

VII-7

藻類酸素発生抑制試験の感度に対するリン、窒素濃度の影響

山梨大学工学部 学生員 竹内 英樹

同上 正会員 金子 栄廣

1. はじめに

藻類を用いたバイオアッセイの一つに藻類生長阻害試験があるが、結果を得るのに数日を要するため、廃棄物等の最終処分場への受け入れ判定などの迅速性が求められるスクリーニング試験としては利用できない。著者らはこれを迅速化する方法として酸素発生抑制試験を検討してきた¹⁾。

一方、この方法は短時間で測定できるために実験時に栄養を多く必要としない利点がある。本研究では藻類に対して制限栄養素となりうるリンと窒素濃度が毒性評価の試験感度に与える影響について、この酸素発生抑制試験を用いて調べることとした。

2. 方法

2. 1 酸素発生抑制試験

本研究では供試藻類として *Selenastrum capricornutum*(NIES-35 株)を、培地には AAP 培地²⁾を基本として、そのリン、窒素の濃度設定を変えた培地を用いた。供試物質には硝酸銅(II)水溶液を用いた。表 1 に AAP 培地の多量栄養素の組成表を示した。

表 1 : AAP 培地組成表(多量栄養素)

化合物	濃度(mg/l)	元素	最終濃度(mg/l)
NaNO ₃	25.5	N	4.20
		Na	11.0
NaHCO ₃	15.0	C	2.14
K ₂ HPO ₄	1.04	K	0.469
		P	0.186
MgSO ₄ ·7H ₂ O	14.7	S	1.91
		Mg	2.90
MgCl ₂	5.70		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.41	Ca	1.20

まず、25℃、3,000lux の白色蛍光灯連続照明下で 10 日間 M11 培地³⁾ で前培養した藻体を洗浄、濃縮した。その後培養液として藻体濃度を乾燥重量濃度にして 15 ~20mgSS/l、供試物質濃度、培地組成のそれぞれを調整し、その培養液を容量を計測済みの共栓試験管に入れ、25℃、4500lux の照明を与えた恒温水槽内で 8 時間本培養を行った。溶存酸素の測定にはウィンクラーアジ化ナトリウム変法を用い、各供試物質濃度のサンプルに対して 0 時間と 8 時間における溶存酸素を測定した。各サンプルには、同じものを 2 本用意した。

このようにして得られた 0 時間と 8 時間の溶存酸素から、単位藻類量あたりの 8 時間での酸素発生量を算定し、横軸に供試物質濃度の対数、縦軸に単位藻類量あたりの 8 時間での酸素発生量をとったグラフを作成すると概念図として図 1 のようなグラフが得られる。この図 1 中の $(\Delta DO/SS)_B$ 、 $(\Delta DO/SS)_i$ 、および $(\Delta DO/SS)_T$ 、はそれぞれ対照区(ブランク)、ある供試物質濃度、および十分高濃度な供試物質濃度での単位藻類量あたりの 8 時間での酸素発生量である。ここで、図 1 からわかるように十分高濃度に毒物を加えても酸素発生量は 0 にはならないため、酸素発生を抑制する毒性評価の指標として次式によって $I(\%)$ に変換し、 $I(\%) = 50$ となる供試物質濃度を求め、これを EC_{50} と定義した。

$$I(\%) = \frac{(\Delta DO/SS)_B - (\Delta DO/SS)_T}{(\Delta DO/SS)_i - (\Delta DO/SS)_T} \times 100$$

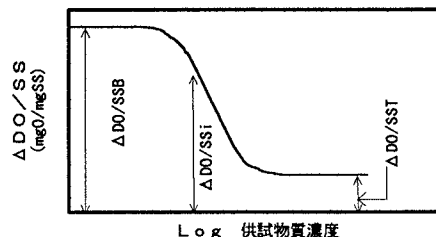


図1: 酸素発生抑制模式図

キーワード：バイオアッセイ、酸素発生抑制試験、リン、窒素

連絡 先：〒400-8511 甲府市武田 4-3-11 TEL 0552-20-8601 FAX 0552-20-8770

本研究では、AAP 培地を用いたときの EC_{50} 相当の 0.1mgCu/l 、十分高濃度な供試物質濃度である 0.5mgCu/l 、およびブランクという 3 段階の供試物質濃度を設定して実験を行い、異なる培地について前式によって $I(\%)$ を求め、感度を比較した。

2.2 リン、窒素の濃度条件

培地中のリン濃度は AAP 培地の $1/2, 1/5$ および $1/100$ 倍に設定した。窒素濃度は同じく、 $1/100$ および $1/200$ 倍に設定した。いずれも AAP 培地中の K_2HPO_4 、または $NaNO_3$ の量を単独で変えることにより調整した。

3. 実験結果

3.1 リン濃度と試験感度

図 2 は、横軸に AAP 培地を基準としたリンの相対濃度、縦軸に $Cu=0.1\text{mgCu/l}$ 添加したときの酸素発生抑制 $I(\%)$ をとり、リン濃度と酸素発生抑制との関係を示したものである。

この図を見ると、リン濃度のみを AAP 培地の $1/100$ ($PO_4-P=0.00186\text{mgP/l}$) まで下げても $I(\%)$ はほぼ 50% となり感度に大きな差がないことが分かる。

3.2 窒素濃度と試験感度

図 3 は、横軸に AAP 培地を基準とした窒素の相対濃度、縦軸に $Cu=0.1\text{mgCu/l}$ 添加したときの酸素発生抑制 $I(\%)$ をとり、窒素濃度と酸素発生抑制との関係を示したものである。

この場合もリンの結果と同様に、窒素濃度を AAP 培地の $1/200$ ($NO_3-N=0.021\text{mgN/l}$) まで下げても感度 $I(\%)$ に大きな差は見られなかった。

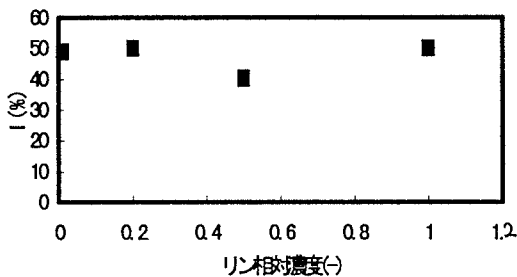


図2：リン濃度と酸素発生抑制の関係

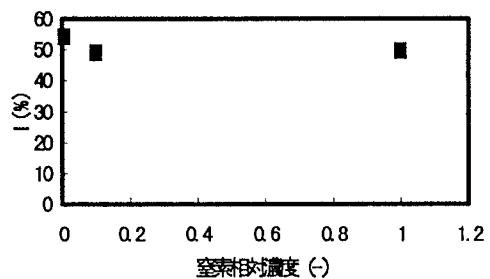


図3：窒素濃度と酸素発生抑制の関係

4. まとめ

本研究では、藻類にとって制限栄養素となりうるリンと窒素に着目し、その濃度を貧栄養と考えられる濃度まで下げたときに毒性評価の感度へ与える影響を検討した。その結果、リンと窒素濃度をそれぞれ 0.00186mgP/l および 0.021mgN/l まで下げても試験感度に影響がないことが分かった。藻類生長阻害試験においては、培地濃度によって毒性試験の感度に影響が出ることが報告されているが⁴⁾、これは藻類の増殖の代わりに酸素発生を指標としたものか、あるいはキレート剤などのリン、窒素以外の培地成分が感度に影響するためと考えられる。

<参考文献>

- 1) 金子他、第 8 回廃棄物学会研究発表会講演論文集Ⅱ、pp.970-972、1997
- 2) APHA-WWWA-WPCF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed. (1989)
- 3) National Institute for Environmental Studies, Environmental Agency, Japan : NIES-Collection List of Strains, 4th ed. (1994)
- 4) 森下玲子他、土木学会第 52 回年次学術講演会講演概要集第 7 部、pp.522-523、1997