

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. 研究の背景 ~ピコ植物プランクトンによる障害~

水道におけるクリプトสปORIZウム等対策指針(平成19年4月1日~)

クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高い、もしくは、おそれがある場合、ろ過池等の出口の濁度を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。

原水のピコ植物プランクトン細胞数が高まると、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となる。

光学顕微鏡や落射蛍光顕微鏡による観察において、形態的な特徴に乏しく、ろ過漏出障害の原因生物は明らかとなっていない。

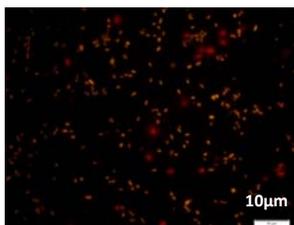
1. 研究の背景 ~ピコ植物プランクトンとは~

水域に浮遊して生息する細胞サイズ0.2~2μmの植物プランクトン
 真核生物、原核生物(ピコシアノバクテリア)に分けられる。

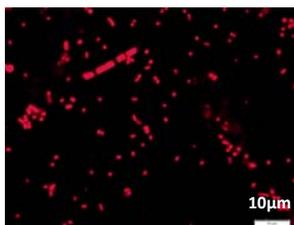
落射蛍光顕微鏡による観察における蛍光の色調

| | | B励起 | G励起 | 主要アンテナ色素 |
|--------------|---------|------|-----|----------|
| ピコシアノバクテリア | PE-type | 黄(橙) | 鮮紅 | フィコエリスリン |
| | PC-type | 暗赤 | 鮮紅 | フィコシアニン |
| 真核ピコ植物プランクトン | CH-type | 赤 | 暗赤 | クロロフィル |

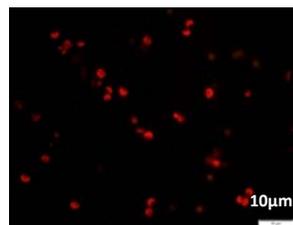
ピコシアノバクテリア(PE-type)



ピコシアノバクテリア(PC-type)



真核ピコ植物プランクトン(CH-type)



1. 研究の背景 ~Synechococcus属について~

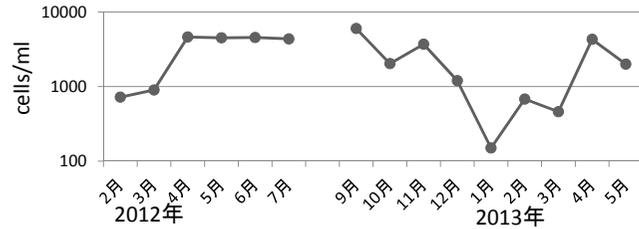
淡水産の代表的なSynechococcus属の16S rRNA遺伝子に基づく系統樹



2. 研究方法 ～調査対象～

K市 A浄水場 原水、沈澱水、ろ過水
 期間： 2012年2月～2013年5月(1回/月)

原水のピコシアノバクテリア細胞数の推移(1～2μmサイズ)



2012年2月～2013年1月までの濁度(度)

原水 1.6～5.4、平均3.0
 沈澱水 0.1～0.5、平均0.23
 ろ過水 0.01～0.04、平均0.023 (2012年9、10月0.04)

4

2. 研究方法 ～クローニング～

- ・集菌：孔径3μm、5μmフィルターによるナノプランクトンの除去、孔径0.2μmフィルターによる吸引ろ過(原水1～2L、沈澱水20L、ろ過水40L)
- ・ゲノムDNA抽出：CTAB法
- ・PCR：
 - 18S rRNA遺伝子(真核ピコプランクトン)、プライマー：3Fphp, 1749Rphp
 - 16S rRNA遺伝子(ピコシアノバクテリア)、プライマー：106F, 789R
- ・精製：アガロースゲルおよび抽出キット
- ・クローニング：増幅産物を用いて大腸菌を形質転換 (TOPO TA Cloning Kit)
- ・コロニーPCR：挿入部分の増幅
- ・グルーピング：制限酵素 *Hae* III、*Msp* I による反応 (37°C, 2h)、切断片の電気泳動
- ・塩基配列の解析：シーケンス、アライメント、相同性検索 (FASTA)、キメラチェック
- ・系統解析：近隣結合法、ベイズ法



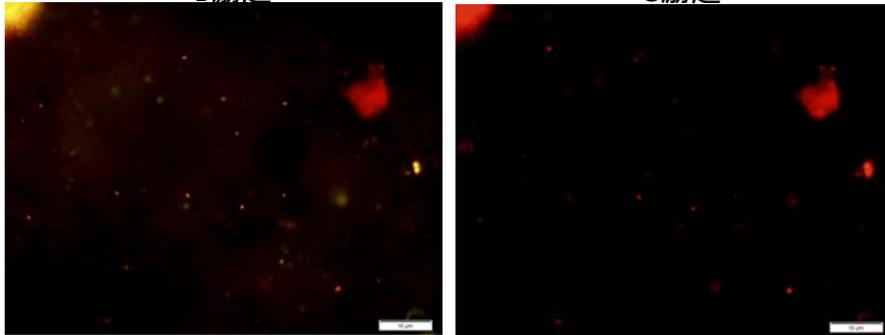
5

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真(1)

2013年1月23日 沈澱水

B励起

G励起



バーは10μm

◆1μmに満たない自家蛍光を有する細胞が観察される。

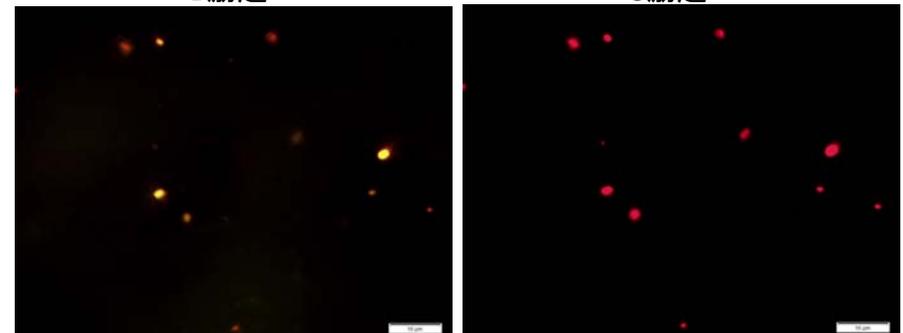
6

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真(2)

2013年4月17日 沈澱水

B励起

G励起



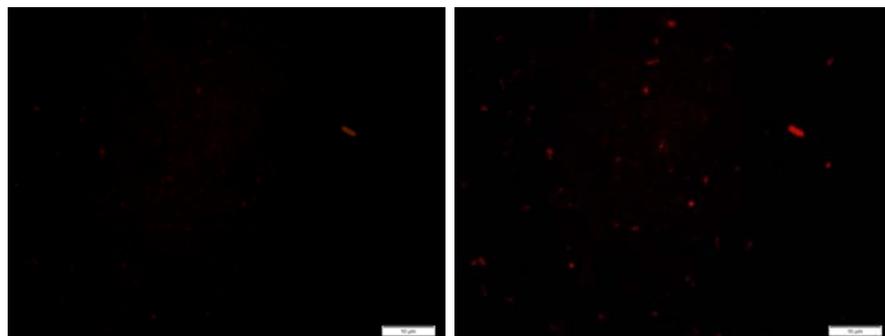
バーは10μm

◆サイズの異なるピコシアノバクテリアが存在する。

7

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真 (3)

2012年10月17日ろ過水
B励起 G励起



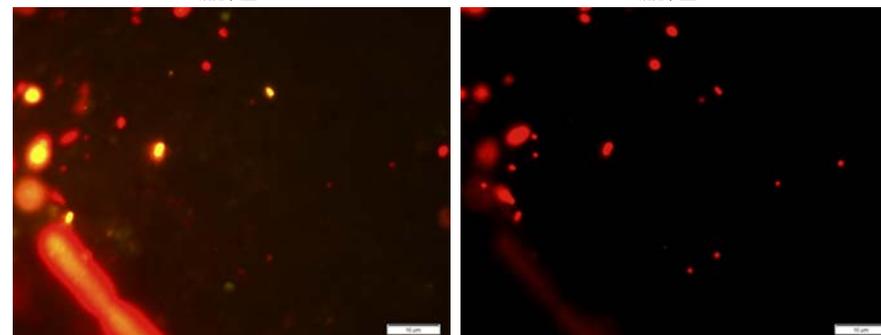
バーは10μm

◆ピコシアノバクテリアおよび自家蛍光の弱い細胞が観察される。

8

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真 (4)

2013年7月17日原水
B励起 G励起



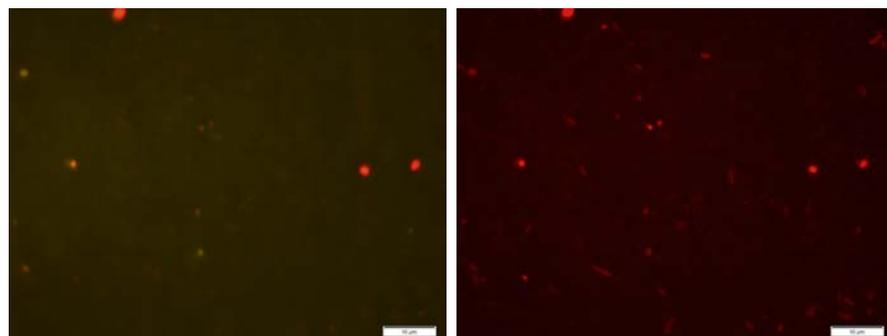
バーは10μm

◆サイズの異なるピコシアノバクテリアが存在する。

9

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真 (5)

2013年7月17日ろ過水
B励起 G励起



バーは10μm

◆ピコシアノバクテリアおよび自家蛍光の弱い細胞が観察される。

10

3. 結果 工程水クローニング結果(2012年3月27日)

| | Sequences | クローン数 | 近縁種 | 相同性(%) |
|-----|-------------|-------|--|--------|
| 原水 | RW1_MAR2012 | 10 | <i>Stephanodiscus minutulus</i> (葉緑体) | 99.3 |
| | RW2_MAR2012 | 10 | <i>Dinophysis acuta</i> (葉緑体) | 99.0 |
| | RW3_MAR2012 | 2 | <i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81 | 99.5 |
| | 細菌 | 17 | ペルコムクロビウム門 | - |
| 沈澱水 | SB1_MAR2012 | 18 | <i>Thalassiosira pseudonana</i> (葉緑体) | 98.7 |
| | SB2_MAR2012 | 8 | <i>Synedra acus</i> (葉緑体) | 99.7 |
| | SB3_MAR2012 | 8 | <i>Cryptomonas curvata</i> (葉緑体) | 99.2 |
| | SB4_MAR2012 | 7 | <i>Asterionella ralfsii</i> (葉緑体) | 99.5 |
| | SB5_MAR2012 | 6 | <i>Stephanodiscus minutulus</i> (葉緑体) | 98.9 |
| ろ過水 | F1_MAR2012 | 21 | <i>Synechococcus</i> sp. MH305 | 99.8 |
| | F2_MAR2012 | 5 | Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51 | 99.8 |
| | F3_MAR2012 | 4 | Chlorophyta symbiont of <i>Lubomirskia</i> sp. (葉緑体) | 98.9 |
| | F4_MAR2012 | 3 | <i>Thalassiosira gravida</i> (葉緑体) | 98.5 |
| | F5_MAR2012 | 1 | <i>Synedra fragilaroides</i> (葉緑体) | 98.5 |
| | F6_MAR2012 | 1 | <i>Cryptomonas curvata</i> (葉緑体) | 99.0 |
| | F7_MAR2012 | 1 | <i>Nitzschia frustulum</i> (葉緑体) | 99.7 |
| | F8_MAR2012 | 1 | <i>Pseudanabaena</i> sp. 0tu30s18 | 97.9 |
| | 細菌 | 10 | ペルコムクロビウム門 | - |

- ◆原水、沈澱水において真核生物の葉緑体に含まれる遺伝子のクローンを多く検出している。
- ◆ペルコムクロビウム門・・・本研究で用いたプライマーにより増幅する細菌。
- ◆ろ過水において*Synechococcus*に近縁なクローンを検出している。

11

3. 結果 工程水クローニング結果(2012年10月17日)

| | Sequences | クローン数 | 近縁種 | 相同性(%) |
|-----|-------------|------------|---|--------|
| 原水 | RW1_OCT2012 | 2 | <i>Dinophysis norvegica</i> strain norvCC04 (葉緑体) | 98.7 |
| | RW2_OCT2012 | 2 | <i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 | 98.2 |
| | 細菌 | 44 | ペルコミクロビウム門 | - |
| 沈澱水 | SB1_OCT2012 | 4 | <i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 | 98.5 |
| | SB2_OCT2012 | 3 | <i>Synechococcus</i> sp. MH305 | 99.2 |
| | SB3_OCT2012 | 2 | <i>Cryptomonas curvata</i> (葉緑体) | 99.2 |
| | SB4_OCT2012 | 2 | <i>Dinophysis norvegica</i> strain norvCC04 (葉緑体) | 99.0 |
| 細菌 | 37 | ペルコミクロビウム門 | - | |
| ろ過水 | F1_OCT2012 | 38 | <i>Thalassiosira gravida</i> isolate C140 (葉緑体) | 99.3 |
| | F2_OCT2012 | 6 | <i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 | 98.7 |
| | F3_OCT2012 | 1 | <i>Synechococcus</i> sp. LBB3 | 99.8 |
| | 細菌 | 3 | ペルコミクロビウム門 | - |

- ◆ 原水、沈澱水、ろ過水に共通して*Synechococcus* sp. 0BB26S03を検出している。
- ◆ 原水、沈澱水においてペルコミクロビウム門のクローンを多く検出している。

12

3. 結果 沈澱水から検出された*Synechococcus*属

| グループ名 | 代表的な株、登録配列名 | 2012年 | | | | | 2013年 | | | | | | |
|---------------|--|-------|----|----|----|----|-------|-----|-----|----|----|----|----|
| | | 3月 | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 9月 | 10月 | 11月 | 1月 | 2月 | 4月 | 5月 |
| group B | <i>Synechococcus</i> sp. MW76B2 | | ● | ● | ● | | | | | | | | ● |
| group E | <i>Synechococcus</i> sp. PS721 | | | | | ● | | | | | | | |
| group E' | <i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 | | | | | ● | ● | ● | ● | | | | |
| group H | <i>Synechococcus</i> sp. MW6B4 | | | ● | | ● | ● | ● | ● | | | | |
| MH305 cluster | <i>Synechococcus</i> sp. MH305 | | | | | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● |
| PD II | Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51 | | | | | | | | | ● | ● | ● | ● |
| Mazurian Lake | <i>Synechococcus</i> sp. MA0607K | | ● | ● | | | | | | | | | |

Ivanikova et al., Appl. Environ. Microbiol., 73, 4055-4065 (2007).
 Crosbie et al., Appl. Environ. Microbiol., 69, 5716-5721 (2003).
 Jasser et al., FEMS Microbiol. Ecol., 75, 89-98 (2011).
 Castiglioni et al., Appl. Environ. Microbiol., 70, 7161-7172 (2004).

- ◆ group H、MH305 cluster、PD II が検出される頻度が高い。

group H: オーストリアのモンド湖からの分離株等を含むグループ。宮ヶ瀬湖の優占種はこのグループに属する。

MH305 cluster: オーストリアのモンド湖からの分離株MH305を含むグループ。草木湖の優占種はこのグループに属する。

PD II: スペリオル湖から検出されたクローン(未培養の*Synechococcus*)を含むグループ。

13

3. 結果 ろ過水から検出された*Synechococcus*属

| グループ名 | 代表的な株、登録配列名 | 2012年 | | 2013年 |
|---------------|--|-------|-----|-------|
| | | 3月 | 10月 | 3月 |
| MH305 cluster | <i>Synechococcus</i> sp. MH305 | ● | | |
| group E | <i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 | | ● | |
| LBB3 group | <i>Synechococcus</i> sp. LBB3 | | ● | |
| PD II | Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51 | ● | | ● |

group E': イタリアBubano Basin からの分離株0BB26S03株を含むグループ。
 group Eに近縁である。

LBB3 group: 琵琶湖からの分離株を含むグループ。

- ◆ ろ過水まで解析できた回数が少なく、データの蓄積が必要である。

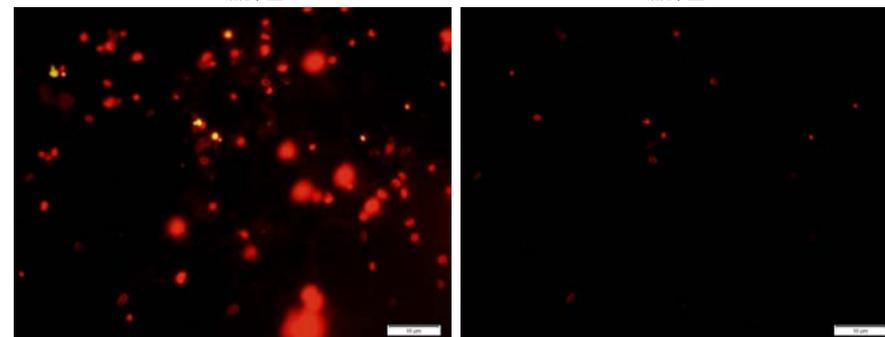
14

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真(6)

2012年7月18日原水

B励起

G励起



バーは10μm

- ◆ 真核ピコ植物プランクトンの細胞数が多い(11000cells/ml)。

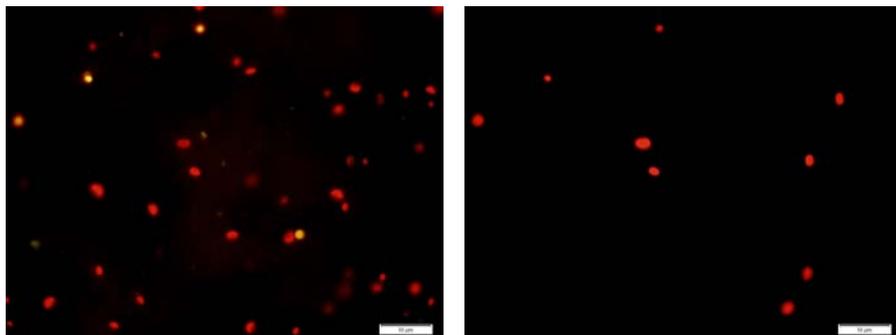
15

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真(7)

2012年7月18日沈澱水

B励起

G励起



バーは10μm

◆真核ピコ植物プランクトンが多い。

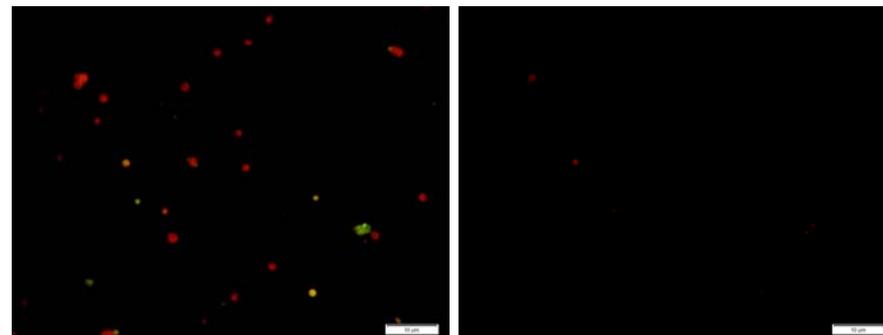
16

3. 結果 落射蛍光顕微鏡写真(8)

2012年7月18日ろ過水

B励起

G励起



バーは10μm

◆真核ピコ植物プランクトンが観察される。

17

3. 結果 工程水クローニング結果(2012年7月18日)

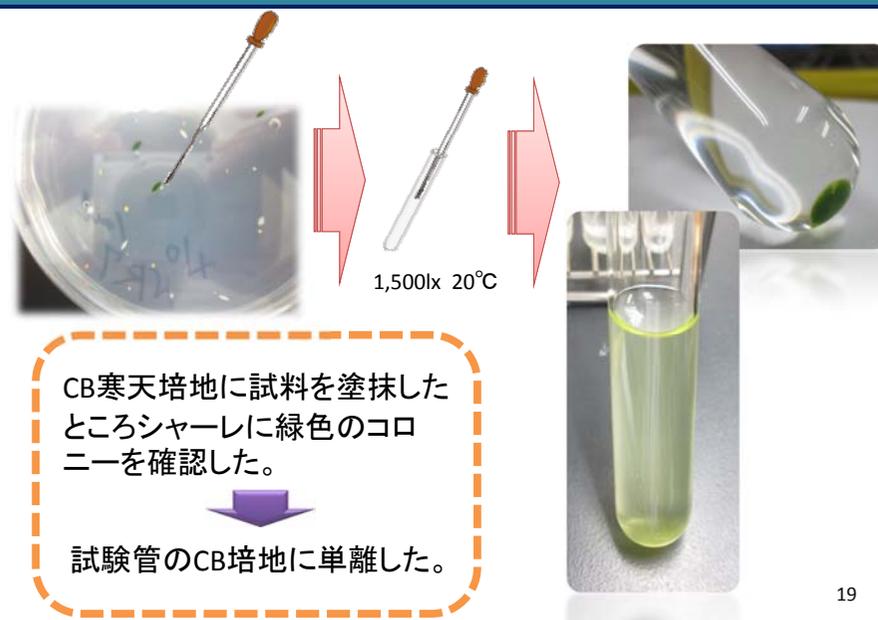
真核生物

| 門 | 綱 | 属 | 原水 | 沈澱水 | ろ過水 |
|-----------|-----------|----------------------------------|----|-----|-----|
| 緑藻植物門 | 緑藻綱 | <i>Carteria lunzensis</i> | | | ● |
| | | <i>Chlamydomonas orbicularis</i> | | | ● |
| | | <i>Mychonastes homosphaera</i> | | | ● |
| | | <i>Mychonastes zofingiensis</i> | | | ● |
| | | <i>Scenedesmus deserticola</i> | | | ● |
| クリプト植物門 | クリプト藻綱 | <i>Cryptomonas curvata</i> | | ● | |
| | | <i>Plagioselmis prolunga</i> | | ● | |
| | ゴニオモナス綱 | <i>Goniomonas</i> sp. | ● | ● | |
| カタブレファリス門 | カタブレファリス綱 | <i>Leucocryptos marina</i> | ● | | |
| ピコエカ門 | ピコエカ綱 | <i>Nerada mexicana</i> | ● | | |
| アメーバ鞭毛虫門 | サルコモナデア綱 | <i>Eocercomonas</i> sp. | ● | ● | |
| 繊毛虫門 | 前口綱 | <i>Placus striatus</i> | ● | | |
| | 旋毛綱 | <i>Tintinnidium balechi</i> | | ● | |
| | 少膜綱 | <i>Urocentrum turbo</i> | ● | | |
| 子囊菌門 | サツカロミセス綱 | <i>Candida</i> sp. | ● | | |

◆桐生市水道局元宿浄水場(2010年5月)と同様に、*Mychonastes homosphaera*がろ過水から検出された。

18

3. 結果 2012年7月18日の試料を用いた分離実験

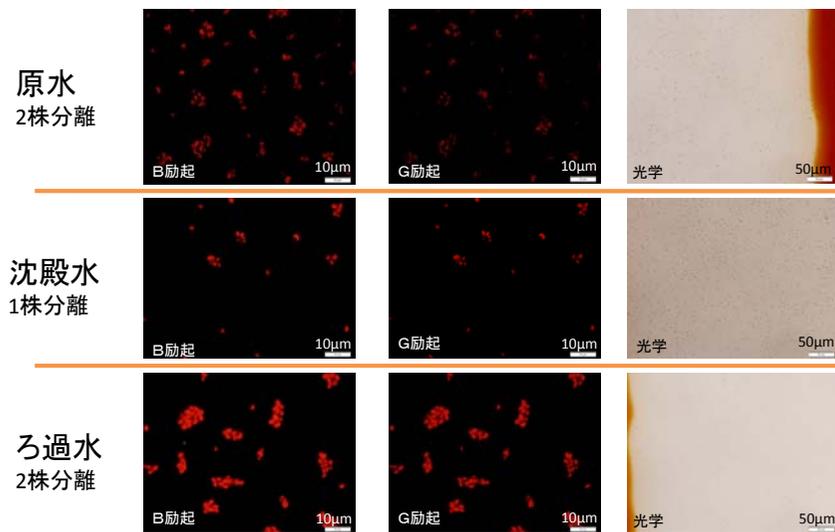


CB寒天培地に試料を塗抹したところシャーレに緑色のコロニーを確認した。

試験管のCB培地に単離した。

19

3. 結果 分離株の顕微鏡写真



20

4. まとめ

- ◆ A浄水場工程水にサイズの異なるピコシアノバクテリアが存在することが明らかとなった。
- ◆ クローニングにより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。
- ◆ 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。

22

3. 結果 分離株の18S rRNA遺伝子の解析

| 分離源 | 株名 | 近縁種 | 分類 | 相同性(%) |
|-----|------|---|-----|--------|
| 原水 | NRW1 | <i>Mychonastes homosphaera</i> (AB025423) | 緑藻綱 | 99.4 |
| 原水 | NRW2 | <i>Mychonastes homosphaera</i> (AB025423) | 緑藻綱 | 99.4 |
| 沈殿水 | NSB1 | <i>Mychonastes homosphaera</i> (AB025423) | 緑藻綱 | 99.4 |
| ろ過水 | NF1 | <i>Mychonastes homosphaera</i> (AB025423) | 緑藻綱 | 99.4 |
| ろ過水 | NF2 | <i>Mychonastes homosphaera</i> (AB025423) | 緑藻綱 | 99.4 |

- ◆ すべての株が *Mychonastes homosphaera* に近縁である。
- ◆ ろ過水から *M. homosphaera* を分離したことから、ろ過水のクローニング結果を裏付けることができた。

21

5. 今後の課題

- ◆ ろ過水の生物相データを蓄積する。生物相とろ過水濁度との関連性を検討する。
- ◆ 葉緑体に含まれる遺伝子や、細菌が多く検出されることがあり、ピコシアノバクテリア生物相を評価できないことがある。(前処理やPCR条件の変更により対応)
- ◆ 主要なろ過漏出障害の原因生物については、水源における消長を明らかにする。
- ◆ 次世代シーケンサーによる生物相の詳細な評価を行う。

23