

遺伝子マーカーによる蕪島海水浴場の糞便汚染調査

八戸高専 専攻科 ○田中 優希
八戸高専 産業システム工学科 矢口 淳一

1.はじめに

蕪島は八戸市の港湾区域内に位置し、2月から8月にかけて数万羽のウミネコが集まる繁殖地である。大正11年には天然記念物「蕪島ウミネコ繁殖地」になり環境の保全が図られている。海水浴場は蕪島の南側に位置しており、市の中心部から近距離に位置しているため、古くから多くの市民に親しまれている。しかし、平成14年に実施された水浴場開設前の水質調査で、糞便性大腸菌群数が「要改善」基準値を超えた。そのため、開設が見送られ平成20年まで遊泳禁止措置が継続されていた。現在では遊泳可能となっているが継続して調査する必要がある。そこで本研究では、蕪島海水浴場の糞便汚染の現状を把握するため水質調査を行い、また分子生物学的手法を用いて遺伝子レベルで糞便汚染源の解明を試みたので報告する。

2.実験材料および方法

2-1.調査の概要

一般水質項目(pH, DO, 電気伝導度, 水温)と大腸菌群数、糞便性大腸菌群数、大腸菌数を対象とし、2014年5月2日～12月8日の計13回蕪島海水浴場の水質調査を行った。ウミネコの糞便は滅菌したマイクロチューブに18個サンプリングした。また、八戸高専排水処理施設(5回)、八戸市東部終末処理場(2回)、馬淵川浄化センター(1回)それぞれの流入水をサンプリングして調査した。

2-2.大腸菌群、糞便性大腸菌群、大腸菌の計数方法

採取した水のサンプル 1～100ml をメンブランフィルター(Advantec、孔径 0.45μm)でろ過し、MF-Endo 培地(Difco)法、M-FC 培地(Difco)法によってそれぞれの大腸菌群数、糞便性大腸菌群数を測定した。また、EC-MUG 培地(Difco)によるMPN法、そして2015年からクロモアガー培地法を用いて、大腸菌数を測定した。

2-3.DNAの抽出

海水のサンプルを100倍にろ過濃縮後、ガラスビーズを用いてミニビードビーダー(家田貿易 Model 3110BX、4800RPM、40sec)でろ紙を粉碎し、QIAamp DNA Stool キット(Qiagen 社)を用いた方法でDNAの抽出を行った。

2-4.遺伝子マーカーとリアルタイムPCR

水域調査で採水したサンプルとウミネコの糞便、下排水のリアルタイムPCRはMini Opticon システム(Bio-rad 社)で行った。リアルタイムPCRの遺伝子マーカーとして、腸内細菌 *Bacteroides* の16S rRNA 遺伝子断片 HF183 とカモメの糞便中に多数存在する *Catellibacoccus marimammali* の16S rRNA 遺伝子断片 Cat998 を用いた。表-1 に使用したプライマーセットをそれぞれ示した。リアルタイムPCRにはSso fast EvaGreen Supermix(Bio-rad 社)を用いてHF183 と Cat 998 プライマーを使用し、98℃で2分間熱変性させた後(98℃:5sec、60℃:10sec)のサイクルを40回繰り返した。また、融解曲線分析は、55～95℃の範囲で昇温速度 0.2℃/10secで行った。

表-1 使用したヒトとカモメのプライマー

	対象遺伝子	プライマー名称	塩基配列(5'→3')	濃度(nM)	変性温度(℃)
ヒト	<i>Bacteroides</i> 16S rRNA	HF183F	AGGTGCTAATACCGCATAATACAGAG	250	78.4
		HF183R	GCCGTTACCTCACCCTCTA		
カモメ	<i>Catellibacoccus marimammali</i> 16S rRNA	Cat998F	ATCATGAGTTCACATGTCCG	300	82.4
		Cat998R	TACCCCGCCTACTATCTAATG		

糞便汚染、遺伝子マーカー、大腸菌、PCR、ウミネコ

3.実験結果および考察

3-1. 燕島海水浴場の採水調査

2014 年 5 月から 2015 年 12 月における燕島海水浴場の大腸菌群数、糞便性大腸菌群数および大腸菌数の推移を図-1 に示した。大腸菌群数は、5 月上旬がピークでありその後は減少傾向にある。2014 年は 7 月上旬に一度増加しその後減少しているが、2015 年は 9 月下旬に増加している。また、2014 年 12 月には 1 個/100mL しか検出されなかったが、2015 年 12 月は 12.5 個/100mL であった。糞便性大腸菌群数は 2014 年、2015 年ともに 5 月上旬が最も多く、その後は減少傾向にある。海水浴シーズンの 7 月頃は、適(水質 A)の基準である 100 個/100mL 以下となった。2014 年 12 月及び 2015 年 9 月、12 月は不検出であった。全体的に大腸菌群数の変化とほぼ同じような推移を示した。MPN 法での大腸菌数は、2014 年では 5 月 2 日、2015 年では 6 月 3 日が最大となった。その後は減少傾向にある。クロモアガー培地法による大腸菌数は MPN 法と同様 2015 年 6 月 3 日に最大となり、その後減少傾向にある。2015 年 5 月 1 日は、クロモアガー培地法で大腸菌数は検出できなかった。

3-2. 糞便と下水中の遺伝子マーカーの検出状況

使用した遺伝子マーカーの信頼性を確かめるため、ウミネコ糞便の 18 個のサンプルと本校排水処理施設、八戸市東部終末処理場、馬淵川浄化センターの流入水から採取した下水の 8 個のサンプルについて HF183 と Cat998 の遺伝子マーカーでそれぞれリアルタイム PCR を行った。その結果を表-2 に示した。ウミネコの糞便サンプルでは、ヒトの遺伝子マーカーである HF183 は全く検出されず、カモメの遺伝子マーカーである Cat998 は 83.3% の高い比率で検出された。逆に、下水のサンプルでは、HF183 は 8 個の全てで検出され、Cat998 はほとんど検出されず、検出された 2 個のサンプルでも検出限界近くで対象外の遺伝子とともにわずかに検出された。これらの結果から、HF183 が検出された場合はヒトによる汚染、Cat998 が検出された場合はウミネコ糞便による汚染が疑われる。

3-3. 燕島海水浴場での遺伝子マーカーの検出状況

燕島海水浴場における 2 つの遺伝子マーカーの検出状況を調査するため採水したサンプルのリアルタ

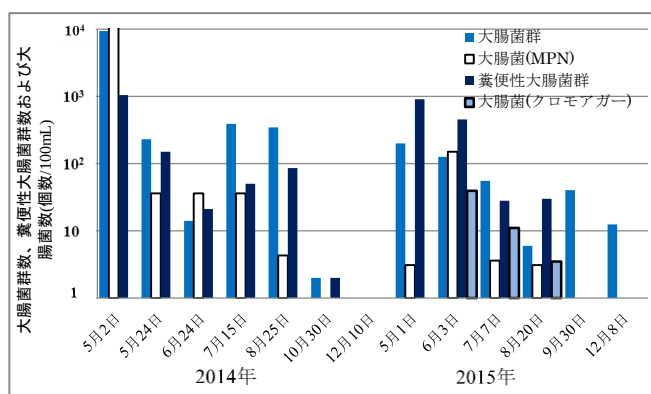


図-1 燕島海水浴場における各細菌の推移

表-2 HF183 および Cat998 の検出状況

	サンプル数	ヒト(HF183)		カモメ(Cat998)	
		反応数	%	反応数	%
ウミネコ糞便	18	0	0	15	83.3
下水	8	8	100	2*	13.3

*検出限界近くで対象外の遺伝子とともにわずかに検出

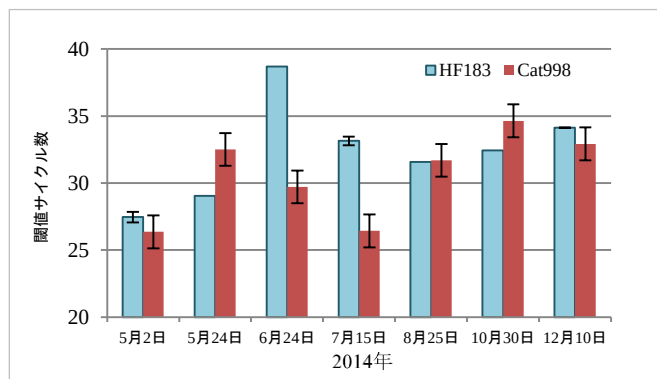


図-2 燕島海水浴場での遺伝子マーカーの検出状況

イム PCR を行い、2014 年のサンプルの解析結果を図-2 に示した。図-2 は閾値サイクル数の値が小さいほどその遺伝子マーカーが多量に存在し、汚染が深刻であるということを意味する。HF183 は 5 月上旬をピークに 6 月下旬にかけて汚染が急激に減少を示し、その後わずかに増加して 7 月中旬から 12 月まで横ばい傾向であった。Cat998 も 5 月上旬にピークを迎え 5 月下旬にかけ減少し、その後 7 月中旬にかけて大きく増加して 8 月から 12 月までは HF183 と同じ減少傾向を示した。

4.まとめ

燕島海水浴場は 2 年間を通じて海水浴シーズンには水質 A であるが、2014 年 5 月には不適の水質基準である。このような結果から今後も定期的な調査を行う必要がある。使用した遺伝子マーカー HF183、Cat998 の濃度は大きく季節変動し、2014 年 5 月から 7 月にかけてウミネコの汚染の可能性が示された。5 月にはヒトの影響による汚染の可能性も示唆された。