

近畿大学理工学部 学生員 ○近藤 章弘
 近畿大学理工学部 学生員 伊坪 宏治
 近畿大学理工学部 学生員 石川 将之
 近畿大学理工学部 正会員 麓 隆行
 近畿大学理工学部 正会員 松井 一彰

1. はじめに

河川の河床石の表面に形成されるバイオフィーム（微生物膜）は、有機物の吸着や分解を通じて河川の水質改善に寄与しているといわれている。人工的に護岸された場所が多い都市河川では、自然河川の河川床とは異なる微生物種によるバイオフィームが形成され、栄養塩吸着能力にも違いがある可能性が高いが、その実情はほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、都市河川におけるバイオフィームの性状と特性を明らかにすることを目的に、材質の異なる試験片を用いたバイオフィーム形成実験を実施し、形成された微生物群集構造と含有栄養塩量について検討した。

2. 実験方法

2-1 現場浸漬実験

モルタル、天然石である大理石、おが屑を原料とするポリウレタン（PU）樹脂にて表面をコートしたモルタル板の3種の試験片を準備し、表面に形成されるバイオフィームについて調べた。表面形状の違いによる影響を避けるため、試験片の表面はすべて平坦になるよう留意した。

現場浸漬実験は夏季（7月21日～8月4日）、秋季（10月20日～11月3日）、冬季（12月1日～12月16日）の日程で、それぞれ試験材料毎に4枚の試験片（10cm×5cm×1cm）を準備し、塩化ビニル製のユニットに装着後（図1）、川底からユニットまでの距離が1mになるように道頓堀川（大阪府大阪市浪速区幸町3丁目及び西区南堀江4丁目地）に設置した（図2）。各試験片はリン酸緩衝液（PBS）の入ったタッパーに入れ実験室に持ち帰り、歯ブラシで表面を擦りPBS溶液中にバイオフィームを回収した。



図1 ユニットの写真



図2 実験地地図

2-2 バイオフィームの測定項目

全細菌数…蛍光染色剤 SYBR Green I を用いて PBS 溶液中に懸濁したバイオフィームを染色し、落射蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) を用いて染色された細菌細胞数を計測した。

クロロフィル a 量…PBS に懸濁させたバイオフィームを GF/F フィルター上に回収し、DMF を用いて抽出したクロロフィル a 量を分光光度計 (UVmini-1240, SHIMADZU) にて求めた。

全リン・全窒素量…ペルオキシニ硫酸カリウム分解法により分解後、モリブデンブルー法 (全リン) と紫外線吸光度法 (全窒素) にて測定した¹⁾。

2-3 温度勾配電気泳動によるバイオフィームの細菌群集構造の解析

16S リボソーム DNA を指標として、付着性微生物（細菌）の群集構造解析を行った。ISOIL for Beads Beating (ニッポンジー) を用いてバイオフィーム中の全 DNA を抽出し、DNA 溶液に含まれる各菌の 16S リボソーム DNA を PCR 法によって増幅した。その後温度勾配電気泳動法を用いて増幅された DNA を分離し、画像解析装置 (LAS-4000, FUJIFILM) を用いて、得られた種数 (DNA バンド数)、種構成 (各バンドの泳動距離) 及び各種の量 (バンドの輝度) を定量化し、各試験片間でのバイオフィーム群集構造を多次元尺度法にて解析した²⁾。

3. 実験結果

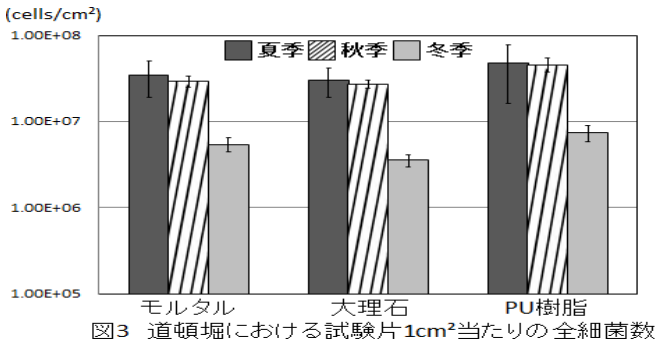


図3 道頓堀における試験片1cm²当たりの全細菌数

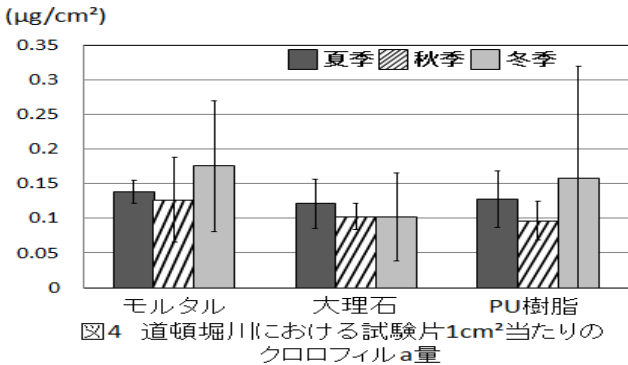


図4 道頓堀川における試験片1cm²当たりのクロロフィルa量

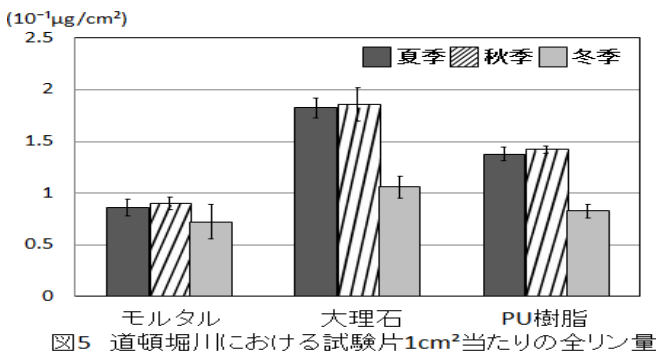


図5 道頓堀川における試験片1cm²当たりの全リン量

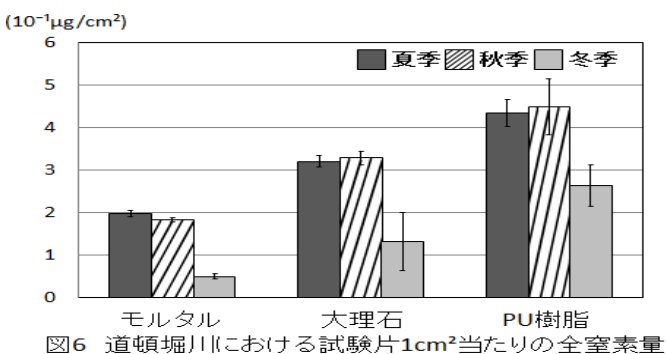


図6 道頓堀川における試験片1cm²当たりの全窒素量

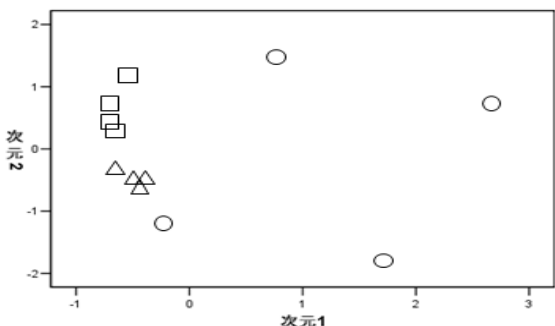


図7 夏季実験におけるバイオフィルムの細菌群集の類似度
○モルタル □大理石 △PU樹脂

4. 結果と考察

3 回の実験のいずれにおいても、試験片の材質の違いによる全細菌数およびクロロフィル a 量の差はみられなかった(図 3, 4)．一方でバイオフィルムに含まれる全リン量および全窒素量は、モルタル上のバイオフィルムでは低く、大理石および PU 樹脂上において高かった(図 5, 6)．これらの事から、特にモルタル板上に形成されるバイオフィルムを他の材料上のバイオフィルムと較べた場合、単位面積当たりの微生物数に変化はみられなくても、そこに含まれる全リン、全窒素量が 40%程度減少することが示唆された．その原因として、モルタル表面が他の材料に較べて強いアルカリ性を示すため、付着できる微生物種が偏り、リンや窒素の含有量が少ない微生物が付着したためだと考えられた．

このように、試験片の材質によって表面に形成されるバイオフィルム形成微生物の種類が異なることが予想された．そこで各試験片に付着した微生物群集について、16SrDNA を指標とした多次元尺度法による比較をおこなった(図 7)．

夏季の結果を例にとると、大理石や PU 樹脂の上に形成された微生物群集構造は 4 枚の試験片間で似通っていたのに対して、モルタル上に形成された微生物群集構造は、試験片間での違いが大きいことがわかる．秋季、冬季においてもモルタル上に形成される微生物群集は試験片間の差が大きく、モルタル板上には、材料としてまとまった微生物群集が形成されるわけではないことが示唆された．

これらの結果より、大理石や PU 樹脂でコートした場合に較べると、モルタルという材料と形成される微生物群集の関係は弱いことが考えられる．

今後の展望としては、群集構造が一定ではないにも関わらず、なぜ含有リン量や窒素量の少ない微生物群集がモルタル表面に形成される原因についての検討を進めていきたい．

参考文献

- 1) 奥修：吸光光度法ノウハウ ケイ酸・リン酸・硝酸塩の定量分析、技報堂出版、(2002)
- 2) 中村和憲 関口勇地：微生物相解析技術 目に見えない微生物を遺伝子で解析する 米田出版、(2009)