

## 宇宙ステーション内生活環境における原生生物叢解析法の開発

月井雄二 (法政大・自然科学センター)

### A new system to analyse protist species diversity on board a space station

Yuuji TSUKII (Hosei University, Science Research Center)

#### SUMMARY

To develop an efficient system for detecting protist species within a space station, we examined samples collected from three localities under various culturing conditions. Some samples were cultured by dividing them over 24 small wells, while others were cultured in single large culture flasks. After about one month, the samples cultured in the 24 small wells had, on average, about three times more protist species than those cultured in the single large culture flasks. This suggests that the species-species interactions that occur within the large flasks inhibited the growth of some species and that the "subdividing" method (using the 24 wells) may be useful to increase the efficiency of detecting protist species in the environment of a space station. This research was supported by the "Ground-based Research Program for Space Utilization" promoted by the Japan Space Forum.

**【目的】** 宇宙ステーション内生活環境及び乗員の体内外における微生物生態系解析システムの開発を目指す地上研究 (代表 榎村浩一, 帝京大) の一部として, 原生生物叢解析法の開発を行なっている。原生生物は, 他の微生物 (細菌, 菌類) と比較すると, ステーション内での存在確率は非常に低いと予想されるが, 一方で, 生息可能な種は従属栄養から独立栄養まで多種多様である点が特徴といえる。そのため, 希少かつ多様な原生生物をいかにして効率的に検出するかが最大の課題となる。これに関し以下のような手法の開発を行なっている。

a) 直接観察による検出: 原生生物は単離培養が困難な種が多い。それらについては, 原生生物の画像データベース構築に用いた記録法で静止画と動画を記録し, 後で時間をかけて同定を行なう。

b) 培養による検出: とはいえ, サンプルの直接観察

だけでは種同定が容易な増殖期の細胞は見つけにくいであろう。なぜなら, ステーション内に生息する原生生物は, 個体数が少ないだけでなく, その多くはシスト化していると予想されるからである。仮にステーション内では増殖期にあったとしても, 宇宙から地上へ移送され観察可能になるまでにはかなり時間がかかるので, 途中でシスト化する可能性が高い。細胞数が少ない種, および, シスト化した種については, 可能なかぎり培養によって増殖させ検出しやすくする必要がある。

その場合, 既述したように, 原生生物は従属栄養から独立栄養まで様々なものがあるので, 組成の異なる培養液をいくつか用意し, そのどれかで増殖することを狙う。また, 同じサンプル中に複数種が混在していると, 培養液の組成そのものは増殖に適していても, 捕食や他生物が出す有害物質等の影響で

増殖が阻害され、結果として検出できない恐れもある。

そこで今回は、組成の異なる培養液ごとに検出される種数・種組成にどのような違いがあるか。さらに、同量のサンプルを1つの培養器で培養した場合と複数の培養器に小分けして培養した場合とで検出種数の比較を行なった。

**【材料と方法】** 使用したサンプルは、須川高原温泉（岩手県一関市）前の道路脇の土 約 50  $\mu\text{g}$ 、千沼ヶ原（岩手県雫石町）にある池塘の水垢 約 50  $\mu\text{l}$ 、沼原湿原（栃木県那須塩原市）の木道脇の水垢 約 5  $\mu\text{l}$  の3点である。各々を4種の培養液、A～D各 50 ml (A: KCM+10  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CaCl}_2$ , B: KCM+10  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CaCl}_2$ +0.1EM, C: KCM+HP, D: KCM+HP+0.1EM ; KCM: 8  $\mu\text{g/ml}$  KCl, 10  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CaCl}_2$ , 25  $\mu\text{g/ml}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , HP: HypoNex 0.02% (v/v), 0.1EM: 0.2 mg/ml Trypton, 0.1 mg/ml Proteose peptone, 0.2 mg/ml Yeast extract, 0.1mg/ml Sodium acetate, 1  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CaCl}_2$ ) に加えて攪拌した後、25 ml を平底容器（容量 50 ml）に、残りの 25 ml を 24 穴の培養器に分注して約 1 ヶ月間、室温 23°C、蛍光灯下で培養した。

**【結果と考察】** 24 穴培養器に分注して培養した試料から観察された原生生物の種数は、同量を1つの培養器にまとめて培養した場合に比べて平均で約3倍多かった。同一サンプル中に複数種が混在している場合、捕食や他の生物が出す有害物質等の影響で生育が阻害され検出種数が減ったことが示唆される。

須川高原温泉の土からは培養液 B,C,D において土壌アメーバの一種、*Acanthamoeba* が、また、培養液 C でのみ緑藻類の一種、*Chlorococcum* が検出された。一方、千沼ヶ原と沼原湿原の水垢からは採集直後の直接観察では見つからなかった *Scenedesmus*（複数種）や *Chlorococcum* が多く検出された。逆に採集直後に観察された種は、1, 2種を除いてほとんどが検出されなかった。今回用いた培養液の中で検出種数をもっとも多かったのは、培養液 C、すなわち塩溶液に液肥を少量加えたものだったが、これは2つの水垢サンプルにはもともと緑藻類が多く生息していたためと思われる。一方、液肥の有無に関わらず、0.1EM を加えて富栄養にすると検出される種数が減少した。富栄養条件では増殖した細菌類が出す有害物質により緑藻類等の増殖が阻害されたためだろう。

一方、鞭毛虫、肉質虫、繊毛虫等の従属栄養生物は、いずれのサンプルでもあまり観察されなかった。従属栄養生物は増殖が早いので実験開始から1週間後、半月後にも途中経過を観察したが、1ヶ月後と違いはなかった。今回のサンプルにはもともと従属栄養生物があまりいなかったか、あるいは、用いた培養液ではうまく増えなかったかのいずれかが原因であろう。今後は培養液の組成を変えて、より多種類の原生生物が検出できる条件を探りたい。

本研究は（財）日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの一環として行ったものである。