



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ノリ（海苔）を供試生物とした都市下水処理水の生物検定法に関する研究
Author(s)	丸山, 俊朗; 三浦, 昭雄
Description	第1回衛生工学シンポジウム（平成5年11月17日（水）-18日（木） 北海道大学学術交流会館） . 4 計測手法 . 4-2
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 1, 122-128
Issue Date	1993-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7434
Type	departmental bulletin paper
File Information	1-4-2_p122-128.pdf



4 - 2

ノリ(海苔)を供試生物とした都市下水処理水の生物検定法に関する研究

丸山俊朗(宮崎大学), 三浦昭雄(青森大学)

1. はじめに

都市下水道は沿岸海域の水質保全に重要な役割を果たしている。しかし、都市下水処理水や工場廃水処理水(以下、下水処理水と略す)はなお多様な物質を含み、これが海産生物の生息地に放流されることが多いため、生物への長期的影響が危惧されている。

わが国では1950年代以降の急速な産業の発展に伴う産業廃水とし尿処理水によると推定される栽培ノリ(海苔)への影響が社会問題化した。今日の下水処理水等の放流は、過去の一時期のよ様なドラスチックな生物影響はみられなくなったものの、なお影響を与える可能性があり、過去の経験から放流域の漁業者、特にノリ栽培業者には不安を与えている。今後、益々処理場の建設が進められる状況下で、人の生活と水産生物との共存は、水産業のみならず一般市民からもアメニティー向上の観点からも求められている。

沿岸域は高い生物生産の場であり、海藻は沿岸海域の生物群集のなかで一次生産者であるのみならず、動物の再生産の場を形成し、極めて重要な生物群集構成生物である。海藻は潮間帯から漸深帯に位置する基物(基材)に着生して生活し、魚類のように移動できないので、下水処理水の影響を受け易い。

下水道建設の目的の一つである環境保全、すなわち生物の保全を行うには、海藻(水生植物)の保全が基本である。現行の処理法を評価し、必要に応じて処理法を改善するためにも短期間毒性試験法の確立が急務である。

OECDの毒性試験法の供試生物(9種)には海産生物は採用されていないが、近年になって検討され始めた。また、Standard Methodsの毒性試験には海産生物(7種)が用いられているが海藻は用いられていない。しかし、米国カリフォルニア州は下水処理水から海域の水産資源保護のための長期影響予測を目的として、海藻を含む4種の生物による短期間毒性試験法を開発した。

海産の動・植物プランクトンと魚類を供試生物とした単一物質の短期毒性試験の研究は多いが、単一物質の海藻(草)に対する影響の研究は少なく、下水処理水関連物質の毒性研究はさらに少なく、下水処理水自体の海藻(草)に及ぼす影響に関する研究は極めて少ない。筆者らはノリ(海苔)の生育に及ぼす都市下水処理水の影響を検討してきた。海藻を供試生物として毒性試験を行う場合、生物学的効用(供試される海藻の種類)、生活環における世代、試験法、及び社会経済的効用が重要である。ここではノリのもつ生物学的効用、社会経済学的効用、環境変化に伴う海藻群落の遷移、生活環における世代による効用、試験法及び2,3の試験結果例について述べる。

2. 海藻を供試生物とした廃水等の毒性に関する研究の概括

2.1 廃水

これまで海藻を用いて毒性試験がなされた廃水(有害性物質)と供試された海藻に関する文献は下水処理水の毒性試験用の海藻を選定するにあたって有益である。それによれば海藻を用いた毒性試験の対象になった廃水(有害性物質)はおおまかに次の5種に類別される。(1)産業廃水(パルプ工場廃水など5種類)(論文数4編)、(2)し尿処理水(3編)、(3)都市下水処理水関連(懸濁物質など8種類)(18編)、(4)船底塗料・殺藻剤(銅など)(7編)、(5)化学物質(PCBsなど22物質)(8編)。

2.2 供試海藻

供試された海藻の種類をまとめると次のとおりである。

緑藻類：アナアオサ(*Ulva pertusa*) (論文1編), ヒラアオノリ(*Enteromorpha compressa*) (1), ボウアオノリ(*Enteromorpha intestinalis*) (1), ヒビミドロ(*Urothrix pseudoflaccida*) (1), ヒトエグサ(*Monostroma wittrockii*) (2)。

褐藻類：ジャイアントケルプの一種(*Macrocystis pyrifera*) (8), コンブの一種(*Laminaria farlowii*) (2), コンブの一種(*Laminaria saccharina*) (2), ワカメ(*Undaria pinnatifida*) (3), カジメ(*Ecklonia cava*) (3), シオミドロの一種(*Ectocarpus siliculosus*) (2), ホンダワラの一種(*Sargassum agardhianum*) (1)。

紅藻類：アサクサノリ(*Porphyra tenera*) (6), スサビノリ(*Porphyra yezoensis*) (8), オゴノリ(*Gracilaria verrucosa*) (1)。

これらの海藻のうち都市下水処理水の毒性試験に最も普通に供される海藻はわが国ではノリであり、アメリカではジャイアントケルプ(コンブを含む)である。

3. ノリを供試生物とすることの意義

3.1 ノリの供試生物としての効用

供試海藻は生物学的効用と社会経済学的効用を兼ね備えたものが望ましい。

3.1.1 生物学的効用

わが国においてノリを供試生物とする生物学的効用として次のことがらが考えられる。①一次生産を行う多細胞有用藻類である, ②世界中に広く分布する固着生物であり, 魚類のように移動できないので現場で汚染の影響を受け易い, ③ノリの一種スサビノリは日本, 韓国及び中国で最も広く栽培されている種類である, ④実験室で生活環を完結でき, 通年配偶体世代と孢子体世代のいずれの供試体も得られる, ⑤実験室で葉長1cmの幼葉が10日間で数倍に生長する, ⑥ノリ栽培は育苗期(9~10月)から生産期(11月~翌3月)までの間廃水中の毒性物質のモニタリングの役割を果たしている, ⑦ノリ栽培は浮流し式によって水表面で行われるので, 低塩分の下水処理水の影響を検出し易い, ⑧ノリは相当に富栄養化の進んだ海域においても生育できるので, ノリが生育できる水質は保全すべき最低の水質と考えられる。

3.1.2 社会経済学的効用

ノリは供試生物として次の社会経済学的効用をもつ。①国民にとって極めて身近な食料である, ②消費量が多い(わが国の1988年度生産量: 1枚3gの乾ノリ106億枚(最大)), ③栽培・養殖水産物のうちで生産量と生産金額が最大である(生産量: 総量133万トン, ノリ(33.3%), カキ(20.4%)など; 生産金額: 5,800億円, ノリ(25.5%), ブリ(22.2%)など), ④経営体数は約18,000世帯である, ⑤施設面積は約121 km²で栽培場は北海道から鹿児島県に至る太平洋沿岸域と瀬戸内海のほとんどの県にわたる, ⑥今日もなお下水処理水による生育障害が危惧されている。

3.2 海藻類群集の遷移系列

海藻がそれぞれどのような物理的・化学的環境で生育するかを知ることは, 供試海藻の選定とその意義を明らかにするうえで重要である。図1は海域の汚染度と物理的・化学的安定度を指標として, 多細胞藻(草)類, 珪藻, 鞭毛藻, 藍藻及び細菌からなる生物群集の遷移系列をおおまかに区分したものである。例えば, IからIIIに環境が変化すると, 海藻(草)群落は短時間に遷移し, その回復には長時間を要する。ノリはIからIIIまでの広範な環境に生育でき, ノリが生育できない環境に変わると植物プランクトン(赤潮)と細菌のみが生息するようになる。ノリ生産量の高くなるIIIの環境は必ずしも望ましい環境ではないが, 保全すべき最低の水質環境である

う。この意味でノリは環境保全の観点から極めて極限的な環境指標生物と考えることができる。

3.3 ノリの生活環

図2はノリの生活環を示している。葉状体は10月から翌3月までの期間中の40日間で幼葉から葉状体に生長して枯れて流失する。葉状体に造果器が形成されて受精し、受精卵は分裂して果胞子になる。果胞子は自然界ではカキ殻に侵入して貝殻糸状体に生長する。カキ殻がない場合には綿状のフリー糸状体(無基物糸状体)に生長する。フリー糸状体を夏季の条件(高温・長日)に維持すると糸状体はいつまでも増殖し続ける。実験室ではこの状態で培養保存される。これを秋の条件(低温・短日)に移すと糸状体は殻胞子嚢を形成し、成熟して殻胞子(直径約10 μm)を放出する。放出された殻胞子は核相が2nからいったん4nになった後、付着基を形成して基物に着生後、2回の減数分裂を経て発芽体から幼芽・幼葉に生長する。巨視的藻体は配偶体(有性世代, 核相 n)であり、微視的藻体は胞子体(無性世代, 核相 2n)である。

4. 毒性試験方法

4.1 供試藻体の世代と試験期間

毒性試験に用いられるノリの供試藻体は巨視的藻体と微視的藻体に分けられる。ノリ供試藻体は、実験室で培養保存中のフリー糸状体から培養によっていつでも巨視的藻体のすべての発育期の藻体が得られる。なお、容易にクローン、すなわち遺伝子型の同一の個体群を作ることができる。その生活環における世代と試験期間は次のようである。

巨視的藻体：葉状体の生長速度，発症，死細胞，色調(葉長1cm～数cmの幼葉：培養約10日間)。

微視的藻体：①殻胞子の基物への着生(カバーグラスでは2～3日間)，②根様系の形成～付着基形成(通算4日間)，③4細胞期までの減数分裂期(通算5日間)，④4～32細胞期の幼芽期(通算約10日間)，⑤幼芽～幼葉(約1 cm)～成葉の生長期(通算約2～3週間)。

4.2 影響の検出法

ノリは有害性物質に暴露されると、細胞が枯死する直前から色素体の形状変化や細胞の膨潤、収縮、原形質分離、色調変化、及び退色等が観察されるようになる。これまで行われた影響の検出法は供試藻体が巨視的藻体か微視的藻体かによって大別される。影響を検出する指標は巨視的藻体では肉眼的変化と生理学的変化を、微視的藻体では顕微鏡下での肉眼的変化である。

4.2.1 供試藻体が巨視的である場合

(a)肉眼的変化：①生長速度，②葉体面積，③葉体乾燥重量，④Chl.a含有量，⑤肉眼による色調，⑥吸光度比(567nm ab./676nm ab.)，⑦死細胞率，⑧生残率。

(b)生理学的変化：①エリスロシン染色，②エバンスブルー染色，③硝酸銀還元反応(Molish反応)，④TTCによる脱水素酵素反応，⑤放射性同位元素による栄養塩等吸収速度([^{32}P] KH_2PO_4 ，[^{35}S] H_2SO_4 ，[^{14}C] Na_2CO_3)，⑥細胞内 K^+ 含有量，⑦DMSPの細胞膜浸透性，⑧光合成速度，⑨原形質分離限界濃度。

4.2.2 供試藻体が微視的である場合

①殻胞子の基物への着生率，②細胞分裂速度，③生残率。

以上のように影響の検出法としてさまざまな方法が検討ないしは採用されてきた。巨視的藻体の場合は、葉状体細胞の生理作用や健康度(発症や細胞死を含む)は、終局的には生長量として現れるので、培養によって生長量を測定するのが最も確実である。色調変化は生長に関係がないようであるが、水質を確実に反映する。したがって、影響の検出法としては葉長を主たる指標とし、細胞死、症状及び色調を補助的指標にするのが適切と考えられる。しかし、一般の毒性試験のような対照区と比較して影響を定量的に表すことが困難である。その理由は海水に

下水処理水を添加することは、同時に生長促進物質(栄養塩類)と生長阻害物質を添加し、塩分を低下させることであり、生長促進物質は健康度を増して生育阻害を抑制し、塩分低下は生育阻害を強めるためである。この結果として有害性物質のみが変量となる場合と比較して、複雑な用量-影響関係を示す(図3のB, C及びD曲線, 図5)ためであり、適切な対照区の設定が困難なためである。

短期間毒性試験では栄養塩を添加しなくてもよいので、対照区と比較して影響を定量的に評価することができる。長期毒性試験では栄養塩を添加する必要がある。栄養塩添加は生育阻害を抑制するので、下水処理水の影響を正しく評価できない可能性がある。したがって、微視的藻体を用いた短期間毒性試験の方が巨視的藻体を用いた長期間毒性試験より影響を良く把握し得ると考えられる。

4.3 培養法

4.3.1 培養法の種類

巨視的藻体の培養法には、静置培養法、静置培養下で適宜浮動を与える方法、流水培養法、通気培養法及び振盪培養法がある。ノリの生長に影響検出の指標とすると、いずれの培養法が最適であろうか。生長に及ぼす影響濃度を検出するには多数の培養区の設定が必要である。生長に及ぼす影響因子のうち物理的因子である培養液とノリの相対運動と大気からの炭酸ガス供給を全培養区で等しくしなければならない。この条件を満たす培養法は上記5つの培養法のうち振盪培養法が最適である。

微視的藻体を用いた毒性試験は専ら静置培養法で行われる。この理由は少ない培養液中で殻胞子のカバーグラスなどの基物への着生から初期細胞分裂の段階を対象とするためである。

4.3.2 培養条件と培養区

培養条件として、水温、照度、日長、栄養塩濃度及び塩分がある。水温、照度、日長の条件は供試海藻の自然における条件に設定すればよい。

巨視的藻体を用いて生長を指標として毒性試験する場合、海水の種類、処理水の採水曜日と採水時刻、処理水添加率、栄養塩濃度及び塩分をどのようにして、どのような培養区を設定するかが重要な問題である。

さらに、生長によって影響を定量的に表現するには対照区が問題となる。処理水の場合、前述したように単一物質の毒性試験の場合のように真の対照区を設定できない問題がある。

これに対して、微視的藻体を用いる短期間毒性試験では栄養塩添加は不要であるが、培地を交換して有害性物質の濃度を一定に保つことは殻胞子の着生に影響するので不可能である。

5. ノリを供試生物とした下水処理水の毒性試験結果例

5.1 未殺菌2次処理水

図3は6種の処理水の塩分31.0における処理水添加率と振盪培養約10日後のノリ葉状体の生長比の関係である。変化のパターンはA処理水, B, C及びD処理水, 及びE₁とE₂処理水の3種の処理水に区分できる。A処理水はB~E₂処理水と比較して、著しく異なった変化を示し、相当に強い生育阻害物質を含んでいることを示している。B, C及びD処理水は何等かの生育阻害物質を含み、E₁とE₂処理水には生育阻害物質をほとんど含んでいないと推定される。6種の処理水のうちA処理水のみ死細胞と一症状が発現した。図3から無影響濃度を求めようとするれば、A処理水では0.3%以下となるが、B~E₂処理水では求められない。

図4は図3のA処理水添加率と塩分を変量とした振盪培養10日目の生長比である。A処理水添加率の増加に伴う生長比の変化は、栄養塩濃度を一定とした遊離塩素、塩素処理水あるいはモノ

クロラミン(NH_2Cl)の用量-影響関係(図8)で見られる変化傾向とは著しく異なる。また、塩分低下が生育阻害を強めることが明瞭である。

図5は図4に対応する死細胞率である。死細胞は添加率1%程度で塩分が低いほど特異的に発現している。処理水添加率1%で死細胞が特異的に発現する現象はA処理水だけでなく、通日試験でも認められている。A処理水のみで一症状が観察されたが、症状は「ちりめん症」様であった。症状は塩分が低いほど、また処理水添加率が高いほど重くなっている。図4と図5のような現象はノリ葉状体の生長に対する生長促進物質(栄養塩など)、生長阻害物質(死細胞発現物質など)、及び塩分との拮抗作用と考えられ、未殺菌処理水の重要な特徴の1つで、振盪培養法ではじめて明らかになった。

5.2 殺菌2次処理水

2次処理水に遊離塩素を加えると多様な物質が生成される。図6は塩素殺菌2次処理水を熟成海水に加えた培地を用いて図3を得たと同様の条件(1 cmの幼葉、2日ごとに培地交換など)で培養試験を行った。生長は処理水に加えた遊離塩素濃度に完全に支配され、処理水添加率にはほとんど支配されていない。10日間培養-50%生長阻害初期遊離塩素濃度(10-day EC_{50})は $0.025 \sim 0.035 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ であり、細胞の半数致死初期遊離塩素濃度(10-day LC_{50})は $0.06 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ であった。遊離塩素添加によって極めて強い生育阻害物質が生成されることが明らかとなった。2次処理水の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度は一般に $10 \sim 30 \text{ mg NH}_4\text{-N} \cdot \text{l}^{-1}$ である。これに遊離塩素を加えると、加えた遊離塩素の50~60%がモノクロラミン(NH_2Cl)になるので、生育阻害物質の主たる物質が NH_2Cl と考えられた。そこで、塩化アンモニウム溶液と次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて NH_2Cl を調整し、同様の培養試験を行った。その結果、塩素殺菌2次処理水で得た結果とほとんど一致した結果(10-day EC_{50} : $0.014 \sim 0.02 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$; 10-day LC_{50} : $0.015 \sim 0.035 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$)を得た。

NH_2Cl の暴露濃度は培養試験中に低下する。 NH_2Cl 濃度がほとんど低下しないように3時間ごとに培地を交換して培養試験を行った結果、48-h LC_{50} は $0.007 \text{ mg Cl}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ であり、暴露時間が増加すると LC_{50} 値は指数関数的に低下することが明らかになった。これまで検討した方法によって、塩素殺菌2次処理水中の最も強い生育阻害物質が NH_2Cl であることを明らかにすることができた。

一方、最近の研究から、 NH_2Cl 濃度は実験中に低下するが、系の酸化力は低下していないところから、減少した NH_2Cl の全量が NH_2Br に変化したと考えられる。 NH_2Br の毒性は NH_2Cl の毒性と同程度と考えられるが、今後の課題である。

5.3 下水処理水の採水時刻

処理水の水質は刻々と変化するので、毒性試験を行う際の採水時刻が重要である。

図7は木曜日の9時から翌7時の間、2時間ごとの未殺菌2次処理水の添加量と振盪培養10日後の生長比の関係(日間変化、晴天時、塩分28.0)である。それぞれの処理水添加率について、危険率5%以下で有意差のない連続した時間帯を点線で囲んで示している。それぞれの処理水添加率における生長比は採水時刻によって変化し、同程度の生長比を示す2つの時間帯と移行的生長比を示す時間帯のあることがわかる。この変化は栄養塩、特に生長比は $\text{P}_{04}\text{-P}$ 濃度の対数値と直線関係にある。ノリの生長比からみて同質とみられる時間帯は11~17時と23~翌3時とみられる。また処理水添加率0.5%の11~17時の生長比は海水区の生長比より低く、21~翌5時の処理水は添加率5%の生長比が添加率2%の生長比より低いところから、両時間帯に有害性物質が混入していたことが示唆されている。11~17時の処理水では死細胞率は2%以下であるが、23~翌1時の処理水(添加率1%)では死細胞率が約10%であった。

図8は異なる処理水添加率に対する処理水採水曜日(15時採水、雨天時は除く)と生長比の週間

変化である。ノリの生長比からみて火～金曜日の処理水は同質とみられ、月曜日の処理水は最も生長比が低いことがわかる。また、処理水添加率0.5%区の生長比が火、水、金及び月曜日で海水区より低いことから、未殺菌処理水にはかなりの頻度で生育阻害物質が含まれていると推測される。このように日間変化と週間変化するところから、コンボジット試料は試験に供すべきでないことがわかる。

6. おわりに(今後の課題)

以上の検討結果から、下水処理水の生物検定のための海藻は、特にわが国においては、ノリが最適であると考えられる。ノリ自体の巨視的藻体(葉状体, 配偶体)と微視的藻体(糸状体, 胞子体)について塩分を含めた有害性物質に対する感受性を明らかにして毒性試験法を確立すべきであると考えている。ノリを海藻の代表的供試体とする場合、ノリ以外の海藻の巨視的藻体と微視的藻体の感受性を比較しておく必要がある。さらに、下水処理水ができて得る限り海藻の生育に影響を与えないようにするために下水に流入する有害性物質の監視法, 塩素殺菌処理水の無毒化法, 代替殺菌法, 処理水の処理・処分法及び影響の評価法などの検討が必要と考える。

これまで述べた筆者らのノリの生育阻害の研究結果は実験室で得られた結果であり、今後現場での検証が必要であると考えている。

塩素殺菌処理水に生成されるモノクロアミンがノリの生育に対して極めて強い毒性を示すことが明らかになったが、ノリよりも感受性の強い波打ちぎわに生息する生物への影響が危惧される。

文 献

本論文の作製に60編の論文を引用したが、引用文献は「丸山, 三浦(1993), 水濁協誌, 16, 327-338.」をご覧ください。

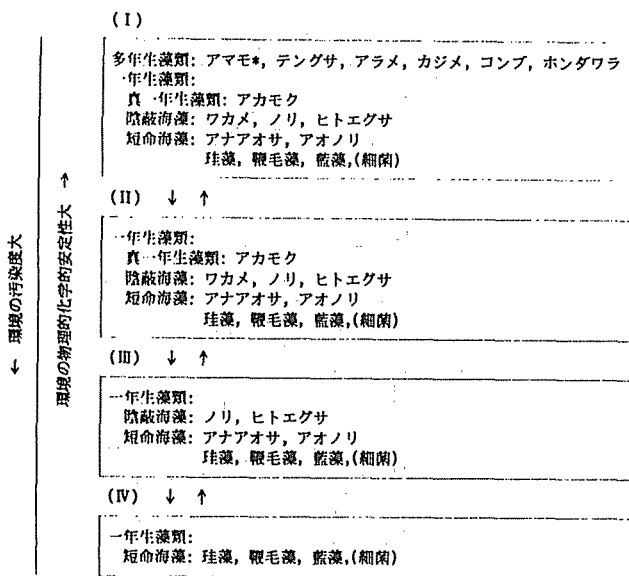


図1 汚染の進行と環境の物理化学的安定度の変化に伴う海藻(海草)群落の遷移系列の概念図
 * 種子植物(顕花植物)(海草)

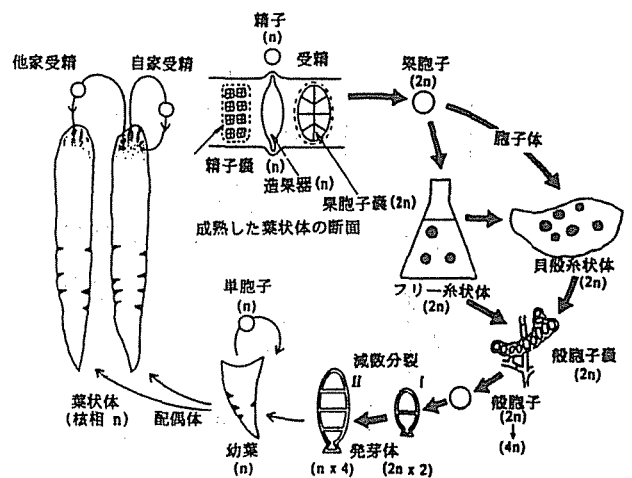


図2 スサビノリ *Porphyra yezoensis* の生活環

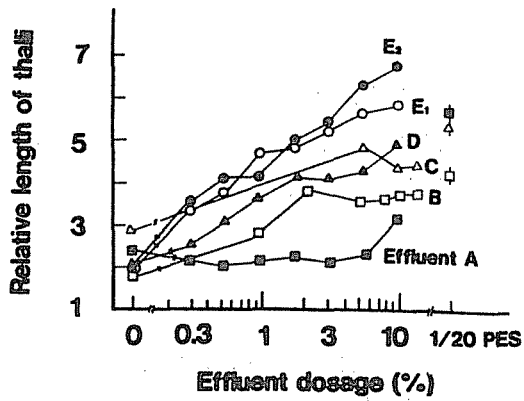


図3 海水に対する6未殺菌2次処理水の添加率とスサビノリ *Porphyra yezoensis* の葉長比の比較。
処理水添加率, 0~10v/v%; 塩分, 31.0; 培養期間, 振盪培養10日間; n=5; 縦線, 標準偏差(1 σ).

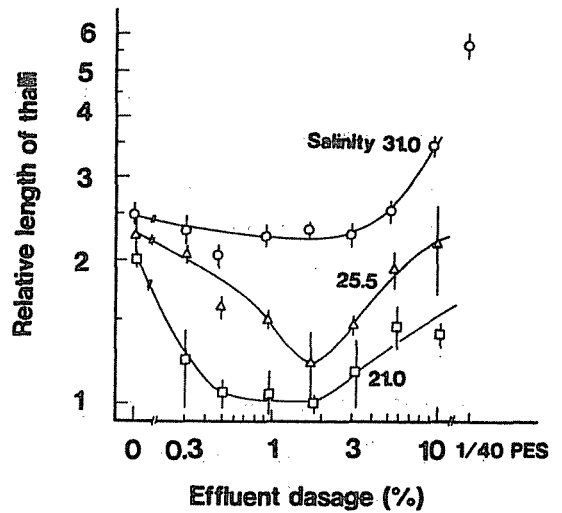


図4 海水に対するA処理場の未殺菌2次処理水の異なる添加率と塩分におけるスサビノリ *Porphyra yezoensis* の葉長比の比較。
処理水添加率, 0~10 v/v%; 塩分, 21.0, 25.5, 31.0; 培養期間, 振盪培養10日間; n=5; 縦線:標準偏差(1 σ).

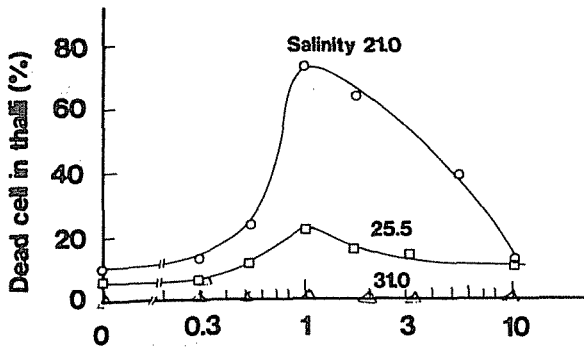


図5 海水に対するA処理場の未殺菌2次処理水の異なる添加率と塩分におけるノリ生葉状体に発現した死細胞率の関係。
処理水添加率, 0~10 v/v%; 塩分, 21.0, 25.5, 31.0; 培養期間, 振盪培養10日間; n=1(3ヶ所).

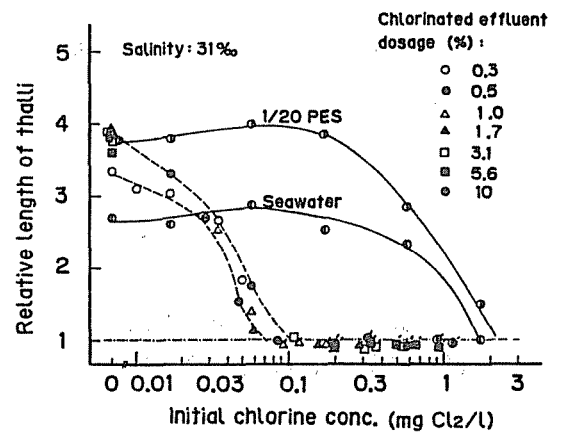


図6 添加率の異なる塩素処理水添加培地における初期添加遊離塩素濃度と葉長比の関係。
培地交換頻度: 2日; 塩分:31.0; 培養日数: 振盪培養10日間; 塩素処理水添加率: 0~10%; n=5.

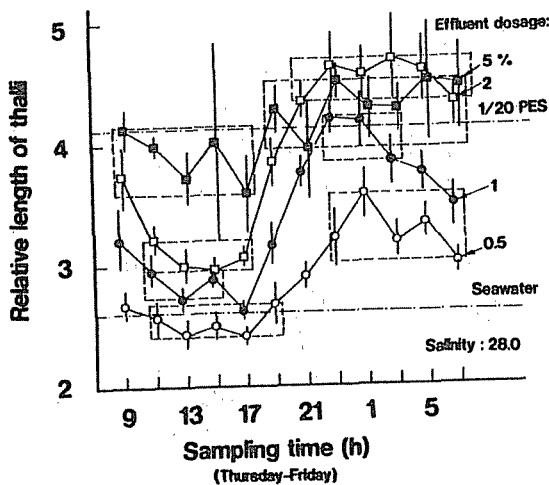


図7 採水時刻と異なる処理水添加率と葉長比の関係。
処理水: A処理場未殺菌処理水(1985.5.16~17); 培養期間: 10日間; n=5; 縦線: 標準偏差(1 σ); 点線枠内の平均値は危険率5%で有意差なし。

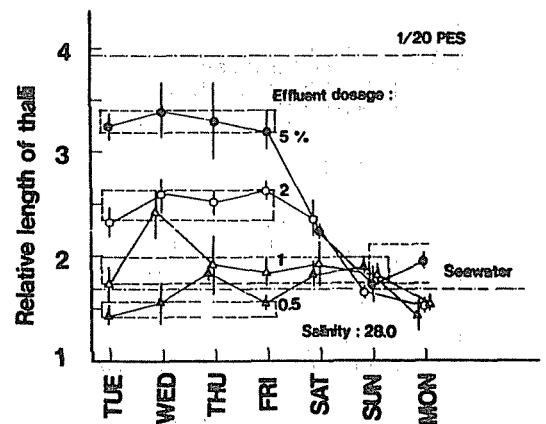


図8 採水曜日による処理水添加率と葉長比の関係。
処理水: A処理場未殺菌処理水(1986.5.12と7.29~8.3); 採水時刻: 15:00時; 培養期間: 10日間; n=5; 縦線: 標準偏差(1 σ); 点線枠内の平均値は危険率5%で有意差なし。