

## 〈研究発表〉

### 多波長励起蛍光光度計の開発

吉田 光男, 長澤 泰宏

JFEアドバンテック株式会社 商品技術開発センター 商品技術開発部 神戸センサー開発グループ  
(〒651-2242 神戸市西区井吹台東町7丁目2番3, E-mail: m-yoshida@jfe-advantech.co.jp)

#### 概要

植物プランクトンの種組成測定は、赤潮による漁業被害や生態系監視に不可欠である。種組成測定として歴史的な手段は顕微鏡観察であるが、測定に多大な時間と技術を要する。そこで、種組成を時空間的高密度に測定する技術が要求されている。多波長励起蛍光光度計は、植物プランクトン群集の蛍光励起スペクトルを測定する現場観測型装置である。測定結果は重回帰分析により種組成推定に応用できる。本開発では、海洋から湖沼、ダムにわたる観測環境を想定し、測定に影響を与える環境因子への対策を行った。本稿では測定の実理と性能を示す。

キーワード: 蛍光光度計, 蛍光励起スペクトル, 植物プランクトン, 有害藻類ブルーム

#### 1. はじめに

植物プランクトンの現存量や種組成の測定は、水質や生態系保全の観点から重要である。特に、沿岸や内湾において、富栄養化に伴う赤潮発生による漁業被害や、これらが生成する毒素の生態系へ与える影響が顕在化してきている。赤潮を形成する種は水域や季節によって異なり、生成毒素は種に依存する。そのため、これらの水域においては種組成観測が普遍的に実施されている。クロロフィル a (以下, Chl-a) 濃度は、植物プランクトン現存量の指標として利用されており<sup>1)</sup>, Chl-a 蛍光を自動観測する Chl-a 蛍光光度計は、植物プランクトン現存量の時空間的高密度観測に貢献している。しかし、Chl-a 蛍光光度計は、励起効率の高い波長域である青色単一光源を使って、全植物プランクトン種共通の赤色発光特性である Chl-a 蛍光を測定する装置であるため、種の識別、種毎の現存量推定に応用できない。種組成測定として、歴史的かつ有効な手段は顕微鏡を用いた観察手法である。しかし、試料採取から測定までに多大な時間を要し、測定結果も観察者の技能に依存する。そのため、顕微鏡観察では、時空間変動の大きい種組成変化に相応しい密度での観測は難しい。そこで、種組成の時空間的変動を高密度測定する現場観測技術の開発が求められている。

植物プランクトンは種毎に色素組成が異なるので、色素組成によって種を同定することができる<sup>2)</sup>。しかし、水中で色素組成を直接測定することはできない。植物プランクトンの光学特性は色素組成に依存する。したがって、光学特性を測定することで、色素組成を間接的に測定し、種組成の推定が可能である。植物プランクトンの色素組成は光吸収特性および蛍光励起特

性に現れる。現場観測において、光吸収特性は、水、溶存有機物、懸濁物の吸収成分が加算されているため、純粋な植物プランクトンの吸収特性を直接測定できない。一方、蛍光励起特性は、植物プランクトンが 680nm 付近に特異的な蛍光発光特性をもつため、他の水中懸濁物や溶存物質の蛍光と容易に区別することができる。したがって、水中の植物プランクトンの光学特性の測定手段として、蛍光励起スペクトルの測定が有効である<sup>3,4)</sup>。

多波長励起蛍光光度計 (Fig. 1) は、植物プランクトンの蛍光励起スペクトルを測定する現場観測型装置である。本装置は、蛍光励起スペクトルを測定することによって、植物プランクトンの現存量だけでなく、種組成も観測することを目的としている。本装置が想定する観測環境は、海洋の希薄な植物プランクトン群集から湖沼の濃密な植物プランクトン群集である。そのため、海洋では高感度性能が要求され、湖沼では懸濁粒子または植物プランクトン自身による反射光の影響に対する対策が技術的課題である。本稿では、本装置の測定システム概要、感度性能、反射光の影響に対する測定性能を示す。また、本装置の応用として、植物プランクトンの種組成推定例を示す。

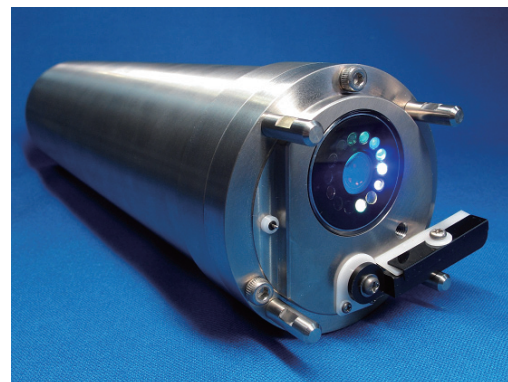


Fig. 1: Appearance of the Multi-Exciter.

## 2. 測定システムの概要

植物プランクトンは、一般的に 680nm 周辺に特徴的な赤色蛍光を示すため、本装置は、610nm 以下の励起光によって励起された 640nm から 1100nm までの蛍光を検出するように設計されている。励起波長領域と受光波長領域は光学フィルタによって分離されている。受光素子はフォトダイオードを使用している。また、励起光源は、中心波長の異なる 9 種類の LED を使用している。各 LED の中心波長は、375, 400, 420, 435, 470, 505, 525, 570, 590nm である。各波長は、610nm 以下の領域に現れる光合成色素の吸収極大を考慮して選択している。Fig. 2 は、各 LED の発光特性と光学フィルタの光学特性、検出する Chl-a 蛍光を示している。

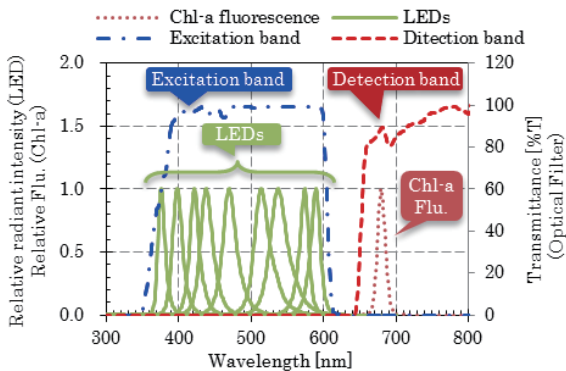


Fig. 2: Spectral distributions of the nine LEDs and characteristics of the optical filters.

また、本装置には、水温、深度、濁度センサーが付属している。深度情報は鉛直プロファイル観測に利用でき、濁度情報は蛍光励起スペクトル測定結果の質を確認することに利用できる。さらに、生物付着防止のため機械式ワイパーを備えており、全観測期間において、安定かつ正確なデータ観測が可能である。

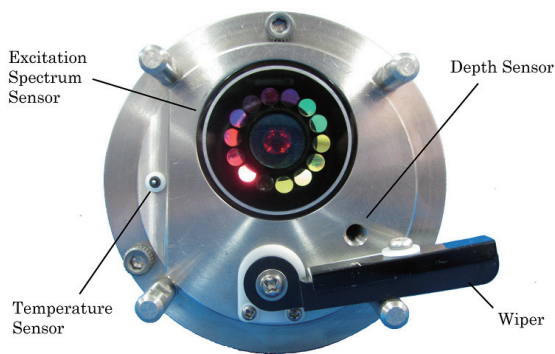


Fig. 3: Positions of the excitation spectrum sensor, the depth sensor, the temperature sensor and the mechanical wiper.

## 3. 測定性能

### 3.1 Chl-a 濃度に対する応答

Fig. 4 は、Chl-a 濃度に対する本装置の応答を検証した結果である。検証には、試料として珪藻 (*Cheateceros* sp.) を使用した。2 L の濾過海水に珪藻を混ぜ、本装置の出力を測定する。また、その時の試料の Chl-a 濃度を蛍光定量法で分析する。この操作を、試料希釈を繰り返して実施した。Fig. 4 より、Chl-a 濃度 0.1 $\mu$ g/l 以下においても、本装置は直線性を有して出力が得られている。

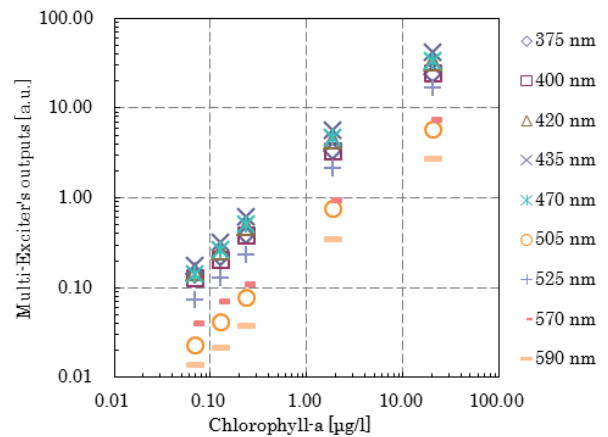


Fig. 4: Responses to Chl-a concentration.

### 3.2 懸濁物質による反射光の影響

Fig. 5 は、懸濁物質による反射光の影響を検証した結果を示している。検証には、試料としてカオリンを使用し、濃度を変えて本装置の出力を測定した。なお、濁度は濁度計を用いて測定している。Fig. 5 より、109FTU における本装置の誤出力は 0.6%以下と評価できる。

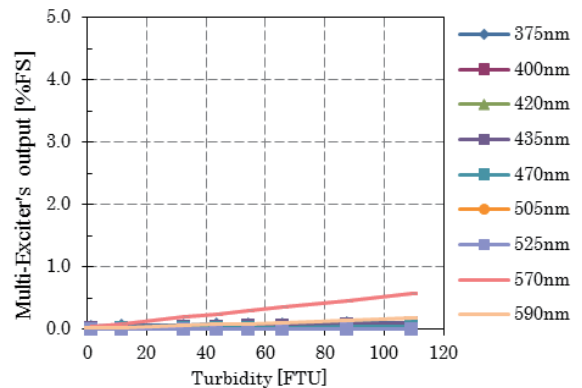


Fig. 5: Responses to suspended solids.

#### 4. 種組成推定への応用

3種類の植物プランクトン混合試料を用いて本装置の種組成推定性能を評価した。種組成推定のためには、各植物プランクトン種の基本スペクトル情報を準備する必要がある。基本スペクトルは、本装置で測定した単一種の植物プランクトンの蛍光励起スペクトルを、測定時試料の Chl-a 濃度で正規化したものである。本評価では、珪藻 (*Cheatoceros* sp.)、緑藻 (*Nanochloropsis* sp.)、藍藻 (*Microcystis* sp.) を使用した。各試料の基本スペクトルを Fig. 6 に示す。なお、Fig. 6 において、珪藻と緑藻は 435nm で正規化されており、藍藻は 570nm で正規化されている。

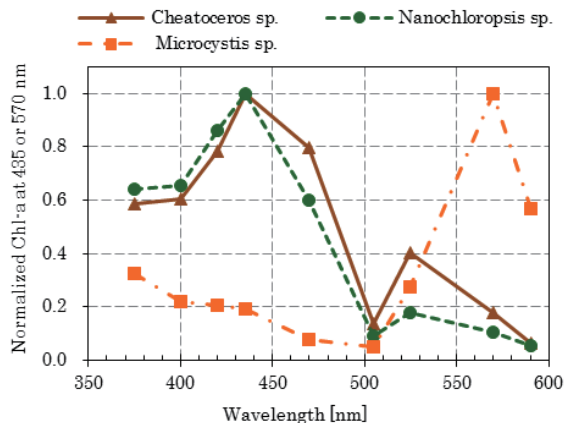


Fig. 6: Specific spectra of phytoplankton.

蛍光定量法により Chl-a 濃度が分かっている各試料の混合比を変えた混合試料を本装置で測定し、測定された蛍光励起スペクトルと基本スペクトルを用いて、重回帰分析により種組成を推定する。なお、実際の濃度比は Chl-a 濃度と混合比から計算して求めている。Fig. 7 は、本装置により推定された各プランクトン種の濃度比と実際の濃度比を示している。各混合比において推定値は 6% 以下の誤差で一致している。

#### 5. おわりに

多波長励起蛍光光度計は、植物プランクトンが有する色素組成に依存して変動する蛍光励起スペクトルを、色素抽出等の前処理も無く、水中で直接自動連続測定することができる。測定された蛍光励起スペクトルは、種によって異なる色素組成によって変動することから逆問題的に植物プランクトン種組成の推定が可能であり、種組成分析の現場実時間観測を提供することができる。従来の顕微鏡観察による種組成測定では、大量試料処理は不可能であり、連続的、高頻度な種組成変

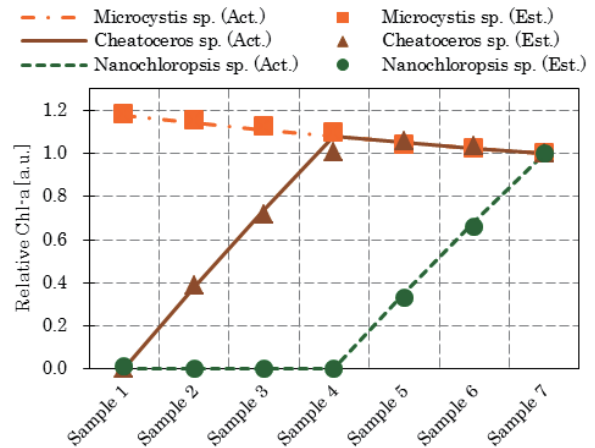


Fig. 7: Estimates of the phytoplankton composition for mixed culture samples. Dots indicate the estimated chlorophyll-a relative concentrations, and dashed lines represent the actual chlorophyll-a relative concentrations.

化を観測することはできなかった。本装置はこの問題を克服し、種組成の時空間的な高密度測定の一助となるであろう。

本稿で明らかにした高感度性能は、植物プランクトン濃度が希薄な外洋域で、本装置が十分使用可能であることを示す。また、特異な植物プランクトン種の発生初期段階に現れる微弱な蛍光励起スペクトル変化を検知でき、種組成変化の監視、予測の効果および効率を高めることができる。さらに、蛍光測定において雑音となる植物プランクトンを含む水中懸濁物質による光散乱や反射の影響を低減した本装置の機構は、懸濁物質濃度が高い湖沼やダムでの測定を可能とし、幅広い用途、環境での植物プランクトン種組成測定に貢献することができる。

#### 参考文献

- 1) C. J. Lorenzen: A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration, Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts, Vol. 13, No.2, pp.223-227, (1966)
- 2) S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, and S. W. Wright, Eds.: Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods, Paris: UNESCO, (1997)
- 3) C. S. Yentsch and C. M. Yentsch: Fluorescence spectral signatures: the characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra, J. Mar. Res., Vol.37, pp.471-483, (1979)
- 4) C. S. Yentsch and D. A. Phinney: Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations, J. Plankton Res., Vol.7, No.5, pp.617-632, (1985)