

助成番号 0823

黄砂バイオエアロゾルによって長距離輸送される耐塩細菌群の分離分析

牧 輝弥

金沢大学理工研究域物質化学系

概要 黄砂粒子とともに微生物群が、中国北部の砂漠地域から日本まで運ばれ、微生物生態系に与える影響に、学術的および社会的関心が集まりつつある。実際、黄砂には、ウイルスや細菌、カビ、花粉が含まれ、こうした生物由来の粒子を黄砂バイオエアロゾルと呼ぶ。しかし、大気エアロゾルの捕集には高度な技術を要するため、大気に浮遊する微生物群を直接調査した核心的な報告例は少ない。一方、大気中で微生物が生残するには、乾燥や紫外線照射などの過酷な環境ストレスへ順応し耐える必要がある。これまで、耐塩細菌は、環境ストレスに耐える膜構造を有することが知られており、『耐塩細菌は、大気中で生存し、黄砂とともに長距離輸送されやすい』という仮説を立てた。本研究では、タクラマカン砂漠(敦煌市:黄砂発生地)および能登半島(珠洲市:黄砂飛来地)の上空からバイオエアロゾルを採取し、耐塩細菌群の生残を確認し、その種組成を解明することで、黄砂による耐塩細菌群の越境移送を論じた。

まず、敦煌市(2008年10月17日実施)および珠洲市(2008年5月17日実施)の上空において、エアポンプを搭載した係留気球をあげ、地表から高度600 - 1,000 mで、孔径0.2 μmのメンブランフィルター上にエアロゾル(上空試料)を1時間吸引捕集した(大気量700 L)。また、高度10 mでも試料を採取し、地上試料とした。フィルター上の粒子を細菌用液体培地に懸濁させ、懸濁液を、NaCl濃度0%、3%、10%及び20%の液体培地に接種し、集積培養した後、微生物生長量を確認した。この際、フィルター上の粒子を、染色法を用いた落射型蛍光顕微鏡によって観察した。さらに、集積培養に含まれる細菌種の16S rDNAを標的としたPCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)解析を施行し、種組成を解析した。

捕集したエアロゾル粒子試料を落射型蛍光顕微鏡で観察したところ、鉱物粒子表面に青く蛍光を発する粒子(直径0.5 ~ 1 μm程度)が確認され、大気中鉱物粒子への細菌の付着が示唆された。敦煌市および珠洲市の上空及び地上で捕集したエアロゾル試料を、液体培地で集積培養したところ、いずれのNaCl濃度の培地においても微生物が増殖し、大気中での生残が認められた。PCR-DGGE解析では、細菌の種数を示すバンドがゲル上に複数見られ、上空(600 m - 1,000 m)と地上(10 m)で細菌種組成が概ね一致し、核酸塩基配列はグラム陽性細菌に属した。今回調査した上空までの大気は垂直混合しており、大気中に耐塩細菌が生残している可能性がある。なお、敦煌市のバンド中の遺伝子配列は、上空地上ともに*Bacillus*属あるいは*Staphylococcus*属の細菌群に属した。特に、NaCl濃度20%の培地からのみ、*Staphylococcus*属の細菌が検出され、好塩細菌種も生残していると考えられる。一方、珠洲市の試料由来の核酸塩基配列は、上空と地上において*Bacillus subtilis*グループの細菌群と近縁となった。敦煌市および珠洲市では細菌群の垂直混合が確認されたものの、細菌種の完全一致はなかった。しかし、調査回数を増やすことで同種の細菌が検出され、分離できると予想される。

1. 研究目的

黄砂はモンゴル北部及び中国北部の砂漠地域を起源とし、偏西風によって数日で日本まで風送される^{1,2,3}。ま

た、黄砂粒子に付着する微生物群が、日本や韓国、中国の各地に運ばれ、微生物生態系に与える影響にも関心が集まりつつある。実際、黄砂には、ウイルスや細菌、カビ、

花粉が含まれており、こうした生物由来の粒子は、黄砂バイオエアロゾルと呼ばれる。一方、大気中において微生物が生残するには、気温変化や、乾燥、酸素制限、紫外線照射などの過酷な環境ストレスへ順応し耐える必要がある^{4,5)}。日本海を経由して飛来する黄砂粒子には、多分に塩分が含まれることから¹⁾、高い塩分に耐性がある耐塩細菌が大気中で生残しつづける可能性が高い。なお、耐塩細菌は、pH 及び気温変化や乾燥などのストレス因子にも耐えうる膜構造を有するため⁶⁾、『耐塩細菌は、大気中で生存しやすく、黄砂とともに長距離輸送され、生息範囲を広げる』という仮説を立てた。実際に、関東一円には同種的好塩細菌種が分布しており、この分布は黄砂によって細菌が分散したためと推察されている⁴⁾。従って、大気中から耐塩細菌に焦点を絞って、分離培養し、細菌種組成を明らかにすることで、大気による長距離輸送に関わる細菌群が検出されると考えた。しかし、大気エアロゾルの捕集には高度な技術を要するため、大気に浮遊する微生物群を直接調査した核心的な報告例は少なく、あっても西インド諸島やアメリカ大陸のバイオエアロゾル研究に限られる^{7,8)}。従って、アジア上空の大気に生息する細菌群の生理生態に学術的および社会的関心が非常に高まりつつある。しかし、黄砂発生地から日本や韓国への微生物の輸送に着目した研究は少数であり^{9,10)}、大気中のバイオエアロゾルの生理学的特徴及び微生物種組成は、まだ明らかになっていない。

一方、これまでの砂塵による微生物の長距離輸送の研究では、培養できる細菌のみを対象にしてきた^{11,12)}。しかし、自然環境に存在する細菌群の90-99%は、従来の培養法では培養できないものの、環境中で増殖して生きていることが認識されている(viable but unculturable bacteria)¹³⁾。そのため、分離培養とは独立した変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE 法)によって環境試料から直接抽出したDNAの16S rRNA 遺伝子のPCR産物を解析した結果、微生物種組成は、陸上や海洋の動的環境因子によって影響を受けることが明らかとなった^{14,15)}。しかし、大気中におけるviable but unculturable bacteriaに関する情報は少ない。そこで、耐塩細菌を集積培養によって分離すると同時に、分離できない細菌群についてもその種組成を解析する価値がある。

本研究では、黄砂発生地(タクラマカン砂漠敦煌市)及び黄砂飛来地(能登半島珠州市、金沢市、天草市)において、地上(地上から10 m)と上空(地上から800 m から1,000 m)のバイオエアロゾルを採取し、細菌分離手法および遺伝学的分類手法を用いて微生物種を明らかにし、黄砂によって長距離輸送される微生物種に目処をつけた。1) 各調査地点のバイオエアロゾル試料を、NaCl濃度を変えた培地に接種し(NaCl集積培養)、耐塩細菌群を選択的に増殖させた。2) バイオエアロゾルを対象とした16S rDNAのPCR-DGGE法を確立し、NaCl集積培養物およびバイオエアロゾル試料中の細菌種組成を解明した。

2. 研究方法

2.1 調査

珠州市(2008年5月7日実施)および敦煌市(2007年8月17日および2008年10月23日実施)において、エアポンプを搭載した係留気球をあげ、孔径0.2 μmのメンブランフィルター上にエアロゾルを1時間吸引捕集した(大気量200 cm³) (Fig. 1)¹⁶⁾。

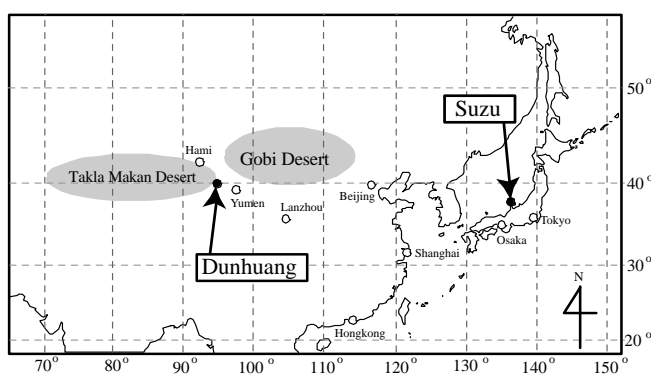


Fig. 1. Dunhuang City in KOSA source regions (Takla Makan Deserts) and Suzu City in KOSA arrival regions

2.2 耐塩細菌を対象とした集積培養

エアロゾル粒子懸濁液5 mlを10 ml Trypticase-soy-broth (TS) 液体培地に加え、その液体培地1 mlを、NaCl濃度0%、3%、10%及び20%のTS液体培地19 mlに接種し、8日間培養した。TS培地は、エアロゾル中に含まれる細菌群を分離する際に一般的に使用される培地である¹⁷⁾。培養を開始した後、波長550 nmの吸光光度を測定することで微生物の生長量を定量した。生長の見られた

培養をPCR-DGGE法に供し、16S rDNA情報をを用いた系統分類学的解析によって細菌種組成を分析した。また、培養を寒天培地塗抹することで、細菌株の分離も行った。

2.3 16S rRNA 遺伝子情報を用いた PCR-DGGE 法

エアロゾル粒子懸濁液のフィルター洗浄液 1 ml あるいは集積培養 5 ml に、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、proteinase K、及び lysozyme を加えることで微生物細胞を溶解させ、ゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した後、ゲノム DNA を鋳型として PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。この際、PCR-DGGE 解析用のオリゴヌクレオチド primer F-341 (GC クランプ含有: 5'-GC クランプ-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') と primer 907R (5'-CCGTCAATTCCTTT[A/G]AGTTT-3') を使用した¹⁸⁾。各 PCR 反応では、抽出 DNA 10 ng に dNTP 2 μ mol/l、各 primer 2 nmol/l、Taq DNA polymerase 1 U を含む PCR mastermix 20 μ l を加えた。混合液を 94°C で 5 分間保温した後、以下 94°C で 1 分間、55°C で 1 分間、72°C で 2 分間の反応を 34 サイクル行い、72°C で 10 分間保温した。次に、得られた PCR 産物を、DNA 変性剤(尿素)で上部 40% および下部 50% と勾配をつけて含むポリアクリルアミドゲル上に電気泳動した(100% 変性剤は、7 mol/l の尿素と 40% のホルムアミドを含む)。電気泳動は、1× TAE buffer 中において、温度 60°C、90 V で 16 時間、電気泳動槽を用いて行った。電気泳動した後、ゲルを核酸染色剤(サイバーゴールド)で染色し、254 nm UV 励起でバンドパターンを確認し、Printgraph (ATTO) を用いてゲルイメージを撮影した。さらに、アクリルアミドゲル上のいくつかのバンドを切り出し、核酸塩基配列の決定に用いた。

2.4 核酸塩基配列を用いた系統分類学的解析

切り出したゲル片を PCR チューブに移し、PCR 産物をフェノールクロロホルム抽出によって精製し、核酸塩基配列を、Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit 及び DNA autosequencing system を用いて決定した。シーケンス primer として GC クランプを除いた primer F-341 を用いた。決定した塩基配列を BLAST と FASTA プログラムを用いて DDBJ データベース(DNA Data Bank of Japan)上で比較した¹⁹⁾。すべての塩基配列を含む系統樹は、TreeViewPPC を用いた近隣結合法によって作成した²⁰⁾。

3. 結果

3.1 敦煌市におけるバイオエアロゾル

3.1.1 バイオエアロゾル試料の採取調査

敦煌市の上空 800 m 地点の大気中におけるエアロゾル粒子数は、いずれの粒子サイズでも上空 20 m 以下の地点よりも少なかった。しかし、粒子サイズごとの分布数は、高度 800 m と 20 m 以下の大気で類似しており(Fig. 2)、大気成分の垂直混合が示唆される。両高度において、粒径 0.3~0.5 μ m の粒子が 91,000 particles/l 以上の高い濃度であり、全粒子数の 90% は 0.3 μ m より大きいことになる。

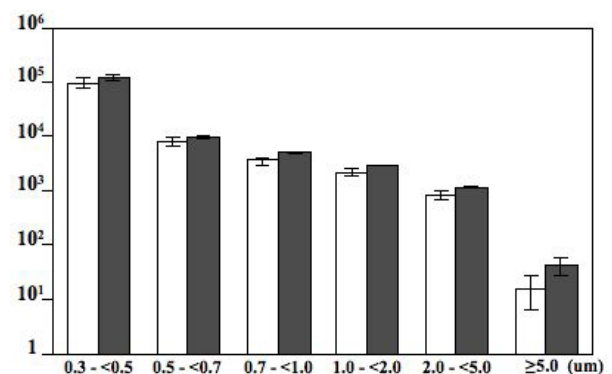


Fig. 2. Particle concentrations of each diameter size in the atmosphere at 800 m (white bars) and below 20 m (grey bars) above ground

3.1.2 耐塩細菌の集積培養

バイオエアロゾル試料を、NaCl 濃度を変えた TS 培地で培養した際、NaCl 濃度 0 及び 3% の培地中での微生物生長量は、培養 3 日以内に急速に増加し、吸光度は、実験期間内で 1,200 以上に達した(Fig. 3)。NaCl 濃度 10% の培地では、高度 10 と 800 m 両方の試料中の微生物は、徐々に生長し、吸光度は、培養 7 日で 1,200 以上に増加した。NaCl 濃度 20% の培地では、生長量が少なく、培養 6 日目でも吸光度は 600 以下と低かった。

3.1.3 大気中の細菌種組成解析

バイオエアロゾル試料に含まれる微生物の 16S rDNA 遺伝子の PCR 増幅産物を、変成剤濃度勾配ゲル上に電気泳動したところ、高度 10 m と 800 m で捕集した試料で 2 本のバンドが検出され、バンドパターンは一致した(Fig. 4)。NaCl の濃度を変えた集積培養の内、NaCl 濃度 0 と

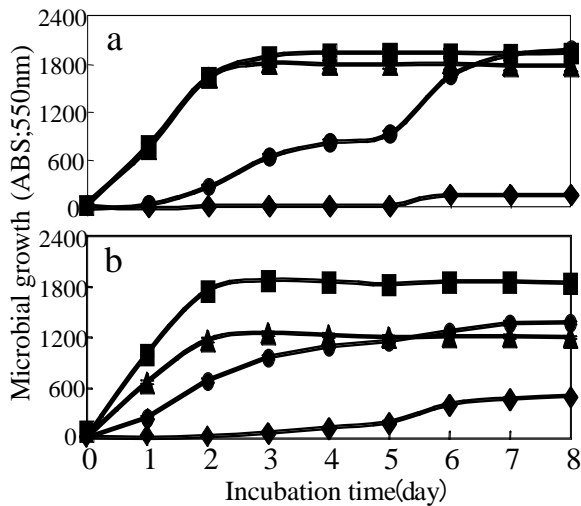


Fig. 3. Microbial growth of the bioaerosol samples collected at heights of 800 m (a) and 10 m (b) in the TS media containing NaCl at the concentrations of 0% (square), 3% (triangle), 10% (circle) and 20% (diamond)

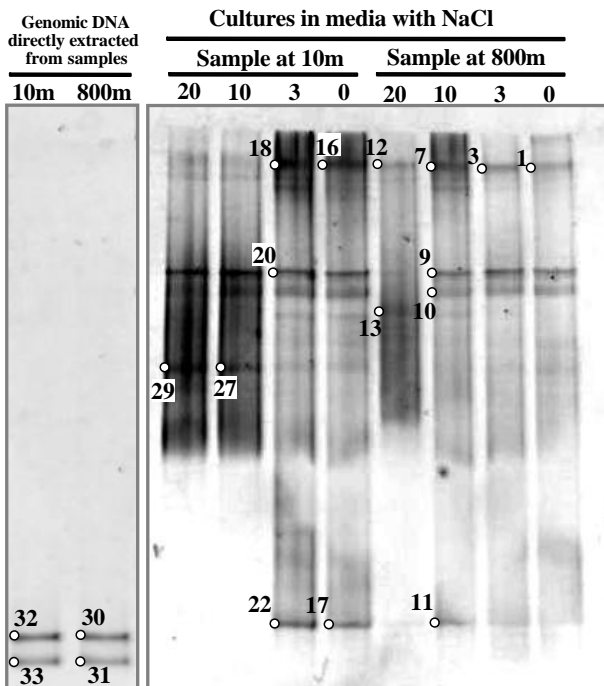


Fig. 4. DGGE profile (band patterns) of amplified 16S rDNA from the genomic DNA directly extracted from bioaerosol samples at 10 and 800 m and from the bacterial cultures of bioaerosol samples collected at 10 and 800 m, which were cultivated in TS media containing 0%, 3%, 10%, and 20% NaCl. A 40% (upper side) to 60% (lower side) denaturing gradient was used.

3% の培地では、高度 10 m と 800 m の試料で共通したバンドパターンが検出され、細菌種組成が近似していることが示唆された。一方、NaCl 濃度 10 および 20% での培養には、ゲルの下部において特有のバンドが見られ、高度 10 と 800 m の試料で異なった。なお、ゲルの上部と中央部のバンドは、すべての NaCl 濃度の培養から検出された。

DGGE ゲルから 19 本のバンドを切り出し、核酸塩基配列を決定したところ、八つのタイプが得られ (Table 1)、グラム陽性細菌グループに属し、*Bacillus* 属と *Staphylococcus* 属の細菌種とクラスターを形成した (Fig. 5)。八つの遺伝子タイプのうち、三つのタイプは複数のバンドから検出された。NaCl 濃度 0、3 および 10% の培養から得られた DAd-11、DAd-17、DAd-22 の塩基配列とパイ

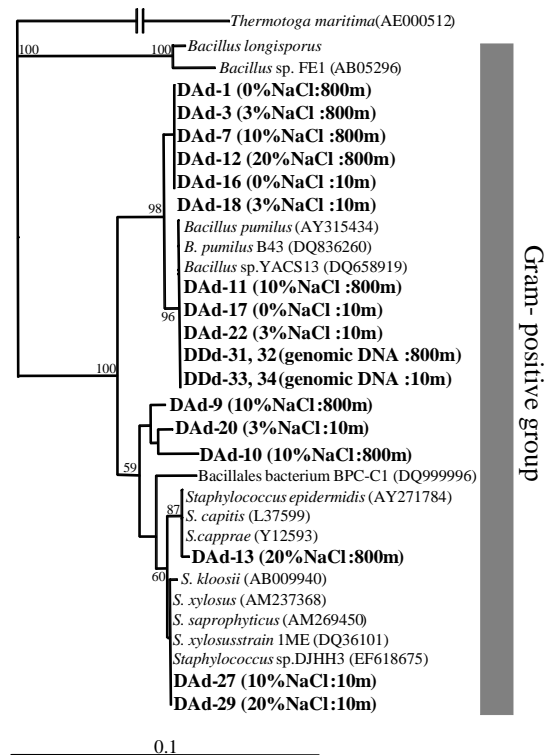


Fig. 5. Phylogenetic tree including the partial sequences of 16S rDNA amplicons excised from the DGGE gel shown in Fig. 5. The tree was calculated from a dissimilarity matrix of ca. 450 bp alignment using a neighbor-joining algorithm. Sample information (NaCl concentrations in the culture medium or genomic DNA directly extracted from bioaerosol sample) is shown in parentheses. Bootstrap values larger than 50% (after 1,000 resampling) are indicated on the branches.

Table 1. Phylogenetic affiliation of sequences contained in the DGGE bands

DGGE band No. *1	Sampling location *2	Sample condition *3	Length (bp)	Category	GenBank accession no.	Closest relative	Similarity (%) *4
DAd-1, 3, 7, 12, 16, 18	10 m and 800 m	< 20% NaCl	481	Gram- positive group	AB455151	<i>Bacillus pumilus</i>	99.4
DAd-9	800 m	10% NaCl	424	Gram- positive group	AB455152	<i>Bacillus pumilus</i>	97.4
DAd-10	800 m	10% NaCl	422	Gram- positive group	AB455153	<i>Bacillus pumilus</i>	96.7
DAd-11, 17, 22 DDd-30, 32	10 m and 800 m	< 10% NaCl direct extracted DNA	473	Gram- positive group	AB455154	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6
DAd-13	800 m	20% NaCl	485	Gram- positive group	AB455155	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.8
DAd-20	10 m	3% NaCl	424	Gram- positive group	AB455156	<i>Bacillus pumilus</i>	98.1
DAd-27, 29	10 m	20% NaCl	486	Gram- positive group	AB455157	<i>Staphylococcus xylosus</i>	100
DDd-31, 33	10 m and 800 m	direct extracted DNA	487	Gram- positive group	AB455158	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6

*1 Numbers of the bands in Fig. 3 refer to the numbering of the DAd or DDd series.

*2 Height above ground.

*3 Cultures cultivated with NaCl at concentrations of 0%, 3%, 10% and 20%, and genomic DNA directly extracted from the bioaerosol samples.

*4 Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

オエアロゾル試料から直接抽出した DNA から得られた DDd-30 および DDd-32 の塩基配列は、一つの系統タイプに属し、*Bacillus pumilus* と 99.6% の高い相同性を示した。一方、DAd-1、DAd-3、DAd-7、DAd-12、DAd-16 および DAd-18 で構成されるバンドも 99.4% の高い相同性で *B. pumilus* と近縁となった。調査時の大気中においては、*B. pumilus* の近縁細菌種が、砂粒子とともに上空に舞上がる優占細菌種であると見なせる。一方、DAd-13、DAd-27 および DAd-29 の三つの塩基配列は、NaCl 濃度 10、20% の培養に特有で、*Staphylococcus* 属に属する二つの系統タイプに分類された。高度 10 m で捕集したバイオエアロゾル試料の培養から検出された系統タイプ DAd-27 および DAd-29 は、*Staphylococcus xylosus* と別の系統タイプが確認され、高度 800 m で捕集したバイオエアロゾル試料の培養は、99.8% の高い相同性で *S. epidermidis* と近縁となり、高度ごとに細菌種は異なると言える。

3. 2 日本上空におけるバイオエアロゾル

3. 2. 1 バイオエアロゾル試料の採取調査

珠洲市での調査期間 3 日間 (2008 年 5 月 6~8 日) の大気中のエアロゾル量を、OMI エアロゾルインデックスデータで解析したところ、ゴビ砂漠及びタクラマカン砂漠などの黄砂発生地域から韓国や日本にかけ

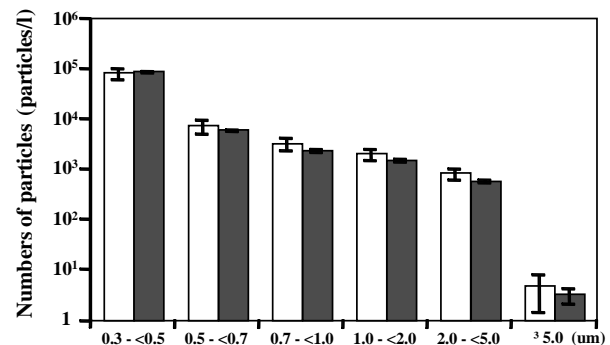


Fig. 6. Particle concentrations of each diameter size in the atmosphere at 600 m (white bars) and below 20 m (grey bars) above ground

て、大型の粒子が広く分布した。また、流跡線は、中国大陸から日本まで大気の移送を示した。気象庁の気象データでは、調査期間中の珠洲市上空 20 m 以下では、東向きに風速 1 m/s 以下の風が記録された。従って、上空と地上では異なる向きに風が吹いていたといえる。調査時において、粒径 0.5 μm を超えるエアロゾル粒子数は、高度 600 m の方が、高度 20 m 以下よりも多く、粒径 0.3~0.5 μm の小粒子の数は、高度 20 m 以下より少なくなった (Fig. 6)。粒子数のサイズ分布は、高度 600 m と 20 m 以下の大気中

で異なり、高度 600 m の大気中の粒子組成は、他の地域に由来することが示される。

3. 2. 2 耐塩細菌の集積培養

バイオエアロゾル試料を、NaCl 濃度を変えた TS 培地で培養した際、NaCl 濃度 0 と 3% の培地での微生物生長量は、培養 2 日で急速に増大し、実験期間内で吸光度は 23~190 (約 $10^8 \sim 10^9$ cells/ml) を維持した (Fig. 7)。NaCl 濃度 10% の培地では、高度 10 m と 600 m の両方の試料において、吸光度が徐々に増大し、培養 15 日間で吸光度 80 を超えた。NaCl 濃度 15% の培地では、培養 7 日目から弱い吸光度の増大がみられ、実験期間中、低い吸光度 (約 10^7 cells/ml) を維持した。これらの結果から、高度 10 と 600 m 試料中の微生物が、NaCl 濃度 3、10 および 15% の培地で増殖することが実証された。

3. 2. 3 上空の細菌種組成

珠洲市上空で採取したバイオエアロゾル試料から直接抽出したゲノム DNA から 16S rDNA を PCR 増幅させ、アクリルアミドゲル上で展開した。その結果、高度 10 m と 600 m の試料で DGGE バンドパターンが異なり、それぞれ一つの DGGE バンド (それぞれ SDD-1 及び SDD-7) を示した (Fig. 8)。NaCl 濃度 0、3、10 及び 15% の集積培養を PCR-DGGE 法を用いて解析したところ、高度 10 m と 600 m でバンドパターンが異なり、2 本のバンドが優占した。しかし、いくつかのバンドは両高度で共通しており、高度 600 m の集積培養では、2 本のバンドのうち、低い位置のバンド (SDD-1、SAd-2、SAd-3、SAd-5 及び SAd-6) がすべての NaCl 濃度で共通して見られ、高度 10 m の NaCl 濃度 3% での集積培養からも検出された。

ゲル上のバンド 13 本に含まれる 16S rDNA の部分塩基配列を決定したところ、四つの系統タイプに分かれた (Fig. 9, Table 2)。すべての塩基配列は、*Bacillus* 属に属し、高度 600 m の試料の塩基配列は、*B. subtilis* グループに属し、一方で、高度 10 m の試料は、*B. subtilis* グループと *B. cereus* グループの系統タイプで構成されていた (Fig. 9)。珠洲市上空の大気試料中には、*Bacillus* 属のグラム陽性細菌種が優占していると言える。また、塩基配列の大部分は、高度 10 と 600 m で異なり、優占細菌の種組成が異なった (Fig. 9)。ただし、高度 600 m の試料に由来する塩基配列 (SDD-1、SAd-2、SAd-3、SAd-5 及び SAd-6) からは、*B. subtilis* グループの一つ系統タイプが主に検出され、

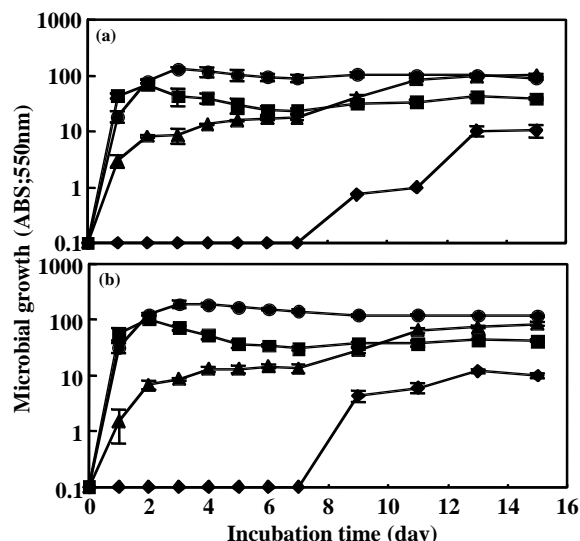


Fig. 7. Microbial growth of the bioaerosol samples collected at heights of 600 m (a) and 10 m (b) in the media containing NaCl at the concentrations of 0% (square), 3% (circle), 10% (triangle) and 15% (diamond)

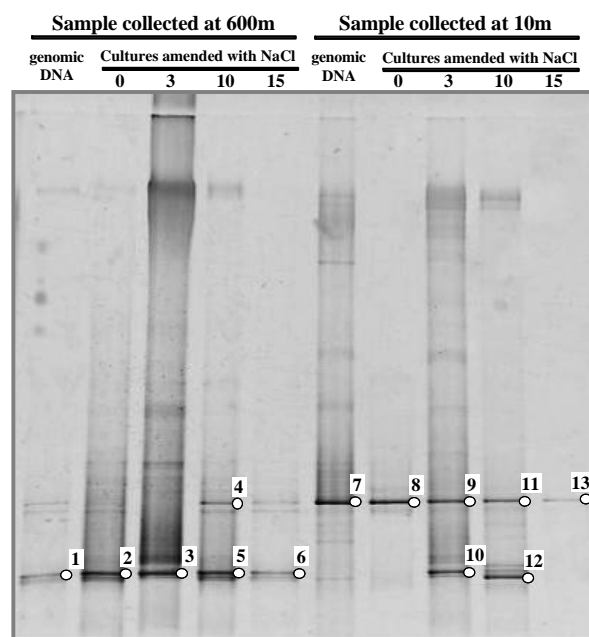


Fig. 8. DGGE profile (band patterns) of amplified 16S rDNA from the genomic DNA directly extracted from bioaerosol samples at 10 and 600 m and from the bacterial cultures of bioaerosol samples collected at 10 and 600 m, which were cultivated in TS media containing 0%, 3%, 10%, and 15% NaCl. A 40% (upper side) to 60% (lower side) denaturing gradient was used

Bacillus 種 Z17 と 100% の高い相同性を示し、高度 10 m 試料の NaCl 濃度 3% の集積培養からもバンド SAd-10 として確認された。

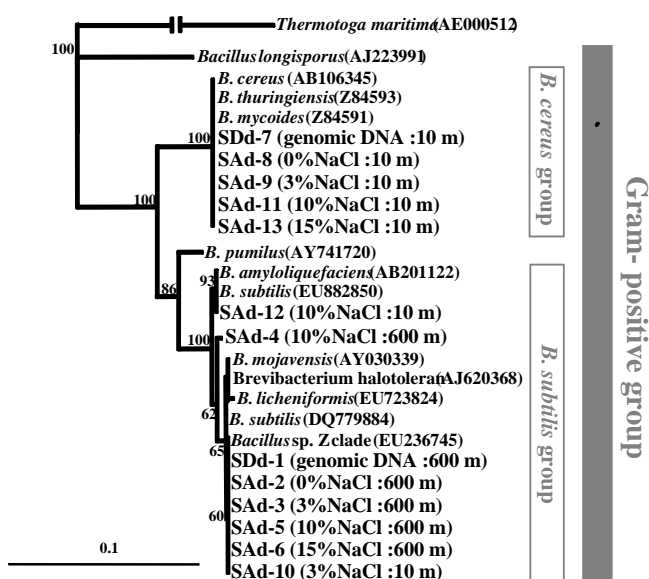


Fig. 9. Phylogenetic tree including the partial sequences of 16S rDNA amplicons excised from the DGGE gel shown in Fig. 4. The tree was calculated from a dissimilarity matrix of ca. 409 bp alignment using a neighbour-joining algorithm. Sample information (NaCl concentrations in the culture medium or genomic DNA directly extracted from bioaerosol sample) is shown in parentheses. Bootstrap values larger than 50% (after 1,000 resampling) are indicated on the branches.

高度 10 m 試料で主に見られた系統タイプは、SDd-7、SAd-8、SAd-9、SAd-11 及び SAd-13 の塩基配列を含み、*B. cereus*、*B. thuringiensis* および *B. mycoides* などの *B. cereus* グループの細菌種と 100% の相同性で一致した。さらに、この系統タイプに含まれる SDd-7 は、バイオエアロゾル試料から直接抽出した DNA から得られており、高度 10 m の大気中で優占していると言える。SAd-4 の塩基配列は、高度 600 m の試料の NaCl 濃度 10% での集積培養から得られ既知細菌とは 99.4% の低い相同性を示し、*B. subtilis* グループに属した。高度 10 m の NaCl 濃度 10% の集積培養から得られた SAd-12 の系統タイプは、系統樹上で *B. amyloliquefaciens* を含む *B. subtilis* グループの細菌群とクラスターを形成した。

4. 考察

4.1 敦煌市におけるバイオエアロゾル

敦煌市の大気中におけるサイズごとの粒子数分布状態は、高度 800 m と 20 m 以下の大気で類似していたものの、粒子数は、上空 20 m 以下の大気中よりも上空 800 m で少なかった (Fig. 2)。従って、大気成分は垂直に混合され、地上から上空へと砂粒子が分散したと見なせる。タクラマカン砂漠は、周囲を山脈で取り囲まれた大きなつぼ状になっており、常に風が吹くつぼの中の大気を混合している³⁾。よって、黄砂発生源では、恒常的に巻き上がった砂粒子に微生物が付着し、大気中を垂直混合されていると充分考えられる。

Table 2. Phylogenetic affiliation of sequences contained in the DGGE bands

DGGE band No. ^{*1}	Sampling location ^{*2}	Sample condition ^{*3}	Length (bp)	Category	GenBank accession no.	Closest relative	Similarity (%) ^{*4}
SDd-1 DAd-2, 3, 5, 6, 10	10 m and 600 m	< 15% NaCl direct extracted DNA	553	Gram- positive group		<i>Bacillus</i> sp. Z clade	100.0
SAd-4	600 m	10% NaCl	409	Gram- positive group		<i>B. mojavensis</i>	99.4
SDd-7 SAd-8, 9, 11, 13	10 m	< 15% NaCl direct extracted DNA	544	Gram- positive group		<i>B. cereus</i>	100.0
SAd-12	10 m	10% NaCl	563	Gram- positive group		<i>B. subtilis</i>	100.0

*1 Numbers of the bands in Fig. 4 refer to the numbering of the SAd or SDd series.

*2 Height above ground.

*3 Cultures cultivated with NaCl at concentrations of 0%, 3%, 10% and 15%, and genomic DNA directly extracted from the bioaerosol samples.

*4 Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

大気中で採取した粒子に含まれる微生物は、0% から15% のNaCl濃度においても増殖を示した。耐塩細菌は、乾燥、UV照射、極限温度、酸素限界、高塩分など高いストレスに抵抗力を有し、極限環境で生残する能力がある⁶⁾。Echigoらは、日本の東京周辺数地点の塩分を含まない環境から耐塩細菌を分離し、細菌株が同種であることを示し、耐塩細菌が黄砂発生により輸送された可能性があると報告した²¹⁾。従って、タクラマカン砂漠上空では、耐塩細菌が生残し、大気中の厳しい環境ストレスに耐えていると推察できる。エアロゾル試料から直接抽出したDNAを鋳型とした16S rDNAのPCR増幅産物は、DGGEゲル上で二つの共通するバンドを示し(Fig. 4)、高度10と800mの両試料でバンドパターンが概ね一致した。一方、NaCl濃度0と3%で集積培養した試料では、高度10と800mのバンドパターンが一致し、低NaCl濃度で生長する細菌群は同一であることが示唆された。一方で、NaCl濃度10および20%での培養では、高度10mと800mで異なるバンドパターンを示した。従って、好塩細菌種組成は上空と地上で異なると言える。

また、ゲルのバンドに含まれる核酸塩基配列は、八つの遺伝子タイプに分かれ(Table 1)、いずれもグラム陽性細菌グループに属し、*Bacillus*属と*Staphylococcus*属の細菌種とクラスターを形成した(Fig. 5)。従って、調査時の敦煌市上空の大気中の微生物群の多様性は低く、少数のグラム陽性細菌種が優占していると推察できる。2006年8月の敦煌市の高度100mで捕集したエアロゾル試料からも、*Bacillus*属の細菌種が分離されている¹⁶⁾。*Bacillus*属は、芽胞を形成するため、環境ストレスに耐えて大気中で生残し続けることができる²²⁾。タクラマカン砂漠のような乾燥状態が続く大気中では、芽胞を形成する細菌のみが生残し続け、他の微生物種が死滅し、微生物群の多様性が減少したのであろう。

特に、最も多くのバンドから検出された3タイプは、*Bacillus pumilus*と近縁になった。調査時の大気中では、*B. pumilus*の近縁細菌種が優占していた可能性が高い。*B. pumilus*のある株は、人に対して毒素を生成する病原菌として分離されており²³⁾、African dust発生時に北カリブのエアロゾル²⁴⁾および海域からも分離された^{25,26)}。また、*Bacillus*属に属する細菌は、高度20,000mで分離されており²⁷⁾、*Bacillus*属の細菌は地球の対流圏を越えて垂直

輸送され得る。従って、黄砂発生地域でも、*B. pumilus*が生きたまま上空を浮遊し、大気中を移送されていると考えられる。集積培養中の*B. pumilus*は、寒天培地を用いて分離できたため、今後、耐ストレス機能の解析も含め生理生態を解明できる。

一方、DAd-13、DAd-27及びDAd-29の三つの塩基配列は、NaCl濃度10および20%の集積培養に特異的に検出され、*Staphylococcus*属に属する二つの系統タイプに分類された。また、高度10mの集積培養からは、*S. xylosum*に近縁な系統タイプ(DAd-27およびDAd-29)が確認され、高度800mの集積培養では*S. epidermidis*の近縁細菌種が検出され、高度ごとに細菌種は異なった。これらの細菌群は、耐塩細菌であり生長にはある程度のNaCl濃度を必要とするため、好塩細菌であると考えられる。一方、これらの系統タイプは、エアロゾル試料から直接抽出したDNAからは検出されていないため、*Staphylococcus*属の近縁種は、黄砂発生地域の上空において、非優占種であると見なせる。*Staphylococcus*属の一部は、人の肌や口腔内でコロニーを形成し、病気の原因となる可能性があり^{28, 29)}、エアロゾルによる輸送過程でも生残することが知られている。*S. xylosum*および*S. epidermidis*などの近縁種も、African dust発生中に北カリブで分離されている³⁰⁾。よって、*Staphylococcus*種も、大気中において生残し、容易に生息域を拡大する可能性がある。

4.2 日本上空におけるバイオエアロゾル

珠洲市での調査期間3日間、大気中のエアロゾル粒子は、ゴビ砂漠及びタクラマカン砂漠から韓国や日本にかけて、広く分布していた。珠洲市において、粒子数のサイズ分布は、高度600mと20m以下の大気中で異なり、高度600mの大型粒子数は、高度20m以下よりも多くなった(Fig. 6)。また、流跡線は中国大陸から珠洲市まで伸び、調査期間中の珠洲市上空20m以下では、東向きに1m/s以下の風速があった。従って、高度600mの大気中の粒子組成は、他の地域に由来すると考えられ、高度600mの大気粒子は、東の海方角の地域に由来している可能性がある。

大気中で採取した試料を、NaCl濃度を変えた培地で集積培養した際、敦煌市の試料と同様にいずれの濃度の液体培地でも微生物が増殖した(Fig. 7)。よって、珠洲市

の大気中にも耐塩細菌が生残していることが実証された。「集積培養のゲノム DNA」あるいは「エアロゾル試料から直接抽出したゲノム DNA」を鋳型とした PCR 産物は、高度 10 と 600 m の試料で異なる DGGE パターンを示したものの、いくつかのバンドは両高度で共通した。ゲル上のバンド 13 本に含まれる核酸塩基配列は、*Bacillus cereus* グループと *B. subtilis* グループの細菌種とクラスターを形成し、大きく四つの系統タイプに分かれた (Fig. 9, Table 2)。従って、珠洲市上空の大気中には、*Bacillus* 属のグラム陽性細菌種が優占していると考えられる。*Bacillus* 属の細菌種は、芽胞を形成し、環境ストレスに強い耐性をもつことが知られている^{25,26)}。よって、大気中の乾燥状態では、芽胞細菌のみが生残したと考えられる。

四つの系統タイプの内、高度 600 m の試料の一つのタイプは、*B. subtilis* グループに属しており、高度 10 m においても検出され、唯一、両高度ともに生息していた細菌に由来すると考えられる。前述のように、気象データの解析では、調査期間中、高度 10 m と 600 m では異なる向き(それぞれ、東向きと西向き)に風が吹いていた。地上の系統タイプが上空では検出されなかったことから、高度 600 m の大気中のバイオエアロゾル粒子が地表に垂直に降下して、上空の細菌種が地上で検出されたと推察できる。この系統タイプの塩基配列は、*Bacillus* 種 Z17 と 100% の高い相同性を示した。DDBJ データベースでは、*Bacillus* 種 Z17 は、中国の高山湿地から分離されている。

さらに、高度 10 あるいは 600 m 試料の集積培養から検出された SAd-4 と SAd-12 を含む系統タイプは、両高度で相同性が低かったものの、*B. subtilis* グループに属した。*B. subtilis* の近縁細菌種は、African dust 発生時の北カリブ³¹⁾と黄砂発生地の大気中から分離されてきた。本研究では、大気中を黄砂粒子とともに、*B. subtilis* の近縁細菌が、生残力維持したまま大気中を移動し、珠洲市をふくむ環境域に向けて生息範囲を拡大する可能性がある。高度 10 m で捕集した試料で特異的に検出された系統タイプは、*B. cereus* グループに属し、バイオエアロゾル試料から直接抽出した DNA から検出されたため (SDd-7)、高度 10 m の大気中で優占していると言える。

今回 PCR-DGGE 解析で検出された *Bacillus* 属の細菌種は、集積培養から寒天培地を用いて分離できたため、

今後、耐ストレス機能の解析も含め生理生態を解明できる。

5. 今後の課題

中国タクラマカン砂漠及び能登半島の珠洲市の上空数百 m において、バイオエアロゾル試料を捕集し、その細菌種組成を PCR-DGGE 解析で分析したところ、大気中には *Bacillus* 属に属する細菌種が優占した。これらの細菌群は、高 NaCl 濃度に対する耐性機能を利用して、様々な環境ストレスにも耐えて大気中に生残できると考えられる。更に、タクラマカン砂漠では、大気の垂直混合が示され、珠洲市では、上空から地上へとエアロゾルの降下が本調査で実証された。従って、タクラマカン砂漠の地上に生息する耐塩細菌が、砂粒子が舞あがるのに乗じて、上空大気へと垂直混合され、黄砂粒子に付着したまま、能登半島珠洲市にまで飛来して地上に降下する可能性はある。

ただし、現時点では、*Bacillus* 属の細菌種は、黄砂飛来地域(珠洲市)と黄砂発生地(敦煌市)の両地点において、同一の細菌種由来の 16S rDNA 塩基配列は検出されていない³⁶⁾。これは、調査回数が少ないことや、調査時期が異なることなどが原因と考えられる。将来、同時期に黄砂発生地と飛来地で試料を捕集し、調査を積み重ねていく必要がある。また、細菌群の長距離輸送を実証するには、16S rDNA を用いた種レベルでの同定だけではなく、株レベルでの一致を検討する必要がある。今後は、耐塩機能や抗ストレス機能をコードする保存性の低い核酸塩基配列を標的とした解析を行い、新規の塩分耐性機能を模索する。

参考文献

1. R. A. Duce, C. K. Unni, B. J. Ray, J. M. Prospero, J. T. Merrill, Long-range atmospheric transport of soil dust from Asia to the tropical North Pacific: temporal variability, *Science*, 209, 1522-1524 (1980)
2. Y. Iwasaka, H. Minoura, K. Nagaya, The transport and spacial scale of Asian dust-storm clouds: a case study of the dust-storm event of April 1979, *Tellus*, 35B, 189-196 (1983)
3. Y. Iwasaka, M. Yamato, R. Imasu, A. Ono, The transport of Asia dust (KOSA) particles; importance of weak

- KOSA events on the geochemical cycle of soil particles, *Tellus* 40B: 494-503 (1988)
4. M. J. Alan, R. M. Harrison, The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - a review. *Sci. Total. Environ.* 326, 151-180 (2004)
 5. A. A. Imshenetsky, S. V. Lysenko, G. A. Kazakov, Upper boundary of the biosphere, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1-5 (1978)
 6. L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, Life in extreme environments, *Nature*, 409, 1092-1100 (2001)
 7. J. M. Prospero, E. Blades, G. Mathison, R. Naidu, Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust, *Aerobiologia*, 21, 1-19 (2005)
 8. A. M. Jones, R. M. Harrison, The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - a review, *Sci. Total Environ.*, 326, 151-180 (2004)
 9. P. C. Wu, J. C. Tsai, F. C. Li, S. C. Lung, H. J. Su, Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China, *Atmospheric Environ.*, 38, 4879-4886 (2004)
 10. H. G. Yeo, J. H. Kim, SPM and fungal spores in the ambient air of west Korea during the Asian dust (Yellow sand) period, *Atmospheric Environ.*, 36, 5437-5442 (2002)
 11. D. W. Griffin, Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health, *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 459-477 (2007)
 12. D. W. Griffin, C. A. Kellogg, Dust storm and their impact on ocean and human health: Dust in Earth's atmosphere, *EcoHealth*, 1, 284-295 (2004)
 13. R. A. Olsen, L. B. Bakken, Viability of soil bacteria; optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups, *Microb. Ecol.*, 13, 59-74 (1987)
 14. N. Lorenz, T. Hintemann, T. Kramarewa, A. Katayama, T. Yasuta, P. Marschner, E. Kandeler, Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure, *Soil Biol. Biochem.*, 38, 1430-1437 (2006)
 15. F. Suehiro, T. Kobayashi, L. Nonaka, B. C. Tuyen, S. Suzuki, Degradation of tributyltin in microcosm using mekong river sediment, *Microbial Ecol.*, 52, 19-25 (2006)
 16. F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamanda, B. Chen, G. Y. Shi, Y. Iwasaka, Study on atmospheric diffusion of bioaerosols in a KOSA source region, *Eurozoru Kenkyu*, 22, 218-227 (2007)
 17. M. P. Fabian, S. L. Miller, T. Reponen, M. T. Hernandez, Ambient bioaerosol indices for indoor air quality assessments of flood reclamation, *J. Aerosol. Sci.*, 36, 763-783 (2005)
 18. G. Muyzer, E. C. de Waal, A. G. Uitterlinden, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700 (1993)
 19. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410 (1990)
 20. N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425 (1987)
 21. A. Echigo, M. Hino, T. Fukushima, T. Mizuki, M. Kamekura, R. Usami, Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm), *Saline Systems*, 2005, 1-8 (2005)
 22. P. J. Riesenman, L. Nicholson, Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 620-626 (2000)
 23. B. Hoult, A. F. Tuxford, Toxin production by *Bacillus pumilus*, *J. Clin. Pathol.*, 44, 455-458 (1991)
 24. D. W. Griffin, C. A. Kellogg, V. H. Garrison, J. T. Lisle, T. C. Borden, E. A. Shinn, Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust, *Aerobiologia*, 19, 143-157 (2003)
 25. S. Banerjee, T. N. Devaraja, M. Shariff, F. M. Yusoff,

- Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and Artemia. *J. Fish Dis.* 30: 383-389 (2007)
26. E. P. Ivanova, M. V. Vysotskii, V. I. Svetashev, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, V. V. Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi, S. Yoshikawa, Characterization of *Bacillus* strains of marine origin, *Int. Microbiol.*, 2, 267-271 (1999)
27. D. W. Griffin, Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere, *Aerobiologia*, 20, 135-140 (2004)
28. B. Spellerberg, K. Steidel, R. Lütticken, G. Haase, Isolation of *Staphylococcus caprae* from blood cultures of a neonate with congenital heart disease, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.*, 17, 61-62 (1998)
29. Y. Q. Zhang, S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin, Y. M. Wen, Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228), *Mol. Microbiol.*, 49, 1577-1593 (2003)
30. H. Wisplinghoff, A. E. Rosato, M. C. Enright, M. Noto, W. Craig, G. L. Archer, Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3574-3579 (2003)
31. C. A. Kellogg, D. W. Griffin, V. H. Garrison, K. K. Peak, N. Royal, R. R. Smith, E. A. Shinn, Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa, *Aerobiologia*, 20, 99-110 (2004)

No. 0823

Long Distant Transport of Halotolerant Bacterial Community by Asian Dust (KOSA) Bioaerosol

Teruya Maki

Kanazawa university , Graduate School of Natural Science and Technology

Summary

Asian desert dust (KOSA) which originates in desert regions of northern China such as the Takla Makan Deserts can carry microbial organisms (KOSA bioaerosol) and possibly impact ecosystem and human health in the downwind environments of Japan. In atmosphere, the halobacterial population is expected to dominate, because halobacteria have tolerance to several stress factors, such as UV irradiance and low oxygen, as well as high concentration of salinity. The physiological characteristic of halobacteria in the atmosphere has to be investigated for searching the functions of novel halobacteria. However, a few studies have focused on the atmospheric bacterial population.

In this study, bioaerosol samples were collected at 10 and 800 m above the ground within the KOSA source area, Dunhuang City, China, and at 10 and 600 m above the ground within the KOSA arrival area, Suzu City at a tip of the Noto Peninsula, which is located in East Sea coastal area. During sampling period of Suzu City, the particle numbers at 600 m were higher than at below 20 m, suggesting the presence of KOSA particles in atmosphere. The microorganisms in bioaerosol samples collected from Dunhuang City and Suzu City grew in media containing up to 15 % NaCl, suggesting that bacteria tolerant to high salinities remain viable in the atmosphere.

The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis using 16S rDNA sequences revealed that halobacterial communities in the bioaerosol samples of Dunhuang City and Suzu City were composed of similar bacterial species belonging to the genus *Bacillus*. The some species of the genus *Bacillus* are thought to maintain alive in the cosmopolitan atmosphere. Moreover, at the both sampling cities, some sequences of 16S rRNA genes were identical between the samples at ground area and upper areas. Presumably, active mixing processes of the boundary layer transport viable halotolerant bacteria into the free atmosphere, where the long-range atmospheric transport of desert dust is frequently observed and down to the ground surface, where the KOSA particles were transported from China. Since the bacterial population of the genus *Bacillus*, which were detected from the NaCl amended cultures of bioaerosol samples in Dunhuang City and Suzu City, could be isolated using the TS agar plates, the detail physiological characteristics of bacteria including the novel NaCl tolerance system will be elucidated in the future studies.