において, *Daphnia* 属ミジンコのカイロモンは陰イオン界面活性剤と構造的に類似する脂肪族硫酸塩の化合物グループとして識別された (Lürling, 2012)。重要なことに, 一部の陰イオン界面活性剤 (SDS やモノ-ジドデシルジスルファン化ジフェニルオキシド (FFD-6) 等) は, 非常に低濃度 (0.01 mg L^{-1} , Yasumoto et al 2005; Lürling et al., 2011) でも群体形成を誘導する。消費者の不在下における群体形成の誘導は, イカダモに不必要なコストを課す可能性がある (光が届きにくい低層水への沈下速度の向上など, Lürling and Van Donk, 2000)。カイロモンが存在する場合でも, SDS は群体形成の発現レベルを高め, 発現を延長させた (Zhu et al. 2020)。SDS に誘導されたイカダモの群体形成は, 消費者の摂食率を低下させ, 湖の食物連鎖における一次生産者から消費者へのエネルギーの流れを減少させる可能性がある (Lürling et al., 2011)。

一方で, SDS による群体形成の誘導が消費者の摂食率に及ぼす影響について調べた研究はない。Lürling et al. (2011) は, FFD-6 に誘導されたイカダモ *Scenedesmus obliquus* の群体形成が, オオミジンコ *Daphnia magna* の濾過率を低下させたことを報告している。しかし, この研究では, 群体形成を顕著に誘導した条件で実験が行われたため, どの程度の群体形成が誘導されるとミジンコの摂食に影響を及ぼすかは議論されていない。また, 陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導と消費者の摂食率の関係について調べた研究は他にないため, イカダモや消費者の種による影響の違いは明らかにされていない。第 2 章では, SDS が複数種のイカダモの群体形成を, 異なる発現レベルで誘導すること

を示した。本章では、これらイカダモ種の群体形成が異なる齢の消費者（カプトミジンコ *Daphnia galeata*）の摂食率に及ぼす影響を評価することを目的として実験を行った。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 生物及び試験物質

本実験で用いたイカダモ類 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) およびミジンコ類 (*D. galeata*, *B. longirostris*) の入手元および培養条件は、第 1 章に記載した通りである。また、本実験で用いた試験物質 (SDS) の入手元およびストック溶液の調整法は第 1 章に記載した通りである。

3-2-2. 摂食実験

摂食実験は、*D. galeata* の摂食率に対する SDS に誘導されたイカダモ 3 種の群体形成の影響を評価するために実施した。単一細胞及び群体のイカダモは、それぞれ第 1 章の藻類増殖阻害試験における SDS の非曝露下（対照区）及び曝露下（処理区, 1 mg L^{-1} ）で 72 時間培養したものを COMBO 培地で希釈し、約 $1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ にしたものを用いた。各種の対照区および処理区における群体形成比（細胞数/群体数）と単一細胞及び 2, 3, 4, 6, 8 細胞群体の割合を決定した。この際、単一細胞と群体の表面積 (μm^2) を Image J ver. 1.51 K（米国国立衛生研究所）を用いて測定した（Table 3-1）。

Table 3-1 イカダモ類の単一細胞及び群体 (2-8 細胞) の表面積 (μm^2 , 平均 \pm 標準偏差, N = 5).

	<i>D. subspicatus</i>	<i>S. acutus</i>	<i>T. dimorphus</i>
Unicell	42.6 \pm 8.0	93.5 \pm 7.0	322.5 \pm 76.5
2-celled	96.7 \pm 13.0	184.2 \pm 19.0	638.6 \pm 182.9
3-celled	162.8 \pm 19.0	274.2 \pm 19.4	1064.9 \pm 189.2
4-celled	223.1 \pm 27.3	399.6 \pm 21.9	1673.2 \pm 361.9
6-celled	386.7 \pm 51.9		2424.2 \pm 295.6
8-celled	590.6 \pm 79.4		3825.8 \pm 718.5

摂食実験は、イカダモの種 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) , イカダモの形態 (単一細胞または群体) , 及び *D. galeata* の齢 (幼若齢または成熟齢) の 3 つの要素を含む入れ子型デザインとして設定された。3 日齢 (幼若齢; 平均体長 1.0 mm, N = 10) 及び 7 日齢 (成熟齢; 平均体長 1.4 mm, N = 10) の *D. galeata* をストック培養から集めた。各個体を COMBO 培地ですすぎ、5 mL の単一細胞または群体のイカダモを含む 15 mL のプラスチック遠沈管に移した。*D. galeata* を含まない対照区も各処理区に対して用意した。全ての遠沈管 (N = 3) をインキュベーター内 (暗条件, 22 °C) で 2 時間静置し、遠沈管は 30 分毎に手動で緩やかに振盪した。実験開始時と 2 時間後に全ての遠沈管内における藻類細胞の密度 (cells mL^{-1}) を測定した。

上記の実験で得られた細胞密度をもとに、*D. galeata* の摂食率として Clearance rate (CR, mL h^{-1}) を Lürling et al. (2011) の式に従って算出した。

$$\text{CR} = (a + b) \times V$$

$$a = \frac{\ln(A_0) - \ln(A_T)}{\Delta t}$$

$$b = \frac{\ln(A_{C,t}) - \ln(A_0)}{\Delta t}$$

ここで、 A_0 は実験開始時の細胞密度、 A_T は処理区における実験終了時の細胞密度、 $A_{C,t}$ は

対照区における実験終了時の細胞密度, Δt は実験時間 (2 時間), V は培養水量 (5 mL) である。

処理区間の CR は, Bartlett's 検定で処理区間の等分散性を確かめた後, 等分散が仮定できる場合は一元配置分散分析, 等分散が仮定されない場合は Kruskal-Wallis 検定により比較を行った。解析には, 統計ソフト R ver. 4. 1. 3 を使用した。

3-3. 結果

SDS により群体を形成した *D. subspicatus* 及び *T. dimorphus* を摂食した処理区における幼若齢の *D. galeata* は, それらの対照区における *Daphnia* よりも有意に低い CR を示した (Fig. 3-1a, c)。処理区における CR の低下は, *D. subspicatus* を摂食した成熟齢の *Daphnia* でも観察された (Fig. 3-1a)。一方, *S. acutus* を餌として与えた *Daphnia* では, 齢に関係なく, 対照区と処理区の CR に差は検出されなかった (Fig. 3-1b)。処理区における *D. subspicatus* 及び *T. dimorphus* の群体形成比は, 対照区よりも有意に高かった (Fig. 3-2a, c)。しかし, *S. acutus* の群体形成比は対照区と処理区で同等であった (Fig. 3-2b)。*D. subspicatus* の処理区における群体形成比の増加は, 主に単一細胞の割合の減少 (12.6 %) と 4 細胞群体の割合の増加 (7.7 %) に起因していた (Fig. 3-2d)。*T. dimorphus* では, 単一細胞の減少 (9.3 %) と 4 細胞及び 8 細胞群体の増加 (17.8 %) が, 処理区における群体形成比の増加に関係していた (Fig. 3-2f)。

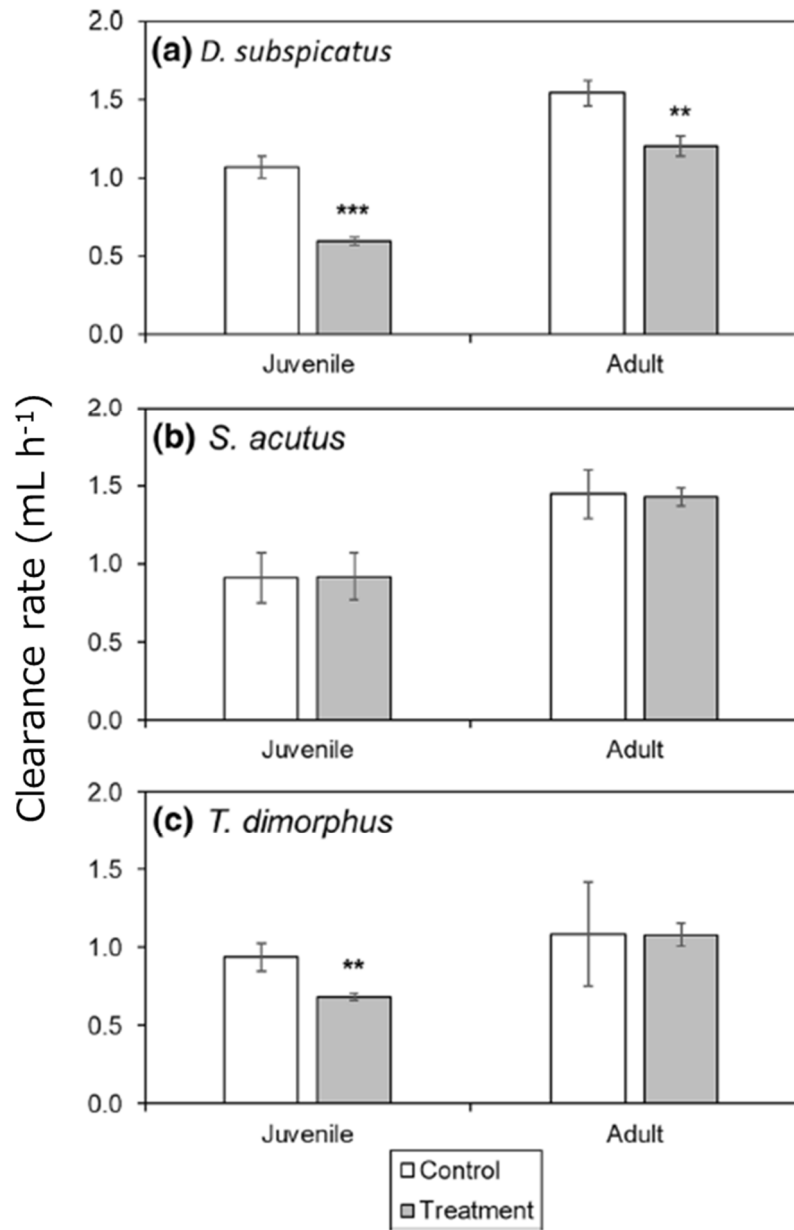


Fig. 3-1. SDS 非曝露 (対照区) または曝露後 (処理区) の *D. subspicatus* (a), *S. acutus* (b), *T. dimorphus* (c) を給餌した幼若齢および成熟齢の *D. galeata* の摂食率 (mL h⁻¹, 平均±標準偏差, N=3) の比較. 図中に付したアスタリスクは対照区と処理区間に統計的有意差があることを示す(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

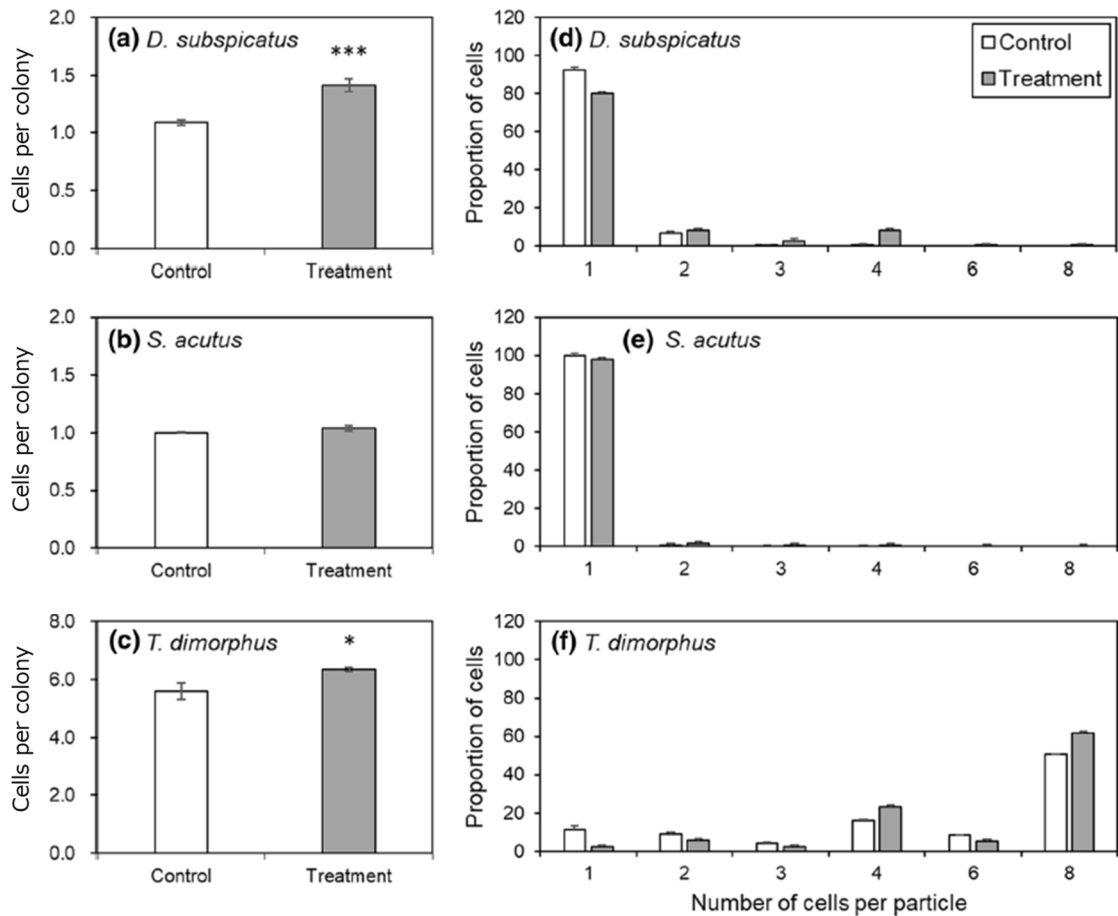


Fig. 3-2. 摂食実験の開始時における対照区と処理区 (SDS 曝露区) におけるイカダモ類の群体形成比 (平均±標準偏差, N = 3, a-c), およびそれらにおける単一細胞と群体 (2, 3, 4, 6, 8 細胞) の割合 (平均±標準偏差, N = 3, d-f) の比較. *D. subspicatus* (a, d), *S. acutus* (b, e), *T. dimorphus* (c, f). 図中に付したアスタリスクは対照区と処理区間に統計的有意差があることを示す(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3-4. 考察

SDS は、イカダモの群体形成に対する活性が低いにも関わらず (第 2 章), 本実験の結果は *D. subspicatus* や *T. dimorphus* において観察された群体形成が *D. galeata* の摂食率を低下させたことを示した (Fig. 3-1a, c)。SDS は *D. galeata* に毒性影響を及ぼした可能性も考えられるが、実験の開始時 (藻類増殖阻害試験の終了時) に測定された処理区の SDS 濃度 (1.0×10^{-2} — 2.0×10^{-2} mg L⁻¹) は、*D. galeata* に対する 48-h LC₅₀ をはるかに下回っていた (第 1 章)。Lüring et al. (2011) は、陰イオン界面活性剤 FFD-6 が *D. magna* の

48-h LC₅₀ より 5 倍ほど低い用量で *D. magna* の CR を低下させたことを報告した。界面活性剤は、藻類粒子の表面電荷を中性から負電荷へと変化させ、消費者と藻類が接触する際の濡れ性を高めることにより、ミジンコ類のろ過率に間接的な影響を与える可能性がある (Gerritsen and Porter, 1982)。藻類増殖阻害試験では、低濃度の SDS (10^{-2} — 10^1 mg L⁻¹) は曝露後 72 時間で劇的に減少したため (第 1 章)、一定量の SDS が藻類に吸着していた可能性がある。しかし、*S. acutus* を給餌させた *D. galeata* の CR は対照区と処理区で同一であり (Fig. 3-1b)、摂食実験では SDS による *Daphnia* への毒性や物理化学的な影響は小さかったと考えられる。

群体を形成したイカダモが、植食性動物プランクトンに対して摂食抵抗性を高めるという古典的な仮説 (Hessen and Van Donk, 1993) と一致して、*D. galeata* で観察された CR の減少は、処理区における餌藻類の粒子サイズの増加に起因すると考えられる (Fig. 3-1a, c)。処理区での *D. subspicatus* は、4 細胞群体の割合が高く (Fig. 2d)、4 細胞群体の表面積は単一細胞の約 5 倍であった (Table 3-1)。同様に、*T. dimorphus* における大きなサイズ粒子 (群体) の割合は、処理区で増加していた (Fig. 3-4f)。4 細胞 ($1,673.2 \pm 361.9 \mu\text{m}^2$) 及び 8 細胞 ($3,825.8 \pm 718.5 \mu\text{m}^2$) の群体の表面積は、単一細胞 ($322.5 \pm 76.5 \mu\text{m}^2$) とは大きく異なっていた (Table 3-1)。藻類の個体群全体に対する大きなサイズ粒子の増加は、特に小さい *Daphnia* 個体の摂食率を低下させる可能性がある。例えば、1.2 mm 未満の *Daphnia* は、平均粒子体積が 150 — $300 \mu\text{m}^3$ の群体 (*S. obliquus*) を摂食した場合に、CR が低下した (Lürding, 2003)。群体形成比は平均粒子体積と強く相関するため (Lürding, 2006)、群体形成比が 1.5—3.0 のイカダモは体サイズの小さい消費者に影響を与える可能性がある。本研究で用いた幼若齢の *D. galeata* (体長 1.0 mm) は、群体藻類の影響を受けやすいサイズと考えられる。対照的に、体長の大きな大型の *Daphnia* (約 1.6—2.5 mm) は、群体のイカダモを餌にしても CR が低下しない (Lürding,

2003)。本研究では、群体の *D. subspicatus* を給餌した成熟齢の *D. galeata* でも CR の減少が検出されたが (Fig. 3-1a) , それらの体長 (1.4 mm) は大型の *Daphnia* を下回っていたためと考えられる。

D. subspicatus と *T. dimorphus* の間では、群体形成による *D. galeata* の摂食率への影響が、*Daphnia* の齢によって異なっていた (Fig. 3-1a, c)。これらのイカダモ種は、そもそも細胞サイズに大きな違いがあり (Table 3-1) , 粒子サイズの水準が小さいにも関わらず *D. subspicatus* が成熟齢の摂食率にも影響を及ぼした。*Daphnia* は、一般に粒子サイズの小さな餌に対して高い摂食効率を示す (e.g., Porter et al., 1983)。 *T. dimorphus* は、他のイカダモ種と比べ、対照区でも全体に対する単一細胞の割合が低く (Fig. 3-2f) , もともと *D. galeata* にとって摂食しにくい種であった可能性が高い。また、体サイズの小さな幼若齢と比べ、大きな成熟齢の *D. galeata* は、サイズの大きな藻類粒子をろ過していたと考えられる。*Daphnia* は、ろ過スクリーンで収集した粒子を食物溝に集めて口へ運ぶが、その際に口へ入らなかった粒子などを尾部の棘で掻き出す拒絶行動を示すことが知られている (Gophen and Geller, 1984)。 *T. dimorphus* に対する成熟齢の CR が対照区で大きくバラついていたことを考慮すると、摂食率の低下は相対的に存在量が少ない単一細胞を摂食できていたかどうか依存するかもしれない。

第 2 章までの内容を含め、本研究で得られた結果を整理すると、SDS による群体形成の誘導はイカダモの種によっても発現レベルが異なり、*S. acutus* と比較して SDS の曝露による群体形成比の変化が大きい *D. subspicatus* や *T. dimorphus* は、これらを餌とする *D. galeata* の摂食率は低下させることが明らかになった。*S. acutus* とその他の種で影響の有無が異なった要因は、群体形成の発現レベルというよりも、誘導の有無 (対照区と処理区の群体形成比に差が見られたかどうか) によるものと考えられた。また、群体形成の影響は、イカダモ種間で異なる粒子サイズの違いや、*D. galeata* の齢 (体長) によって

も異なることが示唆された。陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導影響を評価する上で、イカダモ種の違いやミジンコのサイズ等の条件によっても結果が変わる可能性があると考えられる。

3-5. 参考文献

- Arenzon A, Pinto RF, Colombo P, Raya-Rodriguez MT. (2003) Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22, 2188-2190.
- Bondi CA, Marks JL, Wroblewski LB, Raatikainen HS, Lenox SR, Gebhardt KE. (2015) Human and environmental toxicity of sodium lauryl sulfate (SLS): evidence for safe use in household cleaning products. *Environmental Health Insights*, 9, EHI-S31765.
- Bulus Rossini GD, Ronco AE. (1996) Acute toxicity bioassay using *Daphnia obtusa* as a test organism. *Environmental toxicology and water quality: An International Journal*, 11, 255-258.
- Gerritsen J, Porter KG. (1982) The role of surface chemistry in filter feeding by zooplankton. *Science* 216, 1225-1227.
- Gophen M, Geller W. (1984) Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*. *Oecologia*, 64, 408-412.
- Hemmer MJ, Barron MG, Greene RM. (2010) Comparative toxicity of Louisiana sweet crude oil (LSC) and chemically dispersed LSC to two Gulf of Mexico aquatic test species. *USEPA Dispersed Oil Toxicity Testing*.
- Jackson M, Eadsforth C, Schowanek D, Delfosse T, Riddle A, Budgen N. (2016) Comprehensive review of several surfactants in marine environments: fate and ecotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 1077-1086.
- Liowska-Bizukojc E, Miksch K, Malachowska-Jutysz A, Kalka J. (2005) Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere*, 58, 1249-1253.
- Lürling M. (2003) Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, EDP Sciences, 39, 85-101.
- Lürling M. (2012) Info-disruption: pollutants interfering with the natural chemical information conveyance in aquatic systems. Brönmark C, Hansson LA (Eds.), *Chemical Ecology in Aquatic Systems*, Oxford University Press, New York, 250-271.
- Lürling M, Beekman W. (2002) Extractable substances (anionic surfactants) from membrane filters induce morphological changes in the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21, 1213-1218.
- Lürling M. (2006) Effects of a surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* morphology and growth under different nutrient conditions. *Chemosphere*, 62, 1351-1358.
- Lürling M, De Lange HJ, Peeters E. (2011) Effects of an anionic surfactant (FFD-6) on the energy and information flow between a primary producer (*Scenedesmus obliquus*) and a consumer (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology*, 20, 1881-1889.
- Lürling M, Van Donk E. (2000) Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus*: are there costs to being colonial? *Oikos*, 88, 111-118.
- Mariani L, De Pascale D, Faraponova O, Tornambè A, Sarni A, Giuliani S, Ruggiero G, Onorati F, Magaletti E. (2006) The use of a test battery in marine ecotoxicology: the acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. *Environmental Toxicology*, 21, 373-379.
- Martínez-Jerónimo F, García-González R. (1994) Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 3, 247-253.
- Porter KG, Feig YS, Vetter EF. (1983) Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, and *Bosmina* fed natural bacteria. *Oecologia*, 58, 156-163.
- Reátegui-Zirena EG, Whatley A, Chu-Koo F, Stewart PM. (2013) Acute toxicity testing of crude oil using *Piaractus brachypomus*, and *Pimephales promelas*. *International Journal of Environmental Protection*, 3, 1.
- Rebello S, Asok AK, Mundayoor S, Jisha MS (2014) Surfactants: toxicity, remediation and green

- surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 275–287.
- Shedd TR, Widder MW, Toussaint MW, Sunkel MC, Hull E. (1999) Evaluation of the annual killifish *Nothobranchius guentheri* as a tool for rapid acute toxicity screening. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18, 2258-2261.
- Van Donk E. (2007) Chemical information transfer in freshwater plankton. *Ecological Informatics*, 2, 112-120.
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46, 4765-4767.
- Yasumoto K, Nishigami A, Kasai F, Kusumi T, Ooi T. (2006) Isolation and absolute configuration determination of aliphatic sulfates as the *Daphnia* kairomones inducing morphological defense of a phytoplankton. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 271–274.
- Yasumoto K, Nishigami A, Aoi H, Tsuchihashi C, Kasai F, Kusumi T, Ooi T. (2008a) Isolation and absolute configuration determination of aliphatic sulfates as the *Daphnia* kairomones inducing morphological defense of a phytoplankton—Part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 129–132
- Yasumoto K, Nishigami A, Aoi H, Tsuchihashi C, Kasai F, Kusumi T, Ooi T. (2008b) Isolation of new aliphatic sulfates and sulfamate as the *Daphnia* kairomones inducing morphological change of a phytoplankton *Scenedesmus gutwinski*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 133–136.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.

第4章

SOSに誘導されたイカダモの群体形成による *Daphnia* と *Bosmina* の摂食阻害

Part of data from

Oda Y, Miyabara Y. Grazing inhibition in *Daphnia* and *Bosmina* by colony formation of *Desmodesmus subspicatus* triggered by octyl sodium sulfate. submitted.

4-1. はじめに

1990年代以降, 農薬, 重金属, 界面活性剤, 医薬品等が, 生物の生存や繁殖に影響を与えない濃度で, 餌生物の捕食回避戦略 (誘導防御, 捕食者に対する回避行動や防御形態への変化) を攪乱 (誘導または阻害) することが明らかにされてきた (Boyd, 2010; Hanazato, 2001; Lüriling and Scheffer, 2007; Van Donk et al., 2016)。このような事例として, 消費者の摂食圧に対するイカダモの群体形成の攪乱が多く報告されている。例えば, ミジンコ類が放出する情報化学物質 (カイロモン) と構造的に類似している陰イオン界面活性剤は群体形成を誘導する (e.g., Yasumoto et al., 2005)。反対に, 除草剤 (Zhu et al., 2016), 重金属 (Huang et al., 2016; Zhu et al., 2019), 抗生物質 (Pan et al., 2017) は, カイロモン曝露下での群体形成を阻害する。群体形成の発現は消費者の密度 (またはカイロモンの濃度) に依存するため (Wu et al., 2013), 群体形成は餌生物と消費者個体群の密度変動を安定化させる役割を持つ (Verschoor et al., 2004)。これはまた, 化学物質による群体形成の攪乱が, 個体群の存続性を低下させる可能性があることを意味する。実際に, 抗生物質 norfloxacin は *Scenedesmus obliquus* の群体形成を阻害することで, オオミジンコ *Daphnia magna* の個体群の存続性を低下させた (Pan et al., 2020)。

化学物質による群体形成の攪乱に関して多くの報告がある一方で, 消費者の摂食に対

する群体形成の影響は一部の動物プランクトンでしか評価されていない：例えば、ツボ
ワムシ *Brachionus caryciflorus* (Verschoor et al., 2007) や数種の *Daphnia* 属ミジンコ
(Hessen and Van Donk, 1993; Lürling and Van Donk, 1996)。化学物質に誘導あるいは阻害
された群体形成が消費者の摂食率に及ぼす影響については、*D. magna* を用いて評価した
研究のみである (Lürling et al., 2011; Pan et al., 2017)。ワムシや *Daphnia* 属ミジンコだけ
でなく、体サイズの小さな枝角類やカラヌス目カイアシ類 (Calanoida) も、プランクト
ン食魚が豊富に存在する湖では動物プランクトン群集で優占種となる。枝角類とカイ
アシ類の間には、植物プランクトンのサイズに対する餌選択性に大きな違いがある：例
えば、枝角類は小さな藻類粒子 ($\leq 4,000 \mu\text{m}^3$) に対し強い摂食圧を示すが、カイアシ類は
大きな藻類粒子 ($> 10,000 \mu\text{m}^3$) を選択的に消費した (Sommer et al., 2003)。イカダモの
平均粒子体積は、8細胞群体で最大 $1,000 \mu\text{m}^3$ であるため (Lürling, 2003), 群体形成はカ
イアシ類の摂食に大きな影響を及ぼさないと考えられる。一方で、枝角類の間でさえ餌
選択性には違いがある。例えば、*Daphnia* 属はバクテリアを含む小さな球状の餌粒子を
好む傾向があるが、*Bosmina* 属は大きな不定形粒子を選択的に摂取する (Bleiwas and
Stokes, 1985; Porter et al., 1983)。*Bosmina* 属はまた、摂食附属肢 (ろ過フィルター) の形
態や採餌行動様式においても *Daphnia* 属と異なる (e.g., Geller and Müller, 1981; Hessen,
1985; Porter et al., 1983)。これらの違いは、*Daphnia* と *Bosmina* がイカダモの群体形成に
対して種特異的な反応を示す可能性があることを示唆する。

群体形成が異なるミジンコ類の摂食に及ぼす影響を明らかにすることは、種構成が
異なる野外のプランクトン群集に対する群体形成の攪乱影響を理解することに繋がる。
本研究では、*Daphnia* と *Bosmina* 間で異なる餌選択性に基づいて (Bleiwas and Stokes,
1985; Porter et al., 1983), 群体形成による摂食阻害のパターンも *Daphnia* と *Bosmina* の
間で異なると仮説を立てた。この仮説を検証することを目的として、*Daphnia* 属ミジン

コ 1 種 (*D. galeata*) , 及び *Bosmina* 属ミジンコ 2 種 (*B. longirostris*, *B. fatalis*) を対象に, 陰イオン界面活性剤で群体形成させたイカダモを異なる条件 (餌密度とミジンコの齡) で摂食させ, ミジンコ類の種特異的な応答を比較した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 実験生物及び試験物質

本実験で用いたイカダモ (*D. subspicatus*) とミジンコ類 2 種 (*D. galeata*, *B. longirostris*) の入手元および培養条件については, 第 1 章に記載した通りである。ニセゾウミジンコ (*B. fatalis*) については, 長野県諏訪湖 (緯度 36°3'N, 経度 138°5'E) から単離培養したクローン系統を用いた。なお, *B. fatalis* の培養条件は *B. longirostris* と同様である。また, 本実験で用いた試験物質 (SOS) の入手元およびストック溶液の調整法は第 1 章に記載した通りである。

4-2-2. 摂食実験

摂食実験は, イカダモの形態 (単一細胞と群体) , 餌密度 (高密度と低密度) , 及びミジンコの齡 (成熟齡と幼若齡) の 3 要因がミジンコ各種の摂食率に及ぼす影響を評価するために実施した。第 2 章において, SOS の曝露下でイカダモの群体形成が十分に確認できた濃度区 (2 mg L^{-1}) と対照区の藻類懸濁液を摂食実験に用いた。以降, 単細胞優占の懸濁液を対照区, 群体優占の懸濁液を処理区と表記する。対照区と処理区の藻類懸濁液を再度希釈し, ミジンコ類に対して高い餌条件 ($\text{約 } 1.0 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$) と低い餌条件 ($\text{約 } 1.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) をそれぞれ準備した。細胞密度, 粒子密度, 及び形態 (群体形成比, 細胞数/群体数) の初期条件は, 各条件で少なくとも 100 藻類粒子から推定した (Table 4-1)。この際, イカダモの各形態 (単一細胞及び 2、4、8 細胞群体) の長さ と幅

(μm , Fig. 4-1) を Image J ver. 1.51 K (米国国立衛生研究所) を用いて測定した (Table 4-2)。 *D. galeata*, *B. longirostris*, 及び *B. fatalis* の抱卵個体 (約 100—200 個体) をストック培養から集め, 約 50 inds. L^{-1} の密度で 24 時間飼育した。24 時間後に産まれた仔虫と抱卵していない成熟個体を選択し, COMBO 培地ですすいだ後, 実験に用いた。

Table 4-1 摂食実験の開始時における対照区または処理区における *D. subspicatus* の初期細胞密度, 粒子密度および形態 (群形成比). 値は平均値 \pm 標準偏差 (N = 3)を示す.

Condition	Food level	Cell density	Particle density	Morphology
		(cells mL^{-1})	(particles mL^{-1})	(colony formation ratio)
Control	Low	$1.1 (\pm 0.21) \times 10^4$	$1.0 (\pm 0.16) \times 10^4$	$1.1 (\pm 0.043)$
	High	$1.1 (\pm 0.11) \times 10^5$	$1.0 (\pm 0.12) \times 10^5$	$1.1 (\pm 0.037)$
Treatment	Low	$1.0 (\pm 0.07) \times 10^4$	$0.34 (\pm 0.04) \times 10^4$	$3.1 (\pm 0.20)$
	High	$0.84 (\pm 0.08) \times 10^5$	$0.27 (\pm 0.02) \times 10^5$	$3.1 (\pm 0.12)$

Table 4-2 SOS 非曝露下 (対照区) および曝露下 (処理区) における *D. subspicatus* の単一細胞および群の長さおよび幅の平均値 (\pm 標準偏差, N = 10).

Morphology	Control		Treatment	
	Length	Width	Length	Width
Unicell	$7.2 (\pm 1.1)$	$4.6 (\pm 0.6)$	$7.2 (\pm 0.8)$	$4.5 (\pm 0.6)$
Two-celled	$6.9 (\pm 0.6)$	$8.2 (\pm 1.1)$	$6.4 (\pm 0.7)$	$8.3 (\pm 0.9)$
Four-celled	$7.8 (\pm 1.0)$	$14.3 (\pm 1.3)$	$7.3 (\pm 1.1)$	$13.3 (\pm 1.8)$
Eight-celled	*	*	$8.1 (\pm 0.8)$	$27.3 (\pm 2.7)$

*対照区において 8 細胞は観察できなかった。

摂食実験は 15 mL 容量のプラスチック遠沈管を用いて行った。10 mL の対照区もしくは処理区 (それぞれ高餌条件と低餌条件を含む) を遠沈管に入れ, これに *Daphnia* は 2 個体, *Bosmina* は 10 個体 (各種仔虫と成熟個体を含む) を投入した。また, 各条件 (2

餌密度×2 餌形態) でミジンコを投入しない遠沈管を用意した。表面張力による動物プランクトンのトラップを避けるため、約 5 mg のセタノール粉末を水面に滴下した。各遠沈管は繰り返しを3つ用意し、インキュベーター内（暗条件、22 °C）で24時間静置した。全ての遠沈管は12時間後に緩やかに振盪した。

細胞密度と形態の顕微鏡観察のために、24時間後に全ての遠沈管から藻類試料（0.3 mL）を採取した。遠沈管内のミジンコ類は、4%シュガーホルマリンで固定した（Haney and Hall, 1973）。固定試料は、光学顕微鏡下で全身の画像を撮影した。この過程で、*Bosmina* の個体は全体の3—26%が水面でトラップされ、画像を撮影できなかった。*Daphnia* と *Bosmina* の体長（mm, 複眼から尾棘の付け根までの長さ）を、Image Jを使用して測定した（Table 4-2）。

Table 4-3 摂食実験の終了時における各条件下 (齢×餌タイプ×餌密度) でのミジンコ類 (*D. galeata*, *B. longirostris*, *B. fatalis*) の平均体長 (±標準偏差).

Species	Age	Prey type	Food level	Body length	N
				(mm)	
<i>D. galeata</i>	Neonate	Unicell	Low	0.82 (± 0.042)	6
			High	0.81 (± 0.046)	6
		Colony	Low	0.84 (± 0.023)	6
			High	0.83 (± 0.065)	6
	Adult	Unicell	Low	1.92 (± 0.14)	6
			High	1.97 (± 0.13)	6
		Colony	Low	1.91 (± 0.15)	6
			High	1.93 (± 0.18)	6
<i>B. longirostris</i>	Neonate	Unicell	Low	0.24 (± 0.022)	29
			High	0.25 (± 0.026)	30
		Colony	Low	0.24 (± 0.023)	30
			High	0.25 (± 0.027)	29
	Adult	Unicell	Low	0.47 (± 0.029)	24
			High	0.47 (± 0.022)	26
		Colony	Low	0.46 (± 0.025)	26
			High	0.47 (± 0.024)	28
<i>B. fatalis</i>	Neonate	Unicell	Low	0.28 (± 0.023)	28
			High	0.27 (± 0.017)	28
		Colony	Low	0.27 (± 0.011)	24
			High	0.29 (± 0.023)	26
	Adult	Unicell	Low	0.51 (± 0.024)	26
			High	0.52 (± 0.031)	26
		Colony	Low	0.52 (± 0.025)	26
			High	0.52 (± 0.026)	22

Helgen (1987) を参考に、ミジンコ類に摂食された細胞数の実測値として、以下の式に従い個体当たりの摂食率 (FR, cells h⁻¹) を計算した。

$$FR = \left\{ \frac{(A_0 - A_T) + (A_{C,t} - A_0)}{\Delta t} \right\} \times \frac{N}{V}$$

ここで、 A_0 は初期細胞密度、 A_T は各処理の最終細胞密度、 $A_{C,t}$ はミジンコを含まない条件での最終細胞密度、 Δt は実験時間 (24 時間)、 V は培養水量 (10 mL)、 N は *Daphnia* (2 inds.) または *Bosmina* (10 inds.) の個体数である。また、対照区と処理区の摂食率の差を比率で表した摂食阻害率 (IR, %) を、以下の式から算出した。

$$IR = 100 - \left(\frac{FR_t}{FR_c} \times 100 \right)$$

ここで、 FR_t と FR_c は、それぞれ処理区と対照区の摂食率を表す。

イカダモの形態、餌密度、及びミジンコの齢がミジンコ 3 種の摂食率に及ぼす影響を、三元配置分散分析を使用して解析した。解析の前に、統計的仮定に準拠するため摂食率を対数変換した。三元配置分散分析が各要因の交互作用項を検出した場合、Tukey HSD 検定による全群比較を実施した。三元配置分散分析で交互作用項が見つからなかった場合、Welch の t 検定を対照区と処理区の比較に用い、これは第 1 種の過誤を起こすリスクを回避するためであった。摂食阻害率は、Welch の t 検定を使用して、各条件 (餌密度 × ミジンコの齢) においてミジンコ種間で比較した。ここで、有意水準は Holm の方法により調整した。全ての統計解析は、統計ソフト R ver. 4.1.3 を使用して実行した。

4-3. 結果

単一細胞、2 細胞群体、4 細胞群体の長さとは幅は、対照区と処理区の間で同等であった (Table 4-2)。また、各齢のミジンコ 3 種の平均体長は、餌密度と餌形態の各条件間で同じであった (Table 4-3)。これらの結果は、動物プランクトンの摂食率に対する処理区

の影響に対して、イカダモの同一形態のサイズやミジンコの体長等のバイアスがないことを裏付けている。

三元配置分散分析は、*B. longirostris* の摂食率に対する餌形態の影響を除き、各条件の単一効果が摂食率に影響することを示した (Table 4-4)。ほとんどの場合、摂食率は対照区よりも処理区で低く、幼若齢よりも成熟齢の方が高かった (Fig. 4-1)。2 要因 (形態×年齢) 及び 3 要因 (形態×食物×年齢) の相互作用項は、*D. galeata* のモデルで有意な効果として検出された (Table 4-4)。これらの結果は、対照区と処理区間の摂食率の差が、低食物レベルで培養された成熟齢の *Daphnia* で特に大きかったことを示唆している (Fig. 4-1a)。

Table 4-4 三元配置分散分析による摂食実験での処理条件 (餌タイプ, 餌密度, 齢) がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響の解析結果. アスタリスクが付されている場合, 各要因あるいはそれらの交互作用に有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Species	Source of variation	F value	P value
<i>D. galeata</i>	Prey type ***	39.32	< 0.001
	Food level ***	320.30	< 0.001
	Age ***	59.59	< 0.001
	Prey type × Food level	2.90	0.108
	Prey type × Age	3.46	0.082
	Food level × Age ***	17.30	< 0.001
	Prey type × Food level × Age ***	25.42	< 0.001
<i>B. longirostris</i>	Prey type	0.66	0.423
	Food level ***	135.60	< 0.001
	Age **	11.72	0.003
	Prey type × Food level	2.47	0.136
	Prey type × Age	0.05	0.830
	Food level × Age	1.43	0.249
	Prey type × Food level × Age	0.68	0.423
<i>B. fatalis</i>	Prey type **	17.31	< 0.001
	Food level ***	369.76	< 0.001
	Age *	4.67	0.046
	Prey type × Food level	4.36	0.053
	Prey type × Age	2.76	0.116
	Food level × Age	3.38	0.085
	Prey type × Food level × Age	0.23	0.636

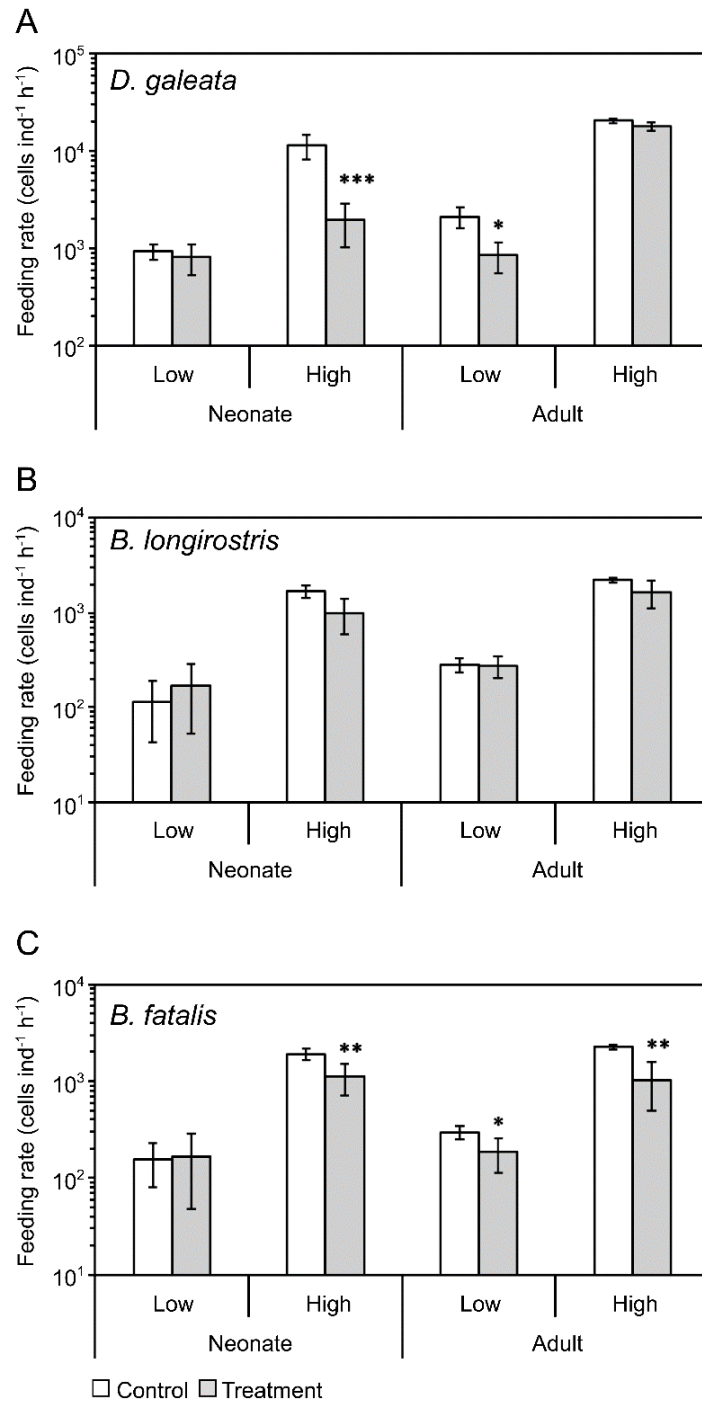


Fig. 4-1. 摂食実験において異なる条件 (餌密度, ミジンコ類の齢) で対照区と処理区のイカダモを給餌した *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C) の摂食率 (平均±標準偏差, N=3) の比較。図中に付したアスタリスクは各処理条件において対照区と処理区間に統計的有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

対照区と処理区間の摂食率の比較は、餌の形態による影響がミジンコ種ごとに異なることを明らかにした (Fig. 4-1)。 *D. galeata* では、高食物レベルと低食物レベルでそれぞれ培養された幼若齢と成熟齢は、群体を餌に与えられたときに低い摂食率を示した (Fig. 4-1a; $P < 0.05$)。対照区と処理区間での摂食率の有意差は、低食物条件下で摂食させた幼若齢を除き、*B. fatalis* でも検出された (Fig. 4-1c; $P < 0.05$)。一方で、*B. longirostris* の摂食率は、食物レベルや齢に関係なく、対照区と処理区間で同等であった (Fig. 4-1b)。

D. subspicatus の群体形成比と各形態の組成は、ミジンコ類の存在下と非存在下で異なっていた (Fig. 4-2; Fig. 4-3)。群体形成比の有意な増加は、*D. galeata* でのみ観察された。成熟齢は高食物レベルで単細胞藻類を消費し、幼若齢は低食物レベルで群体を消費していた (Fig. 4-2a)。各条件下でのこれらの変化は、主に単一細胞の割合の減少 (対照区より 11.5 %低い) と 4 細胞及び 8 細胞群体の増加 (対照区より 9.4 %高い) に起因していた (Fig. 4-3a)。低食物レベルで群体を消費した成熟齢の *Daphnia* でも群体形成比が大幅に減少しており (Fig. 4-2a) , 4 細胞及び 8 細胞群体の減少に対応していた (対照区より 20.3 %低い, Fig. 4-3a)。幼若齢及び成熟齢の *B. longirostris* は、低食物レベルで群体の餌を与えた場合にのみ、群体形成比を著しく減少させた (Fig. 4-2b)。また、これらの条件下では 4 細胞及び 8 細胞群体の割合が減少していた (対照区より 15.0—16.9 %低い, Fig. 4-3b)。 *B. fatalis* では、低食物レベルと高食物レベルの両方で群体を餌として与えた幼若齢の群体形成比が大幅に減少した (Fig. 4-2c)。この結果と対応して、各条件下での 4 細胞群体の組成比は対照区よりも低かった (11.4—19.0 %低い, Fig. 4-3c)。

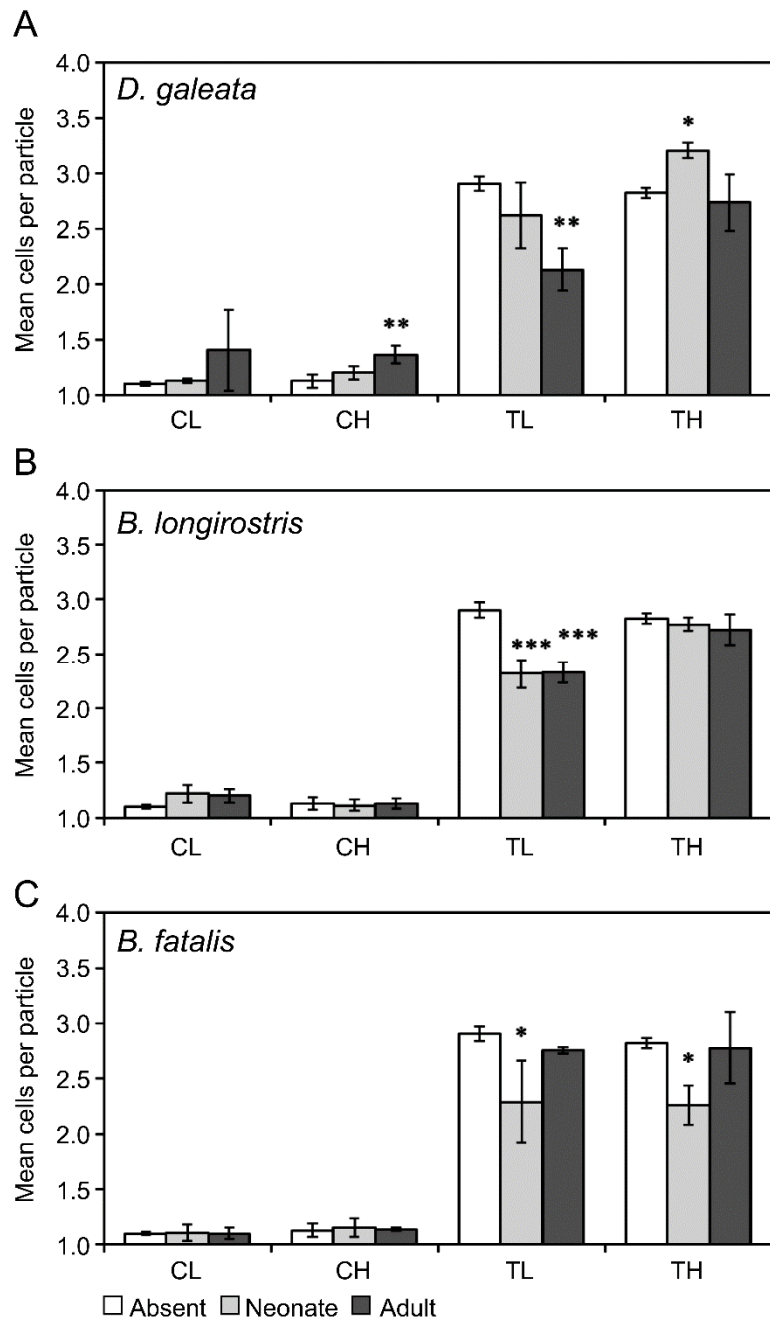


Fig. 4-2. 摂食実験の終了時において各餌条件 (CL, 対照区×低餌密度; CH, 対照区×高餌密度; TL, 処理区×低餌密度; TH, 処理区×高餌密度) 下でのミジンコの非存在下 (Absent) および存在下 (Neonate, 幼若齢; Adult, 成熟齢) で得られた群体形成比 (平均±標準偏差, N=3). *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C). 図中に付したアスタリスクは, ミジンコ非存在下に対してミジンコ存在下での群体形成比が有意に異なることを意味する (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

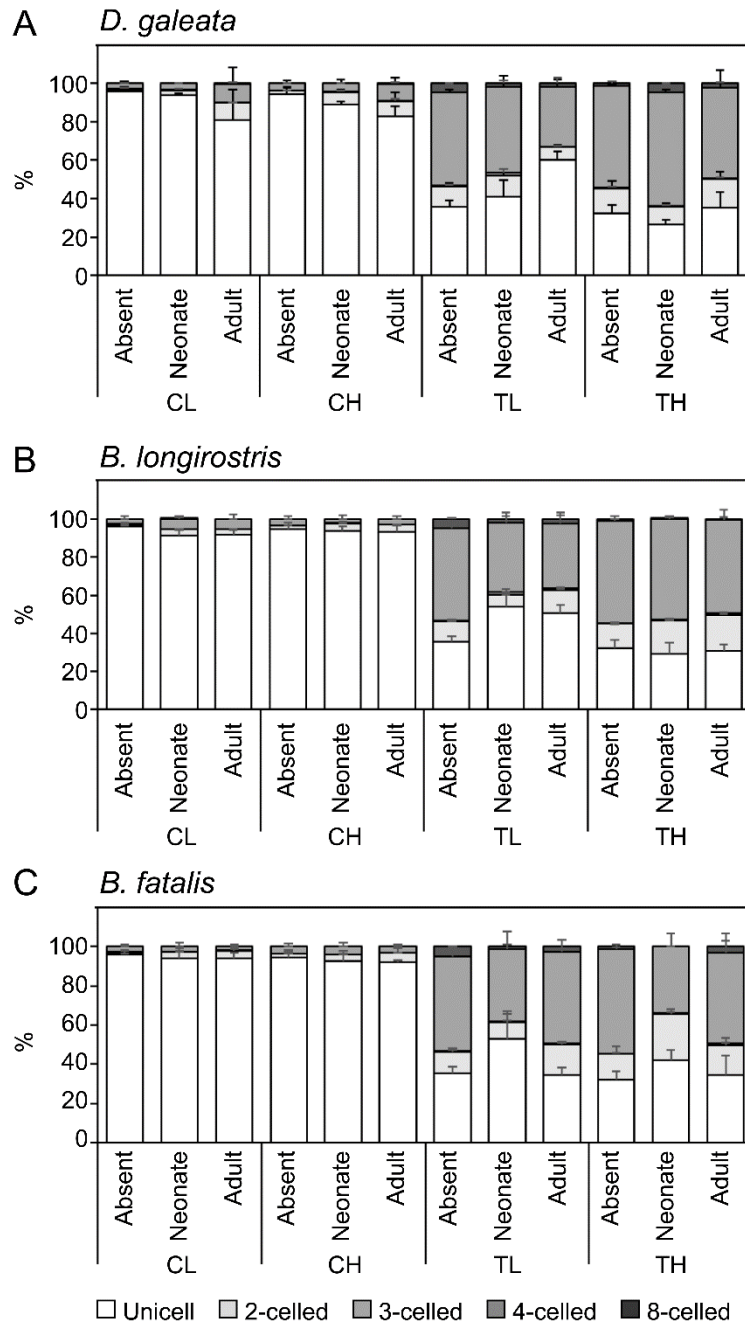


Fig. 4-3. 摂食実験の終了時において各餌条件 (CL, 対照区×低餌密度; CH, 対照区×高餌密度; TL, 処理区×低餌密度; TH, 処理区×高餌密度) でのミジンコの非存在下 (Absent) および存在下 (Neonate, 幼若齢; Adult, 成熟齢) で観察された単一細胞 (Unicell) および群体 (2-, 3-, 4-, 8-celled) の割合 (平均±標準偏差, N = 3). *D. galeata* (A), *B. longirostris* (B), *B. fatalis* (C).

低食物レベルでの幼若齢を除き、ミジンコ種間の摂食阻害率に有意差が検出された (Fig. 4-4)。高食物レベルにおける幼若齢の *D. galeata* の摂食阻害率は、他の *Bosmina* 種よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。一方、低食物レベルでの成熟齢の *D. galeata* の摂食阻害率は、*B. longirostris* よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。対照的に、成熟齢の *D. galeata* は高食物レベルで *B. fatalis* よりも低い摂食阻害率を示した ($P < 0.05$)。 *Bosmina* 2種間では、食物レベルや齢に関係なく、摂食阻害率は同等であった。

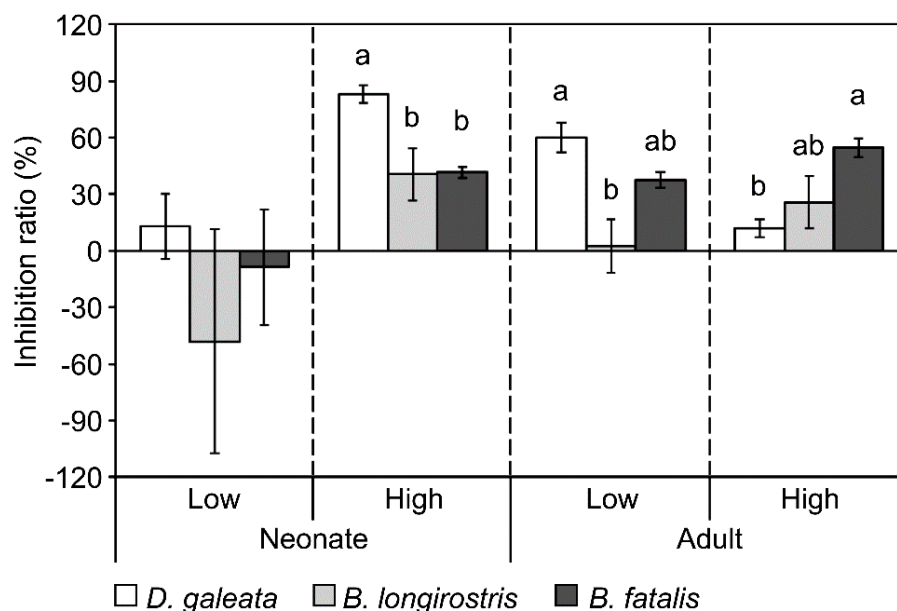


Fig. 4-4. 摂食実験において異なる条件下 (餌密度および齢) でのミジンコ各種 (*D. galeata*, *B. longirostris*, *B. fatalis*) の摂食阻害率 (%、平均±標準偏差, N = 3) の比較. 図中の記号 (a, b) が異なる場合、統計的有意差があることを示す ($P < 0.05$).

4-4. 考察

幼若齢の *D. galeata* の摂食率は、高食物レベルでは対照区より処理区で低かったが、低食物レベルでは同等であった (Fig. 4-1a)。体サイズの小さい *D. galeata* は、大型の同一種と比べて群体藻類をほとんど摂食できない (Oda et al., 2022)。高食物レベルでの処理区では群体形成比の増加と単一細胞の組成の減少が観察されたため (Fig. 4-2a; Fig. 4-3a)、幼若齢の *D. galeata* が単一細胞を積極的に消費したことが示唆された。幼若齢の *D. galeata* による単一細胞の選択的な摂食は、*Daphnia* のフィルターメッシュサイズの齢依存的な変化によって説明できる。幼若齢の *Daphnia* は、成熟齢よりも細かいフィルターメッシュを持つ (Geller and Müller, 1981)。幼若齢とは対照的に、低食物レベルでの成熟齢の *D. galeata* の摂食率は、対照区よりも処理区で有意に低かった (Fig. 4-1a)。大型の *Daphnia* (1.64—2.48 mm) は、濾過率を下げることなく群体を消費することができる (Lürling, 2003)。*Daphnia* 非存在下と比べて、成熟齢 *Daphnia* の存在下における群体形成比と 4 細胞群体の組成は、低食物レベルでは減少したにもかかわらず、高食物レベルでは同等であった (Fig. 4-2a; Fig. 4-3a)。これらの結果は、単一細胞が低密度で存在する場合、成熟齢の *D. galeata* は群体を選択的に消費したことを意味している。食物レベルで異なった成熟齢 *Daphnia* の摂食率の減少は、主に単一細胞の相対的な割合または量の違いに起因する可能性がある。これはまた、群体形成に伴う粒子密度の減少は *Daphnia* の摂食率に大きな影響を与えることを示している (Table 4-1)。

B. longirostris の摂食率に対する餌形態の影響は検出されなかった (Table 4-4; Fig. 4-1b)。低食物レベルでは幼若齢及び成熟齢ともに群体形成比が有意に低下しており (Fig. 4-2b)、本結果は単一細胞の増加及び 4 細胞群体の減少と一致していた (Fig. 4-3b)。これらの結果は、*B. longirostris* が齢もしくは体サイズに関係なく 4 細胞群体を消費したことを意味している。Bleiwas and Stokes (1985) は、*B. longirostris* は小型藻類

(クロレラ *Chlorella vulgaris*, 粒子直径 3—7 μm) よりも大型藻類 (ツヅミモ *Cosmarium impressurum*, 最大直径 25—28 μm) を効率的に濾過摂食したことを報告している。本研究では, 処理区における 4 細胞群体の直径 (約 13.3 μm , Table 4-2) は, ツヅミモより小さく, クロレラよりも大きかった。これは, 単一細胞よりも 4 細胞群体のサイズが *B. longirostris* の摂食に適していたことを意味する。*B. longirostris* における種固有の形質, 例えば前部に付属する 3 対の脚で粒子をつかむモード (DeMott and Kerfoot, 1982) や粗いメッシュサイズのフィルター (Hessen 1985) などにより, *B. longirostris* は大型の藻類を効率的に消費できる可能性がある。一方, 高食物レベルで給餌した場合には群体形成比や形態の組成に変化は観察されず (Fig. 4-2b), 藻類量が多い場合には *B. longirostris* が 4 細胞群体だけでなく単一細胞も消費したことを示している。これは, フィルター付属物へ付着した群体の影響によって説明できるかもしれない。Porter et al. (1983) が説明した *B. longirostris* の細菌摂食のメカニズムのように, 藻類の密度が高い場合, フィルターに付着した大きな群体が付属肢表面の吸着特性を高め, 小さな単一細胞の収集もより効率的にした可能性が考えられる。

B. longirostris と異なり, *B. fatalis* の摂食率は, 低食物レベルで群体を給餌した幼若齢を除き, 処理区において大幅に低下した (Fig. 4-1c)。他種の幼若齢についても低食物レベルでの摂食率の顕著な減少は見られなかったため (Fig. 4-3a, b), 幼若齢は摂食率の違いが観察できる十分な食物粒子を消費しなかった可能性がある。両食物レベルでの群体形成比及び 4 細胞群体の減少 (Fig. 4-2c; Fig. 4-3c) は, 幼若齢の *B. fatalis* が群体を好んで消費したことを示している。単一細胞の藻類 (*Chlorella* sp.) と群体藻類 (*Microcystis aeruginosa*) の混合餌を与えた場合, *B. fatalis* の再生産と個体群増加率は *B. longirostris* をわずかに上回ったことが報告されている (Hanazato and Yasuno, 1987)。個体群増加率は, 主に生後から幼若期の成長条件により決定するため, 大型藻類を効率的

に採餌することで、幼若齢の *B. fatalis* は *B. longirostris* よりも優れた成長率を示した可能性がある。一方、成熟齢の *B. fatalis* は、食物レベルが低い場合でも 4 細胞群体の選択的な摂食を示さず (Fig. 4-3c) , *B. fatalis* の食物サイズの好みは体サイズや齢によって変化する可能性があることを示唆している。諏訪湖や霞ヶ浦などの富栄養湖では、夏季の動物プランクトン群集で *B. fatalis* が優占することが多い (Chang and Hanazato, 2003; Hanazato et al., 2001)。Hanazato et al., (2001) は、*B. fatalis* による夏の優占は、分解された *Microcystis* によって供給される豊富な資源により支えられる可能性を指摘した。これは、*B. fatalis* がより小さな餌粒子を採餌することにも優れることを示唆している。実際に、炭素・窒素安定同位体比を指標とした食物網解析では、夏に諏訪湖で優占する *B. fatalis* が様々なサイズ画分の食物を摂取していたことが示されている (<10 μm , 10–20 μm , 20–40 μm , Sakamoto et al., 2015)。本研究では、*B. fatalis* の摂食率の減少パターンは、*D. galeata* と類似していたが、*B. longirostris* とは異なっていた (Fig. 4-3)。*B. fatalis* のろ過付属肢の形態や構造は未解明であるが、Wei et al. (2021) による近年の研究では、*B. fatalis* のミトコンドリアゲノムが *Daphnia* 種のミトコンドリアゲノムと密接に関連していたことも報告されている。これらの知見は、*B. fatalis* と *Daphnia* が小さな粒子を効率的に収集する同様の能力を持っている可能性があることを示唆する。例えば、*Daphnia* は細かいフィルターメッシュを持っており、バクテリアの収集能力が高いことが知られている (e.g., Geller and Müller, 1981)。

ミジンコ種間の摂食阻害率に対するペアワイズ比較は、群体形成による摂食効率の制限が、各齢の体サイズと食物レベルに応じて *Daphnia* と *Bosmina* の間で変化する可能性があることを示した (Fig. 4-4)。重要なことに、*D. galeata* が *Bosmina* 種より群体形成の影響を受けやすい 2 つのケースがあった：高食物レベルでの幼若齢と低食物レベルでの成熟齢。この結果は、イカダモ科に見られる群体形成は小型の動物プランクトンに対

してより効果的であるという古典的な仮説 (Lüring 2003) とは対照的である。これはおそらく、*Bosmina* の摂食率に対する群体形成の影響については、幼若齢個体や低食物レベルなどの特定の条件下では検証されなかったためである。本結果は、藻類一植食者 (ミジンコ類) の個体群動態に及ぼす群体形成の影響が餌量やミジンコの齢によって変わるという条件依存性を支持する。個体群動態では藻類の密度と植食者の齢はどちらも時間的変数であり、藻類の群体形成は植食者に与える影響は両者の組み合わせ条件によって変化することを意味する。例えば、*D. galeata* の幼若齢は藻類密度 (食物レベル) が高い条件で群体を摂食すると摂食率が低くなり (Fig. 4-1a) , 個体群増加率は制限される。*Daphnia* は春や秋に見られる藻類繁殖期などの豊富な食物条件下で、急速に個体群サイズを増大する場合が多い (e.g., Scheffer et al., 1997)。その後、発達した *Daphnia* 個体群は、藻類の密度が大きく制限される澄水期 (clear-water phase) に直面するだろう。それぞれの状況において、群体形成は餌制限と密度効果 (e.g., Burns 1995) に依存して *Daphnia* 個体群増殖を抑制する。一方で、*Bosmina* は餌のサイズ増加 (群体形成) に比較的影響を受けにくい (Fig. 4-4) , これらの状況では反対に個体群を発達させる可能性が高い。*Bosmina* は *Daphnia* と比較して閾値餌濃度 (threshold food concentration) , つまり再生産が可能で個体群増加率が正となる最低餌濃度が低い (Schulz and Sterner, 1999; Urabe, 1991)。群体形成の影響は、藻類の粒子密度そのものの減少も寄与する可能性があり (Table 4-1) , 餌供給が少ない条件では、群体形成は *Daphnia* よりも *Bosmina* に対して有利に働くことを示唆している。

本研究の結果は、SOS によって誘導された群体形成による摂食阻害が、*Daphnia* と *Bosmina* の間で食物レベルとミジンコ類の齢に応じて異なることを強調している。この条件依存性を理解することは、群体形成を攪乱する化学物質が沖帯プランクトンシステムにおける個体群の持続性と群集構造に及ぼす影響を評価するために重要である (Pan

et al. 2020; Wan et al. 2020)。 *Daphnia* と *Bosmina* は、世界中の湖沼で優占してよく共存する (e.g., DeMott and Kerfoot, 1982; Korosi et al., 2010; Nevalainen et al., 2014; Oh et al., 2019)。 SOS を含め、陰イオン界面活性剤による群体形成の誘導 (e.g., Lürding et al., 2011; Oda et al., 2022) は、*Daphnia* の個体群増加を制限し、*Bosmina* を豊富にする。大型の *Daphnia* とは異なり、小型のボスミナは魚類よりも無脊椎捕食者 (キクロプス目カイアシ類 Cyclopoid copepods など) にとって有利な餌生物であり、*Daphnia* から *Bosmina* への優占の置き換わりは、湖の生態系を低いエネルギー伝達効率を伴う長い食物連鎖へと変化させる可能性があることを示唆している (花里, 1998)。反対に、除草剤 (Zhu et al., 2016) , 重金属 (Huang et al., 2016; Zhu et al., 2019) , 医薬品 (Pan et al. 2017) 等の群体形成を抑制する汚染物質は、*Daphnia* の個体群増加を促進することにより、餌競争で劣勢な *Bosmina* 個体群を崩壊させる可能性がある。しかし、藻類の群体形成が抑制されると、*Daphnia* の個体群変動を不安定になり、絶滅のリスクが高まる可能性もある (Pan et al., 2020)。今後の研究は、化学物質に攪乱された群体形成の影響を個体群レベル (個体群の安定性など) 及び群集レベル (種の多様性や食物連鎖長など) での定量的エンドポイントを使用して直接評価することが重要である。

4-5. 参考文献

- Aomura K, Ashidate N, Aisawa T, et al (1981) *Mizu no Bunseki (in Japanese)*. The Japan Society for Analytical Chemistry. Hokkaido, Japan
- Bleiwas AH, Stokes PM (1985) Collection of large and small food particles by *Bosmina*¹. *Limnology and Oceanography* 30:1090–1092
- Boyd RS (2010) Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemistry and Ecology* 36:46–58
- Burns CW (1995) Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia* 101:234–244
- Chang KH, Hanazato T (2003) Seasonal and spatial distribution of two *Bosmina* species (*B. longirostris* and *B. fatalis*) in Lake Suwa, Japan: its relation to the predator *Leptodora*. *Limnology* 4:0047–0052
- DeMott WR, Kerfoot WC (1982) Competition among cladocerans: nature of the interaction between *Bosmina* and *Daphnia*. *Ecology* 63:1949–1966
- Geller W, Müller H (1981) The filtration apparatus of Cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* 49:316–321
- Ha K, Jang MH, Takamura N (2004) Colony formation in planktonic algae induced by zooplankton culture media filtrate. *Journal of Freshwater Ecology* 19:9–16
- Hanazato T (1995) Combined effect of the insecticide carbaryl and the *Chaoborus* kairomone on helmet development in *Daphnia ambigua*. *Hydrobiologia* 310:95–100
- Hanazato T (1998) Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. *Environmental Pollution* 101:361–373
- Hanazato T (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112:1–10
- Hanazato T, Arakawa T, Sakuma M, Chang KH, Okino T (2001) Zooplankton community in Lake Suwa: community structure and its role in the ecosystem. *Japanese Journal of Limnology* 62:151–167
- Hanazato T, Dodson SI (1995) Synergistic effects of low oxygen concentration, predator kairomone, and a pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 40:700–709
- Hanazato T, Yasuno M (1987) Experimental studies on competition between *Bosmina longirostris* and *Bosmina fatalis*. *Hydrobiologia* 154:189–199
- Haney JF, Hall DJ (1973) Sugar-coated *Daphnia*: A preservation technique for Cladocera¹. *Limnology and Oceanography* 18:331–333
- Helgen JC (1987) Feeding rate inhibition in crowded *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 154:113–119.
- Hessen DO (1985) Filtering structures and particle size selection in coexisting Cladocera. *Oecologia* 66:368–372
- Hessen DO, Van Donk E (1993) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. *Archiv für Hydrobiologie* 127:129–129
- Huang Y, Nan H, Zhu X, Li B, Zhang Z, Yang Z (2016) Waterborne copper impairs grazer-induced colony formation and photosynthetic efficiency in *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography* 61:625–634
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 377:147–159
- Korosi JB, Paterson AM, DeSellas AM, Smol JP (2010) A comparison of pre-industrial and present-day changes in *Bosmina* and *Daphnia* size structure from soft-water Ontario lakes. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 67:754–762
- Labenia JS, Baldwin DH, French BL, Davis JW, Scholz NL (2007) Behavioral impairment and

- increased predation mortality in cutthroat trout exposed to carbaryl. *Marine Ecology Progress Series* 329:1–11
- Lürling M (2003) Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 39:85–101
- Lürling M, De Lange HJ, Peeters E (2011) Effects of an anionic surfactant (FFD-6) on the energy and information flow between a primary producer (*Scenedesmus obliquus*) and a consumer (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology* 20:1881–1889
- Lürling M, Scheffer M (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends of Ecology & Evolution* 22:374–379
- Lürling M, Van Donk E (1996) Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. *Oecologia* 108:432–437
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends of Ecology & Evolution* 20:685–692
- Nevalainen L, Ketola M, Korosi JB, Manca M, Kurmayer R, Koinig KA, Psenner R, Luoto TP (2014) Zooplankton (Cladocera) species turnover and long-term decline of *Daphnia* in two high mountain lakes in the Austrian Alps. *Hydrobiologia* 722:75–91
- Oda Y, Sakamoto M, Miyabara Y (2022) Colony formation in three species of the family *Scenedesmaceae* (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus acutus*, *Tetradesmus dimorphus*) exposed to sodium dodecyl sulfate and its interference with grazing of *Daphnia galeata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 82:37–47
- Oh HJ, Oda Y, Ha JY, Nagata T, Hanazato T, Miyabara Y, Sakamoto M, Chang KH (2019) Responses of daphnids and other zooplankton populations to massive fish kill in Lake Suwa. *Ecological Research* 34:856–863
- Pan Y, Dong J, Wan L, Sun S, MacIsaac HJ, Drouillard KG, Chang X (2020) Norfloxacin pollution alters species composition and stability of plankton communities. *Journal of Hazardous Materials* 385:121625
- Pan Y, Liu C, Li F, Zhou C, Yan S, Dong J, Li T, Duan C (2017) Norfloxacin disrupts *Daphnia magna*-induced colony formation in *Scenedesmus quadricauda* and facilitates grazing. *Ecological Engineering* 102:255–261
- Porter KG, Feig YS, Vetter EF (1983) Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, and *Bosmina* fed natural bacteria. *Oecologia* 58:156–163
- Ritz C, Streb JG, Ritz MC (2016) Package ‘drc.’ Mountain View, CA, USA, Creative Commons.
- Sakamoto M, Nagata T, Ha JY, Kimijima S, Hanazato T, Chang KH (2015) Inducible defenses as a factor determining trophic pathways in a food web. *Hydrobiologia* 743:15–25
- Schulz KL, Sterner RW (1999) Phytoplankton phosphorus limitation and food quality for *Bosmina*. *Limnology and Oceanography* 44:1549–1556
- Scheffer M, Rinaldi S, Kuznetsov YA, van Nes EH (1997) Seasonal dynamics of *Daphnia* and algae explained as a periodically forced predator-prey system. *Oikos* 519–532
- Sommer U, Sommer F, Santer B, Zöllner E, Jürgens K, Jamieson C, Boersma M, Gocke K (2003) *Daphnia* versus copepod impact on summer phytoplankton: functional compensation at both trophic levels. *Oecologia* 135:639–647
- Urabe J (1991) Effect of food concentration on the carbon balance of *Bosmina longirostris* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology* 26:57–68
- Van Donk E, Peacor S, Grosser K, Senerpont Domis LND, Lürling M (2016) Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 91–105
- Verschoor AM, Vos M, Van Der Stap I (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters* 7:1143–1148
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T (2005) Aliphatic

- sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters* 46:4765–4767
- Yokota K, Sterner RW (2011) Trade-offs limiting the evolution of coloniality: ecological displacement rates used to measure small costs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278:458–463
- Wan L, Long Y, Hui J, Zhang H, Hou Z, Tan J, Pan Y, Sun S (2020) Effect of norfloxacin on algae–cladoceran grazer–larval damselfly food chains: Algal morphology-mediated trophic cascades. *Chemosphere* 256:127166
- Wei W, Zhang K, Shi Q (2021) Complete mitochondrial genome of *Bosmina fatalis* (Cladocera: *Bosminidae*) and its phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA Part B* 6:2567–2568
- Wu X, Zhang J, Qin B, Cui G, Yang Z (2013) Grazer density-dependent response of induced colony formation of *Scenedesmus obliquus* to grazing-associated infochemicals. *Biochemical Systematics and Ecology* 50:286–292
- Zhu X, Sun Y, Zhang X, Heng H, Nan H, Zhang L, Huang Y, Yang Z (2016) Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 162:243–251
- Zhu X, Wang Y, Hou X, Kong Q, Sun Y, Wang J, Huang Y, Yang Z (2019) High temperature promotes the inhibition effect of Zn^{2+} on inducible defense of *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 216, 203–212.

PART III.

界面活性剤による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響

第5章 界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱が2栄養段階（藻類-ミジンコ類）構成種の個体群動態に及ぼす影響

第5章

界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱が2栄養段階（藻類-ミジンコ類）構成種の個体群動態に及ぼす影響

Part of data from

小田 悠介, 坂本 正樹, 宮原 裕一. 界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱が2栄養段階（イカダモ, ミジンコ類）構成種の個体群動態に対する影響. in preparation

5-1. はじめに

多くの水生生物は捕食者による物理的刺激（Sakamoto et al., 2007）や化学的合図（カイロモン, Lass and Spaak, 2003）に応答して行動や形態, 生活史特性を柔軟に変化させる防御戦略を示す。これは誘導防御と呼ばれ, その発現と維持にはコスト（体成長率や再生産率の低下）を伴うため, 餌生物にとって被食リスクが十分に高い条件でのみ誘導防御は適応的となる（Riessen and Trevett-Smith, 2009）。適応的な防御発現は, 捕食者により餌生物が食い尽くされる確率を低下させ, 餌生物と捕食者の極端な密度変動を抑制することで, 結果として個体群の存続性や種の共存（種多様性）を維持する機能的役割を持つ（Miner et al., 2005）。

1990年代以降, 農薬, 重金属, 界面活性剤, 医薬品を含む様々な人為由来化学物質が誘導防御の発現を攪乱するという報告が増えている（Hanazato, 2001; Boyd, 2010; Lüring and Scheffer, 2007; Van Donk et al., 2016）。攪乱には大きく分けて2通りのパターンがあり, 捕食者の不在化で防御が誘導されるケースと, 捕食者の存在下で防御が抑制されるケースがある。前者の場合, 防御発現と維持のコストにより餌生物の適応度が低下し, 後者の場合は餌生物の被食率が上昇する（坂本・河, 2013）。また, いずれの場合でも捕

食者に対する防御発現の時間的な不一致 (Miner et al., 2005) を招くため、防御は非適応的となり、個体群や群集の動態に影響を及ぼすことが懸念される。誘導防御の攪乱は生物の生存や繁殖には影響がない濃度でも観察され、化学物質に対する半数影響濃度 EC₅₀ (Effective concentration 50) や無影響濃度 NOEC (No effective concentration) を下回るケースも多いことから (坂本・河, 2013), OECD 等により標準化された試験法では検出することが困難である。また、複数種を用いた群集レベルでの実験においても、化学物質の曝露による群集構造の変化が、構成種の感受性の違いによるものか、誘導防御の攪乱に起因するのか判別できないという問題がある (坂本・河, 2013)。しかし、誘導防御の攪乱は種・個体レベルでの観察例がほとんどであり、実際に個体群・群集レベルでの程度の影響を及ぼすかは十分に評価されていない。そのため、誘導防御の攪乱が生物間相互作用に及ぼす影響について知見を収集し、2-3 種で構成される単純な系からより複雑な系へと段階的に群集実験を行うことで評価することが重要となる。

淡水性の緑藻イカダモは、ミジンコやワムシ等の植食性プランクトンが放出するカイロモンに曝されると 2 から 8 細胞が連結した群体を形成することが知られている (Hessen and Van Donk, 1993)。群体を形成したイカダモはミジンコ類に摂食されにくくなる (Hessen and Van Donk, 1993) ことから、群体形成は誘導防御の 1 つである。様々な化学物質が、イカダモの増殖阻害を引き起こさない濃度で群体形成を攪乱することが報告されている。例えば、陽イオン界面活性剤 benzalkonium bromide や非イオン界面活性剤 nonyl phenol ether (Zhu et al., 2020), 除草剤 glyphosate や 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Zhu et al., 2016), 重金属の銅 (Huang et al., 2016) や亜鉛 (Zhu et al., 2016), 抗生物質 norfloxacin (Pan et al., 2020) は、カイロモンの存在下で誘導される群体形成を抑制する。逆に、陰イオン界面活性剤の dodecyl sodium sulfate (Oda et al., 2022) や mono- and didodecyl disulfanated diphenyloxide (Lürding et al., 2011) は群体形成を誘導することが報

告されている。イカダモの群体形成が消費者の個体群動態に及ぼす影響については、2000年代初期から数理モデル及び室内実験による多くの評価が為されている (Vos et al., 2004; Verschoor et al., 2004; Van der stap et al., 2006)。例えば, Vos et al. (2004) は, 一次生産力の高い (栄養塩の供給量が高い) 条件では, イカダモの群体形成が消費者や捕食者を含む 2-3 栄養段階の食物連鎖系における構成種の密度変動を抑制することを数理モデルで予測しており, この予測は Verschoor et al. (2004) によるイカダモ, 植食性のツボワムシ (*Brachionus calyciflorus*) 及び捕食性のフクロワムシ (*Asplanchna brightwelli*) を含む群集実験で実証されている。従って, 化学物質による誘導防御の攪乱が個体群や群集動態に及ぼす影響を評価する上で, イカダモの群体形成は有用なモデルとなる。

化学物質による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響は, 攪乱パターン (誘導と抑制) や, 消費者となる種に依存する可能性がある。例えば, Van der stap et al. (2006) は, 遺伝子型や種によって群体形成の発現性が異なる複数のイカダモを餌としてツボワムシ (*B. calyciflorus*) の個体群動態を比較した。その結果, イカダモが群体形成を示さない場合はツボワムシの密度変動が不安定となる傾向が見られ, また常に群体を形成する (恒常的な発現を示す) イカダモを餌とした場合では, 密度変動は安定する一方で, 個体群が全滅する確率は増加した (Van der stap et al., 2006)。後者のケースは, 口部偽内繊毛が口部繊毛域に覆いかぶさり, 餌粒子の口部侵入を防ぐツボワムシ特有の摂餌機構 (Pseudotrochal screening と呼ばれる) が餌粒子中の群体割合が高い場合に活発に働き, 細かい餌粒子の取り込みも極端に低下させたことが要因と考えられている (Van der stap et al., 2006)。一方, イカダモの群体形成のような小さな粒子サイズの変化 (直径 4-25 μm) は体サイズの大きな動物プランクトン (e.g., *Daphnia* 属ミジンコ) に対しては影響が小さいと指摘されている (Van der stap et al., 2006; Lürding and Van Donk, 1996)。例えば, *Daphnia* 属では体サイズが比較的小さい *D. cucullata* (成体で体長 0.8-1.1 mm 程

度)は群体形成したイカダモ (*S. acutus*) を餌とした場合に体成長や繁殖率が低下したが、体サイズが比較的大きな *D. pulex* (成体で体長 3–4 mm 程度) は影響を受けなかった (Lürling and Van Donk, 1996)。一方、体サイズに関わらず、ミジンコ類の餌サイズ選択性は、ろ過付属肢やろ過肢毛の形態、遊泳行動によっても異なる (Geller and Müller, 1981; DeMott and Kerfoot, 1982)。例えば、体サイズが小さい *Bosmina longirostris* (体長 0.2–0.6 mm 程度) は、小さな餌藻類 (長径約 3–7 μm) よりも大きな餌藻類 (長径約 25–28 μm) を効率的にろ過摂食することが知られている (Bleiwas and Stokes, 1985)。また、第 4 章では、イカダモを給餌した *Daphnia* 属の摂食速度は *Bosmina* 属よりも顕著に低下することが明らかになった。このように、群体形成の攪乱パターン (誘導と抑制) 及び消費者の種特異的な餌サイズ選択は、化学物質による群体形成の攪乱を介した個体群動態への影響を決定する重要な要因といえる。

これまでに、群体形成の攪乱影響を、その攪乱パターンや消費者の種の違いに着目し、同一の実験条件下で比較した研究例はない。本研究では、群体形成の攪乱パターンと消費者の異なる系に対する影響の違いを明らかにすることを目的とし、イカダモ (*Desmodesmus subspicatus*) と異なるミジンコ種 (*D. galeata* または *B. longirostris*) を構成種とする 2 栄養段階での共培養系を用い、群体形成の抑制と誘導が個体群動態に及ぼす影響を評価した。化学物質として、ミジンコ類のカイロモン存在下でイカダモ *S. obliquus* の群体形成を阻害することが報告されている benzalkonium bromide (Zhu et al., 2020) (以降, BZK-Br と表記) , また *D. subspicatus* の群体形成を顕著に誘導することが既知 (Yasumoto et al., 2005) である sodium octyl sulfate (以降, SOS と表記) の 2 種の界面活性剤を用いた。

5-2. 実験材料及び方法

5-2-1. 実験生物及び試験物質

本実験で用いたイカダモ (*D. subspicatus*) とミジンコ類 2 種 (*D. galeata*, *B. longirostris*) の入手元および培養条件については、第 1 章に記載した通りである。また、本実験で用いた試験物質 (BZK-Br および SOS) の入手元およびストック溶液の調整法は第 1 章に記載した通りである。

5-2-2. 2 栄養段階での個体群レベル実験

本実験では、SOS および BZK-Br の低濃度曝露が 2 栄養段階構成種 (イカダモ, ミジンコ) の個体群動態に及ぼす影響を明らかにするため、餌生物として *D. subspicatus*, 消費者として *D. galeata* あるいは *B. longirostris* を構成種とした共培養系を用いた。本実験では、*D. subspicatus* の群体形成の攪乱 (誘導または抑制) による個体群動態への影響のみを評価するため、第 1 章及び第 2 章で得られた結果を参考に、構成種の生長及び行動に影響を与えない濃度 (<72-h EC₁₀ または <48-h LC₁₀) として、SOS は 200 mg L⁻¹, BZK-Br は 10 µg L⁻¹ を曝露濃度とした。

実験容器には 500 mL 容量の蓋付き三角フラスコを用い、培地には COMBO 培地 (500 mL) を用いた。本実験系において SOS および BZK-Br が *D. subspicatus* に及ぼす影響を確認するため、ミジンコ類を投入する前に、*D. subspicatus* を細胞密度 10⁴ cells mL⁻¹ で投入し、対照区, SOS 曝露区, および BZK-Br 曝露区において 3 日間培養した。3 日後における *D. subspicatus* の細胞密度及び群体形成比を測定し、COMBO 培地で細胞密度を 2 × 10⁵ cells mL⁻¹ に再調整した。これに *D. galeata* を 20 inds L⁻¹, *B. longirostris* を 40 inds L⁻¹ の密度で投入し、2 栄養段階での共培養を開始した。

実験期間中、水温, pH, DO, 各種界面活性剤 (SOS と BZK-Br) の濃度, および藻類とミ

ジンコ類の密度について、一定期間ごとに測定と観察を行った。藻類はフラスコから 0.3 mL のサブサンプルを採取し、細胞密度と群体形成比を記録した。ミジンコ類については、総個体数が各フラスコで 100 inds (200 inds L⁻¹) 未満までは全個体数を目視で計数し、それ以上の場合はサブサンプルとして 50 mL (全量の 1/10) を 3 回採り、個体数を計数してフラスコ内に戻した。つまり、全量の 3/10 を観察して密度を推定した。実験期間中 6 日ごとに各フラスコで 50 mL (処理区ごとに 150 mL) を採取し、50 mL の COMBO 培地で全量を 500 mL に戻した。この際、SOS および BZK-Br を各処理区に再添加した。採取した水試料は、GF/C フィルターでろ過した後、100 mL を BZK-Br, 50 mL を SOS の定量分析に供した。実験は、ミジンコ類を投入してから 60 日間行った。

藻類、ミジンコ各種の密度変動とその安定性に関する指標として、密度の標準偏差を平均で除算して得られる変動係数の逆係数 CV⁻¹ (Pan et al., 2020) , 観察された密度の最大値と最小値の比の常用対数として定義される最大振幅 (Verschoor et al., 2004) , 及び最低密度を算出した。これらの指標は、初期増殖時の密度によって結果が変化するため (Verschoor et al., 2004; Sakamoto et al., 2016) , 藻類については細胞密度が平衡に近くなった実験開始後 12 日目以降、ミジンコ類については最低密度への影響を考慮するため初期増殖時の密度が実験終了時の平衡よりも高くなったタイミング (21 日目) 以降のデータを用いて計算を行った。

藻類の単一培養における増殖速度および群体形成比、また系の安定性に関する各指標値は、Bartlett's 検定により処理区間の等分散性を確かめた後、等分散が仮定できる場合は一元配置分散分析及び事後 Dunnett 検定、等分散が仮定されない場合は Welch の *t* 検定により対照区と各処理区の比較を行った。なお、Welch の *t* 検定における全群比較では、Holm 法に従って有意水準を補正した。また、12 日目以降における群体形成比の増減に関わる潜在的要因として、餌生物と消費者の密度依存フィードバック (Miner et al., 2005)

が考えられるため、常用対数で変換したミジンコ類と藻類の密度比 (\log_{10} (ミジンコ密度) / \log_{10} (藻類密度)) を指標値として計算した。密度比の効果及び処理区 (BZK-Br 及び SOS) との交互作用が群体形成比に及ぼす影響について、一般化線形モデルを用いて評価した。一般化線形モデルでは、応答変数の確率分布としてガンマ分布, log リンク関数を用いた。以上の解析は R で行い, Dunnett 検定にはパッケージ multcomp (Hothorn et al., 2016) を使用した。

5-2-3. 界面活性剤の定量分析

BZK-Br の試験で得た水試料は, GF/C フィルター (孔径 1.2 μm , Cytiva, Tokyo, Japan) でろ過した後, 高濃度の試料は 10—100 $\mu\text{g L}^{-1}$ の範囲になるよう希釈した。C₁₈ カラム (Bond Elut, Agilent technologies, USA) による固相抽出を行い, メタノールで溶出後, 分析まで冷凍保存した。なお, 固相抽出による BZK-Br の回収率は, 添加回収試験により 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (各 1 L, 各 1 点) を検討した結果, それぞれ 98.4%, 103.6%, 121.9%, 94.6% であった。回収率が一部 120% を超過していたが, その他は $\pm 10\%$ 未満の良好な回収率が得られていることから, 回収試験での試料濃度の調整時におけるバラつきと判断し, 10—100 $\mu\text{g L}^{-1}$ の範囲では回収率による濃度補正は行わなかった。試料は窒素ガスで乾固した後, 最終濃度で 2—10 mg L^{-1} となるようアセトニトリルに再溶解した。BZK-Br の定量分析は, 分析カラムとして野村化学製 ODS-UG-3 (内径 2.0 mm \times 100 mm) , 10 mM ギ酸 : アセトニトリル (3 : 7) を移動相とした HPLC 分析を行い, 検出波長 220 nm におけるピーク面積を求めた。定量は BZK-Br の標準試料 (1, 2, 5, 10 mg L^{-1}) をもとに絶対検量線法で行い, 本分析における定量下限値は 0.28 mg L^{-1} であった。最大試料量 (200 mL) 及び最低の分析必要量 (0.5 mL) を考慮すると最大濃縮率は 400 倍となり, この場合の試料濃度の定量下限値は 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。

SOS については、試料中に含まれる陰イオン界面活性剤の絶対量を対象に、メチレンブルー吸光度法³⁰⁾により定量分析を行った。SOS は設定濃度が高いため、SOS の標準試料 2, 5, 10, 20 mg L⁻¹ (添加量は各 1 mL, 絶対量でそれぞれ 2, 5, 10, 20 μg) をもとに作成した検量線の範囲内となるよう試料の希釈を行い、分析に供した。本分析における SOS の定量下限値は、絶対量で 0.5 μg であり、最大添加量 (50 mL) では 0.01 mg L⁻¹ であった。

5-3. 結果

D. subspicatus の単一培養において、BZK-Br 処理区及び SOS 曝露区での *D. subspicatus* の平均増殖速度は対照区と変わらず (Fig. 5-1a, $P = 0.22$) , 群体形成比は SOS 曝露区でのみ増加した (Fig. 5-1b, $P < 0.001$)。

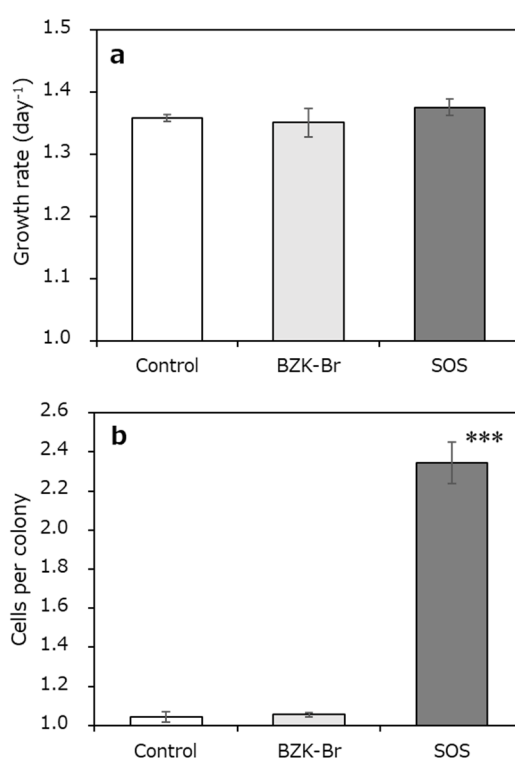


Fig. 5-1. 個体群レベル実験におけるイカダモの前培養期間での各処理区の増殖率 (a, 平均±標準偏差, N = 3) および群体形成比 (b, 平均±標準偏差, N = 3) の比較.

D. subspicatus と *D. galeata* の共培養系において、各処理区の *D. subspicatus* の細胞密度は Day-21 まで $2\text{--}5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の範囲で増加した (Fig. 5-2a)。その後、SOS 曝露区では Day-24 から Day-60 まで高い密度 ($10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) が維持されていた一方で、対照区および BZK-Br 曝露区では Day-36 に $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ を下回り、特に BZK-Br 曝露区では最低密度が $10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ 以下となる場合も見られた (Fig. 5-2a)。*D. galeata* の密度は、対照区と BZK-Br 曝露区において Day-27 まで同様に増加し、対照区では Day-39 にピーク ($987 \pm 55 \text{ ind. L}^{-1}$) を示し、BZK-Br 曝露区では Day-33 でさらに高いピーク ($1384 \pm 189 \text{ ind. L}^{-1}$) を示した (Fig. 5-2c)。ピーク密度に達した後、これらは Day-51 まで低下した (Fig. 5-2c)。SOS 曝露区においては緩やかな密度増加が観察され、Day-48 以降では対照区と同等の密度 (約 $450\text{--}500 \text{ ind. L}^{-1}$) となった (Fig. 5-2c)。*B. longirostris* が消費者の系では、*D. subspicatus* の細胞密度は Day-12 から Day-15 の間に最大 (約 $3 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) となり、その後も Day-60 まで全ての処理区で $1\text{--}2 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ で維持されていた (Fig. 5-2b)。*B. longirostris* の密度は Day-21 まで全ての処理区で同様に増加したが、その後は SOS 曝露区において他処理区よりも高いピーク密度を示し、Day-30 から Day-33 にかけて最大 1100 ind. L^{-1} に達した (Fig. 5-2d)。全ての処理区において、*B. longirostris* の密度がピークに達した後に大きく低下する傾向は見られず、対照区および BZK-Br 曝露区では約 600 ind. L^{-1} 、SOS 曝露区では約 900 ind. L^{-1} で平衡状態となった (Fig. 5-2d)。

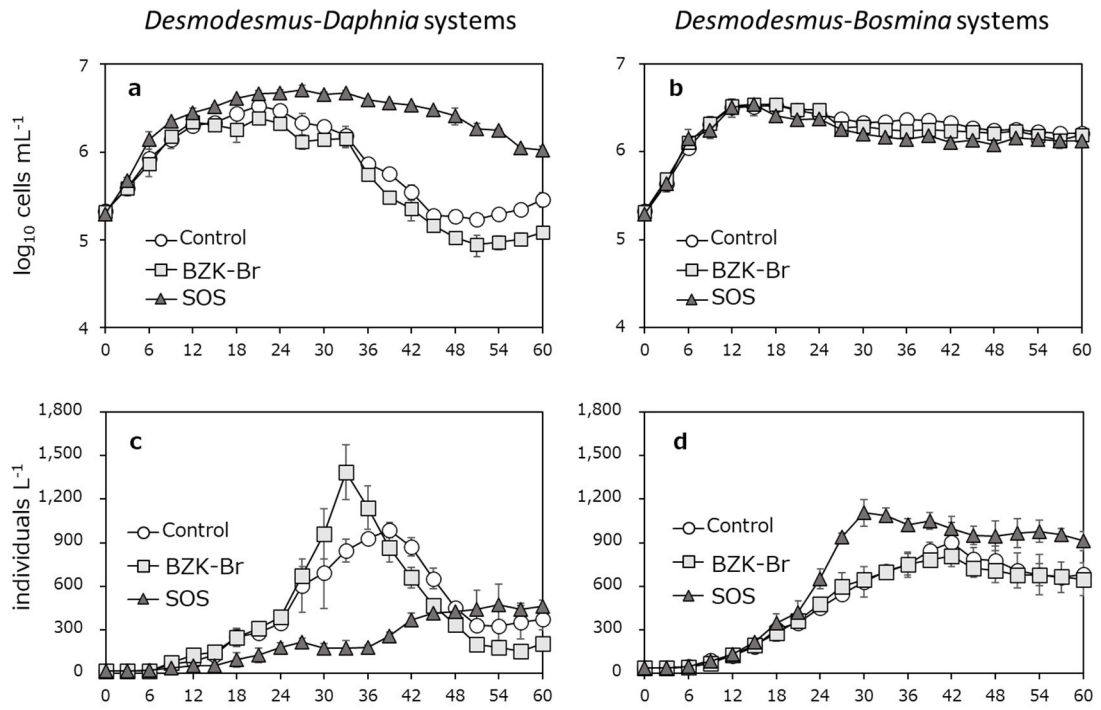


Fig. 5-2. 個体群レベル実験におけるイカダモ (a, b, *D. subspicatus*)とミジンコ類 (c, *D. galeata* または d, *B. longirostris*) の各処理区での密度の経時変化 (平均±標準偏差, N = 10).

実験期間中、全ての処理区における水温は 21.5—22.7 °C の範囲内で変化した (Fig. 5-3a, b)。pH は、*D. galeata* が消費者の系においては Day-30 以降に処理区間で違いが見られ、BZK-Br 曝露区 (約 5.5—9.0) では対照区 (約 8.0—9.5) より低い水準で変動する傾向があったが、SOS 曝露区においては対照区より高い水準 (約 8.0—10.5) で変動した (Fig. 5-3c)。*B. longirostris* が消費者の場合、pH は SOS 曝露区でのみ低い水準 (約 8.0—10.0) で変動した (Fig. 5-3d)。DO についても処理区間の変動パターンの違いは pH と同様であり、*D. galeata* が消費者の場合は SOS 曝露区 (約 10—17 mg L⁻¹) > 対照区 (約 7.5—15 mg L⁻¹) > BZK-Br 曝露区 (約 4.5—15 mg L⁻¹) の順に濃度変化の水準が大きく (Fig. 5-3e)、*B. longirostris* が消費者の系では SOS 曝露区において他の処理区より低い水準 (約 9—15 mg L⁻¹) で変動した (Fig. 5-3f)。実験期間における BZK-Br の濃度は、Day-36 までは全処理区で定量下限 (< 0.28 mg L⁻¹) を下回ったが、Day-36 以降の BZK-Br 曝露区においては約 2—5 µg L⁻¹ が検出され (Fig. 5-4a,b)、*D. galeata* が消費者の系では Day-60 において約 14 µg L⁻¹ が検出された (Fig. 5-4a)。SOS については、実験期間を通して全処理区で検出され、Day-24 までは 20 µg L⁻¹ 以下の場合が多く、Day-30 からは 20—50 µg L⁻¹ 程度が検出された (Fig. 5-4c, d)。SOS 曝露区では、*D. galeata* が消費者の系では Day-48 で SOS 濃度が最大値 (104 µg L⁻¹) となり、それ以降も他処理区より高い値が維持された (Fig. 5-4c)。*B. longirostris* が消費者の系では、Day-24 から Day-60 にかけて、SOS 濃度は SOS 曝露区で他処理区よりも高い水準 (約 30—75 µg L⁻¹) で変動した (Fig. 5-4d)。

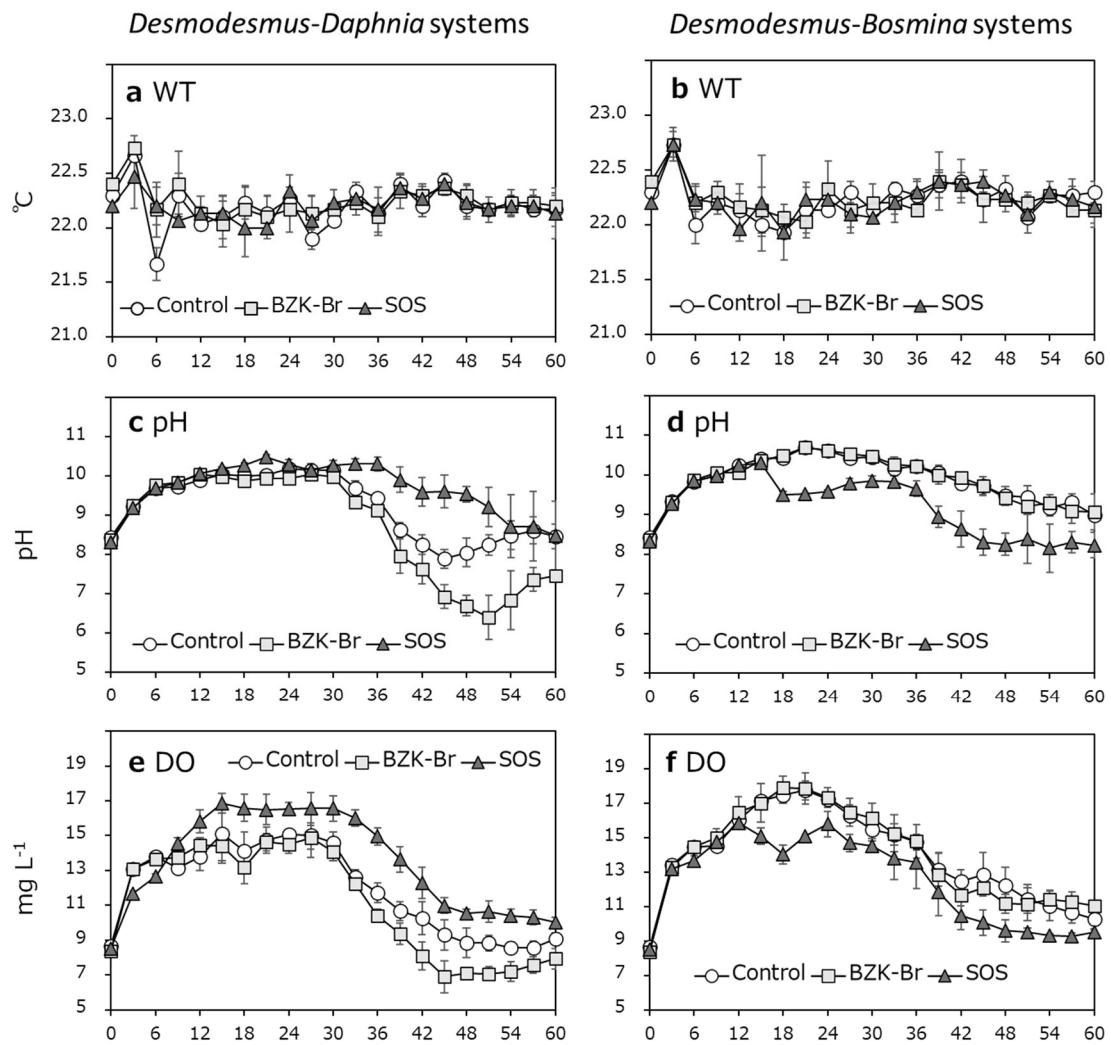


Fig. 5-3. 個体群レベル実験における各処理区での水温 (a, b), pH (c, d), DO 濃度 (e, f) の経時変化 (平均±標準偏差, N = 10).

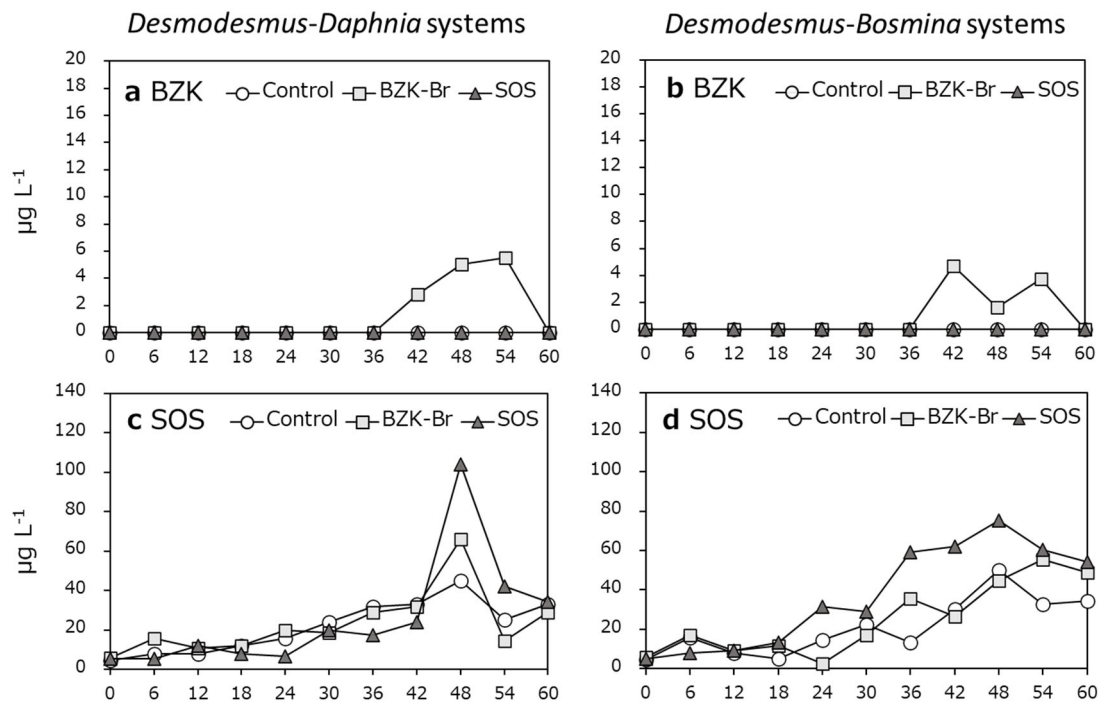


Fig. 5-4. 個体群レベル実験における各処理区での BZK-Br 濃度 (a, b), SOS 濃度 (c, d) の経時変化.

D. galeata が消費者の系における *D. subspicatus* の群体形成比は、対照区では Day-9 に約 3.0 まで増加した後、Day-60 まで 2.5—3.2 の範囲で増減した (Fig. 5-5a)。BZK-Br 曝露区では Day-9 に 2.5 程度までしか増加せず、Day-24 までは 2.1—2.5 の範囲で変化したが、Day-27 から Day-39 では最大 3.2 まで高くなり、その後は対照区と同様の範囲 (2.5—3.1) で増減した (Fig. 5-5a)。SOS 曝露区では Day-3 に 5.0 に近い値を示した後、Day-15 には 2.4 まで減少し、Day-60 まで他処理区よりやや低い範囲 (2.3—2.6) で増減した (Fig. 5-5a)。*B. longirostris* が消費者の場合、対照区および BZK-Br 曝露区における群体形成比は実験を通して最大約 1.7 までしか高くなり、*D. galeata* の場合と比べ低い傾向にあった (Fig. 5-5b)。一方、SOS 曝露区における群体形成比は Day-3 で約 4.5 まで増加し、その後も他処理区より高い値 (17—3.0) で変化した (Fig. 5-5b)。

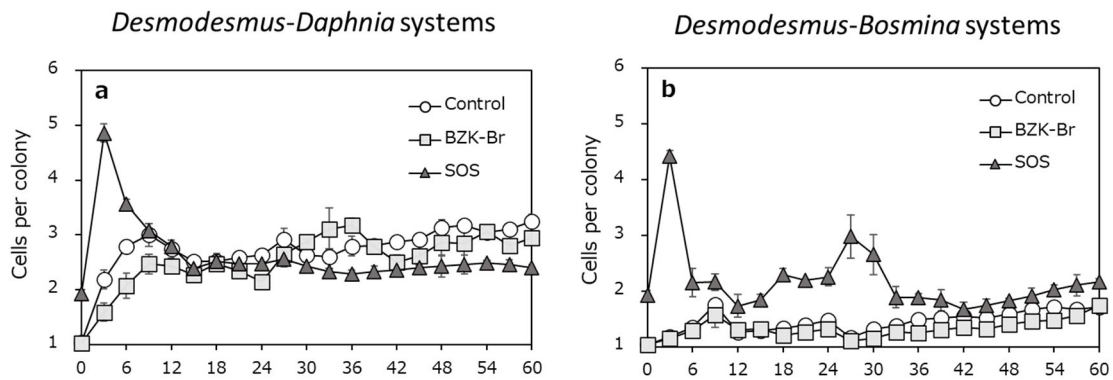


Fig. 5-5. 個体群レベル実験における各処理区での群体形成比の経時変化 (平均±標準偏差, N = 10). *D. galeata* が消費者の系 (a), *B. longirostris* が消費者の系 (b).

群体形成比の決定要因について一般化線形モデルで解析した結果 (Table 5-1), 消費者を *D. galeata* とした系のモデルでは, *D. galeata* と藻類の密度比 ($\log_{10} (Daphnia) / \log_{10} (\text{algae})$) が正の要因であり ($P < 0.001$), 密度比と BZK-Br 曝露との交互作用 ($P < 0.01$) 及び SOS との交互作用 ($P < 0.001$) が負の要因として検出された。また, *B. longirostris* が消費者のモデルにおいても, *B. longirostris* と藻類の密度比 ($\log_{10} (Bosmina) / \log_{10} (\text{algae})$) および密度比と BZK-Br 曝露の交互作用はそれぞれ正の効果 ($P < 0.05$) と負の効果 ($P < 0.001$) を示したが, 密度比と SOS 曝露の交互作用については正の効果 ($P < 0.001$) を示した。

Table 5-1 イカダモとミジンコの2種培養実験において観察された群体形成比に及ぼすミジンコ/藻類の密度比の単一効果及び SOS, BZK-Br との交互作用に対する GLM 解析による評価.

Parameters	Estimate (\pm SE)	<i>t</i> -value	<i>P</i> -value
<i>Algae-Daphnia</i> systems			
Intercept	0.77 (\pm 0.05)	17.15	< 0.001
$\log_{10}(\textit{Daphnia})/\log_{10}(\textit{algae})$	0.61 (\pm 0.10)	5.99	< 0.001
$\log_{10}(\textit{Daphnia})/\log_{10}(\textit{algae}) : \text{BZK-Br}$	- 0.11 (\pm 0.04)	- 3.01	< 0.01
$\log_{10}(\textit{Daphnia})/\log_{10}(\textit{algae}) : \text{SOS}$	- 0.28 (\pm 0.05)	- 5.86	< 0.001
<i>Algae-Bosmina</i> systems			
Intercept	0.14 (\pm 0.11)	1.25	0.21
$\log_{10}(\textit{Bosmina})/\log_{10}(\textit{algae})$	0.59 (\pm 0.25)	2.32	< 0.05
$\log_{10}(\textit{Bosmina})/\log_{10}(\textit{algae}) : \text{BZK-Br}$	- 0.23 (\pm 0.06)	- 3.56	< 0.001
$\log_{10}(\textit{Bosmina})/\log_{10}(\textit{algae}) : \text{SOS}$	0.68 (\pm 0.06)	10.61	< 0.001

D. galeata を消費者とした系の *D. subspicatus* において、対照区に対する SOS 曝露区での全ての安定性指標は有意水準 0.001 未満で異なった：逆変動係数 CV^{-1} は高く (Fig. 5-6a, $P < 0.001$) , 最大振幅 $\log_{10}(\text{max/min})$ は低く (Fig. 5-6b, $P < 0.001$) , 最低密度は高かった (Fig. 5-6c, $P < 0.001$)。また, BZK-Br 曝露区における *D. subspicatus* の最低密度も対照区より有意に低かった (Fig. 5-6, $P < 0.05$)。 *D. galeata* は, BZK-Br 曝露区において CV^{-1} が対照区より有意に低く (Fig. 5-6a, $P < 0.01$) , $\log_{10}(\text{max/min})$ は対照区より有意に高かった (Fig. 5-6b, $P < 0.05$)。また, 最低密度は SOS 曝露区において対照区より有意に低かった (Fig. 5-6c, $P < 0.05$)。一方で, *B. longirostris* を消費者とした系では, *D. subspicatus* および *B. longirostris* の両種ともに, 全ての安定性指標について対照区と処理区間で有意差が検出されなかった。

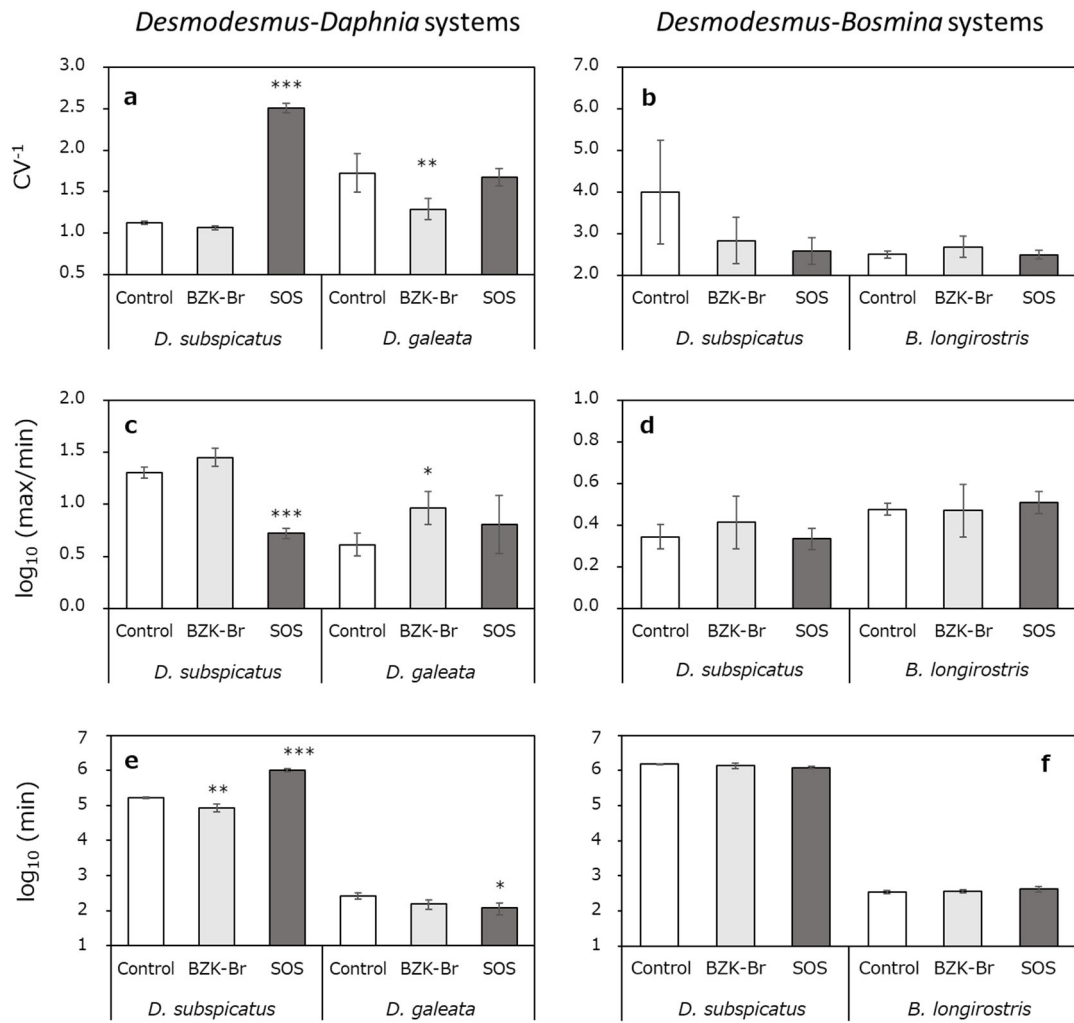


Fig. 5-6. 個体群レベル実験における各種の密度変動から算出した各処理区での変動係数 (a, b), 最大振幅 (c, d), および最低密度 (e, f) の比較. 値は全て平均±標準偏差で示す (N = 3).

5-4. 考察

BZK-Br および SOS のパルス曝露は、特に *D. galeata* を消費者とした系における構成種の個体群動態を大きく変化させた。BZK-Br 曝露区では、*D. subspicatus* は対照区よりも低い密度で変動しており (Fig. 5-2a) , *D. galeata* は速い個体群成長と高いピーク密度を示したため (Fig. 5-2b) , 消費者による藻類の摂食影響が顕著に表れたと考えられる。BZK-Br 曝露区における群体形成比は、特に実験初期 (Day-3 から Day-24) で対照区より低い傾向があり、*D. subspicatus* 個体群に高い割合で存在した小さな餌粒子が初期の *D. galeata* 個体群の成長に寄与したことを示唆する。Pan et al. (2020) による 2 種系 (*S. obliquus* と *D. magna*) での長期培養実験においても、抗生物質 norfloxacin の曝露下で *S. obliquus* 個体群の 4 細胞群体の割合が低く維持されている場合、*D. magna* の個体群成長は速くなり、ピーク密度も高くなったことが示されている。また、ピーク後に観察された急速な個体群密度の低下 (Fig. 5-2b) は、高い密度下での大量消費による *D. subspicatus* 個体群内の単一細胞の減少 (Fig. 5-3a, Day-30 から Day-36) や、*Daphnia* の個体間接触及びフェロモン様物質 (crowding substance) の増加による死亡率の上昇や再生産率の低下 (Lüring et al., 2003) , また生殖様式の変化 (休眠卵や雄個体の生産, Kleiven et al., 1992) 等が主な要因と考えられる。BZK-Br 曝露区とは対照的に、SOS 曝露区における *D. subspicatus* の細胞密度は対照区より高く維持され (Fig. 5-2a) , また *D. galeata* の個体群密度は緩やかに増加していた (Fig. 5-2b)。Day-4 から Day-12 までの SOS 曝露区における群体形成比は高い値で推移していたことから (Fig. 5-3a) , 実験初期における *D. galeata* の体成長や再生産率に影響を及ぼしたと考えられる。また、実験後期において藻類の細胞密度は高い水準 (約 5×10^6 cells mL⁻¹) で維持されたため、全体に対して 10%の培地交換 (6日に1回) による系内への栄養塩供給では藻類の栄養状態が保たれず、*D. galeata* に対する質的な餌要件を下回った可能性がある。例えば、藻類に

含まれる炭素：リンの比率が閾値（220）を下回る場合、*Daphnia* における DNA：RNA 比が低下し、個体群増殖率も低下する（Vrede et al., 2002）。また、SOS をパルス曝露したにも関わらず、Day-12 以降で群体形成比が他の処理区より低い値で変動したのは（Fig. 5-3a）、藻類の増殖が平衡状態に達しており、かつ群体形成が培地中の栄養塩欠乏によって制限されること（Watkins et al., 2011）などが要因と考えられる。

D. galeata が消費者の系と比較して、*B. longirostris* を消費者とした系では、BZK-Br および SOS の曝露は構成種の個体群動態に顕著な影響を及ぼさなかった。初期増殖後、*D. subspicatus* の細胞密度は全ての処理区で約 $1-3 \times 10^6$ cells mL⁻¹ で平衡となり（Fig. 5-2c）、*B. longirostris* 個体群は SOS 曝露区において他処理区よりも高い密度で平衡を示した（Fig. 5-2d）。*Daphnia* と異なり、*Bosmina* は餌藻類への摂食圧が小さく、個体群密度が環境収容力（餌濃度など）に依存して平衡状態となり、内的自然増加率も一定となる（Ertan et al., 2011）。また、*B. longirostris* は *Daphnia* と比べて、個体群成長に対する閾値餌濃度が低く（Urabe, 1991）、かつ高い餌濃度では餌の質（C：N 比および C：P 比）に対する閾値が低い（Urabe and Watanabe, 1992）、餌の量と質の変化に対して個体群動態は影響を受けにくい。さらに、本稿の第 4 章では、SOS を曝露して群体形成を誘導させた *D. subspicatus* を *B. longirostris* に餌として与えた場合、特に 4 細胞群体に対する餌選択性が高いことが明らかになっている。本実験での群体形成比について見ると、対照区と BZK-Br 曝露区で同様の変動を示しており、SOS 曝露区でのみ高い値で変動していた（Fig. 5-3b）。そのため、SOS 曝露区の *B. longirostris* 個体群において観察された高い密度平衡は、大きなサイズ粒子（4 細胞群体以上）が高い割合で餌に含まれており、*B. longirostris* に対する環境収容力を高めた結果である可能性が考えられる。

構成種の初期増殖期を除いた実験期間中における群体形成比は、ミジンコの種に関わらず、 \log_{10} （ミジンコ密度）/ \log_{10} （藻類密度）に対して正の効果があった（Table 5-3）。

ミジンコの密度が高いほど系内のカイロモン濃度が高くなり、また食べられやすい単一細胞の割合が必然的に減少するため、群体形成比も高くなると考えられる。また、藻類の密度が高いほどカイロモンに曝される細胞数は減り、かつ密度が高いほど細胞当たりの被食リスクが低下するため、群体形成比は低くなる。従って、本結果は誘導防御が餌生物と消費者の密度に依存して発現性が変化するという理論的予測と一致する (Miner et al., 2005)。これに対し、BZK-Br 曝露は負の効果を示しており (Table 5-1)、これは BZK-Br のパルス曝露がミジンコ類の密度が相対的に高い場合においても群体形成をある程度抑制したためと考えられる (Fig. 5-3a, b)。一方、SOS の処理効果は消費者が *D. galeata* の場合 (負の効果) と *B. longirostris* の場合 (正の効果) で異なっていた (Table 5-1)。これは、対照区に対する SOS 曝露区での群体形成比が、*D. galeata* が消費者の場合には低くなっており (Fig. 5-3a)、*B. longirostris* が消費者の場合には高い傾向にあったためと考えられる (Fig. 5-3b)。*B. longirostris* の密度がピークに近くなった期間 (Day-27 以降) をはじめ、SOS 曝露区の陰イオン界面活性剤の総濃度は対照区より高い傾向にあり (Fig. 5-4d)、*B. longirostris* 由来のカイロモン濃度が高まっていたことも要因と考えられる。

系の安定性に関する指標は、*D. galeata* を消費者とした系においてのみ処理区間での差が見られた (Fig. 5-6a, b, c)。逆変動係数 CV^{-1} は密度の平均値と標準偏差に依存する安定性の指標であり、高いほど個体群の存続性が高いと解釈できる (Pan et al., 2020)。また、最大振幅 $\log_{10}(\max/\min)$ は高いほど密度変動が激しいことを意味し、最低密度とともに構成種の確率論的な全滅リスクを表す直接的な指標といえる (Verschoor et al., 2004; Sakamoto et al., 2016)。BZK-Br 曝露区では、*D. subspicatus* の最低密度が低く (Fig. 5-6c)、また *D. galeata* においても CV^{-1} が低く、 $\log_{10}(\max/\min)$ も高いことから、BZK-Br による群体形成の抑制は両種の全滅リスクを高めることが示唆された。本結果と同

様に, *S. obliquus* と *D. magna* の 2 種系においても群体形成の抑制が両種の CV^{-1} を低下させることが示されており (Pan et al., 2020), 系内で過密化した *D. magna* が藻類を食い尽くし, 結果として *D. magna* の個体群密度もゼロに近い値となったことが主な要因であると考えられた。一方で, SOS 曝露区では *D. subspicatus* について算出された各指標値は対照区と比べて低い全滅リスクを示しており (Fig. 5-6a, b, c), *D. galeata* では最低密度のみ低い傾向があったが, これは *D. galeata* の初期個体群成長の遅延が反映された結果であり, SOS による群体形成の誘導は 2 種系における全滅リスクを高める要因ではないと考えられる。*B. longirostris* が消費者の系において各種の指標値に処理区間で有意差が検出されなかった理由は (Fig. 5-6d, e, f), *B. longirostris* の摂食圧が低く, 餌の量や質, 形態などの要因にも影響を受けにくいため, 両種ともに密度平衡が大きく変化しなかった結果であるといえる。

Daphnia と *Bosmina* は多くの湖沼における優占種であり (Demott and Kerfoot, 1982; Nevalainen et al., 2014; Oh et al., 2019), プランクトン食魚等によるサイズ選択的な捕食圧が弱い場合は, 餌競争に強い *Daphnia* が優勢する (Huelsmann, 2011)。しかし, 野外における *Daphnia* の個体群動態は, 捕食によるトップダウンだけでなく, 餌の量や質によるボトムアップ効果にも大きく左右される (Huelsmann, 2011)。本研究では, BZK-Br による群体形成の抑制が *D. galeata* の個体群成長を促し, 密度変動を不安定化させ, 全滅リスクを高めることを示した。反対に, *B. longirostris* の個体群動態は影響を受けなかった事実は, BZK-Br によって群体形成が抑制されると系内の優占種が *D. galeata* から *B. longirostris* へ置き換わることを示唆する。*B. longirostris* が優占する系では, その捕食者となる捕食性無脊椎動物 (例えば, ケンミジンコやノロ) が出現するため, 栄養段階が 1 つ増えることで系内の物質やエネルギーの伝達効率が低下すると考えられる (Hanazato, 2001)。その結果, 魚食魚等の最高次捕食者の栄養状態や個体群密度にも影

響を及ぼす可能性がある。BZK-Brだけでなく、除草剤や重金属、抗生物質等の様々な化学物質が低濃度でも群体形成の阻害を引き起こすことが報告されている（Zhu et al., 2016; Huang et al., 2016; Zhu et al., 2019; Pan et al., 2020）ことから、このような影響のリスクは高いと考えられる。また、SOSによる群体形成の誘導は、系の安定性に関わる指標から評価した結果、藻類と消費者の2栄養段階に及ぼす影響はないと考えられたが、*D. galeata*の个体群成長を低下させ、反対に*B. longirostris*の个体群成長を高めた点を考慮すると、捕食者を含めた3栄養段階の系では2種の个体群動態に対する影響は変化するかもしれない。今後は、*Daphnia*属と*Bosmina*属の競争系や、それらの捕食者を含めた3栄養段階以上の系で評価し、群体形成の攪乱が群集動態に及ぼす影響を明らかにする必要があるだろう。

5-5. 参考文献

- 坂本正樹, 河鎮龍. (2013). 食物網を考慮したリスク評価. 環境毒性学会誌, 16, 49–57.
- Aomura K, Ashidate N, Aisawa T, Fujita M, Goto K, Hasebe K, Hikime S, Ikehata A, Kawamura S, Kimura M et al. (1981) Mizu no Bunseki. The Japan Society for Analytical Chemistry, Hokkaido, Kagaku-Dojin, Kyoto, 374–378.
- Bleiwas AH, Stokes PM. (1985) Collection of large and small food particles by *Bosmina*¹. *Limnology and Oceanography*, 30, 1090–1092.
- Boyd RS. (2010) Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 46–58.
- Brooks JL, Dodson SI. (1965) Predation, Body Size, and Composition of Plankton: The effect of a marine planktivore on lake plankton illustrates theory of size, competition, and predation. *Science*, 150, 28–35.
- DeMott WR, Kerfoot WC. (1982) Competition among cladocerans: nature of the interaction between *Bosmina* and *Daphnia*. *Ecology*, 63, 1949–1966.
- Ertan ÖO, Güçlü Z, Erdoğan Ö, Savaş S, Gülle İ. (2011) Population Growth of *Bosmina longirostris* Fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus subspicatus* in Different Densities. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah; IIC*, 63, 1–7.
- Geller W, Müller H. (1981) The filtration apparatus of Cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia*, 49, 316–321.
- Hanazato T. (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution*, 112, 1–10.
- Hessen DO, Van Donk E. (1993) Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. *Archiv fur Hydrobiologie*, 127, 129–129.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P, Heiberger RM, Schuetzenmeister A, Scheibe S, Hothorn MT. (2016) Package ‘multcomp’. Simultaneous inference in general parametric models. Project for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Huang Y, Nan H, Zhu X, Li B, Zhang Z, Yang Z. (2016) Waterborne copper impairs grazer-induced colony formation and photosynthetic efficiency in *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography*, 61, 625–634.
- Huelsmann S. (2011) The combined effect of bottom-up and top-down factors on life history and reproduction of *Daphnia* in the field: is a strategic dilemma underlying population declines? *Journal of Limnology*, 70, 378.
- Kilham SS, Kreeger DA, Lynn SG, Goulden CE, Herrera L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, 377, 147–159.
- Kleiven OT, Larsson P, Hobæk A. (1992) Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*, 197–206.
- Lass S, Spaak P. (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia*, 491, 221–239.
- Lürling MFLW, De Lange HJ, Peeters ETHM. (2011) Effects of an anionic surfactant (FFD-6) on the energy and information flow between a primary producer (*Scenedesmus obliquus*) and a consumer (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology*, 20, 1881–1889.
- Lürling M, Roozen F, Van Donk E, Goser B. (2003) Response of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics. *Journal of Plankton Research*, 25, 967–978.
- Lürling M, Scheffer M. (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 374–379.
- Lürling M, Van Donk E. (1996) Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. *Oecologia*, 108, 432–437.
- Miner BG, Sultan SE, Morgan SG, Padilla DK, Relyea RA. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 685–692.

- Nevalainen L, Ketola M, Korosi JB, Manca M, Kurmayer R, Koinig KA, Psenner R, Luoto TP. (2014) Zooplankton (Cladocera) species turnover and long-term decline of *Daphnia* in two high mountain lakes in the Austrian Alps. *Hydrobiologia*, 722, 75–91.
- Oda Y, Sakamoto M, Miyabara Y. (2022) Colony formation in three species of the family Scenedesmaceae (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus acutus*, *Tetradesmus dimorphus*) exposed to sodium dodecyl sulfate and its interference with grazing of *Daphnia galeata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 37–47.
- Oh HJ, Oda Y, Ha JY, Nagata T, Hanazato T, Miyabara Y, Sakamoto M, Chang KH. (2019) Responses of daphnids and other zooplankton populations to massive fish kill in Lake Suwa. *Ecological Research*, 34, 856–863.
- Pan Y, Dong J, Wan L, Sun S, MacIsaac HJ, Drouillard KG, Chang X. (2020) Norfloxacin pollution alters species composition and stability of plankton communities. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121625.
- Riessen HP, Trevett-Smith JB. (2009) Turning inducible defenses on and off: adaptive responses of *Daphnia* to a gap-limited predator. *Ecology*, 90, 3455–3469.
- Sakamoto M, Chang KH, Hanazato T. (2007) Plastic phenotypes of antennule shape in *Bosmina longirostris* controlled by physical stimuli from predators. *Limnology and Oceanography*, 52, 2072–2078.
- Sakamoto M, Mano H, Hanazato T, Chang KH. (2016) Construction of a Simple Bi-trophic Microcosm System Using Standard Test Species (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*) for Testing Chemical Toxicities. *Korean Journal of Ecology and Environment*, 49, 228–235.
- Urabe J. (1991) Effect of food concentration on the carbon balance of *Bosmina longirostris* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology*, 26, 57–68.
- Urabe J, Watanabe Y. (1992) Possibility of N or P limitation for planktonic cladocerans: an experimental test. *Limnology and Oceanography*, 37, 244–251.
- Van der stap IRENE, Vos M, Mooij WM. (2006) Linking herbivore-induced defences to population dynamics. *Freshwater Biology*, 51, 424–434.
- Van Donk E, Peacor S, Grosser K, Senerpont Domis LND, Lürling M. (2016) Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 91–105.
- Verschoor AM, Vos M, Van Der Stap I. (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters*, 7, 1143–1148.
- Vos M, Kooi BW, De Angelis DL, Mooij WM. (2004) Inducible defences and the paradox of enrichment. *Oikos*, 105, 471–480.
- Vrede T, Persson J, Aronsen G. (2002) The influence of food quality (P: C ratio) on RNA: DNA ratio and somatic growth rate of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 47, 487–494.
- Wan L, Long Y, Hui J, Zhang H, Hou Z, Tan J, Pan Y, Sun S. (2020) Effect of norfloxacin on algae–cladoceran grazer–larval damselfly food chains: Algal morphology-mediated trophic cascades. *Chemosphere*, 256, 127166.
- Watkins J, Rudstam L, Holeck K. (2011) Length-weight regressions for zooplankton biomass calculations—A review and a suggestion for standard equations. *Cornell Biological Field Station Publications and Reports*.
- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T. (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46, 4765–4767.
- Zhu X, Sun Y, Zhang X, Heng H, Nan H, Zhang L, Huang Y, Yang Z. (2016) Herbicides interfere with antigrazer defenses in *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 162, 243–251. *Limnology and Oceanography*, 61, 625–634.

- Zhu X, Wang J, Chen Q, Chen G, Huang Y, Yang Z. (2016) Costs and trade-offs of grazer-induced defenses in *Scenedesmus* under deficient resource. *Scientific Reports*, 6, 1–10.
- Zhu X, Wang Y, Hou X, Kong Q, Sun Y, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2019) High temperature promotes the inhibition effect of Zn^{2+} on inducible defense of *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere*, 216, 203–212.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.

6. 総合考察

6-1. 研究成果の概要

本研究では、化学物質による水生生物種における誘導防御の攪乱が個体群および群集動態に及ぼす影響の解明を目的として、陰イオン・陽イオン界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱（誘導および抑制）をモデルケースとし、攪乱がイカダモとミジンコ類の2種相互作用システムへ与える影響を評価した。本論文では、一連の実験に応じてPART I（第1章, 第2章）、PART II（第3章, 第4章）、PART III（第5章）に各章を割り当てたため、以下ではPARTごとに得られた成果について議論する。

6-2. PART I 界面活性剤に対するイカダモとミジンコ類の感受性：

直接影響（生長阻害及び遊泳阻害）と間接影響（群体形成の攪乱）の濃度関係

PART I では、陰イオン界面活性剤（SDS および SOS）と陽イオン界面活性剤（BZK-Br）による生物種への直接影響（生長や遊泳の阻害）と間接影響（群体形成の攪乱）について濃度関係を整理するため、イカダモ類3種（*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*）およびミジンコ類2種（*D. galeata*, *B. longirostris*）を対象に生物応答試験を実施した。ここで得られた直接影響（EC₅₀ および EC₁₀）と間接影響（LOEC）の差は、間接影響について個体群・群集実験から評価する際に、直接影響と区別して解釈するための知見となる。また、間接影響を引き起こす濃度（LOEC）が既存の生態影響評価に用いられる直接影響の結果（EC₅₀ および EC₁₀）や環境中濃度より低いことは、これらの界面活性剤には、群体形成の攪乱を介して生態系構成種の個体群存続性や群集構造を変化させうる生態リスクがあることを示唆している。

PART I で得られた試験結果について、生長/遊泳を指標に算出した EC₁₀ および群体形

成比を指標に算出した LOEC, 陰イオンおよび陽イオン界面活性剤の河川中での最大検出濃度の文献値 (González et al. 2010; Jackson et al., 2016) を Table 6-1 に整理した。群体形成に対する SDS や SOS, BZK-Br の LOEC は, イカダモ類に対する EC₁₀ と比べて約 1/2 から 1/1000 低く, 特に陰イオン界面活性剤では LOEC と EC₁₀ の差異が顕著 (1/10—1/1000) であった。化学物質の初期リスク評価では, 安全性に配慮した基準値を設定するために不確実性係数 (10 から 100 程度) を乗じた濃度が用いられるが (山崎, 2003), それでも群体形成の誘導については生態リスクの懸念があるといえる。また, 環境中での最大検出濃度と比べても群体形成に対する陰イオン界面活性剤の LOEC は低いことから, 群体形成の誘導は実環境中でも影響するリスクが高いと考えられる。

一方で, SDS や SOS は構造的差異 (アルキル鎖長) によって活性が異なる点や, BZK-Br による群体形成の抑制の程度は, ミジンコ類の種や密度に依存するカイロモン量によって変化する傾向も見られた。従って, 群体形成の攪乱を正確に評価するためには, 攪乱の作用機序 (物質の構造的特徴に基づく活性や受容体との相互作用など) について知見を収集し, 低濃度でも作用する条件を考慮した評価に繋げることが重要である。

Table 6-1 本研究で得られたイカダモ類 3 種 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) およびミジンコ類 2 種 (*D. galeata*, *B. longirostris*) に対する界面活性剤の 72-h および 48-h EC₁₀ (95%信頼区間) とイカダモ類の群体形成を攪乱する LOEC, および環境中での最大検出濃度 (文献値) の比較. EC₁₀ および LOEC の単位は, SDS および SOS については mg L⁻¹, BZK-Br については µg L⁻¹ で示す.

Surfactants	Taxon	Species	Growth/Immobilization	Colony formation	Environmental concentration
			EC ₁₀ [95% C.I.]	LOEC	Maximum value
SDS	Algae	<i>D. subspicatus</i>	8.75 [4.68—12.7]	0.11	0.50 mg L ⁻¹
		<i>S. acutus</i>	6.01 [-1.19—13.2]	1.07	as total anionic surfactants
		<i>T. dimorphus</i>	12.5 [1.42—23.7]	0.10	(Jackson et al. 2016)
SOS	Algae	<i>D. subspicatus</i>	1.16 [0.268—2.06]	0.16	
	Crustacean	<i>D. galeata</i>	227 [157—297]		
		<i>B. longirostris</i>	336 [249—423]		
BZK-Br	Algae	<i>D. subspicatus</i>	34.8 [24.2—45.5]	10	70 µg L ⁻¹
	Crustacean	<i>D. galeata</i>	22.7 [15.5—30.0]		as concentration of BZK-Cl
		<i>B. longirostris</i>	36.5 [27.9—44.9]		(González et al. 2010)

誘導防御の攪乱はガイドライン化された既存の毒性試験では検出が困難であるため、攪乱作用を検出する新たな試験系の開発が重要となる。イカダモの群体形成は、捕食-被食関係の攪乱が懸念される化学物質の初期評価として短期的に影響を検出するためのスクリーニング評価指標として活用できる可能性がある。例えば、化学物質による群体形成の攪乱作用は低濃度で起こるため、イカダモの生長に対する毒性値（EC₅₀等）の半値を最大濃度とし、濃度区を3つほど設けた条件でOECDのテストガイドライン No. 201（OECD, 2006）を行う。試験手順としては、72 h 以内で24 h ごとにイカダモの形態を観察して群体形成比（検出力を保証するため、N数は3以上を推奨）を算出し、これを対照区と比較して統計的な有意差が検出されるか否かで誘導作用の有無を判別できる（Fig. 6-1）。抑制作用の検出には、本研究で十分な誘導作用が検出されたSOSを陽性対照区として添加し、これと抑制物質を複合曝露した処理区を比較する。試験種としては、OECDのテストガイドラインにおける試験推奨種の1種であり、また本研究でも最も感受性が高いと判断された*D. subspicatus*が適している。この方法を活用することで、化学物質による群体形成の攪乱作用について短期的な検出が可能になると考えられる。

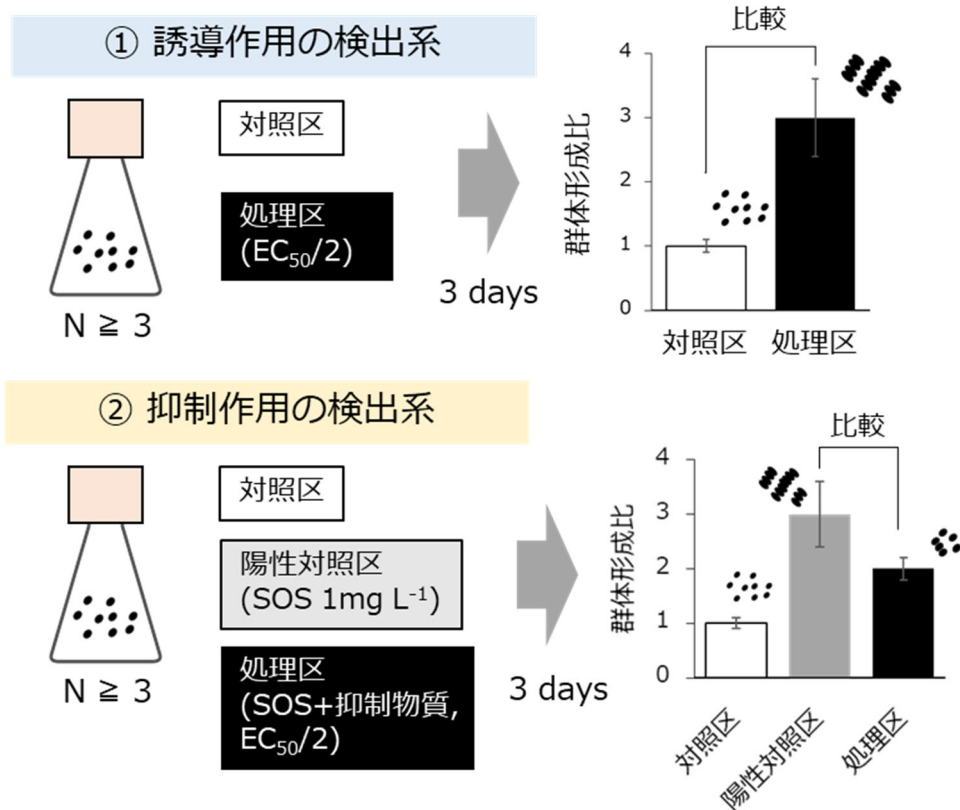


Fig. 6-1. 化学物質による群体形成の誘導①, 抑制②作用を検出する試験法.

6-3. PART II 陰イオン界面活性剤に誘導された群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響

誘導防御の攪乱に関わる既存研究では、個体レベルで観察された形質攪乱を報告した例がほとんどであり、それが2種以上の生物間相互作用に及ぼす影響を評価した研究例は少ない。イカダモの群体形成の誘導が消費者（ミジンコ類）に及ぼす影響については、*Daphnia* 由来のカイロモンと構造的な類似性を有する陰イオン界面活性剤の FFD-6 の曝露によってイカダモ *S. obliquus* の群体形成を低濃度で誘導し、オオミジンコ *D. magna* に給餌して摂食率が低下したことを報告した事例研究があるが（Lürling et al., 2011）、この研究では対象のイカダモ種やミジンコ種が一对であり、また摂食率が影響

を受けやすい実験条件で評価されたものであった。群体形成の攪乱について個体群・群集レベルの実験系で影響を評価するためには、群体形成の攪乱を受けやすい種や群体形成がミジンコ類の摂食率に影響する条件についても詳細に検討する必要がある。

本研究の第3章では、SDSによるイカダモ類の群体形成の誘導は種によって応答性が異なり、カブトミジンコ *D. galeata* の摂食率は群体形成が比較的顕著であった種 (*D. subspicatus* 及び *T. dimorphus*) を給餌した場合に低下したことを示した。特に、幼若齢 (体長が小さい) の *D. galeata* で摂食率が低下する傾向があり、群体形成の攪乱はイカダモ種やミジンコの齢によっても2種間の相互作用 (捕食-被食関係) に及ぼす影響が変化することが明らかになった。第4章では、SOSによる群体形成の顕著な誘導が確認された *D. subspicatus* を餌として、異なるミジンコ種 (*D. galeata*, *B. longirostris*, *B. fatalis*) の摂食率に及ぼす影響を評価した。その結果、ミジンコ種によっても単一細胞や群体の選択的な摂食が異なり、摂食率の低下にも違いが見られた。餌密度やミジンコ各種の齢 (体長) を考慮して摂食阻害率を比較した場合、*Daphnia* 属は *Bosmina* 属より群体形成の影響を受けやすいことが明らかになった。

湖沼における藻類やミジンコ類の個体群動態は季節的な遷移を示し、例えば春季や秋季では藻類の存在量が増加し、豊富な餌条件下でミジンコ類の個体群が発達した後、藻類の密度は急激に減衰する傾向がある (Scheffer et al., 1997)。このような個体群動態では、藻類の密度とミジンコ類の個体群における齢構造は連続的に変化する。イカダモの群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響は、藻類の密度とミジンコ類の齢 (体長) に依存し (第3章, 第4章), イカダモに対する摂食効率が低いとミジンコ類の成長率と繁殖率が低下する (Lürling and Van Donk, 1996)。従って、界面活性剤による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響は、藻類の密度とミジンコ類の齢構造に依存して変化すると考えられる (Fig. 6-2)。例えば、ミジンコ個体群の初期増殖期においては幼若個体

が個体群の多くを占めるが、ミジンコ類の密度はピークに達していないため、イカダモの個体群に占める群体の存在比率も低いと考えられる。この状況では、群体形成によってミジンコ類の個体群増殖が大きく制限されないが、陰イオン界面活性剤によって群体形成が誘導あるいは促進された場合、ミジンコ類の個体群増殖率は低下すると考えられる。一方、ミジンコ類の個体群密度がピークに達している場合、群体形成が強く働き、食い尽くしによるイカダモの全滅リスクを低下させると考えられる。この状況では、陽イオン界面活性剤による群体形成の抑制はイカダモ個体群の全滅を助長し、ミジンコ類の個体群持続性を低下させる可能性が高い (Pan et al., 2020)。

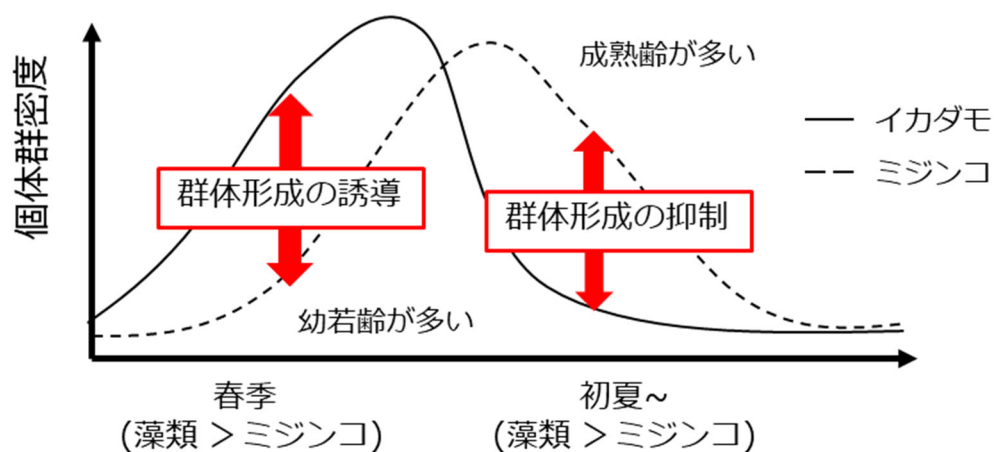


Fig. 6-2. イカダモの密度とミジンコの齢によって異なる群体形成の誘導と抑制の影響。上向きの矢印は個体群成長に対して正の影響を表し、下向きの矢印は負の影響を表す。

また、第 4 章で得られた結果から、上述した条件依存的な群体形成の攪乱影響がミジンコ類の属によっても大きく異なることが明らかになった。特に、*Daphnia* 属と *Bosmina* 属間で得られた摂食阻害率の相対的な違い (*Daphnia* 属は幼若齢において *Bosmina* 属より群体形成の影響を受けやすく、成熟齢の *Daphnia* 属は *Bosmina* 属と比べて群体形成の影響を受けにくい) は、界面活性剤による群体形成の誘導と抑制が 2 属の個体群動態に異なる影響をもたらすことを示唆する。

陰イオン界面活性剤の曝露シナリオでは、初期の個体群成長期で曝露される場合、幼若齢での摂食阻害率が高い *Daphnia* 属の個体群成長が抑制されるが (Fig. 6-3a), 個体群密度が高い時期の曝露では成熟齢の *Daphnia* 属の摂食阻害率は低いいため *Daphnia* 属の個体群動態は大きな影響を受けないと考えられる (Fig. 6-3b)。陽イオン界面活性剤の曝露シナリオでは、個体群成長期ではイカダモの群体形成は強く働かないと考えられるため、構成種の個体群動態は大きく変化しないと考えられ (Fig. 6-3c), 餌競争に強い (個体当たりの摂食率が高い) *Daphnia* 属が優占すると考えられる。一方、密度がピーク時の曝露では、イカダモ類の群体形成が抑制されるため、イカダモが食い尽くされた結果としてミジンコ類 (*Daphnia* および *Bosmina* の両属) が全滅すると考えられる (Fig. 6-3d)。このように、界面活性剤の攪乱パターンの違いや曝露時期によって各種の個体群動態は変化する。

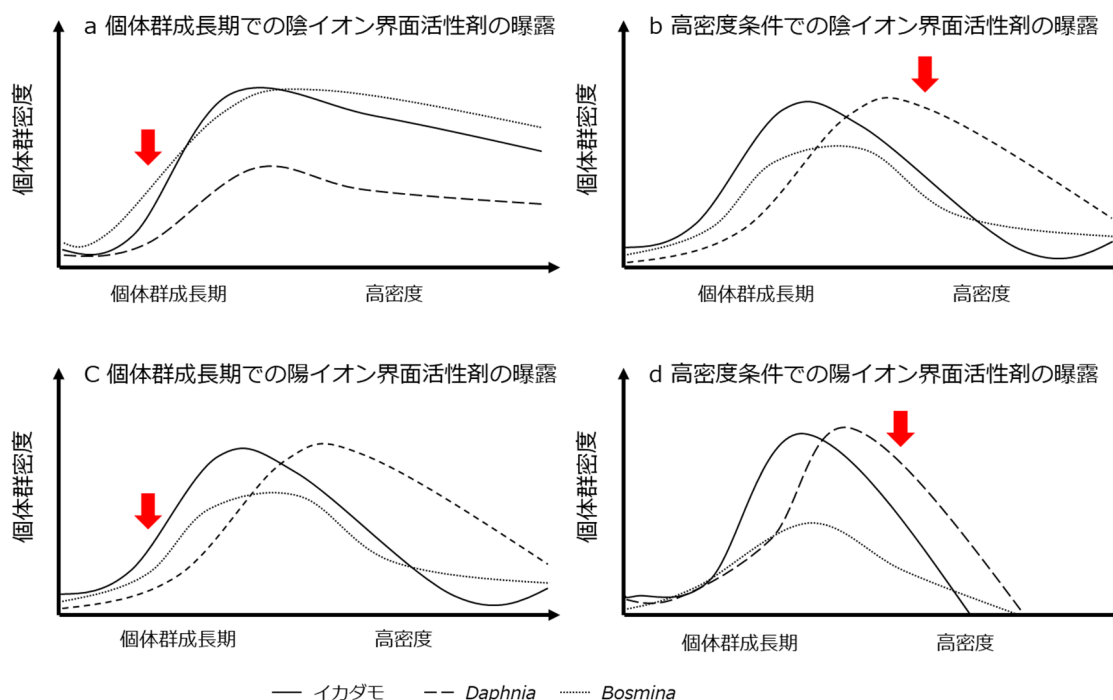


Fig. 6-3. 陰イオン・陽イオン界面活性剤の曝露タイミング (矢印) に応じたイカダモ, *Daphnia* 属ミジンコ, *Bosmina* 属ミジンコの個体群動態。

摂食率に対する餌密度やミジンコ類の齢などの条件依存性や攪乱パターンによる種特異的な摂食阻害率の違いは、界面活性剤により個体群動態が影響を受けやすい曝露タイミングの予測や、群集（優占種）と関連付けた影響の予測など、実環境を反映した生態リスク評価に活用できる基礎的な知見となる。例えば、PART I で提案したスクリーニング試験で攪乱作用（誘導か抑制）を特定できれば、それらが環境中で検出される時期に対応して野外個体群が影響を受けやすいタイミングを予測することができる。また、野外の生物モニタリングデータと組み合わせることで、優占種の個体群動態から系の脆弱性を判別することなども可能になると考えられる。

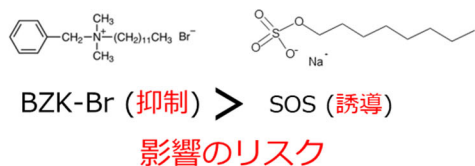
6-4. PART III 界面活性剤による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響

第5章では、第4章で得られた結果を鑑み、*D. galeata* と *B. longirostris* の個体群動態に及ぼす影響を個体群レベルでの実験により実際に比較した。系の安定性に関わる指標による評価では、*D. galeata* の個体群動態が BZK-Br の曝露による影響を受けた一方で、*B. longirostris* は SOS や BZK-Br による影響を受けず、消費者の種によっても群体形成の攪乱による結果が異なることが支持された。群体形成の攪乱を個体群レベルで評価した既存研究は *D. magna* のみを対象としたものであり（Pan et al., 2020; Wan et al., 2020）、他のミジンコ種の個体群動態に及ぼす影響については初めての報告となった。

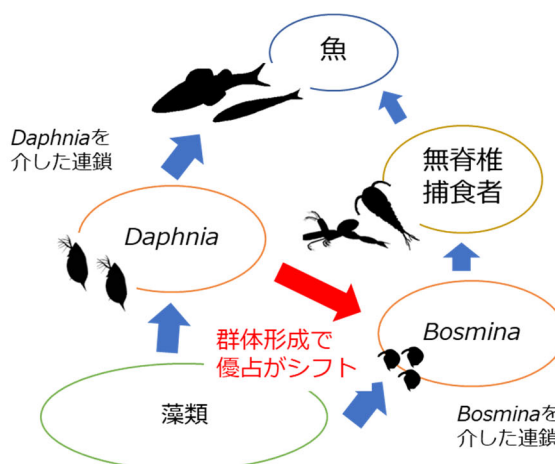
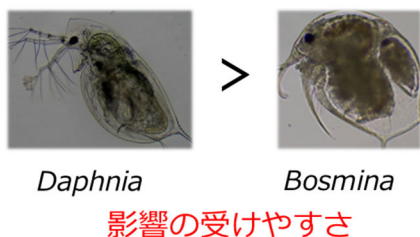
湖沼の生態系構造を決定する重要な要因の1つにサイズ効率説（Brooks and Dodson, 1965）が挙げられ、体サイズの異なる動物プランクトンに対する視覚的捕食者（魚類）による選択的捕食によってプランクトン群集構造とバイオマス、及び栄養カスケードの変化が説明できることが現在でも支持されている（e.g., Detmer and Wahl, 2019）。サイズ効率説では、最も体サイズの大きなミジンコ類として *Daphnia* 種が仮定されるケースが多く、従って *Daphnia* 種は湖沼のキーストーン種として陸水生態学における重要なモ

デル生物となっている (Seda and Petrusek, 2011)。一方で, *Bosmina* 種は富栄養湖を含め幅広い湖沼システムにおける優占種であり, サイズ効率説では小型種として扱われることが多い (e.g., Bennice et al., 2009)。従って, 群体形成の攪乱影響を *Daphnia* と *Bosmina* を消費者として仮定したシステムで比較することは, その影響の違いが生態系の構造や機能にどのように反映されるかを考察する上で重要となる。例えば, *Daphnia* 種が優占する系では高い魚類の生産性が維持されるが, *Bosmina* 種が優占する場合は *Bosmina* を餌とする捕食者が増加するため栄養段階も増え, エネルギー伝達効率が低下することにより魚類の生産性も低下する (Hanazato, 2001)。特に群体形成の抑制は, 系内における *Daphnia* 種の個体群密度を低下させ, *Bosmina* 種の密度増加を助長することにより, 系内の物質・エネルギーフローに影響を与えることが危惧される (Fig. 6-4)。

攪乱パターンの違い



消費者の違い



⇒ 優占のシフトにより食物連鎖構造に影響 (系内の物質・エネルギー転換効率に影響)

Fig. 6-4. 系の安定性に対する BZK-Br (群体形成の抑制) と SOS (群体形成の誘導) の相対的な影響のリスクと消費者に依存する系の影響の受けやすさ, および攪乱による優占のシフトが群集構造に及ぼす影響.

本研究では、誘導防御の攪乱が個体群動態に及ぼす影響を評価する指標として、系の安定性（変動係数, 最大振幅, 最低密度）を使用した（Verschoor et al., 2004）。このうち、特に変動係数は個体群の存続性を評価する尺度として多くの生態学研究で用いられており（e.g., Haddad et al., 2011）, 群形成の抑制が藻類とミジンコ類の個体群動態に及ぼす影響の評価にも適用されている（Pan et al., 2020）。Kondoh（2003）は、この個体群の安定性指標と食物網動態との関係性について数理モデルを用いて評価しており、食物網内の種数と結合度（捕食-被食関係を繋ぐリンクの強さ）の大きさが増加すると個体群は不安定となるが、捕食者の適応形質（柔軟な餌選択のスイッチング）を考慮するとこの関係は逆転すると結論付けた。捕食者による餌選択の変化は、誘導防御によっても変化しうるため、食物網内の構成種が誘導防御を示す場合も個体群の安定性は増加すると考えることができる。従って、誘導防御が系の安定性に及ぼす影響を数理モデルに組み込めば、化学物質による誘導防御の攪乱が個体群の安定性に及ぼす影響を予測できるかもしれない。このためには誘導防御の攪乱が及ぼす影響を食物網動態と結びつける実測データの収集が必要となる。

食物網構造の変化を推定する手法としては、生体内の $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ の比率が栄養段階の高い生物群において増加する傾向に着目した炭素・窒素安定同位体比分析が知られており（Cole et al., 2011）, 実際に誘導防御と食物網内の捕食-被食関係との関連性の解析にも活用されている（Sakamoto et al., 2015）。系の安定性を指標とした群集実験と炭素・窒素安定同位体比分析を組み合わせれば（坂本・河, 2013）, 誘導防御が化学物質により攪乱された場合の系内の個体群密度と結合度（リンクの強さ）の変化を調べることで（Fig. 6-5）, 誘導防御の攪乱影響について群集構造や生態系機能（食物連鎖長や物質・エネルギー転換効率など）から評価することが可能になる。この実証研究により、これまで困難であった理論的予測の検証や（Kondoh, 2003）, 生物多様性や生態系機

能を長期的に維持する要因の探索および新たな生態学理論の確立に繋がることが期待される。また、このような手法を生態影響試験に活用できれば、生物への直接的な毒性だけでなく、生物間相互作用の攪乱を介した間接的な影響も考慮した生態リスク評価の発展に繋がると考えられる。

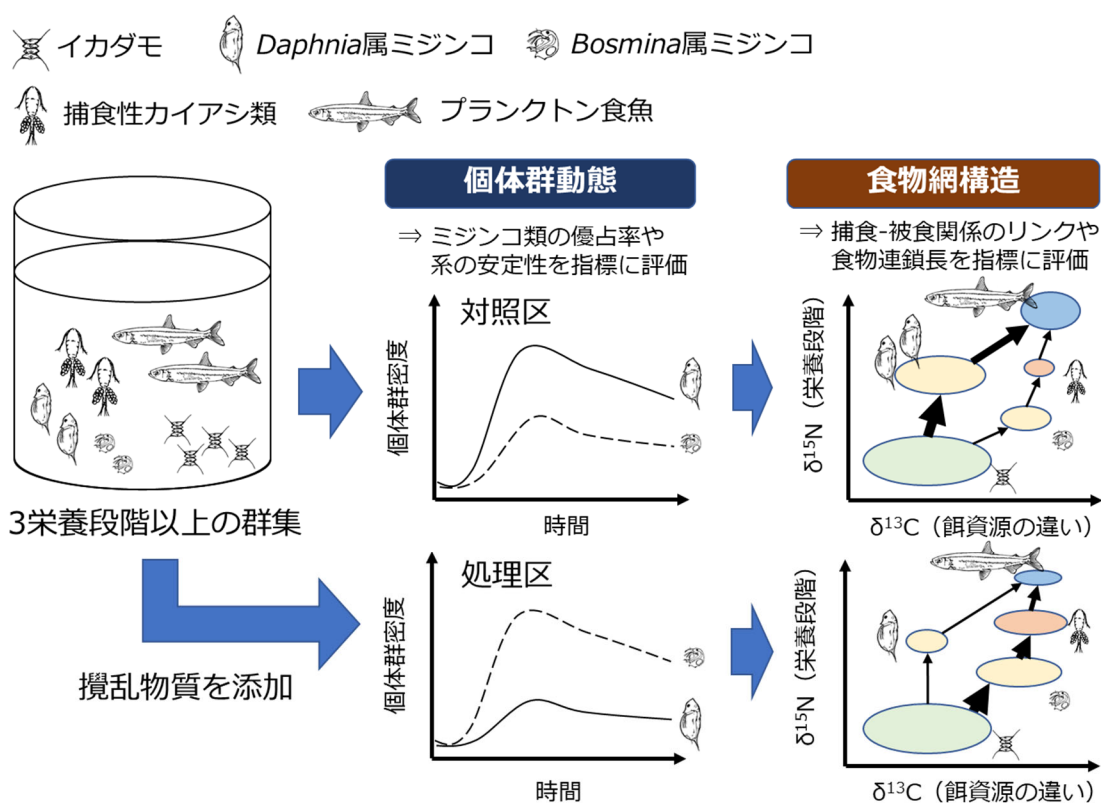


Fig. 6-5. 個体群動態 (系の安定性) と食物網構造 (捕食-被食関係のリンクや結合度) を指標とした群体形成を攪乱する物質の影響評価の概念図。

6-5. 水生生態学分野における本研究成果の意義

本研究の第4章で得られた結果は、化学物質の曝露による生態系への影響としてだけでなく、動物プランクトン種が藻類群集に及ぼす影響について藻類サイズが重要な要因になるという点で、水生生態学分野における新たな知見となる。

藻類の粒子サイズは動物プランクトンによる藻類の選択的摂食や摂食圧を決定する

主な要因と考えられており、沖帯プランクトンの相互作用（現存量や密度の増減に対する一次生産と消費（植食）の相互影響）を理解するために重要である（e.g., Sommer et al., 2001）。例えば、粒子サイズや形態に基づいて藻類をグルーピングした試みとして Morphology-based functional groups（MBFG）が知られている（Kruk et al., 2010）。MBFG では 7 つのグループに藻類を分類しており、粒子サイズをはじめ、毒素の有無や形態的特徴の違いに着目して動物プランクトンの摂食圧に対する藻類の感受性を対応させた分類となっている（Table 6-2）。Colina et al.（2016）は、動物プランクトンの摂食実験を行った広範な既存研究から得られた文献値に基づき、3 つの代表的な動物プランクトン分類群（ワムシ類、枝角類、カイアシ類）による藻類の摂取率について、MBFG との対応関係を解析した。その結果、ワムシ類は MBFG I に対応する小型藻類（長径 5 μm 程度）、枝角類は MBFG IV に対応する不定形の間サイズサイズの藻類（長径 22 μm 程度）に対する摂取率がそれぞれ高いことや、カイアシ類は複数の MBFG（III, IV, V, VI）を含む広いサイズの藻類（長径 11.6—90 μm 程度）に対する摂取率に大きな違いは無いことが明らかになった。この研究例は代表的な分類に基づいて藻類と動物プランクトンの相互作用や群集動態を説明するための有用な情報を提供しているが、イカダモを含む粒子サイズが可変で不定形の藻類グループ（MBFG IV）に対する枝角類の摂取率については大きなバラつきも見られていることから、著者らは不確実性の高い MBFG についてはグループ内での種特異的な形質の関連性等も考慮した詳細な実験的評価が重要であることも指摘している（Colina et al., 2016）。この点について、本研究ではイカダモ *D. subspicatus* の群体形成による粒子サイズの可変性（長径 7.2—27 μm ）が体サイズの異なる枝角類の摂食率を有意に変化させることを実証できた。特に、群体形成した *D. subspicatus* では長径 13.3 μm の 4 細胞群体の優占比率が高い傾向が見られたことから、粒子サイズ < 10 μm と 10—15 μm がそれぞれ *Daphnia* 属と *Bosmina* 属が高い摂食率を示

す餌サイズ範囲であると考えられる。また、この差異はミジンコ種内でも齢によって異なる（例えば、成熟齢の *Daphnia* 属は 10—15 μm の餌に対する摂食率は高い）点で注意が必要である。MBFG に当てはめると、グループ I と II の分類の粒子サイズ（長径）が < 10 μm であり（Table 6-2）、これらの藻類はワムシ類だけでなく *Daphnia* 属に対しては感受性が高いと考えられる。MBFG V に分類される非鞭毛藻類は粒子サイズが 10—15 μm の範囲にあるため、*Bosmina* 属による選択的摂食を受ける可能性がある。特定の粒子サイズについて得られたミジンコ類の種特異的な餌選択性は、環境中での藻類群集構造の変化を説明する新たな発見といえる。

Table 6-2 Morphology-based functional groups (MBFG) に基づく藻類の分類.

MBFG	特徴	代表的な分類	体積, μm^3	長径, μm	毒性
I	表面積の大きな小型藻類	<i>Chlorella</i> <i>Monoraphidium</i>	12.6	5	無し
II	珪質外骨格構造を有する 小型鞭毛藻類	<i>Chromulina</i> <i>Dinobryon</i>	629	7.3	無し
III	ガス泡を有する大型糸状 藻類	<i>Dolicospermum</i> <i>Cylindrospermopsis</i>	1,541	90	有り
IV	不定形の中型サイズ藻類	<i>Scenedesmus</i>	1,543	21.8	無し
V	中型から大型の単一細胞 鞭毛藻類	<i>Chlamydomonas</i> <i>Rhodomonas</i>	2,444	11.6	有り
VI	珪質外骨格構造を持たない 非鞭毛藻類	<i>Thalassiosira</i> <i>Cyclotella</i>	3,143	34	無し
VII	大型で粘性を有する群体 藻類	<i>Microcystis</i> <i>Aphanocapsa</i>	43,152	19	有り

6-6. 結論

本研究では、誘導防御の攪乱が個体群動態に及ぼす影響を評価するため、界面活性剤によるイカダモの群体形成の攪乱をモデルケースに、個体・個体群レベルで影響を評価

した。個体レベルの評価では、異なるイカダモ種 (*D. subspicatus*, *S. acutus*, *T. dimorphus*) やミジンコ種 (*D. galeata*, *B. longirostris*) に対する陰イオン界面活性剤 (SDS 及び SOS) と陽イオン界面活性剤 (BZK-Br) の直接影響 (生長・遊泳への影響) と間接影響 (群体形成の攪乱) を整理し (PART I 第 1 章, 第 2 章), それらの濃度関係を比較した。その結果, イカダモ類の生長やミジンコ類の遊泳に影響を及ぼさない濃度で界面活性剤が群体形成を攪乱することが明らかになり, また群体形成の攪乱は野外環境中の濃度で影響しうる可能性が高いことが示唆された。

PART II では, SDS や SOS により誘導された群体形成がミジンコ類の摂食率に及ぼす影響を評価した (第 3 章, 第 4 章)。その結果, 群体形成が誘導されたイカダモを餌として与えた *D. galeata* の摂食率に低下する傾向が観察され, その影響の有無はイカダモの種特異的に異なった。また, 群体形成による摂食阻害率はミジンコ種によっても異なり, 単一細胞や群体に対する餌選択性には *Daphnia* 属と *Bosmina* 属の間に違いがあることが明らかになった。さらに, この結果は餌密度やミジンコ種の齢 (体長) といった摂食時の条件に依存して変化することが明らかになり, 群体形成の攪乱が個体群・群集動態に及ぼす影響を評価する上で考慮すべきことが示唆された。また, 異なるミジンコ種の摂食実験で観察された異なる粒子サイズに対する餌選択性の種差は, 環境中の藻類群集構造の変化を説明する上で意義のある知見となった。

PART III (第 5 章) では, PART I と PART II で得られた知見を基に, イカダモ—ミジンコ 2 種の共培養による個体群レベルでの実験を行い, SOS や BZK-Br による群体形成の攪乱が個体群動態に及ぼす影響を評価した。その結果, 界面活性剤による群体形成の攪乱パターン (誘導と抑制) や, 消費者となるミジンコの種 (*D. galeata* 及び *B. longirostris*) によって個体群動態に及ぼす影響は異なり, 第 4 章で得られた知見を支持する結果が得られた。*Daphnia* 属のような湖沼のキーストーン種が群体形成の攪乱によ

って影響を受けやすいという事実は、*Daphnia* 属の個体群密度の変動を介して群集構造や機能が変化する可能性を支持しており、本研究を通して攪乱物質の汚染が誘導防御の攪乱を介して群集動態に影響するという因果関係を実証することができた。

本研究の成果は、ガイドライン化された既存の毒性試験では検出ができない誘導防御の攪乱について、その影響を個体群・群集動態から評価するための重要な知見であり、化学物質の生態リスク評価および生態毒性学に貢献する。本研究で提案した手法に基づき、化学物質による群体形成の攪乱が湖沼システムの捕食-被食関係と個体群動態に及ぼす影響を評価するための段階的な評価フローを Fig. 6-6 にまとめた。第1段階では、攪乱が懸念される化学物質について、群体形成の誘導作用に対して感受性の高い *D. subspicatus* の群体形成比を指標に低濃度条件でのスクリーニング試験を実施することで短期的に攪乱作用の有無が検出できる。この結果に基づき、第2段階では群体形成の誘導および抑制による個体群動態への影響が懸念される *Daphnia* 属ミジンコを用いて2栄養段階での個体群動態実験を実施し、系の安定性を指標として影響の有無を検出する。ここで影響がある場合において、より複雑な群集レベル実験を実施することが推奨される。その例として、群集実験と炭素・窒素安定同位体比を活用した食物網構造解析を組み合わせることで生態系構造や機能（食物連鎖長や物質・エネルギー伝達効率）を指標とした新たな生態影響評価手法を提案した。

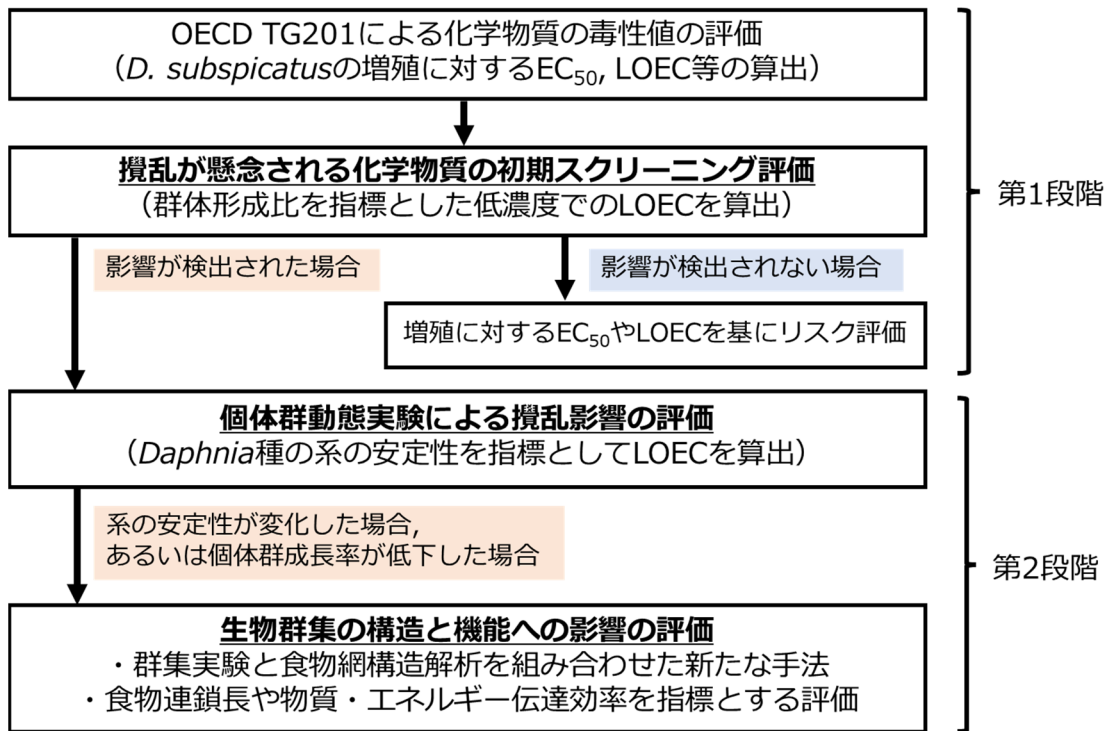


Fig 6-6. 化学物質による群体形成の攪乱を群集レベルで評価する段階的フロー.

6-7. 謝辞

本研究の遂行と博士学位論文の執筆にあたり、信州大学理学部の宮原 裕一教授には多くのご指導をいただきましたこと、心より深く感謝申し上げます。宮原先生からは湖の調査法や化学分析の基礎から応用に至るまで幅広くご指導いただき、また研究の成果発表においても多くのご助言をいただきました。また、先生とともに、信州大学同理学部の笠原 里恵助教、および信州大学理学部附属 諏訪臨湖実験所に所属する学生一同の皆様とも熱心に研究の議論を行えたからこそ、本研究の成果や意義を深く考え、最大化することができたと思っております。以上の諏訪臨湖実験所の皆様には、改めて深く御礼申し上げます。

信州大学同理学部の朴 虎東教授、國頭 恭教授、牧田 直樹准教授には本博士論文の執筆において、大変貴重なご意見をいただきましたこと、心より深く感謝申し上げます。先生方から様々なご指摘をいただいたことで、本研究成果について異なる研究分野からの意義や一般化するための可能性、今後の発展性について幅広く考えることができ、博士論文の完成に向けて熱心に取り組むことができたと思っております。

富山県立大学工学部環境・社会基盤工学科の坂本 正樹准教授には、実験デザインや研究成果の解析手法など、実践的な研究内容のご指導も含め、本博士論文の執筆に際して貴重なご助言をいただきましたこと、心より深く感謝申し上げます。

以上の先生方には博士論文の審査委員を快く引き受けていただきましたこと、改めて深く御礼申し上げます。先生方に学んだことを活かして、今後も本研究テーマの更なる発展を目指し、邁進したいと思っております。

最後に、博士課程を含め、今まで研究に従事してきた時間の中で、大変な時はいつでも家族や友人、大切な方々に支えていただきました。私が研究を続けることができたのは、皆様の支えがあったからこそでもあります。この場を借りて、深く御礼申し上げます。

本研究は日本学術振興会特別研究員制度 DC2（課題番号: JP20J11681）特別研究員奨励費による支援を受けて実施されました。

6-8. 参考文献

- 坂本正樹, 河鎮龍. (2013) 食物網を考慮したリスク評価. 環境毒性学会誌, 16, 49–57.
- 日置恭史郎, 渡部春奈, 林岳彦, 岩崎雄一, 山本裕史. (2020) 生態毒性学における Adverse Outcome Pathway (AOP) 研究の整理と展望. 環境毒性学会誌, 23, 22–37.
- 宮川一志. (2016) ミジンコの環境応答を制御する幼若ホルモン. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー, 85, 3_135-3_140.
- Bennice CO, Conroy JD, Culver DA. (2009) Decreasing trophic efficiency in cool-water aquaculture ponds: size-selective predation removes large prey. Aquaculture Research, 40, 582-589.
- Boyd RS. (2010) Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. Journal of Chemical Ecology, 36, 46–58.
- Brooks JL, Dodson SI. (1965) Predation, Body Size, and Composition of Plankton: The effect of a marine planktivore on lake plankton illustrates theory of size, competition, and predation. Science, 150, 28-35.
- Chen Y, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JL, Droge ST. (2014) Acute toxicity of the cationic surfactant C12-benzalkonium in different bioassays: How test design affects bioavailability and effect concentrations. Environmental Toxicology and Chemistry, 33, 606–615.
- Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell J, Pace ML, Solomon CT, Weidel B (2011). Strong evidence for terrestrial support of zooplankton in small lakes based on stable isotopes of carbon, nitrogen, and hydrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(5), 1975–1980.
- Colina M, Calliari D, Carballo C, Kruk C (2016). A trait-based approach to summarize zooplankton–phytoplankton interactions in freshwaters. Hydrobiologia, 767, 221–233.
- DeMott WR, Kerfoot WC. (1982) Competition among cladocerans: nature of the interaction between *Bosmina* and *Daphnia*. Ecology 63:1949–1966.
- Detmer TM, Wahl DH. (2019) Trophic cascade strength is influenced by size frequency distribution of primary consumers and size-selective predation: examined with mesocosms and modeling. Aquatic Sciences, 81, 1-11.
- González MM, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E (2010) Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. Science of the Total Environment, 408(3), 563–570.
- Haddad NM, Crutsinger GM, Gross K, Haarstad J, Tilman D. (2011) Plant diversity and the stability of food webs. Ecology Letters, 14, 42-46.
- Hanazato T. (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. Environmental Pollution, 112, 1–10.
- Jackson M, Eadsforth C, Schowanek D, Delfosse T, Riddle A, Budgen N (2016) Comprehensive review of several surfactants in marine environments: fate and ecotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, 35(5), 1077–1086.
- Kondoh M. (2003) Foraging adaptation and the relationship between food-web complexity and stability. Science, 299, 1388-1391.
- Korosi JB, Paterson AM, DeSellas AM, Smol JP. (2010) A comparison of pre-industrial and present-day changes in *Bosmina* and *Daphnia* size structure from soft-water Ontario lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 67, 754–762.

- Lürling M (2003) Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 39, 85–101.
- Lürling MFLW. (2012) Infodisruption: pollutants interfering with the natural chemical information conveyance in aquatic systems. *Chemical Ecology in Aquatic Systems*, 250-271.
- Lürling M, De Lange HJ, Peeters E. (2011) Effects of an anionic surfactant (FFD-6) on the energy and information flow between a primary producer (*Scenedesmus obliquus*) and a consumer (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology*, 20, 1881–1889.
- Lürling M, Scheffer M. (2007) Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 374–379.
- Lürling M, Van Donk E. (1996) Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. *Oecologia* 108:432–437.
- Nevalainen L, Ketola M, Korosi JB, Manca M, Kurmayer R, Koinig KA, Psenner R, Luoto TP. (2014) Zooplankton (Cladocera) species turnover and long-term decline of *Daphnia* in two high mountain lakes in the Austrian Alps. *Hydrobiologia* 722:75–91.
- OECD (2006) OECD guidelines for the testing of chemicals: 201 Freshwater alga and cyanobacterial growth inhibition test. OECD Publishing, Paris.
- Oda S, Kato Y, Watanabe H, Tatarazako N, Iguchi T. (2011) Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 232-238.
- Oh HJ, Oda Y, Ha JY, Nagata T, Hanazato T, Miyabara Y, Sakamoto M, Chang KH. (2019) Responses of daphnids and other zooplankton populations to massive fish kill in Lake Suwa. *Ecological Research*, 34, 856–863.
- Pan Y, Dong J, Wan L, Sun S, MacIsaac HJ, Drouillard KG, Chang X. (2020) Norfloxacin pollution alters species composition and stability of plankton communities. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121625.
- Sakamoto M, Nagata T, Ha JY, Kimijima S, Hanazato T, Chang KH (2015). Inducible defenses as factor determining trophic pathways in a food web. *Hydrobiologia*, 743, 15–25.
- Scheffer M, Rinaldi S, Kuznetsov YA, van Nes EH. (1997) Seasonal dynamics of *Daphnia* and algae explained as a periodically forced predator-prey system. *Oikos* 519–532.
- Sommer U, Sommer F, Santer B, Jamieson C, Boersma M, Becker C, Hansen T (2001). Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. *Ecology letters*, 4(6), 545–550.
- Seda J, Petrusek A. (2011) *Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *Journal of Limnology*, 70, 337-344.
- Van Donk E, Peacor S, Grosser K, Senerpont Domis LND, Lürling M. (2016) Pharmaceuticals may disrupt natural chemical information flows and species interactions in aquatic systems: ideas and perspectives on a hidden global change. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 91–105.
- Verschoor AM, Vos M, Van Der Stap I. (2004) Inducible defences prevent strong population fluctuations in bi- and tritrophic food chains. *Ecology Letters*, 7, 1143–1148.
- Wan L, Long Y, Hui J, Zhang H, Hou Z, Tan J, Pan Y, Sun S. (2020) Effect of norfloxacin on algae–cladoceran grazer–larval damselfly food chains: Algal morphology-mediated trophic cascades. *Chemosphere*, 256, 127166.
- Weiss LC, Albada B, Becker SM, Meckelmann SW, Klein J, Meyer M, Schmitz OJ, Sommer U, Leo M, Zagermann J, Metzler-Nolte N, Tollrian R. (2018) Identification of Chaoborus kairomone chemicals that induce defences in *Daphnia*. *Nature Chemical Biology*, 14, 1133-1139.
- Weiss LC, Leese F, Laforsch C, Tollrian R. (2015) Dopamine is a key regulator in the signaling pathway underlying predator-induced defences in *Daphnia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20151440.

- Yasumoto K, Nishigami A, Yasumoto M, Kasai F, Okada Y, Kusumi T, Ooi T. (2005) Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46, 4765–4767.
- Zhu X, Wang Z, Sun Y, Gu L, Zhang L, Wang J, Huang Y, Yang Z. (2020) Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 261, 114131.