

多摩川の河川水、及び河川底の環境DNA解析による微生物叢解析

ー微生物を指標とした河川管理ガイドラインの提案の試みー

2019年

齊藤 玉緒

上智大学理工学部 教授

共同研究者

上智大学地球環境研究科 黄 光偉

研究成果報告書

多摩川の河川水、及び河川底の環境 DNA 解析による微生物叢解析
ー微生物を指標とした河川管理ガイドラインの提案の試みー

代表研究者:上智大学理工学部 齊藤玉緒

共同研究者:上智大学地球環境研究科 黄 光偉

研究の目的

近年の環境問題に対する意識の向上とともに、河川と人々の繋がりが重視されてきている。特に多摩川は東京都民の生活に密着した都市河川であり、多くの親水域が設けられ、人々に親しまれる河川である。多摩川を中心とした流域全体の安心・安全な生活の構築を考えた場合、子供を含む多くの人々が集う多摩川親水域の水質管理は重要な課題である。これまでの土壌、水系に潜む病原菌をはじめとした細菌の研究は、個々の細菌に焦点を絞ったもので、細菌叢全体の変動に着目したものは少ない。本研究では多摩川に潜む細菌叢の全体像を明らかにするため、培養を介さない 16S アンプリコン解析を中心としたメタゲノム解析を行った。これによってこれまで解析が困難であったため見つけ出すことができなかった細菌による水質汚染を検証し、多摩川の環境保全・改善に資することを目的とした。

序論

河川や湖などの淡水環境に見られる微生物の構成は海水や土壌とは異なっている (1)。微生物群集はその環境において生物地球化学的循環を回す主体である。環境微生物研究の第一歩は全ての微生物の記述する微生物叢研究にあると考えられる。しかし、微生物は、例えば VNC の状態にあるもの、あるいは *Legionella* のようにアメーバ細胞に隠れ棲むものなどがあり、複雑系の中に生息している (2)。したがって、これまでのような培養の過程を含む方法では全ての細菌を解析することはできない。多摩川は山梨県から東京都を通り神奈川県川崎市に至る河川で、周辺にはキャンプ場を始め多くの親水域が存在する。したがって河川水は人間の活動による影響を受けていると考えられる。Han らにより多摩川には抗生物質耐性の *E. coli* が存在することが示される (3) など、比較的多くの微生物解析が行われている (3, 5-9)。その一方で、Savio らはヨーロッパ・ドナウ川での解析から河川水の細菌叢構造の理解の重要性を説いている (4) が、多摩川において全微生物叢解析を行った例はまだない。

予備調査として、2015 年 10 月から 12 月にかけて多摩川全域にわたって河川水の微生物叢解析を行った。

サンプリング地点を図1に示す。

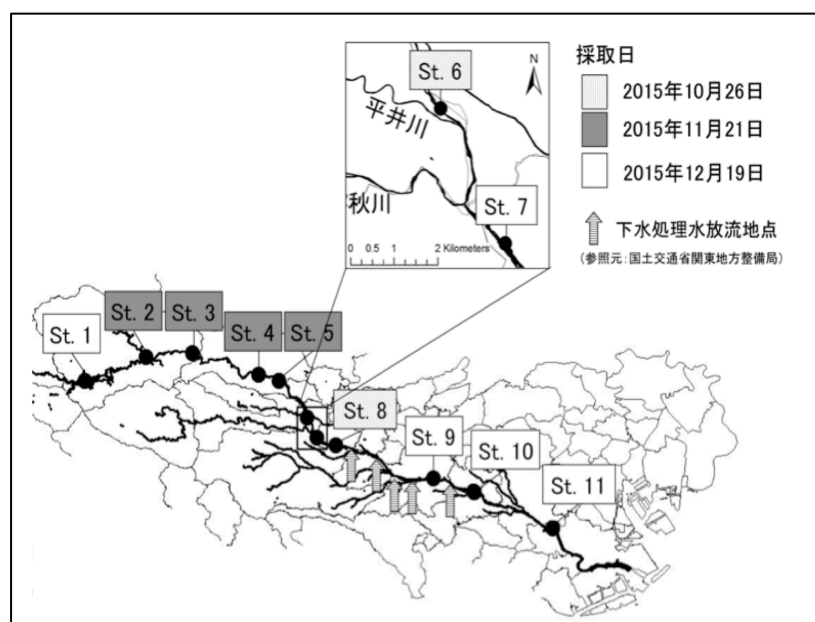


図1. 2015年に行った多摩川の調査地点を示した地図

矢印は下水処理水放流地点を示す。

図1に示した地点から表層水を採取して16S アンプリコン解析を行った。その結果を図2に示す。

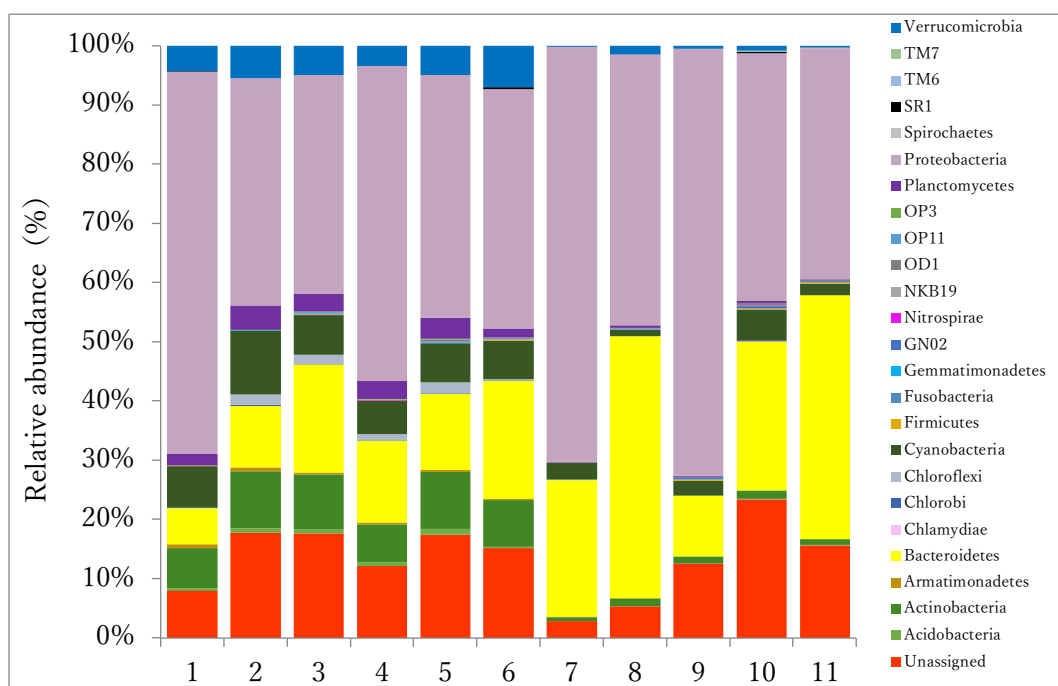


図2. QIIMEによる各サンプリング地点 phylum レベルの微生物構造

2015年サンプルの解析結果。各 phylum は右の欄に示した。合計で24門が検出された。St. 6とSt. 7の間で微生物叢が大きく変わっているのがわかる。

この調査で St. 6 と St. 7 の間で大きく微生物叢構造が変化することがわかった。St. 7 は平井川、秋川が合流した後の地点であるため、支流の合流が本流の微生物叢に影響を与えている可能性を考えた。そこで、支流および季節変動による微生物叢の変化を追うことによって、その全体像を明らかにするという発想に至った。

実験方法

2017 年については図 3、2018 年については図 8 にそれぞれ調査地点を示した。

各地点で表層水を採取して、フィルターを通し細菌を集めた。このフィルターから DNA を抽出することによって環境 DNA を得た。DNA の抽出は Water RNA/DNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Canada) を用いて行った。

得られた環境 DNA は 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域に特異的な配列に基づいたプライマーを用いて 16S アンプリコンを作成した。プライマーは北海道システムサイエンス社による。次世代シーケンサーは Illumina 社の MiSeq を用いて 2x 300bp ペアエンド法で行った。この解析については北海道システムサイエンス社に委託分析した。Illumina 社の MiSeq を用いた次世代シーケンサーによる解析は一部株式会社ファスマック (FASMAC) によって分析された。

得られたシーケンスデータは、微生物群集解析用プログラム QIIME によって解析した。リードデータのクオリティーチェックは QIIME の配列 cleanup 用プログラムを用いた。OTU は OTU 作成プログラムをもちいて配列相同性 99% の条件でクラスタリングを行なった。各 OTU より代表配列を抽出した。この配列からキメラ検索プログラムを用いてキメラ配列を除去した。

次に、抽出された OTU 代表配列を入力してアノテーションプログラムを用いて 16S rRNA データベース Greengenes に対して相同性 97% 以上の条件で相同性検索を行なった。OTU 代表配列のアラインメントは PyNAST (標準設定) を用いた。系統樹作成は FastTree (標準設定) を用いた。

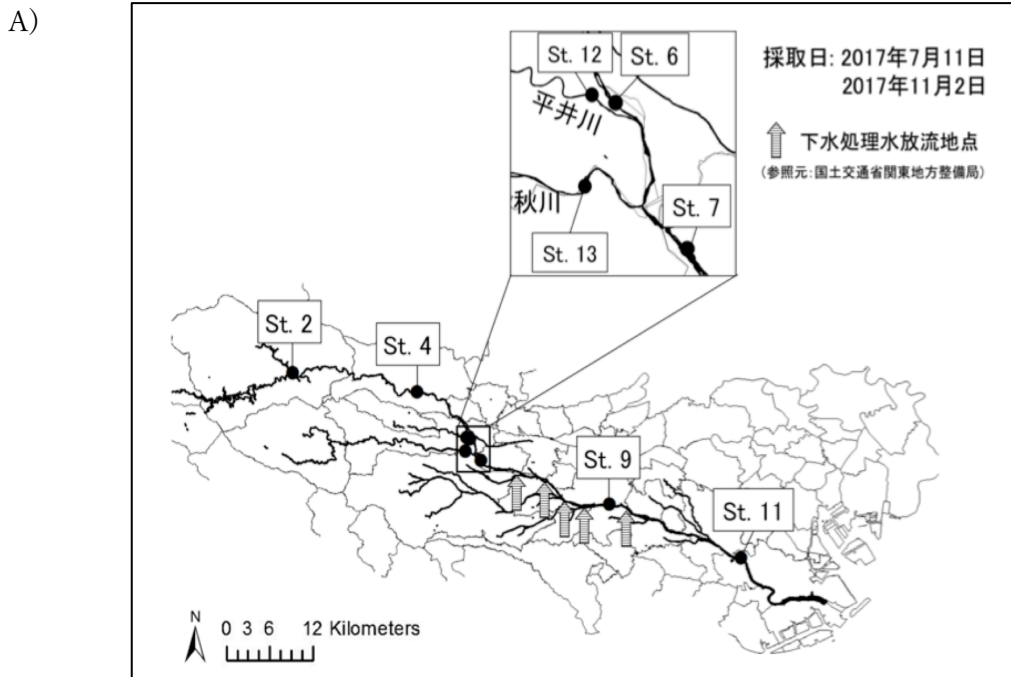
採取地点での化学データについては、pH と水温はデジタルペン型 pH メーター PH-222 (株式会社 佐藤商事) を用いて、COD、リン酸態リン ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)、アンモニア態窒素

(NH_4^+ -N)、亜硝酸態窒素(NO_2^- -N)、硝酸態窒素 (NO_3^- -N) は川の水調査セット (株式会社 共立理化学研究所) を用いて測定した。

結果と考察

2017年の調査: 支流は本流の微生物叢に影響を与えているのか。

2017年には本流の微生物叢に支流がどのような影響を与えているのかを調べるために図3の8地点を選んで表層水の微生物叢解析を行った。新たに追加した St. 12、St. 13 はそれぞれ2015年に微生物叢構造が大きく変化した St. 6と St. 7の上流で合流する支流、平井川と秋川の合流前の地点である。



B)

	Station	地点名	北緯	東経
本流	St. 2	氷川キャンプ場	35°48'26.18"	139°05'59.93"
	St. 4	釜の淵公園	35°47'07.04"	139°15'15.48"
	St. 6	多摩川中央公園	35°48'48.60"	139°19'23.60"
支流	St. 12	平井川 多西橋	35°43'53.25"	139°19'08.63"
	St. 13	秋川ふれあいランド	35°42'57.22"	139°19'01.83"
本流	St. 7	秋川合流地点	35°42'16.47"	139°20'11.14"
	St. 9	是政橋下流	35°39'09.49"	139°30'01.36"
	St. 11	多摩川緑地広場	35°35'24.71"	139°39'49.16"

図3. 2017年7月、11月の多摩川調査地点

A) 上流の氷川キャンプ場(St. 2)から下流の多摩川緑地広場(St. 11)まで、支流の平井川(St. 12)、秋川(St. 13)の合計8サンプルを採取した。B) 各調査地の詳細な位置情報を示す。

2017年の7月と11月の多摩川河川水の微生物叢構造を以下の図4、5に示す。

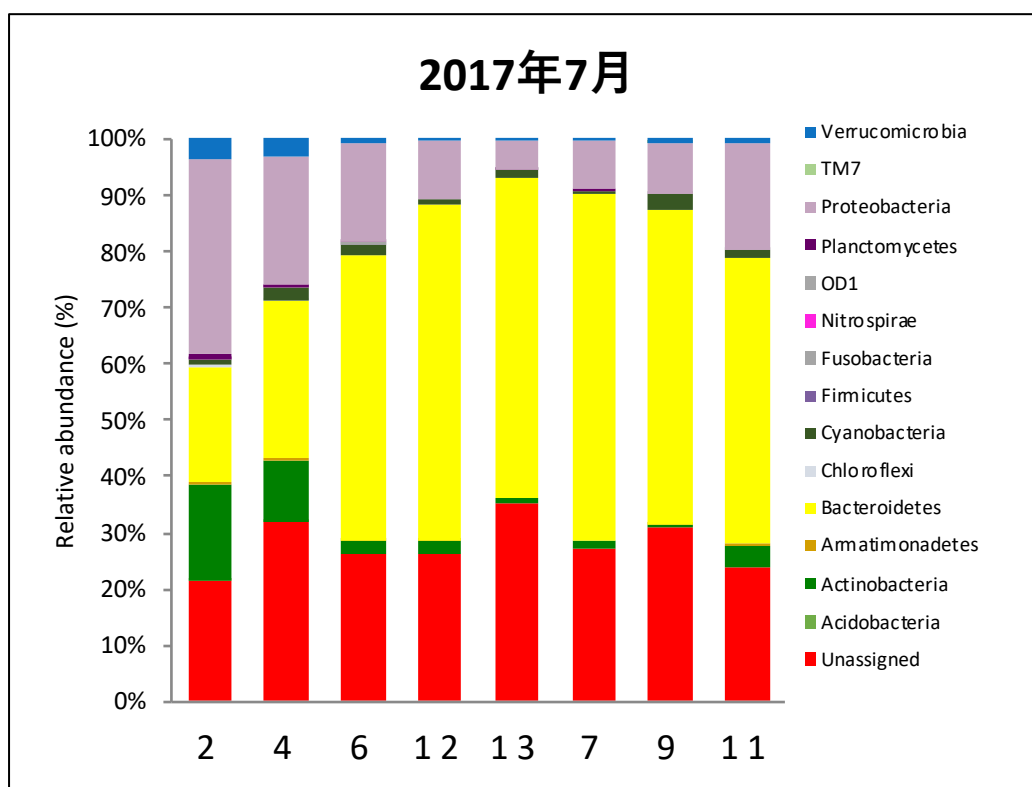


図4. 2017年7月の多摩川表層水の微生物叢

2017年7月サンプルの解析結果。全体で14門が検出され、2015年のサンプルに比べて細菌叢の多様性が失われているように思われる。特に支流と下流域7-11のサンプルでは6-8門しか検出されなかった。最も多い門は *Bacteroidetes* であった。

図4の結果から、主要な細菌は門レベルで *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* であることがわかった。これらは全て河川水で一般的にみられるものであった(1,4,11-13)。St. 12、St. 13の微生物叢構造はその前後の本流の調査地点であるSt. 6、St. 7と変わらないことから、少なくとも7月の解析の結果では、支流の微生物叢が本流に大きく影響しているとは考えられない。一方、2015年の秋冬のデータでは24門の細菌が検出されたのに対し、2017年7月のサンプルでは14門と微生物の多様性が失われていることに気がついた。この変化は何によって起こるのかを検証するため、同年11月に全く同じ調査地点で再度微生物叢解析を行った。その結果を図5に示す。

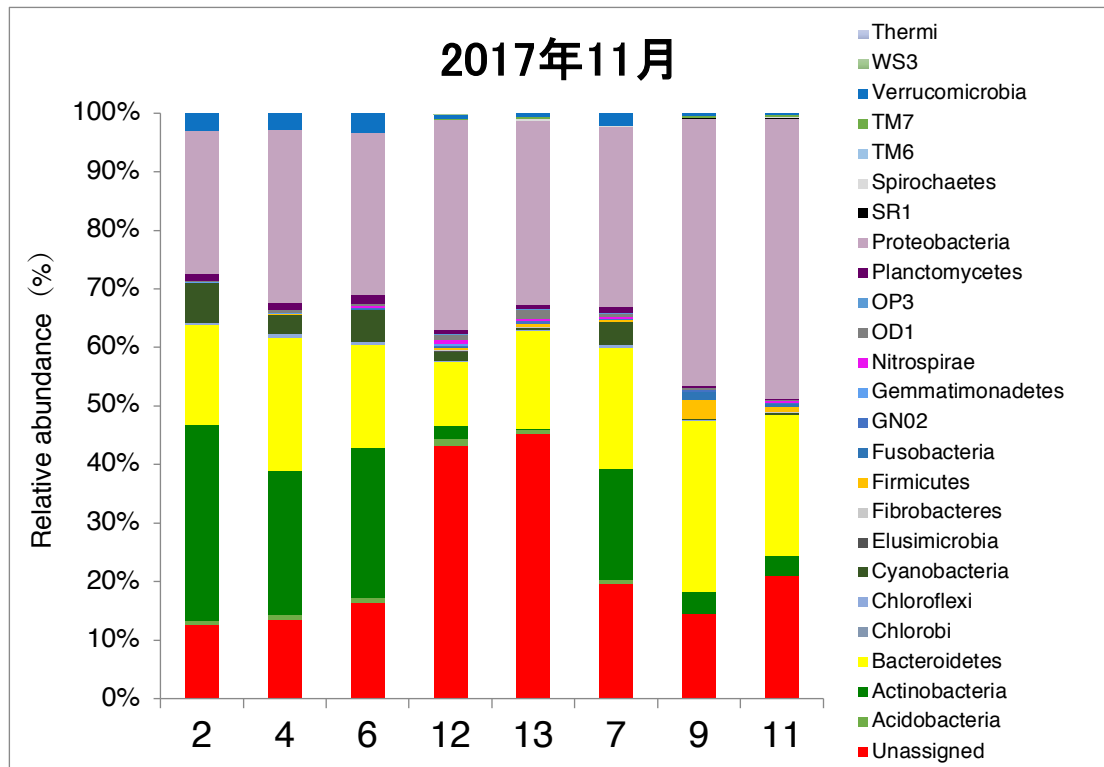


図5. 2017年11月の多摩川表層水の微生物叢

2017年11月サンプルの解析結果。全体で24門が検出され、2015年の結果と同じだけの多様性が見られた。もっとも多い門は *Proteobacteria* であることも2015年と共通している。

2017年11月の調査で検出された OTU は24門からなっており、7月のデータとは大きく異なった。また、多摩川の河川水は *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の2つの門が主要な構成細菌であることがわかる。さらにこの両者の割合が少なくとも夏（7月）と秋冬（11月）で大きく変わっていることが最も大きな変化として見つげられた。図6に両者の変化を示す。

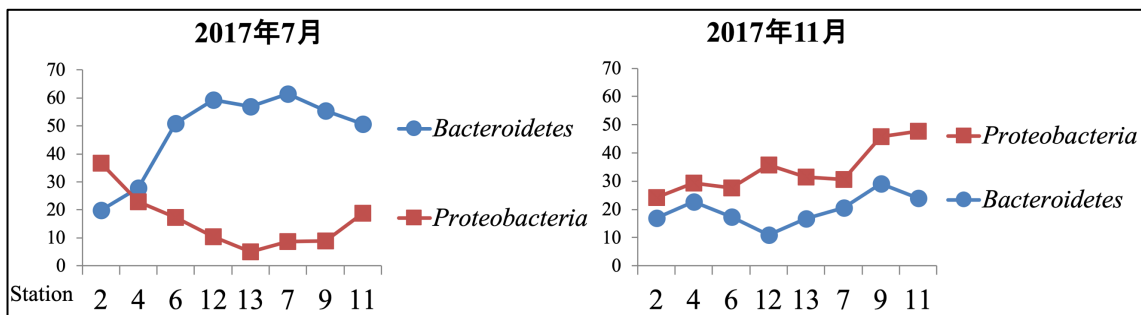


図6. *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の存在比の変化

7月は *Bacteroidetes* が多く、11月はほぼ同等か *Proteobacteria* が多い。

上流の氷川キャンプ場では7月、11月どちらのサンプルでもほぼ安定した比になっていることがわかった。一方、釜ヶ淵公園から下流にかけては7月と11月では *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の2つの主要な門の存在比が逆転している。さらに、7月と11月では、検出される微生物の多様性が大きく変化することが示された。図7に検出された門数の変化を示す。

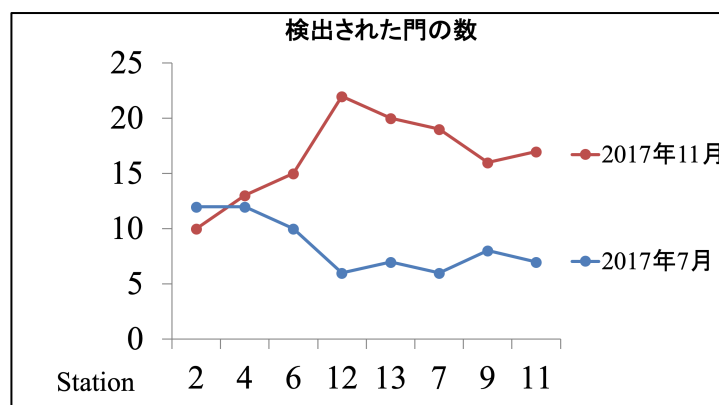


図7. 各調査地点で検出された細菌の門数の比較

図6、7から上流の調査地点の氷川キャンプ場は年間を通じて安定した細菌叢構造を持つ一方、釜ヶ淵公園より下流の地域では多様性の変化と *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の2つの主要な門の存在比が大きく変化していることがわかった。そこで、この変化の原因を調べるため調査地点近くの河川水の化学データについて検証することにした。この時の採取では一部に化学データの欠損があったため、東京都と国土交通省が発表しているBOD、総窒素量、総リン量についてのデータを参考にしたが、その結果では大きな変化は見られず、化学データは一年を通じてほぼ安定していることがわかった

(http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/water/tokyo_bay/news_flash.html)。

それでは、この大きな微生物叢の変化は何を意味しているのか？ 支流域合流地点には水再生センターなども存在することから微生物叢の変化は化学データでは反映できないわずかな違いによってもたらされるのではないかと考えた。Ibekweらは、Natural site waterでは *Proteobacteria* が *Bacteroidetes* より多く、同じ実験で Urban runoff water や水再生センターの水については *Bacteroidetes* がより多いというデータを示している(10)。つまり *Bacteroidetes* が相対的に増えてくると言うことが、水質劣化の指標になるのではないかと

考えた。この結果はこれまでの報告とは異なっているが、この点についてはのちに説明する。この水質劣化の原因について温度が大きな環境要因であると考え、2018年では隔月でサンプリングすることによってどのような変化があるかを検証することにした。

2018年の調査: *Bacteroidetes* が増えることは水質劣化、富栄養化と関連しているのか?

隔月のサンプリングにあたりサンプリング地点を図8のように変更し、微生物叢の変化がいつ、どのようにして現れるのかを検証した。

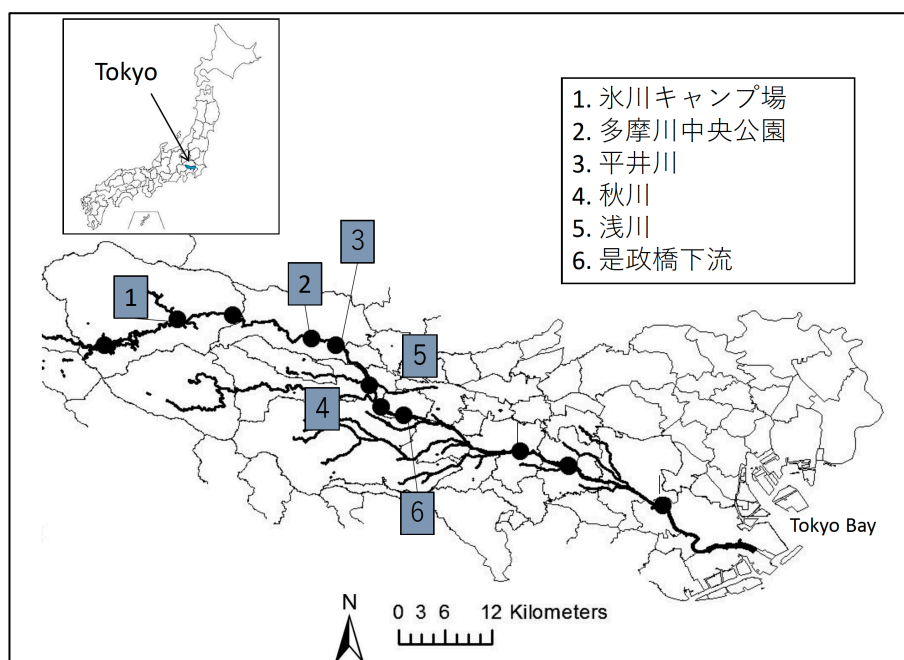


図8. 2018年の隔月調査のための調査地点

調査は2018年2月、4月、6月、8月、10月、2019年1月に行った。

以下に各回の調査によって明らかになった水質の化学データを示す。水質調査は全てパッチテストで行なったため精度はあまり高くないが、全調査地点について大きな汚染というものは見られない。

表 1. 2018 年 2 月の水質調査

2018/2/25	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	12.6	6.6	4.9	0.005	0.2	0.2	0.02	6
2 多摩川中央公園	12.4	7.4	8.4	0.005	0.2	0.5	0.02	2
3 平井川	12.8	8.0	9.5	0.005	1.0	0.2	0.05	6
4 秋川	11.7	7.4	10.2	0.005	0.2	0.2	0.02	>8
5 浅川	11.2	7.5	12.4	0.005	0.5	0.2	0.1	4
6 是政橋下流	11.0	7.7	13.4	0.02	5.0	0.5	0.2	>8

表 2. 2018 年 4 月の水質調査

2018/4/27	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	9.7	8.5	12.9	0.005	0.2	0.2	0.02	2
2 多摩川中央公園	15.5	9.8	19.9	0.005	0.2	0.2	0.02	2
3 平井川	10.6	9.3	19.2	0.005	1.0	0.2	0.02	6
4 秋川	10.3	8.7	19.1	0.005	0.2	0.2	0.02	3
5 浅川	8.2	7.9	20.0	0.005	5.0	0.5	0.1	4
6 是政橋下流	8.9	8.1	20.7	0.01	5.0	0.5	0.2	8

表 3. 2018 年 6 月の水質調査

2018/6/26	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	9.1	7.9	18.9	0.005	0.2	0.2	0.02	6
2 多摩川中央公園	18.7	9.6	30.0	0.005	0.2	0.2	0.05	8
3 平井川	10.1	8.4	26.9	0.005	0.2	0.2	0.2	8
4 秋川	10.6	8.5	27.2	0.01	0.2	0.2	0.05	6
5 浅川	9.1	8.2	26.0	0.005	1.0	0.2	0.1	4
6 是政橋下流	9.6	8.5	28.1	0.01	2.0	1.0	0.2	8

表 4. 2018年8月の水質調査

2018/8/29	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	8.2	7.8	20.3	0.005	0.2	0.2	0.05	2
2 多摩川中央公園	9.9	9.4	24.9	0.005	0.5	0.2	0.1	4
3 平井川	9.3	8.2	24.4	0.005	1.0	0.2	0.1	2
4 秋川	8.1	8.4	27.2	0.005	0.5	0.2	0.1	4
5 浅川	8.4	7.6	26.1	0.005	2.0	0.2	0.2	4
6 是政橋下流	8.8	8.1	24.8	0.005	2.0	0.2	0.2	4

表 5. 2018年10月の水質調査

2018/10/30	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	8.2	8.1	12.8	0.005	0.2	0.2	0.02	2
2 多摩川中央公園	10.7	9.4	22.0	0.005	0.2	0.2	0.02	4
3 平井川	9.5	8.8	19.6	0.005	1.0	0.2	0.02	4
4 秋川	9.8	8.4	18.4	0.005	0.2	0.2	0.02	4
5 浅川	9.0	7.9	21.6	0.005	2.0	0.2	0.02	4
6 是政橋下流	9.1	8.3	22.2	0.01	5.0	0.2	0.02	6

表 6. 2019年1月の水質調査

2019/1/5	溶存酸素 (mg/L)	pH	水温 (°C)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	COD (mg/L)
1 氷川キャンプ場	9.5	6.6	9.5	0.005	0.2	0.2	0.02	0
2 多摩川中央公園	12.4	9.6	14.5	0.005	0.2	0.2	0.02	2
3 平井川	11.2	8.5	13.9	0.005	1.0	0.2	0.02	2
4 秋川	10.3	8.5	10.2	0.005	0.2	0.2	0.02	2
5 浅川	10.7	8.6	13.9	0.005	5.0	0.2	0.5	2
6 是政橋下流	11.5	8.9	18.6	0.02	10	0.2	1	4

年間を通じて微生物叢が安定していた氷川キャンプ場は水温が全体的に低く、8月の20.3°Cが最も高い。一方、多摩川中央公園よりも下流の地点では30°Cに達する日もあつ

た。2018年サンプルについてみると、水温は8月よりも6月の方が高いという結果になった。pHについてみると氷川キャンプ場以外は常にアルカリ側であった。そのほかのデータでは、是政橋下流にかけてやや汚染されている傾向が見られる。

次に各回の微生物叢解析のデータを示す。

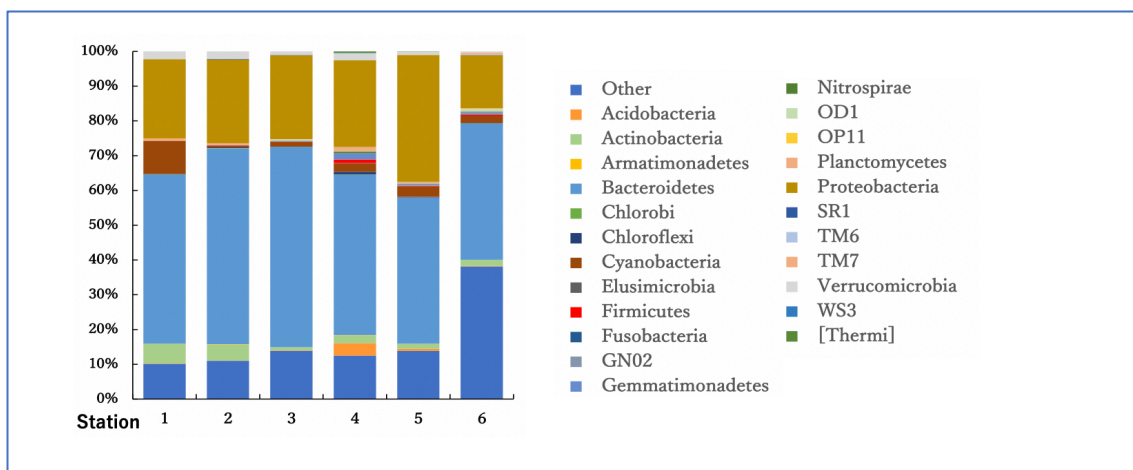


図 9. 2018 年 2 月の微生物叢構造

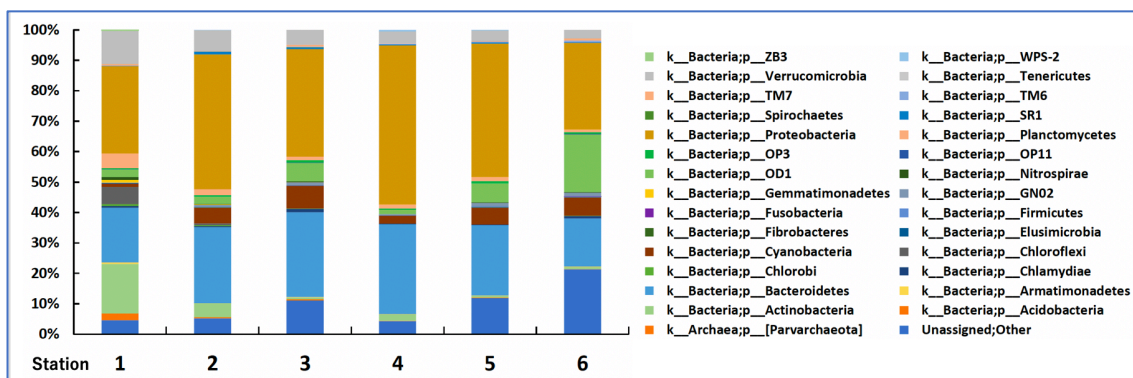


図 10. 2018 年 4 月の微生物叢構造

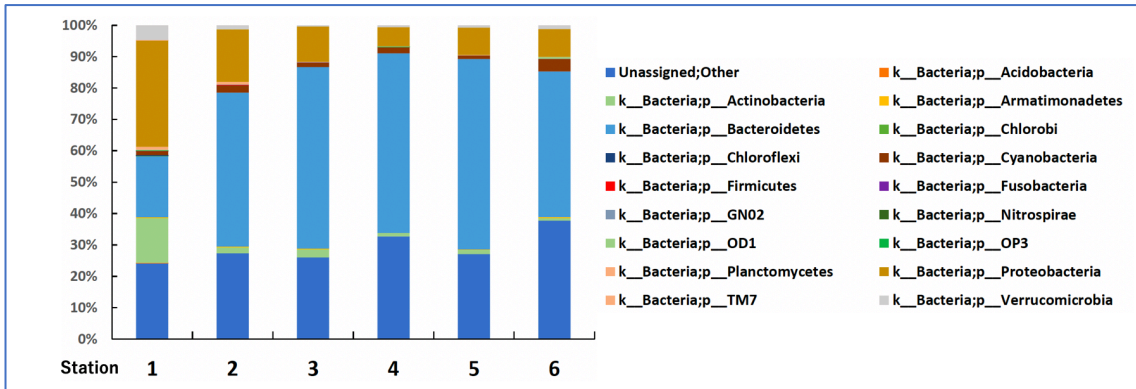


図 11. 2018 年 6 月の微生物叢構造

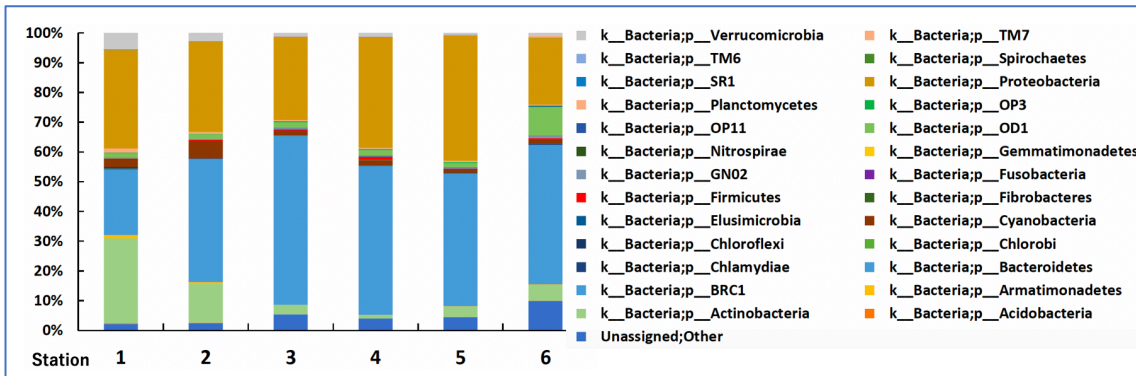


図 12. 2018 年 8 月の微生物叢構造

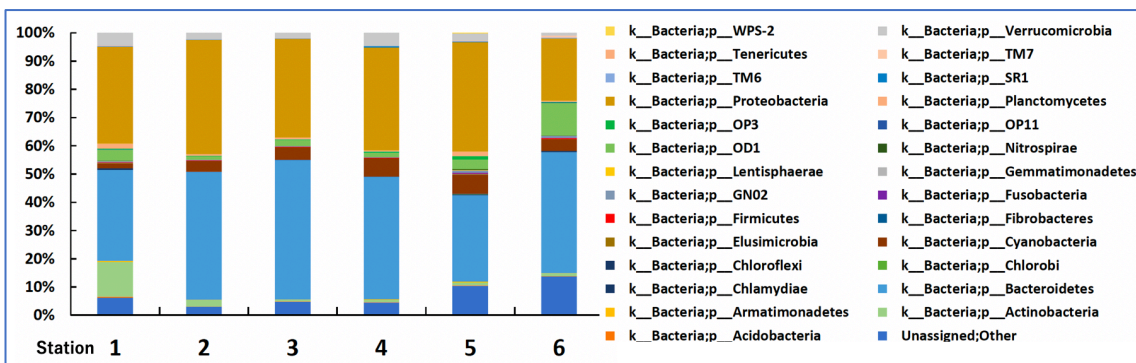


図 13. 2018 年 10 月の微生物叢構造

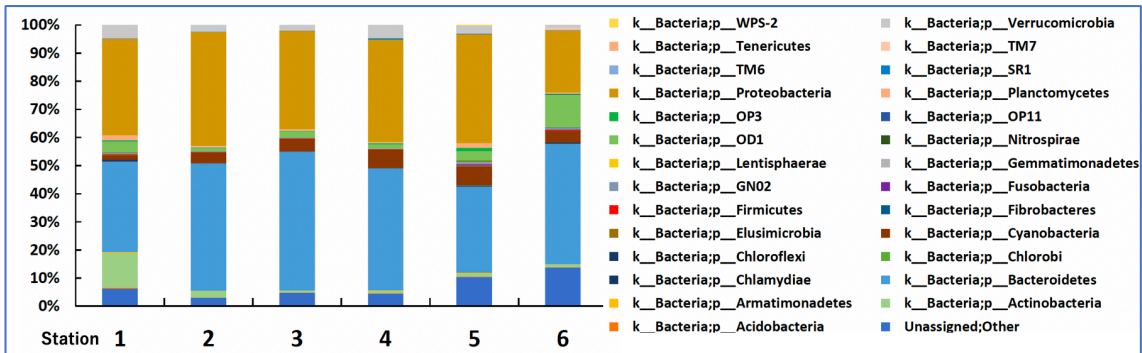


図 14. 2019 年 1 月の微生物叢構造

氷川キャンプ場については、1 年を通して *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の比がほぼ一定になっていることがわかる。また、ほかの地点と比べて *Actinobacteria* が多い。

2017 年の調査で発見した *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の存在比変化については、気温が高かった 6 月と温度が低かった 1 月のデータを比較すると図 15 のようになる。

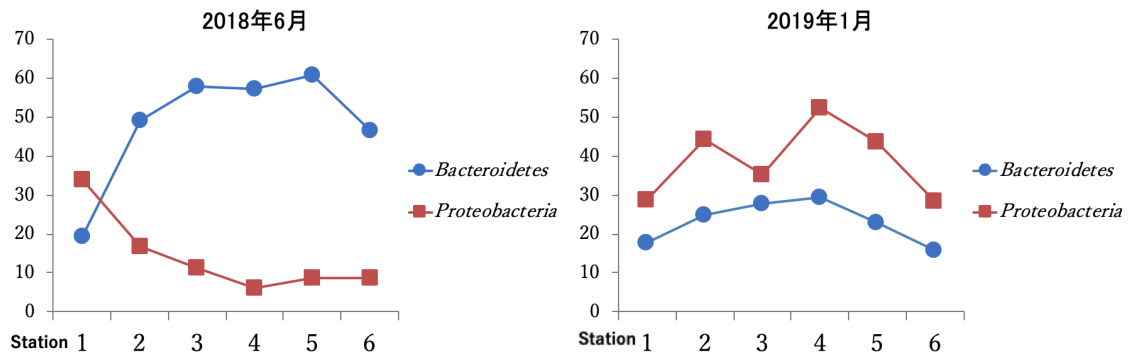


図 15. *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の存在比の変化

図 15 から、図 6 で示す前年の結果が再現的であることがわかる。今回の解析ではさらにこの変化が特定の種の増減によるものかどうかについても検証を行った。その結果、*Bacteroidetes* では *Flavobacterium* が主要なものであり、さらに 6 月、8 月では *Flavobacterium* 以外にも窒素欠乏の根圏で増加することが報告されている *Cytophagaceae* が顕著に増えていることが明らかとなった (14)。しかし、これらが河川水の中でどのような機能を担っているのかについては、さらにデータの統計処理など詳細な解析が必要であると考えられる。

Proteobacteria と *Bacteroidetes* の比については、図 15 の結果では再現的であるが、例えば 2 月のデータは大きくその傾向を外れている。2 月の水質データでは、COD の値が極

端に大きくなっていることから、温度の影響を超える大きな人為的影響を受けている可能性もあると思われる。その意味でも継続的な調査は必要であると考えられる。

展望

本研究によって、支流の微生物叢の本流に対する影響はあまり大きなものではないことが示された。一方で、1年を通じた調査によって多摩川の微生物叢は化学データでは観察できないわずかな違いによって、敏感に変化していることがわかった。したがって、微生物叢を経時的に調べることによって、化学的データでは現れてこない変化を見つけることができると考えられる。特に主要な細菌である *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の存在比については温度との関連で季節的に変動していくことがわかった。低温な季節では *Proteobacteria* が増えており、構成細菌の多様性も増加する。高温な時期では *Proteobacteria* も多様性も減少する。一方で、*Proteobacteria* は水再生センターで排出される水の主要な構成細菌である事も報告されている(15,16)。したがって一概に *Proteobacteria* は処理水に多く水質の低下を意味するとは言い切れず、両者の関係を定式化することはできないと考えられる。

Proteobacteria と *Bacteroidetes* の存在比と水環境との関連については、高温期には平均的に COD の値も高くなり汚濁負荷が高いこと、低温期にはその逆で汚濁負荷が低いことが示されていることから、*Proteobacteria* と *Bacteroidetes* の存在比を調べることによって河川水の環境状態を判断する際の一つの指標になりうると考えられる。

引用文献

1. Mueller-Spitz, S.R., G.W. Giles, and S.L. McLellan. 2009. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:511–522.
2. Winiecka-Krusnell, J., and E. Linder. 1999. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg? *Scand. J. Infect. Dis.* 31:383–385.
3. Ham, Y.S., H. Kobori, J.H. Kang, T. Matsuzaki, M. Lino, and H. Nomura. 2012. Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan. *Environ. Pollut.* 162:98–103.

4. Savio, D., L. Sinclair, U.Z. Ijaz, J. Parajka, G.H. Reischer, P. Stadler, A.P. Blaschke, G. Blöschl, R.L. Mach, A.K. Kirschner, A.H. Farnleitner, and A. Eiler. 2015. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environ. Microbiol.* 17:4994–5007.
5. Ham, Y.S., H. Kobori, and M. Takasago. 2009. Effects of combined sewer overflow and stormwater on indicator bacteria concentrations in the Tama River due to the high population density of Tokyo Metropolitan area. *Environ. Monit. Assess.* 152:459–468.
6. Hirose, S., K. Matsuura, and S. Haruta. 2016. Phylogenetically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria isolated from epilithic biofilms in Tama River, Japan. *Microbes Environ.* 31:299–306.
7. Iwane, T., T. Urase, and K. Yamamoto. 2001. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. *Water Sci. Technol.* 43:91–99.
8. Okai, M., I. Kihara, Y. Yokoyama, M. Ishida, and N. Urano. 2015. Isolation and characterization of benzo[*a*]pyrene-degrading bacteria from the Tokyo Bay area and Tama River in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* 362:fnv143.
9. Purdy, K.J., D.B. Nedwell, T.M. Embley, and S. Takii. 2001. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:165–168.
10. Ibekwe AM., Ma J. and SE. Murinda 2016. Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.168

11. Crump, B.C., E.V. Armbrust, and J.A. Baross. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3192–3204.
12. Liu, Z., S. Huang, G. Sun, Z. Xu, and M. Xu. 2012. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80:30–44.
13. Zwart, G., B.C Crump, M.P. Kamst-van Agterveld, F. Hagen, and S.-K. Han. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28:141–155.
14. Page AP., Tremblay J., Masson L. and CW. Greer. 2019. Nitrogen- and phosphorus -starved *Triticum aestivum* show distinct belowground microbiome profiles. *PLOS one* doi: 10.1371/journal.pone.0210538. eCollection 2019
15. Wang, X., M. Hu, Y. Xia, X. Wen, and K. Ding. 2012. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7042–7047.
16. Ye, L., and T. Zhang. 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:2681–2690.

多摩川の河川水、及び河川底の環境DNA解析による微生物叢解析
—微生物を指標とした河川管理ガイドラインの提案の試み—
(研究助成・学術研究 VOL. 48—NO. 339)

著 者 齊藤 玉緒
発行日 2019年12月
発行者 公益財団法人 東急財団
〒 150-8511
東京都渋谷区南平台町5番6号
TEL (03) 3477-6301
FAX (03) 3496-2965
<http://foundation.tokyu.co.jp>