

山腹斜面流出解析への キノンバイオマーカーの適用

APPLICATION OF QUINONE BIOMARKER TO THE ANALYSIS OF HILLSLOPE RUNOFF

藤田昌史¹・芳賀弘和²・松本嘉孝³・坂本康⁴・西田継⁵・松谷順⁶

Masafumi FUJITA, Hirokazu HAGA, Yoshitaka MATSUMOTO,
Yasushi SAKAMOTO, Kei NISHIDA and Jun MATSUTANI

¹正会員 博(工) 山梨大学助手 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

²博(農) 日本学術振興会特別研究員 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

³修(工) 山梨大学 大学院工学研究科博士課程 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

⁴正会員 工博 山梨大学教授 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

⁵博(工) 山梨大学助教授 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

⁶修(理) 山梨県森林総合研究所 森林環境研究部 (〒400-0502 山梨県南巨摩郡増穂町最勝寺2290-1)

An applicability of quinone biomarker to the analysis of hillslope runoff was investigated. At first, quinone profiles of three types of stream as well as a hillslope runoff in a forest head were compared. The quinone composition of hillslope runoff differed from others. Moreover, there were remarkable differences in quinone profile of hillslope runoff under different rainfall conditions. Then, the behavior of quinone biomarker accompanying the increase and decrease of hillslope runoff after a rainfall event was examined. Q-9 (H2), Q-10 (H2), Q-11, MK-6 and MK-10 can be key biomarkers for the analysis of interflow.

Key Words : biomarker, quinone, rainfall-runoff, interflow, hillslope

1. はじめに

近年, 降雨時に森林流域から自然由来有機物や窒素化合物などの汚濁物質が流出することが問題視されており, 下流域の水源や閉鎖性水域などの水質環境に影響を及ぼすことが懸念されている¹⁾. このようないわゆるノンポイントソース汚染に関する研究は, 1980年代に水質調査を中心に精力的に行われ, 流出負荷量を表現する原単位が提案されてきた. また, 流域水質管理の観点から, 実測から求めた原単位を基本とした水質予測シミュレーションに関する研究も進んだ. 1990年代に入ると, 原単位の精度は格段に向上したが, その一方で, 降雨流出や季節変動などの実現象を十分には表現できないことが, 次第に明らかになった. つまり, 原単位法やそれに基づいた研究方法の限界が顕在化しはじめた. これは, 汚濁負荷流出機構に着目した研究の必要性を示すものである.

森林流域における汚濁負荷流出機構を理解するためには, どのような汚濁物質を対象とするにしても, まず, 降雨が渓流水に達するまでの水文プロセスを

明らかにすることが必須となると考えられる. 特に, 山腹斜面における流出経路の同定や流量の推定が重要となる. 水文学の分野では, ハイドログラフの成分分離という観点で, 水質成分^{2), 3), 4)}や安定同位体^{5), 6)}をトレーサーとして用いる方法が検討されてきた. これらのトレーサーを用いた解析では, 各流出成分とそれらの合成となる総流出水との間で, 水量およびトレーサー量について収支式が立てられる. このとき, 式の数よりも未知数の方がはるかに多くなり, 解析的に解くことが困難となることから, さまざまな仮定を導入することで, 未知数の数を減らす工夫がなされている. しかしながら, それらの仮定が実現象を反映しない場合があることが懸念されている²⁾. また, トレーサーによるハイドログラフの成分分離の結果と別な手法による結果とが, 一致しない事例も報告されている⁷⁾. したがって, 山腹斜面における水文プロセスを十分に解析できるような汎用性の高い方法論が確立されているとは言えない. 山腹斜面の地下空間の場の特徴的であり, かつ豊富な情報量を持つトレーサーの適用が望まれる.

そこで本研究では, 一試料から十数種類の成分の

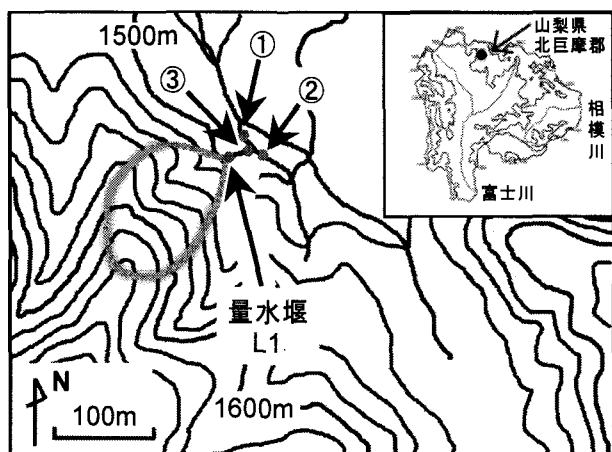


図-1 調査地点

抽出が可能となるキノンバイオマーカー⁸⁾に着目し、山腹斜面における降雨流出解析への適用の可能性を探ることを目的として、以下の二点を検討した。

1) 斜面流出水に加え、湿地を通過した流出水および渓流水などの源頭部周囲における4地点の流出水のキノンプロファイルと比較した。また、降雨履歴の異なる斜面流出水のキノンプロファイルの違いを定量的に評価した。

2) 降雨イベントを受けて斜面流出水量が増加・減少する過程、いわゆる出水時ハイドログラフの増水部・減水部に着目して、各キノン存在比の変化を追跡した。そして、特異的な挙動を示すキノンバイオマーカーについて検討した。

2. 方法

(1) 対象流域

山梨県北巨摩郡須玉町に位置する釜瀬川の源流域を対象流域とした(図-1)。

(2) 観測および採水

降雨量を連続測定するために、転倒マス雨量計を設置した。図中で囲まれた約1haの谷地形からの湧水点付近に量水堰(L1)が設置されている。そこに圧力式水位計を備え付け、5分間隔で水位を自動測定した。そして、斜面流出水量と水位との関係から、流量を算出した。

前述した目的1)の検討のために、L1、この下流側に広がる湿地を経た③、湿地が広がる源頭部の下流に位置する②、そして③と②とが合流する①の合計4地点で、2003年6月11日、25日、7月2日、8月6日に採水を行った。目的2)の検討のためには、8月14日から16日にかけて降った73.4mmの降雨によってもたらされた出水に着目し、L1の上流に位置する湧水点の傍で、8月15日、17日、23日に採水を行った。8月15日はその増水部、17日および23日は減水部であった。特に、17日はピーク直後に位置していた。いずれも約20Lの採水を行い、後述するキノン分析に供した。

(3) キノンプロファイル法

a) キノンバイオマーカー

キノンとは、細菌の呼吸鎖や光合成電子伝達鎖において水素キャリアーとして機能する補酵素である。好気呼吸や硝酸呼吸を行う細菌が持つユビキノン(Q-n (Hx))、嫌気呼吸を行う細菌が持つメナキノン(MK-n (Hx))、光合成を行う細菌が持つビタミンK1(VK1)およびプラストキノン(PQ-n)に大別される。ここで、n, Hxは、それぞれイソプレノイド側鎖数およびその水素飽和度xを表す⁸⁾。一般的に、一細菌種は一種の優占キノン種を持つ。そして、優占キノン種は、環境条件に応じて変化することがなく、遺伝的にも安定していることが知られている⁸⁾。また、キノン濃度は細菌群量を間接的に示すことが報告されている⁸⁾。

キノンは、微生物学的な専門知識を必要とせずに化学分析だけで分析が可能であることや定量性に優れていることから、下廃水処理系⁸⁾、⁹⁾や土壌系¹⁰⁾などの複合微生物系を解析するための生物指標(バイオマーカー)として利用されてきている。

b) 分析方法

採水した試料の重量を測定した後、孔径0.3μmのガラス繊維ろ紙(ADVANTEC社, GF-75)を用いてろ過を行い、ろ過残渣物を得た。そして、このろ過残渣物からキノンを含む脂溶性成分を抽出するために、クロロホルム・メタノール溶液(2:1, v/v)とヘキサンを順次用いた。得られた溶媒抽出物を固相抽出カートリッジ(Waters社, Sep-Pak Silica)に吸着させ、2% (v/v)のジエチルエーテル・ヘキサン溶液を用いてMK, VK1およびPQを、10% (v/v)の同溶液を用いてQを、それぞれ分離・精製した。アセトンに溶媒置換した後、高速液体クロマトグラフィー(SHIMAZU社, SCL-10A VP)により、各キノン分子種を分離・定量した。検出器は、フォトダイオードアレイ(SHIMAZU社, SPD-M10A VP)を用いた。各キノン種の同定には、吸光スペクトルやENIU値¹¹⁾を参考にした。各キノン種の濃度は、採水した試料の重量から換算した体積に対する濃度とした。

c) 非類似度解析

二試料間のキノンプロファイルの違いを定量的に評価するために、統計学的な指標の一つである非類似度を算出した。ここでは、非類似度の指標として、式(1)を用いた¹¹⁾。

$$D(i, j) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n |p_{ki} - p_{kj}| \quad (1)$$

ここで、 P_{ki} , P_{kj} は、それぞれ試料i, jのキノン種kの存在比(モル基準)を表す。nは、検出されたキノン種の総数を表す。この非類似度は0から100%の範囲をとる。これは、試料i, jにおける各キノン種の存在比の差を累積したものであるため、100%に近いほど試料間の類似性が低く、逆に0%に近いほど類似性が高いことを意味する。

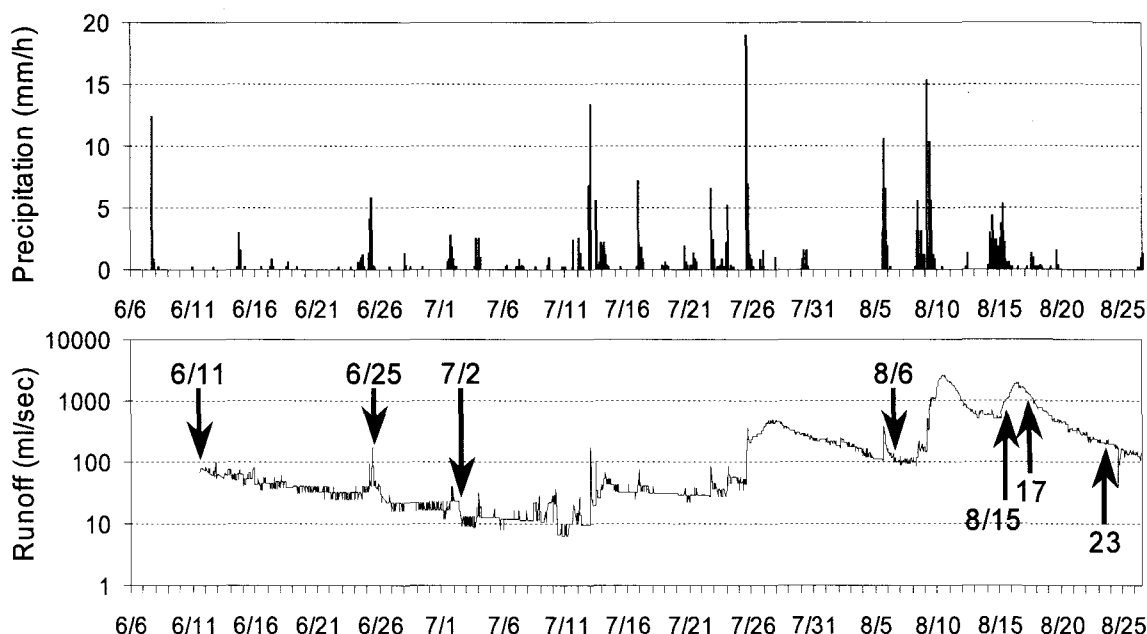


図-2 降雨量および斜面流出水量

3. 結果および考察

(1) 降雨量および斜面流出水量

2003年6月6日から8月26日における降雨量とL1で観測された斜面流出水量を図-2に示した。

6月11日に採水したときの斜面流出水量は、6月25日や7月2日に比べて大きかったが、直前の降雨イベントから90時間が経過していたことから、流出成分は基底流出であったと考えられる。一方、6月25日、7月2日、8月6日に採水したときは、直前の降雨イベントからそれぞれ3時間、12時間、10時間しか経過していなかったことから、直接流出を含むと考えられる。ただし、7月2日は直前の降雨イベントの総降雨量が10.8mmに過ぎず、斜面流出水量も少ないことから、基底流出に近い流れであったと推測される。また、8月6日は、7月中の降雨の影響でもともと斜面流出水量が大きかった状態から降雨イベントを受けている。したがって、6月25日、7月2日、8月6日は直接流出成分を含んでいたと判断されるものの、流出プロセスはまったく異なっていたものと考えられる。

8月14日以降の出水は、8月8日、9日の96.2mmの降雨にともなう出水に引き続いて起こったものであり、8月15日、17日、23日の斜面流出水量は比較的大きかった。例えば、基底流出と考えられる6月11日と比べて、8月15日、17日の斜面流出水量は10倍強であった。8月23日は、降雨後約80時間が経過していたものの、斜面流出水量は2倍強であった。

(2) 源頭部周囲における降雨履歴の異なる流出水のキノンプロファイル

6月11日、25日、7月2日および8月6日の4地点におけるキノン濃度を図-3に示した。

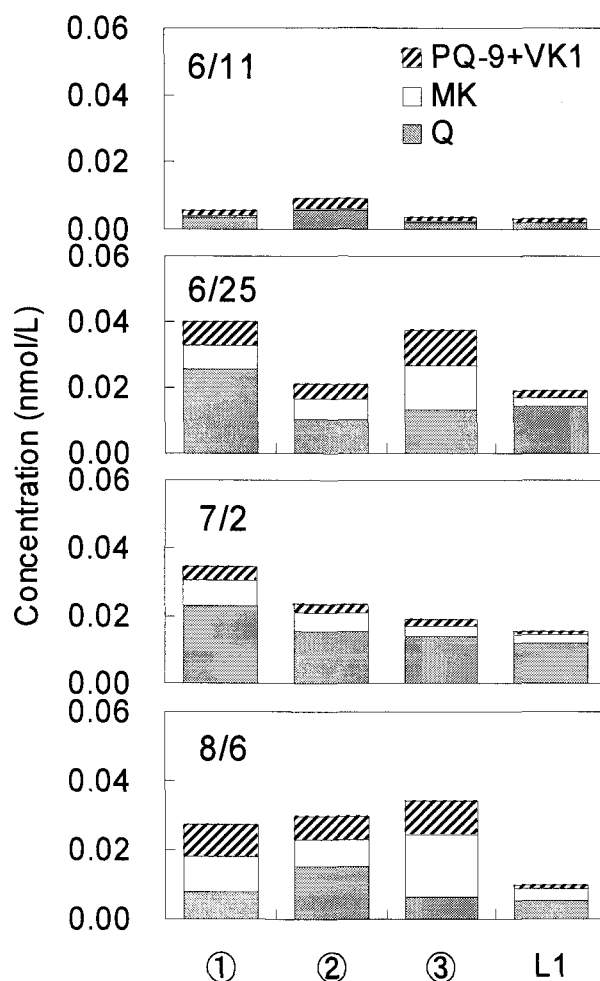


図-3 4地点のキノン濃度

いずれの採水日でも、Q、MK、VK1およびPQが検出された。また、いずれの地点でも、降雨直後に

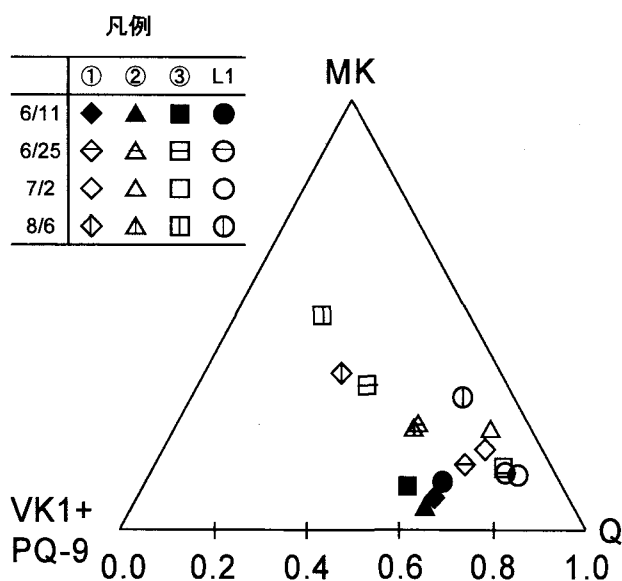


図-4 三角ダイアグラム

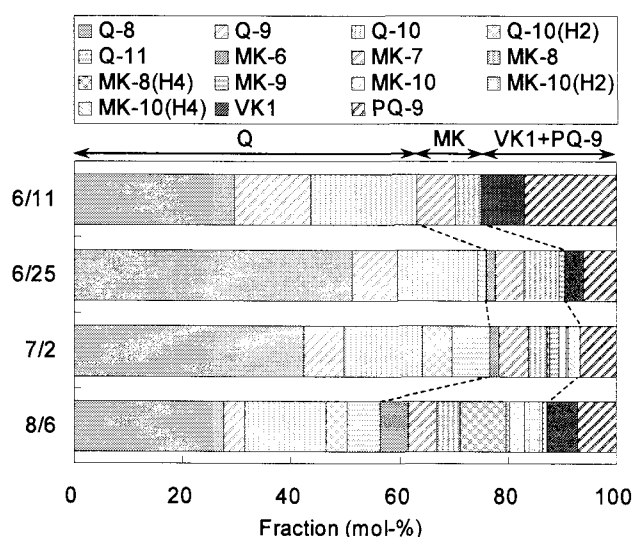


図-5 斜面流出水のキノンプロファイル

採水した6月25日、7月2日、8月6日の方が、6月11日よりキノン濃度が高かった。L1については、降雨が基底流出では通らない経路を通過したことにより、その土壌中に存在する細菌群が流出したものと解釈される。また、②や③については、その上流部に湿地が存在することから、そこに生息する細菌群が降雨により流出したものと考えられる。

それぞれの採水日における4地点のQ、MKおよびVK1+PQ-9の構成比を三角ダイアグラムで示した(図-4)。

基底流出が主であったと考えられる6月11日は、4地点が概ね集束していた。また、直接流出であるもののこのときに近い流れであったと判断された7月2日も同様に集束していた。

一方、6月25日や8月6日は、4地点の布置にばらつきが見られた。これは、特に②や③でMKの構成比

表-1 斜面流出水間の非類似度

	6/11	6/25	7/2	8/6
6/11				
6/25	27.9			
7/2	32.9	16.4		
8/6	31.4	30.6	23.3	

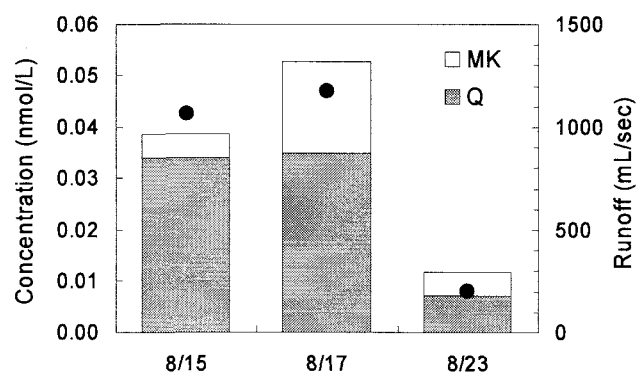


図-6 斜面流出水量の増減にともなうキノン濃度の変化

が相対的に高かったことに起因していた。湿地を通過した流出水には、MK含有細菌群がより多く含まれていると解釈される。②と③とが合流する①では、必ずしも両者の中間的な構成比とはならなかった。両者以外の流出水を含んでいる可能性が示唆される。L1については、6月25日は7月2日の近くに位置していたものの、8月6日は離れたところに布置されていた。単にキノン構成比を見ただけでも、降雨履歴の異なる採水日間である程度違いが認められたことから、キノンバイオマーカーが流出特性の違いを反映している可能性がある。

そこで、それぞれの採水日ごとに、L1で検出されたすべてのキノン種の存在比をモル百分率から算出した(図-5)。6月11日のQおよびMKの優占種の順序は、それぞれQ-8>Q-10>Q-9、MK-7>MK-8であった。他の採水日では、Qの上位3種の順序に違いは認められなかったが、6月11日には検出されなかったQ-10(H2)やQ-11が検出された。一方、MKについては、6月11日には存在しなかったキノン種が、6月25日では1種、7月2日および8月6日では5種検出された。また、優占上位2種の順序は、7月2日は6月11日と同様であったが、6月25日ではMK-8>MK-7、8月6日ではMK-8(H4)>MK-7であった。

このようなキノンプロファイルの違いを定量的に評価するために、非類似度を算出した(表-1)。三角ダイアグラムで近いところに布置された6月25日と7月2日の非類似度は16.4%と見積もられ、すべての組み合わせのなかで最も低い値となった。一方、比較的近い流出特性であったと判断された6月11日

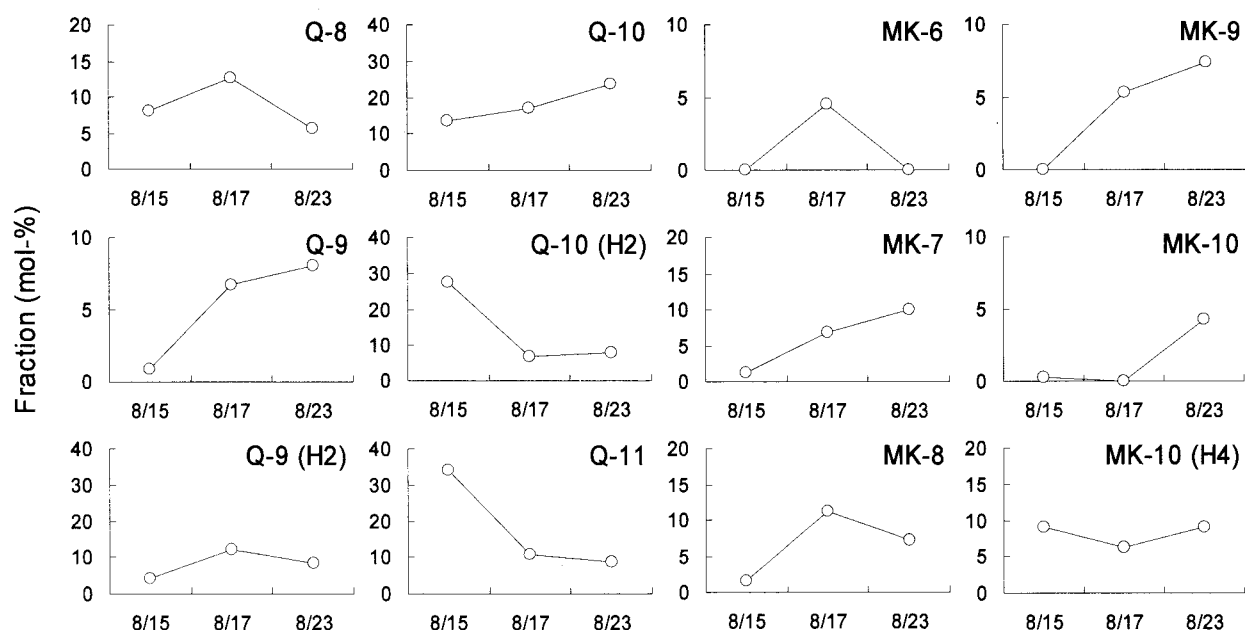


図-7 出水時ハイドログラフの増水部および減水部におけるキノン存在比の変化

と7月2日の非類似度は、32.9%と計算され最も高い値を示していた。都市河川水¹²⁾や活性汚泥^{8), 11)}のキノンプロファイル調べた研究例では、非類似度が10%を超えれば、両者のキノンプロファイルには違いがあると判断している。したがって、それぞれの採水日間のキノンプロファイルには、明確な違いがあったと解釈される。言い換えると、降雨履歴の異なる斜面流出水のキノンプロファイルには、明確な違いが認められたと言える。

(3) 出水時ハイドログラフの増水部・減水部におけるキノンバイオマーカーの挙動

8月15日、17日、23日のキノン濃度を図-6に棒グラフで示した。前述の検討で、流出水のキノンプロファイルが地表の影響を受けることが明らかとなったことから、今回はL1の上流に位置する湧水点の傍で採水を行った。その結果、Q、MKのみが検出された。キノン濃度の変化は、図中にプロットで示した斜面流出水量の増減に対応していた。つまり、斜面流出水量が大きいほどキノン濃度が高く、逆に小さいほど低くなる傾向が見られた。

検出された12種類のキノン存在比の変化を図-7に示した。ここでは、前述の基底流出が卓越していた6月11日に検出されたQ-8、Q-9、Q-10、MK-7、MK-8以外のキノン種について、その挙動と流出特性との関係を検討する。

8月15日にQの優占上位2種であったQ-11とQ-10 (H2)はいずれも17日にかけて、つまり、斜面流出水量の増加にともない減少していた。これらのキノン種は、出水時ハイドログラフの立ち上がり初期から8月15日にかけて流出していたものと考えられる。言い換えると、早い中間流出に特徴的なキノン種の可能性がある。一方、斜面流出水量の増加とともに増加傾向を示したキノン種も存在した。なかでも、

前述の6月25日、7月2日、8月6日の流出水、つまり出水時ハイドログラフの減水部における流出水からは検出されなかったQ-9 (H2)や8月17日にのみ検出されたMK-6は、中間流出に特異的である可能性がある。また、8月23日の存在比が15日や17日に比べてはるかに高かったMK-10は、遅い中間流出に対応している可能性が示唆される。今後、本研究により導き出されたキノンバイオマーカーと斜面土壌のキノンプロファイルとの対応関係を調べることで、流出経路の同定が可能になるものと考えられる。

このように流出プロセスを反映するキノン種が存在した一方で、斜面流出水量の変化とはまったく逆の傾向を示したMK-10 (H4)や存在比が増加し続けたMK-9については、今回の結果だけでは概念的な流出成分との対応を説明することができなかった。

4. まとめ

斜面流出水のキノンプロファイルは、源頭部周囲の流出水などに比べて特徴的であった。また、降雨履歴の異なる斜面流出水のキノンプロファイルには、明確な違いが認められた。そこで、出水時ハイドログラフの増水部および減水部に着目して、キノンバイオマーカーの挙動を追跡したところ、検出された12種類のうちQ-9 (H2)、Q-10 (H2)、Q-11、MK-6、MK-10が中間流出に特徴的なキノン種である可能性が示された。

今後、出水時ハイドログラフの増減部におけるキノンバイオマーカーの挙動を、短い採水間隔でさらに詳細に検討するとともに、さまざまな降雨量、斜面流出水量の状況下でこのような観測を重ねることで、汎用性の高い知見が得られるものと考えられる。

謝辞：本研究は，文部科学省21世紀COEプログラム「アジアモンスーン域流域総合水管理研究教育」の助成を受けて行われた。また，本大学の学部4年生の糸数隆史君には，現場調査や分析をご協力いただいた。以上をここに記して深く謝意を表する。

参考文献

- 1) 國松孝男，須戸幹：林地からの汚濁負荷とその評価，水環境学会誌，20(12)，pp. 810-815，1997.
- 2) 竹内邦良，坂本康，本郷嘉彦：NO₃⁻をトレーサーに用いた流出成分分離の可能性について，第27回水理講演会論文集，pp. 405-413，1983.
- 3) Hooper, R. P., Christophersen, N. and Peters, N. E.: Modelling streamwater chemistry as a mixture of soilwater end-members-an application to the Panola Mountain catchment, Georgia, U. S. A., *Journal of Hydrology*, Vol. 116, pp. 321-343, 1990.
- 4) 勝山正則，大手信人，内田太郎，浅野友子，木本秋津：降雨流出過程の相違が溪流水質形成機構に与える影響，水文・水資源学会誌，第13巻，3号，pp. 227-239，2000.
- 5) Sklash, M. G.: Environmental isotope studies of storm and snowmelt runoff generation, *Process Studies in Hillslope Hydrology*, Anderson, M. G. and Burt, T. P. eds., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 401-435, 1990.
- 6) 辻村真貴，田中正：環境同位体を用いた降雨流出の研究，水文地形学，古今書院，pp. 79-87，1996.
- 7) McDonnel, J. J.: A rationale for old water discharge through macropores in a steep, humid catchment, *Water Resources Research*, Vol. 26, pp. 2821-2832, 1990.
- 8) Hiraishi, A., Masamune, K. and Kitamura, H.: Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 4, pp. 897-901, 1989.
- 9) Furumai, H., Fujita, M. and Nakajima, F.: Quinone profile analysis of activated sludge in enhanced biological P removal SBR treating actual sewage, *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*, Matsuo, T., Hanaki, K., Satoh, H. eds., Elsevier, pp. 165-174, 2001.
- 10) 藤田昌史，鯉渕幸生，Hasanudin, U., 小倉久子，藤江幸一，磯部雅彦：東京湾における水質動態と底質微生物群集構造の解析，海岸工学論文集，第50巻，pp. 996-1000，2003.
- 11) Hiraishi A., Morishima, Y. and Takeushi, I.: Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment system, *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 37, pp. 57-70, 1991.
- 12) 後藤尚弘：キノンプロファイル法による環境水中微生物群集構造変化の解析と予測モデルの構築，文部科学省科学研究費補助金（基盤研究B(2)），2002.
(2003. 9. 30受付)