

# バラスト水処理装置の性能を確認するために 植物プランクトンの生死判別手法 (Neutral Red 法)

## 背景

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。このため、国際海事機関 (IMO) において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 ヶ月後に発効することになっており、発効後は、国際航海に従事する軍用船を除くすべての船舶に対して、下表に示す排出基準値を遵守することが義務づけられる。このため、国内外において、排出基準値を達

### バラスト水排出基準

対象生物	排出基準値
プランクトン	Lサイズ(≥50μm) 10個体(細胞)/m <sup>3</sup> 未満
	Sサイズ(≥10μm, <50μm) 10個体(細胞)/mL未満
微生物	毒素産生性コレラ (O1・O139) 1 cfu* / 100 mL未満、あるいは動物プランクトン湿重量1gあたり 1 cfu未満
	大腸菌 250 cfu/ 100 mL未満
	腸球菌 100 cfu/ 100 mL未満

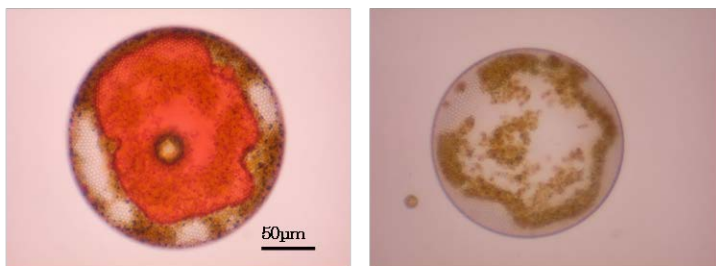
\* cfu : colony forming unit

成できるバラスト水処理装置の開発が進められている。

ここでは、排出基準で対象となる生物群のうち、IMO で求められている生物分析に必要な要件を満たしながら、より迅速に植物プランクトンの生死を計数できる Neutral Red を用いた生体染色法の適用例を紹介する。

## 概要

バラスト水処理装置のプランクトンに対する処理性能を確認する場合、分析試料採取後 6 時間以内に、試料中の L サイズ(最小部位サイズ\*\*50μm 以上)と S サイズ(最小部位サイズ 10μm 以上、50μm 未満)に相当する生物の生存可能数\*\*\*を確定しなければならない。運動性を有する動物プランクトンなどは、顕微鏡下での観察である程度の生存可能数を判断することができるが、運動性を持たない多くの植物プランクトンについては明確に細胞が破細されていない限り、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。Neutral Red 法は赤色素が生細胞の細胞膜の Ca-チャンネルを通過してリゾゾーム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生死を判定するものであ



Neutral Red で染色した *Coscinodiscus asteromphalus*

(左 : 生細胞 右 : 死細胞)

る。生きている細胞は細胞質が赤色または薄ピンク色に染まり、染まらない細胞は死細胞として判別できる。

\*\* “個体ないし細胞の、縦・横・厚さのうち、最も小さい部位の大きさ” を指す。

\*\*\* “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下において再生産および増殖が可能と確認される生物” と定義されている。



## 適用例

Neutral Red で染色できる植物プランクトンの分類群は、珪藻、黄色鞭毛藻、渦鞭毛藻、クリプト藻、ラフィド藻、ハプト藻、ユーグレナ藻など、沿岸域で通常良く出現するものである。バラスト水管理条約で対象となる L サイズ (*Rhizosolenia setigera* や *Noctiluca scintillans* など) および S サイズ (*Skeletonema costatum* や *Ceratium* 属など) 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る。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、Neutral Red による染色性能には違いはないと考えられる。

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サイズとSサイズの生物を対象に、それぞれ最大 15 検体について6時間以内に分析することが求められる。また、Lサイズは 1m<sup>3</sup>中に、Sサイズは最低 100mL中に存在する該当生物の全量について生死を判断しなければならない。運動性を持たない多くの植物プランクトンを対象にその生死を短時間かつ多量に判断するためには、Neutral Red のような生体染色法を活用することが効率的である。

なお、バラスト水処理装置の性能確認試験時に Neutral Red 法を適用することは、我が国における、バラスト水管理システム承認の際の生物分析方法\*\*\*\*においても、既に採用されている。

## Neutral Red で染色できる植物プランクトンの種類

種名	Lサイズ (≥50μm)	Sサイズ (≥10μm, <50μm)	基準対象外 (<10μm)
	珪藻		
<i>Skeletonema costatum</i>		+	+
<i>Leptocylindrus danicus</i>		+	
<i>Leptocylindrus minimus</i>			+
<i>Thalassiosira rotula</i>		+	
<i>Thalassiosira</i> spp.			+
<i>Cyclotella</i> sp.		+	
Thalassiosiraceae		+	+
<i>Coscinodiscus asteromphalus</i>		+	
<i>Coscinodiscus granii</i>		+	
<i>Actinocyclus senarius</i>	+	+	
<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	+	+	
<i>Rhizosolenia phuketensis</i>		+	
<i>Rhizosolenia setigera</i>	+	+	
<i>Chaetoceros affine</i>		+	
<i>Chaetoceros danicum</i>		+	
<i>Chaetoceros debile</i>		+	
<i>Chaetoceros lorenzianum</i>		+	
<i>Chaetoceros sociale</i>		+	
<i>Chaetoceros</i> spp.		+	
<i>Cerataulina pelagica</i>	+	+	
<i>Ditylum brightwellii</i>		+	
<i>Eucampia zodiacus</i>	+	+	
<i>Neodelphineis 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>			+
黄色鞭毛藻			
<i>Distephanus speculum</i>		+	
渦鞭毛藻			
<i>Prorocentrum micans</i>		+	
<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		+	
クリプト藻			
Cryptomonadaceae			+
ラフィド藻			
<i>Fibrocapsa japonica</i>		+	
<i>Heterosigma akashiwo</i>		+	
ハプト藻			
ユーグレナ藻			+
不明微小鞭毛藻			+

\*\*\*\* 財団法人 日本舶用品検定協会(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), 104pp.

## 文献

鋤崎俊二, 海野圭祐 (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, 日本プランクトン学会報, vol.60-No.1, 35-40.