

機関番号：16301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710081

研究課題名 (和文) イトゴカイと細菌の捕食 - 被食関係と相互関係による
堆積有機物分解作用の解明研究課題名 (英文) Decomposition process of sediment organic matter by predator-prey
relationship between *Capitella* and bacteria

研究代表者

國弘 忠生 (KUNIHIRO, TADAO)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 研究員

研究者番号：90512690

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は、海洋有機汚泥域に生息するイトゴカイと堆積物中の細菌の相互関係による有機物分解作用を解明することである。イトゴカイと細菌の増加過程で有機物の分解は促進された。イトゴカイが好気性細菌の増殖を促進し、その生育に特に Alphaproteobacteria 門 Rhodobacteraceae 科に属する細菌が関係していることが示唆された。さらにイトゴカイは、堆積有機物を分解・資化して増殖した細菌を餌資源の一つとして利用していることが示された。

研究成果の概要 (英文)： This study aims at clarifying the interaction and association between *Capitella* sp. I and bacteria on the decomposition of organic matter in the organically enriched sediment. In the associated system with the *Capitella* and the bacteria in the organically enriched sediment, the decomposition of the organic matter may proceed rapidly. It is very likely that the *Capitella* works as a promoter of bacteria in the organically enriched sediment, and feeds the increased bacteria as one of the main foods, while the bacteria decompose the organic matter in the sediment with the assistance of the *Capitella*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：複合新領域、環境微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：イトゴカイ、海洋微生物、有機汚泥、キノンプロファイル、安定同位体、生物間相互作用、PCR-DGGE

1. 研究開始当初の背景

堆積物食性の多毛類、イトゴカイ (*Capitella* sp. I) は、全世界的に分布し海洋の有機物汚染域に生息する代表的な底生生物である (Pearson & Rosenberg, *Ambio* 1976; Pearson & Rosenberg, *Oceanogr Mar Biol A Rev* 1978 など)。イトゴカイは爆発的に増殖する性質を持ち、高い有機物分解能力を持つことから、海底の有機汚泥の浄化生物種として利用されている (Tsutsumi et al., *Benthos Res* 2005)。イトゴカイは、底泥を攪乱することによって底泥の還元化を抑制し巣穴壁面での微生物(主に細菌)の好氣的な増殖を促しており (Alongi, *Mar Ecol Prog Ser* 1985)、細菌は、巣穴壁の酸化層で有機物や多毛類の出す粘液・糞を分解・資化して増殖している (Alongi, *Mar Ecol Prog Ser* 1985; Aller and Aller, *J Gen Microbiol* 1986)。イトゴカイは、底泥を摂食して増殖した微生物(主に細菌)を消化・吸収していると示唆されている (Cammen, *Mar Biol* 1980; Findlay & Tenore, *Science* 1982)。このような現象はガーデンングと称されている (Hylleberg, *Ophelia* 1975)。Kunihira ら (*Mar Pollut Bull* 2008) は、実環境でイトゴカイ個体群高密度時に微生物量が増加し、特に *Alphaproteobacteria* が増加することを明らかにした。これらのことから、イトゴカイと細菌は相互の生態および有機物分解に密接に関係していることは明白である。しかしながら、イトゴカイの体に生息している細菌種の系統学的な位置や、イトゴカイが消化した細菌がイトゴカイの体組成になっていることの確認はされていない。そのため、イトゴカイ餌資源の現存量の把握および動態の解析には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では堆積有機物の分解に関するイトゴカイと細菌の相互関係の解明を目指し、以下の課題に取り組む。

1) 浅海有機汚泥域における堆積有機物と微生物相の関係解析

イトゴカイは代表的な有機汚泥域の指標種であるが、微生物相は堆積物中の有機物量の増加に伴ってどのように変化しているのかを明らかにする。

2) イトゴカイの増殖に伴う堆積物中の有機物量と微生物相の変化

室内水槽実験により、イトゴカイの増殖過程で堆積物中の微生物の量および群集構造がどのように変化するのかを明らかにする。

3) 炭素・窒素安定同位体比に基づくイトゴカイの餌資源の特定

イトゴカイの餌資源を特定するために、室内水槽系において養殖魚用餌料を与えてイトゴカイを飼育・培養し、堆積物、餌料、餌料の分解物、餌料を同化した細菌について炭素・窒素安定同位体比の分析を行い、イトゴカイの栄養源を特定する。

4) イトゴカイ周辺の活性細菌群集構造の解析

野外および室内飼育槽からイトゴカイを採取し、イトゴカイの体に生息している細菌の系統学的位置を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 浅海有機汚泥域における堆積有機物と微生物相の関係解析

愛媛県南宇和郡愛南町南部に位置する海域の魚類養殖場内外において 2008 年 7 月 (20 地点) および 2009 年 2 月 (8 地点) に水質および底質の調査を行った。堆積物は底質表層から 1cm を採取し、その場で酸化還元電位を測定し、実験室に持ち帰った後に酸揮発性硫化物量を測定した。堆積物試料は、有機物量 (TOC) と微生物バイオマーカーであるキノンを指標としたキノンプロファイルの分析を行った。試料は分析するまで -20°C で凍結保存した。キノンプロファイルは、微生物の持つ電子伝達物質の一つであり、この量は微生物バイオマスを、キノン種の違いは微生物群集の違いを表す。本研究では、この凍結保存試料を用い分析・解析を行った。

2) イトゴカイの増殖に伴う堆積物中の有機物量と微生物相の変化

室内水槽実験には底面積 600 cm² の水槽を 2 基用意し、熊本県天草市楠浦湾魚類養殖場より採集した底泥を深さ 2 cm になるように敷き詰め、同湾の濾過海水を入れ、エアレーションを行い、一方をイトゴカイ散布系 (初期密度 3 万個体/m²)、他方を非散布系とし、イトゴカイを加えた日から 50 日間実験を行った。5 日ごとに海水を交換するとともに凍結乾燥した養殖用飼料 (MP) 2.053 g (0.885 g-C) を添加した。実験期間を通じて約 19°C、DO 6 mg/L 以上を維持した。底泥を適宜採取し、酸化還元電位、底泥密度、イトゴカイ個体群密度、全有機炭素 (TOC)、キノンプロファイルの測定・分析に供試した。

3) 炭素・窒素安定同位体比に基づくイトゴカイの餌資源の特定

実験に用いたイトゴカイの培養は、愛媛県南宇和郡愛南町福浦湾のブリ・マダイ養殖場の海底より採取した底泥を凍結し、底生生物を死滅させた後に、イトゴカイのみを入れ、イトゴカイの飼育培養にエクストルーダーペレット(以下、EP)を餌として EP 粉末を使用し、130 日以上培養した水槽より 2~3 週間間隔で計 7 回イトゴカイを採取し、堆積物については同期間に計 4 回採取し、炭素・窒素安定同位体比の測定を行った。

イトゴカイの餌資源を推定する上で、イトゴカイの飼育培養に使用した EP を分解・資化する細菌の炭素・窒素安定同位体比が餌資源の指標の 1 つになると考え、以下のような実験を行った。ろ過海水に EP を懸濁して滅菌し、そこに熊本県天草市楠浦湾のマダイ養殖場海底のイトゴカイ周辺より単離した *Roseobacter* sp. KMUT-1 株を摂取し、2 週間振盪培養した。その後、目合い 10 μm と 20 μm のプランクトンネットを用い分離し、ろ液についてはさらに遠心分離法により KMUT-1 株とモイストペレット分解物に分けて、それぞれの炭素・窒素安定同位体比を求めた。ここで KMUT-1 株画分は、同細菌がピンク色をしていることから色で判別した。

4) イトゴカイ周辺の活性細菌群集構造の解析

イトゴカイの生育に密接に関係している細菌系統群を明らかにするために、愛媛県南宇和郡愛南町南部に位置する海域の魚類養殖場の海底(水深 60 m)より 2010 年 1 月に採取したイトゴカイと、同海域で採取し室内において約 490 日継代培養したイトゴカイを試料とし、RT-PCR-DGGE 法によりイトゴカイの体に生息している細菌群集構造を比較した。泳動後に観察された DNA バンドの塩基配列を解読し、データベースより系統学的位置を調べた。

4. 研究成果

1) 浅海有機汚泥域における堆積有機物と微生物相の関係解析

全 28 試料の堆積物の TOC は 1.66~49.6 mg/g-乾泥の範囲であった。TOC と微生物量とみなせるキノン量に強い正の相関が認められた。TOC の低い地点ではユビキノン(UQ)-8 存在比が最も高く、これは硫黄酸化細菌やアンモニア酸化細菌などの *Betaproteobacteria* 門に属する細菌群が堆積物中に優占して生息していることを示している。TOC レベルが高いほど、UQ-10 の存在割合が高くなる結果が示された。これらのことから、有機物負荷の増加に伴い UQ-8 を持つ

Betaproteobacteria 門に属する細菌群主体の群集構造から UQ-10 を持つ *Alphaproteobacteria* 門に属する細菌群主体の群集構造に変化することが明らかになった。イトゴカイの増加と同時期に堆積物の UQ-10 含有量が増加する結果が得られていることから、*Alphaproteobacteria* 門に属する細菌群は、イトゴカイの生育・増加および有機物量の増加の両方に関係していることが明らかになった。

2) イトゴカイの増殖に伴う堆積物中の有機物量と微生物相の変化

実験開始後、イトゴカイは 40 日目まで急激に増殖し約 81 万個体/ m^2 になった。散布系の酸化還元電位は、5 日目以降上昇し 20 日目を降は酸化であったのに対し、非散布系は実験期間を通じて -110 mV と還元性であった。微生物量を表すキノン量は、散布系・非散布系共に緩やかに上昇した。細菌群集構造の変化を評価するために、キノンプロファイルを基に非類似度を算出しクラスター分析を行った。散布系と非散布系の細菌群集構造は、実験開始 20 日目まではほぼ同じ群集構造(Group III)であったが、30 日以降は散布系(Group II)と非散布系(Group I)でそれぞれ別のグループとなった。Group I は、UQ 種の割合が高く、特に UQ-8 の割合が高く、好気性細菌の増殖、アンモニア酸化細菌の増殖が考えられる。Group II では MK-6, 7 の割合が高く、硫酸還元菌の増殖が考えられる。したがって、イトゴカイが生息・増殖することにより、好気的環境が形成され、好気性細菌の増殖が促進されることが示された。実環境ではイトゴカイ高密度時に堆積物中の細菌群集は UQ-10 を持つ *Alphaproteobacteria* 門に属する細菌が優占(Kunihiro et al., *Mar Pollut Bull* 2008)することが明らかになっているが、水槽実験では同様の結果は得られなかった。これは水槽という限られた空間にイトゴカイが高密度に増殖したことにより、イトゴカイによる底泥の摂食作用が高くなったことによる影響が考えられる。

実験開始時と終了時の堆積有機物量と実験期間中の投入有機物量 173 g/m^2 から実験期間中の有機物分解量を算出したところ、散布系と非散布系でそれぞれ 154 g/m^2 , 87 g/m^2 であった。これらの値から、イトゴカイによって促進された有機物分解速度は 1.34 $\text{g-C}/\text{m}^2/\text{day}$ であった。この値は、Chareonpanich et al. (*Mar Pollut Bull* 1994) が報告したイトゴカイによる有機物分解速度と同程度である。以上のことから、イトゴカイの増殖により好気性細菌の増殖が促進され、イトゴカイと細菌が協働して有機物の分解に貢献していることが示された。

3) 炭素窒素安定同位体比に基づくイトゴカイの餌資源の特定

イトゴカイの炭素・窒素安定同位体比は、それぞれ $-16.0 \pm 0.35\%$ 、 $13.7 \pm 0.29\%$ であった。餌資源と推定される位置に近いのは、EP と $10 \mu\text{m}$ 以下の *Roseobacter* sp. KMUT-1 株であったが、イトゴカイの炭素安定同位体比が餌資源と推定される値よりも 2.7 倍離れていることから、EP と $10 \mu\text{m}$ 以下の KMUT-1 株を選択的に利用しているとは考えられない。Kikuchi and Wada (*Hydrobiologia* 1996), Fry (*Limnol Oceanogr* 1988)は、堆積有機物と多毛類などの窒素同位体効果がそれぞれ $5 \pm 1\%$ 、 6% 前後と報告しており、この高い同位体効果を選択的な細菌の消化によるものではないかと推測している。本研究においても堆積物とイトゴカイの炭素・窒素安定同位体比の差は大きいことから、イトゴカイは堆積物を構成する有機物の分解物またはそれを資化した細菌を捕食していると推測される。

4) イトゴカイ周辺の活性細菌群集構造の解析

野外と室内飼育水槽から採取されたイトゴカイの体の細菌の DGGE バンドパターンは類似しており、主要な DNA フラグメントの泳動位置が一致していた。

最もバンドの輝度が高かった DNA フラグメントをシークエンスしたところ、*Alphaproteobacteria* 門 *Rhodobacteraceae* 科に属する細菌であることが明らかになった。このことから、特定の系統に位置する細菌、特に *Alphaproteobacteria* 門に属する細菌がイトゴカイの生育に関係または体に生息していることが明らかになった。

現在、安定同位体標識された微生物バイオマーカー(DNA、キノン)を指標に利用し、有機物を分解した細菌を直接にイトゴカイが餌資源として利用しているのか調べている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tadao Kunihiro, Hiroyuki Takasu, Tomoaki Miyazaki, Yuuta Uramoto, Kyoko Kinoshita, Supaporn Yodnarasri, Daigo Hama, Minoru Wada, Kazuhiro Kogure, Kouichi Ohwada, and Hiroaki Tsutsumi.

Increase in *Alphaproteobacteria* in association with a polychaete, *Capitella* sp. I, in the organically enriched sediment.

The ISME Journal (Nature Publishing Group). 査読有, DOI: 10.1038/ismej.2011.57 (March 16, 2011, accepted)

[学会発表] (計 3 件)

① Tadao Kunihiro, Hiroaki Tsutsumi, and Koji Omori (2010.9, Matsuyama, Japan) Bioremediation experiment in fish farm sediments with artificially cultured colonies of a deposit-feeding polychaete, *Capitella* sp. International Symposium on Modeling and Analysis of Marine Environmental Problems (MAMEP 2010). P.74.

② 國弘忠生、大森浩二、伊藤克敏、堤 裕昭 (2010.3, 東京) 魚類養殖場由来の有機物が与える海底の微生物群集への影響. 日本生態学会第 57 回全国大会. P.322.

③ 國弘忠生、堤 裕昭、伊藤克敏、大森浩二 (2009.11, 東広島) 魚類養殖場周辺海域の堆積有機物と微生物群集の関係. 第 25 回日本微生物生態学会. p.54.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國弘 忠生 (KUNIHIRO, TADAO)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・グローバル COE 研究員

研究者番号：90512690