

学 位 論 文 要 旨

| | |
|-----|---|
| 氏 名 | グエン ズン ティ フォン |
| 題 目 | 鹿児島湾の底泥有機物および硫酸還元菌に関する研究 (Studies on Sedimentary Organic Matter and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria in Kagoshima Bay) |

沿岸域における富栄養化は、世界的に大きな問題となっている。富栄養化は、過剰な有機物が海域に放出され、分解を受けることによって起こる。鹿児島湾においても、廃水や水産養殖場からの有機物の排出が法的に規制されているにもかかわらず、依然として富栄養化による赤潮や貧酸素水塊の問題が起こっている。しかしながら、富栄養化によって引き起こされる悪影響についてはよく知られている一方、その対策については知見に乏しい。特に、富栄養化環境における様々な生態的プロセスに関与する微生物の役割は重要と考えられる。そこで本研究では、富栄養化に伴う海底底質の特性や動態を明らかにするために、底質の垂直・水平方向の化学的、微生物学的なパラメーターの変動や、それらのパラメーターと海底泥への有機物の蓄積との相関について検討した。

鹿児島湾における有機物と酸揮発性硫化物(AVS)の水平・垂直方向の分布には明確な特徴が認められた。強熱減量(IL)は 1.1 - 13.4 %の範囲にあるのに対し、全有機態炭素(TOC)と全有機態窒素(TON)はそれぞれ0.2 - 2.3 %、0.04 - 0.22 %であった。TOC、TONがILと正の相関を示すことから、底泥中でのTOCとTONの分布プロファイルはILと高い関連性があると考えられる。AVS濃度は0.01 - 2.2 mg/g(底泥乾重量)で、特に湾奥部の水深の深いところで高い値が観察された。また、湾奥部では、底泥表層から深度の増加に伴いIL、TOC、TONが減少した。一方、湾中央部では、深度に伴うこれらの値の変化は認められなかった。

環境特性が互いに異なる4カ所の採取地点の底泥について、土質(texture)、IL、AVS、遊離硫化物、硫酸還元菌(SRB)数の解析を行った。土質に関しては、湾奥部、湾中央部より得た底泥はシルト、粘土の含有量が極めて高いのに対し、湾口部では砂質土、砂礫質土が主要な構成成分であった。ILは2.1 - 13 %の範囲であり、湾中央部と湾奥部天降川近傍の採取地点で高い値を示した。AVSは0.01 - 0.9 mg/g(底泥乾重量)で、採取地点ごとに値が大きく異なっていた。SRB菌数は $1.7 \times 10^2 - 5.0 \times 10^5$ cells/gで検出された。

4つの採取地点の底泥から分離されたSRBの液体培養においてAVS含量とpH値の上昇が見られ、SRBの増殖が確認された。16S rDNA塩基配列に基づく分子系統解析から、地点1と3から分離されたSRBは*Desulfovibrio dechloracetivorans*に近縁である一方、地点2由来の株は*Desulfosporosinus orientis*と、地点4由来の株は*Desulfovibrio acrylicus*と近縁であった。またSRB特異的16S rDNAプライマーにより、SRB分離株の特異的検出が可能であることが示された。

学 位 論 文 要 旨

| | |
|-----|---|
| 氏 名 | Nguyen Dung Thi Phuong |
| 題 目 | Studies on Sedimentary Organic Matter and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria in Kagoshima Bay (鹿児島湾の底泥有機物および硫酸還元菌に関する研究) |

Eutrophication has become a serious problem in all coastal waters around the world. In Kagoshima Bay, despite the legal control of wastewater and aquaculture discharges, eutrophication still exists as indicated by the occurrence of red tide blooms and water layer of low dissolved oxygen concentration. Although the effects of eutrophication are well-known, governing its effects is poorly understood. In particular, the effects on microbial processes are very important factors to dynamics of marine ecosystems. The present study was conducted in order to estimate the mechanism of dynamics in sediment quality relative to eutrophication and the significance of both chemical and microbiological parameters to organic matter accumulation in sediments.

A clear picture of the horizontal and vertical characterization of sediments in Kagoshima Bay in terms of organic matter and acid volatile sulfide (AVS) distributions were drawn. The ignition loss (IL) ranged from 1.1% to 13.4%, while total organic carbon (TOC) and total organic nitrogen (TON) ranged from 0.2% to 2.3% and 0.04% to 0.22%, respectively. The parallel increase in TOC and TON with IL suggested that the distribution profiles of TOC and TON in the sediments should be closely associated with IL. Concentrations of AVS ranged from 0.01 mg/g to 2.2 mg/g of sediment (dry weight) and higher values were observed in the deep basin of the inner area of Kagoshima Bay. Vertical distribution analysis of sediments showed the decrease of IL, TOC and TON with increasing sediment depths in the inner parts of the bay. On the other hand, no significant differences of these parameters among sediment depths were observed in the central area.

Sediments from four different stations were analyzed to determine their texture, IL, AVS, free sulfides and sulfate-reducing bacteria (SRB). Sediment samples obtained from the inner and central areas showed higher silt and clay contents, while those from the bay mouse area consisted of sand and gravel as the main components. IL values were ranged from 2.1% to 13% and higher IL contents were observed at the stations located in the central area and the station near Amori River (inner area). AVS contents ranged from 0.01 to 0.9 mg/g of sediment, and free sulfides were observed only in the stations belong to the inner area, with the range from 0.01 to 0.2 mg/ g of sediment. Viable counts of SRB ranged from 1.7×10^2 to 5.0×10^5 cell/g of sediment.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) from the sediments of four stations in Kagoshima Bay were isolated and examined on the growth response and phylogenetic positions based on 16S rDNA sequences. The AVS content and pH value of liquid cultures of SRB isolates increased rapidly during the incubation period. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences showed that one strain isolated from Station 1 and five strains from Station 3 were most closely related to *Desulfovibrio dechloracetivorans*, while two strains isolated from Stations 2 and 4 have high similarities to *Desulfosporosinus orientis* and *Desulfovibrio acrylicus*, respectively. The application of specific primers to identify *Desulfovibrio* spp. demonstrated that the primers used are suitable to detect 16S rDNA of this bacterial group.

学位論文審査結果の要旨

| | |
|---|---|
| 学位申請者 氏 名 | Nguyen Dung Thi Phuong |
| 審査委員 | 主査 鹿児島 大学 教授 坂田 泰造 |
| | 副査 鹿児島 大学 教授 野呂 忠秀 |
| | 副査 宮 崎 大学 教授 前田 昌調 |
| | 副査 鹿児島 大学 教授 田中 淑人 |
| | 副査 宮 崎 大学 教授 酒井 正博 |
| 審査協力者 | |
| 題 目 | Studies on Sedimentary Organic Matter and Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria in Kagoshima Bay (鹿児島湾の底泥有機物および硫酸還元菌に関する研究) |
| <p>沿岸海域における富栄養化と貧酸素水塊の拡大が問題になっているが、主として有機物の過剰負荷に起因するものと考えられる。本論文は、閉鎖性の強い鹿児島湾において富栄養化や貧酸素水塊の動向に密接に関連している底質の特性と動態を明らかにするために、底泥中の物理化学的および微生物学的パラメーターの測定および解析を行ったものである。さらに底泥中の微生物群として、特に嫌気条件下で有機物の分解を促進する硫酸還元菌の計数と同定を行っている。</p> <p>鹿児島湾全域にわたる底質分析を2001年7月と2002年8月の2回実施し、比較検討した。底泥中の強熱減量(IL)、全有機炭素濃度(TOC)、全有機窒素濃度(TON)の間の相関係数は高く(0.80以上)、これらの値が有機物濃度を表示していると考えられた。IL、TOC、TONとして測定された有機物濃度について、湾奥部の国分沖および湾中央部の鹿屋市沖に高濃度域が見られた。湾奥部については流入河川が、湾中央部については湾内流(反時計回りの潮流)が底泥中の有機物の蓄積に影響していると考えられる。底泥中の垂直分布(全域の平均濃度)については、湾奥部で深度とともに減少したのに対して、湾中央部では深度10 cmまで顕著な差は認められなかった。これは湾中央部では長年月にわたる平均した有機物の蓄積が進行した結果だと推測される。硫化物濃度(AVS)については、</p> | |

湾奥部の国分沖に特に顕著な高濃度域が見られた。この地域は有機物濃度も高く、有機物の嫌氣的分解の結果としてAVS濃度が上昇したものと考えられる。

2004年度に実施した底質調査（8月と12月の2回）において、湾奥部2、湾央部1および湾口部1の4定点の底質を比較した。湾奥部（2）および湾央部定点（1）の土質はシルト・粘土であったが、湾口部定点（1）は砂質土であった。IL値は2.1～13%の範囲であり、湾奥部国分沖と湾央部定点で高い値を示した。AVS濃度は0.01～0.9 mg/g の範囲であり、湾奥部定点で高い値を示しが湾口部定点ではほとんど計測されなかった。AVSの垂直分布について、湾奥部および湾央部定点ともに深度5 cm前後に極大値が見られた。硫酸還元菌（SRB）数は $1.7 \times 10^2 \sim 5.0 \times 10^5$ cells/gの範囲で検出され、AVS濃度と同様に湾奥部定点（2）で高い計数値が得られた。以上の底質調査の結果、IL、TOC、TON、AVS、SRBは底泥の有機物汚染を示す指標として重要な測定項目であることが確認された。

次に湾奥部、湾央部、山川港、湾口部の4定点の底泥中から硫酸還元菌（SRB）を分離し、分子系統解析（16S rDNA塩基配列）に基づいて菌種の同定を試みた。菌株の純化は軟寒天希釈法（MPN法）によって行い、細胞形態の検鏡、液体培養中のAVS生産、pHの変動などで確認した。湾奥部（1株）および山川港（5株）から分離した菌株は*Desulfovibrio dechloracetivorans* に近縁であり、湾央部（1株）と湾口部（1株）からの分離株はそれぞれ*Desulfosporosinus orientis* と*Desulfovibrio acrylicus* に近縁であることが明らかになった。解析した菌株数が少ないが底泥の有機物濃度とSRB菌種の間に関係があることが示唆された。また硫酸還元菌*Desulfovibrio* 属に特異的なプライマーを用いてSRBの検出を試みた結果、2組のプライマー（16S rDNAの特異的領域に基づいて設計されたもの）を用いた場合、*Desulfovibrio* 属細菌の特異的な検出が可能であることが判明した。すなわち特異的プライマーを用いてPCRを行ったところ、*Desulfovibrio* 属菌株にのみ増幅産物が得られ、他の試験菌では全く増幅産物は検出されなかった。他のSRB菌種についても特異的プライマーを設計する必要があるが、SRB特異的プライマーを適用することによって沿岸底泥中のSRB菌種の分布状況を迅速に解析できる方法を提示していると言える。

以上のように、本論文は鹿児島湾全域における底泥中の有機物の水平分布、垂直分布の動態を明らかにし、有機物分解と密接に関係する硫酸還元菌の分布および菌種を特定したことにより、鹿児島湾の環境保全に対する有益な知見を提供するものと評価される。従って、博士（水産学）の学位論文として十分な価値を持つものと判定した。

最終試験結果の要旨

| | | |
|--|------------------------|--|
| 学位申請者 氏 名 | Nguyen Dung Thi Phuong | |
| 審査委員 | 主査 鹿児島 大学 教授 | 坂田 泰造 |
| | 副査 鹿児島 大学 教授 | 野呂 忠秀 |
| | 副査 宮崎 大学 教授 | 前田 昌調 |
| | 副査 鹿児島 大学 教授 | 田中 淑人 |
| | 副査 宮崎 大学 教授 | 酒井 正博 |
| 審査協力者 | | |
| 実施年月日 | 平成 18 年 12 月 25 日 | |
| 試験方法（該当のものを○で囲むこと。） | | <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答 |
| <p>主査および副査は、平成18年12月25日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（水産学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p> | | |

| | |
|--|------------------------|
| 学位申請者 氏 名 | Nguyen Dung Thi Phuong |
| <p>[質問1] 硫酸還元菌 <i>Desulfovibrio</i> 属特異的な 16S rDNA PCR プライマーについて、その特異性を確かめるための陰性コントロールとして <i>Vibrio harveyi</i> と <i>Escherichia coli</i> を用いているが、他の細菌に対するプライマーの反応性については如何か？</p> <p>[回答1] 陰性コントロールとしては、<i>V. harveyi</i>、<i>E. coli</i> 以外に本研究で分離した硫酸還元菌 <i>Desulfosporosinus</i> 属を用い、反応性がないことを確認している。それ以外の細菌種については検討していない。</p> <p>[質問2] St. 3 より分離した 5 株の硫酸還元菌 SR-St-3-1~5 に対する <i>Desulfovibrio</i> 属特異的 PCR プライマーの反応性は如何か？</p> <p>[回答2] SR-St-3-4 株を除いて反応性は確認していない。</p> <p>[質問3] 分離した硫酸還元菌の分子系統樹において、St. 3 由来の 5 株 SR-St-3-1~5 には 16S rDNA 塩基配列に若干の差があるように見受けられるが、その差はどの程度か？</p> <p>[回答3] この 5 株は互いに極めて近縁であり、2~3 塩基の差である。詳細については、解析データを示すことができる。</p> <p>[質問4] 海底泥中の酸揮発性硫化物 (AVS) 量は硫酸還元菌の菌数に相関するのか、あるいは硫酸還元菌の細菌種に依存するのか？</p> <p>[回答4] 自然環境においては、主に硫酸還元菌により AVS が産生されている。しかしながら、AVS 量は底泥中の有機物濃度や酸化還元電位などの影響を受けるので、AVS 量は必ずしも硫酸還元菌数によってのみ決まるものではない。</p> <p>[質問5] St. 1 (湾奥部) では強熱減量 (IL) が高く、また底泥の粘土含量が高いことから考えると、粘土粒子への有機物の吸着が生じているのではないか？</p> <p>[回答5] 一般に、底泥中の粘土含量が高いほど有機物の指標である IL は高くなる傾向がある。St. 1 ではシルト・粘土含量が高く、また非常に高い IL 含量であることが判明した。当然、シルト・粘土粒子への吸着が考えられる。</p> <p>[質問6] 海底泥の有機物量と硫酸還元菌との関連性について説明して欲しい。硫酸還元菌について調べるのであれば、硫酸塩やその他の硫黄化合物の定量も行うべきではないか？</p> <p>[回答6] 本研究の目的は、陸水や水産養殖に伴う有機物の負荷と、有機物の海底泥へ</p> | |

の蓄積、それに伴う沿岸環境の悪化を調べることにある。特に、鹿児島湾湾奥部では海底泥中の有機物分解に伴い貧酸素水塊が形成され、硫酸還元菌による嫌氣的有機物分解が卓越していると考えられる。実際に底泥中における有機物濃度、AVS 含量と硫酸還元菌数の間に一定の相関関係が見られた。

[質問 7] 鹿児島湾における火山性活動に由来する硫黄化合物と汚濁物質由来の硫黄化合物はどのように区別しているのか？

[回答 7] 特に区別はしていない。本研究では鹿児島湾底泥における有機物負荷の動態とその影響に注目した。湾奥部定点および山川港の底泥中では有機物濃度が高く、それに相関して硫酸還元菌数も高いことが示された。これらの定点では AVS 濃度も高くなっているが、特に湾奥部定点における AVS 濃度は硫酸還元菌の活動によるものの他に周辺の火山性活動に由来する硫黄化合物についても検討する必要がある。

[質問 8] 硫酸還元菌数が高ければ、底泥中の有機物分解速度も速いと考える良いか？

[回答 8] 硫酸還元菌による有機物分解は嫌氣的条件下においてのみ起こるので、その環境の酸化還元電位についても考慮する必要がある。

[質問 9] 母国のベトナムに帰国後、この研究をどのように進展させて行くのか？

[回答 9] 今後、母国の経済発展のために養殖産業の振興を図りたいと考えている。それに際して、養殖海域の選定に本研究の成果が有用であると思われる。近い将来、養殖産業の発展に伴う沿岸域の有機物汚染が問題になると予想されるが、本研究で培った知識や技術を応用したい。