

## 河川付着性珪藻を用いた生長阻害試験方法の開発

### Development of A Growth Inhibition Test Method Using Fresh Water Attached Diatoms

石原 悟<sup>1</sup>, 堀尾 剛<sup>1</sup>, 小原裕三<sup>1</sup>, 横山淳史<sup>1</sup>, 真山茂樹<sup>2</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人農業環境技術研究所有機化学物質研究領域 / 〒305-8604茨城県つくば市観音台3-1-3

<sup>2</sup>東京学芸大学生物学教室 / 〒184-8501 東京都小金井市貫井北町 4-1-1

**Satoru ISHIHARA<sup>1</sup>, Takeshi HORIO<sup>1</sup>, Yuso KOBARA<sup>1</sup>, Atsushi YOKOYAMA<sup>1</sup> and Shigeki MAYAMA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Organchemicals Division, National Institute for Agro-Environmental Sciences/  
3-1-3 Kannondai, Tsukuba, 305-8604, Japan

<sup>2</sup>Department of Biology, Tokyo Gakugei University/  
4-1-1 Nukuikita-machi, Koganei-shi, Tokyo, 184-8501, Japan

#### ABSTRACT

A growth inhibition test method using fresh water attached diatoms was developed by improving microplate algal assay technique for planktonic green algae. Applying the solid culture technique for the pre-culture, using the flat bottom microplate for the test vessel and shaking the microplate at least twice a day were necessary procedures for ensuring the reproducibility of the test using attached diatoms.

Reproducible result was obtained from seven repetitions of growth inhibition tests using dimethametryn, a triazine herbicide on *Achnanthes minutissimum* of attached diatom. The average  $ErC_{50}$  values calculated from these tests was  $7.9 \mu\text{g/l}$  ( $n=7$ ,  $SE=1.3$ ).

The optimum culture condition and the adaptability as test organism were evaluated in ten kind of attached diatoms (*A. minutissimum*, *Craticula molestiformis*, *Eolimna minima*, *Eolimna subminuscula*, *Fistulifera saprophila*, *Mayamaea atomus*, *Nitzschia palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Planothidium lanceolatum*, *Sellaphora seminulum*).

The optimum culture temperature was 15-30°C. The difference of illumination intensity (c.a.2,000lux or c.a.5,000lux) did not influence the growth rate of every diatom at the optimum culture temperature. It is concluded that *C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus* and *N. palea* are suitable test species in these diatoms in terms of high growth potential and that *M. atomus* and *N. palea* are valuable test species in terms of habitat diversity and easiness of isolation.

**Key words:** attached diatom, growth inhibition test, herbicide, ecological risk assessment

## 1. はじめに

農薬等化学物質の生態影響評価の初期段階では、陸水生態系の一次生産者に対する影響評価を目的に、単細胞の藻類を用いた生長阻害試験の結果が利用されている。現在、藻類の生長阻害試験に最もよく使用されている種は、淡水産浮遊性緑藻の *Pseudokirchneriella subcapitata* である。本種は OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), USEPA (United States Environmental Protection Agency) 等の試験指針<sup>1-4)</sup> で推奨試験生物に指定されている。

淡水産付着性珪藻は流れのある水域で優位に生息が可能であり<sup>5)</sup>、概して流れの速い日本の河川では他の付着性藻類と共に優占種として一次生産を支えている<sup>6)</sup>。河川の一次生産性に対する化学物質の影響評価をより現実の環境に即して行うには、浮遊性緑藻のみでなく淡水産付着性珪藻に及ぼす影響を明らかにすることが重要である<sup>7)</sup>。淡水産付着性珪藻の生態については、水質汚濁との関係についての研究が進んでおり、我が国においても河川の有機汚濁度の指標生物として利用されている<sup>8-12)</sup>。しかし、ここで言う有機汚濁は河川の腐水性体系を示しており、農薬等有機合成化学物質による汚染は含まれていない。そのため、農薬等有機合成化学物質による汚染と淡水産付着性珪藻の生態に関する研究報告は、除草剤抵抗性に関する研究を除き限られている<sup>13-22)</sup>。

珪藻を用いた生長阻害試験については、USEPA<sup>4)</sup>、及び ISO (International Standards Organization)<sup>23)</sup> 等で試験指針が定められている海産浮遊性珪藻 *Skeletonema costatum* を用いた報告が最も多い。淡水産付着性珪藻については、USEPA の試験指針で *Fistulifera pelliculosa* が推奨種として示されている。また近年、OECD では藻類生長阻害試験の試験指針の改定が進められており、*F. pelliculosa* は OECD の試験指針においても推奨種として検討されている<sup>2)</sup>。このように一部の種類については試験法が示されてはい

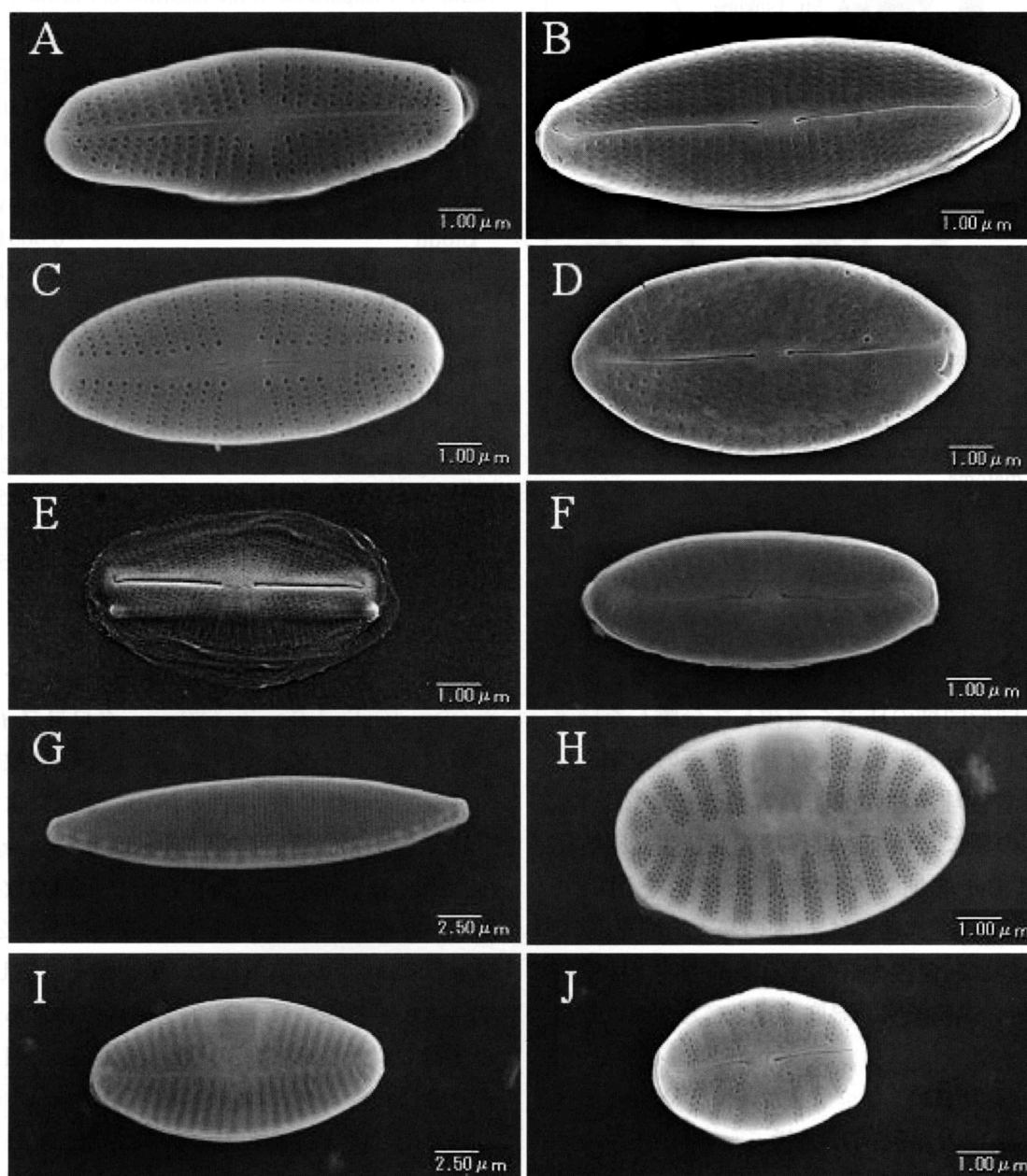
るものの、現行の藻類生長阻害試験は液体培養で安定した継代培養が可能な浮遊性の藻類及び付着性の低い藻類に適用が限られている。これは、多くの付着性珪藻は液体培養条件下では培養容器壁面への付着性が高いため液体培養での安定した培養が難しく、現行の試験指針への適用が難しいことが要因となっている。

そこで、本研究では付着性の高い淡水産付着性珪藻の薬剤感受性を検定できる生長阻害試験の方法を検討すると共に、本試験方法に適用可能な珪藻の種類について検討を行った。

## 2. 実験材料及び方法

### 2.1 試験生物

本研究では、試験生物として 10 種の淡水産付着性藻類 (*Achnanthydium minutissimum*, *Craticula molestiformis*, *Eolimna minima*, *Eolimna subminuscula*, *Fistulifera saprophila*, *Mayamaea atomus*, *Nitzschia palea*, *Planothidium frequentissimum*, *Planothidium lanceolatum*, *Sellaphora seminulum*) を使用した。試験法の検討は無菌の単藻株である *A. minutissimum* を用いて行い、その他の種については非無菌の単藻株を用いて最適培養条件を検討し、試験法への適用性を評価した。Fig. 1 に走査型電子顕微鏡 (KEYENCE, VE-8800) で撮影した各珪藻の被殻像及び採集地点を示す。珪藻の同定は走査型電子顕微鏡による被殻像を元に行った。*A. minutissimum* は財団法人地球・環境フォーラム (現 独立行政法人国立環境研究所・環境研究基盤技術ラボラトリー) より分与された NIES-71 株を使用した。その他の種については 2005 年 6 月 27 日に茨城県つくば市を流下する逆川の臼井 (①: 上流域) 及び桜川の君島 (②: 中流域) 河床石表面から分離し、継代培養しているものを使用した。なお、君島は周囲に水田が分布する水田排水の流入のある地点であり、臼井は上流に水田がない水田排水の影響を受けない地点であった (Fig. 2)。両地点において石表面より採集した珪藻群集試料 ( $n=30$ ,



A: *Achnantheidium minutissima* (NIES-71) B: *Craticula molestiformis* (Kimijima)  
 C: *Eolimna minima* (Kimijima) D: *Eolimna subminuscula* (Kimijima)  
 E: *Fistulifera saprophila* (Kimijima) F: *Mayamaea atomus* (Kimijima)  
 G: *Nitzschia palea* (Usui) H: *Planothidium frequentissimum* (Kimijima)  
 I: *Planothidium lanceolatum* (Kimijima) J: *Sellaphora seminulum* (Kimijima)

(parenthetical reference means strain No. or sampling point)

Fig. 1. SEM micrographs of tested attached diatoms.

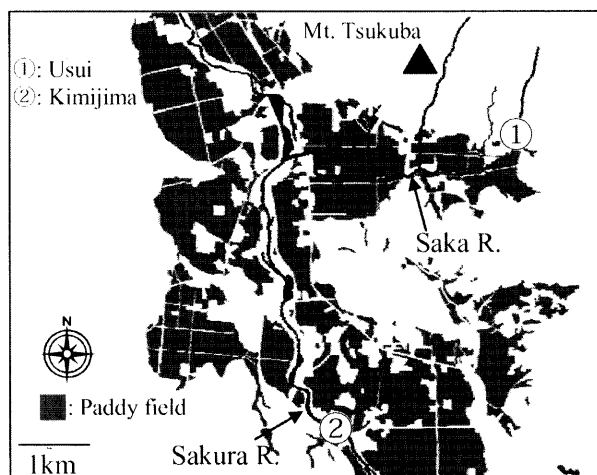


Fig. 2. The location of sampling sites of attached diatoms.

各地点それぞれ30個の石より採集)より、同試料から同形同種の珪藻を重複して分離しないよう注意し、寒天平板法で付着性珪藻の分離を試み、付着性珪藻種の分離の容易さを評価した。いずれの種においても継代培養及び生長阻害試験には Csi 培地<sup>24)</sup>を改変した培地を用いた (Table 1)。継代培養は1.5%の寒天培地を用い、培養条件は白色蛍光灯による上部照明で照度約2,000 lux、連続照明、温度 20±2°Cとした。

## 2.2 生長阻害試験

### 2.2.1 細胞数計測手法の定量性

試験方法の開発に先立ち、試験の定量性の評価を目的に、以下の3点(①-③)について検討を行った。① 培地の蒸発量：マイクロプレートの各ウェルにおける試験期間中の培地の蒸発量を明らかにした。培地の蒸発量は精密秤 (Mettler, AC100) で試験開始前及び72時間後に各ウェル中の培地の重さを測定し比較した。試験培地量は 200 µl/well とした。培養器内の湿度は、湿度計 (testo, test 400) で測定した。なお、本試験では、珪藻の接種は行わなかった。② 生物量の定量性：マイクロプレートリーダー

Table 1. Composition of the modified Csi-medium.

Component	mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	150
KNO <sub>3</sub>	100
Na <sub>2</sub> ·glyceroPO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	50
VitaminB <sub>12</sub>	0.0001
Biotin	0.0001
Thiamine HCl	0.01
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	500
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	100
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.59
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.012
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.075
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.066
	pH7.5

(BIO-RAD, Model550 Microplate Reader) を用いた OD<sub>680</sub> (Optical Density 680 nm; クロロフィル a の吸収帯のピーク波長) 測定による細胞数計測の定量性を評価した。評価は OD<sub>680</sub> 測定による測定値とトーマ血球計算盤 (Kayagaki irikakogyo co., Ltd., Haemacytometer) を用いた細胞数の計測結果を比較して行った。試験開始時及び24時間毎の72時間まで OD<sub>680</sub> 及び細胞数を計測した。試験は6連で行った。③ 各ウェルにおける生長の変動：培養72時間後の OD<sub>680</sub> を測定し、1プレート中におけるウェル間の *A. minutissimum* の生長速度の変動を評価した。静置培養と1日に2回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌する培養方法での変動を比較すると共に、2種類のマイクロプレート (U底及び平底) 間での変動を比較した。試験は60連 (1プレート96ウェル中における縁の36ウェルを除いた60ウェル) で行った。試験終了時にウェル底面への細胞の付着を倒立顕微鏡 (Leica, DM IRB) で観察し、付着の均一性を観察した。いずれの試験もその他の試験条件は後述の生長阻害試験方法に準じて行った。

### 2.2.2 *A. minutissimum*の最適培養条件の検討

試験法の開発に使用した *A. minutissimum* の最適培養条件を検討した。異なる温度 (10,15,20,25 及び 30°C), 及び照度条件 (2,000 及び 5,000lux) で培養し, 最適培養条件を検討した。試験は 3 連で行った。その他の試験条件は後述の生長阻害試験方法に準じて行った。試験開始直後及び 24 時間毎に 72 時間後まで OD<sub>680</sub> を測定し, 試験開始時から 72 時間後における生長速度 ( $\mu$ 0-72h) を算出した。 $\mu$ 0-72h から倍加時間 (*Dt*) を求め, 最適な培養条件の検討を行った。以下に  $\mu$ 0-72h 及び *Dt* の算出方法を示す。

$$\mu_{0-72h} = \ln(OD_{680}72h / OD_{680}0h) / 72 \quad \dots\dots(1)$$

$$Dt = \ln 2 / \mu_{0-72h} \quad \dots\dots\dots(2)$$

OD<sub>680</sub>72h : 培養 72 時間後における 680 nm の吸光度

OD<sub>680</sub>0h : 試験開始時における 680 nm の吸光度

### 2.2.3 生長阻害試験方法の検討

河川付着性珪藻を用いた生長阻害試験方法の検討は, カナダ環境省が公定法として示している 96 穴のマイクロプレートを利用した緑藻 *P. subcapitata* の生長阻害試験の試験指針<sup>25)</sup> を参考に行った。

試験生物調製の簡易化を目的に, 珪藻の前培養は寒天培地を用い静置培養で行った。前培養を 3-5 日間行い対数増殖期にある珪藻コロニーを滅菌した爪楊枝を用い回収し, 予め 1ml の液体培地を分注した 1.5ml の遠心チューブに懸濁した。ボルテックス及び卓上簡易遠心機を用い上澄み液が透明になるまで洗浄を繰り返し, これを試験生物とした。試験開始時の *A. minutissimum* の細胞数は約  $5 \times 10^4$  cells/ml (OD<sub>680</sub> ≒ 0.007/well に相当) とした。試験容器には低蒸発タイプの蓋付き・平底の 96 穴マイクロプレート

(FALCON<sup>®</sup> 35 1172 MICROTTEST<sup>™</sup> Flat Bottom) を用いた。試験培地量は 200  $\mu$ l/well とし, 195  $\mu$ l の培地に 5  $\mu$ l の試験生物を含む培地を加えることにより試験開始とした。珪藻の生長速度は OD<sub>680</sub> を計測して算出した。培養条件は温度 20 ± 2°C, 照度約 2,000lux (白色蛍光灯による上部連続照明) とし, 1 日に 2 回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌した。なお, 試験期間中に培地の蒸発を低減するため, 水を入れた腰高シャーレを培養器 (SANYO, MIR-153) 内に 2 つ置き, 培養器内を高湿度に維持した。

### 2.2.4 試験方法の再現性の評価

試験の再現性は, 被検物質としてトリアジン系除草剤の一つであるジメタメトリン (Wako 分析標準品 純度 > 99%) を用いて生長阻害試験を行うことにより評価した。試験は 6 連 9 濃度区 (公比:2.0, 設定最高濃度区:240  $\mu$ g/l) で行った。試験溶液中のジメタメトリン濃度は HPLC (High Performance Liquid Chromatography; 高速液体クロマトグラフィー, HITACHI 7000 シリーズ) を用いて試験開始時に測定を行った。助剤対照区における生長速度 (OD<sub>680</sub> 値の増加速度) との比較により各濃度区の生長阻害率を求め, 濃度-生長阻害曲線を作図し, 最小二乗法により半数生長阻害濃度 (ErC<sub>50</sub> 0-72h) を算出した。なお, ErC<sub>50</sub> 0-72h の算出には試験開始時におけるジメタメトリン濃度の分析値を使用した。本試験を繰り返し 7 回行い, 本試験方法の再現性を評価した。以下に生長阻害率 (*I* $\mu$ ) の算出方法を示す。

$$I\mu = 100 - ((\mu_{0-72hn} / \mu_{0-72hc}) \times 100) \quad \dots\dots(3)$$

$\mu_{0-72hn}$  : 試験区における生長速度

$\mu_{0-72hc}$  : 対照区における生長速度

### 2.2.5 試験溶液の調製法及び濃度分析法

ジメタメトリン分析用標準品 2mg を 200  $\mu$ l の

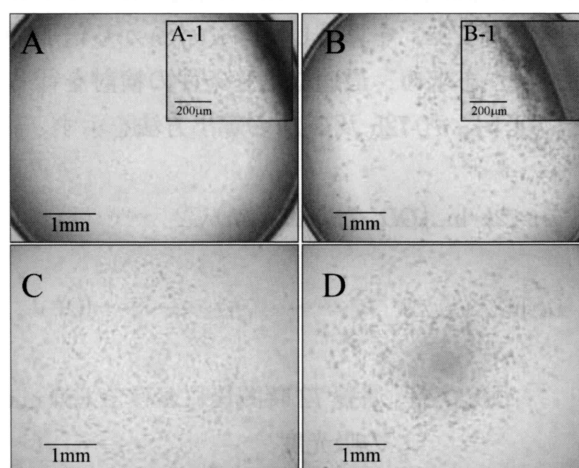
**Table 2.** HPLC condition for Dimethametryn analysis.

HPLC	Hitachi 7000 Series
Column	Wako Wakosil-II 5C18AR (4.6×250mm)
Guard Column	GL Sciences Cartridge Guard Column E (4.0×20mm)
Elution	Gradient elusion, methanol/water =65/35→100/0( 0-12min) 100/0 (12-15min)
Flow rate	1ml/min
Injection	10 μl
Detection	UV at 230nm

DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解した。この DMSO 溶液をスターラーで攪拌している液体培地 200ml 中に滴下し、試験溶液一次原液 (10mg/l 溶液) を作成した。一次原液を 10 倍に希釈した溶液を試験溶液二次原液 (1000 μg/l 溶液) とし、これを段階的に希釈し各試験濃度区の溶液を作成した。助剤対照区はジメタメトリン最高濃度区における DMSO 濃度と等しくなるよう培地に DMSO を添加し作成した。濃度分析は試験開始時の二次原液についてのみ行った。二次原液 1ml にメタノール 1ml を加え攪拌したものを分析試料 (500 μg/l 溶液) とし、HPLC を用いてジメタメトリンの濃度分析を行った。HPLC の分析条件は Table 2 に示した。

### 2.3 適用可能な珪藻種の検討

9 種の淡水産付着性珪藻 (*C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus*, *N. palea*, *P. frequentissimum*, *P. lanceolatum*, *S. seminulum*) について最適培養条件を検討した。試験は前述の *A. minutissimum* の最適培養条件を検討方法に準じて行い、(1), (2) 式を用い、Dt を求め、最適な培養条件の検討を行った。また、最適条件下における Dt 及び試験終了時の OD<sub>680</sub> 値を比較し、各付着珪藻の試験法への適用性を評価した。



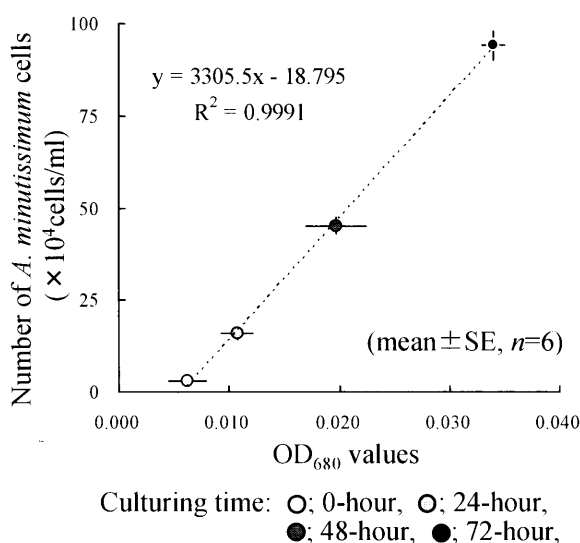
**Fig. 3.** Microscope images of *A. minutissimum* cells on the bottom of microplate well after 72 hours of culturing. A: Flat bottom, agitating twice a day., A-1: Closeup in edge part of A., B: Flat bottom, static culture. B-1: Closeup in edge part of B., C: U bottom, agitating twice a day., D: U bottom, static culture.

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 付着性珪藻を用いた生長阻害試験

#### 3.1.1 細胞数測定手法の定量性

試験期間中、培養器内に水を入れた腰高シャーレを置いたところ、送風機の作動中に若干の変動は認められるものの、培養器内の湿度は 80% 以上に維持された。本試験条件において 96 穴マイクロプレートの各ウェル中の培地は、試験条件下における 72 時間のインキュベートで平均 3.8% ( $n=96$ , 平均蒸発量: 7.1 μl/well, 変動係数: 3.0%) 蒸発した。しかし、蒸発量が多い縁のウェルを除くと平均蒸発率は 1.7% ( $n=60$ , 平均蒸発量: 3.3 μl/well, 変動係数: 0.4%) と低かった。



**Fig. 4.** Correlation of absorbance (OD<sub>680</sub>) and number of *A. minutissimum* cells. (The wavy line shows the regression line)

内側のウェルを試験に使う限りでは変動係数は0.4%と小さく、各ウェル間での差は小さいものと考えられた。なお、縁のウェルの平均蒸発率は6.9% (n=36, 平均蒸発量:13.5  $\mu$ l/well, 変動係数:2.5%)であった。

通常96穴マイクロプレートを用いた浮遊性緑藻の生長阻害試験では、丸底もしくはU底のマイクロプレートの使用が推奨されている<sup>25)</sup>。しかし、付着性珪藻を96穴マイクロプレートで培養する場合、丸底やU底では珪藻が各ウェル底の中心に偏って付着し生長するため (Fig. 3, C & D), 吸光度の計測による精確な細胞数の計測ができない。一方、平底の96穴マイクロプレートでは、各ウェル底面に珪藻が均一に付着し生長するため、再現性のある安定した珪藻密度の測定が可能となった。また、試験期間中に1日に2回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌することにより静置培養で発生するウェル縁部分への細胞の集積 (Fig. 3, B-1) を防止すると共に細胞をより均一にウェル底面に拡散することができ (Fig. 3, A-1), 各ウェル間での生長の変動をより抑制できた。4種の培養方法 (平底・攪拌あり, 平底・静置, U底・攪拌あり,

U底・静置) による培養72時間後のOD<sub>680</sub>の平均値 (n=60) 及び標準誤差は、それぞれ0.035 (SE=0.003), 0.027 (SE=0.008), 0.041 (SE=0.007), 0.072 (SE=0.014)であった。

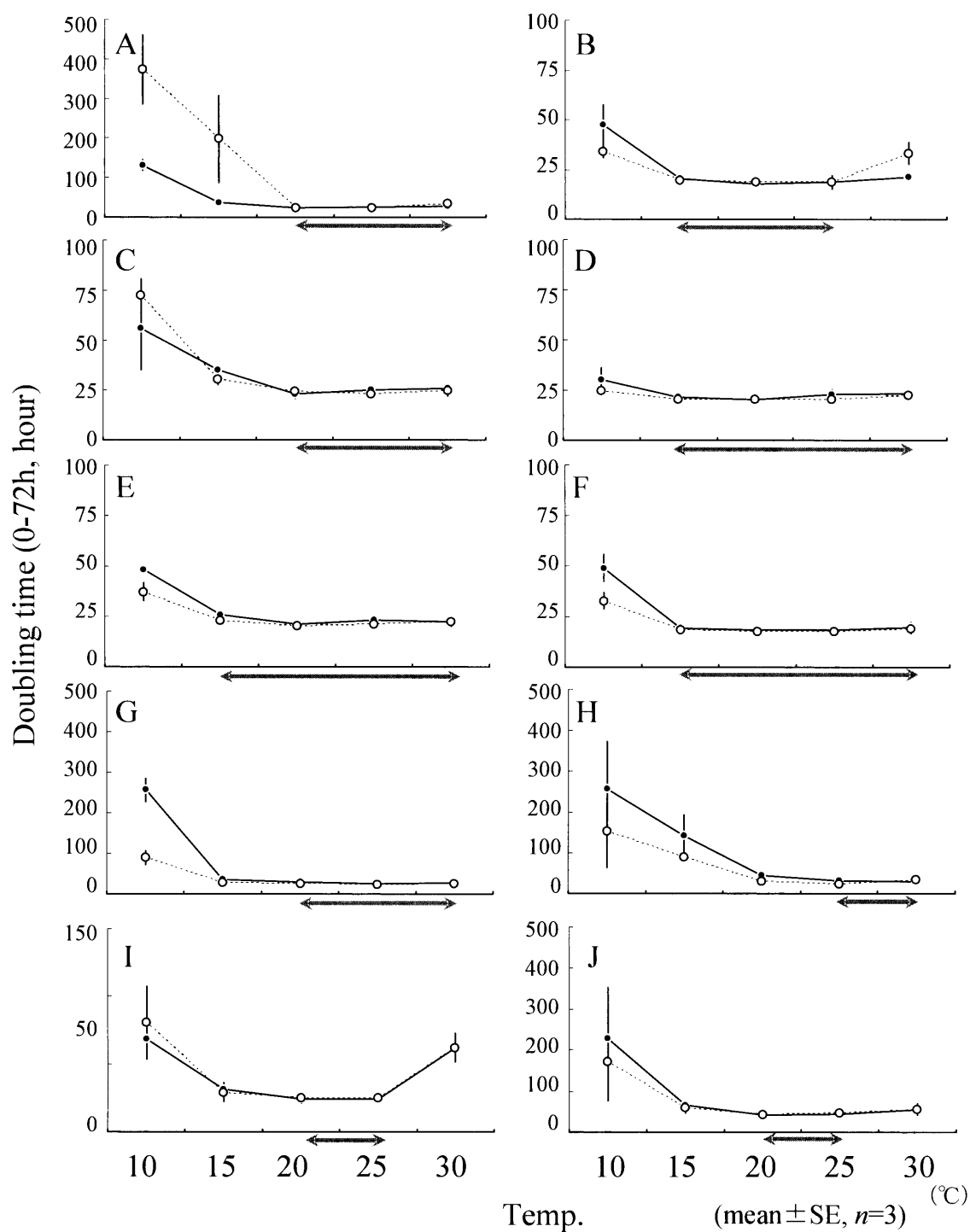
OD<sub>680</sub>と *A. minutissimum* NIES-71株の細胞数との相関性をFig. 4に示す。OD<sub>680</sub>測定による測定値と細胞数には高い相関 (決定係数;  $R^2=0.991$ ) が認められた。このことより、マイクロプレートリーダーを用いたOD<sub>680</sub>測定により定量的な *A. minutissimum* の細胞数の計測が可能であることが明らかになった。

### 3.1.2 *A. minutissimum*の最適培養条件

温度及び光度条件を変えて *A. minutissimum* を培養し、Dtを比較したところ、培養温度20-30°Cで生長速度が速い傾向にあった (Fig. 5-A)。最適温度での培養時に、低照度区 (約2,000lux) と高照度区 (約5,000lux) との間で生長速度に差は認められなかった。被検物質の光分解を低減するために試験は低照度で行うことが望ましいことから、生長阻害試験時における *A. minutissimum* の最適培養条件は、温度20°C、照度約2,000luxとした。

### 3.1.3 試験生物の準備

試験に用いる珪藻の前培養を寒天固形培地上で行うことにより、液体培養では困難を要する試験生物の調製が容易に可能となった。しかし、すべての工程を液体培養で行う浮遊性藻類を対象とする現行の試験法とは異なり、固形培地を用いた培養から試験用の液体培地に珪藻を移植する方法では、液体培地移行時に珪藻細胞への物理的な傷害を完全に防ぐことは難しく、一部の細胞が試験生物調製時に破壊されてしまう。そのため、破壊された細胞から流出したクロロフィル及びクロロフィル分解物により試験溶液のバックグラウンド (OD<sub>680</sub>) が上昇し、精度の高い細胞数の計測が行えなくなる。そこで、試験生物を試験溶液に接種する前に洗浄を行うこと



A: *Achnantheidium minutissima*  
 C: *Eolimna minima*  
 E: *Fistulifera saprophila*  
 G: *Nitzschia palea*  
 I: *Planothidium lanceolatum*

B: *Craticula molestiformis*  
 D: *Eolimna subminuscula*  
 F: *Mayamaea atomus*  
 H: *Planothidium frequentissimum*  
 J: *Sellaphora seminulum*

● : light intensity ca.2,000lux  
 ○ : light intensity ca.5,000lux  
 ↔ : optimal temperature

Fig. 5. Comparison of doubling times of OD<sub>680</sub> value at 72-h from 0-h of tested attached diatoms under different culture conditions using 96-well microplate.



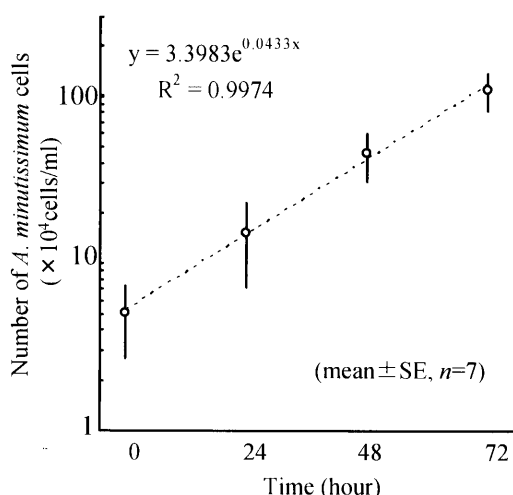


Fig. 6. Growth curves of *A. minutissimum*

により、珪藻回収時のバックグラウンドの上昇を防止した。

### 3.1.4 試験の再現性評価 (*A. minutissimum* NIES-71株のジメタメトリン感受性検定)

7回の試験における対照区の *A. minutissimum* の生長曲線を Fig. 6 に示した。96穴マイクロプレートのウェルで対照区の細胞は試験期間中に指数増殖していた。

反復して行った生長阻害試験では、試験溶液原液 (1,000  $\mu\text{g/l}$  溶液) 中のジメタメトリンは設定濃度の 82-124% (平均94%, SE=15) の範囲であった。設定濃度と実測濃度との間にばらつきが生じる要因としては、ジメタメトリンの水溶解度が低く (20 mg/l)<sup>26)</sup>、試験溶液一次原液 (10mg/l 溶液) を安定した濃度で作成できなかったものと考えられた。

濃度-生長阻害率曲線を Fig. 7 に示す。ErC<sub>50</sub> 0-72h の平均値は、7.0-11.5  $\mu\text{g/l}$  (平均 9.4  $\mu\text{g/l}$ , SE=1.7) の範囲であり、再現性の高い結果が得られた。試験開始時の対象区における OD<sub>680</sub> の平均値は 0.007 (SE=0.003) であり、Fig. 5 の回帰式を利用し、細胞数に換算すると、 $5.6 \times 10^1$  cells/ml であった。試験終了時における対象区の OD<sub>680</sub> の平均値は 0.050 (SE=0.010) であり細

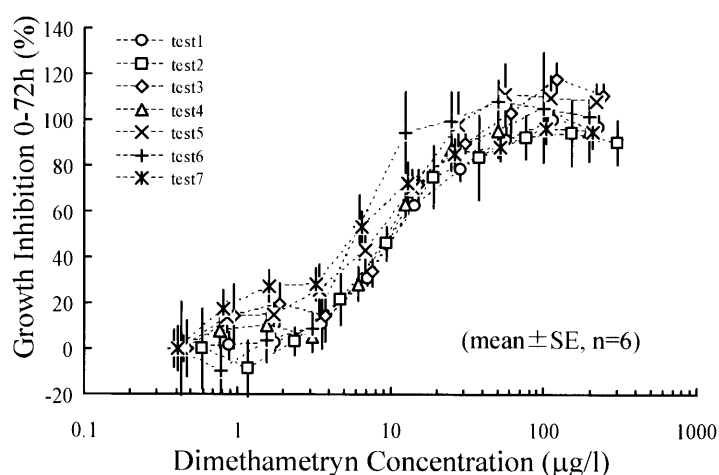


Fig. 7. Concentration-response curves represented by growth rate variation with respect to the control of cultures of *A. minutissima* versus different dimethametryn concentrations after 72-h of exposure.

Table 3. Description of the test procedure

Test organisms	<i>Achnanthydium minutissimum</i> NIES-71
Initial cell concentration	Approximately $5 \times 10^4$ cells/ml (OD <sub>680</sub> = 0.007)
Testing period	Static non-renewal 72hour duration (Shaking microplate twice a day)
Replicates	6 replicates
Test container	96-well plate (Flat bottom)
Medium	Modified Csi, 200 $\mu\text{l}$ / well
Test temperature & light intensity	20 $\pm$ 2°C, Approximately 2,000 lux (Continuous)
Observation	Cell density (OD <sub>680</sub> )
Endpoint	EC <sub>50</sub> 0-72h for growth rate reduction
Point to notice	Using solid medium for preculture.
Conditions for the validity of the test	The cells concentration in the control cultures should have increased by factor of at least 10 within 72 hour.

胞数に換算すると、 $15 \times 10^5$  cells/ml (SE=34  $\times 10^4$ ) であった。試験終了時には試験開始時の細胞数と比べ 22-42 倍 (平均 32 倍, SE=6.2) に増殖した。

なお、ジメタメトリン感受性については、緑藻の *P. subcapitata* で ErC<sub>50</sub> 0-72h = 6.0  $\mu\text{g/l}$ 、同じく緑藻の *Chlorella vulgaris* で ErC<sub>50</sub> 0-72h = 6.9  $\mu\text{g/l}$ 、そして藍藻の *Merismopedia tenuissima* で ErC<sub>50</sub> 0-72h = 1.3  $\mu\text{g/l}$  との報告があり<sup>27)</sup>、本種のジメタメトリンに対する感受性はその他の微細藻類と同程度であった。

本研究で検討した *A. minutissimum* を用いた生長阻害試験の概要を Tabel 3 に示した。

### 3.2 適用可能な珪藻種の検討

#### 3.2.1 試験生物の採集

両地点それぞれ30の珪藻群集試料からF井及び君島でそれぞれ69株(4属), 92株(8属)の付着性珪藻を分離し培養することができた(Table 4)。いずれの場所においても*N. palea*を主とした、*Nitzschia*属が分離されやすい傾向にあった。*Achnantheidium*属及び、*C. molestiformis*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *P. frequentissimum*, *P. lanceolatum*は君島のサンプルからのみ分離できた。なお、付着性珪藻分離の際*N. palea*に関しては大きさが異なるものは別系統として分離培養しカウントした(Table 4)。

*A. minutissimum*, *E. minima*は有機汚濁に対する広適応性種とされており<sup>12)</sup>河川生態系の広範囲での生息が確認されている種である。これらの種は、我々の行った平板培養法による珪藻の分離では、広範囲の水域から分離できる傾向にあったが、中でも有機汚濁の進んだ周囲が水田に囲まれた農村域の河川中流域から分離しやすい傾向にあった。Watanabe (2005)によると*E. subminuscula*, *F. saprophila*及び*S. seminulum*は有機汚濁に対する好汚濁性種とされており<sup>12)</sup>, Mayama (1999)は前2者を中汚濁耐性種群、後者を強汚濁耐性種群に分類される種としている<sup>28)</sup>。*E. subminuscula*及び*F. saprophila*は主として河川中流域から分離しやすい傾向にあったが、*S. seminulum*は河川上流域から分離しやすい傾向にあった。*M. atomus*及び*N. palea*もβ中腐水性からα中腐水性の水域でしばしば優占種として出現する種であり、有機汚濁に対する好汚濁性種とされているが<sup>12)</sup>, 平板培養法による珪藻の分離では有機汚濁の進んだ場所のみでなく、河川上流域から下流域まで幅広い範囲の環境から容易に分離が可能な種であった。*M. atomus*は水環境から出現するだけでなく、土壌藻として気生的な環境からも出現する範囲の広い出現環境をもつ種類であるとの報告もあり<sup>29)</sup>, この適応性の高さが*M. atomus*が幅広い範

**Table 4.** Number of isolated epiphytic diatoms from midstream (Kimijima) and upstream (Usui) of river.

	Usui	Kimijima
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0	10
<i>Achnantheidium</i> sp.	0	3
<i>Craticula molestiformis</i>	0	2
<i>Eolimna minima</i>	1	7
<i>Eolimna subminuscula</i>	0	2
<i>Fistulifera saprophila</i>	0	5
<i>Mayamaea atomus</i>	4	14
<i>Nitzschia palea</i>	44	38
<i>Nitzschia</i> sp.	11	5
<i>Planothidium frequentissimum</i>	0	2
<i>Planothidium lanceolatum</i>	0	2
<i>Sellaphora seminulum</i>	9	2

囲の環境から容易に分離できる要因であると考えられた。*P. frequentissimum*及び*P. lanceolatum*は好清水性種であるが<sup>12)</sup>, 主として河川中流域から分離しやすい傾向にあった。好清水性種は化学物質に対して高感受性が期待できると共に指標試験生物種として期待できる。*C. molestiformis*は中汚濁耐性種群の珪藻とされていると共に<sup>28)</sup>, 電解質の豊富な水質や強腐水性の汚濁水域に達した下水処理場に出現するとの報告もあり<sup>30)</sup>, 有機汚濁に対する適応性は高いと考えられている。平板培養法による珪藻の分離では、河川中流域から分離された。

#### 3.2.2 最適培養温度及び照度の検討

河川より分離し、種を同定した9種の付着性珪藻について、最適培養条件の検討を行った。それぞれの珪藻の最適培養温度は、*C. molestiformis*が15-25℃, *E. subminuscula*, *F. saprophila*及び*M. atomus*が15-30℃, *P. lanceolatum*及び*S. seminulum*が20-25℃, *A. minutissimum*, *E. minima*及び*N. palea*が20-30℃, *P. frequentissimum*が25-30℃であった。いずれの種類においても最適培養温度での培養時に、低照度区(約2,000lux)と高照度区(約5,000lux)との間で生長速度に大きな差は認められなかった(Fig. 5)。最適培養温度及び照度条件で速い生長速度(OD<sub>680</sub>値の倍加時間30時間以下で試験終了時のOD<sub>680</sub>値

0.06以上)を示した種は, *C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus*及び*N. palea*であった。一方, 生長速度が遅い(試験終了時のOD<sub>680</sub>値が0.03以下)種は, *P. frequentissimum*及び*S. seminulum*であった。低照度区(約2,000lux), 最適培養温度で培養した時の9種付着性珪藻の生長曲線をFig. 8に示す。淡水産付着珪藻は浮遊性緑藻ほど速い生長速度が期待できないため, 試験温度はそれぞれの最適温度で行うことが, 再現性の良い試験には重要であると考えられた。

### 3.3 総合考察

マイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験方法は, 三角フラスコ等を使用する従来法と比較して簡易かつ安価な方法として開発が進められてきた<sup>31,32)</sup>。本研究では, これまで浮遊性緑藻類を対象試験生物として開発が進められてきたマイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験方法を改良することにより, 淡水産付着珪藻の試験生物化を試みた。淡水の付着珪藻は河川の優占種として一次生産を支えているため, 淡水産付着性珪藻の除草剤感受性を明らかにすることは, 日本の河川において優占種ではない浮遊性の緑藻のみを指標生物とした現行の評価手法における不確実性を低下させるための有効な手段の一つになり得ると考えられた。

現在, 日本における農薬の生態影響評価は農用地及び農業用施設外側の公共用水域を評価対象地点として想定し, 農薬による生態系への影響の可能性を現状より小さくすることを目的としている<sup>33)</sup>。農用地及び農業用施設外側の公共用水域の大部分は, 環境省の示す水域類型の区分の類型B(コイ・フナ域)<sup>34)</sup>に相当し, また, 水質の汚濁階級<sup>35)</sup>で示すところの $\alpha$ 貧腐水性から $\alpha$ 中腐水性の水質に相当すると考えられる。本目的の達成には, 現状で日本の生態系を構成している生物に対する有害性を明らかにする必要性が高く, 上記水質の水域に優占的に生息する

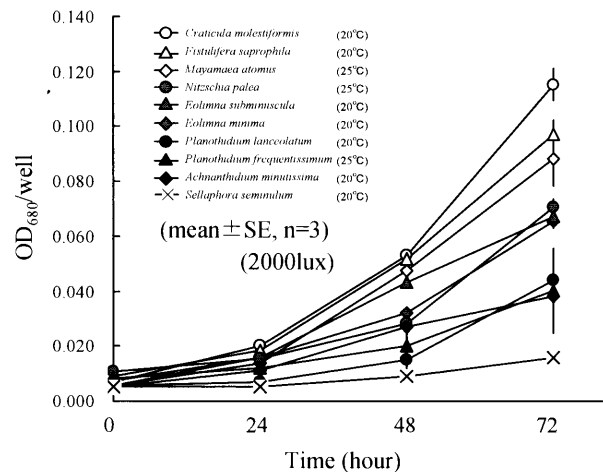


Fig. 8. Growth curves of tested attached diatoms.

生物種に対する有害性評価の結果は, 河川生態系を対象とした農薬等化学物質の生態影響評価を行う上で有用な情報になりうると考えられた。

今回研究に使用した淡水産付着珪藻はいずれも前述の水域に生息するものである。試験生物としての適用性は, 生長速度から判断すると *C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus* 及び *N. palea* が高いと評価できた。一方, 実環境中での生息範囲の広さ及び野外からの分離培養の容易さから判断すると, *M. atomus* 及び *N. palea* が試験生物として適していると考えられた。

### 5. まとめ

従来 of 藻類生長阻害試験方法では試験が難しかった淡水産付着性珪藻を用いた生長阻害試験の試験方法を *A. minutissima* を用いて検討すると共に, 各種淡水産付着性珪藻の試験方法への適用性の評価及び最適試験条件の検討を行った。

前培養に固形培地を用い, 試験容器に平底の96穴マイクロプレートを使用し, 試験期間中, 1日に2回マイクロプレートミキサーにて試験容器を攪拌することにより, *A. minutissima* を用いた再現性高い生長阻害試験が可能であると

結論した。

固形培地上で継代培養が可能な10種の淡水産付着性珪藻の最適試験条件を検討し、最適温度及び最適照度を明らかにした。最適温度は種により異なったが、15-30°Cの間にあった。低照度(約2,000lux)及び高照度(約5,000lux)で生長速度に差が少ないため、被検物質の光分解性を考慮し、試験は低照度(約2,000lux)で行うことが望ましいと考えられた。試験生物としての適用性は、生長速度から判断すると *C. molestiformis*, *E. minima*, *E. subminuscula*, *F. saprophila*, *M. atomus* 及び *N. palea* が高く、実環境中での生息範囲の広さ及び野外からの分離培養の容易さから判断すると、*M. atomus* 及び *N. palea* が試験生物として適していると考えられた。

#### 参考文献

- 1) OECD (1984) Alga, growth inhibition test, OECD guidelines for the testing of chemicals 201.
- 2) OECD (2002) Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, Draft revised guideline 201.
- 3) ISO (1989) Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*, ISO8692.
- 4) USEPA (1996) Ecological effects test guidelines; Algal toxicity Tiers I and II, OPPTS 850.5400.
- 5) Wehr, J. D. and P. G. Sheath (2003) Freshwater algae of north America ecology and classification. Academic press, 32-36.
- 6) 秋山優, 有賀祐勝, 坂本充, 横浜康継 (1986) 藻類の生態, 9.河川底生藻類の生態, 内田老鶴圃, 309-334.
- 7) SR-29'99 (1999) 国立環境研究所特別研究報告, 化学物質の生態影響評価のためのバイオモニタリング手法の開発に関する研究, 29.
- 8) 渡辺仁治 (1962) 北海道常呂川の水質汚濁に対する珪藻の種類数に基づく生物指標, *日本生態学会誌*, **23**: 86-101.
- 9) Watanabe, T. K., Asai, A. Houki, S. Tanaka, T. Hizuka (1986) Saprophylic and eury saprobic diatom taxa to organic water pollution and diatom assemblage index (DAIpo). *Diatom*, **2**, 23-73.
- 10) Kobayashi, H. and S. Mayama (1982) Most pollution-tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo. *Jap. J. Phycol.*, **30**, 188-196.
- 11) Kobayashi, H. and S. Mayama (1989) Evaluation of river water quality by diatoms. *Korean J. Phycol.*, **4**, 121-133.
- 12) 渡辺仁治 (2005) 淡水珪藻生態図鑑. 第3章 湖沼, 河川胸中の水質汚濁指数DAIpo. 内田老鶴圃, 18-53.
- 13) Hamala, J. A. and H. P. Kollig (1985) The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems. *Chemosphere*, **14**, 1391-1408.
- 14) Jurgensen, T. A. and K. D. Hoagland (1990) Effects of short-term pulses of atrazine on attached algal communities in a small stream. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 617-623.
- 15) Kasai, F. and T. Hanazato (1995) Genetic changes in phytoplankton communities exposed to the herbicide simetryn in outdoor experimental ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 154-160.
- 16) Kasai, F. and S. Hatakeyama (1995) Changes in herbicides susceptibility of algae in a river running through an agricultural region. *Ecol. Chem.*, **5**, 292-296. (Russian)
- 17) Tang, J. X., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (1997) Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59**, 631-637.

- 18) Kasai, F. (1998) Shifts in herbicide tolerance in paddy field periphyton following herbicide application. *Chemosphere*, **38**, 919-931.
- 19) Nelson, K.J., K. D. Hoagland and B. D. Siegfried (1999) Chronic effects of atrazine on tolerance of a benthic diatom. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 1038-1045.
- 20) Seguin, F., J. C. Druart, and R. Le Cohu (2001) Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Ann. Limnol. —Int. J. Limnol.*, **37**, 3-8.
- 21) Rimet, F., L. Ector, A. Dohet and H. M. Cauchie. (2004) Impacts of fluoranthene on diatom assemblages and frustule morphology in indoor microcosms. *Vie Milieu*, **54**, 145-156.
- 22) Jansen, M. S. and R. Altenburger (2005) Toxic effects of isoproturon on periphyton communities - a microcosm study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **62**, 539-545.
- 23) ISO (1995) Water quality-marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*.
- 24) (財) 地球・人間環境フォーラム (1997) GEF保存株リスト'97, 19-27.
- 25) Environment Canada (1992) Biological test method: growth inhibition test using the freshwater alga *Selenastrum capricornutum* Report EPS 1/RM/25.
- 26) (社) 日本植物防疫協会 (2005) 農薬ハンドブック2005年版 (改訂新版), 583.
- 27) Ishihara S., T. Horio, Y. Kobara, A. Yokoyama and M. Ueji. (投稿中: Weed Biol. Manage.) The sensitivity of four unicellular algae to rice herbicides.
- 28) Mayama, S. (1999). Taxonomic revisions to the differentiating diatom groups for water quality evaluation and some comments for taxa with new designations. *Diatom*, 15: 1-9.
- 29) Mayama, S. and H. Kobayasi (1988). Morphological variations in *Navicula atomus* (Kutz.) Grun. In Round, E. F. (ed.). Proceedings of the ninth international diatom symposium, Bristol, 1986. 427-435. Biopress, Bristol.
- 30) Lange-Bertalot, H. (2001) Diatom of Europe Volume2 *Navicula sensu stricto* 10 genera separated from *Navicula sensu lato* Frustulia. A.R.G.Gantner Verlag K.G., 116.
- 31) Blaise, C. R., Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie, and P. Vasseur (1986) A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment: An International Quality* vol1, John Wiley & Sons, Inc. 261-281.
- 32) St-Laurent, D. and C. Blaise (1992) Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Toxicity assessment: An international quality* vol7, John Wiley & Sons, Inc. 35-48.
- 33) 環境省, 水・大気環境局 (2005) 環水上発第050801003「農薬取締法第3条第1項第4号から第7号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める等の件の一部を改正する件」について.
- 34) 環境省, 水・大気環境局 (2002) 水生生物の保全に係る水質目標について, 8-14.
- 35) 津田松苗 (1972) 水質汚濁の生態学, 第2部 汚水生物体系論, 公害対策技術同友会, 53-134.

(受付: 2006年5月30日; 受理: 2006年9月22日)