

(1) バイオアッセイによる水道原水の水質監視に関する 2, 3 の検討
STUDY ON SOURCE WATER QUALITY MONITORING BY BIOASSAY

関根 雅彦*, 藤岡 健智**, 浮田 正夫*

Masahiko SEKINE, Kenchi FUJIOKA, Masao UKITA

ABSTRACT; Since trace chemical pollution becomes big problem, safety check of source water is becoming more and more important. Ministry of Health and Welfare notified water purifying plants of keeping fish to check source water quality. But in reality, they just run source water in a fish tank and see what happens occasionally. There are two different approach to this problem: one is to construct an automatic fish movement checking system and the other is to use a special sensor which can detect many kinds of pollutants at one time. In this study, we compare a biosensor, a fish tank with image recognition system, and an avoidance test tank. Shiner, carp and rainbow trout are used as test fish, and cyanogen, tetrachloro ethylene, chloroform, thiram, and simazine are used as test chemicals. The biosensor and the avoidance test tank show a similar sensitivity, whereas the fish tank with image recognition system shows somewhat low sensitivity. We introduce a fish tank that has two compartments; test section and control section, which improve the sensitivity of the fish tank test. We also introduce a composite condition avoidance test that can reveal hidden strong effect of some chemicals.

KEYWORDS; acute toxicity, bioassay, biosensor, fish movement

1. はじめに

微量化学物質汚染が問題となっている今日、水道水の安全性確保はますます重要となっている。しかし、多種類にわたる毒性物質を物理化学的に連続測定することは困難である。そこで、水源の監視のため、水道原水による魚類の飼育が厚生省により指導されるようになった。しかし実際には、原水をかけ流した水槽中の魚の挙動を肉眼で観察するだけであることがほとんどであり、毒性物質に対する反応の定量評価や連続監視は行っていないのが現状である。水槽中の魚の挙動の常時監視のため、中村^{1,2)}はアブラハヤの水槽中の活動量をビームセンサにより計測する装置を開発したが、流入水の異常 pH に対して濃度勾配型の忌避試験装置に比べ活動量の計測では感度が不十分であること、正常状態でも生起するアブラハヤの夜間の活動量の低下がへい死と誤判定される可能性があることを指摘した。馬場ら^{3,4,5,6)}はタナゴやコイ、ニジマスを用い、画像解析により水槽中の魚の分布や遊泳速度を計測し、鼻上げ、錯乱、狂奔を指標として水質を判定する装置を開発し、一部では実用⁷⁾に供されている。彼らは画像解析を用いた手法が TLm などの従来法と比べ、短時間に感度良く毒性物質を検出できること、鼻上げ行動が判定条件として最も信頼性が高いこと、判定条件についてはさらに検討が必要であること、検出感度は水質基準値と比較してまだ十分ではなく、目視監視のバックアップとして位置づけるべきであることなどを述べている。一方、魚の観察によらず、特殊なバイオセンサを用いて多数の毒性物質を連続的に判定する方法も開発されている⁸⁾。

本研究では、バイオセンサ、水槽観察試験および忌避試験による毒性物質の検出感度を比較し、水源水質の監視の高感度化について検討した。

* 山口大学工学部社会建設工学科 〒755 宇部市常盤台 2557

Department of Civil Engineering, Yamaguchi University, Tokiwadai, Ube, Yamaguchi, 755 Japan

** 山口県

Yamaguchi Prefecture, Yamaguchi, Japan

2. 実験方法

2.1. 供試魚と毒性物質

供試魚として、浄水場で毒性物質の生物検定に用いられている魚種のうち、清浄な水を好むと言われるニジマス（体長12～16cm）、農業や工場廃水にも強いと言われるコイ（体長7～13cm）、小型で飼育しやすいタナゴ（3～6cm）の3魚種を用いた。毒性物質としては、シアン、テトラクロロエチレン、クロロホルム、チウラム、シマジンの5種類を用いた。

2.2. バイオセンサの概要

比較対象とするバイオセンサは富士電機（株）の水質安全モニタ⁸⁾である。本センサはニトロセルロース製のメンブレンフィルタに亜硝酸生成細菌を固定化したもので、毒性物質が混入すると細菌の呼吸活性が阻害され、30分程度でセンサの出力は低下する。この出力低下の程度を検出する事によって、毒性物質をモニタで

表1 バイオセンサによる検出濃度と水道水質基準

毒性物質	検出濃度 (mg/l)	水道水質基準 (mg/l)
シアン	0.05	0.01
テトラクロロエチレン	6.0	0.01
クロロホルム	200	0.06
チウラム	0.06	0.006
シマジン	0.6	0.003

できるものである。本研究では、魚の挙動や忌避行動を本センサの出力と関連づける事を目的とするため、実験で用いる毒性物質の濃度は本センサの検出濃度を基本に決定した。表1にバイオセンサの検出感度と水道水質基準値を示す。水道水質基準と比較するとバイオセンサの感度は不十分であるが、複数の毒性物質を検出できるため、魚によるバイオアッセイの代替となり得る可能性がある。

2.3. 水槽観察試験

水槽観察試験では、浄水場における魚による水源の監視と同様に水槽側面から毒性物質に対する魚の挙動を観察し、肉眼による観察の結果と画像解析による結果を求めた。本研究における新たな工夫は、図1に示すように2槽を結合した形態を持つ実験装置を用いた点である。試験区となる水槽には適切な溶媒に溶解させた毒性物質、対照区となる水槽には溶媒のみを注入し、魚の挙動をビデオ撮影(1時間)した。水槽はビデオ撮影時に死角が生じる事を避けるため、壁面が撮影光軸方向に平行となる形状とした。

また、毒性物質以外の外的影響を避けるため、実験装置の周囲に高さ180cmのフレームを設置して暗幕で覆い、実験装置の背面に市販のト

レース台を取り付けて照明とした。実験時間中の試験魚による酸素消費が水槽の溶存酸素量の半分以下となるよう、コイの供試魚数は5尾、マスの供試魚数は4尾、タナゴの供試魚数は10尾とした。実験濃度は、それぞれの毒性物質のバイオセンサによる検出濃度の10倍、1倍を用いた。ただし、クロロホルムの場合は、検出濃度が高いため、0.1倍の実験も行った。画像解析では、ビデオ映像から1分毎に画像を取り込み、それを2値化して魚影を認識し、各魚影の図心と底面からの平均位置を解析した。観察時間は、バイオセンサが30分で毒性物質を検出できることを基準に、60分間とした。

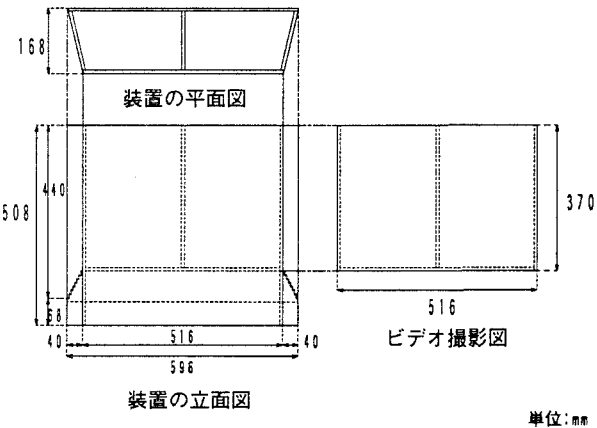


図1 実験装置図(水槽観察試験用)

2.4. 忌避試験

忌避試験では、流水中に試験区と対照区を設け、魚の忌避行動を調べた。毒性物質で汚染された水が流れる試験区と安全な水が流れる対照区を並流させ、その一部分が接続された図2の実験水路において、試験区と対照区の魚の分布を30分間のビデオ撮影より調べた。実験時間を水槽観察試験より短くしたのは、廃液量をできるだけ少なくするためである。また、毒性物質以外の影響を避けるため、実験水路の周囲に高さ150cmのフレームを設置して灰色の暗幕で覆い、照明として実験水路の真上80cmの位置に40wの白熱電球を1個設置した。実験装置の水路長、接続部の長さ、および供試魚数は、1水路内に供試

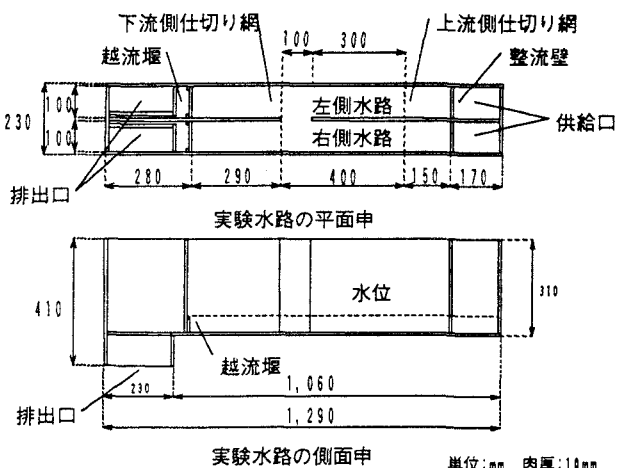


図2 忌避試験装置

魚全数が無理なく1度に入り、水路間の移動も可能となるよう予備実験から決定した。その結果より、タナゴの供試魚数は7尾、水路長は10cm、移動幅は5cm、コイは6尾、水路長30cm、移動幅10cm、マスは6尾、水路長40cm、移動幅10cmとした。流水試験の廃水は活性炭で処理したが、シアンについては十分な処理が困難であったため、シアンについては流水試験は行わなかった。実験濃度は、バイオセンサの検出濃度を基準とし、テトラクロロエチレンではその1倍と10倍、クロロホルムでは1倍と0.1倍、チウラムでは1倍と10倍、シマジンは1倍と0.2倍とした。タナゴの実験では、上記に加えて、テトラクロロエチレンでは0.05倍と0.5倍、クロロホルムでは0.05倍と0.5倍、チウラムでは0.5倍と5倍、シマジンは0.1倍と0.5倍も用いた。また、一般の環境要因と毒性物質の選好強度のウェイト⁹⁾を知るため、魚の選好性の強い遮蔽条件および水温条件と有害物質の複合実験も行った。

3. 実験結果

3.1. 水槽観察試験結果

図3に肉眼による試験区の観察結果を示す。毒性物質に対する魚の挙動としては、動作が少ない、鼻上げをする、痙攣する、頭を振る、素早く泳ぐ、死亡するという過程が観察された。しかし、死亡に至るまでの魚の挙動は断続的であり、毒性に対する動作なのか偶発的な動作なのか判断し難い場合が多かった。文献⁷⁾では、水質異常の判定基準を、

- 1) 魚の70%が水面下3cm以内に入った状態が1分以上継続した時
- 2) 魚群の中心位置が水面下3cm以内に入った状態が1分以上継続した時
- 3) 魚の動きの平均の速さが通常の6~7倍以上になった状態が1分以上継続した時
- 4) 水槽全体に最大限分散した状態を100%とした時、70%以上の分散の状態が1分以上継続した時

としているが、本観察では1分以上異常行動を継続することは死亡直前を除いて極めてまれであり、特に、馬場らが有効な指標であるとする鼻上げ行動をあまり観測することができなかった。従って、確実に水質異常を判定できるのは、試験区のみ観察では死亡直前に至ってからであった。タナゴのシアン×10、クロロホルム×1、コイのテトラクロロエチレン×10、クロロホルム×1、マスのテトラクロロエチレン×10、クロロホルム×1がこれにあたる。そのため、肉眼による観察では、水質基準値のような低濃度が検知できないの

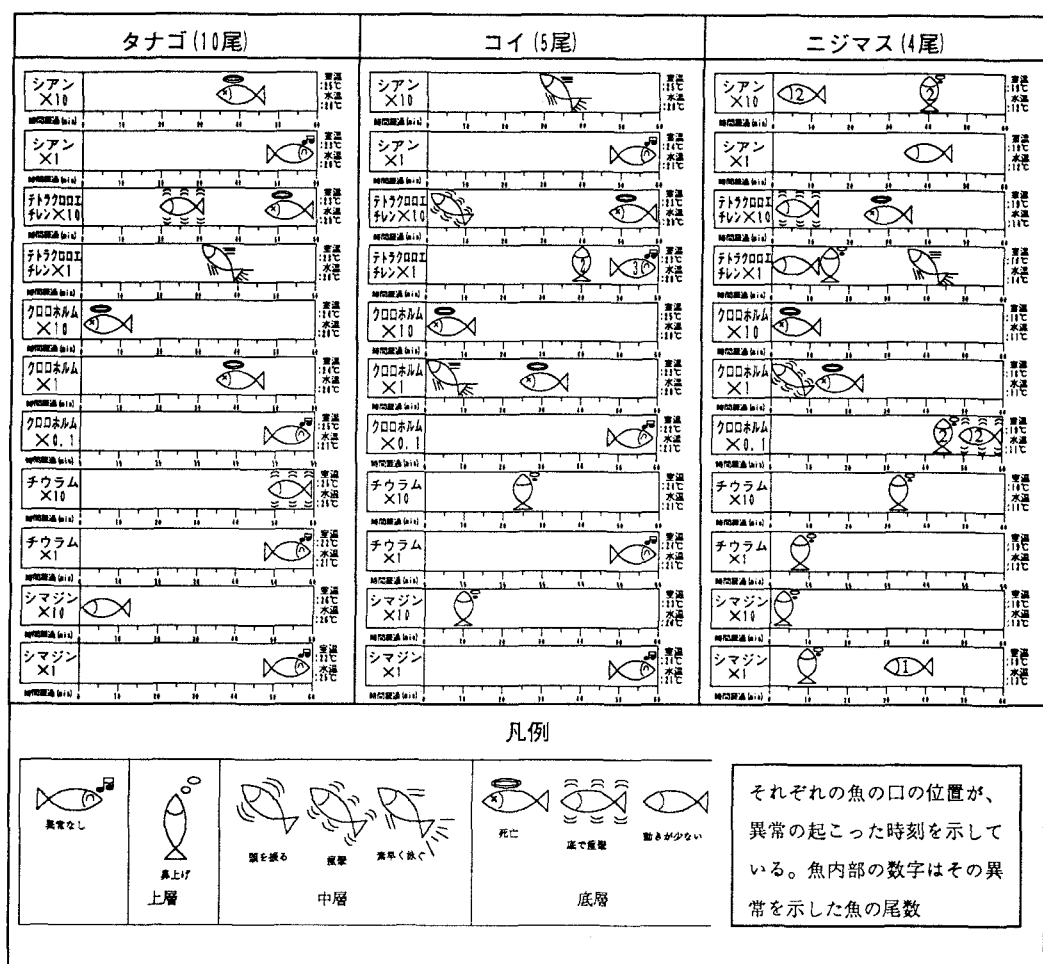


図3 水槽観察試験結果 (肉眼による観察)

もちろん、バイオセンサに比べてもクロロホルムを除き1/10以下の感度にしかすぎない事が分かった。

図4に画像解析結果について1分ごと60分間の魚の存在高さの平均とその標準偏差を示す。対照区の魚の分布位置についても実験毎にばらつきがみられ、特にタナゴにおいてはなはだしい。魚の存在位置を判定基準とすることは難しいことがわかる。一方、対照区では分布位置の標準偏差は安定しており、魚の存在位置は一定でなくとも、集合の拡がり具合は安定していることがわかる。

試験区では分布位置にもその標準偏差にも変化がみられる。タナゴのシアン×10、テトラクロロエチレン×10、クロロホルム×1、チウラム×10、シマジン×10、コイのテトラクロロエチレン×1、クロロホルム×1、チウラム×10、ニジマスのシアン×1、テトラクロロエチレン×10、クロロホルム×0.1、チウラム×10などで対照区と試験区の変化が読みとれ、目視観察では異常を明確には判定できなかった項目でも半定量的ながら判定が可能になったことがわかる。

これらの結果より、対照区と試験区単一槽だけの観察より対照区を併用した方がより客観的に異常が検出

できる事が明らかになった。ただし感度の面ではまだバイオセンサの1/10程度劣っており、特に農薬の判定が難しい。

3.2. 忌避試験結果

図5は忌避試験30分間の1分ごとの魚の試験区の分布を平均して毒性物質の濃度に対しプロットしたものである。ほとんどの物質でグラフは右下がりとなっており、濃度が高いほど忌避傾向が強くなる事がわかる。ただし、水槽観察試験で強い毒性の認められたクロロホルムに対し、タナゴとコイは弱い選好傾向を示した。実験中の観察によれば、タナゴやコイは試験区から一旦逃避するものの、すぐに試験区に戻るという行動を繰り返し、結果として選好傾向を示した。クロロホルムの存在する水中に長くは留まれないものの、なんらかの理由で誘引されているように見受けられた。またタナゴ、ニジマスはシマジンに対しても若干の選好性を示した。過去の研究から毒性物質の濃度があるレベルを超えると忌避率はかえって低下することが広く認められており^{10,11,12,13}、今回の濃度範囲は忌避試験としては高濃度すぎた可能性もある。

図6に複合実験結果を示す。図5においてはタナゴはクロロホルムをあまり忌避していないように見えるが、タナゴが通常は強く誘引される遮蔽条件とクロロホルムを複合させると、タナゴは遮蔽条件に誘引されない。このことは、一見クロロホルムの忌避強度は小さいように見えても、クロロホルムの存在がタナゴの分布に強い影響を与えていることを示している。同様の傾向がタナゴのチウラム、マスのテトラクロロエチレン、クロロホルムでも見られる。このように、一般の環境項目と忌避試験を複合させることにより、毒性物質の影響の大きさが評価できる可能性がある。

忌避試験の危険指標値として、測定時間30分間中の試験区の存在率で35%以下（忌避する場合）又は65%以上（誘引される場合）とした場合、タナゴで判定できる毒性物質は、テトラクロロエチレンで $\times 10$ (60mg/L)以上、チウラムで $\times 1$ (0.06mg/L)以上、シマジンで $\times 1$ (0.6mg/L)以上の場合であった。また、クロロホルムは複合実験により判定できる。以上より、忌避試験では水槽観察よりも若干感度が高く、バイオセンサと同程度の感度があるが、水道水質基準のような低濃度のものは検出できないと思われる。ただし、先述のように低い濃度で忌避が観察される可能性もある。

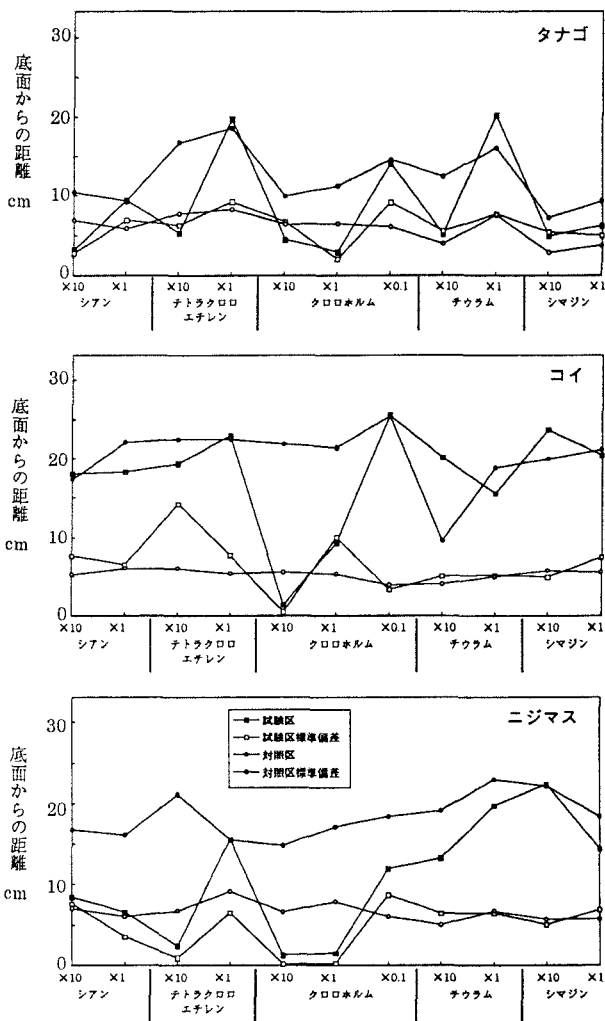


図4 水槽観察試験結果（画像解析）

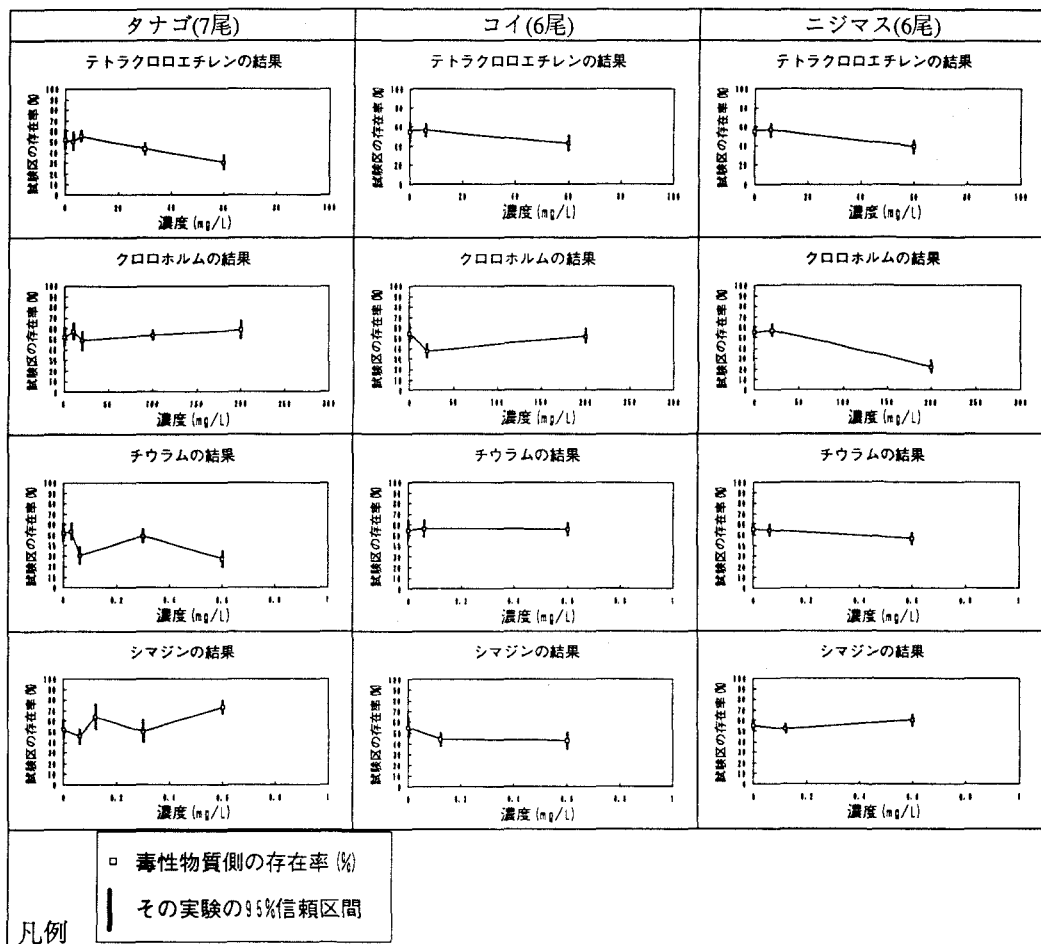


図5 忌避試験結果

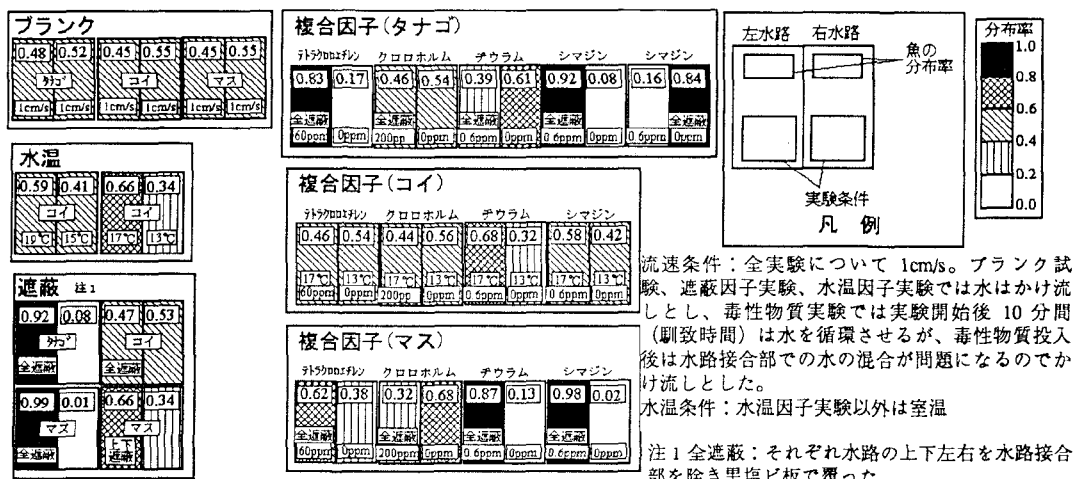


図6 複合実験結果

4. おわりに

バイオセンサ、水槽観察試験および忌避試験による毒性物質の検出感度を比較した。水槽観察試験の感度はバイオセンサのおよそ1/10、忌避試験の感度はバイオセンサとほぼ同じであった。また、水槽観察試験では、試験区と対照区を同時に画像解析することによって、客観的に魚の異常行動を検出しようことを示した。忌避試験では、一般の環境項目と毒性物質を複合させた試験により、検出感度を高めうる場合があることを示した。

多くの毒性物質について、バイオセンサは魚を用いた試験方法と同程度かそれ以上の感度を示したが、水道水質基準に比べると十分ではない。また、クロロホルムのように検出感度が極めて低い物質も存在する。また、魚による水質監視は一般市民にわかりやすく、安心感を与えるという側面もある。

以上より、例えば図7のような試験区と対照区を用いた魚の監視とバイオセンサを併用した水質監視システムが考えられるだろう。残念ながら本研究ではこの装置の設計・操作条件や判定条件を定量的に明らかにするには至っていないが、水道水源水質監視の高感度化の一つの方向は示し得た。有効な水道水源水質の監視のためには、今後さらにこの種のセンサの高感度化が望まれる。

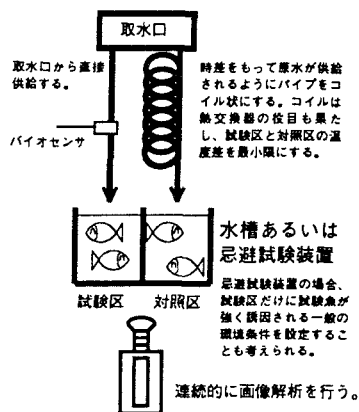


図7 試験区と対象区を設けた水道水源水質監視システムの例

参考文献

- 1) 中村 文雄: 魚類の行動変化に基づく水質の常時監視方法に関する基礎的研究(I) --- 平常時の行動特性とそのモデル化 ---。水道協会雑誌, 54(1), 17-26, 1985.
- 2) 中村 文雄: 魚類の行動変化に基づく水質の常時監視方法に関する基礎的研究(II) --- 忌避行動及び活動量変化に基づく異常水質の検出 ---。水道協会雑誌, 54(8), 12-23, 1985.
- 3) 馬場 研二, 矢萩 捷夫, 飯田 高士, 大木 伸夫: 魚類行動パターンの画像解析に基づく水質異常判定。水質汚濁研究, 11(8), 38-44, 1988.
- 4) 柏木 雅彦, 中沢 昭夫, 依田 幹雄, 馬場 研二: A Iを用いた魚による浄水場水質監視支援システム。環境技術, 17(9), 593-600, 1988.
- 5) 広田 忠彦, 矢萩 捷夫, 依田 幹雄, 馬場 研二, 原 直樹: 水の安全性を確保する水質監視支援システム。日立評論, 76(4), 31-34, 1994.
- 6) 馬場 研二: 魚類行動異常の画像解析による急性毒性物質混入モニタリング。第30回 日本水環境学会年会講演集, 485, 1996.
- 7) 広田 忠彦, 杉田 育生, 福田 功: 水質監視体制の強化に係る施設整備。第44回全国水道研究発表会, 837, 1993.
- 8) 守本 正範, 大戸 時喜雄, 田中 良春: 環境保全と水環境計測技術。富士時報, 65(6), 383-388, 1992.
- 9) 関根雅彦, 浮田正夫, 中西弘, 内田唯史: 河川環境管理を目的とした生態系モデルにおける生物の環境選好性の定式化。土木学会論文集, 491/II-27, 99-108, 1994.
- 10) 日高 秀夫, 立川 涼: 魚類による化学物質の忌避試験法(1)。生態化学, 7(4), 17-25, 1985.
- 11) 日高 秀夫, 立川 涼: 魚類による化学物質の忌避試験法(2)。生態化学, 8(1), 17-27, 1985.
- 12) 日高 秀夫, 立川 涼: 魚類による化学物質の忌避試験法(3)。生態化学, 8(2), 31-40, 1985.
- 13) 日高 秀夫, 立川 涼: 魚類による化学物質の忌避試験法(4)。生態化学, 8(3), 31-38, 1985.