

B-37 マイクロプレートを用いたAGP試験による 淀川流域の河川水質評価

○福永 彩^{1*}・山下 尚之¹・田中 宏明¹

¹京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター(〒520-0811滋賀県大津市由美浜1-2)

* E-mail: aya-fk@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

現在日本の下水道普及率はようやく平成18年度末で70.5%に至り、公共水域の水質が改善されてきている。しかしその一方で、栄養塩類豊富な下水処理水が公共水域の汚染源になっているという側面もある。下水処理水には窒素やリンなどの栄養塩類が豊富に含まれており、河川を含めた放流先での富栄養化等による水質影響が懸念される。

水域の富栄養化の程度を推定する方法としてAGP (Algal Growth Potential) 試験がある。AGP試験は、リービッヒの最小律を基礎にした生物検定法であり、検水の総合的な藻類増殖能力を測定するものである。通常は三角フラスコを用いて試験を行うが、大量の溶液や場所、労力が必要が多く、一斉に多数のサンプルの試験を行うには困難を伴う。そこで本研究では、既存の研究¹⁾を参考に数種類の藻類についてマイクロプレートを用いたAGP試験(マイクロプレートAGP試験)の基礎検討を行った。また、淀川流域の河川水を対象にマイクロプレートAGP試験を行い、淀川流域における河川水質評価を行った。

2. 方法

(1) AGP試験

a) マイクロプレートAGP試験の検討

供試藻類として緑藻類の*Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35) と珪藻類の*Cyclotella meneghiniana* (NIES-805)を用いた。*P.subcapitata*は各種藻類試験に一般的に用いられている種であり、*C.meneghiniana*は珪藻類の代表種として選定した。

*P.subcapitata*はAAP培地、*C.meneghiniana*はCSI培地を用いて継代培養を行い、試験には対数増殖期のものを用い

た。マイクロプレート(IWAKI社製 96 well 細胞培養用マイクロプレート)の各ウェルにサンプル200 μ L、藻類細胞液40 μ Lを投入した。藻類は投入前に15 mg/LのNaHCO₃溶液で洗い、培地成分を除去した。藻類初期細胞濃度は、*P.subcapitata*、*C.meneghiniana*ともに 1.0×10^4 cells/mLとした。

ウェルへの添加が終わったマイクロプレートは、24 $^{\circ}$ C、120 rpm、4000 lux (12時間明暗周期)の条件で振とう培養した。培養期間中はマイクロプレートリーダー(BIO-RAD社製Model 550)で吸光度(波長450 nm)を測定し、藻類増殖量をモニタリングした。藻類濃度がほぼ一定になった時点での増殖量をAGPとした。

吸光度測定後は毎回、培養中の液体蒸発を防止するため側面をパラフィンフィルム(American National Can社製PARAFILM)で覆った。藻類の増殖が顕著にみられる頃には、ウェルの底に藻類が付着し吸光度測定値に影響を及ぼす可能性があった。そこで、マイクロピペットを用いてウェル内の溶液を出し入れし攪拌してから測定を行った。また、培養中にマイクロプレートのカバーに水滴がついた場合は、クリーンベンチ内で水滴を除去した。

b) 吸光度とSSの関係

AGPの値は藻類の増殖量を乾燥重量(mg/L)で表現することが多い。そこでマイクロプレートリーダーの吸光度と、藻類細胞濃度、SS濃度(mg/L)との関係を調べた。

200 mLの三角フラスコに、*P.subcapitata*、*C.meneghiniana*それぞれの培地を100 mL入れ、継代培養を行っている藻類液を少量添加し2週間培養した。培養条件は24 $^{\circ}$ C、90 rpm、4000 lux(12時間明暗周期)とした。培養期間中は、吸光度、藻類細胞濃度、及びSS濃度の測定をほぼ毎日行った。

(2) 淀川水系における調査

淀川水系における調査は2006年9月に行った。採水地点を図-1に示す。

採水したサンプルは、氷冷しながら実験室に持ち帰り

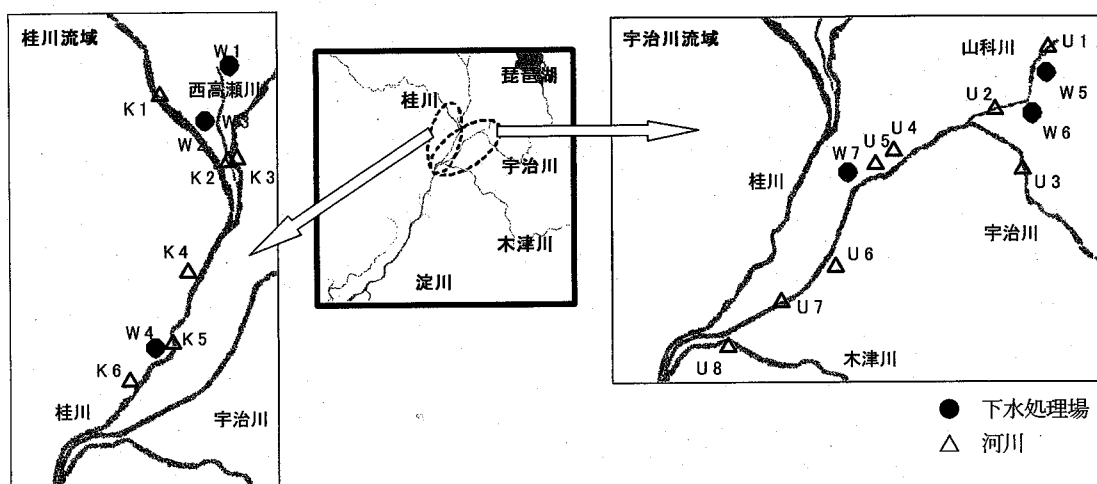


図-1 採水地点位置図

ガラスファイバーフィルター(Whatman社製, GF/B)及びメンブレンフィルター(ADVANTEC社製, 孔径0.2 µm)によりろ過を行った後, -30℃で凍結保存をしたAGP試験では, 凍結させていたサンプルを融解した後, マイクロプレートウェルに添加した。

また, 各地点のサンプルの全窒素(T-N)及び全リン(T-P)濃度の測定をJIS-K0102に準じて行った。

3. 結果と考察

(1) マイクロプレートAGP試験の検討

a) マイクロプレートにおける藻類の増殖

マイクロプレートAGP試験におけるウェル内の藻類増殖の様子を調べた。図-2は3地点のサンプルにおける *C.meneghiniana* の増殖の様子を描いたものである。W4は下水処理水, K5は処理水流入が多い桂川本川, K6は処理水流入のない桂川支流である。この図より *C.meneghiniana* の増殖は11-16日目には, ほぼ横ばいとなった。また *P.subcapitata* を用いた場合も同様の結果であった。よって11-16日程度経過した時点での藻類増殖量をAGPとした。

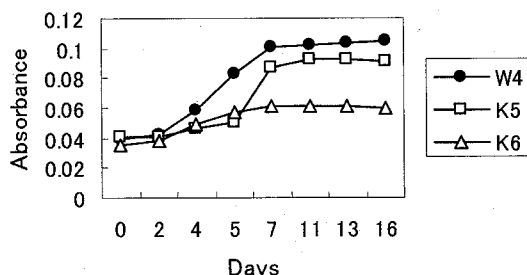


図-2 マイクロプレートを用いたAGP試験における *C.meneghiniana* の増殖

b) 吸光度, 細胞濃度及びSS濃度の関係

P.subcapitata と *C.meneghiniana* の, マイクロプレートリーダーによる吸光度と, 藻類細胞濃度及びSS濃度との関係を調べた。 *C.meneghiniana* の吸光度と細胞濃度の関係を図-3に, 吸光度とSS濃度の関係を図-4に示す。

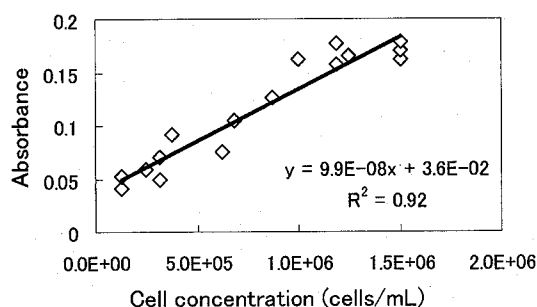


図-3 *C.meneghiniana* の吸光度と細胞濃度の関係

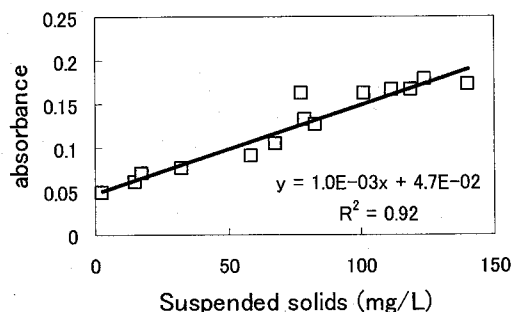


図-4 *C.meneghiniana* の吸光度とSSの関係

C.meneghiniana の吸光度と細胞濃度, 吸光度とSSの間に高い正の相関が見られた。また *P.subcapitata* においても同様の結果であった。よってマイクロプレートリーダー

一で吸光度を測定することにより藻類の増殖をモニタリングすることができ、藻類増殖量を測定できると考えられた。

(2) AGP試験結果

a) 淀川流域におけるAGP

淀川流域で採取したサンプルを対象に行ったAGP試験の結果を表-1に示す。

表-1 AGP 試験結果

Sample		AGP (mg/L)	
		<i>P.subcapitata</i>	<i>C. meneghiniana</i>
桂川流域	K1	4	22
	K2	109	53
	K3	0	10
	K4	25	39
	K5	38	44
	K6	20	13
宇治川流域	U1	27	25
	U2	236	79
	U3	12	13
	U4	2	5
	U5	19	8
	U6	101	65
	U7	23	28
	U8	0	25
下水処理水	W1	69	57
	W2	93	67
	W3	99	53
	W4	128	58
	W5	128	46
	W6	53	46
	W7	27	38

調査地点最上流部のK1やU1は、下水処理水流入の影響を受けていないことから栄養塩濃度も低く、AGPも低い値であった。一方、K2、U2のように、上流にある下水処理場の処理水以外に大きな流入水源が存在せず、流量の大部分が処理水に依存している地点では、AGPの値は*P.subcapitata*が109～236 mg/L、*C.meneghiniana*が53～79 mg/Lであり、処理水と同程度であった。このことから、処理水が放流後に十分に希釈されない地点では藻類の増殖が著しく促進され、停滞させた場合、富栄養化が起こる可能性が高いことが示唆された。

またU6は上流に下水処理場が存在しないが、AGP値が高かった。この付近の土地は農業に利用されている割合が高く、U6には肥料由来の栄養塩が流れ込んでいる可能性が高い。またこの付近は下水普及率が比較的低く、処理が十分でない浄化槽排水が流れていると考えられる。これらが原因で栄養塩類濃度が高く、AGP値も高い値になったと考えられる。

b) 下水処理水のAGP

本研究では7処理場の8箇所の放流口でサンプリングを実施した。各処理水のAGP試験の結果を図-5に示す。

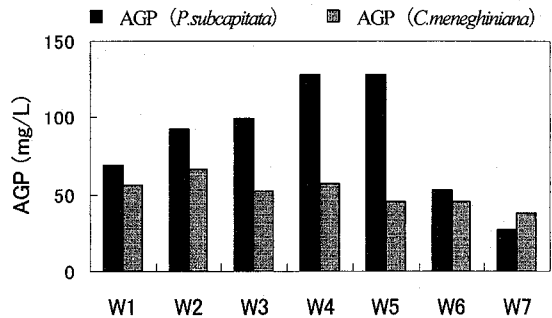


図-5 下水処理水のAGP

下水処理水(W1-7)のAGP値は*P.subcapitata*が27～128mg/L、*C.meneghiniana*が38～67 mg/Lであり、下水処理水の影響を受けていない地点(K2,U2を除くK1-6, U1-8)のAGP値と比べ高い値であった。

また、処理水によって、*P.subcapitata*と*C.meneghiniana*のAGP値は大きく異なっていた。一般にAGP試験には緑藻が用いられることが多いが、河川に生息する藻類としては*Cyclotella*や*Navioula*などの珪藻類の現存量が多い。したがって、河川の富栄養化を考える際には、珪藻類のAGPの値も考慮する必要性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、マイクロプレートを用いて緑藻及び珪藻のAGP試験を行い、淀川流域の河川水質調査を実施した。得られた知見を以下に示す。

1、*P.subcapitata*及び*C.meneghiniana*ともに、吸光度と細胞濃度、吸光度とSSの間に正の相関が見られた。よってマイクロプレートリーダーで吸光度を測定することによりウェル内の藻類の増殖をモニタリングすることができ、藻類増殖量を測定できると考えられた。

2、マイクロプレートを用いたAGP試験により淀川流域における下水処理水及び河川水のAGPを調査した。その結果、下水処理水が十分に希釈されていない地点ではAGP値が高く、河川の富栄養化に対する下水処理水の影響の可能性が示唆された。

参考文献

- 山下尚之、田中宏明、宮島潔、鈴木穰：マイクロプレートを用いたAGP試験法の検討、水環境学会誌、Vol.28, pp.493-499, 2005
- 謝辞 本研究は河川環境管理財団の河川整備基金助成を受けて実施した。