

アオサ葉状体を供試生物とした流水式毒性試験法による塩素酸塩の毒性評価

大分工業高等専門学校 学生会員○城愛由美 正会員 高見徹 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， 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。 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い。また， ClO_3^- は、海藻の硝酸塩還元酵素の酵素活性を阻害するとされ、1980年代にはバルト海において製紙工場由来の ClO_3^- が海藻（*Fucus vesiculosus*）群落（約12km²）に被害を及ぼしたことが報告されている。わが国においても下水の消毒剤や紙パルプの漂白剤として二酸化塩素の使用が検討されていることから、その残留物質である 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。そこで本研究では、わが国の沿岸に一般に生息する海藻であるアオサ（*Ulva* spp.）葉状体に対する ClO_3^- の毒性を明らかにすることを目的として、流水式培養装置（図1）を用いた培養条件（培地の栄養塩濃度および通水量）の検討と、 ClO_3^- の毒性試験を実施したので、ここに報告する。

2. 材料と方法

2.1 栄養塩濃度を変量とした流水式培養実験

栄養塩濃度が海藻の生育に及ぼす影響を明らかにするため、図1の流水式培養装置を用いて次の実験を行った。試験培地として、0.45μmろ過海水（塩分約30，0.01mg N/l以下，0.003mg P/l以下）に標準PES培地の栄養塩類（9.1mg N/l，1.1mg P/l）を0～1/2倍の濃度になるように添加したもの（OPES～1/2PESと称す）を作成し、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（流量1.0ml/min，培養器内の滞留時間約4.5hr）させた。培養器内には直径約1cm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（初期収容密度約0.015% w/v）投入し、スターラを用いて葉片が浮遊する程度に撹拌（約720rpm）した。培養開始から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画像処理解析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－培養開始時の面積）÷培養開始時の面積）を求めた。また、実験前後のアオサ葉状体の健康状態を把握するため、培養開始時と14日後にアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル（Chl-a）の含有量を測定した。

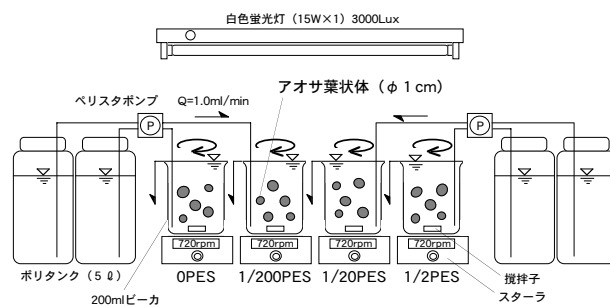


図1 流水式培養装置

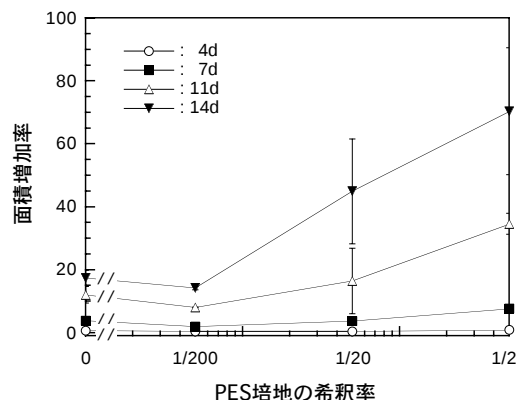


図2 アオサ葉状体の面積増加率に及ぼす培地中の栄養塩濃度の影響

2.2 所定の栄養塩濃度条件下における塩素酸塩の毒性試験

栄養塩濃度が 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1/200PES培地と1/20PES培地において毒性試験を行った。試験物質として塩素酸カリウム（ KClO_3 ）を用いた。図1の装置を用いて所定の ClO_3^- 添加量（0～100mg/l）となるように調整した1/200または1/20PES培地をアオサ葉状体の入った培養器内に流入させ、Dunnett's test（ $\alpha=0.05$ ）に従って、培養開始から14日後におけるアオサ葉状体の面積増加率に対する ClO_3^- の最小影響濃度（14d-LOEC）を求めた。

2.3 培地流量を変量とした流水式培養実験および毒性試験

試験培地の流量がアオサ葉状体の生育に及ぼす影響を明らかにするため、図1の装置において、それぞれの培養器に流入する培地（ろ過海水を使用）の流量を0および0.4～4ml/min（培養器内の滞留時間24および11.3～1.1hr）に調整して14日間の培養を行い、前述の実験と同様にアオサ葉状体の面積増加率と窒素およびChl-a含有量の

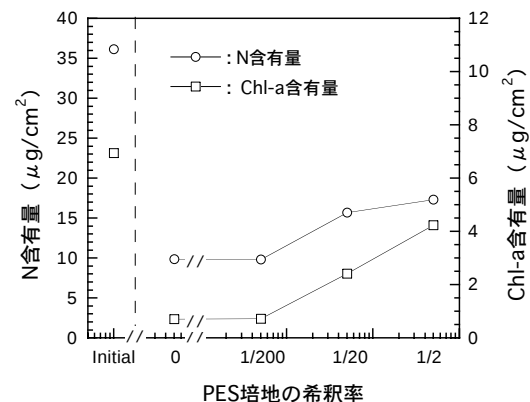


図3 培地中の栄養塩濃度とアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル含有量の関係

キーワード：アオサ，塩素酸塩，最小影響濃度，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）

変化を測定した。また、培地流量が有害物質の生育阻害濃度に及ぼす影響を検討するため、 ClO_3^- 添加量0.1mg/lのろ過海水を所定の流量条件下で通水し、アオサ葉状体を14日間培養した。

3. 結果と考察

3.1 栄養塩濃度がアオサ葉状体の生育に及ぼす影響

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、希釈率0（0PES培地）および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が、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上昇した。また、14日後におけるアオサ葉状体の単位面積当たりの窒素およびChl-aの含有量（図3）は、面積増加率と同様な傾向を示し、1/20PES以上において増加した。しかし、14日後の窒素およびChl-a含有量は、最も値の高かった1/2PES培地（4.6mg N/l, 0.6mg P/l）においても、培養開始時の約1/2程度の低い値となり、本実験条件においてアオサ葉状体を健康に生育させるためには、1/2PES以上の栄養塩を添加しなければならないことがわかった。

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

1/200PES培地および1/20PES培地における培養開始から14日後の 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。1/200PES培地におけるアオサ葉状体の面積増加率は、 ClO_3^- 添加量0.1mg/l以上においてコントロール（ ClO_3^- 添加量0mg/l）に対して有意に低下し、14d-LOECは0.1mg/lが得られた。これに対して、1/20PES培地における14d-LOECは10mg/lが得られ、栄養塩濃度の上昇に伴って14d-LOECが100倍に増加することがわかった。以上の結果から、本実験条件において、培地に栄養塩類を添加することは、 ClO_3^- に対するアオサ葉状体の感受性を著しく低下させることが明らかになった。

3.3 流量がアオサ葉状体の生育と有害物質の毒性に及ぼす影響

培地（ろ過海水）の流量とアオサ葉状体の面積増加率の関係を図5に示す。アオサ葉状体の面積増加率は、流量0～1ml/minまでは急激に上昇したが、2ml/min（滞留時間2.3hr）以上ではほぼ一定であった。しかし、アオサ葉状体の単位面積当たりの窒素およびChl-a含有量は流量の増加に伴って増加し、流量4ml/min（滞留時間1.1hr）での窒素含有量は初期値の82%の高い値を示した。このことから、培地に栄養塩類を添加しない場合でも、培地の流量を大きく（すなわち、培養器内の滞留時間を短く）すればアオサ葉状体を健康に生育させることができることがわかった。また、栄養塩無添加の培地に ClO_3^- を0.1mg/l添加し、所定の流量で培養した場合の14日後のアオサ葉状体の面積増加率を図7に示す。流量0ml/min（滞留時間24hr）では、 ClO_3^- を添加した場合の面積増加率は ClO_3^- を添加しない場合の約1/7であったが、流量4ml/min（滞留時間1.1hr）においては約1/30以下にまで低下することがわかった。この結果、流量の増加はアオサ葉状体を健康に生育させると共に ClO_3^- による生育阻害影響を鋭敏に発現させることが明らかになった。

4. まとめ

以上の結果から、アオサ葉状体を供試生物とした流水式培養による毒性試験においては、培地への栄養塩類の添加を必要とせず、培地の流量を増加させることで葉状体を健康に生育させることが明らかになった。また、 ClO_3^- のアオサ葉状体の生育に対する14d-LOECは $\leq 0.1\text{mg/l}$ であることが明らかになった。

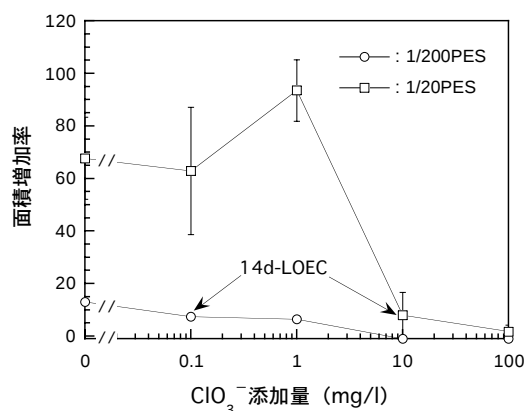


図4 栄養塩濃度の違いによる14d-LOECの比較

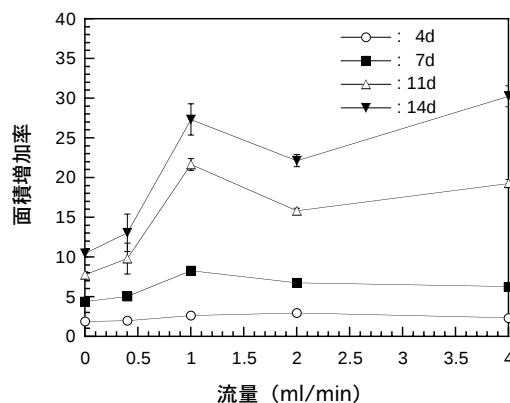


図5 流量とアオサ葉状体の面積増加率の関係

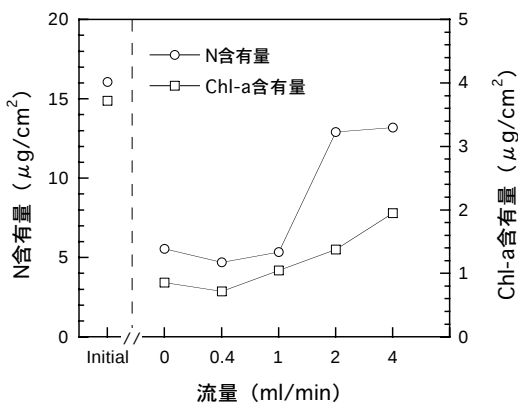


図6 所定の流量におけるアオサ葉状体の窒素およびクロロフィル含有量

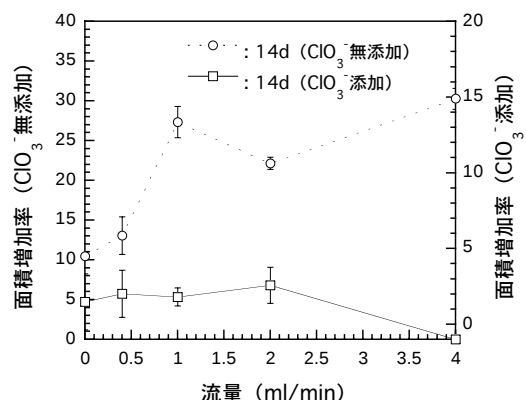


図7 所定の流量条件下での ClO_3^- 添加によるアオサ葉状体の面積増加率の低下