

「細菌叢と生物叢を指標とした新規河川環境評価法の確立」

有明高専創造工学科 内田雅也、富永伸明

株式会社フレッシュ・ウォーター三池 丸山 勉、吉田亮介、石橋幸介

Masaya Uchida, Nobuaki Tominaga (National Institute of Technology, Ariake College)

Hiroshi Maruyama, Ryosuke Yoshida, Kosuke Ishibashi (Freshwater Miike K.K)

1. はじめに

環境変化に伴う河川中の食物連鎖の底辺にある細菌叢の変化は、食物連鎖の上位に存在するプランクトンや藻類に影響し、最終的には魚類などに影響を及ぼすことが予想される。しかし、これまで水質と細菌叢及び生物叢は各々独立した調査が主であり、それらの詳細な関連性については不明な点が多い。現在、河川環境の管理・評価には生物調査が行われているものの費用や労力等の課題があることから、環境水を採取しDNAを分析することで対象水域の生物叢を推定できる環境DNA技術が着目されている。そこで本研究では、環境DNA技術を導入し、生物叢の調査を行うとともに、16Sメタゲノム解析技術による細菌叢調査も行うことで、それらの関連性について検討し、新規河川評価手法を確立することを目的とした。なお、上水用河川の管理において藻類の異常発生等は悪臭やポンプの目詰まり、水道水の異臭味の原因であることから、生物叢の中でも藻類を中心に生物叢調査を実施した。

2. 方法

2.1 採水

福岡県大牟田市において主に上水用河川である諏訪川(関川)を対象に、上流から下流にかけて3地点から隔月毎に採水を行った。採水地点はそれぞれ、上流は、南関浄化センター付近の関下、中流は、南関町立第二小学校付の上長田、下流は、日の出前ポンプ所の取水地として採水を行った。採水日は2018年6月19日、2018年8月28日及び2018年10月25日であった。また、今回は、2018年9月18日に株式会社フレッシュ・ウォーター三池内の凝集沈殿槽の流入口、沈殿槽入口及び沈殿槽出口において採水も実施した。

2.2 DNA抽出

上記で採水した河川水を0.7µmのフィルターで濾過を行い、PowerSoil DNA Isolation Kit(MO BIO社)DNAを用いて、フィルターから生物叢解析用ゲノムDNAを、濾液から細菌叢解析用ゲノムDNAを抽出した。

2.3 cDNAライブラリーの合成

河川水サンプルから抽出したゲノムDNAを鋳

型として、生物叢(藻類)の増幅領域を18S rRNA-v9、28S rRNA、ITS-1及びITS-2とし、細菌叢の増幅領域を16SリボソームRNA遺伝子のV2/V3/V4/V6-7/V8/V9の領域とし、PCRによる増幅を行った。得られたPCR産物を電気泳動にて確認し、目的断片サイズを100~400bpとしてバイオラプターを用いて断片化を行った。断片化後、精製を行いシーケンス用サンプルとした。

2.4 メタバーコーディング解析

Ion Plus Fragment Library Kit(Thermo Fisher Scientific社)を利用してアンプリコンの両末端にバーコードアダプターとシーケンシングアダプターを結合させ、ライブラリー増幅用PCRプライマーによってアンプリコンを増幅することで、シーケンシング用サンプル(シーケンスライブラリー)を作製した。その後、シーケンスライブラリーの最終濃度がそれぞれ8pMになるように調製し、Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit(Thermo Fisher Scientific社)を用いてエマルジョンPCRによるアンプリコンの更なる増幅及びシーケンスビーズへの固定を実施した。シーケンスランの実施は、Ion PGM System/Ion 316 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific社)/Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific社)を利用して行った。

2.5 藻類叢及び細菌叢の同定

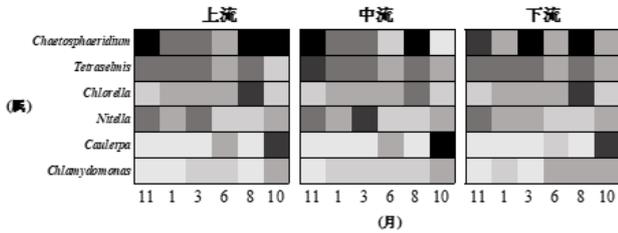
それぞれのサンプルのシーケンシングから得られた配列データをCLC Genomics Workbench Ver.10.1.1(QIAGEN社)を用いてアセンブリ後、公共のデータベースであるNCBI(The National Center for Biotechnology Information)からインポートした藻類及び細菌叢のデータと配列を照合して同定した。これにより、各地点、各季節の生物叢(藻類)及び細菌叢の変化の可視化を行った。

3. 結果と考察

3.1 生物叢(藻類)の地点・季節毎の変化

得られた配列データから生物叢を同定し、特定した諏訪川河川中における藻類の主要な6種としてChaetosphaeridium属、Tetraselmis属、Chlorella属、Nitella属、Caulerpa属、Chlamydomonas属を選定することが出来た。これら主要6種の同一地点における季節変化を調べるためにシーケンスの

総リード数を元に半定量解析を行った。算出した定量値から、定量値が多いものに濃い色、少ないものに薄い色を用いた濃淡で可視化を行った図を、



以下の図 1 に示す。

図 1. 生物叢(藻類)の各地点での季節毎の変化

半定量解析の結果、*Chaetosphaeridium* 属は、全地点において 11 月から 1 月にかけて減少、梅雨の時期である 6 月においてさらに減少し、夏季の 8 月にかけて増加する傾向が見られた。これは、11 月から 3 月にかけては気温の低下により減少し、再び温度上昇により増加したのではないかと考えられた。また、*Chaetosphaeridium* 属は水田に多く存在する淡水藻類 7) であるため、田植えにおいて生育管理期間である 7~9 月にかけて増加したのではないかと考えられた。*Tetraselmis* 属は、梅雨の時期である 6 月にかけてやや減少傾向にあったものの、全区域において大きな差は見られなかった。*Nitzschia* 属は、梅雨の時期にかけて大幅に減少する傾向にあった。これらの藻類が 6 月に減少した理由として、降水量が関係していると考えられた。

3.2 浄水場における沈殿処理による変化

3.1 で述べた藻類は、浄水場での沈殿処理において除去できれば問題無いと考えられる。しかし、沈殿しやすい藻類は除去できる為、後にポンプの目詰まりといった異常を引き起こす可能性は少ないが、沈殿しにくい藻類は、後の工程においてポンプの目詰まりといった異常を引き起こす可能性がある。そこで、各沈殿槽において検出された藻類及び諏訪川における主要な藻類が除去処理できているかどうかを確認する為に各沈殿槽における検出数の変化を調査した結果、*Caulerpa* 属は源流、最初沈殿槽、最終沈殿槽、全てにおいて多く検出された事から、凝集沈殿処理による除去が困難であると考えられ、夏季から 10 月にかけては浄水場としての注意が必要であると考えられた。

3.3 細菌叢の地点・季節毎の変化

諏訪川における主要な細菌叢は *Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Actinobacteria* 門、*Cyanobacteria* 門、*Crenarchaeota* 門の 5 種であった(図 2)。生物叢(藻類)と同様に半定量解析を行った結果、細菌叢の存在量は冬より夏に増加する傾向があり、季節による変動がみられることが確認できた。また、中流や下流に増加する傾向がみられる細菌叢がみられたことから、流域に存在する病院や畜産からの排水に加え、生活排水が原因である可能性が考

えられた。主要な 5 種のうち全体の半分近く割合を占めている *Proteobacteria* 門は自然界における炭素固定、窒素固定に関わる菌や有機物の分解に関与する菌も含む系統群である。これらは国内の河川において多く存在し常在することが知られており、諏訪川においても主要な系統群であることが分かった。*Bacteroidetes* 門はヒトなどの腸内細菌由来の系統群であり、日和見感染菌(*Flavobacterium hercynium*)などの病原性菌も見つかった。これら病原性菌には薬剤耐性を持つ菌も存在することが知られており、諏訪川における薬剤耐性菌の汚染が懸念された。*Bacteroidetes* 門の量の変化をみると下流で増える傾向にあり、生活排水や流域に存在する病院排水などに起因するものではないかと考えられた。以上の結果から、河川の細菌叢は河川環境を反映し河川管理における鋭敏な指標になり得ると考えられた。

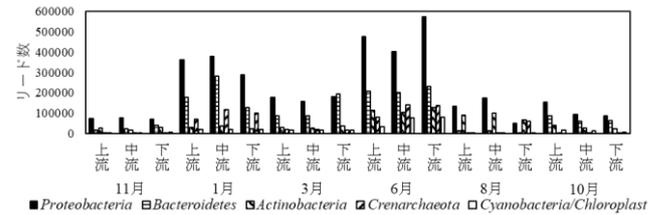


図 2. 細菌叢主要 5 種の地点・季節毎の変化

4. まとめと今後の予定

今回、生物叢及び細菌叢解析技術を利用することで河川水を定期的にモニタリングすることで主要な藻類及び細菌叢を同定することが出来た。これらは河川の状況を反映しており、河川環境を評価する上で重要な種であると考えられた。今後もモニタリング調査を継続することで河川環境評価手法確立に向けた更なる知見を得る。また藻類においては、今回明らかとなったアオコ構成藻類である種等にターゲットを絞り、PCR 法を活用してターゲットとする藻類の定量を行うことで、河川管理手法の簡易化・迅速化に向けた応用を行う。

今後は、水質、生物叢及び細菌叢の関連性を詳細に調査することで(1)豊富な細菌叢と生物叢が良好な河川環境と言えるのか、(2)水質が変化し、細菌叢の変化(一次応答)が起き、生物叢の変化(二次応答)が生じることで河川環境の変化(結果)をもたらすのか、(3)細菌叢の変化が起きても生物叢に影響が出る前に細菌叢が修復され(生物叢は変化なし)河川環境が保たれる場合(重篤でない環境の変化)も起こりうるのか、という点を明らかにすることで細菌叢と生物叢を指標とした新規河川環境評価法の確立を目指す。

謝辞

本研究は、有明広域産業技術振興会平成 30 年度地場産業振興支援研究によりご支援を頂きました。また、株式会社フレッシュ・ウォーター三池には本研究を遂行するにあたり多大なご協力を頂きました。ここに記し深甚なる感謝の意を表します。