

ツヅミモ *Staurastrum* の食品利用に向けた培養

2年 9組 柳 花瑠
2年 9組 山村 優太
指導教諭 門口 盛雄

1 要約

私たちは微生物に興味を持ち、校内にある池の微生物を調査した。そして、数多くの *Staurastrum* が存在することが分かった。微小藻類にはタンパク質などの栄養価が高いものが多い。そこで私たちは *Staurastrum* を食品に利用する研究をしようと考えた。栄養評価をするには多くの *Staurastrum* が必要とされるため、まずは簡単に培養する方法を研究することにした。その結果、市販の液体肥料で行う容易な培養条件を発見した。今後は培養した *Staurastrum* を用いて栄養評価も行いたいと考えている。

ABSTRACT

We were interested in microorganisms and investigated the microorganisms in the pond in the school. And it turned out that there are many *Staurastrums*. Many microalgae have high nutritional value such as protein. Therefore, we decided to study the use of *Staurastrum* for food. Since a lot of *Staurastrum* is required for nutritional evaluation, we decided to study an easy culture method first. As a result, we found easy culture conditions for using commercially available liquid fertilizers. In the future, we would like to perform nutritional evaluation using cultured *Staurastrum*.

キーワード

スタウラストルム、栄養評価、簡単な培養

Key word

Staurastrum, nutritional assessment, simple culture

2 緒言

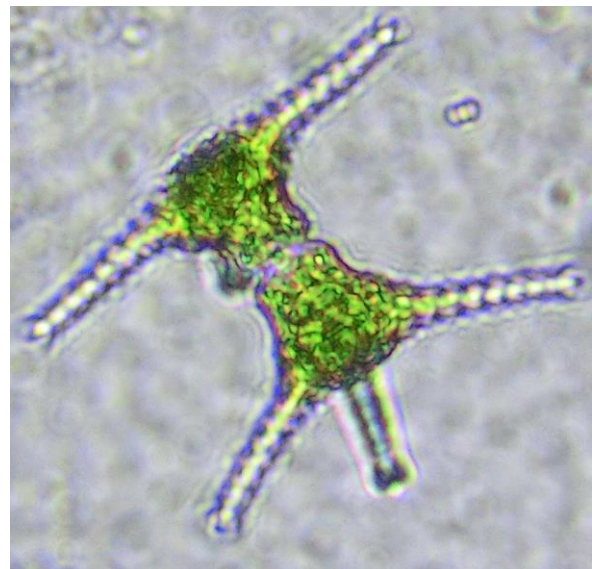
海外では、高密度の微小藻類の培養に成功し、微小藻類の工業的利用に向けた第一歩を踏み出している。また、日本では既に企業が、微小藻類のもつ高い栄養価をサプリメントに利用している。私たちは微小藻類を食品に利用する研究を行いたいと考えた。

私たちは学校内にある池の微生物を調査して、多く見られたツヅミモ *Staurastrum*(写真1)に着目した。私たちは *Staurastrum* の栄養評価を試みたいと考えたが、そのためには大量培養が前提となる。まずは、どのような条件下で培養できるのかを調べることにした。微小藻類は小さく、扱うのは難しいが、簡単に培養できる方法を見出したい。

3 目的

Staurastrum の簡単な培養法と食品利用の可能性について研究する。

写真1 *Staurastrum dorsidentiferum*



4 研究内容

4.1 実験I

4.1.1 目的

大量の *Staurastrum* を集める方法を調べる。

4.1.2 研究方法

(i)池の水と浮いていたハスの葉をビーカーに採り、1週間放置したもの

(ii)採ったばかりの池の表面の水

キムワイプ(1重, 2重)で(i)(ii)をろ過した後、遠心分離機(5分, 2100RPM)にかけたものを観察し、*Staurastrum* を数えた。

4.1.3 研究の結果

(i)キムワイプ1重

Staurastrum は十分な量存在していたが、他の微生物や砂粒などが多かった。

(i)キムワイプ2重

Staurastrum が少なかった。

(ii)キムワイプ1重, 2重

Staurastrum が少なかった。

4.1.4 考察

(i)キムワイプ1重

Staurastrum のみを単離することは難しい。デトリタスを少なくする方法を発見すれば、*Staurastrum* のみを集めやすくなるのではないと思われる。

(i)キムワイプ2重

全く *Staurastrum* がいなかった。キムワイプを2枚重ねてろ過すると、*Staurastrum* がキムワイプ上に残ってしまう。

(ii)キムワイプ1重, 2重

池の表面の水は *Staurastrum* の個体数が少ない。

キムワイプ1重でろ過した後、遠心分離をした沈殿物を用いて顕微鏡下で *Staurastrum* のみを単離すると、他の生物も多少混在するが多くのデトリタスを除去できるため、池の水をそのまま用いるより単離しやすいと考えられる。今後池の水のろ過を行う際は、キムワイプ1重を用いる。

4.2 実験II-1

4.2.1 目的

季節による微生物の遷移を知り、*Staurastrum* の多く見られる季節を知る。

4.2.2 研究方法

池の水を取り、キムワイプでろ過をする(※)。そのあと遠心分離機にかけ、遠沈管に沈殿した微生物を顕微鏡で観察する。これを四季にわけて行う。

(※)デトリタスを除去するためにろ過をした。微生物は目が細かい紙を通過しないため、水に強く目があらいキムワイプを用いることにし

た。

4.2.3 研究の結果

(春)光合成をする緑色の微生物が多かった。特に *Staurastrum* が多かった。ワムシなどの動物プランクトンはあまり観察できなかった。(写真2)

写真2



(夏)春の池の様子とは違い、植物が腐るなどして、池の色が黒く変色していた。動物プランクトンが多かった。春にはいなかったシネココッカスが激増していた。*Staurastrum* は葉緑体の緑色を失った殻のみのものが多かった。(写真3)

写真3 *Staurastrum*(右下)とその透明な殻(左上)



(秋)植物の腐敗も夏に比べると落ち着き、池の黒い変色がなくなった。動物プランクトンが少なくなり、シネココッカスも少なくなった。

(冬)*Staurastrum* の個体数は春に比べて少ないが、再び安定して観察することができるようになった。微生物の全量が少なくなった。

4.2.4 考察

池の水温などの環境と微生物の遷移は相関性があると思われる。夏に微生物の種数が多かった

のは、一般に微生物は水温が高いほうが分裂を行って繁殖する頻度が高く、逆に冬に微生物の量が減ったのは、水温の低さが微生物の繁殖を抑えたためではないかと考えられる。一時期しか見られなかった微小藻類は環境に左右されやすいのではないかと。一方で *Staurastrum* を1年間観察することができたのは、温度変化などの環境に左右されにくく、生命活動を長く維持できるか、または繁殖速度が速いためであると推測した。私たちは *Staurastrum* が他の微小藻類より研究材料として扱いやすいのではないかと考えた。

4.3 実験III

4.3.1 目的

池のどこに *Staurastrum* が多く存在するかを調べる。

4.3.2 研究方法

(i)池の縁に付着している藻類を含んだ水
(ii)池の底のデトリタスを含んだ水
キムワイプ1重で(i)(ii)をろ過後、遠心分離機(5分、2100RPM)にかけたものを観察し、*Staurastrum* の個体数を数えた。

4.3.3 研究の結果

(i)(ii)ともに *Staurastrum* が存在した。

4.3.4 考察

Staurastrum は池の表面の水には少なく、池の縁や底に付着している個体が多い。*Staurastrum* の腕状の突起が他の藻類やデトリタスに引っかかる可能性が考えられる。今後実験で扱うときは *Staurastrum* を池の縁または底の沈殿物から採取することがよいと思われる。

4.4 実験IV

4.4.1 目的

栄養評価をするためには、大量の *Staurastrum* のストックが必要であるため、培養をして十分な量を確保する。また、*Staurastrum* の培養を行う際、寒天培地が適しているか調べる。

4.4.2 研究方法

校内の池の水を採取し、*Staurastrum* の単離を行った。そのうち4個体ずつ、それぞれ条件を変えた寒天培地上で培養した。条件は次のとおりである。

①ハイポネックス液を含む寒天培地

②寒天培地

※ハイポネックス液はいずれも1,000倍希釈
これらを人工気象計(20°C、14L:10D、6,000ルクス)内で培養した。

4.4.3 研究の結果

19日後

①増殖していなかった。

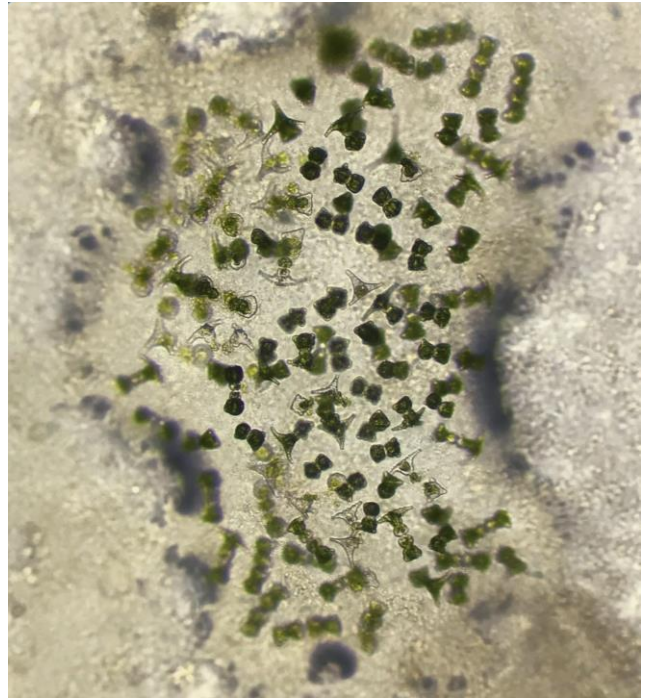
②10個体に増殖していた。

41日後

①増殖していなかった。

②数えきれないほど増えていた。(写真4)

写真4 増殖した *Staurastrum*



4.4.4 考察

①ハイポネックス液を混合していないのにも関わらず、4個体全部が確認できず、また葉緑体を失った透明な殻も見つからなかった。

②ハイポネックス液がない培地でも増殖したことから、*Staurastrum* は低栄養状態においても生育するという仮説が立てられる。また、寒天培地で培養した *Staurastrum* は、特徴的な突起がなくなるように形質が変化するものが多かった。

このことから、突起は水に流されないようにするための構造である可能性が考えられる。

4.5 実験IV

4.5.1 目的

Staurastrum を培養することで、栄養評価に用いるのに十分な量を確保する。また、研究所で使用されている培地(AF-6)と、市販の液体肥料を用いて作成した簡易培地での培養状況を比較し、最終的には簡単な培養方法を確立する。

4.5.2 研究方法

○12/10

ハイポネックス液を含んだ液体培地(以下「ハイポネックス培地」と呼ぶ)(1,000倍、10,000

倍、100,000 倍希釈)を作成し、それぞれ 10mL を 20mL 用スクリー管に入れた。そこへ 20 μ L の *Staurastrum dorsidentiferum* 試料(推定個体数:320)を入れ、人工気象計(25°C、14L:10D、6,000 ルクス)内で培養を開始した。また、AF-6 培地 10mL も同様にスクリー管に入れ、同量の試料を入れて培養を開始した。

○12月21日

12月10日に作成したハイポネックス培地を同様にスクリー管に入れ、20 μ L の *Staurastrum dorsidentiferum* 試料(推定個体量:156匹)を入れ、同じ条件で培養を開始した。

培養開始から約1か月間、各培地において5 μ L の試料を採取し、顕微鏡下で個体数を数えた。

※AF-6 培地の組成は表2、表3参照

※培養中の様子は写真5参照

AF-6 表2

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| NaNO ₃ | 14 mg |
| NH ₄ NO ₃ | 2.2 mg |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 3 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 1 mg |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 mg |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 1 mg |
| CaCO ₃ ¹⁾ | 1 mg |
| Fe-citrate | 0.2 mg |
| Citric acid | 0.2 mg |
| Biotin | 0.2 μ g |
| Thiamine HCl | 1 μ g |
| Vitamin B ₆ | 0.1 μ g |
| Vitamin B ₁₂ | 0.1 μ g |
| Trace metals ¹⁾ | 0.5 mL |
| Distilled water | 99.5 mL |
| pH 6.6 ²⁾ | |

1) CaCO₃ が除去され、微量金属の代わりに PIVmetals が使用されます。

2) 40mg の MES を追加し、pH を 6.6 に調整します。

PIV metals 表3

| | |
|--|---------|
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 100 mg |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 19.6 mg |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 3.6 mg |
| ZnCl ₂ ¹⁾ | 1.04 mg |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.4 mg |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.25 mg |
| Distilled water | 100 mL |

1) 1.04mg の ZnCl₂ は 2.2mg の ZnSO₄ · 7H₂O に置き換えられます。

写真5 培養中の様子

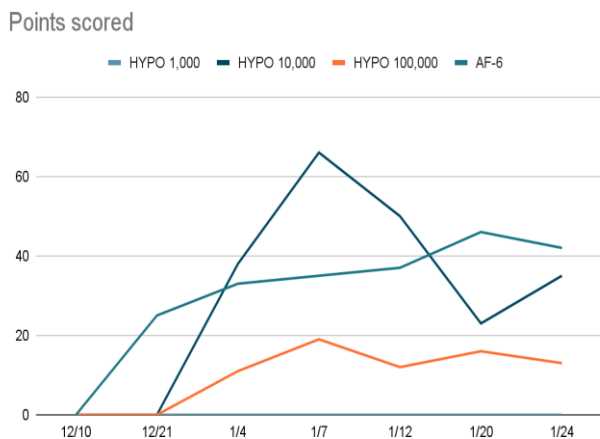


4.5.3 結果

12/10 培養開始、12/21 培養開始ともに個体数の変動は同じようになった。ハイポネックス液 10,000 倍希釈での増加量が最も多く、*Staurastrum* 個体数の最大値を、AF-6 培地を用いた場合よりも早く記録した。(グラフ1、2参照)

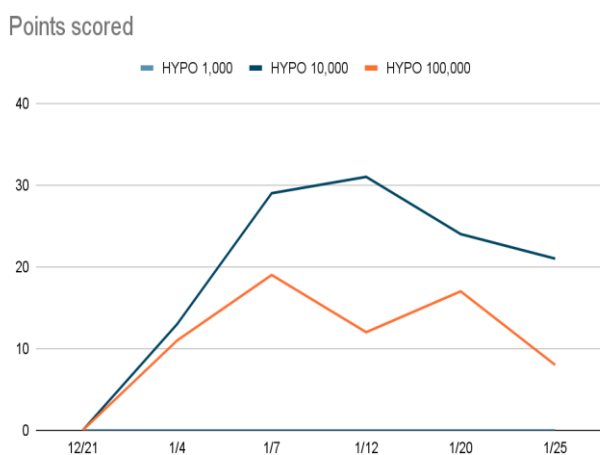
ハイポネックス液 100,000 倍希釈とハイポネックス液 10,000 倍希釈を用いた場合の個体数の増加は、培養初期はほぼ同じであったが、日が経過するにつれ差が広がっていった。

グラフ1 12月10日から培養開始



※1/7のAF-6培地の個体数は数えていない

グラフ2 12月21日から培養開始



※グラフの横軸は計測した日付、縦軸は5μLあたりの *Staurastrum* の個体数を表している。

4.5.4 考察

どちらの培地の個体数も、培養開始日の約1か月後には個体数が減少し始めたので、約1か月後が植え継ぎに適する時期だといえる。

1か月ごとに植え継ぎを行えば、AF-6培地よりハイポネックス液10,000倍希釈の方が、増殖する個体数が多いと考えられる。これは短期間でハイポネックス培地の栄養塩が少なくなり、順調に増殖できなくなった可能性がある。

より厳密に個体数を計測する方法としては、先行研究にあるように吸光光度計などで培養液中のクロロフィル量を測定する手法などがある。吸光光度計を用いて計測するには量的に多くの *Staurastrum* が必要となるため、今後も継続的に培養して十分な量を確保したい。

Staurastrum の培養については、最も増加速度が大きく、短期間で最大個体数に達していたハイポネックス液10,000倍希釈の液体培地を用いて行うのがよいと考えられる。

6 今後の展望と課題

最適な培養条件は明らかになりつつあるので、培養の回数を重ねてより条件を吟味していきたい。また今回上記の培養実験に加え、Bradford法を用いたタンパク質定量などの栄養評価に向けた実験も行ったが、十分なデータが得られなかった。今後安定して *Staurastrum* の十分量を確保できるようになれば、栄養評価を行う最適な手法もより深く研究していきたい。

7 参考文献・サイト

研究論文『石上三雄・保積京子,ツヅミモ *Staurastrum dorsidentiferum* var. *ornatum* の培養と増殖,滋賀大学教育学部紀要 自然科学,1984,No.34,p33-40』

培養に用いた培地組成について
NIES collection 微生物系統保存施設
<https://mcc.nies.go.jp>

8 謝辞

今回の研究を行うにあたり、琵琶湖環境研究センター様から多くのご助言と *Staurastrum* 株をいただきました。NIES collection 微生物系統保存施設様から AF-6 培地と *Staurastrum* 株のご提供いただきました。また、先生方には親身にご指導していただきました。感謝申し上げます。

5 結論