

**Quality Assurance Project Plan (QAPP) of the
approval testing process for Ballast Water
Management System**

MBRIJ

June 2017



Marine Biological Research
Institute of Japan Co., Ltd.

Marine Biological Research Institute of Japan Co., Ltd.

Contents

Quality Assurance Project Plan (QAPP)

1. Purpose and Scope of Application	1
1.1 Purpose	1
1.2 Scope of application	1
1.3 Quality assurance and management	1
1.4 Definition	1
2. Sampling Methods	2
2.1 Preliminary drainage	2
2.2 Organisms in an L-size group	2
2.3 Organisms in an S-size group	3
2.4 Bacteria	3
2.5 Water quality	3
2.6 Instrument cleaning after sampling	3
3. Analytical Methods	4
3.1 Organisms in an L-size group	4
3.2 Organisms in an S-size group	7
3.3 Bacteria	10
3.4 Water quality	15
Annex 1 Example of sample list	17
Annex 2 Field note for analysis (organisms in L- and S-size groups)	18
Annex 3-1 Field note for analysis (microorganism: heterotrophic bacteria)	20
Annex 3-2 Field note for analysis (microorganism: <i>Escherichia coli</i>)	21
Annex 3-3 Field note for analysis (microorganisms: enterococcus and <i>Vibrio cholerae</i>)	22
Annex 4-1 Method using neutral red (technical document 1)	23
Annex 4-2 Method using neutral red (technical document 2)	26
Annex 4-3 Method using neutral red (technical document 3)	31

Quality Assurance Project Plan (QAPP)

1. Purpose and Scope of Application

1.1 Purpose

A Quality Assurance Project Plan (QAPP) is a technical document created to perform land-based and shipboard tests of Ballast Water Management System, a ballast water management system (hereinafter referred to as BWMS), using appropriate quality management measures based on international standards in accordance with the “test criteria before the execution of the Guidelines for Approval of Ballast Water Management Systems (G8)” (announced by the Inspection and Measurement Division, the Marine Bureau, the Ministry of Land, Infrastructure and Transport on November 21, 2011). The Marine Biological Research Institute of Japan Co., Ltd (hereinafter referred to as the company) has determined biological analysis methods in detail for evaluation of the performance of BWMS.

The biological analysis methods described in the QAPP are in accordance with “biological analysis methods for approval of ballast water management systems (second edition)” published by the Ship Equipment Inspection Society of Japan in March, 2010.

1.2 Scope of application

The QAPP is applied to all the company’s land-based and shipboard tests of BWMS performed based on the “test criteria before the execution of G8.”

1.3 Quality assurance and management

The quality of the shipboard tests is assured based on the QAPP. The quality management of the land-based and shipboard tests is in accordance with the Quality Management Plan (QMP) described in the first section of this paper.

Microorganism tests, including bacterial analysis, deal with organisms that are invisible to the naked eye. Therefore, when samples are carelessly handled, contamination or infection may occur and analytical results may be inaccurate. Of bacteria counted in the land-based and shipboard tests, all indicator organisms corresponding to regulation D-2 of the International Convention for the Control and Management of Ships’ Ballast Water and Sediments (hereinafter referred to as regulation D-2) are classified as Biosafety Level 2 (BSL 2) pathogens. Therefore, all the land-based and shipboard tests are performed following foreign and domestic biosafety guidelines and regulations, such as Laboratory Biosafety Manual proposed by the World Health Organization and Safety Management Regulations for Pathogens and Toxins proposed by the National Institute of Infectious Diseases, Japan. Infection and contamination with pathogens may endanger not only experimenters engaged in the shipboard tests but also other experimenters and neighboring societies, so these types of infection and contamination must be avoided.

In the company and outsourcing organizations, microorganism tests are basically performed in laboratories for microorganisms equipped with apparatuses and instruments necessary for handling bacteria belonging to BSL 2. However, in the shipboard tests, since apparatuses and instruments are limited, completely following biosafety guidelines for microorganism tests is sometimes difficult. In that case, microorganism tests might be performed in a facility that does not completely agree with requirements for BSL 2, on the assumption that microorganism tests are performed only by technically skillful staff in an isolated room.

In the land-based and shipboard tests, the experimenters and assistants engaged, who have sufficient acquired knowledge and skills for handling pathogens, pay adequate attention to safety measures from inoculation to disposal of microorganisms. When a microorganism test is performed, a person with a full understanding of the risk of pathogens and has been thoroughly trained in the handling of pathogens, is responsible for the test. The responsible person gives appropriate advice to a person who handles microorganisms (hereinafter referred to as handler). When the handler is not familiar with pathogens, a certain period of education and training on pathogens is prepared for the handler.

1.4 Definitions

The definitions of terms regarding biological analysis methods used in the QAPP are described below. Terms that are not specifically defined in the QAPP use definitions from the Ballast Water Management Convention and the Guidelines for Approval of Ballast Water Management Systems.

(1) Viable organisms

In the Ballast Water Management Convention, viable organisms are defined as organisms whose morphology, motility, and intracellular active state are confirmed to be normal, or organisms whose reproduction and breeding are confirmed to be possible under optimum growth conditions.

(2) Minimum dimension

In the Ballast Water Management Convention, the minimum dimension is defined as the smallest size among the width, length, and thickness of an organism. For a colony-forming organism, the minimum dimension is defined as the smallest size among the width, length, and thickness of an individual or a cell that composes a colony.

(3) Bacteria

The definitions for *Escherichia coli*, intestinal enterococci, and toxicogenic *Vibrio cholerae* (O1 and O139) regulated in D-2.2 of regulation D-2 and coliform, Enterococcus group, *Vibrio cholera*, and heterotrophic bacteria regulated in Section 2.3.20 of G8 are described below. These definitions were determined based on foreign and domestic test methods.

E. coli and coliform are detectable by an enzyme substrate method. Coliform is identified using β -galactosidase activity as an index, and *E. coli* is identified using β -glucuronidase activity as an index.

The Enterococcus group is defined as bacteria that deoxidize triphenyltetrazolium chloride (TTC) on a medium that inhibits the growth of Gram-negative bacteria or possess β -D-glucosidase activity. Of the Enterococcus group, intestinal enterococci can grow at a sodium chloride concentration of 6.5 % and 45 ± 0.5 °C.

Some bacteria aerobically form colonies in an alkaline medium, which inhibits the growth of Gram-positive bacteria. The use of sucrose or sulfur supports the growth of *Vibrio cholera* in salt-free alkaline peptone water. Toxicogenic *Vibrio cholera* possesses O1 or O139 as an O antigen. In the QAPP, the existence of cholera enterotoxin-positive organisms is not examined.

Heterotrophic bacteria are defined as bacteria that form colonies on a medium consisting of salt water (artificial seawater), purified water, and organic nutrients at low concentrations, following culture at 20–28 °C for 5–7 days.

2. Sampling method

The sampling method in this chapter is for sampling during influent and drainage of the G8 testing. Therefore, all sampling point must be on the ballast water drain line and must be carried out at the upstream and downstream of the ballast water management system and at the drainage point. A sample concentrator must be included in a sampling facility equipped with the isokinetic and perform sampling and concentration of aquatic organisms simultaneously.

The procedure per sampling is shown below.

2.1 Preliminary drainage

Preliminary drainage for 10 minutes or more is performed after the ballast pump is in operation, and subsequent sampling is performed after the flow rate stabilizes.

2.2 Organisms in an L-size group**2.2.1 Sampling of L-size group**

As a sample for L size group from the sampling port of the facility, 1m³ equivalent of sea water is concentrated with the following net. Prior to the sampling, the inside of the sample bottle is pre-washed for three or more times with sampling target seawater. The sample is immediately transported to the laboratory and preserved in a cool and dark place (15 °C) and analysis is started.

2.2.2 Concentration of sample

- (1) Gently concentrate a sample using a plankton net with a mesh opening size of 35 μ m and a mesh opening diameter (diagonal length) of less than 50 μ m. The sea water passing through the plankton net is discharged to the outside of through the drain pipe.
- (2) Enrichment is performed to facilitate observation of organisms in test water under a microscope. Also, in order to avoid damage to the organisms, submerge the surface of the

plankton net always underwater and make it as gentle as possible so as not to bubble.

- (3) Immediately before the concentration operation is completed, collected particles of organisms on the plankton net are washed with preliminarily prepared filtration seawater and stored in a 500 ml capacity bottle. When the density of the particles after concentration is increased by the organisms after treatment, must be suitably diluted with filtered sea water so as not to affect the physiological state of the living body, and it is accommodated in a bottle of 1 L capacity or more.
- (4) Measure the amount of sample as much as possible up to the unit of 10 ml and the amount of concentrated sample as well as the unit of 1 ml.
- (5) Transport the sample to the analysis room and immediately analyze L-size plankton.

2.3 Organisms in an S-size group

2.3.1 Sampling of S-size group

From the sampling port, organisms of S size group are sampled into a clean 1 L bottle. Before sampling, wash in the bottle for three times or more with sampling seawater. The sample is immediately transported to the laboratory in the cold-dark storage (15 °C) and analysis is started.

2.3.2 Concentration of sample

- (1) 100 ml of the sea water sample is gradually concentrated to 10 ml or less using a plankton net having an opening diameter (diagonal line length) of 5 µm.
- (2) The concentration operation is performed to facilitate the observation of organisms in the test water under a microscope. Also, to avoid damage to living organisms, make sure that the surface of dirt and plankton net is always underwater and as gentle as possible to avoid bubbles.
- (3) Carefully rinse the particles on the mesh with the filtered sea water before ending the concentration work.
- (4) When the concentration of particles increases due to residual organism after treatment, dilute appropriately with filtered seawater to avoid the influence on the activity of organism as much as possible.
- (5) The amount of specimen shall be measured in 10 ml unit as much as possible, in concentrated specimen volume and 1 ml unit.
- (6) Transfer the sample to the analysis room and immediately analyze S-size plankton.

2.4 Bacteria

Sample 500 ml of sea water sample for bacteria analysis into a sterilized bottle from the sampling port of the sampling facility. The collected sample is immediately transported to the laboratory in the cold-dark preserved (5 °C) and the culturing operation must be started within 6 hours.

2.5 Water quality

Sample for analysis of water quality (TSS, DOC, POC) from a sampling facility of a sampling point into a clean 2 L bottle. Before sampling, wash the inside of the bottle for more than three times with sampling target seawater collected. Samples taken shall be transported to the laboratory promptly in a cool and dark preserved state (5 °C) and analyzed within 6 hours.

2.6 Instrument cleaning after sampling

After the sampling and concentration work is completed, wash all sampling equipment and equipment with fresh water and dry it.

3. Analytical method

The analytical methods described below are basically completed within 6 hours after sampling in order to minimize the effects of aquatic organisms and bacteria on the number of viable organisms as much as possible. Judgmental standards for viable organisms described in Section 3.1.4 must also be appropriately applied to these methods.

3.1 Organisms in an L-size group

3.1.1 Counting method

- (1) A concentrated water sample is placed on a counting chamber for large zooplankton using a pipette, and the water sample is observed using a stereoscopic microscope or a biological microscope.
- (2) The minimum dimension (refer to Section 1.4.(2) of an individual showing movement in the water sample and a normal morphology and contents is measured using an ocular micrometer, and the number of individuals with minimum dimensions more than 50 μm is counted. Tables II.2.1.1-1 and -2 show that the minimum dimension differs according to the individual even it may be the same species. The minimum dimension of some individuals extends to more than two different size fractions. Therefore, the minimum dimension of a certain species cannot be determined simply as that of its size fraction, so the minimum dimension of each individual is measured. In addition, the genus and species names of an organism are recorded while counting.
- (3) Observations are performed several times, so that the total amount of the observed water sample exceeds 1 m^3 of the original water sample before concentration.

3.1.2 Determination of the minimum dimension

- (1) The minimum dimension indicates the smallest size among the width, length, and thickness of an aquatic organism.

The width and thickness of an aquatic organism are determined by measuring the largest part (refer to Figure II.2.1-1). If present, the antennae of zooplankton and the bristles of phytoplankton are excluded from the measurement (refer to Figures II.2.1-2 and -3).

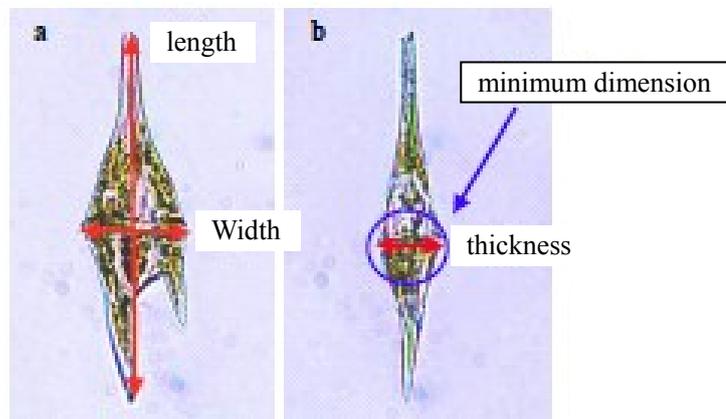


Figure II.2.1-1 Example showing the determination of the minimum dimension (dinoflagellate)
(a: ventral view, b: side view)

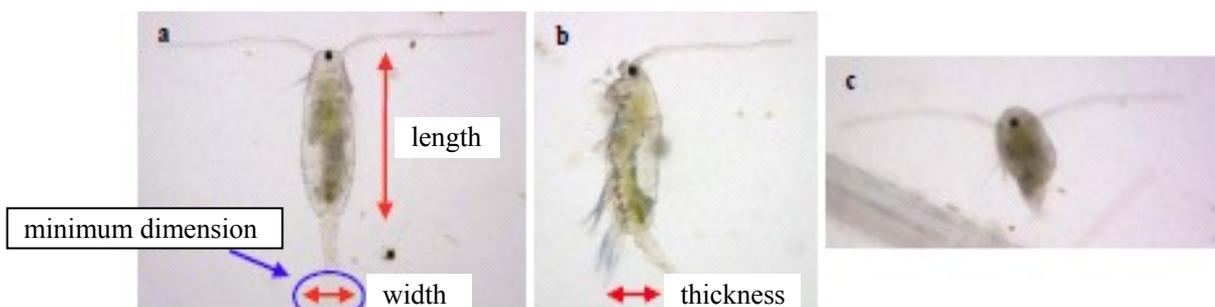


Figure II.2.1-2 Example showing the determination of the minimum dimension (copepod)

(a: front view, b: side view, c: head)

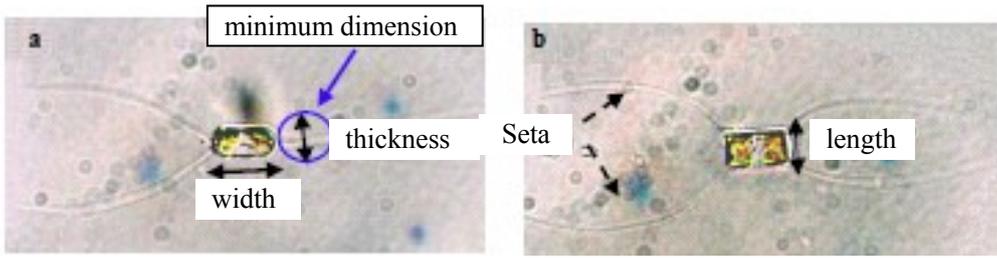


Figure II.2.1-3 Example showing the determination of the minimum dimension (diatom)
(a: front view, b: side view)

3.1.3 Determination of the minimum dimension of an aquatic organism that forms a colony

(1) The minimum dimension of each cell or individual composing an aquatic organism that forms a colony is determined as the minimum dimension of the aquatic organism (refer to Figures II.2.1-4, -5, and -6).

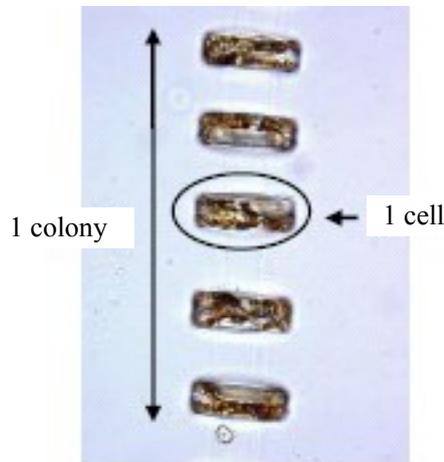


Figure II.2.1-4 1 Relationship between a cell and a colony (diatom)

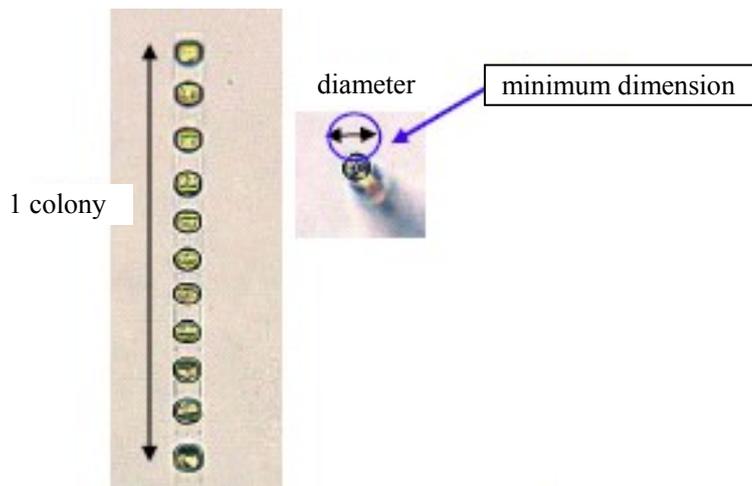


Figure II.2.1-5 Example-1 showing the determination of the minimum dimension of a colony (diatom)

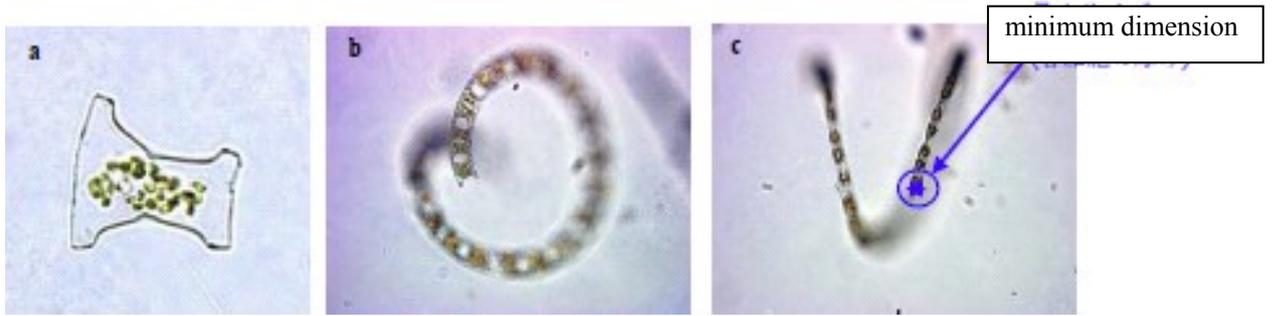


Figure II.2.1-6 Example-2 showing the determination of the minimum dimension of a colony (diatom) (a: cell, b and c: colony)

3.1.4 Judgment standards for viable organisms

(1) Judgment standards for viable organisms include the change in morphology, the motility, and the change in the intracellular activity due to a staining method. Staining methods are applied to organisms whose viability cannot be judged based only on the change in morphology and the motility. The QAPP adopts a staining method using neutral red (hereinafter referred to as NR) (technical documents are added to Annex 4-1 and -2).

1) Change in morphology

When part of an organism is greatly damaged, that organism is judged as nonviable (refer to Figure 2.1-7).

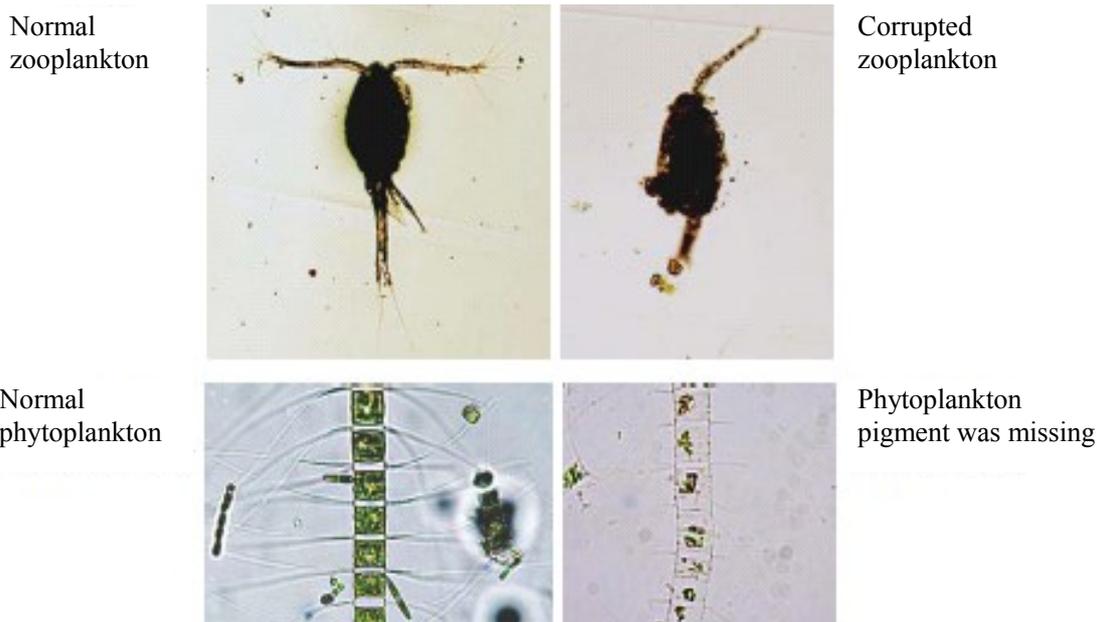


Figure II.2.1-7 Example of the change in morphology (top: copepod, bottom: diatom)

2) Motility

Motility is evaluated in organisms that are capable of swimming, and an individual that shows no swimming motility is judged as nonviable.

3) Staining methods

Staining methods are applied to organisms whose viability cannot be judged from the change in morphology and the motility.

a. Preparation of NR

NR is dissolved in distilled water to prepare a 1% (w/v) solution. The solution can be used for several months if it is stored in a cool and dark place.

b. Staining method using NR

To 10 ml of a saltwater sample, 5 µl of the 1% solution is added (the final concentration of

$5 \times 10^{-4}\%$ w/vol.) (Crippen and Perrier, 1974). After stirring, the saltwater sample is left to stand for 20–30 minutes for staining. Cells with an excellent active state or small cells may be stained within approximately 5 minutes. However, the time required for unequivocal staining differs according to the active state or the type of a cell. If the staining time is too short, an appropriate sample cannot be obtained. Therefore, the QAPP adopts 20–30 minutes as the staining time.

c. Counting of living cells

A specific quantity or the whole quantity of the concentrated sample is placed on a slide glass that has rules of 1 mm width. A biological microscope equipped with an eyepiece micrometer is used to judge the living or dead state of an organism, which is either S- or L-size plankton, by observing the stainability of its cells. Since cells stained with NR are not discolored for at least 2–3 hours after staining, an organism with stained cells is judged as viable while one with no stained cells is judged as nonviable, and the number of these living or dead organisms is counted.

Related documents [Annex 1 and 2]

3.1.5 Fixation and preservation of a sample

- (1) Upon completion of counting, a sample is fixed by adding a neutralized formaldehyde solution (2% of the sample volume), prepared by adding borax to an undiluted formaldehyde solution, and the sample is then slowly and sufficiently stirred.
- (2) The fixed sample is stored in a cool and dark place.

3.2 Organisms in an S-size group

3.2.1 Counting method

- (1) One ml of the concentrated water sample is placed in a ruled counting chamber (refer to Figure II.2.2.1-1) using a pipette and observed with a biological microscope.



Figure II.2.2-1 Example of a plankton counting chamber

- (2) The minimum dimension of an individual, that is moving in the water sample or that shows normal morphology is measured using an ocular micrometer, and the number of individuals of sizes between 10 and 50 μm is counted. At this time, even if individuals larger than 50 μm occur in the sample, these need not be counted because the water samples are separately collected for counting aquatic organisms larger than 50 μm (belonging to the L-size group).
- (3) Observations are performed several times, so that the total amount of the observed water sample exceeds 100 ml of the original water sample before concentration (when 1 L of the original water sample is concentrated to 15–35 ml; i.e., 1 ml of the observed water sample is equivalent to 45–70 ml of the original water sample). In other words, observation of the concentrated water sample three times is equivalent to observation of 135–210 ml of the original water sample.
- (4) This observation using a plankton counting chamber and a biological microscope can be performed using an objective lens with 20 \times magnification. When the objective lens magnification is more than 20 \times , the objective lens touches the water surface of the counting chamber, thereby preventing observation. When the size of the majority of phytoplankton is as small as approximately 10 μm , observation with higher magnification is required. In that case, an inverted microscope is used.

3.2.2 Determination of the minimum dimension

The determination of the minimum dimension is in accordance with Section 3.1.2.

3.2.3 Determination of the minimum dimension of an aquatic organism that forms a colony

The determination of the minimum dimension is in accordance with Section 3.1.3.

3.2.4 Judgment standards for viable organisms

Judgment standards for viable organisms are in accordance with Section 3.1.4.

3.2.5 Fixation and preservation of a sample

Fixation and preservation of a sample is in accordance with Section 3.1.5.

Table II.2.1-1 Species where many individuals belong to the L-size group, and the maximum and minimum values of the minimum dimension (unit: μm)

Species name	Max	Min.
Dinophyta		
<i>Noctiluca scintillans</i>	150	2000
Tintinnida		
<i>Tintinnopsis</i> spp.	15	167
<i>Tintinnidium mucicola</i>	50	160
<i>Favella taraikaensis</i>	70	90
<i>Favella ehrenbergii</i>	80	95
Ciliata		
<i>Vorticella</i> sp.	38	200
<i>Didinium balbianii</i>	60	96
<i>Didinium gargantua</i>	125	130
Rotatoria		
<i>Keratella cruciformis</i>	40	100
<i>Synchaeta</i> sp.	95	145
<i>Brachionus plicatilis</i>	110	176
Copepoda		
<i>Oithona davisae</i>	140	140
Radiolaria		
<i>Sticholonche zanclea</i>	200	300
Appendicularia		
<i>Oikopleura</i> sp.	300	5000
<i>Oikopleura dioica</i>	500	1300
Cladocera		
<i>Podon polyphemoides</i>	500	700
Sarcodina		
<i>Arcella discoides</i>	90	146
<i>Arcella</i> sp.	90	216
<i>Arcella vulgaris</i>	100	100

Table II.2.1-2 Species where many individuals belong to the S-size group, and the maximum and minimum values of the minimum dimension (unit: μm)

Species name	Max	Min.
Diatoms		
<i>Chaetoceros compressum</i>	3	40
<i>Rhizosolenia setigera</i>	3	87
<i>Aulacoseira distans</i>	4	20
<i>Chaetoceros sociale</i>	4	15
<i>Aulacoseira granulata</i>	5	20
<i>Chaetoceros radicans</i>	6	25
<i>Leptocylindrus danicus</i>	6	12
<i>Skeletonema costatum</i>	6	22
<i>Cerataulina pelagica</i>	7	56
<i>Chaetoceros danicum</i>	8	20
<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	8	70
<i>Chaetoceros affine</i>	9	30
<i>Chaetoceros debile</i>	9	40
<i>Chaetoceros didymum</i>	10	40
<i>Chaetoceros lorenzianum</i>	10	80
<i>Leptocylindrus mediterraneus</i>	10	35
<i>Detonula pumila</i>	12	55
<i>Chaetoceros constrictum</i>	14	35
<i>Actinopterychus senarius</i>	20	105
<i>Eucampia zodiacus</i>	20	100
<i>Thalassiosira rotula</i>	20	60
Dinophyta		
<i>Prorocentrum minimum</i>	15	23
<i>Protoperidinium bipes</i>	15	20
<i>Heterocapsa triquetra</i>	17	29
<i>Gonyaulax verior</i>	26	32
<i>Ceratium furca</i>	30	50
Chrysophyceae		
<i>Distephanus speculum</i>	15	35
<i>Ebria tripartita</i>	34	40
Rhaphidophyceae		
<i>Heterosigma akashiwo</i>	6	15

Species name	Max	Min.
Tintinnida		
<i>Eutintinnus</i> spp.	18	53
<i>Helicostomella longa</i>	17	18
<i>Stenosemella parvicollis</i>	19	25
<i>Stenosemella</i> sp.	19	47
<i>Helicostomella subulata</i>	20	24
<i>Tintinnopsis aperta</i>	25	25
<i>Tintinnopsis beroidea</i>	25	40
<i>Tintinnopsis corniger</i>	28	33
<i>Tintinnopsis radix</i>	30	43
<i>Salpingella</i> sp.	30	50
<i>Tintinnopsis kofoidi</i>	35	38
<i>Amphorella quadrilineata</i>	40	46
<i>Tintinnopsis directa</i>	40	47
<i>Tintinnopsis lohmanni</i>	40	62
Ciliata		
<i>Mesodinium rubrum</i>	23	30
<i>Tiarina fusus</i>	30	35
Rotatoria		
<i>Trichocerca</i> sp.	28	50
Sarcodina		
<i>Euglypha</i> sp.	30	60

3.3 Bacteria

3.3.1 Counting method for heterotrophic bacteria

(1) “Biological analysis methods for approval of ballast water management systems (second edition)” published by the Ship Equipment Inspection Society of Japan in March, 2010 recommends a smear-plate method for the counting of heterotrophic bacteria. However, Special Notation states that “if bacteria can be counted as the colony forming unit, pour-plate and spiral-plate methods can be used depending on the situation of each laboratory.” Therefore, the QAPP adopts a pour-plate method.

(2) Medium

When freshwater and saltwater are the main components, R2A agar medium (R2A Agar) and Marine Agar 2216 (DSMZ35Medium604) are used, respectively. To detect heterotrophic bacteria, two types agar media, whose main components are freshwater and saltwater, are used.

[R2A Agar]

Yeast Extract	0.5 g
Acid hydrolysate of casein	0.5 g
Glucose	0.5 g
Soluble starch	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Sodium pyruvate	0.3 g
Pancreatic digest of casein	0.25 g
Peptic digest of animal tissue	0.25 g
MgSO ₄ , anhydrous	0.024 g
Agar	15.0 g
Purified water	1000 ml

This medium is used after performing high-pressure steam sterilization at pH 7.2 ± 0.2 and 121°C ± 1°C for 15 minutes.

[Marine Agar 2216]

Peptone	5.0 g
Yeast Extract	1.0 g
Ferric citrate	0.1 g
Agar	15.0 g
Seawater or artificial seawater	1000 ml

This medium is used after performing high-pressure steam sterilization at pH 7.6 ± 0.2 and 121°C ± 1°C for 15 minutes.

(3) Diluent

A phosphate buffer solution adjusted at pH 7.2–7.5 is recommended as a diluent. However, the QAPP uses a sterilized water sample as a diluent. For a water sample collected in a brackish water or saltwater region, the salinity of the diluent is adjusted with sodium chloride to equal that of the water sample.

Phosphate buffer solution	
KH ₂ PO ₄	42.5 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	190 mg
Purified water	1000 ml

(a) Preparation of each ingredient

a-1. Phosphate solution

34 g of potassium dihydrogen phosphate is dissolved into 500 ml of distilled water, and pH of the distilled water is adjusted to 7.2 ± 0.5 using a 1 mol/l sodium hydroxide solution.

a-2. Magnesium chloride solution

38 g of magnesium chloride hexahydrate is dissolved in 1000 ml of distilled water.

(b) Mixing of ingredients

1.25 ml of the phosphate solution and 5.0 ml of the magnesium chloride solution are added to 1000 ml of distilled water. High-pressure steam sterilization is performed for the distilled water at $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes.

(4) Culture

The water sample is diluted to several concentration levels and the water sample at each concentration level is inoculated onto at least five agar plates (Figure II.2.3-1). The culture temperature can be arbitrarily set in a range of $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ according to the water temperature when the water sample was collected, but the culture is performed within $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ of the set temperature. The culture period can be arbitrarily set in a range of 5–7 days. In addition, a series of tests are performed under the same conditions.



Figure II.2.3-1 Performing the smear culture method

(5) Counting

After the culture, a plate on which 20–200 colonies have been formed (Figure II.2.3-2) is selected, and the number of colonies is counted. The average number of colonies per plate and the dilution level are used to calculate the number of bacteria per ml of the water sample.

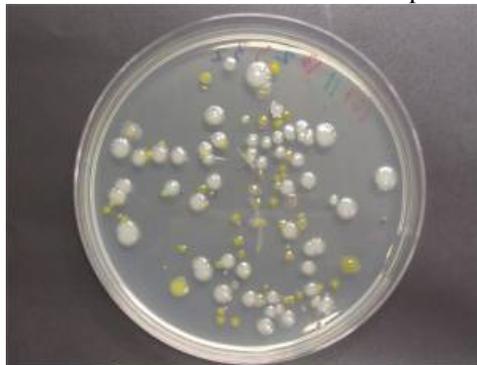


Figure II.2.3-2 Example of a nonselective medium used for counting

3.3.2 Counting method for coliform and *Escherichia coli*

The numbers of coliforms and of *E. coli* can be counted on the same medium, so both numbers can be counted simultaneously when the following method described is adopted.

(1) A membrane filter method is used for counting the numbers of coliform and *E. coli*.

(2) Medium

“Biological analysis methods for approval of ballast water management systems (second edition)” published by the Ship Equipment Inspection Society of Japan in March, 2010 recommends MI medium as a medium for counting the numbers of coliform and *E. coli*. However, these biological analysis methods describe that “although only one medium and solution are recommended, media and solutions other than recommended ones can be used.” Therefore, the QAPP adopts XM-G medium, which also allows simultaneous counting of the numbers of coliform and *E. coli*, similar to MI medium.

[XM-G medium]

Peptone	10.0 g
Sodium pyruvate	1.0 g
L-tryptophan	1.0 g
D-sorbitol	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium dihydrogen phosphate	2.2 g
Sodium monohydrogen phosphate	2.7 g
Potassium nitrate	1.0g
sodium lauryl sulfate	0.2 g
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC)	0.1 g
5- bromo-6- chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (MAGENTA-GAL)	0.1 g
Agar	15.0 g
Purified water	1,000 m ℓ

Before use, high-pressure steam sterilization at pH 7.1 ± 0.2 and $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ is performed for 15 minutes.

(3) Diluent

A diluent is prepared in accordance with Section 3.3.1(3).

(4) Sterilization of a membrane filtration device

A membrane filter (the pore size of $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ and the diameter of 47 mm) is placed on a filter holder, a funnel is fixed to the filter, and the filter is sterilized by high-pressure steam. Alternatively, a commercially available, presterilized, and disposable device equipped with a membrane filter is used.

(5) Culture

The membrane filter method (Figure II.2.3-3) consists of thoroughly mixing a water sample and the diluent to prepare a test solution, which is then poured into the funnel for vacuum filtration. The inner surface of the funnel is washed with the diluent and the diluent is also filtered. The filter is quickly placed on the medium and cultured at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ – $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 ± 2 hours. The quantity of the test solution is adjusted so that 20–200 colonies are formed on the filter. When no bacteria are detected on a filter, onto which 100 ml of the test solution has been poured, the test solution is judged as not detectable (N.D.).



Figure II.2.3-3 Performing the membrane filter method

(6) Counting

Coliforms form red (pink–purplish red) colonies and *E. coli* forms blue (blue–bluish violet) colonies. The number of these colonies is counted. The average number of colonies per plate and the dilution level or the quantity of the filtered test solution are used to calculate the number of bacteria per ml of the water sample.

3.3.3 Counting method for bacteria in the *Enterococcus* group and intestinal *Enterococci***(1) Counting of bacteria in the *Enterococcus* group**

A membrane filter method similar to that described in Section 3.3.2(1) is used.

(2) Medium

M-Enterococcus Agar (m Azide Agar) is used.

[M-Enterococcus Agar]

Pancreatic digest of casein	15.0 g
Papaic digest of soybean meal	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
KH ₂ PO ₄	4.0 g
Glucose	2.0 g
NaN ₃	0.4 g
Triphenyltetrazolium chloride	0.1 g
Agar	10.0 g
Purified water	1000 ml

Before use, these ingredients are dissolved into purified water while heating at pH 7.2 ± 0.2.

(3) Diluent

A diluent is prepared in accordance with Section 3.3.1(3).

(4) Culture

The membrane filter method is used in accordance with Sections 3.3.2(4) and 3.3.2(5). The filter is cultured at 37 °C ± 2 °C for 48 ± 3 hours.

(5) Counting

Bacteria that have formed pale pink to red colonies are defined as belonging to the *Enterococcus* group and the number of these colonies is counted (Figure II.2.3-5). The average number of colonies per plate and the dilution level or the quantity of the filtered test solution are used to calculate the number of bacteria per ml of the water sample.

(6) Counting of intestinal enterococci

Each colony formed in the bacterial counting procedure in the *Enterococcus* group is statically cultured in brain heart infusion broth with 6.5 % sodium chloride at 45 °C ± 0.5 °C for 48 hours. For each water sample, bacteria are collected from colonies to be used for counting. When the number of colonies is below 100, bacteria are collected from all the colonies. When the number of colonies exceeds 100, bacteria are collected from 100 or more colonies. Bacteria detected in this culture method are defined as intestinal enterococci, and the number of these bacteria is counted (Figure II.2.3-6).

[Brain heart infusion broth]

Pancreatic digest of gelatin	14.5 g
Brain heart, solids from infusion	6.0 g
Peptic digest of animal tissue	6.0 g
NaCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
Purified water	1000 ml

This broth is used after performing high-pressure steam sterilization at pH 7.4 ± 0.2 and 121°C ± 1°C for 15 minutes.

3.3.4 Counting methods for *Vibrio cholera* and toxicogenic *Vibrio cholera* (O1 and O139)

The following counting methods described are used for water samples. The regulation D-2 also regulates zooplankton samples. However, collection of 1 g of zooplankton requires a great deal of labor, and this collection is presumed to be impossible in practice. Therefore, this paper does not describe this.

(1) Counting of *Vibrio cholera*

A membrane filter method similar to that described in Section 3.3.2(1) is used.

1) Medium

Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) Agar is used.

[TCBS Agar]

Peptone	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium citrate	10.0 g
Na ₂ S ₂ O ₃	10.0 g
NaCl	10.0 g
Ferric citrate	1.0 g
Oxgall	5.0 g
Sodium cholate	3.0 g
Sucrose	10.0 g
0.2%Thymol Blue	20 ml
2%Bromothymol Blue	20 ml
Agar	15.0 g
Purified water	1000 ml

Before use, these ingredients are dissolved into purified water while heating at pH 8.6 ± 0.2 .

2) Diluent

A diluent is prepared in accordance with Section 3.3.1(3).

3) Culture

The membrane filter method is used in accordance with Sections 3.3.2(4) and 3.3.2(5). The filter is cultured at $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 24 ± 2 hours.

4) Counting

Bacteria that form yellow colonies are defined as *Vibrio cholera*, and the number of colonies is counted (Figure II.2.3-4). Subsequent steps are the same as those described in Section 3.3.2(6).



Figure II.2.3-4 Detection of *Vibrio cholera*
(Yellow colonies are counted as *Vibrio cholera*)

(2) Counting of toxicogenic *Vibrio cholera*

- 1) Each colony detected during the counting of *Vibrio cholera* is statically cultured in salt-free alkaline peptone water at $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 6–18 hours. For each water sample, bacteria are collected from colonies to be used for counting. When the number of colonies is below 100, bacteria are collected from all the colonies. When the number of colonies exceeds 100, bacteria are collected from 100 or more colonies. Since this enrichment culture method inhibits the growth of marine bacteria belonging to the genus *Vibrio*, only the cultured bacteria are used for counting. The salt-free alkaline peptone water after being cultured is used as an antigen suspension (Figure II.4.3-5).

[Salt-free alkaline peptone water]

Peptone	10.0 g
Purified water	1000 ml

This water is used after performing high-pressure steam sterilization at $\text{pH } 8.6 \pm 0.2$ and $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 minutes.

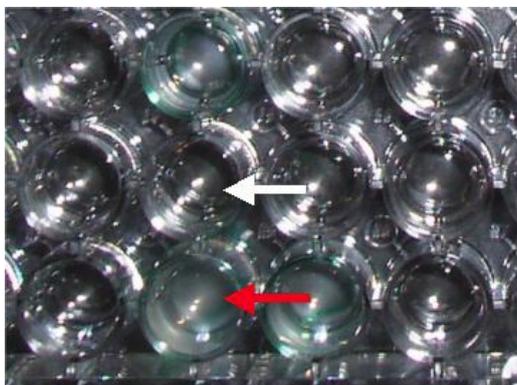


Figure II.4.3-5 Example of judgment of antigen suspension
(The red arrow indicates positive and the white arrow indicates negative)

- Slide agglutination of toxicogenic *Vibrio cholera* O1 and O139 is performed using antiserum. The antigen suspension obtained in Section 1), each antiserum, and a physiological saline solution are mixed on a slide glass. When agglutination is clearly recognized by the naked eye, the antigen suspension is judged as positive.

3.4 Water quality

The G8 regulates items used for observing water quality in order to understand environmental parameters during tests.

In the land-based tests, temperature, pH, salinity, Dissolved Oxygen (DO), total suspended solids (TSS), dissolved organic carbon (DOC), particulate organic carbon (POC), and Nominal Turbidity Unit (ex. Nephelometric Turbidity Unit :NTU) are observed during the uptake, storage, treatment, and discharge of ballast water to the storage tank.

In the shipboard tests, temperature, salinity, total suspended solids (TSS), and particulate organic carbon (POC) are observed during the uptake, storage, treatment, and discharge of ballast water to the ballast tank.

Water temperature, pH, DO, and NTU, are measured with a sensor measuring device.

Here, analytical methods for TSS, POC and DOC, which cannot be measured using any instrument, are described below. This paper also describes a method to measure salinity.

3.4.1 TSS

- A membrane filter with 0.4 μm particle-holding capacity is washed with distilled water at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for one hour three times.
- The washed filter is dried naturally, dried again at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ – $70 \text{ }^\circ\text{C}$ for approximately 2 hours, and stored in a desiccator for several days. Subsequently, the weight of the filter is weighed using a balance with a sensitivity of approximately 0.1 mg. The weighing is repeated several times and a constant value is obtained.
- A collected water sample is filtered as quick as possible (within 12 hours after the collection) using the filter weighed in Step 2). Vacuum filtration can be used for this step. The filtration quantity can be determined after examining the collection status of particles. In addition, the filtration quantity is recorded.
- Immediately after the filtration, the filter is removed from the filtration device and placed on a glass filtration device that has a slightly larger size than the filtration device.
- The filter placed on the glass filtration device is placed under vacuum while being sprayed 3–4 time with an ammonium carbonate solution (35 g of ammonium carbonate is dissolved into 1 ℓ of distilled water (3.5 % solution)) to wash out saltwater, etc. The same procedure is also

performed for the filter used for the blank test.

- 6) The filter after Step 5) is preserved by folding it, placing it in a container, and storing it chilled or frozen.
- 7) The filter is weighed after being dried in a drier at 60 °C for 2 hours. The weighing is repeated several times and a constant value is obtained.
- 8) TSS is obtained using the following equation:

$$\text{TSS (mg/ℓ)} = (W2 - W1 - B) / V$$
 where W1 represents the weight of the filter before sample filtration (mg), W2 represents the weight of the filter after sample filtration (mg), B represents the blank correction value, and V represents the filtration quantity of saltwater (ℓ).

3.4.2 POC

- 1) Pretreatment is performed using a glass fiber filter (GF/F) with 0.7 μm particle-holding capacity. Before the pretreatment, the filter is heated at 450°C for several hours.
- 2) The filter (with suspended matter collected) is wrapped with aluminum foil as a sample used for analyzing POC and preserved in a refrigerator at -20 °C or lower.
- 3) The filter is analyzed after drying at 60 °C for more than 4 hours in a drier.
- 4) The dried filter with suspended matter is placed in a carbon/hydrogen/nitrogen (CHN) analyzer and combusted at high temperatures. The carbon dioxide concentration is measured to obtain the carbon content.
- 5) A blank value is obtained based on the carbon content of a GF/F, which has been heated but has not been used for filtration of a water sample, measured using a CHN analyzer to obtain a constant value. This constant value is subtracted from the carbon content obtained in Step 4) to obtain the quantity of POC.
- 6) When particulate inorganic carbon derived from foraminifera and coral may be contained in a water sample, acid treatment is performed for the filter after the water sample has passed through. After removing inorganic carbon, POC is measured.

3.4.3 DOC

- 1) Prepare by filtration. Filters used for filtration are added at 450 °C for several hours. GF/F with a particle holding capacity of 0.7 μm subjected to heat treatment is used.
- 2) The filtered filtrate is stored in a bottle and used as an analysis sample of DOC.
- 3) DOC is analyzed by combustion oxidation / infrared TOC analysis method.

3.4.4 Salinity

- 1) 200 ml of a water sample is contained in a 250 ml vessel.
- 2) The salinity of the water sample is analyzed using a high-precision salinity analyzer (Tsurumi Seiki Co., Ltd.).
- 3) In addition, the high-precision salinity analyzer is calibrated using standard sea water with a known salinity, and the value obtained in Step 2) is corrected.

Annex 1 Example of sample list (Shipboard testing)
 Sample Lists (No.1)

L size organisms (500ml Bottle)

Test cycles	Organisms Size	Sample	Sampling at	Collected sample	Sample Bottle Name	Remarks
No. -	L (50µm<)	Test water	beginning	①	12- 1 LG1①	
			middle	①	12- 1 LG1②	
			end	①	12- 1 LG1③	
		Treated	beginning	①	12- 1 LS1①	
				②	12- 1 LS1②	
				③	12- 1 LS1③	
			middle	①	12- 1 LS2①	
				②	12- 1 LS2②	
				③	12- 1 LS2③	
			end	①	12- 1 LS3①	
				②	12- 1 LS3②	
				③	12- 1 LS3③	
		Control	beginning	①	12- 1 LT1	
			middle	①	12- 1 LT2	
			end	①	12- 1 LT3	

S size organisms (1000ml Bottle)

Test cycles	Organisms Size	Sample	Sampling at	Collected sample	Sample Bottle Name	Remarks
No. -	S (10~50µm)	Testwater	beginning	①	12- 1 SG1①	To adopt only one sample
				②	12- 1 SG1②	
				③	12- 1 SG1③	
			middle	①	12- 1 SG2①	To adopt only one sample
				②	12- 1 SG2②	
				③	12- 1 SG2③	
			end	①	12- 1 SG3①	To adopt only one sample
				②	12- 1 SG3②	
				③	12- 1 SG3③	
		Treated	beginning	①	12- 1 SS1①	
				②	12- 1 SS1②	
				③	12- 1 SS1③	
			middle	①	12- 1 SS2①	
				②	12- 1 SS2②	
				③	12- 1 SS2③	
			end	①	12- 1 SS3①	
				②	12- 1 SS3②	
				③	12- 1 SS3③	
		Control	beginning	①	12- 1 ST1①	To adopt only one sample
				②	12- 1 ST1②	
				③	12- 1 ST1③	
			middle	①	12- 1 ST2①	To adopt only one sample
				②	12- 1 ST2②	
				③	12- 1 ST2③	
end	①		12- 1 ST3①	To adopt only one sample		
	②		12- 1 ST3②			
	③		12- 1 ST3③			

Sample Lists (No.2)

Bacteria (500ml Bottle)

Test cycles	Organisms Size	Sample	Sampling at	Collected sample	Sample Bottle Name	Remarks
No.-	-	Test water	beginning	①	12- 1 G1	
			middle	①	12- 1 G2	
			end	①	12- 1 G3	
		Treated	beginning	①	12- 1 S1①	
				②	12- 1 S1②	
				③	12- 1 S1③	
			middle	①	12- 1 S2①	
				②	12- 1 S2②	
				③	12- 1 S2③	
			end	①	12- 1 S3①	
				②	12- 1 S3②	
				③	12- 1 S3③	
		Control	beginning	①	12- 1 T1	
			middle	①	12- 1 T2	
			end	①	12- 1 T3	

Water quality (2000ml Bottle)

Test cycles	Organisms Size	Sample	Sampling at	Collected sample	Sample Bottle Name	Remarks
No.-	-	Test water	middle	①	12- 1 G2	
		Treated	middle	①	12- 1 S2	
		Control	middle	①	12- 1 T2	

Annex 2 Field note for analysis (organisms in S- and L-size groups)

Test Name				Data Sheet No. /								
Organisms groups	S	L	Test day : Y: M: D: : ~ :						Analyst Analysis section () Analyst name :		Examination sing	
Sample Name			Analysis day : Y: M: D: : ~ :									
Original Sample Vol. (mL)			Influent Discharge ; Test-water Treated Control ; Beginning Middle End ; ① ② ③									
Concentration Sample Vol. (mL)			【 Remarks 】									
Separation Sample Vol. (mL)												
Split Rate												
Amount of sample before concentration (mL)												
species	Counts	Viable organisms	Not survive organisms	Minimum dimension of viable organisms (μ m)							Remarks (Colony etc.)	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												

Annex 3-1 Field note for analysis (microorganism: heterotrophic bacteria)

Heterotrophic bacteria		Data Sheet No. /	
Test Name		Test day: Y: M: D: : ~ :	Analyst Analysis section ()
-	-	Incubation start day: Y: M: D: : ~ :	Analyst name:
-	-	Colony count day: Y: M: D: : ~ :	
Sample bottle name		Influent Discharge ; Test-water Treated Control ; Beginning Middle End ; ① ② ③	

Sub sample volum (ml)		(Freshwater medium)	(Marine water medium)	(Freshwater medium)	(Marine water medium)	(Freshwater medium)	(Marine water medium)
		Colony numbers (Freshwater medium)	Colony numbers (Marine water medium)	CFU/ml (Freshwater)	CFU/ml (Marine)	Adopted value (CFU/ml) (Freshwater)	Adopted value (CFU/ml) (Marine)
10 ⁻⁰	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						
10 ⁻¹	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						
10 ⁻²	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						
10 ⁻³	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						
10 ⁻⁴	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						
10 ⁻⁵	①						
	②						
	③						
	④						
	⑤						

Sub sample volum	mL
10 ⁻⁰	1
10 ⁻¹	0.1
10 ⁻²	0.01
10 ⁻³	0.001
10 ⁻⁴	0.0001
10 ⁻⁵	0.00001

Blank test

(Freshwater medium)	BL1 : BL2 : BL3 :
(Marine water medium)	BL1 : BL2 : BL3 :

【Remarks】

Annex 3-2 Field note for analysis (microorganism: *Escherichia coli*)

Coliform and <i>Escherichia coli</i>			Data Sheet No. /	
Test Name		Test day: Y; M; D; : ~ :	Analyst Analysis section () Analyst name :	Examination sing
-	-	Incubation start day: Y; M; D; : ~ :		
-	-	Colony count day: Y; M; D; : ~ :		
Sample bottle name		Influent Discharge ; Test-water Treated Control ; Beginning Middle End ; ① ② ③		

Filtration Vol.	<i>E. coli</i>	Coliform	<i>E. coli</i>	Coliform	<i>E. coli</i>	Coliform	<i>E. coli</i>	Coliform
(ml)	Colony numbers	Colony numbers	CFU/100ml	CFU/100ml	average CFU/ml	average CFU/ml	Adopted value (CFU/ml)	Adopted value (CFU/ml)
10 ²								
10 ¹								
10 ⁰								
10 ⁻¹								
10 ⁻²								

10 ²	100
10 ¹	10
10 ⁰	1
10 ⁻¹	0.1
10 ⁻²	0.01

Annex 3-3 Field note for analysis (microorganisms: intestinal enterococci and *Vibrio cholera*)

<i>Enterococcus</i> group and intestinal <i>Enterococci</i>		データシートNo. /	
Test Name		Test day: Y: M: D: : ~ :	Analyst Analysis section ()
-	-	Incubation start day: Y: M: D: : ~ :	Analyst name:
-	-	Colony count day: Y: M: D: : ~ :	
Sample bottle name		Influent Discharge ; Test-water Treated Control ; Beginning Middle End ; ① ② ③	

Filtration Vol. (ml)	<i>Enterococcus</i> group				intestinal <i>Enterococci</i> (confirm test)			
	Colony numbers	CFU/100ml	average (CFU/ml)	Adopted value (CFU/ml)	Isolation colony numbers	Re growth colony numbers	average (CFU/ml)	Adopted value (CFU/ml)
10 ²								
10 ¹								
10 ⁰								
10 ⁻¹								
10 ⁻²								

10 ²	100
10 ¹	10
10 ⁰	1
10 ⁻¹	0.1
10 ⁻²	0.01

<i>Vibrio cholera</i> and toxicogenic <i>Vibrio cholera</i>		データシートNo. /	
Test Name		Test day: Y: M: D: : ~ :	Analyst Analysis section ()
-	-	Incubation start day: Y: M: D: : ~ :	Analyst name:
-	-	Colony count day: Y: M: D: : ~ :	
Sample bottle name		Influent Discharge ; Test-water Treated Control ; Beginning Middle End ; ① ② ③	

Filtration Vol. (ml)	<i>Vibrio cholera</i>				toxicogenic <i>Vibrio cholera</i> (confirm test)				
	Colony numbers	CFU/100ml	average (CFU/ml)	Adopted value (CFU/ml)	Isolation colony numbers	Salt-free alkaline peptone water (positive numbers)	performed using antiserum (positive numbers)	average (CFU/ml)	Adopted value (CFU/ml)
10 ²									
10 ¹									
10 ⁰									
10 ⁻¹									
10 ⁻²									

10 ²	100
10 ¹	10
10 ⁰	1
10 ⁻¹	0.1
10 ⁻²	0.01

Annex 4-1 Method using neutral red (technical document 1)

Source: Test criteria before the execution of the Guidelines for Approval of Ballast Water Management Systems announced by the Inspection and Measurement Division, the Marine Bureau, the Ministry of Land, Infrastructure and Transport on November 21, 2011, pp. 102–104.

2. ニュートラルレッドを用いた方法

2.1 適用可能生物（試験に適用した生物/生物群）

L サイズ： カイアシ類、ゴカイ幼生、シオミズツボワムシを含む多くの動物プランクトン（※ただしアルテミアは全く染色されない。二枚貝幼生への染色性が悪い場合もある）、珪藻類等

S サイズ： 原生動物や植物プランクトン（珪藻類、渦鞭毛藻類、テトラセルミス等）（※染色可能な植物プランクトンは鮎崎&韓 2006 に詳しい）

2.2 使用試薬

neutral red ($C_{15}H_{16}N_4=228.78$)

CAS No. : 553-24-2

2.3 必要機材

光学顕微鏡（実体顕微鏡においても透過光源が必要）、マイクロピペット等

2.4 作業手順

1) Working solution の作成

蒸留水を用いて 1%(w/v)溶液を作成。遮光室温保存。

2) 染色サンプルの調整

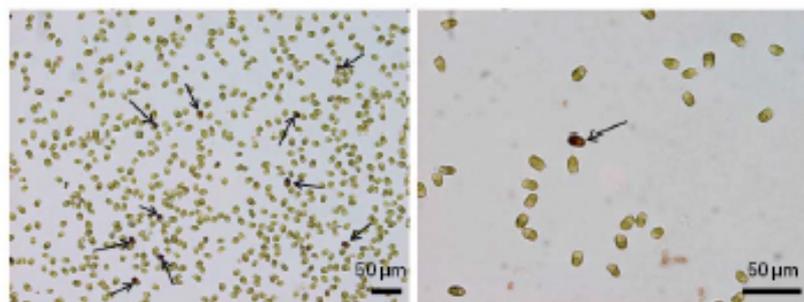
a) プランクトンを含む試水 10 ml に対して Working solution 5 μ l を加え、静かに転倒混和。

b) 環境水温下で 30～60 分間インキュベート。

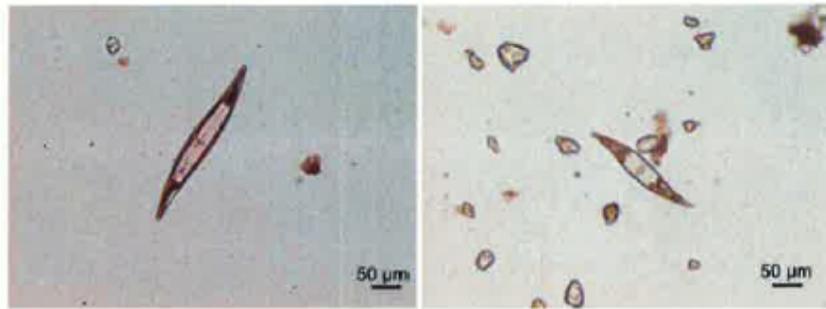
c) 光学顕微鏡（透過光下）で染色性を確認。

2.5 viability 判定規準例（写真等）

生存個体はニュートラルレッドに染色される鮮赤色部位を持つ。（細胞・組織全体が染まるのではなく、細胞内のリソソーム顆粒が染色される。）以下に加熱処理によるラボラトリー実験結果および加熱処理型システムに応用した例を示す。

S サイズグループ

上図、テトラセルミスの死細胞（加熱処理）に生細胞を加えニュートラルレッド染色した結果。生細胞のみが染色されている（矢印）。



上図、加熱型処理システムによる珪藻 *Pleurosigma* sp. の処理前 (左) と処理直後 (右)。処理後の細胞は染色されない。

L サイズグループ



上図、シオミズツボムシ (a)、カイアシ類 (b; *Paracalanus parvus*)、珪藻 *Coscinodiscus wailesii* (c) の染色例。何れも生個体・生細胞である。

2.6 留意事項

- 一部のプランクトン種に対して染色性が悪い場合がある。必ずポジティブコントロールを取る。
- 試水中に染色剤を吸着するような浮遊物が多い場合は、染色液の添加濃度を適宜増やす。3 倍程度増やしても死亡個体は染色されない。
- ニュートラルレッドの溶解性と赤色色調は pH に大きく依存する。一般的な海水 (pH 8.0) では溶解性を保ち淡黄色を呈する。生体内の酸性細胞内器官に取り込まれた後は鮮やかな赤色を呈する。試水の pH が高い場合 (例えば pH 8.5 程度) はニュートラルレッドの溶解性が低くなり、生体への取り込みが妨害される。pH が低い場合 (例えば pH 7.0 を下回る場合) は海水自体が鮮赤色を呈し、検鏡が困難となる。
- 処理水に残存する様々な化学物質がニュートラルレッド発色団の退色を引き起こすことが予想される。適切な方法で「偽陰性」を与えないという証明が必要である。

2.7 参考文献

- Crippen and Perrier (1974) The use of neutral red and evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technology* 49: 97-104.

- ・ 鋤崎 俊二・韓 東勲 (2006) 植物プランクトン細胞の生死判別ー自然海水中に存在する植物プランクトンへの生体染色法の適用可能性ー. 日本海洋生物研究所年報 2006 年版: 50-54.
- ・ Koike et al. (2010) Thermal Aqua-Filtration (TAF) System: A New Concept of Environment-Friendly BWMS Applying “Retrieved Heat” to Eliminate Living Organisms, WMU Journal of Maritime Affairs, in press.

2.8 問合せ先

広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授 小池一彦

kazkoike@hiroshima-u.ac.jp

Annex 4-2 Method using neutral red (technical document 2)

Source: S. Sukizaki and D. Han (2006): Viability assay of phytoplankton cells – Possibility of applying a vital staining method to phytoplankton living in natural seawater, 2006 Annual Report of Marine Biology Research Institute of Japan, pp. 50–54.

MBRIJ Ann. Rep., 2006

(速報)

植物プランクトン細胞の生死判別

－自然海水中に存在する植物プランクトンへの生体染色法の適用可能性－

鋤崎 俊二・韓 東勲

1. はじめに

2004年2月に、国際海事機関(IMO)においてバラスト水を介した有害な水生生物や病原微生物の移動による、環境、健康、財産、資源への危害を防止することを目的としたバラスト水管理条約が国際条約として採択された。本条約によって、将来的には国際航海に従事するすべての船舶に対して、バラスト水管理条約で採択された基準値(表1)を遵守することが義務づけられる。

表1に示す基準値では、排出水中に存在する生物のうち、最低寸法(minimum dimension)50 µm以上の生存生物が1 m³あたり10未満で、かつ最低寸法10 µm以上50 µm未満の生存可能生物が1 mlあたり10未満でないと、バラストタンクからの排出はできないことになっている。また、人間に対する健康の基準として、3種類の指標微生物についても排出基準値が設定されている。このため、バラスト水対策においては、これら基準値を達成できる技術の開発が進められている。

なお、本基準値で該当する生物のうち、10 µm以上の生物に関しては、処理後の生死状態を個体(細

胞)レベルで判定することが求められている。バラスト水管理条約では、『生物の生死判定方法は、形態上の変化、運動性、生命に関わる染料を使用する染色、或いは分子技術を含む。ただし、これに限定せず、適切な方法により生死判定を通じ決定されることが出来る』と記載されている。該当生物のうち、動物プランクトンは運動性の可否判定や生体染色法を通じてその生死を判断する手法が報告されている(Gaff & Okong'O-Ogola, 1970; Dressel *et al.*, 1972; Crippen & Perrier, 1974)。一方、植物プランクトンに関しては、大半が運動能力を持たないため、細胞の活性状態を判断する方法として、主に細胞内に有する活性度合が反映される物質の多寡を対象に研究が行われてきた。近年の研究としては、蛍光顕微鏡でRB(rodamin B)、CFW(calcofluor white)やFDA(Fluorescein diacetate)を用いた植物プランクトンの活性測定法が報告されているが(Pouneya 1997; 山田, 2000)、現場での測定には時間と施設の制限があり汎用性に乏しい。

Crippen & Perrier(1974)は、動物プランクトンと培養した植物プランクトンを用い、Neutral Red

表1 バラスト水管理条約で採択された基準値

1.	less than 10 viable organisms per cubic metre greater than or equal to 50 micrometres in minimum dimension.; and
2.	less than 10 viable organisms per milliliter less than 50 micrometres in minimum dimension and greater than or equal to 10 micrometres in minimum dimension.; and
3.	less than the following concentrations of indicator microbes, as a human health standard: ① Toxicogenic <i>Vibrio cholera</i> (serotypes O1 and O139) with less than 1 Colony Forming Unit (cfu) per 100 milliliters or less than 1 cfu per 1 gramme (wet weight) of zooplankton samples. ② <i>Escherichia coli</i> less than 250 cfu per 100 millilitres.; and ③ Intestinal <i>Enterococci</i> less than 100 cfu per 100 millilitres.

($C_{15}H_{17}ClN_4$ 、以下 NR) と、Evans Blue ($C_{34}H_{26}N_6Na_4O_{14}S_4$ 、以下 EB) による生体染色法によって、プランクトンの生死区分の可能性を検討している。彼らは、NR を用いることで、植物プランクトンの活性細胞と非活性細胞を簡便かつ明確に区分できることを報告した。ただし、培養細胞を用いた結果であるため、自然海水中に存在する多種の植物プランクトンに対しても適用可能であるかは明確でない。ここでは、生死判定法の一つとして、自然海水中の植物プランクトンに対する NR や EB による生体染色法の有効性について検討した結果を報告する。

2. 材料と方法

1) 植物プランクトンの採取

2005 年 10 月と 11 月に東京湾奥部の表層海水をバケツによって採取した。採取した海水は 2 L の褐色ポリ瓶に収容し、氷を充填したクーラボックス内で冷・暗条件にして実験室へ持ち帰った。

2) 植物プランクトン細胞の染色

海水中の植物プランクトンを対象に、Crippen & Perrier (1974) に準拠した方法で NR と、EB を用いた生体染色を資した。NR 染色法は赤色色素が生細胞の細胞膜の Ca-チャンネルを通してリソゾーム (lysosome) に取り込まれ蓄積する性質を利用した方法で、細胞膜が損傷を受けると取り込みが阻害される性質を用いて簡便に染色判定が可能である。生きている細胞は細胞質が赤色またはうすピンク色に染まり (写真 1)、染まらない細胞は死細胞として判定できる (写真 2)。また、EB の染色機構も NR と同様であるが、本方法では、生細胞は染まらないが、死細胞は青黒く染まる。

各染色剤は、予め蒸留水に溶かし 1% (w/v) 溶液を作成した。NR は海水サンプル 10 ml に 1% 溶液を 5 μ l (最終濃度 1:200,000 w/v)、EB は海水サンプル 10 ml に 1% 溶液を 10 μ l (最終濃度 1:100,000 w/v) 添加した。

NR は室温で約 5 分間染色し、EB は 1 時間室温で

染色した後に、計数板に移して素早く細胞の染色度合いを観察しながら計数を行った。染色有無 (生死判定) と計数作業は NR の場合は染色剤添加後 5 分、30 分、1 時間および 2 時間後に、EB は 1 時間、2 時間および 24 時間後にそれぞれ行った。なお、細胞内に色素胞が入っていない植物プランクトンは計数対象から外した。

また、植物プランクトンが完全に死滅している場合の染色性を確認するため、試料を最終濃度が 2% になるよう中性ホルマリンで固定し、細胞を死滅させた直後に染色を資す試験も同時に実施した。

3. 結果と考察

1) NR と EB の染色性の違い

NR を用いた場合、出現した全ての種類の植物プランクトンが染色できた (写真 1)。また、細胞は染色後 2~3 時間まで退色せずに持続した。さらに、運動性を有する渦鞭毛藻類などは動かなくても染まったままに在る種も見られた (写真 3)。

一方、EB を用いた場合、2 時間後まですべての種が染まらず、24 時間後に *Skeletonema costatum* と *Eucampia zodiacus* の群体中の 1~2 細胞が染まったのみであった。このため、自然の植物プランクトン群集を対象として、生死判別をおこなうためには、NR 染色法の方がより適していると判断された。また、試料を最終濃度が 2% になるよう中性ホルマリンで固定し、植物プランクトン細胞を死滅させた後に NR 染色を資した場合には、すべての細胞は染色されなかった。したがって、死滅した細胞は速やかに NR の染色性が無くなり、その生死状態をより精度良く判断できると考えられた。

2) NR で染色された植物プランクトンの種組成

今回用いた海水試料中の総細胞数は、約 470 ~ 13,200 細胞/ml の範囲にあり、典型的な赤潮が発生した時期も含まれる。優占種としては *S. costatum*、*Cyclotella* sp.、*Chaetoceros debile*、*Pseudo-nitzschia multistriata* などの珪藻類の他、渦鞭毛藻類の

Prorocentrum minimum が優占する場合もあった。また、海水試料中に出現した植物プランクトンは合計 54 種類で、東京湾で普遍的に出現する珪藻類と渦鞭毛藻類が最も多かった。さらに、珪藻類の中でも円心目の種類が多く、羽状目の種類は少なかった。NR で染色された植物プランクトンの分類群を見ると、珪藻類、黄色鞭毛藻類、渦鞭毛藻類、クリプト藻類、ラフィド藻類、ハプト藻類、ユーグレナ藻類など出現したすべての植物プランクトン種が染色された(表 2)。細胞の大きさ別に見た場合においても 10 μm 以下のナノプランクトンに属するクリプト藻類、ハプト藻類、20 μm 以上のマイクロプランクトンの他、100 μm 以上の大型珪藻類である *Coscinodiscus asteromphalus* や渦鞭毛藻類の *Noctiluca scintillans*、*Ceratium* 属も染色された。このため、植物プランクトンの分類群や細胞サイズが異なる場合においても、NR による染色性能に違いはないと考えられた。

また、表 3 には NR で染色された細胞数と非染色の細胞数を示した。今回使用した海水試料では、植物プランクトン細胞の約 87 ~ 97% が染色されたことから、植物プランクトン群集の大半は生存していたと推定された。1996 年 ~ 2003 年にかけて日本周辺海域に生息する植物プランクトン群集を対象に、蛍光色素である FDA (フルオレイセンジアセテート) を用いた染色法での研究例 ((財) 海洋生物環境研究所, 2004) でも、植物プランクトン細胞の 89 ~ 93% が生存していると報告されており、今回の植物プランクトン試料についても同程度の活性を有していたものと考えられた。

4. まとめ

Crippen & Perrier (1974) による培養細胞を用いた染色法において、多くの植物プランクトン種の活性度合いを細胞レベルで区分できることが報告されているが、自然海水中に生息する植物プランクトンにおいても、活性度合いに応じた染色結果が得られ、NR 染色法の適用できる可能性が強く示唆された。

バラスト水管理条約で定められる基準値を達成で

表 2 NR で染色された植物プランクトンの種類

No.	種名
1	珪藻類 <i>Skeletonema costatum</i>
2	<i>Leptocylindrus danicus</i>
3	<i>Leptocylindrus minimus</i>
4	<i>Thalassiosira rotula</i>
5	<i>Thalassiosira</i> spp.
6	<i>Cyclotella</i> sp.
7	Thalassiosiraceae
8	<i>Coscinodiscus asteromphalus</i>
9	<i>Coscinodiscus granii</i>
10	<i>Actinopterychus senarius</i>
11	<i>Rhizosolenia fragilissima</i>
12	<i>Rhizosolenia phuketensis</i>
13	<i>Rhizosolenia setigera</i>
14	<i>Chaetoceros affine</i>
15	<i>Chaetoceros danicum</i>
16	<i>Chaetoceros debile</i>
17	<i>Chaetoceros lorenzianum</i>
18	<i>Chaetoceros sociale</i>
19	<i>Chaetoceros</i> spp.
20	<i>Cerataulina pelagica</i>
21	<i>Ditylum brightwellii</i>
22	<i>Eucampia zodiacus</i>
23	<i>Neodelphineis pelagica</i>
24	<i>Navicula</i> spp.
25	<i>Pleurosigma</i> sp.
26	<i>Nitzschia</i> sp. (cf. <i>pungens</i>)
27	<i>Nitzschia</i> sp.
28	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>
29	<i>Cylindrotheca closterium</i>
30	黄色鞭毛藻類 <i>Distephanus speculum</i>
31	渦鞭毛藻類 <i>Prorocentrum micans</i>
32	<i>Prorocentrum minimum</i>
33	<i>Prorocentrum triestinum</i>
34	<i>Noctiluca scintillans</i>
35	<i>Gymnodinium breve</i>
36	<i>Gymnodinium</i> sp.
37	<i>Gyrodinium dominans</i>
38	<i>Gyrodinium spirale</i>
39	<i>Gyrodinium</i> sp.
40	Gymnodiniales
41	<i>Heterocapsa lanceolata</i>
42	<i>Protoperdinium bipes</i>
43	<i>Protoperdinium</i> spp.
44	<i>Ceratium furca</i>
45	<i>Ceratium fusus</i>
46	<i>Ceratium tripos</i>
47	<i>Oxytoxum</i> sp.
48	Peridiniales
49	クリプト藻類 Cryptomonadaceae
50	ラフィド藻類 <i>Fibrocapsa japonica</i>
51	<i>Heterosigma akashiwo</i>
52	ハプト藻類 Haptophyceae
53	ユーグレナ藻類 Euglenophyceae
54	不明鞭毛藻類 unidentified flagellates

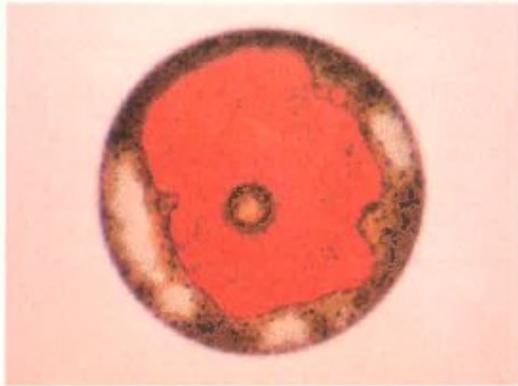


写真1-1 *Coscinodiscus asteromphalus* (直径 180 μm)

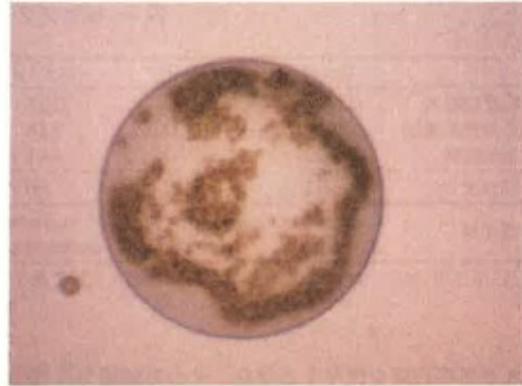


写真2-1 *Coscinodiscus asteromphalus* (直径 160 μm) 死細胞

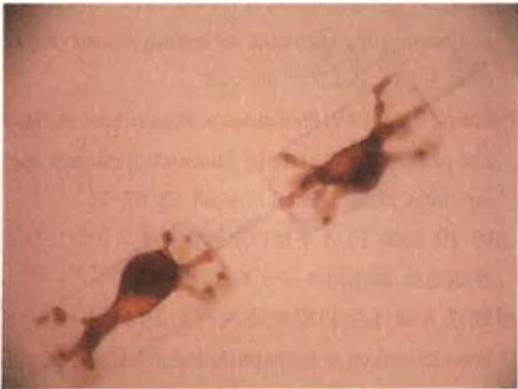


写真1-2 *Ditylum brightwellii* (短径 28 μm)



写真2-2 *Ditylum brightwellii* (短径 26 μm) 死細胞

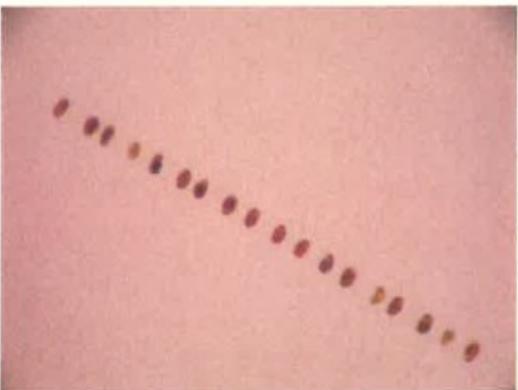


写真1-3 *Skeletonema costatum* (短径 6 μm)



写真3 *Gyrodinium spirale* (短径 34 μm)

表3 植物プランクトン細胞の染色性

	Oct.4	Oct.7	Oct.12	Oct.18	Nov.10	Nov.17	Average
染色細胞数	6,610	11,960	1,507	1,035	455	1,005	3,762
非染色細胞数	590	1,210	234	125	15	70	374
総細胞数	7,200	13,170	1,741	1,160	470	1,075	4,136
活性度(%)	91.8	90.8	86.6	89.2	96.8	93.5	91.4
優占種	<i>P. multistriata</i> <i>S. costatum</i>	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i>	<i>P. minimum</i> <i>P. triestinum</i>	<i>S. costatum</i> <i>C. debile</i>	

注) 活性度(%) : 染色された細胞数 / 総細胞数 × 100 で算出した

きる処理装置を開発する場合、その処理能力の判定をおこなうためには、より短期間に生物の生死状態を個体(細胞)レベルで判定する必要がある。今回用いたNR法は、比較的簡便に使用することができ、5分程度の染色時間で速やかに結果が判るため、その判定手段として有効な手法であると考えられた。

今後は、さまざまなプランクトン組成を持つ水域で同様な実験を重ね、データの蓄積を図るとともに、よりよい方法を検討する必要がある。

引用文献

Crippen, R. W. and J. L. Perrier, 1974. The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technology* 49: 97-104.

Dressel, D. M., D. R. Heile and M. C. Grote, 1972. Vital staining to sort dead and live copepod. *Chesapeake Sci.* 13: 156-159.

Gaff, D. F. and O. Okong'O-Ogola, 1970. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *J. Exp. Bot.* 22: 756-758.

Pouneva, Irina, 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 67-76.

山田 裕, 2000. FDA を用いた植物プランクトンの活性測定法. *海生研ニュース* 68: 6-8.

財団法人海洋生物環境研究所, 2004. <http://www.kaiseiken.or.jp/publish/itaku/h15shusui.pdf>. (2006. 1. 24 参照).

Annex 4-3 Method using neutral red (technical document 3, which was added in 2013)

Source: S. Sukizaki and K. Unno (2013): A technical method for viability of phytoplankton to be applied for examining the performance of a ballast water management system. Bulletin of Plankton Society of Japan 60(1), pp. 35–40.

Bull. Plankton Soc. Japan 60(1): 35–40, 2013

日本プランクトン
学会報
©The Plankton Society of Japan 2013

バラスト水処理装置の性能試験に適用する植物プランクトンの生死判別技術

鋤崎俊二*・海野圭祐

株式会社日本海洋生物研究所 技術研究部 〒142-0042 東京都品川区豊町 4-3-16

A technical method for assessing the viability of phytoplankton to examine the performance of a ballast water management system

SHUNJI SUKIZAKI* AND KEISUKE UNNO

Marine Biological Research Institute of Japan Co., Ltd. Research and Development Division, 4–3–16 Yutaka-cho, Shinagawa-ku, Tokyo 142–0042, Japan

* Corresponding author: E-mail: sh-sukizaki@mbrij.co.jp

Abstract In the case of examining the performance of ballast water treatment systems, it is necessary to follow the "Guidelines for approval of ballast water management systems (G8)" by the IMO-MEPC. When determining the performance of a ballast water treatment system using plankton viability, the plankton cells should be counted within 6 hours after the treatment to verify if the number of viable plankton is reduced below the ballast water management standard, or the sample should be treated in such a way so as to ensure that a proper analysis can be performed. In order to count the number of viable phytoplankton more efficiently, a suitable method of staining plankton cells with neutral red (NR) is described in the present paper.

The phytoplankton that can be stained with the NR method include Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Dinophyceae, Cryptophyceae, Raphidophyceae, Haptophyceae, Euglenophyceae and autotrophic micro-flagellates. This NR method can also be applied to general phytoplankton in other taxa and to various sizes of cells that appear in coastal areas. However, the pH value of the ballast water during the treatment must be above 7.0 and below 8.5, otherwise it may have an effect on the staining performance; therefore, a positive check is needed before the method is applied.

Key words: IMO, Ballast water, Phytoplankton, Neutral red

はじめに

各種の海洋生物が船舶に搭載するバラスト水中に混在して移動し、本来生息していない水域で増殖することで水域環境や漁業活動に悪影響を与える可能性が問題視されている。バラスト水を媒体として各種海洋生物の移動・拡散がもたらされているとの報告がなされ始めたのは、1900年代初期の頃である (Carlton 1985)。その後、船舶の大型化、高速化および輸送頻度の増大に伴い現在では年間30~40億トンのバラスト水が輸送され、同時に多くの海洋生物がバラスト水と共に移動するようになった (福代 2009)。実際、バラスト水によって伝搬さ

れたと考えられる海洋生物が各所で見いだされるようになり (例えば Hirakawa 1988, 福代 2009)、これらの生物の一部が水産資源や周辺の海域環境に影響を及ぼしていることが明らかになっている (Hallegraeff & Bolch 1992, IMO 1998)。

このため、国際海事機関 (IMO) においてバラスト水を介した有害な海洋生物や病原微生物の移動による環境、健康、財産、資源への危害を防止することを目的としたバラスト水管理条約が、2004年2月に国際条約として採択された。本条約は30カ国の批准およびその合計船腹量が35%を越えた日から12ヵ月後に発効することになっている。我が国は2013年1月現在でまだ批准していないが、既に2012年9月12日時点で36カ国が批准し、

その合計船腹量は全世界の商船全体の29.07%になっていることから、近い将来には発効要件を満たすと予想される。

本条約の発効によって、国際航海に従事するすべての船舶（但し、軍用船は除く）に対してバラスト水管理条約で採択された排出基準値（Table 1）を遵守することが義務づけられる。本基準値では、バラスト水の排出水中に存在する生物のうち、個体の最小部位（minimum dimension と称す）サイズが50 μm 以上の“生存可能生物”（Lサイズプランクトンと称す）が1 m^3 あたり10未満、かつ最小サイズが10 μm 以上で50 μm 未満の生存可能生物（Sサイズプランクトンと称す）が1 mLあたり10未満でないと排出できないことになっている。なお、生存可能生物とは、“形態・運動性・細胞内活性状態が正常な状態と確認される生物、あるいは増殖至適環境において再生産および増殖が可能と確認される生物”と規定されている（日本船用品検定協会2010）。また、人間に対する健康の基準として3種類の指標微生物についても排出基準値が設定されている。このため、船舶から排出するバラスト水については、これら排出基準値を達成できる処理装置の搭載が必要になる。

バラスト水管理条約では、上記排出基準を満たす処理装置であることを陸上試験および船上試験を通じて事前に確認し、薬剤等（オゾン等のガスを含む）を用いない処理の場合には各国の主管庁の承認を、薬剤等を用いる場合には各国の主管庁に加えIMO-MEPCの承認を得る必要がある。2012年12月11日現在、承認済みおよび承認申請中を含め国内外で50件の処理装置が開発されている（日本海事協会2012a）。これまで開発されてきたバラスト水中の生物処理方法には二つの手法がある。一つは、物理的・化学的にバラスト水中に存在する生物を殺滅させる手法である。いま一つは、バラスト水の漲水時ないし排出時にバラスト水中に存在する生物を濾過や遠心分離等によって除去する手法である。いずれの手法と

もに、陸上試験および船上試験において排出基準値を満たす生物処理性能が確保されているかについての確認試験が必要になるが、ここで最も重要な点が生存可能生物の数を如何に迅速かつ正確に計数するかである。

ここでは、浮遊生物のうち植物プランクトンを対象としてIMO-MEPCによる“バラスト水管理システム承認のためのガイドライン(G8)”（IMO-MEPC 2008）の要件を満たしながら、より迅速に生存可能な植物プランクトンを計数できるNeutral Redを用いた生体染色法（以下NR法）の活用例を紹介する。

1. 陸上試験および船上試験で求められる要件

バラスト水処理装置の生物処理性能を確認する場合、陸上試験および船上試験ともに試験のための総水量、分析用に採取するサンプル水量と数量、観察に必要な最小サンプル水量、試験回数および処理対象とする生物群の種類等が厳密に規定されている（IMO-MEPC 2008）。このうち、観察に必要な最小サンプル水量については、“バラスト水管理システム承認の際の生物分析方法（第2回改訂版）”（日本船用品検定協会2010）に基づき実施することが推奨されている。本生物分析方法では、Lサイズプランクトンについては、1 m^3 以上の原試水量についてメッシュ開口径（対角線長）が50 μm 未満の篩かプランクトンネットを用いて穏やかに濃縮し、その全量について観察することが求められている。また、Sサイズプランクトンについてもメッシュ開口径が10 μm 未満の篩かプランクトンネットを用いて穏やかに濃縮し、濃縮前の原試水量の100 mLに相当する量を観察せねばならない。また、試料中に存在する生存可能生物数の判定は、分析試料採取後6時間以内に終了させる必要がある（IMO-MEPC 2008）。

筆者らのこれまでの経験からすると、国内沿岸水中にはLサイズプランクトンが1 m^3 あたり数万～数十万個、Sサイズプランクトンが100 mLあたり数千～数万個存在

Table 1. Ballast water performance standard (IMO-MEPC 2008).

	Indicator organisms	Performance standard
plankton	L-size ($\geq 50 \mu\text{m}$)*	less than 10 viable organisms per m^3
	S-size ($\geq 10 \mu\text{m}$, $< 50 \mu\text{m}$)*	less than 10 viable organisms per mL
mikrobes	Toxicogenic <i>Vibrio cholera</i> (serotypes O1 and O139)	less than 1 cfu** per 100 mL or less than 1 cfu per 1 g (wet weight) of zooplankton samples.
	<i>Escherichia coli</i>	less than 250 cfu per 100 mL.
	Intestinal <i>Enterococci</i>	less than 100 cfu per 100 mL.

* Size is minimum dimension of plankton. ** cfu: colony forming unit.

している。つまり、この数のプランクトンを対象に6時間以内に何らかの方法で試料中の生存可能生物数を確定しなければならない。IMO-MEPC (2008) においては、本件に関して『生物の生存可能性については、形態学的変化、運動性、生命維持に必要な染料を用いた染色または分子技術を含む適切な方法による生・死判定を通じて決定可能であるが、これらの方法に限定されるわけではない。』と記載されている (日本海事協会 2012b)。植物プランクトンの場合、明確に細胞が破滅されていない限り、その細胞が死滅ないし再増殖できないかを確定することは殆ど不可能である。運動性を有する生物 (主に動物プランクトン) については、顕微鏡下でその有無からある程度の生存可能数を判断することができる可能性があるが、運動性を持たない多くの植物プランクトンについては適用することができない。また、IMO-MEPC (2008) には細胞を各種の強化培地に接種して培養し、その再増殖の有無から判断することも記載されているが、対象とする植物プランクトンによって適切な強化培地の種類を選定する必要もあり、汎用性には乏しい。このため、現時点では生体染色法等をうまく活用することが最も有効かつ効率的であると考えられる。

2. 植物プランクトンを対象とした生死判別

植物プランクトンの細胞活性状態を判断する方法として、主に細胞内に有する活性度が反映される物質の多寡を対象に研究が行われてきた。近年では、蛍光顕微鏡でRB (rodamin B)、CFW (calcofluor white) やFDA (fluorescein diacetate) を用いた植物プランクトンの活性測定法が報告されているが (Pouneya 1997, 山田 2000)、細胞壁まで明瞭に染色されないことからバラスト水処理で規定されている最小部位サイズを確認しながらの測定が

難しく、分析にも時間を要する。

Crippen & Perrier (1974) は培養した植物プランクトンを用い、Neutral Red ($C_{15}H_{17}ClN_4$, 以下NR) による生体染色法によってプランクトンの生死区分の可能性を検討し、植物プランクトンの生細胞と死細胞を簡便かつ明確に区分できることを報告した。NR法は赤色素が生細胞の細胞膜のCa-チャンネルを通してリソゾーム (lysosome) に取り込まれ蓄積する性質を利用した方法で、細胞膜が損傷を受けると取り込みが阻害される性質を用いて染色判定が可能である。生きている細胞は細胞質が赤色またはうすピンク色に染まり、染まらない細胞は死細胞として容易に判別できる (Fig. 1)。ただし、Crippen & Perrier (1974) の結果は培養細胞を用いたものであるため、自然海水中に存在する多種の植物プランクトンに対しても適用可能であるかは明確でない。そこで、鶴崎・韓 (2006) は、バラスト水処理装置の生物処理性能判定用への活用を検討するため、自然海水中の植物プランクトン群集にNRによる生体染色法を適用した。その結果、NRは植物プランクトンの種類に関係なく生細胞と死細胞を区分でき、かつ操作性も簡便なことからバラスト水処理装置の性能判定用の手法として汎用性が高いと報告した。本手法に関しては、その後小池 (2010) によって追試験が行われ、有効な判定方法であると評価されている。

3. NRを用いた染色と計数手順

A. NRの調整

NRは、予め蒸留水に溶かし1% (w/v) 溶液を作成しておく。冷暗所に保存しておけば数ヶ月間は利用可能である。ちなみに、NRは粉末状で市販されており、25g入りで約8,000円程度と安価に入手できる。

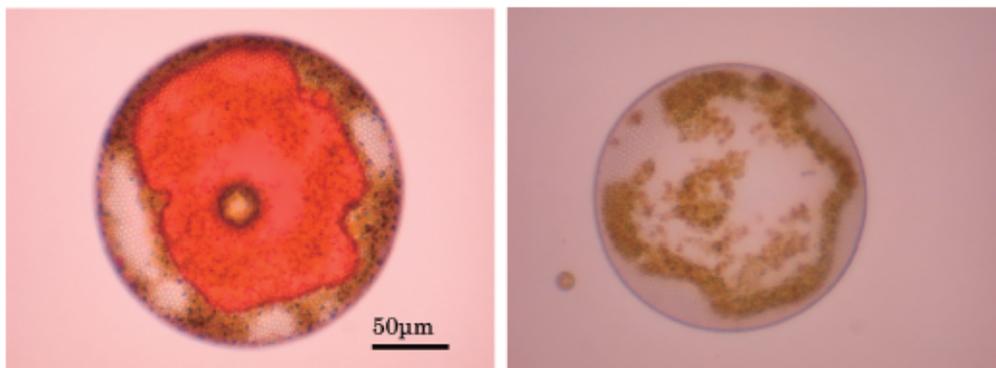


Fig. 1. Phytoplankton (The diatom species *Coscinodiscus asteromphalus*) cells stained with NR (Suktzakt & Han 2006). Left: Living cell Right: Dead cell

Table 2. List of the natural phytoplankton species in Tokyo Bay that have been stained with NR (Suktzaki & Han 2006).

	Species	L-size* ($\geq 50 \mu\text{m}$)	S-size* ($\geq 10 \mu\text{m}$, $< 50 \mu\text{m}$)	Others ($< 10 \mu\text{m}$)	
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema costatum</i>		+	+	
	<i>Leptocylindrus denticus</i>		+		
	<i>Leptocylindrus minimus</i>			+	
	<i>Thalassiostra rotula</i>		+		
	<i>Thalassiostra</i> spp.			+	
	<i>Cyclotella</i> sp.		+		
	Thalassiostraceae		+	+	
	<i>Coscinodiscus asteromphalus</i>		+		
	<i>Coscinodiscus grantii</i>		+		
	<i>Actinocyclus senarius</i>	+	+		
	<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	+	+		
	<i>Rhizosolenia phuketensis</i>		+		
	<i>Rhizosolenia setigera</i>	+	+		
	<i>Chaetoceros affine</i>		+		
	<i>Chaetoceros denticum</i>		+		
	<i>Chaetoceros debile</i>		+		
	<i>Chaetoceros lorenzianum</i>		+		
	<i>Chaetoceros socialis</i>		+		
	<i>Chaetoceros</i> spp.		+		
	<i>Ceratium pelagicum</i>	+	+		
	<i>Ditylum brightwellii</i>		+		
	<i>Eucampia zodiacus</i>	+	+		
	<i>Neodelphinella pelagica</i>		+		
	<i>Navicula</i> spp.		+		
	<i>Pleurosigma</i> sp.		+		
	<i>Nitzschia</i> sp. (cf. <i>pungens</i>)		+		
	<i>Nitzschia</i> sp.		+	+	
	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>		+		
	<i>Cylindrotheca closterium</i>			+	
	Chrysophyceae	<i>Ditylum speculum</i>		+	
		<i>Prorocentrum micans</i>		+	
	Dinophyceae	<i>Prorocentrum minimum</i>		+	
		<i>Prorocentrum triestinum</i>		+	
<i>Noctiluca scintillans</i>		+		+	
<i>Gymnodinium breve</i>			+		
<i>Gymnodinium</i> sp.			+		
<i>Gyrodinium dominans</i>			+		
<i>Gyrodinium spirale</i>			+		
<i>Gyrodinium</i> sp.			+		
Gymnodiniales			+		
<i>Heterocapsa lanceolata</i>			+		
<i>Protoperidinium bipes</i>			+		
<i>Protoperidinium</i> spp.			+		
<i>Ceratium furca</i>			+		
<i>Ceratium fusus</i>			+		
<i>Ceratium tripos</i>			+		
<i>Oxytoxum</i> sp.			+		
Peridinales			+		
Cryptophyceae		Cryptomonadaceae			+
Raphidophyceae		<i>Fibrocapsa japonica</i>		+	
		<i>Heterostigma akashiwo</i>		+	
Haptophyceae				+	
Euglenophyceae				+	
unidentified micro-flagellates				+	

* Size is minimum dimension of phytoplankton.

Table 3. Number of the natural phytoplankton cells in Tokyo Bay that have been stained with NR (Suktzakt & Han 2006).

	Oct. 4	Oct. 7	Oct. 12	Oct. 18	Nov. 10	Nov. 17	Average
Stained cells	6,610	11,960	1,507	1,035	455	1,005	3,762
Un-stained cells	590	1,210	234	125	15	70	374
Total cells	7,200	13,170	1,741	1,160	470	1,075	4,136
Percentage of viable cells in total phytoplankton	91.8	90.8	86.6	89.2	96.8	93.5	91.4
Dominant species	<i>P. multistriata</i> <i>S. costatum</i>	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i> <i>Cyclotella</i> sp.	<i>P. multistriata</i>	<i>P. minimum</i> <i>P. triestinum</i>	<i>S. costatum</i> <i>C. debile</i>	

B. 染色方法

海水試料10 mLに対して1%溶液を5 μ L (最終濃度: 5×10^{-4} % w/vol) 添加し (Crippen & Perrier 1974), 攪拌後, 20~30分間染色する。細胞の活性状態が良好なものや細胞が小さいものは, 5分程度で染色されるものもあるが, 細胞の活性状態の違いや種類によっては明瞭に染色されるまで一定の時間を要するものがあるため, 染色時間が短すぎるのは適切でない。このため, 必ず20~30分間の染色を行う。

C. 生細胞の計数

濃縮試料の一定量または全量を1 mm幅の野線付きのスライドグラスに取り分け, 接眼レンズにマイクロメータを装着した生物顕微鏡下でLサイズプランクトンないしSサイズプランクトンに該当するものについて, その細胞の染色性を観察しながら生・死を判別する。NRに染色された細胞は, 染色後少なくとも2~3時間までは退色しないことから, この間に染色されているものを“生細胞”として計数する。

4. NRを用いた生体染色例

Table 2には, 10月~11月の東京湾に生息する植物プランクトンを対象としてNRによって染色できた種類を示した。NR法で染色された植物プランクトンの分類群を見ると, 珪藻類, 黄色鞭毛藻類, 渦鞭毛藻類, クリプト藻類, ラフィド藻類, ハプト藻類, ユーグレナ藻類など, 本試料中に出現した54種類すべての植物プランクトン種が染色された。バラスト水管理条約で対象となるLサイズプランクトン (*Coscinodiscus asteromphalus* や *Noctiluca scintillans* 等) およびSサイズプランクトン (*Skeletonema costatum* や *Ceratium* 属等) の他, ナノプランクトンに属するクリプト藻類, ハプト藻類も染色された。このため, 植物プランクトンの分類群や細胞サイズが異なる場合においても, NRによる染色性能には違いはないと考えられている (駒崎・韓 2006)。

さらに, 今回使用した海水試料では植物プランクトン総細胞の約87~97%が染色されたことから, 植物プランクトン群集の大半は生存していたと推定された (Table 3)。

一方, 植物プランクトンが完全に死滅している場合の染色性を確認するため, 東京湾から採取した試料に最終濃度が2%になるよう中性ホルマリンを滴下して固定し, 細胞を死滅させた直後にNR染色を賣した場合には, すべての細胞は染色されなかった。したがって, 死滅した細胞は速やかにNRの染色性が無くなり, その生死状態をより精度良く判断できると考えられた。

5. バラスト水処理にNR法を適用する際の留意点

NR法では完全に死滅した細胞については染色されないことは確認されているが, バラスト水処理による生物処理が不十分な場合には淡く染色される場合がある。淡く染色されるものが活性を有するか非活性であるかについてはまだ十分な知見はない。このため, このような細胞が試料中に多数存在しているようであれば確実な生物処理ができていない可能性がある, と筆者らは判断するようになっている。

また, NRの色調はpH依存性であり, pH 7.5以下では赤色を示すが, 通常の海水のpHである8付近以上では黄色~オレンジ色になる (小池 2010)。pHが7.0を下回る場合には海水自体が鮮赤色を呈し, 検鏡が困難になる場合がある。また, pH 8.0以上でNRの溶解度が落ち始めることも知られており (Fleming & Coughla 1978), pHが8.5以上になる場合には生体への取り込みが妨害される。このため, バラスト水処理において, pHが大きく変化するような処理方法を採用する場合には, 事前に本手法が適用可能かのポジティブチェックが必要である。さらに, 小池 (2010) は上記に加え以下のような留意事項を指摘している。

(i) 試水中に染色剤を吸着するような浮遊物 (デト

リタスなど)が多い場合は、染色液の添加濃度を増やす。3倍程度増やしても死亡個体は染色されない。

- (ii) 各種の薬剤等を用いてバラスト水中の生物処理を実施した場合、処理水に残存する薬剤等がNR染色性に影響を与えることも想定される。このような懸念がある場合には事前に薬剤等の存在がNR法の適用に対して問題ないことを確認しておく必要がある。

おわりに

バラスト水管理条約で定められる陸上試験や船上試験を実施する場合、1回の試験で生残可能なLサイズプランクトンとSサイズプランクトンを対象に、それぞれ最大15検体について6時間以内に分析せねばならない(IMO-MEPC 2008)。運動性を持たない多くの植物プランクトン細胞を対象にその生残の有無を短時間に判断するためには、本稿で紹介したような生体染色法を活用するのが最も効率的である。NR法の操作性は簡便で、かつ明瞭に生死細胞の区分ができることから、プランクトン分析に熟練した者以外でも充分対処可能と思われる。バラスト水処理装置の性能試験に適用するプランクトンの生死判別技術の一手法として活用していただけることを期待する。

引用文献

- Carlton, J. T. 1985. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organisms: the biology of ballast. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23: 313-371.
- Crippen, R. W. & J. L. Perrier 1974. The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton. *Stain Technology* 49: 97-104.
- Fleming, J. M. & J. Coughla 1978. Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting. *Estuaries* 1: 135-137.
- 福代康男 2009. バラスト水による導入の特徴. 海の外来生物 III 部 13章. 日本プランクトン学会・日本ベントス学会編. pp. 195-204. 東海大学出版会. 神奈川.
- Hallegraeff, G. M & C. J. Bolch 1992. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ship's ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.* 14: 1067-1084.
- Hirakawa, K. 1988. New records of the north Pacific coastal planktonic copepods, *Acartia omorii* (Acartidae) and *Oithona davisae* (Oithonidae) from southern Chile. *Bull. Mar. Sci.* 337-339.
- IMO 1998. Alien Invaders—putting a stop to the ballast water hitchhikers. Focus on IMO, IMO, London, 17 pp.
- IMO-MEPC 2008. Guidelines for approval of ballast water management systems (G8), http://www.classnk.or.jp/hp/pdf/activities/statutory/ballastwater/guidelne_g8_rev.pdf (2012.12.20参照).
- 小池一彦 2010. ニュートラルレッドを用いた方法. 102-104. バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法(第2回改訂版). 財団法人日本船用品検定協会.
- 財団法人 日本船用品検定協会 2010. バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法(第2回改訂版). 104 pp.
- 一般財団法人 日本海事協会 2012a. G8, G9承認を取得したバラスト水処理装置の一覧. <http://www.classnk.or.jp/hp/ja/activities/statutory/ballastwater/index.html> (2012.12.20参照).
- 一般財団法人 日本海事協会 2012b. バラスト水管理システム承認のためのガイドライン(G8)(仮訳). <http://www.classnk.or.jp/hp/ja/activities/statutory/ballastwater/index.html> (2012.12.20参照).
- Pouneya, I. 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulg. J. Plant Physiol.* 23: 67-76.
- 鶴崎俊二・韓東 敷 2006. 植物プランクトン細胞の生死判別—自然海水中に存在する植物プランクトンへの生体染色法の適用可能性—. 日本海洋生物研究所年報2006年版: 50-54.
- 山田 裕 2000. FDAを用いた植物プランクトンの活性測定法. 海生研ニュース 68: 6-8.