放射性核種の海洋微生物による摂取

梅 津 武 司·佐 伯 誠 道

GROSS UPTAKE OF RADIONUCLIDES BY MARINE MICRO-ORGANISMS IN BATCH CULTURE*

Takeshi Umezu and Masamichi Saiki**

The sea water contains minute particles situated on diverse trophic levels in suspension. The suspended matters may regard important roles on the cycle of radionuclides in a contaminated marine environment, and also serve as food for filter feeding animals. One object of the study was to investigate an aspect of gross uptake patterns of radionuclides by micro-organisms. In addition, the labeling of food particles with radioisotopes was involved as one phase of a study on the feeding of suspension feeders.

Seven strains of marine bacteria, three species of marine yeasts, four stock cultures of phytoplanktons and one or two crustacean zooplanktons were applied in the states of living and heat killed suspension by batch culture. After exposure of certain hours in the sea water mixed with radioactive materials, aliquot of suspension was filtered with "Millipore" filters or nylon nets (mesh: 129), and radioactivities of the organisms gathered on filters were compared with these of control. Gross uptake patterns were shown in Figs. 2, 3 and 5 for each species on each radionuclide, in the analogical spectrum.

The uptake of \$^{134}\$Cs and \$^{55}\$Fr was hardly recognized from these of control. \$^{90}\$Y, F.P., \$^{106}\$Ru, \$^{60}\$Co, \$^{65}\$Zn and \$^{32}\$P were taken up by some organisms. Generally, \$^{32}\$P was biologically accumulated by living materials, while \$^{65}\$Zn was adsorbed by heat killed one more rapidly than living. \$^{90}\$Y, \$^{106}\$Ru and \$^{55}\$Fe, occurred often as particulate or colloidal states in the sea water, appear to show some affinities for particles whether they are alive or not. It seems that \$^{32}\$P and \$^{65}\$Zn are more suitable for the labeling of micro-organisms as foods.

T は し が き

海洋の水中には、さまざまな懸濁物が含まれ、これらは生態学的に異なった栄養段階に属する多種多様なものからなる。これらの粒状物質は、魚類の初期幼生や二枚貝をはじめとする沪過摂餌生物(filter feeder)の餌として重要な意味を持つといわれている。この種の生物の摂餌機構や餌の選択性を解明するにあたっ

^{*} Studies on suspension feeding-I. 本報告の一部は日本水産学会年会(1964), 第2回国際水質汚濁研究会議(1964)の公式討論において口頭発表した。内海区水産研究所業績第117号.

^{**} 放射線医学総合研究所.

て、懸濁粒子を放射性同位元素で標識して使用すれば、粒子の動きを定量的に測定することが容易になると 考えられる。

他方、放射性降下物や廃棄物が河川や海洋に流入し、放射能汚染が生じた場合には、いろいろの問題がひき起こされる。放射性、非放射性にかかわらず、懸濁物は、液相からさまざまの物質を収着(sorption)する性質を備えているから、微生物により放射性核種の水中での挙動を追跡できるはずである。

このような目的で、以下に述べるいくつかの実験を行なった。

Ⅱ 試料および方法

7株の海洋細菌は ZoBell 2216E 培地で、3種の海洋酵母はポテト・グルコース・寒天培地を用い、いずれも寒天斜面培養を行なった。接種後2週間目に菌体を集め、海水で洗浄し、遠心分離して濃厚な菌体懸濁液を得た。この懸濁液は、使用の約12時間前に、それぞれの菌種について透過率が緑色で当価になるように調整したが、種間では必ずしも厳密には一定にできなかった。第1図に示した透過率曲線は、干渉フィルタ

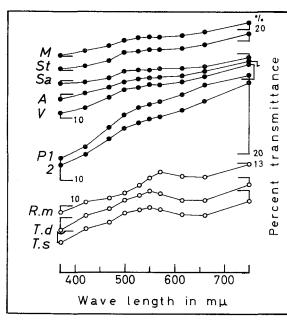


Fig. 1. Transmittance of bacteria and yeasts.

Initial letter shows scientific name as
Table 1.

ーを使用した光電光度計で測定して求め たものである。

緑藻2種と紅藻1種の培養および Artemia salina のふ化には MIQUEL 氏 液添加の天然海水を用い、硅藻の1種の み TA type の人工海水に栄養塩を加え たもの(高野, 1964)で、いずれもフラ スコ中で培養した。微小藻類は、接種後 2週目の増殖期にあるものを用いた。特 に記す場合を除いては、上記の微生物は いずれも室温(10~25°C)で培養を行 なった。微生物の大きさは第1表に示し た。

放射性核種を含む海水で調整した微生物の懸濁液をフィルター*で沪過し、フィルター上の微生物に保持された放射能を対照のそれと比較することにより、微生物による核種摂取の概略(g.oss uptake)を判定するのが実験方法の基本である。薬類については、増殖中の培養液に直接放射性核種を加えて、核種の摂取

を調べた。なお、藻類の培養液については核種を加える前に、そのほかの種については濃厚な懸濁液を沸騰中の熱湯に浸して殺したもの(heat killed)を生きているもの(living)と同様に処理して、核種の生物学的濃縮(biological concentration)の差違を見た。

実験にあたって使用した海水は、すべて MF で沪過したので、この海水中には懸濁物は含まれていないと考えられる。 32 P (H_{8} PO₄)、F. P. (硝酸溶液)を除いて、 134 Cs、 85 Sr、 89 Sr+ 90 Sr— 90 Y、 106 Ru、 55 Fe、 60 Co、 65 Znは、いずれも塩化物の形態であった。MFに保持された結果からみると、F. P.、 90 Y、 106 Ru、 106 Ru 10

^{* &}quot;Millipore" filter の DA, HA, GS タイプ (孔径はそれぞれ 0.65, 0.45, 0.22μ)のいずれでも、微生物の保持では差がみられなかったので、以下では HA タイプ (MF と略記)を用いた。*Artemia* に対してのみ、ナイロン・ネット (XX13, mesh: 129)を用いた。

Table 1. Species of marine micro-organisms used.

Species	Approximate size (µ)		
Micrococcus sp. FHU* 1023-1	0,5-0.8 × 0.5-0.8	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Staphylococcus sp. FHU 1024-1	$0.5-0.8 \times 0.5-0.8$		
Sarcina sp. FHU 1219-1	$1.0-1.5 \times 1.0-1.5$		
Agarbacterium sp. FHU 194-1	1,0-1.3×1.6-4.0	Bacteria Bacteria	
Vibrio sp. FHU 155-2	$0.4-0.8 \times 2.0-3.5$		
Pseudomonas sp. FHU 189-1	0.5-1.0×1.8-4.0		
Pseudomonas sp. FHU 201-1	0.5-1.0 × 1.8-4.0/		
Rhodotorula mucilaginosa (Fres.) Harison, FHU 1215-3	2-5 × 4-7		
Torulojsis dattila (KLUYVER) Lodder, FHU 1036-2	4-5 × 5-8	Yeasts	
Torulopsis spherica (Hammer et Cordes) Lodder FHU 1172-2	3-5×3-5		
Dunaliella sp.	8-10×10-13		
Nannochloris sp.	1-2×1-2	Green algae	
Dytilum brightwellii (West) Grun.	$10-20 \times 20-50$	Diatom	
Porphyridium sp.	$4-8 \times 4-7$	Red alga	
Artemia salina	500-700	Brime shrimp	

^{*} Strain of Faculty of Fisheries, Hokkaido University.

55Feは、海水中で粒子あるいはコロイドとして存在するものの割合が多いように考えられた。55Fe の場合には、懸濁液を遠心分離し、その上澄液と沈澱部分との放射能を比較して、微生物による核種摂取の目安としたが、必ずしも細胞のみをうまく沈澱させることはできなかった。

放射能の絶対測定は 行なわなかったが、海水の 放射能は $1,000~5,000 {\rm cpm/ml}$ であった。放射能の 測定は、 β 線計数 $(F.P., {}^{89}{\rm Sr} + {}^{90}{\rm Sr} - {}^{90}{\rm Y}, {}^{56}{\rm Fe}, {}^{32}{\rm P})$ ではマイカ窓の ${\rm GM}$ 計数管を用い、フィルターを測定皿の中に置いて行ない、 r線放出体 $(F.P., {}^{134}{\rm Cs}, {}^{85}{\rm Sr}, {}^{106}{\rm Ru}, {}^{60}{\rm Co}, {}^{65}{\rm Zn})$ については ${\rm MF}$ あるいはナイロン・ネットをポリエチレン試験管中に入れて、それぞれ濃硫酸あるいは 濃蟻酸の ${\rm 1ml}$ で溶解してウェル型のシンチレーションカウンターで 測定を 行なった。 沪液については、 ${\rm 6}$ 線計数では ${\rm 1ml}$ を沪紙を敷いた測定皿中で蒸発して、 ${\rm 7}$ 線放出体では ${\rm 5}$ ${\rm ml}$ を試験管に入れて 測定に 供した。 計数時間は、前者については、全計数が最低 ${\rm 1}$ 000カウント以上になるようにし、後者では ${\rm 2}$ 分間とした。

■ 結果および考察

酸生物による核種の摂取あるいは濃縮は、大きく分けて次の2つの様式で起こると考えられる。生体の代謝過程に介入して細胞の内部に吸収(absorption)される場合と、おもに物理化学的な作用で細胞表面に吸着(adsorption)される場合である。核種摂取の様相は、生物の種によって異なることはいうまでもないが、海水中における核種の物理化学的な溶存状態および生物の培養条件によって大きく変化する。今回の実験結果を検討するうえでは、核種が海水中では無担体(carrier-free)ではなかったと考えられ、比放射能が一定でないこと、バッチ法による培養である点および薬類、Artemia などは無菌(bacteria-free)でないことを十分考慮に入れておく必要がある。

次に述べる細胞濃度において、放射性海水を入れた三角フラスコから5 ml ずつを経時的に沖別して調べ

た微生物による核種摂取の様相を、24時間後の値について第2、3図に示した。相対目盛は、それぞれの測定値と対照の値を log目盛で表わし、その目盛における両者の差を数段階に分けて示した。すなわち、菌種

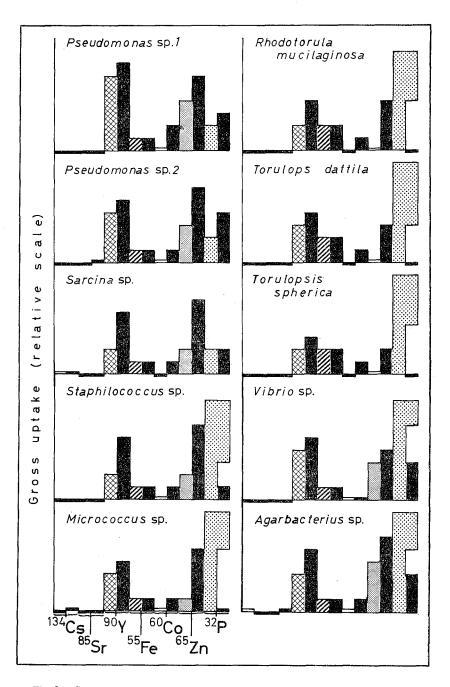


Fig. 2. Spectra of gross uptake by marine bacteria and yeasts. Black columns indicate heat killed, others living.

については 1ml 当たり約 10^6 個,乾物量*にして $0.02\sim0.04$ mg, $Nannochloris:10^8$, $Dunaliella:10^6$, $Porphyridium:10^6$, $Ditylum brightwellii:2×10^3$ 個であった。なお,沪液については, 65 Zn, 32 P を除いては,対照との差はほとんど認められなかった。

134Cs, 85Sr, 89Sr+90Sr-90Y

実験条件下では、 134 Cs、 85 Sr の摂取は認められなかった。したがって、 89 Sr+ 90 Sr- 90 Yからの放射能摂取は 90 Y の寄与によることになる。このことは、同一試料の放射能の減衰を追うことによっても確かめられた。 Dunaliella の腐敗したものとこれを加熱処理したものでは、ともに 90 Yの摂取は 15 分程度の単時間内に平衡に達することが示された。 90 Yの摂取は,生死にかかわらずすべての種で認められ、むしろ死細胞による摂取のほうが生細胞の場合よりいくぶん多い傾向が示された。これらのことから、 90 Yは表面吸着により取り込まれると考えられた。

なお, ¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr の浮遊性藻類による摂

取を認めた報告は数例ある (Boroughs ら (1957), Lackey · Bennett (1963), Williams (1960), Rice (1963) および Rice (1956), Lear · Oppenheimer (1962), Corcoran · Kimball (1963) など)。

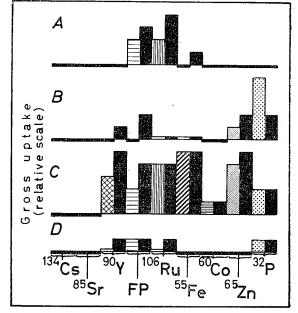


Fig. 3. Spectra of gross uptake by phytoplankton.

Black: heat killed, others: living. A:

Dytilum brightwellii, B: Nannochloris, C:

Dunaliella, D: Porphyridium.

F. P. 106Ru, 55Fe, 60Co

F.P. 中のどの核種が濃縮されるのかは不明であったが、藻類、Artemia によって、F.P. 添加海水中からの放射能摂取が認められた。 106 Ru も、上記の微生物により摂取されるのが認められた。 56 Fe の摂取は遠心分離法による判定が正確さの点で十分ではないが、ほとんどすべての種で摂取がみられた。 60 Co は、全般的に、次に述べる 65 Zn と似た挙動を示した。

65 Zn, 32 P

 65 Zn は細菌の生きたものでは摂取されたが、酵母では摂取は明らかでなかった。今回の実験条件における24時間後の値では、すべての種を通じて、生きているものより加熱処理したものにより多く濃縮される傾向がみられた。 32 Pは、4種の細菌と酵母の生菌では、特に著しく取り込まれるのが認められたが、細菌のPseudomonas、Sarcina の生菌による摂取はきわめて少ない点で、他の細菌と異なるように考えられた。また、Pseudomonas では 90 Yの摂取は、生死にかかわらず、ほかの種より多かった。藻類で 65 Zn、 32 Pの摂取がそれほど多くなかったのは、両元素が栄養塩として多量に培養液に添加されたために、比放射能が低くなっていたためかもしれない。

 ^{65}Zn , ^{32}P の摂取におよぼす温度の影響を 3 , 4 種の細菌,酵母について調べた。三角フラスコ中の ^{50}ml の放射性海水にそれぞれの菌体懸濁液を加え,冷蔵庫中($^{-2}\sim2^{\circ}$ C)および恒温槽中($^{18}\sim22^{\circ}$ C)に保ち,経時的(2 , 4 , 8 , 24 , 26 , 30 時間)に 5 ml ずつを沪別した。 24 時間後には冷蔵庫中のものと恒温槽中のも

^{*} 蒸溜水で2度煮沸してほぼ恒量にしたMFで濃厚な懸濁液を沪過し、乾燥して求めた。

のを相互に入れ換え、また、 65 Zn・生菌・冷蔵庫中の群は24時間後に 50分間かけて、容器のまま 90° Cにまで加熱し、摂取におよぼす加熱の影響を調べた。

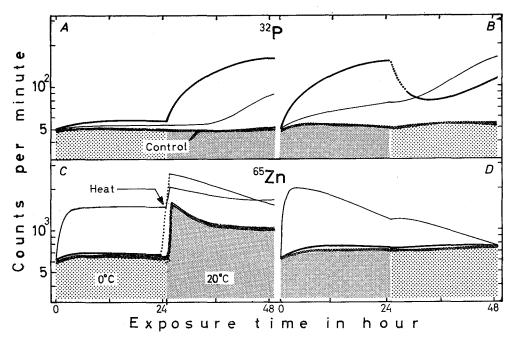


Fig. 4. The uptake curves of **P and **SZn as the functions of time and temperature. Broad line: living, narrow line: heat killed, ** contro 1, ***: 0°, ***: 20° C. A: Micrococcus, B: T. dattila, C: R. mucilaginosa, D: Pseudomonas 1.

結果の中から、二、三の例を第4図に示した。 ^{32}P の摂取は温度が高いほうが多く、徐々に行なわれるようであるが、 ^{65}Zn が死菌に摂取される場合には、0°と 25 °Cとでは差がみられず、 2 時間以内に最大値、すなわち平衡に達した。容器のまま加熱した場合には、まったく懸濃物を含まない対照においても、保持される放射能が増加している(第4図、C)のは、海水中において ^{65}Zn の溶存状態が加熱のために変化したのかもしれない。 ^{65}Zn の死菌による摂取が時間とともに減少を示しているのは、加熱処理された 細胞がなんらかの作用で分解して行き、 ^{65}Zn が細胞から離れ、あるいは溶出して行くことを 示唆しているのかもしれない。

以上のことから、 32 Pの摂取は生物学的な過程により、 65 Zn のそれは物理化学的な吸着により行なわれるのであろうと推察される。

BACKMANN (1963)によると、浮遊性緑薬の Golenkinia の場合においても、生細胞よりも死細胞(formalin killed)による 65 Zn の摂取の多いことが示されている。Chipman ら(1958)は、Nitzschia の細胞中に取り込まれた 65 Zn は大部分は TCA で抽出される部分に存在し、すなわち交替しうる(exchangeable)状態にあると述べている。 65 Zn の摂取機構については、まだよくわかっていないが、死細胞に 標識をほどこすうえで 65 Zn は有用な場合があるかもしれない。

Artemia, そのほか

Artemia は、ふ化後に Dunaliella を投与して数日を経た体長 0.70mm 前後のノープリウス幼生を用いた。一定数の幼生からなる生体群(絶食)、餌料生物と共存する生体群(Dunaliella の108個と共存) および

死体群(加熱処理)の3群と対照群を設けて、それぞれの幼生を放射性海水5ml を入れた 試験管に加え4時間後に沪別し、5ml の海水を注いで洗浄した。その結果については、第5図に示した。Artemia の数は、測定しなかったが、5ml 当たり湿重量で約7mg、乾物量で約0.7mg が含まれていた。

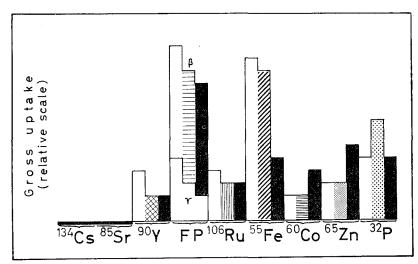


Fig. 5. Spectra on *Artemia*. White columns indicate living orgnisms without *Dunaliella*, black: heat killed, others: living with *Dunaliella*.

さらに,同じ 放射能を含む 海水で、次の実 験を行なった。 三角フラスコに 100ml の上記海 水をそれぞれ入 n Artemia O 乾燥卵を約20 mg ずつ加え, 隔日に 108個 の Dunaliella を投 与し, 5日後に 幼生、卵殻およ び未ふ化の卵な どすべて沪別 し、海水で洗浄 して放射能を測

定した。 β 線計数をした試料は,ただちに,100mlの海水に再懸濁して,30分後に放射能の損失を調べた。 さきの実験結果では,Artemia 幼生は 1^{134} Cs, 85 Sr 以外の核種を摂取するのが認められた。 90 Y, F. P. , 10^{6} Ru, 55 Fe については,餌として Dunaliella を与えなかったほう(絶食群)が,これらの,核種の摂取 はいくぶん多かった。これらの核種は,粒状,コロイド状で存在しやすいもので,餌(Dunaliella)を経なくて直接取り込まれる割合が多いようで,KRUMHOLZ ら(1957)および BERNER ら(1962)の述べているこ

Table 2. Gross uptake of radionuclides by larvae and eggs of *Artemia* salina.

Radionuclide	Control Not washed Washed*		Larvae and eggs Not washed Washed**		Radioactivity of sea water
	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm/ml)
134Cs	264	243	1,900		4,890
85Sr	301	228	419		4,590
*9Sr+90Sr-90Y	101	100	16,600	13,100	1,690
F. P. (γ)	432	658		91,000	4,680
(β)	15.6	17.6	43,500	40,000	4,290
106Ru	289	248	60,900		4,620
60Co	331	242	43,600		4,510
65Zn	411	229	105,400		4,600
32P	16.0	14.1	15,000	11,900	3,990

^{*} Each nylon net filter washed with 5ml of non-active sea water.

^{**} Organisms gathered on filters were resuspended in non-active sea water.

とと一致するようである。すなわち、粒状の放射性物質は二次栄養段階に濃縮される傾向があり、これらをもっとも多く取り込むのは、粘液、繊毛、偽足で摂取する型の生物で、藻類、剛毛のある種、貪欲な摂餌者より、単位重量当たりでは放射能は高いという。 60 Co、 65 Zn は、生体の場合より死体のほうに親和性を示し、 32 P のみ、餌を与えた群のほうが摂取が多かった。

後の実験では、 85 Sr 以外の核種が取り込まれるのが認められた。ただし 184 Cs はほかの 摂種に 比べると 摂取は少ない。幼生、卵などは、海水から直接あるいは Dunaliella を通して、海水の 放射能濃度にはほぼ 比例して核種を濃縮したといえる(第2表)。幼生、卵などの湿重量を約 25 mg として、これが海水 10 ml と 当価の放射能を持っていたので、核種は約 400 倍濃縮されたことになる。

なお、トビムシの1種 Hyale grandicornis の未成体、サヨリの発生中の卵およびサヨリ、マダイの初期 幼生による海水(TA type)からの \$2P の摂取を予備的に調べたところ、マダイ幼生以外のものでは、 32 P の摂取が認められた。マダイ幼生は、ふ化後約 10 日を経て、カキの受精卵を餌として育っていた体長数 10 m の大きさのものを、 34 9 10 1 cpm/ 10 1 の海水中に 10 16時間保った後の結果である。

IV 要 約

以上の結果は、それぞれの生物種について、放射性核種の摂取の一端を示すものにすぎないが、一般的に 次のようなことが推定された。

 52 P は生体にきわめてすみやかに摂取され、生物学的に濃縮される核種である。 65 Zn、 60 Co は、短時間内ではむしろ死体にすみやかに取り込まれ、物理化学的は吸着されると考えられた。 134 Cs、 85 Sr は、今回の実験条件下においては、摂取がほとんど認められなかった。 $^{F.}$ P. 中のあるもの、 90 Y、 106 Ru、 55 Fe などコロイド状あるいは粒子状で存在しやすい核種は、そうでない核種より、生死にかかわらず懸濁微生物に対して親和性を示すようであった。

定量的には示さなかったが、 32 P、 65 Zn を摂取した微生物の標識は、洗浄などに対し短時間内では安定であったから、微生物の物理的トレーサーとして今後の実験に使用できることがわかった。

本研究の大部分は放射線医学総合研究所環境衛生研究部において行なった。同部のかたがたにいろいろの面で援助を受けたことに対して厚くお礼申しあげる。試料を提供していただいた、北海道大学木村喬久氏、水産大学校尾形英二博士、九州大学上田和夫氏、東海区水産研究所高野秀昭博士、京都大学河合章博士、石田祐三郎氏、当研究所小笠原義光博士および助言をいただいた池末弥博士、古川厚博士、永田樹三博士の諸賢に感謝いたします。

文 献

- Bac Mann, R. W. 1963: Zinc-65 in studies of the freshwater zinc cycle. In: Radioecology, Ed. by Schultz and Klement, Reihold Publ. Corp., New York, 485-496.
- Berner, L. Jr., Beiri, R., Goldberg, E. D., Martin, D. & Wisner, R. L. 1962: Field studies of uptake of fission products by marine organisms. Limnol. and Oceanogr., 7, (suppl.), 82-91.
- Boroughs, H., Chipman, W. A. & Rice, T. R. 1957: Laboratory experiments on the uptake, accumulation, and loss of radionuclides by marine organisms. In: The effects of Atomic Radiation on Oceanography and Fisheries, Ed. by Nationl Research Council, Washington, Publ., 551. 80-87.
- CHIPMAN, W. A., RICE, T. R. & PRICE, T. J. 1958: Uptake and accumulation of radioactive zinc by marine plankton, fish, and shellfish. U. S. Fish and Wildlife Serv., Fish. Bull., (135) 58, 279-292.

- CORCORAN, E. F. & KIMBALL, J. F. Jr. 1963: The uptake, accumulation and exchange of strontium-90 by open sea phytoplankton. In: Radioecology, 187-191.
- KRUMHOLZ, L. A., GOLDBERG, E. D. & BOROUGHS. H. 1957: Ecological factors involved in the uptake, accumulation, and loss of radionuclides by aquatic organisms. In: The Effects of Atomic Radiation..., 69-79.
- Kuhl, A. 1962: Inorganic phosphorus uptake and metabolism. In: Physiology and Biochemistry of Algae, Ed. by Lewin, Academic Press, New York and London, 211-229.
- LACKEY, J. B. & BENNETT, C. F. 1963: Micro-organisms in environments contaminated with radioactivity. In: Radioecology, 175-177.
- Lear, D. W. Jr. & Oppenheimer, C. H. Jr. 1962: Biological removal of radioisotopes Sr⁹⁰ and Y⁹⁰ from sea water by marine micro-organisms. Limnol. and Oceanogr., 7 (suppl.) 44-62.
- Rice, T. R. 1953: Phosphorus exchange in marine phytoplankton. U. S. Fish and Wildlife Serv., Fish. Bull., (80) 54, 77-89.

- Takano, H. (高野秀昭) 1964: Diatom culture in artificial sea water-II. Cultures without using soil extract. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., (38) 45-56, 1 pl.
- Williams, L. G. 1960: Uptake of cesium¹³⁷ by cells and detritus of Euglena and Chlorella. Ibid., 5, 301-311.