

ミドリムシの大量培養の検討

学校法人静岡理工科大学 静岡北高等学校
科学部 2年 塩沢直政 他3名

1 動機

近年、ミドリムシは健康食品等、幅広く利用され注目を浴びているが、その詳しい生態は知られていない。培養方法に関しても一部の企業等が培養に成功しているが、方法は公開されていない。そこで、本研究ではミドリムシの生態を明らかにし、生態から有効な培養液の作製や培養の方法について検討を行い、効率の良い培養方法を確立することを目的とした。

2 要旨、概要

ミドリムシは日本全国に分布し、池などの水辺に多く生息している原生生物である。体内に豊富な栄養素を持ち、その高い栄養価から現在健康食品やバイオ燃料に利用され、今後も広く活用される可能性がある有益な生物である。有効に利用するためには大量に培養する必要があるため、静岡市内にある麻機遊水池を調査地とし、ミドリムシの生態を調べ、効率の良い培養方法を確立することを目的とし研究を行った。

3 研究方法

実験 1

〈調査地点〉

ミドリムシの分布・生態調査は静岡市内麻機遊水池（静岡県静岡市葵区牛田）において平成 29 年 4 月から 8 月に行い、採集地点は麻機遊水池の地点 1～5 とした。また、室内で行うミドリムシの観察については平成 29 年 4 月から平成 30 年 9 月までに行い、観察資料は、麻機遊水池の地点 1、4、5 において採集した。

〈採取方法〉

各地点の水と底質を採取し、空気が入らないように容器に入れ持ち帰ったものをシャーレに移し、マイクロピペットでミドリムシの種類毎に単離した。種類ごとに顕微鏡で形態等を観察した。採集する際には気温、天気を記録した。

実験 2

麻機遊水池の各池から底質を採集したのちその底質を使って土壌浸出液を作成してからオートクレーブ滅菌し土壌浸出液を滅菌した。滅菌した培地には *E. gracilis* を 400 匹ずつ入れた。土ありと土なしは、3 地点分の培地を作ることになるのでそれぞれ 3 種類ずつ作る。土なしは、土ありと同じ割合で作成するが、ビーカーに 5 倍の分量で調製する。滅菌後、土なしはビーカーに入った土壌浸出液の上澄み液だけを滅菌した試験管に 10ml 入れてから *E. gracilis* を移す。土あり、土なしそれぞれ 3 本ずつと水のみ 1 本の 7 本を 1 つのセットとする。このような条件で作成した培地と同じセットを計 4 セット用意する。培地内をよく懸濁し、均等に吸い取れるようにしてから 2 μ l を量り取る。1 週間ごとに各培地内の 2 μ l 中の細胞数を数える。

実験 3

土壌の量による、栄養の差だけでミドリムシが増えたのかを、確かめるために HUT 液状培地と HUT 寒天培地の培養実験を行った。

(1) 実験のために以下の培地を作成した

HUT 液状培地 100ml + 寒天 150mg HUT 液状培地 100ml + 寒天 0mg 精製水 10ml

- (2) 作成した培地を 20ml 試験管に入れ、これを各培地ごと四本ずつ作成する。
- (3) これらの培地に、ミドリムシを 400 匹ずつ入れる。
- (4) 培地内を、マイクロピペットで懸濁し、均一にとれるようにする。
- (5) シャーレ内に 2ul を三回ずつ落とし、三つの細胞数の平均を記録した。

(懸濁から培地の摘出までは、すべてクリーンベンチ内で行った。)

- (6) (4)、(5) の方法で、一週間ごと各培地の細胞数を測定した。

実験 4

この実験では、ミドリムシの寒天に対する運動を観察することで、ミドリムシが正の接触走性を持っているのかを調べることを目的とした。

- (1) ホールスライドガラスに以下の二種類の寒天を入れた。

寒天 1g + 精製水 100ml (10mg/ml) 寒天 0.5g + 精製水 100ml (5mg/ml)

- (2) 寒天を冷まし固め、カバーガラスを用いて半分に切り、凹凸のあるものとないものの、二種類を作成した。
- (3) 寒天を切り落とした方に、ミドリムシ 300 匹と精製水数滴を入れた。
- (4) 10 分間観察を行い、寒天の壁面に接近した個体と、離れた個体の数を記録する。これを 30 分継続し行った。
- (5) 記録した数値から、寒天に接近した個体に対し、寒天にとどまった個体の割合を算出し、グラフにまとめた。

*実験に用いた寒天は、あらかじめオートクレーブを用いて滅菌した。

計測前に寒天に接着していた個体は、記録に含まなかった。

実験 5

この実験では、培地の粘度の違いが、ミドリムシの増殖に与える影響を調べることを目的とした。

- (1) 培地として以下の五種類を調整した。

A : 寒天 500mg + HUT 液状培地 100ml

B : 寒天 250mg + HUT 液状培地 100ml C : 寒天 125mg + HUT 液状培地 100ml D : HUT 液状培地 100ml E : 精製水 100ml

- (2) これら五種類の培地を、オートクレーブを用いて滅菌したのち、10ml ずつ試験管に入れ、これらの培地にミドリムシ 400 匹を入れ、培養した。
- (3) 一週間ごとミドリムシの細胞数を数え、記録した。

〈記録方法〉

- (1) 培地内をピペットで懸濁し、均一に採取できるようにした。
- (2) シャーレ内に培地 10 μ l を三回とり、それぞれの細胞数を数えた。
- (3) 三つの平均値をとり、これを記録した。

*懸濁から培地の摘出までは、すべてクリーンベンチ内で行った。

A の培地はピペットによる培地の摘出ができなかったため、目視で培養状態を確認した。

4 結果

実験 1 の結果

ミドリムシは、五月中旬以降、特に水温が 25℃以上になって後に採集できることが多かった。地点 1、5 では 2 種、地点 4 では 3 種、計 5 種のミドリムシを採集・観察することができた。底質が沈殿している状態で底質の上にある水を採取し、観察してもミドリムシは存在していなかったが、底質と共に採取し観察すると、ミドリムシが存在していた。また、シャーレに底質と共に採取した水を入れると、ミドリムシはどれもシャーレの底に沈んだ状態でとどまっていた。

実験 2 の結果

全ての土あり培地は 5 週目から 7 週目にかけて細胞数が増加しているが、全ての土なし培地が同じ時期にかけて細胞数が減少している。これにより 7 週目から 9 週目にかけて土あり培地と土なし培地の細胞数に差ができていく。9 週目には地点 5—土ありの培地が、他の土あり培地に比べ細胞数が減少している。

実験 3 の結果(グラフ 1 参照)

HUT 寒天培地と HUT 液状培地を比較すると、HUT 寒天培地の方が HUT 液状培地よりも増えていた。実験中、ミドリムシは寒天付近にいたことが多かった。

実験 4 の結果 (グラフ 2、3 参照)

多くのミドリムシが寒天に接近し、そこにとどまった。また、凹凸がある培地とない培地とでは、凹凸のある培地のほうが、より多くの個体が集まった。

実験 5 の結果

寒天培地では、HUT 培地のみの培地と比べて細胞数の増加に有意な差があった。また、HUT 寒天培地のうち培地 B の細胞数は培地 C より有意に増加していた。培地 B と培地 C はすべての試験管内で増加した。培地 A は粘度が高すぎたため、採取できず他の培地のように計測できなかったが、目視で培地 A 試験管上部でのみ増加が確認できた。

5 考察

実験 1 の考察

平成 29 年から平成 30 年に行ってきたミドリムシの 5 つの採集地点のうち地点 1、4 ではミドリムシが多く採集できた。ミドリムシが観察できたサンプルは、水温が 25℃の時のものであることから、増殖する温度条件は 25℃以上であり、ミドリムシの観察時、常に池の底質表面にいたことが多いため、底質に接する生活形態を持つと考えられた。そこから、底質に増殖する要因がある可能性が考えられ、特に多くミドリムシが採集できたのは地点 1、4 であることから、植物由来の物質が多く、ある程度底質の粒子が大きいものが培養に適している可能性があることが示唆された。以上の生態調査の結果より、培養には植物由来の物質が多く、ある程度粒子が大きいものを含む培養液が培養に適していると考えた。

実験 2 の考察

土なしの培地よりも土ありの培地の方が細胞数の増加が確認された。このことから、培地中の底質がミドリムシの細胞数の増加に影響していると言える。これを底質が溶液中に養分を供給する働きをするからではないかと考え、ミドリムシにとって底質は必要なものであると言える。また、各地点におけるミドリムシの有無の表と比べると、ミドリムシがよく観察することができた地点 1 と 4 の底質を使った培地で *E. gacilis* の増加が見られた。よって、地点 1 と 4 はミドリムシにとって増殖しやすい何らかの要因があると考えられる。このように、各地点で観察されたミドリムシの個体数と各培地での増殖速度との関連性や、地点ごとの細胞数の増殖速度に違いが見られたことが、どのような要因によって生じたかを明らかにするための実験を行っていく必

要がある。

実験3の考察

寒天は、ミドリムシにとって、養分として働かないため、実験2で底質を含んだ培地のミドリムシが増殖した要因には、養分以外の要因が影響していると考えられる。寒天付近にミドリムシがいることが多かったことから、ミドリムシは物理的な要因によって増殖した可能性があると思われる。

実験4の考察

多くのミドリムシが寒天に接近し、そこにとどまったことから、ミドリムシには正の接触走性がある可能性が高いと考えられる。

また、凹凸がある培地とない培地とでは、凹凸のある培地のほうが、より多くの個体が集まったことから、固体の表面積も寒天に対するミドリムシの密集度と関係していると考えられる。

実験5の考察

結果から、ミドリムシの培養には粘度の高い培地が適していると考えられる。しかし、最も粘度の高い培地Aでは、ユーグレナは二週目以降から増殖しなかった。このことから、培地の粘性には適切な値が有り、固くなり過ぎるとミドリムシは成長しにくくなると考えられる。

6 結論（課題）

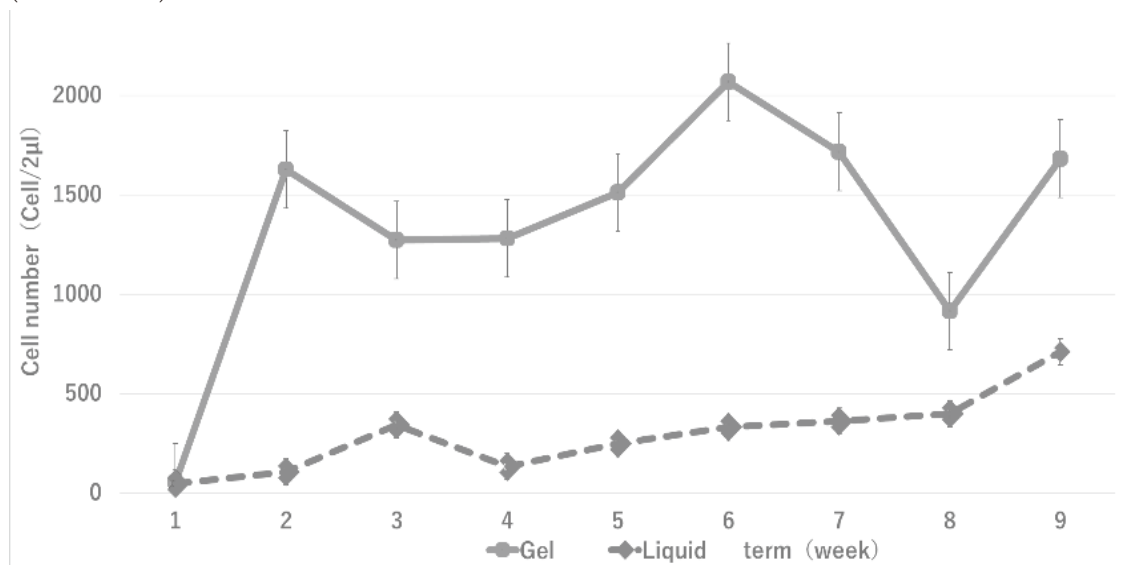
研究を通してミドリムシには正の接触走性がある可能性が高いということ、ミドリムシの培養には粘度の高い培地のほうが適しているということが分かった。

今後は麻機遊水地で採取したミドリムシを培養するとともに種類による適した培地や培養条件を調べていく。また粘度の高い培地でも計測できる方法を模索しようと思う。

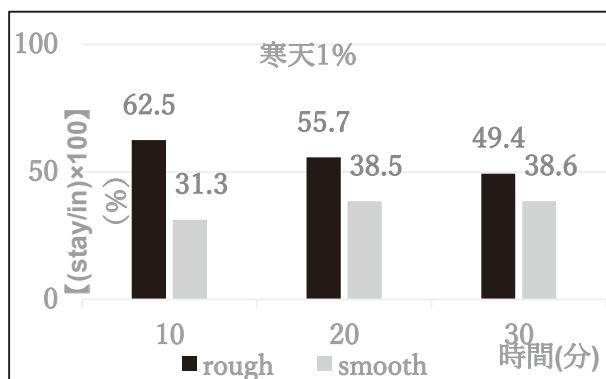
7 参考文献

- ・一瀬 諭 若林徹哉 (2008)
『普及版やさしい日本の淡水プランクトン 図解ハンドブック改訂版』 合同出版
- ・月井雄二 (2010)『原生生物 ビジュアルガイドブック 淡水微生物図鑑』 誠文堂新光社
- ・「原生生物の採集と観察」
<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/DataBook/m&m/2003/contents.html> (2017. 6. 3)
- ・「淡水プランクトンのページ」
<http://cyclot.sakura.ne.jp/index.html> (2017. 6. 17)
- ・「ユーグレナ（ミドリムシ）の観察」 斎藤実
<http://ci.nii.ac.jp/els/contents110006151493.pdf?id=ART0008119052> (2017. 6. 27)
- ・「動植物プランクトン調査編」
http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/mizukokudam/system/download/H24D_Chousamanual_dam/H24D_06pura.pdf (2017. 6. 27)
- ・「培地リスト」
<http://mcc.nies.go.jp/02medium.html> (2017. 7. 10)
- ・「微生物株取り扱い手引き」
https://mcc.nies.go.jp/download/manual_for_beginners_j.pdf (2017. 9. 13)
- ・「微生物の培養液一覧表」
<http://www.hyogoc.ed.jp/~rikagaku/jjmanual/manual/i2107.htm> (2017. 9. 13)

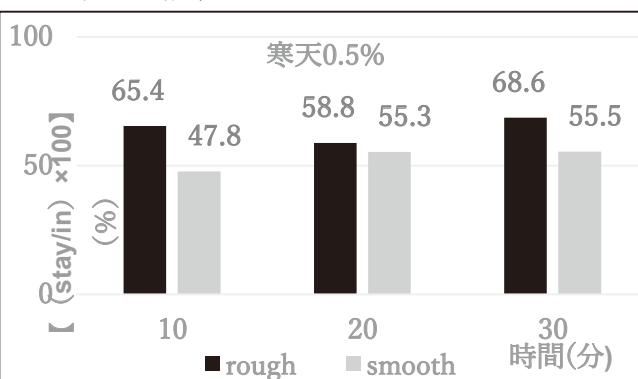
(2017. 9. 22)



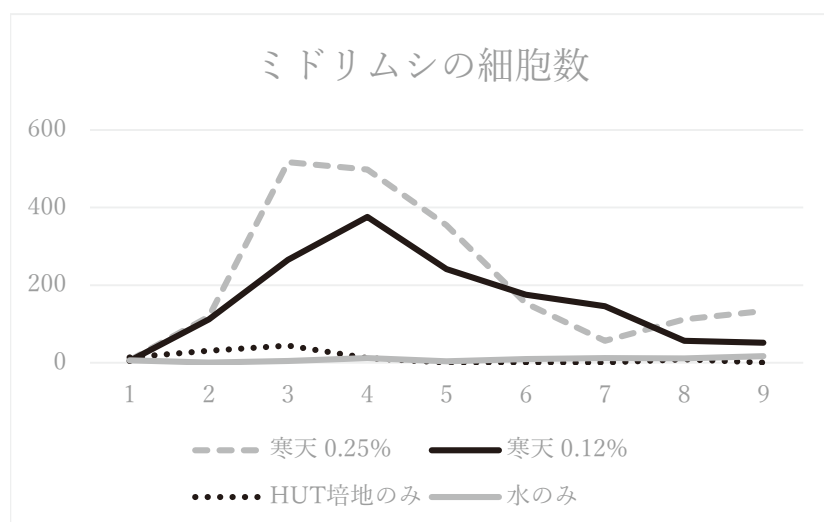
グラフ1 実験3の結果



グラフ2 寒天1%にミドリムシが接触した数と離れた数



グラフ3 寒天0.5%にミドリムシが接触した数と離れた数



グラフ4 粘度の異なる培地のミドリムシの細胞数の変化