

分子生物学的手法を用いたろ過漏出障害原因生物の評価

東京農業大学応用生物科学部 藤本尚志

川崎市上下水道局 藤瀬大輝

国立保健医療科学院 岸田直裕、秋葉道宏

1. はじめに

近年、湖沼・貯水池を水源とする浄水場においてピコ植物プランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている。平成19年に厚生労働省が水道事業に対して義務付けた「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」において、クリプトスポリジウム等による汚染の対応措置として、リスク判断がレベル4(クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高い)またはレベル3(クリプトスポリジウム等による汚染のおそれがある)の場合、ろ過池またはろ過膜の出口の濁度を0.1度以下に維持することが可能なろ過設備(急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等)を整備することが義務付けられている。浄水場原水のピコ植物プランクトンの細胞数が高まると、この対策指針に従って濁度0.1度以下に維持することが困難になり、浄水場では対応に苦慮している。この問題となるピコ植物プランクトンとは0.2~2 μm の大きさの植物プランクトンを指し*Synechococcus*属等の藍藻類と真核生物に属するものが含まれる。ピコ植物プランクトンはこれまで落射蛍光顕微鏡による観察における蛍光の色調により3グループに分けて検討されているが、ろ過池から漏出する種に関する知見が不足しているのが現状である。そこで本研究ではピコプランクトン対策に関する基礎的知見を得ることを目的として、相模湖等を水源とするK市A浄水場を対象とし、分子生物学的手法を用いて工程水のピコプランクトンの生物相について解析した。

2. 研究方法

2.1 供試試料

2012年2月から毎月K市A浄水場において採水した原水、沈澱水、ろ過水を用いた。処理工程に要する時間を考慮して原水、沈澱水、ろ過水の順に採水した。DNA抽出に及ぼす遊離塩素の影響を防ぐため、ろ過水にチオ硫酸ナトリウムを添加し中和した。

2.2 クローニングによる生物相の解析

真核ピコプランクトンの生物相解析はLefrancら¹⁾Richardsら²⁾に従って行った。ピコシアノバクテリアについてはIvanikovaら³⁾に従って行った。2012年2月から7月の試料は、試料を0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過し集菌を行った。9月の試料からは、ナノプランクトンの除去を目的として試料を孔径5 μm のメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過を行い、前処理を行った後、そのろ液を0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過し集菌を行った。集菌したフィルター

を裁断して 50ml 容ファルコンチューブに回収した。CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 法により遺伝子の抽出を行った。アガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の確認を行った後 PCR に供した。16S rRNA 遺伝子の PCR には 106F および 789R のプライマーペアを用い、18S rRNA 遺伝子の PCR には 3Fphp および 1749Rphp のプライマーペアを用いた。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認を行い、切り出したゲルを QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いてゲル精製を行った。精製した PCR 産物を用いて TOPO TA Cloning Kit によりクローニングを行った。得られた約 50 コロニーについてコロニー PCR により挿入部分の遺伝子を増幅し、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) 法により、グルーピングを行った。これに基づいて目視でグループ分けを行い、各グループについて塩基配列の解析を行った。クローンの塩基配列約 600 塩基もしくは 1700 塩基の前半 100~150 塩基、後半 100~400 塩基について FASTA サーチを行い、近縁種が一致するか確認を行った。一致しないものはキメラとした。その後、アライメントを行い決定した塩基配列を基に相同性検索を行った。

3. 研究結果および考察

落射蛍光顕微鏡によって観察したところ、ろ過水に存在するピコ植物プランクトンは主にピコシアノバクテリアであり、月によっては真核ピコ植物プランクトンが存在することが明らかとなった。原水におけるピコシアノバクテリア (PE-type, PC-type) は、 $10^2 \sim 10^3$ cells/ml のオーダーを推移し、2012 年 9 月に最大 6000 cells/ml となった。計数はしていないものの原水、沈澱水に $1 \mu\text{m}$ に満たない自家蛍光を有する細胞が見られた。7 月に原水の真核ピコ植物プランクトン (CH-type) が増加し 1.1×10^4 cells/ml となった。

原水、沈澱水はほぼ全ての試料において DNA 抽出および PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅が見られたが、ろ過水の試料では 3 月および 10 月試料でのみ 16S rRNA 遺伝子の増幅がみられた。これは試料中のピコシアノバクテリアの細胞数が少なく、ゲノム DNA の抽出が不十分だったためと考えられた。7 月試料までは孔径 $5 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターによるナノプランクトンの除去を行っていなかったために、ナノプランクトンの葉緑体に含まれる遺伝子が多く検出された。9 月以降の試料より、 $5 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターによる前処理を行ったため、ナノプランクトンの葉緑体に含まれる遺伝子が検出される頻度が減少した。ろ過水では、*Synechococcus* sp. MH305、Uncultured *Synechococcus* sp. clone LS51、*Synechococcus* sp. 0BB26S03、*Synechococcus* sp. LBB3 に近縁な微生物が検出され、ろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された。7 月にはろ過水中に真核ピコ植物プランクトンが多くみられたことから、真核ピコプランクトンをターゲットとした解析を行った。原水ではクリプト植物門ゴニオモナス綱 *Goniomonas* sp. ATCC 50108 に、沈澱水では繊毛虫門旋毛綱 *Tintinnidium*

balechi に、ろ過水では緑藻植物門緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンが多く検出された。*M. homosphaera* は桐生市水道局元宿浄水場のろ過水からも検出されており⁴⁾、主要なろ過漏出障害原因生物と考えられた。ろ過水から単離した球形、約 2 μm 径の緑藻綱の 18S rRNA 遺伝子を解析したところ、*M. homosphaera* であることが明らかとなった。クローニングで検出した *M. homosphaera* に近縁なクローンと相同性が 99.9%であり、クローニング結果を裏付けることができた。

A 浄水場 3 月のろ過水において *Synechococcus* sp. MH305 が検出されたが、原水、沈殿水では検出されなかった。これは、約 50 クローンの解析のため、真核生物の葉緑体に含まれる遺伝子や細菌を検出し、ピコシアノバクテリアの生物相を完全に評価できていないことや、*Synechococcus* sp. MH305 に近縁な微生物がろ過池を通過しやすいことが可能性として考えられた。ろ過水まで解析できた回数が少ないため、さらに調査を継続し知見を蓄積するとともに、次世代シーケンサーによる詳細な評価の必要性が示唆された。

4. まとめ

クローニングにより浄水場工程水の生物相解析を行ったところ複数の系統に位置づけられる *Synechococcus* 属が検出され、ろ過漏出障害の原因生物となる可能性が示唆された。さらに真核生物では緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンがろ過水から検出され、ろ過漏出障害の原因生物となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Lefranc, M., Thenot, A., Lepere, C. and Debroas, D., Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5935-5942 (2005).
- 2) Richards, T.A., Veprikitskiy, A. A., Gouliamova, D. E. and Nierzwicki-Bauer, S. A., The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages, *Environmental Microbiology*, 7, 1413-1425 (2005).
- 3) Ivanikova, N. V., Popels, L. C., McKay, R. M. L., Bullerjahn, G. S., Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4055-4065 (2007).
- 4) 藤本尚志、村田昌隆、大西章博、鈴木昌治、矢島 修、岸田直裕、秋葉道宏、分子生物学的手法による浄水場における濁度障害原因生物の解明、水道協会雑誌、82 (5), 2-10 (2013).