

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 25 日現在

機関番号：25101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580252

研究課題名(和文)有用微生物の扶育場としてのアマモ葉体表面のバイオフィーム

研究課題名(英文)Biofilm on the reef of *Zostera marina* as the nersary habitat for useful microbes

研究代表者

吉永 郁生 (Yoshinaga, Ikuo)

鳥取環境大学・環境学部・教授

研究者番号：40230776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主に沿岸海域に生息するアマモ(*Zostera marina*)の葉上と、琵琶湖や河口汽水域に生息するヨシ(*Phragmites australis*)にのバイオフィーム生息する微生物のうち、有害赤潮藻を殺滅する細菌と水質の浄化に深く関係している窒素循環に関わる細菌に着目して研究を行った。その結果、沿岸の植物には付随しているこれらの細菌が、多く存在しており、一種の有用細菌の扶育場となっていることを明らかにした。この結果は、今後、沿岸域の維持・管理におけるこれらの植物群落の価値について、微生物の生息場としての意義を加える必要性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：This study has focused on the bacteria, especially the bacteria algicidal on the harmful algae and carrying out the nitrogen cycling, inhabiting in the biofilms formed on the reefs of *Zostera marina* and on the submerged stems of *Phragmites australis*, which are both the representative plants of coastal area. The results shows that the both coastal plants housed many algicidal bacteria and denitrifying bacteria, which are the key bacterial population in the nitrogen cycle, meaning the coastal plants are important as the nersary habitats for the both useful bacterial populations. From the results, I could propose the significance of coastal plants, *Z. marina* and *P. australis* forming representative landscape over Japan, from the aspect of microbial ecology.

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：*Zostera marina* *Phragmites australis* algicidal bacteria denitrifier

1. 研究開始当初の背景

さまざまな海産植物(海草や海藻)の群落である藻場では、魚類や貝類、甲殻類など多くの生物が旺盛に生物生産すると同時に、沖合の生物も含めた様々な生物が卵を産み、孵った幼生や稚魚が育つ育成場(ナーサリーグランド)でもある。砂地にアマモ(*Zostera marina*)が繁る「アマモ場」や汽水域の典型的な植生であるヨシ(*Phragmites australis*)群落も例外ではなく、まさに「豊かな沿岸域の象徴」になっている。さらにアマモ場やヨシ群落は、陸域から流入負荷する有機・無機の汚染物質の浄化システムとしても機能するといわれている。陸域からの過度な窒素の負荷は海域の富栄養化につながり、直接に沖合域に流入すると植物プランクトンの異常増殖(赤潮)やそれに伴う底層の嫌気化(貧酸素水塊)などを引き起こす。それゆえ特に窒素の豊富な陸水が流入する地域では、アマモ場の管理・育成は海域を良好に維持管理するために重要である。

さて、アマモ場やヨシ群落における窒素除去過程はアマモやヨシそのものによる同化と、細菌による有機物の無機化・硝化・脱窒のサイクルによる大気への窒素ガス(N_2)の放出に大別できる。これまで前者に関する研究例は比較的多いものの、後者に関する知見は近年ようやく蓄積されはじめたところである。たとえば、アマモ場の細菌研究は、現在のところ砂地や堆積物のそれに限られている。脱窒(特殊な細菌が、硝酸や亜硝酸を電子受容体として有機物を無機化する反応で、最終産物として N_2 や N_2O を排出する。)は、嫌気反応であると考えられているため、少なくとも海水環境よりは酸素濃度が低いと思われる砂地や堆積物内部の研究が主流である。しかし我々は、これまでに、琵琶湖南湖のヨシ表面のバイオフィーム(BF、基盤表面に発生する多様な微生物の混合コロニー)に多数の脱窒細菌が生存しており、かつその脱窒活性が、周辺の堆積物や岩石表面のBFのそれらよりも2倍から50倍高いことを発見した(Nakamura et al., 5th International conference Interfaces Against Pollution 2008 IAP2)。このことは水生植物表面に形成されたBFに脱窒細菌が集積し、そこで活発に脱窒を行っていることを意味する。さらにその群集内の脱窒関連遺伝子の組成を解析したところ、周辺の環境の遺伝子組成とは異なり、またこれまでに報告された同種の遺伝子データベースには存在しない新規な脱窒遺伝子が優占していた(Yoshinaga et al. IAP2008)。このことは水辺の植物の水中部分に形成されるBFは、それ以外の環境とは異なるユニークな生息場を微生物に提供している可能性を示唆している。

一方、我々は1990年代より、沿岸海域で発生する赤潮の動態に、赤潮の原因となる各種の微細藻を直接殺滅する細菌(殺藻細菌)が関与している可能性を示唆する知見を多

く得ている(Yoshinaga et al. 1995, 1996, 1998)。特に、海水中の浮遊懸濁粒子には様々な殺藻細菌が周辺の海水中よりも多数生息している(Park et al. 2010)。また、海水中の懸濁粒子は、陸地に近ければ近いほど沿岸の生態系の影響を強く受ける。実際、申請者のグループは、我々は、岩礁周辺の海水中の懸濁粒子に付着する細菌の種組成が、岩礁の海藻に付着している細菌の種組成と類似している事を、PCR-DGGE法によって明らかにしている。この事は、沿岸域の植物体表面のBFが沖合の懸濁物に付着する細菌群集(懸濁物付着細菌)に影響を与えている事を示唆する。この二つの新事実から、我々は「沿岸の水生植物などの表面に形成されるBFに殺藻細菌が増殖・集積し、その後、植物の枯死や海水の動きによってBFが沖合に流出してその場の赤潮原因微細藻の動態に影響を及ぼしている。」という仮説を考えた。ヨシやアマモ表面のBFには非常に多くの光合成生物(珪藻や緑藻、らん細菌などの微細藻)が生息していることを我々は日常の顕微鏡観察からすでに確認しており、このような生息環境がこれらの微細藻を殺滅して利用する殺藻細菌の増殖に有利になっているのではないだろうか。つまり、ヨシやアマモの表面のBFでも同様のプロセスで殺藻細菌群集の集積が行われているのではないかと考えている。

本研究では、過度に供給され富栄養化の原因となる窒素を大気中へ除去する細菌である「脱窒細菌」と、赤潮を引き起こして魚介類を死滅させたり、人に対する毒素を生産したりする有害微細藻を直接攻撃して殺滅する「殺藻細菌」を健全な沿岸海洋環境の維持・修復のための「有用微生物」と定義し、この有用微生物の生育場(ナーサリーグランド)としてのアマモの有用性を評価し、提言する事を目的とする。このことによって、アマモ群落が沿岸環境浄化へはたす役割に新しい科学的な根拠を与え、アマモ場育成事業のさらなるdriving forceとなるうえ、アマモとそこに形成されるBFを一体化した管理技術を考案する事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では日本沿岸の代表的な植生であるアマモとヨシ表面に形成されるバイオフィーム(BF)が、窒素除去に関わる「脱窒細菌」や赤潮原因微細藻を殺滅する「殺藻細菌」などの特殊な細菌を集積しているのではないかと仮説をたて、これらの有用細菌の存在量や分布、種組成や生理的な特徴などを微生物学的手法や分子生物学的手法によって解析し、仮説の実証を試みる。アマモ周辺の堆積物や岩石表面のそれらと比較することで、アマモ葉表面のBFの生態学的役割を評価する。以上の結果から、従来から言われてきた沿岸の植生が沿岸環境浄化等へはたす役割に科学的な根拠を付与すると同時に、

沿岸植生管理の微生物的な側面について考察する。

3. 研究の方法

アマモ葉体やヨシ水中茎、そして海水中の懸濁物などを採取し、付着する微生物集団 (BF) の従属栄養活性や脱窒活性を測定した。今回はさらに、九州最大の河川であり、その河川水に含まれる有機性懸濁物が有明海の特徴的な環境を形作っているとみなされている筑後川において、上流部とヨシの生い茂る下流河口部に調査定点を設定し、懸濁物付随細菌群集のなかの従属栄養細菌の種組成等を調べた。さらに、MPN 法による細菌の培養計数を試み、その最大希釈段階から限界希釈法によって沿岸植生の BF 内で優占する有用細菌や懸濁物付着細菌群落で優占する有用細菌を分離した。

Chattonella antiqua や *Karenia mikimotoi* などの西日本において猛威をふるう赤潮原因有害微細藻の無菌培養株と、代表的な淡水赤潮 (アオコ) 原因微細藻である *Microcystis aeruginosa* を用いたバイオアッセイ法によって、殺藻細菌の MPN (most probable number) を計数した。で採取した試料に加えて、大阪湾泉南地域のアマモ場では、アマモ場から沖合に向かって設定した定線にしたがい、表層海水を数カ所で採取し、同様に殺藻細菌の MPN 計数を行った。その際、海水を 3 μ m 口径のフィルターでろ過し、フィルター捕集画分を「懸濁粒子付着細菌画分」とし、ろ液画分を「浮遊細菌画分」として、別々に計数した。すでに申請者を含む研究グループによってこの方法は確立されている。(Park et al. 2010)

殺藻細菌に関しては、現場の細菌以外の微生物 (ウイルスや動物性の原生動物など) の影響とともに、殺藻細菌が凝集体 (aggregate) として機能する可能性を調べるために、さまざまなサイズ分画試料を赤潮原因微細藻培養液に接種して、その動向を調べる、いわゆる「マイクロコスム」実験を数回試みた。

4. 研究成果

平成 23 年度から 25 年度にかけて、琵琶湖沿岸域、大阪湾沿岸域、岡山県日生海域、気仙沼湾、そして有明海沿岸海域から、アマモ葉体やヨシ水中茎、そして各海域の懸濁物を採取して、それぞれ殺藻活性および脱窒活性等の微生物活性を測定した。その結果、下記の知見を得ることができた。

琵琶湖南湖のヨシ群落から得たバイオフィルム (BF) からは *M. aeruginosa* を殺滅する細菌 (殺藻細菌) を見出すことはできなかった。バイオフィルム中には Cyanobacteria も生息していたことから、これは予想外の事であった。しかし、ヨシ群落の周辺から得たオオカナダモ (*Egeria densa*) の葉体に付随している細菌集団から、

M. aeruginosa を殺滅する細菌を分離することに成功した。非常に興味深いことに、この殺藻効果は、本細菌が単細胞浮遊状態で増殖しているときには存在せず、付着界面上で増殖をした時、つまりいわゆるコロニーを形成したときにのみ効果を示した。このことは、湖水中の植物がある種の殺藻細菌のコロニー形成を促し、その場合に有害赤潮 (アオコ) の発生を抑制している可能性を示唆している。近年、細菌のさまざまな活性発現において、細菌の密度が関与している (quorum sensing) ことがさまざまな研究機関で発見されている。また、水生植物の BF は波あたり等によって水中に剥離することが考えられ、その場合は、殺藻活性を保持したままで湖水中のアオコ原因微細藻の増殖を抑制すると考えられる。今後、湖水中の懸濁物の由来と殺藻細菌の分布を評価することで、水生植物が潜在的に寄与しているアオコ抑制効果を定量化できるかもしれない。

大阪湾泉南地域に存在する、天然のアマモ群落を調査地点として、アマモ葉体上の殺藻細菌の存在量を MPN 計数したところ、周辺の海水中よりも 10~1000 倍多い計数値を得ることができた。とりわけ、初夏のアマモ葉体には多くの *C. antiqua* 殺藻細菌が生息していた。21 株の殺藻細菌を分離し、その 16SrRNA 遺伝子配列を解析したところ、Flavobacter-Cytophaga-Bacteroides (CFB) グループとガンマプロテオバクテリアに属する細菌であることが判明した。代表的な 2 種の細菌を特異的に認識するオリゴマーを設計し、リアルタイム PCR 法を用いて、その分布を、アマモ葉体、周辺の海藻 (アオサ) 葉体、海水中の懸濁物付随細菌群集と浮遊細菌群集に対して両種の細菌の現存量を定量分析したところ、アマモ葉体の BF から剥離し、懸濁物として海水中漂いながら沖合に殺藻細菌が伝播していく様子を確認できた。このことは、沿岸のアマモ群落が有害赤潮原因微細藻の抑制因子の扶育場として機能していることを示し、当初の仮説が支持されたことを示唆する。しかし、大阪湾に隣接する播磨灘海域の懸濁物には、アマモ葉上の BF に生息していた殺藻細菌は優占種として検出されなかったことから、瀬戸内海海域全体でアマモ群落がどの程度の赤潮抑制効果があるのかは評価できなかった。そのため、大阪湾同様、播磨灘に隣接する岡山県日生海域のアマモ葉上の殺藻細菌について、2013 年に MPN 計数と分離を行ったところ、やはりアマモ葉上とその周辺海水中にそれ以外の海域よりも多い *C. antiqua* 殺藻細菌が生息していることを明らかにできた。しかし、その 16SrRNA 遺伝子の解析結果は、大阪湾のアマモ葉上の BF で優占していた殺藻細菌とは異なる種であることを示したことから、アマモ群落の殺藻細菌は海域によって異なることが示唆された。今後、どのような環境要因がこの違いを生み出しているのかを解析する

ことで、殺藻細菌の地域差にも言及できるかもしれない。いずれにせよ、アマモ群落を持つアマモ場は潜在的に海域の赤潮被害を抑制している可能性が高いことが今回示された。以上の結果は、今後、海域の赤潮被害の抑制のためにも、沿岸の水生植物群落を保全し、失われた群落については回復させる必要性を強く提示することになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) 今井一郎, 岡本悟, 西垣友和, 吉永郁生, 竹内照文, 和歌山県下芳養湾における海水中およびアオサに付着する赤潮藻殺藻細菌の分布, 北海道大学水産科学研究彙報, 査読あり vol. 62, No1, 2012, pp. 21-28.
- 2) 吉永郁生 (2012), シャットネラ殺藻細菌の扶育場としてのバイオフィルム, Nippon Suisan Gakkaishi, 査読なし vol. 78, No.2, p284. (査読無し)

〔学会発表〕(計 3 件)

吉永郁生, 池ノ谷直孝, 澤山茂樹, 今井一郎, アマモ (*Zostera marina*) 葉上のバイオフィルムに生息する有害ラフィド藻殺滅細菌とその分子識別マーカーによる生態研究, 平成 24 年度日本藻類学会

吉永郁生, 横山勝英, 畠山 信, 田中克, 気仙沼・舞根湾における生物環境調査-5 今後の展開, 平成 24 年度日本水産学会春季大会

吉永郁生, 2011.10, シャットネラ殺藻細菌の扶育場としてのバイオフィルム, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会

〔図書〕(計 3 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永郁生 (YOSHINAGA, Ikuo)

鳥取環境大学・環境学部・教授

研究者番号: 40230776

(3) 連携研究者

諏訪裕一 (SUWA, Yuichi)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号: 90154632