

VII-262

モノクロラミンの *Selenastrum capricornutum* の増殖阻害濃度に
及ぼす栄養塩濃度の影響

宮崎大学工学部 学生員 森下玲子
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. はじめに

有害物質の環境への影響を評価する方法として、生物を用いた毒性試験方法がUSEPAやOECDにより提唱されている。その一つである藻類増殖阻害試験を用いて、都市下水処理水の塩素殺菌によって生成するモノクロラミン (NH_2Cl) の毒性評価を行った。その結果、 NH_2Cl の毒性が極めて強いことが明らかとなった¹⁾。しかし、藻類増殖阻害試験結果は、藻類の前培養の方法、培地の組成、あるいは栄養塩濃度の違い、などによって著しく影響を受ける可能性がある。したがって、殺菌下水処理水の藻類に対する毒性を評価する場合、栄養塩濃度の違いが試験結果に及ぼす影響を検討する必要がある。そこで本研究では、USEPAの毒性試験用淡水産植物プランクトンに採用されている緑藻類 *Selenastrum capricornutum* について、有害物質を NH_2Cl として、藻類増殖阻害試験における前培養と暴露培養における栄養塩濃度が増殖阻害濃度に与える影響を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

試験手順はUSEPAの毒性試験方法²⁾に従った。毒性試験の供試藻類は管理が簡単に培養しやすく、すでに NH_2Cl の増殖阻害濃度を明らかにした *S. capricornutum* を使用した。藻類の前培養は栄養状態を均一に保てるように、半連続培養法を用いた。前培養条件は温度を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度を $4,000 \sim 5,000 \text{ lux}$ とし、1日二回手で振盪した。EPAの推奨する標準培地（表1）を栄養塩濃度1/1とした。標準培地の窒素濃度は 4.20 mg/l である。栄養塩濃度1/1に対する希釈率の逆数をそれぞれ栄養塩濃度1/2, 1/10, 1/20とした。栄養塩濃度は4段階とした。栄養塩濃度1/1の場合には、4～5日間に一度の割合で、栄養塩濃度1/2～1/20の場合には約一週間に一度の割合で、培地を半分交換した。この操作を3回以上繰り返した後、暴露試験に使用した。250ml三角フラスコに前培養した *S. capricornutum* を約 10^4 cells/ml になるように接種した培養液100mlを入れ、これに NH_2Cl をそれぞれ所定の曝露濃度になるように添加して試験を開始した。 NH_2Cl の初期曝露濃度は $0 \sim 0.1 \text{ mg Cl}_2/\text{l}$ の間で9段階とした。 NH_2Cl の添加量は1ml以下となるように調整し、添加後の容量変化は1%以下なので無視した。毒性試験はそれぞれの曝露濃度区とも3連で行った。試験期間は96時間、温度と照度および培地の栄養塩濃度は前培養と同様の条件とし、振盪は100rpmとした。細胞数は血球計算盤を用いて24時間ごとに4日間計数した。毒性評価の有意差検定はUSEPAの統計的分析法²⁾に従った。毒性は、各試験の96時間後のLOEC（Lowest observed effective concentration, 最小影響濃度）と EC_{50} （Effective concentration, 50%増殖阻害濃度）によって評価した。

Table 1 Composition of algal assay medium

a. Stock solution

Nutrient stock solution	Compound	Amount dissolved in 500ml distilled water
A	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6.08 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.20 g
	H_3BO_3	92.8 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	208.0 mg
	ZnCl_2	1.64 mg
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79.9 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.714 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.63 mg
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006 mg
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150.0 mg
B	NaNO_3	12.750 g
C	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.350 g
D	K_2HPO_4	0.522 g
E	NaHCO_3	7.50 g

b. Algal assay medium

A-solution	1ml
B-solution	1ml
C-solution	1ml
D-solution	1ml
E-solution	1ml
Distilled water	995ml
pH=7.5 ± 1	

キーワード： 栄養塩濃度, モノクロラミン, 毒性, 藻類増殖阻害試験

〒889-21 宮崎市学園木花台西11 TEL 0985-58-2811 FAX 0985-58-1673

3. 結果と考察

図-1は各栄養塩濃度について、 NH_2Cl 初期曝露濃度と毒性試験96時間後の細胞数(対数値)との関係を示したものである。栄養塩濃度1/1の場合、コントロールと比較して、96時間後の細胞数は、初期曝露濃度 $0.01\text{mg-Cl}_2/\ell$ 以上において5%の危険率で有意な減少が認められた。すなわち、96h-LOECは $0.01\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。栄養塩濃度1/2の場合では、初期曝露濃度 $0.005\text{mg-Cl}_2/\ell$ 以上において、栄養塩濃度1/10と1/20では、ともに $0.003\text{mg-Cl}_2/\ell$ 以上において有意な減少が認められた。すなわち、栄養塩濃度1/1, 1/2, 1/10, 1/20の96h-LOECはそれぞれ、0.01, 0.005, 0.003, $0.003\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。

次に NH_2Cl 濃度と各栄養塩濃度の増殖阻害率の関係を図-2に示す。栄養塩濃度1/1の場合、 NH_2Cl に対する96h-EC₅₀は $0.015\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。栄養塩濃度の低下に伴って96h-EC₅₀の値は低くなったが、栄養塩濃度1/10, 1/20では同じであった。栄養塩濃度が1/1, 1/2, 1/10, 1/20における96h-EC₅₀は、それぞれ $0.015, 0.009, 0.004, 0.004\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。

図-3は栄養塩濃度と96h-LOEC及び、96h-EC₅₀との関係である。栄養塩濃度1/1と比較すると、栄養塩濃度の低下に伴って、96h-LOECと96h-EC₅₀は低くなった。栄養塩濃度1/10以下からは、96h-LOECと96h-EC₅₀は変化しなかった。

実際の自然水の栄養塩濃度はUSEPAの栄養塩濃度よりも低い場合が多い。したがって、 NH_2Cl が自然界に放出された場合の影響濃度は栄養塩濃度1/1に保たれた影響濃度よりも低くなると考えられる。したがって、藻類に対する影響を求めるには対象水域の栄養塩濃度に近い栄養塩濃度の培地で試験する必要がある。

4. まとめ

淡水産植物プランクトン*S. capricornutum*に対する NH_2Cl の毒性は、前培養時と暴露培養時の栄養塩濃度の違いによって影響を受ける。栄養塩濃度1/1, 1/2, 1/10, 1/20の場合の96h-LOECは、0.01, 0.005, 0.003, $0.003\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。また、 NH_2Cl の96h-EC₅₀はそれぞれ0.015, 0.009, 0.004, $0.004\text{mg-Cl}_2/\ell$ であった。

参考文献

- 鈴木祥広, 森下玲子, 丸山俊朗: 淡水産植物プランクトンの増殖阻害試験によるモノクロミンと塩素殺菌下水処理水の毒性評価, 水環境学会誌, Vol.19, No.11, pp.861-870, 1996.
- USEPA (1989): Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Second edition, pp.147-187, NTIS, Cincinnati.

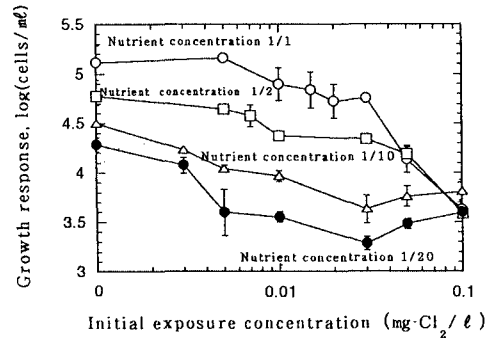


Fig.1 Effect of different exposure concentration of NH_2Cl on algal growth, Plots are log₁₀ transformed cell count data. (96-exposure period, n=3, error bar shows SD)

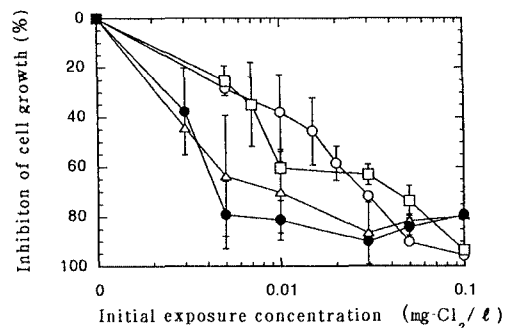


Fig.2 Effect of different exposure concentration of NH_2Cl on algal growth, inhibition of growth. (96h-exposure period, n=3, error bar shows SD)

—○— Nutrient concentration 1/1, —□— Nutrient concentration 1/2,
—△— Nutrient concentration 1/10, —●— Nutrient concentration 1/20.

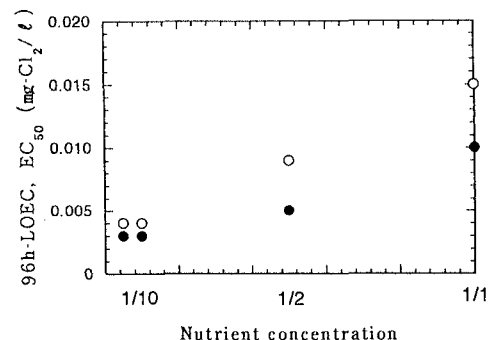


Fig.3 Relationship between nutrient concentration and 96h-LOEC, EC₅₀.
● LOEC, ○ EC₅₀.