溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ2種への影響の調査と毒性同定評価試験の適用

真野 浩行¹・武田 文彦¹・南山 瑞彦¹

¹正会員 国立研究開発法人土木研究所 (〒305-8516茨城県つくば市南原1-6)

E-mail:h-mano@pwri.go.jp

溶存態の金属濃度が高い二次処理水に対してニセネコゼミジンコとオオミジンコの生物応答を用いた排水試験を実施した。試験結果から対象の二次処理水によるニセネコゼミジンコへの影響が確認された。オオミジンコへの影響は確認されなかったことから、調査対象の二次処理水に対するニセネコゼミジンコの感受性はオオミジンコよりも高いことが示された。次に、二次処理水に含まれる生物影響の原因物質を推定するために毒性同定評価試験を実施したところ、陽イオン金属とアンモニアが原因物質として推定された。推定された原因物質の生物影響を水質分析結果から検討したところ、ニッケルの生物影響が示された。本研究で用いた二次処理水では、毒性同定評価試験により下水処理水の溶存態の陽イオン金属の生物影響を検出できた。

Key Words : bioassay, treated wastewater, toxicity identification evaluation, whole effluent toxicity

1. はじめに

生物応答を用いた排水試験法(検討案)¹⁾が公表されて以降、わが国でも試験生物に対する事業場排水の影響に関する知見が集積されつつある^{2), 3)}。一方、本試験法に基づき、下水処理水を対象として行われた試験報告例は少なく^{4), 5)}、下水処理水による試験生物への影響に関する知見の収集が必要とされる。

排水試験の対象生物種の一つであるニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)は、金属に対して高い感受性を示し、金属を含む事業場排水による影響を受けることが報告されている^{3), 6)}。事業場排水に由来する金属の負荷が高い下水処理場では、下水処理水中の金属濃度が比較的高くなる可能性があるため、ニセネコゼミジンコが影響を受けることが考えられる。これまで、金属の流入負荷が高い下水処理場の下水処理水に関する生物応答を用いた排水試験の調査事例はなく、このような下水処理水のニセネコゼミジンコへの影響を把握するとともに試験適用にあたっての留意点等の整理が必要である。また、排水の生物影響ではニセネコゼミジンコが採用されているのに対して、個別化学物質の生物影響評価ではオオミ

ジンコ(*Daphnia magna*)が採用されており、その感受性の差について議論がされている⁷⁾。国内では、下水試料に対する感受性の違いについて、オオミジンコとニセネコゼミジンコの感受性が同程度と報告されているが、その報告事例は限られている⁸⁾。

下水処理水の生物影響が認められた場合、必要に応じ、生物影響削減対策の検討が求められることとなると想定されるが、対策計画の立案にあたっては、原因物質の特定が必要となる。わが国では、排水の生物影響の改善のための原因物質の特定に関するガイドラインはない。また、原因物質を特定するために、下水処理水に含まれる膨大な種類の化学物質の全てを対象に分析を行うことは困難である。そこで、米国で適用されている毒性同定評価⁹⁾に着目した。これは、生物影響が認められた排水に物理化学的な処理を施すことで、処理前後の生物影響の変化から原因物質を推定する手法であるが、国内では、この手法に関する下水処理水への適用事例は限られている⁵⁾。そのため、我が国での下水処理水の毒性同定評価試験に関する知見の収集とともに、下水処理水への毒性同定評価試験の適用性を検討する必要がある。

本研究では、事業場排水に由来する金属が比較的多く

流入する下水処理場の二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコとオオミジンコを用いた排水試験を実施し、対象とした二次処理水のミジンコへの影響を調査するとともに、ミジンコ2種間で対象とした二次処理水に対する感受性を比較した。また、影響が確認された二次処理水に対して毒性同定評価試験を行い、下水処理水中の生物影響の原因物質の推定を行った。さらに、推定された原因物質について、ニセネコゼミジンコへの影響を二次処理水の水質分析の結果に基づいて評価し、下水処理水の毒性同定評価試験の適用性を検討した。

2. 調査方法

(1) 下水試料の採取

PRTRけんさくん¹⁰⁾の公開情報に基づき、金属類の流入負荷量が多い下水処理場Aを対象とした。この下水処理場Aでは、処理方式に嫌気好気活性汚泥処理を採用し、日平均で約150,000m³/日の下水を処理して河川に放流している（平成26年度）。表-1は、平成24、25年度における下水処理場Aへの金属およびその化合物の年間移動量を示す。全国の下水処理場の移動量の中央値と比較して、この下水処理場への亜鉛、クロム、銅およびニッケルの移動量が多いと考えられた。

2015年の1、4、7、10月に二次処理水を採水した。採水は塩素添加前の最終沈殿池の出口付近で実施した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は24時間とし、1時間ごとに1リットルずつ採水した。採水した二次処理水をコンボジットして、24リットルの下水試料を得た。この下水試料をすぐに実験室に持ち帰り、孔径60μmのメッシュでろ過し、試験を実施するまで、ろ液を遮光したガラス瓶に入れて4℃の冷暗所で保管した。

表-1 下水処理場Aへの金属の年間移動量 (kg)

第一種指定化学物質名	平成24年度		平成25年度	
	移動量* 中央値 (下水処理場数**)		移動量 中央値 (下水処理場数)	
亜鉛の水溶性化合物	80	10 (84)	81	16 (86)
クロム及び三価クロム化合物、 六価クロム化合物	113.4	5.9 (69)	144.2	9 (65)
セレン及びその化合物	0.4	-	3.5	-
銅水溶性塩（錯塩を除く）	43	15 (65)	7	13 (62)
鉛化合物	0.4	-	3.5	-
ニッケル、ニッケル化合物	807	20 (119)	167	20 (123)
砒素及びその無機化合物	0.7	-	0.3	-

*PRTRけんさくん¹⁰⁾の公開情報に基づいて集計した

**PRTRけんさくん¹⁰⁾の公開情報から、事業場からの移動が確認された全国の下水処理場の数を示す

(2) 水質項目分析

採水した下水試料および生物試験の対照区に用いた水試料の水質を把握するため、各試料の一般水質項目（ア

ンモニア性窒素（NH₄-N）、全りん（T-P）、全窒素（T-N）および下水処理場Aに多く流入していると考えられる金属のうち銅、ニッケル、亜鉛（Cu、Ni、Zn）の溶存態濃度を測定した。アンモニア性窒素、全りんおよび全窒素の分析は下水試験方法¹¹⁾に従い、連続流れ分析装置（TRAACS2000, Bran+Luebbe）を用いて定量を行った。また、溶存態の金属の分析は河川水質試験方法¹²⁾に従った。孔径0.45μmのフィルター（Millipore社）でろ過した試料の硝酸分解を行った後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置（X7CCT, サーマフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて定量を行った。

(3) 下水試料の排水試験

a) ニセネコゼミジンコを用いた試験

本試験は、ニセネコゼミジンコを下水試料に一定期間曝露し、曝露期間中の累積産仔数に対する下水試料の慢性毒性を調査した。本試験は、生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾に基づき、国立環境研究所より分譲されたニセネコゼミジンコを用いて実施した。採取した二次処理水に対して4段階の割合（試料割合40%、20%、10%、5%）の希釈溶液及び対照区を用意した。二次処理水の希釈及び対照区に使用する試験水として、市販のミネラルウォーターを用いた。50mLのガラス容器に試験溶液15mLを入れ、試験連数を10連/試験区とした。試験区ごとに生後24時間以内の個体を10匹（1容器1匹）曝露し、曝露期間は最大で8日間とした。餌として、クロレラ（*Chlorella vulgaris*）、ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*）およびYCTを使用した。曝露方式は半止水式（1日おきに換水）とし、照明は白色蛍光灯で明期16時間、暗期8時間、水温は25±1℃とした。曝露終了後まで試験個体の生存と産仔数を毎日観察し、試験個体ごとに累積産仔数を算出し、試験溶液ごとに生存率を求めた。また、曝露期間中の水換え前後に、pH、水温、溶存酸素（DO、Dissolved Oxygen）の測定を行った。本試験は、採水した全ての二次処理水を対象とした。

b) オオミジンコを用いた試験

本試験は、二次処理水に対するニセネコゼミジンコの生物応答と比較するため、曝露期間中のオオミジンコの累積産仔数に対する下水試料の慢性毒性を調査した。生物応答を用いた排水試験法（検討案）¹⁾およびOECDテストガイドラインNo.211¹³⁾を参考に、国立環境研究所より分譲されたオオミジンコを用いて、本試験を実施した。採取した下水試料に対して4段階の割合（試料割合80%、40%、20%、10%）の希釈試料及び対照区を用意した。50mLのガラス容器に試験溶液50mLを入れ、試験連数を10連/試験区とした。各下水試料の希釈及び対照区に使用する試験水として、脱塩素水道水を用いた。試験区ご

とに生後24時間以内の個体を10匹（1容器1匹）曝露し、曝露期間は15日間とした。水温は21±1℃とした。曝露方式、照明、観察および水質項目の測定はニセネコゼミジンコを用いた試験と同様の条件とした。本試験は、2015年1月に採水した二次処理水を対象とした。

(4) ニセネコゼミジンコを用いた下水試料の毒性同定評価試験

本研究では、ニセネコゼミジンコの累積産仔数に影響がみられた7月と10月に採取した二次処理水に対して、米国の毒性同定評価の方法⁹⁾を参考に、Tier 1の特性評価試験（Characterization test）を行った。二次処理水の割合を40%とした希釈水に対し、無処理、ろ過、チオ硫酸ナトリウム添加、EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加、ばっ気、pH調整の各前処理を行った。ろ過処理として、二次処理水200mLを孔径1μmのフィルターでろ過した後、希釈水を500mL作成した。チオ硫酸ナトリウム添加処理として、試験開始前に、希釈水500mLに、チオ硫酸ナトリウムが10mg/Lになるように添加した。EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加処理として、希釈水500mLにEDTA濃度が3mg/Lになるように、試験開始前にEDTA二水素二ナトリウムを添加した。チオ硫酸ナトリウムおよびEDTAの濃度は、板津ら⁹⁾の試験条件を参考にした。ばっ気処理として、二次処理水200mLを1L/（1L air/min）で1時間ばっ気後に、40%に希釈した。pH調整処理として、換水ごとに、希釈水に塩酸を添加して、pHが約6.2～6.5になるように調整した。また、SPE[Solid Phase Extraction, 固相抽出]カラム（Sep-Pak C18, Waters社）を用い、試料を孔径1.0μmのフィルターでろ過後にSPEカラムに通水したもの（SPE通過水）、及びSPEカラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの（SPE溶出水）も前処理した水試料として同様に試験した。カラムの使用にあたっては、メタノールでコンディショニングした後に、送液ポンプを用いて二次処理水1Lを10mL/minでカラムに通水した。通水した二次処理水を回収し、この二次処理水を40%に希釈してSPE通過水を作成した。また、二次処理水を通水させたカラムにメタノール10mLを5mL/minで通水した後に回収し、窒素ガスを用いて3mLに濃縮した溶出試料を作成した。ミネラルウォーター500mLに溶出試料を0.6mL添加し、SPE溶出水を作成した。試験連数は5連/試験区とした。

(5) データ解析

排水試験では、累積産仔数について Bartlett 検定（有意水準 $\alpha = 0.05$ ）により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定（有意水準 $\alpha = 0.05$ ）による多重比較で対照区と下水試料での累積産仔数の違いを調査した。等分散が棄却された場合は Steel 検定（有意

水準 $\alpha = 0.05$ ）で対照区と下水試料での累積産仔数の違いを調査した。排水試験では、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC（No Observed Effect Concentration）として求めた。

毒性同定評価試験では、排水試験と同様の統計手法により、各前処理区の累積産仔数を対照区または無処理区の累積産仔数と比較した。無処理区と前処理区の間で累積産仔数に有意差が認められ、無処理区よりも前処理区の累積産仔数が多い場合、その前処理による生物影響の改善がみられたと判定した。SPE溶出水については、対照区と比較し、累積産仔数の有意差がある場合はSPE溶出水による影響があると判定した。

3. 結果と考察

(1) 水質項目分析

表-2に採取した二次処理水および二次処理水の希釈や対照区に用いた水試料の水質項目分析結果を示す。全窒素、全リンは調査回間で同じ値を示した。アンモニア性窒素は4月に比較的高い値で検出された。金属について、亜鉛は1月と7月で比較的高い濃度で検出され、ニッケルは1月に比較的高い濃度で検出された。ニッケルについて、江藤らは2000年度に全国の13下水処理場の放流水中のニッケル濃度を測定しており、平均値は34μg/Lと報告している¹⁴⁾。また、磯崎らは、2005年に4都市下水処理場の標準活性汚泥処理水中の溶存態ニッケルを測定しており、溶存態のニッケル濃度は2.6～13μg/Lと報告している¹⁵⁾。これらの値に比べて、本研究で対象とした下水処理場の二次処理水中のニッケルは高い濃度で検出された。

表-2 二次処理水および対照区の水試料の水質分析項目

水質項目	二次処理水				対照区	
	1月	4月	7月	10月	ニセネコゼミジンコ	オオミジンコ
T-N (mg/L)	11.7	11.7	10.6	11.6	1.63	0.33
T-P (mg/L)	0.442	0.468	0.592	0.132	0.152	N.D.
NH ₄ -N (mg/L)	1.03	9.17	0.257	2.2	0.04	N.D.
Cu (μg/L)	7.28	2.5	3.13	2.48	0.22	-
Ni (μg/L)	88.39	55.03	38.88	35.67	0.44	0.41
Zn (μg/L)	63.55	24.16	50.96	35.76	4.8	3.14

N.D.は不検出を示す

脱塩素水道水のCuは未測定

(2) 下水試料の排水試験

ニセネコゼミジンコの試験期間中の各試験溶液の水温、pHおよびDOを表-3に示す。曝露実験期間中の平均水温は、全ての試験区で25±1℃以内を維持した。平均pHは、全ての試験区で7.65～8.38の範囲であった。DOは、曝露前後において全ての試験区で飽和DO濃度の60%以上に

表-3 ニセネコゼミジンコの排水試験における試験溶液の DO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

採水月	Sample	二次処理水の割合 (%)	曝露前			曝露後		
			DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH
1月	対照区	-	7.85 ± 0.23	25.8 ± 0.1	8.16 ± 0.15	7.58 ± 0.16	25.3 ± 0.2	8.10 ± 0.16
	二次処理水	5	7.94 ± 0.15	25.7 ± 0.2	8.15 ± 0.09	7.50 ± 0.40	25.2 ± 0.5	8.38 ± 0.47
		10	7.99 ± 0.14	25.7 ± 0.1	8.12 ± 0.05	7.69 ± 0.35	24.8 ± 0.7	8.32 ± 0.32
		20	8.08 ± 0.28	25.4 ± 0.1	8.06 ± 0.03	6.93 ± 0.62	25.4 ± 0.3	7.97 ± 0.31
		40	8.34 ± 0.33	25.4 ± 0.0	7.86 ± 0.06	7.45 ± 0.16	25.4 ± 0.1	8.13 ± 0.04
4月	対照区	-	9.05 ± 1.65	25.7 ± 0.3	7.81 ± 0.45	8.66 ± 1.28	25.1 ± 0.4	8.12 ± 0.20
	二次処理水	5	9.08 ± 1.76	25.5 ± 0.4	7.90 ± 0.36	9.06 ± 1.48	25.0 ± 0.7	7.98 ± 0.23
		10	9.07 ± 1.73	25.5 ± 0.4	7.88 ± 0.30	8.60 ± 1.04	24.9 ± 0.5	7.99 ± 0.24
		20	8.97 ± 2.10	25.4 ± 0.6	7.97 ± 0.27	9.49 ± 0.63	25.0 ± 0.5	7.96 ± 0.34
		40	10.32 ± 1.45	25.4 ± 0.7	7.66 ± 0.15	8.65 ± 0.98	25.2 ± 0.5	7.97 ± 0.25
7月	対照区	-	8.99 ± 1.48	25.7 ± 0.3	7.95 ± 0.89	7.89 ± 0.68	25.0 ± 0.4	7.81 ± 0.55
	二次処理水	5	8.67 ± 1.33	25.6 ± 0.4	7.75 ± 0.67	8.16 ± 0.87	24.8 ± 0.3	7.79 ± 0.57
		10	8.75 ± 1.29	25.5 ± 0.4	7.73 ± 0.66	8.27 ± 1.01	24.9 ± 0.3	7.95 ± 0.48
		20	8.87 ± 1.25	25.4 ± 0.3	7.71 ± 0.59	8.24 ± 1.26	24.7 ± 0.5	8.02 ± 0.38
		40	9.10 ± 1.14	25.3 ± 0.3	7.65 ± 0.50	8.03 ± 0.51	24.5 ± 0.4	8.03 ± 0.33
10月	対照区	-	8.04 ± 0.19	25.6 ± 0.2	7.81 ± 0.47	7.49 ± 0.10	25.5 ± 0.2	8.00 ± 0.34
	二次処理水	5	8.11 ± 0.17	25.6 ± 0.2	7.85 ± 0.52	7.62 ± 0.55	25.2 ± 0.2	7.79 ± 0.41
		10	8.22 ± 0.14	25.5 ± 0.2	7.84 ± 0.51	7.36 ± 0.52	25.1 ± 0.2	7.85 ± 0.38
		20	8.34 ± 0.15	25.4 ± 0.3	7.82 ± 0.47	7.41 ± 0.40	25.4 ± 0.1	7.87 ± 0.33
		40	8.60 ± 0.22	25.3 ± 0.5	7.76 ± 0.43	7.42 ± 0.49	25.2 ± 0.3	7.89 ± 0.29

図-1 ニセネコゼミジンコを用いた二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率. a) 2015年1月試料, b) 2015年4月試料, c) 2015年7月試料, d) 2015年10月試料. ■: 生存率を示す. *: 累積産仔数が対照区と有意な差を示し ($p<0.05$), 対照区よりも少ないことを示す.

達していた。

図-1 にニセネコゼミジンコを用いた二次処理水の試験結果を示す。全ての調査回で二次処理水の生物影響がみられた。1, 4, 7, 10月の二次処理水のNOECはそれぞれ、5%未満、5%未満、5%、5%未満と求められた。安田ら

は、都市部の下水処理場の処理水に対してニセネコゼミジンコの排水試験を実施しており、NOECは10%と報告している⁹⁾。NOECの比較により、既報の二次処理水に比べて本研究で対象とした二次処理水によるニセネコゼミジンコへの影響が大きいことが考えられた。また、生

表-4 オオミジンコの排水試験における試験溶液の DO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

Sample	二次処理水の割合 (%)	曝露前			曝露後		
		DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH
対照区	-	8.16 ± 0.62	21.7 ± 0.2	7.01 ± 0.12	7.41 ± 0.96	22.0 ± 0.2	7.52 ± 0.42
二次処理水	10	8.32 ± 0.78	21.7 ± 0.2	7.04 ± 0.12	6.89 ± 0.87	21.8 ± 0.2	7.55 ± 0.38
	20	8.56 ± 0.90	21.6 ± 0.3	7.06 ± 0.07	7.02 ± 0.80	21.8 ± 0.4	7.59 ± 0.23
	40	9.08 ± 0.97	21.4 ± 0.3	7.04 ± 0.05	6.87 ± 0.86	21.9 ± 0.2	7.60 ± 0.18
	80	10.30 ± 0.65	21.3 ± 0.4	6.99 ± 0.05	7.04 ± 0.99	22.0 ± 0.3	7.58 ± 0.16

存率は、希釈試料中の二次処理水の割合の増加と共に低下する傾向を示した。特に、1, 4月の二次処理水の希釈系列は、7, 10月の二次処理水の希釈系列に比べて生存率が低い傾向を示した。

オオミジンコの試験期間中の各試験溶液の水温, pH およびDOを表-4に示す。曝露実験期間中の平均水温は、全ての試験区で21±1°C以内を維持した。平均pHは、全ての試験区で6.99~7.60の範囲であった。DOは、曝露前後において全ての試験区で飽和DO濃度の60%以上に達していた。

図-2に1月に採取した二次処理水に対するオオミジンコの排水試験結果を示す。オオミジンコの繁殖と死亡に対する1月の二次処理水の生態影響はみられなかった。この結果から1月の二次処理水のNOECは40%以上と求められた。

1月に採取した二次処理水の排水試験結果では、ニセネコゼミジンコへの生物影響が検出されたのに対して、オオミジンコへの生物影響は検出されなかった。下水処理水に対するミジンコ種間の感受性を調査した先行研究⁸⁾では、オオミジンコとニセネコゼミジンコの感受性は同程度であることが報告されているが、本研究で対象と

図-2 オオミジンコを用いた 1 月の二次処理水の排水試験における累積産仔数と生存率。■：生存率を示す。

した二次処理水に対して、ニセネコゼミジンコはオオミジンコよりも高い感受性を示した。先行研究および本研究の結果から、ニセネコゼミジンコを用いて下水処理水の生物影響を調査する場合、オオミジンコを用いるより安全側の結果となる可能性が示された。

(3) 下水試料の毒性同定評価試験

試験期間中の各試験溶液の水温, pH および DO を表-5 に示す。水温, pH, DO は試験条件を満たしていた。7

表-5 毒性同定評価試験における試験溶液の DO, 水温, pH (平均値±標準偏差)

採水月	Sample	曝露前			曝露後		
		DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH
7月	対照区	9.47 ± 0.94	25.3 ± 0.5	8.08 ± 0.18	7.05 ± 0.98	25.1 ± 0.4	7.55 ± 0.40
	無処理	9.52 ± 0.47	25.2 ± 0.2	7.83 ± 0.08	7.68 ± 0.77	25.1 ± 0.3	7.41 ± 0.38
	ばっ気	9.74 ± 0.59	25.1 ± 0.3	7.91 ± 0.12	7.31 ± 0.77	24.9 ± 0.5	7.71 ± 0.17
	EDTA 3mg/L	9.75 ± 0.70	25.1 ± 0.4	7.81 ± 0.06	7.10 ± 0.67	25.1 ± 0.3	7.84 ± 0.11
	チオ硫酸 10mg/L	9.92 ± 0.62	25.1 ± 0.2	7.74 ± 0.05	7.10 ± 0.86	24.8 ± 0.3	7.92 ± 0.07
	ろ過	9.64 ± 0.67	25.2 ± 0.2	7.76 ± 0.07	7.43 ± 0.20	24.4 ± 0.5	7.83 ± 0.22
	SPE通過	9.51 ± 0.69	25.0 ± 0.3	7.79 ± 0.06	6.89 ± 0.61	24.8 ± 0.2	7.99 ± 0.07
	SPE溶出	8.79 ± 0.41	25.1 ± 0.3	7.61 ± 0.14	7.08 ± 1.02	24.8 ± 0.4	8.07 ± 0.07
	低pH	9.57 ± 0.92	25.2 ± 0.2	6.44 ± 0.07	7.40 ± 1.03	24.7 ± 0.4	7.96 ± 0.06
10月	対照区	9.60 ± 0.95	25.0 ± 0.4	8.08 ± 0.03	7.83 ± 1.61	24.9 ± 0.3	7.97 ± 0.53
	無処理	9.77 ± 0.41	24.5 ± 0.5	7.83 ± 0.08	8.38 ± 1.19	25.0 ± 0.4	7.96 ± 0.37
	ばっ気	10.24 ± 0.34	24.7 ± 0.6	7.78 ± 0.06	8.10 ± 1.32	24.9 ± 0.6	8.02 ± 0.29
	EDTA 3mg/L	9.99 ± 0.59	24.7 ± 0.4	7.75 ± 0.08	7.74 ± 0.90	25.1 ± 0.5	8.07 ± 0.25
	チオ硫酸 10mg/L	9.93 ± 0.64	24.9 ± 0.2	7.77 ± 0.13	7.33 ± 1.05	24.9 ± 0.6	8.11 ± 0.14
	ろ過	9.97 ± 0.72	24.7 ± 0.4	7.80 ± 0.03	7.96 ± 1.28	24.9 ± 0.7	8.08 ± 0.21
	SPE通過	10.23 ± 0.37	24.7 ± 0.3	7.82 ± 0.03	7.93 ± 0.41	25.3 ± 0.6	8.13 ± 0.19
	SPE溶出	8.62 ± 0.69	24.9 ± 0.5	7.53 ± 0.08	7.49 ± 0.74	25.1 ± 0.4	8.20 ± 0.14
	低pH	9.42 ± 0.36	25.1 ± 0.4	6.19 ± 0.05	7.23 ± 0.96	24.5 ± 0.5	8.08 ± 0.19

図-3 毒性同定評価試験における累積産仔数と生存率 a) 2015年7月二次処理水 40%、b) 2015年10月二次処理水 40%。棒グラフは累積産仔数の平均値、バーは標準偏差を示す。■：生存率を示す。*：累積産仔数が対照区と有意差 ($p<0.05$) を示し、対照区に比べて少ないことを示す。†：累積産仔数が無処理区と有意差 ($p<0.05$) を示し、無処理に比べて多いことを示す。

月に採取した二次処理水（試料割合 40%）に対する TIE の結果を図-3 a)に示す。生物応答試験と同様に、無処理区で生物影響がみられた。EDTA 処理による生物影響の改善がみられた。米国の毒性同定評価の方法⁹⁾に基づいて、EDTA 処理により生物影響が低下する物質は陽イオン金属と判断されることから、陽イオン金属が7月の二次処理水中の主な生物影響の原因物質であると推定された。また、SPE 通過水で生物影響が検出され、SPE 溶出液で生物影響が検出されなかったことから、有機物ではなく、金属等のイオン物質による生物影響への寄与が考えられた。

10月に採取した二次処理水（試料割合 40%）に対する TIE の結果を図-3 b)に示す。生物応答試験と同様に、無処理区で生物影響がみられた。EDTA 処理および低 pH 処理による生物影響の改善がみられた。米国の毒性同定評価の方法⁹⁾に基づいて、EDTA により生物影響が低下する物質は陽イオン金属、低 pH 処理により生物影響が低下する物質は、アンモニアおよびニッケル等の一部の陽イオン金属と判断されることから、10月の二次処理水中の主な生物影響の原因物質として、陽イオン金属とアンモニアが推定された。また、7月の二次処理水の試験結果と同様に、SPE 通過水で生物影響が検出され、SPE 溶出液で生物影響が検出されなかったことから、有機物ではなく、金属等のイオン物質による生物影響への寄与が考えられた。

毒性同定評価試験により、7月と10月に採水された二次処理水の生物影響の原因物質として推定されたアンモニアと陽イオン金属について、原因物質であるかどうかを検討した。水質分析結果から推計された試験溶液中の濃度と既報文献から得られた慢性毒性の値を比較し、試験溶液の濃度で、これらの化学物質がニセネコゼミジンコに影響を引き起こすかどうかを調査した。

はじめに、アンモニアによるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。二次処理水と対照区の水試料のアンモ

ニア性窒素の濃度に基づいて、二次処理水の割合が40%の試験溶液に含まれるアンモニア性窒素濃度を推計した。7月および10月に採取した二次処理水の割合が40%の試験溶液中のアンモニア性窒素の濃度はそれぞれ、0.13, 0.90mg/Lと推計された。アンモニアの毒性値として、平均水温24.5℃、平均pH8.59の試験環境下で、アンモニア性窒素濃度で示された25%阻害濃度が1.99mg/Lと報告されている¹⁶⁾。アンモニアの毒性はpHに依存して変化するため¹⁷⁾、以下のpHによる慢性毒性値の標準化式¹⁸⁾を用いて、毒性同定評価試験における平均pHでのアンモニアの慢性毒性値に換算した。

$$CV_x = CV_{pH8} \times \left(\frac{0.0676}{1+10^{7.688-x}} + \frac{2.91}{1+10^{x-7.688}} \right) \quad (1)$$

CV_x はpHがxでの慢性毒性値を示し、 CV_{pH8} はpH8での慢性毒性値を示す。7月および10月の二次処理水の毒性同定評価試験の平均pHの下で推計されたアンモニアの毒性値は、アンモニア性窒素濃度で、それぞれ8.29, 6.03mg/Lと推計された。7月および10月の二次処理水の40%試験溶液のアンモニア性窒素濃度の推計値は、推計されたアンモニアの慢性毒性値よりも低い値を示した。このことから、7月および10月の二次処理水の生物影響にアンモニアは寄与しなかったことが推察された。

次に、陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響を検討した。表-6に、各希釈試料の陽イオン金属濃度の推定値を示す。推計は、二次処理水と対照区の水試料の陽イオン金属に基づいて行った。ニセネコゼミジンコの繁殖に対する銅の無影響濃度と最低影響濃度は、硬度94.1mg/Lで6.3μg/Lと9.9μg/L¹⁹⁾、ニッケルの無影響濃度と最低影響濃度は硬度113mg/Lで5.3μg/Lと9.9μg/L²⁰⁾、亜鉛の無影響濃度と最低影響濃度は硬度82.4mg/Lで13μg/Lと25.1μg/L²¹⁾と報告されている。最低影響濃度に比べて、毒性同定評価試験で用いた二次処理水の割合が40%の試験溶液中のニッケル濃度の推計値が高いことから、ニッケルはこの試験溶液の生物影響に大きく寄与していたこ

表-6 7月と10月に採取した二次処理水の割合が5,10,20および40%の試験溶液に含まれる陽イオン金属3物質の推定濃度

	40%試験溶液		20%試験溶液		10%試験溶液		5%試験溶液		無影響 濃度	最低影響 濃度
	7月	10月	7月	10月	7月	10月	7月	10月		
Cu (μg/L)	1.38	1.12	0.80	0.67	0.51	0.45	0.33	0.37	6.3	9.9
Ni (μg/L)	15.82 **	14.53 **	8.13 *	7.49 *	4.28	3.96	3.17	2.36	5.3	9.9
Zn (μg/L)	23.26 *	17.18 *	14.03 *	10.99	9.42	7.90	5.77	7.11	13	25.1

**ニセネコゼミジンコに対する最低影響濃度よりも高い金属濃度を示す

*ニセネコゼミジンコに対する無影響濃度よりも高く、最低影響濃度よりも低い金属濃度を示す

とが考えられた。一方で、オオミジンコの最低影響濃度は、250μg/Lと報告されており²⁾、二次処理水中のニッケルによるオオミジンコへの影響はなかったと考えられた。銅については、二次処理水の割合が40%の試験溶液の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いことから、銅はこの試験溶液の生物影響に寄与しなかったことが考えられた。また、亜鉛については、二次処理水の割合が40%の試験溶液中の濃度の推計値が最低影響濃度よりも低いが無影響濃度よりも高い値を示しており、この試験溶液の生物影響に寄与していた可能性が考えられた。以上の結果から、陽イオン金属のうち、ニッケルが主要な影響原因物質として7月と10月に採水された二次処理水の生物影響に寄与していると考えられた。

10月の二次処理水を用いた毒性同定試験では、低pH処理によりニセネコゼミジンコへの影響が改善された。ニセネコゼミジンコに対するニッケルの毒性は、低pH条件下で低下することが報告されている^{9, 29)}。これは、ニッケルイオンが低pH処理により増加した水素イオンと競合し、ニセネコゼミジンコの鰓に結合しにくくなるためと考えられている²⁴⁾。このことから、低pH処理によりニッケルの毒性が低下し、10月に採水された二次処理40%の試験溶液の生物影響が低下したと考えられた。

また、7月および10月に採水した二次処理水の排水試験では、ニセネコゼミジンコで影響がみられた二次処理水の割合の最小値はそれぞれ、10%と5%であった。これらの試験溶液の陽イオン金属3物質の濃度の推計値は慢性毒性値よりも下回っており、個別の陽イオン金属によるニセネコゼミジンコへの影響は小さいことが考えられた(表-6)。そのため、これらの試験溶液によるニセネコゼミジンコへの影響は、陽イオン金属の複合的な影響による可能性が考えられた。また、本研究では、対象下水処理場への移動量が高いクロムについて検討していないため、今後クロムによる影響についても調査が必要である。

以上の結果から、本研究で用いた二次処理水では、毒性同定評価試験により二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響を検出できた。また、7月と10月に採水した二次処理水の生物影響の主要な原因物質とし

てニッケルが推察された。ニッケルは金属製品製造業の排水において、ニセネコゼミジンコに影響を引き起こす原因物質の1つとして報告されている^{3, 9)}。溶存態のニッケルを比較的多く含む排水が流入する下水処理場において、二次処理水によるニセネコゼミジンコへの影響が考えられるため、今後、他の下水処理場で採取された溶存態金属の濃度が高い二次処理水に対して排水試験および毒性同定評価試験を実施し、ニッケルによる生物影響に関する知見を収集する必要がある。また、水生生物に対する金属の毒性は、遊離イオンや無機錯体として存在する金属によって引き起こされるとされている²⁹⁾。そのため、ニッケルが生物影響原因物質であることを確認するためには、遊離イオンや無機錯体のニッケル濃度が毒性同定評価の前処理により減少することを確かめる必要がある。

4. 結論

本研究では、溶存態金属の濃度が高い下水処理水に対して、ミジンコ種の生物応答を用いた排水試験を適用するとともに、対象とした下水処理水に米国の毒性同定評価試験を適用することで生物影響の原因物質を推定した。また、水質分析の結果に基づいて、毒性同定評価試験により推定された原因物質の生物影響を個別に調査することで、下水処理水に対する毒性同定評価試験の適用性を検討した。得られた結果を以下に示す。

- 1) PRTR データに基づいて溶解性金属負荷が高い下水処理場を選定し、その二次処理水を用いてニセネコゼミジンコを用いた排水試験を実施したところ、ニセネコゼミジンコに対する二次処理水の影響が検出された。
- 2) ニセネコゼミジンコと個別化学物質の毒性試験に使用されるオオミジンコの、下水処理水に対する感受性を比較した。その結果、ニセネコゼミジンコはオオミジンコに比べて高い感受性を示した。
- 3) 毒性同定評価試験により生物影響の原因物質として推定された陽イオン金属とアンモニアについて、

水質分析の結果と既報文献に基づいて推定された慢性毒性値とを比較した。その結果、ニセネコゼミジンコへの影響を引き起こした原因物質として、陽イオン金属のニッケルが推定された。

- 4) 毒性同定評価試験は二次処理水に含まれる溶存態の陽イオン金属の生物影響の検出に使用できると考えられた。

今後、他の下水処理場でも、ニセネコゼミジンコの生物応答を用いた排水試験および毒性同定評価試験の適用性を明らかにし、水生生物への影響削減対策へとつなげていく必要がある。

参考文献

- 1) (独)国立環境研究所：生物応答手法を用いた排水試験に関する技術セミナーテキスト，2013。
- 2) (一般社団法人)日本環境化学会：第 58 回日本環境化学会講演会予稿集 生物応答を利用した新しい排水管理の現状について，pp.33-96，2016。
- 3) 藤原尚美，野中信一，豊久志朗，鎌迫典久：金属製品製造工場の WET を用いた排水中毒性要因の推定とその改善例，環境化学，Vol.25，No.1，pp.35-42，2015。
- 4) 武田文彦，真野浩行，北村友一，小森行也，岡本誠一郎：パイオアッセイによる下水の生物影響評価，第 18 回日本水環境学会シンポジウム講演集，pp.157-158，2015。
- 5) 安田佑右，澤井淳，中本貴士，岡村哲郎，増崎優子，宮本信一：生物応答を用いた下水処理水の毒性原因の特徴化，第 18 回日本水環境学会シンポジウム講演要旨集，pp.159-160，2015。
- 6) 板津靖之，高野智弘，金俊，福富真実子，楠井隆史：事業所排水の生態毒性学的評価：毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響，環境化学，Vol.25，No.1，19-26，2015。
- 7) 新野竜大，阿部良子，山口直子，新倉良之，吉村奈緒子，押岡香，中山光二，鎌迫典久：数種類の有機化学物質に対する淡水性甲殻類 *Daphnia magna* および *Ceriodaphnia dubia* の慢性毒性による感受性比較，環境化学，Vol.25，No.1，pp.55-60，2015。
- 8) 松原正明，原田新，南山瑞彦，田中宏明：水生生物を用いた各種のパイオアッセイの下水試料に対する感受性の比較，環境工学研究論文集，Vol.35，pp.305-312，1998。
- 9) U.S.EPA: Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992。
- 10) 経 済 産 業 省 ホ ー ム ペ ー ジ : http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html, 2014 年 6 月 11 日確認。
- 11) 社団法人日本下水道協会：下水試験方法 1997 年版試験方法編，社団法人日本下水道協会，1997。
- 12) 国土交通省水質連絡会：河川水質試験方法（案）[2008 年度版] 河川管理者のために，http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html，2009。
- 13) OECD: *Daphnia magna* Reproduction Test No. 211, 2008。
- 14) 江藤隆，栗林栄，新海幸男，野尻希守：下水道施設における微量化学物質に関する現状と対策についての調査研究，2000 年度下水道新技術研究所年報，pp.75-80，2000。
- 15) 磯崎雄一，中島典之，古米弘明：下水処理工程水及び放流先河川水における亜鉛・銅・ニッケルの形態分析，環境科学会誌，Vol.19，No.5，445-452，2006。
- 16) Johnson, C. G. : Effects of pH and hardness on acute and chronic toxicity of un-ionized ammonia to *Ceriodaphnia dubia*, M.S. Thesis, University of Wisconsin, Stevens Point, WI, 1995。
- 17) 若林明子：化学物質の毒性や濃縮性に影響を与える因子，環境毒学会誌，Vol.1，No.2，pp.27-40，1998。
- 18) U.S.EPA: 1999 Update of Ambient Water Quality Criteria For Ammonia (EPA-822-R-99-014), p.34, 1999。
- 19) Belanger, S. E., Farris, J. L. and Cheny, D. S. : Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol.18, No.4, pp.601-611, 1989。
- 20) Keithly, J., Brooker, J. A., DeForest, D. K., Wu, B. K. and Brix, K. V. : Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*), Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.23, No.3, pp.691-696, 2004。
- 21) Cooper, N. L., Bidwell, J. R. and Kumar, A. : Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.72, No.5, pp.1523-1528, 2009。
- 22) Pavlaki, M. D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M. : Effect of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.74, No. 1, pp. 99-110, 2011。
- 23) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D. and Ankley, G. T. : pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.12, No.7, pp.1261-1266, 1993。
- 24) De Schampelaere, K. A. C., Van Laer, L., Deleebeeck, N. M. E., Muyssen, B. T. A., Degryse, F., Smolders, E. and Janssen, C. R. : Nickel speciation and ecotoxicity in European natural surface waters: Development, refinement and validation of bioavailability models. Report prepared for the Nickel Producers Environmental Research Association, Gent University, Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Gent, Belgium, <https://biblio.ugent.be/publication/5785290>, 2006 [accessed in 19 August 2016]。
- 25) 永井孝志：環境水中重金属のスペシエーションと生物利用性，環境毒学会誌，Vol.14，No.1，pp.13-23，2011。

(2016.5.26 受付)

INVESTIGATION OF EFFECTS OF TREATED WASTEWATER WITH HIGH CONCENTRATIONS OF DISSOLVED METALS ON TWO WATER-FLEA SPECIES AND APPLICATION OF TOXICITY IDENTIFICATION EVALUATION TEST TO THE TREATED WASTEWATER

Hiroyuki MANO, Fumihiko TAKEDA and Mizuhiko MINAMIYAMA

Effluent tests of secondary effluent with high concentrations of dissolved metals were conducted based on biological responses of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. The secondary effluent affected the survival and reproduction of *C. dubia* but did not affect the survival and reproduction of *D. magna*. Results indicate that *C. dubia* was more sensitive to the secondary effluent than *D. magna*. Toxicity identification evaluation tests indicated cation metals and ammonia as substances that caused effects of the secondary effluent on *C. dubia*. Effects of cation metals and ammonia on *C. dubia* were evaluated based on results of water quality analysis. Results showed the effect of nickel included in the secondary effluent on *C. dubia*. Toxicity identification test could detect the biological effect of dissolved cation metals in the secondary effluent used in this study.