

# ラン藻の窒素固定

勝本 美咲, 中妻 由紀, 福原 愛梨

## 【概要】

私たちは、ラン藻が窒素固定をしていることを実証するため、2種類の実験を行った。まず、水中植物とラン藻を比較するため、無菌無栄養の寒天培地でそれぞれ培養した。次に、水中のアンモニウム濃度を計測した。これらの実験の結果、ラン藻の窒素固定を確認することができた。

We carried out to experiments to prove that *Cyanobacteria* do Nitrogen Fixation.

First, to compare *Cyanobacteria* to aquatic plant, we cultivated both of them in medium made of vegetable gelatin individually.

Second, we measured ammonium ions in the water.

As a result of these experiments we could confirm that they did Nitrogen Fixation.

## 【研究の目的】

この研究を始めた背景は、自分たちとラン藻は極めて身近でありながらその実態をあまりにも知らないことに気づき、その性質について知りたくなったからです。

## 【実験Ⅰ：寒天培地】

### 【実験器具】

シャーレ、三角フラスコ、薬さじ、マグネティックスターラー、オートクレーブ、無菌室寒天、純水、ラン藻、水草（アナカリス）

### 【実験方法】

- ① 寒天30gを測りとる。
- ② 三角フラスコに精製水1l入れる。
- ③ ②を沸騰させマグネティックスターラーにかけ、①を少しずつ溶かす。
- ④ ③をオートクレーブに入れ、121℃で15分間、滅菌する。
- ⑤ ある程度冷めたら無菌室でシャーレに分注して平らなところに静置して固化させる。
- ⑥ 培地上に試料を乗せ、ラン藻の輪郭をマジックで書く。(図5)
- ⑦ 無菌室で培養する。
- ⑧ 週に1回観察する。

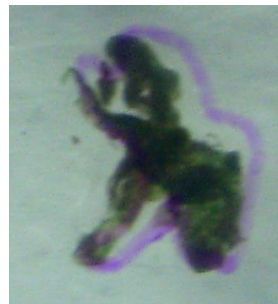
## 【実験結果】



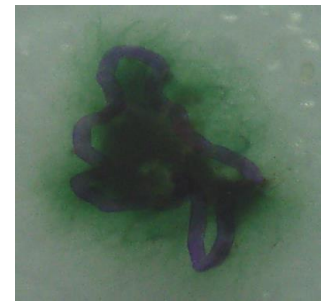
(アナカリス 1日目)



(アナカリス 14日目)



(ラン藻 1日目)



(ラン藻 14日目)

写真から確認できるように、栄養分を含んでいない寒天培地の上では、アナカリスはすぐ枯れてしまったけれど、ラン藻は成長した。

## 【実験Ⅱ：アンモニウムイオン濃度の測定】

### 【実験器具】

分光光度計、石英試験管、培養管、パラフィルム、メスシリンダー、電子天秤、薬さじ、ビーカー、純水、塩化アンモニウム、パックテスト（アンモニウムイオン測定用）、ラン藻（イシワカメ）

【実験方法】

- ① ラン藻を精製水で洗う。
- ② 培養管に、ラン藻 5 g、精製水 10 ml を入れたもの、精製水のみを 10 ml 入れたものをそれぞれ 4 本ずつ作り、パラフィルムをかぶせる。  
\* ラン藻と精製水を入れたものを試料①、精製水のみを入れたものを試料②とする。



左) 試料①                      右) 試料②

- ③ ②で作った試料を窓ぎわならべる。
- ④ 一週間ごとにそれぞれの試料のアンモニウムイオンの濃度を調べる。  
[アンモニウムイオンの濃度の調べ方]
- ① 試料①・②それぞれから溶液を 2ml とり、石英試験管に入れる。
- ② ①で作ったものにそれぞれパックテストの試薬を入れ、パラフィルムをかけ、よく振り、5 分間おいておく。
- ③ ②で作ったものの吸光度を分光光度計で測り、検量線のグラフを用いて、アンモニウムイオンの濃度を調べる。

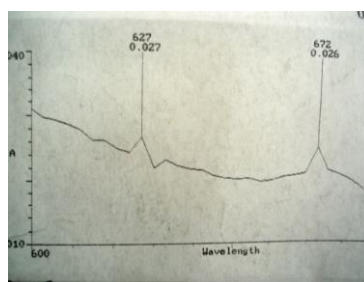
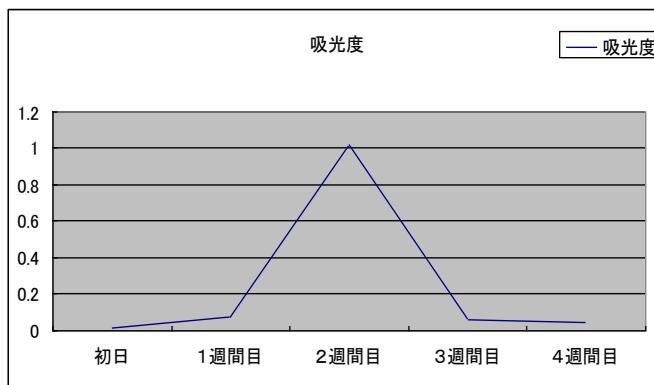
【実験結果】

◎第 1 回

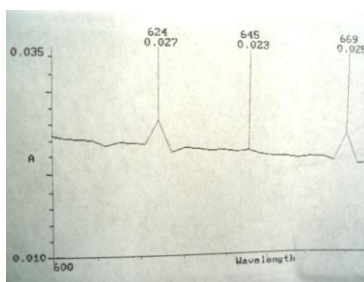
<アンモニウムイオン濃度の推移>

初日から 1 週間目の間では、アンモニウムイオン濃度が順調に上昇したが、1 週間目から 2 週間目の間では急激にアンモニウムイオン濃度が上昇し、2 週間目と 3 週間目の間では今度は急激なアンモニウムイオン濃度の低下が見られ、3 週間目から 4 週間目の間には緩

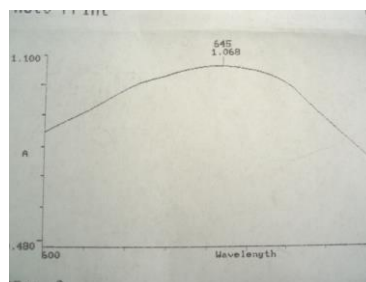
やかに戻ったものの濃度の低下は続いた。



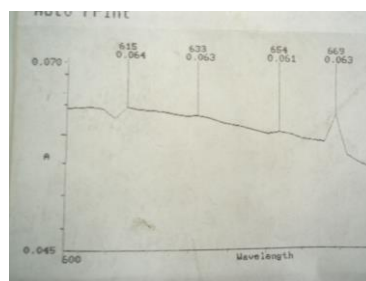
初 日



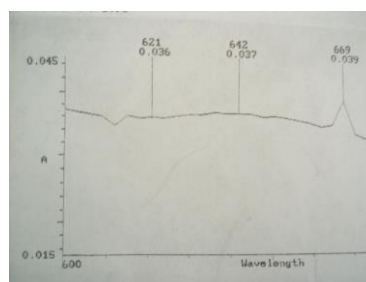
1 週 間 目



2 週 間 目



3 週 間 目

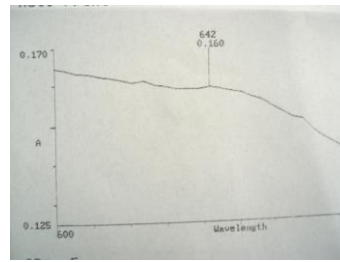
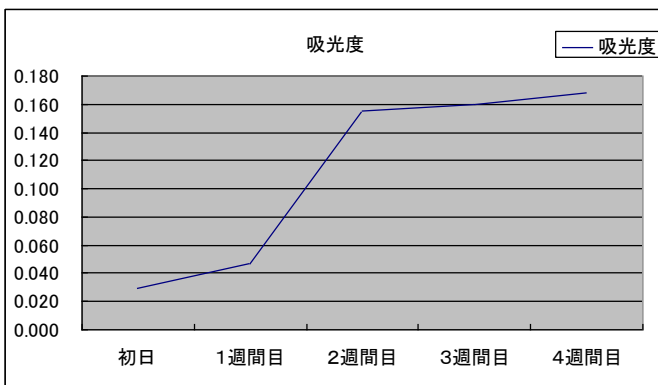


4 週 間 目

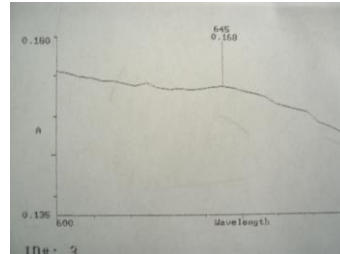
◎第2回

＜アンモニウムイオン濃度の推移＞

初日から1週間目の間では、アンモニウムイオン濃度が順調に上昇していき、1週間目から2週間目の間では急激にアンモニウムイオン濃度が上昇し、また第1回の実験と同様に、今後濃度が急激に低下していくのではないかと少し懸念したが、2週間目と3週間目の間には初日から一週間目の間のように緩やかな上昇に転じて、その傾向は3週間目から4週間目の間も同様に続いた。



3 週 間 目



4 週 間 目

【考察】

実験 I : 寒天培地

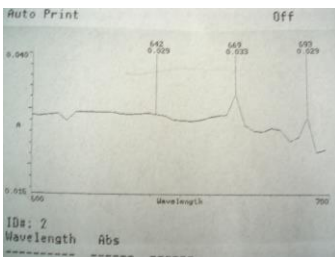
私達は、寒天培地でラン藻とアナカリスを培養し、アナカリスが枯れて、ラン藻が成長することによってラン藻が窒素固定をしていることが示せる、と考えていた。

そして実際に実験を行い、アナカリスがすぐに枯れてしまい、ラン藻は増殖し続けたことを示すことができた。

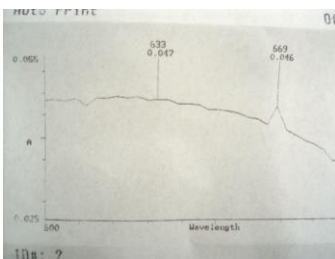
しかし、私たちの仮定と実験内容を考え直してみると、ラン藻は水分が少量しか存在しない場所でも生存出来るが、アナカリスのような水草は水分が少量しか存在しない場所では生存できない。そのため今回の実験 I の寒天培地を使った実験はアナカリスにとっては培養するのに適切でない環境であるため、今回の実験 I の対照実験は、成り立たないという結果に終わった。

上記の理由で対照実験にはならなかったが、ラン藻が栄養分なしで成長したという結果は事実である。私たちは、ラン藻が確実に窒素固定をしていると証明するにはどうすればよいのかを再度考え、今度はアンモニウムイオンに着目した。

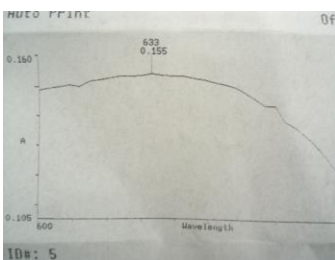
アンモニウムイオンが純水から検出されれば、窒素固定中に合成されるアンモニウムイオンが純水中に溶け出してきたと推測するこ



初 日



1 週 間 目



2 週 間 目

とができると考えたからだ。

## 実験Ⅱ：アンモニウムイオン濃度の測定

第1回の実験結果は、条件をまったく同じにしたにもかかわらず、数値にばらつきがみられた。

このような結果に終わってしまった原因は

- (1) 分光光度計の使用法が曖昧であったため。
- (2) ラン藻の状態が健康なものと不健康なものがあったため。

と思われる。

そこで、もう一度、上記2点のことを念頭において同様の実験を行った。

第2回の実験結果は、アンモニウムイオン濃度が順調に上昇していき、1週間目から2週間目の間では急激にアンモニウムイオン濃度が上昇し、2週間目からは初日から一週間目の間のように緩やかな上昇に転じて、4週間目まで同様に続いた。

### 【結論】

結果で詳しく説明していますが、実験に用いたラン藻（イシクラゲ）は確かに純水中で生存し、またその純水中からはアンモニウムイオンが検出されました。具体的に言うと、ラン藻は純水中で30日以上ほぼすべてが生存しており、寒天培地では7月20日の時点（実験開始から60日）で10のサンプルのうち4つの生存が確認されました。生存の確認は顕微鏡で動いていることを確認して行いました。アンモニウムイオンの値は純水中では総じて0ppmで、ラン藻入りのものは値にばらつきがあり、約0.2ppm～10ppmの間でした。しかし、二回目の実験では、思ったような値が得られました。したがって仮定よりラン藻は窒素固定をしていることがわかった。

### 【今後の展望】

ラン藻と同様に窒素固定をする根粒菌についても実験をしてみたい。

また、ラン藻はバクテリアと植物の両方の

性質を備えているが、ほかにもこういった生物がいるのか調べてみたい。

### 【感想】

実験Ⅰでは、窒素固定によってラン藻が成長していることを確認することはできなかったものの、ラン藻は栄養分なしでも成長していけるということを実際にこの目で確かめることが出来たので感動した。

実験Ⅱについては、1回目の実験が失敗に終わったので2回目で思い通りの結果が得られるか不安だったが、無事成功し、ラン藻の窒素固定を確認することができてよかった。

また、これらの研究を通して、私たちが使用したことのない機械を使ったり、植物について調べてみたり、1つのことについて意見をまとめてみたり、日常生活を送っているだけでは経験できないようなことができた。この経験をこれからの生活に生かしていきたいと思います。

### 【参考文献】

化学Ⅱ教科書 p64 実教出版