

## 芝生からネンジュモを撃退するIV

静岡県立掛川東高等学校

サイエンス部 2年 名波由宇多 榛村浩輔 小塚琉希 1年 赤堀百音 谷川正都

### 1 動機

弓道部より弓道場の芝生で繁殖したネンジュモ「イシクラゲ」を駆除して欲しいと依頼され研究を始めた。昨年度、弓道場 方形枠 での駆除に成功し、本年は、ネンジュモが周りの pH を上げる理由を掘り下げたいと研究した。

### 2 昨年度までの研究

- (1) 芝生に影響なくネンジュモを撃退する酢酸は 0.05mol/L である。
- (2) 酢酸により、ネンジュモの呼吸量が減少する。
- (3) 酢酸を 3 日に一度 散布すると撃退できることを発見し、弓道場 方形枠 のネンジュモを実際に撃退することに成功した。
- (4) ネンジュモは自身で弱塩基性の環境を作り、酢酸散布後、短い時間で pH を上昇させることがわかった。これを本年度は研究する。

### 3 本年度の研究

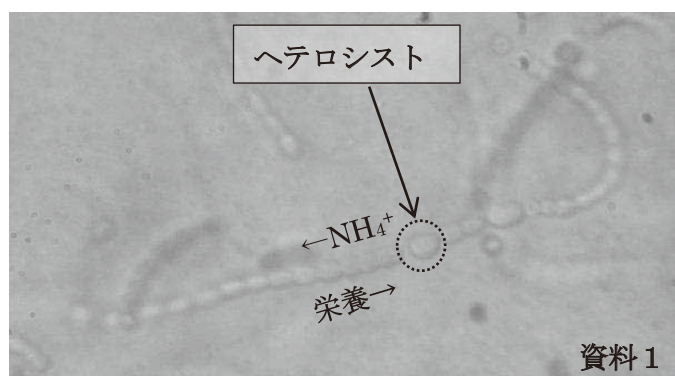
塩基性環境を作り出す物質として、以下の2つに注目して研究した。

- (1)  $\text{NH}_4^+$  : 窒素固定で得た  $\text{NH}_4^+$  (塩基性物質) の細胞外への排出。
- (2)  $\text{CO}_2$  : 明所の光合成による  $\text{CO}_2$  (弱酸性物質) の細胞内への吸収。

### 4 ネンジュモ「イシクラゲ」とは

ネンジュモとは原核生物のシアノバクテリアの一種である。「イシクラゲ」は陸上に生育し、弱塩基性の土壌を好む。資料1は野外の野生株ネンジュモである。普段は乾燥わかめのような状態だが、雨が降ると寒天状になる。寒天状の物質は多糖類で、乾燥耐性を持つ。多糖類の中に他の微生物が生育している。

ネンジュモは単細胞生物だが、分裂した後、離れることなくつながり糸状体をつくる。途中に「ヘテロシスト」という大きな細胞があり(資料1)似ているため、その名がついている。ヘテロシストでは窒素固定を行って、空中の窒素  $\text{N}_2$  から自分で肥料の  $\text{NH}_4^+$  を作り出すことができる。肥料は周りの栄養細胞に渡し、栄養細胞からは光合成でつくられた栄養を受け取る。



### 5 材料・薬品等

#### 〈材料〉

- ・ネンジュモ野生株 *Nostoc Commune Vearch*  
校内で採取、洗浄、乾燥させた新鮮なものを使用
- ・ネンジュモ無菌株 *Nostoc sp.* (HK-01株)  
三重大学から分けていただき、サイエンス部で、無菌の継代培養したものを使用  
野生株には多糖類中に微生物が生育するため、無菌株の HK-01 と比較した。

- ・培地：MDM 培地
- ・培養時間：規定通りの明 10 時間、暗 14 時間

<使用機器>

- ・簡易吸光光度計「デジタルパックテスト」（協立理化学研究所）
- ・オートクレーブ：培地の滅菌
- ・ウォーターバス：無菌株を定温に保つ
- ・卓上遠心機：ネンジュモを沈殿させて、上澄み液を測定する

<薬品>

- ・パックテスト：NH<sub>4</sub><sup>+</sup> インドフェノール青色法（協立理化学研究所） ・ 0.05mol/L 酢酸
- ・ 0.0005mol/L 酢酸 ・ MDM 培地（資料 2）

MDM 培地	
KNO <sub>3</sub>	100mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25mg
NaCl	10mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.6g
Fe solution	0.1mg
Trace metal mix A5+Co	0.1mg
Distilled water(蒸留水)	99.8ml

資料 2

<使用器具>

- ・気体用スクリーバイヤル：無菌株を密封し、微生物の混入を防ぐ
- ・気体用マイクロシリンジ：CO<sub>2</sub>の注入に使用
- ・マイクロピペット
- ・二酸化炭素ガスボンベ
- ・1.5mL エッペンドルフチューブ

6 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>パックテストの有効性の確認

- (1) 蒸留水では発色しないことを確認した後、野生株を入れると、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>値が増加した。
- (2) MDM 培地の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度は 0.2mg/L だが、無菌株培養中の MDM 培地は 1.5mg/L まで上昇した（資料 3）。無菌培養で CO<sub>2</sub>が減り、光合成できずに NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を排出したと考えられた。

	MDM	MDM+無菌株
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	0.2	1.5

資料 3

- (3) 無菌株のバイヤル瓶に、CO<sub>2</sub>を注入すると、明所での NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度は 0.2 mg/L に減少した（資料 4）。光合成できたことで NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を無駄なく使い、排出しなかったのではないかと考えられた。

	CO <sub>2</sub> 無		CO <sub>2</sub> 有(500 μ L)	
	明	暗	明	暗
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	0.5	1.0	0.2	0.5

資料 4

以上の実験から、デジタルパックテストは信用できるデータが得られると考えた。

## 7 仮説

ネンジュモが塩基性環境をつくり出す要因を2つ予想し、仮説とした。

### (1) 仮説1 $\text{NH}_4^+$ の排出。

ネンジュモのヘテロシストが、空中の窒素を窒素固定して $\text{NH}_4^+$ を作り出し、何らかの条件下で、それを排出して塩基性環境を作り出すと考えた。例えば、光合成ができない時に、せっかく作った $\text{NH}_4^+$ を利用できずに排出する可能性があるのではないかと考えた。

### (2) 仮説2 光合成による $\text{CO}_2$ 吸収

$\text{CO}_2$ が溶け込んで弱酸性となっている液体から、光合成によって $\text{CO}_2$ を吸収し、pHが上昇して弱塩基性環境になると考えた。

## 8 <調査1> $\text{NH}_4^+$ 排出量測定

### (1) 方法

同じ蒸留水でスタートし、同量のネンジュモを入れて、明暗2時間ごとの $\text{NH}_4^+$ 濃度変化を8時間測定した。各検体は3つずつ測定して平均し、実験誤差を減らすようにした。卓上遠心機でネンジュモを沈殿させ、上澄み液を取り出して、簡易吸光光度計で測定した。

### (2) 結果

$\text{NH}_4^+$ 濃度が上下して安定しなかった。

### (3) 考察

何度も条件を見直したが、理由の解明ができなかった。窒素固定により $\text{NH}_4^+$ を作り出し、それを排出する、という仮説を証明することはできなかった。

## 9 <調査2> 光合成による $\text{CO}_2$ 吸収

光合成により $\text{CO}_2$ を吸収し、pHが上昇するのではないかと考えた。そこで、明所と暗所でのpH変化をア、蒸留水 イ、酢酸 ウ、MDM培地で調べた。蒸留水は、イオン交換水を利用した。酢酸とMDMは無菌株で調べた。酢酸の濃度は、枯死する $0.05\text{mol/L}$ より、100倍に薄めた $0.0005\text{mol/L}$ で測定した。

### (1) 方法

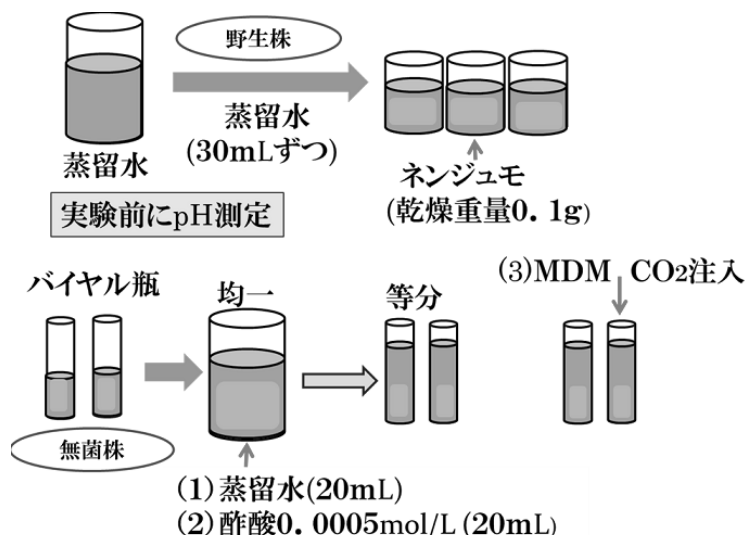
ア あらかじめ溶液のpHを測定する。

イ 無菌株は、ガスバーナー元の無菌状態で作業した。

ウ 野生株は乾燥重量 $0.1\text{g}$ を $30\text{mL}$ の蒸留水に入れる。検体3つを平均する。無菌株はバイアル瓶を混合して均一にした後、再びバイアル瓶に等分する。検体2つを平均する。

エ MDM培地だけは、半分のバイアルにシリンジで $500\mu\text{L}$ の $\text{CO}_2$ を注入した。

オ MDM培地は45分後、蒸留水と酢酸は1時間ごとに、均一に混ぜて溶液を取り出し、測定する。(資料5)



資料5

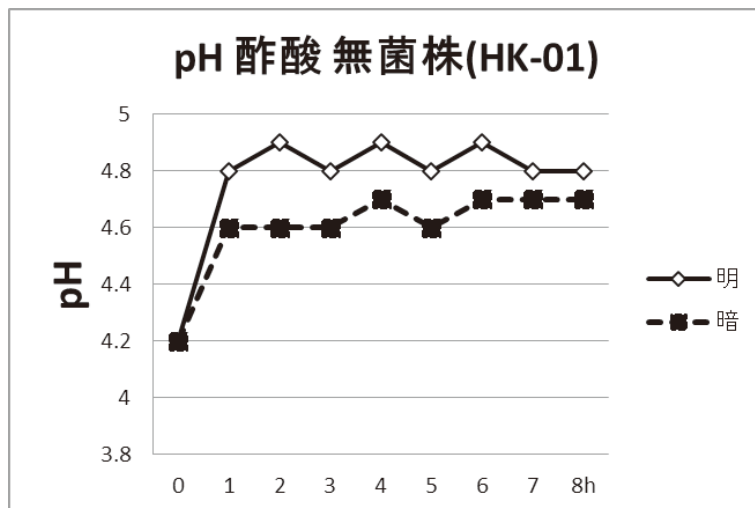
## (2) 結果

### ア 蒸留水

実験ごとに結果が異なった。何度も条件を見直しながら確認したが、pHの上昇は、毎回見られるわけではなかった。

### イ 酢酸：無菌株

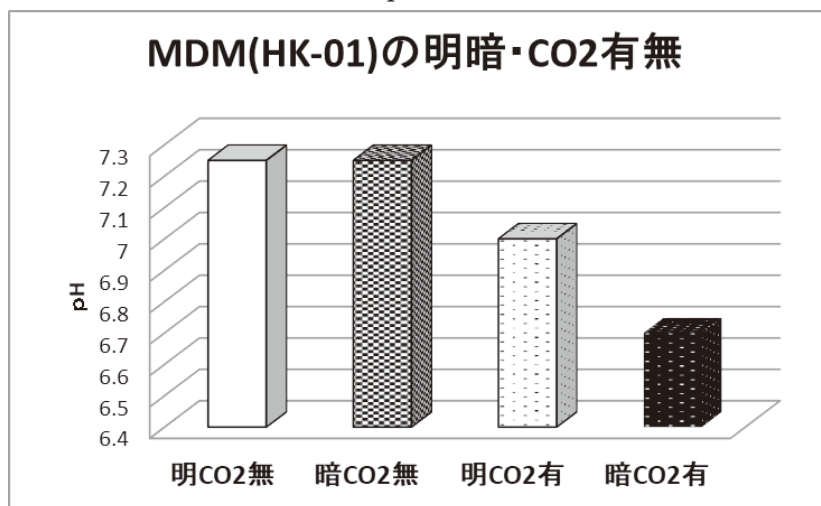
蒸留水と異なり、酢酸の pH は安定しており、明所のネンジュモによって pH を上昇させることを確認できた。(資料6)



資料6

### ウ MDM 液体培地

資料7の結果が得られた。左側2つのCO<sub>2</sub>無しでは、光合成ができないために明暗のpHに差がない。右側2つのCO<sub>2</sub>有りはCO<sub>2</sub>が液体に溶け込むためにpHが下がる。しかし、明所ではpHが上がる。暗所pH6.7に対し、明所はpH7.0と上昇した。これによりネンジュモが光合成を行うと液体中のCO<sub>2</sub>を吸収し、pHが上昇することの証明ができた。



資料7

## (3) 考察

### ア 蒸留水

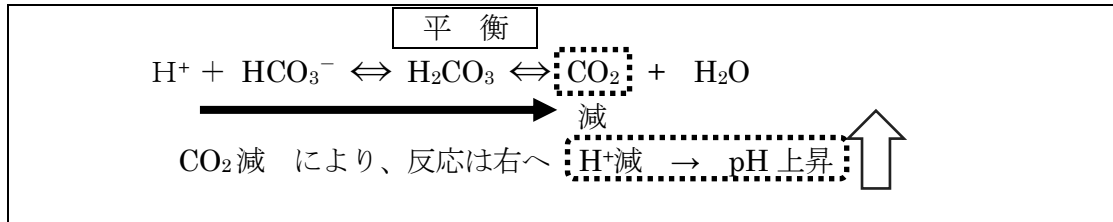
明所のpHの上昇は、毎回見られるわけではないことがわかり、蒸留水では結果の証明ができなかった。実験により、同じ蒸留水、同じ温度で測定しても、蒸留水のpHは、5強~7強の広い範囲で不安定に変わることを確認した。

そこで、メルク社の文献により「蒸留水のpHが安定しない理由」を確認した。それによると、pH7でのH<sup>+</sup>の少なさと、周りのあらゆるものを溶かし込む蒸留水の性質のためにpHが安定しないと考えられていることがわかった。電極にわずかに残る成分でも、pHが変化する。

## イ 酢酸と MDM 培地

明所で pH が上昇する。データは毎回安定していた。蒸留水以外では、「光合成により CO<sub>2</sub> を吸収すると、pH が上昇する」という仮説が証明された。

CO<sub>2</sub> を吸収すると、pH が上昇する理由として、早稲田大学園池公毅教授の「光合成の森」では、化学平衡が考えられている。(資料 8)



### 資料 8

CO<sub>2</sub> の水中での変化では、物質が資料 8 上段の 3 つの段階を行き来して変化し、平衡の状態になっている。ここで CO<sub>2</sub> が減少すると、それを補うように右に反応が進み、H<sup>+</sup> は減少して pH が上昇することになる。これは狭い水槽に藻類がはえるとよく見られる現象である。無菌株の密封バイヤル瓶は CO<sub>2</sub> が不足していたため、pH が上昇していたと考えられる。

## 10 今後の課題

- (1) pH 測定に適した液体は何かを調べる。
- (2) ネンジュモが分泌する化合物をピックアップし、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>だけでなく、多糖類などで、pH を上昇させる化合物を調べる。
- (3) 乾燥ネンジュモの呼吸量を測定し、「クリプトビオシス」に近い状態を示すことを確認する。

## 11 参考文献

- ・日本植物生理学学会「みんなのひろば」HP [http://jspp.org/hiroba/q\\_and\\_a](http://jspp.org/hiroba/q_and_a)
- ・「光合成の森」早稲田大学植物生理学研究室  
園池公毅教授 HP <http://www.photosynthesis.jp/>
- ・国立環境研究所 微生物系統保存施設 HP 微生物株取扱いについて(初心者用)
- ・Isolation and Characterization of a Drought-Tolerant Cyanobacterium ,  
*Nostoc sp.*HK-01 HP <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsme2/>
- ・シグマアドリッチ(メルク)公式サイト「純粋や超純水の pH 判定が難しい理由」  
<https://m-hub.jp/water/2822/186>

## 12 謝辞

静岡理科大学 理工学部物質生命科学科 齋藤明広教授

吸光光度計の操作方法をご教授いただき、借用させていただきました。

三重大学 生物資源学部生物資源研究学科 加藤浩教授

培養方法のご教授、その他たくさんのアドバイスをいただきました。

ご協力いただき、本当にありがとうございました。