

5. 河川水中の細菌フローラと 水質に関する研究

- I. 採水地点
- II. 水生生物による水質の判定
- III. 生菌数、全菌数からの河川環境評価
- IV. 細菌数の季節変動
- V. 画像解析による細菌群集の解析
- VI. 河川水中のアニリン分解菌の分布

大阪大学薬学部教授 近藤 雅臣
大阪大学薬学部助手 那須 正夫

工業化、都市化、また開発とともに河川の汚染が問題となっている。このような環境問題に対しては、環境の変化を早期に見出し、的確な対応をとることが重要である。そのためには、種々の環境指標が役立つが、なかでも細菌は生物ピラミッドの基幹部分を構成し、世代交代が迅速であるため、環境変化にすみやかに対応する。また、細菌は河川浄化に重要な役割をはたし、そのフローラの変化は、昆虫、小動物、魚類などの上位の生態系に対しても大きな影響を与える。

そこで、本調査・研究では、当教室が従来より取り組んできた水系の細菌フローラの解析、また河川水中の細菌による化学物質の分解性を指標とする環境評価手段を用い、河川環境を客観的に評価するとともに、将来の変化をとらえるためのバックグラウンドデータを集積した。

I. 採水地点

大阪府北部を流れる猪名川および箕面川、大阪市内の淀川、寝屋川、道頓堀川、神崎川に定点を設定した（図1、表1）。滝上、瀬川、桑津は、第1種定点とし、定期的に試料を採取した。その他の定点は、第2種定点とし、必要に応じて採水を行った。

試料には、各地点の表層水を用いた。採水時には、pH、気温、水温、溶存酸素濃度を測定した。

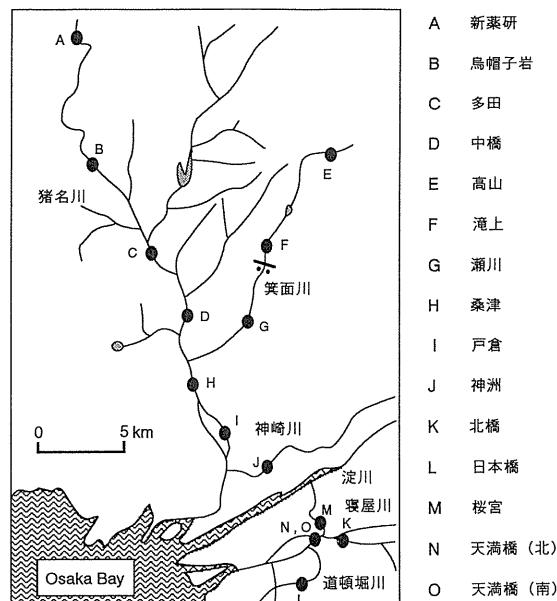


図1 採水地点

表1 採水地点とその環境

種別	採水地点名	位置と環境
第1種	滝上（箕面川）	箕面国定公園内にあり、箕面の滝の上流。
	瀬川（箕面川）	箕面川の中流にあり、周囲は住宅街。
	桑津（猪名川）	大阪空港の西側にあり、箕面川が猪名川に合流後の下流に位置する。付近には工場が点在する。
第2種	高山（箕面川）	箕面治水ダムの上流に位置し、付近には民家や農地がある。
	新薬研（猪名川）	猪名川の最上流。川幅は非常に狭く、周囲の山は植林。
	鳥帽子岩（猪名川）	周囲は、農業地域。
	中橋（猪名川）	周囲は、住宅地。
	多田（猪名川）	周囲は、住宅地。
	戸倉（猪名川）	やや上流には汚水処理場がある。
	桜宮（淀川）	比較的汚染の少ない新淀川からの水が流れ込んでいる。
	北橋（寝屋川）	大阪ビジネスパーク内。汚染はかなり進んでいる。
	天満橋（淀川）	淀川と寝屋川の合流地点。北側と南側では、それぞれ上流の河川の影響を受けている。
	日本橋（道頓堀川）	大阪市内の繁華街に位置する。

II. 水生生物による水質の判定

高山、滝上、瀬川、桑津の水質を、そこに生息する水生生物から判定した。水生生物の採取は、1990年4月21日に行った。

同定、分類した水生生物は表2に、水生生物による水質判定の結果は表3に示した。総合判定では、高山と滝上は貧腐水性 ($\text{OS: oligosaprobic zone}$)と判定された。瀬川の水質は β 中腐水性から α 中腐水性 ($\beta \text{mS} \sim \alpha \text{mS}$: β mesosaprobic zone から α mesosaprobic zone)、桑津は α 中腐水性から強腐水性 ($\alpha \text{mS} \sim \text{PS}$: α mesosaprobic zone から polysaprobic zone)であった。

高山と滝上は同じ貧腐水性水域に分類されたが、汚濁指数は高山では1.11、滝上では1.08、生物指数、多様性指数は高山ではそれぞれ45、3.07、滝上ではそれぞれ54、3.68であり、上流に位置する高山の方が滝上よりやや汚れていることがわかった。これは、滝上が国定公園内にあり、汚染をできるだけ防ぐ努力がなされているのに対し、高山付近には田畠があり、ごみの不法投棄も一部では行われているからと考えられた。

表2 生物学的試験成績

採取生物		高山	滝上	瀬川	桑津
蜉蝣目					
<u>Ephemera orientalis</u>	フタスジモンカゲロウ	1			
<u>Ephemera strigata</u>	モンカゲロウ		7		
<u>Epeorus curvatus</u>	ユミモンヒラタカゲロウ	52	16		
<u>Epeorus hiemalis</u>	オナガヒラタカゲロウ	2			
<u>Ecdyonurus yosidea</u>	シロタニガワカゲロウ	5	3	2	
<u>Rhithrogena sp.</u>	ヒメヒラタカゲロウ属		1		
<u>Ephemerella cryptomeria</u>	ヨシノマダラカゲロウ	133	47		
<u>Ephemerella trispina</u>	ミツトゲマタカゲロウ	8	8		
<u>Ephemerella nigra</u>	クロマダラカゲロウ	5	17		
<u>Ephemerella okumai</u>	オオクママダラカゲロウ		2		
<u>Isonychia japonica</u>	チラカゲロウ	3	6		
<u>Siphlonurus yosinoensis</u>	ヨシノフタオカゲロウ	5			
<u>Paraleptophlebia spinosa</u>	トゲトイロカゲロウ	3			
<u>Paraleptophlebia chocorata</u>	ナミトイロカゲロウ	7			
<u>Caenis sp.</u>	ヒメカゲロウ属	13	8		
<u>Baetis thermicus</u>	シロハラコカゲロウ	149	91		
<u>Baetis sahoensis</u>	サホコカゲロウ			134	9
<u>Pseudocloeon japonica</u>	フタバコカゲロウ		3	2	
せき翔目					
<u>Togoperla sp.</u>	トウゴウカワゲラ属	1	2		
<u>Amphinemura sp.</u>	フサオナシカワゲラ属	1			
<u>Nemoura sp.</u>	オナシカワゲラ属	1			
毛翔目					
<u>Rhyacophilidae</u> RA	ナガレトイケラ属RA	2	1		
<u>Rhyacophilidae nigrocephala</u>	ムナグロナガレトイケラ		2		
<u>Glossomatidae</u>	ナガレトイケラ科		1		
<u>Goera japonica</u>	ヤマトイケラ科		1		
<u>Hydropsyche orientalis</u>	ニンギョウトイケラ		1		
<u>Hydropsyche orientalis</u>	ウルマーシマトイケラ		3		
<u>Macronema radiatum</u>	オオシマトイケラ			1	
<u>Cheumatopsyche brevilineata</u>	コガタシマトイケラ	3	2		
広翔目					
<u>Protohermes grandis</u>	ヘビトンボ	3	4		
<u>Parachauiodes continentalis</u>	クロスジヘビトンボ		2		
鞘翔目					
<u>Mataeopsephenus japonicus</u>	ヒラタドロムシ			2	
<u>Psephenoides japonicus</u>	マスダドロムシ	17	4	2	
<u>Elmidae</u>	ヒメドロムシ科		1		
<u>Luciola cruciata</u>	ヒメドロムシ科(成虫)	3	1		
ゲンジボタル			2		
双翔目					
<u>Athericidae</u>	ナガレアブ科	13	4		
<u>Tipulidae</u>	ガガンボ科		1		
<u>Chironomidae</u>	ユスリカ科 1	5	10		
	ユスリカ科 2		13	29	56
その他					
<u>Geothelphusa dehaanii</u>	サワガニ	2	2		
<u>Asellus hilgendorfii</u>	ミズムシ			15	4
<u>Planariidae</u>	プラナリア科	14	4	7	
<u>Glossiphoniidae</u>	グロシフォニ科			5	
<u>Erpobdellidae</u>	インビル科			2	1
<u>Hirudidae</u>	ヒルド科				4
<u>Tubificidae</u>	イトミミズ科	19	9	15	771
<u>Branchiura sowerbyi</u>	エラミミズ				1

表3 水生生物による水質判定

	高山	滝上	瀬川	桑津
総個体数	470	279	216	846
総種類数	26	33	12	7
優勢種 1	シロハラコカゲロウ	シロハラコカゲロウ	サホコカゲロウ	イトミミズ
出現率・判定	31.7%・OS	32.3%・OS	62.0%・ α mS	91.1%・PS
コルクビッツ法	OS	OS	α mS	PS
汚濁指数	1.11 (OS)	1.08 (OS)	2.33 (β mS)	2.36 (α mS)
生物指数	45 (OS)	54 (OS)	16 (β mS)	6 (α mS)
多様性指数	3.07 (OS)	3.68 (OS)	1.99 (MS)	0.55 (PS)
総合判定	OS	OS	β mS～ α mS	α mS～PS

OS; oligosaprobic zone, MS, mS; mesosaprobic zone, PS; polysaprobic zone

III. 生菌数、全菌数からの河川環境評価

水生生物など、従来から用いられている生物指標をもとに河川環境を評価するためには、分類学的な専門知識が必要なうえ、結果を得るまでに長時間を要する。そこで細菌数、とくに生菌数と全菌数の比率に着目し、細菌数から河川環境を評価する方法について検討した。

表4、5は、各地点における生菌数（以下CFUと略す）、全菌数（以下TDCと略す）、TDCに対するCFUの比率および全有機炭素量（以下TOCと略す）を示したものである。

1990年2月27日の結果ではTOC値は汚染の進んだ北橋では15.5 ppm、清浄な高山、滝上ではそれぞれ2.1 ppm、1.9 ppmであり、汚染の進行とともにTOC値は高くなっている。全菌数は高山で最も少なく、汚染のすんだ桑津、北橋ではそれぞれ 2.3×10^6 cells/ml、 1.4×10^7 cells/mlとなった。0.05寒天平板培地の生菌数は高山で最小値をとり、汚染の進んだ地点ほどその値は大きくなった。

全菌数に対する0.05寒天平板培地上にコロニーを形成する生菌数の割合(CFU/TDC)は、最も清浄な地点と考えられる滝上では2.1%、桑津では10.4%、北橋では69.3%となり、汚染の進行とともに寒天平板培地上にコロニーを形成する細菌の割合が増加することが認められた。また、0.5寒天平板培地の生菌数も汚染の進行とともに増加した。

この結果より、汚染の進んでいる地点ほどCFU、TDCはともに高くなり、TDCに対するCFUの割合もまた高くなることがわかる。

1990年9月6日には、表4の5地点に大阪市内の桜宮、天満橋北、天満橋南（いずれも淀川）の3地点を加え、それぞれの地点の細菌数を調べた。高山、滝上、瀬川、桑津、北橋のいずれにおいても、菌数、CFU/TDCに季節による大きな差はなかった。CFU/TDCは、汚染の少ない滝上で0.1%、汚染の進んでいる寝屋川の北橋では44.8%であった。

淀川の桜宮と天満橋の距離は約1kmであるが、この間に0.05培地で培養可能な細菌が急激に増加し

表4 表層水中の細菌数 (1990/2/27)

採水地点	TDC	0.5PYG medium	0.05PYG medium	TOC
高山	2.1×10^5	9.3×10^3 (4.4)	9.5×10^3 (4.5)	2.1
滝上	4.7×10^5	5.0×10^3 (1.1)	9.7×10^3 (2.1)	1.9
瀬川	5.7×10^5	1.1×10^4 (1.9)	5.0×10^4 (8.8)	2.6
桑津	2.3×10^6	2.4×10^4 (1.0)	2.4×10^5 (10.4)	4.9
北橋	1.4×10^7	4.4×10^6 (31.4)	9.7×10^6 (69.3)	15.5

TDC, cells/ml; 0.5, 0.05 PYG medium, CFU/ml;
(), percentage of CFU/TDC

表5 表層水中の細菌数 (1990/9/6)

採水地点	TDC*	CFU**	CFU/TDC
	(cells/ml)	(cells/ml)	
高山	4.5×10^5	4.0×10^3	0.9
滝上	5.6×10^5	5.5×10^2	0.1
瀬川	8.8×10^5	2.6×10^4	3.0
桑津	3.1×10^6	5.0×10^4	10.6
桜宮	2.9×10^6	5.1×10^4	1.7
北橋	8.7×10^6	3.9×10^6	44.8
天満橋(北)	4.9×10^6	1.5×10^6	30.6
天満橋(南)	4.4×10^6	1.3×10^6	29.5

* TDC, cell/ml

**CFU, CFU/ml (0.05 PYG medium)

たのは、天満橋の上流約 300mで淀川に寝屋川が合流し、その影響をうけたものと推察される。

IV. 細菌数の季節変動

これまでの研究で、細菌数が河川環境を評価するにあたってのひとつの指標となりえることが示唆されている。本研究では、大阪府北部を流れる箕面川と猪名川の4定点について、1989年2月から1990年7月までの18か月にわたり全菌数と生菌数を測定することにより、細菌の現存量と河川環境との関係を明らかにすることを試みた。細菌数の年間変動を図2に示した。全調査期間を通じて汚染の進んだ地点ほど、全菌数および寒天平板培地でコロニーを形成する細菌数のいずれもが増加していた。

調査期間中の0.05寒天平板培地を用いた場合のCFU/TDC平均値は、高山では3.7%、滝上では1.6%、瀬川では5.2%、桑津では9.8%であり、年間を通じてCFU/TDC値は汚染の進行した地点ほどその値が大きくなることがわかった。

水生生物指標で貧腐水性に分類される高山と滝上におけるCFU/TDC値をt-検定を使って統計的に比較したところ、有意の差があった。高山と滝上は水生生物指標では同じ貧腐水性(OS)であるが、生物指数、多様性指数から滝上より高山のほうがやや汚染が進行しているようである。同様の結果がCFU/TDC値より得られたことは、この値が河川環境を評価するための環境指標となり得ることを示唆するものである。

水生生物など、これまでに用いられている生物指標から河川環境を把握するには、分類学的な専門知識が必要なうえ、結果を得るまでに長時間要したが、CFU/TDC値は比較的簡単に求めることができ、短時間のうちに環境を評価することが可能となった。今後、この値を求めることで、汚染の進行がわかりにくい清浄な地点の環境の変動を早期に発見できるものと期待される。

細菌数変動をつかさどる環境因子としては、増殖因子となる有機物の質や濃度、抑制因子となる捕食者の多寡など様々な要因が考えられるが、ここでは水温、pH、TOCについて検討を試みた。その結果、全菌数と水温との間に高山では $r = 0.64$ ($p < 0.01$)、滝上では $r = 0.57$ ($p < 0.01$)、瀬川では $r = 0.62$ ($p < 0.01$)、の相関から認められた。しかし、比較的汚染の進んだ桑津では相

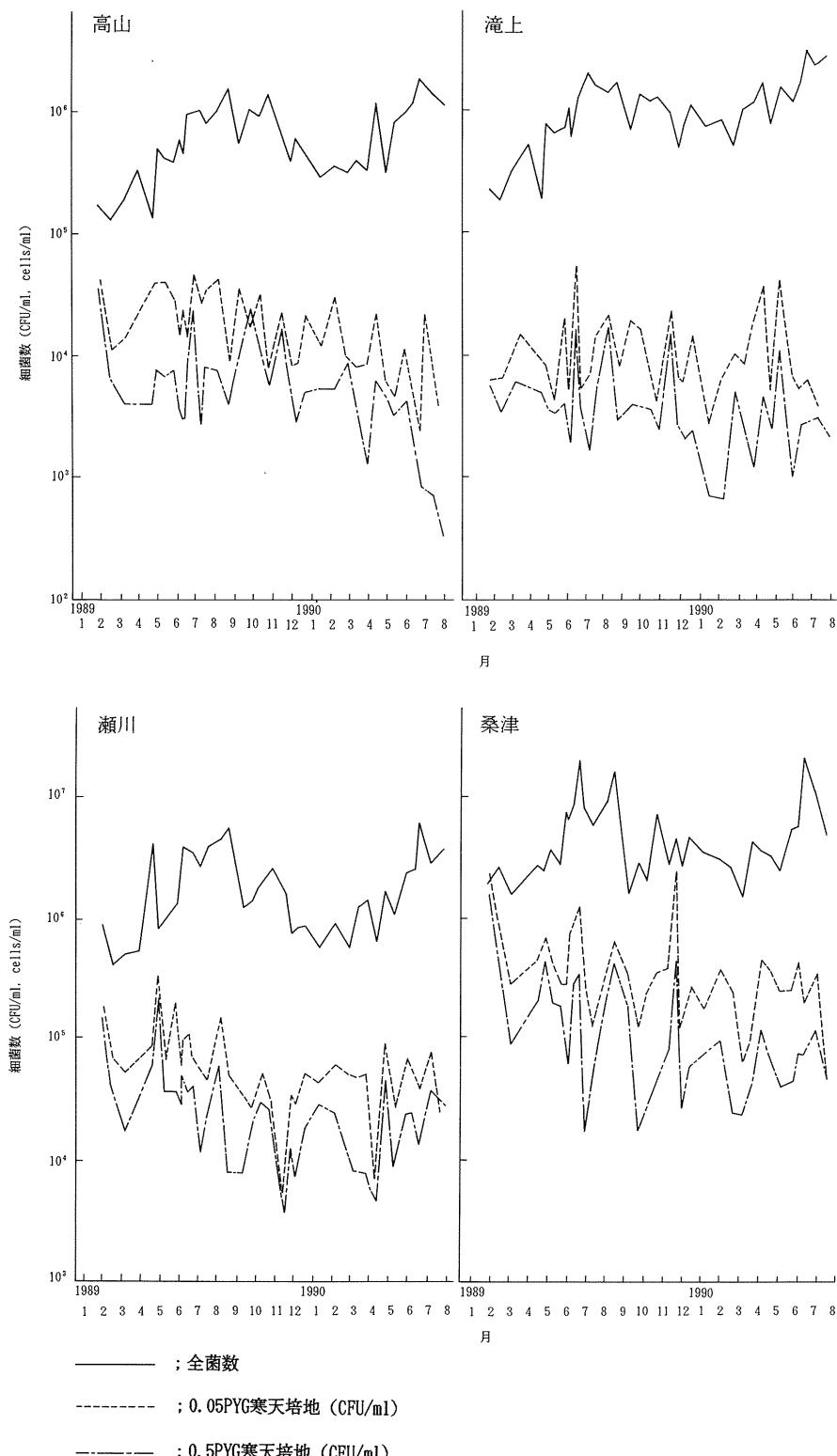


図2 猪名川および箕面川における細菌数の季節変動

関は得られなかった ($r = 0.45$)。なお、今回測定したその他の因子と細菌数との間に相関は認められなかった。

以上の結果より、汚染の進行している河川においては、その全菌数計数にあたっては季節変動を考慮する必要のあることがわかった。一方、汚染域における細菌の季節変動には、温度以外に上述した有機物濃度や捕食圧などの多くの要因が複雑に関与しているものと推察される。したがってこのような河川では、環境評価の指標として細菌数を用いるにさいしては、その変動の解釈にはさらに検討を加える必要があるものと考えられる。

V. 画像解析による細菌群集の解析

環境中の細菌の90%以上は培養が困難な細菌であり、培養を基礎とする従来の細菌学的手法による環境中の細菌の現存量計測、および分類には限界があった。

そこで、蛍光顕微鏡を利用する全菌数測定法と画像解析装置とを組み合わせることにより、環境中の細菌の現存量を計測し、さらに河川環境と細菌の大きさの分布との関係について検討した。

図3は、当研究室で開発した画像解析装置のシステム構成図である。落斜型蛍光顕微鏡（OLYMPUS、BH-2）にCCDカメラ（SONY、XC-77）を接続し、顕微鏡像を画像解析ボード（PHOTRON、FMR 512）にとりこむ。この画像はビデオモニターに映しだされると同時に、パソコン用コンピュータ（NEC、PC-9800シリーズ）でデジタル化される。二値化、連結性解析のためのプログラムはC言語により作成した。

図4は、実際の操作手順を示したものである。

図5、6、7は、本システムにより計測した各地点の細菌の長さ（LENGTH）、面積（AREA

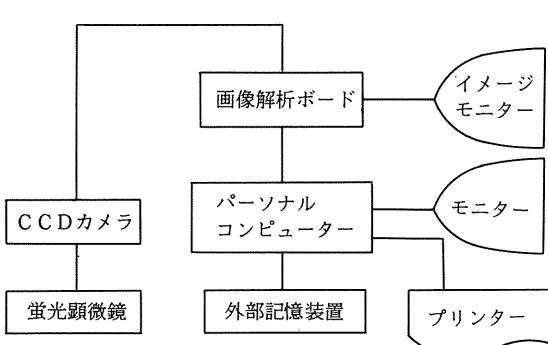


図3 画像解析装置のシステム構成図

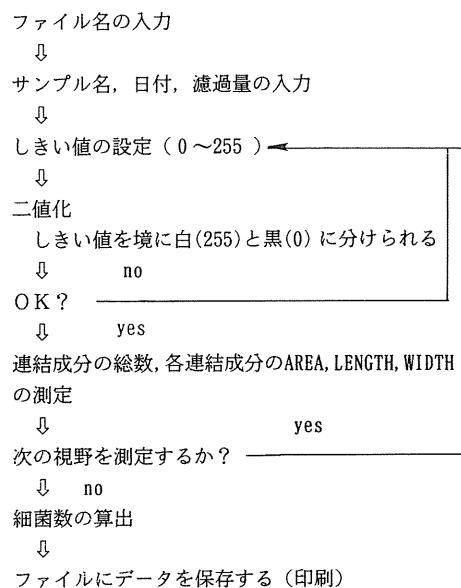


図4 操作の手順

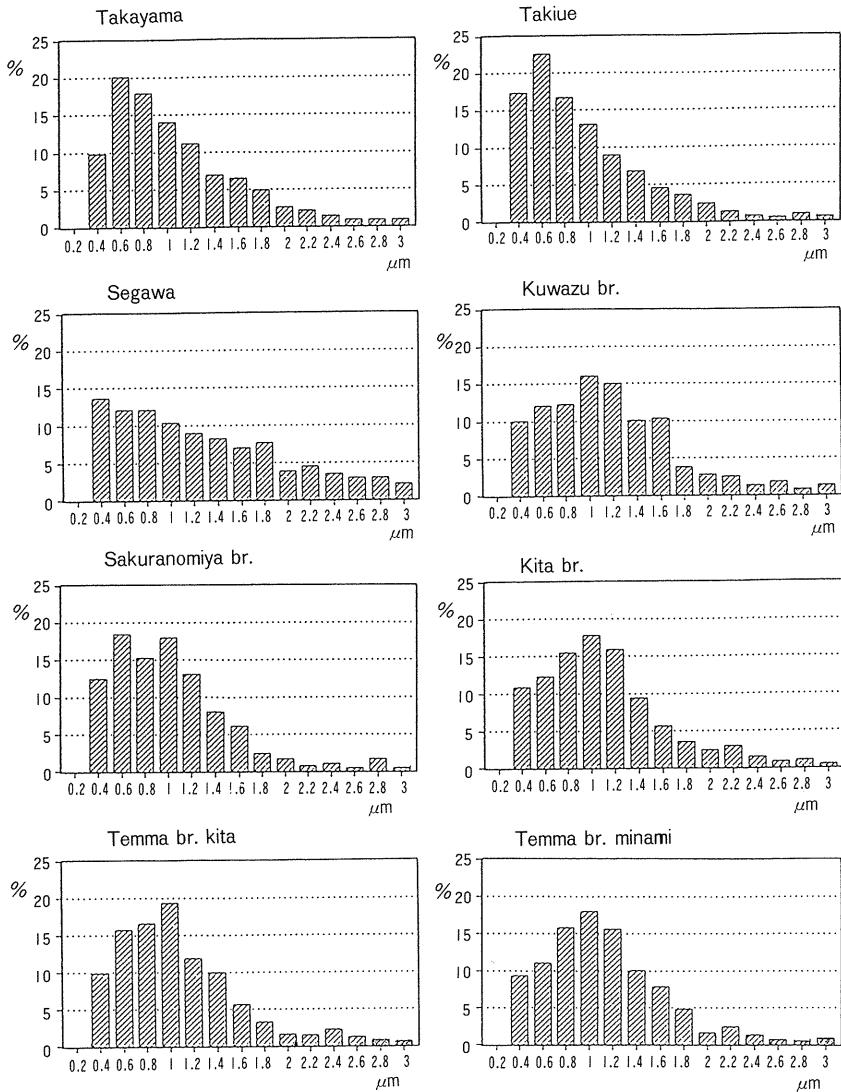


図5 細菌の長さの度数分布

A) および縦横比 (W I D T H / L E N G T H) の度数分布を示したものである。

清浄な地点である高山、滝上に比べ、比較的汚染の進んでいる瀬川、桑津橋では、L E N G T H 値の大きい細菌の占める割合の高くなっていることがわかる（図5）。大阪市内の河川においても、比較的汚染の少ない桜宮に比べ、汚染の進んでいる北橋の方がL E N G T H 値の大きい細菌の占める割合が高くなっている。また天満橋北と天満橋南では、天満橋南の方がL E N G T H 値の大きい細菌の占める割合がやや高くなっている。これは、それぞれ上流の河川の影響を受けているためと考えられる。

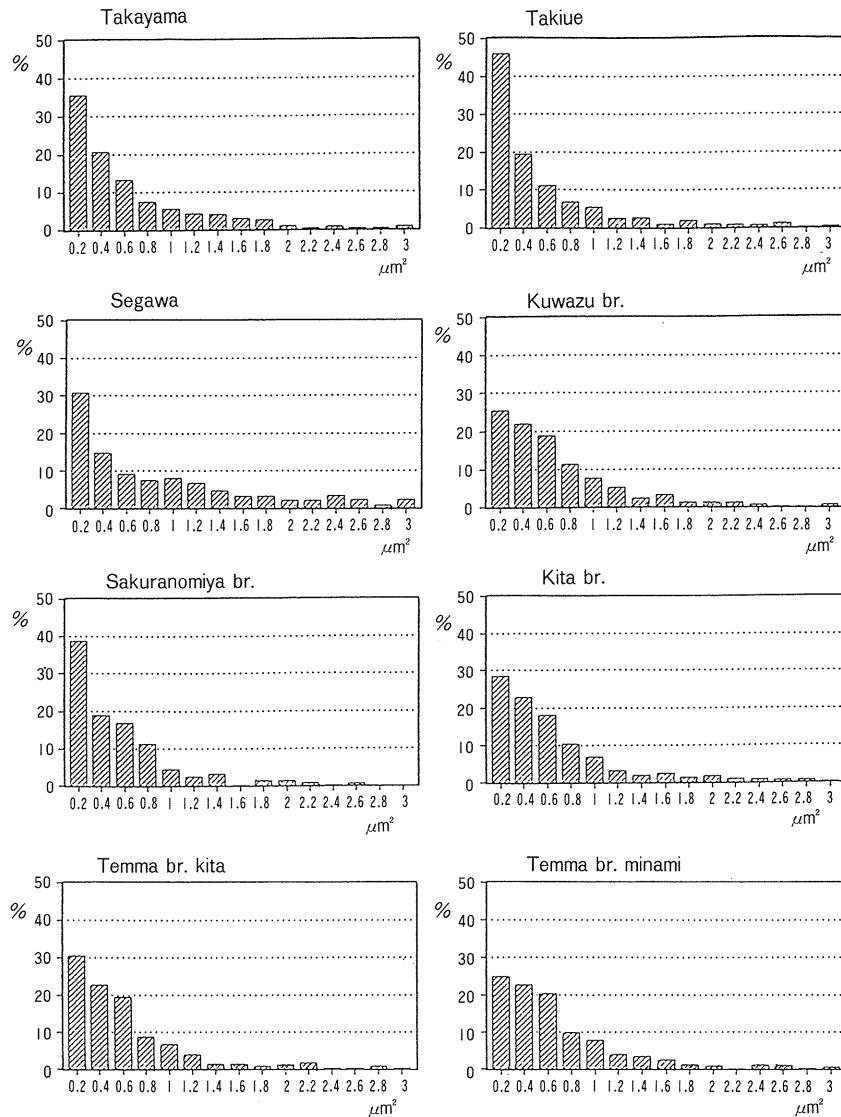


図 6 細菌の面積の度数分布

河川汚染の進行度と細菌 A R E A の度数分布でも、L E N G T H の度数分布と同様の傾向がみられ、汚染のすすんでいる地点程 A R E A 値の大きい細菌の占める割合が高くなっている（図 6）。

一方、細菌の縦横比の度数分布からは、各地点ごとの差異は見られず、本システムによる細菌の縦横比の測定結果から河川環境を評価することは困難であることがわかった（図 7）。

以上の結果より、汚染の進行とともに大きな細菌の占める割合が高くなり、河川の汚染状態と細菌の大きさに相関があることがわかった。また、A R E A の度数分布より L E N G T H の度数分布の方が地点ごとの特徴が比較的はっきりと現れ、本システムにおいては L E N G T H 値による評価が最も

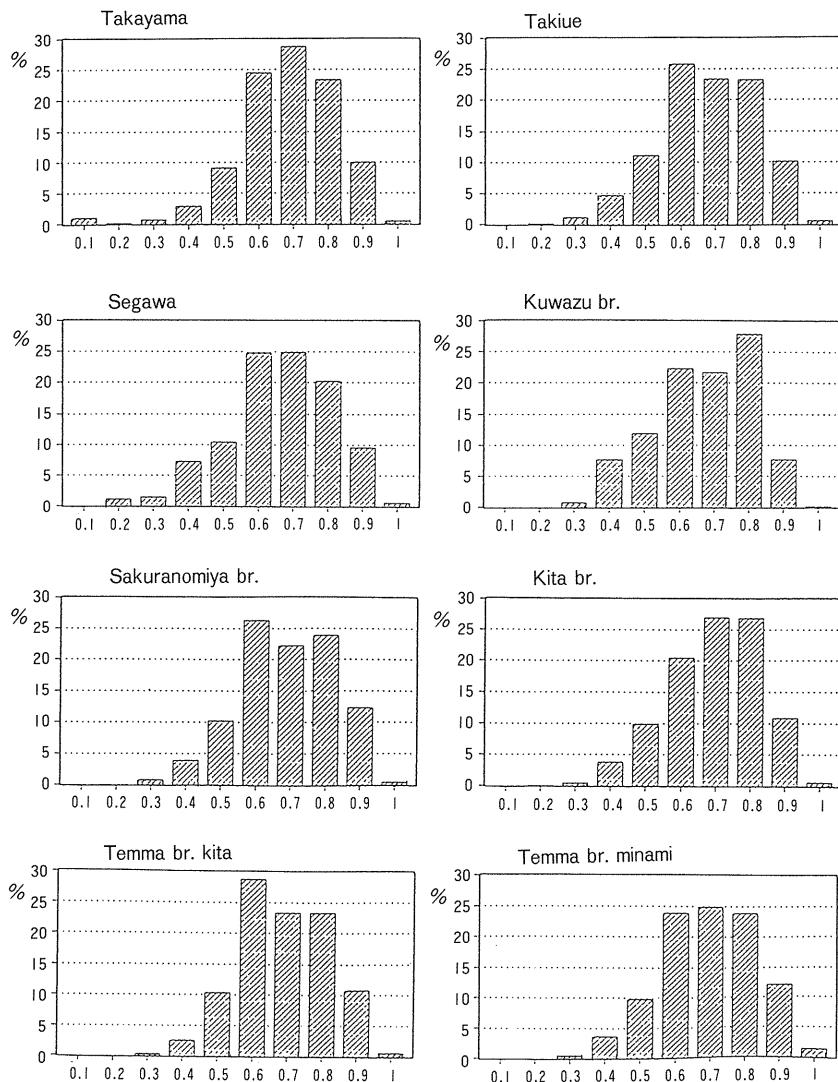


図7 細菌の縦横比の度数分布

河川の環境を反映できることが示された。

画像解析装置は全菌数計測やコロニー計数に大きな威力を発揮することが知られていながら、その装置が高価なためこれまでほとんど普及していなかった。しかし今回使用した簡易型画像解析システムは手軽に利用でき、また数多くの検体を短時間のうちに処理できるので、画像解析から得られた種々の情報と他の環境指標とを比較検討することにより、環境や生態系の変化を知る上で必要となる基礎データを得ることができると考えられる。

VII. 河川水中のアニリン分解菌の分布

水質の指標として従来用いられてきたBOD、COD、DO、TOC、CFU、TDCなどは、化学物質による汚染の程度を知るには十分とはいえない。そこで猪名川の6定点と大阪市内の5定点について1989年12月と1990年9月に試料水を採取し、河川水中の細菌による化学物質の分解性とTOC、CFU、TDCの関係を検討した。

今回モデル化学物質として使用したアニリンは、自然環境中に存在するとともに化学工業でも広く利用され、河川水中では細菌による生分解により無機化されることが知られている。

これまでの調査から、河川の汚染度によりアニリン分解菌の分解能が異なることが明らかとなっており、今回は大阪近郊の河川の汚染度とアニリン分解菌の分布、ならびに二次炭素源がアニリン分解に及ぼす影響について検討した。

河川水中の細菌によるアニリンの分解は、当研究室で開発したTOC阪大法と阪大法の2種の生分解試験法により測定した(図8、9)。

アニリン分解菌数の最尤値は、アニリンの50%以上が分解された場合をプラスとして、Digeronimoら(1978)とLehmickelら(1979)の方法を修正し、算出した。

猪名川の6地点から採取した試料水についてTOC阪大法により、アニリンの分解を調べたところ、すべての地点で分解が認められたが、分解率は地点により異なった(図10)。ラグタイム、すなわちアニリン分解が始まるまでの時間は、新薬研と中橋で長かったのに対し、汚染がこれら2地点と同程度と考えられる鳥帽子岩では河川水中のアニリン分解菌数は検出レベル以下であったにもかかわらずラグタイムは最も短かった。桑津ではアニリン分解菌数は比較的多かったが、ラグタイムは鳥帽子岩よりも長かった。最も汚染の進んだ戸倉のラグタイムは桑津とほぼ同じであったが、河川水中のアニリン分解菌数は検出レベル以下であった。

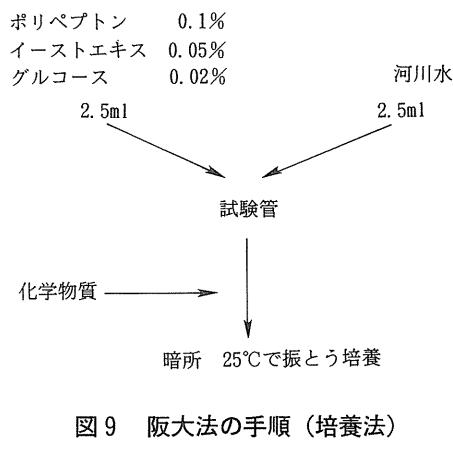
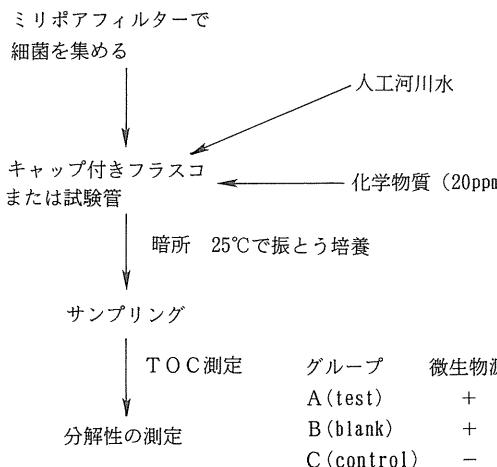


図8 TOC阪大法の手順 (die away法)

培養法である阪大法では、汚染の少ない新薬研を除くすべての地点でアニリンは分解され、分解速度は桑津で最も速かった（図11）。

鳥帽子岩の試料水では他の易分解性物質の存在によりアニリンの分解は遅れたのに対し、桑津と中

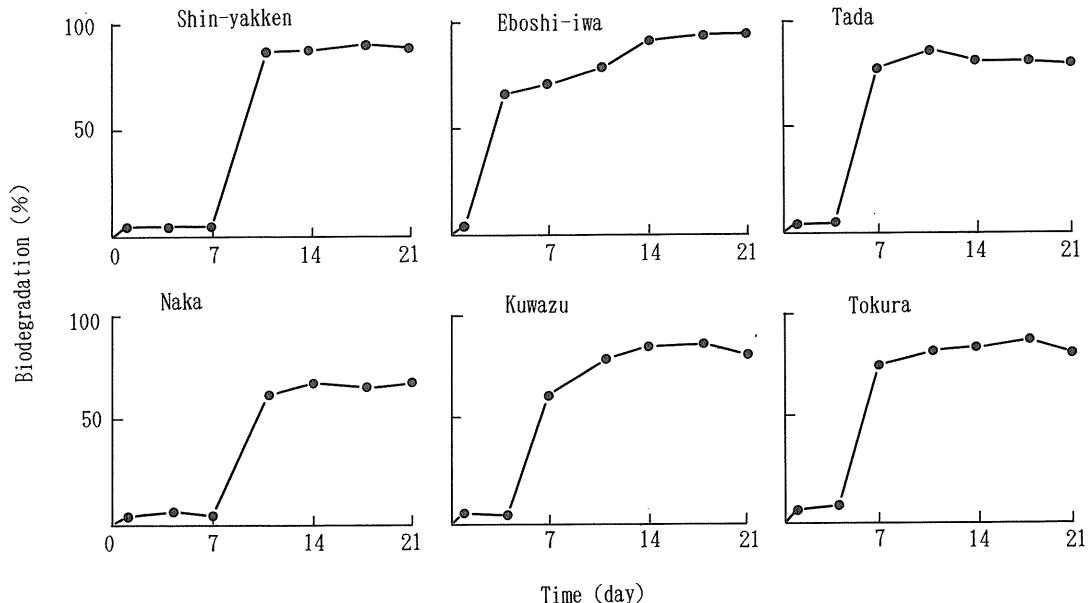


図10 河川中の細菌によるアニリンの分解（T O C阪大法）

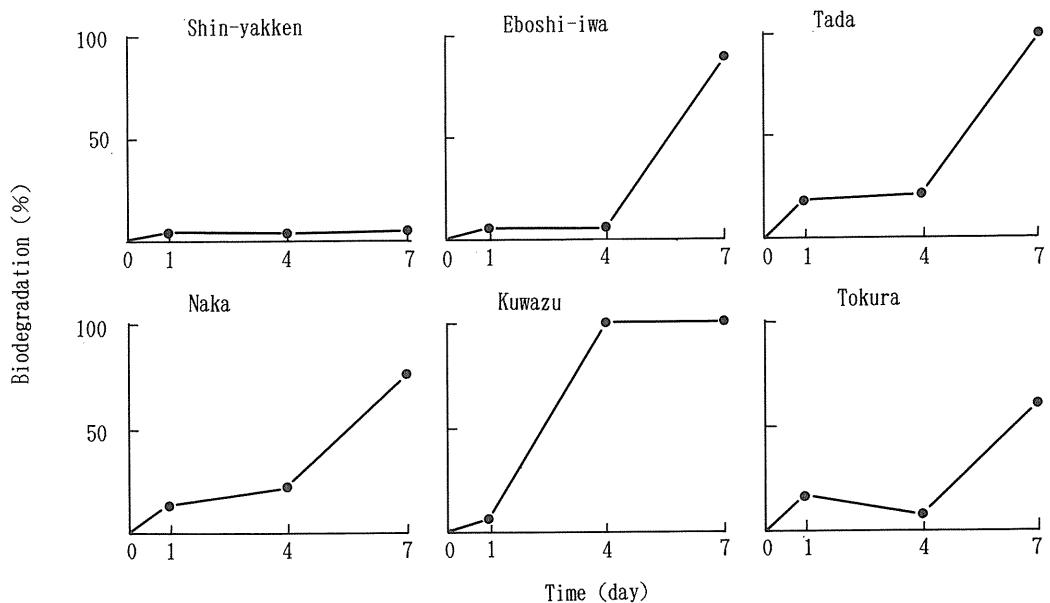


図11 河川中の細菌によるアニリンの分解（阪大法）

橋の試料水では易分解性物質の存在によりラグタイムは短縮され、アニリンと他の物質を同時に分解できるアニリン分解菌の存在が示唆された。これは多種の栄養物質が存在する汚染地点では、微生物が環境に順応したためであると推察された。

表6は猪名川の各地点におけるアニリン分解菌数、表7は大阪市内の各地点におけるアニリン分解菌数を示したものである。

TOCは下流にいくにつれ、徐々に増加したが、戸倉のTOCはとくに高かった（表6）。CFUも同様の傾向が見られたが、戸倉では例外的に桑津よりも低いCFUが得られた。TDCは各地点で同じオーダーの値であった。すなわち、培養可能な細菌の割合は、戸倉を除き下流にいくにつれ増加していた。最尤法により、アニリン分解菌数を求めたところ、桑津では3.6cells/mlであったが、その他の地点では検出限界以下であった。

大阪市内では、桜宮を除き、いずれの地点でもアニリン分解菌が検出され、寝屋川で最高であった。

今回の結果より、比較的汚染の少ない河川にもアニリン分解菌が生息しており、培地の炭素源としてアニリンのみを用いた場合にはアニリン分解能が測定できることがわかった。ただし最も汚染の少

表6 猪名川におけるアニリン分解菌数（1989/12/13）

採水地点	TOC (ppm)	CFU (cells/ml)	TDC (cells/ml)	アニリン分解菌数 (cells/ml)
新薬研	0.9	4.4×10^3	1.3×10^6	< 0.3
鳥帽子岩	1.4	2.8×10^4	1.7×10^6	< 0.3
多田	1.9	3.5×10^4	4.3×10^6	< 0.3
中橋	2.5	1.0×10^5	3.4×10^6	< 0.3
桑津	5.3	3.8×10^5	7.9×10^6	3.6
戸倉	12.0	8.5×10^4	5.9×10^6	< 0.3

表7 汚染水域におけるアニリン分解菌数（1990/9/6）

採水地点	TOC (ppm)	CFU (cells/ml)	TDC (cells/ml)	アニリン分解菌数 (cells/ml)
日本橋 (道頓堀川)	6.0	7.6×10^4	2.3×10^6	2.3
天満橋（南） (淀川)	3.9	1.5×10^6	4.4×10^6	4.2
天満橋（北） (淀川)	8.5	1.3×10^6	4.9×10^6	4.2
桜宮 (淀川)	4.2	5.1×10^4	2.9×10^6	< 0.3
北橋 (寝屋川)	5.1	3.9×10^6	8.7×10^6	23.0
神洲橋 (神崎川)	8.2	4.9×10^5	6.9×10^6	4.2

ない新薬研ではラグタイムが非常に長く、培養後7日を経過するまではアニリン分解菌は検出レベル以下であった。鳥帽子岩では、TOCとCFUは低く汚染は少ないとと思われたが、農業排水が流入しているためかラグタイムは最小であった。汚染度が低いと考えられる地点でも、汚染物質の種類により微生物の活性の大きく変化することが示唆された。

CFUの最高値を示した寝屋川の北橋ではアニリン分解菌数も最高であった。戸倉はTOCは最高であったがCFUとTDCが比較的低く、他の地点とは異なっていた。これは戸倉の微生物群集が污水处理場の排水の影響を受けているためと考えられた。

以上の結果より、アニリンの生分解とアニリン分解菌数の計測が河川の汚染度を知るうえで有用な指標となりうることが示唆された。