

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21105

研究課題名(和文)湖沼の微生物群集が産出する難分解性溶存有機物の化学的描像と動態解明

研究課題名(英文) Characteristics and behavior of refractory dissolved organic matter produced by bacteria in Lake Biwa

研究代表者

日下部 武敏 (Kusakabe, Taketoshi)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：40462585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：国内の湖沼において、微生物に分解されにくい難分解性有機物が増加しており、湖沼の炭素循環や今後の有機物管理を考える上で、湖沼有機物の起源や特性、変動を理解することは重要である。本研究は、湖沼の微生物群集が産出する難分解性有機物に着目し、その化学的描像と環境動態の解明を目指した。本研究では、琵琶湖溶存有機物(DOM)および流入河川DOM、並びに様々な有機基質から微生物が産出したDOMを調製し、精密質量分析を実施した。その結果、琵琶湖DOMの生成経路の一つとして微生物群集の機能と役割が重要であることが示された。一方、河川経由で琵琶湖に流入する陸域由来DOMの寄与も決して少なくないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、微生物群集が介在する「微生物炭素ポンプ(microbial carbon pump)」が長期的な炭素貯留プロセスとして駆動していることに鑑みて、微生物食物網(microbial food web)の結節点として細菌が重要な鍵になると考え、微生物群集が産出する有機物に注目した。本研究で明らかとなった難分解性有機物の化学的描像や環境動態に関する知見は、湖沼における物質循環や水質形成メカニズムに対する理解の深化のみならず、健全な湖沼生態系の創出、持続可能な水利用、等々に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The refractory (non-biodegradable) organic matter has been increasing in lakes, and it is of crucial importance to understand the origin, characteristics, and behavior of natural organic matter. We focused on the refractory dissolved organic matter (R-DOM) produced by microbial communities, and the objective of this research is to demonstrate its chemical characteristics and behavior in the Lake Biwa watershed. The Orbitrap mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) was applied to DOM in Lake Biwa and inflowing rivers, and DOM produced by microorganisms and bacterial strains from several organic substrates, e.g., glucose, glutamate, *Microcystis aeruginosa*. As a result, the role and function of microbial community in Lake Biwa are significant as production of Lake Biwa DOM. And, it was suggested that the contribution of allochthonous DOM is not small.

研究分野：環境動態解析

キーワード：琵琶湖 溶存有機物 難分解性有機物 微生物群集 精密質量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

琵琶湖では流入負荷と湖内 BOD 濃度は低減傾向にあるが、一方で、湖内 COD 濃度は 1980 年代半ばを境に漸増傾向に転じた。このことは、微生物に分解されにくい難分解性溶存有機物 (R-DOM) の増加を示唆しており、生態系や水利用への悪影響が懸念されている。しかし、同定できる成分 (アミノ酸等) は有機物全体のごく一部とされ、湖沼有機物に関する基盤情報が欠如している。有機物の物質循環過程は、有機物量だけでなく、化学組成や複合体の形成といった変質過程、また、生態系の多様な構成員 (植・動プランクトン、細菌、原生生物、ウイルス等) の活性や構成員間の相互作用の影響を強く受ける。古典的な生食連鎖のほか、微生物ループ (溶存有機物→細菌→原生生物) や、ウイルス感染による細菌の溶菌も物質循環の一部を担っている。さらに、温度や光、DO、pH 等の環境要因も考慮すべき非常に複雑な系である。湖沼の場合、陸域由来有機物の寄与が大きく無視できない。湖沼の R-DOM に関する様々な報告があるものの、その化学像が十分に理解されたとはいえないのが現状である。本研究では、微生物群集が介在する「微生物炭素ポンプ (microbial carbon pump)」が長期的な炭素貯留プロセスとして駆動していることに鑑みて、微生物食物網 (microbial food web) の結節点として細菌が重要な鍵になると考え、微生物群集が産出する有機物に注目した。本研究の目的は、琵琶湖水および河川水に加えて、モデル基質 (グルコース等) や藻類等に対して生分解性試験を実施して、R-DOM (微生物代謝産物) を実験室内で調製し、その元素・化学組成を分子レベルで詳細に明らかにすることである。最終的には、湖沼の R-DOM の化学的描像に新たな知見を加えることにある。

### 2. 研究の目的

国内の主要な湖沼において、微生物に分解されにくい難分解性有機物が増加・蓄積しているとの報告があり、湖沼の炭素循環や今後の有機物管理を考える上で、湖沼有機物の起源や化学的特性、時空間的変動を理解することは極めて重要である。本研究は、湖沼の微生物群集が産出する難分解性有機物に着目してその化学的描像を究明すると共に、環境動態の解明を目指すものである。そこで本研究では、琵琶湖における難分解性溶存有機物 (R-DOM) の化学組成と環境動態を分子レベルで解明するため、湖水と河川水に加えて、モデル基質、藻類等に対して生分解性試験を実験室内で実施して、有機物代謝の規定要因の把握と、Orbitrap 質量分析装置 (FT-MS) を用いた網羅的な有機構造解析を実施する。

### 3. 研究の方法

(1) モデル基質を用いた実験系では、モデル基質は低分子化合物を基本として、化学構造や組成 (C/N) を勘案してグルコースおよびグルタミン酸ナトリウムを選定した。生分解性試験では、微生物株および琵琶湖微生物群集を植種することで、有機物の分解に与える微生物の種の違いが微生物産出有機物の組成に与える影響を調べることにした。本研究で使用したモデル微生物株の情報を表 1 に示す。

表 1 本研究で選定したモデル微生物株

Class	Species	NBRC No.
Alphaproteobacteria	<i>Novosphingobium lentum</i>	NBRC 107847
Betaproteobacteria	<i>Polynucleobacter sp.</i>	NBRC 107834
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NBRC 14160

(2) 起源の異なる有機物から生産される R-DOM の化学組成に違いがあるか、起源推定に利用できる分子マーカーがないか、等を検討するために、起源の異なる有機物を用いて生分解性試験を実施した。本研究においては、琵琶湖北湖沖帯からプランクトンネットで採集した藻類 (生物粒子) や藻類株 (*Microcystis aeruginosa*) 等を生分解性試験に供した。

(3) 季節や土地利用などを考慮して、琵琶湖北湖・今津沖中央 (0.5 m、60 m) および流入河川 (安曇川、野洲川) から水試料を採取して生分解性試験に供試することで、実際の NOM から生産される R-DOM を実験室内で調製した。

(4) 本研究では、固相抽出法によりそれぞれの水試料から DOM を濃縮精製し、Orbitrap 質量分析に供した。分析は direct infusion で行い、negative モードで検出した。

### 4. 研究成果

(1) モデル基質として選定したグルコースおよびグルタミン酸ナトリウムを利用して、微生物株および琵琶湖微生物群集が産出した有機物の精密質量分析の結果をアラインメントした後、基質ごとに重ねて表示した van Krevelen diagram を図 1 に示す。図 1 より、窒素を含むグルタミン酸ナトリウムの方が、量的に多くの有機物を産出しているが、有機物組成は基質間で大きな違いは見られなかったことから、全体的に見れば、いずれの微生物も比較的良好に似た化学組成の有機物を産出していることが示唆された。

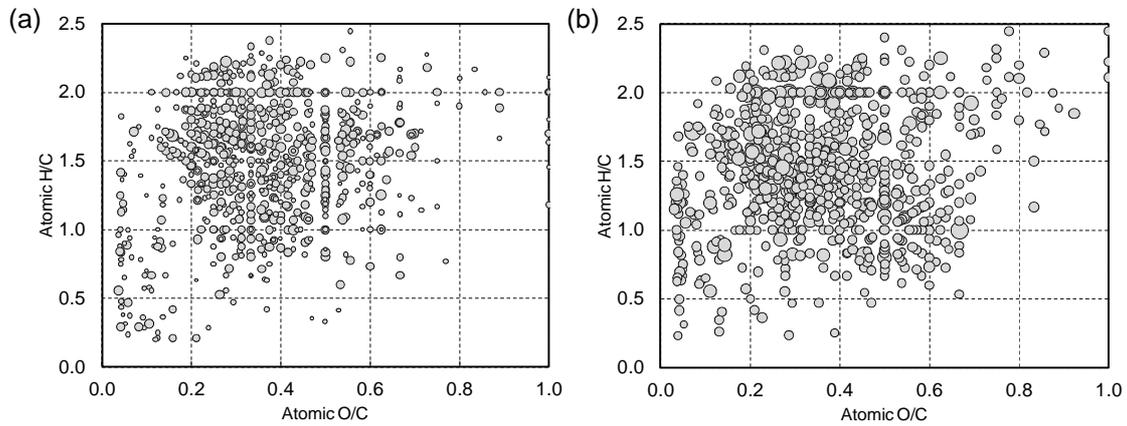


図1 微生物がグルコース(a)およびグルタミン酸ナトリウム(b)から産出した有機物の van Krevelen diagram

(2) モデル藻類として選定した *M. aeruginosa* 株の生分解性試験で得られた R-DOM の精密質量分析の結果を上記(1)と同様にその van Krevelen diagram を図2に示す。次に、琵琶湖流域から採取した水試料(琵琶湖水および流入河川水)を生分解性試験に供して得られた R-DOM の精密質量分析の結果を、上記(1)と同様に van Krevelen diagram として図3に示す。流入河川 DOM と琵琶湖 DOM は構成成分が比較的似ていることから、流入河川 DOM は河川を経由して琵琶湖に入った後も、その化学構造を保持し続けている、すなわち微生物に利用されずに滞留していることが示唆される。流入河川 DOM と比べて、琵琶湖 DOM の方がより多様な成分で構成されていることから、湖内生産有機物からの寄与や流入河川 DOM が分解あるいは代謝される過程で生成した有機物などの寄与も考えられる。

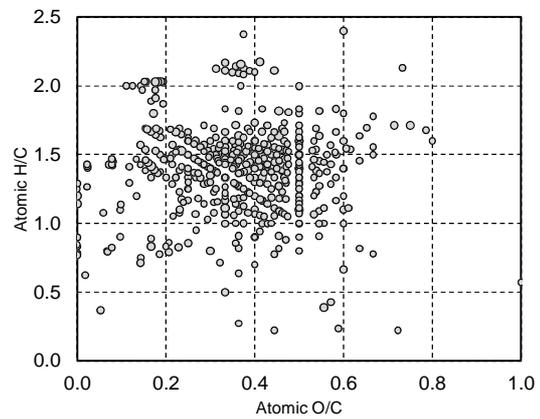


図2 微生物が *M. aeruginosa* から産出した有機物の van Krevelen diagram

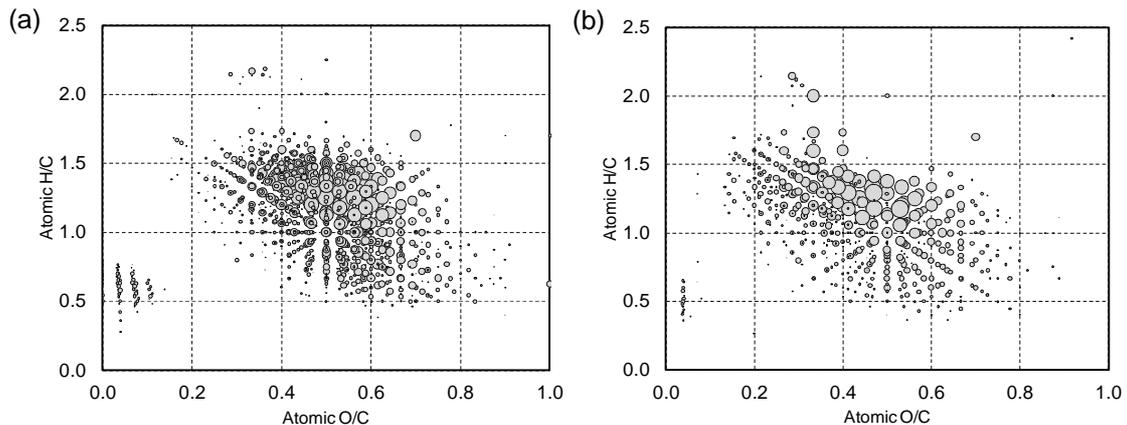


図3 琵琶湖 DOM(a)および流入河川 DOM(b)から調製した R-DOM の van Krevelen diagram

(4) 上記データ以外のデータも用いて解析を行った結果、琵琶湖 DOM で検出された成分のうち、琵琶湖 DOM のみで検出された成分は全体の 41%であった。微生物株および琵琶湖微生物群集が産出した R-DOM 成分は同 34%を占めていることが明らかとなり、湖沼有機物の生成経路として微生物群集の機能や役割が重要であることが示された。階層的クラスター分析結果より、微生物株によって産出された DOM は、流入河川 DOM や下水二次処理水中の DOM と比べて、琵琶湖北湖 DOM および琵琶湖フルボ酸の有機物組成に類似していた(図4)。さらに、琵琶湖南湖 DOM と流入河川 DOM は、都市下水二次処理水中 DOM の有機物組成に類似していた。琵琶湖では R-DOM の起源は湖内生産説が有力とされるが、流入河川 DOM 成分は同 47%を占めていることから、河川経由で琵琶湖に流入する陸域由来(他生性) DOM の寄与も決して少なくないことが明らかとなった。

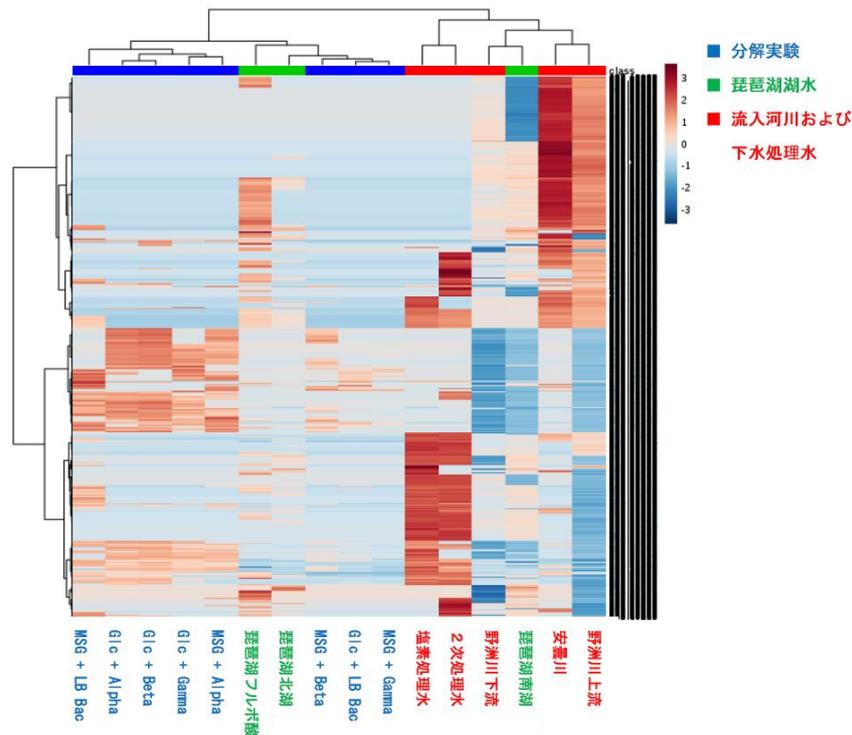


図4 ヒートマップ解析の結果

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 8 件)

吉野魁人, 日下部武敏, 沈尚, 清水芳久: DNA 変性処理を必要としない水環境中の細菌増殖解析法の検討, 第 53 回日本水環境学会年会, 2019.

沈尚, 日下部武敏, 清水芳久: 琵琶湖の物質循環におけるウイルス分流の重要性, 第 53 回日本水環境学会年会, 2019.

沈尚, 日下部武敏, 清水芳久: 琵琶湖北湖における細菌のウイルス感染の実態把握, 第 52 回日本水環境学会年会, 2018.

沈尚, 日下部武敏, 橋本宗樹, 清水芳久: 琵琶湖北湖の底質から溶出する有機物量の推定およびその特性解析, 第 30 回 EICA 研究発表会, 2018.

沈尚, 日下部武敏, 橋本宗樹, 山内渚, 清水芳久: 琵琶湖北湖における細菌の死亡要因にしめるウイルスの影響, 京都大学環境衛生工学研究会第 39 回シンポジウム, 2017.

日下部武敏, 橋本宗樹, 山内渚, 沈尚, 清水芳久: 熱化学分解 GC / MS 法による藻類の生分解特性の評価, 日本腐植物質学会第 32 回講演会, 2017.

S. Sheng, S. Yamagata, H. Hashimoto, T. Kusakabe, Y. Shimizu: Molecular Characteristics and Diversity of Dissolved Organic Matter Produced by an Alphaproteobacteria, *Novospingobium lentum* from Glucose and Glutamate, The 18<sup>th</sup> International Conference of International Humic Substances Society, 2016.

H. Hashimoto, S. Yamagata, S. Shin, T. Kusakabe, Y. Shimizu, M. Katahira: Microbial Transformation and Dissolution Processes of Fine Particulate Organic Matter (FPOM) in Lake Biwa, The 7<sup>th</sup> International Symposium on Advanced Energy Science, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。