

キノンプロファイル法を用いた河川底泥の微生物相の解析

岐阜高専 ○和田 清・種蔵 史典
豊橋技術科学大学 藤江 幸一・胡 洪宮

1.はじめに： 河川環境を評価する手法として、化学的指標、植物・魚類・貝類などの生物学的指標や、バイオアッセイなどを用いた濃縮毒性試験が行われている。しかしながら、微生物（分解者）の群集構造の観点から河川環境を評価する手法はほとんどないのが現状である。そこで本研究は、分離・培養を必要としない微生物の群集構造の解析が可能な新しい方法、キノンプロファイル法を河川底泥に適用して、微生物群集の量・質的な評価を行い、底質や水質特性などの環境条件とどのように関わっているかについて考察したものである。

2.キノンプロファイル法：キノンプロファイル法は、細胞の基本的な組成物質である菌体キノンをバイオマーカーとすることで、分離培養を必要とせず、しかも微生物群集の定量的な評価ができる手法である。この方法は、試料の採取、キノンの抽出・精製、キノン分子種の分離・同定がその分析の流れである。具体的にはまず、採取した試料をクロロホルム・メタノール混合液に混和・ろ過し、脂溶成分を抽出する。この抽出液を、蒸発乾固させてヘキサン抽出を行った後、エバポレーターで蒸発・濃縮する。さらにヘキサン抽出液を「Sep-Pak Plus Silica」に通液してキノンを吸着させ、濃度の異なるジエチル・ヘキサン溶液を通液して、メナキノン（嫌気性菌類：MK）とユビキノン（好気性菌類：Q）を別々に回収する。それを蒸発・乾固させた後に少量のアセトンを加えて二種類のキノンが抽出・精製される。その後、高速液体クロマトグラフィーを用いて、各キノン分子種に分離、プロファイルの測定が行われる。同時に、分離ピークの紫外線吸収スペクトルを測定して、スペクトルピークと合致するピークを各キノン種と同定する。

3.解析方法： 対象河川として長良川およびその支川の糸貫川を選定した。河口堰によって堆積した底質環境と微生物動態が上・下流域ではどのように異なるかを明らかにするために、河川底泥をエクマンバージ採泥器で採取、粒度分布・含水率・強熱減量の測定およびキノンプロファイル法による分析を行った。なお、採取地点は揖斐長良大橋（河口から2.6km）、伊勢大橋（6km）、長良大橋（13.9km）、糸貫川河口（44.6km：排水機場ゲート上流）である。また、試料採取地点における水温・水深・塩分濃度・pH・電気伝導度・濁度・DOの計測を行った。さらに建設省の水質測定ロボットによる水質データを入手して、河川の水質特性を空間・時間的に解析した。

4.結果と考察：（1）キノン量の存在比 図-1は分析された河川底泥のキノン量の存在比を4地点について比較したものである。微生物相はユビキノン、メナキノン、プラストキノン（光合成藍色細菌）に大別される。地点別にみると上流へ進むほどプラストキノンの比率は大きくなり、逆に下流へ行くほどユビキノンの比率が高くなる傾向にある。糸貫川河口ではプラストキノンの比率は45%と最も高く藻類の存在が高い。活性汚泥には一般にユビキノンおよびメナキノンが常に存在し、ユビキノンの含有量が高く、廃水の種類に関係なくQ-8が常に優先キノン分子種（50-80%）であるといわれている¹⁾。対象河川底泥でも、ユビキノンの含有量が高い傾向がみられ、河口堰の上流側では全体の40%程度、堰下流では70%を占めている。また、Q-8の存在比が大きい傾向は認められるが、25-40%程度にとどまっている。さらに、河口堰直上と糸貫川河口の2地点については、メナキノン種が多く出現していることがうかがえる。堰の上流側では流れが緩くなって微細粒子（特に有機物）が堆積しやすくなり、溶存酸素の消費が増加して底層の酸素不足が発生しやすくなるなど、底質や水質の劣化を示しているものと考えられる。4カ所のキノンプロファイルの違いの程度を定量的に表現するために、非類似度（0：同一）を用いて表した結果が表-1である。この非類似度は、キノン存在比の差の総和で評価する相対値であるので、キノンプロファイルが異なると、各キノン分子種の

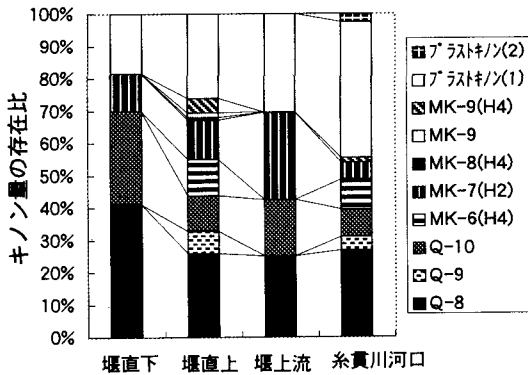


図-1 採取地点ごとのキノン量の存在比

表-1 地点間の非類似度

	堰直下 (x=-3.0km)	堰直上 (x=+0.4km)	堰上流 (x=+8.3km)	糸貫川河口 (x=+39.0km)
堰直下		0.335	0.273	0.409
堰直上	0.335		0.253	0.196
堰上流	0.273	0.253		0.306
糸貫川河口	0.409	0.196	0.306	

表-2 底質の特性量とキノン量

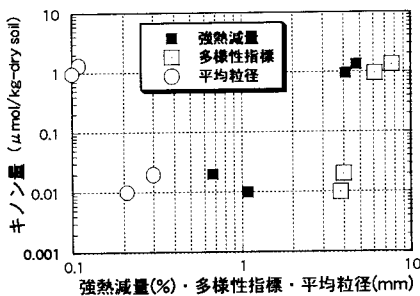


図-2 強熱減量・平均粒径とキノン量

	堰直下 (x=-3.0km)	堰直上 (x=+0.4km)	堰上流 (x=+8.3km)	糸貫川河口 (x=+39.0km)
水深 (m)	-	6.20	6.85	0.20
含水率 (%)	29.00	61.36	27.83	74.55
強熱減量 (%)	1.08	4.74	0.67	4.08
平均粒径 (mm)	0.21	0.11	0.30	0.10
均等係数	1.59	1.83	2.14	2.90
曲率係数	1.12	1.28	0.98	1.94
キノン量 (μmol/kg-dry soil)	0.01	1.33	0.02	0.95
多様性指標: DQ	3.80	7.71	3.96	6.10
MK/Q	0.17	0.68	0.63	0.40
優先種	Q-8	Q-8	M-7(H2)・PQ(1)	Q-8・PQ(1)

存在比の差も大きくなるため、非類似度の値も大きくなる。同表から、河口堰直上と糸貫川河口の底泥は、キノンプロファイルが似ていることを示している。これは、生活排水が流入して汚濁の激しい糸貫川などの支川の底泥が、洪水時に長良川へ流出して河口堰によって堆積されていることを示唆しているものと考えられる。また、河口堰直下と糸貫川河口は他に比べて非類似度が大きく、異なっている傾向を示している。

(2) 底質特性とキノン量：採取した底質の特性（粒度分布・含水率・強熱減量）とキノン量について一覧表に示せば、表-2のようである。同表には、微生物多様性指標（DQ：キノン分子種が多いほど大きな値）、ユビキノンとメナキノン（MK/Q）の比が併記されている²⁾。同表から、河口堰直上と糸貫川河口のキノン量は、他の2カ所に比べて2桁以上大きいこと、河口堰直上の微生物多様性指標はその上流・下流に比べて2倍程度大きいこと、堰下流では、堰上流側に比べてMK/Qの比が小さいことなどがわかる。これらの内、平均粒径、強熱減量および多様性指標とキノン量の関係を両対数表示して表せば図-2のようである。底質の平均粒径が小さくなり、有機物を含む割合が増加すると強熱減量は大きくなるので、微生物の多様性は増加しキノン量も大きくなることがわかる。

5. おわりに：以上、長良川における底泥中の微生物相をキノンプロファイル法を通じて明らかにし、底質環境との関連について述べた。河川底泥中の微生物相と底質の特性との相関が認められ、キノンプロファイル法が河川底泥中の微生物相変化の解析や新たな環境指標として利用できることが期待される。今後、分析数を追加して水質データを含めた検討を行う予定である。

【参考文献】

- 1) 平石 明：キノンプロファイル法による活性汚泥細菌の生態学的研究、用水と廃水、vol.32、pp.1059-1070、1990。
- 2) 近藤洋正：キノンプロファイル法による土壌微生物相変化の解析、横浜国大卒業論文、98p.、1994。