

GF/F フィルターによる *Synechococcus* 属捕集能力の検証

石谷 哲寛

1. はじめに

クロロフィル a はほとんどの植物プランクトンが持つ光合成色素であり、水中のクロロフィル a 濃度を測定することで、植物プランクトンの現存量の指標となる。クロロフィル a 濃度から植物プランクトンのサイズや細胞数を推定することはできないが、顕微鏡観察に比べ短時間で分析可能であるため、多数の試料を扱う研究や定期的な調査で、広く利用されている（例えば、鈴木, 2015）。

クロロフィル a 濃度の分析は、一定量の試水をろ過し、ろ紙上に捕集された懸濁物に含まれるクロロフィル a 濃度を、蛍光法などを用いて定量する手法が一般的である。試水のろ過には、粒子保持径が $0.7\ \mu\text{m}$ のWhatman GF/Fフィルターがよく使われる（鈴木, 2015）が、GF/Fフィルターでは試水中の植物プランクトンを完全に捕集できていない可能性が考えられる。一般に、沿岸域や湧昇域などの富栄養環境では、ミクロプランクトン（細胞径 $200\sim 20\ \mu\text{m}$ ）が、熱帯域や亜熱帯域などの貧栄養環境では、ナノプランクトン（細胞径 $20\sim 2\ \mu\text{m}$ ）やピコプランクトン（細胞径 $2\sim 0.2\ \mu\text{m}$ ）が卓越するとされている（齋藤, 2008）。したがって、全植物プランクトン量のうち、微小なサイズのプランクトンが占める割合が大きくなれば、GF/Fフィルターを通過するプランクトン量が相対的に多くなり、クロロフィル a 濃度が過小に評価される可能性がある。

多田ら（1994）は、広島湾において採取した海水試料を、GF/Fフィルターおよび孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターでろ過し、クロロフィル a 濃度を測定した。その結果、ヌクレポアフィルターを使用して求めたクロロフィル a 濃度が、GF/Fフィルターを使用して求めた

クロロフィル a 濃度よりも1割程度高かった。また、Hashimoto & Shiomoto（2000）は、亜寒帯太平洋において採取した海水試料を、GF/Fフィルター、孔径 $0.6\ \mu\text{m}$ および孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のヌクレポアフィルターでそれぞれろ過捕集し、クロロフィル a 濃度を測定した。その結果、GF/Fフィルターを使用したクロロフィル a 濃度は、 $0.6\ \mu\text{m}$ ヌクレポアフィルターを使用したクロロフィル a 濃度よりも平均で20%高く、 $0.2\ \mu\text{m}$ ヌクレポアフィルターを使用したクロロフィル a 濃度とは有意な差は認められなかった。

これらの結果は、GF/Fフィルターによる植物プランクトン捕集能力が海域やプランクトン群集のサイズ組成により異なることを反映していると考えられる。GF/Fフィルターによる微小植物プランクトンの捕集能力に関しては、上記の研究を含め、いくつかの事例が報告されている（例えば、Knefelkamp *et al.*, 2007）が、これらはいずれも捕集された懸濁物のクロロフィル a 濃度で評価したものであり、数的にどの程度の微小植物プランクトンがGF/Fフィルターを通過したかは不明である。

そこで、本研究ではGF/Fフィルターによる微小植物プランクトンの捕集能力を、GF/Fフィルターを通過する微小植物プランクトンの細胞数によって評価した。確認に際しては、ろ過時の引圧を4段階に設定し、ろ過条件を変えて実施することで、GF/Fフィルターによる捕集能力を検証した。

なお本研究では、今回の調査海域でもっとも一般的な微小植物プランクトンであり、GF/Fフィルターの孔径（ $0.7\ \mu\text{m}$ ）よりもやや大きな藍藻類の*Synechococcus* 属（細胞径約 $0.9\ \mu\text{m}$; 齋藤, 2008）を対象に、その捕

集能力を評価した。

2. 材料と方法

2.1 試料の採取

実験に使用した試料は、2016年4月26日に千葉県鴨川市天津の天津漁港沖の測点St.2で採取した。測点の位置および採水時の現地観測結果を図1および表1に

表1 調査測点の概要および調査時の現地観測結果

測点名	St.2	
調査日	2016年4月26日	
調査時刻	10:30	
採水位置	緯度	35°06'27.06"N
	経度	140°09'25.38"E
水深 (m)	22	
採水層 (m)	16	
水温 (°C)	19.07	
塩分	34.75	
DO (mg/L)	8.02	

注：水温・塩分・DOは採水層の値を示した。

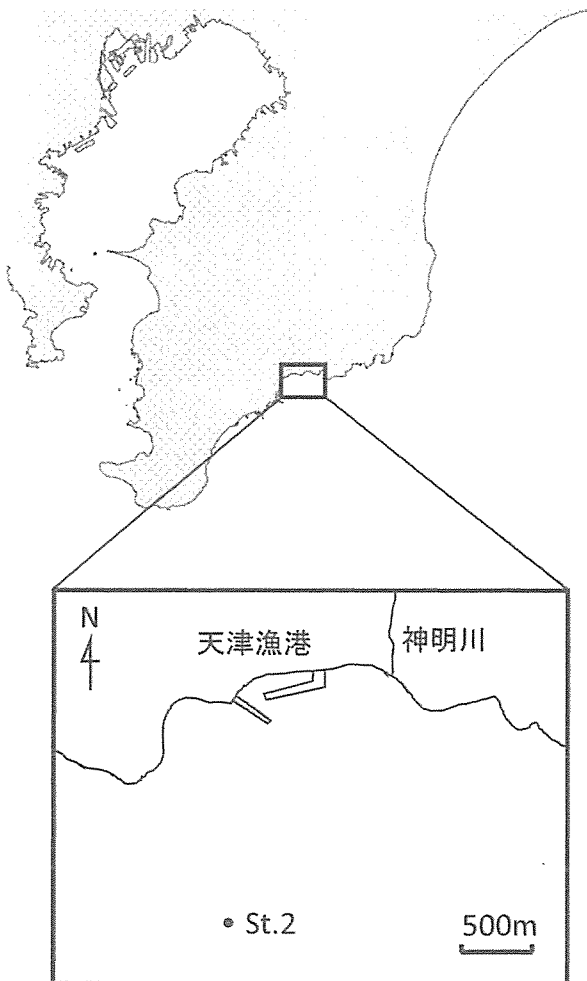


図1 調査測点

示した。まず、直読式総合水質計 (AAQ-RINKO、JFEアドバンテック株式会社) を用いてクロロフィル最大層 (水深16m層) を把握した。次に、バンドーン採水器を使用し、クロロフィル最大層で20L採水し、20Lトスロン容器に収容したのち、実験に供した。

2.2 ろ過処理 (GF/Fフィルター)

実験のろ過処理の流れを図2に示した。試水1LをGF/Fフィルターで吸引ろ過し、ろ液を250mlポリビンに分取した。鈴木 (2015) は、ろ過の引圧について、細胞の破損をできるだけ抑えるために0.016 MPa (12 cmHg) 以下で行うことを推奨しているが、ここでは引圧を①0.007 MPa (5 cmHg)、②0.013 MPa (10 cmHg)、③0.040 MPa (30 cmHg)、④0.067 MPa (50 cmHg) の4段階に変えて行った。また、それぞれ3連とした。ろ過に使用したGF/Fフィルターはクロロフィルa濃度測定用試料とした。また、未ろ過の原水は50ml遠沈管に分注した。これも3連とした。ろ液および原水は、グルタルアルデヒド (最終濃度1%) で固定し、細胞数計数試料とした。

2.3 ろ過処理 (蛍光観察用)

2.2の蛍光観察用試料を、黒暗色に染色した孔径0.2µmのヌクレポアフィルターでろ過した。ろ過量は

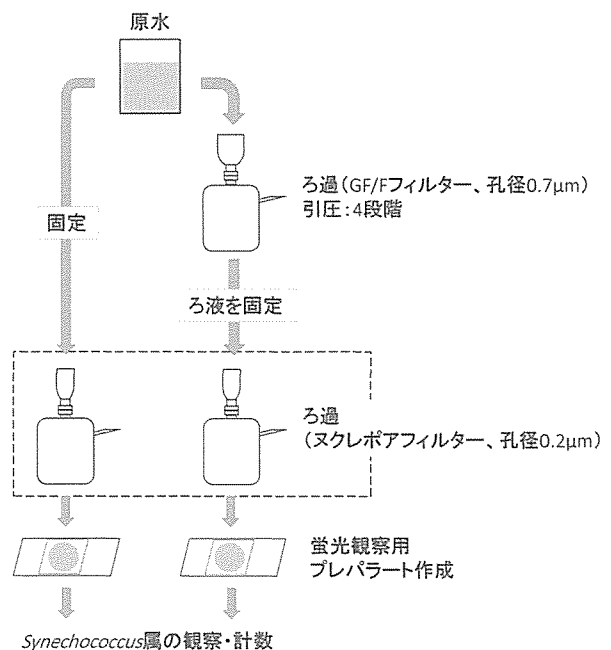


図2 ろ過処理の流れ

ろ液は100 mlまたは50 ml、原水は10 mlとした。ろ過後のヌクレポアフィルターはスライドグラスに乗せ、イメージジョンオイルを1滴垂らしてカバーグラスで封入し、プレパラートを作成した。作成したプレパラートは分析まで冷凍保存した。

2.4 *Synechococcus* 属の計数

2.3で作成したプレパラートを、落射型蛍光顕微鏡を用い、B励起光下で黄色の蛍光を発するものを計数した。計数は、ろ液は100視野、原水は30視野行い、1視野あたりの平均数とろ過量から、1 mlあたりの細胞数を求めた。

3. 結果と考察

実験の結果を表2に示した。クロロフィル *a* は、引圧を変えてろ過した①～④のいずれも0.83～0.96 µg/Lの範囲にあり、大きな差はなかった。

表2 分析結果

試料名	GF/F フィルターろ過時の引圧	クロロフィル <i>a</i> (µg/L)	<i>Synechococcus</i> 属 (cells/ml)
St. 2	①-1	0.007 MPa (5 cmHg)	0.91
	①-2		0.94
	①-3		0.89
	②-1	0.013 MPa (10 cmHg)	0.87
	②-2		0.92
	②-3		0.85
	③-1	0.040 MPa (30 cmHg)	0.94
	③-2		0.87
	③-3		0.92
	④-1	0.067 MPa (50 cmHg)	0.96
	④-2		0.94
	④-3		0.83
原水-1	-	-	4,000
原水-2	-	-	4,400
原水-3	-	-	4,300

Synechococcus 属は、未ろ過の原水では4,000～4,400 cells/mlであったのに対し、ろ液ではいずれも1 cells/ml未満であった。

これらの結果から、試水中の *Synechococcus* 属はGF/Fフィルターによってほぼ捕集されたと考えられた。また、ろ過時の引圧の違いは、*Synechococcus* 属の捕集能力にはほぼ影響はないものと考えられた。

4. まとめ

本研究では、GF/Fフィルターの *Synechococcus* 属捕集能力について検証した。その結果、*Synechococcus* 属はGF/Fフィルターによってほとんどが捕集されることが明らかになった。しかし、試水中の *Synechococcus* 属のサイズが小さい場合や、*Synechococcus* 属よりも小さなサイズのピコ植物プランクトンが卓越する場合、GF/Fフィルターではそれらを完全に捕集できない可能性も考えられる。熱帯外洋域では *Synechococcus* 属よりも小さな原核緑藻が卓越することが知られている(齋藤, 2008)。よって、熱帯外洋域などで、GF/Fフィルターを用いる際は注意が必要であり、本研究で実施したような検証が必要であると考えられた。

参考文献

- Hashimoto, S. and Shiomoto, A. 2000. Comparison of GF/F filters and 0.2 and 0.6 µm Nuclepore filters on the chlorophyll *a* retention. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish*, 37: 45-48.
- Knefelkamp, B., Carstens, K. and Wiltshire, K. H. 2007. Comparison of different filter types on chlorophyll-*a* retention and nutrient measurements. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 345: 61-70.
- 齋藤宏明. 2008. 5-2 植物プランクトンによる栄養塩取り込み特性. 海洋プランクトン生態学-微小生物の海-(谷口旭教授 退職記念事業会 編. 谷口旭 監修). 成山堂書店. 280-281.
- 鈴木光次. 2015. 第4章植物色素. 海洋観測ガイドライン第4巻採水分析II(粒子態). 日本海洋学会. G404JP-1-G404JP-5.
- 多田邦尚・松本幸治・多田充利・越智正. 1994. 広島湾における植物プランクトン群集のサイズ組成. 香川大学農学部学術報告. 46 (1): 27-35.