

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340086

研究課題名(和文) 干潟環境改善のための窒素および硫黄循環に関与する主要微生物の単離と解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of bacteria playing a key role in nitrogen and sulfur cycle

研究代表者

森村 茂 (Morimura, Shigeru)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：20230146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：干潟において窒素循環および硫黄循環に関与する微生物のクローン解析を行った結果、白川、緑川、八代海のすべての干潟環境において同じuncultured cloneが優占種として検出された。それらの微生物種や特性を明らかにするために、単離を試みた。硫黄循環のカギを握る硫酸化細菌について、硫黄化合物の種類やpH制御の有無などの培養条件を変化させて集積培養を行うと、各条件で種類の異なる従属栄養型と独立栄養型の両方の微生物種が検出された。したがって、干潟で起こっている硫酸化反応は、多種多様な硫酸化細菌による複合的反応であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The same uncultured clone was detected in clone analysis targeting nirS and aprA gene in tidal flat sediment sampled from Midorikawa, Shirakawa, and Yatsushiro sea. To clarify the characteristics of the uncultured clone, enrichment culture and isolation were carried out from the tidal flat sediments. Especially in sulfur oxidizing bacteria, which are important for sulfur cycle in tidal flat, both of heterotrophic and autotrophic bacteria were obtained. Therefore, not single group like sulfate reducing bacteria but multiple number of various sulfur oxidizing bacteria construct the oxidation reaction cycle.

研究分野：微生物工学

キーワード：微生物相 干潟 窒素循環 硫黄循環 クローン解析 定量PCR

1. 研究開始当初の背景

本研究以前の研究の結果、干潟環境における硫黄循環および窒素循環に關与する微生物の役割について、DNAを対象とした解析だけでは限界があると考えられた。そこで、もっとも多く検出されたuncultured clone FM879003に近縁な硫黄酸化細菌および*nirS* 遺伝子を標的とした場合にuncultured groupであった脱窒菌がどのような微生物であるかを明らかにするためには、集積培養や単離を行う必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、硫黄循環や窒素循環に關与する主要なバクテリアを単離し、単離したバクテリアを共培養することで硫黄循環や窒素循環モデルの検討を行うことを目標とした。得られた知見を活用し、これらのバクテリアを指標とすることで干潟環境を簡便に評価すること、また干潟環境の保全や修復技術を開発することを最終目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

単離のための微生物源としては、緑川および白川河口と八代海湾奥部の干潟底泥を用いた。脱窒菌の単離では、サンプルの懸濁液をプレートに塗布する直接塗布法と、液体培養によって集積した後プレートに塗布する集積培養法を行った。いずれの単離法においても、炭素源を変化させて単離を試みた。一方、硫黄酸化細菌の単離では、pHを制御しない回分培養による集積培養法と、pHを制御する発酵槽を用いた連続培養による集積培養法の2通りを行った。回分培養では、チオ硫酸塩を硫黄源とする最小培地を使用し、pH指示薬としてフェノールレッドを添加して、振とう培養による集積培養を行った。1回の集積培養時間は、pH指示薬による色の変化で判断した。また、

硫黄源を硫化ナトリウムに変えた培地でも同様の操作を行った。発酵槽を用いた場合は、pHを7.4に制御しながらチオ硫酸塩最小培地を用いて26週間通気を伴う連続好気培養を行い、希釈系列を作成してプレートに塗布することで単離を試みた。集積培養中の微生物に関する遺伝子解析には一般的なクローン解析法を使用し、単離株の同定には16S rRNA遺伝子を対象とした解析を行った。

4. 研究の成果

最初に、研究に使用する干潟底泥の微生物相を確認するために、硫黄循環に關与する*aprA*や窒素循環に關与する*nirS*を標的とした機能性遺伝子のクローン解析を行った。その結果、白川、緑川、八代海のすべてのサンプルにおいて同種のuncultured cloneが最優占種として検出され、干潟の元素循環に關与する主要な微生物については場所による大きな違いは認められないことが確認できたので、次に単離実験を実施した。

脱窒菌の単離について、最初に直接塗布法により脱窒菌の単離を行い、得られた単離株の16S rRNA 遺伝子のホモロジー解析を行った。多様な菌株が単離されたが、炭素源を加えなかった場合でも、炭素源添加条件と同様にプレート上でコロニーが形成され、直接塗布法においては脱窒菌に対する選択性が低いと考えられた。一方、集積培養法では脱窒菌の集積には成功したものの、単離菌の16S rRNA 遺伝子のホモロジー検索結果はほとんどが*Pseudomonas* 属に近縁であった。また、炭素源をトルエンとして集積培養したときに *Azoarcus toluolyticus* に近縁な16S rRNA 遺伝子配列が検出されたが、他の細菌も混在していた。*A. toluolyticus* の単一化を試みたが、その過程で増殖が見られなくなり、目的とするuncultured groupの脱窒菌を含めて、単離で

きなかった。

硫黄循環について、干潟環境では16S rRNA遺伝子を標的とした解析で約10%が硫酸塩還元細菌として検出され、硫化水素の生成が起こっていることは間違いないと考えられた。同時に、生成した硫化水素を速やかに酸化する微生物も多く存在することが示唆された。そのことを確認するために硫黄循環に関する定量的解析を行った。硫化水素等の還元型硫黄化合物を酸化する硫黄酸化細菌の検出には*aprA*遺伝子を、硫酸イオンを硫化水素等に還元する硫酸塩還元細菌の検出には硫酸塩還元細菌に特異的な16S rRNA遺伝子を標的とした定量PCRを行い、全バクテリアに対する比率を推定した。LightCycler® Nanoを用いて定量PCRを行った結果、緑川河口干潟においてはSRBよりもSOBの方が多く検出され、干潟本来の環境が保全されている干潟では確かに硫化水素の蓄積は起こらないものと推測された。

そこで、干潟底泥環境の硫黄循環においてカギとなると判断した硫黄酸化細菌の解析を行うために、単離を試みた。硫黄酸化細菌用液体培地100 mlに干潟底泥 0.5 wet-gを接種し、室温で振とう培養（好気培養）を行った。硫黄酸化反応が起こると最終的に硫酸が生成することになるので培地のpHが低下することから、pH指示薬を添加し培地のpH変化を確認しながら培養を行った。培地に添加する硫黄化合物の種類を硫化ナトリウムやチオ硫酸ナトリウムなどに変化させて集積培養および単離を試みた結果、硫黄源が異なると検出される菌種が変化し、従属栄養型と独立栄養型の両方の硫黄酸化細菌が検出された。単離された従属栄養型の硫黄酸化細菌は、 α -Proteobacteriaの*Paracoccus*、 γ -Proteobacteriaの*Dyella*と*Pseudomonas*、Firmicutesの*Bacillus*に近縁であったが、*aprA*遺伝子を有していなかった。

図1に示したように、硫黄酸化の代謝経路には*dsr*-*apr*経路と*sox*経路の2つが主なものであるが、単離株は*sox*経路を有するグループであると考えられた。*Paracoccus*および*Dyella*はチオ硫酸を硫酸に酸化することが知られており、pHを低下させる。しかし、*Pseudomonas*と*Bacillus*はチオ硫酸を四チオン酸に変換するためにpHを上昇させる²⁾。したがって、図2に模式図を示したように、従属栄養型の硫黄酸化細菌が硫化水素を酸化するときは、硫化水素を硫黄元素まで酸化する菌、それをさらに酸化する菌、チオ硫酸塩を選択的に酸化する菌などの多様な硫黄酸化細菌群が存在し、干潟底泥で起こっている硫黄酸化反応は多種多様な細菌による複合的な反応であることが示唆された。

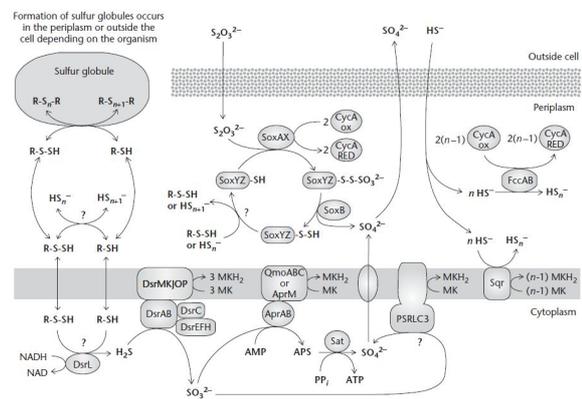


図1 硫黄酸化代謝経路の概要¹⁾

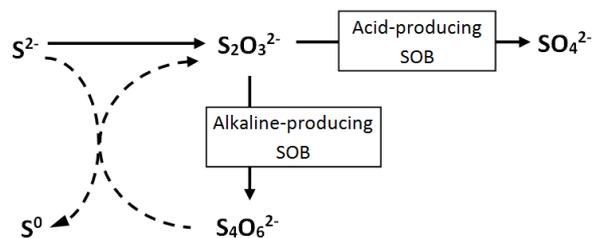


図2 従属栄養型の硫黄酸化細菌による硫化水素酸化様式

次に、pH制御下での硫黄酸化細菌の単離を試みた結果、 γ -Proteobacteriaの*Thiomicrospira*に近縁な独立栄養型細菌が主であり、合わせて従属栄養型細菌が共生していることが確認された。*Thiomicrospira*

属細菌は *aprA* 遺伝子を有しておらず、sox 経路で硫酸化を行うことが知られている³⁾。発酵槽内の *aprA* 遺伝子を有する細菌としては β -Proteobacteria に分類される細菌が検出されたが、16S rRNA 遺伝子の解析では β -Proteobacteria は少数しか検出されなかった。

本研究で得られた単離株を、当研究室の以前の研究で得られた結果と合わせて、図3、図4、図5に示した。その結果、今回単離できた株はクローン解析では少数グループであり、当初の目的としていた主要グループの硫酸化細菌ではなかったことがわかった。

干潟の微生物相は非常に高い多様性を示すが、その中でも比率が大きい γ -Proteobacteria に分類される硫酸化細菌が、 δ -Proteobacteria に分類される硫酸塩還元細菌と硫酸循環を形成しているものと推測された。

多くの研究者が報告しているように、水田、畑地、森林などの土壌環境における菌叢は多様である。しかし、有機物や栄養塩類の供給があり、周期的に潮位が変化することで酸素濃度や塩濃度が常に変化する干潟底泥の菌叢は、門・綱レベルで分類を行ってもその微生物群集構造は多様であり、“微生物の宝庫”と呼んでよいほどに高度の多様性が保持されている。したがって、汚染物質の分解の役割や元素循環機能についても環境変動に対応できる複雑で多様な微生物群集構造が構築されていると考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Dahl, C., Friedrich, C. and Kletzin, A., Sulfur Oxidation in Prokaryotes. In Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2008).
- 2) Sorokin, D.Y., Oxidation of inorganic sulfur

compounds by obligately organotrophic bacteria, Microbiology, 72(6), 641-653 (2003).

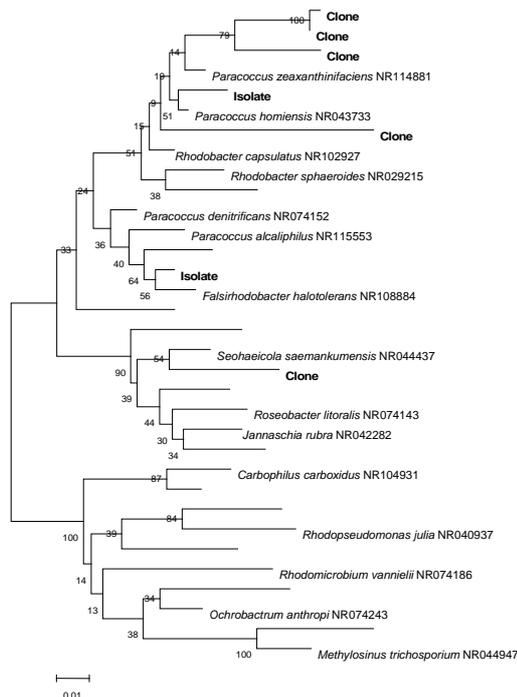


図3 α -Proteobacteria グループの単離株とクローンによる系統樹

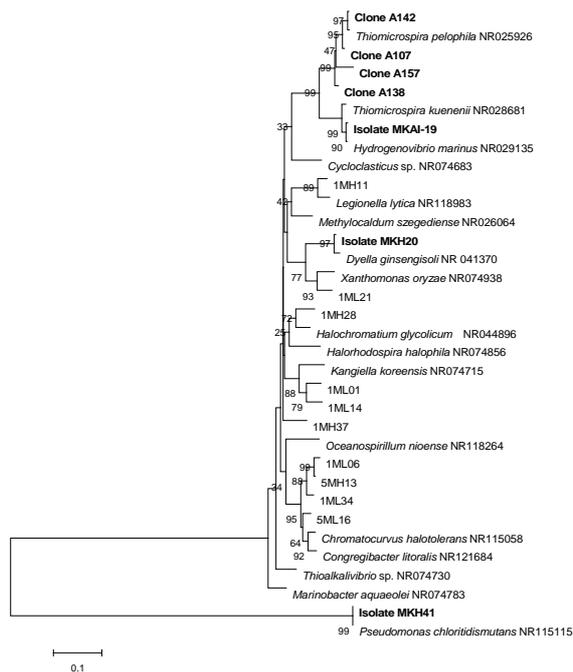


図4 γ -Proteobacteria グループの単離株とクローンによる系統樹

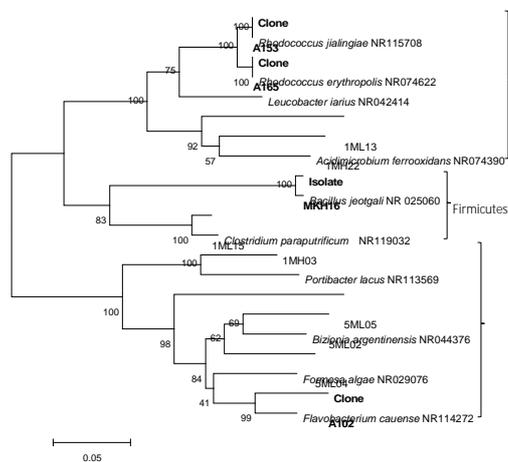


図 5 Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes グループの単離株とクローンによる系統樹

(引用文献のつづき)

3) Meyer, B., Imhoff, J.F. and Kuever, J., Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - Evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system, *Environ. Microbiol.*, 9(12), 2957-2977 (2007).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Irfan Mustafa, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Shigeru Morimura: Community composition of autotrophic thiosulfate oxidizers in tidal flat sediment from the Ariake sea during growth in continuous culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 査読有, Vol.9, pp.51-57, 2015.

2) Irfan Mustafa, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Shigeru Morimura: Isolation and characterization of heterotrophic thiosulfate-oxidizing bacteria and their possible role in the Midorikawa tidal flat, Ariake sea, Japan. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 査読有, Vol.7, No.4, DOI: 10.5897/JENE2015.0504, 2015.

3) Tran Thanh Liem, Mitsuaki Nakano, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Tatsuya Masuda, Kiyoshi

Takikawa, Shigeru Morimura: Microbial community composition of two environmentally conserved estuaries in the Midorikawa river and Shirakawa river. *International Journal of Biological Science and Engineering*, 査読有, Vol. 05, No. 01, pp. 28-34, 2014.

[学会発表] (計 3 件)

1) Irfan Mustafa, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Shigeru Morimura: Isolation of thiosulfate oxidizers and their hypothetical roles in sulfur cycle of Midorikawa tidal flat. Kumamoto, Japan, 5th GelK International Symposium, 1st December, 2014.

2) Irfan Mustafa, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Shigeru Morimura: Sulfur-oxidizing heterotrophic γ -proteobacteria at conserved tidal flats at the Ariake sea. Seoul, South Korea, 2nd Seoul International Conference on Biological Engineering and Natural Science, 29-31st August, 2014.

3) Tran Thanh Liem, Irfan Mustafa, Kanae Okada, Hiroto Ohta, Takuro Niidome, Tatsuya Masuda, Kiyoshi Takikawa, Shigeru Morimura: Analysis of denitrifying bacteria of two estuaries in the Midorikawa river and Shirakawa river., Hotel Manang, Thamel, Kathmandu, NEPAL, 3rd World Conference on Applied Sciences, Engineering and Technology, 27-29 September, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森村 茂 (MORIMURA Shigeru)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号 : 2 0 2 3 0 1 4 6

(2)研究分担者

川越保徳 (KAWAGOSHI Yasunori)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号 : 0 0 2 9 1 2 1 1