

石灰岩帯水層における脱窒に係わる微生物相解析

Microbial analysis of groundwater related to the denitrification in limestone aquifer

安元 純*, 廣瀬 (安元) 美奈**, 聖川 健斗*, 細野 高啓***, 中野 拓治*

YASUMOTO Jun*, HIROSE Mina**, HIJIKAWA Kento*, HOSONO Takahiro**, NAKANO Takuji*

1. はじめに

近年、分子生物学的手法を用いた遺伝子解析技術が、環境中に存在する微生物相解析に応用され、地下水などの水環境における微生物相が徐々に明らかにされつつある。脱窒に関しても、研究が進んできており、これまで脱窒菌とひとくりにされていた脱窒能をもつ微生物が、細菌および糸状菌を含む広範囲の通性嫌気性微生物により行われていることや、脱窒能を持つ菌や細菌が系統分類上多岐にわたっていることが明らかになっている

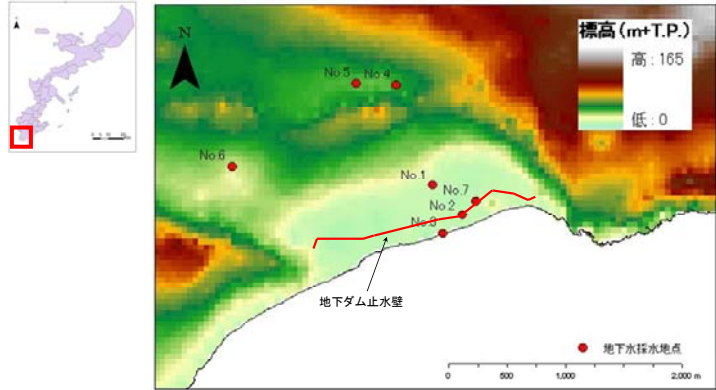


図-1 微生物相解析に係る地下水試料採水地点

(Jones et al., 2012). 遺伝子解析等によりその場の微生物相と単離・培養された細菌の脱窒に関わる遺伝子の有無を直接確かめることが、帯水層における脱窒による窒素除去量を推定するための有益な情報となりえる。本調査地域にて地下水中の硝酸性窒素の本地域で脱窒に係る地下水中の微生物相が遺伝子解析により同定された例はない。

そこで本報では、沖縄本島南部地域の石灰岩帯水層において、地下水水質データと硝酸中の酸素及び窒素同位体比 ($\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$) を測定することで脱窒・非脱窒ポイントを推定し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (以下、DGGE 法) 等の微生物相解析を実施して、帯水層中の優占種および分離菌株の分子系統解析と脱窒関連遺伝子の検出を試みた。

2. 研究方法

調査地域において、2011年4月から月1回実施している定期地下水調査による地下水中の一般的な水質データと、2011年9月、2012年9月に実施している地下水中の $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 分析から脱窒地点を推定し、観測地点 (No.1~No.7) を脱窒ポイントとその他のポイントに分類した。微生物相解析のための地下水調査は、2012年12月25日~27日に実施した。調査地点は図-2に示す。採取した地下水試料は上清 (地下水) と沈殿物 (懸濁物質) に分離し、それぞれDNA抽出及び細菌の単離・培養を実施した。抽出したDNAを用いてDGGE法により地下水中及び地下水中に存在している細菌相のバンドパターンによる可視化を行った。単一バンド (単一優占株) のDNAを抽出し、シーケンス解析を行い細菌の系統解析を行った。さらに、各地点の地下水試料から細菌を単離・培養した。単離・培養した細菌は、リアルタイムPCR法を用いて、地下水から抽出したDNAに含まれる、脱窒反応に係わる遺伝子 *nirS*, *nirK* の定量を行った。地下水中の溶存有機炭素 (DOC) に関しては2013年5月から2013年12月に測定を実施した。

3. 結果及び考察

表-1にDGGE法及びシーケンス解析から同定された地下水中の優先微生物種を示す。今回、DGGE解析により検出された細菌の中で、脱窒能を持つと報告されているのは、地下水上清から分離されたバンドであ

*琉球大学農学部地域農業工学科 Faculty of Agriculture University of The Ryukyus, **一般社)トロピカルテクノプラス, ***熊本大学大学院先端機構, キーワード: 石灰岩帯水層, 脱窒, 微生物相解析

表-1 DGGE 法及びシーケンス解析から同定された地下水中の優先微生物種

Query	近縁微生物の分類情報							Identities	Identities %	Accession No.											
	ドメイン	門	綱	目	科	属	種														
S1-1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	2	138/139	99%	AY216797										
S2-1				Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Denitratisoma</i>	<i>Denitratisoma</i>	1	107/121	88%											
S7-3										1	151/160	94%	AB552842								
S3-3			Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Campylobacteraceae	Helicobacteraceae	<i>Sulfurimonas</i>	<i>Sulfurimonas autotrophica</i>	3	110/115	95%	CP002205									
S5-1																					
S6-1									3	134/135	99%										
S7-4							Campylobacteraceae	<i>Arcobacter</i>	<i>Arcobacter</i> sp.	1	164/167	98%									
S1-2		Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcales	Micrococaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	1	122/124	98%	AM990848									
S3-4																					
S4-2																			2	107/112	95%
S3-5									Intrasporangiaceae	<i>Tetrasphaera</i>	<i>Tetrasphaera jenkinsii</i>	2	96/106	90%							
S4-1											2	119/121	98%	Y14597							
S7-1											2	117/119	98%								
S5-4											1	148/155	95%	CP002542							
S7-2								1	129/136	94%	CP002084										
S3-1								1	85/94	90%	JF707544										
S5-3		Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	1	134/139	96%	JG269247									
S6-2																					
S6-3																		4			

※プライマーの配列は除く、※※Accession No.は、BLAST 検索の結果、一番相同性の高い株を記載した。

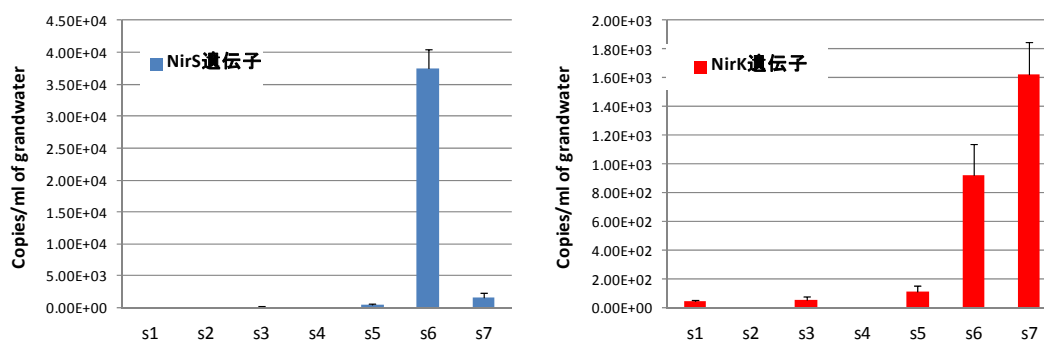


図2 リアルタイム PCR 法による地下水中の亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirS, nirK) の定量

る S1-1 及び S2-1 の *Ralstonia* 属(Stamper et al., 2002; Takaki et al., 2008) , S1-2 の *Micrococcus* 属(Baumann et al., 1996), S7-3 の *Denitratisoma* 属(Fahrbach et al., 2006) , S7-4 の *Arcobacter* 属(Zemft, 2005), S3-4 及び S4-2 の *Arthrobacter* 属(Lee et al., 2005), S3-3, S5-1 及び S6-1 の *Sulfurimonas* 属(Jones et al., 2008)であった。脱窒ポイントである, No.5 (真 8E07) と No.6 (山城流 1) から検出されたバンド S5-1 及び S6-1 は, 硫黄酸化細菌として報告のある *Sulfurimonas autotrophica*(CP002205)と相同性がそれぞれ 95, 99, 98%であった。硫黄酸化細菌は, 嫌氣的条件下では, パイライト (FeS_2) を電子供与体として脱窒 (硫黄脱窒) を行うことが知られている (江口, 2012) が, 本地点における硫黄酸化細菌による脱窒の有無に関しては, 今の段階では判断できない。

図-2 に各地点の地下水試料を上清 (地下水) と沈殿物 (懸濁物質) に分けて DNA を抽出し, リアルタイム PCR 法による亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirS, nirK) の定量を行った。No.6 の地点でコピー数が一番高く, NO_3^-N 値も検出限界以下であったことから, 微生物による脱窒が示唆された。また, 次の No.5, No.7 の値が高かった。nirK 遺伝子については, No.7 の地点のコピー数が一番高く, 次の No.6, No.5 の値が高く, nirS, nirK とともに, 地下水の水質データから脱窒ポイントと推定された地点で大きな値を示す傾向にあった。

4. 今後の方針

今後は, 地下水水質データや各種安定同位体比と分子生物学的解析に加え, 地下水流動場を数値解析モデルなどで正確に把握し, 琉球石灰岩帯水層における脱窒メカニズムに関する詳細な検討を行ってきたい。

5. 参考文献

Jones et al. (2012) : Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Biogeosciences*, 9, 1671–1690. 江口定夫 (2012) : 水田および浅層地下水中の脱窒による環境浄化, 土壌の物理性, 120, 29-38.