

陸水生態学実習レポート 琵琶湖沿岸における植物プランクと付着藻の光合成

京都大学理学部生物学科 4 回

瀬戸宏大

一次生産と呼吸（明・暗ビン法）

植物は、太陽エネルギーを用いて、二酸化炭素と水から有機物を合成し、酸素を放出する一方で、光の有無に関係なくつねに呼吸をしており、体内の有機物と酸素を消費して二酸化炭素を放出する。動物やバクテリアも常に呼吸している。

操作

バンドーン採水器を用いて、所定の深度の湖水を採取する。

1 層につき、容量約 100ml の酸素ビン 6 本に湖水を詰める。採水器下部についている採水用の細いゴム管の先端を酸素ビンの底まで入れて試水を注入し、十分に水をあふれさせながら、ゆっくりゴム管を抜きとる。4 本の酸素ビンには、気泡が入らないように静かに密栓する。うち 2 本はそのまま、2 本をアルミ箔などで包み、光を遮断する。残りの 2 本の溶存酸素を固定する。明ビンと暗ビンを、採取した深度につるす。つるしたビンを、一定時間培養する。培養が終わった試料を引き上げる。直ちにそれぞれのビンの溶存酸素を固定する。明ビン、暗ビンおよび対照ビンの溶存酸素量をウィンクラー法で測定する。

計算

明ビン、暗ビンおよび対照ビンの酸素量をそれぞれ $L(\text{mg O}_2/\text{l})$, $D(\text{mg O}_2/\text{l})$, $C(\text{mg O}_2/\text{l})$ とすると、培養期間中の単位体積あたりの純生産量(P_n :光合成量から、その間に行われた呼吸作用による有機物消費量を差し引いたもの)、呼吸量(R)、および総生産量(P_g :単位時間・体積あたりに作られた有機物総量)は、以下の式により求められる。

$$P_n=L-C, \quad R=C-D, \quad P_g=L-D$$

植物プランクトンの現存量,光合成測定

1、材料

5L メスジョッキ、メスシリンダー、プランクトンネット(目合 20 μm)、
4L ポリタンク(DO 測定用)、酸素瓶(100ml) \times 12 本、
サイホン用チューブ、培養係留セット(金網カゴ、ロープ、固定具)
遮光ネット、光量子計、濾過装置、47mmGF/F、
ピンセット、アルミホイル

2、方法

1) 試水の準備

Sea-Bird 鉛直プロファイルを用いてクロロフィル極大の見られる深度から採水器を用いて採水する。試水は目合 150 μm のハンドネットで大きな懸濁物を除去したものをメスジョッキで計量し、20 μm のプランクトンネットで濃縮する。ろ過水に濃縮液を加えたものが緑色に色づく程度まで濃縮を繰り返し、4L タンクに冷暗保存する。濾過量と濃縮液量は記録しておく。

2) クロロフィル測定試水の濾過

各反 7mmGF/F で試水を濾過し、濾過量を記録する。フィルターはアルミホイルで包み冷暗保存する。後ほど、実験室にてクロロフィル濃度を測定する。

3) 遮光条件

遮光ネットを重ね合わせる枚数を変えて 4 段階(0 枚から微弱光まで)の光条件を設定し、光量子計で光量を測定する。この条件で各明ビンに遮光する。

4) 分注

チューブを使い、サイフォンの原理で試水を酸素ビン 12 本に分注する。2 本（初期酸素濃度測定用、対照ビン）は直ちに固定する。封栓の際は気泡が入らないように気をつける。暗ビンは酸素ビンをアルミホイルで包む。4 段階に遮光した明ビンも同様に分注、封栓する。

5) 現場培養

水面下 0.5m に係留し、3 時間程度培養する。培養終了後、直ちに各便を固定し、冷暗保存する。後ほど、ウィンクラー法で定量する。

6) 計算

- ア) 暗ビン、対照ビンから呼吸量を求める。
- イ) 各光条件での純生産速度、総生産速度を求める。
- ウ) クロロフィル量あたりの呼吸速度、純/総生産速度を求める。
- エ) 光合成の反応式より、元素量の比から酸素を炭素に換算する。

・底生藻の採集とクロロフィル α 量の測定

クロロフィル α 量は、植物が光合成に用いる光を吸収する色素である。この量を測定して底生藻の現存量の指標とする。底生藻は非常に微小なので濾紙の上に濾過して集める。

- 1) 川底の平石を拾い、6cm×6cm コロラード内の藻類をブラシでそぎ落とし、白いバットの上で剥がしたものを水でよく洗い流す。
- 2) 100ml ポリびんに入れて実験室に持ち帰る。
- 3) 実験室では、濾過器具であるガラスの吸引びん、濾過器、ハンドポンプを設置する。
- 4) 濾過器に強熱処理した 47mmGF フィルターをセットする。
- 5) 濾過器上部から付着藻類懸濁水を入れ、ハンドポンプで吸引する。濾過量を記録する。濾過水は濃度に応じて判断する。
- 6) 懸濁物を濾したフィルターは、キムワイプの上におき水分を吸収させる。
- 7) フィルターをはさみで細かく裁断して三角フラスコに入れ、90%アセトンを 15ml 注入する。
- 8) 三角フラスコの口をラップで包み、しばらく暗条件で放置する（2 時間以上）。
- 9) ロートに濾紙をセットし、三角フラスコのアセトンを濾過して、試験管に移す。
- 10) 分光光度計でアセトン抽出液の 750, 665, 645, 630 nm における吸光度を測定する。この際、90%アセトンをコントロールとする。750nm の吸光度は濁り成分なので、各測定値から差し引く。アセトン抽出液は測定したら、試験管に戻す。
- 11) アセトン抽出液に 1 規定の塩酸 2 滴を添加し数分おく。
- 12) もう一度 750, 665 nm の波長で吸光度を測定する。

琵琶湖沿岸における植物プランクトン、付着藻の光合成

1 3) 以下の3つの式でクロロフィル α 量とクロロフィル α が分解した物質であるフェオフィチン α 量を算出する。

$$1、全クロロフィル \alpha(\mu\text{g/ml})=11.64\times E_{665}-2.16\times E_{645}+0.10\times E_{630}$$

溶存酸素の測定 (ウィンクラー法)

測定原理

水中で塩化マンガンと水酸化ナトリウムを加えると白色沈殿が生じるが、試水中に分子上の酸素が存在すると褐色の沈殿が生じる。これに、ヨウ化カリウムと塩酸を加えることにより、 O_2 と等量の I_2 が遊離する。この遊離した I_2 をチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定して酸素濃度を求める。

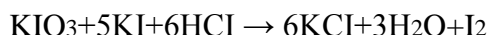
試薬

- 塩化マンガン溶液
- ヨウ化カリウム
- 6N 塩酸
- でんぷん溶液
- 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液
- ヨウ化カリウム

標準溶液

0.025N ヨウ素酸カリウム標準溶液：120~140 °C 2時間乾燥させたヨウ素酸カリウム 0.8917g を正確に秤量し、蒸留水に溶かして 1000ml にする。

(0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液の標定)



0.025N ヨウ素酸カリウム標準溶液 5ml (ホールピペットでとりビーカーに移す)。

ヨウ化カリウム小片、2ml 6N 塩酸 を加える。

0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液を、褐色が薄くなるまでビュレットで滴下する。

数滴でんぷん溶液を加える (ヨウ素でんぷん反応により紫色に着色)。

溶液が無色になるまでチオ硫酸ナトリウムを滴下する。

滴定に要したチオ硫酸ナトリウムの量を α ml とすると、この 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液の正確な規定度(N)は以下の式により求められる。

$$N=0.025\times 5/\alpha$$

溶存酸素の固定

100ml 容の酸素ビンに試水をあふれさせながら満たす。

これに塩化マンガン溶液 1ml, ヨウ化カリウム-水酸化ナトリウム溶液 1ml を加える。

栓をして試水と試薬をよく混合する。

水を張ったバケツ等に入れ、暗所で 1 時間以上放置し、十分沈殿させる。

琵琶湖沿岸における植物プランクトン、付着藻の光合成

試料の分析

沈殿を、巻きあげないように酸素ビンを取り出し、静かに栓を抜く。
これに 6N 塩酸 2ml を加える。
栓をして、栓をしっかり押さえてビンを数回転倒させ、沈殿を溶かす。

溶液すべてビーカーに移す（蒸留水でビンを数回洗浄、洗浄液もビーカーへ）。
0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液を、褐色が薄くなるまでビュレットで滴下する。
これに数滴でんぷん溶液を加える。
溶液が無色になるまで滴定する。

計算

チオ硫酸ナトリウム溶液の規定度を N、滴定に要したチオ硫酸ナトリウム溶液量を β ml、
酸素ビンの容量を Vml とすると、溶存酸素濃度 (DO:mgO₂/l) は以下の式で求められる。

$$DO=8.0 \times N \times \beta \times (1000/V-2)$$

測定原理

水中で塩化マンガンを水酸化ナトリウムを加えると白色沈殿が生じるが、試水中に分子上の酸素が存在すると褐色の沈殿が生じる。これに、ヨウ化カリウムと塩酸を加えることにより、O₂ と等量の I₂ が遊離する。この遊離した I₂ をチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定して酸素濃度を求める。

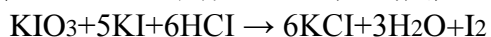
試薬

- 塩化マンガ溶液
- ヨウ化カリウム
- 6N 塩酸
- でんぷん溶液
- 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液
- ヨウ化カリウム

標準溶液

0.025N ヨウ素酸カリウム標準溶液：120~140 °C 2 時間乾燥させたヨウ素酸カリウム 0.8917g を正確に秤量し、蒸留水に溶かして 1000ml にする。

(0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液の標定)



0.025N ヨウ素酸カリウム標準溶液 5ml (ホールピペットでとりビーカーに移す)。
ヨウ化カリウム小片、2ml 6N 塩酸 を加える。

0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液を、褐色が薄くなるまでビュレットで滴下する。
数滴でんぷん溶液を加える (ヨウ素でんぷん反応により紫色に着色)。
溶液が無色になるまでチオ硫酸ナトリウムを滴下する。

滴定に要したチオ硫酸ナトリウムの量を α ml とすると、この 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液の正確な規定度(N)は以下の式により求められる。

$$N=0.025 \times 5/\alpha$$

溶存酸素の固定

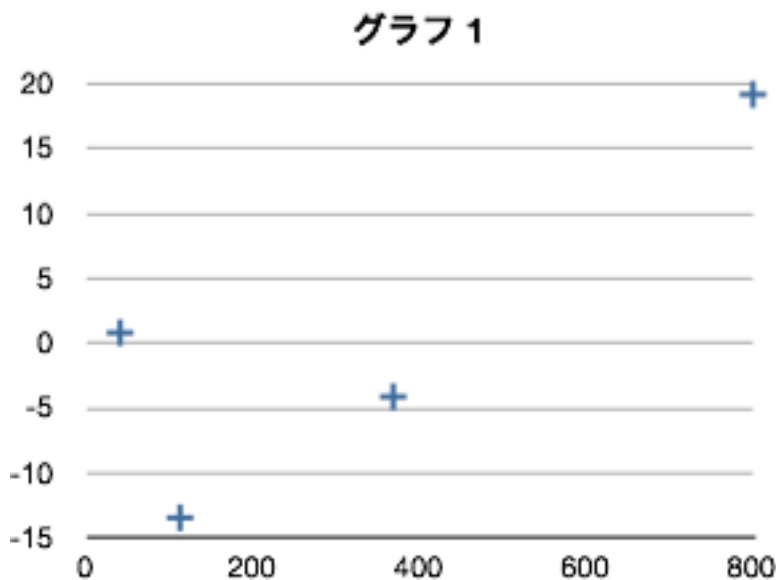
100ml 容の酸素ビンに試水をあふれさせながら満たす。
これに塩化マンガン溶液 1ml, ヨウ化カリウム-水酸化ナトリウム溶液 1ml を加える。
栓をして試水と試薬をよく混合する。
水を張ったバケツ等に入れ、暗所で 1 時間以上放置し、十分沈殿させる。

試料の分析

沈殿を、巻きあげないように酸素ビンを取り出し、静かに栓を抜く。
これに 6N 塩酸 2ml を加える。
栓をして、栓をしっかり押さえてビンを数回転倒させ、沈殿を溶かす。

溶液すべてビーカーに移す（蒸留水でビンを数回洗浄、洗浄液もビーカーへ）。
0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液を、褐色が薄くなるまでビュレットで滴下する。
これに数滴でんぷん溶液を加える。
溶液が無色になるまで滴定する。

計算



チオ硫酸ナトリウム溶液の規定度を N 、滴定に要したチオ硫酸ナトリウム溶液量を β ml、酸素ビンの容量を V ml とすると、溶存酸素濃度 (DO:mgO₂/l) は以下の式で求められる。

$$DO=8.0 \times N \times \beta \times (1000/V-2)$$

考察

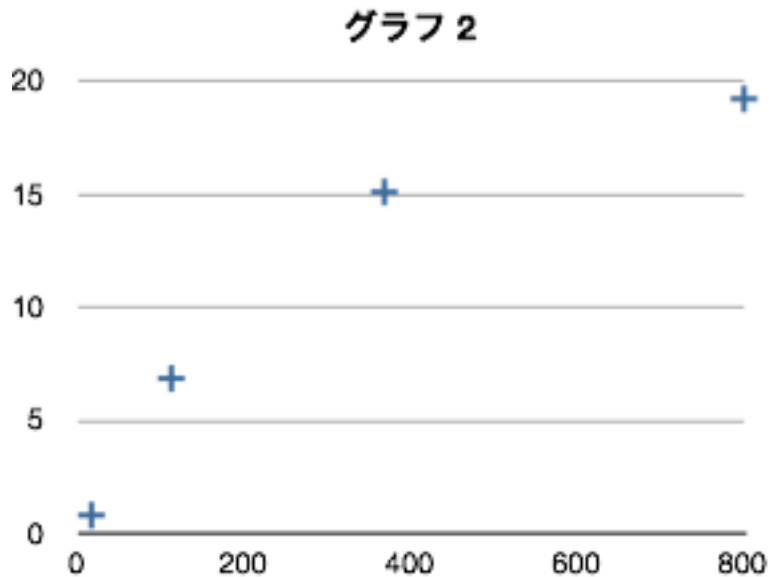
光合成—光曲線

1、植物プランクトン

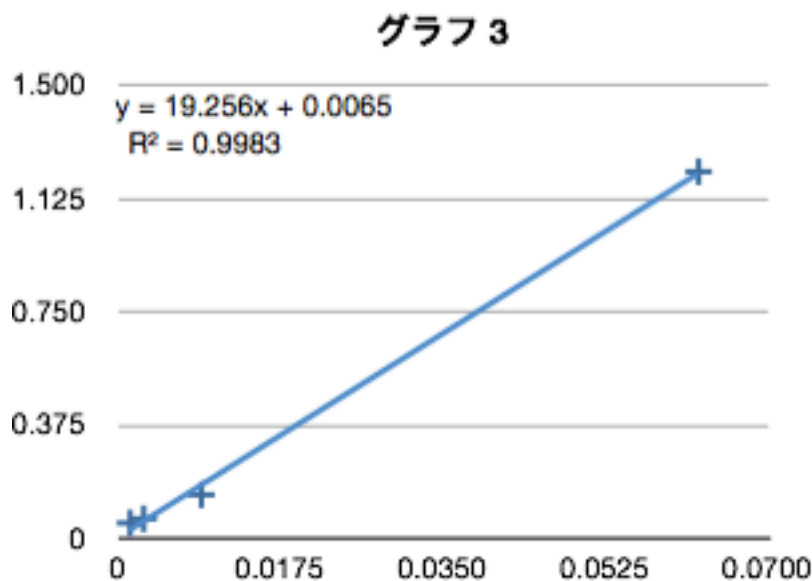
横軸：光量($\mu E/m^2/sec$) 縦軸：光合成速度(mg C /mg chl.a/hr)

このグラフは間違った結果を示していると思われる。DO 測定の際のチオ硫酸ナトリウムの滴定の測定のとときに一人の人が一定の基準で行ってれば、精度の良い測定を行うことができたと思う。

このままではグラフの関係式を直角双曲線に近似することができないから、予測の範囲で近似式を求める。



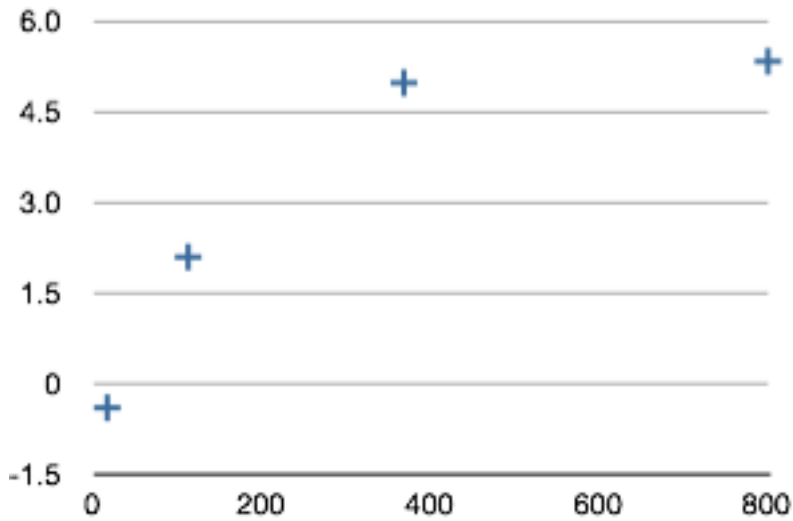
グラフ 1 の DO の値の遮光ビン (14%, 46%) をそれぞれ 0.74, 0.70 だけ上昇させたグラフがグラフ 2 になる。このグラフの関係式を直角双曲線に近似してみると、以下のようなグラフになる。



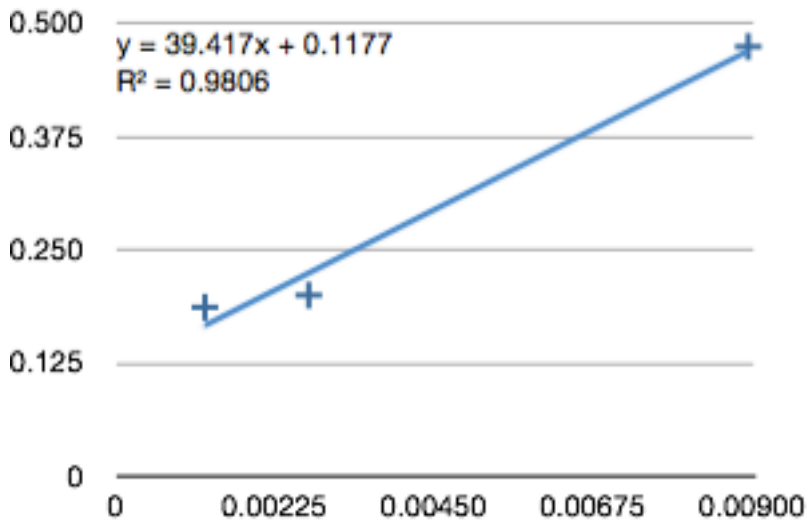
このグラフについて最小二乗法で一次回帰線を引いてみる。

ここから、最大総生産速度(P_{max})を求めると $1/0.0065=153.8$ [mg C/mg chl.a/hr] となる。半飽和定数(I_s)は 2962 [$\mu E/m^2/sec$]。補償点(I_0)は 185.4 [$\mu E/m^2/sec$]。

グラフ 1



グラフ 2



付着藻

光合成—光曲線は以下のようなになる。

このグラフより直角双曲線を求めて、一次回帰させる。そのグラフは以下のようなになる。

琵琶湖沿岸における植物プランクトン、付着藻の光合成

今回、このグラフを作る際にグラフ 1 において遮光ビン（2%）の光合成の値がマイナスになっているので、はずした。

ここから最大総生産速度を求めると $8.49[\text{mg C}/\text{mg chl.a}/\text{hr}]$ 、半飽和定数は $334.9[\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}]$ 、補償点は $710.1 [\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}]$