短

報

バイオレメディエーション用栄養剤 Inipol EAP22 の海産生物 4 種に対する急性毒性

坂見知子,^{1*} 高柳和史,¹ 白石 学²

(2000 年 6 月 19 日受付, 2000 年 9 月 25 日受理)

¹養殖研究所, ²中央水産研究所Acute toxicity of Inipol EAP22, an Oil Spill
Bioremediation Fertilizer, to Four Marine SpeciesTomoko Sakami,^{1*} Kazufumi Takayanagi,¹
Manabu Shiraishi²¹National Research Institute of Aquaculture, Mie 516-0193, ²National Research Institute of Fisheries Science, Kanagawa 236-8648, Japanキーワード: 急性毒性, イニポール, ヒラメ, シロギス, アコヤガイ, *Tigriopus japonicus*

流失原油を除去する方法として, 自然界に存在する微生物が持つ石油系炭化水素分解活性を活用するバイオレメディエーション技術が開発されている。そのひとつに現場に既に存在する微生物群集の活性を高めるために栄養剤(窒素・リン源等)を散布する方法がある。¹⁾しかし栄養剤の散布は同時に沿岸環境へ多量の栄養負荷をかけることでもあり, 貧酸素化を引き起こすなど栄養剤自身による沿岸生態系への影響が心配される。²⁾そのため, この技術を適用するにあたっては, 栄養剤自身の海産生物に対する影響を広く評価しておく必要がある。そこでまず, 栄養剤自身の海産生物に対する急性毒性を調べるために, 1989 年にアラスカで発生した原油流出事故の際に用いられた実績を持つ栄養剤 Inipol EAP22 を用いて, ヒラメ *Paralichthys olivaceus*, シロギス *Sillago japonica*, 海産 桃脚 類 チグリオパス *Tigriopus japonicus*, 及びアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* に対する半数致死濃度を求める毒性試験を行った。

Inipol EAP22 (Lot: 96038708) は, フランス CECA ATO 社から購入した。本品は親油性の液状をしており, 同社により公表されている成分は oleic acid, tri (laureth-4) phosphate, 2-buthoxyethanol 及び尿素で, 窒素含有量 7.4%, リン含有量 0.7% である。ヒラメは人工採苗した 12 日齢(変態期前), 20 日齢(変態期初期), 30 日齢(変態期中期) 仔魚を用いた。シロギスは人工採苗された日齢約 120 日の稚魚(平均重量 12.3 g)を用いた。チグリオパスは千葉県勝浦市守谷海岸で採取し継代培養した成体を用いた。アコヤガイは, 人工採苗

された約 1 年 9 ヶ月齢の貝(平均重量 39.5 g)を用いた。急性毒性試験は止水式による ASTM の方法³⁾に準拠し, 設定濃度に基づく半数致死濃度(LC₅₀)をプロビット法により求めた。⁴⁾ 95% 信頼限界値は藤森⁵⁾に従い計算した。アコヤガイを用いた試験では, 試験飼育水中のアンモニア濃度を Grasshoff⁶⁾に従い測定した。

各試験生物の 6 時間あるいは 24 時間から 96 時間における LC₅₀ を Fig. 1 に示す。アコヤガイを除く各試験生物の LC₅₀ は 96 時間までに一定の値に近づく傾向が見られ, 96 時間の LC₅₀ がその物質の急性毒性作用が完了した濃度: Incipient LC₅₀ (無作用レベル濃度)であると考えられる。⁷⁾ アコヤガイでは 96 時間でも LC₅₀ は減少傾向を続けており, Incipient LC₅₀ はさらに低い値であると考えられる。各試験生物の 96 時間 LC₅₀ は, ヒラメ 仔魚 12 日齢で 31.8 ppm, 同 20 日齢で 25.4 ppm, 同 30 日齢で 182 ppm, シロギス 稚魚で 224 ppm, チグリオパスで 53.6 ppm, アコヤガイで 638 ppm であった。

Inipol のような栄養剤をバイオレメディエーションに用いる場合, その水中毒性を考える上で最も重要な物質はアンモニアであると考えられていて,⁸⁾ アメリカ合衆国環境保護庁(EAP)は, Inipol を現場海域に適用するときは, 293 g/m² (0.75 ガロン/100 ft²) 以下の量で散布し, 海水中のアンモニア濃度が 15°C, pH 8.0 の海水において長期的には 1.5 ppm 以下であるように安全基準を設定している。1989 年のアラスカでの原油流出事故で Inipol が適用された際の環境モニタリング報告によると, 適用後の海水中のアンモニア濃度は 0.1-0.9 ppm 程度であり, この基準値以下であったとされている。⁸⁾ 実際, 今回アコヤガイ試験飼育水中のアンモニア濃度を測定した結果, Inipol を添加した試験区の方が対照区よりもアンモニア濃度は高かった (Fig. 2)。海産魚稚魚のアンモニアに対する 96 時間 LC₅₀ は 10.5-120 ppm 程度の値が報告されているが,⁹⁻¹¹⁾ 今回得られたヒラメ 30 日齢仔魚やシロギス稚魚に対する Inipol の LC₅₀ を Inipol の窒素含有率(7.4%)からアンモニア濃度に換算すると, それぞれ 16, 20 ppm となり, これらの値の範囲に入っている。しかし, これらの計算値は Inipol に尿素的形で含まれる窒素が即座に 100% アンモニアに分解された場合の値であるので, その毒性には 2-buthoxyethanol 等他の成分も複合的に作用していると考えられる。さらに, 今回の試験で最も低い Inipol の LC₅₀ 値はヒラメ 20 日齢仔魚の 25 ppm でアンモニア濃

* Tel : +81-599-66-1830, Fax : +81-599-66-1962, E-mail : sakami@nria.affrc.go.jp

Fig. 1. Inipol toxicity curves for the six marine organisms. Bars indicate 95% confidence limits. *: day-post-hatching, **: All the test animals survived at 34,000 ppm so that LC₅₀ could not be calculated.

度に換算すると 2.3 ppm であった。この値は EPA のアンモニア濃度基準値 (1.5 ppm) と大きく変わらず、安全率を考えると Inipol を適用する際には、仔魚類への影響について十分に注意する必要があると考えられる。

最後に、シロギス稚魚は財団法人水産開発協会の床嶋純孝氏より、チグリオパスは中央水産研究所 (現東北海区水産研究所) の奥村裕氏より分与された。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 渡辺正孝. 流出油の回収技術および汚染修復技術. 水環境学会誌 1997; 20: 649-652.
- 2) Swannell RPJ, Lee K, McDonagh M. Field evaluations of

Fig. 2. Total ammonia concentrations in experimental tanks with *Pinctada fucata martensii*.

marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 1996; 60: 342-365.

- 3) American Society for Testing and Materials. Standard practice for conducting acute toxicity test with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E-729-96. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05, American Society for Testing and Materials, Pennsylvania, 1998; 218-238.
- 4) 日本規格協会. 「JIS 工場排水試験方法, JIS K 0102」日本規格協会, 東京, 1993; 291-294.
- 5) 藤森利美. 「分析技術者のための統計的方法 第2版」社団法人日本環境測定分析協会, 東京, 1995; 293-323.
- 6) Grasshoff K, Ehrhardt E, Kremling K. *Methods of Seawater Analysis 2nd Ed.*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983.
- 7) Rand GM, Wells PG, McCarty LS. Introduction to aquatic toxicology. In Rand GM (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment 2nd, ed.*, Taylor & Francis, Washington DC, 1995; 3-67.
- 8) Bragg JR, Prince RC, Wilkinson JB, Atlas RM. *Bioremediation for shoreline cleanup following the 1989 Alaskan oil spill*, Exxon, Houston, 1992.
- 9) Miller DC, Poucher S, Cardin JA, Hansen D. The acute and chronic toxicity of ammonia to marine fish and mysid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1990; 19: 40-48.
- 10) Tudor M, Katavic I, Marsic-Lucic J. Acute toxicity of ammonia to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at different aeration levels. *Aquaculture* 1994; 128: 89-95.
- 11) Wajsbrodt N, Gasith A, Krom MD, Popper DM. Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. *Aquaculture* 1991; 92: 277-288.