

<報 文>

## 環境DNA分析における塩化ベンザルコニウム溶液の添加及び冷蔵保存による影響\*

平川周作\*\*・古賀智子\*\*・中島淳\*\*

キーワード ①環境DNA ②塩化ベンザルコニウム溶液 ③魚類相 ④微生物群集構造

### 要 旨

環境DNA分析では、環境水中のDNA分解抑制のために塩化ベンザルコニウム溶液(BAC)の添加や一時的な冷蔵保存が提案されている。一方、BACを添加することによるPCR阻害なども指摘されている。本研究では、環境DNAを用いた魚類相と微生物群集構造の同時解析を目的として、福岡県内の3河川を対象にBAC添加及び冷蔵保存による影響を調査した。魚類相を比較した結果、BAC添加及び冷蔵保存による明確な影響は認められなかった。一方、微生物群集構造はBACの添加によって顕著に変化した。また、BAC添加により冷蔵2日間で異なる微生物群集構造の変化が起こることも確認された。以上の結果より、魚類相と微生物群集構造の同時解析には、BACを添加せず、採水後速やかに試料をろ過し、DNAを抽出することが適当と考えられた。

### 1. はじめに

短鎖DNAを大量に解読可能な超並列シーケンス技術の進歩や生物の網羅的検出に適したユニバーサルプライマーの開発などにより、環境中に放出された生物由来のDNA(環境DNA)を分析する技術が急速に発展している。日本国内においても、環境省では2020年6月に「環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第1版」を公開して以降、新しい科学的知見をもとに改訂を実施しており、2025年4月21日の時点で淡水魚類と両生類を対象とした「環境DNA分析技術を用いた調査手法の手引き(淡水魚類・両生類)第1版」<sup>1)</sup>や「MiFish法に係る誤同定チェックシートver. 1.2」<sup>2)</sup>が公開されている。また、環境DNAの調査には、研究者や調査対象によって様々な方法が用いられているが、分析手法の普及と標準化を目的として一般社団法人環境DNA学会がマニュアルを作成しており、こちらにも新たな知見をもとに改訂が実施され、2026年1月8日時点では「環境DNA調査・実験マニュアルVer. 3.01(2025年6月16日発行)」<sup>3)</sup>が公開されている。

環境DNAについて、狭義には魚類などの大型多細胞生物の組織断片に由来するDNAを指すが、広義には細菌や原生生物といった微生物由来のDNAも含まれる<sup>4)</sup>。環境水のろ過によって捕集された環境DNAには、狭義・広義の生物に

由来するDNAが混在し、生物種または生物分類群に適した分析手法を用いることによって標的生物を検出することができる。魚類では、Miya *et al.* (2015)が開発したMiFishプライマーが魚類相の把握を目的としたメタバーコーディング法に広く用いられている<sup>5)</sup>。また、微生物では、16S rRNAをマーカー遺伝子とした微生物群集構造を解析する手法<sup>6)</sup>が提案されており、この方法では培養を必要としないことから難培養微生物も含めた群集情報も獲得することが可能となっている。

我々はこれまでに、環境水の環境DNAを用いた魚類相調査方法の検討<sup>7,8)</sup>や廃棄物最終処分場の浸透水から抽出した環境DNAの微生物群集構造を解析<sup>9,10)</sup>してきた。しかし、前述のように環境水から抽出した環境DNAには大型多細胞生物以外に微生物由来のDNAも含まれている。そのため、理論上は、同一の環境DNA試料から異なる多様な分類群の生物情報を得ることができる。これは環境DNA分析の利点として、他分類群を同時に解析できる可能性を示している。

これまでに魚類などの大型多細胞生物の環境DNA分析を目的とした環境水の保存方法として、冷蔵<sup>11)</sup>や冷凍<sup>12)</sup>、環境DNAの分解抑制を目的とした塩化ベンザルコニウム溶液(BAC)の添加処理<sup>13)</sup>などが報告されている。

\*Effects of Benzalkonium Chloride Treatment and Refrigerated Storage on Environmental DNA Analysis

\*\*Shusaku HIRAKAWA, Tomoko KOGA, Jun NAKAJIMA (福岡県保健環境研究所) Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

このうち、冷凍は速やかなる過が実行できない場合などに後日まとめて処理ができる利点がある一方、PCR阻害が起きやすくなり検出率が低下するとの指摘がある<sup>12)</sup>。BACの添加処理は試料中のBAC濃度が0.01%になるように添加するといった簡便な操作でDNAの分解抑制が図れるものの、PCR酵素によっては阻害が生じることが報告されている<sup>14)</sup>。また、BACは殺菌効果があることや抵抗性がある菌種も報告されている<sup>15)</sup>。そのため、BACを添加することによって、調査地点の本来の微生物群集構造への影響が懸念される。

本研究では、環境DNAを用いた魚類相と微生物群集構造の同時解析を目的として、福岡県内の3河川においてBAC添加による影響を調査した。

## 2. 試料と方法

### 2.1 試料の前処理とDNA抽出

試料とした河川水は、2019年11月に福岡県太宰府市内において、御笠川水系鷺田川田中小橋付近(N33.5111, E130.5045)、御笠川水系御笠川落合橋付近(N33.5133, E130.5028)、御笠川水系大佐野川久保橋付近(N33.5111, E130.4995)の順に採水した(図1)。各調査地点において8 Lポリプロピレン製バケツを用いて橋上から流心部を採水し、よく攪拌したものを1 Lポリプロピレン製容器4本に分取した。そのうち、2本の容器にはDNAの分解抑制を目的として10% BAC溶液を試料中濃度が0.01%になるように添加した。

採水後は直ちに実験室に持ち帰り、BAC添加あり及びBAC添加なしの試料を各地点1本ずつ0.45 µm Microfil V(Merck, Darmstadt, Germany)でろ過し、3地点計6検体のDNAをDNeasy PowerWater Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)により抽出した。残りの試料は冷蔵保存し、2日後にDNA

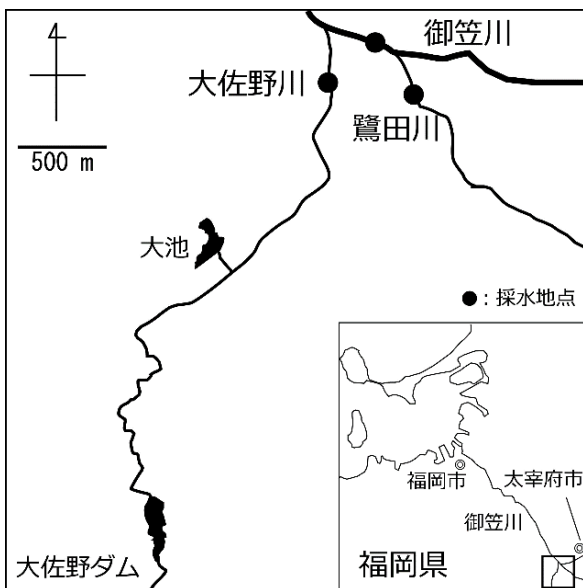


図1 調査地点

を抽出した。

### 2.2 魚類の環境DNAメタバーコーディング解析

抽出したDNA溶液を用いて、魚類の12S rRNA領域を標的としたメタバーコーディング法による魚類相調査を実施した。各試料のDNAライブラリーは、TAKARA Ex Taq HS(タカラバイオ株式会社, 草津)を用いて2回のPCR反応により作製した。なお、1st PCRはMiya *et al.* (2015)が開発したMiFish UとMiFish Eを混合したプライマーセット<sup>5)</sup>を用いて4連で実施し、アンプリコンを混合したものを2nd PCRに適用した。シーケンシング解析は、MiSeq system(Illumina, San Diego, CA)及びMiSeq Reagent Kit v3(Illumina)を用いて、2×300 bpの条件でおこなった。

取得したリード配列は、FASTX-Toolkit(ver. 0.0.14)<sup>16)</sup>のfastq\_barcode\_splitterを用いて、配列の読み始めがプライマー配列と完全に一致する配列を抽出し、QIIME2(ver. 2020.2)<sup>17)</sup>のdada2プラグインでプライマー配列と3'-末端配列、キメラ配列、ノイズ配列を除去した後、代表配列を取得した。代表配列は、MitoFish<sup>18)</sup>と国際塩基配列データベースに登録済みのMiFish参照配列に対してBLASTN(ver. 2.9.0)により相同性検索を行い、最も相同性の高い種を検出種とした。種までの同定が困難な場合は属として表記した。取得したDNA配列データは、DDBJ Sequence Read Archiveに登録した(Accession No. PRJDB20293)。

### 2.3 微生物群集構造解析

上記の抽出したDNAについて、細菌及び古細菌の16S rRNA V3-V4領域を標的とした2回のPCR反応<sup>6)</sup>により、微生物群集構造解析に用いるDNAライブラリーを作製した。酵素は、TAKARA Ex Taq HS(タカラバイオ株式会社)を使用した。1st PCRは、341f\_MIX(forward: 5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGCWGCAG-3')と805r\_MIX(reverse: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')で実施し、2nd PCRでインデックス配列を付与した。シーケンシングは、魚類相調査と同様にMiSeq system(Illumina)を用いて2×300 bpの条件で実施した。取得したリード配列は、FASTX-Toolkit<sup>16)</sup>及びQIIME2<sup>17)</sup>を用いてデータ処理し、代表配列はGreengenes(ver. 13.8)<sup>19)</sup>により系統分類を行った。また、微生物群集構造解析から得られたDNA配列データは、DDBJ Sequence Read Archiveに登録した(Accession No. PRJDB20294)。

微生物群集構造の解析には、vegan package 2.4-3をインストールしたR version 3.2.2を基盤とするRStudio 2022.07.2を用いた<sup>20,21)</sup>。微生物群集構造の類似性を評価

するためBray-Curtis指数を算出し、metaMDS関数を使用した非計量多次元尺度構成法(NMDS)により試料を二次元平面上にプロットした<sup>22)</sup>。なお、本研究で使用した微生物群集解析の実験方法では、植物由来と考えられるChloroplast(葉緑体)がCyanobacteria門として検出されてしまうことから、網レベルのデータから葉緑体のリード配列を除外し、試料間のリード数を揃えるために14,387リードに希釈化して解析を行った。

なお、本研究における次世代シーケンスによる配列解析は株式会社生物技研に委託して実施した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 魚類相調査におけるBAC添加及び冷蔵保存の影響

2019年11月に福岡県太宰府市内の鷺田川、御笠川、大佐野川の調査地点(図1)で採水を行い、BACを添加せず当日及び冷蔵2日後に抽出したDNA試料、BACを添加して当日及び冷蔵2日後に抽出したDNA試料を用い、メタバーコーディング法による魚類相調査を実施した(表1)。

魚種別に検出の傾向を確認した結果、ミナミメダカ *Oryzias latipes*は、検出された6試料中5つがBACを添加した試料であり、BAC添加なしで検出された1つは大佐野川の採水当日に処理した試料であった。また、全12試料の環境DNA分析において、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*、オオクチバス *Micropterus nigricans*、ブルーギル *Lepomis macrochirus*は大佐野川のみ検出された。本研究で調査した大佐野川の地点では、これまでに2014年6月から2020年1月にかけて7回の採捕調査(目視含む)を実施しているが、ドジョ

ウ、オオクチバス、ブルーギルは確認されていない<sup>8)</sup>。しかし、2020年10月に実施した目視観察調査により、上流の大佐野ダムにオオクチバス及びブルーギルが生息していることを確認した<sup>8)</sup>。また、2025年11月2日に大佐野川の環境DNA調査地点における採捕調査によりドジョウが確認された。これらは、調査地点から上流に離れて生息している種や生息数が極めて少ない種でも検出可能である環境DNA分析の感度の高さを表している。そのため、外来種の侵入の早期検知や希少種の存在把握に有効な方法になり得ることを示す結果と考えられる。

表1の魚類相をみると、本研究で大佐野川の試料から検出された魚種は、調査地点上流からのDNAの混入が疑われる種を除き、平川・中島(2020)の調査で検出された魚種と全て一致していた<sup>8)</sup>。また、鷺田川や御笠川ではモツゴ *Pseudorasbora parva*、タモロコ *Gnathopogon elongatus elongatus*、ナマズ *Silurus asotus*が検出されているが、採水順が最後であった大佐野川ではこれらの魚種は検出されていない。これは本研究の採水方法は適切に実施され、試料間のDNAコンタミネーションが極めて小さいことを示唆している。以上の結果から、調査地点に生息する魚種の検出については再現性が高く、魚類を対象とした環境DNA分析は採捕調査を補完する方法として有効な技術と考えられる。

次に、BACによるDNA分解抑制効果をBAC添加の有無で比較したが、魚類の検出種数に顕著な差は認められなかった(表1)。また、2日間の冷蔵保存でもBAC添加による差異は確認されなかったことから、PCR阻害の影響も認められなかった。本研究では、魚類のユニバーサルプライマーで増幅されたアンプリコンを配列解析し、魚類相の把握

表1 BACの添加及び冷蔵保存の有無による環境DNAを用いた魚類相調査結果の比較

| 種名      |  | 鷺田川 |     |    |     | 御笠川 |     |    |     | 大佐野川 |     |    |     |
|---------|--|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|-----|------|-----|----|-----|
| 和名      | 学名                                     | 当日  | 2日後 | 当日 | 2日後 | 当日  | 2日後 | 当日 | 2日後 | 当日   | 2日後 | 当日 | 2日後 |
| コイ      | <i>Cyprinus carpio</i>                 | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| フナ属     | <i>Carassius sp.</i>                   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| ゲンゴロウブナ | <i>Carassius cuvieri</i>               |     | ○   |    |     |     |     | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| オイカワ    | <i>Zacco platypus</i>                  | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| カワムツ    | <i>Nipponocypris temminckii</i>        | ○   |     | ●  | ●   | ○   |     | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| カマツカ    | <i>Pseudogobio esocinus</i>            | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| イトモロコ   | <i>Squalidus gracilis gracilis</i>     | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| ムギツク    | <i>Pungtungia herzi</i>                |     |     |    |     | ○   | ○   |    |     | ○    | ○   | ●  | ●   |
| モツゴ     | <i>Pseudorasbora parva</i>             | ○   | ○   |    | ●   | ○   | ○   | ●  |     |      |     |    |     |
| タモロコ    | <i>Gnathopogon elongatus elongatus</i> | ○   | ○   |    | ●   | ○   | ○   | ●  |     |      |     |    |     |
| ナマズ     | <i>Silurus asotus</i>                  | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   |     | ●  | ●   |      |     |    |     |
| ミナミメダカ  | <i>Oryzias latipes</i>                 |     |     | ●  | ●   |     |     |    | ●   | ○    |     | ●  | ●   |
| ドンコ     | <i>Odontobutis obscura</i>             | ○   | ○   | ●  | ●   | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  | ●   |
| ヨシノボリ属  | <i>Rhinogobius sp.</i>                 | ○   | ○   | ●  |     | ○   | ○   | ●  | ●   | ○    | ○   | ●  |     |
| ドジョウ    | <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>      |     |     |    |     |     |     |    |     | ○    | ○   |    |     |
| オオクチバス  | <i>Micropterus nigricans</i>           |     |     |    |     |     |     |    |     | ○    |     |    |     |
| ブルーギル   | <i>Lepomis macrochirus</i>             |     |     |    |     |     |     |    |     | ○    | ○   |    |     |
| 種数      |  | 11  | 11  | 10 | 11  | 12  | 10  | 12 | 11  | 14   | 12  | 11 | 10  |

当日: 採水当日に DNA 抽出した試料, 2 日後: 冷蔵 2 日後に DNA 抽出した試料

○: BAC を添加していない試料から検出された魚種

●: BAC を添加した試料から検出された魚種

を行う定性分析を実施している。そのため、DNAの分解が進んでいたとしても同一種のDNAが残存していれば増幅・検出されることから、魚類相としての検出種の比較では差が表れなかった可能性がある。先行研究をみると、DNA量を測定する環境DNAの定量分析では、BAC添加の効果がより明確に示されるかもしれない<sup>13)</sup>。

### 3.2 微生物群集構造解析におけるBAC添加及び冷蔵保存の影響

魚類相調査に供試した同じDNA試料を用いて、微生物群集構造の解析を実施した。この方法は、培養が困難な菌種もDNAの増幅によって確認できるという利点があるものの、生菌だけでなく死菌であってもDNAが残存していれば検出される。そのため、微生物群集構造解析では、微生物の種数変化ではなく存在割合の変化に着目し解析を行った。

綱レベルの各微生物の存在割合を図2に示す。鷺田川と御笠川の微生物群集構造が類似しているが、これは同一の流れの上流と下流に位置するためと考えられ、大佐野川の微生物群集構造が異なっていたのは、他の2地点と集水域が異なる河川であることが要因と考えられる(図1)。

BAC添加なしの場合、採水当日と冷蔵保存2日後にDNA抽出した微生物群集構造では、*Flavobacteriia*綱や*Gammaproteobacteria*綱の割合の増加が確認された。*Flavobacteriia*綱には、低温・無酸素環境において脱窒作用を発揮するものや<sup>23)</sup>、深海の低温環境でも炭水化物異化作用を有して生息するものが報告されており<sup>24)</sup>、*Gammaproteobacteria*綱についても南極大陸の湖から低温活性のある株が分離されている<sup>25)</sup>。本研究で確認され

た冷蔵保存中の微生物群集構造の変化は、低温環境でも活性を有する微生物が増殖した結果を反映しているかもしれない。

BAC添加の有無を比較したところ、全ての調査地点においてBACの添加による微生物群集構造の変化が確認された。採水当日にDNA抽出した試料においてもBACの添加による微生物群集構造の変化は顕著であり、BAC添加による即効性が示唆された。

試料間の微生物群集構造の類似性を把握するため、NMDSを用いて二次元平面状に試料を配置した(図3)。NMDSの散布図は、各軸に特定の解釈はなく類似性を位置関係で示すものであり、近くに位置するものほど微生物群集構造が類似していることを示唆している。本研究では、BAC添加及び冷蔵保存による位置の変化を解析した。

全体の配置図から、微生物群集構造はBAC添加ありとBAC添加なしのグループに分かれることが示された(図3 A)。また、採水当日にDNA抽出を実施したBAC添加なし試料とBAC添加あり試料を比較すると、BACを添加することによって全ての調査地点でNMDS 1軸のマイナス側に移動し、特に鷺田川と御笠川は大きく位置が変化した(図3 A)。次に、冷蔵保存による微生物群集構造の変化に着目したところ、BAC添加なしで2日間冷蔵保存した場合、NMDS 1軸及び2軸ともにプラス側に大きく移動した(図3 B)。一方、BAC添加ありで2日間冷蔵保存した場合、微生物群集構造に顕著な変化は認められなかったが、NMDS 1軸ではマイナス側に移動し、NMDS 2軸方向の変化は明確ではなかった(図3 B)。以上の結果から、BACを添加せず採水当日にDNAを抽出した試料を基準とした場合、冷蔵保存中にBAC添加ありではNMDS 1軸マイナス側、BAC添加なしでは

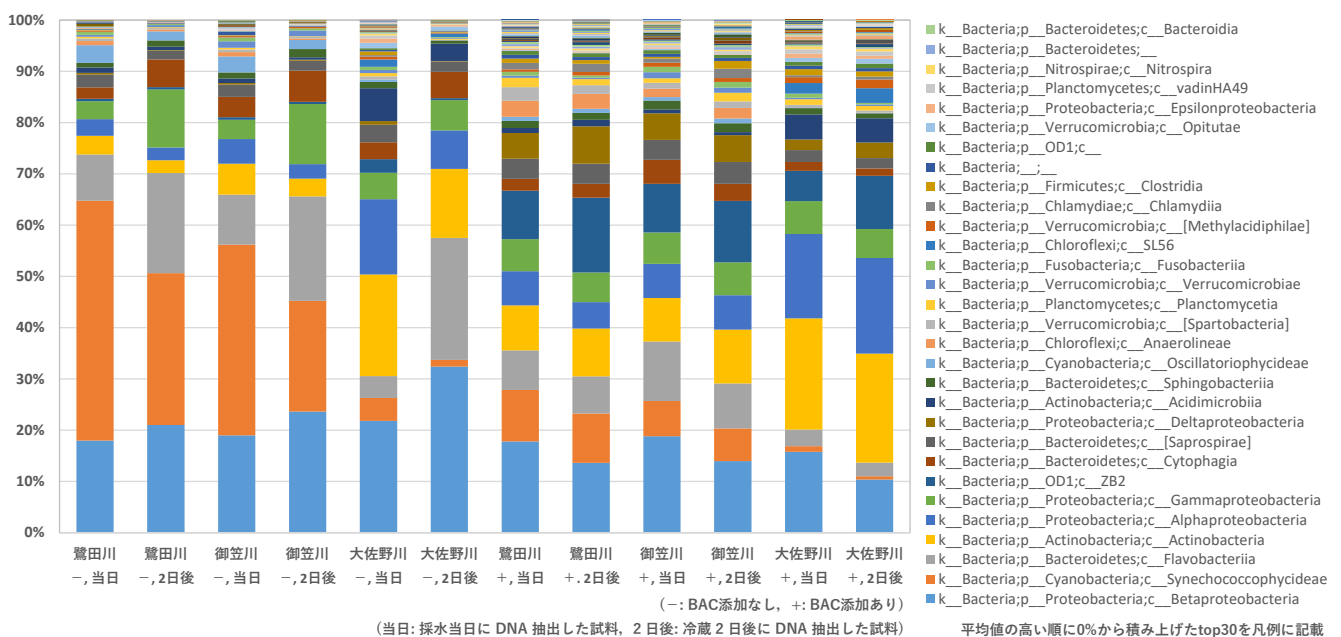
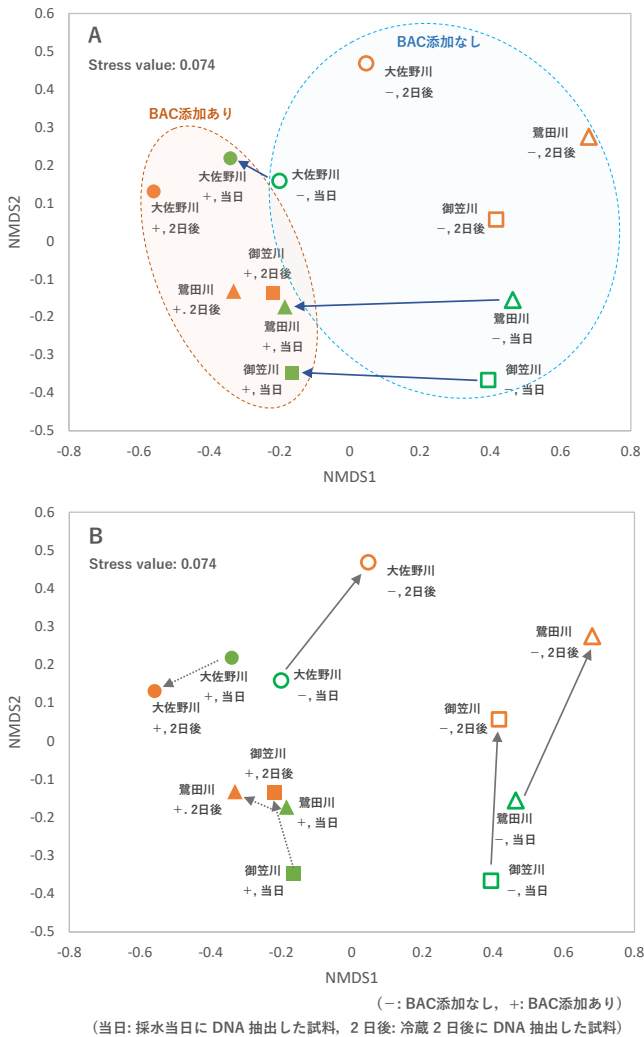


図2 BACの添加及び冷蔵保存の有無による微生物群集構造解析結果(綱レベル)の比較



**図3 NMDSを用いたBACの添加及び冷蔵保存の有無による微生物群集構造(綱レベル)の類似性比較**  
**(A) BAC添加による微生物群集構造の変化**  
**(B) 冷蔵保存による微生物群集構造の変化**

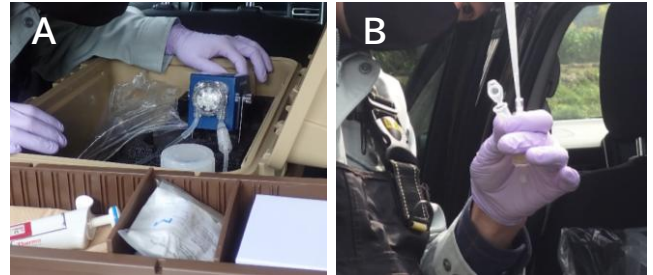
NMDS 1軸プラス側に移動することから、それぞれ異なった微生物群集構造の変化をすることが示された。

伊知地(2019)は、BACは微生物に作用するため環境DNA分析において対象とする生物種に応じて留意が必要であることを指摘している<sup>26)</sup>。また、BACに対する抵抗性を持つ菌種も報告されている<sup>15, 27)</sup>。既報及び本研究の結果から、調査地点の微生物群集構造を反映した情報を取得するには、BACを添加せずにできるだけ速やかにろ過し、DNAを抽出することが有効と考えられた。

#### 4. 現地作業の提案

以上の結果を受け、現在当所では採水後直ちに現地にて作業を進められるよう、ペリスタポンプを用いて筒状フィルターユニットSterivex(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)に通水する可搬式自動ろ過装置を作製した(図4 A)。ろ過後は、Sterivexを十分に脱水した後にDNA安定

化剤としてRNAlater™ Stabilization Solution(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を添加することでDNAの劣化防止を図っている(図4 B)。さらに、本装置を用いる追加の利点として、調査地点間の移動中にろ過が可能になったことから、作業効率化の効果も得られている。



**図4 (A) 可搬式自動ろ過装置を用いた現地ろ過及び (B) SterivexへのDNA安定化剤の添加作業**

#### 5. まとめ

環境DNAを用いた魚類相と微生物群集構造の同時解析を目的として、福岡県内の3河川においてBAC添加及び冷蔵保存による影響を調査した。魚類の存在の検出を判断基準とした魚類相調査において、冷蔵保存して2日以内にDNA抽出した場合は、BAC添加によるDNA分解抑制の効果は明確に表れず、魚類検出には冷蔵保存のみでも有効と考えられた。ただし、本研究では魚類のDNA量の変化は把握できていないため、定量を目的とした環境DNA分析を実施する場合には差が生じる可能性がある。また、微生物群集構造については、採水当日に抽出したDNA試料でも、BACを添加することにより微生物群集構造が顕著に変化することが確認され、即効性の影響が示された。また、冷蔵保存した場合、BAC添加なしの試料では低温環境で活性を有する菌が増殖し、微生物群集構造が変化する可能性も示唆された。以上の結果から、環境水中の環境DNAを標的として魚類相と微生物群集構造の同時解析を実施する場合、BACは添加せず、採水後速やかにろ過し、DNAを抽出することが適当と考えられた。

#### 謝辞

本研究は、JSPS科研費JP22K04390及びJP25K01361の助成を受けたものです。

#### 6. 引用文献

- 1) 環境省生物多様性センター：環境DNA分析技術を用いた調査手法の手引き(淡水魚類・両生類)第1版,  
[https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish\\_anphi\\_tebiki1.pdf](https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_anphi_tebiki1.pdf) (2025.4.21アクセス)

- 2) 環境省生物多様性センター：MiFish法に係る誤同定チェックシートver. 1.2, [https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish\\_checksheetsheet\\_ver1.2.xlsx](https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_checksheetsheet_ver1.2.xlsx) (2025.4.21アクセス)
- 3) 一般社団法人環境DNA学会：環境DNA調査・実験マニュアルVer. 3.0.1, <https://ednasociety.org/manual/> (2026.1.8アクセス)
- 4) 玉田貴, 柴田直樹：環境DNA分析の「い・ろ・は」サンプリングから分析・解析まで, 実践のための技術. *ぶんせき*, **9**, 462-468, 2021
- 5) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. : MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes : detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Soc. Open Sci.*, **2**, 150088, 2015
- 6) Illumina : 16S metagenomic sequencing library preparation Part#15044223 Rev.B, [http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) (2025.4.21アクセス)
- 7) 平川周作, 中島淳, 松木昌也, 古賀敬興, 秦弘一郎, 柏原学, 古閑豊和, 石間妙子, 宮脇崇, 金子洋平, 志水信弘, 松本源生, 石橋融子：環境DNAメタバーコーディングを用いた河川における魚類調査手法の検討と水質による影響の解析. *環境化学*, **30**, 125-132, 2020
- 8) 平川周作, 中島淳：河川水を対象とした環境DNA分析による魚類相調査の可能性. *福岡県保健環境研究所年報*, **47**, 62-66, 2020
- 9) Hirakawa, S., Koga, T., Shimizu, N., Fujikawa, K., Tobiishi, K., Toba, M. : Exploring landfill conditions : analyzing relationships among waste composition, leachate water quality, and microbial community structure in inert-waste landfill sites. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, **27**, 1050-1061, 2025
- 10) Hirakawa, S., Koga, T., Shimizu, N., Hori, T., Kurokawa, Y., Toba, M. : Nitrification-related factors involved in the biochemical oxygen demand of leachate from inert-waste landfill site. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, **21**, 1341-1349, 2019
- 11) Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P. : Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**, 1123-1130, 2013
- 12) Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H. : Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Conserv.*, **183**, 64-69, 2015
- 13) Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., Kondo, A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, **18**, 233-241, 2017
- 14) 笹野祥愛, 山下洋：塩化ベンザルコニウムによるPCR阻害とDNA精製の効果. 第7回環境DNA学会つくば大会要旨集, P-17, 17, 2024
- 15) 消毒剤マニュアルー消毒剤の特徴・使用法・使用上の留意点ー, 健栄製薬株式会社, 大阪, 2012
- 16) FASTX-Toolkit : FASTQ/a short-reads pre-processing tools., [https://github.com/agordon/fastx\\_toolkit/releases/tag/0.0.14](https://github.com/agordon/fastx_toolkit/releases/tag/0.0.14) (2025.4.21アクセス)
- 17) Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodriguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek,

- T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., 2nd, Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vazquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G. : Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 852-857, 2019
- 18) Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., Iwasaki, W. : MitoFish and MiFish Pipeline : A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1553-1555, 2018
- 19) DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. : Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5069-5072, 2006
- 20) R Core Team (2018) : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org/> (2025. 4. 21アクセス)
- 21) Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. : *vegan* : Community Ecology Package. R package version 2.4-3., <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (2025. 4. 21アクセス)
- 22) 土居秀幸, 岡村寛 : 生物群集解析のための類似度とその応用 : Rを使った類似度の算出, グラフ化, 検定. *日本生態学会誌*, **61**, 3-20, 2011
- 23) Li, X.-k., Yang, Y.-j., Liu, G.-g., Sun, D.-d., Ma, X.-c. : Enhanced nitrogen removal at low temperature with mixed anoxic/oxic process. *Water Science and Engineering*, **16**, 67-75, 2023
- 24) Liu, J., Xue, C.X., Sun, H., Zheng, Y., Meng, Z., Zhang, X.H. : Carbohydrate catabolic capability of a Flavobacteria bacterium isolated from hadal water. *Syst. Appl. Microbiol.*, **42**, 263-274, 2019
- 25) Clocksin, K.M., Jung, D.O., Madigan, M.T. : Cold-active chemoorganotrophic bacteria from permanently ice-covered Lake Hoare, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3077-83, 2007
- 26) 伊知地稔 : これから環境DNAによる調査・研究を始める方へ. *日本海水学会誌*, **73**, 273-280, 2019
- 27) 薩田清明, 小川眞利子, 眞壁明子, 黒川顕, 大塚敏文 : 各種消毒薬の殺菌効果について(第2報). *日本医科大学雑誌*, **51**, 99-103, 1984