

環境中から分離された有用細菌群の群集構造解析と有用細菌の単離

熊本大学工学部 学生会員 加藤 侑
 ティーエフケイ (株) 非会員 日高康博
 熊本大学大学院 正会員 川越保徳
 熊本大学工学部 非会員 佐藤字紘

1. はじめに

光合成細菌は水圏微生物の一種であり、湖沼、池、水田、土壌等、一般に富栄養化した水界に広く生息している。光合成細菌は、その名の通り植物と同様にバクテリオクロフィルとカロチノイド等の光合成色素を有し、光エネルギーを自らの活動に利用することができる特異な細菌である。光合成細菌は大きく緑色細菌と紅色細菌に分けられるが、脱窒能や水素生成能、さらには難分解性物質分解能など、様々な能力を有する細菌の存在が報告されており¹⁾、特に紅色非硫黄細菌は、代謝生成物や細菌菌体に生理活性作用を有している可能性がある。

我々は現在、水圏環境中から得られた光合成細菌の培養物に土壌改良剤としての機能などを見いだしたことから、農業、環境浄化、医療など幅広い分野への利用、展開について研究を進めている。一方、現在の光合成細菌培養物には複数の細菌が混在しており、上記機能に貢献する細菌は特定されていない。また、他混合細菌との量的・質的關係も不明な点が多い。そこで本研究では、当該培養物から光合成細菌を単離して同定するとともに、細菌叢を解明することを目的に検討を行った。

2. 実験方法

2.1 供試光合成細菌培養物

本研究では、供試光合成細菌培養物としてTFK (ティーエフケイ (株)) を用いた。本培養物は、土壌環境試料を植種源として培養され、その凍結乾燥物が健康食品などとして販売されている。

2.2 使用培地および培養方法

培養には、平石らのMYS培地²⁾に他微量成分を加えた改変MYS培地を用いた。

2.3 培養方法

液体培地による培養は、200ml容の三角フラスコに、

ビタミン類を除く改変MYS培地200mlを調製し、オートクレーブにて滅菌した。ビタミン類についてはオートクレーブ後に、ろ過滅菌した高濃度溶液を所定濃度になるように添加した。これに一白金耳(約10mg)の微生物凍結乾燥物を接種し、無菌アルゴンガス曝気により溶存酸素を除去した。フラスコを30°Cに一定制御された高温水槽内に設置し、嫌気・明条件下で、緩やかに振とう培養(100rpm)した。光源にはタングステンランプを用い、フラスコ表面での照度が概ね3000lxになるように設定し光照射した(図-1)。

表-1 改変MYS培地組成

培地成分 I	[g/l]	SL8(×1000)	[g/l]
リンゴ酸ナトリウム	3.6	EDTA-2Na	2
酵母エキス	0.5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2
		H ₃ BO ₃	0.1
培地成分 II	[g/l]	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	ZnCl ₂	0.1
KH ₂ PO ₄	1	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.02
NaCl	0.2	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.045	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01
		Na ₂ SeO ₃	0.001
培地成分 III	[ml/l]	Vitamine solution(×1000)	[g/l]
SL8	1.0	ビタミン B ₁ -HCl	0.5
Vitamine solution	1.0	ニコチン酸	0.5
		D-アミノ安息香酸	0.3
		ビタミン B ₁₂	0.05
		ビタミン B ₆ -HCl	0.1
		ビタミン H	0.05

2.4 光合成細菌の単離

光合成細菌の単離には、改変MYS培地、あるいはペプトン等を含む栄養培地に寒天を加えた、寒天平板培地を使用した。液体培養にて光合成細菌の増殖による培地の濁りと赤変を確認後、培養液を平板培地に希釈プレーティングし、改変MYSの場合には嫌気・明条件下で、栄養培地では好気・暗条件下にてコロニーの生成を図った。得られたコロニーから、桃色や赤色を呈するものを任意に選び、平板培地にて希釈プレーティ

ング,あるいは画線接種を繰り返して実施し,コロニーを純化した。

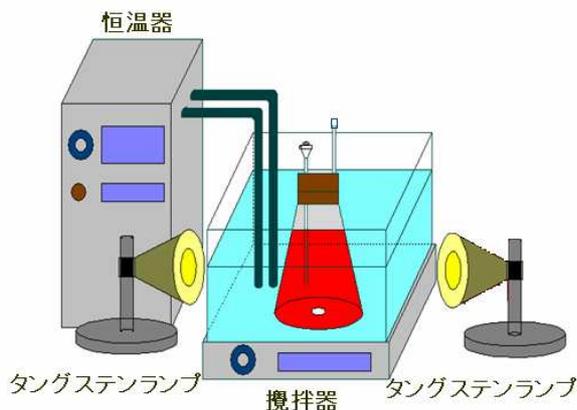


図-1 実験装置概図

2.4 単離細菌の同定と細菌叢解析

単離細菌の同定は,基質利用能や形態等の表現型と,16S rRNA 配列などの遺伝子型の分析結果に基づいて行った。また,細菌叢解析は,16S rRNA を対象とするPCR-DGGE 法にて行った。PCR には,細菌用ユニバーサルプライマー (GM5f, DS907r) を用い, DGGE ゲルの変性剤濃度勾配は20-60%とした。

3. 実験結果

3.1 光合成細菌の培養および単離

改変 MYS 液体培地に凍結乾燥標品を接種し,嫌気・明条件下で培養を開始したところ,約2日後には培養液の白濁がみられ細菌の増殖が確認された。続いて,約5日経過後には培養液が赤変したことから,この時点で光合成細菌が増殖したものと推定し,培養液を細菌の単離に供した。平板培地での希釈プレーティングの結果,培養を開始して1~3日経過後に,白色やクリーム色を呈する光合成細菌以外の細菌と推定されるコロニーが発生した。念のためこれらのコロニーを採取して16s rRNA 部分配列を調べた結果,光合成細菌ではないことが分かった。そこでさらに培養を継続した結果,7~10日経過後に,桃色や赤色を呈するコロニーが生成された。これらコロニーの純化を繰り返し,2種類の単一コロニーを得ることに成功した。

3.2 単離された光合成細菌の同定

得られた2種類の単一コロニーの16S rRNA 部分配列を調べた結果,各々,紅色非硫黄細菌の一種である

Rhodobacter 属細菌,および *Rhodospseudomonas* 属細菌と高い相同性が得られた。そこで,これら単離細菌を光合成細菌と判定し,同定を試みた。表-2 に,これら細菌の生理学的諸性質の一部を,図-2 に電子顕微鏡写真を示す。本結果および16S rRNA 部分配列等から,単離細菌を各々, *Rhodobacter azotoformans*, *Rhodospseudomonas palustris* の近縁種と同定した。

表-2 各単離細菌の生理学的諸性質

	単離細菌 No.1	単離細菌 No.2
コロニーの色	赤	赤
運動性	有	有
細胞形態	Ovoid (卵型)	Rod (桿菌)
細胞の多様性	無	無
孢子	無	無
光沢	有	有
色素産生	有	有
グラム染色	無	無
ウレアーゼ活性	無	有
カタラーゼ	有	有
オキシターゼ	有	有

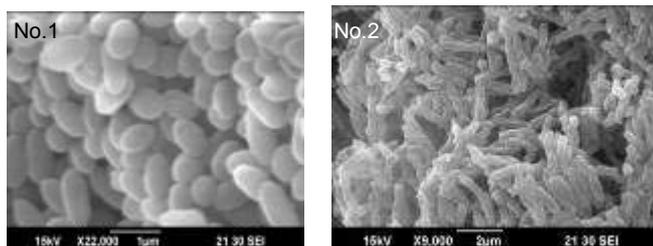


図-2 単離細菌の電子顕微鏡写真

3.3 凍結乾燥標品の細菌叢解析

DGGE ゲル上に複数のバンドが見られたため,それらを切り出してDNA配列を調べ,遺伝子データベース (FASTA, BLAST) による相同性検索を行った。その結果,いずれのDNAバンドについても, *Rhodobacter* 属細菌と最も高い相同性を示した。凍結乾燥標品の培養時に,光合成細菌以外の細菌や *Rhodospseudomonas* 属細菌が認められたにも関わらず, DGGE 上で存在が確認されなかった理由としては,核酸抽出操作やPCRでのバイアス,PCR条件の未最適化が考えられ,再検討が必要ではあるものの, DGGE の結果は,凍結乾燥標品の培養段階において *Rhodobacter* 属細菌が優占化している可能性を示すものと推定される。

【参考文献】

- 1) 北村博他, 光合成細菌, 学会出版センター (1984)
- 2) Hiraishi A., et al., System Appl. Microbiol., 19, 168-177(1996)