

平成30年度 水質保全研究助成 成果報告会(2019.3.22)

湖沼における細菌由来溶存有機物の寄与： 鏡像異性体バイオマーカーを用いた定量法の確立



背景：湖沼の難分解DOMの生成源？

・琵琶湖では過去数十年間で、栄養塩やBODは減少して水質改善傾向な一方で、CODは高止まり

➡ 生物が使いにくい難分解DOCが湖水に蓄積している？

・海洋では、細菌による難分解DOCの生産（微生物炭素ポンプ）の重要性が明らかになってきた

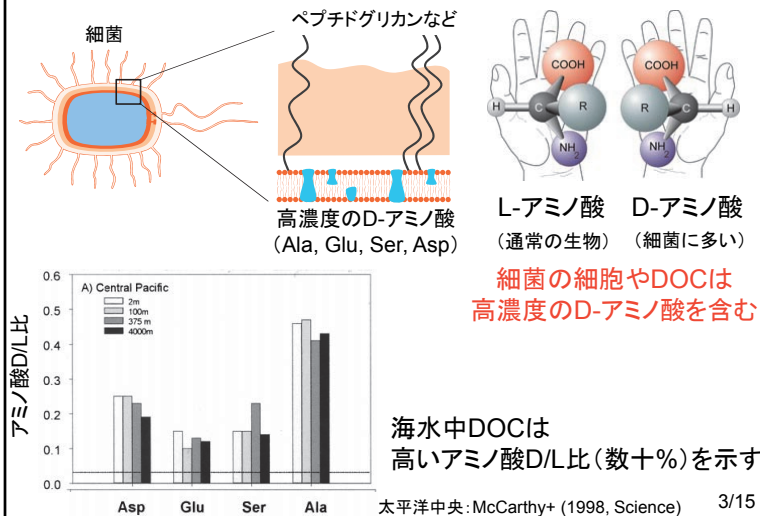
e.g., Tanoue+ (1995); McCarthy+ (1998); Fuhrman (1999); Ogawa+ (2001); Kaiser & Benner (2008); Yamaguchi & McCarthy (2018); etc..

・湖沼など陸水環境ではデータが限定的

➡ 湖沼では微生物炭素ポンプはどのくらい重要なのか？

2/15

アミノ酸鏡像異性体と細菌

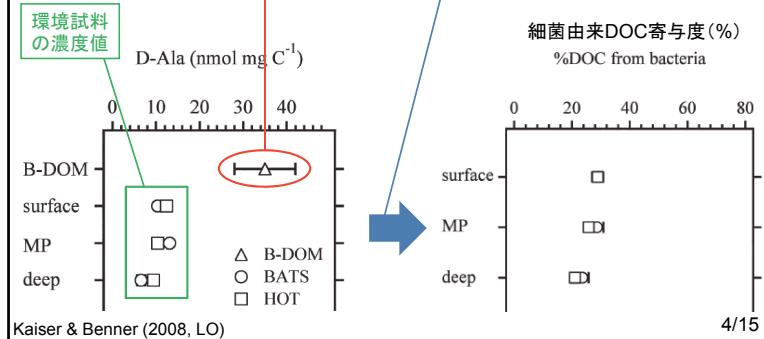


D-アミノ酸濃度による細菌由来DOCの寄与定量

天然細菌群集の培養実験で放出されたDOC中のD-アミノ酸の規格化濃度を100%の端成分とする

環境中DOC中の細菌寄与度の定量式

$$\text{Bacterial C (\%)} = \frac{\text{D-AA}_{\text{Sample}}}{\text{D-AA}_{\text{Bacterial DOC}}} \times 100$$



先行研究と本研究の目的

淡水湖沼DOCの先行研究(唯一)

Kawasaki+ (2013, AEM)

- ・霞ヶ浦DOCに、高濃度のD-アミノ酸を検出
- ・問題点: 湖沼細菌DOCの端成分が不明で、細菌寄与度の定量に課題
湖水濾過法の課題
HPLC蛍光法によるD-アミノ酸同定の課題

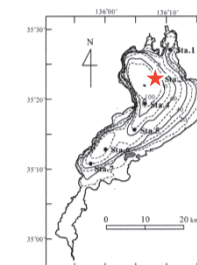
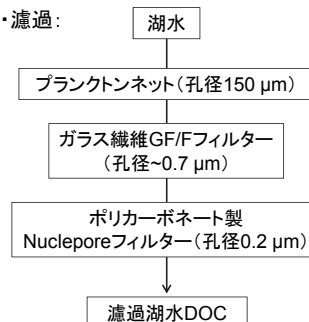
本研究の目的

1. 「D-アミノ酸バイオマーカーを用いたDOC中の細菌成分寄与度定量法」を、湖沼環境に適切に応用できるように改良する
 - A. 湖水濾過法、GC-MSによる分析手法の検討・改良
 - B. 琵琶湖の天然細菌を用いた培養実験で、端成分を制約
2. 琵琶湖DOC(難分解&準易分解)中の細菌由来成分の寄与を定量して、微生物炭素ポンプの重要性を調べる

5/15

試料①: 天然湖水DOCの採取

- ・中栄養～貧栄養湖では世界初のデータ
- ・採取地点: 琵琶湖北湖17B(今津沖中央)
表層(水深5m) & 深層(水深60m)
- ・採取時期: 2018年8月、9月、10月(成層期)
- ・濾過:



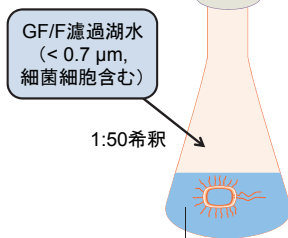
霞ヶ浦の先行研究(Kawasaki+ 2013)では、GF/F濾過のみだったが、本研究では0.2 μm濾過を行い、細菌細胞を除去したDOCを採取

6/15

試料②: 湖沼細菌DOCの端成分のための培養実験

- ・海水、地下水での実験を基本的に踏襲 Kaiser & Benner (2008, LO)
- ・中栄養～貧栄養湖では世界初のデータ Shen+ (2015, Biogeochem)

北湖17B表層(5m)で
2018年9月に採水・濾過



暗所・20℃で培養

- 0.2 μm濾過を行い、
- ・DOC濃度
 - ・アミノ酸濃度
 - ・アミノ酸D/L比を分析(27日目)

合成無機培地+炭素源(グルコース)
+窒素源(硝酸塩)+リン源(リン酸塩)

7/15

手法: GC-MSによるアミノ酸D/L比分析



使用機器: Agilent 7890A GC + 5975C MSD (シングル四重極)

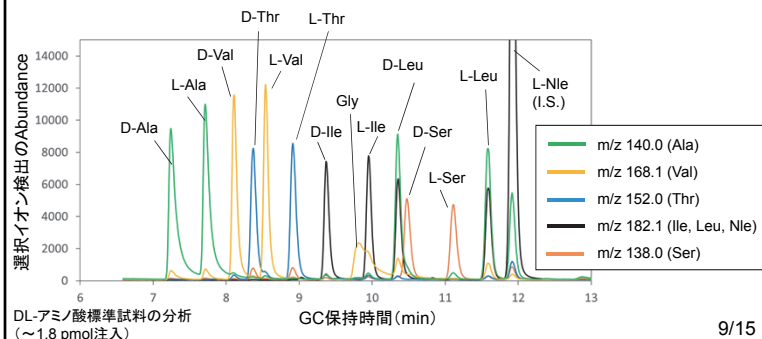
注入法: 温度プログラム気化(PTV)法

GCカラム: Agilent CP-Chirasil-L-Val(長さ25m, 内径0.25 mm, 膜厚0.12 μm)

8/15

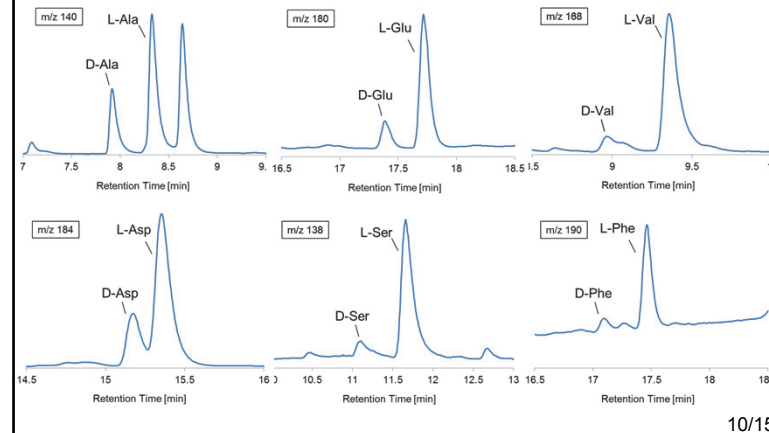
手法: GC-MSによるアミノ酸D/L比分析

- GC-MS分析の諸条件を最適化
- 従来のHPLC蛍光検出法による主要4種アミノ酸 (Ala, Glx, Asx, Ser)に加えて、さらに6種のアミノ酸 (Val, Thr, Ile, Leu, Phe, Tyr) のDL分離検出が可能
- 検出限界は注入量10fmol程度 (HPLC法と同等) で、湖水パルクDOC分析に充分な感度となった



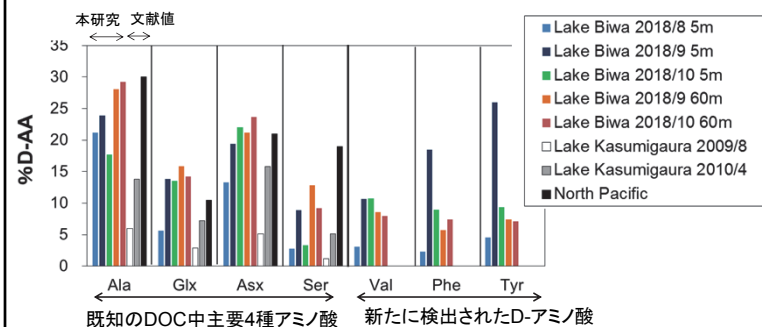
結果: 湖水DOC中アミノ酸のDL分離

2018年10月17B-60m試料のGC-MSクロマトグラム



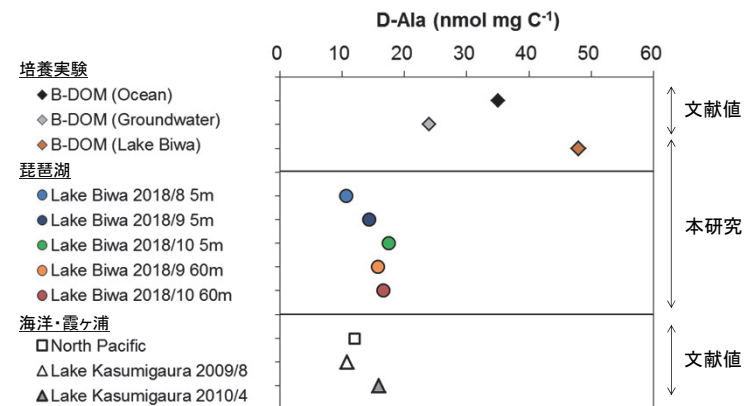
結果: アミノ酸D/L比

- 琵琶湖DOCは、全体的に霞ヶ浦DOCより高く、海洋遠洋域DOC並みのD/L比
- HPLC法でDOC中に未報告のD-アミノ酸を、新たに有意に検出



霞ヶ浦データ: Kawasaki+ (2013)
北太平洋データ: Kaiser & Benner (2005)

結果: DOC中のD-アミノ酸相対濃度

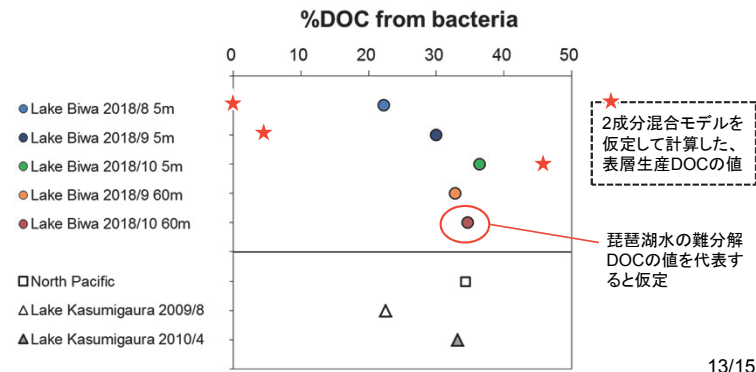


B-DOM (Ocean): Kaiser & Benner (2008)
B-DOM (Groundwater): Shen+ (2015)
North Pacific: Kaiser & Benner (2008)
霞ヶ浦: Kawasaki+ (2013)

12/15

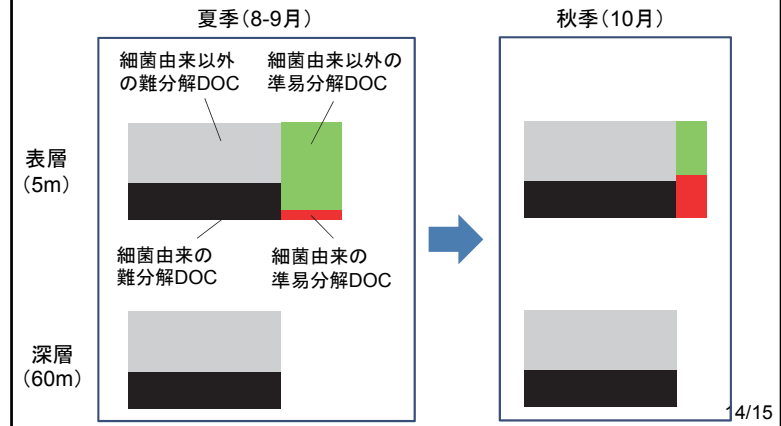
結果:DOC中細菌寄与度

- ・琵琶湖深層DOC(難分解DOC)では30-40%程度で、海洋遠洋や霞ヶ浦と近い値
- ・8-9月表層で生産・蓄積されたDOC(準易分解)では、細菌寄与度は20%以下
- ・10月の表層で生産・蓄積されたDOCでは、細菌寄与度は $47 \pm 20\%$



議論:細菌由来DOCの分布

- ・夏季表層の準易分解DOCの蓄積は、細菌以外(植プラ?)が主
- ・秋にかけて、細菌が生産したDOCが表層にも蓄積



まとめ

1. 本研究による成果

- ・GC-MS分析法、0.2 μm 濾過、微生物培養実験などにより、D-アミノ酸分析から湖DOC中の細菌寄与度を見積もるアプローチを新たに確立
- ・中栄養～貧栄養湖では世界初の、DOC中D-アミノ酸のデータ
- ・D-Alaから計算した細菌寄与度は、琵琶湖北湖の難分解DOCで30-40%程度、夏季表層の準易分解DOCでは20%以下
- ・湖沼でも、海洋と同程度に微生物炭素ポンプが働いている可能性

2. 今後の展望

- ・琵琶湖での深度分布の年間季節変動から、細菌由来DOCの消長を追跡
- ・河川流入と底質溶出に由来するDOC中のD-アミノ酸の分析