

(11) 藻類増殖阻害試験における生物量の測定方法が  
毒性評価に及ぼす影響

Effect of Biomass Measurements on Toxicity Evaluation  
in Algal Growth Inhibition Tests

鈴木祥広\*, 森下玲子\*, 高見徹\*, 丸山俊朗\*

Yoshihiro SUZUKI, Reiko MORISHITA, Tohru TAKAMI, and Toshiroh MARUYAMA

ABSTRACT; General methods for the biomass measurements in algal growth inhibition tests are cell counting, absorbance, and fluorescence, but a standard method is not restricted by the standard procedures. The possibility of the different evaluation is present in the toxicity test by different biomass determinations.

In this study, the toxicity of copper (Cu) and monochloramine ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) as reference toxic substances were evaluated from the algal growth inhibition test using green alga *Selenastrum capricornutum*. To determine the biomass changes, direct cell counting, turbidity, chlorophyll with fluorescence, and ATP methods were used and the effective concentration of Cu and  $\text{NH}_2\text{Cl}$  were evaluated with each results. The most sensitive method of the evaluation was direct cell counting, then LOEC and  $\text{EC}_{50}$  of Cu were 10 and 7  $\mu\text{g/l}$ , and LOEC and  $\text{EC}_{50}$  of  $\text{NH}_2\text{Cl}$  were 7 and 19  $\mu\text{g-Cl}_2/\text{l}$ , respectively. Turbidity and fluorescence methods showed the same sensitivity for Cu, whereas these were not sensitive for  $\text{NH}_2\text{Cl}$ . In contrast, the sensitivity of ATP method was not good for both toxic substances, and the evaluated values of LOEC and  $\text{EC}_{50}$  with ATP were several times higher than with counting method. It is necessary to recognize that the method for biomass measurements in algal growth test has an effect on the estimation.

KEYWORDS; algal toxicity test, biomass measurements, effective concentration, evaluation, sensitivity.

## 1. はじめに

藻類増殖阻害試験は、藻類が水圏生態系の一次生産者に位置する生物であるから、有害性物質、あるいは有害性排水の水圏生態系への影響を検討する上で、まず第一に行わなければならない生物検定の一つである。緑藻 *Selenastrum capricornutum* Prinzを用いた増殖阻害試験は、経済協力開発機構 (OECD)、米国環境保護庁 (USEPA) をはじめ世界各国で最も広く利用されている生物検定であり、これまでに、重金属、農業などの有害性物質、および各種排水についての多数の知見が蓄積されてきている。この試験方法を簡単に述べると、藻類を化学物質や排水に一定の期間 (通常は72~96時間) 暴露し、藻類の生物量の変化から影響を評価するものである。生物量の増減を正確かつ感度良く測定することができれば、それだけ試験の信頼性と感受性は高くなる。

生物量を求める方法としては、細胞数を直接または粒子計数機器によって計数する方法と、細胞密度の代替指標となる吸光度や濁度など光の吸収散乱を利用する方法、あるいはクロロフィル量から求める蛍光光度法などが挙げられているが<sup>1~4)</sup>、特に限定はされていない。今後、多種多様な化学物質あるいは排水、さらには複合的な影響についても検討し、生態系を保全していくためには、数多くの試料を迅速に感度良く測定できることが望まれる。このような背景から、国内外において、感度・精度の優れた計数測定機器や光学分析機器を利用した藻類

---

\* 宮崎大学工学部土木環境工学科

Dep of civil and Environmental Engineering, Miyazaki University

増殖阻害試験の方法の開発が検討されてきている<sup>5~8)</sup>。それでは、藻類の生物量を求める方法の違いによって試験結果に影響が生じる可能性はないのであろうか。水圏環境を保全していくためには、化学物質、あるいは排水の影響を安全側から評価することが重要である。そのためには、正確な定量法を決める必要がある。

そこで本研究では、標準有害性物質として重金属の銅 (Cu) と塩素消毒下水処理水の主要な酸化性物質であるモノクロラミン (NH<sub>2</sub>Cl)<sup>9, 10)</sup> を用い、*S. capricornutum* による増殖阻害試験を行なった。そして、直接計数法、濁度法、クロロフィル抽出法、およびアデノシン三リン酸 (ATP) 法を用いて生物量の変化を測定し、それぞれの方法で得られた結果から影響評価を行い、比較検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 供試藻類の前培養

本研究では、供試藻類として *S. capricornutum* (本株は地球・人間環境フォーラムより分譲された) を用いた。通常の試験では対数増殖期のものを用いることになっているが、半連続培養系<sup>11)</sup> で前培養することによって極めて安定した試験結果が得られることが明らかとなっている<sup>12)</sup>。本実験ではUSEPAの標準培地<sup>2)</sup> を用いて半連続培養系で定常状態に達してから3~4週間以上培養を続けたものを供試藻類として試験を行った。

### 2.2 標準有害性物質

有害性物質の中には、重金属のように溶解性あるいは懸濁物として残留するものと、酸化性物質のように溶解性で減衰していく物質がある。本研究では、重金属としてCu、残留酸化性物質としてNH<sub>2</sub>Clを用いた。Cuは、重金属の中で水銀に次いで毒性が強く生体内の酵素に対して拮抗阻害を引き起こす有害性物質である<sup>13)</sup>。NH<sub>2</sub>Clは、下水処理水の塩素消毒の際に生成され、藻類・海藻に対する毒性の強い酸化性物質であり<sup>12, 14~16)</sup>、時間経過とともに減衰する性質を有する<sup>10)</sup>。

Cuは、硫酸銅 (和光純薬、特級) を用いて10mg/ℓのCu標準溶液を作成した。

NH<sub>2</sub>Clは、次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) 溶液 (和光純薬、化学用) と塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) を用いて Cl<sub>2</sub>:NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N=5:1 (重量比)、pH11の条件でNH<sub>2</sub>Clを生成させてから、生成させたNH<sub>2</sub>Clをジエチルエーテルを用いて抽出・精製して純物質を得た<sup>14)</sup>。NH<sub>2</sub>Cl溶液の標定にはインドフェノール青改変法を用いた<sup>17)</sup>。

### 2.3 試験法

試験は、USEPAの提案している排水の影響試験法<sup>2)</sup> に準じて行った。試験培地は前培養の培地と同じ組成 (ただし、EDTAは除く) とし、メンブレンフィルター (0.45 μm, ADVATEC) でろ過後、高温高圧滅菌 (121℃、1.2atm、30min) した。ガラス器具等は高温高圧滅菌、または塩酸 (6N) で洗浄したものを用いた。250mlの三角フラスコに緑藻を接種した培養液100ml (細胞密度1×10<sup>4</sup> cells/ml) を入れた。これにCu、あるいはNH<sub>2</sub>Cl標準溶液をそれぞれ所定の暴露濃度になるように添加して試験を開始した。なお、それぞれの溶液の添加容量は100mlの1%に相当する1ml以下となるように調整し、添加後の容積変化は無視した。CuとNH<sub>2</sub>Clの暴露濃度区の範囲は、それぞれ0~100 μg-Cu/ℓの間で7濃度区、0~500 μg Cl<sub>2</sub>/ℓの間で7濃度区とし、1つの濃度区について3連で試験を行った。試験条件は、温度25±1℃、連続照射 (照度4,000~5,000 lx) のもとで振とう (100rpm) し、試験開始から96時間まで培養した。容器の位置は1日一度、無作為に変えた。暴露終了後、つぎの4つの方法で藻類の生物量を測定した。

### 2.4 藻類の生物量の測定法

#### (1) 直接計数法

培養液を血球計算板の上に滴下し、一定容積について顕微鏡 (ニコン、TMD300型) で細胞数を直接計数した。細胞密度の低い場合には、マイクロピペットで10~30 μℓの培養液をスライドガラス上に滴下して細胞を沈降させるため数分間放置後、その中に含まれる細胞数 (緑色で半円形に曲がった正常な生細胞) を顕微鏡で全て計数した。なお、一つの試料について3回測定を行い平均値を求め、1ml当たりの細胞数 (cells/ml) に換算した。

## (2) 濁度法

培養液の濁度を積分球式精密濁度計（東京電色、T-2600型）で測定した。測定には1cmのセルを用いた。対数増殖期の植物プランクトンを用いて、細胞密度と濁度の相関関係を調べた結果、約 $10^3 \sim 10^6$  cells/mlの範囲において両者は極めて良い相関関係（ $y = 4.38 \times 10^{-5}x + 0.03$ ,  $r^2 = 0.987$ ）を示した（Fig.1）。

## (3) クロロフィル抽出法

培養液50～100mℓをガラス繊維フィルター（Whatman, GF/C）で吸引ろ過し、そのフィルターを数日間、 $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。つぎに、フィルターをハサミで数mm程度に細かくした後、ホモジナイザー（Iwaki, 20mℓ用）に移し、少量（10mℓ以下）の90%アセトンを加えてから、乳棒を用いて乳液状に粉碎した。つづいて、1時間冷蔵庫に放置後、クロロフィルを抽出した。抽出後、このアセトンを再度ガラス繊維フィルターでろ過し、ろ液を90%アセトンで15mℓとした。

この抽出液のクロロフィル濃度を石英セルに入れて、分光蛍光光度計（日立、F-4500型）を用いて励起波長436nm、受光波長670nmにおける蛍光度（ $F_0$ ）を測定した。つづいて、0.5N HClを2滴加え、5分後に再び蛍光度（ $F_a$ ）を測定した。 $F_0$ と $F_a$ の差（ $F_0 - F_a$ ）をクロロフィルの蛍光度とした。

キャリブレーションは以下に行った。クロロフィル標準試料（和光純薬社製、生化学用、スピルリナ製、クロロフィルa）のクロロフィル含有量を吸光光度法<sup>19)</sup>によって決定した。そして、90%アセトンを溶媒として数段階の既知濃度の溶液を作成し、上記の手順で蛍光度を測定して検量線を作成した。得られた検量線は、

$(F_0 - F_a) = 0.426 \times [\mu\text{g-Chl-a}/\ell]$ ,  $r^2 = 0.999$ である。

## (4) ATP法

ATPは全ての生物の細胞中に必ず含まれる物質であり、水中の藻類をはじめとする微生物群の生物量の指標となる物質である<sup>19)</sup>。そこで、藻類の細胞密度の変化をATP量から見積もることとした。

細胞を含む培養液を専用のテフロンキューベットに分取した後、ATPアナライザー（東亜電波工業、AF-100）を用いてATP量を測定した。このATPアナライザーは、細胞内のATPを抽出してから、ルシフェラーゼとルシフェリンを反応させ、そのときに生ずる化学発光量を自動的に測定するものである<sup>20, 21)</sup>。

培養液中の細胞密度とATP量との関係について、対数増殖期の細胞を用いて両者の関係を調べた結果、 $10^3 \sim 10^6$  cells/mlの範囲において両者は極めて良い相関関係（ $y = 0.85 \times 10^{-6}x + 0.001$ ,  $r^2 = 0.961$ ）にあった（Fig.2）。

## 2.5 影響評価方法

直接計数法によって得られた細胞密度は、対数値に換算してから評価した。また、濁度法、クロロフィル抽出

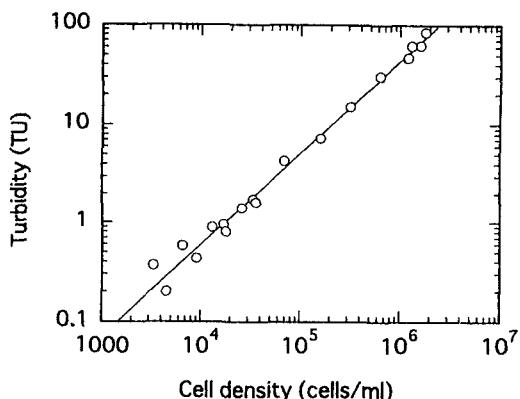


Fig. 1 Relationship between cell density and turbidity of *S. capricornutum*.

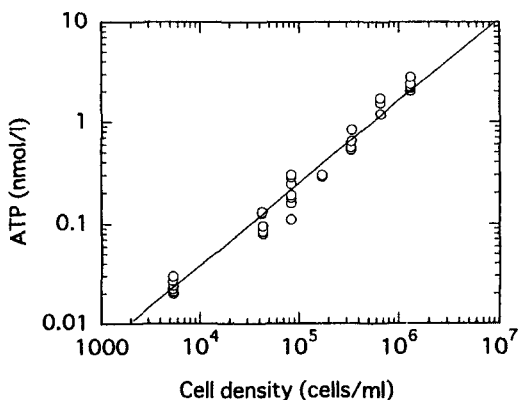
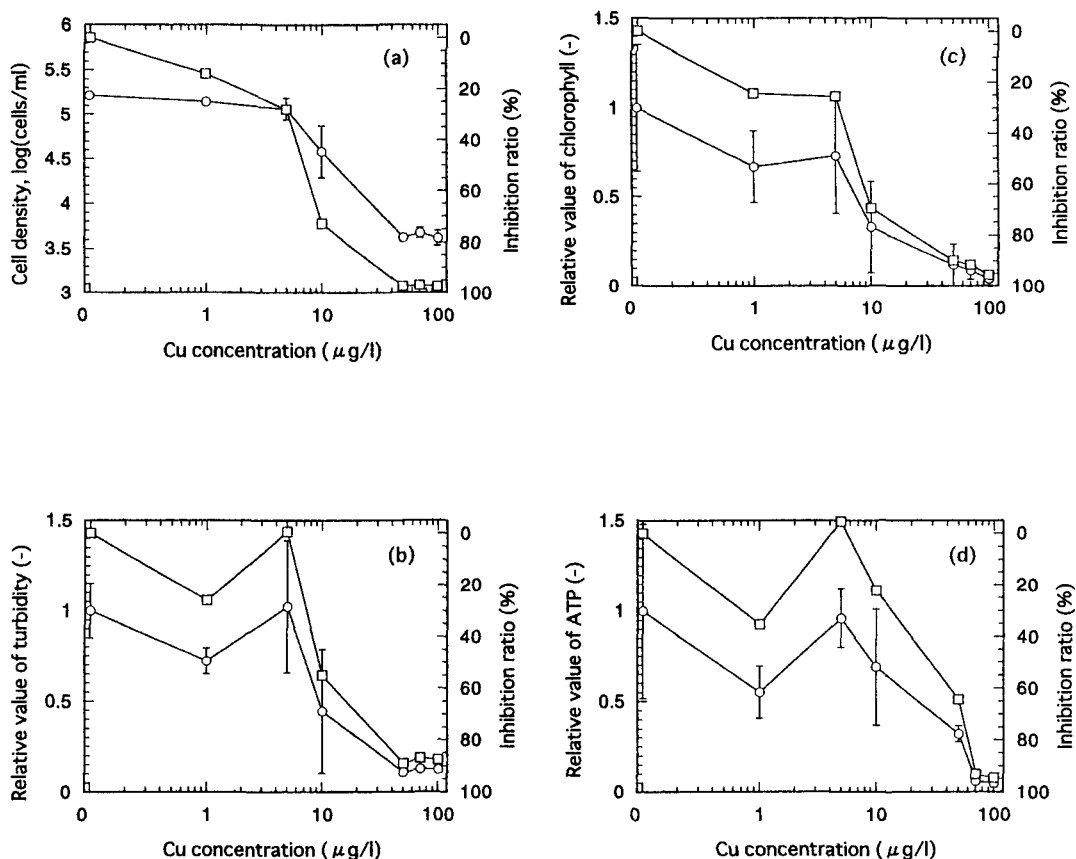


Fig. 2 Relationship between cell density and ATP concentration of *S. capricornutum*.

法、およびATP法については、対照区とそれぞれの試験区との比 { (試験区値) / (対照区値) } から評価した。いずれの測定方法によって得られた結果についても、最小影響濃度 (Lowest-Observed-Effect Concentration, LOEC) および半数影響濃度 (50% Effective Concentration,  $EC_{50}$ ) を求めた。LOECは、USEPAの提示したANOVA test (分散分析)<sup>2)</sup>に従ってデータを解析した。 $EC_{50}$ については、常法に従って暴露濃度を対数目盛上に、増殖阻害率を普通目盛にとってプロットし、50%に最も近い上下2つの測定値を結ぶ直線を引き、増殖阻害率50%の線との交点に相当する濃度から求めた。なお、増殖阻害率は以下の式から求めた<sup>2,2)</sup>。

$$\text{増殖阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{試験区値}) / (\text{対照区値})\} \times 100$$

なお、LOECとは実際に暴露した濃度区のうちで、影響を生じた最小の濃度のことである。したがって、設定した濃度区の間隔によっては、LOECと判定された濃度区が阻害率50%以上を示す場合があり、このとき、LOECは $EC_{50}$ よりも高い値を示す。



**Fig. 3** Effects of copper on algal growth of *S. capricornutum*

(a) direct microscopic counting, (b) turbidity, (c) chlorophyll, (d) ATP.

○: growth response of cell density or relative value (n=3, mean $\pm$ SD)

□: inhibition ratios (plots are means of 3 replicates)

### 3. 結果と考察

#### 3.1 各種測定法によるCuとNH<sub>2</sub>Clの影響濃度

##### (1) Cu

直接計数法、濁度法、クロロフィル抽出法、およびATP法におけるCu濃度と96時間後のそれぞれの細胞密度または生物量の変化、および増殖阻害率の関係をFig.3-a ,b,c,d に示した。細胞密度は自然対数で表し、その他の生物量の変化は対照区と試験区の相対比で表した。

直接計数法によって得られた結果から評価した場合では、Cu濃度が10 µg/ℓから細胞密度は急激に減少し、50 µg/ℓでは対照区の細胞密度の約1/100に低下した。LOECは10 µg/ℓ、EC<sub>50</sub>は7 µg/ℓとなった。7濃度区における各区の細胞密度の3連のデータの変動係数(CV)を求めると、LOECとなった10 µg/ℓの濃度区の変動が73.2%と大きいため7濃度区のそれぞれのCVの平均は21.3±24.5% (n=7)となったが、それ以外の濃度区では変動幅は小さく、平均して12.6±6.4% (n=6)であった。

濁度法では、Cu濃度が10 µg/ℓで濁度が約1/2に減少し、50 µg/ℓ以降では、濁度はほとんど検出されなかった。LOECは10 µg/ℓ、EC<sub>50</sub>は9 µg/ℓとなり、直接計数法とほぼ同じ値を示した。0~10 µg/ℓまでの濃度区における各区の濁度の3連のデータのCVを求めると、4濃度区のそれぞれのCVの平均は34.5±30.6% (n=4)となり、直接計数法と比較して各濃度区の変動幅は大きかった。

クロロフィル抽出法では、LOECは10 µg/ℓ、EC<sub>50</sub>は7 µg/ℓとなり、直接計数法による値と一致した。また、7濃度区におけるそれぞれの変動計数のCVの平均は18.7% (n=7)であり、低濃度区における変動幅が大きかった。

ATP法の結果を見ると、0~10 µg/ℓの濃度区における各区の変動幅が大きく、特に対照区のCVが48.2%と大きかった。ATPの結果から評価すると、LOECは50 µg/ℓ、EC<sub>50</sub>は29 µg/ℓとなった。

Fig.3において、Cuが50 µg/ℓ以上の濃度区では細胞数が横這いになる傾向にあった。これは高濃度区の50~100 µg/ℓにおいても完全に細胞が死滅しなかったを意味している。一般に、生物と毒物との関係は用量-反応曲線で表され、その曲線の両端は漸近する傾向を示すことから、Cuにおいても阻害率が100%に近づくに伴って一定となったと考えられる。このような傾向は、NH<sub>2</sub>Clの試験においてもみられた (Fig.4)。

淡水産の藻類に対するCuの毒性評価に関する最近の報告例 (試験培地の組成は異なる) をみると、粒子計測器を使用した結果では、本研究と同種の *S. capricornutum* に対するCuのEC<sub>50</sub>は34 µg/ℓ<sup>23)</sup>、緑藻ツヅミモ (*Staurostrum chaetoceras*) のEC<sub>50</sub>は19~34 µg/ℓ<sup>24)</sup>、緑藻クロレラ (*Chlorella ellipsoidea*) のEC<sub>50</sub>は約95 µg/ℓ<sup>25)</sup>、また、クロレラ (*C. vulgaris*) のEC<sub>50</sub>は178 µg/ℓ<sup>26)</sup>となっている。直接計数法では、クロレラ (*C. pyrenoidosa*) のCuのEC<sub>50</sub>は16~24 µg/ℓの報告<sup>27)</sup>がある。これらの報告されている影響濃度から考察すると、*S. capricornutum*を用いた本増殖阻害試験は、直接計数法、濁度法、およびクロロフィル抽出法のいずれの方法でも生物量を測定した場合においても、重金属のCuに対して鋭敏な生物検定ができることがわかる。一方、ATP法では、Cuに対する毒性を過小に評価する可能性の高いことがわかった。

##### (2) NH<sub>2</sub>Cl

Cuと同様にして、直接計数法、濁度法、クロロフィル抽出法、およびATP法におけるNH<sub>2</sub>Cl濃度と96時間後のそれぞれの細胞密度または生物量の変化、および増殖阻害率の関係をFig.4-a,b,c,d に示した。NH<sub>2</sub>Clは減衰することから初期暴露濃度で表した。

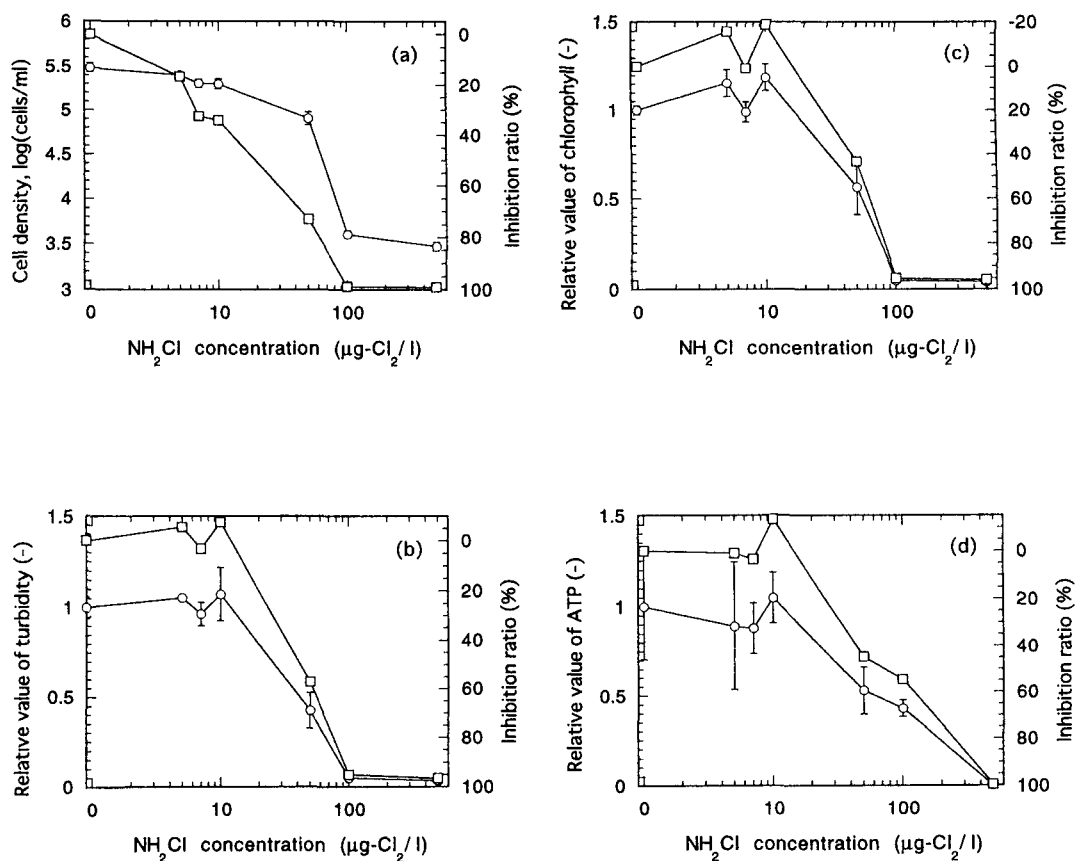
直接計数法によって得られた結果から評価した場合では、NH<sub>2</sub>Cl濃度が7 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓから細胞密度が僅かずつ減少し、50 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓから100 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓにおいて急激に低下した。NH<sub>2</sub>ClのLOECは7 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓ、EC<sub>50</sub>は19 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓであった。また、各濃度区における細胞密度の3連のデータのCVを求めると、7濃度区のそれぞれのCVの平均は11.5±3.2% (n=7)と各区とも変動幅が極めて小さい。

濁度法では、10 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓから50 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓにかけて急激に細胞密度が低下し、NH<sub>2</sub>ClのLOECは50 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓ、EC<sub>50</sub>は42 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓであった。また、直接計数法と比較してNH<sub>2</sub>Clに対する感受性が低く、LOECでみると約1/7に低下した。

クロロフィル抽出法は濁度法と類似した挙動を示し、NH<sub>2</sub>ClのLOECは50 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓ、EC<sub>50</sub>は55 µg-Cl<sub>2</sub>/ℓとなった。

ATP法の場合においても、 $10\mu\text{g-Cl}_2/\ell$  から  $50\mu\text{g-Cl}_2/\ell$  にかけてATP量が急激に減少し、 $\text{NH}_2\text{Cl}$ のLOECは $50\mu\text{g-Cl}_2/\ell$ 、 $\text{EC}_{50}$ は $72\mu\text{g-Cl}_2/\ell$ となった。

以上の結果から直接計数法は、 $\text{NH}_2\text{Cl}$ の影響を最も鋭敏に評価することができ、その他の方法と比較して著しく影響の検定感度が高いことがわかった。一方、濁度法、クロロフィル抽出法、およびATP法による測定結果から評価すると、 $\text{NH}_2\text{Cl}$ に対する毒性を過小評価してしまうことが示された。したがって、 $\text{NH}_2\text{Cl}$ の藻類に対する影響を検討するためには、直接計数法で生物量を測定し、評価することが重要である。



**Fig. 4** Effects of monochloramine on algal growth of *S. capricornutum*.

(a) direct microscopic counting, (b) turbidity, (c) chlorophyll, (d) ATP.

○: growth response of cell density or relative value (n=3, mean±SD)

□ : inhibition ratios (plots are means of 3 replicates)

Table 1 Algal effect concentration values with *S. capricornutum* growth test

| Biomass measurements        | Toxic substances               |                  |                                     |                  |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------|
|                             | Cu                             |                  | NH <sub>2</sub> Cl                  |                  |
|                             | LOEC<br>( $\mu\text{g}/\ell$ ) | EC <sub>50</sub> | LOEC<br>( $\mu\text{g-Cl}_2/\ell$ ) | EC <sub>50</sub> |
| Direct microscopic counting | 10                             | 7                | 7                                   | 19               |
| Turbidity                   | 10                             | 9                | 50                                  | 42               |
| Chlorophyll                 | 10                             | 7                | 50                                  | 55               |
| ATP                         | 50                             | 29               | 50                                  | 72               |

3.2 各種測定方法の比較検討

それぞれの測定方法で得られた結果から求めた影響濃度をTable 1にまとめた。

直接計数法は、CuとNH<sub>2</sub>Clのいずれの有害性物質に対しても最も鋭敏に評価できることが明らかであった。直接計数法の優れた特徴は、顕微鏡下で生存している細胞のみを判別でき、正常な細胞、異常な形の細胞、死滅した細胞、あるいは他の懸濁物と明確に区別できる点である。検鏡による計数は、時間がかかり、試験者の労力からみても多数の試水を検定することは困難であるが、直接計数法の利点を十分に考慮に入れた試験方法の開発が重要である。

濁度法は測定が非常に簡便であるが、生細胞以外でも懸濁物であれば検出されることから、細胞密度を過剰に評価する場合がある。特に、NH<sub>2</sub>Clの場合において、直接計数法と比較して大きく感受性が劣る傾向を示し、死滅した細胞も粒子として検出してしまった可能性が高い。また、下水や排水には懸濁物が多く含まれることから、それらを検定するためには、ろ過などによって試水から懸濁物を除去しなければならないが、有害性物質の中には懸濁物に吸着して存在するものも少なくなく、懸濁物を含む試水を検定する際には濁度法は適切でないと考えられる。

クロロフィルは光合成生物の全てに含まれ、藻類の生物量・細胞密度の指標であり、蛍光光度法によって極めて感度良く測定できる。クロロフィル抽出法による毒性評価は、濁度法と類似した結果を示し、Cuに対しては直接計数法と同一の影響濃度を検出できたが、NH<sub>2</sub>Clに対しては直接法と比較して数倍高く、感受性が低くなった。これは、CuとNH<sub>2</sub>Clでは、細胞に対する阻害作用の働きが異なることを示唆している。懸濁物とクロロフィル量による評価結果が一致していたことから、生細胞がNH<sub>2</sub>Clの作用で死滅しても、その死細胞（遺骸）にクロロフィルが含まれたまま分解されず培養液中に残留し、この分のクロロフィル量が生細胞に含まれるクロロフィルに加算されて過剰量の値を生じ、評価に影響を及ぼしたと考えられる。Mayerら<sup>28)</sup>も藻類増殖阻害試験において、蛍光度を生物量の代替指標として利用することによって生じる同様の問題点を指摘している。

ATP法による評価は、CuとNH<sub>2</sub>Clの両有害性物質に対しても感受性が低く、かつ同濃度区における分析値の変動幅が大きかった。ATP標準物質は蒸留水中（30℃）では、4日間で初期濃度（100nM）の約80%が残留すること（東亜電波工業・化学計測部 羽毛田氏、私信）、また、大腸菌から漏出するATP量に関する研究<sup>29)</sup>ではATPが急速に消失する傾向は認められないことから、死滅した藻類の細胞から漏出したATPも培養液中で残留した可能性が高い。すなわち、細胞が死滅してもATPとして測定されたために、直接計数法と比較して感受性が低くなったと推定される。

現場や培養液の生物量、細胞密度を測定する場合は、生細胞に含まれるChl-aやATPなどの物質を指標とするのは有効な手段である（Fig.1, 2）。しかし、これら代替指標物質では、毒性評価を目的とする増殖阻害試験のように、72～96時間における生物量・細胞密度の増減量の変化を的確に捉えることができず、鋭敏な検定ができないことがわかった。

生物検定の意義は、不特定・多数の化学物質、その複合的作用、未知の化学物質、またそれらを多様に含む排

水の生物影響に関して、物理化学的分析法では得ることのできない情報を得ることができる点であり、種類や性質のことなる有害性物質に対して、広く鋭敏に評価できる方法が望ましい。したがって、重金属に対して鋭敏に評価できたとしても、残留酸化性物質に対して鈍感であっては生物検定の目的を十分に達成することは難しい。以上の点から鑑みると、藻類増殖阻害試験を実施する上で、最も適切な生物量の測定方法は、試験できる試水の数に制限されるものの、直接計数法であるといえる。濁度法、クロロフィル抽出法、およびATP法を用いる場合には、これらの特徴を理解して用いることが重要である。今後、多数の試料を迅速かつ鋭敏に生物検定していくためには、直接計数法の長所である生細胞の識別、すなわち、細胞（粒子）の大きさ、色、および形状に関する情報を素早く得て、解析できる手法を取り入れることが必要である。

#### 4. まとめ

2つの有害性物質CuおよびNH<sub>2</sub>Clについて*S. capricornutum* による増殖阻害試験を行い、直接計数法、濁度法、クロロフィル抽出法、およびATP法を用いて生物量を測定し、それぞれの違いを示した。そして、それぞれの方法で得られた結果から影響評価を行い比較検討し、以下の知見を得た。

(1) 直接計数法は、2つの有害性物質の毒性を最も鋭敏に評価できる方法であった。このとき、CuのLOECとEC<sub>50</sub>は、それぞれ10 μg/l と7 μg/l、NH<sub>2</sub>ClのLOECとEC<sub>50</sub>は、それぞれ初期暴露濃度として7 μg-Cl<sub>2</sub>/l と19 μg-Cl<sub>2</sub>/l であった。

(2) 濁度法とクロロフィル抽出法では、Cuに対する感受性は直接計数法と同等であったにも関わらず、NH<sub>2</sub>Clに対しては感受性が著しく低下した。直接計数法と比較して、濁度法とクロロフィル抽出法とも、それぞれLOECは7倍、EC<sub>50</sub>は約3倍高い値を示した。

(3) ATP法では、CuとNH<sub>2</sub>Clのいずれの有害性物質に対しても感受性が低く、NH<sub>2</sub>Clについてみると、直接計数法と比較して、LOECは約7倍、EC<sub>50</sub>は約4倍も高い値を示した。

以上のことから、藻類増殖試験は、生物量の測定方法の違いによって、評価に著しい影響が生じることを十分に理解して実施することが重要である。

#### 謝辞

本研究を行うに当たり、クロロフィルの分析に際してご助言を頂いた北海道大学水産学部工藤勲博士、ATP分析のご指導と貴重な資料を提供して頂いた(株)東亜電波工業羽毛田靖氏、ならびに関係者各位に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) OECD Alga, growth inhibition test, OECD Guideline for testing of chemicals 201 (OECD), Paris, pp 2-11, 1984
- 2) USEPA(Cincinnati-OH): Algal, *Selenastrum capricornutum*, growth test Method 1003.0, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms Second edition, NTIS, Cincinnati, pp 147-187, 1989
- 3) 岡田光正: 湖沼環境調査指針, 湖沼環境調査指針 (日本水質汚濁研究会), 公害対策同友会, 東京, pp 193-199, 1982.
- 4) APHA Part 8000 toxicity, Standard methods for the examination of water and wastewater 18th edition APHA, Washington D.C., pp 81-882, 1992
- 5) Abdel-Hamid, M. I. Development and application of a simple procedure for toxicity testing using immobilized algae, Water Science Technology, Vol. 33, pp. 129-138, 1996.
- 6) Benhra, A., C. M. Radetski and J. Ferard: Cryoalgotox: Use of cryopreserved alga in a semistatic microplate test, Environ Toxic Chem., Vol 16, pp 505-508, 1997
- 7) Chen, C. and K. Lin: Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test, Environ Toxic Chem., Vol 16, pp. 1337-1344, 1997
- 8) 松原正明, 原田新, 田中宏明: 藻類増殖試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試料への適用, 水環境学会誌, Vol 20, pp 768-775, 1997.
- 9) Tchobanoglous, G., F. L. Burton共著 (松尾友矩監訳) 塩素殺菌, 水質環境工学 技報堂出版, 東京, pp 252-260, 1993

- 1 0) 鈴木祥広, 丸山俊朗, 高見徹 下水処理水の塩素消毒によるモノクロアミンの生成量とその減衰速度, 下水道協会誌論文集, Vol 33, pp 93-103, 1996
- 1 1) 渡辺信 半連続培養系による増殖の動力学, 環境微生物実験法 (須藤隆一), 講談社, 東京, pp. 206-210, 1988
- 1 2) 鈴木祥広, 森下玲子, 丸山俊朗, 増殖阻害試験に用いる供試藻類の栄養条件がモノクロアミンの毒性評価に及ぼす影響, 水環境学会誌, Vol. 20, pp 783-788, 1997
- 1 3) Lobban, C S and P J Harrison: Pollution, Seaweed Ecology and Physiology (Lobban, C S and P. J. Harrison), Cambridge University Press, New York, pp 255-282, 1994
- 1 4) 鈴木祥広, 森下玲子, 丸山俊朗 淡水産植物プランクトンの増殖阻害試験によるモノクロアミンと塩素殺菌下水処理水の毒性評価, 水環境学会誌, Vol 19, pp 861-870, 1996
- 1 5) Maruyama, T, K Ochiai, A Miura and T Yoshida. Effects of chloramine on the growth of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), Nippon Suisan Gakkaishi, Vol 54, pp 1829-1834, 1988.
- 1 6) 丸山俊朗, 三浦昭雄 下水とノリ (海苔), 水, Vol 35, pp. 1-28, 1993.
- 1 7) 鈴木祥広, 丸山俊朗, 高見徹, 土手裕 海水中におけるモノクロアミンの減衰と残留する酸化性物質の存在, 水環境学会誌, Vol 19, pp 388-396, 1996
- 1 8) 高橋正征 クロロフィル, 湖沼環境調査指針 (日本水質汚濁協会), 公害対策同友会, 東京, pp 138-140, 1982
- 1 9) 有賀祐勝 現存量の測定法, 藻類研究法 (西原一俊, 千原光雄), 共立出版, 東京, pp 388-412, 1979
- 2 0) 羽毛田靖, 本橋亮一, 梶原一人, 松永直樹, 権田金治 フローインジェクション法を用いた細胞内アデノシン三リン酸のオンライン測定と微生物細胞数測定への応用, 分析化学, Vol 38, pp. 183-186, 1989.
- 2 1) 羽毛田靖 ATP測定法の微生物検査への応用, New Food Industry, Vol. 36, pp 17-25, 1994
- 2 2) 小林直正 水汚染の生物検定, サイエンティスト社, 東京, pp 8-10, 1993
- 2 3) Chiaudani, G and M Vighi The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies, Mitt Int Verein Limnol, Vol 21, pp. 316-329, 1978.
- 2 4) Ivorra, N, M H Kraak and W Admiraal. Use of lake water in testing copper toxicity to desmid species, Wat Res, Vol 29, pp 2113-2117, 1995
- 2 5) 岡村秀雄, 青山勲, 八木正一 藻類増殖阻害に及ぼす培養条件の影響と重金属の毒性評価, 水質汚濁研究, Vol 12, pp 654-663, 1989
- 2 6) Rachlin, J W and A Grosso The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure, Arch Envir Contam Toxicol., Vol 24, pp 16-20, 1993
- 2 7) Stauber, J L and T M Florence THE effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the fresh water green alga *Chlorella pyrenoidosa*, Wat. Res., Vol 23, pp. 907-911, 1989
- 2 8) Mayer, P, R Cuhel and N. Nyholm: A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests, Wat. Res., Vol 31, pp. 2525-2531, 1997
- 2 9) 石原哲 抗菌剤の作用機構と菌体外への漏出ATPの関連性に関する研究-大腸菌を用いた検討, Chemotherapy, Vol 39, pp 435-442, 1991