

1. はじめに

当社では、環境中の微生物の総細胞数あるいは選択培地によって培養される特定の種類の細胞数の計数を受託している。細胞数から地点間の多寡、季節および経年変動を確認し、環境モニタリングや物質収支の定量的評価、環境影響評価等に活用している。

一方、特に環境影響評価において、細胞数の変化（量的変化）だけでなく、多様な微生物によって構成される微生物叢の変化（質的变化）が重要である可能性が想定される場合には、従来の分析方法のみでは、十分な考察が困難であった。そのため、より詳細な情報として微生物叢の取得が必要と考えた。

環境中の微生物叢を把握する手法として、大腸菌を介したバーコーディング法（吉田ら，2012；仁田原，2015）と次世代シーケンサー（NGS）を用いたメタバーコーディング法（Ul-Hasan *et al.*, 2019; Carrier *et al.*, 2020）が知られている。前者は培地培養でできた大腸菌のコロニーからランダムに拾い上げたコロニーを対象とし解析を行うため、後者と比較して定量性に乏しく、また、遺伝子組換えを行うため、大腸菌を厳重に取り扱う必要がある。後者は既知濃度を用いた分析を行うことで定量性を担保でき、その上、遺伝子組換えを行う必要がないため危機管理上のリスクがなく、1度の機械操作で大量の微生物種のDNA情報を取得することが可能である。

本稿では、今後の環境影響評価に資するため、NGSによるメタバーコーディング解析技術を用いて、水柱に比べて生息環境が安定的と考えられる底泥を対象に微生物叢の把握を試みた。

2. 調査方法

2.1 調査日および地点

調査は2022年6月27日の干潮時に実施した。調査地点は、東京湾に面する城南島海浜公園（JNZ）、東京港野鳥公園（TKY）、お台場海浜公園（ODK）、葛西海浜公園（KSK）の4公園の海岸とした（図1）。

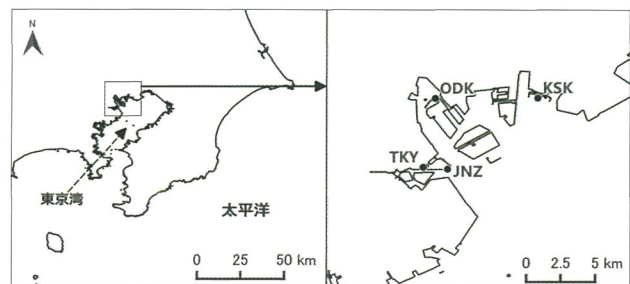


図1 調査地点

QGIS ver. 3.22.7(QGIS Development Team, 2022)で作成。

2.2 環境データ

微生物叢の構造と関連する環境を推定するため、水質として、水温を棒状温度計、塩分、溶存酸素（Dissolved Oxygen: DO）、pHをハンディ水質計WQC-30（東亜ディーケーケー）にて計測した。また、泥中の環境として、酸化還元電位（Oxidation Reduction Potential: ORP）、含水率、泥中クロロフィル a 、泥中フェオフィチン、全硫化物（Total-Sulfide: T-S）、粒度（中央粒径）を測定した。水質の各項目は、コア採泥した場所の海底面より0.5 m上で現地計測し、泥中の各項目にはコアサンプラー（内径5 cm）を用いて採泥した0-3 cm層の泥を測定に供した。各項目の分析方法については、表1に示した。

表1 各項目における分析方法

対象	項目	分析方法
水質	水温	棒状温度計
	塩分	ハンディ水質計WQC-30
	DO	ハンディ水質計WQC-30
	pH	ハンディ水質計WQC-30
泥中	ORP	ORP計
	含水率	乾燥減量(含水率)
	泥中Chl. <i>a</i>	蛍光法
	泥中フェオフィチン	蛍光法
	T-S	環水管127号
	粒度(中央粒径)	ふるい+比重浮標

2.3 微生物叢

微生物叢用の泥は漂白剤による脱DNA処理したコアサンプラー（内径5 cm）を用いて採泥し、0-1 cm層を試料とした。採泥試料からのDNA抽出はDNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN)を用いた。微生物の16S rRNA遺伝子のV4領域を対象とした1st PCRは、プライマー（515F_Parada: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA (Parada *et al.*, 2016), 806R_Apprill: GGACTACNVGGGTWTCTAAT (Apprill *et al.*, 2015))を用いて実施した。1st PCRによって増幅されたDNA配列にサンプル固有のインデックス配列を付与するため、Nextera XT Index (Illumina)を用いて2nd PCRを実施した。2nd PCR産物の濃度を調整したライブラリは、MiSeq Reagent Kit V2 × 250PE (Illumina)を用いてMiSeq (Illumina)によりメタバーコーディングを実施した。

メタバーコーディングによって得られた結果より、既知濃度の標準DNAのリード数からコピー数を算出し、検量線を作成した。そこから、各生物種における湿泥1 gあたりのコピー数を推定した。確認された生物種の網は、Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)を用いてベン図を作成した。

3. 結果

3.1 環境データ

各地点における環境データを表2に示した。各地点の底質は、JNZは砂質、TKYは貝殻混じりの砂質、ODKは砂泥質、KSKは泥質であった。JNZでは、水温が最も低く、クロロフィル*a*量は最も高い値を示した。TKYでは、含水率およびT-Sが最も高く、DOは最も低い値を示した。ODKでは、水温、DOおよびpHが最も高い値を示した。KSKでは、塩分が最も低い値を示した。また、ORPが4地点の中で唯一、プラス（酸化）を示した。

3.2 微生物叢

3.2.1 4地点の群集組成

メタバーコーディングの結果、Operational Taxonomic Unitは6,441配列が得られ、未培養の微生物を含めて2界51門120綱252目382科695属1,517種が示された。総コピー数において、TKYが最も多く、KSKが最も少ない値を示した（図2）。4地点のコピー数において構成比が1%以上を占めた綱レベルを抽出し、各地点における微生物組成をみると、KSKはPolyangiaの割合が高く（他3地点に対しておよそ3倍）、Cyanobacteriaの割合が低かった（およそ0.1倍）（図3）。他の分類群は多少の多寡はあるが、概ね4地点とも近い割合を示した。

綱レベルにおけるベン図では、62綱が4地点で共通し、各地点で特有な綱として、JNZで2綱、TKYで12綱、ODKで2綱、KSKで4綱が示された（図4）。

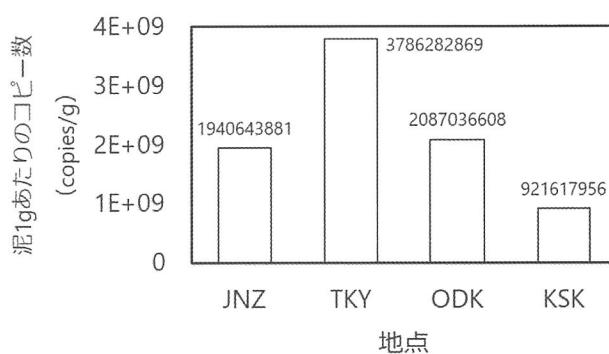


図2 各地点の総コピー数

表 2 調査地点における試料採取時の環境データ

地点	水質				泥中						
	水温 ℃	塩分	DO mg/L	pH	含水率 %	T-S mg/g乾重	ORP mV	クロロフィルa μg/g乾重	フェオフィチン μg/g乾重	中央粒径 mm	
JNZ	26.2	18.9	10.83	8.24	21.0	< 0.01	-130	1.46	18.8	2.06	
TKY	30.1	17.9	5.88	7.79	52.3	0.06	-152	0.52	29.4	0.77	
ODK	30.2	12.4	13.43	8.58	27.4	0.02	-156	0.64	25.7	0.25	
KSK	28.7	5.6	7.35	7.68	27.2	< 0.01	252	0.50	10.5	0.15	

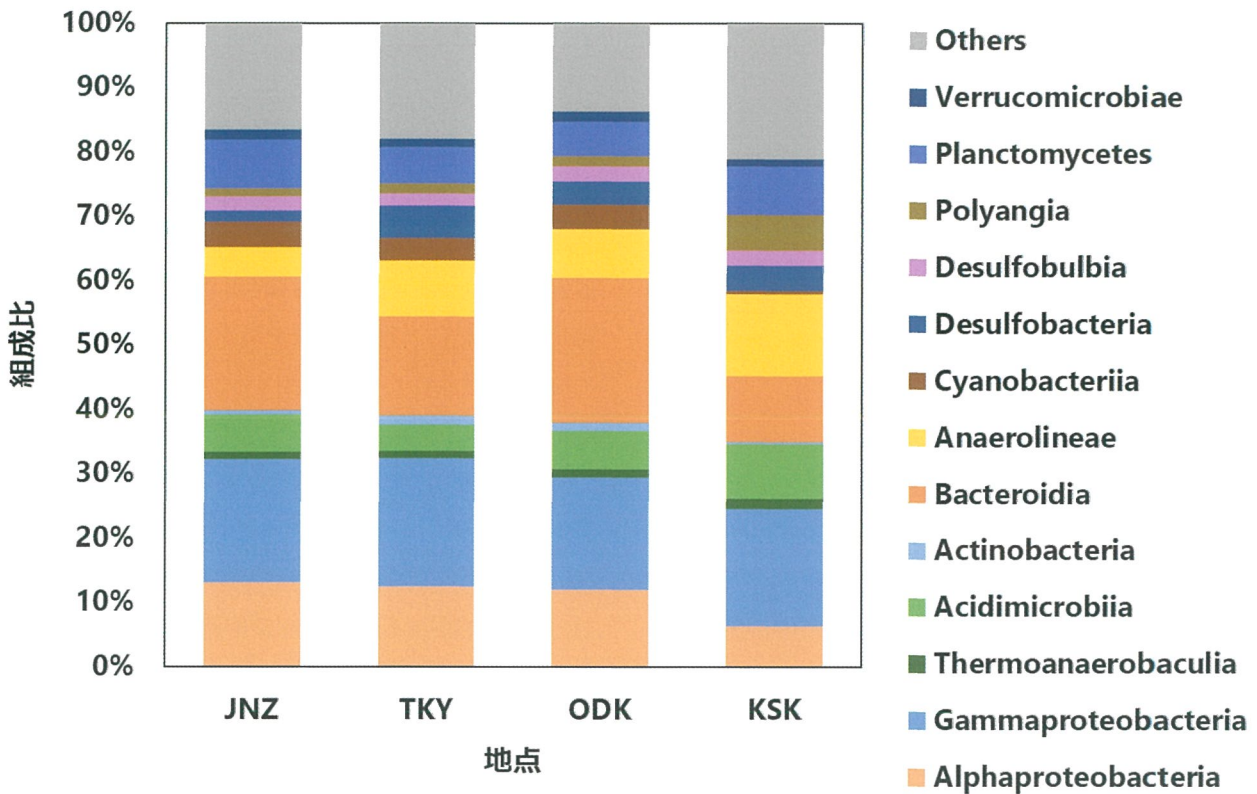


図 3 網レベルでの各微生物の組成比
 全体を通して1%以上のものを表示、それ以下をOthersとしてまとめた。

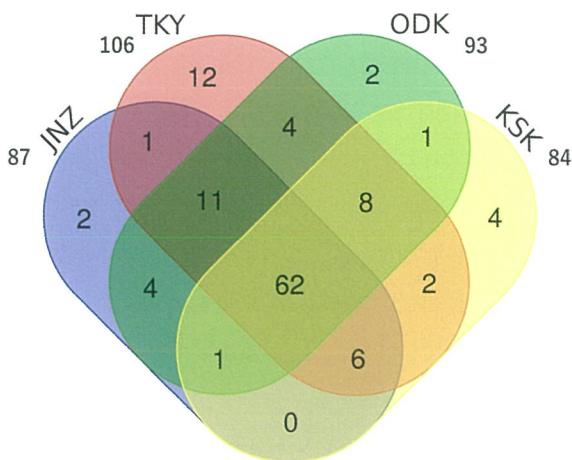


図 4 網レベルにおける4地点のベン図

3.2.2 衛生指標細菌

水利用の際の衛生指標として環境基準値（奥積・藤井，1990；環境基本法第16条（平成5年法律第91号）：環境省，2021）が設けられている大腸菌 *Escherichia coli*・大腸菌群 (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*等) および腸球菌 (*Enterococcus* 属) は未検出であった。また、ヒトや動物の腸内細菌の一種であるサルモネラ菌 (*Salmonella*) も未検出であった。一方、環境中の常在細菌であり、海域や汽水域に広く存在するビブリオ属は6種類が検出され、うち、種まで同定されたものとして3種 (*Vibrio alginolyticus*, *V. sinoensis*,

V. parahaemolyticus) がみられた (表3)。そのうち、食中毒の原因菌として水産食品に対し基準が設定されている *V. parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ) はODKで確認された (ODK全体のうち0.02%)。

属	種	copies/g			
		JNZ	TKY	ODK	KSK
<i>Vibrio</i>	bacterium M19(2011)	2507556	1031713	2302653	0
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1125842	1857083	1420786	510419
<i>Vibrio</i>	uncultured <i>Vibrio</i>	307048	0	0	0
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i> sp.	307048	0	0	0
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio sinaloensis</i>	0	515856	0	0
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	440934	0

3.2.3 硫酸還元細菌

硫酸還元細菌として知られる4属 (*Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfurivibrio*) が検出された。各地点における硫酸還元細菌が占める割合は、JNZが0.23%、TKYが0.19%、ODKが0.25%、KSKが0.03%であった。硫酸還元細菌のコピー数とT-Sには同様の傾向がみられた (図5)。

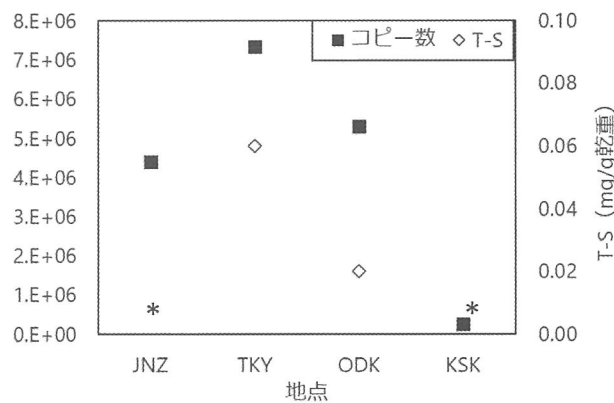


図5 各4地点の硫酸還元細菌4属のコピー数とT-S
*: 定量下限値未満

4. 考察

メタバーコーディングにより、多数の微生物種を識別するとともに、各地点の多寡をコピー数によって推定することができた (図2)。コピー数の最大を示したTKYと最小を示したKSK間で約4倍の差がみられたが、微生物叢の構造は概ね近いことが示された (図3)。一方で、存在比は少ないが、各地点で特有の綱がみられた (図4)。TKYは他地点より貧酸素かつ還元環境であること、KSKは東西から河川水が流れ込んでいることによる低塩分環境が、微生物叢に影響を及ぼし、特有の綱の存在や総コピー数の少なさに繋がっていると考えられる。本調査では、各地点の微生物叢の情報を詳細に取得することができ、微生物叢から環境の差異を判断できる可能性が示唆された。今後、酸化または還元環境や湾内・外といった環境が大きく異なる地点の微生物叢および環境データを取得することで、微生物叢と環境の関係に関する知見を収集したい。

衛生指標細菌である大腸菌、大腸菌群および腸球菌は検出されなかった。一方、ビブリオ属が検出され、高水温となる夏季に活発に増殖して食中毒の原因菌となる腸炎ビブリオが、最も高水温であったODKで確認された。本手法は培養手順を踏まずに複数種の存在と量的変動を推定することが可能であり、沿岸域における衛生指標細菌の分布実態の把握や衛生管理・対策への活用が期待が持てる。ただし、DNAを対象とした分析では細菌の生死が不明な点に留意が必要であり、コピー数から衛生管理上の基準を検討するには、今後もデータの蓄積が必要である。

嫌気的環境に分布する硫酸還元細菌のコピー数の多寡とT-Sには同様の傾向がみられた (図5)。今後、経時的な硫酸還元細菌とT-Sの消長の関係を把握することで、先行する硫酸還元細菌のコピー数の増加から、その後のT-Sの上昇、嫌気的環境へのシフトといった環境悪化の事前予測に資することが期待される。このように、機能が明確になっている細菌に注目し、それらの存在量と、関連する環境項目を照らし合わせていくことで、環境影響評価に繋がる情報を取得することが可能と考える。

今回、微生物叢の環境DNA調査を試みるにあたり、コンタミネーションの不安があったが、4地点間で共通しない綱

が複数確認された。よって、地点間のコンタミネーションは生じていないと考えられ、サンプリング手法に特段の問題はないと思われる。一方で、存在比は少ないながらも、Deep Sea Euryarchaeotic Groupの未培養菌およびメタン生成細菌の一種 *Methanothermobacter crinale* が比較的T-Sが多いTKYでみられた（それぞれ、0.01%、0.03%）。これら2種が他の地点と比較して嫌気性環境を示したTKYで存在していた可能性は考えられるものの、（使用器材は脱DNA処理し、深海調査で用いていないものを利用したが）深海調査を実施する当社の物品等からの混入の可能性も検証する必要がある。この点については、今後の課題として、分析経験を積みながらデータを蓄積していきたい。

5. まとめ

- NGSを用いたメタバーコーディング法による底泥の微生物叢の把握を試みた。
- 各地点の微生物叢を把握することができ、手法を習得することができた。
- 本研究結果より、微生物叢から環境の差異を判断できる可能性が示唆された。
- 衛生指標細菌および硫酸還元細菌等に注目することで、衛生管理・環境評価に資する情報を収集できる可能性が示唆された。

6. 謝辞

本調査を遂行するにあたり、サンプル採取を快諾して下さった各海上公園の関係者の皆様に御礼申し上げます。

参考文献

- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R. and Weber, L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2): 129-137.
- Carrier, V., Svenning, M. M., Gründger, F., Niemann, H., Dessandier, P. A., Panieri, G. and Kalenitchenko, D. 2020. The Impact of Methane on Microbial Communities at Marine Arctic Gas Hydrate Bearing Sediment. *Frontiers in Microbiology*, 11:1932.
- 環境省 (2021) 「水質汚濁に係る環境基準の見直しについて (お知らせ)」 <https://www.env.go.jp/press/110052.html>, 2022年12月12日確認
- 仁田原翔太, 2015. 海洋性マンガクラストの微生物生態系の解析およびその代謝機能の推定. 東京薬科大学大学院博士論文.
- 奥積昌世・藤井建夫, 1990. 5.4 衛生指標細菌. In: 日本海洋学会 (編). 沿岸環境調査マニュアルII (水質・微生物編). 恒星社厚生閣, 329-340.
- Parada, A. E., Needham, D. M. and Fuhrman, J. A. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5): 1403-1414.
- QGIS Development Team. 2022. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- Ul-Hasan, S., Bowers, R. M., Figueroa-Montiel, A., Licea-Navarro, A. F., Beman, J. M., Woyke, T. and Nobile, C. J. 2019. Community ecology across bacteria, archaea and microbial eukaryotes in the sediment and seawater of coastal Puerto Nuevo, Baja California. *PLoS ONE* 14(2): e0212355.
- 吉田光毅・帆秋利洋・沖田紀子・藤原 靖・布施博之・平田敦洋・荒田 直, 2012. メタンハイドレート賦存海域に生息する微生物を指標とした環境モニタリング手法の研究—メタン関連微生物の遺伝子情報に基づく深海底表層域のメタン検知—. 大成建設技術センター報, 45: 56-1-56-7.

