

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04707

研究課題名(和文)簡便で高精度な植物プランクトングループの組成推定法と連続モニタリング手法の確立

研究課題名(英文)A study on a simple method for estimating the composition of phytoplankton groups with an in situ fluorometer

研究代表者

小橋 乃子 (Kohashi, Naoko)

鹿児島大学・理工学研究科・特任助教

研究者番号：00571481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多波長励起蛍光光度計は、植物プランクトングループ推定のために開発された現場型計測機器であり、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、申請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、比較的良好的な結果を得た。また、平均的な基準スペクトルを用いることで、比較的高精度に藍藻類を検出できることから、このような基準スペクトルをあらかじめ作成しておくことで、連続モニタリングにも活用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水環境管理のために、有害赤潮やアオコの発生・消滅状況の把握を目的とした検鏡による植物プランクトン組成の調査が実施されているが、検鏡には多大な作業時間を要する。本研究で実施した「現場型センサーを用いて植物プランクトングループの組成を推定する手法」は、このような問題を補間する技術の開発であり、特にアオコ検出に関しては一定の推定精度が確認できた。このため、事前に対象水域での基準スペクトルを作成することで、アオコのリアルタイムモニタリングにも活用でき、効率的な水環境管理へ貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined how to improve the accuracy of predicting phytoplankton groups and DOC by a relatively simple approach with an in situ fluorometer (the Multi-Exciter). The nine-wavelength excitation fluorescence spectrum of CDOM and size-fractionated phytoplankton groups using 0.7 μ m and 5 μ m filters were measured by the Multi-Exciter, and new norm spectrum of small phytoplankton and CDOM were obtained. By combining these with the spectrum on diatom, green algae and cyanobacteria, we could improve the prediction of colony formation and bloom of cyanobacteria. In addition, it is suggested that this method is available for the real-time monitoring of cyanobacterial blooming because the prediction accuracy of cyanobacteria did not decrease significantly even when the average norm spectrum was used.

研究分野：土木環境システム

キーワード：植物プランクトン組成 アオコ モニタリング 多波長励起蛍光光度計

1. 研究開始当初の背景

日常的な水環境管理が必要となるダム湖や養殖海域では、アオコや有害赤潮の発生・消滅状況を把握するため、一般的に検鏡による植物プランクトン組成の調査が実施される。しかし、検鏡は多大な作業時間を要することから調査点数や観測頻度が限られてしまい、時空間に変動の大きい植物プランクトンの実態を把握するためにはデータが不十分であることも少なくない。環境影響評価において低次生態系モデルの精緻化が望まれていることもあって、植物プランクトングループ(主に、藍藻綱、緑藻綱、珪藻・渦鞭毛藻綱)の組成推定のために開発された現場観測用センサである多波長励起蛍光光度計(bbe Moldaenke社製のFluoroProbeやJFEアドバンテック社製のMulti-Exciter等)に大きな期待が寄せられている。しかしながら、デフォルトの基準スペクトルを用いて計測を行っても適切な推定結果が得られないという報告もなされている¹⁾。ここで基準スペクトルとは、各植物プランクトングループの存在量を定量評価するための「物差し」としての役割を果たすものであり、現場サンプルから単離した培養株から作成することが推奨されている。

ところで、多波長励起蛍光光度計の計測結果には、検鏡調査では検出されない微小植物プランクトンや有色溶存有機物(CDOM)の影響も反映されるため、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によって測定した複数の色素組成から藻類綱群の組成を推定する手法³⁾が用いられることもある¹⁾。このように、多波長励起蛍光光度計を活用しようとする場合、培養やHPLCといった特殊な技術や機器の利用が不可欠であり、結果的に活用事例も自ずと限られている。

以上のような背景の下、申請者らはフィルターを用いて、現場のサンプル水から微小植物プランクトン分画、CDOM分画を分離する手法を提案しており、同手法により藍藻綱(アオコ形成種である*Microcystis* spp.の優占状態)を比較的精度良く推定できることを確認している²⁾。本手法は、ろ過装置さえあれば検鏡データを検証に利用できる簡便な手法であり、かつ、マイクロプランクトングループの検出精度も向上することが期待できるが、最適なフィルタリング手法や*Microcystis*が優占した場合以外のマイクロプランクトングループの推定精度、連続モニタリングへの拡張性については未だ検討の余地が残されている。

2. 研究の目的

以上のような背景の下、本研究ではJFEアドバンテック社製の多波長励起蛍光光度計:Multi-Exciterを用いて、植物プランクトングループ組成の簡便で高精度な推定手法を確立し、連続モニタリングへ拡張することを目的としている。

3. 研究の方法

上記の目的を果たすため、タイプの異なる2つの水域、川内川中流域に位置する鶴田ダム貯水池(大鶴湖:淡水・富栄養水域)と鹿児島湾北部海域(中磯沖:海水・貧から中栄養水域)を対象に、調査研究を実施した。

[タイプI: 基準スペクトル推定のための調査] 各成分の基準スペクトルを明らかにするため、それぞれの現場において採水したサンプル(未濾過)、目合20 μ mおよび5 μ mのプランクトンネットで濾過したサンプル、孔径0.7 μ mの濾紙で濾過したサンプルの FI_i をそれぞれ計測した。0.7 μ m以下で検出される成分をCDOM分画(= FI_{Ci})、20 μ mと0.7 μ m、5 μ mと0.7 μ mの差を微小植物プランクトン分画(= FI_{Si})、さらに未濾過の計測結果 FI_i から $FI_{Ci} + FI_{Si}$ を差し引いたものをマイクロ植物プランクトン分画(= FI_{Li})とした。なお、基準スペクトルは各観測日のChl-a極大層でのみ作成し、その他の水深にも適用した。

[タイプII: 検証のための調査] 鉛直方向の複数点で採水を行い、マイクロ植物プランクトンと微小植物プランクトンのChl-a濃度(以下、Chl-a-L、Chl-a-S)の分析を行った。また、MEXによる蛍光強度スペクトル FI_i の鉛直分布を計測した。さらに、Chl-aが極大となる水深のサンプルに対し、検鏡によりマイクロ植物プランクトンの種組成を計測し、これらを検証データに用いた。

4. 研究成果

(1) サイズ分画の影響について

大鶴湖を対象にChl-a-Sを推定した既往の研究結果において、0.7~20 μ mの分画を微小植物プランクトンとしていたが、マイクロと微小植物プランクトンの分離が適切に行われていない可能性が指摘されている。そこで、0.7~5 μ mと0.7~20 μ mの分画の違いを比較した。マイクロ植物プランクトンのデフォルト3グループ+Chl-a-S+CDOMの5分画の基準スペクトルを用いて、実測のChl-a-Sを推定した結果を示す(図-1: なお、図-1は観測日のChl-a-S極大で作成した基準スペクトルを全水深に適用した結果である)。この結果から、依然としてばらつきはあるものの、微小植物プランクトンの分画の際は20 μ mよ

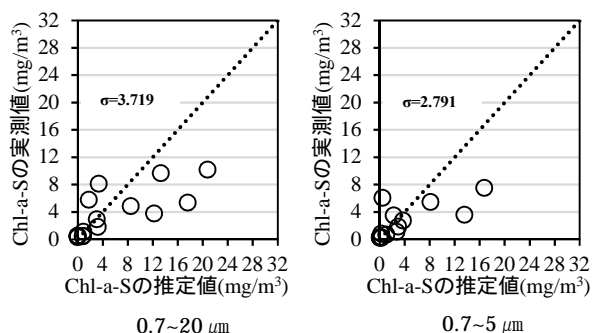


図-1 分画サイズの違いの比較(大鶴湖)

り 5 μm を用いた方が推定精度が向上することが分かった。これらの原因として、ミクロ植物プランクトンが細長い等の形状の場合、20 μm のフィルターを通過してしまい、微小植物プランクトン分画に影響を与えたことが考えられる。

(2) 基準スペクトルの変動特性

次に本研究の対象水域である大鶴湖において、基準スペクトルがどの程度変化するかを調べた。藍藻、珪藻、緑藻についてはそれぞれの細胞数割合が90%以上を占め、かつ相当する Chl-*a* 濃度が10(mg/m³)以上となるデータを検討対象とした。また、後藤(2022、私信)は培養実験により各植物プランクトンの増殖期と安定期の励起蛍光スペクトルをMFLを用いて測定しており、参考のためにそれらのデータも併記した。図-2に藍藻類の結果を示す。大鶴湖における藍藻類の優占種は *Microcystis* spp.に限られていたこともあり、2018/11/7のデータを除くと、観測データから得られた S^* (平均値で規格化した基準スペクトル)は培養実験結果と類似していることが分かった。

(3) 基準スペクトルの変動がアオコの推定結果へ及ぼす影響

次に各グループの基準スペクトルの変動がアオコの推定結果に及ぼす影響について検討する。ここで、規格化する前の基準スペクトル S について、それぞれの分画ごとに平均をとったものを S_{ave} 、 S^* が最大、最小となるスペクトルを各グループの S_{max} 、 S_{min} とする。藍藻の基準スペクトルのみを変化させた推定結果を図-3に示す。棒グラフは S_{ave} を用いた時の推定結果を示しており、 S_{ave} と S_{max} 、 S_{min} それぞれとの推定結果の差を解の変動幅として併記している。 S_{ave} の推定結果を基準とした場合 0.13~6.87 倍の変動がみられたが、アオコの有無に関しては大きな変化は見られなかった。そこで、検鏡で藍藻が検出されている日を対象に、藍藻、MIX、Chl-*a*-S 分画、CDOM 分画の4種で藍藻の推定を行った(図-4)。藍藻、珪藻のデフォルトの基準スペクトルと Chl-*a*-S、CDOM 分画の S_{ave} を用いたときのアオコ検出精度は 9/13(推定結果に藍藻が出た回数/検鏡結果で藍藻が得られた回数)であったのに対し、全グループで S_{ave} を用いた推定結果(S_a)では 12/13 となった。なお、アオコを検出できなかった日の藍藻の細胞数は 9cell/ml であり、他の日と比べるとかなり少なかったことを確認している。また、それぞれの基準スペクトルを $S_{max} \sim S_{min}$ に変化させても、藍藻の推定精度は向上しなかったことから、大鶴湖では過去の観測結果の平均的な基準スペクトルを与えることで、良好な藍藻の推定結果を得られることが分かった。

以上のように、平均的な基準スペクトルを用いてもアオコの推定が可能であることから、このような基準スペクトルを事前に作成しておくことによって、MEX を用いたアオコのモニタリングが可能であると考えられる。なお、実際に大鶴湖に MEX を係留したが、その際にはアオコの発生が見られなかった。

(4) アオコの検出限界

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。藍藻類の推定値と設定値の比較を図-5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-5より、藍藻類の細胞密度が最も低い32倍希釈(394cells/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。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)Wang, S. et al., *OPTICS EXPRESS*, 24(21), pp.23635-23653, 2016. 2)小橋, 安達.土木学会論文集 B2(海岸工学),75(2), I_1255-I_1260, 2019. 3) Mackey, M. et al., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144, pp.265-283, 1996.

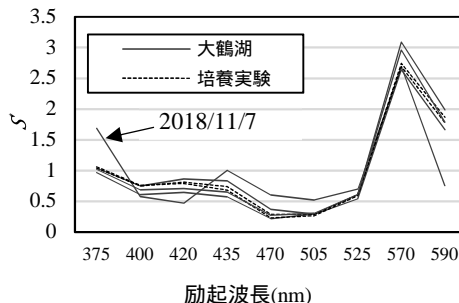


図-2 藍藻(*Microcystis* spp.)の S^*

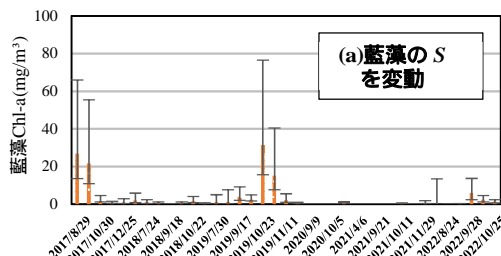


図-3 アオコの推定結果

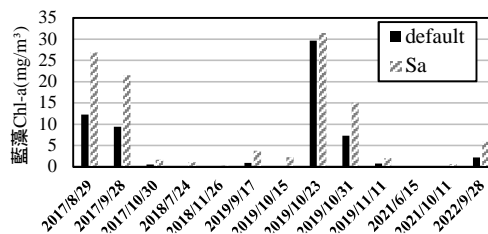


図-4 検鏡結果に藍藻が得られている日の推定結果

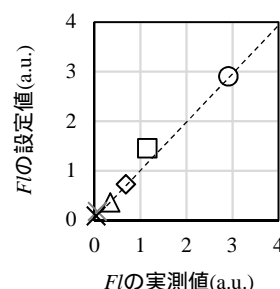
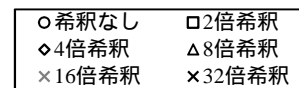


図-5 藍藻類検出限界実験の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小橋乃子、肥後拓馬、井上和久、三浦錠二、安達貴浩	4. 巻 77
2. 論文標題 大量繁殖した増殖期の外来浮草がダム貯水池の水環境に及ぼす影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 土木学会論文集B1(水工学)	6. 最初と最後の頁 I_1045-I_1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川内康平、安達貴浩、小橋乃子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 土木学会西部支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 侍園蒼、安達貴浩、小橋乃子
2. 発表標題 河川の有色溶存有機物(CDOM)に関する基礎的検討
3. 学会等名 土木学会西部支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東 佳樹、安達貴浩、小橋乃子
2. 発表標題 有色溶存有機物(CDOM)に関する現地調査
3. 学会等名 土木学会西部支部
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	安達 貴浩 (Adachi Takahiro) (50325502)	鹿児島大学・理工学域工学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------