

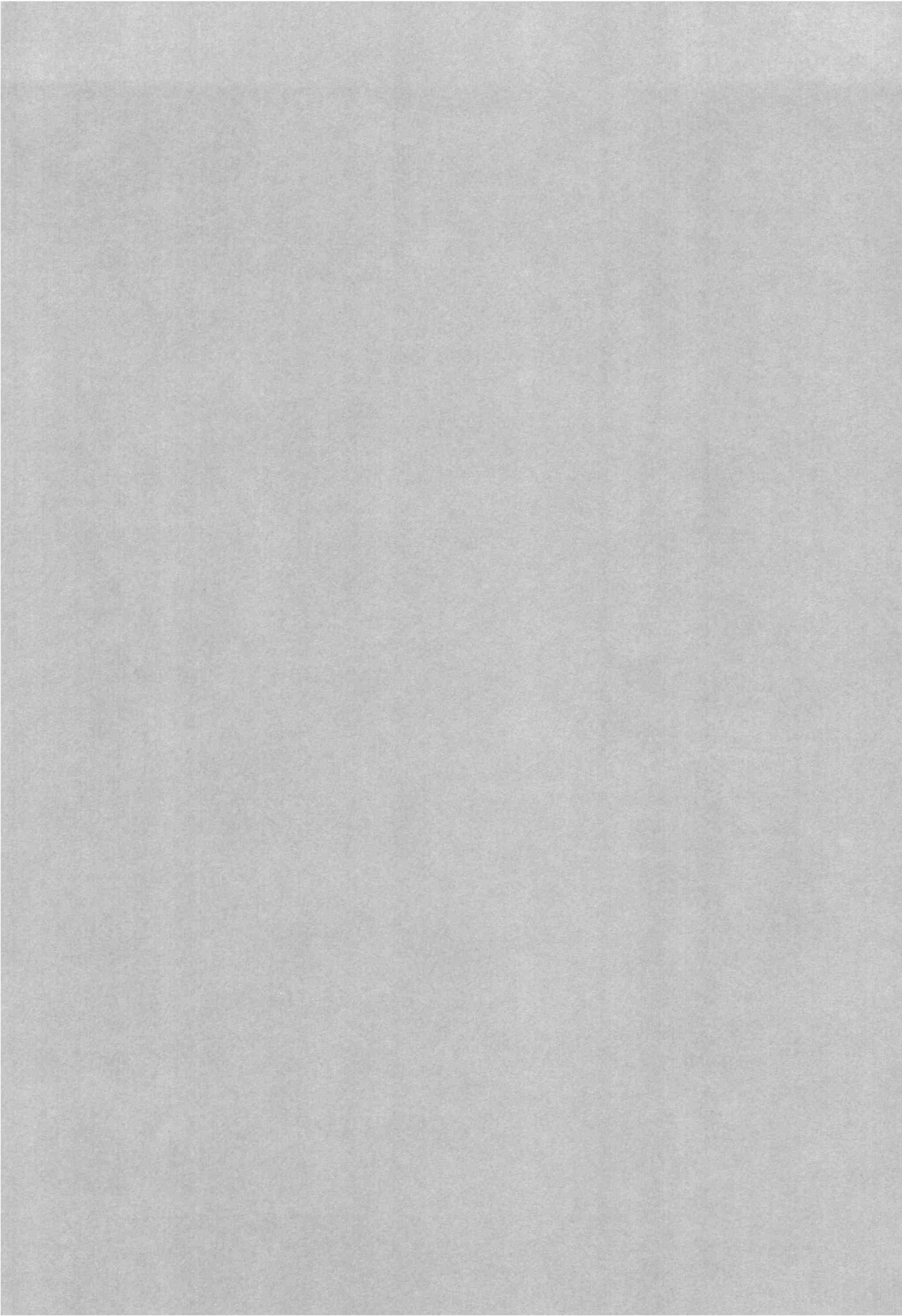
生徒の研究論文

岡山県立岡山朝日高等学校

—岡山朝日研究紀要第21号—

別冊付録

2000年3月



細胞性粘菌の分布と温度の関係

——地球温暖化によって細胞性粘菌の分布に変化が起こるか——

岡山県立岡山朝日高等学校 生物部

2年B組21番 宮脇香奈恵

要 旨

北アルプスの標高の異なる森林土壌から3種(白色1種, 紫色2種)の細胞性粘菌を単離し, 温度と生物の関係を調べた。細胞性粘菌は単細胞生物で, アメーバで増殖した後に孢子を形成して繁殖した。温度が15℃から30℃の範囲で培養したところ, 温度はアメーバの増殖と孢子の形成に影響を与えた。アメーバの増殖は温度が高いと速いが, 孢子体の形成にはそれぞれの種に最適な温度があった。このことから, 標高の低い場所には *Dictyostelium purpureum*(紫), 標高の高い場所には *Dictyostelium firmibasis*(白)と *Polysphondylium violaceum*(紫)が生育しやすいと考えた。温度は生物の分布や「すみわけ」現象に関係があることがわかった。

同所に生育する細胞性粘菌の2種を種間競争させた。それぞれの孢子塊1個をとり, 温度を変えて混合培養したときに形成される孢子体数と孢子塊の直径を調べた。22℃では2種ともに孢子体を形成し, その数はほぼ同数であった。18℃から22℃では *D. firmibasis* が多くの孢子体を形成し, 22℃から26℃では *D. purpureum* が多くの孢子体を形成した。*D. firmibasis* は, 24℃以上では孢子体を形成しなかった。また, それぞれの種の生育に最適な温度では, 孢子塊あたりの孢子数はあまり減少しなかった。温度は, 子孫の数に影響を与えていることがわかった。こうしたことから, 地球温暖化による温度上昇は, 生物の分布に変化を起こし, 微生物に限らず生態系全体にも変化が起こると思う。

動機と目的

私は自然観察やアウトドアが好きで, 生物部と山岳部に所属している。昨年の夏に山岳部の合宿で北アルプス・槍ヶ岳の山域に入ったとき, 登るにつれて植生が変化していくことに気づいた。そして, 標高が高くなり寒くなると植物だけでなく生物全体が変化するのではないかと思った。植生の変化は温度や風の強さなどの影響を直接受けていることが登山しながら分かったが, 生物は標高や温度とどのような関係をもって生活しているのか調べてみたいと思った。

採取可能なのは土だったので, その中に住む生物について調べてみようと思った。生物の教科書には細胞性粘菌が載っている。生物部の先生から細胞性粘菌は土壌中に生息することを教わり, 標高と細胞性粘菌の分布の関係, また温度と細胞性粘菌の成長の関係について調べることを目的

とした。

今、地球温暖化が問題になっているが、この研究を通して温度変化が生物にどのような影響を与えるのかを具体的に知るチャンスだと考えた。そこで、次の2つの仮説を考えて実験を始めた。

- 仮説 ① 標高によって細胞性粘菌の出現種が異なる。
② 細胞性粘菌の成長速度は温度の影響を受ける。

方 法

1. 土壌採集地（図1）

岐阜県上宝村新穂高温泉からワサビ平、鏡平、双六岳に至る登山道脇で、林床の土壌を一握りビニール袋に採取して持ちかえった。実験に使用するまで冷蔵庫で保存した。

2. 細胞性粘菌の分離（図2）

採集した土の20 gに滅菌水を約2倍容量で加えた。ガラス棒で約3分間攪拌し、ガーゼでろ過した。そのろ過液をピペットで取り、P培地（表1,2）に3滴を滴下した。これに大腸菌シロップを滅菌したピペットで3滴加えて、ガラスロッドで培地面に塗り広げた。22℃で約10日間培養した後、実体顕微鏡で培地面を観察した。土壌から発生した細胞性粘菌は、滅菌した竹串で釣り上げ、SM1培地（表4・5）上に滴下した大腸菌シロップにそれぞれ植え継いだ。カビなどの雑菌が無くなるまで、移植を繰り返し、細胞性粘菌を単離した。

3. 細胞性粘菌の培養

実体顕微鏡で見ながら、孢子塊1個を滅菌した竹串に取り、試験管中の1 mlの滅菌水に懸濁した。これを孢子懸濁液として実験に使ったり、継代培養に用いた。孢子懸濁液の1滴をSM1培地上に滴下した大腸菌シロップのスポット（約1 cm径）に植え継ぎ、22℃で培養した。温度の影響を調べる場合には、2台の定温器の温度を15℃、18℃、24℃、26℃、30℃に調節して行った。

2種間の競争実験をする場合には、大腸菌シロップのスポットを直径約5 mmにし、そこに単



図2 細胞性粘菌の分離

独培養では孢子懸濁液をパスツールピペットで2滴、混合培養では2種の孢子懸濁液をそれぞれ1滴ずつ滴下して培養した。

4. アメーバ増殖速度の測定

S M 1 培地に帯状に塗った大腸菌シロップの一端に、孢子懸濁液を1滴滴下して培養した。アメーバが増殖して大腸菌を捕食すると、大腸菌層が透けてくるので、その境界線を一定時間後に記録した。

5. 孢子体の観察

大腸菌シロップのスポット（5 mm径）中に発生してくる孢子体を実体顕微鏡で観察し、孢子体の形成過程を、集合体・移動体・未熟孢子体・成熟孢子体の4段階に区別してその数を記録した。また、成熟した孢子塊の直径をマイクロメーターで測定した。孢子塊当たりの孢子数は、孢子塊1個を竹串で取り、1 mlの滅菌水に懸濁した後、血球計算盤を使って顕微鏡で単位体積あたりの孢子数を測定し、計算によって求めた。

6. 細菌の培養

土壌中の細菌と大腸菌の培養には肉汁寒天培地（表3）を使用した。土壌懸濁液を 10^{-8} に希釈し、その1滴を培地に塗り広げて、35℃で2日間培養した。そして、生じた細菌のコロニーの数とコロニーの形態を記録し、細菌を識別した。

大腸菌は、白金耳で培地面に少量の菌体をストリークして塗り広げ、継代培養した。大腸菌シロップは、培地面に増殖した大腸菌を5 mlの滅菌水で洗い、懸濁・浮遊させてつくった。この大腸菌シロップを細胞性粘菌のアメーバの餌とした。

表1. P 培地 (無栄養寒天培地)

粉末寒天	6 g
燐酸緩衝液	3ml
精製水	300ml

300mlフラスコで滅菌後、滅菌シャーレ12枚に分注する。
燐酸緩衝液は滅菌しておき、分注前に加える。

表2. 燐酸緩衝液（保存液100ml）

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.96g
Na_2HPO_4 （無水）	6.96 g

50mlずつ滅菌後、室温で保存する。
pH=6.4 (1mol/l, 100ml)

表3. 大腸菌の培地 (N B 寒天培地)

Nutrient Broth (Difco)	2.4 g
粉末寒天	6 g
精製水	300ml

300mlフラスコで滅菌後、滅菌シャーレ12枚に分注する。

表4. S M 1 培地

A N 保存液	10ml
燐酸緩衝液	3ml
粉末寒天	6 g
精製水	300ml

滅菌した寒天液に、A N 保存液と燐酸緩衝液を混ぜる。
滅菌シャーレ12枚に分注する。

表5. A N 保存液(300ml用)

Difco Bacto-tryptone	6 g
Difco Yeast Extract	1.8 g
グルコース	5.4 g
精製水	300ml

100mlずつ保存瓶に入れ、滅菌後冷蔵保存する。

結果と考察

1. 細胞性粘菌の分布

標高別に採取した土壌の培養によって、表6に示す結果が得られた。標高の高い高山帯のお花畑やハイマツ帯の土壌からは細胞性粘菌が出現しなかった。その下部の亜高山帯のダケカンバ林と針葉樹のオオシラビソ林の土壌、さらに山地帯の夏緑樹林の土壌からは細胞性粘菌が出現した。単離した細胞性粘菌を孢子体の色によって識別すると、白と紫の2群に分けられ、孢子体の形態を観察すると白色群が1種類、紫群が2種類のあわせて3種類に識別できた。

単離した細胞性粘菌の種名を同定するために、孢子体の形態や孢子とその大きさを顕微鏡で観察した。そして、国立科学博物館の萩原博光先生に確認したところ、白色の種は *Dictyostelium firmibasis* Hagiwara で、紫色群は *Dictyostelium purpureum* Olive と *Polysphondylium violaceum* Brefeld の2種類であると分かった(図3)。

図4は、大腸菌を餌にして増殖する細胞性粘菌である。細菌を捕食して粘菌アメーバが増殖するとアメーバは集合中心に向かって集まり始め、ナメクジのような移動体となり、柄と孢子塊からなる孢子体を形成する。

表6 北アルプスの標高と出現した細胞性粘菌および土壌pH・土壌細菌の分布

調査地	標高 m	粘菌の種類		土壌pH	土壌細菌コロニー	
		白色	紫色		数/cm ³	種類数
お花畑	2630	0	0	5.3	8.3	3
ハイマツ帯	2500	0	0	5.0	4.2	1
ダケカンバ林	2300	1	1	4.7	—	—
オオシラビソ林	2000	1	2	4.7	18.2	3
コメツガ林	1800	0	0	—	—	—
ブナ・サワグルミ林	1400	1	0	5.0	22700	5

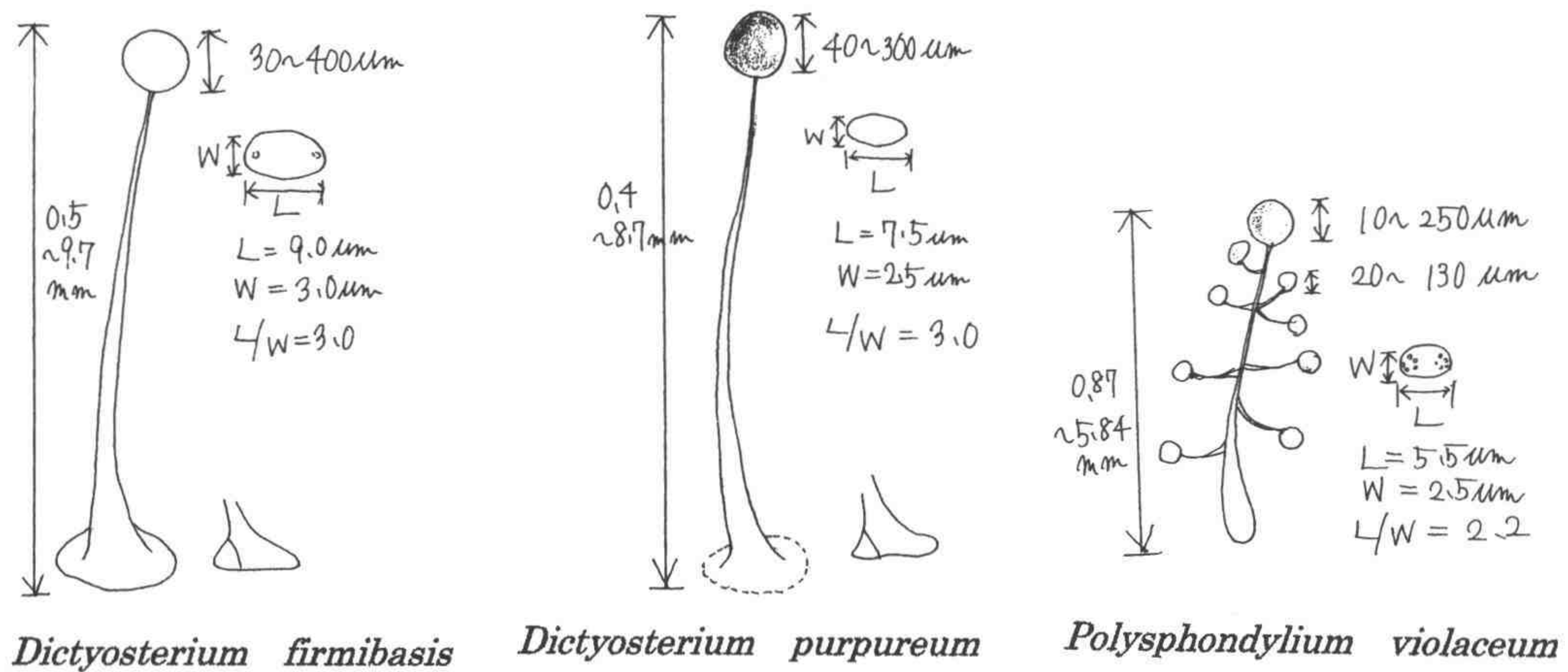


図3 分離した細胞性粘菌

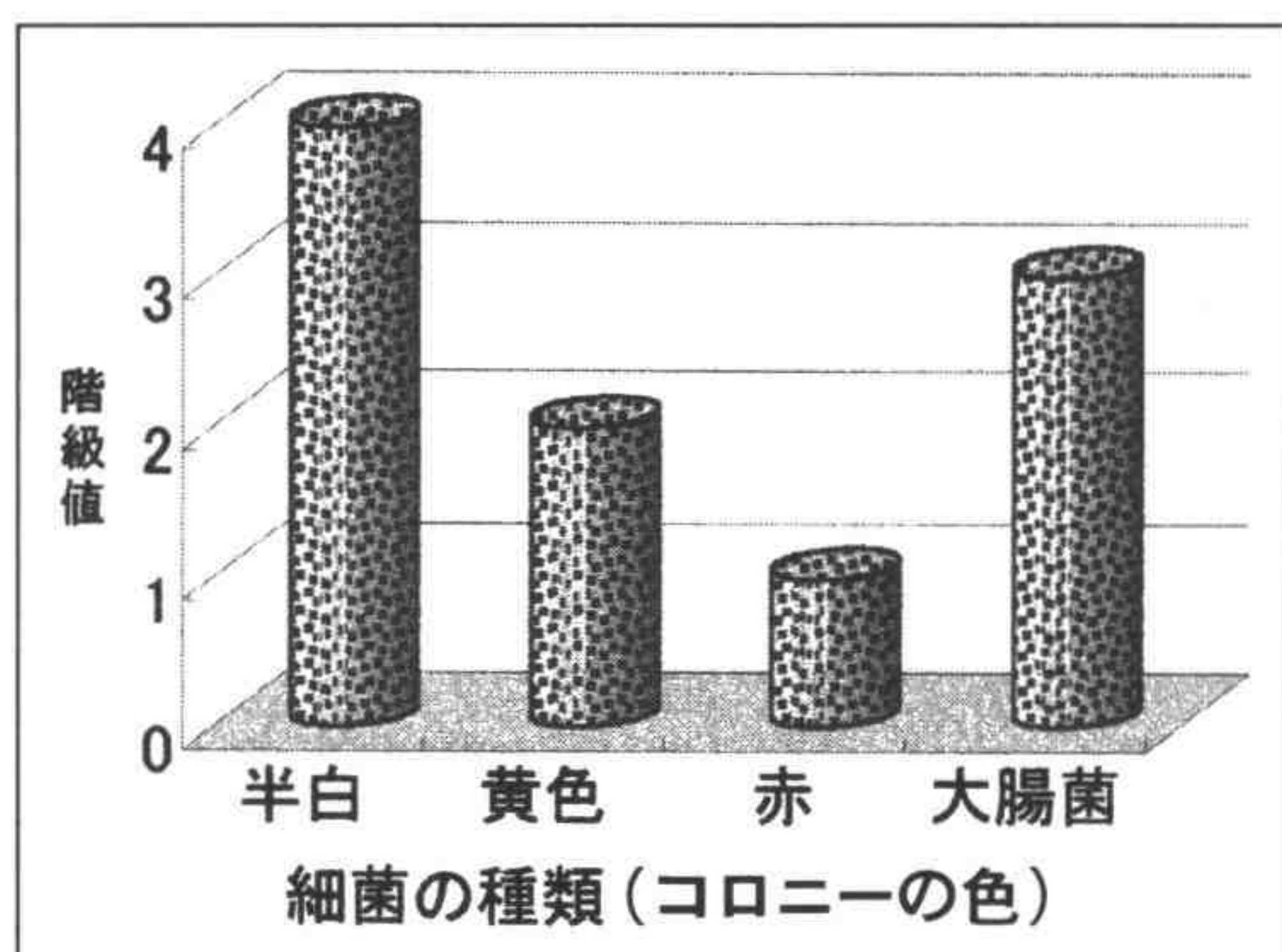


図5 土壌細菌の増殖

表7 餌にした細菌の種類と細胞性粘菌の増殖の関係

細胞性粘菌	餌にした細菌		
	半白	黄色	大腸菌
白色群			
<i>D. firmibasis</i>	r	+++	m
紫色群			
<i>P. violaceum</i>	r	+++	++
<i>D. purpureum</i>	+	+++	++

培養(24℃)開始1日後の結果。

m:移動体から立ち上がっている状態

r:胞子体1個程度形成されている

++:胞子体を形成するが未熟なものを含む

+++:成熟した胞子体が形成されている

細胞性粘菌は、土壌中の細菌を捕食して増殖するので、土壌の pH と土壌細菌について調べてみることにした。標高の高い高山帯やハイマツ帯では、土壌 pH が高く、細菌数は少なくなっていた。しかし、標高が下がったダケカンバ林・オオシラビソ林・ブナ林などの森林域では土壌 pH が低くなり、土壌細菌数は多くなった。細胞性粘菌が生育するところは、土壌細菌が多く土壌 pH は4.7~5.0であることが分かった。細胞性粘菌の分布は標高ではなく植生と関係すると考えられた。

肉汁培地で増殖する土壌細菌には、半白・黄色・赤のコロニーの形態をもつ細菌があった。増殖が速いのは、半白,黄色,赤の順であった(図5)。そこで、土壌中に多い半白と黄色の細菌、お

◀縦軸の階級値：4=75%以上，3=50%以上，2=25%以上，1=25%以下を表わす。

35℃で2日後に増殖したコロニー面積を培地面全体に対する階級値で示した。

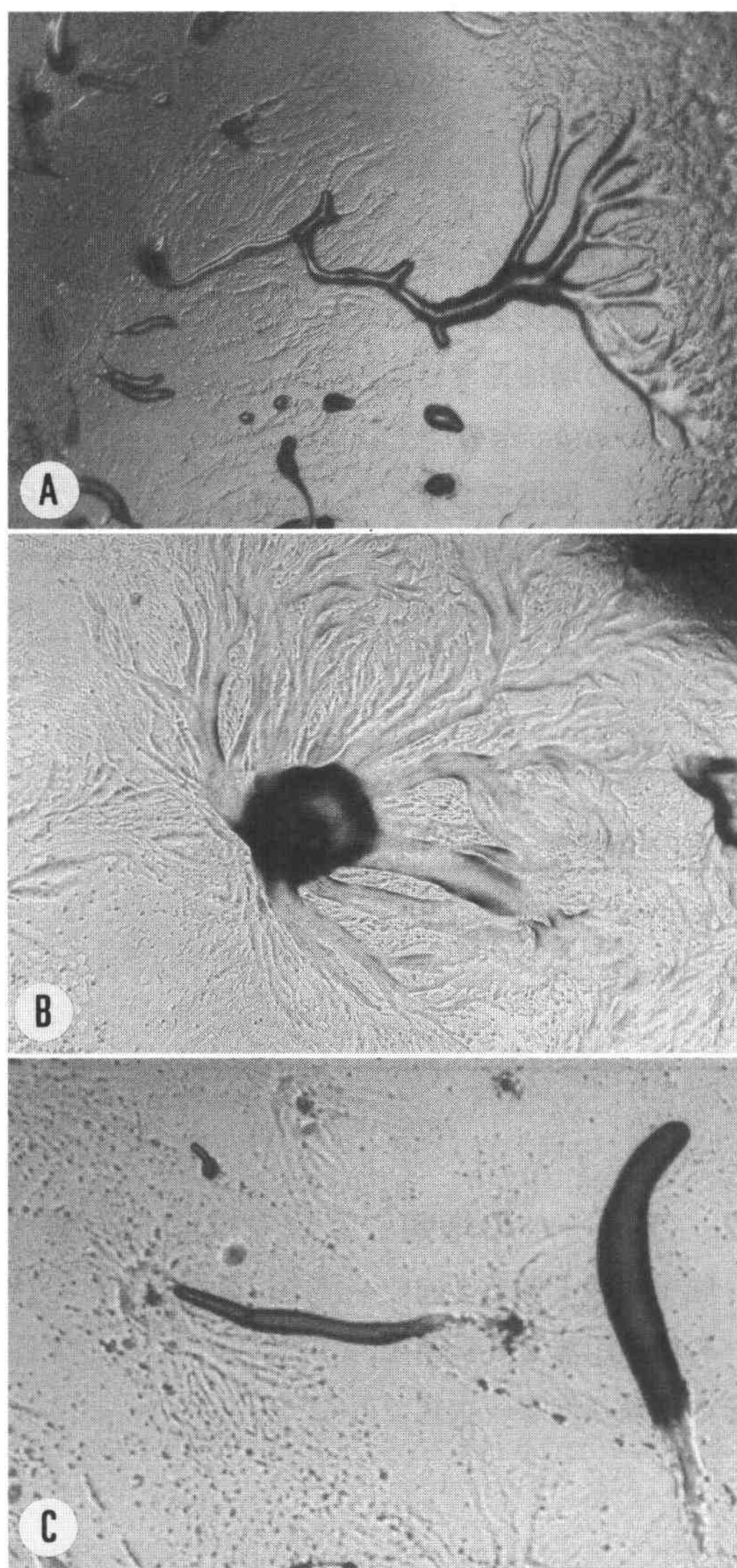


図4 粘菌アメーバの増殖と移動体

A：右周辺部のアメーバが左方向に集合

B：集合体，C：移動体

よび大腸菌を餌として細胞性粘菌の増殖速度を比較した(表7)。半白細菌では、孢子体の形成が少なかったが、黄色細菌の場合には大腸菌以上に増殖が速く、多くの孢子体を形成した。このように、アメーバが捕食する細菌によって増殖速度に違いが見られた。細胞性粘菌の生育は、土壤細菌の種類と量や土壤 pH に影響を受けることが分かった。これは、土壤を形成する植生の違いが細胞性粘菌の分布に関係することを示している。

D. firmibasis は、標高1400mから2300mに出現し、*P. violaceum* は標高2000mから2300mに出現した。しかし、*D. purpureum* は標高2000mだけで出現した。標高が300m上がると、気温は約1.8℃下がる。そこで、分布の違いは植生の違いだけではなく、温度も影響するのではないかと考えられる。

表8は、単離した3種の細胞性粘菌の孢子塊当たりの孢子数と、その孢子集団から増殖するアメーバの増殖速度を比較した。*D. purpureum* は孢子塊当たりの孢子数は約2000万個で最も多いが、アメーバの増殖速度は相対的に遅く、温度が低い(15℃)では増殖が強く抑制された。*P. violaceum* と *D. firmibasis* の孢子数は500万個から700万個であるが、*D. purpureum* よりもアメーバの増殖は速く、低温でもよく増殖した。このことから、孢子塊当たりの孢子数の違いが、アメーバの増殖速度に直接関係しているとは考えられなかった。そこで、アメーバの増殖は、温度の影響を受けていることが分かった。

表8 孢子のう当たりの孢子数とアメーバの増殖

粘菌の種類	孢子のう当たり 孢子数×10 ⁶	アメーバの増殖mm	
		24℃	15℃
<i>D. purpureum</i>	20.7	2.5	0
<i>D. firmibasis</i>	6.9	12.5	6
<i>P. vioaceum</i>	5.0	11	7

表9 培養温度とアメーバの増殖速度の関係

粘菌の種類	傾 き		傾きの変化
	15℃	24℃	
<i>D. purpureum</i>	2.0	6.6	3.2
<i>D. firmibasis</i>	4.2	7.6	1.8
<i>P. vioaceum</i>	4.6	7.4	1.6

2. アメーバの増殖に及ぼす温度の影響

孢子塊の1個を1mlの滅菌水に懸濁し、その1滴中に含まれる孢子から発芽・増殖するアメーバの増殖距離を8日間記録した。図6には、3日目から8日目までのアメーバの増殖距離を示し、その増殖速度を一次式で近似した。

図6 Aは15℃で培養したときの3種の増殖速度を示し、図6 Bは24℃の場合を示す。*D. firmibasis* と *P. violaceum* の増殖速度は、15℃と24℃のどちらも *D. purpureum* より速くなった。*D. firmibasis* と *P. violaceum* の2種は、低温でもよく増殖し、温度上昇による変化が少なかった。*D. purpureum* は、低温では増殖が強く抑制されたが、温度上昇に最も敏感に反応した。表9に温度上昇による増殖速度の近似線の傾きの変化を示す。*D. firmibasis* と *P. violaceum* では変化が少なく、*D. purpureum* では顕著であった。*D. purpureum* は15℃に比べ24℃では3.2倍に増加した。このように、アメーバの増殖には温度が関係し、その影響は種によって異なった。そこで、細胞性粘菌の分布には、温度が重要な要因になると考えられる。

図7では、3種のアメーバの増殖を15℃から30℃の間で温度を変えて培養し、4日後の増殖距離を比較した。*D. purpureum* は、低温では増殖が抑制されたが温度が上昇するにつれて増殖が速くなり、30℃では *D. firmibasis* や *P. violaceum* よりも速くなった。*D. firmibasis* と *P. violaceum* は24℃を超えると、増殖速度が低下し、*P. violaceum* は30℃ではほとんど増殖しなくなった。このように、低温で増殖が抑制される種と、高温で増殖が抑制される種があることが分かった。

3. 胞子体形成に及ぼす温度の影響

アメーバの増殖の後、胞子体の形成される過程は、集合体・移動体・未熟体・成熟体の順に進み、この4段階は実体顕微鏡の観察で識別できる。図8は、培養温度が胞子体の形成に影響する様子を、培養開始後3日目の状態で比較した。

以前から生物室で培養していた *D. discoideum* は、22℃で胞子体を形成し、低温や高温では形成が抑制された。*D. purpureum* は、15℃では成長が抑制され、温度が上昇すると成熟した胞子体の数が多くなり、30℃で最大になった。*D. firmibasis* は、15℃で未熟な胞子体を多く形成したが、

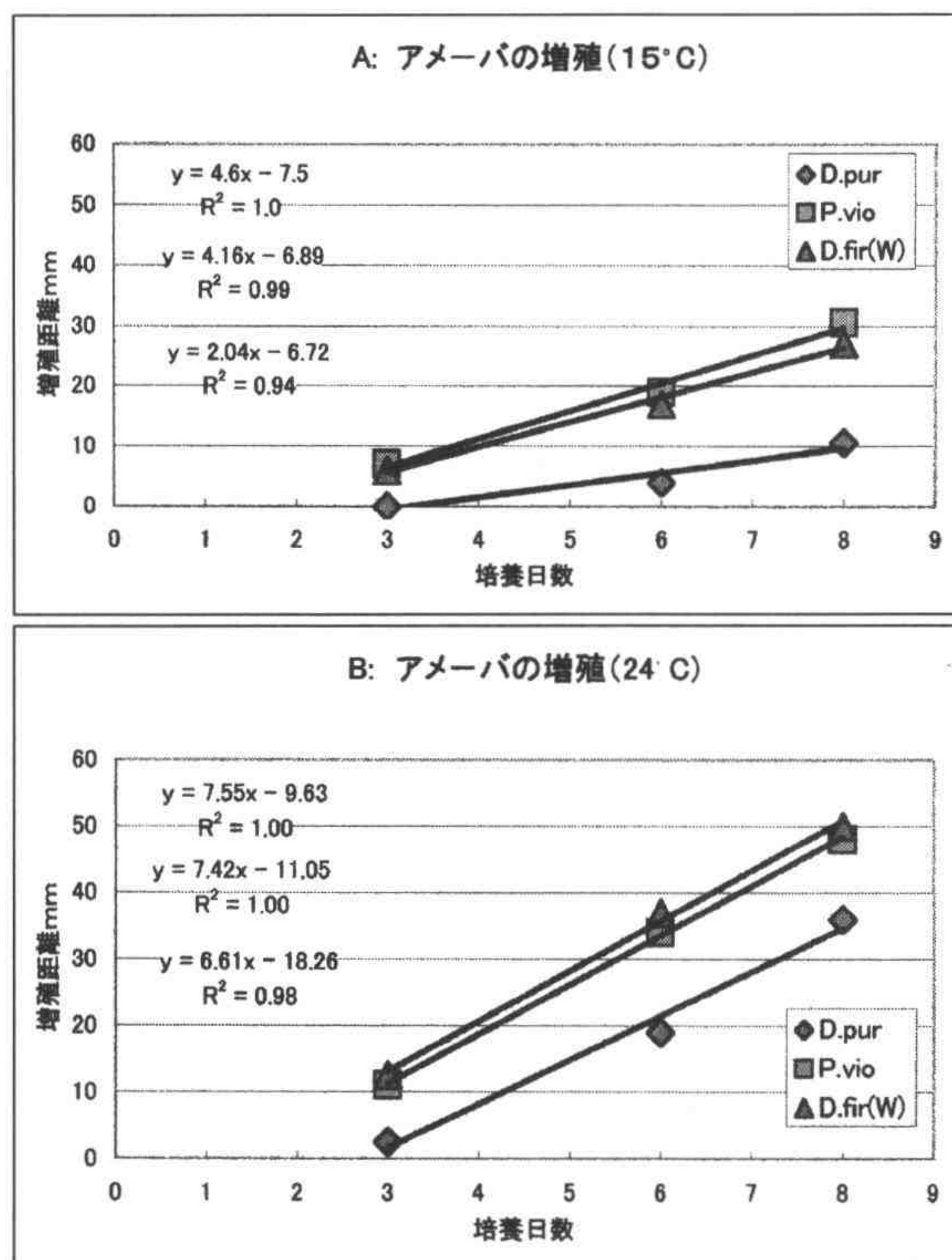


図6 アメーバの増殖速度の比較

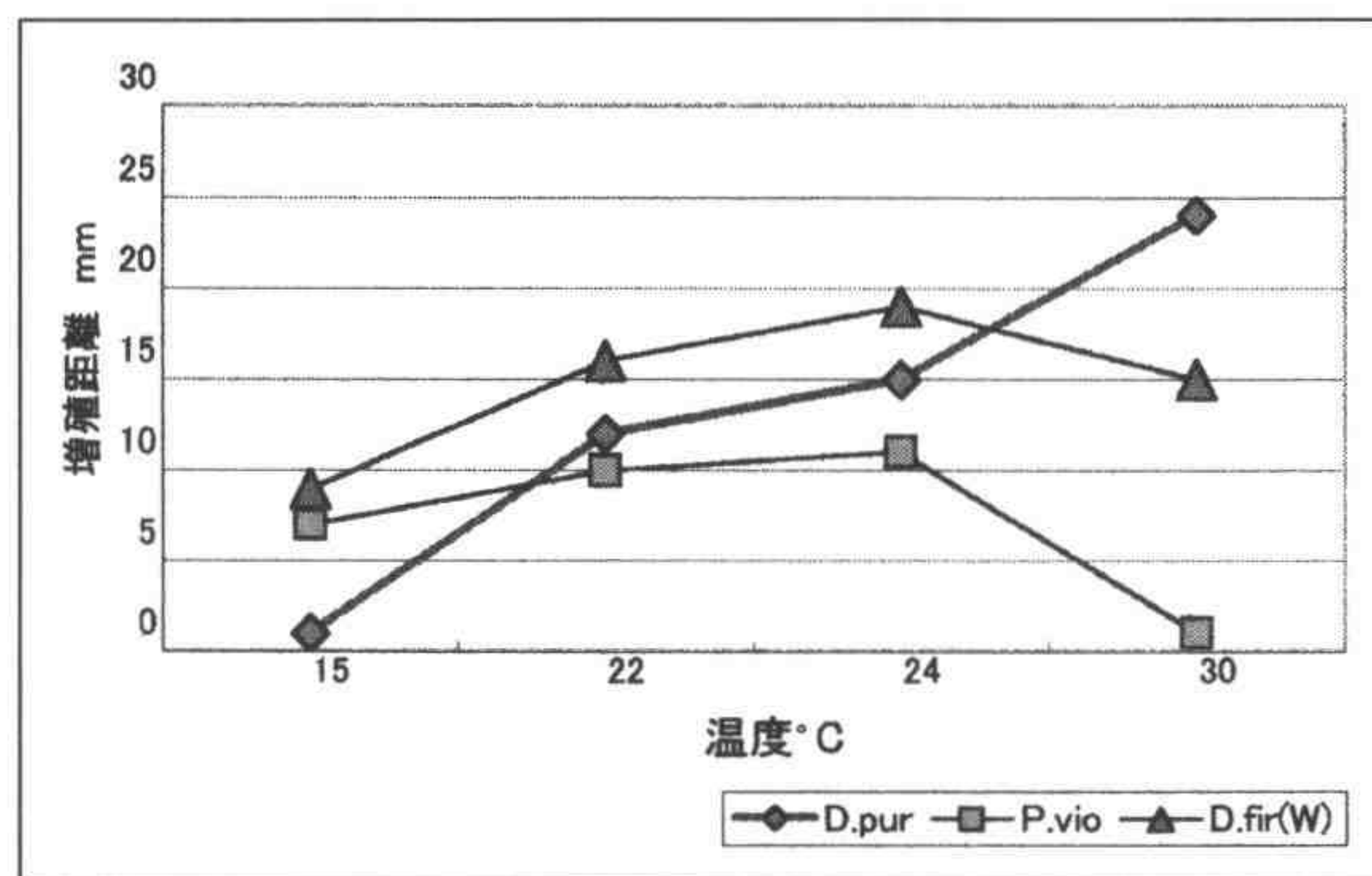


図7 アメーバの増殖と温度の関係

30℃では孢子体が形成されなかった。*P. violaceum* も低温では未熟体を形成したが、30℃では孢子体は形成されなかった。22℃ではすべての種で孢子体の形成があったが、15℃では成長が抑制され、孢子体形成が遅くなる傾向があった。また、温度がより高くなるとアメーバは増殖しても孢子体が形成されない種があった。

生育に最適な温度域は、*D. purpureum* では22℃よりも高く、*D. firmibasis* と *P. violaceum* ではそれよりも低いことが分かった。高温になると、アメーバは増殖しても孢子体は形成しない現象が起こることから、温度は孢子形成に重要な要因であると考えられる。生育に最適な温度域は、種によって異なり、*D. purpureum* は温暖な地域に、*D. firmibasis* と *P. violaceum* は冷涼な地域に生育域を広げると考えられる。

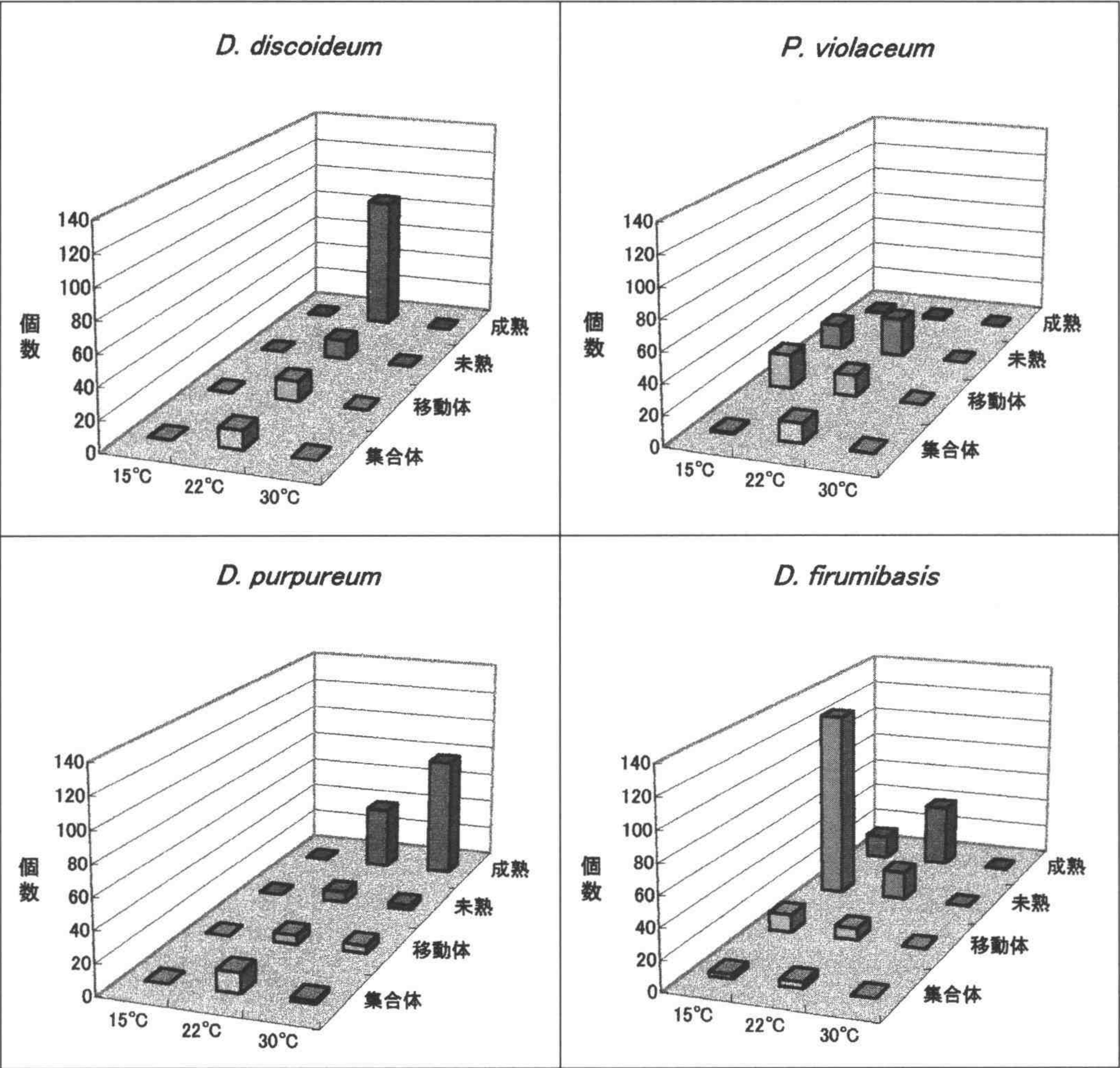


図8 孢子体形成に及ぼす温度の影響

4. 混合培養による2種間の競争

D. purpureum と *D. firmibasis* は、胞子体がともに大形で、大きさがほぼ同じであるが、胞子塊の紫と白の色で明確に識別できる。この2種間の競争に温度がどのように影響するのかを調べた。この2種は、22℃では成長はほぼ同じで、ともに胞子体形成がよい。こうしたことから、この2種を混合培養したとき、成長競争が胞子塊の大きさや胞子体数にどのように現われるかを調べた。

図9は、15℃から26℃の範囲で混合培養したとき、胞子塊の直径の平均値に見られる影響を示した。混合培養によって、胞子塊のサイズは単独培養のときよりも小さくなった。その縮小率は、0.4~0.9の範囲であった。それぞれの種の生育に最適な温度では、縮小率は0.8~0.9で、胞子塊はあまり小形にならなかった。26℃では、*D. purpureum* が優占し、そのとき *D. firmibasis* は胞子体を形成しなかった。しかし、18℃では *D. purpureum* は0.6に小形化した。このように、競争の結果は温度によって異なった。その種の生育に最適な温度では、その種が優占するが、それ以外の温度域では成長が抑制され、小さな胞子塊を形成した。

図10は、混合培養したときの形成される胞子体数と温度の関係を示した。22℃では2種ともに胞子体を形成し、その数はほぼ同数であった。*D. purpureum* は、22℃から26℃で多くの胞子体を形成した。また、*D. firmibasis* は18℃から22℃で多くの胞子体を形成したが、24℃以上では胞子体を形成しなかった。このように、胞子体数においても胞子塊サイズと同様に、温度による違いがあった。また、温度が上昇すると胞子体を形成しない種があることがわかった。

胞子体は胞子塊とそれを支える柄の部分からなり、胞子塊には集合したアメーバ細胞から分化した胞子が形成されている。胞子の大きさは一定であるため、胞子塊の大きさが小さくなるとそこに含まれる胞子数は少なくなる。競争により増殖するアメーバ数が減少すると、形成される胞子数も減少する。実験に用いた2種の細胞性粘菌は、それぞれの最適温度において、最も多数の子孫を残すことができた。温度は、競争の勝敗に大きな影響を与え、次世代の子孫の数に影響す

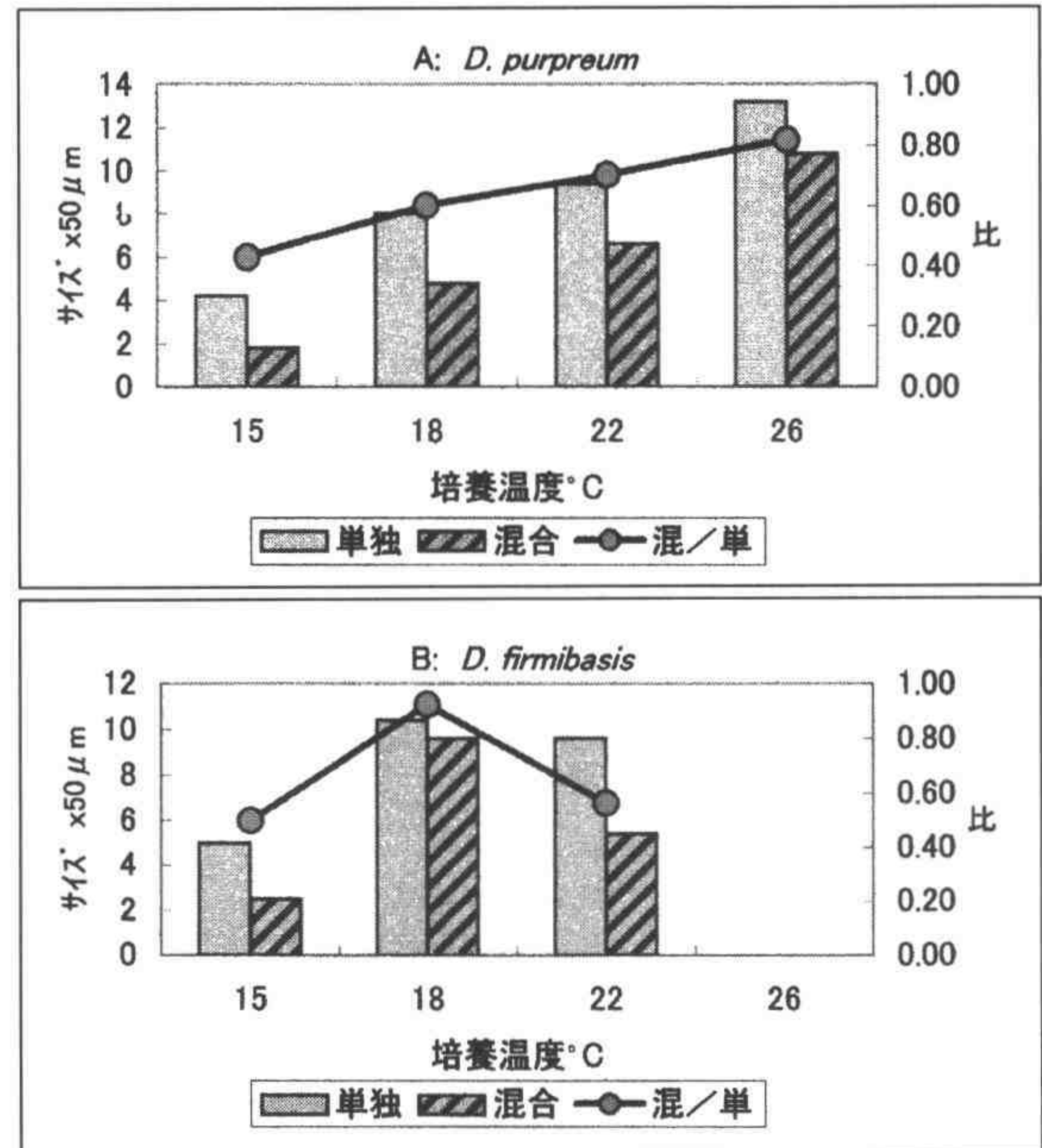


図9 混合培養による胞子のうの小形化

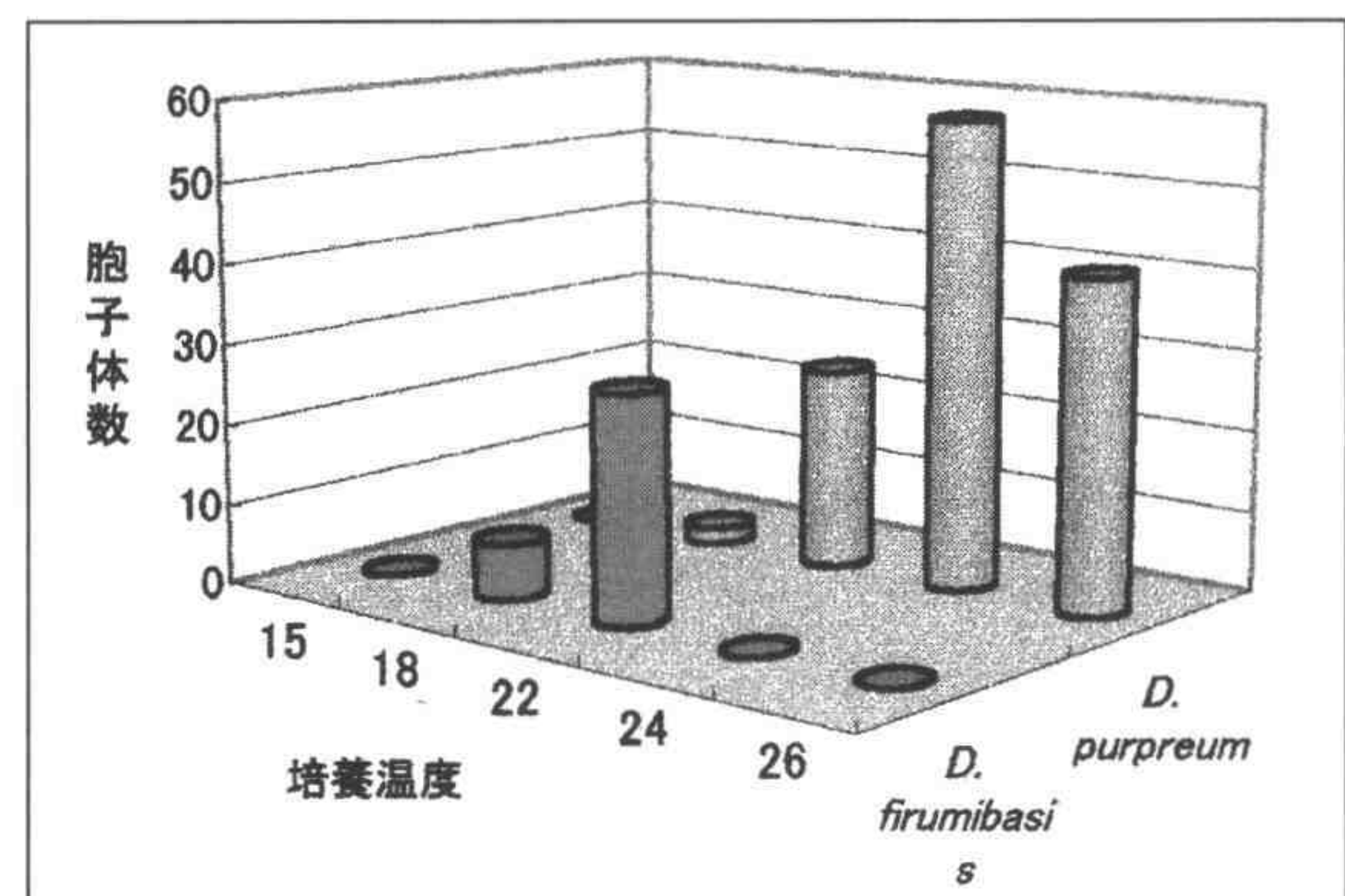


図10 混合培養における胞子体数の比較

ることがわかった。

これは、細胞性粘菌の分布が温度による「すみわけ」の結果であることを示している。気候が温暖化すると、明らかに細胞性粘菌の分布に変化が起こり、その地域に生育できない種が生じると考えられる。

感 想

細胞性粘菌って何？カビの仲間？そう思った。私が普段踏みつけて歩いている土の中にこんなきれいな色の生物がいるなんて驚きだった。だからこの実験は面白かった。実験結果から何が言えるのかということを考えると、細胞性粘菌のアメーバは分解者である細菌を捕食して繁殖している。だからアメーバの量は生態系内の物質の循環速度に関わっている。細胞性粘菌の種類や量を調べると動植物に起こる変化に先立って生物相の変化を予想できると思う。

生物が温度によって「すみわけ」をしている事例は教科書にもある。例えばイワナとヤマメは水温13～15℃を境に低温にはイワナ、高温にはヤマメが住む。ところが水温が上がってしまうとイワナは生息地を狭められ、ついには絶滅してしまう恐れがある。魚類の場合、温度変化がどのように生活に影響するのか具体的には知らない。しかし、細胞性粘菌においては、温度変化の影響を実験によって、具体的に理解することができた。

細胞性粘菌の *D. purpureum* と *D. firmibasis* は22℃の環境下では共存したが、温度が4℃上昇して26℃になると、*D. firmibasis* は子孫を残さなくなった。この実験により、わずかな温度変化が生物に強く影響することが分かり、今まで漠然と地球温暖化は恐ろしいと頭のなかで思っていたことが実感的なものに変わり、危機感を持つことができた。

以前は細胞性粘菌なんて身近にいるのだろうかと思っていたが、文献を読んで身近な土壌中にもいることが分かり、身近な生物で実験していたことが分かった。そうすると温暖化によって私のすぐ近くに存在する生態系も壊されるかもしれない。TVや新聞で「知って」いただけだった温暖化現象は人類をも脅かす恐ろしいものだとして改めて実感した。

「地球温暖化」という言葉は私にはどうしても気になる。私はこの研究を通して「地球環境を生物の立場で考えたい」という思いを持った。そのため、将来環境に関する仕事につきたいと思っている。私に研究の機会と将来の夢を与えてくれた指導の先生に感謝します。また、同定の指導を快くしてくださった国立科学博物館の萩原博光先生にお礼申し上げます。

参考文献

高橋和成 1991. 細胞性粘菌の生態調査とその教材利用に関する研究. 生物の教材開発Ⅱ p 29-

45. 岡山県教育センター.

Hiromitu Hagiwara 1989. The Taxonomic Study of Japanese Dictyostelid Cellular Slime Molds. National Science Museum. Tokyo.

J. M. アシュウオース, J. ディー著 山田卓三訳 1980. 粘菌の生物学. p 43-64. 朝倉書店.