

2003 年度 委託研究概要報告

養殖場いけす周辺の海底土壌における  
微生物相の解析

熊本県立大学環境共生学部  
有 菌 研 究 室  
木 村 宏 和

2004 年 4 月

# 養殖場いけす周辺の海底土壌における微生物相の解析

## 【目的】

狭い養殖環境での魚病の防御は養殖漁業者にとって深刻な問題である。魚病には、ウイルスによるもの、原生動物によるもの、寄生虫によるもの、栄養不足によるものなどがあるが、フグの養殖場では、以前より消毒剤としてホルマリンが多量に使用されてきた。ホルマリンが使用された周辺海域での海水からはホルマリンは検出されないが、ホルマリン由来の化合物が海底に沈殿していることが確認されている。本化合物は未だ同定されておらず、その生態影響も未だ明らかにされていない。そこで、本研究ではホルマリン由来化合物の微生物相への影響を検討することとした。

## 【方法】

ホルマリン由来化合物が存在するであろう養殖漁場の近くの海底土壌サンプルと、それらの影響がないと思われる海域での海底土壌サンプルを採取していただいた。それら土壌 0.25 g を秤量し、Ultra Clean soil DNA Isolation kit (MO BIO Lab)を用いて、海底土壌から細菌を分離することなく直接 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、細菌の 16S rDNA の領域のほとんどすべてをターゲットとしたプライマーセット 27F/1492R および、16S rDNA の細菌の属に依存した特定配列を含むとされている V3 領域をターゲットとしたプライマーセット 338FGC/534R で PCR 増幅を行った。プライマー338FGC は DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)で分離が向上するとされている GC クランプ配列を 5'末端に付加した。PCR 条件は 94°C 5 分、55°C 1 分、72°C 1 分を 35 サイクル、最終伸長 72°C 2 分間とした。変性濃度勾配ゲルは 6%アクリルアミドを用いて、20%から 75%の変性勾配をかけた。変性剤には尿素とホルムアミドを用い、100%変性剤とは 7M 尿素-100%ホルムアミドとした。電気泳動は 50V で 3.5 時間または 150V で 1 時間とし、共に電気泳動中のゲルの温度を 60°C に保った。電気泳動後のゲルを染色しバンドパターンを比較した。

## 【結果】

各土壌サンプルより 16S rDNA を PCR 増幅するのに適した DNA がえられた。現在、プライマーセットによる PCR 反応後のアガロースゲル電気泳動で 1 本のバンドになることを確認している段階である。

## 【今後の予定】

一連の研究のストーリーは、DGGE のバンドパターンの違いから個々の土壌サンプル間での細菌相の違いが見られ、特に、いくつかのバンド(一つのバンドが一つの細菌の DNA に相当する)に分かれるか予測ができないが、それぞれのバンドを抽出後、DNA シーケンサーにより遺伝子解析することで、どの細菌かが分かる。

例えば、コントロールサンプルに比べて、養殖場近辺の土壌に特異的に見られる細菌を上記のように同定し、それらを実際スクリーニングして、ホルマリン耐性などを調べることなどが可能と思われる。