

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11707

研究課題名（和文）生物電気化学的な窒素固定促進技術開発のための基礎的研究

研究課題名（英文）Research for promotion technology of nitrogen fixation fixation by bioelectrochemical system.

研究代表者

粟田 貴宣（Awata, Takanori）

大阪工業大学・工学部・講師

研究者番号：80724905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究テーマでは窒素固定微生物を用いたアンモニア生成技術開発に向けた基礎的な知見を得ることを目的として課題に取り組んできた。水田土壌を植種源とし、窒素固定微生物の継代培養を行うことによって、窒素固定微生物の集積培養を試みた。さらに土壌画分の一つであるヒューミンを添加することによって活性の増加が可能であることを確認し、さらにヒューミンが細胞外電子伝達物質として働くことを明らかにした。今後の課題として、十分量の窒素固定微生物の培養を可能にする装置デザインが求められる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のアンモニア生成技術は高温高圧下で実現するハーバー・ボッシュ法によって生成されているが、大部分は肥料として消費されている。水素エネルギーの需要増加によって、輸送コストの低いアンモニアを水素キャリアとして利用することが注目されており、工業的に製造したアンモニアの需要がさらに増加することが予想される。そこで生物学的な窒素固定によってアンモニアを合成し、肥料として使用することができれば田畑で直接肥料を微生物に生成させて利用が可能となることから、その基礎的な知見として重要な情報を取得できた。

研究成果の概要（英文）：In this research theme, we have tackled the issues with the aim of obtaining basic knowledge for the development of ammonia production technology using nitrogen-fixing microorganisms. An attempt was made to accumulate and cultivate nitrogen-fixed microorganisms by subculturing nitrogen-fixed microorganisms using paddy soil as a planting source. Furthermore, it was confirmed that the activity could be increased by adding Humin, which is one of the soil fractions, and it was further clarified that Humin acts as an extracellular electron transmitter. As a future task, a device design that enables the cultivation of a sufficient amount of nitrogen-fixed microorganisms is required.

研究分野：土木工学、環境微生物学

キーワード：生物学的窒素固定 細胞外電子伝達物質 メタゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

現行のアンモニア生成技術は高温高压下におけるハーバー・ボッシュ法によって生成されているが、その大部分は農業肥料として消費されている。水素エネルギー利用増加の一方で、水素は輸送のコストパフォーマンスが低いという課題を有しており、水素キャリアとしてアンモニア利用が注目されている。工業的に生産されている高濃度アンモニアを水素キャリアとして利用し、微生物学的に生成したアンモニアを窒素肥料に利用することによって、より経済的な水素エネルギーを利用した社会を構築できると考える。微生物学的に生成されるアンモニアは濃度が非常に低く、窒素固定微生物の活性促進が必須であるが、促進技術の確立には至っておらず、本研究では生物電気化学システム（BES）を用いて電子供給を行うことで活性促進が可能かどうかを明らかにすることが重要である。

微生物学的窒素固定は窒素ガスを還元し、アンモニアを生成する微生物学的なプロセスである。プロセスを担う微生物は普遍的に存在し、多様な種に分類されており、その中でもマメ科の植物の根に根粒を形成する *Rhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属に分類される根粒菌がよく知られている。窒素固定には nitrogenase という窒素還元酵素が必要であり、様々な微生物がこの酵素を有しており、根粒を形成しない窒素固定菌も確認されており、嫌気性メタン酸化古細菌やシアノバクテリアなどが報告されている。

生物電気化学システムを用いた電子供給によって一部の微生物活性を促進できることが明らかとなっており、脱塩素活性、鉄還元活性、硝酸還元活性などについて促進が報告されている。しかしながら、一部の微生物を除いてほとんどの微生物は直接電極と電子の授受を行う能力を有しておらず、細胞外電子伝達物質を介して電子の授受を行う必要がある。細胞外電子伝達物質として多く用いられる物質は、メチルビオローゲン、アントラキノンジサルフェート (AQDS)、メチルレッドなどであるが、これらの物質は水溶性であり、有毒である場合がある。実環境中での利用を考慮すると、系外へ容易に排出されてしまう水溶性ではなく固体が有効であると考えられ、無害な物質であることが必須である。土壌画分の一つで酸およびアルカリに不要であるヒューミンが細胞外電子伝達物質として機能することが明らかになっており、ヒューミンは不要であるだけでなく、土壌中に普遍的に存在することから実環境での利用へのハードルは低いと考えられ、電子伝達物質としてヒューミンを用いることのメリットは大きい。

## 2. 研究の目的

本研究は、窒素固定微生物を利用した窒素肥料生成システムの確立を最終的な目的としているが、本課題ではヒューミンを細胞外電子伝達物質として用い、さらに BES で電子供給を行うことでさらなる窒素固定能の活性化が可能かどうかを明らかにすることを目的とした。また、窒素固定菌の培養物について、どのような種の窒素固定菌が存在しており、どの窒素固定菌がヒューミンを介した電子授受による窒素固定を行っているかを明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 集積培養

窒素固定菌の集積培養は、植種源に水田土壌を用い、Ashby 培地で植え継ぎを繰り返し行うことで窒素固定菌の集積培養を行った。植継のタイミングは 2 週間に 1 度とし、植継の際にはヒューミンの有無による 2 系統を作成することで、ヒューミンの有無による活性の違い、優占種の違いの確認を試みた。培養温度は 30°C とした。

### (2) 活性試験

簡易的な窒素固定能の測定としてアセチレン還元活性試験を行った。窒素固定を担う窒素還元酵素はアセチレンをエチレンに還元する能力も有しており、アセチレンおよびエチレンを測定することで簡易的に窒素固定能を測定できることを利用したものである。植継の培養物から一部をヘリウムガスで満たしたバイアルに添加し、アセチレンを添加した。数日後にバイアル内のアセチレンおよびエチレン濃度を測定して活性評価を行った。アセチレン還元活性試験に加えて、実際に培養物中の窒素が増加していることを確認するために、CHN コーダを用いた元素分析を行った。

### (3) 異なるヒューミン・還元剤を用いた試験

33 世代目の培養物を用いて、各種土壌由来のヒューミンの窒素固定に対する効果を調べた。水田土壌、農場土壌、河川土壌、畑土壌などからヒューミンを抽出して添加した Ashby 培地を

用いて 2 週間の培養を行った。

ヒューミンが電子伝達物質として作用しているか、酸化還元電位の調整のみを担っているかを確認するため、各種還元剤を添加した培養系と比較した。還元剤には 15mM 流化ナトリウム、1.7mM L-システイン塩酸塩、0.025mM 塩化チタン(III)-ニトリロ三酢酸 (Ti-NTA) を用いた。

#### (4) 微生物群集構造解析

継代培養を続ける際に、窒素固定菌群の群集構造がある程度安定してきているかをそれぞれの世代の 16S rRNA 遺伝子を用いた DGGE 法によって確認した。微生物群集構造が安定した後に集積された窒素固定培養物内に存在する微生物群集構造解析を 16S rRNA 遺伝子に基づいて行った。また、窒素固定遺伝子 *nifH* の存在量についても測定を行い、ヒューミンの有無による違いを確認した。窒素固定を担う微生物の特定を進めるために培養物から抽出した DNA について、Miseq および Hiseq によるメタゲノム解析を行った。

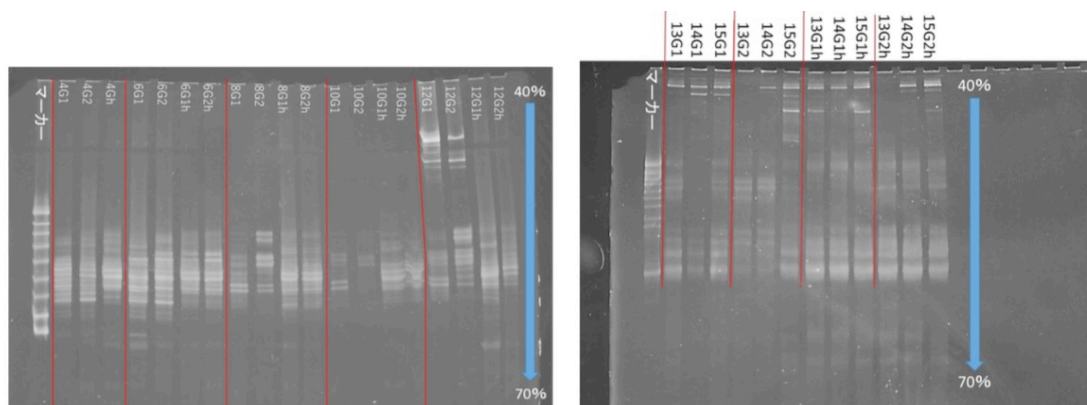
### 4. 研究成果

窒素固定菌の培養に広く用いられている Ashby 培地を用いた継代培養を行った際に、ヒューミンの有無によってアセチレン還元活性が異なることが確認され、ヒューミンのみではアセチレンのエチレンへの還元は確認されなかったことから、微生物によるアセチレン還元活性はヒューミン存在下で促進されることが確認できた。

CHN 元素分析を用いて培養物中の窒素化合物の含有量を測定した。培養 0 日目と 14 日目の培養物中の窒素化合物含有量を測定し、コントロール（ヒューミン、微生物を添加しない条件）の窒素含有量を 100% としたときの相対的窒素含有量を比較すると、培養 0 日目ではすべての条件で窒素化合物含有量に差はなかったのに対し、培養 14 日目では微生物とヒューミンの両方を添加した条件のみがコントロールに対して有意に増加することが確認できた。このことからヒューミンの添加が微生物窒素固定を活性化し、培養物中の窒素化合物を増加させることが確認できた。

5 か所の土壌・底質由来のヒューミンを試験したところ、水田土壌が最も窒素固定活性促進効果が高いことが確認できた。しかしながら、それぞれのヒューミンの炭素含有量、窒素含有量、水素含有量、C/N 比、H/C 比などと窒素固定活性促進効果には明確な相関関係は確認できず、ヒューミンのどのような特徴が窒素固定活性効果に影響を与えるかについては明らかにすることができなかった。

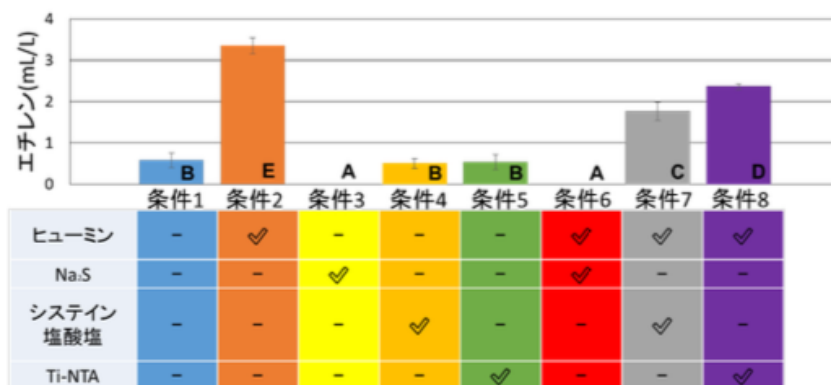
継代培養による培養物中の微生物群集構造の変化を、DGGE 法を用いて解析をした。微生物群集の集積培養において微生物叢の変化が起こりやすいと考えられる初期から中期の合計 8 世代分（第 4、6、8、10、12、13、14、15 世代）を用いたところ、図のような結果が得られた。第 4 世代から第 12 世代にかけてバンドの数が徐々に減少し、バンドの位置も変化していることから、生物叢が世代ごとに大きく変化していた。さらに第 13 世代から 15 世代にかけては、バンド数が少なく、さらに集積が進んでいることが確認でき、世代間のバンド位置に大きな変化がないことから微生物叢が安定したと考えられた。



ヒューミンによる窒素固定の促進について、作用機序は不明であったが、2 つの作用機序が推察され、一つはヒューミンを介して窒素固定微生物へ電子が還元力として供給されることによって窒素固定活性が向上している可能性、もう一つはヒューミンが還元剤として培地中にわずかに残存している溶解酸素を取り除き、酸素感受性である偏性嫌気窒素固定微生物の活性を高めている可能性である。還元剤として働いているかどうかについて確認するために種々の還

元剤を用いた試験を行った結果を図に示す。ヒューミンを添加した条件（条件 2）ではコントロール（条件 1：ヒューミンおよび還元剤無添加条件）と比較して有意にエチレンの生成量が増加した。一方、還元剤を添加した条件（条件 3～5）では、コントロールと比較してエチレン生成量の増加がみられず、硫化ナトリウム添加条件（条件 3）ではアセチレン還元が阻害された。さらにヒューミンと硫化ナトリウムの両方を添加した条件（条件 6～8）でも同様に行ったところ、ヒューミンと硫化ナトリウム添加条件（条件 6）では同様に阻害された。ヒューミンとシステイン塩酸塩、ヒューミンと Ti-NTA 添加条件（条件 7、8）ではエチレン生成量がコントロールよりも有意に上昇したが、ヒューミン添加条件（条件 2）と比較するとエチレンの生成量は低い結果であった。以上の結果から、ヒューミンの添加によって微生物窒素固定活性が促進するが、ヒューミンによる培地中の溶存酸素除去や酸化還元電位の適正化ではないことが明らかとなった。

上記のように、ヒューミンが微生物学的窒素固定を促進することが明らかになったが、窒素固定微生物一細胞当たりの窒素固定活性が増殖しているのか、窒素固定微生物の菌数が増加したために窒素固定活性が上昇したのか不明であった。そこで第 19 世代から抽出した DNA における培養物中の全細菌量（16S rRNA）および窒素固定能力を持つ微生物量（nifH 遺伝子）についてリアルタイム PCR を用いて測定を行った。ヒューミン添加を行って培養した系の方がヒューミンを添加しない系に比べ、22.9 倍多いことが示された。一方で窒素固定微生物量の測定結果から、ヒューミン添加系では全細菌量の約 0.00065% が窒素固定微生物である結果となったが、ヒューミンを添加しない系では計測値がコントロール（ $1.17 \times 10^3$ ）を下回る結果となり、窒素固定微生物がほとんど含まれないことが確認された。ヒューミンの有無によって微生物の増殖が大きく異なることが明らかとなった。



第 35 世代目のヒューミンありとヒューミンなしの培養系について微生物群集構造解析を行ったところ、ヒューミン培養系では *Firmicutes* 門に属する微生物が 70% 以上を占めており、そのうち Clostridiales 目に属する *Clostridium* 属、*Oxobacter* 属、*Ruminococcus* 属などが主なグループであった。マイナーなグループとしては、*Sporolactobacillus* 属、*Phyllobacterium* 属、*Sphingomonas* 属、*Ralstonia* 属などが数%程度検出された。*Firmicutes* 門以外の微生物は古細菌である *Methanobacterium* 属が残りの 20~25% 程度を占めていることを確認した。ヒューミンの有無に関わらず *Firmicutes* 門の微生物が優占かしていた理由としては、培養に用いた Ashby 培地にはマンニトールが含まれており、嫌気培養系であることが要因であると考えられる。ヒューミンの有無によって *Methanobacterium* 属の検出に大きく違いが出ており、*Methanobacterium* は水素資化性のメタン生成古細菌であるが、窒素固定を行う可能性も残る。窒素固定遺伝子の一つである nifH 遺伝子の定量結果から 16S rRNA 遺伝子に比べて非常に小さいコピー数であったことから、培養系内の窒素固定遺伝子が nifH のプライマーセットに対して感度が低い、優占種ではなくマイナーな微生物群が窒素固定を担っているなどの可能性が考えられた。さらにメタゲノム解析の結果から、窒素固定遺伝子の一つである nifH を数種類検出することができた。しかしながら、用いた DNA 濃度が低いこと、得られた塩基配列が短いことから、不完全なゲノム構築であり、どの窒素固定微生物がどの窒素固定遺伝子を有しているかの特定には至らなかった。今後、微生物解析を行うための十分なバイオマス確保や実環境への適用の前段階としてリアクター化を行い、連続運転を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dey Sujan, Awata Takanori, Mitsushita Jumpei, Zhang Dongdong, Kasai Takuya, Matsuura Norihisa, Katayama Arata	4. 巻 11
2. 論文標題 Promotion of biological nitrogen fixation activity of an anaerobic consortium using humin as an extracellular electron mediator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85955-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Awata T, Mitsushita J, Kasai T, Matsuura N, Katayama A.
2. 発表標題 Nitrogen fixing activity promoted by humin.
3. 学会等名 International Conference of Materials and Systems for Sustainability 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dey S, Kasai T, Mitsushita J, Awata T, Katayama A.
2. 発表標題 Acceleration of biological nitrogen fixation using humin as external electron mediator.
3. 学会等名 International Conference of Materials and Systems for Sustainability 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Awata T, Mitsushita J, Kasai T, Matsuura N, Katayama A.
2. 発表標題 Promotion of nitrogen fixing activity of anaerobic consortium using humin.
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference.（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三下純平、笠井拓哉、片山新太、粟田貴宣
2. 発表標題 ヒューミンを利用した嫌気性微生物の窒素固定反応の促進
3. 学会等名 日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関