

東日本大震災で津波浸水した農地土壌の5年後における微生物群集解析

浅野亮樹^{1, 3}, 早川敦², 阿部みどり³, 志村洋一郎¹, 小林弥生¹, 福島淳^{1, 3}¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科² 秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科³ 秋田県立大学生物資源科学部バイオテクノロジーセンター

東日本大震災の津波浸水が農地微生物群集へ与えた長期的な影響の解析のため、以前の研究に引き続き非浸水水田 (unflooded: UF), 短期間浸水した水田 (short term: ST), 長期間浸水した水田 (long term: LT) および長期間浸水して圃場整備せずに作付けを行った水田 (long term and cultivate: LTC) における津波浸水5年後の土壌細菌群集構造を解析した。門レベルおよび Proteobacteria 門の綱レベルの解析では UF と浸水土壌に特徴的な違いは見られず、また階層クラスター解析でも明確な違いは見られなかった。しかし、浸水土壌では硫黄酸化細菌 (SOB) の割合は、浸水の1年後に比べるとはるかに低い水準ではあるものの、UF よりもわずかに高い傾向が見られた。このため、土壌微生物群集に対する津波浸水の影響は浸水5年後においてもわずかながら残存していると考えられた。また、SOB は津波浸水した土壌微生物群集の回復を計るために5年以上の長期間にわたり、有用な指標になりうる可能性が示唆された。

キーワード: 土壌微生物, 東日本大震災, 津波浸水土壌, 真正細菌群集構造, 次世代シーケンサー

2011年に発生した東北地方太平洋沖地震は日本における観測史上最大の地震であり、それに伴い発生した津波は広い地域に被害を及ぼした (Maeda et al., 2011; Mimura et al., 2011)。農業は津波被害地域の主要な産業の一つであり、津波による農業施設の破壊、農地の海水および底泥による汚染による被害は甚大であった (Guo et al., 2011)。海水の浸入は作物への生育に直接影響する塩類濃度の上昇などを引き起こす (Kume et al., 2009; McLeod et al., 2004)。また津波は、作物の生育に間接的に影響する土壌微生物にも多大な影響を与えた。

以前我々は分子生物的手法を用い、津波浸水による土壌真正細菌群集への影響を評価した (Asano et al., 2013)。津波発生から1年後において、非浸水土壌では Acidobacteria 門が、浸水した土壌では Proteobacteria 門がそれぞれ優占しており、浸水した土壌では硫黄酸化細菌 (SOB) の割合が増加し (最

大で20%)、亜硝酸酸化細菌 (NOB) の割合が減少した。さらに、海洋性の環境でのみ報告されている Zeta-Proteobacteria 綱と耐塩性の SOB である *Halothibacillus* 属が浸水土壌から検出された。このように大規模な津波浸水は1年後においても土壌微生物に甚大な影響を与えていることが明らかになった。しかし、農地の復興と継続的な利用を促進するためには、どのように土壌微生物が回復し、またその回復にどのくらいの時間がかかるかなど、長期的な解析が必要と考えられた。

本研究では長期間の津波による微生物群集への影響を調査するため、津波の5年後に浸水した農地土壌の真正細菌群集構造の解析を行い、非浸水土壌との比較を行った。

材料と方法

土壌試料の採取

土壌試料は宮城県東松島市の水田から 2016 年 4 月 8 日に採取した。以前の研究と同様に (Asano et al., 2013), 津波の浸水を免れた水田 (unflooded field: UF), 2 週間浸水した水田 (short term: ST) および 2 ヶ月間浸水した水田 (long term: LT) から採取した。これらの水田は以前の研究と同一の水田を用いた。本研究ではこれに加え, LT の近辺で, 浸水した後圃場整備せずに作付けを再開した水田 (long term and cultivation: LTC1, LTC2) から試料を採取した。

物理化学分析

亜硝酸 (NO_2^-), 硝酸 (NO_3^-), 硫酸 (SO_4^{2-}), リン酸 (PO_4^{3-}) および塩素 (Cl^-) イオン濃度は陰イオンクロマトグラフィ (ICS-2100, Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて測定した。アンモニウムイオン (NH_4^+) 濃度はオートアナライザー (QuA Atro2-HR BLTEC) を用いて測定した。pH と電気伝導度 (EC) はそれぞれ pH メーター (B-212, HORIBA) および EC メーター (B-173, Horiba) を用いて測定した。

細菌群集構造の解析

土壌試料 0.5 g から FastDNA Spin Kit for Soil (Q-Biogene) を用いて DNA を抽出した。これを鋳型にして, 真正細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的な 8F/518R プライマーペアを用いて増幅を行った (Baker et al., 2003; Horz et al., 2005)。次世代シーケンサーを用いた解析のため, プライマーには 454 GS Jr. システム (Roche) に特異的なアダプター配列を連結させた (Binladen et al., 2007; Wegner et al., 2000)。PCR には 1× Go Taq Green Master Mix (Promega) を用いた。PCR 増幅産物はゲル電気泳動を行い特異的な断片長を切り出して精製した後, GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L; Roche) を用いてエマルジョン PCR を行った。エマルジョンビーズを精製した後, 454 GS Jr. システムを用いてシーケンズ解析を行った。

得られたシーケンズデータは Ribosomal

Database Project (RDP) Pyrosequencing Pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>) および Data Bank of Japan (DDBJ) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて解析した。群集構造の比較のため, 97%以上の相同性を持つシーケンスを operational taxonomic unit (OTU) としてまとめ, 各 OTU 構成比率から R software (www.r-project.org) を用いて土壌試料同士のユークリッド距離を計算し, 階層クラスタ解析を行った。

結果と考察

物理化学分析

表 1 に土壌試料の物理化学的特性を示す。ST は計測したすべての項目で UF との違いは見られなかったものの, LT および LTC は SO_4^{2-} -S の濃度が高く, NO_3^- -N が低い傾向が見られた。また, この他にも EC, NO_2^- -N および Cl^- の高い水田があった。

津波浸水 1 年後においては, ST および LT で EC, SO_4^{2-} -S および Cl^- が UF と比べて 100 倍以上の値であり, 無機態窒素 (特に NH_4^+ -N) も 10 倍程度の値であった (Asano et al. 2013)。以上より津波浸水した土壌の物理化学特性には, 浸水の 5 年後においても津波浸水の影響が見られるものの, その影響は非常に小さくなっていると考えられた。

表 1 土壌試料の物理化学的特性

	乾物率 %	pH	EC mS/m	mg/kg					Cl ⁻
				NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	PO ₄ ³⁻ -P	SO ₄ ²⁻ -S	
UF	70.0	5.52	2.18	5.3	0.08	10.3	0.17	6.3	6.2
ST	69.3	5.65	2.07	7.3	0.07	11.9	0.19	6.3	7.7
LT	73.6	5.71	4.11	3.9	0.06	3.5	0.10	36.0	18.5
LTC1	79.1	6.03	5.85	14.2	0.36	4.6	0.17	35.7	7.5
LTC2	75.8	5.90	1.98	5.4	0.07	2.6	0.08	13.3	8.0

細菌群集構造の解析

図 1 に土壌試料の真正細菌の門レベルの群集構造を示す。全ての土壌試料で Proteobacteria 門が最も優占しており, その他にも Chloroflexi 門や Acidobacteria 門が優占していた。

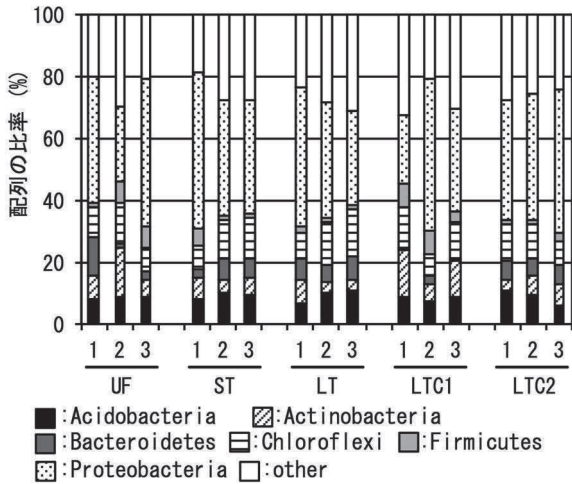


図1 土壌試料の門レベルの細菌群集構造

最も優占していた Proteobacteria 門について綱レベルの群集構造を図 2 に示す. 全ての土壌試料で Beta-Proteobacteria 綱が最も優占しており, その他にも Alpha-Proteobacteria 綱や Delta-Proteobacteria 綱が優占していた. Gamma-Proteobacteria 綱は比較的少なく, Epsilon-Proteobacteria 綱はほとんど検出されず, Zeta-Proteobacteria 綱は全く検出されなかった.

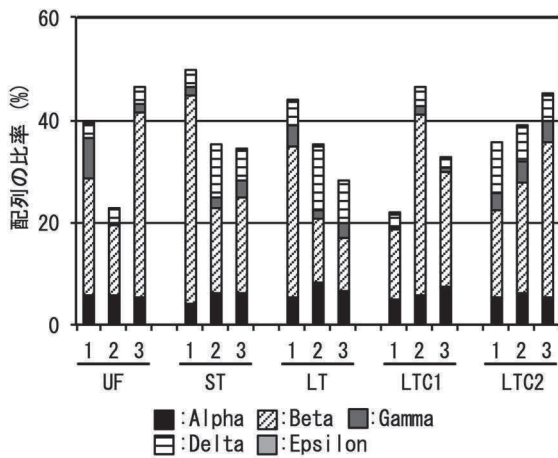


図2 土壌試料の綱レベルの細菌群集構造 (Proteobacteria 門)

群集構造比較のため, 階層クラスター解析を行った (図 3). 採取した水田ごとにクラスターは形成されず, UF, ST, LT および LTC が混在したクラスターが形成された.

津波浸水 1 年後の土壌においては, ST および LT は UF と比較して NOB の割合が低く, SOB の割合が高く, さらに耐塩性 SOB の *Halothibacillus* 属が検出された (Asano et al. 2013). そのため, NOB と SOB についても解析を行った (図 4). NOB は調査地点

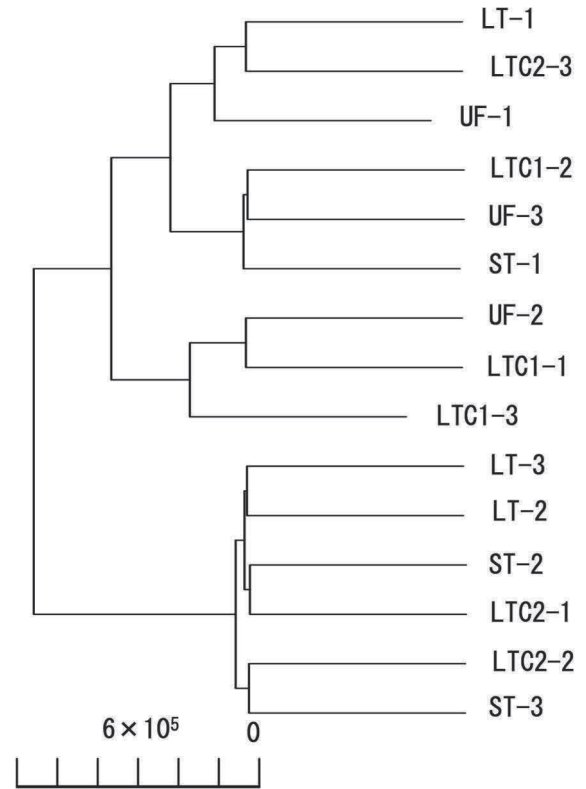


図3 階層クラスター解析による土壌微生物群集構造の比較

ごとに大きな差は見られなかったが, ST, LT, LTC2 は UF よりも SOB の割合がわずかに高い傾向が見られたものの, *Halothibacillus* 属は全く検出されなかった.

津波浸水 1 年において, UF は門レベルの群集構造解析では Proteobacteria 門, Chloroflexi 門および Acidobacteria 門が優占し, 最も優占していた

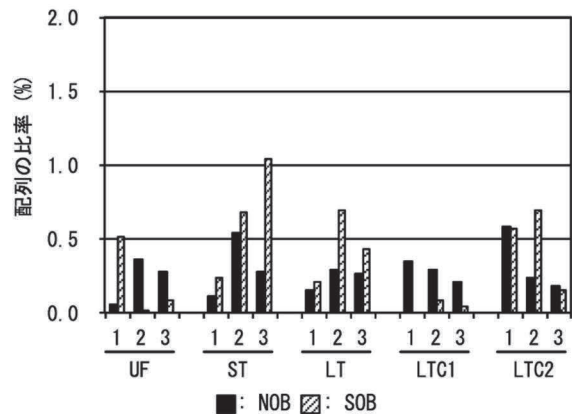


図4 土壌試料の亜硝酸酸化細菌 (NOB) および硫黄酸化細菌 (SOB) の割合

Proteobacteria 門については Alpha-, Beta-および Delta-Proteobacteria 綱が優占していた. また SOB は

0.1%以下, NOB は 1%以下であった (Asano et al., 2013). 浸水した土壌では Proteobacteria 門および Bacteroidetes 門が優占する傾向があった. また Proteobacteria 門については Gamma-および Epsilon-Proteobacteria 綱の割合が増加し, さらに海洋性の環境からのみ分離が報告されている Zeta-Proteobacteria 綱が検出された. また NOB の割合は UF の 10 分の 1 以下だったが, SOB の割合は最大 400 倍であった. LT では耐塩性の *Halothibacillus* 属が SOB の約半数を占めていた. 以上のような UF と浸水土壌の細菌群集構造の相違は階層的クラスター解析にも反映され, 両者は明白に異なるクラスターを形成した.

一方, 津波浸水 5 年においては, 門レベルおよび Proteobacteria 門の綱レベルの優占細菌の種類に UF と浸水土壌に特徴的な違いは見られず, 階層クラスター解析でも両者は明確に異なるクラスターを形成しなかった. また浸水土壌の NOB の割合は UF とほぼ同等であり, 特徴的であった Zeta-Proteobacteria 綱および耐塩性 SOB の *Halothibacillus* 属も検出されなかった. 加えて, ST, LT および LTC の間にも細菌群集構造の違いは見られなかった. しかしながら, 浸水した土壌は SOB の割合が UF よりもわずかに高い傾向が見られた.

以上より, 東日本大震災で津波浸水した土壌の細菌群集構造は, 浸水 1 年後に見られた非浸水土壌と異なる特徴は, 浸水 5 年後にはほぼ見られなくなったものの, SOB の割合はわずかに高い傾向が見られた. このため, 津波浸水の影響は浸水 5 年後においてもわずかながら残っていると考えられた. また, SOB は津波浸水した土壌微生物群集の回復を計るために, 5 年以上の長期間にわたり有用な指標になりうる可能性が示唆された.

文献

- Asano, R., Nakai, Y., Kawada, W., Shimura, Y., Inamoto, T. & Fukushima, J. (2013). Seawater inundation from the 2011 Tohoku tsunami continues to strongly affect soil bacterial communities one year later. *Microbial Ecology*, 66, 639-646.
- Baker, G. C., Smith, J. J. & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 541-555.
- Binladen, J., Gilbert, M. T. P., Bollback, J. P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R. & Willerslev, E. (2007). The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS One*, 2, e197.
- Guo, H. D., Chen, Y., Fen, Q., Lin, Q. Z. & Wang, F. (2011). Assessment of damage to buildings and farms during the 2011 M 9.0 earthquake and tsunami in Japan from remote sensing data. *Chinese Science Bulletin*, 56, 2138-2144.
- Horz, H. P., Vianna, M. E., Gomes, B. P. & Conrads, G. (2005). Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5332-5337.
- Kume, T., Umetsu, C. & Palanisami, K. (2009). Impact of the December 2004 tsunami on soil, groundwater and vegetation in the Nagapattinam district. *Journal of Environmental Management*, 90, 3147-3154.
- Maeda, T., Furumura, T., Sakai, S. & Shinohara, M. (2011). Significant tsunami observed at ocean-bottom pressure gauges during 2011 off the pacific coast of Tohoku earthquake. *Earth Planets Space*, 63, 803-808.
- McLeod, M. K., Slavich, P. G., Irhas, Y., Moore, N., Rachman, A., Ali, N., Iskandar, T., Hunta, C. & Caniago, C. (2010). Soil salinity in Aceh after the December 2004 Indian ocean tsunami. *Agriculture Water Management*, 97, 605-613.
- Mimura, N., Yasuhara, K., Kawagoe, S., Yokoki, H. & Kazama, S. (2011). Damage from the great east Japan earthquake and tsunami—a quick report. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 16, 803-818.

Wegner, K. M., Shama, L. N. S., Kellnreitner, F. & Pockberger, M. (2012). Diversity of immune genes and associated gill microbes of European plaice *Pleuronectes platessa*, *Estuarine Coastal Shelf Science*, 108, 87–96.

〔平成 29 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 29 年 7 月 11 日受理〕

Bacterial Communities in Seawater Flooded Soil at Five Years after the 2011 Tohoku Tsunami.

Ryoki Asano^{1,3}, Atsushi Hayakawa², Midori Abe³, Yoichiro Shimura¹, Yayoi Kobayashi¹, & Jun Fukushima^{1,3}

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

² Department of Biological Environment, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

³ Biotechnology Center, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

The long-term effects of the inundation caused by the 2011 Tohoku tsunami on soil bacterial communities in agricultural fields were evaluated. Following previous study, bacterial communities were compared across different types of soil, unflooded field (UF) soil, soil flooded for 2 weeks (short term: ST), and soil flooded for 2 months (long term: LT) and soil flooded for 2 months where cultivation was begun without field maintenance (long term and cultivated: LTC), using polymerase chain reaction-pyrosequencing of 16S rRNA genes at 5 years after the tsunami. The bacterial structure of phyla level, class level in Proteobacteria and hierarchical cluster analysis for operational taxonomy units (OTUs), the differences between UF and flooded soils were not observed. However, the relative abundance of sulfur-oxidizing bacteria (SOB) in flooded soils were slightly higher than in UF, although these were much lower than the same site at 1 year after the Tsunami inundation. Our results demonstrate that the effects of the 2011 Tohoku tsunami on soil bacterial communities in agricultural fields may have lasted at least 5 years. Furthermore, SOB may serve as indicators of the effects of seawater inundation on microorganisms.

Keywords: Soil microbiology, 2011 Tohoku earthquake and tsunami, Tsunami flooded soil, Bacteria structure, Next generation sequencer