

ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシについて

4年C組 高畑 菜々子
4年C組 中村 友柚
4年C組 西村 咲野
指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシ（ミドリゾウリムシから細胞内共生細菌であるクロレラを除去した個体）を培養して、増殖曲線（成長曲線）を描き、そこにクロロゴンニウムの増殖を追う形でミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシが増殖するという関係性を確かめることを目標とし、実験、培養の経過の観察、個体数の計測を重ねてきた。

キーワード ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシ、増殖曲線

2. 研究背景、目的

私たちは、細胞内共生への興味と石油を分泌する細菌の改良への興味をそれぞれ持っていた。ミドリゾウリムシが細胞内共生細菌としてクロレラを体内に共生させているという点、マルトース（糖）を分泌し、その糖はバイオマスエネルギーとして利用価値があるという点から、ミドリゾウリムシを共通の研究対象とした。そこで、ミドリゾウリムシの培養を始めたが、培養中にカビが生え、フラスコ内のミドリゾウリムシの全滅が何度も起こってしまった。そのためまずは、培養の安定をめざし、その指標としてのシロミドリゾウリムシ、ミドリゾウリムシの増殖曲線を描くことにした。



図1 *Paramecium.ursaria*
ミドリゾウリムシ)

3. 研究内容

3. 1 目的

ミドリゾウリムシは細胞内共生細菌であるクロレラがあるため、養分であるマルトースが供給され、エサがなくなってもある程度の期間個体数を維持していると思われる。これに対して、シロミドリゾウリムシは細胞内共生をしているクロレラが存在しないため、餌であるクロロゴンニウムの減少に伴い最大数になった後は減少の一途を辿ると

思われる。これらの現象を確認する。

3. 2 仮説

同じ条件下で、異なるフラスコに同数のミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシを培養した場合、ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシがフラスコ内で最大数に増えた後、ミドリゾウリムシのみが最大数のままある程度の期間保たれる。

3. 3 実験

3.3.1 実験に用いた培地（簡易クロロゴニウム培地）の作成方法

- ① 100ml のメスシリンダーに酢酸ナトリウムを 2g（酢酸ナトリウム三水和物の場合は 3.3g）、Yeast extract を 10g 入れる。
- ② その上から蒸留水を加えて、全量を 100ml にする。
- ③ よく混合し、50ml チューブ 2 本に分注して冷凍保存する。

※濃縮培地をミドリゾウリムシ培地作成時には 100 倍、クロロゴニウム培地作成時には 20 倍に希釈して使用する。

3.3.2 ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシ、クロロゴニウム培地の作成方法

- ① 前述した簡易クロロゴニウム培地を解凍し、2ml ずつ 100ml フラスコ（クロロゴニウム用）、300ml フラスコ（ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシ用）に入れる。
- ② Volvic (KIRIN のミネラルウォーター) を 40ml (100ml フラスコの場合)、200ml (300ml フラスコの場合) の線まで入れる。

- ③ フラスコの口を綿栓で塞ぎ、綿栓をアルミホイルで包む。その後オートクレーブに入れ、121°C、20 分、20atm で滅菌する。

※培地は植え継ぎ前日に作製するか、まとめて作製した場合は 22°C の暗所で保管された培地（作製より二か月以内のもの）を使用する。

3.3.3 ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシ、クロロゴニウムの植え継ぎ方法

- ① アルコールでフラスコ等器具類の表面を消毒し、クリーンベンチ内に入れる。
- ② クロロゴニウム、シロミドリゾウリムシ、ミドリゾウリムシの順に 3.3.1 で作製した培地に植え継ぐ。

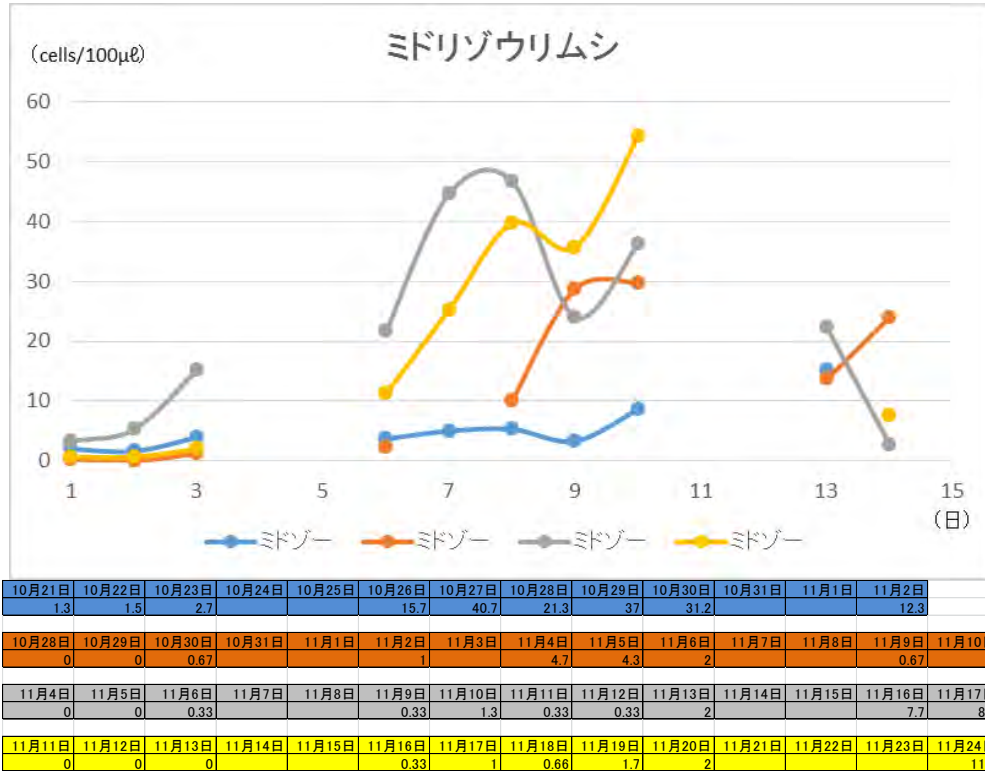
- ③ 植え継いだフラスコは、温度が 23°C で保たれるインキュベーターで保管する。

※クロロゴニウムが 4 日で最大数に達し、ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシは 1 週間から 2 週間で最大数に達するとされたため、植え継ぎはまとめて 1 週間に 1 度行った。

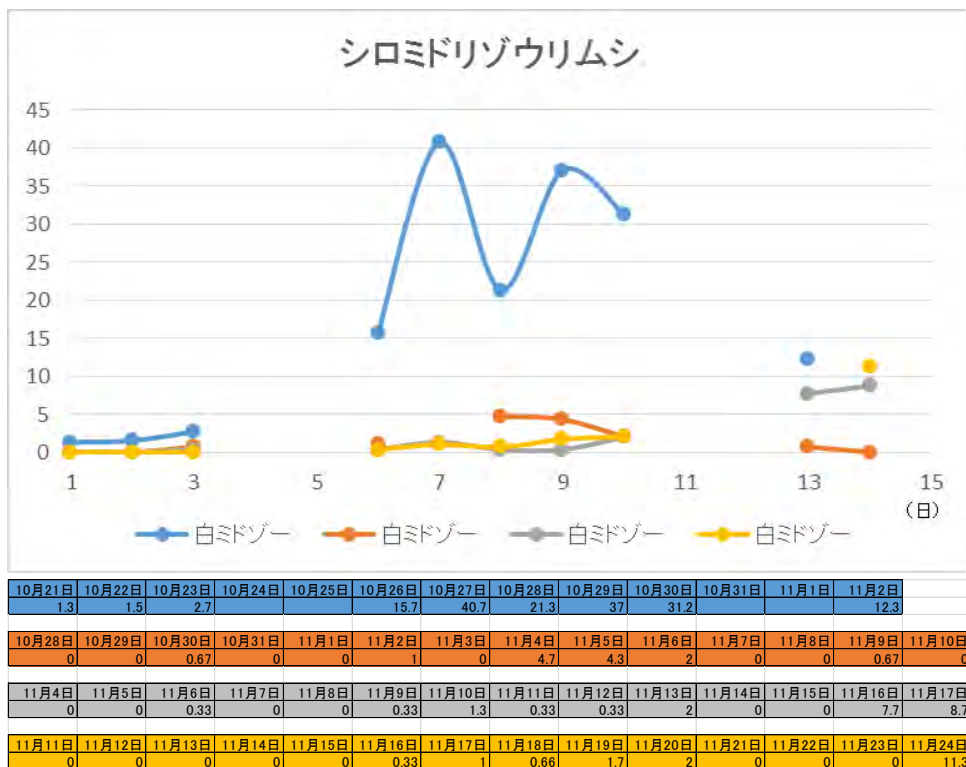
3.3.3 個体数のカウント方法

ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシ共にフラスコ内から 1ml を採集する。そこからさらに 100 μ l を採集し、シャーレ上に 10 ドロップに分ける (1 ドロップは約 10 μ l)。その後、実体顕微鏡で観察し、10 ドロップ内に確認されたミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシ、それぞれの総数をカウントする。同様の操作を 3 回行い、その総数の平均を、その日確認できたミドリゾウリムシ及びシロミドリゾウリムシの総数とした。

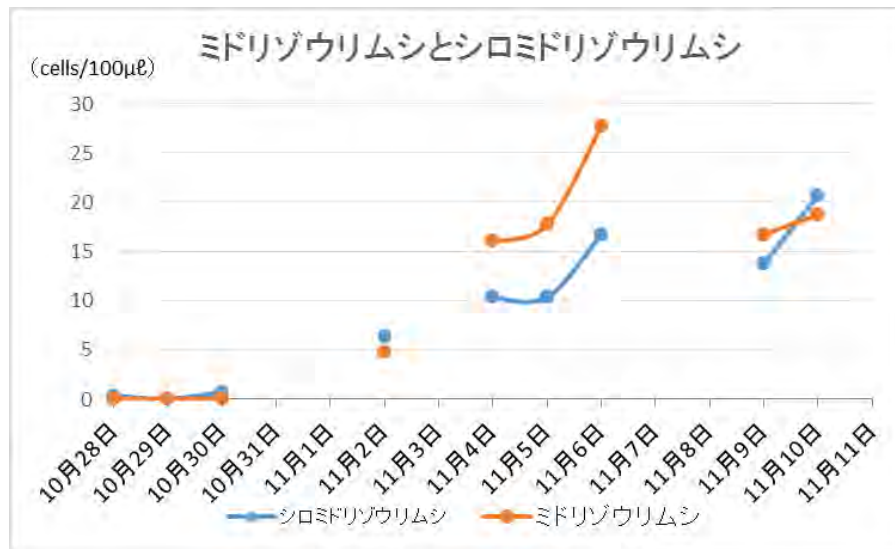
3. 4 実験結果



グラフ1 ミドリゾウリムシの増殖曲線とデータ



グラフ2 シロミドリゾウリムシの増殖曲線とデータ



グラフ3 ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリム

グラフ1 とグラフ2は、1週間以上続けて200ml フラスコ(培地量は100ml)で培養したものである。

グラフ3は、ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシを各200ml フラスコ(培地量は100ml)で、10月27日から11月10日まで培養したものであり、植え継ぎの際にはそれぞれ個体数が同じになるようにした。

4. 考察

シロミドリゾウリムシがミドリゾウリムシに比べて培養が難しいことが分かった。このことはグラフ2の個体数が増えないことから読み取れる。またグラフ3より、植え継いだ当初は、ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシとで増殖速度の差があまり無かったが、植え継いで一週間ぐらい経つと数値の伸び方に差が現れたことからいえる。しかし、平日のみに計測を行ったためデータが欠損している。そのため曲線という形で仮説を実証できるような数値の

変動をみるができなかった。

5. 今後の課題

<現時点での問題点>

- ①植え継ぎの際、3.3.3で出された平均値を利用し、フラスコ内の個体数が同数になるように計算した上で植え継いでいるのだが、全溶液量100ml中の100μlを採取し、その中の個体数を計測するという方法を取っているため、統計的な誤差が生じる。
- ②シロミドリゾウリムシの増殖が不安定である。
- ③土日分のデータの欠損が増殖曲線を描くうえで、大きな障害である。
- ④植え継いでから数日は、3.3.3の方法でミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシの個体数をカウントしても、個体が存在しないことが多い。

<解決策>

- ①問題点の②については、個体数を計測する際、フラスコではなく、ディプレッション

ョンスライドガラス(容量1 ml くぼみを3 つ持つスライドガラス)で培養することにより全体の数を減らし、常に培地内の個体数を把握できるようにする。または、個体数の計測のために取り出す培地量を100 μ l から 1000 μ l(1ml) に変更する。

②シロミドリゾウリムシがミドリゾウリムシに比べ増殖しにくい理由ははっきりとはわかっていない。おそらくシロミドリゾウリムシの増殖を抑制する理由は、到達できる最高の細胞密度がミドリゾウリムシのものよりも低いためであるか、クロゴニウムを取り出したことによって、カビなどに対する免疫のようなものが欠如していると私たちは予想した。今後、原因を確定させていきたい。

③植え継いでから数日は、ミドリゾウリムシとシロミドリゾウリムシの培地から1ml を採集した後、それを10 ドロップに分け、100 μ l 中の個体数をカウントし、ある程度個体数が増えたら、3.3.3 の方法に移行していきたい。

6. 謝辞

今回の研究を行うにあたってご指導してくださった櫻井先生及び、ミドリゾウリムシ、シロミドリゾウリムシを提供していただき、ご指導くださった神戸大学の洲崎先生にこの場をかりて御礼申し上げます。