

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14904

研究課題名(和文) 温暖化ガス亜酸化窒素からの生物電気化学的窒素固定技術の開発

研究課題名(英文) Development of bioelectric nitrogen fixation system from nitrous oxide, global warming gas

研究代表者

片山 新太 (Katayama, Arata)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号：60185808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜酸化窒素ガスは、温暖化ガスであると同時にオゾン層破壊物質であり、生物窒素固定反応がその除去に有効であることが見いだされていた。本研究代表者らは、嫌気性脱塩素微生物群の脱塩素活性を電気化学的に高めることに成功するとともに、同微生物群には窒素固定微生物群が存在することを見いだしていたことから、電気化学的な生物窒素固定の促進の有無を明らかにすることを目的として、本研究を行った。その結果、窒素固定は生物電気化学的に促進できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nitrous oxide is known as global warming gas as well as the ozone-degrading substance. The recent study suggested the biological nitrogen fixation can also incorporate nitrous oxide into ammonia by the biological reduction. Based on our previous findings showing the bioelectrochemical enhancement of dechlorination of pentachlorophenol and anaerobic nitrogen-fixing microorganisms in the dechlorination consortium, we have conducted this project to find whether biological nitrogen fixation can be accelerated electrochemically for removal of nitrous oxide. The results suggested the successful enhancement of nitrogen fixation bio-electrochemically.

研究分野：微生物生態工学

キーワード：生物電気化学 細胞外電子伝達 窒素固定 亜酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素ガス( $N_2O$ )は、温暖化ガスであると同時にオゾン層破壊物質であり、人間活動の増大に伴って、その大気中濃度は増加し続けている。そのため、 $N_2O$ の除去・発生低減は地球環境保全上の緊急課題となっている。 $N_2O$ は、窒素肥料が、農耕地で硝化または脱窒される過程の中間代謝産物として発生する(Zumft と Kroneck, *Adv Microb Physiol* 52, 107, 2007)。硝酸イオンを還元する脱窒細菌に、 $N_2O$ の還元能力の無い(一部の *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Azoarcus* 等)ものが存在し、 $N_2O$ の発生源となっている。また、硝化反応を担うアンモニア酸化細菌(*Nitrosomonas* 等)は、同時に硝酸還元能力も有しているが、 $N_2O$ 還元能力が欠落しているため、硝化過程でも $N_2O$ が発生する。 $N_2O$ 除去には、 $N_2O$ 還元酵素を持つ微生物を用いたバイオテクノロジーを利用することが、最も安価で省エネルギーな処理ができるとして、その開発が待望されている。近年、 $N_2O$ が共生系窒素固定細菌 *Bradyrhizobium japonicum* の有する  $N_2O$ 還元酵素(*nosZ*)によって窒素まで還元されることを利用した、農耕地の  $N_2O$ 発生低減化技術が提案されている(Itakura ら *Nature Climate Change* 3, 208, 2013)。一方、生物電気化学培養系を用いた細胞外電子の供与による  $N_2O$ 除去能を持つ脱窒微生物群の集積が報告され、 $N_2O$ 除去バイオリクターとして期待されている(Desloover ら *ES&T*, 45, 10557, 2011)。しかし、これらは、全世界エネルギー消費の1%に達する空中窒素固定で得た窒素肥料(Boys, *もったいない学会WEB学会誌*, 3, 26, 2010)を、単に窒素ガスとして大気中に戻すだけになってしまっている。

## 2. 研究の目的

本研究代表者らの研究グループは、複数の脱ハロゲン嫌気微生物群の集積を行っており、一部は生物電気化学的な脱塩素活性化に成功している(Zhang ら、*Biores Technol* 164, 232, 2014)。一方、脱ハロゲン化微生物群には、 $N_2O$ 還元酵素(Sanford ら、*PNAS*, 109, 10709, 2012)や窒素固定能(Lee ら、*AEM*, 75, 7551, 2009)が分布することが知られている(ただし、単離菌がまだ少ないので十分わかっているわけではない)。これらの結果は、脱ハロゲン化微生物群には、 $N_2O$ を窒素ガス  $N_2$ に還元し、更にアンモニア( $NH_3$ )固定できる能力がある可能性を示している。しかし、これまで脱ハロゲン化微生物における *nosZ* と窒素固定能の共存を調べた研究例は無い。そこで、これまでに本研究代表者らが集積・単離した脱ハロゲン嫌気微生物(群)等を用いて、 $N_2O$ を  $NH_3$ として固定する能力の有無を解明し、そ

の反応の制御方法を開発する研究を計画した。

## 3. 研究の方法

本研究では、固体腐植物質ヒューミンを電子伝達物質として利用した生物電気化学培養系の中で、嫌気脱ハロゲン化微生物群における  $N_2O$ 還元能および  $N_2$ 固定能の有無、およびその電気化学的制御条件を明らかにする。本研究は2年間の研究計画からなっている。

### (1) 生物窒素固定反応の高活性条件の生理学的解析

固体腐植ヒューミン依存性のペンタクロロフェノール脱塩素活性を持つ鎌島水田土壌にマンニトールを添加して培養し、その後 Ashby 培地に対して10%の割合で植継ぎをおこなって、嫌気性生物窒素固定微生物の集積培養物を得た。これに、固体腐植ヒューミンを加え、アセチレン還元活性による窒素固定能力の評価を行った。また、ケルダール分解(セレン酸ナトリウム、濃硫酸、濃リン酸、過酸化水素水で380分)を行って有機態窒素をアンモニア態窒素に変換してネスラー法で比色定量した。アセチレン還元活性は、培養物をヘリウム置換した20ml嫌気バイアルに入れて、そこにアセチレンを100 $\mu$ L加えて30日1週間培養し、生成したエチレンをFIDガスクロマトグラフで定量することによって評価した。

### (2) 固体腐植ヒューミン依存性の窒素固定微生物の解析

固体腐植ヒューミン添加によってアセチレン還元活性が高まった培養物または元の水田土壌を $10^{-7}$ まで希釈して、その100 $\mu$ Lを Ashby 寒天培地に広げて、嫌気チャンパー(窒素ガス95%、水素ガス5%)内で室温培養してコロニーを形成させ、それをストリークで純化した。純化後に、固体腐植ヒューミンにより窒素固定能力の高まる分離菌を調べる(アセチレン還元活性およびケルダール分解による全窒素測定)とともに、16SrRNA遺伝子を解析して分類学的位置を決定した。窒素固定能試験の際には、固体腐植ヒューミンに加えて、アルドリッチ腐植酸、アントラキノン-1,6-ジスルホン酸(AQDS)を添加した条件でも試験した。16SrRNA遺伝子は、シーケンシングプライマーとして27fと1492rを用いて常法により配列を決定し、分類学的位置を決定した。

### (3) 窒素固定活性の速度論的解析

アセチレン還元活性試験における経時的なエチレン増加の評価によって、窒素固定の速度論的評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 生物窒素固定反応の高活性条件の生理学的解析

鎌島水田土壤にマンニトールを加えて培養したものを、一部抜きとしてアセチレン還元活性を測定したところ、固体腐植ヒューミンを含む培養物の方が、窒素固定能力が高かった。Ashby 培地に植え継ぐことによって、オリジナル培養物に土壤 1 : 水 1 の割合で含まれていた土壤の割合が減少することに伴って、固体腐植ヒューミンを添加する系と添加しない系をそれぞれ 2 系統作成した。固体腐植ヒューミンを添加・無添加の両方の培養物を一部抜き取って、20mL バイアルで窒素固定活性を固体腐植ヒューミン共存下および非共存下で調べたところ、固体腐植ヒューミン存在下で高い窒素固定活性を示した。この活性化には、細胞外電子伝達と単に培養条件をより低い酸化還元電位として窒素固定反応に好適条件となっているという二つのメカニズムが考えられた。そこで、システイン塩酸塩、硫化ナトリウム、塩化チタンの 3 種の還元剤を加えてみたところ、促進効果が無かったことから、固体腐植ヒューミンの促進効果は、細胞外電子伝達による物であることが示唆された。

##### (2) ヒューミン依存性の窒素固定微生物の解析

炭素源としてギ酸、乳酸、マンニトールなどを用いて、嫌気プレート上に形成したコロニーの純度をストリークにより高め、その窒素固定能試験、固体腐植ヒューミンによる活性化試験、および 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分類学的位置の推定を行った。

全部で 8 つの培養物が得られた。その 16SrRNA 遺伝子配列から、4 株は Clostridium 属菌であること、残りの 4 株は Paenibacillus 属菌であることがわかった。アセチレン還元活性を調べたところ、アルドリッチ腐植酸では活性化されなかったが、AQDS および固体腐植ヒューミンで活性化される菌株があり、

それは Clostridium 属菌であった。これをさらにケルダール分解窒素の増加でも確認し、窒素固定活性が固体腐植ヒューミンで高まる Clostridium 属細菌の存在を明らかにした。

##### (3) 窒素固定活性の速度論的解析

アセチレン還元活性は、炭素源を添加しないでヘリウム中窒素ガスを唯一の窒素源として添加して培養し評価している。懸濁培養物中のマンニトールを測定したところ、1 ヶ月培養後も当初添加量の 9 割以上残っていたことから、アセチレン還元活性は、培養物中に残っているマンニトールのために炭素源律速にはなっておらず、大気中にスパイクする窒素固定反応律速になっていると考えられる。窒素固定反応は、2 日後から 7 日後まで、ほぼ直線的にエチレン濃度が高まった。これより、アセチレン還元活性試験では、微生物の増殖が殆ど無いゼロ次反応として取り扱うことができることを示唆している。

以上より、亜酸化窒素および窒素ガスを還元固定する Clostridium 属細菌の反応を固体腐植ヒューミンによって活性化できることを明らかにした。今後、土壤環境中および単離菌中で亜酸化窒素固定化遺伝子の分布と発現を調べることが重要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Zhixing Xiao, Takanori Awata, Dongdong Zhang, and Arata Katayama (2016) Denitrification of *Pseudomonas stutzeri* coupled with CO<sub>2</sub> reduction by *Sporomusa ovata* with hydrogen as electron donor assisted with solid-phase humin, Journal of Bioscience and Bioengineering, 122, 307-313.

[学会発表](計 3 件)

1. 出口世太郎、粟田貴宣、片山新太  
(2016.3.16-18) 生体電気化学システムによる微生物硝酸還元反応の促進と制御、第50回日本水環境学会年回(2015年度)アスティとくしま(徳島県徳島市)2016年3月16日 - 18日
2. Z. Xiao, D. Zhang, C. Zhang, T. Awata, A. Katayama (2016.2.15-17) Solid-phase humin: A “new” natural material with redox mediating property for the anaerobic biotransformation of pollutants, Second International symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-2), 15-17 February 2016, Nagoya University, Nagoya, Japan
3. Zhixing Xiao, Takanori Awata, Dongdong Zhang, Chunfang Zhang, Zhiling Li, and Arata Katayama (2015.10.1-5) Humin-assisted bioelectrochemical system for the enhanced denitrification of *Pseudomonas stutzeri* (JCM20778), The 5<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Electrochemistry and Technologies, 1-5 October 2015, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

〔図書〕(計 件)

該当無し

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.er.imass.nagoya-u.ac.jp/AKLab\\_J/](http://www.er.imass.nagoya-u.ac.jp/AKLab_J/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

片山新太 Katayama, Arata (名古屋大学未来材料・システム研究所、教授)

研究者番号：68185808

### (2)研究分担者

粟田貴宣 Awata, Takanori (名古屋大学未来材料・システム研究所、助教)

研究者番号：80724905