

## 淡水産生物を用いた生態影響評価手法について

若林明子 紺野良子 西井戸敏夫

### 1 はじめに

著者らは昭和57年度より化学物質等の淡水産生物に与える影響を調べるために最も適している方法について検討を行ってきた。<sup>1~6)</sup> その結果、魚類、甲殻類または藻類を化学物質、環境水または排水に暴露し半数致死濃度(LC50)または50%影響濃度(EC50)を求める方法が好ましいことを明らかにした。以下にその概要を述べる。

### 2 魚類

#### (1) 供試生物

孵化後20日齢までのニジマス (*Salmo gairdneri*) 仔魚を用いる。ニジマスは発眼卵の段階で実験室に運び、脱塩素水道水を流した水槽中12±2℃で孵化させる。孵化した仔魚は同じ条件で飼育し実験に用いる。なお、飼育中給餌はしない。

#### (2) 希釈水

蒸留水1ℓ中にCaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 26.1mg, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 17.7mg, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.1mg及びNaHCO<sub>3</sub> 25mgを含むように調製した人工軟水を希釈水として用いる。この希釈水の硬度は25mg/ℓである。

#### (3) 試験容器

2ℓポリエチレンびんの上下両端を切り、底にサラシまたは蒸留水で良く洗って糊を完全に落としたガーゼを張ったものを3~5ℓガラス製ビーカー中の試験液に半分以上浸かる状態で使用する。

#### (4) 方法

JIS K0102-1985に準じて行い、暴露時間ごとのLC50を求める。試験水2ℓ以上を用い、水温10~14℃(温度幅2℃以内)、pHは7±0.4で試験を行う。まず、試験容器に供試魚を10尾ずつ入れ、希釈水中で試験時と同じ水温で24時間順化する。ついで、水温を一定にした試験水に順化の終わった供試魚をポリエチレン容器ごと移

し試験を開始する。試験開始12時間後までは30分おきに供試魚の観察を行って魚の生死及び遊泳状態を記録する。その際、死亡魚は取り出し体重を測定する。その後は、12時間を超えない時間ごとに同様の操作を行う。試験水は24時間ごとに、全量を新たに調製し水温を調節したものと交換する。96時間後に試験を終了する。

片対数方眼紙の対数軸に化学物質の濃度或いは排水等の希釈割合を、実数軸にその時の死亡率をプロットし、3, 6, 12, 24, 48, 72及び96時間LC50を求める。

### 3 甲殻類

#### (1) 供試生物

オオミジンコ (*Daphnia magna*) の24時間齢までの仔ミジンコを用いる。試験前約1カ月は20℃に設定した恒温室内の脱塩素水中で飼育し、1日1回餌として緑藻類の *Chlorella pyrenoidosa* を与える。試験の前日に、十分に成熟した親以外のミジンコをピペットを用いて水槽から除き、試験開始直前に試験前24時間以内に生まれた仔ミジンコを集める。仔ミジンコは100~200mlのビーカーに集めて飼育水を希釈水で数回置換えし、出来るだけミジンコの密度を高くする。

#### (2) 希釈水

魚類の試験で用いたものと同じものを用いる。

#### (3) 試験容器

容量約40mlのポリエチレン製カップを用いる。

#### (4) 方法

試験容器に全量を20mlとした時正確に所定濃度になるように化学物質の濃厚溶液を入れ、希釈水を加えて約18mlとする。これに上記の仔ミジンコ10頭を約0.5mlの希釈水と一緒にピペットで加える。次に、上皿天秤上で希釈水を加えて内容物の全量を20gとする。試験は20±1℃に設定した恒温室内で明条件下で行い、6時間及び24

時間後に実体顕微鏡下で生死の確認を行う。対照及び各濃度区或いは各希釈区はすべて4連で行う。

試験終了後、片対数方眼紙の対数軸に化学物質の濃度或いは排水等の希釈割合を、実数軸にその時の死亡率をプロットし、6及び24時間LC50を求める。

#### 4 藻類

##### (1) 供試生物

対数増殖期にある緑藻類ムレミカツモ属 *Selenastrum capricornutum* を用いる。緑藻を試験開始時に対数増殖期になるように、下記の培地及び培養条件で前培養を行う。

##### (2) 培地

Gorhamの培地を改変した表1の組成のものをろ過により除菌して用いる。河川水はBOD 1 mg/ℓ程度以下の清浄なものを用いる。排水等の試験用には河川水に含まない100倍濃厚培地を調製する。

表1 培地の組成

化合物	濃度 (mg・ℓ <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	19.84
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.56
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	3.0
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	1.44
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.8
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ・9H <sub>2</sub> O	2.32
Na <sub>2</sub> EDTA・2H <sub>2</sub> O	0.2
citric acid	0.24
Fe citrate	0.24
河川水	0.4 (ℓ・ℓ <sup>-1</sup> )

##### (3) 希釈水

魚類で用いたものと同じものを除菌して用いる。

##### (4) 試験容器

容量500mlのガラス製三角フラスコにシリコンセンをしたものを乾熱滅菌して用いる。

##### (5) 方法

操作は全て無菌条件下で行う。化学物質を用いて試験を行う場合は、試験容器に培地を100mlとり、化学物質の濃厚溶液を各フラスコへの添加量が1.5ml以下になるように加える。水に対する溶解度が低い物質はアセトン

溶解補助剤として用いる。排水又は環境水の試験を行う場合は除菌した排水等を希釈水で希釈し、全量を100mlとする。そこへ濃厚培地1mlを加える。溶解補助剤を用いた場合は対照としてアセトンを加えたものも用意する。各フラスコに藻類濃度が1,000~1,500細胞/mlとなるように緑藻を接種する。

培養は温度20±1℃、照度4,000±100ルクス（白色蛍光灯）の連続照射で毎分90回転の振とう条件で行う。

1日1~2回フラスコから培養液を少量サンプリングし、ろ過食塩水で希釈し0.9%食塩濃度として、パーティクルカウンターを用いて藻類の細胞数、平均細胞容量、全細胞容量を測定する。

対数増殖期の比増殖速度 ( $\mu$ ) を次式から求める。

$$\ln C = \mu t + \ln C_0$$

ここで、Cは培養時間tにおける藻類濃度、C<sub>0</sub>は初期藻類濃度である。

対照の比増殖速度 ( $\mu_0$ ) との比  $\mu/\mu_0$  を影響濃度 (EC) とし、片対数方眼紙の対数軸に化学物質の濃度或いは排水等の希釈割合を、実数軸にECをプロットする。図からEC=0.5となる化学物質の50%影響濃度 (EC50) 又は排水等の50%影響割合を求める。

#### 参考文献

- 1) 若林明子, 鬼塚聡: 魚類の急性毒性に影響を与えるいくつかの因子について, 東京都環境科学研究所年報 1986, p102~104.
- 2) 若林明子ら: 藻類培養試験による排水の評価, 東京都環境科学研究所年報 1986, p105~107.
- 3) 紺野良子, 若林明子: 藻類の増殖に及ぼす化学物質の影響, 東京都環境科学研究所年報 1987, p113~116.
- 4) 若林明子ら: 2種のミジンコに対する化学物質の致死影響について, 東京都環境科学研究所年報 1987, p126~128.
- 5) 若林明子, 溝呂木昇: 界面活性剤のニジマスに対する亜急性毒性について, 東京都環境科学研究所年報 1988, p129~131.
- 6) 若林明子, 溝呂木昇: 化学物質のニジマスに対する亜急性影響について, 東京都環境科学研究所年報 1989, p167~169.