

B-29

起源の異なる印旛沼溶存有機物に対する微生物群の利用特性

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

○春日郁朗

同上

中島典之

同上

古米弘明

1. はじめに

水道水源として機能する湖沼・ダム湖の水質管理にとって、水道水質に様々な障害を引き起こす溶存有機物の特性・動態を把握することが求められている。これまでの溶存有機物の特性評価には、CODを始めとする化学的評価手法が適用されてきた。しかし、湖沼水中の有機物の特性やその動態を考えるためには、発生源から湖沼への流入・滞留過程における生物学的な分解・変換作用に着目することも重要である。従来の生物学的な視点からの有機物評価は、BODやBDOCなどの包括的な観点に留まってきた。湖沼への有機物負荷としては、流入河川由来の外部負荷と、藻類・水生植物や底泥に由来する内部負荷がある。これらの起源の異なる有機物のある成分に対して、特定の微生物群が特徴的な利用特性を示すのであれば、それを応用することによって、生物学的な視点から溶存有機物の起源や特性、さらには湖沼内での動態を評価することが期待できる。本研究では、そのための基礎的な情報を得ることを目的として、千葉県印旛沼において回収した起源の異なる有機物を同湖沼水に添加して、実際にどのような変化が微生物群に生じるのかをPCR-DGGEによってモニタリングした。また、各有機物添加系列に現れた特徴的なDGGEバンドに対応する細菌を単離することも試みた。

2. 実験方法

2.1. 実験系列の設定

1l三角フラスコを用いて対照系を含むR1からR6までの室内実験系を用意し、同一の湖水に5種類の異なる有機物を添加した。湖水は2003年6月に印旛取水場から採取し、大型藻類や微小後生動物の影響を除外するために、孔径 $10\mu\text{m}$ のフィルター（オムニポアメンブレン、Millipore）でろ過してから実験に供した。R1からR3には、2003年1月に印旛沼流入3河川からRO膜（Helicon R04, Millipore）を用いて濃縮・凍結保存した溶存有機物を添加した。R4には、2002年12月に印旛沼沿岸から採取したアシと湖水を密封し、暗所・室温で6ヶ月間静置して準備したアシ腐植質のろ液を添加した。サンプリング地点をFig.1に示した。R5にはアシ腐植質との比較という観点から、市販フミン酸（和光純薬 Catalog No. 088-04622, Lot No. TWH6994）を添加した。これらの添加有機物はろ過滅菌して（ $0.2\mu\text{m}$ フィルターユニット, Nalgene）、培養開始時のDOCが、R1を除きおよそ湖水DOC+ $5\text{mgC}\cdot\text{l}^{-1}$ になるように調整した（Table 1）。R6は、湖水のみの対照系である。これらの三角フラスコにシリコセンをした後、 25°C 、暗所で培養を行った。一日一回攪拌する以外は静置して、添加直後（初日）、1日後、2日後の経時変化を調べた。

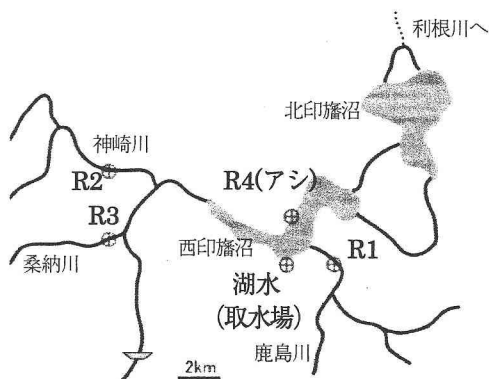


Fig.1 印旛沼サンプリング地点

Table 1 培養開始時における各系列のDOC組成

系列	添加有機物	湖水由来DOC ($\text{mgC}\cdot\text{l}^{-1}$)	基質由来DOC ($\text{mgC}\cdot\text{l}^{-1}$)	初期DOC ($\text{mgC}\cdot\text{l}^{-1}$)
R1	鹿島川	2.3	5.9	8.1
R2	神崎川	2.8	7.6	10.4
R3	桑納川	2.5	8.5	11.0
R4	アシ腐植質	3.1	7.3	10.4
R5	市販フミン酸	3.1	6.7	9.8
R6	未添加対照系	4.5	—	4.5

2.2. 測定方法

PCR-DGGEについては、試料100mlを孔径0.2 μ mのポリカーボネート製フィルター（アイソポアメンブレン、Millipore）でろ過し、菌体をフィルター上に回収した。DNA抽出にはFastDNA Kit for soil（Qbiogene）を用い、357fGCおよび518rプライマーを用いて真正細菌の16SrDNAのV3領域を増幅した。DGGEの条件は既報¹⁾に準じた。代表的なバンドについては、QIAGEN PCR Cloning Kit（QIAGEN）を用いてPCR産物を分離し、DGGEで位置を確認した後、ABI310/3100-Avant（Applied Biosystems）によって配列を決定した。サイクルシーケンシング反応にはBigDye Terminator Cycle Sequencing kit ver. 3.1（Applied Biosystems）を用いた。

単離については、滅菌湖沼水で 10^1 - 10^5 倍希釈したフラスコ培養試料100 μ lをR2A平板培地に塗布した。培養は25℃、暗所で7日間行い、コロニーが現れた最大希釈列から色・形態の異なるコロニーを採取した。単離したコロニーは、コロニーダイレクトPCRによって、16SrDNAのV3領域を増幅し、配列に基づいてスクリーニングを行った。

3. 結果及び考察

培養開始1日後と2日後のPCR-DGGEの分析結果をFig.2に示した。有機物を添加していない対照系R6の培養開始時のサンプル（湖水）も比較のために同時に分析した。番号を付したバンドについては、相同性検索の結果をTable 2の左側にまとめ、原則として既知種の中から最近縁配列を有する細菌を示した。また、Table 2の右側には、各DGGEバンドの配列とのミスマッチが5塩基以下の配列を有する単離株について、どの系列のどの時点から単離されたかを示した。

対照系であるR6では、培養開始直後から2日後までのバンドパターンに大きな変化はない。また、市販フミン酸を添加したR5についても、R6とはほぼ同様のバンドパターンを示し、培養に伴う変化は見られなかった。市販フミン酸は生分解性が低く、短期の培養では微生物群に影響を与えることはないと推察される。

R1-R4では1, 2日という短期にもかかわらず、特徴的な挙動を示すバンドが確認された。1日後には、湖水由来のバンドの多くが引き続き現れているが、バンド1（*Aquaspirillum* sp.の配列に近縁）などは強度が顕著に強くなった。バンド3（*Sphingobacterium* sp.の配列に近縁）、5（*Methylophilus* sp.の配列に近縁）、17（*Aquaspirillum* sp.の配列に近縁）は、有機物の添加に伴って共通して現れたバンドである。*Methylophilus* 属（バンド5の配列に近縁）はC-1化合物を資化する特性を有していることが知られている。バンド17は特にアシの腐植質を添加したR4において明瞭に現れているが、R6の2日後にも確認される。R1-R3には異なる流入河川から回収した有機物を添加したにもかかわらず、バンドパターンの変化が類似していたことから、この時期の外来性有機物を初期に利用する細菌群には共通性があることが推察される。単離の結果、バンド1, 17の配列と同一の配列を有する株は得られたが、バンド3, 5に対応する株は得られなかった。バンド1に対応する株は、R1-R4からは単離されず、R6の初日、1日後から単離された。バンド17に対応する株はすべての系列から単離された。1日後のR4では、R1-R3には見られないバンド15（*Acinetobacter* sp.の配列に近縁）、18（*Acidovorax* sp.の配列に近縁）などが現れた。これらは、特にアシ腐植質に応答した細菌群に由来していると考えられることから、供給される有機物に対応して特定の微生物群が代謝を担っていることが示唆された。バンド15に対応する株は、確かにR4の1日後、2日後から単離されたのに対し、バンド18に対応する株はR4からではなく、R1, R2の1日後の試料から単離された。

培養2日後には、R1-R3において新たにバンド20（*Herbaspirillum* sp.の配列に近縁）が現れた。バンド20に対応する株は、R2の2日後から単離された。またバンド21（*Desulfomonile* sp.の配列に近縁）は、特にR1に現れており、R2, R3とは異なる挙動を示したが、単離はされなかった。R4では、新たにバンド30（*Pseudomonas* sp.の配列に近縁）、31（*Hydrogenophaga* sp.の配列に近縁）が現れており、1日後に特徴的に現れたバンド17や18とは出現パターンに差異があるものの、17, 18, 30, 31は、すべて β -*Proteobacteria*のComamonadaceae科に属する細菌群の配列に近縁であるという特徴を示した。バンド30に対応する株は単離されなかった。バンド31に対応する株は、DGGEで検出されたR4からではなく、R1の2日後から単離された。単離とDGGEの結果との間に整合性が見られない場合があることの理由としては、コロニー形成能やPCRバイアスといったそれぞれの手法上の差異が考えられる。

Table 2 DGGE バンドの相同性検索の結果と単離株の関係

PCR-DGGE				R2A 培地による単離
バンド	最近縁種	分類	相同性 (%)	単離された系列 (日)
1	[AF321032] <i>Aquaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	98	R6 (0,1)
2	[AJ289885] <i>Limnobacter thiooxidans</i>	β -Proteobacteria	95	
3	[AF427161] <i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium</i>	92	
4	[AF250333] <i>Methylophilus leisingerii</i>	β -Proteobacteria	92	R1 (2), R3 (1)
5	[AF250333] <i>Methylophilus leisingerii</i>	β -Proteobacteria	92	
6	[AJ505863] <i>Herbaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	98	
7	[X93019] <i>Polynucleobacter</i> sp.	β -Proteobacteria	95	R6 (1)
8	[AF321032] <i>Aquaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	98	
10	[AY152824] <i>Schlegelia</i> sp.	β -Proteobacteria	97	
11	[Y14597] <i>Nostocoida limicola</i>	Actinobacteria	93	R4 (1,2)
12	[AB098589] <i>Paracoccus</i> sp.	α -Proteobacteria	97	
13	[Y14597] <i>Nostocoida limicola</i>	Actinobacteria	93	
15	[X81663] <i>Acinetobacter johnsonii</i>	γ -Proteobacteria	100	R1 (2), R3 (1), R6 (1)
16	[AF321032] <i>Aquaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	100	
17	[AF078756] <i>Aquaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	98	
18	[Y18617] <i>Acidovorax</i> sp.	β -Proteobacteria	96	R1 (1), R2 (1)
20	[AJ505863] <i>Herbaspirillum</i> sp.	β -Proteobacteria	96	
21	[M26635] <i>Desulfomonile tiedjei</i>	δ -Proteobacteria	97	
29	[AF38908] <i>Methylophilus leisingerii</i>	β -Proteobacteria	94	R1 (1,2), R2 (1,2), R3 (1,2), R4 (1), R5 (1,2), R6 (0,1,2)
30	[AB077038] <i>Pseudomonas spinosa</i>	β -Proteobacteria	98	
31	[AF078768] <i>Hydrogenophaga</i> sp.	β -Proteobacteria	93	

4. 結論及び今後の展望

千葉県印旛沼流域から回収した起源の異なる有機物を湖沼水に添加し、2 日後までの微生物群の変化を追跡した結果、以下の結論を得た。

- 異なる流入河川水有機物を添加した R1-R3 では、DGGE のバンドパターン変化が類似していたことから、外来性有機物に対する初期の微生物群の利用には共通性があることが推測された。
- アシの腐植質を添加した R4 では、河川水有機物の系列とは異なるバンド (*Comamonadaceae* 科の細菌の配列に近縁) が確認され、有機物の種類に応じて特定の細菌が代謝を担うことが示唆された。
- 市販フミン酸を添加した R5 の DGGE バンドパターンは、対照系の R6 と大きな差異がなく、短期間では微生物群に影響を与えないことがわかった。
- R2A 培地による単離を行った結果、特徴的な挙動を示すバンド 1, 15, 17, 18, 20, 31 などに対応する細菌が単離されたが、単離された系列は DGGE の結果とは整合していないものがあつた。

今後は、これらの単離株や培養可能な近縁細菌の代謝特性を調べることで、湖沼有機物の特性・動態を生物学的な観点から調査していく予定である。

参考文献

- 春日郁朗, 中島典之, 古米弘明 (2001) PCR-DGGE による津久井湖における藻類を含む微生物群集構造の季節変動解析, 水環境学会誌, 24, 856-864

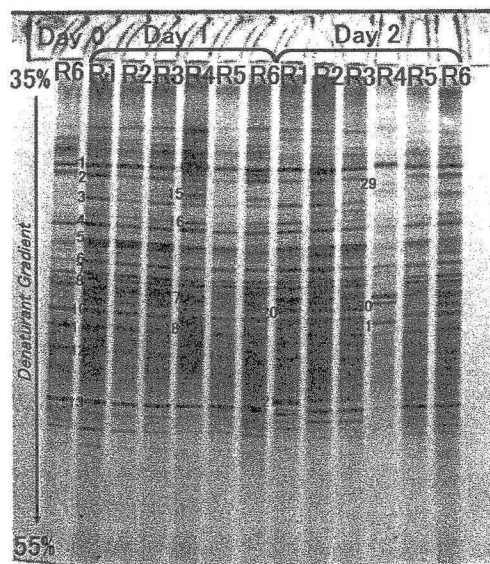


Fig.2 各系列 DGGE バンドパターンの 2 日後までの変化