

高速液体クロマトグラフィーを用いた植物プランクトンの活性量の評価

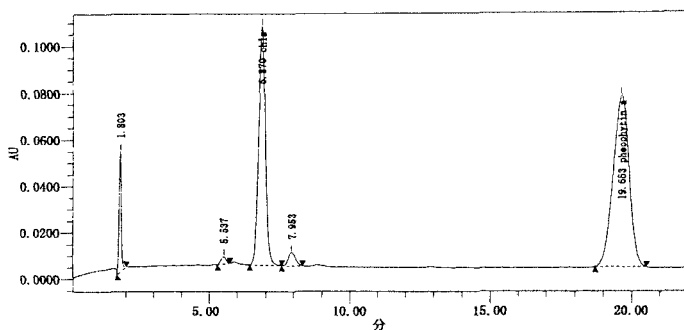
長崎大学工学部 学生員○小野 敏幸 長崎大学大学院 学生員 内田 祐介
 長崎大学工学部フェロー 野口 正人 長崎大学工学部 正会員 西田 渉

1. はじめに

現在、閉鎖性水域などでは汚濁物質の流入・蓄積に伴う富栄養化現象が問題となり、その防止対策の構築が急務とされている。これらの富栄養化現象を明らかにするには、植物プランクトンの活動を把握することが重要となってくる。今回植物プランクトン内に含まれる色素で、活性度の高いプランクトンに含まれるクロロフィルaと、活性度が低かったり、枯死したプランクトンに含まれるフェオフィチンaに着目した。したがって本研究では、クロロフィルa、フェオフィチンa濃度の日周変化を高速液体クロマトグラフィーを用いて計測した。また、併せて生物顕微鏡を用いることにより植物プランクトンの優占種を明らかにして、プランクトンの種類に対応した活性量の評価を試みると共に、両者の対応関係について考察した。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による計測

今回の計測に用いた高速液体クロマトグラフィーの仕組みは、内部に設置されたカラムを物質が通過する際、その通過速度の違いにより物質を分離し、UV検出器により得られたピーク面積から濃度を測定する装置である。実際に不知火橋で採水された検水に対して、HPLCを用いたクロロフィルa、フェオフィチンaの計測例を示せば【図一1】のようである。7分前後に現われているピークがクロロフィルaを示し、19分前後に現われているピークがフェオフィチンaを示す。得られたピーク面積から検量線をもとに濃度が決定される。



【図一1】 HPLC の計測例

3. 植物プランクトンの活性量の評価法

植物プランクトンの種類別に活性量の評価を行なうため、平成12年12月上旬に本明川河口に位置する不知火橋付近、同年12月下旬に長崎大学内の池1・2の3地点を対象にして、6時から18時まで2時間おきの採水を行いクロロフィルa、フェオフィチンaの日周変化を測定する。測定日は3地点とも同じ条件になるようにいずれも晴天の日を選んだ。ここで得られたクロロフィルa濃度の日周変化から植物プランクトンの増殖速度を求め、フェオフィチンa濃度の日周変化から植物プランクトンの枯死速度を求める。以上の水質計測から求められた植物プランクトンの増殖速度と枯死速度を以下の式に代入し、植物プランクトンの生産速度を求めることにした。

$$\text{増殖速度} = \text{生産速度} - \text{枯死速度} \quad \dots (1)$$

また、植物プランクトンの種類に対応した活性量の評価を行うため、生物顕微鏡を用いて各地点ごとの優占種を決定することにした。すなわち、採水したサンプル990mlに中性ホルマリン10mlを注入することで植物プランクトンを凝固させ、沈殿させるために2、3日放置する。その後、アスピレータで900mlを上部から吸い上げる。次に下部に残った100mlのサンプルを遠沈管にいれ、再び2、3日放置した後、アスピレータで90mlを上部から吸い上げ、残った10mlのサン

【表一1】 3地点の上位3位の優占種

不知火橋の優占種

分類	科	属	割合(%)
緑藻類	ツツミ	コウガイシリモ	42.1
珪藻類	フナガタウ	フナガタウ	32.4
緑藻類	ファコツク	ファコツク	10.0

大学内池1の優占種

分類	科	属	割合(%)
緑藻類	デズジウム	スタウラストルム	98.0
緑藻類	ツツミ	ミカツキモ	1.0
緑藻類	オオキスチス	エレモスファエラ	1.0

大学内池2の優占種

分類	科	属	割合(%)
緑藻類	ウロツリクス	ウロツリクス	48.5
藍藻類	クロオコックス	ミクロキステイス	17.3
珪藻類	コアミケイウ	ヒマルケイウ	9.7

ルから 1ml を計数板に浸し、300 個体をカウントして植物プランクトンを種類別に分けてその割合を出し、優占種を決定した¹⁾。3 地点の優占種上位 3 位までを【表-1】に示す。大学内池 1 は、ほぼ 100% 近い割合で優占種が決定され、不知火橋と大学内の池 2 は半数弱で優占種が決定された。また不知火橋、大学内の池 1、大学内の池 2 の優占種の 400 倍の写真を【写真-1】から【写真-3】に示す。以上のことから、決定された優占種一個体当たりの増殖速度、枯死速度がわかり、(1) 式から優占種一個体当たりの生産速度を求める。それから植物プランクトンの種類ごとの生産速度、枯死速度から評価を行うことにした。

4. 考察

植物プランクトンの活性量の評価を行うため、HPLC によりクロロフィル a 濃度を測定した。その測定結果から単位時間当たりの濃度変化を計算し、対象水域全体の増殖速度を求めることにした。【図-2】の上図はクロロフィル a 濃度の日周変化を示したものである。図より大学内の池 2 の 10 時のクロロフィル a 濃度に大きな変化が見られるが、これは対象水域における偶発的な要因、もしくは計測過程でのミスによるものではないかと考えられる。大学内の池 1 の濃度は他の不知火橋や大学内の池 2 の濃度に比べ 3 倍ほど高い値を示しており、汚濁の程度が異なっていることがわかる。また、図中のクロロフィル a 濃度の時間的変化を見れば、8 時から 10 時の間は濃度の増加が見られるが、10 時以降は濃度が減少していることが見てとれる。

つぎに、【図-2】の下図には、対象水域全体の増殖速度の時間的変化が示されている。ここに、大学内の池 2 の濃度に対応した変化があるが、全般的に増殖速度は似通った値になっている。前述された理由より当然なことながら、10 時から 12 時を境にして増殖速度は正の値から負の値に変化している。

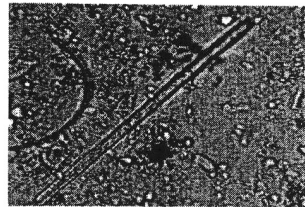
ところで、上述されたように測定対象に選ばれた 3 水域の汚濁の程度は違っており、優占種が水域の全体の藻類に占める割合は異なっている。そのため、対象水域全体での増殖速度の値から優占種の増殖速度を直ちに求めることはできない。しかし、【表-1】より明らかのように、大学内の池 1 の優占種は水域に含まれる藻類のほぼ全部であり、図中の増殖速度は緑藻類のスクラストム科のものと理解できる。これに対して、他の 2 水域での優占種と同じく緑藻類のツギヤリやカワツクスは、水域の藻類の全体のものとして優占種とされた訳ではなく、先ほど示された増殖速度をそのまま優占種の増殖速度と見なすことができない。現在は本論で取り上げられた形での水質観測は始められたばかりでデータの数が多くないが、データの増加に伴い、簡単な方程式を解くことにより個々の種の増殖速度を計算することができる。ともあれ、藻類の個々の種に対して増殖速度を求めることは、適切な水域の水質管理を行って行く上で重要である。

5. おわりに

本研究では、植物プランクトンの生存しているものと、枯死しているものとに注目し、HPLC、生物顕微鏡を用いて個々の種類の活性量について評価しようと試みた。目下のところ、濃度が低い場合のフェオフィチン a 濃度の検出がされていない問題があり、最終的な研究目的は果たされていない。しかし、その方法を提案するとともに、水域での藻類の優占種の評価を行い、個々の種について増殖速度を求める方法を示した。今後はフェオフィチン a 濃度を検出し、藻類の枯死速度を定量的に評価することで水域に優占的な藻類の生産速度を求めていきたい。

【参考文献】

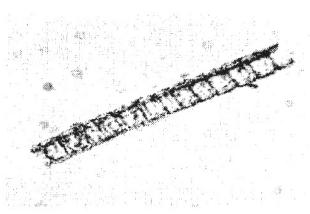
- 1) 気象庁：“海洋観測指針（第一部）” 第 6 章プランクトンの観測、pp109~115、1999



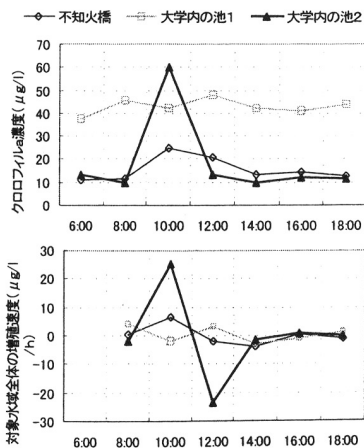
【写真-1】緑藻類ツギヤリ科



【写真-2】緑藻類ツギヤリ科



【写真-3】緑藻類カワツクス科



【図-2】水質計測の結果