

キノンプロファイル法を用いた微生物叢解析に
よる底質環境評価手法の構築

**Construction of Evaluation Technique for
Sediment Environment by Microbial Flora
Analysis Using Quinone Profile Method**

2020年3月

藤井 貴敏

目次

第1章 序章	5
1.1 研究背景	5
1.2 微生物叢解析	7
1.2.1 微生物動態解析手法と問題点	7
1.2.2 微生物叢解析に求める情報	10
1.2.3 キノンプロファイル法	11
1.2.4 キノンの性質と微生物における分布	12
1.2.5 キノンの特徴	14
1.3 生物指標と多変量解析	15
1.4 ベントスによる環境評価	16
1.5 微生物を用いた底質環境モニタリングに必要な知見	18
1.5.1 干潟や湖沼底質中の微生物による物質循環と物理化学的性質との関係	18
1.5.2 人為的な水質汚濁による環境中への影響	19
1.5.3 微生物と底生生物との関連と分布ベントスと微生物の生息環境の類似性	20
1.6 本研究の目的	21
第2章 瀬戸内海の底質と微生物叢の関係	31
2.1 はじめに	31
2.2 方法	32
2.2.1 調査水域	32
2.2.2 サンプルングおよび分析	33
2.2.3 微生物叢解析	33
2.2.3.1 試料の前処理	33
2.2.3.2 クロロホルム・メタノール抽出	33

2.2.3.3	ヘキササン抽出	34
2.2.3.4	分画, 分離	34
2.2.3.5	キノンプロファイル解析方法	36
2.2.4	データ解析	38
2.3	結果および考察	39
2.3.1	底質分析	39
2.3.2	微生物叢解析	39
2.3.3	クラスター分析および主成分分析	42
2.3.4	各クラスターの物理的性質	44
2.3.5	各クラスターに分類された底質のキノンプロファイル	46
2.3.6	底質のキノンプロファイルと物理的性質の関係	50
2.4	結論	52
第3章	地中海の底質と微生物叢の関係	55
3.1	はじめに	55
3.2	方法	55
3.2.1	サンプリングおよび分析方法	55
3.2.2	微生物叢解析	56
3.2.3	データ解析	56
3.3	結果および考察	58
3.3.1	底質分析	58
3.3.2	底質の物理化学的性質を変数にしたクラスター分析による地点の分類	58
3.3.3	主成分分析による地点の分類に影響を及ぼす底質の物理的性質	60
3.3.4	各クラスターの物理的性質	61
3.3.5	中海底質の微生物叢解析	63

3.3.6	各クラスターに分類された底質のキノプロファイル	64
3.3.7	底質のキノプロファイルと物理的性質の関係	67
3.3.8	各グループの物理的性質.....	72
3.3.9	各グループのキノプロファイル.....	72
3.4	結論.....	74
第4章	水質変化と微生物叢の関係	77
4.1	研究背景.....	77
4.2	実験方法.....	78
4.2.1	サンプリング.....	78
4.2.2	水質分析および粒度分布測定	79
4.2.3	微生物叢解析.....	79
4.3	結果および考察.....	79
4.3.1	農業集落排水処理施設周辺の水質	79
4.3.2	農業用水路および河川底質の微生物量.....	80
4.3.3	農業用水路および河川の浮遊微生物量.....	84
4.3.4	農業用水路および河川のキノン種.....	85
4.4	結論.....	89
第5章	ベントスと微生物叢の関係	91
5.1	研究背景.....	91
5.2	実験方法.....	91
5.2.1	調査地点	91
5.2.2	サンプリングおよび分析.....	92
5.2.3	キノプロファイル法	92
5.2.4	データ解析ソフトウェア.....	93

5.3 結果および考察.....	93
5.3.1 ベントスの同定結果.....	93
5.3.2 サンプルング地点の分類.....	94
5.3.3 各クラスターに分類された地点の特徴.....	94
5.3.4 ベントスと微生物の関係.....	100
5.3.5 嫌気的環境における生物指標	102
5.4 結論.....	103
第6章 総括.....	105

第1章 序章

1.1 研究背景

我が国の水環境問題は、1887年の足尾銅山の鉍毒事件に代表されるように、明治時代から既に発生しており、戦後の経済高度成長期と共に急速に進行してきた。1950年代以降、水俣病、イタイイタイ病などの問題が顕在化し、日本は水質汚濁時代に突入した。これらを受けて、「公共用水域の水質保全に関する法律」や「工場排水等の規制に関する法律」などが制定されたが、これらの法律は個々の公害問題に個別に対処するための規制、対策であり、総合的な対策を講ずるものではなかった。そこで、より計画的、総合的な公害行政を推進することができるように、1967年に「公害対策基本法」が制定公布された。その後、「水質汚濁防止法」が制定され、環境基準、排出基準、水質総量規制により水域への汚濁負荷に対して対策を行っている ((社)日本水環境学会, 2009)。

上記の基準や規制により、水質汚濁指標を数値的に管理するため、公共用水域の水質は水質汚濁防止法に基づき常時監視が義務付けられている。常時監視では水環境の変化を継続的に把握して、対策に結びつけることを目的としている。しかし、水環境は多くの要素によって構成されるため、時間的、空間的に変動するものであり、水質の瞬間値を集め水環境について総合的に評価することは難しい。そこで、近年では水質モニタリングデータと合わせ生物を用いた指標で評価をすることが推奨されている(環境省, 2018)。この指標は生物を対象とするため、生物種や群落が生息してから採取に至るまでの水環境の動態を累積評価した結果が反映されている。したがって、生物指標はあらゆる環境の時空間的挙動を反映した総合的な評価を行うことのできる指標であり、その重要性が認められている(環境省, 2017; 小泉ら, 2002)。

生物指標は世界的にも注目されており、河川水質の総合的な評価方法として水生生物を用いたイギリスの Biological Monitoring Working Party system (BMWP)や (BMWP, 1978; Chesters, 1980; Hawkes, 1997), 南アフリカの South African Score system(SASS)が採用され

ている(Chutter, 1972)。近年では、アメリカの Clean Water Act やヨーロッパの Water Framework Directive and the Marine Strategy Framework Directive が沿岸域や河口域の人為的な有機汚濁に対する生物群集への影響の監視を義務付けるなど、底生生物(ベントス)を用いた新たな生物指標の開発が求められている。これを受け Borja らは Glemarec および Hily(Glemarec and Hily , 1981), 次いで Hily(Hily , 1984)が使用した指標を基に AZTI marine biotic index (AMBI)を 2000 年に開発した(Borja et al., 2000)。現在では AMBI, 種の豊富さ, およびシャノン多様性指数を変数に主成分分析(PCA)を行いさらに詳細な情報を得ることのできる multivariate AMBI (M-AMBI) などが沿岸域や河口域の環境評価に広く用いられている(Salas et al., 2004; Fleischer et al., 2007; Pranovi et al., 2007; Piló et al., 2011; Muniz et al., 2005; Borja et al., 2008; Baoquan et al., 2008; Xianxiang et al., 2014)。我が国においても環境省が BMWP を基礎として生物種の分類を変え, 水生生物による水質評価法マニュアル -日本版平均スコア法-を作成して従来の評価方法より詳細かつ客観的な評価に取り組んでいる(環境省, 2017)。U.S. EPA は沿岸域, 湖沼, 河川, 湿地の環境評価の一つに, 生物学的評価を推奨している。ベントス, 魚類, プランクトンなどの生物は時空間的な環境変動の影響を総合的かつ生態学的に評価できる指標として採用されている(U.S. EPA, 2019)。このように, 生物指標はマクロ生物を対象とした研究が多く行われており, その有用性は評価されている。

一方で, 近年の分子生物学の進歩により, あらゆる微生物が持つ機能の重要性が明らかになっている(横川, 2016)。微生物は地球上において生物量として優占し, その代謝を介して有機物を無機物へ変換する能力が, 生態系における物質循環過程の 1 つを構成していると言える。微生物群集の環境評価指標としての重要性は理解されてはいるが, その多様性の時空間分布および変動要因に関する普遍的な知見は少ない。

例えば, 最も一般的に生物指標として用いられているのは大腸菌群と一般細菌であるが(金子, 1990), これは腸管系病原微生物汚染についての指標でしかない。従来用いら

れてきた環境汚染の原因や浄化能を把握する方法として、特定の微生物を追跡する FISH 法、定量 PCR 法などの遺伝子学的手法がある。これらの手法は標的とする微生物種の塩基配列情報が必要であり、その情報が他の微生物に共通な特徴を持つ場合には正確な定量は不可能である。また、環境変化によって微生物種が変化する場合には追跡が困難となる。このように、実際の環境にはあらゆる汚濁物質が存在し、微生物種の変化も生じることが予想されるため、特定の微生物種を指標とした環境モニタリングでは環境リスクに対応した十分な評価とは言えない。

特定の微生物に限定しない生物指標としての微生物群集は未知なる構造の化学物質に対しても生理活性によって組成が変化し(國弘ら, 2004), 環境変化との対応関係が明確で、生息分布が普遍的である点で有効である。従来、微生物叢の化学的分析手法であるキノンプロファイル法は特定の微生物に限定せず、未知の微生物を含めた微生物群集を定量的に解析できる手法としてその有効性が認められている(平石ら, 1993 ; Hu et al., 2001 ; 藤田ら, 2007)。キノンプロファイル法は東京湾や有明海底質の微生物叢解析に用いられ、湾内の物質循環には微生物が深く関わっていることが報告されているが(藤田ら, 2003 ; 鯉淵ら, 2005 ; 遠藤ら, 2010), 実環境での観測結果が乏しく、水質や底質の物理化学的性質と微生物叢・量との関係については十分な知見は得られていない。そこで本論文では、物理化学的な指標と生物指標の双方から水環境を評価し、総合的な底質環境評価手法について提示することを目的に、異なる水域を多地点調査し、微生物叢・量に変化をもたらす因子について考察する。

1.2 微生物叢解析

1.2.1 微生物動態解析手法と問題点

環境変化による環境中微生物生態系への影響など、微生物生態系の影響を評価する上で、直接モニタリングする方法は最も有効である。従来、平板培養法を用いて微生物群

集の評価が行われていたが、一般に環境中に生息している微生物種の内のおよそ半数しか検出されていないため微生物叢解析は非培養的な手法を選定する必要がある(Amann et al., 1995)。そのため現在広く用いられている微生物動態解析手法の多くは非培養的な微生物叢解析手法である。分子生物学的手法は、表現型(phenotype)と遺伝子型(genotype)マーカーを検出する方法に大別される。表現型マーカーとしては微生物に広く含まれるリン脂質脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid : PLFA)やキノンがあり、遺伝子型マーカーとしては DNA, RNA などが利用されている。前者を用いる手法としてはリン脂質脂肪酸プロファイル法およびキノンプロファイル法、後者の場合は PCR 法, FISH 法, PCR-DGGE 法などが挙げられる(谷および那須, 2001)。

表現型マーカーの PLFA, キノンは 1960 年代から微生物叢解析に用いられてきた(Hiraishi, 1999; Bäerlocher, 1992)。リン脂質は細胞膜の特定の成分であり、いくつかの特徴的なリン脂質脂肪酸(PLFA)は、メタン酸化菌, 真菌, 放線菌などの主要な分類学的グループを示すことができる(Frostegård and Bååth, 1996; Bossio et al., 1998)。PLFA 分析はさまざまな土地利用または環境条件における土壌微生物群集の変化を調査するために広く使用されている(Frostegård et al., 1996; Adam et al., 2015)。

キノンプロファイル法は山田と Jeffries らによって環境中の微生物モニタリングに初めて用いられ、自然界のほとんどすべての種の微生物に広く分布する脂溶性物質(キノン)を分離して微生物叢を解析する手法である。1つの微生物種は主要なキノン種の1つを含んでいるので、キノン種を分析することで微生物種を大まかに把握することが可能であり、様々な環境下での微生物叢解析に利用されている(平石・上田, 1997; Hasanudin et al., 2004; 藤田ら, 2007; 浦嶋ら, 2011, Silvia et al., 2014, 平石, 2016)。

表現型マーカーのリン脂質やキノンは細胞膜に含まれ、環境中では細胞死後に急速に分解されるとされ、生菌のみを示すと考えられている(White et al., 1979; Pinkart et al., 2002; Frostegård et al., 2011)。遺伝子型バイオマーカー、例えば環境中の無傷の DNA は、

数ヶ月または数年も生き残ることが知られており、環境中では活性を示さない菌種も解析していることから、環境動態を評価するためには注意が必要である。

遺伝子学的手法である PCR(Polymerase chain reaction)法は培養が困難な細菌を解析するため 1980 年代に開発され、遺伝子クローニングが容易なものとなり、生物の遺伝学的解析に大きな進歩をもたらした。次いで、1980 年代後半には FISH (Fluorescence in situ Hybridization)法、1990 年代には PCR-DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)法が開発された。FISH 法はプローブとして rRNA を標的としたオリゴヌクレオチドを蛍光標識したものを用い、single cell level で細菌を解析することができる手法である。これら手法はバイオマーカーとして rRNA 遺伝子を用いており、特に 16S rRNA は 1500~1800 bp 程度の分子であることから微生物の系統解析には最適の遺伝子として広く利用されている。現在では 200 百万配列以上の 16S rRNA 配列が決定され、日本 DNA データバンク、GenBank や EMBL などのデータベースも充実している。ある菌株を同定する際、データベースへの登録が豊富な 16SrRNA 配列を比較することで、菌種・菌群を培養することなく検出・同定することが可能である。しかし、FISH 法は酵素や抗体を用いた感度増幅手法であることから、巨大分子を細胞内に浸透させる必要がある。細胞壁の性状は菌種によって大きく異なるため、検出条件としての細胞壁消化条件に差異が生じる。そのため、環境中の複雑な微生物系において感度増幅手法を適用する場合、細胞壁の消化条件が異なるために、目的とする細菌群を一括して検出できない可能性がある。PCR-DGGE 法は同じ長さの二本鎖 DNA 断片を塩基配列の違いに基づいて分離する電気泳動法である。全細菌に普遍的に存在しかつ種の推定が可能な遺伝子である 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法を組み合わせた PCR-DGGE 法を用いることで、試料中のすべての細菌を対象とした群集構造解析が可能となる(Rolleke et al., 1996)。しかし、電気泳動に用いる変成濃度勾配ゲルを常に一定に作成することが困難であること。環境中の試料から得られる多数の微生物種で構成されるサンプルではバンドパターンが不鮮明と

なりバンドの識別が難しくなる場合があること。1本のバンドから複数のDNA塩基配列が検出される、あるいは1配列が複数バンドを形成する場合があることなどによる問題が挙げられる。

近年、微生物の生態系調査はメタゲノム解析により培養に依存せず、さらに16S rRNA遺伝子や一部の機能遺伝子を標的とした解析ではない新たな手法が開発されている。メタゲノム解析では全ての遺伝子情報を解読して微生物種を特定する方法であり、多量の塩基配列は次世代シーケンサーの登場により、短時間で多量の塩基配列の決定が可能となっている。しかし、環境中の遺伝子データはデータベースへの依存性が高く、unknown遺伝子群は無視され、多量のデータを用いた相同性検索から得られた候補を絞り込む作業が必要になる。さらに、環境微生物のほとんどは生態系が解明されておらず、微生物の同定は相同性による検索であるため、自然生態系の解明に繋がらない場合もある。さらに、上記の手法は環境中の詳細な微生物情報を得るためには有効であるが、装置が高価であり、得られる情報量が膨大であるため、微生物を絞り込む作業が必要で、調査頻度を要する環境モニタリングや微生物を指標とした総合的な環境評価には実用に適さない。

1.2.2 微生物叢解析に求める情報

環境中の特定の微生物種をターゲットとせず、全微生物種を対象としたモニタリング手法として、煩わしい操作を必要としない化学分類学的手法は有効である。環境モニタリングの観点で求められている情報は、1)微生物叢、2)微生物量、3)微生物の活性(特徴)である。遺伝子型マーカーであるDNAやRNAを解析する手法では微生物種の詳細な情報を得ることができるが、バイオマスとの関連がつかめない欠点がある。脂質成分であるリン脂質脂肪酸とキノンはともにバイオマスとの相関が高いが、リン脂質脂肪酸は1つの微生物種が多様な脂肪酸を含有し、微生物の生理状態によってその割合が変化する

る。さらに、多くの脂肪酸が各微生物に共通して存在するため、リン脂質脂肪酸の組成変化は単純に微生物叢変化ととらえることができない問題がある(片山, 2000)。一方で、キノンプロファイル法では、1つの微生物種が主要なキノン種の1つを含んでいるので、キノン種を分析することで微生物種を大まかに把握することが可能である。また、環境中のキノンの抽出手順は平石らによる研究グループによって提供されており、広く浸透している(Hiraishi et al., 1996; Iwasaki et al., 1998; Hiraishi et al., 1999)。従来はキノンの分離にシリカゲルを修飾した薄層クロマトグラフィーが用いられていたが(Collins, 1985)、キノンの回収効率が悪く過小評価されていた。この問題に対し、現在では Waters 社の Sep-Pak カートリッジを用いたカラムクロマトグラフィーが用いられ、効率よく UQ と MK を分画することが可能である。UQ, MK 分画は HPLC を用いて、ピーク面積と保持時間の差によって定量的に分離される。微生物種が有するキノン種の主要成分についてはデータベースも充実しており(DataBiosafety for Industrial Applications of Microbes) 微生物種をある程度絞り込むことも可能である。以上の条件を踏まえて、本論文で用いる微生物叢解析手法は環境モニタリングの観点で求められている3つの情報を満足する、キノンプロファイル法とする。

1.2.3 キノンプロファイル法

菌体キノンは、微生物の細胞膜に存在し、呼吸鎖や光合成電子伝達鎖の補酵素であり、ユビキノン(UQ)、メナキノン(MK)に大別される(Fig. 1-1)。一般に UQ は主に好気呼吸および硝酸呼吸、メナキノンは主に嫌気呼吸および好気呼吸によってエネルギーを獲得する微生物に存在し、メタン生成菌のように発酵によってエネルギーを獲得する微生物には存在しない。

キノン分子種の数は微生物群集構造の多様性、キノン量はそこに棲息する微生物量をそれぞれ反映していると知られている。微生物群集に関する詳細な情報を得ることは困

難であるが、キノン分析は化学分析であるため再現性・定量性に優れているということ、多くの微生物が一優占キノン種を持つためキノン組成の変化は微生物群集構造の変化とみなせるという点で、微生物群集構造の解析にはキノンプロファイル法が有用と考えられる。しかし、複数の微生物種が同一キノン種を持つために、微生物種の特特定をはじめ微生物群集に関する詳細な情報を得ることは困難である。

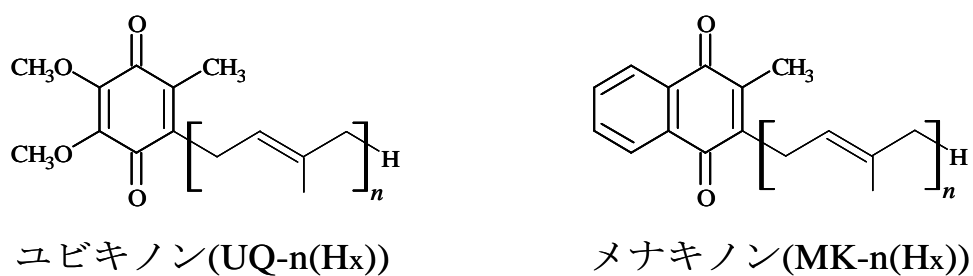


Fig. 1-1 キノン種の構造.

1.2.4 キノンの性質と微生物における分布

キノンとは、芳香族炭化水素のベンゼン環の水素 2 原子が酸素 2 原子で置換された形の化合物である。菌体キノンは、微生物の細胞膜に含まれる呼吸鎖や光合成電子伝達鎖の必須成分であり、生物界に広く分布している。そのため、キノンは好気呼吸、嫌気呼吸や光合成によるエネルギー獲得形式を備えた微生物に存在する。キノンはほとんど全ての微生物に存在するが、メタン発酵を行うメタン生成菌など発酵によってエネルギーを生成する微生物にはその存在が認められない。

キノンは構造的にベンゾキノン型およびナフトキノン型の 2 つに大別される。ベンゾキノン型の主なキノンはユビキノン(2, 3-Dimethoxy-5-methyl-6-polyisoprenyl-1, 4-benzoquinone : UQ)であり、グラム陰性細菌や真核細胞のミトコンドリアによく見られる。ナフトキノン型の主なキノンはメナキノン(2-Methyl-3-polyisoprenyl-1, 4-

naphthoquinone : MK)であり，グラム陽性細菌に良く見られる。その他のキノン種としては，藻類などの光合成細菌に良く見られるプラストキノン(PQ)やフィロキノン(ビタミン K1 : VK1)が挙げられる。

化学分類上有効な指標となり得るのは，先に述べたキノン骨格の構造的差異の他，イソプレン側鎖の長さ，イソプレン側鎖の一部の二重結合が x 個の水素原子で飽和された水素飽和度，修飾基の有無等である。特にイソプレン単位の数と飽和度は菌種・菌属に特有であることから，分類に用いる際の基本的指標になる。このような分類群に特有なキノンの構造的差異は遺伝的に安定しており，環境条件の影響による優占分子種の変動もほとんどない。

キノン分子種は通常略して表わされ，イソプレン単位 n 個のユビキノン，メナキノンはユビキノン- n ，メナキノン- n と呼び，UQ- n ，MK- n と略して表示する。水素飽和度 x のユビキノン，メナキノンはユビキノン- n (H x)，メナキノン- n (H x) と呼び，UQ- n (H x)，MK- n (H x) と表示する。例えば，MK-9(H $_4$)とは，9 イソプレン単位の側鎖を持ち，そのうちの二つの二重結合が四つの水素原子で飽和されているメナキノンを表す(鈴木ら，2001)。

細菌や菌類などの微生物種が持つ優占キノン種，すなわち微生物種が有するキノン種の主要成分についてはすでに豊富な情報が蓄積され(Matthew et al., 1981; Japan Science and Technology Agency), Table 1-1 に見られるように微生物ごとに特有の優占キノン種を有している。

細菌における分類では，嫌気性細菌ではキノンを持たないものや，例外も多いが次のような原則がある(鈴木ら，2001)。

メナキノンを主成分とする細菌はグラム陽性細菌，Proteobacteria 門の δ ， ϵ 網の細菌，Proteobacteria 門以外のグラム陰性細菌である Flavobacterium 属などの細菌である。また，嫌気性細菌と古細菌ではメナキノンとデメチルメナキノンが見出される。

ユビキノンを主成分とする細菌は好気性グラム陰性細菌の α , β , γ -Proteobacteria 網, 真核生物である。酵母は UQ-6~UQ-10 のいずれかを主成分とする組成が一般的である。糸状菌には 1 飽和(H₂)もしくは 2 飽和(H₄)のユビキノンを持つものが多い。

Table 1-1 微生物種とその優占キノン種の例 (鈴木ら, 2001)

	Phylogenetic group	Quinone species
Eukaryote	Yeast	UQ-6 ~ UQ-9
	Fungi	UQ-9, UQ-10, UQ-10(H ₂), UQ-10(H ₄)
Archaea		MK-n, MK-n(Hx)
Bacteria	Proteobacteria	
	Alpha	UQ-10
	Beta	UQ-8
	Gamma	UQ-8, UQ-9
	Delta / Epsilon	MK-n(n ≦ 8)
	Green sulfur bacteria	MK-n(n ≦ 8)
	Cytophagales group	MK-n(n ≦ 8)
	Green non-sulfur bacteria	MK-n
	Thermus / Deionococcus group	MK-n(n ≦ 8)
	Actinobacteria	MK-n(n ≦ 9), MK-n(Hx)

1.2.5 キノンの特徴

・ユビキノン(UQ)

ユビキノンは水に不溶でメタノール, エタノール, アセトンなどの極性有機溶媒に可溶, n-ヘキサンなどの炭化水素系非極性有機溶媒に易溶である。光, 塩基, 熱等に不安定で, ユビクロメノールやデメトキシユビキノンなどに変化する。ユビキノンは還元剤などにより簡単に還元され, 還元型ユビキノン(ユビキノール)になる。ユビキノンの紫外吸収スペクトルは 275 nm 付近に特徴的な吸収極大があり, 極大吸収波長は側鎖の長さに関係なく一定である。この吸収はユビキノンの同定・定量に用いられる(國弘, 2004)。

・メナキノン(MK)

メナキノンの溶解性と安定性はユビキノンとほぼ同じである。メナキノンの結晶は淡黄色である。メナキノンは、ベンゼン、ヘキサン、アセトンなどの有機溶媒に可溶で、メタノール、エタノールに難溶、水に不溶である。空気、熱に対しては安定であるが、アルカリ、紫外線に対してはきわめて不安定である。

紫外吸収スペクトルは、メナキノン類はいずれも 243 nm, 261 nm, 270 nm, 325 nm 付近に 4 箇所吸収極大を持つ(國弘, 2004)。

1.3 生物指標と多変量解析

生物指標には調査の簡便性とある程度の期間の環境状態が生物に与える影響の累積値を反映することが条件として論じられている(高橋, 1984 ; 渡辺ら, 1984)。さらに、環境を生物指標で評価することは、調査地点の設定やサンプル数が膨大になることが問題されているが、多変量解析を用いることで欠点を補うことが期待されている(加藤, 1989)。

生物指標として微生物を用いてその変動の評価に多変量解析を用いた研究は、微生物叢を用いてクラスター分析し、下水処理場の微生物群集の挙動と季節変化の特徴についての報告(國弘ら, 2004 ; 中村ら, 2004)や圃場において土壌微生物叢の主成分分析を行い、施用した有機物の種類によって微生物組成が変化することを明らかにした報告がある(浦嶋ら, 2011)。また、一般廃棄物最終処分場からの浸出水のモニタリングにおいてキノンを生物指標とし、主成分分析を用いて微生物群のキノン組成の違いを調査した結果、微生物叢は浸出水流量に影響を受けていることが明らかになっている(藤田ら, 2008)。環境中の水質と底質微生物群集を調査した研究では、溶存酸素濃度、水温および供給される炭素源の量などにより微生物叢が変化することが明らかになっており、微生物叢解析に多次元尺度構成法によってキノンの遷移過程を評価している(藤田ら, 2003)。

以上の研究より、微生物を用いた生物指標は環境履歴を含む指標として有益であり、そのデータ解析手法に多変量解析を用いることで、生物群集の特徴を把握することが可能であることが示されている。

1.4 ベントスによる環境評価

ベントスは水底に生息する生物の総称として、ドイツの生物学者 E. Haeckel によって名付けられ、環境浄化や魚類などの餌として重要な役割を担っている。国内では瀬戸内海や東京湾をはじめとする沿岸域の底質環境評価に数多く利用されており、環境評価として重要な指標生物とされている。ベントスはその出現個体数、出現種数および多様性によって評価されることが多いが、環境を評価する上で汚濁度を数値化し、標準化する試みが進められている。

東京湾岸自治体で構成された七都県市首脳会議環境問題対策委員会水質改善対策専門部会では、東京湾の水質改善に向け、底層水環境の実態を把握し、底質改善対策に必要な資料を得るため、底生生物を指標とした底質環境モニタリング手法に関して検討を行った。その中で、①底生生物の総出現種数、②総出現種数に占める甲殻類比率、③底質の有機物、④優占指標生物の4項目から評点を付け、合計点から環境評価区分(0～V)を設定する方法を提案している(七都県市首脳会議環境問題対策委員会水質改善対策専門部会、2000)。環境評価区分(0～V)が占める状況は以下の通りである。

環境保全度Ⅳ : 環境が良好に保全されている。多様な底生生物が生息しており、底質は砂質で、好氣的である。

環境保全度Ⅲ : 環境は、概ね良好に保全されているが、夏季に底層水の溶存酸素が減少するなど生息環境が一時的に悪化する場合も見られる。

環境保全度Ⅱ : 底質の有機汚濁が進んでおり、貧酸素水域になる場合がある。底生

生物は汚濁に耐える種が優占する。

環境保全度 I : 一時的に無酸素水域になり、底質の多くは黒色のヘドロ状である。

底生生物は、汚濁に耐える種が中心で種数、個体数ともに少ない。

環境保全度 0 : 溶存酸素はほとんどなく、生物は生息していない。底質は黒色でヘドロ状である。

上記の手法は実用に十分耐える手法であるが、国内の評価手法としては浸透していない現状である。

国外では Borja らによって、Glemarec and Hily(1981)が使用し、次いで Hily(1984)が使用した軟質底質に棲息する生物に基づいた指標を基に AZTI の海洋生物指標(AMBI)が 2000 年に開発された(Borja et al., 2000)。底生生物は有機汚濁への耐性を基に、5つの生態系グループ(EGI~V)に分類群が割り当てられており、AMBI はそれらの存在割合によって底質環境を相対的に評価する手法である(式 1-1)。生態系グループ(EGI~V)の分類方法を以下に示す(Gral et al., 1997)。

EGI : 有機汚濁に非常に敏感で、正常な状態で存在する種。

EGII : 富栄養化に無関係の種で、常に低密度で存在する種。

EGIII : 有機物汚濁に耐性のある種からなり、正常な状態でも発生する可能性があるが、その集団は有機汚濁によって左右される。

EGIV : 二次的な日和見種であり体長が小さく寿命の短い種。

EGV : 一次的な日和見種であり、表面まで還元的な土壌で増殖する堆積物捕食者。

$$AMBI = [(0 \times \%EGI) + (1.5 \times \%EGII) + (3 \times \%EGIII) + (4.5 \times \%EGIV) + (6 \times \%EGV)] / 100 \text{ (式 1-1)}$$

AMBI ソフトウェアには河口と沿岸に存在する最も重要で代表的な底生生物が約 2000 種類分類(Salas, 2004)されており、2012 年には 6300 種以上のベントスデータが登録されている(Borja, 2012)。この指数は、時間および空間的な影響を評価するのに特に有用であり、生物の性質に関する情報を定量的に提供することができる。しかし、問題点として、本来人為的ストレスを決定することを目指す指標であるが、ストレス耐性種が豊富な故に、自然ストレスにも耐性がある種が存在するため、人為的ストレスと判断することが難しい。これらの問題を最小限に抑えるために、近年ではマルチインデックス(M-AMBI)が適用されている。M-AMBI は Richness, Shannon's Diversity, AMBI を基に多変量解析および因子分析(FA)によって求められた指標であり、多くの著者により有用性が示されている (Muxika et al., 2007)。AMBI および M-AMBI の計算値と環境ステータスの区分を Table 1-2 に示す。

Table 1-2 AMBI および M-AMBI の計算値と環境ステータスの区分

AMBI	M-AMBI	Benthic community health/site disturbance classification	Status of the benthic habitat quality
0.0 < AMBI ≤ 1.2	> 0.77	normal/undisturbed	high
1.2 < AMBI ≤ 3.3	0.53-0.77	unbalanced/slightly disturbed	good
3.3 < AMBI ≤ 4.3	0.38-0.53	transitional to pollution/meanly disturbed	moderate
4.3 < AMBI ≤ 5.5	0.20-0.38	transitional to heavy pollution/heavily disturbed	poor
5.5 < AMBI ≤ 7.0	< 0.20	heavy polluted/extremely disturbed	bad

1.5 微生物を用いた底質環境モニタリングに必要な知見

1.5.1 干潟や湖沼底質中の微生物による物質循環と物理化学的性質との関係

干潟や湖沼の水質浄化能は主にベントスおよび微生物が支えていることが明らかになっている(李ら, 1997)。特に分解者である微生物は他の生物では利用不可な有機物を利用可能なものへと変換することが知られている。微生物量は河口域→沿岸域→沖合、汚濁域→非汚濁域のような方向で減少することが知られており、微生物量とともにその活性が重要である(今井, 1989)。また、環境浄化を支える微生物はその量、活性とともに

に好気・嫌気性菌のバランスが重要である。自然界の有機物分解、硝化・脱窒反応、硫黄の循環などにはすべて微生物が関連しており、好気・嫌気的な条件によって異なる生物反応を経て、物質循環に寄与している。したがって、生息する微生物の種類、その割合は環境条件によって大きく異なる。この環境条件は様々な因子が複雑に影響するものであると考えられるが、底質中に蓄積された水質や海流の影響などの情報と微生物叢は非常に深く関連していると予想される。実際に、底質中の微生物量は砂質よりも泥質の方が4倍以上多く存在することや、底質の含泥率が上がると硫酸還元菌が増加することなどが明らかになっている(鯉渕ら, 2005; 中野ら, 2009)。また、東京湾内の酸素消費と微生物叢の関係を調査した結果、微生物叢は水質の履歴を反映した評価手法として有望であることが示唆されている(藤田ら, 2003; 遠藤ら, 2010)。しかしながら、底質の性状が異なる多地点で評価した事例は見当たらず、微生物叢の底質環境に対する普遍的な知見は不足している。

1.5.2 人為的な水質汚濁による環境中への影響

近年、都市河川では下水処理水混入率が高く、淀川で10.9%、東京都(荒川、江戸川、多摩川、相模川)では6.7%、木曾川では1.7%と試算されており(国土交通省淀川河川事務所)、下水処理水の流入は受容河川の水質、COD、全窒素濃度、全リン濃度の増加に影響することが報告されている。特に受容河川の水質、全窒素濃度、全リン濃度の増加は著しいことが明らかになっている(和波および竹内, 2008)。しかし、水量が常に一定量流れる河川において人為的な汚濁負荷の流入は河川水で希釈されるため環境水の水質分析だけでは生態系へ及ぼす影響を把握することは困難である。

生態系への影響を評価した既往の研究は、下水処理水などの高栄養塩の影響を長期間受けた地点は底質の付着藻類が増加することや、底生生物相が変化することが明らかになっている(阿部ら, 1996; 細見ら, 2009; 相澤ら, 1999)。また、農業域の小水路にお

いて、窒素濃度と脱窒速度を調べた結果、底質が安定した地点は水中の窒素濃度が高いほど脱窒速度が速くなることが明らかになっている(駒田および竹内, 1998)。以上のように、生物指標や脱窒速度によって人為的な汚濁負荷が自然環境へ及ぼすの影響は明らかになっている。しかし、水質の中長期的な影響を反映し生態系の基盤および水質浄化に寄与する微生物への影響について評価した例はほとんど存在しない。特定の汚濁物質に対する微生物叢変化を知ることは、汚濁物質や汚濁源を特定することも可能となるため、これらに関する知見が必要である。

1.5.3 微生物と底生生物との関連と分布ベントスと微生物の生息環境の類似性

干潟をはじめとした沿岸域では自然浄化機能を有する貴重な場である。自然浄化能は微生物やベントスによる N, P の無機化機能、水中の懸濁態有機物の除去、ベントスや海藻の形で人、鳥、魚に捕獲され系外へ除去されるなどの働きが役割を担っている。このように、自然浄化には微生物やベントスが大きく関わっていることが数々の研究で明らかになっている(李ら, 1998 ; 武田ら, 2007 ; Karakassis and Hatziyanni, 2000)。また、ベントスは底質の粒度や地盤高さによって特徴のある群集を作ることが知られており、底質の環境履歴を反映することが既往の研究で明らかになっている(大谷ら, 2007; Jayaraj et al., 2008)。ベントスと底質の汚濁度および物理化学的性質との関係は比較的多くの知見がある一方、ベントスと底質中の微生物との関連について調査した事例は少ない。國弘らは養殖場の底質改善のため、イトゴカイを散布し微生物叢との関連を調査した結果、冬季のイトゴカイ個体数とキノン量に正の相関($R^2 = 0.59$)が認められている(Kunihiro et al., 2008)。これは、微生物により有機物がベントスに利用可能な形態に変換されていると推察される。また、Hasanudin らは干潟にアサリを散布し、水質と微生物叢を解析した結果、アサリを散布した干潟でより微生物量が増加して、脱窒能が向上したことを明らかにしている(Hasanudin et al., 2004)。このようにベントスと微生物は相互

に作用することで自然浄化に寄与していると考えられるが、自然環境中のベントスと微生物の関係について評価した事例は少ない。底質環境を評価する上で、様々な環境下で互いの群集構造の変化とその関係を把握することは重要である。

1.6 本研究の目的

前節までに微生物叢解析手法についてキノンプロファイル法の有用性、利用事例、ベントスを用いた生物指標の有用性についてレビューを行った。その中で、環境評価指標として必要な知見が不足しているため更なる探求が必要であることが明らかになった。

本研究では上記の問題を解決するため、キノンプロファイル法を用いた微生物叢解析を用いて、以下の項目について評価を行う。

1) 自然環境下におけるキノン量，キノン種の割合と汚濁状況の関係性を評価

環境中の微生物量，微生物活性，微生物叢を同時に解析できる手法は表現型のバイオマーカーであるキノンプロファイル法である。この方法を用いて、干潟および底質が干出しない湖底で底質の物理化学的性質と微生物叢の関係を明らかにする。具体的にはキノン量，キノン種の割合と底質の汚濁状況に関連が認められるか検証し，底質環境評価指標として検証する。さらに，環境評価手法として用いるためには観測結果の蓄積が重要であるため，性質の異なる多地点でそれらの関係を評価する。(2，3章)

2) 人為的な環境負荷が特定のキノン種に及ぼす影響を評価

特定の汚濁物質に対する微生物叢変化を知ることは，汚濁物質や汚濁源を特定することも可能となる。そのため，キノンプロファイル法で特定の汚濁物質が環境中の微生物叢へ及ぼす影響を評価し，人為的な汚濁負荷への影響をモニタリングできるか検討する。さらに，各キノン種と汚濁物質濃度の相関を見ることにより，汚濁物質に対して増減す

るキノン種(微生物種)を特定し、汚濁物質が環境中へ及ぼす影響の程度を評価する。(4章)

3) 底生生物の分布と微生物叢の関係性を評価

ベントスと微生物は相互に作用することで自然浄化に寄与している。そのため、様々な環境下でベントス、微生物、底質の物理化学的性質の関係を評価し、生息環境の規則性について明らかにする。また、ベントスによって底質環境を定量的に評価する指標である AMBI と微生物叢の特徴について明らかにし、微生物叢解析を用いて環境を評価することが可能であるか検証する。(5章)

以上の研究により、キノンプロファイルに基づく様々な環境下における微生物叢と化学的・物理的に評価した汚濁状況を関連付けることで、微生物叢解析による環境評価手法を提示する。

引用文献

阿部早智子, 加藤丈夫, 伊藤善通, 横林一彦, 宮崎圭三 (1996) 下水処理排水の河川生物相に与える影響. 日本水処理生物学会誌 32, 1, 51-59.

Adam I. K. U., Miltner A. and Kastner M. (2015) Degradation of ¹³C-labeled pyrene in soil-compost mixtures and fertilized soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 9813-9824.

相澤治郎, 佐藤義秋, 伊藤歩, 北田久美子, 海田輝之, 大村達夫 (1999) 下水処理水が河川底生生物及び水環境に与える影響. 日本水処理生物学会誌, 35, 4, 247-259.

Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological review*, 59, 143-169.

- Baoquan L., Quanchao W., Bingjun L. (2013) Assessing the benthic ecological status in the stressed coastal waters of Yantai, Yellow Sea, using AMBI and M-AMBI. *Mar. Pollut. Bull.*, 75, 1-2, 53-61.
- Bärlocher F. (1992) Research on Aquatic Hyphomycetes: Historical Background and Overview. *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*, 1-15.
- Biological Monitoring Working Party (1978) Final Report: Assessment and Presentation of the Biological Quality of Rivers in Great Britain. Unpublished Report. Dept. of Envir., Water Data Unit.
- Borja A., Dauer DM., Díaz R., Llansó RJ., Muxika I., Rodríguez JG., Schaffner L. (2008) Assessing estuarine benthic quality conditions in Chesapeake Bay: A comparison of three indices. *Ecol. Indic.*, 8, 4, 395-403.
- Borja A., Franco J., Pérez V. (2000) A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Mar. Pollut. Bull.*, 40, 1100-1114.
- Borja A., Mader J., Muxika I. (2012) Instructions for the use of the AMBI index software (Version 5.0). *Revista de Investigación Marina* 19, 72-82.
- Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J. (1998) Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36, 1-12.
- Chesters R.K. (1980) Biological Monitoring Working Party: The 1978 National Testing Exercise. Tech Mem. 19, Dept of Envir., Water Data Unit.
- Chutter F.M. (1972) An empirical biotic index of the quality of water in South African streams and rivers. *Water Research*, 6, 1, 19-30.
- Collins M.D. (1985) Analysis of isoprenoid quinones. In *Methods in Microbiology*, Academic

Press, London, 18, 329-366.

Japan Science and Technology Agency, National Bioscience Database Center, DataBiosafety for Industrial Applications of Microbes. URL

<https://dbarchive.biosciencedbc.jp/jp/diam-microbe/data-9.html> (accessed on October, 2019)

遠藤銀朗 (1990) 湖沼底泥のメタン生成細菌の動態と硫酸還元菌による底泥巻上げの評価. 環境システム研究, 18 : 178-183.

遠藤雅実, 鯉渕幸生, 藤田昌史, 鈴木準平, 小倉久子, 飯村晃, 大畑聡, 磯部雅彦 (2010) 東京湾における底泥酸素消費と微生物群集構造の関係. 土木学会論文集 B2, 66, 1, 1036-1040.

Fleischer D., Grémare A., Labrune C., Rumohr H., Berghe EV., Zettler ML. (2007) Performance comparison of two biotic indices measuring the ecological status of water bodies in the Southern Baltic and Gulf of Lions. Mar. Pollut. Bull., 54, 10, 1598-1606.

Frostegård A., Bååth E. (1996) The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biology and Fertility of Soils, 22, 59-65.

Frostegård A., Tunlid A., Baath E. (2011) Use and misuse of PLFA measurements in soils. Soil Biology and Biochemistry, 43, 1621-1625.

藤田昌史, 今井健太郎, 辻幸志, 坂本康 (2007) 一般廃棄物処理場の安定化指標としてのキノンバイオマーカーの有効性. 環境工学研究論文集, 44, 499-504.

藤田昌史, 今井健太郎, 辻幸志, 坂本康 (2008) 一般廃棄物最終処分場における浸出水中のキノンバイオマーカーの動態. 廃棄物学会論文集, 19, 5, 347-351.

藤田昌史, 鯉渕幸生, Udin H., 小倉久子, 藤江幸一, 磯部雅彦 (2003) 東京湾における水質動態と底質微生物群集構造の解析. 海岸工学論文集, 50, 996-1000.

藤田昌史, 吉野宏美, 芳賀弘和, 西田継, 坂本康 (2007) 河川源流域に硝化細菌群の生息に影響を及ぼす要因. 水工学論文集, 51, 1201-1205.

- Glemarec M., Hily C. (1981) Perturbations apportees ala macro-faune benthique de la baie de Concarneau par les effluents urbains et portuaires. *Acta Oecol.*, 2, 139-150.
- Grall J., Glemarec M. (1997) Using biotic indices to estimate microbenthic community perturbations in the Bay of Brest. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44, 43-53.
- Hasanudin U., Kunihiro T., Fujita M., Hu H., Fujie K., Suzuki T. (2004) The Contribution of Clams on Tidal Flat Purification Capacity. *Journal of Water and Environment Technology*, 2, 2, 83-90.
- Hawkes, H.A. (1997) Origin and development of the Biological Monitoring Working Party score system. *Water Research*, 32, 3, 964 –968.
- Hily, C. (1984) Variabilite de la macrofaune benthique dans les milieux hypertrophiques de la Rade de Brest. *These de Doctorat d’Etat, Univ. Bretagne Occidentale.*, 1-2, 359-337.
- Hiraishi A. (1999) Isoprenoid Quinones as Biomarkers of Microbial Populations in the Environment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 5, 449-460.
- 平石明 (2016) 微生物の培養性とその生態学的意義. *日本微生物資源学会誌*, 32, 1-11.
- 平石明, 小林豊, 森山清, 森忠洋 (1993) 活性汚泥の細菌群集構造におよぼす亜鉛ストレスの影響—キノプロファイル法による解析. *水環境学会誌*, 16, 7, 481-487.
- 平石明, 上田陽子 (1997) キノプロファイルによる人工廃水活性汚泥および実処理下水汚泥の微生物群集構造の比較解析. *日本水処理生物学会誌*, 33, 137-149.
- Hiraishi A., Ueda Y., Ishihara J., Mori T. (1996) Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42, 457-469.
- Hiraishi A., Umezawa T., Yamamoto H., Kato K., Maki Y. (1999) Changes in quinone profiles of hot spring microbial mats with a thermal gradient. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 198-205.
- 細見暁彦, 春日郁郎, 古米弘明, 吉村千洋, 中島典之, 加賀谷隆, 栗栖太 (2009) 河川の

- 粒状有機物動態と底生動物の群集構造に及ぼす下水処理水の影響. 水環境学会誌 32, 7, 375-381.
- Hu H., Lim B., Goto N., Fujie K. (2001) Analytical precision and repeatability of respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 47, 17-24.
- 今井一郎 (1989) 沿岸域における微生物の生態. 沿岸海洋研究ノート, 27, 1, 85-101.
- Iwasaki M., Hiraishi A. (1998) A new approach to numerical analyses of microbial quinone profiles in the environment. *Microbes Environ.*, 13, 67-76.
- Jayaraj K.A., Sheeba P., Jacob J., Revichandran C., Arun P.K. Praseeda K.S., Nisha K.A. Rasheed K.A. (2008) Response of infaunal macrobenthos to the sediment granulometry in a tropical continental margin – southwest coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77, 743-756.
- 金子光美 (1990) 水質保全と微生物指標. 水質汚濁研究, 470-476.
- 環境省 (2017) 水生生物による水質評価法マニュアル-日本版平均スコア法-.
- 環境省 HP (2018) 生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会.
<http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf.html> (2019年10月時点)
- Karakassis I., Hatziyanni E. (2000) Benthic disturbance due to fish farming analyzed under different levels of taxonomic resolution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 203, 247-253.
- 片山新太 (2000) 土壌中の農薬分解に関与する微生物群の構造と挙動. 日本農薬学会誌, 25, 300-309.
- 加藤和弘 (1989) 生物による水環境評価について. 環境科学会誌, 2, 4, 301-310.
- 和波一夫, 竹内健 (2008) 都市排水の環境影響に関する研究(まとめ)―河川水質・底生生物に及ぼす下水処理水の影響―. 東京都環境科学研究所年報, 38-46.
- 鯉淵幸生, 藤田昌史, 阿部哲也, 磯部雅彦 (2005) 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. 海岸工学論文集, 52, 946-959.
- 鯉淵幸生, 藤田昌史, 阿部哲也, 磯部雅彦 (2005) 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. 海岸工学論文集, 52, 946-950.
- 小泉優子, 堤聰, 嶋栄吉 (2002) 底生動物群集による農業集落排水処理水を受容する河川水域の評価. 農業土木学会論文集, 218, 107-114.
- 国土交通省淀川河川事務所, 河川水中の下水処理水の混入率. URL.
<http://www.kkr.mlit.go.jp/yodogawa/know/summary/problem/problem-konyu.html> (2019 年 10 月時点).
- 駒田充生, 竹内誠 (1998) 農業域の小水路における脱窒速度の測定と窒素浄化機能の評価. 日本土壌肥料科学雑誌, 69, 162-169.
- 國弘忠生 (2004) 微生物モニタリングによる環境質評価手法の構築. 豊橋技術科学大学博士論文.
- 國弘忠生, 藤田昌史, 胡洪營, 藤江幸一 (2004) キノンプロファイルと PCR-DGGE を併用した汚染修復細菌の特定と微生物群集の挙動解析. 統計数理, 52, 2, 329-342.
- Kunihiro T., Miyazaki T., Uramoto Y., Kinoshita K., Inoue A., Tamaki S., Hama D., Tsutsumi H., Ohwada K. (2008) The succession of microbial community in the organic rich fish-farm sediment during bioremediation by introducing artificially mass-cultured colonies of a small polychaete, *Capitella* sp. I. Mar. Pollut. Bull. 57, 68-77.
- Matthew, D., Collins D. J. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiological, 45, 316-354.
- Muniz P., Venturini N., Pires-Vanin MSA., Tommasi LR., Borja A. (2005) Testing the applicability of a Marine Biotic Index (AMBI) to assessing the ecological quality of soft-bottom benthic communities, in the South America Atlantic region. Mar. Pollut. Bull., 50, 6, 624-637.
- Muxica I., Borja A., Bald J. (2007) Using historical data, expert judgment and multivariate

analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 55, 16-29.

中村好宏, 胡洪宮, 藤江幸一, 馬場康維 (2004) クラスタ分析によるキノプロファイルデータのスクリーニング. *統計数理*, 52, 2, 343-352.

中野光暁, 湯岳琴, 森村茂, 木田建次, 増田龍哉, 滝川清 (2009) 微生物叢解析による干潟底泥中の微生物機能と底質環境特性. *海岸工学論文集*, 56, 1091-1095.

七都県市首脳会議環境問題対策委員会水質改善対策専門部会 (2000) 東京湾における底生生物調査指針および底生生物等による底質評価方法. *全国公害研会誌*, 25, 2, 7-13.

日本水環境学会 (2009) 日本の水環境行政. *ぎょうせい*, 1-24.

大谷壮介, 上月康則, 倉田健悟, 仲井薫史, 村上任士 (2007) 河口干潟潮間帯の物理的な底質環境と底生生物群集との関係. *土木学会論文集 G*, 63, 4, 195-205.

Piló D., Leitão F., Ben-Hamadou R., Range P., Chicharo L. (2011) Macrobenthic response to sewage discharges in confined areas from coastal lagoons: Implication on the ecological quality status. *Vie et milieu life and environment*, 61, 2, 107-118.

Pinkart H.C., Ringelberg D.B., Piceno Y.M., MacNaughton S.J. and White D.C. (2002) Biochemical approaches to biomass measurements and community structure analysis. American Society for Microbiology Press, 101-113.

Rolleke, S., G. Muyzer, C. Wawer, G. Wanner and W. Lubitz. (1996) Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2059-2065.

Pranovi F., Ponte FD., Torricelli P. (2007) Application of biotic indices and relationship with structural and functional features of macrobenthic community in the lagoon of Venice: an example over a long time series of data. *Mar. Pollut. Bull.*, 54, 10, 1607-1618.

- 李正奎, 西嶋渉, 向井徹雄, 滝本和人, 清木徹, 平岡喜代典, 岡田光正 (1998) 自然および人工干潟の有機物浄化能の定量化と広島湾の浄化に果たす役割. 水環境学会誌, 21, 3, 149-156.
- Salas F., Neto JM., Borja A., Marques JC. (2004) Evaluation of the applicability of a marine biotic index to characterize the status of estuarine ecosystems: the case of Mondego estuary (Portugal). *Ecol. Indec.* 4, 3, 215-225.
- Silvia, S., Miura, T., Kaneko, N., Fujie, K., Hasanudin, U., Niswati, A. and Haryani, S. (2014) Soil Microbial Biomass and Diversity Amended with Bagasse Mulch in Tillage and No-tillage Practices in the Sugarcane Plantation. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 410-417.
- 鈴木健一郎, 平石明, 横田明 (2001) 微生物の分類・同定実験法—分子遺伝学・分子生物学を中心に—. シュプリンガー・ジャパン株式会社, 162-173.
- 高橋康夫 (1984) 水生生物による水質の簡易調査について. 公害と対策, 20,(12),77-81.
- 武田和也, 石田基雄, 青山裕晃, 鈴木輝明(2007) 干潟実験施設を利用したマクロベントスによる水質浄化機能定量化手法の検証. 水産海洋研究, 71, 1, 18-28.
- 谷佳津治, 那須正夫 (2001) 環境中の微生物モニタリング-バイオレメディエーションを例として-. 環境技術, 30, 6, 435-440.
- 浦嶋泰文, 中嶋美幸, 金田哲, 村上敏文, 堀兼明(2011)リン脂質脂肪酸およびキノンプロファイル法を用いた家畜ふん堆肥連用圃場における土壌微生物相の解析. 土と微生物, 66, 125-135.
- U. S. EPA, National aquatic resource surveys. Indicators used in the national aquatic resource surveys. URL. <https://www.epa.gov/national-aquatic-resource-surveys/indicators-usednational-aquatic-resource-surveys> (2019年10月時点).
- 渡辺仁治,水野寿彦,御勢久右衛門,桜井善雄,盛下勇 (1984) 水生生物による水質の簡易調査法-策定の理論的根拠-. 公害と対策 , 20, 12, 82-86.

White D.C., Davis W.M., Nickels J.S., King J.D. and Bobbie R.J. (1979) Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia*, 40, 51-62.

Xianxiang L., Juan Z., Jianqiang Y., Wenpeng S., Wenlin C. (2014) Assessing the benthic habitat quality in the Huanghe (Yellow River) Estuary and its adjacent areas using AMBI and M-AMBI. *Acta Oceanol. Sin.*, 33, 9, 117-124.

横川太一 (2016) 細菌群集多様性の動態を生態系評価にいかにとりこむか. *日本生態学会誌*, 66, 301-308.

第2章 瀬戸内海の底質と微生物叢の関係

2.1 はじめに

湖沼や干潟の物質循環は底質中の微生物による働きが重要な役割を担っている。干潟は一次生産の更新速度が速く、堆積物中の汚染物質の変換、栄養塩の無機化など多様な環境浄化能を有する場である。干潟の微生物の機能は汚濁物質および栄養塩の変換、分解、軽減など自己浄化作用において重要な役割を果たしていることが知られている(鈴木および上木, 2006; 瀬口ら, 2007)。以上のことから、底質中の微生物叢は底質環境を評価する上で重要な指標となり得る。

底質と微生物の関係を調査した既往の研究では、底質中の微生物量は砂質よりも泥質の方が4倍以上多く存在することや、底質の含泥率が上がると硫酸還元菌が増加することなどが明らかになっている(鯉渕ら, 2005; 中野ら, 2009)。また、干潟生態系の機能を調べた結果では、メディアン径が150-300 μm の時、干潟で一次生産を担う底生微細藻類の現存量が高く、メディアン径が400 μm 以上では流れなどの外力が生産量を支配すること明らかになっている(小川ら, 2006)。東京湾内の酸素消費と微生物叢の関係を調査した結果では、微生物叢は水質の履歴を反映した評価手法として有望であることが示唆されている(藤田ら, 2003; 遠藤ら, 2010)。

以上のように、底質の粒度や有機物量は微生物叢に深く関係していることが明らかになっているが、底質の性状が異なる多地点で評価した事例は見当たらず、環境評価手法として用いるためには観測結果の蓄積が重要である。そのため、本章では瀬戸内海の4干潟35地点で調査を行い、底質の物理・化学的な特徴と微生物叢の関係性から底質環境を評価した。

2.2 方法

2.2.1 調査水域

調査対象は瀬戸内海の4干潟35地点である(Fig. 2-1)。瀬戸内海の4干潟は a-1 - a-9 の黒瀬川河口(呉市), b-1 - b-9 の藤井川河口(福山市), c-1 - c-8 のハチの干潟(竹原市), d-1 - d-9 の三ツ口干潟(東広島市)である。黒瀬川は東広島から呉市に流れる二級河川で、その流域面積は238.8 km² であり、幹川流路延長は105.0 km で、河口の干潟面積は47 ha である。藤井川は三原市、尾道市、福山市を流れる二級河川である。その流域面積は27.4 km² であり、幹川流路延長は56.0 km で、河口では藤井川と本郷川が合流する。干潟面積は204 ha であり、広島県で最大規模の面積を有する。ハチの干潟は竹原市を流れる二級河川の賀茂川(幹川流路延長28.7 km)の河口に広がる干潟である。干潟面積は22 ha で、河口の西側は主に泥質干潟が広がり、東側は砂質干潟となっている。三ツ口干潟は東広島市安浦町に位置する三ツ口湾に21 ha の干潟面積を有する前浜干潟である。三ツ口湾には二級河川の野呂川が流入し干潟への栄養塩等の供給を担っている。

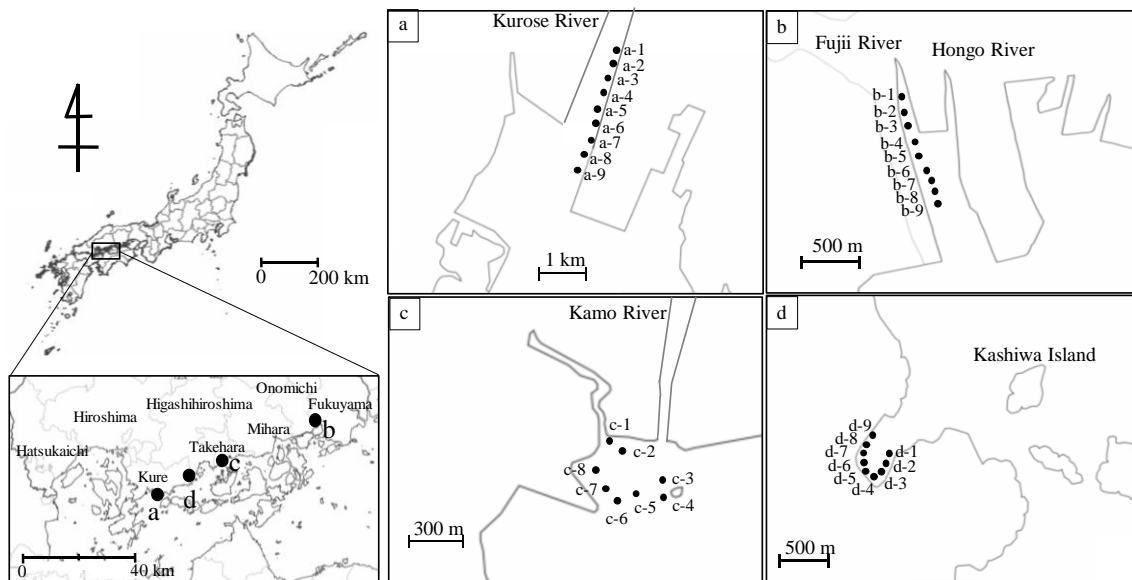


Fig. 2-1 広島県の黒瀬川河口(a), 藤井川河口(b), ハチの干潟(c), 三ツ口湾(d)の調査地点.

2.2.2 サンプルングおよび分析

瀬戸内の4干潟のサンプルングは干潟での生物生産量が増大する2012年5月と7月に行った。黒瀬川とハチの干潟は2012年5月に、三ツ口干潟と藤井川は2012年7月にそれぞれサンプルングを行った。サンプルングは同一干潟で8~9地点とし、堆積物の深さ方向5 cmをφ48 mmのコアサンプラーで同一地点2回採取した。酸化還元電位(ORP)は各地点の土壌深さ方向2.5 cmの位置に電極を差し込み測定した。底質の粒度組成は、各試料をふるい分けによって測定し、シルト(0.063 mm>φ), 砂(2.00>φ>0.063 mm), 礫(φ>2.0 mm)それぞれの含量を求めた。含水率は湿潤状態の底質を15 g以上量りとり110±5°Cで2時間以上加熱し、再秤量して質量の差から算出した。強熱減量(IL)は乾燥させたサンプルを10 g以上量りとり、600±25°Cで5時間強熱し、再秤量して質量の差から算出した。

2.2.3 微生物叢解析

微生物叢解析はキノプロファイル法を用いて、胡らの方法に従って分析した(胡ら, 1992)。以下にキノプロファイル法の詳細を示す。

2.2.3.1 試料の前処理

採取した底質はフリーザー(-20°C)で保存し、この底質を凍結乾燥機(VO-800F, TAITEC)で乾燥させた。乾燥後の試料はガラス製の試薬瓶に入れて、これを実験試料とした。

2.2.3.2 クロロホルム・メタノール抽出

乾燥した底質を200 mL 共栓付褐色三角フラスコに入れ、クロロホルム・メタノール混合液(2:1,v/v, 以下クロ・メタ液)を60 mL 加え、振盪機で30分間振盪して菌体キノ

を抽出した。振盪後、濾紙(ADVANTEC 製, No.2)を通した抽出液を 100 mL なす型フラスコに回収した。次に、濾紙上残渣物を共栓付褐色三角フラスコに濾紙ごと戻し、クロ・メタ液を 60 mL 加え振盪機で 30 分間振盪し、同様に抽出液を回収した。再度クロ・メタ液による抽出を行い、抽出を合計 3 回行った。ウォーターバスの温度を 35°C にして、抽出物をロータリーエバポレーターで毎回 2~3 mL 程度まで濃縮した。このクロ・メタ液の抽出液は、粗脂質画分となる。

2.2.3.3 ヘキサン抽出

上記のなす型フラスコを合計 20 mL のヘキサンで 3 回、合計 3 mL のアセトンで 3 回に分けて洗浄し、洗浄液を 50 mL ガラス製遠沈管に移した。さらに、純水を 10 mL 加えて、手で 1 分間激しく振盪した。遠沈管を遠心分離(4000 rpm, 3 min)し、上層(ヘキサン層, 脂質成分)をマイクロピペッターで 100 mL なす型フラスコに、下層(夾雑物, 水溶性物質)が入り込まないように回収することによって、キノンを再抽出した。残った下層に対し、ヘキサンを 20 mL 加えて、再度ヘキサンによる抽出を行い、合計 3 回抽出操作を行った。100 mL なす型フラスコに入れたヘキサン抽出物を、ウォーターバスの温度を 35°C にして、エバポレーターで約 1 mL 以下まで濃縮した。この操作によって脂質成分が抽出された。

2.2.3.4 分画, 分離

次に、固相吸着カートリッジ(Sep-Pak® Plus Silica, Waters co.)を用いた固相抽出法による夾雑物の除去および UQ・MK 分画を行った。50 ml のガラス製注射筒を用いて、2 個連結した固相吸着カートリッジをヘキサンによるコンディショニングを行った。

なす型フラスコを合計 30 mL のヘキサンで洗浄してなす型フラスコの側面に付着したキノンを溶出させ、洗浄液を固相吸着カートリッジに上向流で通液し、キノンを充填

物に吸着させた。ここに 2%ジエチルエーテル・ヘキサン溶液を上向流で 20 mL 通液し、メナキノンを溶出させ 50 mL なす型フラスコに回収した。その後、溶出溶媒を 10%ジエチルエーテル・ヘキサン溶液に変え、同様にしてユビキノンを溶出させ、メナキノンは別の 50 mL なす型フラスコに回収した。

ここで、各回収液をエバポレーターでウォーターバスの温度を 35°Cにして蒸発・乾固し、なす型フラスコをアセトンで最終的に液量が 3 mL 程度になるように 3 回に分けて洗浄して回収液を 10 mL スクリュー管瓶に移した。

スクリュー管瓶に移した回収液を再びエバポレーターでウォーターバスの温度を 35°Cにして蒸発・乾固させた。ここに、HPLC 用サンプルとして、マイクロピペッターでアセトンを 100 μ L 加え、再溶解させてすぐに分析に供した。なお、すぐに分析しないときは、キノンのアセトン溶液をスクリュー管瓶内に入れた状態で分析まで冷暗所 (-20°C以下)に保存した。精製したキノン(特にメナキノンは)は保存中に徐々に分解されていくので、なるべく早く分析を行った。またキノン類は、太陽光により分解し易いので全て遮光して操作を行った。

各キノン種を分離・同定するために、高速液体クロマトグラフィー(HPLC, JASCO)を用いた。分析に用いた HPLC は、HPLC 用送液ポンプ(PU-980, JASCO), カラムオーブン(CO-960, JASCO), UV/VIS 検出器(UV-970, JASCO), クロマトグラムデータ処理(chromatocoder 21, SYSTEM INSTRUMENTS)を備える機器を用いた。カラムは逆相分配型の ODS カラム(Zorbax-ODS ϕ 4.6 mm \times 250 mm, Agilent Technologies)を使用した。インジェクション量は 20 μ L, カラム温度は 35°C, 移動相にはメタノール・ジイソプロピルエーテル(9:2, v/v)を用い、流量を 1 mL/min とした。キノンの定量には、定量標準物質として UQ-10 Standard を用い、各キノンの定量のために吸収極大波長の検出面積を用いた。各キノンの吸収極大波長は、UQ が 275 nm, MK が 270 nm である。

2.2.3.5 キノンプロファイル解析方法

キノンの同定は極大吸収波長のピーク形状および ENIU 値を用いた。キノンの逆相カラムによる分離ピークは、イソプレン単位相当値(Equivalent Number of Isoprene Unit ; ENIU 値)の計算によって分子種の同定を行うと、イソプレン側鎖の短い分子種から溶出し、その溶出時間はイソプレン側鎖数と相関関係があり、イソプレン側鎖数と溶出時間の対数は直線関係にある。この直線は、二次回帰曲線で近似でき、キノン分子種 X の ENIU 値を以下の(式 2-1)で求めることができる(Hasanudin et al., 2004)。

$$ENIU = A + B \log\left(\frac{ET_x}{ET_{std}}\right) + C \left(\log\left(\frac{ET_x}{ET_{std}}\right)\right)^2 \quad (\text{式 2-1})$$

ETstd: 基準としたキノン分子種の溶出時間

ETx: キノン分子種 X の溶出時間

A, B, C: 定数

水素飽和度については、イソプレン側鎖数と溶出時間の対数の関係が水素不飽和度の分子種と同様に二次回帰曲線で整理でき、その直線は、水素飽和度ごとに一定値だけ水素不飽和度の二次回帰曲線からずれている。

メナキノンの場合

MK-n	n
MK-n(H ₂)	n + (0.39~0.42)
MK-n(H ₄)	n + (0.76~0.82)
MK-n(H ₆)	n + (1.16~1.19)
MK-n(H ₈)	n + (1.58~1.62)

この値は測定条件, キノンの濃度により若干変動するが, 水素飽和数が増えると ENIU 値はほぼ 0.4 ずつ増加していくことがわかる。ユビキノンは同様に ENIU 値が適用できるため, ENIU 値でキノンの同定を行った。

ENIU 値は片対数グラフ上で横軸にイソプレン側鎖数, 縦軸に溶出時間を取り, HPLC で分析したユビキノンは, メナキノンは各々の定性標準のデータをプロットした。水素飽和度により, それぞれ等間隔の平行直線が引ける。この直線から, 定性標準に含まれていないキノンの分子種についても溶出時間が分かる。この直線を用いて, サンプルのキノンの分子種を同定した。

キノンの定量はユビキノンは, メナキノンの分子吸光係数が側鎖数に関係なくそれぞれ 14.4 m/Mcm, 17.4 m/Mcm と一定なため, キノンの量はピーク面積から濃度を算出した。定量用標準物質として UQ-10 Standard を用いた。ユビキノンの濃度算出式は(式 2-2), (式 2-3)に示す。

$$C_{kq} = \frac{\sum A_{kq} \times Ex \times 1000}{A_{std} \times In \times W} \quad \text{(式 2-2)}$$

$$C_{km} = \frac{\sum A_{km} \times Ex \times 1000}{A_{std} \times In \times W} \times \frac{14.4}{17.4} \quad \text{(式 2-3)}$$

C: キノンの濃度 (μmol/L, g-POC)

A: ピーク面積

K_q: ユビキノンの分子種

K_m: メナキノンの分子種

A_{std}: 標準物質 (UQ-10) 1μmol 当たりのピーク面積

In: 試料注入量 (μL)

Ex: 試料抽出量 (μL)

W: 培養液量 (L, g-POC)

2.2.4 データ解析

地点間の類似性を評価するためクラスター分析を行い、調査したサンプルについて類似度の近いものを分類した。各クラスターの分類に寄与する因子は主成分分析により解析を行った。解析にはエクセル統計ソフト BellCurve for Excel (version 3.2) (BellCurve, Tokyo, Japan)を用いて、変数には調査した地点の IL, ORP, 礫含有率, 砂含有率およびシルト含有率を用いた。クラスター分析の個体間距離は標準化ユークリッド距離, クラスターの結合には Ward 法をそれぞれ用いた。各クラスターの平均値の相違は ANOVA により検定した。

キノン種の多様性 (Diversity of microbial quinone species (*MDq*)) と均一性指標 (Equitability of quinone species (*EQ*)) は以下の (式 2-4), (式 2-5) によって算出した (Hu et al., 1999; 平石および上田, 1997)。

$$MDq = \left(\sum_{k=1}^n \sqrt{x_k} \right)^2 \quad (\text{式 2-4})$$

x_k = キノン種 k の mol%

$$EQ = MDq/n \quad (\text{式 2-5})$$

n = キノン種数

MDq は検出されたキノン種が均等に分布しているときに最大になり、均等性の偏りや検出されるキノン種数が少ないほど低くなる。*EQ* はキノン種分布の均一性を定量化した指標であり、検出されたキノン種が均等に分布するほど 1 に近づく。

2.3 結果および考察

2.3.1 底質分析

Table 2-1 に瀬戸内海干潟における底質分析結果を示す。黒瀬川(a)と藤井川(b)は河口に近づく程強熱減量が増加し、最下流の a-9 および b-9 でそれぞれ 5.8, 5.3%を示した。ハチの干潟および三ツ口湾においても河川の流れ込みがある c-7, c-8 でそれぞれ 5.8, 6.3%, d-6 で 5.7%の高い値を示した。含水率、強熱減量およびシルト含有率は c-8 が最も高い地点であった。

Table 2-2 瀬戸内海干潟の各地点における底質の特徴

Site	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ignition loss [%]	a	2.3	1.7	1.2	1.9	3.0	3.3	2.2	4.9	5.8
	b	2.4	0.9	0.9	1.9	1.7	4.5	4.6	4.7	5.3
	c	3.6	3.9	3.4	4.1	1.0	0.9	5.8	6.3	
	d	1.5	1.7	1.8	1.1	2.5	5.7	2.3	2.6	3.1
Water content [%]	a	27.5	23.7	26.9	23.8	24.1	48.6	24.3	31.2	29.9
	b	23.5	20.3	18.3	26.2	27.7	30.2	32.0	34.3	39.0
	c	33.1	33.4	33.6	36.3	25.5	26.8	46.0	52.1	
	d	21.2	19.6	20.8	22.9	26.1	22.9	41.7	21.8	42.5
Gravel [%]	a	69.3	62.9	64.8	55.4	34.7	3.7	33.7	16.1	14.1
	b	81.0	89.0	87.0	33.2	42.9	7.1	17.2	7.8	1.8
	c	8.3	15.4	29.9	16.8	86.3	41.5	4.1	1.0	
	d	50.2	63.1	55.0	55.1	41.7	61.6	18.9	80.3	29.5
Sand [%]	a	30.0	33.8	33.2	37.6	54.3	48.1	50.1	61.8	73.9
	b	18.3	10.9	12.9	58.6	54.1	53.7	46.0	44.4	45.6
	c	61.2	33.9	59.0	69.9	11.6	57.9	49.3	12.0	
	d	46.1	30.3	37.4	33.1	42.5	23.4	61.9	17.4	49.9
Silt [%]	a	0.7	3.3	2.1	7.0	11.0	48.1	16.2	22.1	12.0
	b	0.7	0.1	0.1	8.3	3.0	39.3	36.8	47.9	52.6
	c	30.5	50.7	11.1	13.3	2.1	0.6	46.6	87.0	
	d	3.7	6.6	7.5	11.8	15.8	14.9	19.2	2.3	20.5
ORP [mV]	a	69	96	57	170	-80	-129	-115	-119	-126
	b	232	102	97	-119	-64	-83	-110	104	-89
	c	-380	-308	262	275	282	392	-181	-133	
	d	-163	-163	250	153	172	-90	326	326	-179

2.3.2 微生物叢解析

Tables 2-3 - 2-6 に瀬戸内の干潟それぞれのキノンプロファイル分析結果を示す。UQ/MK 比は河川の上流側や三ツ口湾干潟で 1.0 を上回ることから、好気性菌が優占していることが分かる。UQ は UQ-8, UQ-9, UQ-10 が多く、UQ-8 が優占する地点が多い。MK は黒瀬川、藤井川、三ツ口湾干潟で MK-6, MK-7, MK-8 が優占し、ハチの干潟では MK-5, MK-6, MK-7 が優占した。

Table 2-3 黒瀬川河口のキノンプロファイル分析結果 [$\mu\text{mol}/\text{kg-dry sediment}$]

Quinone species	a-1	a-2	a-3	a-4	a-5	a-6	a-7	a-8	a-9
UQ-8	0.033	0.037	0.022	0.151	0.015	0.013	0.007	0.008	0.008
UQ-9	0.045	0.022	0.015	0.050	0.011	0.005	0.002	0.005	0.001
UQ-10	0.028	0.020	0.011	0.037	0.007	0.009	0.001	0.004	0.002
UQ-9(H ₂)	0.003	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
UQ-others	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000
MK-5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-6	0.038	0.043	0.103	0.063	0.012	0.008	0.008	0.006	0.010
MK-7	0.023	0.029	0.016	0.064	0.013	0.011	0.005	0.009	0.008
MK-8	0.012	0.013	0.009	0.035	0.006	0.002	0.001	0.000	0.000
MK-9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
MK-7(H ₂)	0.008	0.013	0.007	0.016	0.003	0.008	0.000	0.005	0.000
MK-8(H ₂)	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-8(H ₄)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
MK-8(H ₆)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
MK-others	0.003	0.013	0.000	0.000	0.002	0.002	0.006	0.000	0.000
Total	0.192	0.189	0.183	0.419	0.069	0.061	0.028	0.044	0.032
TotalUQ	0.108	0.079	0.048	0.239	0.033	0.029	0.010	0.017	0.011
TotalMK	0.084	0.110	0.135	0.180	0.036	0.032	0.019	0.027	0.021
UQ/MK	1.289	0.713	0.353	1.325	0.917	0.917	0.516	0.625	0.555

Table 2-4 藤井川河口のキノンプロファイル分析結果 [$\mu\text{mol}/\text{kg-dry sediment}$]

Quinone species	b-1	b-2	b-3	b-4	b-5	b-6	b-7	b-8	b-9
UQ-8	0.039	0.041	0.025	0.071	0.006	0.001	0.004	0.007	0.027
UQ-9	0.028	0.038	0.014	0.028	0.000	0.000	0.002	0.004	0.014
UQ-10	0.041	0.019	0.021	0.042	0.002	0.011	0.005	0.004	0.021
UQ-9(H ₂)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
UQ-others	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-6	0.014	0.016	0.016	0.020	0.002	0.005	0.003	0.006	0.026
MK-7	0.014	0.019	0.017	0.035	0.002	0.000	0.006	0.004	0.032
MK-8	0.012	0.019	0.017	0.039	0.000	0.001	0.001	0.000	0.015
MK-9	0.000	0.003	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
MK-7(H ₂)	0.000	0.002	0.000	0.003	0.000	0.005	0.002	0.000	0.003
MK-8(H ₂)	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
MK-8(H ₄)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000
MK-8(H ₆)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-others	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
Total	0.149	0.159	0.116	0.243	0.012	0.024	0.022	0.030	0.143
TotalUQ	0.108	0.099	0.064	0.142	0.008	0.013	0.011	0.015	0.062
TotalMK	0.041	0.060	0.052	0.102	0.005	0.011	0.011	0.015	0.081
UQ/MK	2.621	1.638	1.248	1.392	1.743	1.156	0.980	1.003	0.773

Table 2-5 ハチの干潟のキノプロファイル分析結果 [$\mu\text{mol/kg-dry sediment}$]

Quinone species	c-1	c-2	c-3	c-4	c-5	c-6	c-7	c-8
UQ-8	0.079	0.185	0.070	0.104	0.180	0.032	0.064	0.249
UQ-9	0.009	0.038	0.036	0.076	0.061	0.008	0.005	0.092
UQ-10	0.177	0.016	0.188	0.070	0.127	0.020	0.016	0.214
UQ-9(H ₂)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
UQ-others	0.000	0.000	0.000	0.018	0.062	0.003	0.000	0.000
MK-5	0.154	0.190	0.035	0.141	0.164	0.012	0.064	0.260
MK-6	0.022	0.059	0.038	0.054	0.060	0.025	0.010	0.065
MK-7	0.058	0.136	0.055	0.095	0.123	0.045	0.062	0.180
MK-8	0.020	0.049	0.009	0.030	0.071	0.004	0.000	0.043
MK-9	0.002	0.003	0.001	0.001	0.019	0.000	0.000	0.015
MK-7(H ₂)	0.006	0.053	0.009	0.001	0.018	0.001	0.000	0.005
MK-8(H ₂)	0.000	0.002	0.003	0.000	0.012	0.000	0.000	0.065
MK-8(H ₄)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-8(H ₆)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-others	0.003	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
Total	0.531	0.737	0.444	0.590	0.899	0.150	0.222	1.190
TotalUQ	0.265	0.239	0.295	0.268	0.432	0.063	0.086	0.555
TotalMK	0.265	0.498	0.149	0.323	0.467	0.088	0.136	0.635
UQ/MK	1.001	0.480	1.973	0.829	0.927	0.713	0.631	0.874

Table 2-6 三ツ口湾干潟のキノプロファイル分析結果 [$\mu\text{mol/kg-dry sediment}$]

Quinone species	d-1	d-2	d-3	d-4	d-5	d-6	d-7	d-8	d-9
UQ-8	0.156	0.215	0.130	0.072	0.049	0.020	0.019	0.040	0.047
UQ-9	0.022	0.033	0.039	0.033	0.013	0.003	0.005	0.009	0.009
UQ-10	0.075	0.049	0.039	0.022	0.010	0.009	0.004	0.014	0.017
UQ-9(H ₂)	0.005	0.003	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
UQ-others	0.004	0.000	0.005	0.004	0.001	0.002	0.000	0.000	0.002
MK-5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-6	0.057	0.048	0.058	0.000	0.013	0.009	0.008	0.019	0.022
MK-7	0.047	0.067	0.034	0.019	0.010	0.007	0.007	0.013	0.016
MK-8	0.052	0.046	0.032	0.013	0.010	0.008	0.003	0.006	0.013
MK-9	0.015	0.017	0.003	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
MK-7(H ₂)	0.015	0.012	0.006	0.001	0.001	0.006	0.000	0.001	0.002
MK-8(H ₂)	0.015	0.001	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
MK-8(H ₄)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-8(H ₆)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MK-others	0.002	0.003	0.004	0.005	0.001	0.000	0.000	0.002	0.005
Total	0.465	0.494	0.352	0.186	0.108	0.064	0.047	0.103	0.136
TotalUQ	0.262	0.300	0.213	0.142	0.073	0.035	0.029	0.063	0.075
TotalMK	0.203	0.194	0.138	0.044	0.035	0.030	0.018	0.040	0.060
UQ/MK	1.293	1.546	1.544	3.238	2.068	1.172	1.606	1.576	1.251

2.3.3 クラスタ分析および主成分分析

各地点の類似性を明らかにするためクラスタ分析を行った結果、瀬戸内海 35 地点は 4 つのグループに分類された(Fig. 2-2)。各クラスターに属するサンプリング地点の分布を Fig. 2-3 に示す。各クラスターに属する地点数は Cluster 1-4 でそれぞれ、14, 6, 4, 11 地点である。各クラスターの分布を見ると、Cluster 1 は黒瀬川および藤井川の上流側、ハチの干潟の賀茂川下流に位置する地点が分類され、Cluster 2 は黒瀬川および藤井川の中央側、三ツ口湾の外側の地点が分類された。Cluster 3 はハチの干潟の賀茂川下流側、三ツ口湾の西側に位置する地点が分類され、Cluster 4 は黒瀬川および藤井川の下流側、ハチの干潟の西側、三ツ口湾の南側の地点が分類された。

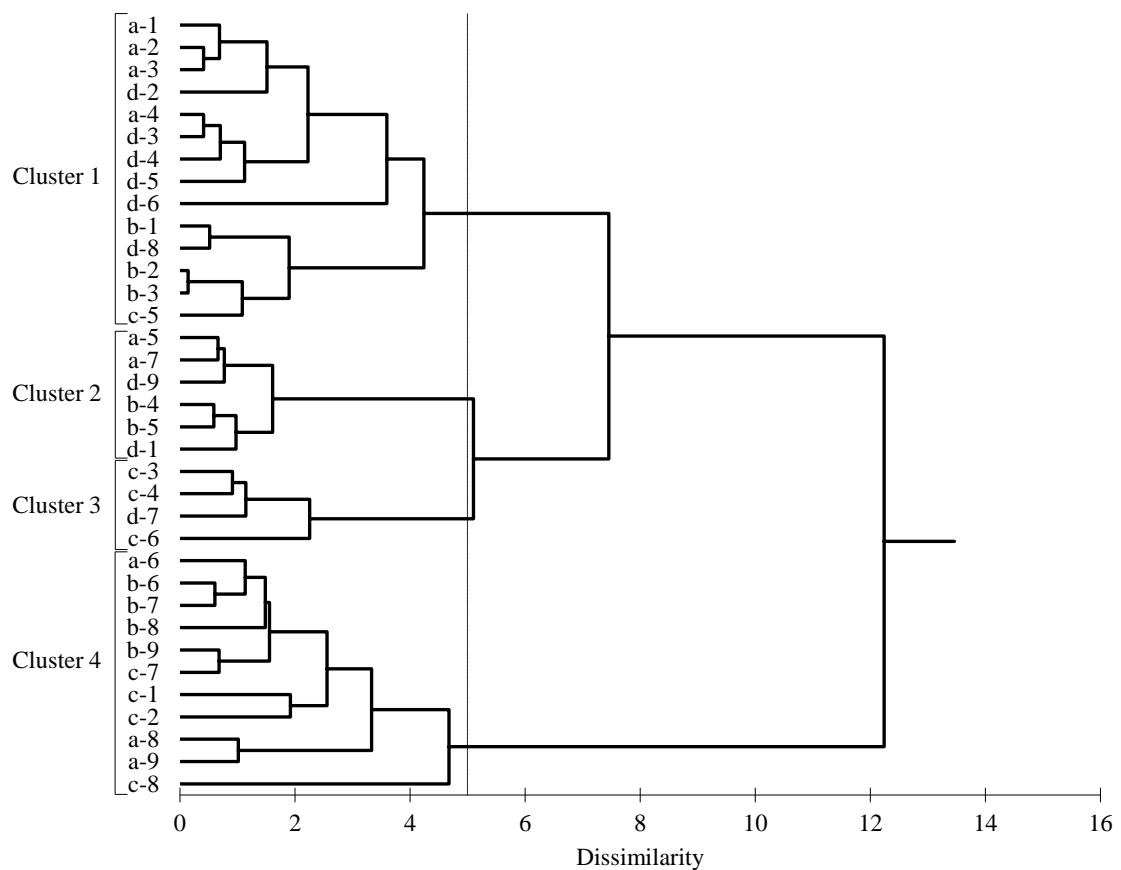


Fig. 2-2 クラスタ解析による瀬戸内海の調査地点の分類.

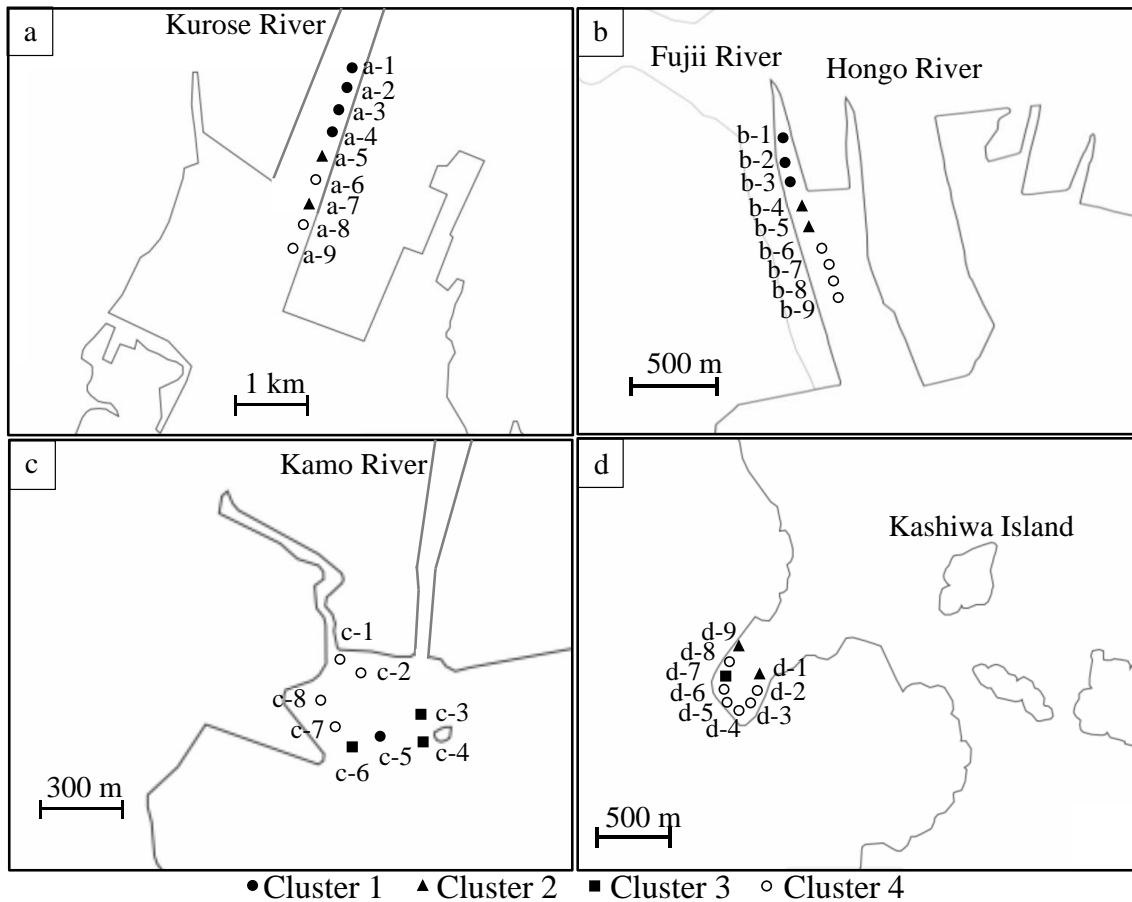


Fig. 2-3 クラスタ分析によって分類された瀬戸内海の調査地点.

クラスタ分析による分類に寄与する因子を求めると主成分分析を行った結果、第一主成分は 61.2% の寄与率が、第二主成分は 21.7% の寄与率が認められ、第二主成分までで 82.9% の累積寄与率が認められた。主成分得点分布(Fig. 2-4)の結果、第一主成分は礫含有率が正に、IL および砂含有率が負に大きな値をとり、第二主成分は ORP および砂含有率が正に大きな値を示した。なお、シルト含有量は線形結合しているため説明変数から除外した。瀬戸内海では粒度のばらつきが大きいことから、礫、砂、シルトの割合と IL で示される有機物量の違いで底質環境が特徴付けられると示唆される。

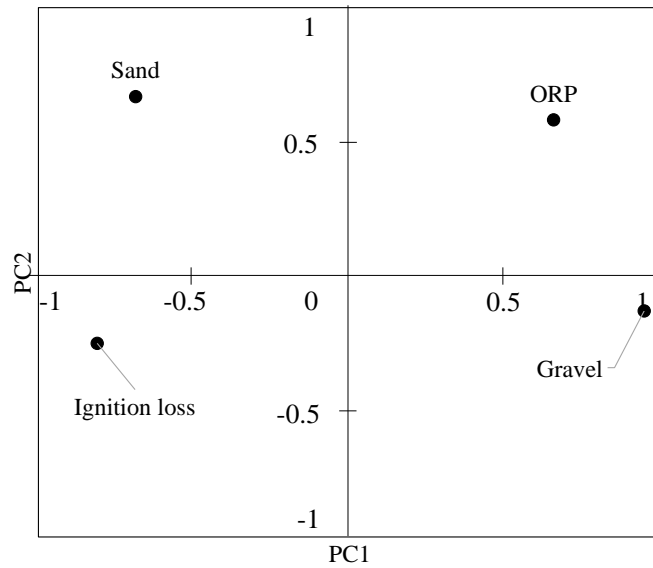


Fig. 2-4 瀬戸内海底質の物理的特徴を用いた主成分得点分布.

2.3.4 各クラスターの物理的性質

Fig. 2-5 に瀬戸内干潟の各クラスターにおける底質の物理的性質の平均値を示す。Cluster 1 の礫含有率は $68.01 \pm 14.0\%$ (mean \pm SD) で最も高く、他の Cluster と有意差が認められた ($P < 0.05$)。Cluster 3 の砂含有率および ORP はそれぞれ $62.2 \pm 4.7\%$, 313.8 ± 51.1 mV と高く、砂含有率は Cluster 1,4 と ORP は他の Cluster と有意差が認められた ($P < 0.05$)。Cluster 4 および Cluster 2 の ORP はそれぞれ -141.3 ± 118.5 , -120.0 ± 41.0 mV で低く、Cluster 2,4 を除く Cluster と有意差が認められた ($P < 0.05$)。Cluster 4 の IL, 含水率およびシルト含有率はそれぞれ $4.8 \pm 0.9\%$, $37.3 \pm 7.6\%$, $43.1 \pm 18.5\%$ と高く、含水率は Cluster 1,2 と IL およびシルトは他の Cluster と有意差が認められた ($P < 0.05$)。

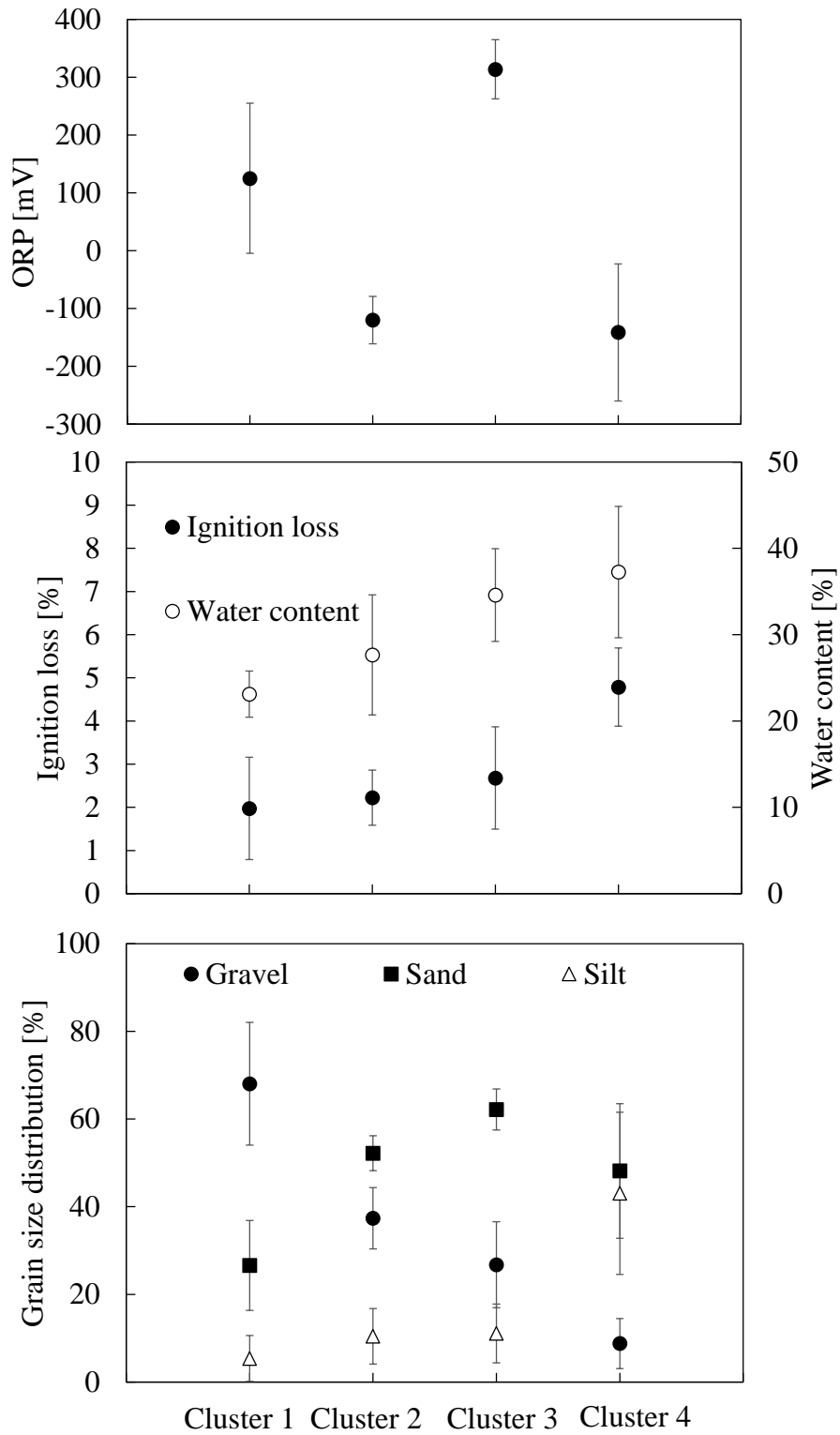


Fig. 2-5 瀬戸内における各クラスター底質の物理的特徴.

2.3.5 各クラスターに分類された底質のキノンプロファイル

各クラスターに分類された底質のキノン量と UQ/MK モル比の平均値を Fig. 2-6 に示す。Cluster 1 - 4 のキノン量の平均値はそれぞれ 0.258 ± 0.215 , 0.159 ± 0.157 , 0.308 ± 0.219 , 0.276 ± 0.367 $\mu\text{mol/kg-dry sediment}(\text{mean} \pm \text{SD})$ であった。Cluster 1-4 の UQ/MK モル比の平均値はそれぞれ 1.5 ± 0.7 , 1.2 ± 0.4 , 1.3 ± 0.5 , 0.8 ± 0.2 で、Cluster 4 は Cluster 1 との間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。Cluster 4 は IL およびシルト含有量が高く、ORP も低いことから有機物汚濁が進行している地点が多く分類されていると考えられる。有機物は微生物量と正の相関を示すが、キノン量は Cluster 3 が最も高い値を示した。したがって、Cluster 4 に分類された地点は微生物生産に用いることのできない難分解性物質の蓄積があると考えられる。

Fig. 2-7 に各クラスターのキノン組成を示す。UQ 類の優占種は Cluster 1, 2, 4 で UQ-8>UQ-10>UQ-9 となり、Cluster 3 で UQ-10>UQ-8>UQ-9 となった。MK 類の第一優占種は Cluster 1, 2 で MK-6, Cluster 3 で MK-7, Cluster 4 が MK-5 であった。UQ-8 は、硫黄酸化細菌やアンモニア酸化菌などの β - Proteobacteria に特徴的なキノン種である。このことから、UQ/MK モル比が高いクラスターであるほどこれらの細菌類が多く生息していると考えられる(胡ら, 1992 ; 鈴木ら, 2001)。MK-5 は紅色硫黄細菌である *Ectothiorhodospira* が含有しており、硫化水素などの硫化物を必要とする細菌として知られている。そのため、Cluster 4 は硫化物の多い地点であると推察される。MK-6 および MK-7 は *Desulfovibrio* sp.などの硫酸還元菌が有することが知られており、夏季の有明海の深奥部や貧酸素化した東京湾で検出されている(鯉渕ら, 2005 ; Kunihiro et al., 2008)。したがって、瀬戸内の嫌気性菌は硫化物の生成に関係する細菌が多く存在すると考えられる。

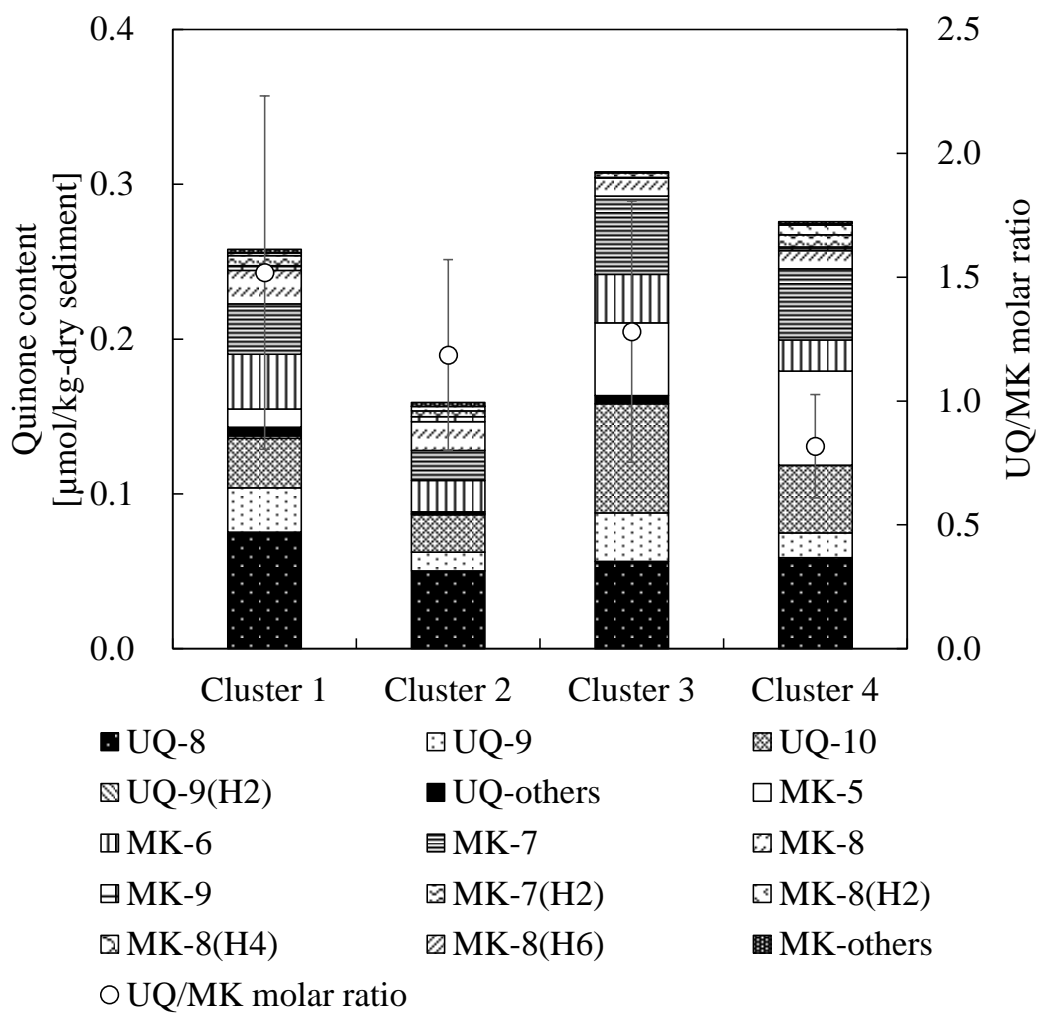


Fig. 2-6 瀬戸内海における各クラスターのキノノン量と UQ/MK 比.

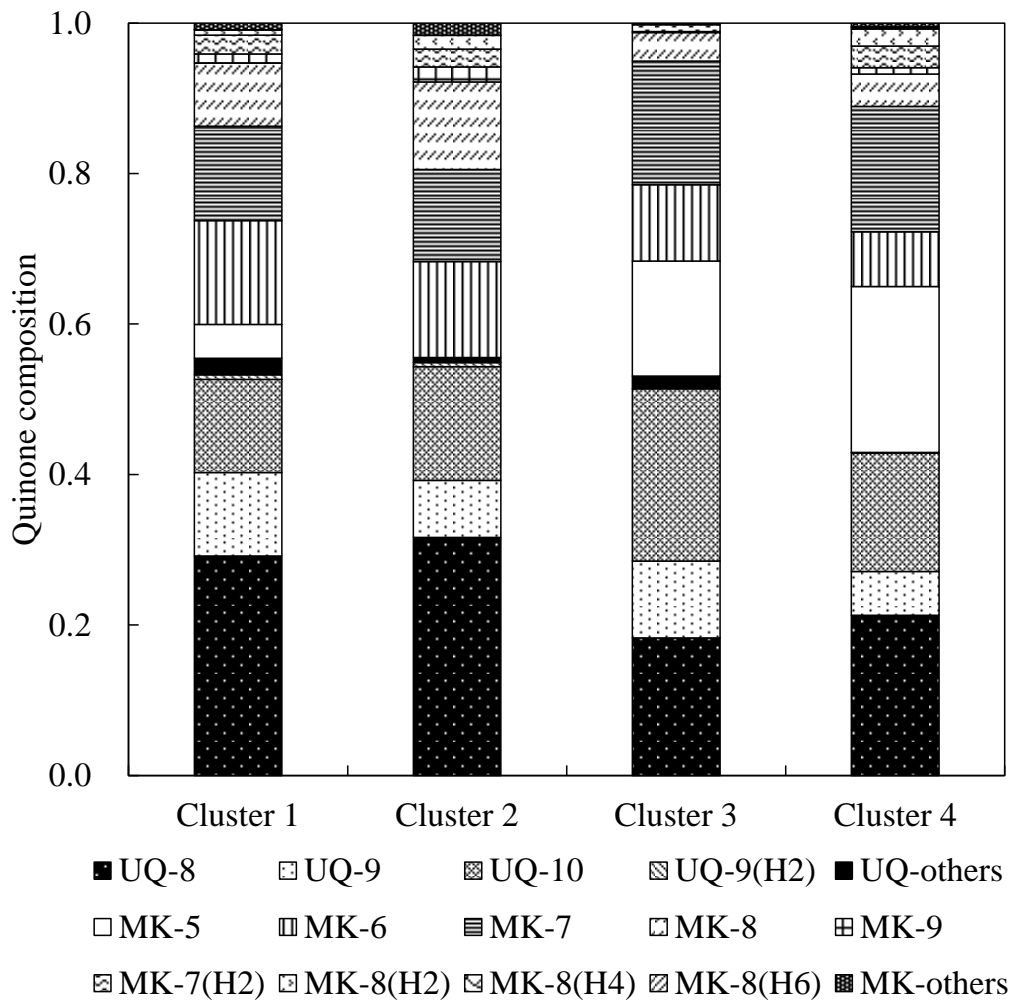


Fig. 2-7 瀬戸内海の各クラスターのキノン組成.

Fig. 2-8 に各クラスターに分類された底質のキノン種数と *EQ* を示す。Cluster 1-4 のキノン種数はそれぞれ 11.1 ± 1.6 , 9.7 ± 3.0 , 9.8 ± 1.5 , 8.6 ± 1.9 (mean \pm SD) 種であり、Cluster 1 は Cluster 4 との間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。Cluster 1-4 の *EQ* はそれぞれ 0.70 ± 0.05 , 0.78 ± 0.08 , 0.74 ± 0.04 , 0.81 ± 0.09 で Cluster 1 は Cluster 2, 4 との間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。キノン種数は IL と負の相関を示すことから ($R = -0.38$, $P < 0.05$)、IL の高い Cluster 4 は微生物種が低い値を示した。IL の低い Cluster 1 はキノン種数が多いが、キノン種の分布の不均一性が大きく、*EQ* は低い値を示した。Cluster 2 はキノン量が少ないため、キノン種のばらつきが小さくなり、*EQ* は高い値を示したと考えられる。

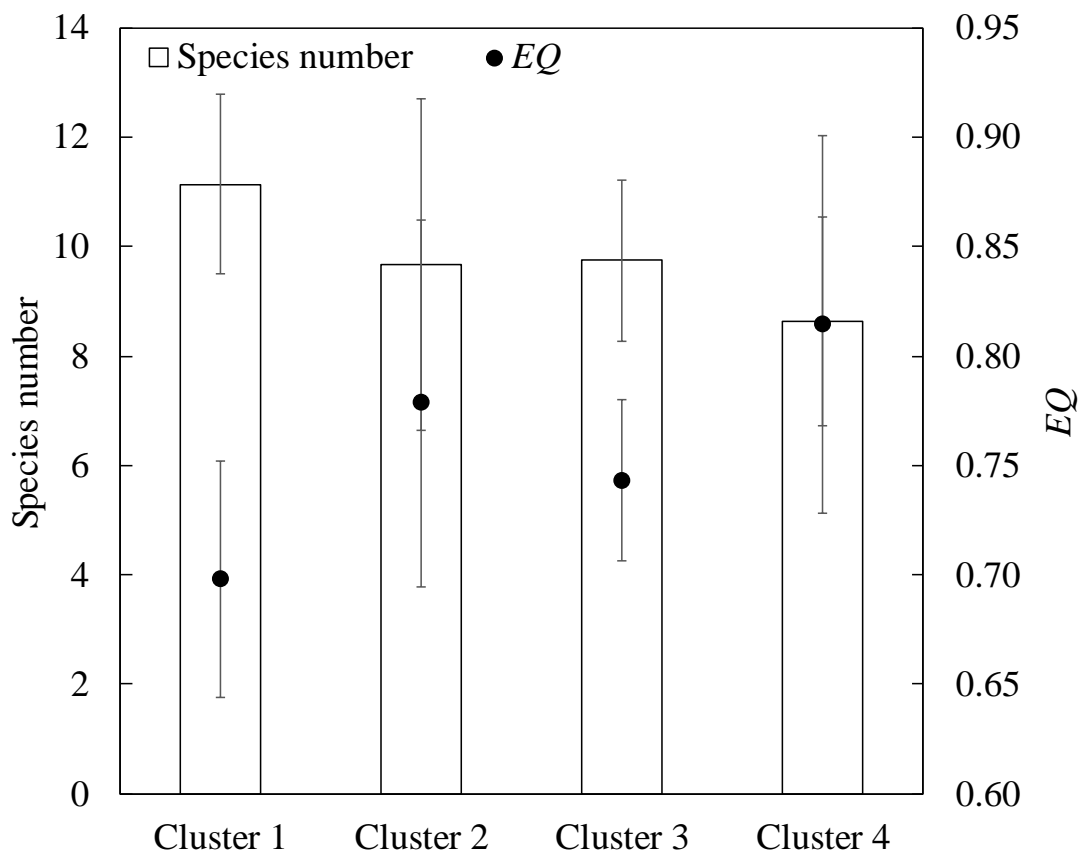


Fig. 2-8 瀬戸内の各クラスターのキノン種数と *EQ*。

2.3.6 底質のキノンプロファイルと物理的性質の関係

Table 2-8 にキノンプロファイルと底質の性質との相関係数を示す。全キノン量はキノン種数のみ相関が認められた($P < 0.01$)。UQ/MK モル比は ORP, IL, 礫含有率および EQ と相関が認められた($P < 0.01$)。一般に底質の IL は 13% を超えるとヘドロから有害物質が発生し、魚類の斃死などの影響を及ぼすとされている(環境省, 1971)。また、泥質で有機物に富む干潟底泥とヘドロの違いは、底質が好氣的か嫌氣的であるかによって明確に区別することが可能であるとされている(奥西ら, 2005)。UQ/MK モル比はヘドロの状態を示す IL および ORP と強い相関があり、好気性菌と嫌気性菌の割合を示す。このことから、UQ/MK モル比は底質の汚濁状況を把握する指標として有効であると示唆される。また、UQ 類および MK 類のうち存在割合の高いキノン種は UQ-8, UQ-9, UQ-10, MK-5, MK-6, MK-7 で UQ/MK 比に影響を及ぼすことから、これらのキノン種は底質の汚濁状況を示す物理的性質と関連していると考えられる。

Table 2-8 瀬戸内海のキノンプロファイルと底質の性質との相関係数

	Total quinone	UQ/MK molar ratio	ORP	Ignition loss	Water content	Gravel	Sand	Silt	Species number	EQ
Total quinone	-	-0.11	-0.06	0.05	0.21	-0.03	-0.30	0.29	0.49	-0.33
UQ/MK molar ratio		-	0.39	-0.37	-0.31	0.39	-0.24	-0.33	0.26	-0.47
ORP		*	-	-0.45	-0.28	0.48	-0.19	-0.48	0.23	-0.34
Ignition loss		*	**	-	0.63	-0.73	0.28	0.75	-0.38	0.47
Water content				**	-	-0.78	0.31	0.79	-0.16	0.24
Gravel		*	**	**	**	-	-0.68	-0.78	0.39	-0.43
Sand						**	-	0.07	-0.41	0.36
Silt			**	**	**	**		-	-0.17	0.28
Species number	**			*	*	*	*		-	-0.70
EQ		**	*	**		*	*		**	-

Upper triangular : Correlation coefficient, Lower triangular : Probability (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

IL は底質の有機物量を示しているため、キノン量と相関があると考えられる。しかし、瀬戸内海の干潟で相関が認められなかった理由として、IL で示される有機物の内、難分解性物質の割合が高い地点が含まれていることが考えられる。広島湾に流入する太田河川河口の C/N 比は広島湾よりも高く、河川が難分解性有機物を太田河川河口に運

んでいることを示唆している(西村ら, 2008)。また, 広島湾では植物プランクトンによる一次生産が活発であり, 植物プランクトンは分解しやすい有機物であるため広島湾の C/N 比は低い(西村ら, 2008)。福井らは, 広島県の瀬野川河口と海田底泥の C/N 比を調査した結果, 瀬野川の C/N 比は海田底泥よりも高いことを明らかにしている(福井ら, 2013)。したがって, 河口に位置する地点は, フミン酸のような多くの難分解性有機物を含むと考えられる。本章で対象とした 4 つの干潟の 35 地点のキノン量と IL の関係を Fig. 2-9 に示す。

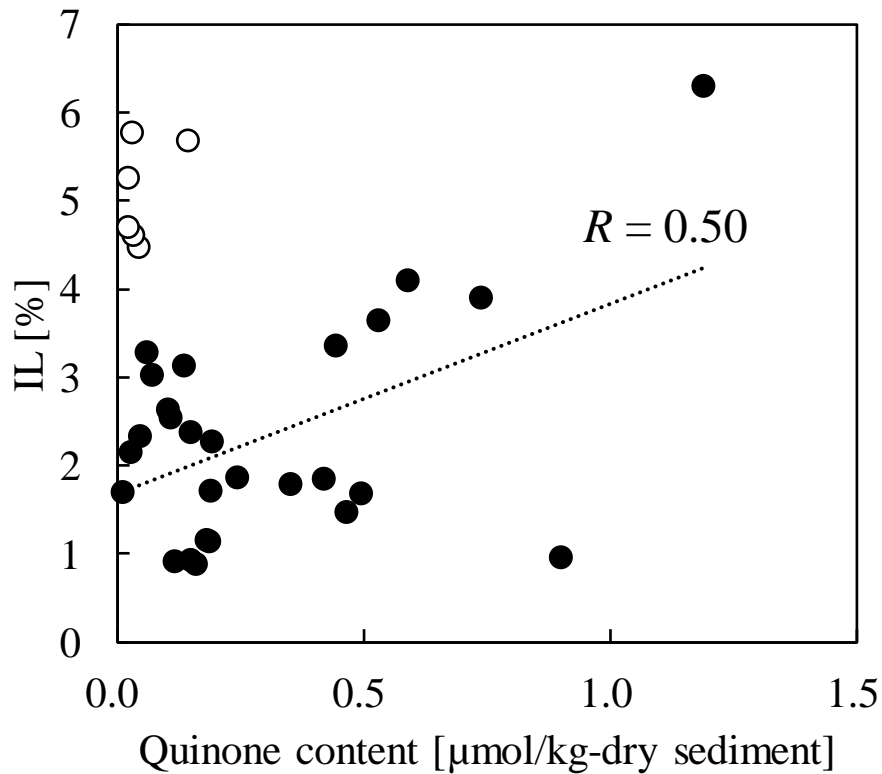


Fig. 2-9 瀬戸内海の干潟での IL と全キノン量の相関.

Fig. 2-9 の白丸で示した地点は a-8, a-9, b-6, b-7, b-8, b-9, c-7, d-6 であり, a-d 地点それぞれ黒瀬川, 藤井川の河口および賀茂川, 野呂川の流入先となっている。上記の地点では

流下の過程で有機物が微生物によって分解されており、難分解性の有機物が下流側に堆積していると考えられる。これらの地点を除くと IL とキノン量の相関は $R = 0.50$ ($P < 0.01$)となり、有機物量の高い場所ではキノン量が高くなる傾向が示された。

2.4 結論

4つの干潟 35 地点の堆積物の物理化学的パラメータである、IL、ORP、礫含有率、砂含有率およびシルト含有率を用いて、主成分分析およびクラスター分析を行った。その結果、以下の事項が明らかになった。

- 1) 35 地点は IL、礫含有率、砂含有率が支配する 4つの Cluster に分類され、各クラスターの堆積物の物理化学的パラメータはキノン量およびキノン組成を決める因子である。
- 2) 好気性菌と嫌気性菌の割合を示す UQ/MK モル比はヘドロの状態を示す IL および ORP と強い相関が認められた。このことから、UQ/MK モル比は底質の汚濁状況を把握する指標となる。
- 3) 各クラスターで優占種が異なることから、干潟の堆積物中の微生物群集構造の分布は、堆積物の物理化学的特徴によって概ね説明できる。

引用文献

遠藤雅実, 鯉淵幸生, 藤田昌史, 鈴木準平, 小倉久子, 飯村晃, 大畑聡, 磯部雅彦 (2010) 東京湾における底泥酸素消費と微生物群集構造の関係. 土木学会論文集 B2, 66, 1036-1040.

- 藤田昌史, 鯉渕幸生, Udim H., 小倉久子, 藤江幸一, 磯部雅彦 (2003) 東京湾における水質動態と底質微生物群集構造の解析. 海岸工学論文集, 50, 996-1000.
- 福井勝吾, 中岡孝行, 中下慎也, 日比野忠史 (2013) 有機物の分解過程を考慮した河口域に堆積する有機泥の性状に関する考察. 土木学会論文集 B1 (水工学) 69, 4, 1417-1422.
- Hasanudin U., Fujita M., Kunihiro T., Fujie K., Suzuki T. (2004) The effect of clams (*Tapes philippinarum*) on changes in microbial community structure in tidal flat sediment mesocosms, based on quinone profiles. *Ecol. Eng.*, 22, 185-196.
- 平石明, 上田陽子 (1997) キノンプロファイルによる人工廃水活性汚泥および実処理下水汚泥の微生物群集構造の比較解析. 日本水処理生物学会誌, 33, 3, 137-149.
- Hu H., Koichi F., Nakagome H., Urano K., Katayama A. (1999) QUANTITATIVE ANALYSES OF THE CHANGE IN MICROBIAL DIVERSITY IN A BIOREACTOR FOR WASTEWATER TREATMENT BASED ON RESPIRATORY QUINONES HONG-YING. *Wat. Res.*, 33, 15, 3263-3270.
- 環境省 (1971) 昭和 46 年版公害白書第 3 節 2 へドロ問題.
- 鯉渕幸生, 藤田昌史, 阿部哲也, 磯部雅彦 (2005) 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. 海岸工学論文集, 52, 946-950.
- 胡洪宮, 中込浩樹, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) キノンプロファイル法によるバイオフィルター内の生物膜を構成する細菌相の解析. 水環境学会誌, 15, 262-265.
- Kunihiro, T., Miyazaki, T., Uramoto, Y., Kinoshita, K., Inoue, A., Tamaki, S., Hama, D., Tsutsumi, H. and Ohwada, K. (2008) The succession of microbial community in the organic rich fish-farm sediment during bioremediation by introducing artificially mass-cultured colonies of a small polychaete, *Capitella* sp. I. *Mar. Pollut. Bull.*, 57, 68-77.
- 中野光暁, 湯岳琴, 森村茂, 木田建次, 増田龍哉, 滝川清 (2009) 微生物叢解析による干

- 潟底泥中の微生物機能と底質環境特性. 海岸工学論文集, 56, 1091-1095.
- 西村尚哉, 駒井克昭, 今川昌孝, 日比野忠史 (2008) 有機懸濁物質の形成に関する基礎的研究-有機物の付着特性-. 海洋工学論文集, 55, 1056-1060.
- 小川葉子, 坂巻隆史, 野村宗弘, 中野和典, 西村修 (2006) 底質性状の異なる干潟の生物学的炭素収支. 土木学会論文集 G, 62, 3, 278-286.
- 奥西一夫 (2005) ヘドロ問題をめぐる最近の話題. 国土問題, 66, 53-59.
- 瀬口昌洋, 郡山益実, 古賀あかね, 野田美幸 (2007) 有明海奥部干潟域における脱窒菌群の生息分布と底質環境について. 海洋工学論文集, 54, 1126-1130.
- 鈴木大典, 上木勝 (2006) 硫酸還元微生物の系統と特徴の多様性. 日本微生物生態学会会誌, 21, 2, 51-59.
- 鈴木健一郎, 平石明, 横田明 (2001) 微生物の分類・同定実験法-分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に. シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.

第3章 中海の底質と微生物叢の関係

3.1 はじめに

湖沼の有機物、窒素および硫黄などの物質循環には底質が深く関わっていることが知られている(菅原, 1998; 清家ら, 1986)。底質中は化学変化のほか、微生物による分解作用が生じることから、湖沼の環境を支える重要な部分である。そのため、底質の微生物叢は湖沼底層水の溶存酸素濃度や汚濁物質の濃度と深く関わっていると考えられる。そこで、湖沼底層の時・空間的な環境変化を評価するためには底質特性と微生物叢を合わせた解析が重要である。

本章では湖沼として汽水域である中海を対象とした。既往の研究では、中海を対象にして微生物叢を解析した事例は少なく(高井ら, 1989; Senga et al., 2006)、物質循環に関わる微生物群集についての知見が乏しい。干潟では *Proteobacteria* 門の微生物叢が年間を通し比較的安定しているが、冬季に窒素循環に関わる細菌が多数検出される傾向にあり、硫酸還元菌が多く地点で検出されている(田中ら, 2011)。このように、窒素循環を含め硫黄循環に関わる細菌群は季節毎に、その存在比を変動させているものと考えられる。そのため、中海においても季節的な変動を把握することは環境評価に必要な知見となる。

以上のことから、本章では水質の変遷を反映した底質環境をキノプロファイル法による微生物叢解析および底質の物理的な性質で評価することを試みた。そのため、底質環境が異なる中海の 12 地点で夏季と冬季で調査を行い、底質の微生物叢と物理的な性質の関係について考察した。

3.2 方法

3.2.1 サンプルングおよび分析方法

中海は湖面積 86.2 km²、平均水深 5.4m の汽水湖であり、湖水の平均滞留時間は 0.4 年

と試算されている(鳥取県・島根県, 2015)。調査は, 中海全域の 12 地点で実施した(Fig. 3-1)。

底質のサンプリングは船上よりエクマン・バージ採泥器(15×15 cm)を用いて, 2016 年 2 月 2 日と 2017 年 6 月 29 日に実施した。採取底質は実験室に持ち帰り各種分析に供した。粒度分布は JIS A 1204 に準拠し, 乾燥させた底質をふるいにかけて, 礫($\phi > 2.0$ mm), 砂($0.850 > \phi > 0.075$ mm), シルト($0.075 > \phi$)に分離した。含水率は採取した底質を乾燥したるつぽに 4 g 以上量りとり, $110 \pm 5^\circ\text{C}$ で 10 時間以上乾燥させ, 減量重量から算出した。強熱減量(IL)は JIS A 1226 に準拠し, 粒径 2 mm 以下の底質を乾燥したるつぽに 4 g 以上量りとり, $600 \pm 25^\circ\text{C}$ で 45 分以上強熱して減量重量から算出した。酸化還元電位(ORP)は ORP 計(ORP-6041, CUSTOM)を用いて測定した。各地点の水深, 塩分濃度は多項目水質計(AAQ-RINKO, JFE アドバンテック)(MS5,環境システム)を用いて測定を行った。

3.2.2 微生物叢解析

微生物叢解析は 2 章と同様にキノプロファイル法を用いて行った。

3.2.3 データ解析

地点間の類似性を評価するためクラスター分析を行い, 調査したサンプルについて類似度の近いものを分類した。各クラスターの分類に寄与する因子は主成分分析により解析を行った。解析にはエクセル統計ソフト BellCurve for Excel (version 3.2) (BellCurve, Tokyo, Japan)を用いて, 変数には 2 月と 6 月に調査を実施した 12 地点それぞれの IL, ORP, 礫含有率, 砂含有率, シルト含有率を用いた。クラスター分析の個体間距離は標準化ユークリッド距離, クラスターの結合には Ward 法をそれぞれ用いた。各クラスターの平均値の相違は ANOVA により検定した。

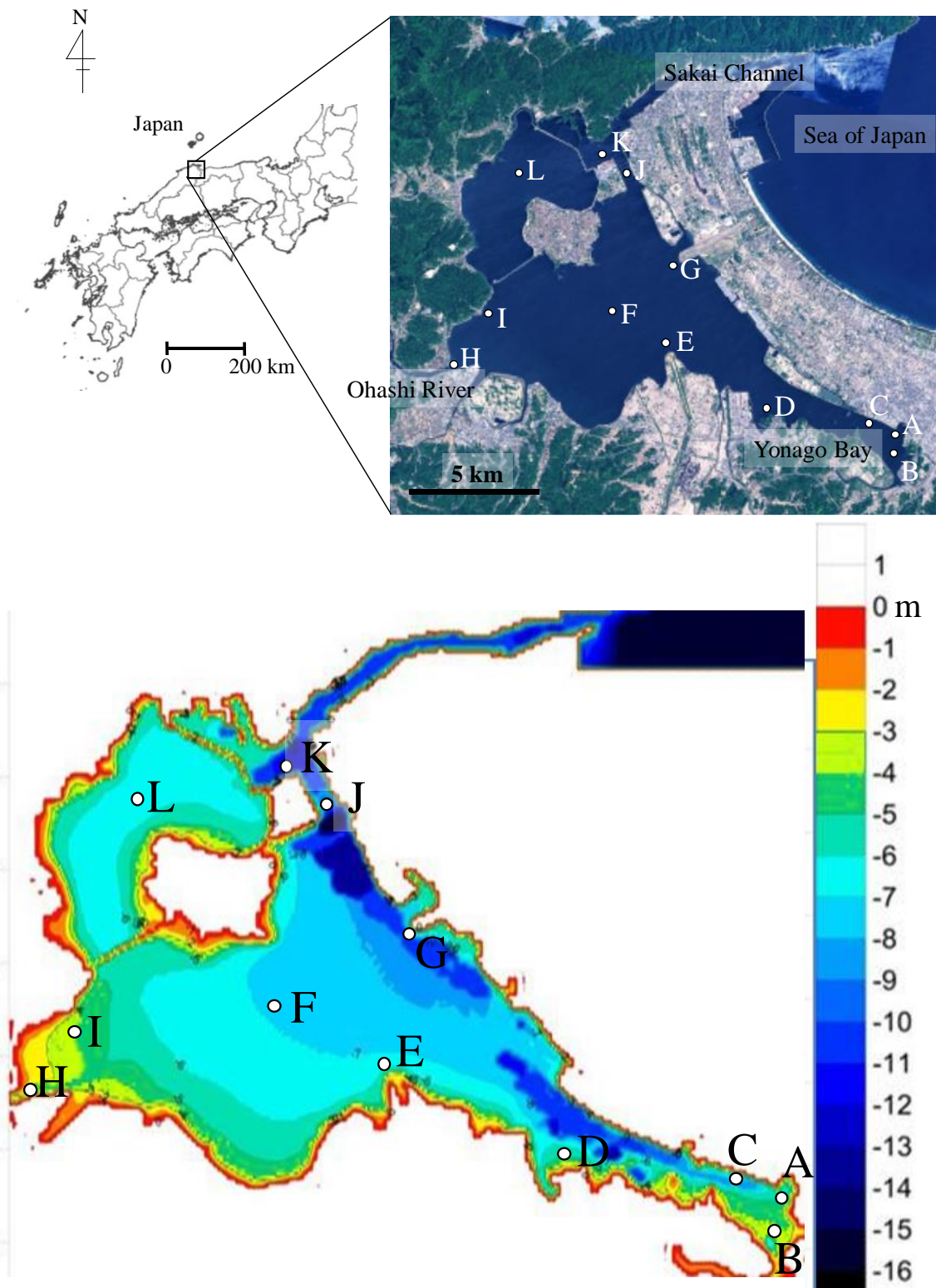


Fig. 3-1 中海の地図と採水地点の水深(国土地理院, 2019; 環境省 2017).

3.3 結果および考察

3.3.1 底質分析

各地点で採取した底質の物理的性質を Table 3-1 に示す。これ以降で用いている A-L は採取地点を、Feb, Jun の表記は、それぞれ 2016 年 2 月 2 日および 2017 年 6 月 29 日のデータを示している。境水道から流入する外海水の影響を受けにくい米子湾、中海南西部、中海中央部はシルト含有率及び含水率が大きく、IL が高い傾向を示した。一方、外海水の影響を強く受ける中海北部(J, G)は、砂含有率が高く、IL が低い。ORP の値から、中海の底泥は全域で強い還元状態にあることが分かるが、その傾向は、特に米子湾、中海南西部、中海中央部で顕著であることが明らかである。

Table 3-1 各地点底質の物理的性質

Site	Ignition loss [%]		Water content [%]		Gravel [%]		Sand [%]		Silt [%]		Depth [m]		ORP [mV]	
	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun
A	8.5	12.2	76.8	79.8	3.3	10.4	51.4	69.3	45.3	20.3	4.9	5.5	-393	-377
B	9.4	7.1	76.4	69.4	2.5	10.9	56.2	36.6	41.3	52.5	3.6	3.7	-345	-375
C	8.2	14.0	83.9	84.1	1.0	4.7	55.6	47.4	43.3	48.0	4.6	5.0	-347	-360
D	14.3	13.6	82.2	79.1	0.1	10.4	48.7	28.4	51.2	61.2	4.7	4.9	-348	-320
E	13.7	11.2	76.9	70.9	0.5	6.0	43.5	75.7	56.0	18.2	4.7	4.8	-420	-322
F	12.0	13.1	75.7	74.9	4.2	14.0	61.4	40.5	34.4	45.5	6.3	6.8	-249	-202
G	4.0	6.5	54.1	65.1	0.8	23.2	84.2	40.8	15.0	36.0	8.0	8.7	-246	-372
H	6.4	2.9	54.3	39.5	2.8	1.0	44.2	92.2	53.0	6.6	2.0	2.1	-152	-348
I	11.6	11.6	72.4	75.4	3.0	14.0	58.5	36.5	38.5	49.5	3.9	4.4	-327	-271
J	0.6	1.8	31.1	35.1	0.1	0.3	98.3	94.8	1.6	4.9	10.1	8.2	27	-178
K	6.8	7.0	51.5	55.7	0.8	8.5	35.8	39.6	63.4	51.8	11.7	11.2	-177	-363
L	7.5	10.8	74.0	75.3	2.1	32.6	50.4	7.0	47.5	58.5	6.1	6.6	-295	-304

3.3.2 底質の物理化学的性質を変数にしたクラスター分析による地点の分類

各地点で採取した底質の類似性を明らかにするため底質の物理化学的性質(IL, 礫含有率, 砂含有率, シルト含有率, ORP)を変数に、2016 年 2 月 2 日および 2017 年 6 月 29 日のデータを用いてそれぞれクラスター分析を行った。その結果、2 月と 6 月のそれぞれ 12 地点は 4 つのクラスターに分類された(Fig. 3-2)。各クラスターに属する地点数は Cluster 1-4 で 6 月は 2, 4, 4, 2 地点, 2 月はそれぞれ 6, 2, 2, 2 地点に分類された。各地点のクラスタリングされた分布を Fig. 3-3 に示す。底質の物理的性質の季節変動を

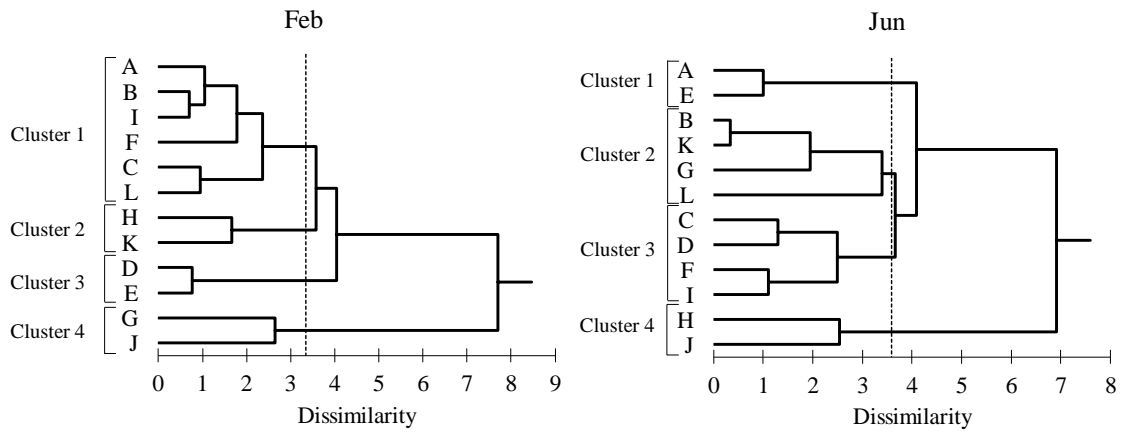


Fig. 3-2 ユークリッド距離およびWard法を用いたクラスター分析による調査地点の分類.

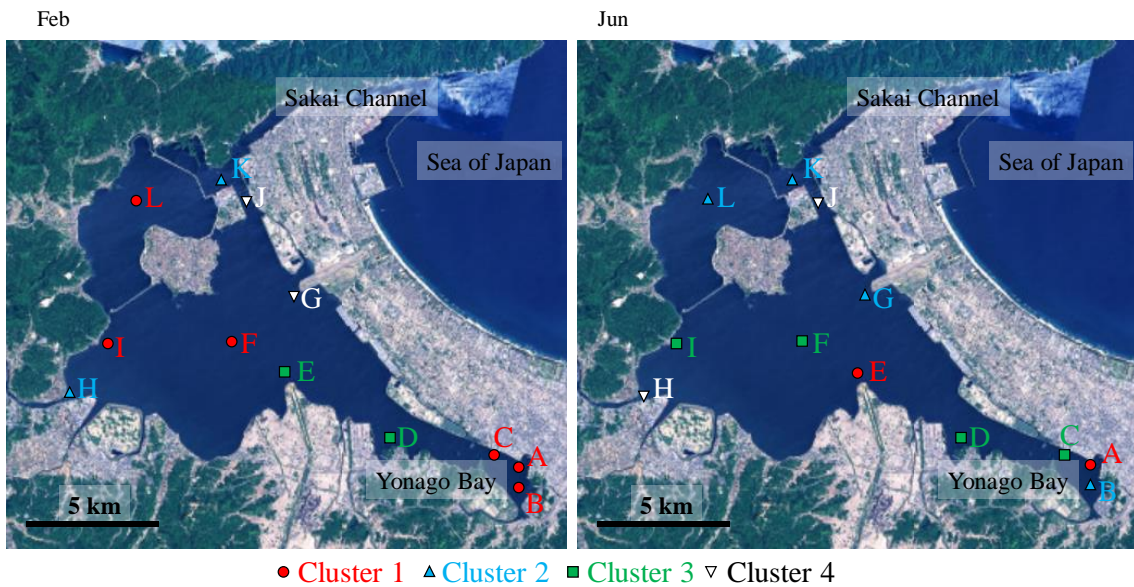


Fig. 3-3 クラスターリングされた調査地点の分布.

見ると、2月は湾奥の A, B, C 地点および中海中央の F, I, L 地点と同じ Cluster 1 に分類されたが、6月では湾奥の A 地点および河口に位置する E 地点のみが Cluster 1 に分類された。A 地点は流動が悪く、また E 地点では河川からの汚濁物質が堆積していることから、これらの地点は底質が極めて嫌気的環境であると考えられる。G, H, J, K は Cluster 2, 4 に分類され、K, J, G は日本海からの海水の影響を強く受ける地点であり、H 地点は大橋川の影響を強く受け、水深が浅い地点である。そのため、これらの地点は酸素供給を受け、底質は比較的的好気的な状態にあると考えられる。Cluster 3 は2月では D, E 地点で6月は C, D, F, I 地点が分類された。C, D, E 地点は堆積物が溜まりやすくヘドロ状の底質が認められるため、夏季の F, I 地点は底質が悪化していると考えられる。

3.3.3 主成分分析による地点の分類に影響を及ぼす底質の物理的性質

クラスター分析に影響を及ぼした因子を求めるため主成分分析を行った。

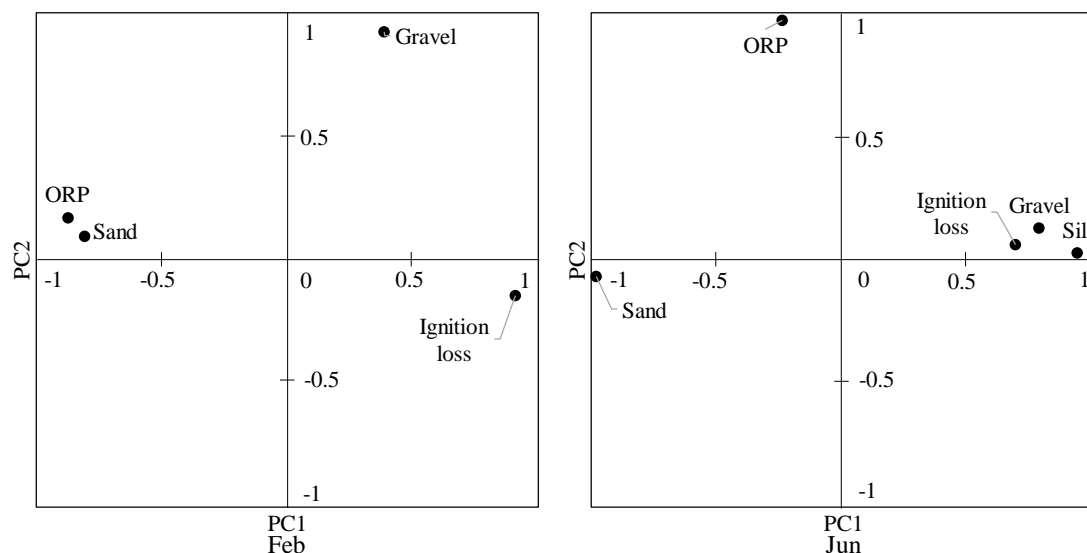


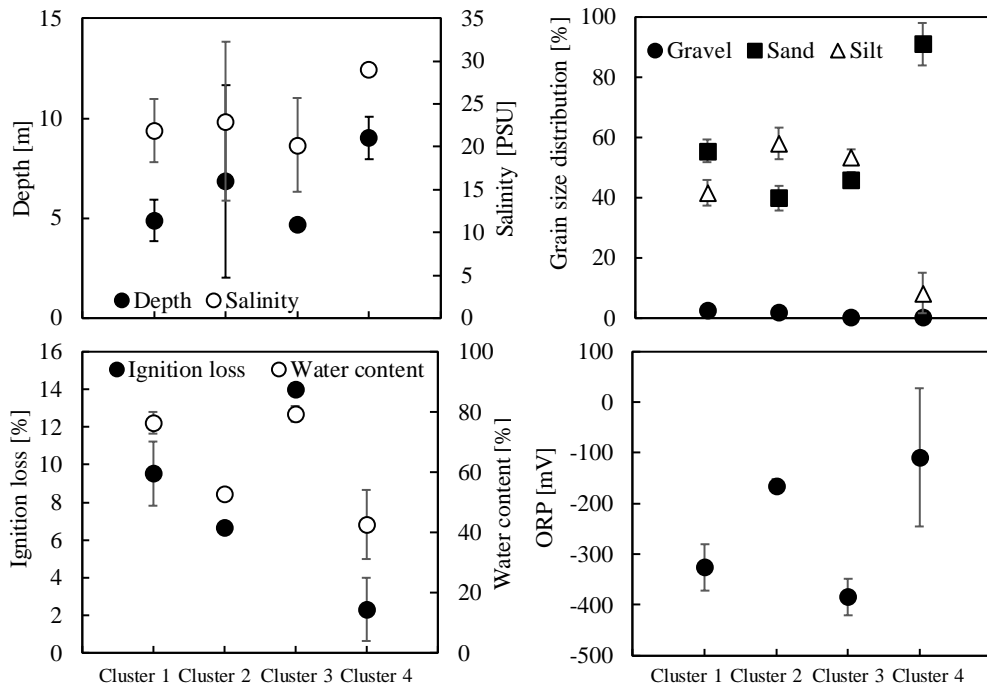
Fig. 3-4 中海底質の物理的特徴を用いた主成分得点分布.

その結果、2月、6月の第一主成分はそれぞれ 59.7, 59.1% の寄与率が、第二主成分はそれぞれ 22.7, 19.3% の寄与率が認められ、第二主成分まででそれぞれ 82.4, 78.4% の累積寄与率が認められた。このことから、第二主成分までの結果を用いて底質の物理化学的性質を用いた分類についてある程度説明できることが分かる。主成分得点分布(Fig. 3-4)を見ると、2月の第一主成分は IL が正に、ORP、砂含有率が負に大きな値をとり、第二主成分は礫含有率が正に大きな値となった。なおシルト含有率は線形結合したため分析からは除外した。6月の第一主成分はシルト含有率、礫含有率、IL が正に、砂含有率が負に大きな値をとり、第二主成分は ORP が正に大きな値となった。いずれの季節も IL と粒度組成が分類に影響を及ぼすことが分かる。

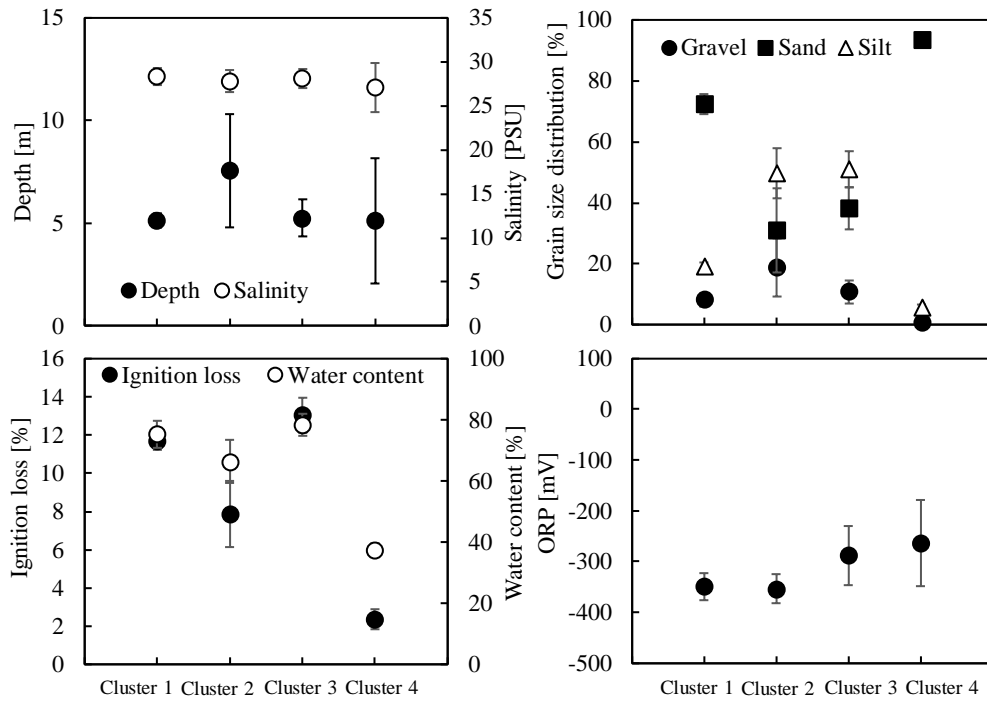
3.3.4 各クラスターの物理的性質

Fig. 3-5 に各クラスターに分類された底質の物理的性質の平均値を示す。2月の各クラスターの物理的特徴を見ると、IL および含水率は Cluster 3 がそれぞれ $14.0 \pm 0.3\%$, $79.5 \pm 2.6\%$ (mean \pm SD) で、4つの Cluster 中で最も高い値を示し、IL は他の Cluster と、含水率は Cluster 2, 4 との間で優位差が認められた ($P < 0.05$)。また、Cluster 3 の ORP は -384 ± 36 mV で、Cluster 2, 4 との間で優位差が認められた。Cluster 1 は Cluster 3 に匹敵するほど IL と含水率が高いが、砂含有率が $55.6 \pm 3.8\%$ と最も高いのが特徴である。Cluster 4 の砂含有率は $91.2 \pm 7.0\%$ で最も高く、他の Cluster と優位差が認められた。

6月の各クラスターの物理的特徴を見ると、2月と同様に IL および含水率は Cluster 3 がそれぞれ $13.1 \pm 0.9\%$, $78.4 \pm 3.7\%$ (mean \pm SD) で、4つの Cluster 中で最も高い値を示し、Cluster 2, 4 との間で優位差が認められた ($P < 0.05$)。ORP はすべてが負に大きな値を示し、Cluster 2 が -353.5 ± 28.9 mV と最も低い値を示した。Cluster 4 の砂含有率は $93.5 \pm 1.3\%$ で最も高く、次いで Cluster 1 も $72.5 \pm 3.2\%$ と高い値を示した。夏季は降雨による増水に伴い流径の大きい土砂の堆積があることが示唆される。



Feb



Jun

Fig. 3-4 各クラスターに分類された底質の物理的性質の平均値.

エラーバーは標準偏差 (SD)を示す.

3.3.5 中海底質の微生物叢解析

Table 3-2 にキノプロファイル分析の結果を示す。なお、表中の UQ-others および MK-others は全キノン量のうち存在割合が 1%未満のキノン種をまとめて表示したものである。

Table 3-2 各地点のキノン量測定結果 [$\mu\text{mol/kg-dry sediment}$] (UQ-others および MK-others は全キノン量の 1%未満のキノン種をまとめて表示)

Quinone species	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L	
	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun	Feb	Jun
UQ-8	0.220	0.306	0.393	0.249	0.249	0.620	0.654	0.379	0.341	0.225	1.056	0.291	0.437	0.182	0.390	0.172	0.877	0.298	0.038	0.058	0.177	0.156	0.442	0.199
UQ-9	0.341	0.310	0.374	0.260	0.263	0.673	0.222	0.238	0.179	0.127	0.178	0.060	0.112	0.044	0.048	0.012	0.072	0.050	0.001	0.015	0.044	0.038	0.076	0.038
UQ-10	0.208	0.259	0.268	0.162	0.181	0.502	0.215	0.205	0.318	0.208	0.335	0.106	0.178	0.095	0.119	0.028	0.134	0.098	0.003	0.020	0.059	0.072	0.139	0.062
UQ-8(H2)	0.122	0.121	0.631	0.072	0.091	0.264	0.190	0.111	0.019	0.024	0.131	0.057	0.052	0.036	0.019	0.001	0.126	0.048	-	0.000	0.017	0.006	0.047	0.027
UQ-9(H2)	0.213	0.001	0.170	0.110	0.091	0.347	0.091	0.178	0.011	0.018	0.273	0.106	0.066	0.057	0.040	0.002	0.107	0.090	-	-	0.006	0.003	0.121	0.042
UQ-others	0.247	0.091	0.045	0.067	0.091	0.128	0.032	0.077	0.010	0.002	0.028	0.018	0.004	0.006	0.005	0.001	0.042	0.039	-	-	0.001	-	0.014	0.002
UQ-total	1.352	1.087	1.882	0.920	0.965	2.534	1.404	1.189	0.877	0.603	2.001	0.637	0.849	0.421	0.621	0.215	1.358	0.623	0.043	0.093	0.302	0.275	0.839	0.370
MK-6	5.189	1.226	0.383	0.599	0.458	1.961	0.323	0.757	0.302	0.357	0.204	0.362	0.437	0.348	0.467	0.074	0.140	0.925	0.009	0.022	0.067	0.133	0.084	0.267
MK-7	1.283	1.315	1.612	0.497	4.512	6.939	2.308	2.275	0.688	0.525	1.967	1.190	4.114	0.523	0.119	0.038	0.028	0.230	0.015	0.050	0.229	0.212	0.684	0.629
MK-8	0.138	0.076	0.130	0.090	0.193	0.193	0.135	0.091	0.380	0.149	0.263	0.096	0.201	0.085	0.117	0.035	0.076	0.097	0.020	0.034	0.073	0.089	0.086	0.074
MK-7(H2)	1.262	0.764	0.818	0.470	0.781	2.656	0.991	0.472	0.253	0.174	1.011	0.055	0.560	-	0.086	0.020	0.266	0.268	0.000	0.008	0.061	0.029	0.280	0.221
MK-8(H2)	1.390	1.030	1.275	0.997	1.815	2.113	0.330	0.822	0.602	0.266	0.387	0.354	0.290	0.148	0.111	0.017	0.077	0.272	0.001	0.002	0.067	0.044	0.008	0.297
MK-7(H4)	-	0.383	-	-	-	-	-	0.001	-	-	-	-	-	0.080	-	-	-	-	-	-	-	0.001	-	0.002
MK-others	0.395	0.305	0.274	0.302	0.543	0.647	0.264	0.250	0.234	0.112	0.483	0.108	0.317	0.082	0.097	0.008	0.112	0.247	0.001	0.003	0.015	0.026	0.111	0.116
MK-total	9.656	5.099	4.492	2.955	8.302	14.508	4.351	4.668	2.459	1.582	4.314	2.165	5.918	1.266	0.997	0.192	0.698	2.039	0.046	0.118	0.512	0.533	1.253	1.606
Total quinone	11.008	6.186	6.374	3.875	9.267	17.042	5.755	5.858	3.336	2.185	6.315	2.802	6.767	1.687	1.618	0.407	2.056	2.662	0.089	0.211	0.814	0.808	2.092	1.976
UQ/MK molar ratio	0.140	0.213	0.419	0.311	0.116	0.175	0.323	0.255	0.357	0.381	0.464	0.294	0.143	0.332	0.623	1.123	1.944	0.305	0.927	0.789	0.591	0.515	0.669	0.230

観測地点、時期を問わず、そのほとんどで MK 量が UQ 量を上回っており、中海湖底は嫌気性菌が優占する環境であることが分かる。全キノン量は、外海水の流入する境水道から離れるにしたがって多くなる傾向があり、中海南東部の米子湾周辺が最も多いことが分かる。

UQ 類の第一優占種は A, C および 6 月の B で UQ-9 となり、他のサンプルでは UQ-8 であった。UQ-9 は *Acinetobacter* や *Pseudomonas* などの γ -Proteobacteria に属する細菌が含有していることから、UQ-9 が優占するサンプルは上記の細菌が優占して生息していると考えられる(胡ら, 1992)。また、UQ-8 は、*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* などの β -Proteobacteria に特徴的なキノン種である(胡ら, 1992; 鈴木ら, 2001)。このことから、上記の細菌は中海の多くの地点で存在していると考えられる。

MK 類の第一優占種は 2 月の A, H, 6 月の H, I で MK-6 であった。また J では MK-

8 であり、2月のIはMK-7(H₂), 6月のBはMK-8(H₂)が優占した。他のサンプルはMK-7が優占した。MK-7は *Clostridia* sp.などの硫酸還元菌が優占する(Yamamoto et al., 1998)ことから、中海では多くの地点で硫酸還元菌が占める環境であると考えられる。

3.3.6 各クラスターに分類された底質のキノンプロファイル

各クラスターに分類された底質のキノン量と UQ/MK モル比の平均値を Fig. 3-5 に示す。2月の Cluster 1 のキノン量は $6.186 \pm 3.332 \mu\text{mol/kg-dry sediment}$ (mean \pm SD)と最も高く、次いで Cluster 3 が $4.546 \pm 1.209 \mu\text{mol/kg-dry sediment}$ となった。UQ/MK モル比は Cluster 3 が 0.34 ± 0.02 であり、Cluster 1, 2, 4 は $0.53 - 0.63$ で大幅な違いは認められなかった。6月の Cluster 3 のキノン量は $7.091 \pm 5.886 \mu\text{mol/kg-dry sediment}$ (mean \pm SD)と最も高く、次いで Cluster 1 が $4.185 \pm 2.000 \mu\text{mol/kg-dry sediment}$ となった。UQ/MK モル比は Cluster 4 が 0.96 ± 0.17 が最も高く ($P < 0.05$)であり、Cluster 1, 2, 3 は $0.30 - 0.35$ で2月と比べ低い値を示した。これは夏季の湖底において嫌気的環境が常態化することで、UQ よりも MK が増加しているためであると考えられる。

2月と6月の Cluster 1,3 に分類された地点を見ると、IL はがどちらの地点も高いが、2月のキノン量は Cluster 3, 6月のキノン量は Cluster 1 が相対的に低かった。このことから、同程度の IL を示す地点においても、微生物の増加に寄与しない有機物、すなわち難分解性物質を多く含む地点が存在すると考えられる。

Fig. 3-6 に中海の各クラスターのキノン組成を示す。2月、6月ともに UQ 類の第一優占種は全てのクラスターで UQ-8 であり、Cluster 3, 1, 2, 4 の順に高い割合を占めた。UQ-8 は、硫黄酸化細菌やアンモニア酸化菌などの β -Proteobacteria に特徴的なキノン種である。このことから、UQ/MK モル比が高いクラスターであるほどこれらの細菌類が多く生息していると考えられる(胡ら, 1992 ; 鈴木ら, 2001)。2月の MK 類の第一優占種は Cluster 1, 3, 4 で MK-7, Cluster 2 で MK-6 であった。

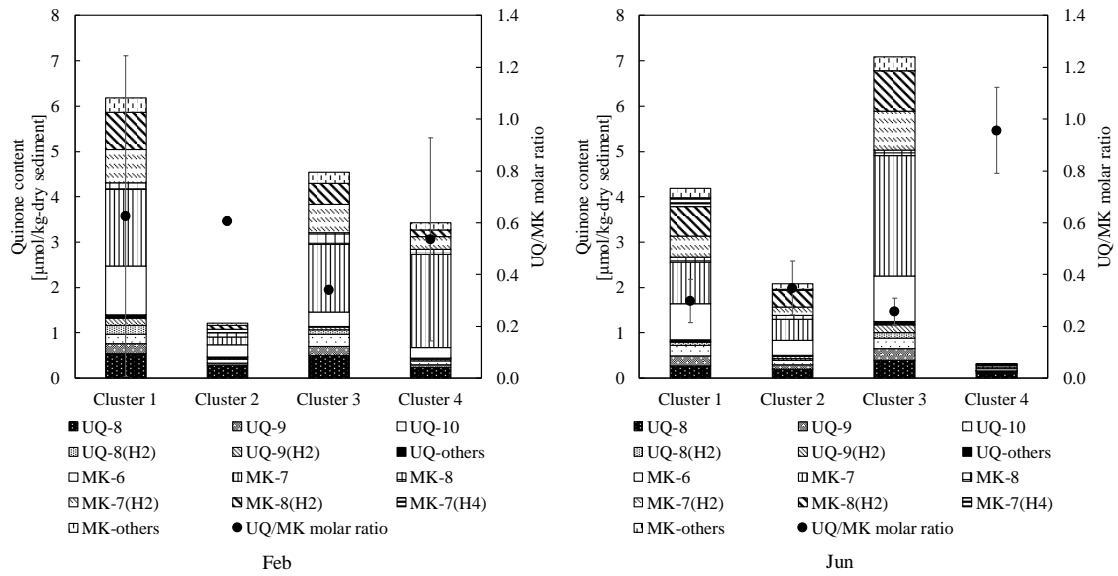


Fig. 3-5 中海の各クラスターのキノン量と UQ/MK モル比.

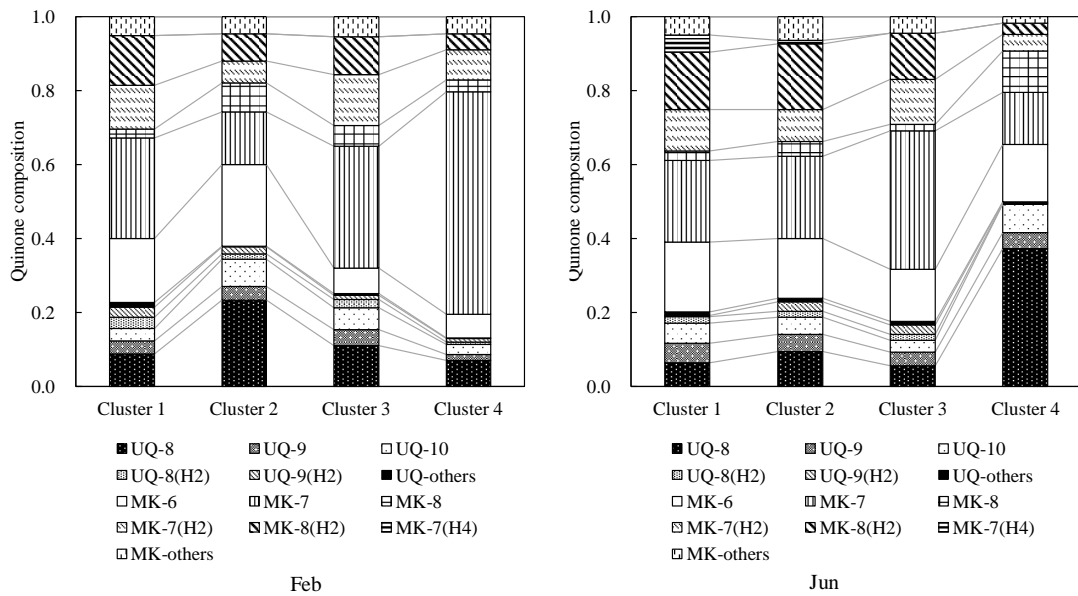


Fig. 3-6 中海の各クラスターのキノン組成.

6月のMK類の第一優占種はCluster1, 2, 3でMK-7, Cluster4でMK-6であった。MK-6およびMK-7は*Desulfovibrio* sp.などの硫酸還元菌が有することが知られており、夏季の有明海の深奥部や貧酸素化した東京湾にて検出されている(鯉淵ら, 2005; Kunihiro et al., 2008)。したがって、中海底質は場所によってMK優占種の存在割合が異なるが、硫化物の生成に関係する細菌が多く存在すると考えられる。

Fig. 3-7に各クラスターに分類された底質のキノン種数とEQを示す。2月のキノン種数はCluster3が 20.5 ± 0.5 (mean \pm SD)種で最も多く、次いでCluster1が 18.8 ± 1.1 種であり、微生物種が豊富であることが分かる。EQはCluster4が 0.55 ± 0.06 で最も低い値を示した。6月のキノン種数はCluster3が 19.8 ± 1.8 種で最も多く、次いでCluster1が 18.5 ± 0.5 種となった。EQはCluster4が 0.55 ± 0.03 で最も低かった。2月、6月のCluster4は砂含有率が極めて高い地点が分類され、キノン種数が少ないことから、特定の微生物が生息できる環境であると示唆される。キノン種数はILと正の相関を示すことから($R=0.74$, $P<0.01$), ILの高いClusterは微生物種が豊富である。しかし、存在割合の低いキノン種もILと同時に増加することからキノン種の分布に不均一性をもたらし、EQの減少にも繋がると示唆される。

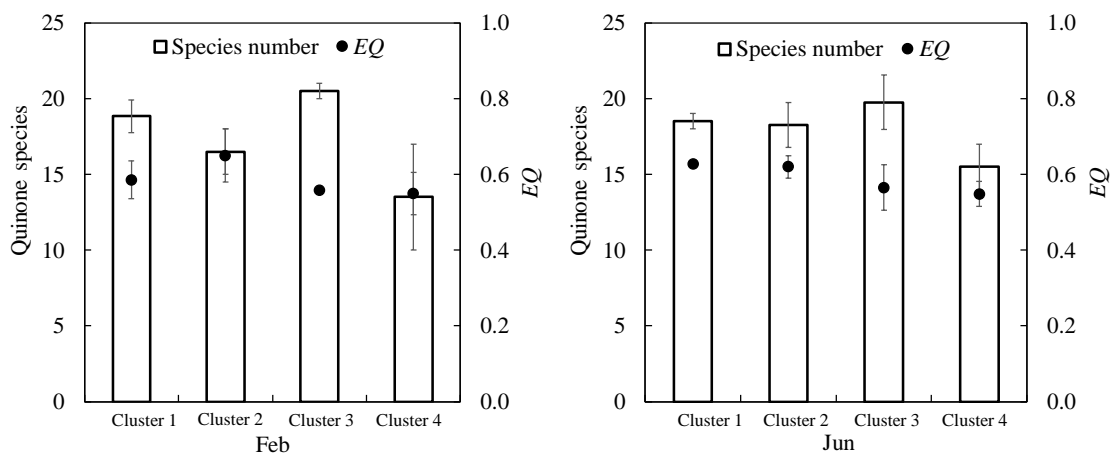


Fig. 3-7 中海の各クラスターのキノン種数とEQ.

3.3.7 底質のキノプロファイルと物理的性質の関係

Table 3-3 に中海のキノン量と底質の性質との相関係数を示す。

Table 3-3 中海のキノン量と底質の性質との相関係数

	Total quinone	UQ/MK molar ratio	ORP	Ignition loss	Water content	Gravel	Sand	Silt	Species number	EQ
Total quinone	-	-0.50	-0.41	0.44	0.61	-0.14	-0.11	0.19	0.54	-0.48
UQ/MK molar ratio	*	-	0.27	-0.30	-0.45	-0.30	0.36	-0.31	-0.42	0.26
ORP	*		-	-0.51	-0.65	-0.19	0.35	-0.34	-0.78	0.23
Ignition loss	*		*	-	0.88	0.24	-0.57	0.58	0.74	0.00
Water content	**	*	**	**	-	0.26	-0.59	0.59	0.83	-0.09
Gravel						-	-0.61	0.29	0.20	0.22
Sand				**	**	**	-	-0.93	-0.54	-0.17
Silt				**	**	**	**	-	0.57	0.12
Species number	**	*	**	**	**	**	**	**	-	-0.36
EQ	*									-

Upper triangular : Correlation coefficient, Lower triangular : Probability (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

中海の全キノン量は UQ/MK モル比, ORP, IL, 含水率, キノン種数および EQ に対して有意な相関が認められた。中海では MK 類が優占する環境であるため, IL および全キノン量が高い地点は UQ/MK モル比を下げ, ORP は負の値を示す傾向にあることが分かる。UQ/MK モル比は底質の性質との関係が強く, 含水率およびキノン種数と有意な相関($P < 0.05$)を示したが, ORP との相関は $R=0.27$ で有意な相関は認められなかった。

ここで, 地理的な分布および底質の物理化学的性質が類似している地点を Group1-3, G 地点にそれぞれ分類して(Fig. 3-8), 以下に各グループの特徴を述べる。中海底質の IL とキノン量の間を Fig. 3-9 に示し, 各グループの IL とキノン量の相関を見ると, それぞれ異なる傾向にあった。まず, Group 1 の IL とキノン量の相関は $R=0.22$ で低い値を示した。米子湾は水の入れ替えが生じにくいいため, 堆積物中に存在する嫌気性菌の量に変動が少ない。そのため, 増殖速度の遅い嫌気性菌が常に多く存在し, IL とキノン量の相関が低くなっていると考えられる。一方で, Group 2 は IL とキノン量は相関が強く, 2月の F 地点を除くと $R=0.72$ であった。Group 3 についても IL とキノン量の相関は R

=0.81 と高い値を示した。Group 2, 3 に属する地点は有機物の沈降が従属栄養菌細菌の増加に寄与している地点であると考えられる。G 地点は 2 月と 6 月でキノン量が大きく異なる。G 地点は外海水の影響を受けることや過去に掘削された場所であるため、他の地点とは異なる挙動を示したと考えられる。

中海の UQ/MK モル比と IL の関係を Fig. 3-10 に示す。なお 2 月の I 地点は値が大きく異なるため、解析から除外した。UQ/MK モル比と IL は有意な相関が認められ($R = -0.65, P < 0.01$), 有機物負荷量が高い程より UQ/MK モル比は下がることが分かる。Group 3 は IL が低く、UQ/MK モル比が 0.51-1.12 であるため、酸素供給を受け UQ を含有する好気性菌が生息していると考えられる。一方、Group 1, 2 は IL が同程度であるが、UQ/MK モル比はそれぞれ 0.12-0.42, 0.23-0.67 と Group 2 が高い値を示した。これについても Group 1 が分布する米子湾は水の入れ替えが生じにくく、増殖速度の遅い嫌気性菌が常に多く存在していると考えられる。Group 2 はわずかであるが酸素供給や大雨等により攪乱を受ける場所で、比較的 UQ を持つ好気性菌が生息できる環境であると示唆される。G 地点は外海水の影響を受けるため IL は低い、過去に掘削され水深が深くなっている。そのため、塩分の変化が大きく、安定した微生物量を維持できない可能性も考えられる。

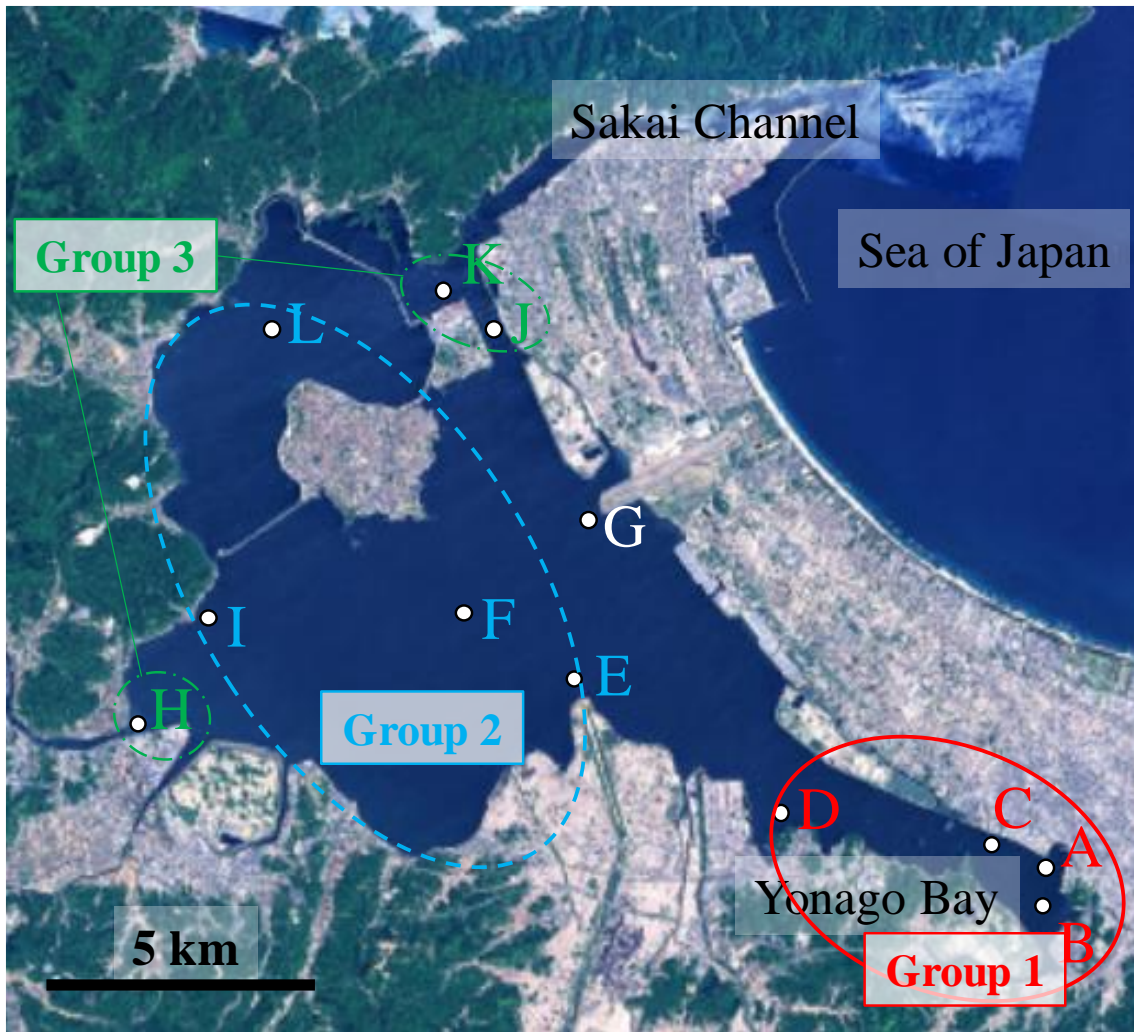


Fig. 3-8 IL とキノン量の関係および地理的な分布が類似している地点のグループ分け.

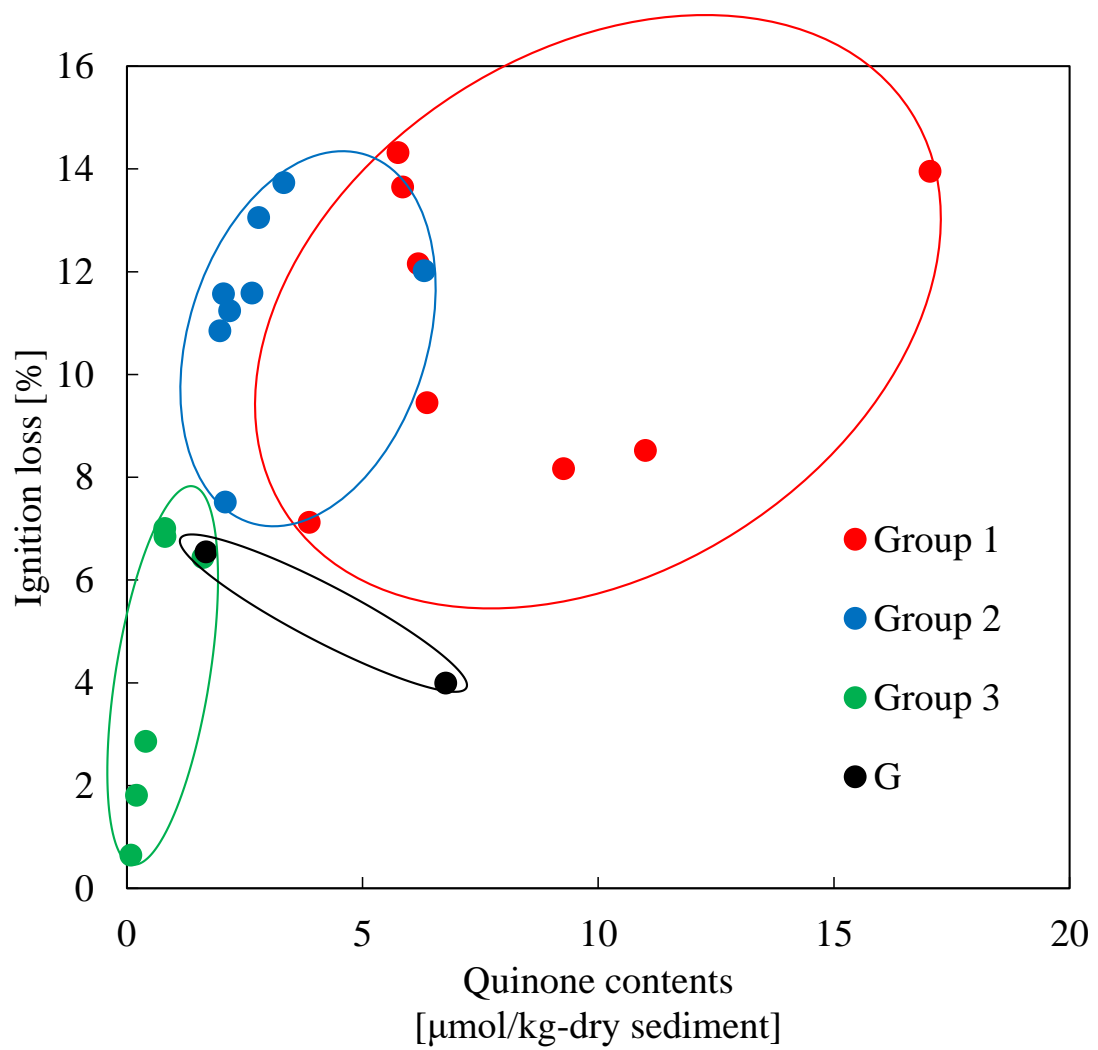


Fig. 3-9 中海のキノン量と IL の関係.

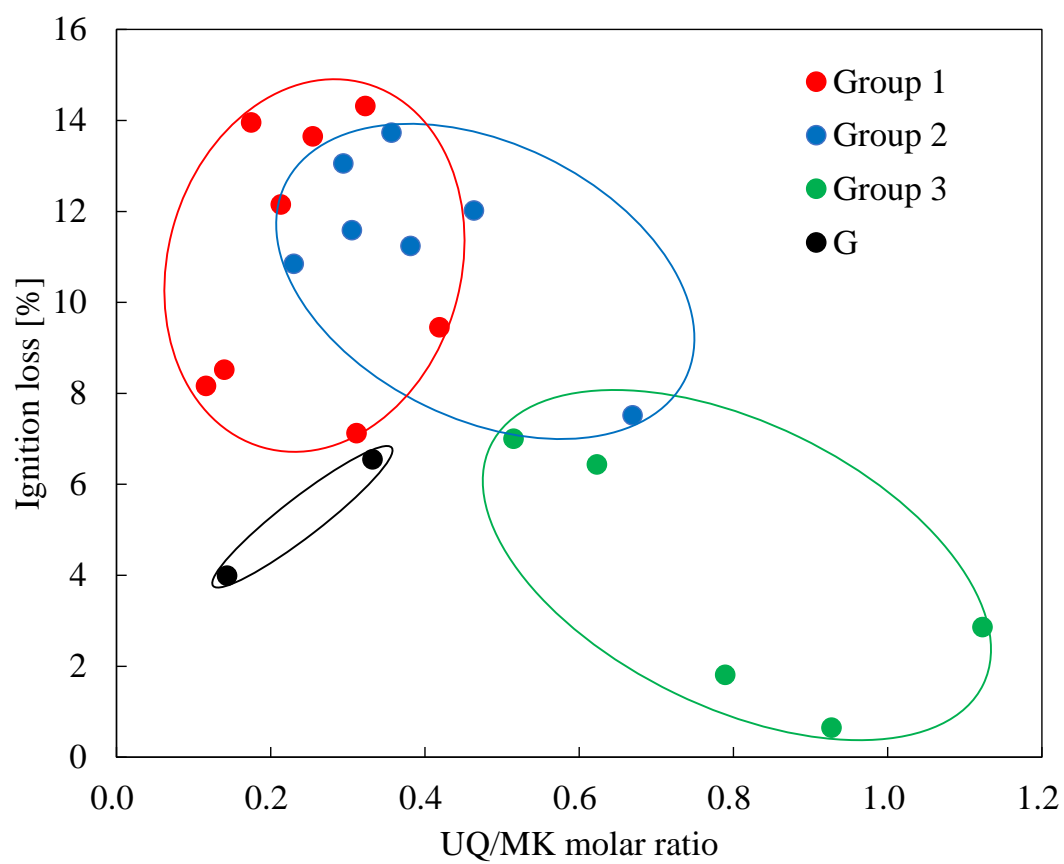


Fig. 3-10 中海の UQ/MK モル比と IL の関係.

3.3.8 各グループの物理的性質

Fig. 3-11 に各グループに分類された底質の物理的性質の平均値を示す。Group 1, 2 の IL はそれぞれ $10.9 \pm 2.7\%$, $11.4 \pm 1.7\%$ (mean \pm SD) で、Group 3, G と優位差が認められた ($P < 0.05$)。Group 3 の ORP は -199 ± 131 mV と最も高く Group 1, 2 と優位差が認められた ($P < 0.05$)。また、Cluster 3 の砂含有率は $67.5 \pm 27.8\%$ で最も高く、多地点と比較すると嫌氣的な状態が弱いと考えられる。

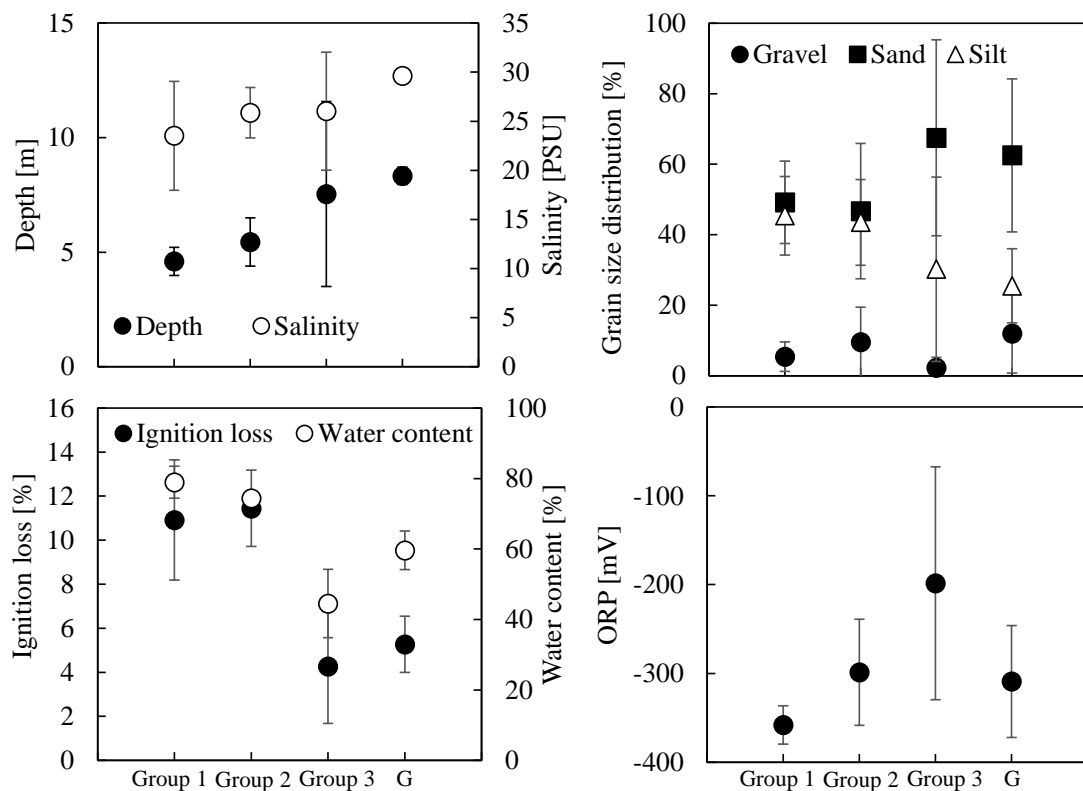


Fig. 3-14 各グループ底質の物理的性質.

3.3.9 各グループのキノンプロファイル

各グループに分類された底質のキノン量と UQ/MK モル比の平均値を Fig. 3-12 に示す。

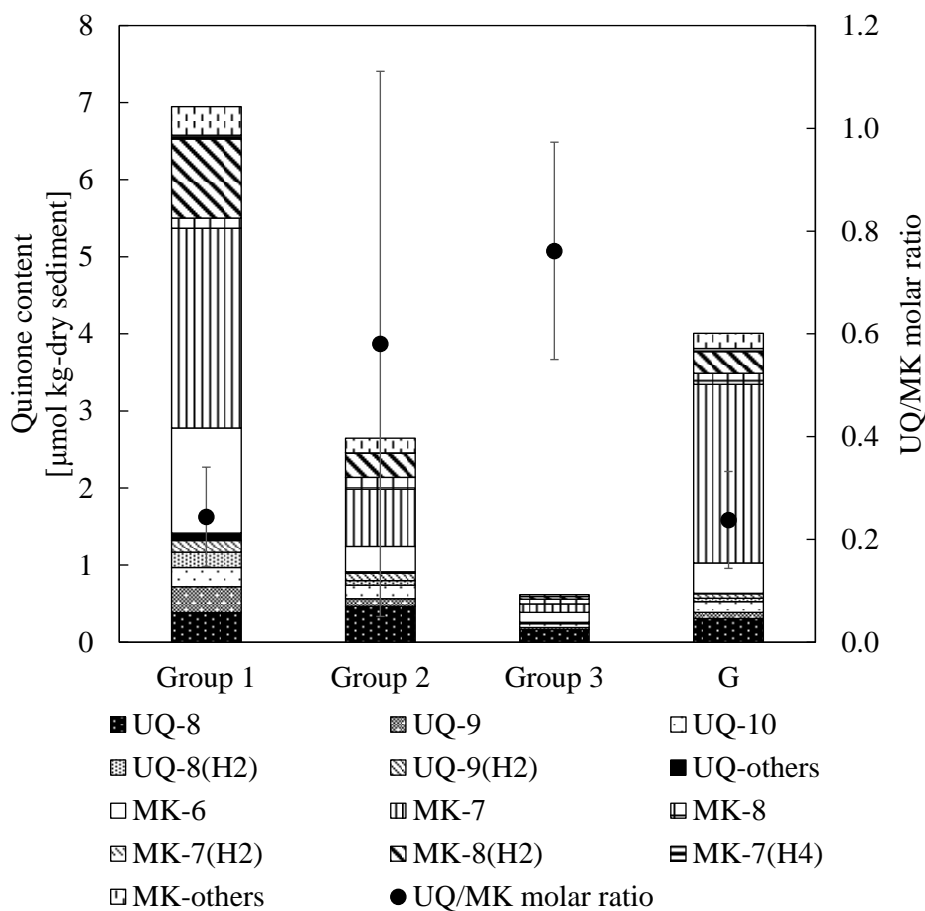


Fig. 3-12 各グループのキノノン量と UQ/MK モル比の平均値.

Group 1 - 3 および G 地点のキノノン量の平均値はそれぞれ 8.170 ± 3.949 , 2.928 ± 1.353 , 0.658 ± 0.509 , 4.227 ± 2.540 $\mu\text{mol/kg-dry sediment}$ (mean \pm SD)で, Group 1 は Group 2, 3 と有意差が認められた ($P < 0.05$)。Group 1-3 および G 地点の UQ/MK モル比の平均値はそれぞれ 0.24 ± 0.10 , 0.58 ± 0.53 , 0.76 ± 0.21 , 0.24 ± 0.09 で Group 1 は Group 3 と有意差が認められた ($P < 0.05$)。Group 1 はキノノン量および IL が高く, 有機物が従属栄養細菌の増殖に寄与していると考えられる。Group 1 は UQ/MK モル比が低く, ORP も -358 ± 22 mV と最も低いことから, 嫌気性菌が優占する環境であると示唆される。一方, Group 2 は IL が $11.4 \pm 1.7\%$ と最も高いが, キノノン量は Group 1 の 35%程度しか存在しない。こ

れは難分解性有機物の堆積により微生物増殖に繋がらないことが考えられる。また、Group 2 の UQ/MK モル比は Group 1 よりも 2.4 倍程度高い。このことから、通常は嫌気の状態にあるが、しばしば酸素供給を受けており、好気条件に変わる時に絶対嫌気性菌の割合が減少するため、キノン量が低くなることも考えられる。

3.4 結論

中海湖底の底質の物理的性質とキノンプロファイル法による微生物叢解析を調査した結果、以下の知見が得られた。

- 1) キノンプロファイルによる微生物叢解析の結果、観測地点、時期を問わず、そのほとんどで MK 量が UQ 量を上回っており、中海湖底は嫌気性菌が優占する環境である。全キノン量は、外海水の流入する境水道から離れるにしたがって多くなる傾向があり、中海南東部の米子湾周辺が最も多い。
- 2) UQ 類の優占種は *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* などの β - Proteobacteria に特徴的なキノン種である UQ-8, MK 類の優占種は *Clostridia* sp. や *Desulfovibrio* sp. などの硫酸還元菌が優占する MK-7 が多くの地点で優占した。このことから、中海では硫黄循環に関する細菌が多く、中海では多くの地点でこれらの細菌が優占することが明らかになった。
- 3) 中海の全キノン量は UQ/MK モル比, ORP, IL, 含水率, キノン種数および EQ に対して有意な相関が認められた。中海では MK 類が優占する環境であるため, IL および全キノン量が高い地点は UQ/MK モル比を下げ, ORP は負の値を示す傾向にあることが明らかになった。

引用文献

環境省 (2017) 中海自然再生事業計画書第2期実施計画. 1-35.

鯉淵幸生, 藤田昌史, 阿部哲也, 磯部雅彦 (2005) 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. 海岸工学論文集, 52, 946-950.

胡洪宮, 中込浩樹, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) キノンプロファイル法によるバイオフィルター内の生物膜を構成する細菌相の解析. 水環境学会誌, 15, 262-265.

国土地理院 (2019) 地理院地図.

<http://maps.gsi.go.jp/#12/35.491425/133.203392/&base=ort&ls=ort&disp=1&lcd=ort&vs=c0j0h0k0l0u0t0z0r0s0m0f0> (2019年11月時点)

Kunihiro T., Miyazaki T., Uramoto Y., Kinoshita K., Inoue A., Tamaki S., Hama D., Tsutsumi H. Ohwada K. (2008) The succession of microbial community in the organic rich fish-farm sediment during bioremediation by introducing artificially mass-cultured colonies of a small polychaete, *Capitella* sp. I. Marine Pollution Bulletin, 57, 68-77.

清家泰, 近藤邦男, 伊達善夫, 石田祐三郎 (1986) 汽水湖・中海における窒素代謝I—植物プランクトンによる無機態窒素の取り込み. 陸水学雑誌, 47, 121-132.

清家泰, 近藤邦男, 伊達善夫, 石田祐三郎 (1986) 汽水湖・中海における窒素代謝II—夏期における底泥表層部での脱窒特性. 陸水学雑誌, 47, 133-141.

清家泰, 近藤邦男, 伊達善夫, 石田祐三郎 (1986) 汽水湖・中海における窒素代謝III—低酸素濃度下における硝化・脱窒. 陸水学雑誌, 47, 269-278.

菅原庸 (1998) 湖沼の底土における微生物. 日本水産学会, 64, 301-302.

鈴木健一郎, 平石明, 横田明 (2001) 微生物の分類・同定実験法-分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に. シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.

高井康雄, 小川直人, 竹内えりか, 犬伏和之, 加藤茂, 松本聰, 和田秀徳 (1989) 中海干拓地での溶脱・酸化過程と鉄・硫黄酸化細菌数の経年変化. 日本土壌肥科学雑誌,

60, 2, 151-156.

田中重光, 田代幸寛, 光武奈緒子, 中園唯, 小林元太, 加藤富民雄, 神田康三 (2011) 有明海底泥中の細菌群集構造解析. 生物工学会誌, 89, 4, 161-169.

鳥取県・島根県 (2015) 中海に係る湖沼水質保全計画(第6期). 1-33.

Yamamoto K., Murakami R., Takamura Y. (1988) Isoprenoid quinone, cellular fatty acid composition and diaminopimelic acid isomers of newly classified thermophilic anaerobic Gram-positive bacteria. FEMS Microbiology Letters, 161, 351-358.

Yukiko S., Mochida K., Fukumori R., Okamoto N., Seike Y. (2006) N₂O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H₂S on dissimilatory nitrate reduction. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 67, 1-2, 231-238.

第4章 水質変化と微生物叢の関係

4.1 研究背景

近年、我が国の都市河川では下水処理水混入率が高く、淀川で10.9%、東京都(荒川、江戸川、多摩川、相模川)では6.7%、木曽川では1.7%と試算されており(国土交通省淀川河川事務所)、下水処理水の流入は受容河川の水温、COD、全窒素濃度、全リン濃度の増加に影響することが報告されている。特に、受容河川の全窒素濃度、全リン濃度の上昇は著しく、下水処理水の影響を強く受けていることが明らかになっている(和波および竹内, 2008)。

下水処理水などの高栄養塩の影響を長期間受けた地点は底質の付着藻類が増加することや、底生生物をバイオマス基準で見ると Filterers が減少し、Predators や Gatherers が増加することが明らかになっており、都市河川では処理水の放流によって水質や生物相に影響を及ぼすことが明らかになっている(阿部ら, 1996; 細見ら, 2009; 相澤ら, 1999)。これらの研究は処理水の影響を常に受けている生態系への影響を評価した事例であり、人為的な汚濁負荷が環境中へ及ぼす影響を明らかにしている。

また、農業域の小水路において、窒素濃度と脱窒速度を調べた結果、底質が安定した地点は水中の窒素濃度が高いほど脱窒速度が速くなることが知られている(駒田および竹内, 1998)。このことより、微生物叢が高濃度の栄養塩の影響を受けて変化していると考えられる。

以上を背景に、本章ではベントスよりも短期的に水質変化に応答すると考えられる河川底質の微生物叢に着目し、汚濁物質が生態系の基盤である微生物に及ぼす影響を評価した。

4.2 実験方法

4.2.1 サンプルング

調査対象は閉鎖性の強い中海の米子湾に流入する主要な河川である加茂川とした。栄養塩負荷に対する影響は流域に存在する農業集落排水施設(成実第一処理場)からの処理水の影響を受ける可能性がある地点をサンプルング地点に選定した(Fig. 4-1)。

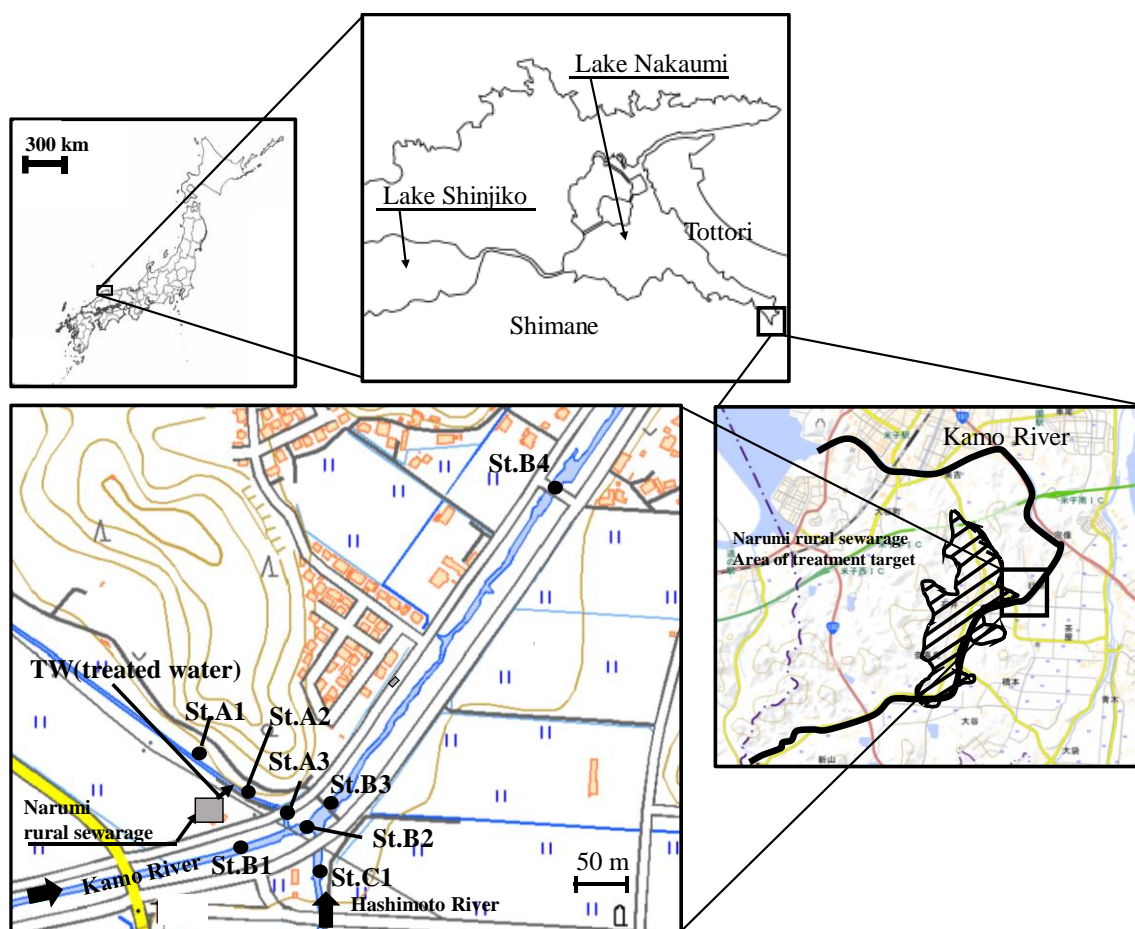


Fig. 4-1 サンプルング地点の位置(国土地理院).

成実第一処理場から処理水が放流される前(St.A1)と放流された後(St.A3)の農業用水路の用水と底質, 処理水が配管から放出される放流水(TW)と放流直後の底質(St.A2), 支流

が加茂川本流に流れ込む前(St.B1)と流れ込んだ後(St. B2)の河川水と底質, 加茂川の支流である橋本川(St.C1)と橋本川と加茂川の合流後(St.B3)とさらに 500 m 下流(St.B4)の河川水, 底質を採取した。農業用水水路および河川のサンプリングは 2013 年 4 月 16 日から 12 月 11 日まで月に 1 度実施し, 48 時間以内に水質分析を完了させた。底質の採取は 2013 年 2 月 12 日, 9 月 13 日に実施し, 深さ方向 5 cm を 3 回採取して混合したものを試料とし微生物叢解析に供した。

4.2.2 水質分析および粒度分布測定

河川水および農業集落排水施設の処理水について, 1 μm のガラス繊維濾紙(ガラス繊維濾紙 GF/B, Whatman)でろ過したものを各種分析に供した。COD, 全窒素濃度, 全リン濃度分析は JIS K 0102 工業排水試験方法に準拠した。粒度分布は JIS A 1204 に準拠して, 9.5, 4.75, 2.0, 0.850, 0.425, 0.250, 0.106, 0.075 mm の篩に掛け分級した。

4.2.3 微生物叢解析

微生物叢解析は 2 章と同様にキノプロファイル法を用いた。試料は土壌試料または 0.2 μm のろ紙で河川水および処理水を 10 L ろ過した試料を凍結乾燥(VO-800F, TAITEC)させたものを使用した。

4.3 結果および考察

4.3.1 農業集落排水処理施設周辺の水質

2013 年 4 月~12 月の水質分析結果を Table 4-1 に, 分析結果の平均値を Fig. 4-2 に示す。農業集落排水処理水(TW)は DCOD, DTN 濃度, DTP 濃度が TW 混合前の農業用水路(St.A1)と比較して, それぞれ 1.2 倍, 8.7 倍, 17 倍高く, SS 濃度, DO 濃度は逆に 3.8 倍, 1.9 倍低い値を示した。また, TW と St.A1 では水温に違いはないが, 夏季は St.A1

と比較して TW は最大で 2.8°C 低く、冬季は最大 5.6°C 高かった。このように処理水は放流先の農業用水路とは異なる水質を示したが、農業用水路と混合後(St.A3)の水質は混合前(St.A1)の水質と比較すると、DCOD においては処理水が放流先の農業用水路に及ぼす影響は小さい(1.04 倍)。一方、DTN 濃度、DTP 濃度は St.A3 では St.A1 のそれぞれ 3.4 倍、6.3 倍に増加していた。加茂川本流に流入する直前(St.A3)の DTN 濃度、DTP 濃度は加茂川本流(St.B1)と比較してそれぞれ 4.0 倍、9.5 倍高く、St.B1 から St.B2 にかけて DTN 濃度、DTP 濃度を、それぞれ 1.2 倍、1.9 倍増加させた。加茂川本流 St.B1 から 500 m 下流に位置する加茂川本流 St.B4 の DTN 濃度、DTP 濃度は St.B1 と比較してそれぞれ 1.5 倍、1.6 倍増加していた。St.B2 と St.B3 の間で加茂川に合流する橋本川が加茂川の栄養塩濃度に及ぼす影響はほとんどなく、農業集落排水処理水によって供給された窒素およびリンが多少の増減はみられたが、ほとんどそのまま加茂川下流の栄養塩濃度を高めることが示された。

4.3.2 農業用水路および河川底質の微生物量

底質中のキノン量を農業用水路および河川の粒径 2 mm 以上の砂礫を除いた底質中の乾燥重量当たり(Fig. 4-3a)と底質中の容積当たり(Fig. 4-3b)で整理して示す。処理水放流直後の水路底質である St.A2 はいずれの評価でも高いキノン量を示し、栄養塩類・有機物等が豊富な処理水の流入による微生物増殖およびほとんどが微生物からなる SS が流入し、沈降した影響によって底泥中の微生物量が大きく高まったことが示唆された。一方、処理水の影響を受ける前の St.A1 の底質は、底質乾燥重量あたりのキノン量が大きい、容積当たりのキノン量は小さい。これは St.A1 の IL(8.2%)が St.A2 を除く他の地点の IL(0.57~3.4%)より高かったためと考えられる。処理水流入後の St.A2、St.A3 は St.A1 と比較して容積当たりのキノン量がそれぞれ 5.9 倍、1.9 倍増加していた。一方で、加茂川内を見ると農業用水路が合流する前の St.B1 と比較して St.B2、St.B3、St.B4 は容

Table 4-1 2013年4月から2013年12月の加茂川および処理水の水質 (n=3)

	16-Apr	4-Jun	18-Jun	2-Jul	24-Jul	7-Aug	26-Aug	3-Sep	19-Sep	15-Oct	29-Oct	18-Nov	11-Dec	Ave.	SD
St.	DCOD [mg/L]														
A1	4.66	3.72	6.49	4.33	4.37	4.65	4.78	4.55	6.46	4.13	4.11	3.71	3.44	4.57	0.90
TW	5.80	5.27	5.94	5.35	5.26	3.83	4.68	4.05	9.49	4.36	4.32	5.28	4.67	5.25	1.37
A3	5.98	3.36	6.92	4.17	4.33	5.70	4.98	4.47	1.75	4.82	4.45	6.11	4.44	4.73	1.26
B1	2.72	4.11	6.50	4.71	4.14	3.55	4.60	4.82	2.13	3.91	3.11	3.92	3.02	3.94	1.07
B2	3.41	3.85	6.71	5.27	4.44	2.69	5.02	4.78	2.30	3.94	2.92	3.59	3.07	4.00	1.18
B3	3.21	4.35	6.95	4.68	4.44	3.26	4.39	5.30	6.70	3.63	3.11	4.17	3.25	4.42	1.21
B4	2.78	4.32	6.75	4.94	4.37	5.28	4.20	4.39	2.06	3.41	2.85	6.03	3.02	4.18	1.30
C1	1.75	4.69	7.61	4.90	4.26	3.07	4.01	4.89	6.42	3.29	2.28	3.94	3.21	4.18	1.54
St.	SS [mg/L]														
A1	7.4	5.2	7.4	8.1	23.0	13.4	7.4	24.0	6.1	4.8	5.6	18.0	10.6	10.85	6.45
TW	2.3	2.5	2.8	1.0	1.7	2.7	8.9	2.1	2.1	1.8	2.5	3.4	2.7	2.82	1.85
A3	10.2	6.8	16.8	6.0	19.8	16.5	16.3	34.0	10.7	25.0	4.8	32.0	7.2	15.85	9.30
B1	6.7	10.0	12.4	22.0	24.8	16.8	19.3	26.0	9.4	16.0	23.0	32.8	17.6	18.21	7.20
B2	7.5	11.4	8.2	17.4	15.0	15.6	21.4	22.5	15.6	18.4	19.4	33.6	18.2	17.25	6.45
B3	4.1	11.8	9.6	10.3	13.8	25.4	19.6	23.0	10.0	22.2	16.8	27.6	11.2	15.80	6.90
B4	3.1	14.0	7.4	15.2	27.0	12.7	11.7	42.0	15.8	5.0	17.4	29.6	12.6	16.42	10.34
C1	1.5	12.6	7.8	4.8	20.2	11.7	25.6	45.0	3.4	3.6	2.2	13.6	6.6	12.20	11.74
St.	DTN [mg/L]														
A1	0.79	0.63	1.16	0.66	0.68	0.63	1.06	1.60	0.59	0.51	1.28	1.44	1.38	0.95	0.37
TW	13.12	4.71	3.63	1.23	12.59	8.91	17.45	13.08	2.53	3.50	7.91	5.59	13.42	8.28	4.99
A3	8.12	0.65	1.63	0.71	0.66	3.00	3.60	1.40	0.67	6.78	6.60	2.01	6.19	3.23	2.64
B1	1.28	0.63	1.08	0.63	0.62	0.63	0.84	1.07	0.44	0.51	0.69	1.12	0.83	0.80	0.25
B2	1.40	0.67	0.98	0.66	0.74	1.38	1.27	1.04	0.45	0.78	0.94	0.98	1.32	0.97	0.29
B3	2.19	0.79	1.45	0.92	0.68	0.92	1.09	0.98	0.55	0.95	1.17	1.17	1.46	1.10	0.40
B4	1.59	0.88	1.19	1.20	0.82	0.80	1.24	1.41	0.64	1.69	1.14	1.40	1.40	1.18	0.31
C1	2.43	0.89	1.44	1.10	0.58	0.83	0.89	1.30	0.83	1.54	1.69	1.16	1.41	1.24	0.47
St.	DTP [mg/L]														
A1	0.12	0.17	0.09	0.11	0.10	0.11	0.13	0.19	0.07	0.11	0.13	0.17	0.09	0.12	0.04
TW	2.19	2.57	1.05	0.10	2.65	2.22	2.41	2.45	2.45	0.19	2.41	2.21	2.43	1.95	0.86
A3	1.87	0.21	0.13	0.13	0.11	1.23	0.97	0.19	0.21	1.19	1.25	0.96	1.43	0.76	0.59
B1	0.07	0.14	0.10	0.09	0.08	0.06	0.06	0.11	0.07	0.14	0.05	0.07	0.05	0.08	0.03
B2	0.79	0.12	0.09	0.07	0.14	0.10	0.07	0.11	0.08	0.17	0.06	0.11	0.07	0.15	0.19
B3	0.87	0.15	0.15	0.11	0.12	0.08	0.10	0.11	0.11	0.15	0.12	0.10	0.09	0.17	0.20
B4	0.18	0.17	0.15	0.11	0.14	0.08	0.08	0.11	0.11	0.33	0.11	0.10	0.11	0.14	0.06
C1	0.12	0.16	0.19	0.10	0.07	0.07	0.08	0.11	0.07	0.14	0.12	0.10	0.06	0.11	0.04
St.	DO [mg/L]														
A1	13.82	7.77	5.72	7.32	5.09	6.82	6.67	6.32	7.65	8.2	9.26	8.01	10.24	7.91	2.16
TW	4.56	3.86	3.87	5.04	3.53	4.81	3.37	4.71	3.53	3.77	4.76	3.90	4.39	4.16	0.55
A3	9.27	6.83	4.74	6.86	5.00	5.55	4.94	6.1	6.71	6.27	7.9	7.55	10.30	6.77	1.60
B1	10.81	6.44	5.55	7.2	5.35	4.71	5.54	5.5	7.63	5.51	8.08	8.52	9.11	6.92	1.75
B2	11.23	7.69	4.94	5.86	6.07	5.11	4.92	5.7	6.94	5.34	8.94	8.13	8.57	6.88	1.85
B3	10.72	8	6.53	6.21	5.54	5.86	5.93	5.79	6.53	5.57	8.2	10.40	8.11	7.18	1.70
B4	10.21	5.71	4.82	6.33	5.03	5.66	6.41	5.58	6.96	5.88	8.2	8.83	7.91	6.73	1.55
C1	10.61	6.12	4.74	6.33	5.36	5.82	5.79	5.45	7.86	6.58	8.12	7.75	10.24	6.98	1.77
St.	Water Temperature [°C]														
A1	23.5	25.6	24.0	27.1	29.9	31.8	29.2	21.3	26.0	22.5	21.2	10.7	13.4	23.6	5.8
TW	20.7	24.6	24.3	26.5	29.8	31.2	29.0	24.1	26.0	23.1	22.0	16.3	15.7	24.1	4.5
A3	21.3	25.8	23.8	27.6	30.8	31.0	31.0	21.1	25.5	21.4	20.4	11.3	11.8	23.3	6.2
B1	22.5	25.4	23.9	27.4	30.8	30.2	28.8	21.8	26.9	21.2	19.6	10.8	11.0	23.1	6.2
B2	22.2	25.2	23.8	27.2	31.2	29.5	27.9	21.6	23.8	20.3	19.9	10.4	10.3	22.6	6.2
B3	22.3	25.5	23.8	27.6	31.0	29.0	29.1	21.3	24.7	20.5	20.0	8.5	10.7	22.6	6.5
B4	21.0	25.6	23.5	27.7	30.6	29.5	26.4	21.3	22.9	20.4	20.0	10.4	8.7	22.2	6.3
C1	21.2	25.1	23.9	27.3	30.0	31.2	27.2	21.7	27.2	21.1	19.8	10.0	11.4	22.9	6.2

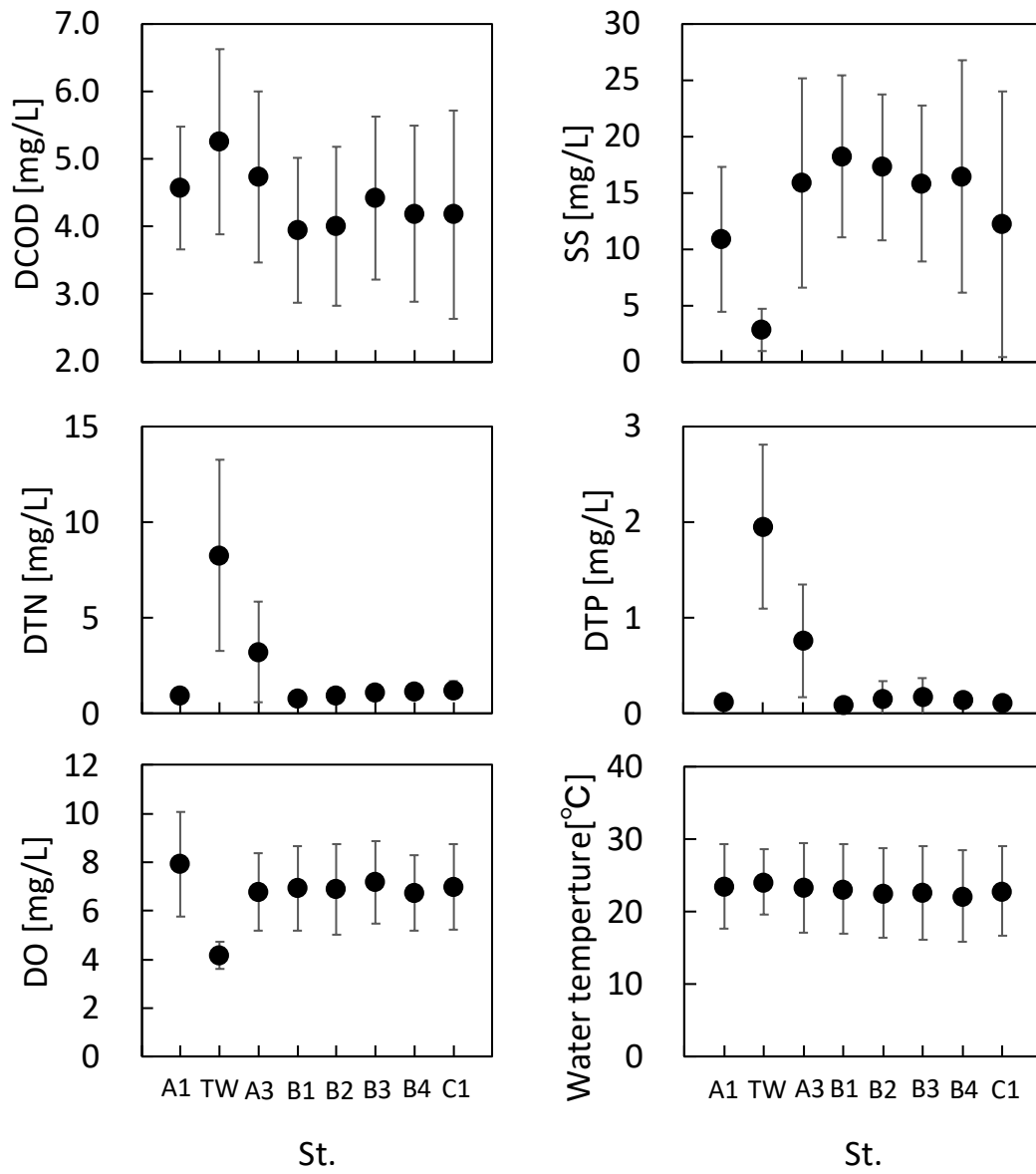
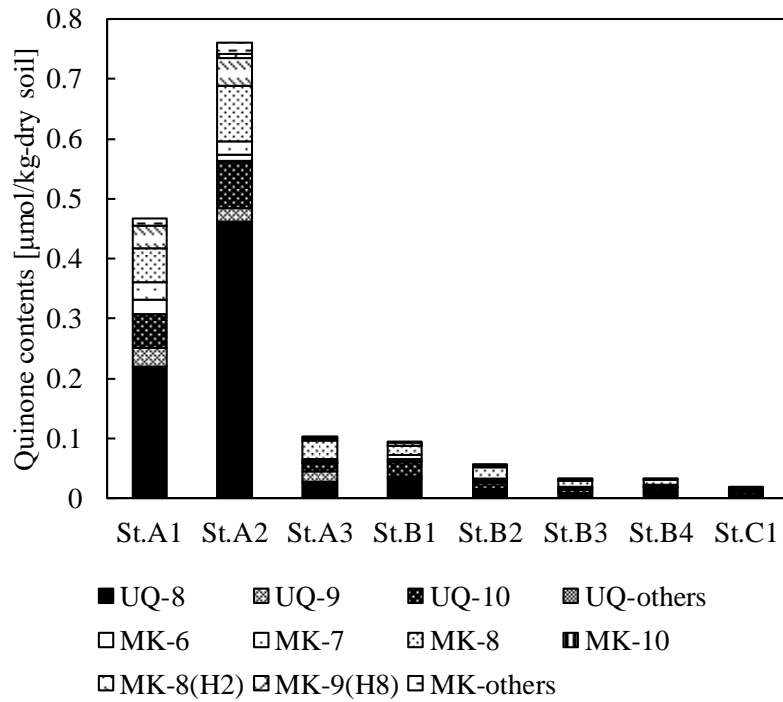
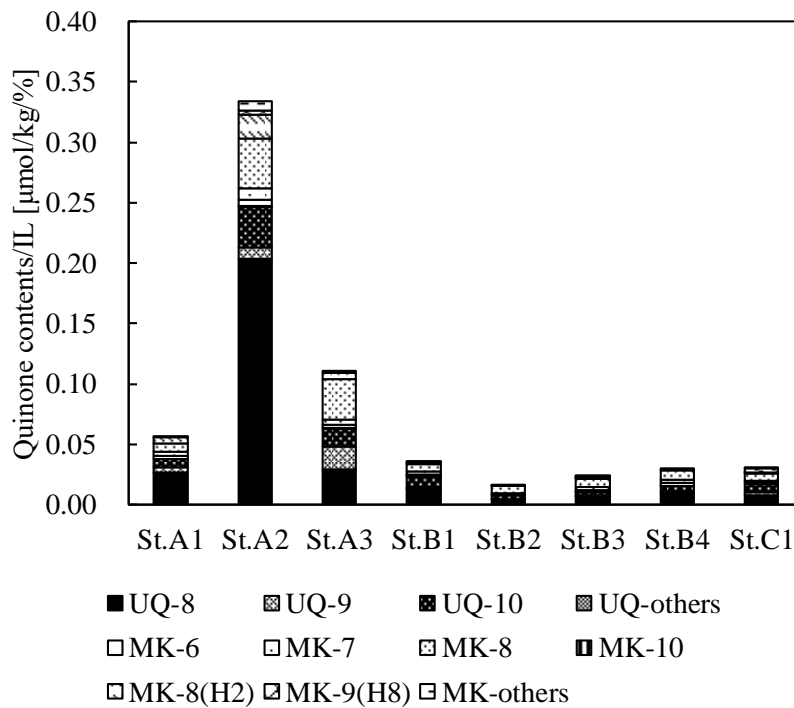


Fig. 4-2 各地点の水質の平均値. エラーバーは標準偏差を示す(SD).



a



b

Fig. 4-3 底質中の乾燥質量当たりのキノン量 (a). 底質中の容積当たりのキノン量 (b).

積当たりのキノン量はそれぞれ 0.5 倍, 0.7 倍, 0.8 倍に減少していた。農業用水路の栄養塩濃度を見ると, St.A3 の DTN 濃度, DTP 濃度は St.A1 よりもそれぞれ 3.4 倍, 6.3 倍に増加しており, St.B2 は St.B1 と比較して DTN 濃度, DTP 濃度を, それぞれ 1.2 倍, 1.9 倍増加させている。すなわち, 加茂川内では農業用水路の合流によって栄養塩濃度が高くなったにも関わらず, キノン量の増加は見られていない。栄養塩類と比較して処理水の流入前後での DCOD 変化(1.2 倍)が小さいことから, 十分生物処理された水が農業用水路に流入していると考えられる。そのため, 大きな有機物濃度変化がない中で栄養塩濃度の増加が直接細菌の増殖を促すとは考えにくい。このことから, 処理水流入直後の St.A2 と A3 での高いキノン量は, 処理水中に含まれる生物フロックそのものが堆積した影響であり, 特に水質変化として顕著であった栄養塩類の増加はキノン量で示される微生物量には影響を及ぼさなかったと推定される。

4.3.3 農業用水路および河川の浮遊微生物量

浮遊微生物量の指標となる各地点の SS 中のキノン量を Fig. 4-4 に示す。処理水(TW)に含まれる SS 濃度当たりのキノン量をもっとも高く 0.095 nmol/mg であり, 先に考察した処理水から生物フロックが供給されていることを裏付けた。一方, St.A3 は処理水放流前の St.A1 と大差なく, 処理水に含まれている生物フロックは, 放流口の近傍に沈澱し, 下流への影響は小さいことが示唆された。この結果は, 底質 IL 当たりのキノン量が St.A2 で St.A1 と比較して大きく増加し, その影響は St.A3 までであったこととも一致する。St.B2, St.B3 は St.B1 と比較して, キノン量がそれぞれ 1.7, 1.6 倍増加しているが, St.B4 では St.B1 と同程度まで減少している。農業用水路の合流地点での底泥の巻き上がりが原因で St.B2 および St.B3 において一時的に浮遊微生物量の増加が起こった可能性はあるが, いずれにしても増加レベルは小さく, 農業用水路の存在は加茂川の浮遊微生物濃度にはほとんど影響を与えていない。

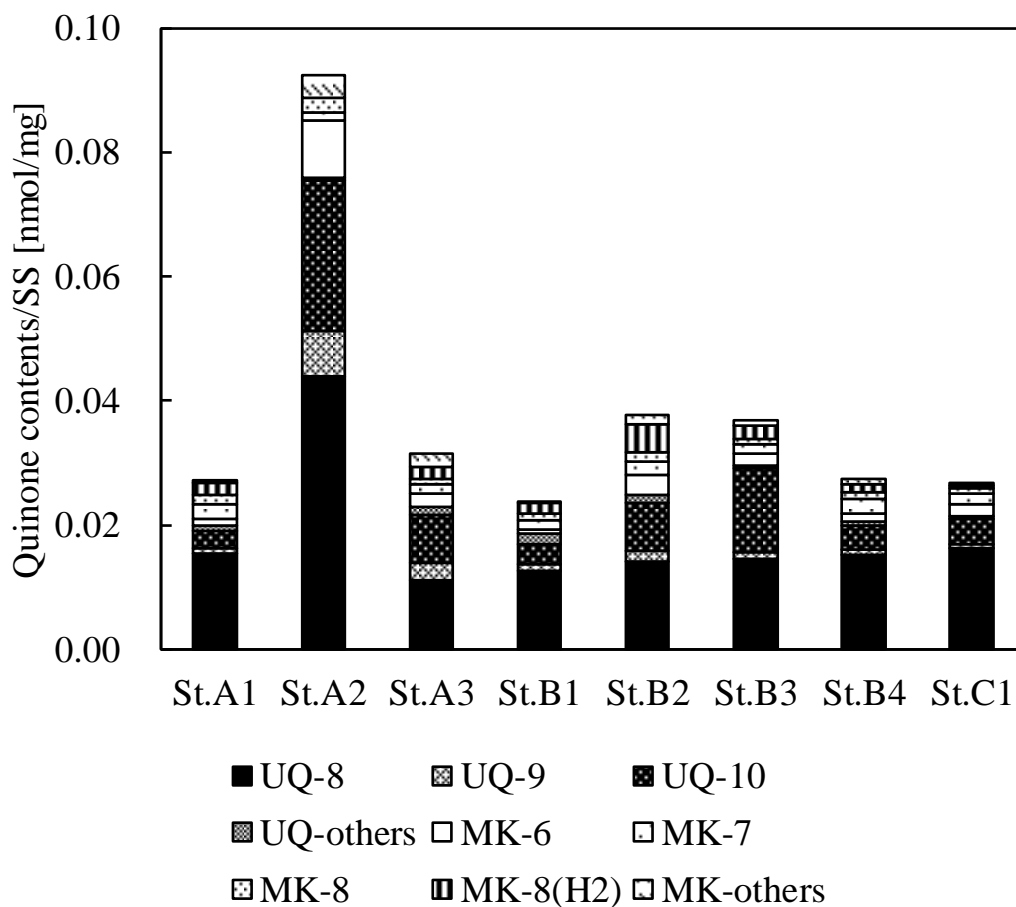


Fig. 4-4 浮遊微生物中のキノン組成. 試料は 0.2 μm のろ紙で 10 L 捕集.

4.3.4 農業用水路および河川のキノン種

農業用水路および河川の粒径 2 mm 以上の砂礫を除いた底質中のキノン組成(Fig. 4-5a)と処理水, 農業用水および河川水中のキノン組成(Fig. 3-5b)を整理して示す。処理水が放流された直後の底質中のキノン組成(St.A2)の特徴は UQ-8 が 60%を超えて優占し, MK-6 がほとんど検出されず, UQ-9, UQ-10 および MK-8 の割合が他の地点の底質中キノン組成と比較して小さいことである。また, St.A2 の底質中キノン組成は, Fig. 5b に示す処理水中(TW)のキノン組成と同様に UQ 割合が高く(それぞれ 74%と 82%), UQ-8(48%)が優占する処理水の微生物が底質に移行したと考えられる。UQ-8 は, β または γ -Proteobacteria に属するほとんどの細菌が含有している(鈴木ら, 2001)。具体的には

Achromobacter, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* などが知られており(鈴木ら,2001; 胡ら,1992),一般的な活性汚泥中の UQ 優占種は UQ-8 で,27~38 mol% 程度であると報告されている(平石および上田,1997; 平石ら,1993)。St.A1 と St.A2 のキノン組成は MK-6 の割合が比較的大きいことを除けば類似したキノン組成であった。一方, St.A3 のキノン組成は St.A2 と比較して UQ-8 が半減し, MK-8 および UQ-9 が 2 倍以上に増加している。また, 加茂川本流(St.B1~B4)および支流の St.C1 の底質キノン組成は St.A2 とは異なっていた。

各地点におけるキノン種と水質との関係を明らかにするため, 栄養塩濃度と各キノン種のキノン量の相関をとり, 相関が高かったキノン種を Table 4-2 に示す。DTN, DTP と強い相関を示したキノン種は UQ-8, MK-8 であり, これらは栄養塩負荷を示す指標であると考えられる。UQ-8, MK-6, MK-8 は脱窒活性に影響を受ける種として知られていることから, 処理水中によって供給される窒素は硝酸性窒素(全窒素の約 90%)に対応して脱窒菌の増加が生じていると考えられる(濱田ら,2009)。また, 宋らは油汚染サイトにおいて, 栄養塩を注入した 3 か月後に UQ-8, MK-8 が著しく増加したと報告しており, 栄養塩の付加による脱窒菌の増殖を示唆しているが(宋ら,2012), 本調査地点では地理的な栄養塩濃度の違いによって脱窒菌の密度が変化していることが示唆される結果となった。

各地点のキノン種数と EQ の関係を Fig. 6 に示す。栄養塩濃度はキノン種数と正の相関が認められた(DTN, $R=0.78$; DTP, $R=0.78$)。一方で, キノン組成の均一性を示す EQ と栄養塩濃度は負の相関を示した(DTN, $R=-0.71$; DTP, $R=-0.73$)。St. A1, A2, A3 の EQ はそれぞれ, 0.51, 0.37, 0.63 であり, 栄養塩濃度の高い St.A2 では EQ が減少した。しかし, St.A3 の EQ は St.A1 よりも高い値を示した。このことから, キノン種の増加は処理水に含まれるフロックが放流口の近傍に沈澱したためであり, 下流への影響は小さいことが示唆された。

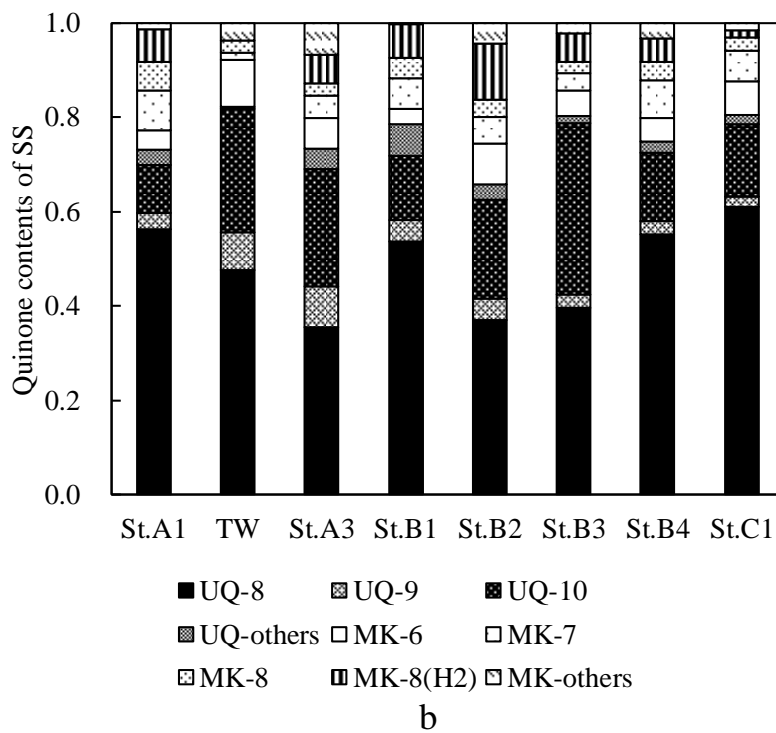
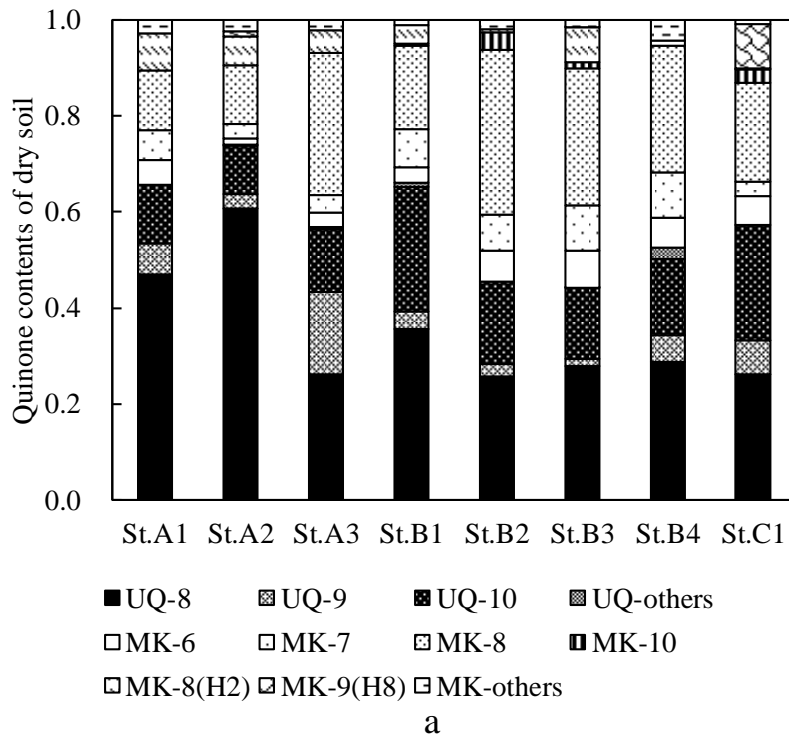


Fig. 4-5 農業用水路および河川の粒径 2 mm 以上の砂礫を除いた底質中のキノン組成(a)

と処理水, 農業用水および河川水中のキノン組成(b).

Table 4-2 DTNおよびDTP と底質中のキノン量との相関

	UQ-8	UQ-others	MK-8	MK-others	Total quinone	DTN	DTP
UQ-8	-	0.78	0.97	0.97	0.99	0.83	0.83
UQ-others	*	-	0.71	0.64	0.72	0.89	0.88
MK-8	**	*	-	0.97	0.98	0.81	0.82
MK-others	**		**	-	0.99	0.72	0.72
Total quinone	**	*	**	**	-	0.78	0.78
DTN	**	**	*	*	*	-	1.00
DTP	*	**	*	*	*	**	-

Upper triangular : Correlation coefficient, Lower triangular : Probability (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

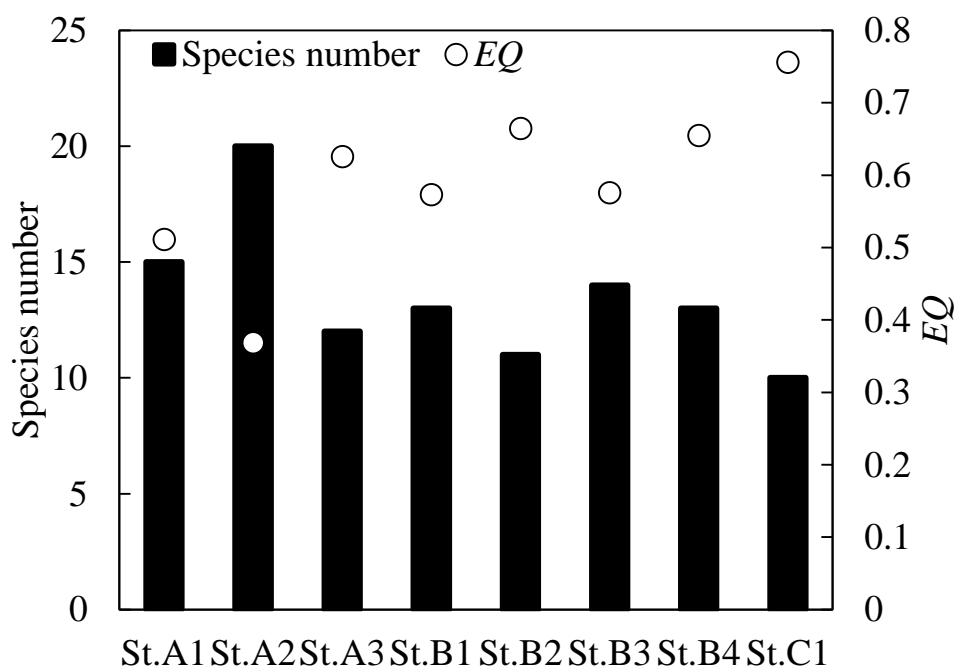


Fig. 6 各地点のキノン種数と多様性指標(EQ).

4.4 結論

高栄養塩負荷が農業用水路および河川底質の微生物に及ぼす影響を調査した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 放流先の用水路の水質に対して強い影響を及ぼした農業集落排水処理水の水質は溶存態窒素濃度と溶存態リン濃度であり、平均値としてそれぞれ放流先の用水路よりも 7.33 mg/L(8.7 倍), 1.83 mg/L(17 倍)高い値を示した。さらに、処理水は用水路の濃度をそれぞれ 2.28 mg/L(3.4 倍), 0.64 mg/L(6.3 倍)増加させた。処理水放流先の用水路からの流入により、水量が大きい加茂川本流の溶存態窒素濃度、溶存態リン濃度も、それぞれ 2.44 mg/L(4.0 倍), 0.68 mg/L(9.5 倍)増加させた。
- 2) DTN, DTP と強い相関を示したキノン種は UQ-8, MK-8 であった。このことから、栄養塩濃度が高い農業集落排水処理水放流による影響は用水路内の微生物叢を変化させ、特に脱窒菌の増加に寄与していることが明らかになった。

引用文献

- 阿部早智子, 加藤丈夫, 伊藤善通, 横林一彦, 宮崎圭三 (1996) 下水処理排水の河川生物相に与える影響. 日本水処理生物学会誌, 32, 1, 51-59.
- 相澤治郎, 佐藤義秋, 伊藤歩, 北田久美子, 海田輝之, 大村達夫 (1999) 下水処理水が河川底生生物及び水環境に与える影響. 日本水処理生物学会誌, 35, 4, 247-259.
- 濱田康治, 藤田昌史, 人見忠良, 久保田富次郎, 白谷栄作 (2009) 農業排水を対象とした水質浄化装置内での脱窒反応とキノン組成の変化. 濃工研技報, 210, 101-109.
- 平石明, 小林豊, 森山清, 森忠洋 (1993) 活性汚泥の細菌群集構造におよぼす亜鉛ストレスの影響—キノンプロファイル法による解析. 水環境学会誌, 16, 7, 481-487.
- 平石明, 上田陽子 (1997) キノンプロファイルによる人工廃水活性汚泥および実処理下

- 水汚泥の微生物群集構造の比較解析. 日本水処理生物学会誌, 33, 3, 137-149.
- 細見暁彦, 春日郁郎, 古米弘明, 吉村千洋, 中島典之, 加賀谷隆, 栗栖太 (2009) 河川の粒状有機物動態と底生動物の群集構造に及ぼす下水処理水の影響. 水環境学会誌, 32, 7, 375-381.
- 和波一夫, 竹内健 (2008) 都市排水の環境影響に関する研究(まとめ)ー河川水質・底生生物に及ぼす下水処理水の影響ー. 東京都環境科学研究所年俵, 38-46.
- 胡洪營, 中込浩樹, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) キノプロファイル法によるバイオフィルター内の生物膜を構成する細菌相の解析. 水環境学会誌, 15, 4, 262-265.
- 国土交通省淀川河川事務所, 河川水中の下水処理水の混入率. URL.
<http://www.kkr.mlit.go.jp/yodogawa/know/summary/problem/problem-konyu.html> (2019 年 11 月時点).
- 国土地理院, 地理院地図. URL. <http://maps.gsi.go.jp/#17/35.406983/133.354915> (2019 年 11 月時点).
- 国土地理院, 地理院地図. URL. <http://maps.gsi.go.jp/#14/35.406086/133.331022> (2019 年 11 月時点).
- 駒田充生, 竹内誠 (1998) 農業域の小水路における脱窒速度の測定と窒素浄化機能の評価, 日本土壌肥料科学雑誌, 69, 162-169.
- 宋徳君, 田村和嗣, 打木弘一, 原学, 西島正範 (2012) 栄養塩注入サイトに伴う油汚染サイトの微生物分解容量の変化. 第 18 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, 529-532.
- 鈴木健一郎, 平石明, 横田明 (2001) 微生物の分類・同定実験法-分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に-. シュプリンガー・ジャパン株式会社, 172-173.

第5章 ベントスと微生物叢の関係

5.1 研究背景

ベントスは底質の粒度や地盤高さによって特徴のある群集を作ることが知られており、底質の環境履歴を反映することが既往の研究で明らかになっている(大谷ら, 2007; Jayaraj et al., 2008)。ベントスと底質の汚濁度および物理化学的性質との関係は比較的多くの知見がある一方、ベントスと底質中の微生物との関連について調査した事例は少ない。國弘らは養殖場の底質改善のため、イトゴカイを散布し微生物叢との関連を調査した結果、冬季のイトゴカイ個体数とキノン量に正の相関($R^2 = 0.59$)が認められている(Kunihiro et al., 2008)。これは、微生物により有機物がベントスに利用可能な形態に変換されていると推察される。また、Hasanudin らは干潟にアサリを散布し、水質と微生物叢を解析した結果、アサリを散布した干潟でより微生物量が増加して、脱窒能が向上したことを明らかにしている(Hasanudin et al., 2004)。このようにベントスと微生物は相互に作用することで自然浄化に寄与していると考えられるが、自然環境中のベントスと微生物の関係について評価した事例は少ない。底質環境を評価する上で、様々な環境下で互いの群集構造の変化とその関係を把握することは重要である。

本章では、干潟に生息するベントスと微生物の関係を明らかにすることを目的に2章で調査した地点のベントスの個体数と種から得られる情報で各地点を分類し、分類されたクラスターの微生物叢の特徴について考察する。

5.2 実験方法

5.2.1 調査地点

調査は2章と同様の地点(瀬戸内海の黒瀬川河口、藤井川河口、ハチの干潟、三ツ口干潟で行った。調査地点を Fig. 5-1 に示す。

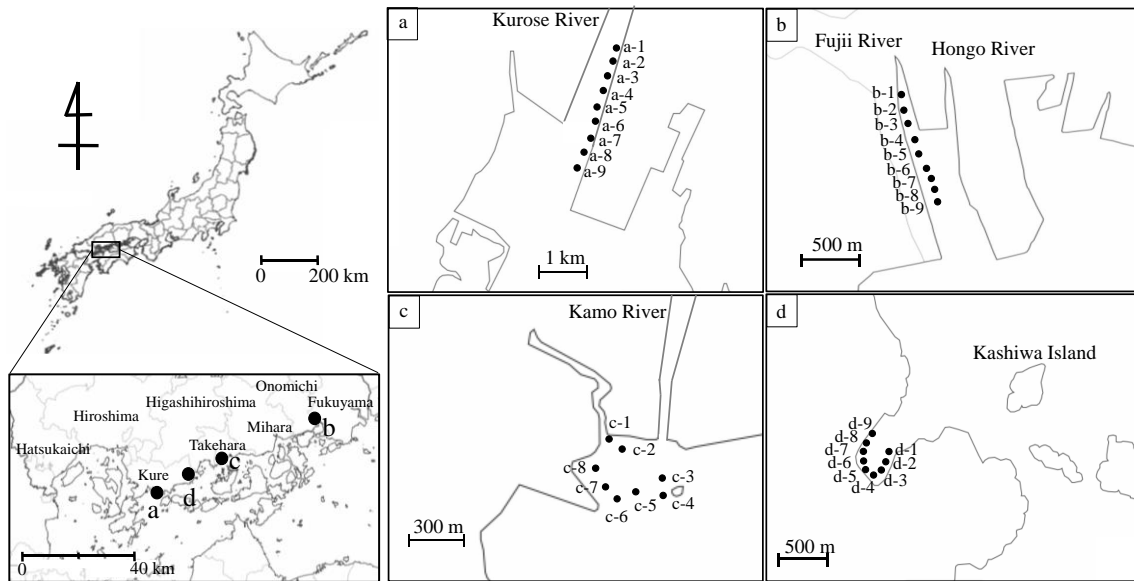


Fig. 5-1 瀬戸内海の調査地点の位置，黒瀬川 (a)，藤井川 (b)，
ハチ干潟 (c)，三ツ口干潟 (d)。

5.2.2 サンプルングおよび分析

4つの干潟のサンプルングは干潟での生物生産量が増大する2012年5月と7月に行った。黒瀬川とハチ干潟は2012年5月に、三ツ口干潟と藤井川は2012年7月にそれぞれサンプルングを行った。ベントスのサンプルングは同一干潟で8~9地点とし、堆積物の深さ方向5cmをφ140mmのコアサンプラーで採取した。採取したベントスは70%エタノールで保存して図鑑と照合して形態学的に同定した(西村, 1992; 西村, 1995; 奥谷, 2000)。

5.2.3 キノンプロファイル法

微生物叢解析は2章と同様にキノンプロファイル法を用いて行った。

5.2.4 データ解析ソフトウェア

各干潟の調査地点の類似度を評価するためクラスター分析を行い、調査したサンプルについて類似度の近いものを分類した。解析にはエクセル統計ソフト BellCurve for Excel (version 3.2) (BellCurve, Tokyo, Japan)を用いて、変数には調査した4干潟35地点のベントスの出現数、種数、シャノン Weiner の多様性指標を用いた。クラスター分析の個体間距離は標準化ユークリッド距離、クラスターの結合には Ward 法をそれぞれ用いた。各クラスターの平均値の相違は ANOVA により検定した。

シャノン Weiner の多様性指標は以下の (式 5-1) によって算出した。

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \cdot \log_2 P_i \quad (\text{式 5-1})$$

S は種数、 P_i は i 番目の種類の個体数が総個体数 N に占める割合を示し、 $P_i = n_i/N$ である。

5.3 結果および考察

5.3.1 ベントスの同定結果

各地点のベントス個体数を Table 5-1 に示す。個体数が最大となった地点は a-9 で 140 個体のうち 52 個体がウミニナ属で、48 個体がイカリナマコ科であった。種類数が最も多い地点は d-2 で 23 種認められた。35 地点のうち多くの調査地点で共通して現れた種はウミニナ属(15 地点)、アラムシロ(12 地点)、ホトトギスガイ(14 地点)、ゴカイ科(24 地点)、シロカネゴカイ科(17 地点)、ギボシイソメ科(19 地点)、イトゴカイ科(24 地点)、ヨコエビ亜目(18 地点)、イカリナマコ科(12 地点)であった。

5.3.2 サンプルング地点の分類

クラスター分析はベントスの出現数, 種数, シャノン Weiner の多様性指標を変数に用い, 35 地点は 5 つのクラスターに分類された(Fig. 5-2)。クラスター分析によって分類された各地点の位置関係を Fig. 5-3 に示す。Cluster 1-5 に分類された地点数はそれぞれ 5, 11, 2, 14, 3 地点で, 藤井川および三ツ口の干潟は同一の Cluster が近距離に位置している。黒瀬川は類似度が低い Cluster が不規則に分布しており, ベントスの生息条件が多様であると考えられる。ハチの干潟は類似度が比較的高い Cluster 1, 2 が分布しており, 堆積物や淡水の影響を受けることで生物相が変化すると考えられる。

5.3.3 各クラスターに分類された地点の特徴

各クラスターに分類された地点のベントスの出現数と種類数, ベントスの多様性指標と AMBI, 全キノン量と UQ/MK モル比, 土壌の強熱減量と含水率, 粒度組成および ORP を Fig. 5-4 に示す。Cluster 1, 2 はベントスの種数, 多様性指標が高く, AMBI は低いため, ベントスで見た底質環境としては他の Cluster と比較して良好であると分る。Cluster 1, 2 のキノン量はそれぞれ 0.418 ± 0.226 , 0.422 ± 0.328 $\mu\text{mol/kg-dry sediment}$ (mean \pm SD) であり, Cluster 3-5 と有意差が認められた($P < 0.05$)。このことから, 微生物量が豊富な地点はベントスの餌となる有機物が多く存在するため, 種数および多様性が高いと考えられる。Cluster 3 はベントスの出現数が 140 匹と他の Cluster よりも著しく高い値を示した($P < 0.05$)。多様性指数および AMBI はそれぞれ 1.8, 3.2 であり, ベントスで見た底質環境は Cluster 1, 2 に次いで良好であると判定される。一方で, Cluster 3 のキノン量は 0.046 ± 0.014 $\mu\text{mol/kg-dry sediment}$ で, Cluster 5 と同程度の低い値を示した。Cluster 3 の IL は 4.5 ± 1.2 % で最も高く, ORP も -128 ± 1.5 mV で低いことから, IL で示される有機物は微生物などの生物由来ではなく, ベントス等の排泄物や難分解性物質が堆積していると考えられる。Cluster 4, 5 はベントス個体数, 種類数が少なく, ベントスの多

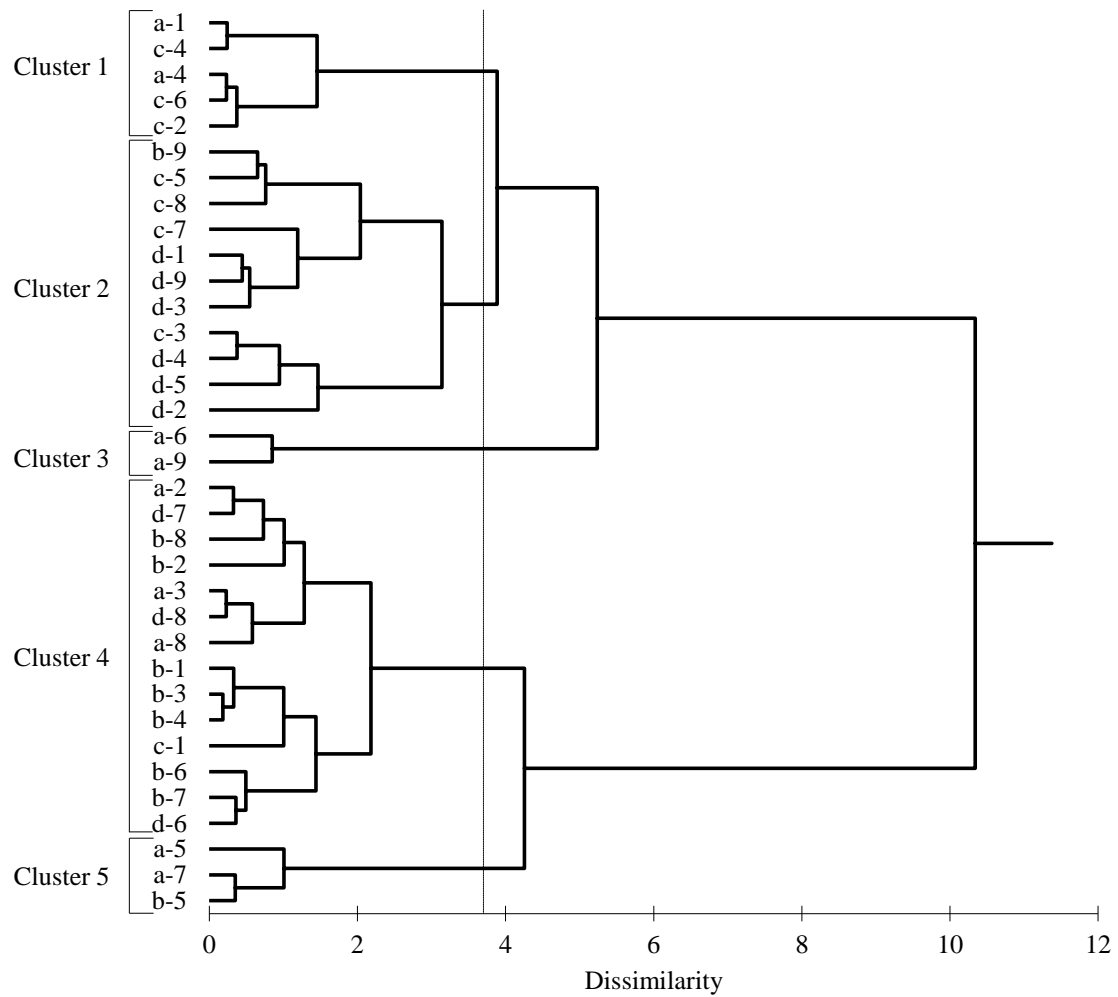


Fig. 5-2 標準化ユークリッド距離を用いたクラスター分析.

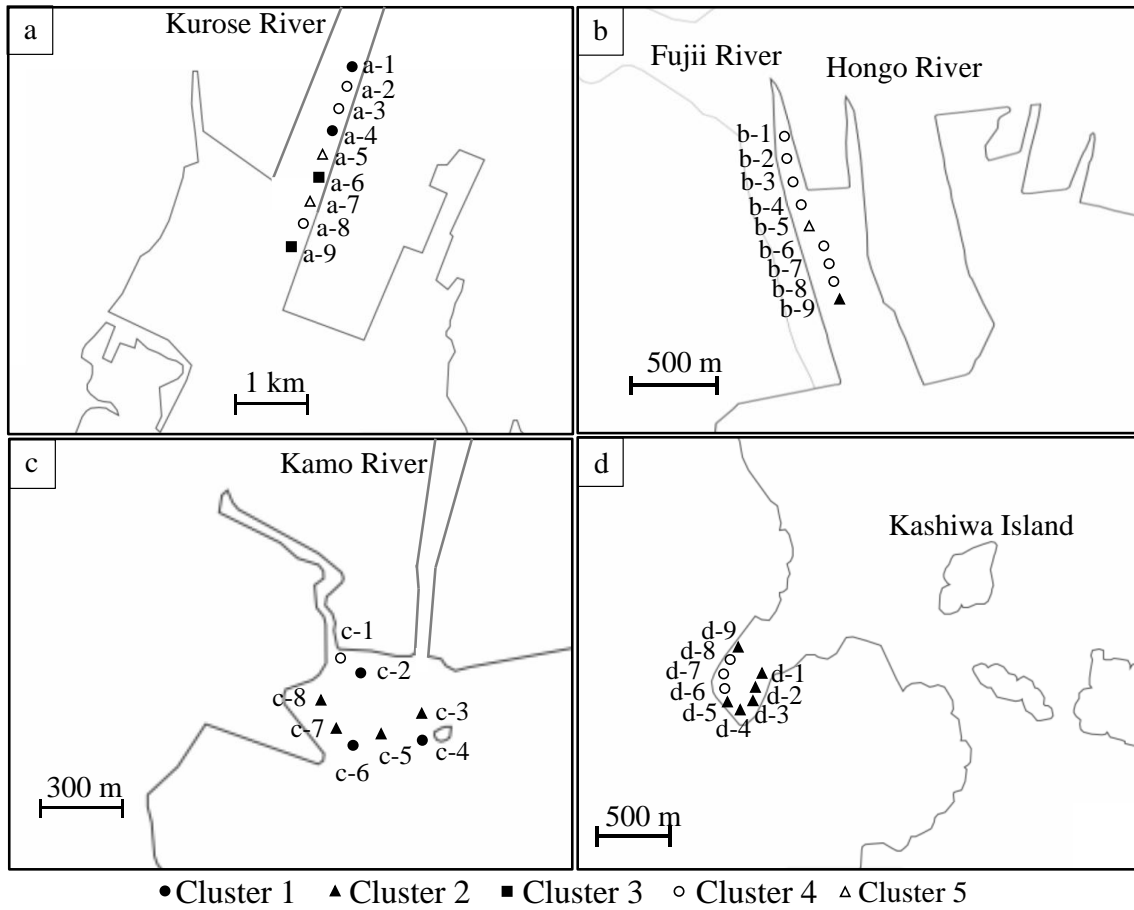


Fig. 5-3 各クラスターに分類された地点の位置 (黒瀬川 (a), 藤井川 (b), ハチ干潟 (c), 三ツ口干潟 (d)).

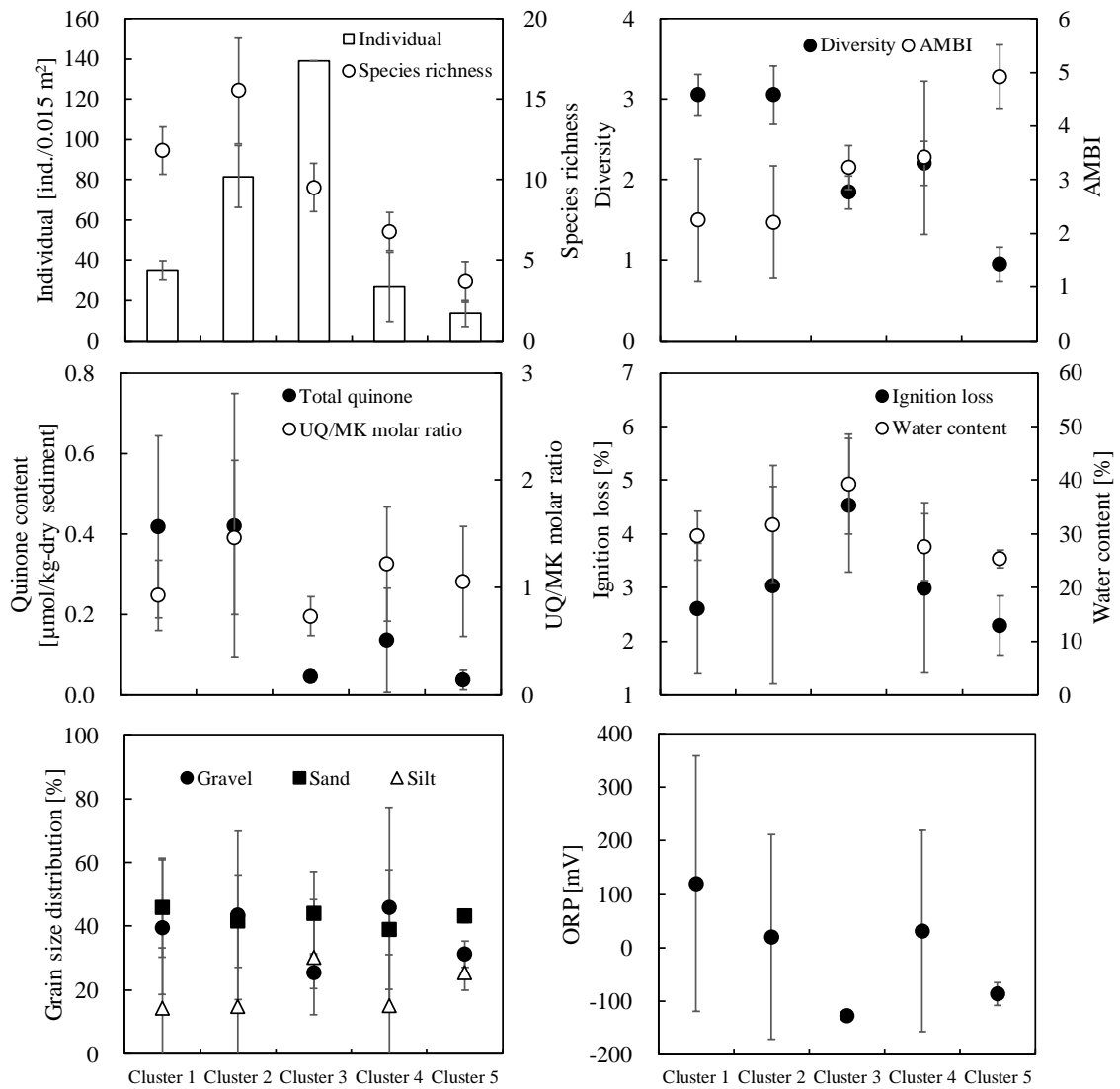


Fig. 5-4 各クラスターに分類された地点の特性

エラーバーは標準偏差を示す (SD).

様性指数, AMBI から見た底質環境は中程度の汚濁環境である。Cluster 4, 5 の IL および含水率は Cluster 1, 2 と同程度であるが, キノン量はそれぞれ 0.136 ± 0.129 , $0.037 \pm 0.024 \mu\text{mol/kg-dry sediment}$ で, Cluster 1, 2 と有意差が認められた ($P < 0.05$)。これは先と同様に, 微生物量が少ない地点はベントスの餌となる有機物が少ないためであると考えられる。

各クラスターに分類された地点のキノン組成を Fig. 5-5 に示す。UQ 種の第一優占種は全クラスターで UQ-8 であり, 第二優占種は Cluster 1, 5 で UQ-9, Cluster 2, 3, 4 で UQ-10 であった。MK 類の第一優占種は Cluster 1, 2, 3 で MK-7, Cluster 4, 5 で MK-6 であり, 第二優占種は Cluster 1, 2 で MK-5, Cluster 3 で MK-6, Cluster 4, 5 で MK-7 であった。UQ-8 は β -Proteobacteria および γ -Proteobacteria が多く含有するキノン種である(鈴木ら, 2001)。堆積物中の β -Proteobacteria および γ -Proteobacteria は, 主に *Nitrosomonas*(アンモニア酸化細菌)および *Thiobacillus*(硫黄酸化細菌)などが存在する。UQ-10 は α -Proteobacteria が多く含有するキノン種であり, 主に *Nitrobacter*, *Rhodomicrobium*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*(光合成細菌)である。これらの事実は, β -Proteobacteria および γ -Proteobacteria が全クラスターで支配的であり, α -Proteobacteria は Cluster 2, 3 で優占することを示している。硫酸塩還元細菌は, 主に MK-6 または MK-7 を有することから, 硫酸塩還元細菌が各クラスターにおいて支配的であったことを示している(Yamamoto et al., 1998)。MK-5 は紅色硫黄細菌である *Ectothiorhodospira* が含有しており, 硫化水素などの硫化物を必要とする細菌として知られている。そのため, Cluster 1, 2 は硫化物の割合が多い地点であると推察される。

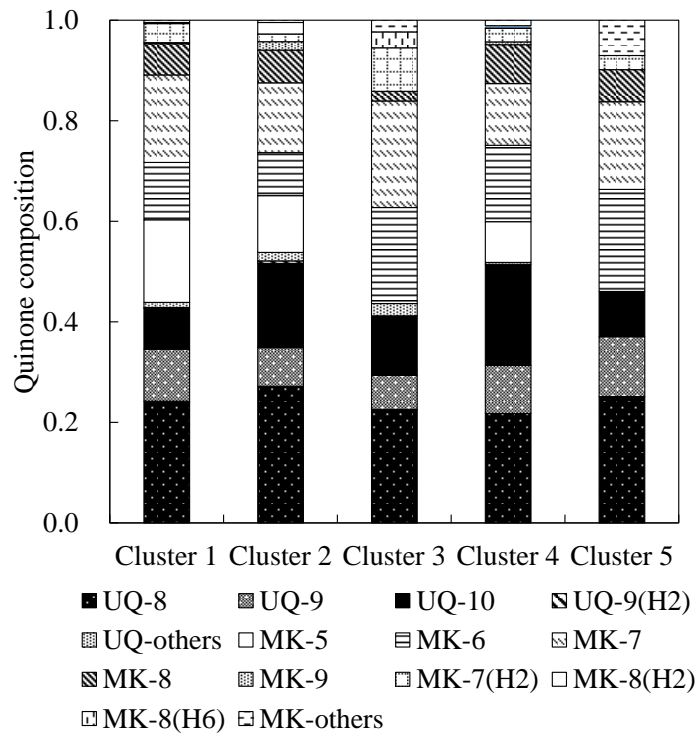


Fig. 5-5 各クラスターに分類された地点のキノン組成.

5.3.4 ベントスと微生物の関係

ベントスとキノンの相関を Table 5-2 に示す。ベントスの種数および多様性はキノン量、キノン種の多様性、キノン種数、 EQ と有意な相関が認められた($P < 0.05$)。これはベントスの種数、多様性は底質微生物に強く影響を受けていることを示している。微生物は有機物を他の生物が利用しやすい形に分解し、エネルギー供給に寄与している。このことから、干潟のように潮汐があり、著しく還元的な底質環境ではない場合(UQ/MK モル比: 0.35~2.24, 1.21 ± 0.60 (mean \pm SD))ではキノン量およびキノン種数が多い地点であるほど、生息できるベントスの種は多様であり、ベントスの生息環境は良好であると判断される。

ベントスの個体数、種数、多様性指標は底質の性質である ORP や IL との有意差な相関は認められなかった。一方で、UQ/MK モル比は ORP と IL 有意な相関が認められた

($P < 0.05$)。したがって、微生物はベントスよりも底質環境変化に敏感であり、ベントスから判定される環境汚濁度よりも、短い期間の環境変動を反映した結果を表すものと考えられる。

Table 5-2 ベントスとキノンの相関

		Benthos				Quinone				Sediment		
		Total individual	Species richness	Diversity	AMBI	Total quinone	UQ/MK molar ratio	Diversity	Species number	EQ	ORP	IL
Benthos	Total individual	-	0.60	0.31	-0.28	0.31	-0.01	0.29	0.21	0.02	-0.06	0.20
	Species richness	**	-	0.82	-0.25	0.43	0.31	0.40	0.51	-0.42	0.12	-0.08
	Diversity		**	-	-0.15	0.47	0.30	0.44	0.61	-0.59	0.21	-0.11
	AMBI				-	-0.33	0.21	-0.11	-0.02	-0.10	0.18	-0.36
Quinone	Total quinone		**	**	-	-	-0.11	0.47	0.49	-0.33	-0.06	0.05
	UQ/MK molar ratio						-	0.04	0.26	-0.47	0.39	-0.37
	Diversity		*	**		**		-	0.90	-0.33	0.11	-0.22
	Species number		**	**		**		**	-	-0.70	0.23	-0.38
Sediment	EQ		*	**			**	**	**	-	-0.34	0.47
	ORP						*			*	-	-0.45
	IL						*		*	**	**	-

Upper triangular : Correlation coefficient, Lower triangular : Probability (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

キノン量とベントスの出現数の関係を Fig. 5-6 に示す。

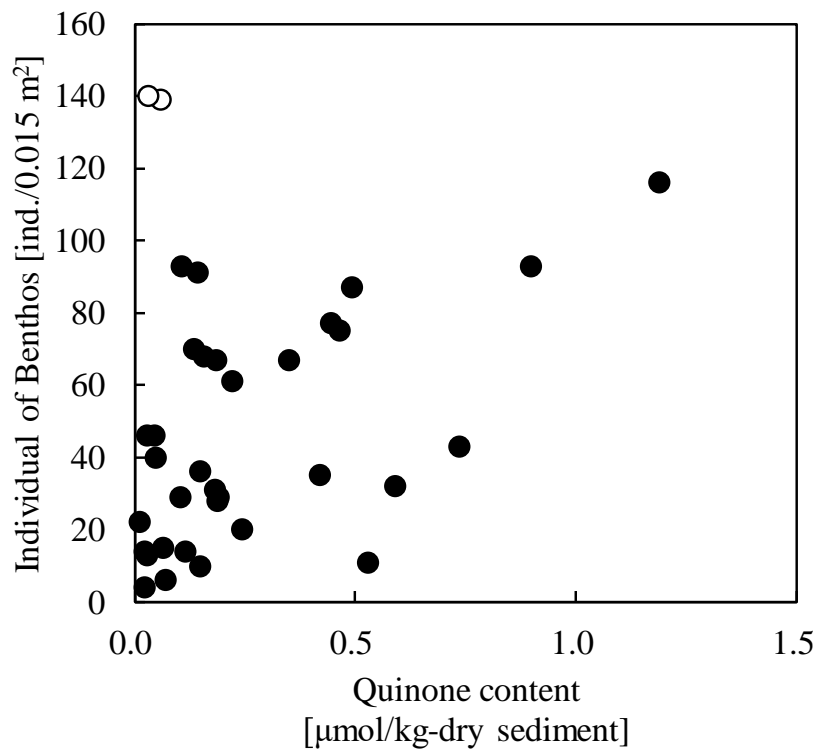


Fig. 5-6 キノン量とベントスの出現数の関係。

Fig. 5-6 の白丸はベントス出現数が最も多い a-6, a-9 で Cluster 3 に分類された地点である。この地点は特定のベントスが著しく多く確認された特異的な地点とみなし、この2点を除くと、ベントスとキノン量は正の相関が認められた。このことから、有機物の分解者である微生物が豊富な地点であるほど、堆積物食者であるベントスにとって良好な環境であり、生息数は増加すると考えられる。一方で、キノン量が少ない地点でもベントスの出現が認められることから、微生物の分解する有機物に依存しないろ過摂食などのベントスも存在することが考えられる。さらに、ベントスが著しく増加した地点では底質中の有機物がベントスに捕食され、底質中の微生物が一時的に減少していることも考えられる。

AMBI はベントスに汚濁耐性区分(EG)を割り振り、その存在割合で底質環境を定量的に評価する指標である。AMBI は同一地点で個体数が 6 匹以上、種数が 3 種以上で計算することが推奨されている。本調査地点で上記の条件を適用して AMBI を計算した結果、35 地点のうち、26 地点が該当した。AMBI によって 26 地点は high, good, moderate にそれぞれ 3, 21, 2 地点分類され、ほとんどが good であった(Table 1-2)。high, good, moderate に分類された地点の全キノン量はそれぞれ、0.228, 0.331, 0.163 $\mu\text{mol/kg}$ で good に分類される地点のキノン量が最も高くなった。また、UQ/MK モル比はそれぞれ 1.17, 1.08, 0.81 であった。このことから、干潟では好気性菌が多く含有する UQ の割合が高い地点ほど有機物汚濁は低いと判断される。

5.3.5 嫌気的環境における生物指標

中海の底質は嫌気的環境であり(3章参照)、各地点の ORP の平均値は $-294 \pm 98 \text{ mV}$ で、瀬戸内($21 \pm 193 \text{ mV}$)と比較して著しく低い。このような嫌気的環境ではベントスの出現数が夏季に著しく低下する(倉田ら, 2018)。倉田らのベントス調査結果に基づき、3章で調査した 12 地点と照合すると、ベントスの出現が認められる地点は 7 地点で米子湾

周辺、中海西側に集中した。さらに、4地点は多毛類のみの出現種であった。そのため、中海の底質環境をベントスで評価する場合、ベントスの出現が認められないと一律に判定される。一方、キノプロファイ法を用いた微生物叢解析では、キノン量、キノン種、UQ/M モル比を用いて、ベントスが生息できない環境についても、環境の状態を評価することが可能である。このことから、キノプロファイ法を用いた環境評価手法は汚濁が進行した海域においても有用であると考えられる。

5.4 結論

ベントスと底質のキノプロファイルの関係について調査した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 干潟のように潮汐があり、著しく還元的な底質環境ではない場合(UQ/MK モル比: 0.35~2.24, 1.21 ± 0.60 (mean \pm SD))ではベントスの個体数、種数、多様性指標はキノン量、種数、多様性と有意な相関が認められた。
- 2) 有機物汚濁への耐性を基に分類したベントスを用いて底質環境を評価する AMBI は好気性菌が多く含有する UQ が多い地点で低下した。干潟では好気性菌が優占するほど有機物汚濁に敏感なベントスの出現数が増加する。

引用文献

- Hasanudin U., Kunihiro T., Fujita M., Hu H., Fujie K., Suzuki T. (2004) The Contribution of Clams on Tidal Flat Purification Capacity. *Journal of Water and Environment Technology*, 2, 2, 83-90.
- Jayaraj K.A., Sheeba P., Jacob J., Revichandran C., Arun P.K., Praseeda K.S., Nisha K.A.,

- Rasheed K.A. (2008) Response of infaunal macrobenthos to the sediment granulometry in a tropical continental margin – southwest coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77, 743-756.
- Kunihiro T., Miyazaki T., Uramoto Y., Kinoshita K., Inoue A., Tamaki S., Hama D., Tsutsumi H., Ohwada K. (2008) The succession of microbial community in the organic rich fish-farm sediment during bioremediation by introducing artificially mass-cultured colonies of a small polychaete, *Capitella* sp. I. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 68-77.
- 倉田健悟, 園田武, 山口啓子, 瀬戸浩二 (2018) 2016 年夏の中海における底生生物相. *LAGUNA*, 24, 49-63.
- 西村三郎 (1992) 原色検索日本海岸動物図鑑I. 保育社.
- 西村三郎 (1995) 原色検索日本海岸動物図鑑II. 保育社.
- 奥谷喬司 (2000) 日本近海産貝類図鑑. 東海大学出版社.
- 大谷壮介, 上月康則, 倉田健悟, 仲井薫史, 村上任士 (2007) 河口干潟潮間帯の物理的な底質環境と底生生物群集との関係, *土木学会論文集 G*, 63, 4, 195-205.
- 鈴木健一郎, 平石明, 横田明(2001)微生物の分類・同定実験法-分子遺伝学・分子生物学的手法を中心に-. シュプリンガー・ジャパン株式会社, 172-173.
- Yamamoto K., Murakami R., Takamura Y. (1988) Isoprenoid quinone, cellular fatty acid composition and diaminopimelic acid isomers of newly classified thermophilic anaerobic Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 351-358.

第6章 総括

本論文では、物理化学的な指標と生物指標の双方から水環境を評価し、総合的な底質環境評価手法について提示することを目的に、異なる水域を多地点調査し、微生物叢・量に変化をもたらす因子について考察した。各章のまとめを以下に示す。

1章は微生物叢解析手法についてキノンプロファイル法の有用性、利用事例、ベントスを用いた生物指標の有用性についてレビューを行った。キノンプロファイルに関する先行研究と本研究の目的および意義について述べた。

2章は瀬戸内海の底質と微生物叢の関係について評価した。干潟では好氣的・嫌氣的な条件によって異なる生物反応を経て、物質循環に寄与している。したがって、生息する微生物の種類、その割合は環境条件によって大きく異なる。この環境条件は様々な因子が複雑に影響するものであると考えられるが、底質中に蓄積された水質や海流の影響などの情報と微生物叢は非常に深く関連していると予想される。そのため、瀬戸内海の4干潟の合計35地点サンプリングを行い、底質と微生物叢の関係について評価した。結果、調査した35地点は強熱減量(IL)、礫含有率、砂含有率が支配する4つのクラスターに分類され、各クラスターの堆積物の物理化学的パラメータはキノン量およびキノン組成を決める因子であることが明らかになった。好気性菌と嫌気性菌の割合を示すユビキノン(UQ)/メナキノン(MK)モル比は底質汚濁の程度を示すILおよび酸化還元電位(ORP)と強い相関が認められた。このことから、UQ/MKモル比は底質の汚濁状況を把握する指標となることが示唆される結果となった。各クラスターでキノン優占種が異なることから、干潟の堆積物中の微生物群集構造の分布は、堆積物の物理化学的特徴によって概ね説明できることが明らかになった。

3章は中海の底質と微生物叢の関係について評価した。中海は干潟のように干満の差で底質が干出せず、強固な塩分成層が形成されているため、底層水の貧酸素化が生じやすい特徴を有する。そのため、底質の有機物汚濁が干潟よりも進行している中海で2章と同様に底質と微生物叢の関係について評価した。その結果、中海では観測地点、時期を問わず、そのほとんどでMK量がUQ量を上回っており、中海湖底は嫌気性菌が優占する環境であることが明らかになった。全キノン量は、外海水の流入する境水道から離れるにしたがって多くなる傾向があり、中海南東部の米子湾周辺が最も多い結果となった。中海の全キノン量はUQ/MKモル比、ORP、IL、含水率、キノン種数およびキノンの均一性指標(EQ)に対して有意な相関が認められた。中海ではMK類が優占する環境であるため、ILおよび全キノン量が高い地点はUQ/MKモル比を下げ、ORPは負の値を示す傾向にあることが明らかになった。各クラスターのUQ類の優占種はβ-Proteobacteriaに特徴的なキノン種であるUQ-8、MK類の優占種は硫酸還元菌が優占するMK-6、7が多く、多くの地点で優占した。このことから、中海では硫黄循環に関係する細菌が多く、中海では多くの地点でこれらの細菌が優占することが明らかになった。

4章は水質変化と微生物叢の関係について評価した。特定の汚濁物質に対する微生物叢変化を知ることは、汚濁物質や汚濁源を特定することも可能となるため、水質と微生物叢の関係性を評価した。調査対象は農業集落排水処理施設の処理水流入河川とした。その結果、放流先の用水路の水質に対して強い影響を及ぼした農業集落排水処理水の水質は溶存態窒素(DTN)濃度と溶存態リン(DTP)濃度で、平均値としてそれぞれ放流先の用水路よりも7.33 mg/L(8.7倍)、1.83 mg/L(17倍)高い値を示した。DTN、DTPと強い相関を示したキノン種はUQ-8、MK-8であった。このことから、栄養塩濃度が高い農業集落排水処理水放流による影響は用水路内の微生物叢を変化させ、特に脱窒菌の増加に寄与していることが明らかになった。

5章はベントスと微生物叢の関係について評価した。ベントスと微生物は相互に作用することで自然浄化に寄与していると考えられるが、自然環境中のベントスと微生物の関係について評価した事例は少ない。そのため、瀬戸内海のベントスと微生物叢の特徴を評価した結果、ベントスの個体数、種数、多様性指標はキノン量、種数、多様性と有意な相関が認められた。このことから、微生物が豊富な地点であるほど、ベントスにとって良好な環境であり、微生物が他の生物に利用可能な物質に変換することで干潟の物質循環に寄与していることが示唆される結果となった。一方で、ベントス個体数、種数、多様性指標は底質のILおよびORPと有意な相関が認められなかった。そのため、微生物はベントスおよび底質の物理化学的パラメータのどちらとも関係が認められ、ベントスが生息できない底質環境も評価することが可能であることが明らかになった。有機物汚濁への耐性を基に分類したベントスを用いて底質環境を評価するAMBIは好気性菌が多く含有するUQが多い地点で低下した。そのため、干潟では好気性菌が優占するほど有機物汚濁に敏感なベントスの出現数が増加することが明らかになった。

以上の結果から、底質のキノン量、キノン種、UQ/MKモル比は様々な物理化学的パラメータと関連しているため、キノンプロファイル結果により、過去の水質変化を反映した評価が可能であることが示唆される結果となった。

今後は微生物叢の季節的な変動や堆積物の深さ方向の変化など、詳細なデータを蓄積することにより、微生物叢解析が様々な環境下における汚濁度を評価する手法の一つになることが期待される。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻をいただきました、日本大学文理学部地球科学科の竹村貴人教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました日本大学文理学部化学科の藤森裕基教授、日本大学生産工学部環境安全工学科武村武教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たり終始御懇切な指導いただきました広島大学環境安全センターの西嶋渉教授、梅原亮助教に厚くお礼申し上げます。また、研究指導に貴重なご助言をいただきました横浜国立大学先端科学高等研究院の藤江幸一教授、龍谷大学理工学部環境ソリューション工学科の奥田哲士准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験設備の準備やサンプリングにも同行いただき、暖かいご指導をいただきました米子工業高等専門学校物質工学科の青木薫教授、伊達勇介准教授、須崎萌実助教、同技術教育支援センターの日野英壺技術専門職員、宇部工業高等専門学校物質工学科中野陽一教授に深謝いたします。

干潟のサンプリングやベントスの同定、土質分析にご協力いただきました国土技術政策総合研究所沿岸海洋・防災研究部海洋環境・危機管理研究室の秋山吉寛研究官、神島工業株式会社の矢野ひとみ氏に厚くお礼申し上げます。

米子工業高等専門学校物質工学科青木・伊達・藤井・須崎研究室に在籍された宮川龍馬氏、高塚郁也氏をはじめ多くの学生諸君に深く感謝いたします。

最後に、これまで私を支え続けてくれた家族に心から感謝します。

2020年3月 藤井貴敏

付録

Table A-1 農業集落排水周辺の土壌試料中のキノン量測定結果 [$\mu\text{mol/kg-dry sediment}$]

(UQ-others および MK-others は全キノン量の 5%未満のキノン種をまとめて表示)

Quinone species	St. A1		St. A2		St. A3		St. B1		St. B2		St. B3		St. B4		St. C1	
	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep	Feb	Sep
UQ-8	0.026	0.413	0.191	0.734	0.010	0.044	0.064	0.002	0.005	0.023	0.007	0.011	0.013	0.006	0.006	0.003
UQ-9	0.010	0.051	0.014	0.030	0.002	0.033	0.006	0.001	0.002	0.001	0.000	0.001	0.003	0.000	0.002	-
UQ-10	0.049	0.064	0.081	0.071	0.009	0.018	0.039	0.009	0.013	0.006	0.002	0.007	0.007	0.003	0.002	0.007
UQ-others	-	-	0.005	-	0.001	-	0.001	0.001	-	-	-	0.000	0.002	0.000	-	-
MK-6	0.016	0.032	0.020	-	0.005	0.001	0.005	0.001	0.004	0.003	0.002	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001
MK-7	0.017	0.041	0.034	0.010	0.005	0.002	0.014	0.001	0.006	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.000	0.001
MK-8	0.053	0.063	0.084	0.104	0.031	0.029	0.030	0.002	0.017	0.020	0.009	0.009	0.010	0.007	0.001	0.006
MK-10	-	-	-	0.000	-	-	0.001	-	0.004	-	-	0.001	-	0.000	-	0.001
MK-8(H2)	0.012	0.061	0.003	0.088	0.002	0.008	0.007	0.001	0.001	-	0.001	0.004	0.001	0.000	-	0.000
MK-9(H8)	-	-	0.000	0.016	-	-	-	-	-	-	-	0.000	-	0.000	0.003	0.000
MK-others	0.018	0.007	0.033	0.001	0.004	0.000	-	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000	0.003	0.000	0.000	-
Total quinone	0.203	0.732	0.466	1.055	0.069	0.136	0.167	0.019	0.054	0.057	0.026	0.037	0.046	0.019	0.016	0.019
TotalUQ	0.085	0.528	0.292	0.835	0.022	0.094	0.110	0.013	0.020	0.030	0.009	0.019	0.025	0.009	0.010	0.010
TotalMK	0.117	0.204	0.174	0.219	0.047	0.042	0.056	0.006	0.034	0.026	0.017	0.019	0.021	0.010	0.006	0.009
UQ/MK molar ratio	0.728	2.586	1.677	3.807	0.477	2.265	1.949	1.996	0.590	1.153	0.555	1.013	1.184	0.945	1.726	1.097

Table A-2 農業集落排水周辺の水中浮遊物質中のキノン量測定結果 [nmol/L] (UQ-

others および MK-others は全キノン量の 5%未満のキノン種をまとめて表示)

Quinone species	St. A1	TW	St. A3	St. B1	St. B2	St. B3	St. B4	St. C1
UQ-8	0.166	0.124	0.177	0.230	0.242	0.231	0.249	0.199
UQ-9	0.010	0.021	0.043	0.020	0.029	0.017	0.013	0.007
UQ-10	0.030	0.068	0.124	0.058	0.136	0.211	0.065	0.050
UQ-others	0.009	0.001	0.021	0.029	0.022	0.008	0.011	0.006
MK-6	0.012	0.026	0.032	0.014	0.056	0.032	0.023	0.023
MK-7	0.025	0.004	0.024	0.028	0.037	0.022	0.036	0.021
MK-8	0.017	0.007	0.013	0.018	0.024	0.014	0.018	0.009
MK-8(H2)	0.020	-	0.030	0.031	0.077	0.035	0.022	0.005
MK-others	0.004	0.010	0.034	0.001	0.029	0.013	0.015	0.005
Total quinone	0.294	0.260	0.498	0.430	0.652	0.583	0.451	0.326