

大阪湾における水中型蛍光光度計を用いた クロロフィルの測定と赤潮の判断

山本圭吾・中嶋昌紀

A Measurement of Chlorophyll Using Submerged Fluorescence Spectrophotometer in Osaka Bay and Judgement of Red Tide

Keigo Yamamoto and Masaki Nakajima

はじめに

大阪湾では1960年代以降富栄養化が進み、毎年のように赤潮が発生している¹⁾。赤潮はその定義からいえばプランクトンを主とする海洋微生物の急速な増殖に伴う海色変化であるが²⁾、その海域が赤潮であるか否かの判断基準は海域により異なっているのが現状である。

大阪水試においては赤潮の判断基準として水色、透明度、プランクトン種類、細胞数などから総合的に判断しているが、大阪湾のように多種多様な植物プランクトンから赤潮が構成される海域においてはその判断基準は複雑で担当者の主観による部分が多い。赤潮か否かを判断する上で、定義に基づくと水色によるものももっとも確からしいと思われるものの、客観性に乏しく、実際は水色と植物プランクトンの状況が一致しないことも多い。逆に、細胞数やクロロフィル濃度は客観性は高いが、測定が煩雑で結果を得るのに時間がかかる。

そこで、本研究では客観的かつ簡便に赤潮を把握するため、水中型蛍光光度計を用いたクロロフィルの測定を検討し、それにより赤潮の判断をおこなうことを試みた。

材料と方法

調査は1998年4月から11月、および1999年2月と4月から11月にかけて月1回の頻度で計17回、水中

型蛍光光度計（アレック電子製、クロロテック MODEL ACL215-DK）を用いておこなった。各観測では蛍光強度、水温、塩分、水中照度について0.1m間隔のデータが得られたが、水温、水中照度については本解析には用いなかった。現場採水による水中型蛍光光度計の較正は1999年2月を除く計16回、5もしくは6定点（図1 a, open circle）について行った。較正は黒色のタンク（30cm×30cm×30cm）を用いて各定点で3回おこない、その平均値を使用した。タンクの試料は実験室に持ち帰り、アセトン抽出による蛍光法³⁾でクロロフィルaの1ℓあたりの量（クロロフィルa濃度とする、以下同）およびフェオフィチンと合わせた合計量（植物色素濃度とする、以下同）を求め、5点もしくは6点分の較正による蛍光強度と蛍光法によるクロロフィルa濃度および植物色素濃度で回帰分析をおこない両値の相関関係を求めた。

調査のうち1998年、1999年の4、6、7、9、10月は大坂湾内の13定点（図1 a）、1998年5、8、11月および1999年2、5、8、11月は大坂湾内の20定点（図1 b）について表層採水した試水を実験室に持ち帰り、蛍光法でクロロフィルa濃度と植物色素量を求めた。また、大阪湾南部、中部、北部の3定点（図1 b, open circle）については表層、5m層、10m層（南部の定点は水深が浅いため除く）、B-1層の層別採水をおこない実験室で塩分計（TS

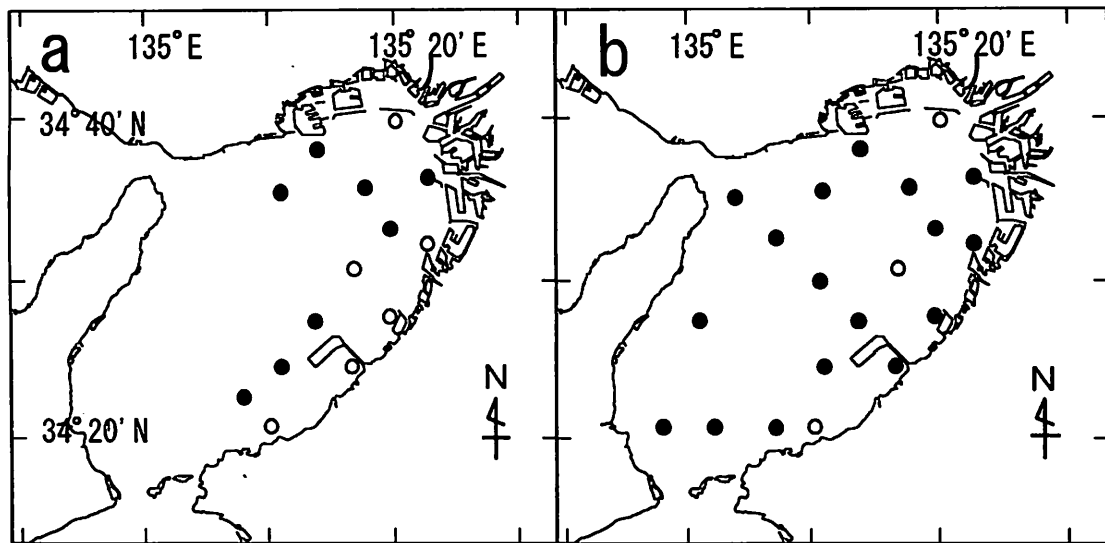


図1 調査定点図

塩分計デジオート model3G) により塩分を測定したあと同様に蛍光法による測定を行った。

加えて、従来法による赤潮判断との比較をおこなうため、現場において透明度板による透明度の測定、およびJIS規格準拠のMUNSELL COLOR SYSTEM STANDARD COLOR BOOK (以下、MUNSELL COLOR BOOK) を用いた水色の判定をおこなった。また、試水の一部は実験室において、海水 1 mlあたりの主要種の細胞数を検鏡により計数した。

結 果

・ 回帰分析結果

表1に各調査時における現場較正による蛍光強度と蛍光法によるクロロフィル a 濃度および植物色素

表1 各調査時の回帰直線

クロロフィル a 濃度		植物色素濃度	
'98.4	$Y=0.101X-4.072$ $R^2=0.816$	$Y=0.165X-5.748$ $R^2=0.892$	
'98.5	$Y=0.189X-17.474$ $R^2=0.996$	$Y=0.277X-20.526$ $R^2=0.995$	
'98.6	$Y=0.126X-6.483$ $R^2=0.863$	$Y=0.116X+18.481$ $R^2=0.419$	
'98.7	$Y=0.217X-13.125$ $R^2=0.988$	$Y=0.379X-17.780$ $R^2=0.939$	
'98.8	$Y=0.196X-8.686$ $R^2=0.990$	$Y=0.286X-10.903$ $R^2=0.999$	
'98.9	$Y=0.154X-7.388$ $R^2=0.915$	$Y=0.257X-11.099$ $R^2=0.862$	
'98.10	$Y=0.105X+3.024$ $R^2=0.909$	$Y=0.178X+4.733$ $R^2=0.947$	
'98.11	$Y=0.167X-11.121$ $R^2=0.689$	$Y=0.235X-9.902$ $R^2=0.662$	
'99.2	$Y=0.118X-4.431$ $R^2=0.723$	$Y=0.302X-10.989$ $R^2=0.649$	
'99.4	$Y=0.168X-6.483$ $R^2=0.896$	$Y=0.276X-6.597$ $R^2=0.996$	
'99.5	$Y=0.060X-2.356$ $R^2=0.915$	$Y=0.232X-9.358$ $R^2=0.906$	
'99.6	$Y=0.211X-16.178$ $R^2=0.747$	$Y=0.328X-23.644$ $R^2=0.928$	
'99.7	$Y=0.107X+1.012$ $R^2=0.722$	$Y=0.192X+1.851$ $R^2=0.830$	
'99.8	$Y=0.138X-4.755$ $R^2=0.903$	$Y=0.199X+0.702$ $R^2=0.866$	
'99.9	$Y=0.299X-17.708$ $R^2=0.994$	$Y=0.476X-29.745$ $R^2=0.996$	
'99.10	$Y=0.225X-10.637$ $R^2=0.990$	$Y=0.398X-18.840$ $R^2=0.994$	
'99.11	$Y=0.141X-2.285$ $R^2=0.682$	$Y=0.268X-5.532$ $R^2=0.823$	

濃度の回帰式を示した。 R^2 は 0.419 と低い値も見られるものの、概ね 0.8-0.9 の高い値を示していた。

また、各調査回時のクロロフィル a 濃度の回帰式と植物色素濃度の回帰式を比較しても R^2 に大きな差はみられなかった。一方、各調査間で比較すると傾きはクロロフィル a 濃度で 0.1 から 0.2 前後、植物色素濃度で 0.2 から 0.4 前後で差は比較的小さかったが、Y 切片はクロロフィル a 濃度が約 $-18 \mu\text{g/l}$ から $+3 \mu\text{g/l}$ 、植物色素濃度で $-30 \mu\text{g/l}$ から $+20 \mu\text{g/l}$ と大きな差が見られた。

図2に現場較正で得たすべての値を用いて回帰分析をおこなった結果を示した。計81個のデータから回帰した結果、クロロフィル a 濃度： $Y=0.184X-10.368$, $R^2=0.885$ 、植物色素濃度： $Y=0.284X-12.045$, $R^2=0.883$ の回帰直線を得た。 R^2 は各調査回時に得た回帰直線の値よりは低いもののクロロフィル a 濃度、植物色素濃度ともほぼ同様の値が得られたが、クロロフィル a 濃度の方が若干高い値であった。

・ 回帰式から得られた推定値と蛍光法によるクロロフィル a 濃度および植物色素濃度との比較

図3に各調査回時の回帰式から得られたクロロフィル a 濃度および植物色素濃度の推定値と蛍光法で得られた同値の関係を、図4にすべての較正值を用いた回帰式から得られた推定値と蛍光法による同値の

関係を示した。比較にあたっては較正に用いた定点を除いた点でおこなった。各相関係数は各調査回時の回帰式から得られた推定値でクロロフィル a 濃度が0.903, 植物色素濃度が0.832, すべての較正值からの回帰式から得られた推定値でクロロフィル a 濃

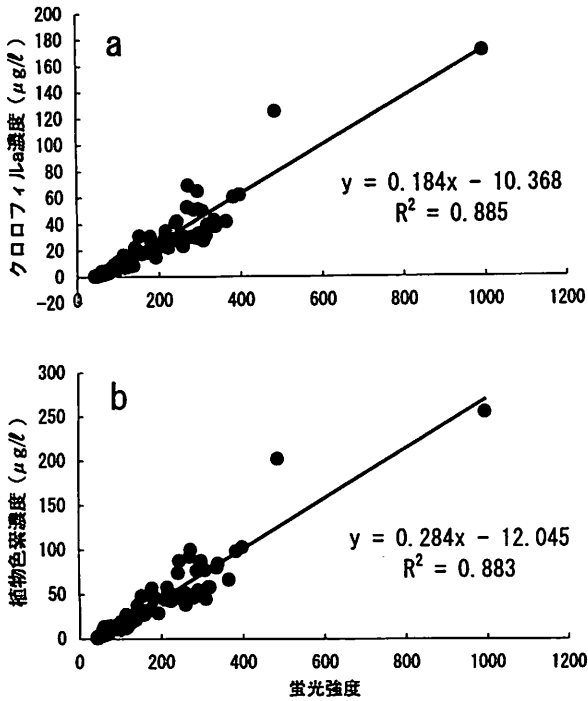


図2 蛍光強度と蛍光法による測定値の関係
a: クロロフィル a, b: 植物色素

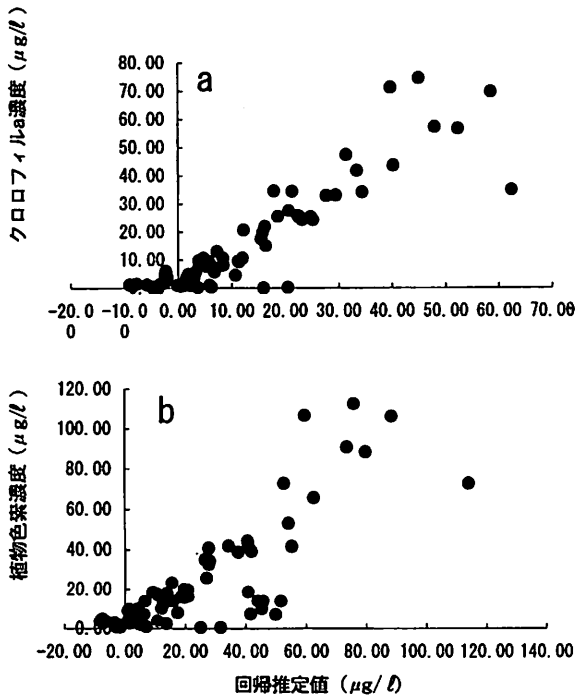


図3 回帰推定値と蛍光法による測定値の関係
各調査ごとの式で回帰
a: クロロフィル a, b: 植物色素

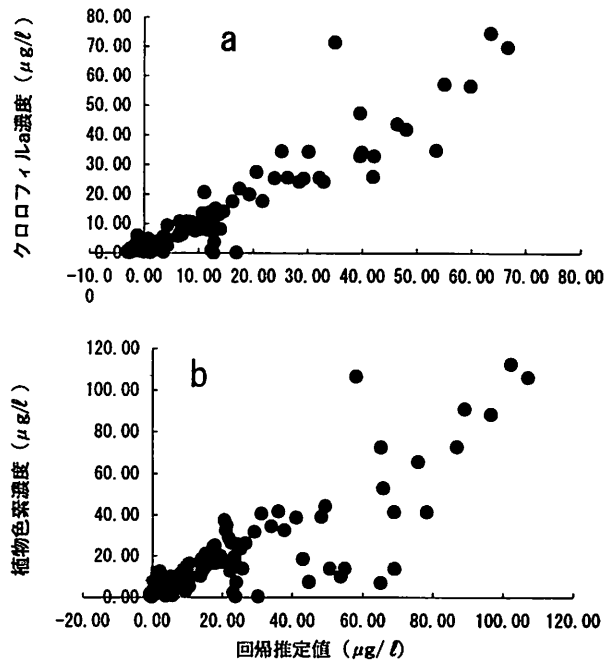


図4 回帰推定値と蛍光法による測定値の関係
すべての較正值からの式で回帰
a: クロロフィル a, b: 植物色素

度が0.935, 植物色素濃度が0.846であり, いずれもクロロフィル a 濃度の方が植物色素濃度より高い相関が得られた。また, 各調査時で得られた回帰式から得られた推定値よりもすべての較正值から得られた推定値の方が相関が高かった。

図5に20定点で蛍光法によりクロロフィル a 濃度および植物色素濃度を測定した'98年5, 8, 11月, '99年2, 5, 8, 11月についてすべての較正值から得られた回帰式から計算した推定値と蛍光法によって得られたクロロフィル濃度, 植物色素濃度を定点別に示した。すべての較正值より得られた回帰式から計算した推定値はクロロフィル a 濃度, 植物色素濃度とも'99年5月を除いては, 蛍光法による同値と概ねよく一致した。また, 蛍光法による測定値の低いところでは回帰式による推定値が負になるところも見られたが, 蛍光法による測定値が高いところでは比較的良好に一致する傾向にあった。

図6に層別採水した各層について, 回帰式から計算したクロロフィル a 濃度および植物色素濃度の推定値と蛍光法により測定した同値の関係を示した。

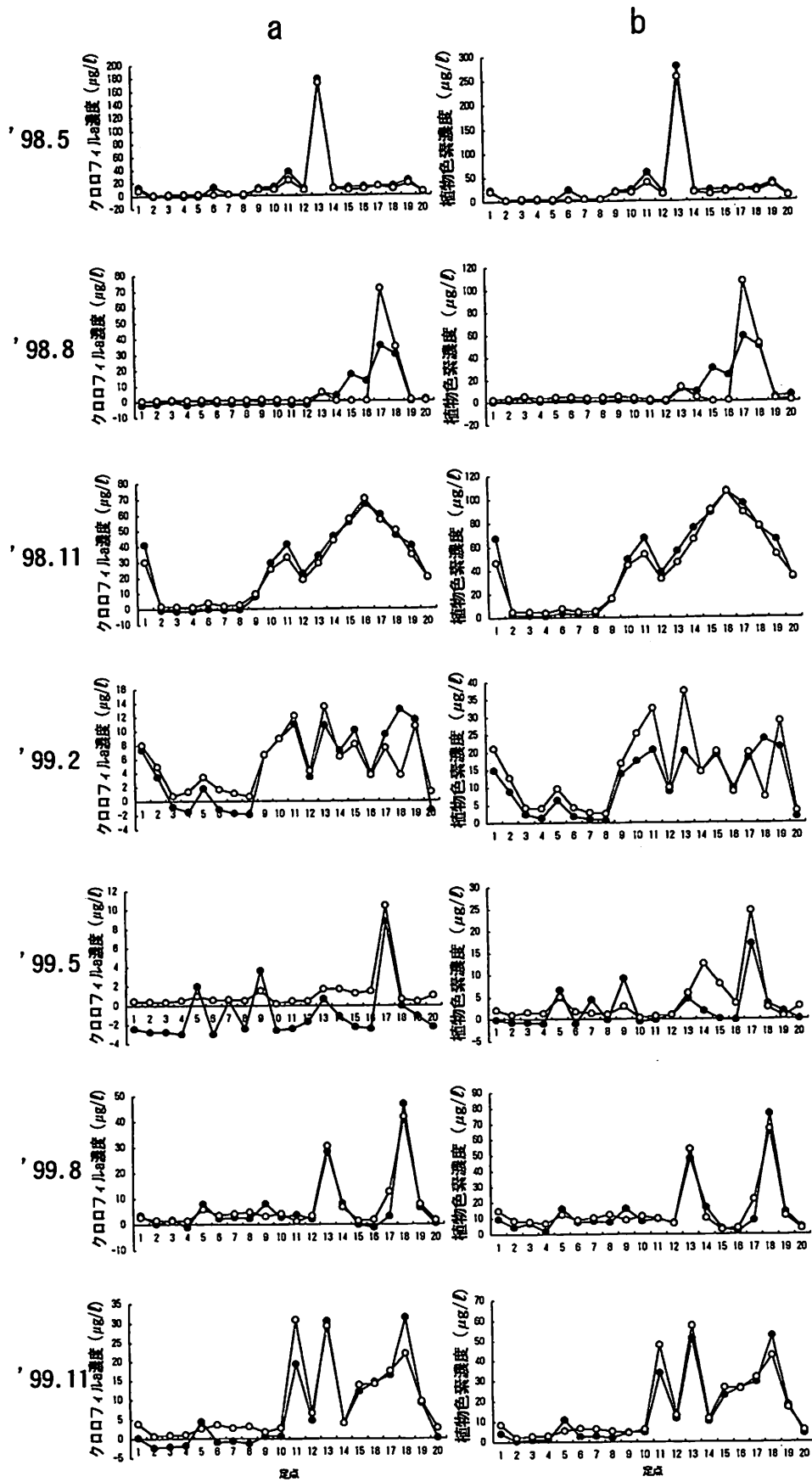


図5 定点別回帰推定値と蛍光法測定値

a: クロロフィルa, b: 植物色素

●: 回帰推定値, ○: 蛍光法による測定値

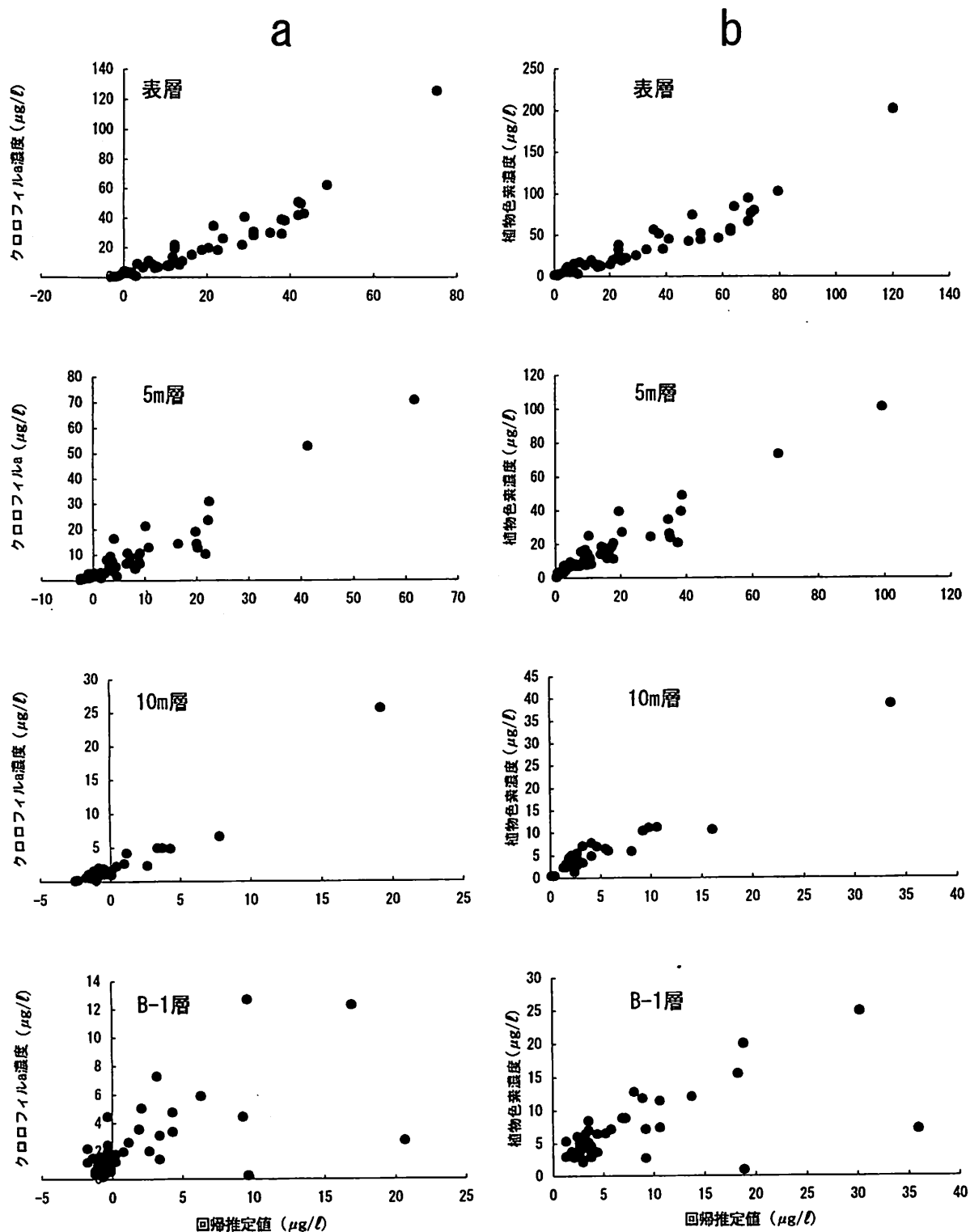


図6 回帰推定値と蛍光法による測定値の関係 (水深別)

a : クロロフィルa, b : 植物色素

水中型蛍光光度計の蛍光強度は採水層に近く、塩分計で求めた塩分値と水中型蛍光光度計で得られた塩分値が一致する層における値を用いた。クロロフィル a 濃度、植物色素濃度とも10m層まではばらつきは少なく、相関係数はクロロフィル a 濃度が表層から0.938, 0.942, 0.965, 植物色素濃度が0.939, 0.950, 0.960と高い値を示したがB-1層ではばらつきが大きくクロロフィル a 濃度が0.625, 植物色素濃度が0.639と低い相関であった。

・従来法による赤潮判断との比較

図7に水色値と水中型蛍光光度計の蛍光強度との関係を示した。今回水色の判断基準として用いたMUNSELL COLOR BOOKはマンセル表色系⁴⁾に従い色相を大きく40段階に分け、さらにその中を彩度と明度で段階に分けて表形式にしたものである。大阪湾における水色は概ね2.5Rから10Gの間にあり、R (red) に近づくほど赤みがかかり赤潮と判断される。従来法により赤潮と判断したのはMUNSELL COLOR BOOKで2.5GYより赤色側の水色を示していた点で、水色10Yではほとんどの点で赤潮と判断していた。また、5GYより青色側では赤潮と判断したものはなかった。赤潮と判断したときの蛍光強度の最低値は124で150を越えるとほとんどの点で赤潮と判断していた。赤潮と判断した最低蛍光強度の124を全体から得られた回帰式に代入すると、クロロフィル a 濃度で12.41 $\mu\text{g}/\text{l}$, 植物色素濃度で23.20 $\mu\text{g}/\text{l}$ の値を得た。

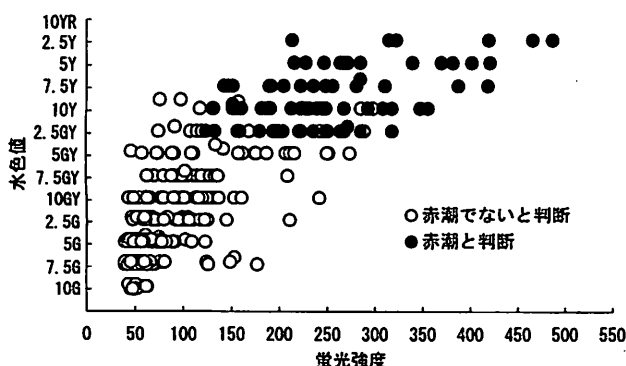


図7 蛍光強度と水色の関係

図8に透明度と水中型蛍光光度計の蛍光強度との関係を示した。蛍光強度は透明度で示された水深までの最大値とした。蛍光強度で約200までは透明度のばらつきが大きい、約200を越えるとほぼ2-4mの範囲で推移していた。

表2に調査期間中出现した植物プランクトン主要種を示した。主要種は各調査において全点を総計した1mlあたりの細胞密度で上位5種とした。これら5種を総計した細胞密度は確認された総細胞密度の86.5から99.9%の割合に相当した。調査期間中に細胞密度で上位5種に含まれたのは珪藻綱10種以上、渦鞭毛藻綱2種、ラフィド藻綱2種、クリプト藻綱1種以上、およびキネトフラグミノフォーレア綱1種であり、このうち出現回数が多かったのは*Chaetoceros* spp., *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* spp.などの珪藻綱であった。図9に各調査における上位5

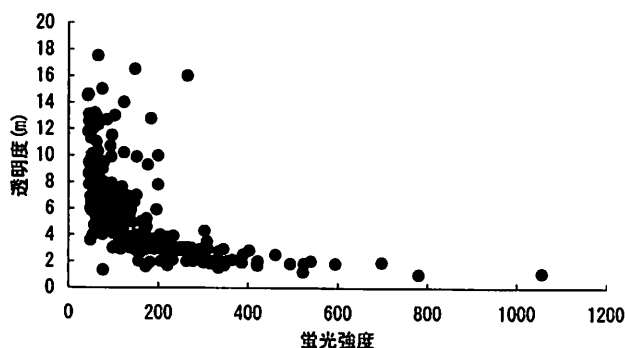


図8 蛍光強度と透明度の関係

表2 調査期間中出现した植物(動物)プランクトンの優占種

網	種	出現回数
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i> spp.	17
	<i>Eucampia zodiacus</i>	2
	<i>Leptocylindrus danicus</i>	8
	<i>Leptocylindrus minimus</i>	4
	<i>Pseudonitzschia</i> sp.(<i>pungens</i>)	6
	<i>Nitzschia</i> sp.1	1
	<i>Nitzschia</i> sp.2	1
	<i>Rhizosolenia fragilissima</i>	4
	<i>Skeletonema costatum</i>	16
	<i>Thalassiosira</i> spp.	11
Dinophyceae	<i>Prorocentrum minimum</i>	1
	<i>Prorocentrum triestinum</i>	2
Raphidophyceae	<i>Chattonella antiqua</i>	1
	<i>Heterosigma akashiwo</i>	1
Cryptophyceae	<i>Cryptomonas</i> sp(p).	9
Kinetofraagminophorea	<i>Mesodinium rubrum</i>	1

種の1 mlあたりの植物プランクトン細胞数の合計と水中型蛍光光度計の蛍光強度との関係を示した。グラフの傾きは蛍光強度の低いところで大きく、蛍光強度約100で細胞数は概ね 10^3 cells/ml以上を示した。その後、蛍光強度100を越えたあたりで緩やかになり、約200では細胞数は概ね 10^4 cells/mlを示していた。

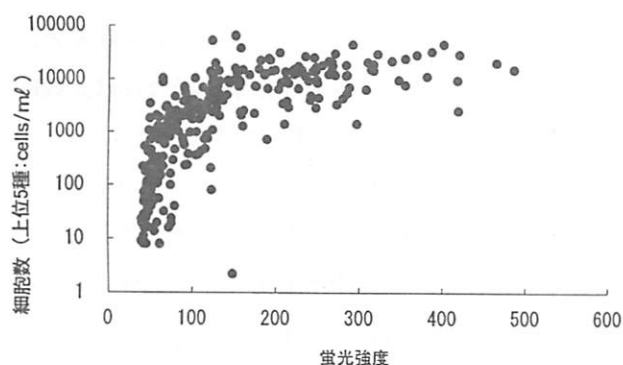


図9 蛍光強度とプランクトン細胞数の関係

考 察

大阪湾では特に湾奥の停滞水域において春から秋にかけて珪藻を主とする植物プランクトンにより恒常的に赤潮状態にあり、しかも多種多様なプランクトンにより赤潮が形成されている⁵⁾。そのため、従来の採水による観測では赤潮の規模や範囲、優占種などを定量的に把握することは難しい。また、船上からの観察では中層で増殖するとされる⁶⁾ *Gymnodinium mikimotoi*赤潮などの早期の把握は困難であると考えられる。植物プランクトン量を推定する目安のひとつであるクロロフィルを測定する方法は多様にあるが、大きく分けると抽出蛍光法、吸光法、現場蛍光法の3つがある³⁾。それぞれの方法に一長一短があり、精度的には現場蛍光法、抽出蛍光法、吸光法の順に高くなり、作業量も同様の順に多くなる。今回用いた水中型蛍光光度計は現場蛍光法の一つで、蛍光光度計を海水中に入れて連続測定する方法である。精度的には最も低いが、抽出蛍光法と吸光法は採水の必要性から点的な観測にとどまるのに比べ、より密なデータが得られる利点がある。これ

らのことから本研究では大阪湾において水中型蛍光光度計を使うことでどの程度の精度でクロロフィルが測定でき、さらに赤潮の把握に有効か否かについて検討した。

各調査ごとに現場でおこなった較正では R^2 に低い値が見られることもあったが、クロロフィルa濃度、植物色素濃度とも各調査で概ね高い相関が得られた。すなわち各々の調査において現場蛍光値と実際のクロロフィルa濃度、植物色素濃度はよく対応していたと思われる。一方、傾きやY切片など回帰係数には各調査時で差が見られた。生体内における蛍光強度は植物の活性の度合いによって変わり、海洋の光環境によっても変動する³⁾。また、岩本⁷⁾の実験では培養した*Skeletonema costatum*と*Chaetoceros* sp.とで蛍光強度とクロロフィル量の関係において回帰係数に相違が見られている。今回、検鏡による結果では上位5種に入ったものだけでも16種以上の植物プランクトンが観察されたことから、異なった日における調査間で回帰係数に差が見られたのは岩本の結果と同様に植物プランクトンの種類や活性に差があったことによるものと推察された。

各調査ごとに回帰係数に違いが見られる一方で、毎回の調査で較正をおこなうことは労力的に負担が大きく、現場蛍光法のもつ簡便であるという利点を損なうものである。そのため種類や活性に関わらず、どの程度確からしい値が得られるか検討する目的で、すべての較正值から回帰式を導き出し、さらにその回帰式から得られた推定値と蛍光法による測定値との比較を試みた。すべての較正值から得られた回帰式ではクロロフィルa濃度、植物色素濃度とも R^2 の値はそれぞれ約0.88となり、調査回時に得た較正值からの回帰式の各 R^2 と比較しても遜色ない相関が得られた。また、調査ごとに得られた回帰式から計算した各調査時の推定値と蛍光法による測定値との関係、およびすべての較正值から得られた回帰式を各調査に適用して計算した推定値と蛍光法による測定値との関係を比較すると、クロロフィルa濃度、植物色素濃度とも相関係数はすべての較正值から得られた回帰式からの推定値と蛍光法測定値の方が高

い値であった。

同様の推定値と蛍光法による測定値を定点ごとに示した結果を見ると'99年5月以外は推定値と蛍光法による測定値は概ねよく合っていた。'99年5月は例年この時期に多い珪藻の赤潮が見られず⁸⁾、透明度も全域で記録的に高かった⁹⁾。そのため蛍光法によるクロロフィルa濃度、植物色素濃度とも20点の調査を行った7回のなかで最も低い傾向であった。また、他の調査日においても、蛍光法による測定値が低いときに推定値がマイナスになるなどばらつきが見られることから、クロロフィル値が高いときには比較的安定した結果が得られるが低いときにはばらつきが顕著に見られることが推察された。

前述の岩本の報告⁷⁾でも現場海域での実験をおこなっており、その結果では蛍光強度と吸光法によるクロロフィル測定値の相関はかなり低い相となっている。ここで岩本の報告ではクロロフィル量(本論文における植物色素濃度と同)の範囲が1.87-7.48 $\mu\text{g}/\text{l}$ で推移しており、10 $\mu\text{g}/\text{l}$ 以上の濃度の値は観測されていなかった。一方、大阪湾では春期から秋期においてクロロフィルa濃度においても10 $\mu\text{g}/\text{l}$ を上回る値が観測されることは珍しくなく、100 $\mu\text{g}/\text{l}$ を越える例もしばしばみられる^{10) 11)}。前述の通り、水中型蛍光光度計からの推定値は海域のクロロフィル濃度が高いときに比較的安定すると考えられる。これらのことから、植物プランクトンの発生量が多く、クロロフィル濃度が常時高いレベルに保たれている大阪湾のような海域においては水中型蛍光光度計を用いたクロロフィルの測定もある程度の精度が期待できると考えられた。

次に鉛直方向への利用について検討した。水中型蛍光光度計の利点としてこれまで点的な測定に限定されていた中底層等のクロロフィルが細かい間隔で正確な深度とともに測定できる点がある。しかし、一般に水深が深くなるほどフェオフィチンの割合が大きくなることから、深い層ほど特にクロロフィルa濃度について推定値と測定値のずれが生じることが予想された。実際、今回の調査でも底層においては、相関係数はクロロフィルa濃度で0.625、植物

色素濃度で0.639と低い値であった。一方で5 m層、10 m層では直線性が高く、それぞれ0.938-0.965、0.939-0.960と高い相関係数が得られた。ここで大阪湾で蛍光法によりクロロフィルa濃度を層別採水により調査した例^{10) 11)}をみると、クロロフィルa濃度は通常、表層で最も高く、水深が深くなるに従って低くなっている。グラフからも水深が深くなると推定値が0以下になる点が多くなる傾向が見られた。この結果から、鉛直的に見てもごく底層を除くと、高い濃度でクロロフィルが存在する場合には比較的高い精度でクロロフィルが測定できると考えられた。

最後に水中型蛍光光度計を用いた赤潮の把握について検討した。大阪水試における赤潮判断基準の一例として、水色では色相がGYで赤潮気味、Yで赤潮、透明度で3.0 m以下、細胞数では $3-5 \times 10^3$ cells/ml以上、クロロフィルa濃度が10 $\mu\text{g}/\text{l}$ 以上とし¹²⁾、これらを総合して赤潮を判断している。また、岩崎¹³⁾は比較的大型の鞭毛藻の場合、細胞数で1,000 cells/ml、クロロフィルa濃度が50 $\mu\text{g}/\text{l}$ を赤潮判断の一応の目安としている。

今回おこなった蛍光強度と水色との関係では色相が2.5GYより赤色側で赤潮と判断し、赤潮と判断したときの表層における最も低い蛍光強度が124、推定値がクロロフィルa濃度で12.41 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、植物色素濃度で23.20 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。この値は上記の大阪湾における赤潮の判断基準とはほぼ合致するものと考えられたため、この蛍光強度とその他の判断基準との比較を試みた。まず透明度との関係を見ると、蛍光強度124付近においては透明度のばらつきが大きく、3 m前後から10 mを越える例もみられた。今回、透明度水深までの最大値を用いたことからこの結果は3 mないし10 mまでのある水深に蛍光強度124の層が存在したことを意味する。すなわち透明度が高い場合でも中層以深に赤潮に近いクロロフィルの極大層が存在することを示すものと考えられる。ここで蛍光強度で約200を越えると透明度は2-4 mの範囲に集中することから濃い赤潮のほとんどが表層で形成されていたと考えられる。これらのことは水中型蛍光光度計を使用することで層別採水では把握が困

難と思われる中層付近で形成された初期の赤潮、もしくは中規模程度の赤潮の把握に有効である可能性を示唆する。最後に細胞数との関係で見ると、蛍光強度124付近においてはほぼ 10^3 cells/mlの値に対応しており上記の珪藻類の細胞数による判断基準に概ね準じていた。

以上のことから、現場海域において水中型蛍光光度計の蛍光強度が100から200を越える値を示したとき、植物プランクトンはその組成にも左右されるが上位5種の総計でおおよそ 10^3 cells/ml程度、クロロフィルa量で最低 $10 \mu\text{g/l}$ 程度存在する事が仮定でき、その海域もしくは水塊が赤潮と判断することは可能であると考えられた。

文 献

- 1) 城 久 (1986) 大阪湾における富栄養化の構造と富栄養化が漁業生産におよぼす影響について。大阪水試研報, 7, 1-174.
- 2) 岡市友利 (1997) 赤潮現象. 赤潮の科学 (岡市友利編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 5-41.
- 3) 日本気象協会 (1990) 海洋観測指針 (気象庁編). 257-261.
- 4) 平凡社 (1984) 大百科事典. 1, pp.1251-1255.
- 5) 城 久 (1980) 大阪湾における植物プランクトン群集. 月刊海洋科学, 12 (11), 778-790.
- 6) T.Honjyo, S.Yamamoto, O.Namamura, and M.Yamaguchi(1990) Annual cycle of motile cells of *Gymnodinium nagasakiense* and ecological features during the period of red tide development, in "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by E.Graneli, B.Sundstron, L.Edler, and D.M.Anderson), Elsevier Science, New York, 169-170.

- 7) 岩本俊樹 (1995) 現場蛍光法によるクロロフィル測定について. 南西海ブロック海洋研究会報告. 12, 13-18.
- 8) 山本圭吾 (2001) 赤潮予察調査. 平成11年度大阪府立水産試験場事業報告 (印刷中).
- 9) 中嶋昌紀 (2001) 浅海定線調査. 平成11年度大阪府立水産試験場事業報告 (印刷中).
- 10) 山本圭吾 (1999) 赤潮予察調査. 平成8年度大阪府立水産試験場事業報告. 32-38.
- 11) 山本圭吾 (1999) 赤潮予察調査. 平成9年度大阪府立水産試験場事業報告. 32-37.
- 12) 城 久・安達六郎・三好礼治 (1971) 大阪湾に発生する赤潮の生態に関する研究. 大阪水試研報, 3, 1-115.
- 13) 岩崎英雄 (1976) 赤潮—その発生に関する諸問題一. 海洋出版. 東京.

謝 辞

本研究をおこなうにあたり調査にご協力いただいた水産試験場調査船「おおさか」の榊昭彦船長をはじめとする乗組員の皆様に深く感謝する。また、資料の整理に協力いただいた高瀬玲子氏、小川藤両氏にも感謝する。