

広瀬川河川水から単離した細菌捕食性原生動物の解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○須藤真志

東北学院大学 工学部 正会員 中村寛治

1. 背景および目的

広瀬川河川中には、原生動物が生息しており、外来細菌を導入した場合、原生動物によって外来細菌が捕食されることが分かっている¹⁾。我々はこれまでに捕食に関する正確なデータを得るため、*Bacillus subtilis* BN1001 株を用いて 5 種類の原生動物の単離を行った。そこで本研究では、4 種類の細菌を被食者とした捕食実験を行い、原生動物の捕食の多様性や、原生動物 1 細胞当たりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数、原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数、原生動物の捕食速度の算出を行った。

2. 実験材料および方法

2-1 添加細菌及び利用した単離原生動物

捕食実験に使用する細菌として 4 種類を選出した。

- ・ *Bacillus subtilis* BN1001 (以下 BN1001 株)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (以下 PAO1 株)
- ・ *Cupriavidus necator* KT-1 (以下 KT-1 株)
- ・ *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 (以下 IAM1399 株)

捕食実験で使用する単離原生動物を 5 種類選出した。下記に示す相溶性とは 18S rRNA 遺伝子を比較した時の値である。

- ・ Ptz1 (最近縁種: *Spumella obliqua*) 相溶性 98%
- ・ Ptz2 (最近縁種: *Bodo saltans*) 相溶性 100%
- ・ Ptz4 (最近縁種: *Spumella* sp. Mbc_3C) 相溶性 99%
- ・ Ptz6 (最近縁種: *Cercomonas vacuolata*) 相溶性 98%
- ・ Ptz7 (最近縁種: *Spumella-like flagellate* JBAS37) 相溶性 99%

2-2 単離した原生動物による捕食実験

4 種類の細菌をそれぞれ DNSY-IB¹⁾に懸濁し A₆₀₀ を約 0.2 に調整した 5mL の菌懸濁液を試験管に入れ、原生動物を単離したサンプル 0.01mL を加え、180 rpm, 20℃で振盪培養を行い、捕食が起こるかを確認した。吸光度が初期値の 20%以下になった時点で既報の論文¹⁾に従い、本サンプルから DNA 抽出を行った。

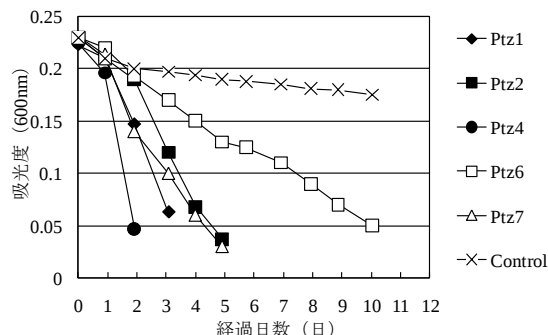


図-1 原生動物による吸光度の経時変化 (被食者: BN1001 株)

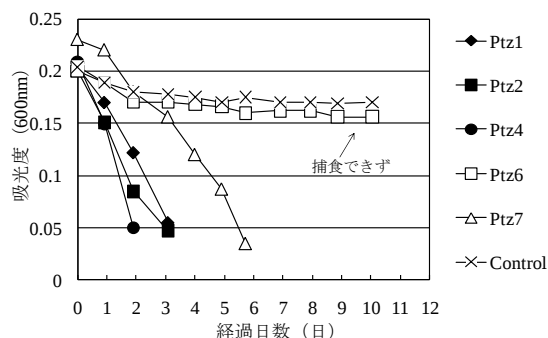


図-2 原生動物による吸光度の経時変化 (被食者: PAO1 株)

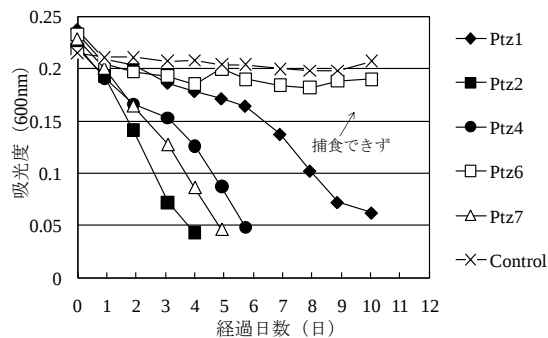


図-3 原生動物による吸光度の経時変化 (被食者: KT-1 株)

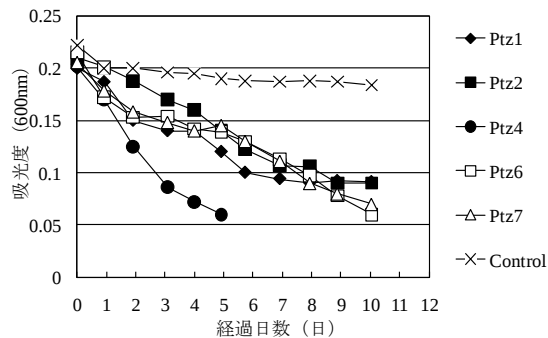


図-4 原生動物による吸光度の経時変化 (被食者: IAM1399 株)

キーワード 単離 18S rRNA 遺伝子 原生動物

連絡先 中村 寛治 (宮城県多賀城市中央 1-13-1) 022(368)7045

2-3 qPCR による 18S rRNA 遺伝子の定量

単離した原生動物による細菌の捕食を確認するために 2-2 項で得た DNA を基にサンプル中の 18S rRNA 遺伝子を qPCR (quantitative real-time PCR) 法によって定量した。18S rRNA 遺伝子検出用プライマーペア¹⁾を利用した。測定には LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic 社製) を使用し、運転条件は既報の論文¹⁾に従った。

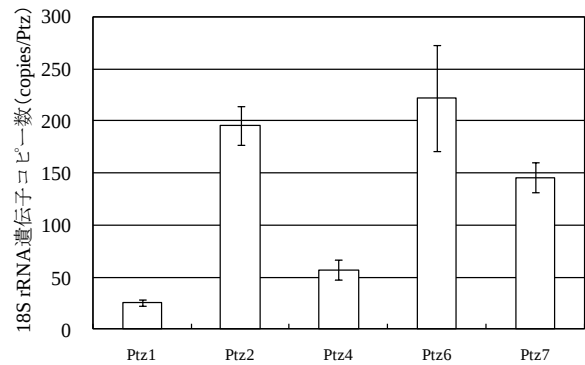


図-5 原生動物 1 細胞の 18S rRNA 遺伝子のコピー数

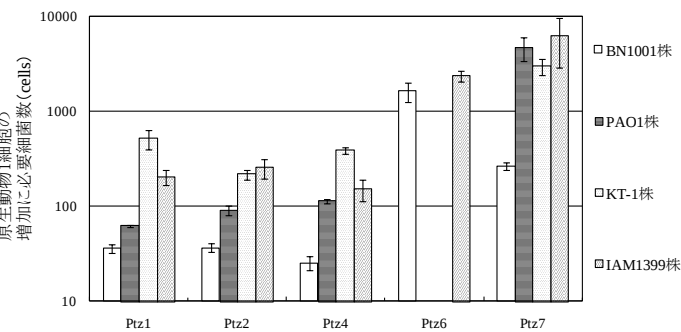


図-6 原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数

表-1 被食細菌ごとの 1 日当たりの減衰吸光度

	BN1001株	PAO1株	KT-1株	IAM1399株
Ptz1	-0.0623	-0.0497	-0.0284	-0.0193
Ptz2	-0.0528	-0.0633	-0.0460	-0.0126
Ptz4	-0.1451	-0.0977	-0.0389	-0.0350
Ptz6	-0.0124			-0.0145
Ptz7	-0.0310	-0.0299	-0.0434	-0.0108

3. 実験結果および考察

単離原生動物による各細菌の捕食による吸光度 A_{600} の経時変化を図-1～図-4 に示す。図中の Control は原生動物無添加系であり、細菌の吸光度の自然減衰を表している。 *Bacillus* 属細菌を用いて単離した原生動物のうち Ptz6 においては、PAO1 株と KT-1 株を捕食することができなかったが、その他の原生動物は全ての細菌を捕食することができ、捕食の多様性を確認することができた。系統学的に見て、*Cercomonas vacuolata* に近縁な原生動物は捕食の多様性が少ない可能性がある。

次に、BN1001 株を捕食後の 18S rRNA 遺伝子数を原生動物数で除して、原生動物 1 細胞当たりの 18S rRNA 遺伝子コピー数を算出した。それぞれ原生動物ごと値を平均した結果を図-5 に示す。単離原生動物 1 細胞当たりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数を算出した結果、原生動物の種類によって大きく異なり、最小値は Ptz1 の 26copies/Ptz、最大値は Ptz6 の 222copies/Ptz となり、10 倍程度の差があった。

また、BN1001 株の $A_{600}=0.2$ が 7.5×10^7 cells/mL、PAO1 株の $A_{600}=0.2$ が 6.1×10^8 cells/mL、KT-1 株の $A_{600}=0.2$ が 6.2×10^8 cells/mL、IAM1399 株の $A_{600}=0.2$ が 2.5×10^8 cells/mL であることから、比例計算により、捕食された細菌数を算出、原生動物数で除して、原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数を算出し、図-6 に示す結果を得た。原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数は、原生動物によって異なり、少ないもので 60cells 程度、多いものでは 100 倍の 6000cells 以上の細菌数を必要とすることがわかった。同様に被食細菌によっても、原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数が異なることがわかった。また、BN1001 株が他の株よりも収率の値が低かった。これは、顕微鏡観察の際に、BN1001 株のサイズが他の株に比べて、大きかったためであると推測した。

次に期間中での被食細菌の 1 日当たりの減衰吸光度を算出した結果を表-1 に示す。添加した原生動物ごと、細菌の減衰吸光度が最も高い値を示した数値を表でグレーで表示した。表のように、捕食する細菌によって、原生動物の捕食速度が異なることがわかった。また、IAM1399 株は、全ての原生動物に対して、捕食される速度が遅いことが明らかとなった。

4. 結論

- ・ *Bacillus subtilis* BN1001 株を用いて単離することの出来た 5 種類の原生動物のうち、4 種類の原生動物は *Bacillus subtilis* BN1001 以外の細菌も捕食した。
- ・ 原生動物 1 細胞当たりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数は、26～222 コピーと原生動物によって差があった。
- ・ 捕食する細菌によって、原生動物 1 細胞の増加に必要な細菌数が異なることが明らかとなった。
- ・ 単離した原生動物は、捕食する細菌によって捕食する速度が異なることがわかった。

(参考文献)