

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580202

研究課題名（和文）シャットネラ赤潮から急激な貧酸素化をもたらす海洋微生物群集の実態解明

研究課題名（英文）Studies on the marine microbial communities associated with the bloom of *Chattonella antiqua/marina*

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・准教授

研究者番号：70292860

研究成果の概要（和文）：2010年から2012年夏の海洋観測により、橘湾から有明海奥部にかけて、低塩分かつ高水温で、クロロフィル a 濃度および溶存態有機物濃度が高い上層水ほど、浮遊性細菌 1 細胞あたりの呼吸活性が高くなることが示された。また、シャットネラの培養実験により、シャットネラ細胞の周囲には  $\gamma$  および  $\alpha$  プロテオバクテリアを含む多様な細菌群が存在し、シャットネラの増殖に伴って放出される親水性の溶存態有機物を利用して増加することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Single cell-level analysis of bacterioplankton in Tachibana Bay and Ariake Sea in summer 2010-2012 revealed that the bacterial cells were highly respiratory active in the upper layers with lower salinity, higher water temperature and higher concentrations of chlorophyll a and dissolved organic carbon (DOC). Furthermore, DNA finger printing and cloning of bacterial communities associated with *Chattonella antiqua/marina* cultures suggested that the phycosphere bacterial community was diverse and included gamma- and alpha- proteobacteria, seemingly growing on hydrophilic DOC derived from the growing algae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学、水産学一般

キーワード：シャットネラ、細菌群集、溶存有機物

## 1. 研究開始当初の背景

長崎県西方に位置する有明海は南北方向に細長く東西に狭い閉鎖的な内湾だが、満潮と

干潮の潮差が大きく、潮流が速いため、海水の鉛直混合が盛んで、成層が形成されにくいという特徴を持っている。また、有明海の湾奥部には一級河川である筑後川、矢部川、六

角川、緑川、白川から大量の河川水が流入しているため、これらの河川から供給される多量の砂泥と大きな潮汐の作用により、有明海には日本最大の干潟が形成されている。しかし近年、有明海では有害赤潮の発生や、湾奥部の浅瀬や西部干潟縁辺部において貧酸素水塊の形成が頻発しており、有用水産資源の減少が問題となっている。一般に貧酸素水塊の形成は、海域上部の成層化によって、下部への酸素供給が抑制されることに端を発し、その後、隔離された下部において、微生物群集による酸素呼吸が酸素供給を上回ることで生じる。こうした状況を改善し、持続的に水産資源を利用することを目指して、多くの調査・研究が行なわれ、主に貧酸素水塊形成に関する物理過程の理解が進んできた。しかし、有明海における微生物群集の呼吸活動が「いつ、どこで、どの程度、どのように活性化されるのか」について、既存の知見は乏しく、貧酸素水塊形成との関わりについて不明な点が多い。

夏期の有明海西部・諫早湾の干潟縁辺部における貧酸素水塊は、小潮時のシャットネラ赤潮発生とほぼ同時に形成され、大規模化することから、シャットネラ赤潮に由来する有機物か好気的な微生物分解を受け、周囲の溶存酸素濃度が急速に低下することが主な原因と考えられている。一般に、微細藻類の赤潮崩壊後には大量の赤潮由来有機物が海底に沈降し、その後、堆積物中の微生物による分解が酸素消費を活発化して、底層における貧酸素水塊形成の原因になると考えられており、同様のメカニズムがシャットネラ赤潮崩壊後の貧酸素水塊形成に関わっている可能性は高いが、それだけでは赤潮発生と同時期に見られる急激な水柱全体の貧酸素化を説明するには不十分である。一方、シャットネラ赤潮が崩壊する前の段階、すなわちシャットネラ細胞がまだ健全な状態で、易分解性の有機物が水中に放出され、周囲の従属栄養細菌による分解を受けて、溶存酸素濃度が低下する可能性については、これまで見過ごされてきた。海洋微細藻類の多くは健全な状態でも、光合成により産生した有機物の一部を溶存態として海水中に放出しており、シャットネラも細胞外に溶存態有機物を放出すると考えられる。微細藻類由来の溶存態有機物が周囲の従属栄養細菌により易分解性の炭素源として利用されることは、水圏の「微生物ループ」を構成する基本過程の1つであり、溶存態有機物を介した赤潮藻類とその周囲の海洋細菌群集の関係解明は、赤潮と同調して発生する貧酸素水塊の形成メカニズムを理解する上で、未解明の重要課題である。

## 2. 研究の目的

### (1) 有明海における浮遊性細菌群集の動態

夏期小潮時にシャットネラ赤潮発生と貧酸素水塊形成が頻発する有明海西岸・諫早湾小長井港付近の干潟浅海域においてシャットネラの個体数、全菌数、および溶存態有機物の分布状況を明らかにし、赤潮形成に伴う溶存態有機物放出と浮遊性細菌群集による利用について基礎的知見を得ることを目指した。また、橘湾及び有明海における浮遊性細菌群集を対象として、flow cytometryによる1細胞レベルでの呼吸活性解析を行い、浮遊性細菌群集の呼吸活性が水柱の酸素消費に与える影響を明らかにするとともに、浮遊性微生物群集の呼吸活性が、どのような環境因子によって制御されているのかについて考察を加え、各海域における浮遊性細菌群集による酸素消費活動の実態解明を目指した。

(2) シャットネラ分離株を用いた培養実験：シャットネラの増殖に伴う溶存有機物および浮遊細菌数と細菌群集構造の変動

近年、有明海で顕著な漁業被害をもたらし、有明海西岸干潟縁辺部での急激な貧酸素化を誘発すると考えられているシャットネラ (*Chattonella antiqua/marina*) に注目し、その分離株を用いた培養実験により、シャットネラ自身が放出する溶存態有機物の量と組成、およびシャットネラの周囲に存在する浮遊細菌群集の現存量と群集組成の変動を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 有明海における浮遊性細菌群集の動態 ① サンプルング

2009年および2010年7月～10月の小潮時に諫早湾・小長井漁港付近の干潟域においてバンドン採水器を用いて採水するとともに、2011年7月～10月の各月には、橘湾から有明海奥部にかけてニスキン採水器を用いて



図1 有明海における観測地点

採水した (図 1)。

採水後、試料海水をあらかじめオートクレーブ滅菌したポリプロピレン製ボトルに 2 回共洗いたした後、それぞれの容器に分取し、全菌計数、溶存有機態炭素の測定用に固定、保存した。また、採水時に CTD を用いて、水温・塩分・溶存酸素量・クロロフィル蛍光値を記録した。表層については水温塩分計を用いて水温と塩分を観測した。

②フローサイトメーターによる全菌計数  
-80°C で保存していた海水固定サンプルを SYBR-Green I で染色後、試験管に移し、フローサイトメーター (CyFlow space, Partec) を用いて測定した。測定の際は、ゲインを前方散乱光 (FSC) : 300、側方散乱光 (SSC) : 400、緑蛍光 (FL1, 520nm) : 350、トリガーを FL1 とした。測定終了後、横軸は対数表示で緑蛍光を、縦軸は同じく対数表示でイベント数を示すサイトグラムを作成し、測定された全てをゲート範囲に設定し、菌数を求めた。さらに、ろ過海水から得られた菌数をノイズとし、サンプルの菌数からろ過海水の菌数を引いて、全菌数を求めた。

### ③呼吸活性測定用サンプル測定

凍結した培養サンプルを室温で融解し、フローセルソーター (FACS Aria II, Becton Dickinson) を用いて測定した。パラメーター設定を前方散乱光 (FSC) : 348、側方散乱光 (SSC) : 253、赤蛍光 (PE-Texas Red) : 643、閾値を前方散乱光 : 5000 とし、1 つのサンプルにつき 10,000 細胞測定した。測定終了後、横軸に側方散乱光、縦軸に赤蛍光 (PE-Texas Red) に設定したサイトグラムをフローサイトメトリ解析ソフトで作成し、赤蛍光値が 100 を超える全ての範囲をゲートで囲い、呼吸活性の高い細胞 (H-CTF) 数とその存在割合を求めた (この値を H-CTF<sub>bulk</sub> (%) と記す。図 2)。

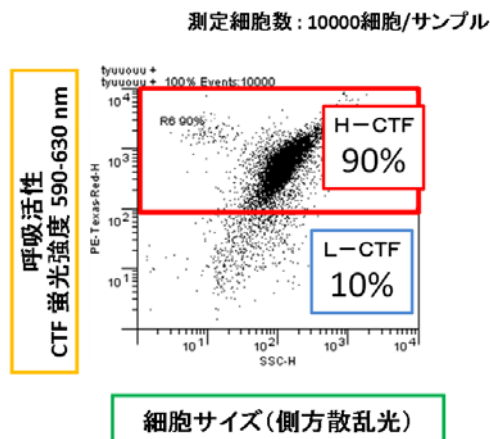


図2 Flow cytometryによる呼吸活性の解析方法

### ④溶存有機炭素量測定

凍結保存サンプルを融解後、全有機炭素計で有機炭素量 (TOC) を測定した。検量線はフタル酸カリウム溶液を用いて作成した。

### (2) シャットネラ分離株を用いた培養実験 ①培養株と培養方法

表に示す 4 種類の *Chattonella antiqua/marina* 株を使用し、IMK 培地を用いて、20°C、14L/10D の条件下で 14-16 日間静置培養した (表 1)。

表 1. 使用したシャットネラ単離培養株

培養株 Ca0808	培養株 Cm43
培養温度 20°C	培養温度 20°C
明暗条件 14L/10D	明暗条件 14L/10D
培養日数 16日	培養日数 16日
分離海域 諫早湾 (2008年)	分離海域 諫早湾 (2008年)
培養株 A85	培養株 Op27
培養温度 26°C	培養温度 21°C
明暗条件 12L/12D	明暗条件 14L/10D
培養日数 14日	培養日数 14日
分離海域 鹿児島沿岸 (1985年)	分離海域 有明海大浦湾 (2010年)

### ②サンプル採取

培養サンプルを十分に攪拌したのち、培養液の一部を定期的に枠付きスライドグラスに取り、顕微鏡下で *C. antiqua/marina* の細胞を計数するとともに、グラスファイバーフィルターで濾過後、溶存有機炭素量測定用のサンプルを結保存した。このとき、細菌の計数用にはホルムアルデヒドで固定 (最終濃度 10%) 後、4 度保存し、DNA 抽出用サンプルは -20°C で凍結保存した。

### ③全細菌数測定

計数用サンプル 1ml に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を加えた後、0.2 μm 孔径の黒色ポリカーボネートフィルターで濾過し、蛍光顕微鏡下で UV 照射して検鏡、計数した。

### ④溶存有機炭素量測定

凍結保存サンプルを融解後、全有機炭素計で有機炭素量 (TOC) を測定した。

### ⑤溶存有機物分画分析

凍結サンプルを室温で溶解した後、非イオン性マクロ網状アクリル樹脂 DAX-8 を用いて親水性有機物と疎水性有機物の 2 つに分画した。得られたサンプルは 1 か月以内に、前述の溶存有機炭素量測定と同様の手順で定量した。

### ⑥細菌ゲノム DNA 抽出

細菌 DNA 抽出用凍結サンプルから、市販のキット (QuickGene-Mini800, FUJIFILM または PureGene Core Kit A, QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。

### ⑦ARISA 法による細菌群集構造解析

ARISA 法は、細菌ゲノムの rRNA オペロン内

のsmallサブユニット(16SrRNA 遺伝子)およびlargeサブユニット(23SrRNA)間に存在する領域 (rITS) をPCR 増幅後、rITS の断片長に応じた電気泳動解析する手法であり、細菌の種や亜種レベルの解像度があると考えられている。抽出したゲノム DNA を ITSF eub および ITSr eub プライマーを用いて PCR 増幅した。増幅した rITS 産物 (rITS フラグメント) を、キャピラリーシーケンサー (ABI-3130x) で電気泳動後、各 rITS フラグメントピークの蛍光強度をすべて合計し、各フラグメントの相対的な割合を求めた。また、各フラグメントの存在の有無を (1, 0) の行列式に変換し、サンプルごとの類似度 (Jaccard 計数) を求め、階層的クラスタリング法 (AHC) および多次元尺度法 (MDS) を用いて群集構造解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 有明海における浮遊性細菌群集の動態 ① 諫早湾・小長井漁港付近

シャットネラ個体数は、6~365 cells/ml の範囲にあった。全菌数は 1.7~4.5 x10<sup>6</sup> cells/ml だった。溶存有機炭素量は 0.84~2.12 mgC/l の範囲にあり、栄養塩は、NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N の合計が 0.08 ~ 12.51 μM, PO<sub>4</sub>-P が 0.24~1.58 μM, SiO<sub>2</sub>-Si が 81.1~134.0 μM であった。これらのうち、水温と全菌数との間でのみ有意な正の相関が見られた (r=0.84, p=0.03)。クロロフィル a 濃度および溶存態有機物濃度はともにシャットネラ個体数と正の相関を示したが、統計的に有意ではなかった。

今回の観測でシャットネラ個体数と溶存態有機物濃度の間に有意な関連を見出せなかった理由として、現場海域における溶存有機炭素がシャットネラ以外に起源している可能性や、溶存態有機物に占める易分解性成分の割合が低かった可能性等が考えられる。現場観測だけでシャットネラに由来する溶存有機炭素と、その細菌群集への影響を明確にすることは困難なため、今後は観測頻度を高めるとともに、培養実験などを併用して、両者の関係を精査することが必要である。

##### ② 橘湾および有明海

2011年7月~10月の有明海内では、表層に高水温・低塩分の水塊が存在し、Chl. a 極大は、表層または中層にあることを確認した。溶存酸素は表層から中層にかけて減少しており、7月、8月は、全ての測点において表層付近で大きな変化が見られた。9月、10月には橘湾と湾口ではそのような大きな変化は見られなくなった。

溶存有機炭素 (DOC) はいずれの測点も表層で最も高く、底層が最も低い分布を示し、上層部 (表層・深度 5m) と下層部 (中層・底

層)間で有意な差が得られ (T 検定, <0.0001)、有明海における DOC は上層部に多かった (図 4-37)。測点間の DOC の分布では、湾外 (橘湾・湾口) と湾内 (島原湾沖・奥部) との間に有意な差が見られ (T 検定, p<0.0001)、湾外よりも湾内の方が DOC は多かった (図 4-38)。これらの結果から、有明海における DOC は湾内の表層付近に多いことが分かった (図 3)。

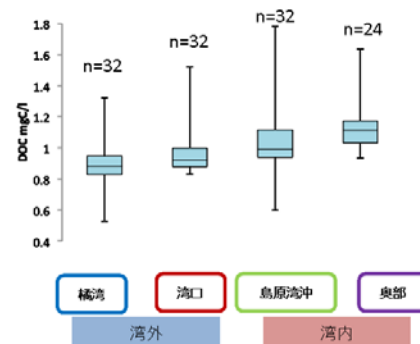


図3. 有明海におけるDOC分布

H-CTFbulk も、湾内の上層部で最も高く、河川水の影響を強く受ける低塩分水域において、浮遊性細菌群集の呼吸活性が高まるものと考えられた (図 4)。

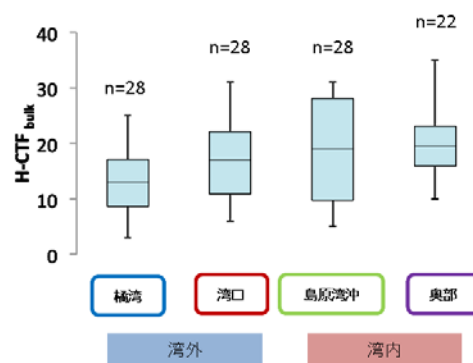


図4 有明海におけるH-CTFの分布

H-CTFbulk と Chl. a, 及び DOC と間に見られた有意な正の相関関係は、浮遊性細菌群集の呼吸基質として、植物プランクトン由来の溶存有機物が利用されており、溶存有機物が実質的な呼吸の制御因子になっていることを示唆している (表 2)。

表2 H-CTF<sub>bulk</sub>と環境因子の相関

2011年 有明海 n=66		水温	塩分	Chl.a	DOC
H-CTF <sub>bulk</sub>	r	0.37	-0.44	0.6	0.41
	p	0.002	0.0002	<0.0001	0.001

塩分躍層付近にはクロロフィル極大が発

達しており、河川水の流入によって、豊富な栄養塩が供給され、植物プランクトンの増殖が促進されていることが考えられた。塩分とChl. a の間に有意な正の相関関係が得られたことは、このような状況が広範囲かつ長期にわたって生起していることを強く示唆する。

近年、有明海奥部の大規模な貧酸素水塊が塩分躍層の直下で形成されることが指摘され、湾内の塩分成層の長期化および広域化によって、植物プランクトンの大増殖（赤潮）と貧酸素水塊形成が同所的に頻発すると論じられている。本研究で得られた結果は、こうした「有明海奥部における貧酸素水塊の形成仮説」を支持するものであり、浮遊性細菌群集による呼吸活性の促進が貧酸素水塊形成に寄与する可能性を示している。

(2) シャットネラ分離株を用いた培養実験：シャットネラの増殖に伴う溶存有機物および浮遊細菌数と細菌群集構造の変動

*C. antiqua/marina* は培養開始から10～12日で定常期に達した。溶存有機炭素量は、*C. antiqua/marina* の培養初期に増加した後、対数増殖期の間は一定の値を保ったが、培養後期から定常期にかけて再び増加した。培地中に存在する全浮遊細菌数は溶存有機炭素量の変動パターンと同様に *C. antiqua/marina* 培養初期および後期に増加した(図5)。

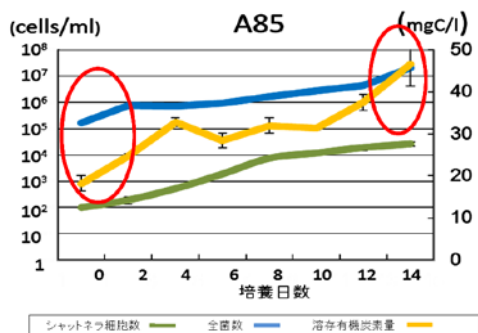


図5. シャットネラ細胞数・全菌数・溶存有機炭素量

この時、浮遊性細菌群集は4つの *C. antiqua/marina* 株ごとに異なったが、すべてのシャットネラ株間に共通する rITS の優占フラグメントも見られた(図6)。

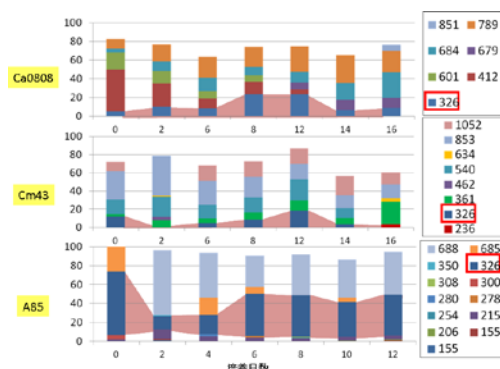


図6. 各株の優占するフラグメントの変化

溶存有機炭素は90%以上が親水性の酸であり、5～10%が疎水性の酸であった。この割合は *C. antiqua/marina* の増殖期にかかわらず一定であった。

これらの結果から、天然海域で *C. antiqua/marina* の赤潮が発生した際には、以下のような微生物過程が進行すると考えられる。すなわち、「*C. antiqua/marina* 赤潮発生初期および後期に、藻体から親水性成分を主体とする溶存有機物が放出され、*C. antiqua/marina* の周囲に存在する細菌群集のうち、それらを利用できるものが速やかに増殖する。」という過程である。このとき、*C. antiqua/marina* 由来の溶存有機物を利用できる細菌群集構造は赤潮発生海域ごとに異なるが、共通した細菌種も存在すると考えられる。

今後、*C. antiqua/marina* が放出する溶存有機物の詳細な分画定量や、*C. antiqua/marina* と共存する細菌種の特定を進めることで、有明海西岸の干潟縁部で発生した *C. antiqua/marina* 赤潮が、水柱全体の急激な貧酸素化をもたらす機構について理解が進むとともに、有明海における生物地球化学過程に関して新知見が得られると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① 右田雄二, 山崎省吾, 高藤美和子, 中村まき子, 吾郷昌信, 西山雅也, & 和田実. (2012). 有明海西岸域における *Vibrio vulnificus* の分布. *Journal of Japan Society on Water Environment*, 35(2), 33-39. 査読有  
DOI:10.2965/jsw. 35. 33
- ② Wada, M., Suzuki, S., Nara, T., Umezawa, Y., Shimanaga, M., Matsuoka, K., & Nakata, H. (2012). Microbial community respiration and structure of dead zone sediments of Omura Bay, Japan. *Journal of oceanography*, 68(6), 857-867. 査読有  
DOI:10.1007/s10872-012-0136-6
- ③ 和田実. (2012). I-2. 貧酸素水塊の形成に関わる微生物過程. *日本水産学会誌*, 78(2), 276-276. 査読無  
DOI:10.2331/suisan. 78. 276
- ④ Shin, H. H., Mizushima, K., Oh, S. J., Park, J. S., Noh, I. H., Iwataki, M., Matsuoka, K. & Yoon, Y. H. (2010). Reconstruction of historical nutrient levels in Korean and Japanese coastal areas based on dinoflagellate cyst assemblages. *Marine pollution*

bulletin, 60(8), 1243-1258. 査読有  
DOI:10.1016/j.marpolbul.2010.03.019

[学会発表] (計 7 件)

- ① Takano, Y., Umezawa, Y., Wada, M.,  
Impacts of extra-cellular organic  
matter derived from red tide forming  
algae (*Chattonella marina* and *C.*  
*antiqua*) on bacterial population, 日  
本微生物生態学会、2010 年 11 月 25 日、  
筑波大学
- ② Iwataki, M. and Fukuyo, Y., Taxonomy of  
the armored dinoflagellate genus  
Heterocapsa based on body scale  
ultrastructure, Horiba International  
Conference “New Direction of Ocean  
Research in the Western Pacific” -  
Past, Present and Future of  
UNESCO/IOC/WESTPAC Activity for 50  
years and the JSPS Project “Coastal  
Marine Science”, 2010 年 10 月 26 日、  
東京大学大気海洋研究所
- ③ 右田雄二、山崎省吾、石原雅行、北川由  
美香、平木希、吾郷昌信、西山雅也、和  
田実、16S-23S rDNA ITS 領域の制限酵素  
断片長多型に基づく *Vibrio vulnificus*  
臨床分離株のクラスタリング、日本微生  
物生態学会、2011 年 10 月 8 日、京都大  
学
- ④ Ohtake, Y. and Wada, M., Dynamics of  
respiratory-active bacterioplankton  
in hypoxia as revealed by flow  
cytometry, The 8<sup>th</sup> International  
Workshop on the Oceanography and  
Fisheries Sciences of the East China  
Sea, 2011 年 11 月 25 日、沖縄県市町村  
自治会館
- ⑤ Mori, F., Wada, M., Umezawa, Y., Matsuoka,  
K. and Nakata, H., Seasonal variation  
in microbial community respiration of  
dead zone sediments in Omura bay, Japan,  
International Symposium on  
“Biodiversity in Changing Coastal  
Waters of Tropical and Subtropical  
Asia” 2012 年 12 月 3 日、熊本県天草市  
苓北町民ホール
- ⑥ 森郁晃、和田実、梅澤有、松岡數充、中  
田英昭、大村湾の貧酸素水塊形成時期に  
おける堆積物酸素消費ポテンシャルの動  
態、日本水産学会春季大会、2013 年 3 月  
27 日、東京海洋大学
- ⑦ 高野由紀子、梅澤有、松岡數充、小田達  
也、中村心一、吉田誠、松山幸彦、和田  
実、*Chattonella antiqua/marina* の細胞  
外有機物と浮遊性細菌群集構造の動態、  
日本水産学会、2013 年 3 月 27 日、東京  
海洋大学

[その他]

ホームページ等：

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 実 (WADA MINORU)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究  
科・准教授

研究者番号：70292860

### (2) 研究分担者

鈴木 利一 (SUZUKI TOSHIKAZU)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究  
科・教授

研究者番号：20284713

梅澤 有 (UMEZAWA YU)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究  
科・准教授

研究者番号：50442538

岩滝 光儀 (IWATAKI MITSUNORI)

山形大学・理学部・准教授

研究者番号：50423645

### (3) 連携研究者

なし