

水田排水から採取した微生物の群集構造

Community Structure of Microorganism Collected from Surface Drainage from Paddy

○濱田康治*・人見忠良*・藤田昌史**・久保田富次郎*・白谷栄作*

Koji Hamada, Tadayoshi Hitomi, Masafumi Fujita, Tomijiro Kubota and Eisaku Shiratani

1. はじめに

自然浄化と微生物の関係は非常に強いと考えられるが、農業地域における水質浄化機能と微生物の役割に着目した研究は少ない。水田は農業地域内において窒素除去などの水質浄化が期待されているが、水田での水質浄化と微生物の関係についての知見は少ない。

微生物群の性質を評価する際、微生物群集構造を把握することが重要である。微生物群集構造の評価手法は、分子生物学的手法や化学的手法など数多く存在するが、分子生物学的手法は生物学的な知識を必要とするなど、その評価には熟練を要する。これらに比較して、微生物が呼吸鎖の補酵素として利用しているキノンをバイオマーカーとして利用する微生物群集構造解析法であるキノンプロファイル法は、化学分析のみに基づいた手法であり、培養などの微生物学的な専門知識を必要としないため、比較的容易に利用可能であり、排水処理や土壌微生物などの分野において活用されている。

本報告では、キノンプロファイルを利用して、水田排水から回収した微生物を対象に微生物群集構造の特徴と期別変化を評価した。

2. 実験方法

2.1 微生物トラップ・・・水田の水尻に微生物固定化担体としてチップ状木炭(直径 5mm 程度)を充填した装置を設置した。表面排水は装置の中を通過して排水されるため、排水中の微生物が木炭表面にトラップされるため、木炭表面の微生物は水田由来の微生物であると考えられることができる。

2.2 キノンとその分析・・・キノンは呼吸鎖や光合成電子伝達鎖の必須成分として生物界に広く分布するイソプレノイドであり、構造の違いにより多くの種類が存在する。微生物はその呼吸鎖の補酵素としてキノンを利用しているが、主に利用する種類は微生物のエネルギー代謝機構や微生物種に依存している。微生物トラップ内のできる限り上流側から経時的に木炭を取り出し、木炭の表面に付着した微生物からキノンを Sep-Pak Plus 分離カラム (Waters Corp)を用いて抽出した。抽出したキノンは、ODS カラム(Aglent Technologies)と UV 検出器(Shimadzu Corp.)を装備した逆相 HPLC(Shimadzu Corp.)にて分離・定量した。

2.3 非類似度 (D)・・・式(1)に従い、オーバーラップ法により非類似度(D)を算出した。非類似度(D)は 2 試料間の同一キノン分子種についてモル%の差を絶対値として求め、全分子種におけるその値の総和(総計の最大値を 100%とするため 2 で割る)であり、プロファイルの違いを定量的に評価している。

$$D = \frac{\sum_{i=1}^n |Q_i - Q_i'|}{2} \quad (1)$$

ここで、 Q_i ・ Q_i' : キノンのモル%[%]、 n : キノン分子種数。

* 農研機構 農村工学研究所 National Institute for Rural Engineering, NARO

** 茨城大学 工学部 Faculty of Engineering, Ibaraki University

キーワード：微生物、群集構造、キノンプロファイル

3. 結果および考察

Fig.1 に灌漑期間に 4 回測定したキノンの含有率を示す。ユビキノン (Q-n) の構成は Q-8>Q-10>Q-9 となる傾向があり、主要なメナキノン(MK-n)は MK-6、MK-7、MK-8、MK-8(H₂)であった。これは活性汚泥の傾向と同様の傾向であった。呼吸レベルを示す指標として使用されるメナキノンとユビキノンのモル比である MK/Q 比は 1.56~3.29(平均: 2.25)であった。MK/Q 比は、一般的な水環境では 0.14

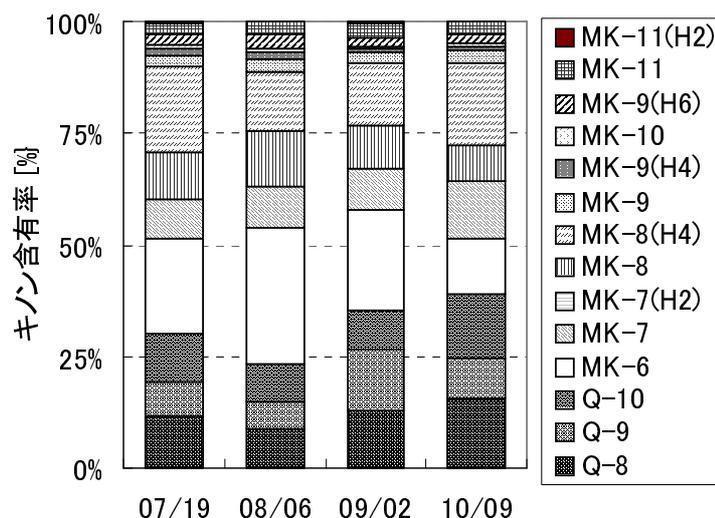


Fig.1 キノン含有率の時間変化

~0.54、土壌環境では 2.5~3.4 との報告がある。水田からの表面排水をトラップして回収した微生物群の MK/Q 比が土壌環境の MK/Q 比に最も近かったことは、トラップの内部は水環境よりも土壌の環境に近い酸化還元状態であったことを示している。これより、トラップ内では水田表層付近に由来する微生物が土壌と同様の酸化還元状態で保持されていたと考えることができる。つまり、トラップ内の環境は、水田土壌の表面とほぼ同様の環境になっているといえるため、トラップで採取した微生物の微生物群集構造は水田土壌の表層付近の微生物群集構造とほぼ同様であると考えることができるであろう。

Table 1 非類似度(D)

| | 07/19 | 08/06 | 09/02 |
|-------|-------|-------|-------|
| 08/06 | 12.8 | | |
| 09/02 | 10.1 | 13.5 | |
| 10/09 | 13.4 | 24.4 | 18.0 |

次に、微生物群集構造の時間変化を評価するために D 値を算出した。Table 1 に微生物群集構造間の D 値を示す。D 値の解釈は、D 値が 20%を超えた場合に微生物群集構造に有意な差があるとされ、D が 10%以下の場合には実質的な違いがないとされる。7月19日の群集構造と、それ以外の群集構造を比較した場合、D が 10.1~13.4%と小さい。廃水処理場の活性汚泥を対象とした研究では、10~15%であると同じ地域にある都市下水活性汚泥間の違い程度、15~20%であると 1つの処理系の季節変動の上限に相当するとしている。以上より、灌漑期間中の水田土壌表層付近での微生物群集構造は、小さな変動が確認されたが有意な差が認められず、時間変化は小さいと評価することができる。

4. まとめ

水田からの表面排水をトラップすることにより水田由来の微生物を回収して、微生物の群集構造をキノンプロファイル法により把握した。結果より、灌漑期間であれば水田土壌の表層付近での微生物群集構造の時間変化が小さい可能性が高いことが示された。

[参考・引用文献]

平石 (1992): 呼吸鎖キノンをバイオマーカーとして用いる廃水処理系微生物群集の動態解明, 水環境学会誌, 15(9), 558-563.
 Hiraishi A. et al. 1996. Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42, 457-469.
 Hiraishi A. et al. 2003. Signification of lipoquinons as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment, *Microves and Environments*, 18(2), 89-93.