

## GSI を指標とした微生物動態解析 中国北西部の沙漠に点在する半閉鎖系高塩分水圏を例として

Microbial Dynamics indicated by GSI in semi-enclosed Salty Aquatic Ecosystems in the Desert of  
Northwestern China

講師 才田春夫  
SAIDA Haruo

### はじめに

中国北西部の新疆ウイグル族自治区 (xinjian) は、中国構内でも最も乾燥した地区の一つで、砂漠地帯には塩濃度などの異なる様々な条件の湖や池が数多く存在し、(Zheng *et.al.*, 1993) 特有な半閉鎖系エコシステムを形成している。塩分が極めて高い極限環境では、外部環境を起源とする微生物の影響を受けることなく、そこに適応した好塩古細菌群が優占していると考えられ。一方、塩濃度の薄い塩湖では一般に、外来微生物の影響を受けて生物の多様性が見られる。従って、この地域に存在する様々な条件の塩水環境は、グラム染色指標 (GSI) を用いて生態系の遷移評価を行うのに貴重なサンプルである (Saida *et.al.*, 1999)。

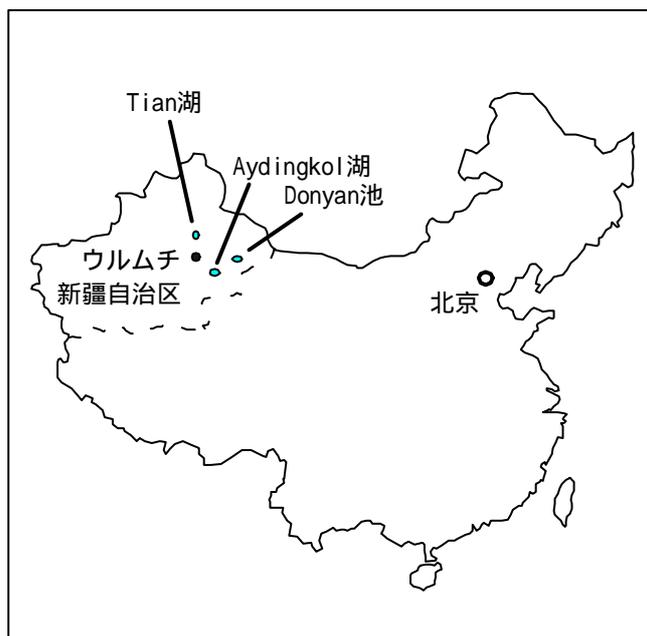


図1 . 調査地点

### 材料と方法

#### サンプル

Aydingkol 湖及び Donyan 池の水中及び湖岸から塩結晶を、また、それぞれの

表層水を無菌的に採取した。水サンプルの一部は 37%ホルマリン (最終濃度 3.7%) で固定した。一部は直ちに培養し、その他は Whatman GF/F ガラスフィルターでろ過をして、冷凍保存した後、実験室に持ち帰って化学分析を行った。

#### 物理化学的及び微生物学的解析

現場水の塩分は EC メーター (CM 14P 東亜電子工業) で行った。溶存有機態炭素 (DOC) は全有

機炭素分析器 (TOC - 5000 島津製作所) で行った。各固定サンプルはポリカーボネートヌクレポアメンブレンフィルター (孔サイズ 0.2 μm、直径 25mm) でろ過した。フィルターを2分割し、それぞれ全菌計数とグラム染色解析に用いた。全菌数はフィルターをアクリジンオレンジ (1/110,000、pH6.6) で2分間染色し、蛍光顕微鏡下でカウントした。グラム染色は古典的なグラム染色法 (Rodina, 1972) に従って染色し、光学顕微鏡 (Optiphot-2, Nikon) と画像解析装置 (Luzex、Nireco) を用いて評価を行った。3-CCD カメラ (XC-009, Sony) で捕らえたバクテリア像の3原色を画像解析装置に送り、それぞれの光強度を256階調で表すことで、各菌体のグラム染色性を無段階評価する。現場細菌のグラム染色性は、各サンプルから約300個体の染色性分析結果をヒストグラム化して、半地幅やピーク位置などを比較することによって特徴づける (Saida *et al.*, 1998, 2000)。

#### 培養と同定

サンプル水各 10ml をろ過した Millipore フィルター (孔サイズ 0.45 μm) を JCM166 寒天培地 (Bacto-casamino acids (Difco) 15.0 g, Trisodium citrate 3.0 g, Glutamic acid 2.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g, KCl 2.0 g, NaCl 250 g, and Agar 20.0 g per liter, pH 8.5) 及び改変 JCM166 寒天培地 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O を 20 g に増量して pH 7.0 に調整) 上で、35 °C で2週間培養を行った。分離培養した菌体は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984) に従って生化学的同定を行い、更に 16SrRNA シーケンスによって確定した (亀倉 & 瀬野, 1993)。

#### 現場微生物群集の Uptake kinetics

微生物による栄養塩摂取速度は現場水 50ml に異なる濃度のペプトン (5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L and 250 mg/L) を加えて現場温度で 15 時間培養し Mono Kinetics (1949) により算出した。

$$\mu = \frac{M_m S}{K_m + S}$$

μ は増殖速度、*M<sub>m</sub>* は最大増殖速度を表す。*K<sub>m</sub>* は μ = *M<sub>m</sub>* / 2 の時の栄養塩濃度で、*S* は栄養塩濃度を示す。

#### 結果及び考察

##### 塩湖エコシステムの生態学的特性

サンプル採取を行った3つの塩湖は塩分、DOC 及び無機栄養塩などの物理化学的要因から特徴付けられる (表 1)。塩分は Aydingkol 湖が最も高い極限環境で、他の水圏環境とは明らかな違いが見られ、特に Tian 池の塩分は海洋と同程度だった。DOC 濃度も塩分と同様に Aydingkol 湖で最も集積されていた。3 水圏の無機栄養塩は Tian 池の無機窒素を除いた全てが過栄養の状態であった。Aydingkol 湖では特有の栄養塩バランスが見られた。つまり、アンモニアが高い値を示すのに硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素が低濃度だった。このことは、Aydingkol 湖が高塩分かつ低酸素環境ゆえ、消化細菌が生息していないか極めて活性が弱いことを意味している。高濃度塩分環境では十分な酸素供給が無いことが多いが、好塩古細菌は嫌気条件下で様々なエネルギー生産方式をと

ることが報告されている(Oren and Truper 1993)。このことから、この塩湖でも光合成によるエネルギー獲得が可能な好塩古細菌が優占していることが示唆される。これと対照的に、少し塩濃度が低い Dongyan 池では、アンモニアと同様に硝酸性窒素も亜硝酸性窒素も高いことから、この程度の塩濃度は消化細菌増殖の許容範囲にあるものと思われる。

表 1. 物理化学的性質の違い

Sampling sites	Aydingkol Lake	Dongyan Pond	Tian Lake
Salinity (‰)	316	172	35
DOC (mg C litre <sup>-1</sup> )	50	8	11
NO <sub>3</sub> -N (µg litre <sup>-1</sup> )	14	6348	3
NO <sub>2</sub> -N (µg litre <sup>-1</sup> )	14	344	7
NH <sub>4</sub> -N (µg litre <sup>-1</sup> )	6063	364	185
PO <sub>4</sub> -P (µg litre <sup>-1</sup> )	301	239	357

Aydingkol 湖程度の塩環境では、真正細菌は塩耐性菌でさえも生息し得ないものと思われる (Madigan *et al.*, 1999) ことから、この塩湖では好塩古細菌が土着の微生物群集が周辺環境由来微生物の影響を受けずに、固有の生態系を形成しているに違いない。一方、塩濃度の低い Dongyan 池や Tian 湖では外部環境由来微生物の影響を受けていると思われる。これらの観点から、異なる塩濃度の半閉鎖系水圏における微生物活動を何らかの指標で比較することは、土着微生物群集への外部由来微生物の影響評価につながる可能性がある。

Aydingkol 湖の湿質性塩結晶から滲出する高塩分水に溶存する有機炭素 (DOC) は極度に高濃度で、水中の細菌密度も他の池に比べてひと桁高かった事実に加えて、天然微生物群集の擬似現場培養実験によって得られた uptake kinetics の高い閾値濃度の結果は、高度好塩古細菌の栄養摂取が原始的なメカニズムであるため、増殖には高濃度の栄養塩を必要とすることを説明するものである (図 2)。尚、Aydingkol 湖の uptake kinetic は次式で求められる。

$$\mu = \frac{8.4S}{750 + S}$$

栄養摂取閾値は 153mgC/L で真正細菌が優占する富栄養海域での海洋微生物群集に比べて非常に高い値である (Seki, 1992)。このことは、この古細菌群集が増殖するため条件として高濃度の栄養が必要であることを意味するものである。

一方、Dongyan 池群集の kinetic モデルは次式で表される。

$$\mu = \frac{0.33S}{0.68 + S}$$

栄養摂取閾値は 0.21mgC/L で、殆どの富栄養海域での真正細菌群集の値と同程度であったことから、Aydingkol 湖の微生物群集は、他の水圏とは明らかに異なる優占種によって構成されていると考えられる。

好塩古細菌の GSI

好塩古細菌の標準的な GSI パターンを知るために、好塩古細菌の代表として *Halobacterium Salinarum* (JCM10927) の GSI を最初に解析した (図 3)。その結果、ヒストグラムは標準的な真正細菌である *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* とは明らかに異なる形状を示した。同じグラム陰性である *E. coli* の GSI が -0.09~0 までの幅広いヒストグラムでピーク位置が -0.045 であるのに対し、*H. salinarum* のそれは、*E. coli* の最ネガティブ領域に鋭いピークを示した (Saida *et.al.*, 2000)。

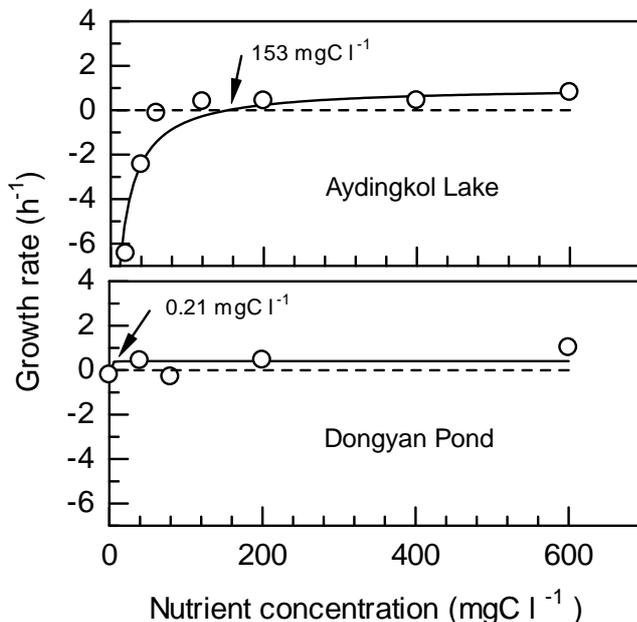


図 2 . Uptake kinetics

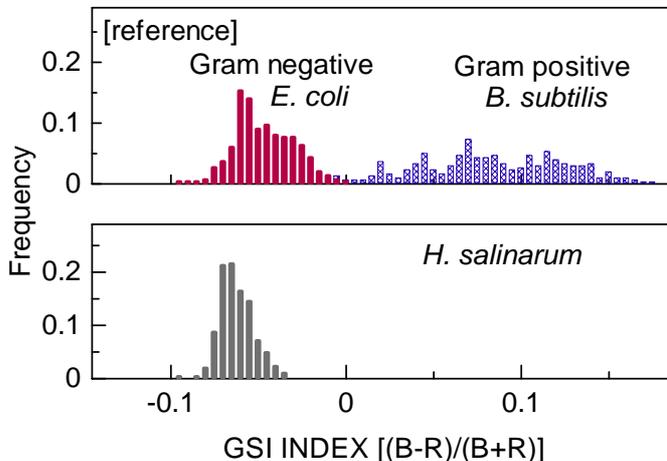


図 3 . 真正細菌と好塩古細菌の GSI ヒストグラム

高塩分の Aydingkol 湖の天然微生物群集の GSI ヒストグラム形状とその出現位置は、標準的な好塩古細菌のそれと殆ど同一で、典型的な鋭い単一性のピークを示した (図 4)。これに対して他の塩水環境である Donyan 池及び Tian 池の微生物群集は Aydingkol 群集よりも幅広く、多峰性ピークを持つ形状を示したことから、これらの水圏では、周辺の細菌群集の混入による影響が出ているものと思われる。従って、Aydingkol 湖の微生物群集は好塩古細菌が優占した極度に少ない種で構成され、他の水圏では好塩古細菌と多くの真正細菌が混在した群集であると結論づけられる (図 . 4)。

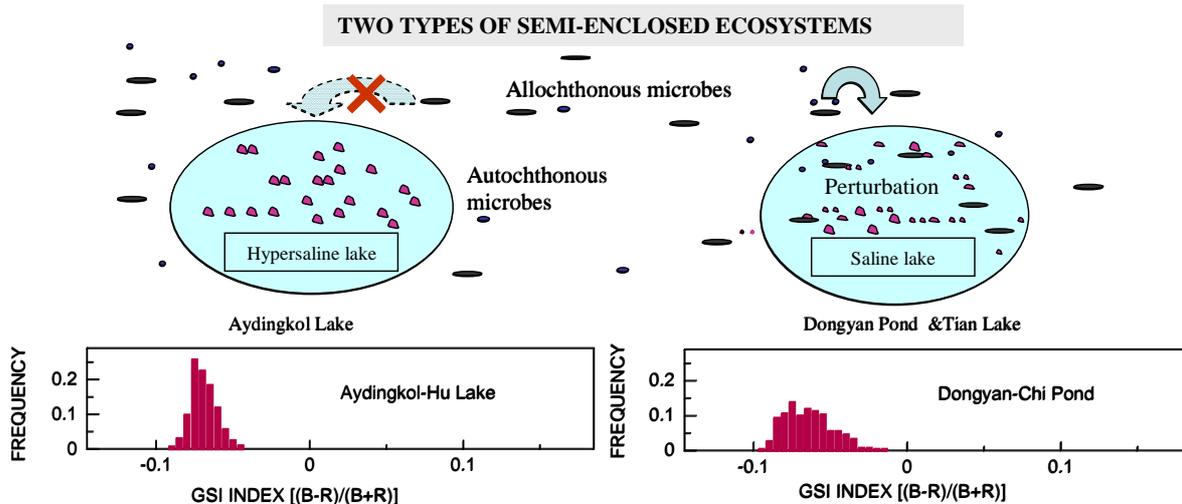


図3 . 半閉鎖系エコシステム内における攪乱モデル

#### 参考文献

1. Kamekura, M., and Y. Seno, Partial sequence of the gene for a serine protease from a halophilic archaeum *Haloferax mediterranei* R4, and nucleotide sequences of 16S rRNA encoding genes from several halophilic archaea. *Experientia*, 49: 503-13., 1993.
2. Krieg, N. R., and J. G. Holt, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1<sup>st</sup> ed., Vol. 1, Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. 1984.
3. Madigan, M. T., Martinko, M. J., and J. Parker, *Brock Biology of microorganisms*, 9th ed. Prentice-Hall International, Inc. Upper Saddle River, New Jersey. 1999.
4. Oren, A., and H. G. Trüper, Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine *N*-oxide. *FEMS Microbiology Letters* 70, 33-36, 1993.
5. Rodina, A. G., *Methods in aquatic microbiology*. University Park Press, Baltimore. 1972.
6. Saida, H., M. Kamekura, W. S. EL-Sayed, M. Abu-Shady, Y. Abe, T. Yamaguchi, Y. Peiling, T. Maekawa, and H. Seki, Gram stain index (GSI) of bacterial and archaeal cells in the natural microbial communities of slightly and extremely saline environments. *J. Oceanogr.*, (In press) 2000.
7. Seki, H., Microbial uptake kinetics in Pacific coastal waters of different degrees of eutrophication. *Sci. Total Environ.*, Suppl. 957-972, 1992.
8. Saida, H., Ytow, N., and H. Seki, Photometric Application of the Gram stain Method To Characterize Natural Bacterial Populations in Aquatic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 742-747, 1998.
9. Saida, H., Maekawa, T., Satake, T., Higashi, Y., and H. Seki., Gram stain index of a natural bacterial community at a nutrient gradient in the freshwater environment. *Environ.*

Poll., 109: 1-9. 2000.

10. Zhen, M., Tang, J., Liu, J., and F. Zhang, Chinese saline lakes. *Hydrobiologia* 267: 23-36, 1993.