

## 東濃地下の窒素固定菌・硝化菌・脱窒菌：地下微生物が地下窒素サイクルに関与する可能性

### Potential microbial contribution to nitrogen cycling in the Tono subsurface

# 長沼 毅[1], 足立 奈保美[1], 藤田 夕佳[1], 谷本 大輔[1], 渡辺 史子[1], 岡本 拓士[1], 村上 由記[1], 天野 健治[2], 岩月 輝希[3], 濱 克宏[3]

# Takeshi Naganuma[1], Naomi Adachi[1], Yuka Fujita[1], Daisuke Tanimoto[1], Fumiko Watanabe[1], Takuji Okamoto[1], Yuki Murakami[1], Kenji Amano[2], Teruki Iwatsuki[2], Katsuhiko Hama[2]

[1] 広大・院・生物圏, [2] サイクル機構 東濃センター, [3] サイクル機構東濃センター

[1] School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [2] JNC TGC

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hubol/naganuma.html>

地下生物圏が伝統的生物圏（陸上・海洋）と大きく異なる点の一つに分子状酸素（O<sub>2</sub>）の利用性がある。陸上や海洋の生物が分子状酸素を利用して好気呼吸するのに対し、地下では硝酸イオンや硫酸イオンなどを電子受容体（酸化剤）とした嫌気呼吸を行われている。核燃料サイクル開発機構の東濃地科学センター（岐阜県土岐市）で採取した地下サンプルについて微生物の培養および遺伝子解析を行ったところ、代表的な嫌気呼吸菌である脱窒菌に加え、窒素固定菌・硝化菌など「地下窒素サイクル」に関与すると思われる微生物が検出された。つまり、これらの微生物によって N<sub>2</sub>（窒素固定） 有機 N（腐敗） アンモニア（硝化） 硝酸（脱窒） N<sub>2</sub> というサイクルが地下で回転していることが想定される。

本研究では、東濃地科学センターの TH-6 号孔の深度 104、132、153（堆積岩）および 177 m（花崗岩）から、他深度の水の混入および雑菌混入のないように注意して地下水を採取した。採取した地下水中の全菌数を蛍光顕微鏡観察によって計数した。また、16S rDNA 解析により地下水中の微生物相の系統解析を試みた。各深度の地下水微生物群集から全 DNA を抽出し、16S rDNA を PCR により増幅して得られた PCR 産物についてクローニングを行い、各深度においてクローンライブラリーを作成した。得られたクローン（各深度 50 クローン；合計 200 クローン）の塩基配列を解析し、各深度別に、DNA 配列の相同性が 96% 以上のクローンは同じグループ単位（operational taxonomic unit, OTU）としてグループ化を行った。近隣結合法によって系統樹を作成し、系統および多様性の解析を行った。さらに、これらの地下水から脱窒菌の単離・培養を試みた。単離菌株については 16SrDNA 塩基配列を決定し、系統樹を作成した。また各株の塩分、温度に対する生育特性、95 種類の単一炭素源の利用性を調べた。また、脱窒の主要酵素である硝酸還元酵素 narH および亜硝酸還元酵素 nirS をコードする遺伝子について、深度別にその遺伝子の有無・多少をドットプロットハイブリダイゼーション（dot blot hybridization, DBH）によって調査した。

地下水試料の蛍光顕微鏡法により地下水中の全菌数（生菌および死菌）を計測したところ、1 ミリリットル当たり 440 万～820 万 細胞であった。これは光合成生産の行われる海洋表層の密度と同レベルである。また、この程度の深度では減少傾向は見られなかった。

16S rDNA 配列にもとづいて地下水微生物相の系統解析を行ったところ、脱窒菌および硝化菌に近縁の多様な OTU が検出され、TH-6 号孔において脱窒・硝化が盛んに行われているという可能性を示唆された。近傍の試錐孔（KNA-6 号孔）のほぼ同深度の地下水から低栄養細菌（oligotrophic bacteria）を単離・培養し、その 16S rDNA 解析をしたところ、この菌は窒素固定を行う Rhizobium 属菌であることが示唆された。TH-6 号孔の 16S rDNA 解析では検出されなかったものの（おそらく他の優占 16S rDNA の蔭に隠れてしまった）東濃地域の地下に広く窒素固定菌が生息しているものと思われる。

実際に脱窒菌の単離を試みたところ、硝酸塩還元菌 21 株、さらにガス（N<sub>2</sub>）産生菌 13 株を得ることができた。ガス産生が確認された株について遺伝子解析を行なった結果、それぞれ Bacillus 属、Staphylococcus 属、Comamonas 属、Pseudomonas 属のいずれかに分類された。Pseudomonas 属に属する株はどの深度からも単離されていた。Pseudomonas 属は脱窒菌の中では一般的な細菌グループである。

本研究で得られた脱窒菌株はすべて中温性であり、至適塩分濃度は最大 1.5% であった。TH-6 号孔の地下水温度は約 20 °C であることから、これらの株にとっておおよそ生育に適した環境であるといえる。炭素源の利用性は、非常な多様性を示すものもあれば、極度に限られているものもある。Pseudomonas 属に属する株は他の株と比較して利用できる炭素源の種類が多かった。中でも 153-01 株は、95 種類中 85 種類の有機化合物を唯一の炭素源として利用することができた。利用できる炭素源の種類が多いことは、それだけ適応できる環境の幅も広がると考えられる。DBH の結果、本研究によって単離された全株で narH および nirS の存在を確認することができた。また深度ごとのプロファイリングを試みた結果、深度 132m における DBH シグナルが強い傾向が見られた。深度 132m における存在量が比較的多いことが示唆される。