

国立公害研究所研究報告 第26号

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, No.26, 1981.

陸水域の富栄養化に関する総合研究(X)  
*Comprehensive Studies on the Eutrophication of Fresh-water Areas*

藻類の培養試験法によるAGPの測定

*Determination of Algal Growth Potential  
by Algal Assay Procedure*

昭和53~54年度

1978-1979

須藤隆一・田井慎吾・矢木修身・岡田光正  
細見正明・山根敦子

Ryuichi SUDO, Shingo TAI, Osami YAGI,  
Mitsumasa OKADA, Masaaki HOSOMI,  
and Atsuko N. YAMANE

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

## 序

本冊は特別研究「陸水域の富栄養化に関する総合研究」の昭和53～54年度報告8分冊の一つである。富栄養化の現状は、陸水学的な手法を用い、水質や生物群集の特性を把握することによって十分評価することができるが、富栄養化の制限要因や排水の影響を検討する場合には、藻類生産の潜在能力（AGP）を測定する必要がある。AGPを測定する試験は、藻類の増殖は制限栄養物質に支配されることを応用した生物検定法であり、藻類培養試験とよばれている。本試験は、富栄養化の評価指標として注目されているにもかかわらず、試験方法が十分確立されていない。この報告では、試験方法が詳細に検討され、測定上の問題点やAGPの応用法が記載されており、試験法のマニュアルとしてまとめられている。本冊が水質測定に携わる方々にいささかでも役立つことができれば幸甚である。

昭和56年1月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

## 緒 言

**本冊の内容概要** 特別研究「陸水域の富栄養化に関する総合研究」において、本冊は他報告と異なり次のような特異な内容である。すなわち、富栄養化の象徴的な対象である藻類増殖能を、媒体である試水の化学的性質と結びつけて、実験室における規格的な培養試験によりAGP指標としてあらわすための、試料採取から保存、前処理、藻類接種、培養振盪、増殖量測定に至る過程を「試験法」的に記述し、その他海水の場合や自然水、排水などにおけるAGPの測定実例と制限因子、底泥に関するAGP試験法、試験に際しての有害物質等につき詳述したもので、この種の手引書は国内にはなかったから、本冊がAGP試験の手引として今後活用されることが期待される。

**研究のいきさつ** この特別研究は当研究所創立の翌年、すなわち昭和50年に企画され、約1年ていどの準備・調整期間を経て実施に移されたもので、対象陸水として研究所から至近の距離にある霞ヶ浦を選び、フィールド調査とデータ収集が始まった。52年4月に特別研究として正式にスタートしてからは霞ヶ浦のみでなく、全国の湖沼をも対象としたが、湖沼と汚濁源の流域の関係が比較的シンプルな系として独特の調査を行った湯の湖を除き、霞ヶ浦以外の他湖沼では霞ヶ浦で行ったようなルーチンサーベイが不可能であったので、主として夏期における各湖沼の水質特性をつかむためのフィールド調査のみに止め、その成果は湖沼一般の富栄養度評価の研究や、他湖沼との比較における霞ヶ浦の特性把握に役立てた。

**研究スタッフと研究の性格** この特別研究には、研究所の9部のうち6部が参加し、35名の研究者が寄与している。その内訳は水質土壌環境部13、総合解析部6、生物環境部5、環境情報部5、計測技術部4および技術部2である。その専門分野も陸水学、生態学、環境工学のようなフィールド調査に直接関係のあるものから、気象学、地文学、情報工学、社会工学といった諸分野にまで亘っていて、まさに典型的な学際研究である。第1期の特別研究の特徴は、第2期（昭55年4月より）のそれが「陸水域の富栄養化防止」をかかげたのに対し、明らかに基礎研究の色彩が濃い。霞ヶ浦でいえば、その流域、背後地まで含めた面、空間でみられる物質移動、状態変化から、視覚・心理学的価値評価まで、富栄養化に関連する可能な限りの角度からスポットをあてて、その実態、実相をつかむことを試みた。

**本報告各分冊の紹介** 成果をまとめて1冊にするには種々難点があるので、全体をRシリーズで8分冊（R-19……R-26）、プラス総括編（R-27）計9冊とした。本冊はその一つであるが、全体との関係を知って貰うため分冊のタイトルを紹介すると、Ⅲ、「霞ヶ浦（西浦）の湖流」、Ⅳ、「霞ヶ浦の微地形、気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響」、Ⅴ、「霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価」、Ⅵ、「霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量」、Ⅶ、「湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究」、Ⅷ、「富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究」、Ⅷ、「*Microcystis* の増殖特性」、Ⅹ、「藻類培養試験法によるAGPの測定」で、これに加えて総

括編がある。Ⅲ～Ⅹを通じて、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵは標題が示す通り霞ヶ浦、とくに西浦の現象を扱ったもので、Ⅷもその色彩が強い。

**霞ヶ浦をめぐる行政の現実と研究の今後** 第一期特別研究のこれらの成果（Ⅰ～Ⅹ）を足がかりに第二期特研で富栄養化防止策を研究するにあたり、霞ヶ浦の現実を見直すと、一方で現行水質環境基準 A 類型を達成すべしという命題が重くのしかかっており、富栄養化防止関係の諸要求充足のための対応策を早急に講じなければならない。また一方では、水資源公団が昭和60年度完成を期している霞ヶ浦開発事業があって、その主たる目的である43m<sup>3</sup>/秒の新規利水と沿岸の浸水や塩害防止のため湖周の護岸や常陸川水門の改造が行われ、それにより調節可能水深は2.85mとなり、治水容量3.4億m<sup>3</sup>、利水容量2.8億m<sup>3</sup>となる。この合計である有効貯水量6.2億m<sup>3</sup>は、霞ヶ浦の現貯水容量8.8億m<sup>3</sup>に比し極めて大きな数字であり、この新規利水により常陸川水門を流下する放流量は、現在の14億m<sup>3</sup>/年から5億m<sup>3</sup>/年と大幅に減ずる。富栄養化しやすい浅湖の代表である霞ヶ浦にとって極めて重大なこの改造が将来水質にどう影響するかの予測も重要な課題である。われわれはこうした行政上の現実を注視して今後の研究を有効に展開することを心掛けるつもりだが、将来水質の予測は正直なところ難しいものになると予想される。研究グループがなお保持している高いポテンシャルに期待するのみである。

昭和56年1月

国立公害研究所

水質土壤環境部長

合 田 健

# 目 次

1. 藻類培養試験の意義と目的	1
2. A G P 試験法：淡水用	3
2.1 採水、運搬、保存	3
2.1.1 採水	3
2.1.2 運搬	3
2.1.3 保存	3
2.2 試水の前処理	3
2.2.1 濾過法	3
2.2.2 熱分解法	4
2.2.3 希釈	4
2.2.4 混合	4
2.2.5 添加試験	4
2.3 供試藻類種とその保存	5
2.3.1 供試藻類種	5
2.3.2 保存培養	6
2.4 前培養と接種	7
2.4.1 前培養	7
2.4.2 接種	7
2.5 培養条件	8
2.5.1 培養器具	8
2.5.2 培養方法	8
2.5.3 培養条件	8
2.6 藻類増殖量の測定	13
2.6.1 最大増殖量	13
2.6.2 藻類増殖のモニタリング	13
2.6.3 乾燥重量の測定	14
2.7 試験結果の整理と解釈	14
2.7.1 A G P	14
2.7.2 データの信頼性	14
3. 海水の A G P 試験法	15
3.1 使用藻類種	15
3.2 培地	15
3.3 試水の前処理	15
3.4 接種藻の調整	15
3.5 測定方法	15
3.6 栄養塩類等の添加	16
4. 自然水、排水の A G P	17
4.1 自然水の A G P	17
4.2 排水の A G P	17
4.3 A G P に及ぼす試水の前処理の影響	19

4.4	A G Pに及ぼす排水の影響	22
5.	A G Pによる制限要因の決定	24
5.1	制限栄養物質	24
5.2	実験方法	24
5.3	結果の整理	24
6.	底泥に関するA G P試験	28
6.1	底泥に関するA G P試験法の概説	28
6.2	採泥・運搬・保存	29
6.2.1	採 泥	29
6.2.2	運 搬	30
6.2.3	保 存	30
6.3	底泥のA G P試験法（その1）	30
6.3.1	試験法	30
6.3.2	試験結果	31
6.4	底泥のA G P試験法（その2）	34
6.4.1	試験法	34
6.4.2	試験法の応用	34
7.	混合培養によるA G P試験法	38
7.1	A G P試験の変法	38
7.2	測定方法	38
7.2.1	藻類の接種	38
7.2.2	培養条件	38
7.2.3	藻類増殖量の測定	38
7.3	測定例	38
8.	A G P試験による有害物質の判定法	42
8.1	自然水、排水等の藻類増殖阻害	42
8.1.1	概 要	42
8.1.2	供試溶液の調製（試水への栄養塩の添加、標準培地の調製ならびにそれらの混合）	42
8.1.3	A G P試験	42
8.1.4	試水Aの栄養塩分析	43
8.1.5	結果の整理	43
8.1.6	EDTA添加試験	44
8.1.7	試水AのA G P試験	44
8.1.8	実例（埋立地浸出水の毒性評価）	44
8.2	既知物質の毒性評価	46
8.2.1	最大比増殖速度の変化による毒性評価方法	46
8.2.2	最大増殖量の変化による毒性評価方法	48
8.3	補 遺	48
8.3.1	50%影響濃度（ $EC_{50}$ ）の求め方	48
8.3.2	比増殖速度（ $\mu$ ）の求め方	48
	引用文献	50
	図表リスト	52

## 1. 藻類培養試験の意義と目的

湖沼および内海・内湾などの閉鎖水域では、生活排水、工場排水、かんがい排水などの流入によって、富栄養化の急速な進行が続いている<sup>1)</sup>。富栄養化は、1次生産力を著しく増大させる現象であり、藻類や水生植物を異常に増殖させる。その結果として、水域はそれにかかわる人々にとって多くの悪影響をこうむるようになる。富栄養化は視覚や嗅覚によっても感知することができるが、より正確には生物学および化学的手法によって測定される。富栄養化を評価する方法として、1)透明度、2)指標生物の存否および藻類の現存量(個体数あるいはクロロフィル a)、3)1次生産力、4)溶存酸素濃度、5)窒素およびリン濃度、などの測定方法がある。富栄養化の現状は、これらの方法を組み合わせることによって充分評価することができる。しかしながら、水域に負荷される各種の排水が富栄養化の促進にどの程度の影響があるのか、あるいは藻類増殖の制限物質が何であるのかを検討する場合には、藻類生産の潜在能力を測定する必要がある。

1965年ごろから藻類生産の潜在能力の測定に関する研究が盛んに行なわれており、わが国ではこれをAGP(Algal Growth Potential)と呼んでいる(以下AGP試験とよぶ)<sup>2)</sup>。AGPは、生物の増殖は制限栄養物質に支配されるというリービッヒ(Liebig)の最少律を基礎にした生物検定である。

AGPは、藻類生産の潜在能力を最大の藻類増殖量として表わした値(乾燥重量, mg/l)と定義する。すなわち、自然水、排水などの試水に特定の藻類を接種して、一定の環境条件のもとで藻類が定常期に達するまで培養し、その増殖量を乾燥重量(mg/l)として表わした値がAGPである。AGPを測定する試験方法は、藻類培養試験(Algal Assay Procedure)とよばれており、欧米ではAAPの略語が好んで使われている<sup>3),6),7)</sup>。藻類培養試験は、1956年西独Bringmannら<sup>8)</sup>によって*Scenedesmus*を用いた研究が最初であり、続いて1964年ノルウェーのSkulberg<sup>9)</sup>によって*Scenedesmus capricornutum*を用いた実験が広範囲に実施され、その基礎が築かれた。その後米国のMaloney<sup>10),11)</sup>らによって詳細な検討が続けられ、米国環境保護庁において1971年には淡水試験法<sup>6)</sup>、1974年には海水試験法の標準法<sup>12)</sup>が制定されている。本法は米国の水質測定標準法の14版<sup>7)</sup>にも記載されている。

AGPは、単に富栄養化の現状の把握のみにとどまらず、富栄養化の予測および制御に必要な知見を得るのに役立つ。次にAGPの代表的な応用例を示す<sup>4),13),14)</sup>。

1) 排水処理における脱窒や脱リンなどの処理操作の効率を判定する。2) 放流水域の富栄養化に及ぼす排水の影響を調べる。3) 自然水および排水の藻類増殖の制限要因を決定する。4) 水中の利用可能な栄養塩量を推定する。5) 富栄養化の程度を調べる。特に湖沼においては、春季のAGPから夏季における藻類の最大増殖量が予知できる。6) 藻類増殖に対する阻害物質の有無およびその影響を調べる。

筆者らは、主として湖沼や河川などの自然水および排水など淡水を対象に、特定藻類を接種するAGPの測定について検討を加えた。したがって、この報告書に述べた試験方法は、淡水のための純粋培養を行う方法が中心である。海水用の試験、毒性を評価する試験、混合培養による試験についても触れてあるが、これらについては十分な検討を加えていない。今後とも未解決の問題については詳細に検討を続けるつもりである。



## 2. A G P 試験法：淡水用<sup>19)-21)</sup>

### 2.1 採水・運搬・保存

#### 2.1.1 採水

一般の水質調査用採水器（バンドーン採水器，北原式採水器，等）を使用する。排水の場合はペッテンコッヘル，バケツ等で差しつかえない。

#### 2.1.2 運搬

採水後は，良く洗浄した（洗浄方法は2.5.1に述べる培養器具洗浄法に準ずる）ポリビンに入れ，すみやかに実験室に運搬する。ポリビン上部の空隙は少ない方がよい。また，運搬に長時間を要する場合には，氷冷したコンテナに入れ，暗所に置くことが望ましい。

#### 2.1.3 保存

実験室に試水を持ち帰った後，すみやかに2.2で述べる前処理を行わなければならない。24時間以内に試験ができない場合は，冷暗所（4℃）に保存する。ただし，2.2.1，2.2.2で述べる前処理を行った後，試水を保存する方が望ましい。

### 2.2 試水の前処理

前処理法としては，下記の4通りがある。これらは，A G P試験の目的に応じて使いわけなければならない。その方法については，3.以降で述べる試験例を参照されたい。

#### 2.2.1 濾過法

特定の供試藻種を用いてA G Pを測定する場合，試水中に存在した藻類を除去しなければならない。これは供試藻類種以外の微生物による汚染を防ぎ，供試藻類種のみを試水中で増殖させるために不可欠な前処理である。また粒子計数器で細胞数を求める場合にも必要である。濾過は孔径 $0.45\mu\text{m}$ （ミリポアH Aフィルターなど）のメンブレン・フィルターで行う。フィルター，濾過びん等，試水に接触する器具は，あらかじめ洗浄（2.4.1.参照）し，オートクレーブ等で滅菌しておかななければならない。濾過操作は無菌室で行うことが望ましい。濾過は0.5気圧もしくはそれ以下に減圧して行う。なお，試水中に浮遊物質（SS）が多い場合は，メンブレンフィルターで濾過する前にガラスフィルター等で濾過すると，メンブレンフィルターの目づまりを防止でき，濾過時間も短縮できる。

濾過法を前処理として採用すると，試水中のSSに含まれていた栄養塩も除去される。したがって，この前前処理は，試水中に存在した可溶性の栄養塩等を対象にしてA G Pを測定する場合

に有効である。

### 2.2.2 熱分解法

この方法は、試水中の溶存栄養塩類のみならず、藻類、細菌等のSSに含まれている栄養塩類のうち、熱分解によって可溶化するものも含めてAGPを測定する場合に用いる。オートクレーブは1.1kg/cm<sup>2</sup>、121°Cで15分間行う。オートクレーブ分解にともなって試水中の炭酸ガスが失われるため、通常pHが上昇する。このため、冷却後1%の炭酸ガスを含む空気を通気し、炭酸ガスを供給するとともにpHをもとに戻すことが望ましい。通気は試水1 l に対して最低2分間行う。試水はさらに2.2.1に従って濾過処理し、試験に供する。

この前処理は、制限栄養塩の推定試験や、重金属による毒性試験には適しているが、試水中の有機物の化学変化、可溶成分の不溶化等による誤差を招くこともあるので注意を要する。

### 2.2.3 希 釈

排水のように試水中の栄養塩濃度が高い場合、BOD試験と同様に試水を希釈した後にAGPを測定する。希釈を伴うAGPは次式で算定する。

$$\text{AGP (mg/l)} = \left( \frac{\text{希釈試水の藻類増殖量 (mg/l)}}{\text{藻類増殖量}} \right) \times (\text{希釈倍率})$$

希釈水としては、イオン交換水を用いる。希釈倍率はAGP値が最大となるように設定することが望ましい。通常2次処理水では5～10倍、生下水では10～20倍希釈となる。われわれの経験では自然水の場合、希釈操作を必要とする例はほとんどなかった。

### 2.2.4 混 合

ある排水が、放流水域の藻類生産力に与える影響を予測する場合、放流水域の水と排水とを混合してAGPを測定する。混合比率は対象水域で予測される混合比率に準じて決定する。

### 2.2.5 添加試験 (Spike test)

ある試水中で増殖する藻類の最大濃度は、藻類が必要とする栄養物質のうち、相対的に最も不足する物質の濃度によって制限される(リービッヒの最少律)。したがって、このような制限物質を試水に加えたならば、新たに添加した物質、もしくは他の栄養物質が制限になるまで藻類は増殖する。すなわち、無添加の場合(対照)と比較して高いAGP値が得られるはずである。

重金属のような藻類の増殖阻害物質が試水中に存在した場合、栄養物質量に対応して藻類が増殖しないこともある。このような場合、EDTAのように重金属の毒性を低下させる物質を添加すれば、高いAGP値が得られよう。

添加試験は、対照と同時に、窒素、リン、鉄、EDTAのような物質を単独もしくは複数で添加

する。そして試水中における藻類増殖の制限物質の推定、もしくは阻害物質の有無の推定を行う。添加する物質ならびにその濃度は、目的に応じて種々考えられるが、通常次のように設定している。

リン (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 使用)	: 0.05~0.1 mgP/l
窒素 (NaNO <sub>3</sub> 使用)	: 1.0~2.0 mgN/l
鉄 (FeCl <sub>3</sub> 使用)	: 1.0~2.0 mg Fe/l
EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O使用)	: 1.0 mg/l

上記の濃度は、添加後の濃度である。これらの物質の添加にともなう試水中の他の物質の変化は最小にとどめなければならない。このためイオン交換水を用いて、まず標記の100倍濃度液を作成する。これらはオートクレーブ等で滅菌した後、試水100 mlに対し1 mlずつ添加する。(2.5.2.参照)

## 2.3 供試藻類種とその保存

### 2.3.1 供試藻類種

標準種としては、米国をはじめとして世界各国で *Selenastrum capricornutum* Printz. (緑藻類) が推奨されている。この藻類はノルウェーの Nitelva 川より O. M. Skulberg 博士により1959年に分離された。*S. capricornutum* が標準種として用いられるのは下記の理由による。

- 1) 貧栄養から富栄養までの広範囲の試水で増殖可能である。
- 2) 環境条件による形態変化が少ない。
- 3) 凝集しにくい。
- 4) 培養が容易で安定した増殖が得られる。

標準種としては次の2種がある。

- 1) *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend Elenkin (窒素固定を行わないらん藻類)
- 2) *Anabaena flos-aquae* De Brebisson. (窒素固定を行うらん藻類)

なお、珪藻については現在標準種として使用されているものはない。

標準種ではないが、供試藻類として用いられた種類には、*Nostoc muscorum*, *Chlorella* sp., *Oscillatoria* sp., *Scenedesmus* sp., *Asterionella formosa*, *Haematococcus pulvisalis*, *Scenedesmus quadricauda*, *Stigeoclonium tenue*, *Chlamydomonas* sp. などがある。排水のAGPを測定する場合、*Chlorella* や *Chlamydomonas* のような汚水性の藻類でないとは安定した培養ができない場合もある。

標準種を供試藻類種として用いることは、結果の相互比較上望ましい。しかし、特定の水域のみを対象とする場合、対象水域で優占となる藻類を分離してAGPを測定してもよい。標準種以外の藻類を用いる場合、以降に述べる培養条件、培地、接種量等が標準種と異なる場合もあるのであらかじめ十分に検討する必要がある。

### 2.3.2 保存培養

#### a. 培地

表2-1に示すAAP培地(AAM: Algal Assay Mediumとも言う)を使用する。ただし、*M. aeruginosa*は、AAP培地では、良好な増殖を示さないことがある。この場合、表2-2に示すGorhamの5倍希釈培地を使用してもよい。培地の滅菌は、無菌濾過もしくはオートクレーブ(121°C, 15分)にて行う。オートクレーブ滅菌を行う場合、沈殿物の生成を防ぐために、 $K_2HPO_4$ は別に滅菌し、冷却後混合する。

表2-1 AAP培地組成

化合物	濃度(mg/l)	元素	濃度(mg/l)
$NaNO_3$	25.500	N	4.200
$K_2PO_4$	1.044	P	0.186
$MgCl_2$	5.700	Mg	2.904
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14.700	S	1.911
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4.410	C	2.143
$NaHCO_3$	15.000	Ca	1.202
		Na	11.001
		K	0.469
微量元素			
化合物	濃度( $\mu$ g/l)	元素	濃度( $\mu$ g/l)
$H_3BO_3$	185.520	B	32.460
$MnCl_2$	264.264	Mn	115.374
$ZnCl_2$	32.709	Zn	15.691
$CoCl_2$	0.780	Co	0.354
$CuCl_2$	0.009	Cu	0.004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7.260	Mo	2.878
$FeCl_3$	96.000	Fe	23.051
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	300.000		

注1. 蒸留水もしくはイオン交換水を使用する。

注2. 培地は、オートクレーブもしくは無菌的に濾過した後、4°C、暗所に保存することが望ましい。

注3. pHは、0.1N-NaOHもしくは0.1N-HClにより、7.5 ± 0.1に調整する。

#### b. 培養方法

2.5に述べる培養器具、培養条件に準じて行う。ただし、保存のみを目的とした場合には、試験管(18mm×180mm程度)を用いた方が便利である(図2-1参照)。この場合振とうはしなくてもよい。植えつき(継代培養)は2週間に1回行う。

より長期間保存する場合には、1%の寒天を含む培地を用いる。この場合、植えつきは1か月に1度行えばよい。

表2-2 Gormamの5倍希釈培地

化合物	濃度 (mg/l) <sup>(注1)</sup>	Gaffron 微量元素溶液 (g/l)	
NaNO <sub>3</sub>	99.2 (30.3) <sup>(注2)</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.8 (1.1)	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.230
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.287
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.088
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4.0	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.125
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	11.6	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.146
EDTA	1.0	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0.474
クエン酸	1.2	NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.198
クエン酸第2鉄	1.2	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.154
Gaffron微量元素溶液	0.08 ml	Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.037
		V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O	0.035
		Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.033
		KBr	0.119
		KI	0.083

注1) pHは7.5~8.0に調整する。

注2) 前培養時のN、P濃度に対応する試薬量(2.4.1)

## 2.4 前培養と接種

### 2.4.1 前培養

試水に接種する藻類は、保存培養とは別に、AGP試験と同一の培養条件(2.5.参照)であらかじめ培養しておかなければならない。培地は保存培養と同一のものを用いる。ただし前培養でGorhamの5倍希釈培地を用いる場合、リンおよび窒素濃度はそれぞれ0.2mg-P/l, 5mg-N/lとする(表2-2)。

### 2.4.2 接種

接種する藻類は、前培養において対数増殖期にあるものを使用する。通常7~10日程度の培養令のものがこの条件に適合し、かつ接種に必要な濃度となっている。

前培養した藻類培養液を洗浄(2.5.1参照)、滅菌したフタ付遠沈管に入れ、遠心分離(1,000×g, 5分)する。分離後、上澄液をすて、滅菌したNaHCO<sub>3</sub>溶液(15mg/l)を加える。遠沈管を振とうして藻体を十分に懸濁させた後、再び遠心分離を行い、上澄液をすてる。残った藻体をNaHCO<sub>3</sub>溶液に懸濁させたものを接種藻類懸濁液とする。

初期藻類濃度を一定とするために、接種量は1ml以上とすることが望ましい(図2-2)。接種藻類懸濁液の濃度は、接種後次の初期濃度となるようNaHCO<sub>3</sub>溶液にて調整する。

*S. capricornutum*……1,000細胞/ml, もしくは0.02mg/l

*M. aeruginosa* ……10,000細胞/ml, もしくは0.2mg/l

*A. flos-aquae* ……10,000細胞/ml, もしくは0.2mg/l

## 2.5 培養条件

### 2.5.1 培養器具

培養に用いるすべてのシリンダー、フラスコ、ピペット等は洗剤（無リン洗剤が望ましい）で洗淨した後、水道水でゆすぐ。その後10%（容積比）の塩酸溶液で洗淨する。塩酸洗淨後は、5回程度水道水でゆすぎ、さらに蒸留水もしくはイオン交換水でゆすいだ後、乾燥する。無菌操作に使用する器具はアルミホイル等でつつんで乾熱滅菌（150°C、3-4時間）、もしくはオートクレーブ滅菌して乾燥する。

培養フラスコとしては、500mlの三角フラスコ(図2-3参照)、125mlの三角フラスコもしくは1,000mlのL型培養管(図2-4参照)を用いる。これらは、洗淨・乾燥後、綿栓、シリコン栓、もしくはアルミホイル等でフタをして1.1kg/cm<sup>2</sup>、121°Cで15分間オートクレーブ滅菌し、さらに乾燥した後に使用する。なお、150°Cで3~4時間乾熱滅菌を行ってもよい。

### 2.5.2 培養方法

500mlの三角フラスコの場合は100ml、125mlの三角フラスコの場合は40ml、また1,000mlのL字管の場合は500mlそれぞれ前処理した試水が無菌的に分注する。リン、窒素、EDTA、鉄などの添加試験(2.2.5)を行う場合には、これらの溶液を所定の濃度になるよう添加する。その後、前培養した供試藻種を接種する。

### 2.5.3 培養条件

#### a. 温度

25±1°C、あるいは20±1°C

#### b. 照明

白色けい光灯を用いる。照度は三角フラスコ上部より照射する場合、フラスコ外部の水表面の位置で測定する。L形培養管では底部の位置で測定する。設定照度は次のとおりである。

*S. capricornutum* : 4000±400 lx

*M. aeruginosa* : 1000±100 lx

*A. flos-aquae* : 1000±100 lx

#### c. 振とう

三角フラスコを用いる場合、90回転/分の回転式振とうを行う(図2-3)。L型培養管は30回/分のモノ型振とうを行う(図2-4)。振とう装置が得られない場合には、静置培養を行ってもよい。ただしこの場合、毎日1回手で培養容器を振とうし、容器底部に沈殿した藻体をよく懸濁させなければならない。



図2-1 供試藻類種の保存培養

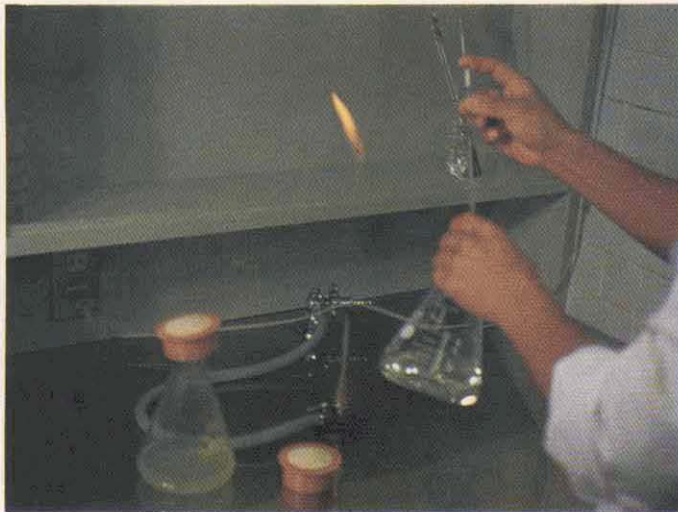


図2-2 接種



図2-3 500 ml 三角フラスコ(シリコン栓使用)による回転式振とう培養

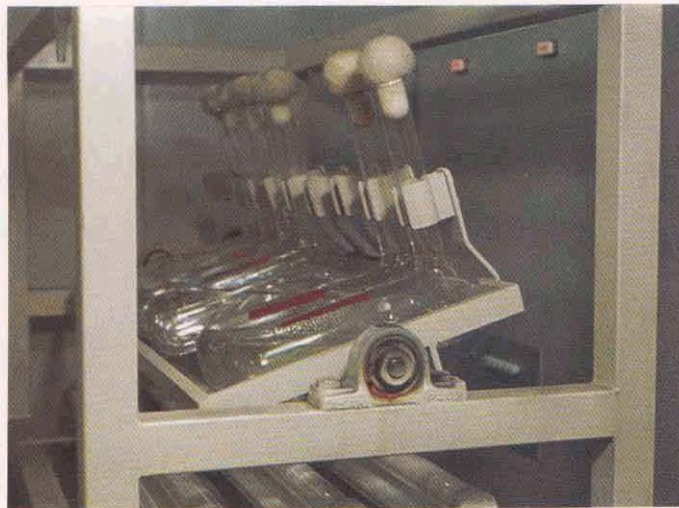


図2-4 1000 ml L型培養管(綿栓使用)によるモノ型振とう培養



## 2.6 藻類増殖量の測定

### 2.6.1 最大増殖量

AGPは、培養期間内における最大の藻類濃度(乾燥重量)に希釈率(2.2.3 参照)をかけた値(mg/l)で定義する。このため2~3日ごとに藻類濃度を測定し、最大濃度に達するまでこれを継続する。実用上、藻類濃度の増加率が1日当たり5%以下となった場合、最大値に達したと見なしてよい。

### 2.6.2 藻類増殖のモニタリング

乾燥重量により、藻類濃度をモニタリングすることは、サンプル量が大きくなるためほとんど不可能である。また必ずしも簡便かつ迅速な手法ではない。このため、通常は下記のような手法により培養期間中の藻類濃度の変化を求める。

#### 1) 粒子計数器

コールターカウンター、血球計算機等の電氣的に水中に懸濁する粒子数を測定する機器を用いる。とくにコールターカウンターの場合、平均細胞容積(MCV: Mean Cell Volume)も求められる。(粒子数)×(平均細胞容積)で得られる全粒子容積は、単なる粒子数より、乾燥重量とはるかに高い相関を示す。これらの機器に必要なサンプル量は数ml程度である。

*A. flos-aquae*のような糸状性藻類の場合、直接これらの機器で測定できない。測定誤差が大きくなり、計数用の細孔の目づまりを起こすこともある。この場合、ホモジナイザー、もしくは超音波処理によりフィラメントを切断した後に計数する。ただし、超音波などを強くかけ過ぎると細胞自身が破碎され、過少評価する可能性がある。使用する機器に応じて、乾燥重量と最も高い相関の得られる処理条件、処理時間を設定しなければならない。

#### 2) 直接計数法

血球計算板もしくはプランクトン計数板を使用し、顕微鏡(100~200倍)による直接計数を行う。

#### 3) 吸光度

培養液の750nmにおける吸光度を、分光光度計もしくは比色計によって測定する。測定には1cmの石英セルを用いる。この測定は簡便であるが、乾燥重量との相関は粒子計数法より低い。

#### 4) クロロフィル

けい光光度法によるクロロフィル濃度測定は、感度も高く、迅速な測定が可能である。ただし単位細胞量当たりのクロロフィル含有量は、試水の化学組成等によって変化することに注意を要する。また、試水中の毒性物質や有機物質によって阻害を受ける場合もある。けい光光度法による測定値は、特定の試水における藻類増殖のモニタリングには適するが、一般的なクロロフィル濃度と乾燥重量との相関を求めるには適さない。

### 2.6.3 乾燥重量の測定

藻類濃度が最大値となった後、すみやかにその乾燥重量を求める。測定にはメンブレンフィルター（孔径 $1.2\mu\text{m}$ 、あるいは $0.45\mu\text{m}$ ）を用いる。その手順を次に示す。

- 1) フィルターを $70^{\circ}\text{C}$ で2時間乾燥する。（ $75^{\circ}\text{C}$ 以上にすると、フィルターの孔径が変化する恐れがある。）
- 2) デシケーター中で1時間以上冷却した後、精密天秤で秤量する。
- 3) 培養液の適量を、2) で用意したフィルターで吸引濾過する。ただし、吸引圧は $0.5$ 気圧以下にしなければならない。必要サンプル量は通常 $50\sim 100\text{ml}$ であるが、濃度が低い場合には $100\sim 500\text{ml}$ の培養液を濾過しなければならない。
- 4) 培養液を濾過した後、 $50\text{ml}$ の蒸留水を用いて濾過器を洗浄し、器壁に付着した藻類細胞を集める。洗浄液はフィルターを通過させて、フィルター自身も洗浄する。
- 5)  $70\sim 105^{\circ}\text{C}$ で恒量になるまでフィルターを乾燥する。デシケーターで冷却後秤量し、濾過前後の重量差ならびに濾過液量より、培養液の乾燥重量を求める。

## 2.7 試験結果の整理と解釈

### 2.7.1 AGP

AGPは、試水中における最大藻類増殖量(2.6.1参照)を、乾燥重量( $\text{mg/l}$ )で表わした値である。前処理において希釈を行った場合、2.2.3で述べたように最大増殖量に希釈倍率をかけた値をAGP値とする。何段階かに希釈した場合には、希釈倍率ごとにAGP値が計算される。この場合、最大値を採用する。

AGP値は、2.6.2で述べたモニタリング後、2.6.3に従って試水ごとに乾燥重量を直接求めることが望ましい。しかし、コールカウンターによって求められる全細胞容積は、乾燥重量に対し非常に高い相関を示す。このような場合、既往のAGP測定データ、ならびに人工培地による培養データを使用してキャリブレーションチャート（もしくは相関関係式）を作成しておくことと便利である。試水ごとに乾燥重量を測定する手間が省ける。

### 2.7.2 データの信頼性

AGP測定は生物検定(bioassay)の一種である。したがって測定値のばらつきも大きくなる。AGP測定値の変動係数は、おおよそ下記の程度である。

AGP値 ( $\text{mg/l}$ )	変動係数 (%)
1.00以下	50 %
1.00 ~ 3.00	30 %
3.00 ~ 100.00	20 %
10.00以上	10 %

### 3. 海水のAGP試験法

#### 3.1 使用藻類種

米国においては、標準種として *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta* が用いられているが、<sup>22)</sup> その他 *Hornellia* sp., *Heterosigma* sp., *Skeletonema costatum* 等も使用される。<sup>22), 23)</sup>

#### 3.2 培地

保存用培地としては表3-1に示したS-5培地を用い、AGPの測定に際しての前培養には、は、S-5培地中の窒素、リンをそれぞれ1.0mg/l, 0.1mg-P/lに減少させたS-11培地を用いる。

表3-1 S-5培地の組成

NaNO <sub>3</sub>	100	mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10	mg
FeCl <sub>3</sub>	1	mg
Thiamine-HCl	0.2	mg
Biotin	0.1	μg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.1	μg
海水	750	ml
蒸留水	250	ml

#### 3.3 試水の前処理

2.2に示した濾過法と熱分解法の前処理を行う。

#### 3.4 接種藻の調整

S-11培地を用いて培養した藻体を遠心分離し濃縮した後に、表3-2に示した無菌の人工海水で希釈し遠沈洗浄を繰り返す。この洗浄藻体を無菌水に懸濁し接種液とする。洗浄条件を表3-3に示した。

#### 3.5 測定方法

300 mlの滅菌した3角フラスコに、前処理した試水100 mlを無菌的に添加し、これに3.4で調整した接種液を表3-3に示した藻体濃度となるよう加えた後に、白色けい光灯を連続照射の条件下で培養を行う。温度は20℃、照度は4,000 lx静置条件で培養を行う。培養後、最大増殖量がAGPである。最大増殖量は、コールターカウンターにより細胞数と平均細胞容量を測定し、乾燥重

表3-2 人工海水

NaCl	23.48 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.61 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.92 g
KCl	0.66 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.47 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.19 g
KBr	0.10 g
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.04 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.04 g
蒸留水	1 l

量として表示する。また660nmによる培養液の濁度を測定し、藻体の乾燥重量を算出してもよい。

### 3.6 栄養塩類等の添加

栄養塩類等の添加量は以下のとおりである。リン：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1mg-P/l, 窒素：NaNO<sub>3</sub> 1.0 mg-N/l, 鉄：FeCl<sub>3</sub> 1.0mg/l, ビタミン：チアミン塩酸塩 0.2mg/l, ビオチン 0.1μg/l, ビタミンB<sub>12</sub> 0.1μg/l。

表3-3 各藻類の洗浄条件および接種濃度

藻 種	洗 浄 条 件	接 種 濃 度
<i>Hornerllia</i> sp.	1,000 rpm, 1分間, 1回	20 細胞/ml
<i>Heterosigma</i> sp.	1,000 rpm, 3分間, 1回	150 細胞/ml
<i>Skeletonema costatum</i>	3,000 rpm, 10分間, 2回	0.1 mg/l
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	3,000 rpm, 10分間, 2回	100 細胞/ml
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	1,000 rpm, 3分間, 1回	100 細胞/ml

## 4. 自然水・排水のAGP

### 4.1 自然水のAGP

表4-1は湖水のAGPを測定した一例である。通常、湖水のAGP値は、貧栄養湖で1mg/l以下、富栄養湖で10~50mg/l程度である。ちなみに富栄養化の極度に進行した霞ヶ浦では60~80mg/lという高いAGPが得られることもある。

表4-1 湖水のAGP

	T-P (mg/l)	接種藻類*	AGP (mg/l)
然別湖	0.005	Se	0.08
支笏湖	0.0065	Se	0.06
糠平湖	0.020	Se	0.23
トウナイ湖	0.022	Se	0.11
奥多摩湖	0.05	C	5.0
白樺湖	0.04	C	5.0
河口湖	0.04	C	16
赤城大沼	0.06	C	15
琵琶湖	—	Se	4.0

\* Se: *Selenastrum capricornutum*  
C: *Chlorella* sp.

図4-1は印旛沼流域におけるAGPの分布を測定したものである。印旛沼においては、流入河川の一つである桑納川が大きな汚濁源とされているが、AGPについてもやはり高い値を示し、これが湖沼のAGPに影響していることがわかる。このような分布図を作成することにより、おのおの流入水の富栄養化に対する寄与の程度、またそれが湖内で混合した場合の効果等がある程度推定できるものと考えられる。

### 4.2 排水のAGP

AGPの測定のおが国における代表的な応用例は処理水の評価である。これは主としてつぎのような目的に用いられる。

- ①処理水の藻類生産の潜在能力
- ②処理水が放流水域の藻類生産に与える影響
- ③富栄養化防止対策としての高度処理プロセスの評価

表4-2はいくつかの活性汚泥処理装置における2次処理水のAGP測定値である<sup>14)</sup>ここでは

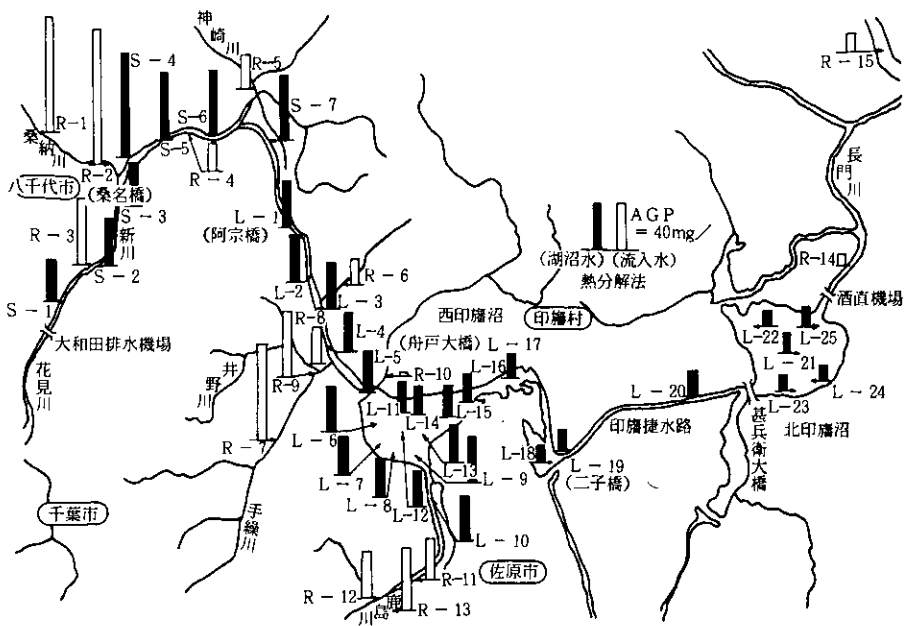


図4-1 印旛沼水域のAGP分布(1975.11.25) (*Selenastrum capricornutum*)

表4-2 活性汚泥処理水のAGP(単位:mg/l)

処理場	COD	T-IN*	T-P	AGP**		
				C	S	Ch
A	18.5	26.52	0.34	118	—	—
B	12.5	26.70	0.65	214	238	72
C	8.6	7.55	0.49	140	—	—
	12.1	21.85	1.68	—	—	198
D	17.1	21.78	1.37	214	—	—
E	10.7	15.07	1.25	281	—	—
	12.9	21.03	1.64	—	288	—
	17.3	26.52	2.86	—	—	226
F	14.6	7.31	0.82	139	—	—
	18.3	20.47	2.28	—	—	256
G	10.7	14.79	5.55	145	—	—
H	12.3	15.68	2.61	199	285	—
I	6.7	16.01	1.66	150	124	146

\* T-IN=NH<sub>4</sub>-N+NO<sub>2</sub>-N+NO<sub>3</sub>-N

\*\* C: *Chlorella*, S: *Stigeoclonium*, Ch: *Chlamydomonas*

無希釈法(2.2.3参照)によったが、100~300mg/lのAGPが測定されている。しかしながら家庭下水を主とする分流式の下水処理場の処理水では500~1,000mg/lという大きな値が得られる

こともある。AGPに対応する藻類培養液のCOD<sub>Mn</sub>の値は、須藤<sup>3)</sup>によると *Chlorella* ではつぎのように表わされる。

$$(\text{COD}_{\text{Mn}}) = (\text{AGP}) \times 0.40$$

したがって2次処理水のCODが低い場合でも、AGPが高いと潜在的なCOD負荷量は大きいものと見なさなければならない。

AGPの測定値から明らかのように、活性汚泥法などの2次処理は高栄養化対策にはあまり効果的ではない。このため脱窒、脱リンのような高度処理は、今後さらにその重要性が増すものと考えられる。表4-3は脱リン処理をAGPによって評価したものである。この結果から明らかのように生石灰(CaO)では300mg/l以上、硫酸バン土と塩化第2鉄では100mg/l以上添加すれば、AGPが極端に減少することがわかる。

表4-3 凝集沈殿した下水処理水のAGP

薬 剤 添 加 量 (mg/l)	T-P (mg/l)	AGP* (mg/l)
CaO	0	1.29
	50	0.96
	150	0.62
	300	0.12
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> 18H <sub>2</sub> O	0	1.35
	100	0.11
	200	0.08
	200+P0.5	0.58
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0	1.42
	50	0.13
	100	0.07
	200	0.01

\* *Chlorella* sp. を用いた。

#### 4.3 AGPに及ぼす試水の前処理の影響

従来のAGP測定は、試水にもともと存在する微生物による汚染を防ぐために、濾過法の前処理を行なうのが通常であった(2.2 参照)。当然のことながらこのような予備処理を行なうと、懸濁物質中に存在した栄養塩や、すでに微生物体内に吸収された栄養塩は除去されてしまう。したがって濾過法では、試水中ですでに増殖した微生物の使い残しの栄養塩に着目し、その藻類生産力を測定していることになる。濾過法を採用する場合には、試水中の藻類現存量をも評価対象に含める必要があり、試水の由来する環境が一定でないため統一的な評価を行うには、より一層の

検討が必要である。

このような欠点を克服するには、藻類や懸濁物質中の栄養塩類を何らかの方法によって再溶解させればよい。熱分解法はそのための一つの方法である。

図4-2、図4-3は同一の試水につき、ろ過および熱分解処理を行って得られたAGP値を比較したものである。図4-2はAGP値が100mg/l以下である自然水、3次処理水についての結果を、図4-3はAGP値が高い2次処理水についての結果を示す。ほとんどの試水において熱分解法のAGPはろ過法のAGPより高く、この傾向は図4-3の2次処理水の場合に顕著である。

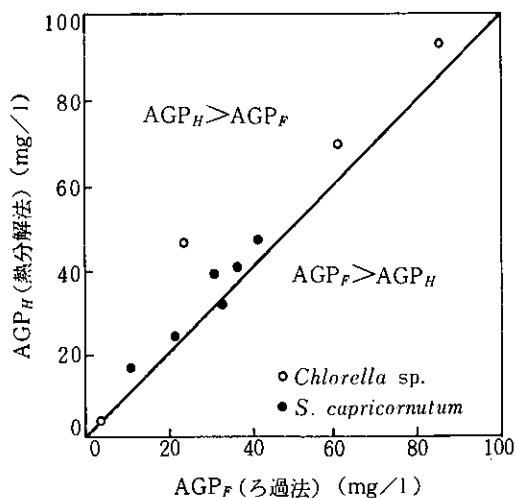


図4-2 ろ過法および熱分解法によるAGPの比較 (AGP < 100 mg/l)

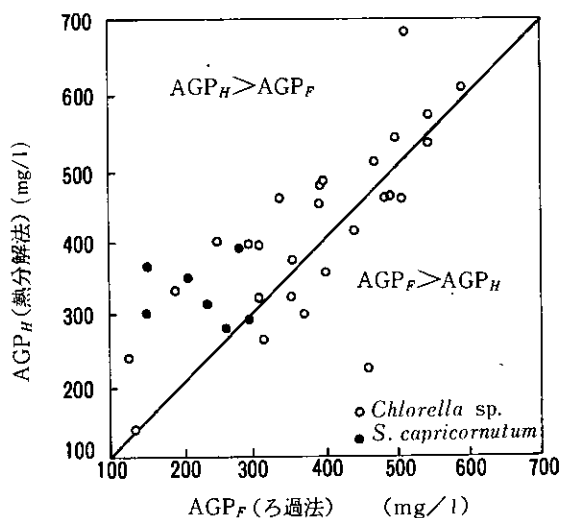


図4-3 ろ過法および熱分解法によるAGPの比較 (AGP > 100 mg/l)



しかし試水によっては滷過法のAGPの方が高い場合もある。この原因としてはオートクレーブ処理時における栄養塩、増殖促進物質などの変化（分解、沈殿）が考えられるが、その詳細は必ずしも明らかではない、このため常温、高圧により微生物細胞を破壊する方法も検討されているが、<sup>24</sup> 実用化には至っていない。

自然水を対象とする限りほとんど問題とならないが、下水、処理水等を対象とする場合にはBODの測定と同様に試水の希釈を考慮しなければならない。図4-4は2次処理水が2.5~50%の濃度となるように蒸留水で希釈した後、藻類増殖量を測定した結果である。図から明らかなように藻類増殖量は10%以上の濃度においてはほとんど変化がない。このような傾向は他の試水においても認められ、試水によっては無希釈のものが希釈試水より低い藻類増殖量となる場合もあった。

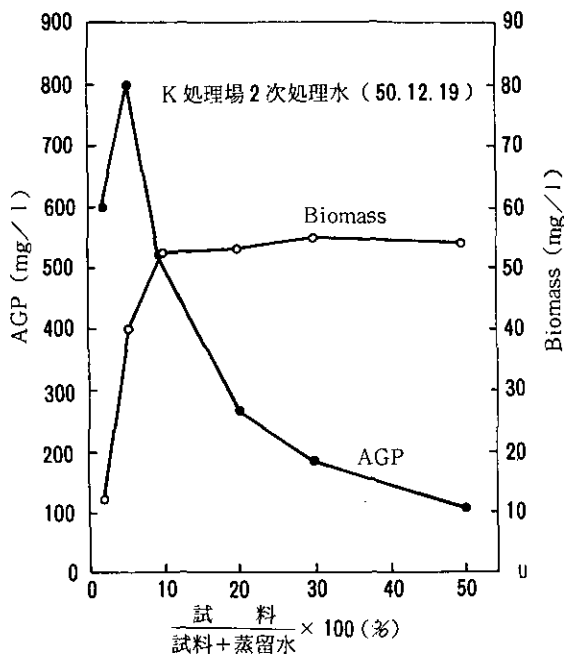


図4-4 希釈法による2次処理水のAGP測定

この原因として考えられるのは、2次処理水中に何らかの藻類増殖の阻害物質が含まれている可能性である。このような場合には、無希釈では増殖速度が著しく低下するか、まったく増殖しないのに対し、希釈するとその阻害物質濃度が許容レベルに下がるため、増殖が良好となると考えられる。

しかし排水は最終的には河川、湖沼等に放流されて希釈を受けるから、栄養塩濃度の高い試水においてはそれを適当に希釈して測定すべきであると考えられる。

この場合、AGP値として最大値を与えるように希釈するのが妥当であるといえよう。図4-4

の例では5%になるような希釈(20倍)が最大のAGP値を与える。

希釈によるAGP測定では、数段階の希釈を行なってその最大値を採用することが望ましい。通常の2次処理水では5~20倍希釈、もしくは藻類増殖量として10~50mg/lの範囲になるような希釈がAGPとして最大値を与えるようである。

#### 4.4 AGPに及ぼす排水の影響

図4-5は2次処理水を、調査対象となる実際の放流水域の水に添加してその影響を調べたものである。ここでは多摩川の河川水に処理水を添加したが、わずか5%の添加で藻類生産力が著しく増加することが明らかとなった。

高度処理した排水が水域の藻類生産力に与える影響を評価したのが図4-6である。2次処理水を添加した場合には著しくAGPが高いが、凝集沈殿(硫酸バン土による)、急速濾過、活性炭濾過などの高度処理を組み合わせることで、AGPの値は湖沼水に近くなった。

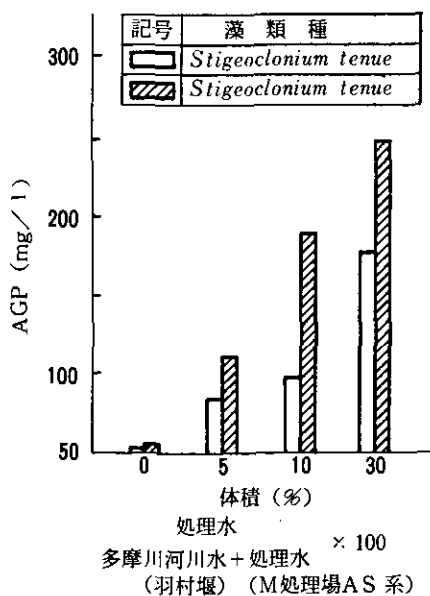


図4-5 多摩川の富栄養化に及ぼす処理水の影響

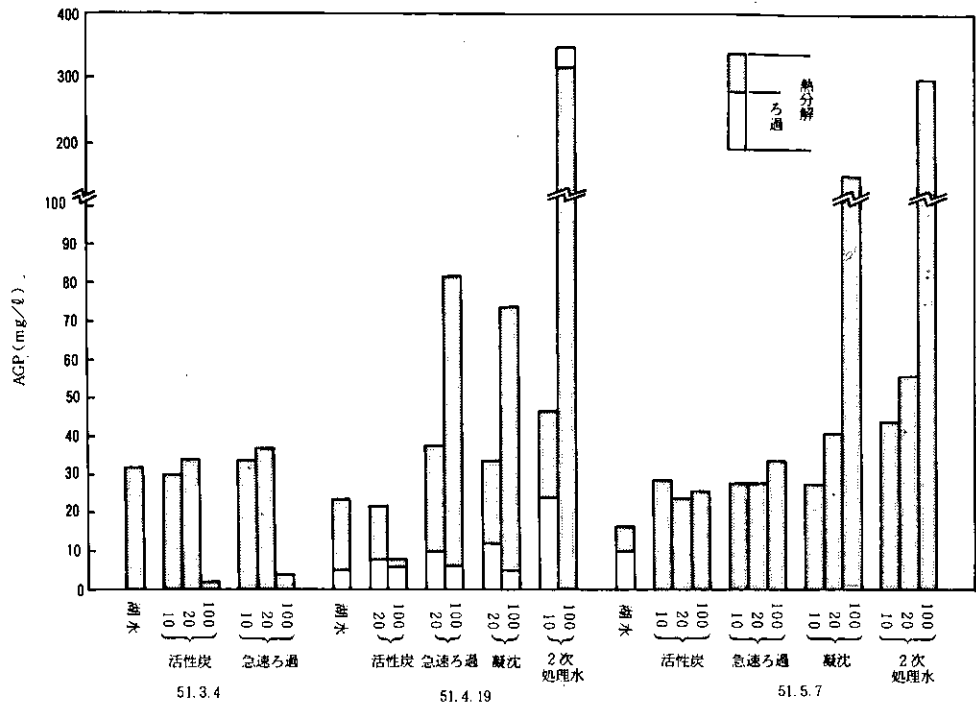


図4-6 湖水のAGPに及ぼす脱リン処理水の影響(*Chlorella* sp.)

## 5. A G P による制限要因の決定

### 5.1 制限栄養物質

A G P の実験において、藻類の最大増殖量は、藻類の増殖に必要とする種々の栄養物質の最小量によって決定される。次のこの制限物質を十分添加した場合、藻体は別の物質が制限となるまで増殖を続ける。このように、栄養物質の添加実験から試水の制限栄養物質の推定が可能となる<sup>23, 24, 25, 26</sup>。添加栄養物質の量はできるだけ少量とすることが望ましいが、添加による増殖の増加量が有意のものでなければならない。したがって、添加量は試料中の栄養物質の濃度を考慮して決める必要がある。

### 5.2 実験方法

2.1~2.6 に準じて A G P の測定を行うがその際、試水に栄養物質を無菌的に添加し培養を行い、最大増殖量を測定する。栄養物質としては、窒素、リン、鉄、ビタミン類、および EDTA 等が考えられる<sup>27, 28</sup>。添加量は、通常窒素：NaNO<sub>3</sub> 1.0 mg-N/l、リン：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 mg-P/l、鉄：Fe·citrate 0.5 mg-Fe/l あるいは FeCl<sub>3</sub> 0.34 mg-Fe/l、チアミン塩酸塩 0.2 mg/l、ビオチン 0.1 μg/l、ビタミン B<sub>12</sub> 0.1 μg/l、Na<sub>2</sub>·EDTA·2H<sub>2</sub>O 1 mg/l 程度が望ましい。

### 5.3 結果の整理

データの整理の仕方および制限栄養物質の評価方法などは海水も淡水の場合と同様である。

半久沼の夏期の湖水を用いて、*S. capricornutum* による濾過法と熱分解法の A G P および栄養物質の添加実験の結果を図 5-1 に示した。濾過法の場合 A G P は 1 mg/l であるが、リンを 0.1 mg/l 添加すると藻体量は 35 mg/l と著しく増加するが、窒素、鉄、EDTA 添加では増加は全く認められない。このことから濾過水はリンが制限になっているといえる。またリンと窒素 (1.0 mg/l) を同時に添加すると藻体量が 54 mg/l とさらに増加することから、リンに次ぐ制限栄養物質は窒素であると考えられる。熱分解法の場合は、A G P が 6 mg/l と濾過法に比べかなり高い値となっている。また栄養物質を添加した実験から、制限栄養物質としては濾過法の場合と同様の結果が得られたが、増殖量は濾過法に比べいづれも 5~15 mg/l 程度高くなった。この理由として、熱処理により試料中の栄養物質が利用されやすい形に変化したことが考えられる。また接種藻として *S. capricornutum* を用いる場合には、鉄および EDTA の添加は不必要と考えられる。

霞ヶ浦の夏期の湖水を用いて、*M. flos-aquae* による濾過法と熱分解法の A G P および栄養物質添加実験の結果を図 5-2 に示した。濾過法の場合、A G P は 3.5 mg/l であり、リン、窒素、鉄、EDTA をそれぞれ添加しても増殖量が増大しないが、リンと窒素を同時に添加すると 26 mg/l に増大した。このことからリンと窒素が同時に制限栄養塩になっていることがわかる。一方熱分解

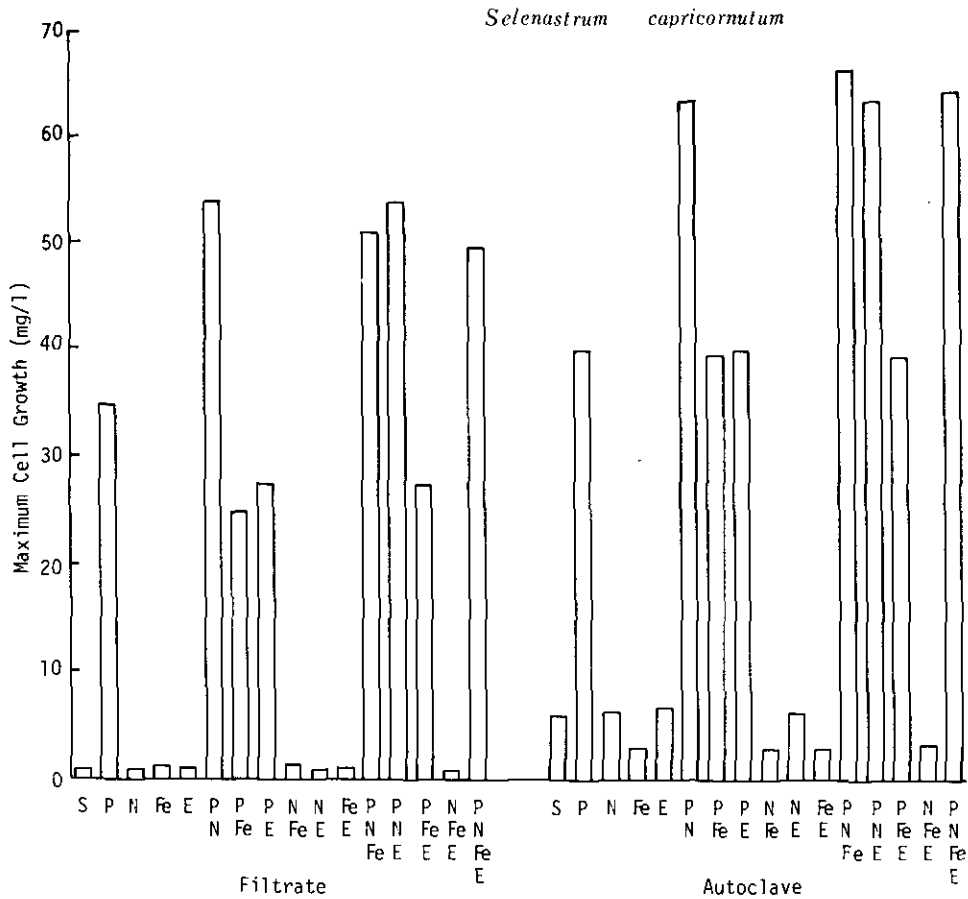


図5-1 牛久沼における制限栄養要因の決定

法では、リン、窒素添加による増殖量の増大は認められなかったが、窒素および鉄添加ならびに窒素およびEDTA添加で、増殖量の著しい増加が認められることから、窒素と鉄が制限栄養塩となっているといえる。このことから、熱分解法により試料によっては鉄が制限要因になることもありうる。

霞ヶ浦の秋期の湖水を用いて、*M. flos-aquae*による濾過法と熱分解法のAGPおよび栄養物質の添加実験の結果を図5-3に示した。濾過法のAGPは1mg/l以下であるが、リンおよび窒素添加では全く増加が認められず鉄またはEDTAの添加で2.5mg/l程度までの増加が認められたことから制限栄養物質は鉄と考えられる。またリンと鉄あるいはEDTAの同時添加で9mg/lにまで増大し、リン、窒素およびEDTAの同時添加で40mg/lにまで増大することから、鉄の次の制限栄養物質はリンであり、次いで窒素が制限栄養物質であることが推定される。なおEDTAは、*M. aeruginosa*の鉄利用性を高めていることが推測される。熱分解法の場合は、AGPが8.5mg/lと高い値を示し、窒素添加により増殖量が増大することから、窒素が制限栄養物質にな

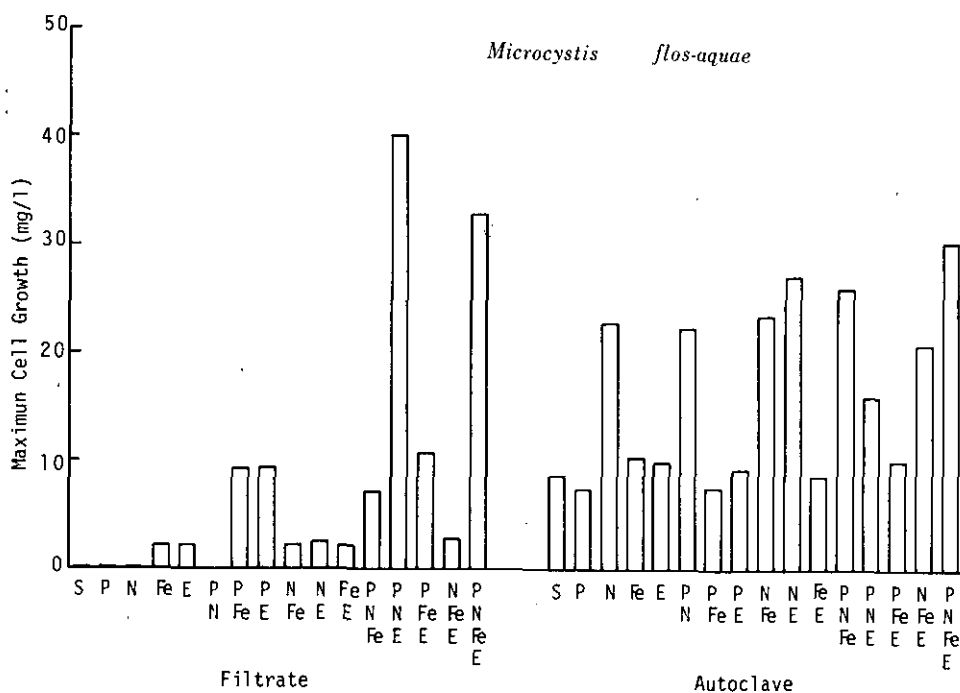


図5-2 霞ヶ浦(夏期)における制限栄養要因の決定

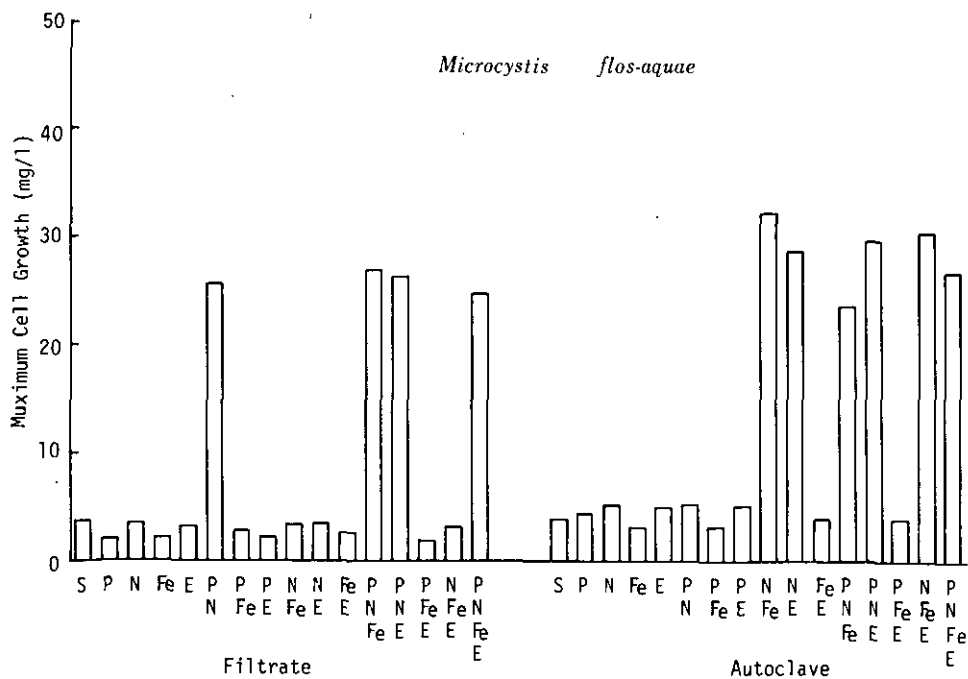


図5-3 霞ヶ浦(秋期)における制限栄養要因の決定

っている。熱分解法では鉄およびEDTAの添加効果は認められなかった。

茨城県大洗海岸の海水を用いて、*Hornellia* sp.による濾過法および熱分解のAGPと栄養物質添加実験の結果を図5-4に示した。濾過法でのAGPは5mg/lであり、リン添加により増殖量が15mg/lに増加することからリンが制限となっていることがわかる。一方ビタミン類、鉄は制限になっていない。熱分解法の結果は濾過法とほぼ同様のものであった。

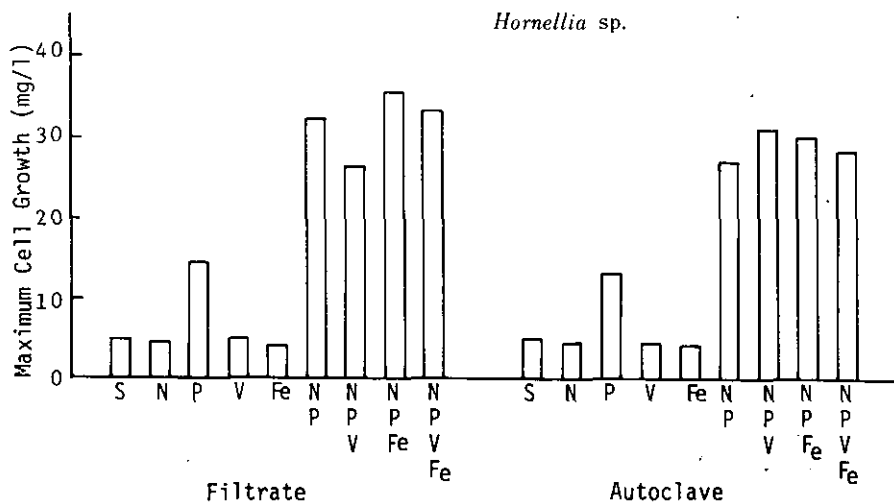


図5-4 大洗の海水中の制限栄養要因の決定

試料の制限要因を検索する際には使用藻種の選択が重要となってくる。制限物質がリンか窒素であるかを判定する場合には、ビタミン等の栄養要求性を示さずまた培養の容易な *S. capricornutum* を用いることが推奨される。一方、*Microcystis* は鉄の栄養要求性が高いことから、鉄の制限要因を調べる上では有効である。また鞭毛藻は一般に、鉄およびビタミン類の栄養要求性が高いといわれており、鞭毛藻の培養が困難であるという欠点はあるが、鞭毛藻を用いることにより、鉄、ビタミン類の試料中における有効含量を把握することが可能である。

このようにAGPの方法は富栄養化の現象解明に役立つだけでなく、原因究明に利用でき、さらに防止策を検討するにも有効である。

## 6. 底泥に関するAGP試験

### 6.1 底泥に関するAGP試験法の概説

藻類の増殖に及ぼす底泥の影響を評価する場合 (図6-1 参照),

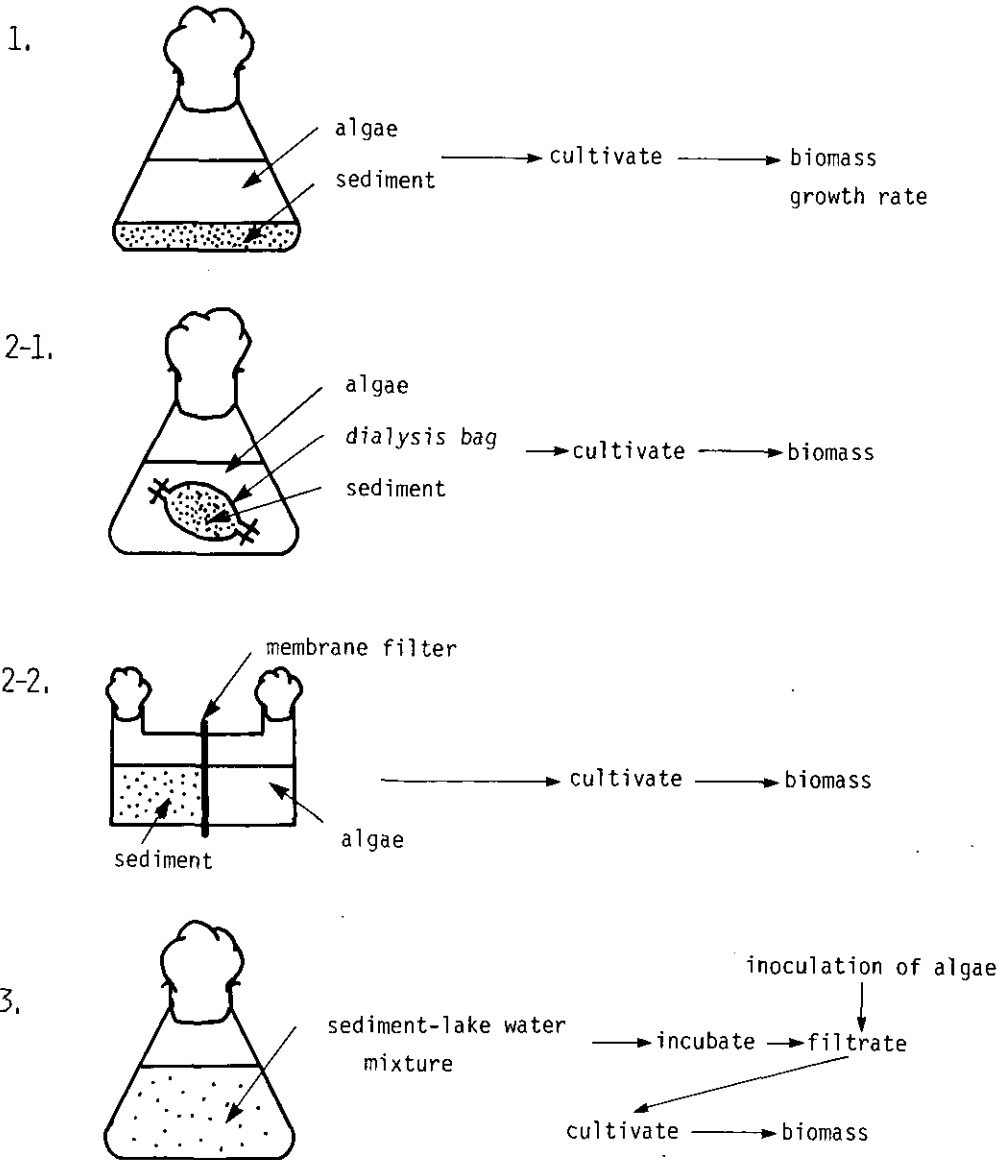


図6-1 藻類の増殖に及ぼす底泥の影響に関する評価方法



1) 底泥と藻類とを直接接触させた系<sup>29,30,31</sup>。

2) 底泥と藻類とがメンブレインフィルターなどによって、物理的に分離された系<sup>32,33,34,35</sup>。

3) 底泥と湖水とをある一定条件下で放置した後、その滷液に藻類を接種した系<sup>36,37</sup>。

と、それぞれの系の中で、藻類の増殖量を測定する方法がとられる。

上記の1) および2) は、底泥と藻類との相互作用が働く中で、藻類の増殖量を評価できる。

3) は、ある一定条件下で底泥と湖水との相互作用が総合的に積分された結果が滷液であり、この滷液を試水としてAGP試験を行う。したがって、3) には藻類の増殖過程において、底泥と藻類との相互作用が働かないが、いろいろな条件下での底泥と湖水との相互作用の結果を、藻類の増殖量により評価できる特徴がある。一方、1) は底泥と藻類とが混在しているので、藻類の正確な測定が困難である。また2) のうち、メンブレインフィルターで仕切られた混合培養管を使用する場合は、比較的長時間の培養が行えるが、透析膜を使用して底泥と藻類とを分離する場合には、透析膜の破損のため長期にわたる培養実験が不可能である。

以上から、ここでは、3) と2) の混合培養管を使用した方法について述べる。しかしながら、現段階においては、底泥に関するAGP試験法は、淡水用のAGP試験法のように確立されたものではなく、今後更に改良していくべき点もあり、暫定的な試験法として示すものである。

## 6.2 採泥・運搬・保存

### 6.2.1 採泥

投込型のコアサンプラー（図6-2参照）あるいはエクマンバージ型採泥器を使用する。潜水夫が直接採泥してもよい。コアサンプラーは、ほとんどそのままの状態ですべての底泥を採取できるので、底泥の深さ方向の相違を検討する場合に有効である。エクマンバージ型採泥器は、底泥を多量に採取できる利点があるが、底泥の表層が乱れ、底泥の正確な深度が不明である。したが

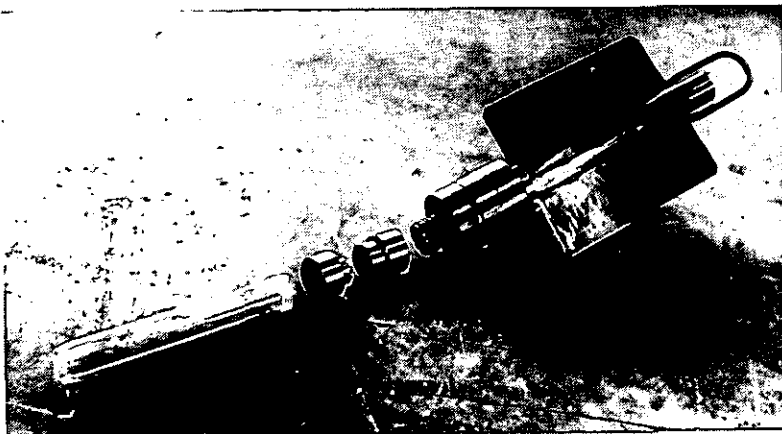


図6-2 投込型コアサンプラー（離合社製）

って特別な理由がなければコアサンプラーを使用するのが望ましい。

### 6.2.2 運 搬

コアサンプラーの場合、採泥後その場でコアの底部からゴム栓等でゆっくり押し上げながら、一定深度毎に切断する。切断した底泥は、ポリ容器あるいはビニール袋に入れて、氷冷したコンテナ（暗所にする）ですみやかに実験室に運搬する。エクマンバージ型採泥器の場合、大き目のビニール袋に入れ、コアサンプルと同様に運搬する。

### 6.2.3 保 存

底泥試料はできるだけすみやかに6.3、6.4に述べる試験を行なう。不可能な場合は、冷暗所(4℃)にて保存する。

## 6.3 底泥のAGP試験法（その1）

### 6.3.1 試験法

一定量の底泥と湖水(2.1 参照)とを1 l(2 lでも可)の三角フラスコ（試薬ビンでも可）に入れる。SSとして1,000mg/l～4,000mg/lになるように混合する。このとき三角フラスコ上部の空隙は少ない方が望ましい。これを以下の好氣的条件および嫌氣的条件を保ちながら、7日間、20℃、暗所で放置する。

1) 好氣的条件……図6-3に示したように、ホウ酸(希硫酸でも可)、蒸留水を通したair(通常は蒸留水だけでも差つかえない)で底泥と湖水とを混合した三角フラスコを通気する。通気量

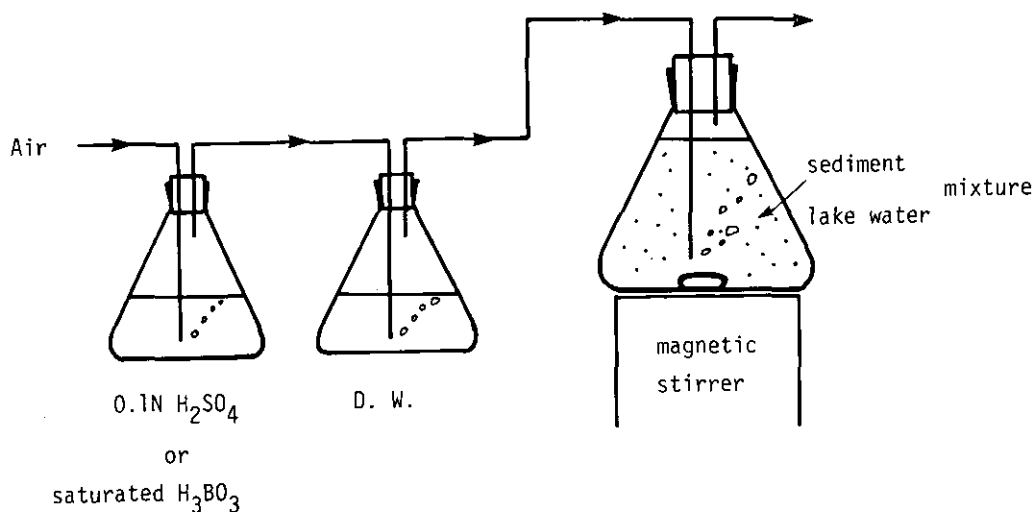


図6-3 好気条件下における底泥—湖水混合液のインキュベーション方法

は、0.2~1.0l/min程度でよい。このときスターラーで攪拌するのが望ましい。

2) 嫌気的条件……好気的条件と同様の装置で、airのかわりに窒素ガス(できるだけ純度の高いもの)を、0.1l/min~0.2l/min程度の流量で、24時間注入する。通常、三角フラスコ内の溶存酸素(DO)は、0.1mg/l程度となる。窒素ガスを注入後、すばやくシリコン栓で、三角フラスコを密栓する。

7日間放置後、底泥と湖水との混合液を0.45μmのミリポアフィルターで濾過を行う。濾過の要領は2.2.1濾過法に準じる。また対照として、湖水のみについても、底泥と湖水との混合液と同様の処理を行う。これらの濾過水を試水として、2.3、2.4、2.5、2.6に従いAGP試験を行う。底泥と湖水との混合液のAGPと対照のAGPから、好気的条件および嫌気的条件における底泥の評価をする。

### 6.3.2 試験結果

図6-4に霞ヶ浦の結果<sup>36)</sup>を示す。底泥と湖水との混合液のAGPを底泥のAGPと呼ぶこと

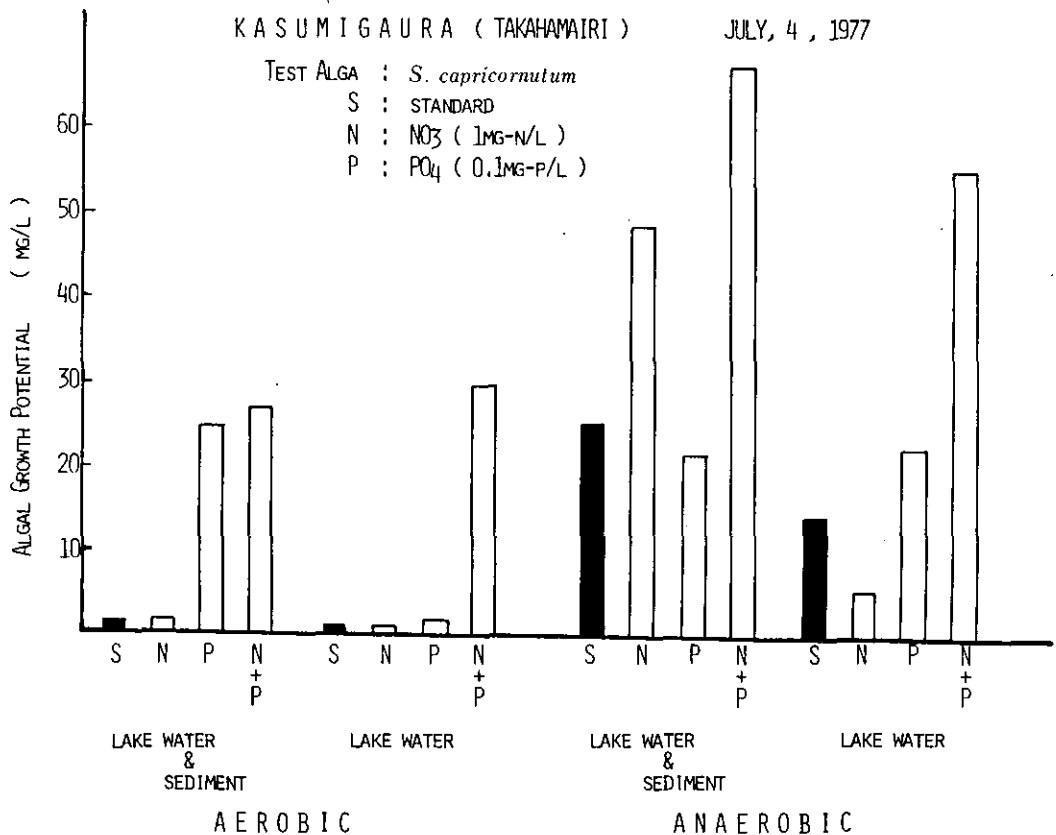


図6-4 霞ヶ浦底泥のAGP(*S. capricornutum*)

にする。供試藻類は、*Selenastrum capricornutum*である。底泥のAGPは、好気条件で処理したものより、嫌気条件で処理したものの方がはるかに高いAGPを示している。対照のAGPも同様のことが言える。嫌気条件では底泥のAGPが対照のAGPよりも高く、栄養塩添加試験から窒素が制限要因に、また対照のAGPはリンが制限要因になっている。したがって嫌気条件下では底泥からリンが溶出し、底泥の藻類増殖に及ぼす影響が大きくなることがわかる。好気条件では底泥のAGPが対照のAGPと同程度であるが、リンを添加したAGPは底泥を入れたものの方が高くなっており、底泥から窒素の供給があったものと考えられる。また好気条件では、いずれのAGPともリンが制限要因になっている。

図6-5に貧栄養湖である日光の中禅寺湖の結果<sup>36)</sup>を示す。底泥のAGPは、わずかに嫌気条件で処理した方が高くなっているが、対照のAGPとともに小さい値である。すべてリンが制限要因になっている。これらのことから底泥の藻類増殖に与える影響はほとんどないといえる。

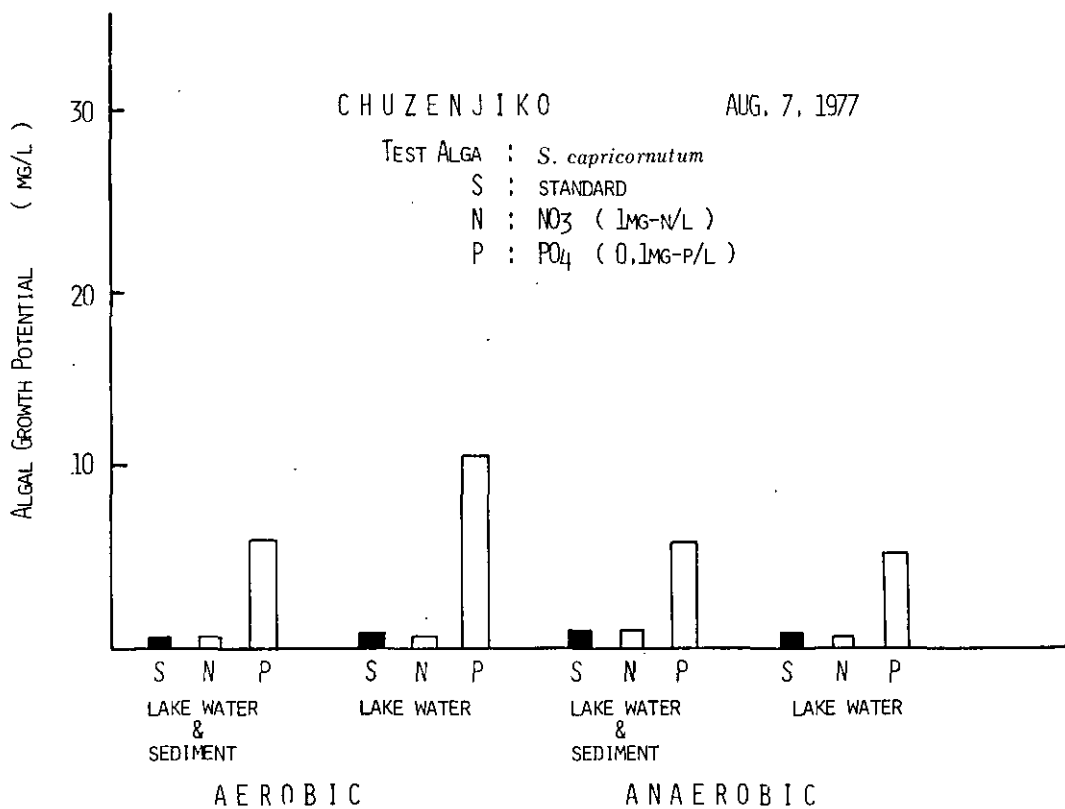


図6-5 中禅寺湖底泥のAGP(*S. capricornutum*)

供試藻類を *M. aeruginosa* とした琵琶湖赤野井湾の結果<sup>37)</sup>を表6-1および図6-6に示す。好気条件では、表層(0-4cm, 4-9cm層)泥のAGPが高いが、深層(9-14cm, 14-24cm層)泥

表6-1 底泥のAGP試験に用いた汙液中の栄養塩濃度(琵琶湖赤野井湾)

	Total P	PO <sub>4</sub> -P	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> -N
Filtered lake water	0.029	0.027	0.034	0.025
0.0- 0.4cm : Oxic	0.510	0.440	0.08	1.066
0.0- 4.0cm : Anoxic	2.30	1.83	0.09	0.000
4.0- 9.0cm : Oxic	0.496	0.304	0.05	0.899
9.0-14.0cm : Oxic	0.394	0.304	0.08	0.88
14.0-24.0cm : Oxic	0.261	0.190	0.06	0.90
14.0-24.0cm : Anoxic	0.738	0.452	0.05	0.00

単位はすべて mg/l

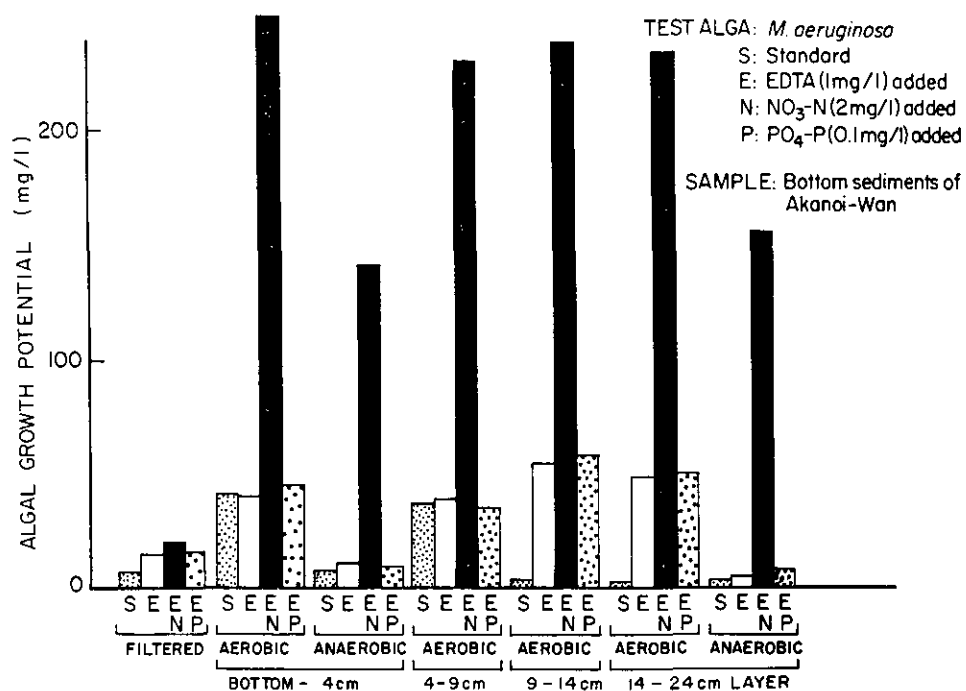


図6-6 琵琶湖赤野井湾底泥のAGP (*M. aeruginosa*)

のAGPは栄養塩濃度が高いにもかかわらず、低い値を示している。EDTAを添加すれば表層泥のAGPに近い値になる。したがって、表層泥からEDTAと働きの似た物質が溶出するが、深層泥からは溶出しないか、あるいは、藻類の増殖を抑える物質が溶出するとも考えられる。このように窒素やリンだけでなく、EDTAなどのキレート物質についても評価しうる。

## 6.4 底泥のAGP試験法（その2）

### 6.4.1 試験法

図6-7に示す培養管を使用する。この培養管は、メンブレンフィルターで仕切られたふたつのL字管から成る。すなわち、底泥の入った容器（底泥管という）と藻類が増殖する容器（藻類管という）とに分かれる。バインダーの種類を変えることによって、この培養管は回転式振とうやモノ型振とうのいずれも可能である。

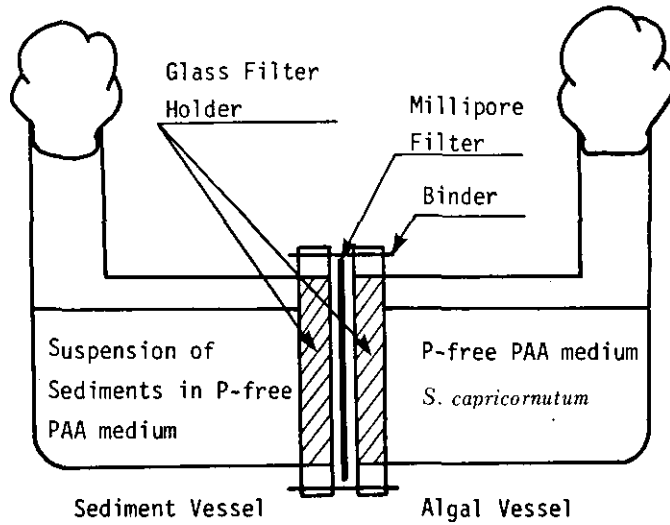


図6-7 底泥-藻類混合培養管

操作方法は、あらかじめオートクレーブ等で滅菌しておいた容器(2.5.1に準じる)や孔径 $0.45\mu\text{m}$  (あるいは $1.2\mu\text{m}$ )のメンブレンフィルターなどで培養管を組み立てる。底泥管に一定量の底泥と2.2.1に準じる方法で濾過した湖水とを入れ(SSとして $1,000\text{mg/l}$ ~ $4,000\text{mg/l}$ )、藻類管には濾過した湖水のみを入れる。培養管に入れる溶液量は、培養管の容積の $\frac{1}{2}$ 程度とする。藻類管には2.4に準じる方法で供試藻類を接種する。それぞれの培養管に綿栓をほどこす。さらに底泥管に光が当たらないように、黒いビニールシートかアルミホイルでおおう。

この培養管を2.5の培養条件に準じる方法で培養し、2.6により藻類の増殖量を測定する。

### 6.4.2 本試験法の応用

底泥と濾過した湖水とが入っている底泥管のDOは、 $8\text{mg/l}$ 程度あり、混合培養管は好氣的状態にある。したがって本試験法は、好氣的な条件下で底泥が藻類の増殖にどのような影響を与えるのかを検討するものである。ここでは、この試験法の応用として、底泥中のリンに着目し、好氣的条件下において、藻類の増殖に与える底泥中のリンの有効性について検討した例<sup>34), 35)</sup>を示す。

6.4.1では濾過した湖水を使用した<sup>34</sup>が、ここでは、そのかわりにPAAP培地<sup>31</sup>(あるいは2.3.2にあるAAP培地や $\frac{1}{2}$ Gorham培地も可)から、リンを抜き、pHを7.5に調整したものを使用する。すなわち、この系のリン源は底泥中のリンのみである。このリンがメンブレンフィルターを通過して藻類管に入り、藻類の増殖に利用される。

まずメンブレンフィルターの孔径のちがいによるリンの移動性について検討した<sup>35</sup>。図6-8は、リンを抜いたAAP培地だけを入れた混合培養管の一方に、1mg/lになるよう $PO_4-P$ を添加した。すぐこの培養管を回転振とう(2.5.3参照)し、もう一方のL字管のリン濃度を調べたものである。当然、フィルターの孔径が大きいかほどリンが移動しやすいことは明らかである。孔径が $0.45\mu m$ (HA)のフィルターでも、10時間ではほぼ平衡に達する。通常、藻類の培養期間は、2ないし3週間であるので、底泥から溶出したリンは、藻類の増殖に比べて、十分はやく移動できると考えられる。

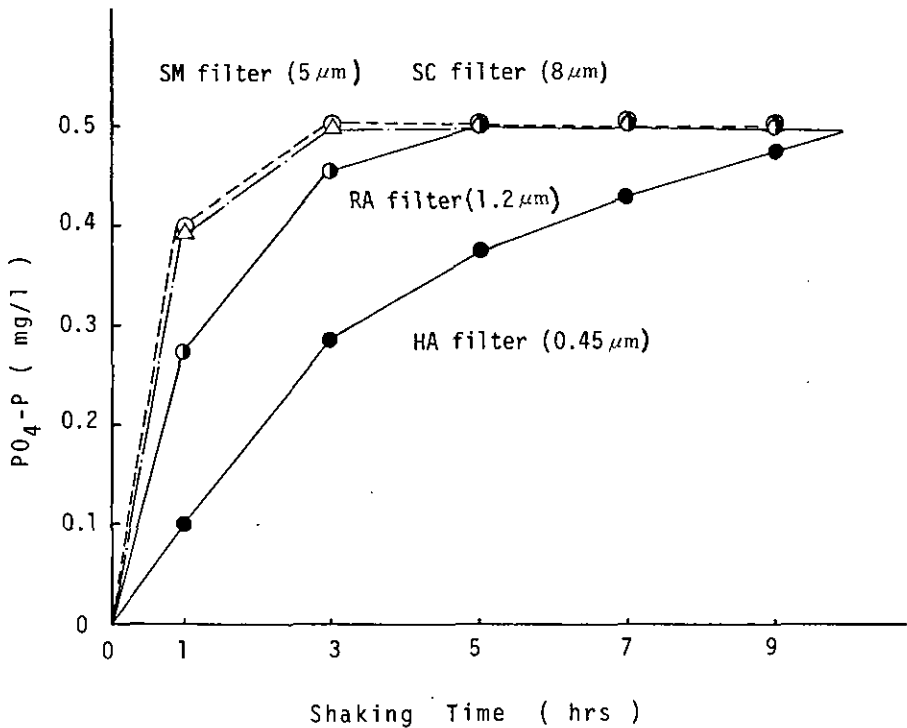


図6-8 混合培養管におけるフィルター孔径のちがいによるリンの移動性

図6-9は、底泥の添加量に対して、*S. capricornutum*の最大増殖量と、底泥側から藻類側へ移行した全リン量とをプロットしたものである<sup>34</sup>。底泥の添加量に対して、藻類の最大増殖量および底泥から溶出したリン量はいずれも比例関係が認められる。

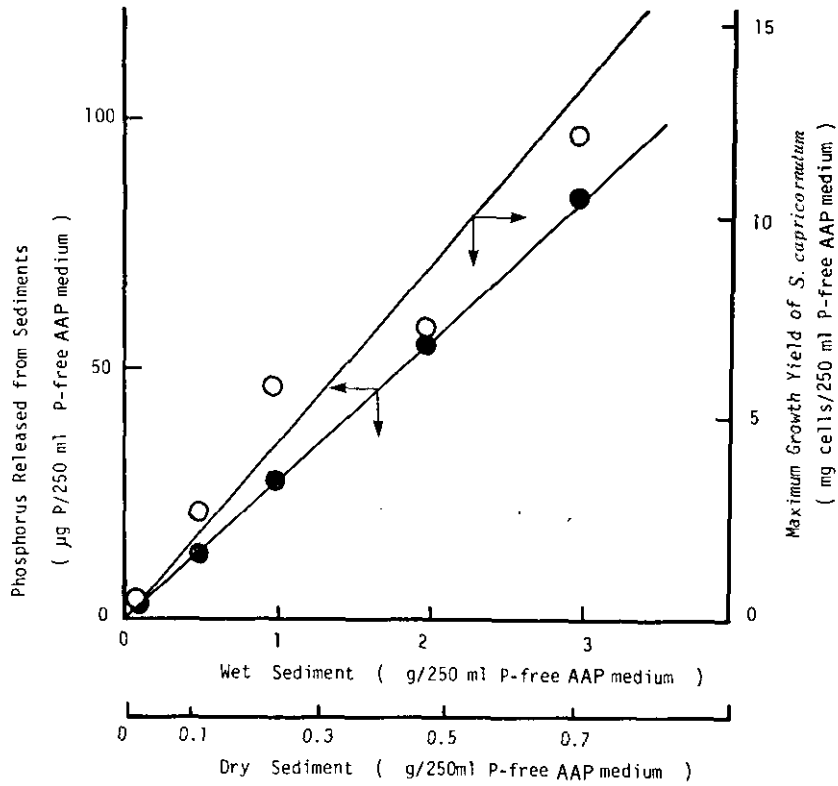


図6-9 底泥の添加量に対する *S. capricornutum* の最大増殖量と底泥側から藻類培地側へ移行したリン量

図6-10は、供試藻種を *M. flos-aquae* としたときの増殖曲線を示したものである<sup>35)</sup>。培地は、 $\frac{1}{2}$  Gorham培地からリンを抜いたものを使用した。供試底泥は、霞ヶ浦土浦入の水道事務所沖で採取したコーサンザルの表層部(0-3cm)である。この底泥中のリンは、*M. flos-aquae* の増殖に利用されやすいリンが含まれていることがわかる。



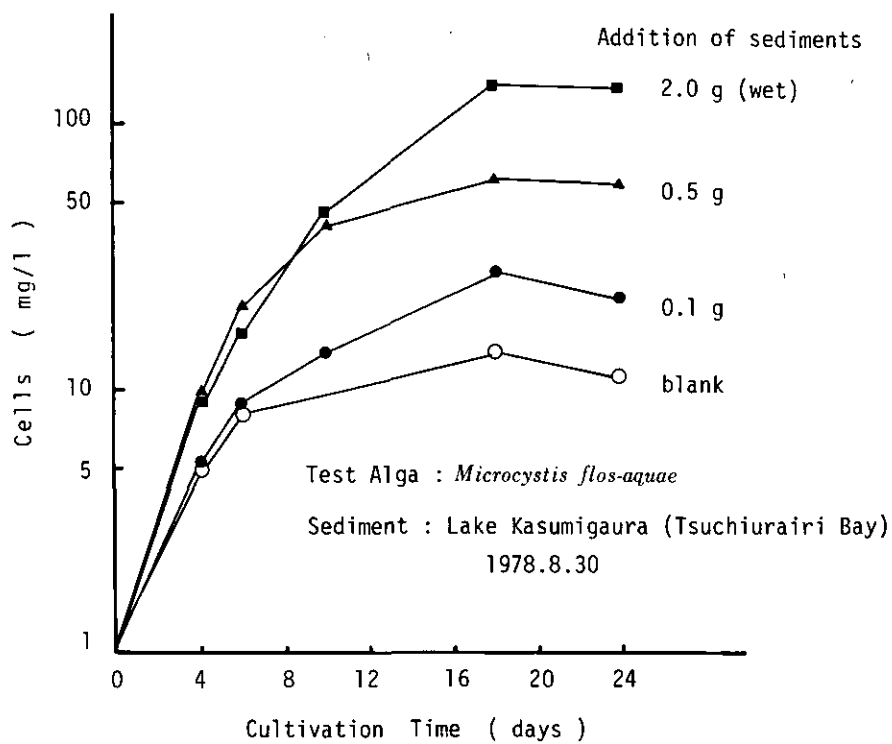


図6-10 底泥の添加量に対する *M. flos-aquae* の増殖曲線

## 7. 混合培養によるAGP試験法

### 7.1 混合培養によるAGP試験

AGP試験法の1つの変法として、河川水や湖沼水などを植種する方法が考えられる<sup>38),39)</sup>。すなわち、AGPが*Chlorella* sp.あるいは*Selenastrum capricornutum*などを接種する純粋培養であるのに対して、この変法は混合培養によるAGP試験である。したがって本変法によるAGPを、添字Mを付しAGP<sup>M</sup>と称することとする。

この変法の意図するところは、

- 1) 実験が簡略化できる。純粋培養のための煩雑な操作を必要としない。
  - 2) 試水に適応した藻類が優占的に増殖できる可能性が高い。
  - 3) 自然界に近い状態で藻類生産の潜在能力が測定できる。
- などである。

### 7.2 測定方法

AGP<sup>M</sup>の測定法は2のAGP試験法に準ずる。

#### 7.2.1 藻類の接種

自然水のように藻類が十分に存在する試水では、接種を行わない。排水、および前処理を行った試水は、湖沼水、河川水など藻類を十分含む水を試水500mlに対して5～10ml加える。

#### 7.2.2 培養条件

容器はL型培養管(1,000ml)を用い、試水は500mlとする。その他の培養条件はAGP試験と同様である。

#### 7.2.3 藻類増殖量の測定

AGP<sup>M</sup>は乾燥重量の測定によって求める。また藻類培養液のCODを同時に測定すれば、CODとしての潜在生産能力が測定できる。乾燥重量およびCODとも培養前の値を測定し、培養後のそれぞれの値から差し引く。培養前の値が著しく小さい場合はこの必要はない。培養の経過にたがって藻類相の消長がかなり認められるので、これを記録しておくといよい。

### 7.3 測定例

湖水、排水およびその処理水、河川水についてのAGPとAGP<sup>M</sup>の測定を行い図7-1に示した。AGPに対してAGP<sup>M</sup>の方がやや大きい値を示している。なお、増殖した藻類をCODで

測定した場合、AGP<sup>M</sup>とCODの間には概ね、COD=0.4AGP<sup>M</sup>の関係がある。

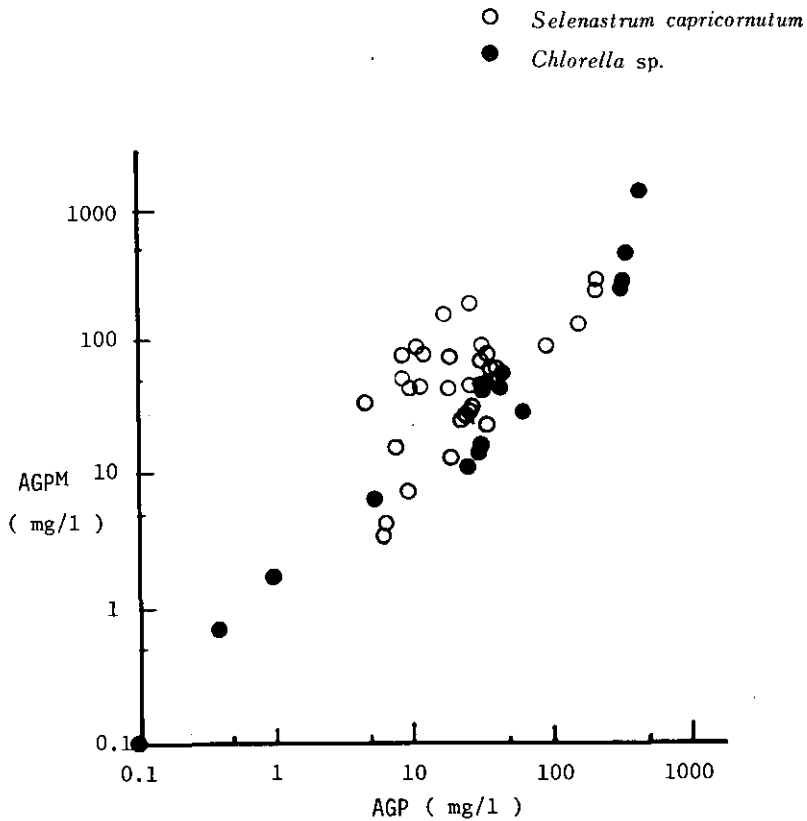


図7-1 AGPとAGP<sup>M</sup>の関係

AGP<sup>M</sup>試験培養液を鏡検し藻類の種あるいは属とその個体数を求め、培養前のそれと比較することによって、どの藻類が優占的に増殖し藻類群落がどのように変化するかを知ることができる。表7-1に霞ヶ浦木原沖の藻類の培養前後の種類と個体数の変化を示した。培養によって培養前は見られなかった(鏡検の0.25ml中に発見されなかったということで、存在しなかったのではない)*Oscillatoria*が優占種となっており、全個体数の70%を占めている。

種あるいは属と個体数の変化を1つの尺度で表わすものとして次に示した多様性指数 (diversity index,  $DI$ ) がある<sup>39), 40)</sup>。

$$DI = -\sum P_i \ln P_i$$

ここで $P_i = n_i/N$ で全個体数 $N$ に対する $i$ 番目の種(あるいは属)の個体数 $n_i$ の比である。表7-2に霞ヶ浦木原沖(表7-1)のほか霞ヶ浦土浦入、菅生沼および琵琶湖の湖水の培養前後の多様性

表7-1 霞ヶ浦(木原沖)湖水の培養前後における種と個体数の変化

種名	個体数(個/ml)	
	培養前	培養後
<i>Oscillatoria</i> sp.		5,540
<i>Fragilaria crotonensis</i>		40
<i>Synedra</i> sp.	200	1,640
<i>Navicula</i> sp.	60	100
<i>Nitzschia</i> sp.	80	100
<i>Pediastrum tetras</i>	20	20
<i>Tetraedron elegans</i>	20	
<i>Chodatella quadriseta</i>	20	
<i>Nephrocytium agardhianum</i>	20	140
<i>Selenastrum minutum</i>	20	100
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	40	160
<i>Actinastrum hantzschii</i>	40	80
<i>Scenedesmus arcuatus</i>	80	
<i>Scenedesmus ovalternus</i>	60	200
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	40	
<i>Scenedesmus acutus</i>		40
<i>Scenedesmus intermedius</i>	20	
<i>Scenedesmus bicaudatus</i>	20	
<i>Westella botryoides</i>		200
計	740	8,360

表7-2 湖水のAGP<sup>M</sup>と培養前後における多様性指数の変化

	inog-N	PO <sub>4</sub> -P	COD <sub>P</sub>	AGP <sup>M</sup>	属数		種数		個体数		多様性指数(属)		多様性指数(種)	
	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	b. c.	a. c.	b. c.	a. c.	b. c.	a. c.	b. c.	a. c.	b. c.	a. c.
霞ヶ浦 (土浦入)	—	0.052	17.2	31.3	9	17	12	25	560	26,300	0.784	0.589	1.070	0.643
霞ヶ浦 (木原沖)	—	0.030	15.6	41.9	11	12	15	13	740	8,360	0.852	0.509	1.040	0.540
菅生沼 (湖心)	1.95	0.079	20.3	41.5	7	8	7	8	378	11,340	0.415	0.105	0.415	0.105
琵琶湖 (堅田沖)	0.19	0.014	5.0	8.9	16	7	22	10	574	4,760	0.812	0.589	1.050	0.742

b. c. ; 培養前 a. c. ; 培養後

指数の変化とAGP<sup>M</sup>の値を示した。いずれの場合も特定の二、三の種が優占的に増殖し多様性指数が低下している。藻類が一定の物理的、化学的条件下で最大に増殖する場合は初めに存在した藻類が一様に増殖するのではなく、ある特定の種が優占し増殖することを示しており、AGP<sup>M</sup>の

意義もここにある。

AGP<sup>M</sup>測定において、接種する自然水の影響、培養条件等の検討が十分でない。また多くの種類の試水についてAGP<sup>M</sup>の測定を実験していない。今後これらについて検討を加えるとともに、栄養塩添加試験も実施する必要がある。

## 8. AGP試験による有害物質の判定法

### 8.1 自然水、排水等の藻類増殖阻害

自然水、排水等には、富栄養化をひき起こす要因となる窒素、リン等の栄養塩類が含まれると同時に、藻類の増殖を阻害する有害物質が含有されている可能性がある。AGP試験を応用し、これらの有害物質の有無、毒性の定量化を行うことができる。

#### 8.1.1 概要

あらかじめ栄養塩を添加した試水と標準培地(8.1.2参照)とを種々の割合で混合したものについて、AGP試験(2.3~2.7に準ずる)を行う。各混合率におけるAGP試験の結果(最大増殖量)を、栄養塩濃度から推定した理論的最大増殖量と比較する。次式に従って増殖阻害率を計算し、増殖に対する50%の影響濃度を推定する。

$$\text{増殖阻害率(\%)} = 100 - \left( \frac{\text{試水混合培地における最大増殖量}}{\text{理論的最大増殖量}} \times 100 \right) \quad (8-1)$$

#### 8.1.2 供試溶液の調製(試水への栄養塩の添加、標準培地の調製ならびにそれらの混合)

①AAP培地(2.3.2参照)からEDTAを除いたものの62.5倍の濃度の溶液を調製する。これを添加原液とする。

②試水を2.2に準じ前処理を行った後(試水Aとする)、その100mlに対し、①の添加原液1mlの割合で添加し、栄養塩添加試水(試水B)とし、栄養塩無添加の試水(試水A)と区別する。

③AAP培地からEDTAを除いたものを、イオン交換水もしくは蒸留水で62.5% v/vに希釈し、これを標準培地として用いる。

④試水Bを③の標準培地と混合し、培養に用いる供試溶液とする。混合率の決定は以下のように行う。試水混合率は増殖阻害効果の現われはじめる混合率から、増殖がまったく見られなくなる混合率までの範囲を、対数目盛で等間隔に数点とれるように決定するのが望ましい。通常は、その濃度範囲は未知であるため、本実験と同じ条件で混合率を大まかに変化させた予備実験を行い範囲を決定するとよい。しかし、毒性の強弱があらかじめ予想される場合には、表8-1に従って混合率を決定する。

#### 8.1.3 AGP試験

供試藻類種として *S. capricornutum* を用い、8.1.2で調製した標準培地ならびに供試溶液について、2.3~2.7の方法に従いAGP試験を行い、最大増殖量を求める。

表 8-1 試水混合率の決定

毒性が低いと予想される場合	毒性が高いと予想される場合
100 % v/v	100 % v/v
75	56
56	32
42	18
32	10
24	5.6
18	3.2
13.5	1.8
10	1.0

#### 8.1.4 試水 A の栄養塩分析

試水 A について、溶解性無機態窒素  $[(\text{NH}_4\text{-N})+(\text{NO}_3\text{-N})+(\text{NO}_2\text{-N})]$  ならびにリン酸態リンの分析を行う。

#### 8.1.5 結果の整理

①理論的最大増殖量の推定：培地中に窒素、リン以外の栄養塩類が十分に存在し、毒性もない場合には、*S. capricornutum* の最大増殖量は窒素もしくはリンによって制限される (2.2.5 および 5 参照)。溶解性無機能窒素を N、リン酸態リンを P と表わせば、培地 (供試溶液) 中の 0.001 mg/l の N は、乾燥重量として最大 0.038 mg dw/l の藻体を生産する。同様に 0.001 mg/l の P は、最大 0.430 mg dw/l の藻体を生産する (ただし P が 0.01 mg/l 以上の場合<sup>4)</sup>)。したがってこれらの関係から最大増殖量の予測が可能である。ただし予測値と実測値は ±20% の範囲で適合する。

供試溶液における理論的最大増殖量は、標準培地中の N、P および、それに混合された試水中の N、P それぞれの和から次のように計算する。試水中の N、P 濃度は 8.1.4 で測定した値を用いる。

N による推定

$$\text{理論的最大増殖量 (mg dw/l)} = \frac{0.038}{0.001} \times \left[ \left( \frac{\text{標準培地の N 濃度 (mg/l)}}{\text{N 濃度 (mg/l)}} \right) + \left( \frac{\text{試水の N 濃度 (mg/l)}}{\text{N 濃度 (mg/l)}} \right) \times \frac{\text{混合率 (\%)}}{100} \right] \quad (8-2)$$

P による推定

$$\text{理論的最大増殖量 (mg dw/l)} = \frac{0.430}{0.001} \times \left[ \left( \frac{\text{標準培地の P 濃度 (mg/l)}}{\text{P 濃度 (mg/l)}} \right) + \left( \frac{\text{試水の P 濃度 (mg/l)}}{\text{P 濃度 (mg/l)}} \right) \times \frac{\text{混合率 (\%)}}{100} \right] \quad (8-3)$$

たとえばここで用いた標準培地の N、P 濃度はそれぞれ、2.625 mg-N/l、0.116 mg-P/l である。

上式から理論的最大増殖量を求めるとNによる推定では、99.8mg dw/l、Pによる推定では49.9 mg dw/lである。したがってこの標準培地ではリンが制限となっており、理論的最大増殖量は約50mg dw/lと推定できる。

② 毒性の評価：供試溶液それぞれの最大増殖量（実測）および理論的最大増殖量から(8-1)式を用いて、増殖阻害率(%)を計算する。得られた増殖阻害率をそれぞれの試水混合率に対して、対数-確率紙上にプロットし量作用直線を求める。グラフから確率50%に対応する混合率を求め、50%増殖阻害濃度( $EC_{50}$ )の値とする。

#### 8.1.6 EDTA添加試験

試水に含まれる有害性物質が重金属の場合、EDTAを添加することにより、毒性が低下する可能性がある。したがって、栄養塩添加試水にEDTAを添加してAGP試験を行い、EDTAを添加しないものに比べ増殖阻害効果が減少（増殖量が増加）した場合、有害物質が重金属であると判断できる。

試験方法：試水B(8.1.2)にEDTAを $Na_2EDTA$ として10mg/lとなるよう添加し、これを供試溶液とする。2.3~2.7および8.1.5に従いAGP試験を行い、増殖阻害率を算定する。

#### 8.1.7 試水AのAGP試験

栄養塩無添加の試水Aについても、AGP試験を行い、試水自身のAGPを測定する。

#### 8.1.8 実例（埋立地浸出水の毒性評価）<sup>42)</sup>

8.1.2~8.1.7に準じて行った毒性評価の1例を次に述べる。

##### 1) 試験条件

試水は、モンリオール近辺の埋立地浸出水である。標準培地への試水Bの混合率は100, 56, 32, 18, 10, 5.6, 3.2, 1.8, 1.0, 0%の10段階とし、他に試水Bに10mg/lのEDTAを添加したもの、試水Aについてもそれぞれ3連のAGP試験を行った。培養液容積は125ml容の三角フラスコに対し40mlとした。したがって試水の必要量は約600mlである。接種藻の初期濃度を約1,000細胞/mlとなるように、各培養容器に培養令7~14日の藻体を約40,000細胞/mlに濃縮したものを1mlずつ接種した。増殖量はコールターカウンタにより細胞数を測定し、乾燥重量に換算して求めた。

##### 2) 結果

培養結果を表8-2に示す。 $EC_{50}$ を求めるためのグラフを図8-1に示す。この試水の $EC_{50}$ は試水の混合率16%であることがわかる。統計処理を行い、95%信頼区間を求めたところ、 $EC_{50}$



表 8-2 埋立地浸出水の毒性試験結果<sup>42)</sup>

	NAGP	100+ EDTA	試水 B 混 合 率 % v/v								標準 培地	
			100	56	32	18	10	5.6	3.2	1.8		1.0
細胞数	0.000	0.000	0.000	0.357	0.660	1.137	0.000	1.860	2.314	2.656	2.350	2.416
( $\times 10^4$ 細胞/ml)	0.000	0.062	0.000	0.369	0.718	1.247	1.616	0.000	2.178	2.607	0.000	2.549
$\bar{X}^2$	0.000	0.069	0.000	0.346	0.784	1.120	1.479	2.108	2.235	2.104	2.469	2.701
2S	0.000	0.065	0.000	0.358	0.721	1.168	1.548	1.984	2.243	2.456	2.409	2.555
CV	0.000	0.005	0.000	0.011	0.062	0.069	0.097	0.175	0.068	0.306	0.084	0.142
最大増殖量(実測)	0.00	6.947	0.000	3.188	8.609	5.880	6.254	8.843	3.052	12.450	3.505	5.575
理論的増殖量 (mg/l)	0.00	1.29	0.00	7.05	14.22	23.04	30.53	39.13	44.24	48.44	47.53	50.41
増殖阻害率(%)	0.33	48.74	48.74	48.43	48.26	48.16	48.11	48.07	48.06	48.05	48.04	48.03
CFB	100	97	100	85	71	52	37	19	8	0	1	—
												19.73

$\bar{X}^2$  : 3連の実験の平均

2S : 標準偏差 $\times 2$

CV : 変動係数

CFB : 乾燥重量への換算係数

NAGP : 試水 A の AGP (栄養塩無添加)

100+EDTA : 試水 B + EDTA (10mg/l)

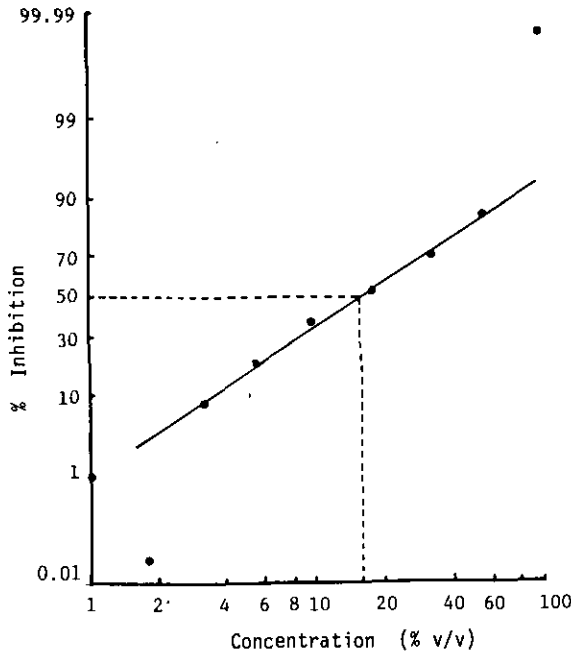


図 8-1 埋立地浸出水の AGP による毒性試験<sup>42)</sup> (EC<sub>50</sub>の算定法)

の95%信頼区間は6.3~40.8%であることがわかった。またEDTAを添加しても、増殖阻害効果に著しい変化が見られないことから、試水の毒性は、重金属イオンではないか、あるいは添加したEDTAの量が不足しているのかどちらかであろう。

## 8.2 既知物質の毒性評価

一般に自然水、排水等による藻類増殖の阻害は、種々の要因の複合効果であろう。しかしながら、その主な要因は重金属イオンであったり、無機あるいは有機のある特定の化合物であったりする。特定の化学物質が、藻類に対しどのような影響を及ぼすかを調べることも必要である。ここでは、環境中で変化を受けやすい物質と、受けにくい物質とに分けて、その毒性の評価方法について述べる。

環境中で変化を受けやすい物質の毒性を調べるための試験は、短期間の培養で結果が出る方法が望ましい。このため通常のAGP試験のように最大増殖量を測定するのではなく、最大比増殖速度を測定する。これに対し、環境中で変化しにくい物質については、最大増殖量ならびに最大比増殖速度のいずれを測定してもよい。

最大比増殖速度の変化による毒性評価と最大増殖量による毒性評価の方法を以下に述べる。

### 8.2.1 最大比増殖速度の変化による毒性評価方法

標準培地に既知濃度の供試物質を添加し、供試物質濃度と最大比増殖速度の関係からEC<sub>50</sub>を求めらる。

#### (1) 濃度範囲の決定

供試物質の毒性の現われる濃度についての知見がまったくない場合には、広い濃度範囲にわたる予備試験を行い、本試験の濃度範囲を決める。濃度範囲の目安がみついたら、その範囲内で、対数目盛りで等間隔に試験濃度を定める。

#### (2) 供試溶液の調整

供試物質を標準培地(AAP培地等、接種藻類種に応じ適当に選択する)に添加して、前項で定めた濃度の溶液を調製する。調製はどんな方法を用いてもよいが、標準培地をあらかじめ一定量つ培養フラスコに分注し、その100mlに対し、供試物質の濃厚原液を1ml程度加えるようにするのが便利であろう。供試物質の添加により培養液のpHが大巾に変化する場合には、供試物質に変化がない範囲で1N HClあるいは1N NaOHを加え、pHを6.5~8.5に調整する。

#### (3) 接種

本法は短期間の培養における比増殖速度の測定から、毒性を評価するため、接種する藻体の状

態、量等には充分注意を払わねばならない。培養の初期から、一定の増殖速度で増殖させるためには、前培養において、対数増殖期にある藻体を植種しなければならない。もし対数増殖期を過ぎ、定常状態にはいつてしまった藻体を用いると、対数増殖の前に長い誘導期が現われるため、短時間で比増殖速度を求めることが困難となる。

前培養の方法は2.3、2.4に準ずるが、接種量は次のような理由により、変更することがある。

接種の量は、藻体量の測定方法の感度により、ある程度決められてしまう。しかしながら、一般に溶液中の有害物質濃度が一定である場合、生物体濃度が低い方が毒性に敏感であるので、できる限り、藻体量は低くする方が望ましい。

接種量の例を表8-3に示す。接種量を決めたら、前培養において対数増殖期にある藻体を濃縮し、培地100mlに対し1~2ml程度の割合で加え、所定の初期藻体量が得られるようにする。

表8-3 接種量の例(*S. capricornutum*)

測定方法	初期藻体量	培養液 体積	接種原液	接種 体積
計数法(コールターカウンタ)	$2 \times 10^4$ 細胞/ml	100ml	$2 \times 10^6$ 細胞/ml	1ml
	$2 \times 10^5$ 細胞/ml	100ml	$2 \times 10^7$ 細胞/ml	1ml
クロロフィルa(けい光光度計) <sup>43)</sup>	$2 \times 10^4$ 細胞/ml	200ml	$2 \times 10^6$ 細胞/ml	2ml

#### (4) 培養条件

培養条件は2.5に準ずる。

#### (5) 増殖量の測定

植種後、適当な間隔で数回、藻体量を測定する。たとえば、6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後の5点をとる。測定方法は、充分な感度が得られるならば、2.6で述べたどの方法を用いてもよい。

#### (6) 結果の整理

藻体量を培養時間に対し、片対数方眼紙上にプロットし、直線を得る。この直線の傾きから最大比増殖速度 $\mu$ を求める。得られた最大比増殖速度を標準培地での値と比較し、阻害率を求める。

$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \left( \frac{\text{供試溶液における最大比増殖速度}}{\text{標準培地における最大比増殖速度}} \times 100 \right) \quad (8-4)$$

次に、供試物質濃度と、阻害率の関係を対数確率紙上にプロットし $EC_{50}$ を求める。

## 8.2.2 最大増殖量の変化による毒性評価方法

標準培地に既知濃度の供試物質を添加し、供試物質濃度と最大増殖量との関係から  $EC_{50}$  を求める。

試験方法については、8.2.1, 2.3~2.7, 8.1.5に準ずる。

## 8.3 補遺

### 8.3.1 50%影響濃度( $EC_{50}$ )の求め方

- (1) 試水混合率あるいは供試物質濃度と阻害率(%)の表をつくる(表8-2参照)。
- (2) 対数確率紙(図8-1参照)の横軸に、試水混合率あるいは供試物質濃度を取り、縦軸に最大増殖量あるいは最大比増殖速度に対する阻害率(%)を取り、(1)で作成した表の測定値をプロットする。ここで得られた直線上で、確率50%に相当する混合率あるいは濃度を  $EC_{50}$  とする。

### 8.3.2 比増殖速度( $\mu$ )の求め方

- (1) 対数増殖期における藻類の増殖速度は、次式のように表わせる。

$$\frac{dC}{dt} = \mu C \quad (8-5)$$

ただし、 $C$  : 培養時間  $t$  における藻体量

$t$  : 培養時間

$\mu$  : 増殖速度定数 (比増殖速度)

である。(8-5)式を積分すると次のようになる。

$$\ln \frac{C}{C_0} = \mu t \quad (8-6)$$

$$\ln_e C = \mu t + \ln C_0 \quad (8-7)$$

$$\log_{10} C = (\mu/2.303)t + \log_{10} C_0 \quad (8-8)$$

ただし  $C_0$  は  $t=0$  における藻体量である。

したがって  $\log_{10} C$  を  $t$  に対して図示した直線の傾きは  $\mu/2.303$  に等しい。

- (2) 測定した藻体量の対数を培養時間に対してプロットする。この直線の傾きを最小二乗法で求め、2.303を乗じて  $\mu$  を計算する。例を図8-2に示す。

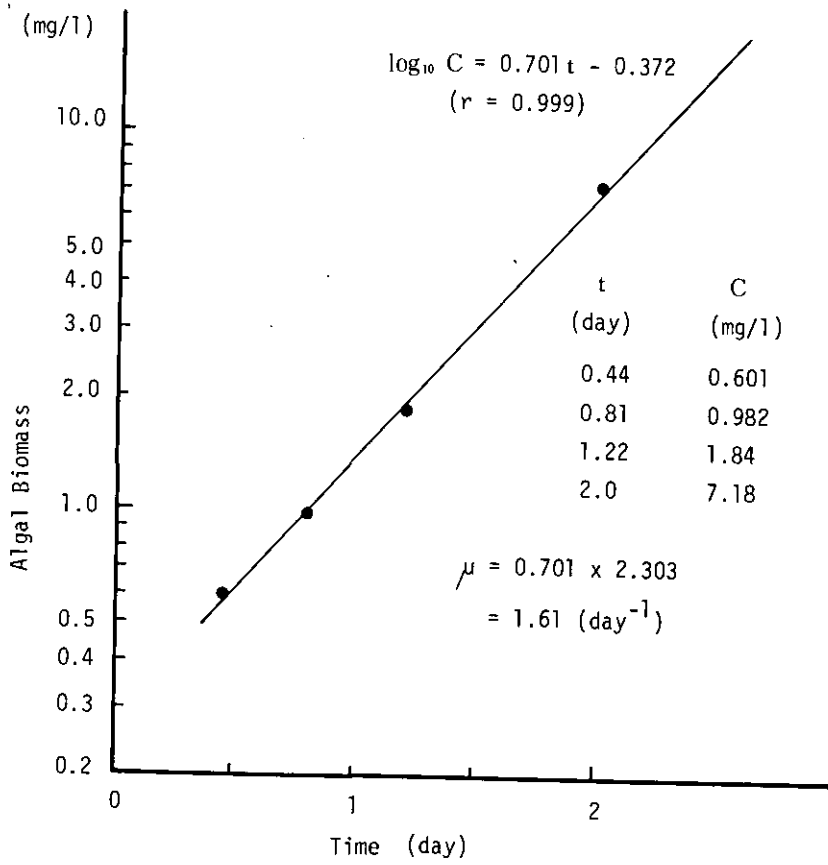


図8-2 比増殖速度 ( $\mu$ ) の算定法

## 引 用 文 献

- 1) 須藤隆一 (1979) : 富栄養化とその対策. 日本機械学会誌, **82**, 1052-1057.
- 2) 須藤隆一 (1980) : 霞ヶ浦における水の華に関する研究. 陸水学雑誌, **41**, 124-131.
- 3) 須藤隆一・森忠洋・岡田光正 (1973) : 藻類培養試験による富栄養化の評価. 用水と廃水, **15**, 107-116.
- 4) 岡田光正・須藤隆一 (1978) : A G Pをめぐる諸問題. 用水と廃水, **20**, 765-779.
- 5) Joint Industry/Government Task Force on Eutrophication (1969): Provisional Algal Assay Procedure, 62 pp.
- 6) National Eutrophication Research Program EPA (1971): Algal Assay Procedure Bottle Test, 82 pp.
- 7) APHA, AWWA, WPCF (1976): Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 14th Ed., 1193 pp. 744-759.
- 8) Bringmann, G. and R. Kühn (1956): Der Algan-Titer als Masstab der Eutrophierung von Wasser und Schlamm. Gesundheitsingenieur, **77**, 374.
- 9) Skulberg, O. M. (1964): Algal Problems Related to the Eutrophication of Water Supplies, and Bioassay Method to Assess Fertilizing Influences of Pollution on Inland Waters. In D. F. Jackson (ed.), Algal and Man. Plenum Press, New York.
- 10) Miller, W. E. and T. E. Maloney (1971): Effects of Secondary and Tertiary Wastewater Effluents on Algal Growth in a Lake-River System. Jour. WPCF., **43**, 2361-2365.
- 11) Maloney, T. E., W. E. Miller and N. L. Blind (1972): Use of Algal Assays in Studing Eutrophication Problems. 6th International Water Pollution Research, III-6.
- 12) U.S. Environmental Protection Agency (1974): Marine Algal Assay Procedure Bottle Test. Eutrophication and Lake Restoration Branch, Corvallis, Oregon. EPA-660/3-75-008.
- 13) 須藤隆一 (1976) : 陸水域のモニタリング-富栄養化におよぼす排水の影響. 環境情報科学, **5**(2), 23-30.
- 14) 須藤隆一・森忠洋・大竹久夫・岡田光正・合葉修一 (1975) : 都市下水の2次処理水が示す藻類生産の潜在能力. 下水道協会誌, **12**(6), 1-9.
- 15) Miller, W. E., J. C. Greene, T. Shiroyama and E. Merwin (1975): The Use of Algal Assys to Determine Effects of Waste Discharges in the Spokane River System. Proceedings: Biostimulation/and/Nutrient Assessment Workshop, EPA-660/3-75-034, 319 pp., 113-131.
- 16) Gerhold, R. M. (1975): Algal Nutritional Bioassys of Lake Wylie, North Carolina. Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop Proceeding, Utah Water Research Laboratory, 390 pp., 175-220.
- 17) Payne, A. G. (1975): Application of the Algal Assay Procedure in Biostimulation and Toxicity Testing. Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop. Utah Water Research Laboratory, 390 pp., 3-27.
- 18) Greene, J. C., R. A. Soltero, W. E. Miller, A. F. Gasperino and T. Shiroyama (1975): The Relationship of Laboratory Algal Assays to Measurements of Indigenous Phytoplankton in Long Lake, Washington. Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop. Utah Water Research Laboratory, 390 pp., 93-126.
- 19) Miller, W. E., J. C. Greene and T. Shiroyama (1978): The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test Experimental Design, Application, and Data Interpretation Protocol. EPA-600/9-78-018, 126 pp.
- 20) 日本下水道事業団試験部 (1976) : 富栄養化防止のための指標の開発と実用化. 日本下水道事業団試験部, 122pp.
- 21) 環境庁企画調整局研究調整課 (1979) : 環境測定分析参考資料 (補遺) 第4分冊, 163-170.
- 22) 林光則・葉山八千代・秋山広子・永井史郎 (1978) 海洋プランクトンの栄養要求と藻類培養試験による海水の富栄養評価に関する研究. 水質汚濁研究, **1**, 199-202.

- 23) 今岡務・寺西靖治・矢木修身・須藤隆一 (1981) : 海域における赤潮生物生産能力の評価. 第17回衛生工学研究討論会講演論文集.
- 24) Saldick, J. and J. F. Jadlocki, Jr. (1978): Solubilization of Biologically Available Phosphorus by Autoclaving *Selenastrum*. Mitt. Internat. Verein. Limnol., **21**, 50-56.
- 25) 笠文彦・北尾高嶺・岩井重久 (1977) : 藻類培養試験法に関する基礎的研究. 用水と廃水, **19**, 325-334.
- 26) Claesson, A. and A. Forsberg (1980): Algal Assay Studies of Waste-Water Polluted Lakes. Arch. Hydrobiol., **89** (1-2), 208-224.
- 27) 岡市友利 (1977) : 汚染と海洋生物—プランクトン—. 用水と廃水, **19**, 75-81.
- 28) 村上彰男 (1976) : 赤潮と富栄養化. 公害対策技術同友会, 207 pp.
- 29) Golterman, H. L., C. C. Bakels, and J. Jakobs-Mögelin (1969): Availability of Mud Phosphates for the Growth of Algae. Verh. Internat. Verein Limnol. **17**, 467-479.
- 30) Porcella, D. B., J. S. Kumagai, and B. J. Middlebooks (1970): Biological Effects on Sediment-water Nutrient Interchange. J. Sanitary Engineering Div. Proc. Amer. Soc. Civil Eng. SA4, 911-926.
- 31) Sagher, A., R. F. Harris and D. E. Armstrong (1975): Availability of Sediment Phosphorus to Microorganisms. PB-240822, 57 pp.
- 32) Fitzgerald, G. P. (1970): Aerobic Lake Muds for the Removal of Phosphorus from Lake Waters. Limnol. Oceanogr., **15**, 550-555.
- 33) Wildung, R. E., and R. L. Schmidt (1973): Phosphorus Release from Lake Sediments. U.S. Environmental Protection Agency Report Number, EPA-R3-73-024, 185 pp.
- 34) 細見正明・須藤隆一 (1979) : 湖沼底泥からのリン溶出に関する研究, 水質汚濁研究, **2**, 157-162.
- 35) 細見正明・矢木修身・須藤隆一 (1978) : 藻類の増殖に及ぼす底泥の影響に関する研究, 日本醸酵工学会大会講演要旨, 219.
- 36) 細見正明・須藤隆一 (1979) : 藻類の増殖に及ぼす底泥の影響に関する研究—底泥のAGP—, 国立公害研究所研究報告, **6**, 115-121.
- 37) Sudo, R. and Okada, M. (1979): The Effects of Sediment on Lake Eutrophication: The Application of Algal Assay Procedure. Management of Bottom Sediments Containing Toxic Substances, Proceedings of the 4th U.S.-Japan Experts' Meeting. EPA-600/3-79-102. 394 pp., 161-179.
- 38) 田井慎吾・岡田光正・須藤隆一 (1979) : 情報エントロピーとAGPによる富栄養化の評価. 国立公害研究所報告, **6**, 203-212.
- 39) 田井慎吾 (1979) : AGP<sup>m</sup>と多様性指数. 水環境指標, 合田健編著, 思考社, 392pp., 289-299.
- 40) 田井慎吾・須藤隆一・合田健 (1981) : 情報エントロピーによる栄養状態の評価. 国立公害研究所研究報告, 第23号, —
- 41) Shiroyama, T., W. E. Miller and J. C. Greene (1975): Effect of Nitrogen and Phosphorus on the Growth of *Selenastrum capricornutum*. Proceedings: Biostimulation/and/Nutrient Assessment Workshop, EPA-660/3-75-034, 319 pp., 132-142.
- 42) Gerald, J. (1980): A Bioassay Application for Quantitative Toxicity Measurements, Using the Green Algae *Selenastrum capricornutum*. Water Research, **14**, 1759-1763.
- 43) Guy, R. D. and A. Ross Kean (1980): Algae as a Chemical Speciation Monitor - I. A Comparison of Algal Growth and Computer Calculated Speciation. Water Research, **14**, 891-899.

## 図 表 リ ス ト

### 〈表〉

- 表2-1 AAP 培地組成
- 表2-2 Gorham の5倍希釈培地
- 表3-1 S-5 培地の組成
- 表3-2 人工海水
- 表3-3 各藻類の洗浄条件および接種濃度
- 表4-1 湖水のAGP
- 表4-2 活性汚泥処理水のAGP
- 表4-3 凝集沈殿した下水処理のAGP
- 表6-1 底泥のAGP試験に用いた滷液中の栄養塩濃度(琵琶湖赤野井湾)
- 表7-1 霞ヶ浦(木原沖)湖水の培養前後における種と個体数の変化
- 表7-2 湖水のAGP<sup>M</sup>と培養前後における多様性指数の変化
- 表8-1 試水混合率の決定
- 表8-2 埋立地浸出水の毒性試験結果
- 表8-3 接種量の例(*S. capricornutum*)

### 〈図〉

- 図2-1 供試藻類種の保存培養
- 図2-2 接 種
- 図2-3 500 ml 三角フラスコ(シリコン栓使用)による回転式振とう培養
- 図2-4 1,000 ml L型培養管(綿栓使用)によるモノ型振とう培養
- 図4-1 印旛沼水域のAGP分布(1975.11.25)(*S. capricornutum*)
- 図4-2 滷過法および熱分解法によるAGPの比較(AGP<100mg/l)
- 図4-3 滷過法および熱分解法によるAGPの比較(AGP>100mg/l)
- 図4-4 希釈法による2次処理水のAGP測定
- 図4-5 多摩川の富栄養化に及ぼす処理水の影響
- 図4-6 湖水のAGPに及ぼす脱リン処理水の影響(*Chlorella. sp.*)
- 図5-1 牛久沼における制限栄養要因の決定
- 図5-2 霞ヶ浦(夏期)における制限栄養要因の決定
- 図5-3 霞ヶ浦(秋期)における制限栄養要因の決定
- 図5-4 大洗の海水中の制限栄養要因の決定
- 図6-1 藻類の増殖に及ぼす底泥の影響に関する評価方法
- 図6-2 投込型コアサンプラー(離合社製)
- 図6-3 好気条件下における底泥-湖水混合液のインキュベーション方法



- 図6-4 霞ヶ浦底泥のAGP (*S. capricornutum*)
- 図6-5 中禅寺湖底泥のAGP (*S. capricornutum*)
- 図6-6 琵琶湖赤野井湾底泥のAGP (*M. aeruginosa*)
- 図6-7 底泥-藻類混合培養管
- 図6-8 混合培養管におけるフィルター孔径のちがいによるリンの移動性
- 図6-9 底泥の添加量に対する *S. capricornutum* の最大増殖量と底泥側から藻類培地側へ移行したリン量
- 図6-10 底泥の添加量に対する *M. flos-aquae* の増殖曲線
- 図7-1 AGPとAGP<sup>M</sup>の関係
- 図8-1 埋立地浸出水のAGPによる毒性試験 (EC<sub>50</sub>の算定法)
- 図8-2 比増殖速度 ( $\mu$ ) の算定法

## 国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 — 霞ヶ浦を対象域として。(1977)
- 第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/52年度研究報告。(1978)

(改 称)

## 国立公害研究所研究報告

- 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) (1978)  
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和52年度中間報告。(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素 — 窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究 — 昭和51/52年度研究報告。(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II) — 霞ヶ浦を中心として。(1979)
- 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)  
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和52/53年度研究報告。(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和53年度中間報告。(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/53年度特別研究報告。(1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)  
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)  
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)  
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.  
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.  
(多摩川に発生するユスリカの研究  
— 第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係 —  
— 第2報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の20種について —)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53, 54年度特別研究報告。(1980)
- 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和54年度特別研究報告。(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果 — 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 昭和53/54年度 特別研究報告。(1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)  
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅲ) — 霞ヶ浦(西浦)の湖流 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅳ) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅴ) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅵ) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅶ) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅷ) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ) — *Microcystis* (藍藻類) の増殖特性 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) — 藻類培養試験法によるAGPの測定 — 昭和53/54年度. (1981)

### **Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies**

- No. 1\* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1966. (1977)
- No. 2\* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[ Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to: ]

### **Research Report from the National Institute for Environmental Studies**

- No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5\* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6\* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- No. 8\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9\* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10\* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
- No.14\* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.15\* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1979. (1980)
- No.16\* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- No.17\* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- No.19\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydro-meteorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)
- No.21\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)

- No.22\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of *Microcystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26\* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of argal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)

\* in Japanese

RESEARCH REPORT FROM  
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES  
No. 26

国立公害研究所研究報告 第26号  
(R-26-'81)

---

昭和56年3月31日発行

編集・発行 国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

---

印刷 株式会社イセブ印刷  
茨城県新治郡桜村天久保2-11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies  
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.  
March 1981