

<報 文>

酸性河川のヨシ原における リター分解に関する土壤細菌叢の解析*

中村 和徳**

キーワード ①酸性河川 ②ヨシ原 ③細菌叢 ④リター分解 ⑤アンプリコンシーケンス解析

要 旨

河岸に発達する植生帯は、陸域から水域への移行帯であり、独自の多様な生態系を構成する重要な地域である。本研究では有機物の無機化や窒素形態変換等を駆動する土壤細菌に着目し、酸性河川の氾濫原におけるヨシの分解に関わる細菌群集構造を周辺土壌と比較解析し、特徴づけを行った。その結果、特徴的な酸性河川の細菌叢、さらにヨシの分解に関与する細菌叢が周辺土壌とは異なることを明らかとすることができた。両者の細菌群集構造の違いは新鮮な有機物の分解に主に関与する細菌が土壌環境とは異なっており、それは酸性環境の影響を受けることを示唆するものと考えられた。

1. はじめに

日本の河岸や湖岸にはヨシが至る所に群生している。この河岸に発達する植生帯は、陸域から水域への移行帯であり、独自の多様な生態系を構成する重要な地域である。これらのヨシ原は水質浄化性能を有していることが期待される¹⁾。水生植物を利用した水質浄化システムは流入河川の水質を改善するのに最も役に立つ方法であるかもしれない。例えば、ヨシを利用した水質浄化システムが秋田県に位置する八郎湖の流入負荷削減のために利用されている²⁾。また、この植生帯は高い生産性を有することや、周期的に起きる河川の増水によって冠水し河川流路とつながることなどから、重要な有機物源となっている可能性が指摘されている³⁾。

本研究では猪苗代湖の主要な流入河川である長瀬川と合流する酸川を対象とした。猪苗代湖は磐梯山の麓に位置し、日本で4番目の広さを有する。猪苗代湖は安達太良山に起源を持つ酸性の温泉水や鉾山廃水の流入を原因とする酸性湖沼である。そのために湖心の表層におけるpHは1995年まで約5を示していたが、その後徐々に上昇し、2009年には6.8に達した^{4, 5)}。このpHの上昇は主に硫酸イオン濃度の減少に起因すると考えられている⁶⁾。pHの上昇と共に、COD等の猪苗代湖の水質は悪化した⁷⁾。猪苗代湖の主要な流入河川は長瀬川である⁸⁾。猪苗代湖の効果的な水環境保全を構築するためには、長瀬川の河川環境を十分に理解することが重要である。

猪苗代湖最大の流入河川である長瀬川は強酸性である酸川と合流した後、pHが大きく低下する(2019年の酸川のpHの年平均は3.1^{9, 10)}。火山性無機酸性河川は、火山起源の硫酸や塩酸を豊富に含んでいる。このように火山性無機酸性河川は、自然災害の原因や観光資源となる火山に関連しているため、陸水学上の重要な研究対象である。酸性河川では中性河川とは異なる生物種が卓越するとされている。例えば、長瀬川の酸性水域では中性水域では出現しなかった34種の水生無脊椎動物が報告されている¹¹⁾。しかしながら、長瀬川あるいは酸川の生態系についての知見は乏しく、構成する生物相の成立過程や生活の研究が不足している。枯死したヨシの分解は根圏土壌における土壌生物の生物間相互作用を通して発現されると考えられている¹²⁾、長瀬川及び酸川の河川環境において土壌生物を調査した研究は知られていない。

そこで、本研究では有機物の無機化や窒素形態変換等を駆動する土壤細菌に着目し、酸性河川の氾濫原に設置したリターバック内のヨシの群集構造を周辺土壌と比較解析し、特徴づけを行った。

2. 材料及び方法

2.1 調査地

最大の流量を持つ猪苗代湖の流入河川は長瀬川である⁸⁾。長瀬川は桧原湖に端を発し、猪苗代町の広大な水田地帯を流れて流れるが、途中で酸川が合流する。長瀬

*Soil microbial community structure involved in common reed decomposition in floodplain of acidic river

**Kazunori NAKAMURA (福島県環境創造センター) Fukushima Prefectural Centre for Environmental Creation

川の支流の一つである酸川は極めて酸性な水質を有するために、酸川と合流した長瀬川のpHは酸性を呈する。本研究の調査は2か所のヨシ原で実施した。酸川のヨシ原と対照として酸川と合流する前の長瀬川のヨシ原である。図1に調査地の位置を示す。

調査地が位置する猪苗代町の2020年の気候は月平均気温0.5~24.4℃、年降水量1193.5mmであった。また、2019年12月~2020年2月の冬期間は平年よりも極めて降雪量の少ない年であった。

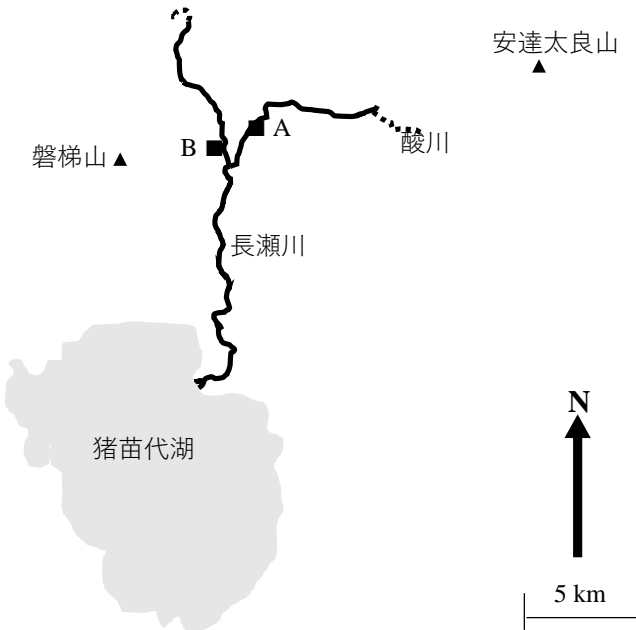


図1 調査地の位置

: A, 調査地 (酸川) ; B, 調査地 (長瀬川)



図2 調査地の様子

: A, 調査地 (酸川) ; B, 調査地 (長瀬川)

2.2 ヨシ分解試験

2019年の11月に各調査地から枯死したヨシを採取し、実験室内で十分に風乾させた。葉を取り除き、約10cmに切断したヨシの茎を作成した縦20cm×横20cm、2000μmの目の大きさのナイロンメッシュの袋 (以下、リターバッグ) に同量 (20本) 入れた。2019年12月にヨシ採取地の

表面にリターバッグを等間隔で並べ、PP製の杭で固定した。設置したリターバッグを2020年9月に回収し、リターバッグの表面に付着した落葉や土をそっと取り除いた後にリターバッグ内容物を分析に供した。

リターバッグの回収と同時にリターバッグの周囲に100mLのステンレス試料円筒 (直径0.05m、高さ0.051m) を置き、土壤試料を採取した。

2.3 細菌群集構造解析

リターバッグ内のヨシと比較対象として周辺土壤を実験に供した (3反復)。なお、供試試料は採取後すみやかに冷蔵し、その後DNA抽出まで凍結保存した。DNA抽出キットISOIL Large for Beads ver.2 (株式会社ニッポンジーン) を用いてリターバッグ内のヨシと土壤試料から全DNAの抽出を行った。土壤試料はオプションプロトコル②に従い、10gの土壤からDNAを抽出した。抽出したDNAは、300μL TEにて溶出した。植物体試料は凍結した状態で袋の上から揉みこみ断片化させた後、混合し、均一化させた。試料は、破砕ビーズと試料の容積比が1:1~2程度となるようにチューブに分取した。抽出は標準プロトコルに準じて行い、300μL TEにて溶出した。

抽出したDNA試料を鋳型として、1回目のPCRを16S rRNA 遺伝子領域を対象に実施した。増幅に用いたプライマーは、植物由来のDNAの増幅が生じにくい799F/1193R¹³⁾ を用いた。PCR酵素は、植物由来のPCR阻害物質 (ポリフェノール類や多糖類など) に耐性を有するKAPA3G Plant (Kapa Biosystems, Inc.) を用いた。PCR産物の精製にはMonoFaS DNA精製キット (ジールサイエンス株式会社) を用いた。

精製した1回目のPCR産物を鋳型として、次世代シーケンシングに必要なアダプター配列、および試料判別のためのバーコード配列を含むIndex kitプライマー (Nextera XT Index Kit, イルミナ株式会社) を使用し、2回目のPCRを行った。酵素はKAPA HiFi HS ReadyMix (Kapa Biosystems, Inc.) を用いた。PCR反応条件はイルミナ社の公式プロトコルに準じた。インデックス配列を付与させたPCR産物は、NucleoMag NGS Clean-up size select (MACHEREY-NAGEL GmbH & CO. KG) により精製した。本精製キットは、サイズ分画が可能であるため、増幅長である500bp付近の回収量が最大となるようにPCR産物溶液量に対し0.9倍量の精製試薬を混合させた。精製後にAgilent 4200TapeStation (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて対象遺伝子の増幅 (鎖長, 非特異的な増幅の有無) を確認した結果、全試料において非特異的な増幅は見られなかった。調整後のライブラリで、次世代シーケンス解析装置MiSeq (イルミナ株式会社) にてMiSeq Reagent Kit v3 (600cycle) を用いたペアエン

ドシークエンス (300bp×2) を行った。

次世代シーケンシングにより取得された遺伝子配列データはQIIME2 (Version2020.6) を用いて次のとおりに解析した: 解読配列からプライマー配列を除去, Quality Scoreが低下する後半解読配列の除去, QIIME2のプラグインソフトDADA2によりエラー配列と判断された配列の除去, フォワード配列およびリバース配列のマージ, キメラ配列の除去, 既存データベースとの比較による検出配列の分類群の決定, 不適切配列の除去, レアファクションカーブの作成, Unifrac距離 (unweighted, weighted Unifrac) によりβ多様性解析の実施及び主座標分析 (PCoA) による図示, そして相同性検索プログラムNCBI blast+ (2.10.0+) を用いて各OTU配列の最近縁種の特定を行った。

3. 結果及び考察

リターバック内のヨシは, 時間が経過するとともに断片化し, Ono et al.¹⁴⁾の報告と同様に全炭素の減少が起

こり, 分解が進んだことが確認された。

次世代シークエンス解析により1検体あたり平均20万リードの解読データを得ることができた。レアファクションカーブの結果から, 試料内に存在し得る細菌種を網羅的に解読できていることが示された。植物由来のDNAが増幅しにくいプライマーセット799F/1193Rの使用で植物由来のDNAはほぼ検出されなかった(最大で0.07%)。Pavlovska et al.によると上位の分類群レベルは試料の保存条件(冷蔵条件を含む)に大きく影響を受けないと報告されている¹⁵⁾。従って, 以下の議論では主要な分類群と菌叢全体のみを対象とした。

細菌網レベルでの菌叢結果を図3に示す。検出割合1%以上の細菌網に着目してグラフ化し, それ以外の細菌網についてはOthersとして一つにまとめた。リターバック内のヨシと土壌試料ともに非常に多様な細菌が検出されたが, 各河川で特徴的な細菌種が検出された。γ-Proteobacteriaとα-Proteobacteriaはいずれの試料でも共通して優占する細菌群であった。

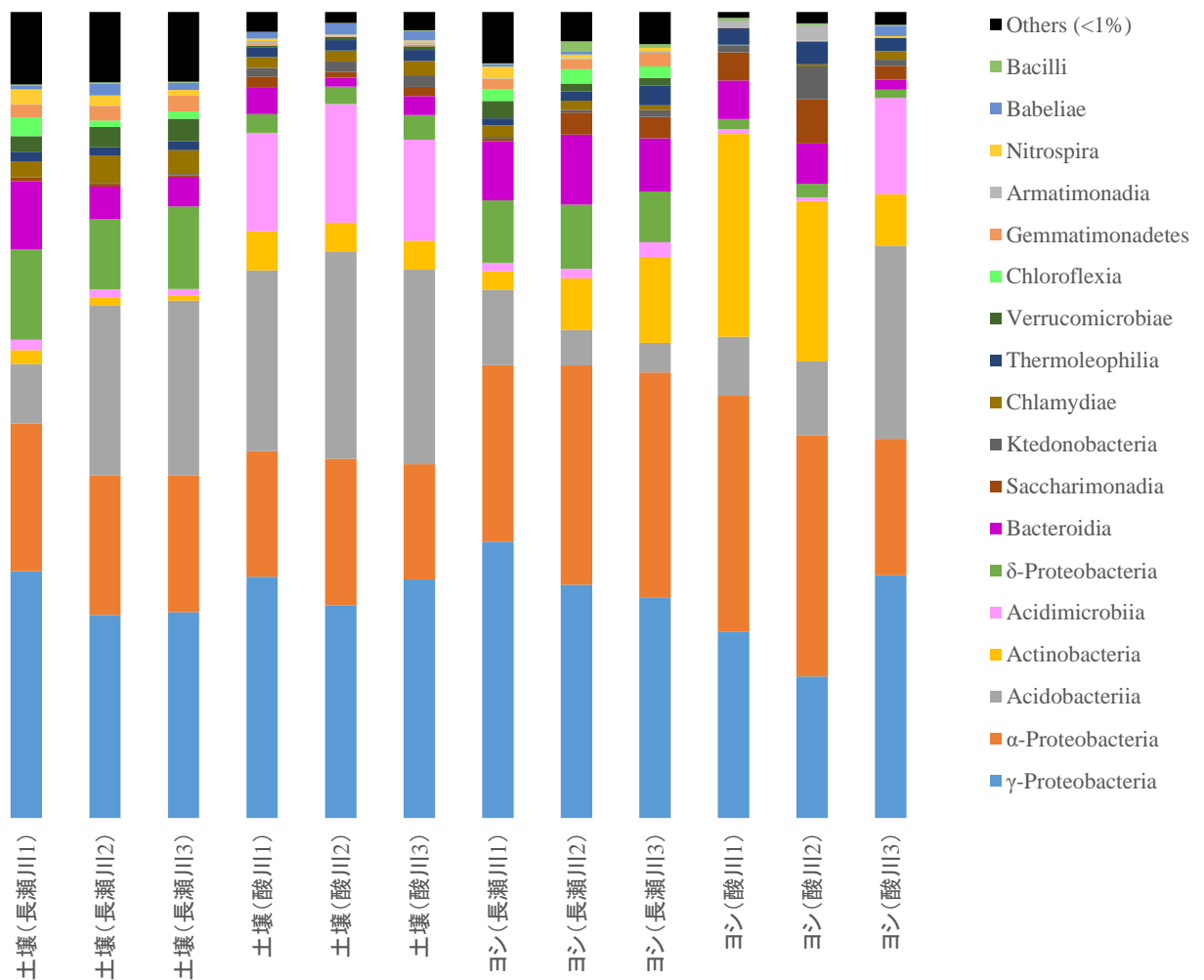


図3 細菌網レベルでの菌叢結果

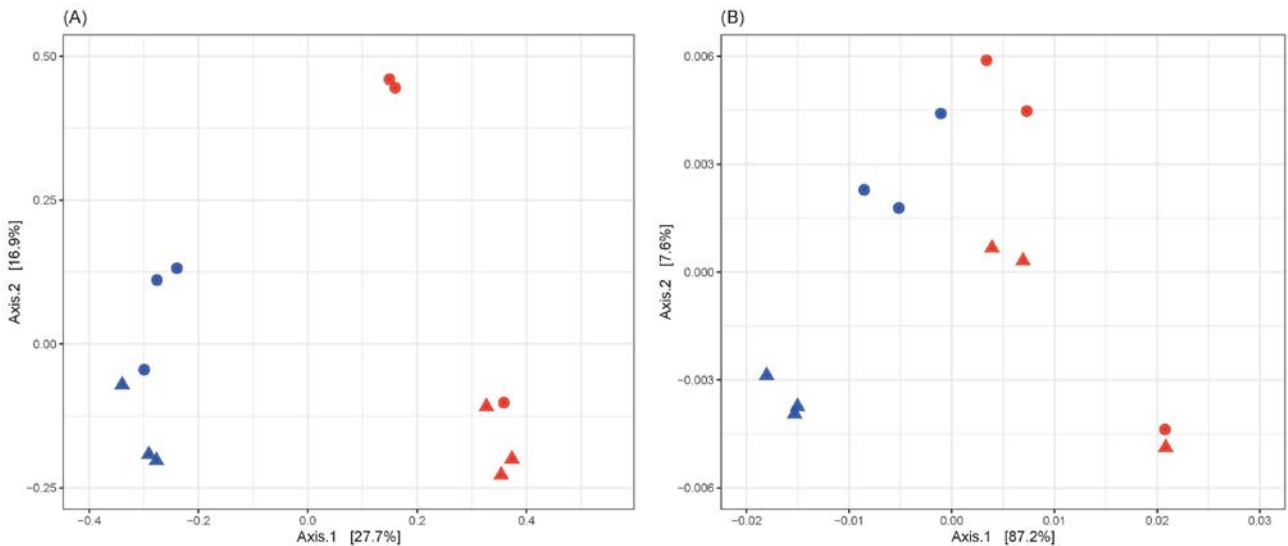


図4 主座標分析結果 (A, Unweighted unifrac ; B, weighed unifrac)

●, ヨシ (酸川) ; ●, ヨシ (長瀬川) ; ▲, 土壌 (酸川) ; ▲, 土壌 (長瀬川) .

*Acidobacteria*は酸川と長瀬川のどちらの土壌でも優占する細菌群であり、リターバッグ内のヨシでは構成割合が小さくなった。酸川の土壌は、長瀬川の土壌と比べて*Acidimicrobia*の構成割合が高まり、その内*Aquihabitans daechungensis*に最も近縁の細菌の存在割合が高かった。最近縁の*A. daechungensis*は貯水池から分離された至適pH7.0の細菌であるが、検出された遺伝子配列との相同性は低かった¹⁶⁾。従って、本研究で検出された遺伝子配列は新規の細菌の存在を示唆するものであり、他の*Acidimicrobiales*と同様な酸性環境下に適応した細菌の可能性が示唆される。

一方で、長瀬川の土壌では δ -*Proteobacteria*と*Bacteroidia*の存在比が高く、これはリターバッグ内のヨシでも同様であった。リターバッグ内のヨシでは*Acidobacteria*の存在比が減少する一方で、*Actionobacteria*の存在比が高い傾向であった。特に酸川のリターバックで顕著であった。

これらの構成割合を反映して、細菌叢は酸川と長瀬川、或いはリターバッグ内のヨシと周辺土壌で異なる様相を持つことが明らかとなった(図4)。リターバックの目の大きさは2000 μ mであり、リターバック内と周辺土壌の環境に影響を与える土壌動物の行動制限は類似したものと考えられる。従って、両者の細菌群集構造の違いは新鮮な有機物の分解に主に関与する細菌が土壌環境とは異なっており、それは酸性環境の影響を受けることを示唆するものと考えられた。

本研究から河川環境によりリターの分解に関与する細菌叢が異なることが示された。しかし、Hietz¹⁷⁾が報告しているように本研究はヨシの分解初期の結果と考えられる。河岸に発達する植生帯は、陸域から水域への

移行帯であり、独自の多様な生態系を構成する重要な地域である。また、この植生帯は高い生産性を有し、周期的に起きる河川の増水によって河川流路とつながることなどから、河川や湖沼の重要な有機物源となっている可能性が指摘されている¹⁸⁾。そのために、より長期的な視点での研究を行うことがリターの分解の仕組みを明らかにするためには必要である。

4. 謝辞

本研究の試料採取において、多くのご協力を賜った阿部正仁氏、吾妻和泉氏、及び遠藤正二氏、アンプリコンシーケンス解析においてご協力を賜った中外テクノス株式会社斎藤弥生氏、近藤貴志氏、及び高橋唯氏に謝意を表します。また、実験計画や原稿執筆において、貴重なご助言を賜った福島県環境創造センターの職員の皆様に謝意を表します。

本研究の一部は、公益財団法人河川財団の河川基金助成事業の支援を受けて実施しました。ここに記して謝意を表します。

5. 引用文献

- 1) 保光義丈, 竹野健次, 渡部晃久, 新川英典, 佐々木健: 瀬野川水系熊野川における天然ヨシ原川床の水質浄化能力. 環境技術, **36**, (8), 53-58, 2007
- 2) Hayashi N, Ozaki Y, Sakai F: Role of aquatic animals for water purification on aquatic plant purification system. *Japanese Journal of Water Treatment and Biology*, **47**, (3), 119-129, 2011
- 3) Minshall G. W, Cummins K. W, Peterson R. C, Cushing C. E, Bruns D. A, Sedell J. R, Vannote R. L: Developments

- in stream ecosystem theory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**, 1045-1055, 1985
- 4) 福島県：平成7年度福島県水質年報, 1996
- 5) 福島県：平成21年度福島県水質年報, 2011
- 6) 菊池宗光, 佐藤政寿：猪苗代湖における水質の中性化について. 全国環境研会誌, **35**, 33-38, 2010
- 7) 福島県環境創造センター：平成28年度猪苗代湖調査研究事業等報告書,
<https://www.fukushima-kankyosozo.jp/inawashiro-chousa.html> (2022. 12. 12アクセス)
- 8) 福島県環境センター：平成21年度猪苗代湖水質モニタリング調査事業等報告書,
<https://www.fukushima-kankyosozo.jp/inawashiro-chousa.html> (2022. 12. 12アクセス)
- 9) 福島県：平成30年度福島県水質年報, 2020
- 10) 福島県：令和元年度福島県水質年報, 2021
- 11) 塘忠顕, 横山拓未：長瀬川の表碁梯地域の流域における底生動物相. 福島大学地域創造, **31**, (2), 55-74, 2022
- 12) Nakamura K, Yano T, Suyama Y, Nishimura O, Nakano K : Macrofauna in a full scale vertical flow constructed wetland during vegetative growth stage. *Japanese Journal of Water Treatment and Biology*, **52**, (3), 45-54, 2016
- 13) Beckers B, Beeck M. O. De, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J : Performance of 16S rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 650, 2016
- 14) Ono K, Hirai K, Morita S, Ohse K, Hiradate S : Organic carbon accumulation processes on a forest floor during an early humification stage in a temperate deciduous forest in Japan: Evaluations of chemical compositional changes by ¹³C NMR and their decomposition rates from litterbag experiment. *Geoderma*, **151**, 351-356, 2009
- 15) Pavlovska M, Prekrasna I, Parnikoza I, Dykyi E. : Soil sample preservation strategy affects the microbial community structure. *Microbes and Environments*, **36**, ME20134, 2021
- 16) Jin L, Huy H, Kim K. K, Lee H. -G, Kim H. -S, Ahn C. -Y, Oh H. -M : *Aquihabitans daechungensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from reservoir water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**, 2970-2974, 2013
- 17) Hietz P : Decomposition and nutrient dynamics of reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) litter in Lake Neusiedl, Austria. *Aquatic Botany*, **43**, 211-230, 1992
- 18) 佐々木晶子：氾濫原河畔植生に由来する有機物の生産・分解・流出過程. 日本生態学会誌, **61**, 53-61, 2011