

休眠打破後のイシクラゲにおける窒素固定能の回復

平松恒輝 難波遥伸 白石涼馬 竹川大翔 小坂慧
指導者 野津俊朗

要旨

イシクラゲ(*Nostoc commune*)は、乾燥状態では無代謝で休眠を行い、水を与えることで休眠から回復し、活動を再開する。また、イシクラゲは空気中の遊離窒素を吸収、窒素化合物を生成する窒素固定という代謝を行うことでも知られている。ここでイシクラゲが休眠から回復する際に窒素固定という代謝活動はどのような変化を見せるのかについて疑問を持った。そこで本実験では窒素固定に着目してイシクラゲが休眠から回復する際に代謝活動を再開させる様子を調べることを目的とした。実験として、呼吸のみを行える条件下、呼吸と窒素固定を行える条件下に置いたものをそれぞれ休眠状態から回復させ、気体の吸収量の差を取った。さらに時間経過ごとのアンモニウムイオンの量の変化を調べた。その結果、イシクラゲは休眠打破後の初期段階でも窒素固定能を有し、2度に分けて窒素固定能が回復することが分かった。

Nostoc commune are a kind of cyanobacteria. They have some features such as dormancy and nitrogen fixation. First, dormancy is the reaction that they suspend their metabolism in them drying and resume it by getting water. Second, nitrogen fixation is the metabolism that they capture some nitrogen in air, and synthesize nitrogens compounds. In this research, we aim to detect the process of their metabolism when they recover from dormancy, by observing the nitrogen fixation. To research the efficiency of nitrogen fixation, we did two experiments. First, we made the experimental condition that one *N. commune* group could only do respiration and the other *N. commune* group could do respiration and nitrogen fixation, and we observed each amount of gas captured. As a result, subtracting the latter group's result from the former, we calculated the amount of nitrogen captured. In the second experiment, we measured ammonium ion concentration. As a result, we found out that the nitrogen fixation ability repeated the active term and inactive term, and that as the ability became weak, the ion concentration was lowered.

キーワード：イシクラゲ、窒素固定、休眠

1. 序論

藍藻類の一種であるイシクラゲは乾燥状態では無代謝で休眠を行い、水を与えることで代謝を開始、活動を再開する。また、イシクラゲは呼吸や光合成といった代謝活動に加え、空気中の遊離窒素を吸収し、窒素化合物を生成する窒素固定という代謝を行う。このような特徴、特に窒素固定と休眠は植物が生育できないような植生が乏しい地域の地力回復や緑化に役立つのではないかと考えた。しかし、休眠からの回復の際に窒素固定という代謝がどのようなふるまいを見せるのかについて先行研究が存在しない。

そこで本実験では、イシクラゲの行う窒素固定に着目し、休眠状態から代謝活動を再開する様子を調べることを目的とした。



図1 イシクラゲを採取した空き地
(岡山県倉敷市藤戸町天城1208-8)



図2 乾燥状態のイシクラゲ



図3 吸水後のイシクラゲ

<仮説>

生物学的窒素固定にはニトロゲナーゼ (nitrogenase) という酵素が関与する。この酵素は酸素やアンモニアによる阻害を受けるという特徴がある³⁾。しかし、アンモニウムイオンは窒素固定の生成物であり、酸素は呼吸に用いられる必要な物質である。そこで阻害への対策として窒素固定細菌などの生物は阻害回避機構を有している。たとえば、根粒菌はマメ科植物の根粒に共生することでこれを解消している。イシクラゲの阻害回避機構は、根粒菌と異なりイシクラゲ自身が有しているため³⁾、休眠から回復する際に阻害回避機構の回復もおこなう必要があり、この回復速度が窒素固定の制約になると考えられる。またこの速度はニトロゲナーゼがはたらき始める速度より遅いと予想する。これは、窒素固定によって取り込まれるアンモニウムイオンの最終的な行先であるタンパク質の合成には、比較的多くのプロセスを必要とするためにアンモニウムイオンの供給が受け入れ可能な量を上回ると考えたからである。従って、

窒素固定能は一時的に落ち込む段階があると仮説を立てた。また、参考文献3によるとイシクラゲは吸水開始30分後には十数倍に膨らむ事から、窒素固定能が完全に回復するのはこの時期以降であるという仮説を立てた。

2. 研究内容

窒素固定とは空気中の遊離窒素を吸収し、アンモニウムイオンを合成するという働き ($N_2 + 8H^+ + e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$) である。そこで窒素固定能の変化を測定するため

- ①窒素の吸収量を求める実験
- ②アンモニウムイオン量を測定する実験の2つを行った。

実験1

<目的>

本実験は、気体の吸収量から窒素固定能の変化を調べることが目的である。休眠状態から回復する際に窒素固定によって吸収される気体の量の変化を測定する。

<実験方法>

- ① 酸素と窒素を2:8の割合で混合させたO-N酸素とアルゴンとを2:8の割合で混合させたO-Ar気体を用意した。また、混合気体の組成は自然に近い環境にする目的からこのようにした。これらの気体を注射器内に充填した。これは後述の操作によりイシクラゲを気体の中に放置する際に行う代謝活動を制限するためであり、実験は光をさえぎった環境下で行った。そのためO-N気体内では呼吸と窒素固定が、O-Ar気体内では呼吸のみが行われると考えられる。このことからO-N気体とO-Ar気体での結果の差を算出することで窒素吸収量を求めることができる。

(O-N気体の変化量)

− (O気体の変化量)

= (N気体の変化量)

また、O-N気体で酸素に混合させる気体は反応性に乏しいものであればどのような気体でも問題はないと思われるが、本実験では反応性に乏しくかつ、ガラスを透過することもないアル

- ゴンを用いた。
- ② 乾燥させた 200mL 三角フラスコ内に休眠状態のイシクラゲを 2g 入れたものを 2つ用意した。
 - ③ 2つのフラスコを水中に沈め、2本のチューブをつなげたゴム栓で蓋をした。
 - ④ 片方のチューブの先を注射器につなげ、O-N気体、O-Ar 気体をそれぞれのフラスコに充填し、チューブを塞いだ。
 - ⑤ 一方のチューブを、内側に着色した水

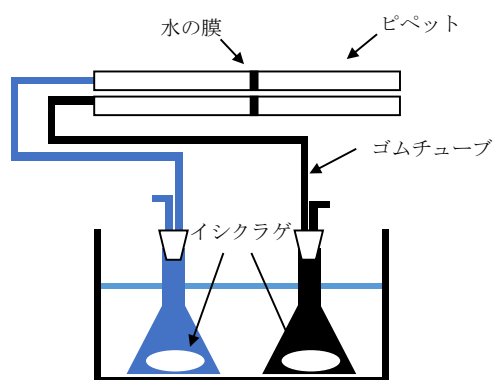


図4 実験装置の模式図

で膜を張ったメスピペットにつないだのちフラスコを 30℃の水を張ったビーカー内に沈めた。その後 30℃に保った光源のない恒温器内に放置し、10分ごとにそれぞれの膜の移動を計測した。本実験では常温として 30℃に環境を設定し、温度変化の影響を減らすためにフラスコを 30℃の水に沈めた。光源のない恒温機内に放置することで光合成は行われないと考えられる。



図5 実験装置

<結果1>

上記の実験を 21 回繰り返した。そのデータから四分位数を利用して外れ値を除き

平均の差をとったものが以下のグラフである。これは窒素の吸収量が示されている(図6)。

表1 経過時間ごとの気体減少量

	経過時間	10分	20分	30分	40分	50分	60分		経過時間	10分	20分	30分	40分	50分	60分
	Ar	データ1	-0.2	-0.3	-1.2	-1.2	-1.3		-0.6	N ₂	データ1	-0.1	-0.05	-0.65	-0.8
	データ2	-6.85	0	0.02	-0.01	0.01	-0.02		データ2	1.1	0.1	0.35	-0.05	0.1	0.3
	データ3	0	0	0	-0.01	0.01			データ3	-0.05	0.15	-0.01	-0.04	0.04	0
	データ4	0.15	0.05	-0.03	-0.02	-0.01	0		データ4	3.9	0.01	-0.03	0.01	1.11	
	データ5	-0.09	-0.21	-1	-1.2	-0.62	-0.73		データ5	1.12	0.07	0.01	1.92	0.58	0.2
	データ6	0.03	-0.09	-0.64	-6.65				データ6	0	-0.1	0.1	0	-0.05	-0.04
	データ7	-2.4	-2.3	-1.54	-0.9				データ7	-3.75	-1.1	0.02	-0.41	-0.06	-0.03
	データ8	0.23	0.05	-0.03	0	0.2	0.13		データ8	0.19	-0.01	0.04	0.02	0.01	0.12
	データ9	-0.15	0.18	-1	-0.38	-0.32	-0.48		データ9	-0.05	0.01	0.01	0.06	0.26	0.86
	データ10	0.15	0.06	-2.12	0	-3.24	0.01		データ10	-0.01	-0.07	0	0.05	0.05	0.05
	データ11	-3.35	-1.68						データ11	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02
	データ12	-0.05	-0.51	-5.24	-0.05	-0.02			データ12	-0.03	0.05	0.25	1.05	2.8	0.55
	データ13	0	0	0	0	0	0		データ13	-0.05	-0.1	-0.01	0	0.04	0.35
	データ14	0.07	0.05	0.04	0.01	0.03	-0.01		データ14	-0.18	0.21	0.07	2.4	0.95	0.48
	データ15	2.1	-4.25	-2.15					データ15	0.16	0.02	0.05	0.05	0	0.02
	データ16	-0.45	-0.3	-0.05	-0.03	0	0.05		データ16	0.24	0.06	0	1.3	0.02	0.08
	データ17	0.09	0.19	0.14	0.04				データ17	0.73	0.46	0.07	0.01	0.71	0.2
	データ18	0	0.15	0.13	0.05	0.25	0		データ18	0.66	0.43	0.6	0	0.8	0.62
	データ19	0.02	0.06	0.02	0	-0.02	0.02		データ19	0.27	0.12	-0.04	0	2.19	1.35
	データ20	-0.04	0	0.02	-0.05	0.05	-0.13		データ20	0.46	-0.28	-0.08	-0.2	-0.28	0.91
	データ21	0.14	0.09	0.02	0.05	0.03	1.1		データ21	2.84	2.65				

※計測不能であった箇所は空欄にしてある

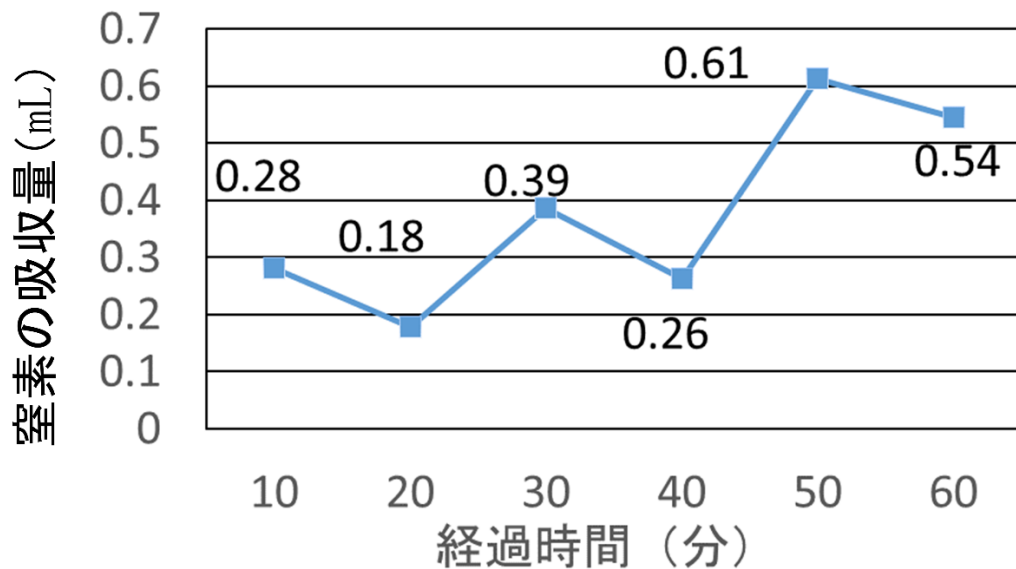


図6 休眠打破後の窒素吸収量

このデータに対し t 検定を行ったところ、20～30 分間、40～50 分間でそれぞれ 0.06、0.08 と有意傾向が見られた。よって休眠打破後 20～30 分、40～50 分で窒素固定能の回復が見られた。

を用いて試薬の色の変化を調べた。

実験 2

<目的>

休眠から回復する際の、イシクラゲが含有するアンモニウムイオンの量の変化を調べた。これは窒素固定による生成物であるアンモニウムイオンの量から窒素固定能の変化を調べることが目的である。

<実験方法>

- ① シャーレを6つ用意し、それぞれに休眠状態のイシクラゲを2gずつはかり入れた。
- ② それぞれに20mL ずつ水を与え、放置した。
- ③ 10分ごとに1つのシャーレからイシクラゲを取り出し、80mL の熱湯に投下した。これは既定の時間以上イシクラゲが代謝を行うことがないように細胞を固定するためである。
- ④ 乳鉢を用いて③のイシクラゲを熱湯ごとすりつぶし、濾過を行った。
- ⑤ ④で採取した液とアンモニウムイオン濃度検査薬(図7)を混ぜ、吸光度計



図7 実験に使用したアンモニウムイオン濃度検査薬

<結果 2 >

ベールの法則(光路長が一定のとき、吸光度は溶質のモル濃度に比例する)により吸光度の増減はアンモニウムイオン濃度の増減を意味する。本実験では使用した試薬の理由から 580 nm, 590 nm, 680 nm の波長での吸光度を参考にした。開始 10 分から 20 分後に高い吸光度を示したのちに 30 分後吸光度が低くなり、さらに 40 分後にまた吸光度が大きくなるという結果が得られた(図 8)。

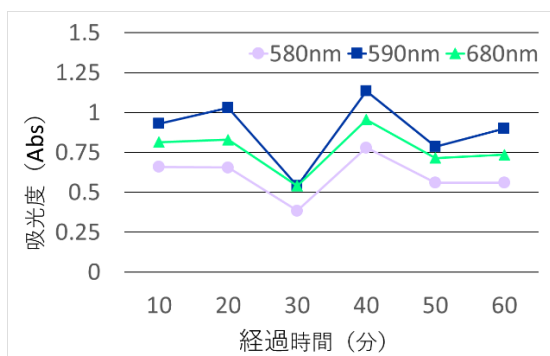


図8 試薬反応による吸光度の変化

3. 考察

実験1では休眠打破後の窒素固定能の変化を、実験2では休眠打破後のイシクラゲが含むアンモニウムイオン量を調べた。これらの結果からイシクラゲは休眠打破10分後にはすでに窒素固定能を有し、アンモニウムイオンを保持していると考えられる。また20～30分間、40～50分間で有意傾向が見られたことから窒素固定の機能は2度に分けて回復されるものと考えられる。更に休眠打破後30分ごろのアンモニウムイオン濃度の減少による窒素固定能の上昇は見られなかったことから、イシクラゲの阻害回避機構は20～30分間ですでに回復しているものと考えられる。また窒素固定の機能は休眠打破50分後には完全に回復し、その後一定に保たれると考えられる。

4. 結論

イシクラゲは休眠打破後20分～30分、40分～50分の2度に分けて窒素固定の機能の回復を行い、休眠打破50分後には窒素固定能が完全に回復する。

今後の展望として、断続的な測定ではなく、連続的に測定を行える仕組みを模索すること、アンモニウムイオン濃度ではなくモル数を測定する方法を模索することがあげられる。

【文献】

- 1) 小池裕幸: “へん”な藻類イシクラゲ
(<http://www.yomiuri.co.jp/adv/chuo/research/20140605.html>)
- 2) ミライブ: 環境に応じて窒素を取り入れる仕組みを変えられる不思議なイキ

モノ

(<https://www.milive.jp/live/18sobun/pa15/>)

- 3) 前田勇: 微生物共培養による窒素固定能の発現微生物共生体における窒素からアンモニアへの変換
(https://katosei.jsbba.or.jp/view_html.php?aid=735)

効果的な打ち水の量の提案

藤原晴紀 村國広貴 山田琉生 山本航志

指導者 小田夏海 小林俊彦 白神陽一郎 筒井愛知 仲達修一 山本拓

要旨

夏の暑い日に水を撒いて清涼感を得る打ち水では、水を撒きすぎると湿度が上がり、より暑いと感じてしまうと聞いた。そこで本研究では打ち水の量を変えた時の不快指数の変化を、自作した装置を用いて計測・比較をし、最も効果のある量を考察した。

その結果、撒く水の量を増やしていくと不快指数は減少する傾向にあるが、ある量からは不快指数が増加する傾向にあることが分かった。また、湿度の低いときに打ち水を行うと逆効果になることが示唆された。

We heard that we feel hotter because of watering too much when we do Uchimizu, that is the way watering around us in order to be cool in summer day, so we measured the change of discomfort index and examined the best amount of water.

As a result, we found discomfort index tended to drop when the amount of water increased, but from a certain quantity it tended to rise. In addition, we found there is a possibility that doing Uchimizu in dry day have opposite effect.

キーワード：打ち水 不快指数

1. 序論

近年、地球温暖化やヒートアイランド現象などの問題により、気温が上昇してきている。そのため、電気を使わず、温室効果ガスも出さないような地球にやさしい方法で暑い夏を少しでも涼しく、快適に過ごしたいと考えた。調べている中で、日本の伝統的な涼み方の1つに打ち水というものがあることを知った。打ち水とは、暑い夏場に、玄関先や庭、道路やマンションのベランダなどに水を撒き、そこで発生した気化熱によって気温を下げるというものである。しかし、打ち水により、湿度が上がり、かえって逆効果になる場合もある。我々は打ち水の量と比例して体感温度は下がっていくのではないかと考え、本研究を行おうと考えた。しかし、体感温度は温度、湿度、風速を計測する必要があり風速を計測することは困難であったため、気温と湿度から決まる不快指数を用いて

実験を行うことにした。

不快指数とは、「人間が生活する上で不快を感じるような体感を、気温と湿度で表した指数である。風速が含まれていないため、体感とは一致しないことがある。気温を T °C、相対湿度を H % とすると

$$\text{不快指数} = 0.81 \times T + 0.01 \times H (0.99 \times T - 14.3) + 46.3$$

で計算される。不快を感じる値は人種などにより違いがあるが、日本人は 77 になると 65% の人が不快を感じ、85 では 93% の人が不快を感じるといわれている。」²⁾ と説明されている。

その不快指数を用いて打ち水には効果があるのか、また、撒く水の量によって不快指数にどのような変化が現れるのか調査する。

2. 研究内容

〈材料・器具〉

・材料

木箱 (厚さ 20mm の児童用机の天板を用いて自作したもの)、発泡スチロール容器、ビニール袋
コンクリート板 (300mm×300mm×35mm)

・器具

温湿度計、非接触温度計、湯沸かしポット、スタンド、ストップウォッチ、霧吹き



図2 測定の様子

実験1.

〈目的〉

一般的な夏の日を想定してモデルを用いて打ち水を行い、撒く水の量と不快指数の関係について調べる。

〈研究方法〉

- ①室温を 27℃ に設定する。
- ②二重にしたビニール袋に入れたコンクリート板を熱湯で満たした発泡スチロール容器に入れ、10 分間加熱する。



図1 コンクリート板を加熱する様子

③加熱後、コンクリート板の中心の表面温度が 57℃ になったところで木箱に入れる。

④中心の表面温度が 54℃ になると同時に、霧吹きで 0g, 45g, 67.5g, 90g, 112.5g の水をコンクリート板全面に吹きかけ、30 秒ごとに 20 分間、箱の床から高さ 20 cm の地点の湿度と気温を測定する。図 3 は、水を撒く直前の不快指数を基準とした、時間経過による不快指数の変化量を表したグラフである。

〈結果〉

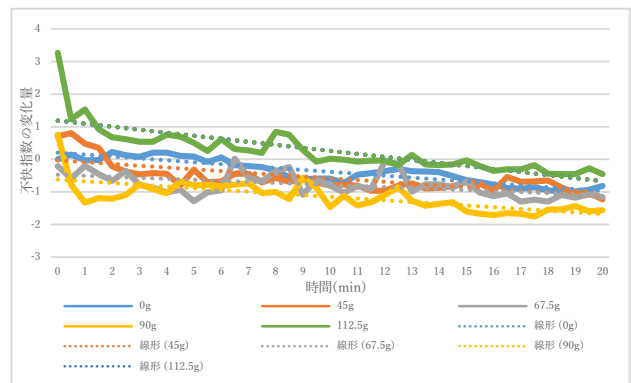


図3 撒く水の量と不快指数の変化量の関係 (実験①)

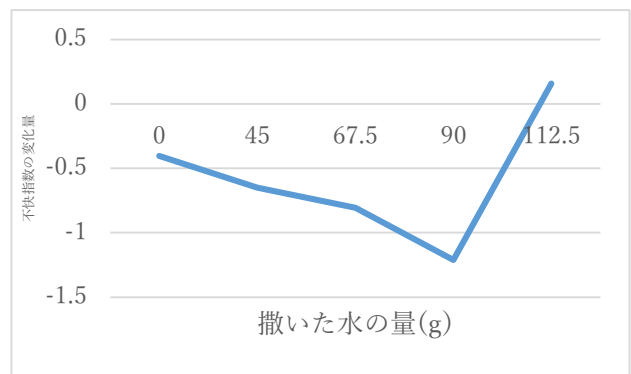


図4 撒く水の量と水を撒く前と後での不快指数の変化量の平均の関係 (実験①)

0g, 45g, 67.5g, 90g の順に水の量を増やすと不快指数は減少する傾向にあったが、112.5g に増やした途端、急激に不快指数が上昇した (図 3, 図 4)。ただし、最初の 1 分は不快指数の上昇が極端に大きかったため最初の 1 分のデータは図 4 のグラフでは除いている。

〈考察〉

0g から 90g では不快指数が減少したため打ち

水には一定の効果があるが、90g から 112.5g の間で不快指数が急激に上昇したことから打ち水の量にはそれ以上撒くと逆に不快になるという量が存在すると考えられる。

実験 2.

〈目的〉

実験 1 で 90g と 112.5g の間で不快指数が急激に上昇することが分かったのでその間の値を調べることでより細かい不快指数の推移を調べる。

〈研究方法〉

- ①実験 1 の実験方法の①②③の操作を行う。
- ②中心の表面温度が 54℃になると同時に、90.0g, 112.5g, 90.0g と 112.5g の中間の 101.25g の水をコンクリート板全面に吹きかけ、30 秒ごとに 20 分間、箱の床から高さ 20 cm の地点の湿度と気温を測定する。

〈結果〉

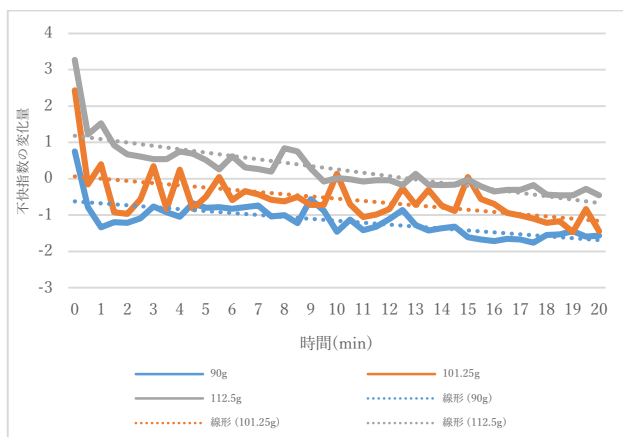


図 5 撒く水の量と水を撒く前と後での不快指数の変化量の関係 (実験 2)

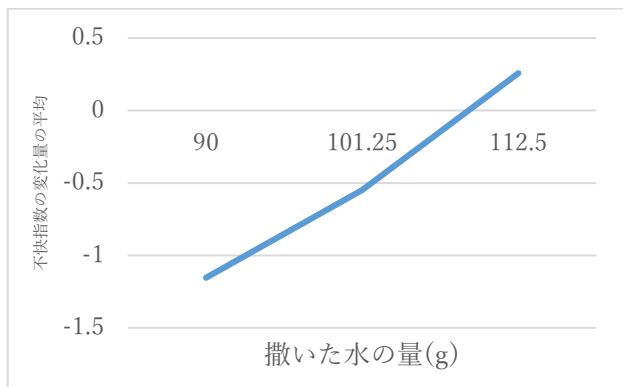


図 6 撒く水の量と水を撒く前と後での不快指数の変化量の平均の関係 (実験 2)

101.25g で行ったところ 90.0g と 112.5g の中間程度であった (図 5, 図 6)。ただし、図 6 のグラフも実験 1 と同様に最初の 1 分のデータは除いている。

〈考察〉

101.25g のとき不快指数が 90g と 112.5g の中間ぐらいになったことからそれ以上撒くと逆に不快になるという量が存在し、それは 110g 程度であると考えられる。

実験 3.

〈目的〉

通常よりも湿度の低い状態を想定してモデルを用いて打ち水を行い、撒く水の量と不快指数の関係について調べる。

〈研究方法〉

- ①湿度を実験 1, 2 では 50%程度であったのを、35%に変えて実験 1 と同様の実験を行う。

〈結果〉

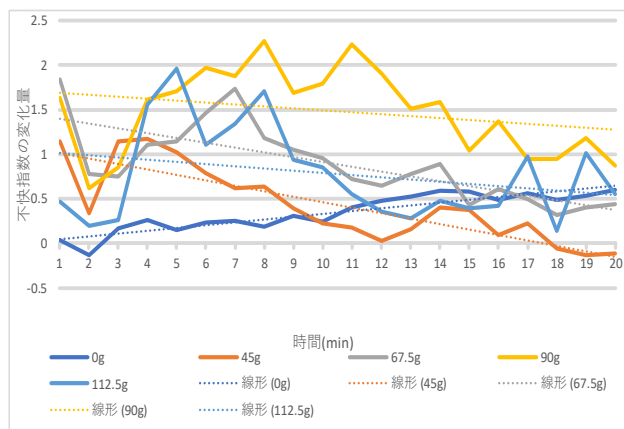


図 7 撒く水の量と水を撒く前と後での不快指数の変化量の関係 (実験 3)

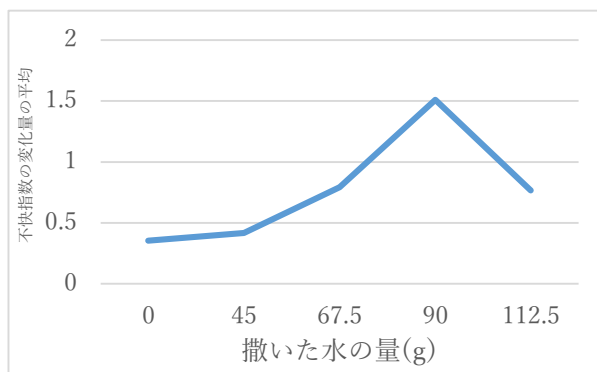


図 8 撒く水の量と水を撒く前と後での不快指数の変化量の平均の関係 (実験 3)

0g, 45g, 67.5g, 90g と増やしていくと不快指数は上昇する傾向にあり, 112.5g は少し減少した(図7, 図8)。ただし, 図8のグラフも実験1と同様に最初の1分のデータは除いている。

〈考察〉

90g までは水の量を増やしていくと不快指数が上昇したことから湿度が低いときに打ち水をする
と逆に不快になると考えられる。この理由として、元の湿度が低いので打ち水をする
と湿度が大いに上がったからだと考えられる。また、112.5g になると不快指数が減少するのは
実験3では温度管理に暖房を用い、実験を行ったため90gの上昇が誤差により著しかった
からであり、112.5g で不快指数が下がる効果があったわけではないと考えられる。

3. 結論

以上より通常の時撒く水の量を増やしていくと、不快指数は下がっていくが、ある一定の量を超えると不快指数が上がっていき、それが90g程度であると考えられる。また、今回は0.090 m²、厚さ3.5cmのコンクリート板を用いたので、0.090 m²あたり90g、すなわちコンクリート1 m²あたり約990g程度の打ち水を行えば最も効果的であると考えられる。また、湿度が低いときには打ち水をして
もあまり効果が得られず、逆効果であると考えられる。

今後の課題として、今回は湿度が低いときには打ち水は逆効果と結論付けたが、本実験での打ち水の最小の量が1 m²あたり約500gとかなり多かったので、これより少ない量に不快指数が下がる量がある可能性が十分にあるため、少ない水の量での実験を行うことが挙げられる。

4. 文献

1) <https://keisan.casio.jp/exec/system/1202883065> 不快指数 - 高精度計算サイト - CASIO

2) <https://kotobank.jp/word/%E4%B8%8D%E5%BF%A%E6%8C%87%E6%95%B0-123712> ブリタニカ国際大百科事典 小項目事典