

近畿大学理工学部 学生員 ○黒杭 恭介  
 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

自然河川では、河床石の表面に形成されるバイオフィームと呼ばれる微生物膜が、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<sup>1)2)</sup>。しかし都市部の河川や海岸の多くはセメントを材料とするコンクリートで人工的に護岸されている。打設したばかりのコンクリート表面は高いpHを示すため、自然河川とは異なる微生物種によるバイオフィームの形成や、栄養塩吸着能力の変化が生じている可能性があるが、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、建材としてのコンクリートがバイオフィームの性状と特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、都市河川（道頓堀川）と都市港湾（大阪港）にて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、バイオフィーム中の細菌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

コンクリートの代わりに粗骨材を含まないモルタルを用いて試験片（10cm×5cm×1cm）を作製し、実験に使用した。また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片と、セメント同様に石灰を主成分とする大理石片をそれぞれ準備し、比較対照として実験に用いた。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。

現場浸漬実験は年に6回、偶数月に道頓堀川(大阪市浪速区幸町3丁目)および大阪港(大阪市港区海岸通3丁目4番地)にて実施した。試験材料毎に4枚の試験片を準備し、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になるように現場設置し、2週間浸漬させた後に試験片を緩衝液の入ったタッパーに入れて実験室に持ち帰り、表面を歯ブラシで擦って緩衝液中にバイオフィ

ームを懸濁させて回収した。



図1. 試験片を装着したユニット

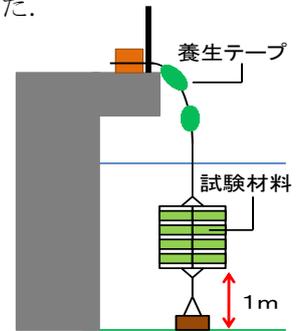


図2. 水中でのユニット浸漬の様子

2-2 バイオフィームの測定項目

- ・全細菌数：バイオフィーム懸濁液の一部を蛍光染料である SYBR Green I にて染色し、落射蛍光顕微鏡（BX51 システム顕微鏡, OLYMPUS）を用いて細菌細胞数を顕微鏡下で計数した。
- ・クロロフィル a 量：バイオフィーム懸濁液を GF/F フィルターでろ過し、フィルター上のクロロフィル a を DMF（ジメチルホルムアミド）中にて抽出後、分光光度計（UVmini-1240, SHIMADZU）にて吸光度を求め、SCOR/UNESCO 法の式により算出した。
- ・全リン量：ペルオキシニ硫酸カリウムによる分解処理後、モリブデンブルー法(全リン)にて測定。
- ・懸濁態炭素量と懸濁態窒素量：バイオフィーム懸濁液を GF/F フィルターでろ過して塩酸薫蒸処理を施し、乾燥させたフィルターを CHN コーダー (MT-6, ヤナコ分析工業) を用いて測定した。
- ・バイオフィーム構成細菌群集構造の解析：市販の DNA 抽出用キット (ISOIL for Beads Beating, ニッポンジーン) を用いてバイオフィームより DNA を破碎抽出後、抽出した DNA を鋳型に細菌の 16SrDNA を PCR 法にて増幅した。増幅した 16SrDNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGEE)にて区分し、バンドパターンとして現れた試験片毎のバイオフィーム構成細菌種と種数のパタ

ーンを非計量多次元尺度法を用いて視覚化し、バイオフィーム構成細菌群集の試験材料間での違いについて考察した。

### 3. 実験結果と考察

道頓堀川において実施した浸漬実験の結果の一部を以下に示す。

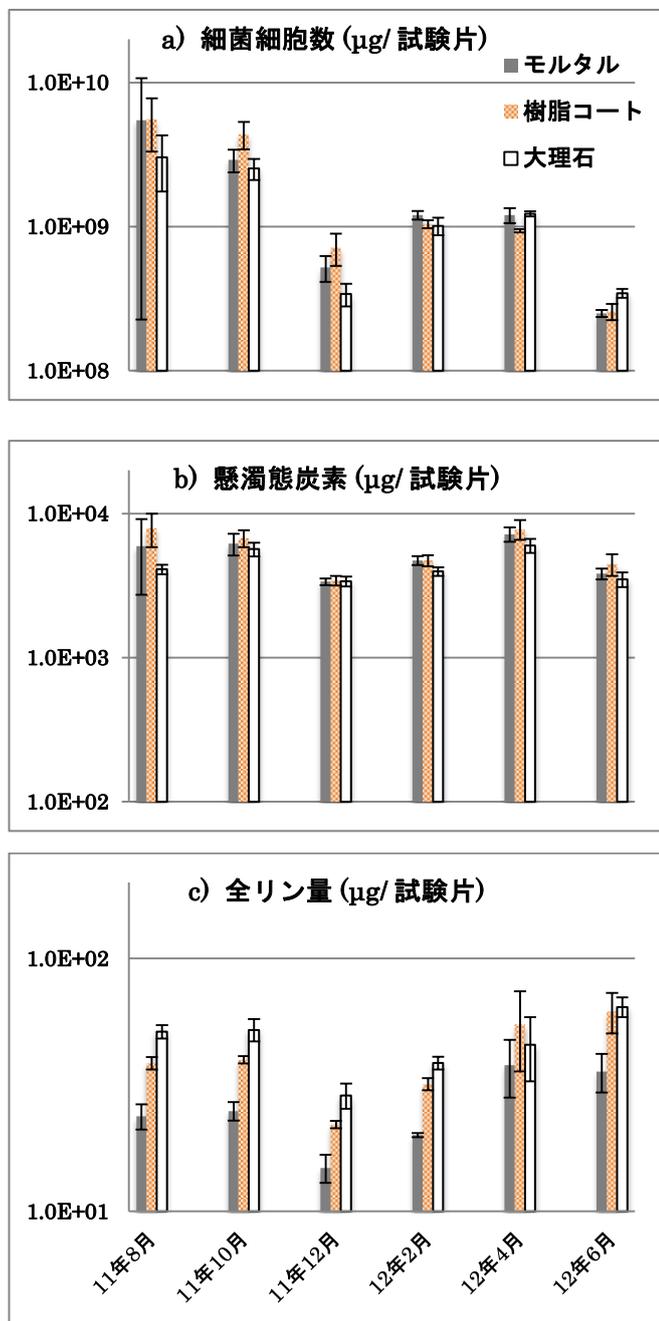


図 3. 道頓堀川における 2 週間の浸漬実験によって各試験片上に形成されたバイオフィーム中の a)細菌数, b)懸濁態炭素量, c)全リン量. 各グラフ中のバーは 4 枚の試験片の平均値に対する標準偏差をしめしている。

バイオフィーム中の細菌細胞数については、実験実施時期によって最大約 10 倍の差が見られた。しかし年 6 回のいずれの実験時期においても、試験片の

材質の違いによる細菌細胞数の違いはみられなかった (図 3-a)。形成されたバイオフィーム中に含まれる元素量についてみると、炭素量 (懸濁態炭素) (図 3-b) と窒素量 (懸濁態窒素) は、試験片の材質の違いによる含有量の違いがみられなかった。しかしリンの含有量についてみると、モルタルの表面上に形成されたバイオフィーム中に含まれる全リン量は、どの時期においても大理石や樹脂コート試験片上に形成されたバイオフィーム中のリン量よりも低い値になり (図 3-c)、統計的にも有意な差があることが確認された (ANOVA, Tukey's HSD,  $p=0.05$ )。そこで次にモルタル試験片上には特徴的な細菌群集が形成されている可能性を考えて、バイオフィーム中の細菌群集構造を DGGE 法にて解析したところ、モルタル片上の細菌群集構造が他の試験片上と大きく異なっている時期があることがわかった (図 4)。

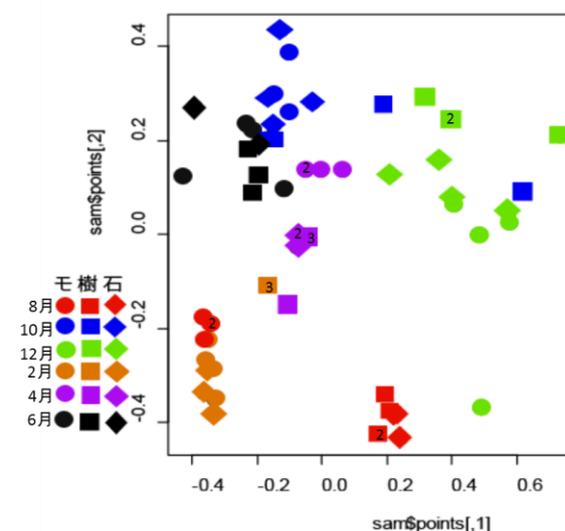


図 4. 非計量多次元尺度法による、各試験片上に形成されたバイオフィーム細菌群集構造の相対的な差異。

このことより、モルタルの上には他の材質とは異なる細菌種によってバイオフィームが形成され、バイオフィーム中に含まれるリン量に変化が生じている可能性が考えられる。今後、実験系での確認実験や、関係する細菌種の特特定を進め、現場実験より示唆された可能性を確認していく必要がある。

### 参考文献

- 1) 小林由紀 (2007) 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 57: 375-382.
- 2) 日本微生物生態学会 バイオフィーム研究部会編著 (2005) バイオフィーム入門