

SHIGYO 法をミドリムシ培養に応用する

静岡市立高等学校
科学探究科 2 年 篠原祐奈 他 3 名

1 動機

植物工場で用いられている植物育成法の「SHIGYO 法(Shigyo 法との表記に同じ)」が、ミドリムシの培養に応用できるのではないかと考え実験を始めた。

2 SHIGYO 法

植物に一日中(24 時間)光を当て続けた場合、育成が阻害されることが広く知られているが、山口大学農学部の実行正義教授と昭和電工は、植物に照射する光を赤, 青に限定し交互に与えることで、光を当て続けても育成が阻害されるどころか、促進されることを見出した。このことを応用し、植物の生育に最適な照射方法(赤青比)を見出し、経時的に照射強度を変える方法は SHIGYO 法と呼ばれ、植物の成長と光応答の関係に着目した例として注目されている。

3 研究目的

SHIGYO 法はミドリムシ培養に有効かを調べる。

4 実験準備

自作の装置 (Fig. 2, 3, 4) を作り、赤青光の照射時間は赤 12 時間、青 12 時間の交互照射とする SHIGYO 法の下でミドリムシを培養した。ミドリムシの増加については、顕微鏡での個体数カウントと分光光度計での吸光度測定により調べた。SHIGYO 法とその対照実験の設定については、文献¹⁾を参考に、シロイヌナズナとリーフレタス栽培の光条件をミドリムシ培養に適応させた。

(1) 作り方とタイマーの設定

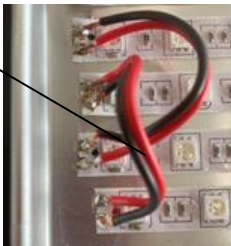
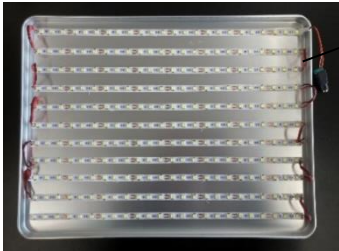
	配線拡大図	Fig. 2, 3, 4 の蓋に LED を取り付けた図
SHIGYO 法用 装置蓋	 b) a) 赤 a') 青 a) 赤 a') 青	 c)
対照実験用 装置蓋	 b) a'') 白 a'') 白	 c)

Fig.1 LED ライトを取り付けた装置蓋 a)LED テープ b) ビニル平形コード c) 餃子バット

- ① 2つの段ボール箱の内側(底と側面)に、光を反射させるためのアルミホイルをボンドで貼った。
- ② 蓋にする餃子バットに幅1cmのLEDテープを等間隔で貼った。このとき、SHIGYO法に用いる蓋は赤色光と青色光のテープを交互に貼り、対照実験に用いる蓋は、赤色光または青色光と同数のライトとなるよう、白色光のテープ幅を調節して貼った。
- ③ ビニル平形コードを10cm程度に30本切り、端のビニルを5mm切って金属部を露出させた。
- ④ 各LEDテープの端をビニル平型コードで接続するようにはんだ付けをした。(色ごと一つの電源のオンオフですべてのライトが同時に点灯、消灯できるようにした。)
- ⑤ DCアダプターを取り付け、タイマーに繋いだ。

(2) 完成した装置について

Fig. 2, 3は同じ箱であり、Fig. 2は赤色光が点灯している状態、Fig. 3は青色光が点灯している状態である。12時間ごと赤色光と青色光が切れ変わるようにタイマーを設定した。Fig. 4は対照実験用の箱である。1日(24時間)のうち12時間、白色光が点灯するようにタイマーを設定した。



Fig. 2 完成した装置
(赤色LED点灯時)



Fig. 3 完成した装置
(青色LED点灯時)



Fig. 4 完成した装置
(白色LED点灯時)

なお、各LEDライトの分光強度(Fig. 5)を測定したところ、購入したLEDライトは、可視光領域の波長全体が含まれる白色ライト(ピーク波長460nmと580nm)をベースに、青色であれば、420～530nm以外の可視光波長をカット、赤色であれば590～660nm以外の可視光波長をカットしていることが分かった。そして、分光強度は青色が赤色の3倍程高い値となっているが、ミドリムシが吸収する光強度(Fig. 6)を測定したところ、実験に用いたミドリムシの吸光は、赤色に比べ、青色を3倍以上多く取り込んでいることがわかったため、LEDライトの数を赤色と青色で増減することなく同数用いた。

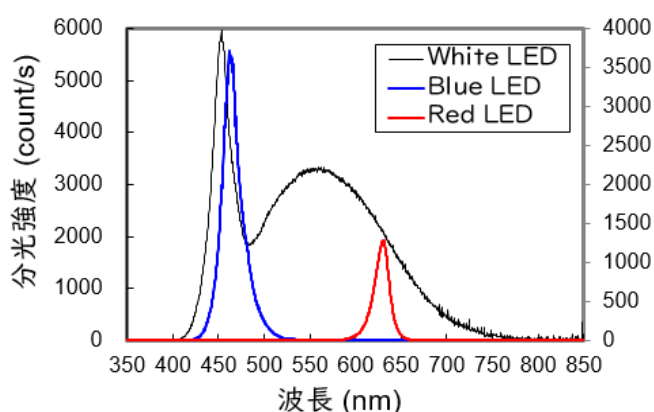


Fig. 5 実験に用いたLEDライトの分光強度

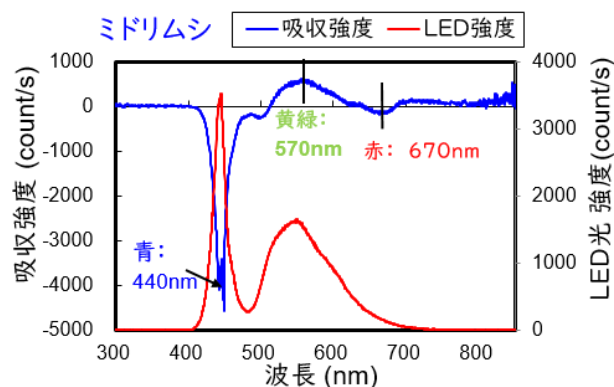


Fig. 6 実験に用いたLEDライトの光強度と
実験に用いたミドリムシの吸収強度

(3) 実験にもちいたミドリムシの調整

- ① 軟水ミネラルウォーター600mLにMS培地を0.645g加えてよく攪拌し、MS溶液とした。
(0.25mol/L)
- ② MS溶液を6本の空ペットボトル(500mL)に100mLずつ分けた。なお、実験開始時は概ねFig. 8のような状態であった。
- ③ ミドリムシ培養液を50mLずつ加え、攪拌した。
- ④ ペットボトル3本ずつを透明プラスチックケースに入れ、一方はSHIGYO法条件下で培養し、もう一方は対照となる白色LEDの下で培養した。

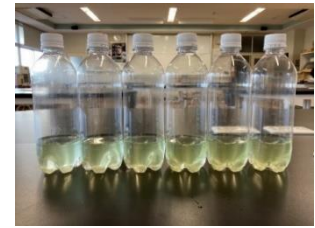


Fig. 7 実験4日目(9月16日)

5 実験方法

(1) 顕微鏡での個体数カウント方法(区画法)

- ① 直径32mmプラスチックシャーレにペットボトルからのミドリムシ培養液を2mL入れた。(6本それぞれ行った)
 - ② 1つのシャーレに対して3枚ずつ写真を撮った。(スライドガラスを使用するとカバーガラスをかけた際に、ミドリムシがカバーガラスの淵に偏ってしまうためシャーレを用いることにした。)その際顕微鏡には、事前に1目盛りの大きさが $10\mu\text{m}$ であることを確認した接眼マイクロメーターをセットし、目盛りが映り込むようにした。
 - ③ 写真を印刷し、 $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ で枠を3つ作り、それぞれの枠内にいるミドリムシの個体数を数えた。ただし線上のミドリムシはカウントしなかった。(Fig. 8)
- ### (2) 分光光度計での吸光度測定方法
- ① ガラスセルに6本ペットボトルからそれぞれミドリムシ培養液2mLを入れた。
 - ② 波長を440nmに設定した分光光度計でミドリムシ吸光度を測定した。(440nmはミドリムシが最も吸光する波長のため(Fig. 6)、440nmを吸光度測定に用いた。)

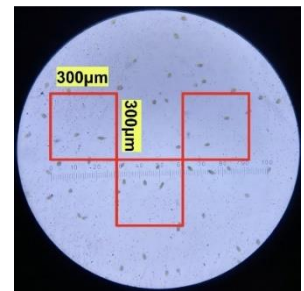


Fig. 8 個体数のカウント方法

6 結果

(1) 顕微鏡での個体数カウント結果

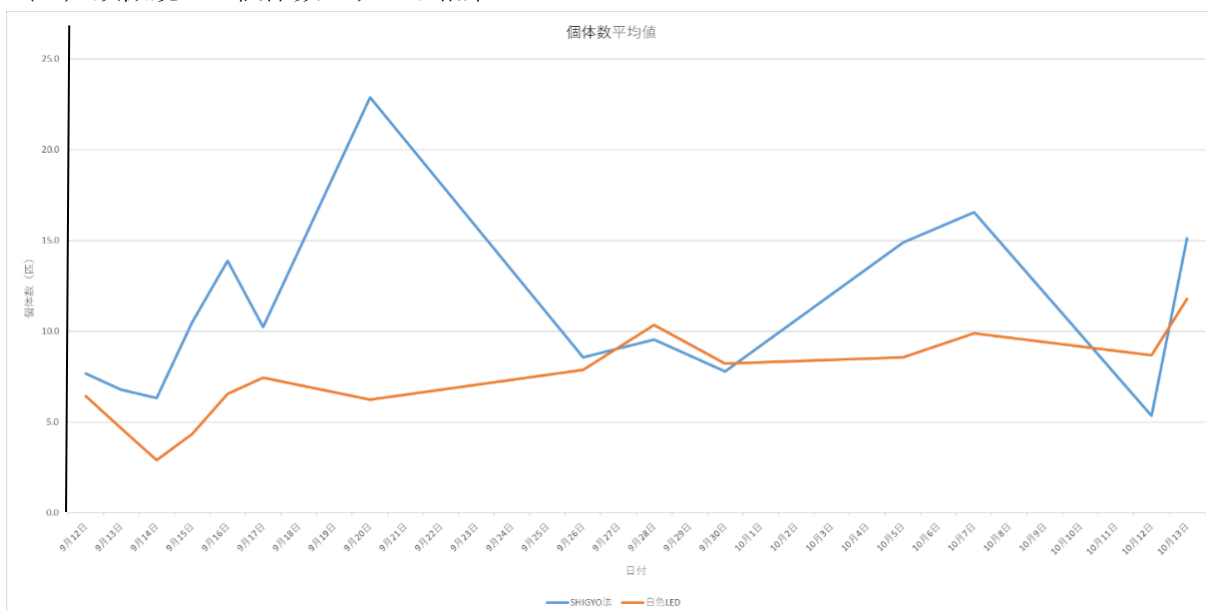


Fig. 9 顕微鏡での個体数カウント結果(平均値)

(2) 分光光度計での吸光度測定結果

各3本、1本のペットボトルにつき1回ずつ測定した。

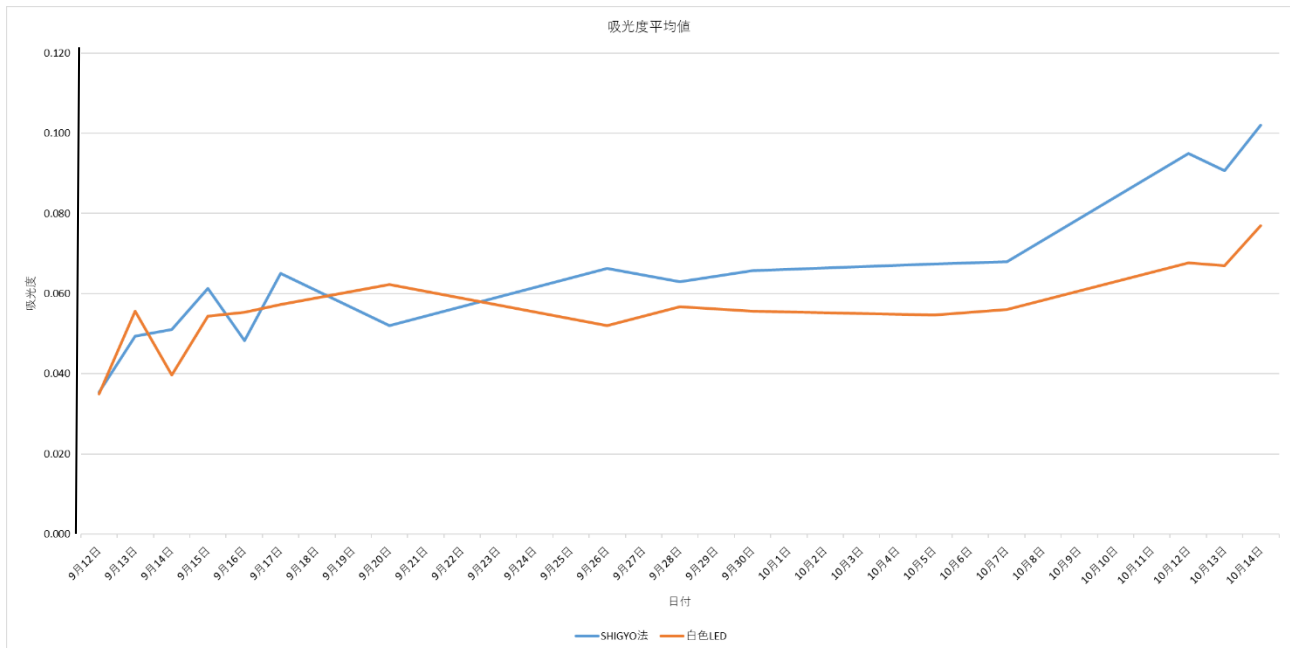


Fig. 10 分光光度計での吸光度測定結果のグラフ（平均値）

7 考察

(1) 顕微鏡での個体数カウント結果について

SHIGYO 法のみドリムシは活発に動いているものが多かったが、白色 LED の下で培養した対照のみドリムシは動かないみドリムシが多かった。このように顕微鏡観察では、SHIGYO 法で培養しているみドリムシの方が状態がよいことを把握できるのに、個体数のカウントでその状態を示すことができず残念である。

SHIGYO 法のみドリムシの個体数カウントで安定したデータを得られないのは、みドリムシが活発に動くため、写真を撮るタイミングで顕微鏡のピントを多くのみドリムシに合わせられなかったからだと考えた。シャーレの中のみドリムシは上下に移動しており、状態がよく活発であればあるほど動く。総じて個体数カウントの結果がかなり分散しており、データとしての信憑性に欠けていると判断した。

(2) 分光光度計での吸光度測定結果について

SHIGYO 法での培養を始めてから、対照と比べ吸光度において常に優位な差が出るまで 10 日ほどかかった。しかし優位になってから、徐々に吸光度の値に差が表れ、顕微鏡で観察しているみドリムシの状態と、データとに相関があると考えられた。

実験の立ち上がりに時間がかかるものの、SHIGYO 法で培養すると、みドリムシの個体数を反映した吸光度の値が対照よりも高い。このことから、SHIGYO 法はみドリムシ培養に効果的だと結論付けた。

しかし仮説の段階では SHIGYO 法がより優位な数を示すと考えていた。期待したほど大きな差にはならなかったのは、実験期間中にみドリムシ培養液が緑色から黄色に変色したためだと考える (fig. 11)。そのため、みドリムシが反射する光の波長が変化し、吸光度の値に影響が出たのではないか。その際吸収する光に吸光度の値を変更していたら、より SHIGYO 法の効果をわかりやすく示せたかもしれない。

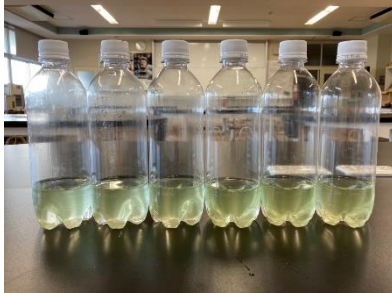
個体拡大(10月20日)	実験容器全体 (左から SHIGYO 法 1, 2, 3、対照 1, 2, 3)	
緑のミドリムシ 		実験 4 日目 (9 月 16 日) (左写真 fig. 7 に同じ) ミドリムシ培養液はいずれも緑色をしている。
黄色いミドリムシ 		実験 30 日目 (10 月 12 日) ボトルの順は上に同じ。 ミドリムシ培養液はいずれも黄色くなっている。

Fig. 11 実験後黄色になったミドリムシと通常のミドリムシの比較

8 追加研究

実験期間中にミドリムシ培養液が緑色から黄色に変色した。顕微鏡で個体を観察すると、細胞内の葉緑体数を大きく減らしていたため、設定培養条件に不足があると考えた。その原因をとらえ、SHIGYO 法でミドリムシを培養するうえでの改善点を明らかにするために、以下の実験を行った。

(1) 背景・目的

黄色く変色したミドリムシを、緑色に戻すために必要な条件を見つけ、培養条件の改善を図る。

(2) 仮説

黄色く変色したミドリムシ培養液中のミドリムシは、不足した培養条件を加えることで緑色に戻る。不足している培養条件の候補は日光, MS 溶液 (栄養分), CO₂ とし、私たちが不足による影響が強いと考える順に示した。

(3) 手順

- ① 黄色ミドリムシ培養液 500mL を 4 本のペットボトルに分けた。(1 本 125mL)
- ② 軟水ミネラルウォーター 50mL に MS 培地を 0.43g 加えてよく攪拌した。
- ③ 1 本のペットボトルにイの MS 溶液を 25mL 入れ、残りの 3 本のペットボトルにはそれぞれ 25mL ずつ軟水ミネラルウォーターを入れた。
- ④ 分光光度計での吸光度測定 (初回のみ波長 520nm、2 回目から波長 560nm) を行った。
(初回の波長設定は誤りだったが、0 日目時点でそれぞれが波長 520nm においてはであるが、同じ状態であったことを示すため、データとして利用した。)
- ⑤ 4 本のペットボトルのミドリムシの培養環境
 - ア 日光の下で培養した。以下「日光」
 - イ MS 溶液 (栄養) を加え、白色 LED の下で培養した。以下「MS」
 - ウ CO₂ を加え、白色 LED の下で培養した。以下「CO₂」
 - エ 白色 LED の下で培養した。以下「対照」
- ⑥ 吸光度測定方法
ガラスセルに 2mL ミドリムシ培養液を入れ、波長を 560nm (初回のみ 520nm) 設定した分光光度計で吸光度を測定した。前述したが初回の波長 520nm での測定は誤りである。

(4) 結果

日光	MS	CO ₂	対照	写真のペットボトルは左から「日光」、「MS」、「CO ₂ 」、「対照」の順で並んでいる。
				1. 10月20日(0日目) 吸光度測定 ○ CO ₂ を入れたペットボトルでは、CO ₂ が溶液に溶解込んだため、容器のへこみを観察した。一度ボトルを開け形を戻す。
				2. 10月21日(1日目) 全体的に色が濃くなったように見えるが、下の板によるもので、変化はほぼない、と判断。
				3. 10月22日(2日目) 吸光度測定 ○ 黄色ミドリムシの原因として、日光に含まれる波長の光不足を有力視していたが、MSの方が先に色が濃くなった。
				4. 10月25日(5日目) 吸光度測定 ○ CO ₂ を入れたペットボトルでは、ミドリムシ培養液が透明になったため死滅を疑う。吸光度もCO ₂ を入れたもののみ低下。
				5. 10月26日(6日目) MSを加えたものの方が先に色が濃くなった。CO ₂ を入れたペットボトルでは、より色が無色透明に近づいた。
				6. 10月27日(7日目) 吸光度測定 ○ CO ₂ を入れたペットボトルのミドリムシを顕微鏡で観察すると、少ないが黄色ミドリムシが存在することが確認できた。
				7. 10月31日(11日目) 吸光度測定 ○ 透明だったCO ₂ を入れたペットボトルに色がついていることを確認。吸光度は他と比べ最も高くなった。
				8. 11月2日(13日目) 吸光度測定 ○ CO ₂ を入れたペットボトルが明らかな緑色になっていた。
				9. 11月4日(15日目) 吸光度測定 ○ CO ₂ を入れたペットボトルでより鮮やかな緑色となった。ミドリムシの増加を示す吸光度も3倍以上高まっている。
				10. 11月7日(18日目)写真上 ~11月25日(36日目)写真下 CO ₂ を入れたペットボトルで濁りが生じ始める。以後11月25日まで観察を続けるが、状態はほぼ変わらない。対照に比べ、MS培地を加えたもの、日光に当てたものの順で、ミドリムシの増加が確認できるが、黄色ミドリムシが緑色に戻ったものはCO ₂ を入れたペットボトルのみであった。
				

Table 1 各条件における溶液の経日変化

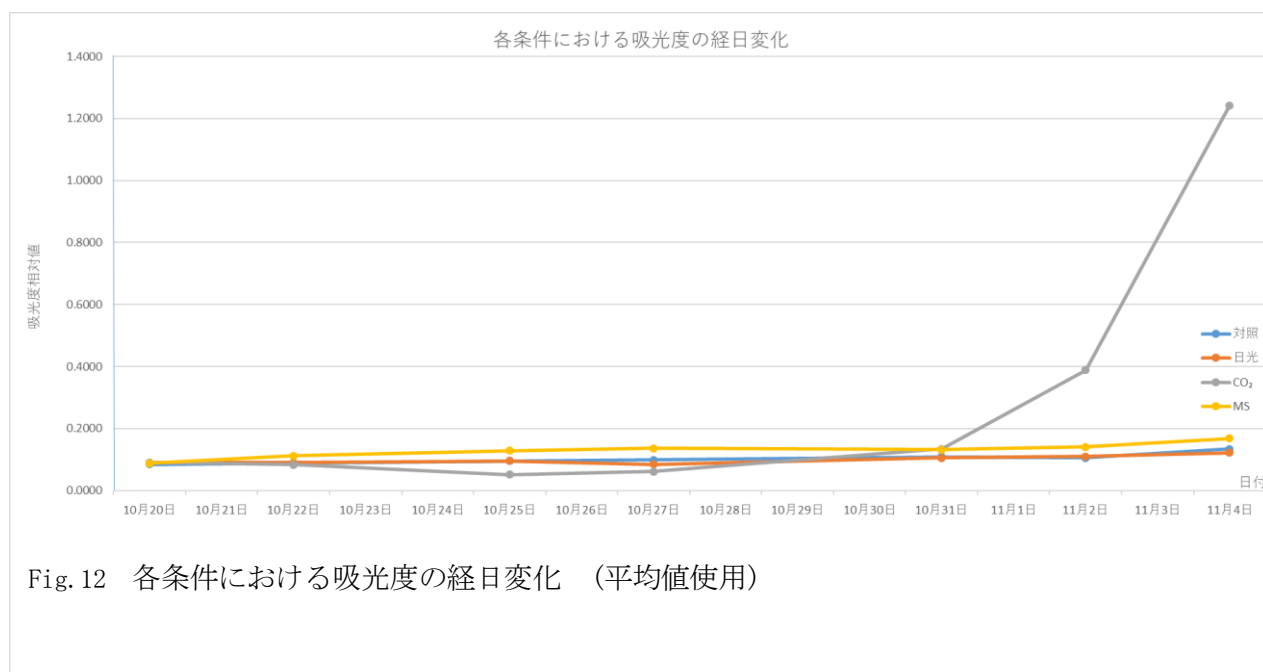


Fig. 12 各条件における吸光度の経日変化（平均値使用）

(5) 考察

CO₂を加えたペットボトルでのみミドリムシ培養液の色に大幅な変化が見られた。黄色から鮮やかな緑色に戻ったため、培養液中のCO₂の不足が、緑のミドリムシを黄色く変色させたことが明らかとなった。緑になる前に一度透明になったのは、CO₂濃度が急に高まった環境の変化に耐えられず、ミドリムシが死滅したと疑った。しかし数は減っていても、黄色いミドリムシが少数存在したことから、環境の変化に耐えたミドリムシが、その後CO₂が十分存在する条件で急激に増えたと結論付けた。

よって、SHIGYO法により、ミドリムシを培養する際には、培養液のCO₂濃度の低下に注意することとで、ミドリムシが黄色く変色することを防ぎ、より効率よく増加させることができると考える。

9 展望

CO₂濃度を測定しながら、よりよい状態でSHIGYO法を実施した場合の効果を検証したい。

10 謝辞

研究を進めるに際し、データの測定の協力をしてくださり、多くのアドバイスをくださいました静岡大学 グリーン科学研究所研究支援室技術専門職員 竹本裕之先生、静岡大学 技術専門職員 増田健二先生に心から感謝いたします。

11 参考文献

- 1) 26660028 研究成果報告書/新規植物育成技術「SHIGYO法」の原理解明：赤青の交互照射に対する植物の応答
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-26660028/26660028seika.pdf>
- 2) 人工光型植物工場における赤青LEDと蛍光灯使用時の植物成長および消費電力の評価
https://www.jstage.jst.go.jp/article/shita/27/4/27_213/_pdf
- 3) 植物栽培方法及び植物栽培装置
<https://patents.google.com/patent/WO2013021676A1/ja>
- 4) 植物栽培方法
<https://ipforce.jp/patent-jp-A-2015-204801>