

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510030

研究課題名（和文） バクテリア群集の変動解析による富山湾の海水汚染モニタリング手法

研究課題名（英文） Monitoring method for seawater pollution in Toyama Bay by analyses of changes in bacterial community structure

## 研究代表者

中村 省吾（NAKAMURA SHOGO）

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・教授

研究者番号：60134996

研究成果の概要（和文）：富山湾の海水汚染をモニタリングするための基礎研究として、その海水中のバクテリア群集構造を PCR-DGGE 法で観察した。その結果、表層海水中のバクテリア群集構造は、年間を通して比較的安定していたが、緩やかに季節変動していることが判った。また、河口に近い表層海水中のバクテリア群集構造は、河川水の影響を受けて変化しやすいことが判った。一方、水深約 320m の海洋深層水中のバクテリア群集構造は年間を通して非常に安定しており、能登半島先端から富山湾の奥部まで、ほぼ一様であった。しかし、深層水中のバクテリア群集構造は、表層のそれとは明確に異なっていた。次には、これらの基礎研究を基に、富山湾における海水汚染とバクテリア群集構造の変化との関わり合いを調べていきたい。

研究成果の概要（英文）：We have observed bacterial community structures (BCS) in the seawater of Toyama Bay by PCR-DGGE for the basic study of the seawater pollution detection. The results show that the BCS of surface seawater were relatively stable throughout the year, but seasonal changes occurred gradually. Estuarine BCS were changeable by effects of river water. From top of the Noto Peninsula to head of the Toyama Bay, the fundamental BCA of deep seawater (depth ~320 m) were almost the same and were very stable throughout the year. However, BCS of the deep seawater were clearly different from those of the surface seawater. As the next step, we will examine the relationship between the changes in BCS and the seawater pollution in Toyama Bay.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：海洋環境保全・バイオモニタリング・海洋汚染・PCR-DGGE・バクテリア・16S-rRNA・日本海・富山湾

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

北東アジアの中心となる日本海は、平均水深が1,350mであるのに対し、出入り口となる海峡の水深は4m~130mと浅いため、巨大な池のような形態をした半閉鎖的環境と捉えられている。そのため、この日本海で一旦汚染が始まるとその修復は困難となり、北東アジア諸国だけでなく地球レベルでも大きな損失を蒙る恐れがある。また、この地域では、大気や水による汚染物質の越境的な拡散も懸念されている。たとえば、生活・工場廃水などの流入による海水の化学物質汚染や富栄養化（渤海・黄海など）、ナホトカ号などのタンカー事故による石油汚染、ロシア（ソ連）の原子力艦船の処理に伴う放射能汚染、大気の流れに伴って飛来する硫酸化物や黄砂、そして近年では、中国吉林省の石油化学工場の爆発事故によるアムール川の化学物質汚染など、大きな環境汚染問題が次々と生じている。

このような海洋汚染のモニタリング方法として、採取したイガイやイカの体内の汚染物質濃度を測定する方法や、藻類の成長速度や鞭毛再生、ウニの初期発生異常、発光バクテリアの発光能などを指標とする方法が提唱され使用されている。しかし、これらは、海洋生態系の中のごく一部（ほとんどが単一種）の生物を用いた方法で、ある地域の生態系全体への影響をモニタリングするものではない。

そこでわれわれは、生態系の中でも大きな集団であるバクテリアに注目し、まずは沿岸域海洋生態系の中に生息する各種バクテリアを用いて、その群集変動（遷移）から海洋汚染をモニタリングする方法を確立するとともに、その有用性を検討することを考えた。そして、そのような研究計画を平成19-20年度の基盤研究(C)に申請し、採択された。その申請では、まず、日本海の中央に位置する富山県下の沿岸域を研究のフィールドとするため、県内の大川である庄川、神通川、黒部川などの各河口付近に位置する漁港や海岸と、その対照として河口域から離れた漁港や海岸とに定点を設けた。次に、各定点で捕集したバクテリアの16S-rRNA遺伝子を用いて、その変性剤濃度勾配ゲル電泳動(DGGE)パターンが、どのように変化するかを比較・観察することによって、富山湾沿岸域に共通に生息する菌種と、各漁港・海岸に特有に生息する菌種を見いだした。さらに、季節

変化、富栄養化(海水へ窒素、リンの添加)、重金属汚染(カドミウムの添加)、石油汚染(重油の添加)などの環境変化によって増減する菌種を見い出すことが出来た。

そこで、今回の申請では、このような研究結果を再確認すると共に、次の研究段階として、沿岸域だけでなく沖合や深層の海水中のバクテリア群集の解析を行い、富山湾の海洋環境全体でのバクテリア群集解析へと繋げていくことを計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、PCR-DGGE法を用いてバクテリア群集の変動を解析する方法が、富山湾の沿岸域に加えて沖合の海水や深層海水の汚染状況のモニタリングに有用であるかどうかを確認するための基礎データを得ることとした。

平成20年度までに研究を実施した富山県下の沿岸域6定点に加えて、沖合(湾内)10定点での表層水及び深層水(3定点;水深約320m)で、採水した試料水中に生息するバクテリアの群集解析を行う。そして、各定点間での菌相の相違や、各定点での菌相の季節変動の有無を調べる。さらに、各定点、各季節における優占種を選定し、それらの菌種の同定を、16S-rRNA遺伝子の塩基配列から行う。また、この結果より、各定点間に共通する菌種と、各定点や各季節に特有の菌種とが明らかになると思われた。

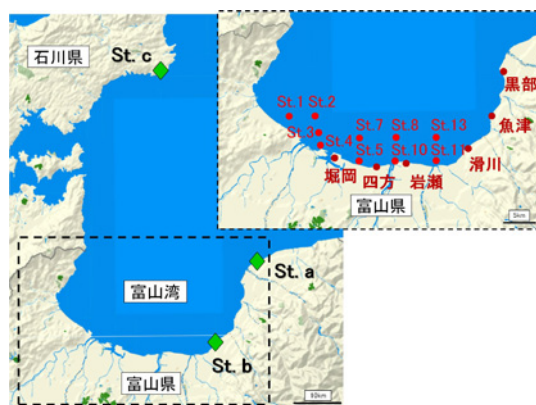


図 1. 試料海水の採水定点。富山県下の漁港6 定点（黒部、魚津、滑川、岩瀬、四方、堀岡）と富山湾沖合の 10 定点（St. 1-13）で表層海水を、入善深層水活用施設（St. a）、滑川水産試験場（St. b）、能登深層水活用施設（St. c；石川県）の 3 定点で海洋深層水を採水した。

### 3. 研究の方法

富山県下の漁港6定点(黒部, 魚津, 滑川, 岩瀬, 四方, 堀岡)と, 沿岸から約1~5km沖合の10定点(St. 1~13)で表層海水を, 入善深層水活用施設, 滑川水産試験場, 能登海洋深層水施設(石川県能登町)の3定点(St. a~c)で海洋深層水を採水し(図1), それらを滅菌したメディウムビンに入れ, 氷冷しながら研究室に持ち帰った。そして, それら試料海水100~500mL中の細菌を, 減圧濾過によって0.2 $\mu$ mのメンブレンフィルター上に捕集した。そのフィルターを, フィルターごとリゾチーム, Proteinase K, RNaseなどで処理した後, フェノール・クロロホルム法でDNAを抽出した。次に, このDNAを鋳型として, 真正細菌の16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマー(341F-GC:GCクランプ付加, 518R)とKOD FX (TOYOBO)を用いてPCRをかけ, 増幅した産物をDGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動; D-code, Bio-Rad)にかけた。そして, 得られたDGGEのバンドパターンからFP Quest (Bio-Rad)を使用して, クラスタ解析を行い, 細菌の群集構造の類似度や変化を調べた。また, DGGEで得られた主要なバンドをゲルから切り出し, その抽出液と上記プライマーでPCRにかけた。そして, 増幅したDNAとBig Dye Terminator (Applied Biosystems(AB))を用いてシーケンス反応を行った後, シークエンサー(Genetic Analyzer 3130xl, AB)で決定した塩基配列をBLAST検索にかけ, 細菌の同定を行った。

### 4. 研究成果

まず, 漁港6定点と沖合10定点で採集した表層海水試料をDGGEにかけ, クラスタ解析した結果, 採水時期に限らず, 河口域を除く全地点で60%以上の類似度を示した(図2)。このことから, 富山湾の表層海水は全体で比較的均一であると考えられた。しかし, その中でも漁港内と沖合では, 異なるクラスターを形成した。また, 神通川正面のSt. 10や黒部港などの河口域では, ほとんどの月で他の定点とは異なるクラスターを形成した(図2)。このことから, 表層海水中の細菌群集構造は, 河川の影響を受けて変化しやすいことが考えられた。

次に, 沖合の定点St. 1とSt. 10で得た1年間の試料をDGGEにかけ, クラスタ解析した結果, どちらの定点でも年間を通して50%以上の類似度を示しながらも, 隣接する月でクラスターを形成した(図3)。このことから, 表層海水中の細菌群集構造

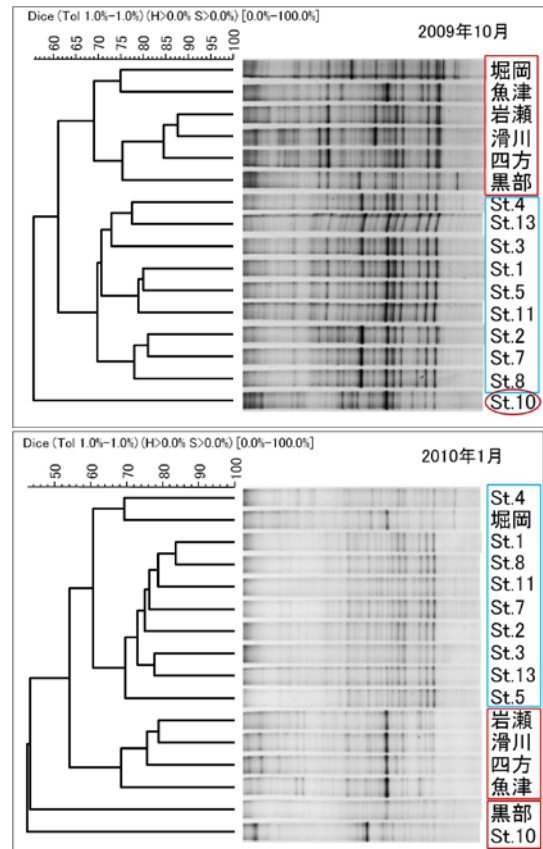


図2. 2009年10月と2010年1月の漁港6定点と沖合10定点の表層海水中の細菌群集構造(DGGEバンドパターン)とクラスタ解析。漁港海水と沖合海水中の細菌群集構造は, 異なるクラスターを形成することが多かった。また, 神通川の正面に位置するSt. 10では, 他の定点と大きく異なる群集構造を形成する月が多くみられた。

は年間を通して比較的安定しているが, 緩やかに季節変動していると考えられた。また, 1年中見られたバンドや季節に特徴的なバンドをシーケンス解析した結果, Alpha Proteobacteriaに属する種がほぼ1年中見られ, 夏から冬にかけてCyanobacteriaに属する種が検出された(表1)。一方で, St. 10では, 他の定点で見られなかった淡水に多いとされるFlavobacteriaに属する種が多く検出された(表2)。

次に, 水深約320mの海洋深層水中の細菌群集構造をDGGEで解析した結果, 年間を通して非常に安定で(図4), 採水地点による大きな違いもほとんど見られず, 約80%の類似度が示された(図5)。また, 主要なバンドの種の同定を行った結果, 表層水中では見られなかった, 硫酸化細菌と思われる種の存在が示唆された(表3)。そして,

深層水中のバクテリア群集構造は、表層とは異なった特有の群集構造をしていることが考えられた。

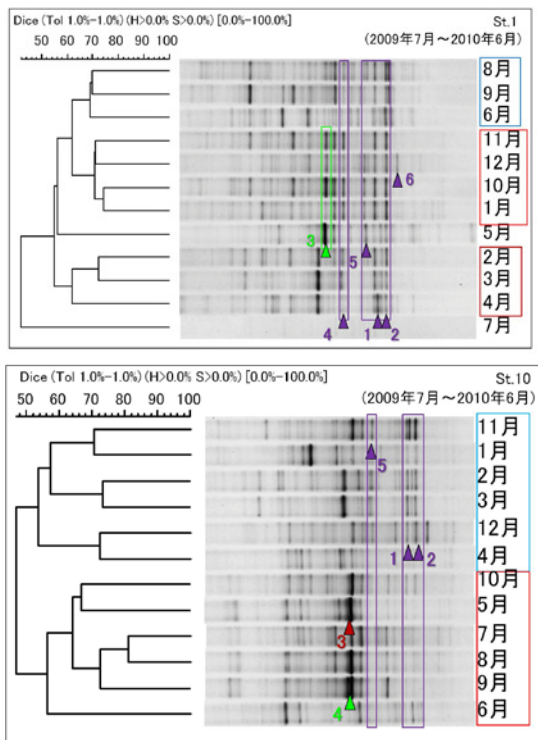


図 3. St. 1 と St. 10 の 2009 年 7 月から 2010 年 6 月までの年間の群集構造の変化。群集構造は、どちらの定点でも年間を通して、約 50%以上の類似度を示したことから、富山湾全体の群集構造は比較的安定していると考えられた。しかし、より詳細に検証した結果、隣接した月でクラスターを形成したことから、群集構造は緩やかに季節変動していると考えられた。

表 1. St. 1 の試料から同定された菌種

No.	種名	一致率
1	alpha proteobacterium IMCC10404	124/133 (93%)
2	alpha proteobacterium IMCC10422	133/138 (96%)
3	<i>Synechococcus</i> sp. BN31	113/122 (92%)
4	alpha proteobacterium IMCC10404	157/159 (98%)
5	<i>Methylophilus</i> sp. Ship	130/143 (90%)
6	beta proteobacterium HTCC349	130/143 (90%)

表 2. St. 10 の試料から同定された菌種

No.	種名	一致率
1	alpha proteobacterium IMCC10404	115/119 (96%)
2	alpha proteobacterium IMCC10422	115/118 (97%)
3	<i>Flavobacterium</i> sp. 01WB02.3-36	134/138 (97%)
4	<i>Synechococcus</i> sp. BN31	118/120 (98%)
5	alpha proteobacterium IMCC10404	115/116 (99%)

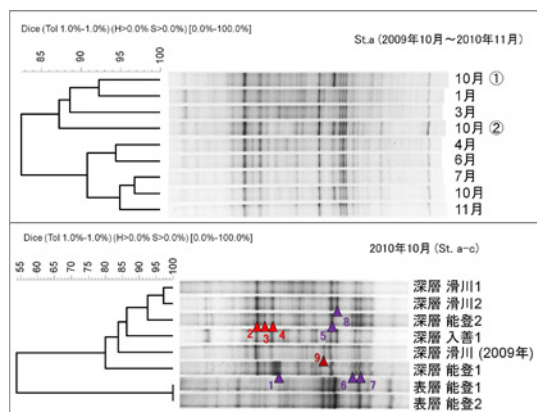


図 4. 海洋深層水中のバクテリア群集構造と主要なバンドの種の同定。海洋深層水中のバクテリア群集構造は、年間を通して非常に安定で、採水地点による大きな違いも見られなかった。

表 3. 深層水試料から同定された菌種

No.	種名	一致率
1	<i>Endozoicimonas</i> sp. R214111	73/78 (93%)
2	bacterium HTCC8012	129/131 (98%)
3	<i>idas macdonaldi</i> thioautotrophic gill symbiont	130/131 (99%)
4	bacterium HTC8012	129/130 (99%)
5	Proteobacterium MS-B-32 16S ribosomal	108/116 (93%)
6	alpha proteobacterium IMCC10404	117/118 (99%)
7	alpha proteobacterium IMCC10404	116/118 (98%)
8	<i>Aeromonas veronii</i> bv. sobria	141/143 (98%)
9	<i>Flavobacteria bacterium</i> 7538	122/128 (95%)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Sakatoku, A., Wakabayashi, M., Tanaka, Y., Tanaka, D., Nakamura, S. Isolation of a novel *Saccharophagus* species (Myt-1) capable of degrading a variety of seaweeds and polysaccharides. *MicrobiologyOpen*, 査読有, Vol. 1, 2012, 2-12.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 田中俊輔, 中村明広, 田中大祐, 中村省吾, 飯田直樹, 松村 航, 富山湾海水および海底堆積物中におけるバクテリア群集構造解析, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010 年 3 月, 福岡大学(福岡)

(2) 田中俊輔, 中村明広, 田中大祐, 中村省吾, 飯田直樹, 松村 航, 富山湾海水におけるバクテリア群集構造解析, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011 年 3 月, 北海道大学(札

幌)

(3) 田中俊輔, 酒徳昭宏, 中村明広, 田中大祐, 中村省吾, 飯田直樹, 松村 航, 富山湾の表層海水中及び海洋深層水中のバクテリア群集構造解析, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月 14 日, 東洋大学(東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[http://www.sci.u-toyama.ac.jp/env/kinou3/kinou3\\_JP.htm](http://www.sci.u-toyama.ac.jp/env/kinou3/kinou3_JP.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 省吾 (NAKAMURA SHOGO)

富山大学大学院理工学研究部(理学)・教授  
研究者番号: 60134996

### (2) 研究分担者

田中 大祐 (TANAKA DAISUKE)

富山大学大学院理工学研究部(理学)・准教授

研究者番号: 40360804

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: