

多摩川上流域における 付着層形成過程の解析

1998年

森川和子

東京農工大学農学部助教授

目 次

1. はじめに	1
2. 材料と方法	1
2-1 調査地点	1
2-2 人工基層の選定	1
2-3 試料の採取方法	2
2-4 試料の分散方法	2
2-5 調査項目	2
3. 結果と考察	
3-1-1 基層の違いによる現存量の相違	5
3-1-2 ザラザラにした塩ビ板を用いた 人工基層における付着層の変動	6
3-2 人工基層浸漬時期の違いによる着層形成過程の相違	9
3-3 付着層形成過程初期の顕微鏡観察	17
まとめ	23
引用文献	24

1. はじめに

河川には、河川水を漂流していく細菌群集と、河床付着層をなす微生物群集を形成している細菌群集が生息している。多摩川においてこれらの細菌群集を計数、同定する過程で、河床付着層の細菌群集の変動は、河川水の性質や河床を構成する藻類の消長など、河川が固有に持っている要因によって変動が規定されていることが明らかにされた。しかし、河川水を漂流していく細菌群集の変動は、測定したいずれの環境要因の変動とも関連を持たずに変動していた^(5, 6, 8, 9)。これらの事実は、河床付着層こそが河川固有の細菌群集の生息場所である事を示唆している。河川水を漂流している細菌は、河床付着層から剥がれたものや、系外から流入してきたもので、いずれ海へ流れていく。

本研究では河床付着層に生息している細菌群集の動態について、さらに詳細な検討を加えるため、特に付着層形成の初期過程に関しての細菌群集の挙動を明らかにしようとした。河床では、付着層が形成されてからの同調性が崩れているので、人工基層を用いて経時的に検討することに主眼をおいた。

2. 材料と方法

2-1 調査地点

多摩川源流域付近までの踏査の結果、小河内ダムより上流は人為的な河川改修も少なく、河床では河川固有の付着層形成が行われている様子がみられた。特に丹波村の山吹橋付近は、河床構造と付着層を形成する藻類の状況がこの研究に適していると思われた。しかし、大学からの距離を考えると度重なる調査には困難を伴うことから、主な調査は多摩川の上流域と中流域の境界になっている羽村において行った。多摩川の水は羽村堰から農業用水として玉川上水に取水されるため、本川の流量は減少し、河川上流域に似た河川水の流れが見られる。そして、堰において常時毎秒2 m³の水が放流されるよう制限されているので、河川水の量は一定しており、河床に設置する人工基層の上面における水深が安定しているという利点がある。

主な調査は1996年5月16日から6月5日と、1997年2月12日から4月1日、および1997年10月2日から11月11日に行った。また、顕微鏡観察のため1997年12月14日から1998年1月26日に調査を行った。

2-2 人工基層の選定

1996年の調査では、人工基層として表面にサンダーをかけてザラザラにした塩ビ

板を用いた。さらに基層の違いを明らかにするために、塩ビ板表面をそのままにしたものと、アクリル板（ポリエチレンテレフタレート）および変性アクリル（アクリル変性衝撃塩ビ板）を用いた。

1997年の調査では、できる限り現場の岩石に近いもので、なおかつ一定面積を決めやすいという観点から、建築資材である素焼きタイル板を用いた（図-1）。

1998年1月の調査では、特に顕微鏡観察を目的としたため、スライドガラスをそのまま用いて行った。

付着板の表面までの水深は、1996年と1997年の調査では20～30cm、1998年の調査は10～15cmであった。

2-3 試料の採取方法

塩ビ板等やタイル板については、前報⁽⁵⁾に従って5×5cm²のビニールシートをもちいて歯ブラシにより回りの付着層を取り除いた後、試料を新たな歯ブラシでポリビンに回収する方法を用いた。回収に際しては、河川水を使わず、滅菌水道水を用いた。

スライドガラスから試料を採取するに当たっては、まずスライドガラスの表面を滅菌水道水ですすいだ後、新しいカバーガラス（26×50mm²）を滅菌水道水ですすぎ、スライドガラス上に乗せ、カバーガラスの回りをキムワイプで剥がした。その後、表面を滅菌水道水で軽くすすいで、微生物膜をカバーガラスで削ぎ落として滅菌ポリビンに回収した⁽¹⁰⁾。

2-4 試料の分散方法

いずれの付着層試料も現場水温で保持して研究室に持ち帰り、超音波処理（大竹製作所5202-T、20kc、50Wで100mlにつき60秒）後、次の処理を施した。

2-5 調査項目

いずれの試料に関しても以下の分析を行った。

- 現存量：付着乾量、強熱減量、クロロフィル量
- 生菌数：1996年の調査は、1/16PYG平板を用いて、他は1/8PYG平板を用いて、20℃で28日から30日培養後、生じたコロニーを計数して得た。
- アクリジンオレンジ染色性粒子数(AODC):Hobbie等の方法⁽³⁾に従った。
- 顕微鏡観察の方法：微生物膜にある非付着性の物質を取り除くため、微生物膜が発達したスライドガラスを1mMリン酸緩衝液1mlで軽くすすいだ。表



人工基層に用いたタイル

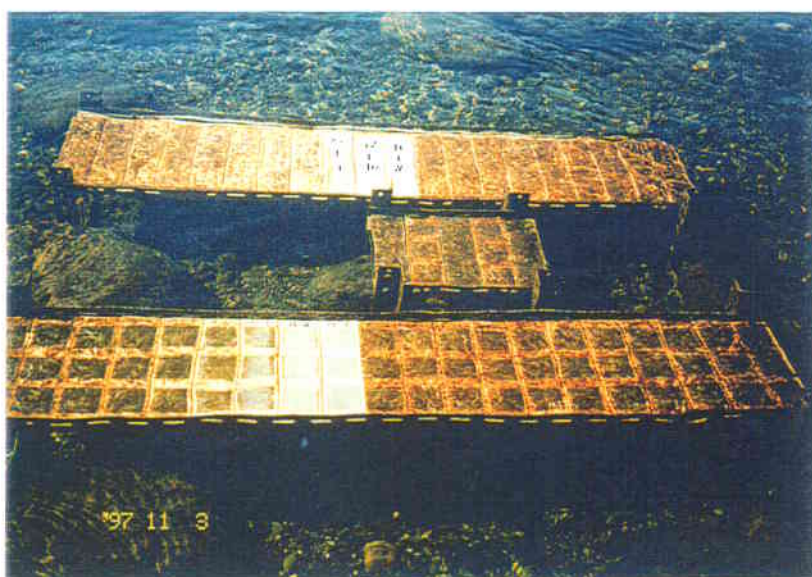


図-1 人工基層

面のリン酸緩衝液をろ紙に吸わせた後、シャーレに置いて0.1%アクリジンオレンジをスライドグラス上に滴下した。これを再び洗浄して、無限遠焦点落射型蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX-60）を用いて観察後、顕微鏡撮影を行った。

- 水質分析：現場で水温、pH、ECを測定し、DO、DOC、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 、TPは実験室へ戻って測定した⁽⁵⁾。

3. 結果と考察

3-1-1 基層の違いによる現存量の相違（1996年5月-6月の実験）

表-1に異なる基層から得られた付着乾量について示した。用いた人工基層のうち、最も付着層の乾燥重量の多かったのは、表面をザラザラにサンダーをかけた塩ビ板で、この値を100とすると、変性アクリル板59.7、アクリル板47.6、塩ビ板17.9となり、強熱減量・クロロフィル量についてもこの割合と順序はほぼ同じであった。これに対して、平板法で得られた生菌数は、ザラザラにした塩ビ板を100とすると、次に多いのがアクリル板で70.6、変性アクリル板64.7、塩ビ板31.2と、細菌数は付着量とは一定の関係を持っていなかった。この実験のみで断定はできないが、細菌の付着の仕方および増殖の仕方が、重量として付着層の多くをしめる藻類とは異なることを示している。つまり、材質として細菌が付きやすいのはアクリル板であるが、相崎等⁽¹⁾が述べたように、表面の形状としてはザラザラして引っかかりがあるものの方がよいといえる。

表-1 羽村における異なる人工基層を用いた1cm²あたりの現存量の比較

	乾燥重量 (mg)	強熱減量 (mg)	クロロフィル量 (μg)	生菌数 (CFU)
ザラザラ塩ビ板	37.66	13.05	62.13	1.7×10^7
変性アクリル板	22.48	7.05	35.58	1.1×10^7
アクリル板	17.93	6.47	29.76	1.2×10^7
塩ビ板	6.75	2.36	13.01	5.3×10^6

3-1-2 ザラザラにした塩ビ板を用いた人工基層における付着層の変動

(堀 麻衣子⁽⁴⁾)

羽村において、表面をザラザラにした人工基層を鉄製のアングルに固定して浸漬後、生じた付着層を経時的に採取して、乾燥重量と強熱減量、クロロフィル量、好気性従属栄養細菌数、AODCを測定した。それぞれの結果を図-2から図-4示した。

乾燥重量と強熱減量は類似した変動を示し、両者の間には有意の高い相関が見られた。これらの値で示された付着乾量は、15日目に大きく減少し、付着層が剥離したことが示されたが、その後付着層は再び増加した。強熱減量で得られた付着層の増殖速度は、5/23から5/27の期間に $2.56 \text{ lg loss g/m}^2/\text{day}$ で、5/31から6/3に $1.81 \text{ lg loss g/m}^2/\text{day}$ であった。これをもとに比増殖速度を計算したところ、5/31から6/3には0.481と、5/23から5/27に得られた0.398より大きく、剥離後の付着層の増殖速度が、大きいことが明らかとなった。

クロロフィル量の変動も乾燥重量と同様な変動を示した。しかし、クロロフィル量より求めた比増殖速度は、剥離前の方が0.625と剥離後の0.532より大きく、付着層の剥離前後で藻類の活性が変化していることがうかがわれた。

一般に、クロロフィル量をクロロフィル*a*とフェオフィチン*a*に分けて測定した時のC/C+Pの値は藻類の活性を示しているといわれる。剥離後の藻類の活性の減少は図-3のこの値からも明らかである。

好気性従属栄養細菌数の変動は、 1 cm^2 あたり 10^3 から 10^7 と大きく変動した。そして付着層の剥離時には87.7%が剥離した。この細菌数の減少割合はクロロフィル量の減少割合83.6%とほぼ同じであった。なお、AODCの減少割合は90.9%であった。この傾向は海沢で塩ビ板を人工基層として用いて得られた結果⁽⁷⁾と異なっている。海沢ではクロロフィル量として剥離した割合が80.8%であったが、生菌数としてえた細菌数の剥離した割合は33.3%、AODCでは56.8%であり、藻類が選択的に剥離していた。この差は海沢では約 2 m/sec 、羽村では約 0.3 m/sec という流速の違いにより、付着層のつき方が異なることによるのであろう。

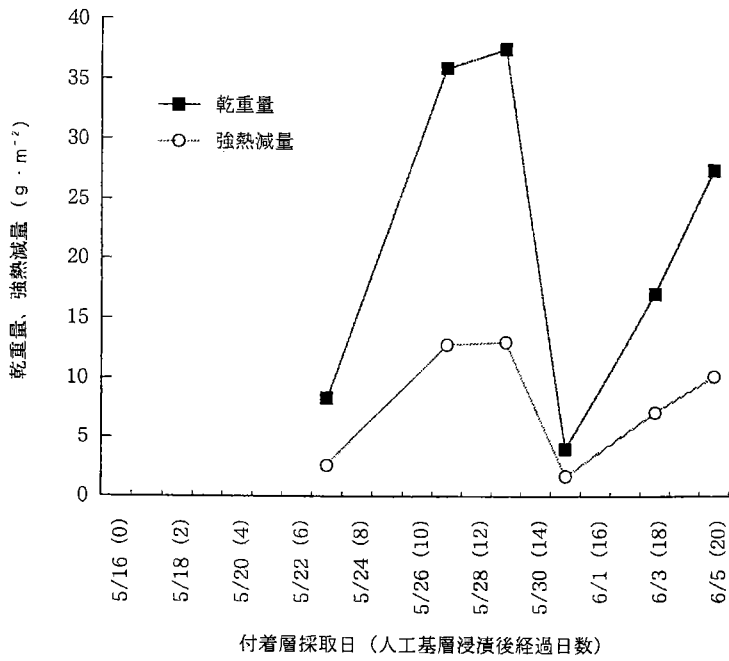


図-2 人工基層付着層の乾重量、強熱減量の変化

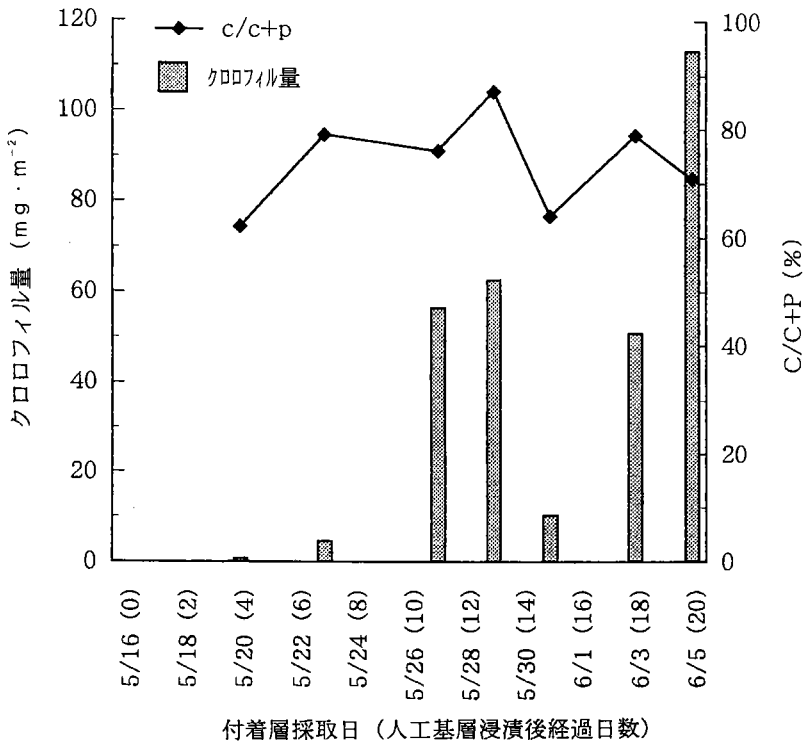


図-3 人工基層付着層のクロロフィル量とc/c+p

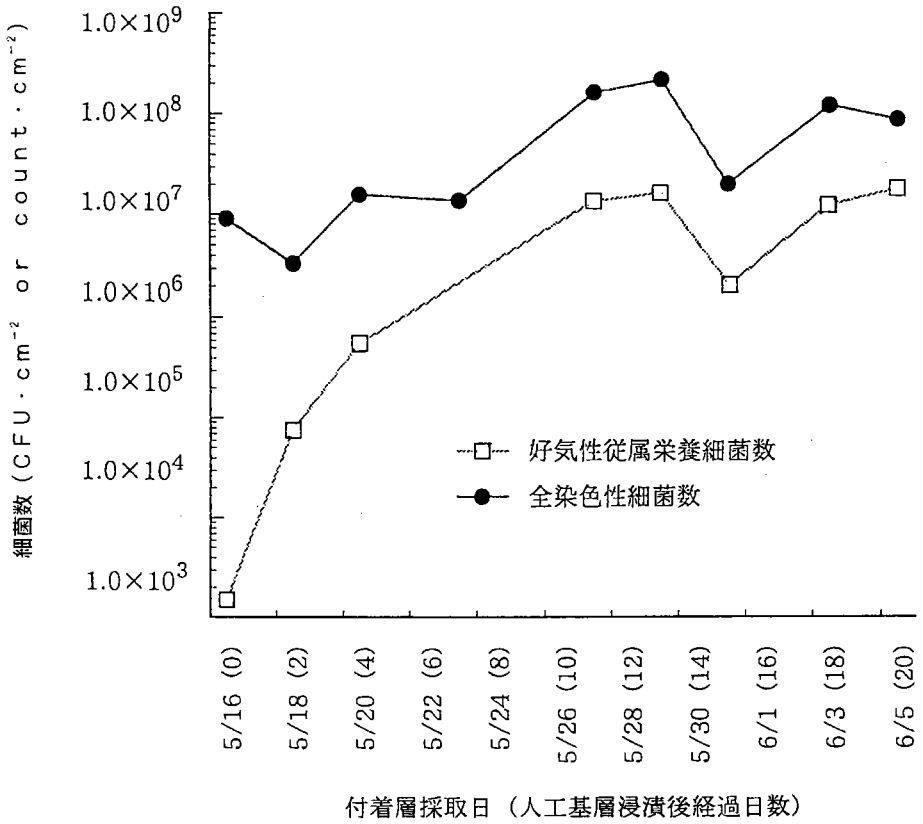


図-4 人工基層付着層の細菌数の変化

3-2 人工基層浸漬時期の違いによる付着層形成過程の相違

(徳永真知子⁽¹⁾)

羽村において、塩ビ板を人工基層として用いて浸漬する実験を行ったが、人工基層の性質をより河床の岩石に近づけるため、素焼きタイルを用いて浸漬実験を行った。浸漬は春期と秋期の2回行い、付着層形成の要因を検討した。これらの結果を図-5から図-16に示した。図には藻類の増殖との関連を明らかにするためデータを取ったタイル板の下面のデータも書いてあるが、ここではふれない。同一地点で同一素材の基層を用いて、春と秋の2回実験を行ったが、上面から得られた両者の間には付着量の大きな違いがあり、特にクロロフィル量にはその違いが顕著であった。

人工基層の上面に形成された付着層の乾燥重量(図-5、6)・強熱減量(図-7、8)・クロロフィル量(図-9、10)をみると、春期には時間をかけてゆっくと増加し、最大値に達するまで40日を要したが、秋期には急激に増加し24日目に最大に達し、春期の約半分の日数であった。また、そのときの最大量は、春期にはそれぞれ $26.51 \pm 5.84 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $5.73 \pm 0.93 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $25.8 \pm 6.9 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ であったが、秋期には $27.93 \pm 2.27 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $12.24 \pm 0.68 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $111.1 \pm 6.0 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ と、乾燥重量は双方で大きな差がなかったにもかかわらず、強熱減量の秋期の値は春期の約2.1倍、クロロフィル量では実に4.3倍と大きくなった。それに伴い、最大値に達した後の付着層の剝離量は、春期も秋期も最大量の約半分の量が剝がれたが、秋期は最大量そのものが大きかったので、剝離後に残っている量は春期の最大値より大きかった。

このように乾燥重量が変化しないにも関わらず、クロロフィル量や強熱減量が大きく異なったことから、藻類量の変化があったことが考えられる。この藻類量に変化を与えた環境要因としては、水質は春期と秋期で大きく異なることはなかったので、日照条件と水温という物理的条件が考えられる。そこで浸漬日から最大値を得るまでの日射量を、府中市にある東京農工大学のファイトトロンの日射量をもとに積算してみた。その値は春期には484.5MJとなり、秋期には283.1MJと春期の方が秋期より1.7倍で高くなっていた。これに対して現場水温をみると、春期には5.5°Cから13.2°Cの間で変動し、秋期には11.5°Cから19.1°Cで変動したので、秋期の水温が浸漬期間を通じて高かった。そのため今回の実験では水温が付着層の藻類量に大きく影響したと考えられた。このような付着層の倍加時間と水温の関係は多摩川丸子橋において相崎も報告している⁽²⁾。多摩川海沢で森川が得た結果では、

年間を通じて付着層の最大量は一定であったのとは異なり一致しないが、それは海沢の水温が極めて低かったことによるのかもしれない。

図-11から図-16には、同時に得られた細菌数について示した。染色法で得られたAODCの値は、春期が秋期の1.1倍、平板法で得られたCFUの値は1.4倍で大きな差は認められなかったが、立ち上がりの勾配は秋期の方がはるかに大きかった。その結果、細菌数からみた付着層の剥離は、春期が16日目と32日目にみられたのに対して、秋期は12日目と24日目に剥離がみられ細菌の活性は秋期の方が高かったといえる。

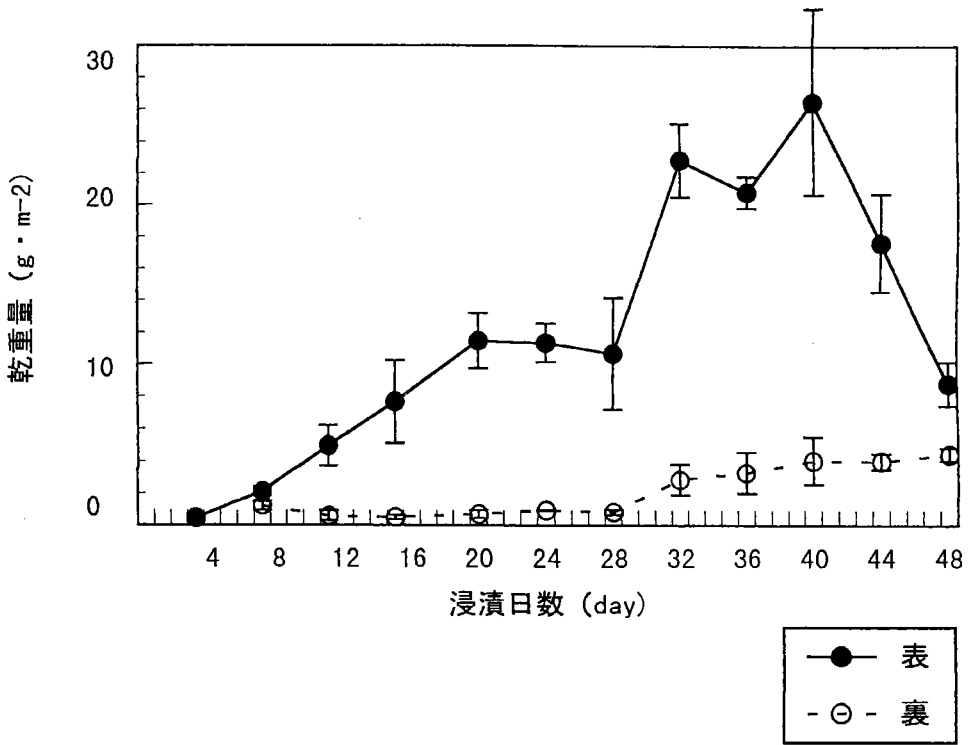


図-5 人工基層付着層の形成過程・乾重量 (春)

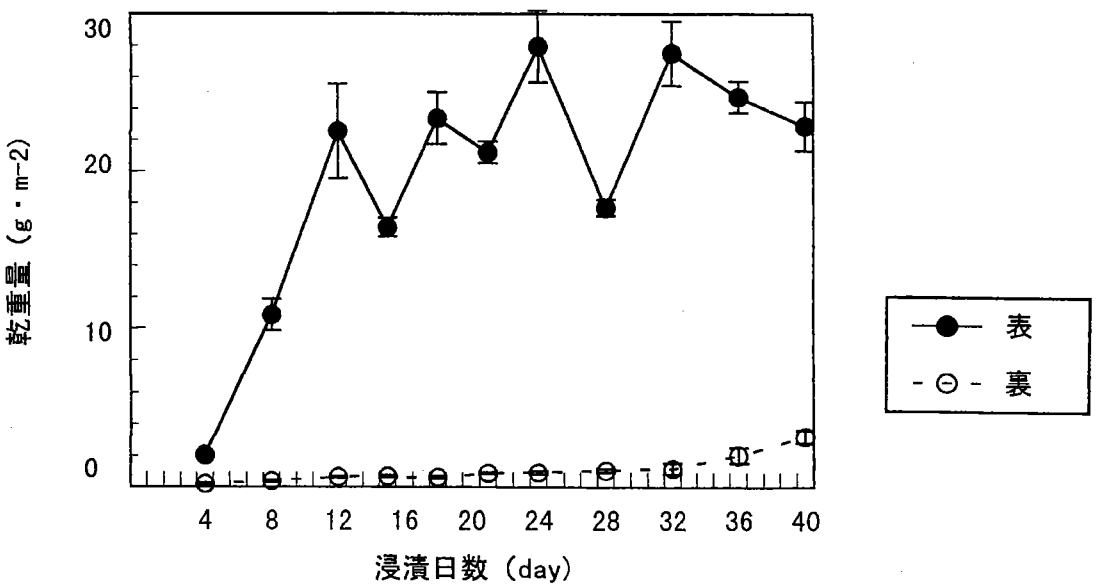


図-6 人工基層付着層の形成過程・乾重量 (秋)

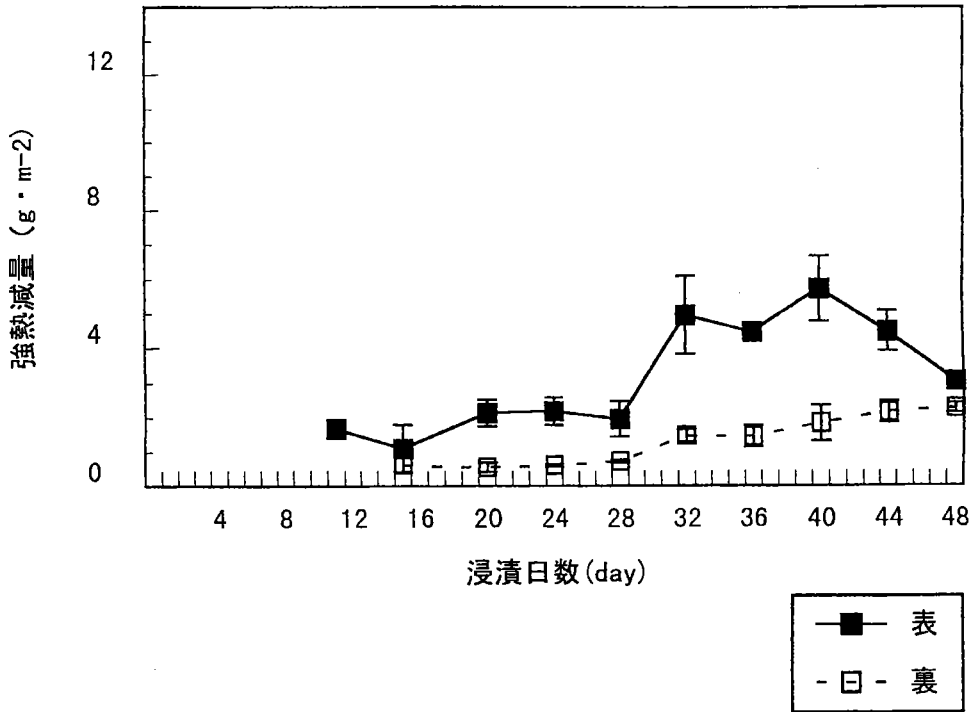


図-7 人工基層付着層の形成過程・強熱減量 (春)

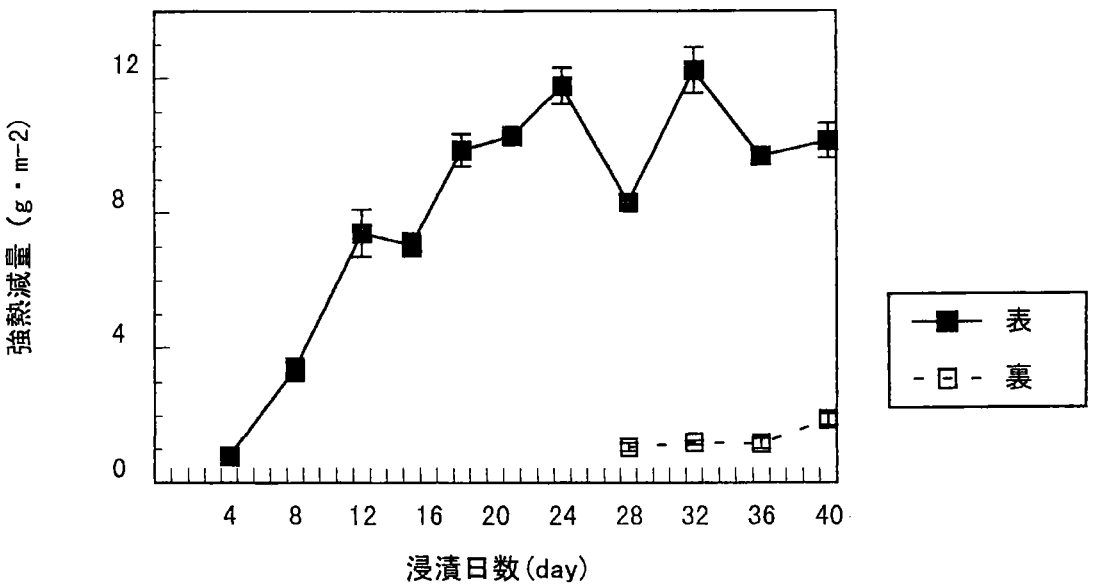


図-8 人工基層付着層の形成過程・強熱減量 (秋)

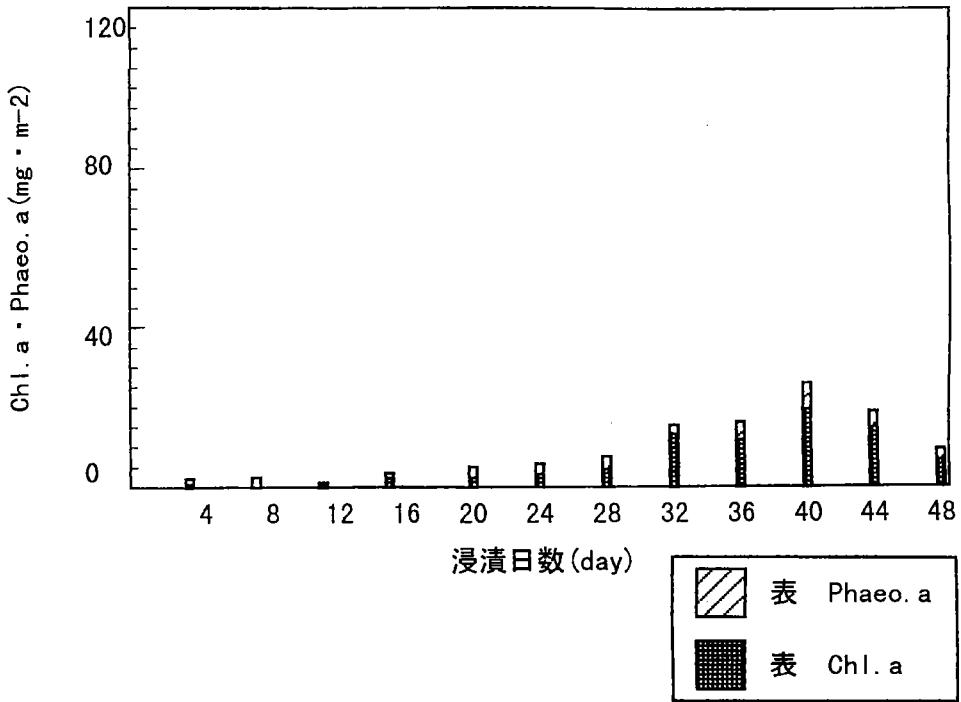


図-9 表の人工基層付着層の形成過程・クロロフィル量 (春)

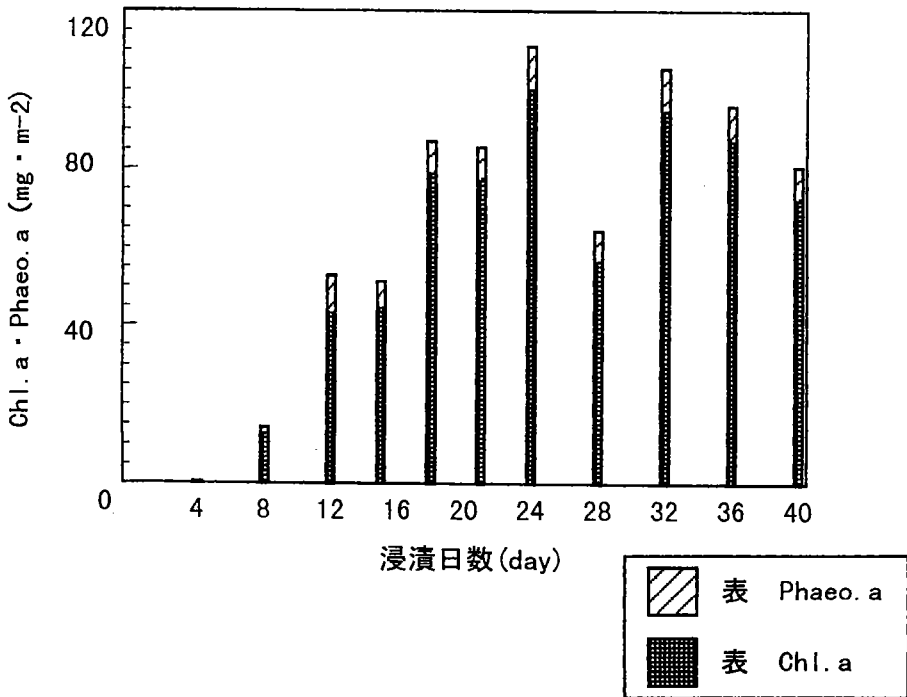


図-10 表の人工基層付着層の形成過程・クロロフィル量 (秋)

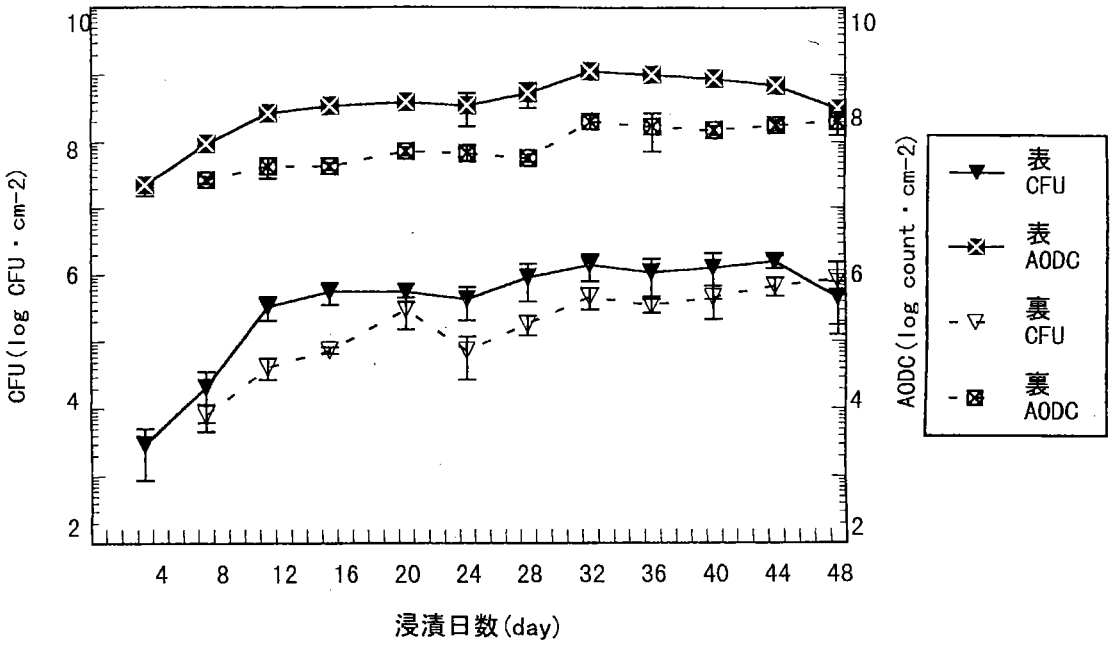


図-11 人工基層付着層の形成過程・細菌数 (春)

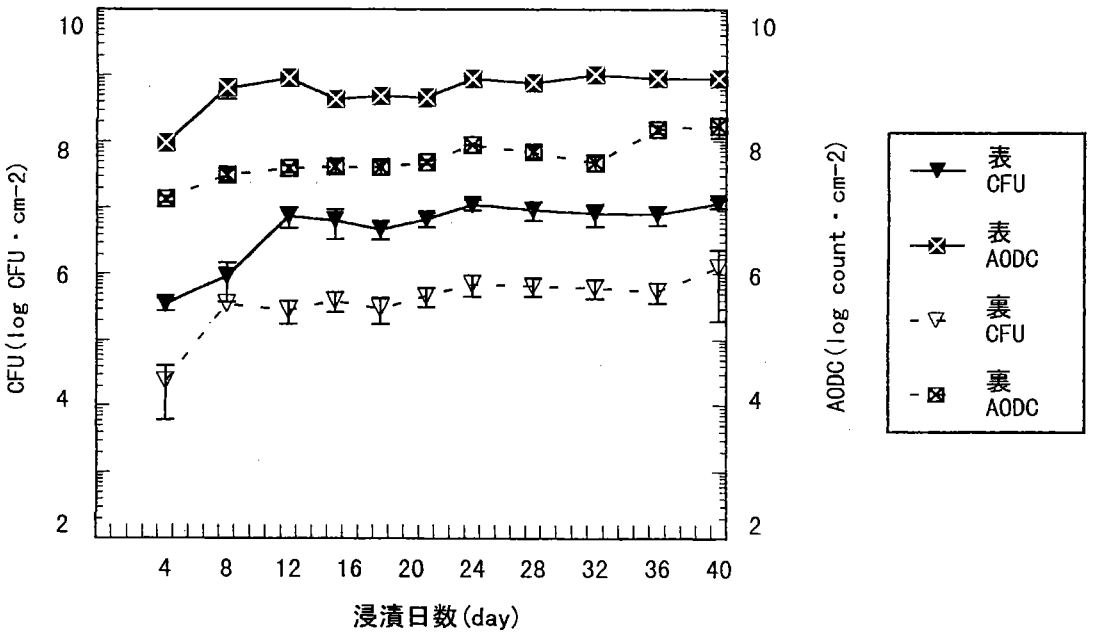


図-12 人工基層付着層の形成過程・細菌数 (秋)

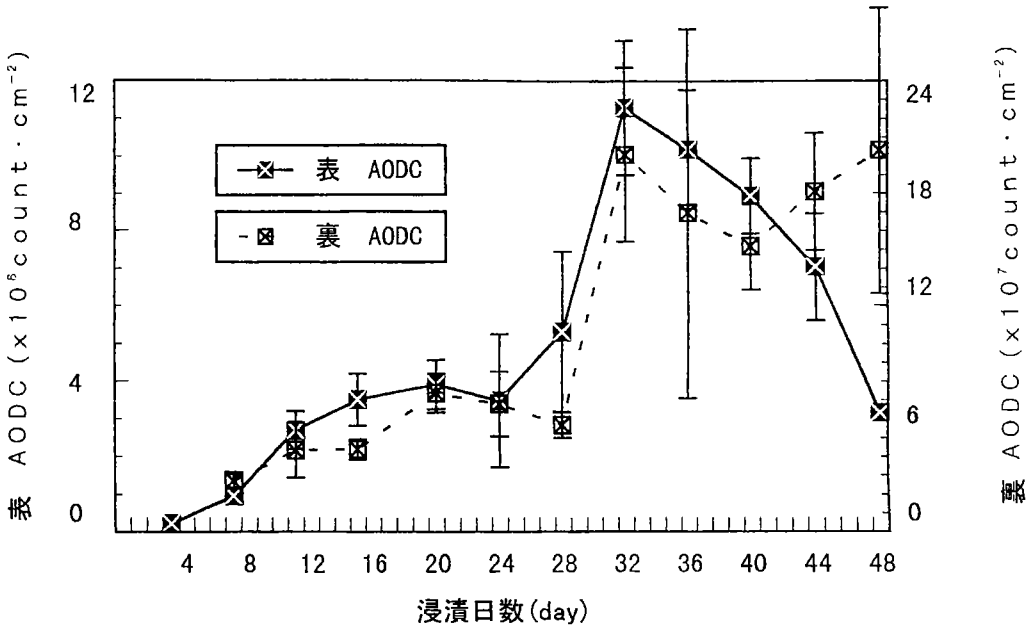


図-13 人工基層付着層の形成過程・AODC (春)

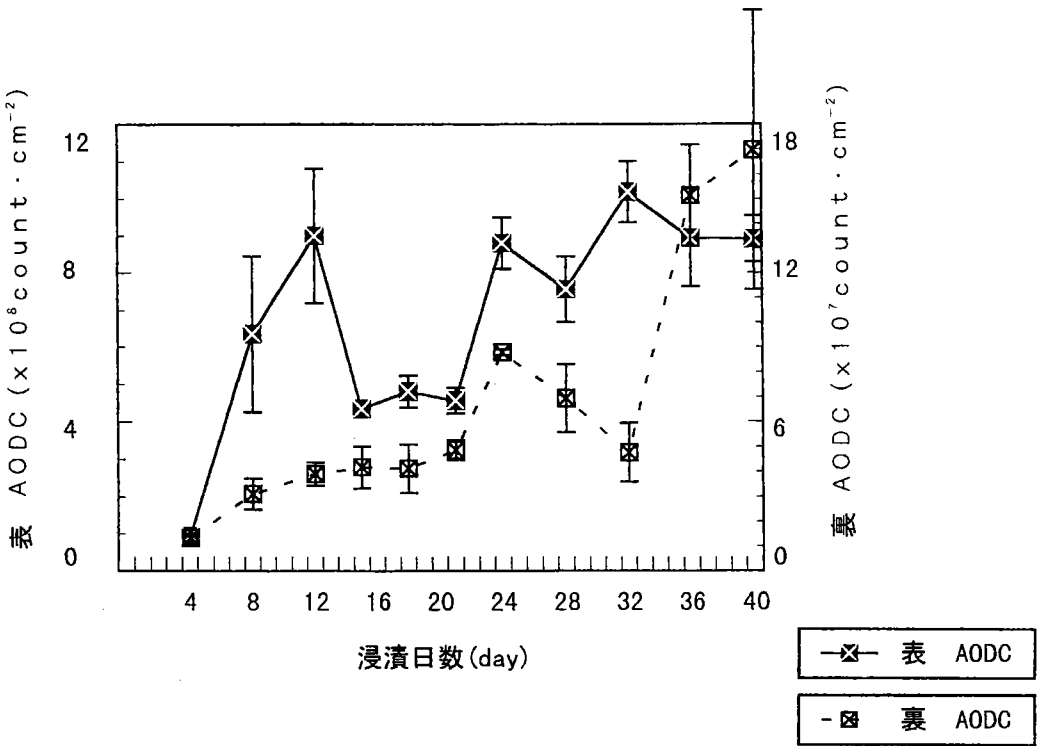


図-14 人工基層付着層の形成過程・AODC (秋)

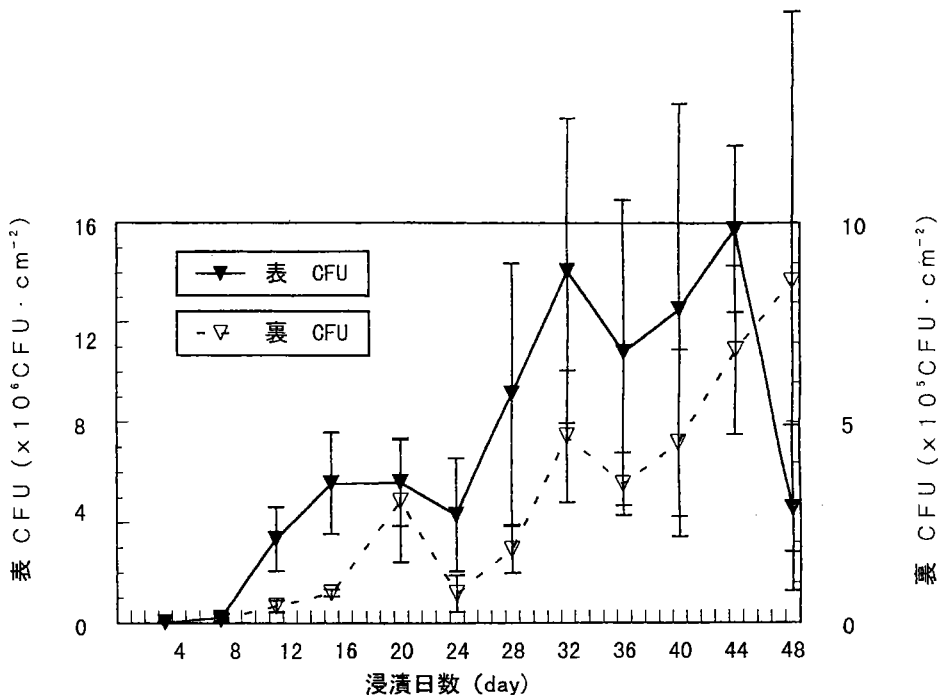


図-15 人工基層付着層の形成過程・CFU (春)

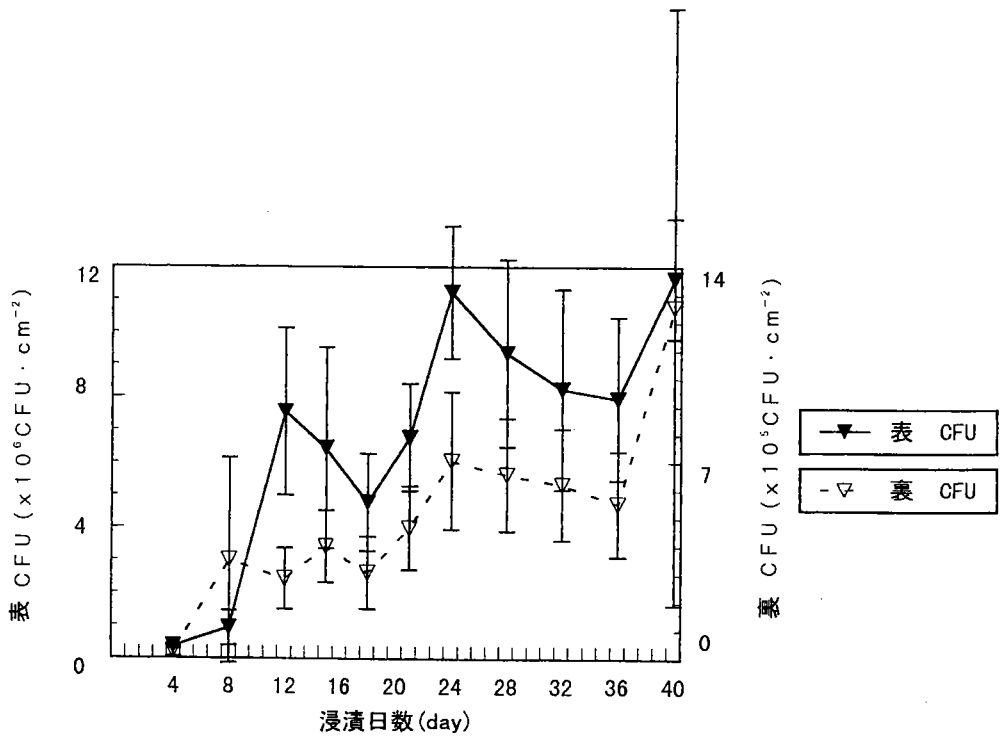


図-16 人工基層付着層の形成過程・CFU (秋)

3-3 付着層形成過程初期の顕微鏡観察

(渋谷俊治⁽¹⁰⁾)

スライドガラス上に形成された付着層は、実験期間を通じて剥離することがなかった。今回の浸漬実験は、冬至の時期に重なっており、日照量・水温ともに年間で最低の時期にあたり、1年で最も付着量の増加速度が遅い時期であったこと、冬季は特に多摩川の流量変動が少なく、付着層の剥離の引き金がなかったことが原因となっている。

このスライドガラスを経時的に観察した結果を写真1-4に示した。スライドガラス浸漬後1時間で付着している細菌が観察され、さらに4日目にはその数が増加した(写真-1)。そして8日目にはコロニーを形成し始めた細菌がかたまっている状態がみられ(写真-2)、12日目には垂直方向に増殖が見られた(写真-3)。さらに21日目には糸状細菌や藻類が増殖をはじめ、特に付着層形成初期の細菌のつき方を明らかにするための同一視野を用いた顕微鏡観察は不可能になった(写真-4)。

顕微鏡の1視野に存在する微生物の形態をすべて記載し、一定基準でわけた分類に基づいて数、占有面積、頻度について集計した。顕微鏡内の視野は20×20のメッシュに区切られており、1メッシュの大きさは $4.7 \times 4.7 \mu\text{m}^2$ となっている。形態により珪藻を中心にした微細藻類(A)、単独細胞の細菌(B)、糸状細菌(F)、それら以外の有機堆積物質(D)として細胞数の計数を行った。これを図-17、18に示した。

さらに各メッシュにそれらの存在があるかないかにより、占有エリアを求めた。特に細菌については1メッシュ内の細胞数を計数し、

- 頻度1：1メッシュに1細胞
- 頻度2：1メッシュに2細胞
- 頻度3：1メッシュに3細胞
- 頻度4：1メッシュに4細胞
- 頻度5：1メッシュに5細胞以上

とランク分けを行った。この時の細菌の頻度と占有エリアを表わしたのが図-19である。細菌の頻度分布をみると、各頻度の最大値が頻度1から頻度5に向けて時間経過とともに移動している様子が認められる。これは付着初期の細菌は、スライドガラス表面にランダムに付着していたと考えられるため、頻度1や頻度2が多かったが、次第に細菌が付着面で分裂を始めてコロニーを形成するため、時間が経つと

頻度3から頻度5が多くなっていったことを物語っている。写真の様に直接染色を試みた結果でも、細菌がコロニーを作った後に、珪藻や糸状のらん藻群落が積み重なって立体化していったことが明らかである。

この実験では、河床における付着層形成初期において、相崎等が示した^(1,2)、細菌が付着の足場を作り、そこに藻類が付着して、さらに立体的な付着層を形成していく様子を、具体的な数値と写真で明らかにしたものである。今回何度か試みてうまくできなかったことであるが、今後この付着層を縦に切ることによって、付着膜の立体構造を明らかにすることができるであろう。

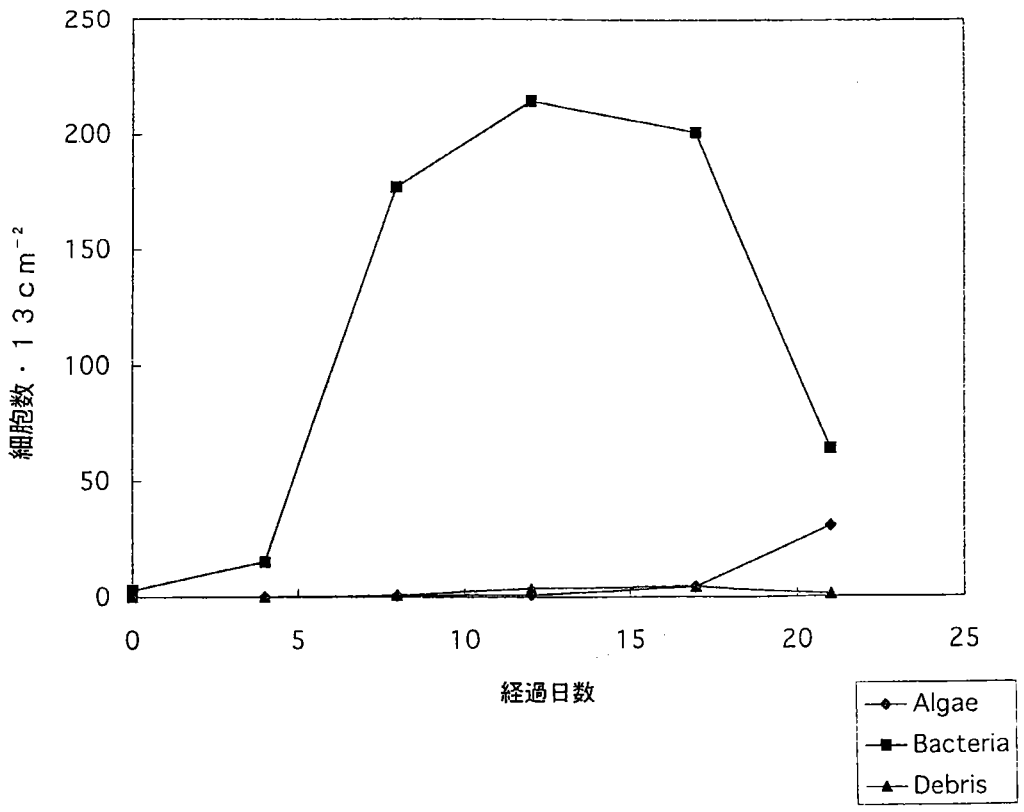


図-17 スライドグラス上で見られる微生物数の経時的変化

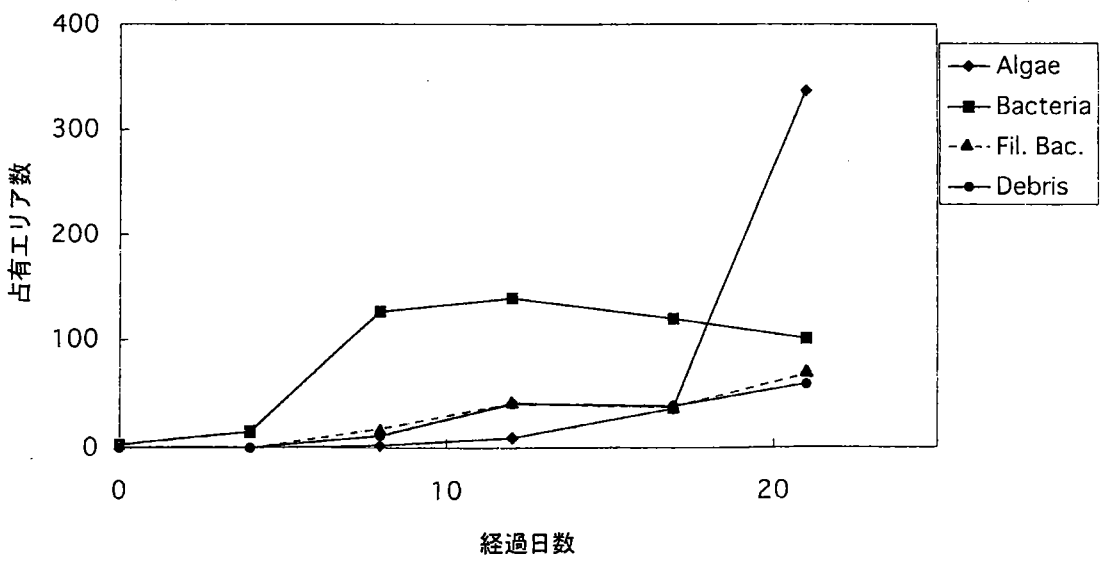


図-18 スライドグラス上で見られる微生物の占有エリア数の経時的変化

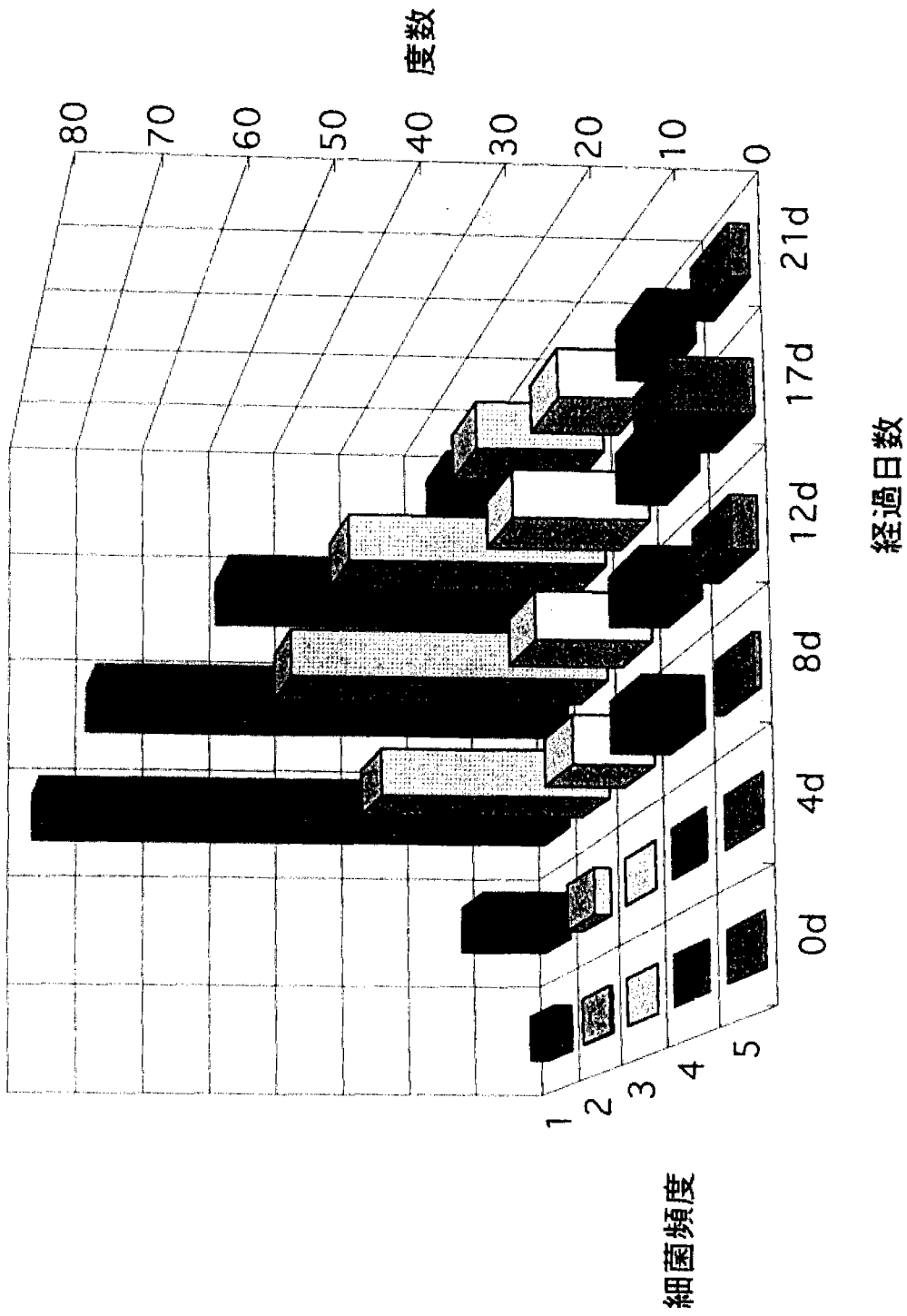


図-19 スライドグラス上で見られる細菌頻度の経時的変化

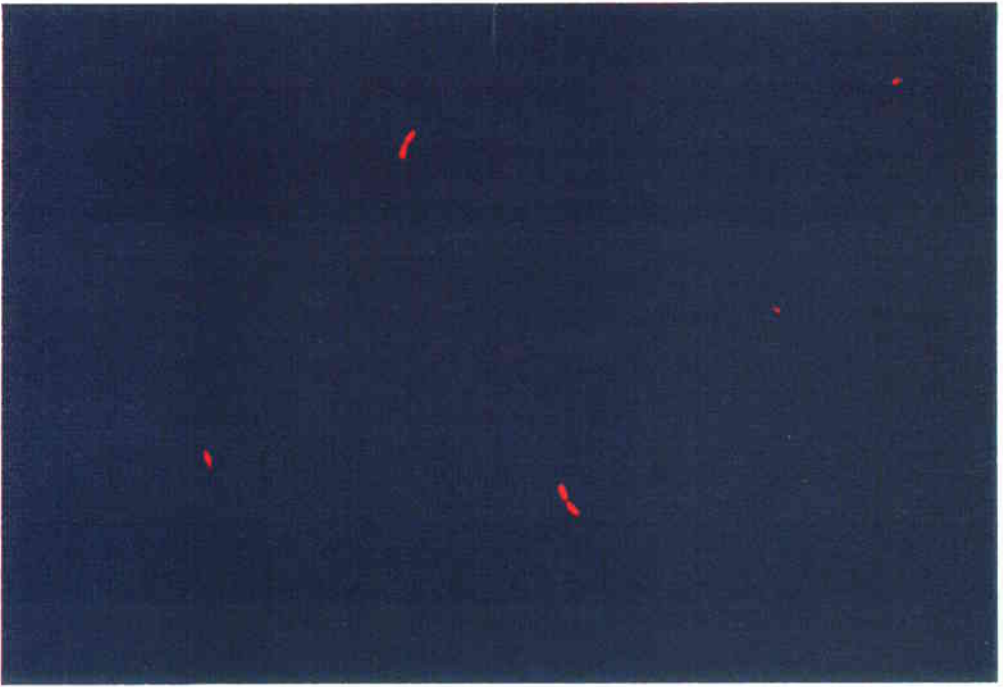


写真-1 スライドガラス浸漬後4日目の顕微鏡写真

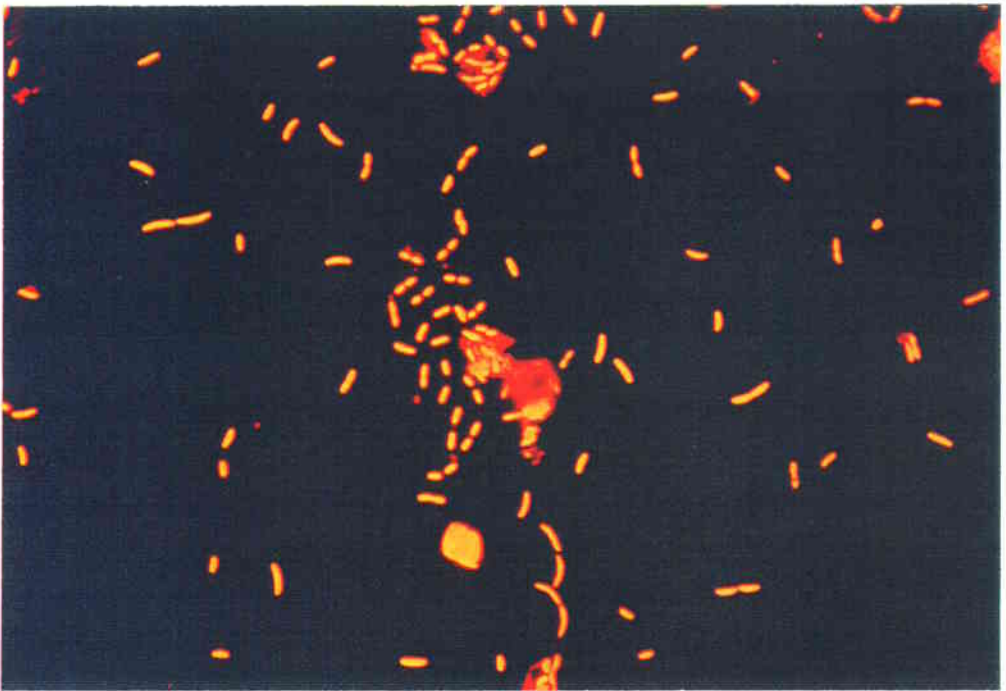


写真-2 スライドガラス浸漬後8日目の顕微鏡写真

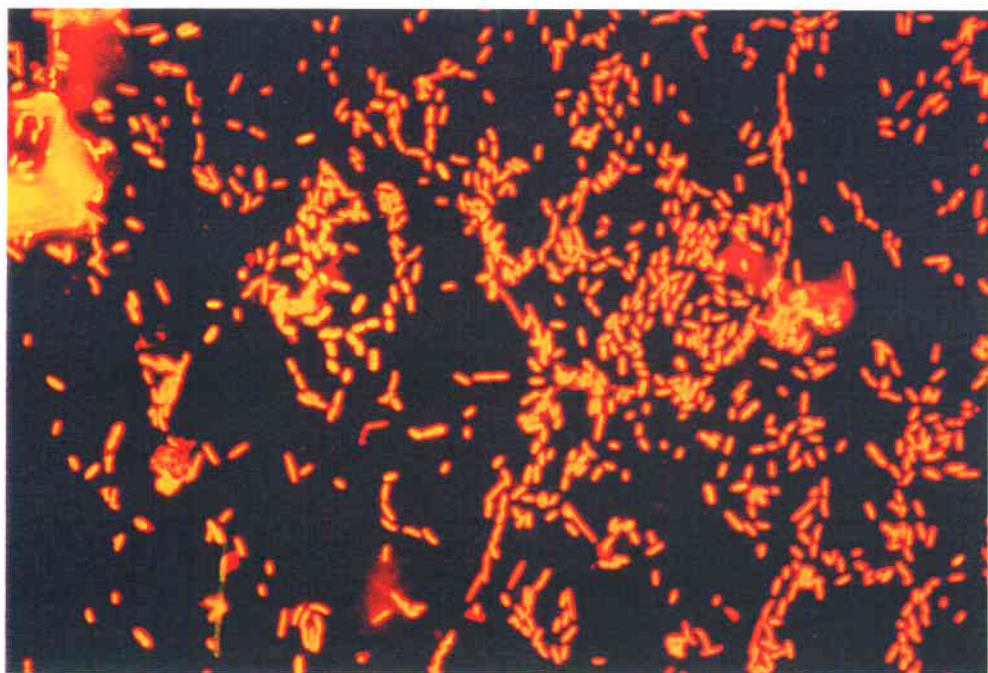


写真-3 スライドグラス浸漬後12日目の顕微鏡写真

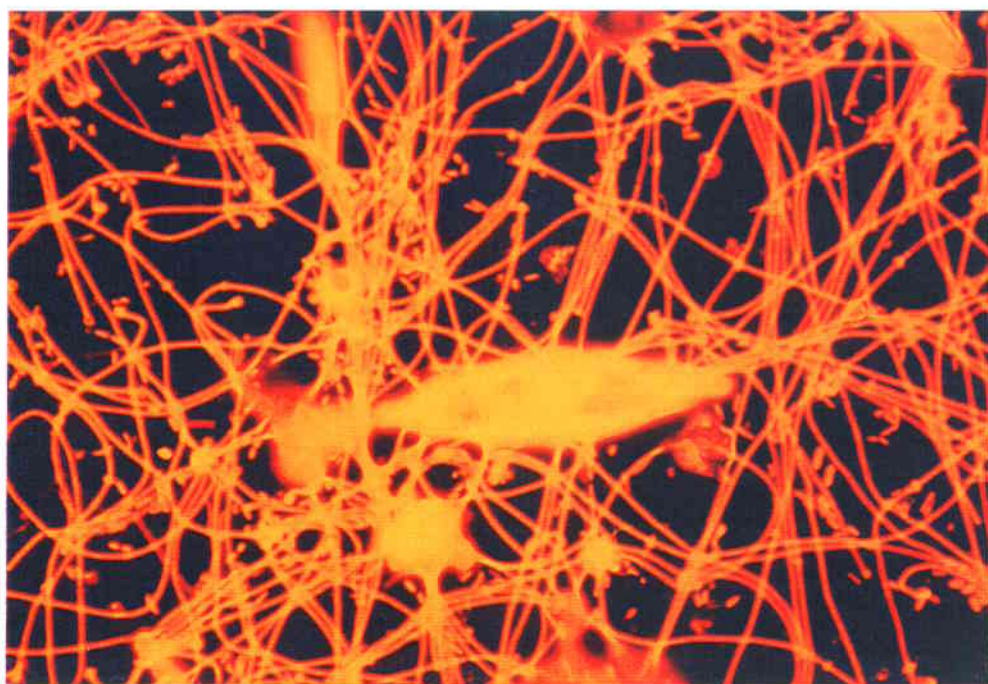


写真-4 スライドグラス浸漬後21日目の顕微鏡写真

まとめ

河床の石面付着層が形成される過程に関して、人工基層を用いて浸漬実験を行った。新たな基層を沈めることによって、特に付着層が形成される初期過程や剥離過程の様子が明らかにされる。その結果、人工基層に何を用いるかにより、付着層形成の速度や付着層量の最大値が異なることが明らかにされた。また、水温により藻類量が大きく影響を受けることも明らかにされた。従って、現在量を目的とするこの種の実験では、できる限り現場の石に類似したものをを用いることが重要である。また、付着層形成初期には、細菌がまず付着面に付着して、その場で増殖し基底層を作ると、藻類が入り込む様子を顕微鏡で観察することができた。

引用文献

- 1) 相崎守弘・手塚康彦：汚濁河川における付着性微生物
—— 付着生物層形成過程の解析及び季節変化、陸水富栄養化の
基礎的研究、2, 4-7(1973).
- 2) 相崎守弘：富栄養河川における付着微生物群集の発達にともなう現存量および
光合成量の変化、陸水学雑誌、41、225-234(1980).
- 3) Hobbie, J. E., R. J. Daley, and S. Jasper: Use of nucleopore filters for
counting bacteria by fluorescence microscopy, *Appl. Environ.
Microbiol.*, 33, 1225-1228(1977).
- 4) 堀 麻衣子：河床の付着層の藻類と細菌の種類構成 —— 特に水質および遷移
段階との関係について —— 、東京農工大学 農学部 環境・資源
科学科 1996年度卒業論文
- 5) 森川和子：多摩川上流域における好気性従属栄養細菌数の季節変動とその環
境要因との関係について、陸水学雑誌、45、69-78 (1984).
- 6) Morikawa, K.: Characteristics of Generic Composition of Aerobic
Heterotrophic Bacteria in Periphyton at an Oligotrophic
Region in the Tamagawa River. *Jpn. J. Limnol.*,
48, 1, 55-65 (1987).
- 7) Morikawa, K.: Differences in Plating Efficiency of Bacteria from
River Epilithon Sampled from Upper and Lower Surfaces of
Artificial Substrata, *Microb. Ecol.*, 15, 217-228(1988).
- 8) 森川和子：多摩川中流域における細菌数の季節変動とその環境要因との関係
について、陸水学雑誌、54、317-327(1993).
- 9) Morikawa, K.: Differences in the Characteristics of the Bacterial
Community in the Epilithon and River Water as Demonstrated
by Plate Counts using Different Temperatures and Staining
Methods, *Jpn. J. Limnol.*, 55, 193-199(1994).
- 10) 澁谷俊治：河川に浸せきした人工基層に形成された微生物膜の構造変化、東京
農工大学 農学研究科 応用生物科学専攻 1997年度修士論文
- 11) 徳永真知子：河床付着層形成過程の量的変動に関する研究 —— 多摩川にお
ける人工基層浸漬実験 —— 、東京農工大学 農学部 環境・資源科
科学科 1997年度卒業論文

「た ま がわじょうりゅういき多摩川上流域ふ、ちやくそうけいせい かていにおける付着層形成過程かいせきの解析」

(学術研究VOL. 27、研究助成・A類 No. 196)

著 者 もり かわ かづ こ 森 川 和 子
発行日 1999年3月31日
発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団
〒150-0002 渋谷区渋谷1-16-14
(渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03)3400-9142
FAX (03)3400-9141
