

繊毛虫による *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制とエイコサペンタエン酸の合成

九州大学大学院工学府 学生会員 李瑞寧

九州大学大学院工学研究院 正会員 藤林恵

東北大学工学部・工学研究科技術部 非会員 田中伸幸

九州大学大学院工学研究院 正会員 久場隆広

1 序論

高度不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸 (EPA) は動物の成長、繁殖、生残に不可欠であり、餌から得られる EPA が不足することで成長率、繁殖率、生残率が低下することが多くの水生動物で報告されている。EPA は珪藻などの藻類によって合成され、食物連鎖によって水圏生態系に組み込まれるが、近年では繊毛虫などの原生動物も EPA を合成していることが明らかになりつつあり、原生動物が EPA 供給者としての役割を担っている可能性が指摘されている¹⁾。しかし、原生動物による EPA の生産量については検討が不十分であり、EPA 供給者としてどの程度寄与しているかは分かっていない。

他方、湖沼では世界的に富栄養化によるアオコの異常増殖が問題となって久しい。アオコは利水上の障害を引き起こすのみならず、アオコを引き起こす藍藻類は EPA を含まないため、生態系に供給される EPA が減少し、水生動物の健全な生息が阻害される恐れがある。すなわち、原生動物がアオコを餌として利用し、EPA を合成していれば、摂食によるアオコの抑制と EPA の供給という二つの役割を果たしていると捉えることができる。そこで、本研究では繊毛虫 *Uronema* sp. と *Tetrahymena* sp. に対してアオコを形成する代表的な藍藻である *Microcystis aeruginosa* (NIES-102) を餌として与えて培養し、藍藻摂食速度ならびに EPA 含有量を検討した。

2 実験方法

2.1 繊毛虫による藍藻の摂食実験

本実験では原生動物培養液として BLEY 培地(大麦若葉と卵黄の煮沸抽出液)を用いた。まず、100-mL フラスコに BLEY 培地 30 mL および培地を洗浄し蒸留水に置き換えた *M. aeruginosa* を 1 mL 加えた。次に、*Uronema* sp. と *Tetrahymena* sp. の培養液を 1 mL ずつ異なるフラスコに加えた。繊毛虫を添加しないフラスコを対照系とした。*Uronema* sp. 添加系、*Tetrahymena* sp. 添加系、対照系それぞれ 3 連とし、培養実験を行った。

培養実験は 25℃ の恒温室内で行った。フラスコに段ボールを被せることで暗条件とした。培養開始後 0、10、19、30 日目に各フラスコ中の繊毛虫および *M.*

aeruginosa 細胞数を計測し、次式より繊毛虫による *M. aeruginosa* の摂食速度を算出した。

$$V_{(t+\Delta t)} = \frac{\frac{MA_{con(t+\Delta t)} \times MA_{protozoa(t)} - MA_{protozoa(t+\Delta t)}}{MA_{con(t)}}}{Protozoa_{ave} \times \Delta t}$$

ここで $V_{(t+\Delta t)}$ は t 日から $t+\Delta t$ 日目までの繊毛中の摂食速度平均値 $\text{cells ind}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、 $MA_{con(t)}$ および $MA_{protozoa(t)}$ は t 日目における対照系と繊毛虫添加系の *M. aeruginosa* 細胞数 cells mL^{-1} 、 $MA_{con(t+\Delta t)}$ および $MA_{protozoa(t+\Delta t)}$ は $t+\Delta t$ 日目における対照系と繊毛虫添加系の *M. aeruginosa* 細胞数 cells mL^{-1} である。 $Protozoa_{ave}$ はカウント期間の繊毛虫個体数の平均値 cells mL^{-1} 、 Δt はカウント期間 day である。

2.2 繊毛虫の脂肪酸組成の分析

予備実験において *Tetrahymena* sp. は EPA を合成しなかったことから、*Uronema* sp. のみを対象として、EPA 合成量の評価を行った。まず、Bley 培地中で *M. aeruginosa* を餌として *Uronema* sp. を 35 日間培養した。培養開始後 0、8、16、23、35 日目に *Uronema* sp. および *M. aeruginosa* の細胞数を計数した。また、培養 35 日後の培養液をガラスフィルター (GFD) でろ過し、凍結乾燥後に脂肪酸分析に供試した。また、比較のために無機塩培地中で、細菌を餌に継代培養している *Uronema* sp. についても脂肪酸分析を行った。

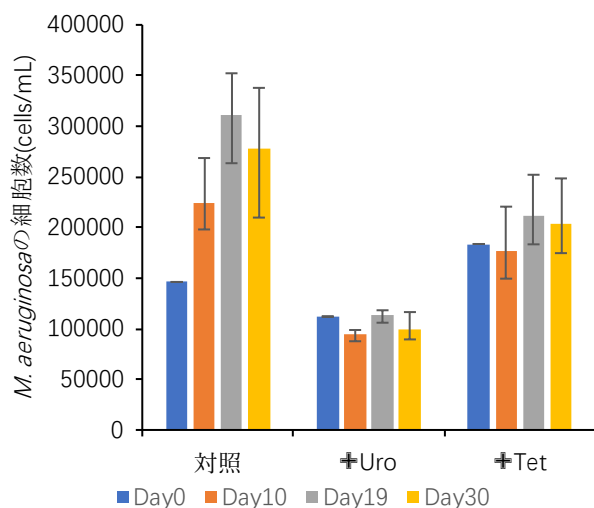
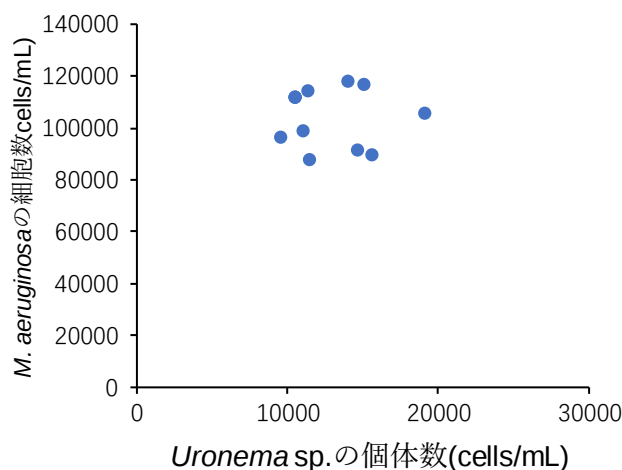
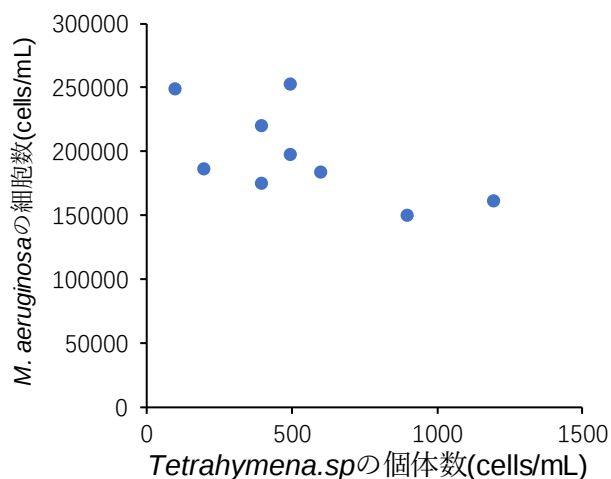
2.3 細胞数の計測

培養中のフラスコをマルチシェイカーを使ってよく攪拌し群体を分散させ、0.5 mL を分取し、適宜希釈を行った。その後、希釈した試料をさらにマルチシェイカーを使って攪拌し、検液をプランクトン計数板 (MPC-200、松浪硝子工業株式会社) に移し、顕微鏡を用いて細胞数の計測を行った。

3 結果と考察

3.1 *M. aeruginosa* 抑制実験

暗条件下で培養したものの、対照系において 19 日目まで *M. aeruginosa* の増殖が確認された (図 1)。しかし、繊毛虫を添加した系では *M. aeruginosa* の増殖は見られなかったことから、繊毛虫による *M. aeruginosa* の抑制効果が働いたと考えられた。そのため、実験期間中に繊毛虫が *M. aeruginosa* を摂食して増殖したものと考えられたが、*M. aeruginosa* 細胞数

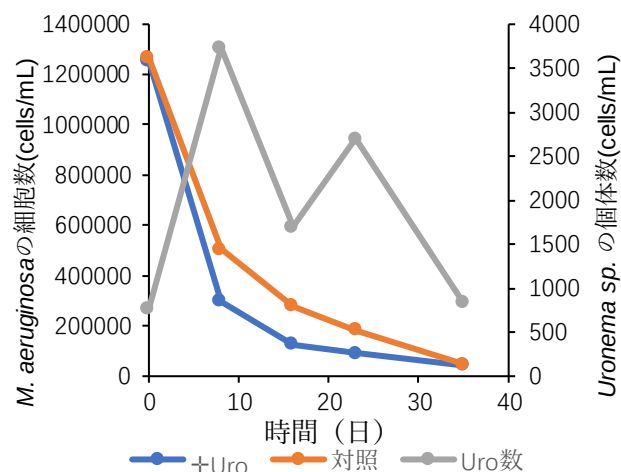
図 1. 実験期間中の *M. aeruginosa* 細胞数図 2. *Uronema* sp. と *M. aeruginosa* の関係図 3. *Tetrahymena* sp. と *M. aeruginosa* の関係
と繊毛虫の細胞数との間に有意な負の関係は見られなかった (図 2、図 3)。

Uronema sp. および *Tetrahymena* sp. の摂食速度の平均値はそれぞれ 0.3 、 $1.8 \text{ cells ind}^{-1} \text{ day}^{-1}$ と算出された。Sherr et al. ²⁾ によって報告された *Uronema marina* の細菌摂食速度が $710 \text{ cells ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であることを踏まえると本研究の摂食速度は極めて低い。既往の研究と

は培地や水温などの培養条件が異なることが影響した可能性が考えられるが、供試した *M. aeruginosa* が餌として不適であり、繊毛虫が効率的に餌利用できていなかった可能性も考えられた。

3.2 脂肪酸解析実験

培養実験期間を通して、*Uronema* sp. を添加した系で *M. aeruginosa* の細胞数が小さく、*Uronema* sp. による抑制効果が認められた。しかし、*Uronema* sp. の細胞数は実験 8 日目までは増加しているものの、その後減少した (図 4)。

図 4. *M. aeruginosa* と *Uronema* sp. 細胞数の経時変化

実験最終日の *Uronema* sp. から $0.68 \text{ pg cell}^{-1}$ の EPA が検出され、*Uronema* sp. が *M. aeruginosa* を餌として EPA を合成できることが明らかとなった。しかし、無機培地中で細菌を餌に培養した *Uronema* sp. の EPA 含有量は $2.09 \text{ pg cell}^{-1}$ であり、*M. aeruginosa* を餌とした際の EPA 合成効率 は細菌を餌とした場合より低かった。摂食速度の実験同様に、*M. aeruginosa* の *Uronema* sp. に対する餌としての適性が低いと考えられる。ただし、繊毛虫の増殖には少なくとも $10^6 - 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$ という高い細菌密度を必要とすることが報告されている ³⁾。そのため、本実験による *M. aeruginosa* の供試量が不十分であったことも考えられ、今後の検討課題となった。

本実験で確認された *Uronema* sp. の EPA 含有量は無機培地の系で 2.3 mg g^{-1} であった。珪藻の EPA 含有量が $0.5 \sim 23.1 \text{ mg g}^{-1}$ である ⁴⁾ ため、*Uronema* sp. の EPA 含有量は、EPA の主要な生産者と考えられている珪藻の生産範囲内にあることが明らかとなった。

謝辞 本研究は科研費 (19140345) の助成を受けた。

参考文献：

- 1) Bec et al. 2006. *Limnol. Oceanogr.* 51(4), 1699.
- 2) Sherr et al. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5), 1091.
- 3) 神山孝史 1999. *Bull. Plankton Soc. Japan* 46(2), 113.
- 4) Peltomaa et al. 2019. *Marine Drugs* 17, 233.