

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292114

研究課題名(和文) 貧酸素化した内湾においてイオウ酸化細菌が担う青潮抑制効果と一次生産機能の評価

研究課題名(英文) Ecological studies on sulfur bacteria in a hypoxic inner bay with special emphasis on their trophic fate

研究代表者

和田 実 (WADA, Minoru)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：70292860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：2013年から2015年にかけて湾の中央部は7-9月上旬に貧酸素化し、8月には無酸素水塊も出現したが、海底におけるイオウ細菌を含む微生物マットの発達状況は年によって大きく異なった。海底表層の細菌群集はプロテオバクテリア門が恒常的に過半数を占め、イオウ循環に関わるDesulfobacteralesや、Thiotrichales等が優占していた。貧酸素化の進行に伴い細菌捕食性の嫌気性微小鞭毛虫や貧酸素耐性の強い線虫類を介した細菌バイオマスの利用が促進される可能性が示めされた。

研究成果の概要(英文)：During 2013 through 2015, hypoxia in the center of Omura Bay has consistently developed in summer (July through September). Although the extent to which microbial mat composed of sulfur bacteria developed on the bottom sediment varied significantly year to year, Proteobacteria contributed to the majority of the bacterial community composition in the upper surface layer of the sediment. Bacterial groups involved in sulfur cycle such as Desulfobacterales and Thiotrichales were significantly dominant throughout the hypoxic period. Changes in abundance and metabolic activities of both sulfur reducing and sulfur oxidizing bacteria seemed to be driven by the extent of bottom hypoxia. Besides, grazing on bacteria by anaerobic heterotrophic nanoflagellates as well as low-oxygen tolerant benthic nematodes may have exerted fundamental top-down control over the sediment bacterial population during the period of hypoxia in Omura Bay.

研究分野：海洋微生物生態学

キーワード：貧酸素水塊 閉鎖性内湾 微生物群集

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界の沿岸域における貧酸素化は、近年、長期化と広域化の傾向を強め、閉鎖性内湾では無酸素水塊も頻繁に形成される。こうした海の酸素欠乏は、海底堆積物中の硫酸還元細菌の働きを刺激するため、その代謝産物として毒性の強い硫化水素が多量に生成される。水中に移行した過剰な硫化物が湧昇すると青潮となり、魚介類に大きな被害をもたらすが、硫化水素が海底付近でイオウ酸化細菌によって酸化される場合には、青潮の発生は抑制される。さらに、イオウ酸化細菌の多くは独立栄養性で二酸化炭素を取り込み有機物に変換する能力(炭酸固定能)を持つことから、貧酸素化した海洋環境における一次生産者としての意義も大きい。

(2) 長崎県の大村湾は閉鎖性が極めて強い内湾だが、底生の水産資源を対象とした漁業が盛んである。しかし、毎年夏季には中央部付近から貧酸素化が進行して海底(水深20m)付近が無酸素状態に陥り、湾全体も貧酸素化するため、漁業活動は大きく制限される。これまでの研究により、夏季の大村湾海底および水柱には嫌気性の光合成イオウ酸化細菌が広く分布すること(Fujita and Zenitani 1975)、湾中央部の堆積物直上水は極めて短時間に無酸素化して、嫌気細菌バイオフィームが形成されること(Wada et al 2012)などが示されているが、2012年8月の潜水調査によって無酸素化した海底上に大規模な微生物マットが発見された(下写真)。



大村湾海底(水深20m)に広がる微生物マット
(2012年8月24日撮影)

さらに同年9月には微生物マット由来と思われる多量の懸濁態有機物が南東岸の藻場でも確認され、微生物マットが大村湾全体の有機物動態に関与していることが示唆された。

このような背景のもと、本研究では、微生物生態学、海洋生態学、生物地球化学などの専門領域を統合した学際的・機能的な研究グループを組織し、閉鎖性内湾の典型例の一つである大村湾において、貧酸素化に伴う海底の微生物群集の動態およびその生態学的意義の解明に取り組むことを計画した。

2. 研究の目的

夏季に底層水の貧酸素化が恒常的に発達する大村湾で、潜水調査を含めた現場観測と室内実験を組み合わせ、微生物マットの形成、拡大、および消失過程を追跡するとともに、分子生物学的手法と微生物学的手法を用いて、マット内の微生物群集構造およびイオウの酸化還元(イオウ循環)の動態を解き明かし、イオウ酸化細菌群集の一次生産能力ならびに、ベントスおよび動物プランクトンなどの高次の捕食者に対する餌資源としての価値を評価することを目指した。

3. 研究の方法

夏季を中心に大村湾中央部の海底付近の水質観測および潜水による底質観測から、貧酸素化の進行過程を把握し、堆積物微生物群集の呼吸活性と細菌群集構造(和田)ならびにメイオベントス群集構造(嶋永)をそれぞれ明らかにした。また、貧酸素化した海底付近から原生生物(近藤)およびイオウ酸化細菌(和田)の分離・培養を実施し、培養したイオウ酸化細菌による高次捕食者への有機物転送の可能性を実験的に示す(梅澤)とともに、湾東部の藻場における溶存酸素濃度の継続的な観測(西原)を実施して、湾中央部の貧酸素化が縁辺部へ及ぼす可能性を評価した。以上の観測ならびに各種実験の結果を総合することによって、大村湾の貧酸素化に伴う海底微生物群集構造ならびに生態学的機能の動態について取りまとめた。

なお、上記の調査・実験に関する方法の詳細については、それぞれの研究成果と合わせて以下に記載した。

4. 研究成果

(1) 貧酸素化の進行過程と海底の微生物マットの動態

2013年から2015年の夏季(7月から9月)に、大村湾中央部の海底付近(水深18m以深)の溶存酸素濃度は4mg/L未満の貧酸素状態となったが、9月の中旬以降には上昇し、再び4mg/L以上となり、多くの海洋生物の生存にとって支障がない通常の酸素濃度レベルに回復した。この溶存酸素濃度の変動パターンを詳細にみると貧酸素化と回復のタイミングは各年で異なり、溶存酸素濃度が4mg/L未満となる期間は、2013年は73日、2014年は89日、2015年は86日間であった。一方、海底における微生物群集マットは、2013年には確認できなかったが、2014年および2015年の8月上旬には、白色の繊維状イオウ細菌のマットが定点付近を覆っていることを目視確認した。以上の観測から、6月下旬から9月にかけて大村湾海底付近における溶存酸素濃度が4mg/L未満となる期間が合計で90日程度に達するとき、イオウ酸化細菌による

マット形成が顕著に亢進すると考えられ、海底付近の底層水塊の滞留時間とイオウ酸化細菌のマット形成との密接な関連が示唆された。

貧酸素期の湾中央部で観察されたイオウ酸化細菌のマット形成を実験的に再現する試みとして、貧酸素が解消した 10 月に大村湾中央部で採取した海底堆積物試料を、硫化ナトリウム、酵母抽出物および鰹抽出物を混合した高濃度の固形有機物上に重層し、静置培養したところ、短期間（3 日以内）に堆積物試料の表面に白色の微生物マットが形成された。この結果は、湾中央部の堆積物上のイオウ酸化細菌によるマット形成にとって、堆積物深層から表層にむかう硫化物などの還元性物質の溶出が重要な因子であることを示唆している。

（ 2 ） 海底および微生物マットの細菌群集構造解析

2014 年および 2015 年に湾中央で観察・採取された微生物マットよりゲノム DNA を抽出し、細菌の 16SrRNA 遺伝子の大量配列解析をおこなったところ、門（Phylum）レベルでは、プロテオバクテリア由来の配列が常に過半数をしめる最も優占したグループであり、その次にイオウ酸化能力を持つ Verrucomicrobia の細菌群に由来する配列が多く見られた。綱（Class）レベルでは、プロテオバクテリアのほぼ半数近くの配列が、ガンマグループとデルタグループで占められていた。目（Order）レベルではデルタプロテオバクテリアに属す硫酸還元細菌 Desulfobacterales や、ガンマプロテオバクテリアに属す Xanthomonadales、イオウ酸化細菌 Thiotrichales 等が優占していた。貧酸素期の湾中央部海底表層における細菌群集構造は通常酸素期と有意に異なるとともに、縁辺部とも明瞭に異なることが示された。湾中央の海底表層で優占する硫酸還元細菌は、底層水中の貧酸素化の進行初期段階で細胞数が増加するものの、後期では漸減することが定量 PCR によって確かめられた。

湾中央の浮遊細菌群集について同様の遺伝子配列解析を行ったところ、水柱には表層から海底直上にいたるまでアルファプロテオバクテリアに属す細菌群が最も優占し、多様なイオウ酸化細菌群が存在していることが明らかとなった。また、水柱で優占的なイオウ酸化細菌の多くが、表層よりも海底から 10m 以深の中層から底層にかけて相対的に多く出現し、貧酸素水塊形成前から存在量が増加することが示唆された。

（ 3 ） 海底メイオベントス群集構造解析

ベントス（底生生物）は体サイズにもとづいて複数のグループに分けられる。メイオベントスは 31 μm ~1mm の範囲の体サイズをもつ

生物の総称である。メイオベントスは世代交代時間が短く、分類群によって環境変化への耐性能力に顕著な相違があるため、底質環境の指標生物としても利用される。2013 年から 2015 年に大村湾中央部における海底堆積物試料のメイオベントス群集構造を調べたところ、最も優占する分類群は線虫類であり、次に底生カイアシ類が優占した。一方、貧酸素水塊の発達に伴ってメイオベントス全体の個体数と生物量は減少し、線虫を除くほぼ全ての動物群は一時的に消失した。貧酸素期に残存し、数を増加させた線虫類の口器（口腔）は通常酸素濃度期に優占した線虫と比べて狭く、歯状突起も殆ど見られないことから、細菌をおもな餌資源として利用していると考えられた。これらの結果は、イオウ酸化細菌を含む海底の細菌バイオマスが、貧酸素期にも線虫類を介して積極的に利用されることを示唆している。

一方、通常酸素期に優占した底生カイアシ類はソコムジンコ類であり、合計 11 科が出現した。例年、貧酸素が解消した直後（9-10 月）に底生カイアシ類群集の個体数は再び増加し、翌年の貧酸素化直前に最大となった。貧酸素が解消した直後はアシナガソコムジンコ類（Longipediidae）の優占率が高く、冬以降に、Cletodidae と Ectinosomatidae の優占率が高まった。これらの結果から、大村湾中央部で夏季に発生した貧酸素水塊により、底生カイアシ類群集は一時的に壊滅するが、貧酸素の解消直後から、その多様性と個体数は再び回復し始めるという周期変動を繰り返している可能性が示された。

（ 4 ） 海底の微生物群集呼吸解析

大村湾の海底堆積物表面における微生物群集呼吸の動態を明らかにするために、水温・塩分・クロロフィル a・溶存酸素濃度（DO）を観測するとともにテトラゾリウム化合物の還元活性を指標とした in vivo ETSA により潜在的な堆積物酸素消費速度の測定を行った（森ら 2015）。この手法によって見積もられた全酸素消費速度（Whole Oxygen Consumption Rate；WOCR）のうち、嫌気性の硫酸還元細菌の呼吸活動がもたらす還元物質等による酸素消費、すなわち化学的酸素消費速度（Chemical Oxygen Consumption Rate；COCR）の占める割合は高く（平均 72%）、貧酸素水塊が湾中央部底層に発達する 7 月から上昇し、8 月に最大値を示した。貧酸素水塊形成期の底層 DO（ mg L^{-1} ）は、WOCR 及び COCR と負の相関を示し（WOCR； $r=-0.95$ 、 $p=0.05$ 、COCR； $r=-0.97$ 、 $p=0.03$ 、 $n=4$ ）、貧酸素水塊形成期の底層 DO 低下によって、嫌気的な有機物分解の進行に伴い硫化物が蓄積していた可能性が強く示唆された。また、WOCR と COCR は約 1 月前の観測で得られたクロロフィル a の水深 0-20 m 間の積算値と正の相関を示し（WOCR； $r=0.84$ 、 $p=0.07$ 、COCR；

r=0.89, p=0.04, n=5) 堆積物微生物群集が利用可能な呼吸基質量の時空間的な変動によって制御されている可能性が示唆された。

(5) 貧酸素下で出現する嫌気性微小鞭毛虫の集積培養

貧酸素期の大村湾中央部から得られた底泥表層試料を、硫酸還元細菌用の改変培地(有機物を、小麦、玄米、酵母エキス、セロフィルに置き換えたもの)に接種し、20℃、暗所で培養した(Okamura and Kondo 2015)。その結果、玄米培地でのみ微小鞭毛虫の増殖が確認された。この集積培養を光学顕微鏡で観察したところ、いずれの試料中でも、細胞長が約 10 μm の水滴形をした鞭毛虫が優占していた。その他、細胞数は少ないものの、やや細長い紡錘形をした鞭毛虫も観察された。何れの集積培養も1ヶ月に1回程度の植継ぎによって継代することに成功している。これらの結果から、大村湾の底層で貧酸素化が進行すると、堆積物中で細菌捕食性の従属栄養鞭毛虫の活動が活発化し、細菌群集に対するトップダウンコントロールとして機能している可能性が示された。

(6) 微生物マット由来有機物の高次捕食連鎖への転送

大村湾海底泥から集積培養された嫌気性独立栄養細菌の一種である光合成イオウ酸化細菌(*Prosthecochloris vibrioformis*)を用いて、その細胞由来有機物が底生濾過食動物に取込まれる可能性を、炭素および窒素の安定同位体(¹³C および ¹⁵N)による標識実験で定量的に検証した。アカガイ(*Anadara broughtonii*)に安定同位体標識した細菌由来の有機物を1週間給餌するとともに、対照として植物プランクトン(珪藻)由来の有機物を与えた後、*A. broughtonii*の筋組織における標識元素の取り込み量から同化率(同化量/餌投与量)を求めた。*A. broughtonii*による細菌由来有機物の同化率が炭素で0.14%、窒素で1.5%であったのに対し、珪藻由来有機物の同化率は5.1%、窒素で9.0%であり、細菌由来の有機物は低効率(炭素で1/36倍、窒素で1/6倍)だが、*A. broughtonii*の体細胞に同化されることを確かめた(市川ら2016)。どちらの餌でも、炭素より窒素の同化率が高かった理由として、新たに取り込まれた炭素成分が、呼吸基質として代謝され速やかに体外に放出される可能性が示唆された。以上の結果は、大村湾の貧酸素化に伴って海底で増殖するイオウ酸化細菌群集が、湾内の懸濁態有機物の基礎生産者として、高次生産に寄与する可能性を示唆している。

(7) 大村湾縁辺部藻場の溶存酸素の変動

大村湾の東岸にあるアマモ場域内の溶存酸

素濃度は日中に増加し、夜間に減少するという周期的な変動を示した。日中は光合成活動によって酸素は増加し、夜間は呼吸によって酸素が消費されたためであると考えられる。2015年度は、最大値は14.27 mg L⁻¹、最小値は1.58 mg L⁻¹を記録し、夜間においては湾中央の貧酸素と同レベルまで低下することもあった。曇りや雨の時は、日中の光合成活動が低下するため、日中と夜間の溶存酸素濃度の変動幅は小さかった。1年あたりの溶存酸素濃度は、春から夏にかけて減少し、秋から春にかけて増加するという周期的な変動を示した。2012年に糸状イオウ酸化細菌マット由来と思われる微生物凝集物が同藻場内で確認されたが、本研究の調査期間中には、そのような事象は確認されなかった。

<引用文献>

森 郁晃、近藤 竜二、梅澤 有、松岡 数充、須崎 寛和、中田 英昭、和田 実、西九州・大村湾の貧酸素水塊形成期における堆積物微生物群集呼吸の動態、沿岸海洋研究、53号、2015、87-95

T. Okamura、R. Kondo、*Suigetsumonas clinomigrationis* gen. et sp. nov., a novel facultative anaerobic nanoflagellate isolated from the meromictic Lake Suigetsu, Japan. *Protist*, 166, 2016, 409-421.

市川 好貴、梅澤 有、山喜 邦次、島塚 桃子、和田 実、閉鎖性内湾における光合成硫黄細菌由来有機物の高次捕食者への転送に関する基礎的研究、長崎大学水産学部研究報告、95号、2016、41-51

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

市川 好貴、梅澤 有、山喜 邦次、島塚 桃子、和田 実、閉鎖性内湾における光合成硫黄細菌由来有機物の高次捕食者への転送に関する基礎的研究、長崎大学水産学部研究報告、査読有り、97号、2016、11-18

森 郁晃、近藤 竜二、梅澤 有、松岡 数充、須崎 寛和、中田 英昭、和田 実、西九州・大村湾の貧酸素水塊形成期における堆積物微生物群集呼吸の動態、沿岸海洋研究、査読有り、53号、1巻、2015、87-95

梅澤 有、鈴村 昌弘、塚崎あゆみ、尾崎 健史、牟田 直樹、山口 聖、沿岸域生態系のリン循環、地球環境、査読有り、20号、2015、63-76

Takahiko Okamura, Ryuji Kondo,

Suigetsumonas clinomigrationis gen. et sp. nov., a novel facultative anaerobic nanoflagellate isolated from the meromictic Lake Suigetsu, Japan, Protist, 査読有り 166 巻、2015、409-421

DOI: 10.1016/j.protis.2015.06.003

豊嶋 香苗、梅澤 有、中田 英昭、大村湾の環境修復に向けた陸起源窒素の取り込みに適した海藻の選択、長崎大学水産学部研究報告、査読有り 95 号、2014、41-51

〔学会発表〕(計 10 件)

和田 実、河端 雄毅、梅澤 有、閉鎖性内湾の貧酸素水塊に來遊する浮き魚類の観察記録、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日、東京海洋大学(東京都港区)

和田実、大村湾の貧酸素化にかかわる化学および生物過程、大村湾研究共同シンポジウム、2016 年 3 月 2 日、長崎大学、(長崎県長崎市)

才津 真子、寺田 竜太、Gregory N. Nishihara、藻場の溶存酸素濃度と光合成速度の日周リズム、日本藻類学会第 39 回大会、2015 年 3 月 21 日、九州大学(福岡県福岡市)

Mako Saitsu, Ryuta Terada, Gregory N. Nishihara, Gross ecosystem production in marine forests of different component species, 2015 EAST CHINA SEA WORKSHOP, 2015 年 11 月 2 日、済州大学、済州島(大韓民国)

河野 一希、嶋永 元裕、上田 遼、和田 実、大村湾における貧酸素化がメイオバントスへ及ぼす影響—カイアシ類群集の場合—、2015 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会、2015 年 9 月 3 日、北海道大学(北海道札幌市)

Minoru Wada, Hirokazu Suzaki, Fumiaki Mori, Hideaki Nakata, Wind speed as a controlling factor for interannual variation in the extent of bottom hypoxia in Omura Bay, Symposium: Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem and Fisheries, Nagasaki Japan Symposium: Human Impacts on Oceanic Environment, Ecosystem and Fisheries, 2014 年 11 月 11 日、ホテルセントヒル長崎(長崎県長崎市)

上田 遼、嶋永 元裕、森 郁晃、山喜 邦次、中田 英昭、和田 実、大村湾中央部

における貧酸素水塊形成に伴うメイオバントス群集の動態解明、2014 年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2014 年 9 月 6 日、広島大学(広島県東広島市)

森 郁晃、山喜 邦次、上田 遼、近藤 竜二、梅澤 有、松岡 數充、須崎 寛和、中田 英昭、和田 実、大村湾の貧酸素水塊形成に関する微生物呼吸活性の動態、2014 年日本海洋学会春季大会、2014 年 3 月 27 日、東京海洋大学(東京都港区)

Fumiaki Mori, Minoru Wada, Yu Umezawa, Kazumi Matsuoka, Kazuhiro Suzuki, Hideaki Nakata, Seasonal Variation in Microbial Community Respiration of Dead Zone Sediments of Omura Bay, Japan, 9th International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea, 2013 年 9 月 30 日、国立台湾海洋大学、基隆市(台湾)

Ryo Ueda, Fumiaki Mori, Yu Umezawa, Motohiro Shimanaga, Minoru Wada, Analysis of Meiofauna in hypoxic sediment of Omura Bay, Japan, 9th International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea, 2013 年 9 月 30 日、国立台湾海洋大学、基隆市(台湾)

〔図書〕(計 3 件)

和田実、恒星社厚生閣、水圏微生物学の基礎、2015 年、219-241

近藤竜二、朝倉書店、環境と微生物の事典、2014 年、135、141

砂村倫成、朝倉書店、環境と微生物の事典、2014 年、139

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.focas.fish.nagasaki-u.ac.jp/report/wada.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 実(WADA, Minoru)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号: 70292860

(2)研究分担者

近藤 竜二 (KONDO, Ryuji)
福井県立大学・海洋生物資源学部・教授
研究者番号：30244528

梅澤 有 (UMEZAWA, Yu)
長崎大学・水産・環境科学総合研究
科(水産)・准教授
研究者番号：50442538

ニシハラ グレゴリー ナオキ
(NISHIHARA, Gregory Naoki)
長崎大学・水産・環境科学総合研究
科(環シナ)・准教授
研究者番号：40508321

嶋永 元裕 (SHIMANAGA, Motohiro) 熊本大
学・沿岸域環境科学教育研究センター・准
教授
研究者番号：70345057

(3)連携研究者

砂村 倫成 (SUNAMURA, Michinari)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：90360867