

## 改良型プロダクトメーター（差働式検容計）と その海藻の光合成測定への応用\*

横浜康継\*\*・片山舒康\*\*\*・古谷庫造\*\*\*

\*\* 筑波大学下田臨海実験センター（415 静岡県下田市 5-10-1）

\*\*\* 東京学芸大学生物学教室（184 東京都小金井市貫井北町 4-1-1）

YOKOHAMA, Y., KATAYAMA, N. and FURUYA, K. 1985. An improved type of 'Product-meter', a differential gas-volumeter, and its application to measuring photosynthesis of seaweeds. Jap. J. Phycol. 34: 37-42.

An improvement was made on a gas-volumeter devised by YOKOHAMA and ICHIMURA (1969) and subsequently modified by YOKOHAMA *et al.* (1980). The major improvement is the replacement of the glass stop-cocks, capillary glass tubes and stoppers of the original type, with rubber blocks, rubber capillary tubes and rubber plugs, respectively.

The improved type is just as accurate but is far simpler and can be used easily by high school students. The instrument is suitable for the measurement of the photosynthetic oxygen evolution of small plants or pieces of larger seaweeds, as well as the respiratory oxygen consumption of small animals.

Since a compensation vessel is used in conjunction with the reaction vessel, measurements can be performed without strict regulation of temperature in the water bath. When flasks of about 50 ml capacity are used as the reaction and compensation vessels, it is recommended that about 5-10 ml of filtered seawater is used in both vessels, with a piece of algal frond approximately 3-5 cm<sup>2</sup> in the reaction vessel. In such a case an adequate interval of reading is 1-5 min and the measurement can be finished with 5 to 10 readings.

*Key Index Words:* Gasmetry; photosynthesis; respiration; volumeter.

Yasutsugu Yokohama, Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba, 5-10-1, Shimoda, Shizuoka, 415 Japan; Nobuyasu Katayama and Kurazo Furuya, Department of Biology, Tokyo Gakugei University, 4-1-1 Nukuikita-machi, Koga-*nei-shi*, Tokyo, 184 Japan.

呼吸や光合成は、生物にとってきわめて重要な機能であるにもかかわらず、その測定は敬遠される傾向にあった。そのおもな原因は、古くから呼吸や光合成を測定する標準的方法とされていたワールブルグ検圧法（吉川ら 1956 参照）が高度の熟練を要するためと思われる。最近では溶存酸素計や赤外線ガス分析装置など、呼吸や光合成の測定に利用できる便利な装置が開発されているが、高価なうえ操作もそれほど簡単ではなく、使用方法によっては大きな誤差を生む可能性があって、これらの装置の使用もごく一部の専門家に限られる傾向にある。

このような呼吸や光合成の測定が簡単に行えるようになったら、多くの生物学者にとって、また大学や高

\* 下田臨海実験センター業績 No. 457。本研究は文部省科学研究費補助金総合研究(A)課題番号60304100による研究の一部である。

校での生物教育にとっても、非常に大きな意味を持つことになるであろう。このような考えから YOKOHAMA and ICHIMURA (1969) は、原理および操作が共に検圧計より簡単でありながら従来あまり用いられなかった検容計の改良を試み、反応容器の他に対照容器を用いた差働式検容計の改良型である置換式検容計の一種を開発した。それは小型動植物の呼吸や水生植物の光合成などの測定に適したものと考えられるが、実際に海藻や微細藻類を対照とした研究に用いられ、多くの成果が挙げられてきた（畑・横浜 1976, Ikehara *et al.* 1981, 影山・横浜 1977, Kageyama *et al.* 1979, Katayama *et al.* 1985, Mizusawa *et al.* 1978, Yokohama 1972, 1973, 横浜 1973a, 1973b)。

この装置はプロダクトメーターと名付けられ、高校

の生徒実験での使用も試みられてきたが、初めて使用する生徒が1～2時間という限られた時間内に操作法を会得したうえでデータまで出さなければならないという教育現場の実情に合わせて、構造や操作の一層の簡便化が試みられた。その結果初め毛細ガラス管やガラスロックなどから構成されていた本体主要部をプラスチックブロックと毛細ゴム管を組み合わせたものに代え、最も面倒であったロック操作をプラスチックブロック上の2つの小孔をビニールテープで開閉するという単純な操作に変えることができた (YOKOHAMA *et al.* 1980, 横浜ら 1981)。しかしプラスチックブロックには5本のプラスチック管が接着されているために、接着の不完全などによるトラブルの生じやすいことがわかり、再度の改良が試みられ、プラスチック製であった部分の素材をゴムに代え、毛細ゴム管と一体成形することができた。

本報文では、この方式の装置の構造と操作および応用例について記す。

## 構造

Fig. 1 に大学や高校での実習のほか専門的な研究にも使用できる小型のセットを示す。本体・反応容器 (R) と対照容器 (C) ・水槽および光源からなるが、本体は Fig. 2 に示されているように、一端がゴム栓 (RP) で他端がゴムブロック (RB) で終る毛細ゴム管 (RT) 2本 (Fig. 3), 双方のゴムブロックを連結する毛細ガラス管製のU字管 (U) ・左側のゴムブロックに接続された目盛管 (G) ・その下端に接続された耐圧ゴム管製の液溜め (FR) およびそれを圧する調節ネジ (S) などをプラスチック板 (P) に固定したものである。

U字管の底部の表面には2本の定線 (FM) が刻まれていて、その内部には双方の定線にまたがるくらいの長さの液滴 (I) が形成されている。左側のゴムブロックに接続されている目盛管は、0.1 ml のメスピペットの上部を直角に曲げたもので、その1目盛は 1  $\mu$ l を示している。

水槽の下には背面に対して45度の角度で鏡が固定されており、後方に置かれた光源からの光をそれによって反射して、反応容器の底面へ垂直に当てることができる。

水槽の向かい側の壁の上部にはモーター・回転盤・振とう板からなる振とう装置が固定されている。振とう板下方の左側には反応容器、右側には対照容器がそ

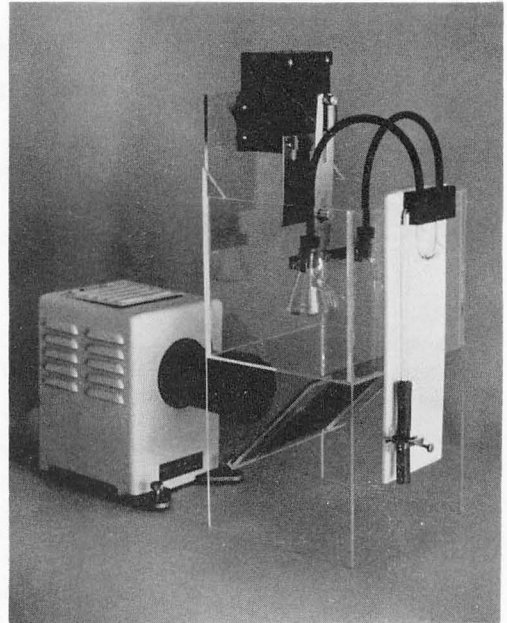


Fig. 1. The whole set of the 'Productmeter' equipped with the light source for measuring photosynthetic oxygen evolution. The set consists of the main part with its reaction and compensation vessels, and a water bath equipped with a motor to shake the vessels.

れぞれ固定され、振幅約 3 cm 毎分 100 回で振とうされるようになっている。

この装置では、反応容器および対照容器として容積約 40 ml の三角フラスコ型のものを用いているが、大型試料のためには、水槽と振とう装置を大型にして、1 l 程度のデンケータ型あるいは培養ビン型の容器を使用することも可能である。また大型の水槽に複数の本体を掛けて使用することによって、多数の試料について同時に測定することもできる。

## 水槽の準備と温度調節

呼吸や光合成の速度は温度に影響されるので、測定中は試料をできるだけ一定の温度に保たなければならない。また反応容器と対照容器の間で温度差が生ずると、それだけでU字管内の液滴が動き、誤差を生むことになる。以上のような理由で、反応容器と対照容器は水槽に浸し、水温をできるだけ一定に保ち、双方の容器の間に温度差の生ずるのを防ぎながら測定を行わなければならない。

水槽の水は振とう板下端の止め金が漬かるくらいま

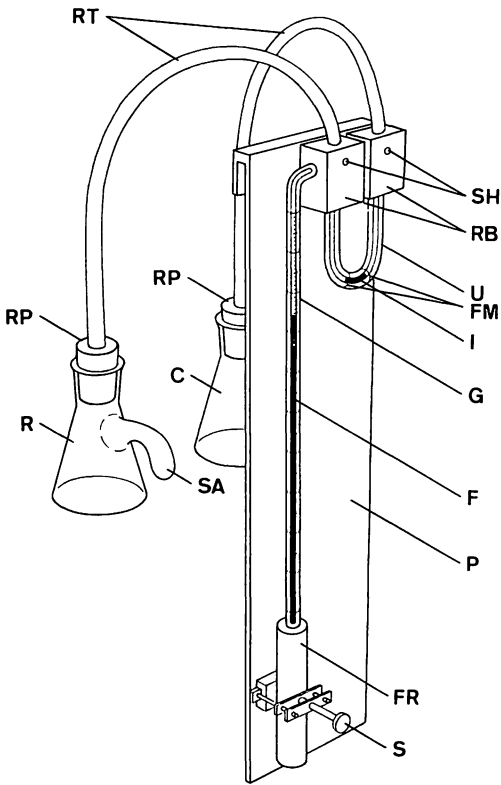


Fig. 2. Schematic diagram of the main part of the 'Productmeter'. RB: rubber blocks, SH: small holes, U: U-shaped capillary tube, FM: fixed marks, I: index drop (kerosene containing 0.01-0.02% sudan black), G: graduated capillary tube, F: colored fluid (aqueous solution of 2% reversed soap such as benzethonium chloride and 0.01-0.02% eosine), FR: fluid reservoir, S: screw clamp, RT: rubber capillary tubes, RP: rubber plugs, R: reaction vessel, C: compensation vessel, SA: side arm, P: plastic plate holding the system.

で入れ、測定に先立って水温を調節しておく。

加熱器あるいは冷却器を断続させる型の温度調節装置を使用する場合は、水をよほどよく攪拌しながらでないと、反応容器と対照容器の間に大きな温度差を生じてしまうことがある。むしろ測定前に湯あるいは冷水を用いて水温を調節し、あとは水槽のための温度調節装置を用いず、設定温度に近い温度の室で測定を行なうようにしたほうが高い精度が得られる。高校の生徒実験などで特定の温度に設定する必要のない場合には、水温を実験室の室温にほぼ等しくするようにすればよいであろう。

水温を室温よりかなり高く、あるいは低く保って測

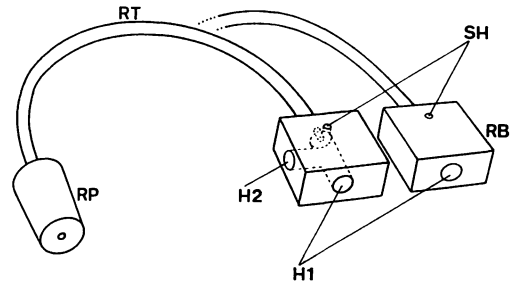


Fig. 3. Rubber parts each of which is composed of rubber plug (RP), rubber capillary tube (RT) and rubber block (RB). SH: small holes, H1: hole connected to the U-shaped capillary tube, H2: hole connected to the graduated capillary tube.

定を行なわなければならない場合は、実験中に時々湯あるいは冷水を注いで温度変動の幅を  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  程度に抑えるという方式で、精度の高い測定を行なうことができる。湯や冷水は読み取り（操作の項参照）の直後に加え、そして速かに水をよく攪拌する。高校や大学での実習の場合、このような作業は、ガス量の測定における温度調節の重要性を認識させるためのよい手段とも言える。

またたとえば室温が水槽の設定温度よりかなり高い場合、水温を設定すべき温度より  $0.5^{\circ}\text{C}$  ほど下げておいて測定を開始し、水温が  $1^{\circ}\text{C}$  上昇するまでに測定を終了するというようにしてもよい。測定の開始から終了まで10分から20分という場合が多く、そのような場合はこの方式が便利である。

温度が  $1^{\circ}\text{C}$  前後変動しても精度の高い測定が可能なのは、対照容器の使用によって、温度変動による反応容器内の空気の体積変化が抑えられるからである。対照容器を用いない方式では、検圧法検容法のいずれでも、きわめて厳密な温度調節が必要となる。

### 装置の組み立て

液溜め (FR) に界面活性剤を含んだ着色液 (市販の逆性石ケン液を約5倍にうすめ、エオシンを 0.01~0.02% 溶かしたもの) を口まで入れ、泡が生じたら取り除いてから、目盛管 (G) の下端 (細くなった側) を目盛の下端近くがかくれるまでさしこむ。液が上端からあふれるが、ペーパータオル等で吸い取り、さらに液溜めを指で押して、液をあふれさせ、指を離れた時に管内の液柱の上端が目盛の下限附近に位置するように

する。目盛管の途中で気泡が生じたり上方に液滴が生じたりした場合は、液溜めを指で速かに押してからゆっくり離すという動作をくり返すと、それらは消える。

目盛管の上端をよく拭いてから、側面に穴の開いたゴムブロック (RB) の側面の穴 (2H) に十分にさしこみ、管部が斜めになるように立てかけておく。

U字管(U)に着色したケロシン (ケロシンは精製した灯油。スタンプラック等の脂溶性色素を溶かす) を少量注入してから、目盛管のさしこまれたゴムブロックの下面の穴 (H1) に一端をさしこみ、他端は側面に穴のないゴムブロックの下面の穴にさしこむ。この時左右のゴムブロックの小孔 (SH) は前面を向いてなければならない。

双方のゴムブロックの裏面に両面テープをはり、液溜めを調節ネジ (S) の押板の下に通してから、ゴムブロックをプラスチック板 (P) の上端へ右寄りに固定する。

以上のようにして組み立ての終わった本体は、プラスチック板の裏側上端の折り返し部分を使って、水槽の前面に掛けておく。

## 操 作

海藻や水草の光合成を測定する場合は、反応容器 (R) に 3~5 cm<sup>2</sup> の海藻葉片と 5~10 ml の濾過海水または水草の小片と池や湖の水か 0.1~0.2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液を入れ、対照容器 (C) には反応容器に入れたのと同量の水を対照容器に入れる。

両方の容器の口の内側にごく少量の水をつけてから、反応容器には左側のゴム栓を、対照容器には右側のゴム栓をそれぞれ、口のすり合わせ部分が透明になるまで強くさしこんで、水槽の振とう板に固定し、振とうを開始する。

小型の動植物体などの呼吸を測定する場合は、反応容器の側室 (SA) に 20% KOH 溶液 (CO<sub>2</sub> 吸収剤) 数滴を先の曲ったスポイトで入れてから、主室に生物体を入れ、対照容器には少量の水を入れる。海藻の呼吸を測定する場合は、反応容器の主室には 3~5 cm<sup>2</sup> の葉片 2~4 枚と濾過海水 5~6 ml を入れ、対照容器にはほぼ同量の濾過海水だけを入れる。

振とうを始めてから約10分後、光合成測定の場合は、

目盛管 (G) 内の着色液 (F) の上端を目盛の上限近くまで押し上げておき、まず光源を点灯してから、左右のゴムブロック (RB) の小孔 (SH) をビニールテープでふさぎ、調節ネジ (S) を回してU字管 (U) 内の液滴 (I) の左端を左側の定線 (FM) に合わせ、目盛管内の着色液の上端の位置を読む。この時が測定開始時 (0時) である。

呼吸測定の場合は、目盛管内の着色液の上端を目盛の下限近くまで下げておき、左右のゴムブロックの小孔をビニールテープでふさいでから、調節ネジを回してU字管内の液滴の右端を右側の定線に正確に合わせ、目盛管内の着色液の上端の位置を読む。

ただ光合成植物の呼吸を測定する場合は、室を暗くするか、反応容器と対照容器をアルミホイルで包むかして、植物体に光があたらないようにしなければならない。室を暗くした場合、読み取りは小型の懐中電灯などを用いて行なう。

反応容器内での酸素の増減につれてU字管内の液滴は移動するが、1分あるいは2分ごと、また反応の遅い場合は5分ごとに、調節ネジを回してU字管内の液滴をもとの位置にもどし、目盛管内の着色液上端の位置を読み取る。

読み取りを10回ほどくり返したら、振とうを止め、左右のゴムブロックからビニールテープを同時にはがし、容器を振とう板からはずす。

## 記録とデータ処理

Table 1 は、褐藻ホソメコンブの 3 cm<sup>2</sup> の葉片を約 7 ml の濾過海水と共に容積約 40 ml の反応容器に入れ、15°C において 40 Klux の光をあてた時の反応容器内のガス量増加を測定した記録例である。目盛管内の着色液上端の位置の各時刻における読みを A 欄に記入し、それから 0 時における読みを差し引いた値を B 欄に記入すると、B 欄の値は各時刻までに反応容器内のホソメコンブ葉片から発生した酸素の体積とみなすことができる。

時間を横軸にとり、B 欄の値をたて軸にとって作製したグラフが Fig. 4 である。各点がある傾きを持った直線 (測定開始直後は光合成速度の低い場合があるので、直線は必ずしも原点を通るとはかぎらない。また測定を長時間続けていると、海水中の CO<sub>2</sub> 濃度低下のために光合成速度が低下して、点が直線から下方へずれることがある) に沿って並んでいることがわかるが、その傾きが酸素発生速度で、純光合成速度 (み

Table 1. An example of recording oxygen evolved by a frond piece of 3 cm<sup>2</sup> of *Laminaria angustata* under light of 40 Klux at 15°C. A: readings of the position of the colored fluid meniscus in the graduated capillary tube. B: difference between the reading at 0-time and that at each time.

Mar. 19, 1985 Ozuchi, Iwate Pref.  
*Laminaria angustata* 3.0 cm<sup>2</sup> (16.2 mg dry wt.)  
 Filtered seawater 7 ml  
 Light 40 Klux  
 Water bath 15°C  
 Room 16.1°C

	A	B
0 min	5.0	0 $\mu$ l
2	9.0	4.0
4	15.9	10.9
6	22.0	17.0
8	28.9	23.9
10	36.9	31.9
12	43.0	38.0
14	50.0	45.0
16	56.3	51.3
18	63.0	58.0

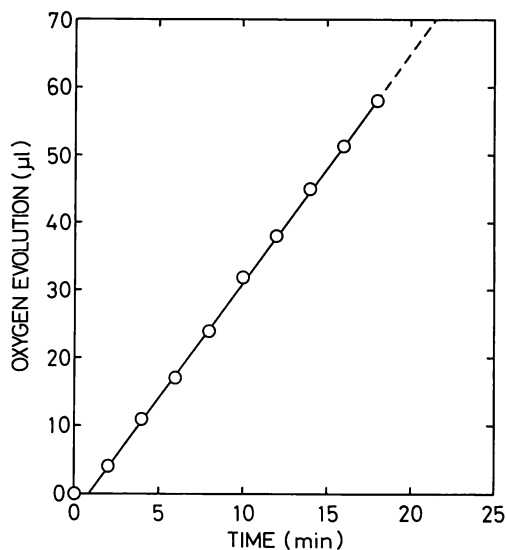


Fig. 4. Time course of oxygen evolution from a 3 cm<sup>2</sup> frond piece of *Laminaria angustata* under a light intensity of 40 Klux at 15°C.

かけの光合成の速度)を意味する。その傾きは20分あたりにして 67.7  $\mu$ l なので、1時間あたりになると 203  $\mu$ l となる。

この値は目盛管の温度すなわち室温の 16.1°C の下で1気圧の状態にある酸素の体積として表わされたものと考えられるので、これを標準状態すなわち 0°C・1気圧における体積として表わすには、以下のような計算を行なう。

$$203 \times \frac{273}{273 + 16.1} \approx 191.7$$

一般に室温  $t$ °C (水槽の温度でないことに注意)の下で得られた値  $v$   $\mu$ l O<sub>2</sub>/h を標準状態の値にするには以下の式を用いる。

$$v \times \frac{273}{273 + t}$$

191.7 を葉片の面積 (3 cm<sup>2</sup>) で割ると単位葉面積あたりの純光合成速度 63.9  $\mu$ l O<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup>/h が得られる。また葉片の乾燥重量は 16.2 mg だったので、それで割ると単位乾燥重量あたりの純光合成速度 11.8  $\mu$ l O<sub>2</sub>/mg dry wt./h となる。

Table 2 は、ホソメコンブの 3 cm<sup>2</sup> の葉片 4 枚を約 5 ml の濾過海水と共に容積 40 ml の反応容器に入れ、その側室には 20% KOH 溶液数滴を入れて、15°C の暗中で呼吸による酸素消費量を測定した時の記録例で

Table 2. An example of recording oxygen consumed by four frond pieces of 3 cm<sup>2</sup> of *Laminaria angustata* in the dark at 15°C. Notations are the same as in Table 1.

Mar. 20, 1985 Ozuchi, Iwate Pref.  
*Laminaria angustata* 3.0 cm<sup>2</sup> × 4 (66.0 mg dry wt.)  
 Filtered seawater 5 ml  
 Dark  
 Water bath 15°C  
 Room 16.0°C

	A	B
0 min	71.2	0 $\mu$ l
2	70.5	-0.7
4	68.8	-2.4
6	68.2	-3.0
8	66.3	-4.9
10	64.5	-6.7
12	64.0	-7.2
14	63.0	-8.2
16	61.5	-9.7
18	60.8	-10.4
20	59.0	-12.2

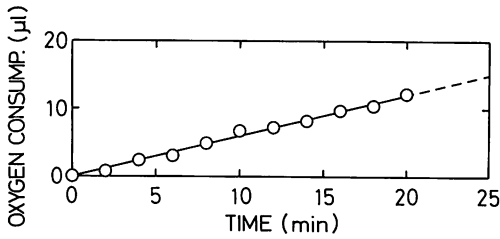


Fig. 5. Time course of oxygen consumption by four frond pieces of 3 cm<sup>2</sup> of *Laminaria angustata* in the dark at 15°C.

ある。この場合 *B* 欄の値は負となるが、たて軸に酸素消費量をとって作製したグラフが Fig. 5 である。やはり各点がある傾きを持った直線に沿って並ぶが、その傾きは酸素消費速度すなわち呼吸速度を意味する。その値は 36.0 μl O<sub>2</sub>/h であるが、標準状態における値は 34.0 μl O<sub>2</sub>/h となる。それを葉片面積 12 cm<sup>2</sup> で割ると 2.83 μl O<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup>/h となり、また乾燥重量 66.0 mg で割ると 0.52 μl/mg dry wt./h となる。

#### 引用文献

- 畑 正好・横浜康継 1976. 本邦北部産海藻の光合成—温度特性とその季節変化。藻類 24: 1-7.
- IKEHARA, N., ISA, Y. and YAMASATO, K. 1981. The separation of Zooxanthellae from a coral, *Euphyllia glabrescens* (CHAMISSO and EYSENHARDT). Sesoko Mar. Sci. Lab. Tech. Rep. (8): 1-5.
- 影山明美・横浜康継 1974. 生育深度を異にする褐藻の光合成特性。藻類 22: 119-123.
- 影山明美・横浜康継 1977. 深所性緑藻の色素と光合成。藻類 25: 168-175.
- KAGEYAMA, A., YOKOHAMA, Y. and NISIZAWA, K. 1979. Diurnal rhythm of apparent photosynthesis of a brown alga, *Spatoglossum pacificum*. Bot. Mar. 22: 199-201.
- KATAYAMA, N., TOKUNAGA, Y. and YOKOHAMA, Y. 1985. Effect of growth temperature on photosynthesis-temperature relationships of a tide pool alga *Cladophora rudolphiana* (Chlorophyceae). Jap. J. Phycol. 33: 312-316.
- MIZUSAWA, M., KAGEYAMA, A. and YOKOHAMA, Y. 1978. Physiology of benthic algae in tide pools I. Photosynthesis-temperature relationships in summer. Jap. J. Phycol. 26: 109-114.
- YOKOHAMA, Y. 1972. Photosynthesis-temperature relationships in several benthic marine algae. Proc. 7th Intl. Seaweed Symp.: 286-291.
- YOKOHAMA, Y. 1973. A comparative study on photosynthesis-temperature relationships and their seasonal changes in marine benthic algae. Int. Revue ges. Hydrobiol. 58: 463-472.
- 横浜康継 1973a. 生育深度を異にする緑藻の光合成特性。藻類 21: 70-75.
- 横浜康継 1973b. 生育深度を異にする紅藻の光合成特性。藻類 21: 119-124.
- YOKOHAMA, Y. and ICHIMURA, S. 1969. A new device of differential gas-volumeter for ecological studies on small aquatic organisms. Journ. Oceanogr. Soc. Japan 25: 75-80.
- YOKOHAMA, Y., KATAYAMA, N. and FURUYA, K. 1980. Simplification of gasmetry for measuring respiration and photosynthesis. Proc. 8th Biennial Conf. AABE: 159-165.
- 横浜康継・片山舒康・古谷庫造 1981. 呼吸・光合成簡易測定装置。遺伝 35(3): 22-27.
- 吉川春寿他 1956. ワールブルグ検圧計。南江堂, 東京。