

## 論文要旨

**論文題目** Bacterial concentration, viability and composition in the rainwater of cyclones, stationary fronts and typhoons

「低気圧、停滞前線および台風による降水中の細菌の濃度・生存状態・遺伝子組成」

**氏名** 胡偉 (HU Wei)

細菌は、霧や雲水、雨、雹、雪などの大気中の水中に大量に存在し、降水によって地表へ撒き散らされることで、生態系の発達や進化を促進すると考えられる。一方では、環境や公衆衛生への悪影響も懸念されている。細菌は、大気の物理や化学的プロセスにおいても重要な役割を果たしている可能性が高い。例えば、雲凝結核および氷晶核として雲の形成および降水過程に作用することで、大気中の物質循環および放射伝達に影響を与える。

降水中の細菌の濃度、生存状態および遺伝子組成に関する定量的データは、細菌の生態系および公衆衛生への影響を評価し、また大気圏-生物圏-水圏間のリンクにおける挙動と役割を良く理解しモデル化するために不可欠である。しかし、降水中の細菌の濃度、生存率および遺伝子組成に関する研究は非常に限られているのが現状である。

降水中の細菌の存在量と生存状態を定量するために、細菌を測定する汎用の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色法をコントロールにして、LIVE / DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (LIVE / DEAD BacLight 染色) を用いた落射蛍光顕微鏡法の計数の適用可能性を検証した。LIVE / DEAD BacLight 染色により計数した細菌細胞の総数は DAPI 染色によるものと一致し、平均検出効率は  $109 \pm 29\%$  であった。グルタルアルデヒド固定したサンプルと固定なしの同じサンプル中カウントした細胞数の比は、平均  $106 \pm 5\%$  であった。本法において、ネガティブコントロール (ブランク) における細菌濃度は、おおむね雨水試料における細菌濃度よりも一桁低かった。ただ、降水量が少ない場合、ブランク中の細菌の存在量は雨水試料の細菌より多い結果もあった。これらの結果は、グルタルアルデヒド固定の影響と慎重なネガティブコントロールの確認を行えば、LIVE / DEAD BacLight

染色による計数が、雨水中の細菌の濃度および生存率の測定に適用可能なアプローチであることを示している。

総観気象によって引き起こされる雨水中の細菌は様々な特徴を有すると考えられる。大気中の細菌が雲降水プロセスに果たす役割を正確に理解するためには、それらのデータが基礎的な情報となる。我々の知る限りでは、異なる総観気象における、雨水中の細菌の濃度、生存率および遺伝子構成についての研究はほとんどなされていない。

2014年~2015年の間に、熊本県立大学のキャンパス (32.806°N、130.766°E) で雨水のサンプルを採取した。上記の開発された LIVE / DEAD BacLight 染色法を用いて、低気圧 (寒冷前線)、停滞前線 (梅雨期および非梅雨期) および台風による雨水中の細菌の存在量および生存率を測定し、それらの特徴を調べた。雨水中の細菌の平均濃度は  $2.3 \pm 1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> であり、細菌の生存率 (全細菌濃度に対する生存可能な細菌濃度の比) は  $80 \pm 10\%$  であった。アジア大陸気団の侵入に伴って雲が生成された低気圧の雨水中には、細菌濃度はほかのタイプの雨水中より高く ( $3.5 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>)、生存率は低かった ( $75 \pm 8\%$ )。雲が海域の影響を強く受けている梅雨前線と台風の場合、細菌濃度はそれぞれ  $1.5 \pm 0.5 \times 10^4$ 、 $1.2 \pm 0.3 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> であり、細菌の生存率は  $84 \pm 7\%$  と  $85 \pm 7\%$  であった。梅雨ではない停滞前線の雨水中には、細菌濃度は  $2.4 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> であり、生存率は  $78 \pm 14\%$  であった。細菌濃度は雨水中の水溶性イオン nss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、nss-Ca<sup>2+</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> と関連していたが、浮遊粒子濃度と降水量とは明らかな関係がなかった。細菌と水溶性イオンを組み合わせた相関分析や主成分分析を行ったところ、雨水中の細菌は雲形成の段階で雲の中に閉じ込められている可能性が高いことが分かった。

14 雨水サンプル中の細菌の遺伝子組成を、16S rRNA 遺伝子配列解析を用いて同定し、低気圧 (寒冷前線)、停滞前線 (梅雨期および非梅雨期) および台風の雨のタイプ別に細菌の種類を検討した。4 タイプの雨水中に多様な細菌が存在し、*Proteobacteria* (37%)、*Bacteroidetes* (16%)、*Cyanobacteria* (14%)、*Actinobacteria* (9%)、*Acidobacteria* (8%)、*Firmicutes* (5%) 門の細菌が優占していた。約半数 (33 のうち 16) の門が 4 タイプの雨水中に共通して存在していた。共通の Operational Taxonomy Unit (OTU) が全配列の大部分 (平均的に 74%) を構成し、雨の種類にかかわらず共通の細菌 OTU が優占的に存在してい

た。一方で、雨に関連する気団の起源と総観気象の条件によって細菌組成は異なっていた。土壌起源のバクテリア指標菌の割合が高いことは土壌起源のバクテリアの寄与が大きいことを示している。おそらく、土壌起源のバクテリアは雲凝結核および氷晶核として雲中プロセスに関与していたと考えられる。台風時の雨の1サンプルを除いて、その他のサンプルには、*Pseudomonas*、*Xanthomonas* および *Erwinia* 属のメンバーのような氷核形成活性バクテリアがあった。いくつかのサンプルから海洋起源バクテリアに属する種、例えば *Pseudoalteromonas*、*Synechococcus* と *Marinobacter* が検出され、雲および雨水を介した海洋起源バクテリアの大気中拡散が示唆された。ヒトおよび動物の病気の潜在的な病原体である糞便指標バクテリアもすべてのサンプルで検出された。これらのことから、降水は大陸、海洋と島の生態系をつなぐ、自然界のバクテリア群集の普及にとって非常に効率的な経路であるといえる。

以上の結果をまとめると、降雨イベントと関連する総観気象によって、雨水中のバクテリアの濃度、生存率および群集組成には相違が見られた。雨水中には様々なバクテリア群集が検出された。総観気象が異なるにもかかわらず、共通するバクテリアが OTU を優占していた一方で、群集組成は雨水のタイプによって異なっていた。また、大陸起源のバクテリアは雨水中で大きな割合を占めていた。雨水中のバクテリアの重要なソースとして、雲の下で除去された大気中のバクテリアだけではなく、雲中凝結核および氷晶核として働いたバクテリアも含まれると考えられる。以上のことから、雨水中のバクテリアは、生態系の進化、公衆衛生上の脅威および気候変動に関与する可能性があるといえる。

キーワード：バクテリア、濃度、生存率、遺伝子組成、16S rRNA シークエンシング、降水、総観気象

## Abstract

Bacteria substantially exist in atmospheric waters, e.g., fog and cloud water, rain, hail and snow. They can be disseminated by precipitation from the atmosphere to the Earth's surfaces. On the one hand, bacteria in the atmosphere are likely a driver of the development and evolution of ecosystems; on the other hand, they are also causing great concern for their potential negative impacts on environments and public health. Bacteria likely play important roles in atmospheric physicochemical processes, such as acting as cloud condensation nuclei and ice nuclei to initiate cloud formation and precipitation, and consequently impact the mass cycle and radiation transfer in the air.

Quantitative data on the concentration, viable or nonviable status, and community composition of bacteria in precipitation are essential to assess their impacts on ecosystems and public health, as well as to better understand and model the activities of bacteria in the atmosphere–biosphere–hydrosphere links. However, studies on the concentration, viability and community composition of bacteria in rainwater, especially those dependent on different synoptic weather systems, are largely lacking.

To quantify the abundance of viable and nonviable bacterial cells in rainwater, the applicability of epifluorescence microscopy enumeration with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit stain was verified, with the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain for the reference of total cell counts. Results showed that the total counts of bacterial cells by LIVE/DEAD BacLight staining were consistent with those by DAPI staining, and the average detection efficiency was  $109 \pm 29\%$ . The ratio of cell count with glutaraldehyde fixation to that without fixation was  $106 \pm 5\%$  on average. The bacterial concentration in negative control was usually an order of magnitude lower than that in rainwater samples. However, in case of small precipitation, the abundance in negative control could be more than that in rainwater samples. These results indicate that the enumeration with LIVE/DEAD BacLight bacterial viability assay coupled with glutaraldehyde fixation and careful negative control investigation is an approach applicable to the measurement of the concentration and viability of bacterial cells in rainwater.

The bacteria in the rainwater of the rain caused by different synoptic systems might have distinctive characteristics. The related data are fundamental information for an accurate understanding of the roles

that airborne bacteria play in cloud and precipitation processes. To our knowledge, there have been no research studies on the dependence of abundance, viability and community composition of bacteria in rainwater on the synoptic weather.

In this study, rainwater samples were collected at a site (32.806°N, 130.766°E) in Kumamoto, southwestern Japan during 2014–2015. The abundance and viability of bacterial cells in rainwater samples were measured and their distinctiveness, according to synoptic weather systems, i.e., cyclones (cold fronts), stationary fronts (including Meiyu and non-Meiyu fronts) and typhoons, was examined. On average, the cell concentration of bacteria in the rainwater was  $2.3 \pm 1.5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>, and bacterial viability, the ratio of viable cells to total cells, was  $80 \pm 10\%$ . In the rainwater of cyclones when clouds were induced by the intrusion of continental air, the bacterial concentration was higher ( $3.5 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>) and the viability was lower ( $75 \pm 8\%$ ) than in the rainwater of other types. In the rainwater of Meiyu fronts and typhoons when clouds were significantly influenced by marine air, bacterial concentrations were  $1.5 \pm 0.5 \times 10^4$  and  $1.2 \pm 0.3 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>, and bacterial viabilities were  $84 \pm 7\%$  and  $85 \pm 7\%$ , respectively. In the rainwater of non-Meiyu stationary fronts, the bacterial concentration was  $2.4 \pm 1.6 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>, and the viability was  $78 \pm 14\%$ . Abundant bacteria were associated with ions nss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, nss-Ca<sup>2+</sup>, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in rainwater. However, the bacterial concentrations did not correlate with the ratios of airborne particle concentrations to the precipitation amounts. Further investigations with correlation analysis and principal component analysis combining bacteria and ion species revealed that bacteria in the rainwater were likely enclosed in clouds at the stage of cloud formation in addition to below-cloud scavenging, and bacteria involved in the rainwater did not show confirmable growth.

Bacterial communities in fourteen samples were identified by using 16S rRNA gene sequencing and compared according to the rain types on synoptic scales, i.e., cyclones, Meiyu and non-Meiyu stationary fronts, and typhoons. Diverse bacterial communities were present in all four types of rainwater, and were dominated by the phyla *Proteobacteria* (37%), *Bacteroidetes* (16%), *Cyanobacteria* (14%), *Actinobacteria* (9%), *Acidobacteria* (8%) and *Firmicutes* (5%). About half of the phyla (16 out of 33) were common among the rain types. The common operational taxonomic units (OTUs) comprised the majority (averagely 74%) of the sequences, indicating the predominance of the common bacterial OTUs regardless of the rain types. On the other hand, the synoptic weather systems as well as the origins of air

masses associated with the rain, likely caused distinct bacterial communities. High fractions of bacterial indicator taxa of soils, which were presumably involved in in-cloud processes as nuclei, signified the large contribution of bacteria from soils. There were ice nucleation-active bacteria, such as the members of the genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Erwinia*, in all samples except one of typhoon rain. Marine bacterial taxa, e.g., *Pseudoalteromonas*, *Synechococcus* and *Marinobacter*, were detected in several samples, indicating the dispersal of marine bacteria via cloud and rainwater. Fecal indicator bacteria, which are potential pathogens of human and animal diseases, were also detected in all samples. Rain is thus a very efficient pathway for the dissemination of bacterial communities in nature to link continent, marine and island ecosystems.

In summary, there was a dependence of bacterial concentration, viability and community on the corresponding synoptic weather of rain events. Diverse bacterial communities occurred in the rainwater. Common bacteria dominated OTUs despite the synoptic weather, and distinct bacterial communities occurred in rainwater of different rain types. Bacteria from continental sources made a large contribution in the rainwater. In addition to below-cloud scavenging, bacteria as nuclei in clouds may be an important source of bacteria in rainwater. The bacteria in rainwater have a potential to involve in ecosystem evolution, public health threat and climate change.

**Keywords:** Bacteria; Concentration; Viability; Community composition; 16S rRNA sequencing; Rainwater; Synoptic weather