

(24) 富山県内の産業排水の生態毒性評価

Ecotoxicological Assessment of industrial effluents in Toyama Prefecture

楠井隆史*、Christian BLAISE**、佐藤美和子***、清水宏裕****、田嶋美樹*****、筒井孝次*****

Takashi KUSUI, Christian BLAISE, Miwako SATOH, Atsuhiko SHIMIZU, Miki TAJIMA and Kohji TSUTSUI

ABSTRACT ; The ecotoxicological potential of 18 industrial effluents and 2 sewage effluents in Toyama Prefecture was assessed by using 5 small-scale bioassays (Microtox test, *Daphnia magna* immobilization test, freshwater crustacean immobilization test ThmnotokitF, *Hydra attenuata* acute test and *Selenastrum capricornutum* growth inhibition test). Algal assay and hydra acute sublethal assay had the most sensitive detection capacity and showed positive results out of 80% and 60% effluents tested, respectively. The comparison of 6 metal bioassay results and measured concentrations in effluents suggested the significant contribution of two metals (Zn^{2+} , Cu^{2+}) to the toxicity of effluent from surface processing factory. This suggestion was supported by the results of detoxification experiments with chelating agent. Other factors contributing effluent toxicity were found to be pH and volatile matters. By integrating the results of 5 bioassay in each effluents, the relative ecotoxicological potencies were compared. Finally, the comparison of toxic loading (potency \times flow) showed the relatively high contributions from several large dischargers to the aquatic environment.

KEYWORDS ; ecotoxicological assessment, bioassay, industrial effluent, toxicity, heavy metal.

1. はじめに

科学技術の進展に伴い様々な化学物質が開発・使用され、意図的・非意図的に様々な経路を経て、水環境に流入するようになってきている。有害性の明確な既知物質については排水基準等が設定され、その使用・放出が制御されている。しかし、水界生態系保全という観点からは、こうした規制が不十分である事が指摘されており¹⁾、未規制有害物質や物質間の相互作用の影響も懸念される。物理化学的分析手法に対して、生物を用いる生物検定法(バイオアッセイ)は、生物個体又は生物機能(細胞、酵素等)を用いて試料の生物影響を直接測定する方法であり、未規制有害物質の生態影響を測定し制御するための情報を提供できる利点がある。しかし、生物間の感受性の相違のため、生態影響を評価するためには複数のバイオアッセイを組み合わせる事が推奨されている²⁾。筆者らは、こうした手法を用いて、下水処理水³⁾、バルキング抑制剤⁴⁾の環境影響評価を実施してきた。本研究では、産業排水の生態影響評価を行う事を目的に、比較的小規模な5種類

* 富山県立大学短期大学部 (College of Technology, Toyama Prefectural University)

** カナダ環境省セントローレンスセンター(St. Lawrence Center, Environment Canada)

*** 山形県遊佐町役場 (Town Office of Yusa-Machi, Yamagata Prefecture)

**** 共栄製薬 (Kyohei Seiyaku)

***** 建設省北陸地方建設局 (Hokuriku Regional Construction Bureau, Ministry of Construction)

***** 中央設計技術研究所 (Chou Sekkei Engineering Co., Ltd.)

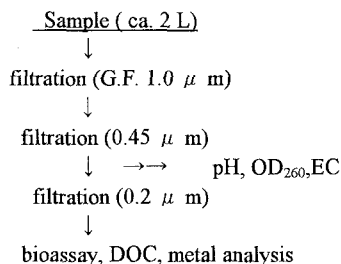


Fig. 1 Sample preparation

DOC: dissolved organic carbon
EC: electric conductivity

2. 実験方法

2.1 調査対象および採水方法

調査対象としては富山県内で比較的排水量の多い18社及び2下水道終末処理場を選定し (Table 1)、1995年10月23日~12月18日に採水を行った。処理水中の残留塩素は強い急性毒性を与えるため³⁾、今回の調査では、残留塩素以外の影響を主目的として、塩素処理を行っている施設ではその前の地点で試料を採取した。検水は、必要な前処理 (ろ過) を行い、速やかに分析に供した (Fig. 1)。バイオアッセイには、ろ過滅菌後 (0.2 μ m)、滅菌した硝子瓶 (滅菌済) に入れて冷蔵保存した試料を用いた。重金属分析は、試料を硝酸分解後、原子吸光分析 (フレイムレス、日立 8200型) を行った。

2.2 バイオアッセイ

本研究では、細菌1種、甲殻類2種、刺胞動物1種、単細胞緑藻1種を用いた比較的簡易な小規模バイオアッセイを用いた。具体的には、海洋性発光細菌発光阻害試験 (Microtox、以下、マイクロトックス試験)⁶⁾ ミジンコ遊泳阻害試験⁷⁾、淡水性甲殻類遊泳阻害試験 (ThmnotoxkitF)⁹⁾、ヒドラ急性毒性試験 (*Hydra attenuata*)¹⁰⁾、藻類生長阻害試験 (*Selenastrum capricornutum*)¹²⁾ の5種類のバイオアッセイを用いた (Table 2)。Microtox試験は、凍結乾燥菌体を用いる、迅速性、経済性、操作性に優れた有害性スクリーニング試験であり、魚類急性毒性試験の結果との相関性が報告されている。ミジンコ遊泳阻害試験は、一次生産者より高次の生物を結ぶ食物連鎖の中間に位置し、化学物質に対する感受性の高いミジンコを用いた試験であり、化学物質や

Table 1. Characteristics of dischargers

Effluent No.	Process	Treatment ^a	Flow rate m ³ /day
1	pulp & paper	2 ^Y +PC	100,000
2	chemical production	2 ^Y	24,000
3	pharmaceuticals	2 ^Y	16,000
4	surface processing	PC	850
5	pharmaceuticals	2 ^Y	1,200 ^b
6	recycled paper	2 ^Y	17,000
7	metal processing	PC	3,000
8	meat processing	2 ^Y	600
9	sewage treatment	2 ^Y	49,600
10	textile	PC	700
11	recycled pulp	PC	7,000
12	chemical production	PC	24,000
13	aluminum	PC	22,830
14	semiconductor	2 ^Y +PC	5,000
15	chemicals production	2 ^Y	2,400 ^b
16	aluminum	PC	1,000
17	recycled paper	PC	10,000
18	refinery	PC	1,600
19	laundry	2 ^Y	200
20	sewage treatment	2 ^Y	40,000

a) 2^Y: effluent with both primary and secondary (biological) treatment.

PC: effluent with physico-chemical treatment including neutralization, flocculation, sand filtration and activated carbon.

b) Samples were collected from effluent of activated sludge process. These effluents were diluted with used cooling water before discharge,

and the flow rates of final effluent were about 5,000~6,000m³/day (#5) and 26,400 m³/day (#15).

Table 2. Description of Bioassays

Test Organism	Observation	Exposure time	Endpoint
Bacteria <i>Photobacterium phosphoreum</i>	light inhibition	5, 15, 30 min	EC ₅₀
Crustacean <i>Daphnia magna</i>	motility inhibition	24, 48 h	EC ₅₀ , LC ₅₀
Crustacean <i>Streptocephalus platyurus</i>	motility inhibition	24 h	EC ₅₀
Cnidarian <i>Hydra attenuata</i>	morphological change	24-96 h	EC ₅₀ , LC ₅₀
Algae <i>Selenastrum capricornutum</i>	growth inhibition	72 h	IC ₅₀

EC₅₀: concentration resulting in 50% of organisms affected.

LC₅₀: concentration resulting in 50% of lethality

IC₅₀: concentration resulting in 50% of growth inhibition

排水の毒性を検討する試験方法として世界中で利用されている。淡水性甲殻類遊泳阻害試験は、同じく甲殻類を用いた試験であるが、耐久卵（シスト）から孵化させた幼生を用いて試験の簡易化を図った市販キットである。ヒドラ急性毒性試験は、催奇形性試験として開発された系の一部であり、操作の簡易さ、培養の容易さ、ヒドラの頑強性（取り扱い易さ）、小規模で安価などの利点がある。具体的には、*H. attenuata* は有害物質の影響を受けると、膨張（C）、短い（S）、チューリップ状（T）、分解（D）の4段階の方向に進行していく（Fig. 2）。C、Sの状態では回復することも見られるが、T以上の兆しが見られたときは回復することはない。C、Sは垂致死、T、Dは致死として判定した。藻類生長阻害試験は水界生態系の第一次生産者である藻類を選び、その生長にたいする有害物質の影響を測定する事を目的としている。食物連鎖の底辺を形成している藻類への影響は食物連鎖全体への影響となるため重要な試験である。以上の5種のうち、淡水性甲殻類遊泳阻害試験、ヒドラ急性毒性試験、藻類生長阻害試験の3種はマイクロプレート上で実施できる小規模な系である。

各バイオアッセイの排水試験の結果は、EC₅₀（半数影響濃度、v/v %）、LC₅₀（半数致死濃度、v/v %）または IC₅₀（50%阻害濃度、v/v%）として表示した。更に、相互比較に当たっては、毒性の強さが数値と比例する指標、毒性単位（Toxicity Unit、TU）に変換して用いた。

$$TU = \frac{100}{EC_{50}} \text{ or } \frac{100}{LC_{50}} \text{ or } \frac{100}{IC_{50}}$$

3. 結果及び考察

3.1 各バイオアッセイの結果

(1) マイクロトックス試験

20 試料中の 14 試料(70%)において阻害効果(45%濃度時)が認められた (Fig. 3-a)。このうち、濃度-反応関係が認められて EC₅₀ を算出することが出来たのは、11 試料(55%)であった。特に、急性毒性が強い試料では、10.2%(#7)、14.4%(#10)、5.9%(#12)の 15min- EC₅₀ を得た。本研究では、15 分後の EC₅₀ を代表値として用いているが、これらの試料（特に、#7,#12）においては経時的に毒性（毒性単位）が強まる傾向が認められた(Fig. 3-b)。

(2) ミジンコ遊泳阻害試験(*Daphnia magna*)

半数の試料(50%)において遊泳阻害(100%濃度時)が認められた(Fig. 4-a)。しかし、48h-EC₅₀ を算出することが出来たのは 6 試料(30%)で、4.10~64.4%であった(Fig. 4-b)。(24h-EC₅₀/48h-EC₅₀)の比率は、一試料を除くと(#7: 1.78)、0.91~1.36 と経時的な変動は少ない。致死を指標として求めた LC₅₀ と EC₅₀ は、pH の影響が大きいと考えられる一試料を除きほぼ同じであった（LC₅₀/EC₅₀=0.81~1.05）。

(3) 淡水性甲殻類遊泳阻害試験(ThmnotoxkitF)

最高濃度(100%)において 55%(11/20)の試料において影響が認められた(Fig. 5-a)。その内、24h-EC₅₀ の算出できた試料は 30%(6 試料)で、37.5~86.4%の値を得た(Fig. 5-b)。

(4) ヒドラ急性毒性試験

ヒドラ急性毒性試験の場合は、一試料について、24 時間ごとの LC₅₀ と EC₅₀ を 4 組み得ることが出来る

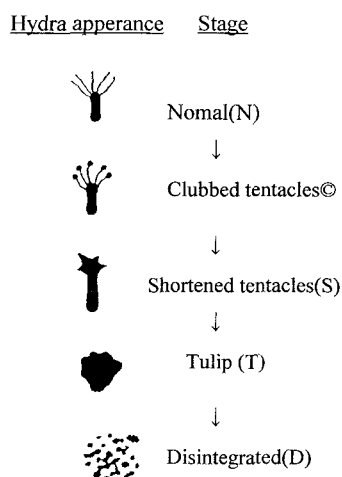


Fig.2 Time-related morphological change in *Hydra* exposed to a toxic event¹⁰⁾

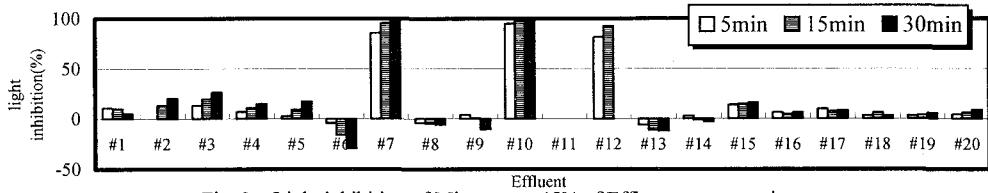


Fig. 3-a Light inhibition of Microtox at 45% of Effluent concentration

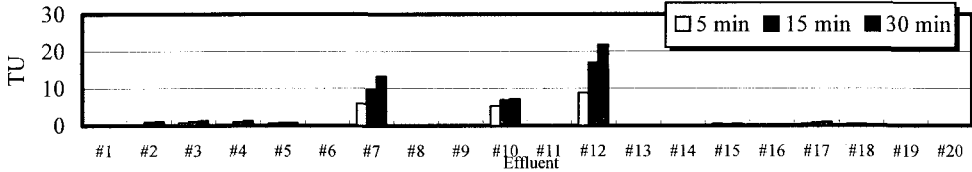


Fig. 3-b. TU of Microtox

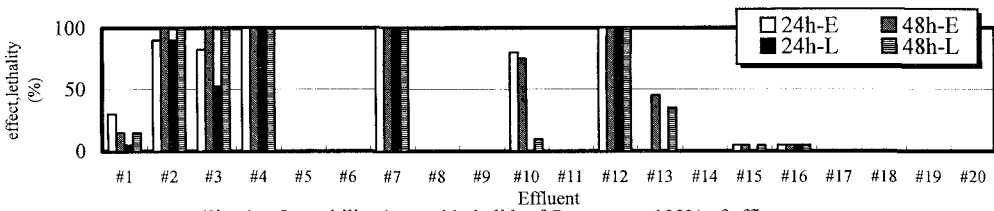


Fig. 4-a. Immobilization and lethality of *D. magna* at 100% of effluent

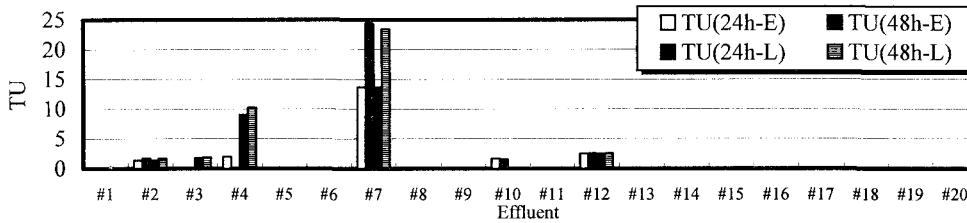


Fig. 4-b TU of daphnia assay

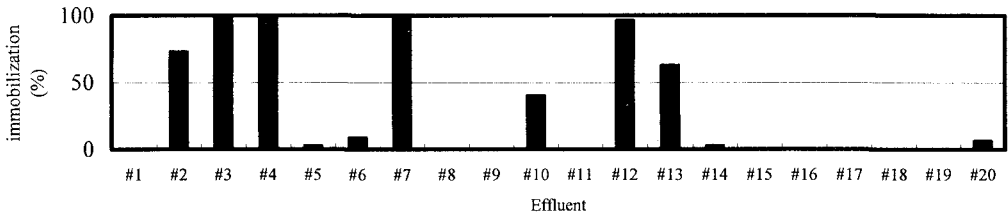


Fig. 5-a. Immobilization of Thamnotoxkit at 100% of effluent

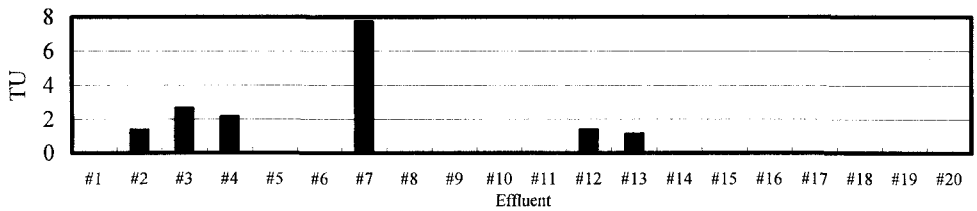


Fig. 5-b. TU of Thamnotoxkit

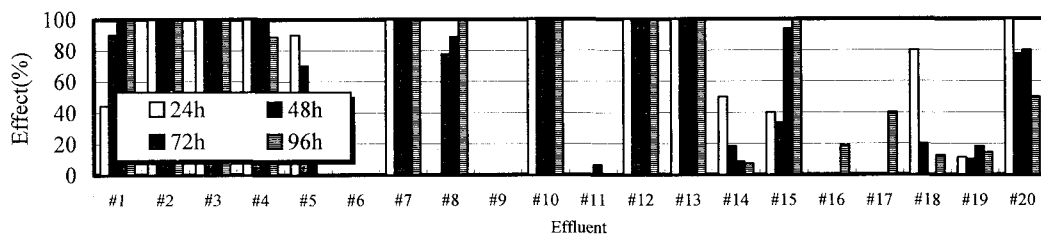


Fig. 6-a. Sublethal effect in hydra assay at 100% concentration

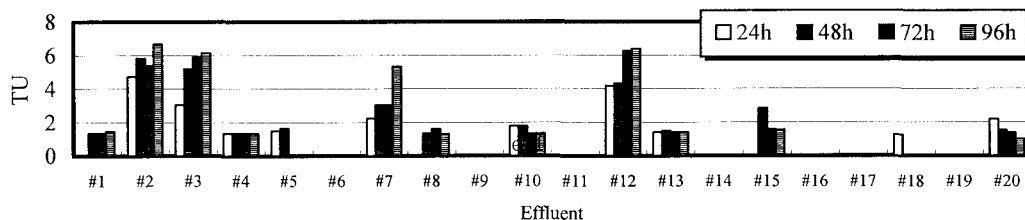


Fig. 6-b. TU of hydra assay based on EC50

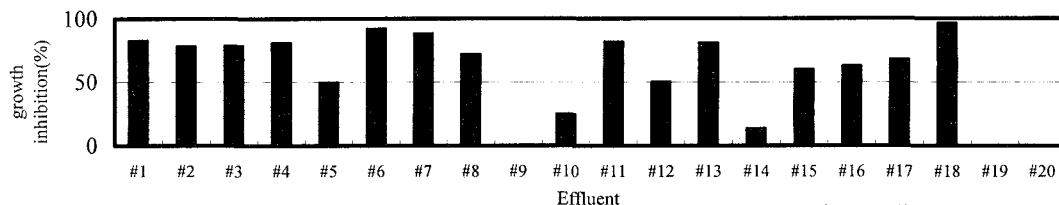


Fig. 7-a Growth inhibition of *S. capricornutum* at maximum concentration(91%)

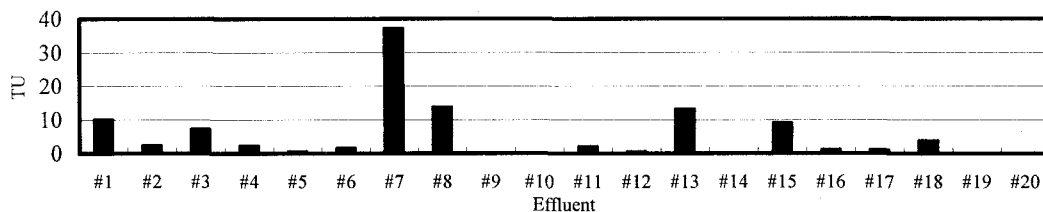


Fig. 7-b. TU of algal assay

Table 3 Sensitivity of bioassay

Bioassay ^a	<u>M</u>	<u>D</u>		<u>T</u>	<u>H</u>		<u>A</u>
endpoint ^b	S.L.	S.L.	L.	S.L.	S.L.	L.	C.
B/A (%) ^c	70	50	50	55	90	50	85
C/A (%) ^d	55 (30 ^e)	30	25	30	60	30	80
TU	0.41-9.80	1.41-24.4	1.66-23.5	1.16-7.75	1.17-5.62	1.33-6.67	0.74-37.3

a): M:Microtox, D:dahnia assay, T:Thamnotoxkit, H: hydra assay,

A: algal assay

b): S.L.: sublethal effect, L :lethality, C : chronic effect

c), d): A: number of samples (=20), B : number of samples with any adverse effect, C: number of samples which have LC₅₀ or EC₅₀.

e): percentages of samples that have EC₅₀ of less than 100 %.

(24-96 時間)。致死効果、亜致死効果はそれぞれ 50%、90%の試料で観察された(Fig.6-a)。亜致死効果について馴致(耐性獲得)または毒性物質の損失と推測される経時的減少が認められた(#5, #14, #18, #20)。このうち、LC₅₀と EC₅₀を算出できたのは、それぞれ 65%、30%である。特に、有害性の強い試料(#2, #3, #7, #12)では経時的に毒性が強まる傾向が認められた(Fig.6-b)。

(5) 藻類生長阻害試験

一部の試料においては栄養塩等の影響と考えられる成長促進効果(#9, #10, #13, #14, #19, #20)が認められたのが特徴である。しかし、全体の 85%の試料において、成長阻害効果(90.9%濃度時)が認められた(Fig. 7-a)。IC₅₀は全体の 80%の試料で算出された(Fig. 7-b)。

(6) 各バイオアッセイ指標間の関連

バイオアッセイにおいて認められる生物反応は致死にいたらなくとも早期警報の一つと考えられる。検出感度を、最高濃度での影響の発現という観点から比較すると、ヒドラ(亜致死) > 藻類 > マイクロトックス > Thmnotoxkit > ミジンコ(亜致死、致死) = ヒドラ(致死)の順に感受性が高くなっている(Table. 3)。一方、各バイオアッセイの代表値(EC₅₀または LC₅₀)が 100%以下で求めた割合で考えると、藻類 > ヒドラ(亜致死) > マイクロトックス = Thmnotoxkit = ヒドラ(致死) = ミジンコ(亜致死) > ミジンコ(致死)の順である。

以上の結果から、今回対象とした排水においてはヒドラ(亜致死)と藻類が比較的感度の高い試験であった。

各バイオアッセイ間で得られた毒性単位を比較すると、甲殻類を用いているミジンコ遊泳阻害試験(*Daphnia magna*)と淡水性甲殻類遊泳阻害試験(ThmnotoxkitF)の間に高い相関が認められた(相関係数 0.929、Table. 4)。

Table 4 Inerbioassay correlation coefficient matrix based on toxicity units

Bioassay ^a	M	D (SL)	T	A	H (SL)
M	1.000				
D (E)	0.435	1.000			
T	0.474	0.929	1.000		
A	0.257	0.763	0.785	1.000	
H (SL)	0.605	0.421	0.649	0.613	1.000

a): M: Microtox test, D(SL): daphnia sublethal test, T: Thmnotoxkit
A: algal test, H(SL): hydra sublethal test

Table 5. Characteristics of effluents

Effluent	pH	OD260	EC(μ S)	DOC (mg/L)
#1	6.58	0.572	294,000	71.2
#2	7.20	0.357	4,690	23.3
#3	6.66	0.586	2,700	32.7
#4	7.00	0.042	1,000	10.0
#5	6.97	0.438	1,340	37.0
#6	6.84	0.342	772	26.3
#7	6.29	0.020	1,120	2.18
#8	6.87	0.112	786	5.96
#9	6.46	0.082	280	4.4
#10	9.67	2.994	858	79.1
#11	6.90	0.044	399	5.87
#12	7.02	0.022	529	2.2
#13	7.28	0.002	376	3.45
#14	1.10	0.011	220	1.73
#15	7.42	0.078	458	34.2
#16	7.19	0.021	430	6.82
#17	7.92	0.101	371	60.1
#18	7.51	0.023	419	3.32
#19	8.89	0.092	762	7.08
#20	7.11	0.078	315	4.43

3.2 毒性因子の探索

各バイオアッセイで認められた毒性の原因を解明することは排水による環境影響の削減策を検討する上で重要である。ここでは、水質指標並びにバイオアッセイ結果の関連から有害性因子の探索を試みた。

(1) 水質指標との関連

各排水の分析結果の一部を Table 5 に示す。試料#10(織物染色)においては pH 調整装置の不調と見られる高い pH(9.67)と染料による着色が認められた。Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn の 6 種類の重金属分析の結果、水質汚濁防止法に基づく一律排水基準および特殊項目(Cd 0.1mg/L, Cr⁶⁺ 0.5 mg/L, Cu 3mg/L, Zn 5mg/L, Mn 10 mg/L)を超える試料は無かった。

各バイオアッセイの無機物および有機物に対する感受性(EC₅₀, LC₅₀, IC₅₀)を Table 6 に示す。Mn に関しては、過マンガン酸イオン(MnO₄⁻)の方が Mn²⁺よりも毒性が強い(4.44~106 倍)。先に述べた排水基準と比較すると、Cr⁶⁺、

Table 6 Comparison of the relative sensitivities of bioassay

Chemical	Microtox	daphnia	Thamnotoxkit	alga	Hydra	
	15min-EC50	48h-EC50	24h-EC50	72h-IC50	96h-EC50	96h-LC50
<u>inorganic</u>						
Cd ²⁺ (CdCl ₂)	14.5	0.148	0.2	0.173	0.854	0.85
Cr ⁶⁺ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	104	0.0291	0.018	0.487	0.005	0.017
Cu ²⁺ (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.211	0.0328	0.0895	0.0425	0.441	0.44
Mn ⁷⁺ (KMnO ₄)	-	0.13	-	0.286	0.428	1.27
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	75.5	13.9	-	1.27	-	-
(MnSO ₄ ·H ₂ O)	-	-	23.3	-	-	-
Ni ²⁺ (NiCl ₂ ·6H ₂ O)	110	1.53	-	0.187	0.443	0.82
(NiSO ₄ ·6H ₂ O)	-	-	2.21	-	-	-
Pb ²⁺ (Pb(NO ₃) ₂)	0.189	1.61	-	3.39	0.524	1.78
(PbCl ₂)	-	-	1.63	-	-	-
Zn ²⁺ (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.872	1.16	0.69	0.053	0.446	0.663
<u>organic</u>						
SDS ^a	0.711	11.1	22.8	131	7.09	10<
phenol	28.2	5.38	71.8	559	7.08	7.89
PCP ^b	0.755	0.87	0.109	0.535	0.156>	0.156>

All effect values are in mg/L.

a): Sodium dodecyl sulfate

b): pentachlorophenol

銅、亜鉛に関しては排水基準を満たしてもほとんどのバイオアッセイで有害性が示される可能性があることが解る。

次に、実測した6種類の重金属の有害性への寄与度を推定するために、各重金属毎の毒性係数(Toxicity Factor, 以下、T.F.)を以下のように算出した。

$$T.F._i^m = \frac{C_i^m}{EC_{50}^i \text{ or } LC_{50}^i \text{ or } IC_{50}^i}$$

$T.F._i^m$: 排水 m の重金属 i の毒性係数

C_i^m : 排水 m 中の重金属 i の実測値(mg/L)

$EC_{50}^i, LC_{50}^i, IC_{50}^i$: 重金属 i の各バイオアッセイの特性値(mg/L)

$T.F._i^m$ の値が大きい程、重金属 i の影響が発現している可能性が強い。更に、重金属間の相互作用を単純化して考え、排水 m の6種類の毒性係数の総和、 $T.F.^m$ を求める。

$$T.F.^m = \sum_1^6 T.F._i^m$$

$T.F._i^m$ は排水 m における重金属(6種類)の毒性影響のポテンシャルをあらわしている。したがって、各バイオアッセイの毒性単位 TU と $T.F.^m$ を比較することにより、重金属の影響を推定できる。

藻類生長阻害試験の例を Fig. 8-a, b に示す。排水#7(TU=37.3、 $T.F.^7=91.8$)、#13(TU=13.3、 $T.F.^{13}=15.5$)において、重金属の影響が示唆される(Fig. 8. a)。更に、 $T.F.^m$ の内訳を各重金属毎に比較してみると、有害性因子となっている主要な重金属が推定できる(Fig. 8-b)。排水#7の場合は Zn ($T.F.=83.8$)、#13は Ni ($T.F.=10.4$)と Zn ($T.F.=3.96$)の影響が示唆された。

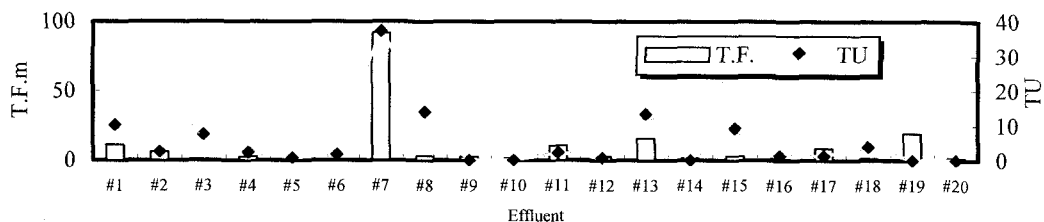


Fig. 8-a. TU and T.F. of algal assay

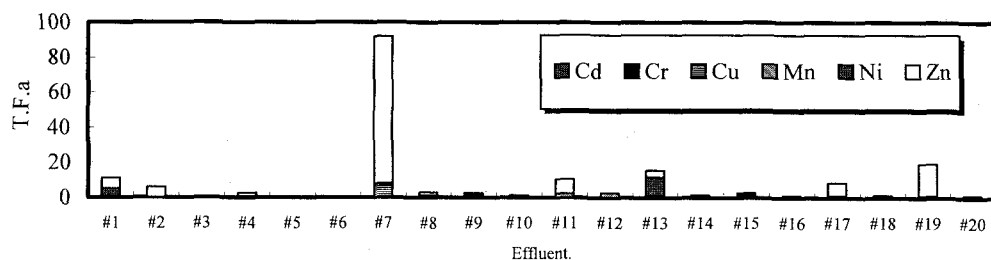


Fig. 8-b T.F. of each metal in algal assay

同様の評価を全ての排水について行った結果を Table 7 に示す。その結果、以下の点が指摘できる。

- 1) 全てのバイオアッセイに強い毒性を示した排水#7 (金属加工) の因子は主として Zn, Cu であり、各バイオアッセイの感受性の相違により 2 者の寄与は異なる。
- 2) 全てのバイオアッセイに比較的強い毒性を示した排水#3 (医薬品) の有害因子は主として検討した重金属以外に起因すると推定される。
- 3) ヒドラ試験においては 2 価マンガン(Mn^{2+})の代わりに、過マンガン酸 (MnO_4^{1-})で存在するマンガンにより毒性係数を算出したため、全体的にマンガンの寄与率を過大評価した可能性がある。
- 4) 他の毒性を示した試料については、Zn, Cu, Ni, Cr, Mn などの重金属が単独又は複合的な寄与が予想されるが、Cd は影響は全ての試料において毒性に寄与していないと考えられる。
- 5) 以上の例とは逆に、比較的強い毒性係数にもかかわらず毒性を示さなかった試料#19 (クリーニング)、#9 (下水処理) においては毒性修飾因子(共存有機物、イオン存在状態等)が機能している可能性が考えられる。

(2) 物理化学的操作による毒性の変化

一般に重金属の毒性はキレート剤により緩和される事が知られている。そこで、毒性への重金属の寄与を解明するために、キレート剤(EDTA)添加前後の毒性の変化を検討した。まず、EDTA を試料体積の 10 分の 1 量(EDTA 最終濃度 90.9mg/L)を添加してマイクロトックス試験を行った(EDTA の 15min-EC50 は 342mg/L)。検討した 6 種の重金属中、 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} において緩和効果が認められたが、 Mn^{2+} , Ni^{2+} においては認められなかった(Table 8)。同様の操作を、マイクロトックス試験において毒性の認められた試料に行った結果、排水#7 (金属加工) において顕著な毒性減少が認められた。先の毒性係数の結果と、重金属での EDTA 添加実験の結果を併せて考えると、排水#7 においては Zn と Cu が主な毒性の要因であることが明らかである。一方、排水#10(織物染色)、#12(合金鉄)においては、EDTA 添加による影響はほとんど認められなかった。更に、中和を行った結果、排水#10 において毒性に軽減が認められたことから、排水#10 においては pH が直接的な毒性因子と考えられる。

Table 7. Contribution of heavy metal to effluent toxicity

Effluent	M	D	T	A	H*
#1		Ni		Zn>Ni	Mn>Ni>Zn
#2				Zn	Zn
#3					
#4		Cu		Zn>Cu	
#5					Mn
#6			Cr		Cr
#7	Zn>Cu	Cu>Zn	Zn>Cu	Zn>Cu	Zn>Mn>Cu
#8			Cr	Zn>Mn	Mn>Cr
#9		Cr>Cu	Cr>Cu	Mn>Cu	Cr>Mn
#10			Cr	Mn	Mn>Cr
#11			Cr>Zn	Zn>Mn	Mn>Cr>Zn
#12			Cr	Mn	Mn>Cr
#13		Ni>Cr	Cr>Ni	Ni>Zn>Mn	Ni>Cr>Mn
#14				Mn	Mn
#15			Cr	Mn>Zn	Mn>Cr
#16				Mn	Mn
#17		Cr	Cr>Zn	Zn>Mn	Cr>Mn>Zn
#18				Mn	Mn
#19	Zn		Zn>Cr	Zn>Mn	Cr>Mn>Zn
#20		Cu>Cr	Cr	Mn	Cr>Mn

□: TU>5, □: 5>TU>1, □: 1>TU>0

Name of metal species represent the metal with significant T.F.(>0.5);

bold letter: T.F.>5, normal: 5>T.F.>1, underlined letter: 1>T.F.>0.5

M: Microtox, D:daphnia test, T: Thamonotoxkit, A: algal test, H: hydra test

H*: T.F. of Mn was calculated based on EC50 of Mn7+(KMnO4)

次に、藻類生長阻害試験において EDTA 添加実験を行った(EDTA 添加濃度 1mg/L)。検討した排水(#1, #7, #8, #13)のうち, #7 (金属加工)、#13(アルミサッシ)において EC₅₀ がそれぞれ、3.29 倍、2.76 倍増加するなどの削減効果が認められた。マイクロトックス試験と併せて考えると、両者いずれも重金属の影響と推測される。しかし、削減効果の少ない排水#1(紙パルプ、1.89 倍)、#8(食肉加工、1.22 倍)のいずれにおいても、#7 同様、毒性係数の比較(Table. 7)では Zn が毒性の主因子として挙げられている。藻類生長阻害試験における重金属と EDTA の相互作用については今後の検討を要す。

アンモニア様刺激臭を有する排水#3(医薬品)において、揮発性物質の影響をミジンコ遊泳阻害試

Table 8 Effect of EDTA on Microtox toxicity

Sample		15 min-EC ₅₀ addition of EDTA ^a		Effect ^b
		without	with	
metal (mg/L)	Cd ²⁺	14.5	27.7	+
	Cu ²⁺	0.211	8.0	++
	Mn ²⁺	75.5	55.2	-
	Ni ²⁺	110	61.5	-
	Pb ²⁺	0.189	>10.4	++
	Zn ²⁺	0.872	2.65	+
effluent (v/v %)	#7	10.2	49.7	+
	#10	43.8	34.0	-
	#12	146 ^c	5.90	3.97

a): 90.4 mg/L of EDTA was added.

b): - : EC₅₀ was decreased or not increased.

+: EC₅₀ was increased

++: EC₅₀ was increased more than ten times.

c): after neutralization (pH=6.94)

験において検討した。実験容器(プラスチック製カップ 容積約 50mL)において蓋をしない場合には 48h-EC₅₀の増加が認められた(51.8%→99.2%)。この結果より揮発性物質の関与が推測される。他のバイオアッセイ(マイクロトックス試験以外)は、いずれもマイクロプレート(蓋付き)で試験を実施しており揮発性物質の損失は少ないと考えられ、揮発性物質の影響が顕在化したと予想される。

3.3 工場排水の総合評価

毒性の原因物質が明らかにならない場合でもバイオアッセイの結果自体は、環境中の生物への影響を示唆していると考えられる。しかし、排水のバイオアッセイ結果から水環境への影響評価を考える際に以下の点を考慮する必要がある。

- a. 供試生物種：生物種間の感受性の相違、影響判定点
- b. 排水流量の影響
- c. 総合評価

a. に関しては、今回用いている単一種の試験方法はいずれも実施容易であり、そのため、同時に異なる生物種の試験を行えるという特徴がある。排水のような多数の環境試料を対象とする場合、こうした条件が必須である。また、レベルの異なる生物種の試験を同時に実施できるため、生物間の感受性をある程度、補うことが出来ると思われる。本研究では、EC₅₀など標準的な影響判定点を用いた。より高感度な結果を必要とする場合には EC₂₀(20%影響濃度)、NOEC(最大無影響濃度)、LOEC(最小影響濃度)を用いることができる。

b. については毒性単位(TU)に流量を乗じて毒性負荷量を算出することにより相互比較が可能になる。放流先での影響を論ずる場合には、放流先での希釈率と室内試験結果の比較から考察する必要がある。。本研究では、各工場、業種による負荷量の相対比較を目的としているため、毒性負荷量で議論する。

一つの排水を複数のバイオアッセイで試験した場合、より多くの系において陽性の結果が出た排水ほど、生態系に対してより有害性が高い蓋然性がある。こうした要因を検出率として総合評価に組み込むことも可能である¹³⁾。本研究においては5種のバイオアッセイの毒性単位(TU)の総和、更に、それに排水量を乗じた毒性負荷量(Toxic Loading, TL)を定義し、比較検討した。

$$TU^m = \sum_{i=1}^5 TU_i^m$$

$$TL^m = TU^m \times Q^m$$

TU^m : 排水 m の総毒性単位

TU_i^m : 排水 m のバイオアッセイ i による毒性単位

TL^m : 排水 m の毒性負荷量

Q^m : 排水 m の排水量(m³/日)

各排水の総毒性単位および、毒性負荷量の結果を Fig. 9, 10 に示す。全てのバイオアッセイにおいて、毒性の検出されなかった#9(下水処理)、#14(半導体)、#19(クリーニング)を除き、85%(17/20)の排水において平均 14.1 の総毒性単位を検出している。総毒性単位は、#7 (金属加工) 84.6、#12(合金鉄) 26.9、#3(医薬品) 20.0、#4(表面処理) 17.5 の順に大きい。総毒性単位の総和に占める各バイオアッセイ毎の毒性単位の割合を算出すると、藻類(44.9%)>ミジンコ(17.3%)>マイクロトックス(16.3%)>ヒドラ(14.0%)>Thamnotoxkit(7.2%)と検出率の結果と同様(Table. 3)、藻類に対する影響が最も大きいことが明らかである。一方、毒性負荷量を全排水の毒性負荷量に占める割合と比較すると、#1(紙パルプ) 36.0%、#12(合金鉄) 19.9%、#13(アルミサッシ) 11.2%、#3(医薬品) 9.9%、#2(化学品) 9.80%、#7(表面処理) 7.85%の順に大きく、他は2%以下の寄与率である。この寄与率は、対象工場の毒性を削減するための優先順位と見なすことができる。調査対象企業の排水量において500倍もの相違がありこの影響を無視できないことは明らかである。毒性負荷の特に強い#7を除く、上位

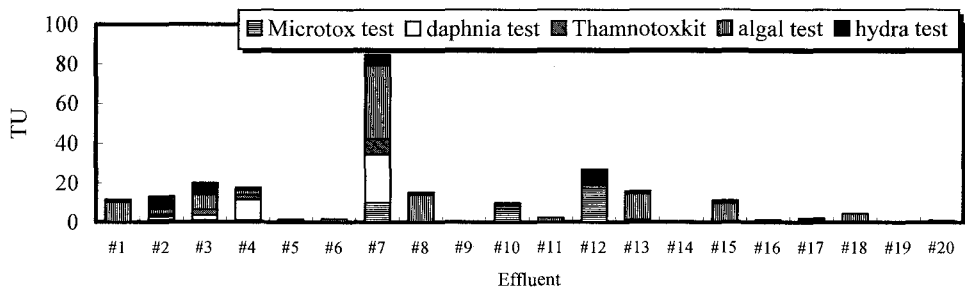


Fig. 9 Total TU of effluent

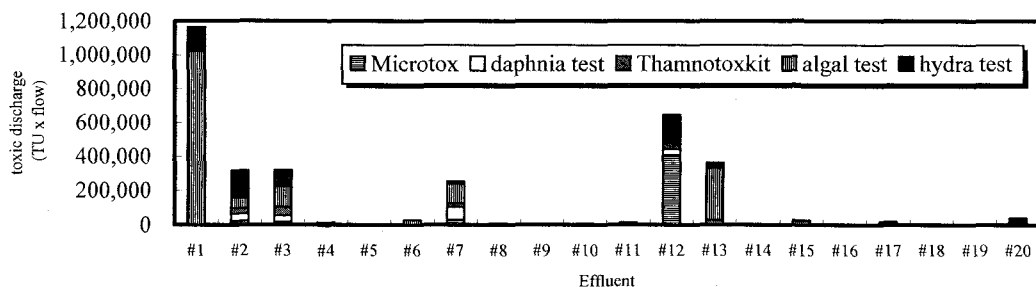


Fig. 10. Toxic loading

6 社の排水量は全体の 57.1%を占めている。カナダのセントローレンス河においては、「流域からの工場排水の有害物質排出量を 90%削減」するために、流域の企業 50 社を対象にバイオアッセイを用いた毒性総合評価を実施した¹⁴⁾。その結果、排水量の多い紙パルプ工場から影響が全体のかかなりの割合を占めることが明らかとなっている。更に、今回の調査においては有機物負荷量削減の削減からも排水量の多い上記の企業の対策が必要であると考えられる(調査対象企業の全有機物排出負荷量の 82.5%)。

4. まとめ

比較的小規模な 5 種類のバイオアッセイを用いて富山県内の 20 種類の排水を対象に産業排水の生態影響評価を行ない、以下の結論を得た。

- 1) 5 種類のバイオアッセイの内、バイオアッセイの代表値(EC₅₀ など)の検出率の点では藻類成長阻害試験 (80%)、ヒドラ亜致死急性毒性試験(60%)の順に高く、15%(3/20)の排水においては毒性が検出されなかった。
- 2) 排水中の重金属濃度と毒性を比較した結果、最も強い毒性を示した排水 (金属加工) については Zn、Cu が主要な毒性の原因物質として推定され、キレート剤を添加した実験結果とも一致した。その他には、pH(織物染色)、揮発性物質(医薬品)などが毒性寄与因子として推定された。
- 3) 5 種類のバイオアッセイ結果を毒性単位(TU)の総和と比較した結果、85%(17/20)の排水において平均 14.1 の総毒性単位が検出された。その中でも、金属加工(86.2)、合金鉄(26.9)、医薬品(20.0)、表面処理 (17.5)などの排水に比較的高い毒性が検出された。
- 4) 排水量を考慮した毒性負荷量を算出した結果、上位 7 社で全体の 86.8%を占めており、排水量比較的大きい企業の排水対策の重要性が明らかとなった。

本研究においては、調査対象の全排水量の 30%弱を占める下水処理水 (塩素消毒前) は有意な毒性は示さ

なかった。しかし、塩素処理に伴い付加された残留塩素濃度に比例して急性毒性は増加する。排水量の割合から考えると、残留塩素に起因する毒性負荷量は無視できない量と考えられ、流域の生態系保全を目指す毒性削減という観点から、流域での消長も含め再検討が必要であろう。

おわりに

本研究の実施に当たっては調査対象企業の担当者の方々に多大な御協力を頂きました。深く感謝の意を表す次第です。尚、本研究は平成6、7年度科研費一般研究C（課題番号06680522）の補助を受けた。

参考文献

- 1) 田中：生物の棲みやすい水環境への下水道の課題、月刊下水道、Vol.1, No.1, p.15, 1995.
- 2) U.S.EPA.: Technical Support Document for Water Quality-Based Toxics Contros, EPA/505/2-90-001, 1991.
- 3) Kusui, T. Ecological Evaluation of Municipal Wastewater Treatment, Advances in Ecotechnology, Vol.1, pp.259-264, 1995.
- 4) 楠井、山田、脇坂：バルキング抑制剤の生態毒性、第29回日本水環境学会年会講演集、p.365、1995.
- 5) MICROBICS: Microtox Manual - A Toxicity Testing handbook, 1992.
- 6) 楠井：発光細菌を用いて水の毒性を測るーマイクロトックスの紹介、水情報、Vol. 11, No. 10, p. 10-13, 1991.
- 7) Environment Canada: Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*, 1990.
- 8) 日本工業規格：化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験方法(JIS K 0229-1992)、1992.
- 9) Thamnotoxkit F Standard Operational Procedure
- 10) Johnson, E.M., Gorman, R.M., Bradley Gabel, E.G., and George, M.E.: The *Hydra attenuata* System for Detection of Teratogenic Hazards, Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, **2**, 263-276, 1982.
- 11) Blaise, C., and Kusui, T.; Acute Toxicity Assessment of Industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay, Environmental Toxicology and Water Quality (submitted)
- 12) Environment Canada: Biological Test Method : Growth Inhibition Test : Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum* (1992)
- 13) Constan, G., Bermingham, N., Blaise, C., and Ferard, J.F.: Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): A Novel Index to Assess and Compare The Toxic Potential of Industrial Effluents, Environmental Toxicology and Water Quality, **8**, 115-140, 1993.
- 14) 楠井：カナダにおける生態系保全の試みーセントローレンス河のケーススタディー、水情報、Vol.14, No.12, p.14-16、1994.