

光合成微生物ユーグレナが長期生存できる培養条件の検討
～完全閉鎖型生態系の構築に向けて～

岸本幹太 a)、松井一彰 a),b)

Examination of the culture condition that a photosynthetic microbe, *Euglena gracilis*, can survive in synthesized completely closed ecosystem.

Kanta Kishimoto a) and Kazuaki Matsui a),b)

- a) Department of Civil and Environmental Engineering, Kindai University
近畿大学工学部社会環境工学科
- b) Science and Technology Research Institute, Kindai University
近畿大学理工学総合研究所

(Received March 5, 2019)

概要 (Abstract) :

人工生態系を構築するための基礎実験として、ユーグレナ藻 *Euglena gracilis* が、溶存酸素を枯渇させることなく、完全閉鎖環境下で長期間生存できる培養条件を探った。Hutner 培地を用いた培養では、*E. gracilis* の増殖後に溶存酸素が枯渇した。また光を遮断した培養では *E. gracilis* 数が減少し、溶存酸素も枯渇した。一方、希釈 Hutner 培地における培養では、溶存酸素が枯渇することなく 70 日間 *E. gracilis* が生存した。今後目的を達成するためには、培養液の質や濃度についての検討が有効だと考えられる。

キーワード(Keywords): Completely closed ecosystem, microcosm, *Euglena gracilis*, photosynthetic microbe

1. 諸言

生態系は、生物と環境の作用・反作用の関係での結びつきと、生物間の相互作用によって形成される。生態系を構築する生物は機能別に、生産者、消費者、分解者に区分される。しかし、生態系内の生物種を完全に把握し、各生物の動態を追跡することができる人工生態系の構築は、まだ実現できていない。地球が宇宙において独立した生態系を形作っているように、人工的に独立した閉鎖生態系を構築できれば、生態系の成り立ちや脆弱性を実験的に解明する上での有効なツールとなる事が期待できる。

地球上の多くの生物は、酸素を必要とする好気呼吸によってエネルギーを獲得している。よって長期間に渡って生物が生存・共存できる閉鎖生態系を構築するためには、安定した酸素の供給が重要となる。また、呼吸によって分解・利用された後に蓄積される有機物（代謝産物）の再利用も、生態系の構築では重要である。このように閉鎖生態系の構築においては、生態系内に絶える事無く酸素が存在し、特定の有機物が生態系内に蓄積すること無く、物質が循環している状態が重要になる。そこで人工生態系を構築する上での第一歩として、酸素の供給や、無機物から有機物の変換に関与する生産者（光合成生物）が長期生存できる条件の検討をはじめた。

本報告では、2018年度に実施した完全閉鎖環境下で単一種の生産者を長期培養できる条件の検討について、現在までに得られた実験結果と、今後の展望について紹介したい。

2. 実験方法

2.1 実験材料および培養液

本研究では、生産者機能を持つ光合成生物として、無菌培養が確立されているユーグレナ藻 *Euglena gracilis* klebs (NIES 48) を国立環境研究所微生物系統保存施設より入手して使用した。*E. gracilis* の継代培養と管理には HUT 培地¹⁾を用いた。また完全閉鎖環境下での実験には、培地中に含まれる化合物が全て明白な Hutner 培地²⁾を使用した（表 1）。

表 1 Hutner 培地の組成

構成成分	量 (g/L)
KH_2PO_4	0.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
CaCO_3	0.2
$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	5
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	2
※微量元素混合物	4.86 mL/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0.001
$\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$	2×10^{-7}
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.2

※微量元素混合物

構成成分	量 (g/L)
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.8
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.48
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.28
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.036
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.48
Na_3VO_4	0.037
H_3BO_3	0.114

2.2 完全閉鎖環境下での培養実験

完全閉鎖環境下で *E. gracilis*（生産者）の単一培養を行い、生産者の長期間生存を可能とする培養条件を検討した。密封が可能なガラス培養瓶に 100ml の培地と *E. gracilis* を封入した培養瓶を同時に30本作製した（図1）。培養瓶ごとの誤差を考慮して、1週間ごとに3本ずつを開封して、実体顕微鏡下（×60）で *E. gracilis* の細胞数と細胞の状態を観察した（図2）。また培養液中の溶存酸素量は、センサーチップを同封した計測用の培養瓶3本を対象に、非接触式酸素濃度計（Fibox3、PreSens 社）を用いて計測を行った。*E. gracilis* の無菌操作については、実験生態系の作製手法に倣った³⁾。

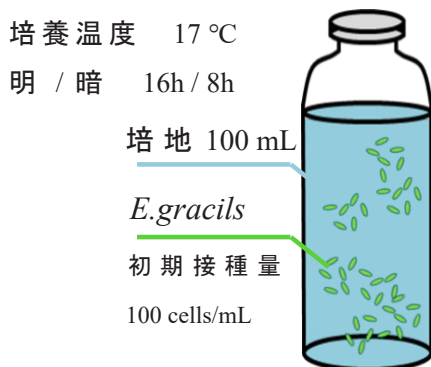


図1 完全閉鎖実験培養系

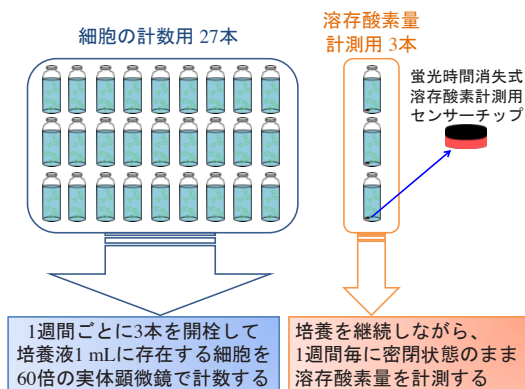


図2 実験の概略図

2.3 培養条件の検討

完全閉鎖環境下での *E. gracilis* の培養を可能にする条件を検討するために、異なる条件下での培養を実施した。検討した培養条件は①光、②通気、③培地濃度（有機物量）の3点である。①の光の有無について検討するために、*E. gracilis* を接種した培養瓶をアルミホイルで包んで光が入らない条件での培養実験を実施した。②の通気について検討するために、*E. gracilis* を接種した培養瓶をシリコ栓にて塞ぎ、無菌状態を保ちながらも外部との空気の入りが可能な状態での培養実験を実施した。③の培地濃度（有機物量）について検討するために、100倍希釈した Hutner 培地を用いての培養を実施した。

3. 結果と考察

密閉条件下にて Hutner 培地を用いて培養した *E. gracilis* の細胞数は、培養開始後28日目まで増殖を続け、その後は定常状態を示した（図3）。しかし、培養液内の溶存酸素量は培養開始以降下がりが続け、培養開始後14日目以降は $0 \mu\text{mol/L}$ を示した（図4）。培養開始後の増殖は、②の通気条件での培養においても観察された。細胞数の変動に密封条件と通気条件の間での違いは見られなかった（図3）。しかし通気条件下では、21日後に一旦 $0 \mu\text{mol/L}$ を示した溶存酸素量がその後上昇し、培養液中に酸素が含まれている事がわかる（図4）。密封条件下でも、培養42日頃に一度培養液中に酸素が確認されたが、その後は $0 \mu\text{mol/L}$ を示し続けた。この現象については、増殖期が終わる頃に培地内の有機炭素量が極端に減少

した状態になったため、ユーグレナの呼吸による酸素消費量と、光合成活動による酸素放出量が一時的に逆転した事が予想された。再現性の検証が必要だが、興味深い事象である。

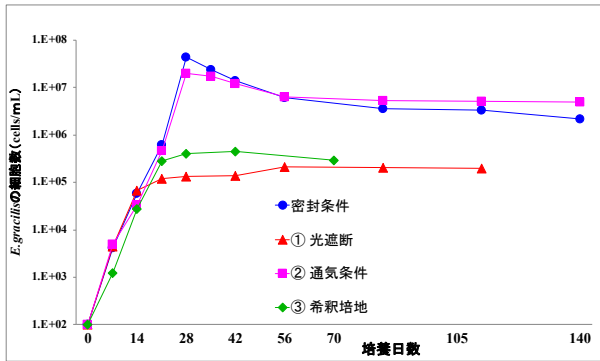


図3 各実験培養系の細胞数変動

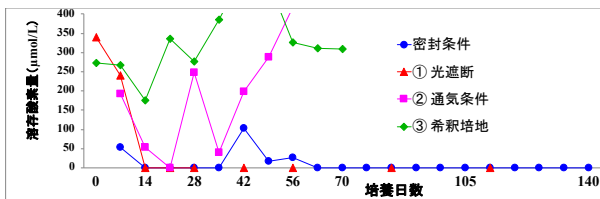
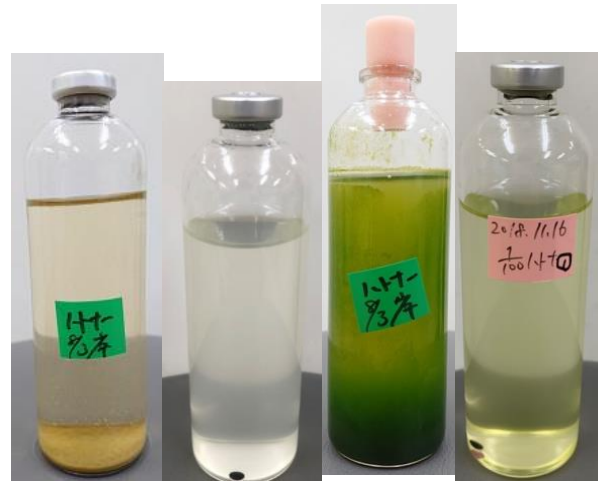


図4 各実験培養系の溶存酸素濃度

密封条件と通気条件間で培養瓶を比較すると、通気条件では *E. gracilis* が本来の緑色を保持しているのに対して、密封条件では緑色が抜け落ちてしまっていた (図5)。顕微鏡下での観察においても、通気条件では細胞が運動する様子が観察されたが、密封条件の細胞に運動性は確認できなかった (図6)。密封条件での培養初期には、細長い楕円形の細胞が観察されていたが、培養の進行に伴って球状のものが多く見られるようになった。このことから、密封条件で培養した *E. gracilis* は培養84日頃までに活動が止まっていた可能性が考えられる。活動が止まった細胞が死んでいたのか、細胞中のクロロフ

イルが活性を失って休眠状態になっていたかについては判断できなかった。この確認のためには、変色した培養液から取った細胞を新しい培養液に接種して、同条件で培養する実験が有効であると考えられる。



密封条件 ① 光遮断 ② 通気 ③ 希釈培地

図5 培養84日後 (右端の③希釈培地のみ70日後) の培養瓶の様子

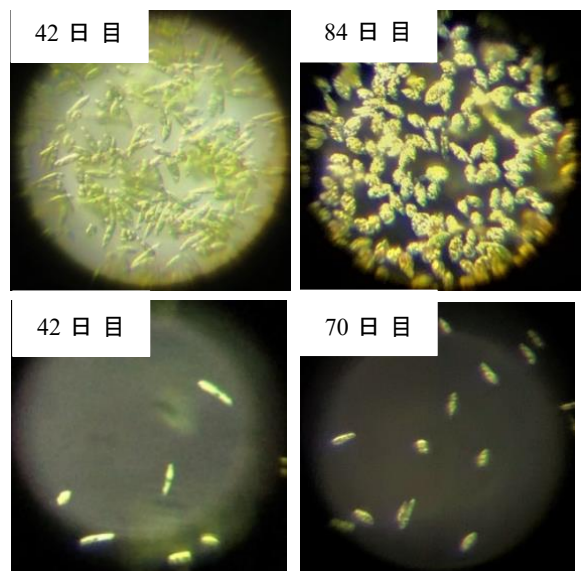


図6 培養瓶中の細胞の様子 (上段: 密封条件、下段: 希釈培地) 全て60倍での観察

光遮断条件下 (①) にて培養した *E. gracilis* の細胞数も、培養開始後28日目まで増殖を続け、その後は定常状態を示した (図3)。しかし、定常状態時の *E. gracilis* の細胞数は 1×10^5 cells/ml 程度であり、密閉条件や通気条件で培養した時と比べると、その細胞数は100分の1程度に留まった。

E. gracilis は従属栄養でも生育できる生物であるが、Hutner培地を用いた密封条件下では、光合成によって増殖可能な量に100倍の差が出るのがわかった。光遮断条件 (①) の培養瓶中の溶存酸素量は、培養開始以降下がり続け、培養開始後14日目以降は $0 \mu\text{mol/L}$ を示したまま増加することはなかった (図4)。光遮断条件下では、従属栄養生物として *E. gracilis* が増殖するが、酸素の供給には関与しなかった事が確認できる。

希釈したHutner培地を用いて培養 (③) した *E. gracilis* の細胞数も、培養開始後28日目まで増殖を続け、その後は定常状態を示した (図3)。しかし定常状態時の *E. gracilis* の細胞数は 2×10^5 cells/ml 程度であり、密閉条件や通気条件で培養した時の細胞数と比べると50分の1程度に留まった。細胞数の変動が光遮断条件下での培養時と類似していたことから、培養瓶の環境収容力に及ぼす影響の大きさが、培地の100分の1希釈と光の遮断で同等であると考えられた。着目すべき点は、培地を希釈した培養瓶では、培養液中に溶存酸素が維持されている点である。この事から、希釈培地を用いた密封培養では、少なくとも70日間は溶存酸素を枯渇させる事無く *E. gracilis* の培養が可能である可能性が示された。また

顕微鏡下での観察結果においては、70日後も細胞が運動している様子が観察された (図6)。

今回の培養実験中の課題として、途中で *E. gracilis* がセンサーチップとガラス容器の間に入り込み、溶存酸素量の値が飽和溶存酸素量の値を大きく上回る異常値を示すことがあった (図4)。今後の実験課題として、培養中にこのような事態を生じさせないように接着などの工夫が必要だと考えられる。

4. 参考文献

- 1) M. Kawachi, M. Ishimoto, F. Mori, K. Yumoto, M. Sato and M. -H. Noël (2013) MCC-NIES List of Strains, 9th ed. Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan.
- 2) 北岡正三郎 編 (1989) ユーグレナ - 生理と生化学、学会出版センター
- 3) K. Matsui, S. Kono, A. Sacki, N. Ishii, M-G. Min and Z. Kawabata (2000) Direct and indirect interactions for coexistence in a species-defined microcosm. *Hydrobiologia* 435: 109-116.