

有明海底泥中の細菌群集構造解析

田中 重光¹・田代 幸寛²・光武 奈緒子³・中園 唯³・小林 元太^{3*}
加藤 富民雄³・神田 康三³

¹佐賀大学有明海総合研究プロジェクト微生物相研究部門, ²西南女学院大学短期大学部生活創造学科,
³佐賀大学農学部生命機能科学科応用微生物学分野

(2011年1月12日受付 2011年2月22日受理)

Analysis of bacterial community structures in coastal sediments in the Ariake Sea

Shigemitsu Tanaka¹, Yukihiro Tashiro², Naoko Mitsutake³, Yui Nakazono³, Genta Kobayashi^{3*},
Fumio Kato³, and Kohzo Kanda³ (*Division of Microbial Technology, Ariake Sea Research Project, Saga University, 1 Honjo-cho, Saga 840-8502*¹; *Department of Life Study, Seinan Jo Gakuin University Junior College, 1-3-5 Ibori, Kokura Kita-ku, Kitakyushu, Fukuoka 803-0835*²; *Laboratory of Applied Microbiology, Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo-cho, Saga 840-8502*³) *Seibutsu-kogaku* **89**: 161–169, 2011.

Bacterial communities in sediment samples at two sites in the Ariake Sea, Ashikari and Rokkaku, were investigated by double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis (DG-DGGE) analysis and 16S rRNA gene (rDNA) sequencing analysis. Seasonal changes of the bacterial community structures were evaluated by cluster analysis using Ward's method from DG-DGGE profiles. The analysis indicated that the bacterial communities were more susceptible to a seasonal effect near estuarine areas than at offshore areas. In addition, DG-DGGE and 16S rDNA sequencing analyses revealed a shared bacterial community of sediment samples at Ashikari and Rokkaku, comprising the phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. In particular, 16S rDNA sequencing analysis showed that the annual detection rates of sulfate-reducing bacteria, including *Desulfobacterium*, *Desulfomonile*, *Desulfonatronum*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, and *Desulfonispora*, fluctuated between 0–20% and 5–15% at Ashikari and Rokkaku, respectively. These fluctuations may alter the balance of the sulfur cycle in the Ariake Sea, and might be an indicator of further environmental change at the tideland.

[**Key words**: Ariake Sea, bacterial community, 16S rDNA sequencing analysis, sulfate-reducing bacteria, double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis analysis]

有明海は九州最大の半閉鎖系の湾である。その沿岸部には、最大6 mに及ぶ干満の差と河川の流入により、日本最大の干潟が発達している¹⁾。有明海では、古くからこの干潟を利用した漁業やノリの養殖が盛んに行われてきた。しかし、近年では赤潮やノリの病気が増加し²⁻⁴⁾、漁獲量は減少傾向にある。このような環境変化は、いわゆる「有明海異変」として危惧されているものの、根本的な原因は未だ説明されていない。

一般に干潟は、水質浄化機能を有しているといわれる。干潟に生息する多種多様な生物による物質循環が、陸地や底層より供給される有機物や無機栄養塩などの除去に寄与しているのである⁵⁾。なかでも干潟底泥中に生息する細菌は、陸地から流入する有機物を分解し無機化することで、干潟の水質浄化に大きく貢献している⁶⁾。したがって、干潟域における水質浄化能の低下に伴う環境の悪化は、細菌群集構造に強く反映するものと考えられる。

*連絡先 E-mail: gentak@cc.saga-u.ac.jp

有明海に関して、古賀ら⁷⁾は、MPN法により脱窒菌群の生息分布を調査し、夏季の泥質干潟でその菌数が多くなることを報告している。また、Kariminiaae-Hamedani⁸⁾は、新規な脱窒菌を分離し、有明海干潟における窒素循環に深く関与することを示した。しかしながら、有明海底泥中の細菌群集構造に関しては、未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis (DG-DGGE)法^{9,10)}および16S rDNAクローンライブラリー法を用いた有明海干潟底泥中の細菌群集構造解析を行った。

実験方法

底泥サンプルおよびDNA抽出 実験に使用した有明海底泥は、佐賀県沖の2地点、芦刈（以下アシカリ：33° 11.766' N, 130° 12.494' E）および六角川自動観測塔（以下ロッカク：33° 08.149' N, 130° 13.303' E）より、2006年4月から2008年1月まで3ヶ月ごと（4, 7, 10, 1月）に採取した（Fig. 1）。アシカリとロッカクは、それぞれ六角川河口および海岸線より約3 km離れた沖合に位置しており、アシカリでは干潮時に干潟が出現する特徴がある。底泥は、エクマン・バージ採泥器（Rigo, Saitama）を用いて、表層から0–1 cmの部分を採取した。DNA抽出は、底泥約0.5 gから、土壤DNA抽出キット ISOIL for Beads Beating（ニッポンジーン）を用いて行った。

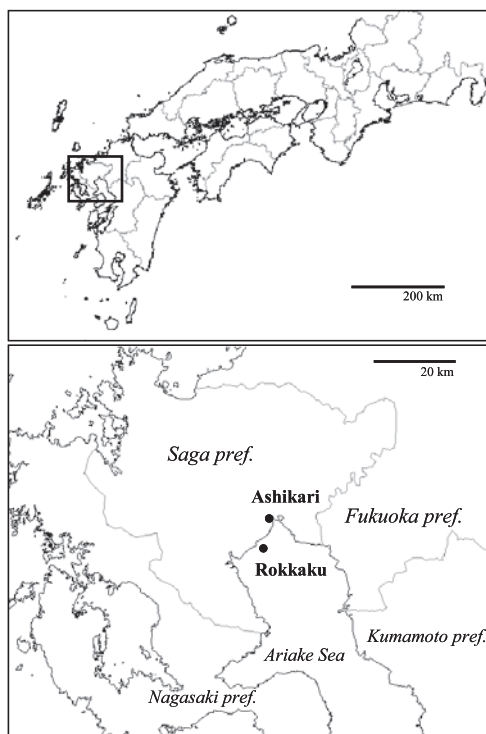


Fig. 1. Location of sampling sites.

DG-DGGE法 抽出したDNAを鋳型とし、HDA1-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')とHDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3')のプライマーセットを用いて、細菌16S rDNAのV2–V3領域をPCR増幅した¹¹⁾。PCR増幅にはPremix Ex Taq™ HS (Takara Bio, Shiga)を用いた。PCRの条件は、94°C/5分間、65°C/1分間、72°C/1分間のステップの後、94°C/1分間、64.5–55°C/1分間（1サイクルごとに0.5°C低下）、72°C/1分間のステップを20サイクル行い、さらに94°C/1分間、55°C/1分間、72°C/1分間を9サイクルの後、72°C/5分間の最終伸長反応を行った。

電気泳動にはDGGE mini-electrophoresis system (NB-1490; Nihon Eido, Tokyo)を用いた。DGGEゲルは、アクリルアミドの濃度勾配が6–8%、変性剤（100%：尿素7M、ホルムアミド40%(v/v)）の濃度勾配が30–70%となるように調整した。電気泳動は、1.0 × TAE Buffer中で、60°C、50 Vの条件で2時間、さらに66 Vで3時間行った。各サンプル由来のPCR増幅断片600 ngを電気泳動に供した。電気泳動マーカーにはDGGE marker II（ニッポンジーン）を用いた。電気泳動後のゲルはSYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いて染色し、UV照射下で画像を得た。得られた画像中の各バンドの移動度および輝度（バンドピークの高さ）は、画像解析ソフトTotalLab TL 120 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)を用いて算出した。全レーンについてDGGEマーカーに対する相対移動度より、同じ位置のバンドを同定し、各レーンにおける相対輝度が1%以上のものをバンドとして検出した。バンドの相対輝度(P_i)は、あるレーンのバンド*i*の輝度(n_i)および同一レーン中のバンド輝度の総和(N)より、 $P_i = n_i / N$ にて算出した。さらに、Blackbox program (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/Blackbox.html>)を用いて、クラスター分析を行うことで、類似のDGGEバンドパターンを示す底泥サンプルをグループ化した。クラスター分析には、ユークリッド距離を用いたワード法を用いた¹²⁾。

また、任意のDGGEバンドを切り出し、HDA1とHDA2のプライマーセットを用いて、上記の条件でPCR増幅を行った。増幅したDNAはpGEM-T easy vector systems (Promega, Madison, MI, USA)を用いてクローニングを行った後、塩基配列を解読した (Accession Nos.: AB559948–AB559965)。得られた配列は、DNA Data Base of Japan (DDBJ)の提供するプログラムBLAST version 2.2.24¹³⁾を用いて相同性検索を行った。さらに、Ribosomal

Database Project-II (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>)に登録された標準株を対照とした系統解析を行った。DGGEバンド由来の塩基配列と比較的高い相同性を示す標準株33種の塩基配列を取得し、DDBJの提供するプログラムClustalW, version 1.83を用いてアラインメントを作成した。また、ClustalW, version 1.83のオプション機能を利用して、系統的距離をKimuraモデル¹⁴⁾により算出し、近隣結合法¹⁵⁾により系統樹を描画した。Bootstrapの実行回数は1000回とした。

16S rDNA クローンライブラリー法 2006年4月, 7月, 10月, 2007年1月の底泥に関して, クローンライブラリーを作製した。まず, 抽出したDNAを鋳型に, 細菌16S rDNAのV1-V9領域を8f (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')と1510r (5'-GTGAAGCTT ACG GYTACCTTGTTACGACTT-3')のプライマーセットを用いてPCR増幅した¹¹⁾。PCR増幅にはPremix Ex Taq™ (Takara Bio)を用いた。PCRの条件は, 95°C/5分間の後, 95°C/30秒間, 55°C/30秒間, 72°C/1分間のステップを30サイクル行い, さらに72°C/5分間の最終伸長反応を行った。DG-DGGE法と同様にpGEM-T easy vector systems (Promega)を用いてクローンを作製した後, M13Fプライマーを用いて挿入断片の839~925 bpの塩基配列を解読した(Accession Nos.: AB559966-AB560125)。得られた塩基配列はRDP-IIが提供する検索プログラムSeqMatch¹⁶⁾を用いて, 標準株を対照に近縁種を調査した。上述の操作で得られた標準株の塩基配列をBioEdit (配列アラインメント編集ソフト; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)を用いてデータベース化し, クローン由来の配列の相同性を調査した。

実験結果

DG-DGGEバンドプロファイルにより観察された底泥細菌群集構造の変動 アシカリおよびロッカクの2年間のDG-DGGEバンドプロファイルをFig. 2に示した。各地点のバンドプロファイル中には, それぞれアシカリで36種, ロッカクで27種のバンドが検出された。これらバンドの相対輝度の増減を基に, ウォード法によるクラスター分析を行うことで, 各底泥サンプルの細菌群集構造をグループ化した(Fig. 3)。その結果, 底泥中の細菌群集構造は3つのクラスターに分類された。ロッカク由来の底泥サンプルは, アシカリと比べて非常に近い位置にクラスターを形成し, 2年間の細菌群集構造に季節的な大きな変動は見られなかった。一方, アシカリ由来の底泥サンプルは, 2つのクラスターを形成し, 1月の底泥サンプルは固有のクラスターを形成した。以上の結果より, 干潟域であるアシカリの細菌群集構造は, 沖合

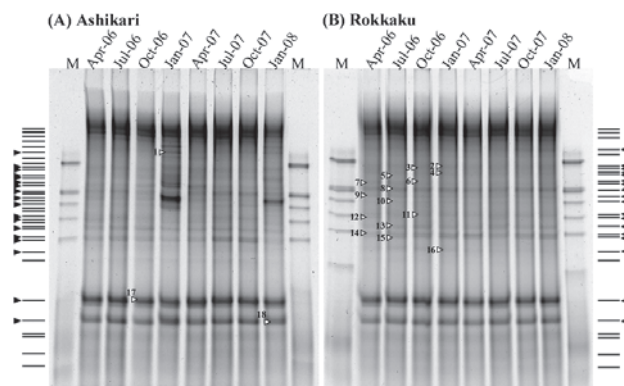


Fig. 2. DG-DGGE analysis of partial 16S rDNA fragments amplified with universal primers from sediment samples at Ashikari (A) and Rokkaku (B) every 3 months from April 2006 to January 2008. "M" indicates a reference marker. Each excised and sequenced band is marked by open arrow and numbered. Bands from samples at Ashikari and Rokkaku are indicated on the left and right side of gel respectively. Solid arrows indicate the identical positions of sequenced bands.

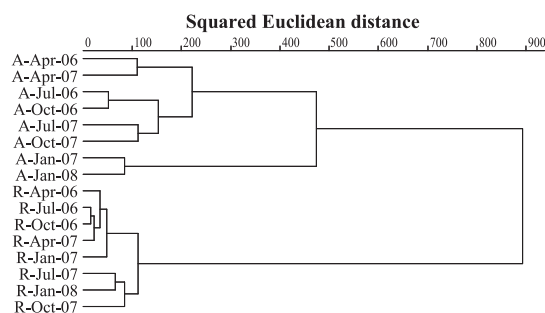


Fig. 3. Similarity between bacterial community structures of sediment samples from Ashikari and Rokkaku. Cluster analysis by Ward's method was performed using band relative intensities. Sediment samples from Ashikari and Rokkaku are indicated by the letters "A" and "R", respectively.

のロッカクよりも季節変動が大きく, 特に冬期には特有な細菌群が形成されることが示唆された。

DGGEバンドシーケンシングにより検出された近縁種 主要な移動度の異なる18個のDGGEバンドについて, シーケンス解析を行った。相同性検索の結果をTable 1に示した。解析を行った18個のバンドのうち9個(Band no. 1, 2, 3, 5, 6, 9, 13, 16, 17)が, *Proteobacteria*門に属す細菌として検出された。これら*Proteobacteria*門に次いで, 4個のバンド(Band no. 4, 7, 10, 12)が*Bacteroidetes*門に属す細菌として検出され, Band no. 10, 12は*Flavobacteriaceae*に属することが示された。一方, Band no. 1, 7, 9に関して, これらと同一移動度のバンドが, アシカリの1月の底泥中に顕著に見られた。特に, Band no. 1, 9は*Geobacteraceae*に属す細菌であること

Table 1. Closest relatives determined by DG-DGGE band sequencing.

Band no.	Phylum	Family	Closest relative	Accession no.	Length (bp)	Identity (%)
1	Proteobacteria	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i> sp.	AF019929	198	90
2	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.	Z93436	198	99
3	Proteobacteria	—	<i>Olavius algarvensis</i> Gamma 3 endosymbiont	AJ620496	197	98
4	Bacteroidetes	—	<i>Flavobacteria</i> bacterium Yb008	AB496663	192	100
5	Proteobacteria	—	δ - <i>Proteobacterium</i> MLMS-1	AY459365	199	89
6	Proteobacteria	Desulfobulbaceae	<i>Desulfobacterium catecholicum</i>	EF442982	198	98
7	Bacteroidetes	—	Bacterium PB90-2	AJ229236	192	93
8	—	—	Marine sponge bacterium PLATEdelici-(3)-6	EU346576	176	99
9	Proteobacteria	Geobacteraceae	<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i>	AY187304	191	93
10	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Robiginitalea myxolifaciens</i>	AB270585	192	96
11	Chlamydiae	Rhabdochlamydiaceae	<i>Rhabdochlamydiaceae</i> bacterium cvE55	FJ976100	197	90
12	Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Eudoraea</i> sp. MOLA 359	AM945589	192	98
13	Proteobacteria	Geobacteraceae	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	CP000148	199	89
14	Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Clostridium sartagoforme</i>	Y18175	198	97
15	Chloroflexi	—	<i>Dehalococcoides</i> sp. BHI80-52	AJ431247	173	91
16	Proteobacteria	—	δ - <i>Proteobacterium</i> PL12	AB468588	198	94
17	Proteobacteria	Ectothiorhodospiraceae	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. AKL11	EU709870	197	91
18	—	—	Marine sponge bacterium PLATEdelici-(3)-6	EU346576	176	96

—, Unclassified bacterial group.

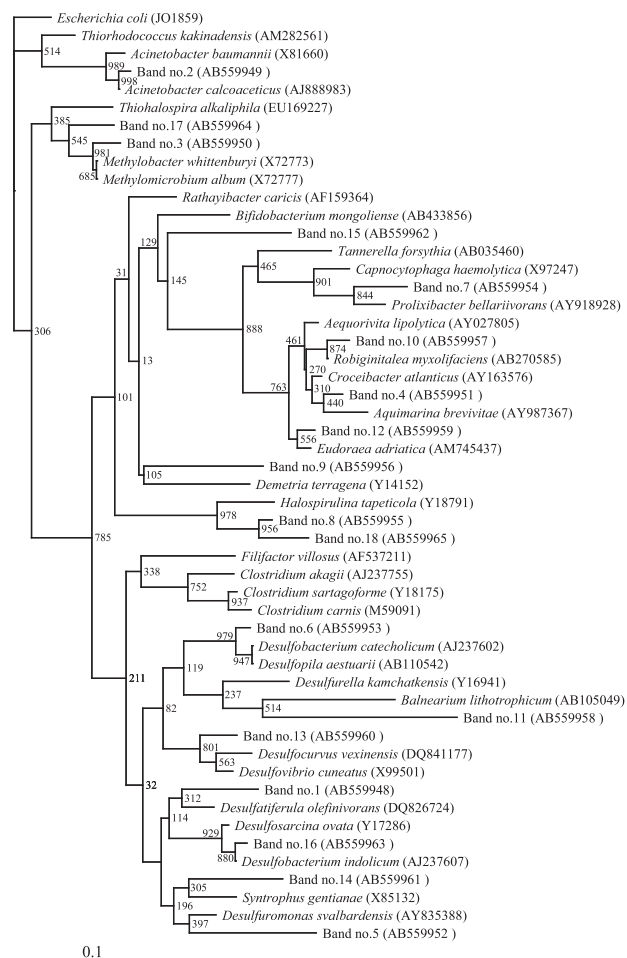


Fig. 4. Neighbor-joining tree of DGGE bands in the Ariake Sea sediments and related 16S rRNA gene sequences from type strains. *Escherichia coli* was used as an outgroup. Numbers in parentheses indicate GenBank nucleotide accession numbers. Bootstrap values are indicated at branch points. Scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

が明らかとなった。

さらに、作製したクローンおよびそれに近縁な標準株の塩基配列を用いて系統解析を行った (Fig. 4)。その結果、18個のバンドのうち7個 (Band no. 1, 5, 6, 11, 13, 14, 16) が、それぞれ硫酸還元菌 (SRB) である *Desulfobacteraceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfurobacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae* を含むクラスターを形成した。

16S rDNA クローンライブラリー法による細菌群集構造解析 アシカリとロッカクの詳細な細菌群集構造を比較することを目的として、各地点80クローン (各月20クローン) のクローンライブラリーを作製し、シーケンス解析を行った。Table 2に標準株を対象とした相同性検索の結果を示した。また、Fig. 5には綱レベルでの細菌分布を円グラフで示した。クローンを門レベルで分類した場合、*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* の7つの門が両地点から検出された。特に、*Proteobacteria* の年間の検出率はアシカリで50–80%、ロッカクで50–75%であり、優占的に分布していることが示された。また、*Proteobacteria* を綱レベルで分類した場合、 γ -*Proteobacteria* が優占的に存在することが明らかとなった。2006年4月、7月、10月、2007年1月の γ -*Proteobacteria* の存在比は、アシカリで35, 40, 50, 20%, ロッカクで55, 45, 20, 40%であった。SRBを含む δ -*Proteobacteria* については、アシカリで5–20%, ロッカクで15–20%の存在比で、いずれの地点においても常に検出された。一方、 α -*Proteobacteria* と β -*Proteobacteria*

Table 2. List of closest relatives among type strains in the RDP-II database of clones in 16S rDNA libraries.

Sampling location	Months	Domain	No. ^a	Phylum	No. ^a	Class	No. ^a	Genus and species	No. ^a	Max ^b	Min ^b
Ashikari	April	Bacteria	20	<i>Firmicutes</i>	1	<i>Clostridia</i>	1	<i>Soehngenella saccharolytica</i>	1	94	94
				<i>Bacteroidetes</i>	6	<i>Flavobacteria</i>	4	<i>Eudoraea adriatica</i>	1	98	98
								<i>Gaetbulibacter marinus</i>	1	95	95
								<i>Sediminibacter furfurosus</i>	2	97	96
						<i>Sphingobacteria</i>	2	<i>Terrimonas lutea</i>	1	95	95
								<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	1	88	88
				<i>Lentisphaerae</i>	1	<i>Lentisphaeria</i>	1	<i>Lentisphaera araneosa</i>	1	92	92
				<i>Proteobacteria</i>	11	<i>α-Proteobacteria</i>	1	<i>Rhizobium lusitanum</i>	1	97	97
						<i>β-Proteobacteria</i>	1	<i>Azoarcus buckelii</i>	1	92	92
						<i>δ-Proteobacteria</i>	2	<i>Desulfobacterium indolicum</i>	1	94	94
								<i>Haliangium tepidum</i>	1	90	90
						<i>γ-Proteobacteria</i>	7	<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	3	92	90
								<i>Methylococcus capsulatus</i>	2	91	91
								<i>Caedibacter caryophilus</i>	1	93	93
								<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i>	1	91	91
				<i>Cyanobacteria</i>	1	<i>Cyanobacteria</i>	1	<i>Halospirulina tapeticola</i>	1	87	87
	July	Bacteria	20	<i>Firmicutes</i>	1	<i>Clostridia</i>	1	<i>Blautia wexlerae</i>	1	85	85
				<i>Bacteroidetes</i>	1	<i>Sphingobacteria</i>	1	<i>Persicobacter diffluens</i>	1	86	86
				<i>Actinobacteria</i>	1	<i>Actinobacteria</i>	1	<i>Streptomyces platensis</i>	1	83	83
				<i>Chloroflexi</i>	1	<i>Caldilineae</i>	1	<i>Caldilinea aerophila</i>	1	84	84
				<i>Planctomycetes</i>	1	<i>Planctomycetacia</i>	1	<i>Rhodopirellula baltica</i>	1	88	88
				<i>Proteobacteria</i>	14	<i>α-Proteobacteria</i>	1	<i>Hyphomonas oceanitis</i>	1	90	90
						<i>β-Proteobacteria</i>	4	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	2	93	92
								<i>Variovorax soli</i>	1	96	96
								<i>Leptothrix mobilis</i>	1	96	96
						<i>δ-Proteobacteria</i>	1	<i>Cystobacter badius</i>	1	99	99
						<i>γ-Proteobacteria</i>	8	<i>Ectothiorhodosinus mongolicus</i>	1	90	90
								<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	1	89	89
Ashikari	October	Bacteria	20					<i>Methylomicrobium japonense</i>	1	89	89
								<i>Steroidobacter denitrificans</i>	1	91	91
								<i>Thiohalomonas nitratreducens</i>	4	94	92
				<i>Verrucomicrobia</i>	1	<i>Verrucomicrobiae</i>	1	<i>Luteolibacter pohnpensis</i>	1	90	90
				<i>Firmicutes</i>	3	<i>Clostridia</i>	2	<i>Caloramator indicus</i>	1	86	86
								<i>Thermosediminibacter oceani</i>	1	92	92
						<i>Thermolithobacteria</i>	1	<i>Thermolithobacter ferrireducens</i>	1	84	84
				<i>Proteobacteria</i>	16	<i>α-Proteobacteria</i>	2	<i>Methylovirgula ligni</i>	2	97	97
						<i>β-Proteobacteria</i>	2	<i>Thiobacillus aquaesulis</i>	1	96	96
								<i>Propionivibrio limicola</i>	1	96	96
						<i>δ-Proteobacteria</i>	2	<i>Haliangium ochraceum</i>	1	91	91
								<i>Desulfomonile limimaris</i>	1	91	91
						<i>γ-Proteobacteria</i>	10	<i>Ectothiorhodosinus mongolicus</i>	2	91	90
								<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	3	92	92
								<i>Thiohalomonas nitratreducens</i>	3	92	89
								<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i>	2	93	93
				<i>Cyanobacteria</i>	1	<i>Cyanobacteria</i>	1	<i>Halospirulina tapeticola</i>	1	87	87
				January	Bacteria	20		<i>Bacteroidetes</i>	1	95	95
								<i>Actinobacteria</i>	1	87	87
								<i>Proteobacteria</i>	10	96	96
								<i>α-Proteobacteria</i>	1	97	97
								<i>β-Proteobacteria</i>	1	97	97
								<i>δ-Proteobacteria</i>	4	94	91
									3	94	91
								<i>Desulfomonile limimaris</i>	1	90	90
								<i>γ-Proteobacteria</i>	4	90	90
								<i>Microbulbifer donghaiensis</i>	1	90	90
								<i>Oceanobacter kriegii</i>	2	88	88
								<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i>	1	92	92
								<i>Halospirulina tapeticola</i>	6	88	87
								<i>Prochlorococcus marinus</i>	2	89	89

Table 2. (continued)

Sampling location	Months	Domain	No. ^a	Phylum	No. ^a	Class	No. ^a	Genus and species	No. ^a	Max ^b	Min ^b			
Rokkaku	April	Bacteria	20	<i>Bacteroidetes</i>	2	<i>Flavobacteria</i>	2	<i>Sediminibacter furfurosus</i>	1	96	96			
								<i>Ulvibacter litoralis</i>	1	97	97			
				<i>Actinobacteria</i>	2	<i>Actinobacteria</i>	2	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	1	89	89			
								<i>Streptomyces albulus</i>	1	85	85			
				<i>Deinococcus-Thermus</i>	1	<i>Deinococci</i>	1	<i>Truepera radiovictrix</i>	1	90	90			
				<i>Proteobacteria</i>	15	<i>α-Proteobacteria</i>	1	<i>Defluviibacter lusatiensis</i>	1	90	90			
						<i>δ-Proteobacteria</i>	3	<i>Desulfonatatronum thiodismutans</i>	1	95	95			
								<i>Pelobacter acetylenicus</i>	1	88	88			
								<i>Kofleria flava</i>	1	91	91			
						<i>γ-Proteobacteria</i>	11	<i>Haliea salexigens</i>	1	94	94			
								<i>Marinimicrobium agarilyticum</i>	1	88	88			
								<i>Ectothiorhodosinus mongolicus</i>	1	88	88			
								<i>Natronocella acetinitrilica</i>	1	93	93			
								<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	3	92	88			
								<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	1	92	92			
								<i>Thiohalomonas nitratreducens</i>	3	91	90			
	July	Bacteria	20	<i>Firmicutes</i>	1	<i>Thermolithobacteria</i>	1	<i>Thermolithobacter ferrireducens</i>	1	85	85			
				<i>Actinobacteria</i>	1	<i>Actinobacteria</i>	1	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	1	83	83			
				<i>Chloroflexi</i>	2	<i>Anaerolineae</i>	2	<i>Bellilinea caldifistulae</i>	2	89	85			
				<i>Planctomycetes</i>	1	<i>Planctomycetacia</i>	1	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	1	86	86			
				<i>Proteobacteria</i>	15	<i>α-Proteobacteria</i>	2	<i>Methylosinus sporium</i>	1	94	94			
								<i>Sulfitobacter litoralis</i>	1	95	95			
						<i>δ-Proteobacteria</i>	4	<i>Desulfonema magnum</i>	3	93	93			
								<i>Geobacter metallireducens</i>	1	87	87			
						<i>γ-Proteobacteria</i>	9	<i>Haliea rubra</i>	1	92	92			
								<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	3	93	87			
								<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	1	92	92			
								<i>Thiohalomonas nitratreducens</i>	2	92	91			
								<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i>	2	92	91			
				October	Bacteria	20	<i>Bacteroidetes</i>	2	<i>Flavobacteria</i>	1	<i>Sediminibacter furfurosus</i>	1	97	97
											<i>Pedobacter composti</i>	1	92	92
							<i>Actinobacteria</i>	2	<i>Actinobacteria</i>	2	<i>Ilumatobacter fluminis</i>	1	89	89
											<i>Streptomyces naganishii</i>	1	88	88
							<i>Chloroflexi</i>	3	<i>Anaerolineae</i>	2	<i>Bellilinea caldifistulae</i>	2	89	89
			<i>Dehalococcoidetes</i>				1	<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i>	1	89	89			
	<i>Proteobacteria</i>	10	<i>β-Proteobacteria</i>				2	<i>Burkholderia ferrariae</i>	1	88	88			
								<i>Methylbium petroleiphilum</i>	1	92	92			
			<i>δ-Proteobacteria</i>				4	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	1	87	87			
								<i>Desulfosarcina cetonica</i>	1	94	94			
								<i>Pelobacter acetylenicus</i>	1	91	91			
								<i>Haliangium tepidum</i>	1	85	85			
			<i>γ-Proteobacteria</i>				4	<i>Ectothiorhodosinus mongolicus</i>	1	94	94			
								<i>Natronocella acetinitrilica</i>	1	92	92			
	January	Bacteria	20	<i>Firmicutes</i>	4	<i>Clostridia</i>	4	<i>Caloramator indicus</i>	1	87	87			
								<i>Desulfonisporea thiosulfatigenes</i>	1	89	89			
								<i>Dehalobacter restrictus</i>	1	85	85			
							<i>Dethiosulfatibacter aminovorans</i>	1	89	89				
<i>Chlorobi</i>				1	<i>Chlorobia</i>	1	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	1	97	97				
<i>Proteobacteria</i>				13	<i>β-Proteobacteria</i>	2	<i>Caldimonas taiwanensis</i>	1	96	96				
							<i>Schlegelella thermodepolymerans</i>	1	93	93				
					<i>δ-Proteobacteria</i>	3	<i>Desulfonema magnum</i>	1	94	94				
							<i>Desulfosarcina variabilis</i>	1	92	92				
							<i>Pelobacter carbinolicus</i>	1	88	88				
					<i>γ-Proteobacteria</i>	8	<i>Haliea rubra</i>	1	93	93				
							<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i>	2	93	90				
							<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	1	91	91				
							<i>Kangiella koreensis</i>	1	91	91				
							<i>Thiohalomonas nitratreducens</i>	1	92	92				
							<i>Thiohalophilus thiocyanatoxydans</i>	2	93	92				
				<i>Cyanobacteria</i>	2	<i>Cyanobacteria</i>	2	<i>Halospirulina tapeticola</i>	1	87	87			
							<i>Prochlorococcus marinus</i>	1	95	95				

^aThe number of detected clones in 16S rDNA libraries.^bThe maximum and minimum values of homology.

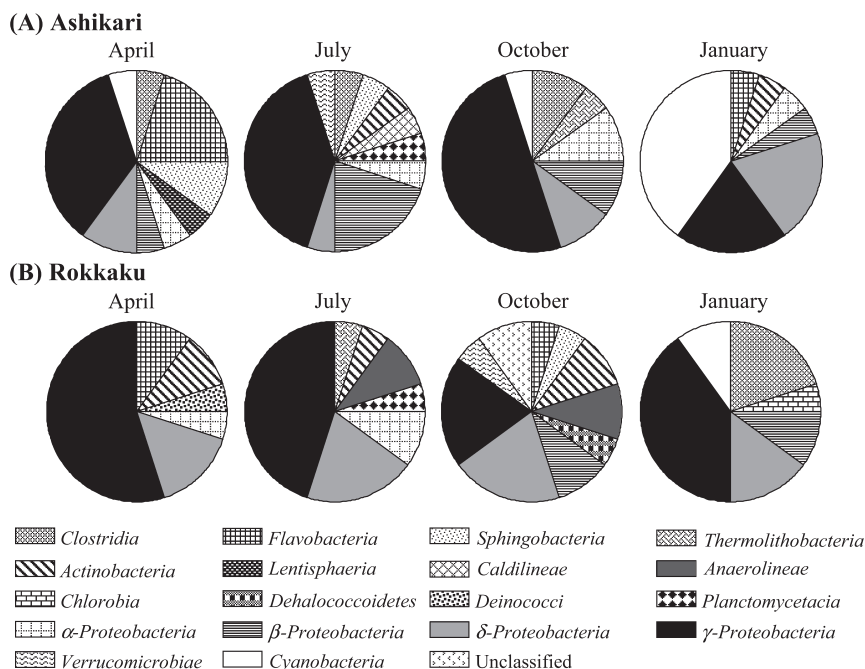


Fig. 5. Circular graph illustrating the diversity of bacterial groups in the clone libraries of sediment samples from Ashikari (A) and Rokkaku (B).

に関しては、アシカリではそれぞれ5–10%、5–20%で常に検出されたのに対して、ロッカクでは4、7月には α -Proteobacteria、10、1月には β -Proteobacteriaのみが検出された。また、Proteobacteria以外の細菌に関しては、アシカリ1月の底泥でCyanobacteriaが多く検出される傾向にあった(40%)。他の月におけるCyanobacteriaの検出率は0–5%であり、冬期に著しく増加したものと考えられる。ロッカクにおいても同様の傾向が見られるものの、その程度は弱く、Cyanobacteriaは1月にのみ10%の頻度で検出された。さらに、両地点の4月にはFlavobacteriaが共通して検出された。各地点での存在比は、アシカリで20%、ロッカクでは10%であり、Proteobacteriaを除く細菌の中では比較的優勢種として検出された。ただし、Flavobacteriaは、アシカリでは1月(5%)に、ロッカクでは10月(5%)にも検出されることから、一過的な存在比の増減を生じているものと考えられる。

一方、DG-DGGE法により多数検出されたSRBに関しては、16S rDNAクローンライブラリー法では、Desulfobacterium, Desulfomonile, Desulfonatronum, Desulfonema, Desulfosarcina, Desulfonisporaの6属が検出された。アシカリにおいて優勢なSRBはDesulfobacteriumであるのに対して、ロッカクではDesulfonemaが多く検出された。このことから、有明海の各種SRBの存在比は干潟域と沖合で異なることが示唆された。また、4、

7、10、1月のSRBの検出率は、それぞれアシカリでは5、0、5、20%であり、ロッカクでは5、15、10、10%であった。

考 察

有明海底泥中の細菌群集の特徴 本研究では、DG-DGGE法および16S rDNAクローンライブラリー法により、有明海底泥中にはActinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobiaの7つの門を主要構成細菌とし、Proteobacteria門が優勢な細菌群を形成していることを明らかにした。また、Proteobacteria門の中でも特に γ -Proteobacteriaが優占的に分布する傾向がみられた。これら有明海底泥中の細菌群は、沖合では比較的安定して存在しているのに対して、干潟域では季節変動がみられた(Fig. 3)。DG-DGGE法においては、1月の干潟底泥中にGeobacteraceaeが顕著に検出された(Table 1)。Geobacteraceaeは、窒素固定能を有することが報告されている^{17,18)}。Holmesら¹⁹⁾は、Geobacteraceaeの30種に関して、それらすべてが、ジニトロゲナーゼの α -サブユニットをコードする遺伝子nifDを有することを報告している。さらに、16S rDNAクローンライブラリー法では、1月の干潟底泥中にCyanobacteriaが多く検出される傾向が見られた(Table 2, Fig. 5)。Cyanobacteriaは、アンモニウム塩、硝酸塩、尿素、N₂などを広く窒素源として利用でき、環境中の窒素循環に大きく寄与し

ている²⁰⁾。このことから、1月の有明海干潟底泥中では、これら細菌群が増加する要因については不明であるものの、活発な窒素循環が行われていると考えられる。

一方、沖合に位置するロッカクでは、16S rDNA クローンライブラリー法により、*Proteobacteria* 門を構成する細菌綱が7月の α , γ , δ -*Proteobacteria* から10月の β , γ , δ -*Proteobacteria* に遷移する傾向がみられた (Fig. 5)。 α -*Proteobacteria* と β -*Proteobacteria* の分布については、溶存態有機物 (DOM) の濃度に影響を受けることが知られている。 β -*Proteobacteria* および *Cytophaga-Flavobacterium* グループ (CFB) は比較的広範な DOM 濃度で存在するのに対し、 α -*Proteobacteria* は低 DOM 濃度時に優勢となる²¹⁾。ロッカクの10月においては β -*Proteobacteria* に加え、CFB に属す *Flavobacteria* や *Sphingobacteria* が出現することから、7月から10月にかけて DOM 濃度が高濃度側へシフトしたものと考えられる。しかしながら、DG-DGGE 法において、ロッカク由来の底泥サンプルがアシカリ1月の様な明確なクラスターを形成しないことから、これら細菌群の変動は一過的な微少変動であるものと考えられる。

また、DG-DGGE 法と 16S rDNA クローンライブラリー法いずれの方法においても、*Flavobacteria* に属す細菌が検出された (Table 1, 2, Fig. 5)。有明海ではノリの養殖が盛んに行われるが、ノリの病気の一種であるスミノリ病の原因菌は *Flavobacterium* sp. であると報告されている^{22,23)}。したがって、*Flavobacteria* の存在比が増加すると、スミノリ病発症のリスクが高くなると考えられる。有明海底泥中の *Flavobacteria* の分布とスミノリ病発症の因果関係の解明については、今後の研究課題である。

有明海底泥中のSRBの分布 本研究におけるいずれの解析手法によっても、底泥中にSRBが多数検出された (Fig. 4, Table 2)。16S rDNA クローンライブラリー法によるSRBの検出率は、アシカリでは1月、ロッカクで7月に最も多く、それぞれ20%、15%であった。底泥中のSRBの分布に関する既往研究では、rRNA プロンプを用いた検出により、1989年11月のフロリダ北西部 Santa Rosa Sound の小湾で5%の割合でSRBが存在していることが報告されている²⁴⁾。また、1996年4月のデンマーク Aarhus 湾では、スロットプロットハイブリダイゼーション法により18–25%の割合でSRBが分布することが報告された²⁵⁾。さらにLeloup ら²⁶⁾は、デンマーク Aarhus 湾地下3–5 m について、硫酸塩豊富な部分、メタン生成部、およびそれらの遷移部のSRBの存在比が、それぞれ13, 8, 22%であることを示した。本研究では有明海底泥中のSRBの存在比に季節変動がみられたが、それに伴い硫酸還元とメタン生成のバランスも変動

しているものと推察された。

また、SRBは硫酸塩を水生生物に有害なH₂Sに還元することが知られている²⁷⁾。底泥中のH₂S濃度の上昇が生じると、乱流混合により海水中の濃度も上昇すると考えられる²⁸⁾。Kawahara ら²⁹⁾は、底泥中のSRBの分布量は、化学的酸素要求量 (COD) や硫酸塩など、底泥の汚染度の指標となることを示唆している。したがって、有明海底泥環境の指標として、今後さらにSRBの定量的モニタリングを行う必要があるものと考えられる。

要 約

本研究では、有明海底泥中の細菌群集構造をDG-DGGE 法および16S rDNA クローンライブラリー法により調査した。その結果、干潟域および沖合のいずれの底泥でも *Proteobacteria* 門を中心とする細菌群集が形成されていることが明らかとなった。これら底泥中の細菌群集構造は、年間を通じて比較的安定に存在していたが、沖合に比べて干潟域は細菌群が多様であり、特に冬期 (1月) には *Geobacteraceae* や *Cyanobacteria* など窒素循環に関与する細菌が多数検出される傾向にあった。また、各地点の底泥中の細菌群には *Desulfobacterium*, *Desulfomonile*, *Desulfonatronum*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfonispora* などのSRBが多数検出された。このことから、有明海底泥中にはSRBが広く分布することが示唆された。また、SRBの存在比は季節毎に変動が見られ、地点毎に最大となる季節が異なっていた。つまり、窒素循環を含め硫黄循環に関わる細菌群は季節毎に、その存在比を変動させているものと考えられる。有明海の環境状態を把握するためには、今後さらにこれらの変動を定量的にモニタリングする必要がある。

文 献

- 1) 堤 裕昭, 岡村絵美子, 小川満代, 高橋 徹, 山口一岩, 門谷 茂, 小橋乃子, 安達貴浩, 小松利光: 海の研究, **12**, 291–305 (2003).
- 2) Kawamura, Y., Suzuki, S., Gasa, S., and Kusuda, R.: *Microbios.*, **92**, 139–145 (1997).
- 3) Zhang, J., Nagahama, T., Ohwaki, H., Ishibashi, Y., Fujita, Y., and Yamazaki, S.: *Anal. Sci.*, **20**, 137–143 (2004).
- 4) 堤 裕昭, 堤 彩, 高松篤志, 木村千寿子, 永田紗矢香, 佃 政則, 小森田智大, 高橋 徹, 門谷 茂: 海の研究, **16**, 183–202 (2007).
- 5) 鈴木輝明: 地球環境, **11**, 161–171 (2006).
- 6) Poulin, P., Pelletier, E., and Saint-Louis, R.: *Mar. Environ. Res.*, **63**, 490–505 (2007).
- 7) 古賀あかね, 瀬口昌洋, 郡山益実: *Trans. of JSIDRE*, **260**, 15–22 (2009).
- 8) Kariminiaae-Hamedani, H.-R., Kanda, K., and Kato, F.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 39–44 (2004).

- 9) Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P. G., and Gelfi, C.: *BioTechniques*, **22**, 326–330 (1997).
- 10) Meyer, B. and Kuever, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7664–7679 (2007).
- 11) Nakayama, J., Hoshiko, H., Fukuda, M., Tanaka, H., Sakamoto, N., Tanaka, S., Ohue, K., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 481–489 (2007).
- 12) Ward, J. H.: *J. Am. Stat. Assoc.*, **58**, 236–244 (1963).
- 13) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.: *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410 (1990).
- 14) Kimura, M.: *J. Mol. Evol.*, **16**, 111–120 (1980).
- 15) Saitoh, N. and Nei, M.: *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406–425 (1987).
- 16) Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5261–5267 (2007).
- 17) Bazyliniski, D., Dean, A., Schuler, D., Philips, E., and Lovley, D.: *Environ. Microbiol.*, **2**, 266–273 (2000).
- 18) Coppi, M., Leang, C., Sandler, S., and Lovley, D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3180–3187 (2001).
- 19) Holmes, D. E., Nevin, K. P., and Lovley, D. R.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1591–1599 (2004).
- 20) Flores, E. and Herrero, A.: *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 164–167 (2005).
- 21) Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S., and Tranvik, L. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3701–3709 (2003).
- 22) Kawamura, Y., Suzuki, S., Gasa, S., and Kusuda, R.: *Microbios.*, **92**, 139–145 (1997).
- 23) Zhang, J., Nagahama, T., Ohwaki, H., Ishibashi, Y., Fujita, Y., and Yamazaki, S.: *Anal. Sci.*, **20**, 137–143 (2004).
- 24) Devereux, R., Winfrey, M. R., Winfrey, J., and Stahl, D. A.: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, 23–31 (1996).
- 25) Sahm, K., MacGregor, B. J., Jørgensen, B. B., and Stahl, D. A.: *Environ. Microbiol.*, **1**, 65–74 (1999).
- 26) Leloup, J., Fossing, H., Kohls, K., Holmkvist, L., Borowski, C., and Jørgensen, B. B.: *Environ. Microbiol.*, **11**, 1278–1291 (2009).
- 27) Bagarinao, T.: *Aq. Toxicol.*, **24**, 21–62 (1992).
- 28) Hansen, M. H., Ingvorsen, K., and Jørgensen, B. B.: *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 68–75 (1978).
- 29) Kawahara, N., Shigematsu, K., Miura, S., Miyadai, T., and Kondo, R.: *Plankton Benthos Res.*, **3**, 42–45 (2008).