

藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験方法の構築

保月勇志・吉舎直輝

Establishment of the growth inhibition test using cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*

Takeshi HOZUKI, Naoki KISA

1. はじめに

福井県の三方五湖と北潟湖はいずれも淡水と海水が混ざる汽水湖である。汽水湖は、河川の末端に位置する地理的条件から、流域の負荷が集積しやすい水域¹⁾であり、流域の水田、畑、住居、事業場等の排水中に含まれる栄養塩や化学物質等が湖に集積することとなる。このことにより、有機汚濁が進行しやすく、一方で、湖に棲息する生物としては流域からの化学物質等の影響を直接受けやすい環境となる。

湖水中の植物プランクトンは有機汚濁の主要因であるとともに、一次生産者として水圏生態系の基底をなす生物である。そのバイオマス量や種構成は、湖沼の水質や水圏生態系を左右する極めて重要な要素である。

そのため著者らは、令和3年度から、「微生物を用いた試験による湖沼環境の影響評価に関する研究」を開始した。この研究では、湖内の植物プランクトンが流域負荷から受ける増殖や生長阻害の影響を室内実験系の生物応答試験を用いて評価することを目的としている。今回、流入水による湖内の植物プランクトンの生長阻害の影響を評価するために、藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験を構築したので報告する。

2. 方法

生長阻害試験は、事業場排水の管理方法として米国などで採用されている全排水毒性 (Whole Effluent Toxicity: WET) 試験^{2,3)}を参考とした。ただし、WET試験において広く用いられている緑藻のムレミカヅキモ (*Raphidocelis subcapitata*) は、国内種でないことや、三方五湖および北潟湖に存在しないため、これまで当該湖で観測されている種であり、またフローサイトメーターで測定可能な種として藍藻の *Microcystis aeruginosa* を試験生物として採用した。また、作業の省力化と試料量の削減を図るため、培養容器として従来の三角フラスコに代えてウェルプレートを採用した。

構築した試験系の精度評価については、コントロール試験(n=6)を実施し、藻類生長阻害試験の規範となっている OECD テストガイドラインの評価基準³⁾と比較した。

2.1 培養

試験に用いた *Microcystis aeruginosa* (NIES-102)は、国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲を受け、シリコ栓付き試験管を用いて、MA 培地により維持培養した。前培養は、ガラス製三角フラスコ(300mL)に OECD 培地 100mL を入れ、維持培養液を 1mL 程度添加し、シリコ栓をして 5 日～7 日培養した。本試験は表 1 の条件で行った。

表 1 試験条件

試験生物	藍藻 <i>Microcystis aeruginosa</i> (NIES-102)
培地	OECD 培地濃縮液 I、III、IV：富士フィルム和光純薬㈱社製 OECD 培地濃縮液 II (FeCl ₃ ・6H ₂ O 64 mg/L、Na ₂ EDTA・2H ₂ O 100 mg/L)：フィルターろ過滅菌 (用時調整)
温度	25℃
初期濃度	100,000 cell/mL
照明条件	明期 10 時間、暗期 14 時間
照度	20 μ photons/m ² /s
振とう	50 rpm
培養容器	γ 滅菌済みの PS 製 6 穴ウェルプレート (Corning 社製)
容量	5 mL

2.2 細胞濃度の計数

細胞濃度の計数は、0、1、2、3、4、7 日目に行い、フローサイトメーター (Beckman Coulter 社製 CytoFLEX) を用いて計数した。なお、i 日から j 日の期間における生長速度は次式により算出した。

$$\text{生長速度 } i-j = \frac{\ln(\text{細胞濃度 } j) - \ln(\text{細胞濃度 } i)}{j-i} \quad (\text{単位: day}^{-1})$$

3. 結果

3.1 構築した試験系の精度確認

OECD テストガイドラインでは、バイオマス量が初期値の 16 倍になること、併行試験間の区間成長速度および平均成長速度の変動係数 (CV) がそれぞれ 35%未満、10%未満であることが求められている³⁾。

コントロール試験における生長曲線は図 1 のとおりであり、細胞濃度が初期値の 16 倍となるまで 7 日を要したが、試験期間中は対数増殖していることを確認した。また、生長速度のばらつきは、区間成長速度 (1~2 日、2~3 日、3~4 日、4~7 日) の CV の最大値は 19%、平均成長速度の CV が 2%であり OECD テストガイドラインの基準を満たすことを確認した (表 2)。

4. 考察

4.1 試験生物

今回の研究では、試験生物として藍藻 *Microcystis aeruginosa* (NIES-102) を選定した。本株は初期濃度の 16 倍になるまで 1 週間を要することがわかったが、基本的に 3 日間で試験が終了する *Raphidocelis subcapitata* と比較した場合、試験中のサンプリングの回数が増えること

や、管理が煩雑になる点が短所として挙げられる。また、環境水を試料に用いる際は、試験期間中に農薬などの化学物質が分解するおそれがあることなどへの留意が必要である。しかし、*Microcystis aeruginosa* は三方五湖や北潟湖の優占種になったことがある種であることから、実際の湖において起こりうる水環境への影響を捉えるためには有効であり、また、周辺住民の水環境への理解を促す点でも有効であると考えられた。

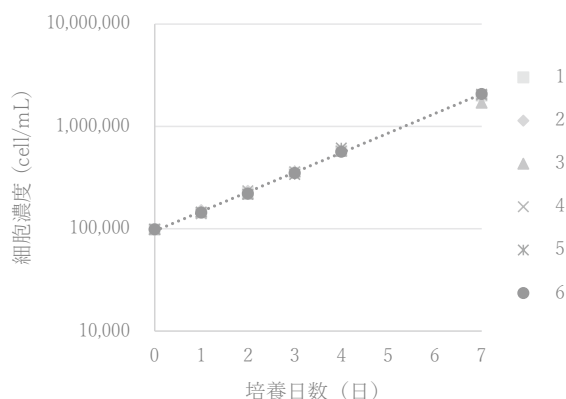


図1 コントロール試験の生長曲線

4.2 ウェルプレートを用いた試験

本研究では、ウェルプレートを用いた試験系を構築することで、従来の三角フラスコを用いた試験系に比べて作業を省力化でき、また、試料量の削減が可能であることが確認できた。しかし、本試験系を構築するにあたって、ウェルプレートの使用にはいくつかの注意点があることがわかった。

1点目は、試験期間中に培養液の蒸発を防ぐ必要があることである。これは、振とうにより液面が揺れることで水分が蒸発しやすく、またウェルプレートが密閉されていないため蒸気がウェルプレートの系外に逃げやすいことが原因と考えられた。ウェルプレートを用いた試験系では試料量が少ないため、少量の蒸発でも細胞濃度への影響は大きい。この対応策として、本体とカバーの間に透明なシールをする方法⁴⁾が有効であった。

2点目は、試験期間中の光条件を各ウェル間で一定にする

必要がある点である。この対応として、各プレートを細胞濃度の測定毎に180度回転させる方法⁵⁾が有効であった。なお、複数のプレートを使用する場合は、培養器の中の光条件が一定ではないため、設置する位置もランダムにするなどの工夫が必要である。さらに、環境水を評価する際には、容器の素材がPS等のプラスチックであることにより一部の重金属や農薬が吸着する可能性がある点にも注意する必要があると考えられる。

5. まとめ

藍藻 *Microcystis aeruginosa* を用いた生長阻害試験を構築し、コントロール試験を実施したところ、OECDテストガイドランの評価基準に適合した。本試験系では、ウェルプレートを使用することにより省力化が実現できたが、いくつかの留意点があることもわかった。今後は、確立した試験法を用いて、三方五湖および北潟湖の流入河川を対象とした調査を実施する予定である。

謝辞

本研究は、文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により実施したものです。感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 環境省：日本の汽水湖～汽水湖の水環境の現状と保全～(2014)
- 2) 環境省・国立環境研究所：生物応答を用いた排水管理法(検討案)(2013)
- 3) OECD：Fresh Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Guidelines for the Testing of Chemicals NO.201 (2006)
- 4) Environment and Natural Resources in Canada：Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga, Environmental Protection Series (2007)
- 5) Wisconsin Department of Natural Resources Bureau of Watershed Management：Aquatic Life Toxicity Testing Methods Manual (2004)

表2 生長阻害試験の評価

	細胞濃度(cell/mL)						平均生長速度	区間生長速度 (day ⁻¹)						
	0 day	1 day	2 day	3 day	4 day	7day		1-7day	0~1	1~2	2~3	3~4	4~7	CV
1	98,900	143,260	225,390	352,720	580,160	1,993,680	0.43	0.37	0.45	0.45	0.50	0.41	11%	
2	98,900	152,640	236,070	353,260	573,720	1,969,530	0.43	0.43	0.44	0.40	0.48	0.41	7%	
3	98,900	147,140	220,460	364,820	578,200	1,710,530	0.41	0.40	0.40	0.50	0.46	0.36	13%	
4	98,900	140,610	235,820	360,160	573,850	2,025,740	0.43	0.35	0.52	0.42	0.47	0.42	14%	
5	98,900	146,270	217,810	340,230	615,560	2,062,720	0.43	0.39	0.40	0.45	0.59	0.40	19%	
6	98,900	144,430	220,900	351,720	567,790	2,082,040	0.44	0.38	0.42	0.47	0.48	0.43	9%	
							平均値	0.43	<35% *					
							SD	0.01						
							CV	2%	<10% *	*OECD TG201の評価基準				