

冷凍温度とイシクラゲの生育状態との関係

石川県立金沢泉丘高等学校 3年

池田 音緒 新谷 紗也 杉盛 遥 池田 昂生 高島 泰貴

1. 要旨

近年火星のテラフォーミング（惑星地球化計画）に関する研究がさかんに行われている。私たちはこの火星のテラフォーミングに興味をもち、地球の生物が火星で生存できるのかどうかを明らかにしたいと思った。そこで火星の低温環境に着目し、地球の微生物が火星のような低温で変化の激しい温度ストレスに対して抵抗性を持つのかどうかを調べた。

本研究では、シアノバクテリアの一種 *Nostoc* 属であるイシクラゲを -20°C 、 -40°C の低温（対照実験として常温）にさらし、温度ストレスに対する抵抗性を調べた。実験にはメチレンブルー法、インドフェノール青法を用いた。

実験の結果、低温処理をしたイシクラゲとしなかったものとの間に細胞の活性や窒素固定能力に大きな差異はみられず、このことからイシクラゲは -40°C の低温ストレスに対して抵抗性をもつことが確認できた。

2. 研究目的

世界で宇宙移住化計画が進められる中、1961年、カール・セーガンの金星の環境改造に関する研究によりテラフォーミングが提案されて以来、火星のテラフォーミングに関する研究も進められている。

火星のテラフォーミングに関する研究として、アメリカのアーカンソー大学の研究者による、4種類のメタン細菌が火星を模した低圧環境で生存可能かどうかを調べたものがある。この研究では「メタン細菌が最長21日間生存した」という結果を得たが、私たちはこの先行研究と同様に微生物を用い、火星の低圧環境ではなく温度ストレスに着目し研究を行うことにした。火星の赤道付

近の最低気温は -133°C 、最高気温は 27°C 、年平均気温は -55°C と低く、1日の温度変化は 100°C 近くあり、激しい。そこで、私たちは実験に用いる微生物としてイシクラゲに着目した。イシクラゲは、シアノバクテリアのネンジュモ目に属する原核生物であり、光合成や窒素固定をすることができる。また、シアノバクテリアの中には南極・北極などの寒冷地で生息するものもいるので、低温環境に耐えるのではないかと考えたからである。

細胞は凍結時、生じた氷の結晶によって細胞が傷つくことがある。そこで低温処理を施したイシクラゲは一部の細胞が傷つき、細胞の活性や窒素固定機能の低下などが起こると考えた。低温処理をしたイシクラゲの成長率、メチレンブルーの還元率、窒素固定によるアンモニア態窒素量が常温下での値を下回るという仮説を立て、本研究では低温処理によるイシクラゲの状態について調べた。

3. 実験方法

イシクラゲは学校敷地内で生息しているものを採取し、水で洗浄した後使用した。

使用する際は、12時間以上水に浸して吸水状態にしたものを -40°C 、 -20°C 、常温の遮光条件下に置き、その後の状態変化を次の実験1, 2, 3を行い調べた。

以降、イシクラゲを -40°C 、 -20°C 、常温にさらすことを温度処理といい、 -40°C 、 -20°C にさらすことを低温処理という。

<実験1：乾燥重量測定>

イシクラゲは校内で採取した後洗浄し、自然乾燥させ、デシケータに24時間入れた後、質量を

量った。その後吸水状態にし、 -40°C 、 -20°C 、室温に14時間さらし、6週間培養した。培養は室温で光源装置を用い、脱脂綿を敷いたシャーレ内で行った。

培養中イシクラゲの乾燥重量を2週間ごとに測定し、成長率を求め、グラフ化した(図1)。先行研究の岡山県立一宮高等学校の実験を参考にして培養方法を考え、脱脂綿を用いて培養を行うことにした。

<実験2：メチレンブルー法>

メチレンブルー法は酵母の生死の判定に用いられるが、これを用いてイシクラゲの細胞の活性を調べた。メチレンブルーで細胞を染色後、活性の高い細胞では、酸化還元酵素の働きによって青色のメチレンブルーが還元され、無色のロイコメチレンブルーとなる。一方、活性が低い細胞では、メチレンブルーが還元されないため細胞が青く染色されたままである。この細胞の色の変化によりイシクラゲの活性を観察することができる。

[手順]

- ①吸水状態のイシクラゲに温度処理を14時間施した。
- ②低温処理後 40°C ～ 50°C の湯に1分30秒間シャーレごと浸し、イシクラゲを急速融解した。
- ③メチレンブルーで染色し、10分後、20分後、40分後、60分後と顕微鏡で同じ視野の細胞を観察した。顕微鏡の光源はつけたままにし、明るさを1250lux前後にそろえた。
- ④染色した細胞のうち、メチレンブルーが還元された細胞の数を時間ごとに計測し、還元率を求め、グラフ化した(図2)。

<実験3：インドフェノール青法>

実験2の観察の際、ヘテロシスト(異質細胞)が分離しているものがよく観察された。また、メチレンブルーが還元されず、青色に染まっている状態のヘテロシストが多く確認された(図3)。これらを考慮し、「低温処理によりイシクラゲの窒素固定機能に影響がでるのではないか」と考えた。

[インドフェノール青法]

インドフェノール青法とは、アンモニア及びアンモニア化合物が次亜塩素酸と共存のもとでフ

ェノールと反応して生じるインドフェノール青の吸光度を測定する方法である。これにより、イシクラゲの細胞の窒素固定機能の活性を測定した。

[試薬]

- ・フェノール溶液 0.5ml
フェノール($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) 20gを95%エタノール($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 2200mlに溶解した。
- ・ニトロプロシド溶液 0.5ml
ニトロプロシドナトリウム($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.5gを水50mlに溶解した。
- ・アルカリ試薬 0.8ml
クエン酸ナトリウム($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10gと水酸化ナトリウム(NaOH) 0.5gを水50mlに溶解した。
- ・次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.2ml
10%アンチホルミン溶液(NaClO)を使用した。

[試水]

吸水状態のイシクラゲ約2.0gを低温処理後、急速融解させ、水20mlを加えて 25°C に設定したインキュベーターに8時間放置した。そのシャーレ内の水20mlを試水とした。

[手順]

- ①吸水状態のイシクラゲに14時間温度処理を施した。
- ②イシクラゲを解かし、試水を用意した。
- ③各薬品を混合する直前にアルカリ試薬と次亜塩素酸ナトリウム溶液とを4:1で混合した。
- ④試水を10mlビーカーにとり、フェノール溶液0.5ml、ニトロプロシド溶液0.5ml、アルカリ試薬と次亜塩素酸ナトリウム溶液の混合液1.0mlを順に加えガラス棒でよく混ぜた。
- ⑤60分間放置した溶液をセルに移し波長を640nmに設定した吸光度計で吸光度を測定する。
- ⑥①～⑤を4回繰り返し、検量線より求めた以下の計算式より濃度を求め、アンモニア態窒素量の変化をグラフに表した(図4)。

$$\text{アンモニア態窒素濃度 (ppm)} = 84.55 \times \text{吸光度}$$

4. 結果

<実験1：乾燥重量測定>

-40°C 、 -20°C 、室温にさらしたイシクラゲは

ともに、質量が増加した。(図 1)

成長率は次式で求めた。

$$\text{成長率} = \frac{\text{(培養後のイシクラゲの乾燥重量)}}{\text{(培養前のイシクラゲの乾燥重量)}}$$

<実験 2 : メチレンブルー法>

さらした温度によるイシクラゲの細胞のメチレンブルーの還元率は、0、20、40、60 分後のどの時間においても、温度によるはっきりとした差はみられなかった (図 2)。60 分後、どの温度においても約 60%の細胞でメチレンブルーが還元されていた。

メチレンブルーの還元率は次式で求めた。

$$\text{メチレンブルーの還元率} = \frac{\text{(メチレンブルーが還元された細胞数)}}{\text{(染色した細胞数)}}$$

<実験 3. インドフェノール青法>

イシクラゲが出したアンモニア態窒素量は温度処理を重ねると減少した。さらした温度によるアンモニア態窒素量の変化に大きな差はみられなかった (図 4)。

5. 考察

成長率、メチレンブルーの還元率、窒素固定機能において、低温処理を施したイシクラゲと、常温下に置いたイシクラゲの間には大きな差はみられなかったことから、イシクラゲには低温耐性があると考えられる。

<実験 1 : 乾燥重量測定>

乾燥重量を測定する際に乾熱滅菌をするため、1つのサンプルを用い続けることができず、イシクラゲの成長率に個体差が生じた (図 1)。イシクラゲを乾燥重量ではなく、吸水状態での質量を測定することにより、6 週間同じイシクラゲの成長率を調べることが可能になり、改善できると考える。

<実験 2 : メチレンブルー法>

低温処理を施したもののメチレンブルーの還元率が常温に放置したものと同程度の割合だったことから、イシクラゲには -40°C においても低温耐性があると考えられる。

<実験 3. インドフェノール法>

温度処理の回数が多くなると、イシクラゲが出したアンモニア態窒素量が減少したことは確認されたが、さらした温度による違いはあまりみられなかった。常温に放置したものが出したアンモニア態窒素量が低温処理を施したものによるものと同様に減少しており、アンモニア態窒素量の減少が低温処理によるものであると示すことはできなかった。

6. 結論

イシクラゲの細胞に低温処理を施すことで、常温時より活性が低下すると考え、成長率、メチレンブルーの還元率、窒素固定機能の 3つの観点から研究を進めてきたが、低温処理を施したものと常温に放置したものの間に差はあまりなかったことから、イシクラゲには -40°C においても低温耐性があると確認できた。それ以下の温度に対する抵抗性について、引き続き調べていきたい。

イシクラゲの低温耐性が証明されることはのちの火星のテラフォーミングにおける低温への対策に応用できるであろうと期待し、より深くイシクラゲに関する極限環境への耐性について調べていきたいと思う。

7. 参考文献

- 1) 「栄養塩類の測定 アンモニア態窒素の測定」, https://blogs.yahoo.co.jp/suisanzoushokuusu/32634689.html?__ysp=5qCE6aSK5aGp6aGe44Gu5ris5a6aI00Cou0Ds%2B0Dou0Di%2B0CouaFi%2Beqkue0o00Brua4r0Wumg%3D%3D (2018/3/15) .
- 2) 市川貴大, 高橋輝昌, 浅野義人, 小林達明 (2002) 「インドフェノール青法によるアンモニア態窒素の簡易訂量法の検討」, 『日本緑化工学会誌』 27 (4), p. 623-626.
- 3) 尾関結佳, 塩見野衣, 白神理子, 村川佳穂 (2015) 「イシクラゲの生育抑制について」, 『平成 27 年度理数科課題研究論文集』, 岡山県立岡山一宮高等学校理数科.

4) 「火星基礎知識」,
<http://www.miraikan.jst.go.jp/sp/mars/information/kiso.html>
 (2018/3/15)

8. 謝辞

今回の研究を行うにあたり、ご指導いただいた北陸先端科学技術大学院大学の小田和司助教に心より感謝いたします。また、実験するにあたり、本校の堀先生、仙座先生には大変お世話になりました。本当にありがとうございました。

9. 図

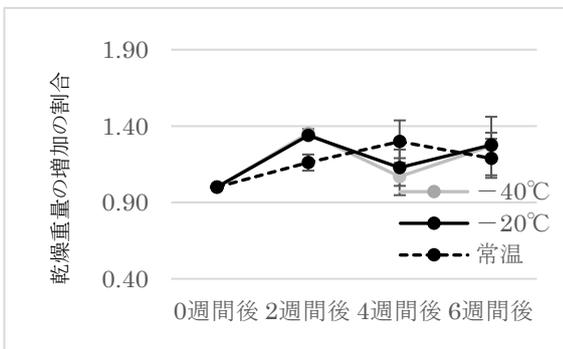


図1. 成長率の変化 (培養前の重量を1とする)

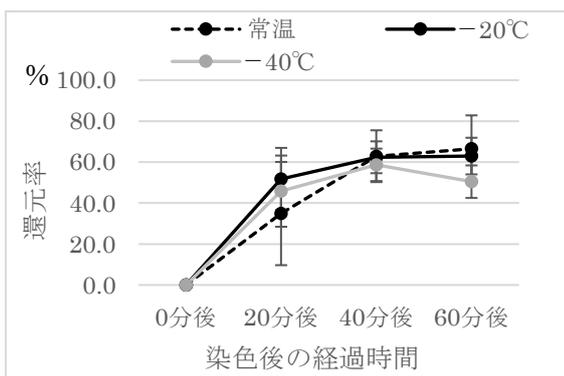


図3. ヘテロシストがとれてしまっている

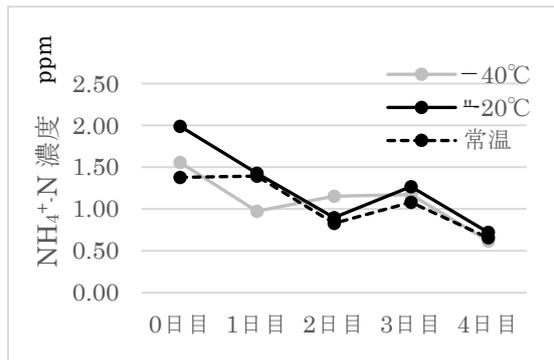


図4. アンモニア態窒素濃度の変化量