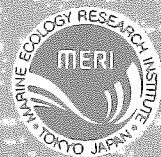


マダイの卵及び仔稚魚のアンモニア耐性



平成6年3月

マダイの卵及び仔稚魚アンモニア耐性の目次

目 次

| | |
|-----------------|----|
| はじめに | 3 |
| 試験材料 | 4 |
| 試験方法 | 5 |
| 魚類急性毒性試験の考え方 | 5 |
| 分析法 | 5 |
| 卵期試験の条件と手順 | 6 |
| 仔稚魚期試験の条件と手順 | 8 |
| 試験結果 | 8 |
| 卵期試験 | 8 |
| 仔稚魚期試験 | 9 |
| 考 察 | 12 |
| アンモニア耐性の比較 | 12 |
| 発育に伴うアンモニア耐性の変化 | 13 |
| アンモニア馴致効果と水質 | 15 |
| おわりに | 15 |
| 参考文献 | 16 |

はじめに

近年、水産業界においては沿岸各地における養殖業の規模拡大にともない、養魚環境、特に水質を管理する技術の向上が切望されてきている。

狭い環境で高密度に魚介類を飼育する場合、飼育生物の排泄物や残餌等の有機物の分解により生物自身にとって不都合な物質が蓄積しがちなことが知られている。これらの分解産物は飼育魚介類の成育に影響を及ぼさないようなるべく低濃度に抑える必要がある。

そのような分解産物の一つであるアンモニアは、一般に水生生物に対する毒性の大きいことが知られているが、海生生物についての知見は乏しい。我が国においてブリと並ぶ重要養殖対象種であるマダイの場合も、アンモニアの影響について調べた報告例は見当たらない。本報では、マダイの卵期および仔稚魚期の生残に及ぼすアンモニアの影響を検討した結果（城戸ら，1991）を紹介する。

試 験 材 料

本試験に用いたマダイの卵および仔稚魚は、当研究所内で卵から育てた雌雄の3年魚（平均体長33.8cm，平均体重1.4kg）が7 m²の流水式円形水槽内で自然に放卵・放精して得られたものである。受精卵は分裂をくりかえし，形態形成を進めて孵化に至るが，この卵期を対象とする第1，2回試験には4～8細胞期に達した浮上卵を供試した。続いての仔稚魚を対象とする第3，4回試験には孵化後24～31日間飼育したものをを用いた。

仔稚魚には，孵化後3～20日間はシオミズツボムシを与え，その後はアルテミア，マダイ卵，配合餌料などを適宜，追加給餌した。飼育期間中の水温と2回の試験の開始時における供試魚体の大きさを第1表に示す。全試験を通じて海水供給システムからの砂濾過海水を用いた。

第1表 半数致死濃度（LC₅₀）試験中の飼育水温とマダイ仔稚魚の大きさ

| 試験 番号 | 試験 期間 | 孵化 日 | 孵化後 経過日 数 | 飼育水温 平均±s. d. (°C) | 体長 | 全長 | 体重 | 測定 個体 数 |
|----------|--------------|---------|-----------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | | | | | 平均±s. d. (mm) | 平均±s. d. (mm) | 平均±s. d. (mg) | |
| 3 | 6.27～ 7/1 | 6.3 | 24 | 21.2±1.00 | 8.70±0.62 | 10.61±0.76 | 15.91±3.86 | 35 |
| 4 | 7.4～ 11 | 6.3 | 31 | 21.0±0.99 | 12.36±1.55 | 15.54±1.94 | 52.70±20.00 | 46 |

試験終了後，マダイ仔稚魚の成長に関する既往のデータ（山口，1978；北島ら，1976）と比較すると，供試魚は正常な発育経過をたどっていた。

試 験 方 法

魚類急性毒性試験の考え方

魚の生息する水中に有毒な化学物質が拡散する場合、その濃度が十分に高いと魚の外観、行動等に異常が生ずるほか、死亡する個体も現れ、さらに高い濃度では全個体が死亡する。このような致死濃度域を何段階かに分けて試験すれば濃度に応じた死亡率が得られ、この関係は通常シグモイド曲線で示される。

そして、試験開始後のある時点における濃度-死亡曲線からおよそ50%の個体が死亡する濃度を求めることができ、これをその時点での LC_{50} (半数致死濃度)と呼んでいる。本試験では約25時間~96時間の LC_{50} を中心に求めた。

最も、この程度の経過時間での LC_{50} 値は急性毒性の指標を与えるにとどまり、実用的には長期的影響の限界濃度を知る必要がある。しかし、この限界濃度を実験的に確定するのは困難な場合が多い。これに代わる便宜的手段として、短期間の急性毒性試験で得られる LC_{50} 値に、後述のような適用係数を乗じて許容濃度を推定する試みがなされている(田端, 1980)。

分析法

水温、塩分、DO量、pH(25°C)は常法により測定し、試験水温下のpHは海洋観測指針(日本海洋学会, 1981)により算出した。全アンモニア態窒素(以下、 NH_4-N)の定量はインドフェノール法(比色)によって行った(Strickland and Parsons, 1972)。

なお、海水中でアンモニアはイオンと非解離分子の二つの形で存在し、その比率は水温、pH、塩分によってことなり、しかも水生生物への毒性には分子状のアンモニアによる効果が強いとされている。その非解離アンモニア態窒素(以下、非解離 NH_3-N)の NH_4-N に対する割合(%)は次式で与えられる

(Whitfield, 1974; Bower and Bidwell, 1978)。

$$X (\%) = \frac{100}{1 + 10^{[9.35 + 0.0324 (298 - T) - \text{pH}]}}$$

(塩分32~36%, イオン強度0.7のとき)

X : 非解離NH₃-Nの割合 (%)

T : 温度 (°K)

pH : 水素イオン濃度

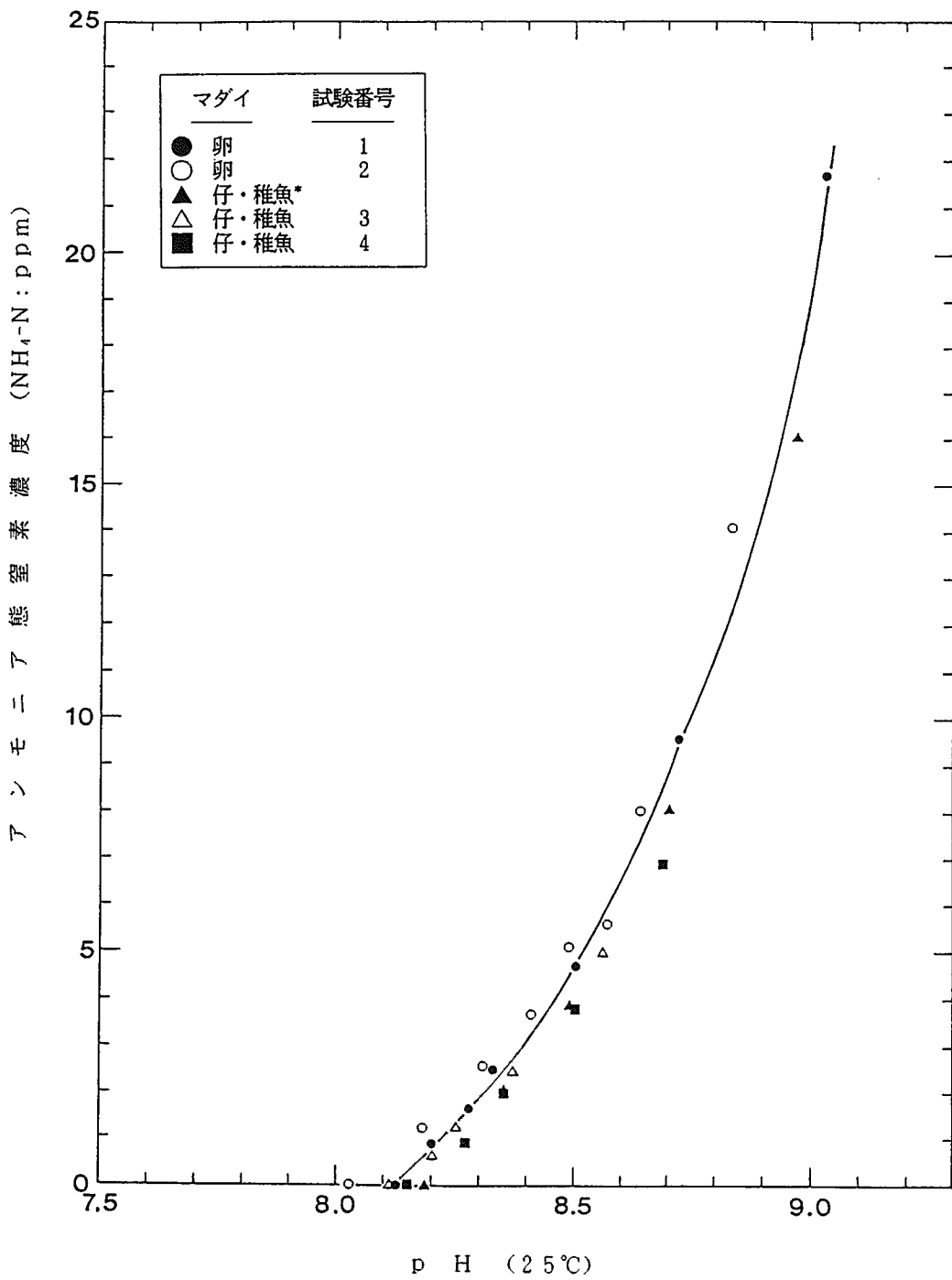
本試験では、別途明らかにしたpHとNH₄-N実測濃度との関係 (第1図) から先ず個々のNH₄-NのLC₅₀値におけるpH値を知り、該当する非解離NH₃-Nを上式によって算定した。試験区アンモニア濃度の調整には試薬特級アンモニアを原液とし、海水で所定の濃度に希釈した。また試験開始時と終了時に、各試験区から海水試料を採取してNH₄-N濃度を実測した。

卵期試験の条件と手順

卵期の第1, 2回試験では、それぞれNH₄-Nの1~50ppmおよび2~20ppm間に、いずれも7濃度区を設定した。各設定濃度につき600mlの試験海水を入れたビーカー2個を用い、4~8細胞期のマダイ卵を約50ずつピペットで移し入れた後、20°C恒温室に静置した。供試卵は産卵後約40時間で孵化したが、48時間の時点で、濃度毎に形態、行動とも正常な孵化仔魚を数え、次式のように正常生残率を算定した。

$$\text{正常生残率} (\%) = (\text{正常生残孵化仔魚数} / \text{全供試卵数}) \times 100$$

また、それらをまとめて濃度-正常生残率曲線を描き、50%正常生残濃度を求めて、これを半数孵化濃度 (HC₅₀) と呼ぶこととした。



第1図 試験開始時のpH値とアンモニア濃度の関係
 (*: 予備試験時)

仔稚魚期試験の条件と手順

仔稚魚の第3，4回試験では，それぞれ0.8～6ppm，1.2～9ppm間にいずれも4濃度区を設けた。供試魚は各濃度とも33尾とし，無給餌下での共食いを避けるために500ml容の透明な広口瓶にスプーンを用いて1尾ずつ収容した後，21℃に保った。試験に先だって，同大のマダイ仔稚魚が同じ容器・条件下で4日間鼻上げ等の異常を示さず，絶食にも耐えることを確かめておいた。試験開始から96～168時間供試魚の観察を行うと共に，横臥・平衡喪失の個体を異常，自由遊泳の個体のみを正常とみなして，次のように正常生残率を算定した。

$$\text{正常生残率 (\%)} = (\text{正常仔稚魚数} / \text{全供試仔稚魚数}) \times 100$$

各濃度区の結果をまとめて50%正常生残率濃度を求め，これを半数致死濃度(LC₅₀)とした。

試験結果

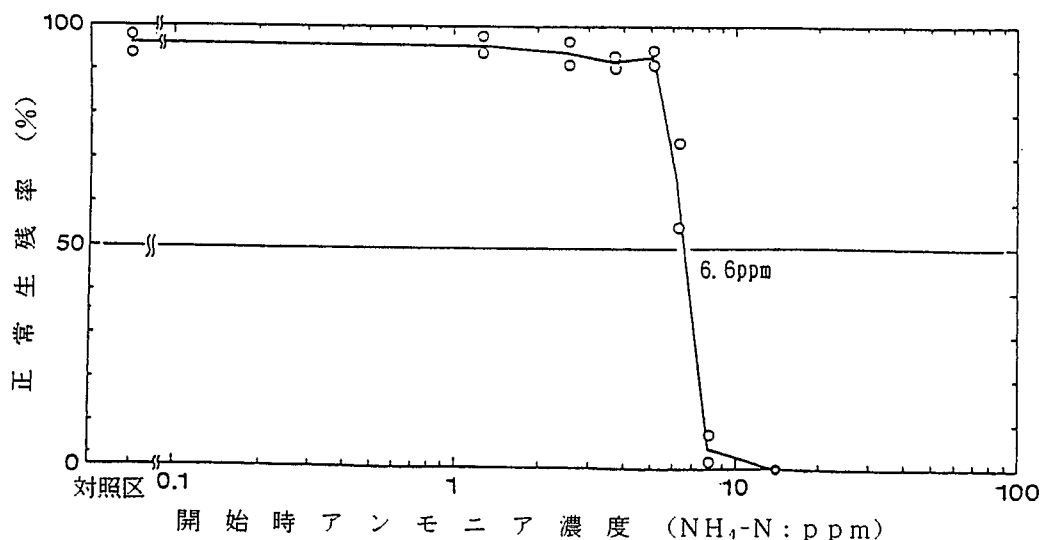
アンモニアを添加することなく，卵または仔稚魚のみを入れた対照区海水の塩分，DO量，酸素飽和度は，実験期間中全て正常レベルに維持された。従って，良好な水質条件下で，アンモニアの影響が検討されたといえる。

卵期試験

pHは開始時に実測したNH₄-Nが2.5ppm以下の各区では，8.03～8.33と沿岸海域の通常範囲内にあり，NH₄-Nが3.7～43ppmと高い区では8.41～9.35と通常範囲を上回った。なお，対照区において，供試卵の排出作用によるNH₄-Nの増加はほとんど認められなかった。

第1，2回試験で得られた正常生残率に基づくNH₄-NのHC₅₀値（半数孵化

濃度)は7.0および6.6ppmであった(第2図参照)。これらに対する試験水温下のpH値は、8.66および8.64となることから非解離NH₃-Nの占める割合は12.6%および12.0%と算出され、非解離NH₃-NのHC₅₀値としては、0.88および0.79ppm-Nが得られた。



第2図 第2回試験時の開始時実測アンモニア濃度と
マダイ卵の正常生残率との関係

仔稚魚期試験

pHは、卵期試験と同様に、NH₄-Nの高い濃度区(開始時4.0~7.2ppm)で海水の通常レベルをかなり上回り8.50~8.69であった。対照区のpHは正常生残率が97~100%となる96時間後に7.87~7.91とやや低下した。試験期間中のpH低下傾向は、アンモニア添加区でも認められた。いずれも供試魚の呼吸に伴うCO₂の中和作用によるものと解される。

他方、NH₄-N濃度は、供試魚が96時間以上生存した場合、終了時で0.15~0.90ppmほど増加していた。また、死亡区では生残区に比べてNH₄-N濃度の

増加が大きく、設定濃度が3～6ppmの試験区で96時間後に0.4～1.2ppmの上昇が認められた。これらの変化は、供試魚による生理的なアンモニアの排出と死後変化にともなうアンモニアの発生に基づくものと考えられる。

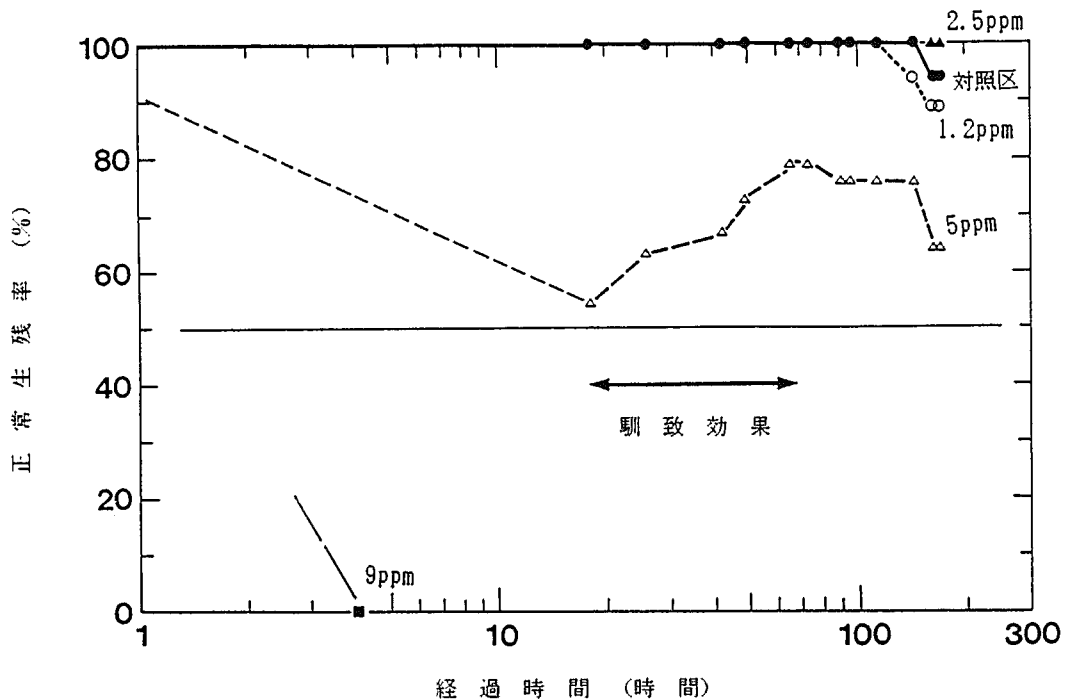
第3，4回の試験を通じて繰り返し求められた正常生残率に基づく $\text{NH}_4\text{-N}$ の LC_{50} 値（半数致死濃度）とその中に含まれる非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ 量等を第2表に示した。第3回，4回試験における96時間 LC_{50} 値は3.0ppmおよび4.9ppmとなり，非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ は0.26ppm(8.7%)，および0.58ppm(11.9%)と算出された。

ここで第4回試験の LC_{50} 値，特に非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ の値が第3回試験に比べて倍増したのは，供試魚の体重に3倍余りの差が生じていたためと推定される（第1表参照）。

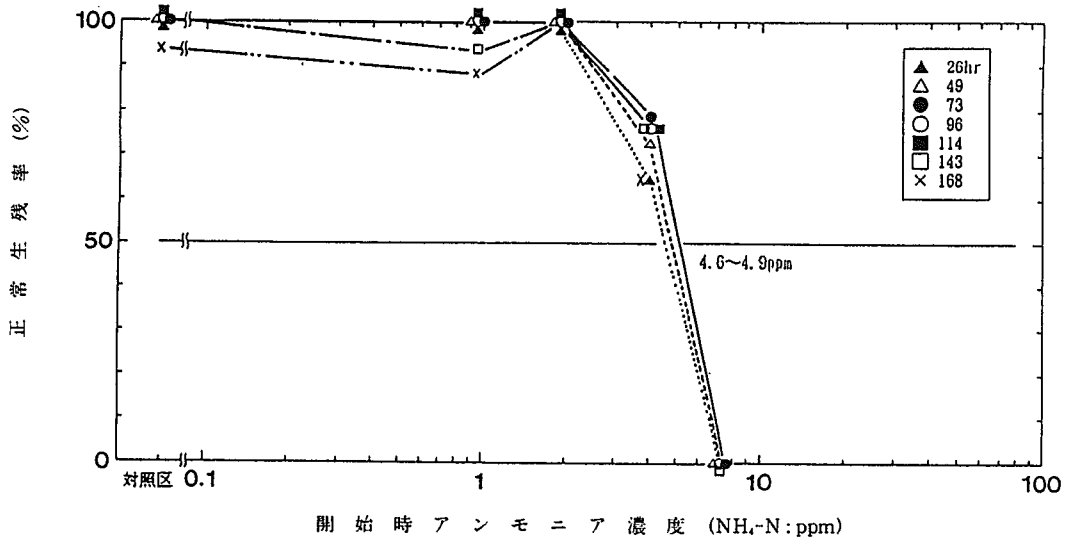
第4回試験では興味ある現象が観察された（第3，4図）。第3図に示されるように，9ppm設定区（開始時実測値7.2ppm）では，4時間以内に全供試魚が死亡したが，1.2および2.5ppm設定区（開始時測定値0.96および1.9ppm）では168時間後（実測値2.6および3.1ppm）でも正常生残率は88～100%で悪影響はほとんど認められなかった。他方，中間濃度の5ppm設定区（開始時実測値4.0ppm）では，18時間後正常生残個体は18尾，55%，異常生残個体は，11尾，33%であったが，その後に異常から正常に回復するものが現れ，73時間後の正常生残率は79%に上昇した。168時間後でも正常生残率は64%とかなり良い値が示された。ちなみに，第3回試験中ではこのような回復現象は明かではなかったが，3ppm設定区（開始時実測値2.5ppm）および6ppm設定区（同じく5.0ppm）では正常生残率が25時間以内にそれぞれ約67%および約6%に落ちつき，96時間後までそのレベルが維持された。

第2表 マダイ仔稚魚のアンモニア接触時間, 正常生残率にもとづく半数致死濃度 (LC₅₀) [全アンモニア(NH₄-N)と非解離アンモニア(NH₃-N)], 非解離アンモニアの百分率および対照区の正常生残率

| 試験 番号 | アンモニア 接触時間 (hr) | LC ₅₀ | | 非解離アンモニア 百分率 (%) | 対照区 正常生残率 (%) |
|----------|-----------------------|---|---|------------------------|---------------------|
| | | 全アンモニア (NH ₄ -N) (ppm) | 非解離アンモニア (NH ₃ -N) (ppm) | | |
| 3 | 25~96 | 3.0 | 0.26 | 8.7 | 97 |
| 4 | 26 | 4.6 | 0.51 | 11.2 | 100 |
| | 49 | 4.8 | 0.56 | 11.7 | 100 |
| | 73 ~ 143 | 4.9 | 0.58 | 11.9 | 100 |
| | 168 | 4.6 | 0.51 | 11.2 | 94 |



第3図 第4回試験時の各設定アンモニア(NH₄-N)濃度におけるマダイ仔稚魚の正常生残率と経時変化



第4図 第4回試験時の7段階の経過時における開始時実測アンモニア濃度とマダイ仔稚魚の正常生存率の関係

考 察

アンモニア耐性の比較

良く知られるように、多くの魚類はタンパク質代謝の産物であるアンモニアをそのまま鰓から環境水中に排出する。今回の試験でも、マダイ仔稚魚を容れた試験水中のアンモニア濃度は、4～7日間に確実に増加していた。従って、試験開始時の実測濃度に基づいて求められた96時間または168時間のLC₅₀値は本来の値より若干低めに見積もられたことになるであろう。過去の関連研究についても、例えば試験水を頻繁に更新するか、かけ流しするか等の定濃度維持方式を採用していないところから、同じことが云える。ただし、今回取り上げたマダイ卵の場合には生理的なアンモニア排出はほとんど認められなかった。

海産魚に対するアンモニアの急性毒性に関する既往の研究結果に、本試験で得られた結果を加えて第3表に示す。既往のデータは多くなく、LC₅₀値を求め

るためのアンモニア接触時間の長さや供試魚の大きさも異なるなどの理由から十分な比較は難しいが、マダイ仔稚魚における非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ の LC_{50} 値(0.26~0.58ppm)は大西洋サケのスマルトの値(飽和溶存酸素条件下)よりやや高く、その他の魚種、gilthead seabream(タイ科)、ゴンズイ、ハゼ、メジナ、ブリ若魚、海水馴化メダカの場合よりは明らかに低いことが分かる。マダイ仔稚魚のアンモニア耐性は比較的に低いことが示唆されたといえよう。

発育に伴うアンモニア耐性の変化

マダイ卵期における $\text{NH}_4\text{-N}$ の48時間 HC_{50} 値すなわち LC_{50} 値としては6.6~7.0ppm、非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ の同値としては0.79~0.88ppmが得られたことは前述のとおりである。次いで、発育の進んだ仔稚魚期における同じく48時間の LC_{50} 値は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ としては、3.0~4.8ppm、また非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ としては0.26~0.56ppmが得られており(第2表)、この時期にアンモニア耐性がかなり低下することが確かめられた。この耐性の低下は、卵期の胚が堅い卵膜で保護されるのに、孵化後の仔稚魚は環境水に直接曝されることから当然予想されるところである。

更に、仔稚魚の第3および第4回試験では、96時間 LC_{50} 値が $\text{NH}_4\text{-N}$ としては3.0および4.9ppm、非解離 $\text{NH}_3\text{-N}$ としては0.26および0.58ppmとなり、両試験間に見られた明かな差異が供試魚の平均体重(15.9および52.7mg)の約3倍におよぶ相違を反映するものと推定された。しかも、これらの供試魚が同一起源(孵化日)の飼育集団から前後7日間を隔ててサンプリングされた点(第1表)も考慮するならば、マダイ仔稚魚のアンモニア耐性は成長と共に向上すると云うことができる。

第3表 海産魚に対するアンモニアの毒性

| 魚種 | 大きさ | アンモニア 接触時間 (hr) | LC ₅₀ 全アンモニア (NH ₄ -N) (ppm) | LC ₅₀ 非解離アンモニア (NH ₃ -N) (ppm) | 備考 |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------|---|---|--|
| gilthead seabream (タイ科) 稚魚 | 0.4 ~ 3.2 g | 96 | — | 1.27 | 水温27°C, pH 8.1, 塩分 40.5‰ (Wajsbroet et al. 1991) |
| ブリ若魚 | 20 g 前後 | 96 | 28 | 3.4 | (杉山ら, 1991) |
| 大西洋サ ケ・スモ ルト | 平均体長 146mm | 24 | — | 0.25 | 水温12°C, 飽和 D0, 30%海水 (Alabaster et al. 1979) |
| 同 上 | 同 上 | 24 | — | 0.099 | 水温12°C, D0 3.1ppm, 30% 海水 同上 |
| ゴズイ | 体長2.0 ~5.5 cm | 24 | 226 | 1.2 | 平均水温27°C pH 7.0 (田端, 1962) |
| 同 上 | 同 上 | 24 | 37 | 1.4 | 同上pH8.0 |
| ハゼ | 90mg | 24 | 34 | 1.5 | 水温25°C, pH 8.0 (田端, 1973) |
| メジナ | 280mg | 24 | 47 | 2.0 | 同上 |
| 海水馴化 メダカ | 360mg | 24 | 91 | 3.9 | 同上 |
| マダイ卵 | 約0.9mm | 約24 | 6.6~7.0 | 0.79~0.88 | 本報告 |
| マダイ仔 稚魚 | 平均体重 15.9mg | 25~96 | 3.0 | 0.26 | 同上 |
| 同 上 | 平均体重 52.7mg | 26~168 | 4.6~4.9 | 0.51~0.58 | 同上 |

アンモニア馴致効果と水質

前述したとおり、第4回試験の中間濃度（開始時実測値4.0ppm）区において、接触開始後18時間から66時間にかけて、外見的異常個体の一部回復が観察され、正常生残率は55%~79%へ上昇した（第3図）。また、第3回試験の開始時濃度が2.5および5.0ppmの2区においては、正常生残率が早くも25時間以内に67および6%の安定レベルに落ちついた。これら異常からの回復や正常生残率の安定化はいずれも20時間前後に始まり、かつ、供試魚自体の排出作用によるアンモニア濃度増加傾向の中で進行する耐性上昇を示唆する現象として注目される。大西洋サケのスマルトにおける類似した耐性上昇がAlabaster et al. (1979)によって報告されている。本種の場合、前もって微量の非解離NH₃-N (0.05ppm)を含む30%海水に24時間馴致させた群のLC₅₀値は、非馴致群のそれを約57%上回った。

Alabaster et al. (1979)はまた、大西洋サケのスマルトでは同一水温下の溶存酸素が異なる条件で、溶存酸素の減少につれてアンモニア耐性が半分以下に低下することを認めている。同様な事例はgilthead seabreamの稚魚についても報ぜられている(Wajsbrodt et al., 1991)。他の海産魚においても、アンモニア耐性の溶存酸素レベル依存度は、程度の差はあれ、広く見いだされるものではなかろうか。

おわりに

有害な物質について、水生生物が長期間接触しても様々な障害を生じない濃度（許容濃度）は、供試魚を有害な物質に可能な限り長期間接触させて得た結果（慢性毒性試験）に基づいて決定される必要がある。一方で、ここで行った

短期的接触試験（急性毒性試験）から許容濃度を推定する場合，得られた急性毒性値にある一定の係数（適用係数）を乗じて求める方法が便宜的にとられている。水産用水基準・改訂版（日本水産資源保護協会，1983）では，有害な物質についての許容濃度を，48時間の接触で得られた LC_{50} 値に適用係数0.1を乗じて求めており，アンモニアに関しては，pH8.0の条件で全アンモニアで1.0ppm-N（20°C，34%，pH8.0では非解離 NH_3 -Nに換算して0.03ppm）をあげている。

日本工業標準調査会(1981)は，「魚類による急性毒性試験」の項目の中で，毒性物質の許容濃度を推定する一つの方法として，96時間 LC_{50} 値に適用係数として0.01前後を乗じている。また，毒性の異なる物質では，毒性の大小に応じた適用係数を用いる必要があることから，田端(1979，1980)は，既往文献データに基づき，「淡水魚」に対する汚染物質の類別を行い，96時間 LC_{50} に乗ずる適用係数としてアンモニアについては0.03群にランク付けしているが，海産魚についてはこれまで記載例はない。

仮にマダイについて本調査で得た15.9mgの仔稚魚の結果を基に適応係数0.03を乗じて許容濃度を推定すると全アンモニアに換算して0.09ppm-N（非解離 NH_3 -N換算0.008ppm）となる。

魚の飼育を行う上では，飼育水からアンモニアが検出されないことが理想であるが，マダイについては上述の推定濃度以下であれば魚体に著しい影響を与えることはないものと考えられる。

参 考 文 献

Alabaster, J.S., D.G. Shurben, and G. Knowles(1979). The effect of dissolved oxygen and salinity on the toxicity of ammonia to

- smolts of salmon, *Salmo salar* L. *Jour.Fish Biol.*, 15: 705-712.
- Bower, C.E. and J.P. Bidwell(1978). Ionization of ammonia in sea water:effects of temperature, pH, and salinity. *Jour.Fish.Res. Bd.Can.*, 35: 1012-1016.
- 城戸勝利・渡辺康憲・中村幸雄・岡村武志(1991). マダイ卵および仔稚魚の生残に及ぼすアンモニアの影響. 水産増殖, 39(4): 353-362.
- 北島 力・福所邦彦・岩本 浩・山本博敬(1976). マダイ稚仔のシオミズツボワムシ摂餌量. 長崎水試研報, (2): 105-112.
- 日本海洋学会(1981). 海洋観測指針(気象庁編). 429pp.
- 日本工業標準調査会(1981). 魚類による急性毒性試験. 工業排水試験方法(JIS. K. 0102): 208-211. 日本規格協会, 東京.
- 日本水産資源保護協会(1983). <水質資料>水産用水基準(改訂版). 29pp.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Fish.Res.Bd.Canada*, 167, Ottawa, 310pp.
- 杉山元彦・田中秀樹・福所邦彦(1991). ブリ若魚に対するアンモニア態、及び亜硝酸態窒素の毒性. *Bull.Natl.Res.Inst.Aquaculture*, No.19: 31-33.
- 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. 東海水研報, 34: 67-74.
- 田端健二(1973). 水棲生物による工場排水の毒性試験方法(その1) - 魚類によるTLm試験法について -. 工業用水, (177): 49-56.
- 田端健二(1979). 水産生物に対する各種水質汚染物質の半数致死濃度と長期影響限界濃度との関係. 東海水研報, 98: 1-21.
- 田端健二(1980). <資料>水生生物に及ぼす各種水質汚染物質の亜急性・慢性毒性について. 水処理技術, 21(6): 41-59.

- Wajsbrot, N., A. Gasith, M.D. Krom, and D.M. Popper (1991). Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. *Aquaculture*, 92: 277-288.
- Whitfield, M. (1974). The hydrolysis of ammonium ions in sea water - a theoretical study. *Jour. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 54(3): 565-580.
- 山口正男 (1978). タイ養殖の基礎と実際. 恒星社厚生閣, 414pp.



事務局 〒101 東京都千代田区内神田1-18-12/北原ビル ☎(03)3233-4173
中央研究所 〒299-51 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300番地 ☎(0470)68-5111
実証試験場 〒945-03 新潟県柏崎市荒浜4-7-17 ☎(0257)24-8300