

オオミジンコを用いたプラズマ処理の安全性評価

阿部 達雄, 丸藤 洸, 岡部 陽平, 吉木 宏之

Effect of cold plasma treatment on water and its evaluation using *Daphnia magna*

Tatsuo Abe, Hiroshi Gandou, Youhei Okabe, and Hiroyuki Yoshiki

Abstract

Recently, atmospheric-pressure nonequilibrium plasmas called “cold plasmas” have received much attention in view of their environmental and bio-medical applications. In cold plasma, various radical species such as atomic oxygen and OH are generated and these radicals play an important role in degradation of toxic organic compounds and sterilization of bacteria and fungi. So, many kinds of cold plasma devices have been developed so far.

In this study, the cold plasma generated in contact with water was used to chlorophenols degradation and the influence of the plasma treatment was evaluated by means of the *Daphnia magna* acute immobilisation test. The cold plasma irradiation on the M4 medium which is the breeding water for *Daphnia magna* was also conducted to check the toxic effect of plasma treatment.

キーワード： オオミジンコ, 低温プラズマ, 急性遊泳阻害試験

1. 緒言

プラズマとは、原子が電子と原子核に電離している状態で、全体として中性な自由に動く電荷粒子の集まりである。化学反応に必要なエネルギーは、数 eV であり、温度に換算すると約 10^4 K となる。プラズマ中の電子イオン温度は約 10^4 K 以上であり化学反応に十分に影響すると予想される。地球誕生当初、地球は原始ガス(CH₄、NH₃、N₂、H₂、H₂O)で充満しており、プラズマにより原始ガスから有機物が合成されて原形質が生成し、生命体に進化していったとするオパーリンの仮説がある。ミラーの実験では、原始ガス組成近似の混合気体に 60,000 V の高圧をかけて放電するとアミノ酸が合成されることが実証されている。これらのことから、環境中の化学物質や生物へのプラズマの与える影響は少なくない。プラ

ズマを用いた技術としては、電気溶接、切断などが古くから用いられている技術であるが、高温高密度のプラズマによる核融合などの未来の技術もある。環境分野においては、アルゴンガスによる誘導結合プラズマ (ICP) を用いた機器として、ICP-AES (ICP 発光分光分析装置) や ICP-MS (ICP 質量分析装置) 装置などが開発されている。これらの装置は、環境分析や無機化学分析において必要不可欠な研究ツールのひとつになっている。近年は、低温プラズマ (以下プラズマとする) による新技術の開発も盛んに行われている。ブラウン管に替わるプラズマテレビ、空気清浄機や一部の家電製品に含まれるプラズマクラスターによるクリーン技術等が有名である。その他にも集積回路の微細加工、薄膜合成などにも使われる。また一方で、有害物質の分解・微生物の滅菌処理などの研究も行われている。例えば、揮発性有

機物質 (VOC)、難分解性のダイオキシン類、大気汚染物質 (NO_x、SO_x、フロン類) の分解について、紫外線による分解法とともに化学物質を使わない分解法として注目されている。これまで、プラズマ生成には減圧状態が必要であり、他方で常圧プラズマは高温状態となるため、水溶液への直接の照射は困難だった。近年、大気圧下で液面へのプラズマ照射が可能となり、プラズマを用いた水質汚染の改善、水質浄化、生物の効率的な培養等が期待できる^{1)~7)}。

本研究では、プラズマの安全性評価にミジンコ急性遊泳阻害試験を用いた。この試験方法は、OECD テストガイドライン等により、化学物質の生態毒性を評価する上で重要な試験法となっている⁸⁾。また、プラズマ処理による分解試験には、化学物質としてクロロフェノールを選んだ。クロロフェノール類は、様々な工業化学製品の間体として使用されており、農薬などにも用いられている^{7) 9)}。また、プラズマ処理の超純水や M4 培地などに対する影響についても調べた。本研究は、それらの影響や原因を明確にすることでプラズマ処理の有用性を評価することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 オオミジンコの飼育

オオミジンコの飼育は、OECD テストガイドライン TG202⁸⁾ に準拠して、飼育水は Elendt M4 培地 (以下 M4 培地)、飼育密度は 20 頭/L、水温は 20±2°C で行った。培地の調製には超純水 (ミリポア製 Academic-Q10、東京) を使用した。容器には、ふたをした 1L ビーカーを用いた。常時エアレーションを行い、定温とするため流し台に栓をして、ヒーター (ニッソー製 New IC オート 100) クールユニット (GEX 製 GXC-200) ポンプ (コトブキ製 POWER BOX 55) を用いた。光周期は、16 時間明/8 時間暗として、鑑賞魚用の照明器具を用いて行った。餌は、クロレラ (*Chlorella vulgaris*) を培地中濃度が 1×10⁹ cells/mL となるようにクロレラ給餌溶液を 1 mL/L を毎日加えた。オオミジンコの個体数、水温は毎日

記録し、1 日おきに換水を行った。

クロレラには、クロレラ V12 (クロレラ工業製、福岡) を用い、原液の細胞数をカウンティングチャンバー (ビルケルチュルク血球計数板) により顕微鏡を用いて観察し、細胞数を計算した。M4 培地を用いて遠心分離により 2 回洗浄した後、再び培地で 1×10⁶ cells/mL となるように調整し、クロレラ給餌溶液とした。

2.2 急性遊泳阻害試験

分解試験には、化学物質として 2-クロロフェノール (CAS No. 95-57-8、MW = 128.56、特級、東京化成工業製、東京) を用いた。オオミジンコ急性遊泳阻害試験は、OECD ガイドライン TG202 に準拠して行った¹⁾。M4 培地を入れた 100 mL ビーカーに試験原液を設定した濃度になるように加えて、5 濃度区と対照区を作成した。作成した各濃度区と対照区の水温、pH、溶存酸素量(DO)は、試験開始時と試験終了時 (48 時間後) に測定した。水質測定には、水温計 (SATO 製 SK-250WPII-K)、pH 計 (HORIBA 製 D-53T) および溶存酸素計 (YSI 製 Model 55) を用いた。試験には、24 時間以内に産まれたオオミジンコの子を使用した (20 頭/濃度区)。このとき、初産個体の使用は避けた。24 時間後および 48 時間後にミジンコの状態および個体数を実体顕微鏡により観察して記録した。ビーカーを軽くゆすつても動かない個体と死亡個体を影響されたとみなした。影響の強さは、半数影響濃度(EC₅₀)で評価した。試験は、クールインキュベーター (IWAKI 製 ICB-151LN) 内にて行った。

2.3 プラズマ処理の安全性評価法の開発

i) プラズマの生成

プラズマの生成には、鶴岡工業高等専門学校 電気電子工学科において作製された大気圧グロープラズマ装置を用いた¹⁰⁾。導入ガスは、ヘリウムガス、導入量 0.05 MPa、入射電力 4 W とした。

ii) 処理のタイミングと静置時間の検討

プラズマ照射時間における影響を調べる実験では、

ビーカーにM4培地を100 mL入れそれぞれについてプラズマ処理を行った。プラズマ処理を行う時間をそれぞれ、0、2、4、6、8および10分間と設定した。また、0、1、3、10、20および30分間として急性遊泳阻害試験を行った。

プラズマ処理をどの段階で行うかの検討では、調整済みであるM4培地を100 mLずつビーカーにいれたもの5個とM4培地に調整前の超純水をビーカーに100 mLずつ入れたもの5個を用意し、それぞれについてプラズマ処理を行った。その時の照射時間は0、2、5、10および20分間とした。プラズマ処理を行ったものについて1分間のバブリングおよび、10分間の静置をしたのちに急性遊泳阻害試験を行った。

プラズマ処理後の静置時間の検討では、ビーカーにM4培地を100 mL入れ、それぞれ10分間プラズマ処理を行った。各ビーカーについて0、24、48および72時間静置した後、それぞれミジンコ急性遊泳阻害試験を行った。

iii) プラズマ処理生成物の分析と分解法検討

プラズマ処理により、ミジンコに影響する生成物として、オゾンや過酸化水素が生成する可能性があり、これらの水中濃度を分析した。超純水100 mLに対してプラズマ処理を5、10、15、20、25および30分間行い、処理後のオゾンと過酸化水素の濃度は、デジタルパックテスト（共立理化学研究所製DPM-MT-SE）の各測定用試薬（オゾン：WAK-O3、過酸化水素：WAK-H2O2（C）およびWAK-H2O2）を用いて測定した。

また、照射時間と攪拌方法を検討するためインジゴカルミンのプラズマ処理による分解実験を行った。インジゴカルミン（特級、和光純薬製、大阪）は、0.50、1.0、1.5、2.0、2.5および3.0 ($\times 10^{-5}$) mol/Lの濃度で610 nmにおいて吸光度を測定し検量線を作成した。インジゴカルミン水溶液 1.0×10^{-5} mol/Lを調整しプラズマ処理を行った。処理方法は、全く攪拌しないもの（サンプル採取時は攪拌した）、スターラーで常に攪拌したもの、[1分間プラズマ処理・

20秒間スターラーで攪拌・10秒間静置]を繰り返したものの3通りで行った。それぞれ、5、10、15および20分後に吸光度を測定した。

2.4 化学物質の分解とミジンコによる安全性評価

2-クロロフェノールのミジンコに対する影響を調べるため、はじめに1、2、4および8 mg/Lの濃度になるように設定し、急性遊泳阻害試験を行った。つづいて、プラズマ処理による安全性評価を行うため、2-クロロフェノールが0.5、1、2および4 mg/Lの濃度となるように調製し、プラズマ処理を10分間行い4日間静置したもの、なにもせず4日間静置したものを用意したのち、エアレーションしてから急性遊泳阻害試験を行った。

3. 結果と考察

3.1 処理のタイミングと静置時間

i) プラズマ照射時間とミジンコへの影響

プラズマの照射時間とミジンコ急性遊泳阻害を調べた結果をFig. 1に示した。プラズマ照射の時間とともに阻害率が上がり、プラズマ処理が20分を超える場合にほぼ100%になった。何も化学物質を入れていない条件でミジンコに阻害が出てしまったのは、安全性評価を行うことはできない。このため、プラズマ処理を行う時間は、8~10分間よりも少なくするか、何らかの対処法を見つける必要が生じた。

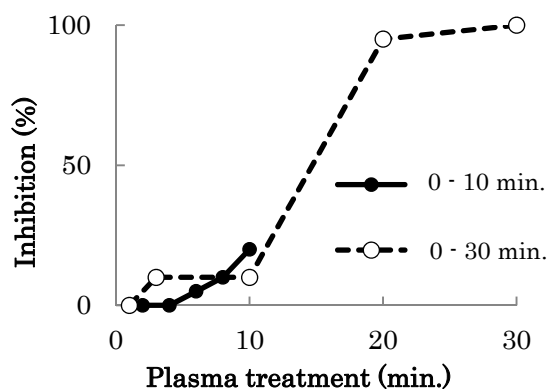


Fig. 1 Daphnia inhibition in plasma exposure.

そこで、プラズマ照射による影響がどの段階で生じているのか、明確にするためM4培地に調製する

前後の比較を行った。Fig. 2 は、培地調製前の超純水にプラズマ照射したもの (Ultrapure water ; 点線) および M4 培地調製後にプラズマ照射したもの (M4 medium ; 実線) とミジンコ急性遊泳阻害試験との結果である。いずれも 2~5 分間のプラズマ照射では、ミジンコに影響を及ぼさず、10 分間より前に影響が現れ、20 分間で阻害率が 100% とほぼ同様な傾向であった。

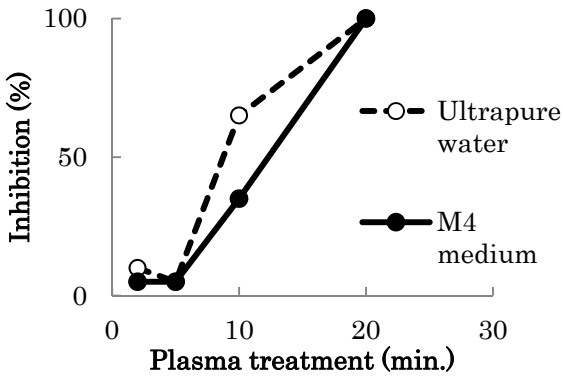


Fig. 2 Influence of plasma on a M4 medium.

また、急性遊泳試験を行った際の溶存酸素量(DO) と水温は、いずれも 7.7~8.8 DO mg / L、20.1~20.2℃ で安定していた。ただし、プラズマ処理を 20 分間行った際の水温は 21.1℃ だったが、この温度は、ミジンコの成育に大きく影響する値ではない。

以上の結果は、超純水にプラズマ処理をしたものと M4 培地にプラズマ処理をしたものの阻害率、水温、DO とともに近い値を示していることを考えると培地成分には影響せず、超純水 (水) に何らかの影響を及ぼす成分が生じた事を示唆した。

ii) 静置時間とミジンコ急性遊泳阻害率

水面へのプラズマの照射は、オゾンの発生を誘導すると考えられた⁴⁾。オゾンは、酸化力が強く殺菌、酸化作用があるため、ミジンコに影響を与えた可能性がある。しかし、オゾンは不安定な物質でもあり水中で速やかに消失してしまう。プラズマ照射処理後に静置時間を設ければ、これらの影響が緩和されると考えた。Fig. 3 は、静置時間とミジンコ急性遊泳阻害との結果である。24h の場合は、阻害率が 82.5% と高い数値を示したが、48h 後の場合は 17.5%

と大きく減少した。オゾン以外の化学物質が生成していれば、静置時間を設けてもオオミジンコは阻害を受けると予測されるため、Fig. 2 の結果を合わせプラズマ照射が培地成分に対して影響したとは考えにくい。しかしながら、72 時間でも阻害率が 0% に近づかなかったので、オゾン以外の化学物質が生成していることが考えられた。

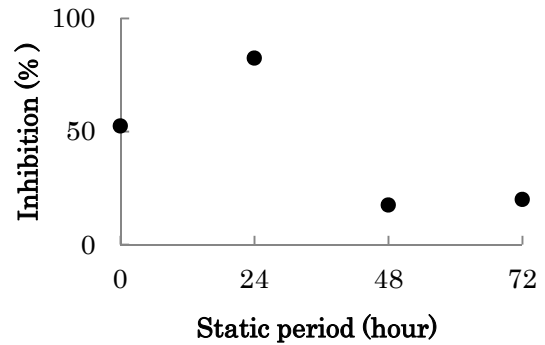
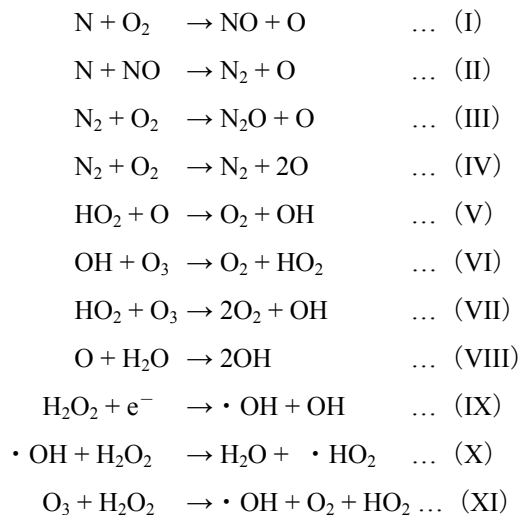


Fig. 3 Effect of the static condition.

3.2 プラズマ処理生成物の分析と分解方法検討

i) プラズマ処理生成物の分析

水面にプラズマ照射をした場合、オゾン以外の物質として、大気中に含まれる窒素 (N₂)、酸素 (O₂) に関連する物質が生成すると考えられた³⁾⁻⁷⁾。



上式のような反応により、窒素酸化物および過酸化水素が候補として挙げられた。しかし、(I)~(IV)式で生成される窒素酸化物は、硝酸イオン (NO₃⁻) となる。硝酸イオンは、培地成分としてかなり多く含まれ、窒素源となるため候補からは除外した。そこ

で、(V) ~ (XI) 式うち測定可能なオゾンと過酸化水素の発生量とプラズマ処理時間の関係を調べ、その結果を Fig. 4 に示した。プラズマの照射時間とともにオゾン、過酸化水素とも濃度が上昇することが確認できた。オゾンは、消失してしまいミジンコに対する影響は不明である。過酸化水素は、これも安定な物質とは言えないが、既報の研究で $EC_{50} = 2.32 \text{ mg/L}^{11)}$ であるとされている。今回の過酸化水素の分析結果をみると、10 分間でオオミジンコに影響する濃度になったと考えられる。

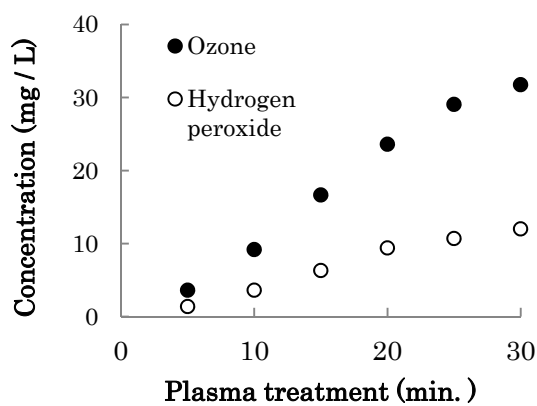


Fig. 4 Concentration of oxidants.

ii) プラズマ処理による分解方法の検討

インジゴカルミン溶液を用いて、攪拌方法により分解に要する時間の短縮検討を行った結果を Fig. 5 に示した。①全く攪拌しないもの(サンプル採取時は攪拌した)、②スターラーで常に攪拌したもの、③間欠攪拌のもの (1 分間プラズマ処理・20 秒間スターラーで攪拌・10 秒間静置) の 3 通りを比較した結果、①と②はほぼ同様の傾向を示した。③の方法では、①と比較してほぼ半分の時間でインジゴカルミンが分解でき、分解時間の短縮が可能となった。①は、既に分解できたところのみにしかプラズマが当たらず、非効率的な処理となっていると考えられる。③では、一律なプラズマ処理効果が得られたのではないかと考えられる。②は、攪拌し続けたものの①とほぼ同様だった。本研究でのプラズマ処理は、水表面への照射だったため、液面の安定が処理効率に大

きく寄与していたことが示唆された。攪拌により、波立っている液面よりも穏やかで安定している液面のほうが、均一かつ効率的に照射できる可能性を示唆した。

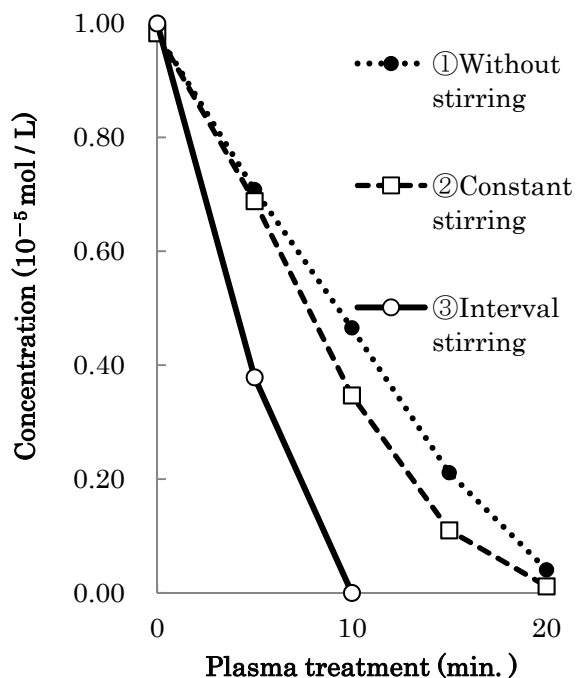


Fig. 5 Various stirring method on resolution of Indigo carmine.

3.3 化学物質の分解とミジンコによる安全性評価

i) 2-クロロフェノールの急性遊泳阻害試験

陽性対照として、オオミジンコに対する 2-クロロフェノールの影響について、急性遊泳阻害試験を行った。この結果は、Fig. 6 に示したように $EC_{50} = \text{約} 2.0 \text{ mg/L}$ と既報の結果¹²⁾ とほぼ同様な値だった。

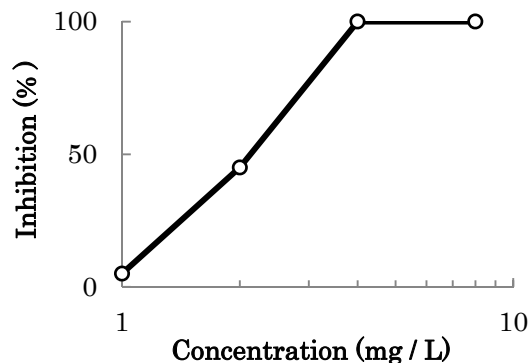


Fig. 6 Effect of 2-chlorophenol.

ii) 化学物質の分解と安全性評価

プラズマ処理により、ミジンコに対して影響を与えないか、すなわちどれだけ環境生態系に対する安全性が向上したかを確認する実験を行った。Fig. 7は、クロロフェノールにプラズマ処理した結果を示した。実線(—)は、プラズマ処理を行ったもの、点線(---)はプラズマ未処理のものである。点線で示したものは、陽性対照(Fig. 6)とほぼ同じ試験であり、同様の用量反応曲線となった。ただし、静置時間をおいた影響のためか、若干影響が強い結果となっている。プラズマ処理を行った用量反応曲線は、プラズマ未処理のものとは比べて、全体的にグラフの右側にシフトしている。これは、ミジンコに対する有害性が減少した、すなわちプラズマ処理の効果が認められたことを示している。

プラズマ処理で確認された結果は、プラズマによる直接の影響のほか、オゾンや過酸化水素の強い酸化力により、2-クロロフェノールが反応して有害性を減少させたと考えた⁵⁾。また、前述の(IX, XI)式より、OHラジカルが生成することが分かっている。このOHラジカルが、2-クロロフェノールの分解に関与したのではないかと考えられた。また、ミジンコに対する安全性は向上した(EC₅₀値が約1.1 → 1.5 mg/L)が、いずれの濃度区においても無害化には至らなかった。完全な無害化には、その他の分解法の組合せの検討など、更なる研究が必要である。

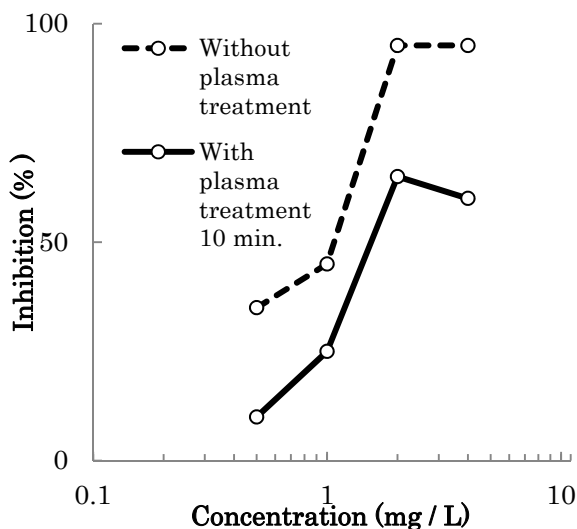


Fig. 7 Effect with / without cold-plasma.

4. 結論

今回の実験から、水溶液へのプラズマ処理において、長時間のプラズマ照射は、オゾンや過酸化水素の発生があり、安全性評価に注意を要するが、48~72時間以上の静置時間により、問題が無いことを確認した。また、インジゴカルミンにより、短時間(10分間)な分解条件を見出すことができた。2-クロロフェノールのプラズマ処理では、プラズマ照射によりミジンコへの影響が緩和され、水環境生態系への安全性向上が確認できた。

また、本研究で使用したプラズマ生成装置は、ヘリウムガスを用いている。ヘリウムは、近年貴重な資源となっており、ロスが少ない条件を見出すことができた。

参考文献

- 1) 林泉, 高電圧プラズマ工学, 丸善, (1996)
- 2) 山崎耕造, トコトンやさしいプラズマの本, 日刊工業新聞社, (2004)
- 3) 飯島徹穂, 近藤信一, 青山隆司, はじめてのプラズマ技術, (1999)
- 4) 山部長兵衛, オゾン生成, プラズマ・核融合学会誌 74 (2) 134-139, (1998)
- 5) 中村嘉利, オゾンマイクロナノバブルを用いた青果物の残留農薬除去技術の開発浦上財団研究報告書 16, 160-164, (2008)
- 6) 日本下水道事業団 技術開発部, オゾン処理技術の技術評価に関する報告書, (2009)
- 7) 鈴木大士, 船山齊, 発生ラジカルによるフェノールの分解, 秋田高専研究紀要 47 69-75, (2012)
- 8) 日本環境毒性学会編, 生態影響試験ハンドブック, 朝倉書店, (2003)
- 9) 若林明子, 化学物質と環境毒性, 丸善, (2000)
- 10) Yoshiki, H., Magnetized microplasmas generated in a narrow quartz tube, *Applied Physics Letters* 95 (2), 021501 - 021501-3, (2009)

- 11) Watanabe,H., E. Takahashi, Y. Nakamura, S. Oda, N. Tatarazako, and T. Iguchi, Development of a *Daphnia magna* DNA Microarray for Evaluating the Toxicity of Environmental Chemicals , *Environmental Toxicology and Chemistry* **26** (4) 669-676 , (2007)
- 12) Abe, T., Saito, H., Niikura, Y., Shigeoka, T., and Nakano, Y., Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of chlorophenols, *Water Science & Technology* **42** (7-8) 297-304, (2000)

