

高含水土壤用吸水改質材の水生生物に対する安全性評価

Bioassays of Water Absorption Additive for Highly Hydrus Soil

リンブーンケン 中村華子 河野麻衣子 田中真弓

要 約

本試験は、当社が開発した高含水・高粘性土壤を容易に低粘性かつ細粒状に改質する選別補助材「泥DRY®」(以下、本改質材)の水生生物に対する安全性評価を目的に、淡水・海水水生生物を用いて生物暴露試験を行った。淡水魚のメダカ・ウグイと海水魚のマダイの96時間暴露試験では、死亡個体並びに異常な遊泳行動個体が観察されなかった。また、魚の胃内容物解剖観察では本改質材の構成材料が検鏡されなかった。藻類生長阻害試験では、淡水緑藻類・海水珪藻類を用いて96時間の培養を行った。藻類の生長に阻害はなく、逆に本改質材に含まれているシリカ成分が海水珪藻類の生長に寄与した結果となった。貝類の慢性毒性試験では、ヤマトシジミ(淡水)とホンビノスガイ(海水)を供試生物として100日間の暴露試験を行った。試験中、両貝類とも潜砂ができ、正常な摂餌行動が観察され、大量斃死の発生がなく、試験終了時の肥満度は試験開始時と同等または高くなったので良好な状態であると評価できた。したがって、これらの試験の評価結果から、本改質材は水生生物に対して悪影響を与えないと判断できる。

目 次

- I. はじめに
- II. 魚類の急性毒性試験
- III. 藻類の生長阻害試験
- IV. 貝類の慢性毒性試験
- V. おわりに

毒性試験を実施し、その評価結果を報告する。

II. 魚類の急性毒性試験

1. 試験材料

試験に用いた土壤は、園芸用の赤土と黒土を1:1の割合で混合したものを原土とし、改質土壤はこれに本改質材(成分:粘土鉱物混合物, 比重:2.6, 10%水分散液のpH:6.0~7.5, 添加量:40kg/m³)と含水比100%を目安に水を添加して調製した(Photo 1)。当該土壤と土壤溶出水に暴露した魚類は、淡水魚では生物試験を用いる指標魚種のミナミメダカ(*Oryzias latipes*)と沖縄地方を除いて全国の上流域から下流域に分布しているウグイ(*Tribolodon hakonensis*)を、海水魚では全国沿岸域に分布し、重要な食用魚のマダイ(*Pagrus major*)を選定した(Photo 2)。

2. 試験方法

各魚種の試験条件をTable 1に示す。生物試験の指標生物であるミナミメダカでは土壤の溶出水と土壤の直接投入による影響試験で評価した。一方、ウグイとマダイではより厳しい条件設定である土壤の直接投入による暴露試験のみを実施した(Photo 3)。試験方法はJIS-K0120の魚類による急性毒性試験に準じて96時間実施した。試験期間中は無給餌とし、毎日の換水、魚の遊泳行動の観察、水質(水温, pH,

I. はじめに

2011年の東京電力福島第一原子力発電所の事故に伴って拡散した放射性物質を取り除き、放射線量による外部被ばくによる健康影響を低減することを目的とした除染事業が行われている。本事業により発生する除去土壤は、中間貯蔵施設の受入れ分別施設で土壤から草木などを選別するために、高含水・高粘性土壤を容易に低粘性かつ細粒状にする選別補助材で改質される。当社関連工事では「泥DRY®」(以下、本改質材)によって改質を行った^{1,2)}。本改質材は中間貯蔵施設以外にも様々な工事への適用が期待されている。一方で、河川や海岸などに隣接する場所で適用された場合、本改質材が水域に大量に流出すると水生生物への影響が懸念される。

そこで、本報では本改質材の安全性を評価するために、淡水・海水の魚類の急性毒性試験、淡水・海水の微細藻類の生長阻害試験、および底生生物である淡水・海水の貝類の慢性

キーワード : 土壤改質材, 泥DRY®, 水生生物, 急性毒性試験, 慢性毒性試験, 生残率, 生長阻害
Keywords : water absorption additive, Dei-DRY®, aquatic organisms, acute toxicity tests, chronic toxicity tests, survival rate, growth inhibition



Photo 1 土壌検体
(Soil Specimens)

Photo 2 供試魚種
(Fishes for The Test)

溶存酸素濃度，電気電導度，アンモニウム態窒素) の計測を行った。試験終了時は，各試験ケースの魚生存個体を計数し，ウグイとマダイの試験では解剖して胃内容物の有無を顕微鏡で観察した。

なく，エラぶたの動きの増加・減少は観察されなかった。試験終了時，全試験区で収容した魚の死亡がなく，顕微鏡によって魚の消化管を観察したところ改質土壌のような胃内物はなく，本改質材は取り込まれていなかった。

3. 試験結果および考察

Table 2 に各試験における水質測定データと各魚種の観察結果を示す。試験期間中，改質土壌区と改質土壌溶出水試験区の水質は，原土を用いた対照の土壌区と土壌溶出水試験区とほとんど相違はなかった。また，各魚種の遊泳観察では異常行動（表層遊泳，平衡失調，方向不定遊泳や痙攣など）は

Ⅲ. 藻類の生長阻害試験

1. 試験材料

本改質材料の溶出水は JIS-K0058-1 の 5. 「利用有姿による溶出試験」に準じて，滅菌処理水道水または滅菌処理ろ過海水に本改質材 (Photo 1) を添加して作製した。試験に供した

Table 1 各魚種の急性毒性試験の設定条件
(Acute Toxicity Test Conditions of the Fishes)

魚種	淡水魚		海水魚
	ミナミメダカ	ウグイ*	マダイ
試験ケース	土壌投入試験**： ① 無土壌区 (対照)，②土壌区 (対照)，③改質土壌区 土壌溶出水試験***： ①水道水試験区 (対照)，②土壌溶出水試験区 (対照)，③泥 DRY 改質土壌の 1，5，10%w/v の溶出水試験区	土壌投入試験**： ①土壌区 (対照)，②改質土壌区	土壌投入試験**： ①無土壌区 (対照)，②土壌区 (対照)，③改質土壌区
収容****	7 個体/50×1 検体	1 個体/50水槽×4 検体	2 個体/50水槽×4 検体
平均全長	2.7±0.2cm	6.6±0.9cm	4.2±0.1cm
飼育方法	無給餌，24 時間毎 70～80% 換水 (半止水式)		
評価方法	生残率，遊泳行動，魚の胃内容物		

*：ウグイの予備飼育では底質なしでは魚が常に表層遊泳して死亡が観察されたため，無土壌区の対照を設けなかった。

**：飼育水に対する土壌の投入率 10%w/v の設定は，JIS-K0058-1 の固液比 1：10 を参照した。

***：溶出水作製時の固液率 10%w/v の設定は，JIS-K0058-1 の固液比を起用し，また，半数影響濃度 (EC₅₀) を把握するために 1 と 5% w/v のケースも設けた。溶出水作製は JIS-K0058-1 の 5. 「利用有姿による溶出試験」を参照した。

****：供試生物の収容密度設定は 1 水槽当たり 7 個体以上，または魚のサイズと習性を応じて行った。



Photo 3 各魚種の飼育試験の状況
(Status of the Fishes Acute Toxicity Test)

Table 2 各試験の水質測定データと魚種の観察結果
(Water Qualities and Observation Results of the Fishes Acute Toxicity Test)

魚種	ミナミメダカ				ウグイ		マダイ		
	土壌投入		溶出水		土壌投入		土壌投入		
試験方法	原土	改質土壌	原土	改質土壌*	原土	改質土壌	原土	改質土壌	
換水 24 時間 後	水温 (°C)	24~25	24~25	24~25	24~25	14~15	14~15	17~18	17~18
	pH	6.9~7.2	7.0~7.1	6.7~6.9	7.0~7.1	6.8~7.7	6.8~7.6	7.3~7.7	7.3~7.7
	溶存酸素 (mg/l)	6.7~7.3	7.0~7.2	6.8~7.2	6.8~7.4	7.9~8.4	7.8~8.4	7.4~7.9	7.6~8.0
	電気伝導度 (mS/cm)	0.16~0.17	0.15~0.19	0.14~0.15	0.17~0.18	0.14~0.17	0.16~0.18	n.d.	n.d.
	アンモニウム態窒 (mg/l)	n.d.				0.08~0.17	0.01~0.16	0.19~0.59	0.12~0.29
魚の遊泳行動	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	
魚の生残率 (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	
魚の解剖観察	n.d.				胃内容物 なし	胃内容物 なし	胃内容物 なし	胃内容物 なし	

n.d.: ノーデータ, *: 水質データは改質土壌溶出水 10%w/v のものである。

なお, Table 2 にはメダカの無土壌と水道水区, マダイの無土壌試験区の水質データと観察結果は他区と差がなかったため省略した。

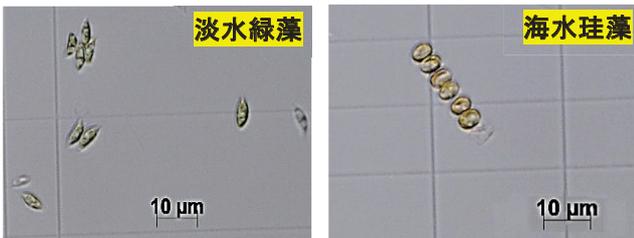


Photo 4 試験供試藻類
(Species of the Algae for the Test)



Photo 5 藻類生長阻害試験の実施状況
(Status of the Alga Growth Inhibition Test)

Table 3 藻類生長阻害試験の設定条件
(Conditions of the Alga Growth Inhibition Test)

藻類	淡水緑藻類	海水珪藻類
試験ケース	対照区: 滅菌処理水道水 試験区: 泥 DRY 0.04, 0.1, 0.4%w/v の溶出水	対照区: 滅菌処理ろ過海水 試験区: 泥 DRY 0.04, 0.1, 0.4%w/v の溶出水
試験期間	藻類ごとに計4ケース, 各ケース3反復, 全てのケースには PES 培地を添加した。	
培養条件	水温: 20±1°C, 明暗周期: 14L10D, 光量子束密度: 60μmolm ⁻² S ⁻¹ (LED 光灯)	
評価方法	水温, pH, 溶存酸素濃度 (DO) の水質測定: 試験開始時と終了時に実施した。 藻類細胞数の計数: 24時間ごとに光学顕微鏡のもとで血球計算盤を用いて実施した。 藻類の生長阻害率: 水産庁 (2010) の海産生物毒性試験指針 ⁵⁾ に準じて 24時間ごとに蛍光強度を測り, 成長曲線下の面積を計算して阻害率を求めた。	

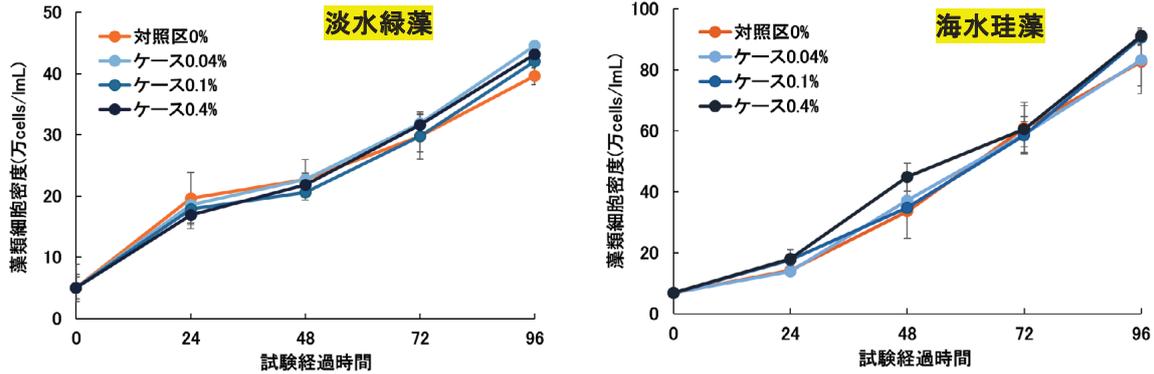


Fig.1 各ケースにおける藻類の生長曲線 (平均値±標準偏差)
(Alga Growth Curves of Each Test)

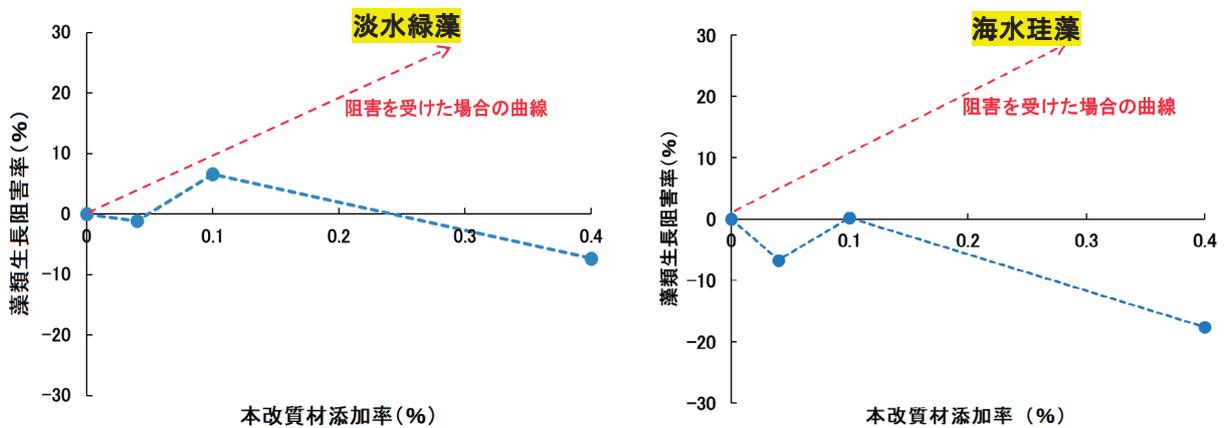


Fig.2 本改質材添加率における生長阻害曲線
(Relationship between the Additive Concentration and Alga Growth Inhibition Rates)

微細藻類は、全国淡水域・沿岸域に代表的に分布しているもの、また、OECD テストガイドライン 201³⁾ で提示された生長が速いものを選定した。これらの藻類は国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES) から入手した淡水緑藻類 (*Tetrademus obliquus* N-2280 株) と海水珪藻類 (*Skeletonema marinoi-dohrnii* complex. N-324 株) である (Photo 4)。

2. 試験方法

両藻類は温度 20℃、12 時間明暗周期の照度 (光量子束密度) $40 \mu\text{molm}^{-2}\text{S}^{-1}$ に設定した恒温器で Provasoli の ES 改変培地⁴⁾ (以下、PES 培地) 添加培養溶液に植え付けて静置培養し、指数増殖期に入った細胞を試験に供した。藻類生長阻害試験は 200 ml 三角ガラスフラスコに 100 ml の PES 培地添加の溶出水を入れ、各藻類を $5.0 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ になるように投入して培養した (Photo 5)。試験ケースの設定、培養条件および評価手法の内容を Table 3 に示す。

3. 試験結果および考察

Fig.1 に両藻類の 96 時間培養細胞密度増加 (生長) の曲線を示す。対照区 (培地添加培養液) と本改質材溶出水試験区はほぼ同様な生長曲線を示した。そして、異なる添加率の本

改質材に暴露した両藻類の生長 (増加量) への影響を評価するために、各試験ケースの生長曲線下の面積の比較 (対照区との比較) による生長阻害率を算出して Fig.2 に示す。藻類の生長に阻害を受けた場合、本改質材添加率と生長阻害率は正の関係が求められるが、本改質材溶出水試験区の試験結果からはその関係が見られず、EC₅₀ (50%生長阻害濃度) を算出できなかった。逆に本改質材溶出水試験区の海水藻類の生長は対照区より良好な結果が得られた。本改質材溶出水の水質分析をしたところ、対照区に比べてシリカ濃度が 10 倍以上高かった。そのシリカ成分が珪藻の生長の違いに寄与したためと考えられる。



Photo 6 試験供試貝類
(Species of the Clam for the Test)

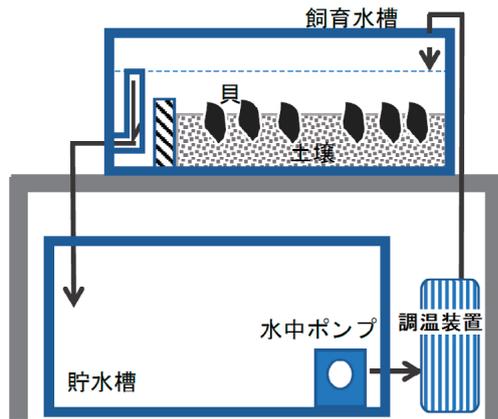


Fig. 3 貝類試験の飼育装置の断面図
(Diagram of the Clam Rearing Apparatus)

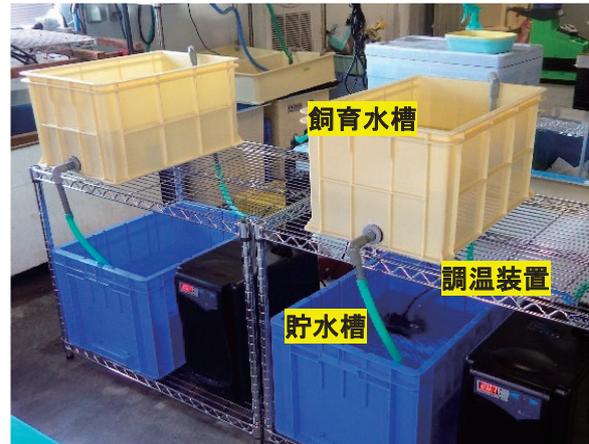


Photo 7 試験貝類の飼育状況
(Status of the Clam Rearing)

Table 4 貝類慢性毒性試験の設定条件
(Conditions of the Clam Chronic Toxicity Test)

貝類	ヤマトシジミ (淡水)	ホンビノスガイ (海水)
試験ケース	対照区：土壌区，試験区：改質土壌区	
収容密度	35 個体/600水量水槽	7 個体/600水量水槽
試験期間	100 日間	
飼育方法	給餌：週 5 回 (培養微細藻類) 換水：週 1 回全水量の 33% 換水 水質測定：水温，pH，溶存酸素濃度 (DO)，電気伝導度 (淡水) と塩分濃度 (海水)	
評価方法	試験期間中：死亡個体，摂餌行動と潜砂行動の観察 試験終了時：収容個体の生残率，サイズと肥満度測定	

IV. 貝類の慢性毒性試験

1. 試験材料

本試験に用いた土壌は，魚類急性毒性試験のものと同様，園芸用の赤土と黒土を 1:1 の割合で混合したもの (土壌区；対照) と，これに含水比 100% を目安に加水して本改質材を 40kg/m³ 添加調製したもの (改質土壌区) である。該当試験土壌に暴露した貝類は，土壌に潜ることができる種類を予備飼育で確認し，淡水ではヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) と海水ではホンビノスガイ (*Mercenaria mercenaria*) (Photo 6) を選定した。両種類とも水産有用種である。試験の飼育装置には土壌充填の貝飼育水槽 (525×340×282mm；土壌厚み 100mm 敷き) と貯水槽 (535×399×322mm) が構成された (Fig.3, Photo 7)。水中ポンプ (エーハイム製 1046 型；50/min) の稼働で飼育水を両水槽に常に循環させ，調温装置 (ゼンスイ製 ZR-180E) の設置で飼育水温を 20±2℃ で制御した。

2. 試験方法

試験期間中は週 5 回，各試験ケースの飼育水槽に培養微細藻類 (ヤマトシジミには緑藻類 *Tetrademus obliquus* と珪藻類 *Cyclotella meneghiniana*，ホンビノスガイには珪藻類 *Phaeodactylum tricornutum*) を給餌していた。また，週 1 回全水量 600 に対して 200 (33%) を新しい水道水・ろ過海水

に換水した。換水前の水温，pH，溶存酸素濃度とアンモニウム態窒素濃度を計測し，貝類の生残，潜砂および摂餌状況を観察した。試験終了後，収容した貝を取り出して，サイズと湿重量を計測して肥満度⁶⁾を求めた。



Photo 8 改質土壌区に収容した貝類の摂餌行動
(Feeding Behavior of the Clams)

Table 5 各試験の水質測定データと貝類の行動観察結果
(Water Qualities and Observation Results of the Clams Chronic Toxicity Test)

貝類		ヤマトシジミ (淡水)		ホンビノスガイ (海水)	
試験方法		土壌投入		土壌投入	
試験ケース		土壌区 (対照)	改質土壌区	土壌区 (対照)	改質土壌区
換水前	水温 (°C)	19~21	19~21	18~21	18~21
	pH	7.4~8.3	7.3~8.2	7.4~7.9	7.5~7.9
	溶存酸素濃度 (mg/l)	7.3~7.6	7.1~7.5	7.4~7.8	7.4~7.9
	アンモニウム態窒素 (mg/l)	0.02~0.21	0.00~0.09	0.02~0.34	0.01~0.45
摂餌・潜砂行動		異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
生残率 (%)		100	94	100	100
肥満度 (%)		12.8±0.7		6.4±0.5	
(平均±標準偏差)		試験前	試験後	試験前	試験後
		11.6±1.2	12.6±1.5	7.7±0.5	8.2±1.4

3. 試験結果および考察

水質測定データと貝類の観察結果を Table 5 に示す。試験期間中の水質は、各試験ケースの区間において大きい変動はなかった。また、飼育水槽に収容した貝が水管を出して給餌微生物類を摂餌していたことが試験中に観察された (Photo 8)。ヤマトシジミ試験では試験初期に改質土壌区の死亡個体があったが、その後には死亡が発生しなかったことから、入手時のダメージによるものと考えられる。ホンビノスガイ試験では両区とも試験終了まで死亡個体が観察されなかった。試験終了時の貝個体の肥満度は、ヤマトシジミ試験では、試験開始時の測定値に比べて終了時の対照区値は多少低くなったが、試験区である改質土壌区には概ね同等の値であった。一方、ホンビノスガイ試験では試験開始時の値より両区の終了時の測定値が高く、特に改質土壌区では最も高い値を示した。以上の長期飼育試験結果より、本改質材の改質土壌には収容した両貝類が潜砂し、正常な摂餌行動が観察され、飼育期間中に大量斃死の発生がなかったことから、貝類への悪影響はないと評価できる。

V. おわりに

本改質材の安全性評価試験では、水域の食物連鎖を考慮して代表的な捕食者である魚類を対象に急性毒性試験を、また、一次生産者である微生物類を対象に生長阻害試験を、さらに、

底質に潜って生息し、移動能力が低い底生生物を対象に慢性毒性試験を実施した。これらの試験結果より、本改質材は水生生物に対して悪影響を与えないと判断できる。今後、本改質材が水辺エリアに適用される際に、水環境のモニタリングを行い、本改質材の水域環境に対する安全性を監視していきたいと考えている。

参考文献

- 1) 大橋麻衣子ほか; 草木類選別補助材の適用性検討—細粒分含有率と含水率が選別能力に与える影響, 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集, 22, 2016, pp.77-82.
- 2) 田中真弓ほか; 無機系改質材を用いて改質した高含水・高粘性の除去土壌の改質効果, 地盤工学会研究発表, 51, 2016, pp.2173-2174.
- 3) OECD; OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 201 “Algae Growth Inhibition Test”, 1984.
- 4) 佐賀県栽培漁業センター; 佐賀県栽培漁業センターにおける種苗生産マニュアル, 1996, p.58.
- 5) 水産庁; 海産生物毒性試験指針, 水産庁増殖推進部, 2010, p.156.
- 6) 鳥羽光晴; アサリの水槽飼育での性成熟過程における摂餌量の重要性, 水産増殖, 37 巻 1 号, 1989, pp.63-69.

Bioassays of Water Absorption Additive for Highly Hydrous Soil

Boon Keng Lim, Hanako Nakamura, Maiko Kawano and Mayumi Tanaka

Acute and chronic toxicity tests using freshwater and seawater aquatic organisms were conducted to evaluate the safety of “Dei-DRY®,” which was developed as a water absorption additive for highly hydrous soil. The results of 96-hour acute toxicity tests of freshwater and seawater fishes showed no observation of abnormal swimming behavior as well as no mortality occurrence during the tests. Moreover, no effect of the additive was observed in a gastric-content dissection of the fishes. In an alga growth inhibition test, the growth of neither freshwater nor seawater algae was inhibited in the 96-hour culture. Adversely, the silica ingredient in the additive contributed to the growth of seawater algae (Diatomaceae). 100-day-long chronic toxicity tests of freshwater and seawater shellfishes were conducted. During the tests, both shellfishes always burrowed in the substrates and showed normal feeding behavior, and no mass mortality occurred. With these test results, the authors are convinced that the additive does not negatively affect aquatic organisms.