

湖沼の富栄養化状態の把握を目的としたクロロフィルの定量 —蛍光光度計の試作とその利用—

村松 隆*・早坂智恵**・安達菜央***

Quantitative Analysis of Chlorophyll Aimed for the Grasp of Lake's Eutrophication
- Utilization of Hand-Made Fluorophotometer -

Takashi MURAMATSU, Chie HAYASAKA and Nao ADACHI

要旨：水中の植物性プランクトン量を指標するクロロフィルを定量するための蛍光光度計を試作した。クロロフィルの励起光源として紫外発光ダイオードを、クロロフィル蛍光検出器としてフォトトランジスターを用いた。試作した蛍光光度計は、簡単な操作でクロロフィルを精度よく分析でき、湖沼生態系の活動度や富栄養化状態の理解を目的とした環境教育教材に活用できることが確かめられた。

キーワード：水質調査 富栄養化 クロロフィル 蛍光光度法

1. はじめに

湖沼生態系の活動度や水の富栄養化状態を探るための水質指標として、溶存酸素、pH、生物化学的酸素要求量、窒素態、リン態、クロロフィルなどが知られている。特に、クロロフィルは、水中のらん藻類や緑藻類などに由来することから、学校における水辺の生物調査との関係も深く、環境学習活動にも役立つ水質指標と考えられる。しかし、湖沼や河川などから抽出されるクロロフィル溶液は希薄で、比色分析を行うには多量の試料水から植物性プランクトンを捕集しなければならず能率的でない。一般に、微量なクロロフィルの定量には蛍光法が用いられるが、市販の蛍光分析装置は高価であり、学校の生徒実験に利用できる状況にはなっていない。

蛍光法では、植物性プランクトンから抽出したクロロフィル溶液に光を照射し、クロロフィルから発する赤色蛍光を測定し、蛍光強度からクロロフィル濃度を算出する。吸光光度法に比べて高感度であり精度の高い定量分析が行えるなどの利点がある。クロロフィル蛍光を測定するためには、クロロフィルを励起するための光源として、青色可視領域のできるだけ波長

幅の狭い光を利用するのが一般的である。以前は適当な光源を安価に入手することが困難であったが、最近になって、強い発光特性を有する青色発光ダイオードや紫外発光ダイオードなども安価に入手できるようになった。安価な青色発光ダイオードを用いた化学実験教材も報告されている。¹⁾

著者らは、入手可能な発光ダイオードの中で、クロロフィル蛍光が比較的強く現れる紫外発光ダイオード（発光ピーク波長 395nm）を励起光源に用い、また、蛍光波長領域に高い感度をもったフォトトランジスターを検出器に用いて簡易な蛍光光度計を試作した。ここでは、試作した蛍光光度計の性能と、これを用いた環境分析実験への利用について述べる。

2. クロロフィル蛍光光度計

1) 装置の製作

湖沼の植物性プランクトンに含まれる主要な光合成色素はクロロフィルaとクロロフィルbであるが、クロロフィルbの含有率はクロロフィルaの含有率に比べて低い。いずれの色素も、近紫外領域から青色可視領域の光を吸収し、赤色の蛍光（発光ピーク波長：

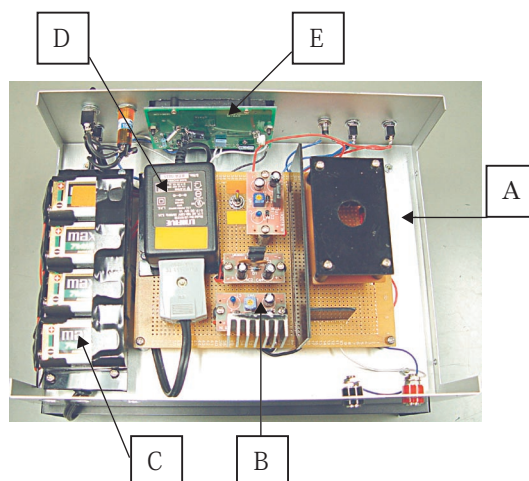
*宮城教育大学環境教育実践研究センター， **宮城教育大学教育学部， ***宮城県立伊具高等学校



図 1. 試作蛍光光度計

660nm～680nm 付近) を発する。通常の蛍光法では、試料水中に含まれる含有率の高いクロロフィル a の励起に適した 436nm の光を照射光源として用い、クロロフィル a からの蛍光を計測することで、クロロフィル a の濃度を求めるのが一般的である。しかし、クロロフィル b の含有量の増加に伴って、クロロフィルの定量結果に不確かさが生ずるので注意が必要である。蛍光光度計の製作に際しては、励起光源として利用する発光ダイオードの光学特性と、クロロフィル a とクロロフィル b の蛍光特性を十分把握しておく必要がある。

図 1 に試作した蛍光光度計の外観を、図 2 に試作装置の内部構造を示す。クロロフィル励起光源として 2 個の紫外発光ダイオード (ピーク波長 395nm, 5Φ, SANDER SDL-5N3CUV-A 型) を、蛍光検出器として 570nm 以下の短波長カット硝子フィルター (東芝 V0-57) を取り付け付けたフォトトランジスター (SHARP PT550F 型) を使用した。電源としては、室内測定用に AC アダプター (12V 1A) を用い、定電圧回路を経由して光源と検出器に電圧を供給した。また、乾電池 (9V 4 個) を屋外測定用電源として用い、切り替えて使用できるようにした。クロロフィル蛍光は、フォトトランジスターに接続したデジタルマイクロアンメータ (MT マザーツール MT-322C 型) で読みとるようにした。希薄なクロロフィル溶液について、できるだけ強い蛍光を計測する目的で、図 3 に示すように、セル (内径 10mm の円筒形 Pyrex 製吸光測定管) の両側に 2 個の紫外発光ダイオード (F) をとりつけ、励起光路に対して直角方向のセルの側面にフォトトランジスター (G) を固定した。散乱光を除去するためのスリットや



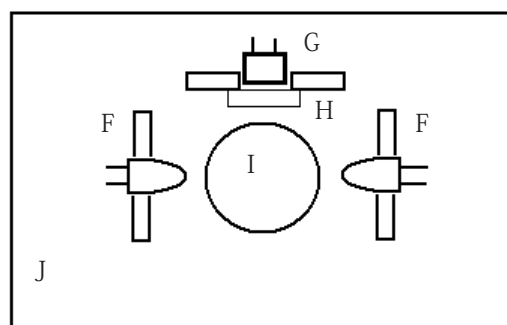
A: 試料室 (光源、検出器), B: 定電圧回路
C: 電源 (乾電池 9V×4 個), D: AC アダプター (12V, 1A) E: マイクロアンメータ (MT-322C)

図 2. 試作蛍光光度計の内部

微弱な蛍光を増幅されるためのデバイス等は使用していない。

2) クロロフィルの蛍光特性

紫外発光ダイオードに加える電圧を変え、定量のための測定条件を探索した。試験用の試料として、ペーパークロマトグラフ法 (展開溶媒: 石油ベンジン・アセトン 8:1 v/v) で、緑葉から分取したクロロフィ



F: 紫外発光ダイオード (SDL-5N3CUV-A 型)
G: フォトトランジスター (PT550F)
H: 硝子フィルター (V0-57)
I: セルホルダー (外径 15mm)
J: 黒色アクリル板 (50mm×70mm)

図 3. 試料室 (光源、検出器) の構成
(上部投影図)

ル a とクロロフィル b の DMF 溶液を用いた。²⁾ それぞれのクロロフィル濃度は、可視吸収スペクトル測定により吸光係数値を用いて算出した。³⁾ 4 段階の既知濃度の希釈溶液列をつくり、これを標準溶液として試験に用いた。

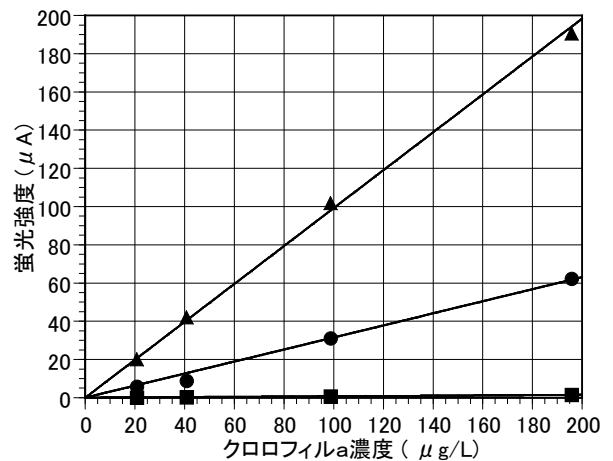
図4と図5は、それぞれクロロフィル a とクロロフィル b の蛍光強度の濃度変化を示したものである。いずれの場合も、発光ダイオード（規格最大電圧 4V）に加える電圧が規格上限値に近いほど強い蛍光が観測される。クロロフィルの紫外線分解を避ける目的で検討したが、試作装置では数分間光を照射し続けても蛍光強度の変化は認められなかった。高感度測定には、可能な限り紫外発光ダイオードに加える電圧を高くした方がよいことから、測定条件として許容上限値に近い 3.9V にすることとした。図4、図5から、約 200 $\mu\text{g/L}$ 以下の希薄溶液では、クロロフィル蛍光強度が濃度の増加に伴って直線的に増加していくことが分かる。また、紫外発光ダイオードの加電圧を 3.9V とした場合、クロロフィル a の蛍光強度は、クロロフィル b の蛍光強度に比べて 6.7 倍強く観測され、クロロフィル a に対して感度の高い測定が可能であることが分かった。クロロフィル蛍光と濃度との関係は、クロロフィル a とクロロフィル b の蛍光強度（加電圧 3.9V の場合）をそれぞれ F_a 、 F_b とすると、(1) 式と (2) 式で与えられる。

$$\text{クロロフィル a (}\mu\text{g/L)} = 1.01 \times F_a \quad (1)$$

$$\text{クロロフィル b (}\mu\text{g/L)} = 0.15 \times F_b \quad (2)$$

3) 蛍光強度に及ぼすクロロフィル b の影響

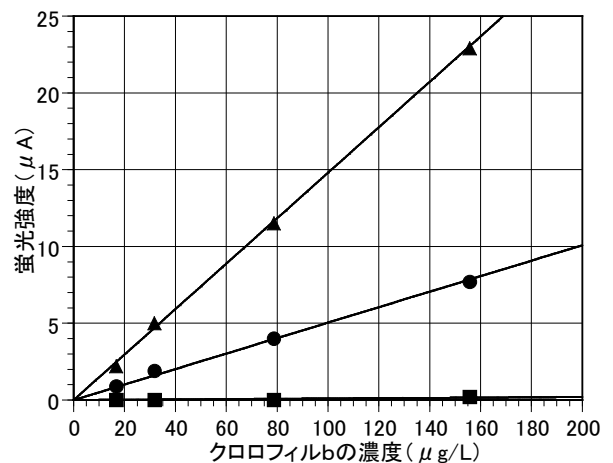
湖沼の植物性プランクトンから抽出した試料溶液について蛍光を測定しクロロフィル濃度を算出する場合は、(1) 式を用いることになる。従って、試料溶液にクロロフィル b が含有する場合には、クロロフィルの定量結果に不確かさが生じるので、クロロフィル b に由来する定量誤差を見積もっておく必要がある。淡水性の植物性プランクトンには、らん藻類、緑藻類、紅藻類など種類も多く、水域の違いや季節によってその存在量も異なる。しかし、クロロフィル全量に占めるクロロフィル b の割合はそれほど大きくはない。



発光ダイオード加電圧

—■— : 3.3V, —●— : 3.6V, —▲— : 3.9V

図4. クロロフィル a 溶液の蛍光強度と濃度との関係



光ダイオード加電圧

—■— : 3.3V, —●— : 3.6V, —▲— : 3.9V

図5. クロロフィル b 溶液の蛍光強度と濃度との関係

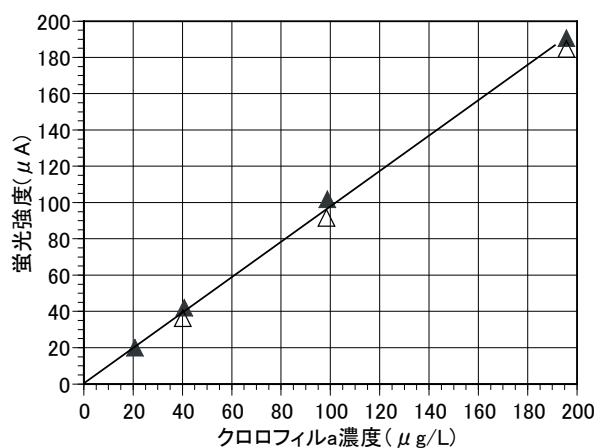
仮に、緑葉の平均的な重量含有率（クロロフィル a : クロロフィル b ~ 3 : 1）を試料水にあてはめると、(1) 式と (2) 式から、定量値に含まれるクロロフィル b に由来する不確かさはおよそ 5% と見積もれる。環境水のクロロフィルの混合比が変化する場合を想定し、クロロフィル定量誤差を 10% としても、(1) 式を用いて算出したクロロフィル濃度を富栄養化等の実態把握に利用することは十分可能である。

4) フェオ色素の蛍光特性

湖沼や河川には、クロロフィルが一部酸化分解したフェオ色素（フェオフィチンとして報告されている）も含まれる。フェオ色素はクロロフィルと同様に紫外光を吸収し赤色蛍光を発する。フェオ色素とクロロフィルの固有蛍光強度（1 μg あたりの蛍光強度に相当）は、用いる励起光の波長によって異なる。通常の蛍光法（例えば海洋法）では、436 nmの励起光を用いて試料水の蛍光強度（F_{ch}）を測定する。その後、セルに1滴程度の塩酸を加えて溶液中のクロロフィルを全てフェオ色素に酸化分解し、再度、蛍光強度（F_{ph}）を測定する。予め、クロロフィルとフェオ色素の固有蛍光強度を求め、F_{ch} >> F_{ph}の条件が成立すれば、それぞれの蛍光強度から、試料水中に含まれるフェオ色素をクロロフィルと区別して定量することができる。

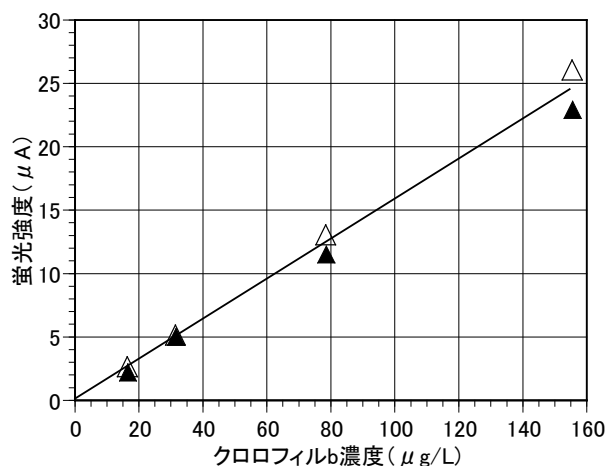
著者らは、クロロフィルaとクロロフィルbに由来するフェオ色素溶液をつくり、試作した蛍光光度計を用いてフェオ色素の濃度と蛍光強度との関係を調べた。図6と図7に測定結果を示す。フェオ色素の蛍光強度はクロロフィルの種類と無関係に、それぞれのクロロフィルの蛍光強度にほぼ一致していることが分かる。試作した蛍光光度計では、クロロフィルとそのフェオ色素の固有蛍光強度比（R）は、クロロフィルaとクロロフィルbいずれも、R \sim 1と近似できる。つまり、試作装置では、クロロフィルとフェオ色素を区別できず、混合比を求めることできない。試作装置を用いる場合は、フェオ色素を定量するための実験操作は不必要であり、試料水についてのみ蛍光測定を行うだけで、(1)式を用いてクロロフィル総量（クロロフィルとフェオ色素の合計量）が算出されることになる。実際に、湖沼の富栄養化状態を把握するのに、クロロフィルの酸化分解がどの程度進行しているかはあまり重要ではなく、クロロフィル総量が有効な指標値となる。

以上の検討から、試作した蛍光光度計の特性として次のことが確かめられた。①クロロフィル励起用の光源として紫外発光ダイオード（発光ピーク波長395nm）を利用すれば、数 $\mu\text{g/L}$ 程度の希薄なクロロフィル溶液に対しても、赤色蛍光強度を感度よく計測できる。②試作した蛍光光度計では、クロロフィル総量を迅速に求めることができる。この総量値は、植物性プ



—▲—：クロロフィル a ， —△—：フェオ色素

図6. クロロフィルaとその酸化体（フェオ色素）の蛍光強度と濃度との関係



—▲—：クロロフィル b ， —△—：フェオ色素

図7. クロロフィルbとその酸化体（フェオ色素）の蛍光強度と濃度との関係

ランクトン量に相関（正の相関）し、水の富栄養化状態の実態を表す指標として使用できるものである。③淡水性の植物性プランクトンを対象とした測定では、クロロフィルbの存在は、クロロフィル総量値に約10%以下の誤差を与える程度である。

3. 環境教育への利用

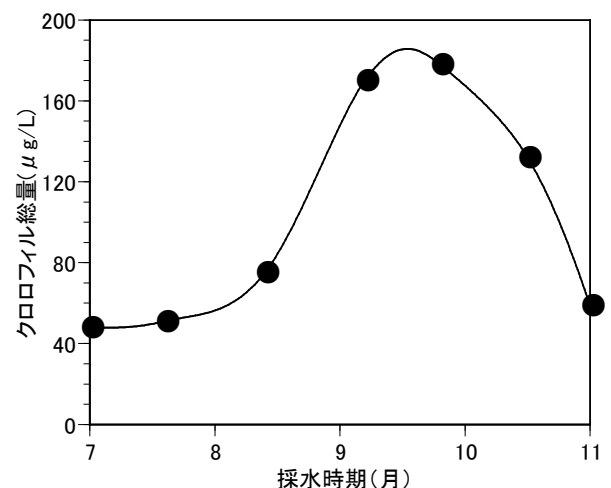
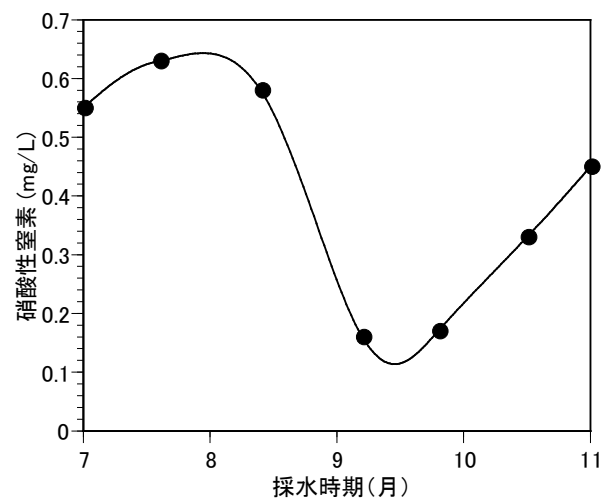
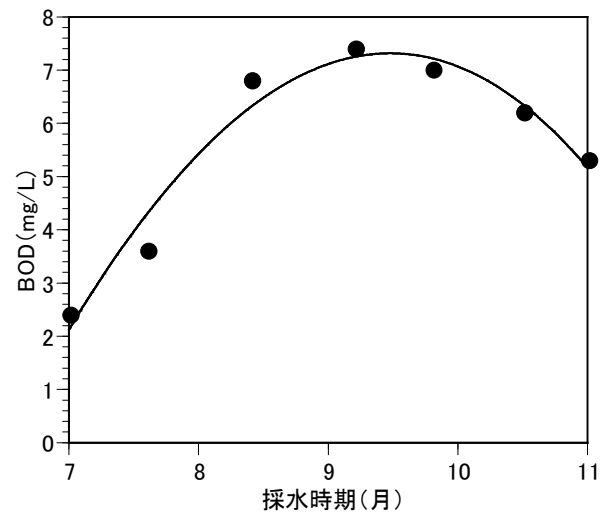
1) 水の富栄養化状態の分析

著者らはこれまで、河川やため池の水質調査を行い、富栄養化に伴う水質変動現象の解析を進めている。^{4) 5)}ここでは、試作した蛍光光度計のため池水質調査への利用について述べる。調査対象は丸田沢ため池（仙台市泉区上谷刈）で、平成16年7月から同年11月まで定期的に採水し、硝酸性窒素、生物化学的酸素要求量およびクロロフィル総量を調べた。図8に測定結果を示す。丸田沢ため池の7月から11月までの時期は、生物化学的酸素要求量が9月中旬に最も高くなり、その後低値化が進む。この変化に対して、硝酸性窒素は9月頃に減少し、10月にかけて増加傾向を示す。試作した蛍光光度計を用いて求めたクロロフィル総量は生物化学的酸素要求量の変化の傾向と似ており、有機汚濁の進行が水の富栄養化を促し、藻類発生による窒素固定が進行していることをよく表している。

2) 蛍光光度計の生徒実験への導入

試作した蛍光光度計は、小学校における水質調査（気仙沼面瀬小学校6年の取り組み）と、高等学校での実験実習（宮城県第一女子高等学校スーパーサイエンス実験など）で利用した。図9は、学校で行った植物性プランクトンの捕集と蛍光測定に関する実験操作を示したものである。ひとつの試料水について生徒実験の所用時間は約20分である。

植物性プランクトンの捕集は、注射器を用いて、環境水250 mLを硝子フィルター（GF/F）を通してろ過し、硝子フィルターに植物性プランクトンを捕集する。次に、硝子フィルターに付着した水分を抜き取った後、硝子フィルターをDMF 10 mLの入った共栓付試験管に入れ、約5分間振り混ぜる。DMF溶媒に植物性プランクトンからクロロフィルが抽出されるので、ろ紙フィルターでろ過し、ろ液（25倍濃縮液）を蛍光測定管に入れる。試作した蛍光光度計を用いて蛍光を測定し、(1)式を使って試料溶液に含まれるクロロフィル総量（ $\mu\text{g/L}$ ）を求め、環境水1Lあたりのクロロフィル総量値に換算する。



a : 生物化学的酸素要求量, b : 硝酸性窒素
c : クロロフィル総量

図8. 丸田沢ため池の水質 (平成16年度)

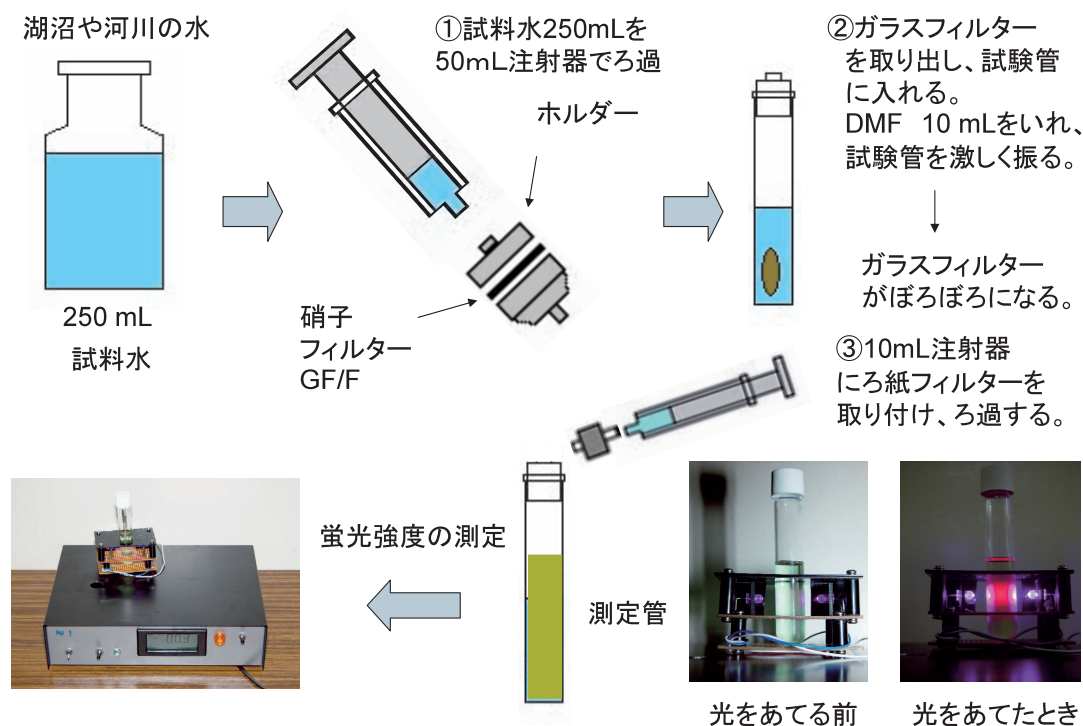


図9. 植物性プランクトンの捕集と蛍光測定

4. さいごに

湖沼の植物性プランクトンは、調査場所や季節によって種類と量が異なる。特に、淡水性の植物性プランクトンはらん藻類以外に緑藻類や紅藻類など種類も多い。ここではクロロフィルaとクロロフィルbのみに着目し考察を試みたが、今後、クロロフィルcに由来する定量誤差についても検討が必要であろう。

これまで著者らが調査して得たクロロフィル総量は、広瀬川で $5 \mu\text{g/L} \sim 10 \mu\text{g/L}$ 、青葉山に点在するため池では、 $5 \mu\text{g/L} \sim 50 \mu\text{g/L}$ 、また、仙台住宅地内のため池（丸田沢ため池）では $20 \mu\text{g/L} \sim 300 \mu\text{g/L}$ であった。河川のような流水では、概してクロロフィル濃度は低い。試作した蛍光光度計は、希薄なクロロフィル溶液の蛍光を高感度で検出でき、測定操作が簡単なことから、環境水の実態や水中生態系の仕組みの理解など、学校における環境学習の取り組みにも有効に活用できると思われる。蛍光光度計を製作する場合の留意点を以下にまとめた。

①環境水を対象として蛍光光度計を製作する場合は、

光源として用いる発光ダイオードの光学特性と使用上の注意点（特に紫外発光ダイオードを利用する場合）、およびクロロフィルの蛍光特性を十分に調べておく必要がある。試作した蛍光光度計では、クロロフィルaはクロロフィルbに比べ約7倍の感度を持ち、クロロフィル総量はクロロフィルaについての検量線データを用いて算出できる。

②蛍光光度計を簡単に製作するためには、できるだけ発光輝度の高い光源を用いるとよい。試作した蛍光光度計では、微弱な蛍光の光電流をマイクロアンメータで直読できるように、光源として2個の紫外発光ダイオードを用いた。 $5 \mu\text{g/L}$ の希薄溶液で、クロロフィル蛍光の光電流値は $4.9 \mu\text{A}$ である。その時のバックグラウンド（溶媒セル）は $0.2 \mu\text{A}$ 程度で蛍光計測に障害とはならない。バックグラウンドを低値化する目的で、フォトトランジスター受光部に570nm短波長カット硝子フィルターを装着させたことによる。

③蛍光光度計の製作費用は約15,000円である。簡易な構成を重視し、スリットなどをもうけなくとも、ク

クロロフィル濃度に比例した再現性のよい蛍光強度を計測できる。

④蛍光光度計の定量限界に併せて、植物性プランクトンの捕集方法も工夫できる。試作した蛍光光度計では、試料水 250 mL 中に含まれる植物性プランクトンを捕集し、10 mL クロロフィル DMF 溶液として蛍光強度を計測している。クロロフィル抽出と測定は簡単かつ短時間に行うことができ、小学生による水質調査でも十分活用できることが確かめられた。

参考文献

- 1) 本田数博・有菌秀敏他, 2001. 青色 LED を光源に用いる緑茶クロロフィルの蛍光測定. 化学と教育, 50, p. 326.
- 2) 村松 隆・花屋 馨, 1987 緑葉中の色素の分離と定量. 宮城教育大学理科教育研究施設年報, 23, p81.
- 3) 花屋 馨・村松 隆, 1989. 宮城教育大学理科教育施設年報, 25, p. 93.
- 4) 村松 隆・早坂智恵他, 2003 ため池の富栄養化に伴う水質変動現象の分析. 宮城教育大学環境教育研究紀要, 6, p. 15.
- 5) 村松 隆・森田衣子, 2000. 環境教育のための河川利用 - 広瀬川本流と支流の学習 -. 宮城教育大学環境教育研究紀要, 3, p. 45.