

アカヒレ, ミナミヌマエビに対する各種毒物の 毒性と飼育水の硬度との関係

北 村 等

Relation Between the Toxicity of Some Toxicants to the Aquatic Animals (*Tanichthys albonubes* and *Neocaridina denticulata*) and the Hardness of the Test Solution

Hitoshi KITAMURA

The concentration toxicity of a river is detected by the freezing concentration method and the toxicity test with the aquatic animals. Many inorganic substances such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , and Cl^- are soluble in river water are also concentrated with a toxicant by the freezing concentration method. The toxicity of a toxicant would change due to these increasing substances. I studied the relation between the toxicity to the aquatic animals and the hardness of the test water.

The fluctuation pattern of the toxicity to the fish and shrimp was the same. The pattern was divided into three types. The first pattern was decreasing toxicity according to increasing hardness of the test water. Zn^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} belonged to the type. The second pattern was increasing toxicity according to increasing hardness of the water, and these toxicants included ammonia and the surfactants. The last pattern was the type that the hardness of the test water had no effect. Hg^{2+} and the synthetic detergents belonged to this type.

Key word: 毒性 (toxicity); 硬度 (hardness)

アカヒレ (*Tanichthys albonubes*); ミナミヌマエビ (*Neocaridina denticulata*)
濃縮毒性 (concentration toxicity)

濃縮毒性試験法¹⁾を河川水に適用することにより、河川の環境を魚類の生活環境に対する毒性物質による汚濁といった観点より評価することが可能となった²⁻⁵⁾。この方法とともに pH, CODなどの分析化学的方法を併用することにより、河川の水質環境をより広範に評価することができる。

本法では濃縮法に凍結濃縮法を用いているため、毒性原因物質とともに河川水に通常含まれる溶存成分も同時に濃縮される。河川水の主要な溶存成分には Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , Na^+ , HCO_3^- などが、これらの濃縮に伴って毒性物質の毒性が変化する可能性がある。そこで本研究では Ca^{2+} , Mg^{2+} の硬度成分を指標として、溶存成分の増加に伴う各種

毒性物質の毒性の変化を追究した。

濃縮毒性試験法の供試生物としては、アカヒレ (*Tanichthys albonubes*) を用いるが、これとともにミナミヌマエビ (*Neocaridina denticulata*) を供試生物とする試みがある⁵⁾。エビ類は魚類に比べて有機リン系の農薬に対して非常に高い感受性を持つため(未発表)、これら農薬の検出には有効な供試生物である。そこで、これら2種類の供試生物を対象として、溶存成分の増加に伴う毒性の変化を検討した。

実験方法

各種毒性物質の毒性と硬度との関係は、数段階の

濃度が異なる硬水を用いて毒性試験液を作成し、これらをアカヒレ及びミナミヌマエビを用いる毒性試験にかけることによって調べた。

硬水は田端⁹⁾の方法に準じて作成した。すなわち、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸カリウム、炭酸水素ナトリウムの各特級試薬を用いて硬度30 ppm, 100ppm, 200ppm 及び400ppm の4段階の硬水を作った。硬度400ppm の溶液は、作成後時間の経過とともに硬度が減少するため数日以内に使用した。硬度30ppm は日本の河川の平均値である⁷⁾。硬度0 ppm には、アカヒレでは蒸留水を使用した。ミナミヌマエビは蒸留水で飼育すると異常をきたし、時として死亡することがあったため、硬度0 ppm での実験は行わなかった。また、アカヒレについては、一部の毒物で硬度200ppm での実験を行わなかった。

毒性試験の容器には直径12cmのガラスシャーレを用い、試験液100mlを入れた。これに全長16~22mmのアカヒレ7尾を収容し、0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48時間後に供試生物の生死を判別し、あわせて横転などの異常をも観察した。なお、対照実験には蒸留水を用いた。ミナミヌマエビでは体長5~15mmの個体を7尾入れ、アカヒレと同様の方法で観察した。対照実験には本学部の地下水を用いた。両種とも試験水温は25±1°Cとした。これらの毒性試験結果より、Doudoroff⁸⁾の直線的補間法に準拠して48hrLC₅₀を求めた。なお、両種とも銅を標準毒物としての毒性試験を随時行い、試験毎の感受性に差がないことを確かめた。

本研究で調べた毒性物質は、実際の河川に流入しへい死事故を起こしたことがある毒物や、また流入して問題となる可能性のある毒物である。これらを裁判化学⁹⁾の化学的分類に従うと、アカヒレでは以下のようなものである。揮発性薬毒物（酸性またはアルカリ性で水蒸気蒸留される薬毒物）としてはシアン、ホルムアルデヒド、パラクレゾール、フェノール、アンモニアを調べた。アンモニアについてはpHの違いによって毒性が大きく変化するため、毒性試験の開始pHを6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0としこれら7段階のpHにわたって硬度と毒性との関係を調べた。なお、pHの調節には1N塩酸及び水酸化ナトリウムを用いた。

難揮発性有機薬毒物（酒石酸の酸性下エチルアルコールで抽出しうる薬毒物）としてはピクリン酸を調べた。無機薬毒物は、いわゆる金属毒物であり水銀、亜鉛、六価クロム、鉛、銅、カドミウム、鉄、

セレン、アンチモン、ニッケル、ヒ素、リチウム及びアルミニウムを調べた。その他の無機薬毒物としては遊離塩素を調べた。

この分類以外の物質としてイオウ、タンニン酸、さらに界面活性剤の分析用原体であるスルホコハク酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム（エーロゾルOT）について調べた。また、市販洗剤として9種類の製品の毒性試験を行い、各48hrLC₅₀を界面活性剤の指標であるメチレンブルー活性物質(MBAS)として求めた。

ミナミヌマエビについては、揮発性薬毒物としてアンモニアを調べた。アカヒレの場合とほぼ同様に、開始時のpHを6.0, 7.0, 8.0及びpH9.0に調節して毒性試験を行った。無機薬毒物（金属毒物）としては水銀、亜鉛、六価クロム、銅、カドミウムの5種類を調べた。また、他の毒物としてはアカヒレの場合と同じ市販洗剤4種類の毒性試験を行なった。

結 果

アカヒレを用いた毒性試験結果より、アンモニアを除く揮発性薬毒物の48hrLC₅₀と硬度との関係をTable 1に示す。4種類の揮発性毒物ではフェノール及びパラクレゾールの毒性が比較的弱く、48hrLC₅₀は14~30ppmであった。ホルムアルデヒドは2.1~2.4ppm、シアンは最も毒性が強く0.42~0.44 ppmを示した。4種類の毒物とも硬度が変化しても毒性はほぼ一定であった。

アンモニアについては開始pH別に各硬度に対する毒性をTable 2に示す。アンモニアの毒性は酸性側よりもアルカリ性側で毒性が強くなることが知られており¹⁰⁾、今回の結果でも同様の傾向が認められた。すなわち、pH6.0、硬度30ppmの48hrLC₅₀が窒素態として150ppmであったが、pH7.0では92ppm、pH8.0では68ppmを示し、pH9.0では24ppmを示した。また、同一pHでは硬度が増加するほど毒性が強くなった。

難揮発性有機薬毒物及び金属毒物についてはTable 3に、無機薬毒物及びその他の毒物をまとめてTable 4に示す。ピクリン酸、鉄(Ee³⁺)、アルミニウムは全ての硬度で48hrLC₅₀が100ppm以上となった。金属類では水銀や銅の毒性が強く、水銀が0.48~0.80ppm、銅が0.10~0.78ppmを示した。遊離塩素(Table 4)も比較的毒性が強く、1.0ppm前後の値を示した。水銀、六価クロム、遊離塩素、市

Table 1. The toxicity of the volatile toxicants to the fish (*Tanichthys albonubes*)

Toxicant	Chemicals	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)				
		0	30	100	200	400
CN ⁻	KCN	0.42	0.42	0.44	-	0.42
formaldehyde	-	2.1	2.3	2.4	-	2.4
<i>p</i> -cresol	-	19	26	30	22	14
phenol	-	25	29	28	25	29

Table 2 The toxicity of the ammonium chloride at various pH to the fish (*Tanichthys albonubes*)

Toxicant	pH	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)			
		0	30	100	400
NH ₄ -N	6.0	140	150	84	24
	6.5	140	120	48	11
	7.0	130	92	40	8.0
	7.5	130	78	30	7.0
	8.0	110	68	24	6.0
	8.5	52	48	23	5.2
	9.0	26	24	15	3.6

Table 3 The toxicity of the unvolatile organic toxicants and the metals to the fish (*Tanichthys albonubes*)

Toxicant	Chemicals	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)				
		0	30	100	200	400
picric acid		>100	-	>100	-	>100
Hg ²⁺	HgCl ₂	0.80	0.52	0.52	0.48	0.48
Zn ²⁺	ZnSO ₄	7.4	24	60	76	140
Cr ⁶⁺	K ₂ Cr ₂ O ₇	60	68	80	80	72
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂	17	95	>100	-	-
Cu ²⁺	CuSO ₄	0.10	0.18	0.40	0.72	0.78
Cd ²⁺	CdCl ₂	5.2	14	23	>100	>100
Fe ³⁺	FeCl ₃	>100	-	>100	-	>100
Se ⁴⁺	Na ₂ SeO ₃	38	38	24	-	26
Sb ³⁺	K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆	38	42	34	-	42
Ni ²⁺	NiCl ₂	50	70	75	-	90
As ³⁺	As ₂ O ₃	23	29	24	22	23
Li ⁺	LiCl	9.2	23	44	44	62
Al ³⁺	K ₂ Al ₂ (SO ₄) ₄	>100	>100	>100	>100	>100

Table 4 The toxicity of the inorganic toxicants, tannic acid and detergents to the fish (*Tanichthys albonubes*)

Toxicant	Chemicals	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)				
		0	30	100	200	400
NaClO		1.1	1.1	1.2	0.94	0.82
S ²⁻	Na ₂ S	4.3	4.4	7.4	-	8.0
tannic acid		40	90	84	>100	>100
MBAS	aerosol OT	130	74	66	42	42
MBAS	detergents*	13	13	12	-	11

* : mean of nine commercial synthetic detergents

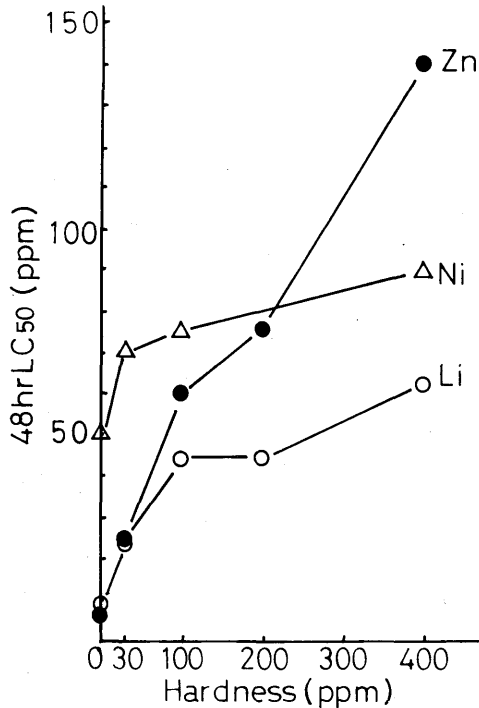


Fig. 1 The relation between the toxicities of Zn^{2+} , Ni^{2+} , Li^{+} to the fish and the hardness of the test water.

販売剤などは硬度が変化しても毒性は大きく変化しなかったが、カドミウム、銅などは硬度の増加に伴って毒性が減少した。

以上の結果より、アカヒレに対する毒性試験では、硬度の増加に伴う毒性の変化傾向を次の3型に分けることができた。すなわち、第1型は硬度の増加に伴い、その毒性が弱くなる毒性物質であり、亜鉛、鉛、銅、カドミウム、ニッケル、リチウム、タンニン酸がこのグループに入った。この内、典型的な変化傾向を示した亜鉛、ニッケル、リチウムの結果を Fig. 1 に示す。第2型は、硬度の増加に伴い毒性が強くなる毒性物質であり、アンモニア、スルホホはく酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム (エーロゾル OT) がこれに相当した。アンモニアの毒性を pH6.0, 7.0, 8.0, 9.0 の各 pH 別に Fig. 2 に示す。第3型は硬度が変化しても、その毒性が大きくは変わらない毒性物質であり、シアン、ホルムアルデヒド、パラクレゾール、フェノール、水銀、六価クロム、セレン、アンチモン、ヒ素、遊離塩素、イオウ及び市販洗剤が属した。

ミナミヌマエビを用いての毒性試験結果を Table

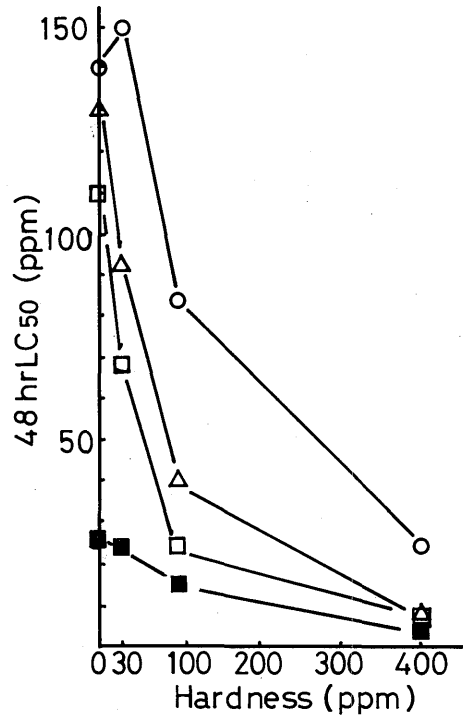


Fig. 2 The relation between the toxicity of the ammonium (as N) at various pH and the hardness of the test water.

○-○: pH6.0 □-□: pH8.0
△-△: pH7.0 ■-■: pH9.0

5, 6 にまとめて示す。水銀、銅、カドミウムの毒性が強く、48hrLC₅₀で3種類とも0.14~0.76ppmを示した。アカヒレに対するカドミウムの毒性が全て5 ppm以上を示したのに比べると、ミナミヌマエビはカドミウムに対して感受性が高かった。アンモニア (Table 6) では35~520ppmの間で変化し、アカヒレの3.6~150ppmに比べるとミナミヌマエビのアンモニアに対する感受性は低かった。また、市販洗剤についても48hrLC₅₀がほぼ300ppmを示したのに対して、アカヒレは120ppmを示し、両種での感受性の違いが認められた。

ミナミヌマエビの毒性試験結果より、アカヒレの場合と同様に毒性の変化傾向が3つの型に分けられた。第1型の硬度の増加に伴って毒性が弱くなる毒物には亜鉛、銅、カドミウム、六価クロムが相当し、第2型の毒性が強くなるものにはアンモニアが属した。アンモニアの毒性の変化傾向を Fig. 3 に示す。第3型の毒性に変化の少ないものには水銀、市販洗剤が属した。

Table 5 The toxicity of the metals and the detergents to the shrimp (*Neocaridina denticulata*)

Toxicant	Chemicals	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)			
		30	100	200	400
Hg ²⁺	HgCl ₂	0.24	0.29	0.28	0.23
Zn ²⁺	ZnSO ₄	5.0	16	24	76
Cr ⁶⁺	K ₂ Cr ₂ O ₇	23	28	42	62
Cu ²⁺	CuSO ₄	0.14	0.16	0.42	0.76
Cd ²⁺	CdCl ₂	0.23	0.28	0.40	0.76
MBAS	detergents*	290	300	330	320

* : mean of four commercial synthetic detergents

Table 6 The toxicity of the ammonium chloride at various pH to the shrimp (*Neocaridina denticulata*)

Toxicant	pH	48hrLC ₅₀ Hardness (ppm)			
		30	100	200	400
NH ₄ -N	6.0	520	428	329	115
	7.0	280	231	99	56
	8.0	197	99	99	31
	9.0	56	63	56	35

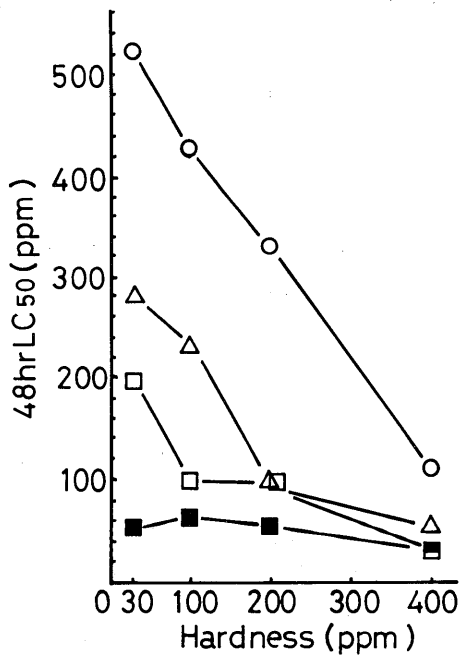


Fig. 3 The relation between the toxicity of the ammonium (as N) at various pH to the shrimp and the hardness of the test water.
 ○-○: pH6.0 □-□: pH8.0
 △-△: pH7.0 ■-■: pH9.0

考 察

アカヒレ, ミナミヌマエビともに, 硬度を指標とした河川成分の濃縮に伴う毒性の変化には3つの型が認められた。そして, 第1型~3型に所属する毒性物質は2種類の供試生物でほぼ共通していたことより, 毒性の変動要因は, 両供試生物で共通だと考えられる。以下に毒性の変動する要因を両生物まとめて考察する。

第1型の硬度の増加に伴い, その毒性が弱くなった亜鉛, カドミウムについては, これらの重金属イオンとカルシウム, マグネシウムとの拮抗作用¹¹⁾が知られており, このため毒性が弱くなったと考えられる。また, 硬度が増加するにつれて試験液のpHが高くなる傾向があり, 実験開始時に調節したpHも硬度が高いほど開始後のpHが上昇しやすく, これに伴って金属イオンが沈澱することも原因の一つと考えられる⁶⁾。

第2型の硬度の増加に伴い, その毒性が強くなった毒性物質にはアンモニアがあり, これは各硬度とも硬度が同じならば実験開始pHが高いほど毒性が強かった。また, 同じpHでも硬度が高いほど毒性が

強くなる傾向があった。これは第1型の場合と同様に硬度が高いほど、試験液のpHも高くなる傾向があるためと考えられる。界面活性剤の分析用原体はカルシウム、マグネシウムイオンと毒性の相乗作用があり¹²⁾、これによって毒性が強くなったと思われる。しかし、市販洗剤では硬度の影響はなく、分析用原体との違いについては原因不明である。

第3型は硬度が変化しても毒性が変化しないグループであり、シアン、水銀などが含まれた。水銀は他の金属毒物が硬度の増加に伴い毒性が弱くなるのに比べ、毒性がほぼ一定であった。水銀は水中に塩素イオンがあると錯体を形成することが知られており、試験液中では陽イオンの型でなく錯体として溶存していると考えられる。このため硬度による拮抗作用が生じなかったものと考えられる¹¹⁾。揮発性薬毒物のシアンは、pHの低下により遊離シアンの割合が多くなり、このため毒性が強くなる。しかし、pHが低いと揮発性が助長されるため、本研究で用いた止水式毒性試験法では、一部が揮発消失するため毒性が弱くなる可能性がある。したがって、硬度の低い飼育水ではpHは低くなり毒性は強くなるものの、一方では揮発消失するため毒性は弱くなる。また、硬水中では、pHは高い傾向にあり、このため毒性は弱いと揮発もしにくい。このような関係から、硬度が変化してもシアンの毒性は変わらない結果になったものと思われる。

ところで、以上みてきたように、アカヒレ、ミナミヌマエビを用いた毒性試験より、毒性物質には、河川水成分の増加によって毒性が弱くなる第1型と毒性が強くなる第2型、さらには毒性の変化しない第3型の3つのグループが存在した。そこで、濃縮毒性が検出された場合、その毒性原因物質がいずれの型に属するかで濃縮毒性の持つ意味が大きく違ってくるのが考えられる。以下に、毒性原因物質が第1型、第2型の各々の場合について、アカヒレを供試生物として考察する。

第1型の硬度の増加に伴い、その毒性が弱くなる毒性物質である銅を例にすると。日本の平均的河川(硬度30ppm)に0.09ppmの銅が溶存しているとす。銅が第3型の硬度が変化しても毒性の変化しない毒物ならば、Table 3より硬度30ppmの48hrLC₅₀が0.18ppmであるため、この河川水を2倍に濃縮すれば0.18ppmとなる。したがって、濃縮毒性は200%(2倍濃縮)である。しかし、実際には200%の硬度60ppmでは銅の48hrLC₅₀は、Table 3から推定する

とおよそ0.3ppmとなる。2倍に濃縮しても銅の濃度は0.18ppmであるので致死量には達しない。この河川水の濃縮毒性を推定すると、およそ800%となり、硬度に影響されないと仮定した場合の濃縮毒性が200%であるので、この800%の値はかなり弱めに検出されることがわかる。このように毒性原因物質が第1型の場合には、濃縮毒性の値が弱めに検出され、実際の河川に棲息する生物への影響が過小評価される可能性がある。

次に第2型の硬度の増加に伴い毒性が強くなる毒性物質であるアンモニアについて検討した。平均的河川水(pH7.0)にアンモニア態窒素が9.2ppm溶存しているとした場合、アンモニアが硬度による影響を受けないと仮定すると、48hrLC₅₀はTable 2より92ppmであるので、この濃縮毒性は1000%(10倍濃縮)となるはずである。しかし、硬度の増加に伴って毒性が上昇するため、銅と同様に推定するとおよそ400%となる。したがって、みかけ上濃縮毒性が600%ほど上回って検出され、過大評価される可能性がある。

このように凍結濃縮法を用いて濃縮毒性を調べた場合、第1型に属する毒性物質が原因物質であると、その毒性は過小評価され、第2型の毒物では過大評価される。したがって、濃縮毒性の測定値のみから河川水の潜在的な毒性を評価するのは危険であり、濃縮毒性が検出された場合は必ず毒性解析を行い、その毒性原因物質を明らかにした上で、実際の河川での影響を考慮することが重要である。

謝 辞

本研究を行うに当たり援助を頂いた本学卒業生の奥島裕二、川根康男の各氏に感謝致します。

引用文献

- 1) 日本水産資源保護協会編(1980):新編水質汚濁調査指針, 恒星社厚生閣, 東京, 451—514。
- 2) 北村等・狩谷貞二・佐藤雅一(1979):河川の毒性研究—I, 長崎市浦上川の毒性値, 本誌, (47), 15—20。
- 3) 北村等(1980):河川の毒性研究—II, 長崎市浦上川の致死濃度以下の毒性物質について, 本誌, (48), 27—33。
- 4) 北村等・池田和彦(1981):長崎市中島川, 浦上

- 川の濃縮毒性および毒性原因, 水処理技術, **22** (10), 861-871.
- 5) 北村等(1990): アカヒレ, ミナミヌマエビを用いた長崎県本明川の濃縮毒性及び毒性解析, 本誌, (**67**), 1-12.
- 6) 田端健二(1968): 水産動物に及ぼす重金属の毒性と緩和要因に関する研究-I, 重金属沈澱の生成とその毒性について, 2, 3の検討, 東海区水産研究報告, **58**, 203-214.
- 7) 小林純 (1974): 水の健康診断, 岩波新書, 東京.
- 8) Doudoroff, P., Anderson, B. G., Burdick, G, E., Galtsoff, E. S., Hart, W. B., Patrick, R., Strong, E. R., Surber, E. W., and Van Horn, W. M. (1951): Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. *Sewage and Industrial Wastes*, **23**, 1380-1397.
- 9) 吉村英敏編 (1984): 裁判化学, 南山堂, 東京.
- 10) 田端健二(1962): 水産動物に及ぼすアンモニアの毒性と pH, 炭酸との関係, 東海区水産研究報告, **34**, 67-74.
- 11) 田端健二(1969): 水産動物に及ぼす重金属の毒性と緩和要因に関する研究-II, 重金属イオンの毒性に及ぼす水中の硬度成分の拮抗作用, **58**, 215-232.
- 12) 東京都公害研究所水質部(1976): 洗剤の水棲生物に対する毒性-I, 陰イオン界面活性剤に対する急性毒性, 水産増殖, **23** (3), 123-124.