

II-84 蛍光光度法による藻類監視について

北海道開発局開発土木研究所 正員 佐藤 徳人
西村 豊
（駒福田水文センター） 益塚 芳雄

1. はじめに

河川の富栄養化は水域のBODを引き上げるばかりでなく、河床表面の付着藻類量を増加させて河川内の有機物質を増加させる原因になる。また、藻類の呼吸は夜間の溶存酸素濃度の低下やpHの変動をもたらし、河川の水質管理上の問題を引き起こす場合がある。さらに、河川流況条件によっては河川富栄養化が浮遊性藻類の増殖を促して淡水赤潮やアオコの発生にもつながる。このような河川水質の変化に対しては、定期的な水質調査や水質自動モニターによる監視がなされているが、これらの方法では富栄養化に伴う藻類の増殖を種々の水質項目から間接的に把握する事しかできず、富栄養化の監視手法としては不十分であると言わざるを得ない。

著者らは、これら富栄養化の監視に寄与するため、代表的な水質分析項目と植物プランクトンの関係などいろいろな手法について、とりまとめた。その結果、クロロフィルaを直接測定することが、藻類監視には最も有効と考えられたが、この方法は監視手法として確立されたものではなかった。

そこで、一つの試みとして、蛍光光度法を用いて、現地観測を連続的におこない、観測結果の解析を行い、藻類監視手法としての可能性を検討したのでその結果について報告する。

2. 監視手法の選定

対象水域の藻類量を把握する方法としては、『①藻類の直接計数、②クロロフィルの直接分析、③指標物質の分析による方法、④リモートセンシングによる方法』が考えられる。これらの各手法の利点と問題点から、監視手法としての評価を示した（表-1）。監視手法として、求められる即時性を考慮した場合、この中で対象水域に観測機器を設置する直接蛍光光度法や指標物質を測定する各種水質自動監視装置（COD 自動計測機器、

表-1 藻類監視手法の評価

監視手法	測定の簡便さ	連続測定	データの精度	藻類との相関性	保守点検	経済性
人による直接計数	△	×	◎	◎	—	—
画像解析による計数	△	×	◎	◎	○	○
吸光光度法	○	×	◎	○	○	○
蛍光光度法	○	×	○	○	○	○
直接蛍光光度法	○	○	○	○	○	○
COD自動計測機器	△	○	△	不明	△	△
TOC自動計測機器	△	○	△	不明	△	△
UV自動計測機器	△	○	△	不明	△	△
人工衛星データ	○	×	○	△	—	○
MSS（航空機）	○	×	○	△	×	×
マルチバンド写真	○	×	○	△	△	△
分光放射計	○	○	○	不明	○	△
テレビカメラ	◎	○	△	不明	◎	○

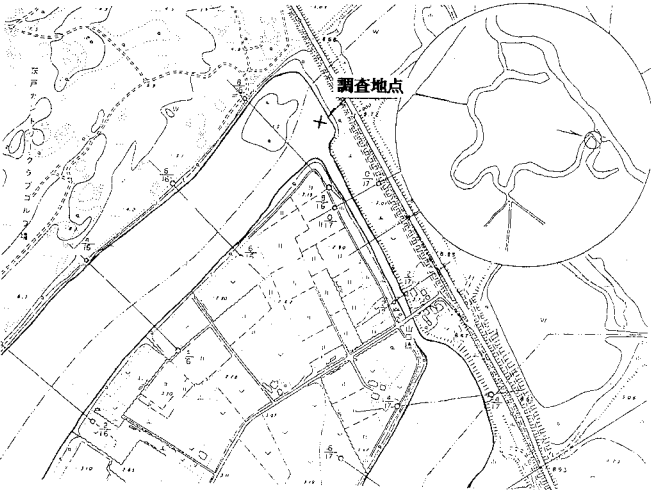


図-1 調査地点位置図

Study on photofluorometry for observation of algae.
by Norito SATOH, Yutaka NISHIMURA, Yoshio MASUZUKA

TOC 自動計測機器、UV自動計測機器) による方法、テレビカメラによる方法等が有効と考えられた。

また、平成4年度には尻別川の蘭越取水堰（北海道電力管理）を対象として、藻類量とクロロフィル濃度（吸光光度法、蛍光光度法…ともに室内分析）、COD、TOC、紫外線吸光度（UV）の関係について検討を行った。その結果、蛍光光度法によるクロロフィルの測定が他の分析項目よりもより藻類量の変動を再現できることが明らかになった。

これをもとに、平成5年度には直接現地でクロロフィル量を測定できる蛍光光度計を設置して、連続的な藻類量の変動をとらえようとした。

3. 現地調査および結果・考察

1)機器の設置および現地調査

機器の設置および現地調査は、藻類増殖が恒常的に見られる石狩川水系茨戸川（図-1）を対象とした。茨戸川では環境整備事業の一環として、水質浄化目的の浚渫が、昭和53年度から行われているが、BOD（75%）値は、B類型の環境基準を（3mg/l 以下）を超過することがある。クロロフィル濃度は開水直後の4月から高くなり、夏期に 300μg/lを越える高い値が記録されており、それを引き起こす主な藻類は珪藻類と藍藻類で、アオコの発生も確認されている。蛍光光度計による観測は、7月28日～10月31日（1時間ごと）

に行った。また、7日ごとに機器の点検と採水および水質分析を行い、データの検証を行っている。分析項目はpH、DO、BOD、COD、SS、TOC、濁度、クロロフィルa b c、植物プランクトンの9項目とし、現地では気温、水温、透明度、全水深を合わせて測定した。

2)観測機器の概要

使用した機器（写真-1、表-2）は蛍光光度法によってクロロフィル量を測定するもので、水中に設置してクロロフィル量を直接測定するセンサー部と、測定間隔の設定や電源の供給等を行う制御部からなる。測定値はデータロガーに記録して回収することとした。

蛍光光度法によるクロロフィルの測定は、励起光によって励起されるクロロフィルの2次蛍光スペクトルの量を検出して濃度の測定を行うものであり励起光としては 430～460nm（1nm=10⁻⁹m）の光を用いる。アセトン抽出液によるクロロフィルaの蛍光は 668nm、クロロフィルbは 652nm、クロロフィルcは 633及び 635nmの波長を持つことが知られている。今回用いている観測機器では励起スペクトル（極大波長：430nm）に見合う光を熱陰極蛍光管より発生させ、2次蛍光スペクトル（極大波長：670nm）の量を、光電子倍增管によって測定する仕組みになっ

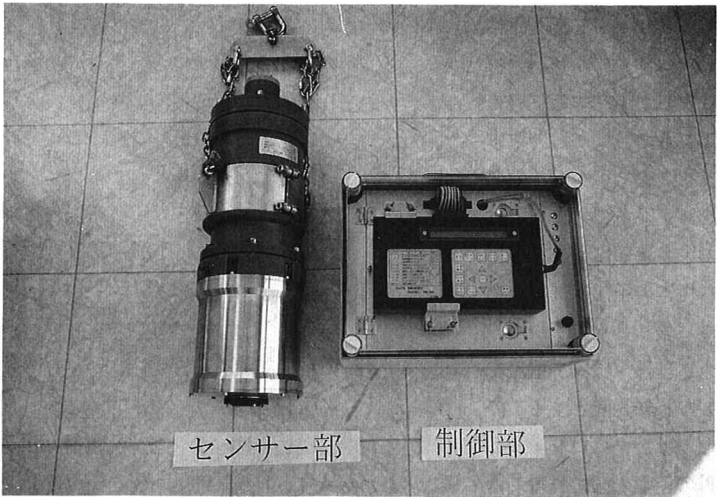


写真-1 観測機器の外観

表-2 機器の仕様

測定方式	蛍光光度法
測定範囲	0～500μg/l
検出精度	±5%FS
応答速度	100%応答 5分以内
使用圧力範囲	0～10kgf/cm ²
電源	DC24V ±10%以内
洗浄方式	ワイパー式自動洗浄
出力電圧	DC 0～2V
重量	空中約18kg、水中約10kg
ケーブル長	15m

表-3 藻類の主要色素組成

色素名	緑藻	珪藻	藍藻	ミドリムシ	渦鞭毛藻
クロロフィルa	◎	◎	◎	◎	◎
クロロフィルb	○			○	
クロロフィルc	○	○			○
β-カロチン	○	○	◎	○	○
ルテイン	◎				
フコキサンチン		◎			

◎：主要色素 ○：存在する

ている。そのため、クロロフィルa b cやフェオ色素（クロロフィルの初期分解生成物）が混在する試料ではこれらの色素から発生する2次蛍光スペクトルの全てを測定することになる。なお、各藻類に含まれる主要な色素の種類は異なっており（表-3）、茨戸川のように珪藻・緑藻・藍藻を主要な藻類組成とするこの水域では、クロロフィルa

以外の色素も含まれることになる。したがって、この観測機器で混合試料を測定する場合にはクロロフィルaばかりでなく、総クロロフィルを対象とした検量線を作成しておく必要がある。

3) 結果および考察

観測結果を図-2に示す。なお、観測結果（出力値）はかなり大きなばらつきを示すことから、8時間の単純移動平均によるデータの平滑化を行いその値も併せて示している。観測された出力値は0.2V以下の低い値で推移しており、この現象は藻類細胞に直接励起光を照射した場合、発生する2次蛍光スペクトルは抽出したものに比較して数分の一程度と低いことと、その一部が光合成に利用されてしまうためと考えられている。また、試料中に含まれる種々の懸濁物質が、励起光の散乱や蛍光の阻害を生じさせるため、このような懸濁物質によっても出力値が低下する。

以上のことから、直接蛍光光度法によって観測された出力値を藻類量の指標値であるクロロフィル量に換算するためには、生細胞の藻類を用いてそれに含まれるクロロフィル量（吸光光度法）と

出力値から検量線を作成しなければならない。定期観測値による出力値とクロロフィル量の関係は図-3のように得られ、10月の2例の観測値（図中の○で囲んだデータ）はクロロフィル濃度が低いにも関わらず大きな出力値を示すといった他のデータと異なる傾向を示した。この2例の観測値は、のちほど述べるように他の要因が作用して例外的な測定値を示したと考えられるため、クロロフィルを換算する回帰式の作成にあたっては、除外して行った。

その結果、クロロフィルa及び総クロロフィル濃度への換算式は以下のように得られた。

$$\text{クロロフィルa} : \text{Chl. a} = 2613.26V - 100.45 \quad r = 0.882 \quad - (1)$$

$$\text{総クロロフィル} : T\text{-Chl} = 2826.66V - 104.12 \quad r = 0.875 \quad - (2)$$

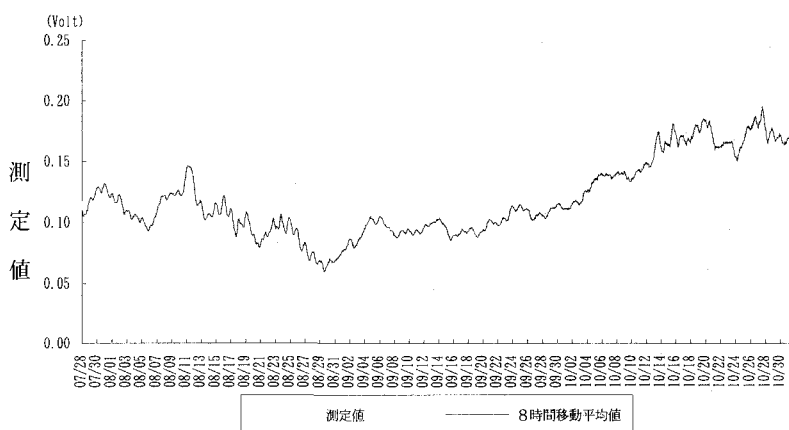


図-2 蛍光光度計による観測結果

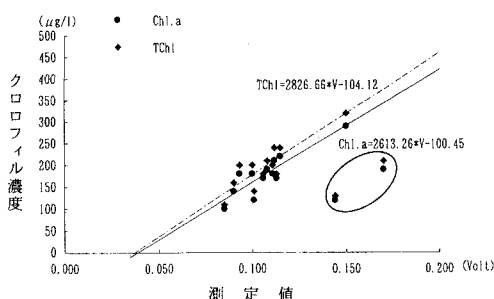


図-3 クロロフィル濃度の換算（観測時データ）

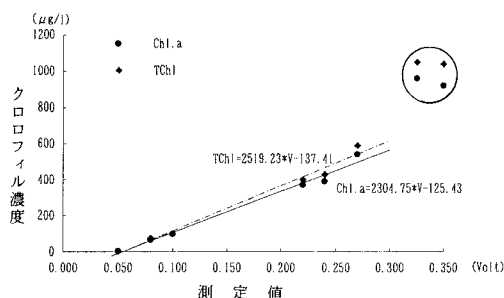


図-4 クロロフィル濃度の換算（検定時データ）

一方、蛍光光度計を回収した後に測定値の精度管理のため検定をおこなったが（11月2日実施）、上記の回帰式とは明らかに異なる結果が得られている。図-4にその時の出力値とクロロフィル濃度の関係を示すが、その換算式は以下のような結果になった。なお、回帰式の作成に当たってはクロロフィル濃度が極めて高く、他の測定値と異なる傾向を示した2例（図中の○で囲んだデータ）を除外している。

$$\text{クロロフィルa} : \text{Chl. a} = 2304.75V - 125.43 \quad r = 0.992 \quad - (3)$$

$$\text{総クロロフィル} : T\text{-Chl} = 2519.23V - 137.41 \quad r = 0.992 \quad - (4)$$

以上のように、観測中のものに比べて11月に行った検定では、同じクロロフィル量に対して出力値が高くなる傾向があり、観測時の後半に見られた2例（回帰式の作成から除外したデータ）と同様の状況が見られている。

このような出力値の違いは、クロロフィルaの分解生成物であるフェオ色素が増加したためではないかと考えられる。観測機器の概要で示したように、フェオ色素を含む2次蛍光スペクトル量を測定する構造になっているため、フェオ色素が増加する藻類の減衰期には高い出力値が現れると考えられる。

図-5に水温（9月2日より連続測定）と出力値の関係を示すが、クロロフィル量が低いにも関わらず高い出力値を示した観測期間の後半（10月の観測）は水

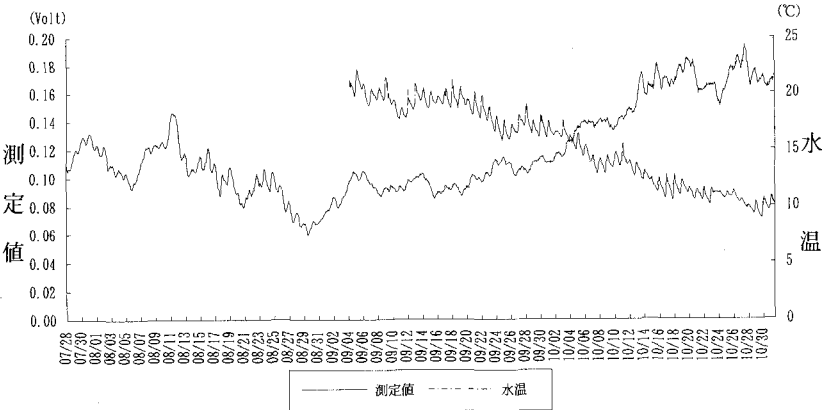


図-5 蛍光光度計出力値と水温

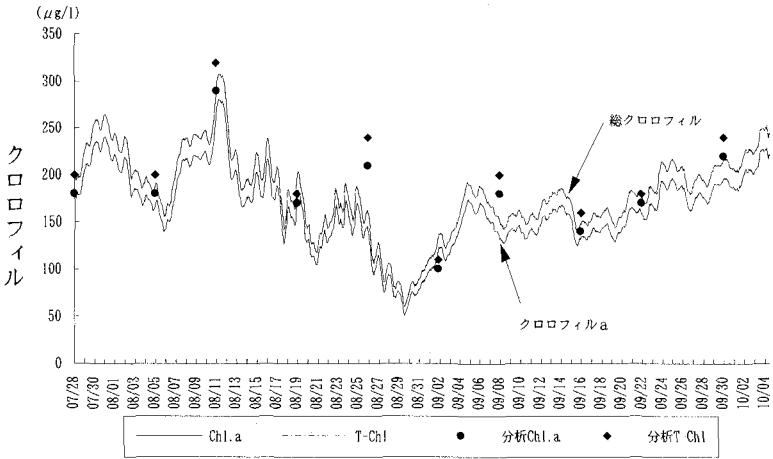


図-6 クロロフィル濃度の換算値

表-4 測定値と分析値の差

月 日	クロロフィルa(μg/l)			総クロロフィル(μg/l)		
	測定値	分析値	差(%)	測定値	分析値	差(%)
7/28	185	180	2.8	204	200	2.0
8/ 5	169	180	- 6.1	188	200	- 6.0
8/11	265	290	- 8.6	291	320	- 9.1
8/19	182	170	7.1	191	180	6.1
8/26	142	210	-32.3	158	240	-34.2
9/ 2	120	100	20.0	134	110	21.8
9/ 8	135	180	-25.0	150	200	-25.0
9/16	131	140	- 6.4	147	160	- 8.1
9/22	160	170	- 5.9	177	180	- 1.7
9/30	195	220	-11.4	216	240	-10.0

以上のことから、観測値のクロロフィル濃度への変換は（1）および（2）式を用いて行うものとし、その適用期間を水温が15℃にまで低下する10月4日までとした。これは、茨戸川の主要な藻類である

珪藻の適水温が15～20℃程度と考えられるためである。図-6に換算したクロロフィルa及び総クロロフィル濃度の時系列変化と分析値を併せて示す。

表-4に測定値と分析値の差(吸光光度法に対する差の割合)を示したが、8月下旬から9月上旬の3回の測定結果に、大きな違いが見られている。この期間は、出水の影響により急激な藻類量の変動が生じた時期に相当しており、藻類組成にも大きな変動が見られている。

図-7、図-8に藻類の現存量と組成比を示したが、これら3回の観測時には珪藻の占める割合が幾分低下して、かわって藍藻や緑藻の占める割合が大きくなる傾向が見られている。

このような藻類組成の変動が換算式の適合度に影響を与えている可能性が考えられ、藻類組成の変化に伴う換算式の検討も今後必要となってくる。しかし、この3例を除いた観測値と分析値の差はほぼ10%以下になっていることから、安定した藻類組成を示す時期については妥当なクロロフィル濃度に換算することが可能であると判断できる。

このように、蛍光光度計の精度は換算式に左右されており、対象とする水域の特性に合致した換算式をどのように作成できるかが重要な要素となる。

4. 藻類監視の可能性

直接蛍光光度計によるクロロフィル量の連続観測は、対象水域の特性を考慮した換算式を用いることで妥当な値を算出することが可能であることがわかった。しかし、長期にわたる観測では藻類組成の変化に応じた複数の換算式を用いなければ誤差が大きくなるという傾向も見られ、直接蛍光光度計による観測を藻類増殖の監視手法の一つとして確立するためには、換算式の作成方法について今後さらに検討を加える必要がある。今回の検討で用いた換算式は、出力値と吸光光度法によるクロロフィル濃度の関係を単純に回帰させたものであるため、出力値を藻類組成の変化による出力値の変動などが考慮されていないという問題がある。

懸濁物質の影響を考慮するためには、濁度計等の懸濁物質量を常時測定できるセンサーを蛍光光度計に併設する必要があるほか、藻類組成の変動を把握するためには一定の頻度で藻類を分析する必要がある。これらの作業は、

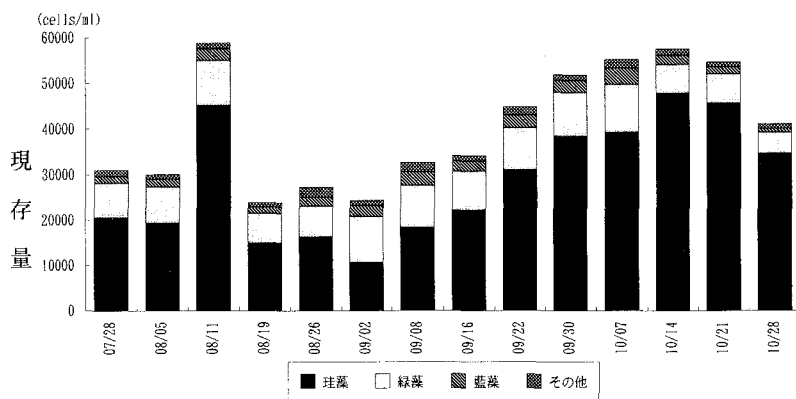


図-7 藻類現存量および組成比(その1)

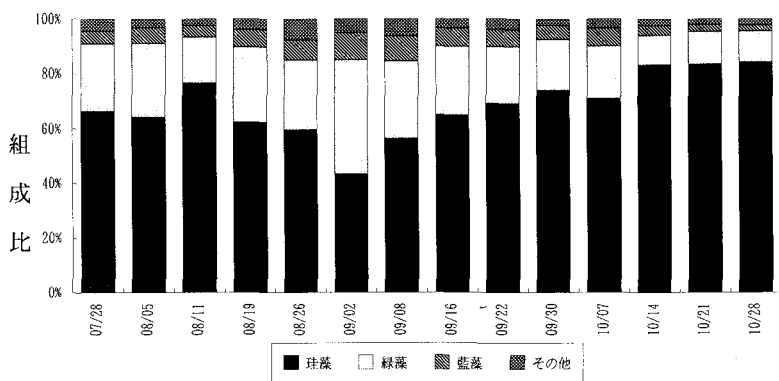


図-8 藻類現存量および組成比(その2)

いずれも蛍光光度計の精度を上げるために必要なことではあるが、藻類増殖の監視に必要な精度がどの程度かという目標によってもその必要性が異なってくる。

クロロフィル濃度が恒常的に高い茨戸川等の水域では、今回得られた精度（吸光光度法に対する差が10%前後）があるならば、十分監視の機能を果たすものと考えられる。ただし、クロロフィルの初期分解生成物であるフェオ色素が増加する時期には、この観測機器による監視は不適當であり、適用期間が限定される。一方、クロロフィル濃度の低い水域に対しては、今後同様の調査を行って適用の可否を検討する必要があると考えられ、広範囲な水域に適用させるためには現地調査を継続し資料の蓄積をはかる必要がある。また、今回の調査では週1回の割合で観測機器の保守・点検を行ったが、精度を維持するために必要な最低限の保守・点検の仕様についても検討する必要がある。さらに、観測データの転送方法やデータの加工、提供方法等についてもその目的に応じたシステム構築が望まれる。

5. まとめ

藻類の増殖は種々の環境要因（栄養塩、日射量、水温、流況等）が複雑に絡み合っているため、藻類量の変化を時間の経過とともに計測することで、他の環境要因との関係を把握することが容易になる。この報告では、藻類量の変化を蛍光光度計によって行うことを試みたものであり、比較的良好な精度でクロロフィル量の連続観測が行えることがわかった。

その原理である蛍光光度法は、吸光光度法に比較して高い感度を持っているため、生細胞を用いて直接クロロフィル量を測定することが可能である。同時にその精度は、出力値からクロロフィル濃度を算出する換算式の精度に左右されており、的確な換算式を作成する手法の確立が最も重要である。特に、蛍光光度計の出力値を低下させる懸濁物質の取り扱い方や、藻類組成の変動に応じた換算式の作成が今後の重要な課題となる。藻類増殖の監視手法の一つとして蛍光光度計は、茨戸川のような比較的にクロロフィル濃度の高い水域では簡易な換算式を用いても十分な精度を有すると考えられるが、様々な水域に対応できる監視手法として確立するためにはさらに検討を加える必要がある。

今後は、広範囲な水域に対応できるように、この観測機器の特性の把握や利用方法について調査を継続し、検討を加えていくことが望まれる。そして、河川の水質管理のなかでも富栄養化に伴う現象を明らかにしていくために、従来より行われている水質監視とともに藻類量の監視を併用することでより的確な管理を行えるものと考えられる。

参考文献

- 1) 秋山優、有賀祐勝、坂本充、横浜康継 共編：藻類の生態、内田老鶴圃、1986. 10
- 2) 日本海洋学会編集：海洋環境調査法（改訂版）、恒星社厚生閣、1985. 3
- 3) 西澤一俊、千原光男 編集：藻類研究法、共立出版(株)、1985. 9