

短報 [Note]

河床石バイオフィーム酵素活性に影響を及ぼす河川環境要因

増山悦子¹⁾*・栗屋良亮²⁾・内藤佳奈子²⁾・中村健一²⁾

(2016年11月28日受付, 2017年4月6日受理)

Biofilm enzyme activities on river-bed stones influenced by river environment factors in lotic systems

Etsuko MASUYAMA¹⁾*, Ryosuke AWAYA²⁾, Kanako NAITO²⁾ and Ken-ichi NAKAMURA²⁾

摘要

流水生態系における物質循環を理解するためには、分解者となる河床石を覆っているバイオフィームが分泌している酵素の特性を明らかにすることが重要である。バイオフィームの主要な分泌酵素が、河川の水質によってどのような影響を受けているかを調べるために、酵素化学的および電気泳動的な手法を用いて酵素の解析を行った。江の川水系の水質が異なる2地点(A, B)で河床石バイオフィームを採取した。バイオフィーム懸濁液のフォスファターゼ活性は、水質汚染度の高いB地点で著しい低下がみられた。ザイモグラフィ解析では、バイオフィーム懸濁液に主要な2種類のフォスファターゼバンド(I, II)が2地点に存在し、バンドIの濃さはフォスファターゼ活性の高さを反映していた。PCR-DGGE解析では、水質の異なる2地点ともに細菌のDNAパターンはよく似ているが、優占菌種は2地点で著しく異なることを明らかにした。バイオフィームの酵素活性に影響を及ぼす環境要因を調べた。A地点のバイオフィーム懸濁液を嫌気性条件下に置くと、バイオフィーム懸濁液のフォスファターゼ活性が低下した。本研究では、河床石バイオフィームのフォスファターゼ活性が河川水質環境を鋭敏に反映していることを示唆している。

キーワード: バイオフィーム, フォスファターゼ, 水質汚染, ザイモグラフィ, PCR-DGGE

Abstract

An understanding of the characteristics of enzymes secreted by the biofilm on riverbed stones is important for elucidating the matter cycling within biofilms in lotic environments. We examined the effect of water quality on the biofilm enzymes by using enzymologic and electrophoretic methods. Biofilm samples were collected at two sites (Sites A and B) of different levels of water pollution in Gono-Kawa River. Phosphatase activity was remarkably low in a biofilm suspension from the more polluted Site B. Zymographic analysis revealed the presence of two common

¹⁾ 県立広島大学人間文化学部 〒734-8558 広島県広島市南区宇品東 1-1-71 Faculty of Human Culture and Science, Prefectural University of Hiroshima, Ujinahigashi 1-1-71, Minami-ku, Hiroshima 734-8558, Japan

²⁾ 県立広島大学生命環境学部 〒727-0023 広島県庄原市七塚町 562 Faculty of Life and Environmental Science, Prefectural University of Hiroshima, Nanatsuka 562, Shobara 727-0023, Japan

* 連絡代表者 (Corresponding author): etsuko.masuyama@gmail.com

phosphatase bands (I and II) in a biofilm suspension, with the strength of each band indicating extent of enzyme activity. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis of bacteria groups revealed that DNA banding patterns were similar within the Gono-Kawa River system but that the dominant bacterial species in the biofilm samples differed markedly at two sites with different degrees of water pollution in Gono-Kawa River. We then examined the effects of different environmental conditions on enzyme activities of the biofilm. Phosphatase activity of the biofilm suspension from Site A decreased under anaerobic conditions. The results of this study suggested that biofilm phosphatase activity is very sensitive to water pollution in the river.

Keywords : biofilm, phosphatase, water pollution, zymography, PCR-DGGE

緒言

河川の自浄作用は、河床石や植物の表層を覆っているバイオフィームに棲息している種々の微生物の代謝活動によって担われ、水質保全のみならず、河川生態系の営みを維持する上で重要であると考えられる。河川におけるバイオフィームは、細菌叢だけではなく、微細藻類や原生生物をも含む異種混合的な環境を形成している(奥西, 2005)。

河川現場において、河川水中の遺骸やデトリタスに含まれる有機物質は、バイオフィームに捕捉・吸収された後、細菌類などから分泌されるペプチダーゼやフォスファターゼを始めとする多くの酵素により加水分解される(Allan et al., 2002; Cardinale et al., 2002)。その反応には細菌類のみならず原生生物や藻類の一部も関与している(Banno et al., 1983)。産生された低分子有機物質やその代謝物のリン酸、硝酸イオンおよびアンモニウムイオンなどは、バイオフィームに棲息している微生物に栄養成分として取り込まれる。その微生物は栄養段階の上位生物に対して被捕食者となる。また、無機塩は一次生産者の生育にとって必須の栄養塩として利用される。以上のように、バイオフィームの代謝活動は河川における生態系の維持や自浄作用に重要な役割を果たしていると考えられる。

流れ行く河川水の浮遊性の微生物と異なり、付着性のバイオフィームはその地点で定着しているため、その場の生息環境を反映していると考えられる。また、バイオフィームの酵素活性は浮遊細菌と比べて高いことが知られている(Araya et al., 2003)。バイオフィームから産生した分泌酵素活性は測定が容易であるばかりでなく、酵素活性値の変動から、その地点の一過性ではない河川環境を知ることができると考えられる。代謝酵素としては、フルオレセイン 2 酢酸を基質として測定したエラストラーゼ活性が、種々の酵素活性と高い相関関係を示すことか

ら、バイオフィームの代謝活性の一指標になり得るとされている(Battin, 1997)。しかしながら、バイオフィーム酵素と河川環境の関わりに焦点をあてた研究は多くないことから、河川環境を鋭敏に反映するバイオフィームの代謝酵素を選定し、その酵素活性を抑制する河川環境要因を明らかにすることは、河川水質のレベルを常に把握できる指標となるだけでなく、河川の水質改善の方策をたてるための一助となることが期待できる。

本研究に先駆けて、2010年10月に広島県北部中国山地を源流(西城川)として盆地の市街地(庄原市、三次市)を通り、島根県江津市の日本海に注ぐ江の川水系の計7地点で、表1と同様な項目で水質検査を行っている。その結果、河川水質検査から江の川水系7地点は、環境庁告示の「生活環境の保全に関する環境基準—河川—」(環境省, 1971)のうち測定した項目について照らし合わせると、AAからA類型に分類された。また、バイオフィーム懸濁液の酵素活性は上流域と市街地(庄原市と三次市)において著しい差が認められた(中村健一, 2011)。本研究では、河川環境とバイオフィームの代謝活動の関わりを明らかにするため、江の川水系支流西城川の上流域と庄原市街地域(戸郷川)の2地点を選定し、現地水質調査と河床に形成されたバイオフィームの採取を行うことにした。バイオフィームの代謝を担う分泌酵素のうち、ペプチダーゼおよびフォスファターゼの活性測定ならびに、それらの酵素のザイモグラフィーによる解析を行い、バイオフィームの酵素活性に及ぼす水質の影響について検討することにした。

材料と方法

バイオフィーム採取地点と採取法

バイオフィーム採取地は、江の川水系の中でも急勾配である支川西城川のA地点(広島県庄原市川西町)と、そこから5kmほど下流にいくと戸郷川が合流している

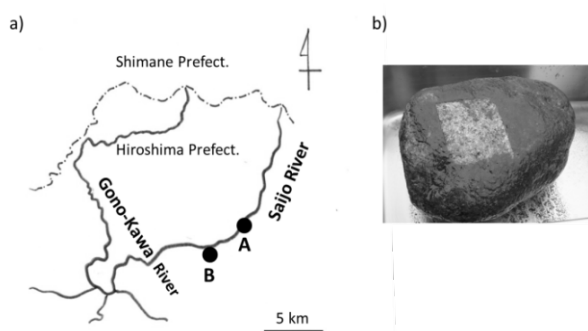


図1. 江の川流域における河床石バイオフィルム採取地の概略図: a) 採取地点 (A, B), b) A 地点のバイオフィルム剥離後の河床石.

Fig.1. Map of the Gono-Kawa River showing locations of sampling sites at which biofilm samples were collected : a) locations of sampling sites (A, B), b) the stone from site A after the removal treatment of biofilm.

地点があり、その 10m ほど上流に B 地点 (庄原市三日市町) を選定した (図 1a)。戸郷川は庄原市街地を流れ、西城川へ注ぎこんでいる流域の狭い川である。

2011 年 6 月 22 日に A, B 地点のバイオフィルムを採取した。A 地点は川岸から約 1m 中央へ入った浅瀬の河床石で、バイオフィルムが一様に付着した 3 検体の河床石を選択し、表層の一定区画面積 ($5 \times 5 \text{ cm}^2$) のバイオフィルムを採取した (図 1b)。河床石バイオフィルムに $5 \times 5 \text{ cm}^2$ にくり抜いたビニール製シートをあてがい、予め採取地点における河川の電気伝導度 (5.8 mS m^{-1}) 付近に調整しておいた塩化ナトリウム水溶液を駒込ピペットで注ぎながら、ポリエチレン製ブラシで縦横 30 回ずつこすり、ステンレスパット内に採取した。調整塩化ナトリウム水溶液を加えて総量 75 mL にしバイオフィルム懸濁液とした。B 地点では、堰堤によって川水が常に滞留し、川底の多くはコンクリートであるため、河床石ではなく護岸コンクリート内壁 (図 2 iii) から河川水面を底辺にして上部 5 cm 平方の湿った状態のバイオフィルムを剥離し、バイオフィルム懸濁液を調製した。

河川水質の測定法

水温および pH は簡易型 pH メーター (WM-22EP, 東亜 DKK), 溶存酸素は簡易溶存酸素測定器 (ID-100, 飯島電子工業), 電気伝導度は電気伝導度計 (B-173, 堀場製作所), 酸化還元電位は ORP メーター (RM-30P, 東亜 DKK), 濁度および色度はデジタル濁色度計 (WA-PT4DG, 共立理化学研究所) をそれぞれ用いて、2011 年 6 月 22 日に A, B の 2 地点のバイオフィルムを採取した場所で測定した。BOD は、河川用 BOD セット (共立理化学研

究所) を用いて、1 検水に対して、2 回ずつ測定した。無機栄養塩は、採取したバイオフィルム近傍の河川水を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルター (Nuclepore, Whatman) で濾過したものを試料水とした。無機リン酸および硝酸イオンの定量は、ポータブル簡易全窒素全リン計 (TNP-10, 東亜 DKK) を用いて計測した。

バイオフィルムにおける各種酵素活性量の測定法

ペプチダーゼ活性測定は、Levy らの方法 (Levy et al., 1970) を一部改変したアゾカゼイン法で行った。バイオフィルム懸濁試料 1 mL に対して反応液 1 mL (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM 2-メルカプトエタノール, 2 mM EDTA, 0.1% (w/v) トリトン X-100, 0.53% (w/v) アゾカゼイン (ナカライテスク)) を加えて攪拌した後、 25°C , 4 時間インキュベートした。3% (w/v) トリクロロ酢酸を 2 mL 加えて反応を停止させ、2,500 rpm, 5 分間遠心分離し、生じた沈殿物を除去した。得られた上清液 2 mL に、4% (w/v) 水酸化カリウム溶液を 2 mL 加えて、アルカリ性にして呈色した後、波長 520 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度の値は、バイオフィルム懸濁溶液 1 mL あたりの吸光度 (Abs. mL^{-1}) で表した。

フォスファターゼ活性測定は、中村の干潟土壌フォスファターゼ活性測定法 (Nakamura, 2001) を改良したフェノールフタレインフォスフェイト法で行った。バイオフィルム懸濁試料 1 mL に対して反応液 1 mL (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM フェノールフタレインモノフォスフェイト (シグマ) を加え、恒温水槽中で 25°C , 10 分間インキュベートした。0.5 M リン酸緩衝液 (pH 10.6) を 2 mL 加えて、塩基性による呈色と高濃度のリン酸による反応停止を行った。生じた沈殿物を 2,500 rpm, 5 分間遠心分離で除去した後、上清液の吸光度を波長 550 nm で測定した。得られた吸光度の値は、バイオフィルム懸濁溶液 1 mL あたりの吸光度 (Abs. mL^{-1}) で表した。

電気泳動的手法による、バイオフィルム中のペプチダーゼ分析

基質となるゼラチンを添加したゲルを支持体にしたゼラチンザイモグラフィ (Heussen and Dowdle, 1980) を部分的に改良した方法 (Nakao et al., 2011) で、バイオフィルムに存在するペプチダーゼを分離し、分析を行った。終濃度が 12% (w/v) アクリルアミド溶液, 0.15% (w/v) ゼラチン, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.5), 0.1% (w/v) SDS, 6.3% (w/v) グリセリンになるように混合した電気泳動用分離ゲル, 3.25% (w/v) アクリルアミド溶液からなる濃縮ゲルを作製した。泳動用緩衝液 (0.1% (w/v) SDS, 25 mM Tris, 0.19 M グリシン) を電気泳動装置 (AE-6500, ATTO) に

満たした後、40 mA の定電流で約 130 分間、電気泳動を行った。なお、電気泳動用試料は、1 mL のバイオフィーム懸濁試料を 10,000 rpm、5 分間遠心分離し、沈殿にタンパク質可溶化液 (0.19 M Tris-HCl (pH 6.8), 6.2% (w/v) SDS), および 1/5 量のマーカー色素液 (0.05% (w/v) ブロモフェノールブルー, 80% (w/v) グリセリン, 6.3 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を加えた後、冷水中 (10°C以下) で超音波処理 (35 kHz) を 5 分間施した。処理後、10,000 rpm、5 分間遠心分離して得られた上清液を電気泳動用試料とし、試料溝に電気泳動用試料 20 μ L を流し込んで泳動した。

電気泳動後の分離ゲルは、ゲル中の SDS を除去するために 1.5% (w/v) トリトン X-100 溶液に浸して 2 回の液交換をしながら計 60 分間洗浄した。洗浄後、ゲル中のペプチダーゼを再活性化させるため、ゲルを再活性化液 (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)) に浸して 30 分間振騰した後、室温に約 24 時間静置した。ゲルをアミドブラック溶液 (0.1% (w/v) アミドブラック, 30% エタノール, 9% 酢酸) に浸してゲル内のゼラチンを染色した後、脱色液 (30% エタノール, 9% 酢酸) を用いてゲルに付着した余分な色素を取り除いた。ペプチダーゼの存在は、ゼラチンを分解することによって生じた非染色部分 (白色) を検出することで判定した。

電気泳動的手法による、バイオフィーム中のフォスファターゼ分析

Native 電気泳動分離後のゲルをフォスファターゼ酵素反応させ、反応生成物を呈色する手法で分析した。臨床化学分野で血清アルカリフォスファターゼ等の検出に用いられている電気泳動法 (Kaplow, 1968) を部分的に改良し、SDS 無添加の泳動用緩衝液 (25 mM Tris, 0.19 M グリシン), および 15% Native-gel (NPU-R15L 電気泳動用既製ゲル, ATTO) を電気泳動用支持体として用いた (Nakao, 2011)。電気泳動試料は、分析の対象とするバイオフィーム懸濁液を遠心分離した後、沈殿量とほぼ同量の 0.5% (w/v) トリトン X-100 を添加し、1/5 量のマーカー色素液を添加した。10 mA の定電流で約 130 分間、Native 電気泳動を行った。泳動後、直ちに分離ゲルを酢酸緩衝液 (100 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0), 20 mM CaCl_2) に浸し、室温で 15 分間振騰した。その後、基質と染色剤の酵素反応混合液 (0.02% (w/v) ナフチルリン酸二ナトリウム, 0.02% (w/v) ファーストガーネット GBC 塩, 20 mM 塩化カルシウム, 100 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0)) に浸し、フォスファターゼ活性を有するバンドが黄~茶褐色に発色するまで約 24 時間、酵素反応を行った。反応後、分離ゲルを蒸留水に浸し撮影した。

PCR-DGGE 法によるバイオフィーム中の細菌叢解析

江の川水系の A, B 地点で採取した河床石バイオフィーム中の細菌叢は、PCR-DGGE (Polymerase chain reaction - denaturing gradient gel electrophoresis) 法を用いて解析した (Muyzer et al., 1993)。河床石バイオフィームからの DNA 抽出は、バイオフィーム中に存在する微生物のゲノム DNA 精製キット (PowerBiofilm DNA Isolation Kit, MO BIO Lab.) を用いて、マニュアルに従って行った。

マイクロチューブに 1 mL のバイオフィーム懸濁試料を入れ、10,000 rpm、5 分間遠心分離した。沈殿物を DNA 抽出用試料とし、冷凍保存 (-20°C) した。DNA 抽出用試料をマイクロチューブに 0.1 g 測り入れ、遠心分離した。遠心後の沈殿物を PowerBiofilm™ Bead Tube に入れ、溶解緩衝液を加えて恒温槽中で 65 °C、5 分間インキュベートした。アダプター (TURBOMIX) 装着のボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2, Scientific Ind.) で、Bead Beating (最大速度, 10 分間) による物理的な菌体破碎を行い、ゲノム DNA を抽出した。DNA の精製はスピンフィルターを用いて行い、PCR 用試料に供した。精製 DNA は、PCR 操作まで -20°C で保存した。

真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3 領域を増幅するために、41f GC (5'-(GC clamp)-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), および 517r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') をプライマーとして PCR を行った。DNA ポリメラーゼは KOD FX Neo (TOYOBO) を用い、PCR 緩衝液と dNTP は付属のものを用いた。PCR 反応溶液 (2 U 100 μ L⁻¹ ポリメラーゼ, 1 \times 緩衝液, 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M プライマー, 計 49 μ L) とテンプレート 1 μ L という組成の PCR 混合液を調製し、以下の温度条件下で PCR を行った。操作は、熱変性: 94°C \times 2 分 \rightarrow 【熱変性: 94°C \times 30 秒 \rightarrow アニーリング: 55°C \times 30 秒 \rightarrow 伸長反応: 72°C \times 1 分】 \times 30 サイクル \rightarrow 伸長反応: 72°C \times 10 分 \rightarrow 保存 4°C で、サーマルサイクラー (Little Gene TC-24H, BioFlux) を用いて行った。PCR 産物は、3% アガロースゲルの電気泳動で確認し、DGGE に供試するまで -20°C で保存した。

DGGE は、PCR-DGGE 用電気泳動システム (NB-1480 型, 日本エイドー) を用いて行った。14 cm \times 14 cm の電気泳動用ガラス板対内に、DGGE グラジエントゲル (8% アクリルアミド溶液中の変性剤の濃度勾配は 38~68%) を作製した。なお、変性剤 100% は 7 M 尿素, 40% ホルムアミド (分子生物学用試薬) に相当する。一晚放置して重合を促進させたゲル板を泳動槽に取り付け、泳動槽内に TBE 緩衝液 (0.5 M Tris / Borate, 20 mM EDTA 緩衝液 (pH 8.2)) を注いだ。大型恒温水槽内に泳動槽を入れ、60°C, 100V, 5 時間の条件で電気泳動を行った。DNA マーカーは細菌 16S rDNA 用 DGGE Marker III (ニッポンジ

ーン)を用いた。泳動後、0.03% GelRed (Biotium) 溶液中でゲルを 30 分間染色し、蛍光イメージアナライザー (E-Graph, ATTO) によって画像を取り込んだ。

バイオフィルムの酵素活性に影響を及ぼす環境要因の検討— 曝気・嫌気処理試験及びリン酸、有機物の負荷試験

曝気・嫌気処理試験の河床石バイオフィルムは、支川西城川の A 地点 (図 1a) で採取した。ビーカーにそれぞれのバイオフィルム懸濁試料を入れ、それぞれ室温で、24 時間静置させたもの、エアーポンプ (INNO-2 1500, マルカン) を用いて約 20 mL min^{-1} の気泡を吐出させて 24 時間曝気処理を施したもの、および褐色ビンにバイオフィルム懸濁試料を入れ、アルゴンガス (太陽日酸) をノズルから 2 分間送気して十分に空気と気体交換した後、密閉した嫌気状態で 24 時間静置したものの計 3 種類のバイオフィルム試料に対し、ペプチダーゼおよびフォスファターゼ活性を測定した。

リン酸負荷試験は、バイオフィルム懸濁試料 1 mL 中に終濃度 1, 10, 100, 1000 μM になるようにリン酸を加え、恒温水中で 25°C 、24 時間インキュベートした後、フォスファターゼ活性を測定した。

有機物負荷試験は、A 地点のバイオフィルム懸濁試料 1 mL に、終濃度が 1% (w/v) デンプン、1% (w/v) アルブミンになるように加え、恒温水中で 25°C 、24 時間インキ

ュベートした後、ペプチダーゼ活性を測定した。

結果および考察

江の川水系 2 地点 (A, B) におけるバイオフィルム分泌酵素活性と水質

図 2 は A, B 地点の景観 (i, iii) および水中カメラで撮影した両地点の河床のバイオフィルムの形状 (ii, iv) を示している。山間の水田および畑地を貫流している西条川の比較的急勾配にある A 地点は、清澄な流れの両岸に、ヨシやセイダカアワダチソウ、チガヤおよびクズが繁茂していた。また河川敷の岩場の水たまりには鉄バクテリアに由来する油滴状の紋様が数多く観察された (図 2 i)。バイオフィルムは河床石に密に繁茂し、光合成に由来する酸素の泡の活発な発生を認めることができた (図 2 ii)。一方、戸郷川 B 地点はコンクリート護岸が川の両端に設置され、堰によりほとんど流速がなく、河川水はやや褐色の色調を帯びていた。水中カメラで撮影すると、バイオフィルムは糸状で厚く堆積していた (図 2 iii, iv)。

2 地点の水質検査結果を表 1 に示す。A 地点に比べて B 地点における pH および BOD 値は高く、DO 値は低い。環境庁告示の「生活環境の保全に関する環境基準—河川—」(環境省, 1971) のうち測定した項目について照らし合わせると、A 地点は AA 類型で、B 地点は A 類型に相

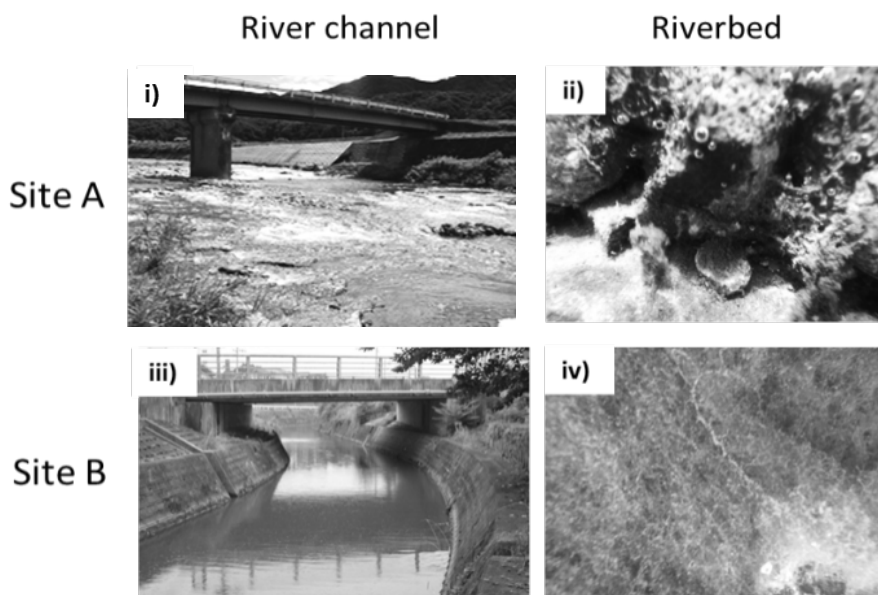


図 2. A, B 地点の河川景観 (i, iii) と河床景観 (ii, iv)。

Fig. 2. Photographs of river channel (i, iii) and riverbed (ii, iv) at Sites A and B. Letters, A and B, are the same as those in Fig.1.

表 1. 江の川水系におけるバイオフィーム採取地点 A (西城川) と B (戸郷川) の水質検査.

Table 1. Analysis of water quality at biofilm sampling sites A (Saijo River) and B (Togo River) along the Gono-Kawa River (n = 2).

	Sampling sites	
	A	B
pH	7.45	7.80
DO (mg L ⁻¹)	9.1	8.1
BOD (mg L ⁻¹)	0.9	1.4
EC (mS m ⁻¹)	6.1	22.0
ORP (mV)	210	202
Turbidity	1.1	5.1
Colorimetry	4.5	42.5
PO ₄ ³⁻ (ppm)	0.018	0.149
NO ₃ ⁻ (ppm)	1.830	0.106

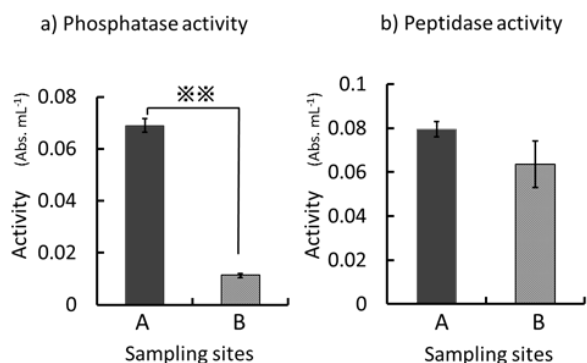


図 3. 2 地点 (A, B) のバイオフィーム懸濁液の酵素活性: a) フォスファターゼ活性, b) ペプチダーゼ活性. 誤差バーは標準偏差を表し, **は $p < 0.01$ で有意差ありを示す.

Fig. 3. Enzyme activities of biofilms from two sites (A and B): a) phosphatase activities, b) peptidase activities. Error bars show standard deviations. The mark (**) indicates a significant difference between A and B at $p < 0.01$.

当していた. また, B 地点の方が A 地点より, EC, 濁度, 色度, リン酸態リン濃度が高く, 硝酸態窒素濃度は著しく低い値を示したことから, 市街地に位置している B 地点の水質は生活排水等による汚染の影響があると考えられる.

2 地点から採取したバイオフィーム内のフォスファターゼおよびペプチダーゼ活性の測定結果を図 3 に示す. B 地点におけるフォスファターゼ活性は, A 地点の約 1/6 の活性値を示し, t-検定による統計解析の結果, $p < 0.01$ となり A 地点に対して有意に低いことが認められた. 一方, ペプチダーゼ活性は, 3 検体の平均値において B 地点がやや低い値となったものの, t-検定による統計解析では A, B 地点間に有意差は認められなかった.

各河川におけるバイオフィーム内酵素の電気泳動解析

バイオフィーム内で営まれるフォスファターゼおよびペプチダーゼ活性は, 同一反応においても分子種の異なる複数の酵素が関わっていることが推定されることから, 電気泳動法すなわちザイモグラフィーによる解析を行った. 江の川水系の 2 地点 (A, B) のバイオフィーム中のフォスファターゼおよびペプチダーゼの活性バンドを検出した (図 4).

図 4a で示すように, A 地点ではゲル上端部位に, 黄~黄褐色に呈色した 3 種類のフォスファターゼバンド (I, II, III) が認められ, そのうちバンド III が薄かった. B 地点は A 地点のバンド I, II と同じ移動度のバンドが認められ, バンド I のほうがやや濃かった. 矢印で示す移動度の小さい薄いバンドも存在していた. また, B 地点は A 地点に比べて, 濃い活性バンドの数が少ないが, 図 3a において B 地点のフォスファターゼ活性値が有意に低かったことを反映しているのかどうかは今後, 検討が必要であると思われる.

ペプチダーゼザイモグラム (図 4b) は, バイオフィームを採取した A, B 地点ともに, 泳動ゼラチンゲル上端にスメアーな白色バンドを呈しており, ペプチダーゼ活性が高いことを表している. また, 上部のスメアーなバンド以外でも活性バンドが多く見出されており, 移動度の小さい領域でも, 矢印で示すように 2 地点とも同じ移動度のバンドが約 3 本存在している. ゲル上端部に強い活性が見出されることから, バイオフィームが分泌する主要なペプチダーゼは高分子量であるか, またはこの泳動条件下の pH では移動しにくい塩基性タンパク質であるという可能性が考えられる. 2 地点ともに活性バンドが多いことから, バイオフィーム微生物叢から多種のペプチダーゼが分泌され, 活発なタンパク質分解が行われていることが推測される. 図 3b で示すようにペプチダーゼ活性の比色定量において A, B 地点の有意差が見いだせなかったと同様に, ザイモグラフィーでも, ペプチダーゼ活性の強さや種類に A と B 地点での特徴的な差が見いだせなかった.

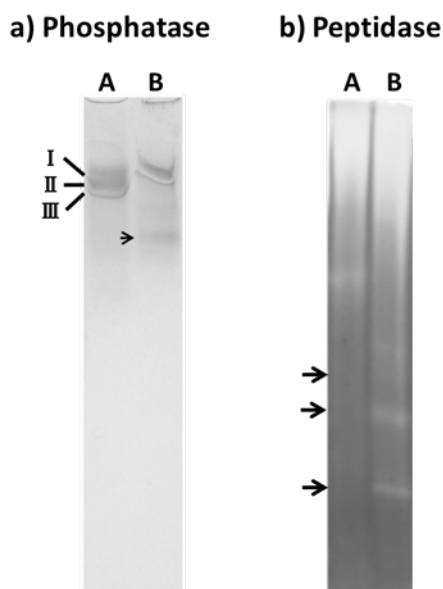


図4. ザイモグラフィーによるバイオフィルム酵素の解析; a) フォスファターゼ, b) ペプチダーゼ.
 レーン A; 西城川 A 地点, レーン B; 戸郷川 B 地点.
 Fig. 4. Zymographic analysis of biofilm enzymes; a) phosphatase and b) peptidase.
 Lane A, Site A on the Saijo River; lane B, Site B on the Togo River.

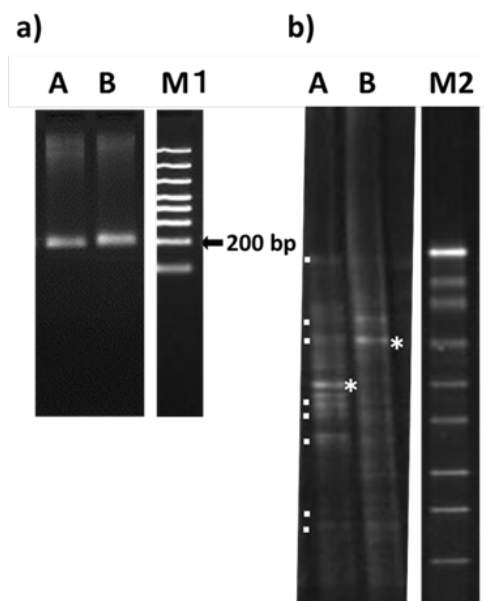


図5. バイオフィルムに由来する細菌群集の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した DGGE 解析: a) PCR 産物のアガロースゲル電気泳動パターン, b) DGGE バンドパターン. *印は各レーンの一番濃いバンドを示す. レーン A: 西城川 A 地点, レーン B: 戸郷川 B 地点. M1: λ /HindIII, M2: DGGE Marker III
 Fig. 5. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of PCR-amplified 16S rRNA gene segments from biofilm bacteria: a) agarose gel electrophoresis of PCR products, b) PCR-DGGE profile. Asterisks indicate the most intense band in each lane. Lane A: Site A on the Saijo River; lane B: Site B on the Togo River; M1: λ /HindIII digest; M2: DGGE Marker III.

バイオフィルム微生物叢の検討—PCR-DGGE 法による細菌叢解析

河床石バイオフィルムは細菌, 藻類, 菌類および原生生物からなる多様で複雑な生活圏を構築している. A, B 地点における光学顕微鏡による微生物種の種類を試みると, 多数の珪藻類の他, 緑藻類, 藍藻類, 原生生物の存在が確かめられたが, A, B 地点における特徴的な差は見いだせなかった (データ未発表). 次に, 光学顕微鏡による分類が不可能な真正細菌種については, PCR-DGGE 法を用いた細菌叢の解析を行った.

B 地点で採取したバイオフィルムから細菌 DNA を抽出後, それらの PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行った (図 5a). 2 地点ともに約 200bp の DNA バンドのみが現れ, 目的 DNA の増幅を確認することができた. 2 地点の PCR 産物を DGGE 後のゲルパターンを図 5b で示す. レーン M2 の DGGE Marker はシャープな 9 本のバンドに分離していることから, PCR 産物は変性剤の濃度勾配下で良好な分離を示し, 細菌群集の変化を捉えることが可能であると判断した. 2 地点ともに多数のシャープなバンドに分離しており, 蛍光強度が最も強いバンド (*印)

の位置が異なることが分かる. そのバンドの蛍光強度でみると, A, B 両地点の主要バンドは同じ程度の濃さである. 共通位置のバンドをみると, 江の川水系の A, B 地点では約 8 本の共通バンド (点で表示) が特定できる. 2 地点のバイオフィルムには多数の細菌種が確認でき, 共通の細菌種も多いが, それぞれに異なる優占種が存在していることが分かる. 優占種が異なることから, 菌叢がバイオフィルムのフォスファターゼ活性の差に関与している可能性が考えられる. B 地点においてフォスファターゼ活性が低値を示した (図 3a) のは, 微生物叢の違いだけでなく, 種々の環境要因が複雑に入り混じって, バイオフィルム酵素活性に影響を及ぼしているものと推察され, 検討が必要である.

バイオフィーム酵素活性に及ぼす環境要因—好気性および嫌気性条件

自然界では、種々の環境要因が複雑に入り混じって、バイオフィームの酵素活性に影響を及ぼしていると考えられる。そこで、バイオフィーム懸濁液に、酸素濃度条件を変えた単純な系を用いて、酵素の産生や活性への影響を検証した。すなわち、清澄な西城川 A 地点のバイオフィーム懸濁試料を、室温で 24 時間、3 種類の処理を行った。無処理で静置したもの、曝気処理を続けたもの、アルゴンガスを送気し嫌気処理したまま静置しておいたものに、それぞれフォスファターゼおよびペプチダーゼの活性を測定した結果を図 6 で示す。フォスファターゼ活性は、曝気、嫌気処理を施した場合では、静置しておいたコントロールに比べ、統計的にも有意な差異 ($p < 0.01$) として活性低下が認められた (図 6a)。そのうち嫌気処理を施したフォスファターゼ活性はコントロールの約 1/2 の低値を示している。一方、ペプチダーゼ活性は、曝気および嫌気処理による活性の変化は有意とはいえない (図 6b)。

河川のバイオフィーム懸濁液は嫌気環境に置かれると、フォスファターゼ活性の抑制がみられるのと同様に、緑膿菌バイオフィームでも、好気条件から嫌気条件に切り換えると、アルカリフォスファターゼ活性は抑制され、再び好気条件に戻すと活性が回復することが報告されている (Karen et al., 1998)。一方、24 時間曝気処理を施し

た場合、ペプチダーゼおよびフォスファターゼの活性値は 24 時間静置しておいた場合と比較して低下している。活性低下の理由としては、曝気処理による物理的な活性抑制、酸化ストレスに対応するために代謝酵素の働きが抑えられた、酸素を好まない細菌類の活動が低下したなどの原因が考えられるが、詳細については今後の課題としていくつもりである。

バイオフィームの酵素活性を有効に引き出すためには、河川環境を溶存酸素の高い状態に保持することが、リン酸産生の代謝に関わる河川生態系物質循環にとって重要であると推定される。

バイオフィーム代謝活性に及ぼす環境要因—リン酸負荷と有機物負荷

表 1 で示すように、水質検査を行った河川リン酸態リン濃度は、戸郷川 B 地点は 0.149 ppm (約 1.53 μM)、西城川 A 地点は 0.018 ppm (約 0.18 μM) であり、B 地点は A 地点より 8 倍もリン酸濃度が高いことが示された。B 地点のバイオフィーム懸濁液のフォスファターゼ活性が低値を示した要因が水溶液中のリン酸態リン濃度に起因している可能性を考えて、リン酸負荷による河床石バイオフィームのフォスファターゼ活性への影響を検討した。

図 7 の結果は、1 μM リン酸負荷では活性抑制は認められず、10 μM リン酸負荷で無処理のコントロールにおける活性値の約 3/4 の値を示し、高濃度の 100 μM 及び 1,000

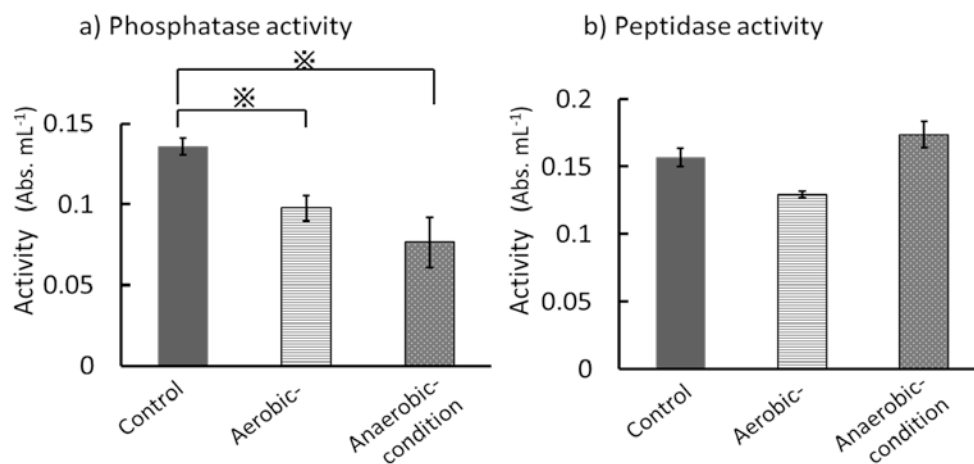


図 6. 酸素処理によるバイオフィーム酵素活性への影響。

西城川 A 地点のバイオフィーム懸濁液に曝気処理、嫌気処理をして、a) フォスファターゼ活性と b) ペプチダーゼ活性を測定。誤差バーは標準偏差を表し、※は $p < 0.01$ で有意差ありを示す。

Fig. 6. Effect of aerobic conditions on biofilm enzyme activities. a) Phosphatase and b) peptidase activities were examined after biofilm suspension collected at Site A in the Saijo River was subjected to no treatment as a control, aerobic condition by bubbling with air and anaerobic conditions filled with argon, respectively. Error bars show standard deviations. The mark (※) indicates a significant difference at $p < 0.01$.

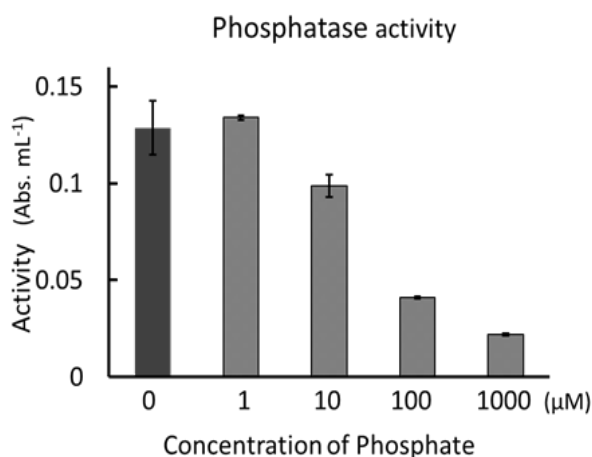


図7. リン酸負荷によるバイオフィルム懸濁液のフォスファターゼ活性への影響.

A 地点のバイオフィルム懸濁液に 1~1000 μM リン酸を負荷し、フォスファターゼ活性を測定.

Fig. 7. Effect of phosphate on biofilm phosphatase activity.

Phosphatase activities of biofilm suspension collected at Site A were measured in the presence of various concentration of phosphate (from 1 to 1000 μM).

μM リン酸負荷で、それぞれコントロール値の約 3/10、約 1/10 の値を示した.

リン酸負荷や高濃度のリン酸における微生物のフォスファターゼの抑制は、ホーン・ゴールドマン (手塚訳, 1911) によると、プランクトン性藻類は、リン酸が少なく大分子のリン酸化された化合物が比較的多い環境において、アルカリフォスファターゼの生産を行い、リン欠乏に対する顕著な適応をしている。また、リン過剰に対しては増殖に必要な量よりも多くのリン酸が取り込まれ、余分な分は細胞内に貯蔵されることから、新しいアルカリフォスファターゼの合成は培地にリン酸を加えることによって抑制されると報告している。また、緑膿菌バイオフィルムでも同様に、リン酸欠乏状態に晒した条件下では、アルカリフォスファターゼの分泌が検出され、逆に高濃度のリン酸が存在する状態では分泌が見られないという報告がある (Karen et al., 1998)。本研究においても同様なリン酸過剰濃度に負荷した場合、バイオフィルムのフォスファターゼ活性が抑制されている。したがって、フォスファターゼは環境でのリン欠乏に対する適応を行う結果として、鋭敏な反応を示していると考えられる。戸郷川 B 地点の河川水のリン酸態リン濃度 (約 1.53 μM) は低いにもかかわらず、西城川 A 地点に比べて川

床石バイオフィルムのフォスファターゼ活性が著しく抑制されている (図 3a)。現場の河川環境においては、フォスファターゼはリン酸濃度に敏感に反応しているとも推測される。今後は現場での調査地点を増やして、フォスファターゼ活性とリン酸濃度との関係を追究していく必要がある。

リン酸負荷実験と同様に、A 地点のバイオフィルム懸濁液に終濃度が 0.1% (w/v) ウシ血清アルブミンの負荷を行い、ペプチダーゼ活性を測定したところ、未添加のコントロール、0.1% (w/v) デンプン負荷を行った場合と比較して、活性には有意な差が認められなかった (図 8)。

以上のように、バイオフィルム産生のフォスファターゼの活性測定ならびに、ザイモグラフィーによる活性バンドの解析結果は、酸素供給状態やリン酸濃度などの河川の水質変化を鋭敏に捉えていると推測される。バイオフィルムの酵素活性、とくにフォスファターゼは大雨などの一時的な河川の変化ではなく、その時期の平均的な河川の水質変化を捉える指標として適していると考えられる。

今後、河川の多地点において、バイオフィルム産生のフォスファターゼに注目した各種酵素化学的解析や細菌種の同定を行い、バイオフィルム産生フォスファターゼ

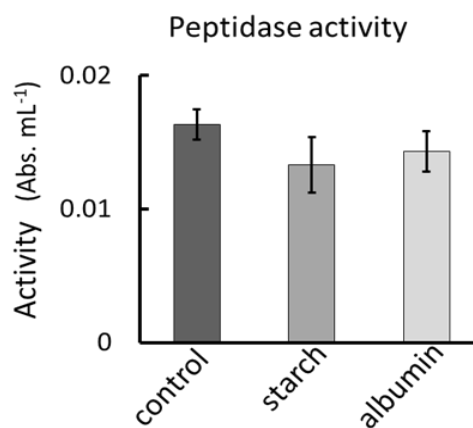


図8. 有機物負荷によるバイオフィルム懸濁液のペプチダーゼ活性への影響.

A 地点のバイオフィルム懸濁液に、それぞれ 1% (w/v) デンプン、1% (w/v) アルブミンを負荷し、ペプチダーゼ活性を測定.

Fig. 8. Effects of organic reagents on biofilm peptidase activities.

Peptidase activities of biofilm suspension collected at Site A measured in the presence of organic substrates (1% (w/v) starch or 1% (w/v) albumin), respectively.

が河川の環境変化を捉える指標として、また河川の自浄能を予測できる指標として利用可能であるかどうかを検証していくことが必要である。バイオフィーム産生のフォスファターゼ活性を抑制する要因を解明することは、河川生態系の物質循環に関わる代謝活性を高め、河川の自浄作用を促し、河川生態系の保全や再生への基礎的情報提供に繋がるものと期待される。

謝 辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP25550095 の助成を受けた成果です。関係各位に深く感謝します。

参考文献

- Allan, V. J. M., M. E. Callow, L. E. Macaskie and M. Paterson-Beedle (2002): Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology*, 148:277-288.
- Araya, R., K. Tani, T. Takagi, N. Yamaguchi and M. Nasu (2003): Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. 43: 111-119.
- Banno, Y., K. Yano and Y. Nozawa (1983): Purification and characterization of a secreted protease from *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*, 132:563-568.
- Battin, T.J. (1997): Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilm. *The Science of the Total Environment*. 198: 51-60.
- Cardinale, B. J., M. A. Palamer, C. M. Swan, S. Brooks and N. Leroy Poff (2002): The influence of substrate heterogeneity on biofilm metabolism in a stream ecosystem. *Ecology*, 83(2):412-422.
- Heussen, C. and E. B. Dowdle (1980): Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102:196-202.
- ホーン A. J.・ゴールドマン C. R. (1911) : 陸水学. リンの取りこみとホスファターゼの誘導, 手塚泰彦 (訳), 176-178. 京都大学学術出版会, 京都.
- 環境省 (1971) : 生活環境の保全に関する環境基準—河川—, 昭和 46 年 12 月 28 日環境庁告示第 59 号
- Kaplow, Leonard S. (1968): Leukocyte alkaline phosphatase. *Cytochemistry Applications and Methods*, 155:911-947.
- Karen D., Xu, P. S. Stewart, Fuhu Xia, Ching-Tsan Huang and G. A. Mcfeters (1998): Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and Environmental Microbiology*: 4035-4039.
- Levy, M. R., E. E. Sisskin and C. L. McConkey (1976): A protease that increases during a period of enzymatic and metabolic adjustment in *Tetrahymena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 172: 637-677.
- Muyzer, G., E. C. de Waal and A. G. Uitterlinden (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Nakamura, K (2001): A method for phosphatase assay in tideland soils. *Journal of Environmental Chemistry*, 11(4):827-834.
- 中村健一 (2011) : 河床石バイオフィーム構成微生物の代謝活性測定に基づく河川環境診断法の開発. 平成 22 年度 河川整備基金助成事業成果報告書, 河川財団.
- Nakao, Y., K. Naito, E. Masuyama and K. Nakamura (2011): Protease activities in tideland sediments. *Journal of Environmental Chemistry*, 21:129-134.
- 奥西将之 (2005) : バイオフィーム入門. 環境中のバイオフィーム, 日本微生物生態学会バイオフィーム研究部会 (編), 93-112. 日科技連出版社, 東京.
- Romani AM, Sabater S (2001): Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream. *Ecology*, 82: 3232-3245.