

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21341

研究課題名（和文）複雑に絡み合う窒素循環を新規多重同位体標識培養実験で紐解く

研究課題名（英文）Unveiling the complex nitrogen cycle by using novel stable isotope labeling incubations.

研究代表者

小林 香苗（Kobayashi, Kanae）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門（超先鋭研究開発プログラム）・Young Research Fellow

研究者番号：20908264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では硝化・脱窒・アナモックスの3つの微生物代謝が共存する深海表層堆積物を対象として、窒素化合物の濃度・同位体測定と菌叢解析、そして同位体標識培養実験を組み合わせ、共存する3つのプロセスの鉛直分布と個別の反応速度を求めることに取り組んだ。水深や有機物沈降量が異なる相模湾、深海平原、伊豆小笠原海溝から複数の堆積物を採取した。窒素代謝に関わる微生物の鉛直分布の情報と、堆積物の間隙水の溶存酸素濃度や栄養塩濃度、有機物濃度の情報と組み合わせることによって、それぞれの海域での微生物分布の特徴とともに、それぞれのプロセスによる窒素フラックスについて知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深海堆積物中の微生物系が駆動する無機窒素循環の評価を通じて、グローバルな深海底における窒素除去評価の基盤的データを得ることができた。また、本研究では新たな取り組みとして地球化学分析（各種窒素化合物の濃度および安定同位体組成）と、微生物の分子生態解析（群集構造および窒素代謝機能遺伝子）を組み合わせ、これまで未解明であった深海堆積物中の窒素代謝微生物の鉛直分布と物質フラックスの両方を求めて深海底における物質循環を議論する足がかりとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we challenged to investigate N-related microbial community composition and their nitrogen flux in the deep-sea sediments by conducting both of biogeochemical (concentration and isotope composition of nitrogen compounds) and molecular analyses (SSU rRNA gene tag sequencing). Sediment columns were collected from sites with different depth and surface productivities including Sagami Bay, abyssal plain and Izu-Ogasawara Trench. Our results provide insight into the patterns of distribution of nitrogen-related microorganisms and N fluxes of each sampling sites.

研究分野：微生物生態学

キーワード：硝化 脱窒 嫌氣的アンモニウム酸化 安定同位体比 窒素循環 深海堆積物

1. 研究開始当初の背景

アンモニア(NH₃)や硝酸(NO₃⁻)などの反応性窒素は窒素肥料を施用した農耕地や家畜排せつ物、生活排水などから環境中に大量に放出されている(Peñuelas et al., 2013, Nat. Commun.)。この過剰な窒素負荷は、水質汚染や富栄養化などの問題を引き起こし、地球と人類の共存を不可能にする三大地球環境問題の1つに挙げられている(Rockström et al., 2009, Nature)。

環境中に放出された反応性窒素は、貧酸素環境で硝化・脱窒・アナモックスの3つの微生物代謝によって代謝される(Lam et al., 2009, PNAS等)。脱窒およびアナモックスが環境中から窒素を除去する一方で、硝化および脱窒では強力な温室効果とオゾン層破壊能を持つ一酸化二窒素(N₂O)が生成してしまう。これら3つのプロセスは、貧酸素環境において同時多発的に進行しつつ代謝基質を競合するため、個々の反応速度、共存・競争関係を考慮した定量的な動態の把握は非常に困難である。特に深海底堆積物は、海洋最大の窒素除去のホットスポットであり(Brandes and Devol, 2002, Glob Biogeocheml Cycles)、地球規模での窒素循環に占める役割の大きさからも注目が集まっている。深海底堆積物においては、海洋表層で一次生産される有機物の数%が沈降有機物として供給される。堆積物中の有機物は無機化されてアンモニアになり、そのアンモニアは硝化により、亜硝酸、さらに硝酸に酸化される。アナモックス細菌により、亜硝酸を電子受容体とアンモニウムが窒素ガスとして除去され、同時に脱窒により硝酸や亜硝酸が除去される(図1)。

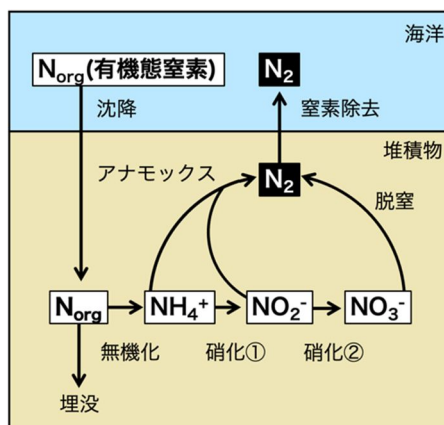


図1 深海底層堆積物中の窒素循環

深海底堆積物は、海洋最大の窒素除去のホットスポットであり(Brandes and Devol, 2002, Glob Biogeocheml Cycles)、地球規模での窒素循環に占める役割の大きさからも注目が集まっている。深海底堆積物においては、海洋表層で一次生産される有機物の数%が沈降有機物として供給される。堆積物中の有機物は無機化されてアンモニアになり、そのアンモニアは硝化により、亜硝酸、さらに硝酸に酸化される。アナモックス細菌により、亜硝酸を電子受容体とアンモニウムが窒素ガスとして除去され、同時に脱窒により硝酸や亜硝酸が除去される(図1)。深海底堆積物は、海洋表層から沈降する有機物の質や量の違いにより、海域や深度ごとに溶存酸素濃度や硝酸濃度、アンモニア濃度の鉛直分布が変化することが知られており、海域・堆積物深度ごとに異なる窒素代謝が卓越すると予想される。

2. 研究の目的

そこで、本研究では硝化・脱窒・アナモックスの3つの微生物代謝が共存する深海底層堆積物を対象として、窒素化合物の濃度・同位体測定と菌叢解析、そして同位体標識培養実験を組み合わせ、共存する3つのプロセスの個別の反応速度を求める。本手法の確立により、貧酸素環境中の窒素除去速度および温室効果ガスである一酸化二窒素の生成量を定量的に把握することを可能にする。

3. 研究の方法

- (1) 調査航海に参画し、水深や地形、海洋表層からの有機物沈降量が異なる複数の海域(相模湾(水深730-1400m)、深海平原(5500m)、伊豆小笠原海溝(6300m))からプッシュコアラを用いて堆積物を採取する。
- (2) 採取した堆積物の溶存酸素濃度をマイクロセンサー(Unisense, Aarhus, Denmark)を用いて、船上で速やかに測定する。
- (3) 採取した堆積物を分割し、各層をファルコンチューブに入れ、遠心することで各層の間隙水を採取する。
- (4) 間隙水を用いて、アンモニウム、亜硝酸、硝酸の濃度を測定する。
- (5) 堆積物の有機物濃度(TOCおよびTN)を測定する。
- (6) 間隙水中のアンモニウムの窒素安定同位体比(¹⁵N)、亜硝酸と硝酸の窒素および酸素安定同位体比(¹⁸O)、堆積物中の有機物の窒素安定同位体比(¹⁵N)及び炭素安定同位体比(¹³C)の分析を行う。
- (7) 化学環境と対応する微生物相を明らかにするため、各堆積物層のSSU rRNA遺伝子配列解析を行う。
- (8) 船上において、各堆積物層をバイアル瓶に入れ、安定同位体比によって標識された基質(アンモニウム、亜硝酸、硝酸)を添加する。経時的に窒素化合物の濃度および安定同位体比を測定し、数値計算モデルを用いて各トレーサー(¹⁵N、¹⁸O)の物質収支をとり、3つのプロセスの反応速度を算出する。

4. 研究成果

水深や有機物沈降量が異なる相模湾(水深 730-1396m)、深海平原(5502m)、伊豆小笠原海溝(6284m)から複数の堆積物を採取した(図2)。採取した堆積物について溶存酸素濃度、窒素化合物および有機物の濃度・同位体測定をおこなった。さらに、窒素代謝を担う微生物系統群の鉛直分布を把握するために SSU rRNA 遺伝子シーケンス解析を行った。

各海域における硝化・脱窒・アナモックスの鉛直分布の情報と、堆積物の間隙水の溶存酸素濃度や栄養塩濃度、有機物濃度の情報と組み合わせることによって、それぞれの海域での微生物分布の特徴や棲み分けについて把握した。有機物量が少ない伊豆小笠原海溝斜面と深海平原では、硝化に関わる微生物の存在量が比較的多く、濃度および安定同位体比の情報からも、硝化によって硝酸が生成されていることが示唆された。一方、有機物量の多い相模湾では、表層から 1 cm 以深で嫌気環境となり、硝酸も表層から 3 cm 以内で消費される。硝酸の窒素および酸素安定同位体比の値からも、脱窒が起きている可能性が支持された。さらに、堆積物の間隙水のアンモニウムの窒素安定同位体比、亜硝酸と硝酸の窒素および酸素安定同位体比のデータに基づいて、それぞれのプロセスによる窒素フラックスの推定を行った。特に、硝酸の窒素・酸素安定同位体比は、硝化、脱窒、アナモックスの全ての反応に関わり、卓越する反応の影響により異なる硝酸の窒素・酸素安定同位体比を示す傾向があることが明らかになった。

同位体標識培養実験に関しては、2022 年度に海底堆積物を追加採取し、同位体標識培養実験を船上で実施する予定だったが、油価高騰と円安の影響により調査航海の日数が大幅に削減されたため、堆積物のサンプリング自体が中止となり実施できなかった。そのため、硝化・脱窒・アナモックスの共存するバイオフィームを用意し、複数の同位体標識パターンで培養実験を行い、培養条件の検討を行った。経時的に同位体標識された窒素化合物の濃度および安定同位体比を測定し、各反応速度の算出を進めることができた。

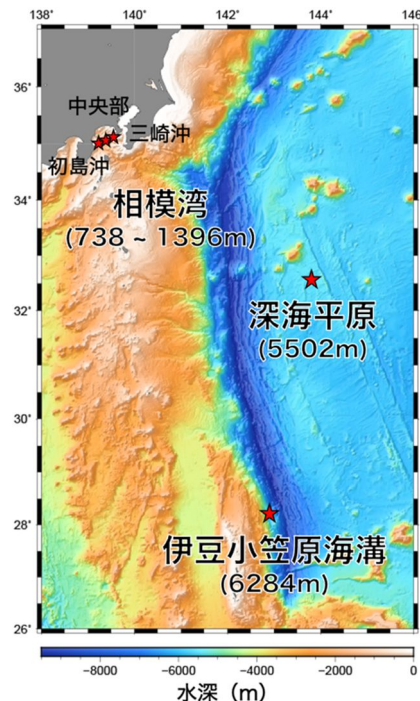


図 2 堆積物を採取した地点

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 香苗, 眞壁 明子, 中島 悠, 平岡 聡史, 宮崎 征行, 津田 美和子, 澄田 智美, 野牧 秀隆, 布浦 拓郎, 川口 慎介
2. 発表標題 深海表層堆積物中の窒素代謝を担う微生物の鉛直分布と窒素循環への寄与の評価
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanae Kobayashi, Akiko Makabe, Masahito Shigemitsu, Satoshi Hiraoka, Miwako Tsuda, Masayuki Miyazaki, Tomomi Sumida, Hidetaka Nomaki, Takuro Nunoura, Shinsuke Kawagucci
2. 発表標題 Microbial nitrogen cycling in the deep-sea sediments: Combined molecular and stable isotopic analyses to determine the nitrogen flux of nitrification and anammox
3. 学会等名 8th International Conference on Nitrification and Related Processes (ICoN8) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanae Kobayashi, Akiko Makabe, Masahito Shigemitsu, Satoshi Hiraoka, Miwako Tsuda, Masayuki Miyazaki, Tomomi Sumida, Hidetaka Nomaki, Takuro Nunoura, Shinsuke Kawagucci
2. 発表標題 Combined molecular and stable isotopic analyses reveal the microbial nitrogen cycle in the deep-sea sediments
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------