

海水中懸濁粒子と沈降粒子のクロロフィル *a* 類組成からみた 富栄養内湾における植物プランクトンの分解過程

佐光 宏昭・松田 治・山本 民次

広島大学生物生産学部, 東広島市724

1993年10月25日 受付

要 旨 広島湾内にある閉鎖的内湾である江田内湾において、海水中懸濁粒子、沈降粒子および底泥表層を採取し、その光合成色素組成を比較した。クロロフィル *a* 類色素は高速液体クロマトグラフィーを用いて chl. *a*, chl. *a* アイソマー、およびフェオ色素に分類した。その結果 chl. *a* の占める割合は沈降粒子に比べて懸濁粒子で高かった。しかし懸濁粒子、沈降粒子ともに chl. *a* の分解産物であるフェオ色素の占める割合は30%以下と低く、chl. *a* の分解はあまり進んでいなかった。一方で底泥表層では chl. *a* の占める割合は数%と低く、分解が進んでいた。以上のことから江田内湾での chl. *a* の分解過程は外洋などと違って、動物プランクトンの摂餌・消化によるものより、植物プランクトンの自然死滅によるものが主であると考えられた。chl. *a* の分解は水中ではほとんど進まず、底泥表層に堆積してから進むものと考えられた。

キーワード: 江田内湾, クロロフィル *a*, 懸濁粒子, 高速液体クロマトグラフィー, 沈降粒子

緒 言

海洋生態系の食物連鎖は、100~200 m 以浅の有光層内で行われる光合成を基礎としている。光合成に関与する物質の中でも、太陽エネルギーを捕捉する chlorophyll *a* (以下 chl. *a* と略記) は、光合成活動の直接的な担い手であり、あらゆる種類の藻類に含まれるため、水圏における植物プランクトンの生物量ならびに基礎生産量の指標としてしばしば用いられてきた。

従来、chl. *a* の分析には吸光法または蛍光法が頻繁に用いられてきたが (STRICKLAND and PARSONS, 1972), 最近これらの測定法による chl. *a* の定量が疑問視されるようになった。その理由として、すべての chl. 類がその構造に母核としてポルフィリン環を有するため酷似した光化学的特性を持ち、このことに由来する分析法上の問題点が指摘されている。例えば、chl. *b* の存在下では蛍光法による chl. *a* の定量は誤差が大きいこと (HOLM-HANSEN and RIEMANN, 1978), また chlorophyllide *a* 及び chl. *a* の初期分解産物であるアイソマーと考えられる緑色色素は chl. *a* と似た吸収スペクトル・蛍光スペクトルをもつため、その存在下では chl. *a* の定量に誤差が生じること (JENSEN and SAKSHAUG, 1973; GIESKES *et al.*, 1978) などである。

1980年代より、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が光合成色素の分離定量に用いられるようになり (MONTOURA and LLEWELLYN, 1983; GIESKES and KRAAY, 1983), chl. *a* を chl. *a* のアイソマーや他の高次分解産物と分離することが可能となった。HPLC によって chl. *a* 類色素をより詳しく分画することができれば、光合成活性を持つ chl. *a* を正確に定量できるだけでなく、植物プランクトンの増殖、死滅にともなう chl. *a* の消長とともに、その分解過程を理解することができる。このような研究法を海域に応用すれば、chl. *a* の量的変動と共に chl. *a* の変質過程を知ることができ、植物プランクトンの増減と共に植物プランクトンの生理状態ならびに分解状況を知ることが可能と考えられる。

一般に chl. *a* 類は植物の枯死にともなってその活性を失い、中心金属の脱離した pheophytin *a* へと変換される。さらに側鎖の分解によって、多種多様な高次分解物へとその形態を変え、水中および堆積物中で最終分解物へと分解されてゆくと考えられている。

本研究では、広島湾内の閉鎖的内湾である江田内湾において海水中懸濁粒子とともに、セディメントトラ

ップを設置して沈降粒子を採集し、さらに表層堆積物を採取した。これらの粒子状物質の光合成色素組成を比較することにより、植物プランクトンの沈降に伴う色素組成の変化を明らかにし、植物プランクトンの分解過程を検討した。

研究方法

広島湾内の閉鎖性海域である江田内湾の E-5 (Fig. 1) において、1990年4月20日から21日、1990年6月27日から28日、1990年9月21日から22日にかけて観測を行った。観測時の平均水深は21mであった。

水温、塩分の測定及び海水の採取を、4月には6時間おき、6月には12時間おき、9月には21日16:30のみに行った。水温、塩分をCTD (Sea Bird社製 SBE-9/11) により、採水はバンドン採水器により0, 5, 10および海底上2m (B-2m) の4層から行った。採取した海水1ℓをワットマン GF/C フィルターで吸引濾過したのち、フィルターを-15°Cで凍結保存し、chl. 類の分析に供した。また4月にはコアサンプラーを用いて採泥を行い、底泥の表層1cmを採取し冷凍保存し、同様の分析を行った。

沈降粒子の観測はセディメントトラップ (内径14.5 cm, 高さ45 cm, 円筒型) を用いて行った。船上よりセディメントトラップを5および15mの2層に23時間 (6月は24時間観測の前半と後半に10時間ずつ) 吊下し、沈降粒子を捕集した。揚収したトラップ中の上澄み海水をサイフォンで静かに取り除いた後、捕集した試料をメスシリンダーに移して攪拌し、各サンプルの1/5を懸濁粒子の場合と同様に濾過した後凍結保存をし、chl. 類の分析に供した。

chl. 類の分析にあたっては、まず海水中懸濁物および沈降粒子の場合にはフィルターに、底泥試料の場合には泥1g (湿重量) に100%メタノール5mlを加え、振とう攪拌し冷暗条件下で24時間放置して色素を抽出した。抽出後、再振とうし、ミリポアガードフィルターで濾過した。この抽出濾過液の10μℓをマイクロシリンジでHPLC装置にインジェクトし、クロマトグラムを得た (Fig. 2)。

chl. 類の測定に用いたHPLC装置は、高速液体クロマトグラフ (日立 L6000型)、サンプルインジェクター (レオダイン7125型)、検知器として分光蛍光光度計 (日立 F-1050型)、クロマトデータ処理装置 (日立 D-2500型) から成る。分析用カラムとしてMerk 18 RPeを、移動相としてアセトニトリル:メタノー

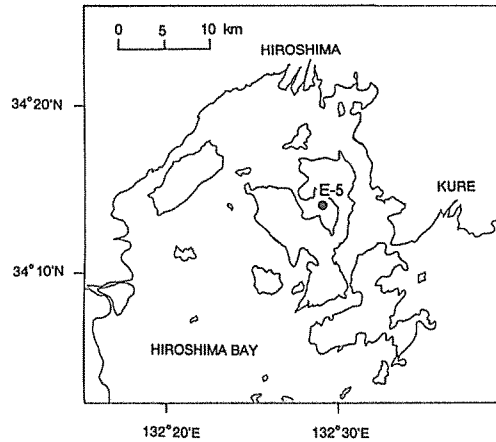


Fig. 1. Location of the sampling station in Etauchi Bay, Japan.

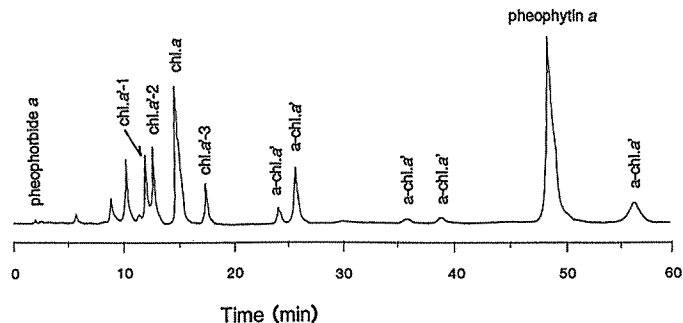


Fig. 2. HPLC fluorescence chromatogram of the mixture of acidified chl. *a* and the water sample obtained from Etauchi Bay in June, 1990.

ル=20:80 (v/v) を使用し、流速は 1.0 ml min^{-1} とした。蛍光の測定は励起波長 410 nm, 受光波長 670 nm とした。室温はほぼ 29°C とした。

クロマトグラム上の chl. *a* 関連物質と思われるピークを以下のように分類し、本研究における chl. *a* 関連物質の定義とした。

chl. *a*, pheophytin *a*, pheophorbide *a* chl. *a* ピークの同定には、chl. *a* 標準物質 (和光純薬製, スピルリナ) を用いた。また pheophytin *a*, pheophorbide *a* の同定には前記の標準物質より調製したものをを用いた (芳竹ら, 1987)。以上の標準試料は、全て100%メタノールに溶かして使用した。

chl. *a'*-1, 2, 3 市販の chl. *a* 標準物質のクロマトグラム上に存在する chl. *a* 以外の物質で、リテンションタイムも chl. *a* のそれに近いことから、chl. *a* の初期分解産物である chl. *a* アイソマーとみなし、リテンションタイムの短い順に chl. *a'*-1, 2, 3 とした。

a-chl. *a'* 市販の chl. *a* 標準物質を 1 N 塩酸で処理した (acidify) ときに新たに出現して来るピークのうち pheophytin *a* のピーク以外の5つのピークに対応する物質を総称して a-chl. *a'* とした。これらは pheophorbide *a*, pheophytin *a* とともに中心金属 (Mg) の離脱したフェオ色素群を構成する。

また各色素を厳密に定量的に取り扱うことが現時点では困難であるため、これら色素量の比較はピークの面積比で行った。

結 果

環境特性 江田内湾の測点 E-5 における水温、塩分の鉛直変化において4月、6月とも観測時刻による大きな変動はなかったので、これらの観測結果のうち、観測期間の中央に当たる4月20日18:00、6月28日6:00のもの、また9月は観測開始直前の9月21日16:30のものを Fig. 3 に示した。水温、塩分の鉛直分布において時間的変動が少ないのは、この湾の閉鎖性が強く、海水の流動ならびに交換があまり大きくないことによると考えられた。4月には水温は 0 m では $13.6\sim 14.5^{\circ}\text{C}$ 、B-2 m では 12.5°C であった。塩分は各時刻とも、0 m ($29.8\sim 30.2$) から 10 m 層 (32.4) にかけて増加した。6月には水温は 0 m 層では 24.2°C で、B-2 m 層で約 17°C であった。塩分は 0 m では $28.3\sim 29.1$ で、0 m から 10 m 層にかけては急激に上昇し、B-2 m で 32.7 付近であった。9月には水温の鉛直変化はほとんど $23.7\sim 24.1^{\circ}\text{C}$ の間で変化した。塩分は 0 m から B-2 m 層にかけ緩やかに上昇し、0 m で 30.32 、B-2 m で 32.01 であった。以上から江田内湾では4月、6月に 5 m から 10 m 層付近に塩分躍層が存在していたことがわかった。

懸濁粒子中の chl. *a* 類濃度と組成変化 chl. *a* 類の濃度の鉛直変化をみると、chl. *a* は4月20日18:00を除いて5 m 層以浅で最高濃度を示した (Fig.4)。chl. *a* アイソマーのうち chl. *a'*-1, 2, 3 はほぼ chl. *a* と

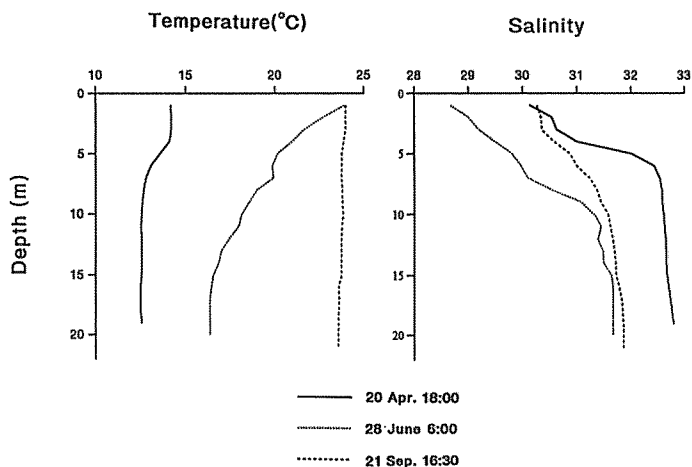


Fig. 3. Vertical distribution of temperature and salinity in sea water of Etauchi Bay (E-5).

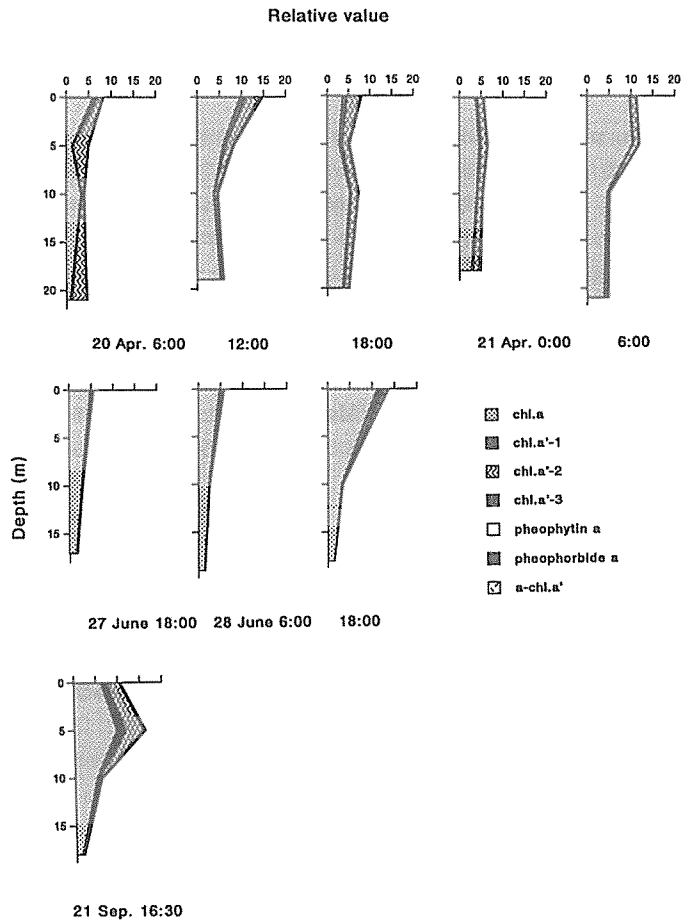


Fig. 4. Variations of chl. *a* and its derivatives in suspended particles of Etauchi Bay (E-5). Upper, April; Middle, June; Bottom, September, 1990.

同様の变化を示したが、4月20日6:00のみ chl. *a*'-2 が 5 m と B-2 m で多く、chl. *a* と異なった分布を示した。また、a-chl. *a*' は検出されなかった。

またそれらの組成では4月20日6:00の観測を除いて、chl. *a* が60~90%を占めており、残りのほとんどを chl. *a*'-1, 2 が占めていた。また、検出された pheophorbide *a* はほとんどの観測時に全体のわずか1~2%であった。4月20日6:00の観測では5およびB-2m で chl. *a*'-2 が60%以上を占めており、chl. *a* は20%程度しかなかったが、一般に懸濁粒子中では chl. *a* が chl. *a* 類中の60%以上を占めており、chl. *a* 類組成には時間、季節、観測層による大きな変化はなかったといえる。

沈降粒子中の chl. *a* 類組成 セディメントトラップにより捕集された沈降粒子中の chl. *a* 類の組成を Fig. 5 に示した。4月には 5 m 層で捕集された沈降粒子中で chl. *a* が78%を占めた。しかし pheophorbide *a* の占める割合は懸濁物中より大きく10%を占めていた。また、懸濁物中にはみられなかった a-chl. *a*' が2%存在していた。これに対し15 m 層で捕集された沈降粒子中では chl. *a* の割合は36%と低く、pheophorbide *a* の占める割合も5 m に比べて7%と若干低下したが、a-chl. *a*' の占める割合が35%と大幅に増えて、フェオ色素全体の割合が高くなっている(51%)のが特徴であった。沈降粒子と関係の深い底泥表層について調べたところ、chl. *a* はほとんどなく、chl. *a* の高次分解産物である pheophorbide *a* の割合が60%と著しく高くなっていた。

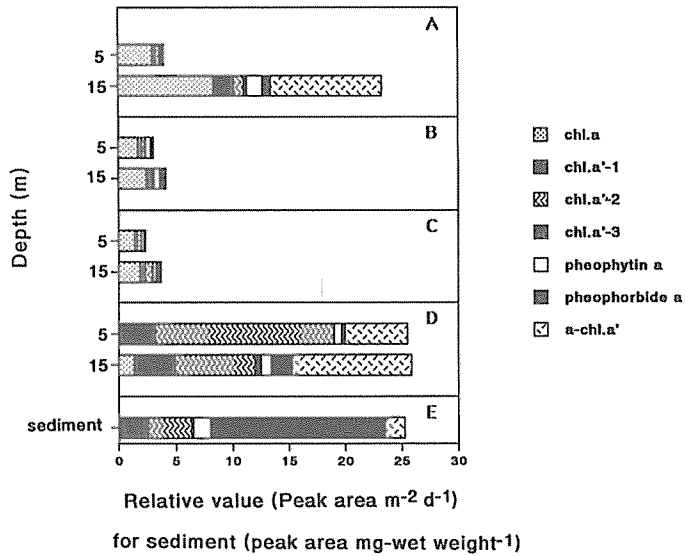


Fig. 5. Variations of chl. *a* and its derivatives in sinking particles and surface sediment of Etauchi Bay (E-5), 1990. A, 18:00 20-17:00 21 April; B, 18:00 27-4:00 28 June; C, 6:00-16:00 28 June; D, 18:00 21-17:00 22 September; E, 16:30 20 April.

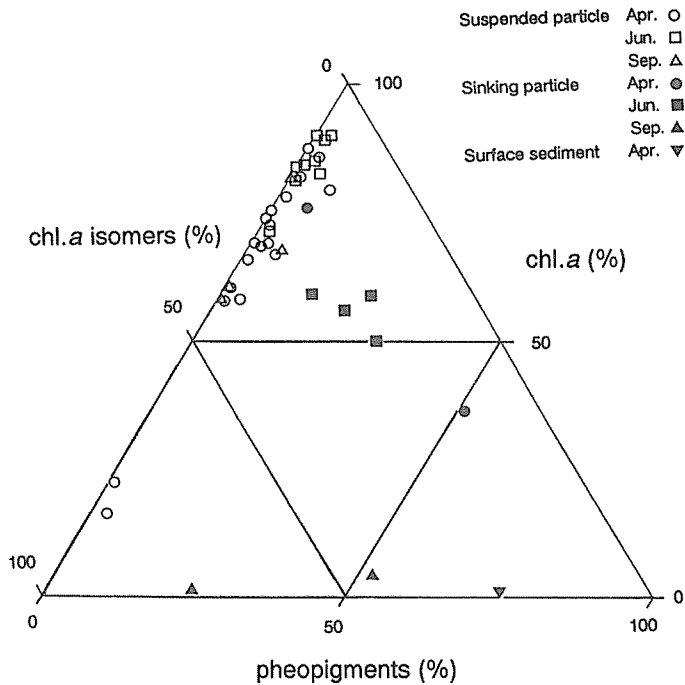


Fig. 6. Comparison in the relative abundance of chl. *a*, chl. *a* isomers and pheopigments among suspended particles, sinking particles and surface sediments obtained from Etauchi Bay.

6月のトラップに捕集された沈降粒子からは昼夜における chl. *a* 類の沈降量, 組成に差はほとんど見られず, 5 m, 15 m 両層を通じて chl. *a* が60%以上を占めていた。また 15 m では 5 m ではみられなかった a-chl. *a'* が検出された。

9月には chl. *a* の占める割合が非常に低く (5 m, 3%; 15 m, 9%), 一方, フェオ色素の割合が高かった (15 m, 52%)。フェオ色素のうちでは a-chl. *a'* が 5 m で88%, 15 m で79%を占めた。

これらの結果より, 例えば chl. *a* の占める割合は3~75%と大きく変動することからわかるように, 沈降粒子中の chl. *a* 類組成は季節, 観測層により大きな違いがあることがわかった。

懸濁粒子と沈降粒子中の光合成色素組成の比較 懸濁粒子と沈降粒子の性質を比較するに当たり, 懸濁粒子の性質は採水時の瞬間的なものであるのに対し, 沈降粒子の測定値はセディメント・トラップの設置期間 (10~23時間) の平均的な性質を示す。そこで, 4, 6月には沈降粒子の捕集期間中に懸濁粒子を複数回採集してその性質を検討した。その結果, 海況と合わせて時間的変動は大きくないことがわかったので, 今回の観測結果においては懸濁粒子と沈降粒子の性質を比較することが原理的に可能であるといえる。

懸濁粒子および沈降粒子中の chl. *a* 類を, chl. *a*, chl. *a* アイソマー, フェオ色素の3群に分類し, 三成分組成図として Fig. 6 に示した。懸濁粒子中では多くの場合に chl. *a* が chl. *a* 類の60%以上を占めることがわかり, 60%以下であったのは全観測中4月の2例だけであった。chl. *a* アイソマーが占める割合は大部分の場合35%以下であり, 高次分解産物であるフェオ色素はほとんどの場合に10%以下と少なかった。一方, 沈降粒子中の chl. *a* 類組成は観測季節により差はあったが, 4月の5 m で捕集されたものを除けば, chl. *a* の占める割合が60%以下と低く, フェオ色素の占める割合は20%以上と高かった。以上の結果から沈降粒子中に比べて海水懸濁物中では chl. *a* の占める割合が高かったことが分かる。

考 察

生理状態が悪くなった植物プランクトン生体内では chl. *a* は chl. *a* アイソマーに変成される。その後の chl. *a* の分解過程には植物プランクトンの自然死滅によるものと動物プランクトンの摂餌によるものの二通りが考えられる (半田, 1992)。植物プランクトンが自然死滅した場合は chl. *a* 及び chl. *a* アイソマーから pheophytin *a* が生成され, さらに pheophorbide *a* に変成される。一方, 動物プランクトンに摂食された植物プランクトン細胞中の chl. *a* は, 動物プランクトンの消化管内において pheophorbide *a* に分解され, 糞として排泄される。これらの分解産物は沈降中も分解を続けて底泥表層に蓄積され, さらに高次の分解産物となる。従って, 沈降粒子中にはこの二通りの分解過程を受けた chl. 類や生細胞が含まれる。

本研究においてセディメントトラップにより捕集された沈降粒子中の chl. *a* 類の組成は, 海水懸濁物中の chl. *a* 類の組成に比べてフェオ色素の割合が高かった。動物プランクトンの摂餌による chl. *a* のフェオ色素への分解率に関して, SHUMAN and LORENZEN (1975) は66%以上という高い値を報告している。また, VERNET and LORENZEN (1987) によると pheophorbide *a* に3種, pheophytin *a* には2種の誘導体があることが判明しており, pheophorbide *a* の誘導体の内の1種は動物プランクトンの摂餌によって生成し, さらにこれらが有光層内で光化学反応により他の2種の pheophorbide *a* に分解すると述べている。今回, 沈降粒子中に検出された a-chl. *a'* にこれら pheophytin *a* や pheophorbide *a* の誘導体が含まれている可能性もある。これらの沈降粒子中に含まれるフェオ色素の大部分は chl. *a* の動物プランクトン消化作用による分解過程で生成したと考えられる。

次に沈降粒子中の色素組成から chl. *a* の分解の度合いをみると, 4月の5 m で捕集されたものが最も chl. *a* の分解が進んでおらず, 以下6月, 9月の5 m, 4月の15 m と9月の15 m で捕集された沈降粒子の順で後者のものほど分解が進んでいた。沈降粒子中に植物プランクトンの生細胞が多ければ chl. *a* の割合は高く, また死細胞でも死滅直後であれば chl. *a* の割合は高いと思われる。一方で動物プランクトンの糞粒が多ければ, フェオ色素の割合が高くなると考えられる。つまり, 4月の5 m で捕集された沈降粒子は主として植物プランクトン生細胞からなっており (chl. *a* 78%), 4月の15 m と9月の15 m で捕集された沈降粒子は, 主として死滅した植物プランクトン細胞と動物プランクトン糞粒からなる (フェオ色素51~52%) と考えられた。

しかし, 最も分解が進んでいると考えられた4月の15 m と9月の15 m を除けば, 沈降粒子中のフェオ

色素の割合は30%以下であった。沈降粒子中の chl. *a* 類の組成は水域の植物、動物プランクトンの活動に関係が深く、植物プランクトンが大増殖をする時期にはトラップ中に chl. *a* が多くみられ、動物プランクトンが多く活発に活動している季節にはトラップ中に分解産物であるフェオ色素が多くなる (HURLEY and ARMSTRONG, 1990)。外洋においても栄養塩が多く植物プランクトンが増殖しやすい八丈島沖の湧昇域では、その周辺海域に比べて chl. *a* の割合が高く、一方、周辺海域では chl. *a* アイソマーが検出されず pheophorbide *a* が多かったことが報告されている (鈴木・石丸, 1989)。その理由として湧昇域内の植物プランクトン群集を構成する珪藻が外洋性群集に比較してサイズが大きく沈降しやすいこと、湧昇が短寿命であったため、捕食者である動物プランクトンの個体数増加が伴わず、糞粒があまり形成されなかったことがあげられている。湧昇域に比べて栄養塩が多く植物プランクトンの増殖が起りやすい富栄養化した沿岸海域ではこのような傾向はさらに強いと考えられる。以上の結果から今回観測を行った江田内湾のような沿岸海域では植物プランクトンの細胞サイズが大きく、また富栄養化により植物プランクトンの増殖が起りやすく、動物プランクトンの摂餌量を植物プランクトンの増殖量が上回るために、水柱内での chl. *a* 分解は動物プランクトンの摂餌、消化による分解に比べて植物プランクトンの自然死滅による分解過程をとるものが多いと本研究では結論づけられた。ただし、水深が浅いために水柱内では分解が最終段階まで進行せず、高次の分解過程は堆積物中で進行するものと推定された。

なお、本研究では chl. *a* アイソマーを初期分解産物として取り扱ってきたが、これらの構造はわかっていない。そのため chl. *a* アイソマーの内のいずれかが光合成活性を持つ可能性や、chl. *a* の前駆体である可能性もある。また、一部の chl. *a* アイソマーからは chl. *a* への再構成もあり得ると考えられる。HPLC による chl. 類の分析は多数の chl. 類を同時に検出できるため、植物プランクトンの生理状態や分解過程のみならず、群集の分類学的組成等を検討する際にも有用であると思われる。

引用文献

- GIESKES, W. W. C., KRAAY, G. W. and TIJSSEN, S. B. 1978, Chlorophylls and their degradation products in the deep pigment maximum layer of the tropical North Atlantic. *Neth. J. Sea Res.*, 12, 195-204.
- GIESKES, W. W. C., and KRAAY, G. W. 1983, Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 28, 757-766.
- 半田暢彦, 1992, 海洋における有機物の動態. 海の研究, 1, 251-263.
- HOLM-HANSEN, O. and RIEMANN, B. 1978, Chlorophyll *a* determination: Improvements in methodology. *Oikos*, 30, 438-447.
- HURLEY, J. P. and ARMSTRONG, D. E. 1990, Fluxes and transformations of aquatic pigments in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 384-398.
- JENSEN, A. and SAKSHAUG, E. 1973, Studies on the phytoplankton ecology of the Trondheimfjord. 3. Chloroplast pigments in relation to abundance and physiological state of the phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 11, 137-155.
- MANTOURA, R. C. F. and LLEWELLYN, C. A. 1983, The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 151, 297-314.
- SHUMAN, F. R. and LORENZEN, C. J. 1975, Quantitative degradation of chlorophyll by herbivore. *Limnol. Oceanogr.*, 20, 580-586.
- STRICKLAND, J. D. H. and PARSONS, T. R. 1972, A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd ed. 310pp, *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, Ottawa.
- 鈴木玲子・石丸 隆, 1989, 局地的湧昇域内外における光合成色素の組成. 月刊海洋, 21, 604-607.
- VERNET, M. and LORENZEN, C. J. 1987, The relative abundance of pheophorbide *a* and pheophytin *a* in temperate marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, 32, 352-358.
- 芳竹良彰・垣内喜久子・合田四朗・山崎秀夫・重松恒信・西川泰治, 1987, 高速液体クロマトグラフィーによる堆積物中のクロロフィル分解過程の研究. 日本化学会誌, 4, 678-683.

Degradation Processes of Phytoplankton in a Eutrophic Bay with Particular Reference to the Chlorophyll *a* Pigment Composition of Suspended and Sinking Particles.

Hiroaki SAKOH, Osamu MATSUDA and Tamiji YAMAMOTO

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 724, Japan*

Physiological condition of phytoplankton can be estimated from both quantitative and qualitative analyses of photosynthetic pigments. In this study, the process of chlorophyll *a* degradation in an enclosed eutrophic bay were investigated using high-performance liquid chromatography (HPLC). Chlorophyll *a* and its derivatives were classified into chl. *a*, chl. *a* isomers (chl. *a*'-1, 2, 3) and pheopigments by the use of reverse-phased HPLC. Resulted pigment compositions were compared between suspended particles, sinking particles and surface sediment in Etauchi Bay. Chl. *a* was more abundant in suspended particles than in sinking particles, while pheopigments in both particles accounted for only less than 30%. Since it was reported that 66% of chl. *a* was degraded by grazing of zooplankton, these results indicate that grazing and digestion by zooplankton are not the major process of degradation. Different from open sea, the major degradation process of chl. *a* in the eutrophic coastal area was concluded to be the natural death of phytoplankton. Because of the shallowness of the area, final stage of the degradation is supposed to occur after sedimentation.

Key Words: chlorophyll *a*, Etauchi Bay, high-performance liquid-chromatography, sinking particle, suspended particle