

福岡工業大学 機関リポジトリ

FITREPO

Title	水生植物近傍の溶存酸素のリアルタイムモニタリング
Author(s)	呉 行正, 田村 圭祐
Citation	福岡工業大学総合研究機構研究所所報 第2巻 P59-P62
Issue Date	2020-2
URI	http://hdl.handle.net/11478/1532
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	Publisher

Fukuoka Institute of Technology

水生植物近傍の溶存酸素のリアルタイムモニタリング

呉 行正 (工学部生命環境化学科)

田村 圭祐 (工学部生命環境化学科)

Real Time Monitoring of Dissolve Oxygen at a Vicinity of Aquatic Plants

Xing-Zheng WU (Department of Life, Environment and Applied chemistry, Faculty of Engineering)

Keisuke TAMURA (Department of Life, Environment and Applied chemistry, Faculty of Engineering)

Abstract

Recently we developed a novel optical detection system that allowed real-time in-situ simultaneous monitoring of dissolved oxygen and materials movements at a vicinity of micrometers from an aquatic plant by combining deflection of a probe beam and fluorescence quenching. In the detection system, dissolved oxygen (DO)-quenched fluorescence was monitored, and then DO concentration was calculated from the DO-quenched fluorescence intensity by an algorithm based on fitting calculations of quadric equations in software of Origin. Here, an improved algorithm based on fitting calculations of cubic equations in the most widely used Microsoft Excel was proposed. The algorithm contained Excel macros of adjusting monitoring time between DO and temperature sensor software and digital multimeter controlling software, deleting large noise of fluorescence intensity monitoring, and fitting calculation of cubic equations. Also, fixing aquatic plants was improved. Results showed that the algorithm in the Microsoft Excel gave good results for monitoring of DO at vicinities of aquatic plants.

Keywords : fluorescence quenching, dissolved oxygen, aquatic plant, real time monitoring

緒言

世界的な人口増加によって人類は食料の増産だけではなく、CO₂の濃度増加による地球温暖化や環境汚染問題にも直面している。植物は光合成により、人類に食料の提供だけではなく、CO₂の固定や環境汚染物の除去等環境問題の解決に大いに貢献している。植物の共通する生理活動として、呼吸活動や光合成活動が挙げられる。植物の生理活動は、二酸化炭素、酸素、あるいは光合成産物の測定により評価される。植物活動に出入りする酸素の測定は従来で検圧法や明暗瓶法などが知られている⁽¹⁾。検圧法とは酸素ガスの発生で増加した分圧を測定することにより光合成活性を測定する。また、明暗瓶法とは試料瓶1つを暗所、もう1つを明所において、一定時間後、二つの瓶の中の溶存酸素(dissolved oxygen, DO)濃度の差を測定する。これらの測定法は、いずれ植物を含むある空間内の平均的酸素濃度を測定できるが、植物の部位ごと(葉、茎、根など)における酸素の出入りの測定はできない。一方、植物の部位ごとの生理活動が異なる。また、これらの測定に時間がかかるため

植物にとって負担が大きい。

本研究室では、蛍光消光法による水草近傍のDOのリアルタイム測定法について検討している⁽²⁻⁵⁾。具体的には、405 nmのレーザーを植物近傍にあて、植物近傍の蛍光性Ru(II)錯体が励起され、その蛍光がDOにより消光される。この消光は定量的に下記の式に記述される。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} C_{DO} \quad (1)$$

F_0 、 F 、 K_{SV} 、及び C_{DO} はそれぞれDOがない時とあるときの蛍光強度、消光係数、及びDO濃度である。 $F_0 F = 1 + k_{SV} C_{DO}$ と K_{SV} が予め分かれば、 C_{DO} は測定した蛍光強度 F から求められる。一方、 F_0 、 F 、 K_{SV} 、及び C_{DO} 温度 T に依存するので、その温度依存を二次関数で表した。具体的には、まずDO除去剤であるNa₂SO₃を含む10⁻⁶ mol/LのRu(II)錯体溶液の F_0 、温度変化 T を2時間モニタリングし、 $F_0 \sim T$ の図を作り、さらに $F(T)$ を二次関数でフィッティングし

た。次に、 10^{-6} M Ru(II) 錯体の C_{DO} 、 F 、及び T を 2 時間モニタリングし、 $C_{DO}(T)$ 及び $F(T)$ も二次関数でフィッティングした。これらの二次関数を下記式に代入し、 $K_{SV}(T)$ を求めた。

$$K_{SV}(T) = \left(\frac{F_0(T)}{F(T)} - 1 \right) / C_{DO}(T) \quad (2)$$

また、この $K_{SV}(T)$ も二次関数でフィッティングした。

この $K_{SV}(T)$ を使って、植物試料近傍の C_{DO} は植物近傍の蛍光強度 F 及び測定時点の温度 T から、(1) 式により計算される。

一方、上記フィッティング計算で今まで Origin というソフトウェアを使っていた。一方、Origin はそれほど汎用的なソフトウェアではないので、できれば Microsoft Office の Excel で使えることが望まれている。また、今までの Origin を使うフィッティングでは、蛍光強度のノイズ、多チャンネルスキャンの間の待ち時間が均一ではないことによる酸素センサーとの時間のズレを修正していないという問題がある。そこで、本研究では、Excel でフィッティングできる計算プログラム、更に上記ズレの修正ができるようなマクロを作成した。さらに、フィッティング計算に 3 次関数を用いた。また、実験測定における植物試料の固定も改善した。

2. 実験

〈2・1〉 測定装置系

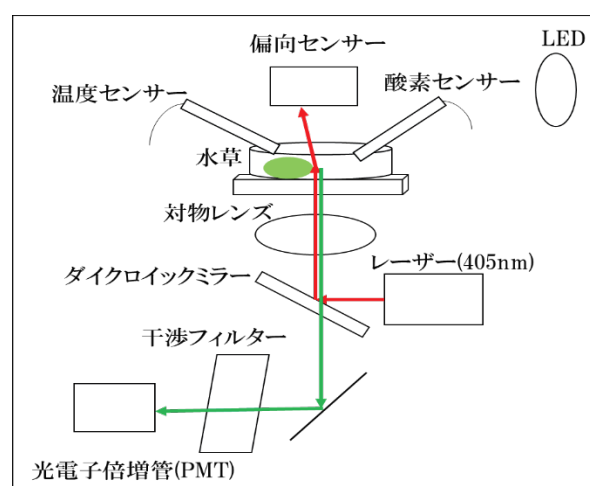


図1 偏向測定装置

図1に偏向測定装置を示した。半導体レーザー（波長 405 nm）からの光は、ダイクロイックミラーにより反射され、さらに対物レンズによってシャーレ中の水草近傍（0 μm）に絞られ、偏向検出器によって測定された。レーザー光と水草近傍の距離はマイクロステージにより調整した。

また、シャーレに加えたルテニウム錯体溶液（ 1.0×10^{-6} mol/l）はレーザーにより励起され、その蛍光はダイクロイックミラーを透過するので、光電子倍增管 (Photo Multiplier Tube, PMT) により測定を行った。また、市販の温度センサーと溶存酸素 (DO) センサーもシャーレに差し入れ、シャーレ中の温度、DO も同時に測定した。偏向検出器、及び蛍光を測定する PMT の出力をデジタルマルチメータにより測定した。デジタルマルチメータを制御するソフト及び温度センサー、DO センサーのデータ記録ソフトを同時に一台のパソコンで操作した。



図2 水草の固定

シャーレ内の水草の固定方法は図2のようにになっている。また、水草は葉だけでなく茎もつけて固定している。その固定の仕組みは、 1 cm^2 程度に切ったスライドガラスを2枚重ねて接着し、おもりとして用いている。今までの実験では1枚のスライドガラスのみであったが、今回2枚にすることで、より確実に固定できるようにした。

〈2・2〉 試料及び試薬の調製

試料はアナカリスとカボンバを使用した。水草の中でも丈夫な水草で、シャーレの中という劣悪な環境下でも長時間の測定が問題なく出来る。

試薬は Ru(II) 錯体 (Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) chloride) で、その 1.0×10^{-6} mol/l 水溶液は次のように作成された。Ru(II) 錯体(分子量: 748.62) を電子天秤で 0.0075 g 量りとり、100 ml メスフラスコで希釈し、 1.0×10^{-4} mol/l 水溶液となった。次に、それを 0.5 ml とり、50 ml メスフラスコで希釈した。

3. 結果と考察

3.1 フィッティング計算プログラム (アルゴリズム) の改良

計算プログラムとして Excel のマクロ (VBA) を使用して、3 次関数のフィッティング、デジタルマルチメータの多チャンネルのスキャンの間の待ち時間の不均一による温度・酸素センサー出力の記録時間とのズレの修正、蛍光強度のノイズの除去等を行った。

図3に記録時間とのズレの修正をするマクロを示す。時間のズレを修正するには、前提として時間の表示を日付表示から 0 秒スタートのストップウォッチ形式の表示変更が必要である。これにより、温度・酸素センサーの出力を記

録するソフトの時間とうまく合わせられるようにできた。
アルゴリズムは、まず全てのデータの時間を秒に換算し、
最初のデータが 0 になるように減法した。

```
Z = Split(Cells(2, 2), " ")
Y = Split(Z(1), ":")
Y1 = Split(Z(0), "/")
X = Y1(2) * 24 * 60 * 60 + Y(0) * 60 * 60 + Y(1) * 60 + Y(2)
For i = 2 To Cells(Rows.Count, 2).End(xlUp).Row
n = Split(Cells(i, 2), " ")
w = Split(n(1), ":")
w1 = Split(n(0), "/")
Cells(i, 13) = w1(2) * 24 * 60 * 60 + w(0) * 60 * 60 + w(1) * 60 + w(2) - X
Next
```

図 3 記録時間とのズレを修正するマクロ

ここでの Z、Y、Y1、X、m、W、W1 はそれぞれ数値を一時的に保存するための変数である。Cells(2, 2)には日付表示の時間が入っている。For i = ...はデータの数だけ繰り返し処理をしている。Split 関数は引数を分解できる関数で、日付と時刻を別々に処理することができるようになっていいる。日付表示からストップウォッチ形式の表示に変更するには下記計算式が使われている。

$$(\text{ストップウォッチ表示}) = (\text{日付}) \times 24 \times 60 \times 60 + (\text{時間}) \times 60 \times 60 + (\text{分}) \times 60 + (\text{秒}) \quad (3)$$

式 (3) より、日付表示を時間(秒)に変換することができた。次に、開始時間を変数 X に代入し、各データの時間を変数 X で減法する事で 0 秒から開始するストップウォッチ形式の時間表示となった。

大きなノイズの除去をするマクロを図 4 に示す。レーザーで励起した蛍光を測定する時、小さい気泡や微粒子の散乱等により、時々大きなノイズが生じる。ここでは、ある時刻での測定データが突然前の時刻の測定データより 3.5%以上も大きく、あるいは小さくなったら、そのデータをノイズとして除去するようにした。

```
x = Cells(Rows.Count, 3).End(xlUp).Row
For i = 2 To Cells(Rows.Count, 20).End(xlUp).Row
henkamae = Cells(i, 20)
henkago = Cells(i + 1, 20)
henka = Abs(henkamae - henkago)
If henka >= 0.035 And Not Cells(i, 20) = "" Then '
For j = 17 To 22
Cells(i + 1, j) = "AVERAGE(C2:C" & x & ")"
Next j
k = k + 1
End If
Next i
MsgBox (k & "個のノイズを消しました。")
```

図 4 ノイズの除去をするマクロ

図 4 では、変数(henkamae)にある時刻の測定データを、変数(henkago)に次の時刻の測定データを、変数(henka)がこの二つの測定データの差を代入している。また、変数(henka)は Abs 関数を使う事で絶対値にしている。次に If(条件分岐)で 3.5%(0.035)以上のノイズを検知し、繰り返しループでノイズのあるデータを平均値に置き換えている。最後に、検知したノイズの数を変数 K に代入し、MsgBox でその数を知らせるようにした。

```
X = Split(Str(2), " ")
Y = Split(Str(Cells(Rows.Count, 20).End(xlUp).Row), " ")
Cells(1, 100) = "=INDEX(LINEST(T" & X(1) & "T" & Y(1) & ",S" & X(1) & "S" & Y(1) & "^(1,2,3),1,1)"
Cells(2, 100) = "=INDEX(LINEST(T" & X(1) & "T" & Y(1) & ",S" & X(1) & "S" & Y(1) & "^(1,2,3),1,2)"
Cells(3, 100) = "=INDEX(LINEST(T" & X(1) & "T" & Y(1) & ",S" & X(1) & "S" & Y(1) & "^(1,2,3),1,3)"
Cells(4, 100) = "=INDEX(LINEST(T" & X(1) & "T" & Y(1) & ",S" & X(1) & "S" & Y(1) & "^(1,2,3),1,4)"
```

図 5 マクロによる 3 次関数の計算

3 次関数でフィッティングするマクロは図 5 に示した。アルゴリズムは、INDEX 関数(最小二乗法)を使って計算した。変数 X と変数 Y に Split 関数を使い 3 次関数でフィッティングするデータの範囲を入力している。次に、各 INDEX 関数に変数 X と変数 Y を代入し、4 つの INDEX 関数をつなぎ合わせると 3 次関数にすることができる。

3.2 測定結果

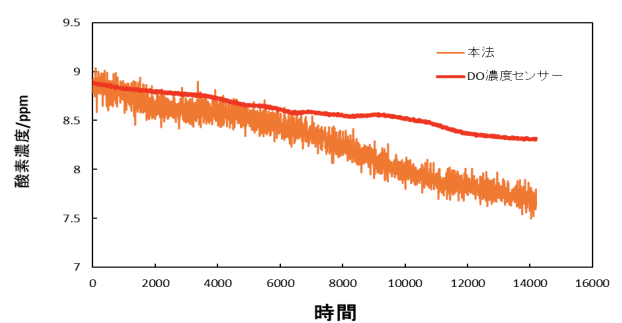


図 6 呼吸過程の DO 濃度の測定結果

図 6 が植物の呼吸過程(暗室)において、モニタリングした蛍光強度から計算した植物近傍の DO 濃度の時間変化である。植物の近くに設置した DO センサーによりモニタリングした DO も図 6 に示している。DO センサーは物理的なサイズがあるので、表面 $0 \mu\text{m}$ まで近づけないので、DO の時間変化の測定結果は本法より小さかった。これは植物近傍の DO が呼吸過程で吸収されたので、濃度減少が離れたところより大きかった。DO 変化の測定の観点から、本法は DO センサ

一より高感度であると言える。

図7が植物の光合成過程（LED照射下）で50分間モニタリングした蛍光強度から計算した植物近傍のD0濃度の時間変化である。同様に植物の近くに設置したD0センサーにより測定したD0の結果も図7に示している。両者を比較すれば分かるように、D0センサーより、本法でモニタリングした植物近傍のD0の増加が速いことが分かった。これは光合成により生成した酸素が水草表面から拡散していくので、植物近傍のD0濃度が最も高いからである。

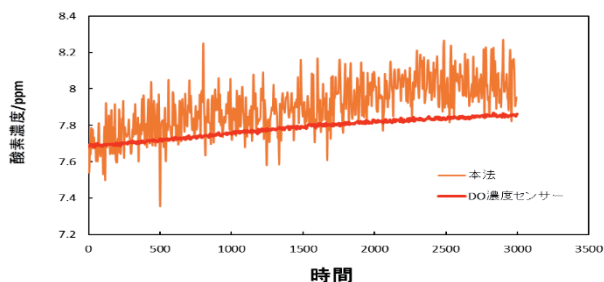


図7 光合成過程のD0濃度の測定結果

4. まとめ

本研究では、最も汎用的なソフトであるExcelを用いて、溶存酸素による蛍光消光の測定データから溶存酸素の濃度を計算できるようになった。また、フィッティング計算では3次関数を用いることにより、今までの2次関数によるフィッティングよりも、より精度がよい結果となった。さらに、植物の固定に2枚のスライドガラスを使うことにより、測定中に植物が微動することが無くなった。

謝辞：本研究は福岡工業大学総合研究機構の研究支援制度により実施したものである。

(令和元年10月18日受付)

文 献

- (1) 光合成の測定, <http://www.photosynthesis.jp/sokutei.html>
- (2) X.-Z. Wu, T. Nakaoka, T. Inoue, and H. Inoue, "Optical Sensing of Materials Movements Occurring at a Plant Surface with a Probe Beam", Sens. Actuators, A, 155, 241-245 (2009).
- (3) L. Nie, M. Kuboda, T. Inoue, X.-Z. Wu, "Effect of acid solutions on plants studied by the optical beam deflection method", J. Environ. Sci., Vol.25 (suppl.), S93-S98 (2013)
- (4) X.-Z. Wu, X. Wu, and T. Inoue, "Real-time in-situ Simultaneous Monitoring of Dissolved Oxygen and Materials Movements at a Vicinity of Micrometers from an Aquatic Plant by Combining Deflection of a Probe Beam and Fluorescence Quenching", Anal. Sci., 33, 351-355 (2017).
- (5) X.-Z. Wu, and L. Huang, "Improvements on the Fluorescence Quenching/Deflection Method for Real-time in situ Simultaneous Monitoring of Dissolved Oxygen and Material Movement-induced