

アオウキクサ《*Lemna*》を利用した環境モニタリングの基礎研究

——銅とカドミウムの吸収・蓄積——

釘本 完*・那須 裕*
田中 修**・滝本 敦**

Mamoru KUGIMOTO, Yutaka NASU,
Osamu TANAKA and Atsushi TAKIMOTO:

Studies on the accumulation of copper and
cadmium in the plant bodies of *Lemna*.

Abstract

Effect of medium composition, such as EDTA, ammonium ion and initial pH, added to modified Hoagland medium on the accumulation of copper and cadmium in the plant bodies of *Lemna paucicostata* 6746 was investigated. Addition of $30\mu\text{M}$ EDTA to the medium completely suppressed the absorption of copper, whereas cadmium was abundantly absorbed even in the presence of $100\mu\text{M}$ EDTA. Addition of ammonium ion to the medium suppressed copper absorption and not only reversed the growth inhibition caused by copper, but accelerated the frond multiplication. The uptake of cadmium was slightly suppressed by ammonium ion and frond production reduced by cadmium was not greatly improved by an increase of ammonium concentration. Initial pH had no effect on the accumulation of copper, but the absorption of cadmium was increased with a high initial pH.

These results strongly suggests the difference in the absorption mechanism and action mode of copper and cadmium in *Lemna paucicostata* 6746.

緒 言

アオウキクサは、小さな浮漂性の水生植物であるため、実験的に取り扱いが簡単で、光、温度、培養液組成などの環境要因の制御が容易である。また、他の高等植物に比較して、生長速度が著しく大きいため、植物生理学的研究の絶好の実験植物として、世界中で、広く用いられている。

一方、環境科学の分野においても、この植物が生育環境の変化に鋭敏に反応するという特性に着目して、環境モニタリングへの利用が注目されている。筆者らはすでに、重金属イオンなどの水質汚染物質に対して、アオウキクサが速やかに、形態形成や増殖速度の変化で反応することを明らかにし、この植物を水質汚染の指標植物として利用することを検討している。また、この植物が過剰の栄養塩類や重金属イオンなどの水質汚濁物質を積極的に体内に吸収・蓄積する性質を水質浄化に利用し、汚

染物質の除去・回収を実用化する可能性も考慮されている。

今回は、アオウキクサの水質汚染指標植物としての資質を検討し、この植物を廃水からの重金属イオン除去に利用する際の基礎資料とするため、代表的重金属イオンとして、銅イオンとカドミウムイオンを取り上げ、アオウキクサによるこれら両イオンの取り込みとその結果おこる形態形成上の変化や増殖速度が、培養液中の環境要因によって、どのように影響を受けるかを調べ、その原因について考察した。

なお、ここで取り上げた銅イオンは、植物にとっての必須微量元素であるが、ごく低濃度でも過剰になれば毒性を発現させることで知られ、アオウキクサにおいては花芽形成を支配するものとして、植物生理学的に研究されてきていた。この銅イオンによる花芽形成反応を水質の重金属汚染指標に用いることは、環境科学の分野でも興味深いことである。

一方、カドミウムイオンは、イタイイタイ病をひき起こす有毒重金属として広く知られ、その毒性発現機構、

* 信州大学医学部 Fac., Med., Shinshu Univ.

** 京都大学農学部 Fac., Agr., Kyoto Univ.

水質・土壌汚染対策などの検討が進められている。また水中では銅イオンと共存している場合が多く、その相互作用による毒性の変化についても、検討がなされている。

材料・方法

実験用の基本培養液には、Hoagland の培養液をウキクサ用に修正した modified Hoagland medium (M-medium) を使い、1% Sucrose を添加、pH を 4.1 に調整後、50ml 三角フラスコに 25ml の培養液を入れ、1.2 気圧で 10 分間高圧滅菌した。

カリフォルニア原産のアオウキクサ *Lemna paucicostata* 6746 を $1/2$ Hutner's medium に 1% Sucrose を添加した培養液で、25°C、6000 lux の照明下、10 日～12 日間、無菌培養したものから、3 葉状体からなる 1 コロニーを選んで、これらを上記の培養液に植え込み、25°C 約 4000 lux のもとで、一週間、無菌的に培養し、開花率、増殖量などを測定した。

また、体内に吸収された重金属イオンの定量は、次の手順に従った。培養後のアオウキクサを、蒸留水、1% EDTA 溶液 (pH 5.0)、蒸留水の順に 10 分間ずつ攪拌洗滌し、ろ紙で水分を取った後、Wet Weight を測定する。続いて、 HNO_3 を 250 μl 加えて加熱溶解し、 HNO_3 が蒸発後、蒸留水で稀釈し、原子吸光分光光度計 PERKIN・ELMER 4000 により、重金属イオンの濃度を測定した。

結 果

I. 銅イオンの吸収とその増殖阻害及び花芽分化誘導効果

Lemna paucicostata 6746 は、花芽分化に必要な限界暗期が 9 時間の短日性植物であるため、9 時間以上の暗期すなわち 15 時間以下の明期からなる日長条件下では花をつけるが、連続照明のもとでは、何日間培養を続けても花はつけない。しかし、培養液に銅イオンが含まれる場合には、たとえ連続照明下であっても、7 日間で花が咲く。その時の様子を示したものが図 1 である。

培養液中の銅イオン濃度が増加するにつれて、7 日間培養後の 1 三角フラスコ当たりの Wet Weight は減少する。この Wet Weight の減少は葉状体数の減少と対応しており、銅イオンによる増殖阻害が原因であると考えられる (図 1-A)

一方、培養液中に含まれる銅イオン濃度が増加するにつれて、花をつけた葉状体数は増加し、図 1-B の黒丸で示されるように、開花率 (花をつけた葉状体数の全葉状体数に対する百分率) は上昇する。開花率は銅イオン濃度 5 μM で最高に達し、これ以上では栄養生長の阻害が大きいので、低下する。

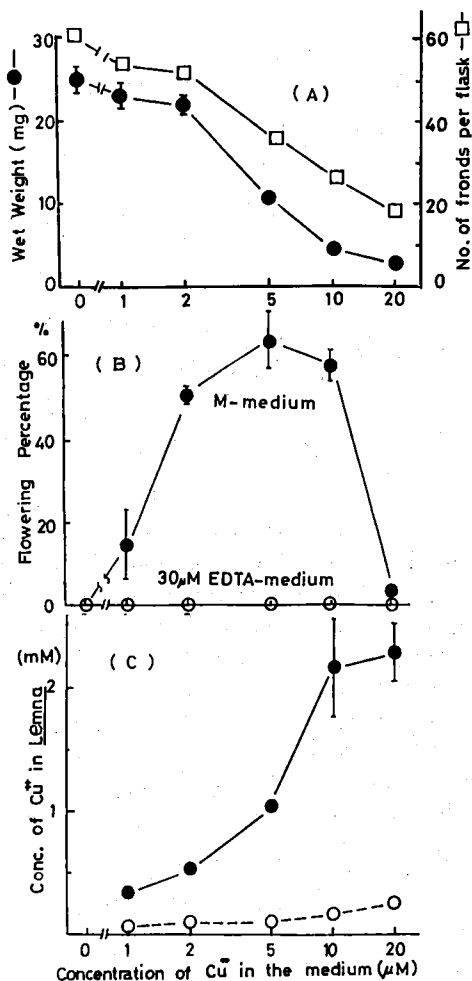


図 1. 銅イオンによるアオウキクサの増殖阻害・花成誘導、及び生体内への吸収

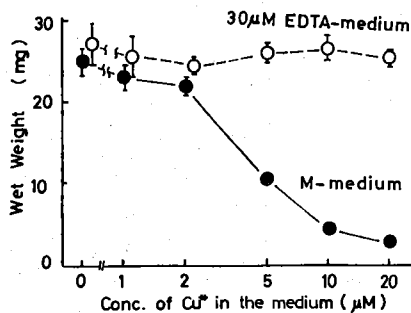


図 2. 銅イオンによる増殖阻害に対する 30 μM EDTA の効果

いろいろの濃度で銅イオンを含む培養液で7日間培養したアオウキクサが、体内に吸収・蓄積した銅イオン濃度は図1-Cの黒丸で示される。生体内銅イオン濃度は葉状体数やWet Weightの減少に逆比例して増加し、体内に吸収・蓄積された銅イオン濃度の増加とともに、銅イオンによる増殖阻害が強くなり、葉状体数やWet Weightが大きく減少するものと推察される。

II. 銅イオンの吸収・蓄積に影響を及ぼす培養液組成

1) キレート剤 EDTA

Modified Hoagland Mediumにキレート剤EDTAを30 μ M加えると培養液中に含まれる銅イオンに起因する増殖阻害や花芽分化反応は完全に消失する(図2, 図1-B・白丸)。培養液中に銅イオンが20 μ Mの高濃度で

含まれていても、それによる増殖阻害はまったく見られず、また、花芽分化は誘導されない。

そこで、体内に吸収・蓄積された銅イオン濃度を定量してみると、図1-C・白丸に示されるように、培養液中にEDTAが共存する場合には20 μ Mの銅イオンが含まれていても、生体内にはほとんど銅イオンは吸収・蓄積されていないことが判る。

これらの結果は、培養液中に共存するEDTAによりアオウキクサによる銅イオンの吸収・蓄積は完全に抑制される事を意味している。

2) アンモニウムイオン NH_4^+

窒素源として硝酸イオンを含むModified Hoagland mediumにアンモニウムイオンを加えると、銅イオンにより誘導される花芽分化は阻害を受け、アンモニウムイオン濃度が400

表1. 銅イオンによる花成誘導・増殖阻害、及び銅イオン取り込みに対するアンモニウムイオンの効果

Concentration of NH_4Cl added (μM)	Flowering percentage	Wet Weight (mg)	Concentration of Cu^{++} in <i>Lemna</i> (μM)
0	57.5 $\pm$ 2.7	11.9 $\pm$ 1.1	877.5 $\pm$ 40.4
100	28.7 $\pm$ 9.5	23.9 $\pm$ 1.8	745.3 $\pm$ 61.2
200	6.9 $\pm$ 3.4	28.6 $\pm$ 2.9	712.6 $\pm$ 40.4
400	0	33.7 $\pm$ 2.0	482.0 $\pm$ 39.8
800	0	36.2 $\pm$ 3.2	470.7 $\pm$ 14.2
2500	0	36.0 $\pm$ 2.4	440.2 $\pm$ 16.8

μM 以上になると、まったく花芽形成反応は見られない。

(表1)

一方、培養液のアンモニウムイオン含有量が增加するにつれて、銅イオンによる増殖阻害が原因で低下していたWet Weightは増加し、アンモニウムイオン濃度が800 μM ~2,500 μM になると、Wet Weightは回復するにとどまらず、むしろ促進される。

表2. 銅イオンによる花成誘導・増殖阻害、及び銅イオン取り込みに対する硝酸イオンの効果

Concentration of NO_3^- in the medium (μM)	Flowering percentage	Wet Weight (mg)	Concentration of Cu^{++} in <i>Lemna</i> (μM)
200	0	10.0 $\pm$ 0.6	852.1 $\pm$ 60.7
2000	3.8 $\pm$ 3.8	10.5 $\pm$ 1.1	886.8 $\pm$ 36.2
10000	21.4 $\pm$ 4.9	10.3 $\pm$ 1.4	993.1 $\pm$ 43.9
25000	54.3 $\pm$ 3.3	10.5 $\pm$ 0.6	1048.4 $\pm$ 33.5

表3. 銅イオンによる花成誘導・増殖阻害、及び銅イオン取り込みに対する培養液初期pHの効果

Initial pH in the medium	Flowering percentage	Wet Weight (mg)	Concentration of Cu^{++} in <i>Lemna</i> (μM)
3.6	52.4 $\pm$ 7.6	16.1 $\pm$ 1.1	715.1 $\pm$ 119.4
4.1	54.2 $\pm$ 3.1	12.8 $\pm$ 1.0	889.9 $\pm$ 85.6
4.6	6.7 $\pm$ 3.9	11.9 $\pm$ 0.6	869.6 $\pm$ 97.9
5.1	0	6.0 $\pm$ 0.4	892.3 $\pm$ 65.1

生体内に吸収・蓄積される銅イオン濃度は、培養液中のアンモニウムイオンの増加とともに、減少する傾向は示すが、アンモニウムイオンが添加されること

による急激な花成反応の消失や、Wet Weight の増加で示される栄養生長の著しい回復・促進を説明できるほど著しい減少は見られない。アンモニウムイオンはアオウキクサによる銅イオンの吸収・蓄積を阻害するが、アンモニウムイオンによる花成反応の抑制や栄養生長の促進が、銅イオンの吸収・蓄積の減少のみに基くものであるとは考えられない。

3) 硝酸イオン NO_3^-

Modified Hoagland medium は 25 mM の硝酸イオンを含んでいるが、硝酸イオン濃度を低下させると、培養液に加えられた銅イオンの花成誘導効果は顕著に弱まり、硝酸イオン濃度 200 μM 以下では花成反応は見られなくなる(表 2)。しかし、このような培養液中の硝酸イオン濃度の低下は 1 フラスコ当りの増殖量を示す Wet Weight にはほとんど影響を与えず、また、銅イオンの取り込み・蓄積にもわずかな影響を与えるにすぎない。それ故、培養液中硝酸イオン濃度の低下に伴う、銅イオンの花成誘導効果の消失は、銅イオンの取り込み、蓄積量の減少によるものではないと思われる。

4). pH

培養液の初期 pH が高くなるにつれて、銅イオンによる花成反応は消失する。体内に蓄積される銅イオン濃度はそれほど pH の影響を受けないので(表 3)、花成反応の消失は、吸収・蓄積される銅イオン濃度とは無関係であろうと思われる。

しかし、pH が高い場合には (pH 5.1), Wet Weight は著しく減少する。一般的に重金属イオンの吸収は pH が高いと促進される傾向にあるので、pH 5.1 の場合、培養初期に銅イオンが強く吸収され、2・3 日後には、体内銅イオン濃度が飽和に達するため栄養生長がそれ以後は阻害されることも考えられる。もしそうであれば、7 日間培養後の Wet Weight が極めて小さいのは当然であり、初期に生長が止ったために花芽も分化しないと考えることが出来る。

そこで、銅イオン濃度の経日変化を調べた(図 3)。結果は予想に反し、7 日目まで体内の銅イオン濃度は、初期 pH が 4.1 の場合も 5.1 の場合も、ほとんど同じであった。

それ故、銅イオンは pH が高い場合、上記以外の未知の機構を通して花成誘導効果を示さなくなるものと推察される。図 4 は、pH 4.1 と 5.1 で 3 日間、5 μM の銅イオンを含む培養液で育てた後、銅イオンを含まない 2 通りの pH (4.3 と 5.1) の培養液に移して育てた場合の花芽分化反応を示している。pH 4.1 で培養されたものは、pH 4.3、5.1 のどちらの培養液に移しても 4 日目以後花芽を形成するので、はじめの 3 日間で花成誘導がなされていたと思われる。一方、pH 5.1 で銅イオンを与えたも

のは pH 4.3 と 5.1 のどちらの培養液に移しても花芽を形成しない。従って培養初期 3 日間の pH が高いと銅イオンは花成誘導効果を示し得ないと考えられる。

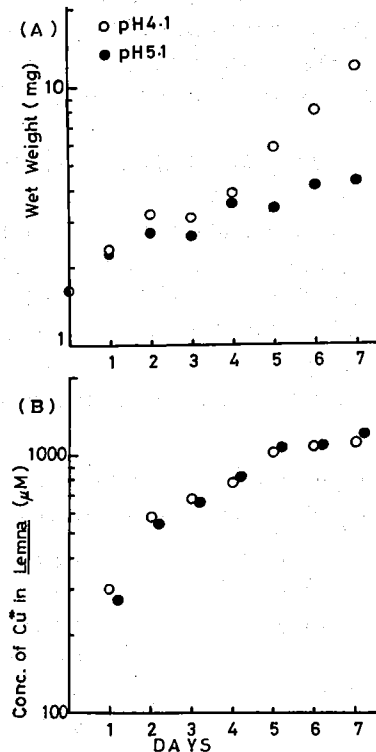


図 3. 5 μM 銅イオン培養液における増殖・銅イオン取り込み経日変化と培養液 pH

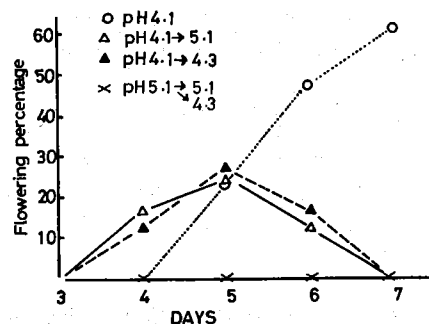


図 4. 5 μM 銅イオンによる花成誘導に対する培養開始 3 日目までの培養液 pH の効果

Ⅲ. カドミウムイオンの吸収・蓄積に影響を及ぼす培養液組成の効果

河川水などの水質汚染指標として或いは廃水から重金属イオンを除去・回収するためにアオウキクサを用いようとする際には、いろいろな環境条件が重金属イオンの

取り込みや、その結果生じる生育・増殖阻害および形態形成に影響を与えることが考えられる。銅イオンによる花芽分化誘導反応に影響を与えるいくつかの要因について、以上のように検討してきたが、これらの要因はアオウキクサのカドミウムイオンに対する反応には、どのように作用するのであろうか。

1). キレート剤 EDTA

いろいろな濃度のカドミウムイオンを含む Modified Hoagland medium で一週間培養されたアオウキクサに見られる増殖阻害の様子は、図5-Aに示されており、培養液中のカドミウムイオン濃度の高まりと共に増殖阻害の程度は大きくなる。しかし、このカドミウムイオンによる増殖阻害は、共存するキレート剤EDTAによって解除されない。銅イオンの場合には、わずか $30\mu\text{M}$ のEDTAが共存することにより、銅イオンの吸収は完全に阻止され、増殖の阻害は消失したが、カドミウムイオンの吸収に対しては、 $30\mu\text{M}$ のEDTAは、ほとんど何の影響も持っていない(図5-B)。

そこで、さらに培養液中のEDTA濃度を高めてみた結果が図6である。EDTAの濃度が $100\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ と高くなるにつれて、 $10\mu\text{M}$ のカドミウムイオンによる増殖阻害が緩和される傾向が見られるが、 $200\mu\text{M}$ 以上のEDTAは、図6-Aの白丸で示されるように、それ

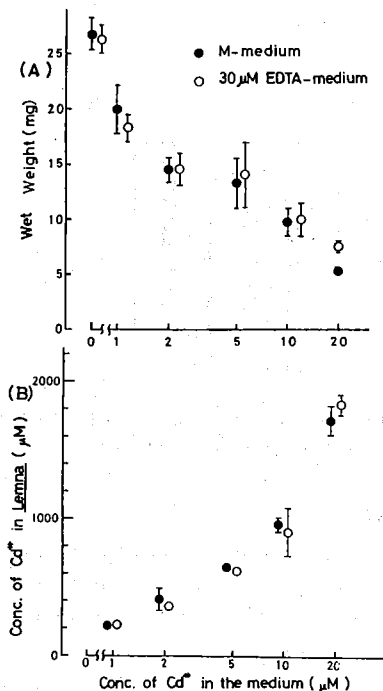


図5. カドミウムイオンによる増殖阻害、生体内吸収に対する $30\mu\text{M}$ EDTA の効果

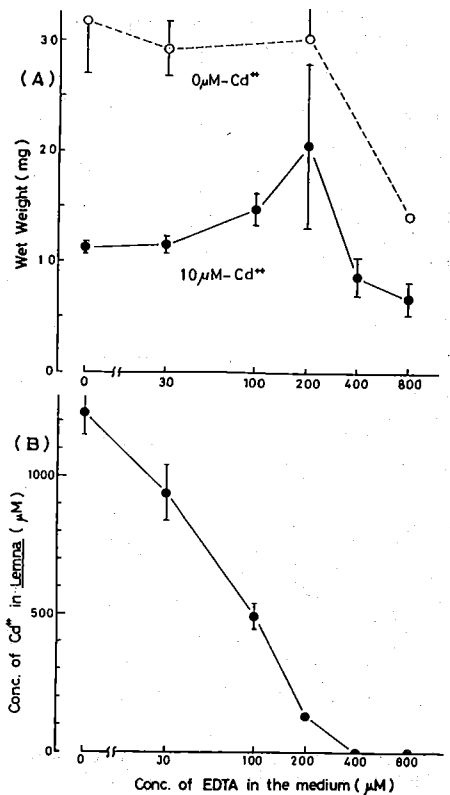


図6. $10\mu\text{M}$ カドミウムによる増殖阻害、生体内吸収に対する各種濃度 EDTA の効果

自身がアオウキクサの増殖に阻害的に働くため、カドミウムイオンによる増殖阻害を完全に除去するEDTA濃度の検索は不可能となる。しかし、 $200\mu\text{M}$ のEDTAによって、かなり、カドミウムイオンの吸収が阻害されていることは明かである(図6-B)。

いろいろな濃度でカドミウムイオンを含む培養液で一週間育てられたアオウキクサの増殖とカドミウムイオンの吸収に対する $200\mu\text{M}$ EDTAの影響を示したのが、図7-A, Bである。銅イオンに対する $30\mu\text{M}$ EDTAの作用(図2-A, C)と比較すると、取り込み濃度については同じ傾向が見られるが、増殖阻害回復の程度がきわめて小さいのが特徴的である。

2). アンモニウムイオン NH_4^+

カドミウムイオンを $10\mu\text{M}$ 含む培養液に、いろいろな濃度のアンモニウムイオンを添加して、アオウキクサを一週間育てた結果得られる増殖量と、アオウキクサ体内のカドミウムイオン濃度を図8に示す。培養液中のアンモニウムイオン濃度が高まるにつれて、体内に取り込まれるカドミウムイオン濃度は低下し、それに起因する増

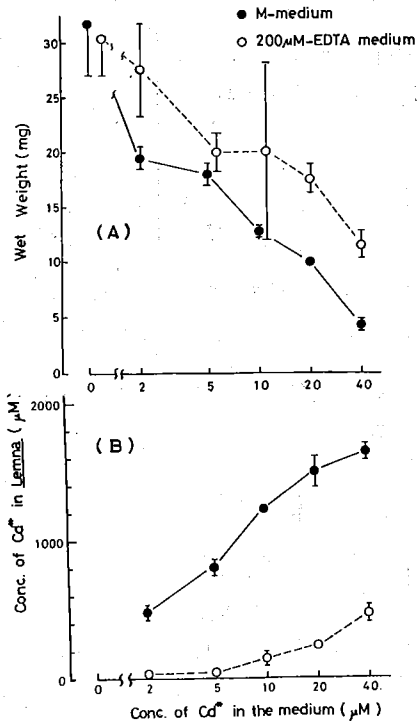


図 7. 各種濃度カドミウムイオンによる増殖阻害、生体内吸収に対する 200 μM-EDTA の効果

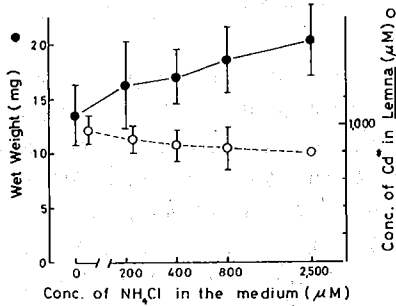


図 8. 10 μM カドミウムイオンによる増殖阻害、生体内吸収に対する各種濃度アンモニウムイオンの効果

殖阻害は回復されている。

しかし、銅イオンの場合と比較してみると(図 9)、取り込みの抑制もわずかであり、その結果生じる増殖阻害の回復もきわめて少ない。銅イオンの増殖阻害を、アンモニウムイオンは完全に回復させ、さらに増殖量を促進した結果を考えると、アオウキクサによるカドミウムイオンの取り込みや、その結果生じる増殖阻害に対してアンモニウムイオンの影響はきわめて弱いものである。

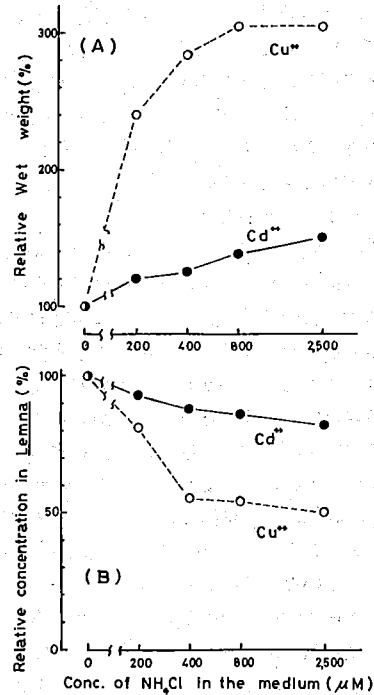


図 9. 銅イオン・カドミウムイオンの作用に対するアンモニウムイオン濃度効果の比較

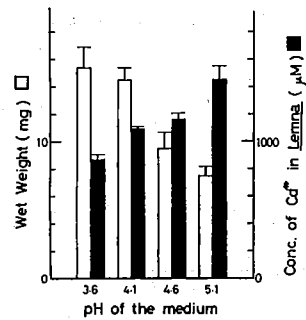


図 10. 10 μM カドミウムイオンによる増殖阻害、生体内吸収に対する培養液初期 pH の効果

3). pH

カドミウムイオン 10 μM を含む培養液で、初期 pH を種々の値に調整してアオウキクサを一週間育てると、初期 pH が高いほど、体内のカドミウムイオン濃度は高く増殖阻害も大きい(図 10)。

これを、銅イオンの場合と比べたものが図 11 である。先に述べたように、初期 pH は銅イオンの取り込みに、ほとんど影響を与えないが、カドミウムの取り込みに

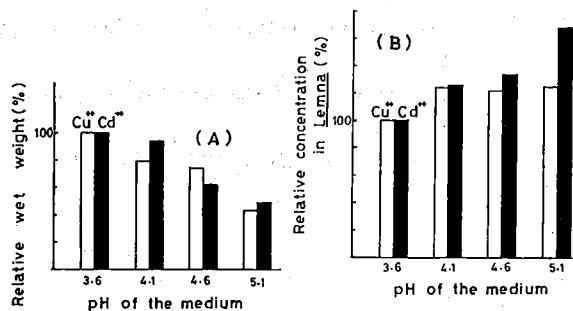


図 11. 銅イオン、カドミウムイオンの作用に対する培養液初期 pH 効果の比較

かなり大きな効果を持っている。初期 pH が高いと、両イオンの場合とも増殖量が低下しており、カドミウムイオンの場合には、この低下は取り込み量の増加によるものと考えられるが、銅イオンの場合には pH の違いによる体内濃度の差はなく、増殖量の低下が取り込み量の増加によるものとは思われない。

考 察

アオウキクサによる銅イオンとカドミウムイオンの取り込み、及びその結果生じる形態形成上の変化や増殖速度に、培養液中のキレート剤 EDTA、アンモニウムイオン、硝酸イオン濃度や、培養液 pH がどのように影響を及ぼすかを調べた。

その結果、わずか 30 μ M のキレート剤 EDTA が、たとえ 20 μ M の銅イオンが培養液に含まれている場合でも、アオウキクサによる銅イオンの吸収を完全に阻害し、花芽分化や増殖速度に対する銅イオンの影響を完全に打ち消すことが示された。しかし、カドミウムの場合には、200 μ M の EDTA を与えても完全にその吸収を阻害することはなく、それ以上の高濃度の EDTA は、カドミウムと関係なく、アオウキクサの増殖を阻害することが示された。キレート剤 EDTA の安定度定数は、銅イオン・カドミウムイオンに対し、それぞれ 18.80, 16.46 であり、両重金属イオンに対するキレート剤の作用の違いは予想されるが、ここで明らかとなったような顕著な違いが安定度定数の違いだけから説明できるものかどうかは疑問である。たとえば、EDTA と水銀イオンの安定度定数は 21.80 であるが、50 μ M の EDTA によって、ほとんど吸収が阻害されないことを示す結果があり、また、安定度定数 25.1 の三価の鉄イオンは、EDTA が共存することにより吸収を促進されるという報告もある。それ故、EDTA の銅イオンとカドミウムイオンに対する反応の違いは、安定度定数の違いによるものではなく、アオウキクサにおけるこれら両イオンの吸収様式や作用

様式がかなり違っていることを反映していると考えられる。

アンモニウムイオンは銅イオンの吸収を顕著に抑制し、銅イオンによる増殖阻害を回復するばかりでなく、増殖を促進するのに対し、カドミウムイオンの吸収に対しては、わずかな抑制を示すにすぎず、カドミウムイオンで抑制された増殖速度に対してもわずかな回復効果を示すにすぎない。これらの結果は、アオウキクサにおける銅イオンとカドミウムイオンの吸収様式や作用様式が、かなり異なることを強く示唆していると思われる。

初期 pH が異なる 5 μ M の銅イオンを含む培養液で、一週間培養されたアオウキクサの銅イオン体内濃度は、ほとんど変わらないにもかかわらず、増殖量には著しい差がでることが明らかとなった。外見上の観察から、高い pH の場合には吸収された銅イオンがクロロフィル分解を促進するものと思われる。すなわち、5 μ M の銅イオンを含む pH 4.1 と 5.1 の培養液で育っているアオウキクサを見ていると 3 日目ぐらいから肉眼的にクロロフィル含量の違いが認められる。しかし図 3 に示されるように、増殖量の違いは 2 日目から現われ始めるため、その原因は 2 日目より以前に始っていなければならない。現在クロロフィル含量の経日変化を定量中である。一方、カドミウムイオンの場合には、pH 4.1 と 5.1 の間に、かなりの取り込み量の違いが見られる。この点においても、銅イオンとカドミウムイオンのアオウキクサにおける吸収様式には違いがあることが示されている。

以上の点から、銅イオンとカドミウムイオンは、同じ 2 価の陽イオンであり、ほぼ同様の濃度でアオウキクサの増殖阻害をもたらすものであるが、その吸収様式や、作用様式はかなり異なることはまちがいないと思われる。今後、これらの吸収様式や作用様式を調べ、その違いの原因を追求してゆくとともに、他の重金属イオンのアオウキクサにおける吸収様式や作用様式に関する知見を得ることも重要である。

また、ここで調べられた、硝酸イオン・アンモニウムイオン・キレート物質などは、通常の汚水・河川水・湖沼水等に、多少の差はあれ、含まれる物質である。そして、ここに示されたように、これらの濃度がアオウキクサによる重金属の取り込みを制御する要因であるならばこの植物を水質汚染指標植物として用いたり、廃水からの重金属イオン除去に利用したりする際には、この事を十分に考慮しなければならない。と同時に、このように多くの要因が容易にアオウキクサの重金属イオンの吸収に影響をもたらす事を考えると、他にもいくつかの要因がこれらと同様に働くことも考えられ、それらを検討してゆくことが今後の課題ともなろう。

参考文献

釘本 完・那須 裕

: アオウキクサ (*Lemna*) を利用した環境モニタリングの基礎研究——水中重金属とアオウキクサの増殖——

昭和54年度特定研究・信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関する研究 (1980)

釘本 完・那須 裕

: アオウキクサ (*Lemna*) を利用した環境モニタリングの基礎研究——アオウキクサによる重金属取り込み——

昭和55年度特定研究・信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関する研究 (1981)

Takimoto, A. and O. Tanaka

: Effects of some SH-inhibitors and EDTA on flowering in *Lemna perpusilla* 6746. *Plant Cell Physiol.* 14: 1133 (1973)

Tanaka, O. and A. Takimoto

: Suppression of long-day flowering by nitrogenous compounds in *Lemna perpusilla* 6746

Plant Cell Physiol. 16: 603 (1975)

Tanaka, O. and A. Takimoto

: Effect of nitrate concentration in the medium on the flowering of *Lemna paucicostata* 6746

Plant Cell Physiol. 19: 701 (1978)

田中 修

: バイオマス資源としてのウキクサ
水草研究会報 No 5: 2 (1981)

田中 修

: ウキクサの開花とサリチル酸
植物と自然 15-9: 16 (1981)

Nasu, Y. and M. Kugimoto

: *Lemna* (Duckweed) as an indicator of Water pollution.

1. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals.

Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10: 159 (1981)

Hillman, W. S.

: Experimental control of flowering in *Lemna*.

I. General methods of medium composition in *L. perpusilla* 6746.

Amer. Jour. Bot. 46: 489 (1959)

Hillman, W. S.

: Experimental control of flowering in *Lemna*.

IV. Inhibition of photoperiodic sensitivity by copper.

Amer. Jour. Bot. 49: 892 (1962)