

他の生物に対してクロレラの及ぼす影響

The influence *chlorella* exerts to other creatures

岡野 里奈 松本 花菜
OKANO Rina, MATSUMOTO Hana

I 研究動機

今回課題研究を行うにあたり、私たちは微生物を用いた実験ができないだろうかと考えた。そして文献や資料を探す過程で微細藻類というグループ、ひいてはクロレラ内の生物に興味を持ち、研究を行った。クロレラとは淡水性単細胞緑藻類プランクトンの一種であり、元来より健康食品や稚魚槽の環境水としても使われてきた。そこで、クロレラが生育する環境に対してどのような影響を与えるのか、また、クロレラが植物の生育にどのような影響を与えるのかを行った。

II クロレラについて

淡水産単細胞緑藻類プランクトンの一種で約二十億年前から地球上に生息している。直径 2~10 μm であり、細胞壁が頑丈。空気中の二酸化炭素、水、太陽光と極少量の無機物(ビタミン等)があれば大量に培養可能。日本では 1951 年に大量培養に成功。栄養素が豊富で、独自の動物体成長促進因子である *Chlorella Growth Factor* (以下 CGF とする)を持つとされている。

CGF とはクロレラにしか存在していない希少な物質である。CGF がクロレラの驚異的な増殖速度、生命力を実現させていると言われている。現在もその構造や成分に関する研究が進められているが、まだ解明されていないことも多い。現在、サルファーを含む核酸やアミノ酸などからなる複合体であること、その核酸の糖部分はグルコースを主体として、マンノース、ラムノース、アラビノース、ガラクトース、キシロースなどから形成されていること、またペプチドのアミノ酸組成はグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、セリン、グリシン、プロリンなどであることが分かっている。

III 研究方法

クロレラの育成方法

クロレラ株は国立環境研究所の微生物系統保存施設から無料で分譲して頂いた。クロレラを培養する培地は C 培地と呼ばれる特殊なもので作成が難しく、高額だったために異なる培地での培養を検討した。研究所の方からハイポネックス培地の使用を勧められた。この培地でクロレラ属の培養が成功した前例はなく、そのため少しずつ株を植え継いで培養が可能かどうかの検討を行った。

C 培地の濃度から推測して 0.2%、0.1%、0.05%、0.01%のハイポネックス培地を作り、四つの濃度の培地を 5ml ずつ入れた試験管を二本ずつ用意した。そこに培養液 5ml につき 100 μl のクロレラを入れ、顕微鏡で各濃度中のクロレラの数の変化を観察した。その中でも多く増殖していた 0.01%と 0.05%の培地を三角フラスコに用意した。0.01%のものの方が増殖していることを確認できたが、培養液中に動物プランクトンを発見した。同定の結果ワムシだと判明したため、対策として培養液中にクロレラを入れる前に煮沸することに決めてこれからの大量培養を行うことにした。

※ハイポネックス…株式会社ハイポネックスジャパンの園芸用配合肥料

実験1 水中の環境に対してクロレラが及ぼす影響について

クロレラがもつ CGF が水中の環境にどのような影響を及ぼすのかということに興味を持ち、学校の近くにある御坊川の水で調査を行うことにした。御坊川は木太町付近で本流である詰田川に合流する河川で、高度経済成長期に周囲の住宅化により著しく汚染されていた。平成 24 年度に香川県が行った調査でも生化学的酸素要求量 (BOD) 年平均値が減少傾向にある。

〈実験①〉 pH の測定

仮説

クロレラの CGF によって増殖が速められた藻類の光合成作用によって試料中の pH が変化する。

準備物

ビーカー 御坊川の水 pH 試験紙 恒温器 クロレラ

実験方法

2つのビーカーを用意し、両方に同量の川の水を入れた。一方にはクロレラをいれ、比較対象としてもう一方には川の水のみを入れた。この2つを同温下で二週間保存し水質の指標の1つである pH の変化を測定した。

結果

2つのビーカーの pH に差は見られなかった。

考察

原因としてはこの時測定に pH 試験紙を用いたため正確な値が得られなかったことなどが考えられる。pH に関しては芳しい結果が得られなかったが2つのビーカーを比較するとクロレラが入っているものの方がクロレラ以外の増殖度も大きいことが分かった。このことからクロレラが試料中に入っているとクロレラ以外の藻類及び好気性微生物の増殖がより促され BOD 値が上昇するのでは、と考えた。

〈実験②〉 BOD の測定

仮説

実験①から試料中の藻類が増殖することで溶存酸素 (DO) 量が上昇し、その結果 BOD が上昇する。

準備物

1000ml ビーカー 人工気象器 5ml メスピペット 試験管 ビーカー 御坊川の水 溶存酸素 (DO) キット クロレラ 御坊川で優占種と思われる藻類 (藻類 1) 培養液 蒸留水

緩衝液：リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4)	21.75 g
リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)	8.5 g
リン酸水素二ナトリウム ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	44.6 g
塩化アンモニウム (NH_4Cl)	1.7 g
硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	22.5 g
無水塩化カルシウム ($CaCl_2$)	27.5 g
塩化鉄 (III) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.25 g

実験方法

4つのビーカーを用意し、同量の川の水を入れる。1つにはクロレラ、1つには藻類 1、1つには培養液、1つには川の水以外何も入れないものを作った。これらを 20℃ で二週間培養し BOD を測定した。

BOD の測定方法 (身近な水の環境科学 実習・測定編(自然の仕組みを調べるために)より)

I) 試薬の用意

- 1) 緩衝液としてリン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウムおよび塩化アンモニウムを水に溶かして1Lとし、これを緩衝液とする。
- 2) 硫酸マグネシウムを水に溶かして1Lとする。
- 3) 塩化カルシウムを水に溶かして1Lとする。
- 4) 塩化鉄(III)を水に溶かして1Lとする。

II) 1～4の緩衝液、硫酸マグネシウム溶液、塩化カルシウム溶液、塩化鉄(III)溶液をそれぞれ1mlずつメスピペットにて混合する。この溶液を希釈水と呼び試水の希釈に用いる。

III) 試水を希釈水により適度に希釈する。今回の実験では2倍、4倍希釈を用いた。

IV) 希釈したもののDO値をそれぞれ測定する。この値をDO₁とする。

V) 試験管に2倍希釈のものは希釈水10ml 試料10mlを、4倍希釈のものは希釈水15ml 試料5mlをいれパラフィルムを用いてしっかりと蓋をする。その試験管を20℃に保った人工気象器の中に設置した水槽に入れ暗条件で5日間培養する。

VI) 5日後に培養した試験管を取り出し、溶存酸素濃度を測定する。この各値をDO₅とする。

VII) 以下の式よりBODを算出する。

$$\text{BOD (mg/L)} = \frac{(\text{DO}_1 - \text{DO}_5) \times \text{希釈試料水 (ml)}}{\text{試料水 (ml)}}$$

結果

4倍希釈したものの方が値にばらつきがあった。2倍希釈では藻類1を入れたもののBOD値が最も小さくその他のものが等しいという結果となった。しかし4倍希釈では培養液を入れたものが一番小さい値、クロレラを入れたものが一番大きい値となった。

表1 BODの測定結果

	二倍希釈	四倍希釈
藻類1	1.5	1.25
培養液	2	0.75
クロレラ	2	1.375
コントロール	2	1

(培養液：クロレラを育てている溶液)

(コントロール：川の水のみのもの)

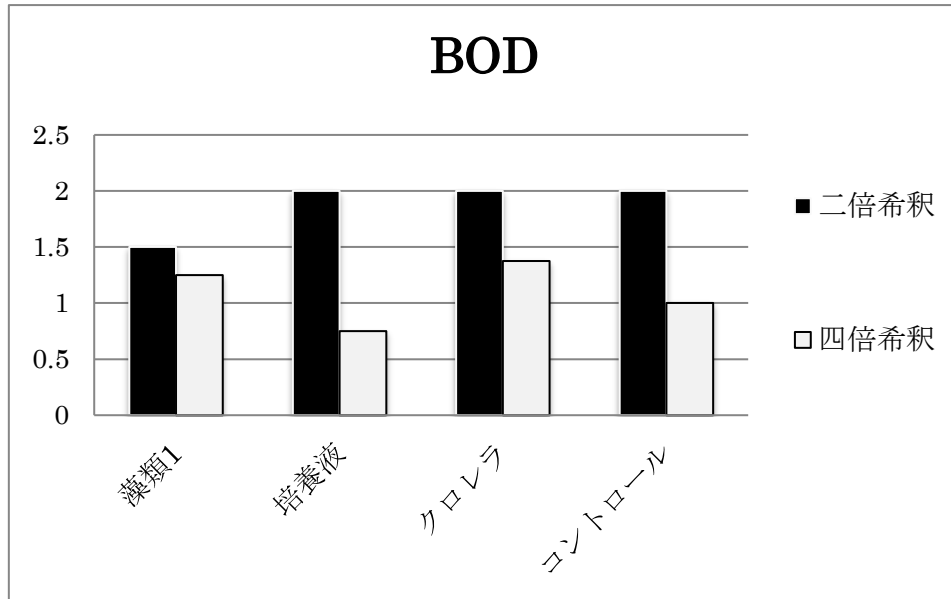
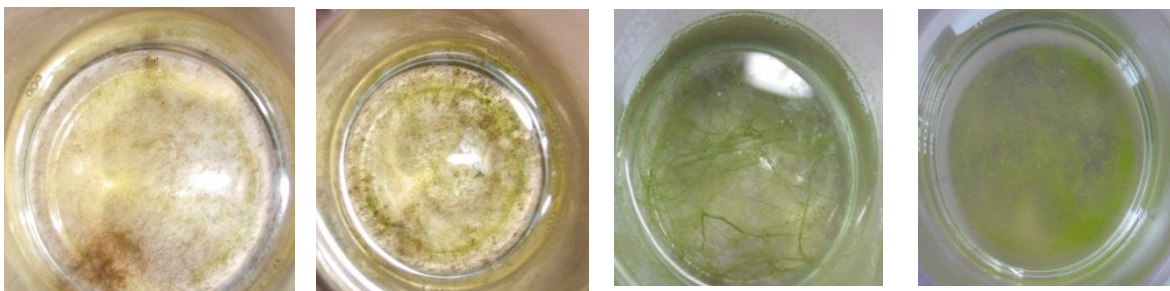


図1 BODの測定結果のグラフ



コントロール

培養液

藻類1

クロレラ

図2 培養開始から二週間経過後の各試料の様子

考察

図2より培養液、コントロールのビーカー内ではあまり藻類が見られないのに比べ、藻類1とクロレラのビーカーではたくさんの藻類が見られる。培養液とコントロールは他の二つに比べてBODの値が低かった。このことから実験②の仮説である試料中の藻類が多いほどBODの値が大きくなるということが実証されたと考える。

実験2. 植物への栄養促進効果について

クロレラは高い栄養価を持つことが先行研究から判明しており、また動物体栄養促進因子であるCGFの存在も示唆されている。そこで、それらを用いることによって植物にも成長促進が見込めるのではないかと考え、実験を行った。

仮説

クロレラの持つ栄養素や CGF の効果により、クロレラを投与した方のコマツナに成長促進が見られる。

〈予備実験〉 研究に適する植物の探究

投与実験を行うにあたり実験に最適な植物の探求が求められた。そこで私たちは先行研究からダイコンとコマツナが他の微生物の投与実験に使われていたことを知り、どちらがより私たちの研究に適するかを調べるために予備実験を行った。

準備物

脱脂綿 蒸留水 恒温器 コマツナ、ダイコンの種子 各 50 粒
シャーレ 温度計 剃刀 定規

実験方法

シャーレに脱脂綿を敷いて種を等間隔になるように並べ、蒸留水を脱脂綿が全体的に湿る程度に注ぐ。恒温器の内部が 25℃前後で安定していることを温度計を用いて確認した後に、シャーレを並べて置く。明暗周期はできる限り 12 時間に近づけた。一週間後に長さ、重さ、発芽率をそれぞれ測定し、計測値のばらつきが少ないのはどちらか調べた。

結果

長さ、重さではコマツナの方が結果の値のバラつきが少なかった。また、発芽率はダイコンが 86%、コマツナが 100%だった。

以上より、長さ、重さの個体差が少なく、発芽率も極めて高かったコマツナを以降の実験で用いることに決めた。

〈本実験〉

準備物

脱脂綿 蒸留水 恒温器 コマツナの種子 シャーレ 温度計 剃刀 ビーカー 定規 マイクロピペット
遠心分離機 遠沈管(2.5ml) スポンジ 電子天秤 ピンセット

実験方法

実験には図のような水耕栽培装置を用いた。ビーカーを用意し、1つはコントロールとして水だけのものを作製した。クロレラは他のビーカーに実験に応じた処理を施した後に投与するものとした。気温は1年中通して 25℃前後で固定し、明暗周期は約 12 時間とした。コマツナは脱脂綿もしくは寒天培地上で一週間育成し、スポンジに差し込んで固定し、根が水につかるように位置を調整した。5 日後に長さ、重さを測定した。

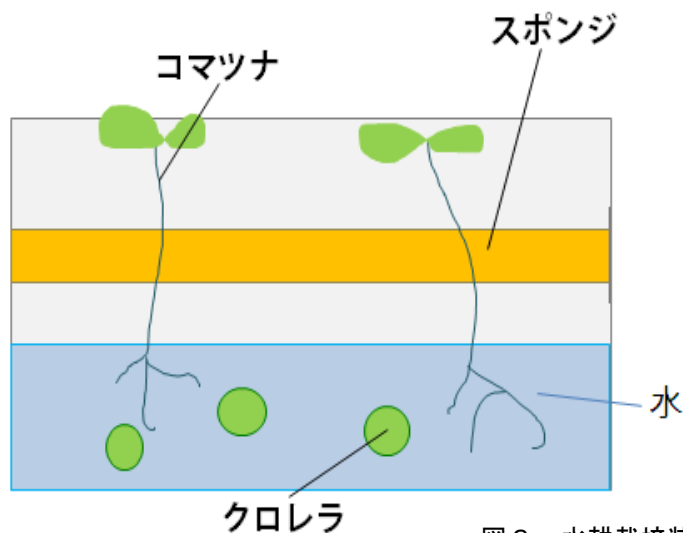


図3 水耕栽培装置の様子

クロレラへの処理

1. 未処理
2. 手動のホモジナイザーで破碎
3. 電動のホモジナイザーで破碎
4. 加熱処理

<クロレラへの処理 1. 未処理>

結果

クロレラ入りの方が結果の値のバラつきが少なかった。また、クロレラ入りの方で外れ値が発生した。中央値はどちらも同じ程度だった。

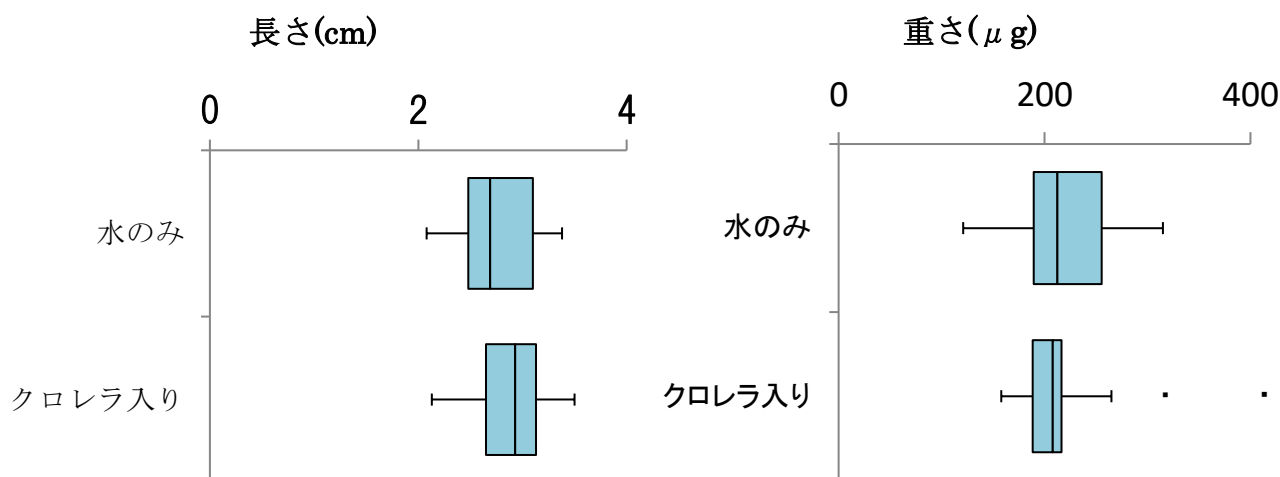


図4 実験1の結果

<クロレラへの処理 2. 手動のホモジナイザーで破碎>

処理1の考察より、クロレラ内の栄養素及びCGFをコマツナに作用させるには細胞壁の破壊が必要だと考えた。そこでホモジナイザーを用いてクロレラの細胞壁の破壊を試みた。遠心分離して集めたクロレラをホモジナイザー内に入れて3分程度ホモジナイズを行った。

結果

処理 1 とは異なり、中央値はクロレラ入りのものが水のみのものに比べて若干大きくなった。外れ値は発生しなかった。値の散らばりはどちらも同じ程度だった。

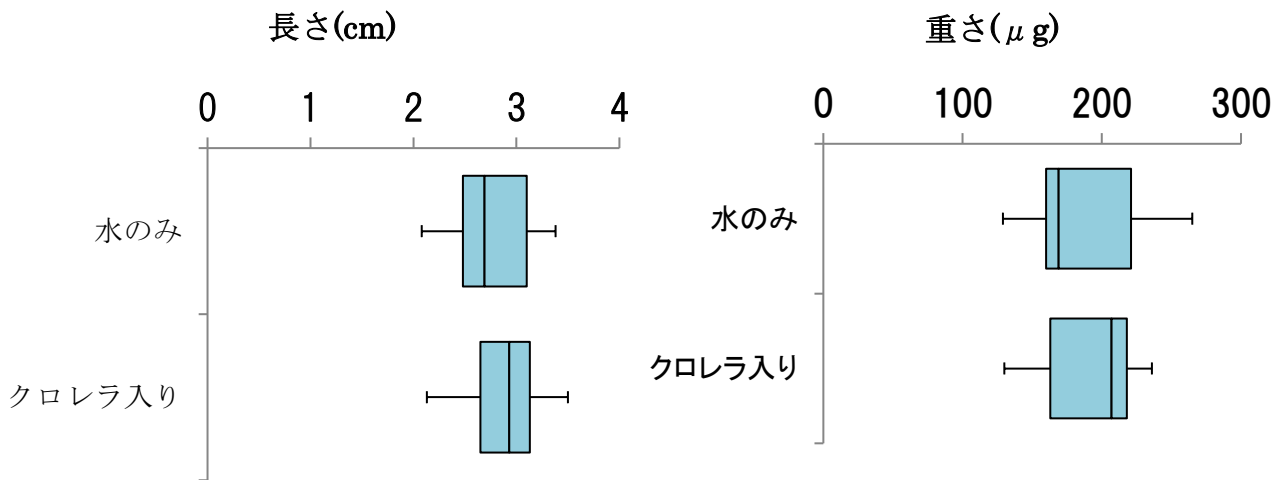


図 5 実験 2 の結果

考察

中央値という観点において多少の成長促進効果が認められたが、想定していたより大幅なものではなかった。そこで実験に用いたクロレラを顕微鏡で観察してみると、殆どのクロレラで細胞壁が破壊されている様子は見られなかった。

<クロレラへの処理 3. 電動のホモジナイザーで破碎>

より強い力でホモジナイズするためにホモジナイザーを手動式から電動式に変更した。工業用のドリルにホモジナイズ用のペッスルという用具を取り付け、電動ホモジナイザーとした(図 3)。クロレラに的確なダメージを与えるために試料を遠心分離して上澄みの培養液を取り出しクロレラだけを凍結後、ホモジナイズを行いコマツナに投与した。



図 6 電動ホモジナイザー

結果

処理 3 では重さは実験株すべての合計をグラフにしている。長さの面では水のみのものに比べてクロレラ入りのほうがバラつきが少なく株が一律的に成長していることがグラフより判断できる。また、重さの面ではクロレラ入りのもののほうが格段に数値が大きいことが分かる。以上のことから、この実験③では成長促進効果が確認できたものと判断した。

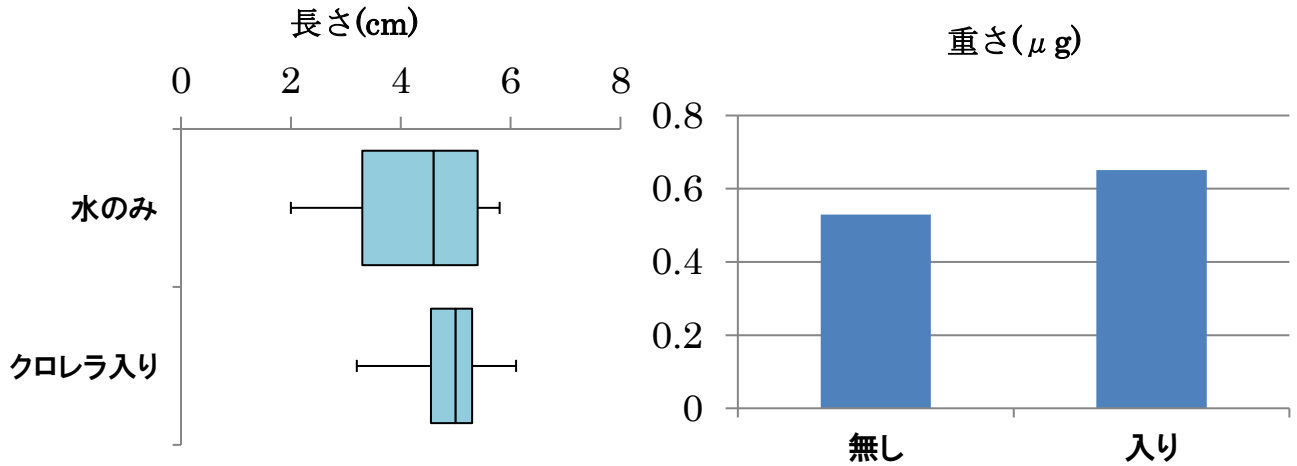


図7 実験3の結果

考察：投与前に冷凍することによってクロレラの細胞内の水分が膨張、圧迫されると共にホモジナイザーでダメージを与えたために、クロレラの細胞壁に傷が入り、そこから栄養素やCGFが漏れ出したのではないかと考える。

<クロレラへの処理4. 加熱処理>

クロレラへの処理として、直接細胞壁を破碎するのではなく熱することで細胞内の栄養素及びCGFの効果を細胞外へ取り出せるのではないかと考えた。そこで、寒天培地を作る際にクロレラを加えて加熱した。

実験方法

寒天(粉末)を水と混ぜ、沸騰させる際にクロレラを添加し、寒天培地を作製。シャーレに培地を流し込み、固まった後にコマツナの種子を播種した。恒温器内にて成長させ、その後長さと重さを測定した。

結果

重さは中央値や分布の範囲から多少成長促進されたと判断できるが、長さは成長促進されているとは言えない結果になった。

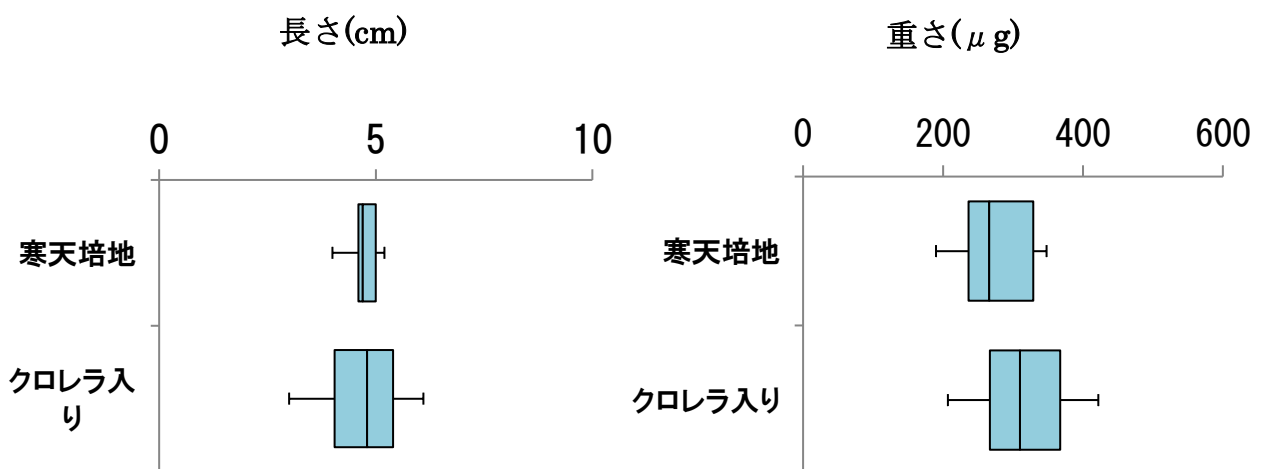


図8 実験4の結果

考察

加熱したことにより CGF に含まれるペプチドが変性したのではないかと考えられる。

IV 結論

クロレラに存在するとされる CGF は細胞壁を破壊することで用いることができ、植物の成長を促す働きがあると考えられる。しかしその働きによって BOD 値は上昇し、BOD 値の観点において水質は悪化したのではないかと考えられる。

しかし、BOD 値が上昇するということは試料中の好気性微生物が増えているということを示している。つまりクロレラをいれたものの BOD 値が高いということはクロレラをいれた試料中に好気性微生物が多いということである。このことから水中の微生物増殖の観点ではクロレラは非常に有益であると考えられる。

V 参考文献

- ・植物生育に及ぼすクロレラ熱水抽出物の土壌施用の影響

http://ci.nii.ac.jp/els/110001751468.pdf?id=ART0001889561&type=pdf&lang=jp&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1418368636&cp=

- ・クロレラ工業株式会社

<http://www.chlorella.co.jp/practical>

- ・株式会社サン・クロレラ

<https://www.sunchlorella.co.jp/>

- ・国立環境研究所 微生物系統保存施設

<http://mcc.nies.go.jp/>

- ・「水環境工学」

田中修三・神子直之・齋藤利晃・長岡裕 共著

- ・身近な水の環境科学 実習・測定編（自然の仕組みを調べるために）

日本陸水学会東海支部会編集

NIES-642

国立環境研究所の微生物系統保存施設より分譲していただいた株を使用して実験を行った。

VI 謝辞

研究にあたって沢山のご助言、ご協力いただいた高松第一高等学校の先生方、株を分譲してくださった国立環境研究所の微生物系統保存施設の皆様に心より感謝いたします。ありがとうございました。