

異なる光強度でのナノプランクトン
Isochrysis galbana の日周変化と生存戦略

理工学研究科 生命環境科学専攻

指導教員 佐々木洋教授

石川由紀

平成 27 年 1 月 14 日提出

目次

ページ

第1章 緒言	1
1.1. 植物プランクトンと気候変動	1
1.2. 植物プランクトンの群集構造の解析方法	1
1.3. 植物プランクトンのサイズと生存戦略	2
1.4. 細胞を取り巻く水の環境	3
1.5. 本研究の目的	6
第2章 異なる光強度でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の炭素含量および細胞体積の日周変化	8
2.1. 序論	8
2.2. 材料と方法	9
2.2.1. 培養条件と試料採取	9
2.2.2. 細胞数と細胞体積	10
2.2.3. 粒状有機炭素量	11
2.2.4. 数学および統計分析	12
2.2.5. 文献資料	13
2.3. 結果	13
2.3.1. 細胞数の日周変化	14
2.3.2. 細胞体積の日周変化	14
2.3.3. 細胞内炭素含量の日周変化	15
2.3.4. 日周変動量（MCD）と光強度および培地流入速度との関係	16
2.3.5. 細胞体積と細胞内炭素含量との関係	16
2.4. 考察	17
第3章 日周サイクル下でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の沈降特性	21
3.1. 序論	21
3.2. 材料と方法	23
3.2.1. 培養条件と試料採取	23
3.2.2. 細胞数、細胞表面積および細胞体積	23
3.2.3. 粒状有機炭素量	24
3.2.4. タンパク質、炭水化物および脂質	24
3.2.5. 沈降速度	25
3.2.6. ペクレ数	26
3.2.7. 数学分析	26

3.3. 結果	26
3.3.1. 細胞数の日周変化	26
3.3.2. 細胞表面積の日周変化	27
3.3.3. 細胞体積の日周変化	27
3.3.4. S/V比の日周変化	28
3.3.5. 細胞内炭素含量の日周変化	28
3.3.6. 細胞内タンパク質含量の日周変化	29
3.3.7. 細胞内炭水化物含量の日周変化	29
3.3.8. 細胞内脂質含量の日周変化	30
3.3.9. 細胞内炭素、タンパク質、炭水化物、脂質含量の MCDと光強度	30
3.3.10. AFDWの日周変化	30
3.3.11. 細胞の比重の日周変化	31
3.3.12. 沈降速度の日周変化	32
3.3.13. 沈降速度から求めたペクレ数の日周変化	32
3.4. 考察	32
第4章 日周サイクル下でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の 運動特性	38
4.1. 序論	38
4.2. 材料と方法	38
4.2.1. 培養条件と試料採取	39
4.2.2. 運動特性	39
4.2.3. ペクレ数	40
4.2.4. 数学分析	40
4.3. 結果	41
4.3.1. 運動速度の日周変化	41
4.3.2. 相対運動速度の日周変化	41
4.3.3. 運動速度から求めたペクレ数の日周変化	42
4.4. 考察	42
第5章 総合考察	48
5.1. はじめに	48
5.2. 異なる光強度でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の 炭素含量および細胞体積の日周変化	49

5.3. 日周サイクル下でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の 沈降特性と生存戦略	50
5.4. 日周サイクル下でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の 運動特性と生存戦略	51
5.5. 日周サイクル下でのナノプランクトン <i>Isochrysis galbana</i> の 拡散制限からの回避と生存戦略	52
5.6. 気候変動にともなう植物プランクトンの群集組成の変化 と生存戦略	53
謝辞	56
引用文献	58
表	73
図	76
Appendix	109

表一覽

ページ

Table 2.1.	The intercepts and the slopes $\pm$ 95% CI of the relationship between cell volume and cellular carbon contents of <i>I. galbana</i> in each irradiances.	40
Table 3.1.	Biochemical composition, expressed as pg cell^{-1} , protein/carbohydrate (Prot/cbh) and protein/lipid (Prot/lip) ratio of <i>Isochrysis</i> sp. in batch culture and several growth conditions. Exp: exponential phase, stat: stationary phase.	60
Table 3.2.	Biochemical composition, expressed as pg cell^{-1} , protein/carbohydrate (Prot/cbh) and protein/lipid (Prot/lip) ratio of <i>Isochrysis</i> sp. in turbidostat culture.	61
Table 3.3.	The magnitude of change during cell division (MCD) and standard error of the biochemical composition of <i>I. galbana</i> .	62
Table 3.4.	Contributin of protein C, carbohydrate C, and lipid C to cellular carbon contents in light-limited (LL) and -saturated (LS) conditions.	63
Table 3.5.	Maximum and minimum cellular density (ρ') and sinking rate (S_i) of <i>I. galbana</i> at each irradiance. Min and Max denote minimum and maximum of the data.	64

図一覧

ページ

- Fig. 2.1. Relationship between irradiance and average cell density (A), cell volume (B), and cellular carbon contents (C). Error bars indicates the standard deviation. 49
- Fig. 2.2. Relationship between cell volume and cellular carbon contents of *I. galbana* at 45 (A), 150 (B), 365 (C), 500 (D), and 1500 (E) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Broken lines denote the 95% confidence intervals of the data. 50
- Fig. 2.3. Relationship between magnitude of change during cell division (MCD) of cell volume and carbon quota and irradiance in phytoplankton. *Dunaliella tertiolecta* (Eppley and Coatsworth 1966; solid hexagon: cell volume), *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Kohata and Watanabe 1986; open dot within solid circle: cell volume), *Pyramimonas parkeae* (Kohata and Watanabe 1989; open circle: carbon quota, solid circle: cell volume), *Heterocapsa* sp. (Berdalet et al. 1992; plus: cell volume), *Nannochloris* sp. (DuRand and Olson 1998; open triangle: carbon quota, solid triangle: cell volume); *Emiliana huxleyi* (Varela and Harrison 1999; open square: carbon quota, solid square: cell volume), *Micromonas pusilla* (DuRand et al. 2002; open diamond: carbon quota, solid diamond: cell volume), *I. galbana* (Ohi et al. 2002; open dot within inverted triangle: cell volume, 2003; open dot within diamond: cell volume), and the present study (open inverted triangle: carbon quota, solid inverted triangle: cell volume) with a fitted curve (solid line). 51

- Fig. 2.4. Relationship between cell volume and cellular carbon contents during cell divisions. Solid lines denote regression line or simple line connected the maximum and minimum of diel variation for *Micromonas pusilla* (DuRand et al. 2002; open circle); *Nannochloris* sp. (DuRand and Olson 1998; open triangle); *Emiliana huxleyi* (Varela and Harrison 1999; open square); *Pyramimonas parkeae* (Kohata and Watanabe 1989; open diamond); *I. galbana* (the present study at $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; solid circle, at $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; solid triangle, at $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; solid square; at $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; solid diamond). Broken line denotes a regression line for those five species. 52
- Fig. 3.1. Diel variation in cellular carbno contents (a) and cell volume (B) of *Isochrysis galbana* . Closed and open circle denote light-limited and -saturated conditions, respectively. Dark bar denotes dark period. 65
- Fig. 3.2. Diel variation in cellular protein (A), carbohydrate (B), lipid contents (C) and AFDW (D) of *Isochrysis galbana* . Closed and open circle denote light-limited and -saturated conditions, respectively. Dark bar denotes dark period. 68
- Fig. 4.1. Diel variation in cell long diameter (A) and S/V ratio (B) of *Isochrysis galbana* . Dark bar denotes dark period. 78
- Fig. 4.2. Diel variation in cellular protein (A), carbohydrate (B), and lipid contents (C) of *Isochrysis galbana* under continuous culture. Dark bar denotes dark period. 79
- Fig. 4.3. Diel variation in swimming velocity (A) and relative motility (B) of *Isochrysis galbana* under continuous culture. Dark bar denotes dark period. 80

Fig. 4.4. Diel variation in swimming velocity at 70 (A), 140 (B), and 550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) of *Isochrysis galbana* under batch culture. Error bars denote standard error.

Dark bar denotes dark period.

81

Fig. 4.5. Diel variation in relative motility at 70 (A), 140 (B), and 550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) of *Isochrysis galbana* under batch culture. Dark bar denotes dark period.

82

Fig. 4.6. Relationship between swimming velocity (A), relative motility (B), the MCD of swimming velocity (C), and MCD of relative motility (D) and irradiance of *Isochrysis galbana*. Open and closed circle denote batch and continuous culture, respectively. Error bars denote standard deviation.

83

第1章 緒言

1.1. 植物プランクトンと気候変動

植物プランクトンは地球上の一次生産の約 50%を担っていると推定されている¹。急速に進む気候変動により、海洋の氷が溶け、温度や降水量、大気の循環などが変化し²、それによって植物プランクトンの現存量や一次生産量が影響を受けていることが報告されている^{3,4}。さらに、海洋の酸性化⁵、オゾンホールが増大による水柱上部の紫外線の変化^{6,7}、沿岸域の富栄養化や汚染^{8,9,10,11}などが海洋生態系への圧力に拍車をかけている。これらの圧力により、植物プランクトンの群集構造が変化し、海洋生態系の食物網や元素循環を急激に変化させている^{6,7}。一次生産者である植物プランクトンの群集構造の解析方法をより正確にし、植物プランクトンの環境に対する生理学的な応答を調べることにより、海洋生態系が環境や気候変動にどのように応答しているのか、より正確に推測することができる。

1.2. 植物プランクトンの群集構造の解析方法

植物プランクトンは原核および真核生物にまたがる様々な生物分類群で構成され、サイズ範囲は 0.5 μm から数百 μm におよぶ^{12,13}。食物連鎖（被食 - 捕食）の関係がサイズで一義的に決定される海洋生態系においては、食物連鎖の起点となる植物プランクトンのサイズによって食物連鎖における位置と機能が異なるため、植物プランクトン群集をサイズで分画することが海洋生態系の基本構造の理解につながる。植物プランクトンの群集構造は、植物プランク

トンのサイズをいくつかの範囲ごとに分画し、サイズごとに炭素生物量を求めることで決定される^{14,15}。サイズ区分による植物プランクトンの群集構造の把握をする場合、クロロフィル量で現存量を把握する研究事例も多くあるが、植物プランクトンの細胞内クロロフィル含量は、光強度や栄養塩の環境などで変化してしまうため^{16,17}、環境の影響を受けにくい炭素をもとにした現存量で評価の方が好ましい。海水中の粒状有機炭素量を測定する場合には、適当なサイズのフィルターで分画、捕集したものについて分析するのが一般的である。しかし、植物プランクトンの炭素生物量を現場において直接測定することは、同じサイズ画分に植物プランクトン以外の生物、非生物有機物粒子が含まれており識別が不可能であるため^{18,19}、植物プランクトンのサイズから推定する方法が通常用いられている^{14,20,21}。しかしこの推定法には、光強度などの植物プランクトンの環境応答や、日周変化などの要因が考慮されていない。細胞内クロロフィル量が光強度の変化により 10 倍程度変化してしまうのに比べると²²、植物プランクトンの細胞内炭素含量や細胞体積の変化は小さいが、植物プランクトンの炭素含量や細胞体積は、光強度によっても変化することが知られているからである¹⁶。また、これらは一日の中でも細胞分裂と光合成により変化することが知られている^{23,24}。植物プランクトンの光応答や日周変化などの要因を考慮することにより、さらに正確に生物量を推定することができると考えられる。

1.3. 植物プランクトンのサイズと生存戦略

相対的に大型の植物プランクトンと相対的に小型の植物プランクトンにも、そのサイズの違いによる異なった生態が存在する。大型の植物プランクトンは、細胞の単位体積あたりの色素濃度が小型の植物プランクトンと比べて

低く保たれているので、クロロフィル *a* あたりの光吸収能力が高く、細胞あたりの光吸収も多い^{25,26}。また、栄養塩も多く吸収できる。したがって、大型の植物プランクトンは、光や栄養の豊富な環境下では有利である。

小型の植物プランクトンは、大型種とは逆に光制限下や低栄養塩濃度下において有利である。小型の植物プランクトンは大型種よりも弱光下で色素の凝集による光吸収能力の低下率が小さいため、弱光下でも比較的効率よく光を吸収することができる²⁵。また、栄養塩の取り込みは細胞の表面を通して行われるので、表面積/体積比が大きい小型の細胞の方が、効率よく栄養塩を取り込むことができる²⁷⁻³⁰。さらに、小型の植物プランクトンは最小の代謝要求が低いいため、大型の植物プランクトンと比べると、光強度や栄養塩濃度が著しく低いところでも生存することができる^{31,32}。小型の植物プランクトンは、ナノプランクトン (2-20 μm) とピコプランクトン (0.2-2 μm) に分けられる。ピコプランクトンは、貧栄養海域で優占し、その細胞数も多いが、サイズが非常に小さいため、生物量はナノプランクトンと比較すると少ない³³。ナノプランクトンはほぼ全球に存在し、その生物量も全植物プランクトンの半分程度を占めるため³³、本研究ではナノ植物プランクトンに着目した。

1.4. 細胞を取り巻く水の環境

水中では、ほぼ体長 1 mm を境にして、生物の生きている環境は大きく異なることが予測される。小さい生物と大きい生物に対して働く物理法則が異なるためである。大きい生物にとっては慣性による作用が支配する環境下にある。慣性力は質量に比例するため、サイズが小さくなると質量が減少して、慣性力が小さくなる。逆に、小さい生物では慣性力に代わって分子間の引力によ

って支配されるようになり、非常に粘性の高い物質に覆われることになる。

慣性力と粘性力の比をレイノルズ数という。レイノルズ数が大きければ粘性力は無視し、慣性力だけを考えることができるが、反対にレイノルズ数が小さければ粘性力だけを考えることができる。バクテリアからクジラまでの、生体表面のレイノルズ数と生物の体長との関係が調べられた結果、生物の体長はレイノルズ数に比例することが分かっている³⁴。鞭毛 ($1\ \mu\text{m} - 50\ \mu\text{m}$) や繊毛 ($20\ \mu\text{m} - 20\ \text{mm}$) を持つ生物のレイノルズ数は約 0.1 以下であり、粘性力に支配される環境となる³⁵。

レイノルズ数は生物の体長と運動速度に比例している。植物プランクトンのサイズから換算したレイノルズ数は $10^{-2} - 10^{-6}$ の範囲をとるが、どのサイズの植物プランクトンも、粘性力による作用が支配的となる環境下に生息している³⁶。レイノルズ数が小さいと、生物の表面のような個体の境界には粘性により水の動きを減少させるような境界層が形成される。海中に生息するすべての生物は酸素、二酸化炭素、硝酸塩のような分子を周りの海水中から吸収する必要があり、境界層は交換速度を減少させる³⁶。そのため、植物プランクトンは栄養塩分子の交換を十分に行えなくなる。これを拡散制限下にあるという³⁶。微小なナノプランクトンにとって、この拡散制限からの回避は生存にとって欠くべからざる要件である。拡散制限からの回避を可能にする例として、細胞の能動的移動がある。動く生物にとって、速く動くことで進行方向の境界層は相対的に薄くなり、基質の交換を促進させる効果があると考えることができる。植物プランクトンと拡散制限との関係について最初に報告したのは Munk and Riley (1952)³⁷である。それによれば、静止している水に懸濁している植物プランクトンの細胞は、周りの栄養を使いきってしまうというものである。栄養塩取り込み速度は、植物プランクトンに向かって拡散する速度によって制限されること

になる。この制限を克服するためには、水に対して動きを生じさせ、それにより栄養の枯渇した水の層を周期的に新しくすることができると考えられる。細胞は沈降することや鞭毛を用いて動くことによりこの目的を果たすことができる³⁶。

植物プランクトンの沈降速度は、細胞サイズの関数で表すことができる。サイズが大きいほど速く沈降することができるため³⁸、沈降によって拡散制限下にある境界層を薄くして栄養塩取り込み速度を増加させることが可能である。同時により栄養塩濃度の高い深層へと移動することができる³⁹⁻⁴¹。さらに、休眠胞子を形成して沈降することにより、細胞の増殖に不適切な環境から、適切な環境になるまで待機可能な種も存在する⁴²。しかし、沈降によって栄養塩取り込み速度を増加させる一方で、植物プランクトンの増殖にとって必要な光の弱い環境にさらされる危険も伴っている。小型な植物プランクトンは、大型の植物プランクトンと比べて脂質をより多く体内に持つことが知られている⁴³。脂質の密度はタンパク質や炭水化物と比べると小さく、海水の密度よりも小さいため、脂質を多く体内に蓄えることで細胞がより軽くなるからである。しかし鞭毛を持つ植物プランクトンにおいて、浮揚や沈降速度における脂質の寄与を定量的に明らかにした報告例はない。小型植物プランクトンの沈降速度における脂質の寄与度を調べることにより、沈降による拡散制限からの回避との関係について明らかにすることが必要である。

小型の植物プランクトンについてはこれまで実測した運動速度と拡散制限との関係を論じた報告例はない。小型の植物プランクトンは、大型の植物プランクトンと比べて、単位時間あたり、細胞の直径の何倍移動できるかという相対的な運動能力が高いことが知られている³⁹。しかし、小型な植物プランクトンの運動速度についての報告例は限られており⁴⁴⁻⁴⁶、運動速度が環境の変化に

どのような応答を示すのか、また一日の中でどの程度変化するのかについては明らかではないため、これらを考慮することにより、小型植物プランクトンの運動による拡散制限からの回避について、より正確に調べることができる。

細胞直径が 5 μm 以下の、小型の植物プランクトンの沈降速度は大型の植物プランクトンと比べて遅く、沈降による栄養塩取り込み速度はほとんど変化しないと考えられる³⁶。そのため、沈降とは異なる方法によって栄養塩取り込み速度の減少を防いでいると予想できる。小型の植物プランクトンは細胞表面積/体積比 (S/V ratio) が大きく、栄養塩の取り込みは細胞表面を通じて行われるため、この値が高い方が栄養塩取り込み効率がよい⁴⁷。そのため、小型の植物プランクトンは貧栄養海域における生存において有利であると考えられている。

1.5. 本研究の目的

本研究では、*Isochrysis galbana* の拡散制限からの回避を通じた生存戦略について明らかにすることを目的とした。生存戦略とは、生物が存在するために、自然環境に適応しようとする総合的な生活様式の最適化のことであり、広義には遺伝的行動、学習的行動なども含む⁴⁸。ピコ・ナノプランクトン捕食者の捕食速度は非常に速く、かつ複雑であるため^{49,50}、捕食者からの回避などは考慮に入れず、本研究で使用する生存戦略とは、光や栄養塩などの資源獲得に関する適応生態と定義して議論を進めた。

海洋生態系を捉えるためにプランクトン群集は様々な基準で分類されるが、生態系における機能に注目するとともに、サイズによる分類が重要になる⁴⁷。海洋生態系ではサイズによって食物連鎖における位置と機能が異なるからである。ナノプランクトンはほぼ同じ形態、同じ運動性を有するのでほぼ同じ

機能集団と考えることができる。そして貧栄養塩海域で優占するナノプランクトンの細胞サイズはほとんどが直径 5 μm 程度である²⁰。プリムネシオ藻 *I. galbana* は、細胞直径が平均 5 μm 程度の相対的に小型なナノプランクトンであり、鞭毛を有する運動性の細胞である。また、他の多くの小型ナノプランクトンと細胞分裂の様式が同様であるため、自然群集の小型ナノプランクトンのモデル種として適している^{51,52}。

第2章では、光制限下から強光阻害下までの異なる光環境下で *I. galbana* の細胞内炭素含量と細胞体積との関係における日周変化の影響を明らかにすることで、植物プランクトンの群集構造解析に必要な炭素生物量推定モデルについて考察した。第3章では、細胞内炭素を構成するタンパク質、炭水化物、脂質含量の光応答について調べ、細胞内のエネルギー分配が光にどのような影響を受けているのか調べた。生化学含量から沈降速度を求めることにより沈降による拡散制限からの回避について考察した。第4章では、*I. galbana* の運動速度の光応答について明らかにすることにより、*I. galbana* の運動による拡散制限からの回避について考察した。そして第5章では、第2章から第4章までをまとめ、気候変動による植物プランクトンの群集構造の変化について、得られた知見から考察し、その問題点や今後の発展性について述べた。

第2章 異なる光強度でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の

炭素含量および細胞体積の日周変化

2.1. 序論

植物プランクトンの生物量を推定することは、プランクトン生態系にかぎらず地球上の全ての生態系を理解する上で欠かせないものの一つである。しかし、自然界における植物プランクトンの炭素含量を直接推定することは、混入するバクテリアやデトリタスの分離が困難であるために難しい^{18,53}。そのため、植物プランクトンの生物量を求めるには細胞内炭素含量を推定するモデルが一般的に用いられている⁵⁴⁻⁵⁶。それは、細胞体積から細胞内炭素含量を求め、細胞数をかけることで植物プランクトンの生物量を推定するというものである。サイズごとに分画して植物プランクトンの生物量を推定することで、植物プランクトンの群集構造を調べることができる。そして植物プランクトンの生物量およびプランクトンの群集構造解析は、細胞炭素量推定モデルの正確さに依存している。

植物プランクトンの細胞体積と細胞内炭素含量の関係は、はじめに Mullin et al. (1966)¹⁸ によって調べられた。しかし、用いられた植物プランクトンの多くは直径 20 μm 以上の比較的大型の種であった。その後、ピコプランクトン (1-2 μm) およびナノプランクトン (2-20 μm) などの小型の植物プランクトンにおける外洋域での貢献度が認識されるようになったため^{57,58}、体積と炭素の関係はピコおよびナノプランクトンのサイズ幅で調べられるようになってきた^{58,59}。

植物プランクトンの細胞体積と細胞内炭素含量は細胞の光合成による肥大化や分裂によって変化することが知られている²⁴。栄養塩と光に制限のない室内実験環境下では、珪藻を除く植物プランクトンの細胞内炭素含量は明期に増加し、暗期に細胞分裂して減少した^{60,61}。しかし、日周レベルでの細胞体積と細胞内炭素含量の関係についてはほとんど調べられていない⁶²。例えば、炭素含量の推定のために現場試料を採取する際においても、日周レベルでの細胞体積や細胞内炭素含量の変化については注意が払われていない^{58,59}。それ故、日周レベルでの炭素—体積関係を考慮した正確な生物量の推定が必要である。

本研究では、植物プランクトンの体積と炭素の関係を調べる対象生物としてプリムネシオ藻の *Isochrysis galbana* を選択した。この種は外洋に優占するナノプランクトンとほぼ同じ細胞サイズであり、同様の分裂様式、すなわち夜間同調的に細胞二分裂で無性増殖を行うため²⁰、モデル種として適している^{51,52}。本研究では、12:12 時間の明暗周期で 48 時間連続的に培養して、細胞の成長を同調させ、少なくとも 2 回の日周変化を調べた。植物プランクトンの成長にとって光制限状態から強光阻害状態となる光強度のうち、5 段階の光強度で日周レベルでの細胞体積と細胞内炭素含量との関係を明らかにすることを目的とした。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 培養条件と試料採取

プリムネシオ藻 *Isochrysis galbana* Parke (NEPCC633) は、カナダのブリティッシュコロンビア大学の北東太平洋培養コレクション (NEPCC) より得た。*I. galbana* を、25°C で f/2 培地で連続培養した⁶³。光合成有効放射は、光量子計 (Biospherical Instrument, Model QSL 100) を用いて測定し、光強度は 45、150 (と

もに光制限下)、365、500 (ともに光飽和下)、および 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (光阻害下) の 5 段階で培養を行った。細胞には連続的に無菌の空気を送り込み、攪拌器を用いて混合させた。明暗周期は白色蛍光灯 (National, Osaka, Japan) を用いて 12:12 時間で培養を行った。新しい培地は、ペリスタルティックポンプ (Eyela, Tokyo, Japan) を用いて一定の速度で連続的に添加された。実験では外部からの塵や細菌の混入を防ぐため、注意深く操作を行った。細胞は、各光強度で少なくとも 2 週間馴致させた。細胞数は一日に一度、決まった時間に測定することにより、細胞が定常状態になっていることを確認した。定常状態になっていることが確認された後、一日の成長速度 ($\mu: \text{d}^{-1}$) を次式を用いて計算した;

$$\mu = \frac{v}{V_c} \quad (2.1)$$

ここで、 v は新鮮な培地の流入速度、 V_c は培養量 (容積量) である。一日の成長速度を、光強度 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.12 d^{-1} 、150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.45 d^{-1} 、365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.53 d^{-1} 、500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.51 d^{-1} また、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.30 d^{-1} で保った。定常状態が確立された後、2 時間ごとに 48 時間連続で試料を採集した。

2.2.2. 細胞数と細胞体積

細胞数と細胞体積を調べるために、試料は 2%ホルマリンで固定し、暗所で 4°C で保存した。細胞数の計測には、対物レンズ 20 倍 (倍率 200 倍)、血球計算盤 (Erma Inc., Tokyo, Japan) を用いて 200-600 細胞を計数した。細胞体積

の計測には、固定試料をスライドガラスに滴下してカバーガラスで封入し、油浸 (Olympus, Tokyo, Japan) 対物レンズ 100 倍 (倍率 1000 倍) を用いて、50-100 細胞について長径 d_1 と短径 d_2 を測定した。細胞体積 (V) は、*I. galbana* の細胞を楕円形とみなし、次式より計算した⁶⁴;

$$V = \frac{\pi d_1 d_2^2}{6} \quad (2.2)$$

ここで、 π は円周率である。

細胞をホルマリンで固定したため、細胞を保存する時間が長期化すると細胞が縮んでしまう。そのため、時間経過に伴う縮み効果を確認する実験を行った。細胞体積の分布を考慮したときに、ほとんどの細胞が等しい割合で縮んでいた。ホルマリン固定期間は約 1 ヶ月程度であったので、固定した細胞の体積に 1.34 をかけることにより、固定した細胞体積から生きた細胞の体積に補正した (Fig. 2.1. and Appendix)。

2.2.3. 粒状有機炭素量

試料を、あらかじめ 500 °C で 2 時間焼いた Whatmann GF/A グラスファイバーフィルター (孔径 1.6 μm) でろ過し、元素分析計 (Fison, Model EA-1108) で粒状有機炭素量 (POC; particulate organic carbon) を測定した。POC の標準試料には、アセトアニリドを用いた⁶⁵。細胞内炭素含量は、POC を細胞数で割ることにより計算した。

2.2.4. 数学および統計分析

細胞体積などの日周変化は Kieding et al. (1984)⁶⁶に示された式をもとに示すことができる;

$$Y = A + B \sin \left[\frac{(t + C) \pi}{12} \right] \quad (2.3)$$

ここで、 Y は細胞体積などの変数、 A は平均値、 B はサイン関数の振幅、 t は時間、 C は24時間周期からの位相のずれである。 $C = 18$ の時に日周変化の波形は明期に増加し、暗期に減少する日周変化を示し、 $C = 6$ の時に日周変化の波形は暗期に増加し、明期に減少する日周変化を示す。また、実測値と推定値の適合度を検定するために非線形回帰分析を行った。非線形回帰分析の結果、統計的に有意であった場合に日周変化があるものとみなした。日周変化の振幅と光強度および培地流入速度との関係を調べるために、日周変動量 (MCD; magnitude of change during cell divisions) を次式より計算した;

$$MCD = \frac{|Max - Min|}{Min} \times 100(\%) \quad (2.4)$$

ここで、 Max および Min は、それぞれ細胞体積や細胞内炭素含量の日周変化の極大値、極小値である。(2.3) 式より得られた振幅は、平均値の違いが反映されるため、光強度および培地流入速度との関係を適切に評価するのが難しい。第2章では2日間連続で試料採取を行ったため、1日ごとに (2.3) 式に非線形回帰分

析を行い、得られた関数より (2.4) 式を用いて平均値および日周変動量を求め、光強度および培地流入速度との関係を調べた。

回帰直線の 95%信頼区間は Sokal and Rohlf (1995)⁶⁷に従って求めた。回帰直線間の傾きに差があるか、Snedecor and Cochran (1989)⁶⁸に従い、共分散分析 (ANCOVA) を用いて検定した。回帰直線間の傾きに、統計的な差が見られなかった場合は、切片の差の検定も行った⁶⁸。

2.2.5. 文献資料

ピコおよびナノプランクトンにおける過去に報告された文献より、細胞体積と細胞内炭素含量の極小値と極大値を得て、それらを対数変換した。それらの出典元は、Kohata and Watanabe (1989)⁶⁰, DuRand and Olson (1998)⁶², Varela and Harrison (1999)⁶¹ および DuRand et al. (2002)⁶⁹である。細胞体積と細胞内炭素含量の細胞世代における時間変化に傾きがある場合は、傾きをゼロに直して極小値と極大値を得た。

細胞体積や細胞内炭素含量の日周変化の振幅は、極大値と極小値の差を表しているが、文献に報告された細胞体積や細胞内炭素含量の日周変化における振幅をもとめると、サイズの違いが振幅に反映されてしまい、必然的にサイズの大きいものの振幅は大きくなってしまふ。この影響をなくし、振幅を標準化するために、細胞体積および細胞内炭素含量の日周変動量を (2.4) 式より計算した。

2.3. 結果

2.3.1. 細胞数の日周変化

細胞数は、すべての光強度下において、明期に減少し、暗期に増加する日周性を示した (Fig. 2.2)。細胞数の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞数の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.05$)。細胞数の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $4.11 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $3.89 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $2.51 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $3.18 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $3.41 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Fig. 2.2)。細胞数の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.255 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.435 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.300 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.362 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.406 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Fig. 2.2)。細胞数の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 10.5 h、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 3.13 h、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 6.80 h、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.578 h、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 7.47 h であった (Fig. 2.2)。C 値は 24 時間周期の日周変化の最大値がどの時間に表れるかを示しており、全ての光強度下において細胞数は明期に減少し、暗期に増加する日周性を示すが、 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では暗期開始後 7.5 時間、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では明期開始後 3.1 時間、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では暗期開始後 10.8 時間、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では明期開始後 5.8 時間、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では暗期開始後 10.5 時間に細胞数が最大になることを意味している (Fig. 2.2)。

2.3.2. 細胞体積の日周変化

細胞体積は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 2.3)。細胞体積の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞体積の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細

細胞体積の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $92.6 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $78.3 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $64.9 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $95.1 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $76.9 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ であった (Fig. 2.3)。細胞体積の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $7.34 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $18.2 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $20.4 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $23.4 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $11.6 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ であった。細胞体積の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は、 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.3 h、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.9 h、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.9 h、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 15.5 h、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.8 h であった (Fig. 2.3)。細胞体積の平均値と光強度の関係は、有意な相関関係は得られなかった (Fig. 2.4A)。細胞体積の平均値と培地流入速度との間には有意な相関関係が得られ、細胞体積の平均値は培地の流入速度が速くなるにつれて有意に減少した ($p < 0.001$; Fig. 2.4B)。

2.3.3. 細胞内炭素含量の日周変化

細胞内炭素含量は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 2.5)。細胞内炭素含量の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞内炭素含量の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞内炭素含量の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 23.8pg cell^{-1} 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.8pg cell^{-1} 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 14.0pg cell^{-1} 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 14.6pg cell^{-1} 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 15.5pg cell^{-1} であった (Fig. 2.5)。細胞内炭素含量の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 2.15pg cell^{-1} 、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 1.74pg cell^{-1} 、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 4.64pg cell^{-1} 、 $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 2.71pg cell^{-1} 、 $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 3.38pg cell^{-1} であった。細胞内炭素含量の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 19.6 h、 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.2 h、 $365 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.1 h、

500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.3 h、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 19.7 h であった (Fig. 2.5)。細胞内炭素含量の平均値と光強度の関係は、有意な相関関係は得られなかった (Fig. 2.6A)。細胞内炭素含量の平均値と培地流入速度との間には有意な相関関係が得られ、細胞内炭素含量の平均値は培地の流入速度が速くなるにつれて有意に減少した ($p < 0.01$; Fig. 2.6B)。

2.3.4. 日周変動量 (MCD) と光強度および培地流入速度との関係

細胞体積、細胞内炭素含量の MCD と光強度との関係は、光飽和下 (45-500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) までの光強度では、光強度とともに有意に MCD が増加する関係が得られた ($p < 0.01$; Fig. 2.7A)。細胞体積、細胞内炭素含量の MCD と培地流入速度との関係は、培地の流入速度が速くなるにつれて、有意に MCD が増加する関係が得られた ($p < 0.05$; Fig. 2.7B)。

2.3.5. 細胞体積と細胞内炭素含量との関係

全ての光強度下において、細胞体積と細胞内炭素の間に有意な回帰直線が得られた ($p < 0.01$; Fig. 2.8)。細胞一世代における体積—炭素関係の傾き $\pm$ 95%信頼区間は、45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.59 ± 0.40 、150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.66 ± 0.39 、365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.95 ± 0.26 、500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.51 ± 0.30 、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 1.6 ± 0.45 であった (Table 2.1)。細胞一世代における体積—炭素関係の切片 $\pm$ 95%信頼区間は、45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.22 ± 0.79 、150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では -0.0076 ± 0.73 、365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では -0.57 ± 0.46 、500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 0.14 ± 0.58 、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では -1.8 ± 0.85 であった (Table 2.1)。

細胞体積と細胞内炭素含量における炭素—体積関係の傾きは、45 から

500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ までは光強度による有意な変化はみられず、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では有意に異なった (ANCOVA: $p < 0.05$)。45 から 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ までの炭素—体積関係の傾きの平均値 $\pm$ 標準偏差は、 0.68 ± 0.19 であり、1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の炭素—体積関係の傾きは、45 から 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ までの炭素—体積関係の傾きの約 2.4 倍であった。炭素—体積関係の切片は、45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の間で有意な差がみられた (ANCOVA: $p < 0.001$)。150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ と 365 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の間には有意な差はみられなかった (ANCOVA)。

2.4. 考察

細胞体積と細胞内炭素含量の日周変化は、ピコおよびナノプランクトンのプリムネシオ藻⁶¹、プラシノ藻^{60,69}、緑藻⁶²において、過去に報告された研究例と一致した。一般的に、細胞体積と細胞内炭素含量は、明期に光合成により増加し、暗期には細胞分裂により減少する。しかし、ナノプランクトンのサイズ範囲でさえ、いく種類かの珪藻は異なった細胞分裂様式を示す⁷⁰⁻⁷²。Berges et al. (1995)⁷¹ は、珪藻 *Thalassiosira pseudonana* が、明期と暗期に 1 回ずつ同調して分裂するために、細胞体積の変化の極大値が 1 日に 2 回あることを示し、その一方で、細胞内炭素含量は他の植物プランクトン分類群と同様の明期の終盤に最大、暗期の終盤に最小を取る日周変化を示すことを報告した。珪藻が群集組成の大半を占めるような場合は細胞体積と細胞内炭素含量の関係が異なる可能性があるため、細胞体積と細胞内炭素含量の関係を実際の海洋のピコおよびナノプランクトン群集に適用する場合には、群集組成に注意しなくてはならな

い。

細胞内炭素含量には、一種の中でも様々な値が観測されている^{16,17,59,73}。例えば、Montagnes et al. (1994)⁵⁹の報告で、光強度が $20\text{--}60\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で、明暗周期が 14:10 時間で温度 $16\ ^\circ\text{C}$ のとき、本研究と同種の細胞内炭素含量は $6.97\ \text{pg cell}^{-1}$ であった。一方、本研究では、光強度 $45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗周期 12:12 時間、温度 $25\ ^\circ\text{C}$ のときの細胞内炭素含量は、 $23.8\ \text{pg cell}^{-1}$ であった。Montagnes et al. (1994)⁵⁹の報告で、成長速度は $0.32\ \text{d}^{-1}$ であり、本研究では $0.12\ \text{d}^{-1}$ であった。Montagnes et al. (1994)⁵⁹と本研究の培養条件の違いは、温度と成長速度である。細胞内炭素含量は温度によって影響を受けると考えられるが、細胞内炭素含量は成長速度にも依存している。連続培養にて、光強度 $175\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、温度 $18\ ^\circ\text{C}$ で成長速度が $0.18\ \text{d}^{-1}$ から $0.96\ \text{d}^{-1}$ まで変化したとき、細胞内炭素含量は $18.1\ \text{pg cell}^{-1}$ から $10.5\ \text{pg cell}^{-1}$ まで減少した¹⁷。本研究において光制限下から光飽和下までの光強度において、成長速度が $0.12\ \text{d}^{-1}$ から $0.53\ \text{d}^{-1}$ まで変化したとき、細胞内炭素含量は $23.8\ \text{pg cell}^{-1}$ から $14.0\ \text{pg cell}^{-1}$ まで減少した。Herzig and Falkowski (1989)¹⁷では本種と同種において、成長速度が速くなるにつれて細胞内炭素含量は減少した。この成長速度と細胞内炭素含量の関係が、本研究においても成り立つとすると、本研究では成長速度が低いため、本研究の細胞内炭素含量は Montagnes et al. (1994)⁵⁹の細胞内炭素含量よりも高い値を示したものと考えられる。

細胞体積と細胞内炭素含量の MCD と光強度との関係は、双曲線関数的に増加した (Fig. 2.9; $p < 0.001$)^{52,60-62,69,74-77}。炭素—体積の関係の傾きにおいても、光障害の光強度 ($1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) では、傾きが有意に異なるという傾向が確認された。光制限から光飽和までの光強度下 ($45\text{--}565\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) で、細胞体積と細胞内炭素含量の MCD が光に対して同様の傾向を示したことは、細胞

体積も細胞内炭素含量も、一日の中で同様の割合で変化していることを示している。そのため、光制限から光飽和までの光強度下では、炭素—体積の関係の傾きは有意に変化しなかったと考えられる。また、本研究で得られた MCD と培地流入速度との関係には有意な正の相関関係が得られたのは (Fig. 2.7B)、培地の流入速度が速くなるにつれて、細胞分裂が活発に起こったためであると考えられる。細胞体積および細胞内炭素含量の平均値は培地の流入速度が速くなるにつれて有意に減少する関係が得られたが (Figs. 2.4B and 2.6B)、培地の流入速度が速いところでは細胞分裂が活発に起こるために平均値も減少したと考えられる。

光飽和の光強度で、炭素と体積の日周変化が対で報告されている 4 種について、炭素—体積の関係を調べたところ、本研究において傾きに有意な差がみられなかった光制限から光飽和下の結果も含めて有意な一本の回帰直線が得られた ($p < 0.001$; Fig. 2.10)^{60-62,69};

$$\text{Log } C = (-0.58 \pm 0.097) + (0.97 \pm 0.052) \log V \quad (2.5)。$$

炭素と体積の関係をピコおよびナノプランクトンのサイズ幅で用いるときには、光強度が植物プランクトンの成長を阻害しない有光層中部から底部において適用されることが望ましい。特に珪藻の細胞分裂様式が、他のピコおよびナノプランクトンとは異なるために、珪藻の占める割合が低い植物プランクトン群集方が、より正確に炭素生物量を推定することができると考えられる。

植物プランクトンの成長を阻害する光強度 ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) での炭素—体積関係の傾きが、光制限や光飽和下の炭素—体積の関係の傾きよりも有意

に高い値を示した理由のひとつとして、強光によって光合成の炭素同化効率や呼吸速度が変化することが挙げられる⁷⁸。また、強光阻害下では光防御機構がはたらくことが知られているが、この光防御機構が炭素一体積の関係の傾きになんらかの影響を及ぼした可能性も考えられる^{79,80}。しかしながら、強光阻害下において炭素一体積の関係の傾きが弱光下と異なる理由は、まだ特定できていない。外洋域では春季に、海洋表面の光強度が $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度となることから⁸¹、有光層上部での炭素生物量推定のための関係は、有光層中部や底部のそれとは異なることが予測される。このため細胞体積から細胞内炭素含量を推定する際には深度に注意する必要がある。しかし、植物プランクトンが強光阻害を起こす有光層上部では、小型の植物プランクトンの現存量は少ないため^{22,82}、実際の炭素生物量推定に与える誤差は僅かなものになる可能性がある。

本研究により、植物プランクトンの細胞体積や細胞内炭素含量が日周変化しても、これまで観測されてきた炭素含量推定モデルと同様の関係が成り立つことが初めて示された。もし、本研究で得られた傾向が、自然界でのナノプランクトン群集においても一般的な特性であるならば、炭素一体積関係を用いて生物量を推定する際に、強光阻害下を除けば、試料を採取する時間に関係なく、適切に推定できることを示唆している。*I. galbana* の細胞分裂様式および細胞サイズは、ほとんどのピコおよびナノ植物プランクトンと同様であるため、本研究で得られた結果は外洋域においても成り立つと考えられる。また、炭素一体積関係の傾きは、強光阻害下では傾きが有意に異なることが示されたため、炭素一体積関係を用いて植物プランクトンの炭素生物量を推定する際には試料を採取するときの光強度を考慮する必要があることが示された⁸³。

第3章 日周サイクル下でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の

沈降特性

3.1. 序論

第2章では、*Isochrysis galbana* の日周サイクル下での炭素—体積関係の傾きが、光制限下から光飽和下までは一定であり、強光阻害下では有意に異なるという結果を得た。しかし実験の光強度と培地流入速度がそれぞれ異なっていた。連続培養装置を用いることで培地流入速度を調節することができるため、第3章では培地流入速度が一定の環境下で光強度のみを変化させ、光制限下および光飽和下において3日間実験を行うことで実験の再現性を確認した。さらに炭素を構成する主な3要素である炭素化合物が日周変化するときの細胞内のエネルギーの分配について調べ、炭素化合物の割合をもとに *I. galbana* の沈降速度を調べた。

細胞内炭素は、主にタンパク質、炭水化物、脂質の3つの炭素化合物から構成されている。これらの炭素化合物も細胞分裂によって変化をし²⁴、さらに光強度に影響を受けることが知られている⁸⁴⁻⁸⁶。タンパク質は細胞の骨格を形成するのに必要であり、一般的に植物プランクトンの成長を環境が制限しないような状態の時に増加する⁸⁷。炭水化物は貯蔵物質であり、栄養塩が乏しい環境下など、細胞の成長に不利なときに増加することが知られている^{87,88}。脂質は中性脂質、糖脂質、リン脂質に分けられ、脂質の約50%を占める中性脂質は、炭水化物と同様に貯蔵物質である。細胞内炭素を構成する3つの炭素化合物の光に対する応答を明らかにすることで、細胞内でのエネルギー変化について理解す

ることができる。

サイズが約 1 mm 以下まで小さくなると、生物にとっては、粘性による作用が支配的となる⁸⁹。つまりすべてのサイズの植物プランクトンも、粘性力に支配された環境下に生息している。そのため、人間に例えると、はちみつのプールで泳ぐような状態が想定されることになる。同様の環境下では植物プランクトンにとっても身動きが取れにくい状況となると思われる。重力的に中立の場合、植物プランクトンのまわりの栄養塩は植物プランクトンによって吸収され、植物プランクトンの栄養塩取り込み速度は、栄養塩分子の拡散速度によって制限される³⁶。これを、拡散制限という³⁶。一部の植物プランクトンは拡散制限から回避するために、沈降したり、浮揚性を増したり、鞭毛を用いて細胞を運動させたりすることが知られている⁹⁰。このうち、細胞の浮揚性については、鞭毛を持たない珪藻や^{90,91}ガスを体内に蓄えることで表層に浮くことのできるシアノバクテリアや^{92,93}、日周鉛直移動を行う渦鞭毛藻に注目が集まり^{23,94}、鞭毛を持つが、日周鉛直移動を行わない相対的に小型のナノプランクトンでは知見が少ない。ナノプランクトンは脂質を相対的に多く持つことが知られており、水産学的に、また次世代エネルギー源として多くの研究者によって調べられてきている⁴³。しかし、ナノプランクトンの脂質が浮揚性にどの程度貢献しているかといった観点での報告例はない。むしろ、細胞内に脂質を蓄えることによる浮揚性の調節については疑問視されてきた⁴⁸。また、ナノプランクトンは表面積/体積比がマイクロプランクトンと比べて小さいため沈降し難く、栄養塩の取り込み効率が良いと考えられている⁴⁷。表面積/体積比及び沈降速度について同時に調べることで、ナノプランクトンの拡散制限からの回避が達成されるかどうかについて明らかにすることができる。

植物プランクトンの拡散制限からの回避の指標として、ペクレ数が知ら

れている^{95,96}。これは植物プランクトンが沈降や遊泳などで動くことによる海水の動きに対する分子などの拡散速度の比である。本章では、ナノプランクトンの沈降速度からペクレ数をもとめ、沈降による拡散制限から回避が可能かどうかについて考察した。

本研究においても、対象種としてプリムネシオ藻の *I. galbana* を選択した。本研究では、12:12 時間の明暗周期で、光制限下および光飽和下において、生化学組成および表面積/体積比の日周変化について調べ、沈降速度を明らかにした。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 培養条件と試料採取

培養方法および培養に用いた種は第 2 章と同様である。光強度は光制限下 ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、および光飽和下 ($425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の 2 段階で培養を行った。一日の成長速度（培地流入速度）を、光制限下および光飽和下ともに 0.3 d^{-1} で保った。定常状態が確立した後、3 時間ごとに 72 時間連続で試料を採集した。

3.2.2. 細胞数、細胞表面積および細胞体積

細胞数および細胞体積の測定の仕方については第 2 章と同様である。細胞表面積 (S) および細胞体積 (V) は次式より計算した⁶⁴;

$$S = \pi d_1 d_2 \quad (3.1)$$

$$V = \frac{\pi d_1 d_2^2}{6} \quad (3.2)$$

ここで、 π は円周率、 d_1 および d_2 は細胞の長径および短径である。求めた細胞表面積を細胞体積で割ることにより、表面積/体積比 (S/V ratio) を求めた。

(3.2) 式により求めた細胞体積はホルマリンの影響により縮んでいるため、1.34 をかけることで生きたままの細胞体積に換算し (第2章参照)、細胞を球状と仮定して細胞直径を逆算した。

3.2.3. 粒状有機炭素量

第2章と同様なため省略する。

3.2.4. タンパク質、炭水化物および脂質

凍結乾燥させた試料を、タンパク質、炭水化物および脂質の測定に供した。タンパク質は 80°C で 0.1N の NaOH で加水分解した後、Lowry et al. (1951)⁹⁷ にしたがって定量した。牛血清アルブミン (BSA) を標準試料として用い、蒸留水に対して標準化した。炭水化物は、100°C で 2N の HCl で加水分解した後、フェノール硫酸法により定量した⁹⁸。グルコースを標準試料として用い、蒸留水に対して標準化した。脂質は Bligh and Dyer (1959)⁹⁹による方法に従って抽出した後、Kochart (1978)¹⁰⁰に従って定量した。パルミチン酸を標準試料として用い、蒸留水に対して標準化した。タンパク質、炭水化物、脂質を細胞数で割ることにより、細胞内タンパク質、炭水化物、脂質含量を求めた。また、細胞内タンパク質、炭水化物、脂質含量を合計することにより、細胞内の灰分を除いた乾

乾燥重量 (Ash free dry weight; AFDW) を求めた。

3.2.5. 沈降速度

植物プランクトンの浮揚性について明らかにするために、次式（ストークス式）より沈降速度を求めた；

$$Si = \frac{2}{9} gr^2 (\rho_c - \rho_w) / \eta \quad (3.3)。$$

ここで、 g は重力 (m s^{-2})、 r は細胞の半径 (m)、 ρ_c は細胞の比重 (kg m^{-3})、 ρ_w は海水の密度 (kg m^{-3})、 η は動粘性係数 ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) である。

(3.3) 式は、レイノルズ数が 1.0 未満の場合に用いることができるので、ナノプランクトンのサイズ範囲 (2-20 μm) では (3.3) 式を用いることが適切である⁴⁸。重力は 9.8 m s^{-2} 、海水の密度は 1030 kg m^{-3} 、動粘性係数は $10^{-6} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ である。(3.3) 式で、海水の密度 (ρ_w) に対して細胞の比重 (ρ_c) の方が軽くなる時、すなわち $\rho_w < \rho_c$ のときに細胞は浮揚し、 $\rho_w > \rho_c$ のときに細胞は沈降する。

ρ_c は、求めた細胞内炭素化合物含量よりそれぞれの密度（タンパク質の密度は 1300 kg m^{-3} 、炭水化物の密度は 1500 kg m^{-3} 、脂質の密度は 860 kg m^{-3} ）をかけ⁴⁸、各炭素化合物の密度をかけることで細胞内に占める炭素化合物の体積をもとめ、それ以外は全て水分と仮定することにより推定した。細胞内の水分の密度は、海水と等浸透圧なために、海水の密度と等しい 1030 kg m^{-3} とした。細胞内タンパク質、炭水化物、脂質含量の合計は、細胞内全有機物の約 87-97% を占めるため¹⁰¹、これらの合計を細胞内の全有機物とした。この式により見積も

られる沈降速度は、タンパク質、炭水化物、脂質、および細胞内の水分の密度が一定であると仮定した場合の推定値である。

3.2.6. ペクレ数

植物プランクトンが沈降するときのペクレ数 (Pe_{si}) を次式より求めた；

$$Pe_{si} \equiv \frac{Si d}{D} \quad (3.4)$$

ここで、 D は拡散係数 ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) であり、分子の大きさや温度や溶液の種類によって決まる定数である。比較的小さい分子が室温で水の中を拡散するときには D の値は $10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ になる。3.2.2 で求めた細胞直径の値を d に代入し、ペクレ数を求めた。

3.2.7. 数学分析

第 2 章と同様なため省略する。

3.3. 結果

3.3.1. 細胞数の日周変化

すべての光強度下において、細胞数は明期に減少し、暗期に増加する日周性を示した (Fig 3.1)。細胞数の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞数の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞数の平

均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.21 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $3.46 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Fig. 3.1)。細胞数の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.138 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $0.346 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ であった (Fig. 3.1)。細胞数の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 7.18 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 3.03 h であった (Fig. 3.1)。これは、 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では暗期開始後 10.8 時間に、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では明期開始後 3.03 時間に最大になることを意味している (Fig. 3.1)。

3.3.2. 細胞表面積の日周変化

細胞表面積は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.2)。細胞表面積の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞表面積の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.01$)。細胞表面積の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $68.4 \mu\text{m}^2 \text{cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $67.6 \mu\text{m}^2 \text{cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.2)。細胞表面積の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $4.23 \mu\text{m}^2 \text{cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $6.31 \mu\text{m}^2 \text{cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.2)。細胞表面積の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.6 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.8 h であった (Fig. 3.2)。

3.3.3. 細胞体積の日周変化

細胞体積は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.3)。細胞体積の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞体積の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞体積の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $51.9 \mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $50.1 \mu\text{m}^3$

cell⁻¹であった (Fig. 3.3)。細胞体積の振幅は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 5.83 $\mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ 、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 6.53 $\mu\text{m}^3 \text{cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.3)。細胞体積の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.9 h、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.8 h であった (Fig. 3.3)。

3.3.4. S/V 比の日周変化

S/V 比は、すべての光強度下において、明期に減少し、暗期に増加する日周性を示した (Fig. 3.4)。S/V 比の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、S/V 比の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。S/V 比の平均値は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 1.32 μm^{-1} 、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 1.35 μm^{-1} であった (Fig. 3.4)。S/V 比の振幅は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.0643 μm^{-1} 、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.0510 μm^{-1} であった (Fig. 3.4)。S/V 比の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 6.48h、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 4.71 h であった (Fig. 3.4)。

3.3.5. 細胞内炭素含量の日周変化

細胞内炭素含量は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.5)。細胞内炭素含量の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞内炭素含量の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞内炭素含量の平均値は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.0 pg cell⁻¹、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 15.3 pg cell⁻¹ であった (Fig. 3.5)。細胞内炭素含量の振幅は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 2.94 pg cell⁻¹、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 2.31 pg cell⁻¹ であった (Fig. 3.5)。細胞内炭素含量の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.1 h、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.0 h であった (Fig. 3.5)。

3.3.6. 細胞内タンパク質含量の日周変化

細胞内タンパク質含量は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.6)。細胞内タンパク質含量の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞内タンパク質含量の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.01$)。細胞内タンパク質含量の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $6.79 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $8.63 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.6)。細胞内タンパク質含量の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.16 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.12 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.6)。細胞内タンパク質含量の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 19.0 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 17.1 h であった (Fig. 3.6)。

3.3.7. 細胞内炭水化物含量の日周変化

細胞内炭水化物含量は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.7)。細胞内炭水化物含量の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞内炭水化物含量の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞内炭水化物含量の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $14.0 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $10.8 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.7)。細胞内炭水化物含量の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $2.59 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.20 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.7)。細胞内炭水化物含量の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.0 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.6 h であった (Fig. 3.7)。

3.3.8. 細胞内脂質含量の日周変化

細胞内脂質含量は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.8)。細胞内脂質含量の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、細胞内脂質含量の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。細胞内脂質含量の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $9.53 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $6.19 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.8)。細胞内脂質含量の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.83 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $1.06 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.8)。細胞内脂質含量の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.0 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.4 h であった (Fig. 3.8)。

3.3.9. 細胞内炭素、タンパク質、炭水化物、脂質含量の MCD と光強度

(2.3) 式より、一日ごとに細胞内炭素、タンパク質、炭水化物、脂質含量の日周変化の MCD を求めたところ、個々の項目では MCD と光強度の間に有意な差はみられなかったが、細胞内炭素、タンパク質、炭水化物、脂質含量全ての MCD と光強度との間には、有意に光飽和下の方が低い値を示した (t-test: $p < 0.001$; Fig. 3.9)。

3.3.10. AFDW の日周変化

AFDW は、すべての光強度下において、明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した (Fig. 3.10)。AFDW の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、AFDW の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。AFDW の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $30.3 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $25.6 \text{ pg cell}^{-1}$ であった (Fig. 3.10)。AFDW の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $5.59 \text{ pg cell}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2}$

s⁻¹で 3.36 pg cell⁻¹であった (Fig. 3.10)。AFDW の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 18.2 h、425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 16.7 h であった (Fig. 3.10)。

3.3.11 細胞の比重の日周変化

細胞の比重は、全ての光強度下において明確な日周変化は示さなかった (Fig. 3.11)。細胞の比重の平均値は、光制限下で $1.09 \times 10^3 \pm 8.1 \times 10^5 \text{ kg m}^{-3}$ 、光飽和下で $1.09 \times 10^3 \pm 6.1 \times 10^5 \text{ kg m}^{-3}$ であった。

第 2 章より、細胞体積－細胞内炭素の間には強い相関関係があり、この関係が多種においても成り立つことが確認された (Fig. 2.11)。また、この関係の傾きはナノプランクトン群集においてはほぼ 1 に近い値であったことから、群集レベルでは細胞体積当たりの炭素量（ $\div$ 細胞の比重）はほぼ一定であると考えられる。基本的には細胞の比重はほぼ変化しないが、日周変化のようなごく短い時間内の生理的な変化を捉えると、わずかに変動する傾向もあるかもしれない。細胞の比重は細胞内タンパク質、炭水化物、脂質の密度および細胞体積からも求めることができる。Figs. 3.6-3.8 より、これら 3 つの炭素化合物含量は光制限下、光飽和下ともに明期に増加し、暗期に減少する日周変化を示したため、細胞の比重も全ての光強度下において日周変化を示すかもしれないが、細胞内炭素化合物の日周変化には、実験による誤差が大きいため、(2.3) 式より求めた値を用いて細胞の比重を各光強度下で求めた。その結果、光制限下では明期に増加し、暗期に減少する日周変化を示したのに対し、光飽和下では明期に減少し、暗期に増加する日周変化を示した (Fig. 3.12)。

3.3.12. 沈降速度の日周変化

実測値に基づいて推定した沈降速度は、全ての光強度下において明期に増加し、暗期に減少する日周変化を示した (Fig. 3.13)。沈降速度の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、沈降速度の日周変化は全ての光強度下において (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.05$)。沈降速度の平均値は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では $0.800 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では $0.815 \mu\text{m s}^{-1}$ であった (Fig. 3.13)。沈降速度の振幅は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では $0.112 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では $0.0466 \mu\text{m s}^{-1}$ であった (Fig. 3.12)。沈降速度の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 18.6 h、 $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では 17.2 h であった (Fig. 3.13)。

(2.3) 式より求めた細胞の比重の値をもとに推定した沈降速度は、全ての光強度下において明期に増加し、暗期に減少する日周変化を示した (Fig. 3.14)。(2.3) 式より求めた細胞の比重の値をもとに推定した沈降速度の MCD は、光制限下では 39.3%で光飽和下では 11.7%と、光制限下の方が光飽和下よりも約 3.3 倍大きく変動していた。

3.3.13. 沈降速度から求めたペクレ数の日周変化

実測値をもとに推定された沈降速度から求めたペクレ数は、全ての光強度下において、明確な日周変化は示さなかった (Fig. 3.15)。3 日間を通じての光制限下の平均値は $4.06 \times 10^{-3} \pm 6.8 \times 10^{-4}$ 、光飽和下では $4.08 \times 10^{-3} \pm 4.8 \times 10^{-4}$ であった。

3.4. 考察

これまでに報告された、バッチ培養における生化学含量および生化学組成の値を Table 3.1 に示した。細胞内生化学含量は培養条件によって異なり、特に細胞の成長段階によって変化する (Table 3.1)^{85,86,102-105}。対数増殖期の細胞は活発に細胞分裂を行い、光合成によって作られた炭水化物はタンパク質を合成するために消費されてしまうため、対数増殖期でのタンパク質/炭水化物比は 1 よりも大きくなると考えられる (Table 3.1)^{85,86,102,103}。本研究では、連続培養を行い、細胞が対数増殖期を終えて安定期に入ったのちに 2~3 週間、成長速度を 0.3 d^{-1} で定常状態に維持している。バッチ培養における収穫期と、連続培養における定常状態の収穫期を比較することは難しいため、異なる成長速度での連続培養における *Isochrysis* sp. の生化学組成が調べられた (Table 3.2)¹⁰⁶。Marchetti et al. (2013)¹⁰⁶によって報告された細胞内生化学含量の値は、本研究で示された値の約半分である (Table 3.2)。この違いはおそらく培養株の違いによるものであろう。Marchetti et al. (2013)¹⁰⁶で用いた *Isochrysis* sp. (T-ISO) の細胞体積は、 $37\text{-}57 \mu\text{m}^3$ であり¹⁶、本研究の *Isochrysis galbana* Parke の細胞体積は $53\text{-}84 \mu\text{m}^3$ であった。細胞体積が小さいと、細胞内炭素含量もそれに伴い小さくなる¹⁸。Marchetti et al. (2013)¹⁰⁶では、成長速度が低い時に細胞内タンパク質含量が減少し、炭水化物が増加するため、タンパク質/炭水化物比は 0.62 から 0.44 まで減少していた (Table 3.2)¹⁰⁶。また、成長速度が速い時は、暗呼吸も増加していた¹⁰⁶。連続培養において、成長速度が速い時は速い速度で培地が供給されるため、細胞がそれに適応するために、暗呼吸の TCA サイクルで形成された炭水化物をタンパク質合成のために消費する。そのため、連続培養で成長速度が速い時には、タンパク質/炭水化物比は相対的に低い値を示すものと考えられる。本研究で成長速度は 0.3 d^{-1} であり、相対的に遅いため、バッチ培養での対数増殖期の細胞と比べると、炭水化物が蓄積し、タンパク質/炭水化物比が小さくなったと考えられる。これ

までに、連続培養において、一定の成長速度で生化学組成における光の影響を報告した例はない。光制限下での連続培養（成長速度一定）では、タンパク質が減少して炭水化物が増加したため、タンパク質/炭水化物比は減少した。植物プランクトンの脂質は中性脂質、糖脂質、リン脂質で構成され、そのうち中性脂質は貯蔵物質であり、脂質の約 50%以上を占める。本研究では脂質の構成成分までは分析していないが、タンパク質/脂質比は光飽和下から光制限下で 1.4 から 0.72 まで減少したのは、おそらく炭水化物同様、貯蔵物質である中性脂質の増加とタンパク質の減少によるためであると考えられる。

光制限下における炭素および炭素化合物の MCD が、光飽和下と比べて相対的に大きい値を示したことは、光制限下でエネルギー貯蔵に関わる代謝経路が活性化したためであると考えられる (Fig. 3.9)。光合成により合成された炭水化物はタンパク質や脂質にすばやく消費されてしまうため、光制限下では明期により大きく増加し、暗期により大きく減少するものと考えられる。第 2 章では、MCD の変化は培地の流入速度に依存していたが (Fig. 2.7)、本章において培地の流入速度を一定にすることで光強度のみの影響を調べることができた。このような条件下では MCD はエネルギー貯蔵に関わる代謝経路を活性化させることで光に応答していることが示唆された (Fig. 3.9)。

ナノ植物プランクトンにおいてストークスの式を用いて沈降速度を求めた場合と、細胞を薬剤により動かない状態にして沈降速度を測定した場合とで、その値にほとんど差はなかったことが報告されている⁴⁴。本研究で用いた *I. galbana* は、わずかに楕円形ではあるが、ほぼ球状とみなせるため、ストークスの式を用いて沈降速度を算出しても、実際の沈降速度とほとんど差がないと考えられる。また、鞭毛を有することで海水との摩擦が増加して沈降速度に影響がないかについて考察するため、鞭毛の長さを細胞直径と同程度と仮定して

鞭毛の表面積を算出したところ、鞭毛の表面積は細胞の表面積の約 0.4%であったため、鞭毛を有することは、沈降速度の推定にはほとんど影響しないと考えられる。

細胞の比重は炭水化物などの細胞内の物質を全て固体と仮定して推定しているが、実際には植物プランクトンの炭水化物は細胞内液に溶解しており、細胞内水分に溶存性の炭水化物を 75%程度含まれるとして推定された細胞の比重は最大で 9.5%程度増加することが考えられる。そのため沈降速度やペクレ数の増加につながると予測される。本研究で推定した細胞の比重が厳密に正確な値ではない可能性は否定できない。

沈降速度における脂質の寄与度について調べるために、(2.3) 式を元に算出された値のうち、脂質のみを各光強度において日周変化させ、細胞内タンパク質、炭水化物、水分含量や細胞体積は光制限下で推定された値の平均値を用いて沈降速度を推定したところ、光飽和下では細胞の比重の平均値は 3.7%増加し、沈降速度は 71.4%速くなった (Fig. 3.16A and B)。そのため、脂質以外の要素が全て日周変化しない場合は細胞内に脂質を貯めることにより、沈降速度はやや遅くなることが示された。

細胞内脂質含量は、(2.3) 式に適合させた結果では光飽和下よりも光制限下の方が平均で 39.8%増加したため (Fig. 3.8)、細胞の比重が光制限下で軽くなり、沈降速度も遅くなることが想定されたが、炭素化合物を (2.3) 式に適合させた値を元に算出すると、光制限下における沈降速度は明期の初期と暗期の終盤において、わずかに光飽和下よりも小さい値を示したことから (Fig. 3.14)、光制限下では明期の初期と暗期の終盤には、わずかに光飽和下よりも沈み難いと考えられる。また、栄養塩取り込み効率の指標となる S/V 比は明期の初期に最

大、明期の終盤に最小となることから (Fig. 3.4)、明期の初期に細胞を沈み難くしながら、栄養塩取り込み効率を高めていると考えられる。実際の海洋中で、光制限下となる有光層底部では、海水温の低下と塩分の上昇に伴い海水の密度も上昇するため、細胞はより沈み難くなる。そのため、光制限下では脂質の増加に伴って細胞をわずかに沈み難くしているのに加え、海水の密度が大きくなることでさらに有光層内に留まりやすくなっていると考えられる。現場観測において、小型の植物プランクトンの現存量は、有光層底部 (80-130 m 程度) で最大となることが知られており⁸²、その深度において沈降速度も遅くなることが報告されている^{22,107}。このことは本研究により得られた結果と矛盾しない。有光層底部では栄養塩も表層と比べて濃度が高くなるため¹⁰⁸、この層に滞留することは、植物プランクトンにとって不利ではないと考えられる。また有光層内に留まることで、再び光の強い層へ上昇する機会を得て光合成を活発に行うことができるため、生態学的に有利であると考えられる。

これまでに報告されたナノ植物プランクトンの沈降速度は、渦鞭毛藻の *Prorocentrum mariae-labouriae*⁴⁴で $0.26-0.51 \mu\text{m s}^{-1}$ (細胞を球状と仮定した時の直径は $11.7 \mu\text{m cell}^{-1}$)、プリムネシオ藻の *Coccolithus huxleyi*³⁵で $3-15 \mu\text{m s}^{-1}$ (直径は $10-13 \mu\text{m cell}^{-1}$) であった。本研究で用いた種の細胞直径が $5 \mu\text{m}$ 程度であることを考慮に入れると、*I. galbana* より大型の渦鞭毛藻 *P. mariae-labouriae* の値とほぼ同じであるため、本研究で推定された沈降速度は過大評価している可能性もあるが、*P. mariae-labouriae* は球状ではなく、三角形に近い形をしているため、球状体と仮定できる細胞と比べ沈降速度が遅くなったと考えられる。また、プリムネシオ藻の *Coccolithus huxleyi* の沈降速度は、珪藻のように比重の高いココリスの殻を持つために沈降速度が速くなるとも考えられている一方で、細胞を覆うココリスの形状には、浮力を調節するために複雑な形をしているとも考え

られているため¹⁰⁹、本種とそのまま比較することは難しいが、単純にサイズと沈降速度のみを比較すると、本研究で推定された沈降速度は妥当な値であると考えられる。*I. galbana* の沈降速度は 0 に近いため、重力的にはほぼ中立であると言える。

沈降速度から求めたペクレ数をこれらの種と本研究で得られた値と比較すると、*P. mariae-labouriae* では 0.0030-0.0060、*C. huxleyi* では 0.030-0.195 となり、細胞直径を考慮すると本研究で得られた 3 日間の平均値である 0.0041 は妥当な値であると考えられる (Fig. 3.15)。ペクレ数は、植物プランクトンが動くことによる海水の移動に対する分子の拡散の比であるため、この値が高いほど分子の拡散は無視でき、この値が低いほど分子の拡散の影響を受けていることを示している。本研究において沈降速度から求めたペクレ数が、小さな値を示したことは、*I. galbana* が沈降することで移動する海水の対流よりも分子の拡散の方が相対的に影響が大きいことを示している。もし本種が鞭毛を持たず、沈降のみを行う種であると仮定すると、海水中を沈降しても、栄養塩の取り込みは分子の拡散に依存する状況となる。そのため、*I. galbana* では沈降することで拡散制限から逃れるよりも、むしろ上述のように沈降速度を重力的に中立に近づけることでより有光層内に滞留する方が有利であると考えられる。

本研究で得られた *I. galbana* の結果は、他のナノプランクトンにも適用できると考えられる。特に直径 5 μm 以下のナノプランクトンは本研究と同様に S/V 比が小さく、沈降速度も小さいことから、拡散制限から回避するためには、有光層内により留まりやすくするために沈降速度を小さくする生存戦略を獲得したと考えられる。

第4章 日周サイクル下でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の

運動特性

4.1. 序論

植物プランクトンの多くが鞭毛を有することが知られているが³⁵、その鞭毛による運動性と拡散制限からの回避に注目して議論した報告例のほとんどが渦鞭毛藻が対象であった^{36,46}。また、実験の培養条件の詳細な記載が不足する場合や^{39,110}、一定の環境条件下でのみ行われており^{44,45}、運動速度に対する光強度などの環境応答の影響についての報告例はないため、小型の植物プランクトンの拡散制限からの回避について、考察するのにはまだ知見が不足していると考えられる。実際、外洋の海洋生態系においては直径 5 μm 程度の小型植物プランクトンが優占しているため、このサイズにおける運動特性について、光強度などの環境応答について調べる必要がある。また、ナノプランクトンの運動速度や相対運動能力の日周性については報告例がないため、これらの日周変化を調べることにより、生理特性の短期的応答を通して拡散制限からの回避について明らかにすることができる。

そこで、本章では *I. galbana* の運動特性の日周変化と、細胞の運動によるペクレ数の変化を通して海洋生態系に優占するナノ植物プランクトンの拡散制限からの回避について考察することを目的とした。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 培養条件と試料採取

プリムネシオ藻 *I. galbana* を用いて、25°C で f/2 培地でバッチ培養を行った⁶³。光強度は光制限下の $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および光飽和下の $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ でも培養を行った。実験の期間中、外部からの塵や細菌の混入を防ぐため、注意深く操作を行った。細胞は、対数増殖期中期から後期の試料を採集した。試料を採集し、ただちに顕微鏡下で細胞の運動速度を測定した。実験の再現性を確認するため、培養は2本のボトルで行い、実験は6時間ごとに2日間連続で行った。

4.2.2. 運動特性

細胞の運動速度は、血球計算盤 (Erma Inc., Tokyo, Japan; 深さ 0.1 mm) でストップウォッチを用いて一定の距離を移動する時間を測定することにより求めた。運動速度 ($u, \mu\text{m s}^{-1}$) を細胞直径 ($d, \mu\text{m}$) で割ることにより、単位時間あたりに細胞直径の何倍を移動できるかを示す、相対運動速度 (RM ; relative motility) を計算した;

$$RM = \frac{u}{d} \quad (4.1)。$$

相対運動速度を求める際の細胞長径は、第3章で求めた明期開始後 0, 6, 12, 18 時間の細胞長径の平均値を算出し、 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では光制限下で算出した各時間の値を、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ では光飽和下で算出した各時間の値を用いた。

細胞の運動速度を測定するときには、顕微鏡の光によって瞬間的に運動速度が変化するかどうか捉えるため、あらかじめプレパラートをセットし、ピントを合わせた後に顕微鏡の光をつけ、運動速度を測定した。その結果、光を照射することによる瞬間的な運動速度の変化は認められなかった。1つの培養ボトルにつき100細胞計測した。顕微鏡の熱により、細胞の動きが遅くなってきた時は、新しい試料に変えて測定を行った。1つの培養ボトルを計測している間、もう1つの培養ボトルはインキュベーターに保管した。培養ボトル1と2とで、運動速度および相対運動速度に統計的に有意な差はなかった (t-test)。

4.2.3. ペクレ数

植物プランクトンが沈降することによるペクレ数 (Pe_{swim}) を次式より求めた;

$$Pe_{swim} \equiv \frac{u d}{D} \quad (4.2)$$

ここで、 D は拡散係数 ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) であり、分子の大きさや温度や溶液の種類によって決まる定数である。比較的小さい分子が室温で水の中を拡散するときには D の値は $10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ になる。 d の値は 4.2.2 の相対運動速度と同様である。

4.2.4. 数学分析

第2章と同様である。

4.3. 結果

4.3.1. 運動速度の日周変化

運動速度は、すべての光強度下において、明期の中央期で最大、暗期の中央期で最小となる日周性を示した (Fig. 4.1)。運動速度の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、運動速度の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。運動速度の平均値は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $56.8 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $60.6 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $77.7 \mu\text{m s}^{-1}$ であった (Fig. 4.1)。運動速度の振幅は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $10.4 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $17.1 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $29.0 \mu\text{m s}^{-1}$ であった (Fig. 4.1)。運動速度の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 23.1 h、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 22.0 h、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 23.1 h であった (Fig. 4.1)。

運動速度の最小値および最大値は光強度が強くなるにつれて速くなったが ($p < 0.001$; Fig. 4.2)、光強度と運動速度の最小値および最大値の傾きは、最大値の方が大きい値を示した (Fig. 4.2)。運動速度の MCD も光強度が強くなるにつれて一日の中で大きく変化した ($p < 0.001$; Fig. 4.3)。

4.3.2. 相対運動速度の日周変化

相対運動速度は、運動速度と同様、すべての光強度下において、明期の中央期で最大、暗期の中央期で最小を取る日周性を示した (Fig. 4.4)。相対運動速度の実測値を (2.3) 式に当てはめたところ、相対運動速度の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。相対運動速度の平均値は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $11.8 \text{ bodylength s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $12.8 \text{ bodylength s}^{-1}$ 、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $13.8 \text{ bodylength s}^{-1}$ であった (Fig. 4.4)。

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $15.9 \text{ bodylength s}^{-1}$ であった (Fig. 4.4)。相対運動速度の振幅は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $2.13 \text{ bodylength s}^{-1}$ 、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $3.61 \text{ bodylength s}^{-1}$ 、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で $5.98 \text{ bodylength s}^{-1}$ であった (Fig. 4.4)。相対運動速度の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 23.6 h、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 22.5 h、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 23.6 h であった (Fig. 4.4)。

4.3.3. 運動速度から求めたペクレ数の日周変化

運動速度から求めたペクレ数は、すべての光強度下において、明期の中央期で最大、暗期の中央期で最小を取る日周性を示した (Fig. 4.5)。ペクレ数を (2.3) 式に当てはめたところ、ペクレ数の日周変化は全ての光強度で (2.3) 式に有意に適合した ($p < 0.001$)。ペクレ数の平均値は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.272、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.291、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.380 であった (Fig. 4.5)。ペクレ数の振幅は $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.0516、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.0850、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 0.142 であった (Fig. 4.5)。ペクレ数の日周変化の 24 時間周期からの位相のずれを示す C は、 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 22.6 h、 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 21.7 h、 $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 22.7 h であった (Fig. 4.5)。

4.4. 考察

植物プランクトンの運動性において影響を与える可能性があるブラウン運動について初めに考察した。ブラウン運動とは、熱運動によって溶媒中の分子が不規則に衝突することによってもたらされるものである。植物プランクトンの運動とブラウン運動との関係について考える時に、細胞の直径とブラウン運動が行われる分子の直径を比較すると、本研究で用いた *I. galbana* の細胞直

径は $5 \times 10^{-6} \text{ m}$ 程度で、水分子の直径は $2 \times 10^{-10} \text{ m}$ である。本研究で用いた植物プランクトンのサイズが、水分子の直径よりも圧倒的に大きいため、水分子が熱運動によって植物プランクトンに衝突しても、植物プランクトンはそれによって動くとは考え難い。そのため、本研究で測定した運動速度の値には、ブラウン運動の影響はほとんどないものと考えられる。

Fig. 4.6 に、文献に報告されているナノプランクトンの運動速度のうち、培養条件について記載があるものについて細胞直径との関係を示し、本研究で得られた運動速度の最大値、最小値および平均値を比較した。ナノプランクトン群集では、運動速度の幅が非常に大きく、運動速度は細胞直径に依存しなかったが、運動速度を細胞直径で割った相対運動速度と細胞直径の関係は負の相関関係にあり、細胞直径が大きくなるにつれて相対運動速度は減少した⁴⁴⁻⁴⁶ ($p < 0.05$; Fig. 4.6)。このことは、細胞直径が小さいナノプランクトンの方が相対的な運動能力は高く、栄養塩取り込み効率もよいことを示している。本研究で得られた相対運動速度と細胞直径の関係と、他のナノプランクトンで得られた相対運動速度を比較すると、本研究の結果は他のナノプランクトンで推定された相対運動速度の範囲内に位置していた⁴⁴⁻⁴⁶ (Fig. 4.6)。

海水が粘性力を持っている場合、植物プランクトンの細胞がはじめに周りの栄養塩を取り込んでしまうと、次の段階では栄養塩を拡散による供給に頼らざるを得ない拡散制限の状態になる。そこで次に細胞の運動速度と栄養塩分子の拡散速度との関係について考察する。分子の移動距離 (L) と時間 (t) との関係式は;

$$L^2 = D t \quad (4.3)$$

となり、 D は分子の拡散速度である。硝酸塩分子の拡散速度は、水温 25 °C のとき $17.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ であり、式 4.3 より硝酸塩分子が拡散によって移動する距離は、1 秒間に 41 μm と算出される。この値を本研究で実測した *I. galbana* の運動速度と比較すると、各光強度における *I. galbana* の平均運動速度は、光制限下では 43.4-80.3 $\mu\text{m s}^{-1}$ 、光飽和下では 55.1-115 $\mu\text{m s}^{-1}$ であったため、硝酸塩分子の拡散による移動速度よりも速いことから、*I. galbana* は、硝酸塩分子の拡散よりも速い速度で運動し、効率よく栄養塩を取り込む可能性が高いことが示唆される。また、光制限下よりも光飽和下の方がより効率がよいと考えられる。

植物プランクトンの拡散制限についてはじめに報告したのは Munk and Riley (1952)³⁷ であり、静止海水中に懸濁している植物プランクトンの細胞は、周りの水柱の栄養を使い切ってしまうとするものである。レイノルズ数が 1 未満になると生物にとっては粘性力に支配された環境下にあることを示しているが、本研究で用いた種のような小型の植物プランクトンは、レイノルズ数が 0.001 以下であるため、細胞の表面には水の動きを減少させるような境界層が形成される³⁶。細胞は静止状態でいると、細胞のまわりの栄養塩を吸収し、栄養塩の枯渇した層が形成される。境界層の形成には栄養塩濃度の高低は無関係である。海水中に栄養塩が豊富にあるとしても、細胞が動かなければ周りの栄養塩を使い切ってしまうと考えられる。それ故、例えば富栄養状態における実験環境下においても、貧栄養状態と同様のことが起こっていると考えられる。高栄養塩濃度下において運動性についての実験結果が得られるため、貧栄養の自然海水中においてはより顕著な回避効果が期待できると考えられる。また、貧栄養環境で植物プランクトンが生存できる理由として、植物プランクトンが排泄する溶存態有機物や動物プランクトンの排泄物をバクテリアが有機分解することで形成

された、高栄養塩濃度の小パッチを利用しているとの指摘もある¹¹¹。しかし、実験室でそのような環境条件を構築することは難しい。

植物プランクトンが拡散制限から回避できているかどうかを示す指標となるペクレ数は、植物プランクトンの鞭毛の運動による場合には 0.093-104 程度であることが知られている^{95,96}。これらの値は、これまでに報告されたナノプランクトンの運動速度より推定したナノプランクトンのペクレ数 0.02-2.0⁴⁴⁻⁴⁶の範囲にある。ペクレ数が大きいほど、植物プランクトンが拡散制限から回避する可能性が高くなると予想され、効率よく栄養塩を取り込むことができると考えられる^{36,96}。これまでに報告されたナノプランクトンの運動速度より求めたペクレ数と細胞直径の間には有意な相関関係が見られ ($p < 0.01$)、その回帰直線よりペクレ数が 1 となるのは細胞直径が 13.5 μm の時であった (Fig. 4. 7)。ペクレ数が 1 となるのは運動による海水の対流と分子による拡散が等しくなる時であるが、細胞直径が 13 μm 以下の場合、ほとんどの細胞が、自ら作り出す海水の対流よりも分子による拡散の影響が大きい状態にあると考えられる。現場で優占するナノプランクトンの細胞直径は、ほとんど 5 μm 以下であるため、実際の海洋ではナノプランクトンの多くが分子による拡散の影響が大きい状態にあると考えられる。本研究のペクレ数は、光制限下で 0.206-0.377、光飽和下で 0.277-0.560 であったことから、光飽和下の方がより拡散制限から回避しやすい状態にあり、特に明期の中央期には最も速く運動し、拡散制限からも回避しやすい状態となるため、栄養塩を効率よく取り込むことができると考えられる。植物プランクトンの硝酸塩の取り込みは光が強いほど速くなることが報告されており^{112,113}、このことは本研究の結果を支持している。本研究において、ペクレ数が最大となったのはいずれも明期であり、光制限下では 1.6-1.7 倍、光飽和下では 2.0 倍一日の中でペクレ数が変化していたが、明期の間に暗期と比べて

1.6-2.0 倍程度ペクレ数を変化させることで、栄養塩の取り込みが必要となる明期に栄養塩を効率よく取り込み、栄養塩吸収効率を高め、光合成を行うのに有利にしていると考えられる。

植物プランクトンが運動することで海水を牽引する力は、細胞直径および運動速度より求めることができ³⁶、細胞直径が $5\ \mu\text{m}$ の細胞が $50\ \mu\text{m s}^{-1}$ で運動するときに必要なエネルギーは $1.3 \times 10^{-16}\ \text{W cell}^{-1}$ となる¹¹⁴。また、細胞を維持する（呼吸）速度が細胞内炭素含量の $-1/4$ 乗に比例すると仮定し、ADP から ATP を合成する時に必要なエネルギーが $55\ \text{kJ mol}^{-1}$ であることを考慮すると、細胞を維持するのに必要なエネルギーは $1.9 \times 10^{-14}\ \text{W cell}^{-1}$ と推定される¹¹⁴。そのため、体を維持することと比べると、体を運動させることは少しのエネルギーで済むと考えられる。また、本研究で得られた運動速度の最小値および最大値は 43.4 および $115\ \mu\text{m s}^{-1}$ であり、このときの運動に必要なエネルギーは、それぞれ $9.8 \times 10^{-17}\ \text{W cell}^{-1}$ および $6.3 \times 10^{-16}\ \text{W cell}^{-1}$ となることから¹¹⁴、暗期に運動速度を遅くすることで、約一桁のエネルギー消費を抑えることができると推測される。そのため、光合成が起こらない暗期に、運動に使うエネルギー消費を抑えていると考えられる。光強度が強くなるにつれて運動速度の MCD が増加したことは (Fig. 4.3)、エネルギー消費量の視点からも説明することができる。光強度が強い時に、明期の初期から最大値に近い運動速度を示すのではなく、初期の運動速度は比較的最低運動速度に近い値であった (Fig. 4.1)。速い運動速度を維持することは、一桁分大きいエネルギーを必要とするため¹¹⁴、光合成により炭水化物や脂質などのエネルギー貯蔵物質の蓄積が始まった後（第3章）、運動速度も速くなっているものと考えられる。

以上のことは海水が静止しているかまたは層流であると仮定した時に成り立つものであるが、乱流のときはまた別の条件となる。層流とは一般的に

ある管の中を流れる水が常に管軸と並行に流れる状態のことを指し、乱流とは層流の反対の状態のことを指す。乱流の時のペクレ数は次式により示すことができる⁹⁶;

$$Pe_{turbulence} \equiv \frac{r^2}{D} \left(\frac{\varepsilon}{\nu} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.4)。$$

この時、 r は細胞の半径 (m)、 D は拡散係数 ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)、 ε はエネルギー消散速度 ($\text{m}^2 \text{s}^{-3}$)、 ν は乱流の時の動粘性 ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) である。エネルギー消散速度および乱流時の動粘性に外洋域での最大値を代入すると⁴⁸、ペクレ数は細胞直径が $5 \mu\text{m}$ の時は 0.063 となり、植物プランクトンの運動速度に関係なくサイズに依存した値となる。そのため、乱流の時はサイズが大きい細胞の方が栄養塩の獲得には有利となる^{95,96}。

細胞直径が $5 \mu\text{m}$ 程度の鞭毛を有する植物プランクトンの運動特性および生化学特性の変化を総合的に示した例はこれまでにない。本研究において、*I. galbana* が一日の中で効率よく栄養塩を獲得する戦略を持ち、さらに有光層底部の光強度が光合成を制限するような環境下においても運動特性を変化させて拡散制限から回避していることが示唆された。以上のことより、栄養塩濃度の少ない外洋域において、直径 $5 \mu\text{m}$ 程度の鞭毛植物プランクトンが、非常に効率よく環境に適応して生存していることが示唆された。

第5章 総合考察

5.1. はじめに

地球上の一次生産の約半分程度を支えるとされる植物プランクトンの群集構造の変化は海洋食物網に大きく影響を与え、その結果として炭素や窒素等の元素循環も変化しつつある^{6,7}。一次生産者である植物プランクトンの群集構造の解析と共に、植物プランクトンの環境に対する生理学的な応答を総合的に把握することにより、海洋生態系が環境や気候変動にどのように応答しているのか、より正確に推測することができる。

様々な環境に対する生理学的応答の複合的組み合わせが、その生物の生存戦略であるとするならば、その生理学的応答を要求するある特定の生息環境を把握する必要がある。その一つが植物プランクトンの周囲の栄養塩環境である。陸上に生息する生物と水中に生息する生物とでは大きく環境が異なるが、生物が粘性度の高い水中を移動することは空中よりも困難であるため、水中の植物プランクトンの移動も容易ではない。重力的に中立の場合、植物プランクトンの周りの栄養塩は植物プランクトンによって吸収され、植物プランクトンの栄養塩取り込み速度は、栄養塩分子の拡散速度によって制限されることが考えられる³⁶。植物プランクトンの中でも相対的に小型のナノプランクトンにとって、この拡散制限からの回避は生存にとって必要である。植物プランクトンは栄養塩の拡散制限から回避するために、沈降したり、浮揚性を増したり、鞭毛を用いて細胞を運動させたりすることが知られている³⁶。自然海水中には *I. galbana* とほぼ同様なサイズのナノ植物プランクトンが豊富に存在するので、*I. galbana* の拡散制限からの回避に関して得られた結果や解釈は他のナノプランク

トンの生存戦略を議論する上で多くの示唆を与えると考えられる。

本研究では、植物プランクトンの群集構造が、急速に進む気候変動などの環境変化にどのように応答するかについての知見を得るため、第 2 章では炭素生物量推定モデルの妥当性を検証し、それらを用いて環境応答の影響について調べた。第 3 章および第 4 章では、細胞直径が 5 μm 程度の鞭毛を有する植物プランクトン *I. galbana* の拡散制限からの回避について論じた。

5.2. 異なる光強度でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の炭素含量および細胞体積の日周変化

第 2 章では、植物プランクトンの群集組成を把握するために欠かせない細胞炭素量推定モデルを用いて日周変化および光強度の影響について調べた。植物プランクトンの炭素含量を現場で測定することは、デトライタスやバクテリアなどと分離して測定することが難しいため、細胞体積から細胞内炭素含量を推定するモデルが頻繁に用いられている^{14,15}。植物プランクトンの細胞体積も細胞内炭素含量も一日の中で変化するが、これまでに炭素含量の推定モデルには日周変化の要因が考慮されていなかった^{15,19}。さらに、有光層の上部と底部で光強度は異なるが、光強度の影響も考慮されていなかった^{15,19}。植物プランクトンの群集組成を正確に把握するためには、炭素生物量をより精度よく推定することが必要となる。したがって第 2 章では、光制限下から強光阻害下までの光強度下において細胞体積と細胞内炭素含量の日周変化を明らかにし、炭素含量推定モデルによる日周変化および光強度の影響を調べた。その結果、光制限下から光飽和下までの光強度では、細胞分裂によって細胞体積および細胞内炭素含量が変化しても、これまでに報告されてきたナノ植物プランクトン群集での

炭素含量推定モデルと同一の直線上に乗るが、強光阻害下では傾きが有意に異なることが示された^{80,83}。このことから、現場で採取した試料からナノ植物プランクトンの生物量を推定する際には、表層の強光阻害が起こる光強度では傾きが異なるため、注意が必要であることが示唆された。しかし、そのような場所ではナノプランクトンのような小型の植物プランクトンの現存量は低いため^{82,108}、水柱積算をもとにした現存量の評価に及ぼす影響は小さいと考えられる。

5.3. 日周サイクル下でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の沈降特性と生存戦略

第3章では、炭素を構成するタンパク質、炭水化物および脂質の炭素化合物の、光制限下および光飽和下での日周変化を明らかにし、細胞内での生化学組成より求めた沈降速度が光強度によって変化することを示した。プリムネシオ藻の *I. galbana* を用いて栄養塩飽和下で温度 25°C、12:12 時間の明暗周期で連続培養を行った。連続培養では、 $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (光制限下) および $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (光飽和下) の各光強度において実験を行い、3 時間ごとに 72 時間、細胞内生化学含量の日周変化を調べた。

全ての光強度下において、全ての細胞内生化学含量は明期に増加し、暗期に減少する日周性を示した。そして *I. galbana* の生化学組成より沈降速度を推定したとき、推定した沈降速度は光制限下の方が明期の初期と暗期の終盤において、わずかに低い値を示した。また、栄養塩取り込み効率の指標となる S/V 比は明期の初期に最大となることから、明期の初期に沈み難くなり、栄養塩を効率よく取り込むことができると考えられる。沈降速度の日周変化には、全て

の光強度下で細胞直径の日周変化の影響を受けていることが示された。光制限下となる有光層底部では海水の密度が大きくなるため、実際よりもさらに沈降速度が低下すると考えられることから、鞭毛を持つ植物プランクトンでも、光制限下で細胞の比重と海水の密度の差を小さくすることにより浮揚性を増し、有光層に留まりやすくしていることが示唆された。有光層底部は表層よりも栄養塩濃度が高いため¹⁰⁸、光制限下において明期の初期に栄養塩取り込み効率を高め、沈み難くすることはナノプランクトンにとって有利である。有光層内に留まることは、より光の強い表層に運ばれる機会も増えるため、生存には有利であると考えられる。*I. galbana* の生態学的特性が、外洋域に優占する相対的に小型なナノ植物プランクトン群集と同様であるならば、本研究で得られた結果は、他のナノプランクトンにも適用できると考えられる。したがって、ナノプランクトンは光環境に合わせて沈降速度を変化させることにより、光環境に適応していると考えられる。

5.4. 日周サイクル下でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の運動特性と生存戦略

第4章では、ナノプランクトン *I. galbana* の運動特性の日周変化を光制限下および光飽和下において明らかにした。プリムネシオ藻の *I. galbana* を用いて栄養塩飽和下で温度 25°C、12:12 時間の明暗周期でバッチ培養を行った。光強度は 70、140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （ともに光制限下）、550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ （光飽和下）で実験を行い、6 時間ごとに 48 時間、運動速度および相対運動速度の日周変化を調べた。

明期開始後 6 時間に運動速度および相対運動速度が最大となったことか

ら、*I. galbana* は一日の中で運動速度を変化させることにより、栄養塩の取り込みが必要となる明期に効率よく拡散制限から回避し、栄養塩を取り込んでいることが考えられる。*I. galbana* の運動速度が光強度とともに変化し、光強度が強い方が、光制限下と比べて有意に運動速度が速くなることが分かった。さらに、硝酸塩の拡散速度よりも *I. galbana* の運動速度の方が速いことから、光強度が強くなると、細胞がより速く運動することにより、より多くの栄養塩を獲得する機会を増やしていると考えられる。

5.5. 日周サイクル下でのナノプランクトン *Isochrysis galbana* の拡散制限からの回避と生存戦略

I. galbana の細胞特性の日周変化をまとめると、明期の初期に S/V 比が最大、沈降速度が最小となり、明期の中央期に運動速度および相対運動速度が最大となる。植物プランクトンの栄養塩取り込み速度は光が強い方が速くなり、明期に最大となることから^{112,113}、*I. galbana* は一日の中で細胞の状態を変化させることにより、栄養塩の取り込みが必要となる明期に運動特性を高めて拡散制限から回避し、栄養塩の吸収効率を上げていると考えられる。拡散制限からの回避の指標として用いられるペクレ数は、細胞の運動や沈降に起因する海水の対流と分子の拡散の比であるが、本研究において求めた沈降速度のペクレ数は平均で 0.015 と非常に小さく、光制限下においては明確な日周変化も見られなかった。一方運動速度から求めたペクレ数は 0.206-0.560 となり、各光強度で明期開始後 6 時間で最大、暗期開始後 6 時間で最小となる日周変化を示した。また、運動速度から求めたペクレ数は、一日の中で光制限下では 1.6 倍、光飽和下では 2.0 倍変化していた。植物プランクトンの栄養塩取り込み速度は光が強いほど速

くなることが報告されており、このことは本研究の結果を支持している^{112,113}。このことから、*I. galbana* は、拡散制限から回避するために沈降するというよりも、重力的に中立に近づけることでより有光層内にとどまりやすくし、運動することで拡散制限から回避していると考えられる。沈降速度からもとめたペクレ数は、細胞内の炭水化物の水分を考慮したときに細胞の比重が最大で 9.5%程度高くなることが予測され、そのため沈降速度からもとめたペクレ数も最大で 130%程度増加することが考えられるが、そのような増加が実際にあったとしても、沈降速度からもとめたペクレ数は最大で 0.013 となり、運動速度からもとめたペクレ数よりも非常に小さいため、運動することで拡散制限から回避しているとの考察には影響しないものと考えられる。一般的に有光層上部は光は強いが栄養塩濃度は低く、底部ではその反対に光は弱く栄養塩濃度は高いが¹⁰⁸、小型植物プランクトンは有光層底部に現存量が最大となることが知られている⁸²。光の強い有光層上部では、運動速度を速くすることで効率よく栄養塩を獲得することができると考えられる。有光層底部では栄養塩濃度は比較的高いため、運動速度は光飽和下よりも遅いが、栄養塩は獲得しやすい環境下にあると考えられる。このように、ナノプランクトンは光や栄養塩の環境に合わせて運動速度や沈降速度、S/V 比を変化させて適応していると考えられる。

一般的に小さな細胞ほど S/V 比が小さく沈降速度も小さいため、本研究で得られた結果は直径 5 μm 以下のナノプランクトン群集においても同様のことが起こっていると考えられる。

5.6. 気候変動にともなう植物プランクトンの群集組成の変化と生存戦略

植物プランクトンのサイズとその生存戦略について論じた Grime

(1979)¹¹⁵によると、植物プランクトンは数種類の戦略パターンに分類される。そのうち C 戦略の植物プランクトンは、細胞体積は $0.1-100\ \mu\text{m}^3$ 、ほとんどが単細胞で、成長速度が速く（温度 20°C の成長速度は約 $0.9\ \text{d}^{-1}$ より速い）、全世界に分布しているという特徴がある⁴⁸。C 戦略の植物プランクトンは、光合成可能な最低限の弱光下でも存在し、沈降速度は一般的に遅く、その多くは運動性があるが動物プランクトンに摂餌されやすい⁴⁸。C 戦略の植物プランクトンよりも大きい植物プランクトンに、S (stress-tolerators) 戦略を持つものがある。S 戦略の植物プランクトンは資源獲得型で、資源に制限されやすく、細胞体積は $10^4-10^7\ \mu\text{m}^3$ 、単細胞もいるが、多くが複数の細胞が集まり、群体を形成している。温度 20°C の成長速度は約 $0.7\ \text{d}^{-1}$ より小さく、C 戦略の植物プランクトンと比較すると成長速度は遅い。多くが運動性を持ち、シアノバクテリアなど、鞭毛がなくてもガスを体内に蓄えることにより鉛直的に移動することができる種もある⁹²。また、C 戦略の植物プランクトンよりもさらに小さい植物プランクトンは SS (subcategory of stress-tolerators) 戦略であるとされ、長期にわたるストレス（栄養塩枯渇下など）に耐性があり、細胞体積は $4\ \mu\text{m}^3$ 以下で、全て単細胞で、成長速度は非常に速く（温度 20°C の成長速度は約 $1.8\ \text{d}^{-1}$ より速い）、全世界に分布している⁴⁸。このような植物プランクトンはピコプランクトンと呼ばれ、栄養塩の希薄な熱帯海域で優占し、外洋域や貧栄養の湖でも生息している^{13,33,48}。SS 戦略の植物プランクトンは運動性がないうえに、沈降速度が非常に遅く、ろ過食の動物プランクトンに対しては無防備である⁴⁸。本研究で用いた植物プランクトン *I. galbana* の細胞直径は約 $5\ \mu\text{m}$ 程度で、細胞体積は約 $80\ \mu\text{m}^3$ 程度であるため（第 2 章）、上記の分類によれば C 戦略者である。運動性を有することが特徴であり、それを利用して資源獲得のために他種との競争に晒されながら生存を図っていると考えられる。ナノプランクトンはほぼ同じ形態、同じ運動性を有するので、

同じ機能を持った集団と考えることができる。本研究で得られた一種での結果を、ナノプランクトン群集全体に応用して考えた時、ナノプランクトンはほとんどが C 戦略者に該当すると考えられる。

急速に進行する気候変動により、植物プランクトンの群集構造が変化することが予測されている¹¹⁶。海水温の上昇に伴い海洋の成層化が進み、貧栄養な海域が広がることで、より小型な植物プランクトンが優占する可能性が高い^{116,117}。そして真核植物プランクトン、動物プランクトン、魚類以外の海洋脊椎動物、魚類の現存量もここ数十年で変化してきている¹¹⁸⁻¹²⁴。本研究により、C 戦略者であるナノプランクトン *I. galbana* が光制限下で炭水化物含量や脂質含量を増加させ、細胞にエネルギーを貯蔵しながら浮揚性を増し、光飽和下では運動能力を高めることで拡散制限から回避するという生存戦略を持つことが示唆された（第 3 章、第 4 章）。気候変動により本種のような運動性や浮揚性を調節するような生存戦略を持つナノプランクトンが増加することが予測されるが、同じ C 戦略の種でも、好適温度や運動性、生化学組成の変化など、進む成層化や海水温の上昇に対してどのように応答を示すのかは、不明瞭な点が多い。植物プランクトンの群集構造や海洋食物網の変化を予測するためには、今後、現場観測に加えてさらに実験室でのデータの蓄積が必要である。

謝辞

石巻専修大学大学院理工学研究科教授の佐々木洋博士には、快く受け入れてくださり、暖かくご指導をして頂き、大変貴重なご意見、ご指摘を戴きましたことを心から深く感謝申し上げます。

石巻専修大学大学院理工学研究科教授の太田尚志博士、依田清胤博士には、本研究の議論を深める上で、大変貴重なご意見、ご指摘を戴きましたことを、心から感謝致します。さらに石巻専修大学担当教員の皆様には、大変多くのご意見を賜り、深く感謝致します。また、本研究において、創価大学大学院生物工学専攻教授、田口哲博士には、長年に渡って粘り強く支えて頂き、厳しくも暖かいご指導をして頂いたことに心から深く感謝申し上げます。

筑波大学の大井信明博士、National University of Singapore の Sandric Chee Yew Leong 博士、創価大学教育学部の Victor Shinichi Kuwahara 博士、東京大学海洋研究助出身の柴田晃博士には多大なご指導、ご指摘を頂きましたことを、心から深く感謝致します。創価大学工学部生物海洋学研究室出身の小幡光子博士、前田美華子さん、溝渕明美さん、牛来貴子さんをはじめ、後輩方には多大なる本研究の手伝い、助言を頂いた他、日々の生活においても激励して頂き、大変お世話になり、心から感謝致します。さらに、西海区水産研究所の山田勝雅博士、国立極地研究所の高橋邦夫博士、特定非営利活動法人 APEX の尾上保子博士、大阪大学の宿里ひとみ博士、創価大学出身の高橋亜紀さんには多岐に渡る助言を頂いた他、日々の生活においても激励して頂き、大変お世話になり、心から感謝致します。創価大学出身の渡辺英子さんには、多くの文献を複写、郵送して下さい、大変お世話になり、心から感謝致します。

フランス Villefranche 海洋研究所 Fereidoun Rassoulzadegan 博士には、論文

に対して親切な助言をしてくださり、大変お世話になり、心から感謝致します。

フランス Villefranche 海洋研究所所長の Louis Legendre 博士には研究を進めていくに際し、ご指摘を頂くなど大変お世話になり、心から感謝致します。創価大学工学部教授の青山由利博士、弘前大学博士研究員の多田羅洋太博士には、実験器具を快く貸して頂き、助言も頂きましたことを心から感謝致します。

横浜国立大学教授の菊池知彦博士には、海水採取にあたり、研究船「たちばな」を出してくださり、大変感謝致します。アメリカ Woods Hole 海洋研究所の Michele D. DuRand 博士には、細胞体積と細胞内炭素含量の実験結果を快く教えて頂きましたことを、感謝致します。

最後に、常に激励し、温かく見守ってくださった創価大学創立者池田大作先生と、常に暖かく見守り激励し、子どもの面倒をみてくれた両親と実家の家族、そして理解し、子育てに協力し、いつも支えてくれた夫の日本原子力開発機構副主幹研究員の石川正男博士、子どもたち石川恵美理、美希に心から深く感謝致します。本当にありがとうございました。

本研究は、一部、日本科学協会笹川科学財団による研究助成を受けています。

引用文献

1. Falkowski, P. G. and Raven, J. A. 2007. Aquatic photosynthesis. Princeton University Press, Princeton.
2. Meehl, G. A., Stocker, T. E., Collins, W. D. et al. 2007. Global climate projections. In: Solomon, S., Quin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. et al. (eds.), Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
3. Sarmiento, J., Slater, R. D., Barber, R. et al. 2004. Response of ocean ecosystems to climate warming. *Global Biochem. Cycles*, 18: 1-23.
4. Irwin, A. J. and Finkel, Z. V. 2008. Mining a sea of data: determining controls of ocean chlorophyll. *PLOS One*, 3, e3836, doi: 3810.1371/Journal.pone.0003836.
5. Raven, J. A., Caldeira, K., Elderfield, H. et al. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. The Royal Society of London, Policy document 12/05, pp. 60.
6. Beardall, J. and Raven, J. A. 2004. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*, 43: 26-40.
7. Beardall, J. and Stojkovic, S. 2006. Microalgae under global environmental change: Implications for growth and productivity, populations and trophic flow. *ScienceAsia*, 32: 26-40.
8. Ryther, J. H. and Dunstan, W. M. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in

- the coastal marine environment. *Science*, 171: 1008-1013.
9. Fanning, K. A. 1989. Influence of atmospheric pollution on nutrient limitation in the ocean. *Nature*, 339: 460-463.
 10. Smith, V. H., Tilman, D. and Nekola, J. C. 1999. Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial systems. *Environ. Pollut.*, 100: 179-196.
 11. Rabalais, N. N., Turner, R. E., Dortch, Q., et al. 2002. Nutrient-enhanced productivity in the northern Gulf of Mexico: Past, present and future. *Hydrobiologia*, 475: 39-63.
 12. Johnson, P. W. and Sieburth, J. McN. 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.*, 24: 928-935.
 13. Chisholm, S. W., Olson, E. R., Zettler, E. R., Waterbury, J., Goericke, R. and Welschmeyer, N. 1988. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334: 340-343.
 14. Polovina, J. J. and Woodworth, P. A. 2012. Declines in phytoplankton cell size in the subtropical oceans estimated from satellite remotely-sensed temperature and chlorophyll, 1998-2007. *Deep-Sea Res. II*, 77-80: 82-88.
 15. Lin, S., Huang, L., Zhu, Z. and Jia, X. 2013. Changes in size and trophic structure of the nanoflagellate assemblage in response to a spring phytoplankton bloom in the central Yellow Sea. *Deep-Sea Res. II*, 97: 93-100.
 16. Falkowski, P. G., Dubinsky, Z. and Wyman, K. 1985. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 30: 311-321.

17. Herzig, R. and Falkowski, P. G. 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. J. Phycol., 25: 462-471.
18. Mullin, M. M., Sloan, P. R. and Eppley, R. W. 1966. Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 11: 307-311.
19. Menden-Deuer, S. and Lessard, E. J. 2000. Carbon to volume relationship for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. Limnol. Oceanogr., 45: 569-579.
20. Lomas, M. W., Moran, S. B., Casey, J. R., Bell, D. W., Tiahlo, M., Whitefield, J., Kelly, R. P., Mathis, J. T. and Cokelet, E. D. 2012. Spatial and seasonal variability of primary production on the Eastern Bering Sea shelf. Deep-Sea Res. II, 65-70: 126-140.
21. Casey, J. R., Aucion, J. P., Goldberg, S. R. and Lomas, M. W. 2013. Changes in partitioning of carbon amongst photosynthetic pico- and nano-plankton groups in the Sargasso Sea in response to changes in the North Atlantic Oscillation. Deep-Sea Res. II, 93: 58-70.
22. Bienfang, P., Szyper, J. and Laws, E. 1983. Sinking rate and pigment responses to light-limitation of a marine diatom: Implications to dynamics of chlorophyll maximum layers. Oceanol. Acta, 6: 55-62.
23. Kamykowski, D., Milligan, E. J. and Reed, R. E. 1998. Biochemical relationships with the orientation of the autotrophic dinoflagellate *Gymnodinium breve* under nutrient replete conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser., 167: 105-117.
24. Lacour, T., Sciandra, A., Talec, A. and Mayzaud, P. 2012. Diel variations of

- carbohydrates and neutral lipids in nitrogen-sufficient and nitrogen-starved cyclostat cultures of *Isochrysis* sp. J. Phycol., 48: 966-975.
25. Finkel, Z. V. and Irwin, A. J. 2000. Modeling size-dependent photosynthesis: Light absorption and the allometric rule. J. Theor. Biol., 204: 361-369.
26. Finkel, Z. V. 2001. Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. Limnol. Oceanogr., 46: 86-94.
27. Eppley, R. W. and Thomas, W. H. 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. J. Phycol., 5: 375-379.
28. Aksnes, D. L. and Egge, J. K. 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser., 70: 65-72.
29. Hein, M., Pedersen, M. F. and Sand-Jensen, K. 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. Mar. Ecol. Prog. Ser., 118: 247-253.
30. Rees, T. A. 2007. Metabolic and ecological constraints imposed by similar rates of ammonium and nitrate uptake per unit surface area at low substrate concentrations in marine phytoplankton and macroalgae. J. Phycol., 43: 197-207.
31. Shuter, B. G. 1978. Size dependence of phosphorus and nitrogen subsistence quotas in unicellular microorganisms. Limnol. Oceanogr., 23: 1248-1255.
32. Grover, J. P. 1991. Resource competition in a variable environment: Phytoplankton growing according to the variable-internal-stores model. Am. Nat., 138: 811-835.
33. Kostadinov, T. S., Siegel, D. A. and Maritorena, S. 2009. Retrieval of the particle size distribution from satellite ocean color observations. J. Geophys. Res., 114, C09015, doi:10.1029/2009JC005303, 2009.

34. McMahon, T. A. and Bonner, J. T. 1983. On size and life. Scientific American Library, New York.
35. Smayda, T. J. 1970. The suspension and sinking of phytoplankton in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 8: 353-414.
36. Mann, K. H. and Lazier, J. R. N. 1996. Dynamics of marine ecosystems. Blackwell Science, Oxford, pp. 9-41.
37. Munk, W. and Riley, G. A. 1952. Absorption of nutrients by aquatic plants. *J. Mar. Res.*, 11: 215-240.
38. Berg, H. C. and Purcell, E. M. 1977. Physics of chemoreception. *Biophys. J.*, 20: 193-215.
39. Sommer, U. 1988. Some size relationships in phytoplankton motility. *Hydrobiologia*, 161: 125-131.
40. Richardson, T. L. and Cullen, J. J. 1995. Changes in buoyancy and chemical composition during growth of a coastal marine diatom: Ecological and biogeochemical consequences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 128: 77-90.
41. Smetacek, V. S. 1985. Role of sinking in diatom life-history cycles: Ecological evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.*, 84: 239-251.
42. 石川 輝. 2008. シスト形成渦鞭毛藻の生態戦略. 「海洋プランクトン生態学. 佐々木洋, 石川輝, 太田尚志, 服部寛, 齋藤宏明, 遠藤宣成 (編)」, 成山堂書店, pp.15-34.
43. Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 25: 294-306.
44. Kamykowski, D., Reed, R. E. and Kirkpatrick, G. J. 1992. Comparison of sinking

- velocity, swimming velocity, rotation and path characteristics among six marine dinoflagellate species. *Mar. Biol.*, 113: 319-328.
45. Solari, C. A., Drescher, K., Ganguly, S., Kessler, J. O., Michod, R. E. and Goldstein, R. E. 2011. Flagellar phenotypic plasticity in volvocalean algae correlates with Péclet number. *J. R. Soc. Interface*, 8: 1409-1417.
46. Bauerfeind, E., Elbrächter, M., Steiner, R. and Throndsen, J. 1986. Application of Laser Doppler Spectroscopy (LDS) in determining swimming velocities of motile phytoplankton. *Mar. Biol.*, 93: 323-327.
47. 谷口 旭. 2008. 海洋生態系におけるプランクトンの重要性と研究の歴史概観. 「海洋プランクトン生態学. 佐々木洋, 石川輝, 太田尚志, 服部寛, 齋藤宏明, 遠藤宣成 (編)」, 成山堂書店, pp.1-14.
48. Reynolds, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge.
49. 佐々木 洋. 2008. 生物ポンプを制御する植物プランクトン群集. 「海洋プランクトン生態学. 佐々木洋, 石川輝, 太田尚志, 服部寛, 齋藤宏明, 遠藤宣成 (編)」, 成山堂書店, pp.264-279.
50. 齋藤 宏明. 2008. 植物プランクトンによる栄養塩取り込み特性. 「海洋プランクトン生態学. 佐々木洋, 石川輝, 太田尚志, 服部寛, 齋藤宏明, 遠藤宣成 (編)」, 成山堂書店, pp.280-295.
51. Nelson, D. M. and Brand, L. E. 1979. Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light: dark cycle. *J. Phycol.*, 15: 67-75.
52. Ohi, N., Ishiwata, Y. and Taguchi, S. 2002. Diel patterns in light absorption and

- absorption efficiency factors of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). J. Phycol., 38: 730-737.
53. Strathmann, R. R. 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. Limnol. Oceanogr., 12: 411-418.
 54. Ishizaka, J., Harada, K., Ishikawa, K., Kiyosawa, H., Furusawa, H., Watanabe, Y., Ishida, H., Suzuki, K., Handa N. and Takahashi, M. 1997. Size and taxonomic plankton community structure and carbon flow at the equator, 175°E during 1990-1994. Deep-Sea Res. II, 44: 1927-1949.
 55. Shalapyonok, A., Olson, R. J. and Shalapyonok, L. S. 2001. Arabian Sea phytoplankton during Southwest and Northeast Monsoons 1995: Composition, size structure and biomass from individual cell properties measured by flow cytometry. Deep-Sea Res. II, 48: 1231-1261.
 56. Cermeño, P., Marañón, E., Rodríguez, J. and Fernández, E. 2005. Large-sized phytoplankton sustain higher carbon-specific photosynthesis than smaller cells in a coastal eutrophic ecosystem. Mar. Ecol. Prog. Ser., 297: 51-60.
 57. Malone, T. C. 1980. Algal size. In: Morris, I. (ed.), The physiological ecology of phytoplankton. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, pp. 433-463.
 58. Verity, P. G., Robertson, C. Y. Tronzo, C. R., Andrews, M. G., Nelson, J. R. and Sieracki M. E. 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. Limnol. Oceanogr., 37: 1434-1446.
 59. Montagnes, D. J. S., Berges, J. A., Harrison, P. J. and Taylor, F. J. R. 1994. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll *a* from volume in marine

- phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1044-1060.
60. Kohata, K. and Watanabe, M. 1989. Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae). *J. Phycol.*, 25: 377-385.
61. Varela, D. E. and Harrison, P. J. 1999. Effect of ammonium on nitrate utilization by *Emiliania huxleyi*, a coccolithophore from the oceanic northeastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 186: 67-74.
62. DuRand, M. D. and Olson, R. J. 1998. Diel patterns in optical properties of the chlorophyte *Nannochloris* sp.: Relating individual-cell to bulk measurements. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 1107-1118.
63. Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8: 229-239.
64. Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U. and Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, 35: 403-424.
65. Nagao, N., Toda, T., Takahashi, K., Hamasaki, K., Kikuchi, T. and Taguchi, S. 2001. High ash content in net-plankton samples from shallow coastal water: Possible source of error in dry weight measurement of zooplankton biomass. *J. Oceanogr.*, 57: 105-107.
66. Kieding, N., Rudolph, N. and Møller, U. 1984. Diurnal variation in influx and transition intensities in the S phase of hamster cheek pouch epithelium cells. In: Edmunds, L. Jr. (ed.), *Cell cycle clocks*. Marcel Dekker, New York, pp. 135-159.

67. Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1995. Biometry. Freeman, New York.
68. Snedecor, G. W. and Cochran, W. G. 1989. Statistical methods, 6th edition. Iowa State University Press, Iowa.
69. DuRand, M. D., Green, R. E., Sosik, H. M. and Olson, R. J. 2002. Diel variations in optical properties of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae). J. Phycol., 38: 1132-1142.
70. Chisholm, S. W. and Costello, J. C. 1980. Influence of environmental factors and population composition on the timing of cell division in *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) grown on light/dark cycles. J. Phycol., 16: 375-383.
71. Berges, J. A., Cochlan, W. P. and Harrison, P. J. 1995. Laboratory and field responses of algal nitrate reductase to diel periodicity in irradiance, nitrate exhaustion, and the presence of ammonium. Mar. Ecol. Prog. Ser., 124: 259-269.
72. Needoba, J. A. and Harrison, P. J. 2004. Influence of low light and a light:dark cycle on NO_3^- uptake, intracellular NO_3^- , and nitrogen isotope fractionation by marine phytoplankton. J. Phycol., 40: 505-516.
73. Thompson, P. A., Harrison, P. J. and Parslow, J. S. 1991. Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. J. Phycol., 27: 351-360.
74. Eppley, R. W. and Coatsworth, J. L. 1966. Culture of the marine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta*, with light-dark cycles. Microbiol., 55: 66-80.
75. Kohata, K. and Watanabe, M. 1986. Synchronous division and the pattern of diel vertical migration of *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada (Raphidophyceae) in a

- laboratory culture tank. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 100: 209-224.
76. Berdalet, E., Latasa, M. and Estrada, M. 1992. Variations in biochemical parameters of *Heterocapsa* sp. and *Olithodiscus luteus* grown in 12:12 light:dark cycles. Hydrobiologia, 238: 139-147.
77. Ohi, N., Shino, M., Ishiwata, Y. and Taguchi, S. 2003. Light absorption of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) under day-night cycle at high-light irradiance. Plankton. Biol. Ecol., 50: 1-9.
78. Szyper, J. P., Rosenfeld, J. Z., Piedrahita, P. H. and Giovanni, P. 1992. Diel cycles of planktonic respiration rates in briefly incubated water samples from a fertile earthen pond. Limnol. Oceanogr., 37: 1193-1201.
79. Vincent, W. F., Neale, P. J. and Richerson, P. J. 1984. Photoinhibition: Algal responses to bright light during diel stratification and mixing in a tropical alpine lake. J. Phycol., 20: 201-211.
80. Ishiwata, Y., Ohi, N., Obata, M. and Taguchi, S. 2006. Diurnal variation in xanthophyll cycle and carbon contents of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) under differing irradiance. Verh. Internat. Verein. Limnol., 29: 1311-1315.
81. ISCCP data; <http://www-ocean.lbl.gov/seawifs.html>
82. Fennel, K. and Boss, E. 2003. Subsurface maxima of phytoplankton and chlorophyll: Steady-state solutions from a simple model. Limnol. Oceanogr., 48: 1521-1534.
83. Ishiwata, Y., Ohi, N., Obata, M. and Taguchi, S. 2013. Carbon to volume relationship of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) during cell divisions.

Plankton Benthos Res., 8: 1-8.

84. Harrison, P. J., Thompson, P. A. and Calderwood, G. S. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Appl. Phycol.*, 2: 45-56.
85. Renaud, S. M., Parry, D. L., Thinh, L. -V., Kuo, C., Padovan, A. and Sammy, N. 1991. Effect of light intensity on proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 3: 43-53.
86. Brown, M. R., Dunstan, G. A., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Barrett, S. M. and LeRoi, J-M. 1993. The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis* sp. (clone T-ISO). *J. Phycol.*, 29: 601-612.
87. Myers, J. 1980. On the algae: Thoughts about physiology and measurements of efficiency. In: Falkowski, P. G. (ed.), *Primary productivity in the sea*. Plenum Press, New York, pp. 1-16.
88. Sukenik, A. and Wahnou, R. 1991. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97: 61-72.
89. Okubo, A. 1987. Fantastic voyage into the deep: Marine biofluid mechanics. In: Teramoto, E. and Yamaguti, M. (eds.), *Mathematical topics in population biology, Morphogenesis and neurosciences*. Springer-Verlag, New York, pp. 32-47.
90. Gross, F. and Zeuthen, E. 1948. The buoyancy of plankton diatoms: A problem of cell physiology. *Proc. R. Soc. Lond. (Ser. B)*, 135: 382-389.

91. Bekl'mishev, K. B., Petrikova, M. N. and Semina, G. I. 1961. On the cause of buoyancy of plankton diatoms. Tr. Inst. Okeanol. Akad. Nauk. SSSR, 51: 33-36.
92. Reynolds, C. S., Oliver, R. L. and Walsby, A. E. 1987. Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. New Zeal. J. Mar. Fresh. Res., 21: 379-399.
93. Oliver, R. L. 1994. Floating and sinking in gas-vacuolate cyanobacteria. J. Phycol., 30:161-173.
94. Kahn, N. and Swift, E. 1978. Positive buoyancy through ionic control in the nonmotile marine dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* Murray ex Schuett. Limnol. Oceanogr., 23: 649-658.
95. Kiørbo, T. 1993. Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. Adv. Mar. Biol., 1-72.
96. Karp-Boss, L., Boss, E. and Jumars, P. A. 1996. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. Oceanogr. Mar. Biol.: Ann. Rev., 34: 71-107.
97. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
98. Dubois, M., Gillies, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.
99. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911-917.

100. Kochert, G. 1978. Quantitation of the macromolecular components of microalgae.
In: Hellebust, J. A. and Craigie, J. S. (eds.), Handbook of phycological methods: Physiological and biochemical methods. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 189-195.
101. Ricketts, T. R. 1966. On the chemical composition of some unicellular algae. *Phytochem.*, 5: 67-76.
102. Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J. and Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
103. Zhu, C. J., Lee, Y. K. and Chao, T. M. 1997. Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK 1. *J. Appl. Phycol.*, 9: 451-457.
104. Molina-Grima, E., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J. A. and García-Sánchez, J. L. 1994. Biochemical productivity and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* Parke and *Tetraselmis* sp. as a function of incident light intensity. *Process Biochem.* 29: 119-126.
105. Picardo, M., Medeiros, J. L., Araújo, O. Q. F. and Chaloub, R. M. 2013. Effects of CO₂ enrichment and nutrients supply intermittency on batch cultures of *Isochrysis galbana*. *Biores. Technol.*, 143: 242-250.
106. Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E., Robert, R. and Cadoret, J. P. 2013. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *J.*

- Appl. Phycol., 25: 109-119.
107. Bienfant, P. K. 1980. Phytoplankton sinking rates in oligotrophic waters off Hawaii. Mar. Biol., 61: 69-77.
108. Litchman, E. 2007. Resource competition and the ecological success of phytoplankton. In: Falkowski, P. G. and Knoll, A. H. (eds.), Evolution of primary producers in the sea. Boston, Elsevier, pp. 333-350.
109. Baumann, F. G., Isenberg, H. D. and Gennaro, J. 1978. The inverse relationship between nutrient nitrogen concentration and cocolith calcification in cultures of the cocolithophorid *Hymenomonas* sp. J. Protozool., 25: 253-256.
110. Throndsen, J. 1973. Motility in some marine nanoplankton flagellates. Norw. J. Zool., 21: 193-200.
111. Currie, D. J. 1984. Microscale nutrient patches: Do they matter to the phytoplankton? Limnol. Oceanogr., 29: 211-214.
112. Toetz, D. W. 1976. Diel periodicity in uptake of nitrate and nitrite by reservoir phytoplankton. Hydrobiologia, 49: 49-52.
113. Cochlan, W. P., Harrison, P. J. and Denman, K. L. 1991. Diel periodicity of nitrogen uptake by marine phytoplankton in nitrate-rich environments. Limnol. Oceanogr., 36: 1689-1700.
114. Raven, J. A. 1982. The energetic of freshwater algae; Energy requirements for biosynthesis and volume regulation. New. Phytol. 92: 1-20.
115. Grime, J. P. 1979. Plant strategies and vegetation processes. Chichester: John Wiley.

- 116.Reynolds, C. S., Irish, A. E. and Elliott, J. A. 2001. The ecological basis for simulating phytoplankton responses to environmental change (PROTECH). *Ecol. Model.*, 140: 271-291.
- 117.Finkel, Z. V., Beardall, J. B., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V. and Raven, J. A. 2010. Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *J. Plankton Res.*, 32: 119-137.
- 118.Behrenfeld, M. J., O'Malley, R., Siegel, D., et al. 2006. Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature (London)*, 444: 752-755.
- 119.Irwin, A. J. and Oliver, M. J. 2009. Are ocean deserts getting larger? *Geophys. Res. Lett.*, 36, doi: 10.1029/2009GL039883.
- 120.Barry, J., Baxter, C. H., Sagarin, R. D., et al. 1995. Climate-related, long-term faunal changes in a California rocky intertidal community. *Science*, 267: 672-675.
- 121.Edwards, M. and Richardson, A. J. 2004. The impact of climate change on the phenology of the plankton community and trophic mismatch. *Nature*, 430: 881-884.
- 122.Richardson, A. J. and Schoeman, D. S. 2005. Climate impact on plankton ecosystems in the Northeast Atlantic. *Science*, 305: 1609-1612.
- 123.Field, D. R., Baumgartner, T. R., Charles, C. D., et al. 2006. Planktonic foraminifera of the California Current reflect 20th-century warming. *Science*, 311: 63-66.
- 124.Richardson, A. J. 2008. In hot water: Zooplankton and climate change. *ICES J. Max. Sci.*, 65: 279-295.

Table 2.1. Results of model I least-squares regression of log10-transformed *I. galbana* cell volume ($\mu\text{m}^3 \text{ cell}^{-1}$) and cellular carbon (pgC cell^{-1}) in each irradiances. Presented are the slope and y-intercept of the regression equations and the 95% confidence intervals (CI). All slopes are significantly different from zero ($p < 0.01$).

Irradiance	Intercept	95%CI	Slope	95%CI
45	0.22	± 0.79	0.59	± 0.40
150	-0.0076	± 0.73	0.66	± 0.39
365	-0.57	± 0.46	0.95	± 0.26
500	0.14	± 0.58	0.51	± 0.30
1500	-1.8	± 0.85	1.6	± 0.45

Table 3.1. Comparison between studies in biochemical composition, expressed as $\mu\text{g cell}^{-1}$, protein/carbohydrate (Prot/cbh) and protein/lipid (Prot/lip) ratio of *Isochrysis* sp. in batch culture and several growth conditions. Exp: exponential phase, stat: stationary phase.

Author	Strain	Irradiance ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L/D cycle	Temp (°C)	Stage of the harvest	Composition ($\mu\text{g cell}^{-1}$)			Prot/cbh	Prot/lip
						Protein	Carbohydrate	Lipid		
Fernández-Reiriz et al. (1989) ¹⁰²	<i>I. galbana</i>	60	24/0h	20	exp	9.4	3.5	5.3	2.7	1.8
					early stat	10.2	15.5	10.6	0.7	1.0
Renaud et al. (1991) ⁸⁵	<i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO)	107-140	12/12h	25	late stat	6.3	22.7	17.0	0.3	0.4
					late exp	8.9-10.6	1.3-3.2	7.4-10.5	3.1-7.4	0.8-1.2
Brown et al. (1993) ⁸⁶	<i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO)	50-1500	12/12h	25	late exp	7.2-12.0	2.0-3.9	5.0-8.4	2.6-3.6	1.2-1.5
Molina-Grima et al. (1994) ¹⁰⁴	<i>I. galbana</i> Park	198-1018	24/0h	20	stat					0.2-2.0
Zhu et al. (1997a) ¹⁰³	<i>I. galbana</i> TK1	200		15	exp				1.1	1.7
					stat				0.8	1.2
Picardo et al. (2013) ¹⁰⁵	<i>I. galbana</i>	70	12/12h	25	late exp				0.4	0.8

Table 3.2. Comparison between studies in biochemical composition, expressed as pg cell⁻¹, protein/carbohydrate (Prot/cbh) and protein/lipid (Prot/lip) ratio of *Isochrysis* sp. in turbidostat culture.

Author	Strain	Irradiance ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	L/D cycle	Temp (°C)	Dilution (d ⁻¹)	Protein (pg cell ⁻¹)	Carbohydrate (pg cell ⁻¹)	Lipid	Prot/cbh	Prot/lip
Marchetti et al. (2013) ¹⁰⁶	<i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO)	100	24/0h	25	0.2	2.9	6.6	5.8	0.44	0.50
		100	24/0h	25	0.7	3.2	5.2	6.7	0.62	0.48
Present study	<i>I. galbana</i> Park	45	12/12h	25	0.3	6.8	13.9	9.5	0.49	0.72
		425	12/12h	25	0.3	8.6	10.7	6.2	0.80	1.4

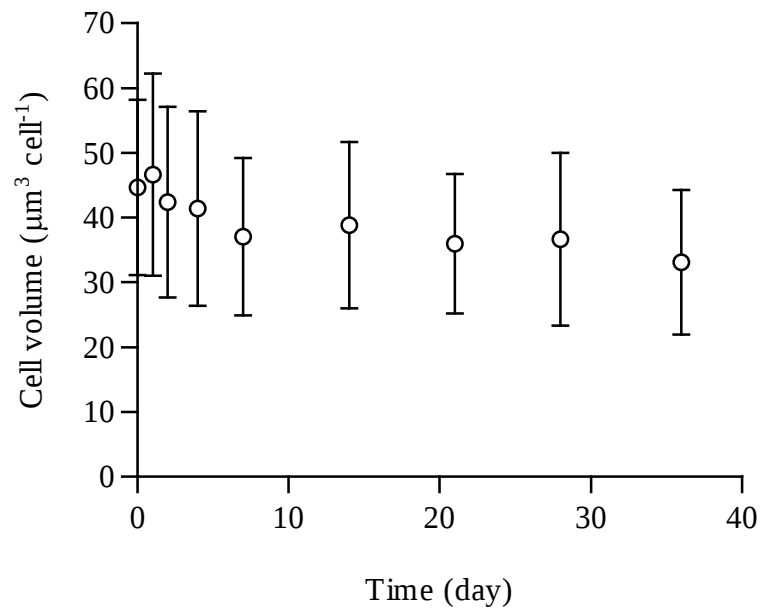


Fig. 2.1. Change in cell volume over time of phytoplankton fixed with 4% formaldehyde.

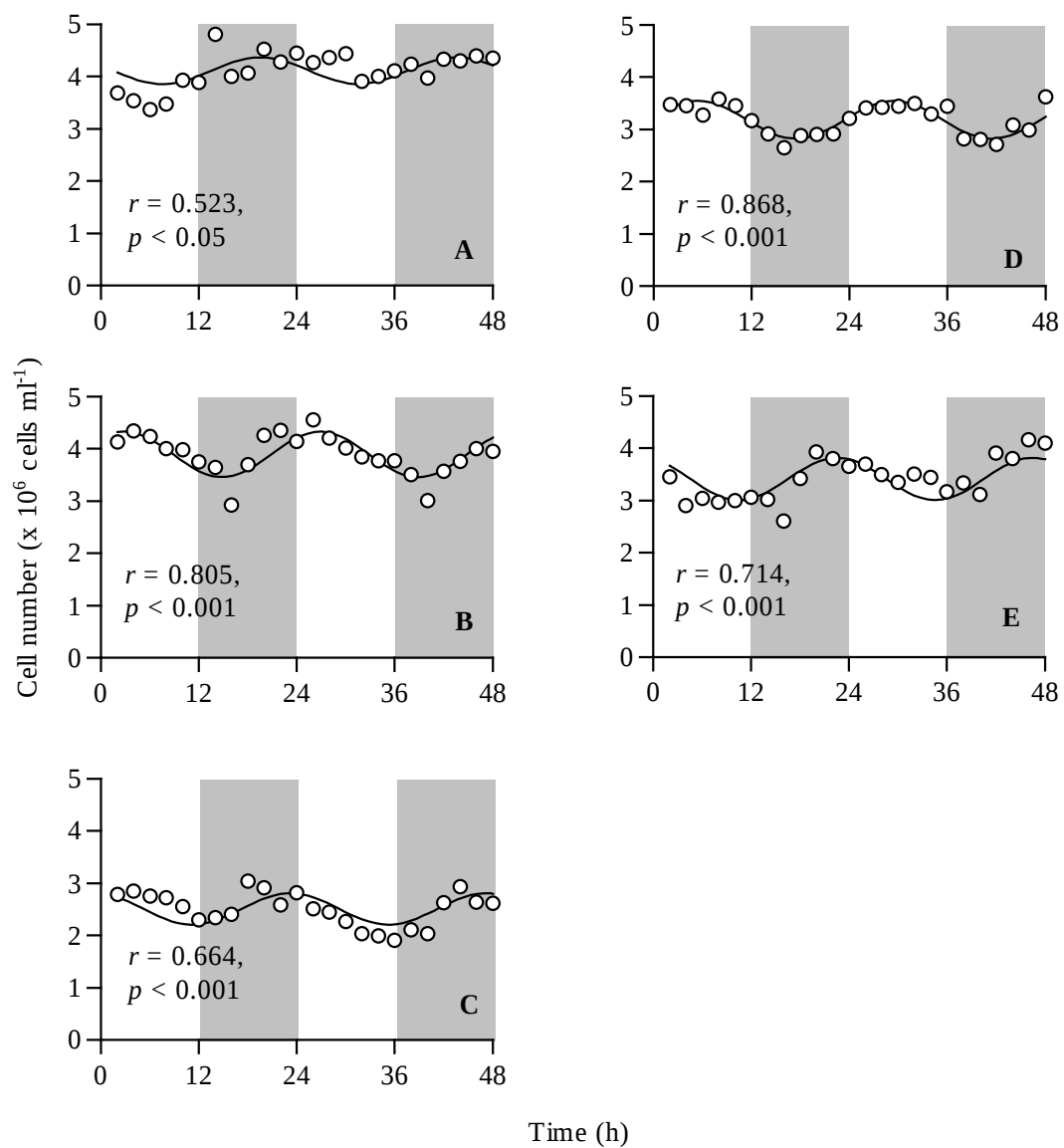


Fig. 2.2. Diel variation in cell number of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A), 150 (B), 365 (C), 500 (D), and 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E). Shaded areas denote dark period.

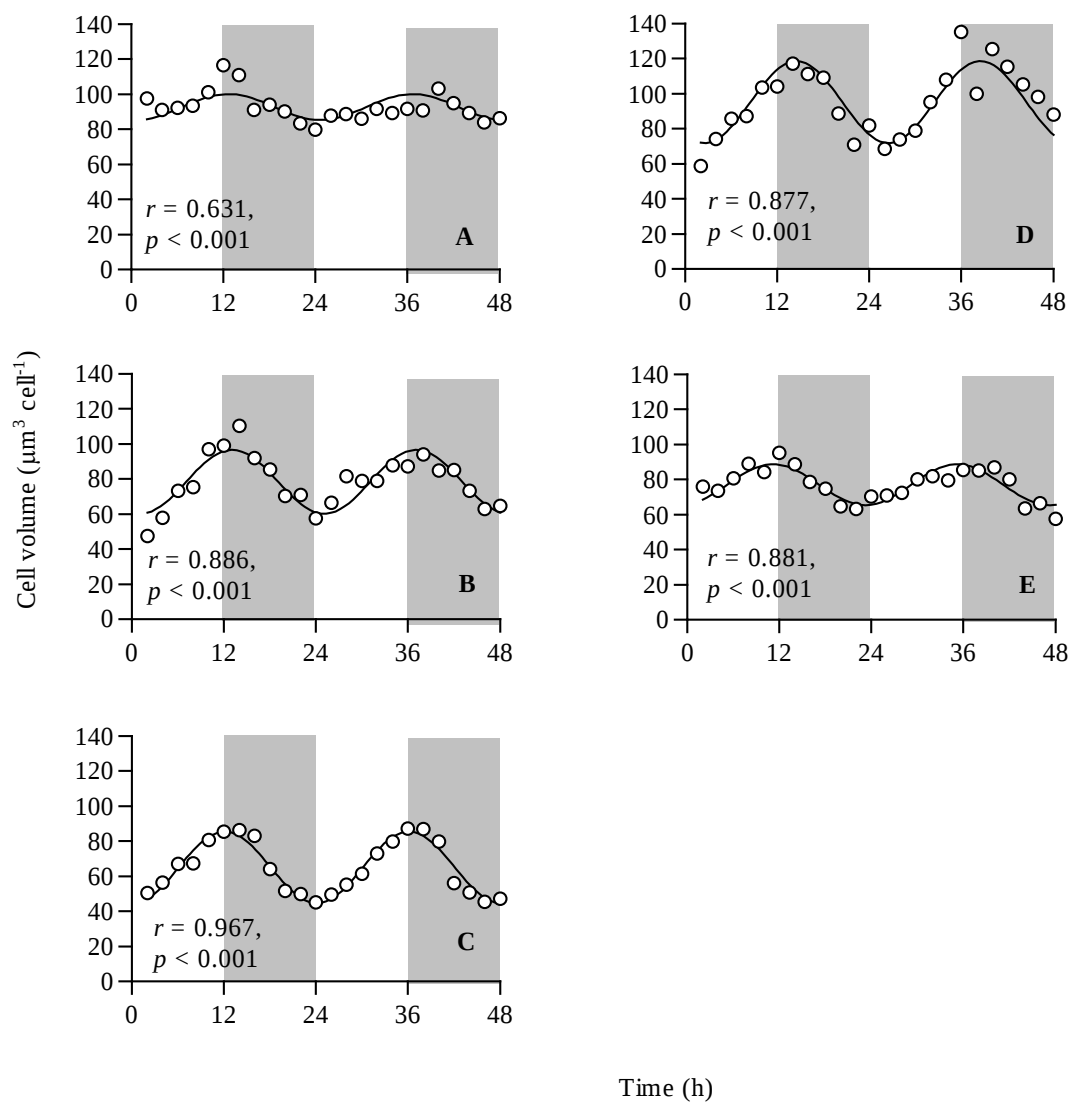


Fig. 2.3. Diel variation in cell volume of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiances of 45 (A), 150 (B), 365 (C), 500 (D), and 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (E). Shaded areas denote dark period.

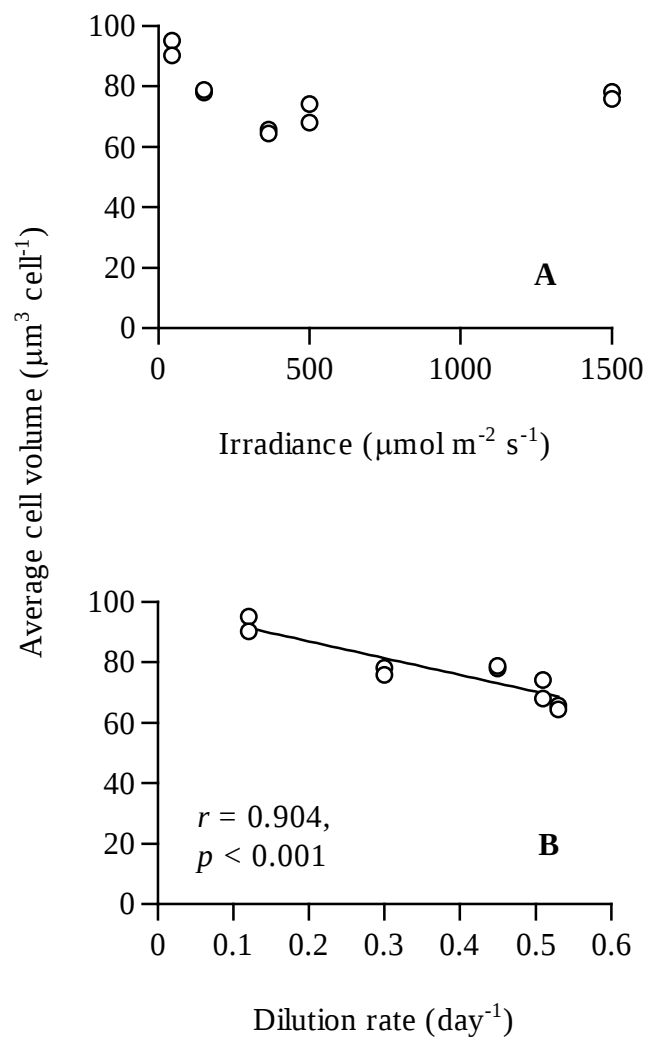


Fig. 2.4. Relationship between average cell volume and irradiance (A) and dilution rate (B) of *I. galbana*.

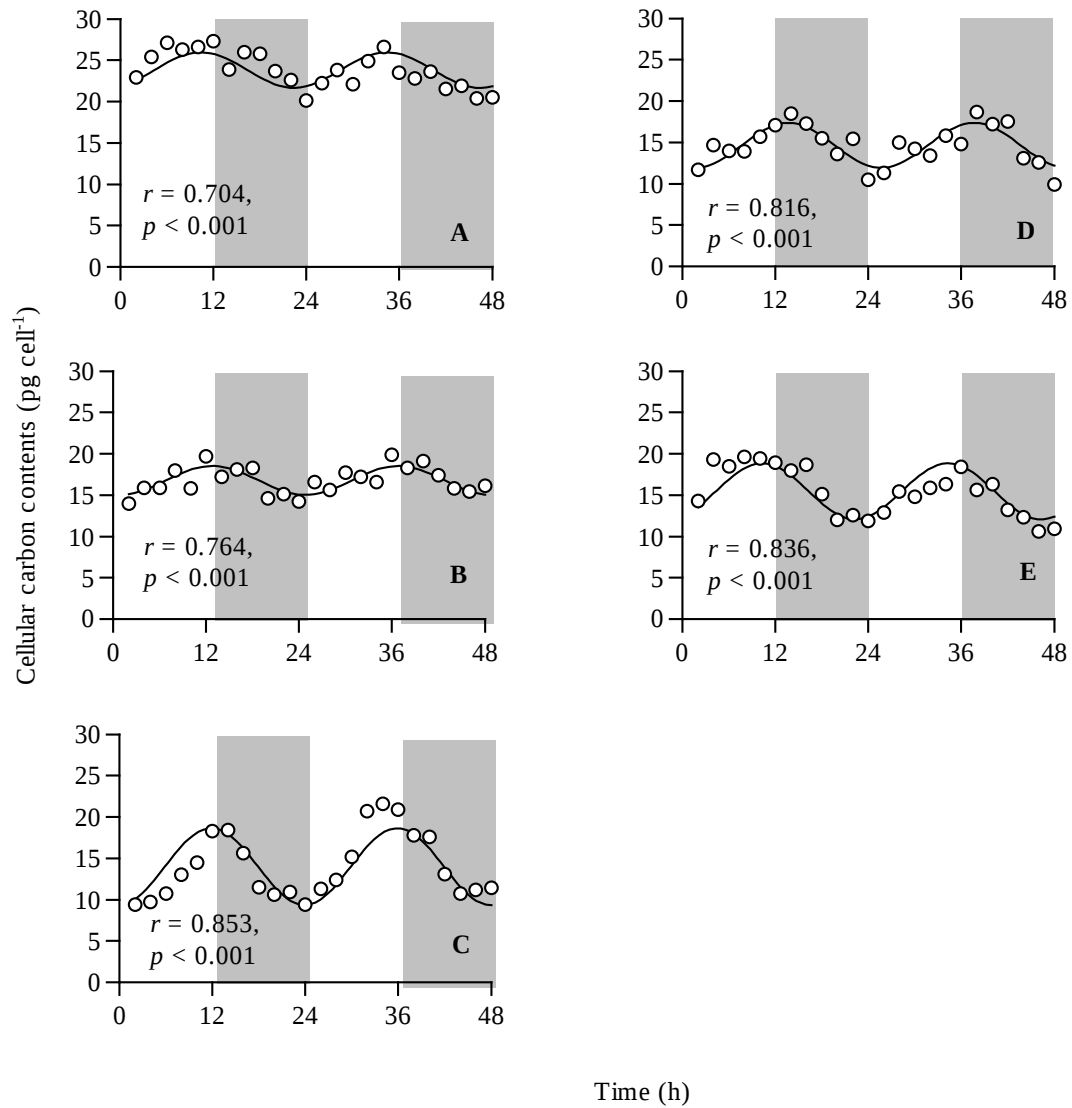


Fig. 2.5. Diel variation in carbon quota of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A), 150 (B), 365 (C), 500 (D), and 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E). Shaded areas denote dark period.

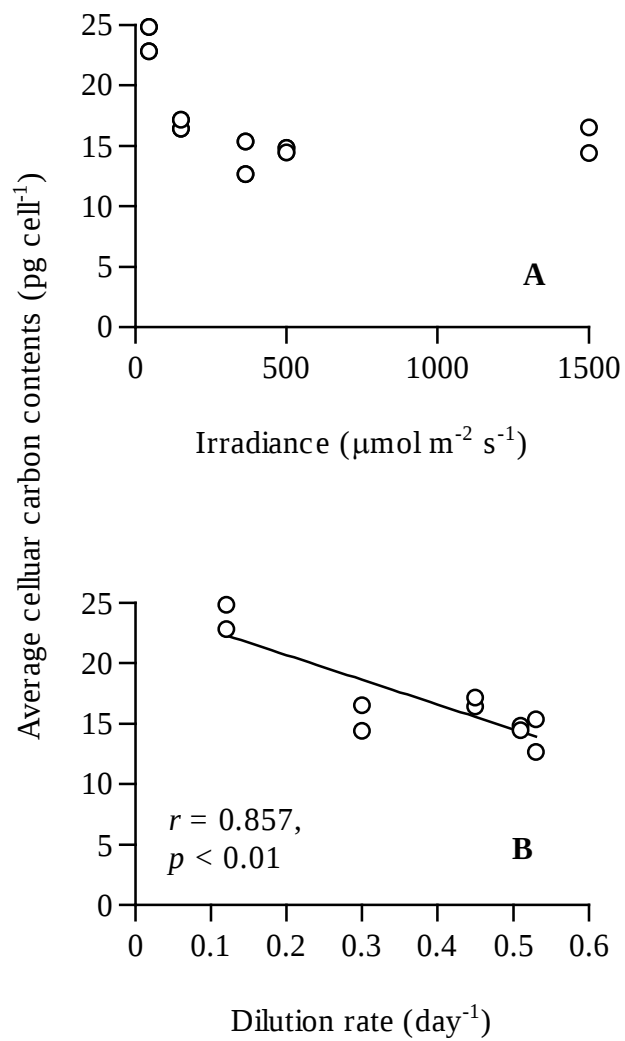


Fig. 2.6. Relationship between average cellular carbon contents and irradiance (A) and dilution rate (B) of *I. galbana*.

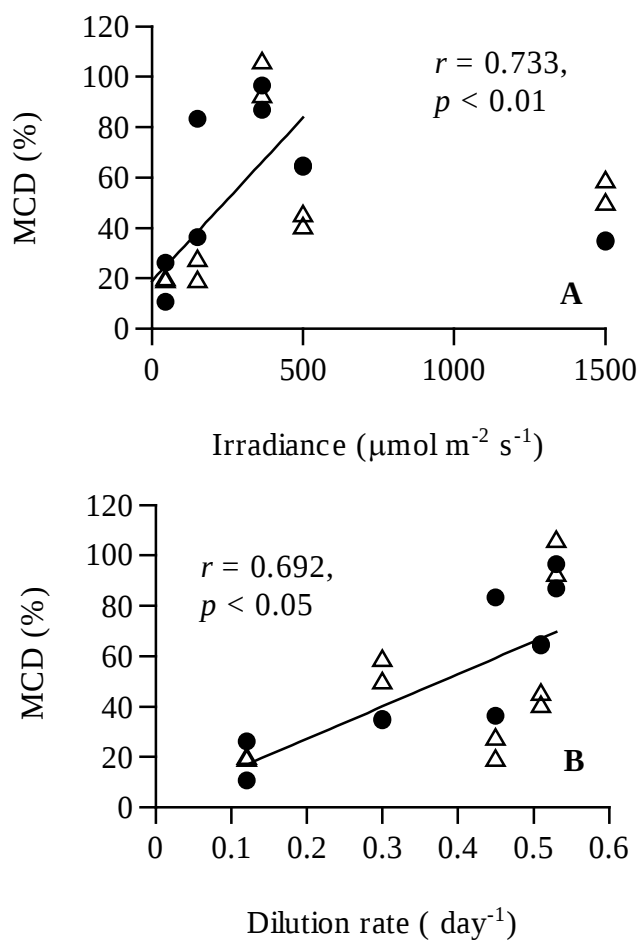


Fig. 2.7. Relationship between MCD and irradiance (A) and dilution rate (B) of *I. galbana*. Closed circle and open triangle denote cell volume and cellular carbon contents, respectively.

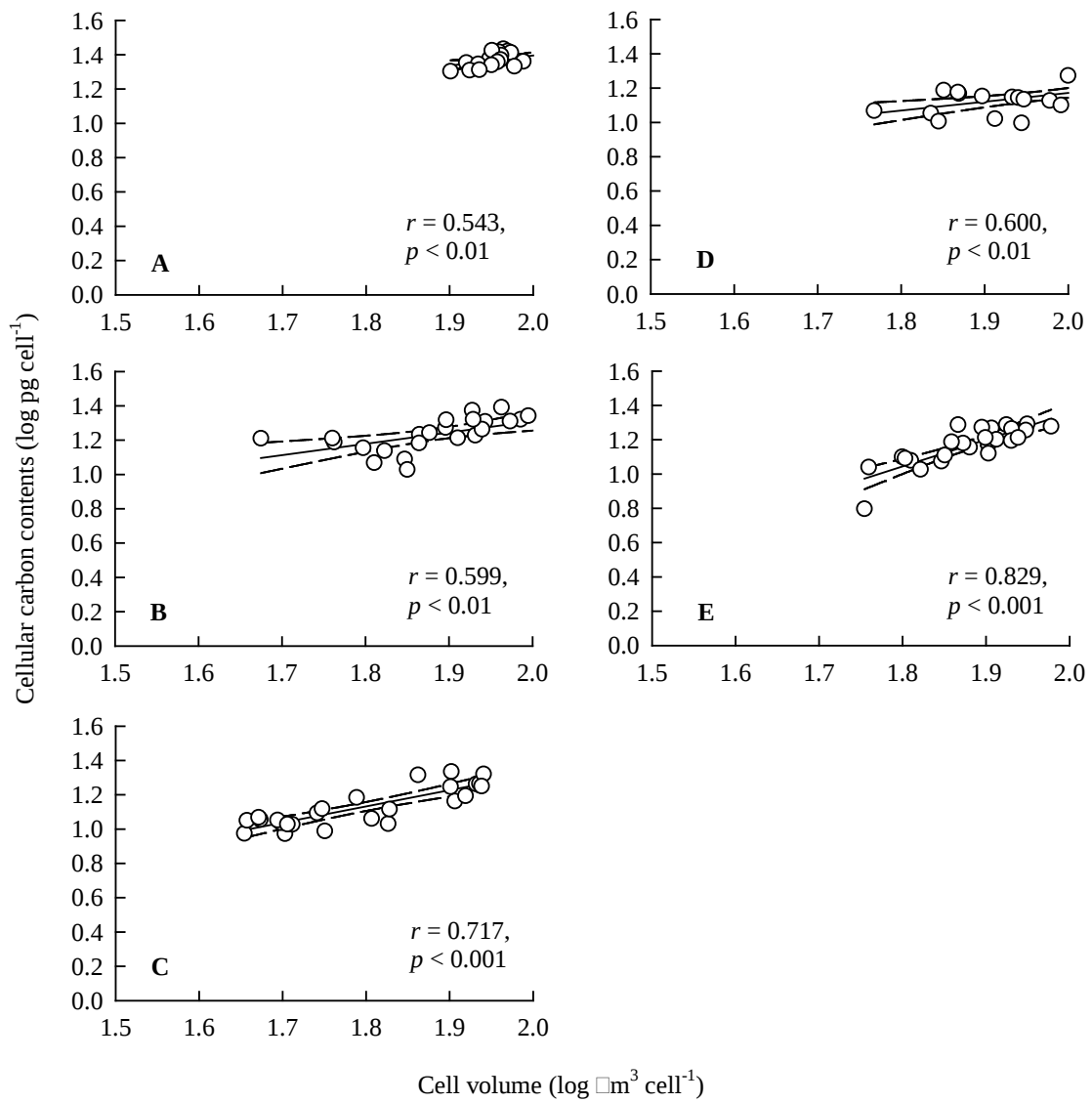


Fig. 2.8. Relationship between cell volume and cellular carbon contents of *I. galbana* at 45 (A), 150 (B), 365 (C), 500 (D), and 1500 (E) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Broken lines denote the 95% confidence intervals of the data. Regression statistics are given in Table 2.1.

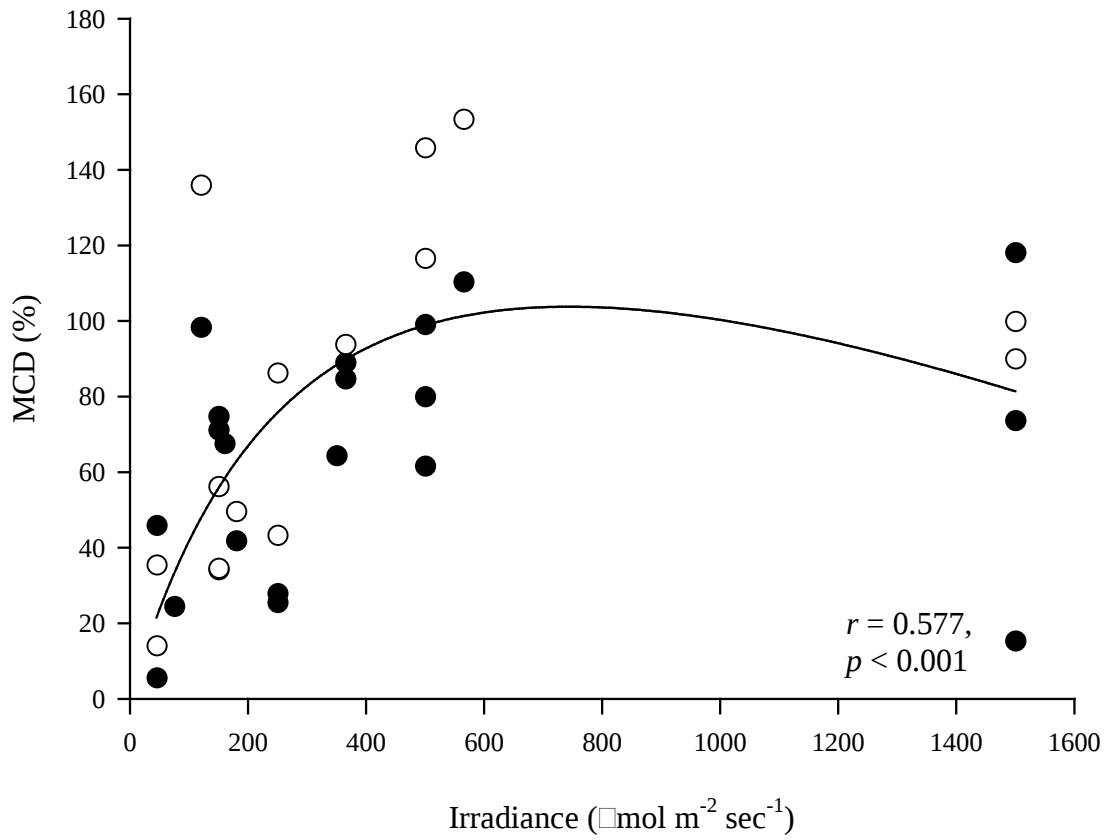


Fig. 2.9. Relationship between magnitude of change during cell divisions (MCD) of cell volume (closed circle) and carbon quota (open circle) and irradiance in nanophytoplankton, determined using data from Eppley and Coatsworth (1966)⁷⁴, Kohata and Watanabe (1986)⁷⁵, Kohata and Watanabe (1989)⁶⁰, Berdalet *et al.* (1992)⁷⁶, DuRand and Olson (1998)⁶², Varela and Harrison (1999)⁶¹, DuRand *et al.* (2002)⁶⁹, Ohi *et al.* (2002)⁵², Ohi *et al.* (2003)⁷⁷, and the present study with a fitted curve (solid line).

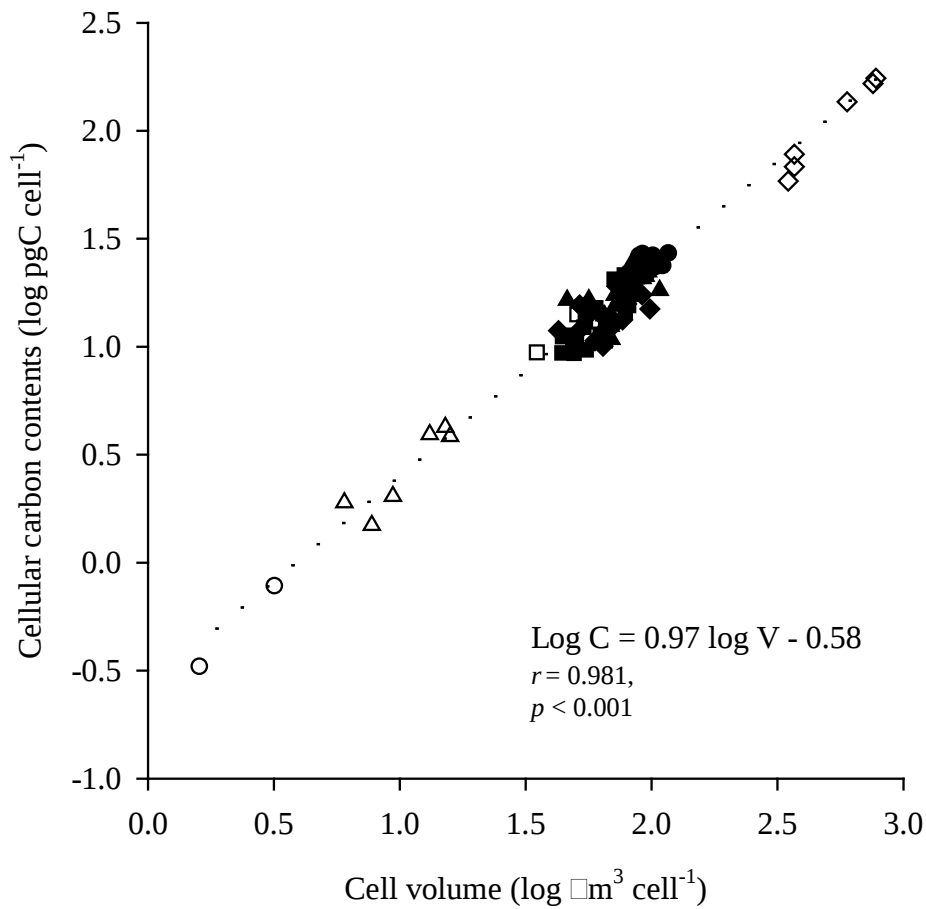


Fig. 2.10. Relationship between cell volume and cellular carbon contents during cell divisions. Solid lines denote regression line or simple line connected the maximum and minimum of diel variation for *Micromonas pusilla* (DuRand et al. 2002⁶⁹; open circle); *Nannochloris* sp. (DuRand and Olson 1998⁶²; open triangle); *Emiliania huxleyi* (Varela and Harrison 1999⁶¹; open square); *Pyramimonas parkeae* (Kohata and Watanabe 1989⁶⁰; open diamond); *I. galbana* (the present study at 45 μmol m⁻² s⁻¹; solid circle, at 150 μmol m⁻² s⁻¹; solid triangle, at 365 μmol m⁻² s⁻¹; solid square, at 500 μmol m⁻² s⁻¹; solid diamond). Broken line denotes a regression line for those five species.

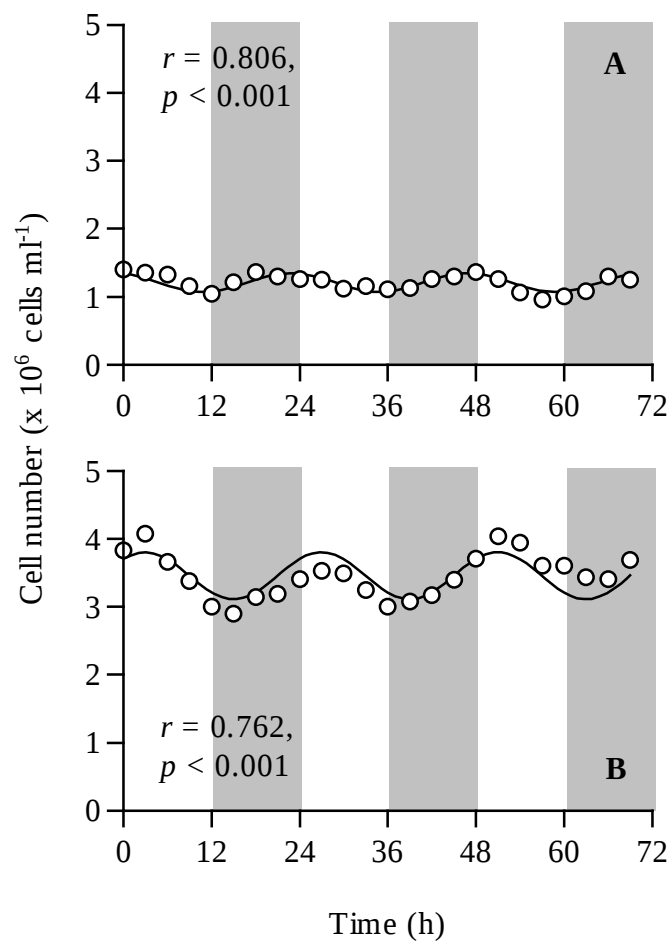


Fig. 3.1. Diel variation in cell number of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

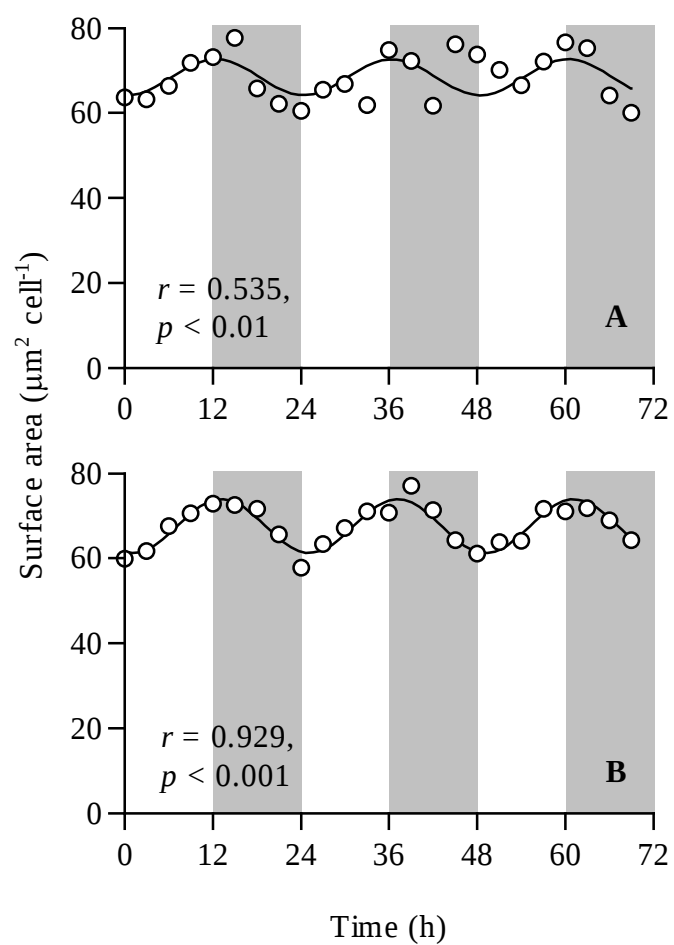


Fig. 3.2. Diel variation in surface area of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

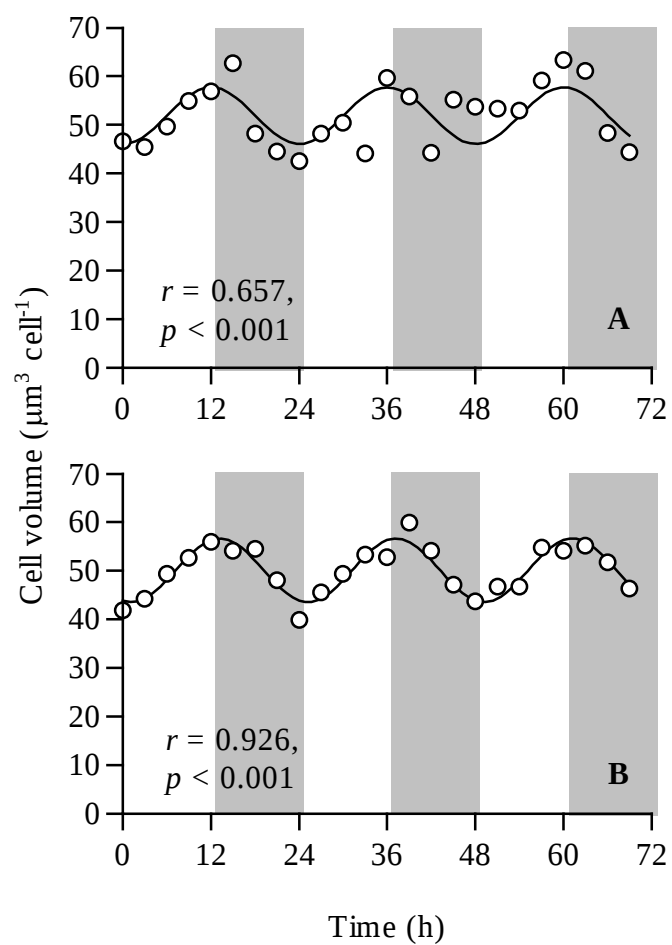


Fig. 3.3. Diel variation in cell volume of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

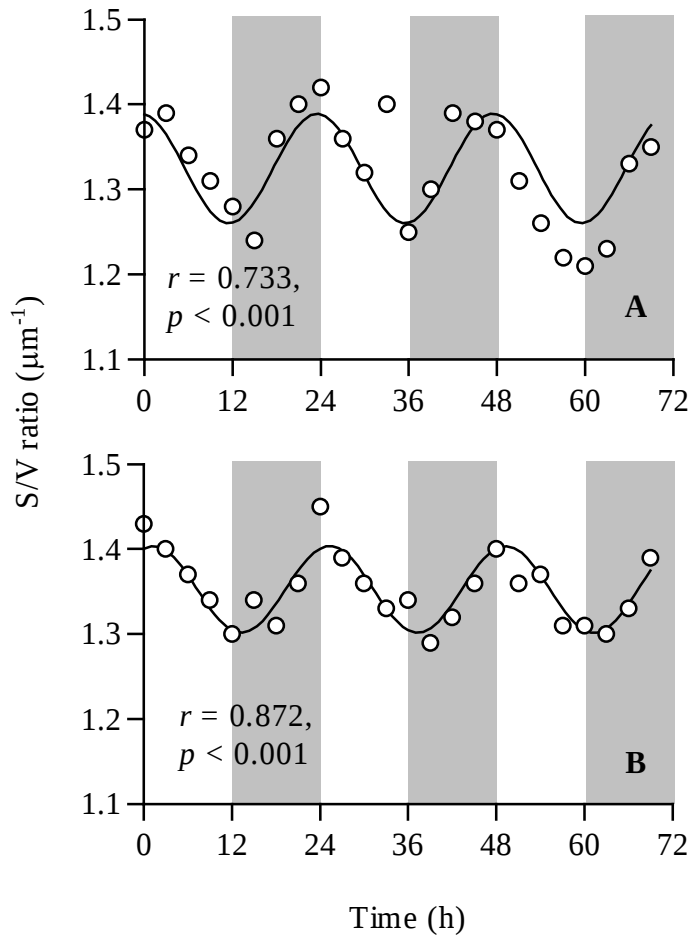


Fig. 3.4. Diel variation in surface/volume (S/V) ratio of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

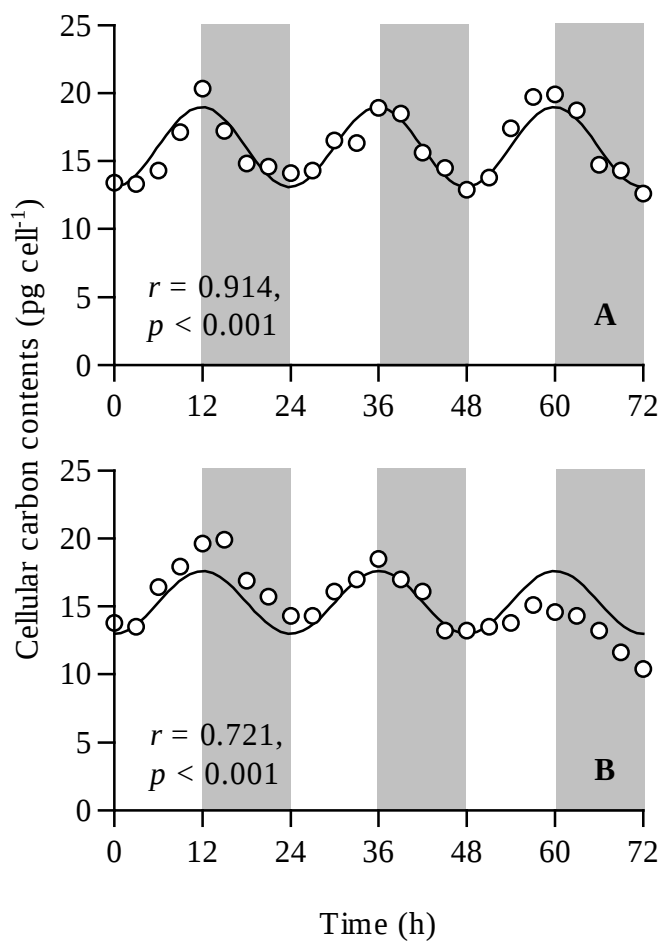


Fig. 3.5. Diel variation in cellular carbon contents of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

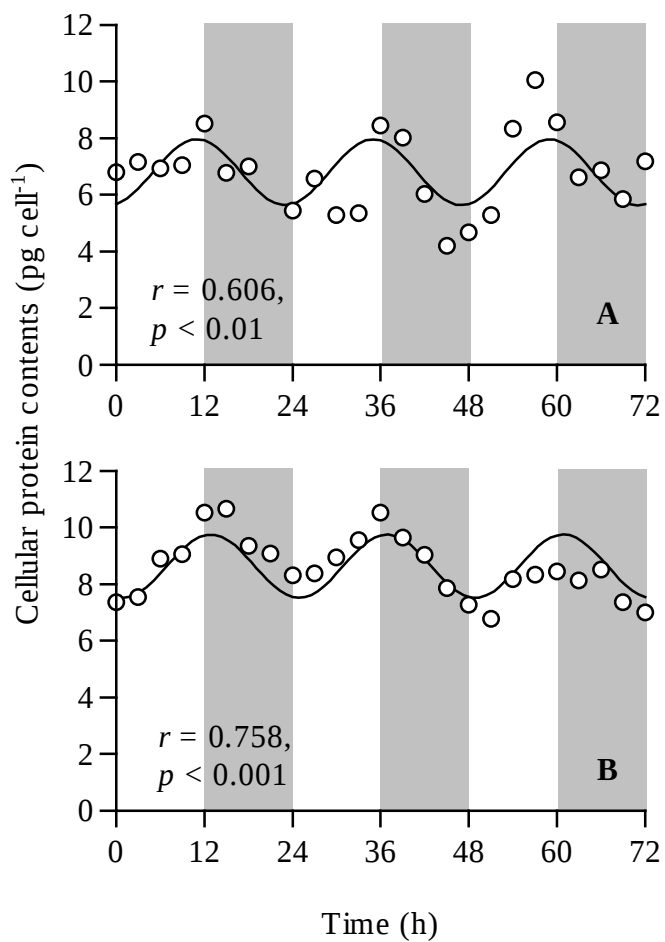


Fig. 3.6. Diel variation in cellular protein contents of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

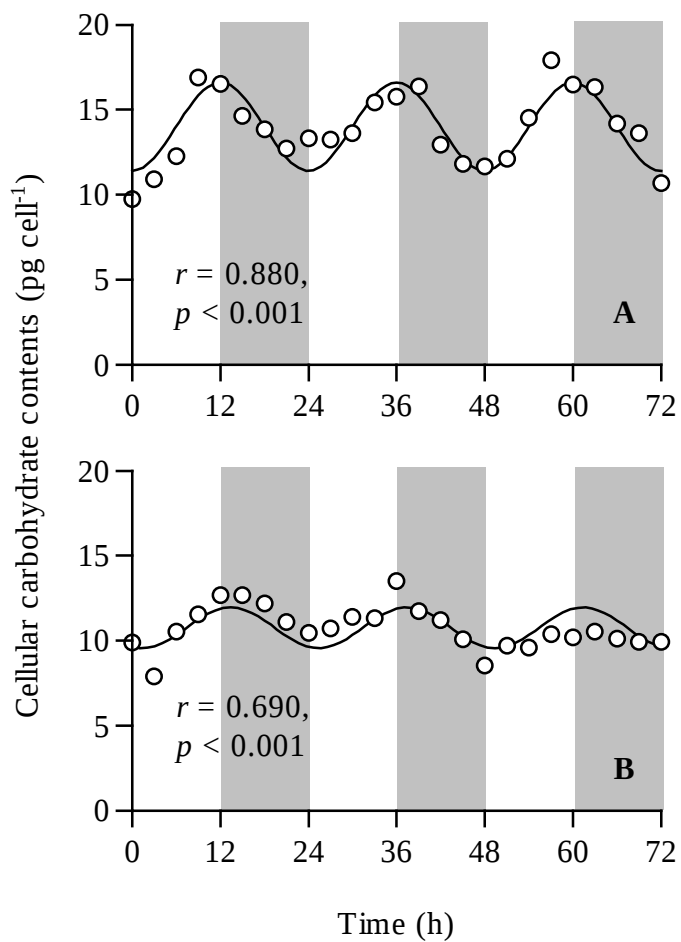


Fig. 3.7. Diel variation in cellular carbohydrate contents of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

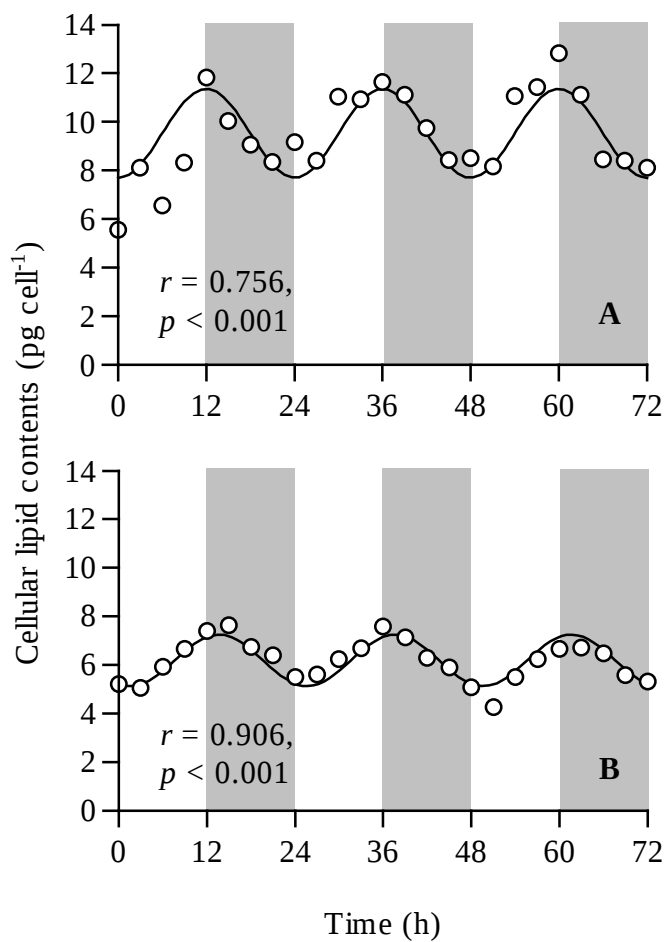


Fig. 3.8. Diel variation in cellular lipid contents of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

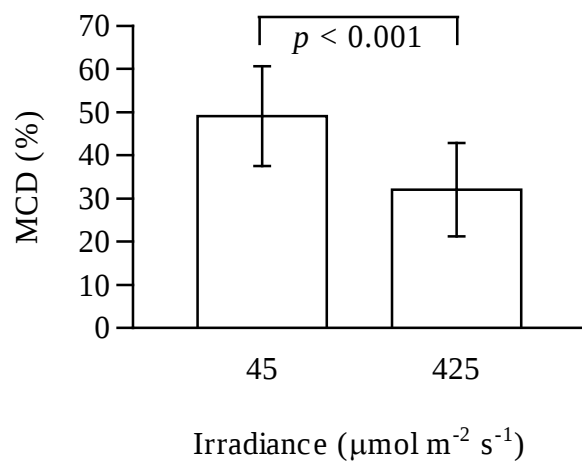


Fig. 3.9. Relationship between MCD of cellular carbon, protein, carbohydrate, and lipid contents and irradiance of *I. galbana*.

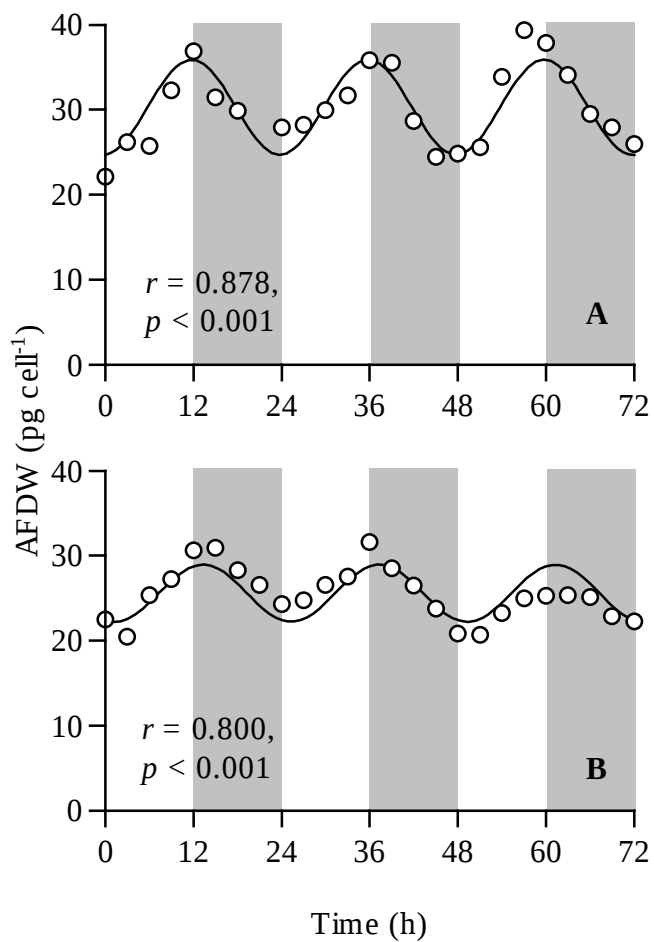


Fig. 3.10. Diel variation in ash free dry weight (AFDW) of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

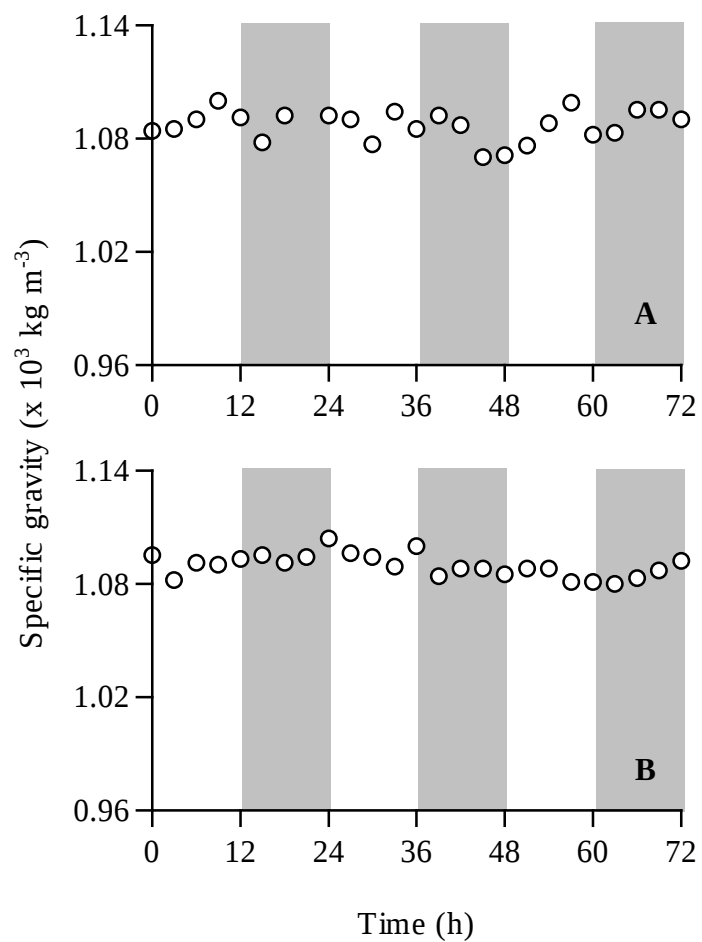


Fig. 3.11. Diel variation in specific gravity of *I. galbana* with at irradiance of 45 (A) and $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

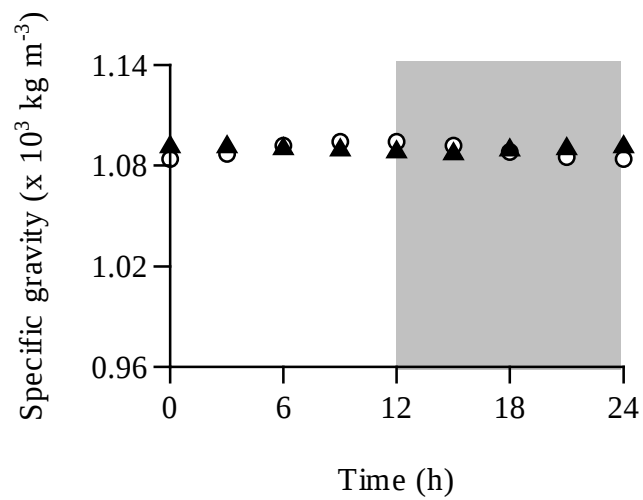


Fig. 3.12. Diel variation in specific gravity of *I. galbana* estimated from fitted data of biochemical contents and cell volume at irradiance of 45 (open circle) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (closed triangle). Shaded areas denote dark period.

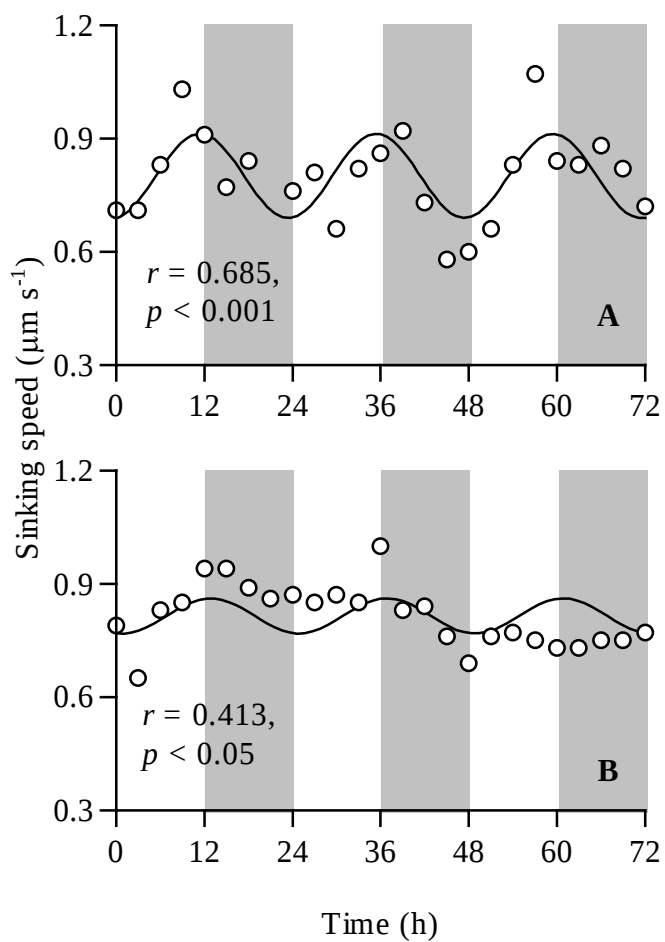


Fig. 3.13. Diel variation in sinking speed of *I. galbana* with a fitted curve (solid line)

at irradiance of 45 (A) and $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

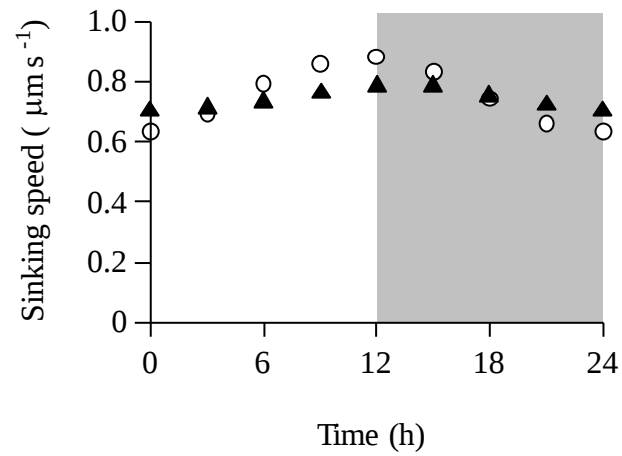


Fig. 3.14. Diel variation in sinking speed of *I. galbana* estimated from fitted data of biochemical contents and cell volume at irradiance of 45 (open circle) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (closed triangle). Shaded areas denote dark period.

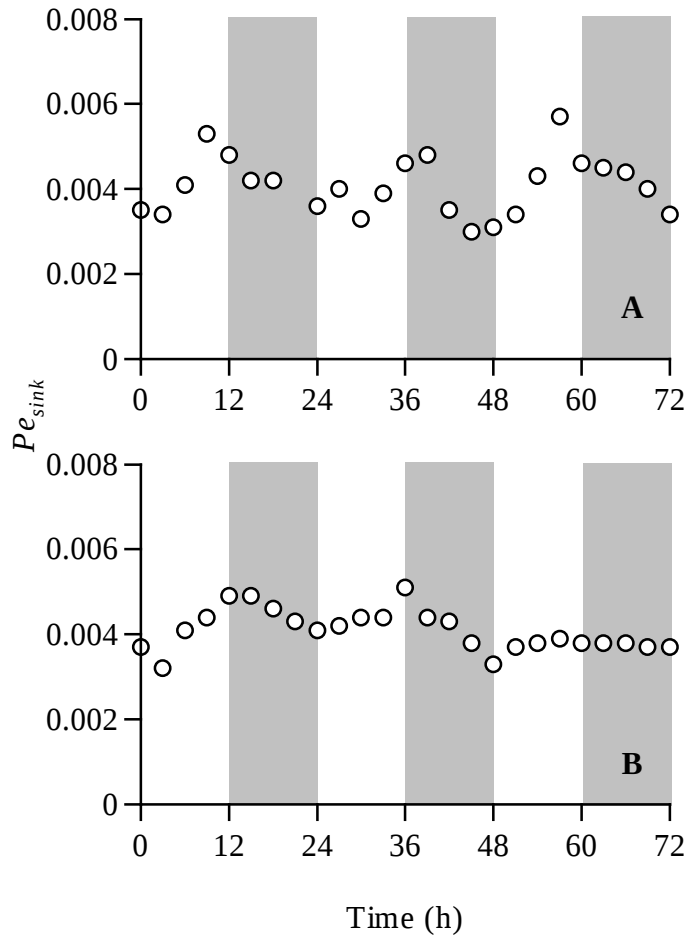


Fig. 3.15. Diel variation in Péclet number of sinking *I. galbana* at irradiance of 45 (A) and 425 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B). Shaded areas denote dark period.

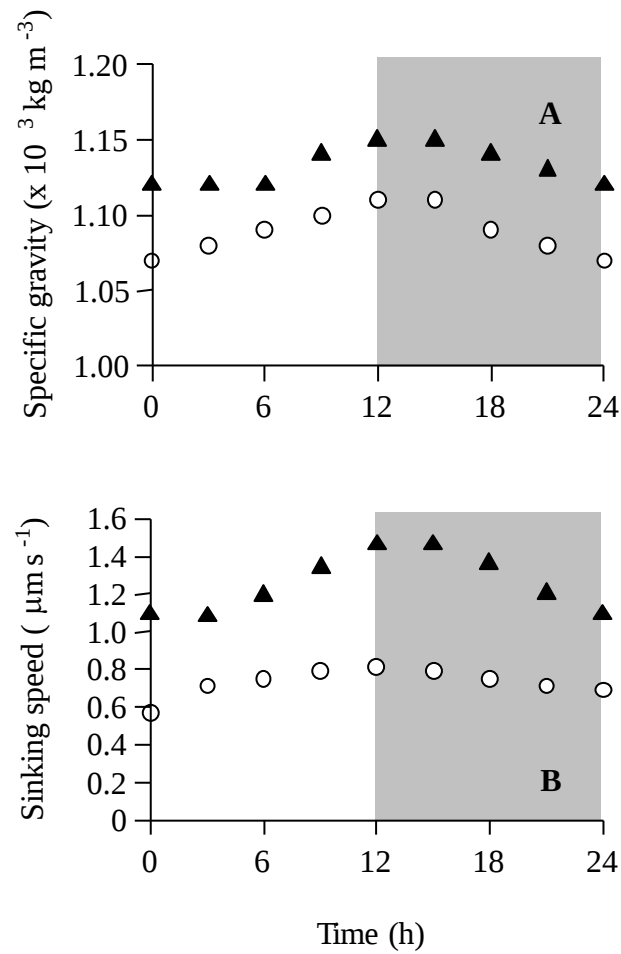


Fig. 3.16. Diel variation in specific gravity (A) and sinking speed (B) of *I. galbana* in which diel variation when cellular lipid contents was changed daily and other elements were constant (average at $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, protein = $6.67 \text{ pg cell}^{-1}$, carbohydrate = $13.7 \text{ pg cell}^{-1}$, cell diameter = $5.05 \mu\text{m}$) estimated from fitted data of biochemical contents and cell volume at irradiance of $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (open circle) and $425 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (closed triangle). Shaded areas denote dark period.

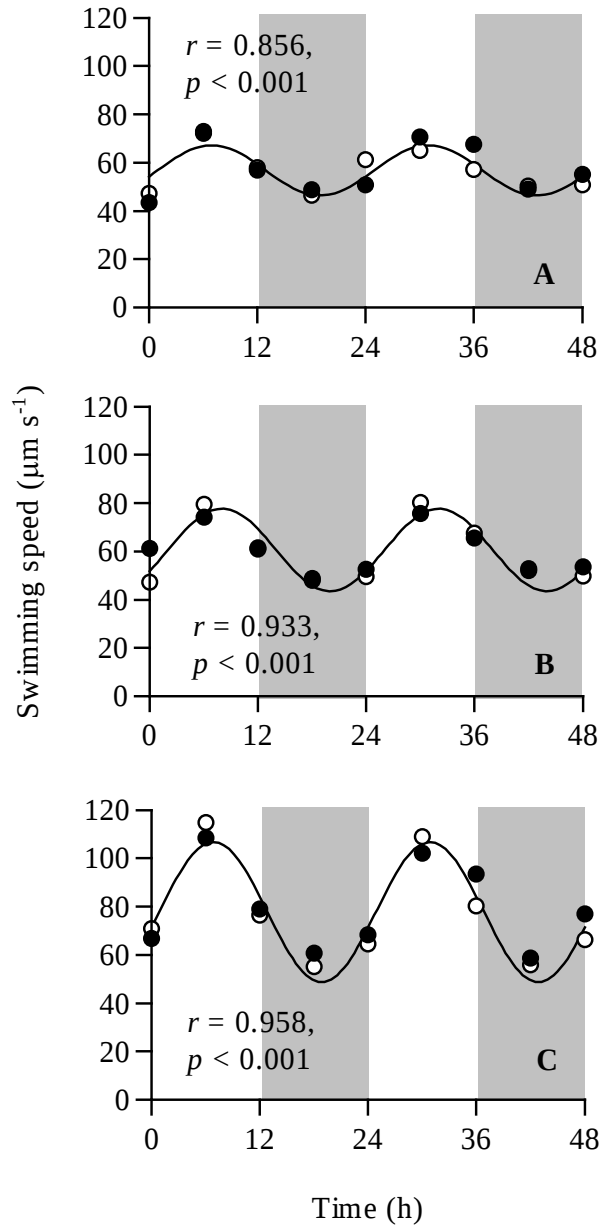


Fig. 4.1. Diel variation in swimming speed of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 70 (A), 140 (B), and $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) conditions. Closed and open symbols denote bottle 1 and bottle 2 experiments, respectively. The data of bottle 1 and bottle 2 were not significantly different. Shaded areas denote dark period.

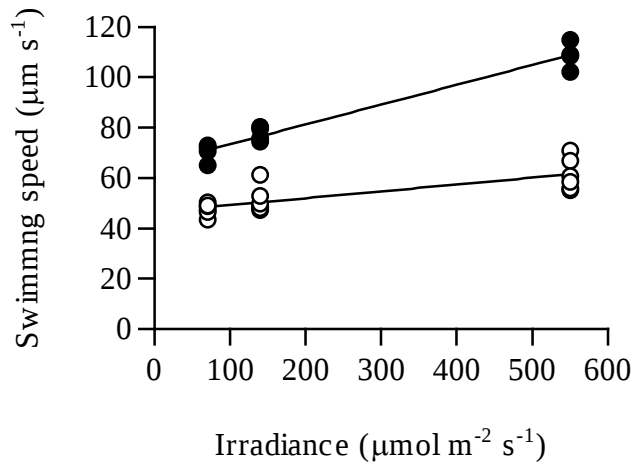


Fig. 4.2. Relationship between irradiance and minimum (open circle) and maximum swimming speed (closed circle) of *I. galbana* with regression lines (minimum swimming speed: $y = 0.0272x + 46.5$, $r = 0.783$, $p < 0.001$; maximum swimming speed: $y = 0.978x + 65.5$, $r = 0.978$, $p < 0.001$).

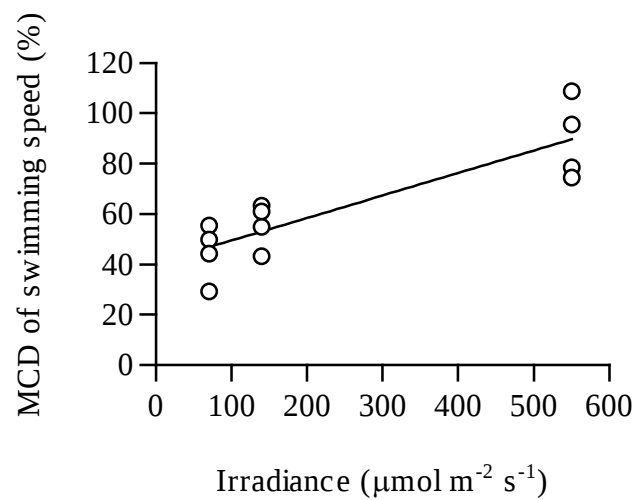


Fig. 4.3. Relationship between irradiance and MCD in swimming speed of *I. galbana*

with regression line ($y = 0.0892x + 40.5$, $r = 0.867$, $p < 0.001$).

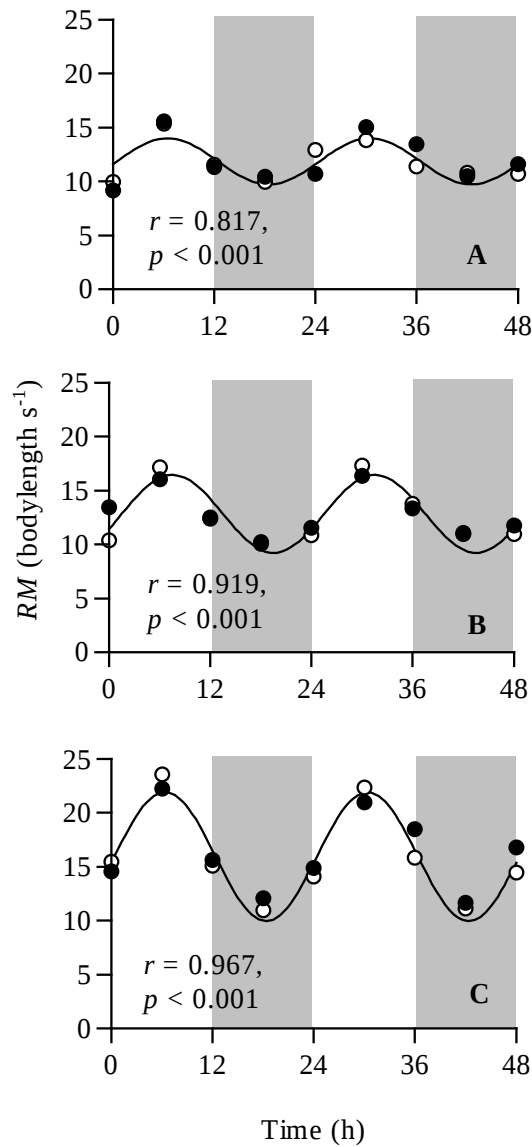


Fig. 4.4. Diel variation in relative motility of *I. galbana* with a fitted curve (solid line) at irradiance of 70 (A), 140 (B), and 550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) conditions. Closed and open symbols denote bottle 1 and bottle 2 experiments, respectively. The data of bottle 1 and bottle 2 were not significantly different. Shaded areas denote dark period.

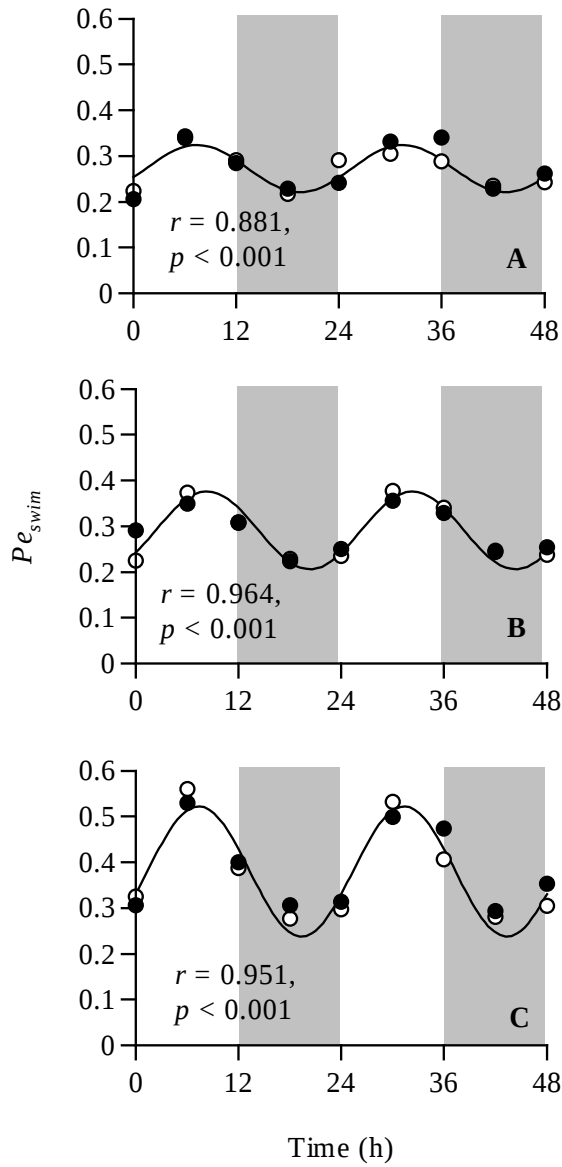


Fig. 4.5. Diel variation in Péclet number of swimming *I. galbana* with a fitted curve

(solid line) at irradiance of 170 (A), 140 (B), and 550 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C) conditions.

Closed and open symbols denote bottle 1 and bottle 2 experiments, respectively. The data of bottle 1 and bottle 2 were not significantly different. Shaded areas denote dark period.

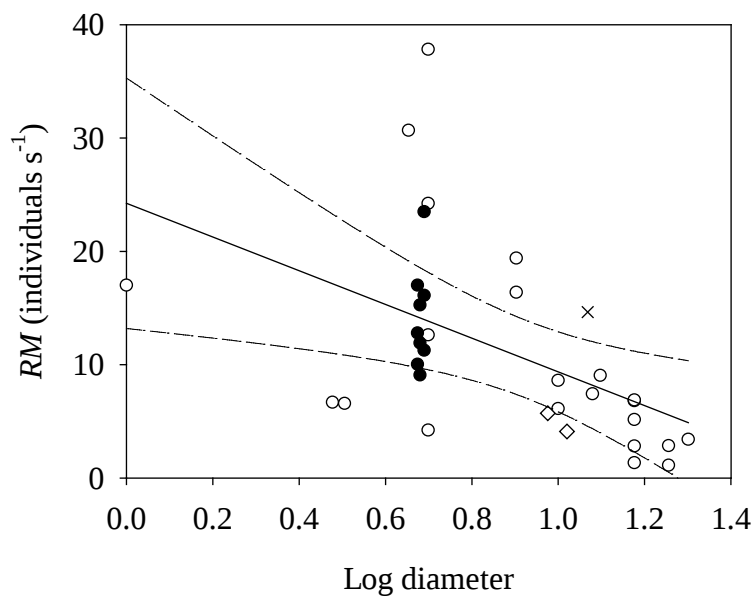
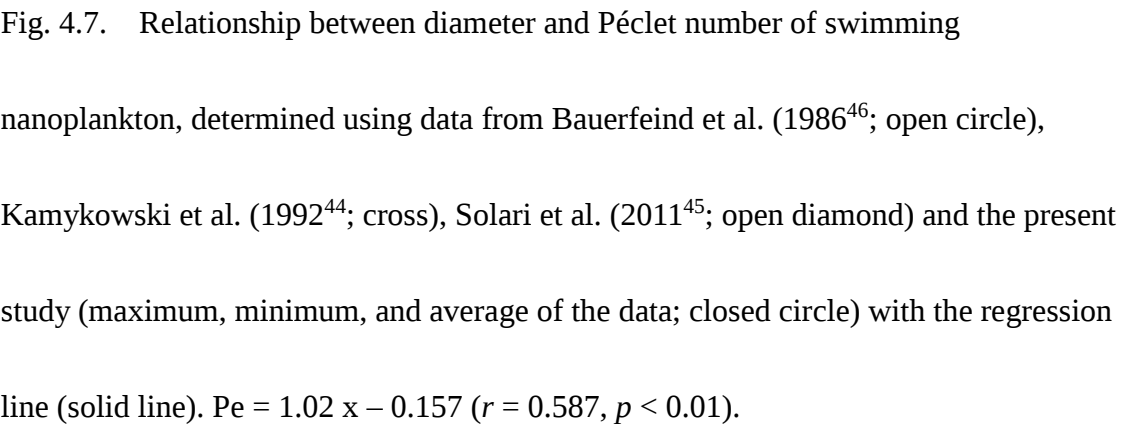


Fig. 4.6. Relationship between diameter and relative motility of nanoplankton, determined using data from Bauerfeind et al. (1986⁴⁶; open circle), Kamykowski et al. (1992⁴⁴; cross), Solari et al. (2011⁴⁵; open diamond) and the present study (maximum, minimum, and average of the data; closed circle) with the regression line (solid line). $Y = -14.9x + 24.2$ ($r = 0.493$, $p < 0.05$).



Appendix Cell volume of 150 cells over time.

No.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 36
1	61.7	41.1	33.7	18.4	41.1	31.2	42.8	37.0	42.4
2	57.7	32.9	35.4	20.8	17.1	18.5	32.1	19.0	74.1
3	57.9	35.4	34.6	56.8	31.3	39.5	24.6	40.3	36.4
4	46.3	21.1	32.9	31.9	38.0	39.5	35.4	52.1	20.0
5	34.6	56.8	41.5	31.9	32.9	40.3	38.7	33.7	29.7
6	62.8	38.1	30.4	49.8	52.1	41.1	45.4	31.3	33.7
7	29.7	37.1	50.8	34.6	49.4	42.6	32.9	41.1	39.5
8	43.6	32.9	34.6	39.5	50.8	32.9	50.8	43.5	18.5
9	41.1	45.6	33.3	37.0	22.2	31.3	42.0	61.7	23.0
10	42.0	61.7	33.7	42.0	64.3	18.8	65.6	33.7	64.3
11	29.7	49.4	52.2	36.2	38.7	35.4	29.0	33.6	33.7
12	43.5	31.9	37.2	39.9	32.1	30.4	36.3	20.3	33.7
13	71.1	20.5	36.2	33.7	32.9	25.2	32.9	14.3	35.2
14	45.4	37.0	56.8	65.6	29.7	36.2	28.3	31.3	35.4
15	35.2	41.1	37.2	40.3	66.8	40.8	41.1	41.1	19.0
16	45.4	34.6	27.3	38.3	19.0	33.7	32.9	66.8	38.7
17	38.1	103.8	39.5	50.0	18.5	19.8	37.0	32.9	29.6
18	43.2	41.1	43.2	33.7	23.7	18.5	32.1	32.9	43.5
19	33.6	74.1	17.6	27.3	39.5	41.1	37.8	45.4	25.8
20	71.1	83.4	65.6	37.0	33.7	19.0	36.3	53.3	31.3
21	60.4	77.1	46.3	17.6	29.7	48.8	41.5	32.9	36.3
22	42.0	71.1	36.3	26.3	31.3	32.9	35.2	19.3	33.6
23	59.1	43.2	57.3	39.0	31.3	59.2	41.1	30.5	23.7
24	42.4	39.1	19.0	18.5	40.3	65.6	41.1	21.1	38.7
25	32.9	38.3	37.2	56.9	44.8	61.7	41.1	36.3	18.5
26	49.8	43.2	33.7	43.6	32.9	20.3	56.9	21.1	32.9
27	46.3	32.9	32.9	39.5	46.6	19.8	18.5	56.8	37.0
28	32.9	64.3	73.3	59.2	40.3	43.2	19.8	29.7	41.5
29	46.3	32.9	20.0	61.6	21.1	29.7	22.4	39.5	41.5
30	39.5	43.5	111.1	55.7	33.7	36.8	36.3	32.9	32.9
31	33.7	54.4	61.6	32.9	38.9	56.8	18.5	41.1	44.4
32	65.4	72.2	32.9	67.5	32.9	34.6	32.9	22.4	21.1
33	59.2	29.7	31.3	32.9	37.2	39.5	31.3	42.0	34.6
34	38.7	32.1	44.1	34.6	52.2	39.9	36.3	21.2	43.8
35	45.4	40.3	37.0	22.4	59.2	41.1	29.7	22.4	32.9
36	64.3	45.4	33.7	43.2	55.5	40.3	29.6	16.2	20.0
37	48.9	74.6	29.7	77.1	32.9	59.2	22.6	41.1	32.9
38	64.3	35.4	13.9	73.7	32.9	40.3	33.6	21.1	32.1
39	45.6	32.9	29.7	70.9	39.5	40.3	52.2	59.2	17.6
40	35.4	47.5	52.1	59.7	60.5	70.7	39.5	22.2	41.1
41	56.8	45.4	21.2	64.3	32.9	35.4	33.6	38.7	23.9
42	22.2	47.5	38.7	17.3	37.1	43.2	28.6	18.5	34.0
43	22.6	39.5	32.9	34.6	33.7	32.9	18.5	35.4	32.9
44	62.5	59.2	31.3	48.1	29.7	41.1	42.6	36.2	32.9
45	30.2	61.7	17.6	33.7	18.5	74.6	38.0	23.9	32.9
46	32.9	42.6	34.6	20.8	29.7	41.1	32.9	31.3	39.5
47	54.4	62.8	34.6	38.7	47.5	23.8	64.3	29.7	32.9
48	37.8	52.1	32.1	17.6	32.9	64.3	41.1	32.9	33.7
49	41.1	46.3	34.6	77.1	21.3	33.7	31.3	23.8	37.8
50	32.9	34.6	29.7	74.6	69.4	54.4	31.3	29.7	37.5
51	66.8	33.7	63.0	66.8	41.1	45.8	34.6	41.5	20.5
52	59.2	58.1	42.8	52.2	37.8	39.5	41.1	31.3	32.9
53	64.3	33.7	50.0	33.7	33.7	32.9	32.9	32.1	20.3
54	34.6	19.8	59.2	23.9	33.7	40.6	34.6	16.2	39.9
55	31.2	39.9	56.9	45.4	21.1	29.0	33.7	58.1	18.5
56	41.1	64.3	56.8	33.7	41.1	58.1	29.7	35.2	29.7
57	26.5	43.2	34.6	41.5	33.7	23.8	23.9	37.8	21.1
58	64.3	37.2	39.5	37.8	14.3	21.3	33.7	32.9	40.3

Appendix(continue). Cell volume of 150 cells over time.

No.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 36
59	39.1	36.3	52.1	52.2	32.9	41.5	22.4	32.9	39.5
60	41.1	31.3	61.6	43.2	32.9	23.8	65.6	31.3	34.6
61	64.3	41.1	32.9	33.7	46.3	23.2	32.9	14.7	34.6
62	33.7	42.8	64.3	23.9	21.6	21.7	22.4	38.3	28.0
63	36.2	21.6	41.1	34.6	38.9	38.0	20.0	40.3	21.1
64	41.1	64.3	59.2	34.6	37.2	39.5	40.8	31.3	41.8
65	16.2	33.7	33.7	45.4	44.4	32.9	42.0	41.5	34.6
66	41.1	33.7	32.9	37.0	31.3	33.7	41.1	18.5	36.3
67	32.9	34.6	62.8	31.9	68.2	35.4	21.3	39.5	21.1
68	39.9	77.1	45.6	34.6	31.3	41.1	32.9	43.5	40.3
69	25.2	43.2	48.9	34.6	61.7	49.8	20.5	32.9	35.4
70	64.3	34.6	39.5	39.5	36.3	35.4	32.9	33.7	35.4
71	36.3	62.5	39.5	36.3	37.0	41.1	31.3	41.1	34.6
72	45.4	38.9	30.0	46.3	54.5	29.7	29.7	40.3	31.2
73	33.7	37.8	59.2	34.6	41.1	36.3	21.1	41.1	33.7
74	64.3	63.0	38.1	32.9	40.9	32.9	59.2	58.1	32.9
75	38.7	58.1	74.6	52.2	34.6	35.4	32.9	21.1	32.9
76	29.7	52.1	32.9	60.5	38.7	33.7	54.5	39.5	37.8
77	45.6	49.4	61.7	55.5	39.5	61.7	32.9	18.8	20.5
78	34.6	42.6	56.8	25.2	32.1	16.8	22.6	65.6	31.2
79	32.9	21.1	41.1	38.1	73.3	43.2	36.3	47.2	23.2
80	32.9	26.3	52.1	45.4	32.9	77.1	61.7	21.8	21.8
81	39.0	45.4	38.9	41.1	40.3	31.3	14.8	22.6	19.9
82	65.6	65.5	43.5	40.3	34.6	56.9	34.6	43.2	29.7
83	35.4	32.9	19.4	60.4	25.2	32.9	34.6	43.5	32.1
84	64.3	34.6	64.3	57.9	19.8	36.2	37.0	32.9	29.7
85	18.3	34.6	32.9	34.6	61.7	35.4	38.7	71.1	19.0
86	39.0	60.4	33.7	39.5	39.5	29.7	52.1	45.8	22.4
87	40.3	71.1	42.4	32.9	16.2	32.9	31.3	36.2	31.3
88	59.2	43.7	33.7	40.3	26.8	36.2	32.9	20.5	61.7
89	36.3	35.4	36.3	65.2	44.4	77.1	19.8	32.9	18.0
90	39.1	73.7	39.0	45.4	35.4	32.9	33.7	42.6	40.3
91	43.2	32.1	34.6	37.0	29.7	45.4	51.0	32.9	29.7
92	39.5	65.6	29.7	32.9	26.8	45.4	30.4	38.9	21.1
93	32.9	43.5	54.5	31.3	45.4	58.1	40.3	32.9	21.1
94	41.1	59.2	54.1	21.1	30.4	59.2	57.9	32.9	25.2
95	64.3	59.2	43.2	65.6	63.0	61.7	39.9	18.5	39.5
96	19.4	61.7	50.0	18.8	34.6	41.1	32.9	65.6	30.4
97	36.3	52.1	64.3	13.9	31.3	41.1	35.4	74.6	41.1
98	62.8	63.0	32.9	25.8	21.1	41.1	49.8	48.1	35.4
99	33.1	64.3	41.1	34.6	37.2	45.4	56.8	39.5	19.8
100	42.6	50.4	40.3	32.9	59.2	41.1	35.4	43.5	59.2
101	64.3	32.9	60.4	32.9	34.4	32.9	32.9	41.1	59.2
102	66.8	29.7	35.4	32.9	32.9	43.2	33.7	49.4	39.5
103	65.6	32.9	45.4	40.6	60.4	38.7	21.1	37.0	33.7
104	35.4	46.6	65.6	32.9	17.6	33.7	33.7	33.7	16.3
105	52.1	61.7	45.6	23.8	35.4	18.5	22.1	18.8	32.9
106	37.9	34.6	32.9	19.4	39.1	41.1	33.7	37.0	36.3
107	66.8	34.6	38.9	29.7	38.9	32.9	39.8	31.3	18.5
108	39.9	33.7	31.3	39.5	40.6	32.1	32.9	30.4	21.1
109	40.3	64.3	39.0	53.3	19.8	31.3	42.8	32.9	22.4
110	41.1	33.7	34.6	42.6	19.8	34.6	31.3	34.6	31.3
111	71.1	35.4	36.2	46.6	44.4	19.8	32.9	32.9	36.8
112	65.6	48.8	34.6	41.1	22.4	32.9	39.0	32.9	34.6
113	44.1	34.6	35.4	46.7	29.7	65.6	59.2	32.9	32.9
114	45.4	41.1	65.6	33.7	32.9	59.2	19.3	61.7	33.7
115	49.8	32.9	42.8	54.5	40.3	22.6	38.7	32.1	29.7

Appendix(continue). Cell volume of 150 cells over time.

No.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 36
116	42.0	64.3	33.7	32.9	33.7	29.7	21.1	40.8	34.6
117	68.1	41.1	20.0	32.9	21.6	15.3	23.8	32.9	32.9
118	40.3	47.5	40.6	32.9	47.5	32.9	39.0	28.2	35.6
119	45.4	40.6	29.7	65.6	22.4	41.8	52.2	34.6	30.2
120	32.9	33.7	32.9	53.1	39.5	58.1	47.9	31.3	32.9
121	61.7	14.8	64.3	77.1	33.7	25.3	40.3	26.5	47.8
122	37.2	47.5	18.5	41.1	31.3	45.4	34.6	44.1	29.7
123	31.5	64.3	32.9	33.7	27.5	15.3	19.8	51.0	29.0
124	42.0	33.7	49.9	29.7	38.7	32.9	68.1	59.2	29.6
125	32.9	40.3	33.7	35.4	39.5	33.7	33.7	42.0	29.0
126	41.1	64.3	34.6	33.7	33.7	32.1	59.2	31.3	18.5
127	32.9	46.3	64.3	34.6	41.1	33.7	24.2	14.3	41.1
128	33.7	66.8	19.8	45.4	42.4	65.6	43.5	24.4	34.6
129	33.7	93.3	33.7	56.9	64.3	37.8	29.7	35.4	16.2
130	29.7	32.1	45.4	59.7	61.7	24.2	38.7	52.2	19.3
131	58.1	83.4	43.2	32.9	21.1	43.5	25.0	35.4	77.1
132	33.7	51.0	61.7	15.3	34.6	41.1	40.3	47.5	32.9
133	25.2	35.4	78.4	25.2	31.9	39.5	42.0	19.4	60.5
134	42.0	37.1	59.2	40.3	37.8	21.1	36.3	13.4	29.7
135	66.8	52.1	23.8	35.6	34.6	44.1	42.6	18.5	29.7
136	39.5	32.9	32.9	38.1	23.9	38.7	41.5	32.9	42.8
137	39.5	41.5	45.6	39.5	33.7	47.5	29.7	45.4	16.9
138	64.3	34.6	32.9	111.1	17.1	43.2	33.7	21.1	32.9
139	66.8	32.9	41.5	38.7	41.1	32.9	19.8	37.8	66.8
140	34.6	39.5	41.5	40.3	56.9	60.4	44.4	66.8	39.5
141	25.2	77.1	64.3	59.2	21.8	43.2	40.3	34.6	23.8
142	77.1	41.1	44.9	47.5	58.1	34.6	19.8	64.3	32.9
143	32.9	74.1	69.4	31.3	31.3	43.2	32.9	23.9	41.1
144	34.6	61.7	19.4	41.1	34.6	32.9	41.1	34.6	24.7
145	48.9	39.5	45.8	39.0	38.7	63.0	33.7	27.3	29.7
146	59.2	52.1	33.7	51.0	32.9	33.7	34.6	64.3	31.3
147	25.3	45.4	35.6	59.2	44.4	43.2	39.9	54.5	23.2
148	32.9	41.1	43.2	42.8	41.1	31.3	31.3	61.7	34.6
149	52.1	47.5	65.6	36.2	38.0	32.9	32.9	72.3	71.6
150	61.7	59.2	72.3	51.0	34.6	33.7	42.6	41.1	32.9