

ワークショップ報告

「植物プランクトン光吸収スペクトル測定法の検討」

—測定プロトコルの作成—

平譚 享¹・鈴木光次²・岸野元彰³・古谷 研⁴・田口 哲⁵・齊藤誠一⁶・才野敏郎²

¹ 国立極地研究所南極圏環境モニタリング研究センター 〒173-8515 板橋区加賀1-9-10

² 名古屋大学大気水圏科学研究所物質循環部門 464-8601 名古屋市千種区不老町

³ 理化学研究所光合成科学研究室 351-0198 和光市広沢2-1

⁴ 東京大学大学院農学生命科学研究科 113-8657 文京区弥生1-1-1

⁵ 創価大学工学部生物工学科 192-8577 八王子市丹木町1-236

⁶ 北海道大学水産学部水産海洋科学科 041-0821 函館市港町3-1-1

E-mail: hirawake@nipr.ac.jp; kojis@ihas.nagoya-u.ac.jp; kishino@postman.riken.go.jp; furuya@fs.a.u-tokyo.ac.jp;

staguchi@t.soka.ac.jp; ssaitoh@salmon.fish.hokudai.ac.jp; tsaino@ihas.nagoya-u.ac.jp

1. はじめに

海水の水分子、植物プランクトン、植物プランクトン以外の懸濁物、溶存有機物の吸収係数と散乱係数は、海水の光学場を決定づける海水固有の光学的性質である。この中で植物プランクトンの光吸収係数は、植物プランクトンに吸収された光エネルギー量（光合成有効放射）を規定する。このため、植物プランクトンの光吸収係数は、植物プランクトンの光合成の光利用効率を評価したり、海色リモートセンシングなどから得た光学情報から基礎生産を見積もる場合に必要不可欠である。

植物プランクトンの光吸収係数の測定方法はオパールグラス法 (Shibata et al., 1954) が世界中で現在最も多く利用されており、我が国でもこれが一般的である。幾つかの大学や研究所において、この方法による測定が進められてきたが、測定法が必ずしも統一されていないため、研究者間の測定値の相互比較が困難な場合が少なからず生じている。また、精度に問題のあるデータも若干見受けられる。これらの問題を解決するために、現在までに日本において植物プランクトンの光吸収係数測定を中心に、第1回光吸収係数ワークショップを名古屋大学大気水圏科学研究所、第2回を東京大学海洋研究所大槌臨海研究センターで行い、問題点の把握と解明に努めてきた (岸野ら, 1996)。しかし、依然として測定法に関する問題が幾つか残され、ワークショップ参加者間でも測定法についてのコンセンサスが得られていなかった。このため、1999年5月に、未解決問題の一つであるオパールグラス法における植物色素の抽出法または漂白法の条件設定、そして光吸収係数測定法のプロトコル作成を中心に検討をおこなうワークショップを開催した。ここではその成果について報告する。

2. 材料および方法

2-1 ワークショップ

1999年5月24日から28日まで、東京大学海洋研究所

大槌臨海研究センターにおいて、吸収係数測定法ワークショップ (第3回) を開催した。大学、研究所等から23名が参加した (Table 1)。

2-2 分光光度計

実験に使用した分光光度計は Beckman 製 DU-640, Shimadzu 製 UV-2500PC および Shimadzu 製 MPS-2400 の3種類である。DU-640はサイドオン型フォトダイオード、UV-2500PCは光電子増倍管および積分球アタッチメント、MPS-2400はエンドオン型光電子増倍管を備えている。

2-3 対照用試料

植物プランクトンの光吸収係数を測定する際、対照用試料としての Whatman 製 GF/F グラスファイバーフィルターは未知フィルター試料と同程度の量の濾過海水 (GF/F

Table 1. Participants in the 3rd workshop.

所 属	参 加 者
北海道大学	齋藤誠一, 工藤 勲, 佐々木宏明, 吉田 貫
創価大学	田口 哲, 桑原ビクター, 藤木徹一, 古原慎一, 大井信明, 山根信明
東京大学	古谷 研, 林 雅人, 吉川 尚, 縄 弘之
理化学研究所	岸野元彰
名古屋大学	鈴木光次, 南 千絵
極地研究所	平譚 享
東京水産大学	鶴村 節
東海大学	田中昭彦
JAMSTEC	松本和彦
(株) KANSO	播本孝史
(株) CT&C	柏 俊行

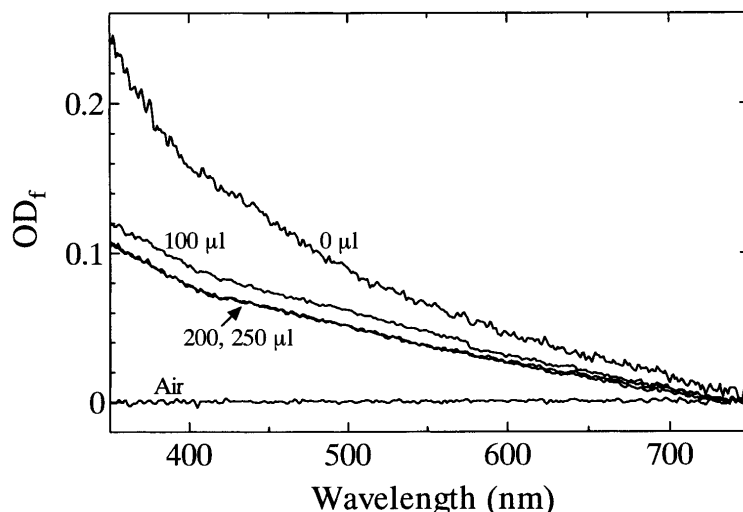


Fig. 1. Absorption spectrum of blank filter with filtered seawater. Reference is air.

で濾過したもの)を含んでいることが望ましいが、測定を繰り返すことにより対照用試料は乾燥し、ベースラインが変化する。対照用試料に滴下する適切な濾過海水量を把握するため、GF/Fフィルターに滴下した濾過海水の量とその吸光度 (OD_f) の関係を調べた。この際、分光光度計の対照側試料ホルダーには何も置かず測定を行った (空気を対照試料とした)。

2-4 植物色素の抽出法・漂白法の検討

植物色素の抽出法および漂白法の検討を行うため、植物プランクトン培養株 *Synechococcus* sp. (ラン藻類) および現場海水を試料として用いた。この際、現場海水は実験当日に大槌湾の湾軸中央付近において採水バケツにより採取した。培養植物プランクトンサンプル 40 ml および現場海水サンプル 500 ml を直径 25 mm GF/F グラスファイバーフィルターで濾過した。

得られたフィルター試料を分光光度計にセットし、その吸光度を測定した (OD_{fp})。走査波長は 350~750 nm、スリット幅は DU-640 の場合、 <1.8 nm、UV-2500PC の場合 5.0 nm、MPS-2400 の場合 2.0 nm とした。この際、対照用試料として 250 μ l の濾過海水 (後述) を含んだ GF/F フィルターを用いた。 OD_{fp} 測定後、植物色素以外の吸光度 (OD_{fd}) を測定するために、3 種類の手法を用いて試料中の植物色素を抽出または漂白した。3 種類の手法は (1) メタノールによる抽出法 (Kishino et al., 1985), (2) メタノール抽出後に温水によってフィコピリタンパク質を抽出する方法 (Culver and Perry, 1999) および (3) 次亜塩素酸ナトリウムによる漂白法 (Tassan and Ferrari, 1995) である。それぞれの抽出および漂白法の詳細は以下の通りである。

(1) メタノール抽出法

OD_{fp} を測定した後のフィルターを再度濾過器にセットし、約 10 ml のメタノールで浸し、30 分、45 分または 60 分間放置して色素を抽出した。抽出に用いたメタノールを試料フィルターで濾過し、さらに、そのフィルターをメタノールおよび濾過海水で洗った。洗浄後、 OD_{fp} を測定した時と同じ条件で、試料フィルターの吸光度 (OD_{fd}) を測定した。

(2) メタノール抽出法+温水抽出法

(1) の抽出および測定の後、ビーカー中に試料フィル

ターを入れ、温水中 (約 75°C) で培養株の場合は 30~60 分間、現場海水の場合は 15~45 分間、フィコピリタンパク質の抽出を行った。抽出後、再度、試料フィルターを濾過器にセットし、フィコピリタンパク質抽出に用いた温水をフィルターで濾過し、さらに濾過海水でフィルターを洗った。洗浄後、 OD_{fp} を測定した時と同じ条件で、試料フィルターの吸光度 (OD_{fd}) を測定した。

(3) 次亜塩素酸ナトリウム漂白法

OD_{fp} を測定した後の試料フィルターを再度濾過器にセットし、1%、5% および 10% (体積パーセント) の次亜塩素酸ナトリウムをフィルターのサンプル面を覆う程度に滴下し、5 分または 10 分間漂白を行った。漂白後、濾過海水で洗い、(1) および (2) と同様に試料フィルターの吸光度 (OD_{fd}) を測定した。

3. 結果および考察

3-1 対照用試料

対照用試料中に保持されている濾過海水の量を変えた場合の、対照用試料の吸光スペクトル (OD_f) の変化を Fig. 1 示した。濾過海水の量が少なくなると、対照用試料の吸光度は増加した。さらに、200 μ l 以上の濾過海水がフィルター中に保持されている場合、同じ吸光度を保つことが示された。しかしながら、250 μ l 以上の濾過海水をフィルターに滴下した場合には、分光光度計の試料ホルダーにフィルターをセットした時にフィルターから濾過海水が浸出した。したがって、対照用試料フィルターに滴下する濾過海水の量は 200~250 μ l が適当であると考えられる。過去の報告において、この濾過海水の量は「ピペットで 1 滴」といった記述がされているが (Mitchell, 1990; Mueller et al., 1995 など)、精度の高い測定のためにはマイクロピペットで正確にフィルターに滴下する必要があると考えられる。

3-2 植物色素の抽出法・漂白法の比較

(1) *Synechococcus* sp.

Fig. 2 にラン藻類 *Synechococcus* sp. の OD_{fp} および各方法によって抽出または漂白した時の OD_{fd} を示した。メタノール抽出では、抽出時間を 30 分および 60 分に設定した両方の場合において、600 nm 付近にフィコピリタンパク質の一つであるフィコシアニンの吸収ピークが残った

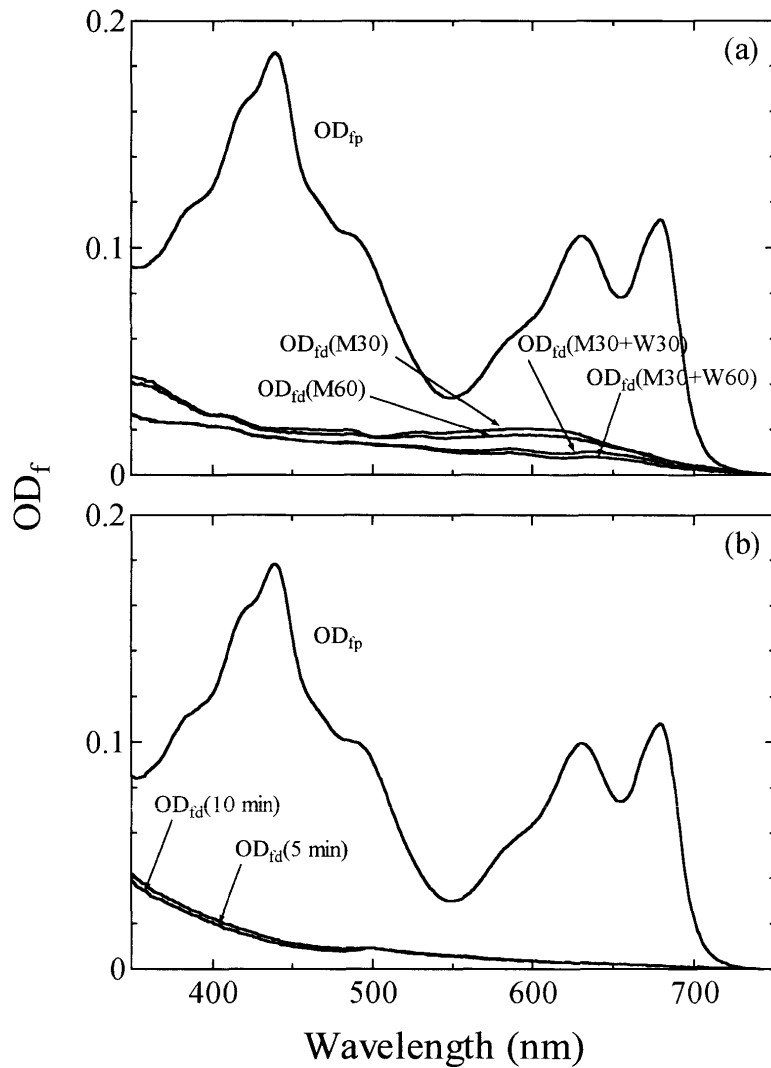


Fig. 2. Absorption spectrum of *Synechococcus* sp. before (OD_{fp}) and after extraction/bleach (OD_{fd}). (a) Extraction with methanol for 30 min (M30) and 60 min (M60), extraction with water for 30 min (M30+W30) and 60 min (M30+W60) after extraction with methanol for 30 min. (b) Bleaching with an oxidizing agent sodium-hypochloride (NaClO) solution of 1% for 5 min and 10 min.

(Fig. 2a). この事は、フィコビリタンパク質が水可溶性であるため、サンプル中にフィコビリタンパク質が存在する場合、メタノール抽出だけでは不十分であることを示している。メタノール抽出後に温水による抽出を行った場合、30分間の抽出時間でフィコシアニンの吸収ピークが消え、この色素が温水により抽出されたことを示している。しかしながら、紫外域の吸光度も減少した。次亜塩素酸ナトリウムによる漂白法では (Fig. 2b)、濃度 1%、5分間で色素を漂白することができ、10分間漂白しても5分の場合と大きな差は無かった。また、次亜塩素酸ナトリウムの濃度による違いは見られなかった。

(2) 現場海水

Fig. 3に現場海水のOD_{fp}および各方法によって抽出または漂白した時のOD_{fd}を示した。30分間のメタノール抽出のみでは675 nm付近にクロロフィルaの吸収ピークが残り、色素抽出が不十分であった (Fig. 3a)。しかしながら、45分間のメタノール抽出では、675 nm付近のクロロフィルaの吸収ピークも消え、十分に色素が抽出された。今回の海水の場合、OD_{fp}を測定した時点で顕著なフィコビリタンパク質の吸収ピークが見られなかったため、温水抽出の効果は認められなかった。次亜塩素酸ナトリウムの場合、濃度 1%では色素漂白が不十分であっ

たが、5%、5分間で色素を漂白することができた (Fig. 3b)。10分間の色素漂白の場合も5分の場合との違いは無かった。

(3) 抽出法と漂白法の比較

メタノール抽出法およびメタノール抽出法+温水抽出法と次亜塩素酸ナトリウム漂白法を比較すると、現場海水の場合、短波長側、特に430 nmよりも短い波長で大きな違いが見られた。その波長帯において、次亜塩素酸ナトリウムによって漂白した場合のOD_{fd}は、メタノール抽出法およびメタノール抽出法+温水抽出法によるOD_{fd}に比べ高い値を示した。次亜塩素酸ナトリウムは短波長側に吸収帯があり、この影響を取り除くため、本研究では濾過海水によってフィルターを十分に洗った。しかしながら、試料フィルター上の粒子に次亜塩素酸ナトリウムが吸着し、次亜塩素酸ナトリウムを十分に洗い流すことができなかった可能性がある。したがって、この現象を考慮した場合、色素抽出法 (メタノール抽出法、あるいはメタノール抽出法+温水抽出法)の方がOD_{fd}の測定法として適していると考えられる。

3-3 分光光度計の種類による測定値の差

本研究で使用した3台の分光光度計で測定された培養

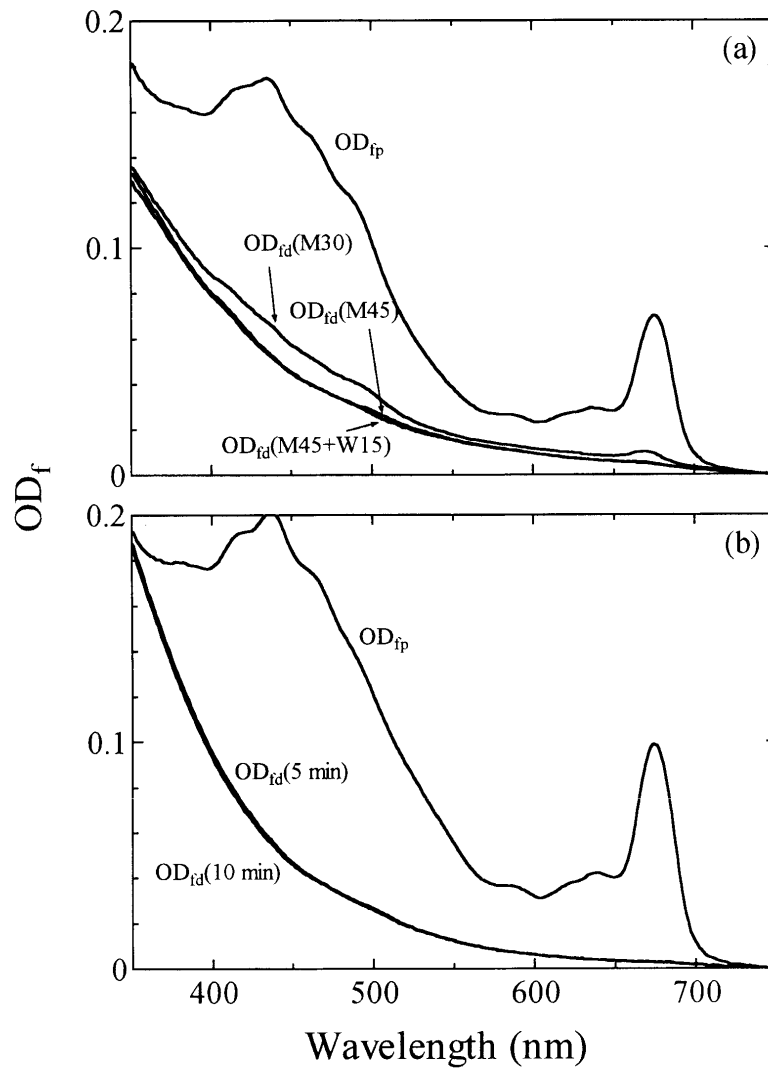


Fig. 3. Absorption spectrum of particulate matter in seawater sample before (OD_{fp}) and after extraction/bleach (OD_{fd}). (a) Extraction with methanol for 30 min (M30) and 45 min (M45), extraction with water for 15 min after extraction with methanol for 45 min (M45+W15). (b) Bleaching with an oxidizing agent sodium-hypochlorite ($NaClO$) solution of 5% for 5 min and 10 min.

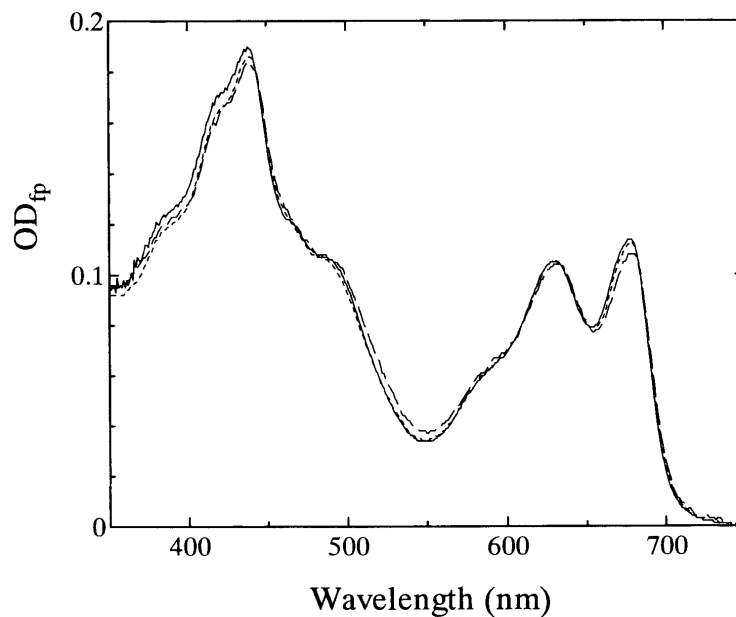


Fig. 4. Comparison of absorption spectra (*Synechococcus* sp.) between spectrophotometers. Solid, dotted and dashed line indicates the data with DU-640 (Beckman), MPS-2400 (Shimadzu) and UV-2500PC (Shimadzu), respectively.

株の OD_{fp} をFig. 4に示した(4サンプルの平均値)。 OD_{fp} の値が小さい700 nm以上の波長帯を除き、分光光度計の種類による測定値の差は9%以内、また、それぞれの分光光度計の4サンプル間の値の差も9%以内であり、測定値に有意な違いは認められなかった。これは、オーバーグラス法を用いることにより、各分光光度計で測定している光の質(直達光と散乱光の割合)がほぼ同じになるためと考えられる。また、分光光度計間による違いは、主に受光器に達する光の量に依存すると考えられる。受光器に入る光量が少ない場合には、増幅器で測定信号(電圧)を大きくするため、測定ノイズも大きくなる。この点に関して、積分球付き分光光度計あるいはエンドオン型分光光度計は、一般的なサイドオン型分光光度計に比べて、有利である。

4. プロトコルの作成

今回のワークショップの最後に、計3回のワークショップの結果を踏まえた植物プランクトンの吸収係数測定法プロトコルについて参加者全員による議論が行われた。その議論のまとめとして作成されたプロトコルの概要を以下に示す。

- (1) 測定方法：QFT (Quantitative Filter Technique; Mitchell, 1990)とac-9(現場型吸光光度計)による測定を推奨。但しそれぞれの長所、短所を考慮する必要あり。
- (2) 濾過：濾紙はGF/Fを使用。0.1<OD(440)<0.3となるような濾過量とし、100 mmHg以下の引圧で暗所において濾過。
- (3) 分光光度計：分光光度計の種類による測定値の差は無視しうる。スリット幅5 nm以下、スキャンスピードは十分感度を得られるように設定。波長域は最低でも350–750 nmを測定する。
- (4) ベースラインノイズ：測定前に確認。
- (5) 対照用試料：現場の濾過海水(GF/Fで濾過) 200–250 μ lをGF/Fフィルターに滴下し、湿った状態を保つ。
- (6) 繰り返し測定：一つのフィルター試料についてビームの当たる位置を変えて2回以上測定して濾過むら対策とする。
- (7) 抽出・漂白：メタノール抽出法+温水抽出法を推奨。

- (8) 光路長増幅効果(β)：熱帯、亜熱帯域のサンプル(ラン色細菌類優占)に対しては、大き目の β 値を使う($OD_s:OD_f$ への回帰係数は小さ目の値)。
- (9) データ管理(記入事項)：サンプル種類、分光機種種、測定条件、濾過量、濾過面積、クロロフィル濃度、濾紙保存法、抽出条件、算出方法などを生データ(OD)と共に保存する。

ここに示したプロトコルは、学生諸氏を含め多くの参加者の協力のもとに得られた結果である。

謝辞

本研究を行うための吸収係数測定法ワークショップを開催するにあたり、東京大学海洋研究所大槌臨海研究センター 乙部弘隆 博士には準備段階より多大なる御支援、御指導を賜りました。心より御礼申し上げます。また、大槌湾の観測にご協力頂きました同センター技官の皆様へ深く感謝致します。

引用文献

- Culver, M. E. and Perry, M. J. 1999. The response of photosynthetic absorption coefficients to irradiance in culture and in tidally mixed estuarine waters. *Limnol. Oceanogr.* 44: 24–36.
- Kishino, M., Takahashi, M., Okami, N. and Ichimura, S. 1985. Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea. *Bull. Mar. Science* 37: 634–642.
- 岸野元彰, 才野敏郎, 古谷 研. 1997. 海水の光吸収スペクトル測定法の検討 1. 検討ワークショップ. 平成9年度日本海洋学会秋季大会 講演要旨集: 157.
- Mitchell, B. G. 1990. Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). In *Ocean Optics X*. Spinrad, R. W. (ed.), pp. 137–148, SPIE, Bellingham.
- Muller, J. L. and Austin, R. W. 1995. Ocean optics protocols for SeaWiFS validation, Revision 1. NASA Tech. Memo. 104566, Vol. 25. Hooker, S. B., Firestone, E. R. and Acker, J. G. (eds.), NASA GSFC, Greenbelt Maryland, 67 pp.
- Shibata, K., Benson, A. A. and Calvin, M. 1954. The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 15: 401–410.
- Tassan, S. and Ferrari, G. M. 1995. An alternative approach to absorption measurements of aquatic particles retained on filters. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1358–1368.