

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書（環境創造部門）

研究期間（ 3年目/ 3年間）

|                             |  |                         |
|-----------------------------|--|-------------------------|
| <p>研究者<br/>又は<br/>研究代表者</p> | <p>氏名</p>  | <p>ふくま みき<br/>福間 三喜</p> |
| <p>研究課題名</p>                | <p>富栄養化湖沼における自然植生及び微生物ニッチを活性化させた環境改善</p>   |                         |
| <p>研究結果</p>                 | <p>研究結果の具体的なデータについては、添付資料に示した。それを以下に要約する。</p> <p>1. 目的と方法</p> <p>自然生態系を活用した閉鎖性水域の水質浄化を目指し、湖山池を実験対象として研究した。その手法は、水質浄化に湖岸の植生帯等の生態系を活用し、湖内環境微生物との相互作用の強化である。そのためにヨシ植生帯や微生物付着担体を組み合わせたモデル水路を作り、窒素、リン、COD等の水質汚濁物質の浄化性能を追跡しつつ、その浄化特性の解明のため水路内土壌の微生物集団の菌叢解析を行い、最適な浄化システムの構築をめざした。</p> <p>実験は鳥取県湖山池水質浄化実験水路にヨシと担体を組み合わせた4本の水路において継続して水質浄化の試験研究を行い、その浄化部分の菌叢解析を行った。4本の水路は以下の通りである。</p> <p>水路1：多孔性担体を充填し、その上に底泥を載せた開水路にヨシを植栽した水路、担体は微生物が付着しやすい廃棄ガラスを再利用した多孔性担体を使用した。湖水は担体部分の流れ、そこにヨシ根圏が侵入し発達している。</p> <p>水路2：担体なしで底泥のみ充填した開水路にヨシを植栽した水路で湖水は植栽上面を主に流れる。</p> <p>水路3：多孔性ガラス担体を充填した水路である。</p> <p>水路4：ヨシ植栽土壌の上に多孔性ガラス担体を充填した開水路で、湖水は担体部分の流れ、そこにヨシ根圏が発達している。</p> <div data-bbox="443 1429 1353 1848" style="text-align: center;"> <p>図1 実験水路の概要</p> </div> <p>研究方法は、まず、定期的に水質浄化性能を把握するための水質分析を行い、次に春・夏・秋・冬の各季節に各水路の入り口付近及び出口付近から、水路内土壌や付着物を採取し、そこから菌体DNAを抽出し、窒素及びリンの水質浄化に関与する特定菌体の存在をPCRにより調べる作業を行って、その存在量を把握した。さらに、同じDNAを用いてクローニング法により各水路内のより広範な菌叢の</p> |                         |

状態を把握した。

## 2. 全窒素・全リン・CODの除去率・除去速度

全窒素の除去性能は、水路1と水路4が年間を通して高く、環境基準値以下に浄化できた。水路2はヨシが生長する夏頃に高くなった。水路3の除去性能は水路1と4に比べると低い、年間を通して安定していた。水路1と水路4で全窒素の除去が良いのは、硝化・脱窒がほぼ完全に行われていたためであった。全リンの除去性能については、全水路において除去率は秋から冬に高い値を示したが夏に低下した。除去速度は全水路においてあまり高くはなかった。CODでは、水路4、水路1、水路3の順で高く、その除去率は春から夏にかけて減少し、秋から冬にかけて増加した。また、除去速度も除去率と同様の变化であった。年間を通して除去性能が最も高いのは水路4であった。このことより、ヨシと担体を組み合わせ且つ水路内に好気部分が多い方が、ヨシ根圏微生物と担体付着微生物の活性により除去性能が向上すると考えられる。また窒素、リン、CODの季節間の除去性能はすべての水路において秋に最も良くなった。

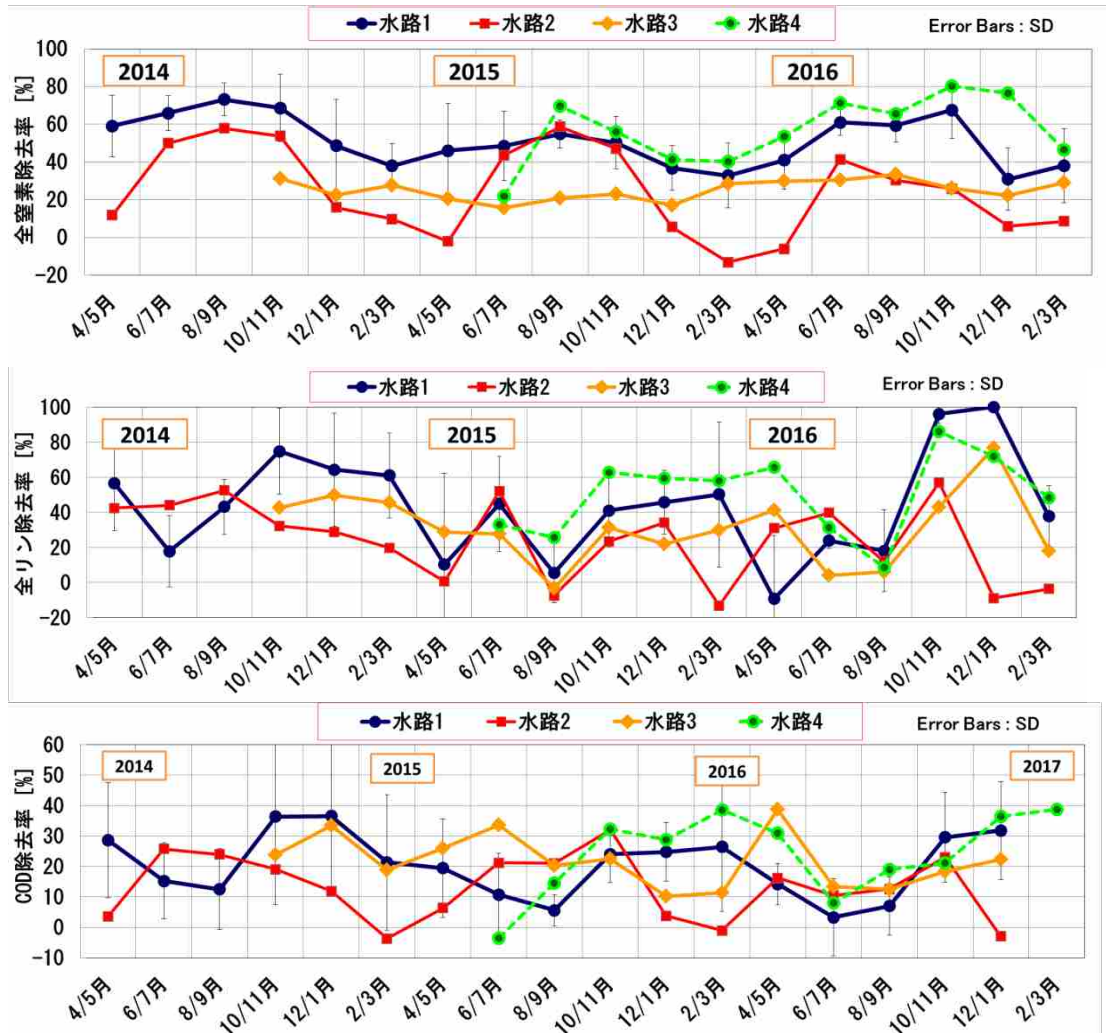


図2 過去3年間の全窒素、全リン及びCODの各除去率の推移

## 3. 各水路の水質浄化菌体量および菌叢解析

水路内の水質浄化菌体検出の結果、硝化古細菌と脱窒菌は年間を通して多く検出されたが、特に秋に最も多くなる傾向があった。硝化細菌は、春に多かった。アナモックス細菌とリン蓄積細菌はわずかに検出された。アナモックス細菌は特に水路3において年間を通して検出された。また、硝化古細菌と硝化細菌は競合して生息していることが分かった。水質浄化菌体の存在量について水路間で大きな差異は見いだせなかった。



図3 水路4における水質浄化細菌菌体量の季節間推移

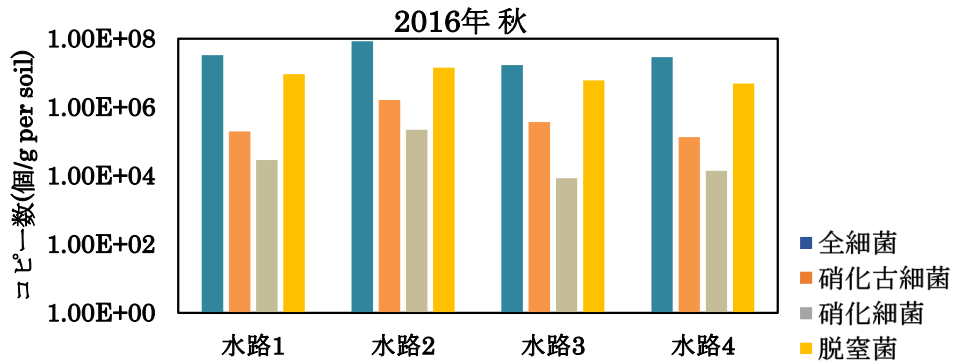


図4 秋における各水質浄化細菌の存在量

16S rRNAによる菌叢解析から、季節間の違いは小さかったが、特に秋には*Alphaproteobacteria*綱から*Gammaproteobacteria*綱まで、また*Bacteroidetes*門など多くの分類群に万遍なく存在し菌叢の豊富さを示した。水路間には明らかな菌叢の違いがあることを確認した。水路1では、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、水路2では、*Bacteroidetes*門、水路3では、*Gammaproteobacteria*綱、水路4では、*Alphaproteobacteria*綱、*Betaproteobacteria*綱の割合が高いことがわかった。また、これら割合の高い門・綱の特徴として、*Alphaproteobacteria*綱は、好気性の細菌が多く、*Betaproteobacteria*綱では、従属栄養細菌や独立栄養細菌が多く、*Gammaproteobacteria*綱では、汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Deltaproteobacteria*綱では、嫌気性で汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Bacteroidetes*門では、淡水などの一般的な環境の細菌が多いことが文献からわかった。また、その他の特徴ある門・綱として、各水路において栄養塩除去に関与している*Chloroflexi*門や、赤潮などの珪藻と関係のある*Bacillariophyceae*門、水路3と水路4では亜硝酸酸化細菌と関係する*Nitrospirae*門などが多く存在することがわかった。

好気性菌、嫌気性菌の分類でみると、水路1は他の水路と比較し、嫌気性菌が優勢であり、脱窒菌が多く見られた。水路3は、好気性菌・嫌気性菌が半々であり、有機物分解菌が多く見られた。水路4は他の水路と比較し、好気性菌が多く好気的環境であることが見えた。しかも水路4では嫌気性菌も多くみられ、好気性・嫌気性の菌叢が豊富であり、それらの環境微生物がそれらの生物学的地位（ニッチ）を保ちながら共存共栄していると考えられ、その結果として水質浄化の促進につながったと考える。

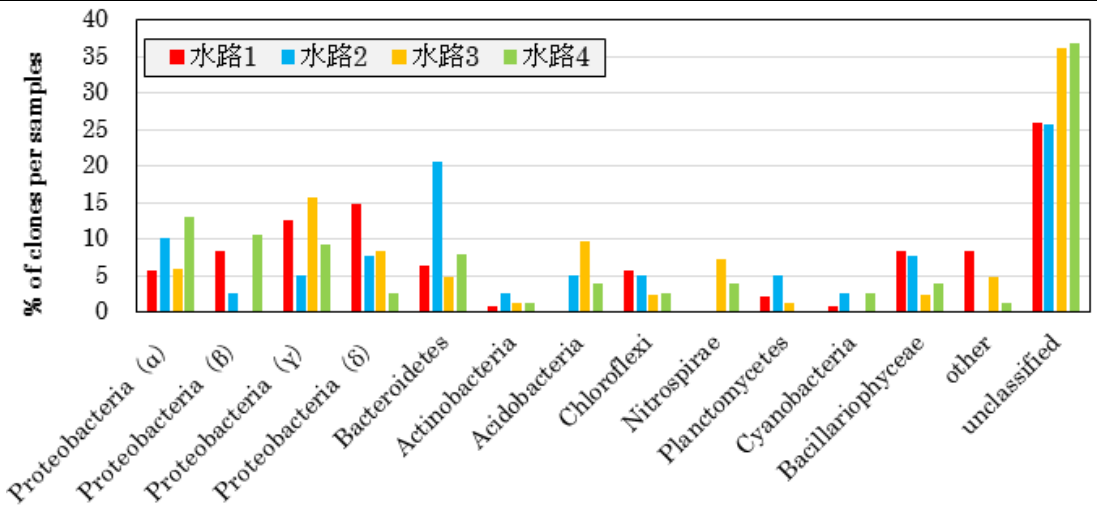


図5 各水路間における主要な門・綱の割合の比較

表1 各水路の水質浄化にかかわる細菌の一覧

| 水路1                    |                       |
|------------------------|-----------------------|
| Acetobacteraceae (科)   | 従属栄養細菌 酢酸菌            |
| Rhizobiales (目)        | 根粒菌                   |
| Paracoccus (属)         | 脱窒菌                   |
| Rhodobacter (属)        | 好気性光合成細菌              |
| Thiobacillus (属)       | 硫黄細菌 窒素固定細菌           |
| Rhodocyclaceae (科)     | N <sub>2</sub> O 還元細菌 |
| Pseudomonas (属)        | 脱窒菌                   |
| Chromatiales (科)       | 紅色硫黄細菌                |
| Gammaproteobacteria(綱) | 鉄酸化細菌                 |
| Deltaproteobacteria(綱) | 嫌気性芳香族生分解能菌           |
| Anaeromyxobacter (科)   | 硫酸還元細菌                |
| Desulfonema (属)        |                       |
| Desulfopila (属)        |                       |
| Desulfobacca (属)       |                       |
| Deltaproteobacteria(綱) |                       |
| Deltaproteobacteria(綱) |                       |
| Deltaproteobacteria(綱) | 鉄(III) - 還元細菌         |
| Deltaproteobacteria(綱) | 嫌気性トルエン分解菌            |
| Bacteroides sp. (属)    | 還元的脱塩素化細菌             |
| Cyanobacteria(門)       | 嫌気性芳香族資化性細菌           |

| 水路2                    |           |
|------------------------|-----------|
| Rhodobacter (属)        | 好気性光合成細菌  |
| Burkholderia (属)       | 脱窒菌       |
| Desulfobulbaceae (科)   | 硫酸還元菌     |
| Deltaproteobacteria(綱) | 硫酸還元菌     |
| Prolixibacter (属)      | 硝酸還元菌     |
| Rhodopirellula (属)     | 鉄酸化細菌     |
| unclassified           | 硫酸還元菌     |
| unclassified           | 海洋性硫黄生成細菌 |

赤色：好気性菌      青色：嫌気性菌

| 水路3                        |            |
|----------------------------|------------|
| Defluviimonas sp. (属)      | 好気性光合成細菌   |
| Sphingomonadaceae (科)      | 海洋性炭化水素分解菌 |
| Gammaproteobacteria(綱)     | 硫酸還元菌      |
| Pseudomonas (属)            | 脱窒菌        |
| Methylosarcina fibrata (種) | メタン資化性菌    |
| Deltaproteobacteria(綱)     | 油分解菌       |
| Deltaproteobacteria(綱)     | 油分解菌       |
| Flavobacterium (属)         | 脱窒菌        |
| Nitrospira (属)             | 亜硝酸酸化細菌    |

| 水路4                   |                  |
|-----------------------|------------------|
| Rhodospirillaceae (科) | 好気性光合成細菌         |
| Defluviimonas (属)     |                  |
| Rhodobacter sp. (属)   | 根粒菌              |
| Devosia (属)           |                  |
| Comamonadaceae (科)    | 脱窒菌              |
| Rhodoferrax (属)       | 紅色非硫黄細菌          |
| Azoarcus (属)          | 硝酸還元菌            |
| Leptothrix (属)        | 鉄酸化細菌(独立栄養で従属栄養) |
| Thiobacillus (属)      | 硫黄細菌 窒素固定細菌      |
| Oceanococcus (属)      | 紅色硫黄細菌           |
| Nitrospira sp. (属)    | 亜硝酸酸化細菌          |
| unclassified          | 油污染海中土壌の分解細菌     |

湖内で、フルボ酸様の親水性難分解性有機物 (DOM) の蓄積が顕著であった。このDOMはCOD成分に反映され、その除去が困難となる。DOMの発生源として植物プランクトンが増殖し、それが死滅した時DOMが溶出し、同時に蛋白質を多く含む有機性窒素類も溶出すると考えられるので、これら微生物の栄養源となる窒素やリンの今後継続した除去が必要と思われる。

|                       |  |                      |   |
|-----------------------|--|----------------------|---|
| <p><b>研究成果</b></p>    | <p>1. 担体とヨシを組み合わせた水路1と水路4は、高い水質浄化性能を示し、さらに水路4は水路1よりもCODの除去に優れていた。水路3は水路1に次ぐ高いCOD除去性能を示すことからヨシ生育帯がないところでの浄化装置として有効であった。</p> <p>2. 各水路における春、夏、秋、冬の水質浄化に関与する菌体量が把握できた。各水路共に、硝化と脱窒及びリン蓄積に関与する菌叢が確認でき、それらの存在量は秋期が最も豊富であった。一方、夏期は他の季節に比べて少なかった。また冬の水路からは、硝化古細菌と脱窒菌が豊富に存在していた。このことから、冬期においても窒素の硝化・脱窒が起こっていると推察された。また、実際に、水質分析からも窒素除去の現象が起きており、その裏付けが取れたと思われる。また各水路とも窒素除去細菌は豊富に検出されたが、水路1と水路4が明らかに他の水路よりも性能が良かったことと考え合わせると、菌叢集団の能力を発揮させるための菌体にとっての良好な環境状態(ニッチ)を創出するにはヨシと担体の組み合わせが極めて有効であることが分かった。水路3は硝化、脱窒菌さらにはアナモックス菌の付着が多くヨシがないところでの窒素除去方法として期待が持てる結果となった。また担体充填された水路からは有機物分解菌の存在が多く観察されたことから担体はCOD除去に効果があると立証された。</p> <p>3. 水路4は他の水路と比較し、好気性菌が多く好気的環境であることが見えた。しかも嫌気性菌も多くみられ、好気性・嫌気性のバランスが良くかつ菌叢の種類も豊富であったため、水質浄化の促進につながったと考える。すなわち水路4では、湖内の好気環境と嫌気環境すべてを具現しており、水路内でこれらの環境微生物がそれらのニッチを保ちながら有効に共存共栄していると推察できた。</p> <p>4. 実験で使用した水路の適用を考えると、担体とヨシを組み合わせた水路4は、高い水質浄化性能を示し、ヨシ生育帯での適用が期待できる。また水路3は水路4ほどではないが水質浄化装置として期待ができ、ヨシが生育していない碎石護岸に設置可能である。それらの水路の設置モデルは以下のようである。</p> <div data-bbox="454 1097 1372 1377" data-label="Image"> </div> <p>図6 湖山池湖岸のヨシ植生帯と担体を組み合わせた水質浄化護岸および担体だけの設置例</p> |                      |   |
| <p><b>次年度研究計画</b></p> | <p>[次年度の研究計画について簡潔に記すこと]</p>   |                      |   |
| <p><b>報告責任者</b></p>   | <table border="1"> <tr> <td data-bbox="354 1617 526 1738"> <p><b>所属・職氏名</b></p> </td> <td data-bbox="526 1617 1474 1738"> <p>鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保<br/>           電話番号 0857-31-5494<br/>           電子メール ken-jyosei@ml.adm.tottori-u.ac.jp</p> </td> </tr> </table>   | <p><b>所属・職氏名</b></p> | <p>鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保<br/>           電話番号 0857-31-5494<br/>           電子メール ken-jyosei@ml.adm.tottori-u.ac.jp</p> |
| <p><b>所属・職氏名</b></p>  | <p>鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保<br/>           電話番号 0857-31-5494<br/>           電子メール ken-jyosei@ml.adm.tottori-u.ac.jp</p>  |                      |   |

- 注1) 表題には、環境部門、地域部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
- 2) 「研究期間 ( 年目/ 年間 ) 」及び「次年度研究計画」は、環境部門のみ記載すること。
- 3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。
- 4) 研究実績のサマリーを併せて提出すること。

## 富栄養化湖沼における自然植生及び微生物ニッチを活性化させた環境改善

鳥取大学大学院工学研究科 化学・生物応用工学専攻 福間三喜

### 1. はじめに

自然生態系を活用した閉鎖性水域の水質浄化を目指し、湖山池を実験対象として研究した。その手法は、水質浄化に湖岸の植生帯等の生態系を活用し、湖内環境微生物との相互作用の強化である。そのためにヨシ植生帯や微生物付着担体を組み合わせたモデル水路を作り、窒素、リン、COD等の水質汚濁物質の浄化性能を追跡しつつ、その浄化性能の解明のために水路内土壌の微生物集団の菌叢解析を行い、最適な浄化システムの構築をめざした。

### 2. 実験方法

作る実験水路はヨシ植栽や担体充填などの組み合わせによる合計4本である(水路1~4と命名)。

水路1: 多孔性担体を充填し、その上に底泥を載せた開水路にヨシを植栽した水路、担体は微生物が付着しやすい廃棄ガラスを再利用した多孔性担体を使用した

水路2: 担体なしで底泥のみ充填した開水路にヨシを植栽した水路で湖水は植栽上面を主に流れる。

水路3: 多孔性ガラス担体を充填した水路である。

水路4: ヨシ植栽土壌の上に多孔性ガラス担体を充填した開水路である。

春夏秋冬の各季節に水路からDNAを抽出し、硝化細菌、硝化古細菌、脱窒菌、アナモックス細菌およびリン蓄積細菌の検出を行い、各水路内の水質浄化に関与する菌の存在量の比較を行った。さらに各水路の微生物生息状況をより詳しく把握するために土壌や根圏、担体付着物に存在する菌叢の解析を16S rRNAのクローニング法により行った。

### 3. 実験結果と考察

#### a) 水質浄化性能

全窒素の除去性能は、水路1と水路4が年間を通して高く、環境基準値以下に浄化できた。水路2はヨシが生長する夏頃に高くなった。水路3は水路1と4に比べると低い、年間を通して安定していた。水路1と水路4で全窒素の除去が良いのは、硝化・脱窒がほぼ完全に行われていたためであった。全リンの除去性能では、全水路において除去率は秋から冬に高い値を示したが夏に低下した。CODの除去率では、水路4、水路1、水路3の順で高く、春から夏にかけて減少し、秋から冬にかけて増加した。また、COD除去速度も除去率と同様の变化であった。年間を通して除去性能が最も高いのは水路4であった。このことより、ヨシと担体を組み合わせ且つ水路内に好気部分が多い方が、ヨシの生育および根圏微生物の活性により除去性能が向上すると考えられる。また窒素、リン、CODの季節間の除去性能はすべての水路において秋に最も良くなった。

湖山池内部生産によって難分解性の水溶性有機物(DOM)の蓄積が顕著であった。これは植物プランクトンの増殖によってもたらされたものと思われ、それが死滅し溶出し、同時に蛋白質を多く含む有機性窒素類も溶出すると考えられた。そのためこれら微生物の栄養源となる窒素やリンの今後継続した除去が必要と思われる。

#### b) 各水路の水質浄化菌体量および菌叢解析

水路内の水質浄化菌体検出の結果、硝化古細菌と脱窒菌は年間を通して多く検出されたが、特に秋に多くなる傾向があった。硝化細菌は、春に多かった。アナモックス細菌とリン蓄積細菌はわずかに検出された。アナモックス細菌は特に水路3において年間を通して検出された。また、硝化古細菌と硝化細菌は競合して生息していることが分かった。

16S rRNAによる菌叢解析から、季節間の違いは小さかったが、特に秋には *Alphaproteobacteria* 綱から *Gammaproteobacteria* 綱まで、また *Bacteroidetes* 門など多くの分類群に万遍なく存在し菌叢の豊富さを示した。水路間には明らかな菌叢の違いがあることを確認した。水路1では、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、

水路2では、*Bacteroidetes*、水路3では、*Gammaproteobacteria* 綱、水路4では、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱の割合が高いことがわかった。また、これら割合の高い綱の特徴として、*Alphaproteobacteria* 綱は、好気性の細菌が多く、*Betaproteobacteria* 綱では、従属栄養細菌や独立栄養細菌が多く、*Gammaproteobacteria* 綱では、汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Deltaproteobacteria* 綱では、嫌気性で汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Bacteroidetes* 門では、淡水などの一般的な環境の細菌が多いことが文献からわかった。また、その他の特徴ある門・綱として、各水路において栄養塩除去に関与している *Chloroflexi* 門や、赤潮などの珪藻と関係のある *Bacillariophyceae* 門、水路3と水路4では亜硝酸酸化細菌と関係する *Nitrospirae* 門などが多く存在することがわかった。

好気性菌、嫌気性菌の分類でみると、水路1は他の水路と比較し、嫌気性菌が優勢であり、脱窒菌が多く見られた。水路3は、好気性菌・嫌気性菌が半々であり、有機物分解菌が多く見られた。水路4は他の水路と比較し、好気性菌が多く好气的環境であることが見えた。しかも嫌気性菌も多くみられ、かつ好気性・嫌気性の菌叢が豊富であったため、水質浄化の促進につながったと考える。

#### 4. 研究成果を踏まえて提案される湖岸植栽帯ならびに護岸砕石帯

ヨシ植栽と担体を組み合わせた浄化システムは水質浄化を良好に行うことが示された。一方で、担体のみのシステムではやや劣るものの COD 成分の除去には有効性が発揮できた。そこでこれら浄化システムは湖岸の適材適所に設置すれば効果が発揮できるものと思われる。湖山池の場合ヨシ植生が広範囲に存在するので、そこには水路4の形が考えられる。一方、ヨシ植生帯がない湖岸では護岸工事を改良し、水路3の形が考えられる。

平成 28 年度 鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書 添付資料  
3 年間の研究結果および成果(実験データとその説明)

鳥取大学・大学院工学研究科・化学・生物応用工学専攻・助教 福間三喜  
電話番号 0857-31-5274  
電子メール [fukuma@bio.tottori-u.ac.jp](mailto:fukuma@bio.tottori-u.ac.jp)

テーマ: 富栄養化湖沼における自然植生及び微生物ニッチを活性化させた環境改善

目次

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| 1. 緒言                            | -1-  |
| 2. 実験方法                          | -3-  |
| 3. 測定項目と方法                       | -6-  |
| 4. 各水路の水質浄化性能                    | -9-  |
| (1) 過去 3 年間の流入した水質汚濁物質濃度の経過      | -9-  |
| (2) DO の消費から見える水路の菌体活性           | -9-  |
| (3) 過去 3 年間の窒素除去性能               | -10- |
| (4) 過去 3 年間の全リン除去性能              | -12- |
| (5) 過去 3 年間の COD 除去性能            | -14- |
| (6) 過去 3 年間の年平均値における除去性能の検討      | -15- |
| 5. 水質浄化に関与する水路土壌内細菌の検出結果         | -16- |
| (1) PCR による菌体の検出結果               | -16- |
| (2) PCR 結果に基づく水質浄化菌体の季節間及び水路間の比較 | -17- |
| (3) Real time PCR による水質浄化細菌量の結果  | -19- |
| (4) 16S rRNA による水路内の菌叢解析結果       | -21- |
| 6. 三次元励起蛍光スペクトルの測定結果             | -26- |
| 7. 研究成果を踏まえて提案される湖岸植栽帯ならびに護岸碎石帯  | -28- |
| 8. 結言                            | -29- |

---

1. 緒言

湖山池をはじめとする閉鎖水域は、本来プランクトンや魚、水生植物などによる食物連鎖や、微生物による硝化・脱窒などの物質循環が行われ、豊かな生態系を保っている。しかし、人間の生活排水などにより大量の有機物や窒素、リンなどの栄養塩が流入すると、植物プランクトンや水生植物は異常増殖し、富栄養化が起こる。また、それらが枯死し底泥として沈降し堆積したのから栄養塩が分解溶出されることで、プランクトンなどの増殖を引き起こし、内部生産と内部循環を繰り返して水質悪化が進行する。

閉鎖性水域の富栄養化した水質汚濁成分は、湖水表層の好気性領域から、湖底の無酸素領域までの間で、好気性菌や嫌気性菌により変換されており、特に湖底付近の貧酸素領域において水質浄化に関与する脱窒菌、アナモックス細菌、リン蓄積細菌などがその役目を果たしていると考えられている。また、湖底に堆積したアンモニア、硝酸、リン酸などの栄養塩は、水生植物の成長の際に吸収される。したがって、湖内に存在する幅広い細菌群を効果的に住まわせそれらの作用を効率よく引き出すことや水生植物を有効に活用することによって水質浄化することが理にかなっている。



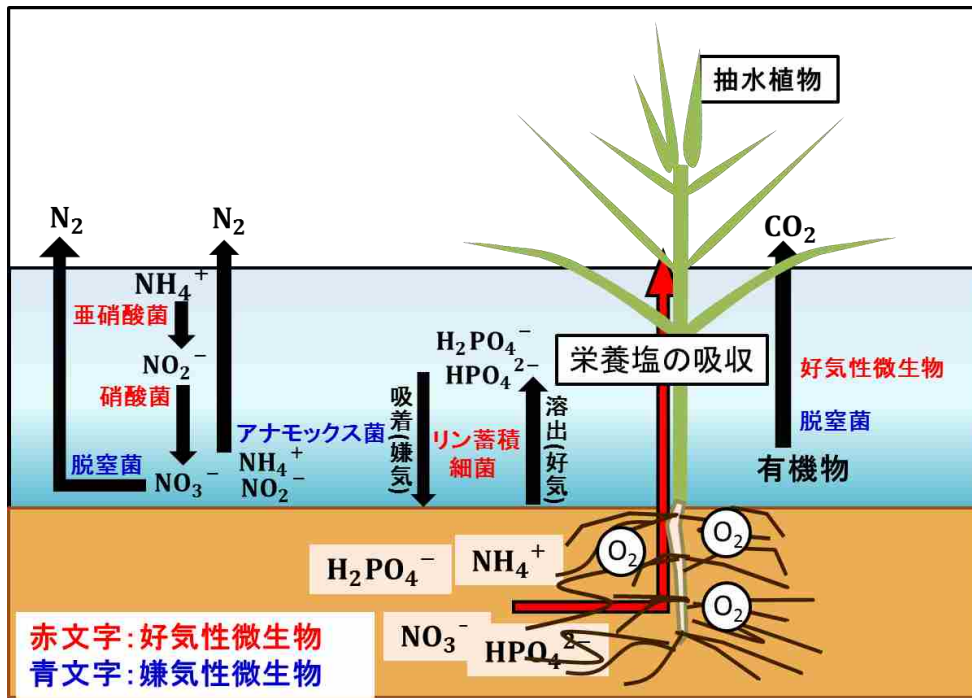


図 1-1 湖内水中及び土壌中の環境微生物と水生植物による汚濁物質の分解・吸収による物質循環

湖山池ではアオコなどの植物プランクトンの異常発生を抑え、ヒシなどの水生植物の異常繁茂を抑えるために、湖山川水門の開閉調整を行いながら海水を導入することで、高塩分による水環境の改善策がとられた。これにより、海水導入以前まで発生していたアオコやヒシがなくなったが、水環境の激変による生態系への影響が多く見られ、水質改善までは至っていないのが現状である。湖山池の全窒素、全リンおよび COD 濃度の年平均値の経年変化をみると、明らかに高塩分化した 2012 年度に全窒素と COD が高濃度化し、全リンは遅れてくる年の 2013 年度に高濃度化していることがわかり、塩分濃度の影響を顕著に受けていた。しかし、2014 年度以降は各濃度とも漸減する傾向にあり、淡水時の濃度と同水準に戻りつつある(図 1-2 参照)。

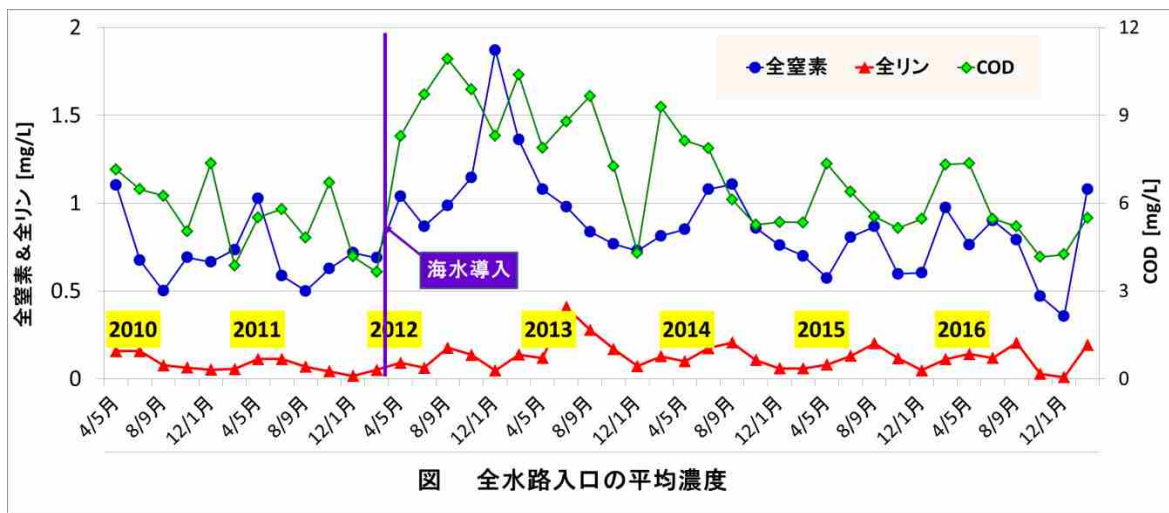


図 1-2 湖山池の全窒素、全リンおよび COD 濃度の 2 ヶ月平均値の経年変化(過去 7 年間の水路実験データから)

本研究では、富栄養化した湖沼の水質浄化さらには環境改善を図るため、富栄養化している湖山池を実験対象として、周囲の生態系に配慮した水質浄化法に着目して、2009 年度から継続して研究を行ってきた。その手法は、自然生態系の活性化とさまざまな水質浄化微生物の活性化の両方を担

うものとして、湖岸に生育しているヨシと、微生物の保持を目的とした担体を組み合わせる方法である。ヨシと担体を組み合わせた場合、根と担体が絡み合い、嫌気や好気など様々な環境が作られ、多くの微生物が集約して高密度に増殖する。その除去機構は微生物分解によって生じた無機態窒素やリン酸態リンのヨシ生育時の吸収による除去ができ、ヨシ根圏を通水することによって根圏微生物の活性化が促進され、担体においては好気性環境、嫌気性環境またその中間領域を作り出すことができ、多くの種類の微生物がその生存環境を維持しながら生育が可能となる（生態的地位：ニッチの創出）。このようにヨシと水質浄化微生物の相乗効果により水質浄化が大きく促進される。このような環境に配慮した水質浄化法に着目し、湖山池沿岸に担体とヨシを組み合わせた実験水路を作り、その浄化性能と性能の裏付けとなる菌叢解析についての研究を行ってきた。

## 2. 実験方法

湖山池沿岸に位置する鳥取県水質浄化試験施設内に開水路（全長 7.6m、高さ 0.6m、幅 0.5m、）を 4 本設置した。それぞれ水路 1、水路 2、水路 3、水路 4 と名付け、各水路で実験を行った。水路 3 に関しては 2014 年 10 月より運転を開始した。また水路 4 に関しては 2015 年 4 月より運転を開始した。通水方法は、湖水をポンプアップして水路の一方の端から流入させ水路内を通過させる。通水量は 3~6 L/min である。

水路実験場の各水路の概要と断面図および実験水路の全景写真は以下に示した通りである。

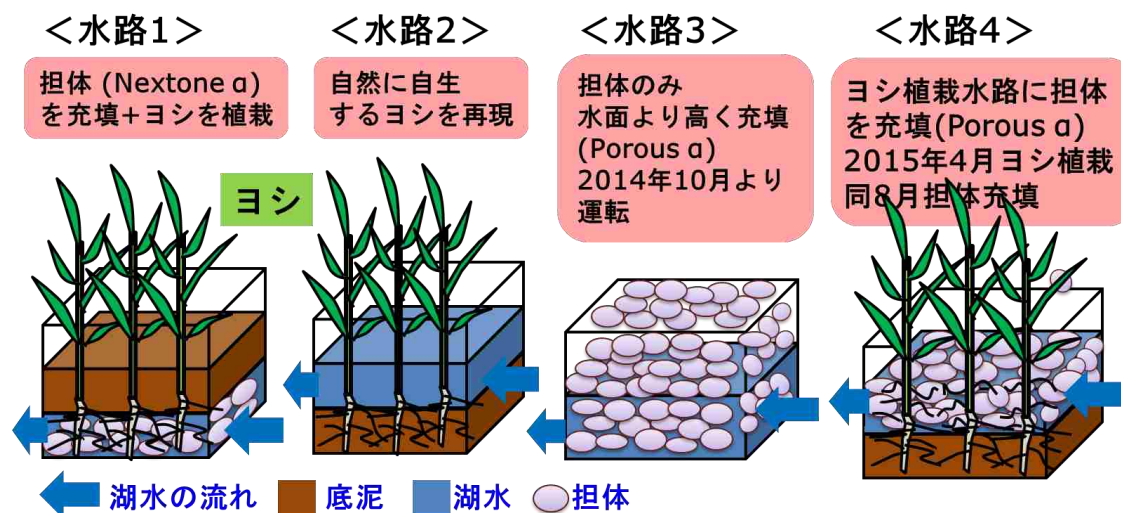


図 2-1 実験水路の構成



図 2-2 水路全景写真（左から水路 4、水路 3、水路 2 及び水路 1）

### (1) 水路 1 について

湖水と根圏との接触を向上させた水路である。30~40 mmの大きさのガラス発泡体でできた多孔性担体 Nextone α（気孔率 24%、細孔のみの気孔率 14%、充填時の空隙率 58%）を敷き詰め、その上

に湖山池の底泥を載せヨシを植栽した。ヨシは水路内に太く長い根茎を張り巡らせており、そこに担体を敷き詰めることで根と絡み、根圏と湖水との接触が向上し、根圏微生物が活性化し、栄養塩吸収の増加と担体内微生物による栄養塩および水質汚濁物質の除去が期待される。

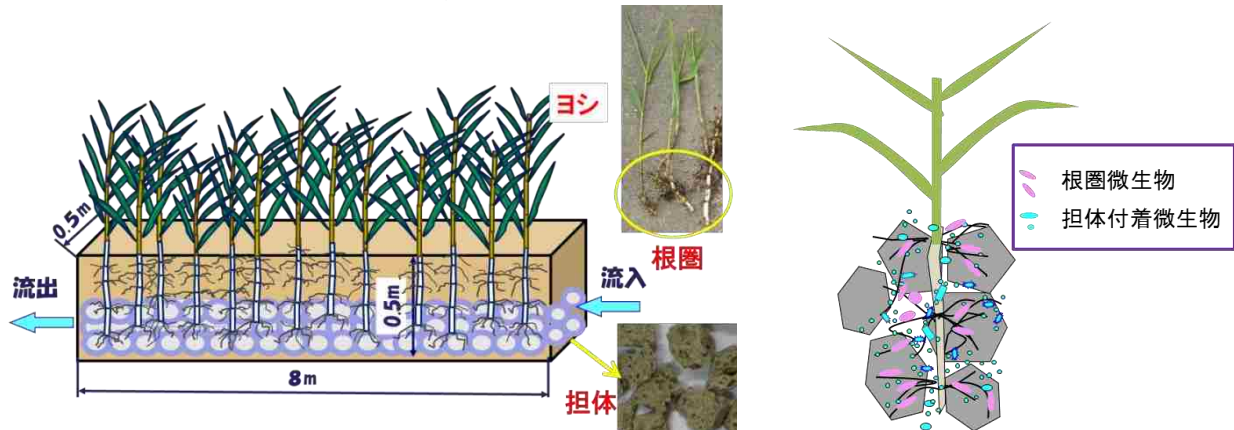


図 2-3 水路 1 の断面図とヨシ根圏が担体に絡んでいる模式図

◎ ヨシと担体を組み合わせた除去機構

富栄養化の原因となる窒素やリンなどの水質汚濁物質は、湖沼内で微生物の働きにより分解される。窒素成分は、好気条件での硝化と嫌気条件での脱窒を経て窒素ガスとなり、大気中へ放出される。リンは加水分解されてリン酸となり、好気条件で底泥に吸着し、嫌気条件で底泥から溶出する。ヨシにリンを吸収・蓄積させ刈取ることで、高い除去効果が期待できる。またリンは微生物作用のみでは根本的には除去できないが、リン蓄積細菌の作用で湖内濃度の調整ができる。有機物（COD成分）は好気条件で好氣的分解、嫌気条件で脱窒菌の働きによりそれぞれ分解される。この過程で生成される「 $\text{NH}_4^+$ 」、「 $\text{NO}_3^-$ 」、「 $\text{PO}_4^{3-}$ 」は水生植物が成長するための養分として吸収される。

ヨシなどのイネ科の植物は、光合成による  $\text{CO}_2$  固定化の他に、根圏への酸素供給に優れているため嫌氣的な土壤中でも根圏は微好気状態を保つことができる。従って、好気性微生物も活動可能となり、水質浄化が促進される。ヨシの根圏部分に担体を投入すると、根と絡むことで担体内部も微好気状態となり、より多くの微生物が増殖される。さらに植物の根圏も活性化されるため、相乗効果による汚濁物質の除去が期待される。以上述べた除去機構を図で示すと以下の図 2-4 のように示される。

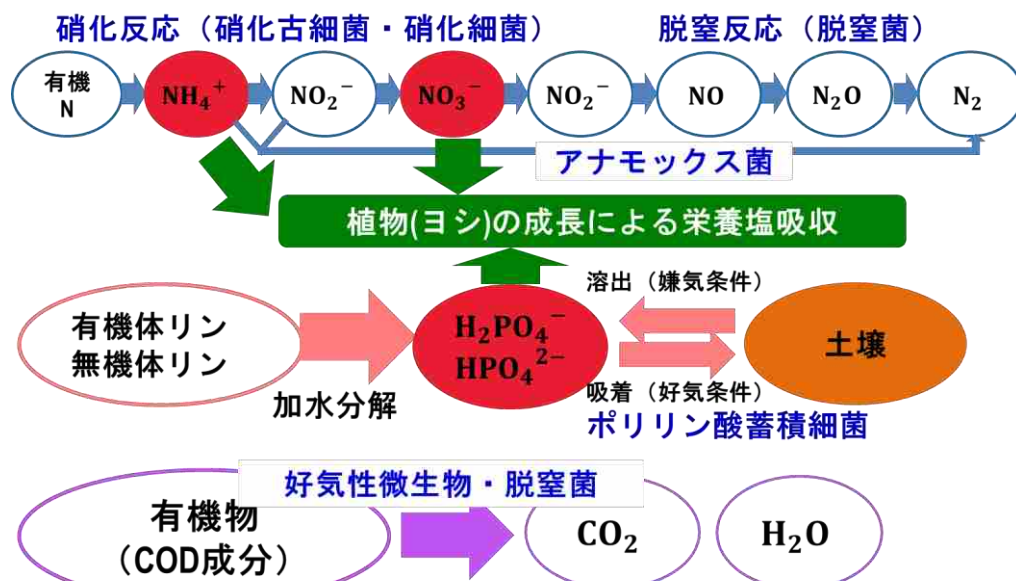


図 2-4 ヨシ植生帯による窒素、リン、有機物の除去機構

(2) 水路 2 について

水路 1 における担体の有効性を検討するため、自然に自生するヨシを再現した水路である。底泥

を敷きヨシを植栽しており、湖水は底泥の上を流れるため底泥に浸透した栄養塩を吸収・分解する。

### (3) 水路3について

ヨシが植栽できない湖岸でも水質浄化を担うものとして、担体のみを充填した水路であり、2014年10月から通水開始した水路である。多孔性担体 Porous α（平均サイズ 40mm、気孔率 31%、細孔のみの気孔率 14%、充填時の空隙率 58%）を水面を覆うように敷き詰めた。この担体の特徴は、内部に無数の空隙をもつ発泡体であり、それぞれの気泡が連なった連通構造になっていることと、直径が 1 μm から 5mm の不均質な気泡により構成されているため、様々な細菌、原生動物、後生動物などの微生物の生息が可能となり、図に示したような多機能性担体として水質浄化を促進できると期待できる（各微生物種間の生物学的ニッチを創出する）。

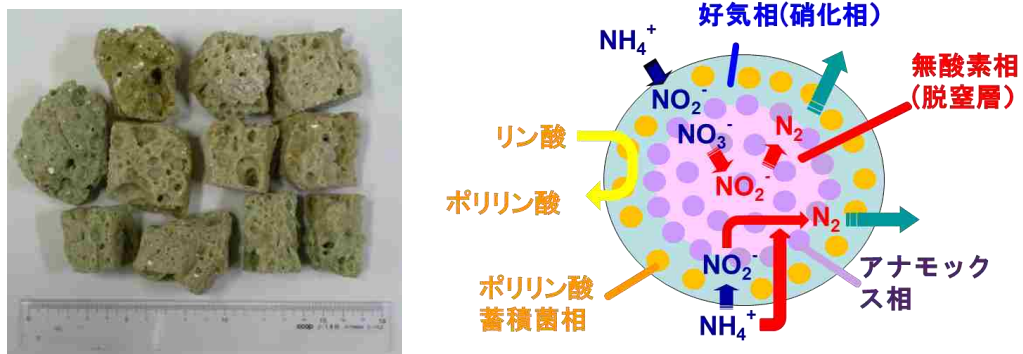


図 2-5 水路3に充填した Porous α 担体とそれが機能した時の概念図

### (4) 水路4について

2015年4月にヨシを植栽して通水開始した水路で、湖岸のヨシ植生帯の改良を前提とした水路である。底泥を敷きヨシを植栽した。ヨシが最大まで成育した同年8月に、植栽帯土壌上面の通水部分に多孔性担体 Porous α（平均径 30~40mm）を充填しており、水路1よりも好氣的な部分が多い。そのため、担体充填部にヨシ根圏の発達や、より多くの微生物の活性化が期待される。

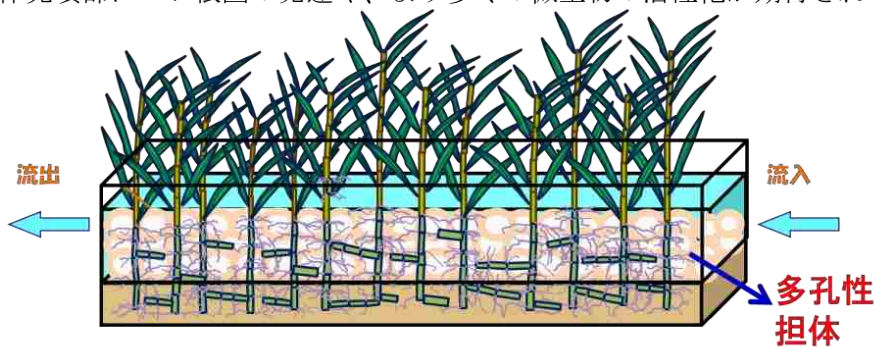


図 2-6 水路4の断面図

各水路の水際あるいは上面の写真を下に示す。水路2ではヨシ根圏は水に浸かっており、水路3では水面が担体層内部にあり、また水路4では、担体間隙からヨシが伸びており、水面は担体層上面とほぼ等しい。



図 2-7 各水路の水際、上面の写真（左から水路 2 の水際、水路 3 の上面、水路 4 の上面）

### 3. 測定項目と方法

#### (1) 水質浄化性能

各水路の入口・出口における流量、水温、pH、ORP(Oxidation-reduction Potential：酸化還元電位)、DO(Dissolved Oxygen：溶存酸素)を水質浄化試験施設内の水路にて直接測定した。各水路の入口・出口からは水サンプルを採取し、研究室にて全窒素(TN)、全リン(TP)、COD、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-Pの各濃度、および濁度と色度を測定した。そのデータから除去速度、除去率を算出し、除去性能を評価した。また、各水路内のヨシの本数と水面からの高さを定期的に測定した。

| 水路にて直接測定     |
|--------------|
| ・ DO [mg/L]  |
| ・ 水温 [°C]    |
| ・ 流量 [L/min] |
| ・ ORP [mV]   |
| ・ pH         |

| 約一ヶ月ごとに測定      |
|----------------|
| ・ ヨシの本数 [本]    |
| ・ 水面からの高さ [cm] |

#### 各水路の入口・出口のサンプルを採取

| 測定項目                                    | 測定方法                                   |
|---|--|
| TOADKK ポータブル全窒素全リン計 TNP-10              |  |
| 全窒素 [mg/L]                              | ペルオキシ二硫酸加熱分解－亜鉛還元<br>ナフチルエチレンジアミン吸光光度法 |
| 全リン [mg/L]                              | ペルオキシ二硫酸加熱分解－<br>モリブデン青吸光光度法           |
| COD [mg/L]                              | 過マンガン酸カリウム吸光光度法                        |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P [mg/L] | モリブデン青吸光光度法                            |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N [mg/L]  | インドフェノール青吸光光度法                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N [mg/L]  | ナフチルエチレンジアミン吸光光度法                      |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N [mg/L]  | 亜鉛還元－ナフチルエチレンジアミン吸光光度法                 |
| HACH ポータブル水質分析計 DR-890                  |  |
| 濁度 [FAU]                                | ホルマジン標準度法                              |
| 色度 [Pt-Co]                              | 白金コバルト標準法                              |

以上の測定データをもとに各汚濁物質の除去速度、除去率を算出した。算出方法は各成分とも同じであるが、全窒素については以下の式となる。

○全窒素除去速度 (g/day) =  
 (流入全窒素濃度[mg/L]－流出全窒素濃度[mg/L])×流量 [L/min]×60×24

○全窒素除去率 (%) =  

$$\frac{\text{流入全窒素濃度[ mg/L ] - 流出全窒素濃度[ mg/L ]}{\text{流入全窒素濃度[ mg/L ]}} \times 100$$

(2) 水質浄化細菌の存在量の解析

水路の性能を考察するために水路内の微生物群集の存在とそれらの相互作用を把握することが重要であると考えた。そこで富栄養化の原因物質である窒素やリンに着目し、それらの除去に関与する菌の存在とその量を調べた。また各水路で 16S rRNA 解析による広範囲の環境微生物菌叢の特定を行い、水路内の機能的多様性を調べた。

まず、春夏秋冬の各季節の各水路内の土壌や根圏・担体付着物のサンプルを持ち帰り、DNA 抽出を行った。DNA 抽出に用いたサンプルの質量は、湿重量 0.5g と定め、DNA 抽出キット (ニッポンジーン製 ISOIL Beads beating) を用いて DNA 抽出を行った。

◎ 水質浄化に関与する水路内細菌の検出

各水路の窒素やリン除去性能に着目し、PCR により季節ごとに各水路の硝化細菌、硝化古細菌、脱窒菌、アナモックス細菌およびリン蓄積細菌の検出を行い、各水路内の水質浄化に関与する菌の存在量の比較を行った。使用したプライマーを表 3-1 に示した。

表 3-1 使用したプライマー一覧

|          | プライマー   | 鎖長 bp |
|----------|---|-------|
| 硝化細菌     | amoA-1F : 5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3'       | 491   |
|          | amoA-2R : 5'-CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC-3'   |       |
| 硝化古細菌    | Arch-amoAF : 5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'       | 635   |
|          | Arch-amoAR : 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'       |       |
| 脱窒菌      | nosZF : 5'-CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG -3'     | 454   |
|          | nosZ1622R : 5'-CGS ACC TTS TTG CCS TYG CG -3' |       |
| アナモックス細菌 | hzsA526F : 5'-TAYTTTGAAGGDGACTGG-3'           | 1332  |
|          | hzsA1857R : 5'-AAABGGYGAATCATARTGGC-3'        |       |
| リン蓄積細菌   | ACCppk1-254F : 5'-TCACCACCGACGGCAAGAC-3'      | 1123  |
|          | ACCppk1-1376R : 5'-ACGATCATCAGCATCTTGGC-3'    |       |

◎ PCR 産物の確認と相対的存在量の把握

PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動を用いて、目的とする標的配列が増幅されたかどうかの確認を行った。あらかじめ分子量サイズが分かっている DNA マーカーと一緒に流すことで、そのバンドの位置からサンプル DNA の存在を把握し、また増幅サイクル数を適切に予め設定することで、そのバンドの太さから存在量の相対値を大まかではあるが把握できる。これはサンプル中に目的の菌体が一定数以上いれば飽和した太いバンドが得られるが、存在しなければ PCR によっても確認ができない、また極めて少量の場合はバンドが薄いからである。例えば 3 サイクルの PCR 分のバンド幅が違えば  $2^3=8$  倍相当の菌体量の違いになる。今回は、硝化細菌、硝化古細菌、脱窒菌については増幅サイクル数 30 回、アナモックス細菌とリン蓄積細菌については 40 回とした。

◎ Real time PCR による水質浄化菌体量の定量化

硝化細菌、硝化古細菌、脱窒菌の水質浄化細菌の数および全菌体数に対して絶対定量法の Real time PCR を行って水路内の各菌体のコピー数を求め存在量の比較定量化を行った。ただし、アナモックス細菌およびリン蓄積細菌に対してはその存在量が極めて少なく現段階では Real time PCR がうまく行えなかった。蛍光試薬には SYBR Green を用いて行った。使用したプライマーは全菌体以外、表 3-1 に用いた菌体検出のものと同じである。全菌数のプライマーは以下の通りである。

表 3-2 全細菌検出のためのプライマー

| 全細菌      | プライマー                 |                          | 鎖長(bp) |
|----------|-----------------------|--------------------------|--------|
|          | Bac1055YF             | 5'-ATGGYTGTCTCGTCAGCT-3' |        |
| Bac1392R | 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' |                          |        |

まず、検量線作成に用いる標準サンプルは各菌体の PCR サンプルをそれぞれクローニング法により 4～6 個増幅させて混合して得た。これを 10 倍ずつ段階的に希釈し、それを用いて増幅曲線を得、増幅曲線より蛍光強度がある一定の閾値に達する増幅サイクル数 Ct 値を求め、そこから定法に従って Ct 値に達するコピー数を算出した。これから Ct 値とコピー数の間の相関線より検量線を作成した。ここで、コピー数とは各細菌には 1 個の目的とする DNA が存在することから、菌体数と同等の意味がある。

次に全細菌、硝化古細菌、硝化細菌および脱窒菌について、各水路サンプルの Real time PCR を行って Ct 値を求め、検量線と比較することによって水路内の菌体のコピー数を求めた。さらに、その正当性を確認するために Real time PCR によって得られた増幅産物の融解曲線でピークが一つであるかということや、アガロース電気泳動を行い、目的のバンドのみであることを確認した。

### (3) 16S rRNA による水路内の菌叢解析

水質浄化細菌に限らず、各水路の微生物生息状況をより詳しく把握するために土壌や根圏、担体付着物に存在する菌叢の解析を 16S rRNA のクローニング法により行った。サンプル DNA は先の水質浄化に関与する水路内細菌の検出に用いたものを使用した。

#### ◎ 16S rRNA の PCR

16SrRNA 内部領域をコードしている DNA を PCR で増幅した。PCR 反応液の調製および PCR サイクル条件を以下の表 3-3 に示した。ここで x は 50 $\mu$ L に対して DNA 量が 80 ng 含まれるように計算した。

表 3-3 16SrRNA の PCR 反応液調整

|                                |        |       |                   |
|--------------------------------|--------|-------|-------------------|
| dH2O                           |        |       | (22.2-x) $\mu$ L  |
| Template DNA                   |        |       | x $\mu$ L         |
| Forward primer                 | 27f    | mixed | 0.7 $\mu$ L       |
|                                | Pla46f |       | 0.7 $\mu$ L       |
| Reverse primer                 | 1492r  |       | 1.4 $\mu$ L       |
| 2 $\times$ Quick Taq HS DyeMix |        |       | 25 $\mu$ L        |
| Total                          |        |       | 50 $\mu$ L/1 tube |

#### ◎ クローニング

複合微生物系から得られた DNA の集合体から DNA を単離する方法のひとつにクローニングがある。これは DNA 集合体をベクターと呼ばれる環状 DNA と反応させ（ライゲーション）、そのベクターを大腸菌に挿入（形質転換）させることで、大腸菌の増殖を利用してベクターおよび組み込まれた DNA 断片を増幅させることができる。基本的に、1 つのベクターには 1 つの DNA 断片（インサート）が、1 つの大腸菌には 1 つのベクターが組み込まれるので、培養された大腸菌の 1 つ 1 つが別々のインサートを持つことになる。この増幅された DNA を再び取り出し精製したのち、そのシーケンス解析を Forward と Reverse 側両方から行い、その後、それらを 1 本鎖に結合し BLAST により解析し菌体の同定を行った。同定の手順は、相同性が高いものから 5 つ候補を絞り、最も相同性の高いものを優先したが、以下で述べるように不適切と判断した場合には、2 番目以降が 1 番目と同等の相同性であり、かつ複数グループとして候補が上がったものを採用した。ここで、不適切と思われるものとしては、例えば、酸性排水やアルカリ排水で生存するもの、極地の低温で生育するものなどである。また、一番相同性が高いものでも 90%以上が得られないものはサンプルから除外した。

#### 4. 各水路の水質浄化性能

##### (1) 過去3年間の流入した水質汚濁物質濃度の経過

初めに過去3年間の水路に流入する湖山池の水質汚濁成分濃度の測定値を図4-1~4-3に示す。これを各水路で浄化することになる。全窒素、全リン、CODは春から夏にかけて高く、秋から冬にかけて漸減する。無機態窒素と全窒素の比率は、夏から秋初めの高水温時には、50~60%であるが、冬から春の低水温期には20%程度である。リン酸態リンと全リンの比率も窒素の場合とほぼ同様であるが、高水温時にはほぼ100%リン酸態リンとなっている。



図 4-1 流入全窒素と無機態窒素の3年間の経過



図 4-2 流入全リンとリン酸態リンの3年間の経過



図 4-3 流入 COD の3年間の経過

##### (2) DOの消費から見える水路の菌体活性

菌体活性が高ければそれに応じて溶存酸素 DO の消費が起こる。そこで、各水路の入口と出口の DO を図 4-4 に示し、さらに入口出口間の DO の差すなわち酸素消費量を図 4-5 に示した。なお流入濃度はすべての水路での平均値を用いた。これから、水路4の出口 DO は担体を投入した8月以降低下した。水路間の比較では、水路1と水路4の出口が最も低くなっている。これは担体が地下にあるか水中にあるかにかかわらず、ヨシ根圏と担体層のからまりによる菌体活性が高く、酸素の消費が活発なためである。一方、水路3では、同じ担体を使っている水路4に比べて DO の消費が低い。これらのことから水路1と水路4のように担体にヨシ根圏を発達させることにより菌体活性を高めることができ、それによって高活性に水質浄化を行っていることが期待される。



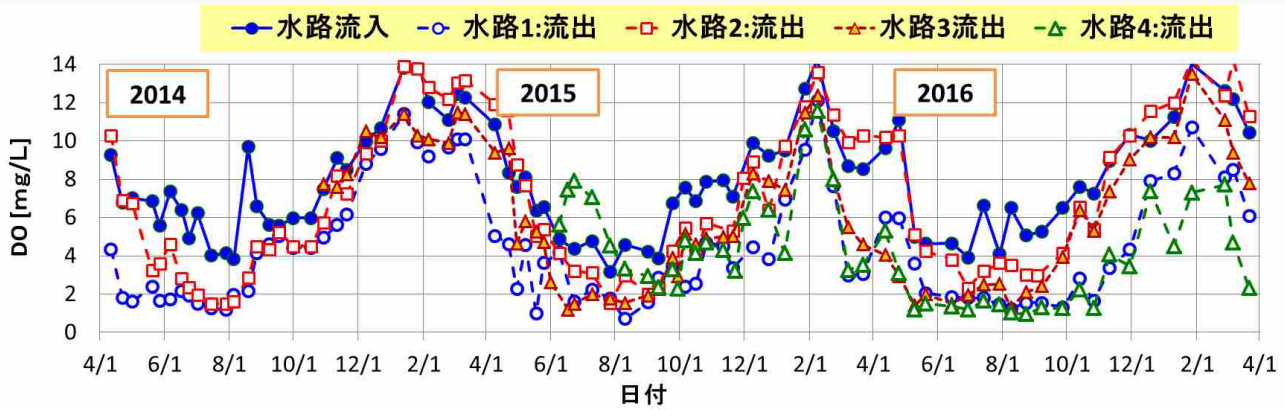


図 4-4 各水路における入口と出口における DO の経過

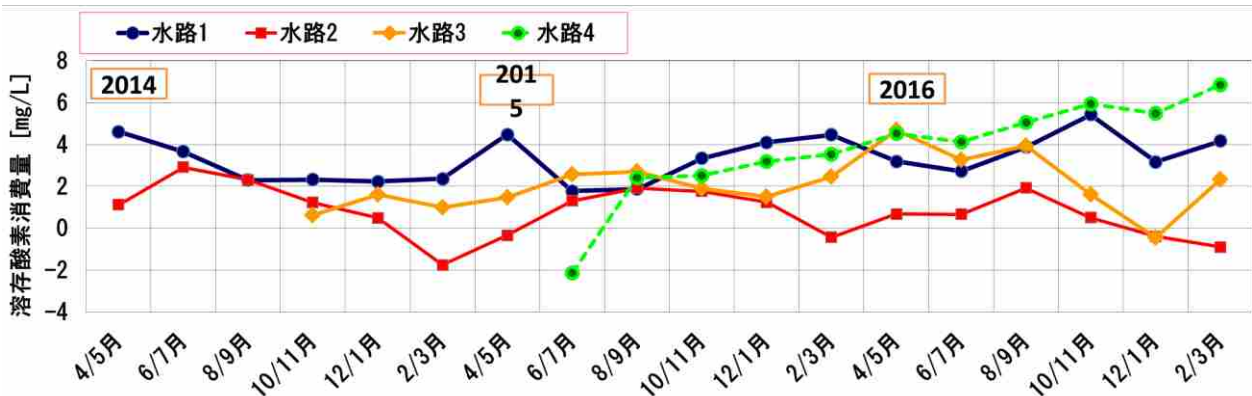


図 4-5 各水路における入口出口間の DO 変化の経過(2ヶ月平均)

(3) 過去3年間の窒素除去性能

◎ 全窒素濃度、除去速度および除去率について

水路内の窒素は除去機構で示した通り、微生物による硝化・脱窒プロセスを経て分解され、その分解過程で発生する $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ は生育のための栄養分としてヨシに吸収される。過去3年間の各水路の全窒素濃度変化を図4-6に示した。なお流入濃度はすべての水路での平均値を用いた。

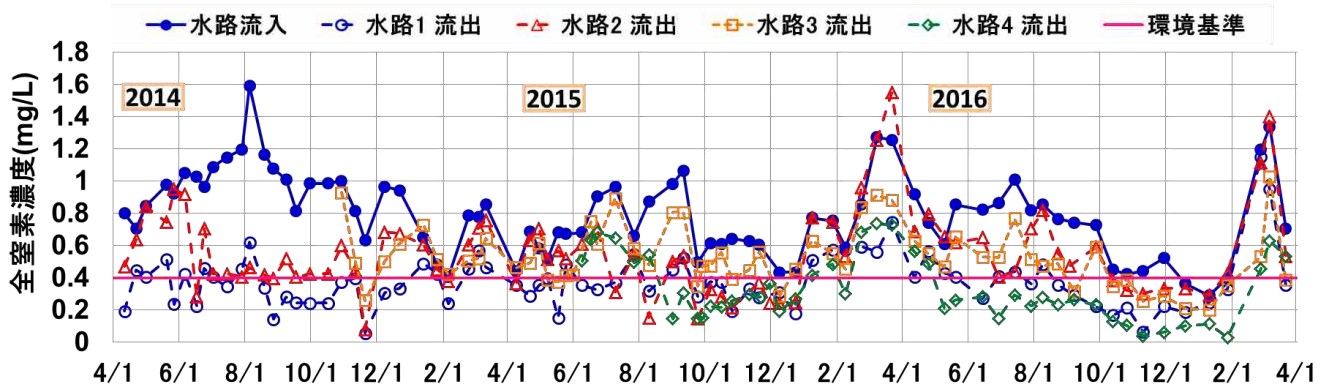


図 4-6 各水路における入口及び出口の全窒素濃度の経過

全水路で流入の全窒素濃度は夏に高く、秋から冬にかけて低下し、春先に再び上昇した。また年間を通してその濃度はほとんど環境基準を上回っていた。

各水路の流出の全窒素濃度を比べてみると、水路1は冬から春先を除き環境基準値を下回り、安定して高い除去性能を示した。水路2ではヨシの生育が盛んになるとともに、全窒素濃度は低くなっており、夏には水路1とほぼ同じぐらいの除去性能であった。しかしヨシを刈り取った冬以降は流出の濃度が高くなっていることから除去性能は低下している。水路3は流出の全窒素濃度は環境基準を上回っていることが多かった。水路4においては年間を通して他の水路よりも低い値を維持

し続けており、他の水路に比べて除去性能が高い。いずれの水路においても冬期から春先にかけては、入口濃度に連動して出口濃度が高くなり環境基準値を上回ってしまった。

各水路の全窒素除去速度と除去率の経過を2ヶ月平均して図4-7、図4-8に示した。速度と率の値の動きに違いが生じるのは、入口濃度が変動することと、各水路の流量が一致していないためである。水路1の除去速度、除去率は年間を通して高い。水路2では、ヨシが活発に成育する6月から10月の期間中は除去速度、除去率が高いが、ヨシが枯れた12月以降はほとんど除去しなくなった。水路3では、年間を通して除去性能はあまり高くなく、20~30%の除去率を保ったまま推移している。水路4では、担体を投入した2015年8月以降除去速度、除去率ともに高くなり、その値は水路1と同等になり、冬期を除き60%以上の除去率を示していた。以上の事からヨシと担体を組み合わせることで根圏微生物および担体付着微生物の活性により、ヨシが枯れる秋以降でも高い除去性能を保つことができている。この理由を求めて根圏を観察すると、土壌より出ている部分は枯れてしまうが、担体層中にある根圏は冬期においても生き続けていることがわかり、年中活性を維持している。



図 4-7 各水路における全窒素除去速度の経過



図 4-8 各水路における全窒素除去率の経過

◎ アンモニア態窒素および硝酸態窒素の除去について

ここまで全窒素の浄化について結果を示してきたが、結果は水路間で大きな違いがあることが分かった。その原因がどこにあるかを明らかにするために、ヨシ根圏と担体に存在する微生物作用がどのような状況にあるかを無機態窒素の消長によって調べたものを図4-9、図4-10に示す。

まず入口のアンモニア態窒素濃度は夏から秋の高水温時に高くなるが、秋から冬にかけては低下する。これが水路を通過することによって、すべての水路でアンモニア成分は除去できているが、水路2では除去できていない時もある。これは有機性窒素の分解から生じてくるものもあるので負荷が入口のアンモニア成分だけではないので複雑ではあるが、水路2ではアンモニア除去性能が他の水路に比べてやや劣る。一方、水路1と水路4ではほぼすべてのアンモニア成分が除去されているので、水路1と水路4では硝化が活発に起こっていることが分かる。また水路3でも水路1と水路4ほどではないが活発に硝化が起こっている。

次に、入口の硝酸態窒素濃度は、6月から10月にかけて高い値を示すが、それ以外の期間は低濃度である。これが水路を通過することによって、年間を通して水路1と水路4ではほぼすべての硝酸成分が除去されている。硝酸成分は流入以外にも水路内部で硝化によって供給されるものが多いので、水路1と水路4では脱窒も高活性であることが分かる。水路2ではヨシ地上部の成長期間では除去できているものの除去できない時もある。また水路3では全期間を通して出口濃度が入口濃度を上回っている。すなわち硝化反応によって供給された硝酸成分のかなりの部分が脱窒されずに残っていることが分かる。

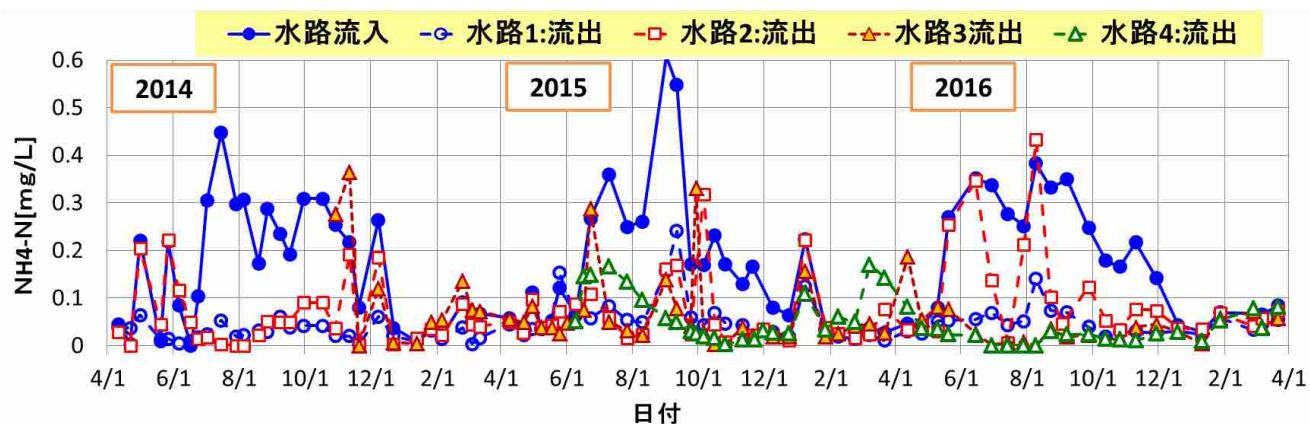


図 4-9 各水路における入口及び出口のアンモニア態窒素濃度の経過

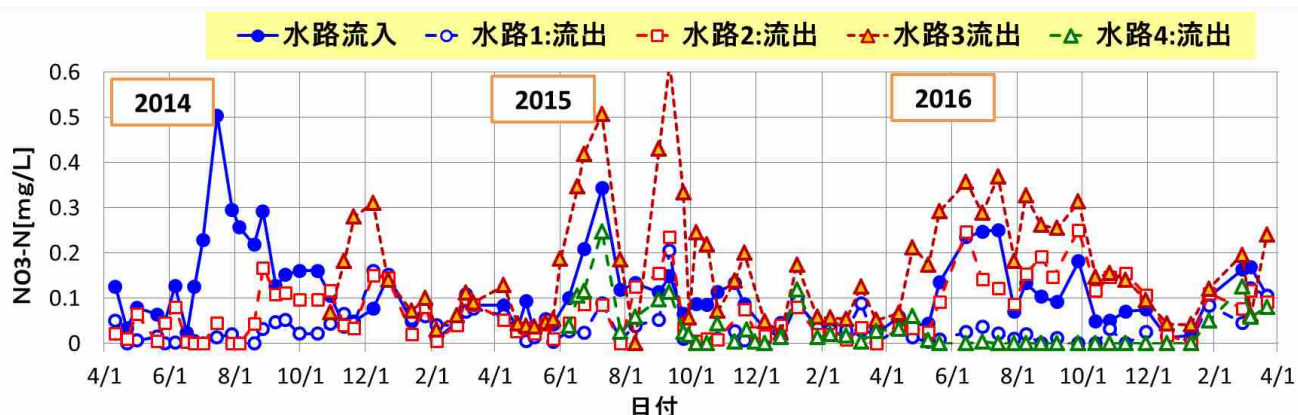


図 4-10 各水路における入口及び出口の硝酸態窒素濃度の経過

#### (4) 過去3年間の全リン除去性能

##### ◎ 全リン濃度、除去速度および除去率について

水路内でのリンは除去機構に示した通り、リン酸態( $\text{HPO}_4^{2-}$ 、 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )を生育の栄養分として植物に吸収されることと、底泥への吸着によって除去される。またリン蓄積細菌によっても一時的に水中から除去できる。各水路における入口と出口での全リン濃度とリン酸態リンの経過を図 4-11、図 4-12 にそれぞれ示した。

流入の全リン濃度は冬期において環境基準値以下まで下がっていたが、それ以外の季節では環境基準値よりもかなり高く、特に夏に非常に高くなった。また出口においても同様であり、冬期の一時期を除いて環境基準を達成できなかった。その要因として、夏は水温上昇で DO 濃度が低下し、湖水環境が貧酸素状態となって土壌に吸着していたリンが溶出したことが考えられる。流出全リン濃度を見てみると水路 2、4 は夏の流出濃度が流入よりも減少していることからヨシの生育により吸収され除去されていることが分かる。しかし、水路 2 では冬期以降ヨシが枯れるとともに除去しなくなる。水路 1 は夏の流出濃度が急激に高くなっていることから、水温上昇 DO 濃度低下により、土壌内に吸着されていたリンが溶出されたことが考えられる。水路 3 は流入と流出の濃度にあまり差はないが、年間を通して少しずつ除去している。一方、冬期から春先においては、水路 1 と 4 において出口濃度が低下しているが、水路 2 と 3 ではそれが見られない。このことより、この期間に

ヨシの根圏がリンを吸収していることが考えられる。

リン酸態リンも全リンとほぼ同じ挙動を示すが、やはり水路3に比べて水路1、2、4の方が出口の濃度の低下が大きいことがわかり、1年を通して根圏はリン酸態リンを吸収していると思われる。

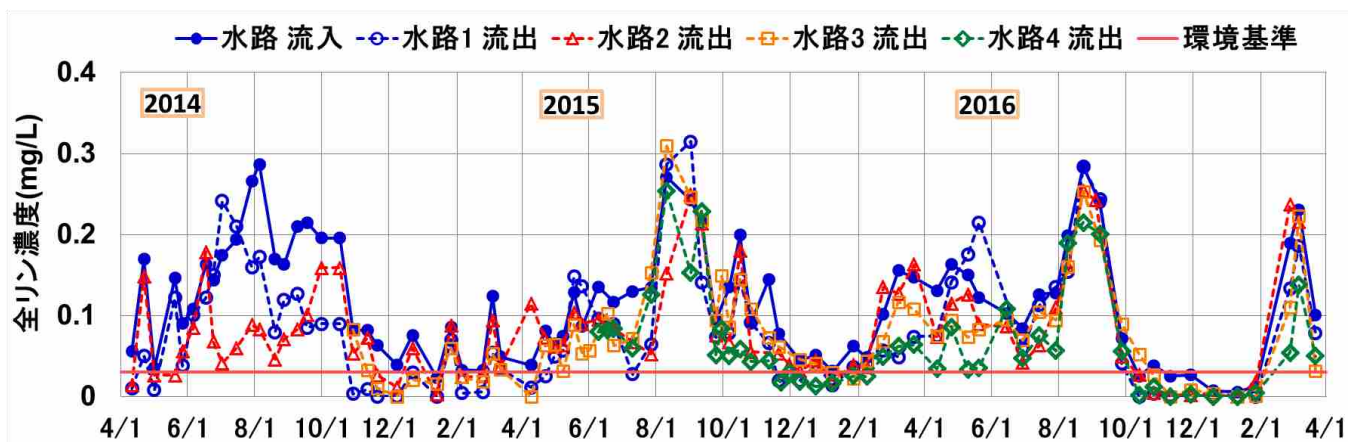


図 4-11 各水路における入口及び出口の全リン濃度の経過

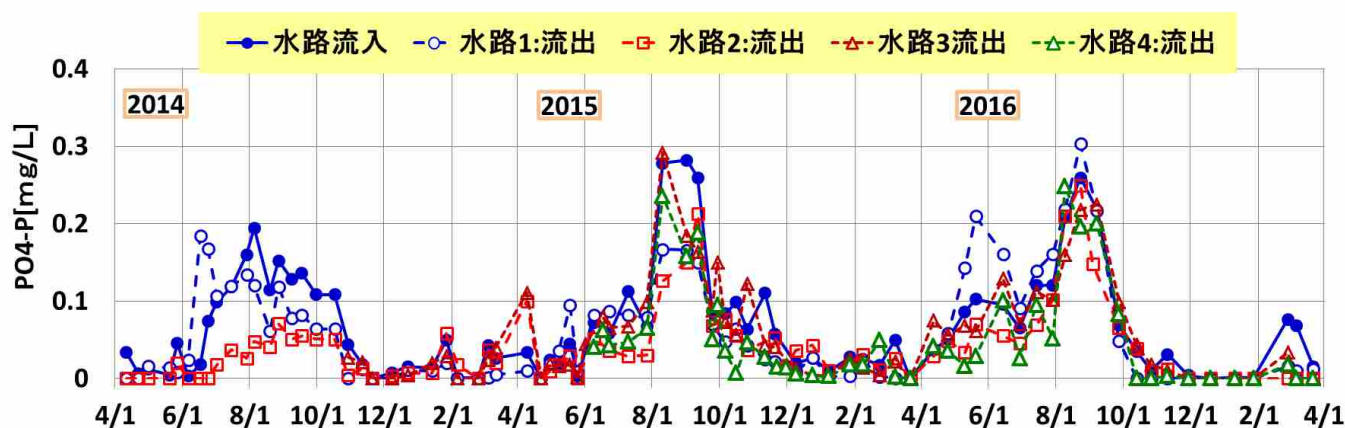


図 4-12 各水路における入口及び出口のリン酸態リンの経過

次に全リンの除去速度、除去率の経過を図 4-13 と 4-14 にそれぞれ示した。全体を見て、水路1と水路4が除去速度、除去率とも高く推移している。一方、水路2は季節によって変動が激しく、水路3では全体的に除去はあまりよくないが、他の水路に比べて変動は少ない。

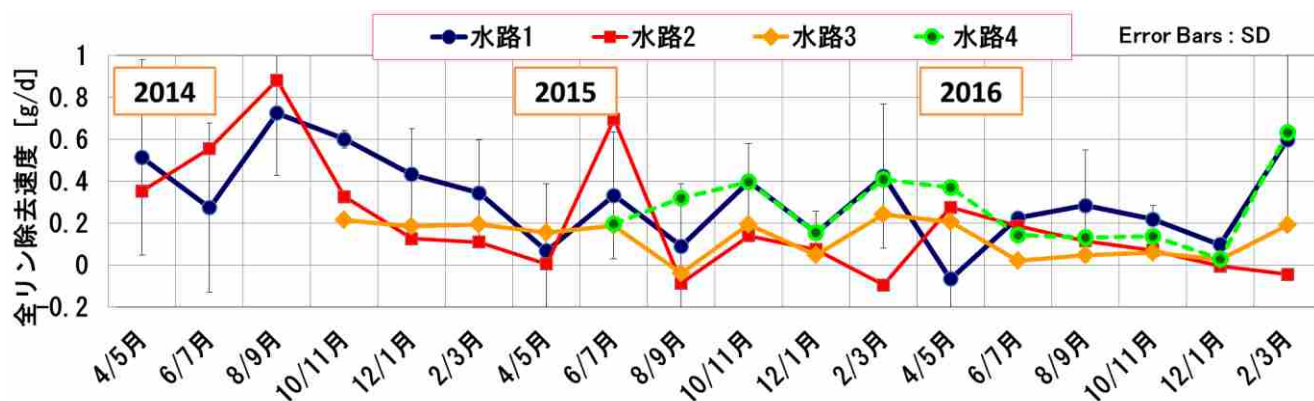


図 4-13 各水路における全リン除去速度の経過

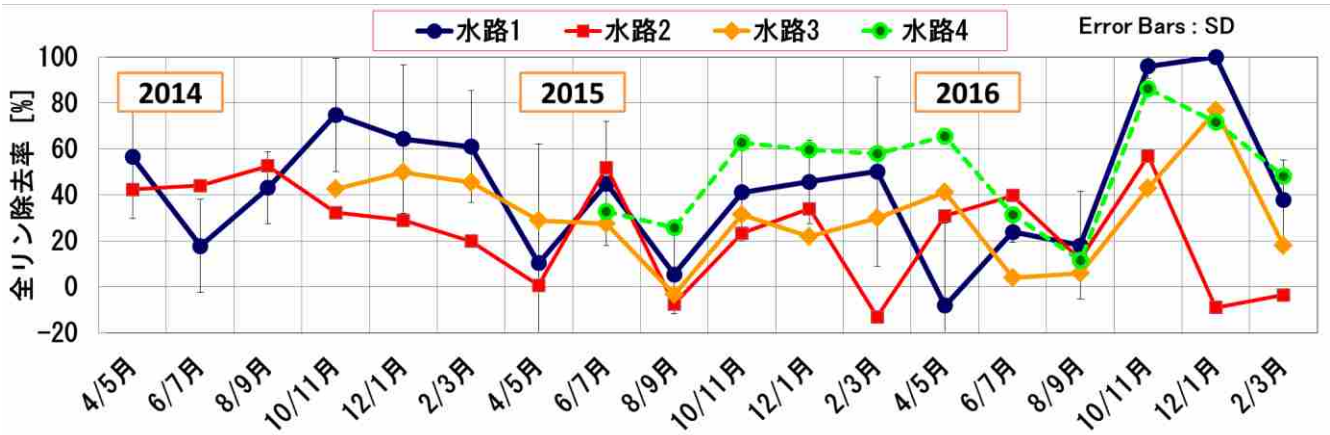


図 4-14 各水路における全リン除去率の経過

(5) 過去 3 年間の COD 除去性能

◎ COD 濃度、除去率および除去速度について

水路内の COD は除去機構に示した通り、微生物による好氣的分解と、脱窒に伴う有機物分解により除去される。各水路の COD 濃度経過を図 4-15 に示した。さらに、COD 除去速度、除去率をそれぞれ図 4-16、図 4-17 に示した。入口 COD 濃度は環境基準値の 2 倍から 3 倍でとかなり大きいことがわかり、その値は、季節によっても日によっても変動が激しいが、特に春期に高い。全水路の流出 COD 濃度もまた入口の値の影響を受け激しく変動している。また出口濃度が環境基準をクリアしているときは全窒素や全リンに比べて少ない。このことから、全体的に除去性能が低いことから、湖水に難分解性の有機物が増えていることが推測される。

季節ごとの除去性能でみると、春期は変動が激しいが、夏以降になると水路 1 と水路 4 の除去性能が高いことがわかる。ついで水路 3 の除去率・除去速度が高いことが分かる。このことから、担体内に有機物を分解する微生物が存在していると考えられる。

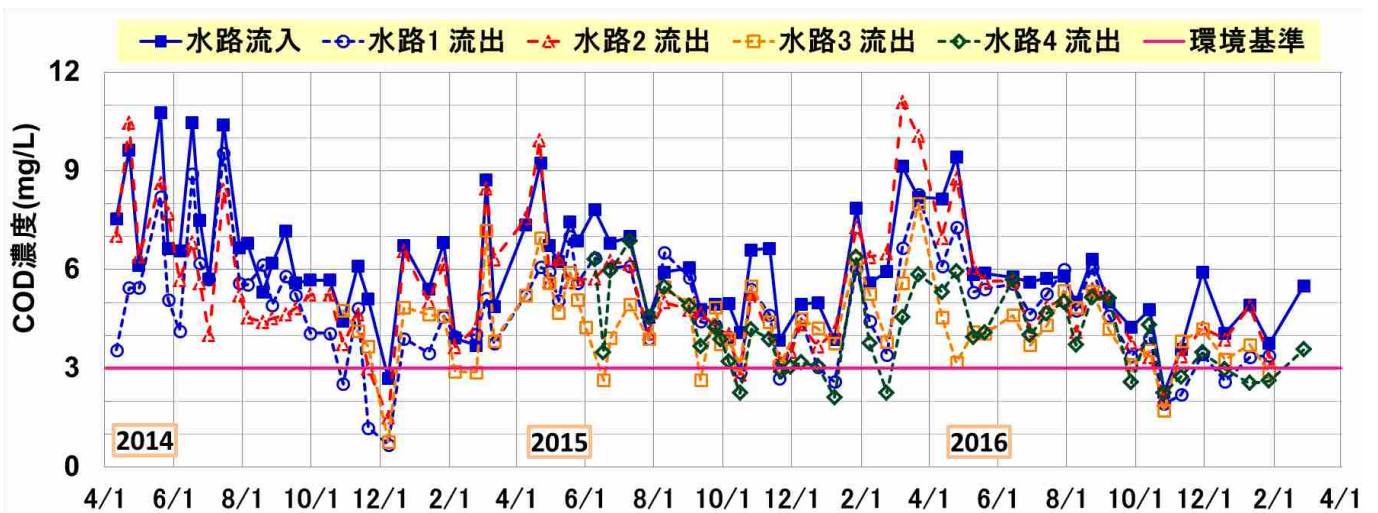


図 4-15 各水路における入口及び出口の COD 濃度の経過

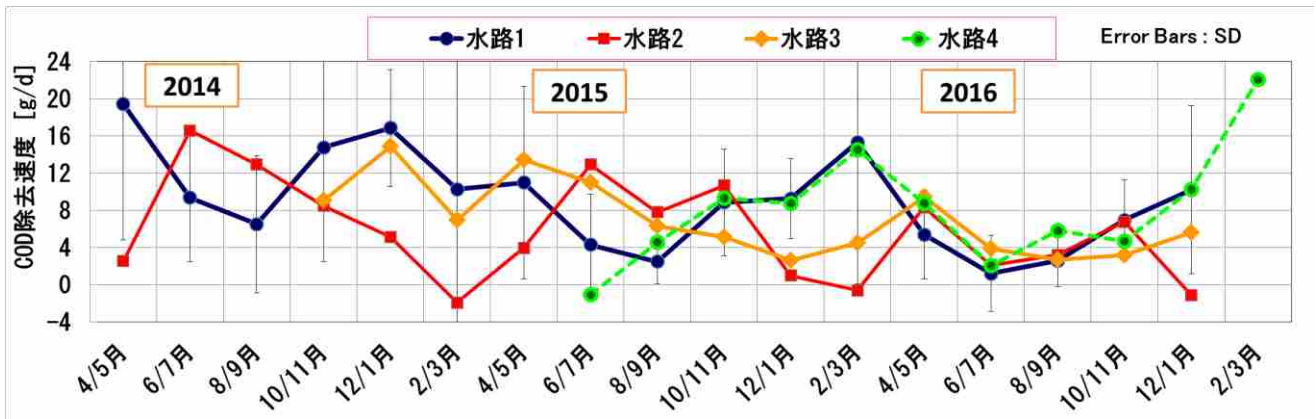


図 4-16 各水路における COD 除去速度の経過



図 4-17 各水路における COD 除去率の経過

以上各水路での窒素、リン、COD の季節間の除去性能を見てきたが、すべてに共通することとして秋に最も除去性能が良くなるのが分かる。これは水温が高く、かつ DO が回復することから夏停滞していた菌体活性が回復することが要因と考える。

(6) 過去 3 年間の年平均値における除去性能の検討

過去 3 年間の各水路の除去速度と除去率の年間平均を、全窒素、全リン、COD について図 4-18 ~ 4-20 に示した。年平均値で見ると、全窒素については水路 1 と水路 4 が同等で最もよく、水路 2 と水路 3 もほぼ同等であった。全リンの除去性能は水路 4 が最も良く、次いで水路 1、水路 3、水路 2 の順であった。また COD 除去性能は水路 4 が最も良く、次いで水路 1、水路 3、水路 2 の順であった。ヨシと担体を組み合わせた水路 1 と水路 4 は高い水質浄化性能を維持し続けたが、水路 4 は特に COD 除去に優れていた。水路 2 はヨシが生育し、その根圏が発達している期間のみ浄化性能が高い。一方、水路 3 は COD 除去に優れていた。総括すると、ヨシと担体を組み合わせた水路 4 の除去性能が最も高かった。これはヨシと担体を組み合わせ且つ好氣的部分が多いため、ヨシの生育および根圏微生物の活性により除去性能が向上していると考えられる。

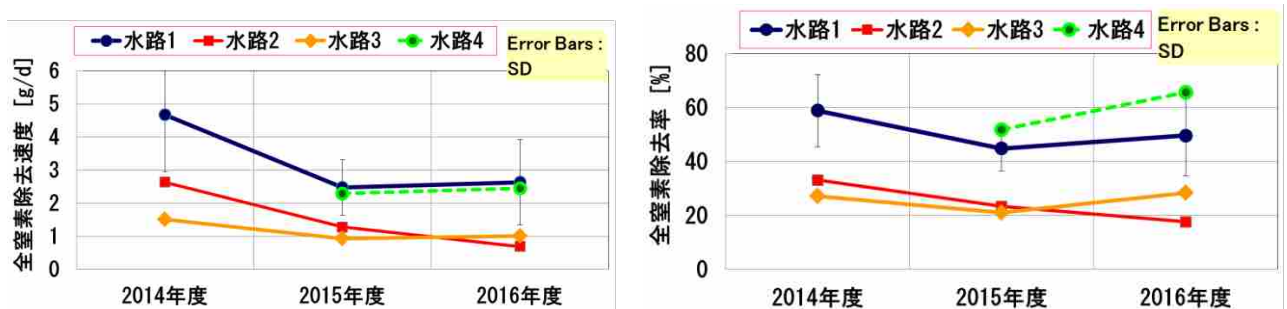


図 4-18 過去 3 年間の各水路の年平均全窒素除去性能の比較



図 4-19 過去 3 年間の各水路の全リン除去性能の比較

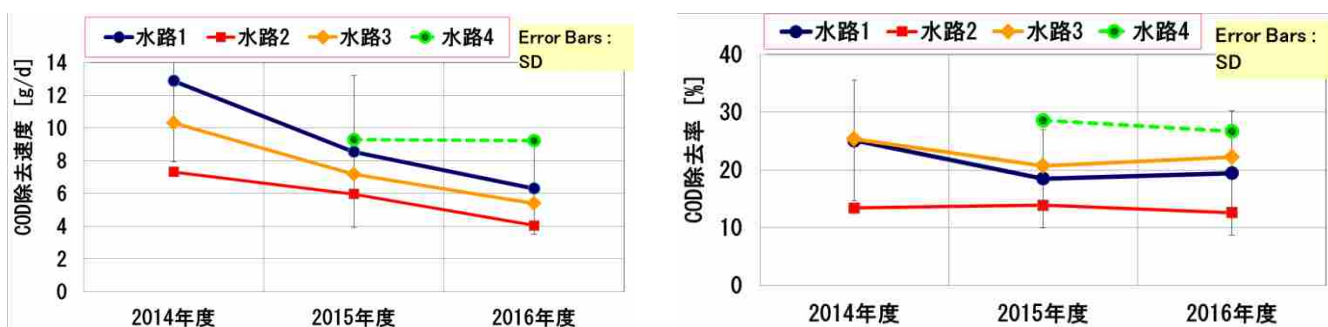


図 4-20 過去 3 年間の各水路の COD 除去性能の比較

## 5. 水質浄化に関与する水路土壌内細菌の検出結果

DNA サンプルの採取は、各水路とも入口付近と出口付近から行った。各水路の構造が異なるためサンプル深度やサンプル対象物は異なった。水路 1 と水路 4 ではヨシの根圏が絡まった担体充填層の間隙および担体内部の付着物から、水路 3 では担体充填層の間隙および担体内部の付着物から、水路 2 では表層から 5cm 以内の根圏部分の土壌から採取した。採取したサンプルから DNA の抽出を行い、PCR やクローニングの解析に用いた。各水路のサンプル地点とサンプル対象を以下に示す。

入口付近: 入口から 1.5~2m、 出口付近: 出口から 1.5~2m、各サンプルとも下に示す垂直位置の 3~4 地点で採取し、混合後、0.5g 湿重量のサンプルから DNA を抽出。これを 2 本行った。

水路 1: 担体充填層内部(ヨシ根圏との合体部分)の間隙土壌および付着物

水路 2: 表層から 5cm 以内の根圏部分の土壌

水路 3: 担体充填層内部間隙土壌および付着物

水路 4: 担体充填層内部(ヨシ根圏との合体部分)の間隙土壌および付着物

### (1) PCR による菌体の検出結果

抽出した DNA から水質浄化に関与する硝化細菌、硝化古細菌、脱窒菌、アナモックス細菌およびリン蓄積細菌を対象に、それら細菌の存在量を確認するため、PCR を用いて増幅したサンプルをアガロース電気泳動した。2016 年冬サンプルから 2016 年秋サンプルまでの各季節におけるアガロース泳動結果の写真を一括して図 5-1 に示した。

|          | 2016冬サンプル | 2016春サンプル | 2016夏サンプル | 2016秋サンプル |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 硝化細菌     |           |           |           |           |
| 硝化古細菌    |           |           |           |           |
| 脱窒菌      |           |           |           |           |
| アナモックス細菌 |           |           |           |           |
| リン蓄積細菌   |           |           |           |           |

図 5-1 水質浄化細菌の 2016 年冬から 2016 年秋における泳動結果

(2) PCR 結果に基づく水質浄化菌体の季節間及び水路間の比較

アガロース電気泳動の結果をもとに、目的のバンドの有無や太さ、光の強さを視覚的に比較し、0～8で数値化した。数値は、水路の入口と出口の合計値によって表した。数値化した結果は過去3年間のデータ全てについて表 5-1 に示し、その表をもとに各水路毎に菌体量の推移を図 5-2～5-5 に示した。

これらの表及び図から、各水路における季節間の動きをみると、各水路とも冬減少し、春増加するが夏再び減少する傾向があった。このことより、冬は水温が低く、また湖内の栄養塩が減少するため、栄養塩を分解・代謝する細菌が減少し、夏に水温が上昇して溶存酸素は減少したために水路内が貧酸素状態になるので細菌が減少すると考えられた。また、各細菌の推移を見ると、硝化細菌は、全ての水路において春に増加し、夏に減少していた。このことより、水温が高くなり、貧酸素状態になる夏において、硝化細菌は減少するということが考えられた。硝化古細菌は、どの水路においても春にやや減少していたが、全体的にその存在量は硝化細菌よりも多かった。これは、硝化古細菌は自然環境中のようなアンモニア成分の少ないところでは硝化細菌よりも優勢になることや硝化細菌と硝化古細菌は拮抗する性質があるとされているので、その通りとなっていた。脱窒菌は、各水路とも春から夏にかけて少なくなり、秋に最も多くなった。以上の硝化古細菌、硝化細菌および脱窒菌については、どの水路も同様の挙動であり、水路間に大きな違いはなかった。アナモックス細菌は水路3と水路4においてわずかに検出された。特に水路3ではアナモックス細菌が多くはないが安定して存在した。リン蓄積細菌は、全ての水路において春にわずかに検出された。各細菌の推移の結果より、水路内では硝化細菌よりも硝化古細菌の方が多く、1年を通して脱窒菌が多く検出されたことから、水路内は貧酸素状態であると考えられた。



表 5-1 2014～2016 年度各水路における季節ごとの菌体量の推移 (PCR の結果から)

|         | 2014年度 |   |   |   | 2015年度 |   |   |   | 2016年度 |   |   |   |
|---------|--------|---|---|---|--------|---|---|---|--------|---|---|---|
|         | 春      | 夏 | 秋 | 冬 | 春      | 夏 | 秋 | 冬 | 春      | 夏 | 秋 | 冬 |
| 水路1     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| アノモックス菌 | 0      | 0 | 0 | 1 | 2      | 2 | 1 | 0 | 0      | 0 | 0 |   |
| 硝化古細菌   | 8      | 3 | 8 | 8 | 8      | 8 | 8 | 8 | 6      | 8 | 8 |   |
| 硝化細菌    | 2      | 3 | 5 | 2 | 6      | 2 | 4 | 2 | 7      | 3 | 4 |   |
| 脱窒菌     | 4      | 2 | 5 | 6 | 6      | 4 | 8 | 6 | 6      | 6 | 6 |   |
| リン蓄積細菌  | 3      | 1 | 3 | 0 | 2      | 2 | 0 | 0 | 2      | 0 | 0 |   |
| 水路2     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| アノモックス菌 | 0      | 0 | 0 | 1 | 2      | 2 | 2 | 0 | 0      | 0 | 0 |   |
| 硝化古細菌   | 8      | 3 | 8 | 8 | 8      | 8 | 8 | 8 | 5      | 8 | 8 |   |
| 硝化細菌    | 3      | 3 | 8 | 2 | 6      | 4 | 2 | 1 | 6      | 1 | 4 |   |
| 脱窒菌     | 5      | 4 | 4 | 6 | 6      | 6 | 8 | 6 | 4      | 6 | 8 |   |
| リン蓄積細菌  | 2      | 1 | 4 | 0 | 2      | 2 | 2 | 2 | 2      | 0 | 0 |   |
| 水路3     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| アノモックス菌 |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 硝化古細菌   |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 硝化細菌    |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 脱窒菌     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| リン蓄積細菌  |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 水路4     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| アノモックス菌 |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 硝化古細菌   |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 硝化細菌    |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| 脱窒菌     |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |
| リン蓄積細菌  |        |   |   |   |        |   |   |   |        |   |   |   |

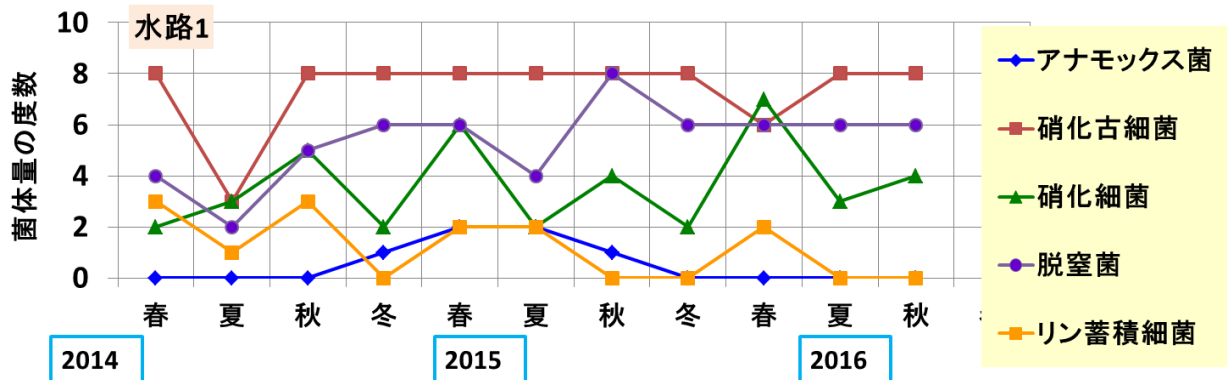


図 5-2 水路 1 における水質浄化細菌菌体量の季節間推移

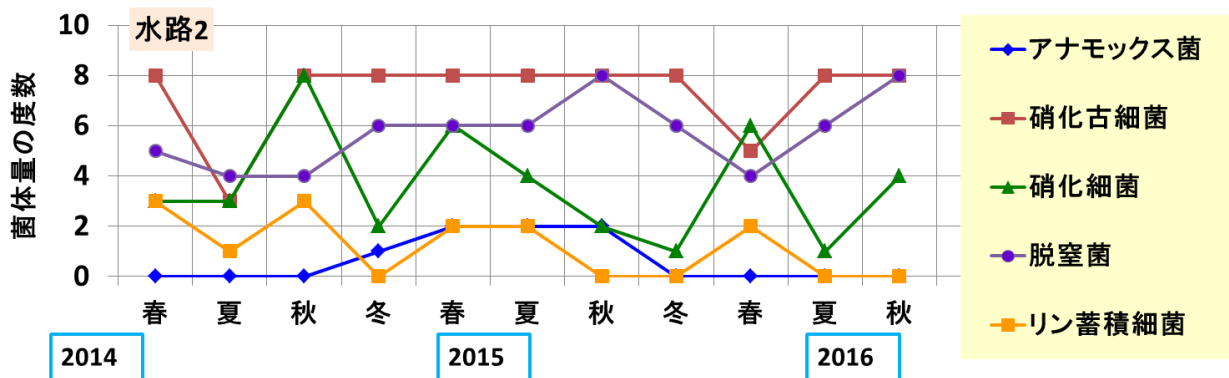


図 5-3 水路 2 における水質浄化細菌菌体量の季節間推移

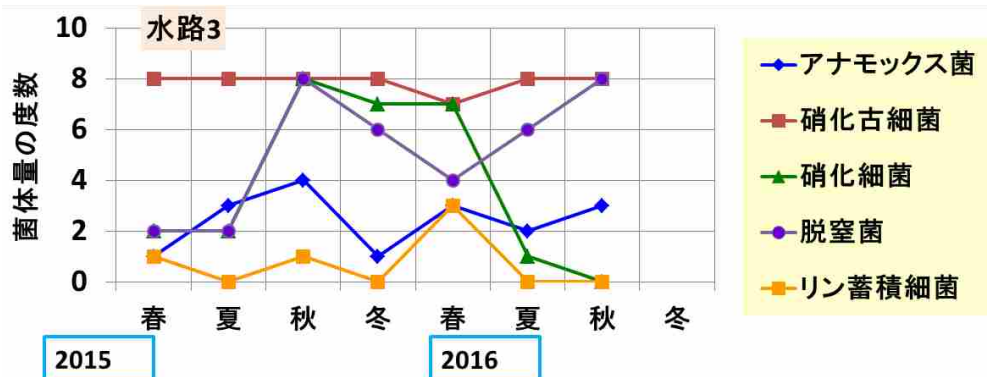


図 5-4 水路3における水質浄化細菌菌体量の季節間推移

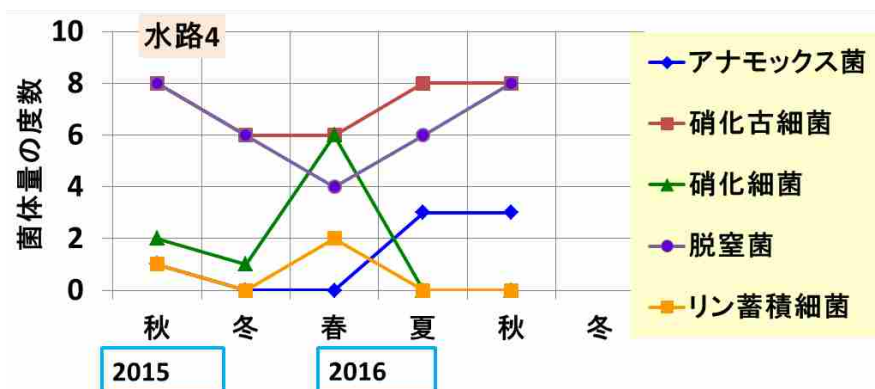


図 5-5 水路4における水質浄化細菌菌体量の季節間推移

(3) Real time PCR による水質浄化細菌量の結果

2016年の各水路のサンプルについて Real time PCR を行った結果を季節ごとに図 5-6～5-9 に示した。図の縦軸の数値は各水路サンプルの湿重量 1g 当たりのコピー数である。なおコピー数は菌体 1 個に相当する。

各図より、すべての季節で脱窒菌が最も多く存在し全細菌数に占める割合も 10%程度と高かった。次いで、硝化古細菌、硝化細菌の順であった。季節についてみると、冬でも菌体は多く存在したが、全体を見ると、秋に最も多くなる傾向があった。水路間でみると、特徴的な違いは見出せていない。

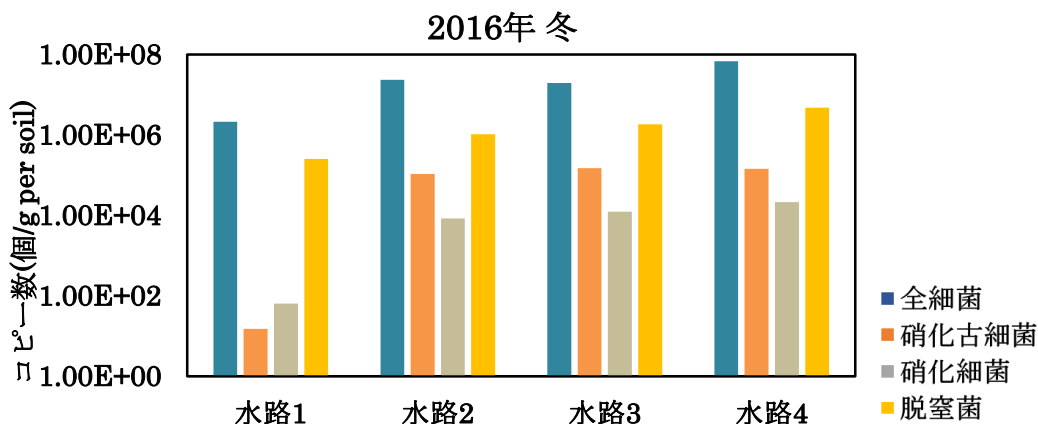
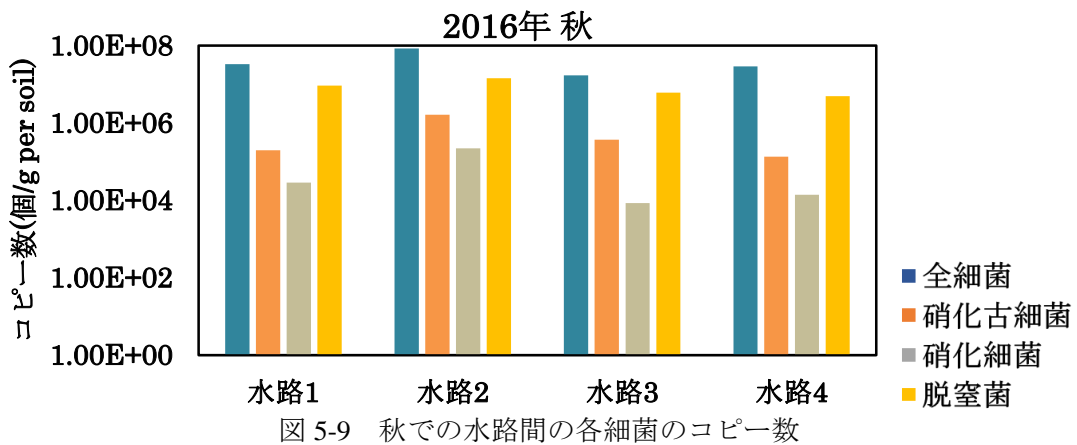
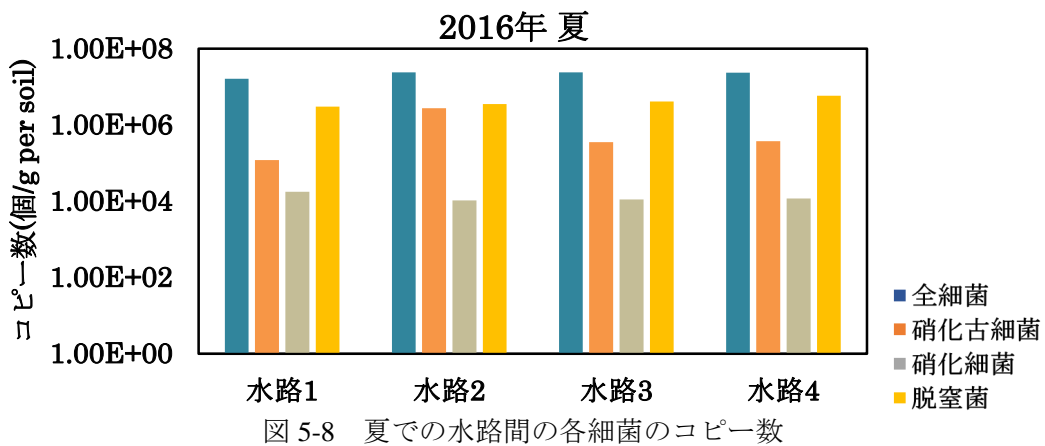
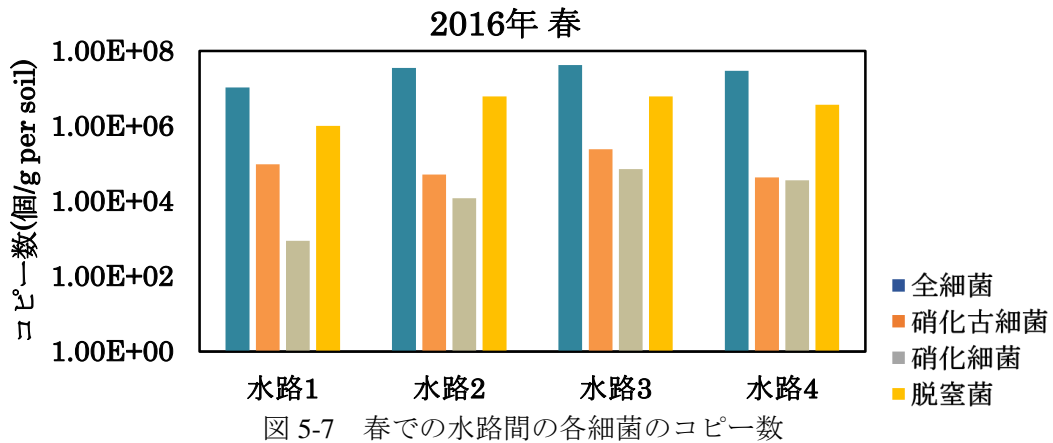


図 5-6 冬での水路間の各細菌のコピー数



◎ Real time PCR 法と PCR 法の結果の比較

本来、Real time PCR 法と PCR 法の結果はその挙動が一致するはずである。そこで、これを検証するために、両法によって得られたこれまでの結果を比較したものを、図 5-10 に示した。図中の実線が Real time PCR 法による結果を、点線が PCR 法による結果を示している。結果は、PCR による結果の方が季節による菌体量の消長を大きく表わしているが、すべての水路において季節間の変化を両方法とも、ほぼ同じ傾向を差し示している。本来は Real time PCR 法の方が、菌体数を示すことができるので、測定操作の手数は多くかかるが更なるデータの蓄積をする必要がある。

以上、PCR と Real time PCR とで、水質浄化菌体の存在量について検討してきたが、水路間で大きな差異は見いだせなかった。一方、これまで明らかにしてきたように水質浄化性能には水路間で大

きな差があった。特に脱窒性能に大きな差があった。このことから菌体の性能を効果的に引き出すにはヨシと担体の組み合わせが改めて必要であるといえる。

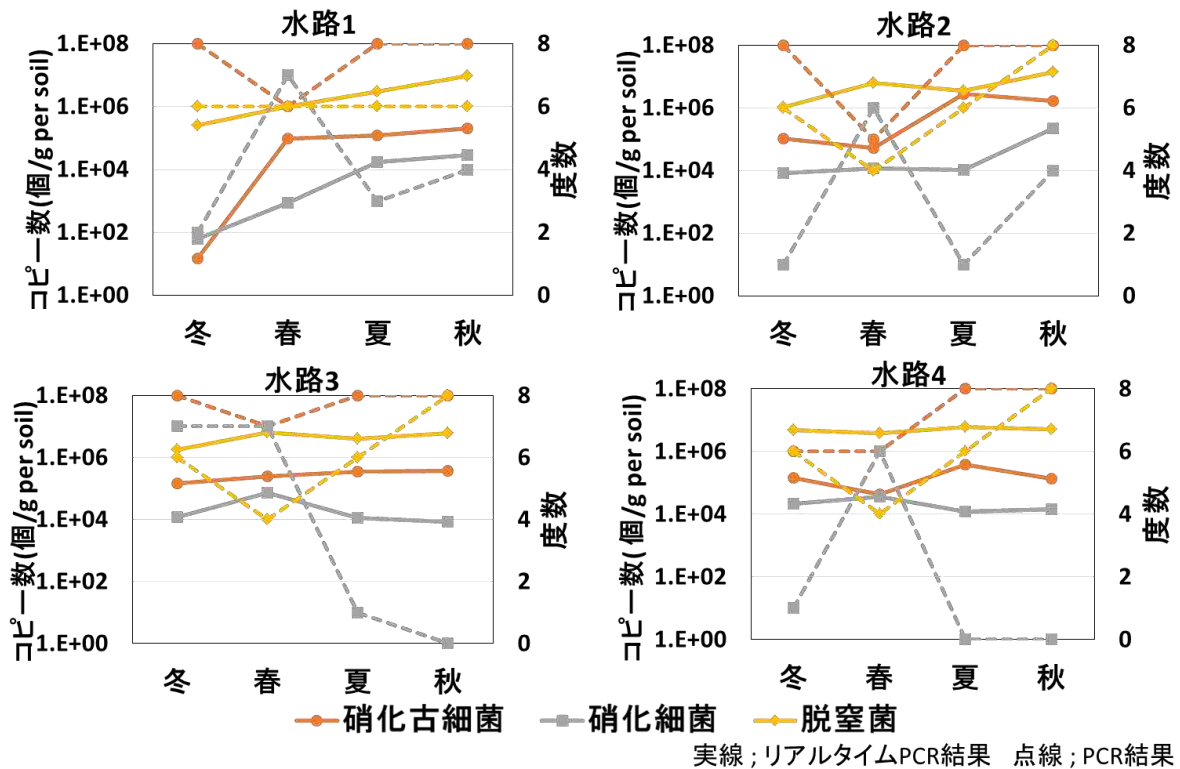


図 5-10 Real time PCR 法と PCR 法の結果の比較

(4) 16S rRNA による水路内の菌叢解析結果

◎ シーケンス解析結果

本年度は、水路3の冬・秋サンプル、水路4の冬・夏・秋サンプルの菌叢解析を行い、菌叢を同定することができた。今年度の結果を表5-2～5-6に示す。

これらの菌叢解析結果を、昨年度、一昨年度のものと合わせて総合的に検討した。

表 5-2 水路3の2016年冬サンプル 菌叢解析結果

| 2016冬水路3           |  |        |                           |
|--------------------|--|--------|---------------------------|
| 門(綱)               | 分類群  | 相同性(%) |                           |
| Proteobacteria (α) | Defluviimonas sp. CC-PW-78 16S ribosomal R     | 98%    | 海水の好気性光合成細菌               |
|                    | Uncultured sludge bacterium A41 16S ribosom    | 96%    | 活性汚泥                      |
| Proteobacteria (γ) | Pseudomonas sp. Asd M6-4 16S rRNA gene, s      | 99%    | 砂のグラム陰性好気性桿菌              |
|                    | Uncultured gamma proteobacterium clone OXI     | 98%    | 炭化水素汚染海洋堆積物の細菌            |
|                    | Uncultured gamma proteobacterium clone AlcI    | 97%    | アルカリ性の湖の微生物               |
| Bacteroidetes      | Flexibacter aggregans gene for 16S rRNA, stra  | 99%    | 非子実体非光合成糸状細菌              |
|                    | Flavobacterium sp. t7 16S ribosomal RNA gene   | 98%    | 淡水のグラム陰性好気性桿菌             |
| Acidobacteria      | Uncultured Acidobacteria bacterium clone bacI  | 97%    | 石油汚染された塩を含むアルカリ土壌の細菌      |
|                    | Uncultured Acidobacteria bacterium clone O-E   | 93%    | 畦畔の炭酸塩堆積物の細菌              |
|                    | Uncultured actinobacterium clone d3 16S ribos  | 99%    | 北部ベーリング海における底層水           |
| Gemmatimonadetes   | Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clon     | 95%    | アルカリ性の湖の微生物               |
| Foraminifera       | Virgulinema fragilis clone J516-16 16S ribosom | 99%    | 有孔虫                       |
|                    | Uncultured bacterium clone HglApr903 16S rib   | 99%    | 海洋バルク水の細菌                 |
|                    | Uncultured bacterium clone C51 16S ribosoma    | 99%    | ペニシリンG生産排水を受けるワンヤン川の下流の細菌 |
|                    | Uncultured bacterium clone D10 16S ribosoma    | 98%    | 水中付着生物                    |
|                    | Uncultured bacterium clone I-5 16S ribosomal   | 98%    | テトラクロロエチレンで汚染された地下水の細菌    |
|                    | Uncultured bacterium clone HglApr798 16S rib   | 95%    | 海洋バルク水の細菌                 |
|                    | Uncultured bacterium clone UB-127 16S ribos    | 92%    | 海底堆積物細菌                   |
|                    | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, c  | 98%    | ゴミ捨て場の細菌                  |
|                    | Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal    | 90%    | ダム貯水池内の水の細菌               |

表 5-3 水路3の2016年秋サンプル 菌叢解析結果

| 2016秋水路3             |   |        |                      |
|----------------------|---|--------|----------------------|
| 門                    | 分類群   | 相同性(%) |                      |
| Proteobacteria(γ)    | Uncultured gamma proteobacterium clone BZ46H8f_a09 16S riboso     | 95     | 海綿付着細菌               |
| Proteobacteria(δ)    | Uncultured delta proteobacterium clone C-B82 16S ribosomal RNA    | 95     | 海岸炭酸塩堆積物からの細菌        |
|                      | Uncultured delta proteobacterium clone ss1_B_07_54 16S ribosoma   | 95     | 北極堆積物における細菌          |
|                      | Uncultured delta proteobacterium gene for 16S ribosomal RNA, par  | 94     | 日本海溝の最も深い寒冷湧出域からの細菌  |
| Acidobacteria        | Uncultured Acidobacteria bacterium clone ONGS233 16S ribosoma     | 92     | 沿岸土壌細菌               |
|                      | Uncultured Acidobacteria bacterium partial 16S rRNA gene, clone C | 96     | 赤い泥汚染土の細菌            |
|                      | Uncultured Acidobacteria bacterium clone HEW_08_673 16S ribosor   | 97     | 森林土壌                 |
|                      | Uncultured Acidobacteria bacterium clone AEG_08_337 16S riboson   | 98     | 草地土                  |
|                      | Uncultured Acidobacteria bacterium clone EK_CK594 16S ribosoma    | 98     | 石油で汚染された土            |
| Planctomycetes       | Uncultured planctomycete clone MSB-3A12 16S ribosomal RNA ge      | 94     | マングローブ土壌             |
| Nitrospirae          | Nitrospira sp. 16S rRNA gene, strain GC86                         | 99     | 亜硝酸塩酸化バイオフィリアクターの微生物 |
|                      | Uncultured Nitrospirae bacterium clone FII-TR043 16S ribosomal R  | 99     | Figueirasビーチの堆積物     |
| Bacteroidetes        | Flexibacter aggregans gene for 16S rRNA, strain:IFO 15974         | 99     |                      |
| Archaea; Thaumarchae | Candidatus Nitrosoarchaeum limnia SFB1 clone SFB1-H04-T15-2       | 99     | サンフランシスコ湾の海洋堆積物      |
|                      | Uncultured bacterium clone JS5_370 16S ribosomal RNA gene, part   | 98     | 海洋堆積物                |
|                      | Uncultured bacterium clone I-5 16S ribosomal RNA gene, partial se | 98     | 韓国のPGE汚染水生動物         |
|                      | Uncultured bacterium clone SEAB1CH081 16S ribosomal RNA gene      | 99     | 湿地                   |
|                      | Uncultured bacterium clone V201-140 16S ribosomal RNA gene, pa    | 98     | 本格的な昆虫のバイオフィルム       |
|                      | Uncultured bacterium clone RMWS16 16S ribosomal RNA gene, par     | 99     | 消化管                  |

表 5-4 水路4の2016年冬サンプル 菌叢解析結果

| 2016 冬水路4         |  |     |                    |
|-------------------|--|-----|--------------------|
| 門                 | 分類群  | 相同性 | 分離                 |
| Proteobacteria(α) | Uncultured alpha proteobacterium clone Skagenf58 16S ribosomal RNA   | 99% | 活性汚泥               |
| Proteobacteria(β) | Uncultured Comamonadaceae bacterium clone BF 029 16S ribosomal       | 99% | 脱窒菌                |
|                   | Rhodoferrax sp. Asd M2A1 16S rRNA gene, strain Asd M2A1              | 99% | 光合成細菌 紅色非硫黄細菌      |
|                   | Janthinobacterium sp. An8 partial 16S rRNA gene, isolate An8         | 96% | 腐敗細菌 3             |
| Proteobacteria(δ) | Uncultured delta proteobacterium clone 4-269 16S ribosomal RNA ger   | 96% | Alum Rock Parkの泉   |
| Bacteroidetes     | Pedobacter ruber strain W1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | 98% | 土壌細菌               |
|                   | Roseivirga sp. GM-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence         | 99% | 海水 2               |
|                   | Flexibacter aggregans gene for 16S rRNA, strain:IFO 15974            | 99% | 非子実体非光合成糸状細菌       |
| Bacillariophyceae | Cymatopleura solea clone D14 66 16S ribosomal RNA gene, partial sec  | 98% | 珪藻                 |
| Cyanobacteria     | Uncultured cyanobacterium clone FII-AN072 16S ribosomal RNA gene     | 99% | Figueirasビーチの堆積物   |
|                   | Uncultured soil bacterium clone 21-(27) 16S ribosomal RNA gene, par  | 99% | 土壌細菌               |
|                   | Uncultured bacterium clone GBII-41 16S ribosomal RNA gene, partial : | 99% | 潮間海岸の砂の海洋微生物       |
|                   | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone C3188              | 98% | 硫黄細菌ゼラチン状の微生物マット 2 |
|                   | Uncultured bacterium clone GBII-27 16S ribosomal RNA gene, partial : | 99% | 海洋微生物 3            |
|                   | Uncultured bacterium clone MSB-2H1 16S ribosomal RNA gene, partia    | 96% | マングローブ土壌細菌         |
|                   | Uncultured bacterium clone SW-Jan-82 16S ribosomal RNA gene, par     | 99% | 海水の細菌              |

表 5-5 水路4の2016年夏サンプル 菌叢解析結果

| 2016 夏 水路4        |  |     |                          |
|-------------------|--|-----|--------------------------|
| 門                 | 分類群  | 相同性 |                          |
| Proteobacteria(α) | Rhizobiales bacterium CL-DNM10 16S ribosomal RNA gene, partial sec   | 99  | 干潟の堆積物                   |
| Proteobacteria(β) | Azoarcus olearius strain DQS4, complete genome                       | 95  | 化学合成有機栄養細菌 窒素固定細菌        |
|                   | Leptothrix mobilis strain Feox-1 16S ribosomal RNA gene, complete se | 96  | 化学合成細菌 鉄酸化細菌(独立栄養)       |
| Proteobacteria(γ) | Uncultured gamma proteobacterium clone Alchichica_AQ1_1_1B_34 sm     | 98  | アルカリ湖Alchichica(メキシコ)からの |
|                   | Uncultured gamma proteobacterium clone LKC3_19B.45 16S ribosomal     | 98  | 洞窟硫化バネからの微生物マット          |
|                   | Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone HG1    | 96  | 養殖したシーホーからの腸内容物およ        |
|                   | Oceanococcus atlanticus strain 22II-S10r2 16S ribosomal RNA gene,    | 91  | 紅色硫黄細菌                   |
| Bacteroidetes     | Uncultured Flammovirgaceae bacterium clone TDNP_Bbc97_63_2_130       | 99  | バイオフィルム                  |
| Nitrospirae       | Uncultured Nitrospirae bacterium clone OXIC-138 16S ribosomal RNA    | 98  | figueirasビーチの炭化水素汚染海洋堆   |
|                   | Uncultured Nitrospirae bacterium clone FII-TR058 16S ribosomal RNA   | 99  | Figueirasビーチの堆積物         |
| Chloroflexi       | Uncultured Anaerolineaceae bacterium clone EK_Ca689 16S ribosomal    | 98  | 石油で汚染された土壌               |
| Actinobacteria    | Conexibacter sp. strain Seoho-28 16S ribosomal RNA gene, partial sec | 99  | 淡水                       |
|                   | Uncultured bacterium clone CV43 16S ribosomal RNA gene, partial sec  | 97  | 微生物バイオフィルム               |
|                   | Uncultured bacterium clone NF099 16S ribosomal RNA gene, partial se  | 95  | 海洋堆積物                    |
|                   | Uncultured bacterium clone 2C228358 16S ribosomal RNA gene, partia   | 99  | 水生細菌                     |
|                   | Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, c | 96  | 水生苔の柱                    |
|                   | Uncultured deep-sea bacterium 16S rRNA gene, clone Ucc15553          | 93  | 深海底堆積物                   |
|                   | Uncultured bacterium clone 1C227515 16S ribosomal RNA gene, partia   | 94  | 水生細菌                     |
|                   | Uncultured bacterium clone AsN85 16S ribosomal RNA gene, partial se  | 95  | 水田土                      |
|                   | Uncultured bacterium clone s29 16S ribosomal RNA gene, partial sequ  | 91  | 実験用ASBR ANAMMOX反応器から巨    |

表 5-6 水路4の2016年秋サンプル 菌叢解析

| 2016 秋 水路4        |  |        |                   |
|-------------------|--|--------|-------------------|
| 門                 | 分類群  | 相同性(%) |                   |
| Proteobacteria(α) | Uncultured Rhizobiales bacterium partial 16S rRNA gene, clone O.RM-            | 97     | 根粒菌               |
|                   | Uncultured Rickettsiales bacterium clone YL197 16S ribosomal RNA g             | 94     | 偏性細胞内寄生細菌         |
|                   | Uncultured Rhodobacter sp. clone W5S6 16S ribosomal RNA gene, par              | 99     | 好気性光合成細菌          |
|                   | Uncultured Rhodospirillaceae bacterium clone DM2-63 16S ribosomal              | 98     | 好気性光合成細菌          |
| Proteobacteria(γ) | Uncultured Xanthomonadaceae bacterium partial 16S rRNA gene, clone             | 98     | キサントモナス(植物病原菌)    |
|                   | Uncultured gamma proteobacterium clone Ppss_Ma123 16S ribosomal l              | 96     | 石油で汚染された塩類アルカリ土壌  |
| Proteobacteria(β) | Uncultured Thiobacillus sp. clone MBBR-A28 16S ribosomal RNA gene, partial sec |        | 硫黄細菌 非共生型窒素固定細菌   |
| Acidobacteria     | Uncultured Acidobacteria bacterium clone HEG.08.446 16S ribosomal              | 97     | 草地と森林の土壌          |
|                   | Uncultured Acidobacteria bacterium clone HEG.08.446 16S ribosomal              | 97     | 草地と森林の土壌          |
|                   | Uncultured Acidobacteria bacterium clone MA-R3 16S ribosomal RNA               | 98     | ×西湿地土             |
| Chloroflexi       | Uncultured Chloroflexi bacterium clone BC_CK725 16S ribosomal RNA              | 95     | 堆肥化した石油で汚染された土壌のバ |
| Foraminifera      | Virgulinema fragilis clone J499-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ         | 99     | 低酸素環境中の底生有孔虫      |
|                   | Uncultured bacterium clone X-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ            | 99     | 重金属汚染河口堆積物        |
|                   | Uncultured bacterium clone 2C228358 16S ribosomal RNA gene, parti              | 99     | 水生細菌              |
|                   | Uncultured bacterium clone X-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ            | 99     | 重金属汚染河口堆積物        |
|                   | Uncultured bacterium clone F_SBR_39 16S ribosomal RNA gene, partia             | 99     |                   |
|                   | Uncultured deep-sea bacterium 16S rRNA gene, clone Ucc15553                    | 94     | 深海底堆積物            |

◎ 三年間のシーケンス結果による水路間の比較

本年度を含める3年間の菌叢解析の累計より、水路1で142個、水路2で39個、水路3で83個、水路4で76個、合計340個の菌叢を同定することができた。表5-7に3年間に解析した菌叢解析数を示し、これら340個の菌叢を同定し主要な門・綱でまとめた結果を、表5-8、表5-9に季節ごと及び水路ごとにそれぞれ示す。そして、これらの表を元に主要な門・綱の割合を算出し、季節間および水路間の違いを図5-11および図5-12にそれぞれ示した。

まず季節間の比較図より、冬には未分類の菌叢が多かった、春には、*Alphaproteobacteria* 綱と *Bacteroidetes* 門が多く、夏には *Gammaproteobacteria* 綱が多く、秋には *Alphaproteobacteria* 綱から *Gammaproteobacteria* 綱まで、また *Bacteroidetes* 門など図に掲載した分類群に万遍なく存在し菌叢の豊富さを示した。このように菌叢において秋に豊富に存在することと、窒素、リン、CODの除去性能が秋に最も良くなることと関連が高いと考える。

次に水路間の比較からは、水路1では、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、水路2では、*Bacteroidetes*、水路3では、*Gammaproteobacteria* 綱、水路4では、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱の割合が高いことがわかった。また、これら割合の高い綱の特徴として、*Alphaproteobacteria* 綱は、好気性の細菌が多く、*Betaproteobacteria* 綱では、従属栄養細菌や独立栄養細菌が多く、*Gammaproteobacteria* 綱では、汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Deltaproteobacteria* 綱では、嫌気性で汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Bacteroidetes* 門では、淡水などの一般的な環境の細菌が多いことが文献からわかった。これを表5-10にまとめて示した。

また、その他の特徴ある門・綱として、各水路において栄養塩除去に関与している *Chloroflexi* 門や、赤潮などの珪藻と関係のある *Bacillariophyceae* 門、水路3と水路4では亜硝酸酸化細菌と関係する *Nitrospirae* 門なども多く存在することがわかった。

表 5-7 3年間の菌叢解析数

|      |   | 水路1 | 水路2 | 水路3 | 水路4 |
|------|---|-----|-----|-----|-----|
| 2014 | 冬 |     |     |     |     |
|      | 春 | 17  |     |     |     |
|      | 夏 | 20  |     |     |     |
|      | 秋 | 20  |     |     |     |
| 2015 | 冬 | 22  |     |     |     |
|      | 春 | 22  |     |     |     |
|      | 夏 | 22  | 21  | 21  |     |
|      | 秋 | 19  | 18  | 18  | 17  |

|      |   |     |    |    |    |
|------|---|-----|----|----|----|
| 2016 | 冬 |     |    | 22 | 22 |
|      | 春 |     |    |    |    |
|      | 夏 |     |    |    | 20 |
|      | 秋 |     |    | 22 | 17 |
| 合計   |   | 142 | 39 | 83 | 76 |

表 5-8 3年間の菌叢解析の同定結果(季節毎)

| 門 (綱)                              | 冬  | 春  | 夏   | 秋   | 総合  |
|------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|
| <i>Proteobacteria</i> ( $\alpha$ ) | 4  | 6  | 6   | 11  | 27  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\beta$ )  | 6  | 4  | 5   | 6   | 21  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\gamma$ ) | 7  | 5  | 17  | 11  | 40  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\delta$ ) | 2  | 4  | 11  | 16  | 33  |
| <i>Actinobacteria</i>              | 2  | 0  | 1   | 1   | 4   |
| <i>Acidobacteria</i>               | 2  | 0  | 2   | 9   | 13  |
| <i>Bacteroidetes</i>               | 6  | 6  | 6   | 9   | 27  |
| <i>Chloroflexi</i>                 | 1  | 0  | 7   | 6   | 14  |
| <i>Nitrospirae</i>                 | 0  | 0  | 4   | 5   | 9   |
| <i>Planctomycetes</i>              | 1  | 0  | 2   | 3   | 6   |
| <i>Cyanobacteria</i>               | 1  | 1  | 1   | 1   | 4   |
| <i>Bacillariophyceae</i>           | 5  | 4  | 6   | 5   | 20  |
| <i>Actinobacteria</i>              | 3  | 4  | 4   | 6   | 17  |
| <i>Acidobacteria</i>               | 26 | 5  | 32  | 42  | 105 |
| 合計                                 | 66 | 39 | 104 | 131 | 340 |

表 5-9 3年間の菌叢解析の同定結果(水路毎)

| 門 (綱)                              | 水路 1 | 水路 2 | 水路 3 | 水路 4 | 合計  |
|------------------------------------|------|------|------|------|-----|
| <i>Proteobacteria</i> ( $\alpha$ ) | 8    | 4    | 5    | 10   | 27  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\beta$ )  | 12   | 1    | 0    | 8    | 21  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\gamma$ ) | 18   | 2    | 13   | 7    | 40  |
| <i>Proteobacteria</i> ( $\delta$ ) | 21   | 3    | 7    | 2    | 33  |
| <i>Bacteroidetes</i>               | 9    | 8    | 4    | 6    | 27  |
| <i>Actinobacteria</i>              | 1    | 1    | 1    | 1    | 4   |
| <i>Acidobacteria</i>               | 0    | 2    | 8    | 3    | 13  |
| <i>Chloroflexi</i>                 | 8    | 2    | 2    | 2    | 14  |
| <i>Nitrospirae</i>                 | 0    | 0    | 6    | 3    | 9   |
| <i>Planctomycetes</i>              | 3    | 2    | 1    | 0    | 6   |
| <i>Cyanobacteria</i>               | 1    | 1    | 0    | 2    | 4   |
| <i>Bacillariophyceae</i>           | 12   | 3    | 2    | 3    | 20  |
| <i>other</i>                       | 12   | 0    | 4    | 1    | 17  |
| <i>unclassified</i>                | 37   | 10   | 30   | 28   | 105 |
| 合計                                 | 142  | 39   | 83   | 76   | 340 |

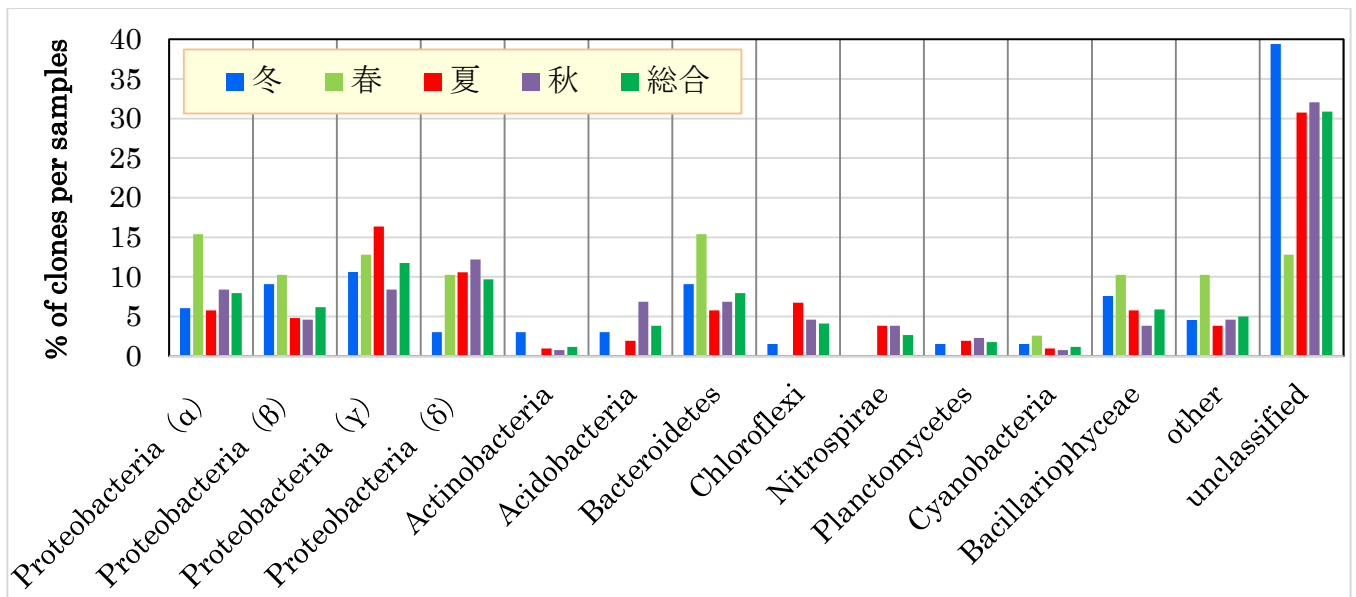


図 5-11 各季節間における主要な門・綱の割合の比較

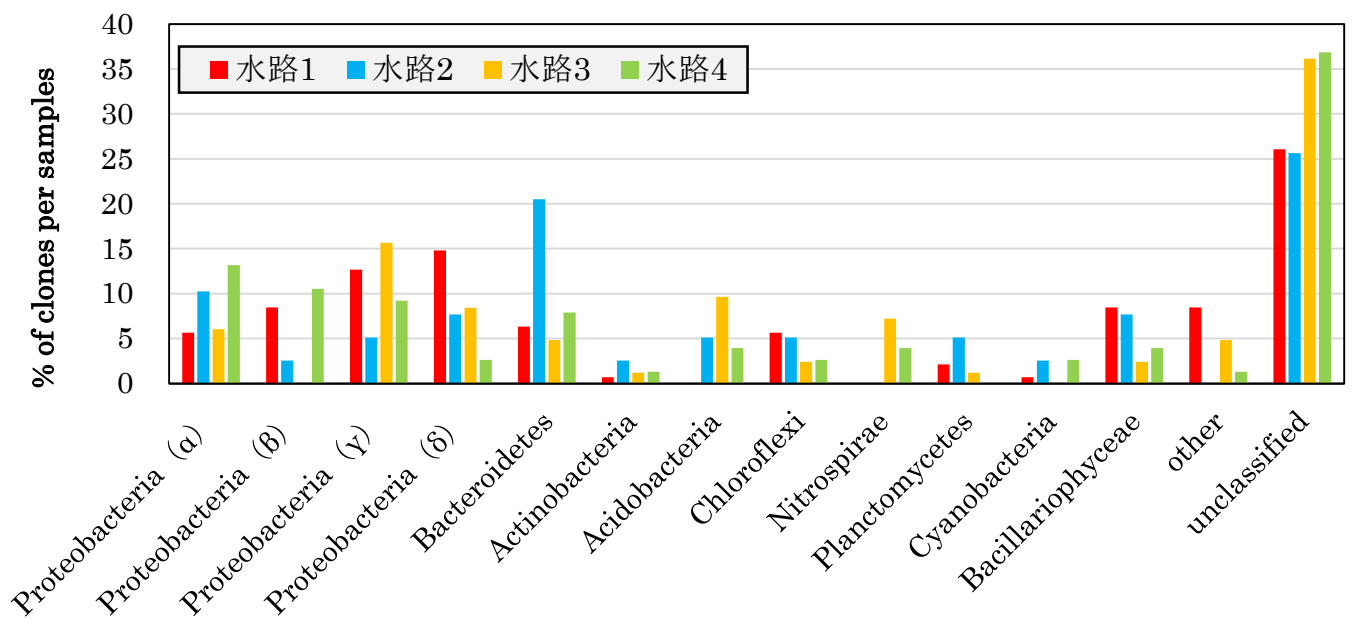


図 5-12 各水路間における主要な門・綱の割合を比較した棒グラフ

表 5-10 水路間の菌叢比較で得られた割合の高かった 5 個の門・綱の特徴

| 割合が高い5個の門・綱               | 水路    | 主な特徴                     |
|---------------------------|-------|--------------------------|
| <i>Proteobacteria</i> (α) | 水路4   | 好気性の細菌                   |
| <i>Proteobacteria</i> (β) | 水路1,4 | 脱窒菌や独立栄養細菌等の各種分解菌        |
| <i>Proteobacteria</i> (γ) | 水路1,3 | 汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌     |
| <i>Proteobacteria</i> (δ) | 水路1   | 嫌気性で汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌 |
| <i>Bacteroidetes</i>      | 水路2   | 一般の環境の細菌                 |



次に、これまでに示した菌叢解析の中で、水質浄化に関与する細菌叢をピックアップし各水路ごとに一覧にまとめて表 5-11 に示す。この表では、好気性菌と嫌気性菌を色分けて示し、それらの共存状況を視覚化した。すべての水路で、窒素循環を担う好気性の亜硝酸酸化細菌や根粒菌、嫌気性の脱窒菌などが存在することがわかった。また、好気性・嫌気性の存在状況をみると、水路 1 は他の水路と比較し、嫌気性菌が優勢であり、脱窒菌が多く見られた。水路 2 は他の水路と比較し、クローン数が少ないため特徴をつかむことができなかった。水路 3 は、好気性菌・嫌気性菌が半々であり、有機物分解菌が多く見られた。水路 4 は他の水路と比較し、好気性菌が多く好気的環境であることが見えた。しかも嫌気性菌も多くみられ、さらに好気性菌・嫌気性菌の種類が豊富であった。このように水路 4 では菌叢の豊富さと好気性・嫌気性の菌叢バランスが良かったため、水質浄化の促進につながったと考える。すなわち水路 4 では、緒言で述べたように湖内の好気環境と嫌気環境すべてを具現しており、水路内でこれらの環境微生物がそれらのニッチを保ちながら有効に共存共栄していると推察できる。

表 5-11 各水路の水質浄化にかかわる細菌の一覧

| 水路1                            |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| <i>Acetobacteraceae</i> (科)    | 従属栄養細菌 酢酸菌            |
| <i>Rhizobiales</i> (目)         | 根粒菌                   |
| <i>Paracoccus</i> (属)          | 脱窒菌                   |
| <i>Rhodobacter</i> (属)         | 好気性光合成細菌              |
| <i>Thiobacillus</i> (属)        | 硫黄細菌 窒素固定細菌           |
| <i>Rhodocyclus</i> (科)         | N <sub>2</sub> O 還元細菌 |
| <i>Pseudomonas</i> (属)         | 脱窒菌                   |
| <i>Chromatiales</i> (科)        | 紅色硫黄細菌                |
| <i>Gammaproteobacteria</i> (綱) | 鉄酸化細菌                 |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱) | 嫌気性芳香族生分解能菌           |
| <i>Anaeromyxobacter</i> (科)    | 硫酸還元細菌                |
| <i>Desulfonema</i> (属)         |                       |
| <i>Desulfopila</i> (属)         |                       |
| <i>Desulfobacca</i> (属)        |                       |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱) |                       |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱) | 鉄(III) - 還元細菌         |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱) | 嫌気性トルエン分解菌            |
| <i>Bacteroides</i> sp. (属)     | 還元的脱塩素化細菌             |
| <i>Cyanobacteria</i> (門)       | 嫌気性芳香族資化性細菌           |
| 水路2                            |                       |
| <i>Rhodobacter</i> (属)         | 好気性光合成細菌              |
| <i>Burkholderia</i> (属)        | 脱窒菌                   |
| <i>Desulfobulbaceae</i> (科)    | 硫酸還元菌                 |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱) | 硫酸還元菌                 |
| <i>Prolixibacter</i> (属)       | 硝酸還元菌                 |
| <i>Rhodopirellula</i> (属)      | 鉄酸化細菌                 |
| unclassified                   | 硫酸還元菌                 |
| unclassified                   | 海洋性硫黄生成細菌             |

赤色：好気性菌      青色：嫌気性菌

| 水路3                               |            |
|-----------------------------------|------------|
| <i>Defluviimonas</i> sp. (属)      | 好気性光合成細菌   |
| <i>Sphingomonadaceae</i> (科)      | 海洋性炭化水素分解菌 |
| <i>Gammaproteobacteria</i> (綱)    | 硫酸還元菌      |
| <i>Pseudomonas</i> (属)            | 脱窒菌        |
| <i>Methylosarcina fibrata</i> (種) | メタン資化性菌    |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱)    | 油分解菌       |
| <i>Deltaproteobacteria</i> (綱)    | 油分解菌       |
| <i>Flavobacterium</i> (属)         | 脱窒菌        |
| <i>Nitrospira</i> (属)             | 亜硝酸酸化細菌    |

| 水路4                          |                  |
|------------------------------|------------------|
| <i>Rhodospirillaceae</i> (科) | 好気性光合成細菌         |
| <i>Defluviimonas</i> (属)     |                  |
| <i>Rhodobacter</i> sp. (属)   | 根粒菌              |
| <i>Devosia</i> (属)           |                  |
| <i>Comamonadaceae</i> (科)    | 脱窒菌              |
| <i>Rhodoferrax</i> (属)       | 紅色非硫黄細菌          |
| <i>Azoarcus</i> (属)          | 硝酸還元菌            |
| <i>Leptothrix</i> (属)        | 鉄酸化細菌(独立栄養で従属栄養) |
| <i>Thiobacillus</i> (属)      | 硫黄細菌 窒素固定細菌      |
| <i>Oceanococcus</i> (属)      | 紅色硫黄細菌           |
| <i>Nitrospira</i> sp. (属)    | 亜硝酸酸化細菌          |
| unclassified                 | 油汚染海中土壌の分解細菌     |

## 6. 三次元励起蛍光スペクトルの測定結果

三次元励起蛍光スペクトルの各種基準となる試料の蛍光を図 5-13~5-15 に示した。トリプトファン(Trp)の蛍光ピークは Ex/Em=260~280/330~370 であり、チロシン(Tyr)の蛍光ピークは Ex/Em=270~280/290~320 である。この2つのピークはタンパク質様蛍光ピークと呼ばれる。また、フルボ酸(Fu)の蛍光ピークは Ex/Em= 300~340/400~450 であり、フミン酸(Fu)の蛍光ピークは Ex/Em= 260~320/400~520 である。この2つのピークはフルボ酸様蛍光ピークと呼ばれる。リグニン(Lo)の蛍光ピークは Ex/Em= 280/390 であり、これはフルボ酸様物質になる前駆体とされるものである。

次に長柄川下流部および水路入口出口の蛍光の変化の結果を図 5-15~5-18 に示した。採水は 10 月 26 日と 11 月 11 日で行った。まず長柄川下流から採水したサンプルの蛍光はフミン酸とフルボ酸

の部分にわずかな蛍光が認められた。次に各水路の両日いずれのサンプルも流入の蛍光ピークはともにタンパク質様蛍光ピークがみられ、またフルボ酸・フミン酸を示す蛍光ピークが高くなっていった。これらは明らかに長柄川のものとは異なっていた。これに対し流出はタンパク質様蛍光ピークの消失が見られたが、フルボ酸・フミン酸を示す蛍光ピークは入口とあまり変化がなかった。この要因として、フルボ酸様蛍光物質は主に親水性の難分解性有機物 (DOM) であり、親水性 DOM の起源は植物プランクトンの内部生産だと知られていることから、湖水のフルボ酸類の増加は植物プランクトンにより内部生産された有機物が溶け出したためと推測される。これら、フルボ酸様蛍光物質が多くなると COD 成分に反映されその除去が困難となる。植物プランクトンが増殖し、それが死滅した時 DOM が溶出し、同時にタンパク質を多く含む有機性窒素類も溶出すると考えられるので、これら微生物の栄養源となる窒素やリンの今後継続した除去が必要と思われる。

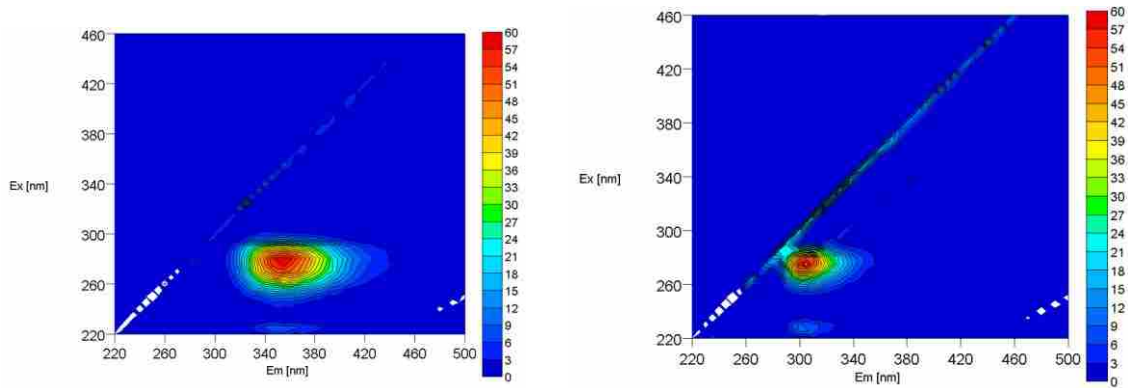


図 5-13 トリプトファン(左)とチロシン(右)の蛍光ピーク

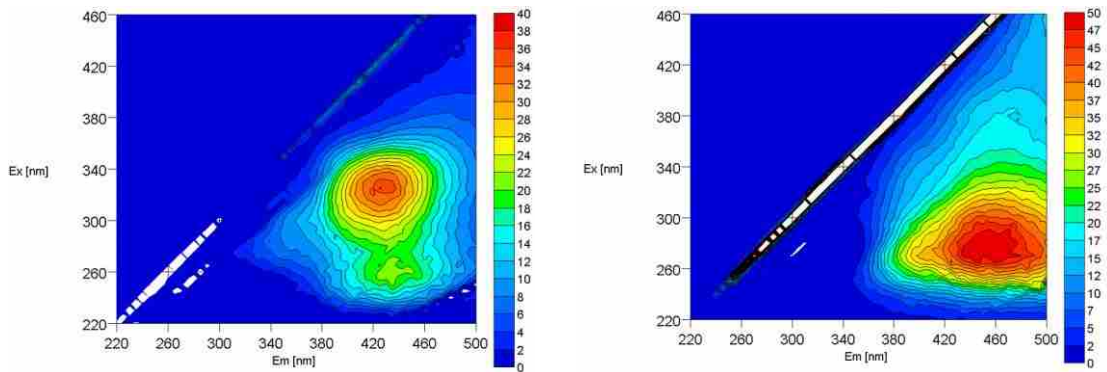


図 5-14 フルボ酸 (フルボ酸エキス「大地の雫」) (左)とフミン酸 (Wako 試薬) (右)の蛍光ピーク

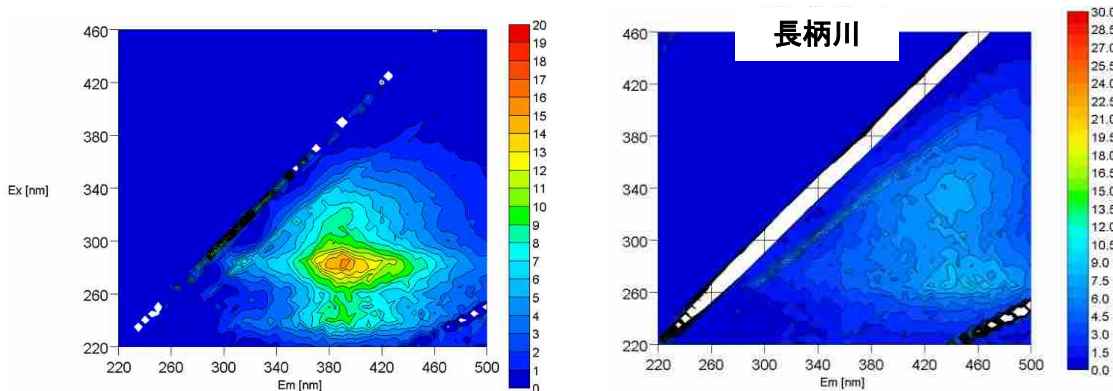


図 5-15 リグニンスルホン酸 (東京化成) (左)と 10 月 26 日採水の長柄川下流部(右)の蛍光ピーク

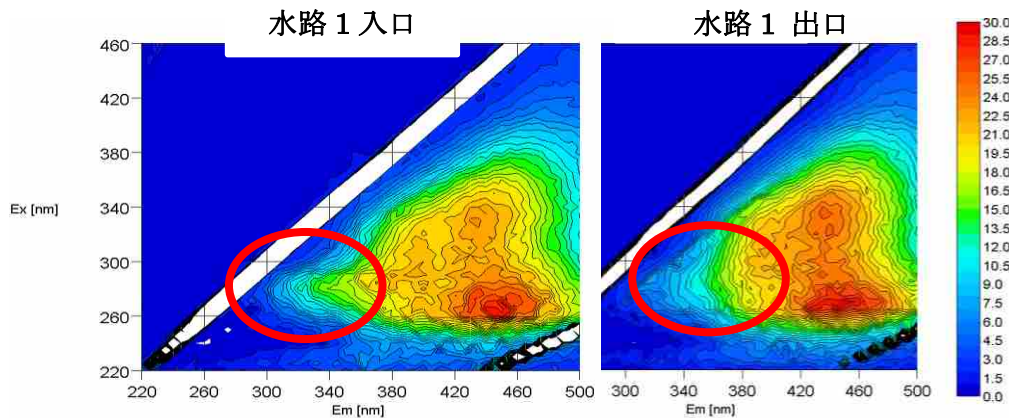


図 5-16 10月26日採水の水路1 入口と出口の蛍光ピーク

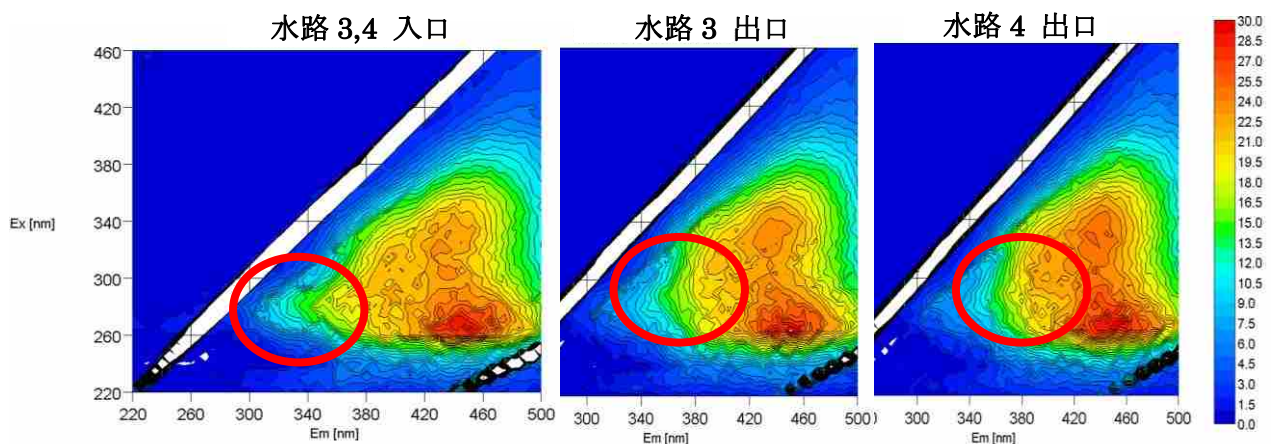


図 5-17 10月26日採水の水路3・水路4の入口と出口の蛍光ピーク

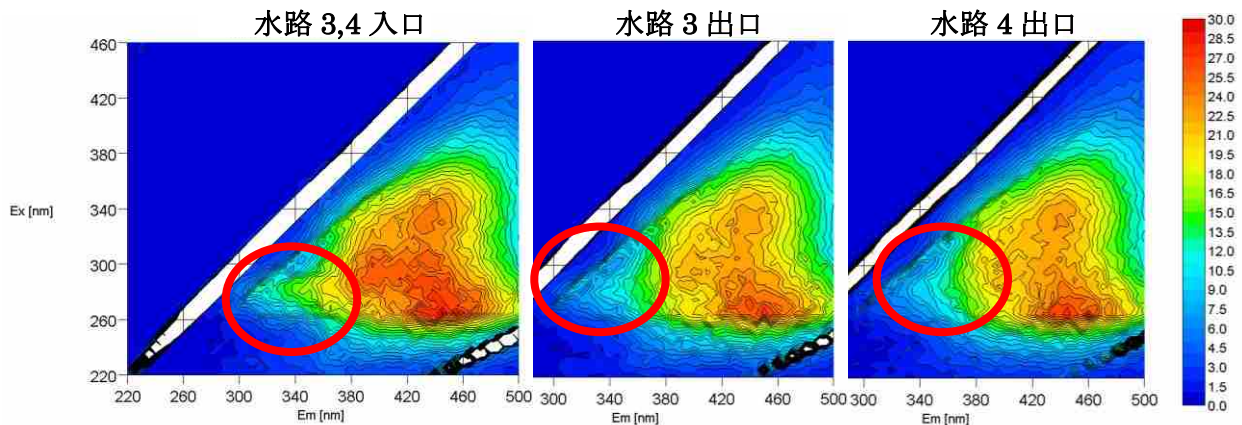


図 5-18 11月11日採水の水路3・水路4の入口と出口の蛍光ピーク

## 7. 研究成果を踏まえて提案される湖岸植栽帯ならびに護岸碎石帯

これまで述べた研究成果より、ヨシ植栽と担体を組み合わせた浄化システムは水質浄化を良好に行うことが示された。一方で、担体みのシステムではやや劣るものの COD 成分の除去には有効性が発揮できた。そこでこれら浄化システムは湖岸の適材適所に設置すれば効果が発揮できるものと思われる。湖山池の場合ヨシ植生が広範囲に存在するので、そこには図 7-1 のように担体をヨシ植生帯にかぶせる形が考えられる。さらにその周りを碎石で保護し、湖水が担体充填部分を通るようにする。こうすることによって担体充填部にヨシ根圏の発達が起き、微生物活性が増大する。一方、

ヨシ植生帯がない湖岸では護岸工事を改良し、図 7-2 のように多機能性担体を砕石護岸の内部に充填し湖水が通るようにする。こうすることによって担体内部の水質浄化菌体の増殖が起こる。



図 7-1 湖山池湖岸のヨシ植生帯とヨシと担体を組み合わせた水質浄化護岸の設置例

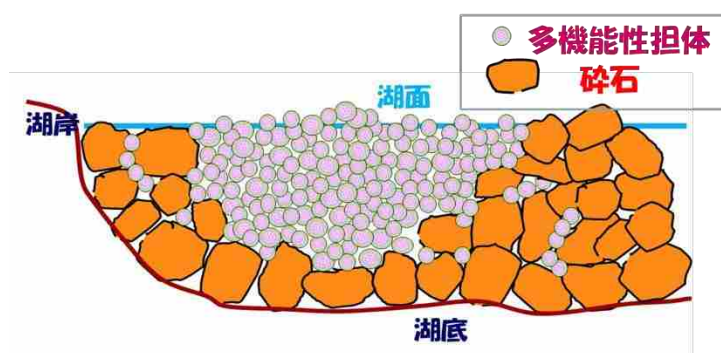


図 7-2 湖岸への多機能担体の設置例

## 8. 結 言

本研究では、ヨシ植栽と担体を組み合わせた水路の水質浄化性能並びに水質浄化に関与する土壌内細菌の検出と定量および菌叢解析を 3 年間にわたって行ってきた結果、以下のことが分かった。

1. 全窒素の除去性能は、水路 1 と水路 4 が年間を通して高く、環境基準値以下に浄化できた。水路 2 はヨシが生長する夏頃に高くなった。水路 3 は水路 1 と水路 4 に比べると低いが、年間を通して安定していた。水路 1 と水路 4 で全窒素の除去が良いのは、硝化・脱窒がほぼ完全に行われていたためであった。
2. 全リンは、全水路において除去率はあまり安定せず、夏に低下した。除去速度は、水路 1 と水路 4 で比較的高い除去速度を示した。
3. COD では、除去率は春から夏にかけて減少し、秋から冬にかけて増加した。また、除去速度も除去率と同様の変化であった。
4. 年間を通して除去性能が最も高いのは水路 4 であった。このことより、ヨシと担体を組み合わせ且つ水路内に好気部分が多い方が、ヨシの生育および根圏微生物の活性により除去性能が向上すると考えられる。また窒素、リン、COD の季節間の除去性能はすべての水路において秋に最も良くなった。
5. 水路内の菌叢解析の結果、硝化古細菌と脱窒菌は年間を通して多く検出された。硝化細菌は、春に多かった。アナモックス細菌とリン蓄積細菌はわずかに検出された。アナモックス細菌は特に水路 3 において検出された。また、硝化古細菌と硝化細菌は競合して生息していることが分かった。水質浄化菌体の存在量について水路間で大きな差異は見いだせなかった。一方、これまで明らかにしてきたように水質浄化性能には水路間で大きな差があった。特に脱窒性能に大きな差があったことから菌体の性能を効果的に引き出すにはヨシと担体の組み合わせが改めて必要であるといえる。
6. 16S rRNA による菌叢解析から、季節間の違いは小さかったが、特に秋には *Alphaproteobacteria*

- 綱から *Gammaproteobacteria* 綱まで、また *Bacteroidetes* 門など多くの分類群に万遍なく存在し菌叢の豊富さを示した。
7. 水路間には明らかな菌叢の違いがあることを確認した。水路1では、*Gammaproteobacteria*、*Deltaproteobacteria*、水路2では、*Bacteroidetes*、水路3では、*Gammaproteobacteria* 綱、水路4では、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱の割合が高いことがわかった。また、これら割合の高い綱の特徴として、*Alphaproteobacteria* 綱は、好気性の細菌が多く、*Betaproteobacteria* 綱では、従属栄養細菌や独立栄養細菌が多く、*Gammaproteobacteria* 綱では、汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Deltaproteobacteria* 綱では、嫌気性で汚染・栄養分が多い土壌や堆積物からの細菌が多く、*Bacteroidetes* 門では、淡水などの一般的な環境の細菌が多いことが文献からわかった。また、その他の特徴ある門・綱として、各水路において栄養塩除去に関与している *Chloroflexi* 門や、赤潮などの珪藻と関係のある *Bacillariophyceae* 門、水路3と水路4では亜硝酸酸化細菌と関係する *Nitrospirae* 門などが存在することがわかった。
  8. 好気性菌、嫌気性菌の分類でみると、水路1は他の水路と比較し、嫌気性菌が優勢であり、脱窒菌が多く見られた。水路3は、好気性菌・嫌気性菌が半々であり、有機物分解菌が多く見られた。水路4は他の水路と比較し、好気性菌が多く好气的環境であることが見えた。しかも嫌気性菌も多くみられ、好気性・嫌気性のバランスが良くかつ菌叢の種類も豊富であったため、水質浄化の促進につながったと考える。また担体充填された水路からは有機物分解菌の存在が多く観察されたことから担体はCOD除去に効果があると立証された。
  9. 三次元蛍光分析の結果、各水路ともにタンパク質様蛍光ピークを示す有機物の除去が見られたが、フルボ酸様蛍光ピークを示す有機物の除去は困難だと推測される。このことからフルボ酸様蛍光ピークを示す有機物はCODの除去を困難にしている。
  10. まとめとして、担体とヨシを組み合わせた水路4は、高い水質浄化性能を示し、さらにこれまでの水路1よりもCODの除去に優れていた。各水路における春、夏、秋および冬の水質浄化に関与する菌体の相対的な量が把握できた。各水路共に、硝化と脱窒及びリン蓄積に関与する菌叢が確認でき、それらの存在量は秋期が最も豊富であった。一方、夏期は他の季節に比べて少なかった。また冬の水路からは、硝化古細菌と脱窒菌が豊富に存在していた。このことから、冬期においても窒素の硝化・脱窒が起こっていると推察された。また、実際に、水質分析からも窒素除去の現象が起きており、その裏付けが取れたと思われる。また各水路とも窒素除去細菌は豊富に検出されたが、水路1と水路4が明らかに他の水路よりも性能が良かったことと考え合わせると、菌叢集団の能力を發揮させるための菌体にとっての良好な環境状態(ニッチ)を創出するにはヨシと担体の組み合わせが極めて有効であることが改めて分かった。水路3は硝化、脱窒菌さらにはアナモックス菌の付着が多く、ヨシがないところでの窒素除去方法として期待が持て、またCODの除去にも優れており、ヨシが生育できないところで使用できる結果となった。
  11. 実験で使用した水路の実際の浄化装置として適用を考えると、ヨシ生育帯では水路4が応用でき、ヨシの生育できない砕石護岸では水路3が応用できると提案できる。