

## 琉球石灰岩帯水層における脱窒に係わる微生物相解析

安元 純\*・廣瀬 (安元) 美奈\*\*,\*\*\*, 久手堅剛\*\*\*・宮城雄次\*\*\*・  
大城要平\*\*\*・聖川健斗\*\*\*\*・細野高啓\*\*\*\*\*・嶋田 純\*\*\*\*\*・中野拓治\*

## Microbial community analysis of groundwater related to the denitrification in Ryukyu limestone aquifer

Jun YASUMOTO\*, Mina YASUMOTO-HIROSE\*\*,\*\*\*, Tsuyoshi KUDEKEN\*\*\*,  
Yuuji MIYAGI\*\*\*, Yohei OSHIRO\*\*\*, Kento HIJIKAWA\*\*\*\*,  
Takahiro HOSONO\*\*\*\*\*, Jun SHIMADA\*\*\*\*\* and Takuji NAKANO\*

### Abstract

This study explores the use of microbial community analysis to evaluate the processes involved in nitrate attenuation in groundwater. Polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is used to identify denitrifiers based only on their 16SrRNA gene sequences, and Real-Time PCR analysis is used to quantify nitrite reducing genes (*nirK* and *nirS*). The latter suggest a new method to be used for detecting denitrification activity by comparing the gene dosage that has been detected by Real-Time PCR and the value of the nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ . This study focuses on a zone of significant  $\text{NO}_3^-$  attenuation occurring at underground dam catchment area in the karstic Ryukyu limestone aquifer, which is located in the southern part of Okinawa, Japan.

As a result of microbial analysis, the bacteria were detected at all observation points which have been reported to have denitrification ability. And it has been confirmed that the bacteria has a gene *nirS* which is related to denitrification. In addition, the correlation was high between *nirK*/*nirS* gene dosage that has been detected by Real-Time PCR and the value of the nitrate  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ ; therefore, this study demonstrates the effectiveness of using Real-Time PCR analysis for providing insights into the processes affecting nitrate attenuation in groundwater.

**Key Words:** denitrification, microbial community analysis, groundwater, Ryukyu limestone

---

\* 琉球大学農学部 (〒903-2213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地)  
Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

\*\* 一般社団法人トロピカルテクノプラス  
Tropical Technology Plus.

\*\*\* (株)トロピカルテクノセンター  
Tropical Technology Center Ltd.

\*\*\*\* 琉球大学大学院 農学研究科  
Graduate School of Agriculture, University of the Ryukyus

\*\*\*\*\* 熊本大学 大学院先導機構  
Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University

\*\*\*\*\* 熊本大学大学院 自然科学研究科  
Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University

## 要 旨

本研究では、沖縄本島南部地域の琉球石灰岩帯水層において、地下水水質データと硝酸中の窒素及び酸素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) を測定することで脱窒ポイントを推定し、PCR法を組み合わせた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (以下、PCR-DGGE法) 及びリアルタイムPCR等を用いた微生物相解析等を実施して、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と定量を試みると共に、その結果と $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の結果を比較し、地下水中の脱窒の有無やその程度の推定に対する微生物相解析の有効性について検討した。

その結果、細菌種は異なるものの、脱窒ポイント、その他のポイントに係わらず、全観測地点で脱窒能を持つと報告されている属と同じ属の細菌が検出された。リアルタイムPCRを用いて脱窒関連遺伝子 (nirS/nirK) の定量を行ったところ、nirK遺伝子に比べnirS遺伝子の方が多く検出され、本地域の脱窒にはnirS遺伝子をもつ微生物が優先的にかかわっていることが明らかとなった。さらに、nirS及びnirK遺伝子のDNAコピー数と $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の値との間には比較的高い相関がみられ、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ を用いた同位体的手法とリアルタイムPCRを用いた脱窒関連遺伝子の定量手法を併用することが、地下水における脱窒環境やその程度を推定する有効な手法となる可能性が示唆された。

## 1. はじめに

帯水層における脱窒は、硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) を含む好氣的環境と酸素を含まない嫌氣的環境の境界付近で、独立栄養または従属栄養の脱窒菌が存在し、電子供与体 (易分解性の有機炭素 (OC) やパイライト ( $\text{FeS}_2$ )) が存在するとき局所的に進行することが知られている (江口, 2012)。現場の地下水中で脱窒を定性的・定量的に評価する場合、脱窒の有無を検証するための複数の直接的・間接的証拠を積み上げられることが多い (江口, 2008)。例えば、 $\text{NO}_3^-$ や溶存酸素 (DO) や酸化還元電位 (ORP)、重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) 等の脱窒の状況証拠となる地下水水質データにくわえ、脱窒の副産物として生成する各種ガス ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ) と地下水中で安定な溶存ガス (Ar) の濃度比、溶質トレーサー ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) や数値モデルを用いて、脱窒の有無やその程度が推定される (江口, 2008)。くわえて、 $\text{NO}_3^-$ 中の窒素の安定同位体比 $\delta^{15}\text{N}$ は、脱窒に伴う同位体分別による濃縮が生じることから、脱窒の有効な指標として古くから利用されてきた (Mariotti, 1986; Mariotti et al., 1988; Böhlke and Denver, 1995; Widory et al., 2005)。近年では、 $\text{NO}_3^-$ 中の $\delta^{15}\text{N}$ にくわえ、 $\text{NO}_3^-$ 中の酸素の安定同位体比 $\delta^{18}\text{O}$ を測定することで、二成分の解析から、より詳細に窒素の起源や脱窒の有無やその程度を検討することが可能となっている (Kendall et al., 2007)。さらに、最近では、硝酸中の $\delta^{15}\text{N}$ や $\delta^{18}\text{O}$

以外にも、各種安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ ) を同時に測定し、脱窒にくわえ硫酸還元の有無や、従属型脱窒あるいは独立栄養型脱窒を識別する試みもみられるようになっていく (Torrentó et al., 2011; Heffernan et al., 2012; Hosono et al., 2014)。

一方、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くりにされていた脱窒能をもつ微生物が、細菌、古細菌および糸状菌を含む広範囲の微生物により行われていることや (Tiedje, 1994; Philippot et al., 2007; Hayatsu et al., 2008)、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 (Katsuyama et al., 2008; Jones et al., 2012)。そのため、脱窒に関わる細菌の検出のために、亜硝酸還元酵素 (nirK, nirS) や $\text{N}_2\text{O}$ 還元酵素 (nosZ) の遺伝子をマーカーにした遺伝子解析等も実施されている (Braker et al., 1998; Rich et al., 2003; Throback et al., 2004)。つまり、上述した各種安定同位体比に加え、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。しかし、地下水における脱窒に関して、上述したような分子生物学的手法と、従来の、地下水水質や各種安定同位体比との

関係性について検証された例はほとんどみられない。

本研究の調査対象地域である沖縄本島南部地域では、農業用水の確保を図るため、糸満市及び八重瀬町の1352haの畑地を対象に国営沖縄本島南部水利事業が1992年～2005年にかけて実施されている。それにより、米須と慶座の2ヵ所に築造された地下ダムによって琉球石灰岩帯水層に貯留されている地下水が新たな水資源として開発され、2006年から農業用水に地下水が利用されている。これまで、琉球石灰岩帯水層において地下水中の脱窒に係る微生物相について遺伝子解析された例はないが、今後、本地域の地下水の持続的な利用や周辺の海域環境保全に資する観点からも、琉球石灰岩帯水層中における脱窒量を正確に見積もるの必要があり、微生物相解析から得られる情報は非常に有益となる。

そこで本研究では、沖縄本島南部地域の琉球石灰岩帯水層において、地下水水質データと硝酸中の窒素及び酸素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) を測定することで脱窒ポイントを推定し、PCR-DGGE 及びリアルタイム PCR 等を用いた微生物相解析等を実施して、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と定量を試みると共に、その結果と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の結果を比較し、地下水中の脱窒の有無やその程度の推定に対する微生物相解析の有効性について検討した。

## 2. 調査研究概要

### 2.1 地形・地質および土地利用状況

地形地質に関する詳細は、安元ほか (2013) をご参照頂きたいが、以下に要約して記述する。

沖縄本島南部地域の地形は、琉球層群を表層地質とする段丘地形によって特徴づけられる。河川の発達は見られず、地域内には断層が縦横に発達し断層崖に沿って長く続くリッジ状の丘が多く点在している。

地質は、新第三紀鮮新世の島尻層群を基盤として、第四紀更新世の琉球層群が不整合に覆っている。琉球層群は隆起サンゴ礁や有孔虫を由来とする堆積岩で空隙に富み極めて高い透水性を有して

おり、琉球石灰岩と呼ばれている。地下水は難透水性地盤の島尻層群を受け皿として、多孔質の琉球石灰岩中に賦存され、地下水盆を形成している (木崎, 1985)。

土地利用に関しては、沖縄本島南部地域は、那覇市に近接する糸満市、八重瀬町、南城市の畑地農業地域であり、調査地域一面にはサトウキビ畑が広がっている。近年、地下ダムによる灌漑用水の利便性の増加から、電照菊等の花卉類の栽培も増えている。糸満市の汚水処理は、主に、公共下水道 (単独) であり、汚水処理施設の普及率は、平成23年末で70～90%とされているため、地下水への窒素の負荷源として生活排水の流入も予想される。また、一部に畜産施設もみられる。

### 2.2 調査・分析方法

図1に本研究で行う帯水層の脱窒の有無および微生物相解析に関するフローチャートを示した。まず、本調査地域において、以下2.2.1に示す地下水水質データと  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  から脱窒の有無を推定し、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。微生物相解析では、採取した地下水試料を上清 (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 PCR-DGGE により地下水試料の上清及び沈殿物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。くわえて、地下水試料の上清中から検出された単一バンド (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。一方、地下水が最も還元的で、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  から脱窒が確認された脱窒ポイントの地下水試料の上清及び沈殿物から細菌を単離・培養した。単離・培養した細菌は、MALDI-Biotyper を用いて系統解析を行うと共に DNA を抽出し、脱窒関連の遺伝子 (*nirS/nirK*) を有しているか確認した。さらに、リアルタイム PCR を用いた脱窒関連の遺伝子 (*nirS/nirK*) の定量を、各地点の地下水試料の上清と沈殿物について行った。

#### 2.2.1 地下水水質データ及び $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ , $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の分析

本研究では、調査対象地域に分布する湧水及

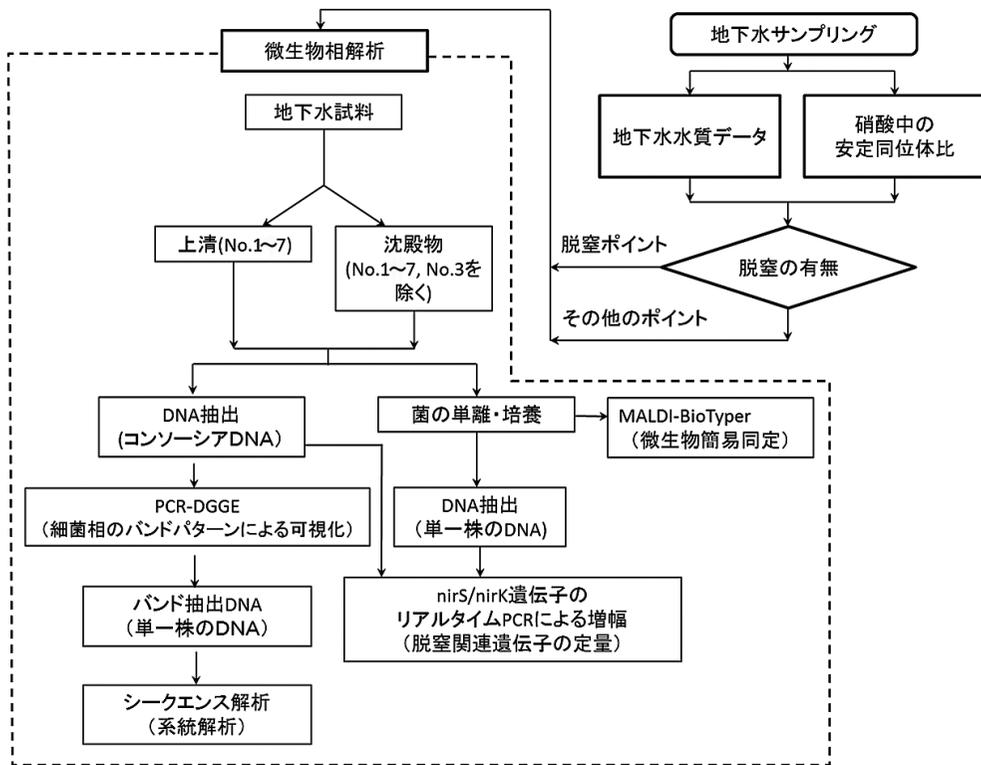


図1 帯水層中の脱窒に係わる微生物相解析に関するフローチャート

Fig. 1 Flowchart of microbial analysis related to denitrification in Ryukyu limestone aquifer

び、沖縄総合事務局が地下ダムを築造する際に設置した観測井（基盤岩に到達するまで全面的にストレーナーを配置）を利用し、図2に示す25地点（湧水：5カ所、観測井：20カ所）で地下水の採水を実施した。その内、図中に示したNo.1～No.7の地点（湧水：1カ所、観測井：6カ所）において微生物相解析のための採水を実施した。地下水調査は2012年12月25日～27日に実施した。

観測井における地下水位の確認にはミリオン水位計を用い、確認された地下水面から-5m付近の地下水をペーラーを用いて採水した。

現地測定項目は、水温、pH、電気伝導度（EC）、酸化還元電位（ORP）、溶存酸素（DO）とし、採水した地下水及び湧水を地表にて大気雰囲気下で測定した。室内水質測定項目は、陽イオン（Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>）、陰イオン（Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>）、重炭酸イオン（HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>）とした。溶存有機炭素（DOC）に関しては、2012年9月23日～24日に採水した試料について測定した。

各種測定に使用した機器は、pH、EC、ORP及びDOの測定には、pHメータD-54及びD-55（堀場製作所社製）を用いた。主要な陽・陰イオンに関しては、イオンクロマトグラフ（DIONEX ICS-1600）、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>に関しては、現地で、HACH社製のデジタルタイトレータを用いアルカリ度滴定法にて行った。DOCに関してはTOC-L（株島津製作所社製）を用いた。

$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ 、 $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ の測定は脱窒菌法（Sigman et al., 2001）を用いて行った。本手法は、硝酸イオンを亜硝酸ガスまで還元する能力を持つ脱窒菌（*Pseudomonas aureofaciens*）による生物的還元作用を用いてサンプル中の硝酸イオンから亜硝酸ガスを生成し、質量分析計を用いて行うものである（Kendall et al., 2007）。分析には熊本大学の安定同位体比測定用質量分析計Delta V（Thermo Electron社製）を用いた。

### 2.2.2 地下水のDNA抽出前処理

微生物相解析のための地下水調査は、2012年

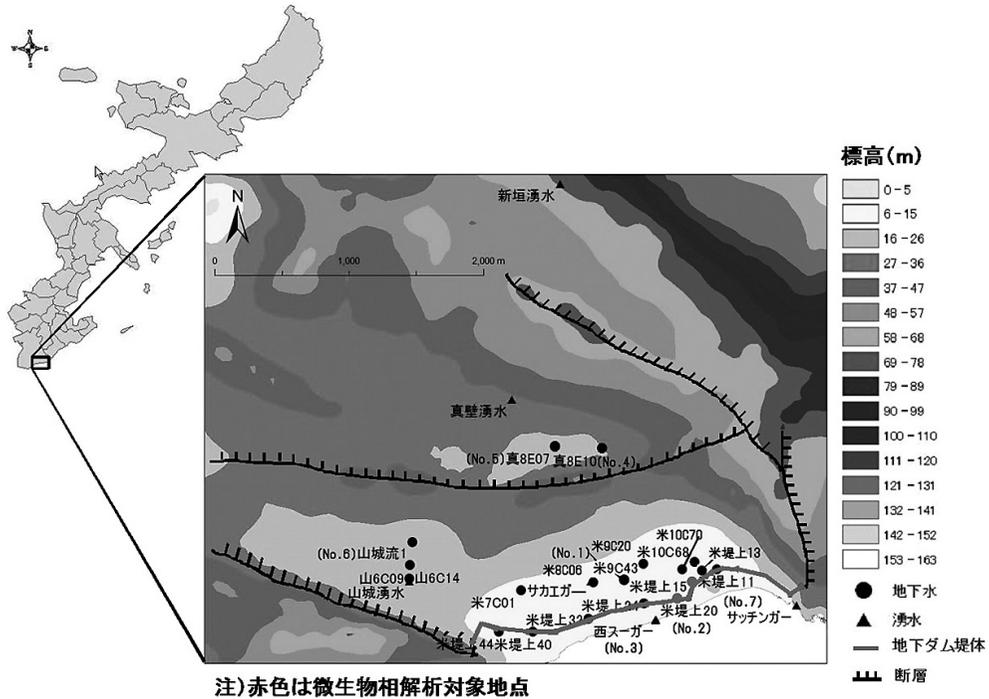


図2 地下水採水地点図  
Fig. 2 Sampling points of groundwater

12月25日～27日に実施した。滅菌処理済み2Lポリ容器に採水した試料は実験室に戻り、すみやかにフィルターろ過器 CN メンブレンフィルターユニット (孔径 $0.2\mu\text{m}$ , Membrane Filter Units, Cellulose Nitrate Membrane, NALGENE® 社製) を使って処理した。サンプルボトルを30分程度静置したのち、試料の上清2.29L (地下水2.29L中の懸濁物質の体積は、その体積が多い箇所でも1.5mL程度) をろ過後に、フィルターろ過器のフィルターをスパテルで切り取り、滅菌した5mLのTE緩衝液 (TE Buffer Solution, pH8.0, 滅菌, バイオテクノロジーグレード, nacalai tesque社製) が入った15mLチューブに浸漬し、攪拌・懸濁した。懸濁液をDNA抽出用試料とした。懸濁体の沈殿部分 (以後、懸濁物質:P) は、滅菌した50mLのチューブに取り、3000rpmで15分間遠心し、沈殿物を滅菌した1.5mLのチューブに移し替え、 $3600\times g$ で2分間遠心した後、上清部分を取り除き、懸濁物質試料とした。DNA抽出条件の検討は試料を $-80^{\circ}\text{C}$ で数日間保存した後に

行った。

### 2.2.3 DNA抽出

DNA抽出条件の検討は、標準eDNA解析マニュアル (農業環境技術研究所, 2010) に従い、FastDNA SPIN Kit for Soil (Q-BioGene社製) を用いた。破碎装置にチューブをセットして、1500rpmで60秒間破碎処理を行いDNAを抽出した。抽出したDNAは、アガロースゲル電気泳動で確認し、細菌16S rRNA遺伝子のPCRを行いDGGEによって菌相解析を行った。直ちに使用しない場合は、DNA溶液は $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### 2.2.4 PCR (遺伝子増幅)

PCRは、Takara社製のPCR Thermal Cycler SPおよびASTECC社製Program Temp. Control System PC818を用い、条件の検討はこれまでの報告を基に行った (農業環境技術研究所, 2010; Muyzer et al., 1993; Yasumoto-Hirose et al., 2006)。一般細菌相用の解析用プライマーとして、真正細菌16S rRNA遺伝子のV3可変領域

を標的とする以下のプライマーセットを使用した。地下水試料の上清および沈殿物それぞれで、341FGC, 5'-cgc ccg ccg cgc gcg ggc ggc ggc gca cgg ggg gcc tac ggg agg cag cag-3' (下線部は GC clamp), 534R, 5'-att acc gcg gct gct gg-3', を用いて PCR 増幅した遺伝子断片を DGGE 解析した。PCR の各条件は以下に示す。1stPCR-KOD-Plus-Neo: 反応液組成 (50  $\mu$ L 反応系) 滅菌蒸留水 33 $\mu$ L, 10xKOD Plus-Neo Buffer 5 $\mu$ L, dNTPs (2mM) 5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> (25mM) 2 $\mu$ L, 341FGC (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L, 534R (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L, BSA (20 mg/mL) 1 $\mu$ L, KOD-Plus-Neo 1 $\mu$ L, Template DNA 1 $\mu$ L。1stPCR 反応サイクルは, 95 $^{\circ}$ C -3分 $\rightarrow$  [94 $^{\circ}$ C -15秒, 57 $^{\circ}$ C -30秒, 68 $^{\circ}$ C -15秒] を33サイクル。2ndPCR-KOD-Plus-Neo: 反応液組成 (上記記載)。反応サイクルは, 95 $^{\circ}$ C -3分 $\rightarrow$  [94 $^{\circ}$ C -15秒, 55 $^{\circ}$ C -30秒, 68 $^{\circ}$ C -15秒] を30または33サイクル。鋳型 DNA を加えないネガティブコントロールを必ず設けた。

### 2.2.5 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 解析

DGGE は, BioRad 社製 D-code system を用い, 変性剤高濃度 (70%) 及び変性剤低濃度 (50%) のゲルストック溶液を調整し, DCode のマニュアルに従って行った。泳動槽温度58 $^{\circ}$ C, 電圧50V, 泳動時間18時間の条件で泳動した。また, パターンの比較を容易にするために, マーカー (DGGE Marker III, ニッポンジーン) レーンを設けた。SYBR Green で染色し, ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 (FUJIFILM 社製) 装置を用いて染色したゲルを撮影した。ゲルからメスでバンドを切り出し, 100 $\mu$ L の TE 緩衝液が入った滅菌チューブに入れて, 一晚振とう後, DNA を抽出した。抽出した DNA は PCR により遺伝子を増幅させた。PCR 産物3 $\mu$ L をアガロースゲルで電気泳動して期待サイズ (約193bp) の産物が得られていることを確認した。抽出した DNA が単一のバンドになるまで, DGGE を繰り返した。すぐに DGGE を行わない場合, 抽出産物は -30 $^{\circ}$ C 以下で保存した。

### 2.2.6 シークエンス解析

DGGE によって分離された DNA 断片の塩基配列を BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Kit (Applied Biosystems) を用い, DNA シークエンサー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いて決定した。得られた配列を DNA データベースと照合して相同性検索 (BLAST 検索) (Altschul et al., 1997) を行い, 地下水中の微生物に近縁な細菌を予測した。地下水7試料の上清 (S1~S7) から20バンドの塩基配列情報を得ることができた。

### 2.2.7 MALDI-TOF MS (地下水からの菌の単離)

地下水上清および懸濁物質から細菌を単離した。細菌の単離は, 各試料50 $\mu$ L を3種の培地に滅菌コンラージ棒 (日水製薬株式会社製) で塗抹することにより行った。培地の組成は以下に示した。(1) NB: Nutrient Broth (Difco 社製) 8g, 蒸留水1L, 寒天濃度は1.5%に調整した。(2) MB: Marine Broth (Difco 社製) 37.4g, 蒸留水1L, 寒天濃度は1.5%に調整した。(3) 1/10MB: Marine Broth (Difco 社製) 3.74g, 人工海水750mL, 蒸留水250mL, 寒天濃度は1.5%に調整した。生えてきたコロニーは新たな培地に植菌し, 単菌化ができた細菌についてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (以下, MALDI-TOF MS) による解析を行った。培地から培養4日目のプレートコロニーを滅菌した楊枝で少量かきとり, ターゲットプレートに薄く均一になるように塗布した。HACC マトリックス (Bruker 社製) 溶液を1 $\mu$ L 添加し乾燥させた。キャリアレーションスタンダードは, Bruker Bacterial Test Standard (Bruker 社製) を使用した。MALDI-Biotyper は ultrafleXtreme (Bruker Daltonics 社製) の MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) を使用した。

MALDI-Biotyper は, すべての微生物に存在する含有量の多いタンパク質を測定し, タンパク質の固有のパターンを多数の菌種が登録されているデータベースとマッチングさせることで, 信頼性が高くかつ正確に微生物を同定し, 種レベルで菌名を決定する手法である。分析速度が他の手法に比べて早く簡便であり, シークエンス解析に比べて安価である。スコア値が2.0以上であれば菌種

レベルで信頼性が高く、1.7以上2.0未満では属レベルと一致するとされている (大楠, 2012)。

### 2.2.8 nirS・nirK 遺伝子の増幅

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。PCR 反応でのプライマーは、nirS 遺伝子に m-Cd3aF/m-R3Cd (Kandeler et al., 2006), nirK 遺伝子に nirK876F/nirK1040R (Henry et al., 2004) を使用した。PCR 反応溶液 (20 $\mu$ L) の組成は、2x FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics 社製) 10 $\mu$ L, プライマー F, R それぞれ 0.2mM, BSA 400ng/ $\mu$ L となるよう調整し、DNA 溶液 1 $\mu$ L を加えた。PCR 反応条件は Henry et al. (2004) の報告に従い、LightCycler 480 II (Roche Diagnostics 社製) を用いて SYBR-Green 法によって測定した。測定は各サンプル 3 連ずつ行った。検量線の作成は、地下水上清および懸濁物質より抽出した DNA をそれぞれのプライマーで PCR 反応を行い、増幅した産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL 社製) で精製した。ND-1000 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific 社製) で濃度を測定し、10倍ずつ 5 段階希釈し、検量線を作成した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 地下水水質データおよび $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ , $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ を用いた帯水層における脱窒地点の推定

表 1 に 2012 年 12 月 25 日～27 日における各観測地点の地下水水質データを示す。本地域の地下水の水温は、23 $^{\circ}\text{C}$  前後と比較的高いのが特徴であり、12 月の冬季の調査時期においても微生物活動に適した環境といえる。NO<sub>3</sub>-N をみると、7 地点における平均値は 8.51 mg/L であるが、平均値を比較的大きく下回ったのは、No.5 の 6.33 mg/L, No.6 の LOQ (検出限界 0.033 mg/L 以下), No.7 の 7.97 mg/L の 3 地点であった。次に、DO に着目すると、7 地点の平均値が 3.2 mg/L であるのに対して、No.5～No.7 の 3 地点の DO の平均値は 1.69 mg/L と比較的低い値を示していた。地下水中の

DO が 1～4 mg/L 以下ならば、帯水層中の嫌気的な微小部位で脱窒が生じていることが報告されている (江口, 2008)。しかし、この 3 地点のうち従属栄養型脱窒の副産物である HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> が比較的高いのは、No.5 及び No.6 の 2 地点であった。観測日は異なるが、DOC の値をみても、この 2 地点は 2.3～2.4 mg/L と、全 7 地点の平均値 (1.3 mg/L) を大きく上回っている。ことから、これら 2 地点では、有機物を電子供与体とする従属栄養型の脱窒が優先化している可能性が示唆された。

脱窒の有無を確認するため、表 1 及び図 3 に示す  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値に着目する。脱窒反応が進むにつれ、脱窒菌は選択的に質量数の軽い窒素並びに酸素から切り離すため、地下水溶液中には質量数の重い硝酸性窒素ならびに酸素が濃縮し、結果、同位体比も重い (高い) 値へと移行する (Kendall et al., 2007)。またその際、窒素同位体比の上昇に対する酸素同位体比の上昇割合は一般に 1:1 から 2:1 の範囲であると考えられている (Kendall et al., 2007)。図 3 をみると、No.5 及び No.6 では、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  は 11.5～17.5‰,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  は 6.6～9.4‰ と他の地点と比較しても高く、図中に示した 1:1 及び 2:1 の脱窒ライン範囲内に位置していることから、これら 2 地点では脱窒が起こっているものと推測できる。No.7 に関しては、脱窒が起こっている可能性もあるが、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値からは十分な確証が得られない結果となった。

以上まとめると、地下水水質データや  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  分析の結果、明確に脱窒が起こっていると推定されたポイントは、No.5 と No.6 の 2 地点で、No.1, No.2, No.3 及び No.4 においては、脱窒が起こっている可能性は低いと考えられる。No.7 においては、脱窒が起こっている可能性はあるが、明確には確認できなかった。

脱窒は比較的還元的雰囲気において起こることから地下水の流速と係わりが深いとされている (Appelo and Postoma, 2005)。そこで、図 4 に調査時 (2012 年 12 月 25 日～27 日) における地下水位の等水位線及び地下水流動ベクトル図を示す。図をみるとわかるように、地下ダムの堤体の天端の標高 (T.P.+4m) に漸近するように、地下ダム

表1 観測地点における地下水水質データ  
Table 1 Groundwater quality data of sampling points

No.	観測地点名	水位 (TP,+m)	水温 (°C)	pH	EC (mS/cm)	ORP (mV)	DO (mg/L)	SS (mg/L)	NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	δ <sup>15</sup> N <sub>NO<sub>3</sub></sub> (‰)	δ <sup>18</sup> O <sub>NO<sub>3</sub></sub> (‰)	DOC (mg/L)
1	米9C43	4.61	24.3	7.45	0.776	284	5.67	1926	10.57	203.8	8.6	1.7	1.2
2	米堤上20	3.55	22.1	6.97	0.824	290	3.25	36	8.42	206.3	10.1	3.5	0.5
3	西スーガー	—	22.7	7.28	0.77	278	5.63	2	10.60	203.8	8.6	2.7	0.7
4	真8E10	18	23.8	7.1	0.962	233	2.8	21	15.66	280.0	8.3	1.3	0.8
5	真8E07	21.01	24.3	7.04	0.936	228	1.68	2772	6.33	307.5	11.5	6.6	2.3
6	山城流1	10.28	24.1	7.07	1.105	-58	1.71	14	LOQ*	375.0	17.5	9.4	2.4
7	米堤上15	4.47	23.3	7.45	0.89	251	1.67	224	7.97	210.0	8.6	4.0	0.9

注) DOC(mg/L)のみ2012年9月23日～24日のデータ、それ以外は、2012年12月25日～27日のデータ

\*LOQは検出限界、NO<sub>3</sub>-Nでは0.033mg/L。

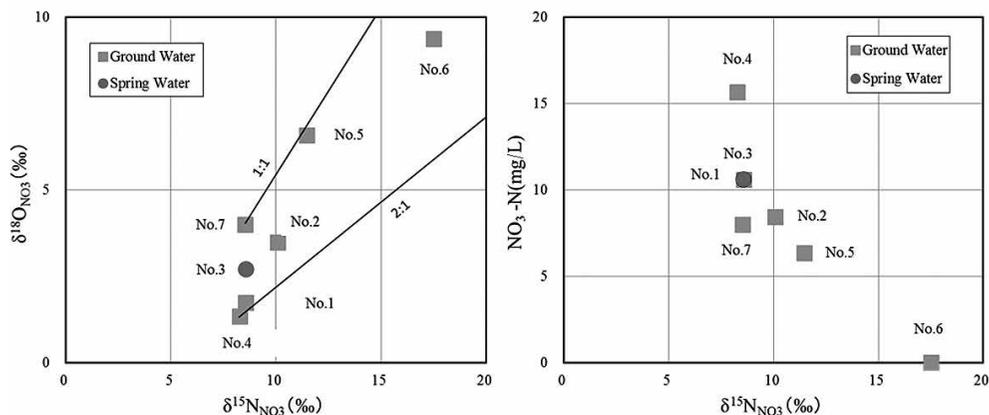


図3 硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)中の酸素・窒素安定同位体比(δ<sup>15</sup>N<sub>NO<sub>3</sub></sub>・δ<sup>18</sup>O<sub>NO<sub>3</sub></sub>)の関係(a)および硝酸態窒素(NO<sub>3</sub>-N)と窒素安定同位体比(δ<sup>15</sup>N<sub>NO<sub>3</sub></sub>)の関係(b)  
Fig. 3 Comparison between δ<sup>15</sup>N<sub>NO<sub>3</sub></sub> and δ<sup>18</sup>O<sub>NO<sub>3</sub></sub> (a) and comparison between nitrate-nitrogen (NO<sub>3</sub>-N) and δ<sup>15</sup>N<sub>NO<sub>3</sub></sub> (b)

後背地の地下水位が平準化されている。また、No.5のある真壁地区の地下水は、断層によって地下水流動が一時遮断され、断層の低い部分から流下する形で下流の米須地区に流れている。脱窒が起こっているNo.6がある山城地区に関しては、地形的に窪んでおり、地下水も海側とは逆向きに流れていることがわかる。脱窒の起こっている可能性のあるNo.7についても、地下ダムにより地下水が滞留しやすい状況となっている。このように、脱窒の起こっている地点は、地下水の滞留時間が他の地点と比べ長くなっていると考えられ、地下水が還元的雰囲気になっていることが推

測できる。今後、地下水流動解析を実施し、滞留時間と脱窒の関係性をより詳細に検討していく予定である。

### 3.2 地下水中の微生物相解析による脱窒に係わる優占菌種の推察

ここでは、各地点の地下水試料を上清と沈殿物に分けてDNAを抽出し、PCR-DGGEによる菌相解析を実施し、本地域の地下水中の優先種を同定すると共に、脱窒を行う微生物として報告されている細菌類が検出されるか検証した。

図5に示すように、PCR-DGGE解析により、

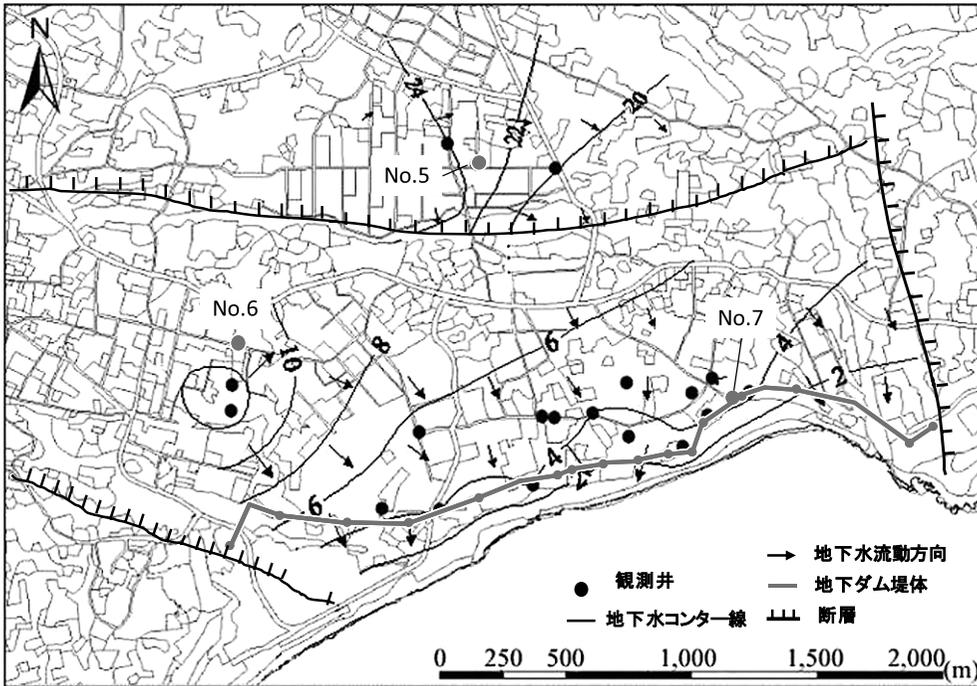


図4 地下水流動状況 (2012年12月25日～27日)  
 Fig. 4 Groundwater flow in the study site

観測地点 (No.1～No.7) の地下水7試料の上清 (S1～S7) から20バンドの塩基配列情報を得ることができ、シーケンス解析の結果から、地下水試料中の細菌群集について検討をおこなった。同じ地点の地下水試料の上清および沈殿物ともにバンドの数も非常に多く検出された。特に沈殿物は、バンドをゲルから切り出し・精製を行う過程で、単一バンドを得ることが難しく多種多様な細菌群集の存在が示唆されたが、今回は上清についてのみバンドの解析を進めた。

表2にPCR-DGGE解析及びシーケンス解析から同定された地下水試料上清中の優占微生物種を示す。3.1で示した地下水水質データや  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  から脱窒ポイントであると推定された2地点 (No.5, No.6) における地下水試料の上清 (S5, S6) からは、Epsilonproteobacteria 綱, Dehalococcoidetes 綱, Dehalococcoidia 綱と Candidate division TM6の細菌が検出された。明確な脱窒が確認されなかった5地点 (No.1～No.4, No.7) における地下水試料の上清 (S1～S4, S7) からは、Betaproteobacteria 綱,

Epsilonproteobacteria 綱, Actinobacteria 綱, Flavobacteria 綱, Acidobacteriales 綱と未分類の細菌が検出された。未分類に分類した細菌は、Flavobacteria 綱に属する細菌と相同性94%であった。

微生物相と各地点のDO値を見てみると、好気性微生物が活発に活動するためには、2 mg/L以上のDOが必要であり、一般に魚介類が生存するためには、3 mg/L必要とされている (EIC ネット, 2009)。この点から見ると、No.5, No.6とNo.7の3地点は2 mg/L以下になっており、好気性微生物が活動しにくい環境になっていると推測される。逆に、No.1～No.4の4地点は好気性微生物が生息しやすい環境と推測される。各地点の菌相を見ていくと、Actinobacteria 綱はNo.1, No.3, No.4のDOの高い地点で、検出されているが、Actinobacteria 門 (放線菌門) に属する細菌は、好気性の細菌が多く、Micrococcus 属や Arthrobacter 属は好気性として知られており (駒形, 1985), Tetrasphaera 属も好気性として報告されている (Maszenan et al., 2000)。No.1とNo.2

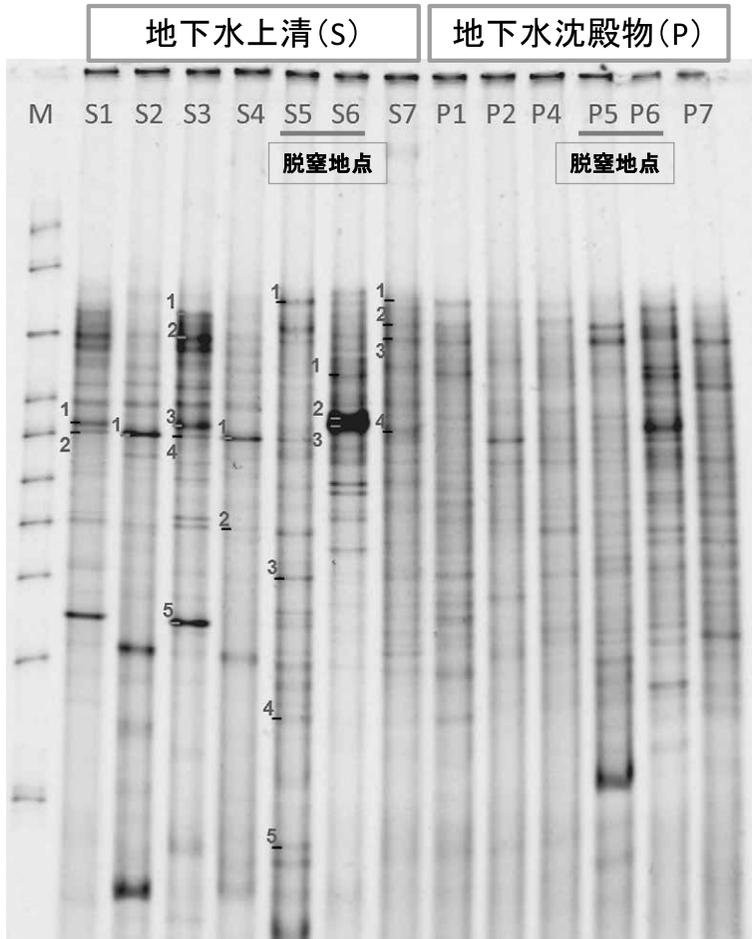


図5 地下水試料からの細菌の16S rDNA配列のPCR-DGGEによる解析  
 M：マーカー，S：地下水清，P：地下水沈殿物，数字：サンプリング地点No.

Fig. 5 PCR-DGGE analysis of bacterial 16S rDNA fragments from the groundwater samples.

で検出された *Ralstonia* 属も好気性として報告されている (Champoiseau et al., 2009)。

No.5, No.6で優占化している, *Sulfurimonas autotrophica* は, 酸素濃度が通常より低い濃度で生育すると報告されている (Inagaki et al., 2003)。No.5で優占化している, *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* は偏性嫌気性細菌として報告されており (Moe et al., 2009), また, TM6は嫌気性細菌であると報告されている (McLean et al., 2013)。No.7で優占化している, *Denitratisoma* 属は嫌気性であると報告されており, (Fahrbach et al., 2006), *Arcobacter* 属は微好気から嫌気性細菌との報告があり (Vandamme et al., 1992), ま

た, *Terriglobus roseus* は, 好気的および嫌気的の両方の条件で増殖することができる (Eichorst et al., 2007)。No.7で優占化している *Fluviicola taffensis* は偏性好気性細菌である (O'Sullivan et al., 2005)。No.5およびNo.6で優占化している *Bacteriovorax stolpii* は偏性好気性菌であるが (Baer et al., 2000), 今回得られたバンドとの塩基配列の相同性は低い。これらの菌相解析の結果から, DOの値の高い環境下では, 放線菌等の好気性の細菌が優占化している傾向が見られ, DOの値の低いところでは, 嫌気性および微好気性の細菌を中心に好気性細菌も検出され, 周辺の環境条件によって優占種の遷移がおこって

表2 PCR-DGGE 解析及びシーケンス解析から同定された地下水上清中の優占微生物種  
Table 2 Identified bacteria on the primary bands in the aquifer by PCR-DGGE and sequence analysis

バンド名	近縁微生物の分類情報										相同性	相同性 %	アクセッション番号**																
	ドメイン	*	門	*	綱	*	目	*	科	*				属	*	登録名	*												
S1-1	Bacteria	20	Proteobacteria	10	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2	Burkholderiaceae	2	<i>Ralstonia</i>	2	<i>Ralstonia</i> sp. OV225	2	138/139	99%	LC020191													
S2-1						Rhodocyclales	1	Rhodocyclaceae	1	<i>Denitratisoma</i>	1	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i> strain AcBE2-1	1	151/160	94%	LC020209													
S7-3																													
S3-3							Epsilonproteobacteria	4	Campylobacterales	4	Helicobacteraceae	3	<i>Sulfurimonas</i>	3	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> DSM 16294	3	110/115	95%	LC020195										
S5-1																										134/135	99%	LC020200	
S6-1															Campylobacteraceae	1	<i>Arcobacter</i>	1	<i>Arcobacter</i> sp. R-28214	1	164/167	98%	LC020204						
S7-4							Deltaproteobacteria	3	Bdellovibrionales	3	Bacteriovoraceae	3	<i>Bacteriovorax</i>	3	<i>Bacteriovorax stobii</i>	3	138/161	85%	LC020201										
S5-3																										140/161	86%	LC020205	
S6-2																											138/161	85%	LC020206
S6-3																													
S1-2					Actinobacteria	5	Actinobacteria	5	Actinomycetales	5	Micrococcales	3	<i>Micrococcus</i>	1	<i>Micrococcus</i> sp. MOLA 73	1	122/124	98%	LC020192										
S3-4																													
S4-2																													
S3-5																													
S4-1																													
S7-1					Bacteroidetes	1	Flavobacteria	1	Flavobacteriales	1	Crymorphaceae	1	<i>Fluviicola</i>	1	<i>Fluviicola taffensis</i> DSM 16823	1	148/155	95%	LC020207										
S5-4					Chloroflexi	1	Dehalococcoidia	1	Unclassified	1	Unclassified	1	<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i> BL-DC-9	1	129/136	94%	LC020202												
S7-2					Acidobacteria	1	Unclassified Acidobacteria	1	Acidobacteriales	1	Acidobacteriaceae	1	<i>Terriglobus</i>	1	<i>Terriglobus rosarus</i> DSM 18391	1	120/143	83%	LC020208										
S5-5					Candidate division TM6	1		1		1		1	Candidate division TM6 bacterium JCVI TM6SCI	1	146/163	89%	LC020203												
S3-1					Unclassified	1	Unclassified	1	Unclassified	1	Unclassified	1	Bacterium SH1-3	1	134/139	96%	LC020194												

\*数字は解析したバンド数を示す。※アクセッション番号は、プライマーの配列を除くシーケンス配列の BLAST 検索の結果、一番相同性の高い株を記載した。

いる可能性が示唆された。今回、PCR-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 (Fahrback et al., 2006), S7-4の *Arcobacter* 属 (Zemft, 1997), 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。つまり、細菌種は異なるものの、脱窒ポイント、その他のポイントに係わらず、全観測地点で脱窒能を持つと報告されている属と同じ属の細菌が検出される結果となった。

各バンドを詳細にみていくと、No.7から検出されたバンド S7-3は(図5参照)、脱窒菌として報告のある *Denitratisoma oestradiolicum* (AY879297) (Fahrback et al., 2006) および BLAST 検索で2番目に相同性の高い(表2中には1番のみ記載) *Sulfuritalea hydrogenivorans* (AB552842) (Kojima and Fukui, 2011) と相同性が94%であった。No.3から検出されたバンド S3-3と、脱窒ポイントである、No.5と No.6から検出されたバンド S5-1及び S6-1は、*Sulfurimonas autotrophica* (CP002205) (Inagaki et al., 2003) と相同性がそれぞれ95, 99, 98%であった。この *Sulfurimonas*

*autotrophica* は、中部沖縄トラフ鳩間海丘のピストンコア堆積物表層から分離されており、常温性硫黄酸化細菌であると報告されている。元素状硫黄およびチオ硫酸を唯一のエネルギー源として利用し、10%以下の酸素を電子受容体として生育する絶対好気性独立栄養細菌である。沖縄トラフ熱水活動域において最も存在量の多い一次生産者であると報告されている (Inagaki et al., 2003)。硫黄酸化細菌は、嫌気的条件下では、パイライト (FeS<sub>2</sub>) など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 (Appelo and Postma, 2005)。しかし、本調査地域の琉球石灰岩帯水層中で FeS<sub>2</sub>などは見つかっていないため、硫黄酸化細菌による脱窒性の有無に関しては、今の段階では判断できない。今後の課題とした。

その他、他の有機物の分解や蓄積に関与していると思われる微生物をあげると、バンド S7-1は、gliding freshwater から単離された、*Fluviicola taffensis* (CP002542) (O'Sullivan et al., 2005) と相同性が95%であった。バンド S5-4は、還元された塩素化溶媒汚染の地下水から単離した *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* (CP002084) (Moe et al., 2009) と相同性が94%であった。バンド S3-5, S4-1は、活性汚泥プロセスにおける活性汚泥の増量と形成を引き起こすと報告のある、*Tetrasphaera jenkinsii* (Y14597) (McKenzie et

al., 2006) との相同性が98%である。*Tetrasphaera* 属に属する細菌には、ポリリン酸を蓄積することが確認されている種も報告されている (Maszenan et al., 2000)。バンド S3-4, S4-2は、炭化水素分解菌との報告のある, *Arthrobacter* sp. (JF339999) とそれぞれ, 95%と90%である。バンド S5-3, S6-2, S6-3, S5-5, S7-2は, 近縁種との塩基配列の相同性が低く, それぞれ, 85%, 86%, 85%, 89%, 83%であり, 新規性の高い細菌群の存在が示唆され, それらの菌群の脱窒能の有無についても今後検討していきたい。

### 3.3 単離株の簡易同定と地下水および単離株からの脱窒関連遺伝子の検出

3.1で示したように, 観測地点 No.6における地下水は, DO や ORP から最も還元的な環境であり,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  分析の結果, 脱窒が確認され, PCR-DGGE 解析からも脱窒菌の存在が確認された。そこで, 本地点で採取した地下水試料(上清および沈殿物)から細菌を単離・培養し, 分離菌の中から63株について MALDI-Biotyper による細菌の簡易同定を行った。そのうち36株については良好なマススペクトルが得られ, 6株については, ライブラリーの株とマッチした。今回, 地下水試料(上清および沈殿物)から単離した6株は, 表3に示すような細菌とマッチした。*Pseudomonas* 属 (Zemft, 1997), *Bacillus* 属 (Zemft, 1997), *Acidovorax* 属 (Zemft, 1997), *Acinetobacter* 属 (Cao et al., 2012) は, 脱窒能を有すると報告がある。*Pseudomonas* 属等は, 水中の硝酸性窒素の微生物を利用した脱窒法に用いられている。MALDI-Biotyper による細菌の簡易同定は, 環境中の微生物に関しては, データベース数が少ないという欠点もあり, 今回の実験の結果からもマッチする株数は十数%であった。分離株について独自のライブラリーを構築していれば, 環境分析においても有力なツールとなり得る。

次に, 単離した *Pseudomonas* 属の株1株(表3の B4) および全地点の地下水試料(上清および沈殿物)から抽出したコンソーシア DNA について, 脱窒関連遺伝子と報告のある亜硝酸還元酵素 *nirS* および *nirK* 遺伝子 (Braker et al., 1998)

の有無について PCR 分析を行った。

単離株 *Pseudomonas aeruginosa* (表3の B4) については, *nirS* 遺伝子の PCR 分析により, *nirS* 遺伝子を保有していることが示唆された。

### 3.4 リアルタイム PCR を用いた脱窒関連遺伝子の定量

地下水中で脱窒が活発になると, 亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirS*, *nirK*) を持つ微生物が増殖することが知られている (Throbäck, et al., 2004)。ここでは, 各地点の地下水試料を上清と懸濁物質に分けて DNA を抽出し, リアルタイム PCR 法により *nirS*, *nirK* 遺伝子を定量し, 3.1で示した地下水水質データや, 脱窒の指標に用いられる  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  と比較し, 両者の相関関係について検証した。*nirS*, *nirK* 遺伝子を定量する評価方法としては, 地下水の上清については, 地下水 上清 1mL 中の *nirS*, *nirK* 遺伝子コピー数で評価した。一方, 地下水中の懸濁物質については, 懸濁物質から抽出した DNA 1 $\mu\text{L}$  中の *nirS*, *nirK* 遺伝子コピー数として比較した。結果を図6に示す。なお, 図6は縦軸を対数表示としている。

地下水 上清中の *nirS* 遺伝子のコピー数が最大を示した地点は, No.6で, 29904 copies/mL となった。次いで, 多い地点は No.7で3409 copies/mL となり,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  から脱窒が確認された No.5の461 copies/mL よりも大きな値を示した。一方, *nirK* 遺伝子が最大を示した地点は No.7で3246 copies/mL となった。次いで, No.6の739 copies/mL, No.5の93 copies/mL の順で

表3 観測地点 No.6 (山城流1) から単離した細菌の MALDI-Biotyper を用いた簡易同定結果  
Table 3 Identified bacteria by MALDI-Biotyper at No.6 (Yamashiro-ryu1)

	試料名	菌種	スコア
B1	S6	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.114
B2	S6	<i>Acidovorax temperans</i>	2.190
B3	S6	<i>Acinetobacter tandoii</i>	1.742
B4	P6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.163
B5	P6	<i>Pseudomonas flavescens</i>	1.764
B6	P6	<i>Bacillus licheniformis</i>	1.776

あった。

nirS, nirK 遺伝子が検出限界以下だった地点は, nirS 遺伝子については, No.1, No.2の地下水の上清および懸濁物質であり, nirK 遺伝子については, No.2, No.4の地下水の上清であった。

nirS 遺伝子と nirK 遺伝子とを比較すると, 地下水の上清中では最大約40倍, 懸濁物質中では最大約7倍の値を示し, nirS 遺伝子の方が全体的に大きな値を示した。

次に, nirS 及び nirK 遺伝子の DNA コピー数と, 上述した, 脱窒菌法を用いて定量した  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値との相関関係に関して検証した。リアルタイム PCR により定量された nirS 及び nirK 遺伝子の DNA コピー数と脱窒菌法を用いて定量した  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値との間の相関関係に関する報告はこれまでなされていない。

表4に示すように, nirS 遺伝子に関しては, 地

下水上清及び懸濁物質ともに  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  それぞれに対して高い相関がみられた。一方, nirK 遺伝子に関しては, 地下水の懸濁物質中の nirS 遺伝子と同様に,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  それぞれに対して高い相関がみられたものの, 地下水の上清中においては相関がみられなかった。Rinaldo and Cutruzzola (2007) によると nirS と nirK の両方の酵素を同時に持つ微生物は存在しないと報告されている。上述の3.1で行った菌相解析においては nirS, nirK 遺伝子を標的としていないため, シーケンス解析の結果との比較は難しいが, 本調査地域における脱窒に関連する微生物は, nirS 遺伝子を有する微生物によるものが卓越していると推測できる。このように, リアルタイム PCR を用いた脱窒関連遺伝子の定量と,  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  分析とを併用することで, 地下水中の脱窒により係わっている遺伝子を識別すると同時に

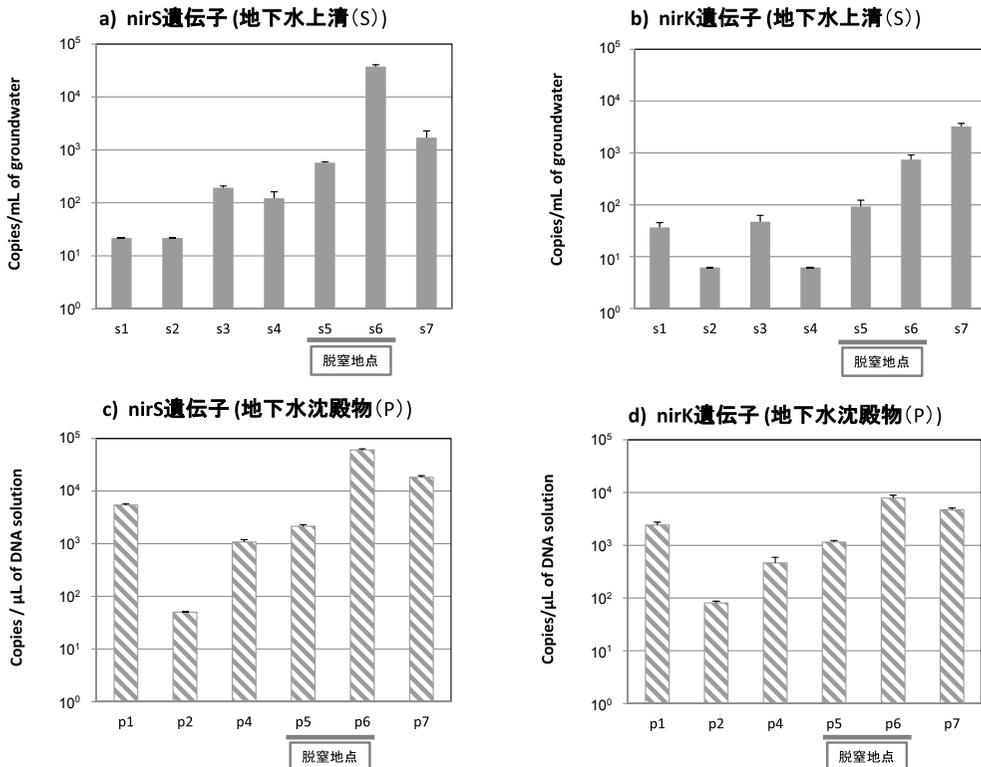


図6 リアルタイム PCR による地下水 (上清および沈殿物) 中の nirS および nirK 遺伝子のコピー数

図の横軸: サンプル地点 No., S: 地下水の上清, P: 地下水沈殿物

Fig. 6 The copy number of nirS or nirK genes of the microbial consortia in the groundwater (supernatant solution and precipitation), which was determined by real-time PCR.

表4 地下水の上清および沈殿物中の亜硝酸還元酵素遺伝子 (nirS, nirK) と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の相関係数

Table 4 The correlation between nirK/nirS gene dosage that has been detected by RT-PCR and the value of the  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  in supernatant solution and precipitation

	nirS 遺伝子		nirK 遺伝子	
	地下水上清 copies/mL	地下水沈殿物 copies/ $\mu\text{l}$ of DNA	地下水上清 copies/mL	地下水沈殿物 copies/ $\mu\text{l}$ of DNA
$\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$	0.93	0.86	-0.04	0.70
$\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$	0.81	0.77	0.16	0.68

\*サンプル数 n 地下水上清 : n=7, 地下水沈殿物 : n=6

遺伝子量を定量することが可能となる。

また、地下水水質データや  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  からは脱窒が起こっていると明確に確認できなかった No. 7 においては、地下水上清中の nirK 遺伝子は全地点の中で一番高い値を示している。No. 7 は、月 1 回の定期観測の結果得られた地下水水質データを用いた多変量解析の結果からも、脱窒が起こっている可能性が高い地点となっており (安元ほか, 2013), 本手法により、潜在的な脱窒地点の推定が可能となりえる可能性がある。今後は、赤木ほか (2005) が報告しているような、地下水流動及び微生物が行う酸化還元反応を考慮した多成分化学反応モデル等のパラメータとして活用し、地下水流域における脱窒量の推定が可能なモデルの開発等に繋げていきたいと考えている。

#### 4. まとめ

本研究では、沖縄本島南部地域の琉球石灰岩帯水層において、地下水水質データと硝酸中の窒素及び酸素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$ ) を測定することで脱窒・非脱窒ポイントを推定すると共に、PCR-DGGE 解析や PCR 等の微生物相解析を通じて、帯水層中の脱窒に係わる優占種の同定と、優先種の脱窒関連遺伝子の検出を試みた。

地下水水質データ及び  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の分析の結果から、7 地点の観測地点のうち 2 地点 (No.5, No.6) で脱窒が確認された。

今回調査を実施した観測井戸において、微生物相解析を実施した結果、これまでに脱窒能を持つ

との報告がある *Ralstonia* 属, *Denitratisoma* 属, *Micrococcus* 属, *Arcobacter* 属, *Arthrobacter* 属等の従属栄養型の脱窒を行う細菌が検出された。さらに、嫌気的環境下で独立栄養型の脱窒を行うことが知られている常温性硫黄酸化細菌 *Sulfurimonas autotrophica* と相同性の高い細菌が検出された。リアルタイム PCR を用いて脱窒関連遺伝子 (nirS/nirK) の定量を行ったところ、nirK 遺伝子に比べ nirS 遺伝子の方が多く検出され、本地域の脱窒には nirS 遺伝子をもつ微生物が優先的にかかわっていることが明らかとなった。また、nirS 及び nirK 遺伝子の DNA コピー数と  $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  の値との間には比較的高い相関がみられ、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{NO}_3}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{NO}_3}$  を用いた同位体的手法とリアルタイム PCR を用いた脱窒関連遺伝子の定量手法を併用することが、地下水における脱窒環境の把握や脱窒の程度を推定する有効な手法となる可能性が示唆された。

今後は、地下水水質データや各種安定同位体比と微生物学的解析値を微生物が行う酸化還元反応を考慮した多成分化学反応モデル等のパラメータとして活用し、地下水流域における脱窒量の推定が可能なモデルの開発等に繋げていきたいと考えている。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、内閣府沖縄総合事務局土地改良総合事務所、沖縄県南部農林土木事務所、沖縄本島南部土地改良区の関係各位に多大の御援助と御協力を頂いた。また、本研究の一部は、基盤研究 (C) 微生物活動による硝化・脱窒動態の把握と水質形成機構の解明 (no. 30595202), 沖縄県の平成24年度バイオ産業活性化支援事業補助金「硫黄酸化細菌による硝酸性窒素汚染地下水浄化技術の開発」、科学研究費補助金若手研究 (A)「窒素-硫黄-炭素同位体システムティクスを用いた脱窒メカニズム解明法の確立」(no. 24681007) 及び科学技術振興機 (JST) 戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (CREST)「地域水循環を踏まえた地下水持続利用システムの構築」で実施したもので得られた成果の一部である。ここに記して、深甚の感謝を表す。

## 参考文献

- 赤木啓悟・細川土佐男・ゲラ・ギンギン・神野健二・堤 敦・広城吉成 (2005): 有機質土壤中に海水を浸透させた場合の陽イオン交換および微生物による還元反応を考慮した主要陽イオン輸送解析. 水工学論文集, 49, 139-144.
- EIC ネット (2009): 環境用語集. <http://www.eic.or.jp/ecoterm/?act=view&serial=2623> (2014.12.2閲覧)
- 江口定夫 (2008): モデルによる土壌, 農耕地, 流域における窒素動態の理解 3. 地形連鎖系スケールの窒素動態 調査技法とモデル化手法. 日本土壌肥科学雑誌, 79, 213-227.
- 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.
- 大楠清文 (2012): 医学検査のあゆみ, 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. モダンメディア, 58 (4), 113-122.
- 木崎甲子郎 (1985): 琉球弧の地質誌. 沖縄タイムズ社, 287.
- 駒形和男 (1985): 好気性細菌及び DNA 塩基組成の測定. 長谷川武治編, 微生物の分類と同定下. 学会出版センター, 99-161及び181-189.
- 農業環境技術研究所 (2010): PCR-DGGE による土壌細菌・糸状菌相解析法. Ver. 3.3 2010年6月10日改訂.
- 安元 純・聖川健斗・仲栄真史哉・砥綿泰弘・中野拓治 (2013): 多変量解析を用いた石灰岩帯水層における地下水水質の統計的分類. 土木学会論文集 B1 (水工学), 69 (41), I\_595-I\_600.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Appelo, C.A.J. and D. Postma (2005): *Geochemistry, Groundwater and Pollution Second Edition*. CRC Press, 458-465.
- Baer, M.L., J. Ravel, J. Chun, R.T. Hill and H.N. Williams (2000): A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 219-224.
- Baumann, B., M. Snozzi, A.J. Zehnder and J.R. Van Der Meer (1996): Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4367-4374.
- Böhlke, J.K. and J.M. Denver: (1995): Combined use of groundwater dating, chemical, and isotopic analyses to resolve the history and fate of nitrate contamination in two agricultural watersheds, Atlantic coastal plain, Maryland. *Water Resources Research*, 31, 2319-2339.
- Braker, G., A. Fesefeldt and K.P. Witzel. (1998): Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3769-3775.
- Cao, H., H. Wang, S. He, R. Ou, S. Hou and X. Yang (2012): Isolation and characterization of a denitrifying *Acinetobacter baumannii* using  $\text{NO}_2^-$ -N as nitrogen source from shrimp farming ponds. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2258-2264.
- Champoiseau, P.G., J.B. Jones and C. Allen (2009): *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.
- Eichorst, S.A., J.A. Breznak and T.M. Schmidt (2007): Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Applied Environmental Microbiology*, 73(8), 2708-2717.
- Fahrbach, M., J. Kuever, R. Meinke, P. Kämpfer and J. Hollender (2006): *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1547-1552.
- Hayatsu, M., K. Tago and M. Saito (2008): Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 33-45.
- Heffernan J.B., A.R. Albertin, M.L. Fork, B.G. Katz and M.J. Cohen (2012): Denitrification and inference

- of nitrogen sources in the karstic Floridan Aquifer. *Biogeosciences*, 9, 1671-1690.
- Henry, S., E. Baudoin, J.C. López-Gutiérrez, F. Martin-Laurent, A. Brauman and L. Philippot (2004): Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 327-335.
- Hosono, T., T. Tokunaga, A. Tsushima and J. Shimada (2014): Combined use of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  tracers to study anaerobic bacterial processes in groundwater flow systems, *Water Research*, 54, 284-296.
- Inagaki, F., K. Takai, H. Kobayashi, K.H. Nealson and K. Horikoshi (2003): *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1801-1805.
- Jones C.M., B. Stres, M. Rosenquist and S. Hallin (2008): Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Biogeosciences*, 9, 1671-1690.
- Kandeler, E., K. Deiglmayr, D. Tschirko, D. Bru and L. Philippot (2006): Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957-5962.
- Katsuyama, C., N. Kodo, Y. Suwa, T. Yamagishi, M. Itoh, N. Ohte, H. Kimura, K. Nagaosa and K. Kato (2008): Denitrification Activity and Relevant Bacteria Revealed by Nitrite Reductase Gene Fragments in Soil of Temperate Mixed Forest. *Microbes and Environments*, 23, 337-345.
- Kendall, C., E.M. Elliott and S.D. Wankel (2007): Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems, In *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2nd ed, R.H. Michener and K. Lajtha (Eds.), Blackwell, 375-499.
- Kojima, H. and M. Fukui (2011): *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1651-1655.
- Lee, S.Y., S.H. Lee and Y.K. Park (2005): New nirS-harboring denitrifying bacteria isolated from activated sludge and their denitrifying functions in various cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 14-21.
- Mariotti, A. (1986): La dénitrification dans les eaux souterraines, principes et méthodes de son identification: une revue. *Journal of Hydrology*, 88, 1-23.
- Mariotti, A., A. Landreau and B. Simon (1988):  $^{15}\text{N}$  isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater: Application to the chalk aquifer of northern France, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(7), 1869-1878.
- Maszenan, A.M., R.J. Seviour, B.K. Patel, P. Schumann, J. Burghardt, Y. Tokiwa and H.M. Stratton (2000): Three isolates of novel polyphosphate-accumulating gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 593-603.
- McKenzie, C.M., E.M. Seviour, P. Schumann, A.M. Maszenan, J.R. Liu, R.I. Webb, P. Monis, C.P. Saint, U. Steiner and R.J. Seviour (2006): Isolates of 'Candidatus Nostocoida limicola' Blackall *et al.* 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2279-2290.
- McLean, J.S., M.-J. Lombardo, J.H. Badger, A. Edlund, M. Novotny, J. Yee-Greenbaum, N. Vyahhi, A.P. Hall, Y. Yang, C.L. Dupont, M.G. Ziegler, H. Chitsaz, A.E. Allen, S. Yooseph, G. Tesler, P.A. Pevzner, R.M. Friedman, K.H. Nealson, J. Craig Venter and R.S. Lasken (2013): Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), E2390-2399.
- Moe, W.M., J. Yan, M.F. Nobre, M.S. da Costa and F.A.

- Rainey (2009): *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* gen. nov., sp. nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2692–2697.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- O'Sullivan, L.A., J. Rinna, G. Humphreys, A.J. Weightman and J.C. Fry (2005): *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family *Cryomorphaceae* in the phylum 'Bacteroidetes'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2189–2194.
- Philippot, L., S. Hallin and M. Schloter (2007): Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, 249–305.
- Rich, J.J., R.S. Heichen, P.J. Bottomley, K. Cromack Jr. and D.D. Myrold (2003): Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5974–5982.
- Rinaldo, S and F., Cutruzzola (2007): Nitrite reductases in denitrification. In *Biology of the Nitrogen Cycles*, H. Bothe, S.J. Ferguson and N.E. Newton (Eds.), Elsevier, 21–35.
- Sigman, D.M., K.L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter and J.K. Bohlke (2001): A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in sea water and freshwater. *Analytical Chemistry*, 73, 4145–4153.
- Stamper D.M., M. Radosevich, K.B. Hallberg, S.J. Traina and O.H. Tuovinen (2002): *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 12, 1089–1098.
- Takaki, K., S. Fushinobu, S.W. Kim, M. Miyahara, T. Wakagi and H. Shoun (2008): *Streptomyces griseus* enhances denitrification by *Ralstonia pickettii* K50, which is possibly mediated by histidine produced during co-culture. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 72, 163–170.
- Throbäck, I.N., K. Enwall, Å. Jarvis and S. Hallin (2004): Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 49, 401–417.
- Tiedje, J.M. (1994): Denitrifiers. In *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, R. Weaver, J. Angle, and P. Bottomley (Eds.), Soil Science Society of America, 245–267.
- Torrentó, C., J. Urmeneta, N. Otero, A. Soler, M. Viñas and J. Cama (2011): Enhanced denitrification in groundwater and sediments from a nitrate-contaminated aquifer after addition of pyrite. *Chemical Geology*, 287, 90–101.
- Vandamme, P., M. Vancanneyt, B. Pot, L. Mels, B. Hoste, D. Dewettinck, L. Vlaes, C. van den Borre, R. Higgins, J. Hommez, K. Kersters, J.-P. Butzler and H. Goossens (1992): Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 344–356.
- Widory, D., W. Kloppmann, L. Chery, J. Bonnin, H. Rochdi and J.L. Guinamant (2004): Nitrate in groundwater: an isotopic multi-tracer approach. *Journal of Contaminant Hydrology*, 72(1–4), 165–188.
- Yasumoto-Hirose, M., M. Nishijima, M.K. Ngirchechol, K. Kanoh, Y. Shizuri and W. Miki (2006): Isolation of marine bacteria by in situ culture on media-supplemented polyurethane foam. *Marine Biotechnology*, 8, 227–237.
- Zumft, W.G. (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 533–616.

(受付：2013年11月1日，受理：2014年12月18日)