フェリーによる植物プランクトンの分析手法と結果の概要

原島 省[1], 古澤一思[2], 田中祐志[3], 津田良平[4], 紀本岳志[5]

1) 国立環境研究所
2) 日本海洋生物研究所
3) 東京水産大学
4) 近畿大学
5) (財)海洋化学研究所

要旨：フェリーで植物プランクトン分析用サンプルを採取し、その分類群組成とサイズ組成から海洋環境の評価を行うフローを確立した。海水は、光学顕微鏡によるマイクロプランクトン計測用のサンプルと、蛍光顕微鏡によるナノ・ピコプランクトン計測用のサンプルに分けて採取・固定する。前者は、同定・計数と同時にサイズを計測する。後者は独立栄養か従属栄養かを判別するため、および原核細胞か真核細胞かを判別するために２種類の色素で染色した上で同様の計数・サイズ計測を行った。従来行われていた細胞数表示では分類群間の量的な比較ができないため、本フローでは検鏡による細胞の計数値、サイズ、形状のデータからStrathmann(1967)[1]の換算式を使って炭素量に換算した。これらのフローにより得られた結果から、通常期には少ないバイオマス量をシアノバクテリア、微小鞭毛藻、渦鞭毛藻、ケイ藻などがほぼ等分の組成で含まれており、その組成はあまり大きな変化を示さないことが確認された。これに対し、ブルーム期には、通常期の組成にケイ藻または渦鞭毛藻の大きなバイオマス量が上乗せされるような形の組成になることが確認された。

１．はじめに

海洋環境の指標としてまず考えられるのは、水温、塩分などの物理量や栄養塩濃度などの化学量であり、それらは、刻々と変化する量の瞬時値という意味、あるいは生物生存の基礎条件という意味をもつ。これに対し、生物量は、ある時間幅、あるいは計測日時に至るまでの環境条件の積算的な要素を示すことが多い。そのため、前者に比べるとそのサンプリング、分析、解釈に任意性が大きく、また多大の労力を要する場合が大きい。しかしながら、モニタリングの基本的な目的が、環境条件が生物活動に適しているかどうかにあることを考慮すると、生物の存在形態そのものをモニタリングの対象にする意義は大きい。海洋では特に生態系の底辺をなす植物プランクトン種組成・サイズ組成のモニターが重要となる。

Kahru and Brown (1997)[2]は、「広域の環境変化を捉えるための新しい技術」という副題のもとに、植物プランクトンの種組成・サイズ組成をモニターする手法を集めたモノグラフ集をとりまとめた。その主旨は、伝統的な植物プランクトンモニター方法、すなわち検鏡にかかる労力を軽減するため、衛星、フェリーや固定点モニタリングによるセンサー計測の技術に関する論文を集めたものである。また細胞ごとの情報を記録するフローサイトメトリーなどの手法も発達しつつある。ただし種の同定としての意味とは別に、分類群組成などの情報から環境の質を評価することにおいては、やはり検鏡による情報の重要性は無視できない。

海洋生物は、陸上生物に比べ、門レベルでの多様度が高い。また、門によって生理特性が大きく変わるため、もし生理特性と環境の関連が明らかであれば門レベルの分類情報であっても環境の指標として有効になる。ここで、異なる分類群を比較するためには、量的な記述が重要となる。従来の細胞数表示もその一端ではあるが、より客観性を高めるためには物質量を単位とした分析結果が必要になる。この点を考慮して、本報文では、Strathmann(1967)[1]の換算式によって炭素量に換算する方式をとりいれ、フェリーによるサンプリング、サンプル処理、検鏡および結果の評価からなるフローを検討・確立した。外洋域のプランクトンの総観的分布については、Ishizaka *et al.*(1996)[3]などにより、分類群別および粒子サイズ別のバイオマスの量的把握に基づいた解析が行われている。ただし、時空間変動の大きな沿岸域に適用された例は少なく、フェリーによるサンプリングと組み合わせることによって、これまでみられていなかったプランクトンの動態を検知することができると考えられる。

2．方法

2.1 全体のフロー

フェリーの船底近くにある取水口（海面下約 6m）から海水をポンプアップし、サンプリング用流しで植物プランクトンサンプル採取した。本報告書中の日夏らの報文に示されるように、航走中の船舶では船底付近で採取される海水も表層近くに起源をもつ。したがってこのサンプルも表層に存在している種を代表していると考えられる。本報告では、蛍光顕微鏡と光学顕微鏡を併用して観察し、大きさが 2μm 程度のピコプランクトンから 200μm 程度までのマイクロプランクトンを分析対象とした。出現種は可能な限り種レベルの同定を行い、それが困難な種類は上位分類群またはタイプにまとめた。また、同じ種類であっても細胞の大きさが異なるものについては、サイズレンジに分けて計数した。サイズレンジは、レンジ間の体積の変化率がほぼ均等になるように細胞の長径を基準として設定し、各種類についてサイズレンジごとに細胞の大きさを適宜計測した。計測値から細胞ごとの体積を算出し、Strathmann(1967)[1]の換算式を適用して炭素量に換算する（Fig.1）。

それぞれの顕微鏡による試料の処理方法と計数時のサイズレンジおよび体積から炭素態現存量への換算方法を以下に示す。

2.2 蛍光顕微鏡分析

比較的小サイズ、すなわち 20μm 以下のピコプランクトンおよびナノプランクトンを対象とする。サンプル海水を採集後直ちに、最終濃度が 0.5%になる量のグルタールアルデヒドを加えて固定し、冷蔵保存する。この試料に、実験室にて DAPI および FITC による二重染色を行う。ただし、DAPI は核酸染色の有無により真核細胞（Eukaryotic cell）か原核細胞（Prokaryotic cell）かの判別を行うものであり、落射蛍光顕微鏡で U 励起光をあてた際に核酸の青色蛍光を示したものが真核細胞であると判別される。 DAPI の最終濃度は 0.5μg/ml、染色時間は 10 分とする。

また、FITC は、膜タンパク染色により、独立栄養細胞（Autotrophic cell）か従属栄養細胞（Heterotrophic cell）かの判別を行うものである。 すなわち、まず落射蛍光顕微鏡でB励起光をあてた際、膜タンパクの淡緑色蛍光があれば生物粒子と考えられる。さらに葉緑体の光合成色素による赤色、橙色または黄色の自己蛍光が検出されれば独立栄養性細胞、検出されなければ従属栄養性細胞であると判別される。FITC の最終濃度は 3μg/ml、染色時間は 5 分とする。

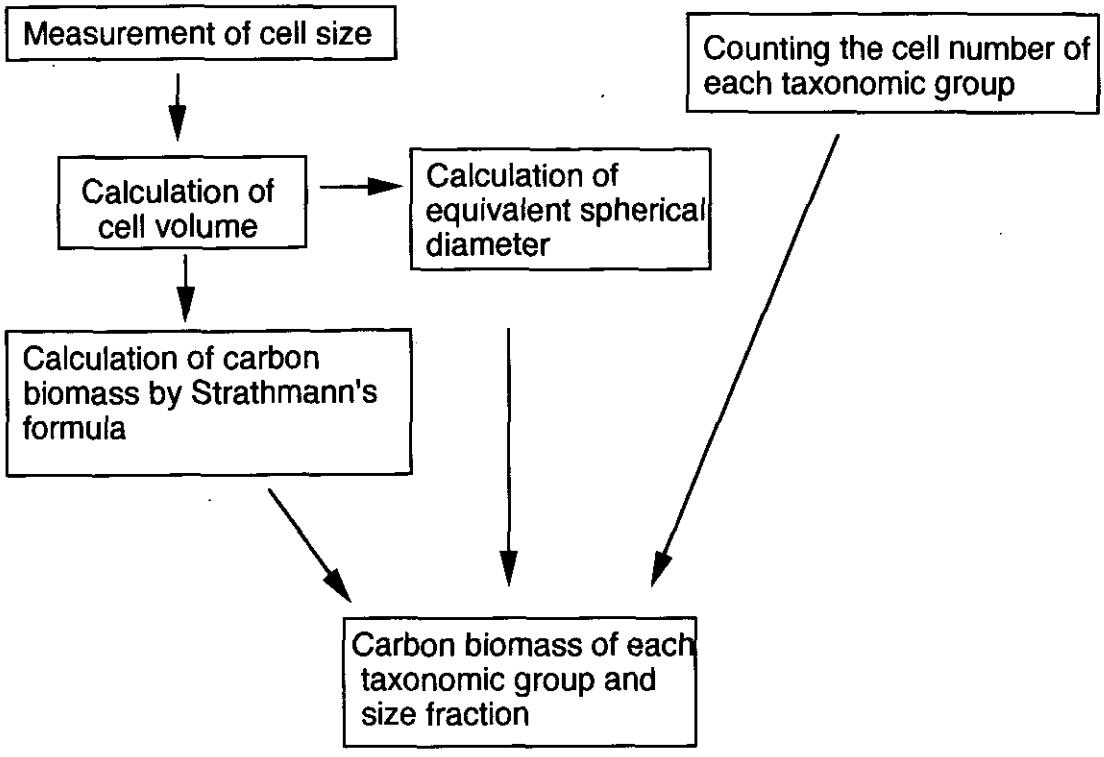


Fig.1 Flow of the quantitative phytoplankton analysis in this research.

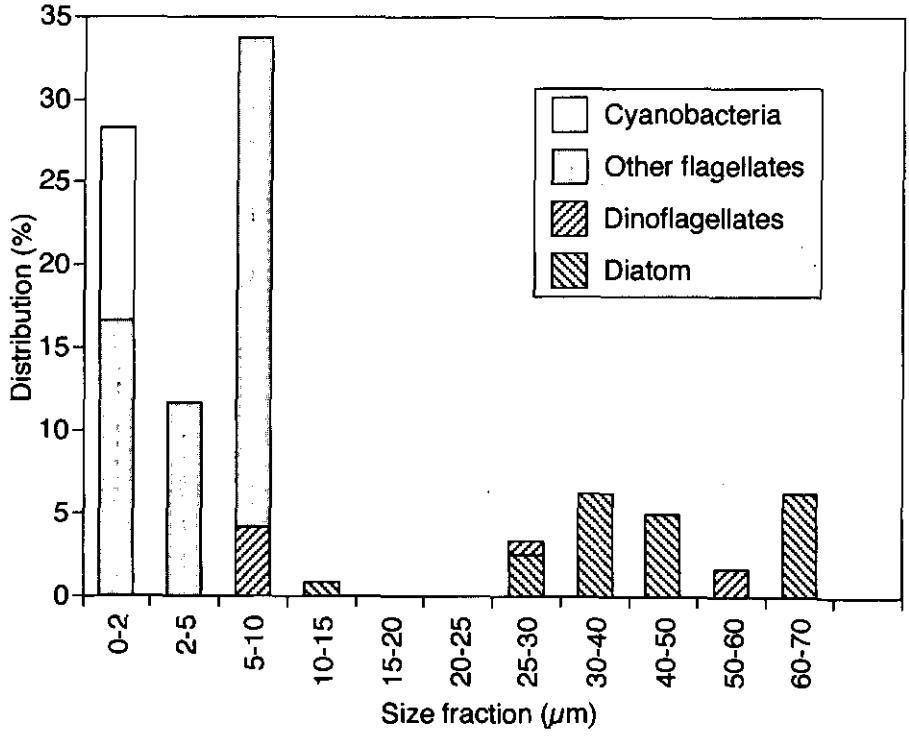


Fig.2 Distribution of carbon biomass of each taxonomic group on size fractions obtained from a sample taken at St.2 in the Seto Inland Sea in March, 1994 (see Fig.3).

染色の後、孔径 0.2 および 3μmのヌクレオポアフィルター上にそれぞれ適量を弱引圧で濾過し濃縮する。前者ではフィルター上の 1mm^2 あたり試水 0.05ml が通過するようにし、その後フィルター試料を凍結保存する。このフィルター上の生物を落射蛍光顕微鏡によって検鏡して、細胞形状、核および光合成色素の特徴により種類を同定する。また、後者のフィルターでは 1mm^2 あたり試水 0.25ml が通過するようにして同様に凍結保存する。

2.3 光学顕微鏡分析

採水試料を直ちにヘキサミン中和のホルマリン（最終濃度 2%）で固定する。試料は、実験室にて 24 時間以上常温で静置してプランクトンを沈澱させ、その後上澄み部分を除去して濃縮する。濃縮試料を適当な濃度に調整し、光学顕微鏡により種類を同定する。

2.4 サイズカテゴリー

計数は細胞の長径を基準として以下のようなサイズカテゴリーに分けて行った。細胞長径が 20μm 以下の細胞は主に蛍光顕微鏡による計数結果を用いる。20μm 以上の細胞と、群体を形成種のうち群体の長さが 20μm 以上の細胞については、主に光学顕微鏡による計数結果を用いた。また、サイズが 20μm 前後の種類については、孔径 3μm フィルター上の細胞を蛍光顕微鏡によって検鏡したものと、光学顕微鏡によって検鏡したものの両方につきオーバーラップするように計数を行った。これは、細胞の大きさや細胞現存量の多少により、どちらの検鏡結果を用いて細胞数現存量を求めるべきかを判断する際の検討データが必要なためである。

2.5 細胞体積と炭素換算方法

細胞の長径と短径を計測し、細胞の形状に類似した幾何学立体として細胞体積を求める（Fig.1)。 Strathmann (1967)[1]の式によって、細胞体積から細胞あたりの炭素含量を算出し、これに細胞数を乗じて、種ごとまたはタイプごとに次のような算出式で炭素態現存量を求めた。すなわち、珪藻類については

$$\log C = -0.422 + 0.758 \log V$$

その他の植物プランクトンについては

$$\log C = -0.460 + 0.866 \log V$$

の算出式を用いた。ただし C は有機炭素含量 (単位: pgC/cell)、V は細胞体積 (単位: μm^3/cell) である。 また形状を球とみなし、細胞体積から等価粒径（ESD: equivalent spherical diameter）を求めた。

このようにして、炭素バイオマス量の分布が、等価粒径によるサイズ分画について、および、分類群による分画について得られる。Fig.2 は、測点２（伊予灘西部）のサンプルより、両方の分画に対する分布の例を示したものであり、その特性については、次項で詳述する。

3.分析結果

3.1 瀬戸内海全体の分布構造

上記の方法により、1994 年 3 月 2～3 日に別府・神戸間の 18 地点（Fig.3）でサンプリングを行った。各測点と海域名の対応は、1:別府湾口, 2: 伊予灘西部, 3: 伊予灘西部, 4: 伊予灘中央部, 5: 伊予灘中央部, 6: 伊予灘東部（釣島近傍）, 7: 安芸灘南, 8: 来島海峡, 9: 燧灘中央, 10: 燧灘東部, 11: 塩飽諸島（栗島近傍）, 12: 塩飽諸島（丸亀沖）, 13: 備讃瀬戸（坂出沖）, 14: 播磨灘東部（小豆島）, 15: 播磨灘, 16: 播磨灘, 17: 明石海峡, 18: 神戸港である。また、各測点における分類群ごとの炭素量の絶対値と相対組成を Fig.4(a)および(b)に示す。

この観測時におけるプランクトン群集は、等価粒径で 1.5μm の微小球状のラン藻（シアノバクテリア）から 90μm の珪藻 *Corethron pelagicum* まで、サイズレンジで 2 オーダー (炭素量換算では 6 オーダー) にまたがる多様なサイズの植物プランクトンにより構成されていた。全測点で出現したプランクトンは 63 種類で、サイズ組成は、10μm 以下が 11 種類、10～25μm が 27 種類、25～50μm が 20 種類、50μm 以上が 5 種類であった。一方、出現種の分類群も、シアノバクテリア、微小鞭毛藻（主にクリプト藻、ハプト藻、プラシノ藻および 10μm 以下の分類群を確定できない種群を含む)、ミドリムシ藻、ケイ藻、渦鞭毛藻の多岐にわたった。

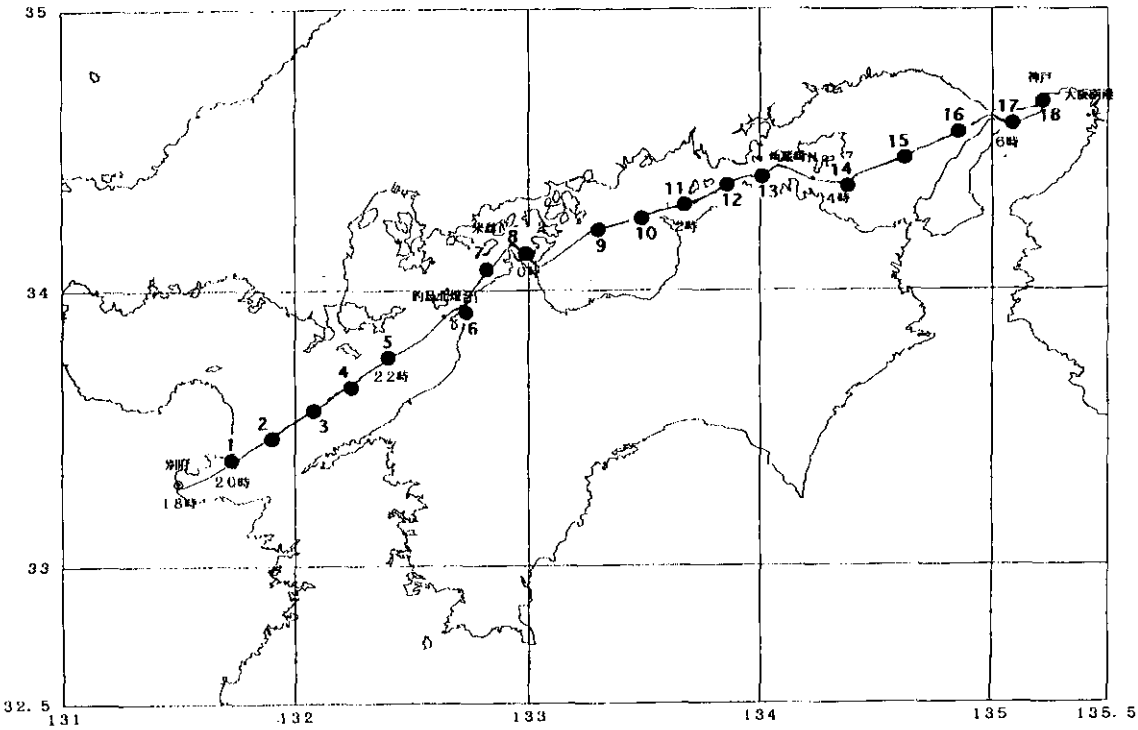


Fig.3 Location of the sampling points in the cruise of 2-3 March, 1994 of Ferry Sunflower-2.

各測点での植物プランクトン現存量は、13～76μgC/l であった。測点 5～7 と測点 18 では 50μgC/l を越すピークが認められ、ブルーミングの一端を捕らえていたものと考えられる。測点 5～7 では大型で群体を形成する珪類の *Eucampia zoodiacus* が、測点 18 では渦鞭毛藻の *Heterocapsa triquetra* が、顕著に出現した。

種群別の現存量では、微小鞭毛藻類の現存量がほとんどの測点で 10～20μgC/l であり、総現存量の大小に関係なく普遍的に分布する特徴が認められた。総現存量の増大を左右するのは珪藻と渦鞭毛藻であり、ブルーミングが全体の現存量に影響していることが明かである。この特徴が、群体構造に反映し、総現存量が少ない測点(1～3 と 11～17)では、微小鞭毛藻が 60%以上を占め、ブルーミングが認められた測点 5～7 と測点 18 では 20%程度と群体構造が大きく異なっていた。

一方、測点 2 のデータでみられたように（Fig.2)、サイズからみた群集構造は、10μm 以下と 25～50μm のプランクトンが多く、10～25μm (特に 10～15μm) のプランクトン現存量が明かになかった。この特徴は、ほぼどの測点でも共通しており、40μm サイズの現存量が 70%と顕著に多い測点 5～7 でも同様であった。また、*Heterocapsa triquetra* のブルーミン

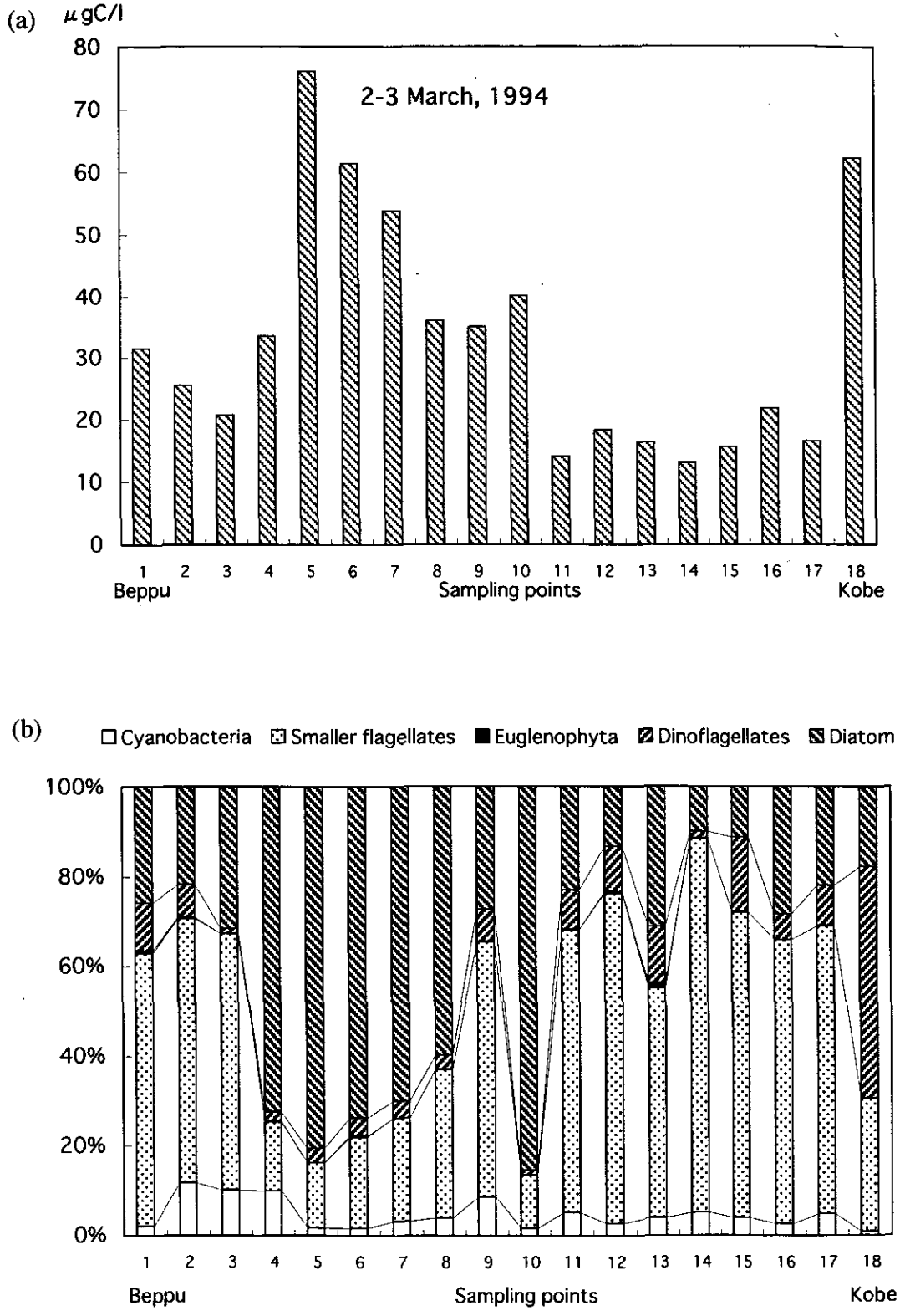


Fig.4 Distribution of (a) phytoplankton biomass and (b) composition of each taxonomic group from the samples obtained on ferry cruise 2-3 March, 1994 between Beppu and Kobe.

グが認められた測点 18 では、それに対応し 15～20 μm に現存量のピークが認められた。

各測点の群集構造の比較から、珪藻によるブルーミングが起こっていた伊予灘東部の測点 5～7 や、大型珪藻が出現していなかった播磨灘の測点 14～16 などの地理的に区分された海域内ごとに、特徴が似ていることが明らかとなった。一方、群集構造が燧灘のように測点により大きく異なることも認められた。しかし、瀬戸内海全体としては、全測点に共通して 10 μm 以下の微小鞭毛藻が同程度の現存量で存在し、ブルーミングがおきている場所においてのみ大型のサイズのプランクトンが上乗せされる形で群集構造を形成していると総括できる。

ここで、再度、細胞サイズ別と分類群別の炭素現存量の関連を吟味する。これによれば、シアノバクテリア（原核、独立栄養性細胞）は [0～2 μ]のサイズ分画の半分弱を占めていた。また、渦鞭毛藻類は、[5～10 μ]と[25～30 μ]の一部と[50～60 μ]のサイズ分画の大半を占めていた。その他の鞭毛藻類（原核、自己栄養細胞）とはほぼクリプト藻類とプラシノ藻類であったが、[0～2 μ], [2～5 μ], [5～10 μ]の３つのサイズ分画にまたがっていた。ケイ藻は [10～15 μ]より大きなサイズ分画のほとんどを占めていた。

このことから、20 μm よりも大きなサイズの細胞はほとんどがケイ藻類で、一部が渦鞭毛藻類であるといえる。また、20 μm よりも小さなサイズの細胞は渦鞭毛藻類、その他の鞭毛藻類およびシアノバクテリアで占められているといってよい。

また、[10～15 μ], [15～20 μ] および [20～25 μ]の 3 つのサイズ分画に該当する細胞が少なかったことが特記される。これは、i)このサイズの藻類が動物プランクトンや従属栄養細胞に選択的に捕食された、ii) その他の理由によりこのサイズの藻類が生態学的に存在しにくい、などにより群集構造決定にかかわるメカニズムによるものと考えられる。

3.2 群集構造の短期時系列

Fig.3 に示した観測例の他にも、何回かのプランクトンの観測を行い、特に 1995 年 6 月と 1996 年 3 月には、燧灘（Fig.3 中の測点 11)、備讃瀬戸（測点 16)、大阪湾（東経 135 度 18 分、本報告書中の報文 15 参照）の３測点において隔日で約１ヶ月間連続的にサンプリングを行った。このうち 7 月の連続観測の結果については、Harashima *et al.*, (1997)[4]に述べたが、以下のように要約される。

i)燧灘では、炭素バイオマス量が比較的低い 5.7～19 μgC/l、またシアノバクテリアや微小鞭毛藻類を主体とする分類群組成がみられた。すなわち、非ブルーミング状態であるといえる。これは安定成層により栄養塩が下層から補給されにくい状況であったことを示す。

ii)備讃瀬戸でも、炭素バイオマス量が 8.5～37 μgC/l と低めであったが、中旬に Naviculaceae、下旬に *Rhizosolenia styliformis* が優占するなど、ケイ藻の相対的寄与が大きかった。これは鉛直混合によって栄養塩が継続的に補給されていたため、ケイ藻も増殖可能だったためと考えられる（報文 9 参照)。

iii)大阪湾では、栄養塩濃度が高く、ケイ藻や渦鞭毛藻類が存在した。またこの期間に 16 μgC/l から 590 μgC/l に至るケイ藻のバイオマスの指数関数的な増加がみられた。現場海域では、補食や沈降なども働いているので、このバイオマス増加は純粋な増殖のみを表現しているものではないが、ほぼ対数増殖的な増加であったといってよい。また、その増加速度は渦鞭毛藻類のそれより格段に速かった（報文 15 中の Fig.6 参照)。ただし、この速い増殖を構成していた種は同一でなく、6 月中旬では *Thalassiosira rotula* 下旬では *Rhizosolenia stolterfothii* というような遷移がみられた。

4．まとめ

以上より、瀬戸内海では、ブルームが起こっていない、すなわちバイオマス量が低い季節

および海域では、ケイ藻、渦鞭毛藻、微小鞭毛藻、ミドリムシ藻、ラン藻（シアノバクテリア）などが同程度の寄与率で存在していることがわかった。そして、春季ブルーミングあるいは他の理由によって起こるブルーミング時には、いわばそれに上乗せされるような形で多量のバイオマスが出現するが、それを形成するのは比較的サイズの大きなケイ藻または渦鞭毛藻であることが確認された。そして、ケイ藻が出現するか渦鞭毛藻が出現するかは栄養塩組成等の環境要因に依存すると考えられる。また、大阪湾のような富栄養環境下ではケイ藻の増殖速度は渦鞭毛藻類の増殖速度より速い。

以上のように、蛍光顕微鏡と光学顕微鏡を併用することによって、ピコサイズからμサイズのすべてを分析したことと、Strathmann の換算式によって炭素バイオマスに換算したことにより、従来明示されていなかったプランクトンの動態が確認された。

参考文献

1) Strathmann, R. R. (1967): Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume, Limnology and Oceanography, 12, 411-418.

2) Kahru, M. and Brown, C. W.(eds.) (1997): Monitoring Algal Blooms - New Techniques for Detecting Large-Scale Environmental Change, pp178, Springer.

3) Ishizaka, J., Harada, K., Ishikawa, K., Kiyosawa, H., Furusawa, H., Watanabe, Y., Ishida, H., Suzuki, K., Handa, N., and Takahashi, M. (1997): Size and taxonomic plankton community structure and carbon flow at the equator, 175°E during 1990-1994, Deep-Sea Res. Part2, 44, 1927-1947.

4) Harashima, A., R. Tsuda, Y. Tanaka, Kimoto, T., Tatsuta, H. and Furusawa, K. (1997): Monitoring algal blooms and related biogeochemical changes with a flow through system deployed on ferries in the adjacent seas of Japan, In "Monitoring Algal Blooms - New Techniques for Detecting Large-Scale Environmental Change", Kahru, M. and Brown, C. W, (eds.), 85-112, Springer.

Method of phytoplankton analysis using ferries for evaluation of marine environmental quality

Akira HARASHIMA[1], Kazushi FURUSAWA[2], Yuji TANAKA[3], Ryohei TSUDA[4] and Takashi KIMOTO[5]

1) National Institute for Environmental Studies
2) Marine Biological Laboratory of Japan
3) Tokyo University of Fisheries
4) Kinki University
5) Research Institute of Oceano-Chemistry

Abstract: We established a method to take samples of phytoplankton on a the ferry and analyse the composition of taxonomic groups for the evaluation of marine environmental quality. The samples for analyse microplankton and nano-pico plankton were taken separately and fixed for the analysis by regular optical microscope and fluorescent microsocope, respectively. The latter were dyed by FITC to discriminate the autotrophs from heterotrophs and by FITC to discriminate eukaryotic cells from prokaryotic cells and separated by micropore filters to size fractionation. Carbon biomass was calculated by the empirical formula by Strathman(1967)[1] from the cell number and size for each taxonomic and size fraction. It was revealed that the biomass of diatom and dinoflagellates variesremarkably in the bloom, which is time and space-dependent. However, those of the cyanobacteria, small-sized flagellates, pracinophycea and crysophycea were relatively stable through the season and location.