

東京湾における水質動態と底質微生物群集構造の解析

藤田 昌史* ・ 鯉 渕 幸生** ・ Udin HASANUDIN***
小 倉 久子**** ・ 藤 江 幸 一***** ・ 磯 部 雅 彦*****

東京湾の中央部平地 (St. 8) と湾奥部浅瀬窪地 (St. 99) の底質微生物群集構造をキノンプロファイル法により解析した。St. 8 では貧酸素化により, St. 99 では成層の解消にともなう底質へのデトリタスの供給により, 底質微生物量が増加することが明らかとなった。成層の形成期間におけるユビキノンの優占種は, St. 8 では Q-8 であったのに対し, St. 99 では Q-9 であった。メナキノンの優占種は両地点ともに MK-6 であったが, 成層が解消した後は優占種の入れ替わりが見られた。多次元尺度構成法による解析を行ったところ, 両地点の底質微生物群集構造は異なる遷移過程を示した。この遷移には, 溶存酸素濃度が大きく関係していたことが明らかとなった。

1. はじめに

東京湾をはじめとする内湾において, 富栄養化問題が顕在化して久しい。窒素・リンなどの流入負荷削減に向けてさまざまな施策が講じられてきたにもかかわらず, 湾内の水質は改善されていない現状にある。陸域由来の有機汚濁物質や植物プランクトン等に由来するデトリタスが, 湾内底質において蓄積・濃縮され, 底質微生物群集によって分解・無機化される過程で溶出し, 再び湾内の食物連鎖に回帰していることが原因であると考えられている (鯉渕ら, 2001)。このような湾内の物質循環に, 底質微生物群集が深く係わっていることは, これまでも報告されているものの, その機能や構造については十分な知見が得られていない。

そこで本研究では, 東京湾における水質動態と底質微生物群集構造との関係を明らかにすることを目的として, 水質観測とキノンプロファイル法 (平石, 1992) を用いた底質微生物群集構造の観測を実施した。

2. 観測および分析方法

(1) 現地観測

東京湾の中央部平地 (St. 8) と湾奥部幕張沖の浅瀬窪地 (St. 99) の二地点において, 2002 年 8 月 26 日から 11 月 14 日にかけて千葉県所有の水質調査船「きよすみ」により, 計 5 回の現地観測を実施した (図-1)。観測期間における水深は, St. 8 では 16.4 ± 0.8 m, St. 99 では 18.5 ± 0.9 m であった。

海水の採水は, 1.5 m 間隔で行い TRAACS-800 (プラン・ルーベ製) を用いて, 窒素, リンの分析を行った。また, 採水と同時に, 投げ込み式多項目水質計 Ocean Seven 316 (Idronaut 製) を用いて, 水温, 塩分, 溶存酸

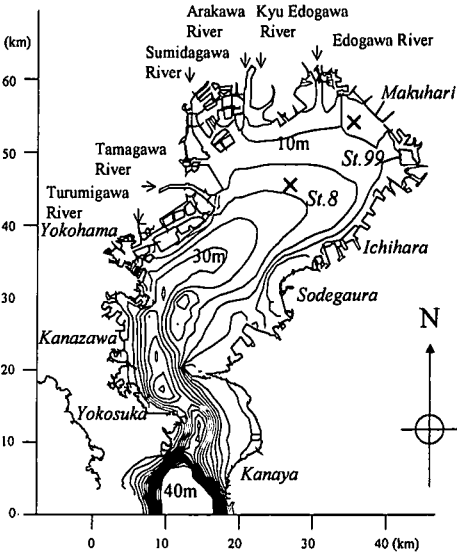


図-1 現地観測地点

素, クロロフィル-*a* 等の鉛直分布を測定した。底質の採取には, 港湾技研式採泥器を用いた。

(2) キノンプロファイル法

キノンは, 細菌の呼吸鎖や光合成電子伝達鎖において水素キャリアーとして機能する補酵素である。キノンプロファイル法とは, 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の解析手法である。キノンは構造的にユビキノンとメナキノンに大別され, イソプレノイド側鎖数 *n* の違いによりそれぞれ, Q-*n*, MK-*n* と表される。さらに, 水素飽和度 *x* の違いにより Q-*n* (*H_x*), MK-*n* (*H_x*) と表される (平石, 1992)。ユビキノンは, 比較的高い酸化還元電位を有し, 酸素や硝酸塩などの電子受容体に対して機能することから, 偏性好気性細菌や通性嫌気性細菌などに存在する。一方, メナキノンは低電位のフマル酸や硫酸塩などによる嫌気呼吸に係わることから, 絶対嫌気性細菌や通性嫌気性細菌などに存在する。一般的に, 一細菌種は一種の優占キノンを含有する。

クロロホルム・メタノール溶液 (2 : 1, *v/v*) およびへ

* 正 会 員 博(工) 山梨大学助手 大学院医学工学総合研究部
** 正 会 員 博(工) 東京大学講師 大学院新領域創成科学研究科
*** M.Sc. 豊橋技術科学大学博士課程 大学院工学研究科
**** 正 会 員 千葉県水質保全研究所 主席研究員
***** 工 博 豊橋技術科学大学教授 工学部
***** フェロー 工 博 東京大学教授 大学院新領域創成科学研究科

キサンを続けて用いて、底質試料からキノンを含む脂溶性成分を抽出した。この抽出液を固相抽出カートリッジ Sep-Pak Silica (Waters 社) に吸着させた後、2% (v/v) および 10% (v/v) のジエチルエーテル・ヘキサン溶液をそれぞれ通過させて、メナキノンおよびユビキノンをそれぞれ回収した。この回収液をアセトンで溶媒置換した後、高速液体クロマトグラフィーでメナキノンおよびユビキノンをそれぞれ分離・定量した。移動相として、メタノール・イソプロピルエーテル溶液 (81:19, v/v) を用い、流量 1 ml/min で流した。カラムには、Zorbax-ODS カラム (4.6×250 mm, 島津) を用いた。検出器の波長は、メナキノンの場合には 270 nm に、ユビキノンの場合には 275 nm にそれぞれ設定した。各キノン種の同定には、ENIU 値 (Hiraishi ら, 1991) を参考にした。この一連の分析手順は、Fujie ら (1998) の方法にしたがった。

本研究では、キノンプロファイルの遷移過程を定量的に把握するために、キノン存在比データを用いて多次元尺度構成法による評価を行った。解析には、SPSS 10.0 J (SPSS Japan Inc.) を用いた。

本手法で用いるのは化学分析だけであり、培養など微生物学的な専門知識を必要としないことから、廃水処理

系 (Hiraishi ら, 1991, 藤田ら, 2002) や土壌系 (Fujie ら, 1998) などの微生物群集解析に利用されている。

3. 結果および考察

(1) 成層の形成と解消

St. 8 および St. 99 における水温、塩分、溶存酸素およびクロロフィル-*a* の時経列を図-2 に示した。観測開始時の 8 月 26 日には、鉛直方向に水温、塩分が大きく異なり、既に水温・塩分成層が形成されていた。この水温成層は 10 月 10 日には解消されていた。一方、塩分成層は、St. 8 では 10 月 29 日、St. 99 では 11 月 14 日には解消されていた。

クロロフィル-*a* および溶存酸素濃度は、両地点ともに、水面下 1 m で高い値を示した。植物プランクトンによる光合成が反映されていたものと考えられる。一方、水深 15 m では溶存酸素濃度が相対的に低い値を示した。成層が形成されていたためであると考えられる。特に St. 99 では、水温成層が解消される 10 月 29 日まで、貧酸素化が続いていた。

(2) 底質直上水のリン動態

St. 8 および St. 99 における底質直上水の全リン濃度変化を図-3 に示した。8 月 26 日から 10 月 10 日にかけ

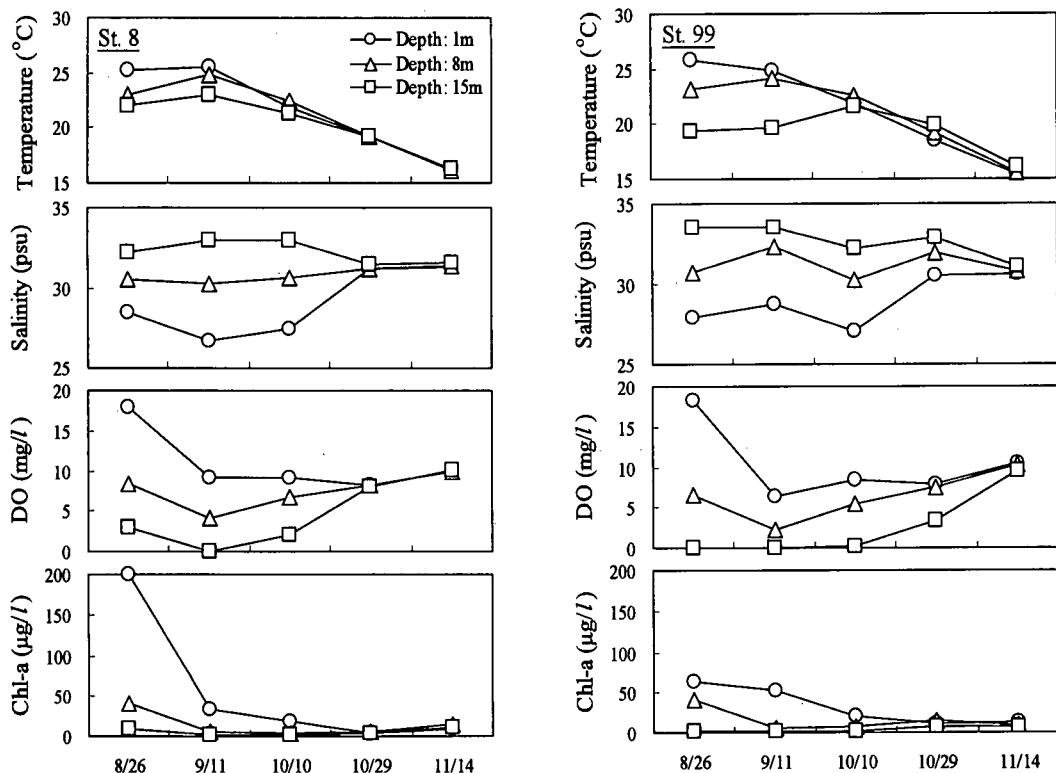


図-2 水温、塩分、溶存酸素およびクロロフィル *a* の変化

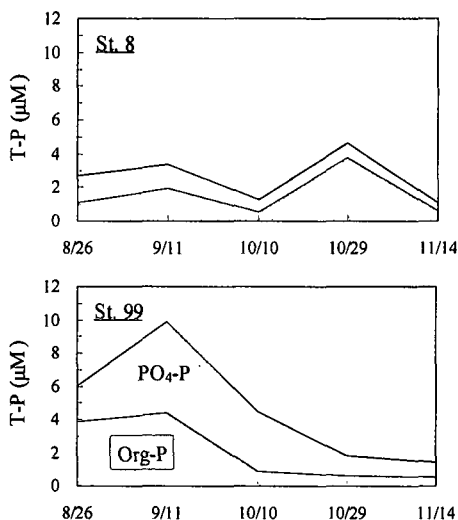


図-3 底質直上水のリン濃度の変化

で、St. 99の方がSt. 8よりも高い値を示した。St. 99では、8月26日と9月11日に有機態リン濃度が、観測期間で特に高い3.9、4.4 μM を示した。これは、デトリティスに由来したものと推測される。図-2に示したように、St. 8の方がSt. 99よりクロロフィル-*a*濃度が高かったにもかかわらず、有機態リン濃度はSt. 99の方が高い値を示したことから、植物プランクトンに由来したとは考えにくい。St. 99では海底で貧酸素化が続いていたことから、好気呼吸を行う細菌群の死滅に由来したものと予想される。

St. 8では、10月29日に有機態リン濃度が観測期間で最も高い3.7 μM を示した。成層の解消と同時期であったことから、デトリティスの供給があったものと予想される。一方、St. 99ではこのような傾向は見られなかった。図-2に示した8月26日の結果に見られるように、St. 8のクロロフィル-*a*がSt. 99の約3倍存在していたことが、成層解消期のデトリティス供給量の差につな

がったものと推測される。

(3) キノン存在量の変化

St. 8およびSt. 99の底質におけるキノン存在量の変化を図-4に示した。8月26日のキノン存在量は、St. 8では12.5 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ であったのに対し、St. 99では2.3倍高い29.1 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ を示した。これは、St. 99における底質細菌群の存在量が、St. 8より2.3倍大きいことを意味している。St. 99では、9月11日には54.1 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ に達していた。図-3に示した有機態リンに見られたように、8月26日から9月11にかけて、より多く存在していたと推測されたデトリティス由来の炭素源の影響が大きいと考えられる。ユビキノンおよびメナキノンのそれぞれの総量の比をQ/MK比として図-4のなかに示したが、この期間を含めて10月10日以外は1以下であった。嫌気呼吸を行う細菌群の方がより多く存在していたと解釈される。10月10日以降にキノン存在量が相対的に減少したのは、水温の低下により増殖速度が減少したことに加え、供給される炭素源が減少したことが要因として想定される。

St. 8では、10月29日に44.8 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ にまで急激に増加していた。このときもSt. 99と同様に有機態リン濃度が相対的に高かったときであった。しかしながら、11月14日には急激に減少していた。Q/MK比は、10月29日までは1以下であったが、11月14日には2.3にまで上昇していた。10月29日には成層が解消され、底質直上水の溶存酸素濃度が8 mg/lにまで増加し、底質付近が好気的な環境に変わったことから、メナキノンを含有する細菌群がより多く死滅したものと考えられる。一方、St. 8より成層の解消が遅れたSt. 99では、11月14日の段階ではまだこのような傾向は認められなかった。

(4) キノン存在比の変化

キノン存在比の変化を図-5に示した。観測期間において優占していたユビキノンは、St. 8ではQ-8であったのに対し、St. 99ではQ-9であった。それぞれの地点で

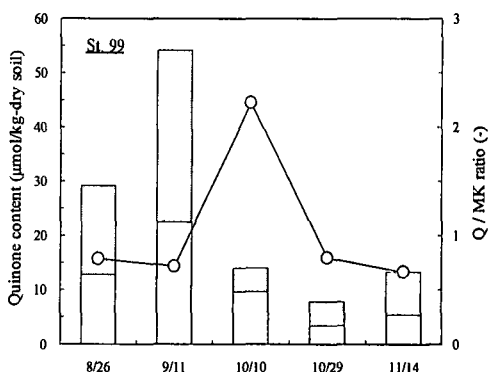
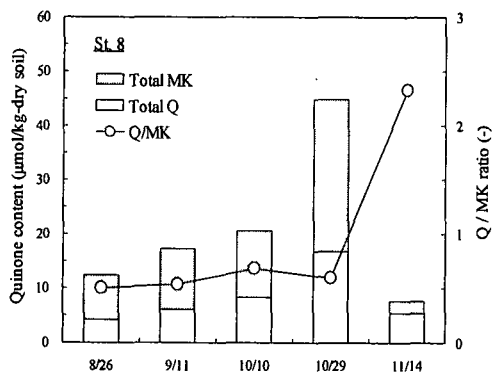


図-4 キノン存在量の変化

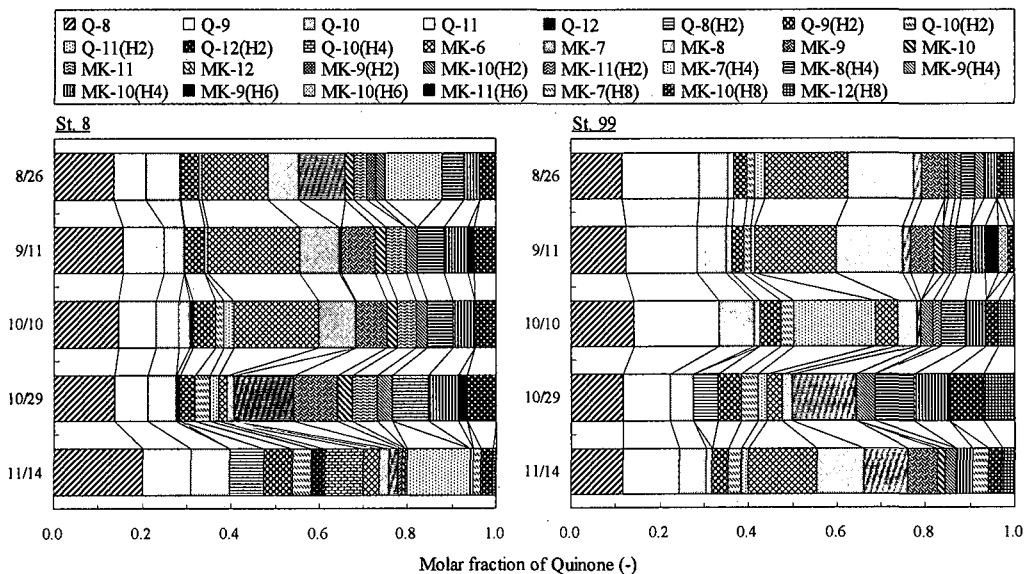


図-5 キノン存在比の変化

は、明らかに異なるユビキノン含有細菌群が生息していたといえる。

St. 8 では、観測期間を通じてユビキノンの優占種は Q-8 > Q-10 > Q-9 の順序であった。一方、St. 99 では Q/MK 比が急激に上昇した 10 月 10 日を除いて Q-9 > Q-8 > Q-10 の順序になった。10 月 10 日は、Q-9 > Q-11 (H2) > Q-8 の順序になり、これまでに存在比の低かった Q-11 (H2) が二番目に優占した。それは、Q/MK 比の大幅な上昇にも係わっていた。ユビキノンの増加したことから、底質が還元状態から酸化状態に転じたものと推測されるが、今回の観測データではその原因が明らかにはならなかった。

メナキノンについては、St. 8 では 10 月 10 日までは MK-6 が優占していたが、成層が解消されキノン量が急激に増加した 10 月 29 日には、これまで存在比の低かった MK-8 が優占した。続く 11 月 14 日には優占種が MK-7 (H4) に入れ替わった。

St. 99 では、図-4 に示したように、8 月 26 日から 9 月 11 日にかけてキノン量が増加していたが、優占種は MK-6 のまま変わることはなかった。底質に供給された炭素源の組成や環境条件にそれほど違いがなかったものと推測される。しかしながら、Q/MK 比が大幅に上昇した 10 月 10 日には、これまで存在比の低かった MK-8 (H4) が優占した。10 月 29 日には MK-7 に、11 月 14 日には MK-6 に入れ替わった。いずれの地点でも、水温・塩分・成層の解消にともない優占種の入替わりが見られた。MK-7 は、*Clostridia* sp. などの硫酸還元細菌が持つキノン種であるが (Yamamoto ら, 1998), St. 8 では 9 月 11

日と 10 月 10 日に、St. 99 では 8 月 26 日と 9 月 11 日に二番目に優占していた。青潮との関係が示唆される。

(5) 多次元尺度構成法によるキノンの遷移過程の評価

底質微生物群集構造の遷移過程を評価するために、多次元尺度構成法による解析を行った (図-6)。プロットの距離が近いほど、群集構造がより類似していると判断することができる。9 月 11 日と 10 月 29 日における両地点の群集構造は類似していたものの、それらの前後における遷移過程は大きく異なっていた。St. 8 では 9 月 11 日から 10 月 10 日、St. 99 では 8 月 26 日から 9 月 11 日以外の観測日で相対的に大きな群集構造の変化が見られた。St. 99 における 9 月 11 日から 10 月 10 日の変化については、前述したとおり原因は明らかではないが、それ以外の観測日では、いずれも底質直上水は貧酸素化して

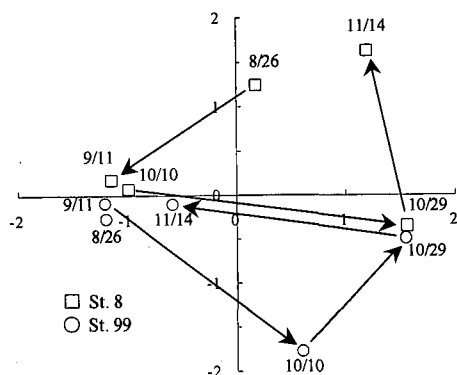


図-6 多次元尺度構成法によるキノンの遷移過程

いなかった。したがって、底質微生物群集構造の遷移には環境要因として溶存酸素濃度が大きく関係していたものと考えられる。

4. ま と め

2002年8月26日から11月14日にかけて、東京湾中央部平地 (St. 8) と湾奥部浚渫窪地 (St. 99) の底質微生物群集構造をキノンプロファイル法により追跡した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1) St. 8では貧酸素化により、St. 99では成層の解消にともなう底質へのデトリタスの供給により、底質微生物量が増加した。

2) 成層が形成されていた期間におけるユビキノンの優占種は、St. 8ではQ-8であったのに対し、St. 99ではQ-9であった。メナキノンの優占種は両地点ともにMK-6であったが、成層が解消した後は優占種の入替わりが見られた。

3) 多次元尺度構成法による解析を行ったところ、両地点の底質微生物群集構造は異なる遷移過程を示した。この遷移には、環境要因として溶存酸素濃度が大きく関係していたことが明らかとなった。

参 考 文 献

- 安藤昭夫・山崎正夫 (2000): 新たな同時多層採水器の開発, 水環境学会誌, 第23巻, 第4号, pp. 238-242.
- 鯉淵幸生・佐々木淳・磯部雅彦 (2001): 東京湾における窒素・リンに着目した物質循環機構, 海岸工学論文集, 第48巻, pp. 1076-1080.
- 平石 明 (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析, 水環境学会誌, 第15巻, 第9号, pp. 558-563.
- 藤田昌史・古米弘明・中島典之 (2002): ショ糖溶液を用いて比重分画した実下水処理リン除去污泥のキノンプロファイル解析, 水環境学会誌, 第25巻, 第12号, pp. 757-761.
- Fujie, K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saitou, and A. Katayama (1998): Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of micro biota, *Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 44, No. 3, pp. 393-404.
- Hiraishi, A., Y. Morishima and I. Takeushi (1991): Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment system, *Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 37, pp. 57-70.
- Yamamoto, K., R. Murakami and Y. Takamura (1998): Isoprenoid quinone, cellular fatty acid composition and diaminopimelic acid isomers of newly classified thermophilic anaerobic Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 161, pp. 351-358.