マイクロプレートを用いたAGP試験の検討

山下尚之*
宮島 潔*

田中宏明**
鈴木 穰*

Examination of AGP Test Using Microplate

Naoyuki YAMASHITA*, Hiroaki TANAKA**, Kiyoshi MIYAJIMA* and Yutaka SUZUKI*

* Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute, 1-6 Minamihara, Tsukuba, Ibaraki 305-8516, Japan

** Research Center for Environmental Quality Management, Graduate School of Engineering, Kyoto University, 1-2 Yumihama, Otsu, Shiga 520-0811, Japan

Abstract

The algal growth potential (AGP) test is a useful tool for assessing the eutrophication of rivers and lakes. Nevertheless, the AGP test is relatively expensive because of its large scale. In this study, a microplate technique was used in the AGP test to develop a microscale version. The algal growth in the microplate wells was monitored by examining the relationship between the absorbance (450 nm) measured using a microplate reader and cell concentration. A high correlation was observed between absorbance and cell concentration. There were few differences between the microplate wells with respect to well position, suggesting that the effect of well position on algal growth is negligible. The microscale AGP test using a microplate was compared with the conventional flask-size AGP test. A high similarity between the two methods was observed. Therefore, the microscale AGP test is a simple and useful method for conducting AGP tests on many water samples. The change in AGP level in the Tama River was investigated. AGP level increased considerably after inflow of water discharged from sewage treatment plants (STPs). This study has demonstrated that STP discharge has a considerable effect on river water quality.

Key words: algal growth potential, microplate, *Pseudokirchneriella subcapitata*, bioassay, eutrophication

1. はじめに

近年、人間活動の活発化により、水域への栄養塩類等の負荷が増大し、水域の富栄養化が著しく促進されている。その結果、湖沼や河川等において藻類の増殖が促進され、水質の悪化が引き起こされている。霞ヶ浦など全国各地の富栄養化した湖沼では、毎年夏から秋にかけて、ラン藻類を主体としたアオコの発生が見られており、異臭味問題、浄水処理におけるろ過障害、魚類の斃死および景観の悪化等、様々な問題が発生している。また、アオコを形成するラン藻類のなかには、有毒物質を含有するものがあることが明らかにされており¹⁻³⁾、家畜や野生動物の死亡事故や人体への影響について報告がなされている⁴⁻⁶⁾。

水域の富栄養化の程度を測定する方法としては、藻類培養試験であるAGP (Algal Growth Potential) 試験がある。この試験は、リービッヒの最小律を基礎にした生物検定法であり、窒素・リンなどの栄養塩類を含め、検水の総合的な藻類増殖能力を測定するものである。この試験は、水域の富栄養化の程度や藻類増殖の制限物質を推定する方法として有用であり、現在までに湖沼や海域等から採取した試料についていくつかの研究がなされている⁷⁻¹²⁾。大月ら¹³⁾は、多摩川の支川である南浅川の富栄養化について、

AGP試験により評価を行っている。流下に伴う窒素およびリン濃度の上昇とともに、AGPが高くなる傾向のあることを報告している。また、河川水に下水処理水を添加した場合には、AGPが大きく増加もしくは減少することを報告しており、下水処理水には、藻類の増殖促進物質が含まれるとともに、増殖阻害物質の存在が考えられることを報告している。一方、Millerら¹⁴⁾は、AGP試験によって、アメリカにある49湖沼について藻類増殖制限物質の検討を行っている。その結果、49湖沼のうち35湖沼がリン制限であり、残りが窒素またはそれ以外の物質が制限物質であったことを報告している。また、矢木ら¹⁵⁾は、AGP試験を用いて霞ヶ浦における藻類増殖制限物質の推定を行っている。試験では、サンプルに窒素、リン、鉄およびEDTAを添加して藻類増殖への影響を観察しており、その結果、6月～8月の間は、窒素およびリンが制限物質となっていたが、それ以外の季節では、鉄もしくはEDTAが制限物質となっていたことを報告している。矢木らは牛久沼においても同様な試験を行っており、牛久沼においては、リンおよびEDTAが制限物質となっており、そのなかでも、EDTAが重要であったことを述べている¹⁶⁾。このことから、水域における藻類増殖には、窒素・リンといった栄養塩類だけでなく、EDTA様物質の影響も大きいことが示唆される。

* 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ 〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6

** 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター 〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2

AGP試験は、水域の富栄養化の程度や藻類増殖の制限物質の推定を行う上で有用な方法であるが、機材と場所が多量に必要であり、多数のサンプルを同時に処理することが困難であるという問題がある。一方、バイオアッセイにマイクロプレートを用いた試験系の検討が行われてきている^{17~23)}。マイクロプレートを用いたアッセイでは、試験に必要なサンプル量が少量で済むこと、試験実施に必要な場所が小規模で済むことといったメリットがある。しかし、マイクロプレートを用いたAGP試験について、その検討はほとんどなされていない。本研究では、多数のサンプルを迅速に処理する方法としてマイクロプレートを用いたAGP試験について検討を行った。はじめに、マイクロプレートを用いたAGP試験について、その基礎的検討を行うとともに、都市河川である多摩川をケーススタディとして、マイクロプレートを用いたAGP試験の適用を試みた。

2. 方法

2.1 マイクロプレートを用いたAGP試験

AGP試験の供試藻類としては、藻類試験に一般的に用いられる緑藻類*Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35)を用いた。*P. subcapitata*は藻類培養用のAAP培地²⁴⁾を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後4~7日経過した対数増殖期のものを試験に用いた。試験では、継代培養を行っている*P. subcapitata*を滅菌した $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の NaHCO_3 溶液で洗い、培地成分を除いた後に使用した。

AGP試験は96穴のマイクロプレート (Falcon社製) を用いて行った。マイクロプレートの各ウェルには、 $200\mu\text{l}$ のサンプルと $40\mu\text{l}$ の*P. subcapitata*の細胞懸濁液を入れ、培養温度 24°C 、 120rpm の振とう条件で培養を行った。光条件は、照度 4000Lux 、12時間明暗周期とし、藻類の初期細胞濃度は $1 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ とした。マイクロプレートへのサンプルおよび藻類懸濁液分注の操作は、すべてクリーンベンチ内で行い、また水分の蒸発を抑えるため、パラフィン製のフィルム (PARAFILM, American National Can) によってプレートの周囲をシーリングした後、培養を行った。培養期間中、マイクロプレートリーダー (Wallac社, ARVO SX-1420) を用いて吸光度 (波長 450nm) を測定し、藻類増殖量をモニタリングした。藻類量がほぼ一定になった時点での藻類増殖量をAGPとした。本研究で使用したマイクロプレートリーダーは、吸光度の測定波長を自由に設定す

ることはできず、リーダーに取付けるフィルターの設定波長に規定される。*P. subcapitata*細胞懸濁液の吸光スペクトルを測定したところ、波長 450nm 付近にもピークが見られたこと、およびマイクロプレートリーダーを用いた測定においてよく使用される波長であることという理由から、測定波長は 450nm とした。

マイクロプレートを用いたAGP試験においては、培養を行っている期間途中に、藻類のマイクロプレート底面への付着が観察される場合があった。付着が観察された場合には、マイクロプレートリーダーによる吸光値に影響が見られ、値のバラつきが非常に大きくなった。このことから、吸光度の測定に先立ち、シェーカー (IWAKI, CST-040) でマイクロプレートを激しく振とうし、ウェル底面に付着した藻類細胞を完全に分散させてから測定を実施した。藻類を完全に分散させた場合には、吸光値のバラつきは小さくなり、安定した結果が得られた。

2.2 三角フラスコを用いたAGP試験

マイクロプレートを用いたAGP試験との比較を行うため、既存の方法^{24,25)}に準拠して、三角フラスコを用いたAGP試験を実施した。試験では、容量 100ml の三角フラスコに、 40ml の試料と*P. subcapitata*細胞懸濁液を入れて、培養温度 24°C 、 90rpm の振とう条件で培養を行った。*P. subcapitata*は、滅菌した $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の NaHCO_3 溶液で洗い、培地成分を除いたものを使用した。光条件は、照度 4000Lux 、12時間明暗周期とし、藻類の初期細胞濃度は $1 \times 10^3 \text{ cells} \cdot \text{ml}^{-1}$ とした。培養期間中、分光光度計 (島津製作所、紫外可視分光光度計UV-160) を用いて吸光度 (波長 750nm) を測定し、藻類増殖量の変化をモニタリングした。三角フラスコを用いた試験では、既存の方法^{24,25)}に準拠して、吸光度の測定波長は 750nm とした。藻類量がほぼ一定になった時点での藻類増殖量をAGPとした。

2.3 吸光度と藻類細胞濃度およびSS濃度との関係

マイクロプレートウェル内の藻類量を測定する方法としては、マイクロプレートリーダーによる吸光度を測定する方法が簡便である。そこで、マイクロプレートリーダーによる吸光度 (波長 450nm) と藻類細胞濃度およびSS (Suspended solids) 濃度との関係を調べた。

実験では、容量 200ml の三角フラスコにAAP培地 100ml を入れ、これに継代培養を行っている*P. subcapitata*の培養液を少量添加して培養を行った。培養は、温度 24°C 、照度

Fig.1 Location of sampling stations.

St.1-St.6: Sampling stations in the Tama River.

STP-1, STP-2, STP-3: Sewage treatment plant effluents.

4000Lux, 12時間明暗周期, 90rpmの振とう条件とした。測定実施に必要な本数の三角フラスコを準備して2週間程度の培養を行い、培養期間中は、吸光度、藻類細胞濃度、SS濃度の測定を行った。

吸光度については、96穴マイクロプレートの各ウェルに、培養中の三角フラスコから培養液240 μ lを移し替え、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度の測定（波長450nm）を行った。藻類細胞濃度については、トーマの血球計数盤（荳垣医理工工業, Haemocytometer）を用いて顕微鏡下で藻類細胞のカウントを行い、藻類細胞濃度を計算した。SS濃度については、培養液をガラスファイバーフィルター（Whatman, GF/B）を用いてろ過を行った後、フィルターを110℃で2時間乾燥させてからフィルター重量の測定を行い、SS濃度を算出した。

2.4 多摩川における調査

多摩川における調査は、2003年2月に実施した。調査地点をFig. 1に示す。調査では、多摩川本川においてSt.1～St.6までの6地点で河川水の採取を行った。この調査区間において、STP-1～STP-3の3ヶ所の下水処理場から、処理水の放流がなされている。また、STP-1より上流側においては、多摩川への下水処理水の流入は見られない。

採取したサンプルは、直ちに実験室に持ち帰り、ガラスファイバーフィルター（Whatman, GF/B）およびメンブレンフィルター（Advantec, 孔径0.2 μ m）によりろ過を行った後、試験に供するまでの間、-30℃にて凍結保存を行った。AGP試験は、凍結保存しているサンプルを融解した後に2倍希釈の希釈系列を作成し、マイクロプレートを用いて実施した。また同時に、採取したサンプルについて、オートアナライザー（Bran Lubbe社, TRAACS800）を用いて、窒素およびリン濃度の測定も行った。

3. 結果 と 考 察

3.1 吸光度と藻類細胞濃度およびSS濃度との関係

マイクロプレートウェル内の細胞濃度を測定する方法としては、マイクロプレートリーダーによる吸光度を測定する方法が簡便である。そこで、藻類培養用のAAP培地を用いて*P. subcapitata*の培養を行い、マイクロプレートリーダーによる吸光度と藻類細胞濃度およびSS濃度との関係を調べた。マイクロプレートリーダーによる吸光度と藻類細胞濃度の関係をFig. 2に、またマイクロプレートリーダーによる吸光度とSS濃度との関係をFig. 3に示す。

Fig. 2より、マイクロプレートリーダーによる波長450nmの吸光度と藻類細胞濃度との間には高い相関が認められ、両者の間には直線関係があることが分かった。この結果より、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度の測定を行うことにより、マイクロプレートウェル内における藻類の増殖をモニタリングすることが可能であると考えられた。ウェル内における藻類の増殖をマイクロプレートリーダーによってモニタリングすることにより、測定のための操作を大幅に簡便化することができる。

一方、AGPの値は、藻類の増殖量をその乾燥重量（mg・l⁻¹）で表すことが多い。そこで、マイクロプレートリーダーによる吸光度（波長450nm）と培養液のSS濃度（mg・l⁻¹）との関係について調べた。結果をFig. 3に示す。Fig. 3より、培養液のSS濃度が低い場合には若干異なる傾向が観察されたが、マイクロプレートリーダーによる吸光度と

*P. subcapitata*培養液のSS濃度との間には高い相関が認められ、両者の間には直線関係があることが認められた。この結果より、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度の測定を行うことにより、マイクロプレートウェル内における藻類増殖量（mg・l⁻¹）を測定することができると考えられた。

3.2 藻類細胞濃度の経時変化

マイクロプレートウェル内における*P. subcapitata*細胞濃度の経時変化について調べた。実験には、AAP培地および多摩川から採取した河川水を用いて、マイクロプレートにより*P. subcapitata*の培養を行った。結果をFig. 4に示す。

Fig. 4より、藻類細胞濃度はAAP培地および多摩川河川水とも、培養開始から10～14日程度で増殖はほぼ横ばいとなり、その後はあまり変化が見られない傾向のあることが分かった。他の河川水サンプルを用いて培養した場合も、

Fig.2 Relationship between cell concentration and absorbance.

Fig.3 Relationship between suspended solids and absorbance.

Fig.4 Temporal changes of cell concentration in the microplate.

ほぼ同様な傾向が見られ、培養開始から10～14日程度で増殖はほぼ横ばいとなった。この結果より、培養開始より14日程度経過した時点での藻類増殖量をAGPとすることが妥当であると考えられた。

Fig. 4において、吸光値の標準偏差をエラーバーで表示する。マイクロプレートを用いたAGP試験においては、培養を行っている期間途中に、藻類のマイクロプレート底面への付着が観察される場合があった。この場合には吸光値のバラつきが非常に大きくなり、その結果、標準偏差の値も大きくなった。一方、ウェル底面に付着した藻類細胞を完全に分散させた後に測定を実施した場合には、Fig. 4に示すように吸光値のバラつきは小さく、安定した結果が得られた。

3.3 振とう条件

藻類試験では、静置の場合と比較して、振とう条件の方が、気相と液相のガス交換が活発となり、藻類の増殖は促進されることが考えられる²⁰。また、三角フラスコを用いた標準的なAGP試験においても、基本的な培養条件としては、振とう条件が設定されている²⁴。マイクロプレートを用いたAGP試験について、振とう条件の影響を見るため、多摩川河川ろ液を用いて藻類の培養を行い、振とう速度を80rpmから120rpmまで変化させた場合の藻類増殖への影響を観察した。その結果をFig. 5に示す。

Fig. 5より、振とう速度の違いによる藻類増殖への影響は、ほとんど見られなかった。振とう速度が80rpmから120rpmへと上昇した場合、藻類の増殖速度に影響が出ることも考えられたが、培養初期の対数増殖期においても、振とう速度の影響は観察されなかった。また、藻類の増殖が横ばいとなった定常期においても、増殖量の差はほとんど観察されず、振とう速度の違いは、AGPの値に影響を及ぼさないと考えられた。一方、マイクロプレートを用いたAGP試験において、サンプルによっては藻類のプレート底面への付着が観察される場合があったことから、藻類の分散を促進するため、本研究では振とう速度を120rpmと設定した。

3.4 マイクロプレート内における藻類増殖量の差

マイクロプレートにおいては、プレート内における各ウェル間で光条件等が若干異なってくるため、プレート内で藻類の増殖量に差が出てくる可能性がある。ここでは、マイクロプレート内における藻類増殖量の差について検討を行った。

多摩川河川ろ液をマイクロプレート全面にまいてAGP試験を行い、藻類増殖量を測定した。その結果をFig. 6に示す。また、プレート内における各ウェルの位置を示し

Fig. 5 Effect of shaking condition to algal growth.

たマイクロプレート平面図をFig. 7に示す。Fig. 6(a)では、培養開始から14日目の吸光度について、第1～12列までの列方向の平均値を示している。また、Fig. 6(b)では、同様に培養開始から14日目の吸光度について、A～F行までの行方向の平均値を示している。

Fig. 6(a)の結果より、第1～12列までの各列において吸光度の差はほとんど認められず、各列において藻類増殖量の差は観察されなかった。また、Fig. 6(b)における行方向の結果より、A～F行についても吸光度の差はほとんど認められず、各行において藻類増殖量の差は見られなかった。これらの結果より、マイクロプレートを用いたAGP試験において、プレート内の各ウェル間における藻類増殖量の差は少なく、プレートのウェル位置による影響は小さいことが分かった。マイクロプレートを用いたアッセイにおいては、マイクロプレートの周縁ウェルにおけるエッジ効果が懸念され、周縁ウェルはアッセイに用いられないこともある。マイクロプレートを用いたAGP試験においても、周縁ウェルは他のウェルと比較した場合、光条件等が異なってくることも考えられたが、マイクロプレートのウェル間で

(a) Average of column absorbance.

(b) Average of row absorbance.

Fig. 6 Algal growth in the microplate.

Fig. 7 Plane view of the microplate.

藻類増殖量の差はほとんど観察されなかった。

3.5 藻類の初期細胞濃度の検討

ここでは、マイクロプレートを用いたAGP試験に関して、初期細胞濃度の影響について検討を行った。実験では、藻類の初期細胞濃度を $1,000 \sim 100,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ の間で変化させ、AAP培地および多摩川河川水をサンプルとしてAGP試験を実施した。結果をFig. 8に示す。

Fig. 8の結果より、培養初期における対数増殖期には、藻類細胞濃度に関して差が見られるが、藻類の増殖が横ばいとなった定常期においては、増殖量の差はほとんど見られなかった。AAP培地および多摩川河川水ともに同様な傾向が示されており、初期細胞濃度の違いによってAGPの値には差は生じないと考えられる。通常のAGP試験では、藻類の初期細胞濃度に関して、*Pseudokirchneriella*属では $1,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*Microcystis*属については $10,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ が推奨されている^{24,25)}。一方、藻類への毒性影響を観察する藻類生長阻害試験については、*Pseudokirchneriella*属の初期細胞濃度として $10,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ が推奨されている^{27,28)}。

Fig.8 Effect of initial cell concentration to algal growth.

Fig.9 Relationship between flask and microplate AGP test.

本研究で検討を行ったマイクロプレートを用いたAGP試験系については、マイクロプレートを用いて、AGP試験と藻類生長阻害試験を並行して実施することも想定し、AGP試験の初期細胞濃度を $10,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ と設定した。

3.6 マイクロプレートおよび三角フラスコを用いたAGP試験の比較

マイクロプレートを用いたAGP試験の適用性を見るため、マイクロプレートおよび三角フラスコを用いたAGP試験の結果について比較を行った。多摩川河川水および多摩川へ流入する下水処理水のサンプルについて、マイクロプレートを用いたAGP試験と従来から実施されてきた三角フラスコを用いたAGP試験を同時に実施し、両者の比較を行った。その結果をFig. 9に示す。

Fig. 9より、マイクロプレートによるAGP試験の値は、従来の三角フラスコを用いたAGP試験の値と高い相関関係が見られた ($R^2=0.94$)。このことから、マイクロプレートを用いたAGP試験は、水域の富栄養化の程度を評価するために、有用な手法であると考えられる。マイクロプレートを用いたAGP試験は、従来から実施されている三角フラスコを用いたAGP試験と比較して、試験に必要なサンプル量が少量で済むこと、試験の実施に必要な場所が小規模で済むことといったメリットがある。また、マイクロプレートリーダーを用いた測定を行うことにより、測定のための操作が簡便化できることから、多数のサンプルを迅速に処理する方法として有用であると考えられる。

マイクロプレートを用いたAGP試験に関して、AAP培地を用いた繰り返し測定からAGPの標準偏差 (S) を求め、その3倍 (3S) を検出下限値、10倍 (10S) を定量下限値と定義すると、検出下限値は $9.3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、定量下限値は $31.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ となった。

3.7 多摩川におけるAGPの変化

都市河川である多摩川においてサンプル採取を行い、本研究で検討を行ったマイクロプレートを用いたAGP試験により、多摩川におけるAGPの変化を調べた。その結果をFig. 10に示す。また、Fig. 11には、多摩川における無機態

Fig.10 Change of AGP level in the Tama River.

Fig.11 Changes of inorganic nitrogen and phosphorus concentration in the Tama River.

Fig.12 Change of N/P ratio in the Tama River.

窒素 ($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$, DIN) および無機態リン ($\text{PO}_4\text{-P}$, DIP) 濃度の変化を示す。

調査地点の最上流部に位置しているSt.1においては、下水処理水の流入を受けていないことから、窒素・リンといった栄養塩類濃度も低く、AGPは低い値であった。しかし、下水処理水 (STP-1) が合流するSt.2においては、栄養塩類濃度の上昇とともにAGPの上昇が見られた。また、下流側に位置しているSt.4およびSt.5においてもAGPの低下はほとんど見られず、この区間において藻類の増殖促進物質は低減せず、高い値が維持されることが確認された。調査地点の最下流部に位置するSt.6では、再度下水処理水 (STP-3) の流入を受け、AGPの上昇が見られた。河川への下水処理水の流入により、AGPの大きな上昇が観察されたことから、河川の富栄養化に対する下水処理水の影響は大きいことが分かる。

Fig. 12に、多摩川における無機態窒素および無機態リンの比 (原子比) を示す。この図において、St.1では無機態リンが検出されなかったため、N/P比の値は示していない。Fig. 12より、各地点においてN/P比は27~31の間で変化し、地点間で大きな差は認められなかった。Redfieldら²⁹⁾は、代表的な藻類の元素組成として、N/P=16 (原子比) という値を提示している (Redfield ratio)。また、Rheeら³⁰⁾およびElrifiら³¹⁾は、淡水域に生息する藻類の最適N/P比 (原子比) について調べており、ラン藻類の*Microcystis*属については9、緑藻類の*Selenastrum*属は15~22、珪藻類の*Synedra*属については10という値を報告している。多摩川におけるN/P比は、これらの報告値を上回る値となっており、窒素およびリンという元素を考えた場合には、藻類の増殖に関して、リン制限である可能性が示唆される。一方、河川において優占することの多い藻類として珪藻類を考慮した場合には、河川水中のケイ素の存在量が問題となる。多摩川中流域におけるケイ酸測定値としては、 $15.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ という値が報告されている³²⁾。このケイ酸の値と、無機態窒素および無機態リン濃度の平均値より窒素、リンおよびケイ素の比を計算したところ、N:P:Si=27:1:20 (原子比) という値が得られた。Redfieldら²⁹⁾は、ケイ素を含めた藻類の元素組成として、N:P:Si=16:1:16という値を提示している。多摩川での値とRedfieldらの値を比較した場合、多摩川においては、リンと比較して窒素およびケイ素の存在比が大きく、ケイ素を考慮した場合においても、藻類の増殖に関してリン制限である可能性が示唆される。

マイクロプレートを用いたAGP試験の結果より、多摩川において、下水処理水の流入を受けていない上流域においては、AGPは低い値であるが、下水処理水の流入により栄養塩類濃度が高くなるとともに、AGPは高い値となり、河

川における藻類の増殖が著しく促進される可能性のあることが示唆された。また、本研究で検討を行ったマイクロプレートを用いたAGP試験により、水域における富栄養化の評価が可能であることが示された。

4. ま と め

本研究では、マイクロプレートを用いたAGP試験について、その基礎的検討を行うとともに、都市河川である多摩川を対象として、その試験法の適用を試みた。本研究で得られた主な結果は、以下の通りである。

1) マイクロプレートリーダーによる波長450nmの吸光度と藻類細胞濃度との間には高い相関が認められ、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度の測定を行うことにより、藻類細胞濃度の測定を行うことが可能であることが示された。

2) マイクロプレート内における藻類増殖量の差異について検討を行った。その結果、マイクロプレート内の各ウェル間で藻類増殖量の差はほとんど認められず、マイクロプレートを用いたAGP試験において、ウェル位置による影響は小さいと考えられた。

3) マイクロプレートを用いたAGP試験に関して、初期細胞濃度の影響について検討を行った。初期細胞濃度を $1,000 \sim 100,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ の間で変化させて培養を行ったところ、藻類の最終増殖量については差が見られず、初期細胞濃度の違いは、AGPの値には影響しないと考えられた。

4) マイクロプレートを用いたAGP試験の適用性を見るため、マイクロプレートおよび三角フラスコを用いたAGP試験の比較を行った。その結果、両者の間には高い相関関係が認められ、マイクロプレートを用いたAGP試験は、三角フラスコを用いたAGP試験と同様、水域の富栄養化の程度を評価する有用な方法であることが示唆された。

5) マイクロプレートを用いたAGP試験により、多摩川におけるAGPの変化を調べた。その結果、下水処理水が流入していない多摩川上流部ではAGPは低い値であるが、下水処理水の流入によりAGPの大きな上昇が観察され、河川の富栄養化に対する下水処理水の影響は大きいことが示された。

(原稿受付 2004年11月26日)

(原稿受理 2005年 6月15日)

参 考 文 献

- 1) Watanabe, M.F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H. and Suzuki, M. (1988) Toxins contained in *Microcystis* spp. of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon*, 26, 1017-1026.
- 2) Kaya, K. and Watanabe, M.M. (1990) Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis* containing waterblooms in Japanese freshwaters, *J. Appl. Phycol.*, 2, 173-178.
- 3) Park, H.-D., Watanabe, M.F., Harada, K., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M. and Hayashi, H. (1993) Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (Anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural Toxins*, 1, 353-360.
- 4) 渡辺真利代 (1994) 有毒藍藻の出現、アオコ・その出現と毒素、東京大学出版、55-73.
- 5) Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Ward, C.J., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H. and Codd, G.A. (1998)

- Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *Lancet*, **352**, 21-26.
- 6) Goodman, T.K., Falconer, I. and Fitzgerald, J. (1999) Human health aspects, *Toxic Cyanobacteria in Water, A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, World Health Organization, 113-153.
- 7) 須藤隆一, 森忠洋, 岡田光正 (1973) 藻類培養試験による富栄養化の評価, 用水と廃水, **15**, 107-116.
- 8) 竺文彦, 北尾高嶺, 岩井重久 (1977) 藻類増殖試験法に関する基礎的研究, 用水と廃水, **19**, 325-334.
- 9) 岡田光正, 須藤隆一 (1978) AGPをめぐる諸問題, 用水と排水, **20**, 765-779.
- 10) 須藤隆一, 田井慎吾, 矢木修身, 岡田光正, 細見正明, 山根敦子 (1981) 藻類の培養試験法によるAGPの測定, 国立公害研究所研究報告第26号, 1-51.
- 11) 矢木修身, 須藤隆一, 今岡 務, 寺西靖治 (1984) 赤潮生物による都市下水のAGP, 国立公害研究所研究報告第63号, 231-242.
- 12) Lee, Y.S., Seiki, T., Mukai, T., Takimoto, K. and Okada, M. (1996) Limiting nutrients of phytoplankton community in Hiroshima Bay, Japan, *Water Research*, **30**, 1490-1494.
- 13) 大月敏弘, 小倉紀雄 (1980) 藻類培養試験 (AGPの測定) による南浅川の富栄養化の評価, 用水と廃水, **22**, 317-322.
- 14) Miller, W.E., Maloney, T.E. and Greene, J.C. (1974) Algal productivity in 49 lake waters as determined by algal assay, *Water Research*, **8**, 667-679.
- 15) 矢木修身, 萩原富司, 高村義親, 須藤隆一 (1987) 霞ヶ浦における藻類増殖の制限物質, 水質汚濁研究, **10**, 115-122.
- 16) 矢木修身, 大久保紀男, 富岡典子, 岡田光正 (1989) 牛久沼における藻類増殖の制限物質, 陸水学会誌, **50**, 139-148.
- 17) Pardos, M., Benninghoff, C., Gueguen, C., Thomas, R., Dobrowolski, J. and Dominik, J. (1999) Acute toxicity assessment of Polish (waste) water with a microplate-based *Hydra attenuata* assay: a comparison with the Microtox test, *Sci. Total Environ.*, **141**, 243-244.
- 18) 松井宏樹, 滝上英孝, 松田知成, 清水芳久, 松井三郎 (1998) マイクロプレートを用いた枯草菌rec-assayの開発とその評価, 環境工学研究論文集, **35**, 313-318.
- 19) Trotter, S., Blaise, C., Kusui, T. and Johnson, E.M. (1997) Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay, *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **12**, 265-271.
- 20) White, P.A., Rasmussen, J.B. and Blaise, C. (1996) A semi-automated, microplate version of the SOS Chromotest for the analysis of complex environmental extracts, *Mutat. Res.*, **360**, 51-74.
- 21) Radetski, C.M., Marcos, J.-F. and Blaise, C. (1995) A Semistatic Microplate-Based Phytotoxicity Test, *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 299-302.
- 22) Cote, C., Blaise, C. and Delisle, C.E. (1995) A miniaturized Ames mutagenicity assay employing bioluminescent strains of *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, **345**, 137-146.
- 23) Blaise, C., Forghani, R., Legault, R., Guzzo, J. and Dubow, M.S. (1994) A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent, *Biotechniques*, **16**, 932-937.
- 24) 日本下水道協会 (1997) AGP試験, 下水試験方法 上巻 (1997年版), 554-562.
- 25) 日本水質汚濁研究協会 (1982) 藻類生産潜在力調査 (AGP試験), 湖沼環境調査指針, 公害対策技術同友会, 193-199.
- 26) 松原正明, 原田新, 田中宏明 (1997) 藻類増殖阻害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, **20**, 768-775.
- 27) OECD (1984) OECD Guideline for Testing of Chemicals 201, Algae, Growth Inhibition Test.
- 28) ASTM (2000) Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae, E1218.
- 29) Redfield, A.C., Ketchum, B.H. and Richards, F.A. (1963) The influence organisms on the composition of sea-water, *The Sea*, Interscience, New York, 26-77.
- 30) Rhee, G.Y. and Gotham, I.J. (1980) Optimum N:P ratios and the co-existence of planktonic algae, *J. Phycol.*, **16**, 468-489.
- 31) Elrifi, I.R. and Turpin, D.H. (1985) Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta), *J. Phycol.*, **21**, 592-602.
- 32) 河川環境管理財団 (2003) 河川水質の栄養塩類濃度の現状と推移, 栄養塩類濃度が河川水質環境に及ぼす影響に関する研究, 河川整備基金報告書, 61-96.