

藻類組成の推定を目的とした多波長励起蛍光光度計の活用

鹿児島大学 学生会員 川内康平 正会員 安達貴浩 小橋乃子

1. はじめに 多波長励起蛍光光度計(JFE アドバンテック社製 Multi-Exciter、以降 MEX と呼ぶ)は、植物プランクトングループ推定のために開発された計測機器であり、9 つの異なる波長の光源で植物プランクトンを励起し、励起蛍光スペクトルを計測する。得られた励起蛍光スペクトルから植物プランクトン組成を推定するためには、グループ毎に基準となるスペクトル(以降、基準スペクトル)が必要となるが、著者らは、現場試水から基準スペクトルを作成する手法を提案し、珪藻・緑藻分画、藍藻分画、微小植物プランクトン分画、CDOM 分画の推定において、比較的良好な結果を得ている¹⁾³⁾。ところで、蛍光物質は一般に温度の上昇とともに放射する蛍光強度が減少すること²⁾が知られているが、これまでの計測において、水温補正等は実施していなかった。このため、本研究では現場試水から MEX の水温補正が可能かどうかを検討した後、測定水温がプランクトン組成の推定値に及ぼす影響を調べた。次に、藍藻類の早期検出を目的として、MEX による藍藻類の検出限界を調べる実験を行った。

2. MEX による植物プランクトン組成の推定式 植物プランクトンはグループ毎に特徴的な光合成色素をもつため、励起蛍光スペクトルにもその影響が反映される。このため、適切な基準スペクトルを設定することで、励起蛍光スペクトルから植物プランクトンの分類群を推定することが可能となる。具体的には以下の式が用いられる。

$$Fl_i = \sum_{j=1}^n S_{ij} C_j \quad (i=1\sim 9) \quad \text{ただし、} C_j \geq 0 \quad (1)$$

ここで、 i : 光源の番号、 Fl_i : MEX による蛍光の実測値、 n : 基準スペクトルの総数、 S_{ij} : Chl- a で規格化した基準スペクトル、 C_j : j 番目の植物プランクトングループの Chl- a 分画である。なお、基準スペクトル(S_{ij})は、3 種の植物プランクトングループ($n=3$: 珪藻グループ、緑藻グループ、藍藻グループ: デフォルト)と、微小植物プランクトン分画(以下、Chl- a -S)、CDOM 分画を与えた。推定方法の詳細は、小橋・安達(2019)¹⁾を参照のこと。

3. 水温補正の必要性の検討 著者らは、鹿児島県鶴田ダム貯水池(大鶴湖)において MEX を用いた調査を実施しているが、作業の都合上、分析室に試水を持ち帰って基準スペクトルを作成していた。その結果、基準スペクトル測定時の水温と現場水温が大きく異なる場合があったため、基準スペクトルの水温補正の必要性について検討した。

3.1 水温補正係数の推定 2021 年 7 月から 10 月にかけて大鶴湖の複数点で採取した表層水を用い、水温補正の必要性とその実施可能性を検討した。具体的には、冷蔵保存した試水(水温約 15°C)を黒いバケツに入れ、暗条件の下、水温が室温と一致するまで MEX で計測を行った。MEX の 9 つの光源毎に水温と蛍光値の関係を調べたが、ここでは結果の一例として、光源波長 375nm と 570nm の結果について示す(図-1)。なお、各データの Fl は 28°C の Fl で規格化されている。図-1 より、観測日や観測地点が異なっても、水温で規格化した Fl_i の挙動は比較的一致していることが確認できた。ただし、いずれの光源でも、20°C 以下ではばらつきが大きいこと、光源の波長が大きくなる程水温に対する変化が大きくなり、光源の波長によって変化特性が異なることが示された。このようにばらつきが大きい結果も含まれていたが、第 1 近似としてこれらの観測結果から温度補正を行うこととし、9 つの光源に対応した近似直線の傾きから水温補正係数 ρ_i を決定した。使用した温度補正式を以下に示す。

$$Fl_{ir} = Fl_i / [1 + \rho_i (T_m - T_r)] \quad (2)$$

ここで、 Fl_{ir} : 補正後の蛍光値、 Fl_i : 蛍光の実測値、 T_m : 計測水温、 T_r : 補正水温、 ρ_i : 水温補正係数である。

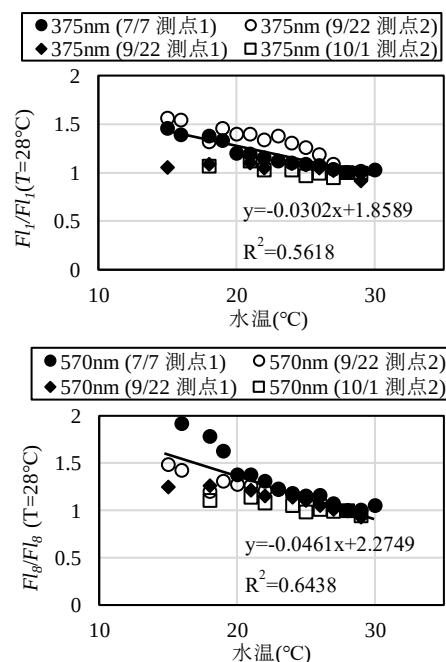


図-1 蛍光値の温度変化
(上図: 375nm, 下図: 570nm)

3.2 Chl-*a*-S の再推定 以上の結果を用いて、基準スペクトルの水温補正を行った。ここでは、補正した水温差が最大であった 2018 年 7 月の基準スペクトルについて、水温補正の有無による相違を比較した(図-2)。ちなみに、補正した水温差は約 14℃であったが、基準スペクトルとしての形状は、それ程大きな差は見られなかった。このような水温補正を複数の観測データに対して行い、Chl-*a*-S の再推定を行った(図-3)。この結果、水温補正を行っても Chl-*a*-S の推定結果に大きな変化は見られなかった。以上の結果から判断すると、基準スペクトルの作成において、状況によっては水温補正が必要とは言えないが、蛍光値は水温変化に敏感であるため、できるだけ現場の水温に近い状態での基準スペクトルを作成することが望ましいと言える。

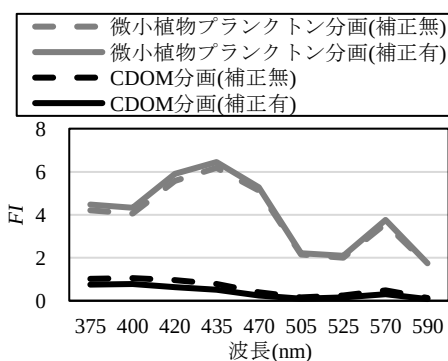


図-2 補正の有無による基準スペクトルの違い(2018/7/24)

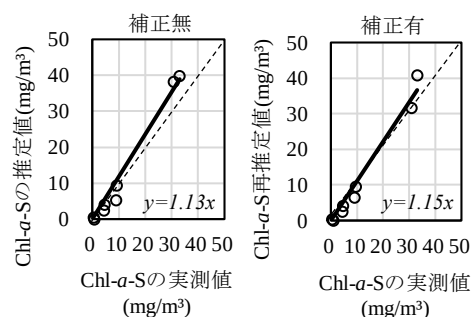


図-3 補正の有無による Chl-*a*-S の推定値の比較

4. 藍藻類の検出限界 MEX の活用事例の一つとして、アオコの早期検出が挙げられるため、次に藍藻類の検出限界を調べる実験を行った。

4.1 実験方法 2021 年 10 月大鶴湖表層で採取した *Microcystis aeruginosa* を含む試水から、50 μm のフィルターを通過した液を取り除くことでアオコの濃縮液を作成した。その後、更に 0.2 μm のフィルターでろ過したろ液を希釈液とし、希釈なしから 32 倍まで希釈を行い MEX で計測を行った。なお、希釈なしに相当する濃縮液の優占植物プランクトンは緑藻であり、藍藻は細胞数の割合で見ると約 4 割に相当する 13,400 cells/ml (群体系数 90/ml) であった(図-5 左図参照)。また、今回使用した基準スペクトルは、デフォルトの珪藻、緑藻、藍藻グループと現場試水から作成した微小植物プランクトン分画、CDOM 分画の計 5 つの基準スペクトルであり、これらを用いて各植物プランクトングループの推定を行った。

4.2 実験結果 藍藻類の推定値と設定値の比較を図-4 に示す。ここで、設定値とは、希釈なしの FI を希釈倍率ごとに単純に除した値である。図-4 より、藍藻類の細胞密度が最も低い 32 倍希釈(394 cells/ml : 2~3 群体/ml に相当)まで藍藻類が検出されており、本実験で設定した条件では検出限界の把握までには至らなかった。絶対値の推定精度については、2 倍希釈の結果がややずれているものの、良好な結果が得られた。また、他の分画(珪藻・緑藻、Chl-*a*-S、CDOM)についても同様に良好な推定結果が得られている。更に、濃縮液に対して推定された珪藻・緑藻・藍藻類の Chl-*a* 分画の割合と、顕鏡結果から得られた細胞数割合とを比較した(図-5)。珪藻と緑藻グループの割合が実測と異なっているが、既往の研究成果からも、両者の区別化は困難であることが報告されている³⁾。このため、珪藻と緑藻を 1 つのグループとして見なすと、従来と同様に比較的良好な推定結果が得られていることが分かる。

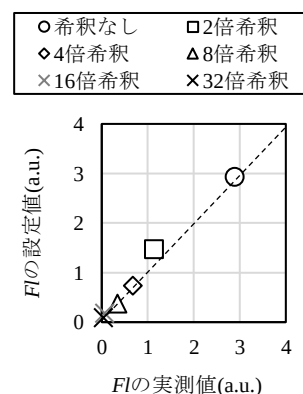


図-4 藍藻類検出限界実験の結果

5. 結論 本研究で使用したサンプルでは、MEX の測定において、水温補正をしても推定精度の向上は見られなかったが、水温による蛍光強度の変化が確認され、基準スペクトル作成における水温補正の重要性が示唆された。また、藍藻類の検出限界実験により、藍藻類の細胞数が低い状態(細胞数 130~200 程度の小型の群体が 1ml 中 2~3 個存在)であっても MEX で検出可能であることが示された。

参考文献 1) 小橋乃子・安達貴浩, 土木学会論文集 B2, Vol.75, No.2, pp.1255-1260, 2019, 2) 西川泰治・平木敬三「蛍光・りん光分析法」 共立出版, 1984, 3) 黒木ら, 土木学会西部支部研究発表会講演概要集, pp.209-210, 2020

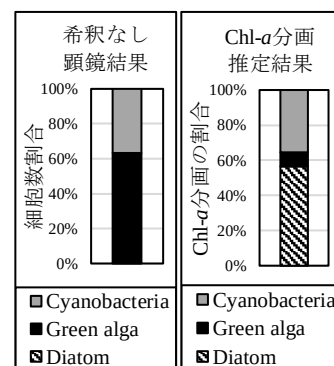


図-5 細胞数割合の比較
(左図：顕鏡結果
右図：推定結果)