

# 稲わらトラップ法によるゾウリムシ(*Paramecium caudatum*) およびアメーバ(*Amoeba proteus*)の採集と 小麦粒を加えた KCM 溶液による簡易培養

八 島 洋 一, 三 枝 聖, 松 政 正 俊

(受付 2007年10月26日)

Collection of *Paramecium caudatum* and *Amoeba proteus*  
from ponds using a rice straw trap method and their culture  
in KCM solution with an added grain of wheat

Yohichi Yashima, Kiyoshi Saigusa and Masatoshi Matsumasa

Department of Biology, Center for Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University

## はじめに

原生動物は細胞の構造, 浸透調節, 生殖, 原形質流動, アメーバ運動, 繊毛運動, 行動などの実験観察用に小・中学校の理科や高等学校の生物の科目において広く教材として使われている(今堀ほか1985, 丸岡2003). その中でも特にゾウリムシとアメーバの需要が高く, 当研究室にも年に数回5-6月に集中して岩手県内の数校から分与の申し込みがあり, これらに応じている. アメーバやゾウリムシを野外から採集しようとする, 適期(一般に原生動物では5月中旬から10月中旬にかけてであり, 水温が15℃~25℃の時で晴天が数日続いた時が良いとされる)には採集ができるが, 水温が10℃以下になると困難になる. 特に, 岩手県のような冬期間が長い寒冷地では11月中旬から5月上旬まで採集がほとんど不可能となる. 原生動物の実

験観察を計画する場合, 株の保存施設から材料を入手することは可能ではあるが, 特別な遺伝子を持つ株を必要とする場合を除き, 野外での採集効率を上げる工夫をして採集できない期間を短縮できれば実施が容易になると考えられる. 本研究は, 採集が比較的困難な時期でもかつて採集した経験がある身近な池や湖沼などから, 十分な個体数を効率的に採集できる簡単な方法の確立を目的として行った. 検討した方法は, 河川などでの落ち葉の分解速度と分解過程および分解にかかわる水生昆虫や甲殻類などの構成種を調査する方法に使われる litter bag 法(Kawahara and Sato 1974, 柳井・寺沢 1995)とゾウリムシの培養法に使用されている「稲わらの浸出液」(楠元・内藤 1981)にヒントを得て, メッシュ製の袋に稲わらをつめた「稲わらトラップ」を利用したものである. その有効性

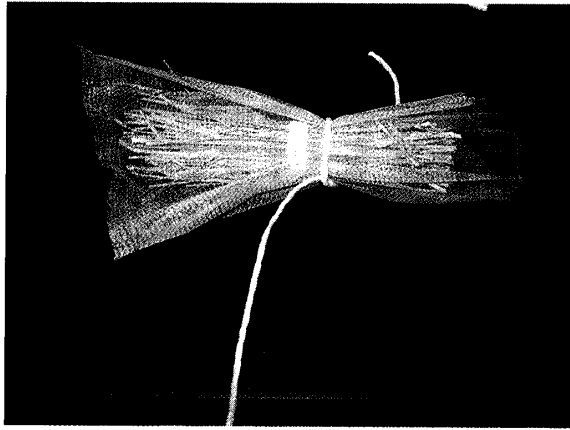


図1. 稲わらトラップ. 稲わらを20cmの長さに切断し, 直径約5cmの太さに中央部をタコ糸で束ねて錘用の小石数個をメッシュ製水切りネットに入れたもの. その口を岸の植物や石に固定するため長さ1mのプラスチック紐でしばる.

を検討するため稲わらトラップをキャンパス内の調整池に設置し, トラップから絞り汁を経時的に採取し, その中に含まれるゾウリムシの個体数の変化とアメーバの存在の有無を調べて個体数がピークに達する日数を求めた. さらに, これら2種について小麦粒を加えたKCM溶液による簡易培養を行い, 個体数のピーク(定常期)に達するおよその時間を調べた.

#### 材料と方法

##### (1) 稲わらトラップの作製

乾燥した稲わらを長さ約20cmに切断し, 直径5cm(約100本程度)の太さにタコ糸で束ねた. この稲わらの束を錘り用の小石数個を入れたメッシュ製の水切り袋(材質ポリエチレン18cm×25cm)に入れ, 袋の口を池の岸の植物や石などに固定するための長さ約1mのプラスチック製ヒモでしばって稲わらトラップを作製した(図1, 以降トラップと略称).

##### (2) トラップの設置と原生動物の採集

岩手医科大学矢巾キャンパスの2つの調整池AとBがキャンパスの雨水調整用に2005年に作られた(図2). これらの池には河川水の流入がなく, 降雨による増水時にはオーバーフローによって水位が一定量以下に保たれるしくみになっている. 調整池Aでは岸辺にカキツバタが植えられ, 池の中央部から岸辺にかけてアオミドロがかなり厚く繁茂している. 調整池Bでは岸辺にカキツバタ, ミツガシワ, イグサが部分

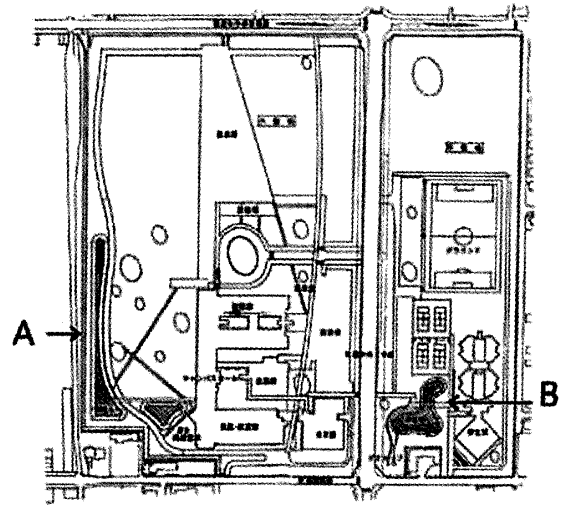


図2. 矢巾キャンパスの模式図. 矢印で示したAとBはそれぞれ調整池AとBを表す.

的に, ヒツジグサが中央部に植えられ, アオミドロも認められるが, 調整池Aほどではない. 両池の深さは, 岸辺の浅い所で10cm程度, 中央部の深い所で30~40cmである. 池の底には大きさ10~20cmの石が敷き詰められているが, 少量の落ち葉が一部に見られる程度である. 池の周囲には木が植えられているが, まだ小さいので池面の日当りは良い. 調整池Aの岸辺に10月4日に1カ所(トラップA), 調整池Bの岸辺の異なる場所に10月4日(トラップB-1)と同月18日(トラップB-2)に1カ所ずつの計3カ所にトラップを水面下に没するように設置した(図3). 水温は設置場所で直接アルコール棒温度計を用いて, pHは池の水を研究室に持ち帰ってpHメーター(セントロンモデル

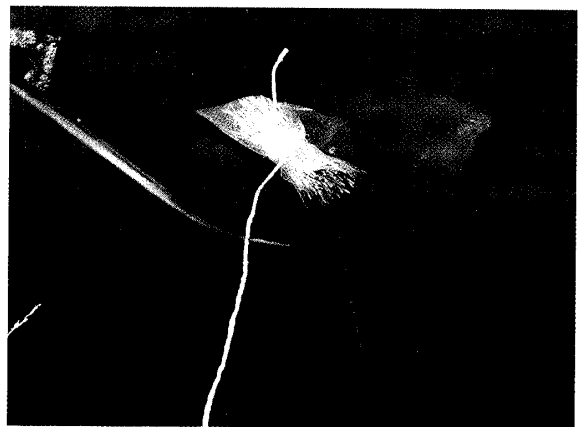


図3. 稲わらトラップを池の水面下に沈めて設置した状態. プラスチック紐で岸の植物に固定する.

3001) を用いて測定した。

トラップを設置した際に、池の中央部から水200mlを、岸辺から底に貯まった泥や水あかを含む水200mlをビーカーでポリ袋に採取した。また、底に沈んだ広葉樹の落ち葉4枚を少量の池の水を入れたポリ袋にピンセットで手早く採取した。トラップ中の原生動物はトラップ設置後、10月4日・10月9日・10月11日・10月18日・10月22日・10月30日・11月7日にトラップに含まれる水100~200mlをできるだけこぼさないように注意しながらポリ袋に絞り取って採取し(以下これを「絞り汁」と呼ぶ)、これを研究室に持ち帰って調べた。

### (3) 個体数の測定と簡易培養

研究室に持ち帰った調整池中央部および岸辺の水は、ポリ袋の中で十分混合した後、駒込ピペットで20mlを9cmシャーレに取った。これらを実体顕微鏡下で検鏡し、ゾウリムシとアメーバの個体数を測定した。落ち葉については、KCM溶液(アメーバの生理的塩類溶液 石井1999)20ml入りの9cmシャーレの中で採取した4枚をすすぎ、同様に個体数を測定した。

絞り汁は研究室で直ちにポリ袋から駒込ピペットで5mlを6cmシャーレに移した。実体顕微鏡下でゾウリムシを他に用意したKCM溶液10ml入りの6cmシャーレに1個体ずつマイクロピペット(作り方は重中1988, 丸岡2003を参照)で単離しながら個体数を測定した。単離したゾウリムシに小麦粒1個を加え、約20~25℃の室温で直射日光のあたらない場所に置いて培養を行った。アメーバについては、分解された植物体に付着していることが多いので、正確に

個体数が測定できなかったため有無のみを確認した。絞り汁をシャーレに移して3日後に実体顕微鏡下で検鏡したときにアメーバが確認できた場合を+、確認できなかった場合を-と表した。シャーレ内のゾウリムシを除いた絞り汁にはアメーバ類以外にも多くの生物(プラナリア, センチュウ, ユスリカ, カゲロウの幼虫, ミジンコ類, ワムシ類, 大型の繊毛虫類など)が入っているため、これらの生物をマイクロピペットやピンセットなどでできるだけ取り除いてからKCM溶液5mlを加えた。これに小麦粒1個を入れ、ゾウリムシと同様に培養を行った。

## 結 果

### (1) 調整池の水温と pH

調整池の水温はAでは10月7日の17.0℃から11月7日の12.0℃へ、Bでは10月7日の18.0℃から11月7日の13.0℃へと、どちらの池でも徐々に低下した(表1)。

pHは、調整池Aでは10月31日に7.64と11月7日には7.52、調整池Bでは10月31日に7.59と11月7日には7.5と弱アルカリであった(表2)。

### (2) 絞り汁の pH

トラップAでは、pHが10月9日の6.94から11月7日の5.29へと徐々に低下し、酸性化した。トラップB-1では、pHが10月9日の6.7から11月7日の7.08へと徐々に中性になった(表3)。

### (3) 池水および落ち葉のアメーバとゾウリムシ

アメーバが調整池Aの落ち葉から1個体確認されたのみで、ゾウリムシは調整池AとBの水、底に貯まった泥や水あかを含む水、調整池Bからの落ち葉などでは確認されなかった(表4)。

表1. 調整池の水温

調整池	10月7日	10月22日	10月31日	11月7日
A	17.0℃	13.3℃	13.2℃	12.0℃
B	18.0℃	13.5℃	13.0℃	13.0℃

表2. 調整池の水の pH

調整池	10月31日	11月7日
A	7.64	7.52
B	7.59	7.50

表3. 絞り汁の pH

トラップ	10月9日	10月18日	10月22日	10月30日	11月7日
A	6.94	※	※	5.6	5.29
B-1	6.7	6.08	6.32	6.69	7.08

トラップAとB-1は10月4日に設置。

※: トラップAの10月18日と22日は水位が低下し、干上がって測定不能、22日以降に注水されたので30日から採取を再開。

表4. 調整池のゾウリムシとアメーバの個体数

調整池	中央部の水		岸辺の水		落ち葉	
	ゾ	ア	ゾ	ア	ゾ	ア
A	0	0	0	0	0	1
B	0	0	0	0	0	0

ゾ：ゾウリムシ，ア：アメーバを表す。

池の水20mlあたりの個体数。

池の底からの落ち葉は4枚を使用。

#### (4) 絞り汁5mlあたりのゾウリムシの個体数の変化

設置後3時間のトラップの絞り汁5ml（以下の検鏡に使用した絞り汁は5ml）では、トラップB-1からゾウリムシは1個体を確認できたがアメーバは確認できなかった。また、トラップAからはアメーバ、ゾウリムシともに見つけられなかった。トラップAでのゾウリムシの個体数は、設置後ゆっくりと増加する傾向が見られたが、2週間後に池の水位が下がって干上がり、絞り汁の採取が不可能となった。この状態はしばらく続いたが、10月22日以降に水道水の注入が行われ、水位が戻ったので10月30日に絞り汁の採取を再開した。絞り汁に含まれるゾウリムシの個体数は設置後1週間のものと同程度

であったが、11月7日には191が認められた(表5)。トラップB-1でのゾウリムシの個体数は、設置後の時間とともに増加し、設置3時間が0、5日目に232、1週間目に314、2週間目に最大の368を記録した。設置3週間から4週間では、ゾウリムシの個体数は最も増殖した時の1/3から1/4に低下したが、個体数は80から130の間にあった(表5)。2回目に設置したトラップB-2でもゾウリムシの個体数は、1回目と同様に設置当日が0で、4日目に18、12日目に120、20日目に254と徐々に増加する傾向を示した(表5)。

#### (5) 絞り汁5mlあたりのアメーバ

トラップAではトラップ設置1週間目に採取した絞り汁にアメーバの出現が初めて確認され、水位の低下により中断したが、26日目、34日目の両日も確認された。トラップB-1では、設置5日目から34日目まで採取日ごとに絞り汁にアメーバが出現した。トラップB-2ではトラップ設置12日目と19日目の絞り汁に、アメーバが確認された(表6)。

#### (6) ゾウリムシとアメーバの簡易培養

10月9日のトラップB-1の絞り汁に小麦粒1個を加えて、アメーバの簡易培養を20~25℃で2週間行ったものが図4である。アメーバは

表5. ゾウリムシの個体数の変化 (絞り汁5ml)

トラップ	10月4日(3時間)	10月9日	10月11日	10月18日	10月22日	10月30日	11月7日
A	0	13	62	※	※	72	191
B-1	1	232	314	368	132	88	130
B-2				0	18	120	254

トラップAとB-1は10月4日に設置。

トラップB-2は10月18日に設置。

※：トラップAの10月18日と22日は水位が低下し、干上がって測定不能、22日以降に注水されたので30日から採取を再開。

表6. 絞り汁5mlに出現したアメーバ

トラップ	10月4日(3時間)	10月9日	10月11日	10月18日	10月22日	10月30日	11月7日
A	-	-	+	※	※	+	+
B-1	-	+	+	+	+	+	+
B-2					-	+	+

トラップAとB-1は10月4日に設置。

トラップB-2は10月18日に設置。

※：トラップAの10月18日と22日は水位が低下し、干上がって測定不能、22日以降に注水されたので30日から採取を再開。

+：アメーバの出現有。-：アメーバの出現無。

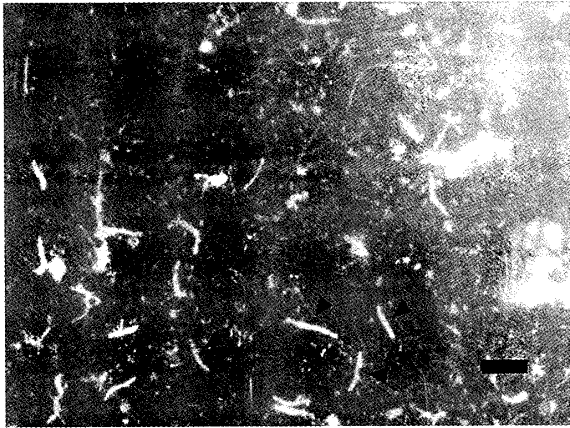


図4. 室温で2週間培養したアメーバ (*Amoeba proteus*) の実体顕微鏡写真. 約500 $\mu\text{m}$ の白い不定形の細長いもの(矢印)がアメーバの細胞である. スケールは500 $\mu\text{m}$ .

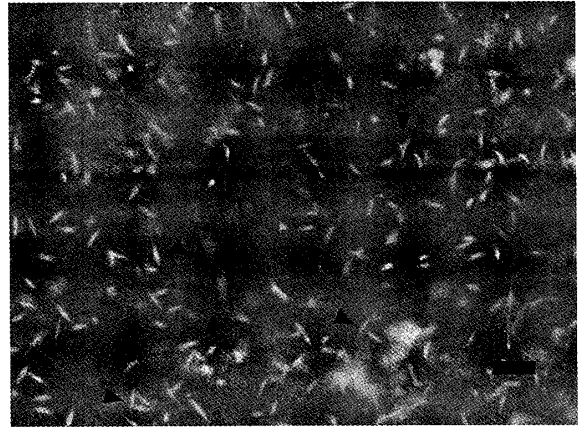


図5. 室温で1週間培養したゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の実体顕微鏡写真. 約200 $\mu\text{m}$ の白い小さな点線状のもの(矢印)がすべてゾウリムシの細胞である. スケールは500 $\mu\text{m}$ .

実験観察に適した個体数にまで増殖している。10月9日のトラップB-1の絞り汁から単離したゾウリムシを20~25 $^{\circ}\text{C}$ で1週間の培養を行ったものが図5である。ゾウリムシは実験観察に適した個体数にまで増殖している。この状態のアメーバとゾウリムシの個体数は、約1ヶ月間維持された。

## 考 察

### (1) 調整池の環境と絞り汁の pH

ゾウリムシの最適な培養条件は、一般に温度が27 $^{\circ}\text{C}$ で pH は7.1であるが、野外の生息範囲は pH が5.3~9.5と広い(重中1988)。アメーバの最適な培養条件は、温度が20 $^{\circ}\text{C}$ 前後で pH については中性付近にあるが範囲は広い(石井1999)。このような培養条件に対して、調整池の水や絞り汁の pH はゾウリムシやアメーバの生息範囲にあったが、水温が最適な培養温度に比べて低かったので、池水や落ち葉からの採集ができなかったと考えられる。これらの採集方法は一般に使用されるもの(重中1988, 月井2003, 丸岡2003)なので、今回対象とした調整池からの採集は、10月から翌春まで水温低下時には難しいものと考えられる。

### (2) トラップ法によるゾウリムシとアメーバの採集について

稲わらトラップ法ではトラップ設置日を除いて採集日ごとにゾウリムシやアメーバが採集された(表4, 5, 6)。これらの結果を較べると、調整池に生息しているゾウリムシやアメーバの

密度は非常に低かったが、トラップでは設置後の日数とともに密度は徐々に高くなり、設置2~3週間にピークに達してその後に減少したと考えられる。このような現象は湖でポリウレタン製の人工基質を用いて行われた原生動物の microhabitats の実験でも見られ、原生動物の種数は設置4~6週間にピークになり、その後徐々に減少することが報告されている(Cairns and Ruthven 1970)。個体数が増加した原因についてはトラップでの増殖によるものか、またはトラップへの集積によるものかが考えられる。今回の調査では、池の水温は原生動物の継代培養に使われる10 $^{\circ}\text{C}$ に近いので、池ではほとんどゾウリムシの分裂は起こっていないと推定される。したがって、この時期はトラップへの集積によりゾウリムシの個体数が増加したものと考えられる。トラップB-1ではトラップ設置2週間までは、ゾウリムシの個体数が増加する傾向が、3~4週間では減少する傾向が見られる。B-1のトラップ設置3~4週間目とB-2のトラップ設置2~3週間の個体数を比較すると同一条件の時期にもかかわらず、B-2では個体数が増加しているもので、減少の原因は水温の低下によるものではなく、トラップからゾウリムシが分散したことによるものと推定されるが、分散の原因は不明である。また、アメーバについてもトラップの絞り汁から確実に存在が確認されたが、水温が10 $^{\circ}\text{C}$ になるとアメーバはほとんど分裂が起こらない(Sopina 1975)のでゾウリムシの場合と同様に集積によって個体数

が増加したと考えられる。

ゾウリムシに関してはトラップ設置2~3週間で最も個体数が多くなったので、水温が18~12℃程度の場合、設置2~3週間での採集によって培養を行わなくとも観察や実験に使用することが可能と思われる。ただし、実験は秋の1シーズンについて行ったにすぎないので、冬期を含む種々の状況でも行う必要がある。トラップの材料についても今回稲わらを用いたが、オオヤマザクラやシラカバなどの柔らかい広葉樹の落ち葉も用いることができる(八島未発表)。しかし、落ち葉は稲わらに較べて分解速度が速いのが欠点であるので、この点の検討も必要であろう。

### (3) 小麦粒による簡易培養

1週間から2週間の培養でゾウリムシとアメーバがともに高密度に増殖し、この状態は約1ヶ月間持続されるので、培養に費やす労力や時間も少なく有効な培養法といえる。さらに、継代培養もこの培養法で可能である。今回はゾウリムシとアメーバを分離して簡易培養を行ったが、同一シャーレ内での培養も可能である。ただし、ゾウリムシやアメーバ以外の原生動物が増殖することやミズカビが増えることがあるので、この場合は実験観察の材料として使うことができなくなる。こうした危険を回避するため、実験観察に必要な個体数にもよるが、培養するシャーレの枚数を増やしておくことが必要になる。

### 要 約

稲わらトラップ採集法の有効性を検討するために、岩手医科大学の矢巾キャンパス内にある雨水調整池にトラップを設置し、約4週間絞り汁を経時的に採取してゾウリムシの個体数を測定するとともに、アメーバの有無を調べた。その後、これらの絞り汁やKCM溶液に小麦粒1個を加えてゾウリムシとアメーバの培養を行った。その結果、ゾウリムシはトラップ設置2週間後に最大の個体数に達し、その後徐々に減少して最大個体数の1/3~1/4になった。アメーバはトラップ設置1週間後に出現し、4週間後

まで存在が確認された。小麦粒による培養ではゾウリムシは培養開始1週間で、アメーバは2週間で実験観察に十分な個体数に増殖し、その後この状態は約1ヶ月間維持された。以上より、稲わらトラップによる採集法を用いると、ゾウリムシやアメーバの採集が秋期にも可能であることが確認された。

### 参考文献

- Cairns J. Jr. and Ruthven J. A. (1970) Artificial microhabitat size and the number of colonizing protozoan species. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **89**: 100-109
- 今堀宏三・山極隆・山田卓三編(1985) 生物観察実験ハンドブック 453 pp. 朝倉書店 東京
- 石井圭一著 堀上英紀・木原 章編(1999) アメーバ図鑑 253 pp. 金原出版 東京
- 楠元 守・内藤 豊(1981) ゾウリムシの走性遺伝 **35**: 3-12
- Kawahara T. and Sato A. (1974) Decomposition of litter in forest floor (I) Study on the decomposition rate by litter bag method. *Jap. Forestry Soc.* **56**: 258-261
- 丸岡 禎(2003) 教材としての原生動物(1) 原生動物学雑誌 **36**: 113-122
- Sopina V. A. (1975) The role of nucleus and cytoplasm in the inheritance of multiplication rates in *Amoeba proteus* cultured at different temperatures. *Exp. Cell Res.* **97**: 259-264
- 重中義信(1988) 原生動物の観察と実験法 259 pp. 共立出版 東京
- 月井雄二(2003) 原生生物の採集と観察 <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/DataBook/m&m/2003/contents.html> 2007年12月1日に確認
- 柳井清治・寺沢和彦(1995) 北海道南部沿岸山地流域における森林が河川および海域に及ぼす影響(II) 山地溪流における広葉樹9種落葉の分解過程 日林誌 **77**: 563-572