

蛍光光度計による河川藻類の現地調査について

佐藤徳人* 西村 豊** 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 の変動をもたらす、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

対策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

技術者による直接計数、画像解析による計数

②クロロフィルの直接分析

吸光光度法、蛍光光度法、直接蛍光光度法

③指標物質の分析による方法

COD 自動計測機器、TOC 自動計測機器、

*環境研究室研究員 **同室副室長 ***榎福田水文センター

UV 自動計測機器

④リモートセンシングによる方法

人工衛星データ、航空機による MSS、

航空機によるマルチバンドカメラ、

分光放射計、テレビカメラ

が考えられる。

これらの各手法の利点と問題点を表-1 に示すとともに、表-2 には監視手法としての評価を示した。評価に用いた項目は、

①測定の簡便さ、②連続測定の簡便さ、

③測定されるデータの精度、

④藻類量との相関性、

⑤機器の保守点検の容易さ、⑥経済性

の 6 項目である。各項目について 4 段階で評価を行い、

◎：極めてよい ○：良い △：やや劣る

×：問題あり

によって示している。また、評価できないものについては（-）によって示し、評価が確立していないものについては（不明）として示してある。

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、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

表-1 藻類監視手法の利点と問題点

監視手法	利点	問題点
藻類の直接計数	・技術者による直接計数	技術者の絶対数が不足 試料の搬入及び前処理が必要 測定に時間を費やす
	・画像解析による計数	熟練技術者を必要としない 短時間に処理ができる 処理ソフトの開発に時間が必要 試料の搬入及び前処理が必要 種名と数量の判定が困難
クロロフィルの直接分析	・吸光光度法	多くの試料を測定できる 量的な把握が可能 公定法として採用されている
	・蛍光光度法	感度が高い クロロフィルaとフェオフィチンを区別して測定が可能
	・直接蛍光光度法	現地で直接測定できる 連続的に測定が可能 試料の搬入及び前処理が必要 水質条件によって精度が異なる 機器の保守管理が煩雑
指標物質の分析による方法	・COD 自動計測機器	連続測定及び記録が可能 フィールドでの使用実績がある 機器の保守点検が煩雑 精度の維持が難しい 藻類量を直接指標出来ない
	・TOC 自動計測機器	連続測定及び記録が可能 フィールドでの使用実績がある 機器の保守点検が煩雑 精度の維持が難しい 藻類量を直接指標出来ない
	・UV 自動計測機器	連続測定及び記録が可能 機器の保守点検が煩雑 他物質の混入によって精度が著しく低下する 藻類量を直接指標出来ない
リモートセンシング	・人工衛星データ	データの入手が容易 現象を映像として据えられる 情報量が多い 広範囲なエリアを網羅できる データ情報の日時が限定される 気象要因に影響されやすい 狭い範囲への応用は不向き
	・航空機による MSS	現象を映像として据えられる 狭い範囲の対象域にも対応できる 測定時期や精度が気象条件に左右される 装置が大型になり、取り扱いが難しい 経費が莫大にかかる
	・航空機によるマルチバンドカメラ	現象を映像として据えられる 狭い範囲の対象域にも対応できる MSS に比べて経費が安価 フィルムの回収が必要 MSS に比べて精度が低い 解析には専用の機器が必要
	・分光放射計	計量、小型 連続的な波長域の変化が据えられる 測定経費が安価 測定時間が短い 現象を映像としては据えられない 水質に応用した実績がない 測定機器が高価
	・テレビカメラ	計量、小型 連続的な変化が記録できる 経費が安価 一定規模以上の現象しか把握できない 変化を定量的に捉えられない

表-2 藻類監視手法の評価

監視手法	測定 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	◎	○

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。

また、平成6年度はその結果を基に、調査地点をかえて現地試験を試みている。

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

平成5年度の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

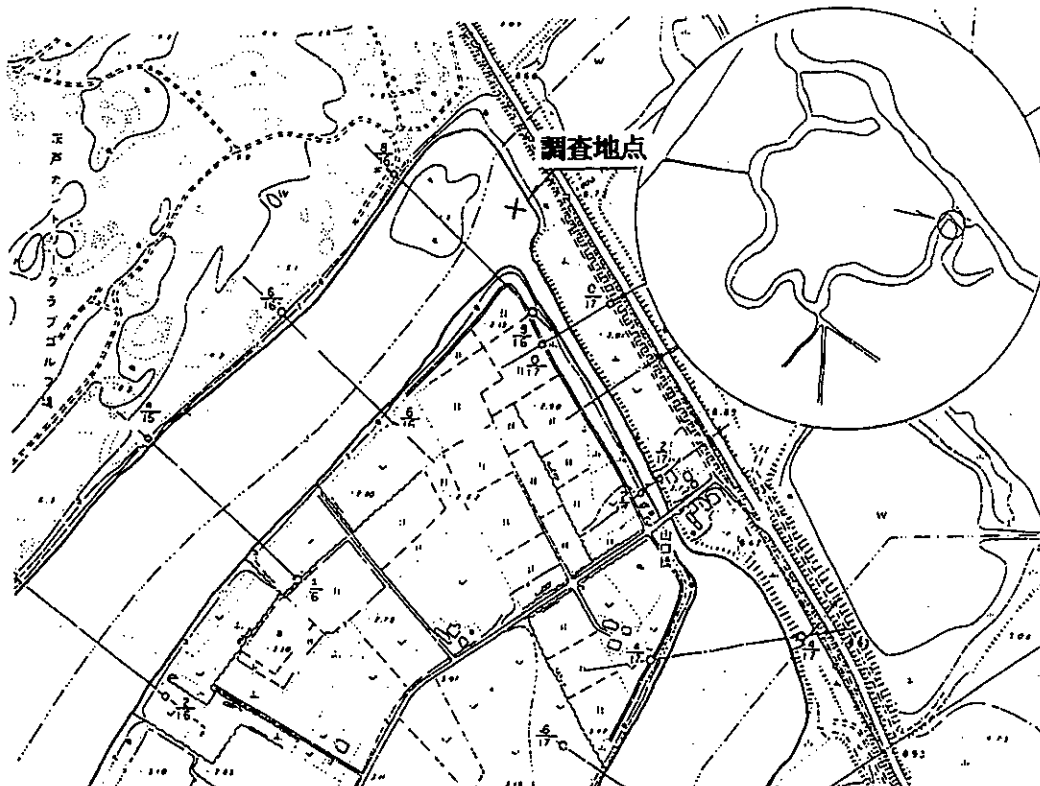


図-1 調査地点位置図

直後の4月から高くなり、夏期に300 $\mu\text{g/l}$ 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abc、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。

平成6年度の調査は、調査地点を千歳川流域のネシコシ排水路に変更して上記と同様の現地調査を実施している。

2) 観測機器の概要

使用した機器（写真-1、表-3）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430～460 nm（1 nm = 10^{-9}m ）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668 nm、クロロフィルbは652 nm、クロロフィルcは633及び635 nm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：430 nm）に見合う光を熱陰極蛍光管より発

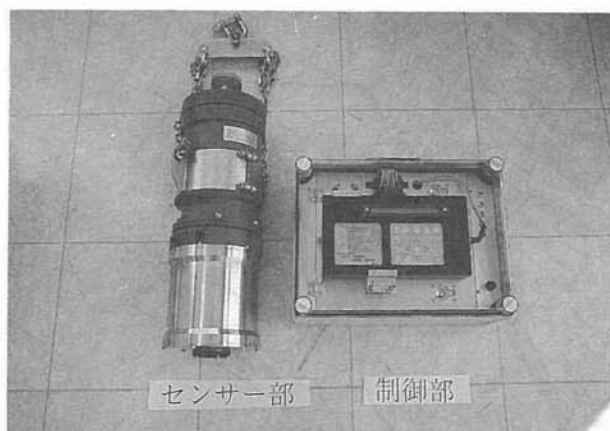


写真-1 観測機器の外観

表-3 機器の仕様

測定方法	蛍光光度法
測定範囲	0～500 $\mu\text{g/l}$
検出精度	$\pm 5\%$ FS
応答速度	100%応答5分以内
使用圧力範囲	0～10 kgf/cm^2
電源	DC 24 V ± 10 以内
洗浄方式	ワイパー式自動洗浄
出力電圧	DC 0～2 V
重量	空中約18kg、水中約10kg
ケーブル長	15m

表-4 藻類主要色素組成

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

生させ、2次蛍光スペクトル（極大波長：670 nm）の量を、光電子倍增管によって測定する仕組みになっている。そのため、クロロフィルabc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-4）、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。

当装置のクロロフィルaに対する蛍光特性は図-2のように得られ、クロレラ製の生化学クロロフィルaのアセトン抽出液を用いた場合の両者の関係は、

$$\text{Chl. a} = 251.3 * V \quad (V: \text{出力値})$$

という直接的な特性が得られている。（◇印）

一方、他の色素が混在するような抽出液（茨戸川の試料を使用）では、クロロフィルaと出力値の関係は（●印）のようになり、他の色素

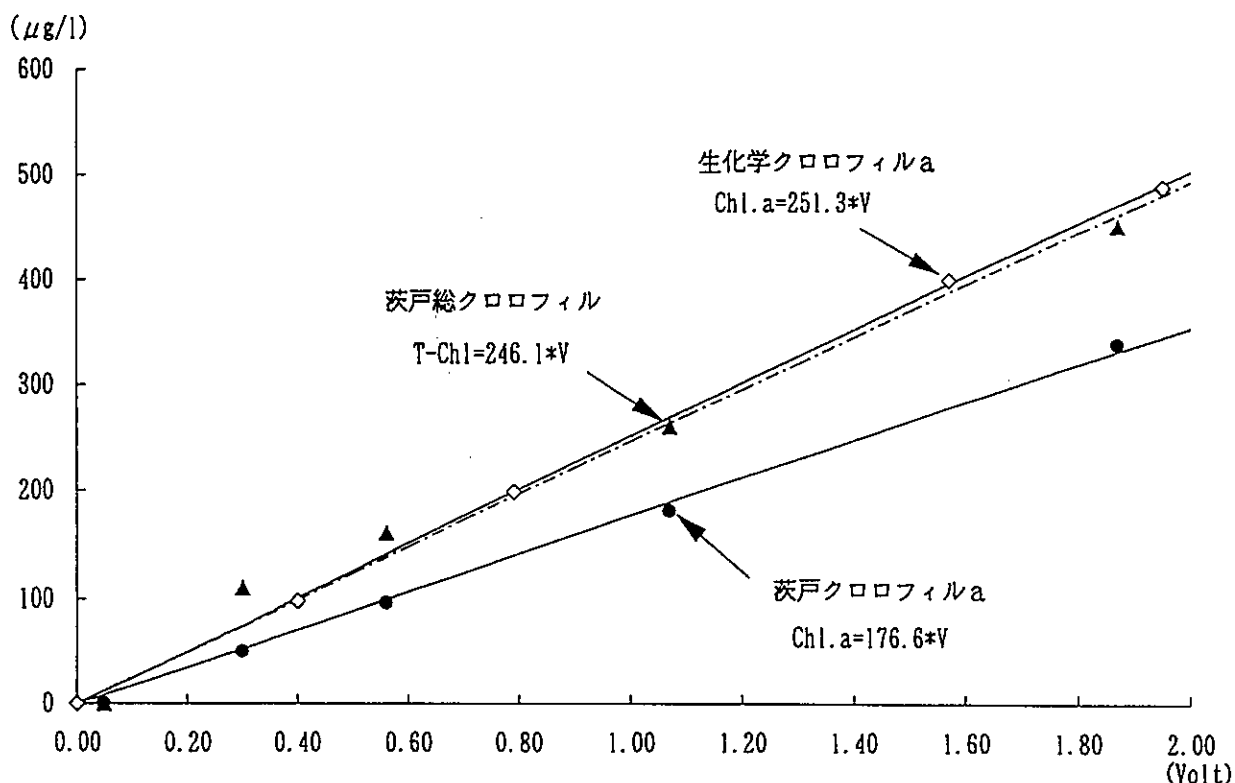


図-2 クロロフィル濃度（アセント抽出）と出力値

による蛍光スペクトルが加わるため生化学クロロフィルaを用いた場合よりも出力値が大きくなる。しかしながら、総クロロフィルを対象にした場合には、

$$Chl.a = 246.1 * V \quad (V: \text{出力値})$$

という関係が得られ（▲印）、総蛍光量と出力値の関係は生化学クロロフィルaを用いた場合と同様の結果になる。従って、当装置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。

さらに、アセトンによる抽出操作を用いなくてクロロフィル濃度を測定する場合には、生きた藻類を試料とした検量線を作成する必要がある。その詳細については、次項で述べるものとする。

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（平成5年度分）

モデル水域の調査期間中のおもな動きを示す

と、全水深は、2.00～2.40 m の範囲で変動しており、平均2.20 m 程度であった。透明度は、0.30 m 前後で安定していたが、降雨時に0.50 m にまで上昇することがあった（図-3）。気温は、7月中旬と8月下旬に一時的に高い期間があったがこの年の冷夏を反映しており、調査期間を通じて低めに推移し、9月上旬以降は急に低下している。水温は、上下層でほとんど差がみられず、9月上旬まで20℃前後で安定している。その後、気温の低下とともに低下傾向を示している（図-4）。

また、有機物質量を指標するBOD、COD、TOCはともに高い値を示しBODの平均値は環境基準B類型（=3 mg/l）を超える7.0 mg/l という値であった。これら有機物の主体は藻類であり、そのため総クロロフィル濃度の最大は320 μg/l、平均でも190 μg/l という高い値を記録している。濁質成分のSS、濁度も比較的高く、観測値の平均は、それぞれ29 mg/l、28度（共に上層）を示している（図-5）。これらは、TOCやクロロフィルa、総クロロフィルと比較的よい相関を示していることから、成分の大半は藻類と判断できる。

蛍光光度計による観測結果を図-6に示す。

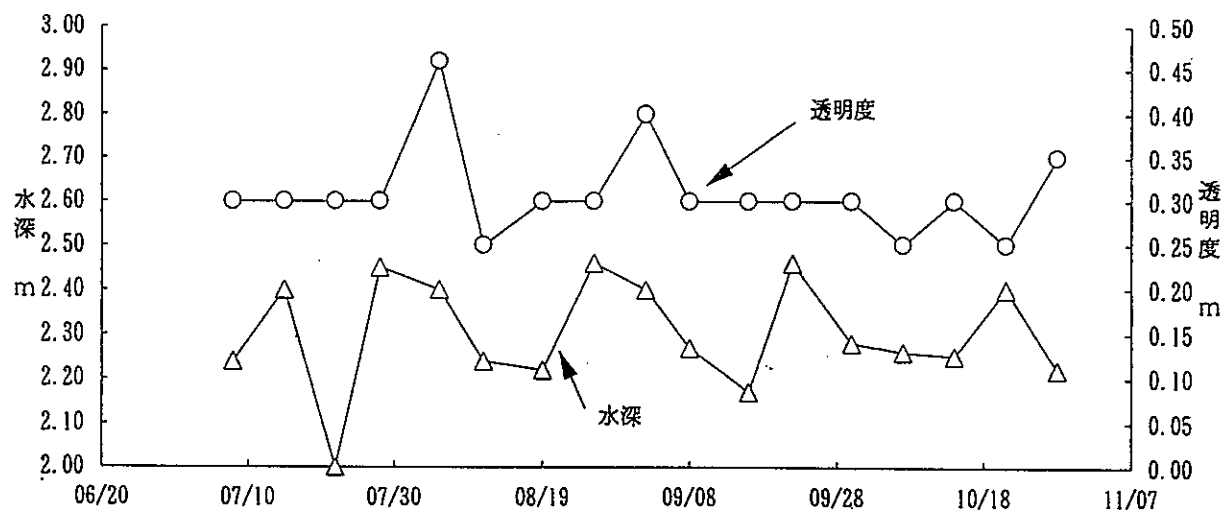


図-3 水深および透明度変化図

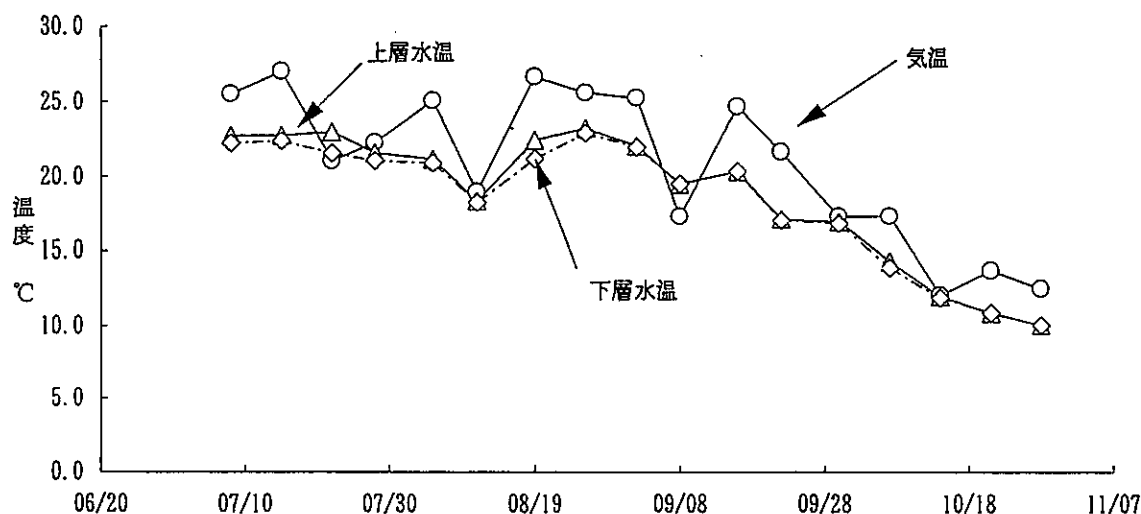


図-4 気温および水温変化図

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-7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。

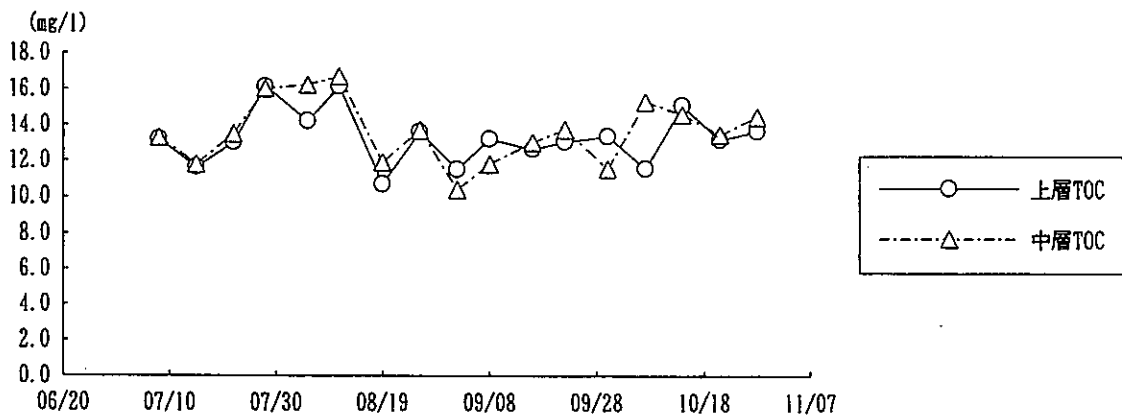
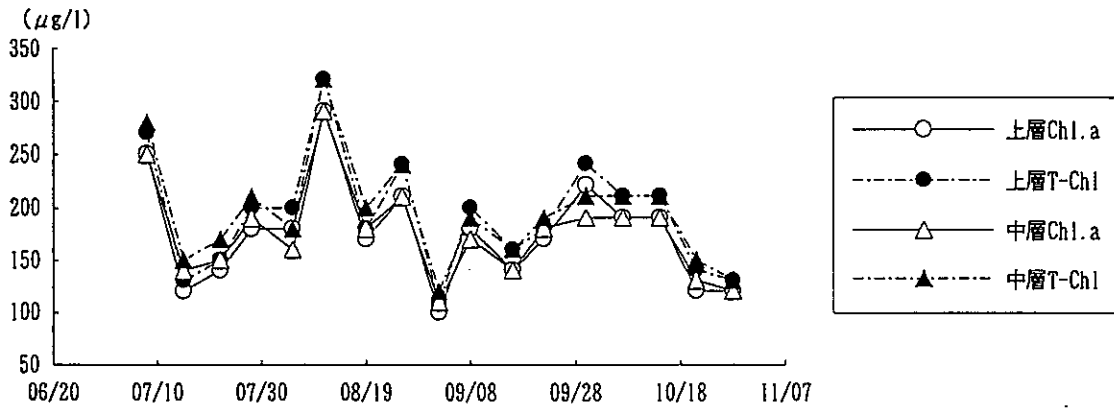
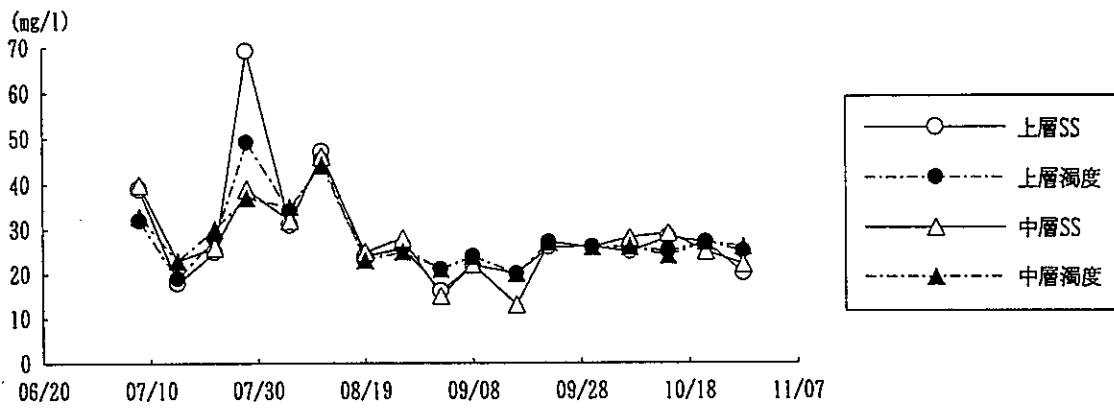
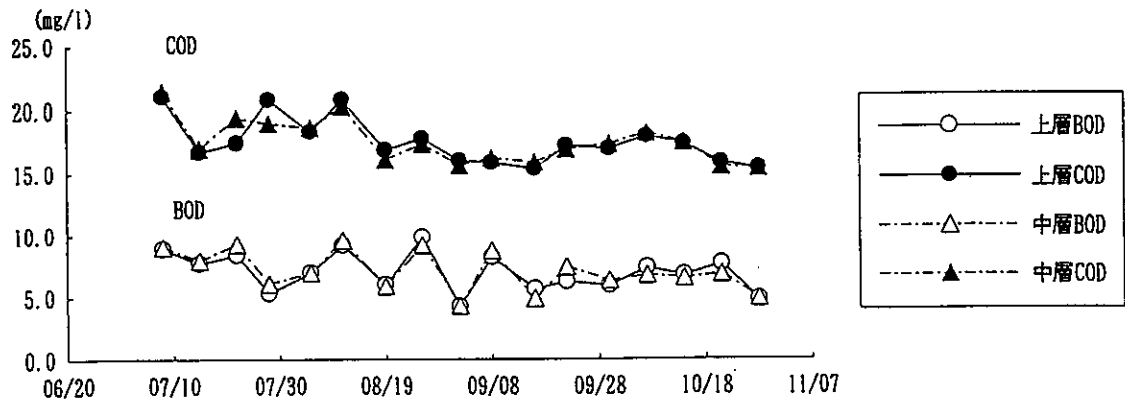


圖-5 主要水質項目變化圖

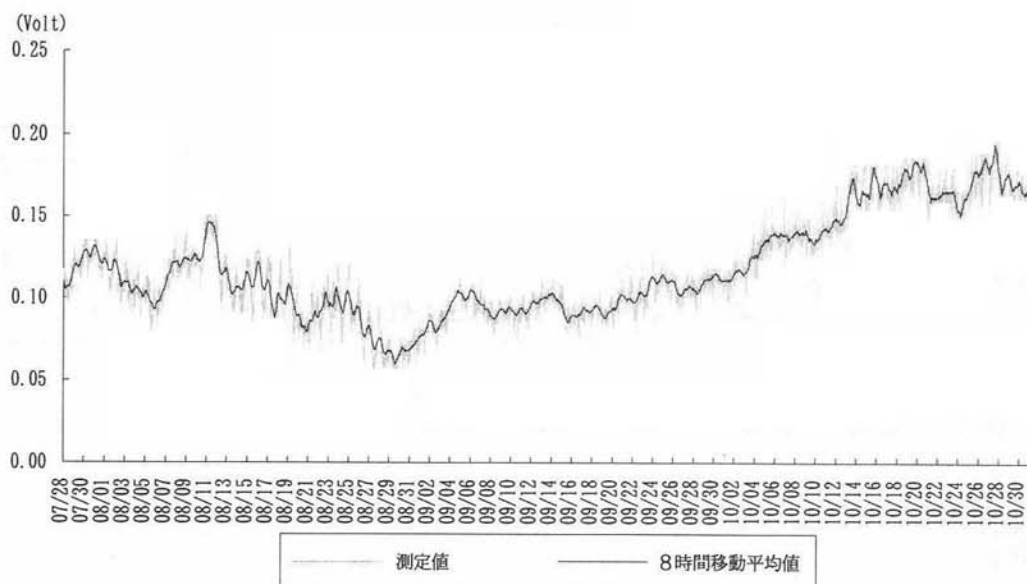


図-6 蛍光光度計による観測結果

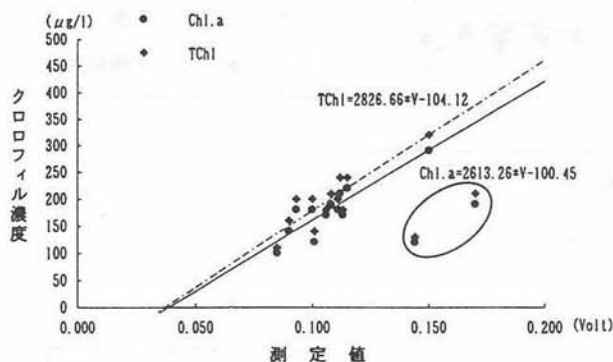


図-7 クロロフィル濃度の換算（観測時データ）

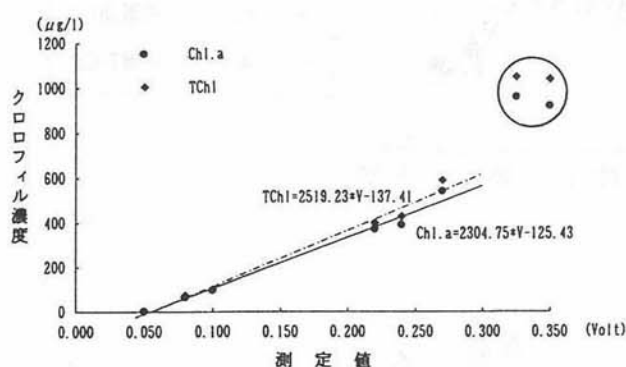


図-8 クロロフィル濃度の換算（検定時データ）

クロロフィル a :

$$\text{Chl. a} = 2613.26 V - 100.45 \quad r = 0.882 - (1)$$

総クロロフィル :

$$T\text{-Chl} = 2826.66 V - 104.12 \quad r = 0.875 - (2)$$

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-8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。

クロロフィル a :

$$\text{Chl. a} = 2304.75 V - 125.43 \quad r = 0.992 - (3)$$

総クロロフィル :

$$T\text{-Chl} = 2519.23 V - 137.41 \quad r = 0.992 - (4)$$

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-9に水温（9月2日より連続測定）と出



図-9 蛍光光度計出力値と水温

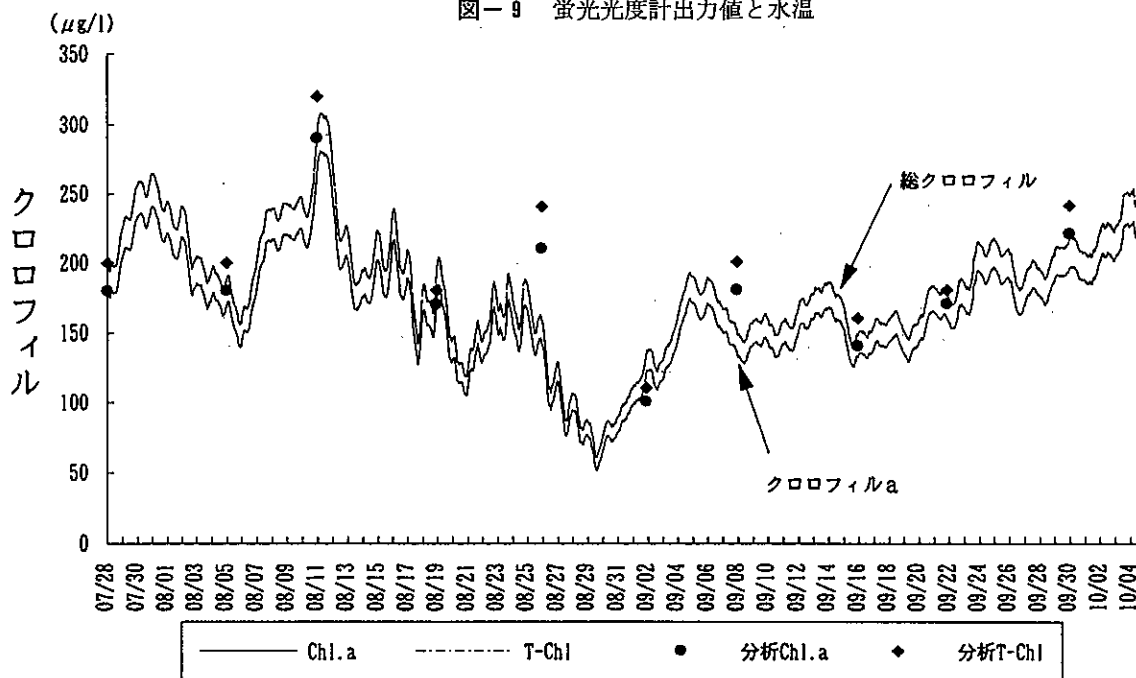


図-10 クロロフィル濃度の換算値

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）は水温が急激に低下する時期に相当しており、藻類増殖が減衰期に入っていることが示されている。そのため、死滅した藻類細胞の分解によって、フェオ色素が増大した可能性が示唆される。ただ、今回はフェオ色素について詳細な調査を行っていないので、定量的な変化については今後の検討課題である。

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-10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-5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

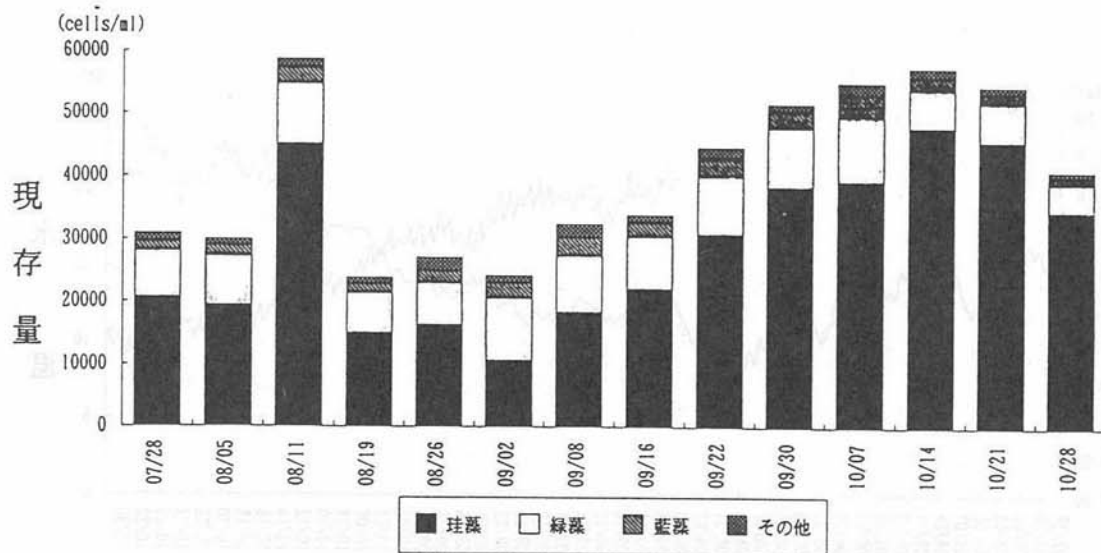


図-11 藻類現存量および組成比（その1）

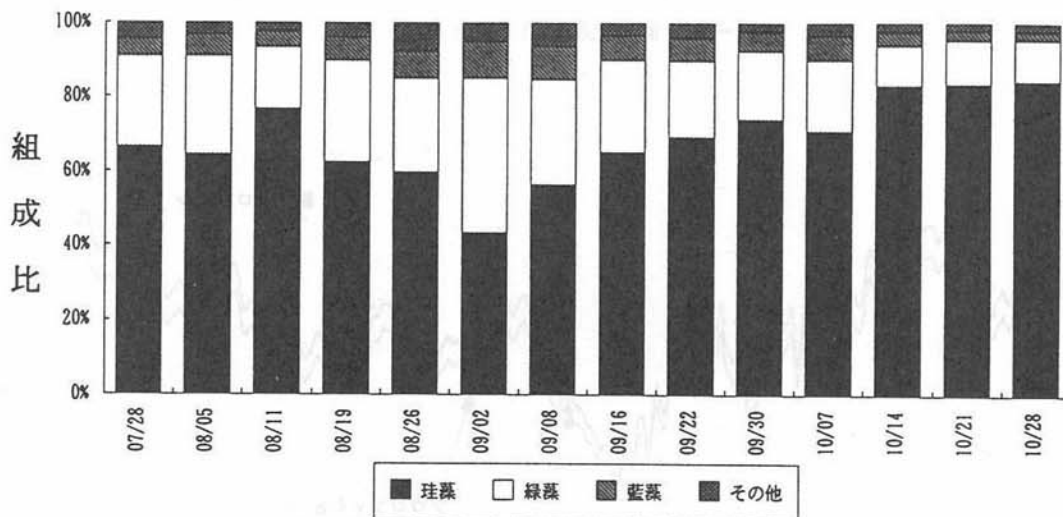


図-12 藻類現存量および組成比（その2）

表-5 測定値と分析値の誤差

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

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-11と図-12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

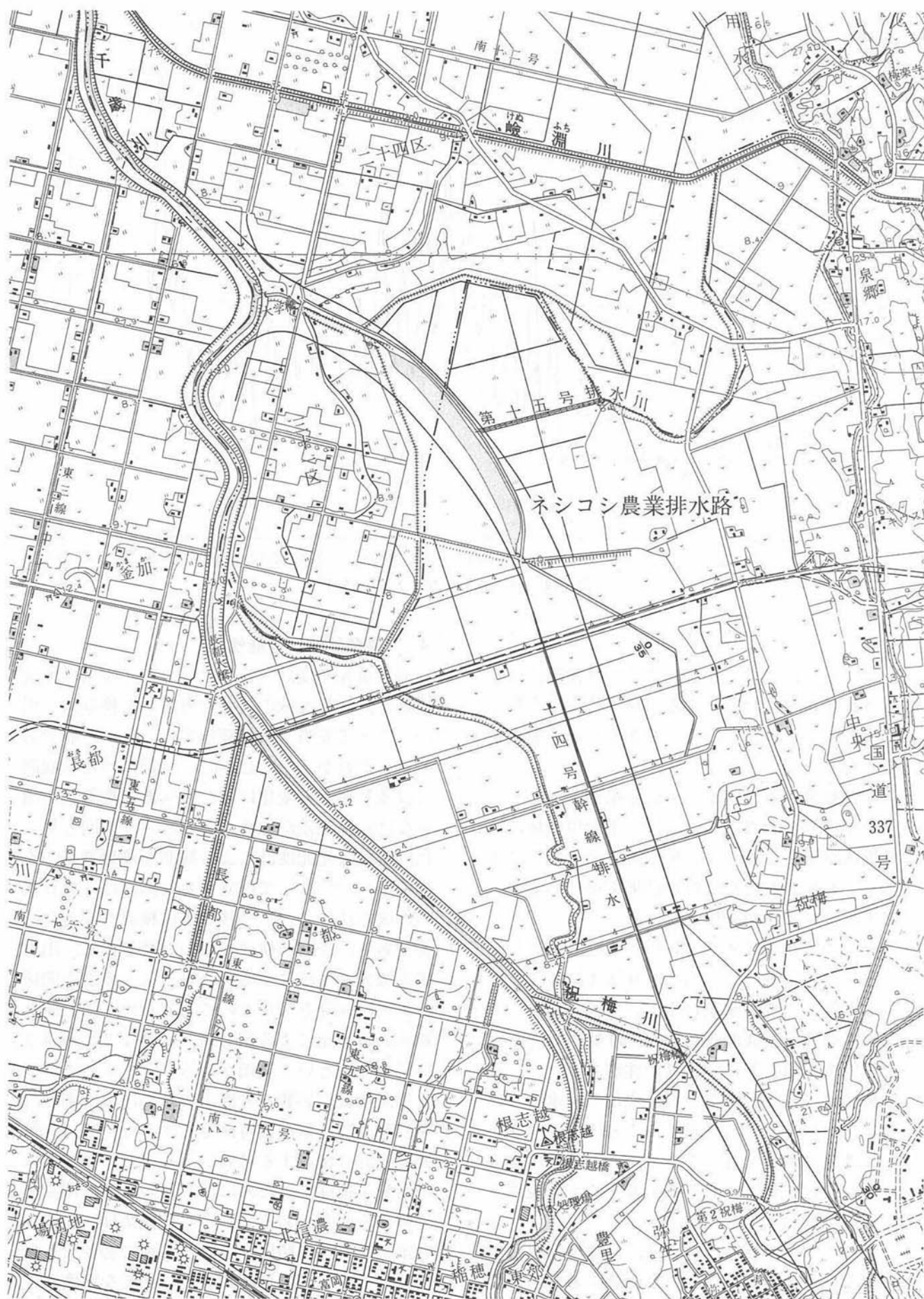


図-13 調査位置図

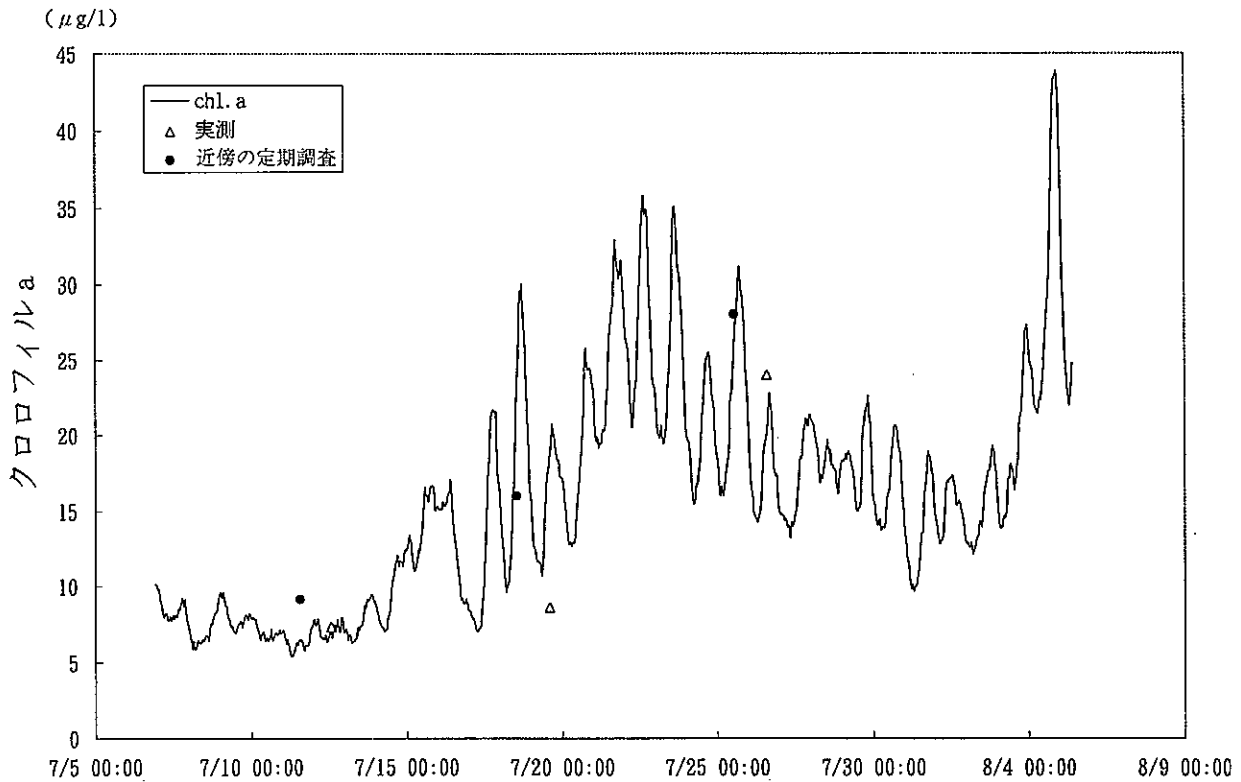


図-14 平成6年度調査の途中経過

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) 結果および考察 (平成6年度分)

今年度分の調査については、千歳川流域の農業排水路であるネシコシ排水路 (図-13) で実施しておりおおむね良好な結果を得ているが、以下のような問題を生じている。

- ①大型の藻類 (アオミドロ) が大量に浮遊しており、測定時にセル内にとり込まれることで蛍光強度に変動が現れやすい (図-14)。
- ②水深が浅く、底泥からの巻上げ物質などが蛍光強度を阻害している可能性がある。
- ③検量線の作成にあたって、現地の試水をプランクトンネットで濾過することでクロロフィル濃度の調整を行っているが大型藻類の混入が検量線の作成に大きな影響を与え、現地の状況を過大評価してしまう。

これらの問題点については、試験地特有のものかあるいは、今後の運用に影響するものか見極めた上で対応を考える必要がある。

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、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

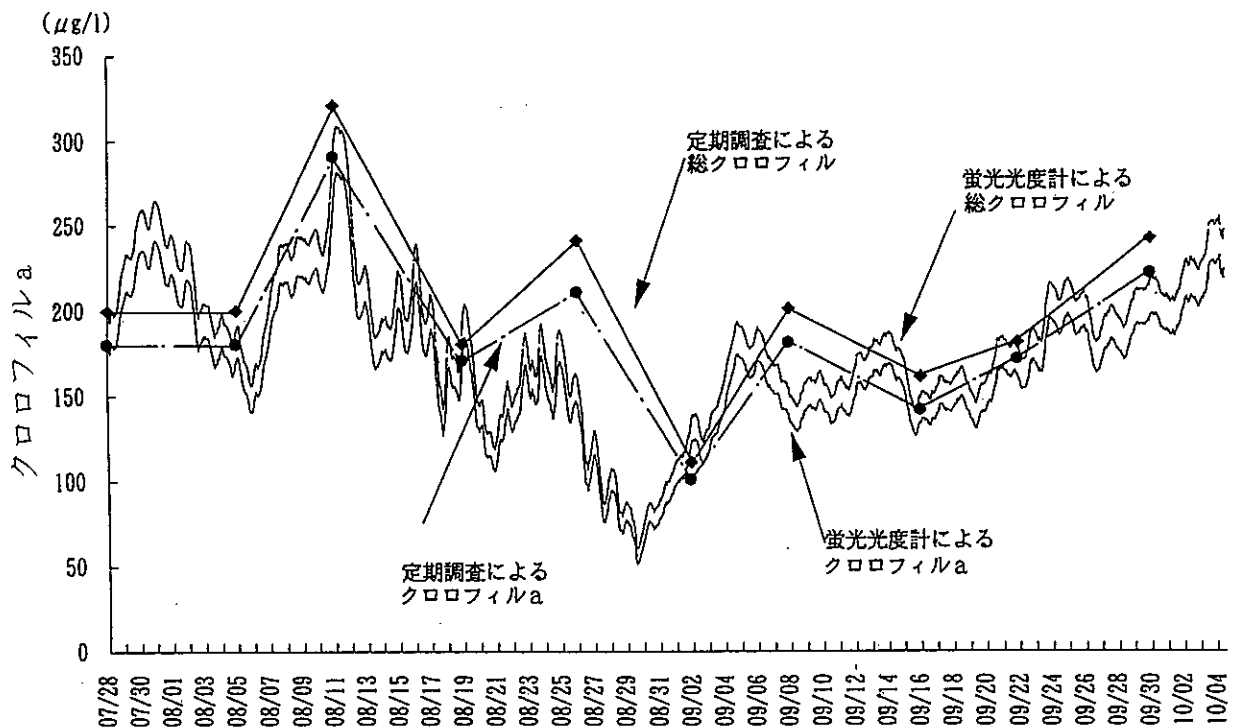


図-15 定期観測および連続観測によるクロロフィル濃度の経時変化

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适当であり、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. 今後の利用方法について

今回用いた蛍光光度計では、対象とする水域のクロロフィル量を化学分析することなく、直接測定することができるという利点がある。

従来より行われている水質監視では、藻類の変動は定期的に行われる採水および水質分析によってその時点のクロロフィル量を把握する方法がとられている。このような監視手法では、月1回程度の測定値を基にその水域の状況判断することになり、測定頻度によっては対象とする水域の藻類増殖を、過小または過大評価する恐れがある。

茨戸川の例を図-15に示すが、藻類量（クロロフィルa）は比較的短時間で大きく変動していることが示されており、ほぼ7日ごとの観測でもその変動をとらえることは困難であった。しかし、蛍光光度計の観測を併用することで、点としてしか得られなかった水質データ（定期調査）を連続データとして利用することが可能となる。このことから、蛍光光度計による観測値は、定期的な水質調査の補助手段として十分な機能を有しており、藻類増殖と環境因子との関係を検討するためその利用価値が増大するものと考えられる。

6. 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生じて

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、比較的良い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の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, 1985.9.

*

*

*