

B-11 多賀城市内の水環境に生息する 細菌捕食性原生動物の単離および解析

○千葉 峻¹ 中村寛治^{1,2*}

¹東北学院大学大学院工学研究科（〒985-8537 宮城県多賀城市中央一丁目13-1）

²東北学院大学工学部環境建設工学科（同上）

* E-mail: knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

1.はじめに

自然界の水環境に特定細菌を放出すると、土着の原生動物によって速やかに捕食されることが、これまで我々の研究から明らかとなっている¹⁻³⁾。出現した原生動物の多くは鞭毛虫に分類される *Spumella* 属であり、本微小真核生物が、放出された細菌の消長に大きな影響をおよぼすと推察される。これまでの研究では、広瀬川河川水を代表的な水環境として、河川水に特定細菌を添加して研究を進めた。そこで、本研究では、異なる水環境でも、特定細菌を添加した場合、同様の微小真核生物が添加細菌を捕食、優占化するか否かを調査するため、多賀城市内の加瀬沼とその周辺の河川水を採取し、捕食実験を行った。優占化した原生動物は、希釈法による純化を行い、18S rRNA 遺伝子を基に種類を特定した。また、捕食における温度の影響も検討した。

2. 実験方法

(1) 河川水および湖沼水の採水

2010 年 8 月 23 日に図 1 に示す多賀城市内の 4 ヶ所の採水地点(St1: 加瀬沼, St2: 加瀬沼水門, St3: 勿来川, St4: 砂押川) から採水を行った。採水時、水温のみを測定し、pH、電気伝導度、TOC は実験室に検水を持ち帰って、8 時間以内に測定した。TOC は島津製作所の全有機炭素計 (TOC-VCSN) で測定した。

(2) 捕食実験および原生動物の単離

採取検水に *Cupriavidus necator* KT-1 株 (以下、KT-1 株) を添加し、捕食実験を行った。捕食実験に利用した KT-1 株は LB 培地で 30℃にて一晩振とう培養 (200rpm) した。本培養液を 11,100×g, 5 min, 4℃で集菌し、上澄みを捨て、無機培地

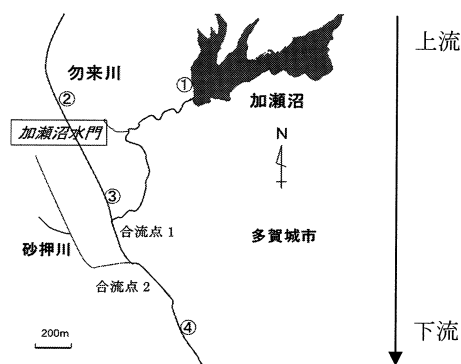


図 1 加瀬沼周辺域の採水地点

表 1 各地点の水質データ

採水地点	St1	St2	St3	St4
水温(℃)	29.1	29.4	29.2	28.5
pH	7.33	7.72	7.60	7.63
電気伝導度 (mS/m)	21.0	32.7	28.7	26.4
TOC(mg/L)	6.1	7.0	6.0	5.5

Nutrient broth soyotone yeast extract inorganic basal medium (NSY-IB)⁴⁾ に懸濁させた。同様の操作を 2 回繰り返して細菌を洗浄、その後、一晩振とう培養 (180rpm, 20℃) し、捕食実験に使用した。捕食実験では、滅菌試験管に 4.85mL のサンプルを入れ、600nm で吸光度 (A_{600}) が約 0.2 になるように、調整した KT-1 株 0.15mL を添加し、振とう培養 (180rpm, 20℃) を行った。吸光度はタイテック社製、Mini photo 518R で計測し、初期値の 20% 以下に低下した時点で次の操作に移った。光学顕微鏡 (ZEISS 社製 Axio Imager.A1) により

優占化した原生動物を確認した後、希釈法によって純化を行った。捕食後の培養液から NSY-IB を使って 10 倍ごとに希釈液 ($10^1 \sim 10^6$ 倍希釈) を作成した。本希釈培養液 0.1mL を前述のように調整した KT-1 株懸濁液 4.9mL ($A_{600}=0.2$) に分注した。希釈倍数ごとに 3 本を用意し、捕食実験同様に振とう培養を行った。その後、吸光度が低下し、原生動物の増殖が確認できた最大希釈域の培養液を選出し、本操作を繰り返した。純化は 3 回繰り返した。純化した原生動物から既報¹⁾の論文に従い、DNA を抽出した。また、純化の確認を行うため、既報の論文に示す手順に従って Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 解析を行った²⁾。プライマーは 5' 末端を 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) で標識した Ek-SSU-83f と 5' 末端を 2',7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) で標識した Ek-SSU-1763r を利用した²⁾。

(3) 単離原生動物の 18S rRNA 遺伝子解析

単離原生動物の抽出 DNA をテンプレートに、蛍光標識をしていない Ek-SSU-83f と Ek-SSU-1763r のプライマーペアを利用して 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅²⁾、マイクロスピナラム S-300 HR (GE Healthcare 社製) でプライマーを除去し、PCR 産物をそのまま使用し、上記の 2 種類のプライマーに加えて、4 種類のユニバーサルプライマー、Ek-SSU-558f, Ek-SSU-1253f, Ek-SSU-551r, Ek-SSU-1254r²⁾を利用して塩基配列を決定した。DNA シーケンシング用試薬、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 社製) により、添付マニュアルに従って反応、処理を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) で両方向の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データは、インターネット上で National Center for Biotechnology Information (NCBI) に送付、近縁種を決定した。

(4) 捕食におよぼす温度の影響

単離した原生動物の捕食におよぼす温度の影響を検討した。上記 2・(2) に従い、 A_{600} を 0.2 に調整した 5mL の KT-1 株懸濁液を準備した。本懸濁液に、単離原生動物を添加し、実験に使用する原生動物の前培養を行った。続いて、前培養液 10 μ L を、新たな KT-1 株懸濁液 ($A_{600}=0.2$) に分注し、180 rpm で振とう培養を行なった。培養温度は 10, 20, 30, 40℃ の 4 段階に変化させた。吸光度 (A_{600}) が初期値の 20% 以下に低下した時点で、光学顕微鏡で原生動物の増殖を確認した。

3. 結果および考察

(1) 原生動物の純化の確認

純化操作を終了した各々の原生動物の抽出 DNA を基に T-RFLP 解析を行った。1 種類の原生動物が単離できた場合、ピークが 1 本だけ出現する。希釈法によって St1~3 から純化された 3 種類の原生動物の T-RF プロファイルを図 2 に示す。全て 1 本のピークであり、単離できたことが分かる。これらは Ptz-K1, Ptz-K2, Ptz-K3 とした。St4 に関しては 2 本の T-RF ピークが検出されたので純化できていないと判断した。

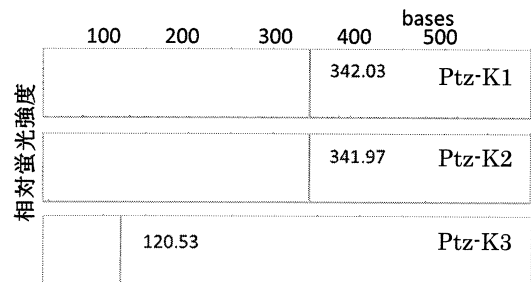


図 2 単離原生動物の T-RF プロファイル

(2) 単離原生動物の系統学的分類

18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析後、NCBI の Blast により、データベース上の近縁種を調べた。Ptz-K1, Ptz-K2 は *Spumella*-like flagellate strain JBC07 に対し 100% の相同性を示した。広瀬川河川水で KT1 株を被食細菌として用いた捕食実験では、同一の 18S rRNA 遺伝子を有する *Spumella* 属の鞭毛虫の出現が確認されており¹⁾、この種類の鞭毛虫は河川水域に広く分布すると推測する。Ptz-K3 は *Neobodo designis* strain HFCC308 と 99% の相同性であった。本原生動物に近縁な原生動物も、過去、広瀬川で観察している³⁾。図 3 に Ptz-K1, Ptz-K2, Ptz-K3 の写真を示す。Ptz-K1 と Ptz-K2 は 2 本の不等長べん毛を持つ。Ptz-K3 は他の単離原生動物よりべん毛が長く動きが活発であった。

この様に 3 株の単離原生動物は過去に広瀬川で確認された原生動物と近縁であり、加瀬沼周辺の水域でも、これらの鞭毛虫が河川に添加された外来の細菌を優先的に捕食すると推測される。

表 1 に示すように、St1~4 の TOC 濃度は 5.5~7.0 mg/L と比較的高い。広瀬川の TOC 濃度はこれまでの分析結果から概ね 1~3 mg/L の範囲にあることを確認している (データ示さず)。この程度の水質の差は、生息する原生動物の種類に大きな影響を与えていないと推察する。

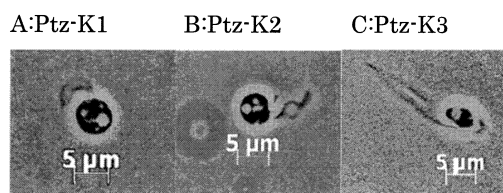


図3 単離された3株の原生動物

(3) 捕食におよぼす温度の影響

Ptz-K1, Ptz-K2, Ptz-K3 による KT-1 株の捕食を 10℃～40℃の範囲で検討した結果を図 4～7 に示す。縦軸は吸光度 (A_{600}) で、吸光度の低下により、原生動物によって捕食されたか否かが判断できる。各図の Control (図中 Cont) は原生動物無添加系である。細菌の吸光度の自然減衰を表しており、極めて小さいことがわかる。10℃から 20℃, 30℃と温度が上昇するにつれて、捕食速度が上昇していることが分かる。40℃ (図 7) で捕食が観察されたのは、Ptz-K2 のみであり、他の原生動物は捕食せず、吸光度の低下は見られなかった。40℃に関しては、実験を 2 度繰り返して行ったが、同じ結果となった。

今回の実験から、原生動物の捕食は温度により影響を受けることが確認できた。実験を行った温度範囲では、Ptz-K1, Ptz-K3 は 30℃で最大の捕食速度を示し、40℃では捕食増殖できないと推察される。しかしながら、Ptz-K2 は 40℃まで捕食速度は上昇し、限界は 40℃以上であると判断でき、さらに高温の実験を行う必要がある。

Ptz-K1 と Ptz-K2 は 18S rRNA 遺伝子は同一であるが、温度影響の結果に差があり、異なる原生動物と考える。今後は、ITS (Internal transcribed spacer) 配列のような、より解像度の高い DNA 塩基配列を調査し、分別できるようにすることが必要となる。

4. 結論

多賀城市内の加瀬沼周辺域の 4 ヶ所のサンプリングポイントから、KT1 株を被食細菌として利用し、3 株の原生動物の単離に成功した。18S rRNA 塩基配列の解析を行い、単離した原生動物は Ptz-K1, Ptz-K2 は *Spumella* 属、Ptz-K3 は *Neobodo* 属に近縁であることが明らかとなった。また、これら原生動物の捕食挙動を調査した結果、2 種類の原生動物 Ptz-K1, Ptz-K3 に関しては、30℃で捕食速度が最も高くなり、一般的な水環境に生息する細菌と大きな差がないことが明らかとなった。

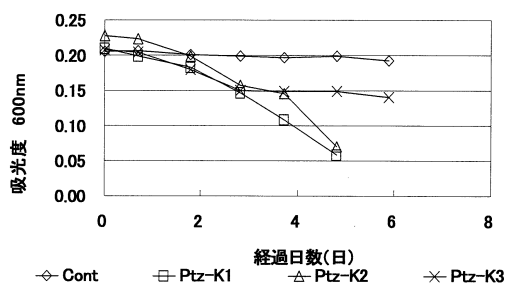


図4 捕食実験－10℃

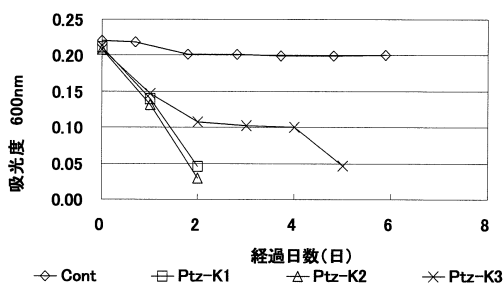


図5 捕食実験－20℃

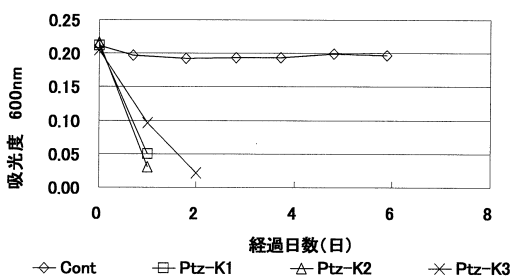


図6 捕食実験－30℃

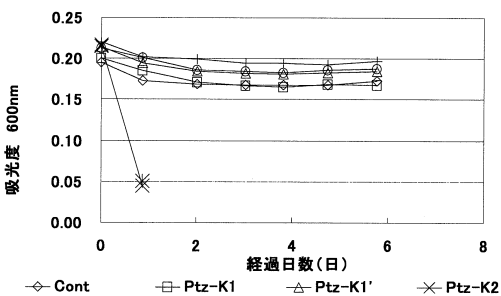


図7 捕食実験－40℃ (2回繰り返し)

参考文献

- 1) 榊ら:環境工学研究論文集,第 45 巻,203-210,2008
- 2) 須藤ら:環境工学研究論文集,第 46 巻,511-219,2009
- 3) 須藤ら:環境工学研究論文集,第 47 巻,85-91,2010
- 4) Martin et al: Apple Environ. Microbiol. 69, 1443-145