

長良川流域における各土地利用形態ごとの河川の微生物密度

岐阜大学大学院工学研究科

○原田 宣男

岐阜大学流域圏科学研究センター

正会員

李 富生

岐阜大学工学部社会基盤工学科

正会員

吉村 千洋

1. はじめに

近年，都市域での産業の集中や拡大を背景に，水質汚濁などの河川環境悪化が懸念され，河川環境保全の現状把握に役立つ情報が必要とされている．河川環境において微生物は生態系の複雑かつ微妙なバランスを維持するために重要な役割を担っている．そのため，河川水中及び河床堆積物中の微生物の種と量については，従来の培養法に最新の分子生物学手法を加えた時空間的分布の評価が重要である．

本研究では，岐阜県民の生活に密着している長良川水系を調査対象とし，流域内社会活動と微生物群集との関連性を評価することを目的とした．微生物の検出は，簡便であって細菌の検出率が比較的高い平板培養法により一般細菌と従属栄養細菌を測定し，生きている細菌（生菌）の密度を標す項目とした．平板培養法により検出できない，死菌や培養できない生菌については，リアルタイム定量 PCR 法を用いて死菌や培養できない生菌を含む細菌の全量として測定し，培養可能な生菌との割合に基づいて定量的に評価した．

2. 調査地点と分析項目

2.1 調査地点

調査地点は，長良川本川 3 地点，長良川支川 7 地点を調査対象とした．調査地点を図-1 に示す．河川水及び河床堆積物を，2007 年 6 月上旬から 11 月下旬までに 3～5 回採取した．

本報では支川 7 地点から下山¹⁾ が行った長良川流域の全窒素収支評価より，特徴的な人間社会活動形態を有する 4 支川を抽出し，栗巣川（St.1 森林），伊自良川（St.2 農業），糸貫川（St.3 工業），逆川（St.4 生活）とし細菌密度との関連性を検討した．各河川の全窒素流入負荷量に対する社会活動の寄与割合を表-1 に示す．

2.2 分析項目

(1) 一般細菌・従属栄養細菌

一般細菌・従属栄養細菌は，上水試験方法²⁾に従って測定し，培地に集落を形成する生菌数（CFU/mL）を計測した．

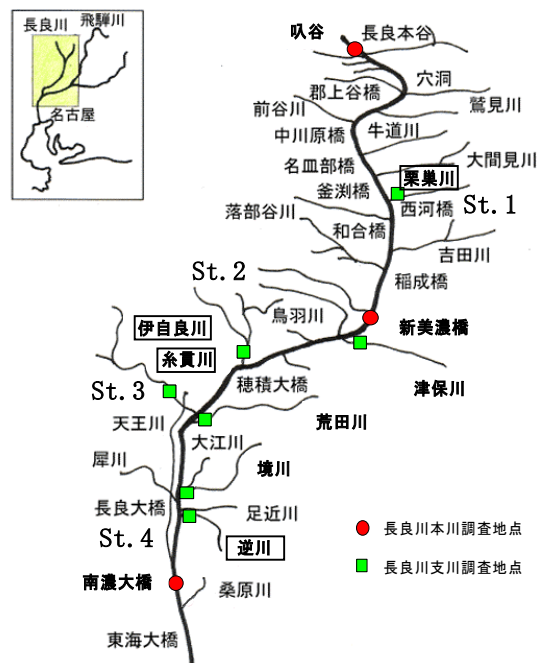


図-1 調査地点（長良川流域）

表-1 全窒素流入負荷量に対する土地利用寄与割合

	全窒素 負荷量(g/s)	負荷量に対する寄与割合 (%)				
		森林	農業系	工業系	生活系	畜産系
St.1	1.1	83.4	6.4	0.0	10.1	0.0
St.2	19.8	0.0	91.5	1.5	6.7	0.4
St.3	17.0	0.2	35.3	45.4	17.4	1.7
St.4	12.8	0.0	31.1	29.1	34.1	5.8

(2) 全細菌³⁾

リアルタイムPCR法に基づき，原核生物の系統分類に用いられる16S rDNAの濃度（16S rDNAを含む微生物の全DNA濃度）を，試料水の濃縮，DNAの抽出の過程を経て，PCR法と蛍光検出法により定量した．リアルタイム定量PCR法には，ユニバーサルプライマーを用い，検量線は大腸菌*Escherichia coli* 12F⁺(NBRC 13965)を用いて作成した．プライマーの塩基配列を表-2に示す．

PCR 反応装置は，ABI Prism 7000(Applied Biosystems 社)を用いた．実測の DNA 量を大腸菌 1cell 当たりの DNA 量で割り，大腸菌に相当する cell 数（全細菌細胞密度）を求めた．固相における細菌密度は，単位 sediment 重量当たりの存在量として，河川堆積物から剥離した懸濁液中の細菌濃度を sediment の濃度で割ったものとした．

表-2 プライマーの塩基配列

名称	塩基配列
com1	5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3'
com2	5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'

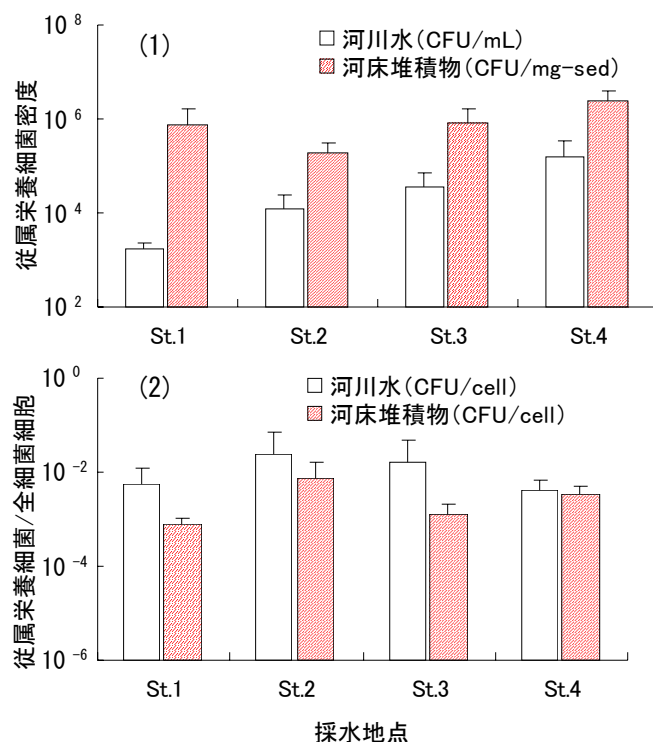
3. 結果と考察

一般細菌密度と従属栄養細菌密度には比較的高い相関が見られたため、本報では従属栄養細菌の結果を中心に述べる。土地利用形態ごとの水相・固相における従属栄養細菌密度結果を図-2(1)、全細菌細胞密度と全細菌細胞密度に対する従属栄養細菌密度の割合（培養可能な生菌密度の割合）結果を図-2(2)に示す。図中バーは標準偏差を示す。

水相の従属栄養細菌密度は、森林が最も小さく、次いで農業、工業、生活系の順に増加している。一方、固相では土地利用形態による差は小さい。これは固相では人間活動に関わる有機物質、汚濁物質等の流入による河川環境変化の影響が、水相ほど微生物密度に寄与しないことを示している。全細菌細胞密度に対する従属栄養細菌密度の割合は、河床堆積物中に比べ河川水中で高い。これは、河床堆積物中の全細菌細胞密度は死菌をおよび培養されない細菌が多く含まれていることを示している。河川水及び河床堆積物中の培養可能な生菌密度の割合は、社会活動による明確な差は見られない。

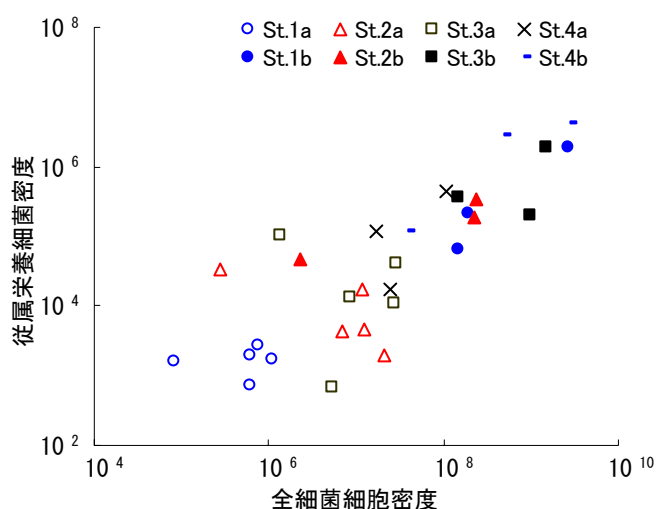
従属栄養細菌密度と全細菌細胞密度の関係を図-3に示す。傾きは調査地点により異なるが、河川水では、森林・生活系は全細菌密度の増加に伴い、従属栄養細菌密度は増加する右肩上がりの傾向が見られたのに対し、農業・工業系は全細菌細胞密度の増加に伴い、従属栄養細菌密度は減少する右肩下がりの傾向が見られた。河床堆積物では、土地利用形態に関係なく全て右肩上がりの傾きを示した。これらからも、河川水と河床堆積物中の微生物密度は異なる反応を示し、河川水中の微生物は人間活動による水質の変化の影響を受けやすいことが改めて示唆された。

今後、このような調査・研究を重ね、微生物の動態ならびに微生物と汚濁物質の関係を明らかにすることが必要である。またそれらの影響を統計解析により明らかにし、河川生態系における微生物の役割を明確にし、河川環境の整備及び保全につなぐ、河川管理のあり方について提言していくことも重要である。



各支川での細菌密度平均値及び標準偏差 (-)

図-2 土地利用形態による細菌密度の関係



a: 河川 従属栄養細菌密度 (CFU/mL) 全細菌密度 (cell/mL)
b: 河床 従属栄養細菌密度 (CFU/mg-sed) 全細菌密度 (cell/mg-sed)

図-3 従属栄養細菌密度と全細菌細胞密度の関係

参考文献

- 1) 下山耕輔：流域内全窒素収支の最適化による流域環境評価指針の提案，岐阜大学大学院修士論文，2001.
- 2) 日本水道協会：上水試験方法・解説，pp.605-658，2001.
- 3) Weili Zhou, Koji Kageyama, Fusheng Li and Akira Yuasa: Monitoring of microbiological water quality by real-time PCR, Environmental Technology, Vol.28(5), pp.545-553, 2007.