

# 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

滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・研究員 山口保彦

## 1. はじめに

琵琶湖など水圏の有機物動態・収支には、湖沼細菌によるDOMの生産・放出が、有機物動態・収支の鍵となるプロセスである可能性がある。例えば、細菌が活発にDOMを放出している状況では、細菌によるDOMの再利用が進むことで有機物の無機化が促進されたり、有機物の難分解化が進行されたりすることが考えられる。また、琵琶湖では近年のBODとCODの乖離から、難分解性DOMの濃度が増加している可能性が指摘されているが、難分解性DOMの生成源として細菌が重要である可能性がある。

海洋では、DOMの生産生物として細菌が量的に特に重要であることが近年分かってきて、「微生物炭素ポンプ」という概念が提唱されるに至った (Jiao et al., 2010 など)。しかし湖沼環境では、手法の制約から、細菌由来DOMに関する知見は非常に限られている。これまで湖沼環境で細菌由来DOMの研究が進んでいない理由の一つに、海洋で用いられてきた研究手法をそのまま応用することが難しいことが挙げられる。

海洋では様々な海域で、D-アミノ酸 (通常の生物が持つL-アミノ酸の鏡像異性体) など細菌特有の有機分子をバイオマーカーとして、DOMの生成源への細菌寄与度が調べられてきた (例えば McCarthy et al., 1998; Kaiser & Benner, 2008 など)。この定量法では、海洋遠洋域の微生物由来のDOMが、ある一定濃度の有機分子バイオマーカーを含むことを利用し、その値を100%の端成分として定量計算に用いている。淡水湖沼では、Kawasaki et al. (2013) が霞ヶ浦でD-アミノ酸を用いて細菌由来DOMの寄与定量を行っているのが唯一の報告となる。しかし、Kawasaki et al. (2013) の研究では、細菌寄与度の定量法や、D-アミノ酸の分析法など手法に課題が残っていた。湖沼などの陸水環境では、グラム陽性細菌が多いなど細菌群集組成が海洋と大きく異なるため、海洋と同じ定量計算法を用いられない可能性がある。また、湖沼中の有機物は、陸域由来の腐植物質を多く含むため、D-アミノ酸などの分析に際して、夾雑物を除いて正確に有機分子を同定する必要がある。

## 2. 本研究の目的

本研究では、「D-アミノ酸を有機分子バイオマーカーとした、水圏DOM中の細菌成分の寄与度定量」を、湖沼でも適用可能な手法として、世界で初めて開発・確立することを目的とした。

研究1年目の平成30年度にはまず、D-アミノ酸の化学分析技術を、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いて、湖沼のDOMにも適用できるように確立した。次に、琵琶湖の天然細菌を用いた培養実験により、湖沼の微生物由来DOMに含まれる有機分子バイオマーカーの濃度を制約し、定量のための端成分を確立した。さらに琵琶湖の湖水DOM中D-アミノ酸濃度の深度分布、季節変動を明らかにした。これにより、琵琶湖湖水DOMには、細菌由来DOMが20-40%程度と高い割合で寄与しており、

「微生物炭素ポンプ」が湖でも重要である可能性が示された。ただし、細菌由来DOMの生分解性や、湖外部からの流入の影響については知見が限られ、さらなる研究が必要となった。

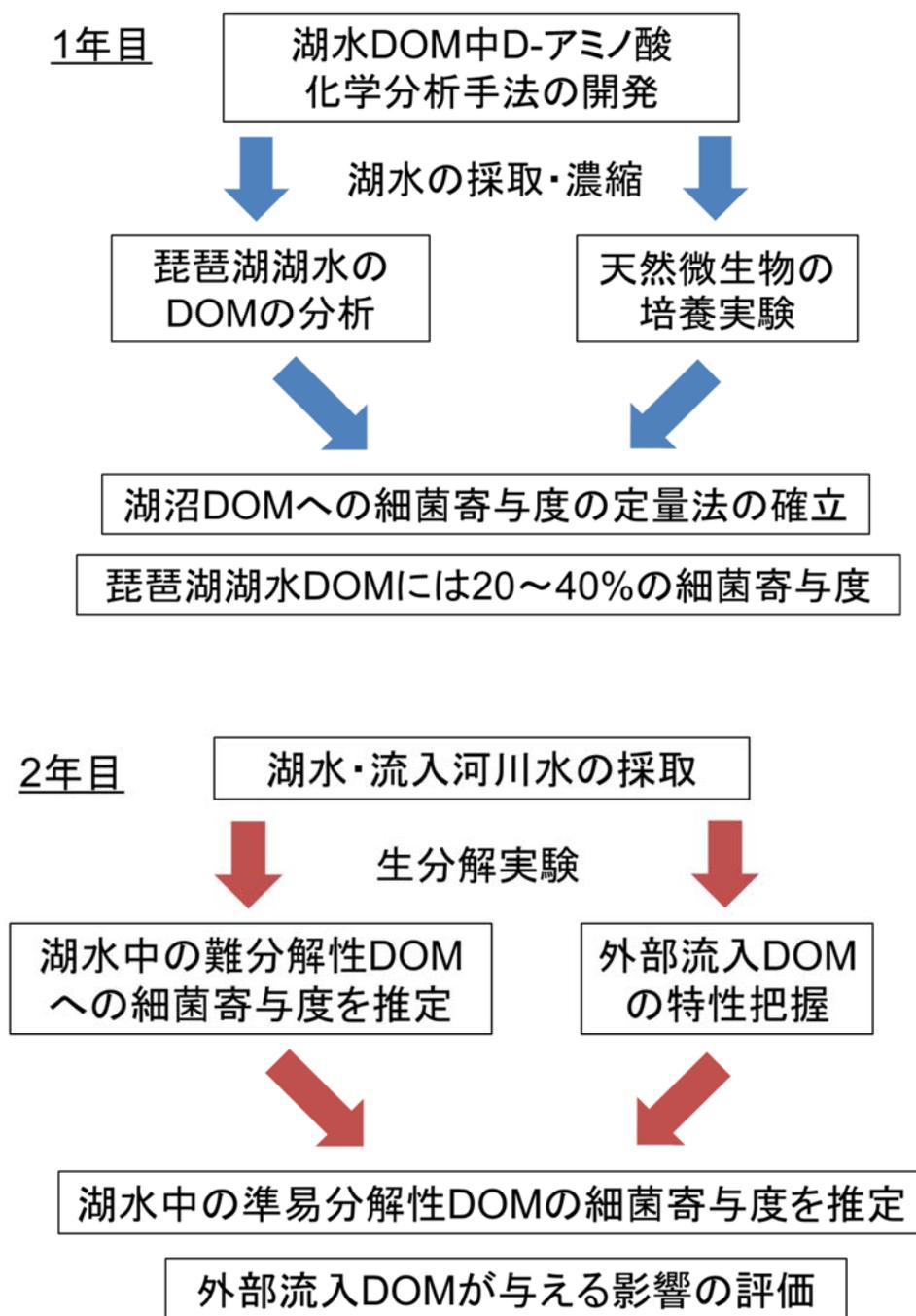


図1：本研究の1年目（平成30年度）の実施内容と主な成果（上）と、2年目（平成31年度/令和元年度）の実施内容（下）

研究2年目の平成31年度/令和元年度には、琵琶湖の湖水と、野洲川の河川水について、100日程度の長期間の生分解実験を行い、そのDOM中D-アミノ酸濃度の変化を追跡した。これにより、細菌由来DOMの生分解性と外部からの流入について知見を得て、琵琶湖における細菌由来DOMの動態について考察した。野洲川は、琵琶湖流入河川のうち、流域面積が最大で、溶存有機炭素（DOC）濃度が中程度であるため（Maki et al. 2010）、琵琶湖流入河川水の値をある程度代表できると考えられる。

なお、堆積物間隙水DOMも湖外部からの流入として重要である可能性があり、D-アミノ酸濃度定量を試行したが、湖水や河川水に比べて試料量が限られたことで、現状の手法では分析前処理時のブランクの影響が大きく、高精度なD-アミノ酸定量が難しかった。そのため、本報告書では堆積物間隙水については記載しない。

### 3. 試料と手法

#### 3-1. 水試料の採取

琵琶湖北湖17Bサイト（今津沖中央：35° 23.36' N, 136° 07.18' E）の表層（水深5 m）において、2018年8月27日に、琵琶湖環境科学研究センターの調査船「びわかぜ」のバンドーン採水器を用いて、琵琶湖湖水を採水した。琵琶湖への流入河川の代表として、野洲川の河口付近の河川水を、2019年8月9日に服部大橋でステンレス製バケツを用いて採水した。採取した湖水と河川水は、高密度ポリエチレン製容器（アルカリ・酸洗浄済）に入れて、実験室に持ち帰った。

#### 3-2. 湖水と河川水を用いた有機物生分解実験

琵琶湖湖水はまず、採水後にプランクトンネット（150  $\mu$ mメッシュ、超純水で洗浄済）を用いて150  $\mu$ m以上の粒子とプランクトンを除去した。次に、佐藤ほか（2016）で報告されている湖水の生分解試験と同様に、試料水を2L ポリカーボネート製容器（酸洗浄済）に分注して密栓した後、暗所20°Cの恒温室で振盪（60 rpm）し、有機物の生分解実験を行った。2L ポリカーボネート製容器は、生分解実験の試料数分を準備し、1本ずつ2L全量を濾過に用いた。分解実験試料は、1、3、9、16、23、30、53、101日目で恒温室から取り出し、濾過を行った。

野洲川河川水についても、琵琶湖湖水と同じ手法で有機物の生分解実験を行った。生分解実験試料は、7、12、26、53、102日目で恒温室から取り出し、濾過を行った。

#### 3-3. 試料の濾過

湖水と河川水は、採取当日に、ナイロン製プランクトンネット（150  $\mu$ mメッシュ、超純水で洗浄済）、Whatmann GF/Fフィルター（孔径0.7  $\mu$ m、450°Cで5時間加熱済）、ポリカーボネート製Nucleporeフィルター（孔径0.2  $\mu$ m、酸洗浄済）を用いて、三段階の濾過で粒子状有機物と細菌細胞を除去し、DOM試料（<0.2  $\mu$ m）を採取した。有機物生分解実験の試料水は、GF/Fフィルター（同上）とNucleporeフィルター（同上）の二段階の濾過で、DOM試料を採取した。アミノ酸分析用のDOM試料は、ポリプロピレン製容器（アルカリ・酸洗浄済）に入れて、-30°Cで冷凍して保存した。

#### 3-4. 有機物の分析

DOC濃度は、TOC計（島津製作所TOC-L）を用いて、濾過した当日に測定した（e. g.,

早川ほか, 2019など)。

生分解実験試料は、琵琶湖湖水は3, 16, 30, 53, 101日目の試料について、野洲川河川水は102日目の試料について、それぞれD-アミノ酸濃度を定量した。アミノ酸分析用の試料はまず、内標準物質 (L-ノルロイシン : L-Nle) を添加した後、凍結乾燥でDOM成分を濃縮した。濃縮試料をリアクティブバイアルに移してアスコルビン酸を添加した後、ヘッドスペースを窒素ガスで置換した状態で、6N塩酸で液相加水分解 (110°C、20時間) を行った。加水分解で遊離体として放出されたアミノ酸について、イオン交換樹脂による精製と、TFA-iPr誘導体化、液々抽出による精製を行った (Takano et al., 2010; McCarthy et al., 2013; Yamaguchi & McCarthy, 2018; Veuger et al., 2005)。

誘導体化したアミノ酸について、キラルカラム (Agilent CP-Chirasil-L-Val : カラム長25 m、内径0.25 mm、膜厚 0.12  $\mu\text{m}$ ) を装着したGC-MS (Agilent 7890A GC - 5975C MSD) を用いて、D-アミノ酸、L-アミノ酸それぞれについて、選択イオンモニタリングモードで、各アミノ酸の特徴的なフラグメントイオンを用いて定量した (Yamaguchi & McCarthy, 2018の手法を改変)。酸加水分解と誘導体化におけるラセミ化ブランクは、Kaiser et al. (2005)とYamaguchi & McCarthy (2018) の手法に基づいて補正した。

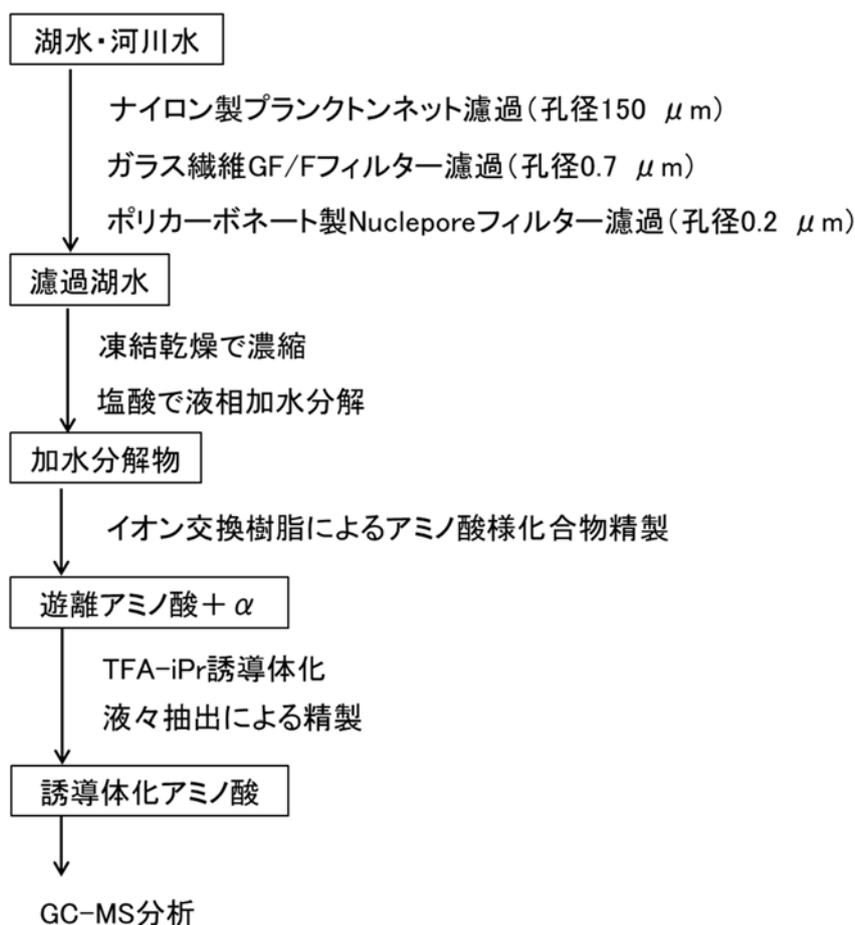


図2 : 湖水DOM中のD-アミノ酸の分析法の流れ

### 3-4. D-アミノ酸濃度を用いた細菌由来DOMの寄与定量

D-アミノ酸濃度は、Kaiser and Benner (2008) に基づき、同試料のDOC濃度で規格化し、有機炭素量あたりの値とした。細菌由来DOMの寄与定量は、Kaiser and Benner (2008) に基づき、培養実験DOM試料の規格化D-アラニン (D-Ala) 濃度を100%として、DOM試料の規格化D-Ala濃度から定量した。

湖水の難分解性DOMと準易分解性DOMの値は、二成分モデルを用いたMaki et al. (2010) の手法を改変して用いて、計算した。琵琶湖湖水の生分解実験の101日経過後の値を難分解性DOMの代表値として、琵琶湖湖水試料と琵琶湖湖水の生分解実験試料の値を、難分解性DOMと各試料の準易分解性DOMの和として仮定した。野洲川河川水については、琵琶湖湖水を用いた微生物培養実験の値をそのまま適用できない可能性があるため、本報告書では計算結果は示さない。

## 4. 結果

### 4-1. 生分解に伴うDOC濃度とD-アミノ酸濃度の変化

図3に、琵琶湖湖水および野洲川河川水の生分解実験における、DOC濃度の変化を示した。生分解実験前から100日程度経過後にかけて、琵琶湖湖水は1.16 mgC/Lから0.79 mgC/Lに、野洲川河川水は1.18 mgC/Lから0.84 mgC/Lへと、それぞれDOC濃度が同程度減少した。

図4に、琵琶湖湖水および野洲川河川水の生分解実験における、規格化D-Ala濃度の変化を示した。比較のために、平成30年度に報告した微生物培養実験試料と琵琶湖湖水試料の値と、文献値（海洋と地下水の微生物培養実験、北太平洋DOM、霞ヶ浦DOM）も示した。

琵琶湖湖水の生分解実験では、生分解実験前（琵琶湖DOM 2018/8:5m）の値（22.3 nmol/mgC）から3日目にかけて値が大きく上昇し、その後は日数の経過に伴って値は徐々に減少した。101日目には、生分解実験前の値よりも低い値（18.3 nmol/mgC）となった。

野洲川河川水は、生分解実験前と102日経過後は近い値となった（それぞれ、12.1 および 14.6 nmol/mgC）。どちらの値も、琵琶湖湖水試料よりも低い値となった。

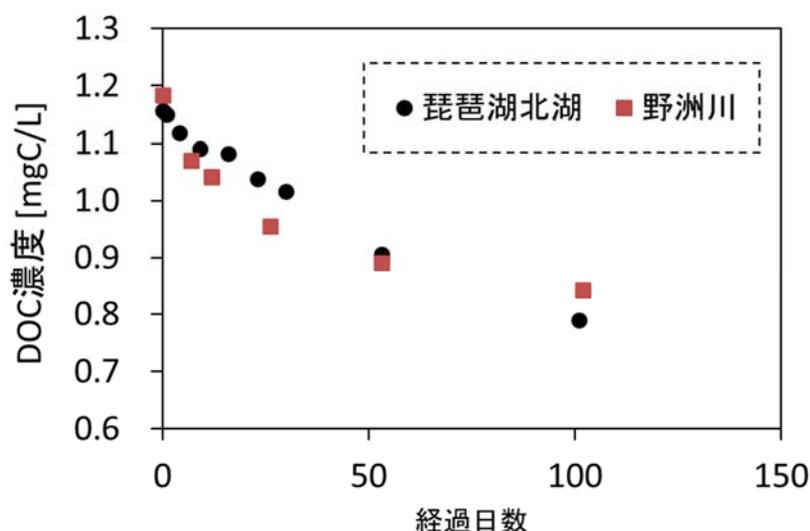


図3：琵琶湖湖水（丸印）および野洲川河川水（四角印）の生分解に伴うDOC濃度の変化

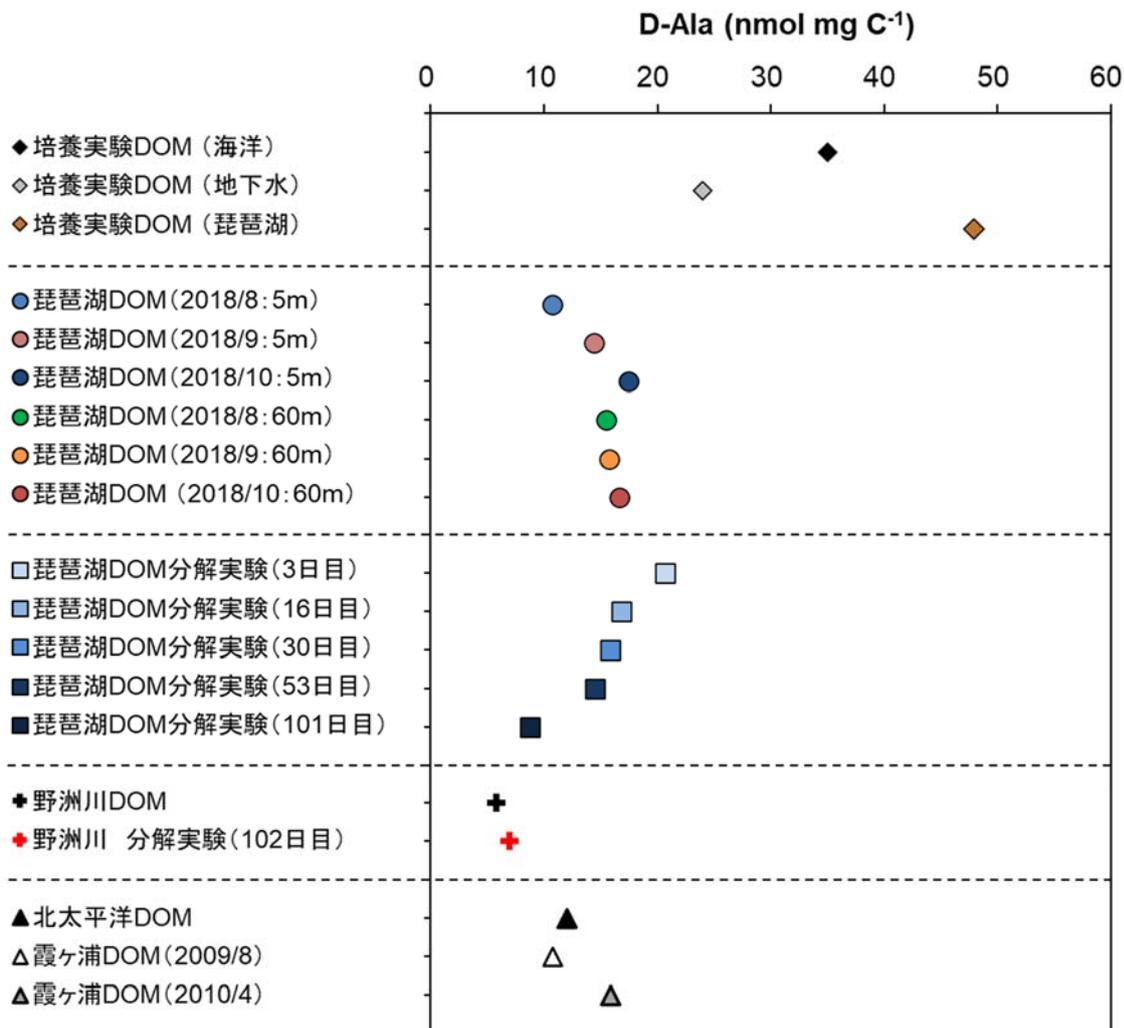


図4：琵琶湖湖水（丸印）および野洲川河川水（黒十字）と、それぞれの生分解実験試料（四角印：琵琶湖分解実験、赤十字：野洲川分解実験）の、DOC濃度で規格化したD-Ala濃度。培養実験DOM（海洋）と北太平洋DOMの値（それぞれ、黒菱形印と黒三角印）はKaiser and Benner（2008）より、霞ヶ浦DOMの値（白および灰色三角印）はKawasaki et al.（2013）より、培養実験DOM（地下水）の値（灰菱形印）はShen et al.（2015）より、それぞれ引用した。

#### 4-2. D-アミノ酸規格化濃度を用いた細菌寄与度推定

図5に、琵琶湖湖水と生分解実験試料における、規格化D-Ala濃度から計算した、DOM全体への炭素ベースでの細菌寄与度を示した（それぞれ丸印、四角印）。さらに、生分解実験101日目の値を難分解性DOMの代表値と仮定して計算した、それぞれの試料に含まれる準易分解性DOMへの細菌寄与度も示した（星印）。全ての水深60mの琵琶湖湖水試料、生分解実験3日目の試料は、計算上では100%を超えた値となったため、100%として示した。比較のために、文献値（北太平洋DOM、霞ヶ浦DOM）も示した。霞ヶ浦DOMの計算には、琵琶湖の微生物培養実験の値を、細菌由来DOMの端成分として用いた。

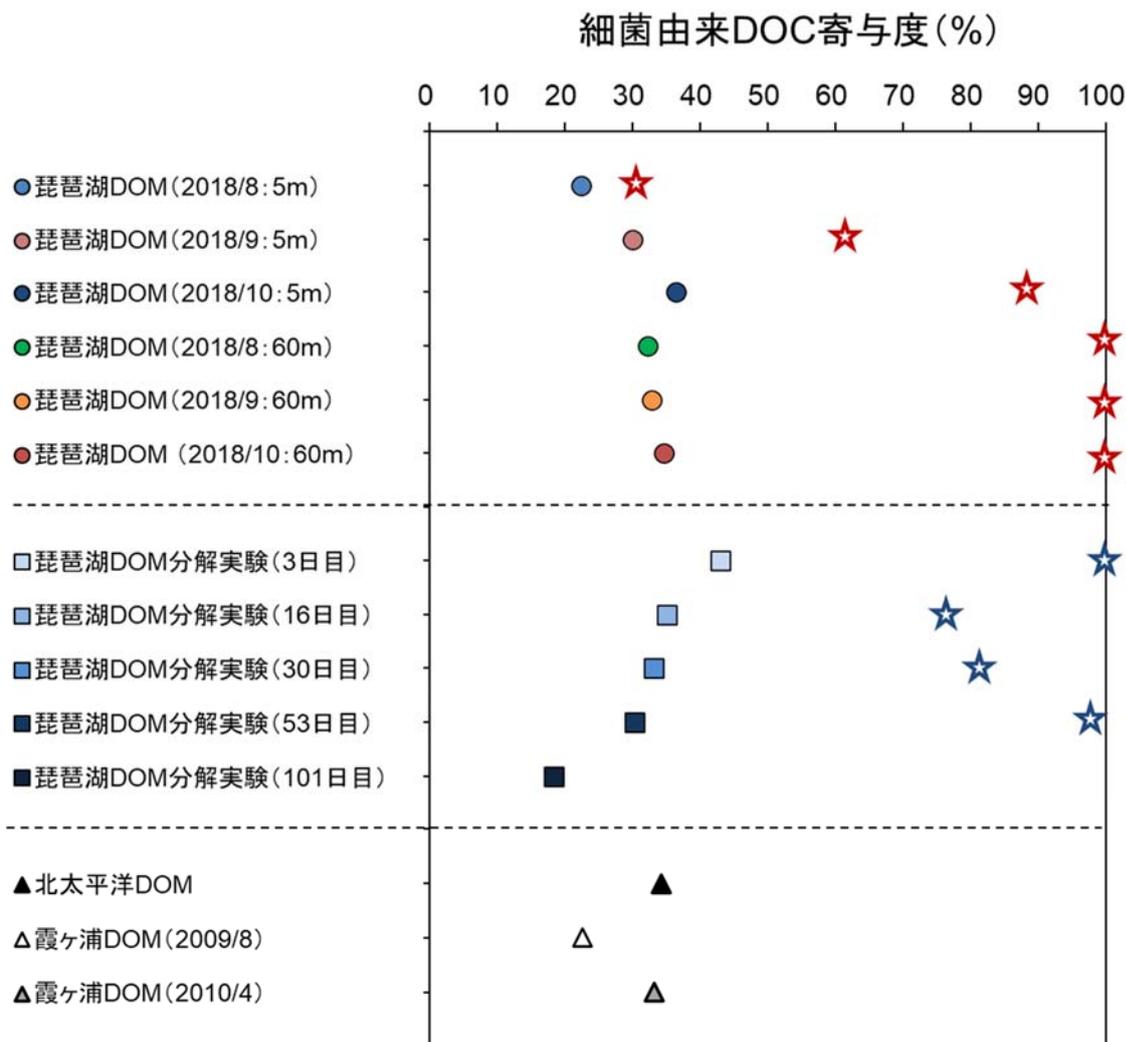


図5：琵琶湖湖水（丸印）と、琵琶湖湖水の生分解実験試料（四角印）の、規格化D-Ala濃度から計算された、DOMへの炭素ベースの細菌寄与度(%)。琵琶湖DOM生分解実験101日目の値を難分解性DOMの代表値と仮定して計算した、それぞれの試料に含まれる準易分解性DOMへの細菌寄与度を、星印で示した。北太平洋DOM（黒三角印）はKaiser and Benner（2008）の、霞ヶ浦DOM（白および灰色三角印）はKawasaki et al.（2013）の値をそれぞれ用いた。

## 5. 議論

### 5-1. 細菌由来DOMの生分解性

琵琶湖湖水の生分解実験で、DOM中の細菌由来DOC寄与度が、生分解前から3日目に増加しことは、まず実験初期に細菌由来DOC以外の基質（藻類由来DOCや粒子状有機物）を湖水中細菌が分解して、細菌由来DOCを放出したことが原因と考えられる。

「DOM中の細菌由来DOC寄与度が、生分解実験の初期数日にまず増加する」というパターンは、Kawasaki et al.（2013）の霞ヶ浦湖水のDOM生分解実験でも、細菌による二次生産速度の一時的な増加を伴って報告されており、上記の考察を支持する。

琵琶湖湖水の生分解実験の3日目から101日目にかけては細菌由来DOC寄与度が減少していったことと、計算された準易分解性DOMの細菌由来DOC寄与度が各試料の

DOM全体や難分解性DOMの値よりも高かったことは、琵琶湖湖水の細菌由来DOMは、生分解性が比較的高いことを意味する。このことは、琵琶湖では、細菌による放出と分解を介したDOMの再利用が活発に起きており、細菌由来DOMは、細菌生産増大や栄養塩再生など生態系を駆動する重要なプロセスの基礎になっていることを示唆する。

琵琶湖湖水の生分解実験の16～53日目の細菌由来DOM寄与度が、生分解前よりも高いことは、琵琶湖北湖5mの9～10月の細菌由来DOM寄与度が8月（＝生分解実験の元試料）よりも高いことと整合的である。つまり、琵琶湖表層では、「細菌由来DOM寄与度が比較的低い（＝藻類等の寄与度が高い）DOMがまず夏季に蓄積し、秋季にかけてそのDOMを分解した細菌由来のDOMに徐々に入れ替わっていく」というプロセスが起きていることが考察される。

細菌由来DOM寄与度の分布は、琵琶湖深層DOMの由来にも示唆を与える。本研究の1年目（平成30年度）では、「2018年10月の琵琶湖北湖60mの試料の値が難分解性DOMを代表できる」と仮定して準易分解性DOMの値を計算したが、生分解実験を行った今年度の結果からは、この仮定には問題があったことが明らかになった。つまり、夏季～秋季にかけての琵琶湖深層のDOMは、Maki et al. (2010)で仮定されていたような「循環期に深層にもたらされたDOMが生分解を受けて難分解性DOMが残存したもの」ではなく、準易分解性の細菌由来DOMの新たな付加を受けていることが考察される。Thottathil et al. (2013)では、湖表層からの沈降粒子有機物が細菌によって分解されるに伴い、腐植様DOM蛍光成分が琵琶湖深層で夏季～秋季にかけて増加することを見出している。腐植様蛍光として捉えられていた成分が細菌由来DOMであり、琵琶湖深層のDOM全体への寄与が量的に重要な可能性がある。

ただし、本研究で今年度得られた準易分解性DOMの細菌由来DOM寄与度の推定値そのものは、いくつかの試料で100%を超えており、今回の計算の仮定（生分解実験101日目の値が難分解性DOMの値を代表できる等）によって過大評価している可能性が高い。101日目ではまだ生分解が停止しきっておらず、日数がさらに経過した生分解実験試料（生分解がほぼ停止してほぼ難分解性DOMのみだけになった状態）の分析により、より現実的な値を得られる可能性がある。

## 5-2. 流入河川由来DOMの寄与

野洲川河川水DOMの規格化D-A1a濃度の値が、琵琶湖湖水の生分解実験101日目と近い値だったことは、「琵琶湖湖水の難分解性DOMに、流入河川由来DOMが半分程度寄与している」とする佐藤ら(2016)の推定や、「琵琶湖湖水の難分解性DOMの安定炭素同位体比は、流入河川水のDOMと近い値を示す」とするMaki et al. (2010)の結果と矛盾しない。本研究のD-A1aの値だけからは、河川水由来DOMの寄与を独自に制約することはできないが、今後、他のD-アミノ酸の濃度分布等の解析から制約をさらに進められる可能性がある。

一方で、野洲川河川水DOMは、102日間の生分解実験を経ても、規格化D-A1a濃度は同程度だったことは、野洲川河川水ではDOM全体と細菌由来DOMの生分解性に大きな差がないことを意味する。つまり、野洲川河川水DOMの準易分解成分は、琵琶湖湖水DOMの準易分解成分と比べて、規格化D-A1a濃度が有意に低い（図4）。このことは、少なくとも本研究の対象地点である琵琶湖北湖沖帯では、分解されるDOMに河川水の寄与は小さいことを示唆する。

## 6. 研究のまとめと今後への示唆

湖沼の細菌由来DOMの動態や物質循環における役割については、海洋での研究の進展に比べて、知見が極めて限られていた。本研究では、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターによる濾過、GC-MSを用いた正確なD/L-アミノ酸の分析、天然湖水中細菌を用いた培養実験を、それぞれ湖沼DOMのD-アミノ酸分析について初めて適用したことで、D-アミノ酸バイオマーカーを用いた細菌由来DOMの寄与度定量を、湖沼環境でも適用可能なアプローチとして世界で初めて確立した。本研究で開発した手法は、他の湖沼にも応用可能であり、今後様々な環境の湖沼で細菌由来DOMの動態解明が進むことが期待される。

本研究ではさらに、湖水（夏季の琵琶湖北湖沖帯表層）と流入河川水（野洲川）の長期間の生分解実験を行い、D-アミノ酸バイオマーカーを分析したことで、細菌由来DOMの生分解性と、流入河川の影響を評価できた。琵琶湖湖水の細菌由来DOMは、湖水DOM全体と比べて生分解性が高いことが明らかになった。つまり、琵琶湖では、細菌による放出と分解を介したDOMの再利用が活発に起きており、細菌由来DOMは、細菌生産増大や栄養塩再生など生態系を駆動する重要なプロセスの基礎になっていることが示唆される。一方で、流入河川水DOMは、湖水中での準易分解成分としての寄与は小さいが、湖水中の難分解性成分には寄与している可能性が示された。

琵琶湖における細菌由来DOMの詳細な空間分布や季節変動の調査や、湖水中難分解性DOMへの流入河川の寄与度の定量、堆積物間隙水DOMの影響の評価は、今後の課題となった。今後、多種類のD-アミノ酸について数多くの試料をハイスループットで分析できる手法や、少量の試料から低いブランクで分析できる手法を検討することが必要になる。また、本研究の生分解実験の結果の一般性を確認するためには、他の地点（琵琶湖北湖深層、琵琶湖南湖、野洲川以外の河川等）や、夏季以外の季節の試料について、同様に生分解実験とD-アミノ酸バイオマーカーの分析を行うことが重要になる。

## 7. 参考文献

- Jiao N., Herndl G. J., Hansell D. A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S. W., Kirchman D. L., Weinbauer M. G., Luo T., Chen F. and Azam F. (2010) Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 593-599.
- Kaiser K. and Benner R. (2005) Hydrolysis-induced racemization of amino acids. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 318-325.
- Kaiser K. and Benner R. (2008) Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 53, 99-112.
- Kawasaki N., Komatsu K., Kohzu A., Tomioka N., Shinohara R., Satou T., Watanabe F. N., Tada Y., Hamasaki K., Kushairi M. R. M. and Imai A. (2013) Bacterial contribution to dissolved organic matter in eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7160-7168.
- McCarthy M. D., Hedges J. I. and Benner R. (1998) Major Bacterial Contribution to Marine Dissolved Organic Nitrogen. *Science*. 281, 231-234.
- McCarthy M. D., Lehman J. and Kudela R. (2013) Compound-specific amino acid

- $\delta^{15}\text{N}$  patterns in marine algae: Tracer potential for cyanobacterial vs. eukaryotic organic nitrogen sources in the ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 103, 104-120.
- Maki K., Kim C., Yoshimizu C., Tayasu I., Miyajima T. and Nagata T. (2010) Autochthonous origin of semi-labile dissolved organic carbon in a large monomictic lake (Lake Biwa): carbon stable isotopic evidence. *Limnology* 11, 143-153.
- 佐藤祐一, 岡本高弘, 早川和秀, 大久保卓也, 小松英司 (2016) 琵琶湖における難分解性有機物の起源: 発生源における生分解試験とボックスモデルによる推計. *水環境学会誌* 39, 17-28.
- Shen Y., Chapelle F. H., Strom E. W. and Benner R. (2015) Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122, 61-78.
- Takano Y., Kashiya Y., Ogawa N. O., Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids: application to biogeochemical samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2317-2323.
- Thottathil S. D., Hayakawa K., Hodoki Y., Yoshimizu C., Kobayashi Y. and Nakano S. (2013) Biogeochemical control on fluorescent dissolved organic matter dynamics in a large freshwater lake (Lake Biwa, Japan). *Limnol. Oceanogr.* 58, 2262-2278.
- Veuger B., Middelburg J. J., Boschker H. T. S. and Houtekamer M. (2005) Analysis of  $^{15}\text{N}$  incorporation into D-alanine: A new method for tracing nitrogen uptake by bacteria. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 230-240.
- Yamaguchi Y. T. and Mccarthy M. D. (2018) Sources and transformation of dissolved and particulate organic nitrogen in the North Pacific Subtropical Gyre indicated by compound-specific  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of amino acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 220, 329-347.

## 謝辞

本研究は、平成31年度（令和元年度）の琵琶湖・淀川保全機構「水質保全研究助成」の支援を受けました。アミノ酸のGC-MS分析にあたっては、総合地球環境学研究所の陀安一郎教授と由水千景博士、および京都大学生態学研究センターの木庭啓介教授に協力いただきました。ここに記して、関係者の皆さまに感謝いたします。