

〈第 68 回鈴木賞 正賞〉

ゲスイクマムシの飼育環境の調査

～新たな飼育系の確立を目指して～

学校法人星美学園静岡サレジオ高等学校

1 年 桐生有花

1 動機・目的

水不足や水質汚染などの水問題は世界中で深刻となっている。様々な国や地域で気軽にきれいな水を得るためにできることを考え、中学生の頃に生活排水処理用の循環型ろ過装置を試作した。そのろ過能力向上のために、下水処理場でも役立っている活性汚泥中の微小生物を利用したいと思った。しかし、汚泥が一時的に乾燥し、乾燥耐性を備えていない微小生物が死滅してしまう状況が想定された。この課題の解決のために、このような微小生物に耐性を獲得させることを考え、乾燥耐性を持つ水棲微小生物であるクマムシに関心を抱くようになった。

コケなどの乾燥が起り得る環境に棲むクマムシ種は、乾燥環境下で自ら脱水した状態になり環境に耐える、乾燥耐性を備えている。一方、活性汚泥に棲むゲスイクマムシ (*Isohypsibius myrops*) のように、生涯を水中で過ごす種は耐性を備えていない。この乾燥耐性メカニズムが解明できれば、これを獲得させることに応用できるのではないかと期待し、ゲスイクマムシに着目した研究を継続している。

乾燥耐性が強いモデル生物のヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) の食餌を投与することによる乾燥耐性の変化を調べているが、これを食餌としたゲスイクマムシの飼育系が確立していないため、飼育の困難さが実験を停滞させることがある。そこで本研究では、ゲスイクマムシの新たな飼育系の確立を目的として、工夫した方法での飼育を行なった。さらに、乾燥と温度への耐性を調べることで、飼育環境の条件について考察した。

2 方法

ゲスイクマムシとヨコヅナクマムシの2種を、ヨコヅナクマムシの食餌として提案されている生クロレラ V12 (クロレラ工業株式会社) を与えて飼育し、個体数の変化を調べた。昨年の飼育では、生クロレラ V12 を投与した個体が著しく増加したものの、一時的であった。その原因は溶存酸素の不足だと考え、今回はその点に配慮した。飼育した個体群の乾燥と温度への耐性を調べた。なお以下、生クロレラ V12 給餌群を (+)、非給餌群を (-) と表記する。

(1) 飼育による個体数変動

100 倍希釈した生クロレラ V12 を食餌として、2 種のクマムシを 20°C のインキュベーター内で飼育し、飼育開始日から 10 日間個体数を数えた。溶存酸素を確保するため、毎日マイクロピペットで水中に空気を送り、油膜ができたなら水面を吸うことで酸素を入れ替えるようにした。分注のしやすさの違いにより、飼育開始時の個体数が大幅に異なってしまったため、個体数変動を正しく比較するため、増減率を算出した。なお増減率は、「その日の個体数」から「飼育開始時の個体数」を減じて、その差をさらに「飼育開始時の個体数」で割った値を百分率にして算出した。ゲスイクマムシは、溶存酸素の確保の工夫をしなかった場合と比較するために、考察の際、昨年度同様に算出した (+) と (-) のデータを用いた。ただし前者は、個体数を数えた期間は 7 日間である。

(2) 耐性の比較

ア) 乾燥耐性

2種のクマムシの (+) の個体を、シャーレ上、ろ紙上、寒天培地上、ナイロンネットフィルター（以下、フィルター）上の4つの場合でそれぞれ乾燥させ、乾燥後の様子を観察した。また、吸水による蘇生の有無を調べた。

イ) 温度耐性

2種のクマムシの (+) の個体を、 -18°C で24h、 4°C で24h、 40°C で2h、 56°C で2hの4つの環境にそれぞれ暴露し、その後の活動の様子を表1の通り4段階で評価した。なお環境は、冷凍庫、冷蔵庫、ヒートブロックを用いて用意した。

表1. 温度耐性の評価基準

| | |
|---|-----------------------------|
| × | ほぼすべての個体が活動しなくなった。 |
| △ | 活動しない個体と活動している個体が約半分ずつみられる。 |
| ○ | ほぼすべての個体が活動している。 |
| ◎ | ほぼすべての個体が活発に活動している。 |

3 結果

(1) 飼育による個体数変動

2種の (+) において、腸が緑色になったことから、生クロレラ V12 を食べた様子が確認できた (図1, 2)。



図1. ゲスイ (+)



図2. ヨコヅナ (+)

また、増減率の比較は図3, 4, 5の通りである。ただし、昨年度のデータを用いたものは「*」で示した。

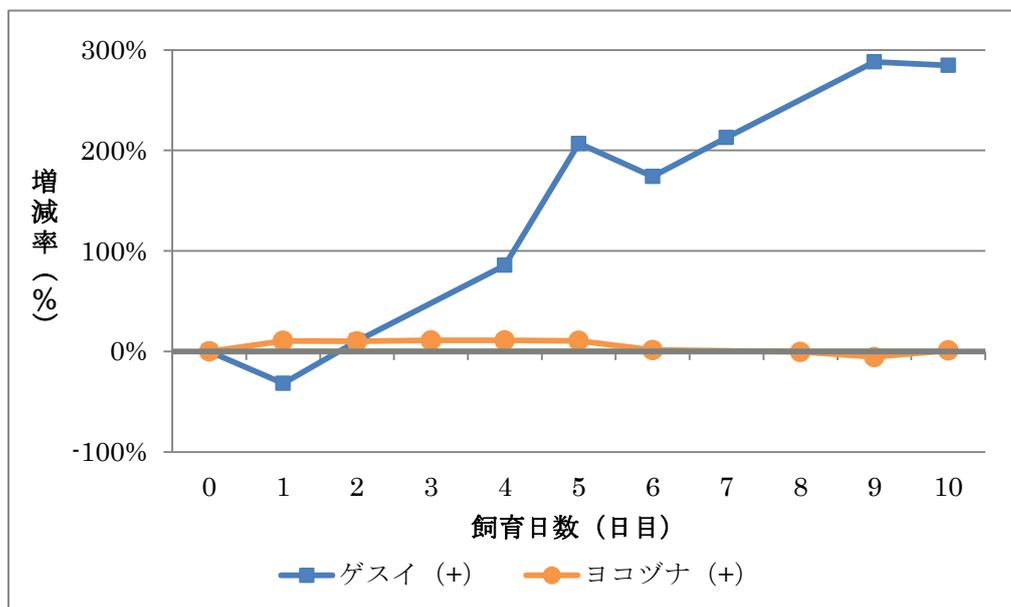


図3. ゲスイクマムシ (+) とヨコヅナクマムシ (+) の増減率の比較

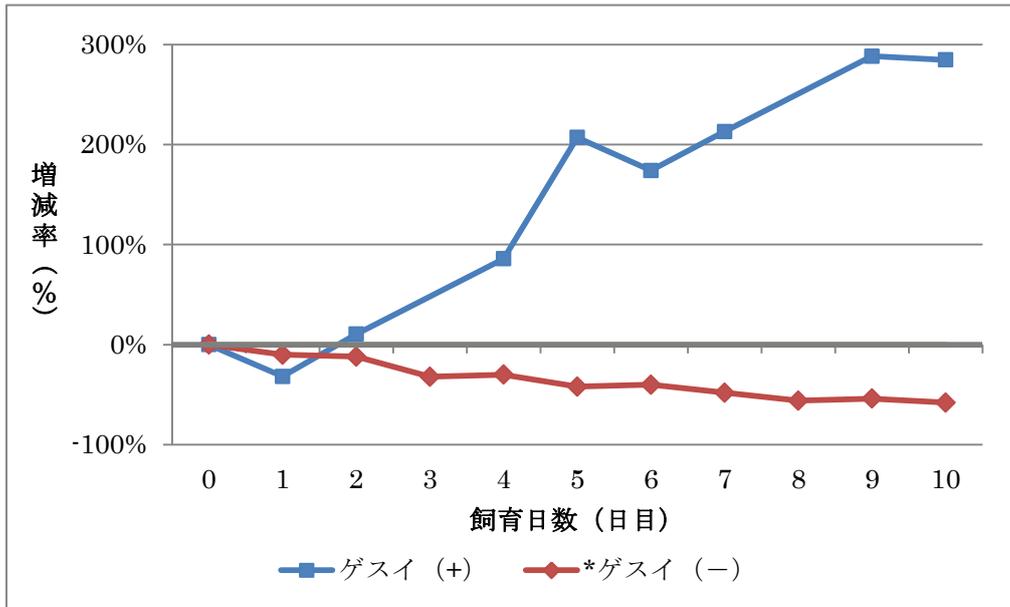


図4. ゲスイクマムシ (+) と*ゲスイクマムシ (-) の増減率の比較

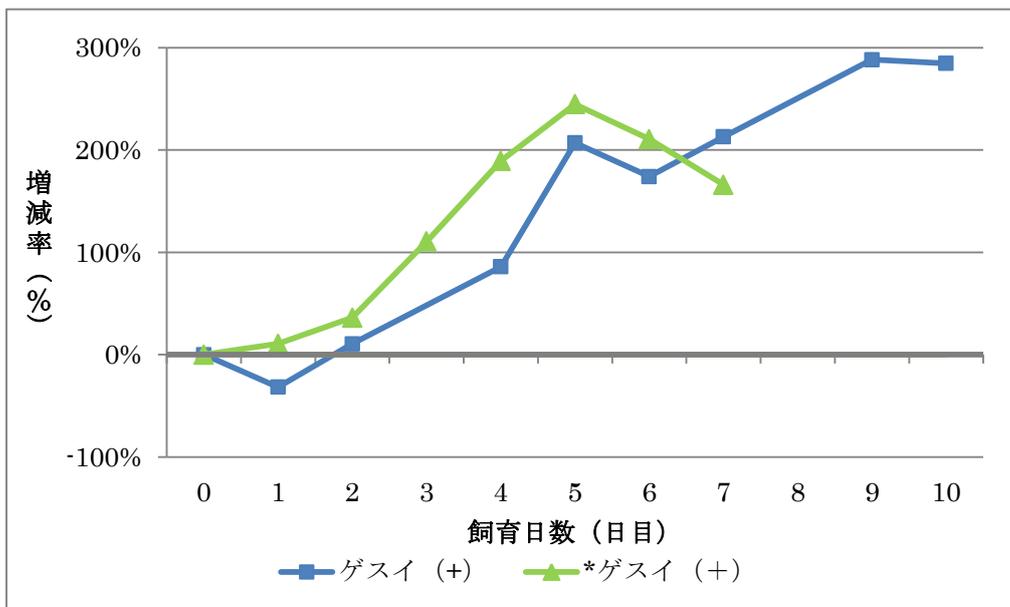


図5. ゲスイクマムシ (+) と*ゲスイクマムシ (+) の増減率の比較

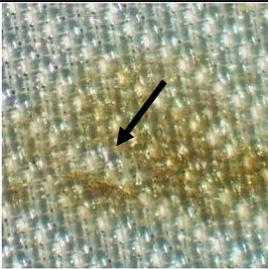
(2) 耐性の比較

ア) 乾燥耐性

2種の乾燥後及び吸水後の様子を表2に示した。

表2. 各個体群の各乾燥環境における様子

| | | ゲスイクマムシ (+) | ヨコヅナクマムシ (+) |
|------|-----|---|---|
| シャーレ | 乾燥後 |  識別できなかった。 |  無代謝状態である乾眠に移行した。 |
| | 吸水後 |  活動は見られなかった。 |  活動を再開した。 |
| | 蘇生 | 無 | 有 |
| ろ紙 | 乾燥後 |  目だけが残る (矢印部)、他は溶けたように見える。 |  無代謝状態である乾眠に移行した。 |
| | 吸水後 | 識別ができず、クマムシの位置がわからなくなった。 |  活動を再開した。 |

| | | ゲスイクマムシ (+) | ヨコヅナクマムシ (+) |
|-------|-----|--|---|
| 蘇生 | | 無 | 有 |
| 寒天培地 | 乾燥後 |  2日後も活動していた。体表が溶けつつあるように見える。 |  2日後も活動していた。 |
| | 吸水後 | — | — |
| | 蘇生 | — | — |
| フィルター | 乾燥後 |  跡のようなものが見られた (矢印部)。 |  無代謝状態である乾眠に移行した。(写真は2匹) |
| | 吸水後 |  様子がより鮮明に確認できた。活動は見られなかった。 |  活動を再開した。 |
| | 蘇生 | 無 | 有 |

※ 「—」はデータがないことを示す。寒天培地の乾燥に時間がかかり、完全な乾燥には至らなかった。

イ) 温度耐性

異なる温度の環境への暴露後の温度耐性の評価は表3のようになった。

表3. 各個体群の温度耐性の評価

| | ゲスイ (+) | ヨコヅナ (+) |
|---------|---------|----------|
| -18℃で一晩 | × | △ |
| 4℃で24h | ◎ | ○ |
| 40℃で2h | ◎ | ○ |
| 56℃で2h | × | × |

4 考察

(1) 飼育による個体数変動

*ゲスイクマムシ (-) の個体数は少しずつ減少し、また、ヨコヅナクマムシ (+) の個体数は安定していた。これに対し、ゲスイクマムシ (+) の個体数は10日間の飼育で3倍近く増加し、生クロレラ V12 が食餌に適していることを確認できた。

さらに、昨年度飼育した*ゲスイ (+) と今回飼育したゲスイ (+) を比較すると、今回は一時減少した日があったものの、全体的に著しい増加が続いた。飼育開始日から10日目以降、約1ヶ月経っても、シャーレ内には成体と幼体がともに多く見られ、個体数の著しい減少は感じなかった。このことから、マイクロピペットの利用と油膜の除去によりエアレーションを行なうことができ、適度な溶存酸素を保つことができたと考えられる。これにより、安定した飼育が可能になり、飼育系の確立にさらに近づくことができた。今後、溶存酸素量の飼育条件も調べたい。

またこれまでの飼育で、ゲスイクマムシがうまく繁殖した場合としなかった場合の環境を比較して考えると、活性汚泥の散らばりの度合いと、クマムシの他にみられる微生物の種類が異なると感じた。活性汚泥が均一に広がっているシャーレ内の方がうまく繁殖した。また他の微生物について、ゲスイクマムシが繁殖したシャーレ内には、下水処理場で「処理状態が良いときによく出現」という報告があるものが多く見られた (図6, 7, 8)。一方繁殖しなかったシャーレ内では、「活性汚泥が古くなったとき」や「硝化が進んでいるとき」によく出現すると報告されている微生物が多く見られた (図9, 10)。すなわち、活性汚泥が分解されずに古いものが残る環境や、逆に、活性汚泥が分解された後の環境ではクマムシは繁殖しにくいと考えられる。これらのことから、ゲスイクマムシの飼育環境に適しているのは活性汚泥の濃度が低い環境であると考えられ、水がきれいな山や川から流れたことで活性汚泥に棲むようになった可能性がある。今後は、効果が確認できたエアレーションに加えて、活性汚泥が少なくなるよう配慮した飼育も行ないたい。



図6. ツリガネムシ (*[1])



図7. エピスティリス (*[1])



図8. タルガタゾウリムシ (*[1])



図9. アルケラ (*[1])

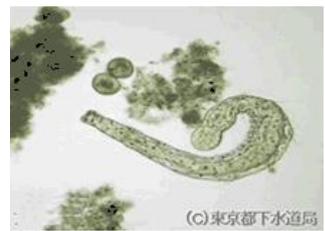


図10. ベニアブラミミズ (*[2])

(2) 耐性の比較

ア) 乾燥耐性

寒天培地を除いた3つでは、ゲスイクマムシは乾燥すると跡が残り、吸水しても蘇生せず、ヨコヅナクマムシは乾眠し、吸水すると蘇生した。ゲスイクマムシは生涯を水中で過ごすため乾燥耐性を備える必要がないが、ヨコヅナクマムシはコケに棲むため乾燥する状況も起こり得る。それぞれの生息環境に適応して耐性の有無が決まることが考えられると確認できた。そのため、ゲスイクマムシの飼育では、十分な水が必要である。

また、4つの乾燥環境を比較すると、フィルターによる乾燥実験が最も観察しやすかった。シャーレとろ紙は、特に乾燥後のゲスイクマムシを探すことが難しかった。寒天培地は、水分を含んでいるため乾燥に時

間がかかる。今後の実験では、湿度を調整する際は寒天培地を用いるのが良いかもしれないが、完全に乾燥させた後の様子を観察する際はフィルターを用いたい。

ゲスイクマムシは、乾燥すると体表が溶けるようになることから、体表の厚さが乾燥耐性に関連する可能性も考えている。ゲスイクマムシとヨコヅナクマムシを電子顕微鏡で観察すると、図 11, 12, 13, 14 のようであった。節のようになっている様子はヨコヅナクマムシのほうがより鮮明で (図 11, 13)、体表は厚いように見える (図 12, 14)。この体表の厚さと耐性の関連についても今後調べたい。

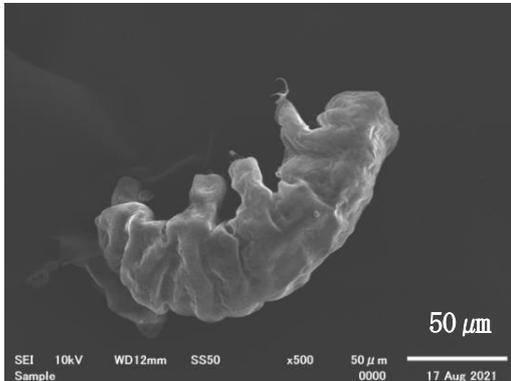


図 11. ゲスイ (+) の SEM 撮影写真

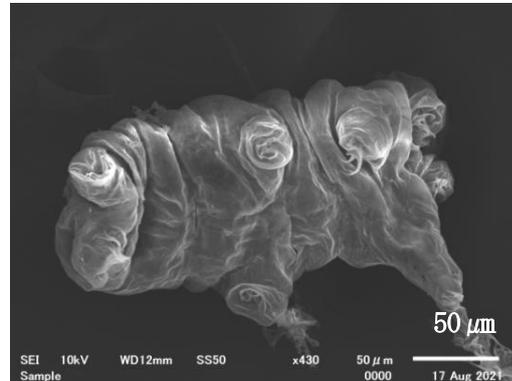


図 12. ゲスイ (+) の SEM 撮影写真

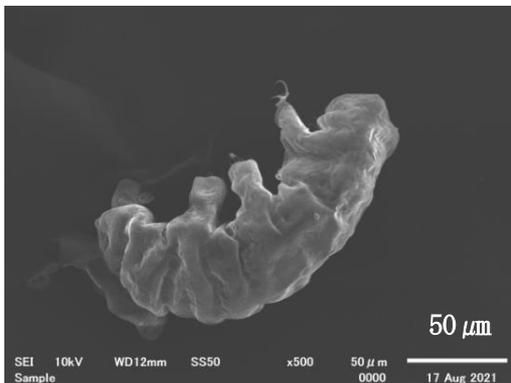


図 11. ゲスイ (+) の SEM 撮影写真

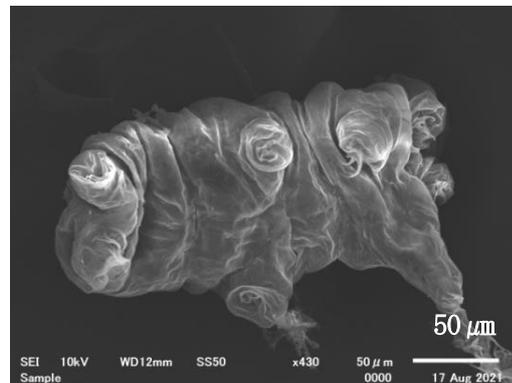


図 12. ゲスイ (+) の SEM 撮影写真

イ) 温度耐性

ゲスイクマムシは下水処理場の反応タンクに棲んでいるため、生息環境の水が凍結することはないため、凍結への耐性を備えていないと考えられる。また、4℃と 40℃の環境でも活動していたことから、季節ごとの水温の変化にもある程度対応できる温度耐性を備えているといえる。ヨコヅナクマムシは北海道のコケで発見された種であり、ゲスイクマムシと違って冬には凍結することも想定されるが、それに対する耐性を備えている。ヨコヅナクマムシも、生息環境にある程度適応できる耐性をもつとわかった。また、両種とも 56℃の環境では活動しなくなったが、どちらの種の生息環境でも、温度がそれほど高くなることはない想定される。

今回、ゲスイクマムシの飼育は 20℃の環境で行なったが、生息環境で起こり得るある程度の温度であれば活発に活動し、生存が可能であることが確認できた。今後さらに詳しく調べ、飼育に適した温度の条件も定めたい。

5 展望

本研究により、ゲスイクマムシの飼育に適した食餌と、エアレーションの効果がわかり、温度と乾燥について適した飼育環境も確認することができた。また、水質がきれいな環境であるほうが繁殖すると考えられる。これらの結果をもとに今後さらに詳しく調べることで、ゲスイクマムシの飼育系を確立したい。

飼育系の確立は、クマムシの乾燥耐性のメカニズムを解明する研究に大きく貢献すると考えている。これは乾燥耐性発現技術の実現につながり、医療分野への応用や経済発展が期待される。

6 参考文献

*[1]池田市上下水道部 「活性汚泥微生物の紹介」(最終閲覧日:2021/08/20)

https://www.city.ikeda.osaka.jp/jogesuido/soshiki/suisitsu/gyomu/gesui_suisitsu/13962.html

*[2]東京都下水道局 「アエオロソマ」(最終閲覧日:2021/08/20)

<https://www.gesui.metro.tokyo.lg.jp/business/b3/corner/biozukan/kousei/aeolosoma/index.html>

7 謝辞

本研究の実施にあたり、御指導くださった静岡大学の宮澤俊義様、竹内浩昭教授、電子顕微鏡の利用に御協力くださった山本千尋様に心から感謝申し上げます。また、研究の機会を提供してくださった静岡大学FSS 未来の科学者養成スクール関係者の皆様に感謝いたします。