

8 海洋性植物プランクトンの謎を追って

1. 研究の目的

本校の海洋班の研究は、今年で 3 年目である。1 年目は、海洋性植物プランクトンが放出する揮発性有機化合物 (VOC) について研究を行った。その結果、イソプレンや DMS、ハロメタン類などの地球大気環境に大きな影響を与える気体が検出でき、植物プランクトンが環境に与える影響の大きさを知った。しかし、植物プランクトンの生態は未解明なことが多いため、私たちは植物プランクトンの生態を調査するためにこの実験を始めた。2 年目は海洋性植物プランクトンを自分達で単離することを目標とし、水深 397m と 687m の海水から植物プランクトンを単離することに成功した。3 年目の現在は、表層と深層 (397m) の植物プランクトンの季節による変動と、水深 687m から単離した緑藻の生育のしくみの 2 点を解明するために実験を行っている。

2. 実験方法

実験 1. 植物プランクトンの季節変動

目的：春夏秋冬（春：6 月 夏：8 月 秋：11 月 冬：1 月 採水前日や当日は晴れていた日を選び採水する。）の 4 つの季節で、表層と水深 397m の海水を培養し、植物プランクトンの特徴を調査する。

（687m は地震によるポンプの損傷により現在採取できなくなっているため今回は水深 397m を検証）

方法：焼津港の表層水と水深 397m の海水から、植物プランクトンの個体数を増やすために集積培養した後、培養できた種類を確認するために純粋培養を行った。

生えてきたコロニーを CCT 位相差顕微鏡で観察し、季節による変化を観察した。（図 1）なお、使用した培地は、多種の植物プランクトンを培養するため、ダイゴ IMK 培地※¹ と f/2 培地※² の 2 種類を用いた。培地をはじめ実験に使用する器具は、あらかじめオートクレーブに 120℃ 20 分滅菌したものを使用した。

※1 ダイゴ IMK0.253g を海水 1L あたり

※2 NaNO₃ 7.5 mg、NaH₂PO₄・2H₂O 0.6 mg、VitaminB12 5.0 μg、Biotin 1.0 μg、Thiamine HCl 17.0 μg、Na₂SiO₃・9H₂O 1.0 mg、f/2 metals※³ 0.1ml、海水 99.9ml (100ml あたり)

※4 Na₂EDTA・2H₂O 440 mg、FeCl₃・6H₂O 316 mg、CoSO₄・7H₂O 1.2 mg、ZnSO₄・7H₂O 2.1 mg、MnCl₂・4H₂O 18.0 mg、CuSO₄・5H₂O 0.7 mg、Na₂MoO₄・2H₂O 0.7mg、蒸留水 100ml

「植物プランクトンの単離」実験方法

1. 集積培養: 植物プランクトンの量を増やす。
2. 純粋培養: 植物プランクトンを寒天培地で培養する。(単離する)
3. 分析: 植物プランクトンの種を特定する。(色・形)

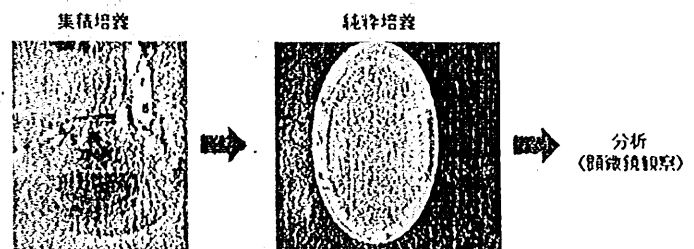


図1 培養方法

実験2. 水深 687m から単離した植物プランクトンの生態調査～暗黒下での生存方法～

目的：光合成ができない環境下では植物プランクトンは細菌などのタンパク質（またはその分解物）を取り込んでいるのではないかと仮説を立て、植物プランクトンと細菌の関係を調べた。また、その時に温度と照度が植物プランクトンに与える影響についても調べた。

方法：昨年度、単離した緑藻を用い、抗生物質（ストレプトマイシン硫酸塩と、ベンジルペニシリンカリウムを各 20mg/L）を入れた IMK 培地と入れない培地を用意し、約 1 週間、照度 1500lux・温度 25℃の環境下で前培養した。前培養したものを 25℃明所（照度は同様、以下明所）・25℃暗所（以下暗所）・5℃暗所（以下冷暗所）で 40 日間培養した。その後、培養 0 日目と 40 日目のクロロフィル a 量をアセトンで抽出し、抽出液を分光光度計で測定した。クロロフィル a 量は下のように求めた。

クロロフィル a を求める数式

$$\text{Chl. a (mg chl. a/m}^3\text{)} = (11.64E663 \cdot 2.16E645 + 0.10E630) \times a/V \times 1/L$$

E663、E645、E630 は、波長 663nm、645nm、630nm における吸光度から波長 750nm の吸光度をそれぞれ差し引いた値である。750nm の値を測定することでサンプル中の不純物を知ることができ、また 663nm、645nm、630nm の値を測定することでクロロフィル量を知ることができる。

ろ過量：V(l) アセトン全量：a(ml) セルの長さ：L(cm)

なお、抗生物質の濃度は予備実験をし、プランクトンの生育に影響がでない濃度を採用した。

3. 結果・考察

実験1.

海洋の優占種は珪藻である。しかし、今回春の培養では珪藻ではなく緑藻が優占種であった。私達の実験からも IMK 培地で珪藻を長期間培養すると、緑藻は死滅しないが珪藻はやがて死滅してしまう。それは、珪藻の必須元素である IMK 培地にはケイ素が入っていないためである。しかし、f/2 培地はケイ素源として、メタケイ酸ナトリウムを添加しているため珪藻がいれば培養できる。にもかかわらず春だけ珪藻がほとんど生えなかったのは、春の時期の海水でケイ素が不足しているためこの時期には珪藻ではなく緑藻が優占種になり、夏の時期にはケイ素不足が解消されるために、緑藻ではなく珪藻が優占種になると考えられる。さらに、秋では再びケイ素が不足しだしたため、緑藻が表層に見られるようになった可能性がある。これが正しければ、冬の培養では珪藻ではなく緑藻が増えてくるはずであるため今後確かめていきたい。

また、同じ時期に観察される植物プランクトンの形は、表層と深層で非常によく似ていることがわかった。これより、深層下にいる植物プランクトンは何らかの作用で表層から深層下に運ばれると考えられる。

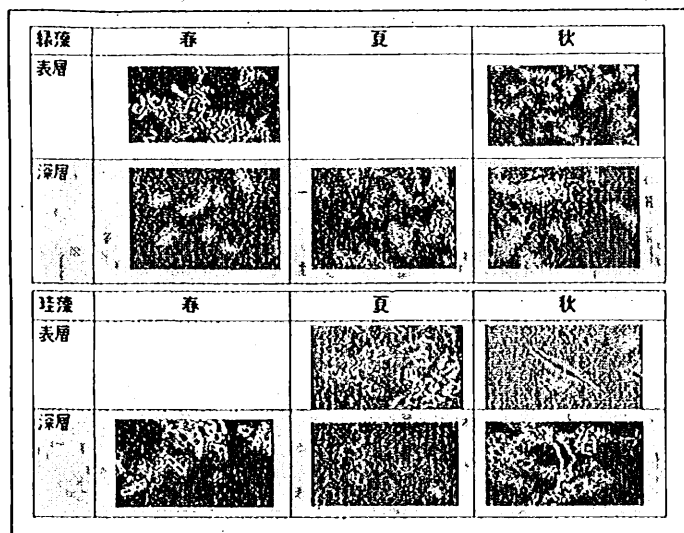


図2 顕微鏡観察の結果（上段：緑藻 下段：珪藻）

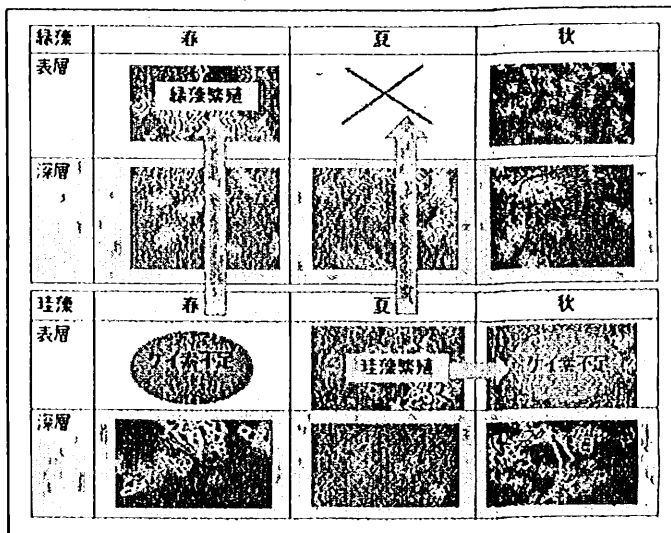


図3 予測した季節変動（上段：緑藻 下段：珪藻）

実験2.

クロロフィル a を分光光度計で計測した結果は、図4である。この結果は、明所で最も多く、以下極明所、冷暗所、極冷暗所の順に増加したが、暗所においては増加どころか減少していた。

今回の結果から、冷暗所でクロロフィル a 量が増加していたことに驚いた。もし、植物プランクトンの増殖に光のみが関係しているのであれば、温度に関わらず暗所では増殖しないはずである。しかし、今回はその予想と反し、暗所では死滅するが、冷暗所では生存するという温度の差により生育に差がでた。しかも、冷暗所では抗生物質を入れない培地の方が、約3倍増殖していた。このことから、今回単離した植物プランクトンは光がない場合、低温で繁殖し、細菌の有無が増殖に関係する可能性があると言える。

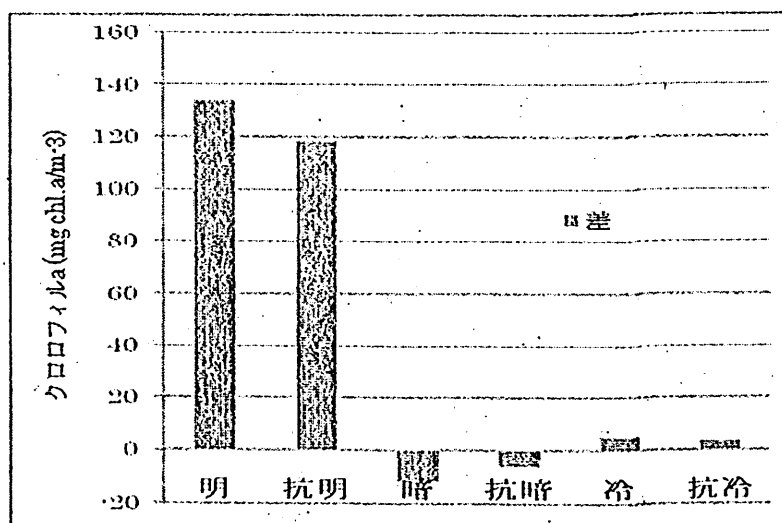


図4 40日目から0日目の値を引いたときのクロロフィル a 量

4. 総合考察

春、夏、秋と季節ごと表層と深層の海水を観察すると、植物プランクトンは表層から深層へ移動していることがわかった。そして、季節により優占種が異なることが確認できた。植物プランクトンの優占種が変わることで上位の生態系にも影響がでることが考えられる。今後は、植物プランクトンだけではなくそれよりも上位の生物も視野に入れながら研究する必要がある。

また、抗生物質を入れた実験から、抗生物質を入れない培地で植物プランクトンが下に沈んでいる様子が観察されたことより、海水の密度が高いことも植物プランクトンが深層下に沈む原因の一つだと考える。また、そのように沈んでしまった植物プランクトンは、再び表層に戻

る日まで何らかの方法で生きながらえているはずである。ただし、緑藻類は珪藻類や円石藻などのように殻をつくりシスト状になることはない。そのため、緑藻類は確実に分裂をして暗黒下でも生存しているはずである。今回、冷暗所でクロロフィル a が増加していたことで、この仮説はより真実味を帯びてきた。

暗黒下では植物プランクトンは、光合成により有機物を合成できないため従属的に有機物を摂取する必要がある。昨年度先輩方は、細菌と共生していると考えていたが、私達は、今回用いた植物プランクトンは体外にタンパク質分解酵素などを分泌し、タンパク質を低分子にしてから吸収しているのではないかと考えた。また、暗所でも 25℃ではなく 5℃で増殖することより、この酵素は低温で活性があると考えられる。このことを検証するために現在、抗生物質を入れた 4 種類の培地(海水、海水+ペプトン、IMK 培地、IMK 培地+ペプトン)に同様の植物プランクトンを入れ、5℃暗所で培養を行っている。

5. まとめ

先輩方が疑問に思っていた暗黒下での植物プランクトンの生育の解明に少し前進した。今回、暗黒下での温度による増殖の違いがでたことは、班員全員が驚いたことだった。暗黒下なら温度による依存性はないと思っていたため、この結果が出たことで植物プランクトンの底知らぬ生命力を感じた。集積培養や純粋培養などの基本的な培養方法以外、すべて自分達で考えながら行ってきたため、結果が出るか不安な毎日だった。また、今回の研究を通して観察することの大変さと大切さを感じた。分析などと違い、ただ見るだけだが、この見ることの積み重ねで発見ができることを学んだ。今後、暗黒下で生存する謎の解明に励んでいき、ぜひ来年度も後輩に受けつがれるような研究にしたい。

6. 参考文献

- 1) 井上勲.藻類 30 億年の自然史.第 2 版.東海大学出版会.2007
- 2) 藤田大介・高橋正征.海洋深層水利用学.成山堂書店.2006
- 3) 木暮一啓.海洋生物の連鎖 - 生命は海でどう連環しているか - 東京海洋研究所.東海大学会.2006
- 4) 早川康博・安田秀一.水産環境の科学.成山堂書店.2002

7. 謝辞

この研究を行うにあたり静岡大学の塩井祐三教授にアドバイスを頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。ありがとうございました。