

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12140

研究課題名(和文) 河川におけるバクテリア生産の定量：河川水および河床の石のバイオフィルム

研究課題名(英文) Quantification of bacterial production in rivers: river water and biofilm on stones in river beds

研究代表者

土屋 健司 (Tsuchiya, Kenji)

国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・研究員

研究者番号：70739276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では河川水と河床の石に形成されるバイオフィルムのバクテリア生産動態を調べた。河川水バクテリアとバイオフィルムバクテリアは水温という共通の制御要因を示すとともに、それぞれに異なる制御要因があることを明らかにした。河川水バクテリアは栄養塩や有機物などの河川水質と関係を示し、瀬・淵といった河川構造との関係は示さなかった。一方バイオフィルムバクテリアは河川水質とは有意な関係を示さず、瀬・淵といった河川構造によって異なった。これは流速などの物理環境がバイオフィルムへの基質供給速度やバイオフィルム形成プロセスなどに影響を与え、生産動態を制御していたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリア生産の測定には放射性同位体を使用する手法が一般的である。放射性同位体を使用しなければならない測定法ゆえに、屋外での使用に強い制限や、サンプルの取り扱いが非常に困難であり、河川のバイオフィルムの生産動態の実測例は非常に限られていた。本研究では放射性同位体を用いない新規手法を適用し、これまで知見が限られていた河川におけるバイオフィルムバクテリア生産動態及び制御要因を明らかにし、水圏における物質循環の理解を貢献する知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the dynamics of bacterial production in river water and biofilms formed on stones in the river bed. It was found that river water bacteria and biofilm bacteria share a common regulator, water temperature, and that there are different regulators for each. River water bacteria showed a relationship with river water quality, such as nutrients and organic matter, but not with river structure, such as riffles and pools. On the other hand, biofilm bacteria showed no significant relationship with river water quality, but depended on river structures such as riffles and pools. This suggests that the physical environment, such as the flow velocity, affected the rate of substrate supply to the biofilm and the biofilm formation process, thereby controlling the production dynamics.

研究分野：陸水学

キーワード：河川 バクテリア バイオフィルム 瀬淵構造 流速 一般線形モデル 溶存態有機物 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

水圏生態系における物質循環を定量する上で、有機物の60%以上を占める溶存態有機物(DOM)の動態の理解が重要である。バクテリアはDOMの主要な消費者としての役割を果たす。特にDOMをバクテリアが同化し、細胞体として懸濁態化させる(=バクテリア生産;BP)ことで高次捕食者に消費され、DOM-バクテリアから始まる微生物食物連鎖を駆動させる。水圏生態系の機能を理解する上でバクテリアによるDOM代謝の定量は重要である。

河川における主要な生物生産の場として、河川水と、河床の石や礫表面などに形成されるバイオフィームが挙げられる(図1)。BPの測定には通常、放射性同位体(^3H や ^{14}C)で標識したチミン(Fuhrman and Azam 1980)やロイシン(Kirchman et al. 1985)を使用する必要がある。しかし、放射性同位体を使用しなければならない測定法のゆえに、屋外での使用に強い制限や、サンプルの取り扱いが非常に困難である。

そのため、放射性同位体の屋外使用に関する規制が強い我が国においては、河川におけるBPの実測例は我々の知る限り殆ど存在しない。また、河床の石表面のバイオフィーム中のBPも、放射性同位体を用いるという手法的な制約による取り扱いの難しさから、海外においてもその実測例は限られている。バイオフィームは、微細藻類の観点から、河川における主要な生産の場であるとの認識はあるが、バクテリアに関してはその実態の知見は乏しく、定量的な回答は殆ど見られない。

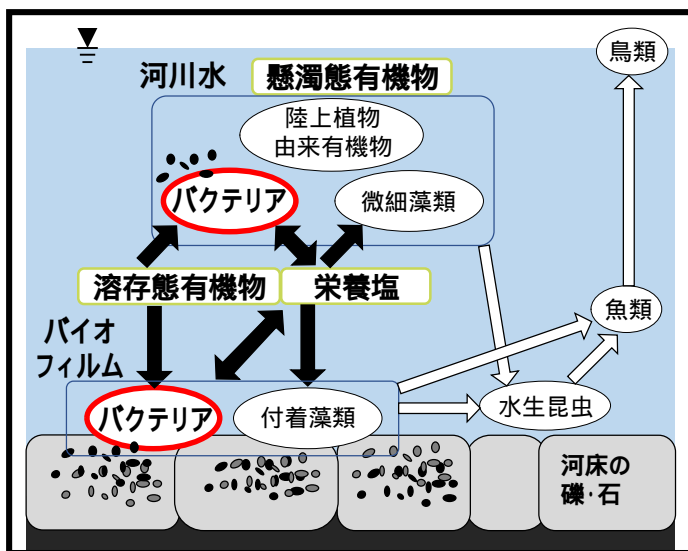


図1 河川におけるバクテリアの主要な生息地と物質フローの模式図

2. 研究の目的

本課題研究代表者らは、従前法とは一線を画す放射性同位体を全く使用しないBP測定法を開発し($^{15}\text{N}_5$ -デオキシアデノシン法, ^{15}N -dA法; Tsuchiya et al. 2015), 任意の場所でのBP測定を可能にした(e.g. Tsuchiya et al. 2019, 2021)。本手法では安定同位体で標識した基質を用いるため、基質をバイオフィームの生物に取り込ませた後にブラシでこすり落としてサンプルを回収するなどの後処理が可能であるとともに、回収した同じサンプルからBP測定用に加え、シークエンス解析用のDNAやクロロフィル、炭素量測定用サンプルなどを得ることができ、環境要因とBPの関連の理解がより一層深まると考えられる。本研究では、長野県の千曲川を対象河川として、河床の石へアクセス可能な中流域における河川水および河床の石のバイオフィーム中のBPの時空間変動を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

調査は2019年2月から2020年5月に上田盆地の末端部に位置する常田地区の瀬・淵の2地点と、犀川合流点より上流に位置する岩野地区の瀬の合計3地点で実施した(図2)。各地点で採水及び採石を行い、クーラーボックスに入れて実験室に持ち帰った。現場では水温、pH、溶存酸素、流速を測定した。



図2 調査地点(左)及び常田(St. T)における瀬(TS), 淵(TF)(右)

実験室では、濾過河川水(<0.45- μm)で満たしたポリエチレンバッグに、現場で採取した石を沈めた(図3)。その後、 $^{15}\text{N}_5$ -2'-デオキシアデノシン(^{15}N -dA)を添加し、現場水温に設定した

インキュベータ内（暗所）で数時間培養した。培養終了後、石表面の25cm²をブラシでこすり落とし、一部をバイオフィルム BP 測定用試料として孔径0.2- μ mのメンブレンフィルターに濾過後、70%エタノールで洗い、分析まで20℃で保存した。同時に、バクテリア現存量（BA）、クロロフィル a（Chl a）測定用試料を採取した。河川水から

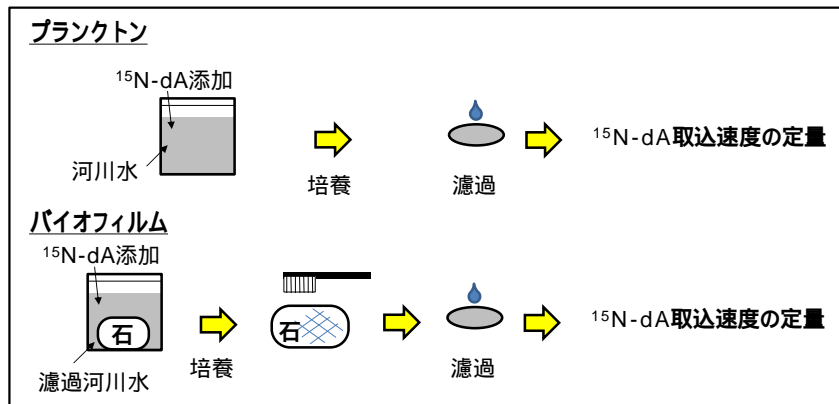


図3 プランクトン BP 及びバイオフィルム BP の処理フロー

DOC, 栄養塩, Chl a, BA, BP 測定用試料を採取した。プランクトン BP は、無濾過の河川水に¹⁵N-dA を添加・培養後、バイオフィルム BP と同様の処理を行った。BP 測定用試料は、DNA 抽出、DNA 加水分解後、LC-MS/MS を用いて¹⁵N-dA 取込速度を測定した。

プランクトン BP の計算のため、孔径1 μ mのポリカーボネートフィルターでろ過しバクテリア捕食者を除去した河川水を培養し、バクテリア細胞増加数と¹⁵N-dA 取込量の関係を求めた（[増加細胞数] = 8.8 × [¹⁵N-dA] - 617, $n = 10$, $r^2 = 0.67$, $P < 0.01$, 図4左）。また、1細胞当たり炭素量を20 fgC (Lee and Fuhrman 1987) とし、以下の計算式(1)でプランクトン BP (mgC m⁻³ d⁻¹) を求めた。

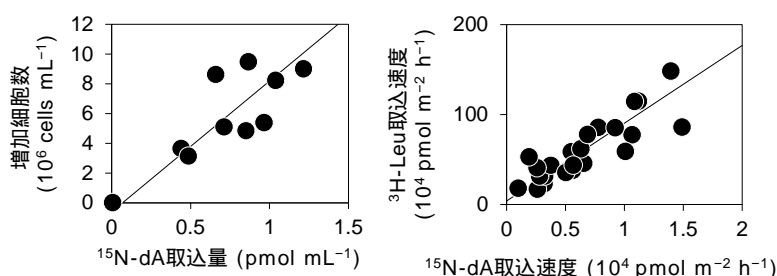


図4 河川水における¹⁵N-dA 取込量と増加細胞数の関係(左)及びバイオフィルムにおける¹⁵N-dA 取込速度と³H-Leu 取込速度の関係(右)

$$\text{プランクトン BP} = {}^{15}\text{N-dA 取込速度} \times 8.8 \times 10^6 \times 20 \quad (1)$$

バイオフィルム BP 計算のため、千曲川河床から採取した石のバイオフィルムを濾過河川水に懸濁させた試料を用いて、¹⁵N-dA と³H-Leu 取込速度の関係を調べた（[³H-Leu] = 87 × [¹⁵N-dA] - 3.7 × 10⁴, $n = 23$, $r^2 = 0.73$, $P < 0.01$, 図4右）。Leu を1 mol 取り込んだ際のバクテリア生物量増加量を3.1 kgC とし (Kirchman 1993), 以下の計算式(2)でバイオフィルム BP (mgC m⁻² d⁻¹) を求めた。

$$\text{バイオフィルム BP} = {}^{15}\text{N-dA 取込速度} \times 87 \times 3.1 \times 10^{-6} \quad (2)$$

プランクトン BP 及びバイオフィルム BP の制御要因の解析のため、ガンマ分布を仮定し、対数リンク関数を用いた一般化線形回帰を行った。モデル選択にはAICcを用いて、 i を求めた(3)。

$$i = \text{AICc}_i - \min \text{AICc} \quad (3)$$

続いて、 $i < 2$ のR個の候補モデルに対して、Akaike weight (w_i) を求めた(4)。

$$w_i = \exp(-i/2) / \sum_{r=1}^R \exp(-r/2) \quad (4)$$

候補モデルの平均化を行い、各変数の相対的重要性 (RVI) を候補モデルの w_i の合計値から求めた。

4. 研究成果

プランクトン及びバイオフィルムのBPは調査期間を通して、それぞれ5.5~466 mgC m⁻³ d⁻¹, 2.9~132 mgC m⁻² d⁻¹の範囲で変動し、冬季に低く、春季から夏季に高いという明瞭な季節変動を示した(図5)。バイオフィルムBPは常田の瀬において最も高い値を示した。一方、プランクトンBPは地点間で有意差は見られなかった。一般化線形モデルによる解析の結果、水温が両BPにおける共通の制御要因であることが明らかとなった(図6)。プランクトンBPはDOCと有意な関係を示し、有機炭素律速であったことが示唆された。バイオフィルムBPは河川水中の栄養塩

及び DOC とは有意な関係を示さなかったが、地点と流速が有意な説明変数であることが明らかとなった。これらの結果は、バイオフィーム BP は季節変動が最も卓越していたが、同一季節においては有意な空間変動が見られたことを意味する。瀬や淵といった河道地形によって変動する流速や底面せん断応力が、バイオフィームへの基質供給速度やバイオフィーム形成プロセスに影響を与え、バイオフィーム BP を制御したものと考えられる。以上のことから、千曲川中流域におけるプランクトン及びバイオフィームの BP は異なる制限要因によって制御されていたことが明らかとなった。

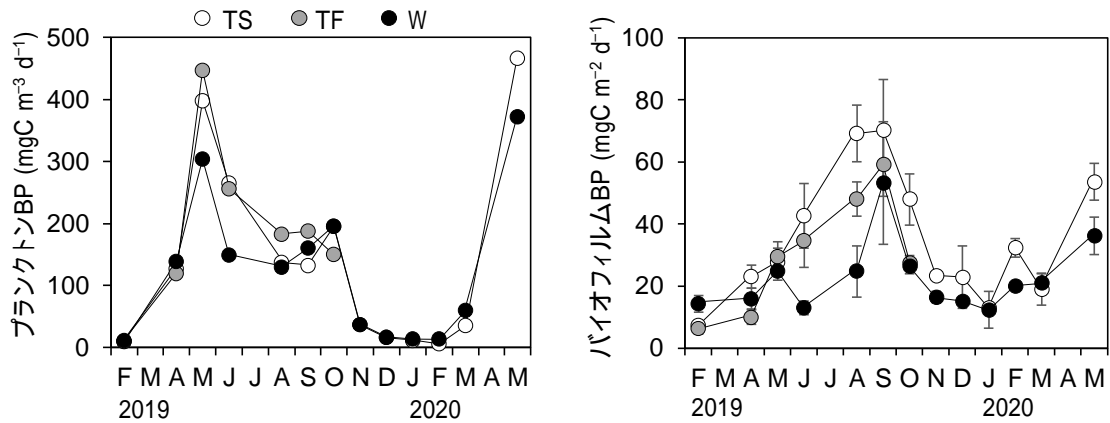


図5 千曲川中流域におけるプランクトン BP 及びバイオフィーム BP の時空間変動

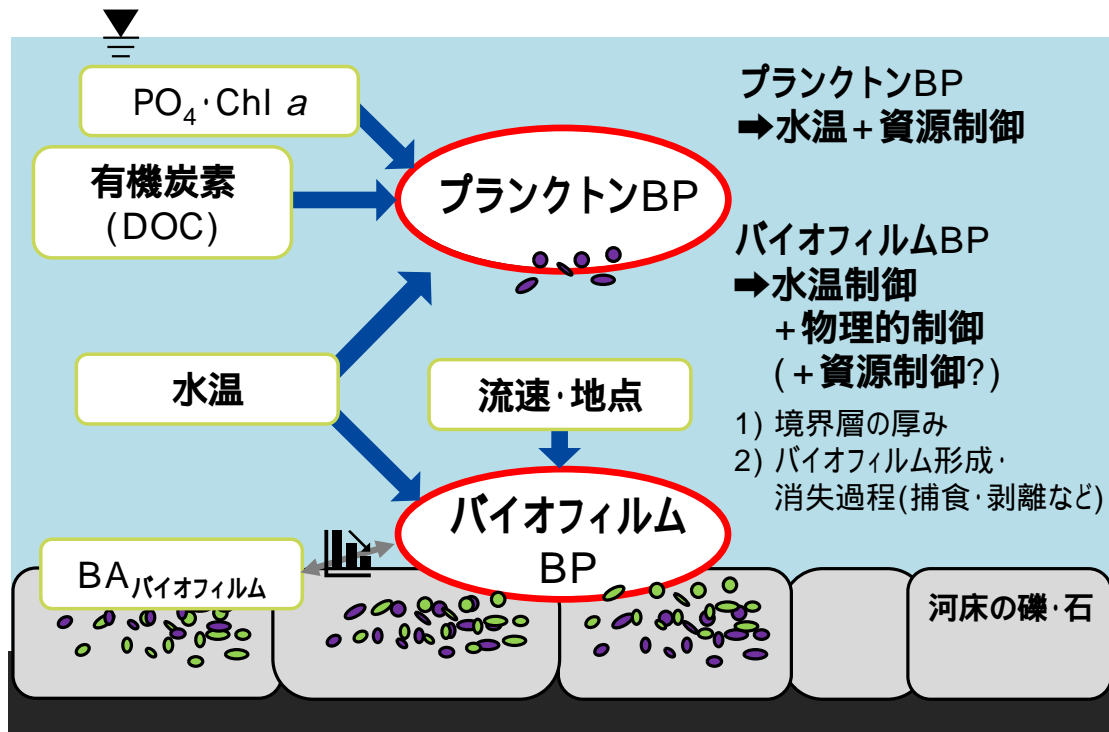


図6 千曲川中流域におけるプランクトン BP 及びバイオフィーム BP の制御要因の模式図

<引用文献>

Fuhrman, J. A., & Azam, F. (1980). Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of british columbia, antarctica, and california. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(6), 1085-1095. doi:10.1128/AEM.39.6.1085-1095.1980

Kirchman, D., Knees, E., & Hodson, R. (1985). Leucine Incorporation and Its Potential as a Measure of Protein-Synthesis by Bacteria in Natural Aquatic Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 599-607. doi:10.1128/Aem.49.3.599-607.1985

Kirchman, D. L. (1993). Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, & J. J. Cole (Eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (Vol. 58, pp. 509-512). Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Lee, S., & Fuhrman, J. A. (1987). Relationships between Biovolume and Biomass of Naturally Derived Marine Bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1298-1303. doi:10.1128/Aem.53.6.1298-1303.1987

- Tsuchiya, K., Sano, T., Kawasaki, N., Fukuda, H., Tomioka, N., Hamasaki, K., . . . Imai, A. (2015). New radioisotope-free method for measuring bacterial production using [15N5]-2 - deoxyadenosine and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) in aquatic environments. *Journal of Oceanography*, *71*(6), 675-683. doi:10.1007/s10872-015-0310-8
- Tsuchiya, K., Sano, T., Tomioka, N., Kohzu, A., Komatsu, K., Shinohara, R., . . . Imai, A. (2019). Seasonal variability and regulation of bacterial production in a shallow eutrophic lake. *Limnology and Oceanography*, *64*(6), 2441-2454. doi:10.1002/lno.11196
- Tsuchiya, K., Tomioka, N., Komatsu, K., Sano, T., Kohzu, A., Imai, A., . . . Ohara, T. (2021). Horizontal variability and regulation of bacterial production in Lake Biwa, Japan. *Limnology*. doi:10.1007/s10201-021-00687-7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuchiya Kenji, Kohzu Ayato, Kuwahara Victor S., Matsuzaki Shin-ichiro S., Denda Masatoshi, Hirabayashi Kimio	4. 巻 87
2. 論文標題 Differences in regulation of planktonic and epilithic biofilm bacterial production in the middle reaches of a temperate river	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquatic Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 47～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3354/ame01968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinohara Ryuichiro, Tsuchiya Kenji, Kohzu Ayato	4. 巻 12
2. 論文標題 Warming of water temperature in spring and nutrient release from sediment in a shallow eutrophic lake	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Water and Climate Change	6. 最初と最後の頁 3187～3199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/wcc.2021.145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya Kenji, Tomioka Noriko, Komatsu Kazuhiro, Sano Tomoharu, Kohzu Ayato, Imai Akio, Hayakawa Kazuhide, Nagata Takamaru, Okamoto Takahiro, Ohara Tomoyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Horizontal variability and regulation of bacterial production in Lake Biwa, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 231～243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-021-00687-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sogawa Sayaka, Tsuchiya Kenji, Nagai Satoshi, Shimode Shinji, Kuwahara Victor S.	4. 巻 6
2. 論文標題 ?Annual dynamics of eukaryotic and bacterial communities revealed by 18S and 16S rRNA metabarcoding in the coastal ecosystem of Sagami Bay, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabarcoding and Metagenomics	6. 最初と最後の頁 41-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3897/mbmg.6.78181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Kenji, Komatsu Kazuhiro, Shinohara Ryuichiro, Imai Akio, Matsuzaki Shin-ichiro S., Ueno Ryuhei, Kuwahara Victor S., Kohzu Ayato	4. 巻 65
2. 論文標題 Variability of benthic methane derived carbon along seasonal, biological, and sedimentary gradients in a polymictic lake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 3017 ~ 3031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lno.11571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya K, Sano T, Tomioka N, Kazuhiro K, Imai A, Hayakawa K, Nagata T, Okamoto T, Kuwahara VS, Kohzu A	4. 巻 85
2. 論文標題 Novel method for measuring aquatic bacterial productivity using D10-leucine based on protein synthesis rate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3354/ame01945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KOMATSU Kazuhiro, NAKAGAWA Megumi, TSUCHIYA Kenji, KOHZU Ayato, SHINOHARA Ryuichiro, MATSUZAKI Shin-ichiro S.	4. 巻 76
2. 論文標題 Assessment of the water quality factors influencing the primary production in Lake Kasumigaura	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Civil Engineers, Ser. G (Environmental Research)	6. 最初と最後の頁 111_11 ~ 111_17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscej.76.7_111_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 土屋健司	4. 巻 25
2. 論文標題 放射性同位体を用いないバクテリア生産速度測定法の開発と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 地球環境	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsuchiya, K., T. Noriko, T. Sano, A. Kohzu, K. Komatsu, A. Imai, K. Hayakawa, T. Nagata, T. Okamoto and Y. Hirose
2. 発表標題 Substantial decrease in bacterial production over the past three decades in the north basin of Lake Biwa, Japan
3. 学会等名 35th Congress of the International Society of Limnology (SIL2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸正敏・小松一弘・土屋健司
2. 発表標題 排水を用いた藻類生産におけるアンモニア毒性検知技術の開発
3. 学会等名 2021年 日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会 自由集会～クロロフィル蛍光を用いた藻類研究の最前線～
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋健司・高津文人・平林公男
2. 発表標題 令和元年東日本台風の出水に伴う河川バクテリア群集の応答：プランクトンとバイオフィルム
3. 学会等名 2021年 日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎慎一郎・高津文人・土屋健司・篠原隆一郎・中川恵・福森香代子・山口晴代・今藤夏子・角谷拓
2. 発表標題 栄養塩添加・水位低下による底層酸素環境の変化：大型実験プールを用いた操作実験
3. 学会等名 日本陸水学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋健司・高津文人・松崎慎一郎・桑原ピクター伸一・傳田正利・平林公男
2. 発表標題 千曲川中流域におけるプランクトン及びバイオフィルムのバクテリア生産動態
3. 学会等名 日本陸水学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福森香代子・今藤夏子・高津文人・土屋健司・角谷拓
2. 発表標題 湯ノ湖におけるサケ科魚類の分布推定-水温と溶存酸素濃度は分布の制約となるか？
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦真吾・高津文人・土屋健司
2. 発表標題 詳細な湖底地形取得がもたらす底層水質の湖内変動に対する新たな理解の可能性
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沈尚・富永賢人・土屋健司・松田知成・清水芳久
2. 発表標題 メタゲノム解析を用いたアクティブな細菌 - ウイルス感染関係の推定
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋健司・佐野友春・富岡典子・小松一弘・今井章雄・早川和秀・永田貴丸・岡本高弘・桑原ビクター伸一・高津文人
2. 発表標題 重水素標識ロイシンを用いたバクテリア生産速度測定法の開発
3. 学会等名 2020年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋健司
2. 発表標題 日本プランクトン学会奨励賞 受賞記念講演「水圏生態系における細菌生産生態に関する研究」
3. 学会等名 2020年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沈尚, 富永賢人, 土屋健司, 松田知成, 吉田天士, 清水芳久
2. 発表標題 琵琶湖ウイルスの多様性と季節変動
3. 学会等名 2020年度日本地球化学会第67回オンライン年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋健司・佐野友春・富岡典子・小松一弘・今井章雄・早川和秀・永田貴丸・岡本高弘・桑原ビクター伸一・高津文人
2. 発表標題 バクテリア生産速度測定における放射性同位体を用いないロイシン法の開発
3. 学会等名 日本海洋学会2020年度秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋健司・高津文人・平林公男
2. 発表標題 2019年台風19号の出水による千曲川のバクテリア群集への影響
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福森香代子・今藤夏子・高津文人・土屋健司・角谷拓
2. 発表標題 成層化した湖沼における生物の鉛直分布把握と環境要因との解析
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松一弘・土屋健司・富岡典子・今井章雄・早川和秀・永田貴丸
2. 発表標題 琵琶湖北湖の一次生産に影響を及ぼす環境因子の解析
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 (公社)日本水環境学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 640
3. 書名 水環境の事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------