

八代海の環境改善に向けた底質部の微生物群集解析

渡邊 千夏¹・森村 茂¹・中野 光暁¹・太田 広人¹・木田 建次¹・
増田 龍哉²・嶋永 元裕³・逸見 泰久³・滝川 清³

¹熊本大学大学院自然科学研究科・²熊本大学大学院先端機構・³熊本大学沿岸域環境科学教育研究センター
〒860-8555 熊本市黒髪 2-39-1 電話: 096-342-3669
Fax: 096-342-3669 E-mail: morimura@gpo.kumamoto-u.ac.jp

近年、有明海・八代海の環境悪化が問題となっている。環境評価の指標として二枚貝等の底生生物を指標とした報告があるが、嫌気環境下でも生息し窒素や硫黄などの物質循環のカギとなる微生物を対象とした解析を行うことで、より詳細な環境変化を解析できると考えられる。われわれは、有明海・八代海の干潟や海域底泥中の微生物に着目し、16S rRNA 遺伝子および窒素代謝や硫黄代謝に関与する機能性遺伝子を標的とした微生物群集解析を行うことで底質部の環境を評価し、悪化しつつある環境の改善策を検討するための指標とする研究を行っている。

1. はじめに

有明海・八代海は日本最大の干潟を有する海域であり、干潟は環境浄化に大きく寄与することが知られている[1]。微生物は自然環境における重要な分解者であり、好気的環境と嫌気的環境が複雑に変化する干潟においては、好気性微生物と嫌気性微生物が協力して有機物を分解することで環境浄化に寄与していると考えられる。したがって、干潟の浄化能力の低下は、好気性細菌と嫌気性細菌のバランスも含めた微生物の代謝バランスの変化として検出することが可能である。われわれは、最初に自然環境が残っている干潟の微生物群集解析を行い、浄化能の優れた干潟の代謝バランスの検討を行った[2]。得られた結果に基づき、浄化能が低下した干潟や海域底質に対して実施した改善策[3]について、浄化能の優れた代謝バランスに向かって回復しているか否かを診断できるようにすることを第一の目的としている。

本トピックスの対象である八代海は、日本で最も閉鎖性が高い海域である。閉鎖性水域では水質が悪化すると赤潮になりやすく、養殖業などに被害をもたらす。海洋においては上述した干潟あるいは藻場などが天然の浄水場の役割を果たしている。八代海における湾奥部、湾央部、湾口部の水質測定点で COD の経年変化を比較すると、湾口部では概ね環境基準を達成しているが、湾奥部および湾央部では環境基準を超える年度が見受けられる。また、1990 年代後半からは赤潮発生件

数も増加しており、それに対応するように 1990 年後半あたりから八代海における漁獲量が減少し、大きな問題となっている。そこで、学術的な調査研究が有明海と比較して不十分な八代海について、微生物学的見地から閉鎖性海域環境の改善技術を提案することを最終目的とし、微生物の 16S rRNA 遺伝子領域を標的とした分子生物学的手法を用いて八代海底質部の微生物叢を解析することにより、その現状把握を行った。

2. 解析方法

(1) サンプル

八代海湾奥部北岸の複数地点でサンプリングした底泥の表層部を解析に使用した。

(2) 調査内容および底質環境特性

底質環境特性と微生物群集の関係を調べるために、微生物だけでなく、底泥の粒度組成、強熱減量、CHN 組成および水質の溶存酸素(DO)濃度、塩分濃度、pH も測定した。底泥表層部は、採取後クーラーボックスで氷冷したものを試験室に持ち帰り、分析を行なった。粒径分布は HORIBA 社製レーザ回折／散乱式粒度分布測定装置を用いて測定した。

(3) 微生物群集解析

底泥サンプルから DNA SPIN Kit for Soil (Q-BIO gene 社)を用いて全 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳

型とし、本トピックスのデータについては、すべての種類の真正細菌を標的とした 16S rRNA 遺伝子を対象とするプライマーセット (Eu27F, 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3' / Eu518R, 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG G-3') を用いて PCR 増幅を行った。得られた 16S rRNA 遺伝子断片をライゲーション反応によりベクター DNA に挿入した後、大腸菌に形質転換を行って遺伝子ライブラリーを構築した。16S rRNA 遺伝子ライブラリーの中から任意に選択したクローンの塩基配列を決定し、ホモロジー検索および系統樹解析を行うことで、生息する微生物群集を推定した。

3. 結果と考察

(1) ホモロジー検索

ホモロジー検索の結果、嫌気性微生物に属する細菌では *Deltaproteobacteria* 綱に近縁なクローンが、好気性微生物では *Gammaproteobacteria* 綱に近縁なクローンが多く検出された。八代海湾奥部北岸の離れた地点でサンプリングしたどの底泥においても門および綱について同じような割合で近縁種が存在する結果となり、サンプリング地点の違いによる微生物叢の差異は認められなかった。

(2) 系統樹解析による微生物叢の推定

今回多くのクローンが検出された *Deltaproteobacteria* 綱に注目した系統樹を作成した。*Deltaproteobacteria* 綱には嫌気的な微生物の代表である硫酸還元菌が多く属している。作成した系統樹から、今回 *Deltaproteobacteria* 綱に分類されたクローンのほとんどが硫酸還元菌の近縁種であると判断された。また、*Gammaproteobacteria* 綱に注目した系統樹も作成した結果、今回検出されたクローンは環境サンプル中で見出された uncultured bacteria に近縁と判断されたものが非常に多かった。

4. 今後の展望

われわれは、八代海底質部の解析を行う前に、自然環境が残っている干潟底質部の微生物群集解析を行っている。砂質干潟の代表として白川河口干潟を、泥質干潟の代表として緑川河口干潟を選択し、表層 5 cm の底泥をサンプルとして解析を行った。土壌環境特性において、白川は緑川と比較して粒径が大きく好気的で有機物量は少なかった。一方、塩基配列データに基づいてホモロジー検索を行い、微生物を門と綱レベルで分類した結果、白川は好気的な微生物の割合が多く、

緑川は好気的な微生物の割合と嫌気的な微生物の割合が同程度となり、土壌環境特性を反映していると考えられた。両河口干潟ともに多種の微生物が検出され、例えば嫌気性微生物に関しては、*Deltaproteobacteria* 綱に属する硫酸還元菌、*Chloroflexi* 門や *Firmicutes* 門に属する偏性嫌気性菌や通性嫌気性菌などが検出された。好気性微生物に関しては、主に通性嫌気性の紅色非硫黄光合成細菌と絶対好気性有機栄養細菌から構成される *Alphaproteobacteria* 綱、好気性菌を多く含む *Actinobacteria* 門に近縁なクローンなどが検出された。さらに全クローンを対象として系統樹を作成した結果、*Firmicutes* 門に属する微生物は緑川に多く検出され、白川では少ないことが確認できた。*Deltaproteobacteria* 綱の系統樹解析では、緑川で検出された微生物は *Desulfobulbus* 属などの硫酸還元菌に近縁な微生物に集中していたが、白川で検出された微生物については *Geothermobacter* 属など硫酸還元菌とは異なるグループに近縁な微生物も少なくないことがわかった。

今回の八代海底質部の解析では *Deltaproteobacteria* 綱および *Gammaproteobacteria* 綱に近縁なクローンが多く検出され、白川・緑川河口干潟と比較して限定された微生物群集構造を形成していると考えられた。潮間帯に位置する河口干潟底質は潮の満ち引きによって酸素や太陽光との接触などの環境変化が大きいが、八代海底質部では完全に潮が引くことはないために、河口干潟と比較して微生物群集構造が比較的単純であったと推測された。自然が残っている／あるいは環境が悪化した様々な底質環境から得たサンプルの微生物群集構造解析データを増やすことによって、より詳細な比較と環境変化の理解が可能になると考える。

窒素循環および硫黄循環は、好気／嫌気環境が共存する中で微生物の関与があってはじめて成立する。八代海のような閉鎖性海域の環境においては貧酸素化が問題となることから、今後は、窒素循環および硫黄循環に関連する機能性遺伝子に着目したクローン解析結果も合わせて考察することで物質循環の状況を推定し、本来のバランスがとれた物質循環に戻すための改善策を考えていきたい。

参考文献

- [1] 鈴木輝明: 地球環境, vol.11, 161-171 (2006)
- [2] 中野光暁 *et al.*: 海岸工学論文集, vol.B2-65, 1091-1095 (2009)
- [3] 増田龍哉 *et al.*: 海岸工学論文集, vol.54, 1131-1135 (2007)