

6. ATPの測定方法の検討

山口慎一, 有賀 紀

I 緒 言

植物プランクトンの現存量の評価のため、クロロフィルの測定が一般的に行われている。これに対し、アデノシン 3 リン酸 (ATP) はクロロフィルと違って植物体だけでなく、すべての生きた細胞中に存在するため、水域の富栄養化の研究を行う上で ATP も重要な指標になりうるものと考えられる。しかし、湖沼水中の ATP の測定方法については、いくつかの報文¹⁾ で検討されているにすぎず、十分、確立されていない。そこで、若干の検討を行ったので報告する。

II 実験方法

1. 試薬

(1). 抽出溶媒

①. トリス緩衝液 (パッカードジャパン製ピコチェックバッファ)

②. グリシン, Mg-EDTA 緩衝液¹⁾

(2). ATP 標準液

アデノシン=5-三リン酸ニナトリウム (和光製) を水で溶解したのち、それぞれの抽出溶媒で希釈する。

(3). ATP 測定用酵素試薬溶液

パッカードジャパン製ピコザイム F を用いてマニュアルどおり作製した。

2. 器具および装置

(1). ATP 測定装置——パッカードジャパン製ルミノメーター

(2). 加熱装置——Water Bath (東洋科学製), 乾燥器 (タバイ製 PS-112)

(3). 抽出用試験管——シバタ製ねじ口試験管 (12×180 mm)

3. 操作

以下の検討結果により確立した測定方法を図-1 に示した。

III 結果と考察

1. 発光温度の影響

ルミノメーターは、クールニクス (ヤマト製) による冷却また、内蔵ヒーターによる加熱が可能である。そこで、温度の発光量に及ぼす影響を図-2 に示した。20度付近で、最高の発光強度を示したため、室温での測定とした。

2. 標準溶液での回収率

抽出溶媒で希釈した標準溶液を湯浴 (95度) で加熱した場合の ATP 回収率を図-3 に示した。トリス, グリシン緩衝

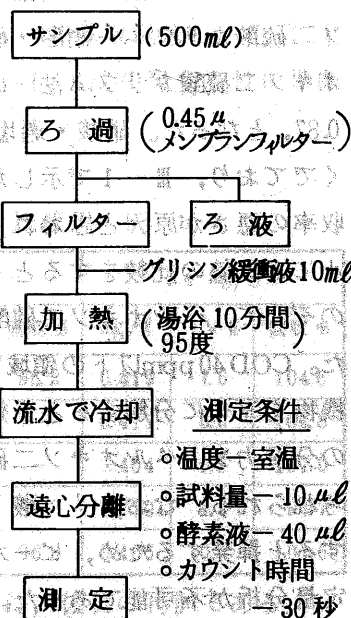


図-1 測定方法

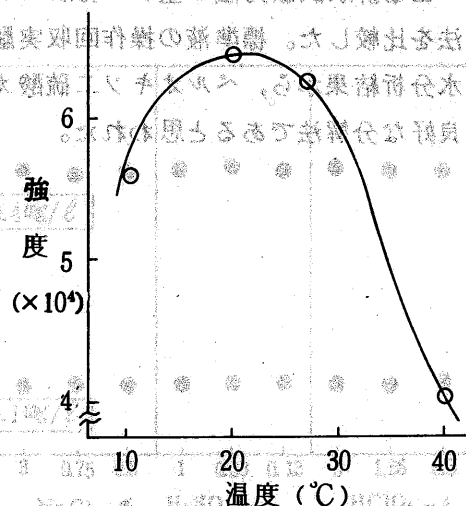


図-2 発光温度の影響

液のいずれも10分以内では分解しないが、これ以上では加水分解しており、その程度はトリス緩衝液の方が大きかった。

3. 抽出溶媒による抽出率（加熱時間5分）

三方湖の湖水を用いてそれぞれの緩衝液で抽出した時の抽出率を比較した結果を発光強度の(%)値で表-1に示した。いずれの温度でも、グリシン緩衝液の方が発光強度が大きく抽出率が良かった。そこで、湖水プランクトンのATP抽出溶媒としては、グリシン緩衝液を用いることとした。

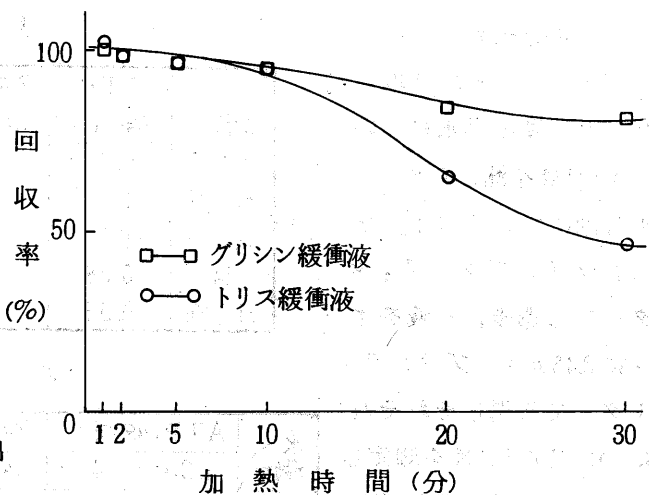


図-3 標準溶液での回収率

表-1 抽出溶媒の比較

($\times 10^5$)

	95度(湯浴)		120度(乾燥器)	
	グリシン	トリス	グリシン	トリス
1	1.57	1.18	0.98	0.28
2	1.67	1.14	0.78	0.33
3	1.83	1.16	0.75	0.28
4	1.71	1.04	0.89	0.36
5	1.74	1.24	0.64	0.36
平均	1.70	1.15	0.81	0.32
cv%	6.2	6.4	16	13

4. 抽出温度の影響（加熱時間10分）

三方湖の湖水を用いて、グリシン緩衝液による抽出における加熱温度の影響を図-4に示した。100度前後が最も抽出率が良好であった。

5. 抽出時間の影響（加熱温度95度）

三方湖の湖水を用いて、グリシン緩衝液による抽出における加熱時間の影響を図-5に示した。10分前後で発光量が最も高く、良好であった。

以上の検討結果により、抽出溶媒としてはグリシン緩衝液を用い、加熱温度95度(湯浴)で10分間、加熱抽出を行うこととした。

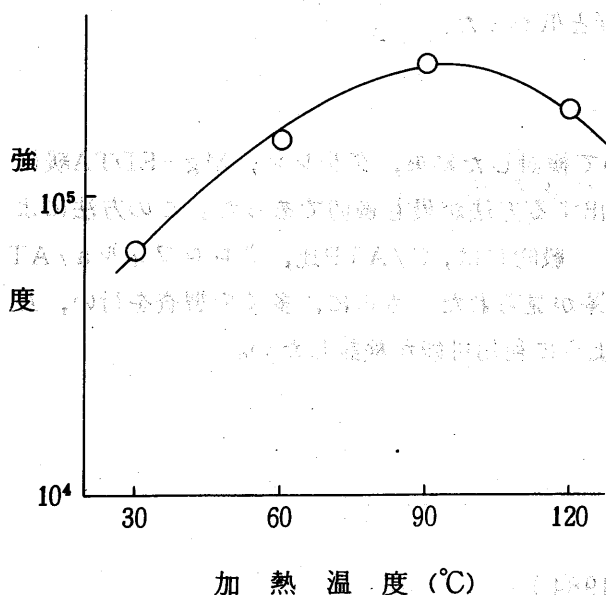


図-4 加熱温度の影響

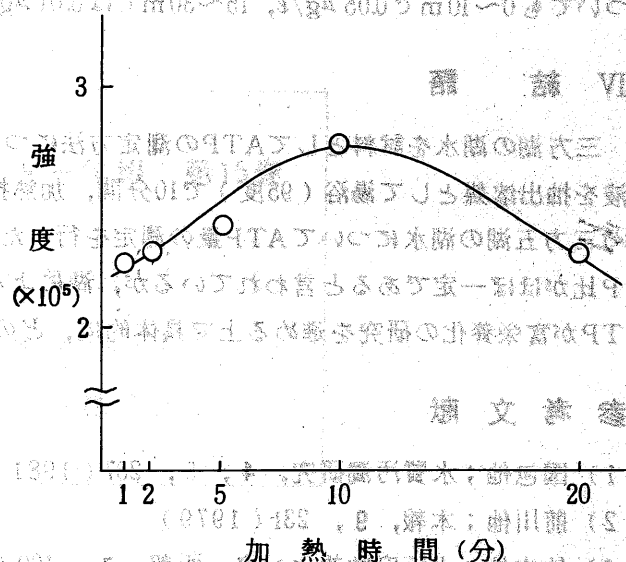


図-5 抽出時間の影響

6. 調査結果

60年11月27日に採取した三方五湖の湖水についてATP量を測定した。水月湖については水深別に1.2 μ メンブランフィルターでろ過後、ろ液をさらに0.45 μ メンブランフィルターでろ過しそれぞれについてATP量を測定した。その結果をそれぞれ表-2、表-3に示した。ここで、炭素(C)の量は北瀉湖、水月湖で測定した懸濁態炭素とSSの割合が、それぞれ27%²⁾

32%であるため30%として算定した。ATP量は各湖により差があるが、0.28~1.2 $\mu\text{g}/\ell$ であり、大阪湾海水での実測値0.06~0.75 $\mu\text{g}/\ell$ ³⁾と同程度である。C/ATP比で見ると久々子、菅、日向湖では280~420であり、一般的に言われている値250~300¹⁾⁴⁾と同程度である。三方湖では、これより大きく、リン欠乏下での藻類の増殖試験での値(2374)¹⁾に近くなっている。このことから、三方湖のプランクトンは、この時期、リン欠乏の状態でないかと推定されるが断定は出来ない。クロロフィルa/ATP比を見ると日向湖では他の湖より、この値が小さく動物プランクトンが多いことを示している。また、三方湖では、この比が他の湖より大きく活性の低いプランクトンが多いためであると思われる。ATP/SS比は生物の種類により異なるが、藻類では0.3~2であり⁵⁾これとほぼ同程度であった。水月湖の垂直分布では0~10mでATP量が0.4~1.2 $\mu\text{g}/\ell$ で表層ほど高く、15~30mでは0.1 $\mu\text{g}/\ell$ とほぼ一定となっている。バクテリア量に関連すると思われる0.45 μ フィルター捕集物についても0~10mで0.05 $\mu\text{g}/\ell$ 、15~30mでは0.01 $\mu\text{g}/\ell$ と低かった。

IV 結 語

三方湖の湖水を試料としてATPの測定方法について検討した結果、グリシン、Mg-EDTA緩衝液を抽出溶媒として湯浴(95度)で10分間、加熱抽出する方法が最も適切であった。この方法により三方五湖の湖水についてATP量の測定を行った。一般的には、C/ATP比、クロロフィルa/ATP比がほぼ一定であると言われているが、湖による差が見られた。さらに、多くの調査を行い、ATPが富栄養化の研究を進める上で具体的に、どのように利用可能か検討したい。

参 考 文 献

- 1) 国包他；水質汚濁研究，4，5，237(1981)
- 2) 前川他；本報，9，231(1979)
- 3) 竹本他；大阪府監視センター所報，7，109(1984)
- 4) 菅原他；国立公害研報告，30，323(1982)
- 5) G・Eグラス(松宮訳)，生物指標実験法(講談社)

表-2 各湖でのATPの比較

湖名	ATP ($\mu\text{g}/\ell$)	クロロフィルa ($\mu\text{g}/\ell$)	SS (mg/ℓ)	ATP/SS ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	C / ATP	クロロフィル ATP
久々子	1.0	4.1	1.0	1.0	300	4.1
水月	1.2	6.3	3.1	0.39	770	5.2
三方	1.1	18	11	0.10	3000	16
菅	0.28	2.0	0.4	0.70	420	7.1
日向	0.53	0.6	0.5	1.0	280	1.1

表-3 水月湖におけるATP

水深(m)	ATP($\mu\text{g}/\ell$)		クロロフィルa ($\mu\text{g}/\ell$)	SS (mg/ℓ)	ATP/SS ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	C / ATP	クロロフィル ATP
	1.2 μ	0.45 μ					
0	1.2	0.03	6.3	3.1	0.39	770	5.2
5	0.84	0.05	6.8	1.3	0.68	430	8.0
10	0.41	0.03	1.9	0.5	0.88	340	4.6
15	0.09	<0.01	—	—	—	—	—
20	0.12	<0.01	—	—	—	—	—
25	0.12	0.01	—	—	—	—	—
30	0.09	<0.01	—	—	—	—	—

福井県公害センター年報 第15巻

発 行 昭和61年10月

発行所 福井県公害センター

印 刷 白崎印刷株式会社