

水環境におけるプランクトン群集の迅速検出手法に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 18～平 20

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：鈴木穰、北村友一

【要旨】

湖水中の植物プランクトン群集の迅速検出の開発を目指し、琵琶湖と霞ヶ浦湖水を測定対象としてフローサイトメトリーの適用性を検討した。その結果、フローサイトメトリーを用いることにより植物プランクトン群集は、植物プランクトンの散乱特性と細胞内に含有するクロロフィルなどの色素とその量の違いから分類・定量できることがわかった。琵琶湖湖水中の植物プランクトンは、赤色と黄色蛍光強度の関係、霞ヶ浦では、前方散乱強度と赤色蛍光強度の関係から概ねグルーピングでき、それぞれの集団を計数できることがわかった。また、フローサイトメトリーによる琵琶湖湖水の測定から、夏季に表層付近でピコ植物プランクトンと考えられる藻類が増加することがとらえられ、フローサイトメトリーは微細植物プランクトンの検出にも有効であることがわかった。フローサイトメトリーで検出された各集団について、分取、同定していくことにより、植物プランクトン群集の迅速検出が可能になるものと考えられた。

キーワード：植物プランクトン群集、フローサイトメトリー、琵琶湖、霞ヶ浦

1. はじめに

湖水中の植物プランクトンの種類や存在量は、湖沼の富栄養化の指標となり、湖沼環境を把握する上で重要である。しかし、植物プランクトンの同定や存在量の測定は、専門的技術や知識を必要とし、簡単に把握できないのが現状である。

そこで、本研究では、湖水中の植物プランクトンの迅速検出の開発を目指した。湖水中の植物プランクトンの迅速検出には、フローサイトメトリー（レーザーを用いて細胞1つひとつを散乱や蛍光特性の違いから計測する技術）による測定が有効と考えられる。そこで、琵琶湖と霞ヶ浦の湖水を測定対象とし、湖水中の植物プランクトンをフローサイトメトリーで測定した際、どのような情報が得られるのか、また植物プランクトンの種類の判定やその計数が可能かどうかを調査した。

2. 調査方法

図-1, 2 は、琵琶湖と霞ヶ浦の湖水の採水地点である。琵琶湖の採水は、平成 19 年 5, 8, 11, 平成 20 年 2 月に、安曇川沖の水深 0.5m, 5m, 10m, 20m, 50m, 約 60m（底面上 1.5m）と大宮川沖の水深 0.5m から行った。

霞ヶ浦では、平成 20 年 4 月から平成 21 年 3 月の間、毎月、西浦と北浦の湖心の表層水を採水した。

図-3 は、本実験に使用したフローサイトメーターの概要である。レーザーは 488nm のアルゴンレーザーを使用し、側方散乱強度 (Side scatter:SS)、前方散乱強度 (Forward scatter:FS)、緑 (525nm ± 15nm)、黄 (575nm ± 15nm)、橙 (610nm ± 15nm)、赤色蛍光 (675nm ± 15nm) 強度を測定した。なお、本実験で使用した装置には、任意の集団を分取できる機能がある。

湖水はフローセルの目詰まりを防ぐため 50 μm のナイロン製メッシュでろ過し、ろ液を 0.5ml または 1ml をフローサイトメーターにより測定した。



図-1 琵琶湖の採水地点



図-2 霞ヶ浦の採水地点

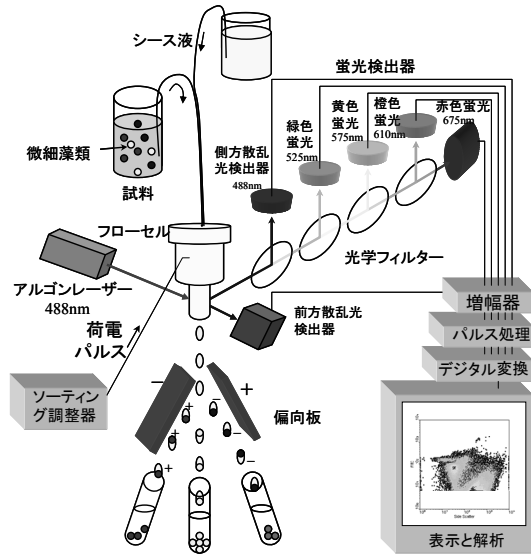


図-3 フローサイトメーターの概要図

3. 調査結果

3.1 琵琶湖湖水中の植物プランクトンの測定結果

図-4~9は、平成19年8月に琵琶湖安曇川沖水深5mから採水した湖水のフローサイトメーター測定結果である。図-4,5は、前方散乱強度と赤色および黄色蛍光強度、図-7,8は側方散乱強度と赤色および黄色蛍光強度

度、図-6,9は、黄色および橙色蛍光強度と赤色蛍光強度の関係であり、図中のプロット1つひとつは、湖水中の粒子である。植物プランクトンが488nm付近の光で励起されると、細胞内に含有されるクロロフィルは赤色蛍光、フィコエリスリンは黄色蛍光を発生することから、図中のプロットは、植物プランクトンを反映している。図-6に示したように琵琶湖水中の植物プランクトンを赤と黄色蛍光強度の関係で図示することにより、色素の違いで分類できることがわかった。

図-10,11は、平成19年5,8,11,平成20年2月の琵琶湖安曇川沖と大宮川沖水深0.5mの湖水中のプランクトンを黄と赤色蛍光強度の関係で図示したものである。季節によって図中のプロットのパターンが異なっていることがわかる。プロットが集中する位置の植物プランクトンを同定し、その関係を把握することにより、フローサイトメーター測定でも、植物プランクトン種の変化を把握することが可能になるものと考えられる。

図中のA, B, C, D領域は、著者が赤色および黄色蛍光強度の強弱で簡易分類したものであり、図-12は、季節毎に安曇川沖水深方向別と大宮川沖表層水中の植物プランクトン数をA, B, C, D領域毎に図示したものである。安曇川沖では8月にC領域（赤色および黄色蛍光

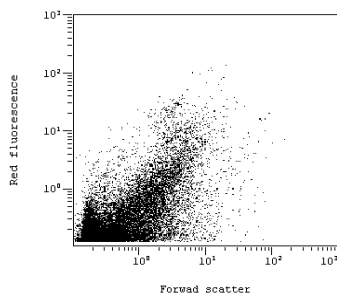


図-4 FS と赤色蛍光強度の関係

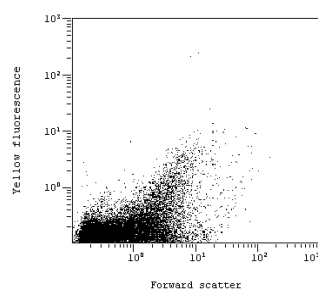


図-5 FS と黄色蛍光強度の関係

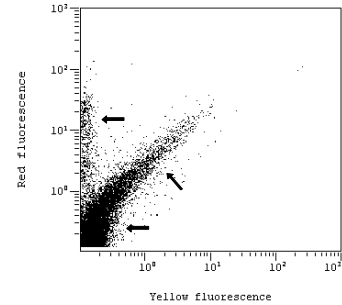


図-6 黄と赤色蛍光強度の関係

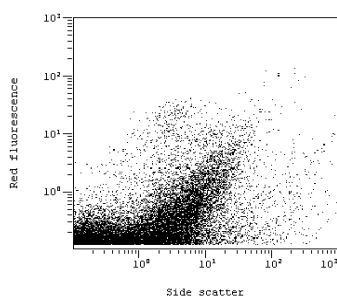


図-7 SS と赤色蛍光強度の関係

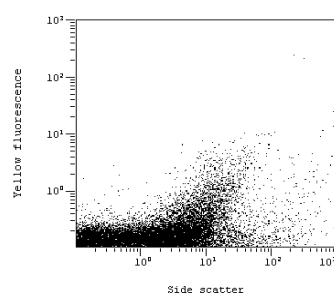


図-8 SS と黄色蛍光強度の関係

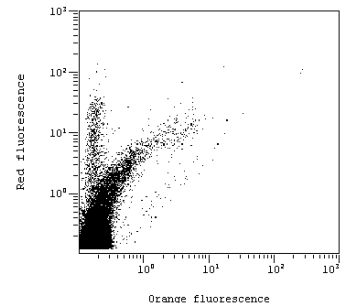


図-9 橙と赤色蛍光強度の関係

強度の弱い集団)の植物プランクトン数が、水深10m以上で多くなるのがわかる。水深10m付近では、1mlあたり約3万個と最大となった。琵琶湖では、夏季にピコプランクトン(0.2~2μm)が増加することが観察されており¹⁾、このC領域の植物プランクトンはピコプランクトンを反映していると考えられる。2月では、

植物プランクトン数は減少し、水深別で植物プランクトン数に大きな違いはみられなかった。

大宮川沖の植物プランクトン数は、8月に若干多くなるものの、安曇川沖に比べて季節変動は小さくっていた。構成割合でみるとA領域(クロロフィルを多く含有する比較的大きな植物プランクトン)の割合が

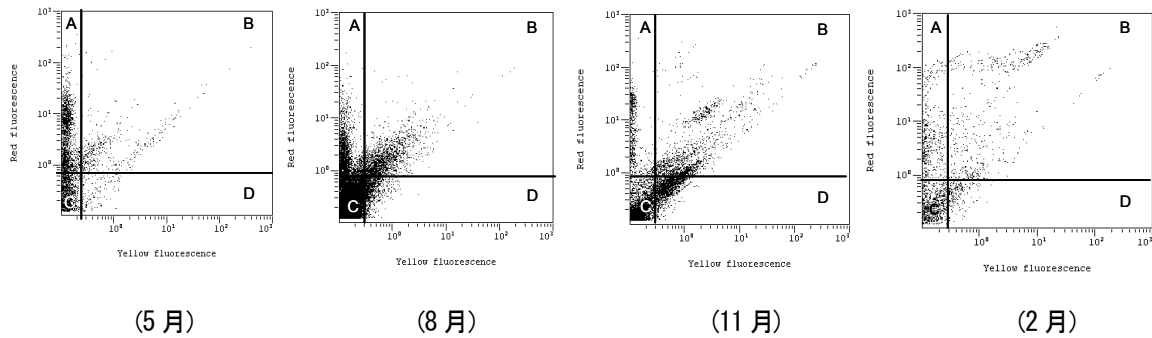


図-10 琵琶湖安曇川沖の水深0.5mの植物プランクトンの黄色と赤色蛍光強度の関係

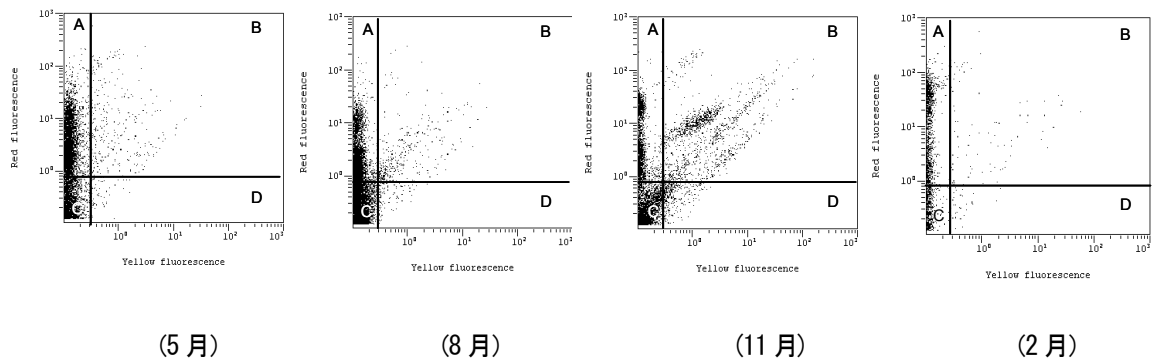


図-11 琵琶湖大宮川沖の水深0.5mの植物プランクトンの黄色と赤色蛍光強度の関係

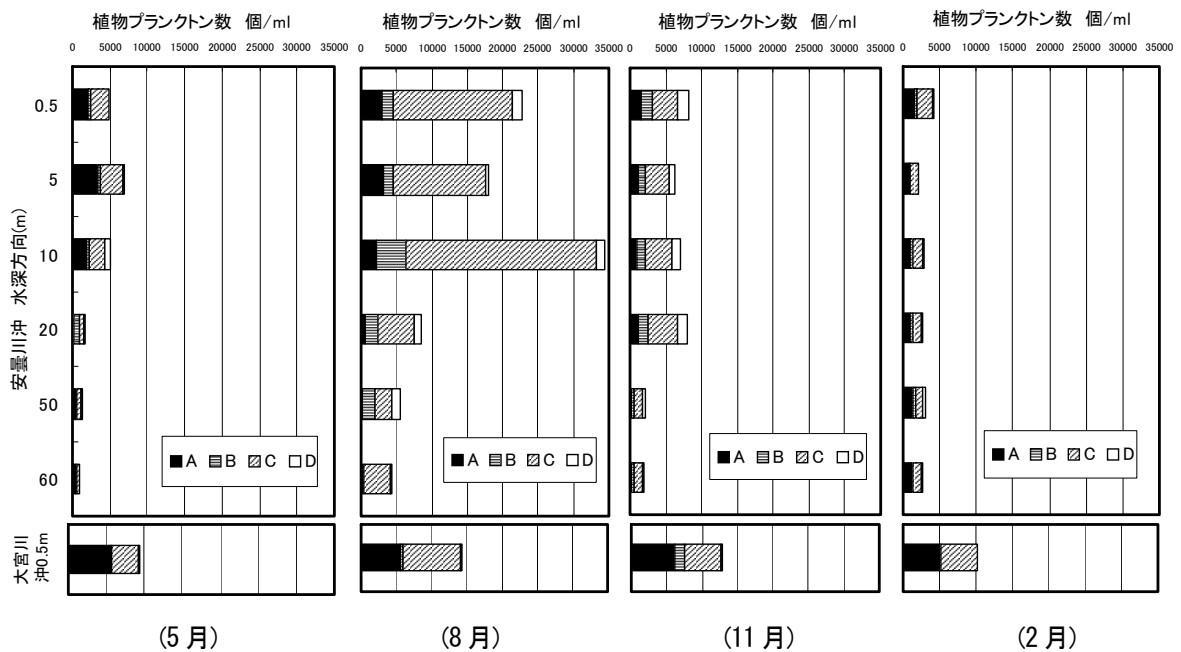


図-12 大宮川沖表層、安曇川沖水深方向別の植物プランクトンの種類と濃度の関係

多くなっていた。

3.2 霞ヶ浦の植物プランクトンの測定結果

図-13~18は、H20年8月の北浦湖水中のフローサイトメトリーの分析結果である。図-13, 14は、前方散乱強度と赤色および黄色蛍光強度、図-16, 17は、側方散乱強度と赤色および黄色蛍光強度、図-15, 18は、黄色および橙蛍光強度と赤色蛍光強度の関係である。前方および側方散乱強度と赤色蛍光強度の関係で図示(図-13, 16)した場合、プロットが集中する位置があり、これらの関係で整理することにより概ねグルーピング

できることがわかった。図-19は、9月の西浦と北浦の湖水中の植物プランクトンを前方散乱強度と赤色蛍光強度の関係で図示し、主な集団を分取し、顕微鏡観察した結果である。顕微鏡観察像には、G励起による蛍光顕微鏡像も合わせて掲載した。なお、顕微鏡写真は、多く観察された種類のみを掲載している。西浦や北浦のAとA'集団は、タルケイソウやマルケイソウ、Bは糸状ラン藻であるオシラトリア、Cは約10 μ mの微細ラン藻が主体である集団であった。北浦のD集団は、アウラコセイラなどの大型のケイ藻、Eは微

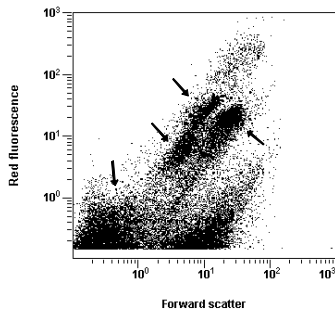


図-13 FSと赤色蛍光強度の関係

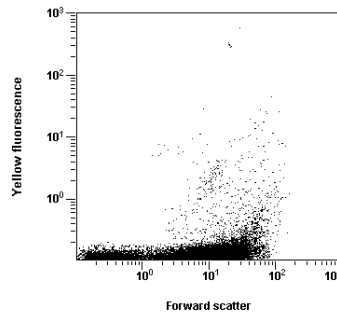


図-14 FSと黄色蛍光強度の関係

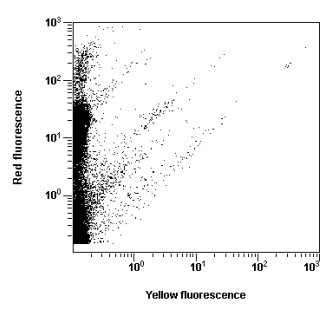


図-15 黄と赤色蛍光強度の関係

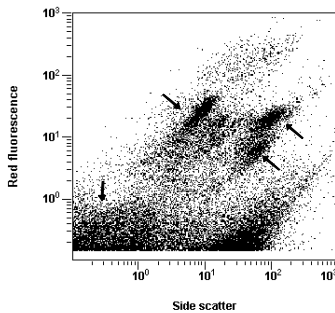


図-16 SSと赤色蛍光強度の関係

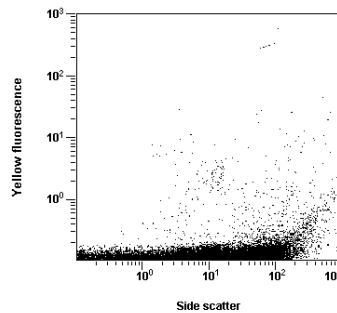


図-17 SSと黄色蛍光強度の関係

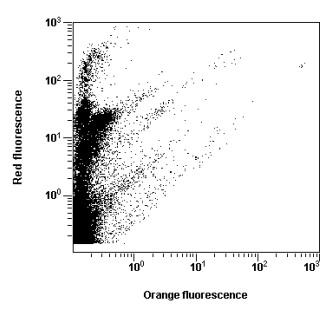


図-18 橙と赤色蛍光強度の関係

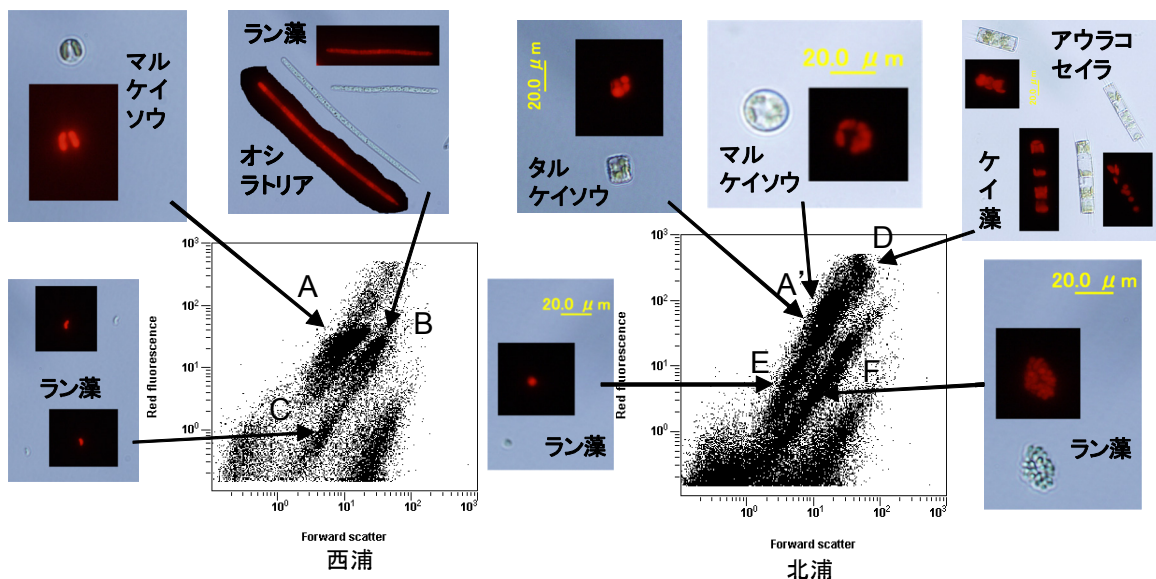


図-19 霞ヶ浦湖水の植物プランクトンのFSと赤色蛍光強度の関係と各集団の顕微鏡観察像

細ラン藻、Fは群体を形成したラン藻が多く含まれる集団であった。各集団の顕微鏡観察から、植物プランクトンの種類毎に完全にグループ化できていなかったが、フローサイトメトリーは、湖水中の植物プランクトンのスクリーニングには十分利用できるものと考え

られた。

図-20は、H20年4月からH21年3月までの西浦と北浦湖水中の植物プランクトンを前方散乱と赤色蛍光強度の関係で図示したものである。図中のA, B, C, D領域は、植物プランクトンの簡易分類のため著者が前方お

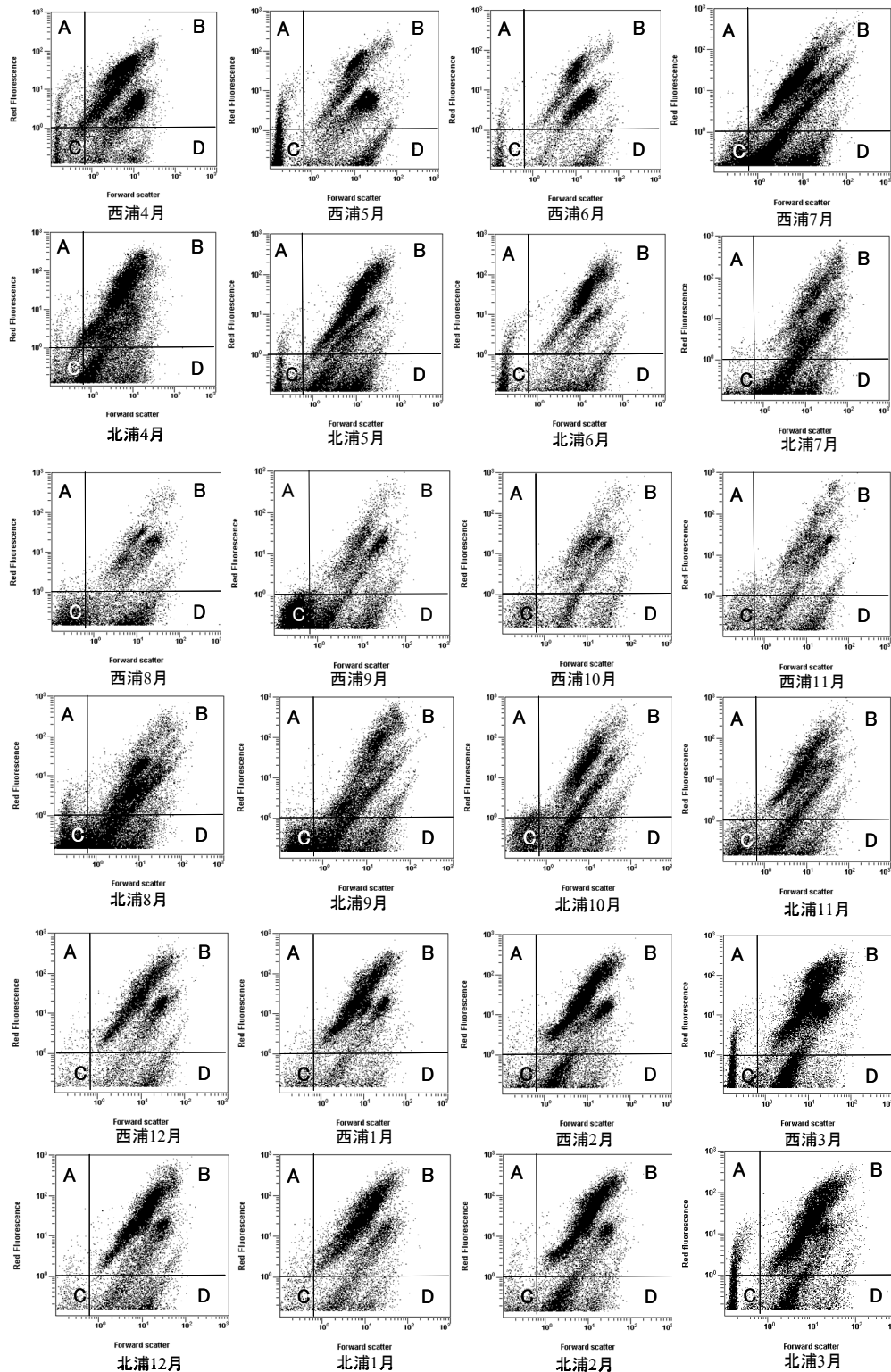


図-20 H20年4月～H21年3月の霞ヶ浦湖水中植物プランクトンのFSと赤色蛍光強度の関係

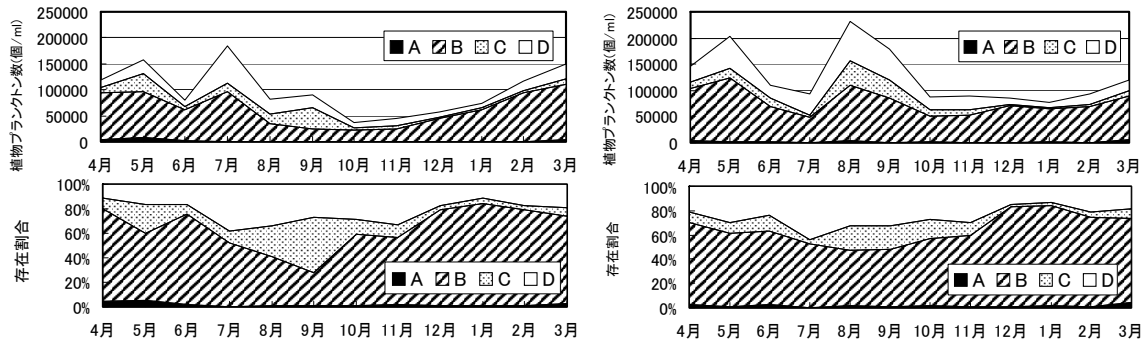


図-21 H20年4月～H21年3月の霞ヶ浦の植物プランクトン数と存在割合の経月変化

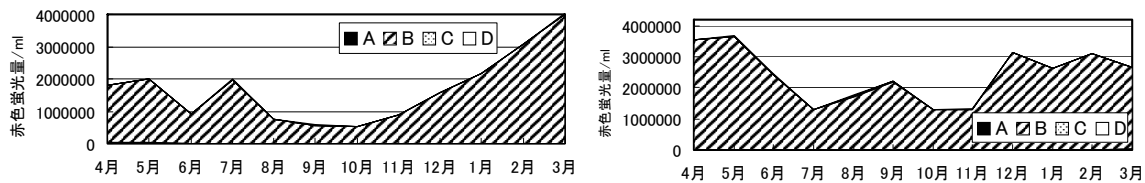


図-22 H20年4月～H21年3月の霞ヶ浦の赤色蛍光量の経月変化

よび赤色蛍光強度の強弱で分割したものであり、図-21は、北浦と西浦の植物プランクトン数と割合をA、B、C、D領域毎に図示したものである。図-20より季節や湖間でプロットパターンが異なっていることがわかる。フローサイトメトリーは、湖間の植物プランクトン群集の違いの判別にも利用できるものと考えられた。

西浦では9、10、11月にB領域のケイ藻やオシラトリア数が減少する傾向がみられた。

湖水中の植物プランクトンの中には群体を形成しているものもあり、フローサイトメトリーによる測定では、群体を1細胞と計数し、細胞数を過小計数する可能性がある。植物プランクトンの量ベースについての情報も必要であると考えられる。そこで、A、B、C、D領域の総赤色蛍光量を次式

$$\text{赤色蛍光量/ml} = \sum (\text{各赤色蛍光強度} \times \text{細胞数/ml}) \quad (\text{式1})$$

で算出し、総赤色蛍光量の経月変化を図-22に示した。赤色蛍光量は、概ねB領域の細胞数と同様の傾向を示し、西浦では9、10、11月に低下する傾向を示した。

4. まとめ

湖水中の植物プランクトンの迅速検出の開発を目指し、琵琶湖と霞ヶ浦湖水を測定対象としてフローサイトメトリーの適用性を検討した。本研究で得られた成果は以下のとおりである。

1) フローサイトメトリーを用いることにより、植物プランクトン群集は、植物プランクトンの散乱特性と細

胞内に含有するクロロフィルなどの色素や量の違いから分類・定量できることがわかった。

2) 琵琶湖湖水中の植物プランクトンは、赤色と黄色蛍光強度の関係、霞ヶ浦では、前方散乱強度と赤色蛍光強度の関係から概ねグルーピングでき、それぞれの集団を計数できることがわかった。

3) フローサイトメトリーによる琵琶湖湖水の測定から、夏季に表層付近でピコ植物プランクトンと考えられる藻類が増加することがわかり、フローサイトメトリーは微細植物プランクトンの検出にも有効であることがわかった。

4) フローサイトメトリーによる西浦と北浦湖水の測定結果から、湖水間の植物プランクトン群集の違いは、プロットパターンの違いとして表現できることがわかった。

5) フローサイトメトリーで検出される各集団を分取、同定し、データを蓄積していくことにより、迅速に植物プランクトン群集の検出が可能になるものと考えられる。

5. 参考資料

1) 琵琶湖環境科学センターホームページ
<http://www.lberi.jp/root/jp/06db/planktonzukan/bkjpico02.htm>

【謝辞】

琵琶湖湖水の採水には琵琶湖河川事務所、霞ヶ浦湖水の採水には霞ヶ浦河川事務所の協力を得た。ここに記して謝意を表す。

Basic study on rapid detection of plankton communities in Lakes

Abstract:

The possibility of the rapid detection of the phytoplankton communities with flow cytometry was examined. The measurement sample was the water in Lake Biwa and Kasumigaura. Detection of the phytoplankton communities with flow cytometry was possible by the scattering and fluorescence characteristic of each phytoplankton. Phytoplankton classification and their counting in the Lake Biwa were possible using the relationship between yellow and red fluorescence intensity. Those in the lake Kasumigaura were possible using relationship between forward scattering intensity and red fluorescence intensity. The flow cytometry is effective for the detection of the picophytoplankton in lakes. The picophytoplankton of Lake Biwa was increased in the upper layer in the summertime.

Key words: Phytoplankton communities, Flow cytometry, Lake Biwa and Kasumigaura