

Ecotoxicological assessment of river water and facility's wastewater using fish, daphnids, and algae

March 2013, Material cycling in the Environment, 47116603 Wenyue Yin
Supervisor: Visiting Professor Norihisa Tatarazako, Sub-supervisor: Masumi Yamamuro

Keywords: Bioassay, biological impact, industrial effluents, surface water, WET system

1. Introduction

In Japan, the water environment has long been managed on the basis of Water Pollution Control Law to monitor and set the limit of several items, mainly in terms of chemical compounds, in effluent and water bodies from the viewpoint of protecting human health and living environment. While this framework has contributed to diminish the severe water pollution, this “chemical compound-based management“ scheme is concerned to neither cover all the chemical compounds increasing rapidly nor predict mixture effects of these numerous compounds. Namely, there could be a case for waters to satisfy all the existing limitations but they still exert adverse effects on aquatic organisms in the natural water environment. Thus, “effect-based management” using bioassays with fish, daphnids, and algae had been proposed to evaluate and manage wastewater and surface water and has already been implemented in several countries sometimes named as “Whole Effluent Toxicity (WET)” system

However, there are two major concerns in implementing this system to Japan: there are few case studies to apply bioassays to river water samples both in terms of quality and in terms of quantity, there are few case studies to investigate how to reduce the toxicity if the significant toxicity is found. In this study, water samples were collected to evaluate toxic effects on the selected aquatic organisms in an urban stream where existing water quality standards are completely met, and the source of the toxicity and the toxicity reduction majors were investigated.

2. Materials and Methods

We selected a typical urban river K and collected water from five sampling sites including an environmental reference point. Water samples were refrigerated and filtered to remove suspended solids prior to the bioassay or chemical analysis. Three aquatic organisms listed below were used to evaluate toxicity of the samples. Dilution series were prepared with the highest concentration of 80% for all the samples. Fish short term embryo-larval tests were conducted using zebrafish (*Danio rerio*) in conformity with OECD TG212¹⁾ and hatching ratio and survival ratio was observed to determine survival index. *Ceriodaphnia dubia* was used to determine the inhibition of reproduction in conformity with EPS/RM21, Second Edition²⁾. Algal growth inhibition tests were conducted using a unicellular green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in conformity with OECD TG201³⁾. In case of detecting adverse effects from the water samples by the bioassays, we conducted both chemical analyses using ICP/AES or ICP/MS and sample treatments such as solid phase extraction to remove organic compounds, addition of flocculants/coagulants to remove suspended solids, removal of heavy metals by ion exchange resin, aeration etc.

3. Results and Discussion

Results of bioassays for both river water and industrial effluents are shown in Table. Significant effects were found from the samples collected in Sites 3 to 5 for algae and daphnia. The No Observed Effect Concentration (NOEC) of Site 4 for daphnia reproduction was 0.03%, which means 3,000 times dilution is necessary to diminish the adverse effects. The results of the chemical analyses suggest either copper, nickel or zinc is the major factor of the adverse effects. Among these heavy metals, the concentration of nickel was found to be higher than the NOEC as results of bioassay of nickel in the lab and nickel is probably the major compound to responsible for the toxicity of the riverwater.

As far as industrial effluents are concerned, severe reproductive effects on daphnia were found from Factories No. 4 to 6. For Factory No. 4, relatively higher concentration of copper was detected but the high salinity is suspected as the major factor of the adverse effects because weakly toxic organocopper was considered as the major fraction, no reduction of the effects was observed by the removal of copper, and salinity of the effluent was as high as 0.41%. For Factory No. 6, toxicity for fish was significantly reduced by the solid phase extraction but we are in process of identifying the organic compound to exert the adverse effects. Instead of identifying the source compound, we proposed proper treatment processes (the change in flocculants/coagulants) to reduce the adverse effects.

Table: Results of Bioassays for River waters and Effluents (No Observed Effect Concentration).

	River waters					Industrial Effluents					
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
Fish (Survival)	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	10%	80%	80%
Daphnia (Reproduction)	80%	80%	10%	0.03%	5%	80%	80%	80%	2.5%	5%	5%
Algae (Growth)	80%	80%	80%	10%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%

4. Summary

Bioassays have frequently used for the evaluation of the toxicity of the sample waters but the results of this study suggest the combination of bioassays, water treatments and chemical analyses could comprehensively identify and reduce the toxicity of the waters. This combined approach could complement the conventional “chemical compound-based management” to develop more advanced water quality management. It is important to further collect the combined data of bioassays and chemical analysis, the confirmation of the effects of the effluent on actual ecosystem, and the restoration of the ecosystem by the improvement of the toxicity of the effluent.

References

1. OECD (1998): Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Publishing.
2. Environment Canada (2011): Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, EPS 1/RM/21, Second Edition.
3. OECD (2011): Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Publishing.

魚類・ミジンコ・藻類を用いた河川水および事業所排水の生態影響評価

2013年3月 自然環境循環学分野 47116603 印文瑛

指導教員：客員教授 鏑迫典久，副指導教員：教授 山室真澄

キーワード：バイオアッセイ，生物影響，工場排水，環境水，WET手法

1. はじめに

日本の水環境管理は水質汚濁防止法に基づき，主としてヒトの健康と生活環境保護の観点から水質の監視・排水規制が行われている。それにより，深刻な水質汚濁の問題は解消されてきている。一方で，このような「物質規制」のみでは①多種多様で日々増加する化学物質を全て把握・規制することが困難，②複合的な影響については予測し得ない，などの懸念もある。つまり既存の規制を満足していても，自然環境水中の生物に対して悪影響を及ぼす可能性がある。そこで，魚類、ミジンコや藻類などの生物応答（バイオアッセイ）を利用して，「影響規制」として事業所排水や環境水を評価・管理するシステムが提案され，各国でWET手法などの名称で導入・適用を進めている。

しかし，上記システムの日本への導入には2つの大きな課題がある。1つは，バイオアッセイを用いて実際の河川水等を評価した事例が質量共に乏しいこと，もうひとつは，生態影響が確認された場合に，どのように低減・改善が可能であるか検討・考察した例が少ないことである。そこで，本研究では，現行規制順守下の都市河川水を対象にバイオアッセイによる生態影響評価と，影響発生源に対するその毒性要因解明及び改善手法について探究を行った。

2. 材料と手法

2-1 被験水

- ・河川水：工場排水等の流入する典型的都市河川Kを選択し，環境基準点を含む5地点にて採水した。
 - ・工場排水：異なる原料を使用する工場6ヶ所を選択し，排水工程の末端より採水した。
- 何れの被験水も，試験施設まで冷蔵輸送し，夾雑物除去の上各試験に供した。

2-2 生物試験

下記3種の生物試験を行った。何れの試験においても，最高濃度は原水の80%とした。

- ・ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた魚類胚・仔魚期短期毒性試験：受精卵のふ化率・ふ化後の生存率・生存指標（孵化率×生存率）を示す。OECD TG212に従った¹⁾。
- ・ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いたミジンコ類繁殖試験：単為生殖する雌ミジンコの生存や繁殖の阻害を指標とする。EPS1/RM/21, Second Editionに従った²⁾。
- ・ムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた藻類増殖阻害試験：単細胞藻類の生長速度を指標とする。OECD TG201に従った³⁾。

2-3 影響要因の推定と低減手法の検討

生物試験にて影響が認められた場合，下記分析及び処理によって，被験水及びその生物に対する影響の特徴や特性を確認し，影響要因の推定や低減手法の検討を行った。

- ・化学分析：ICP/AES及びICP/MSによる金属イオン濃度の分析。

・被験水の処理：固相分離による有機物除去処理，アルミ添加による懸濁物の凝集・沈殿処理，イオン交換樹脂による重金属の除去処理，曝気処理など。

3. 結果と考察

河川水の試験結果を表に示す。地点3～5において，藻類及びミジンコに対する影響が認められた。特に地点4は，ミジンコの繁殖における最大無影響濃度が0.03%であり，これは3,000倍以上にまで希釈しないと影響が消失しないということを示す。化学分析の結果，金属イオンのうちCu・Ni・Znが影響要因の可能性として考えられた。なかでもNiの検出濃度は，Ni感受性試験での最大無影響濃度を上回る値であり，影響物質の可能性が高い。

工場排水の試験結果を表に示す。工場4～6において，特にミジンコの繁殖に対して影響が認められた。このうち，工場4については①Cuが高濃度で検出されたものの，その大部分が毒性の低い有機態の可能性が高いこと，②Cuを除去した場合においても影響が低減しなかったこと，③原排水の塩濃度が約0.41%と高いこと，の3点から，Cuではなく塩分が主な影響要因であると推測される。一方，工場6については，魚類に対して有機物分離によって顕著な影響低減が確認された。ここから，排水中のある種の有機物が影響の原因と考えられるが，物質の同定には至っていない。ただし，物質が同定できていなくても原因物質の影響を削減するための手法の提案（凝集沈殿剤の変更等）を示すことができた。

表. 河川水及び工場排水の生物試験結果（最大無影響濃度）

	河川水					工場排水					
	地点1	地点2	地点3	地点4	地点5	工場1	工場2	工場3	工場4	工場5	工場6
魚類(生存指標)	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	10%	80%	10%
ミジンコ(繁殖)	80%	80%	10%	0.03%	5%	80%	80%	80%	2.50%	5%	5%
藻類(生長)	80%	80%	80%	10%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%

4. まとめ

バイオアッセイは，単に被験水の毒性を評価するツールとして認識されることが少なくない。しかし，本研究のようにバイオアッセイと水処理，化学分析を組み合わせることにより，影響要因の探究や更には改善手法の導出までを包括的に行い得ることが示唆された。本手法と既存の物質規制を併用する事で，より高次の水環境管理が可能になるものと期待される。

今後は，調査実績を増やしデータを蓄積するとともに，フィールド調査との連携によって，実際の生態系に対する排水影響の確認と，その改善後の生態系の回復状況を明らかにすることが重要と考える。

引用文献

1. OECD (1998): Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Publishing.
2. Environment Canada (2011): Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, EPS 1/RM/21, Second Edition.
3. OECD (2011): Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Publishing.