

中海における主要微生物の生息状況と栄養塩変動との相関

松江工業高等専門学校生産・建設システム工学専攻 学生会員 ○橋田一輝

松江工業高等専門学校環境・建設工学科 正会員 山口剛士, 正会員 武邊勝道

島根県保健環境科学研究所 非会員 加藤季晋

1. 研究背景

中海は、海水の約 1/2 の平均塩分濃度を持った湖であり、日本では数少ない連結汽水湖である。中海の水深は、浅いため光が良く届く。このことから、窒素やリン等の栄養塩類が豊富に存在している。従って、中海は、これまでにプランクトンの大増殖や有機物の堆積が発生しており、水質の汚濁や富栄養化が問題となっている¹⁾。中海に生息する微生物は、有機物や栄養塩類の流入濃度、塩分濃度及び水温の変化によって変遷することが考えられる。また、それらの微生物群の中には、富栄養化の要因となる物質の物質循環を担う微生物も存在していると考えられる。従って、中海に生息する微生物群集構造解析を行うことで、中海における富栄養化と微生物叢の関連性を調査することが可能である。これまでの研究により中海湖心では、成層が常態化しているため、貧酸素水塊が形成されていることが知られている²⁾。また、化学分析の結果より、アナモックス細菌から生成されるヒドロキシルアミンが夏季において多く存在していることが明らかとなっている³⁾。さらに、海水の流入と硝化の光障害によって亜硝酸の蓄積が起こることも報告されていることから⁴⁾、中海で新しい脱窒反応であるアナモックス反応が起こっている可能性が考えられる。そこで本研究では、中海に生息する微生物を同定することを目的として、16S rRNA 遺伝子およびアナモックス細菌が有するヒドラジン酸化酵素をコードする機能遺伝子 (*hzo* 遺伝子)⁵⁾ を標的とした微生物群集構造解析を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルの調整

本研究では、中海湖心の底泥サンプルおよび湖底から 1m の位置の水サンプルを 2016/7/22, 8/4, 8/22, 9/28, 10/13, 10/26, 11/17 に採取した。採取した底泥サンプルの DNA 抽出には ISOIL for Beads Beating を用いて行い、DNA 濃度

は Qubit® dsDNA BR Assay Kits を用いて測定した。

採取した水サンプルは、ホルムアルデヒドを最終濃度 2% になるように混合し、固定させた。その後、0.2 μm のフィルターを用いて、固定した微生物をフィルター上に集菌させた。

2.2 微生物群集構造解析

16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセットとして、Mi515f および Mi806r を選定⁶⁾ し PCR を行った。PCR 増幅産物は精製後、MiSeq reagent Kit v2 (Illumina) を用いて MiSeq (Illumina) にて解析を行い、得られた 16S rRNA 遺伝子配列のデータ解析には Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) ソフトウェアを用いた⁷⁾。

2.3 機能遺伝子 (*hzo* 遺伝子) によるアナモックス細菌の検出

ヒドラジン酸化酵素をコードしている *hzo* 遺伝子を検出可能なプライマーセットとして、ana-*hzo*1F および ana-*hzo*2R を選定⁸⁾ し PCR を行った。PCR は、Schmid らの方法に準拠し行った⁹⁾。

3. 結果及び考察

3.1 16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析

中海の水、底泥サンプルを Miseq により解析した結果、中海には多くの未培養微生物が存在し、中海における物質循環を担っていることが明らかとなった。微生物群集構造解析の結果、全期間において *Proteobacteria* 門に属する微生物が最も多く検出された (図 1, 図 2)。中でも、硫酸還元細菌が最も優占しており、特に夏季において硫酸還元菌の存在割合が増加していた。古細菌に属する微生物は、全期間を通じて数%のみであったが、底泥付近の水サンプルにおいて *Nitrosopumilus maritimus* に近縁な微生物が最大で全体の約 6% を占めていた (図 3)。*Nitrosopumilus maritimus* は、海洋中のアンモニア酸化を担っていることが報告されている¹⁰⁾。また、本研究では

アンモニア酸化細菌がほとんど検出されなかったことから中海におけるアンモニア酸化は、*Nitrosopumilus maritimus* に近縁な微生物が担っていることが示唆された。また、亜硝酸イオン濃度が増加するに伴い、*Nitrosopumilus maritimus* の存在割合も増加していた(図3)。この結果より、底泥からの溶出による亜硝酸イオンの蓄積は、微生物による影響が大きいと考えられる。亜硝酸酸化細菌として、*Nitrospira* 属¹¹⁾、*Nitrospina* 属¹²⁾が発見された。しかし、脱窒プロセスを担う脱窒菌やアナモックス細菌に属する微生物は、16S rRNA 遺伝子を標的とした今回の解析では検出されなかった。また、一般的に脱窒菌は、分子系統学的に多様性が広いことが知られており、脱窒菌を把握するには 16S rRNA 遺伝子を標的とした解析よりも脱窒反応を担う機能遺伝子を標的とした解析が有効であると報告されている¹³⁾。今後は、中海に生息する脱窒菌と硝酸の変動との関連を把握するために脱窒に寄与する機能遺伝子の解析が必要であると考えられる。

3.2 *hzo* 遺伝子の機能遺伝子

16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物構造群集解析では、アナモックス細菌が検出されなかった。そこで、アナモックス細菌が有している *hzo* 遺伝子に着目し、アナモックス細菌が生息しているのかPCR法による確認実験を行った。その結果、*hzo* 遺伝子由来の遺伝子増幅は確認できなかった(データ非表示)。

4. 今後の展望

本研究では、分子生物学的手法を用いて中海に生息する微生物群集を明らかにした。中海における物質循環の多くを未培養微生物が担っていることが分かった。そのため物質循環を把握することは困難であった。今後は、未培養微生物の分離培養や生理学的特徴を把握することで中海における未培養微生物の役割を明らかにすることができると考えられる。

謝辞：本研究において、中海の試料の採取及び検体の提供、協力をいただいた島根県保健環境科学研究所、助成いただいたクリタ水・環境科学学振財団に感謝申し上げます。

参考文献：

- 1) 斉藤 直ら, 土木学会論文集B3 (海洋開発) ., 2014 , 2)
- 福岡 捷二ら, 土木学会論文集., 1999 , 3)
- 緒方 秀輔ら, 日本陸水学会第74回大会., 2009 , 4)
- 清家 泰ら, 沿岸海洋研究., 1997 , 5)
- Shimamura et al., Appl. Environ

Microbiol., 2007 , 6) Caporaso et al., Nature., 2012 , 7) Caporaso et al., ISME J., 2010 , 8) Quan et al., Environ. Microbiol., 2008 , 9) Schmid et al., Environ. Microbiol., 2008 , 10) Könneke et al., Nature 2005 , 11) Maixner et al., Environ. Microbiol., 2008 , 12) Watson et al., Archiv für Mikrobiologie., 1971 , 13) Michotey et al., Appl. Environ. Microbiol., 2000

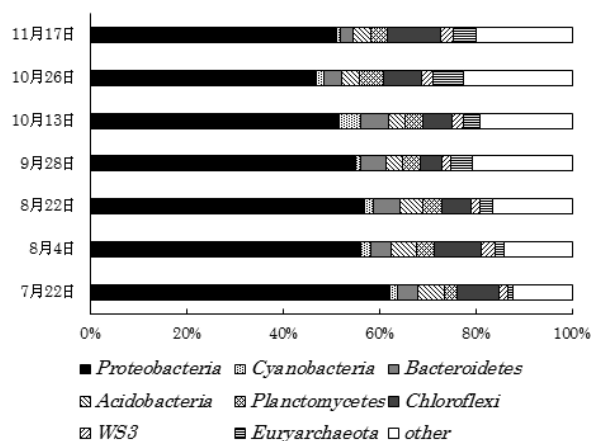


図1 底泥サンプルにおける門レベルでの微生物群集構造解析

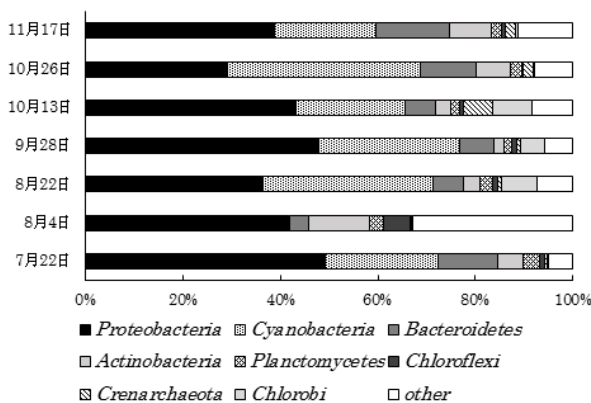


図2 水サンプルにおける門レベルでの微生物群集構造解析

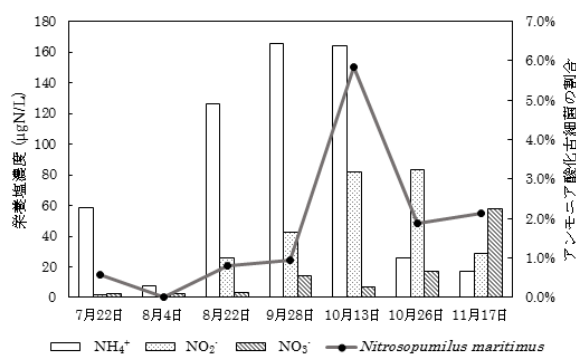


図3 中海におけるアンモニア酸化古細菌と窒素栄養塩との相関