

微生物叢解析による干潟底泥中の微生物機能と底質環境特性

Analysis of Microbial Community in Tidal Flat for Investigation of Relationship between Microbiological Function and Physicochemical Characteristics of Sediment

中野光暁¹・湯岳琴²・森村茂³・木田建次⁴・増田龍哉⁵・滝川清⁶

Mitsuaki NAKANO, Yue-Qin TANG, Shigeru MORIMURA, Kenji KIDA
Tatsuya MASUDA and Kiyoshi TAKIKAWA

Relationship between distribution of bacteria and physicochemical characteristics in tidal flat was studied. Sediment samples in Shirakawa river as sandy site and Midorikawa river as muddy site in Kumamoto Prefecture were investigated for the analysis of microbial community and the determination of sediment characteristics such as oxygen-redox potential, organic matter content, and so on. Midorikawa was seemed to be anaerobic and anaerobic bacteria were detected at that site. On the other hand, Shirakawa river was aerobic and aerobic bacteria were detected. Sulfur reducing bacteria, one of the anaerobic bacteria, might be the key group for understanding the relationship between microbial community and physicochemical characteristics in tidal flat.

1. はじめに

九州西部に位置する有明海は、日本の干潟総面積の約40%に及ぶ広大な干潟が発達した大型閉鎖性内湾である。その干潟には多種多様な生物が生息し、食物連鎖を通じた物質循環がバランス良く効率的に行なわれており、干潟は高い浄化機能を有している。なかでも、微生物は自然環境における重要な分解者であり、特に干潟においては、好気性と嫌気性の微生物が複雑な環境条件の下、互に関連しつつ有機物を分解することで、干潟の浄化機能に寄与していると考えられる。また、好気性および嫌気性の微生物は、窒素や硫黄などの元素循環に対しても重要な働きをしていると考えられる。しかしながら干潟に生息する微生物叢に関する知見はほとんど得られていない現状にある。筆者らは、干潟底質の生態系における一つの指標として微生物叢の変化に着目しており、人工巣穴による底質改善技術の現地実証試験を実施して、嫌気性細菌である硫酸還元菌の減少が人工巣穴設置場所の好气的環境への変化を示唆することを明らかにした(増田ら, 2007)。

本研究は、干潟底泥中の微生物叢解析法の改善策について検討を行うとともに、粒度組成が異なる2つの自然河口干潟をサンプリング地点として選択し、両河口干潟において標高の異なる2箇所から、5月と9月の異なる季

節にサンプリングを行い、干潟に生息する微生物叢の機能と干潟環境特性の関係を明らかにすることを目的としている。

2. 調査対象干潟の概要と底質環境特性

(1) 調査対象干潟の概要

粒度組成が異なる自然河口干潟として、白川河口(砂質干潟)および緑川河口(泥質干潟)を選択した。図-1に示す白川河口干潟(砂質)および緑川河口干潟(泥質)において、潮上帯付近(上部)と潮間帯(下部)のそれぞれ2箇所(図-2)、2008年5月と9月に調査を行った。

調査時に目視で大型底生生物を確認した結果、白川河口の上部はハクセンシオマネキ、下部はハマグリ等が生息していた。一方、緑川河口の上部はチゴガニ、下部はヤマトオサガニやムツゴロウ等が生息していた。

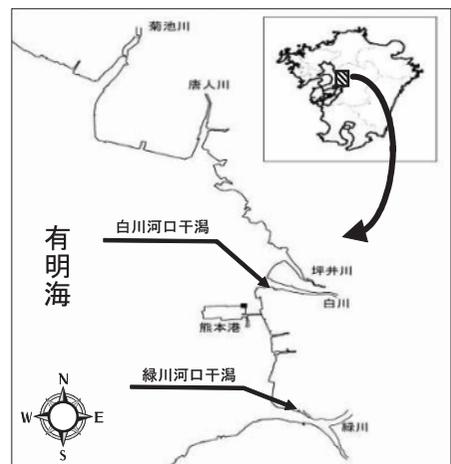


図-1 調査干潟の位置図

1	修(工)	熊本大学学生大学院自然科学研究科
2	工博	北京大学教授
3	工博	熊本大学准教授大学院自然科学研究科
4	工博	熊本大学教授大学院自然科学研究科
5	正会員 博(工)	熊本大学特任助教大学院先導機構
6	フェロー 工博	熊本大学教授沿岸域環境科学教育研究センター

表-1 サンプリング地点の分析結果

時期	場所	標高	pH (-)	NaCl (%)	ORP (mV)	標高 T.P. (m)	有機物量 (mg/g-土)
5月	白川	上部	7.18	N.D. ^a	210	+1.494	6.34
		下部	7.78	1.97	180	-0.476	23.7
	緑川	上部	7.68	0.76	-72	+0.553	69.6
		下部	8.60	1.34	-40	-0.833	98.1
9月	白川	上部	N.D.	N.D.	110	N.M. ^b	21.8
		下部	8.20	0.51	93	N.M.	20.7
	緑川	上部	8.76	N.D.	-50	N.M.	57.8
		下部	8.68	0.37	-20	N.M.	108.9

^a N.D., not determined. ^b N.M., not measured.

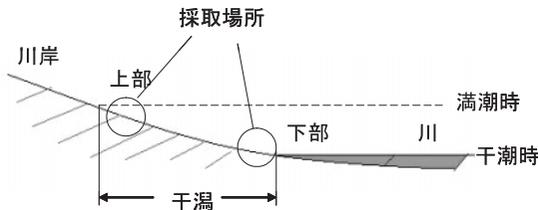


図-2 標高の異なるサンプリング箇所の模式図

(2) 調査内容および底質環境特性

調査内容は微生物、地盤高、底質（粒度組成、強熱減量、酸化還元電位）、水温、pH、塩分濃度で、微生物と強熱減量は表層5cmの底泥を採取し、クーラーボックスで氷冷したものを試験室に持ち帰った後、分析を行った。酸化還元電位（ORP）、水温、pH、塩分濃度は東亜DKK社製ポータブル型測定装置を用いて現地で測定した。有機物量は強熱減量から求め、粒径分布はHORIBA社製レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置を用いて測定した。

表-1に示したように、測定時のORPから判断して白川は緑川と比較して好氣的になりやすく、底泥中の有機物濃度は低いことが確認できた。また、粒径分布については、表-2に示したように、白川は中央粒径が約0.15mmの粒子が主であったのに対し、緑川は約0.02mmの粒子が主であった。なお、9月の白川下部における中央粒径が小さかったのは、表層を泥質粒子が覆っていたことによるものと考えられた。

3. 微生物叢解析による干潟底泥中の微生物叢の特徴

(1) 分析方法の概要

粒度組成、標高、サンプリング時期の違いによる微生物叢の特徴を調べるために、図-3に示した手順で、クローン解析を行った。

最初に、河口干潟底泥サンプル中に存在する細菌などの微生物から全DNAを抽出した。DNA抽出は、後述す

表-2 サンプルの中央粒径および含泥率

時期	場所	標高	中央粒径 (μm)	含泥率 (%)
5月	白川	上部	143.4	32
		下部	99.4	47
	緑川	上部	20.3	86
		下部	11.6	99
9月	白川	上部	151.0	25
		下部	12.7	88
	緑川	上部	36.9	70
		下部	14.1	93

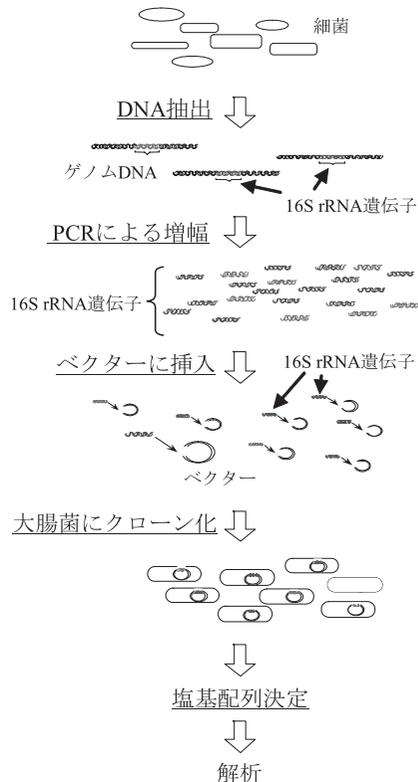


図-3 クローン解析方法の概要

るFast DNA SPIN Kit for Soil (Q-BIO gene社)を用いて行なった。

次に、抽出したDNAを鋳型とし、すべての種類の真正細菌における16S rRNA遺伝子を対象とするプライマーセット (Eu27F / Eu518R) (表-3)を用いてPCR (Polymerase Chain Reaction) による16S rRNA遺伝子断片の増幅を行った。得られた16S rRNA遺伝子断片を、ライゲーション反応によりベクターDNAに挿入した後、大腸菌に形質転換を行ってクローン化することで遺伝子ライブラリーを構築した。16S rRNA遺伝子ライブラリーの中から1サンプルにつき約20クローンを任意に選択し、シーケンサーCEQ 8000 (Beckman Coulter)を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をデータベースに照合しホモロジー検索を行うことで、生息する微生物の種類を推定した。また、系統樹を作成することにより、粒度組成、標高、サンプリング時期の違いと微生物叢の特徴について比較検討を行った。

(2) 効率的なPCRのためのタンパク質添加の検討

干潟底泥のようなサンプルからDNAを抽出し、目的とするDNA断片をPCRによって増幅する場合、サンプルに含まれる物質による阻害効果が見られる。そこで、PCRにおいて目的とするDNA断片を増幅できる条件を明らかにするために、DNA抽出法およびPCRにおけるタン

パク質添加効果の検討を行った。

最初にDNA抽出法について、使用するキットの種類とスキムミルクの添加効果の検討を行った。3種類のキットを使用して比較した結果、PCR増幅の再現性と操作の簡便性の両面で優れていたFast DNA SPIN Kit for Soilを用いることに決定した。このキットを用いる場合はスキムミルク添加の有無で顕著な違いが認められなかったことから、DNA抽出時にはスキムミルクは添加しないこととした。

次に、PCRにおけるタンパク質の添加効果について検討を行った。これまでの研究において、何も添加しない条件で16S rRNA遺伝子あるいは硫黄代謝や窒素代謝に関与する機能性遺伝子を標的とするさまざまなプライマーセットを用いてPCRを行った場合に、目的とするDNA断片が増幅できないことを経験している。そこで、そのような抽出DNAを用いて、T4 gene 32 protein、牛血清アルブミン (BSA)、スキムミルクの3種類のタンパク質を添加しPCRを行った。その結果、T4 gene 32 proteinまたはBSAを添加することで安定して目的DNA断片が増幅することを確認した。BSAの方が安価であることも考慮し、今後はどのような遺伝子を標的とする場合でもBSAを添加してPCRを行うこととした。

(3) ホモロジー検索結果による微生物叢の特徴

これまでの検討で決定した条件でDNAを抽出し、PCR増幅を行うことでクローンライブラリーを構築した。ライブラリーの中から1サンプルあたり約20クローンを任意に選択し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を

表-3 16S rRNA遺伝子領域増幅のためのプライマー

プライマー	塩基配列
Eu27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Eu518R	5'-GTATTACCGGGTCTCTGG-3'

表-4 ホモロジー検索による近縁種の推定

分類	5月				9月				備考
	白川		緑川		白川		緑川		
	上部	下部	上部	下部	上部	下部	上部	下部	
<i>Deltaproteobacteria</i> 綱	0	2	3	5	1	2	4	3	嫌気性微生物が多い
<i>Gammaproteobacteria</i> 綱	0	5	0	3	4	4	1	3	
<i>Chloroflexi</i> 門	2	0	5	2	1	1	4	1	
<i>Firmicutes</i> 門	0	1	1	3	0	1	3	0	
<i>Alphaproteobacteria</i> 綱	5	4	5	3	2	0	3	1	好気性微生物が多い
<i>Betaproteobacteria</i> 綱	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Actinobacteria</i> 門	5	1	0	1	0	0	2	0	
<i>Bacteroidetes</i> 門	4	5	2	0	0	0	2	6	
<i>Acidobacteria</i> 門	2	1	3	0	2	1	0	1	
<i>Planctomyces</i> 属	0	1	1	0	0	0	1	0	
<i>Verrucomicrobia</i> 門	1	0	0	2	1	0	0	0	
<i>Proteobacteria</i> 門	0	1	0	0	0	0	1	2	
<i>Gemmatimonadetes</i> 門	1	0	0	0	0	1	0	0	
Uncultured bacteria	0	0	0	0	0	0	1	1	
総クローン数	20	21	20	20	11	10	22	18	

*Acidobacteria*門, *Actinobacteria*門, *Alphaproteobacteria*綱に属する微生物は上部サンプルから多く検出されていることが確認できた。また, *Deltaproteobacteria*綱における硫酸還元菌の分布を調べた結果, 図-5に示したように, 上部・下部ともに複数のクローンが, *Desulfobulbus*属や*Desulfoluna*属などの硫酸還元菌に近縁であることが確認できた。白川と緑川では粒度が小さい緑川の方が, 上部と下部では下部の方が嫌氣的で硫酸還元菌に近縁な微生物が多いと予想されたが, 今回の解析の結果では, 白川と緑川では緑川の方に硫酸還元菌に近縁な微生物が集中したが, 上部と下部では顕著な違いが認められなかった。このように, 硫酸還元菌の分布に関しては標高の違いよりも粒度分布の違いの方が影響は大きいという結果が得られた。

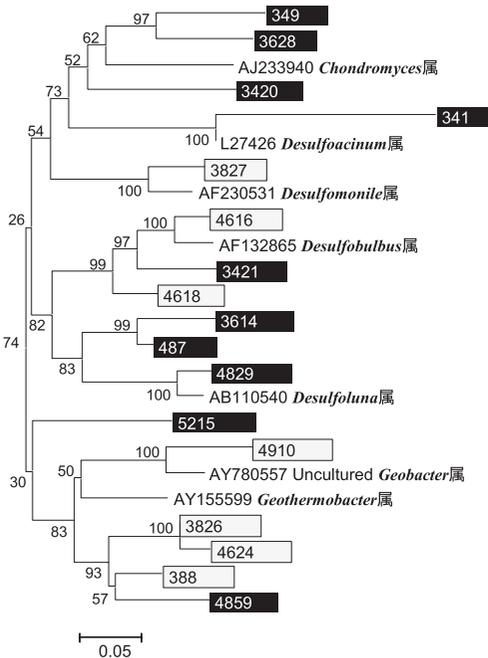


図-5 *Deltaproteobacteria*綱に着目した系統樹解析による上部と下部の微生物叢の比較 (□, 上部; ■, 下部)

表-5 検出されたクローン数のまとめ

	上部	下部	5月	9月	白川	緑川
好気性細菌	43	32	49	26	38	37
嫌気性細菌	29	36	32	33	24	41
硫酸還元菌	3	5	4	4	1	7

(注) 検出されたクローンのうち, uncultured bacteriaはカウントしていない。

4. おわりに

クローン解析を行い, 得られた塩基配列データを用いてホモロジー検索および系統樹解析を行うことで, 河口干潟における砂質/泥質, 標高, 5月と9月のサンプリング時期の違いによる微生物叢の特徴を調べた。サンプリング場所の環境特性との関連性を調べた結果, 表-5にまとめたように, 好気性細菌と嫌気性細菌の検出クローン数の比率, あるいは嫌気性細菌の中でも硫酸還元菌の分布に関して, 環境特性との関連性が認められ, 次のことを明らかにすることができた。

- (1) 砂質干潟である白川河口干潟は泥質干潟である緑川河口干潟と比較して好氣的な環境であり, 有機物濃度は低いことが確認できた。
- (2) クローン解析により微生物叢を比較した結果, 上部と下部では上部で, 白川と緑川では白川で好氣的細菌が優占しており, 下部と緑川では好気性細菌と嫌気性細菌が同程度存在することが明らかになった。
- (3) 硫酸還元菌については泥質干潟である緑川で多く検出され, 上部と下部では両方で検出された。
今後も調査を継続し, 解析するクローン数を増やすとともにDGGE解析や定量PCRも行うことで微生物機能と底質環境特性の関係を明らかにする。

参考文献

今中忠行・吉田 隆・松風まさみ (2002) : 微生物利用の大展開, エヌ・ティー・エス, pp. 29-33.

増田龍哉・滝川 清・森本剣太郎・丸山 繁・木田建次・大久保貴仁 (2007) : 有明海干潟海域環境改善へ向けた人工巣穴による底質改善技術の現地実証試験, 海岸工学論文集, 第54巻, pp. 1131-1135.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer1, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman (1997) : Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, Vol.25, pp. 3389-3402.

Betty, A. F., E. H. Karen (1996) : Substances interfering with direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR : Effects of bovine serum albumin, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.34, pp. 2125-2128.

Deplancke, B., K. R. Hristova, H. A. Oakley, V. J. McCracken, R. Aminov, R. I. Mackie, H. R. Gaskins (2000) : Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.66, pp. 2166-2174.

Iouliia, R., P. Kiran, L. Richard, Z. Karpel, C. Mark, C. Williams (2005) : Theory of electrostatically regulated binding of T4 Gene 32 protein to single- and double-stranded DNA, *Biophys. J.*, Vol.89, pp. 1941-1956.