河川水および下水放流水中の大腸菌群等および溶存態 DNA とそれらの負荷量

龍谷大学理工学部　正会員　越川博元、滝さやか、
ムラタ製作所　井口彩、アイテック　吉田成岐

1. はじめに

抗生物質などの薬剤が多用され環境中に排出されるおそれから、病原性微生物あるいは薬剤耐性微生物の環境中における存在が指摘されている。これらの制御のためには病原性あるいは薬剤耐性遺伝子の伝搬機構について理解する必要がある。これについては、従来から接合などの機構が知られている。一方、溶存態 DNA とは環境水中に細胞などから遊離して存在する DNA を指し、細菌の形質獲得の新たな遺伝子資源となりうる。本研究は河川流下過程における薬剤耐性微生物の挙動について考察することを最終目的とし、ここでは琵琶湖・淀川流域を対象として、採取した河川水あるいは下水処理場放流水について、大腸菌、糞便性大腸菌群、および溶存態 DNA の定量とその負荷量について検討した。

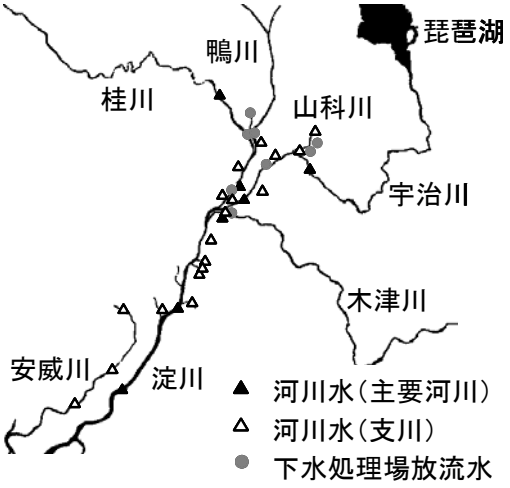

図-1　採水地点

2. 淀川水系での調査方法

桂川、宇治川、木津川および三川合流地点以降の淀川で、図-1 に示した 40 カ所（うち下水処理水放流口は 8 カ所）にてサンプリングを 2006 年 9 月 6 日におこなった。なお、直前の 3 日間に降水は観測されなかったが、サンプリング当日の後半に降水があった。

サンプリングは 1 回のみとして、流量も観測した。大腸菌群・糞便性大腸菌群の測定方法は、メンブレンフィルター法を用いた。採水した試料水を孔径 0.47μm の滅菌済みメンブレンフィルターでろ過して大腸菌群を捕捉し、このメンブレンフィルターを所定の培地を含ませた滅菌済みフィルターの上に密着させ培養することにより、コロニーを形成させた。大腸菌の場合、MF-Endo 培地を使用し、36℃±1℃で 23±1 時間培養し、形成された暗赤色で金属光沢を有するコロニー数を数えた。これは大腸菌群が乳糖を分解して生じるアルデヒドによって、無色のロイコフクシンが酸化されフクシンとなって発色する原理を利用したものである。一方、糞便性大腸菌については、M-FC 寒天培地を用いて、44.5℃で 23±1 時間培養し形成されたアニリンブルーのコロニー数を数えた。

溶存態 DNA については、以下の手順で調製した。すなわち、孔径 0.2μm のフィルターを通過した試料水を、臭化トリメチルアンモニウム（CTAB）を添加して DNA を凝集し、これを精製して得られたものを溶存態 DNA とした。また、ここでは本研究で取り扱った流域では桂川、宇治川および淀川について、それぞれの河川において下流に位置し収支を計算する地点における実負荷量と、それより上流域に由来し流下によりその地点に到達するであろう負荷量（計算到達負荷量）をそれぞれ比較することにより、負荷の動態について考察することとした。計算到達負荷量は、次式に基づいて算出した。

(計算到達負荷量)=(上流域からの負荷量)+(支川からの負荷量)+(下水処理場からの負荷量)

なお、上流域からの負荷とは、桂大橋、隠元橋、木津川御幸橋の各地点における負荷量を、また支川からの負荷とは、各河川の支川からの負荷量とした。ただし下水処理場の負荷として算出した地点は除いた。また、支川とは桂川、宇治川、木津川および淀川以外の河川と定義した。

キーワード：溶存態 DNA　負荷量　大腸菌　糞便性大腸菌群
連　絡　先：〒520-2194　滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5、TEL 077-544-7102, FAX 077-544-7130

3. 結果と考察

図-2 は流量および溶存態 DNA について、計算到達負荷量と実負荷量の比を示したものである。流量は保存されるべきであり、桂川では収支がとれていなかったが、宇治川、淀川では概ね収支がとれていた。

溶存態 DNA の負荷量については、桂川では図-2 の縦軸に示した比が 1 より小さいことから、流下の過程で大きく減少していたが、宇治川、淀川ではあまり減少していないことがわかった。桂川で大きく負荷量が減少(24%)している理由については明確ではないが、宇治川および淀川では負荷量の減少はそれぞれ、87%および 79%であった。一般に DNA は分解しやすいと考えられているが、DNA 量としては大きく減少していない場合もあり、これが DNA が分解しないのか、あるいは流下の過程で死細菌などからの放出などの供給があるのかなどについては、今後の検討が必要であることがわかった。また、DNA 量の測定には 260nm における吸光度から求めていることから、決して鎖状の DNA を選択的に測定していたわけではないことにも注意が必要であった。従って DNA が断片化はしている可能性もあり、DNA の「情報量」としてそのコピー数などの面からの評価が必要である。

同様に大腸菌群、糞便性大腸菌群の負荷量についてまとめたものが、図 3 である。淀川では糞便性大腸菌群が減少していたが、桂川、宇治川ではいずれの大腸菌群も、また淀川でも大腸菌群はむしろ増加していることがわかった。特に糞便性大腸菌群が減少しないことは、糞便性大腸菌群が死滅しにくい、または通常の大腸菌群が糞便性大腸菌群に形質転換している、などの可能性が考えられる。溶存態 DNA が伝播や形質転換のための DNA 資源になりうるなどの可能性もあり、水の安全性の面から適切な制御が必要であろう。

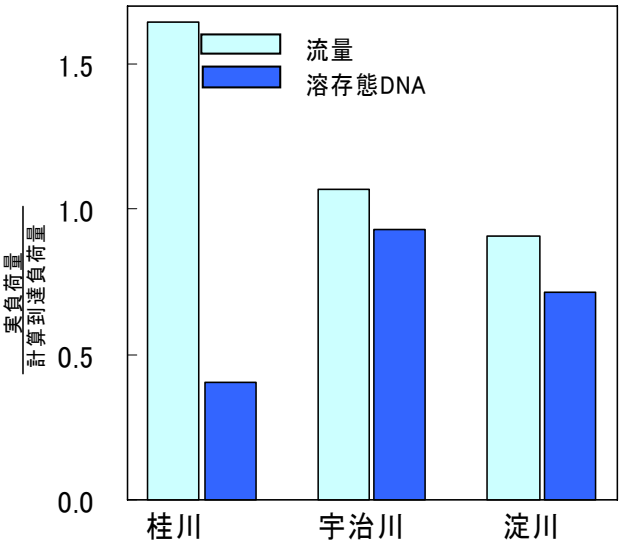

図-2 桂川、宇治川、淀川における流量および溶存態 DNA の計算到達負荷量と実負荷量の比

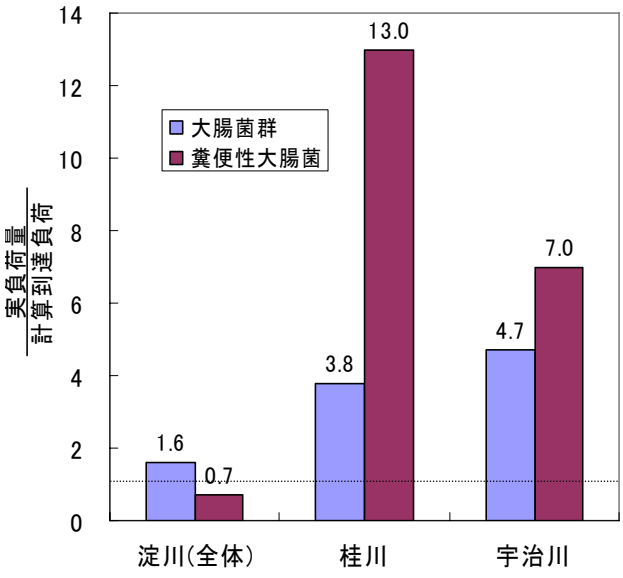

図-3 桂川、宇治川、淀川における大腸菌群、糞便性大腸菌群の計算到達負荷量と実負荷量の比

4. まとめ

本研究で「溶存態 DNA」を定義し、河川水および下水処理放流水から溶存態 DNA を分離し、その負荷量について計算したところ、流下に伴い 80%程度が残存していた。また糞便性大腸菌群もむしろ増加していたことから、水の安全性の面から両者の関連性を明らかにし、さらに適切な制御の必要性が示唆された。

5. 謝辞

本研究は、「財団法人　三菱財団」の助成を得て実施いたしました。また田中宏明先生（京都大学附属流域圏総合環境質研究センター）のグループにもご協力いただきましたことを謝して記します。