

(2) 植物プランクトンの光合成色素を指標とした 佐賀県内湖沼における優占種の推定

副島かおり

Estimate of dominants in the lakes of Saga Prefecture using photosynthetic pigments as indicator

Kaori Soejima

要旨

植物プランクトンは光合成色素としてクロロフィル a を有し水質指標として利用されているが、それ以外にも各綱ごとに特徴的な色素を有する。これらの色素を県内ダム湖で観察される代表的な植物プランクトンの綱について高速液体クロマトグラフィーフォトダイオードアレイ検出器を用いて定量を試み、各地点における優占種を綱レベルで推定した。

キーワード：植物プランクトン、クロロフィル、カロチノイド、高速液体クロマトグラフ

はじめに

水質の富栄養化の指標として、植物プランクトンに含まれる光合成色素であるクロロフィル a (chl-a) は最も一般的に利用されている。

しかし、水中のchl-a濃度は植物プランクトンの総量の目安にはなるが、どのような種類が優占しているかについての情報は得られない。一方、植物プランクトンはchl-a以外にもその綱ごとに特徴的な色素を持つことが知られている。¹⁾ すなわち、水中のchl-aだけでなく他の色素を測定することによって、優占しているプランクトンが綱レベルで推定できる。植物プランクトンの優占種は、検鏡によってそれぞれの種の個体数を計測することによって最も確かな情報が得られるが、そのためには分類学的な知識と多くの時間を要する。以上のことから、簡便な測定で植物プランクトンについてchl-aのみの測定より多くの情報を得られる高速液体クロマトグラフ (HPLC) による分析が近年多く報告され

ている。^{2)~7)}

佐賀県内の湖沼では、植物プランクトンに関しては、現在chl-a以外には継続的な調査が行われていないため、どのようなプランクトンが優占し、変遷してきたかといったデータが不足しているのが現状である。そこで、どの綱の植物プランクトンが存在するかを把握し、更に異常水質発生時の原因究明の一助とするために、HPLCを用いた色素の分析を試みた。

材料と方法

1) 標準品及び試薬

クロロフィル a、クロロフィル b、 β -カロチン標準品は、和光純薬製を使用した。

アセトン及びメタノールは関東化学製HPLC用グレードのものを使用した。

水酸化テトラブチルアンモニウムは和光純薬製HPLC用を使用した。

酢酸アンモニウムは和光純薬製特級品を使用

した。

イオンペア試薬 (P 溶液)²⁾ は 0.5 M 水酸化テトラブチルアンモニウム 10 mL と酢酸アンモニウム 7.7 g を純水で 100 mL に希釈したものを使用した。

水は、ミリQ-SP-TOC システムで調製したものを使用した。

2) 前処理操作

標準品が入手可能な色素以外は、藻類を培養して得た。藻類は、県内の湖沼でよく見られる種を選んだ。

緑藻は、*Closterium acerosum* (NIES-124)、*Senedesmus acuminatus* (NIES-92) の 2 種を、珪藻は *Melosira granulata* (NIES-333) の 1 種を使用した。これら 3 株は国立環境研究所微生物保存施設から分譲を受けたものを培養した。藍藻は蓮池公園内の池から採取した *Microcystis* の混合物を培養して使用した。

水試料からのサンプリングは、各 500 mL を Wat t m a n GF/C 濾紙で濾取した後、窒素置換し、-30℃で凍結保存し、できるだけ早く抽出操作を行い分析に供した。

色素は 90% 冷アセトン 10 mL を加えて濾紙ごとホモジナイズし、遠心分離して抽出を行った。²⁾ 抽出物は、ミリポア Columngard-LCR 13 で濾過してから HPLC 分析を行った。

3) HPLC 分析

HPLC のシステムは WATERS LC モジュール 1、検出器は WATERS 991 J フォトダイオードアレイ検出器を使用した。

検出波長は定量には 440 nm、定性のために各ピークのスペクトルを得るためには 350 から 650 nm の波長範囲を用いた。

HPLC 用のカラムは、WATERS Puresil C18 (4.6×150mm) を 35℃ で使用した。

表 1 緑藻における色素の存在比

	<i>Senedesmus</i>	<i>Closterium</i>	平均
ルテイン	0.11	0.11	0.11
chl-b	0.38	0.31	0.35
chl-a	1.0	1.0	1.0

色素抽出物は、前処理後、オートサンプラー用バイアルに移し、HPLC に 30 μL を注入した。

色素の溶出は MANTOURA らの方法²⁾ を参考にし、次のような条件で行った。即ち、溶媒 A (P 溶液：水：メタノール：アセトン 5：25：50：20) から溶媒 B (メタノール：アセトン 80：20) を 10 分のリニアグラジエント溶出で行い、溶媒 B 100% のアイソクラティック溶出で 15 分保持した。

HPLC の流速は 1.5 mL/分 で一定とした。

4) 定性及び定量

試料中の色素の定性は、既報の文献に基づいて^{2) 3) 4)}、各々の分離されたピークのスペクトル及びリテンションタイムから行った。

定量は標準品が得られる色素については各ピークの 440 nm における吸光度から求めた。標準品が得られないものについては、440 nm における吸光係数の文献値^{1) 2) 3)} を利用して、chl-a に対する比から算出した。

結果と考察

1) 培養試料における色素分布

各培養試料の 440 nm における代表的なクロマトグラムを図 1 に示した。2 種の緑藻は、いずれも緑藻綱に特徴的な色素であるルテインと chl-b が検出された。主な色素の Chl-a に対する存在比の平均値を表 1 に示す。β-カロチンは試料間のばらつきが大きかったため、また存在比の低い色素については、簡便な測定を目的とする意味で、実試料での定性及び定量が困難になる可能性を考慮して割愛した。

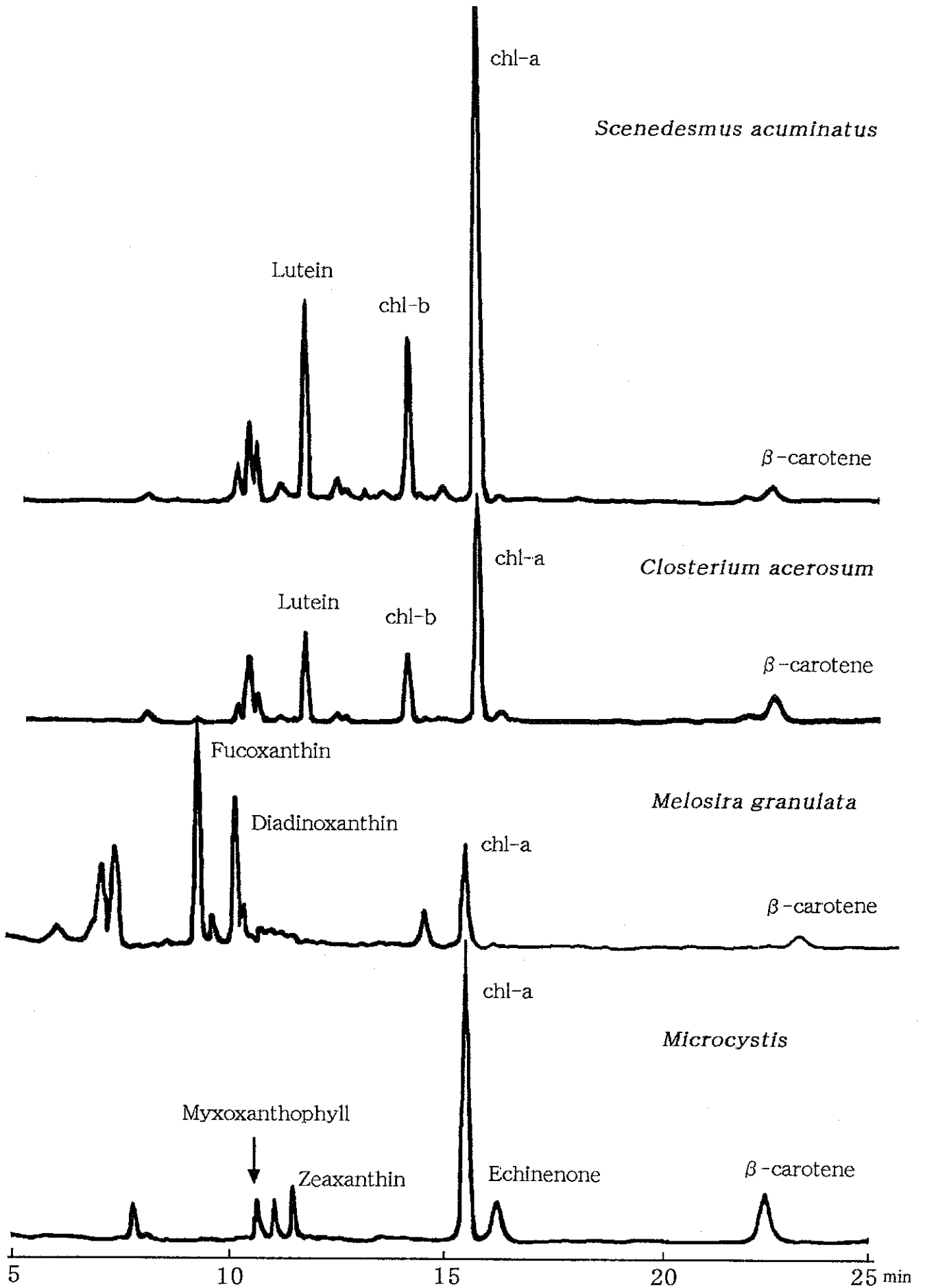


図1 培養試料のクロマトグラム

表2 珪藻における色素の存在比

	Melosira
フコキサンチン	1.0
ディアディノキサンチン	0.30
chl-a	1.0

表3 藍藻における色素の存在比

	Microcystis
ミクソキサントフィル	0.046
chl-a	1.0
エキネノン	0.040

緑藻においては、2種の間で各色素の存在比に違いが見られたが、特徴的な色素であるルテインとchl-bに関しては2種の間で大きな差は認められなかった。このことから、これら2つの色素は緑藻の指標として用いることができると考えた。

珪藻は*Melosira granulata*のみで検討した。珪藻に特徴的な色素であるフコキサンチンとディアディノキサンチンは培養試料間で比較的存在比が一定していた。珪藻に関しては他の種で検討を行っていないので、種の間でこれらの色素分布が変動する可能性を考える必要があるが、大まかな目安としては利用できると思われる。

藍藻は*Microcystis*の混合物である。藍藻に特有な色素であるミクソキサントフィルとエキネノンのうち、ミクソキサントフィルは培養試料間でばらつきが大きかった。エキネノンについては、この試料では大きなばらつきは認められなかった。藍藻に関しても*Anabaena*等、他の種では色素分布の変動が予想されるが珪藻同様どのようなプランクトンが優占しているかを知る手がかりはつかめると考える。

2) 環境試料中の色素分析

今回分析に供した試料は、当所で監視測定を実施している県内湖沼等でプランクトンが異常発生した際のものが主である。これら環境試料

における各色素の濃度及びchl-aに対する存在比を推定される優占藻類ごとに表4から表7及び図2から図5にまとめた。

表4 緑藻が優占した試料の濃度

北山ダムH6/8	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
ルテイン	2	0.14
chl-b	5.5	0.39
chl-a	13.9	1.00
本部ダムH5/10	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
ルテイン	1.9	0.13
chl-b	8.8	0.61
chl-a	14.2	1.00
本部ダムH7/10	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
ルテイン	9.4	0.20
chl-b	13.2	0.28
chl-a	46.4	1.00

表5 珪藻が優占した試料の濃度

北山ダムH7/10	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
フコキサンチン	2.1	0.29
ディアディノキサンチン	1.0	0.14
ゼアキサンチン	0.86	0.12
chl-b	0.34	0.05
chl-a	0.71	1.00
伊岐佐ダムH7/4	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
フコキサンチン	0.26	0.55
ゼアキサンチン	0.58	0.12
chl-b	0.27	0.05
chl-a	4.7	1.00

表6 藍藻が優占した試料の濃度

伊岐佐ダムH7/10	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
ミクソキサントフィル	0.91	0.03
chl-a	30.2	1.00
エキネノン	2.2	0.07

表7 緑藻と珪藻が多く存在する試料の濃度

北山ダムH7/8	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
フコキサンチン	1.6	0.36
ディアディノキサンチン	1.1	0.25
ゼアキサンチン	0.17	0.04
chl-b	0.98	0.22
chl-a	4.3	1.00
養父田ため池	濃度($\mu\text{g/L}$)	存在比
フコキサンチン	4.2	0.39
ゼアキサンチン	2.3	0.21
chl-b	1.6	0.14
chl-a	10.7	1.00
エキネノン	0.14	0.01

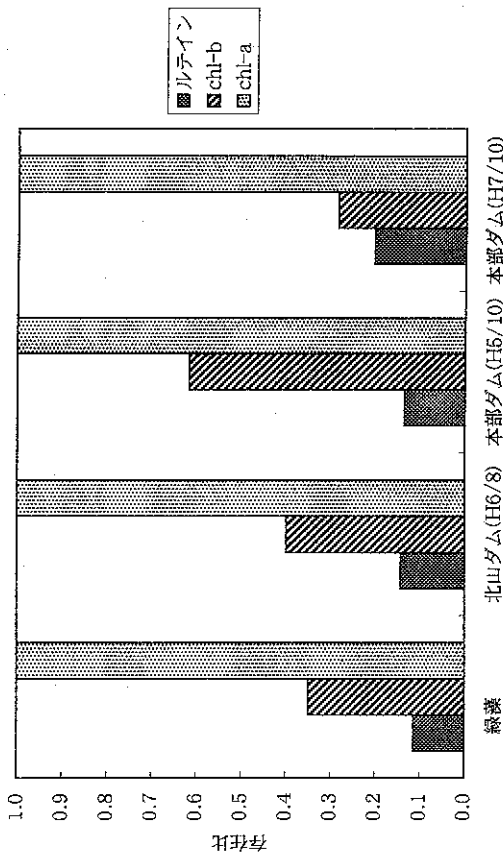


図2 緑藻が優占している試料の色素分布

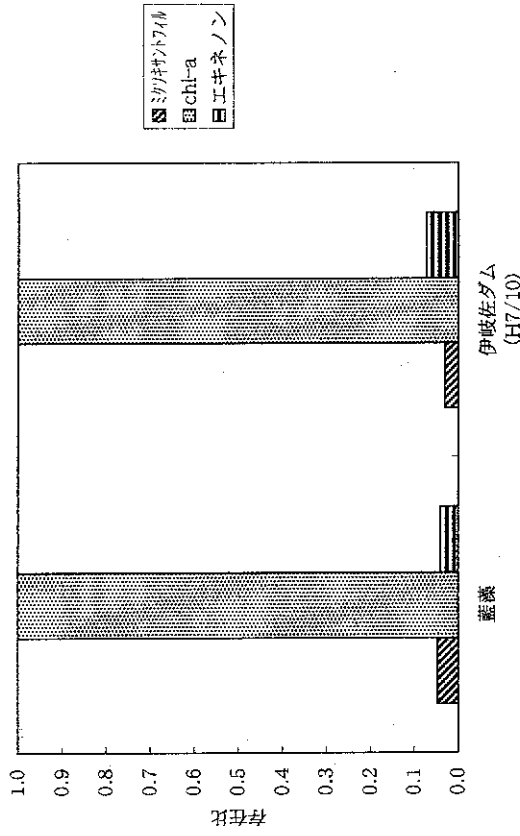


図4 藍藻が優占している試料の色素分布

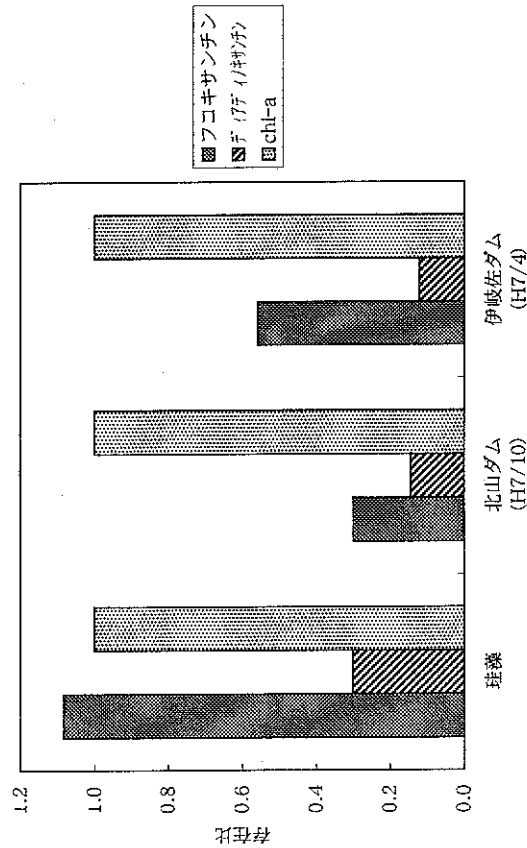


図3 珪藻が優占している試料の色素分布

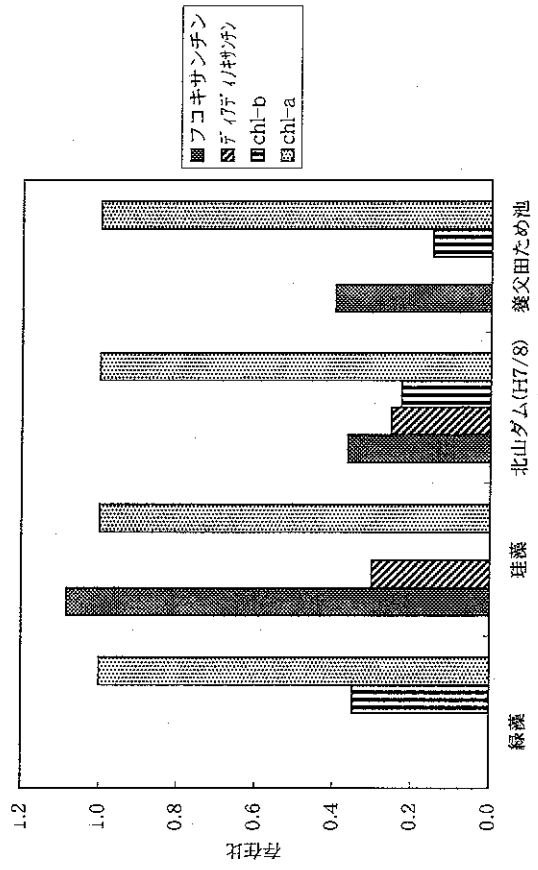


図5 緑藻及び珪藻が多く含まれる試料の色素分布

緑藻が優占していると考えられる試料は、いずれも肉眼で見ても緑色に着色していることが分かるものであった。図2からchl-aに対するchl-b又はルテインの存在比が培養試料と同等か、又はそれより高い値を示すことからこれら3検体はいずれも緑藻綱のプランクトンが優占しているものと考えた。

珪藻が優占していると推定される試料は、藻類が異常発生した試料ではなく、それぞれの湖沼のバックグラウンドを示すものである。表5に示すとおり、他の綱の代表的な色素と比較すると、フコキサンチン及びディアディノキサンチンの比は高いが、図3を見るといずれの色素も培養試料に比べて低い存在比となっている。

珪藻綱は*Melosira granulata* 1種のみで比較しているため必ずしも培養試料と一致しない可能性があり、他の種と比較することが必要であろう。

藍藻が優占していると考えられる試料については、試料採取時に湖面全体がアオコで覆われており、検鏡で数種の*Anabaena*の存在が確認された。この試料では他の綱に特徴的な色素がほとんど検出されなかった。藍藻に関しても珪藻同様の理由で、他の種についても検討すべきであろう。

表7及び図5に示した試料は緑藻綱に特徴的な色素と珪藻綱に特徴的な色素の両方が高い存在比を示したものである。養父田ため池の試料は唐津保健所から苦情処理として持ち込まれたものであったが、検鏡においても著しく優占している種が見あたらなかった。

今回はプランクトンが異常発生している試料や比較的個体数の多い時期の試料について検討した。プランクトンの経年変化を追うためには更に感度を上げるためにHPLC条件の改善が必要であり、また、今回検討した綱のうち、他の種についてのデータも必要である。更に、今回検討した以外の綱のプランクトンについても検討の余地がある。

まとめ

植物プランクトンの各綱に特徴的な色素についてHPLCを用いた分析を行った。県内湖沼で藻類が異常発生した際の採取試料では、優占している綱について推定可能な結果が得られた。湖沼の富栄養化の状態を把握するために、湖沼における優占種の変遷をモニタリングするためには更に若干の検討が必要であろう。

参考文献

- 1) 西沢ら、藻類研究法(1979)
- 2) R. F. C. MANTOURA, et al *Analytica Chimica Acta*, 151(1983)297-314
- 3) K. KOHATA, et al *J. Chromatography*, 558(1991)131-140
- 4) 相馬ら、アオコの計量と発生状況、発生機構-アオコ指標検討会資料(1995)24-30
- 5) 国立公害研究所研究報告,110(1987)67-77
- 6) 国立環境研究所特別研究報告, SR-9-'92(1992)11-18
- 7) 大槻ら、第50回大会日本陸水学会講演要旨集(1985)52