

〈第41回山崎賞 児童・生徒の部優秀賞〉

ホウネンエビ鰓脚に見られた付着藻類の研究

静岡県立磐田南高等学校 生物部 ホウネンエビ班
2年 青島壮祐 落合 美琴 匂坂 陸人 1年 伊藤美結 小名木朝乃

1. ホウネンエビとは

ホウネンエビ (*Branchinella kugenumaensis*) (資料1) は田の水中に生息し、脚を上にして泳ぐ約20mmの甲殻類である。鰓脚(さいきゃく)という資料1の赤い円で示したエラと遊泳器官を兼ねる器官を持っており、稀に藻類が付着し、緑色のホウネンエビになることがある。正の走光性を持ち、光に向かって移動する。5月頃に成体が多く見られるようになり、交尾・産卵を行う。産卵を終えた成体は7月頃には姿を消す。田に産み落とされた卵はその後、水のなくなった田の土の中を乾燥状態で冬を越し、春に田に水が入る時期に一斉に孵化する。



資料1 ホウネンエビ

2. 動機・目的

本校生物部では、2020年度より、ホウネンエビの鰓脚に付着する藻類がホウネンエビと共生関係にあると考え、研究を進めてきた。2021年の研究では、二酸化炭素の有無により、緑色になったホウネンエビから、藻類が自らはがれ落ちると考えられる興味深い結果が得られた。2021年には藻類の付着した個体数も多く、研究を進めることができたが、2022, 2023年度の研究では、様々な方法を試したのにもかかわらず、ホウネンエビの鰓脚に藻類が付着せず、研究が進まなくなった。また、ホウネンエビは季節性が強く、継続飼育が大変難しいため、1年を通じて培養できる藻類に焦点を絞ることにした。

本年2024年度は、1, ホウネンエビに付着している藻類の培養を行うことで藻類の安定した量を得ることと、2, 藻類の物質への付着と二酸化炭素との関係を探ることを目的とし、研究を行うことにした。

3. 過年度研究

〈藻類剥離の条件〉

2021年は、付着した藻類が不利益を受けると短時間で剥がれ落ちることから、剥がれ落ちる条件をCO₂利用の面で確認した。剥がれ落ちるのは暗所と、明所で水中CO₂量が多い時であった。暗所では光合成を行わないのでホウネンエビのCO₂を受け取る必要がないため、明所で水中CO₂が多い時は、ホウネンエビに付着しなくてもCO₂が得られるためではないかと考察した。

〈藻類の種類〉

資料2は2021年に同定したホウネンエビに付着した藻類の写真である。写真から幅20μm程度の細胞が数個、群体を作っていることがわかる。先端部分はY字型



資料2

となり、ホウネンエビの鰓脚に付着する際に粘着性の物質を放出する。鰓脚を採取して psbA 遺伝子と rbcL 遺伝子で解析したところ、*Sphaeropleaceae* 科（スファエロプレア科）であること判明した。

また、2023 年は藻類の同定を行っている企業に鰓脚を送り、顕微鏡観察によって、*Characiaceae* 科（カラキア科）の *Korshikoviella* 属（コルシコヴィエラ属）（以下藻類 A とする）の一種だと判明した。2 種類の科が同定されたことから、ホウネンエビの鰓脚には複数種の付着藻類が存在する可能性があると考えた。

4. 実験 1「ホウネンエビ付着藻類の培養」

A. 前培養

田から採取したホウネンエビを水槽内で 1 日置いたところ脱皮を行ったため、脱皮殻を採取した。脱皮殻を顕微鏡で観察を行なったところ、鰓脚上にピレノイドを一個持つ粒状の藻類を確認した（資料 3）。ピレノイドとは、水中で生息する藻類が不足しがちな CO₂ を濃縮する細胞小器官であり、藻類によって細胞ごとの数が異なることから、分類の一つの指標となる。また、藻類 A は遊走子、クロランジオイド（葉柄状体）、アンキロイド（鉤状体）、成虫、囊子の順へと五段階に変化する（資料 4）。その後囊子から大量の遊走子が放出される。藻類がこのように劇的に変化する生活環を持つことは、ホウネンエビの鰓脚に付着し、自ら剥がれ落ちるといった行動をとる可能性が高いことを示しているのではないだろうか。

私達はこの藻類を、ピレノイドを一つ持つことと周囲にアンキロイド一個体を確認できたことから、藻類 A のクロランジオイドと推測し、培養を行なうことにした。しかし、周辺には目的外の藻類が多数見られたため、藻類の単離を簡易化するためにまずは前培養を行なった。

(1) 材料

培地：CA 培地、C 培地

（CA 培地は NH₄⁺ を多く含む：資料 5）

付着体：プラスチック片、ガーゼ

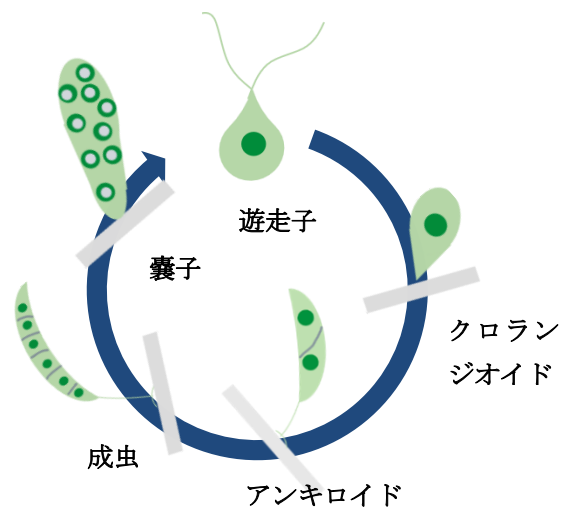
（ともに長さ 20 cm、幅 1.5 cm）

機器：オートクレーブ、人工気象機

人工気象機は、今回の研究において、光周期 14 : 10（明 : 14 時間、暗 : 10 時間）、温度 20℃ の条件で全て統一した。



資料 3



資料 4 藻類 A の生活環

C 培地 藻類培養用培地

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	15 mg
KNO ₃	10 mg
β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	5 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
Vitamin B ₁₂	0.01 μg
Biotin	0.01 μg
Thiamine HCl	1 μg
PIV metals	0.3 mL
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50 mg
Distilled water	99.7 mL
pH 7.5	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6 mg
ZnCl ₂ ¹⁾	1.04 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg
Distilled water	100 mL

CA 培地 (C 培地より NH₄⁺ を多く含む)

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	2 mg
KNO ₃	10 mg
NH ₄ NO ₃	5 mg
β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	3 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg
Vitamin B ₁₂	0.01 μg
Biotin	0.01 μg
Thiamine HCl	1 μg
PIV metals ¹⁾	0.1 mL
Fe (as EDTA; 1:1 molar) ²⁾	0.1 mL
HEPES	40 mg
Distilled water	99.9 mL
pH 7.2	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6 mg
ZnCl ₂ ¹⁾	1.04 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg
Distilled water	100 mL

資料5 C 培地 (左) と CA 培地 (右) の成分表

(2) 方法

オートクレーブを用いて 121°C、20 分で滅菌した CA 培地、C 培地 それぞれ 100mL ずつに、ホウネンエビの脱皮殻と藻類が付着するためのプラスチック片とガーゼを入れた液体培地を作成した。人工気象機で 7 日間培養を行ない、培養した藻類を顕微鏡で観察した。

(3) 結果

ガーゼが濃い緑色になった部分においては、CA 培地、C 培地の両方とも、糸状の藻類が確認できた。一方、緑色の薄い場所では CA 培地のみにかラシウム (*Characium*) 属 (以下藻類 B とする) とと思われる藻類が少数付着していた (資料 6)。藻類 A は培養することができなかったが、カラシウム属は鰓脚に付着することが確認されている藻類であるため、培養を継続することにした。なおどちら



資料6 藻類 B (左) と糸状の藻類 (右)

の培地も、プラスチック片には藻類が付着していなかった。以上、前実験の結果から、CA培地とガーゼで藻類Bの培養を行うことにした。

B.本培養

前培養で得られた藻類Bは10 μm と小さく、ガーゼの緑色が薄い場所に付着していたものの数量は全体的に少なかった。単離が困難なため、藻類Bを増殖させることにした。ガーゼを入れた液体培地に藻類Bを加え、増殖を試みた。また、寒天培地でのコロニー形成が見られるかどうかの確認を行った。寒天培地を用いた理由として、生じた藻類のコロニーをとることで藻類の単離が容易に行えるためである。

(1) 材料

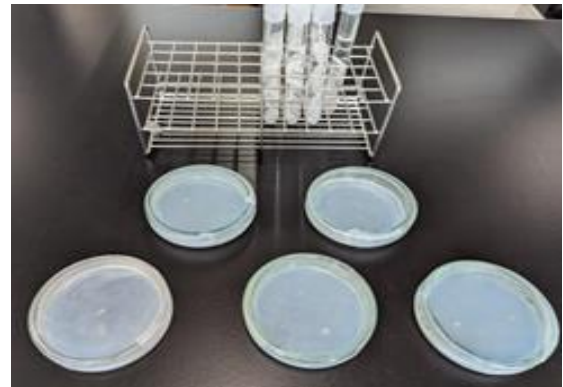
培地：CA「液体培地」(20mL)

CA「寒天培地」(CA44mL+寒天3g)

付着体：ガーゼ(長さ20cm、幅1.5cm)

機器：人工気象機、小型遠心分離機

※培地・付着体は共に培地一つごとの分量



(2) 方法

① 前培養で藻類Bが見られたガーゼの部分のみを切り取る。

資料7 作成した液体培地と寒天培地

② 試験管にCA「液体培地」を入れ、①のガーゼを入れ密閉したものを4本作る。

③ シャーレにCA「寒天培地」に①のガーゼを細かくして散布したものを5個作る。

④ ②, ③ともに人工気象機で培養を行ない、顕微鏡で観察する。

(3) 結果・考察

「液体培地」では、藻類が付着したガーゼを採取し、小型卓上遠心分離機によって分離し顕微鏡で観察した。その結果、藻類Bに似た楕円形の藻類が多く見られ、大きさも約10 μm であった。藻類Bの増殖が成功したと考えられる。また、藻類を確認した3日後に植え継ぎ培養を行ない、同様の操作を行った結果、以前は見られなかった粒状の小さい藻類が多くを占めていた。

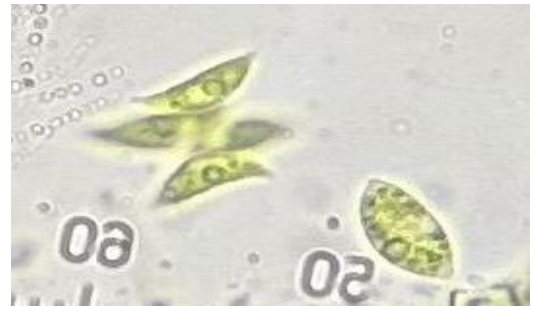
また、「寒天培地」には複数の褐色と緑色のコロニーが見られたが、いずれも藻類Bは見られなかった。



資料8 楕円形藻類(左)と粒状藻類(右)

(4) 藻類の同定

培養で得た藻類を琵琶湖博物館の大塚泰介先生に送付して調べていただいたところ、楕円形の藻類は培養条件下で群体形成を止めてしまった *Tetradesmus* 属（テトラデスムス属）または *Acutodesmus* 属（アクトデスムス属）（ともにイカダモ類）ではないかと推測された。しかし、粒状の藻類の正体は不明であった。イカダモ類の成長過程の初期段階、もしくはコンタミネーションではないかと考察する。



資料9 培地内に見られた楕円形藻類とその群体

5. 実験2「CO₂の有無による藻類のガーゼへのつき方の違い」

2021年の研究において、明所において水中のCO₂が多い時には、藻類がホウネンエビの鰓脚から剥がれ落ちる現象が観察されている。それを培養した藻類で実証するためには、ホウネンエビの鰓脚に付着していた藻類が、ガーゼに十分に付着する必要がある。まずは藻類のガーゼへの付着量を増加させるためにCO₂有無の点から実験を行うこととした。

(1) 仮説

CO₂有の条件において、藻類はガーゼに付着する個体数が増える。

(2) 方法

- ① CA液体培地を10ml ずつ6本の試験管に入れる。
- ② 実験1で培養した藻類を遠心分離にかけ、楕円形藻類を分離した後、目的の藻類があるかを確認する。
- ③ 6本の試験管を2組に分け、片方に石灰水が白く濁るレベルまでCO₂スプレー缶でCO₂を入れる。
- ④ 1cm四方に切りそろえたガーゼを試験管に入れ、②の藻類を1mL ずつ入れる。
- ⑤ 人工気象器にて、実験1と同様の条件下で4日間置く。

(3) 結果

CO₂有の方が藻類の個体数が明確に多く、ガーゼへの付着量もCO₂有で多かった(資料10)。仮説通りの結果であった。数値化するために個体数を数えて密度を算出しようとしたが、ガーゼの繊維の厚さでピントが合わず、ガーゼに入り込んだ藻類の個体数の把握が大変困難であった。

(4) 考察

正確な密度は算出できなかったがCO₂有では光合成が盛んになることで藻類が増殖し付着数も増加した。



資料10 ガーゼに付着した藻類

6. 実験3「CO₂濃度による藻類剥離条件」

藻類を同じ程度付着させた糸を、CO₂濃度の高い培地と低い培地に入れ、短時間で剥がれ落ちる個体数を比較することで、2021年の研究の藻類が自ら剥がれ落ちることを、藻類だけの立場から実証できるのではないかと考えた。

(1) 仮説

CO₂濃度が高くなるほど、付着した物体から剥離する藻類の個体数が増加する。

(2) 方法

① 脱脂綿の綿糸への付着

実験2ではガーゼを使用したのが、繊維が太く、太さが均一ではなかった。そこで培養に適する繊維を探したところ、脱脂綿は太さが一定で、藻類の顕微鏡観察にも適した優れた素材であることを発見した。脱脂綿を細く分け、拡散しないように細くねじった綿糸5mmを、藻類の入ったCA培地に入れ、4日間、実験1と同じ条件の人工気象機内で培養した。藻類が綿糸の繊維上に付着したため、付着個体数を記録することができた。

② CO₂濃度

CA培地5mLにCO₂ガスボンベからCO₂を注入する時間を以下のように変えることで液体培地中のCO₂濃度を比較できるようにした。今後、注入時間をCO₂濃度として表現することとする。注入時間を0s、5s、10s、15sの4段階の時間で注入し、pHを測定したデータが資料11である。CO₂溶解によるpH低下の下限はpH5弱であることが分かる。

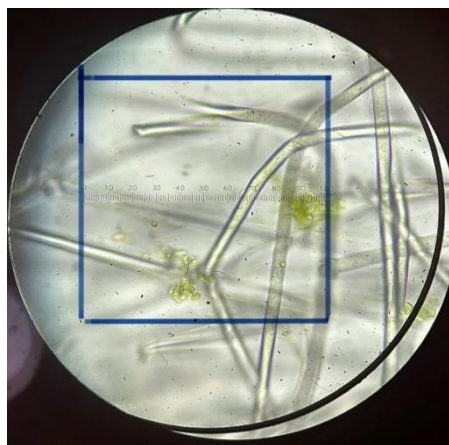
③ 付着藻類個体数の測定

CO₂濃度（CO₂注入時間）の違う培地に藻類の付着した綿糸5mmを5本ずつ入れ、20°Cの人工気象機内で2週間培養を行った。実験開始前と実験終了後に付着個体数、剥離個体数を計測した。実験開始前の藻類の個体数を「初期個体数」と呼ぶことにした。

計測方法は、倍率400倍の顕微鏡を用いて、マイクロメーターで測定して250μm四方の四角を描き、その範囲に含まれる藻類の数を計測した（資料12）。綿糸一本に対して、ランダムに場所を変えながら同じ要領で計測を10回行い、その平均を算出することとした。

CO ₂ 注入時間	pH
0 s	6.69
5 s	5.19
10 s	4.99
15 s	4.93

資料11



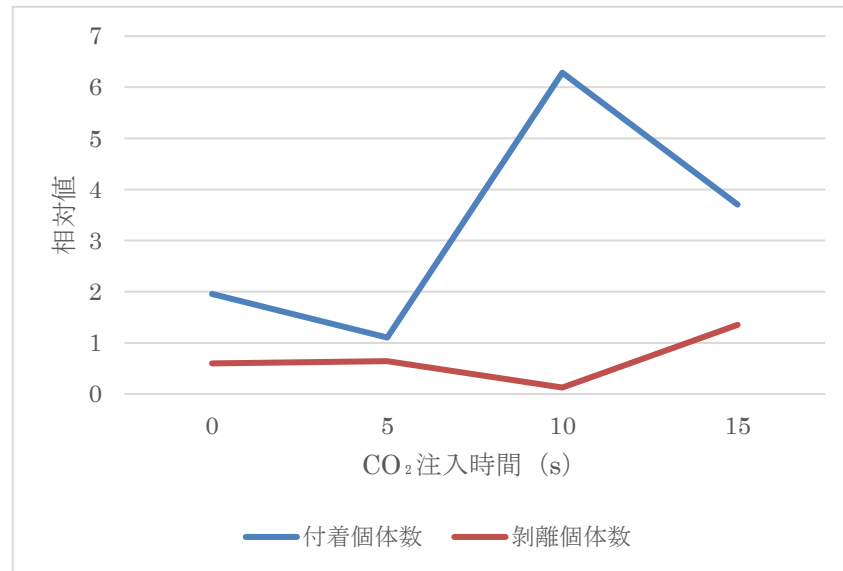
資料12

(3) 結果

藻類は $10\mu\text{m}$ と小さく、培地ごとに同じ個体数の藻類を入れることは不可能である。そのため、最初に培地に入れた藻類の初期個体数に対する付着・剥離個体数を計算し相対値にしたのが資料 13 である。計算式は以下の通りである。

青線：付着個体数 ÷ 初期個体数

赤線：剥離個体数 ÷ 初期個体数



資料 13

資料 13 の相対値により、付着・剥離個体数を比較する。CO₂濃度 10 s では付着個体数が最大になる一方、剥離個体数は最小となる。CO₂濃度 15s では剥離個体数は最大であるが、剥離個体数は CO₂濃度による変化が少なかったため、誤差に含まれる可能性がある。

(4) 考察

① 藻類の付着率

藻類の付着率は CO₂濃度 10s で最大となる。これは綿糸入りの培地中で藻類が最も増殖したことを表しており、光合成速度が最大となる十分な量の CO₂濃度であると分かる。CO₂濃度 10s がホウネンエビの鰓脚が呼吸で生じた CO₂を放出している状態を再現できたのではないかと考えている。

一方、CO₂濃度 15s は、CO₂濃度が高すぎるため、光合成(明期)で使い切れない CO₂が、暗期の時期まで残るのではないかと考えている。人工気象機の、明期 14h 暗期 10h の条件のうち明期の時間を増やせば、15s でも光合成速度が上昇するかもしれない。

② 藻類の剥離率

CO₂濃度の変化による剥離率は、あまり違いがなく、仮説と異なる結果になった。ただ、私たちは、藻類の付着率が最大になった CO₂濃度 10s において、剥離率が最小になることに注目している。ホウネンエビの鰓脚は呼吸を行うため CO₂濃度が高めである。この時に藻類はホウネンエビから剥離しない行動をとるのではないだろうか。

今回の研究は呼吸を行うホウネンエビの鰓脚ではなく、植物の繊維である綿糸からの剥がれ落ち

の測定である。そのため藻類が鰓脚から剥がれ落ちる条件を再現できていなかった可能性もあるため、今後の研究で確かめていきたい。

7. 今後の課題

- (1) ホウネンエビの脱皮殻を使い、CO₂濃度 10s 条件下では、綿糸と同じように付着率が上がり、剥離率が下がるのかを確かめたい。それにより綿糸がホウネンエビの鰓脚の条件を再現できているかを確認する。
- (2) 今年もホウネンエビに付着している藻類はかなり少なく、藻類 A の培養には成功しなかった。地球温暖化等の気候変動や、田の藻類の生育条件の変化など、様々な理由が考えられる。実験室において、ホウネンエビに藻類が付着する条件を探り、ホウネンエビを用いて再度藻類 A の培養を試みたい。
- (3) 今回培養した藻類はあくまで属の推定のみで正確な種までは同定にいたっていない。そのため単離培養を実現し、DNA による同定を行ないたい。

8. 謝辞

滋賀県立琵琶湖博物館の大塚泰介様には藻類に関する適切な助言と資料を提供していただきました。厚く感謝申し上げます。

9. 参考文献

- ・加藤季夫, 1981, 「*Colacium vesiculosum* EHRB. の培養と形態」, 『The Japanese Journal of PHCOLOGY』, 30, 63-67
- ・ J. Barea-Arco, C. Pe´rez-Marti´nez, and R.Morales-Baquero. 2001. "Evidence of a mutualistic relationship between an algal epibiont and its host, *Daphnia pulex*" *Limnology and Oceanography* 46: 871-881.
- ・ Barea-Arco, C. Pe´rez-Marti´nez, and P. Sa´nchez-Castillo. 2001 "Dispersal and colonization of the epibiont alga *Korshikoviella gracilipes* (Chlorophyceae) on *Daphnia pulex* (Cladocera)" *Limnology and Oceanography* 37: 724-730.
- ・白井靖浩・粕渕辰昭, 2013, 「水田湛水層における CO₂, 溶存酸素(DO), pH および RpH の日変動とその相互関係」, 『陸水学雑誌』, 74, 15-20
- ・ Pedro M. Sa´nchez-Castillo. 1987 "Estudio del ciclo biolo´gico de *Korshikoviella gracilipes* (Lambert) Silva (Chlorococcales, Chlorophyta)" *Phycologia* 26: 496-50