

芝生からネンジュモを撃退するⅢ

静岡県立掛川東高等学校 サイエンス部

2年 近江陽向 久保田拓海 岩間健太 鈴木敦士 藤田花恋 1年 名波由宇多 榛村浩輔

1 動機

弓道部より弓道場の芝生上のネンジュモ「イシクラゲ」の駆除の方法がないかと依頼された。芝生に影響なく、ネンジュモだけを撃退する条件を探すべく研究を続けている。

2 昨年度までの研究

2016年度に0.05mol/L酢酸が、芝生に影響なくネンジュモだけを減少させることを発見した。2017年度には単離ネンジュモで気体の酸素量を測定し、明所と暗所の酸素量の差が水と酢酸でほぼ同じことから、「酢酸によって光合成は抑制されない」ということを証明した。酢酸による酸素量の減少は呼吸が増えたことによるものだと考えた。

3 本年度の研究

- (1) ネンジュモを撃退する酢酸の散布期間と、生育場所のpHを調査する。
- (2) 実際に酢酸を散布した芝生の上で起こることを調査するために、ネンジュモの「野生株」を用い、ガスクロマトグラフによる「酸素量」測定と、吸光光度計による「クロロフィル量」測定を行った。
- (3) 単離ネンジュモとして、昨年度使用した非無菌のイシクラゲ *Nostoc Commune*(KU002) に加え、無菌の *Nostoc sp.* (HK-01)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* 野生株

ネンジュモ(イシクラゲ) *Nostoc Commune* 非無菌株(KU002)

ネンジュモ *sp.* *Nostoc sp.* 無菌株(HK-01)

(2) 薬品 0.05mol/L酢酸 0.05mol/Lクエン酸 メタノール

(3) 使用器具 気体用スクリーブバイヤル(8.5ml) 気体用マイクロシリンジ

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

(4) 使用機器 熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフ 吸光光度計 オートクレープ

ボルテックスミキサー 遠心分離機 卓上遠心機 ウォーターバス

(5) 培地 MDM 培地(無機培地)

5 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。弱塩基性の土壌で生育し、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って地面を覆う。寒天状の物質は「トレハロース」などの多糖類でできている。イシクラゲはトレハロースを分泌することで乾燥耐性を持つ。またチラコイド膜で光合成と呼吸の回路を一部共有しているため原核生物でありながら好気呼吸を行う。

6 仮説

- (1) ネンジュモは、一般的に弱塩基性土壌を好むとされている。酢酸の散布を怠ると、再度、増殖が始まることから、酢酸で弱酸性になった住みにくい土壌を弱塩基性に戻すことができるのではない

かと考えた。そこで、「ネンジュモは、自らの周りの環境を住みよい弱塩基性にできる」と仮説を立て研究を行った。

- (2) ネンジュモは乾燥時に、厳しい環境に耐えるべくクリプトビオシスと呼ばれる休眠状態を示すと言われている。そのため「ネンジュモは乾燥状態で酸素の吸収・放出を停止する」と仮説を立てた。

7 調査1・酢酸散布の期間調査と生息場所の pH

2016 年度に弓道場に 0.05mol/L 酢酸を散布したところ、ネンジュモは減少したが、なくならなかった。これは、生き残ったネンジュモが、酸性になった土壌を弱塩基性に変えて増殖したためと考えられる。そのため継続的な酸の散布が必要と考え、何日ごとに酢酸を散布したらネンジュモが減少するのかを調査した。

(1) 方法

ア ネンジュモの生育する掛川東高校正門横の芝生に、散布期間を定めた 15 cm 方形区を 3 セット用意する。3 日、1 週間、2 週間、4 週間に一度ごとに 0.05mol/L 酢酸を 60mL ずつ霧吹きで散布し 6 月 15 日～8 月 1 日までの 96 日間、継続観察した。(コントロールは 3 日ごと水を散布)

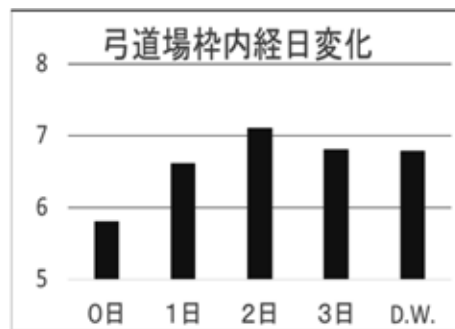
イ 3 セットとも、3 日に一度散布の方形区のみ、ネンジュモが見られなくなることを確認した。

ウ 上記の正門横の芝生での実験結果をふまえ、「弓道場」に一边 30 cm の方形区 (30 cm 方形区) をつくり、3 日ごとに 240ml の酢酸を散布した。(15cm 方形区面積の 4 倍のため、酢酸を 4 倍散布)

エ 土壌 pH の測定。弓道場の方形区内と方形区外の土壌を 30g ずつ取り、30mL の蒸留水で懸濁した後、上澄みの pH を継続的に測定した。

オ ネンジュモの生育している環境の pH を測定する。野生株のネンジュモをビーカー 3 つに乾燥重量 0.1g ずつ入れて蒸留水を 30mL 入れ、pH の時間経過を測定した。

カ ネンジュモなしの MDM 液体培地と、無菌のネンジュモ HK-01 の生育している MDM 液体培地の pH を測定した。



資料 1

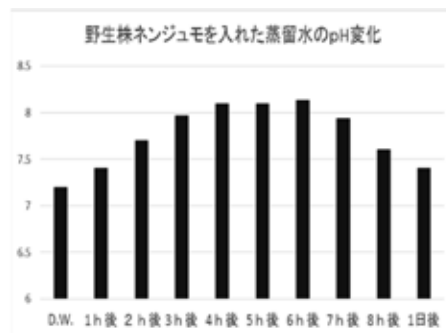
(2) 結果

ア 弓道場において、3 日に 1 度の酢酸散布によって 30cm 方形枠内のネンジュモがなくなった。これにより、弓道場におけるネンジュモ撃退に成功することができた。

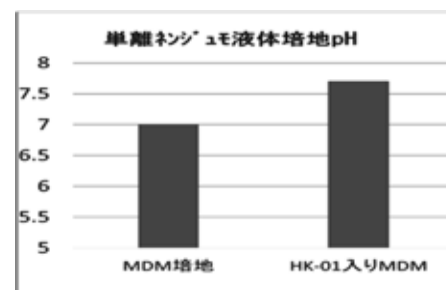
イ 弓道場で 0.05mol/L 酢酸散布直後から、土壌 pH を 3 日間測定したところ、散布直後は pH5.6 であったが、3 日間で pH7 前後の中性に変化した。(資料 1)

ウ ネンジュモ野生株を蒸留水に入れ、pH の変化を測定したところ、45 分程度で pH が塩基側へ変化し始めた。その後 6 時間で、pH8.1 まで上がり続けた。7 時間たつと pH が下がり始め、1 日後には、中性に戻る事が分かった。(資料 2)

エ ネンジュモなし MDM 液体培地と、ネンジュモを培養している MDM 液体培地の pH を測定したところ、ネンジュモなし MDM 培地が pH7.0 の中性なのに対し、ネンジュモ生育の MDM 培地は pH7.7 の弱塩基性に変化していた。(資料 3)



資料 2



資料 3

(3) 考察

ネンジュモは、自身で弱塩基性 pH7～pH8 程度の環境をつくり出し、自身が生育しやすい環境を作り出している。ネンジュモのいる環境に酢酸を散布して弱酸性 pH5.8 にした土壌も、約 3 日で pH7 程度まで上昇させてしまい、酸による効き目がなくなってしまうことが分かる。野生株

を入れた蒸留水の pH が 45 分程度で上昇し始めることは驚きでもある。また、ネンジュモ以外の生物のいない無菌の単離ネンジュモ HK-01 の生育する液体培地が塩基性であることから、ネンジュモ自身が pH 変化にかかわっていることが分かる。以上から、「ネンジュモは、自らの周りの環境を住みよい弱塩基性にできる」という仮説が証明されたことになる。

8 調査 2・「野生株」の酸素測定・クロロフィル量測定

野生株に酸を作用させて、酸素量とネンジュモ量を分析した。野生株のネンジュモは、自身の分泌する多糖類中に微生物が住むため、微生物の呼吸がプラスされて、ネンジュモの酸素量測定ができない。そのため 2017 年度には、単離した培養株で酸素量を測定した。しかし弓道場におけるネンジュモの実態を知るためには、野生株での酸素量を測定する必要性を感じた。ネンジュモの研究をされている三重大大学の加藤先生から、野外のネンジュモを微生物が食べていることを教えていただいた。事実、野生株のネンジュモは水を加えると 1 日で微生物が増殖し、多量の微生物が動き回る様子が観察され、腐敗臭も感じられる。一方、酸の存在下では微生物はあまり増殖しない。これらの微生物が弓道場でのネンジュモに影響を与えていることは間違いないと考えた。今回はネンジュモの量をクロロフィル a の量(μg)によって測定することで、正確さを向上させた。

<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に野生株を入れ、ガスシリンジで $200\mu\text{L}$ ずつ気体を抜きだして酸素量を測定する。「熱伝導度検出器付きガスクロマトグラフ」を静岡理工科大学にお借りして、酸素量測定を行った。クロマトグラムから、酸素量 μL を算出するために、サイエンス部で検量線を作成した。

<クロロフィル量測定>

ネンジュモの乾燥重量 100mg 中のクロロフィル a の量を測定することで、ネンジュモの量を知ることができる。微生物の中に藻類が存在した場合、クロロフィル量に影響を与える可能性もあるが、ネンジュモの量に対して非常に少なく、乾燥状態のネンジュモから 1 日で多量に増える可能性が低いため、無視できるレベルと判断した。

- ① 冷却しながらすりつぶして 1.5ml エッペンドルフチューブに入れる。遠心分離後水分を除く。
- ② メタノール 1mL を入れ、ボルテックスミキサーで攪拌して 5 分間クロロフィルを抽出したのち、 10000rpm (1 分間に 10000 回転、約 17900G) で 10 分間遠心分離する。
- ③ クロロフィルの溶け込んだメタノールを、吸光光度計の波長 665nm で測定する。
- ④ 乾燥ネンジュモ 1mg 中のクロロフィル量(μg)を計算する。

[クロロフィル量算出の式] 13.4 はクロロフィル a 量を換算する係数

$$\text{Abs} \times \text{メタノール } 1\text{ml} \div \text{乾燥ネンジュモ } 100\text{mg} \times 13.4 = \mu\text{g/mg}$$

(1) 方法

ア 酸素量とクロロフィル量の関係を調べるために、野生株を、乾燥重量 100mg ずつ正確に測りとりて密封できるスクリーバイアル瓶に入れ、乾燥状態と、水 0.5mL を与えたものを 3 つずつ用意した。一昼夜、暗所で密封して呼吸させた。

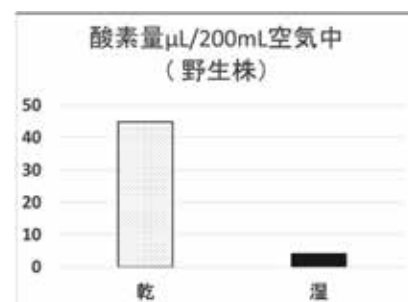
イ 「熱伝導度検出器付きガスクロマトグラフ」で、酸素量を測定する。

ウ 「吸光光度計」を用いて、メタノールで抽出したクロロフィル量を測定する。

エ クロロフィル量の変化を調べるために、乾燥重量 100mg の野生株のネンジュモをシャーレに入れ、乾燥・水・ 0.05mol/L 酢酸・ 0.05mol/L クエン酸を 5.0mL 加えて一昼夜置き、メタノール抽出してクロロフィル量を測定する。

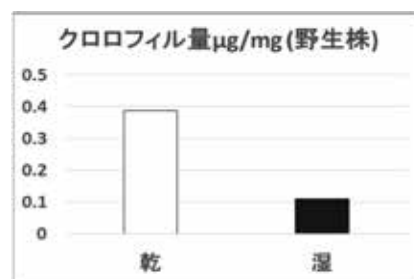
(2) 結果

ア 酸素量とクロロフィル量の関係を調べるために、野生ネン



資料 4

ジュモを密封バイアル瓶に入れて、暗所に1日置いた。白色の「乾」は乾燥したまま、黒の「湿」は0.5mLの水を加え、酸素量、クロロフィル量を測定した。「乾」はコントロールと同じ43 μ Lである。「乾」：「湿」は酸素量が10：1になり(資料4)、クロロフィル量も4：1になった。



資料5

イ クロロフィル量の変化を調べるため、シャーレに乾燥状態のもの、水・クエン酸・酢酸を5.0mLずつ入れたものを用意し、1昼夜後にクロロフィル量を測定した。クロロフィル量は乾燥：水=10：1になった。水と酸を比較するために、乾燥のデータを除くとクロロフィル量は水：クエン酸：酢酸=9：5：4になった。

(3) 考察

ア 水を加えたバイアル中の酸素量の著しい減少は、2017年の「単離株」の調査ではなかったことで、野生株で初めて見られた。「単離株」に対して「野生株」の大きな違いは、野生株の周りの多糖類に、微生物が多く生育することである。「湿」のクロロフィル量の減少から、水によってネンジュモが大幅に減少していることがわかる。そのため、「湿」の酸素量の減少はネンジュモの呼吸量増加ではなく、水によって活動的になった微生物の呼吸量増加と考えた。微生物がネンジュモを捕食して減少させたためにクロロフィル量も減少したと考えられる。実際、水に入れて1日たった野生株ネンジュモからは腐敗臭がしており、微生物による分解が始まっていると予想できる。また、調査1で蒸留水に入れた野生ネンジュモのpHが6時間以降下がり始めるのも、腐敗が始まったことによるpHの低下と考えている。

イ 酸の場合、水よりもクロロフィル量が減少した。クエン酸、酢酸の存在下では微生物はあまり増殖しない。それでも減少したのは、ネンジュモ自身の酸性下での活動低下が考えられる。

ウ 水を逃がさない「実験室」のガラス容器では、水だけでも微生物によってネンジュモが捕食されて減少する。それに対し「弓道場」の芝生では、水だけではネンジュモは減少せず、酸によって始めて減少する。

9 調査3・「無菌株」の酸素量測定・クロロフィル量測定

ほかの微生物のいない無菌株であるHK-01株を使い、乾燥時の「休眠状態」を確認することを目的として分析した。微生物の混入のない無菌の単離株によって、ネンジュモのみの酸素量を測定するために、三重大学加藤浩教授より無菌のHK-01株(*Nostoc sp.*)を譲り受けて研究を行った。HK-01株は、昨年扱った非無菌のKU002株(*Nostoc Commune*)よりも増殖率が高く、pH8.0において最も速く増殖することが、加藤教授の研究で分かっている。KU002と同じく、増殖しているHK-01に酢酸を入れて0.05mol/L酢酸培地にすると、1日で緑色を失い、急激に数が減少することをサイエンス部で確認している。また、増殖の速い培地として、MDM培地を教えて頂き使用した。(昨年の培地はBG11培地である。) 予備実験でHK-01株とMDM培地は昨年のKU002株とBG11培地と同様に使用できること、「酸」を作用させると酸素量が減る事を確認した。

(1) 方法

ア スクリューバイアルにMDM培地2mLで作成した寒天斜面培地を入れ、オートクレーブ殺菌した後、他の微生物が入らないようにガスバーナー下でネンジュモの植え継ぎ操作を行った。

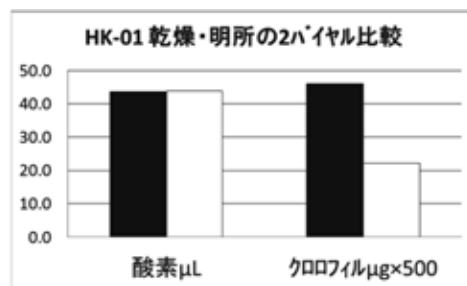
イ HK-01の生育する寒天斜面培地の半数には、51日間、滅菌ガーゼで滅菌シリカゲルを入れてふたをし、シリカゲルを2日ごとに取り換え、ネンジュモを生きたまま休眠状態に入れるよう培地をゆっくり乾燥させた。

ウ 「酸素量」と「クロロフィル量」測定の前日に、すべてのバイアルに気体用マイクロシリンジで500 μ Lの二酸化炭素を注入し、光合成の材料とした。コントロールとして、空のバイアルのほか、MDM寒天斜面培地を用意し、同じように二酸化炭素を注入してコントロールとした。

エ 明所と暗所にわけて一昼夜おき、すぐに冷凍庫で活動を抑えて保管しながら、ガスクロマトグラフによる「酸素量」の測定と、吸光光度計による「クロロフィル量」の測定を行った。

(2) 結果

シリカゲルによって「乾燥」したネンジュモは、コントロールと同じ $43\mu\text{L}$ であり、酸素減少がみられない。無菌の HK-01 の 2 つのバイヤルの比較では、クロロフィル量が約 2 倍違うにも関わらず、ふたつの酸素量が同じである。(資料 6)



資料 6

(3) 考察

ア 乾燥時に酸素量が減少しないのは、次の 2 つの場合が考えられる。①乾燥状態でネンジュモがクリプトビオシス(休眠状態)を示し、呼吸や光合成を行わなくなった場合。②単離株の量は約 1mg と少ないため、乾燥で活動低下した結果、酸素量の変化が少なく、測定できない場合。

イ 調査 2 において、野生株ネンジュモは 100mg で分析した。その場合、クロロフィル量が少ない時に酸素量も少なくなるという相関関係が見られた。しかし調査 3 では単離株は 1mg ほどで、クロロフィル量が異なっても「乾燥」時の酸素量に差が見られなかった。予備実験で行った「酸」による大幅な酸素量減少はこの量のネンジュモでも測定できるが、「乾燥」による呼吸の有無を測定するような微量の酸素量の変化は、測定できない可能性がある。

10 今後の課題

- (1) ネンジュモは自身で弱塩基性の環境を作り出せるということが分かった。今後はネンジュモがどんな物質を利用して、塩基性環境を作り出すかを調べる。
- (2) 「シャーレ」と、「土壌のある野外」での違いに注目して、ネンジュモの増殖の期間や生育条件を探り、野外で、水によるネンジュモの減少が起こらない理由を突き止める。
- (3) 水を加えた「湿」のネンジュモで見られた微生物の同定と、生育条件を探る。
- (4) 呼吸の有無を調べるなどの場合、微量の酸素量変化を測定できない可能性がある。今後は HK-01 をさらに増殖させ「乾燥時はクロロフィル量にかかわらず酸素量が同じ」であることを証明し、ネンジュモ(HK-01 株)が「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

「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/>

12 謝辞

静岡理工科大学物質生命科 齋藤明宏先生

熱伝導度検出器付ガスクロマトグラフ、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 加藤浩先生

Nostoc sp. (HK-01)の譲渡、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。