

# 県内河川における細菌の分布と水質との関係 ～目に見えない生き物は何をしているのか～

水環境担当 渡邊圭司

## 1 はじめに

微生物（細菌を含む）は、大気、河川、湖沼、土壌、海洋などさまざまな自然環境中に無数に存在しています。河川水 1 ミリリットル中には数百万、海水 1 ミリリットル中にはおよそ数十万、土壌 1g 中には数十億の微生物が生息しています。しかしながら、細胞の大きさがとても小さく（およそ 0.5～数マイクロメートル）、人間が自分の目で直接見ることができないため、あまり身近な存在とは感じられないかもしれません（図1）。一方で、パン、チーズ、ヨーグルト、お漬物、納豆などの食品、日本酒、ビール、ワインなどのお酒、味噌、しょうゆ、みりん、お酢などの調味料は、微生物の力により作り出されています。また、人間の体には 100 兆個を超える微生物（腸内細菌など）が存在しており、人体を構成する細胞の数が約 37 兆個であることから、人間はとても多くの微生物と共に生活していると言えます。

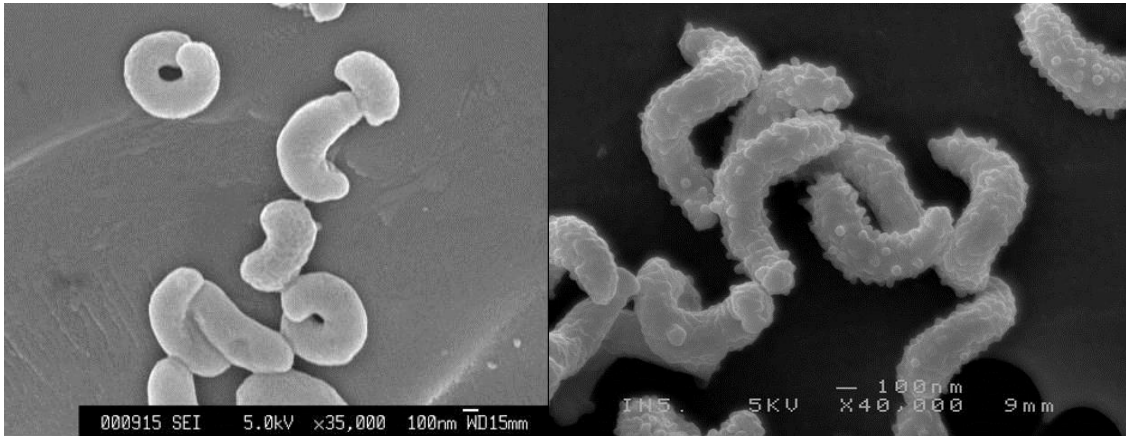


図1 淡水圏から分離した2種類の細菌の走査型電子顕微鏡写真

河川の水圏生態系では、細菌は水の汚濁原因物質である有機物（水質指標として COD や BOD として表される）、窒素化合物、リン化合物の取込み、分解および栄養塩類の再生産などに寄与しており、また、それ自身は動物プランクトンのエサ資源となっていることから、水圏生態系の食物連鎖の中で大切な役割を担っています。しかしながら、1970 年代に光学顕微鏡技術が発達するまでは、水圏環境中に多くの細菌が存在していること、またそれらの炭素、窒素やリンなどの物質循環の担い手としての重要性については認められていませんでした。このように、水圏環境における細菌の研究の歴史は比較的浅く、まだ分からないことがたくさんあります。

当センターでは、県内河川における細菌の分布状況およびそれらが汚濁原因物質である有機物、窒素化合物、リン化合物の循環にどのように寄与しているのかについて調査研究を進めてきましたので、本発表で最新の知見を織り交ぜて報告します。

## 2 県内河川水中の細菌数

2013～2014 年度に埼玉県内の 10 河川 15 地点で、河川表層水を毎月採取し、DAPI<sup>注1)</sup> という蛍光色素による染色操作を行い、蛍光顕微鏡観察で細菌数の測定を行いました。測定結果の概要を図2に示しました。県内 15 地点の 15 ヶ月間のデータを平均すると、河川水 1 ミリリットル中に約 770 万 ( $7.7 \times 10^6$  cells/mL<sup>注2)</sup>) の細菌が検出されました。それぞれの採水地点間の平均値を比較すると、1 ミリリットル中の細菌数は、明覚（都幾川）、大内沢川合流点前（槻川）、新元田橋（小山川）などの河川上流域の地点では少なく（約 100 万個）、中、下流域では多くなる傾向が見られました（約 300 万個～2000 万個）。

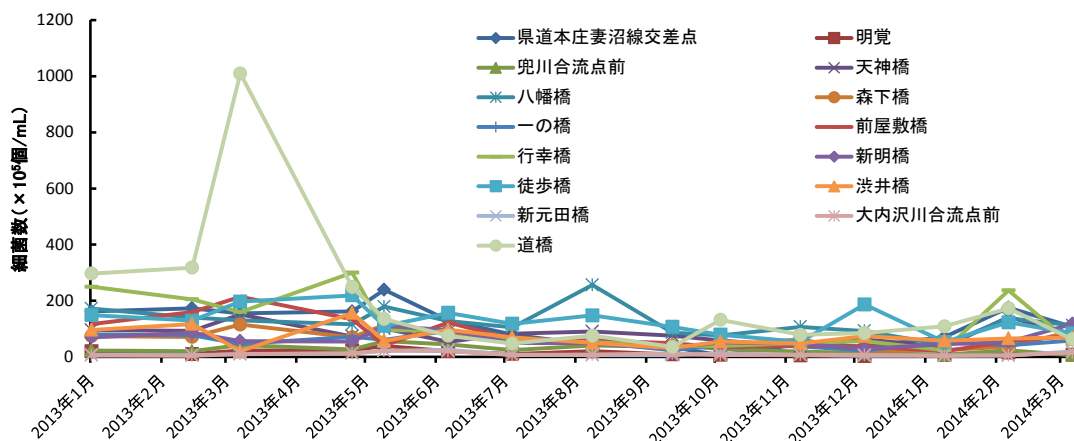


図2 県内の 10 河川 15 地点における細菌数の経月変化

## 3 河川の細菌叢解析

県内の 8 河川 11 地点 15 サンプル、および下水処理水の影響を見るために市野川浄化センターからの排水について、次世代シーケンサーによる細菌叢（種類の構成）解析を行いました。門レベルの分類<sup>注3)</sup>でまとめた細菌叢解析結果の概要を、図3に示しました。すべてのサンプルで、Proteobacteria 門、Bacteroidetes 門、Actinobacteria 門の 3 つの門に属する細菌のリード数（部分遺伝子配列の数）が、全リード数の 85%以上を占めていました。特に、Proteobacteria 門に属する細菌の総リード数は、全体の 44%にも達していました。さらに、Proteobacteria 門の内訳を見てみると、およそ全体の 75%を Betaproteobacteria 綱が占めていました。Betaproteobacteria 綱に属する細菌は、湖沼などで優占している系統群であることが広く知られており、河川でも Betaproteobacteria 綱が優占していることが明らかとなりました。特に、Betaproteobacteria 綱の中でも、IRD18C08 と呼ばれるグループに属する細菌のリードが、下水処理水を除いたすべてのサンプルから検出され、最も多いリード数が得られました。さらに属レベルまで解析を進めると、下水処理水では、*Pseudomonas* 属、*Flavobacterium* 属、*Undibacterium* 属の特定の種に属する細菌のリードが多く検出されること、採水地点のすぐ上流に畜産関連施設があるサンプルからは *Clostridium* 属（腸内などの酸素濃度が低い環境中に生息）に属する、通常の河川水中には生息していない細菌のリードが多く検出されました。また、河川が停滞し植物プランクトンが大量に増殖している地点や、水生植物が河床に多く繁茂している地点のサンプルからは、*Polynucleobacter* 属（PnecD）に属する細菌のリードが多く検出されました。このように、河川水中から検出される細菌の種類は、採水した地点の水質特性や周辺環境と密接に関係していることが示唆されました。

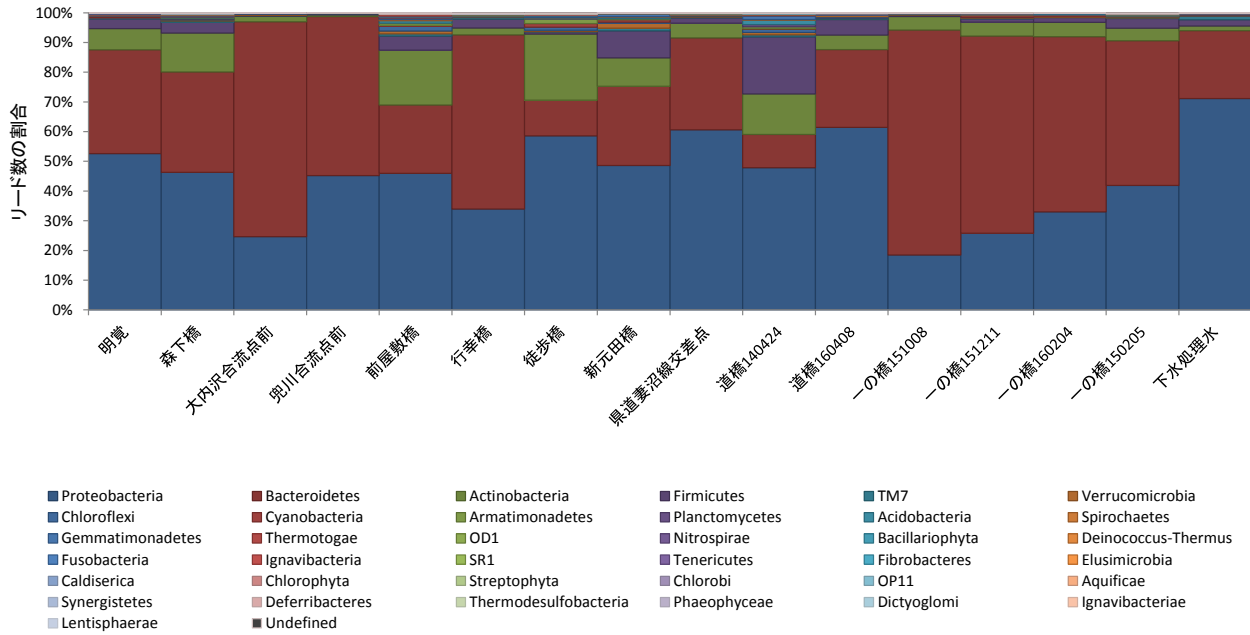


図3 次世代シーケンサーによる埼玉県内河川の細菌叢解析（門レベルの分類）

#### 4 河川に生息する細菌の分離培養とその諸性質の解明

遺伝子配列を基にした次世代シーケンサー<sup>注4)</sup>による細菌叢解析では、細菌に由来する遺伝子の有無しかわからないため、それらの細菌が河川生態系でのような役割を担っているのかわかることはできません。そこで、先行研究で開発した淡水圏の細菌を簡便かつ効率的に分離培養できる手法を用い<sup>1), 2)</sup>、県内の10河川15地点23サンプルについて、細菌の分離培養を試みました（図4）。

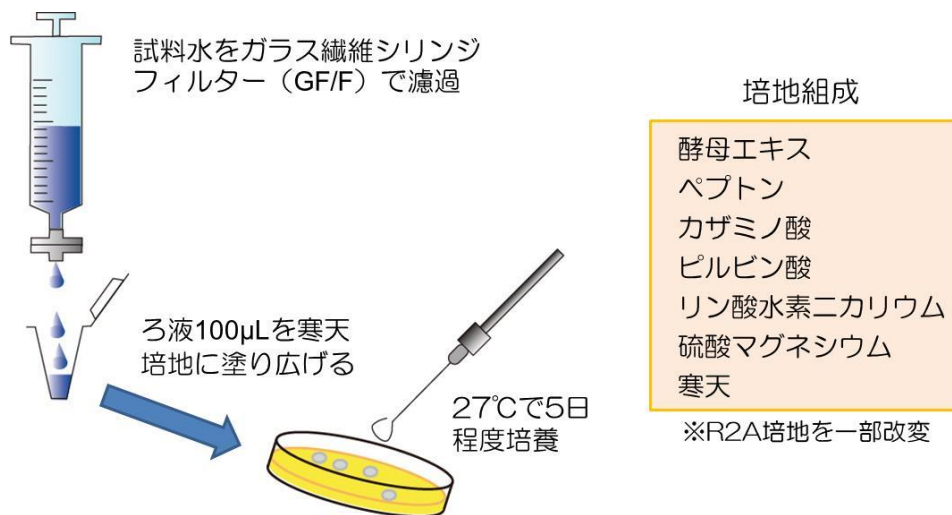


図4 開発した淡水圏の細菌を簡便かつ効率的に分離培養できる手法

河川水から細菌の分離培養を試みた結果、合計で413菌株の細菌が得られました。細菌叢解析で得られたリード数の多かった上位30のOTU<sup>注5)</sup>のうち、14のOTUについて近縁の細菌を分離培養することに成功しました。得られた細菌が、どのような有機物を代謝しているのかを調べたところ、

河川水中で優占していた Betaproteobacteria 綱に属する細菌は、糖質やアミノ酸はほとんど代謝せず、栄養源（炭素源）として有機酸に強く依存していることが明らかとなりました。また、最もリード数の多かった Bacteroidetes 門の Flavobacteriia 綱に属する細菌は、有機態窒素化合物の取込みおよび分解に関与していることがわかりました。本研究では、Flavobacteriia 綱に属する細菌に次いで多くのリードが得られた IRD18C08 というグループに属する細菌を、世界で初めて分離培養することに成功しました。この細菌は、細胞の中にリンを蓄積する能力を有していることがわかりました。また、毎月の県内 5 河川 5 地点のリン濃度および IRD18C08 の菌数のモニタリングと、純粋分離株を用いたリンの取込み実験から、河川水中のリン酸態リンの約 0.7%程度を、この細菌が取込んでいると推計されました。現在、この細菌については、新属・新種として新たに菌名を記載する手続きを進めているところです。

## 5 おわりに

本研究により、埼玉県内の河川に生息する細菌について、どのくらいの数の細菌がいるのか、それらはどのような種類で構成されているのか、それらはどのように炭素、窒素やリンの循環に関わっているのか、などについてさまざまな新しい知見を得ることができました。また、細菌の特定の種の有無が河川水質や周辺環境と密接に関係していること、河川から分離された細菌の多くは倍加時間（細胞が 2 つに分裂するのに必要な時間）が数時間から数日間であることなども明らかになってきました<sup>3)</sup>。このことは、細菌の種構成が水質や周辺環境の変化に敏感（短時間）に反応することを示唆しています。今後は、河川水中の細菌の種構成が、新たな水質や環境の評価指標の一つとして活用できないかなどについて、さらに研究を進めて行きたいと考えています。

## 用語解説

注1) DAPI : DNA に結合する蛍光色素です。ろ紙上に捕集した細菌を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて計測することで、一定量の水の中に含まれる細菌の数を算出することができます。

注2) cells/mL : 1 ミリリットル中の細菌の数を表す単位です。10<sup>6</sup> 個 (cells) は、100 万個のことです。

注3) 分類 : 細菌ではドメインを最も上位の分類とし、その次に門、綱、目、科、属、種の順に細分化されています。

注4) 次世代シーケンサー : 同時並行で大量の遺伝子断片の配列データを読むことのできる装置です。

注5) OTU : 細菌を遺伝子配列の類似性を基にして便宜的にグループ分けした単位です。ここでは、16S rRNA 遺伝子の部分配列が 97%以上の類似性をもつグループを 1 つの OTU としています。

## 文献

- 1) Watanabe, K., *et al.* (2009) *FEMS Microbiol. Ecol.*, **67**, 57-68.
- 2) Watanabe, K., *et al.* (2012) *Environ. Microbiol.*, **14**, 2511-2525.
- 3) Watanabe, K., *et al.* (2017) *Hydrobiologia*, **792**, 67-81.