

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06492・19K21555

研究課題名(和文)排水処理システムからの亜酸化窒素削減に寄与する非脱窒性細菌の探索

研究課題名(英文) Exploring non-denitrifying N<sub>2</sub>O-reducing bacteria in wastewater treatment systems

研究代表者

末永 俊和 (Suneaga, Toshikazu)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80828377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：強力な地球温暖化物質、オゾン層破壊物質である亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)の放出削減は喫緊の課題である。本研究ではN<sub>2</sub>Oを無害化する能力を持つN<sub>2</sub>O還元細菌、特に亜硝酸や硝酸の還元機能を持たない非脱窒性N<sub>2</sub>O還元細菌に着目し、排水処理システムでの探索と活性の検出を目的とした。15窒素安定同位体を用いて、N<sub>2</sub>Oの真の生成と消費速度を算出する手法を開発し、嫌気性アンモニア酸化細菌(アナモックス)と共存していると推測されるN<sub>2</sub>O還元細菌の活性の検出を行った。また、メタゲノム解析や修正培養によりアナモックスバイオマス中のN<sub>2</sub>O還元細菌の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低環境負荷型の社会形成を目指し、人的要因に由来するN<sub>2</sub>O放出の削減が求められている。N<sub>2</sub>O還元細菌は有効なN<sub>2</sub>O削減技術への応用が期待されているが、その全容や活性は未解明な点が多い。本研究では特に、N<sub>2</sub>Oのみを消費できる非脱窒性N<sub>2</sub>O還元細菌の解明にむけて、その活性の検出や探索を試みた。これらの試みは世界的にも初めてであり、今後これらの手法を用いてこの細菌群の有用性が明らかになれば、環境負荷低減に向けた一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：An urgent issue is a reduction of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission, a powerful global warming and ozone-depleting substance. This study focused on N<sub>2</sub>O-reducing bacteria, reducing N<sub>2</sub>O to dinitrogen, especially non-denitrifying N<sub>2</sub>O-reducing bacteria that cannot reduce nitrite and nitrate. The aim in this study was to explore and detecting their activity in wastewater treatment systems.

<sup>15</sup>N tracer method was developed to determine the true rate of production and consumption of N<sub>2</sub>O. The activity of N<sub>2</sub>O-reducing bacteria, presumed to coexist with Anammox, was detected. In addition, the N<sub>2</sub>O-reducing bacteria in anammox biomass were explored through metagenomic analysis and enrichment reactor operation.

研究分野：化学工学，環境微生物学，窒素循環，環境工学

キーワード：亜酸化窒素 脱窒 ゲノム解析 排水処理 地球温暖化 温室効果ガス

## 1. 研究開始当初の背景

$N_2O$  は強力な温室効果能を持ち(IPCC, 2013)、21 世紀最大のオゾン層破壊物質として知られており、その放出削減技術の開発が急がれている。環境中から放出される  $N_2O$  の削減に向けて特に近年注目を集めているのは、 $N_2O$  を無害な  $N_2$  に還元する生物的  $N_2O$  還元経路の活用である。分子生物学的解析の技術革新により、これまでの想定を超える多岐にわたる細菌種が  $N_2O$  還元能力を保有することが示唆されている (Sanford et al., 2012, Proc. Natl. Acad. Sci.; Jones et al., 2013, ISME J.)。  $N_2O$  還元細菌の有効利用が可能となれば、常温・常圧環境下、低コストかつ大規模なスケールで  $N_2O$  を無害化できる技術として提案することが可能となる。

そこで、本研究で着目するのが、窒素化合物のうち硝酸イオンや亜硝酸イオンを還元する能力を持たず  $N_2O$  のみを利用できる非脱窒性  $N_2O$  還元細菌の同定と活性化である。非脱窒性  $N_2O$  還元細菌を利用する最大の利点は、 $N_2O$  生成ポテンシャルを有さないため  $N_2O$  消費能力のみが期待でき、 $N_2O$  放出リスクがない点である。一方で、非脱窒性  $N_2O$  還元細菌は土壌由来の数菌種でのみ活性が確認されており (Sanford et al., 2012, Proc. Natl. Acad. Sci., Domeignoz-Horta et al., 2016, Soil Biol. Biochem.)、その全容は未解明のままである。本研究では、嫌気性アンモニア酸化細菌 (Anammox) と非脱窒性  $N_2O$  還元細菌が共存しているのではとの仮説のもとこれらの細菌群の活性の把握と検出を行った。Anammox 細菌自体は  $N_2O$  の生成、消費に関わる活性を有していないが、Anammox 細菌が優占化しているリアクターには高濃度の  $N_2O$  が存在することが分かっている。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、排水処理システム、特に嫌気性アンモニア酸化細菌と共存する非脱窒性  $N_2O$  還元細菌の活性の把握と、その利用可能性を検証した。微生物叢解析、活性試験により  $N_2O$  還元ポテンシャルの定量化、どのような細菌種が  $N_2O$  還元活性を担っているのか明らかにした。更に、非脱窒性  $N_2O$  還元細菌の集積培養を試みた。

## 3. 研究の方法

試験で用いた Anammox 汚泥は、亜硝酸とアンモニウムを 1:1 の割合で連続供給しているラボスケールリアクターから汚泥を採取して使用した。

### (1) Anammox 汚泥における $N_2O$ 還元反応の検出

$^{15}N$  安定同位体により標識された窒素化合物でトレーサ試験を行った。本研究で新たに、Anammox 反応、 $N_2O$  生成反応、 $N_2O$  消費反応を明確に分離して定量化できる手法を確立した。本試験はガスクロバイアルに Anammox 汚泥を封入し、嫌気状態とした回分試験にて行った。図 1 に示す通り、 $^{15}N$  安定同位体でラベリングした亜硝酸 ( $^{15}NO_2^-$ ) と、ラベリングしていないアンモニウム ( $^{14}NH_4^+$ ) を添加、さらにラベリングしていない  $^{44}N_2O$  を添加することで、 $^{15}NO_2^-$  由来で生成する  $^{46}N_2O$  や  $^{30}N_2$  と区別して  $N_2O$  のプロファイルを追跡可能となった。これにより  $N_2O$  の生成、消費速度を定量可能とした。



図 1.  $^{15}N$  安定同位体を用いた、 $N_2O$  の生成と消費の可視

### (2) メタゲノム解析による非脱窒細菌の $N_2O$ 還元細菌の探索

非脱窒性  $N_2O$  還元細菌が Anammox 汚泥において共存しているのが、Anammox 汚泥から DNA を抽出し、メタゲノム解析を行った。特に、どの細菌種がどの遺伝子セットを有しているか明らかにするために、培養しなくても、メタゲノム解析の結果から細菌のゲノム配列が推定できる Metagenome Assembled Genome (MAG) の構築を目指した。本研究では、高い精度の MAG 構築と細菌種の同定を容易にするために、既往の研究で使用されているショートリードシーケンス配列に加えて Oxford Nanopore Technologies の MinION から得られたロングリードの配列を併用し、解析を行った。また、 $N_2O$  還元酵素機能遺伝子 (*nosZ*) をターゲットとした RNA 発現解析を行うことで、どの細菌群が  $N_2O$  還元細菌として働いているのか明らかにした。

### (3) 非脱窒性 $N_2O$ 還元細菌の集積培養

ガス透過膜を用いたバイオフィルムリアクターを用いて Anammox 汚泥を種汚泥として非脱窒性  $N_2O$  還元細菌の集積培養を試みた。シリコン平膜の底部から  $N_2O$  を供給し、培養液中には  $NO_2^-$  と  $NH_4^+$  を供給する連続培養系で  $N_2O$  還元細菌が集積されるか検討した。培養期間中の細菌種の変遷を捉えるため、16S rRNA 遺伝子解析に基づく細菌群集構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Anammox 汚泥における $N_2O$ 還元反応の検出

実験は 3 系の異なる条件を設定した。Run1 では  $NH_4^+$  と  $^{15}NO_2^-$  を添加し、Anammox 反応が起きる環境とした。このとき  $N_2O$  は分子量 46 の  $N_2O$  生成が確認され、添加した  $^{15}NO_2^-$  由来の  $N_2O$

が大部分を占めることが明らかとなった(図1)。つまり、脱窒細菌の働きによる N<sub>2</sub>O の生成が示唆された。次に、Run2 として、Run1 と同じ成分に加えて、<sup>44</sup>N<sub>2</sub>O を意図的に添加したところ、<sup>44</sup>N<sub>2</sub>O の消費と、<sup>46</sup>N<sub>2</sub>O の生成が確認された。つまり NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の存在にかかわらず N<sub>2</sub>O の消費が起きており、<sup>46</sup>N<sub>2</sub>O が生成しているため、見かけの N<sub>2</sub>O (Total N<sub>2</sub>O) は変化していないが、その裏では N<sub>2</sub>O の生成と消費が同時進行していることが初めて明らかとなった。Run3 として、<sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と N<sub>2</sub>O を添加したが、<sup>46</sup>N<sub>2</sub>O の生成は確認されず、硝化細菌に由来する N<sub>2</sub>O は Anammox 汚泥において殆ど無いことが分かった。

一般的な脱窒反応では、硝酸や亜硝酸の存在下では電子の取り合いが起こり、N<sub>2</sub>O 還元反応は制限されることが報告されていたが(Pan et al., 2013, Water Res.)、Anammox 細菌と共存する N<sub>2</sub>O 還元細菌は、これら電子競合の影響を受けない、つまり、他の窒素酸化物の存在下でも N<sub>2</sub>O を消費できる可能性が示唆された。これらの結果を纏めた論文を投稿中である。

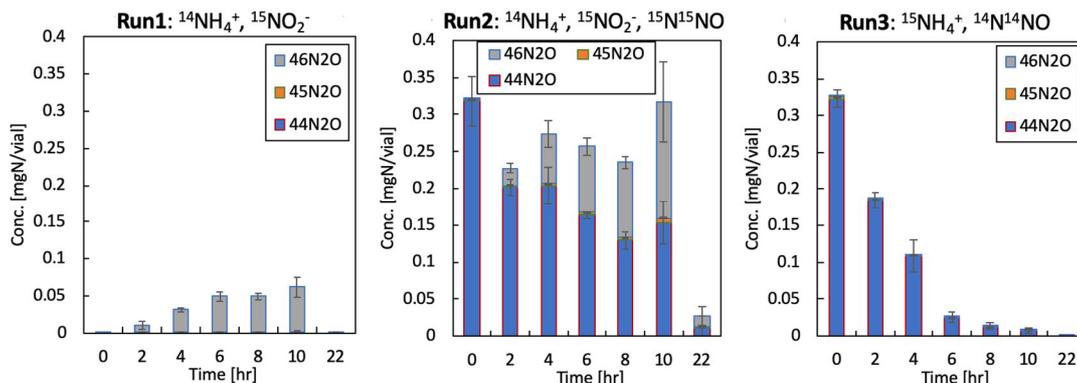


図2. <sup>15</sup>N 安定同位体を用いた活性試験における N<sub>2</sub>O の濃度プロファイル

### (2) メタゲノム解析による非脱窒細菌の N<sub>2</sub>O 還元細菌の探索

メタゲノム解析の結果、絶対嫌気性細菌である *Chloroflexi* 門由来と考えられる *nosZ* 遺伝子が多数検出された。特に *Anaerolineae* 綱に同定された MAG において、亜硝酸還元酵素を欠損している一方、硝酸、一酸化窒素還元酵素は保有していることが示唆された。*Anammox* が優占化する環境下においては NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が多量に存在しているが、*Anammox* 細菌の代謝物として N<sub>2</sub> と共に少量の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> も生成されることが知られている。また、*Anammox* が培養される環境は有機体炭素の流入がない独立栄養的な環境である。N<sub>2</sub>O 還元細菌として検出された *Chloroflexi* 門は、*Anammox* の代謝によって生産される有機物を電子供与体として利用し、*Anammox* が放出する NO<sub>3</sub><sup>-</sup> や、他の脱窒細菌が生成する N<sub>2</sub>O を電子受容体として利用して生存していることが今回のメタゲノム解析により明らかとなった。

RNA の発現解析の結果も、DNA の解析により多く検出された遺伝子が発現している傾向が確認された。DNA として存在が確認された細菌群が N<sub>2</sub>O 還元活性を有している事が強く示唆される結果となった。

### (3) 非脱窒性 N<sub>2</sub>O 還元細菌の集積培養

非脱窒性 N<sub>2</sub>O 還元細菌をターゲットに集積培養を行った。培地中には NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を添加し、ガス透過膜から N<sub>2</sub>O を供給する系と供給しない系をそれぞれ用意した。図3にそれぞれの系で優占度に有意な違い(p<0.05)が見られた種を抽出した。メタゲノムにおいて N<sub>2</sub>O 還元細菌として検出された *Chloroflexi* 門を始めとした種が多数検出された。一方で、1%以上の大きな存在率を示すには至らず、更なる長期培養、または N<sub>2</sub>O 以外の要素もこれらの細菌種の増殖に必要な可能性が示唆された。引き続き長期的な培養実験を継続する予定である。

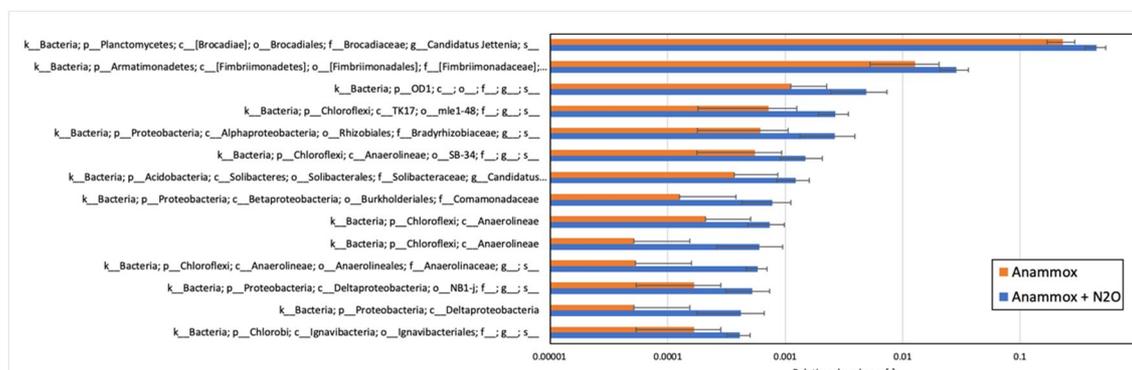


図3. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> と NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Anammox) を添加した系と、加えて N<sub>2</sub>O を添加した系 (Anammox+N<sub>2</sub>O) の有意に優占度に違いが見られた種

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田琢, 末永俊和, 細見正明, 寺田昭彦
2. 発表標題 アナモックス汚泥に棲息するN2O還元細菌のポテンシャル評価
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshikazu Suenaga, Takumi Ota, Tomoyuki Hori, Shohei Riya, 2, Masaaki Hosomi, Kartik Chandran, Susanne Lackner, Barth F. Smets, Akihiko Terada
2. 発表標題 Activity, abundance, and identification of N2O-reducing bacteria present in Anammox biomass - Combination of 15N tracer and molecular analyses
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference (MEWE2019) (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----