Nitrogen and oxygen isotope fractionation during anammox in the activated sludge

古田島 翔徳 2 、*木庭 啓介 1 、池田 大輔 2 、寺田 昭彦 2 、井坂 和一 4,3 、矢野 翠 1 、眞壁 明子 6 、木村 裕 哉 4 、仁科 一哉 5 、楊 宗興 2

Syoutoku Kotajima², *Keisuke Koba¹, Daisuke Ikeda², Akihiko Terada², Kazuichi Isaka^{4,3}, Midori Yano¹, Akiko Makabe⁶, Yuuya Kimura⁴, Kazuya Nishina⁵, Muneoki Yoh²

1. 京都大学生態学研究センター、2. 東京農工大学、3. 東洋大学、4. 日立製作所、5. 国立環境研究所、6. 海洋研究開発機構 1. Center for Ecological Research, Kyoto University, 2. Tokyo University of Agriculture and Technology, 3. Toyo University, 4. Hitachi Co. Ltd., 5. National Institute of Environmental Studies, 6. JAMSTEC

Anammox is an important nitrogen removal pathway in many ecosystems. However, it is still unclear how important the anammox is quantitatively compared with the denitrification. Natural abundance of 15N and 18O of nitrogenous compounds such as ammonium, nitrate and nitrite can provide unique infromation to investigate the relative contribution of anammox to the total nitrogen removal, although the lack of reports on isotopic fractionation factors in the anammox cannot allow us to explore the use of stable isotope signature in the anammox studies.

We incubated the sludge anaerobically to trace the changes in concentrations and isotopic signatures of ammonium, nitrite and nitrate during the anammox process to calculate the isotopic fractionation factors. We found the large isotopic fractionations for ammonium oxidation and nitrite reduction by anammox. In addition, the inverse isotopic fractionation during nitrite oxidation to nitrate was observed. Moreover, the exchange rate of O atom between water and nitrite was higher than previously thought, indicating the importance of this process in regulating the isotope systematics. In the presentation, wapply the isotopic fractionation factors obtained from our incubation experiments to make a simple process model to see if isotopic signatures can detect the anammox in the denitrification-dominated environment.

キーワード:アナモックス、窒素同位体比、酸素同位体比

Keywords: Anammox, d15N, d18O

南海トラフコア試料を対象とした基質誘導ベースのメタゲノム解析法による金属イオン応答遺伝子の網羅的探索

Screening of metal-ion inducible genes from subseafloor sedeiments of Nankai Trouph using substrate-induced gene expression method

*森澤 高至¹、諸野 祐樹²、寺田 武志³、西川 聡美⁴、大下 紘貴¹、稲垣 史生²、芦内 誠⁴、若松 泰介⁴
*Takashi Morisawa¹, Yuki Morono², Takeshi Terada³, Satomi Nishikawa⁴, Koki Ohshita¹, Fumio Inagaki², Makoto Ashiuchi⁴, Taisuke Wakamatsu⁴

- 1. 高知大学大学院総合人間自然科学研究科、2. 国立研究開発法人海洋研究開発機構、3. マリン・ワーク・ジャパン、4. 高知大学農学部
- 1. Kochi University Graduate School of Integrated Arts and Sciences, 2. JAMSTEC, 3. Marine Works Japan, 4. Kochi University Faculty of Agriculture

There are still large room for discovery in gene function and its potential of life in natural environment especially for the least-explored environments such as the subseafloor biosphere. We have employed substrate-induced gene expression (SIGEX) approach to screen DNA fragment that induce gene expression as a response to presence of substrates such as metal ions, D-amino acids, and persistent chemicals from metagenomic shotgun libraries prepared with subseafloor sediment samples of Nankai Trough.

Constructed metagenomics shotgun libraries that confers *gfp* gene downstream of the inserted DNA fragment were induced by metal ions including Ni²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Mo⁶⁺, and Ga³⁺, followed by sorting of clones with green fluorescence by a cell sorter. From sorted clones, we secondary screened clones for its response to the induction of each metal ion. Clones isolated by using Ni²⁺, Ga³⁺ showed specific response to each metal ion used for isolation. Also there were other type of clones that showed response to induction by multiple metal ions. DNA sequence analysis revealed that while around half of the clones had database-identifiable DNA fragment, other half did not show any match to DNA sequences in database. This study showed great potential of SIGEX-based approach to find function of DNA fragments from large pool on unknown environmental DNA of natural environment.

キーワード:海底下堆積物、遺伝子機能、南海トラフ、メタゲノム、SIGEX、金属イオン Keywords: Deap-sea sediment, Gene function, Nankai Trough, Metagenome, SIGEX, Metal-ion 水田土壌オミクス解析から見えた陸域生態系における鉄還元菌の新たな機能ー還元的窒素変換

Predominant but previously-unseen prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, unveiled by metatranscriptomics.

*增田 曜子¹、伊藤 英臣²、白鳥 豊³、磯部 一夫¹、大塚 重人¹、妹尾 啓史¹
*Yoko Masuda¹, Hideomi Itoh², Yutaka Shiratori³, Kazuo Isobe¹, Shigeto Otsuka¹, Keishi Senoo¹

1. 東京大学大学院農学生命科学研究科、2. 産業技術総合研究所北海道センター、3. 新潟県農業総合研究所 1. Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 2. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Hokkaido center, 3. Niigata Agricultural Research Institute

湛水下の水田土壌において発達する嫌気的な環境下では、主に微生物が駆動する還元的窒素変換反応(窒素生成型硝酸還元(脱窒)、アンモニア生成型硝酸還元(Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonia, DNRA)、窒素固定)が進行する。これらの反応により水田土壌は『硝酸・ N_2 Oの低排出』や『窒素肥沃度の維持』といった特徴を有している。我々は、従来法に比べて解析バイアスがはるかに少ないメタトランスクリプトーム解析の手法を用いて、新潟水田土壌の還元的窒素変換を駆動する微生物群集の包括的な解明を試みた。

その結果、従来法ではほとんど検出されてこなかったDeltaproteobacteria綱細菌由来の還元的窒素変換酵素遺伝子の転写産物が高頻度に検出された。中でも、新潟水田土壌微生物の優占種であるGeobacter属, Anaeromyxobacter属細菌に由来する硝酸還元酵素遺伝子(nar)、一酸化窒素還元酵素遺伝子(nor)、一酸化二窒素還元酵素遺伝子(nos)、DNRAの鍵酵素遺伝子(nrf)、窒素固定の鍵酵素遺伝子(nif)の転写産物が高頻度に検出された。これまでPCRベースの解析手法によって土壌からこれら鉄還元菌由来の還元的窒素変換酵素遺伝子はほとんど検出されてこなかったが、それは鍵酵素遺伝子のGC含量の高さが原因であると考えられた。

Geobacter属, Anaeromyxobacter属細菌は、これまで主に鉄還元反応を駆動する微生物(鉄還元菌)として考えられてきた。しかし本研究により、これらの細菌は鉄還元のみならず、DNRA反応や窒素固定反応によるアンモニア生成、部分的脱窒反応による N_2 O消去を行っている可能性が高く、水田土壌における硝酸・ N_2 O低排出や窒素肥沃度維持の要となっていることが示唆された。

さらに本研究では、全国の水田土壌、河川の底泥、畑・雑草地・森林土壌由来の土壌DNAを試料とし、 Geobacter属, Anaeromyxobacter属細菌の16S rRNA遺伝子の定量を行った。その結果、これらの属の細菌は 水田土壌や河川の底泥において優占しているほか、畑・雑草地・森林土壌にも分布していることが明らかとな り、広く陸域環境において還元的窒素変換を行っている可能性が考えられた。

本研究は、水田土壌のみならず陸域生態系における"鉄還元菌"の新たな機能-還元的窒素変換-を提唱するものである。

キーワード:還元的窒素変換反応、Deltaproteobacteria、メタトランスクリプトーム、土壌生態系、鉄還元菌 Keywords: Reductive nitrogen transformation, Deltaproteobacteria, Metatranscriptome, Soil ecosystem, iron-reducing bacteria 関東地域の石灰岩・蛇紋岩土壌の林床における尿素処理効果 Effects of urea application on the forest floors in limestone and serpentinite soils in the Kanto region, Japan

- *深山 寬人¹、伊野 航¹、安井 万奈²、萩谷 宏¹
 *Hiroto Fukayama¹, Wataru Ino¹, Mana Yasui², Hiroshi Hagiya¹
- 1. 東京都市大学、2. 早稲田大学
- 1. Tokyo City University, 2. Waseda University

窒素投与による攪乱が窒素サイクルに与える影響を調査するため, 亜熱帯から温帯域に広く分布する酸性土 壌を有する生育地に尿素処理が行われてきた. 日本列島では酸性土壌が広範に分布しているため, その陸上植物 群落の多くは酸性土壌上に成立したものである. 例えば, 酸性土壌を有する森林に尿素処理を行うとアンモニア 態窒素濃度のみならずpHや含水率の急速な上昇がみられる. 土壌pHは7ケ月以内に対照区 (尿素施与を行って いない場所) のレベルに戻る. 一方、アンモニア態窒素濃度と含水率は, 尿素施与後1-2年をかけて漸次低下し対 照区のレベルに戻る. 尿素施与後, 特定の菌類群の遷移的な発生がみられる. Sagara (1975) は, この化学生態学 的菌群をアンモニア菌と定義している. 遷移前期のアンモニア菌は, アンモニア態窒素濃度, pH, 含水率のいず れもが高い値を示す間に発生する. 一方, 遷移後期のアンモニア菌は, アンモニア態窒素濃度と含水率が対照区 のより幾分高い間に発生する. これらの知見から, アンモニア菌の発生には, pHの急激な上昇を伴うアンモニア 態窒素濃度の急上昇が必須要因と推察されてきた (Yamanaka 1995; Suzuki et al. 2002, 2003; He & Suzuki 2004, 等). しかし,石灰岩土壌や蛇紋岩土壌のような日本列島の代表的アルカリ土壌においてさえも窒素投与の 効果は一切調査されていない. それゆえ. 日原近辺の石灰岩土壌の林床 (珪質岩の基盤上に石灰質土壌が再堆積 した層からなる; 奥多摩地区) 及び蛇紋岩土壌の林床嶺岡林道沿いの林床 (蛇紋岩の基盤とその粘土化して堆積 した層よりなる; 鴨川地区)に2016年の3月末, 800 g/m²の尿素を施与し, 尿素施与後の菌類相と土壌理化学条 件 (土壌温度, 含水率, pH, 無機態窒素濃度) の変化を追跡調査した. なお, 日原の林及び嶺岡林道の林の尿素施与 前の土壌 (LF層及びHA層) のpHは, それぞれ8と10であった. 同尿素施与区では, アンモニア態窒素濃度と含水 率が急激に上昇し、次いで次第に低下した. 同アルカリ土壌でのアンモニア態窒素濃度の低下は、酸性土壌での アンモニア態窒素濃度の低下に較べて急激であった. 一方, アルカリ土壌では, 尿素施与伴うpHの変化はみられ なかった. アルカリ土壌のHA層では, 酸性土壌での尿素施与の場合に較べて, 亜硝酸態窒素濃度の顕著な上昇が みられた. この硝化作用の強さの相違は, アルカリ土壌の特性の一つとも推察される. アルカリ土壌での尿素施 与では, 尿素施与した酸性土壌で確認されている, 遷移前期のアンモニア菌Amblyosporium botrytis, Pseudombrophila petrakii, Coprinopsis echinospora, Lyophyllum tylicolor 及び遷移後期のアンモニア Calocybe constricta と Hebeloma spoliatumが発生したが、アルカリ土壌に特異的なアンモニア菌の菌種は確 認されなかった. 以上の結果から, アンモニア菌の増殖には, アンモニア態窒素濃度とpHの急激な上昇のうち, 前者による攪乱が主要因となっていると推察される.

キーワード:アンモニア菌、アルカリ土壌、石灰岩、蛇紋岩、pH、アンモニア態窒素 Keywords: ammonia fungi, alkaline soils, Limestone, Serpentinite, pH, anmmonium nitrogen

Microbially induced Smectite-to-Illite reaction

*Tae-hee Koo¹, Jinwook Kim¹

1. Department of Earth System Sciences, Yonsei University, Seoul, Korea

Microbial Fe-reduction in smectite structure plays a significant role in illitization accompanying with the structural/chemical modification of smectite, closely linked to the physico-chemical properties of clays, Fe-liberation, water chemistry, elemental cycles, and fault behavior. Especially current researches exploring microbial diversity in the Nankai Trough fault and the influence of illitization on fault behavior emphasize the significance of the microbially induced smectite-to-illite reaction. The dissolution of smectite induced by microbial respiration of Fe in the structure of smectite is a major process that promotes illitization, however direct evidence of K-fixation and K-nontrontie/illite formation is not clearly understood.

The present study demonstrates evidence of biotic illitization during the reductive dissolution of nontronite (NAu-1) associated with microbial Fe-respiration, by the microscopic/spectroscopic measurements of progressive modification in morphology, structure, and elemental composition of bio-reduced nontronite as well as aqueous chemistry in the supernatant as incubation time increased. Fe-reducing bacteria (FeRB), *Shewanella Oneidensis* MR-1 was inoculated in M1 medium with nontronite (NAu-1) less than 0.2 micron as an electron acceptor and Na-lactate as a sole electron donor at 30 degree-Celcius in the anaerobic chamber. The pH was buffered with potassium-phosphate buffer at pH 7.0 and 8.0 for optimum condition for microbial growth and illite formation.

The progress of bio-reduced nontronite reaction can be explained as follows: altered nontronite (AN) with a scouring surface texture \rightarrow K-nontronite (KN) with frayed edges \rightarrow euhedral lath shaped illite. A progressive morphology change in bio-reduced nontronite corresponded to an increase in Al/Si and K/(K+2Ca) that ranged between 0.13 to 0.28 and 0.16 to 1.0, suggesting the biotic reductive dissolution of nontronite and neoformation of illite.

The changes in oxidation state of structural Fe and its consequences on the petrophysical properties of clay minerals during the illitization may modify the fault behavior and geological environments.

Keywords: smectite-to-illite reaction, Microbial Fe reduction, Fault property

Microbial community in brucite-carbonate chimneys discovered in the Shinkai Seep Field, the deepest serpentinite-hosted vent system in the Southern Mariana Forearc

*奥村 知世¹、平井 美穂¹、布浦 拓郎¹、高井 研¹、小原 泰彦^{1,2}
*Tomoyo Okumura¹, Miho Hirai¹, Takuro Nunoura¹, Ken Takai¹, Yasuhiko Ohara^{1,2}

- 1. 独立行政法人海洋研究開発機構、2. 海上保安庁
- 1. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2. Hydrographic and Oceanographic Department of Japan

Serpentinite-hosted fluid vent systems have attracted great interest as unique modern deep-sea chemosynthetic ecosystems and as analogues for the origin and early evolution of early on Earth as well as for extraterrestrial life such as on Mars and Enceladus. During expeditions since 2013 to 2016, brucite-carbonate chimneys were discovered from the deepest known (~5700 m depth) serpentinite-hosted ecosystem –the Shinkai Seep Field (SSF) in the southern Mariana forearc [1]. Here we report geobiological characteristics of the SSF chimneys, as a new type of chemosynthetic microbial habitat at a serpentinite-hosted vent system.

Previous explorations of SSF led to the discovery of fourteen vesicomyid clam colony sites and five chimney sites occurring within an area of 500 square meters. Textural observations and geochemical analysis reveal three types (I-III) of chimneys formed by the precipitation and dissolution of constituent minerals [2]. Type I chimneys are bright white to light yellow, have a spiky crystalline and wrinkled surface with microbial mat and mainly consist of brucite; these formed as a result of rapid precipitation under high discharge conditions of alkaline fluid. In this type of chimneys, filamentous microbial cells were often mineralized by brucite. Type II chimneys exhibit white to dull brown coloration, tuberous fluid pass textures, and are covered with grayish microbial mats and colonies of *Phyllochaetopterus*. This type of chimney is characterized by inner brucite-rich and outer carbonate rich zones and is thought to have precipitated from lower fluid discharge conditions than type I chimneys. Type III chimneys are ivory colored, have surface depressions and lack living microbial mats or animals. This type of chimneys mainly consist of carbonate, and are in a dissolution stage after alkaline fluid input ceased.

Small subunit rRNA gene tag sequences showed that prokaryotic community compositions varied with the chimney types, reflecting the hydrologic and biogeochemical processes. For example, alkaliphylic bacteria were abundant in type I chimneys and diverse symbiotic bacterial strains were identified in type II chimneys. The former likely reflects higher flux of alkaline fluid, whereas the latter possibly reflects higher biomass of faunal community on type II chimneys. Unique characteristics observed in the SSF chimneys shed light on the variability of subseafloor and seafloor geochemical and geobiological processes supporting the serpentinite-hosted exosystems.

References

- [1] Ohara et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109, 2831-2835.
- [2] Okumura et al. (2016) Geochem. Geophys. Geosys. 17, 3775-3796.

キーワード: しんかい湧水域、蛇紋岩湧水、マリアナ前弧、化学合成生態系、深海チムニー Keywords: Shinkai Seep Field, Serpentine-hosted vent system, Mariana Forearc, Chemosynthetic ecosystem, Deep-sea chimney

Interaction between photochemical and microbial degradation of dissolved organic matter in the Pearl River Estuary

*Fangming Yang^{1,2}, Yang Li², Guisheng Song², Huixiang Xie^{3,2}

1. School of Marine Science and Technology, Tianjin University, Tianjin, China, 2. College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, China, 3. Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec àRimouski, Rimouski, Québec, Canada

The migration and fate of dissolve organic matter (DOM) in estuarine ecosystems have gained more attention, due to the important role of the estuary as the bridge of the land and ocean,. Photochemical and microbial processes have long been considered as the key routes for the transformation and mineralization of DOM in the aquatic ecosystems. However, how the above processes influencing each other is still poorly understood. In this study, the interaction between photo- and bio-degradation of DOM was investigated in surface water in the Pearl River Estuary in south China. Microbial, photochemical and microbial + photochemical experiments were carried out and monitored by direct measurements of dissolve organic carbon (DOC) and the adsorption spectra of chromophoric dissolved organic matter (CDOM). The results demonstrated both the fraction of microbial degradation of DOM and the rate of this pathway in the dark were higher in the mid estuary than those in the upper and lower estuaries . The microbial degradation of CDOM under natural light along the estuary was promoted, whereas that of DOC was inhibited. After one-month microbial consumption in the dark, the photobleaching rate of CDOM was slightly enhanced along the estuary. Differently from CDOM photobleaching, the photodegradation rate of DOC was promoted in the upper estuary, but inhibited in the lower estuary. Furthermore, two broadband shoulders at 285-310 nm and 350-360 nm, respectively, were found for the absorption spectrum of CDOM after microbial and then photochemical degradation in the upper estuary, which meant the formation of carbonyl and aromatic heterocyclic compounds. The shoulders were smaller (absent) for the mid (lower) estuarine sample. This study provides direct evidence that microbial and photochemical degradation of DOM can significantly impact on each other in the estuarine ecosystem. Further studies are needed to explore the mechanisms between the two processes in large scale areas.

Keywords: Pearl River Estuary, Dissolved organic carbon, Chromophoric dissolved organic matter,
Photochemical degradation, Microbial degradation

タンクモデル解析で求められた土壌層ー風化層間の水循環と風化反応との 関係

Water circulation between solum and weathered layer examined by Tank Model analysis related to weathering reaction

- *神尾 重雄1、増田 信吾2
- *Shigeo Kanwo¹, Shingo Masuda²
- 1. 特定非営利活動法人 地質情報整備活用機構、2. ニュージェック
- 1. Geological Information Utilization and Promotion Initiative, 2. NEWJEC

概要

河川の低水流出予測に用いられるタンクモデルは流域を表現する四段のタンクの一段目タンクに降水量を入力し、各タンクの流出孔からの流出量合計を河川流量として求める流出解析モデルである。自然植生や微生物活動により形成された、地表を覆う物質である土壌層は、空隙が大きく密度も低い。一方下位の風化層については土壌層より空隙は小さく、また密度も大きい。しかしさらに下方に存在する岩石や地層に比べると風化層の空隙や空隙に接する固体粒子の表面積は、はるかに大きい性質を持つ。この土壌層と風化層の物性の違いは、タンクモデル上でも一段タンクと二段タンクとして区分される。

本検討では平均的降雨再来日間隔からモデル日降水量分布を作成し、これを入力条件として酒匂川水系の鮎 沢川および河内川からの流出を表すタンクモデルを使い、タンク内部の水循環に注目した計算を行った。

モデル日降水量分布の求め方

全国155の気象観測地点で55年間の観測データが公表されている。この中に各閾値である1,10,30,50,70,100ミリ以上の日降水量が生起する日数の月別平均値がある。これから隣接する各範囲の日降水量が生起する日数の月別平均値が求められる。この月別平均生起日数の年平均値を求め、さらにその逆数を計算して5つの降水量範囲と100ミリ以上日降水量について、日降水量の再来日間隔を155地点において求め、その地点の平均年間降水量との相関性を求めた。

年間降水量が増加すると日降水量の再来日間隔が低下する明瞭な反比例の関係となる。

降水量範囲ごとの回帰曲線をまとめ、これらから各降水量範囲と再来日間隔の関係を年間降水量一千ミリ毎に一千ミリから三千ミリまでをパラメーターとして求めた。1ミリ以下降水量はすべて0mmの曇天とし、その再来日間隔を2日とした。さらにいずれにも当てはまらない日を晴天とし、一日5ミリの蒸発散量を与えた。モデル日降水量分布を求めるには上記の降水範囲の代表値を定める必要がある。平均的な数値を中心に試算を行い、年間降水量との整合性を確認して、各降水量範囲を代表する日降水量の数値を決定した。

計算結果

モデル日降水量分布を与えることで規則的な間隔の小降雨により一段タンクと二段タンクの間に起きる水循環の様子を明らかにすることができた。図1上段には河内川タンクモデルに年間降水量千ミリケースのモデル日降水量分布を与えた計算結果を示す。このうち18ミリ及び4ミリの小降雨が規則的に生ずる期間で、一段タンクから二段タンクへの不飽和浸透とその逆方向の蒸発散に伴う水分上方移動が繰り返し起きている様子が赤の線で示される。図1下段には、対応する二段タンクの貯留量変動を青の線で示す。ここでは1732日目の38ミリ降雨を受け、貯留量は急増する。1740日目18ミリ降雨によりこの貯留量は数ミリ増加し、小さなピークを作るが、その上段で赤の線の表す浸透は小降雨による水循環の1サイクル目に相当する。2サイクル目の1754日目小降雨も貯留量の小ピークを作るが貯留量は減少していく、4サイクル目まで減少傾向の中で貯留量の小ピークが出現する。

考察

土壌中で微生物分解により作られた二酸化炭素は、まず小降雨で一段タンク内にたまった水に溶解し、浸透により二段タンクを構成する風化層まで輸送される。しかし1サイクル目では以前の大きい降雨量の影響で二段タンクに残留する水により、希釈される。2サイクル目では希釈割合は小さくなり、3サイクル以降、希釈

はなくなる。この水循環が3サイクル以上になると溶脱物質を含む溶液濃度の均一化と共に反応に必要な炭酸水素イオン濃度が高まり、造岩鉱物を分解する化学反応は促進される。

キーワード: 土壌層、水循環、タンクモデル、酒匂川水系、年平均降水量、化学的風化 Keywords: solum, water circulation, Tank Model, Sakawa River System, average annual precipitation, chemical weathering

