学　術

# 東北地方太平洋沖地震で津波浸水した農地土壌における微生物群集の長期的な変化

浅野亮樹[1]，早川　敦[2]，福島　淳[2]，中井　裕[1]，志村洋一郎[2]，
阿部みどり[2]，稲元民夫[2]，河田　和[2]

1　新潟食料農業大学食料産業学部
2　秋田県立大学生物資源科学部

## 要　約

東日本大震災の津波浸水が農地微生物群集へ与えた長期的な影響の解析のため，非浸水水田（Unflooded: UF），短期間浸水した水田（Short term: ST），長期間浸水した水田（Long term: LT）および長期間浸水して圃場整備せずに作付けを行った水田（Long term and cultivate: LTC）における土壌細菌群集構造を津波浸水後５年間解析した．５年後においては門レベルおよびProteobacteria門の綱レベルの解析ではUFと浸水土壌に特徴的な違いは見られなくなった．しかし，浸水土壌では硫黄酸化細菌（SOB）の割合はUFよりもわずかに高い傾向が見られた．このため，土壌微生物群集に対する津波浸水の影響は浸水５年後においてもわずかながら残存していると考えられた．また，SOBは津波浸水した土壌微生物群集の回復を計るために５年以上の長期間にわたり有用な指標になりうる可能性が示唆された．

## 緒　言

2011年に発生した東北地方太平洋沖地震は日本における観測史上最大の地震であり，それに伴い発生した津波は広い地域に被害を及ぼした[1,2]．農業は津波被害地域の主要な産業の一つであり，津波による農業施設の破壊，農地の海水および底泥による汚染による被害は甚大であった[3]．海水の浸入は作物への生育に直接影響する塩類濃度の上昇などを引き起こす[4,5]．また津波は，作物の生育に間接的に影響する土壌微生物にも多大な影響を与えた．土壌微生物（例えば真正細菌）は有機物の分解や無機物の酸化還元など物質循環に主要な役割を果たしている[6]．硝化細菌は$NH_4^+$を$NO_3^-$へと酸化し，硫黄酸化細菌（SOB）は硫化物を$SO_4^{2+}$へと酸化する．海水にもこれらの微生物は存在するが，その構成は大きく異なる．浸水した農地の今後の適切な利用のため，これらの情報は非常に重要であるにもかかわらず，大規模な津波による浸水が土壌微生物群集構造に与える中・長期的な影響は報告がなされていない．

我々は長期間の津波による微生物群集への影響を調査するため，津波後５年間にわたりに浸水した農地土壌の真正細菌群集構造について分子生物的手法を用いて解析を行い，非浸水土壌との比較を行った．これらの結果については個別に報告をしているが[7~9]，今回はこれらを総括して報告する．

## 材料および方法

### 土壌試料の採取

土壌試料は宮城県東松島市に存在する水田から2012年から2016年にかけて採取した．津波の浸水を

免れた水田（unflooded field: UF1），２週間浸水した水田（short term: ST2）および２ヶ月間浸水した水田（long term: LT3）から採取した．2014年以降はこれに加え，LTの近辺でLTより早期から水稲栽培を再開した２つの水田（long term and cultivation: LTC4, LTC5）からも試料を採取した．各水田の表層１－３㎝から試料を採取してプラスチックチューブに入れ，氷上で運搬した．研究室に移送後，物理化学分析に用いる試料は４℃で，遺伝子解析に用いる試料は－30℃で解析まで保管した．試料は水田の３か所から採取し，平均した値を結果とした．

物理化学分析

亜硝酸（$NO_2^-$），硝酸（$NO_3^-$），硫酸（$SO_4^{2-}$），リン酸（$PO_4^{3-}$）および塩素（$Cl^-$）イオン濃度は陰イオンクロマトグラフィ（ICS-2100, Thermo Fisher Scientific K.K.）を用いて測定した．アンモニウムイオン（$NH_4^+$）濃度はオートアナライザー（QuA Atro2-HR BLTEC）を用いて測定した．pHと電気伝導度（EC）はそれぞれpHメーター（B-212, HORIBA）およびECメーター（B-173, Horiba）を用いて測定した．

細菌群集構造の解析

土壌試料0.5gからFastDNA Spin Kit for Soil（キューバイオジーン）を用いてDNAを抽出した．これを鋳型にして，真正細菌の16S rRNA遺伝子に特異的な8F/518Rプライマーペアを用いて増幅を行った[10,11]．次世代シークエンサーを用いた解析のため，プライマーには454 GS Jr.システム（Roche）に特異的なアダプター配列を連結させた[12,13]．PCRには１×Go Taq Green Master Mix（Promega）を用いた．PCR増幅産物はゲル電気泳動を行い特異的な断片長を切り出して精製した後，GS Junior Titanium emPCR Kit（Lib-L; Roche）を用いてエマルジョンPCRを行った．エマルジョンビーズを精製した後，454 GS Jr.システムを用いてシークエンス解析を行った．

得られたシークエンスデータはRibosomal Database Project (RDP) Pyrosequencing Pipeline（http://pyro.cme.msu.edu/）およびData Bank of Japan（DDBJ）のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) (http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html）を用いて解析した．

## 結果および考察

**表１**に土壌試料の物理化学的特性を示す．津波浸水１年後においては，STおよびLTでEC，$SO_4^{2-}$-SおよびCl⁻がUFと比べて100倍以上の値であり，無機態窒素も10倍程度の値で，$NH_4^+$-Nの割合が高く$NO_3^-$Nの割合が低かった．２年目以降STは計測したすべての項目でUFとの違いは見られなかったものの，LTおよびLTCは５年目においても$SO_4^{2-}$-Sの濃度が高く，$NO_3^-$-Nが低い傾向が見られた．以上より津波浸水した土壌の物理化学特性には，浸水の５年後においても津波浸水の影響が見られるものの，その影響は非常に小さくなっていると考えられた．

**表１　土壌試料の物理化学的特性**

| | $NH_4^+$-N | $NO_2^-$-N | $NO_3^-$-N | $Cl^-$ | $SO_4^{2-}$-S | $PO_4^{3-}$-P | EC | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (mg/kg d.w.[1]) | | | | | | (ms/cm) | |
| 2012 | | | | | | | | |
| UF1 | 0.0 | 0.04 | 0.16 | 1 | 4 | 0.18 | 2 | 6.08 |
| ST2 | 33.1 | 0.00 | 1.16 | 973 | 117 | 0.00 | 243 | 5.91 |
| LT3 | 8.2 | 0.00 | 0.35 | 1062 | 498 | 0.09 | 242 | 7.02 |
| 2013 | | | | | | | | |
| UF1 | 1.7 | 0.00 | 12.3 | 17 | 25 | 0.00 | 7 | 6.17 |
| ST2 | 5.4 | 0.00 | 14.0 | 35 | 15 | 3.35 | 7 | 5.67 |
| LT3 | 25.4 | 0.00 | 2.5 | 2342 | 2368 | 0.00 | 209 | 4.00 |
| 2014 | | | | | | | | |
| UF1 | 25.4 | 0.13 | 20.8 | 12 | 7 | 0.00 | 4 | 5.02 |
| ST2 | 0.7 | 0.04 | 4.7 | 8 | 11 | 0.04 | 3 | 5.56 |
| LT3 | 3.6 | 0.00 | 1.7 | 43 | 228 | 0.00 | 24 | 4.36 |
| LTC4 | 0.7 | 0.00 | 5.0 | 141 | 75 | 0.00 | 13 | 5.37 |
| LTC5 | 0.5 | 0.00 | 6.1 | 73 | 53 | 0.00 | 9 | 5.73 |
| 2015 | | | | | | | | |
| UF1 | 3.0 | 0.01 | 5.6 | 7 | 8 | 0.06 | 3 | 5.40 |
| ST2 | 2.8 | 0.05 | 2.8 | 8 | 4 | 0.19 | 2 | 5.89 |
| LT3 | 3.3 | 0.01 | 5.6 | 235 | 95 | 0.02 | 24 | 5.59 |
| LTC4 | 4.4 | 0.00 | 0.7 | 65 | 56 | 0.00 | 10 | 5.15 |
| LTC5 | 9.9 | 0.00 | 3.7 | 48 | 70 | 0.00 | 12 | 5.46 |
| 2016 | | | | | | | | |
| UF1 | 5.3 | 0.08 | 10.3 | 6 | 6 | 0.17 | 2 | 5.52 |
| ST2 | 7.3 | 0.07 | 11.9 | 8 | 6 | 0.19 | 2 | 5.65 |
| LT3 | 3.9 | 0.06 | 3.5 | 19 | 36 | 0.10 | 4 | 5.71 |
| LTC4 | 14.2 | 0.36 | 4.6 | 8 | 36 | 0.17 | 6 | 6.03 |
| LTC5 | 5.4 | 0.07 | 2.6 | 8 | 13 | 0.08 | 2 | 5.90 |

[1] d.w.; 乾物重量

浅野ら［7-9］のデータを基に作成

細菌群集構造の解析

**図１**に土壌試料の真正細菌の門レベルの群集構造を示す．UFにおいては調査した期間を通して概ねAcidobacteria門とProteobacteia門が優占していた．一方で津波浸水直後の土壌においては，

Acidobacteriaは減少しProteobacteriaが極端に優占化していた．その後STでは2014年以降，LTおよびLTCでは2015年以降はUFと類似した傾向を示した．

全研究期間を通して優占していたProteobacteria門について綱レベルの群集構造を**図２**に示す．UFのProteobacteriaはalfa，beta，gammaおよびdeltaサブグループで構成されていた．一方で浸水した土壌ではUFと比較してgammaおよびepsilonサブグループが増加する傾向がみられた．また，また，LTでは2013年までzetaサブグループに属する*Mariprofundus*属に近縁な配列が検出された．zetaサブグループに近縁な配列は全て海洋から検出が報告され，海洋性のバクテリアマットから分離された*Mariprofundus ferrooxydans*のみが分離株として報告されている[14]．

津波浸水した土壌では$SO_4^{2-}$Sの値が高く$NO_3^-$Nの割合が低かった．そこでこれらの循環に関与するSOBおよび亜硝酸酸化細菌（NOB）についても解析を行った（**図３，図４**）．なお，アンモニア酸化細菌は調査した年や試料採取場所について変動が見られたものの，一定の傾向はみられなかった．津波浸水１年後の土壌においては，STおよびLTはUFと比較してNOBの割合が低く，SOBの割合が高かった．

さらにSOBについては耐塩性の*Halothibacillus*属が約半数を占めていた．*Halothiobacillus*属に属する細菌は全て化学合成独立栄養性で，0.86MのNaCl中でも生育できる耐塩性のSOBである[15]．その後2012年にはSTはUFと差が見られなった．LTおよびLTCでも徐々にNOBは増加し，SOBは低下していき，さらに2016年には*Halothibacillus*属のSOBも検出されなくなった．しかしながら，LTおよびLTCではSOBはUFよりもわずかに高い傾向が見られた．Aoyagiら[16]は東日本大震災で陸上に堆積した海洋性堆積物を保温すると，$NO_3^-$Nの減少と$SO_4^{2-}$Sの増加が見られ，更に微生物群集はSOBが優占的になることを報告した．Iharaら[17]もまた東日本大震災で陸上に堆積した海洋性堆積物はSOBが優占的であったことを報告している．これらより，津波浸水とそれに伴う堆積物の供給は土壌中のSOBを優占化すると考えられた．

また本研究では作物栽培が津波浸水土壌に与える効果を確認するため，LTより早期から作物栽培を再開した水田（LTC）でも調査を行ったが，物理化学特性や微生物群集構造には差はみられなかった．

以上より，東日本大震災で津波浸水した土壌の細菌群集構造は，浸水直後にはNOBの低下，SOBの

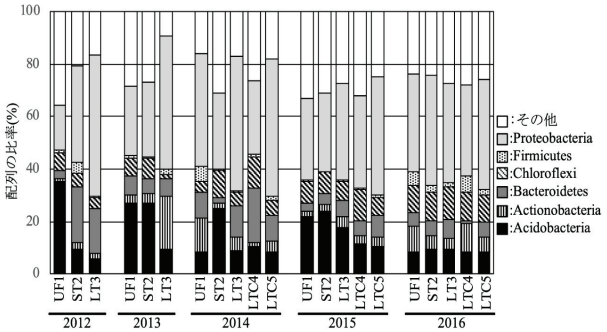


**図１　土壌試料の門レベルの細菌群集構造**

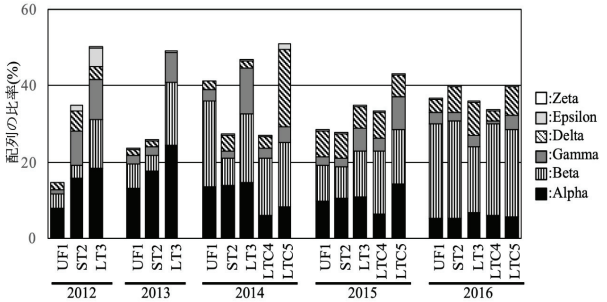


**図２　土壌試料の綱レベルの細菌群集構造（Proteobacteria門）**

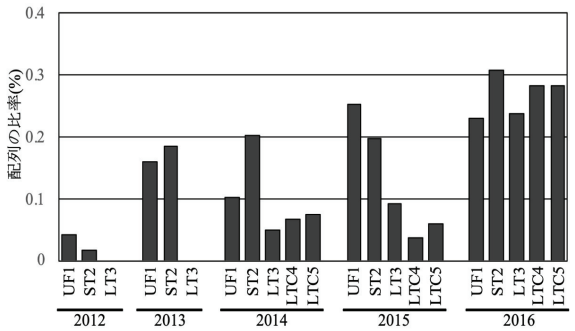


**図３　土壌試料の亜硝酸酸化細菌（NOB）の割合**

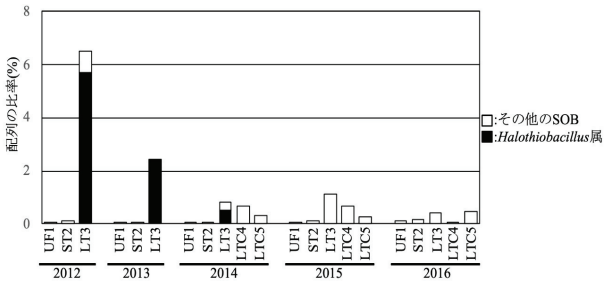


**図４　土壌試料の硫黄酸化細菌（SOB）の割合**

増加，海洋性の*Mariprofundus*属や耐塩性SOBの*Halothiobacillus*属が検出されるなど，浸水を免れた土壌とは異なる特徴を示した．これらの特徴は浸水５年後にはほぼ見られなくなったものの，SOBの割合はわずかに高い傾向が見られた．このため，津波浸水の影響は浸水５年後においてもわずかながら残っていると考えられた．また，SOBは津波浸水した土壌微生物群集の回復を計るために，５年以上の長期間にわたり有用な指標になりうる可能性が示唆された．

## 謝　辞

土壌試料を提供していただいた渡辺農園，三浦農園，本田農園，浅野農園にこの場を借りて謝意を示す．また，454 GS Jr.システムによるシークエンシングは秋田県立大学資源生物学部バイオテクノロジーセンターで実施した．

## 引用文献


1）Maeda T, Furumura T, Sakai S, Shinohara M: Significant tsunami observed at ocean-bottom pressure gauges during 2011 off the Pacific coast of Tohoku Earthquake. Earth Planets Space, 63, 803-808 (2011)

2）Mimura N, Yasuhara K, Kawagoe S, Yokoki H, Kazama S: Damage from the great east Japan earthquake and tsunami-a quick report. Mitig Adapt Strateg Glob Change, 16, 803-818 (2011)

3）Guo H.D, Chen Y, Fen Q, Lin QZ, Wang F: Assessment of damage to buildings and farms during the 2011 M 9.0 earthquake and tsunami in Japan from remote sensing data. Chinese Sci Bull, 56, 2138-2144 (2011)

4）Kume T, Umetsu C, Palanisami K: Impact of the December 2004 tsunami on soil, groundwater and vegetation in the Nagapattinam district. India J Environ Manage, 90, 3147-3154 (2009)

5）McLeod MK, Slavich PG, Irhas Y, Moore N, Rachman A, Ali N, Iskandar T, Hunta C, Caniago C: Soil salinity in Aceh after the December 2004 Indian Ocean tsunami. Agr Water Manage, *97*, 605-613 (2010)

6）Richey JE: C, N, P, and S cycles: major reservoirs and fluxes. In: Bolin B, Cook RB (eds) The major biogeochemical cycles and their interactions. John Wiley and Sons, New York, (1983)

7）Asano R, Nakai Y, Kawada W, Shimura Y, Inamoto T, Fukushima J: Seawater inundation from the 2011 Tohoku tsunami continues to strongly affect soil bacterial communities one year later. Microb Ecol, *66* (3), 639-646 (2013)

8）浅野亮樹，早川敦，阿部みどり，志村洋一郎，小林弥生，稲元民夫，福島淳：東日本大震災で津波浸水した農地土壌の５年後における微生物群集解析. 秋田県立大学ウェブジャーナル, 4, 147-152 (2017)

9）Asano R, Hayakawa A, Fukushima A, Y, Nakai Y, Shimura Y, Abe M, Inamoto T: Changes in bacterial communities in seawater-flooded soil in the four years after the 2011 Tohoku tsunami in Japan. J Mar Sci Technol, 8 (2) (2020)

10）Baker GC, Smith JJ, Cowan DA: Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods, *55*, 541-555 (2003)

11）Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Conrads G: Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol, *43* (10) (2005)

12）Binladen J, Gilbert MTP, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R, Willerslev E: The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. PLoS One, 2:e197 (2007)

13）Wegner KM, Shama LNS, Kellnreitner F, Pockberger M: Diversity of immune genes and associated gill microbes of European plaice Pleuronectes platessa, Estuar. Coast Shelf Sci, *108*, 87-96 (2012)

14）Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C, Moyer CL: A novel lineage of Proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. PLoS One 2:e667 (2007)

15）Kelly DP, Wood AP Genus *Halothiobacillus*. In: Garrity GM (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2, 2nd edn, Part B. Springer, New York (2005)

16）Aoyagi T, Kimura M, Yamada N, Navarro RR, Itoh H, Ogata A, Sakoda A, Katayama Y, Takasaki M, Hori T: Dynamic transition of chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria in response to amendment with nitrate in deposited marine sediments. Front Microbiol, *6*, 426 (2015)

17）Ihara H, Hori T, Aoyagi T, Takasaki M, Katayama Y: Sulfur-Oxidizing Bacteria Mediate Microbial Community Succession and Element Cycling in Launched Marine Sediment. Front Microbiol, 8, 152 (2017)


### プロフィール

浅野　亮樹

新潟食料農業大学　食料産業学部　食料産業学科講師

2007年東北大学大学院農学研究科　博士課程後期三年　修了（農学博士）

以降，農研機構契約研究員，秋田県立大学流動研究員などを経て，2018年より現職。