

Analysis of *in situ* nitrifying activity and microbial community structure in river sediments by using microelectrodes and 16S rRNA-based molecular biological techniques

(微小電極および分子生物学的手法を用いた河川底泥内 *in situ* における硝化活性および微生物群集構造解析)

学位論文内容の要旨

河川底泥には高い自然浄化能力があることが知られており、富栄養化の原因となる窒素化合物がアンモニアとして環境中に排出された際には河川底泥内で生物学的酸化・還元反応によって除去される。しかし、酸化反応を担う底泥表層の好気領域は数 mm の非常に限られた空間である。河川底泥内の好気領域を拡大させる要因として光合成、底生動物による巣穴の形成、植物根からの酸素の放出があげられ、これらの要因は硝化反応を促進すると考えられているが、*in situ* における詳細な硝化活性と微生物群集構造の情報を組み合わせたものは少ない。

本研究では、河川底泥内の窒素除去メカニズムを解明するために、窒素除去の律速反応である硝化反応に着目し、河川底泥内での硝化活性および光合成、底生動物による巣穴の形成、ヨシ根からの酸素放出が硝化活性と微生物群集構造に与える影響を解析した。底泥内 *in situ* 硝化活性を評価するために各種微小電極を用い、河川底泥内の硝化細菌の同定、定量および微生物群集構造の解析を行なうために 16S rRNA 遺伝子を標的とした分子生物学的手法を用いた。

河川底泥内の硝化細菌の優占種はアンモニア濃度と塩分濃度に伴って変化していて、硝化細菌の底泥内深さ方向の分布に変化は見られなかった。暗条件下でのアンモニア消費活性は主に底泥表層 1 mm で観察されたが、明条件下では、光合成が底泥表層で生じ、表面の酸素濃度が増大し、好気領域が約 2 倍に拡大した。それに伴って、底泥内のアンモニア酸化活性は増大し、また底泥深部でも硝化活性が見られるようになり、120%から 270%に増大した。底生動物によって形成された巣穴内部には直上水が取り込まれ、巣穴壁面は好氣的な環境が形成されていた。そして巣穴壁面は底泥表層よりも硝化活性が数倍高く、さらに硝化細菌が底泥表面よりも 2 倍程度多く検出され、底泥内の硝化活性は底生動物が巣穴を形成する事によって促進されていた。ヨシ根の酸素を放出している約 40 mm の範囲では硝酸生成活性が、そして中心部分約 20 mm ではアンモニア酸化活性が観察された。また硝化細菌はヨシ根の酸素を放出している範囲から検出され、酸素を放出していない部分からは検出することができなかった。巣穴壁面およびヨシ根圏生物膜内の微生物群集構造は周辺の底泥に比べて、多様性が大きく、さらに、鉄、メタンおよび硫酸化細菌が特異的に検出された。またヨ

シ根は底泥内に表層の約 20 倍に及ぶ好気領域を形成し、硝化活性は底泥表面の約 10 倍促進させる事が示唆された。

本研究では光合成、底生動物による巣穴の形成、ヨシ根からの酸素放出が硝化活性および微生物群集構造に与える影響を検討し、これらが河川底泥内の好気領域を拡大させ、硝化細菌の増殖を促し、硝化活性が促進されていた事が明らかになり、河川底泥内の硝化活性について詳細な知見を得る事ができた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 岡 部 聡  
副 査 教 授 渡 辺 義 公  
副 査 教 授 船 水 尚 行  
副 査 教 授 松 井 佳 彦

## 学 位 論 文 題 名

### Analysis of *in situ* nitrifying activity and microbial community structure in river sediments by using microelectrodes and 16S rRNA-based molecular biological techniques

(微小電極および分子生物学的手法を用いた河川底泥内 *in situ* における硝化活性および微生物群集構造解析)

河川の水環境保全の観点から、河川の自然浄化能力を定量的に把握することは重要である。特に、富栄養化の原因となる窒素化合物の除去能力・メカニズムの解明が必要である。河川の自浄作用を考えると、河床生物膜や底泥の影響を無視することはできない。一般的に、河川水中のアンモニア性窒素は底泥表層の好氣的領域で生物学的硝化反応によって硝酸塩まで酸化され、生成された硝酸塩は嫌氣的領域で  $N_2$  まで還元され除去されると考えられている。しかしながら、底泥表面に形成される好氣的領域は数 mm の非常に限られた空間であるため、底泥内で生じる硝化活性を *in situ* で定量的に解析した研究事例は少ない。底泥内部での硝化活性および関与する微生物群集構造を解析するためには、時間的・空間的に高い解析手法が必要不可欠である。

そこで本研究では、河川全体の窒素除去能力を正確に理解するため、河川底泥の窒素除去に果たす役割を定量的に評価することを目的とする。この目的を達成するためには、時間的・空間的分解能の高い各種微小電極と最新の分子生物学的手法（16S rRNA 遺伝子クローニング、Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RTQ-PCR)法など）を併用することにより、底泥内で生じる硝化反応機構を明らかにすることに加え、底泥の好氣的領域を拡大させると考えられる、光合成、底生動物および抽水植物の影響を定量的に評価することが必要となる。このように、河川底泥内 *in situ* における詳細な硝化活性と関与する微生物群集構造の解析を組み合わせた研究はない。

本論文の各章の内容は以下のようになっている。

第1章では、河床生物膜および底泥内で生じる硝化反応に影響を及ぼすと考えられる環境要因(例えば、光合成、底生動物、抽水植物など)について、文献検索を行い情報の整理を行うとともに、本研究の目的を述べた。

第2章では、底泥内で生じる光合成の活性を、各種微小電極(酸素、アンモニア性窒素、亜硝酸塩、硫化水素、ORP、pH)を用いて測定した。河川底泥に光を照射した場合、光合成は底泥表面から約 0.5 mm までの範囲で生じた。光照射強度を増加させる事

により酸素濃度が増大するとともに、底泥内の好気領域が約2倍に拡大した。また、底泥内には酸素呼吸、硝酸還元、硫酸還元反応が底泥表層5mmの範囲に層状に分布しており、これら反応は光合成有無により底泥内で上・下する事が明らかとなった。

第3章では、汚濁状況が異なる3地点の河川底泥を対象として、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の群集構造、深さ方向分布および*in situ*における活性を分子生物学的手法および微小電極を併用して解析した。微小電極による明暗条件下の河川底泥内*in situ*での硝化活性とRTQ-PCRによる硝化細菌の分布が共に示されたのは本研究がはじめてである。アンモニア酸化細菌および*Nitrospira*に近縁な亜硝酸酸化細菌の優占種はアンモニア性窒素濃度と塩分濃度に影響され変化していた。暗条件下でのアンモニア消費活性は主に表層1mmで観察されたが、明条件下では、光合成により底泥内の好気領域が約2倍に拡大し、それに伴い底泥内のアンモニア酸化活性も120%から270%まで増加した。この時、暗条件下ではアンモニア酸化が観察されなかった底泥深部においてもアンモニア酸化活性が観察された。これらの結果より、河川底泥内における硝化活性は、表層2mmの範囲に限られが、光合成が生じることにより促進されることが明らかとなった。

第4章では、河川干潮域の底泥内に生息している底生動物が窒素循環に与える影響および巣穴が底泥内の微生物群集構造に与える影響を、各種微小電極、RTQ-PCR、16S rRNA gene クローニング法を用いて検討した。その結果、酸素は底生動物の巣穴を通して巣穴内(底泥表面より350mmの地点)にまで供給されており、巣穴壁面には好気性細菌であるアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌が、底泥表面よりも約2倍多く存在し、巣穴壁面におけるアンモニア酸化活性は底泥表層に比べて約2倍高かった。また巣穴壁面に存在する微生物群集は、巣穴周辺の底泥内および底泥表層に比べて多様性が高かった。さらに、マイクロゾム実験により、底生動物数の増加に伴い硝化および脱窒反応が促進されることが明らかとなったことより、底生動物が底泥内の窒素循環に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

第5章では、抽水植物の代表ともいえるヨシの根から放出される酸素が底泥内の硝化反応に与える影響について検討した。微小電極を用いて基質濃度分布を測定した結果、根先端から40mmまでの領域で酸素の放出が著しく、この領域のみにおいて硝化活性が観察された。さらに根圏内(根先端から40mm)において、アンモニア酸化細菌および*Nitrospira*に近縁な亜硝酸酸化細菌の存在が確認された。ヨシが存在することにより、単位底泥表面積当りのアンモニア消費活性は、ヨシが存在しないときの値に比べて約2倍増大すると予想され、ヨシ根が河川の窒素除去に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第6章では、これらの結果をまとめ、底泥表層、底生動物の巣穴壁面、ヨシ根の表面では、硝化活性が周辺の底泥よりも高く、窒素除去に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後は、底泥内の硝化活性、窒素除去メカニズムの解明に加えて、河川水中における硝化活性を定量的に把握することにより、河川全体における窒素除去能力の評価を行う必要がある。

以上要するに著者は、微小電極と最新の分子生物学的手法を併用し、これまでブラックボックスとして取り扱われてきた河川底泥内で生じる硝化反応をより定量的に解析することにより、底泥が河川の自浄作用(窒素循環)におよぼす影響を明らかにしたものであり、水環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。