

## 流水式培養条件下における海藻（アオサ葉状体）に対する塩素酸塩の生育阻害濃度

大分工業高等専門学校 正会員 高見 徹 正会員○城 愛由美 宮崎大学工学部 正会員 丸山俊朗

### 1. はじめに

塩素酸塩（塩素酸イオン、 $\text{ClO}_3^-$ ）は下水の消毒や紙パルプの漂白の塩素代替剤として用いられる二酸化塩素の主要な分解残留物である。 $\text{ClO}_3^-$ は遊離塩素や二酸化塩素と比較して毒性は極めて弱いものの、残留性が高く、1980年代にはバルト海において製紙工場由来の $\text{ClO}_3^-$ （平均濃度53mg/l）が海藻（褐藻*Fucus vesiculosus*）群落（約12km<sup>2</sup>）に被害を及ぼしたことが報告されている。わが国においても紙パルプの漂白剤として二酸化塩素の使用が増加傾向にあることから、その残留物質である $\text{ClO}_3^-$ の影響を評価する必要があるが、わが国の海藻に対する毒性に関する知見は少ない。一方で、毒性試験の結果を実際の海域に適用する場合には、対象となる海域の環境要因（水温、照度、塩分、栄養塩濃度等）の影響を明らかにする必要がある。そこで本研究では、流水式培養装置を用いて海藻の生育に対する $\text{ClO}_3^-$ の毒性（生育阻害濃度）を明らかにするとともに培養条件が生育阻害濃度に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。なお、本研究では培養条件として栄養塩濃度の影響について検討した。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 流水式培養実験

栄養塩濃度が海藻の生育に及ぼす影響に関する知見を得るため、図1に示す流水式培養装置を用いて次の実験を行った。供試海藻として、わが国の沿岸域に一般に生息する緑藻アオサ（*Ulva* spp.）の葉状体を用いた。アオサ葉状体は大分県番匠川河口干潟に自生していたものを採取した。試験培地として、0.45 μmろ過滅菌海水（塩分約30；0.01mg N/l以下、0.003mg P/l以下）にPES培地の栄養塩類（9.0mg N/l、1.1mg P/l）を0、1/2000、1/200、1/20、1/2倍の濃度になるように添加したもの（それぞれ0PES、1/2000PES、1/200PES、1/20PES、1/2PES培地と称す）を作成した。図1の装置を用いて所定濃度のPES培地を培養器（200mlビーカー）内にペリスタポンプを用いて連続的に流入させた。流量は1.05ml/minとし、培養器内の滞留時間を4.3hrとした。培養器内には直径約1cm（約0.9cm<sup>2</sup>）に切り抜いたアオサ葉状体の葉片を1容器につき5個体ずつ投入し、スターラを用いて葉片が浮遊する程度に攪拌（約720rpm）した。暴露開始から4、7、11、14日後に葉片を取り出し、デジタルカメラで撮影してPC上に取り込み、画像処理解析（NIH Image ver. 1.61を使用）を行って、所定濃度のPES培地におけるアオサ葉状体の面積増加率（＝（所定時間培養後の面積－実験開始時の面積）÷実験開始時の面積）を求めた。また、実験時のアオサ葉状体の生育状態を検討するため、培養開始時と14日後にアオサ葉状体の細胞内のNおよびPの含有量を測定した。

#### 2.2 流水式培養による塩素酸塩の毒性試験

栄養塩濃度が $\text{ClO}_3^-$ の生育阻害濃度に及ぼす影響を明らかにするため、前述の実験で生育速度の大きく異なった1/20PES培地と1/200PES培地において、 $\text{ClO}_3^-$ の毒性試験を行った。試験物質として塩素酸カリウム（ $\text{KClO}_3$ ）を用いた。図1の装置を用いて、所定の $\text{ClO}_3^-$ 添加量（0～100mg/l）となるように調整した1/20または1/200PES培地をアオサ葉状体の入った培養器内に流入させた。培養

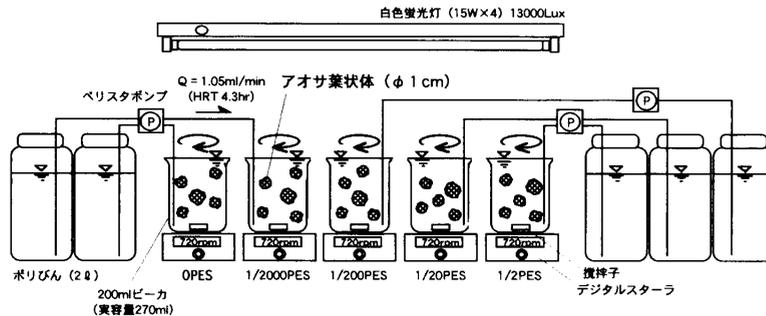


図1 流水式培養装置

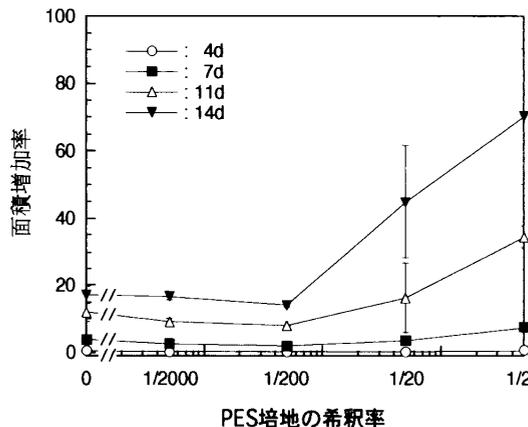


図2 アオサ葉状体の面積増加率に及ぼす栄養塩濃度の影響

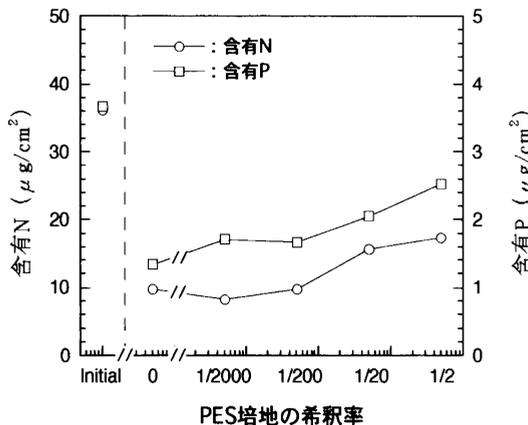


図3 培地中の栄養塩濃度とアオサ葉状体の単位面積当りのNおよびP含有量の関係

キーワード：海藻、塩素酸塩、生育阻害濃度、栄養塩濃度、流水式培養

連絡先（〒870-0152 大分県大分市大字牧1666番地 大分工業高等専門学校土木工学科 TEL: 097-552-7596）

開始から4, 7, 11, 14日後に, 所定の $\text{ClO}_3^-$ 添加量におけるアオサ葉状体の面積増加率を求めた。 $\text{ClO}_3^-$ 添加量と面積増加率の関係から, 生育阻害濃度として, Dunnett-testおよびDoudoroff法に従って最小影響濃度 (LOEC, 有意水準  $\alpha=0.05$ ) および50%影響濃度 ( $\text{EC}_{50}$ ) を求めた。また, 培養開始時と14日後には前述の実験と同様にアオサ葉状体のNおよびPの含有量を測定した。

3. 結果と考察

3.1 栄養塩濃度がアオサ葉状体の面積増加率に及ぼす影響

流水式培養における栄養塩濃度 (PES培地の希釈率として表す) とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図2に示す。アオサ葉状体の面積増加率はすべての希釈率において経時的に増加したものの, 希釈率0 (0PES培地, 栄養塩無添加) から1/200 (1/200PES培地, 0.046mg N/l, 0.006mg P/l) においてはほぼ一定であった。しかし, 希釈率1/20 (1/20PES培地, 0.46mg N/l, 0.06mg P/l) 以上では面積増加率は急激に増加した。図3より, 14日後におけるアオサ葉状体の単位面積当たりのN およびP の含有量は面積増加率と同様に1/200PES以下ではほぼ一定であり, 1/20PES以上において増加したことから, 1/20PES以上の培地ではアオサ葉状体の細胞内へのN・Pの蓄積量が増加することによって生長が促進したことが明らかである。しかし, 14日後のアオサ葉状体のN およびP の含有量は, すべての希釈率において培養開始時と比較して低下した (図3)。本実験における栄養塩濃度は最高濃度の1/2PES培地において4.6mg N/l, 0.6mg P/lであり, 実際の海域よりも非常に高い値であることから, 栄養塩以外の培養条件 (照度, 培地の滞留時間等) がN・Pの取り込みを制限したと考えられる。

3.2 栄養塩濃度が塩素酸塩の生育阻害濃度に及ぼす影響

1/20PES培地 (0.46mg N/l, 0.06mg P/l) における $\text{ClO}_3^-$ 添加量とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図4に示す。 $\text{ClO}_3^-$ 添加量0~1mg/lでは培養日数の経過とともに面積増加率は増加した。しかし, 10mg/l以上では培養開始から11日後において, 面積増加率が0mg/lに対して有意に低下し, 14日後には5個体のうち2個体に色素の脱色や周縁部の流出 (葉状体の死亡) が認められた。この結果,  $\text{ClO}_3^-$ のアオサ葉状体に対する14日後のLOEC (14d-LOEC) は10mg/l,  $\text{EC}_{50}$  (14d- $\text{EC}_{50}$ ) は5.0mg/lが得られた。また, 図5より, 14日後のアオサ葉状体の単位面積当たりのNおよびPの含有量 (死亡しなかった葉片のみを測定) は,  $\text{ClO}_3^-$ 添加量0~1mg/lではほぼ一定であったが, 10mg/l以上では大きく増加していた。このことから, アオサ葉状体は高濃度の $\text{ClO}_3^-$ に暴露された場合でも, 細胞内のN・Pの含有量が多い場合には生き残ることができる ( $\text{ClO}_3^-$ 耐性が高くなる) といえる。一方, 1/200PES培地 (0.046mg N/l, 0.006mg P/l) におけるアオサ葉状体の面積増加率に対する $\text{ClO}_3^-$ の阻害影響は, 1/20PES培地の場合と比較して低い濃度で現れ, 4日後には $\text{ClO}_3^-$ 添加量10mg/lにおいて, 7日後以降は0.1mg/l以上において面積増加率が有意に低下した (図6)。この結果, 1/200PES培地におけるアオサ葉状体に対する $\text{ClO}_3^-$ の14d-LOECと14d- $\text{EC}_{50}$ は0.1mg/lと0.73mg/lが得られ, 1/20PES培地における14d-LOECと14d- $\text{EC}_{50}$ と比較してそれぞれ1/100および1/7に低下することがわかった。

4. おわりに

本研究によって流水式培養におけるアオサ葉状体の生育に対する $\text{ClO}_3^-$ の生育阻害濃度が明らかとなった。また, 生育阻害濃度は栄養塩濃度の低下に従って大きく低下すること, アオサ葉状体はN およびP の含有量が高い場合には $\text{ClO}_3^-$ 耐性が高くなることがわかった。今後は, 照度や培地の滞留時間等の影響について検討する予定である。

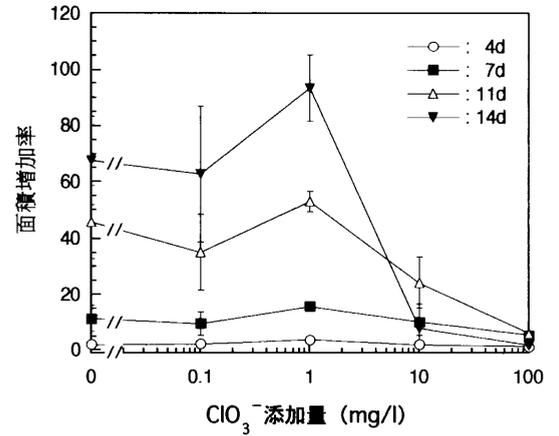


図4 1/20PES培地における $\text{ClO}_3^-$ 添加量とアオサ葉状体の面積増加率の関係

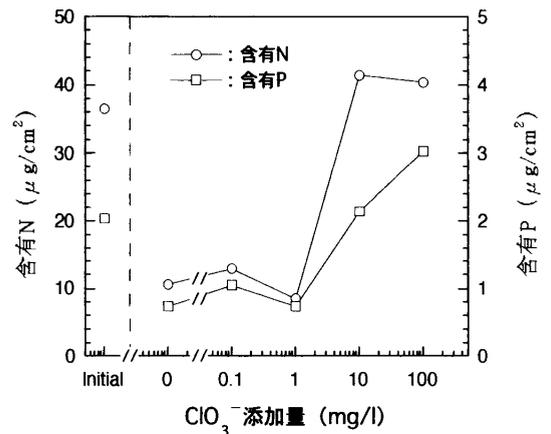


図5 1/20PES培地における $\text{ClO}_3^-$ 添加量とアオサ葉状体の単位面積当たりのNおよびP含有量の関係

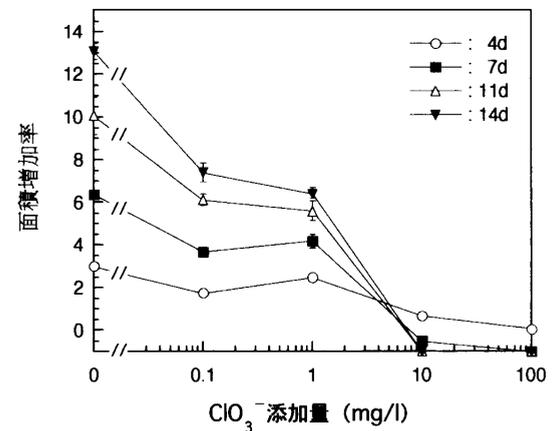


図6 1/200PES培地における $\text{ClO}_3^-$ 添加量とアオサ葉状体の面積増加率の関係