

## いくつかのユーグレナによる硝酸態窒素の利用

加藤 季夫<sup>1</sup>・大島 海一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 國學院大學自然科学研究室 (150-8440 渋谷区東4-10-28)

<sup>2</sup> 日本大学生物資源学部 (252-8510 藤沢市亀井野 1866)

Kato, S<sup>1</sup> and Ooshima, K.<sup>2</sup>: On utilization of nitrate as the nitrogen source by some *Euglena* spp. Jpn. J. Phycol. (Sorui) 50: 79-82.

Utilization of nitrate as the nitrogen source was studied using axenic cultures of *Euglena gracilis*, *E. granulata* and *E. polymorpha*. While *E. gracilis* could not utilize nitrate as reported previously, both *E. granulata* and *E. polymorpha* could utilize nitrate for their growth as evidenced by the effects on cell multiplication and consumption of nitrogen from the nitrate medium. This result indicates that both nitrate and ammonium are good nitrogen sources for some *Euglena* species.

Key Index Words: axenic culture, *Euglena*, *E. gracilis*, *E. granulata*, *E. polymorpha*, nitrate, nitrogen source

<sup>1</sup> Laboratory of Natural Science, Kokugakuin University, Higashi 4-10-28, Shibuya-ku, Tokyo, 150-8440 Japan

<sup>2</sup> Biological Laboratory, College of Bioresource Science, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa-shi, Kanagawa, 252-8510 Japan

Cramer and Myers (1952) は *E. gracilis* Klebs var. *bacillaris* Pringsheim の無菌培養株を用いた実験を行い、ユーグレナは窒素源として硝酸態窒素を利用できないことを明らかにした。その後、Huzisige and Satoh (1960) や Oda et al. (1979) も *E. gracilis* var. *bacillaris* を用いた実験結果から、ユーグレナは窒素源としてアンモニア態窒素は利用できるが硝酸態窒素は利用できないことを報告した。これらの報告に基づいて、現在ではユーグレナは硝酸態窒素を利用できないとされている(北岡 1986)。

今回、*E. gracilis* Klebs, *E. granulata* (Klebs) Lemmermann および *E. polymorpha* Dangeard の無菌培養株を用いて、これら3種のユーグレナが硝酸態窒素を利用できるかどうかを調べた。その結果、*E. gracilis* は従来報告されてきたように硝酸態窒素は利用できなかったが、*E. granulata* および *E. polymorpha* の両種はアンモニア態窒素だけでなく、硝酸態窒素も利用できると判明したので、ここに報告する。

### 材料と方法

実験には *E. gracilis* として E-1533 株 (千葉県山武郡成東町の溝, 1998年2月18日採集), *E. granulata* として E-1657 株 (神奈川県横浜市緑区寺家町の大池, 2000年5月26日採集), *E. polymorpha* として E-1327 株 (沖縄県南大東町の溜池, 1991年7月19日採集) の無菌培養株をそれぞれ用いた。無菌培養株は、それぞれの採集地点から得られた試料からピペット洗浄法で1個体を単離し、AF-6培地(加藤 1982)で温度20℃、照度4,000 lux, 12-12 hrs の明暗周期で継代培養されているものである。

硝酸態窒素及びアンモニウム態窒素の利用について調べるため、それぞれ3種の対数増殖期にある継代培養物を nitrogen-free 培地で数回洗浄したのち、*E. gracilis* については3,000細胞/ml, *E. granulata* および *E. polymorpha* については300細胞/ml になるように nitrogen-free 培地, nitrate 培地および ammonium 培地 (Tab. 1) に接種し、1週間後および2週間後にその細胞数を血球計算盤を用いて測定した。また、nitrate 培地で培養したものについては同時に培地中の硝酸態窒素の濃度を分光光度計(島津製作所UV-1200)を用いて測定した。なお、これらの実験は温度、照度、明暗周期などの条件をすべて継代培養と同じ条件下で行い、それぞれの測定時にはB-III及びB-IV培地(Ichimura and Watanabe 1977)を用いて無菌テストを行った。

### 結果

nitrogen-free 培地, nitrate 培地および ammonium 培地におけるユーグレナの3種の細胞数の変化を Figs 1-3 に示す。*E. gracilis* は ammonium 培地では、接種時の3,000細胞/mlから1週間後には59,000細胞/ml, 2週間後には133,000細胞/mlとよく増殖した。これに対して、nitrate 培地では1週間後には4,600細胞/ml, 2週間後には6,500細胞/mlに過ぎず、ほぼ nitrogen-free 培地での1週間後の3,300細胞/ml, 2週間後の5,200細胞/mlと似た増殖を示した。また、ammonium 培地では、2週間後の細胞さえも貯蔵物質のパラミロン粒は少なく、葉緑体はよく観察できた (Fig. 4c)。nitrate 培地のものでは nitrogen-free 培地のものと同様に1週間後にもかなり多くのパラミロン粒が認められ、2週間後の細胞では多数のパラミロ

Table 1 Compositions of three culture media

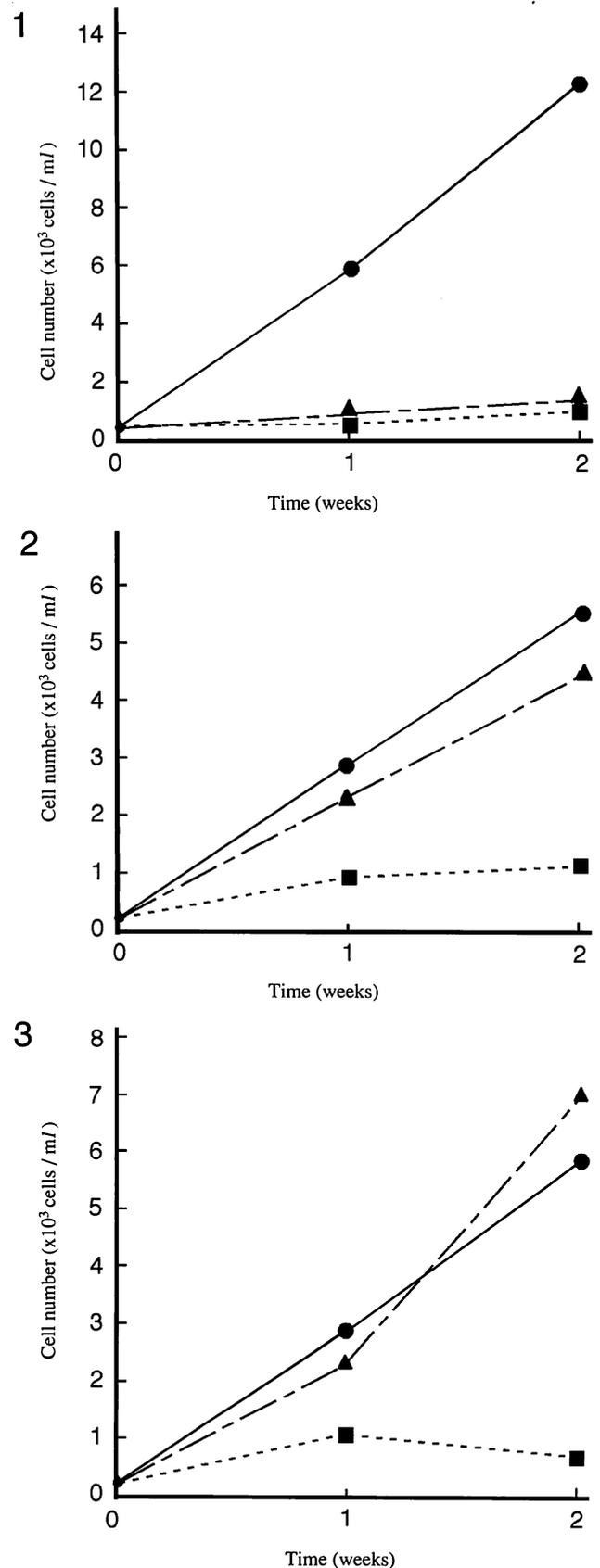
Components	nitrogen-free medium	nitrate medium	ammonium medium
NaNO <sub>3</sub>	—	121 mg	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	95 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 mg	←	←
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg	←	←
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mg	←	←
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mg	←	←
Fe-citrate	1 mg	←	←
Citric acid	1 mg	←	←
Trace metals <sup>1)</sup>	3 ml	←	←
Biotin	2 μg	←	←
Thiamine HCl	10 μg	←	←
Vitamin B <sub>6</sub>	1 μg	←	←
Vitamin B <sub>12</sub>	1 μg	←	←
Distilled water	997 ml	←	←
pH	6.6	←	←

<sup>1)</sup> 1ml of the trace metals solution contains; 0.2mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.08mg MnCl<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.001mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0004 mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0008mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.5mg Na<sub>2</sub>-EDTA

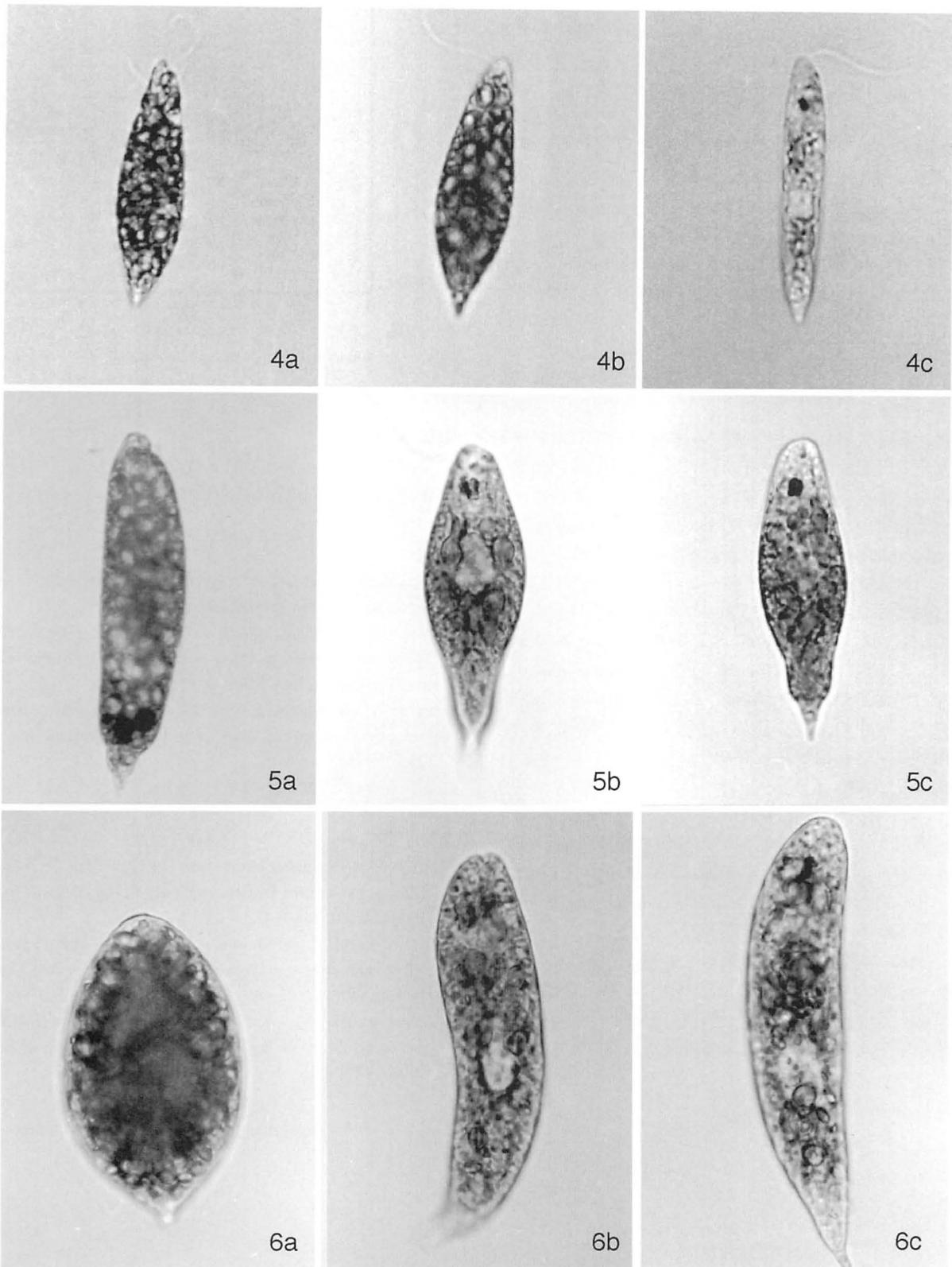
ン粒のために、葉緑体はほとんど観察できなくなっていた (Figs 4a, b)。

*E. granulata* は、ammonium 培地では接種時の 300 細胞/ml から 1 週間後には 2,900 細胞/ml に、2 週間後には 5,500 細胞/ml になった。nitrate 培地では 1 週間後には 2,300 細胞/ml、2 週間後には 4,400 細胞/ml まで増殖した。これに対して、nitrogen-free 培地では接種時の 300 細胞/ml から 1 週間後には 900 細胞/ml に、2 週間後には 1,200 細胞/ml にまで増殖したが、ammonium 培地および nitrate 培地と比べて細胞数は少なかった。また、nitrogen-free 培地では 1 週間後の細胞がすでにかなり多くのパラミロン粒を含み、2 週間後の細胞は多数のパラミロン粒で満たされていた (Fig. 5a)。しかし ammonium 培地および nitrate 培地では、2 週間後の細胞にもパラミロン粒は少なかった (Figs 5b, c)。*E. polymorpha* は、ammonium 培地では接種時の 300 細胞/ml から 1 週間後には 2,800 細胞/ml に、2 週間後には 5,900 細胞/ml となった。nitrate 培地では 1 週間後には 2,400 細胞/ml に、2 週間後には 7,000 細胞/ml になり、ammonium 培地とほぼ同様の増殖を示した。これに対して、nitrogen-free 培地では 1 週間後には 1200 細胞/ml まで増殖したが、2 週間後には 700 細胞/ml にまで減少してしまった。そしてその 2 週間後の細胞にはかなりのパラミロン粒が認められた (Fig. 6a)。しかし ammonium 培地および nitrate 培地では 2 週間後の細胞でもパラミロン粒は少なかった (Figs 6b, c)。

次に接種から 1 週間後および 2 週間後における nitrate 培地中の硝酸態窒素の濃度を Fig. 7 に示す。接種時に 19.9 mg N/l であった硝酸態窒素は、*E. gracilis* では 1 週間後に 19.7 mg N/l、2 週間後には 19.8 mg/l で、ほとんど減少していなかった。それに対して、*E. granulata* では 1 週間後には 18.9 mg N/l、2 週間後には 17.7 mg N/l となり、*E. polymorpha* では 1 週間後には 19.2 mg N/l、2 週間後には 17.8 mg N/l と減少していた。

Fig. 1-3. Growth of three species of *Eugenia* in three media.Fig. 1. *E. gracilis*, Fig. 2. *E. granulata*, Fig. 3. *E. polymorpha*

Symbols; ●: ammonium medium, ▲: nitrate medium, ■: nitrogen-free medium



Figs 4-6. Cells of *Euglena* spp. grown in three media.

Fig. 4. *E. gracilis* (x 900); Cell grown in (b) is filled with many paramylon granules the same as in (a).

Fig. 5. *E. granulata* (x 625); Cell grown in (b) has a few paramylon granules the same as in (c).

Fig. 6. *E. polymorpha* (x 625); Cell grown in (b) has a few paramylon granules the same as in (c).

a: nitrogen-free medium, b: nitrate medium, c: ammonium medium

## 考察

ユーグレナの窒素源に関しては、Pringsheim (1914)が硝酸態窒素をアンモニア態窒素と同じように利用するとしただのに対して、Mainx (1928)は硝酸態窒素よりもアンモニア態窒素の方を利用するとして、両者には見解の相違が見られた。しかし、ユーグレナの無菌培養が困難であったため、どちらの見解が正しいかについては決定されないでいた。その後、Cramer and Myers (1952)は無菌培養株を用いた栄養要求実験から、*E. gracilis* var. *bacillaris*は硝酸態窒素は利用できない報告した。さらに、Huzisige and Satoh (1960)やOda *et al.* (1978)も同様に *E. gracilis* var. *bacillaris*は硝酸態窒素は利用できないことを確かめた。これらの報告から、ユーグレナは硝酸態窒素を利用できないとされてきた(北岡 1986)。しかし、ユーグレナは100種以上を含む多様な分類群で、富栄養水域ばかりではなく貧栄養水域にまで広く生息しているので、窒素源としてアンモニア態窒素だけでなく硝酸態窒素も利用できる種も存在する可能性は否定できない。そこで今回、既に硝酸態窒素を利用できないとされている *E. gracilis* と、有機物汚染があまり進んでいない湖沼などにも出現する *E. granulata* および *E. polymorpha* について、硝酸態窒素を利用できるかどうかをそれらの無菌培養株を用いて調べた。その結果、実験に用いた *E. gracilis* は従来の報告と同じように硝酸態窒素は利用できなかった。しかし、*E. granulata* および *E. polymorpha* は Figs 2-3 に示されているように nitrate 培地でも ammonium 培地のときと同様に増殖した。さらに Fig. 7 に示されたように増殖するにつれて培地中の硝酸態窒素は減少することから、この両種は硝酸態窒素を利用していることが判明した。

*E. gracilis* は無菌培養が容易であるために、ユーグレナの生理・生化学的研究に広く用いられ、ユーグレナを代表する種の1つとされているが、自然水域での出現頻度はかなり低く、生活排水が流れ込むような汚染水域にのみ出現する比較的稀な種である。今回、*E. granulata* および *E. polymorpha* の両種のような硝酸態窒素も利用できる種の存在が明らかになったことは、*E. gracilis* がアンモニア態窒素しか利用できないために有機物汚染が激しい場所でしか生息できなくなった種で、有機物汚染があまり進行していない場所に生育しているユーグレナは硝酸態窒素を利用している可能性があることを示唆している。

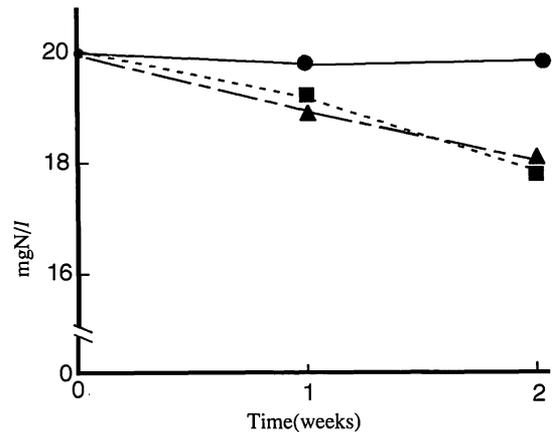


Fig. 7. Consumption of nitrogen in nitrate media by *Euglena* spp.

Symbols; ●: *E. gracilis*, ▲: *E. granulata*, ■: *E. polymorpha*

## 謝辞

本研究を進めるうえで様々なご助言を下った元日本大学生物資源学部教授の山岸高旺博士にお礼を申しあげる。

## 文献

- Cramer, M. and Myers J. C. 1952. Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 17: 384-402.
- Huzisige, H. and Satoh, K. 1960. Biochemical studies on the photochemical nitrate reduction system of green plants I. photochemical nitrate reduction by *Euglena* cells. Biol. J. Okayama Univ. 6:71-82.
- Ichimura, T. and Watanabe, M. 1977. An axenic clone of *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenkin from Lake Kasumigaura. Jpn. J. Phycol. 25:177-181.
- 加藤季夫 1982. *Colacium vesiculosum* Ehr. の培養と形態. 藻類 30:63-67.
- 北岡正三郎 1986. ユーグレナは動物か植物か. 遺伝 44:47-65.
- Mainx, F. 1928. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen. II. Untersuchungen über die Ernährungs und Reizphysiologie. Arch. Protistenk. 60: 355-414.
- Oda, Y., Miyatake, K. and Kitaoka, S. 1978. Inability of *Euglena gracilis* to utilize nitrate, nitrite and urea as the nitrogen sources. Bull. Univ. Osaka Prefec., Ser. B, 31: 43-48.
- Pringsheim, E. G. 1914. Kultureversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. II. Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Beitr. Biol. Pflanz. 12: 1-47.

(Received 6 May 2002, Accepted 5 June 2002)