

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12616

研究課題名（和文）集積培養装置の革新によるnosZ clade IIタイプN₂O還元細菌の獲得研究課題名（英文）Exploration and isolation of nosZ clade II type N₂O-reducing bacteria by a novel enrichment device

研究代表者

寺田 昭彦（Terada, Akihiko）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：30434327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：高い温室効果とオゾン層破壊能を示す亜酸化窒素（N₂O）の削減に向け、高効率なN₂O消費が可能なnosZ clade IIタイプのN₂O還元細菌の獲得を目指した。集積培養技術により、nosZ clade IIタイプのAzospira sp.の単離に成功した。この細菌は、効率的なN₂O還元が可能であり、酸素への耐性があることを示した。さらに、Azospira sp. I13株のゲル包括固定を行った結果、微好気条件下でもN₂O還元活性を示した。非脱窒性N₂O還元細菌の獲得に向け、Anammoxリアクターに生息する細菌群を評価した結果、Chloroflexi門の細菌群が有望であることを示した。

研究成果の概要（英文）：To mitigate emission of N₂O, known as a highly-potent greenhouse and ozone-depleting gas, this study aimed at enriching and isolating nosZ clade II type N₂O-reducing bacteria as promising N₂O consumers with high efficiency. By developing a novel enrichment technology, Azospira sp., affiliated with nosZ clade II type, was successfully isolated. One of the strains in the bacterium, Azospira sp. strain I09, showed N₂O-reducing activity in the presence of oxygen. Immobilization of Azospira sp. strain I13 into alginate gel allowed consumption of N₂O even under microaerophilic conditions. To explore non-denitrifying N₂O-reducing bacteria, an anammox reactor was subjected to the microbial community analysis. The analysis underpinned that the phylum Chloroflexi, detected with a relatively high abundance following anammox bacteria, was a potential candidate as non-denitrifying N₂O-reducing bacteria.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：亜酸化窒素（N₂O） N₂O還元細菌 nosZ clade IIタイプ 集積培養装置 アンプリコンシーケンス 呼吸活性 動力学的解析

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素の 265 倍の温室効果ガスを有すると共に、21 世紀のオゾン層破壊の最大の原因物質の 1 つとして知られている亜酸化窒素 (N_2O) は、自然界、農耕地、排水処理システムをはじめとする工業プロセスにおける窒素変換により排出されている。近年の産業活動の高まりにより、大気中の N_2O 濃度が上昇していると共に、今後さらに N_2O 排出量が増大することが懸念されている。特に、工業プロセスにおいて主要な N_2O 排出起源として知られている排水処理プロセスはその排出量の統計が過小評価されており、 N_2O の排出抑制が強く求められるようになってきている。

排水処理システムにおいて、 N_2O は主に生物反応槽で硝化・脱窒と呼ばれる微生物反応の副生成物・中間生成物として排出される。 N_2O 生成は微生物反応のみならず、非生物的反応により生成することもあり、複数の生成経路が報告され (Schreiber et al. 2012)、抑制手法の削減が困難である。一方で、 N_2O は N_2O 還元酵素を有する微生物、主に細菌により N_2 に還元することが可能である。したがって、 N_2O 還元を担う細菌群 (N_2O 還元細菌) を利用することができれば、 N_2O 排出量の削減が期待できる。しかしながら、 N_2O 還元細菌の生理生態に関する理解は未だに進んでおらず、更なる検討が必要である。

本研究では、このような背景を鑑み、 N_2O 還元細菌の集積培養が進み、高効率な細菌群が多様に獲得できれば、より効率的に N_2O 削減技術に進めることが出来るのではないかと考えた。特に近年では、 N_2O 還元酵素をコードする機能遺伝子 (*nosZ*) が大きく 2 つに分類され (Sanford et al. 2012)、それぞれ clade I、clade II タイプと呼ばれている。*nosZ* clade II タイプの N_2O 還元細菌は、(1) N_2O に対する親和性が高い (Yoon et al. 2016)、(2) 従来の脱窒細菌が有する亜硝酸還元酵素を保有しない非脱窒性の N_2O 還元細菌が存在する (Graaf et al. 2014) ことが知られている。つまり、効率的に N_2O を還元でき、かつ脱窒細菌のように N_2O を生成、場合によっては蓄積してしまう懸念が払拭できるという点で、

nosZ clade II タイプは期待できる。このような *nosZ* clade II タイプの N_2O 還元細菌の生理生態に関する理解を深めることができれば、有用種の選定、排水処理施設における環境条件での N_2O 還元性能の評価、 N_2O の削減技術の開発へと、継ぎ目無く研究を進めることが可能となる。

そこで本研究は、排水処理施設で効率的に N_2O を消費し、 N_2O 削減に寄与できる高機能な N_2O 還元細菌の獲得に向け、集積培養装置の改良を行い、獲得した N_2O 還元細菌の生理学的特性を明らかにした。また、阻害物質として知られる酸素への曝露が N_2O 還元細菌の活性低下と回復に及ぼす影響を包括的に評価した。さらに、*nosZ* clade II タイプの N_2O 還元細菌の更なる探索のため、嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) 反応を担うバイオフィルム中における微生物叢と N_2O の消費活性評価を行った。

2. 研究の目的

1. で示した課題に対し、本研究では以下の 5 点に取り組んだ。

- 2.1. 集積培養装置の改良による高効率な N_2O 還元細菌の獲得
- 2.2. 単離された N_2O 還元細菌の動力学的および生理学的評価
- 2.3. 単離された N_2O 還元細菌の酸素耐性の評価
- 2.4. N_2O 還元細菌のゲル包括固定とモデル化
- 2.5. Anammox リアクター中に生息する N_2O 還元細菌の機能と活性評価

3. 研究の方法

3.1. 集積培養装置の改良による高効率な N_2O 還元細菌の獲得

N_2O の効率的な利用が可能な *nosZ* clade II の未培養細菌の集積・単離に向け、ガス透過膜を用いた集積培養装置の改良を行った。この集積培養装置は、ポリウレタンとポリエチレンからなる中空状のガス透過膜の束をカラムに投入し、 N_2O ガスを中空系の内側から外側に連続的に供給する。中空状のガス透過膜の外側には N_2O を消費可能な細菌群が付

着、増殖し、バイオフィームが形成される。バルク液には有機物を含む培養液が連続的に供給され、電子受容体である N_2O と電子供与体である有機物が、ガス透過膜上の細菌群に対向拡散の方式で供給される。これまでの集積培養装置の課題として、装置への酸素混入が挙げられた。そこで、この装置の前段に水を充填したカラムを設置することにより、酸素の混入を防ぐことを試みた。ガス透過膜上に集積された細菌群は段階的希釈、寒天培地への塗布を経て単離・培養を行った。単離された細菌群は 16S rRNA 遺伝子を標的とするプライマーを用いて、塩基配列を解析することにより同定を行った。さらに、*nosZ* clade I, clade II のプライマーセットを適用することにより、*nosZ* clade I, clade II 遺伝子の有無を判定した。同様に、窒素化合物の変換に関連する他の酵素の有無をその他のプライマーセットを用いて明らかにした。

3.2. 単離された N_2O 還元細菌の動力学的および生理学的評価

単離した N_2O 還元細菌の評価として、微小電極を適用した呼吸活性システムを用いて、 N_2O に関連する動力学的パラメータの算出を行った。この呼吸活性システムは、微量の培養液で N_2O 消費に関する動力学的な解析が可能なユニークな装置である。 N_2O に関連する動力学的パラメータとして、最大比増殖速度、 N_2O に対する半飽和定数を算出した。対象とする細菌群は、*nosZ* clade I タイプとして、*Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *nosZ* clade II タイプとして単離した *Azospira* sp. を N_2O 還元細菌として選定し、比較を行った。

3.3. 単離された N_2O 還元細菌の酸素耐性の評価

酸素存在下では、 N_2O 還元酵素は阻害を受け、 N_2O 還元性能が低下する。その低下の度合いや、酸素曝露後の N_2O 還元活性の回復の傾向を明らかにするため、3.2. で前述した呼吸活性システムを用いて評価を行った。具体的には、 N_2O が溶解した細菌懸濁液に酸素を

供給し、 N_2O と酸素濃度を連続的にモニタリングし、 N_2O の消費速度を時系列的に解析した。得られた N_2O 濃度プロファイルより、酸素への阻害定数などの算出を行った。

3.4. 単離された N_2O 還元細菌のゲル包括固定とモデル化

3.2. および 3.3. の解析結果より、特に N_2O 還元ポテンシャルが高い *Azospira* sp. strain I13 を選出し、この細菌群を球状のアルギン酸ゲルに包括固定化した。様々な直径のアルギン酸ゲルを用意し、酸素存在下での N_2O 還元特性を評価した。ゲルが有する厚みにより、酸素濃度の勾配がゲルの深さ方向で生じるため、ゲル中心部では酸素が枯渇する嫌気部位が生じる。これにより、バルク液の酸素濃度に関わらず、ゲル内に嫌気部位を創製させ、 N_2O 還元を促進させるコンセプトを検証した。前述した呼吸活性システムを用い、酸素濃度と N_2O 濃度をモニタリングした。また、球座標をベースとした N_2O 還元に関する反応-拡散モデルを構築し、ゲル包括固定化を用いた N_2O 還元のコンセプトに対する理論的な考察を行った。

3.5. Anammox リアクター中に生息する N_2O 還元細菌の機能と活性評価

亜硝酸イオン、硝酸イオンを電子受容体として利用しない非脱窒性 N_2O 還元細菌の生理生態に迫るため、Anammox リアクターの長期連続運転を行った。Anammox に共存する細菌群が *nosZ* clade II タイプのニッチになるかどうかを検証するため、Anammox リアクターのバイオマスを選定し、16S rRNA 遺伝子に基づくアンプリコンシーケンスを実施した。さらに、アンプリコンシーケンスの結果から存在する機能遺伝子を予測するため、予測メタゲノムのソフトウェア (PICRUSt) (Langille et al. 2012) を用いて、*nosZ* を保有する細菌群同定と、非脱窒性 N_2O 還元細菌かどうかの評価を行った。さらに、得られた Anammox リアクター由来のバイオマスを呼吸活性システムに適用し、 N_2O 消費に関連する活性評価を行った。

4. 研究成果

4.1. 集積培養装置の改良による高効率な N₂O 還元細菌の獲得

ガス透過膜のカラムが投入されている集積培養装置の前段に、水封カラムを設置した結果、酸素のコンタミネーションを防ぐことが可能になった。これにより、N₂O 還元細菌の集積化が可能になり、装置内で優占化していた Rhodocyclaceae 科の *Azospira* sp. と *Dechloromonas* sp. を高確率で単離した。これらの細菌群は *nosZ* clade II に属する N₂O 還元細菌であること、硝酸還元、亜硝酸還元、一酸化窒素還元を行える機能遺伝子も併せて保有する脱窒性であることが明らかになった。

4.2. 単離された N₂O 還元細菌の動力学的および生理学的評価

集積培養装置で単離された *nosZ* clade II タイプである *Azospira* sp. strain I13 の最大 N₂O 還元速度は、従来から報告されている *nosZ* clade I タイプの N₂O 還元細菌である *P. stutzeri* および *Pa. denitrificans* と有意差の無い値であった。一方、同じく集積培養装置で単離された *Azospira* sp. strain I09 の N₂O 還元速度は他の試験を行った細菌群の半分以下であった。

最大 N₂O 還元速度を N₂O 半飽和定数で割った N₂O 親和性を評価すると、*Azospira* sp. strain I13 が最も高い値を示し、N₂O 還元に有用な種であることが明らかになった。言い換えれば、*Azospira* sp. strain I13 は低い溶存 N₂O 濃度においても、高い活性を示すことが明らかになった。

4.3. 単離された N₂O 還元細菌の酸素耐性の評価

単離された *Azospira* sp. の酸素存在下での N₂O 還元活性を評価した結果、全ての種類において酸素存在下で N₂O 還元速度が大幅に減少した。特に、clade I タイプの *P. stutzeri* は、酸素存在下での N₂O 還元性能の低下が著しく、わずかな酸素濃度で大幅な活性低下が得られた。一方、集積培養装置から単離された *Azospira* sp. strain I09 は、酸素存在下においても N₂O 還元能を有し、微好気的な条件で

も N₂O 削減に寄与できる種類であることが明らかになった。

4.4. 単離された N₂O 還元細菌のゲル包括固定とモデル化

これまでの評価を元に、N₂O 還元能に優れた *Azospira* sp. strain I13 のアルギン酸ゲル包括固定化に適用した。固定化された *Azospira* sp. strain I13 細胞は、細胞が懸濁した状態で N₂O 還元が完全に失活した酸素濃度 100 μM においても活性を示し、ゲル包括固定化により酸素が存在するような排水処理の生物反応槽においても有用であることが示された。一方、見かけ上の N₂O の半飽和定数は上昇し、ゲル固定化により N₂O への親和性は低下することが示唆された。

包括固定化ゲル内の反応 - 拡散モデルを構築し、これまでの得られた動力学的パラメータを採用してシミュレーションを行った。バルク液の酸素濃度における *Azospira* sp. strain I13 固定化ゲルの N₂O 還元速度は、様々なゲルの直径において、実験値と概ね一致する結果が得られた。さらに、排水処理の生物反応槽を想定した溶存酸素濃度においても、ゲルに固定化された *Azospira* sp. strain I13 の N₂O 還元活性を発現させるゲルサイズを、チイル数により体系的に示すことができた。

4.5. Anammox リアクター中に生息する N₂O 還元細菌の機能と活性評価

NH₄⁺を電子供与体、NO₂⁻を電子受容体とした有機物非添加の培地をバイオフィルムに連続供給した際、従属栄養性の *Chloroflexi* 門に属する細菌群が Anammox 細菌の次に高い割合で生息することが明らかになった。さらに、これらの従属栄養性の細菌群は、*nosZ* clade II タイプの N₂O 還元細菌であり、亜硝酸還元酵素を有していない非脱窒性の N₂O 還元細菌であることが明らかになった。また、定量 PCR の結果により、*nosZ* clade II タイプの機能遺伝子のコピー数が *nosZ* clade I タイプの機能遺伝子のコピー数よりも高いことが示された。

次に、呼吸活性評価システムを構築し、これらの微生物コンソーシアムの N₂O 還元性

能を確認したところ、低い N₂O 濃度でも高効率に N₂O 消費を行えることを示した。

以上より、Anammox 細菌が集積される外部からの有機物非添加の環境下で生息する N₂O 還元細菌群が、有用な N₂O シンクになりうる可能性が示唆された。さらに、Anammox リアクターのバイオマスから N₂O 還元細菌の単離に挑戦したが、*nosZ* clade II タイプの N₂O 還元細菌を獲得することはできなかった。単離に関しては、培地の選定、培養条件の最適化といった詳細な検討が必要であることが示唆された。

引用文献

- Graf et al. (2014) *PloS One* 9(12), e114118.
Langille et al. (2013) *Nature Biotechnol.* 31(9) 814-821.
Sanford et al. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(48), 19709-19714.
Schreiber et al. (2012) *Front. Microbiol.* 3 (24).
Yoon et al. (2016) *Appl. Environ. Microbiol.* 82(13) 3793-3800.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Suenaga, T., Aoyagi, R., Sakamoto, N., Riya, S., Ohashi, H., Hosomi, M., Tokuyama, H. and Terada, A. (2018) Immobilization of *Azospira* sp. strain I13 by gel entrapment for mitigation of N₂O from biological wastewater treatment plants: Biokinetic characterization and modeling. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (in press).
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.014 (査読あり)
- Suenaga, T., Riya, S., Hosomi, M. and Terada, A. (2018) Biokinetic Characterization and activities of N₂O-reducing bacteria in response to various oxygen levels. *Frontiers in Microbiology* 9(697), (10 pages).
DOI: 10.3389/fmicb.2018.DGE97 (査読あり)
- Kinh, C.T., Suenaga, T., Hori, T., Hosomi, M., Smets, B.F. and Terada, A. (2017) Counter-diffusion biofilms have lower N₂O emissions than co-diffusion biofilms during simultaneous nitrification and denitrification:

Insights from depth-profile analysis. *Water Research* 124, 353-371.

DOI: 10.1016/j.watres.2017.07.058 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

Terada, A., 2017. Nitrous oxide emission from cost-effective nitrogen removal systems: Mechanisms and mitigation strategies, 2017 International Conference on Environmental Pollution Control (Vancouver, Canada) 2017.10.8-10.12.

末永俊和、佐光俊樹、堀知行、細見正明、寺田昭彦 2018. Anammox リアクターに潜在する N₂O を巡るメタボリズム, 第 20 回日本水環境学会シンポジウム (和歌山大学, 和歌山) 2017.9.26-9.27.

末永俊和、堀知行、利谷翔平、細見正明、寺田昭彦 2017. 酸素の存在が亜酸化窒素の還元活性に及ぼす影響: 単離菌株による呼吸活性の動力的評価, 第 51 回日本水環境学会年会 (熊本大学, 熊本) 2017. 3.15-3.17

末永俊和、中川洋祐、堀知行、利谷翔平、細見正明、寺田昭彦 2017. 亜酸化窒素を還元する脱窒細菌の動力的解析: 酸素曝露の影響, 化学工学会第 82 年会 (芝浦工業大学, 東京) 2017. 3.6-3.8

末永俊和、堀知行、利谷翔平、細見正明、寺田昭彦 2017. 亜酸化窒素還元に寄与する亜酸化窒素と酸素を巡るダイナミクスの動力的評価, 日本微生物生態学会第 31 回横須賀大会 (横須賀市文化会館, 神奈川) 2016.10.22-10.25

Suenaga, T., Kinh, C.T., Ikeda, D., Maruo, K., Song, K., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., 2016. Exploring N₂O-reducing bacteria in anammox-based systems towards mitigation of N₂O emission, Anammox Workshop at MEWE-Biofilm Conference (Copenhagen, Denmark) 2016.9.4-9.8.

Suenaga, T., Nakagawa, Y., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., 2016. Biokinetic characterization of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria possessing typical and atypical *nosZ* genes (Montreal, Canada) 2016.8.21-8.26.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺田 昭彦 (TERADA, Akihiko)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30434327

(2)連携研究者

堀 知行 (HORI, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・

環境管理研究部門・主任研究員

研究者番号：20509533