

6. 河川環境評価システムの開発 —細菌フローラの解析支援システムの開発—

1. 採水地点とその環境
2. 細菌フローラと化学物質分解菌の分布
3. フローサイトメトリーによる細菌群集の解析

大阪大学薬学部教授 近藤雅臣
大阪大学薬学部助手 那須正夫

河川の浄化には、河川ごとにその環境を定性的、定量的に解析し、それぞれに適した的確な対策を講ずる必要がある。また河川の汚染を未然に防ぐためには、環境の変化を早期に見出すことが重要である。そのためには、物理的、化学的、生物学的な種々の環境指標が用いられているが、なかでも生物相の解析は河川環境を生態学的に理解する上で不可欠なものである。

しかし河川環境をそこに生息する生物を用いて評価するにあたっては、解決すべきいくつかの問題点が残されている。たとえば水生生物は、環境指標として確立されたものであるが、その調査研究には分類学的な専門知識が必要であり、広く一般的に利用する上での制約となっている。また細菌は環境の変化にすみやかに対応するので、すぐれた環境指標となりえることが知られているが、河川に生息する細菌の90%以上は培養が困難な細菌であり、培養にたよらない新たな手法の開発が課題となっている。

そこで、本調査・研究では、従来から用いられている培養法に加え、フローサイトメトリーなどの種々の方法を組み合わせることにより、河川に生息する細菌の多様性や細菌フローラを総合的に解析し、河川環境との関係を明らかとした。

1. 採水地点とその環境

大阪府北部を流れる猪名川および箕面川、大阪市内の淀川、寝屋川に定点を設定した（図1、表1）。試料には、各地点の表層水を用いた。採水時には、気温、水温、pHを測定した。

高山、滝上、瀬川、桑津の水質を、そこに生息する水生生物から判定した結果、高山と滝上は貧腐

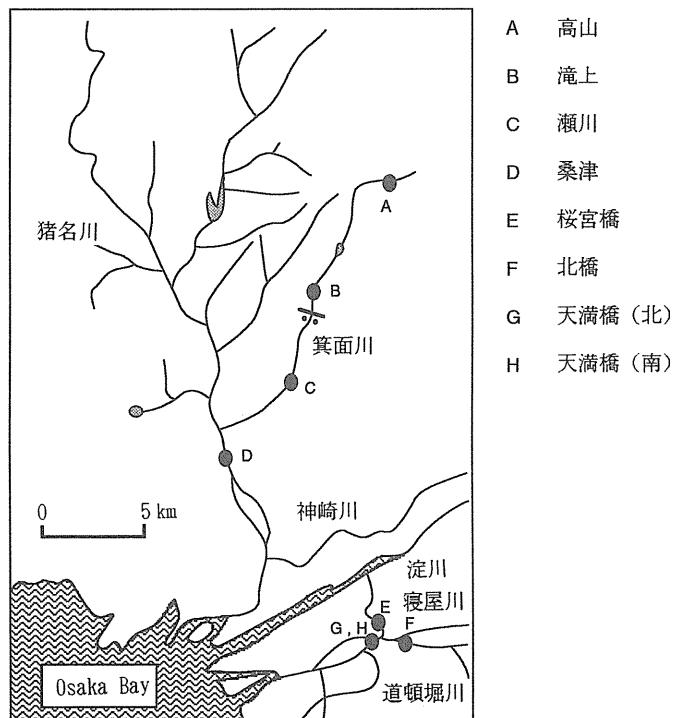


図1 採水地点

表1 採水地点とその環境

採水地点名	位 置 と 環 境
高山（箕面川）	箕面治水ダムの上流に位置し、付近には民家や農地がある。
滝上（箕面川）	箕面国定公園内にあり、箕面の滝の上流。
瀬川（箕面川）	箕面川の中流にあり、周囲は住宅街。
桑津（猪名川）	大阪空港の西側にあり、箕面川が猪名川に合流後の下流に位置する。 付近には工場が点在する。
桜宮橋（淀川）	比較的汚染の少ない新淀川からの水が流れ込んでいる。
北橋（寝屋川）	大阪ビジネスパーク内。汚染はかなり進んでいる。
天満橋（淀川）	淀川と寝屋川の合流地点。北側と南側では、それぞれ上流の河川の影響を受けている。

水生 (O S : oligosaprobic zone) 、瀬川の水質は β 中腐水性から α 中腐水性 (β m S ~ α m S : β mesosaprobic zone から α mesosaprobic zone) 、桑津は α 中腐水性から強腐水性 (α m S ~ P S : α mesosaprobic zone から polysaprobic zone) であった。

表2は、各地点における全菌数（以下T D Cと略す）、生菌数（以下C F Uと略す）、T D Cに対するC F Uの比率、および全有機炭素量（以下T O Cと略す）を示したものである。

表2 各採水地点における全菌数、生菌数、T O C値

採水地点名	全菌数 (cells/ml)	生菌数 (cells/ml)	生菌数／全菌数 (%)	T O C値 (ppm)
高 山	2.1×10^5	9.5×10^3	4.5	2.1
滝 上	4.7×10^5	9.7×10^3	2.1	1.9
瀬 川	5.7×10^5	5.0×10^4	8.8	2.6
桑 津	2.3×10^6	2.4×10^5	10.4	4.9
桜 宮 橋	3.4×10^6	1.3×10^5	3.8	3.5
北 橋	6.0×10^6	2.4×10^5	4.0	8.1
天満橋(北)	3.8×10^6	5.8×10^4	1.5	2.6
天満橋(南)	7.0×10^6	1.0×10^6	14.3	6.9

2. 細菌フローラと化学物質分解菌の分布

河川水中の細菌は、つねにその環境に適応して一定の細菌フローラを形成している。したがって、河川に特定の化学物質が流入し、その環境が変化すると、そこに生息する細菌の群集構造や生物学的活性に大きな変化が生じる。すなわち、細菌フローラはその生息する河川環境を反映しているので、細菌の群集構造解析、また化学物質分解菌の動態解析は、河川における化学物質汚染の現状を知るうえで最も参考となる直接的データを示してくれる。そこで、箕面川、猪名川、および寝屋川の5地点について河川水中の化学物質分解菌数について検討した。

まず、生化学テストにより、高山、滝上、瀬川、桑津、北橋の5地点の細菌フローラを解析した。

細菌属の同定は、表3に示した検索表にもとづいて行った。図2は、5地点から単離した各100株、計500株の属同定結果である。その結果、高山、滝上、瀬川においては優先種は異なるものの、細菌属の分布パターンには類似性が認められた。桑津では他の地点よりも *Pseudomonas*属の細菌が高い割合を占めていた。また、非汚染水域には数多くの属種の細菌が存在するのに対し、汚染域では細菌種の収束が見られた。これは汚染物質によるストレスが強くなるにつれて、感受性の高い細菌は減少し、抵抗性のある細菌のみが増殖し続けるからであると考えられた。

表3 細菌検索表

属名*	gram reaction	shape	catalase	oxidase	motility	O/F	spore	GC content (mol %)
<i>Acinetobacter</i>	-	R	+	-	+/-	O	-	38-47
<i>Flavobacterium</i>	-	R	+	+	-	O	-	31-42
<i>Pseudomonas</i>	-	R	+	+/-	+	O	-	58-70
<i>Alcaligenes</i>	-	R-S	+	+	+	-	-	56-70
<i>Enterobacter</i>	-	R	+	-	+	F	-	52-60
<i>Vibrio</i>	-	R	+	+	+	F	-	38-51
<i>Aeromonas</i>	-	R-S	+	+	+	F	-	57-63

* "Bergery's Manual of Systematic Bacteriology" をもとに作成

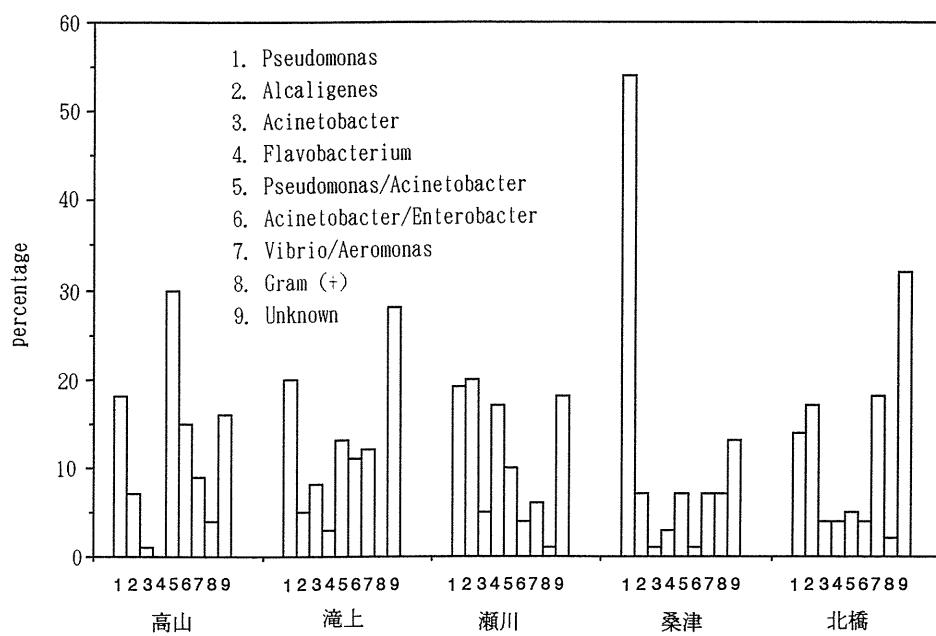


図2 細菌属の同定結果

次に、単離・同定を行った細菌株すべてについて化学物質分解性を調べた（表4）。各々の採水地点から得た計500株のうち、アニリン分解能を有するものはまったく認められなかった。一方、フェノール分解菌およびカテコール分解菌はいずれの地点においても認められ、とくに汚染の進んだ北橋ではフェノール分解菌が多く存在した。また、桑津ではカテコール分解菌が他の地点よりも多く存在した。この結果より、清浄な水域に比べ、桑津や北橋のように汚染の見られる地点では、化学物質分解菌の割合の高いことがわかった。

表4 各採水地点の化学物質分解菌数

採水地点	分解菌の割合 (%)		
	Aniline	Phenol	Catechol
高山	< 1	3	8
滝上	< 1	1	4
瀬川	< 1	1	4
桑津	< 1	5	41
北橋	< 1	32	7

化学物質は、特定の属種の細菌によって分解される傾向のあることが知られている。そこで、化学物質の分解性とその属との関係を考察した（表5）。これより、清浄な地点ではカテコールやフェノールの分解菌は主として *Pseudomonas*であるのに対し、汚染の見られる地点では分解菌に様々な属種のものがいることがわかった。

Pseudomonas はどの地点からも普遍的に単離されたが、とくに桑津から単離した株の半数以上がカテコール分解能を有していた。また、汚染された水域に高い割合で生息することが知られているグラ

表 5 化学物質分解菌の属分類

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
高山	Catechol	4/18*				3/30		1/9		
	Phenol	2/18				1/30				
滝上	Catechol	3/20								1/28
	Phenol									1/28
瀬川	Catechol	1/19								2/19
	Phenol									1/19
桑津	Catechol	26/54		1/3	1/7	2/7		2/7	3/4	6/16
	Phenol	1/54						1/7	1/4	1/16
北橋	Catechol	1/14			1/17	1/5		2/18		2/32
	Phenol	5/14	1/4	1/4			1/4	8/18	1/2	8/32

1. Pseudomonas 2. Acinetobacter 3. Flavobacterium
4. Alcaligenes 5. Pseudomonas/Acinetobacter
6. Acinetobacter/Enterobacter 7. Vibrio/Aeromonas
8. Gram (+) bacteria 9. Not identified

* 分解菌数／単離した株数

ム陽性菌は、単離された数こそ少ないので、フェノールやカテコール分解能を持つものが多かった。

以上の結果から、河川水中における化学物質の分解には *Pseudomonas* が大きく関与している可能性が示されるとともに、汚染域では様々な属種の細菌が化学物質分解能を持ち、これは汚染への適応の結果であると推察された。また、化学物質分解菌の分布、また、その特性が河川環境を評価する上で非常に有益であることが確かめられた。

次に、化学物質分解に関与する遺伝子配列をプローブとするハイブリダイゼーション法により、環境中の化学物質分解菌を解析した。

表 6 は、猪名川より単離したアニリン分解菌 *Alcaligenes*I-8 株から得られたプラスミド pAI-8 をプローブに、各地点から得られたカテコール分解菌、フェノール分解菌とコロニーハイブリダイゼーションを行った結果である。pAI-8 は 83kbp で、アニリン分解に関与する遺伝子配列を含むことが確認されている。

カテコール分解菌、フェノール分解菌の多くは pAI-8 と高い相同性を示した。しかしながら、北橋から単離したフェノール分解菌の約 50% は pAI-8 と相同性を持っていなかった。

細菌によるアニリンとカテコール、フェノールの分解性を比較検討するため、以前に桑津から単離したアニリン分解菌 15 株についてカテコールとフェノールの分解性を調べたところ、すべての株がカテコール分解能を有していた（表 7）。また、フェノール分解性を示した株が 6 株存在した。

自然環境中では化学物質分解能は接合や形質転換によって伝播していく可能性も考えられ、今後さらに詳細な検討を計画している。

表 6 化学物質分解菌と pAI-8 との相同性

採水地点	Catechol	Phenol
高 山	6/8*	3/3
滝 上	1/2	1/1
瀬 川	2/3	1/1
桑 津	17/20	3/3
北 橋	1/1	6/13

* 相同性を示した株数／試験菌株数

表 7 アニリン分解菌のカテコール、フェノール分解性

No.	属 名	catechol	phenol
1	<i>Flavobacterium</i>	+	+
2	<i>Flavobacterium</i>	+	+
3	<i>Flavobacterium</i>	+	+
4	<i>Flavobacterium</i>	+	+
5	<i>Flavobacterium</i>	+	-
6	<i>Flavobacterium</i>	+	-
7	<i>Pseudomonas</i>	+	-
8	<i>Pseudomonas</i>	+	-
9	<i>Alcaligenes</i>	+	-
10	<i>Vibrio/Aeromonas</i>	+	+
11	Not identified	+	+
12	Not identified	+	-
13	Not identified	+	-
14	Not identified	+	-
15	Not identified	+	-

3. フローサイトメトリーによる細菌群集の解析

細菌は生態系において、分解者としての役割を果たすとともに、上位の生物に対しても大きな影響を与えており、環境中の細菌の群集構造や動態に関する研究は、環境の浄化に直接寄与し、また環境評価や環境の変化の早期予測などに大きく役に立つ。

しかしながら、環境中の細菌についてはいまだ十分には理解されていない。その原因としては、環境中の細菌が実験室で研究されている一般的な細菌とは異なる性質を持つことがあげられる。

これまで環境中に生息する細菌の計数や多様性の解析の基本は、まず細菌を培養することであった。しかしながら、環境中の細菌は通常の方法では培養が難しく、培養に大きく依存するこれまでの方法では、環境中の細菌群集について正しく解析しているとはいえない。よって、培養に頼らない新たな手法の開発が必要とされている。そこで今回、培養が困難な細菌も含めた環境中の細菌の総合的な解析を目的に、フローサイトメトリーによる細菌群集の解析を試みた。

図3はフローサイトメトリーの原理を示したものである。フローサイトメトリーとは、細胞を浮遊状態にして、流体系中を高速で通過させ、個々の細胞にレーザー光を照射することにより得られるシグナルからそれぞれの細胞についての解析を行う方法である。この方法を用いることにより、個々の細胞の大きさおよび細胞内構造、そしてDNA、RNAなどの細胞内成分についての情報を正確かつ容易に得ることができる。また、数分間で数千個の細胞を測定できるので、既存の方法と比較してはるかに多数の細菌についての情報を短時間に得られ、迅速な群集構造の解析が可能となる。

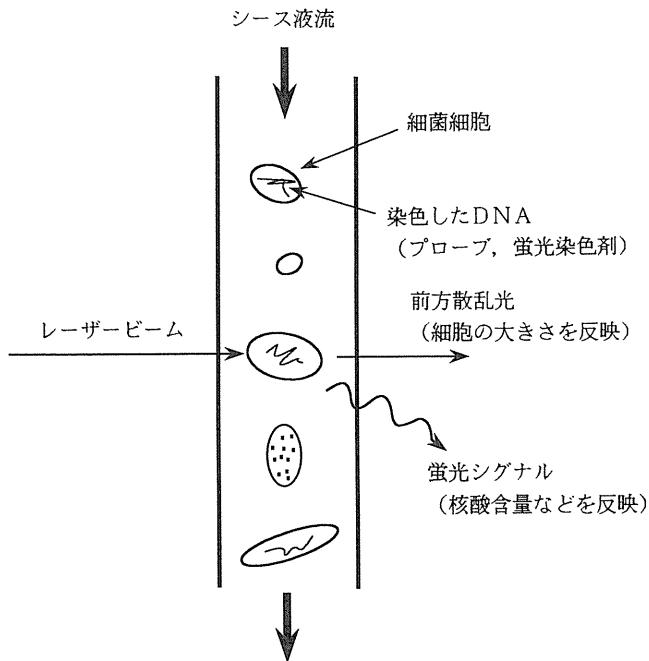


図3 フローサイトメトリーの原理

フローサイトメトリーによる環境試料の解析に先立ち、まず培養細菌を用いて、細菌細胞のみを選択的に測定対象として解析する系の作成を試みた。細菌株としては *E. coli* と *B. megaterium* を用い、核酸の染色には二本鎖核酸に特異的に結合する蛍光染色剤ヨウ化プロピジウムを用いた。電子顕微鏡により両者の大きさを測定したところ、*E. coli* は約 1 μm 、*B. megaterium* は約 5 μm であった（図 4）。

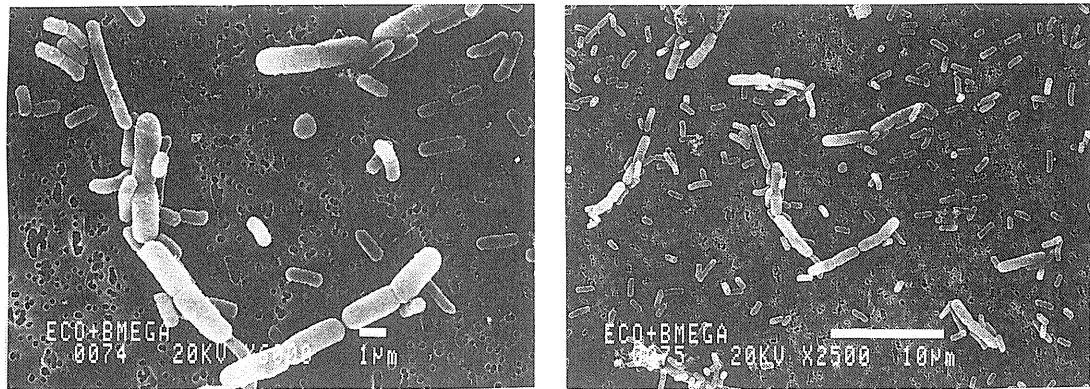


図 4 *E. coli* と *B. megaterium* の電子顕微鏡像

フローサイトメトリーにより各々の細菌株を解析したところ、図 5 に示したように両者について大きさおよび核酸含量の違いを検出できた。すなわち、1 μm から 5 μm の大きさをもつ細菌について、十分に解析できる解析系を確立した。なお、図中の FS シグナルは細菌の大きさを反映し、蛍光シグナルは細菌の核酸含量を反映している。

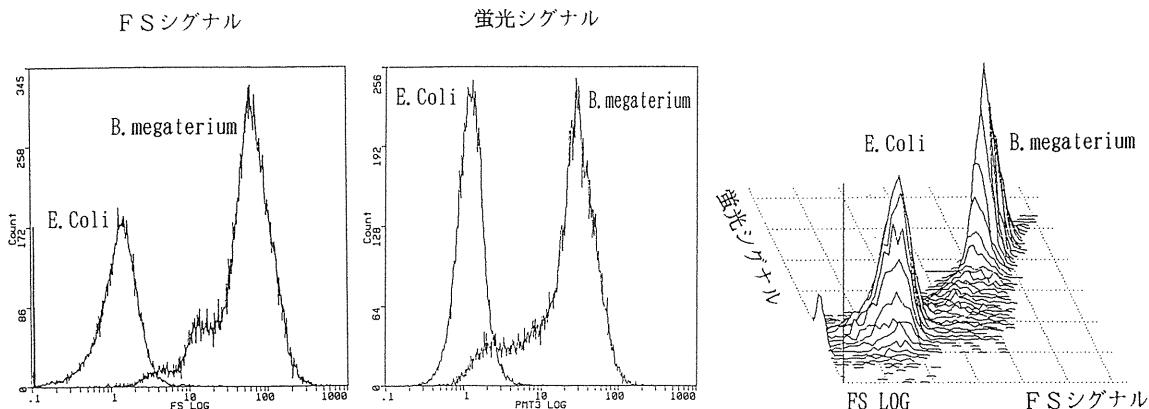


図 5 *E. coli* と *B. megaterium* の解析結果

解析系を確立した上で、次に河川水中の細菌群集の解析を試みた。試料水は、箕面川上流の高山、猪名川の桑津、大川の桜宮橋、天満橋および寝屋川の北橋から採取した。採取した試料水はホルマリンで固定した後、ヨウ化プロピジウムを加えて核酸を染色し、培養菌株と同様の方法で解析した。

各地点から採取した試料の解析結果を図 6 に示した。

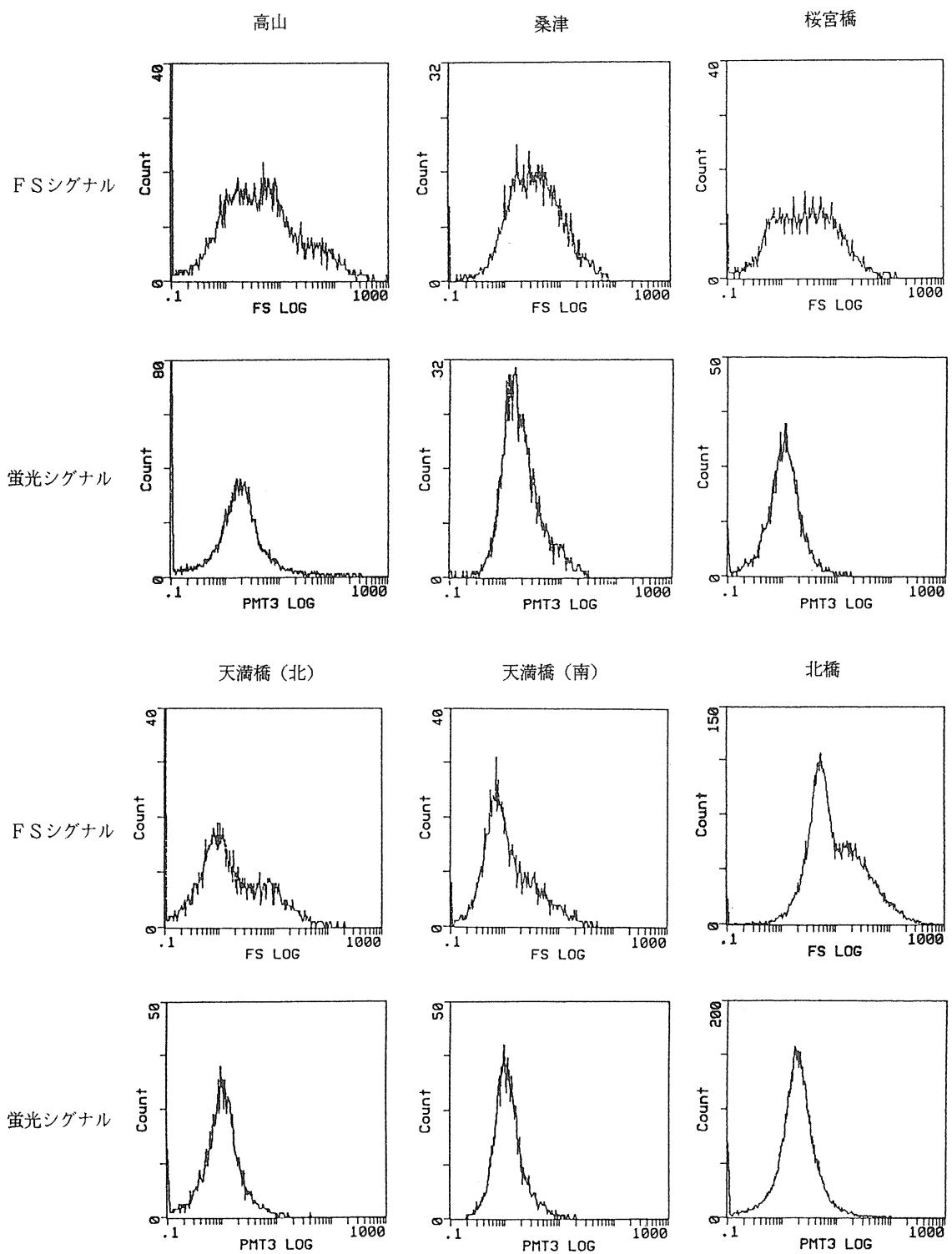


図 6 環境試料の解析結果

F S シグナルより、汚染の激しい北橋および天満橋（南）に比べ、清浄な高山や汚染が北橋ほどには進んでいない桑津、桜宮橋および天満橋（北）では、細菌の大きさにおいて多様性が高いことがわかった。また、蛍光シグナルより、核酸含量には地点による大きな差は見られないことがわかった。この結果より、河川の汚染とそこに生息する細菌の大きさの多様性の間には相関関係が見られるのに對し、核酸含量との間には相関性の見られないことが明らかとなった。

一般的に、清浄な地点ではそこに生息する水生生物の種に多様性が見られることが知られているが、今回の結果から、細菌についても清浄な環境では生息する細菌の大きさに多様性が見られることがわかった。すなわち、清浄な環境には多種多様な生物が生息するが、環境が悪化するにしたがって、生物相がそのストレスに耐えうる生物のみに収束すると考えられた。このことは、汚染が進むにつれて細菌フローラが収束する傾向にあることや化学物質分解菌の現存量が河川の汚染状況を反映していたことからも裏付けられた。

また、今回の結果から、フローサイトメトリーを用いて河川水中の細菌を解析することにより、河川環境の評価が可能となることが示された。

前年度に報告した河川水中の全菌数に対する生菌数の割合（C F U／T D C 値）や細菌による化学物質分解性の測定に加え、今回報告した化学物質分解菌の現存量の測定やフローサイトメトリーによる細菌の解析を行なうことにより、河川環境を微生物学的側面から客観的に評価できるようになった。

参考文献

- ・天神美夫、高橋学、野村和弘（編集）
“フローサイトメトリー ハンドブック”、サイエンスフォーラム、東京（1984）
- ・Anson, J. G. and G. Mackinnon
Appl. Environ. Microbiol., 48, 868 (1984)
- ・Goonewardena, N., M. Goto, M. Nasu, Y. Takubo, T. Nishihara and M. Kondo
Eisei Kagaku, 36, 385 (1990)
- ・Goonewardena, N., M. Nasu, A. Okuda, K. Tani, Y. Takubo and M. Kondo
Biomedical and Environmental Science, 5, 25 (1992)
- ・Hobbie, J. E., R. J. Daley and S. Jasper
Appl. Environ. Microbiol., 33, 1225 (1977)
- ・Konopka, A., D. Knight and R. F. Turco
Appl. Environ. Microbiol., 55, 389 (1989)
- ・Kreig, N. R. and J. G. Holt (eds)
“Bergery's Manual of Systematic Bacteriology”,
The Williams & Wilkens, Baltimore (1984)
- ・Nasu, M., N. Yamaguchi, K. Makino, Y. Takubo and M. Kondo
Bull. Jpn. Soc. Microbial. Ecol., 7, 1 (1992)
- ・Nasu, M., S. Song, N. Yamaguchi, A. Shimazu and M. Kondo

Fresenius Environmental Bulletin, in press.

- 太田和雄（監修）、野村和弘、高本滋（編集）
“フローサイトメトリー・手技と実際”、蟹書房、東京（1984）
- Whyndham, R. C.
Appl. Environ. Microbiol., 51, 789 (1986)
- 芳倉太郎、小田国雄、飯田才一
日水誌、47, 183 (1981)