

II-501

スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) 発芽体を供試生物とした
都市下水処理水の毒性試験法に関する基礎的研究

宮崎大学工学部 学生員○高見 徹

宮崎大学工学部 正会員 鈴木祥広

宮崎大学工学部 正会員 丸山俊朗

1. 背景と目的

公共用水域に放流される排水の生態系への影響を評価するために、排水の生物検定の必要性が高まっている。多様な有害・無害物質を含む都市下水処理水は処理施設の立地的条件から、特に沿岸域の生物群集への影響が危惧されている。この状況の改善には、排水の生物検定によってその影響を明確にし、有害性物質を特定して、保全のための対策を講じなければならない。特に沿岸域の生物の保全を目的として、海産生物を供試生物とした排水等の生物検定法に関する研究は、世界的に極めて少ないが、米国カリフォルニア州が下水処理水の生物検定にジャイアントケルプを用いる方法を確立した。¹⁾しかし、天然の孢子葉から得られる遊走子を用いるために、有害性物質に対する感受性にばらつきの大いことが問題になっている。Maruyama *et al.*(1988)は全生活環を実験室内で再現でき、生物学的にも、特にわが国において社会経済学的にも有用なスサビノリの葉状体を用いた都市下水処理水の一連の生物検定の研究で、主な生育阻害物質が遊離塩素の添加によって生成されるモノクロラミンであることを明らかにした。²⁾

本研究はノリの生活環のなかで葉状体よりも感受性が高く、試験所要期間が短い発芽体を供試生物とした毒性試験法の確立を目標としている。その方法は供試体を安定的に確保でき、感受性が高く、再現性が高く、さらに試験操作が簡易でなければならない。発芽体を供試体にするには、最初に糸状体から殻胞子を放出させ、次いで殻胞子を基材に着生させて発芽開始直前に曝露を開始しなければならない。そこで本研究では、(1)殻胞子の安定的確保の方法、(2)殻胞子の着生基材と着生方法の選定、および(3)(1)(2)で得られた試験方法による都市下水処理水の毒性評価法に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 材料と方法

材料は研究室で培養したスサビノリ *Porphyra yezoensis* Ueda (strain No. U-511)、培地は天然海水ベースの1/20 PES (Provasoli's enriched seawater)³⁾を用いた。目的(1)の方法は、短日高温条件(10hL-14hD, 23°C, 500 lx)で保存培養中の糸状体を殻胞子が放出される短日低温条件(10hL-14hD, 15°C, 8000 lx)に培養条件を変え、曝気培養を行い、放出殻胞子数の経日変化と経時変化を求めた。(2)では試験操作を確実かつ容易にするための殻胞子着生基材として、カバーガラス、ポリスチレン製容器“Cell Wells”[CORNING社製]、親水処理されたポリテトラフルオロエチレン(PTFE)メンブレンフィルター(孔径 5.0 μ m)[Millipore社製]、アルミナメンブレンフィルター(孔径 0.2 μ m)[Nunc社製]について、着生方法として各基材に対して、沈降、加圧ろ過、減圧ろ過等を行った。(3)では未殺菌都市下水2次処理水、紫外線殺菌都市下水2次処理水、5 mg/Lの $\text{NH}_4\text{-N}$ と2 mg $\text{Cl}_2\text{/L}$ の NaClO を添加した塩素殺菌都市下水2次処理水を試水として、静置培養を行い、各処理水添加濃度におけるノリ殻胞子・発芽体の生残率を求め、毒性影響濃度を求めた。

3. 結果と考察

(1) 図 I-1 は 1/20 PES 培地中に放出された殻胞子濃度の経日変化である。殻胞子の放出はフリー糸状体を長日高温条件から短日低温条件にかえてから4~6日後に始まり、以後数週間にわたって放出が続いた。図 I-2 は放出殻胞子濃度の経時変化である。放出の経時変化は点灯3時間後までに1日放出量の約90%に達した。

(2) 殻胞子の基材への着生率は4種類の着生法のうちアルミナメンブレンフィルターを用いた減圧ろ過着生法が最も高く、次いでカバーガラスを用いた沈降着生法、PTFE フィルターを用いた加圧ろ過着生法、

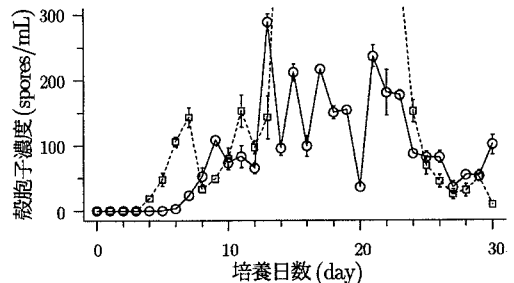


図 I-1 放出殻胞子濃度の経日変化 (n=3)
○— 実験 1, ---□— 実験 2
糸状体湿潤重量: 実験 1 1.813 g, 実験 2 0.846 g
培地: 200 mL 1/20 PES 培地

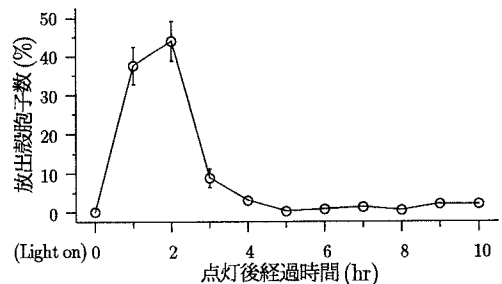


図 I-2 放出殻胞子数の経時変化 (n=3)
10時間の全放出殻胞子数:
1574 spores/mL × 200 mL 1/20 PES 培地

“Cell Wells”を用いた沈降着生法の順となった。図 II-1 にはそれぞれの着生基材と着生方法における殻孢子・発芽体の生残率の経日変化を示した。殻孢子が基材から剥離しない“Cell Wells”を用いた沈降着生法における培養7日後の生残率は97.5%($n=3$, $SD=11.7$, $CV=12.0\%$)であった。カバーガラスを用いた沈降着生法の生残率は83.3%($n=3$, $SD=6.0$, $CV=7.2\%$)となり、5%危険率で両者間に有意差はなかった。PTFEフィルターを用いた加圧ろ過着生法の生残率は67.3%($n=3$, $SD=13.2$, $CV=19.6\%$)となった。一方、アルミナメンブレンフィルターを用いた減圧ろ過着生法の生残率は18.8%($n=3$, $SD=2.3$, $CV=12.2\%$)と他と比較して明らかに低い値となった。アルミナメンブレンフィルターは着生率では最も高いが生残率が最低となった。毒性試験のための殻孢子上着生基材と方法は着生率、生残率、操作性から培地底面に静置したカバーガラスへの沈降着生法が最良の方法と判断された。

以上の結果から得た毒性試験の操作手順を図 II-2 に示した。

(3) 図 III-1 には3種類の2次処理水(凍結)の海水への添加率と殻孢子・発芽体の培養10日後の生残率の関係を示した。図 III-2 には NH_4-N と $NaClO$ を添加した塩素殺菌2次処理水の添加率と生残率の経日変化を示した。図 III-1 から未殺菌2次処理水と紫外線殺菌2次処理水には大きな変化も有意差もなかったが、 NH_4-N と $NaClO$ を添加した塩素殺菌2次処理水は生残率が低下した。培養10日後の50%死細胞率濃度($LC_{50,10-day}$)は、処理水添加率1.7%、つまり、初期有効塩素濃度で0.034 mg Cl_2/L であった。また、図 III-2 から培養3~4日後でほぼ同様の結果を得られることがわかった。

今後、静地培養法から振とう培養法にかえるなどの培養方法の改善によって感受性が高まることが予想される。4)

4. まとめ

(1) 殻孢子の放出は、成熟したフリー糸状体を短日高温条件から短日低温条件に移してから約1週間後に始まる。一度殻孢子の放出が始まると数週間にわたって放出が続く。1日のうちで殻孢子が最も放出される時間は点灯直後から2時間までである。短時間で殻孢子を得るにはライト点灯から3時間までが最適である。

(2) 殻孢子の最適な着生基材と方法はカバーガラスを基材に用いた沈降着生法であった。

(3) スサビノリ発芽体を供試生物とした塩素殺菌2次処理水と紫外線殺菌2次処理水の毒性試験によって、スサビノリ発芽体に対する紫外線殺菌2次処理水の無毒性と塩素殺菌2次処理水の強い毒性が判明した。 $LC_{50,10-day}$ は初期有効塩素濃度で0.034 mg Cl_2/L であった。紫外線殺菌2次処理水では添加率10%までは影響がなかった。

参考文献

- 1) J. W. Hunt, *et al.* : State Water Resources Control Board, (1989).
- 2) T. Maruyama, *et al.* : Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1829-1834, (1988).
- 3) 西澤一俊, 千原光雄 編: 藻類研究法: 共立出版, 東京, (1979).
- 4) 丸山ら: Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 2227-2234, (1987).

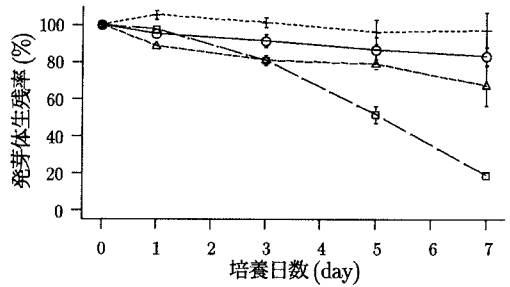


図 II-1 各基材の発芽体生残率の経日変化 ($n=3$)
 ○ Cover glass, + "Cell Wells"
 ▲ PTFE filter, □ Almima filter

殻孢子の基材への着生 (24 hr)

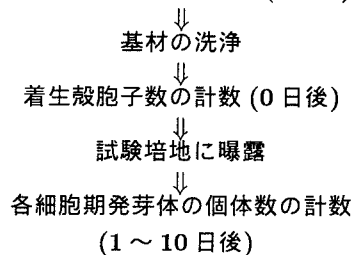


図 II-2 毒性試験の流れ図

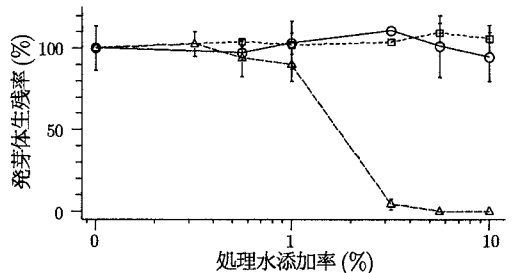


図 III-1 培養10日後の処理水添加率0%を基準とした処理水添加率と殻孢子・発芽体生残率の関係
 ○ 未殺菌2次処理水, + UV殺菌処理水
 ▲ 塩素殺菌処理水

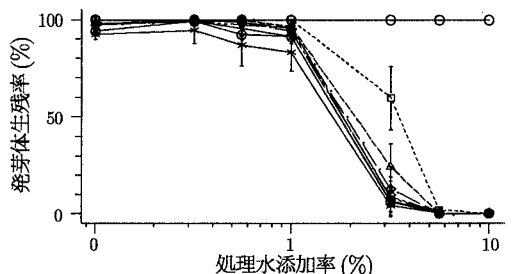


図 III-2 塩素処理水の添加率と殻孢子・発芽体の生残率の関係
 ○ 0, + 1, ▲ 2, ◇ 3, ● 4,
 ▼ 5, × 6, ● 7, * 10-day