

芝生からネンジュモを撃退するⅡ

静岡県立掛川東高校 サイエンス部

2年 角替晴信 松永都夢 若林孝尚 1年 岩間健太 近江陽向 久保田拓海 藤田花恋

1 動機

弓道部が弓道場の芝生上のネンジュモ「イシクラゲ」に困っており、雨の日に寒天状のネンジュモが芝生の上を被って活動に支障が出るため、駆除の方法がないかと依頼された。

ネンジュモを駆除する市販の薬物はあるが、芝生ごと枯らしてしまう。芝生に影響なく、ネンジュモだけを撃退する条件を探すために研究を始めた。

2 昨年度の研究

0.05mol/L の酢酸が、芝生に影響なくネンジュモを減らすことができる酸であるとわかった。酢酸によって、ネンジュモは個体数を減少させる。

光合成・呼吸量を pH によって調べたグラフが資料1である。二酸化炭素が減少すると化学平衡により pH が増加することを利用して、光合成と呼吸の量を測定したものである。

<測定方法>

- ① 同じ乾燥重量のネンジュモを2日間、水と酢酸に入れることで、酸のネンジュモの活性を低下させ、個体数を減らす。
- ② 洗って酸を落とした後、スクリービンにいれ、明所と暗所で一昼夜、光合成と呼吸をさせる。
- ③ ネンジュモを除いた溶液の pH を測定する。

資料1のグラフにおいて、pH が低いほど二酸化炭素が増加していることを示す。白が明所、黒は暗所の結果である。乾・霧・水とは、ネンジュモに与えた水分量である。「乾」は乾燥状態、「霧」とはスプレーで水を吹きかけた状態、「水」とは水につけた状態である。ネンジュモは 0.05mol/L 酢酸のもとで、ドライ(乾)、スプレー(霧)、ウェット(水)と、「水分が多くなるほど、二酸化炭素が増加する」ことが分かった。この現象が明所だけで起こったため、酸で光合成量が低下したと考えた。

3 本年度の研究

- (1) 今年は pH ではなく、気体の酸素量の計測による光合成量の測定を行った。
- (2) 微生物がネンジュモに付着している可能性を考慮し、純粋培養したネンジュモを使用した。

4 材料・薬品等

(1) 材料

ネンジュモ(イシクラゲ) *Nostoc Commune Vauch*
シバ *Zoysia* 属

(2) 薬品

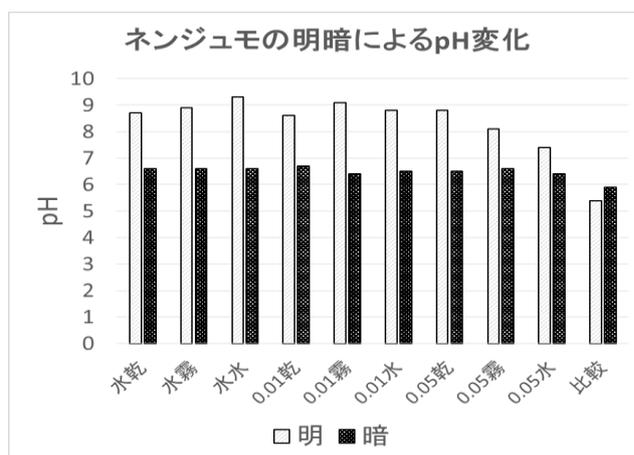
0.05mol/L 酢酸、二酸化炭素ボンベ、BG11 培地

(3) 使用器具

熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフ、無菌箱
マイクロピペット、気体用マイクロシリンジ
気体用スクリービンバイアル 8.5mL、オートクレーブ

5 培地

ネンジュモのイシクラゲを育てる BG11 培地とは、表の通りの「無機培地」である。



資料1

BG11 培地	
NaNO ₃	150mg
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	4mg
MgSO ₄ , 7H ₂ O	7.5mg
CaCl ₂	3.6mg
クエン酸	0.6g
クエン酸鉄アンモニウム	0.6mg
エチレンジアミン四酢酸 二ナトリウムマグネシウム水和物	0.1mg
Na ₂ CO ₃	2mg
Trace metal mix A5+Co	0.1ml
蒸留水	99.0ml

6 ネンジュモ「イシクラゲ」とは

原核生物のシアノバクテリアの一種である。シアノバクテリアは太古の地球に最初に酸素を作り出した生物であり、そのうち、ネンジュモの「イシクラゲ」は陸上に生育する。乾燥した駐車場やグラウンドの隅の地面に、乾燥ワカメのような状態でへばりついているが、雨が降ると寒天状になって地面を覆う（資料2）。寒天状の物質は「トレハロース」などの多糖類で、クマムシなどが環境の変化に耐えるために作り出すものと同じである。イシクラゲもトレハロースを分泌することで乾燥耐性を持つ。単細胞生物であるが、それぞれの細胞が分裂した後、離れることなく一列につながり群体をつくる（資料3）。途中で窒素固定を行うヘテロシストという大きな細胞があるために、念珠に似ている。

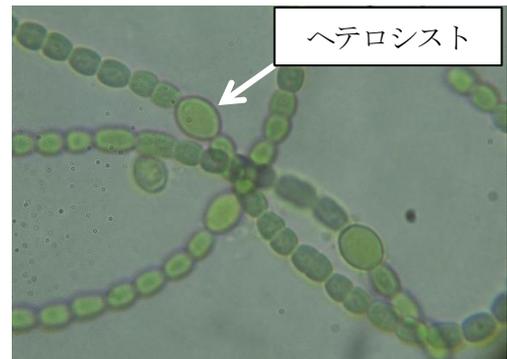


野外の寒天状ネンジュモ

資料2

7 仮説

真核生物の葉緑体は細胞内にあるが、原核生物のシアノバクテリアは葉緑体があるまま外にあるのと同じで、代謝に外部の影響を受けやすいと考えられる。光合成の仕組みのひとつに、水素イオンの濃度差を利用してATPエネルギーを作り出すATP合成酵素がある。水素イオンは酸に含まれるイオンである。原核生物のシアノバクテリアは、外部の酸が細胞内に侵入してしまうと、濃度差が減り、光合成のATP合成が阻害されるはずである。そのため、ネンジュモは酸に弱いのではないかと考えた。そこで、ネンジュモは「酸によって光合成を阻害される」と仮説を立て、研究を行った。

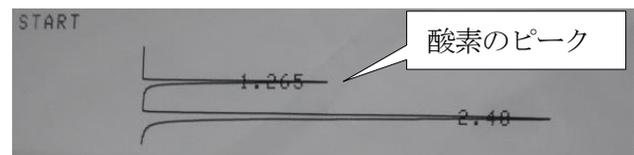


資料3

8 酸素量の測定とその検討

<ガスクロマトグラフ測定>

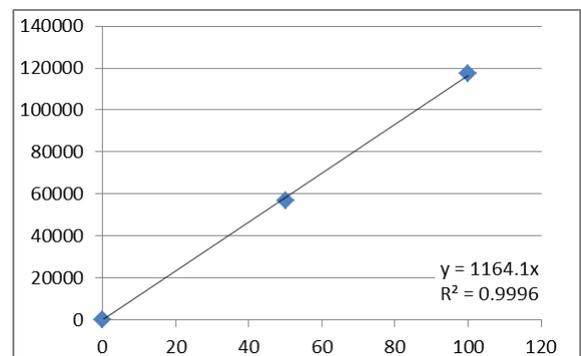
気体用の密封できるスクリーバイアル瓶を用意し、「熱伝導率ガスクロマトグラフ」を静岡理科大学にお借りして、酸素量の測定を行った。ガスクロマトグラフでは、ヘリウムガスを移動層として、熱伝導率の違いから酸素を検出することができ、そのクロマトグラムのピークから、酸素量を算出できる（資料4）。また、50 μ Lと100 μ Lの酸素で測定したクロマトグラムのピークの面積から、サイエンス部で検量線を作り、酸素量を算出した。（資料5）



資料4 クロマトグラム

<自然ネンジュモ>

まず、自然のネンジュモをよく混ぜて酸素量を測定したところ、データにばらつきがみられた。調べた結果、ネンジュモが分泌するトレハロースなどの多糖類に他の微生物が棲みつき、呼吸や光合成を行っているため、酸素量に影響を与えていたことが分かった。



資料5 検量線

<培養ネンジュモ>

そこで国立環境研究所微生物系統保存施設より純粋培養したネンジュモを購入し、BG11培地において、他の微生物が入らないように無菌状態で培養した。無菌状態とは「ガスバーナー下」か「無菌箱」で操作を行い、オートクレーブによって殺菌した器具を使用した。ネンジュモの個体数を完全に一致させるのは不可能なため、調べる培地数を増やし、それぞれの条件で3培地以上ずつ測定できるように用意した。

<酸とネンジュモ>

培養液に0.05mol/Lになるように酢酸を加えて、ネンジュモの分裂の早さを確認した。1個体20細胞程度のネンジュモの群体が10日程度経過すると、培養液に水を加えた場合では平均36細胞の群体に分裂するのに対し、酢酸を加えた場合は平均9細胞の群体にしかならず、個体数も減少して見つけるのが困難になる。酸によって、分裂が抑えられ、多くが死滅したことがわかる。

9 方法「酸素量の測定」

- (1) BG11 培地 2mL ずつの斜面寒天培地を作成し、培養液中でよく混合したネンジュモを 100 μ L ずつ入れて 19 日間培養する。
- (2) 乾燥による光合成量の違いを測定するため、半数は、シリカゲルを入れたガーゼをバイアル瓶の口に入れて蓋をし、2日間乾燥させる。
- (3) 水と 0.05mol/L 酢酸をそれぞれ 100 μ L ずつ、培養ネンジュモの上にかける。
- (4) 光合成の材料として二酸化炭素を 500 μ L 入れた後、気体が十分に拡散した 5 分後に同じ量を抜く。
- (5) 蛍光灯の光を一昼夜当てた「明所」と、アルミ箔で光を遮断した「暗所」に分ける。
- (6) ガスクロマトグラフを使い、純酸素で検量線を測定した後、酸素量を計測する。

10 結果

資料6のグラフは各条件3培地ずつの酸素量を平均したものである。明所が白色、暗所が黒色のグラフである。酸素量はコントロールより明所の方がやや少ないが、この条件下でネンジュモは増加しており、増殖に十分な条件であることがわかっている。

明所の白色のグラフでは、水に比べ0.05mol/L 酢酸の酸素量が少なくなっている。酢酸により、普通の培地で8%、シリカゲル乾燥した培地で5%、酸素量が減少している。どちらも、酢酸によって酸素量が減少した。

次に、明所と暗所との差に注目する。

「明所と暗所の差」が光合成量である。光合成量は、水と0.05mol/L 酢酸でほぼ同じであり、「酢酸で光合成量が減少していない」ことがわかった。

11 考察

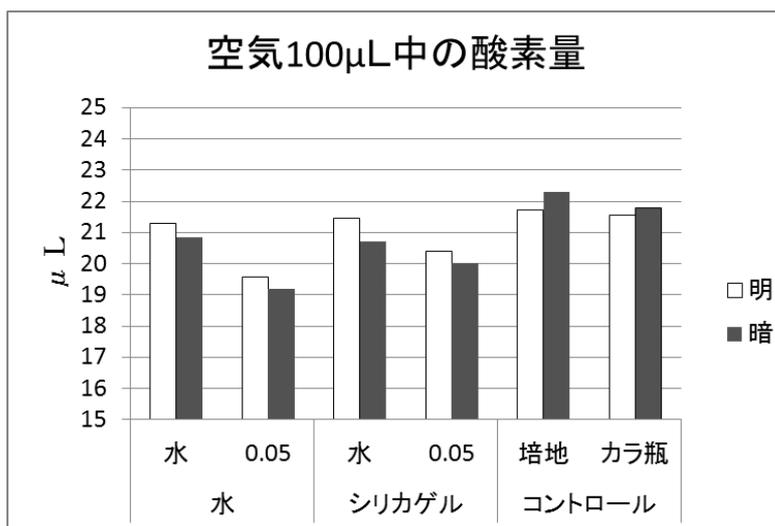
酸によって酸素量は減少するが、光合成量は減少していない。光合成が抑制されるという昨年の結果と矛盾するように見える。

ここで注目したのは、「酸素量の減少」は、「光合成の減少」と「呼吸の増加」の両方で起こることだ。「酸素の減少」が光合成でないことが分かったため、「呼吸が増えた」ことがわかる。酢酸によって光合成が抑えられたのではなく、「呼吸が増えて酸素を消費した」ことになる。

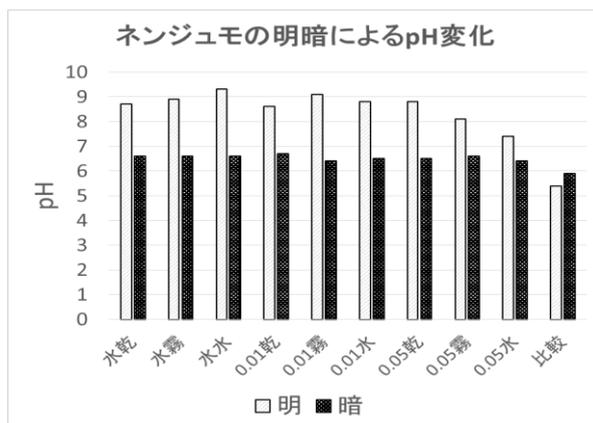
昨年の実験では、pHによって光合成の減少を推測した(資料1)。二酸化炭素が増加するとpHが減ることを利用したものである。昨年は明所でのみ二酸化炭素が増加したため、「光合成減少」と予想することしかできなかったが、二酸化炭素の増加は、「光合成減少」か「呼吸増加」の両方で起こる。

それに対して、今年の酸による酸素量の減少は、明暗の差で「光合成は同じ」であることが分かったために、「呼吸増加」と判断することができる。

昨年と今年の結果はほぼ同じであり、酸によって「呼吸が増加」したことが、今年の研究で明らかになった。この際、シリカゲルで乾燥させたものより、



資料6



資料1

水分が多いものの呼吸が増えるのも、昨年の結果と一致する。水分があると、休眠状態から活性が戻るため、酸の影響を受けやすくなると考えている。ただし、去年は純粋培養のネンジュモを使用していないので、他の微生物の代謝が混じっている可能性がある。昨年、暗所で二酸化炭素濃度が変わらなかったことについては、他の微生物の影響かどうかを、今後解明していきたいと思っている。

酢酸によって呼吸量が増えるというのは、仮説と異なる新しい発見だった。では、呼吸量が増えるとなぜ、ネンジュモは枯死するのだろうか。我々は、「光合成で合成した糖を、酸によって増えた呼吸で消費してしまうため、枯死するのではないか」と考えている。調べたところ、シアノバクテリアは光合成と呼吸の反応を一部共有しているとあった。外界の水素イオン濃度の上昇が、呼吸のATP合成酵素の働きに影響するのではないかと考えている。

12 今後の課題

今回の一番の驚きは、酸によって呼吸が増えるという新たな事実だった。呼吸が増えることで光合成とのバランスを崩し、枯死するという可能性を確認する必要がある。

- (1) ATP合成酵素自身の活性を調べ、酸による影響を実証する。
- (2) 酸によって光合成が抑制されないことを確認する。
- (3) 2日間のシリカゲル乾燥では完全乾燥しなかった。ゆっくりと完全に乾燥させることで休眠状態を作り出し、呼吸・光合成への影響を調べる。この休眠状態がクマムシなどのクリプトビオシスと同じなのかどうか、調べてみたいと考えている。
- (4) 弓道場の外にはネンジュモが少なく、弓道場のフェンスによる湿度の影響が考えられる。乾燥に強いはずのネンジュモが弓道場に生育しやすいのはなぜか、グラウンドや、校舎裏などの他の場所と比較して確かめる。

13 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

「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/>

光合成研究法 北海道大学低温科学研究所・日本光合成研究会 共著

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)

14 謝辞

静岡理科大学物質生命科 齋藤明宏先生 本間大智氏 岩崎由夏里氏

熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフ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。

静岡大学理学部生物科学科 栗井光一郎先生

ネンジュモの性質についてご教授いただきました。

名古屋大学大学院生命農学研究科ゲノム情報機能学研究分野 藤田祐一先生

ネンジュモの実験方法についてご教授いただきました。

ご協力ありがとうございました。