

(62) 広瀬川河川中に生息する細菌群集の 季節変動の周期性と夏期出現優占種

中村 寛治^{1*}・根本 工¹・高橋 正訓^{1,2}・千葉 彩輝^{1,3}・橋浦 康範^{1,4}

¹東北学院大学工学部環境建設工学科 (〒985-8537 宮城県多賀城市中央一丁目13-1)

²東北インフォメーション・システムズ株式会社 (〒980-0021 宮城県仙台市青葉区中央二丁目9番10号) 現在

³新菱冷熱工業株式会社 (〒160-8510 東京都新宿区四谷二丁目4番地) 現在

⁴河北建設株式会社 (〒982-003 宮城県仙台市太白区泉崎二丁目23番41号) 現在

* E-mail: knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

広瀬川河川中に生息する細菌に関して、源流域から下流域までの8ヶ所のサンプリングポイントで季節変動の周期性を調査するため、16S rRNA遺伝子を対象にした細菌群集の解析を行った。その結果、清澄な上流域では細菌群集構造は安定しないが、中・下流域では比較的安定した細菌群集構造が規則的に変化することが示された。また、中流以降の細菌群集構造の変化は、水温が高く、水量の少ない夏期に著しいことが分かった。3年間を通して、夏期に下流に向けて優占化する細菌のTerminal Restriction Fragmentのピークは全く同じ位置に観察された。16S rRNA遺伝子の取得と系統解析を行った結果、本ピークは*Arcicella*属に近縁な細菌由来であり、下流域では本細菌が夏期に繰り返して優占化することが明らかとなった。

Key Words : Hirose river, bacterial community, 16S rRNA gene, T-RFLP, *Arcicella*

1. はじめに

河川には周辺流域から有機物をはじめとする様々な汚染物質が流入する。汚染物質は主として河川に生息する微生物によって分解されることが知られており、河川に生息する微生物は河川の浄化作用に大きな役割を果たしている。

これらの微生物は多様な群集を形成しており、近年、分子生物学的な手法によって詳細な解析が進められ、河川に生息する細菌群集に関する知見が増えてきている¹⁾。しかしながら、複数年にわたる河川の微生物群集の解析例は多くない。Hulterらは、河川の付着微生物群集ではあるが、4年にわたってアメリカ、ペンシルベニア州の3つの河川の付着微生物を調査し、群集構造の変化にある程度の周期性があることを報告している²⁾。我々はこれまでの研究で、広瀬川の細菌群集構造をTerminal Restriction Fragment Length Polymorphisms (T-RFLP) により解析し、季節的な変動があり、その変動は水温と河川水量によって大きく影響されることを示した³⁾。また、夏期には特定の位置でTerminal Restriction Fragment (T-RF) の大きなピークが観察され、ある種の細菌が優占化するこ

とも示した³⁾。この様に、河川での細菌群集構造は、年間を通して、ある程度の規則性をもって変化する可能性が示された。

そこで、本研究では、広瀬川河川中での細菌群集構造の変化が、周期的なものであるか否かを検討するため、さらに2年間調査を継続した。また、夏期に下流に向かって特定の細菌が優占化する現象の再現性の確認と、その細菌種の特定に関しても検討を行った。河川の細菌群集変化の周期性が示されれば、温暖化や有機物負荷の上昇等、大きな環境変化に伴い、その周期性が崩れていくことが予想でき、河川を管理していく上で細菌群集調査を行っていくことの有用性を見出せると考える。

2. 実験方法

2.1 河川水のサンプリング

実験には仙台市を流れる広瀬川(源流から名取川合流点まで約45km)の河川水を利用した。年間を通した細菌群集の変動を調査するため、上流域から下流域までなるべく等間隔になるように、合計8ヶ所のサンプリングポイント(Sp)を設定した。図-1に8ヶ所のSpを示す。

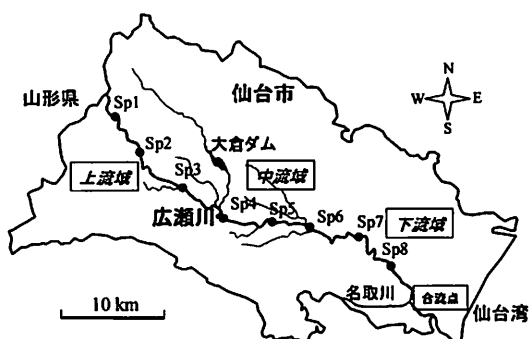


図-1 仙台市および広瀬川サンプリングポイント

設定した Sp は、作並の源流域から始まり、宮沢橋までの間である。サンプリングポイントの名称は、Sp1: 源流域、Sp2: 相生橋、Sp3: 作並川崎、Sp4: 苦地橋、Sp5: 開成橋、Sp6: 生瀬橋、Sp7: 大橋、Sp8: 宮沢橋である。河川水のサンプリングは 2006 年 12 月から 2008 年 10 月まで、約 2 ヶ月毎、合計 12 回行い、前報告⁹⁾と合わせると連続して 3 年間の調査となる。サンプリング日は、河川の状態が普段と極端に異なる場合を避けるため、過去 1 週間の作並観測所（国土交通省雨量観測所、図-1 の Sp2 付近）における累計雨量が 50 mm 以下の日を選択した。しかしながら、2008 年 4 月 23 日の採水においてのみ、累計雨量が 87 mm となった。採水は Sp1, Sp3, Sp5 では河川中に入り、柄付採水器により流心部付近から 2 L を採水、その内の 500 mL を容器に移し、サンプルとした。残りの Sp では橋の上から流心部に採水器を下ろし、3 L を採水し、その内の 500 mL をサンプルとした。採水した水深は水面から 30 cm の範囲内であった。サンプルは 4℃で保存、10 時間以内に実験に使用した。また、細菌群集に影響をおよぼすと考えられる支流や下水処理場からの有機物流入負荷の情報に関しては入手しておらず、本研究の解析では変動要因として考慮していない。

22 DNA 抽出方法

河川水試料からの DNA 抽出は既報⁹⁾に示したとおりに行った。試料中の微生物をフィルターに捕捉し、SDS 処理、Bead Beater 処理を行った。抽出した DNA は 40 μL の TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) に溶解、その後マイクロスピナラム S-300 HR (GE Healthcare 社製) で精製を行った後、最終的に TE で容量を 50 μL に調整した。

23 T-RFLP による解析

河川水から抽出した DNA をテンプレートに、細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、T-RFLP 解析に使用した。この際、プライマーペアは Bact9f (5'-GAGTTTGATCMTG

GCTCAG-3'), Bact1492r (5'-ACGGYTACCTTGTTAGGACT T-3')⁹⁾で、Bact9f の 5'末端は 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識し、Bact1492r の 5'末端は 2,7,8-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5'-carboxyfluorescein (NED) で標識したもの (Applied Biosystems 社製) を、酵素は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用した。PCR 反応は、Pre-heating; 94℃, 2 分に続き、第 1 段階; 94℃, 20 秒, 第 2 段階; 55℃, 30 秒, 第 3 段階; 72℃, 2 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension; 72℃, 7 分を行った。PCR 産物はマイクロスピナラム S-300 HR で精製後、約 50 ng の DNA を 5 U の制限酵素 *Bst*UI (New England Biolabs 社製) で切断し、Sephadex G-50 (GE Healthcare 社製) を蒸留水で膨潤させたものでろ過し、脱塩処理を行った。その後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) により Gene Mapper (Applied Biosystems 社製, Ver 3.7) モードで運転、解析を行い、Terminal Restriction Fragment (T-RF) のピークデータ (0~600 bases の範囲) を取得した。T-RF ピークデータは 16S rRNA 遺伝子の 5'末端および 3'末端に関して得られたが、本研究では 5'末端の 6-FAM による解析結果のみを利用した。また、内部標準には GeneScan500 ROX (ROX: 6-carboxy-X-rodamine, Applied Biosystems 社製) を利用した。

24 多次元尺度法による解析

前項の Gene Mapper で得られた T-RF のピークデータは、SPSS 10.0 J for Windows (SPSS 社製) を利用して、多次元尺度法による非相対度解析を行った。19 bases の Bact9f より大きい 20~519 bases の範囲で、T-RF のピークデータは 1 base 刻み (四捨五入) でピーク面積割合 (%) により整理した。つまり、各々のピーク面積値は総合計面積値で除し、ピーク面積割合を算出した。1 つのデータに関してピーク面積割合の合計は 100 % となる (この際、ピーク面積が 1% 以下のものに関しては解析対象外とし、合計から除いてある)。T-RF プロファイル A と B の非相対度 (距離) は以下のように表される。

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{i=1}^P (A_i - B_i)^2} \quad \cdots \cdots (1)$$

ここで、 D_{AB} : T-RF プロファイル A, B の距離、P: ピークの種類の合計 (ここでは 20 から 519 bases までの 500 種類)、 A_i : T-RF プロファイル A の i (1~500 まで) 番目のピーク面積割合、 B_i : T-RF プロファイル B の i (1~500 まで) 番目のピーク面積割合である。ピークが検出されない場合は A_i や B_i の値は 0 として処理した。本計算によって複数の T-RF プロファイルの距離行列が作成され、そのデータを SPSS 10.0 J で解析し、非相対度の 2 次元プロットを作成した。また、T-RF プロファイルで

は 28 bases 付近にピークが出現したが、GeneScan500 ROX の大きなピークがキャンセリングできないために出現したものであり、このピークも解析から除外した。

2.5 16S rRNA 遺伝子クローンの取得および解析

河川水から抽出した DNA をテンプレートに細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。この際、プライマーペアは 23 と同様に Bact9f, Bact1492r[®] を使用したが、蛍光標識のないものとした。PCR の反応試薬、増幅条件は、23 に示したとおりである。PCR 増幅産物は、マイクロスピナラム S-300 HR でプライマーを除去した後、図-2 に示す TA クローニング用のプラスミドベクター pKNA90XT にクローン化した。pKNA90XT は pKNA80[™] (pTrc99A 由来) のマルチクローニングサイト内の *EcoRI*~*HindIII* までは切り出し、図中の 2ヶ所の *XcmI* サイトを有する DNA 断片に置き換えたアンピシリン耐性の TA クローニング用プラスミドベクターであり、*XcmI*~*XcmI* の間は切断、除去後に使用した。得られた形質転換体のコロニーを滅菌した爪楊枝で少量採取し、10 μ L の TE が入った PCR チューブに懸濁させ、95℃、5 分で処理、プラスミドの熱抽出を行った。本抽出物をテンプレートに、プラスミドに 16S rRNA 遺伝子のクローンが挿入されていることを確認するため、pKNA90XT の挿入部の上・下流の塩基配列から、pKNA-fl (5'-GTG AGCGAGGAAGCGGAAGA-3')、pKNA-rl (5'-AAGGGC GACACGGAAAT) をデザインし、プライマーペアとして使用した。PCR 反応には Ex Taq Hot Start Version を使用、第 1 段階、98℃、10 秒、第 2 段階、60℃、30 秒、第 3 段階、72℃、90 秒を 30 サイクル繰り返した。1 種類の河川抽出 DNA について約 50 個の 16S rRNA 遺伝子クローンを取得した。本 PCR 増幅産物は、マイクロスピナラム S-300 HR で精製し、上流側の 700 bases の塩基配列を片側から決定した。DNA シーケンシング用試薬、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 社製) により、添付マニュアルに従って反応、処理を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。得られた塩基配列データは、インターネット上で Ribosomal Database Project (RDP) に送付、近縁種を決定した。また、決定した配列から、夏期に優占化した T-RF ピークと判断された 16S rRNA 遺伝子クローンに関しては、これをテンプレートに 23 に従って T-RFLP 解析を行い、出現位置を確認した。加えて DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の Clustal W により、近隣接合法の Kimura 法により系統解析を行った。

3. 実験結果

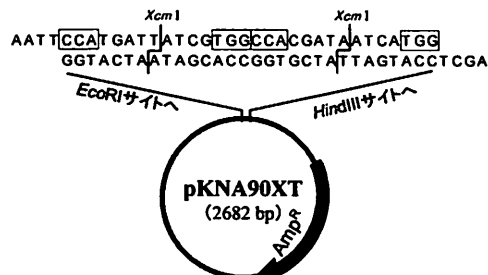


図-2 プラスミドベクター pKNA90XT

表-1 各サンプリングポイントでの水温・pH
(2/17/08 の Sp8 は採水できず)

採水日	12/23/06	2/20/07	4/10	6/9	8/21	10/11
サンプリングポイント	水温 (°C)					
Sp1	4.9	2.4	5.5	12.1	17.0	12.3
Sp2	6.2	3.8	7.2	14.9	21.0	14.3
Sp3	5.7	3.8	7.0	14.2	21.0	13.0
Sp4	5.0	4.0	7.4	15.8	21.0	14.8
Sp5	5.3	3.8	7.7	15.3	21.3	15.0
Sp6	5.3	4.0	8.2	16.5	22.8	15.5
Sp7	5.5	4.4	8.6	17.7	23.3	15.6
Sp8	5.2	4.5	9.0	18.8	25.0	15.6
	pH					
Sp1	6.64	6.55	6.51	6.93	7.00	6.91
Sp2	6.92	6.84	6.61	7.19	7.20	7.07
Sp3	7.07	7.11	6.69	7.25	7.34	7.17
Sp4	7.14	7.23	6.84	7.39	7.64	7.32
Sp5	7.17	7.21	6.93	7.50	7.58	7.53
Sp6	7.51	7.37	7.06	7.68	7.87	7.77
Sp7	8.13	7.65	7.16	8.26	8.05	8.46
Sp8	8.31	7.70	7.19	7.95	7.61	8.42
採水日	12/23/07	2/17/08	4/23	6/18	8/8	10/18
サンプリングポイント	水温 (°C)					
Sp1	4.0	0.0	7.7	11.2	16.3	11.0
Sp2	5.8	1.5	9.5	15.6	21.7	13.8
Sp3	4.8	1.0	9.0	15.9	21.2	13.0
Sp4	4.6	0.5	9.0	15.0	22.1	14.1
Sp5	4.2	1.0	8.8	15.0	21.9	14.1
Sp6	4.6	1.6	9.4	16.2	23.0	14.6
Sp7	4.6	2.2	9.6	17.0	24.2	15.2
Sp8	4.5	—	10.0	18.0	28.0	15.8
	pH					
Sp1	6.28	6.35	6.28	6.45	6.75	6.82
Sp2	6.50	6.79	6.49	6.84	7.00	7.05
Sp3	6.80	6.98	6.63	7.06	7.25	7.15
Sp4	6.90	7.03	6.75	7.23	7.46	7.31
Sp5	7.01	7.15	6.80	7.38	7.56	7.34
Sp6	7.27	7.57	6.90	7.74	8.26	7.58
Sp7	7.38	7.95	6.93	7.94	8.40	7.75
Sp8	7.47	—	6.99	7.88	7.71	7.81

3.1 水温・pH および水位

2 年間にわたって行った河川水サンプリングの採水日、採水時に測定した各 Sp での水温および pH を表-1 に示す。水温は上流から下流に向かって上昇する傾向にある。年間を通して最も水温が低かったのは 2 月で、特に 2008 年は、全域で 0.0~2.5℃ の範囲であった。水温が最も高かったのは、8 月で、最下流では 25℃ 以上となった。pH も下流に向かって上昇する傾向にあり、ほとんどの時期で、pH 6 台から 8 付近に上昇しているが、2008 年の 4 月のみ、最下流でも 6.99 に止まった。

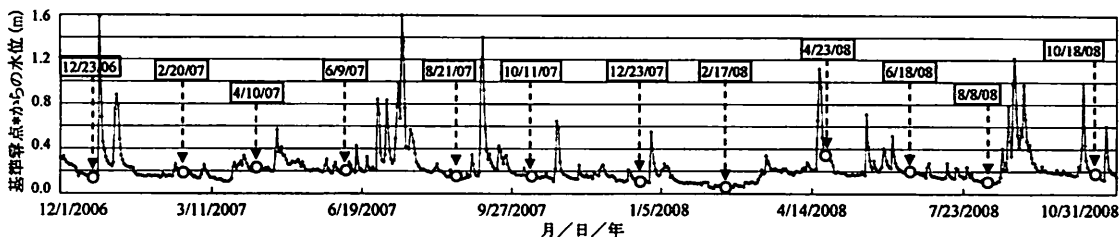


図-3 落合観測所での水位変化と採水日の水位⁸⁾
(採水日は枠内に表示し水位は○印、*基準点は東京湾平均海面、落合観測所はSp6の約220 m上流)

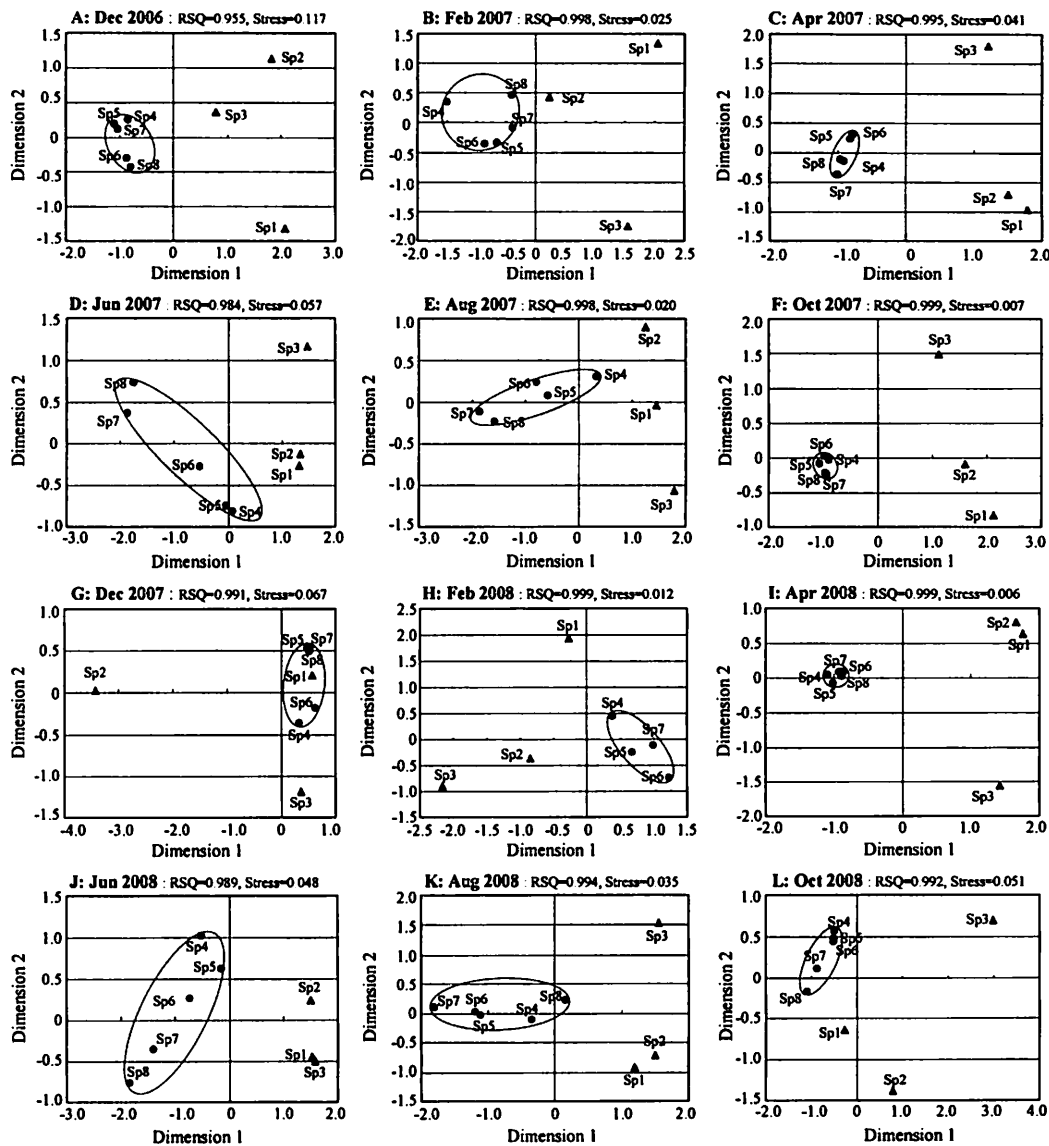


図-4 多次元尺度法によるT-RFプロファイルデータの解析
(HではSp8のサンプルが採取できずSp8のプロットが欠損)

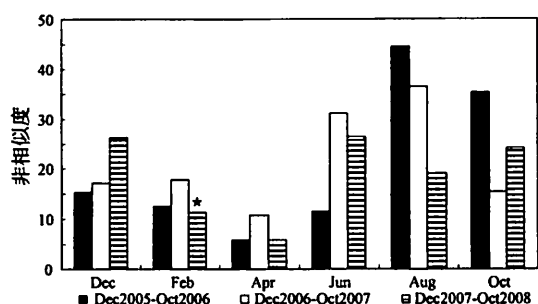


図-5 各サンプルでのSp4とSp8(★はSp7)との非相類似度 (非相類似度は式(1)により算出した値)

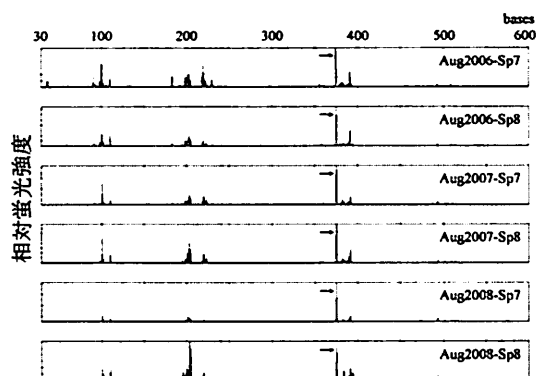


図-6 8月のSp7・8でのT-RFパターン(2006-2008) (図中の矢印は優占ピーク)

また、流量変化の指標として、国土交通省で測定値を公開している基準零点からの水位を入手した⁹⁾。観測点はSp6の約220 m上流に位置する落合観測所で、時間毎のデータを平均して日平均流量を計算し、図-3に示すとおり経時変化として整理した。12回の採水日を比較すると、0.2 m程度が平均的な水位となっている。2008年の4月で相対的に高い水位(0.34 m)となり、2008年の2月で低い水位(0.047 m)となった。

32 細菌群集構造の季節変動解析

年間を通した河川水中の細菌群集構造の変化を解析するため、表-1に示した日時に各Spで採取されたサンプル全てに関してT-RFプロファイルのデータを取得し、2.4で述べた多次元尺度法によって解析を行った。本解析では、多次元尺度法で得られる2次元平面状での非相類似度(距離)が大きくなった場合に、差異が大きいと判断した。結果を図4に示す。図4のA~LはT-RFプロファイルを多次元尺度法で解析した結果である。各図の上部のRSQは決定係数で、Stressはストレス値である。本図では上流域のSp1~Sp3までは▲で、中・下流域のSp4~Sp8までは●のプロットとして区別した。また、本調査に先立って行ったT-RFLP解析結果から一定の変

動パターンが観察された⁹⁾Sp4からSp8までのプロット変動範囲を楕円の枠で示した。

RSQ値は0.6以上で解析結果を受け入れて良いとされている。A~LまでのRSQは0.955以上であり、極めて高い値を示している。また、ストレス値は0.05以下が「Good」、0.1以下が「Fair」、0.2以下が「Poor」として評価されるが、B, C, E, F, H, I, J, Kが「Good」の範囲、D, G, Lが「Fair」の範囲内であり、Aのみ0.117と「Fair」の範囲を若干超えた。この様に、RSQとストレスの値から判断して、T-RFプロファイルデータに適用した多次元尺度法の解析は概ね良好であり、結果を受け入れてよいと判断することができる。

図4のA~Lまでの個々のプロットの位置を見ると、Sp1~3は相互に離れており、上流域の細菌群集構造に差異があることがわかる。Sp1~3のT-RFピークの出現位置はそれぞれに異なっており、Sp4~8のピーク出現位置とも異なっていた。これは前報告⁹⁾でも観察されており、複数年でもこの傾向は変わらない。Sp4~8までのプロットの変動範囲について、2年間の変化の月ごとの特徴を見ると、4月はSp4~8までの5点のプロットが小さな範囲に集まっており、細菌群集にあまり変化がないことが分かる。一方、6月と8月はプロットの変動範囲が広く、Sp4からSp8に向かって距離が徐々に離れている傾向がある。このような場合、変化はランダムでなく、一定の規則性(特定の細菌に対応するT-RFのピークが徐々に大きくなったり、小さくなったり)を持っていることを意味している。2008年8月のKのみは、Sp7まではこの傾向に従ったが、Sp8で再びSp4に近くなった。その他の2月、10月、12月に関しては、変動範囲は4月と6・8月の中間的なものとなっている。本傾向は、前年度の解析⁹⁾でも確認されている。

多次元尺度法では、式(1)で計算された非相類似度はスケーリング処理を受け、距離が相対的になる。そこで相互の距離が年間を通して変化するSp4とSp8の非相類似度を、算出し、図-5に示す結果を得た。今回の調査結果に加えて、その前の1年間の結果⁹⁾も加えて表示した。2008年の2月(図4のH)はSp8でのサンプルが欠損しており、Sp7と比較した。3年にわたる年間変動にはパターンがあり、2006年、2007年は4月の変動が最小、8月の変動が最大となり、その間は徐々に変化している。また、2008年8月(図4K)は前述のとおり、例外的にSp8で再びSp4に近づいたため、6月や10月の方が大きな値となっているが、Sp4とSp7の非相類似度の計算値は30.6と最大値となる。この様に、細菌群集の下流に向かう変化の度合いは、1年を周期として、概ね規則的に変化していることが明らかとなった。

次に、下流域に向けて変動範囲が大きくなった8月の

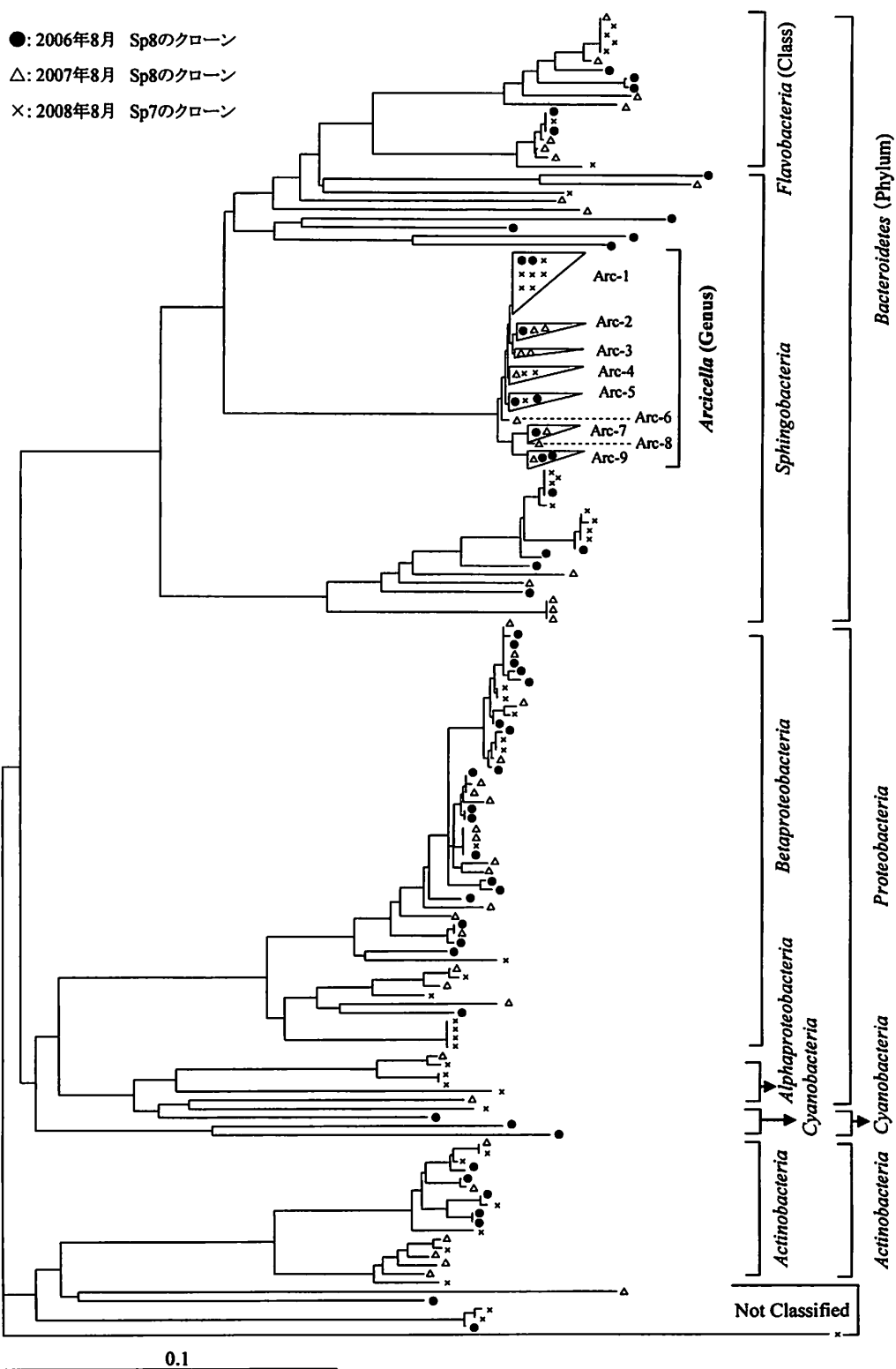


図-7 16S rRNA遺伝子クローンの系統解析結果
 (Arc-1～9まではT-RFプロファイルで主ピークとなった*Arcicella*属に近縁なクローン)

Sp7, Sp8のT-RFプロファイルを前報告⁹⁾のデータと共に図-6にまとめた。本図では、375.5 bases付近のピークの相対割合が高い。このピークは1年を通してSp4かSp5で出現し、以降の下流域でも継続して検出された。水温が15℃以下ではピークの相対割合は低くSp4～Sp8で変化は少なかった。一方、水温が15℃以上に上昇する6～10月には、下流域に向かって大きくなる傾向があり、その結果、図-5に示したように非相似度の値が上昇した。

3.3 夏期に優占化する細菌種の特定

図-6に示したT-RFプロファイルの375.5 bases付近のピークの細菌種を特定するため、2006年8月のSp8, 2007年8月のSp8, そして2008年8月のSp7 (Sp8では対象ピークが低くなったため、Sp7を使用)の抽出DNAを基にPCR増幅した16S rRNA遺伝子から合計152クローン(2006年-52クローン, 2007年-50クローン, 2008年-50クローン)を取得し、上流側の700 basesの塩基配列を決定、ClustalWによる解析を行って図-7に示す系統樹を得た。解析の結果、T-RFの375.5 basesのピークは、図の上部のArc-1～9までの*Arcicella*属に近縁な細菌(以下、*Arcicella*属細菌)由来であることが明らかとなった。Arc-1～9以外のクローンで375.5 bases付近にピークを有するクローンは存在しなかった。*Arcicella*属に近縁なクローンの出現割合は、26/152であった。16S rRNA遺伝子の配列は、9種類あり(Arc-1～9までの塩基配列のAccession NumberはAB520764～AB520772である)、それら全てのクローンでT-RFの出現位置を調査し、計算値は全て378 bases、実測検出位置は375.5±0.5 basesであることを確認した。また、系統樹で最も離れているArc-1とArc-9の相同性は98.6%であった。*Arcicella*属細菌は増殖速度の遅い細菌として近年Type Strainが単離されている⁹⁾。図-7の出現クローン全体の種類を見ると、*Bacteroidetes*と*Proteobacteria*(特に*Betaproteobacteria*)がクローンの多くを占めることが分かった。

4. 考察

広瀬川河川中に生息する細菌群集を16SrRNA遺伝子を基に調査した結果、細菌群集構造の変化は季節による影響を大きく受け、年間を通してある程度の規則性を持って変化することが明らかとなった。海外の河川を対象とした従来の研究¹⁻⁴⁾では、明確な規則性は示されておらず、日本の短い河川の特徴かもしれない。

上流から下流域まで、8ポイントのT-RFプロファイルデータを基にした多次元尺度法による解析(図-4)では、前年度の解析⁹⁾も含め、3年間にわたって類似点が観察された。Sp1～Sp3の上流域では相互の非相似度が高い。一方、Sp4～Sp8の中・下流域では4月に地点間の非相似度

が低くなるが、6月と8月は下流に向かうにつれて、非相似度が徐々に大きくなる傾向が観察された。図-5に示したSp4とSp8の非相似度の比較も、この結果と一致する。調査1年目は8・10月、2年目は6・8月、3年目は6・8月(ここは32で示したSp4とSp7の値30.6の場合)と高い値を示している。6・10月は年毎に高低はあるものの、8月を挟んで、概ね夏期に高い値をとっており、周期的な変化となっている。

また、図-6に示すように、3年にわたって8月には、特定の細菌種が優占化したことが分かった。8月に加えて、2006年には10月⁹⁾、2007年と2008年には6月にも本ピークが優占化した。図-4で、Sp4～Sp8に向かって非相似度が増加した図-4D, 4E, 4J, 4Kがこれに対応している。

次に、これらのサンプルから16S rRNA遺伝子クローンを取得、塩基配列を決定し、系統解析を行い、図-7に示す系統樹を得た。その結果、優占種は*Arcicella*属細菌に近縁な細菌であることを確認した。最も出現頻度の高かったArc-1の16S rRNA遺伝子クローンの塩基配列は、海域由来のUncultured bacterium clone 3C003679 (Accession No: EU802241)⁹⁾と100%一致、またUncultured *Cytophagales* clone PRD01a001B (AF289149)と99.9%の相同性を有していた¹⁰⁾。Clone PRD01a001Bはアメリカのマサチューセッツ州Parker River由来であるが、報文では*Cytophagales bacterium*のグループの1クラスターとして分類されている¹⁰⁾。これらはRDPで*Arcicella*属に分類されており、今回検出したArc-1からArc-9までのクローンは*Arcicella*属細菌由来と判断して問題ないと考えられる。相同性は99.1%に低下するが、単離株としてはBacterium Strain MB-53 (AJ964899)が最も近縁である。本細菌は淡水からの単離株であるが、研究内容は公表論文となっていない。この様に、本研究のクローンと近縁な*Arcicella*属細菌の淡水中での詳しい生態は明らかになっていないのが現状である。

*Arcicella*属細菌の優占化は、河川中の有機物分解にかかわった結果として考えるのが一般的である。相同性は91.8%と低下するが、Type Strainの*Arcocella aquatica* strain NO-502Tが淡水系の生物膜から単離され、増殖速度は遅いとの報告がある¹¹⁾。それゆえ、広瀬川河川中でも生物膜を形成し、結果として河川水中で優占化する可能性があり、今後は生物膜の解析も進めていく必要がある。また、*Arcicella*属細菌の役割解明のためには、単離株の取得が必要であり、これまでに、R2A培地によって*Arcicella*属細菌のコロニー取得を試みたが、得られていない。

3年間の調査の結果、分子生物学的な分析手法の適用によって、細菌群集の解析のみでも、その変動を含めた特徴把握ができた意義は大きい。また、例えば温暖化が進み、広瀬川の水温が上昇すれば、夏期に見られる

*Arcicella*属細菌の優占化の期間が1年の中で長くなることが予想でき、指標細菌としての利用が可能である。今後は、*Arcicella*属細菌の単離と共に、16S rRNA遺伝子を標的とした定量検出を確立して、年間変動をさらに詳細に把握する。また、本細菌が他の河川でも優占種として存在しているか否かを検討するため、調査対象を広瀬川以外へも拡大していく必要がある。

参考文献

- 1) Sekiguchi, H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu, and H. Uchiyama: Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5142-5150. 2002
- 2) Winter, C., T. Hein, G. Kavka, R. L. Mach, and A. H. Farnleitner : Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a Whole-River Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 421-431. 2007
- 3) Beier, S., Karl-Paul Witzel, and Jürgen Mansen: Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 188-199. 2008
- 4) Meredith A. J. H., L. A. Kaplan, and D. A. Stahl: Recurring Seasonal Dynamics of Microbial Communities in Stream Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 713-722. 2006
- 5) 中村寛治, 濱谷美希, 相澤瑛美, 阿部晋太郎, 川口猛: 広瀬川河川中に生息する細菌群集構造の季節変動, *環境工学研究論文集*, 45: 415-422. 2008
- 6) Lane, D. J.: 16S/23S sequencing, p. 115-176. *In* E. Stackbrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons, New York, NY. 1991
- 7) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭: フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析, *環境工学研究論文集*, 36: 1-10. 1999
- 8) 国土交通省, 水文水質データベース(<http://www1.river.go.jp/>), 仙台市落合観測所時刻水位データ
- 9) Shaw, A. K., A. L. Halpern, K. Beeson, B. Tran, J. C. Venter and J. B. Martiny: It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. *J. Environ. Microbiol.* 10: 2200-2210. 2008
- 10) Zwart, G. J. M., B. C. Crump, M. Agterveld, F. Hagen and S. K. Han: Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *J. Aquat. Microb. Ecol.* 28: 141-155. 2002
- 11) Nikitin, D. I., C. Strömpl, M. S. Oranskaya, W.-R. Abraham: Phylogeny of the ring-forming bacterium *Arcicella aquatica* gen. nov., sp. nov. (ex Nikitin et al. 1994), from a freshwater neuston biofilm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(Pt 3): 681-684. 2004

(2009. 5. 22 受付)

Recurring Seasonal Changes in Bacterial Community of the Hirose River and Bacterial Group Dominated during the Summer

Kanji NAKAMURA¹, Takumi NEMOTO¹, Masakuni TAKAHASHI^{1,2},
Saiki CHIBA^{1,3}, Yasunori HASHIURA^{1,4}

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University

²Tohoku Information Systems Company, Incorporated

³Shinryo Corporation

⁴Kahoku Construction Corporation

Seasonal changes of bacterial populations in the Hirose River were examined. Eight sampling points (Sp) were set along the whole river. PCR amplified 16S rRNA genes were used for the population analysis. Although random changes of bacterial population were observed in the upstream region, the changes were relatively regular in the midstream and downstream regions. Regular changes of the bacterial population in those regions were remarkable when river water temperatures were high and river flows were low. Dominant bacterial group was consistently detected as a peak at a certain position in terminal restriction fragment length polymorphism analysis in August for 3 consecutive years. Phylogenetic analysis showed that the dominant bacteria belonged to genus *Arcicella* and they recurrently become dominant in the downstream region during the summer.