

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 29 年 2 月 27 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 東海大学

職 教授

氏名 西川 淳

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

ゼラチン質動物プランクトン遺骸の微生物分解に関する研究

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 西川 淳	東海大学海洋学部	教授	
拠点対応教員 大林由美子	愛媛大学 CMES	助教	

3 研究内容 （別紙）

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」

共同研究報告書

研究課題：ゼラチン質動物プランクトン遺骸の微生物分解に関する研究

西川 淳（東海大学海洋学部）

大林 由美子（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

### 【研究目的】

近年、世界各地でクラゲ類（刺胞動物）、クシクラゲ類（有櫛動物）などのゼラチン質プランクトンの大量発生が報告されている。大量発生後に生じるそれらの遺骸は、他の生物のエネルギー源として、また微生物分解により再生される栄養塩類の供給源として、海洋生態系において重要な役割を果たしていると考えられるが、遺骸の微生物分解過程についての詳細はあまりわかっていない。本研究は、大量発生するゼラチン質プランクトンとして、瀬戸内海や折戸湾のクラゲ類、クシクラゲ類を対象とし、それら遺骸の分解にともなう水中の有機炭素濃度（TOC）、原核微生物数、微生物叢の変化を実験により調べ、海洋におけるゼラチン質動物プランクトン遺骸の微生物分解過程に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。

### 【研究内容】

以下に示す 6 種類の系を作製し、2 種のゼラチン質動物プランクトン、ミズクラゲ *Aurelia coerulea* (刺胞動物門鉢虫綱) およびウリクラゲ *Beroe cucumis* s. l. (有櫛動物門無触手綱) の遺骸を用いた分解実験を行った。

- ・ AuN (微生物群集を含む天然海水 + ミズクラゲ遺骸)
- ・ BeN (微生物群集を含む天然海水 + ウリクラゲ遺骸)
- ・ N (微生物群集を含む天然海水のみ)
- ・ AuC (滅菌海水 + ミズクラゲ遺骸)
- ・ BeC (滅菌海水 + ウリクラゲ遺骸)

・C (滅菌海水のみ)

実験に用いたミズクラゲは、2016年6月に静岡市折戸湾にてバケツで採集、ウリクラゲは、2016年7月に愛媛県松山市沖の瀬戸内海にて愛媛大学調査実習船「いさな」を用いて改良ノルパックネットにより採集した。海水は、ウリクラゲ採集と同日同地点で「いさな」の自律型採水システムを用いて水深10m付近から採取し、目合い200 $\mu\text{m}$ のメッシュを通して大型粒子を除去したものを微生物群集を含む天然海水、それをオートクレーブ滅菌したものを滅菌海水として使用した。いずれの系もはじめの海水量を1Lとし、AuNおよびAuCにはミズクラゲ遺骸片(湿重量8~13g)、BeNおよびBeCにはウリクラゲ遺骸(同2~3g)を入れた。各系はいずれも2連で作製し、22 $^{\circ}\text{C}$ (海水採取時の現場水温)暗所で20日間インキュベートした。インキュベート期間中、経時的に、各実験ボトルから試料水の一部を無菌的作業により採取し、水中の有機炭素濃度、原核微生物数、微生物群集構造の解析用の試料とした。

有機炭素濃度は、実験開始直後(0日目)および、1, 2, 3, 5, 8, 11, 14, 19日目の各ボトルの試水をガラスアンプルにとり、燃烧触媒酸化方式TOC計を用いて測定した。原核微生物数は、原海水および1, 2, 3, 5, 8, 11, 14, 19日目の各ボトルの試水を中性緩衝ホルマリン(終濃度1.8%)で固定後、濾過により孔径0.2 $\mu\text{m}$ のフィルター上に捕集された原核微生物細胞をDAPI染色し、落射蛍光顕微鏡下で計数した。原核微生物群集については、4, 9, 20日目に採取した試料水から孔径0.2 $\mu\text{m}$ のフィルター上に微生物を捕集してDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のV3-V5領域をターゲットとしたPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法により微生物叢の解析を行った。

本報告書では、上記6種類の系のうち、AuN, BeN, Nの各系の結果の概要を中心に報告する。

### 【研究成果】

水中の有機炭素濃度は、クラゲ遺骸を含まない対照区Nでは実験開始時には約1 $\text{mgC L}^{-1}$ で、その後も実験期間を通して大きな変化は見られなか

った。これに対して、ミズクラゲ添加区 AuN, ウリクラゲ添加区 BeN では実験初期から対照区 N (約  $1 \text{ mgC L}^{-1}$ ) に比べて著しく高い値となり、以降、時間と共に低下した。また、有機炭素量の最大値は、供した遺骸の湿重量に比例した。

実験に用いた海水（原海水）中の原核微生物数は  $1.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  であった。対照区 N の原核微生物数は実験期間を通して原海水と同程度であり大きな変化は見られなかったが、AuN および BeN では開始後数日の間、原核微生物数が急激に増加した。ミズクラゲ添加区では 3 日目もしくは 5 日目に最大となった後、11 日目には対照区に近い値まで減少した。ウリクラゲ添加区では 2 日目もしくは 3 日目に最大となった後、5 日目に激減したが、8 日目には再びやや増加した。

PCR-DGGE 法による微生物叢解析の結果（泳動像）を図 1 に示した。対照区 (N1, N2) では、多くのバンドが見られることから多様な種類を含む微生物叢であることがわかった。また 20 日目には若干の違いがあるものの各日のバンドパターンがほぼ共通していることから実験期間を通して類似した微生物叢であったと言える。一方、ミズクラゲ添加区 (AuN1, AuN2) およびウリクラゲ添加区 (BeN1, BeN2) では、4 日目にはそれぞれ数種類の比較的限られた微生物（バンド）が卓越しており、9 日目、20 日目と次第に卓越する種の数（泳動像上ではっきりとみられるバンドの数）が増えた。卓越して見られるバンドのなかには 4, 9, 20 日目で共通しているものもあるものの、各日のバンドパターンは異なっており、遺骸の分解過程において時間経過とともに微生物叢が変遷することが示唆された。また、ミズクラゲ添加区とウリクラゲ添加区の微生物叢も異なっていた。

以上の結果から、(1) これらゼラチン質動物プランクトン遺骸は、現場微生物群集が即座に利用可能な有機物を供給して微生物群集を活性化すること、(2) 遺骸は大型動物などによる捕食を受けない場合でも、微生物群集により活発に代謝され迅速に分解されること、(3) ミズクラゲとウリクラゲで分解に関与する微生物群とその時間的变化が異なる可能性があることが示唆された。

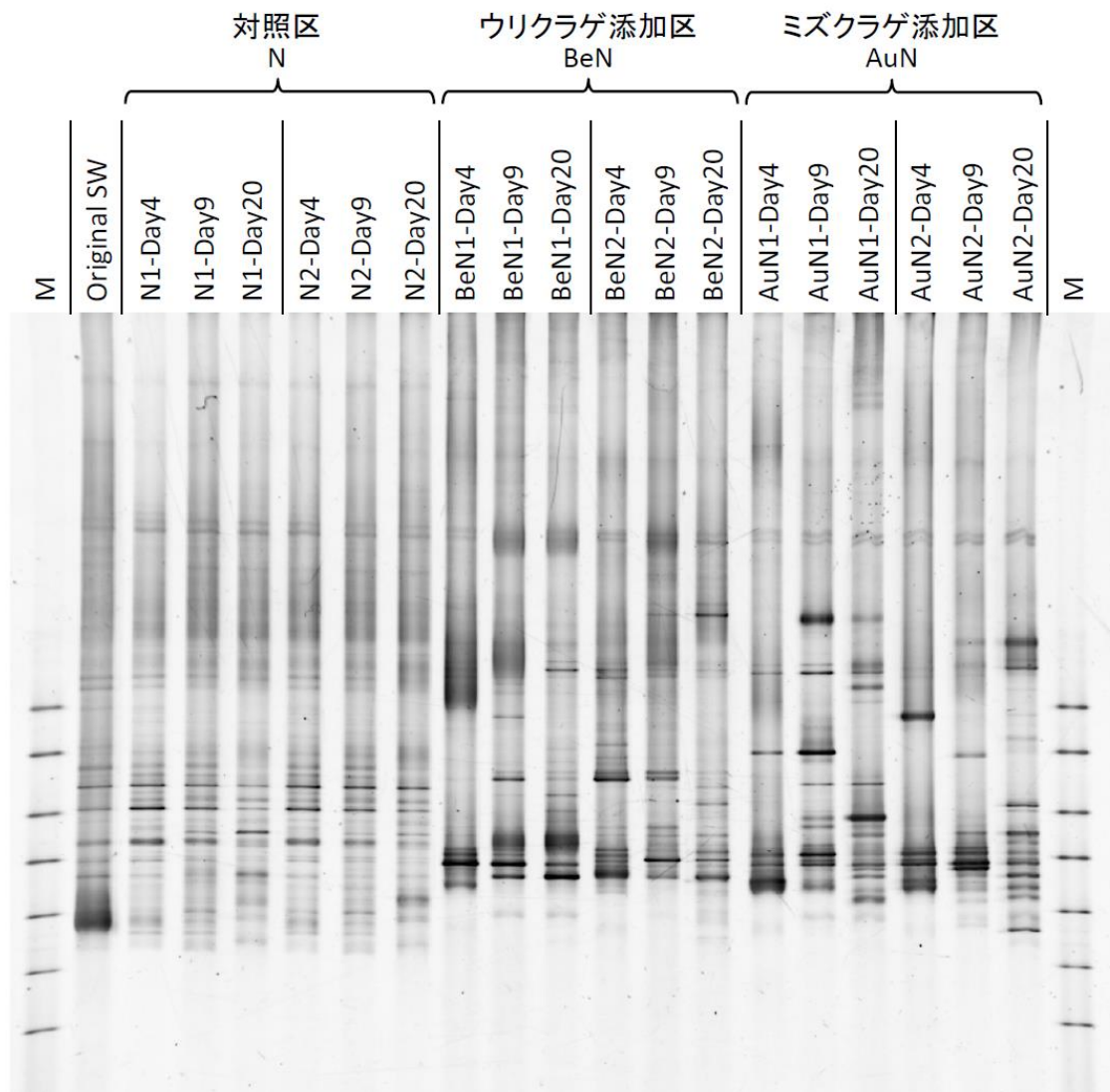


図 1. 16S rRNA 遺伝子の V3-V5 領域をターゲットとした PCR-DGGE 法による微生物叢解析の結果 (泳動像). 対照区 N, ミズクラゲ遺骸添加区 AuN, ウリクラゲ遺骸添加区 BeN の各系 2 本ずつの実験ボトルから 4 日目, 9 日目, 20 日目に採取した試料を用いた. 両端の M はポジションマーカー.

### 【今後の課題】

今回の分解実験で採取した試料について, さらに詳細な微生物群集構造解析を現在実施中である. また, 滅菌海水を用いた AuC, BeC, C の各系についても同様の解析を行っている. それらの結果も合わせて, ミズクラゲ遺骸, ウリクラゲ遺骸の分解に関わる微生物群およびその変遷と, 遺骸の分解機序について総合的に考察する.

さらに、クラゲ類やクシクラゲ類とは体成分が異なるサルパ類など、他のゼラチン質動物プランクトンについても同様の実験を行い、ゼラチン質プランクトンの遺骸の分解に関わる微生物叢や分解機序の違いについてより詳しく明らかにしていく必要がある。

**【成果発表】**

<研究発表>

今中 加奈・大林 由美子・宗林 留美・西川 淳

「クラゲ遺骸の微生物分解に関する研究」. 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア 2016, 2016年12月, 静岡県富士市, 要旨集 p. 79.