

15 暗黒下に生息する植物プランクトンの生態調査

1 動機

本校の海洋班の研究は今年で4年目に入り、現在は暗黒下で植物プランクトンが増加できるかについて実験を行っている。2年前、焼津港の深層水施設から採取した水深 687mの海水から、緑藻類が培養されたことにより、暗黒下でも植物プランクトンが生存しているのではないかと考えこの実験が始まった。昨年度までの結果から、植物プランクトンが暗黒下でも増加する可能性があることがわかった。しかし、この実験には多くの問題点があるため今回私達は新たに実験を改良し、確実に暗黒下でも増加できることを証明する。そして、水深 300m以下の可視光の届かない所での植物プランクトンの生態系の位置を明らかにしたい。

2 実験～暗黒下に生息する植物プランクトンはどのように生育しているのか～

(1) 目的

前年度の実験から、植物プランクトンは暗黒下でも増加をしている可能性が高いことがわかった。しかし、①培養器を完全な遮光状態にできていなかったこと②培養初期のプランクトンが少なすぎ、クロロフィル a が分光光度計の計測限界だったこと③培養初日と培養最終日からしかデータを取らず経時変化がわからないこと④増加の指標がクロロフィル a のみであること、以上4点の問題点がありこれらを解決し、実験を行った。また、温度による増加の違いを見るため 5℃と 25℃で培養した。

(2) 材料

- ア. 前年度焼津港深層 687m から単離した緑藻 (図 1)
- イ. ダイゴ IMK 培地
- ウ. ジメチルホルムアミド (色素抽出用)

(3) 方法

0.253g/L で IMK 培地を作り、前培養を行った。前培養は植物プランクンの個体数が十分に増えるまで照度 3,500～3,800lux の 25℃明所で培養した。その後、前培養した植物プランクトンを 700ml の IMK 培地とともに完全遮光できるオリジナル装置^{*1}に入れ、5℃と 25℃でそれぞれ2個ずつ静置培養した。その後、2～6日おきに培養液を抜き取り、細胞計数版で個体数を測定し、ガラス繊維フィルターでクロロフィルをろ過した。ろ過したフィルターは、6 ml のジメチルホルムアミドの中に入れ、クロロフィル a を抽出した。その後、クロロフィル a を分光光度計で測定した。クロロフィル a の抽出方法については以下に詳細を示す。



図 1. 緑藻類の 600 倍写真 (2.5 μm～5 μm 程度の小判型)

<クロロフィル a 抽出>

- 1 培地をよく攪拌し、シリンジで約 60ml 採取しガラス繊維フィルターでろ過する。
- 2 完全遮光したバイアルに 6 ml のジメチルホルムアミドを入れ 1 で植物プランクトンを抽出したフィルターを入れ、冷凍庫で 24 時間以上かけて抽出する。
- 3 その後、分光光度計で波長 665nm と 750nm で計測し、計測したものに 2 N の塩酸を 1 滴

加えて同様に波長を計測した。

クロロフィル a を求める数式

E665 は、波長 665nm 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、波長 665nm ではクロロフィル a 量を測定することができる。

測定法：ロレンツェン法 $\text{Chl-a (mg/m}^3\text{)} = 26.7 \times (\text{E665} - \text{E665a}) \times A / (\text{V} \times \text{L})$

E665：波長 665nm における吸光度から 750nm における吸光度を引いた値

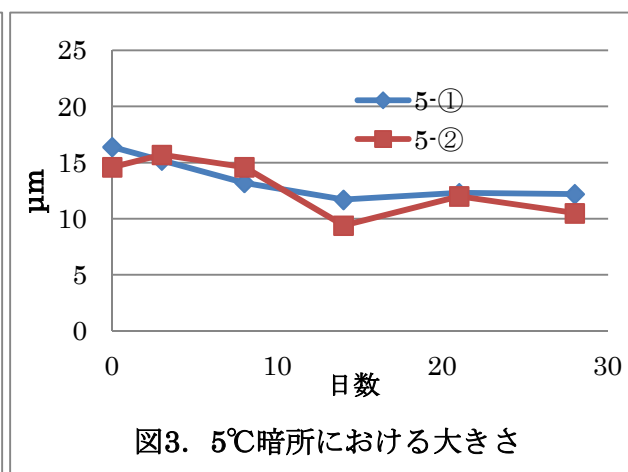
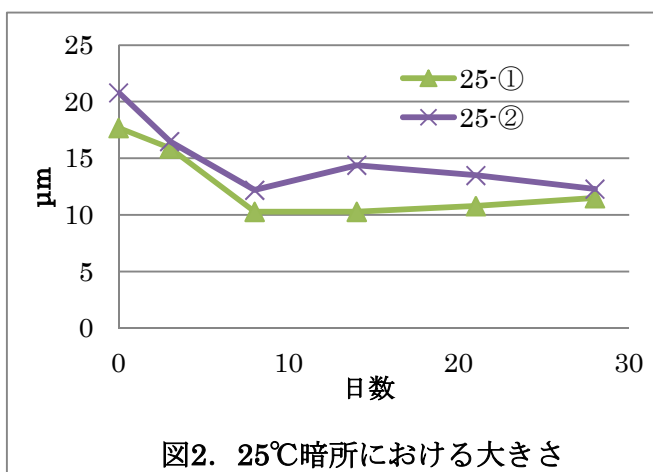
E665a：塩酸(2N)を加えた後の波長 665nm における吸光度から 750nm における吸光度を引いた値

A：上澄み液のアセトンの全量(ml)、V：ろ過した水の量(ml)、L：吸収セルの長さ(cm)

(4) 結果

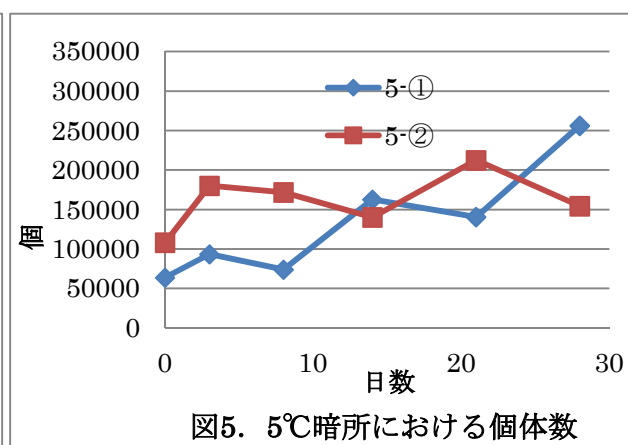
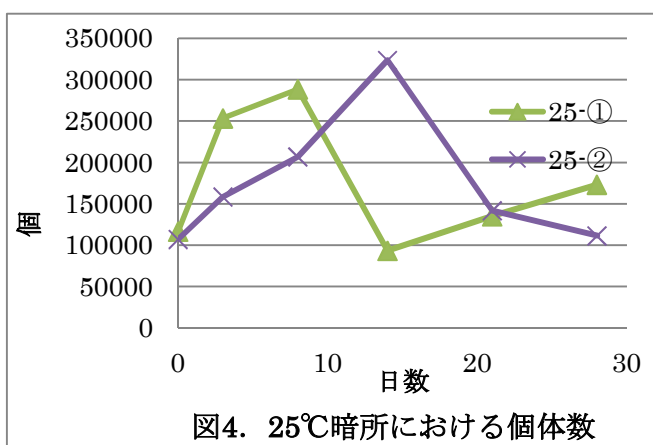
①大きさ

総合的に見て、大きさは培養後半に向けて小さくなっている。(図 2.3) 培養 0 日目の大きさを 100% とし培養 28 日目を比べると、5℃では大きさは約 73% になり 25℃では約 62% になった。25℃では細胞の大きさが 5℃に比べ 10% も小さくなっていることが分かった。



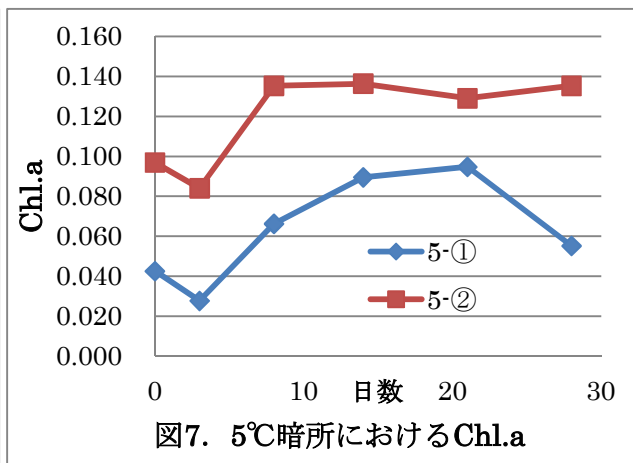
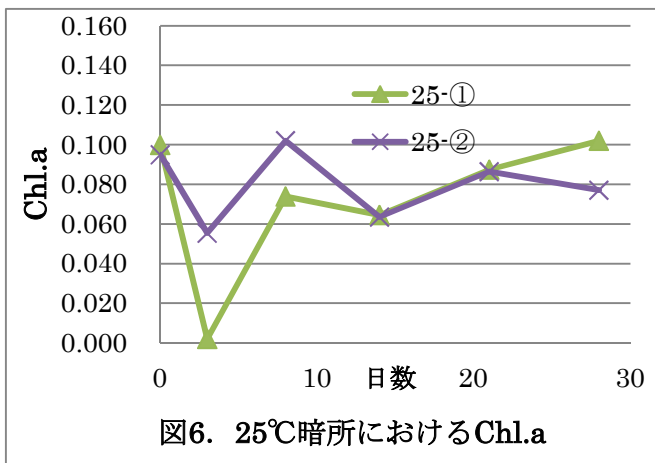
②個体数

5℃では個体数は少しずつ増加している。25℃では、培養 3 日から 14 日にかけて増加し、後に減少したが、培養 28 日目は培養 0 日目とほぼ同じ個体数であった。(図 4.5)



③クロロフィル a

5℃では、20 日目までは両方とも多少の増減はあるにせよ増加していることがわかる。また 25℃では、培養 3 日にかなり減少をし、その後も増減の変動は大きい培養初期から大幅に減少することはなかった (図 6.7)



(5) 考察

5°Cの結果では、個体数の増加、クロロフィル a の増加、大きさの減少が小さいことから考えて、この温度状態では植物プランクトンは構造が保持され分裂もできることがいえる。水深 397m の平均水温が約 5°C であることから、実際の海洋でも 5°C では光がなくても植物プランクトンが増加できるということがわかった。25°C の結果では、培養初期の増加が顕著に見られるが、これは一般的に植物プランクトンは 25°C が最も増加しやすい温度であり、それにより一時的に呼吸量が増し分裂に必要なエネルギーが出たために急激に増加できたといえる。この結果より、25°C では短期的に、5°C では長期的に増加できることがわかった。

しかし、一体何を利用して増加しているかが不明である。細胞成分を使ったという可能性については、動物では脂肪、植物であればデンプンなどの貯蔵物質があることより、植物プランクトンも自らの成分を使って増加している可能性が高いと考えられる。また、大きさも 5°C に比べて 25°C では約 10% も小さくなっていることは、25°C で呼吸量が増すため 5°C よりもより多くの細胞成分を使ったためではないかと推測できる。しかし、自分の細胞成分を使えるのにも限界がある。そのため、長期培養では外部から従属的に何かを取り込む必要がある。今後は培地に有機物を添加し、暗黒下の長期培養でどのように生育するかを検証したい。

3 実験～植物プランクトンの生死の判断～

(1) 目的

私達は顕微鏡で個体数を数える上で、植物プランクトンの死んでいる状態はどのような状態かを把握しておく必要があると考え、この実験を行った。

(2) 材料

ア. 前年度 687m から単離した緑藻 (図 1)

イ. IMK 寒天培地 (0.253g/L の IMK 液体培地にアガロースを 1.5% 入れ減圧滅菌したもの)

(3) 方法

植物プランクトンが死んでいる状態を観察するため、植物プランクトンを燃焼・冷凍の 2 つの方法を考え、それぞれを顕微鏡で観察および培養実験を行った。以下に詳細を示す。

① 燃焼実験

植物プランクトンの培養液をビーカーに移し、完全に水分が蒸発し結晶状になるまで加熱した。

その後顕微鏡で観察したあと、IMK 寒天培地で数日間培養した。また、これとは別にビーカーに植物プランクトンの培養液をいれ、ビーカーごとに 3 分間・5 分間・6 分間の加熱を行った。加熱後、それらのサンプルを IMK 寒天培地で、照度 3,500~3,800lux の 25°C 明所で数日

間培養した。

②冷却実験

植物プランクトンの培養液を少量4本の試験管に入れ、 -40°C で保管した。数日後顕微鏡で観察しその後数日間寒天培地で培養する。

(4) 結果

①燃焼実験

加熱後すぐに顕微鏡で観察した結果は、3分間・5分間・6分間加熱したものはあまり変化がなく結晶状にしたものは色素がなくなっていた。IMK 寒天培地で培養した結果、結晶状のものは繁殖しておらず生育していないと判断した。(図8)

しかし、3分間・5分間・6分間加熱したものはIMK 寒天培地で培養できた。(図9.10.11)

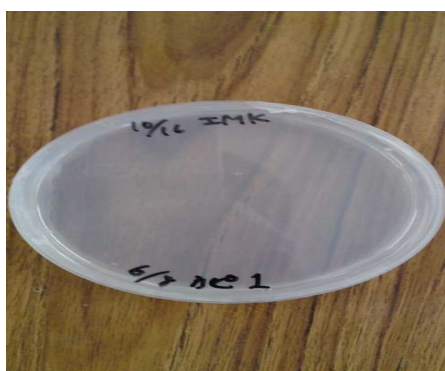


図 8. 燃焼実験 培養 (蒸発)

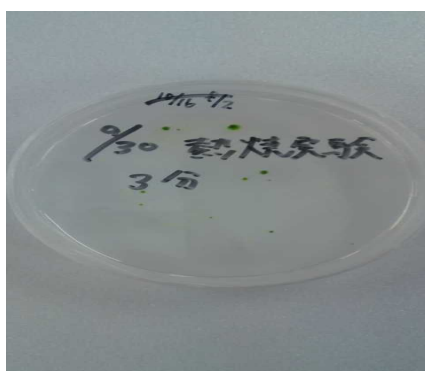


図 9. 燃焼実験 培養 (3分加熱)



図 10. 燃焼実験 培養 (5分加熱)

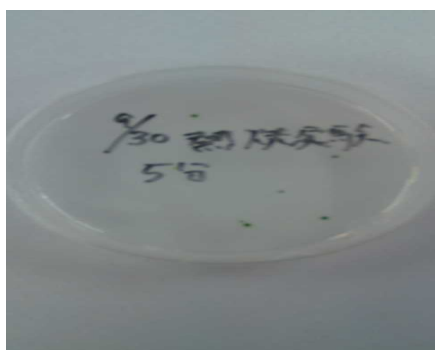


図 11. 燃焼実験 培養 (6分加熱)



図 12. 冷凍実験 培養

②冷却実験

冷却後の見た目は、固まっているだけで他に変化が見られなく、顕微鏡の結果からも見た目に変化は見られなかった。IMK 寒天培地で培養した結果、培養できた。(図 12)

(5) 考察

今回の実験より、数分の燃焼や冷却では植物プランクトンは死滅しないことがわかった。しかし、完全に水分が蒸発するまで加熱した場合は、植物プランクトンのクロロフィルが分解されており、培養できなかつた。このことより、植物プランクトンは死滅するとクロロフィルが分解され色素がなくなることがわかった。数日間培養した結果から、冷凍した方では何も処理しない時と同様の増殖が見られた。このことより、植物プランクトンは低温には強いことがわかった。私たちは、植物プランクトンを計測するとき緑色の強いものを計測しており、今回の結果より死んでいるものは計測していないということがわかった。

4 総合考察

今回の暗所での培養より、 5°C 暗所で1ヶ月程までは増加することがわかったが、これは栄養分を取り込むように従属的に増加しているのか、自らの成分を使って生育しているのかどちらなのかは不明である。もし従属的に増加するなら植物プランクトンは暗所では生産者としてはたらくのではなく、有機物を捕食する細菌類や菌類とともに競争関係にあると考えられる。その場合、生態系

の中の植物プランクトンの役割や海洋中での有機物の移動などが大幅に変わってくることになる。

また、今回個体数を測定しているうちに、本当に生きているものの数を数えているのか疑問に思った。そのために、植物プランクトンの死んだ状態を確認するために燃焼実験や冷凍実験を行ったが、植物プランクトンが死ぬとクロロフィルが分解され色素がなくなることがわかった。しかし、水分が少しでもある場合や、 -40°C の冷凍では死滅しないことがわかった。今回の実験から、植物プランクトンの生命力の強さを実感した。しかし、完全に水分がなくなるまで加熱した場合など、かなり厳しい環境に置いた場合はクロロフィルが分解されたが、実際の環境では死んでからクロロフィルが分解されるまで時間がかかるのかもしれない。まさに、生死の判断の難しさを突き付けられたようであり、これ以上追及することが困難だと感じた。(このように考えると、今回個体数を数える時に死んだものを計測している可能性があるが、死んだものを測定したとしても増加傾向があるため結果には特に影響がないと判断した。)

今後は、植物プランクトンが暗所で長期培養した場合、外部から有機物を得ているのか、それとも自らの細胞成分を使って生きているのか、という植物プランクトンの増加方法を探っていきたい。

5 まとめ

先輩達が残した課題の一つである暗所での確実な増加を証明できたことは非常によかった。ただし、先輩達が言っていた培養や観察の苦勞が想像以上で、数値を出すにはどのように測りどのように判断したかが大切だということもよくわかった。今後は、総合考察にも述べたようにどのように増加しているかに焦点をあて実験を進めていきたい。

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 佐々木洋・石川輝・太田尚志・服部寛・齊藤宏明・遠藤宜成.海洋プランクトン生態学.成山堂書店.2008

7 謝辞

この研究を行うにあたり静岡大学の宗林留美先生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。

* 1 右の図のように、ふたを開けず無菌的に培養液をサンプリングできるような装置を考案し実験に用いた。培養中はシリンジを取り、培養器の全てをアルミホイルで遮光した。アルミホイルが遮光に有効かどうかを、ピーカーにアルミホイルをまき照度計で測定した。その結果、照度は 0lux になり、アルミホイルが十分な遮光をできることがわかった上で実験を開始した。



照度計で測定した様子



実際使用した培養器

