

二酸化塩素が海生生物に与える影響の予備的検討

原 猛也^{*1}・藤澤俊郎^{*2}・山田 裕^{*1}・青山善一^{*2}
杉島英樹^{*3}・小林 努^{*4}

Preliminary Experiments on the Effects of ClO₂ on Marine Organisms

Takeya Hara^{*1}, Toshiro Fujisawa^{*2}, Hiroshi Yamada^{*1}, Zen-ichi Aoyama^{*2},
Hideki Sugishima^{*3}, Tsutomu Kobayashi^{*4}

要約: 二酸化塩素(ClO₂)は、強い酸化力と漂白力があり、有機ハロゲン物質を生成しないことから、次亜塩素酸ソーダに替わる防汚剤として使用されている。本報では、ClO₂の毒性について、アオギス(*Sillago parvisquamis*)、マダイ(*Pagrus major*)、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*) 3種受精卵の孵化率、珪藻(*Chaetoceros gracilis*)の増殖速度を指標とした暴露試験を行った結果、以下の基礎的知見が得られた。ClO₂濃度は、時間とともにほぼ直線的に減衰した。魚卵の孵化率は暴露濃度が高くなるにつれて低下した。マダイの急性毒性について LD₅₀ (15min) を72時間後の孵化率から求めると0.72mg/Lであった。珪藻では、5mg/L以上のClO₂に暴露した試験区では増殖阻害を受け、阻害される期間が濃度に比例する可能性が示唆された。

キーワード: 二酸化塩素, 防汚剤, 急性毒性, 魚卵, 植物プランクトン

Abstract: The possibilities of ClO₂ as an alternative biocide to hypochlorous acid, an antifouling agent currently used in freshwater and seawater, have attracted our interest, because ClO₂ is known to be not organo-halogenated in natural condition of sea water. We have observed the effects of ClO₂ in seawater on fish eggs and phytoplankton. In this investigation, acute toxicity of ClO₂ on developmental success of the eggs of *Sillago parvisquamis*, *Pagrus major* and *Paralichthys olivaceus* and growth rate of *Chaetoceros gracilis* were studied. Hatching rates of fish eggs decreased with ClO₂ concentration and increased with time after exposure. The cells densities of phytoplankton increased, but the growth speed delayed in higher ClO₂ concentrations. LD₅₀ (15min) after 72hrs were estimated to be 0.72mg/L for the eggs of *P. major*.

Keywords: fish egg, phytoplankton, chlorine dioxide, biocide, acute toxicity

はじめに

沿岸に立地する発電所など大量の海水を使用するプラントでは、取放水系統に付着する生物を防除するために海水電解液(次亜塩素酸ソーダ, NaClO)を用いることがある。NaClOは、海域に存在するアンモニアなどに消費されることから(Inman and Johnson, 1978 etc.), 水質によっては

効果が減ずることがあるが、我が国で稼働中の火力、原子力発電所の約半数でこの方法が用いられ長年の実績がある(川邊, 1986, 小島, 1986)。次亜塩素酸が海生生物に及ぼす影響については多くの研究があり(Mattice and Zittel, 1976; Turner and Thayer, 1980; EPRI, 1980 etc.), プロモホルムなどのトリハロメタン生成があることも知られている(丸山ら, 1987)。

(2005年1月28日受付, 2005年2月8日受理)

*1 財団法人海洋生物環境研究所事務局 〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3-29
E-mail:hara@kaiseiken.or.jp

*2 財団法人海洋生物環境研究所中央研究所 〒299-5105 千葉県夷隅郡御宿町岩和田300

*3 国土環境株式会社環境創造研究所 〒421-0212 静岡県川志太郡大井川町利右衛門1334-5

*4 株式会社東京久栄環境科学部 〒333-0866 埼玉県川口市鶴ヶ丸6906-10

二酸化塩素 (ClO₂) は黄緑色の気体で空気の2.4倍の重さがあり、爆発性、毒性があるが、水に良く溶け、水溶液に強い酸化力と漂白力があることから消毒剤や漂白剤として広く用いられている。イタリアでは、有機ハロゲン物質を生成しないことから、早くから次亜塩素酸ソーダに替わる防汚剤としてClO₂の注入が行われており、Belluati et al. (1997) は、海水を使用する3カ所のプラントを調査した結果、0.05~0.25mg/Lの注入で十分な防汚効果があると結論している。

我が国でも上水の殺菌剤として使用が認められており（厚生省令第15号, 2000）、海域における付着防止剤として使用することも可能であろう。本報では、海産魚類の受精卵および珪藻を対象にClO₂の毒性について試験を行った結果、いくつかの基礎的知見が得られたので報告する。

材料および試験方法

供試材料 材料は、千葉県夷隅郡御宿町にある(財)海洋生物環境研究所(海生研)中央研究所(中央研)内で飼育している親魚が自然産卵したアオギス *Sillago parvisquamis*, マダイ *Pagrus major*, ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の受精卵および同所実験室内で単離継続培養した珪藻 *Chaetoceros gracilis* を用いた。ClO₂は稲畑産業株式会社(東京都中央区日本橋本町)から提供された濃度530.7mg/Lの水溶液を原液として希釈して使用した。試験はいずれも、海生研中央研の実験室内で行った。

魚類受精卵暴露試験 魚卵のClO₂暴露試験を繰り返し3回行った(Table 1)。暴露後24時間まで

の孵化率を観察した試験1は、2002年6月17~18日に、48時間まで観察した試験2は、2002年6月18~20日に、暴露後72時間まで観察した試験3は、2002年6月21~24日に行った。試験1では、アオギス、マダイの受精卵、試験2, 3では、ヒラメ、マダイの受精卵を用いた。

0.45μmメッシュ(アドバンテック, TCG-045)で濾過した海水を入れた1L容ガラス製ビーカー内に65mmφ、深さ35mmのステンレス製網籠に10μmメッシュの網を敷設したものを設置し、これに受精卵約80~300個を分取した。ピペットまたはスターラーで網籠の外の海水を1分間攪拌後、ClO₂をTable 1に示した濃度になるように攪拌中の海水に注入して更に3分間攪拌した。攪拌後、12分間静置して受精卵を網籠ごと濾過海水が入った500mL容ビーカーに移し、20℃または25℃に保った恒温庫中に静置した。対照区については、ClO₂の注入を除き同様の操作を行った。アオギスでは原口閉鎖は終了しているが尾芽の先端は卵黄から離れていない発生中期、マダイ、ヒラメではいずれも原口閉鎖期に、ClO₂試験海水への暴露を行った。ClO₂濃度は、試水に添加し攪拌した直後と暴露終了時の2回測定した。24, 48または72時間後に未孵化卵および孵化個体をガラスビンに回収して、エタノールまたは中性ホルマリンで固定し、実体顕微鏡下でそれぞれの数を計数した。LD₅₀は、プロビット法により求めた。

珪藻暴露試験 珪藻の増殖試験は、2002年6月20~26日にかけて実施した。あらかじめ室内で培養した *C. gracilis* を、培地成分を除去するため、目合い10μmの篩いを用いて濃縮し濾過海水で洗浄した。さらにこの珪藻濃縮液を濾過海水で10倍

Table 1. Condition of experiments for fish eggs.

Test No. and dates (unit)	Species*	Stage	Seawater volume (mL)	ClO ₂ Concentration (mg/L)	Exposure period (min)	Seawater temperature (°C)	Time observed (hr)
No.1 Jun.17-18	S	middle**	300	0,0.1,1,10	15	25	24
No.2 Jun.18-20	C	earlier***	300	0,0.1,1,10	15	20	24
No.3 Jun.21-24	P	earlier	1,000	0,0.1,1,10	15	20	48
	C	earlier	1,000	0,0.1,1,10	15	20	48
	P	earlier	1,000	0,0.1,0.3,0.5,1,3	15	20	72
	C	earlier	1,000	0,0.1,0.3,0.5,1,3	15	20	72

*S; *Sillago parvisquamis*, C; *Pagrus major*, P; *Paralichthys olivaceus*. ** middle; the formation of myomere. *** earlier; closed blastopore.

程度に希釈し再び濃縮した上で濾過海水で洗浄した。この作業を2回繰り返し、最終的に濃縮した液を濾過海水で希釈して500mLにしたもの(約 10^6 細胞/mL)を試験用の *C. gracilis* 原液とした。原液はガラスビーカーに入れ、約20°Cに保った恒温庫内で保存した。ClO₂ 試験海水への暴露は、水温20°Cの濾過海水を満した100mLガラスビーカー中に袋状にした目合い10 μ mプランクトンネットを設置し、*C. gracilis* 原液を10mL入れ、スターラーを用いてビーカー内の海水を攪拌させながらClO₂を所定濃度(0.5, 1mg/L)になるよう注入し、3分間攪拌後、12分間静置した。暴露後の珪藻は、プランクトンネットごと取り出し濾過海水にて洗浄後、ピペットを用い、300mL容の三角ガラスフラスコ内のf/2滅菌培地(Guillard and Ryther, 1962)に全量を移植し、設定温度25°Cの恒温庫内に静置後、照度2,000luxの明条件下で連続培養した。ClO₂濃度は、試水に添加し攪拌した直後と暴露終了時の2回測定した。試料は暴露直後と24, 48, 72, 96, 144時間後に部分採取し、それぞれ10%ホルマリン溶液で固定した。標本中の細胞数は光学顕微鏡下の計数板上で計数し、1.0mLあたりの細胞数に換算した。

ClO₂濃度の測定 ClO₂の濃度測定は淡水および海水試料の分析に使用可能なDPD法によった(日本水道協会, 1993)。DPD法は、塩素と全酸化体(オキシダント)がN, N-ジエチル-パラ-フェニレン-ジアミンと反応する現象を利用しており、515nmの波長で赤色の変化を測定する。試薬として、ClO₂標準原液は100%の亜塩素酸ソーダ1.0gと、無水酢酸3.5gを900mLの精製水で反応・希釈し、1,000mLに定容したもの、グリシン溶液は、10gのグリシンを精製水で100mLに定容したもの、DPD試薬は市販のもの(関東化学工業製)を用いた。ClO₂標準原液はヨウ素滴定法で濃度を確かめた。

ClO₂の測定は、まず、ClO₂標準原液を希釈し、0~2mg/Lの範囲内で数段階の標準溶液を作成した。標準溶液20mLに対しグリシン溶液0.1mLを添加後、十分に混和した。このうち10mLを、DPD試薬を100mg分取した10mL比色管に加え、攪拌後直ちに515nmでの吸光度を計測した。各標準液の吸光度に対するClO₂濃度から、最小自乗法によって換算係数を求めた。同様にして試験液の515nmでの吸光度を計測し、換算係数を用いて

ClO₂濃度を算出した。

結果

ClO₂濃度 Fig. 1にClO₂濃度の経時変化を示した。原液を300mLの濾過海水中に1.0mg/Lおよび0.5mg/Lとなるよう添加し、室温(20.4°C)で30分放置した場合、ClO₂濃度は、時間とともにほぼ直線的に減衰した。魚類受精卵の試験3で測定した結果も同様の傾向を示した。珪藻を用いた試験時の減衰傾向は、前二者よりも大きかった。

Fig. 2に各設定ClO₂初期濃度に対する15分後の残留率を示した。高濃度での減衰は低く低濃度では比較的減衰の度合いが大きくなるが、0.1mg/Lでは減衰の程度はそれほど高くなかった。また、植物プランクトン添加時では、魚卵添加時、濾過海水のみのときよりも減衰が大きい。Fig. 3

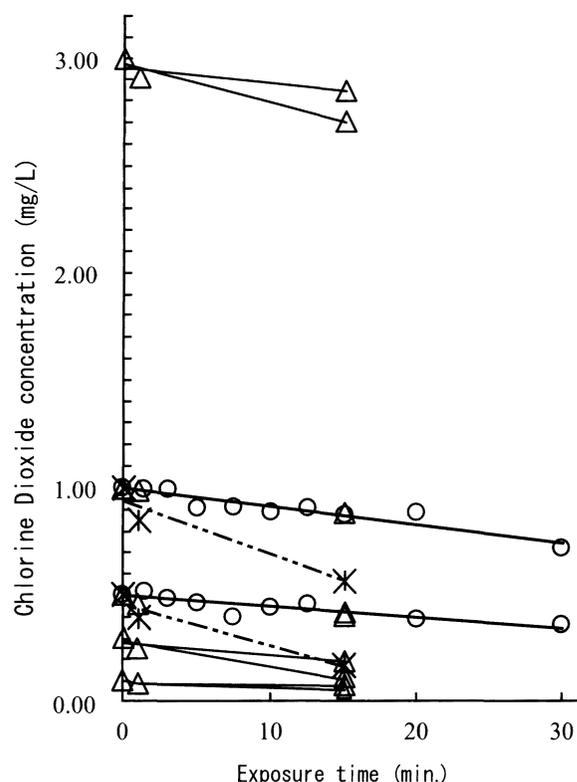


Fig. 1. Time dependent changes in ClO₂ concentrations: ○; Blank test. 0.377 and 0.188mL of ClO₂ (530.7mg/L) was added to 300mL seawater. △; Fish egg test 3 data. ClO₂ was added to 1,000mL seawater containing a few hundred eggs. *; Phytoplankton test data. ClO₂ was added to 110mL seawater containing phytoplankton (about 10⁷ cells). In all cases seawater used was filtered by 0.45 μ m pore size filter.

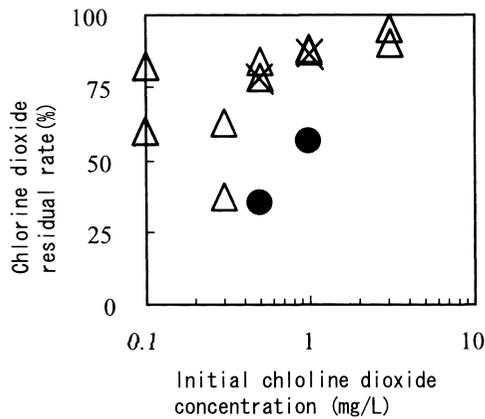


Fig. 2. Effect of adding bio-materials on ClO₂ consumption. ClO₂ residual rates 15 minutes after injection are shown: ×; Filtered sea water only (adding no materials). △; Adding Fish eggs (a few hundred individuals/1,000mL). ●; Adding phytoplankton (about 10⁷ cells/110mL).

に魚類受精卵暴露試験時の魚卵添加数とそのときのClO₂ 残留率の関係を示した。魚卵密度とClO₂ 残留率については、種差を含め、明らかな傾向は見られなかった。

魚類受精卵 3回の試験の結果から、ClO₂ 濃度区ごとに求めた孵化率をTable 2~4に示した。15分暴露後アオギスおよびマダイ卵の24時間後の孵化率を観察した試験1の結果では、両種とも対照区の孵化率は約90%であり、1mg/Lおよび10mg/Lの試験区では0~2%であった。両種の孵化率が大き

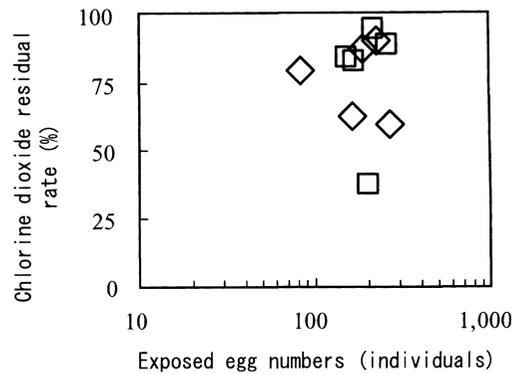


Fig. 3. Effect of adding fish eggs on ClO₂ consumption. ClO₂ residual rates 15 minutes after injection are shown: ◇; *Pagrus major*. □; *Paralichthys olivaceus*.

く異なったのは0.1mg/L区であり、孵化率に10倍程度の差がみられアオギスで高く、マダイで低かった。孵化率が低かったマダイ受精卵では、孵化間近と思われる個体が多く存在していた。

同一の試験条件で暴露し、暴露後48時間目の孵化率を観察した試験2のヒラメ受精卵でもマダイと同様、孵化率は暴露濃度が高くなるにつれて低下した。このときマダイ受精卵の対照区での孵化率は低く、酸素欠乏やバクテリアの発生が疑われたが、試験区に比べ収容個体密度はむしろ低く、原因は不明であった。

試験3では、ヒラメおよびマダイの受精卵を用い、暴露濃度を0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0mg/Lの5段階、暴露後の観察までの期間を72時間として行っ

Table 2. Hatching success ratio of fish eggs in experiment 1 at 24 hours after exposure.

species	hatching success ratio (%)			
	control	0.1mg/L	1mg/L	10mg/L
<i>Sillago parvisquamis</i>	94.0	90.2	2.0	0.0
<i>Pagrus major</i>	89.8	9.0	0.0	0.2

Table 3. Hatching success ratio of fish eggs in experiment 2 at 48 hours after exposure.

species	hatching success ratio (%)			
	control	0.1mg/L	1mg/L	10mg/L
<i>Paralichthys olivaceus</i>	99.8	94.8	42.1	7.9
<i>P. major</i>	28.3	75.9	42.0	0.0

Table 4. Hatching success ratio of fish eggs in experiment 3 at 72 hours after exposure.

species	hatching success ratio (%)					
	control	0.1mg/L	0.3mg/L	0.5mg/L	1mg/L	3mg/L
<i>P. olivaceus</i>	93.6	100.0	96.5	99.3	98.5	86.3
<i>P. major</i>	100.0	100.0	93.3	85.2	23.0	0.9

Table 5. Changes in cell densities of *Chaetoceros gracilis* after exposure (×1,000/mL)

time (hours)	0	24	48	96	144
control	74.7	261.4	518.9	440.6	436.3
0.5mg/L	60.6	40.8	83.0	556.3	582.2
1.0mg/L	57.3	20.2	21.4	410.4	551.5

た。対照区での孵化率はいずれの魚種でも高かった。試験区では、ヒラメ受精卵の孵化率は3.0 mg/L区で若干低くなるものの、1.0mg/L区までは対照区より高く100%またはそれに近い値であった。3.0mg/L区で孵化率は86%に下がった。マダイ受精卵の孵化率は0.1mg/L区から0.5mg/L区まで緩やかに低下し、0.5mg/Lを超えると急激に低下し、3.0mg/L区では約1%の孵化率であった。

珪藻 珪藻の細胞密度の経時変化をTable 5に示した。対照区の細胞密度は時間の経過とともに急激に増加し、48時間後にピークを迎えた。その後緩やかに減少し、96～144時間では約440,000細胞/mLに達した。0.5mg/L区の細胞密度は暴露後24時間には減少したものの、その後増加傾向を示し、特に48～96時間の間に急激に増加した。1.0mg/L区でも一旦減少したが、96時間後には410,000細胞/mLとなった。

考 察

濾過海水中に添加し放置したClO₂は、直線的に減衰し、魚類受精卵及び珪藻の暴露試験時にも減衰したが、珪藻を用いた場合の減衰傾向は、前二者よりも大きかった。ClO₂は、強い酸化力を持つため水中の還元性物質を還元し消費される。生物がClO₂の消費量を左右するとすれば、今回の試験に用いた珪藻のほうが魚卵より密度が高く、1細胞は小さくても群として表面積の総和が大きいなど、ClO₂をより多く消費したことが考えら

れる。

ClO₂に魚卵を暴露した試験1では、0.1mg/L区のアオギス受精卵の孵化率は高かったが、マダイ受精卵の孵化率は低かった。マダイの受精卵を観察したところでは、24時間後で孵化間近と思われる個体が多く存在したため、その後の試験では試験時間を延長した。48時間後の孵化率についての試験2では、マダイ受精卵の0.1および1mg/L試験区孵化率が、試験1のそれに比べて増加した。この2回の試験から、マダイ受精卵に影響を及ぼすClO₂濃度は、0.1mg/Lから1mg/Lの濃度と推察され、その濃度間でより密な試験を行うため、試験3では、暴露後の飼育時間を延長するとともに、0.3、0.5mg/Lの試験区を設けた。この結果、ClO₂がマダイ受精卵の孵化に影響を与える濃度は、0.5mg/Lから1mg/Lの間であることが明らかとなった。

3回の試験を通じてマダイ受精卵の孵化率をみると、0.1mg/L区では、暴露後観察までの時間が長いと孵化率は高かった。1.0mg/L区でも、24時間後観察から48時間後観察にかけて孵化率が上がったが、72時間後観察では孵化率が下がった。48時間後までは未受精卵が観察されたが、72時間後の観察では全てが死亡卵であった。10mg/L区では、24時間後観察で0.2%であった孵化率は、48時間後観察では0%であった。48時間後観察の結果、全てが死亡卵であった。ヒラメ受精卵の孵化率は、0.1mg/L区では、48時間後観察と72時間後観察の孵化率に大きな差は見られず、高かったが、1mg/L区では、孵化率が48時間後観察の42%から72時

間後観察の99%に上昇した。低濃度区では未孵化卵が観察され、高濃度区では孵化に至らず、死亡する卵が観察された。この結果、ClO₂に暴露したヒラメ受精卵は、発生が阻害されるが、その濃度が1mg/L以下であれば殆どの受精卵が孵化することが示唆された。即ち、少なくともマダイ、ヒラメの2種については低濃度暴露の場合、発生が阻害され高濃度では死亡する傾向が示唆された。また、魚種によってClO₂に対する受精卵の感受性に違いがあることが示唆された。LC₅₀を求めると、72時間後のマダイでは0.72mg/L (0.67~0.78mg/L, 95%信頼限界)であった。ヒラメでは求めることができなかったが、少なくとも3mg/L以上であることが示唆された。

植物プランクトンの一種である珪藻を用いた結果においても、ClO₂濃度によって増殖への阻害の傾向が異なった。暴露区では、対照区に比較して少なくとも48時間の増殖阻害が認められた。また0.5mg/L区では96時間で対照区とほぼ同密度になったが、1.0mg/L区では同時期に対照区の密度よりやや低い値にとどまったため、増殖阻害を受ける期間が濃度に比例する可能性が示唆された。0.5mg/L区、1.0mg/L区それぞれの試験区の細胞増殖は、96~144時間経過後には対照区の密度に達していることから、この時点では群として影響から回復したものと考えられる。しかし、本試験では *Chaetoceros gracilis* への増殖阻害が、細胞の活性低下など内部要因に起因するののか、暴露された細胞の殆どは死滅し、生存した細胞密度が少ないため、増殖する時間が長期化した結果であるのかは不明である。

以上をまとめると、海水中に添加したClO₂は減衰する。添加濃度が0.5mg/L程度では、魚卵の発生や植物プランクトン群の増殖は阻害されるが死亡には至らない。魚卵の発生、植物プランクトンの増殖に明らかな急性毒性を及ぼす濃度は、1mg/L以上であると推定される。

謝 辞

この実験の実施及び本稿のとりまとめを強く勧めていただいた海生研中央研前所長城戸勝利博士、ご校閲いただいた東京大学名誉教授平野礼次郎博士、元東京大学教授梶原武博士、東京大学名誉教授清水誠博士、海生研理事会沢安志博士、適切なお助言を下された海生研の清野通康博士、土田修

二博士、吉川貴志博士、道津光生博士、御園生淳総括研究員、アオギス、マダイ、ヒラメの受精卵を調整した海生研の箕輪康主任技術員、吉野幸代技術員、ClO₂水溶液をご提供頂いた稲畑産業(株)尾崎隆志氏の各位に心よりお礼申し上げます。

文 献

- Belluati M., L. Bartole and G. Bressan (1997). Once-through cooling systems antifouling treatment by chlorine dioxide. In "Chlorine dioxide and disinfection", C. I. P. A. S. r. l., Milano, pp.133-151.
- EPRI (1980). Review of open literature on effects of chlorine on aquatic organisms. EPRI EA-1491, Electric Power Research Institute, Palo Alto, Calif., 322pp.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grain. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- Inman, G. W., Jr. and Johnson, J. D. (1978). The effect of ammonia concentration on the chemistry of chlorinated sea water. In "Water chlorination: Environmental impact and health effects" (eds. Jolley, R. L., Gorchv, H. and Humilton, D. H., Jr.), Vol. 2, Ann Arbor Science Publ. Inc., Michigan, pp.235-252.
- 川邊允志 (1986). 海水のクロリネーションの過去と未来. セミナー クロリネーションの過去と現在—クロリネーションに未来はあるか—予稿集, 昭和61年2月, 電気化学協会海生生物汚損対策懇談会, pp.11-28.
- 小島貞男 (1986). クロリネーションの原理と淡水スライム対策. セミナー クロリネーションの過去と現在—クロリネーションに未来はあるか—予稿集, 昭和61年2月, 電気化学協会海生生物汚損対策懇談会, pp.1-10.
- Mattice, J. S. and Zittel, H. E. (1976). Site-specific evaluation of power plant chlorination, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **48**, 2284-2308.
- 丸山俊朗・三浦昭雄・吉田多摩夫 (1987). 養殖ノリの生育に及ぼす塩素殺菌都市下水処理水の影響. *日水誌*, **53**, 465-472.

日本水道協会 (2001). VI-2 17 残留塩素. 「上水試験方法2001年版」(日本水道協会編), 日本水道協会, 東京, pp.247-257.

Turner, A. and Thayer, T. A. (1980). Chlorine toxicity in aquatic ecosystems. *In* "Water

chlorination: Environmental impact and health effects" (eds. Jolley, R.L., Brungs, W. A. and Cumming, R.B.), Vol. 3, Ann Arbor Science Publ. Inc., Michigan, pp.607-630.