

# ミドリムシの増殖と光合成

—効率よい増殖方法、光合成と pH の関係—

石川県立金沢泉丘高等学校 3年

海野 李 中山 侑香 川上 修吾 砂山 星也 若林 勇太

## 1. 要旨、概要

我々はミドリムシの増殖法の研究と生産量を左右する光合成の研究を行った。その結果、明期が長いほど分裂が盛んであること、またカイネチンの添加が増殖を早めることに気づいた。さらに、光合成の pH と光合成速度の関係を調べ、最適 pH を検討した。

## 2. 問題提起、研究目的

ミドリムシは葉緑体と鞭毛を持つ単細胞生物で、光合成効率の高さと豊富な栄養素、バイオ燃料への利用の可能性から近年注目されている。中でも、ミドリムシが合成する貯蔵多糖であるパラミロンはミドリムシ独自のものであり、デトックス効果やガン抑制効果等が期待されている<sup>1)</sup>。材料として *Euglena gracilis* (図1) を市販で購入した。

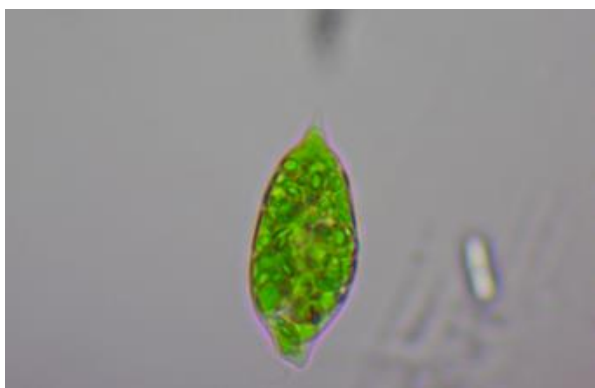


図1 *Euglena gracilis*

我々は (1) 効率よい増殖方法と (2) pH と光合成の関係の 2 点を調べようと考えた。(1) 国立遺伝学研究所によると、藻類を含む光合成を行う微生物の分裂は一般に夜間に行われ、細胞分裂は概日リズムによって制御されているという<sup>2)</sup>。一方ミドリムシは、5 月頃の田圃や沼地で大量発生することから、日長条件がミドリムシの増殖に

かかわっているのではないかと考え、培養のための日長を変化させた。また、ミドリムシの効率よい増殖方法の確立を目的に、細胞分裂を促進する植物ホルモンであるカイネチンの添加を行った。

(2) ミドリムシは高い光合成効率で、地球温暖化対策に役立つものとして注目されている。我々のミドリムシ培養液はミドリムシの炭酸固定によって pH が 8 程度に上昇してしまうが、その上昇によってミドリムシの光合成は影響を受けるのか知るため、pH と光合成の関係を調べた。

## 3. 研究方法

(1) 効率よい増殖方法の検討

### ①ミドリムシの培養方法

当初ミドリムシの入った液を購入し、滅菌したクノッブ氏液に米粒を入れ 25℃、12L12D で培養したが増殖率が極めて低かった。そこで微量元素を補うため市販のミネラルウォーター (SUNTORY 奥大山の天然水) に液肥 (ハイポネックス) を 1000 倍希釈して培養した。

### ②カイネチンの効果

ミネラルウォーターの培地に  $4.36 \times 10^4$  匹/ml の密度のミドリムシ培養液 2000ml を 2 本作成し、一方にカイネチンを 2mg/L の濃度で添加した。これら 2 本の培養液を温度 25℃、明期の照度 4000lux (蛍光灯 PPF 51.6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ )、12L12D の条件下で培養した。一週間ごとに顕微鏡を用いて 2.5  $\mu\text{l}$  中の個体数を目視で計測した。

### ③分光光度計による計測法の確立

従来、目視で顕微鏡を用いて行ってきた個体数計測を、分光光度計を用いて行うことで精度の向上及び、作業の効率化を図った。

まず従来の目視による顕微鏡を用いた計測により、出来る限り密度を正確に求めた培養液を段階

的に希釈した。各濃度の培養液を 590nm の波長で分光光度計にかけてその吸光度（以下 ABS）を計測し計量線を作成した。この操作をミドリムシ濃度が異なる 2 種類の培養液について行った。

#### ④初期密度の違いによる増殖への影響

同じ密度のミドリムシ培養液を希釈して作製した様々な濃度のミドリムシ培養液 300ml に 1000 倍希釈となるようハイポネックスを添加し、さらにミドリムシのエネルギー源として米粒を 3 粒入れた。温度 25℃、明期の照度 2500lux(蛍光灯 PPFD  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ )、12L12D の条件下で培養した<sup>3)4)</sup>。2 日おきに分光光度計を用いて個体数を計測した。

#### ⑤日長周期の違いによる増殖への影響

1000 倍希釈でハイポネックスを添加し、米 3 粒入れた 25 匹/2.5 $\mu\text{l}$  の密度のミドリムシ培養液 300ml をそれぞれ 16L8D、12L12D、8L16D、24D の明暗周期の下で培養し、その個体数を分光光度計で計測した。なお、温度 25℃、明期の照度は 2500lux(蛍光灯 PPFD  $32.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ )とした。

### (2)pH と光合成の関係

#### ① 光合成速度の計測

実験には、光源装置(スライド映写機 CABIN MULTI)、200ml ミドリムシ培養液を用い、液中の溶存酸素濃度を測定するために DO 電極(ポータブル型溶存酸素計 OM-71)を用いた<sup>5)6)</sup>。光源装置とミドリムシ液との距離の変化がミドリムシの受ける光の強度の変化であるとし、光によるミドリムシ液の温度上昇を防ぐために光源装置とミドリムシ液の間に小さな水槽を置いた。(図 2、図 3)

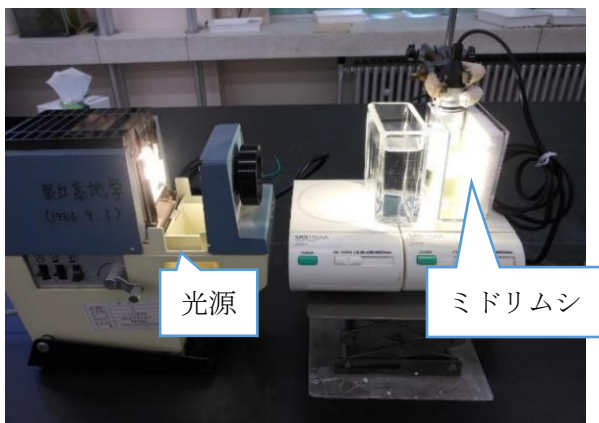


図 2 光合成測定装置

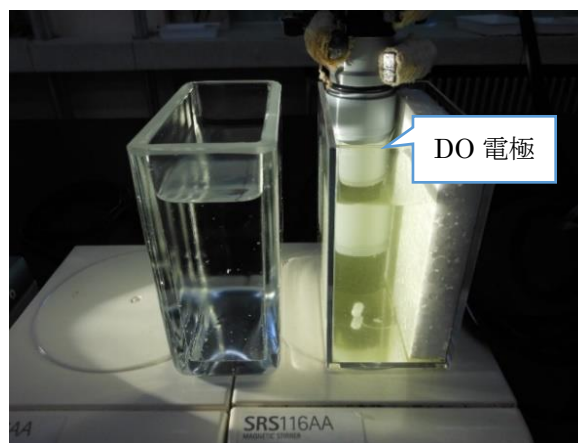


図 3 図 2 右部分の拡大図

また、実験に用いるミドリムシ培養液は一回の計測ごとに同培養条件で同じ密度の新しいものと入れ替えて、ミドリムシが光を受けたことによる影響を省いた。液中の溶存酸素濃度に偏りを出さないようにするために、攪拌子を用いて約 1000rpm で攪拌し続けた。光を当ててから 15 秒ごとに DO 電極に示された溶存酸素濃度を記録した。それぞれ光を当て始めて 1 分後から 5 分間継続した。そして横軸を時刻、縦軸を DO 電極の値とし、このグラフが直線的であることから、エクセルでグラフの傾きを算出し、それを光合成速度と定義することにした(図 4)。

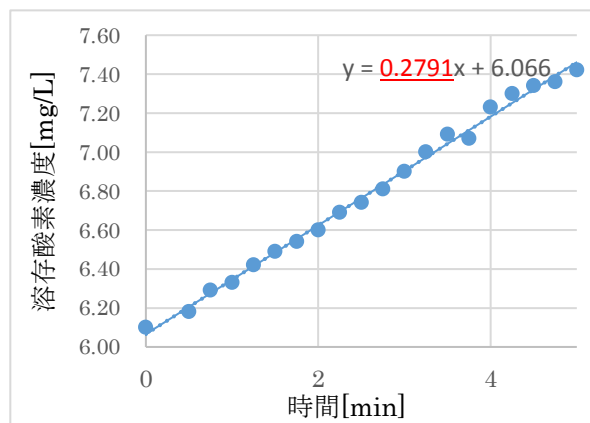


図 4 光合成速度の測定方法

#### ② CO<sub>2</sub> 濃度十分の条件

このままでは光合成速度が過小であったため、炭酸水素ナトリウムを添加し二酸化炭素を供給しようと考えた。今実験の照度は 9000lux(スライド映写機 PPFD  $157.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ )で行っている。結果、炭酸水素ナトリウムを加えるほど、光合成速度が直線的に上昇する傾向にあり、炭酸水素ナトリウムを加えることは大きな効果があることが分かった。(図 5)

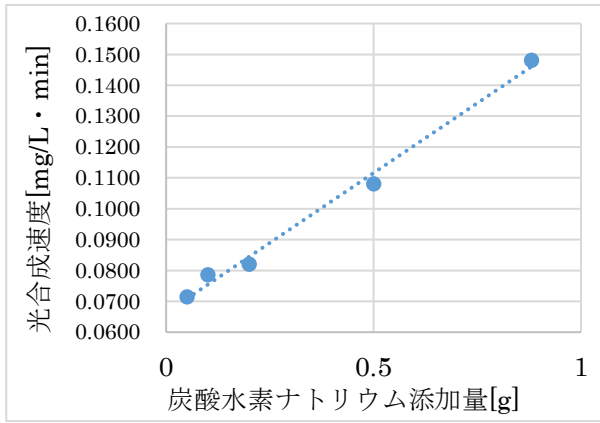


図5 炭酸水素ナトリウムの添加と光合成速度

### ③ pH と光合成の関係の本実験

予備実験①②と同様、ミドリムシ培養液 200mL を用い、炭酸水素ナトリウム 0.5g を添加した。その液を内部から攪拌しながら、pH を下げる場合には 1mol/L の塩酸を、pH を上げる場合には 1mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を少しずつ滴下し、pH メーターで計りながら pH を調節した。このやり方で、さまざまな pH の 200mL ミドリムシ液を作成した。照度 9000lux (スライド映写機 PPF157.1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ ) で行った。

## 4. 結果と考察

### (1) 効率よい増殖方法の検討

#### ① ミドリムシの培養方法

市販のミネラルウォーターの方が、明らかに増殖率が高かった。クノップ氏液での培養は滅菌して行ったが、市販ミネラルウォーターでの培養は非滅菌で行った。顕微鏡の観察によりミドリムシよりも小さい他の透明な微生物が若干存在していたが、その存在数はミドリムシに対してかなり少ないことから、ミネラルウォーターを使い非滅菌で培養することにした。

#### ② カイネチンの添加

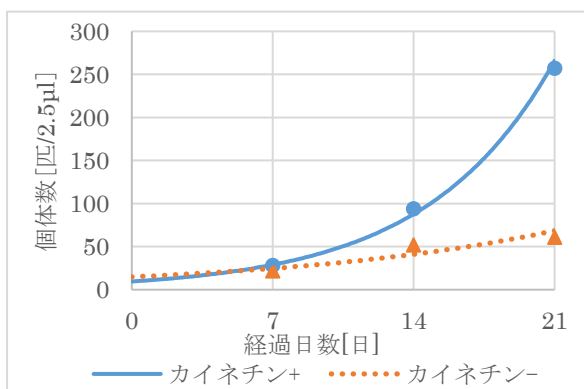


図6 カイネチン添加による個体数増加

図6より、カイネチンを添加した培養液で明らかに増殖効率がよい。

このことから、厳密には植物ではないもののミドリムシにはカイネチンへの感受性があると考えられ、カイネチンは植物の体内と同様に細胞分裂を促進する作用を示すと考えられる。なお実験開始時には、ミドリムシの濃度があまりにも薄すぎて個体数計測は困難であったため、0日目の濃度は同じだったが、グラフの値は推定である。

### ③ 分光光度計による計測法の確立

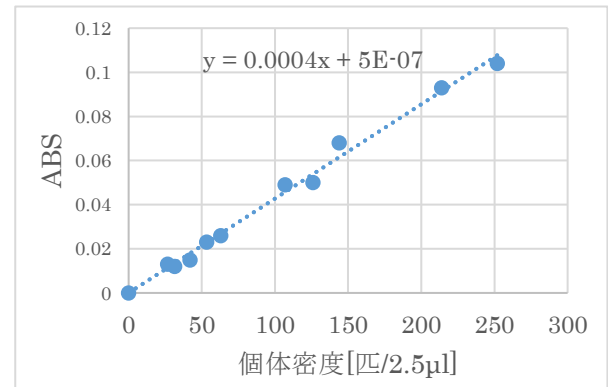


図7 個体密度と吸光度の関係(検量線)

図7よりミドリムシの個体数とABSが比例関係にあることが示された。よって以降、個体数は分光光度計を用いて計測したABSを検量線の式に代入することで求めるものとした。また、個体数の単位は目視での計測単位としてきた  $2.5\mu\text{l}$  当たりの個体数を以降のグラフでも用いた。

### ④ 初期濃度の違いによる増殖への影響

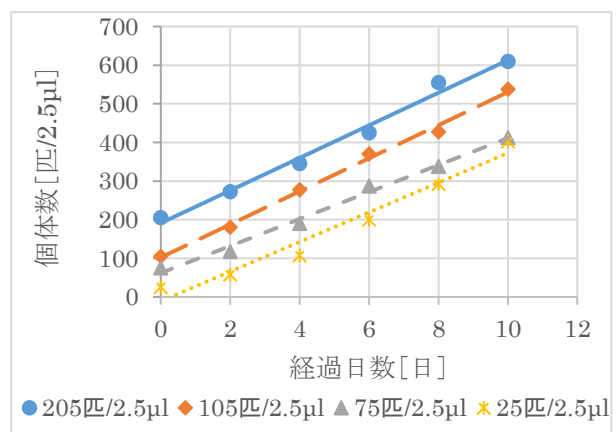


図8 初期密度の違いによる個体数増加

図8より0日目と10日目を比べると、最初ミドリムシ濃度が薄いほど、増殖効率が良いことが分かる。

この理由として、最初の濃度が薄い方が、環境収容力の影響が小さいということが考えられ

る。この結果より、今後の実験は、初期濃度を 25 匹/2.5 $\mu$ l とすることにした。

### ⑤ 日長周期の違いによる増殖への影響

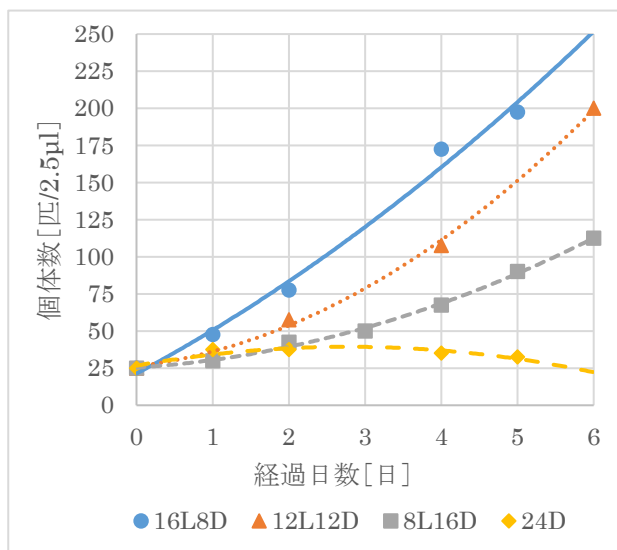


図9 日長条件による個体数増加

図9より16L8Dが最もよく増殖し、続いて12L12D、8L16D、そして24Dという結果になった。

16L8Dは、ミドリムシが自然環境で最もよく増殖する春から夏にかけての明暗周期に近いものであるから、より効率良く増殖しているのだと考えられる。24Dに関しては、1日目は元々培養していたときにパラミロンとして貯蔵されていたグルコースや米粒内にデンプンとしてあったグルコースを使い、分裂したと考えられる。2日目以降はグルコースが不足したため増殖できなかったと考えられる。

### (2) pH と光合成の関係

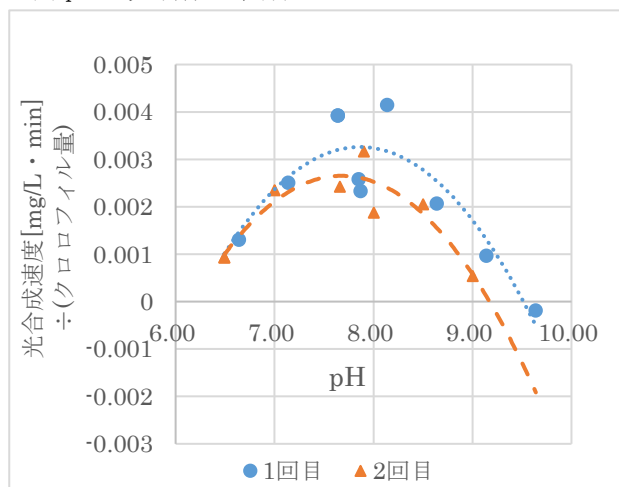


図10 pHと光合成速度

実験は二回行ったが、ミドリムシの密度をそろえることは難しいので、測定した光合成速度を実

験に用いた各培養液中クロロフィル量で割った。その結果、似た曲線が得られた(図10)。光合成はpHが7.5~8.0ほどで最も高い光合成速度を示し、pHが低いほど、あるいは高いほど光合成速度が下がることがわかった。

このことから、培養液に近い8弱のpHが光合成に適していたと言える。この原因として二つのことが挙げられる。(i)ミドリムシの生息する最適pHが7.5~8.0にあり、光合成の最適pHも同じ範囲になった。(ii)ミドリムシの生息環境のpHがどのようであれば、光合成の最適pHは7.5~8.0である。

## 5. 結論と課題

### (1) 効率よい増殖方法の検討

カイネチンを添加することについては、予備実験として大雑把な量で添加したのも同様の結果を示してはいるが、厳密に、長期間連続的に取れたデータは少なかったため、追試をしたい。

ミドリムシの実験用の培養としては、市販のミネラルウォーターと液肥、米粒を用いて簡単に高効率で培養する方法を得た。

日長周期の実験に関しては、6日分しかデータが取れなかったため、実験期間を延ばした再実験を行い、結果をより確かなものになりたい。また、ミドリムシには従属栄養生物としての一面も報告されていることからグルコースを培養液に添加することで24Dにおける増殖効率の低下がグルコースの不足によるものであることを確かめたい。

今回の実験ではハイポネックスにある程度の緩衝能が期待できることから特に考慮しなかったが、ミドリムシの生息に最適なpHについても確かめたい。

### (2) pH と光合成の関係

異なるpHでミドリムシを培養して、今回と同様の実験を行い、果たしてミドリムシの最適pHが変わるのかを検討したい。培養液のpHの調整には緩衝液を用いようと考えている。

## 6. 参考文献

1) 原生動物の作り出すバイオ粒子, パラミロンの性質と利用

宮武 和孝 他3名 (1995年)

2) 昼に光合成、夜に細胞分裂が起こるのはなぜか？その謎を解明！

国立遺伝学研究所 (2014 年)

3) 食品産業廃液を利用したユーグレナ (ミドリムシ) の光従属栄養培養

川野 裕美 他 4 名 (2014 年)

4) 屋外培養におけるミドリムシ藻の増殖速度について

中田 尚宏 (1984 年)

5) 坑廃水中に生息するミドリムシ類の増殖と光合成機能に及ぼす鉄、 亜鉛、マンガンの効果

ブ テツ

6) 赤色 LED 点滅光が *Euglena* の光合成速度に及ぼす影響

大橋光男 他 2 名 (2011 年)

(敬称略)

## 7. 謝辞

今回の研究を進めていくにあたり、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先生をはじめとする方々や、石川県立金沢泉丘高等学校の先生方に、心より感謝いたします。ご協力ありがとうございました。