

# マイクロファイアスクリーニング法による 屋久島土壤中のガス産生微生物の高度分布解析

榎園 千里知,\* 鳥越 祐作,\*\* 上田 岳彦\*

Elevation Distribution of Gas-producing Microorganisms in Yakushima Island  
Determined by Microsphere Buoyant Screening Method

Chisato ENOKIZONO,\* Yusaku TORIGOE,\* and Takehiko UEDA\*

Gas-producing microorganisms are found over a wide-range of natural environments, where they can release gases such as O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub> in a special condition. The population of the gas-producing microorganisms could be a novel ecological index of the type of metabolic cascade formed by those living in collaboration with limited nutrients or in a special physicochemical condition. In this research, every microorganism was introduced into a glass microsphere individually and allowed to float up by its buoyant of produced gas components. The population and distribution of the gas-producing microorganisms were determined from the number of the floated microspheres, over a range of elevation in Yakushima island..

**Keywords :** Gas-producing, Microorganism, Screening, Buoyant, Ecological Index

## 1. 緒言

多様な環境微生物の中に、その代謝の過程でガスを産生する微生物が混在することは珍しくない。*Cyanobacterium*をはじめとする光合成細菌の多くは、代謝の結果、酸素を生成して気泡を形成することがよく知られている。バクテリアや酵母の代謝経路として一般的な解糖系を有する微生物では、ピルビン酸経路で CO<sub>2</sub> を放出する。このピルビン酸経

由の代謝においては、条件が許せば水素の生成を示す場合も多い。古細菌の一部では嫌気性環境でメタンを生成して放出する代謝系が存在する。

解糖によりエタノール発酵を行う微生物が放出する水素を用いて、共存するメタン生成微生物がその水素を消費することによりメタン生成が促進されるような環境は多数知られており、このような栄養共生の関係が成り立つような環境では、個々の微生物を単離した結果、ガス産生能を示すことが示される場合も多い。栄養共生は、栄養が制限されて単独の微生物だけでは生存できないような環境においても、共生関係のおかげで複数の微生物が生存可能になるようなしくみを提供するものであり、そのような環境から単離される微生物には、単離するという操作そのものがダメージとなって、その後の培

2011年8月17日受理

\* 化学生命・化学工学専攻

\*\* 生体工学科

養や維持ができずに発見に至らなかった例も多数あったであろうと考えられる。

このような栄養共生が成り立つ環境からのガス産生微生物の単離が効率よく成功すれば、今まで未発見だった水素産生微生物を発見し、またその水素を例えば燃料電池系等により消費することにより、その微生物の生存が保障されるという、テクノロジーと微生物の栄養共生を実現する可能性がある。すなわち、ガス産生微生物の効率のよい単離法の確立には重大な意義があり、またそこから得られる微生物資源の発掘が今後ますます求められるであろう。

本研究では、一般的な微生物の分離法とは異なり、代謝産物がガスを形成するかどうかを基準にして、それ以外の微生物群からガス産生微生物を分離する方法<sup>1)</sup>を考案して採用した。平均して数 10  $\mu\text{m}$  の単一の孔を有する直径約 100  $\mu\text{m}$  の空洞ガラス球殻（マイクロスフィア）の内部に微生物を吸引して取り込み、共存していた微生物集団を維持したまま培養すると、代謝の過程でガス成分を供給する微生物を含むマイクロスフィアは、その内部の溶存ガス成分の拡散が抑制されるため、比較的短時間のうちに溶存ガス濃度が溶解度に達して気泡を形成し始めた。その結果、ガス産生微生物を含むマイクロスフィアのみがその浮力で浮上し、それ以外のマイクロスフィアから分離された。一定時間後のマイクロスフィアの浮上数をカウントすることにより、試料中のガス産生微生物のポピュレーションを決定することができた。ただしこの方法では、浮力を与えたガス成分の種類、またガス産生能力を有する微生物の種について区別してカウントしてはいない。

このようにして得られたガス産生微生物のカウント数は、一定時間内にマイクロスフィアを浮上させるだけのガス成分を生成することのできる微生物の密度に比例すると推定できる。ガス産生微生物密度は、それを定常的に維持することのできる微生物群の規模がどの程度であるかを示す指標であり、その試料を採取した環境の生態学的条件を反映するものであると考えられる。この仮説を検証するために、孤立した島嶼でありながら九州最高峰の急峻な山地を有する屋久島を選び、標高に応じて亜熱帯から温帯までの気候が連続的に現れる屋久島南部の本富岳の土壌を試料とした。異なる高度から採取した土壌試料からガス産生微生物の浮上を観測し、そのカウント数をその標高に対応した気候と植生<sup>2)</sup>の見地から検証した。

屋久島はほぼ全域が花崗岩で形成されており、年

間降水量が 10m に及ぶ気候条件から、表面の土壌層は常に洗われて層が薄く、ほぼその植生によって土壌の有機物組成が決定されると考えられる。標高が高いほど寒冷で、微生物分解を受ける時間が短いことから有機物成分の多様性が乏しいと推定される。このように、標高が高くなるにつれて栄養成分が量と質の両面で制限される環境の指標としてガス産生微生物のカウント数が使えるかどうかを検証することが、本研究の目的である。

## 2. 実験方法

リン酸カリウム緩衝液（㈱アテクト）以外のすべての試薬類・培養培地は和光純薬工業㈱より購入した。水溶液および緩衝液は 2 回蒸留水を使用して調製した。

### 2.1 中空単孔マイクロスフィア

マイクロスフィアは流動床ファーネス法により製造された豊和直(株)製 SYB-5005(平均粒径 100  $\mu\text{m}$ )から調製した。非中空のもの、中空で孔が開いていないもの、そして中空で単孔を有するものが混在している粗精製マイクロスフィアからの中空単孔マイクロスフィアの分離精製は以下の方法で行った。

500 mg の粗精製マイクロスフィアを水中で遠心分離(3,000 rpm, 5 min)して沈殿物を除去した。これを 3 回繰り返して沈殿物をすべて取り除いた。続いて減圧(0.01 MPa, 30 min)してから水中で遠心分離(3,000 rpm, 5 min)して沈殿物を回収した。これを 3 回繰り返して沈殿物をすべて回収した。沈殿物をエタノールで洗浄後、減圧乾燥した。約 50 mg (収率 10%)の中空単孔マイクロスフィアを得た。

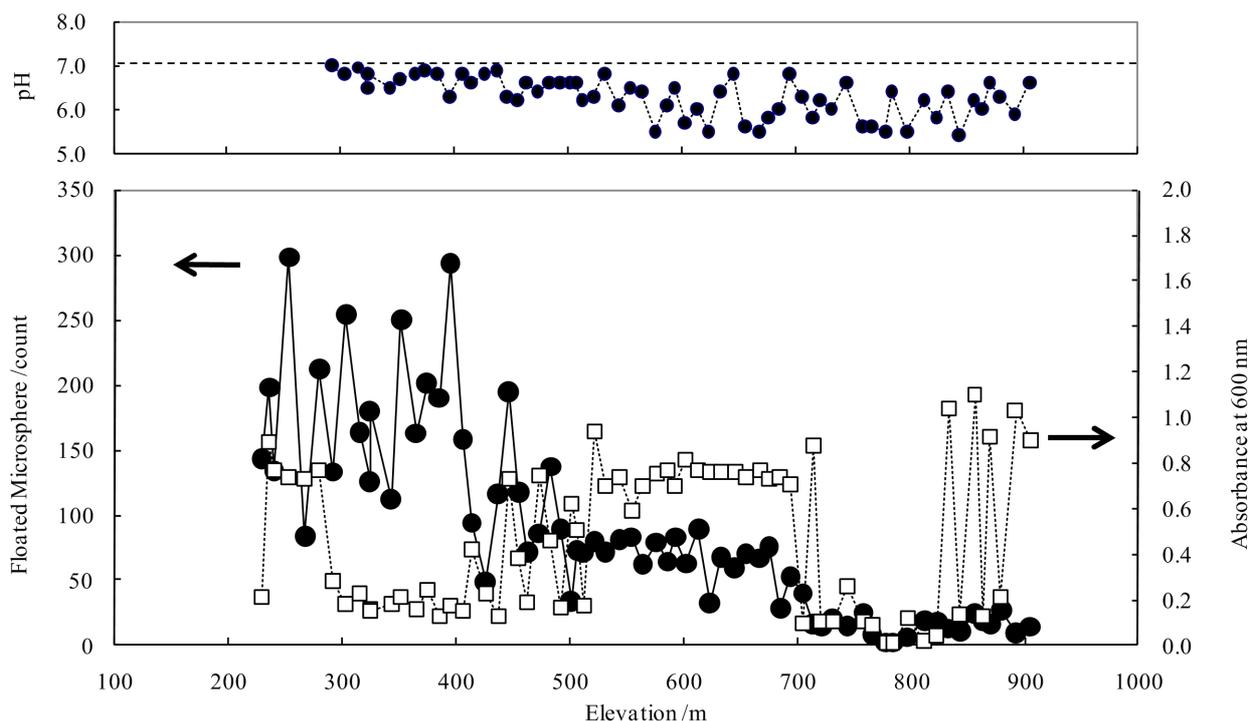
### 2.2 擬似雨水培地および標準 LB 培地

屋久島の雨水は海洋上大気の水蒸気凝縮水であり、完全な脱イオン水ではない。本研究では 10 mM NaCl を含む 0.3 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.2)をオートクレーブ滅菌(121°C, 20 min)して擬似雨水培地とした。これを用いて試料土壌を洗浄・ろ過したろ液をマイクロスフィア浮上実験に供した。

標準 LB 培地は D-グルコース 1.0 g、サッカロース 1.0 g、NaCl 0.6 g、ポリペプトン 2.0 g を 2 回蒸留水に溶解し、全量を 200 mL としたものを pH 7.4 に調製し、オートクレーブ滅菌(121°C, 20 min)した。

### 2.3 屋久島土壌試料の採取

鹿児島県熊毛郡屋久島町本富岳(標高 940 m)に



図－1 採取地点の高度に対する土壌 pH (上図)、浮上マイクロスフィア個数 (下図 ●)、および浮上マイクロスフィアから分離した微生物の 24 h 培養後の波長 600 nm における濁度 (下図 □)

において、登山道(タナヨケ歩道)に沿って標高 229 m から 905 m まで高度約 10 m (気圧換算高度) 毎に計 68 地点を選び、土壌表面から深度 5 cm の土壌(各 10 g)を採取して土壌試料とした。採取地点の土壌の pH は土壌酸度測定器 DM-3 (榎竹村電機製作所製)により決定した。

#### 2.4 マイクロスフィア浮上実験

土壌試料 10 mg に 1.55 mL の擬似雨水培地を加え、ボルテックスミキサーで攪拌(1 min)の後、遠心分離(12,000 rpm, 2 s)して上澄み 1.0 mL を 1.0 mg の中空単孔マイクロスフィアに加えて緩やかに攪拌した。5 min ごとに攪拌しながら減圧(0.01 MPa, 30 min)し、その後大気圧に戻してから遠心分離(12,000 rpm, 2 s)し、上澄みの 200  $\mu$ L を取り除いた。再び遠心分離(12,000 rpm, 2 s)し、上澄みの 200  $\mu$ L を取り除いた。さらに遠心分離(12,000 rpm, 2 s)してから上澄みの 100  $\mu$ L を取り除き、沈殿物を含む水溶液に擬似雨水培地を加えて全量を 1.55 mL とした。エッペンドルフチューブ内で空気をなるべく排除して密閉し、26  $^{\circ}$ C で 24 h 培養した。

培養完了後、遠心分離(12,000 rpm, 2 s)して上澄みの 400  $\mu$ L を PVDF メンブレン(ミリポア製ウルトラフリー-MC、孔径 5.0  $\mu$ m、12,000 rpm, 10 s)でろ過して浮上マイクロスフィアを回収した。これを 3

回繰り返して計 1.2 mL の上澄みから浮上マイクロスフィアを回収した。集めた浮上マイクロスフィアを擬似雨水培地 200  $\mu$ L を加えて穏やかに攪拌し、遠心分離(12,000 rpm, 2 s)して洗浄した。ろ液は取り除いた。この洗浄操作を計 5 回繰り返した。

浮上マイクロスフィア内の微生物の生存を確認するために、標準 LB 培地に接触させて微生物の増殖を濁度法で検証した。浮上マイクロスフィアを乗せた PVDF メンブレンを 1.0 mL の標準 LB 培地に浸漬し、26  $^{\circ}$ C で 24 h 培養した。その後、培地の濁度(波長 600 nm)を測定した。

浮上マイクロスフィアの個数は PVDF メンブレンからマイクロスフィアを回収し、200  $\mu$ L の 2 回蒸留水中に分散させ、光学顕微鏡下でカウントした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ガス産生微生物の高度分布

図－1 (上)に土壌採取地点の高度に対する土壌の pH の分布を示した。高度が高いほど弱酸性に偏る傾向にあるが、これは大気中の CO<sub>2</sub> で平衡化した弱酸性の雨水が絶えず降り注ぐ屋久島の環境の影響で、標高 600 m から 900 m にかけて弱酸性を示す土壌が形成されていると考えることができる。

表-1 層別ガス産生微生物群の高度分布と対応する植物相

層	高度 /m	pH	ガス産生能	増殖能	植物相 <sup>3)</sup>	
L1	230-270	ND	+++	++	ヤクシマアジサイースダジイーヘゴ亜群集	暖温帯 常緑広葉樹林
L2	280-450	6.5-7.0	+++	+	ヤクシマアジサイースダジイー典型亜群集	
M	450-700	5.5-6.7	++	++	イスノキーウラジロガシ ーホソバカナワラビ変群集	
H1	700-820	5.5-6.5	+	+	イスノキーウラジロガシーイズセンリョウ 亜群集 / タカサゴシダースギ群集	暖温帯 針葉樹林
H2	830-900	5.5-6.5	+	+++	タカサゴシダースギ群集	

ND: Not Determined

その一方で、土壌成分の緩衝作用を経験して下方に移動するにつれて中性付近に次第にpHが変化していることも同時に示しているものと思われる。

浮上マイクロスフィア個数(図-1下●)は標高400m以下の土壌で顕著に観察されたが、450mから700mでは、浮上マイクロスフィア個数は低い高度での値の1/3程度に減少しながらほぼ一定の個数の浮上が見られた。標高700m以上の土壌では、浮上マイクロスフィア個数はさらに1/3程度に減少しながらも、やはりほぼ一定の個数の浮上が見られた。これら3つの領域は浮上マイクロスフィア個数という指標を用いて明確に区別できるものであることから、本研究では標高が低い方から順にL層(230m~450m)、M層(450m~700m)、およびH層(700m~900m)と名付けた。

浮上マイクロスフィアから分離した微生物の24hの培養後の波長600nmにおける濁度(図-1下□)から、その土壌中の微生物の増殖能力を検証することができる。一般に栄養が制限された環境では、活発な増殖は周辺の栄養成分の短時間での枯渇を招くため、生態学的には有利ではない。これは大腸菌等の腸内細菌が示す活発な増殖能力とは対照的である。生態学的戦略の観点から考えれば、栄養成分の十分な供給と、絶えず排泄によりポピュレーションが失われるという腸内環境に適応した結果、活発に増殖するという戦略を発達させてきたものと考えられる。この観点から言えば、増殖能力の高さとは、適応した環境から絶えず排除されるような作用がある場合か、またはどんなに増殖しても栄養の供給が十分で枯渇の恐れがない環境であることを示す指標であると言える。

屋久島の山岳においては、高度が高くなるほど栄養成分の十分な供給は期待できなくなるため、雨水による流失作用が顕著な環境であるほど、高い増殖能力が生態学的に重要となるであろう。図-1の濁度分布から、L層の270m以下(L1層)と280m以上(L2層)は明確に異なった層を形成しており、下層では増殖能力が高く、上層では増殖能力が低かった。一方、M層ではおおむね一様に全ての高度で増殖能力が高かった。H層では、820m以下(H1層)では一様に増殖能力が低く、M層とは異なる傾向を示している点が興味深い。標高830m以上(H2層)では局所的に増殖能力が非常に高い微生物群が検出される土壌があり、再び高い増殖能力が生存にとって重要な戦略となっていることがわかった。

以上の各層の特徴を表-1にまとめた。植物相は、標高700m~800mにかけて、低地の常緑広葉樹林帯から高地の針葉樹林帯に転換し、高地では次第にシダ類が顕著に表れるようになる。H2層の高い増殖能は、シダ類と針葉樹の低木が雨水から土壌を十分に保護することができず、表層では常に増殖を続けないと水流によりポピュレーションが失われる傾向にあるからだと推察できる。常緑広葉樹林が現れるH1層では、広葉樹の傘下で雨水の水流による表層土壌が洗われる効果が低減する一方で、栄養もあまり豊富でないと考えられることから、増殖能を低く抑えて生存する戦略が現れていると言える。M層では、山岳中腹の水流はそれより高所の雨水が集められ、一時的な河川を形成して流れるため、表層土壌が洗われる効果が発揮され、従って再び増殖能を高める戦略が種の生存に有利となったであろう。L2層では山岳の裾野の表面積が大きくなるため、

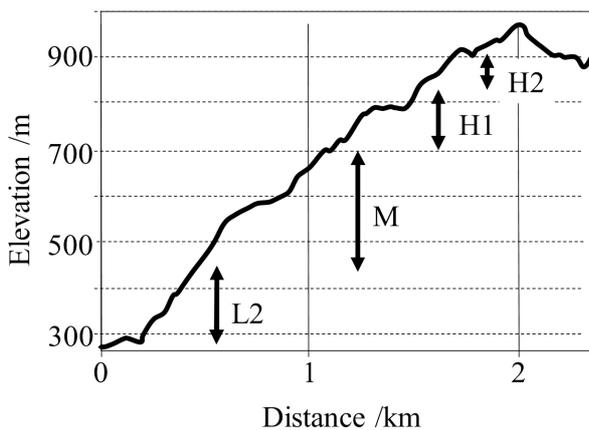


図-2 屋久島登山道断面の高度対水平距離対応図  
各層 (L2, M, H1, H2) を矢印で示した。

水流の効果は緩和され、貧栄養環境における戦略として再度低増殖能による生き残り戦略が有利となると考えられる。

各層のガス産生能力は高度が高くなるにつれて低下した。これは、低地に下がるほど、そこよりも高い位置の土壌で生産された代謝産物が傾斜に従い水流によって供給されるためと考えられる(図-2)。多様な代謝産物の供給は栄養共生する複数種類の微生物を支えるために必要であり、そこで得られる分解産物の多様性は高度が低いほど向上するであろう。従って高地では微生物群の多様性も土壌中の有機成分の多様性も低いと考えられ、高度が低下するに従ってガス産生微生物が現れて栄養共生の重要な一員となっているものと考えられる。

L2層からL1層にわたっては、有機物を代謝分解する微生物相の多様性が向上し、栄養供給量が増加していくにつれて、その栄養に依存して増殖することが、競争的關係にある他の微生物を排除する効果をもつため、再び増殖能を高める戦略に生態学的意義を生じたものと考えられる。

#### 4. 結論

ガス産生微生物群を非ガス産生微生物から分離するマイクロフィアスクリーニング法を用いて、屋久島本富岳の土壌微生物の高度分布を分析した。ガス産生能力を持つ微生物群のポピュレーションを、その土壌における栄養共生の存在を示す指標と解釈し、同時のそのようにして分離した微生物群の増殖能力から、環境適応戦略についての情報を導き出すことに成功した。

本富岳は水平距離で 2 km の間に垂直に標高

940 m まで登る急峻な山岳であり、土壌環境が高度に従って連続的に変化する。このような環境では隣接する土壌がお互いに生態学的な影響を及ぼし合うと期待できるが、それに加えて、高いところから低いところへと雨水によって栄養が一方的に流れる環境でもあり、有機物資源の多様性や量が高度に従って連続的に分布する。その結果、異なる高度では異なる生存戦略が採用され、それが直接ガス産生微生物群のポピュレーションに反映されていることが確認された。微生物群の多様性を測る指標としてこのマイクロフィアスクリーニング法が利用できることから、今後は生態系の複雑度を定量する尺度としても応用可能であると期待できる。

#### 謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金「萌芽研究」No. 18658039 により行われた。

#### 参考文献

- 1) 上田 岳彦、日本国特許第 4752059 号 (2011).
- 2) 宮脇 昭、日本植生誌 屋久島、至文堂、pp. 62-64 (1980).
- 3) 宮脇 昭、日本植生誌 屋久島、至文堂、pp. 82-110 (1980).