

# 多様な微生物の簡便な長期培養法

## — 微生物相の変遷過程の観察 —

丸岡 歩武 / 日野 晶也

### はじめに

中学校または高等学校でも、生物教育には実験と同様に観察が重要視されており、多くの場合初年次の新学期に顕微鏡を利用した観察が実施されている。これは座学だけでなく、理科教室での最初の授業であっても安全であり、生徒の生物への興味を引き出すうえでも適した授業計画である。また、多くの教科書で、生物の多様性や分類については裏表紙や最終章にカラーで微生物の顕微鏡像がとりあげられ、これらを顕微鏡の使い方を学びながら自分の目で観察することが教科書への親しみ易さを導く効果もあると考えられる。最近ではデジタル化された教材も多く、普通教室で顕微鏡像や動画を利用することも多くなったが、このような出来上がった教材からの視角情報を立体像やモデルに置き換える思考訓練のためにも、実際に顕微鏡を使いフォーカスが合ったバランスの良い画像を得るには工夫が必要なことを体験させることは非常に重要である。実際に、神奈川県でも教育センターで純粋培養した生きたゾウリムシやラッパムシのような微生物を教材として県内の学校に適宜に配布することも行っている。

本研究は、顕微鏡による観察のための教材としてだけでなく、微生物を長期間培養することによって、培養液の微生物相が時間とともに変化する、生物相の遷移を簡便な方法で長期間に渡って教材として利用できる方法を紹介する。

### 方法

最初に微生物を含む素材として、水田や畑、水路の土を用意する。水田の場合は田おこしをする前の（水を田に引き込前の）土を 100 g 程度採取し、500mL のビーカーに入れる。米 4 合を 500mL の水道水でとぎ、これを 5 倍に希釈して本実験に用いる米のとぎ汁として、土の入ったビーカーに注ぐ。サランラップで軽く口を覆い更に全体をアルミホイルで遮蔽するなどして、これを暗所・室温で培養を開始する。後述する結果で示す通り、数日後か

ら、ビーカーの中に微生物を観察できるようになる。勿論、採集場所によって、どのような微生物が最初に見られるか、生物相がビーカー内でどのように変化していくかは異なるが、花壇のように殺菌剤を多くまかれた場所の土でなければ、米のとぎ汁が培養液として栄養を補給し、多くの微生物を観察できる。ここまでの内容や方法については文献1などで既に紹介されている。本研究では培養開始から4ヶ月程度で、生物相が非常に貧弱になり、単一の大型の微生物のみが生き残り、それも最後には死滅する状況まで観察した。その状態になった時に、培養液を入れ替え、もう一度米のとぎ汁を加えることを行った。これ以降更に新たな変化が起きたので、以下主に写真で結果を示す。

尚、微生物の同定については、主に月井雄二著「淡水微生物図鑑ビジュアル版」(文献2)を用いた。この図鑑は写真が豊富で検索が容易であるが、著者も会員となっている日本原生生物学会では現在は正確な種同定がなされていないことが議論されている。現在ではその形態が発生段階や生息状況によって変化するので、原生生物の正確な種同定を遺伝情報の基に解析した分子分類に従って行われている。しかし、本稿で取り上げるような教材開発としては属レベルの分類で十分であるし、得られた顕微鏡像との比較によって分類することで目的を達成できるので、この図鑑に基づいて属レベルの同定を行った。

## 結果

米のとぎ汁を加えて投入した土とビーカー内を良く攪拌した後、静置しておく、数日の内に水面の表層に薄い膜が生じてくる。これは微生物の集合体によって生じたもので、顕微鏡観察に用いるために試料を吸い出すには、この膜を含むように、パストゥールピペットなどで、0.5 ml程度を吸い出し、スライドグラスに滴下しカバーグラスを載せて試料とし、顕微鏡での観察を行う。使用する倍率は対物レンズ5, 10, 20倍、接眼レンズは5または10倍の中学校・高等学校で使用されている生物顕微鏡を利用できる。

今回示す培養例では第1期として4月中旬(室温18℃～25℃)に始め、第2期として9月(室温28℃～32℃)から11月ごろまで継続して行った。この間は、週2回から3回の観察以外には、培養液は暗所に静置保管したまま、何の手間を掛けずに継続培養を行った。一定温度を保つ培養器があれば25℃前後に設定すると微生物の増殖速度を制御することができるが、一般の教材として用いるには室温での培養で十分教材として利用できる。

培養開始2週目に集団としてゾウリムシが観察されるようになった(図1のA)、また、数日後にはその接合の場面と捉えることができた(図1のB)。

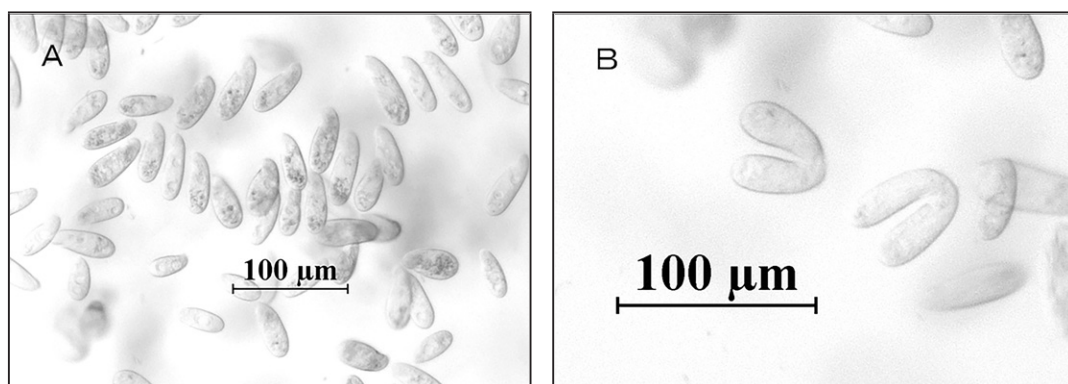


図1 培養2週後

A ゾウリムシ<sub>sp</sub>B ゾウリムシ<sub>sp</sub>の接合

図1にはゾウリムシを代表例として写真で示したが、培養開始直後から属レベルでさえ同定できない多種の極微小な微生物がビーカーの上部にできるバクテリアフィルム中から得ることができる。個体数も種数も多いと思われるが定量的な測定は顕微鏡レベルでは不可能であった。とはいえ、多種多様な微生物の動きを含めて観察することができる。

図2には培養開始後5週目に得られた大型の微生物の顕微鏡写真を示した。

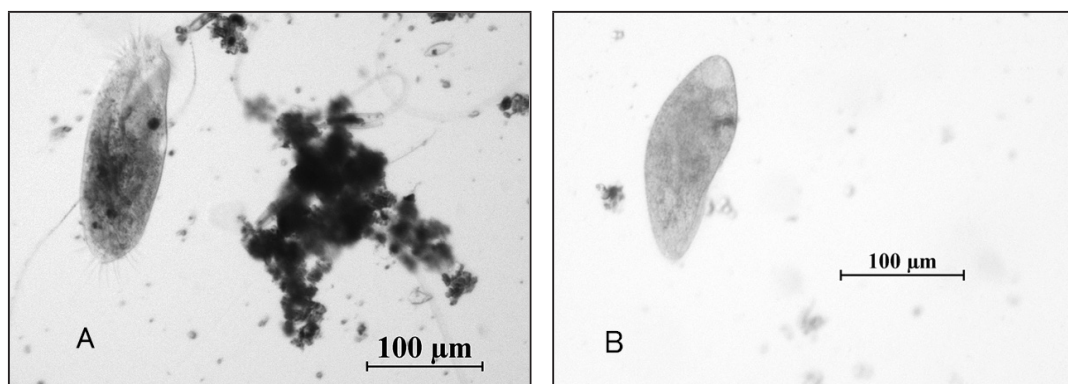


図2 培養5週後

A ウロスティラ属（繊毛虫門）

B プレファリズマ属（繊毛虫門）

この顕微鏡像Aの視野ではウロスティラ属の生物が目立つが大きさを示すBarの上部には先に述べたバクテリアフィルムが黒い影のように見えている。この倍率では判別できないが、この中には遊泳運動や旋回運動をしている生物も見られ、また、これよりは大きい図1で示したゾウリムシと同属と思われる繊毛虫類も見ることができる。

一回分の授業の教材にはこれで十分だが、更に培養を継続するとラッパムシなども見られるようになった。ここに示す実験例では6月に入り開始当初より気温も上昇しており、

培養液中の微生物の細胞分裂を含む活動は一層活発になっていると考えられる。

図3には、培養開始7週目に見られたセンチウとワムシの顕微鏡像を示す。この写真にもバクテリアフィルムの破片とともに、他の微生物が写っているが、この写真ではセンチウとワムシの体内に消化中の捕食された微生物と思われるものも見る事ができる。微小な生物が後になって出現した大型の微生物に捕食されている様子が見て取れる。また、これまで見られた微生物の多くは繊毛運動で遊泳しているが、センチウなどは蠕動運動がみられ、生物の動きも変化して多様になっていることが分かる。

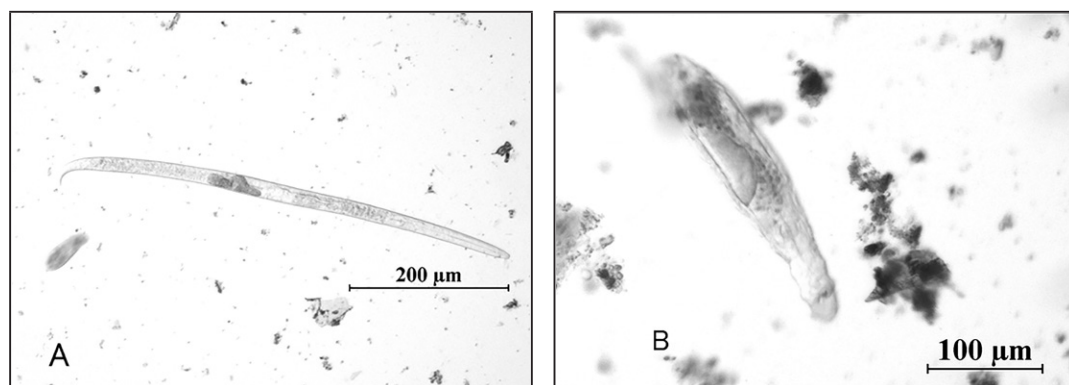


図3 培養7週後

A センチュウ属 (輪形動物門)

B ワムシ属 (輪形動物門)

ところが、培養10週目以降になると、これらの大型の微生物を捕食するさらに大型の微生物の増殖が見られ、17週目には図4に示す微生物のみが見られるようになった。

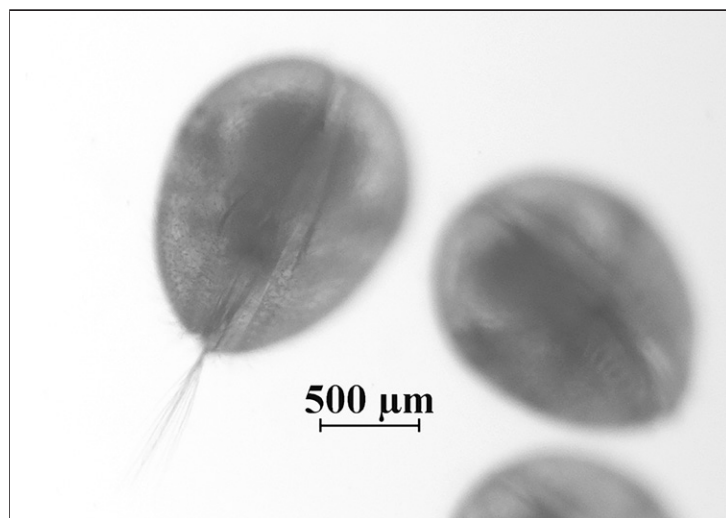


図4 培養17週後 溶液中の生態系で頂点となった微生物 (未同定)

ここに示すのは静止画像だが、ビデオ撮影できた動画にでも、この大型の微生物は二枚貝のように繊毛部分が大きく開き、ワムシやセンチウなどの微生物も大量に捕食していた。そして、この動物のみが培養液中に存在するようになった後、一旦培養液中には微生物が壊滅したように見えた。

この時期のビーカー内は投入直後の米のとぎ汁のよ

うに白濁しておらず、バクテリアフィルムも崩れ溶液はほぼ透明になっていた。このような状況になって本研究では培養を終えたのではなく、この状態のビーカーの中にもまだ微生物が残っていると考えた。但し、そのまま継続するのではなく、ビーカーの底に溜まっている最初に投入した水田の土を残すようにして、この上清を底に残った土を吸い込まないように慎重に駒込ピペットを用いて吸い出し、最初に投入した米のとぎ汁と同濃度を同量再度加えることを試みた。これを第2期の培養開始とした。ここに示す実験例では20週目にこの操作を実施した。

第2期の培養の直後にも、第1期と同様数日でビーカーの表面にバクテリアフィルムの形成が見られた。ただし、図1と2に示したような微生物群が再び同様な増殖をすることは見られなかった。我々が使用した顕微鏡やでは正確な像が捉えることができない大きさの微生物も増殖していたように見えた。実際には、図5に示すように第2期の培養開始から8週後には全長が100 $\mu\text{m}$ を超える大きさの微生物がそれ以下のサイズの微生物とともに見られるようになった。

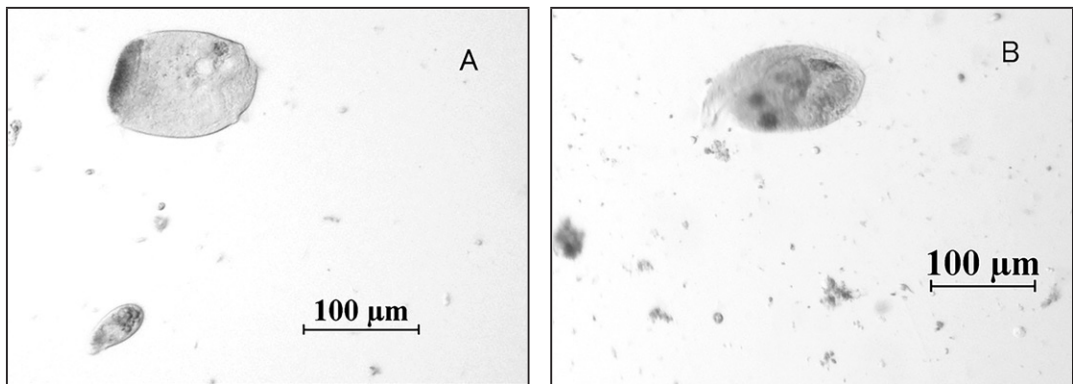


図5 第2期培養 8週後 (通算28週目)

A オピソネクタ属 (繊毛虫門)

B トラケリウス属 (繊毛虫門)

この第2期の培養では、培養液中の微生物相の変化は初期の培養液中の変化と比べると多様性は貧しくその変化も遅いものであった。しかし、第1期の末期には、殆ど微生物が見られなくなっていたにも関わらず、あらたな微生物群が登場したことを考えると驚くべき変化であった。

本稿で示したのは4月から開始した培養であったが、同時期から並行して、微生物の導入源として、畑の土、花壇の土、用水路から得た土も実験をおこなった。用水路から得た土を利用した時には、同様な結果が得られたが、畑や花壇の土ではここに示した程の微生物相の大きな変化は見られなかったが、どの場合でも微生物は発生してきた。但し、図4に示した同定ができなかったものの、大型の微生物のみが一時期大量に増え、優占種と



なっただけでなく、その後これが絶滅してしまったような例は無かった。

## 考察

**観察結果に対する考察** 田おこしの前の水田には、秋から冬にかけて水がなくなるため多くの微生物が休眠状態となって土中に存在すると考えられる。そこに、米のとぎ汁のような、栄養やミネラル豊富な培養液を加えたことにより、土中にシストを形成して休眠していた微生物が水分と栄養分を得ることによって、活性化し増殖を始めたに違い無い。実際、最近一般に普及している無洗米は米のとぎ汁から元で生じる下水の腐敗を軽減するために考案されたものであり、また、ゾウリムシやワムシなどの純粋培養をするための培養液の成分（文献3）と米のとぎ汁には共通した成分だけでなくデンプンを含む栄養素も多くふくまれ、安価な微生物培養液と言える。今回示した観察例で顕著に表れたように、培養開始後から極微小な微生物が多数多様に活動を開始し、それを餌とする微生物が増え、生物相が変化するとともに、培養液中の生態系が大きく変化していくことが、この方法で容易に示すことができる。また、その多様性は培養初期には大きく多彩に変化するが、次第に微小な生物を餌とする微生物が増えて生物相が変化し、最終的には同定はできなかったが1種の巨大な後生生物が優占種となり、やがてこの集団は餌となる生物が枯渇して死滅してしまったと考えられる。

それにも関わらず、ビーカーに投入した土の中にはそれまでに活性化しなかった微生物もしくは、最初の培養中にその生物にとって不利な状況となり休眠状態のシストを形成した微生物種が残っていたので、第2期の培養で溶液を入れ替え、新たに米のとぎ汁を再投入したことにより、第1期とは一部異なった生物種による生物相の変化が観察できたと考えられる。

**教材としての考察** 生徒に生きたままの教材を自身で工夫しながら観察することは非常に意味がある行為である。その為にも、動き回る微生物を顕微鏡で観察させることは顕微鏡の基本的な操作を習得するためには最適な教材であり、最近純粋培養された試料が配布されるまでに教育環境が整って来ている。しかし、配布された試料を長期間学校の準備室で管理することは容易では無い。本稿で紹介した方法によれば、授業計画や学級運営に忙しい教育現場の先生方にとって、安価で容易に生徒に自然界での生物を観察させることができる。特にこの方法を用いれば、別の単元である生物相の変化、生態系の成り立ち、食物網についての実例としても活用できる。1回の実習でこの事を理解させるためには、今回の結果を活用して、田おこし前の土を用意し、5等分して5個のビーカーをに分けておき、授業をする時期から逆算して2週間毎に米のとぎ汁を投入し授業日に経過時間順に

並べそれぞれを比較させることで、生物相の変化を1回の実習の中で観察させることができる。あるいは、この方法で長期間に渡って継続培養ができるので、授業よりも生物クラブなどの課外活動での利用が考えられる。

---

### **【参考文献】**

- 1 渡辺採朗著『生物の科学 遺伝』(2019), Vol.72 No.6, pp638 ~ 643,
- 2 月井雄二著『淡水微生物図鑑』(2010), 誠文堂
- 3 重中義信著『原生動物の観察と実験法』(1988), 共立出版

### **謝辞**

本稿は2020年度に日野・細谷研究室で卒業研究をおこなった丸岡歩武君の卒業論文をもとに日野が改編したものである。本研究の遂行にあたって数々の指摘や助言を頂いた細谷浩史博士に心からの謝意を表します。

また彼と同学年の丸山輝君がこの実験を継続し結果の再現性を確認したこととともに、理由はまだ解明できていないが、自然光を与えた培養では当然光合成を行う微生物も増殖したが、ここに示したような明瞭な生物相の変化は起こらず、劇的な変化がないままに消滅してしまうことが多かったことも合わせて付記する。