

有明海奥部の底性微生物群集構造に及ぼす物理環境の影響

鯉淵幸生*・藤田昌史**・阿部哲也***・磯部雅彦****

有明海奥部の干潟を含む 4 地点における底性微生物群集構造をキノンプロファイル法により追跡し、同時に行った水質や流動の連続観測結果と比較することで、有明海の底性微生物群集の変動を示した。その存在量は水温や流速変化に伴う底質の擾乱に応じて遷移し、台風時の時化で大きく減少した後、徐々に回復する様子が示された。さらにその構造は DO や底質粒径に対応して変動した。キノン含有量と脱窒速度の間に正の相関が見られたことから、分析が複雑な脱窒現象の解析に対してもキノンプロファイル法が有効であり、底質モニタリングの手法としての有効性が示された。

1. はじめに

有明海をはじめとする内湾では、水質悪化や富栄養化問題が長年に渡って問題になっている。こうした有明海における水産資源の減少については、諫早湾の締め切り堤防建設に伴う潮汐振幅の減少やそれに伴う成層の強化に関係したものとする見方や（堤ら, 2003）、潮汐振幅の減少が有明海を含む周辺海域においても発生し、さらに堤防建設後においても実際には成層の強化が見られないことを観測結果より示した例があるなど（柳ら, 2004）、定見は得られていない。一方、横山ら（2005）は、水産資源の減少と筑後川やその周辺の開発及び植林に関連した陸域からの土砂供給の減少との関係を示すと同時に、底質環境が湾内の水質や生態系に及ぼす影響に関する定量的な知見が不足していることを指摘している。このように有明海をはじめとする内湾の物質循環に、底質環境特に底性微生物群集が深く関わっていることは、これまでも報告されているものの、東京湾においていくつかの研究があることを除いては（Fujita ら, 2005）、観測結果が乏しく、その構造や機能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、有明海における底性微生物群集構造と物理環境との関係を明らかにすることを目的に、水質の連続観測と様々な底質分析、特にキノンプロファイル法を用いた底性微生物群集構造の観測を実施した。

2. 地観測概要

(1) 水質および流動の連続観測

水質及び流速の観測は、諫早湾湾口部 B6 近傍の S1（平均水深 14 m）および有明海奥部の中央に位置する 4

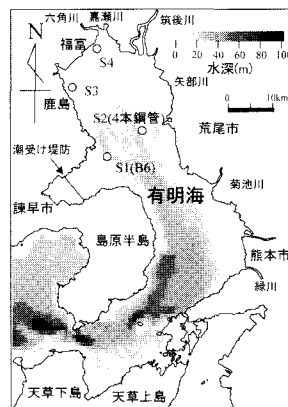


図-1 現地観測地点

本鋼管近傍の S2（平均水深 6.5 m）との二地点において（図-1 参照）、2004 年 5 月から 12 月にかけて実施した（図-1）。上記の 2 地点において、海底に ADCP（RDInstrument, Workhouse ADCP 1200KHz, Zedhed）を設置し、流速の鉛直プロファイルを 25 cm 間隔で計測した。

さらに S2 では、流動観測と同様の期間に係留系を設置し、水温、塩分、DO を水面下 1 m および海底上 50 cm 及び 4 m の 3 層で、濁度及びクロロフィル *a* については水面下 1 m と海底上 50 cm の 2 層で連続観測した。なお S1 においては農林水産省諫早湾干拓事務所の設置した自動昇降式水質観測装置により、S2 と同様の項目の鉛直分布が、1 時間間隔で観測されており、これらの観測結果を使用して分析を行った。

(2) 底質サンプリング

有明海北部の干潟や上記の 2 カ所の係留観測地点を含む計 4 点（S1, S2, S3, S4）において、月 1 回の頻度で底質コア採取を実施した（図-1 参照）。採泥はダイバーによって行い、1 地点につき 5 本のコアを採取することで、脱窒速度、底泥中の無機栄養塩、C/N 比、粒径の鉛直分布、キノンプロファイルによる微生物群集解析等の分析を行った。以下に個々の分析方法を概説する。

a) キノンプロファイル法

* 正会員 博(工) 東京大学講師 大学院新領域創成科学研究科環境学専攻

** 正会員 博(工) 山梨大学助手 大学院医学工学総合研究部
*** 東京大学修士課程 大学院新領域創成科学研究科環境学専攻

**** フェロー 上博 東京大学教授 大学院新領域創成科学研究科環境学専攻

呼吸鎖キノン（以下、キノン）とは、細菌の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。好気呼吸を行う細菌が持つユビキノン(Q-n(HX))、嫌気呼吸を行う細菌が持つメナキノン(MK-n(HX))に大別される。ここで、n, HX は、それぞれイソプレノイド側鎖数およびその水素飽和度 x を表す (Hiraishi ら, 1989)。一般的に、一細菌種は一種類の優占キノン種を持つ。優占キノン種は、環境条件に応じて変化することがなく、遺伝的にも安定していることが知られている。また、キノン濃度は細菌群量と対応することが報告されている (Hiraishi ら, 1989)。

採取した底質試料は、凍結乾燥処理を行ったうえで、重量を測定した。その後、キノンを含む脂溶性成分を抽出するために、クロロホルム・メタノール溶液 (2 : 1, v/v) とヘキサンを順次用いた。得られた溶媒抽出物を固相抽出カートリッジ (Waters 社, Sep-Pak®Silica) に吸着させ、2% (v/v) のジエチルエーテル・ヘキサン溶液を用いてメナキノンを、10% (v/v) の同溶液を用いてユビキノンを、それぞれ分離・精製した。アセトンに溶媒置換した後、高速液体クロマトグラフィー (島津製作所, SCL-10A VP) により、各キノン分子種を分離・定量した。検出器は、フォトダイオードアレイ (島津製作所, SPD-M10A VP) を用いた。各キノン種の同定には、吸光スペクトルや ENIU 値 (Hiraishi ら, 1989) を参考にした。底質試料のキノン含有量は、凍結乾燥後の乾燥重量に対するものとした。この一連の分析手順は、既報 (藤田ら, 2005) にしたがった。

b) 脱窒活性、C/N 比、無機態栄養塩濃度の測定

脱窒活性の測定には、簡便で比較的精度が高い方法としてアセチレン阻害法を用いた。この方法は、アセチレンが脱窒細菌による一酸化二窒素の窒素ガスへの還元を阻害することを利用して、気相中に存在量の少ない一酸化二窒素の増加から脱窒速度を測定する方法である。測定には、内径 5.5 cm、長さ 60 cm のポリカーボネイト製コアラに、あらかじめアセチレン添加用の細孔を 1 cm 間隔で開け、防水性シリコンで塞いだものを用意した。1 地点につき 2 本ないし 3 本の底質コアを採取し測定に用いた。採取したコアは直ちに実験室に持ち帰った後、直上水と底質表層 10 cm に 1 cm ごとに細孔から注射針付シリンジを用いてアセチレンを溶解させた純水を添加した。培養時間を一本は 1.5 時間、もう一本は 3 時間として、培養終了後に、コアを 3 分間程度良く振り底質中にトラップされている一酸化二窒素を抽出し、ヘッドスペース中の一酸化二窒素濃度を測定した後、気液平衡の関係から溶存態の一酸化二窒素濃度を算出した。最終的には培養前後の一酸化二窒素量の増加から、単位面積当たりの脱窒速度を求めた。一酸化二窒素濃度の測定

はガスクロマトグラフィー (島津製作所, GC-8A) を用いて測定した。

また、同じ地点で内径 11 cm、長さ 50 cm のポリカーボネイト製コアによる底質採取を行い、無機栄養塩濃度、C/N 比、粒径の鉛直分布を計測した。採取したコアは冷凍保存し、実験室に持ち帰った後、鉛直方向に 1 cm ずつ表層から 10 cm の深さまで切断し、各分析に用いた。間隙水中の無機態窒素濃度 ($\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$) は、底質試料を遠心分離機にかけて間隙水を抽出した後、濾過を行いオートアナライザー (ブラン・ルーベ(株)製 AACS III) によって分析した。C/N 比の測定は、底質試料を 105°C で 24 時間乾燥させた後、乳鉢で細かく砕いて CN コーダー (ヤナコ分析工業(株), MT-700) を使用し分析を行った。粒径の鉛直分布には、無機栄養塩類の測定に用いたサンプルを利用し、分析にはレーザー回折式粒度分布測定装置 (島津製作所, SALD-3000S) を使用した。

3. 結果及び考察

(1) 成層の形成と解消

観測期間中の佐賀気象台における日射及び降水量、S1における水温、塩分、溶存酸素、クロロフィル a 、濁度の時間変動を図-2 に示す。図-2(a) に示すように、6 月上旬においては比較的晴れた日が多く、降雨量も少なかったが、6 月中旬以降梅雨前線の影響で降雨量が増加し、下旬には 60 mm/day 程度の降雨が 4 日続いた。その後 7 月 4 日には台風 7 号からの低気圧や梅雨による降

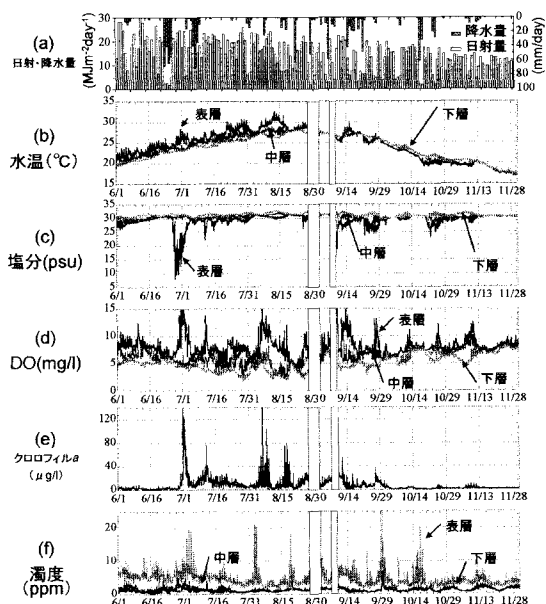


図-2 佐賀気象台の日射と降水量及び S1 の水質観測結果

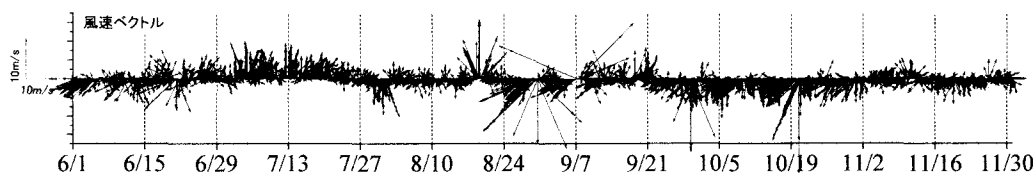


図-3 佐賀気象台における風速の時経列

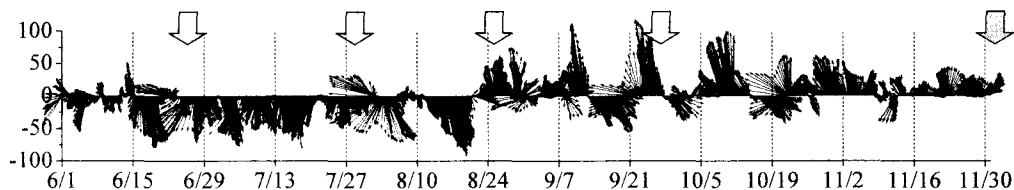


図-4 B6地点近傍における海底上50 cm での流速時系列 (図中の矢印は底質サンプリングの実施日を示す)

雨が観測されたが、7月中旬に梅雨が明け、晴天日が続いた。8月以降例年になく多くの台風が九州地方に接近または上陸し、8月18日ごろには台風15号が、つづく8月30日においては台風16号が熊本付近を通過し、多いところで300 mm/dayの降雨が観測された。その後も台風18号が9月7日に長崎に上陸し、阿蘇山で最大風速57.1 m/s 南南西を観測した。さらに9月29日には台風第21号が鹿児島県に上陸した。台風の上陸は10月になっても修まらず、10月20日に台風第23号が九州の南東海上を北上、さらに25日から26日は前線や台風第24号から変わった低気圧の影響で、九州地方にまとまった雨が降った。

このような強風の影響下において、水温の上下差は小さく (図-2(b)), 8月中旬には成層構造が見られなくなっている。一方、塩分成層は (図-2(c)), 降雨後の淡水流入に伴って形成され、特に6月下旬においては表層塩分が大幅に減少している。また図-2(e)に示すクロロフィル a は、塩分低下後に大きく増加し、降雨により栄養塩が供給され、成層が強化され、日射量が増加した時期にのみクロロフィル a の増加が見られた。また貧酸素化 (図-2(d)) についても、成層が形成された後に、DO が減少する傾向がみられ、特に塩分が大きく低下した6月下旬以降減少をはじめ、7月30日前後や8月10日～19日にかけて DO が 3 mg/l を下回った。このような成層化とそれに伴う水質変動は2001年から2003年において同地点で行った観測結果と一致しており、筑後川からの河川水の流入が付近の水環境に大きく寄与していると考えられる (鯉渕ら, 2003)。また、成層構造の崩壊は、いずれも強風時に見られ、それに伴って下層における DO が急増した。

(2) 流速の時間変動

図-3に佐賀気象台における風の時系列を示す。6月

から8月にかけては全体として南風が卓越しており、9月以降になると逆に北よりの風が卓越していることが分かる。台風の上陸時に強風が観測され、特に8月30日には強い北風が連吹した。図-4は ADCP によりえられた、S1地点の海底上50 cm における流速に25時間移動平均からえられた残差流の時系列である。強風に伴い、風向と逆向きの強い流れが形成され、特に9月10日や9月23日においては100 cm/s を超える強い北向きの流動が観測されると共に、濁度が急増した (図-2(f))。

(3) 粒径・C/N 比・脱窒活性の観測結果

中央粒径は湾奥部の干潟2点では、5～7 μm 程度で大きな変化は見られなかった。図-5は S1及び S2における中央粒径の時系列である。S1では7月30日と9月27日の観測時に大きく増加し、特に9月27日には271 μm を記録した。一方 S2では期間中400 μm 程度で変化がなく、S1が9月27日を除いて泥質なものに対し、S2は砂質であった。また S1における7月30日と9月27日の急増は、時化に伴う底質移動を反映したものと考えられる。

C/N 比は、奥、駅の干潟域において9～12程度の低い値となり、湾内では20～40という高い値となった。C/N 比の高い有機物は陸上起源の物であるため、湾内の S1, S2には筑後川などから流れてきた有機物が堆積していると考えられる。干潟域において C/N 比が低く抑えられたのは、河川などからの直接的な有機物の流入がほとんどなく、湾内において生産された海洋性の有機

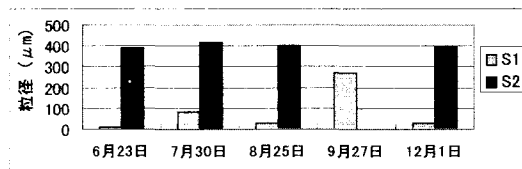
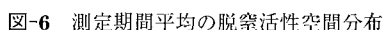


図-5 S1および S2における中央粒径の時系列



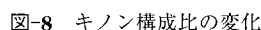
脱窒活性はS1, S2ともに、8月25日に最も高くなり、その後減少した。一般的に、脱窒活性は硝酸態窒素、または有機物量とは相関があるとされているが、両者とは相関を示さなかった。一方、8月25日にピークとなったことから、脱窒活性が季節変化に伴う水温変動による影響を大きく受けていると考えられる。また8月25日以降減少した原因としては、時化に伴う底質移動の影響と見られた。このように脱窒活性は、水温などにより変化すると同時に、海底の移動の影響を強く受け、時化後には大きく活性が低下すると見られる。さらに湾内の4地点における脱窒活性を比較したところ、有明海最奥部の干潟に位置するS4の脱窒活性は、諫早湾湾口のS1と同程度であったが、西部干潟に位置するS3ではS1より低く、S2と同程度であった(図-6)。硝酸態窒素濃度は全地点で同程度であり、一般にいわれるような干潟域での高い脱窒活性は今回の調査では観測されなかった。

図-7に各地点のキノン含有量の変化を示す。S1におけるキノン含有量は、6月23日に約1120 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ であったが、続く7月30日には若干減少したが、8月25日にはこの年の最大値である約1600 $\mu\text{mol/kg-dry soil}$ に達した。また9月27日の観測時にはピーク時の20%にまで低下し、12月に若干回復していることが分かる。これは底質移動の影響と考えると説明がつき、脱窒



(5) キノン構成比の変化

S2におけるユビキノンの存在割合は、S1と比べて小さかった。また、メナキノンの優占種はS1と同様にMK-8であったものの、ユビキノンの優占種はQ-10であった。底質の酸化還元状態や粒径の違いが、両地点の底性微生物群集構造の違いに関係していたものと推測される。



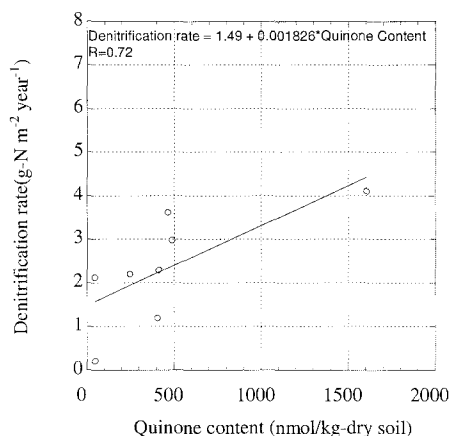


図-9 キノン含有量と脱窒速度の関係

S3やS4におけるユビキノン, メナキノンの優占種は, それぞれQ-8, MK-6であった。これらの地点は干潟であることやHasanudinら(2004)も優占種について同様の結果を報告していることから, この場合, MK-6の優占は前述のような硫酸還元細菌によるものではなく, 干潟特有の底質環境によるものであると考えられる。

4. キノン存在量と脱窒活性

さらに底質の微生物量が物質循環に与える影響を明らかにするため, 図-9にキノン含有量と脱窒活性との関係を示す。両者には明らかな正の相関が認められ, キノン量の増加と共に脱窒活性が増加していることが分かる。さらに単位菌体量あたりの脱窒活性を求めたところ, いずれの地点においても, 同程度であったことから, 微生物量あたりの脱窒活性は, 各地点でそれほど違いはなかったと判断される。脱窒活性の議論については従来水温や無機態窒素との関係のみで議論されることが多かったが, 実際には脱窒をする微生物(脱窒細菌)が存在し, さらに脱窒細菌がその機能を発揮していることが重要である。したがって今回の観測で脱窒活性とキノン量との間に対応が見られたのは妥当であると考えられる。特に脱窒は窒素循環の中でも特に重要な現象であるが, 一方で測定 of 煩雑さと現地環境の再現性への懸念から観測が不足している。今回の結果からキノン量により脱窒量の推定ができる可能性が示された。

5. ま と め

2004年5月から12月にかけて, 有明海奥部の干潟を含む4地点における底性微生物群集構造をキノンプロファイル法により追跡し, 同時に行った水質や流動の連続観測結果と比較することで, 有明海の底性微生物群集の変動が明らかになった。その存在量は従来考えられてきた

水温に加えて, 流速変化に伴う底質の擾乱に応じて遷移することが明らかになり, さらにその構造はDOや底質粒径などにより変化することが明らかになるなど, 今後の底質のモデル化に重要な知見が得られた。さらにキノン含有量と脱窒活性の間に正の相関が見られたことから, 分析が比較的煩雑な脱窒現象の解析に対してもキノンプロファイル法が応用できる可能性があり, 底質のモニタリング法の有効な手段の一つと考えられる。

謝辞: 本研究の一部は, 科学研究費基盤S(課題番号: 14102026, 研究代表者: 磯部雅彦) および科学研究費若手研究B(課題番号: 16760403, 研究代表者: 鯉渕幸生)の補助を受けて実施したものである。ここに記して謝意を表します。

参 考 文 献

- 鯉渕幸生・佐々木淳・有田正光・磯部雅彦(2003): 有明海における水質変動の支配要因, 海岸工学論文集, 第50巻, pp. 971-975, 2003.
- 堤裕昭・岡村絵美子・小川満代・高橋徹・山口一岩・門谷茂・小橋及子・安達貴浩・小松利光(2003): 有明海奥部海域における近年の貧酸素水塊および赤潮発生と海洋構造の関係, 海の研究, 第12巻, 第3号, pp. 291-305.
- 藤田昌史・芳賀弘和・西田継・坂本泰(2005): 山復斜面流出過程におけるキノンバイオマーカーの動態解析, 水工学論文集, 49, pp. 121-126.
- 柳哲雄・塚本秀史(2004): 有明海における潮汐振幅の経年変動, 海の研究, 第13巻, 第3号, pp. 295-300.
- 横山勝英・五十嵐麻美(2005): 有明海への土砂流出と海域環境, 海域環境から見た陸域流出の問題とその構造, 沿岸環境関連学会連絡協議会, 第13回ジョイントシンポジウム, pp. 14-20.
- Fujita, M., Y. Koibuchi, H. Udin, and K. Fujie (2004): Microbial response to benthic environment in trench and flat seabed sediments in Tokyo bay, Japan, Journal of Coastal Research, (printing).
- Hiraishi, A., K. Masamune, and H. Kitamura (1989): Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 55, No. 4, pp. 897-901.
- Hasanudin, U., M. Fujita, T. Kunihiro, K. Fujie and T. Suzuki (2004): The effect of clams (*Tapes philippinarum*) on changes in microbial community structure in tidal flat sediment mesocosm, based on quinone profiles, Ecological Engineering, Vol. 22, pp. 185-196.
- Pires, H. R., I. A. Lourenco, F. Morais, and M. Teixeira (2003): A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1605, pp. 67-82.
- 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.