

# 海洋細菌の微粒子捕獲に関する研究

2006年 7月 環境学専攻 自然環境コース 46870 徐 維那  
指導教員 教授 木暮 一啓

キーワード ; サブミクロン粒子、粒子捕獲、DGGE-MDS、AFM

## はじめに

海洋には、細菌数を 1-2 桁上回るサブミクロン粒子が存在し、細菌によるその代謝は海洋での物質循環を理解する上で重用である。それらの粒子を効率よく利用するため、細菌は菌体周辺にそれらを捕獲する (Particle Capturing)、との仮説を立てた。この研究の目的は磁性粒子をモデル粒子とし、この仮説を証明することである。

磁性粒子を天然海水に混ぜ、培養後、磁石で回収、分離される細菌を微粒子捕獲能を持つ細菌とした。方法論の確立のため、分離された細菌の量および群集組成の解析を行った。また、黒潮外洋域の細菌を AFM (Atomic Force Microscopy) により観察し、実際に微粒子を細胞表面に持っている細菌を定量した。

## 研究方法

**採水 :** 2005年2月21日、4月15日、2006年1月9日、東京湾で採水を行い、採水後2時間以内にサンプル処理を行った。

**磁性分離方法 :** 20  $\mu$  l の磁性粒子溶液 (Micromod, Rostock, Germany) をサンプルに加え、サンプルミキサー (Dynal, Oslo, Norway) で1時間混合した。十分混ぜられたサンプルを磁性サンプル分離機器に3分間設置、上清を捨てる。PBS (pH 7.5) で3回洗い粒子に付いている細菌群集のみを分離する。

**DNA 抽出と PCR 増幅 :** 磁性分離方法で収集したサンプル (130nmDF, 130nmDT, 250nmDF, 250nmDT, 250nmSF, 250nmST, 6 $\mu$ mSF, 6 $\mu$ mST, 100 $\mu$ mAF, 100 $\mu$ mAT) と 1 ml の海水から収集されたサンプル (SF, ST) は DNeasy Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い DNA 抽出を行った。400 ml の海水から収集されたサンプル (LF, LT, AT) は吉田ら (2006) に従い、DNA 抽出を行った。

**DGGE :** 分子生物学手法である変性剤勾配ゲル電気泳動法 (Degenerating Gradient Gel Electrophoresis) を用い、細菌群集組成分析を行った。電気泳動は DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) で行った。電気泳動後、GelStar (1:10,000 dilution; Cambrex Bio Science Rockland, Maine, USA) で 30 分間ゲルを染色し、FLA-2000 image analyzer (Fuji Photo Film, Japan) で得られた画像を ImageGauge 4.0 software (Fuji Photo Film) を用い解析を行った。

**系統解析 :** BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と Applied Biosystems 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用い、DGGE ゲルから切り出して得られた DNA の配列を読んだ。プライマー間の配列を BLAST で照り合わせ、CLUSTALW を用い、nearest-neighbor alignment を行った。

## 考察と結論

**方法の開発** 磁性粒子による分離法を天然細菌への初めての応用するにあたり、蛍光顕微鏡による菌測定及び分子生物学手法の一つである変性剤勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) による再現性の確認を行い、信頼性の確認を行った。磁性粒子により分離された細菌数はサブサンプル間でほぼ一定であった。また、DGGE 法によりじせい分離したサブサンプル間で非常に類似した群集組成を持つことが判った。このことから本手法の信頼性を確立することができた。さらに、磁性分離サンプルの群集組成は、天然細菌の群集組成とは異なることから、特異的な細菌群集が磁性粒子を捕獲することが示唆された。

本研究により、粒子と細菌の関係を調べるための、シンプルながら正確な方法として、磁性分離方法の適用を提案することができた。多様な材質と大きさを持つ粒子を用いると、細菌の粒子分解、細菌の粒子捕獲に関する研究までも適用できると考えられる。

**生態的な意味** 粒子捕獲行動は、大きさの異なる粒子を用い分離した結果、異なる細菌群集がみえたことから、従来の大きい粒子に付く付着行動とは異なると考えられる。しかし、あくまでも1つの実験系から得られた可能性であり、本研究では詳しい分析は行ってないため、今後の課題として、もっと色んな種類の粒子を用いた研究が必要である。

系統分析では、粒子捕獲細菌が特定グループではなく、Proteobacteria の  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  サブクラス、そして、CFB (*Cytophaga-Flabobacteirum-Bacterioides*) グループに属することが判った。 $\gamma$  サブクラスがないのは一般的であるかは確実ではない。CFB などが粒子捕獲を行うことから、今までの知られた1つだけの栄養獲得戦略ではなく、粒子捕獲という戦略を使い有機物分解等でも栄養を取っているということは、細菌が生きるために環境に応じ、色んな栄養取得方法を生かしているという最近の研究報告とも附合していると考えられる。

## まとめ

磁性粒子により分離された細菌数はサブサンプル間でほぼ一定であった。また、回収された細菌群集組成は極めて類似していることが、DGGE 法により確認された。このことから本手法には再現性、信頼性があり、新たな方法が確立したと判断する。なお、本方法は外洋を含めた天然細菌群集を含め、利用が可能である。

AFM による観察から、微粒子を捕獲する細菌の全体に対する割合は、東京湾の奥および外洋の水深 700–2500m で相対的に高くなった。この結果は、捕獲能が微小粒子の量、懸濁態有機物の鉛直輸送およびそれに伴う分解過程を反映するものと考えている。

捕獲能を持つ細菌として、ものが得られた。 $\gamma$  サブクラスは見出されていないが、これが一般的かどうかは今後の検討課題である。また、異なる材質およびサイズの粒子を用いたところ、得られる群集組成は、粒子の材質よりも、サイズにより依存する傾向が見られた。さらに、この方法によって得られた細菌の群集組成は、天然細菌の群集組成とは異なっていた。このことから、粒子捕獲能を持つ特異的な群集が存在すること、さらにこの微小粒子捕獲能は従来の付着細菌の概念とは同一ではないことが示された。今後、様々な材質と大きさを持つ粒子を用い、さらに高分子分解能との関係などを明らかにしていく予定である。

微小粒子の捕獲は全く新しい概念であり、基礎細菌学、生態的研究のみならず応用的な面でも斬新な研究の切り口を提供するものと期待される。

# Particle-capturing activity of marine bacteria

July, 2006, Institute of Environmental Studies, Course of Natural Environmental Studies

46870, Yuna Seo

Supervisor; Professor, Kazuhiro Kogure

**Keywords:** submicron particles, particle-capturing ability, DGGE-MDS, AFM

## Introduction

Numerous submicron particles in diverse marine environments have been studied in the context of the roles of submicron particles and colloids in marine food webs and biogeochemical fluxes. However, there are no studies of the processes that degrade and consume those colloidal particles. We hypothesize that bacteria contact and retain submicron size particles on their cell surface before hydrolysis, which is a key step for efficient utilization of these particles. We call this process 'particle-capturing' (PC).

To test this hypothesis, we used paramagnetic particles to confirm the presence of PC abilities and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and nonmetric multidimensional scaling analysis (NMDS) to compare the community structure of bacteria that retain paramagnetic particles to that of bacteria in natural seawater samples.

## Materials and Method

**Seawater Sampling.** For method development and bacterial community composition analysis, seawater samples were collected at Shinagawa, on the inner part of Tokyo Bay, on Feb. 21 and Apr. 15, 2005 and at Yokohama Bay on Jan. 9, 2006.

**Magnetic separation.** For magnetic separation, 20  $\mu$ l of particle suspension were added, mixtures were incubated for 1h, and samples were collected with a 12-tube magnet. Also, in order to test the effect of incubation time, samples were incubated up to 48h and treated as same as described above. Sample abbreviations are following: 130nmDT and 130nmDF (130 nm, dextran); 250nmDT and 250nmDF (250 nm, dextran.); 250nmST and 250nmSF (250 nm, silica); 6 $\mu$ mST and 6 $\mu$ mSF (6  $\mu$ m, silica); and 100 $\mu$ mAT and 100 $\mu$ mAF (100  $\mu$ m, agarose).

**DNA Extraction and PCR amplification.** DNA from magnetically separated and centrifuged samples was obtained using the DNeasy Tissue kit (Qiagen). DNA from LT, LF, and AT samples was extracted as described by Yoshida et al. (2006).

**DGGE.** Electrophoresis was performed with the DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) using 1  $\times$  TAE running buffer (Bio-Rad) at 60°C for 18 h at 100V. Gels were stained for 30 min in GelStar (1:10,000 dilution; Cambrex Bio Science Rockland, Maine, USA) and scanned with an FLA-2000 image analyzer (Fuji Photo Film, Japan).

**Sequencing and phylogenetic analysis.** Sequencing was performed with the BigDye Cycle Sequencing

Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an Applied Biosystems 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequences between primer regions were aligned to known sequences using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul et al., 1990) and the nearest-neighbor alignments were performed using CLUSTAL W (Thompson et al. 1994).

## Discussion and Conclusion

**Evaluation of Method.** As the first application to natural bacterial populations, method verification was made in combination with molecular techniques to test reliability. Abundances of magnetically separated bacterial cells were recovered consistently throughout the experiments. The NMDS map showed that the community structures determined from three replicate subsamples generally agreed well. And the community structures of magnetically separated bacteria were different from natural seawater samples. We concluded that only specific bacterial groups were recovered by magnetic separation.

Our study shows the applicability of magnetic separation for a simple and sensitive examination of the relationship between particles and bacteria. When used with particles of various surface properties or sizes, it should be applicable to investigations into bacterial hydrolytic activity and bacterial aggregation and colonization of particles. Thus, the protocol used here should enable studies of bacterial interaction not only with size-variable particles, but also with property-variable particles in the context of the roles of bacteria in the fluxes of particulate matter in marine environments.

**Ecological implications.** PC activity may differ from particle-attachment in the context of bacterial strategy of nutrient acquirement or survival. However, detailed analysis should be required to investigate into changes of the community structure along size or composition of particles, which bacteria associate with.

Phylogenetic analysis showed that bacteria with PC ability were not restricted to certain groups, but spread among the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  subclasses of *Proteobacteria*, and the CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides) group (Fig. 7). It is not yet clear whether the lack of strains belonging to the  $\gamma$  subclass is a general phenomenon or not. Bands t1 and t2 were related to chloroplasts, probably due to the presence of a diatom bloom when we sampled the seawaters in April 2005. Currently, we are analyzing community structures of bacteria recovered from the open ocean by the methods presented here.

In conclusion, we have applied a magnetic separation method to natural marine bacterial populations and demonstrated that certain groups of bacteria interacted with magnetic particles. AFM showed the presence of bacterial cells associated with submicron particles. Our results demonstrate that certain bacterial groups possess PC activity, that is, the ability to retain submicron particles on their cell surfaces. Further investigation with various types of model particles in combination with functional analyses should clarify how bacteria interact with submicron particles and how they metabolize those particles in aquatic environments.