

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

1. はじめに

河川生態系において微生物は有機物の分解者として位置づけられており、河川の水質改善に寄与していると考えられている。河川における細菌の存在状態は、水中に浮遊した状態と河床等に付着した状態の大きく二通りに区分される。このうち現存量が多く、代謝活性が高いのは付着性の細菌(バイオフィルム)であることが知られてきており、河川の水質に与える影響も大きいと考えられている<sup>1)</sup>。しかし日本の多くの水域、特に人工的に改変された都市河川や港湾部におけるバイオフィルムの群集構造やその特性については、これまでほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、都市水域におけるバイオフィルムの性状と特性を明らかにすることを目的に、大阪の道頓堀川および尻無川河口において試験片を用いたバイオフィルム形成実験を実施し、形成されたバイオフィルムの性状を解析した。

2. 実験方法

2-1 現場浸漬実験

モルタルを打設し、試験片(10cm×5cm×1cm)を作製した。実験中に試験片がお互いに擦れないよう、塩化ビニル製のユニットに試験片を一地点につき4枚ずつ装着し、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)および尻無川河口付近(大阪府大阪市港区海岸通3丁目4番地)にそれぞれ設置した(図1)。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3回実施した。各試験片はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の入ったタッパーに入れて実験室に持ち帰り、歯ブラシで表面を擦り、PBS溶液中に

懸濁させたバイオフィルムを回収した。



図1 実験地地図(上図:道頓堀川, 下図:尻無川河口)

2-2 バイオフィルムの全細菌数、クロロフィル a 量、全リン量、全窒素量の測定

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ルムを染色し、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ルムを 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<sup>2)</sup>。

### 2-3 温度勾配電気泳動によるバイオフィーム構成細菌相の解析

全ての細菌が持っているが、種ごとに塩基配列が少しずつ異なる特徴を持つ16SリボソームDNAを指標として、付着性微生物の群集構造解析を行った。まず、回収したバイオフィームに含まれる全細菌DNAをISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン)により抽出し、全DNA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62.5℃から1時間に0.3℃ずつ67℃まで温度上昇が起こる条件下で15時間電気泳動を行い、泳動後に現れたDNAバンド数(種数)と、泳動距離及びバンドの濃度から得られる群集構造の特徴を、多次元尺度法によって比較した<sup>2)</sup>。

### 3. 実験結果

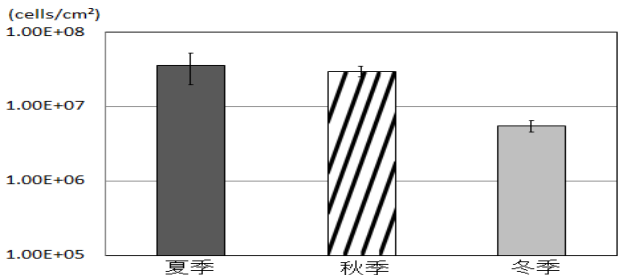


図2 道頓堀川におけるモルタル片1cm<sup>2</sup>当たりの細菌数

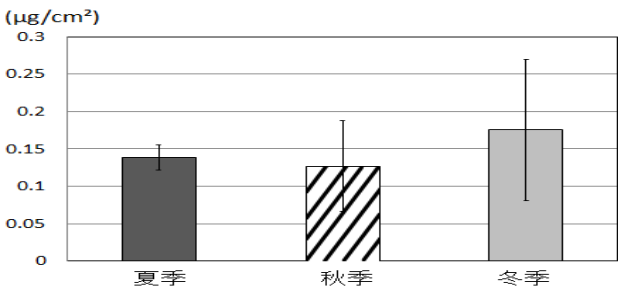


図3 道頓堀川におけるモルタル片1cm<sup>2</sup>当たりのクロロフィルa量

表1 実験地の水温(道頓堀川)

	7月21日	8月4日	10月20日	11月3日	12月1日	12月16日
水温(℃)	27.2	28.3	19.8	19.9	13.5	10.4

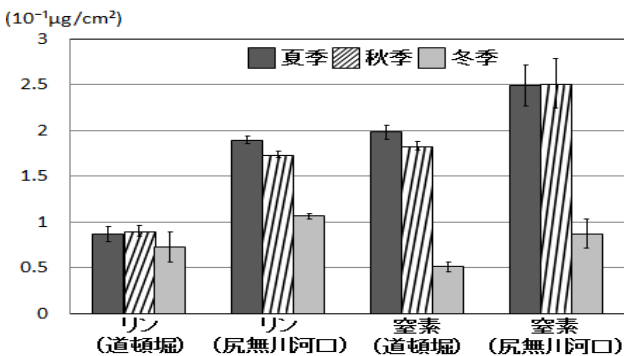


図4 道頓堀川,尻無川河口におけるモルタル片1cm<sup>2</sup>当たりの栄養塩量

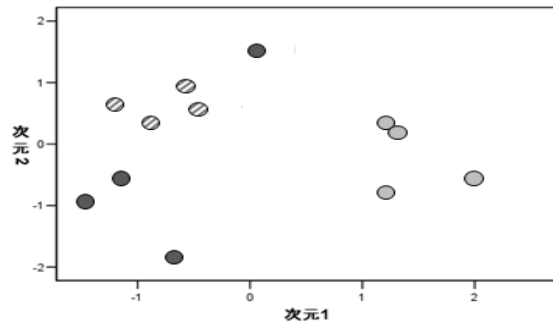


図5 モルタル片上に形成されたバイオフィームの細菌群集の類似度

■ 夏季 ▨ 秋季 □ 冬季

### 4. 結果と考察

図2, 3に道頓堀川における各季節ごとの全細菌数およびクロロフィルa量を示す。道頓堀川におけるクロロフィルa量に、季節間での大きな変化はなかったが、冬季の細菌数は夏季・秋季の10~20%程度であった。冬季の水温は10~13℃であり、生物量の少なさは水温の影響を受けている可能性が高い(表1)。一方尻無川河口においては、夏季のクロロフィルa量が最も高く、秋季では夏季の20%程度、冬季では1%以下と道頓堀川に較べて季節的な生物量の変化が大きかった。

バイオフィームに含まれる全窒素量については、どちらの場所においても冬季においてその量が少なくなる傾向がみられ、尻無川河口においては全リン量についても同様の傾向がみられた(図4)。

以上のことから、どちらの水域においても季節間でバイオフィームの生物相が大きく変化していることが考えられる。そこで16SrDNAを指標とした多次元尺度法による比較検証をおこなったところ、どちらの調査地点においても季節ごとにバイオフィームの細菌群集が変化していることが示唆された(図5)。

これらの結果より、バイオフィームの微生物群集構造は、季節毎に変化している可能性が考えられる。

### 参考文献

- 小林由紀：河川生態系の中の付着性細菌群集：河川連続体仮説の視点から、日本生態学会誌、第57巻、pp. 375-382、(2007)
- 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)
- 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)