

# G8 efficacy 試験の具体的方法

大村卓朗

東京大学アジア生物資源環境研究センター  
沿岸海洋環境評価研究室 特任助教

## G8 efficacy 試験の具体的方法

- (1) バラスト水の特徴
- (2) 対象となる生物
- (3) 処理後の検証について
  - ・ 検証に係わるガイドライン
  - ・ 生物の“最小サイズ”と  
“viability”の判断基準
- (4) 陸上試験と船上試験の難しさ
- (5) その他



## G8 efficacy 試験の具体的方法

### (1) バラスト水の特徴

### (2) 対象となる生物

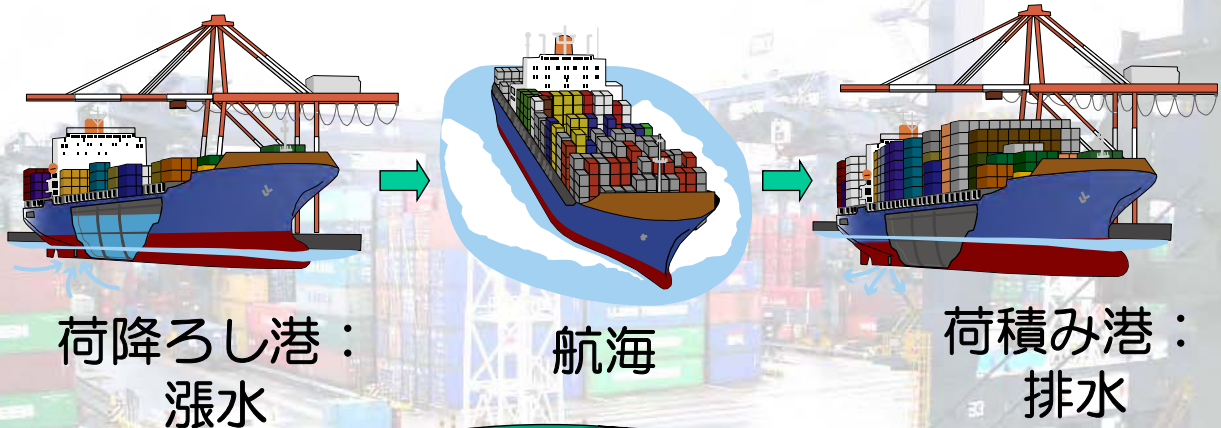
### (3) 処理後の検証について

- ・ 検証に係わるガイドライン
- ・ 生物の“最小サイズ”と  
“viability”の判断基準

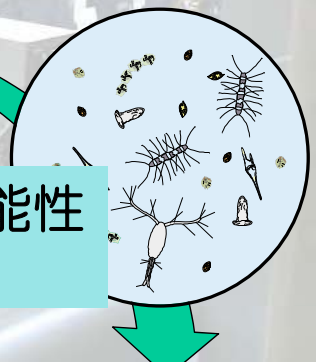
### (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### (5) その他

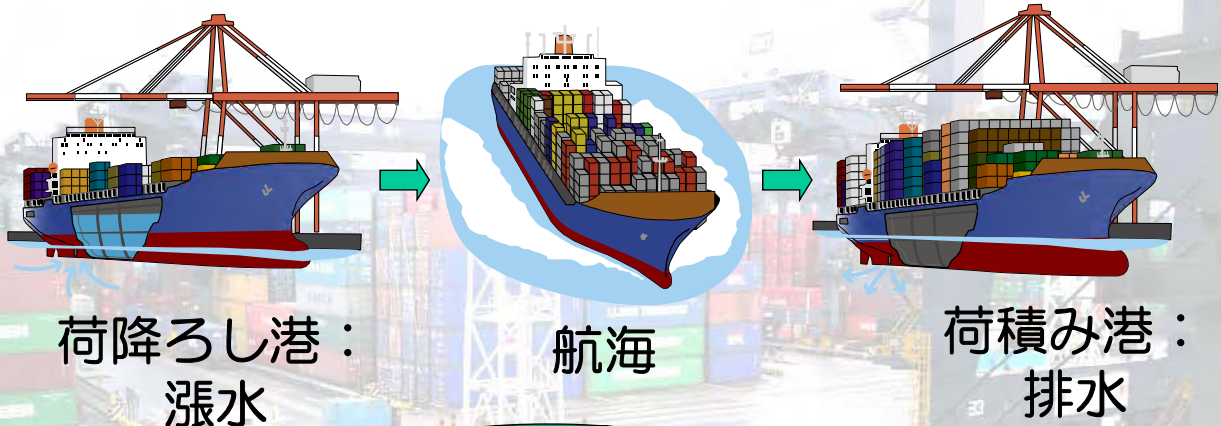
## (1) バラスト水の特徴



バラスト水中に取り込まれる可能性のある生物は、移動可能



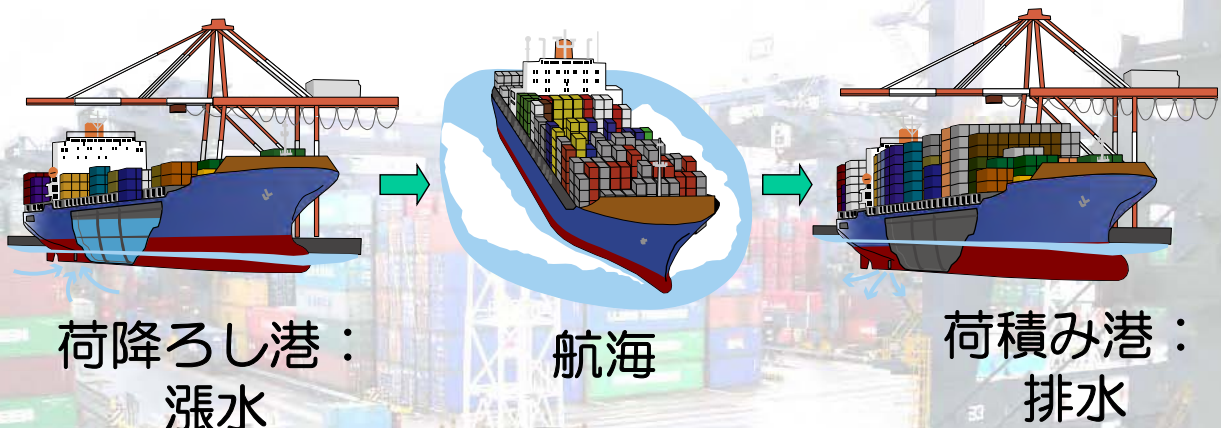
# (1) バラスト水の特徴



バラスト水中に取り込まれる可能性のある生物は、移動可能

動物・植物プランクトン etc.  
様々な大きさの生物・分類群

# (1) バラスト水の特徴



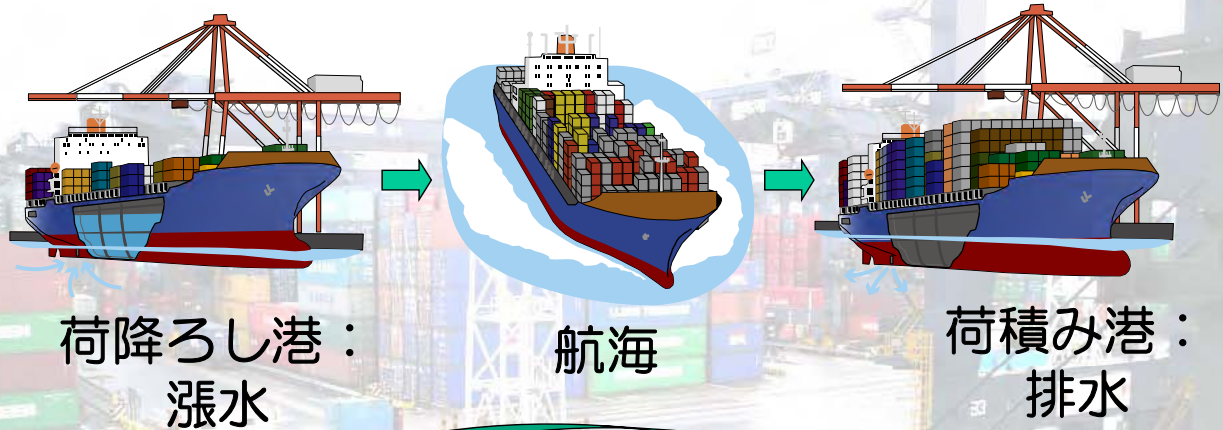
バラスト水中に取り込まれる可能性のある生物は、移動可能

動物・植物プランクトン etc.  
様々な大きさの生物・分類群

↓  
これらが対象となる



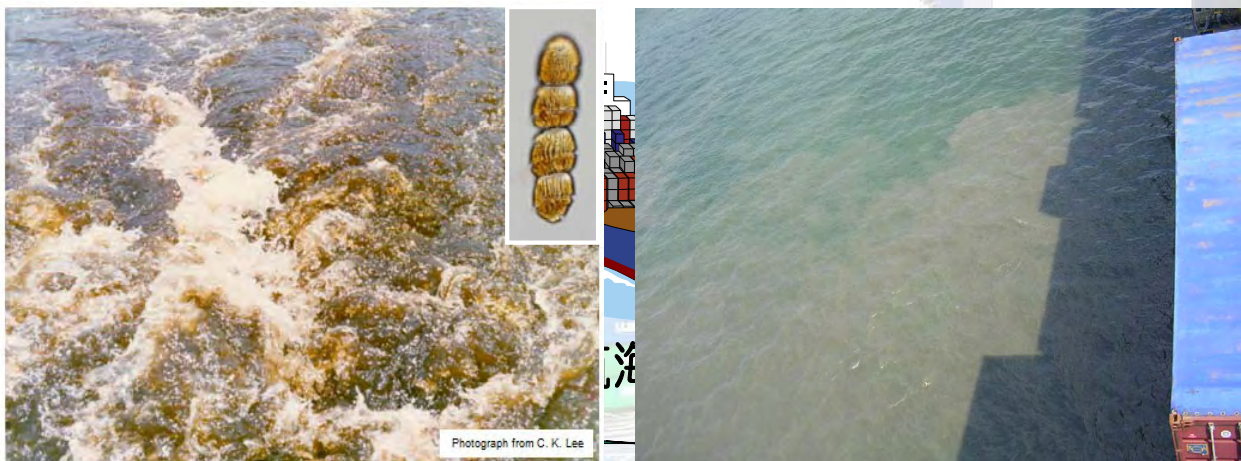
# (1) バラスト水の特徴



○生物の非常に少ない水から、赤潮状態のように生物の非常に多い水の、さまざまな生物量の水が対象

○生物以外の粒状物質の濃度の高い水から低い水が対象

# (1) バラスト水の特徴



○生物の非常に少ない水から、赤潮状態のように生物の非常に多い水の、さまざまな生物量の水が対象

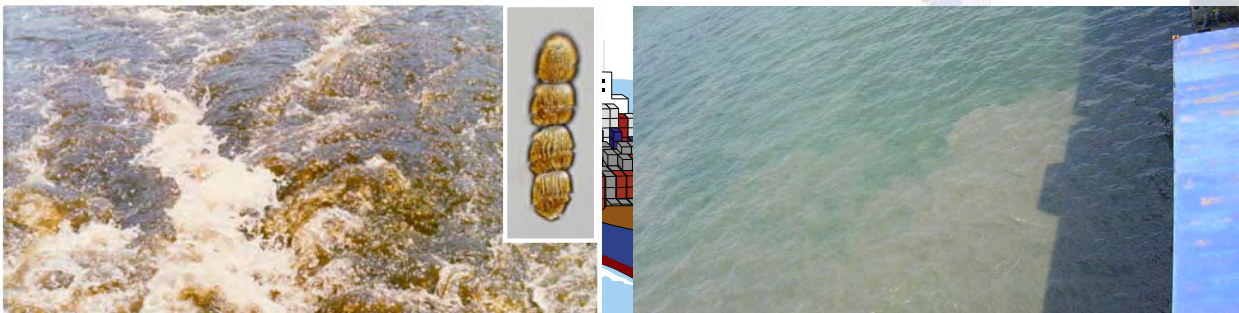
○生物以外の粒状物質の濃度の高い水から低い水が対象

## (1) バラスト水の特徴



- 淡水から海水までのさまざまな塩分が対象
- 生物の非常に少ない水から、赤潮状態のように生物の非常に多い水の、さまざまな生物量の水が対象
- 生物以外の粒状物質の濃度の高い水から低い水が対象

## (1) バラスト水の特徴



- さまざまな水温の水が対象
- 淡水から海水までのさまざまな塩分が対象
- 生物の非常に少ない水から、赤潮状態のように生物の非常に多い水の、さまざまな生物量の水が対象
- 生物以外の粒状物質の濃度の高い水から低い水が対象



## G8 efficacy 試験の具体的方法

(1) バラスト水の特徴

(2) 対象となる生物

(3) 処理後の検証について

- ・ 検証に係わるガイドライン

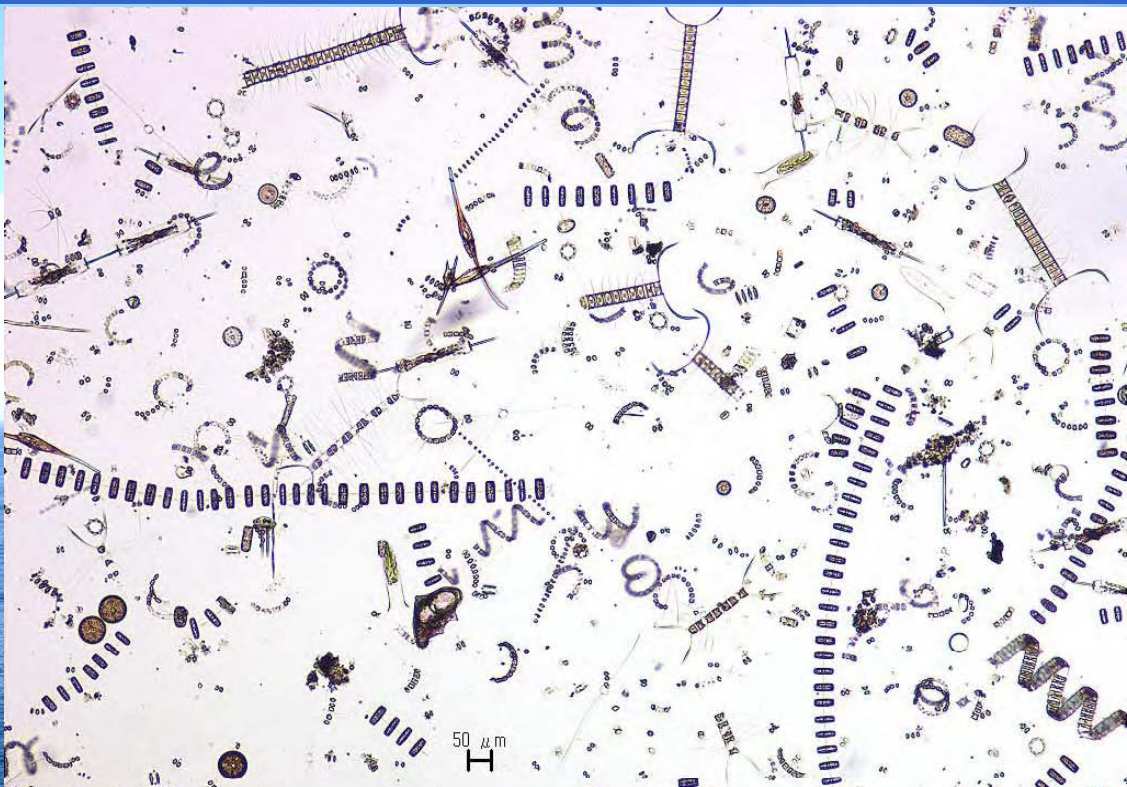
- ・ 生物の“最小サイズ”と

“viability” の判断基準

(4) 陸上試験と船上試験の難しさ

(5) その他

## (2) 処理における基本的な考え方



様々な大きさ・形の生物が存在



## (2) 処理における基本的な考え方



### バラストタンク内に取り込まれる生物

いくつかのグループに分けられる

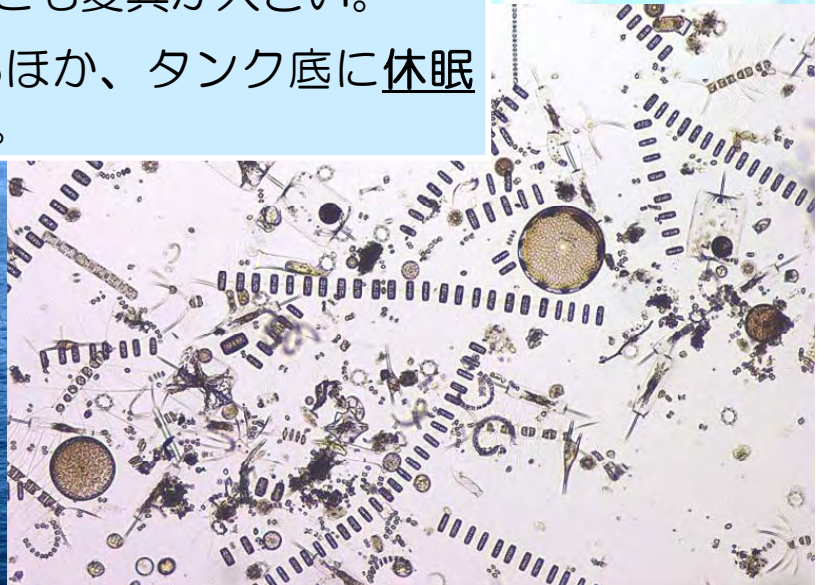
1. バクテリア, ウィルス
2. 微細藻類 (植物プランクトン, シスト)
3. 動物プランクトン
4. 海藻

## (2) 処理における基本的な考え方



### 単細胞微細藻類 (植物プランクトン, シスト)

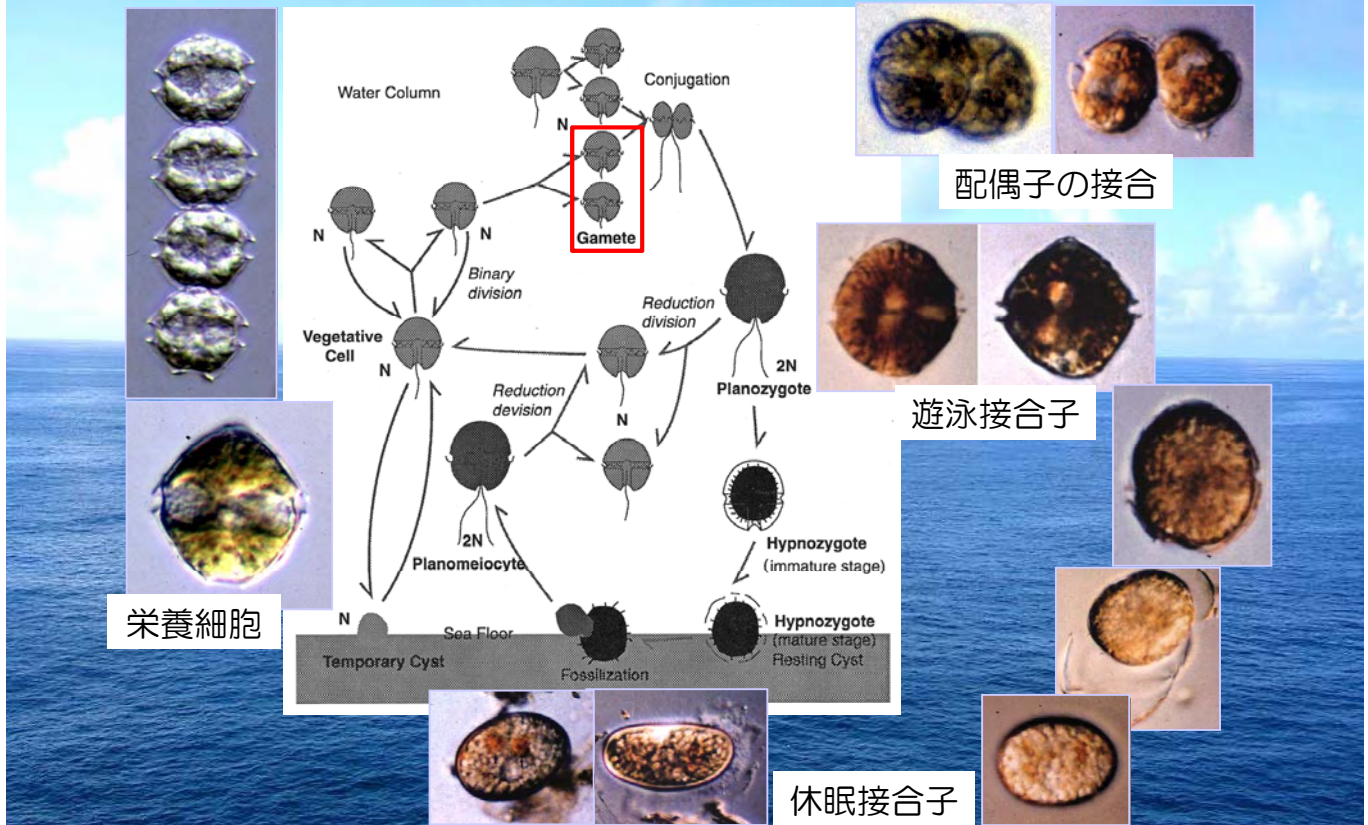
- ・ 1 ~ 1,000 ミクロンと大きさに幅があるが、20 ~ 60 ミクロンの生物が多い
- ・ 水1mlあたり100 ~ 10,000 細胞いるが、環境により、種・数とも変異が大きい。
- ・ 水中に浮遊しているほか、タンク底に休眠しているものもある。





## (2) 処理における基本的な考え方

### 渦鞭毛藻類の生活史の例



## (2) 処理における基本的な考え方

### 渦鞭毛藻類の生活史の例

栄養細胞は暗黒下でも、条件によっては10日間以上生存が可能。そのため、タンク内に取り込まれてからも、長期間生き残っている。

すべての世代がバラスト水に取り込まれる可能性がある。特に、休眠接合子を取り込まれた場合には、耐久力が強く、タンク底に堆積するため、除去が困難になる。

栄養

休眠接合子

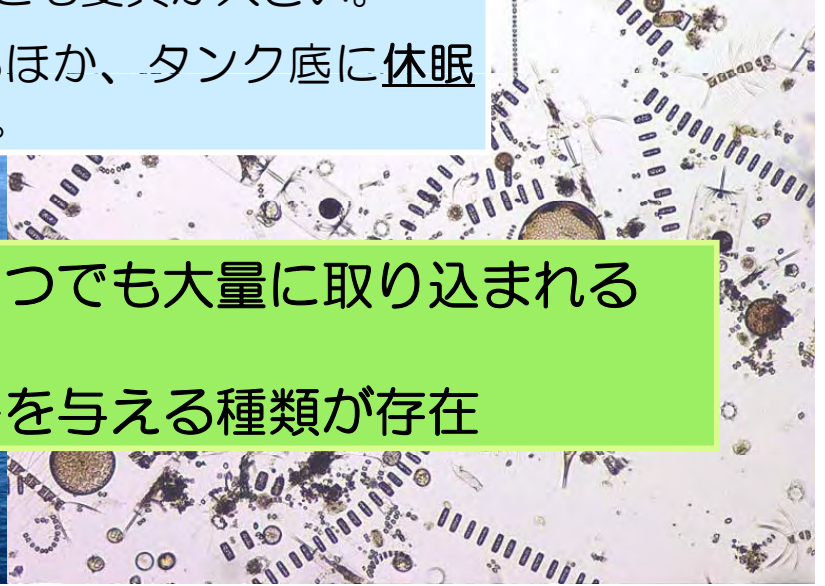


## (2) 処理における基本的な考え方

### 単細胞微細藻類 (植物プランクトン, シスト)

- ・ 1 ~ 1,000 ミクロンと大きさに幅があるが、20 ~ 60 ミクロンの生物が多い
- ・ 水1mlあたり100 ~ 10,000 細胞いるが、環境により、種・数とも変異が大きい。
- ・ 水中に浮遊しているほか、タンク底に休眠しているものもある。

- ・ バラスト水中にいつでも大量に取り込まれる
- ・ 環境に大きな被害を与える種類が存在



## (2) 処理における基本的な考え方

*Alexandrium catenella*

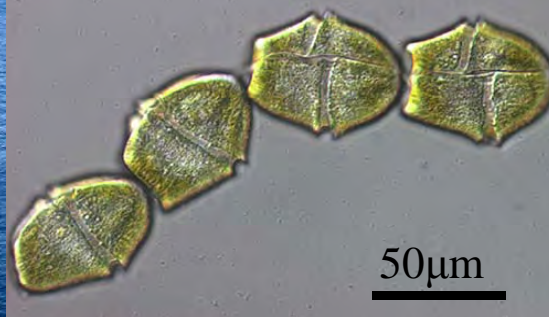
*Alexandrium minutum*

*Gymnodinium catenatum*

といった有毒プランクトン (渦鞭毛藻類) が、バラスト水によって分布を広げたとされている

(Focus on IMO より)

PSP原因渦鞭毛藻 *G. catenatum*

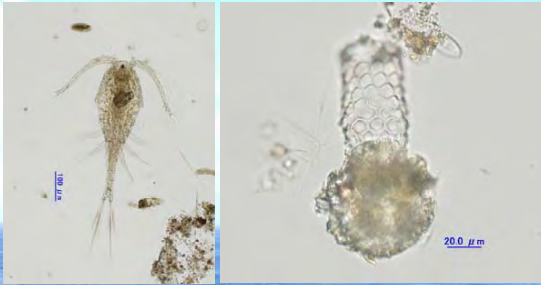




## (2) 処理における基本的な考え方

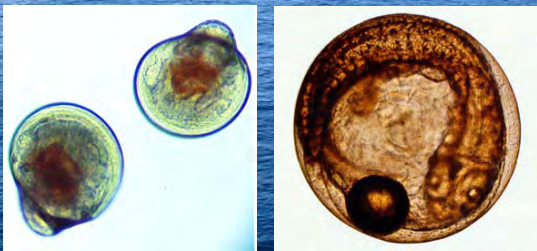
### 動物プランクトン

#### コペポーダなど



0.1 から 50 mmと小さく、バラスト水に混入して運ばれやすい。  
一年中いつでもいる。

#### 大型生物の卵・稚仔

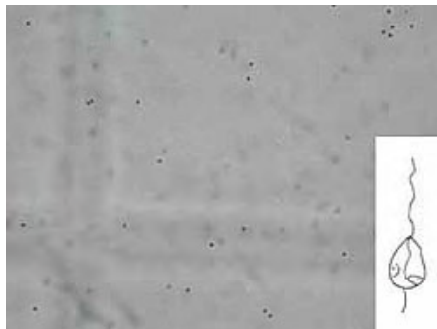


0.1 から 50 mmと小さく、バラスト水に混入して運ばれやすいが、いつでも発生しているわけではなく、時期が限られている。

## (2) 処理における基本的な考え方

### 海藻

#### 胞子



<http://www.suisansc.or.jp/jpg/s-photo/wakame/wakame07.jpg>

0.01mm程度の大きさ

#### 成体



[http://www.gityo.go.jp/ikimono/files/ph\\_032.jpg](http://www.gityo.go.jp/ikimono/files/ph_032.jpg)

- ・ワカメやアカモクなどの広域化が知られている
- ・バラストタンク内には遊走子の状態で混入すると考えられている



## (2) 処理における基本的な考え方

### バラストタンク内に取り込まれる生物

いくつかのグループに分けられる

1. バクテリア, ウィルス
2. 微細藻類 (植物プランクトン, シスト)
3. 動物プランクトン
4. 海藻

さまざまな大きさの生物が対象となる

## (2) 処理における基本的な考え方

### バラストタンク内に取り込まれる生物

いくつかのグループに分けられる

バラスト水にはあらゆる水生生物が混入する可能性がある。

ただし、シーチェスト (海水吸入口) に 1 cm 角程度のスクリーンがあるため、小型の生物や大型生物でも卵稚仔の状態の時に取り込まれやすい。

4. 海藻

さまざまな大きさの生物が対象となる



## G8 efficacy 試験の具体的方法

- (1) バラスト水の特徴
- (2) 対象となる生物
- (3) 処理後の検証について
  - ・ 検証に係わるガイドライン
  - ・ 生物の“最小サイズ”と  
“viability”の判断基準
- (4) 陸上試験と船上試験の難しさ
- (5) その他

## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### バラスト水管理条約

船舶のバラスト水及び沈殿物の規制及び管理のための国際条約

International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast water and Sediment, 2004

条約採択会議 2004年2月9－13日

条約の構成：

本文の部分として22条，附属書の部分でAからEの5項で構成



## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### バラスト水管理条約

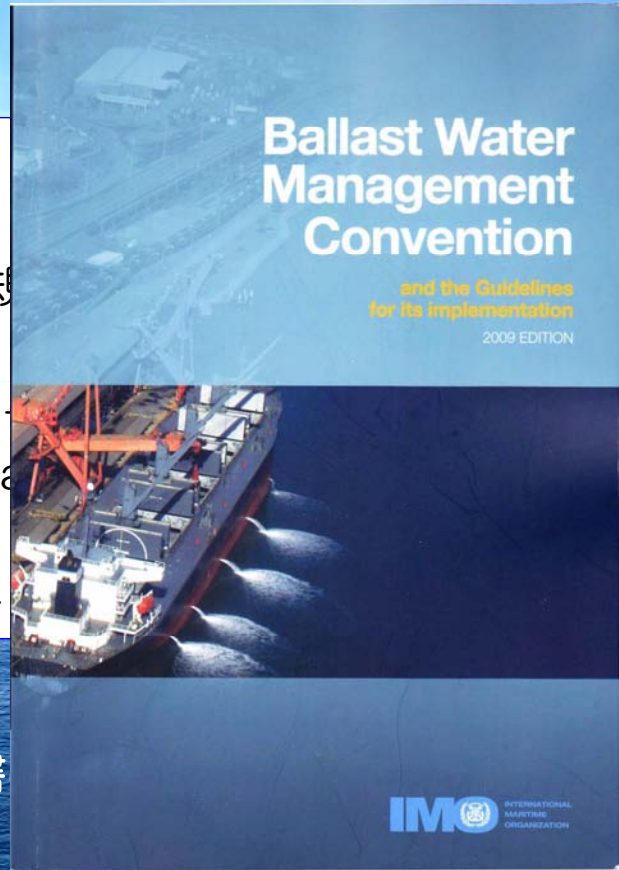
船舶のバラスト水及び沈殿物の規  
約

International Convention  
Management of Ship's Ballast  
2004

条約採択会議 2004年2月9-

条約の構成：

本文の部分として22条，附属書



## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

生物の測定に関する重要な付属文書：  
バラスト水排出基準（規則D-2）のポイント

#### バラスト水排出基準：

バラスト水管理システムで処理された排出バラスト水  
中の水生生物濃度を規定

#### 規定生物：

- ① 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の水生生物（Lグループ）
- ② 最小サイズ10  $\mu\text{m}$ 以上，50  $\mu\text{m}$ 未満の水生生物（Sグループ）
- ③ 指標細菌

生きた水生生物：viable (aquatic) organisms



### (3) 処理後の検証について：ガイドライン

#### 検証に係わるガイドライン

生物の測定に関する重要な付属文書：  
バラスト水排出基準（規則D-2）のポイント

#### バラスト水排出基準：

バラスト水管理システムで処理された排出バラスト水中の水生生物濃度を規定

#### 規定生物：

- ① 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の水生生物（Lグループ）
- ② 最小サイズ10  $\mu\text{m}$ 以上，50  $\mu\text{m}$ 未満の水生生物（Sグループ）
- ③ 指標細菌

生きた水生生物：viable (aquatic) organisms

### (3) 処理後の検証について：ガイドライン

#### 検証に係わるガイドライン

#### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水に含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物（Lグループ）の量がバラスト水1  $\text{m}^3$ あたり10 個体未満、および最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい、増殖可能な生物（Sグループ）の量がバラスト水1 mlあたり10 個体未満
2. 人間の健康にかかわる細菌の指標として  
コレラ菌（セロタイプO1あるいはO139株）がバラスト水100 mlあたり1 cfu以下または動物プランクトン湿重量1 gあたり1 cfu以下  
大腸菌がバラスト水100 ml あたり250 cfu以下  
腸球菌がバラスト水100 ml あたり100 cfu以下



## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水に含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズが 50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物 (Lグループ) の量がバラスト水1  $\text{m}^3$ あたり10 個体未満、および最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい、増殖可能な生物 (Sグループ) の量がバラスト水1 mlあたり10 個体未満
2. 人間の健康にかかわる細菌の指標として  
コレラ菌 (セロタイプO1あるいはO139株) がバラスト水100 mlあたり1 cfu以下または動物プランクトン湿重量1 gあたり1 cfu以下  
大腸菌がバラスト水100 ml あたり250 cfu以下  
腸球菌がバラスト水100 ml あたり100 cfu以下

## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水に含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物 (Lグループ) の量がバラスト水1  $\text{m}^3$ あたり10 個体未満、および最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい、増殖可能な生物 (Sグループ) の量がバラスト水1 mlあたり10 個体未満

### (3) 処理後の検証について：ガイドライン

#### 検証に係わるガイドライン

##### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水に含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物 (Lグループ) の量がバラスト水1  $\text{m}^3$ あたり10 個体未満、および最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい、増殖可能な生物 (Sグループ) の量がバラスト水1 mlあたり10 個体未満

1 ml中に数個の生物は比較的短時間に正確に測定できるが、1  $\text{m}^3$ 中の生物量の測定は容易ではない。特に、その中の生物量がごくごく少ないので、正確な測定にはバラスト水を何らかの方法で大量に濃縮する必要がある。ろ過をして生物を除去する方法で処理したバラスト水は混入物をほとんど含まないことが考えられるので、濃縮は比較的容易。しかしそれ以外の方法で処理したバラスト水ではきわめて困難になる。

### (3) 処理後の検証について：ガイドライン

#### 検証に係わるガイドライン

##### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水に含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズが50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物 (Lグループ) の量がバラスト水1  $\text{m}^3$ あたり10 個体未満、および最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい、増殖可能な生物 (Sグループ) の量がバラスト水1 mlあたり10 個体未満

1 ml中  
生物量の  
で、正確  
る。ろ過  
んど含ま  
の方法で

**なんらかの濃縮  
装置が必要**

1  $\text{m}^3$ 中の  
く少ないの  
る必要があ  
入物をほと  
しそれ以外



## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水には含まれていてもよい生物量

1. 最小サイズ50  $\mu\text{m}$ 以上の増殖可能な生物 (Lグループ) : 10 個体未満/1  $\text{m}^3$   
最小サイズが10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい増殖可能な生物 (Sグループ) : 10個体未満/1ml

## (3) 処理後の検証について：ガイドライン

### 検証に係わるガイドライン

#### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水には含まれていてもよい生物量

1. **最小サイズ**50  $\mu\text{m}$ 以上の**増殖可能な生物** (Lグループ) : 10 個体未満/1  $\text{m}^3$   
**最小サイズ**が10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい**増殖可能な生物** (Sグループ) : 10個体未満/1ml

『**最小サイズ**』とは？

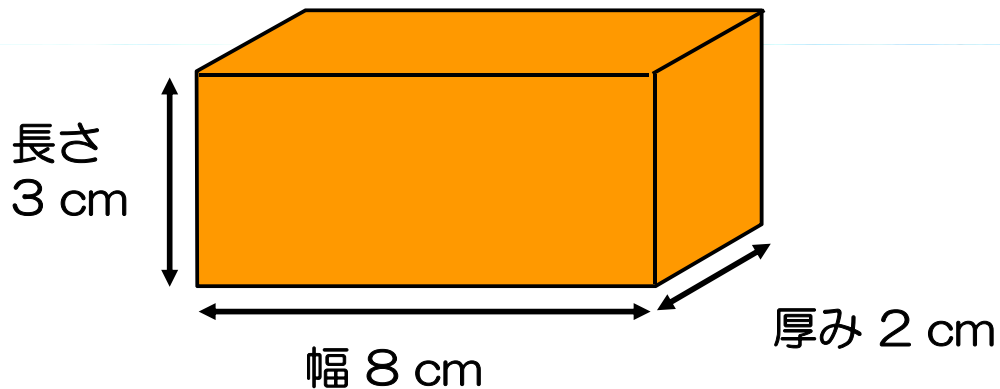
『**増殖可能**』とは？

### (3) 処理後の検証について：最小サイズ

#### 検証に係わるガイドライン

##### 最小サイズとは

→ 生物の長さ・幅・厚みの測定項目のうち最小項目の最大値

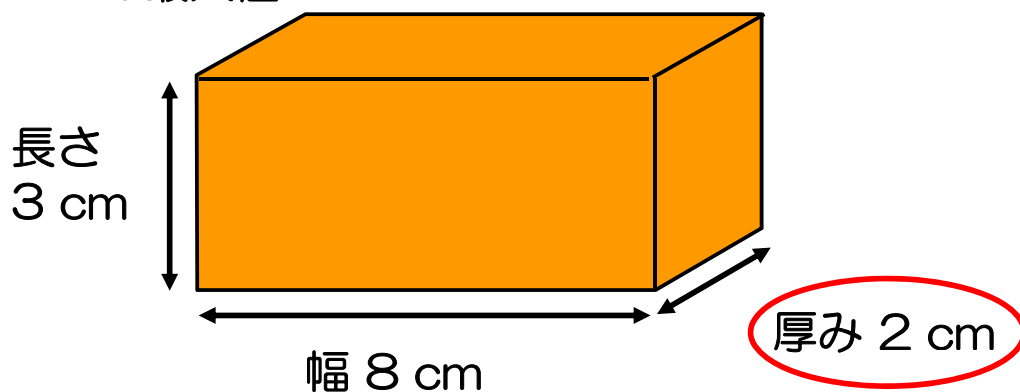


### (3) 処理後の検証について：最小サイズ

#### 検証に係わるガイドライン

##### 最小サイズとは

→ 生物の長さ・幅・厚みの測定項目のうち最小項目の最大値



上記のような形の生物であれば、最小サイズは厚み 2 cm となる。

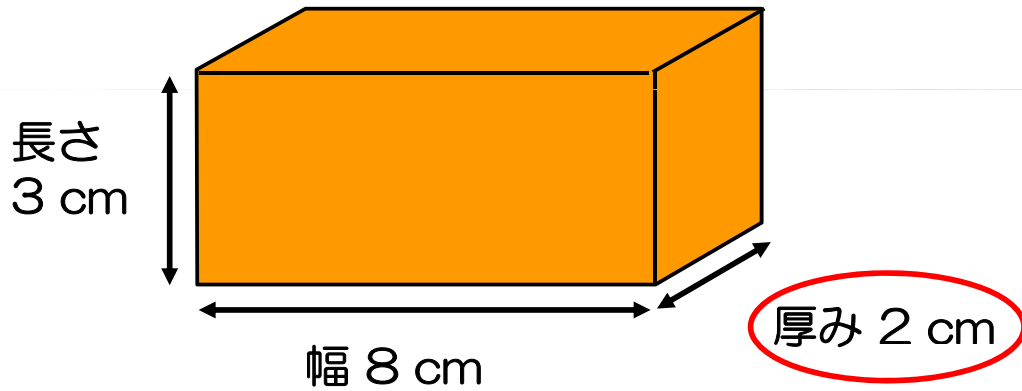


### (3) 処理後の検証について：最小サイズ

#### 検証に係わるガイドライン

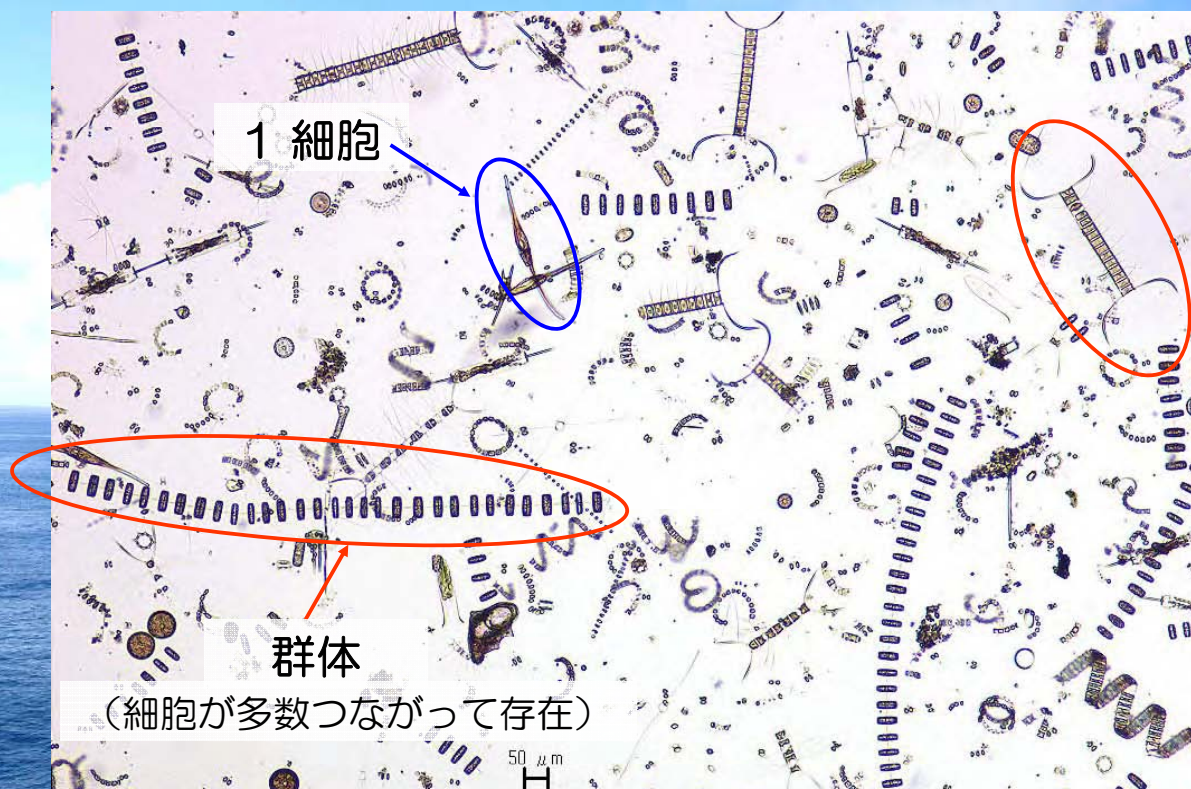
#### 最小サイズとは

→ 生物の長さ・幅・厚みの測定項目のうち最小項目の最大値



従来の生物学は最大サイズを生物の大きさとしていたが、それとは異なる。→ 従来のデータは使用できない。計数時に個体ごとに計測する必要がある。

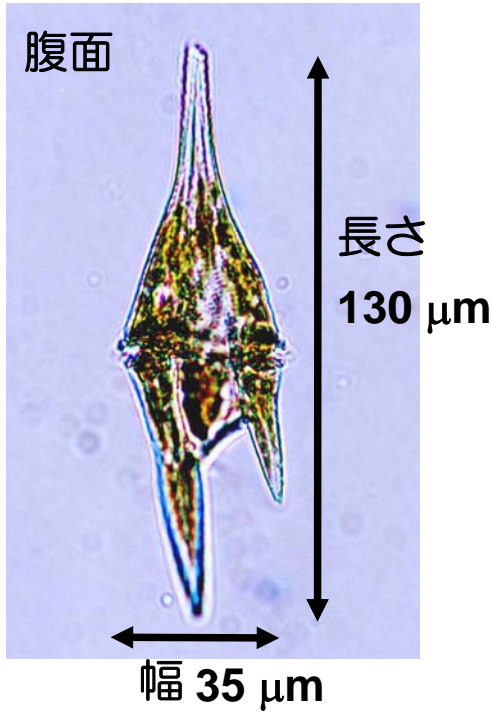
### (3) 処理後の検証について：最小サイズ



様々な形態のプランクトンが海水中には存在する

# 最小サイズの決定例- 1

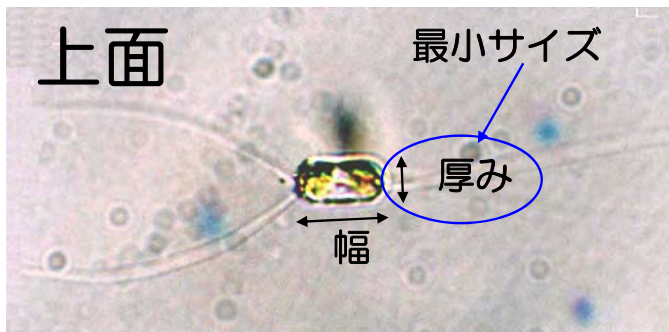
渦鞭毛藻類 *Ceratium furca*



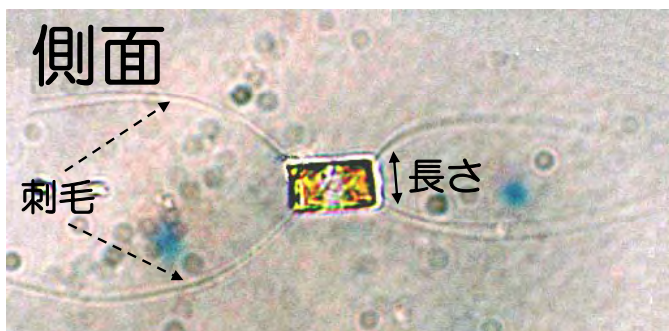
最小サイズは厚み 25 μm → S グループ

# 最小サイズの決定例- 2：刺毛を持つ細胞

珪藻類 *Chaetoceros* sp.



刺毛を省いて測定する

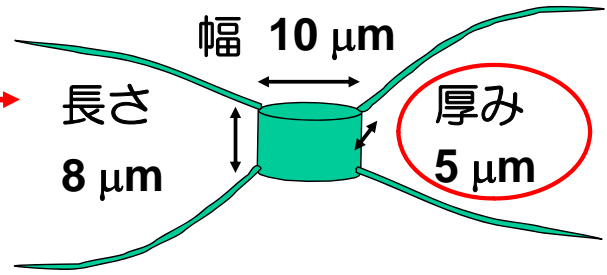
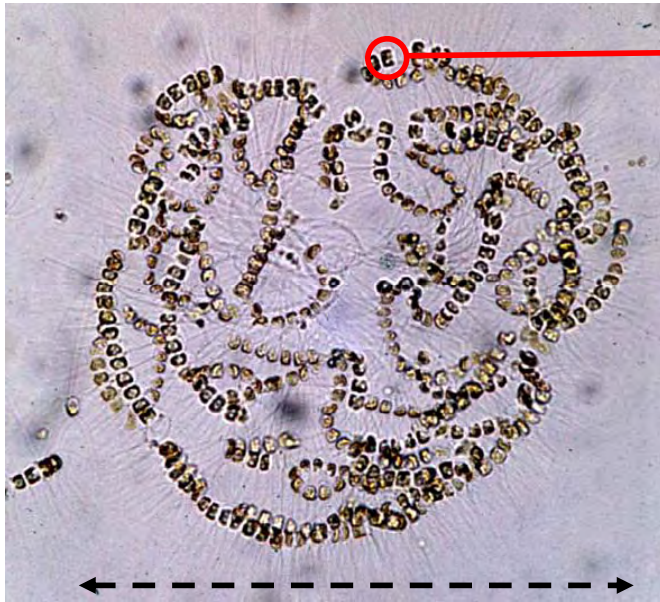


最小サイズは厚み 10 μm → S グループ



### 最小サイズの決定例- 3：群体を形成する種①

群体は、その中の1細胞ごとが計数対象



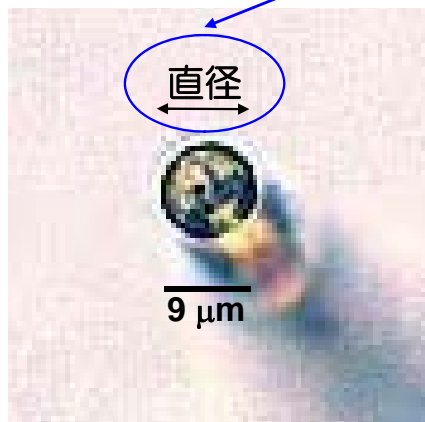
1細胞の最小サイズは5 μm

珪藻類 *Chaetoceros socialis*

250 μm

最小サイズは厚み 5 μm → 計数対象外

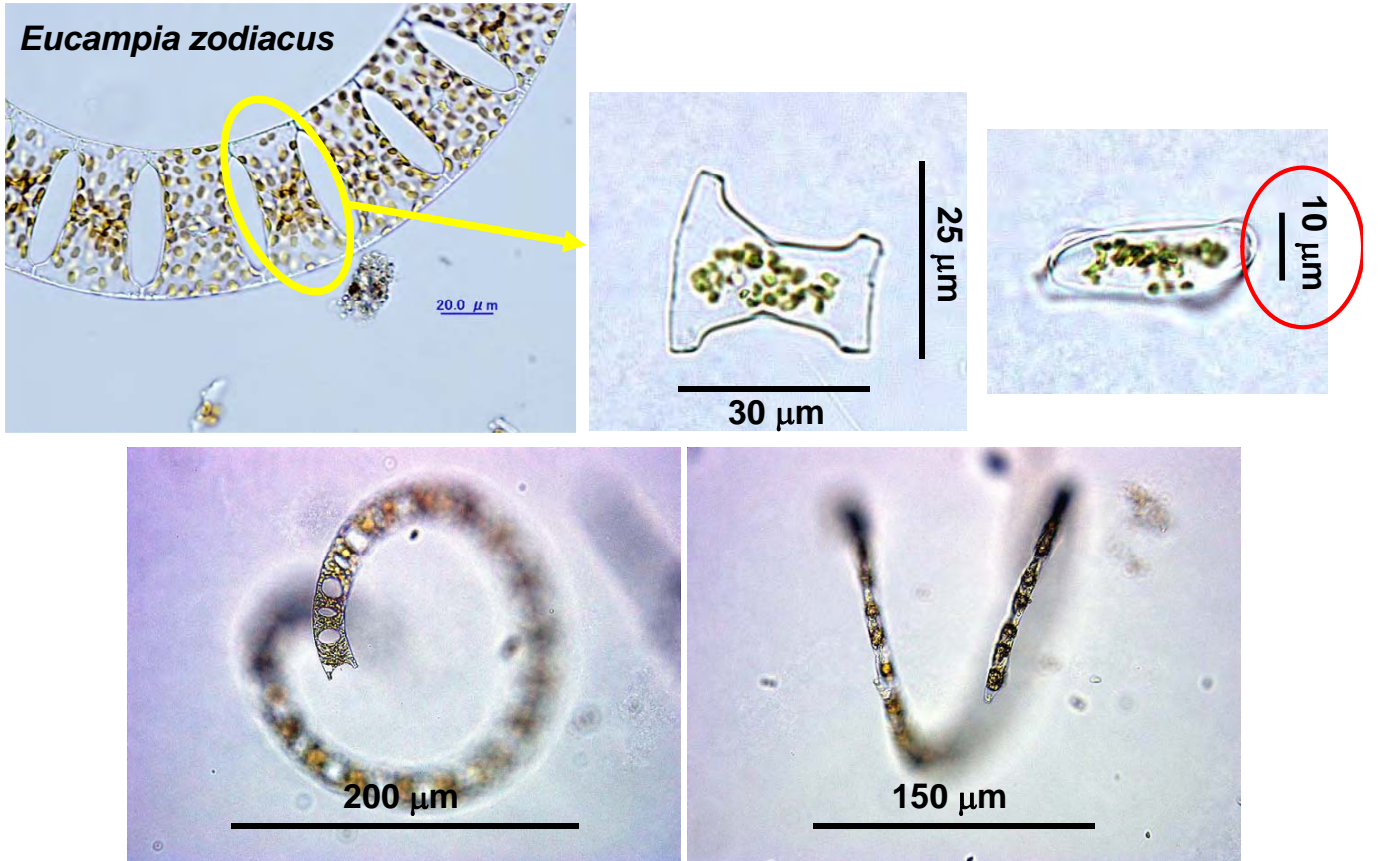
### 最小サイズの決定例- 3：群体を形成する種②



珪藻類 *Skeletonema* sp.

最小サイズは厚み 9 μm → 計数対象外

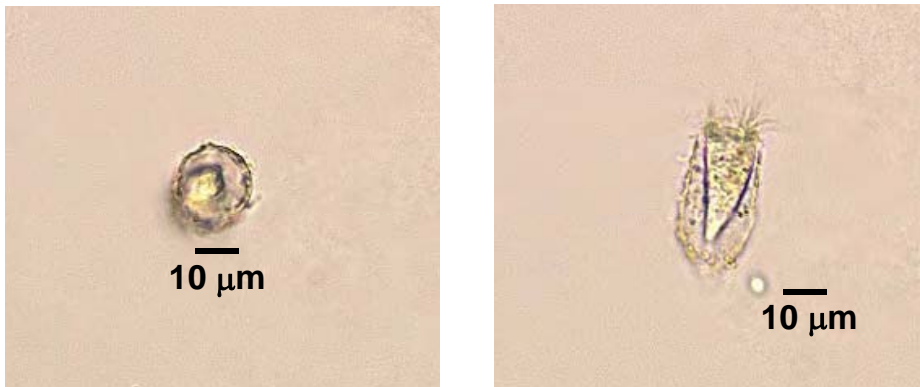
### 最小サイズの決定例- 3 : 群体を形成する種③



最小サイズは厚み **10 μm** → **Sグループ**

### 最小サイズの決定例- 4 : 動物プランクトン

*Tintinopsis* sp.

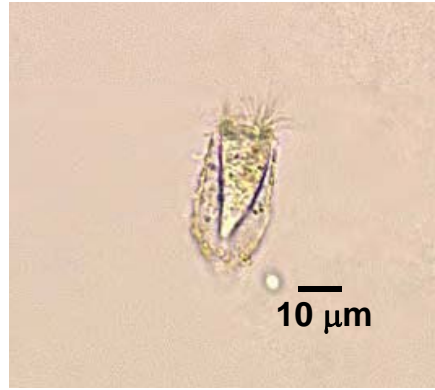


最小サイズは **10 μm** → **Sグループ**



## 最小サイズの決定例- 4 : 動物プランクトン

*Tintinopsis* sp.

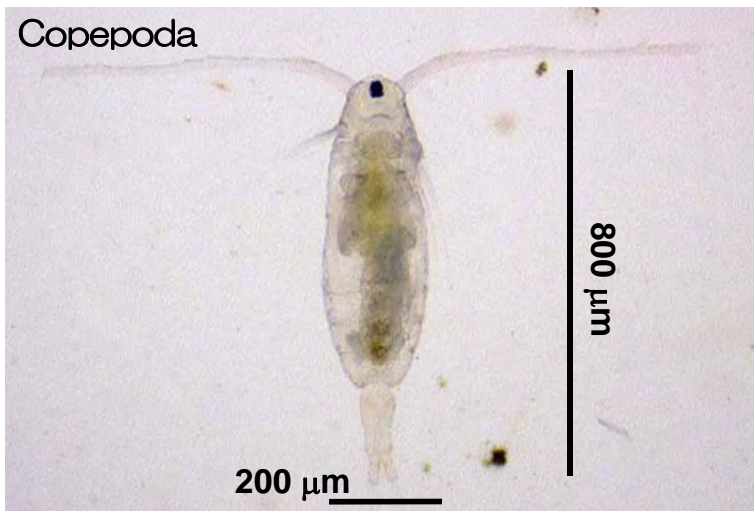


最小サイズは **10 μm** → **Sグループ**

植物プランクトンだからSグループ、  
動物プランクトンだからLグループ、  
といったサイズ分けは出来ない

## 最小サイズの決定例- 5 : 動物プランクトン

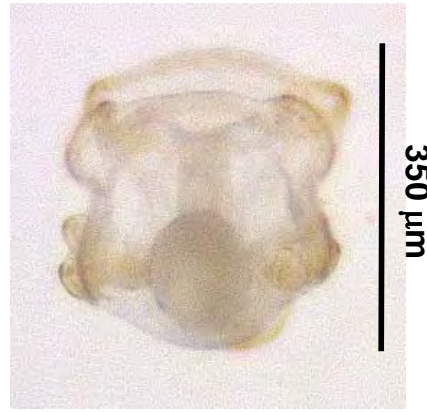
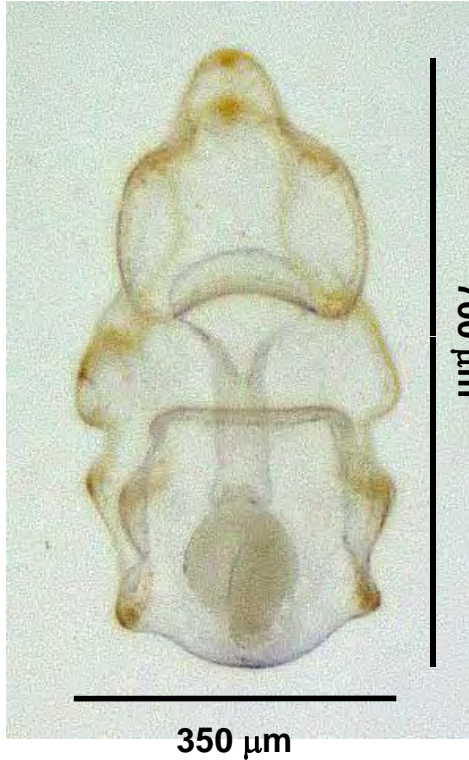
Copepoda



最小サイズは **150 μm** → **Lグループ**

# 最小サイズの決定例- 6 : 動物プランクトン

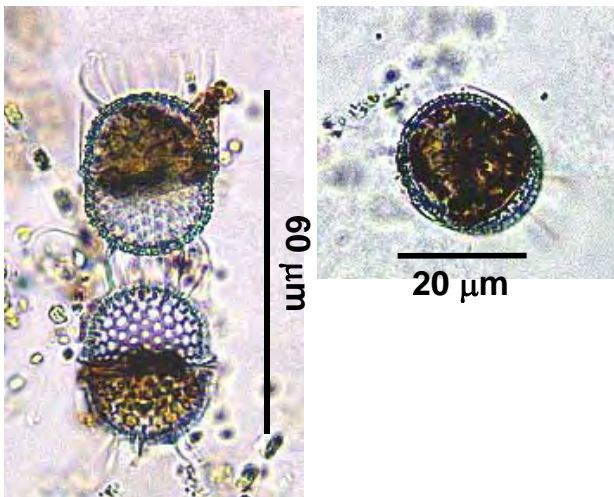
ヒトデのビピンナリア幼生



最小サイズは **350 μm** → **Lグループ**

# 最小サイズの決定例- 7

*Stephanopyxis turris*



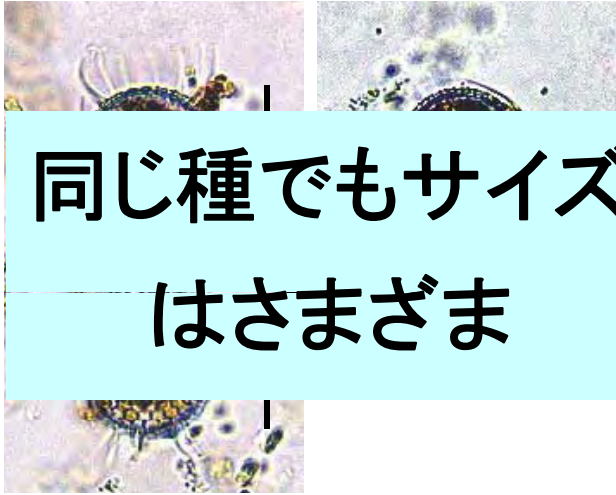
最小サイズは **20 μm**  
→ **Sグループ**





# 最小サイズの決定例- 7

*Stephanopyxis turris*



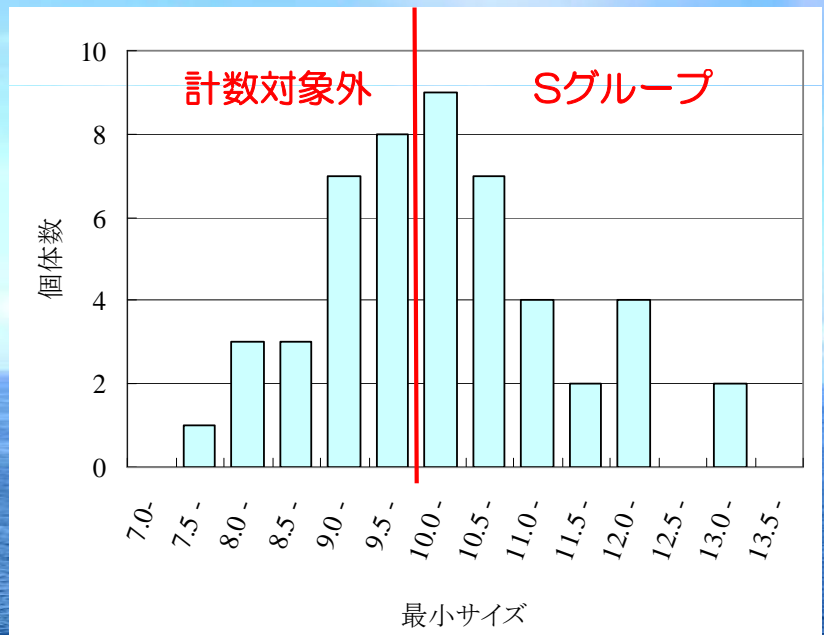
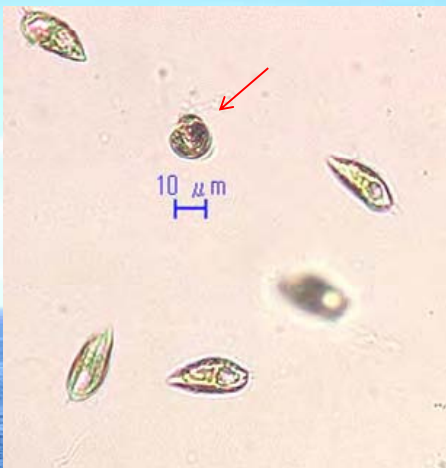
同じ種でもサイズ  
はさまざま

最小サイズは **20 μm**  
→ **Sグループ**



## 同種内の最小サイズの変動例

渦鞭毛藻類 *Prorocentrum triestinum*



無作為に選んだ培養した (約1ヶ月間) 細胞の50個体の最小サイズ分布

## 同種内の最小サイズの変動例

渦鞭毛藻類 *Prorocentrum triestinum*

10

同種だから同じグループとはかぎらない、  
 個体ごとに計測する必要がある。

ただし、実験用に特に別途培養して添加  
 した生物の場合には特別な扱いをする。

最小サイズ

無作為に選んだ培養した（約1ヶ月  
 間）細胞の50個体の最小サイズ分布

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 検証に係わるガイドライン

##### D-2 排出バラスト水中の生物量基準

排水するバラスト水には含まれていてもよい生物量

1. **最小サイズ**50  $\mu\text{m}$ 以上の**増殖可能な生物**（Lグループ）：10  
 個体未満/1  $\text{m}^3$   
**最小サイズ**が10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい**増殖可能な生  
 物**（Sグループ）：10個体未満/1ml

『**最小サイズ**』とは？

『**増殖可能**』とは？



### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 検証に係わるガイドライン

増殖可能な = viable :

「死んでいる生物を百万個体運んでも無害であるが、生きて増殖可能な生物を1個体運ぶことは有害である」という考え方で、問題にしている対象を「生きて増えることができる」ものに限定するために入れられた語。

問題は、生物の「生死」あるいは増殖能力の「有無」の判定が容易ではないことにある。例えば、魚の卵の生死は外観に異常がない限り生きていると考えるのが妥当かもしれないが、バラスト処理では殺すための処理をした後であるので、「生きていないと判断」あるいは「増殖しないと判断」したことに証拠が必要。また、判定方法に信頼できるものが少ないので、判定根拠も示すことが必要。

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 検証に係わるガイドライン

死んでいる個体は計数対象外になる。この点も、通常のプランクトンの計数とは異なるところ。

つまり、計数に用いるサンプルは、固定することが出来ない。

ただし、生死判定をできる、すなわち固定時にすでに死んでいたか、固定によって死んだかのどちらかを明確に判定できる固定法は、当然用いることができる。

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 増殖可能な生物 (viable organisms)

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及び繁殖が可能と確認される生物

#### 生物のviabilityの判断基準

- 1) 形態の変化
- 2) 運動性
- 3) 染色法による細胞内活性状態の変化
- 4) 再成長試験

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 増殖可能な生物 (viable organisms)

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及び繁殖が可能と確認される生物

#### 生物のviabilityの判断基準

- 1) 形態の変化
- 2) 運動性
- 3) 染色法による細胞
- 4) 再成長試験

生物の殺滅方法によっても  
利用可能な判断基準は異  
なってくる場合がある。



# (3) 処理後の検証について：増殖可能

## 生物のviabilityの判断基準

### 1) 形態の変化

<p><b>Phytoplankton</b></p>  <p><b>Normal</b></p>	<p><b>flagella lost</b></p> 	<p><b>Cell walls were destroyed</b></p> 
	<p><b>Chloroplast were bleached</b></p> 	<p><b>Protoplasm lost almost</b></p> 
<p><b>Zooplankton</b></p>  <p><b>Normal</b></p>	<p><b>Antenna and abdomen were cut</b></p> 	<p><b>Damaged cells</b></p>  <p><b>Damaged individuals</b></p> <p><b>Body was destroyed completely</b></p> 
<p>計数対象</p>	<p>計数対象外</p>	

# (3) 処理後の検証について：増殖可能

## 生物のviabilityの判断基準

### 1) 形態の変化

例 1 形態の変化 - 破損



正常な個体  
計数する



破損した個体  
計数しない



### (3) 処理後の検証について：増殖可能

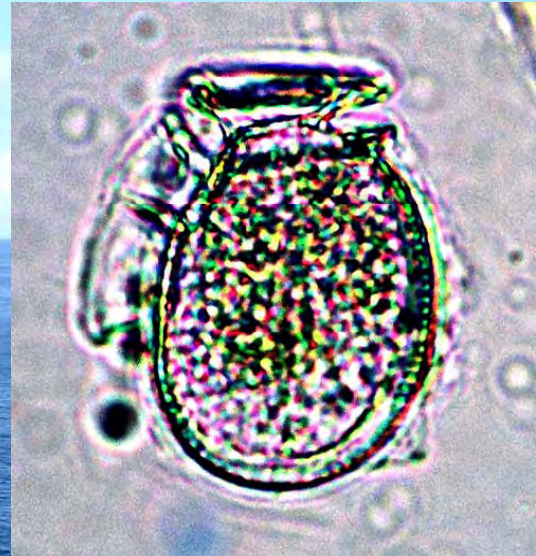
#### 生物のviabilityの判断基準

##### 1) 形態の変化

例 2 形態の変化 - 鞭毛の消失



正常な細胞  
計数する



鞭毛が消失した細胞  
計数しない

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 生物のviabilityの判断基準

##### 1) 形態の変化

例 3 形態の変化 - 色素の欠落



正常な細胞  
計数する



色素が欠落した細胞  
計数しない

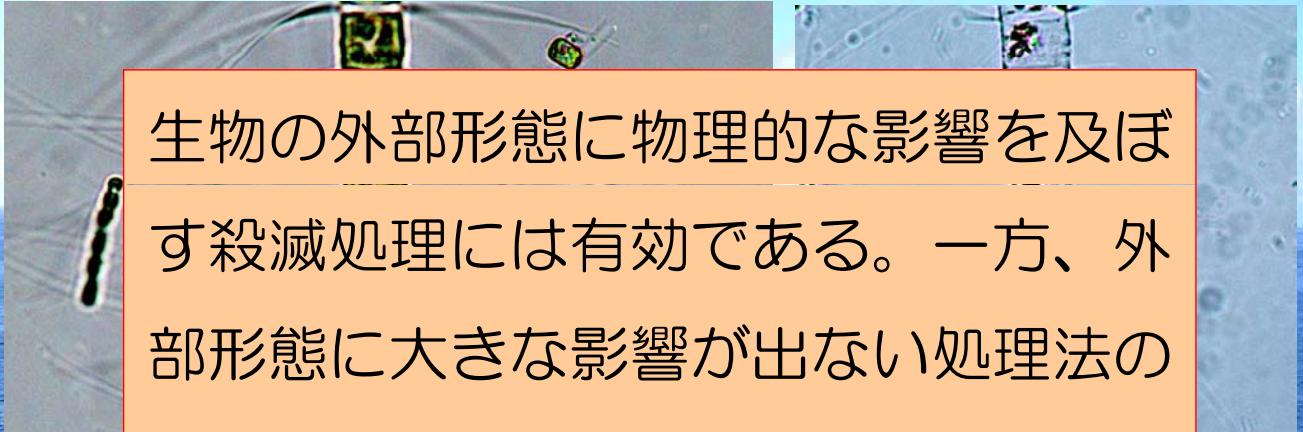


### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 生物のviabilityの判断基準

##### 1) 形態の変化

例 3 形態の変化 - 色素の欠落



生物の外部形態に物理的な影響を及ぼす殺滅処理には有効である。一方、外部形態に大きな影響が出ない処理法の場合は、判断が困難な場合がある。

正常な細胞  
計数する

色素が大浴びした細胞  
計数しない

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 生物のviabilityの判断基準

- 2) 運動性 動いている細胞 → 計数する  
動いていない細胞 → 計数しない

渦鞭毛藻類 *Alexandrium tamarense*





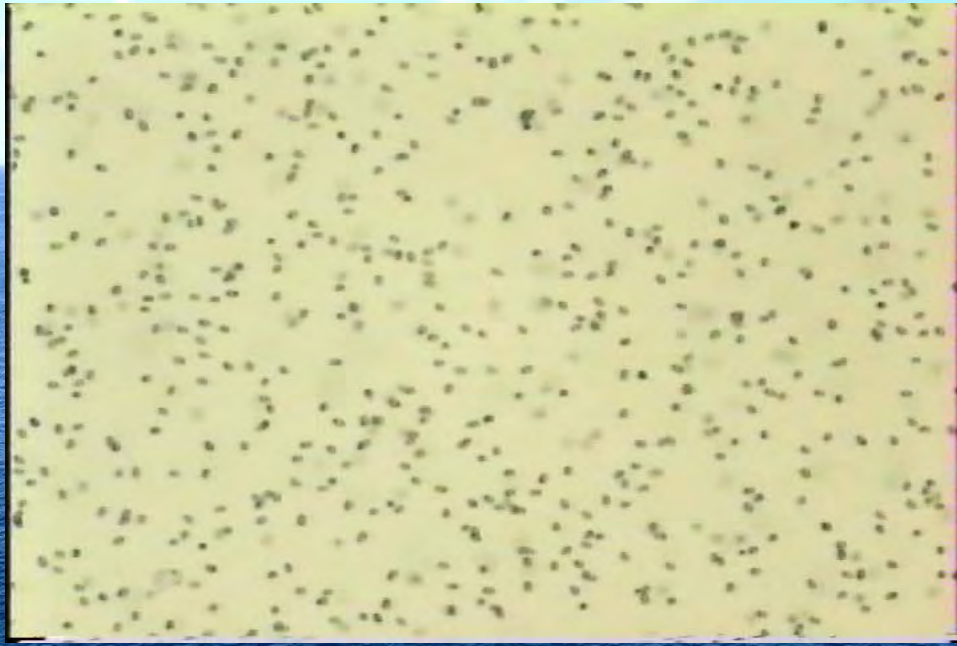
### (3) 処理後の検証について：増殖可能



#### 生物のviabilityの判断基準

- 2) 運動性 動いている細胞 —————> 計数する  
 動いていない細胞 —————> 計数しない

ユーグレナ藻類 *Eutreptiella* sp.



### (3) 処理後の検証について：増殖可能



#### 生物のviabilityの判断基準

- 2) 運動性 動いている細胞 —————> 計数する  
 動いていない細胞 —————> 計数しない

珪藻類 *Skeletonema* sp.





### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 生物のviabilityの判断基準

- 2) 運動性 動いている細胞 → 計数する  
動いていない細胞 → 計数しない

珪藻類のように運動性がほとんどない生物や、各種処理によって一時的に運動が停止している場合は、判断が困難になる場合がある。

### (3) 処理後の検証について：増殖可能

#### 生物のviabilityの判断基準

#### 3) 染色法による細胞内活性状態の変化

例 Fluorescein diacetate (FDA) による染色

FDA を用いて生物を染色

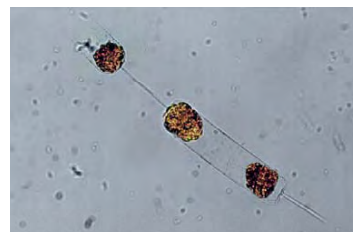


蛍光顕微鏡を用いて観察

青色の光で励起すると、  
黄色い蛍光を発する



蛍光の強さにより、  
活性の状態を調べる



通常観察



青色励起光下で観察

## (3) 処理後の検証について：増殖可能

### 生物のviabilityの判断基準

#### 3) 染色法による細胞内活性状態の変化

例 Fluorescein diacetate (FDA) による染色

FDA を用いて生物を染色

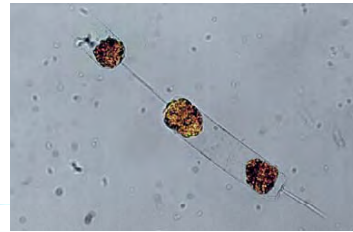


蛍光顕微鏡を用いて観察

青色の光で励起すると、  
黄色い蛍光を発する



蛍光の強さにより、  
活性の状態を調べる



通常観察



青色励起光下で観察

どのように判別できるのか？

## (3) 処理後の検証について：増殖可能

### 生物のviabilityの判断基準

#### 3) 染色法による細胞内活性状態の変化

例 Fluorescein diacetate (FDA) による染色

現在、いくつかの生体染色試薬が知られている

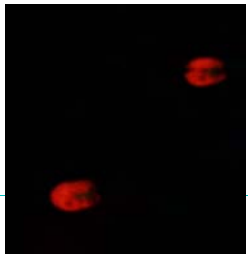

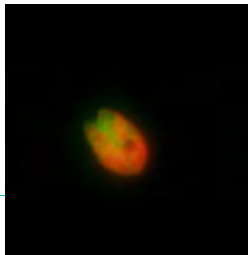
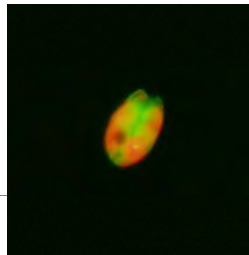
(例：Calcein-AM、FDA、CFDA、ニュートラルレッド等)

各種殺滅処理によって処理後の処理水の状況は異なる。また各種試薬によって濃度・染色時間・染色温度などが異なるので、viability判断のための手法・条件について十分に検討する必要がある。

どのように判別できるのか？中間の個体は復活するのか？



## 染色方法の検討例 1 - 1 : Calcein-AMの染色時間の検討

20°C (室温) 細胞固定無し	5 分	15 分	30 分	60 分
Calcein-AM最終濃度 20μmol (蛍光顕微鏡観察)				
	全ての細胞が染まること無しに、活発に運動していた。	多くの細胞が染まること無しに活発に運動していた。わずかに染色された細胞も存在した。	多くの細胞が薄く染色された。	多くの細胞が染色された。染色されても活発に運動していた。

注) 緑~黄緑色の蛍光がCalcein-AMによるもので、赤色の蛍光はクロロフィルの自家蛍光で

Calcein-AMの最終濃度を2、20、50μmol として確認したところ、20μmolで良好に染色されたことから、濃度は20μmolとした。染色時間は、少なくとも細胞内の一部が染色される60分が良いと考えられた。また、60分以上の染色時間(90分及び120分)においても、60分後の染色状態と大きく差は無かった。

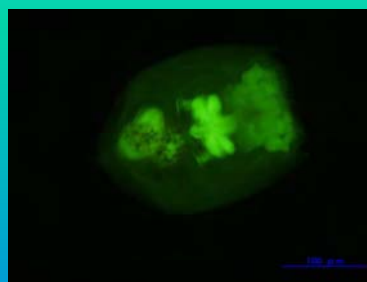
## 染色方法の検討例 1 - 2 : 動物プランクトンへの利用

Calcein-AMによる染色 輪虫類 *Brachionus plicatilis*

明視野観察



蛍光顕微鏡観察



染色条件:

*Tetraselmis* と同様

- Calcein-AM :  
最終濃度 20 μmol
- 染色時間 : 60分

輪虫類  
*Brachionus*  
*plicatilis*

## 染色方法の検討例 1 - 2 : 動物プランクトンへの利用

Calcein-AMによる染色 輪虫類 *Brachionus plicatilis*

### 染色条件:

- Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間: 60分
- MEPC 58/INF.10 (30 July 2008)

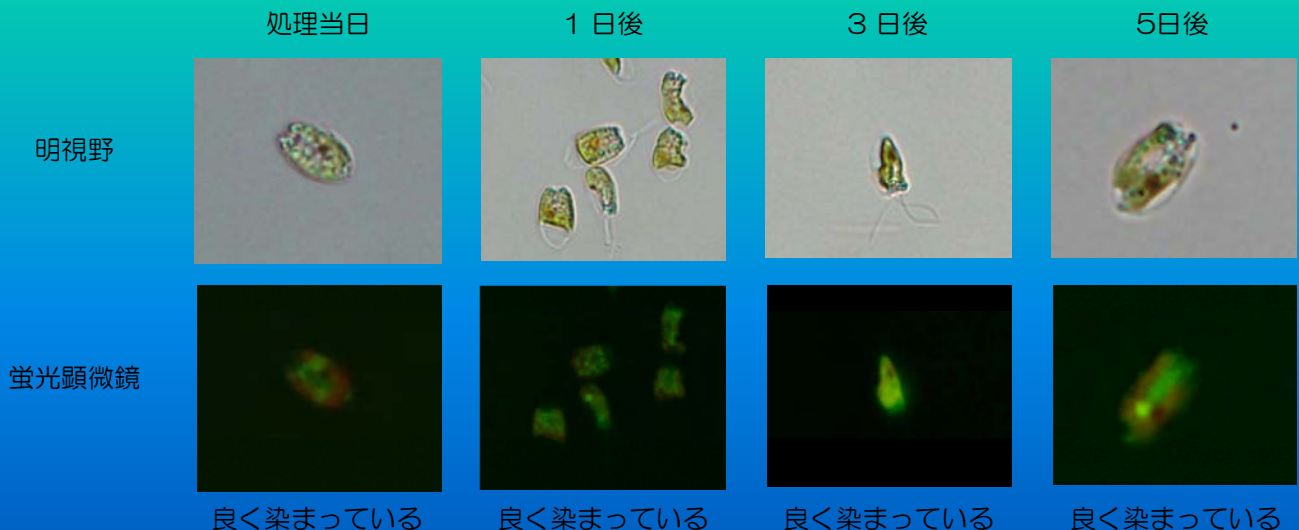
## 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

### 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

Calcein-AMによる染色 (プラシノ藻類 *Tetraselmis*) : 処理無し

染色条件:

- Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間: 60分
- 染色温度: 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)





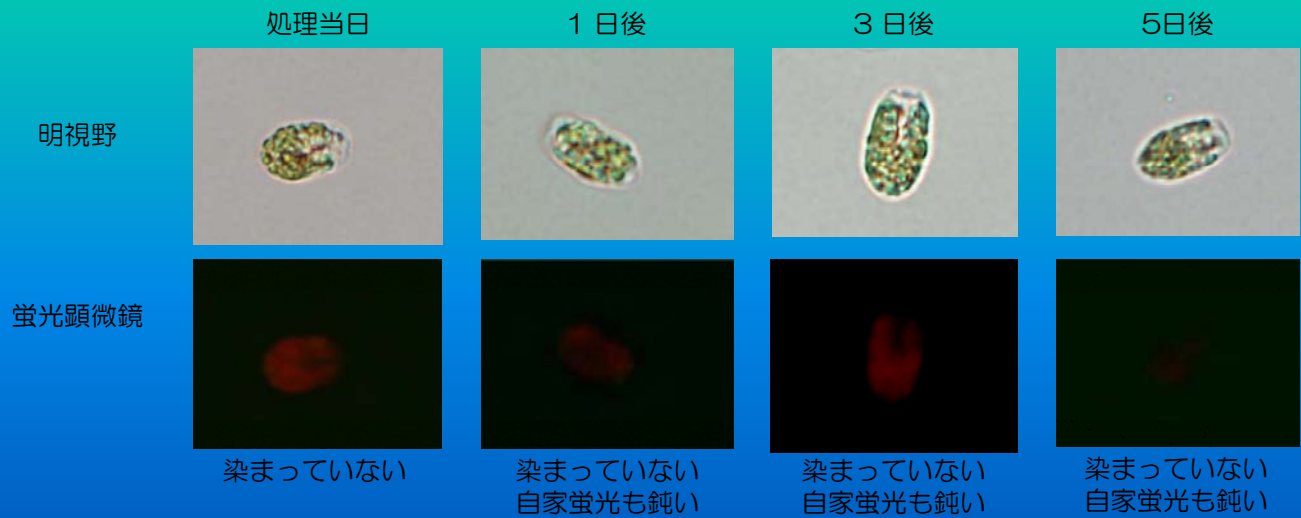
# 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

## 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

### Calcein-AMによる染色 (*Tetraselmis*) : 薬剤処理

染色条件:

- Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間: 60分
- 染色温度: 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)



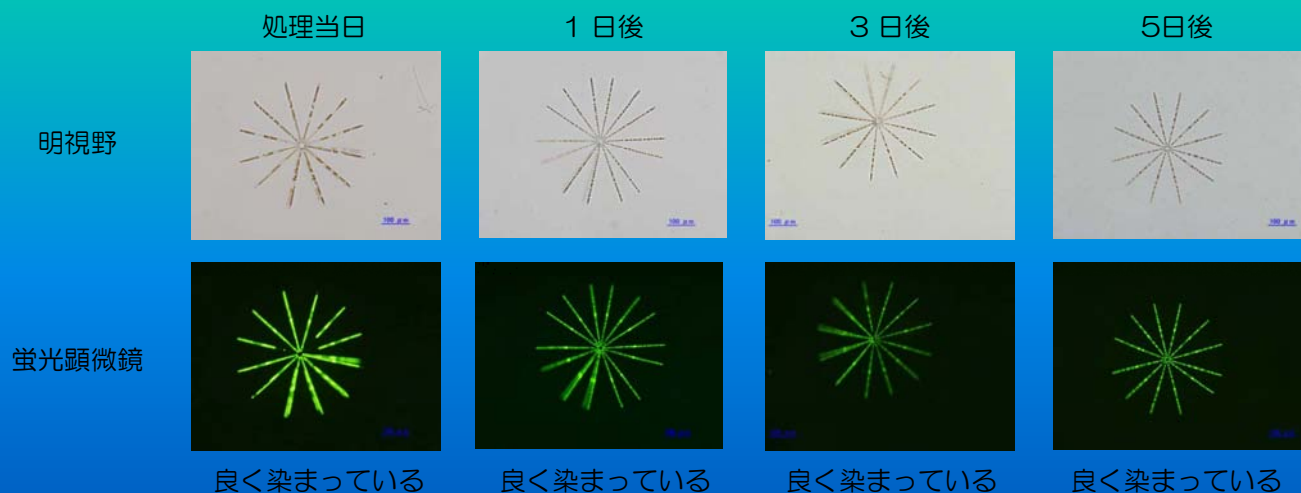
# 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

## 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

### Calcein-AMによる染色 (珪藻類) : 処理無し

染色条件:

- Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間: 60分
- 染色温度: 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)



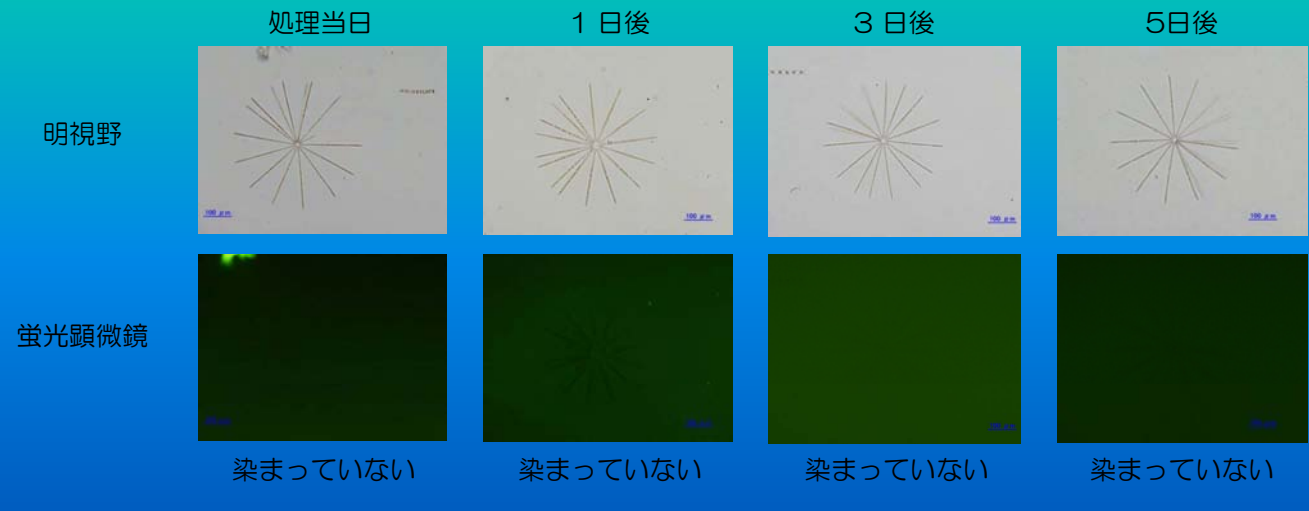
## 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

### 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

#### Calcein-AMによる染色 (珪藻類) : 薬剤処理

染色条件:

- Calcein-AM : 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間 : 60分
- 染色温度 : 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)



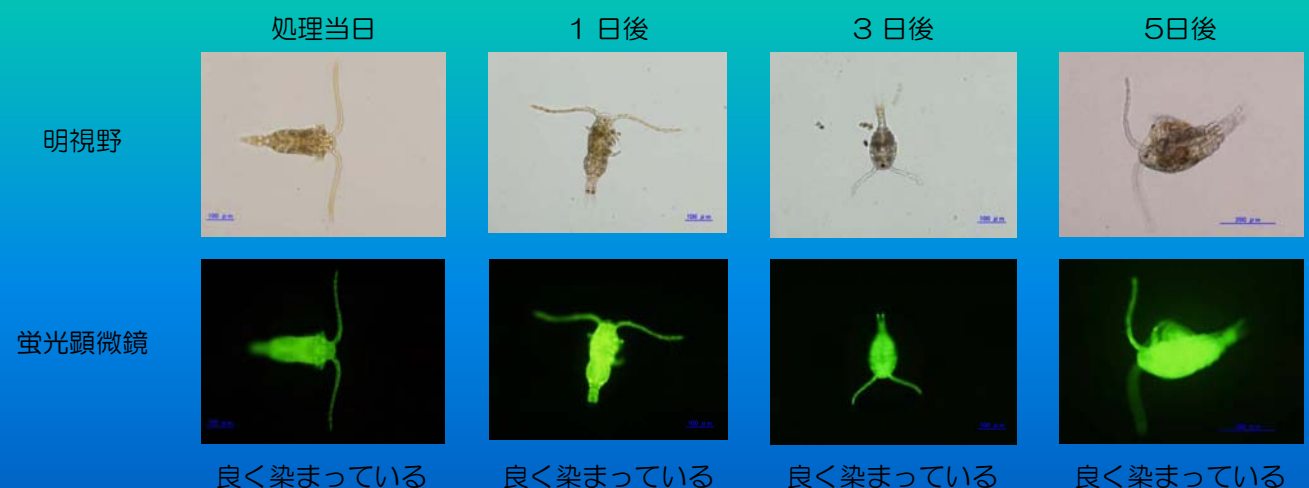
## 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

### 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

#### Calcein-AMによる染色 (カイアシ類) : 処理無し

染色条件:

- Calcein-AM : 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間 : 60分
- 染色温度 : 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)





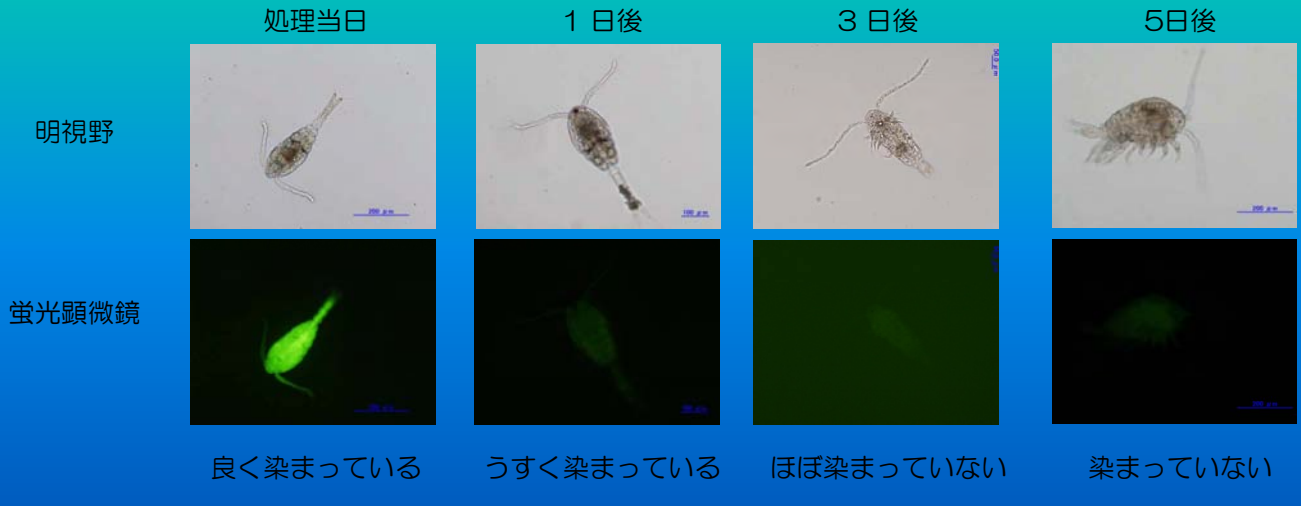
# 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

## 1) 生物死亡後の時間と染色状況との関係

### Calcein-AMによる染色 (カイアシ類) : 薬剤処理

染色条件:

- Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$
- 染色時間: 60分
- 染色温度: 20 (室温)
- 遮光保存 (15°Cで培養/保存)



# 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

## 2) 薬剤処理による陸上試験への利用能

### Calcein-AMによる染色: コントロール (未処理) 5日後 (排水試料)

染色条件: • Calcein-AM: 最終濃度 20  $\mu\text{mol}$  • 染色時間: 60分 • 染色温度: 20 (室温)

#### Lサイズグループ

#### Sサイズグループ

明視野

カイアシ類

ノープリウス幼生

輪虫類

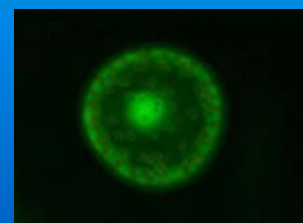
*Brachionus plicatilis*

珪藻類

*Thalassiosira* sp.



蛍光顕微鏡



染まっている

染まっている

染まっている







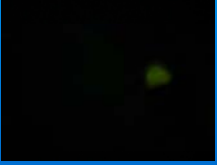
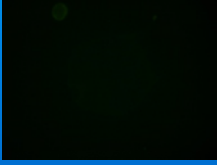
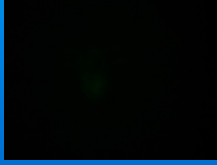



染まっている

# 染色方法の検討例 1 - 3 : 薬剤等の処理による試料の染色状況

## 2) 薬剤処理による陸上試験への利用能

Calcein-AMによる染色: 薬剤処理 5日後(排水試料)

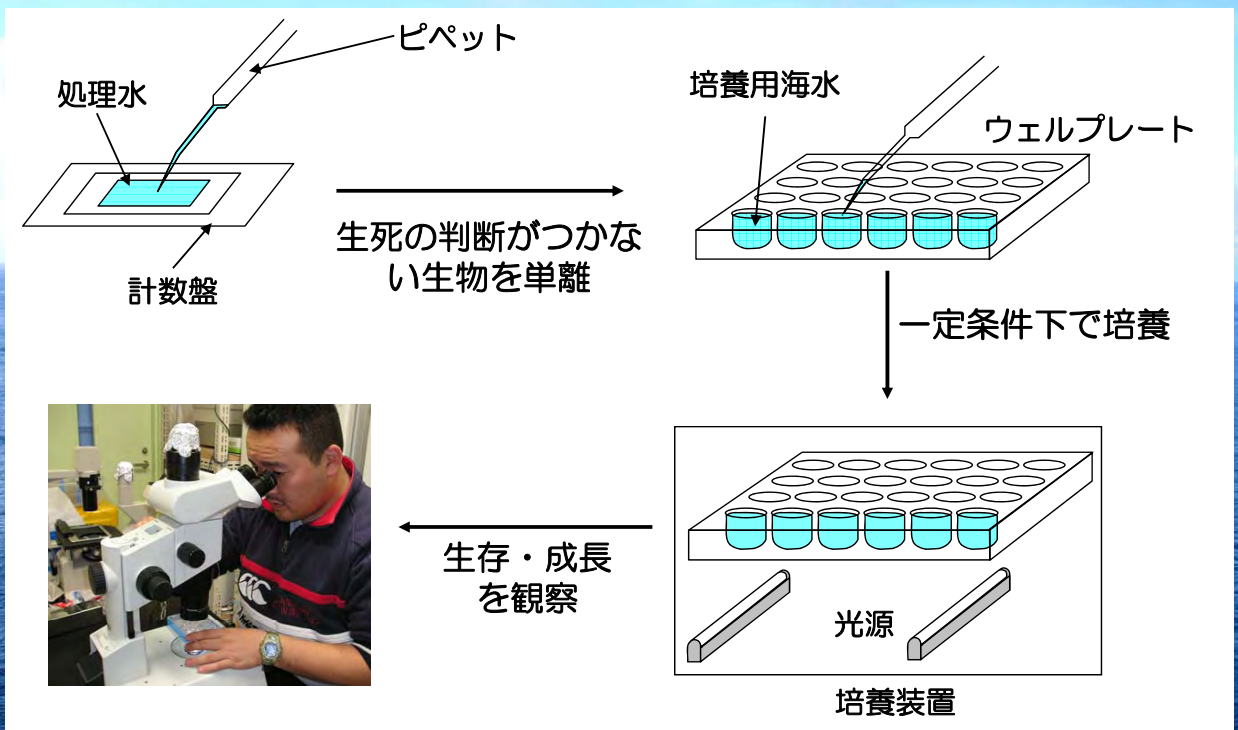
染色条件: ・ Calcein-AM: 最終濃度 20 μmol ・ 染色時間: 60分 ・ 染色温度: 20 (室温)

明視野	Lサイズグループ			Sサイズグループ		
	輪虫類 <i>Brachionus plicatilis</i>	輪虫類 <i>Brachionus plicatilis</i>	ノープリウス幼生	珪藻類 <i>Rhizosolenia</i> sp.	珪藻類 <i>Chaetoceros pseudocurvisetus</i>	ブラシノ藻類 <i>Tetraselmis</i> sp.
						
蛍光顕微鏡						
	染まっていない	染まっていない	染まっていない	染まっていない	染まっていない	染まっていない 自家蛍光は残っている

## (3) 処理後の検証について: 増殖可能

### 生物のviabilityの判断基準

#### 4) 再成長試験

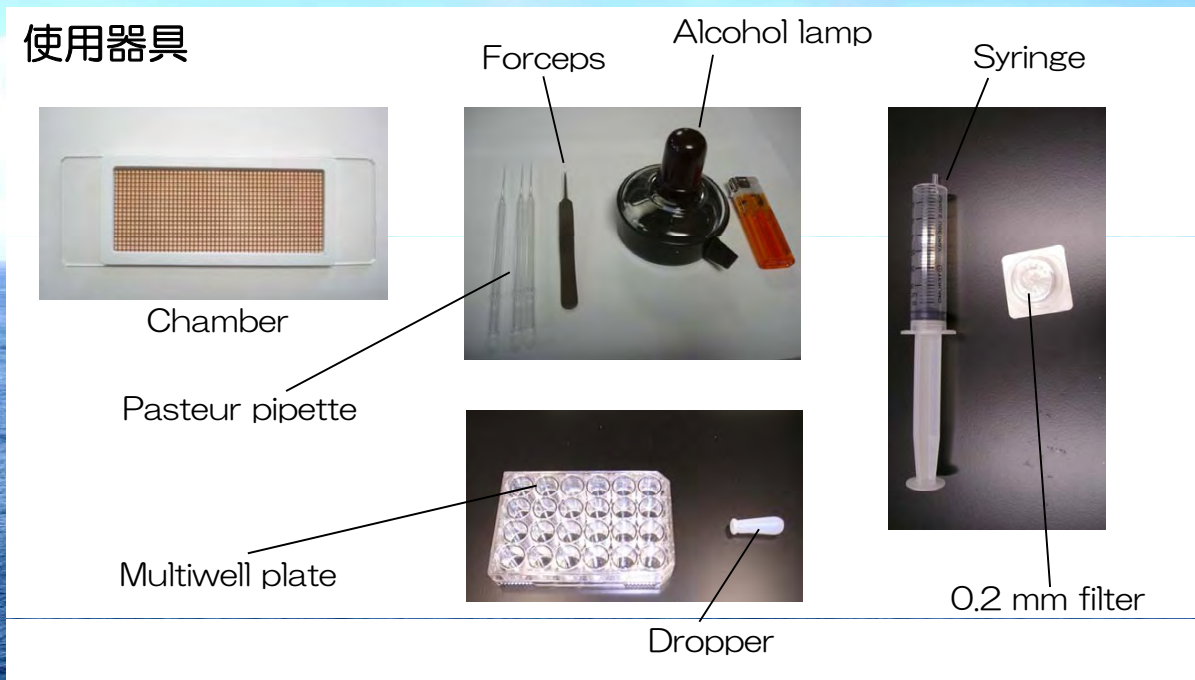




# (3) 処理後の検証について：増殖可能

## 生物のviabilityの判断基準

### 4) 再成長試験



<http://www.hakuyohin.or.jp/> [http://www.hakuyohin.or.jp/Ballast\\_type\\_approval.html](http://www.hakuyohin.or.jp/Ballast_type_approval.html)

財団法人 日本舶用品検定協会  
The Ship Equipment Inspection Society of Japan

HKIについて 業務紹介 申請手続き 申請書 舶用品取扱 アクセス

TOPICS

- \* 2011.3.30 **NEW**

当協会は、公益法人制度改善関連法が施行されたことに対応するため、内閣府から「一般財団法人」への移行許可を申請しておりましたが、平成23年3月29日には内閣府から許可書の交付を受けました。

今後、平成23年4月1日付付にて一般財団法人、日本舶用品検定協会に移行登記を行う予定であり、新法人としてのスタートに向け準備を進めていくこと

更新履歴

- \* 2010.8.1 ホームページリニューアル
- \* 2010.8.1 バラスト水管理関係連絡帳を更新

...その他...

財団法人 日本舶用品検定協会  
The Ship Equipment Inspection Society of Japan

HKIについて 業務紹介 申請手続き 申請書 舶用品取扱 アクセス

◀ バラスト水管理システムの承認関連 ▶

- ◎ 国内におけるバラスト水管理システムの施行前試験(型式承認に準ずる試験)につきましては、国土交通省海事局検査課が実施しております。詳しくは、国土交通省ホームページの「[船舶バラスト水管理システムに係る承認制度の運用開始について](#)」を参照ください。
- ◎ バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法等マニュアル「[バラスト水管理システムの承認の際の生物分析方法\(第2回改訂版\)](#)」を発行しました。(旧版は[こちら](#))

財団法人 日本舶用品検定協会  
〒102-0094 東京都千代田区紀尾井町3-32  
TEL:03-3261-6611

Copyright &copy; 2008 Nihonhakuyohinkenteikyokai Foundation. All Rights Reserved.





## G8 efficacy 試験の具体的方法

- (1) バラスト水の特徴
- (2) 対象となる生物
- (3) 処理後の検証について
  - ・ 検証に係わるガイドライン
  - ・ 生物の“最小サイズ”と  
“viability”の判断基準
- (4) 陸上試験と船上試験の難しさ
- (5) その他

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

試験方法はG8に規定されている

しかし、実際の採水・濃縮・計数において、大きさの計測法や生死判定以外に留意しなければいけないことが多い



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### 陸上試験の難しさ：

#### ●試験水の作成

試験水の条件を満たすためには....

#### ●サンプル容量

Lグループ (最低 $1\text{m}^3$ ) の大量のサンプル容量をどのようにクリアーするか

#### ●サンプル処理の場所

プランクトンの計数, 水質測定等の実施場所, 熟練した技術者

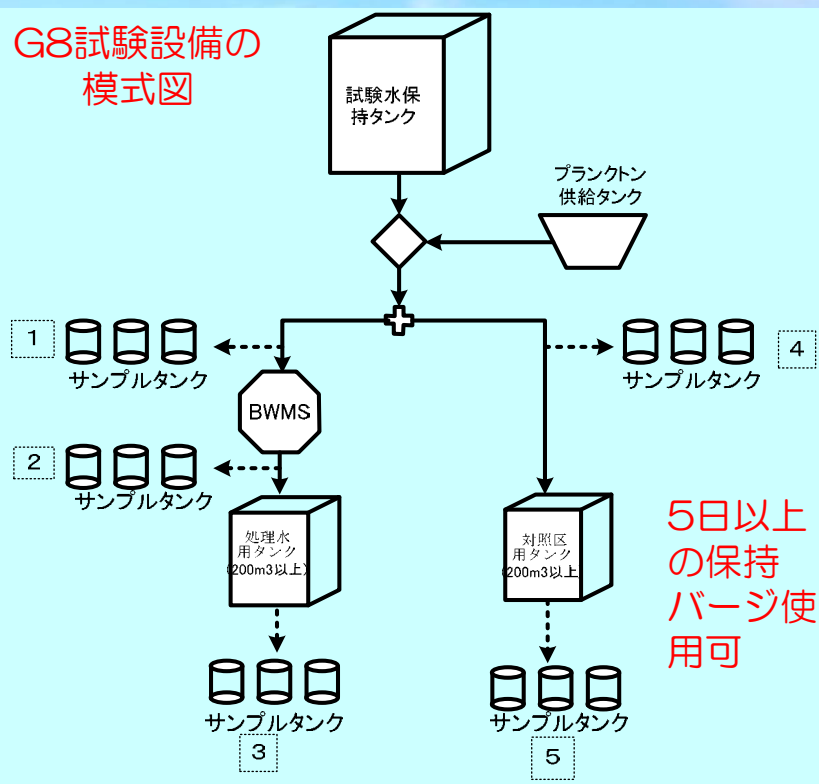
#### ●サンプル処理時間

6時間以内に終了

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### 陸上試験の難しさ：

G8試験設備の  
模式図





## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### 船上試験の難しさ：

#### ●サンプリング

入港している時間内に作業を終了しなければならない

#### ●サンプル容量

Lサイズグループ (最低 $1\text{m}^3$ ) の大量のサンプル容量をどのようにクリアーするか

#### ●サンプル処理

プランクトンの計数、水質測定等の実施場所、熟練した技術者

#### ●サンプル処理時間

6時間以内に終了

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### まとめ：

#### 生物分析のために採集する試水量

Lグループ：陸上試験の実験開始時を除き  $1\text{m}^3$

Sグループ：1リットル

#### 陸上試験のために必要な試験水量と生物量

1000 cells/mlの試験水が400  $\text{m}^3$ 以上必要

#### 従来のプランクトン分析では行われない作業

- ・ 生きた生物のみを計数
- ・ 生物の最小サイズにより L, S グループを識別
- ・ 採水後6時間以内に計数を終了



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

まとめ:

生物分析のために採集する試水量

# 1m<sup>3</sup> のサンプルを取り置く場所および濃縮の時間が問題

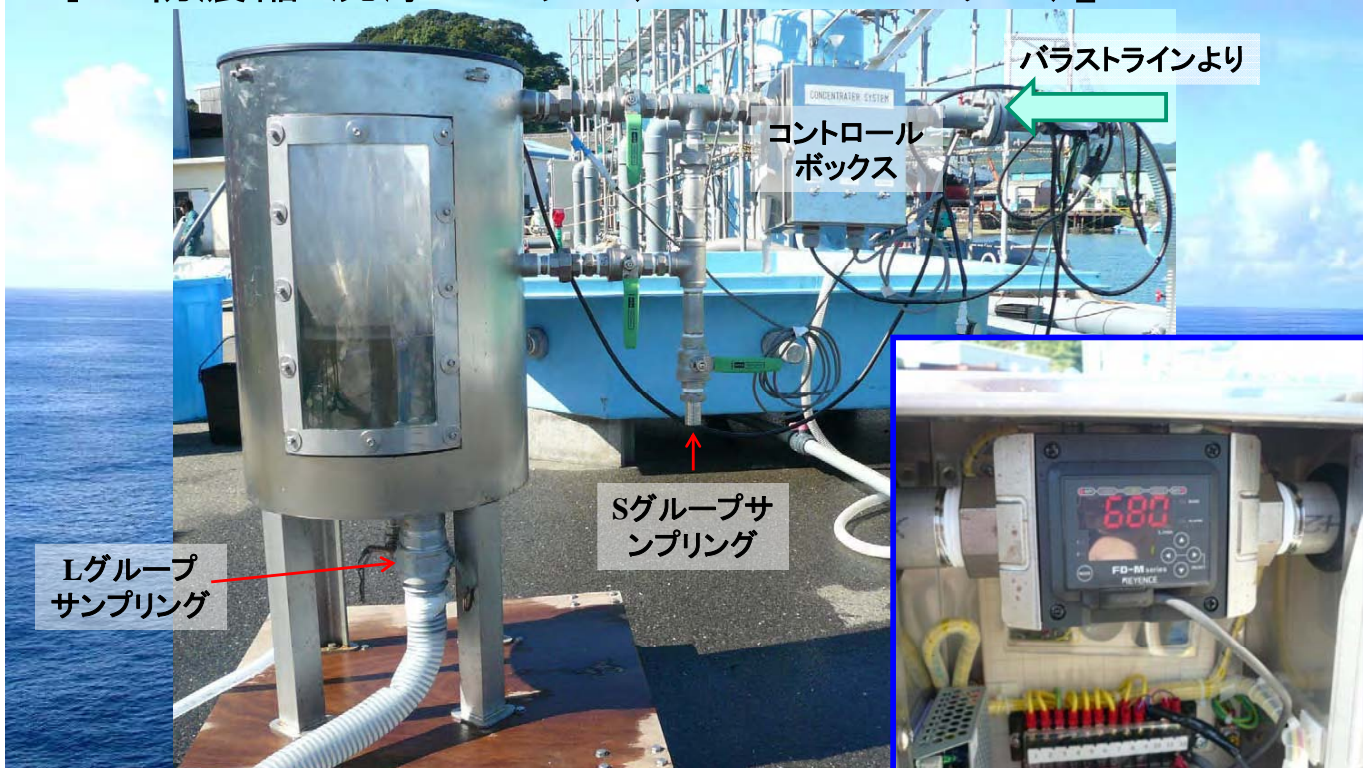
- ・ 生きた生物のみを計数
- ・ 生物の最小サイズにより L, S グループを識別
- ・ 採水後6時間以内に計数を終了

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

サンプリング

(株アムコ提供)

『生物濃縮・洗浄ユニット (コンセントレーター)』





# (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

## サンプリング

### 『生物濃縮・洗浄ユニット (コンセントレーター)』

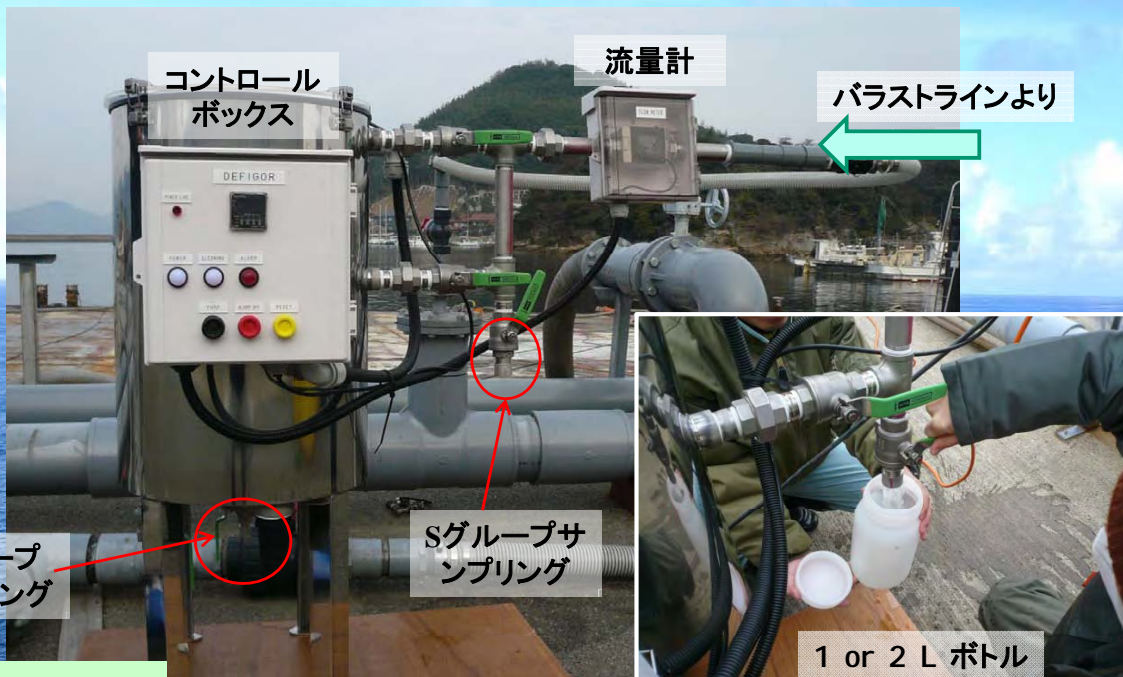


(株アムコ提供)

# (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

## サンプリング

### 『生物濃縮・洗浄ユニット (コンセントレーター)』



Lグループ サンプリング

Sグループ サンプリング

1 or 2 L ボトル

MEPC 57/INF.17

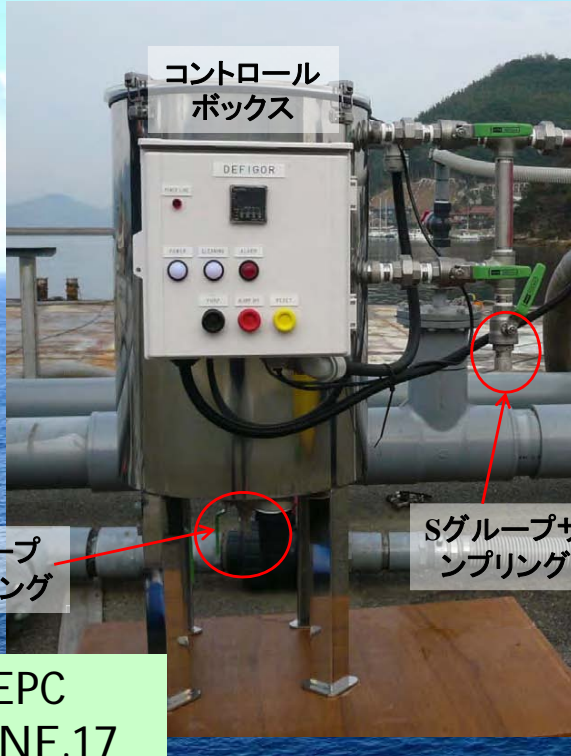
(株アムコ提供)



# (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

## サンプリング

### 『生物濃縮・洗浄ユニット (コン



Lグループ  
サンプリング

Sグループ  
サンプリング

MEPC  
57/INF.17

### Ballast Water Sampling Kit

for organisms above 50 microns acc. to IMO Regulation D-2

A new sampling kit to solve challenging sampling requirements

Experience has shown that sampling ships' ballast water is a challenge. For biological analysis carried out to assess the variety of organisms arriving in ballast several sampling methods have been developed. However, these techniques are neither considered adequate when planning to sample ships for efficacy tests of ballast water treatment systems nor for compliance control sampling for the ballast water discharge standard as set forth in the IMO Ballast Water Management Convention.

According to the IMO Ballast Water Management Convention, the IMO Guideline for Type Approval of Ballast Water Treatment Systems and the IMO Guideline on Ballast Water Sampling large amounts of water need to be sampled to prove the efficacy of treatment systems and to assess compliance of ships with Standards as set forth in the Convention.

Regulation D-2 of the Convention stipulates (as one of several points) that ships meeting the requirements of the Convention must discharge :

- less than 10 viable organisms per cubic meter greater than or equal to 50 micrometers in minimum dimension

Especially to document the number of organisms above 50 microns is challenging as less than 10 organisms per cubic meter of water are acceptable. As a result more than 1,000 liters of water need to be sampled – and this needs to be carried out multiple times as more than one sampling point, several replicates and various sampling occasions are required.

To meet all this requirements the new Ballast Water Sampling Kit has been developed. Due to its design it is able to filtrate the necessary quantity of water without destroying the organisms. The kit is easy to transport, to handle and delivers reliable results in a short time. If you are interested and need more and detailed information, please ask for our technical description under [sales@hydrobios.de](mailto:sales@hydrobios.de). It is available both as pdf-file and as hardcover.



**HYDRO-BIOS**  
Apparatebau GmbH  
Am Jägersberg 5-7  
D-24161 Kiel-Altenholz  
Germany

phone : +49-431-36960-0  
fax : +49-431-36960-21  
e-mail : [sales@hydrobios.de](mailto:sales@hydrobios.de)

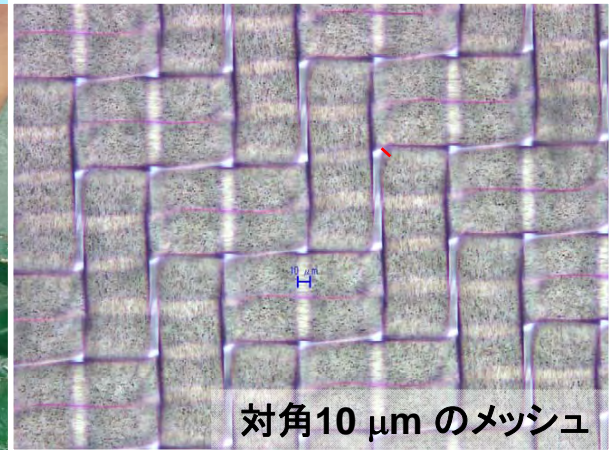
# (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

## サンプリング

Sグループ : 1 L のサンプルを採水後・濃縮



対角10 μm のメッシュ



対角10 μm のメッシュ



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### サンプリング

Sグループ：1 Lのサンプルを採水後・濃縮



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### バラスト水管理システムの承認のためのガイドライン (G8)

陸上試験に用いる試験水は、

最小サイズが

50  $\mu\text{m}$  以上の生物 (Lグループ) :  $10^5$  inds./ $\text{m}^3$  以上

10  $\mu\text{m}$  以上, 50  $\mu\text{m}$  未満の生物 (Sグループ) :

$10^3$  inds./ml 以上

の条件を満たさなければならない。

また、両サイズ区分の生物は、

少なくとも3つの異なる phyla/division の5種

から構成されなければならない。

1回の試験において、上記のような試験水が少なくとも  $400 \text{ m}^3$  必要

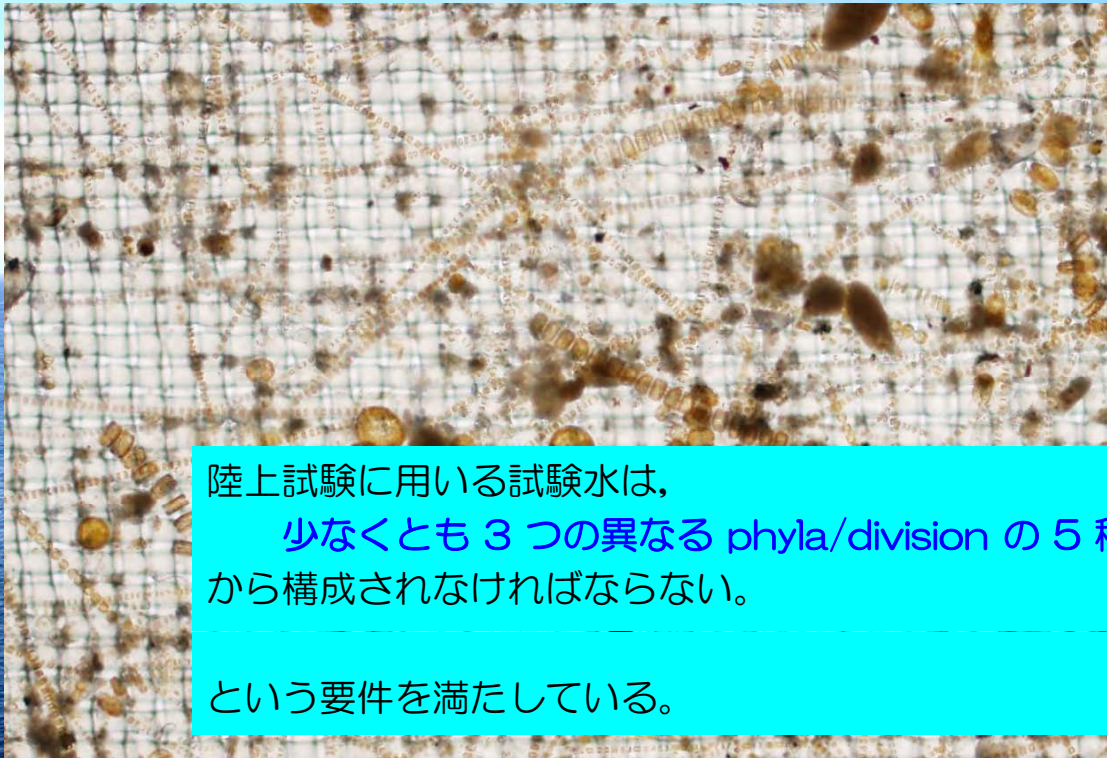
また、少なくとも10回繰り返し行う必要あり



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

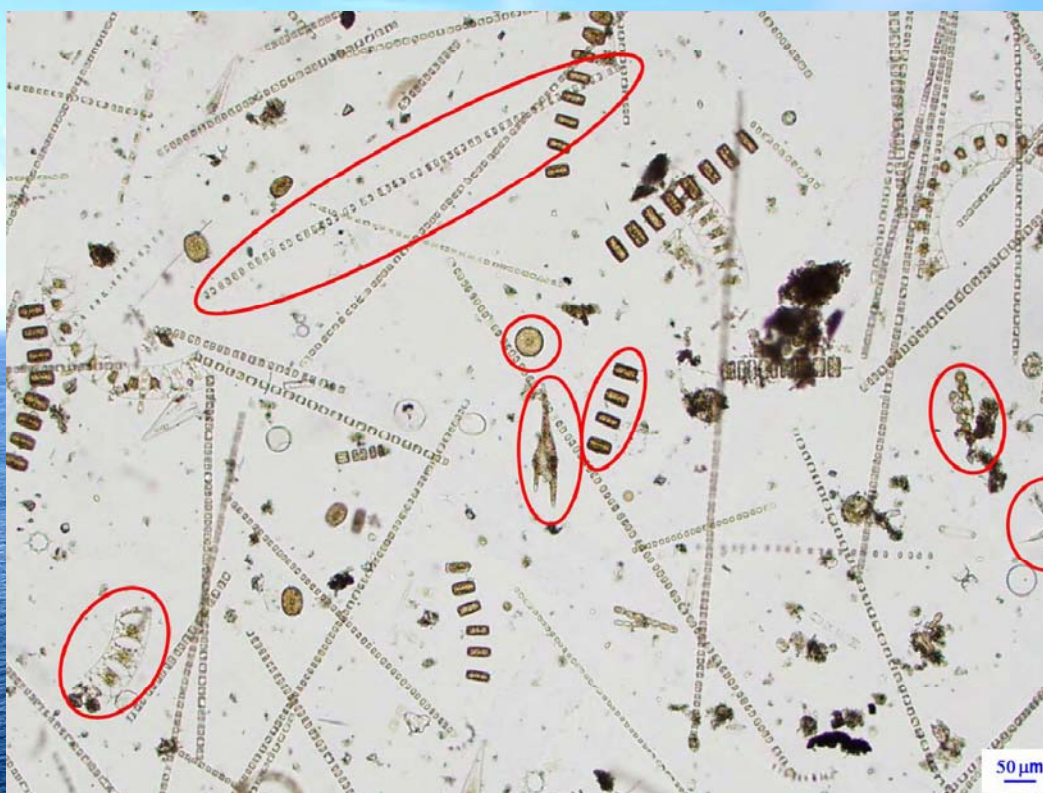
ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

目合い (対角) 10  $\mu\text{m}$  のプランクトンネット



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討





## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

例) 天然海水のみを利用した試験水作成：計数結果

東京湾の海水40 Lを 80 ml (500 倍濃縮)に濃縮した場合

MD が  $50 \mu\text{m} \leq$  の生物  $2.5 \times 10^8 \text{ inds./m}^3$

MD が  $10 \mu\text{m} \leq, < 50 \mu\text{m}$  の生物  $1.7 \times 10^4 \text{ inds./ml}$

基準値を超えることが出来る

陸上試験に用いる試験水は、

**50  $\mu\text{m}$  以上の生物:  $10^5 \text{ inds./m}^3$  以上,**

**10  $\mu\text{m}$  以上, 50  $\mu\text{m}$  未満の生物:  $10^3 \text{ inds./ml}$  以上**

という要件を満たしている。

特に最小サイズが 50  $\mu\text{m}$ 以上の生物については1000倍以上存在。そこで、最小サイズが 10  $\mu\text{m}$ 以上で50  $\mu\text{m}$ より小さい生物について考察。

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

例) 天然海水のみを利用した試験水作成

- 東京湾の海水40 Lを 80 ml (500 倍濃縮)に濃縮した場合基準値を超えることが出来ることはわかったが、何倍に濃縮したら基準値を超えられるのか？

計数結果より、

500倍に濃縮すれば  $1.7 \times 10^4 \text{ inds./ml}$ となる

X倍に濃縮すれば  $1 \times 10^3 \text{ inds./ml}$ となるとすると

$$500 : X = 1.7 \times 10^4 : 1 \times 10^3$$

これを解くと  $X = 29.4$

すなわち 海水を29.4倍濃縮すればよい。

以上から、

基準を満たす試験海水400  $\text{m}^3$ を作成するには:

$$400 \text{ m}^3 \times 29.4 = 11,760 \text{ m}^3$$

の海水が必要



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

東京湾の海水40 L を 80 ml (500 倍濃縮) に濃縮した場合

MD が 50 $\mu\text{m}$ ≤ の生物	$2.5 \times 10^8$ inds. / $\text{m}^3$
MD が 10 $\mu\text{m}$ ≤, < 50 $\mu\text{m}$ の生物	$1.7 \times 10^4$ inds. / ml

基準値を超えることが出来る

G8の条件を満たす試験海水400  $\text{m}^3$  を作成するには、  
11,760  $\text{m}^3$  の海水が必要



少量ならば可能であるが...  
大量に必要となると、  
労力・時間・濃縮装置・生物活性に問題

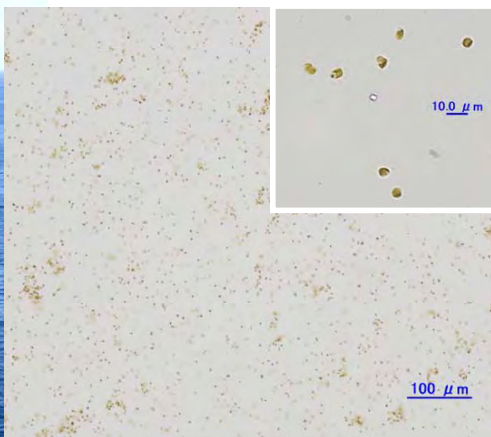
## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

『少なくとも3つの異なる phyla / division の5種』

を培養種を利用し1回当たり 400  $\text{m}^3$  クリアーすることは、  
作業・経費上困難

種類数の要件をクリアーしている自然海水に1種類の培養種を加える



*Chaetoceros gracilis*

販売ベース種を考える：

*C. gracilis* があげられる。

大量培養 (濃縮) が可能：

$1.5 \times 10^8$  cells/ml 以上

しかしながら、G8基準を満たす細胞サイズではない。  
他のものは？

目的が餌料なので細胞サイズの小さなものが多い。

(例) ナノクロプシス (マリンクロレラ)

約 5  $\mu\text{m}$

テトラセルミス

約 7-12  $\mu\text{m}$

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

実験用に特に別途培養して添加したSサイズの生物の場合には特別な扱いをする（これは適当な生物を見つけることが難しいことに配慮した扱いである）。

1. 実験開始時において、Sサイズの個体が含まれていることを確認する。
2. 実験終了時において、大きさの如何にかかわらず、当該種は全て計数対象とする。

Lサイズの生物についてはこの扱いをしなくても、適当な生物が容易に見つかるので、このような配慮はしない。

## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

『50  $\mu\text{m}$ 以上』

のサイズを満たす生物として、シオミズツボワムシとアルテミア



シオミズツボワムシ

大量培養:

$\text{O} \times 10^3 \text{cells/ml}$ 以上

対応が可能である



アルテミア

大量培養:

$\text{O} \times 10^3 \text{cells/ml}$ 以上

対応が可能である



## (4) 陸上試験と船上試験の難しさ

### ガイドライン (G8) の条件を満たす試験水の作成方法の検討

#### ま と め

##### 50 $\mu\text{m}$ $\leq$ の生物

自然海水で十分に可能である。さらに培養種を加えることも可能であり、十分に得ることができる。

##### 10 $\mu\text{m}$ $\leq$ , $< 50 \mu\text{m}$ の生物

自然海水と培養種を利用することで対応が可能である。しかし、サイズの条件を満たし、大量培養が可能で、運搬可能な量に濃縮可能な培養種を探し、検討する必要がある。

#### G8 efficacy 試験の具体的方法

- (1) バラスト水の特徴
- (2) 対象となる生物
- (3) 処理後の検証について
  - ・ 検証に係わるガイドライン
  - ・ 生物の“最小サイズ”と  
“viability”の判断基準
- (4) 陸上試験と船上試験の難しさ
- (5) その他

## (5) その他

### ・バラストタンク内の堆積物



## (5) その他

しかし、まだ多くの障害/検討材料がある。

1. 本当に十分な装置が必要数あるのか？  
(さまざまなタイプと大きさの船に取り付けられるか)
2. 装置取り付けのための施設（ドックなど）が充分あるのか？
3. バラスト水管理システムの承認に係わる試験機関によって実施される分析方法が異なっている可能性があり、プロトコルの標準化が必要？
4. 排出バラスト水中の生物量を測定する際に、PSCで使えるような簡易法があるか？



## (5) その他

### 処理装置の開発/評価グループ

#### 統括管理

処理装置開発

生物分析

熟練した技術者

水質分析

外部有識者

試験状況確認、アドバイス



Thank You

