

平成22年6月2日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19201004

研究課題名（和文） 培養実験によるガス放出微生物過程の生元素アイソトポマー解析

研究課題名（英文） Isotopomer Analyses of biophile elements in microbial greenhouse gases using incubation experiments.

研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA NAOHIRO)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・教授

研究者番号：60174942

研究成果の概要（和文）：一酸化二窒素(N_2O)、メタン(CH_4)、および硫化水素 (H_2S) は温室効果やエアロゾル形成を介して地球の気候変動と密接に関わっている。これら N_2O 、 CH_4 、 H_2S のアイソトポマー比を用いた循環解析を進展させるために、微生物ガス代謝過程に着目し、(1) 単一微生物種の純粋培養実験、(2) 複数種（共存・競合）培養実験、および(3) 環境試料の室内培養実験および観測を利用して、種々の微生物ガス代謝とアイソトポマー比の関係を定量化した。

研究成果の概要（英文）：Changes in atmospheric concentrations of greenhouse gases (GHGs) and aerosols are drivers of climate change. N_2O and CH_4 are important GHGs and H_2S is related to aerosol formation. To develop the source-sink analyses of these gases using their isotopomer signals, we quantified relationships between some microbial processes and their isotopomer signals in pure culture and co-culture conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	20,300,000	6,090,000	26,390,000
2008年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	37,900,000	11,370,000	49,270,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：物質循環、安定同位体、微生物、ガス代謝

1. 研究開始当初の背景

微生物代謝により放出される一酸化二窒素(N_2O)、メタン(CH_4)、および硫化水素 (H_2S) は温室効果やエアロゾル形成を介して地球の気候変動と密接に関わっている。これらガスの安定同位体比 (N_2O の $^{15}N/^{14}N$ 比、 CH_4 の $^{13}C/^{12}C$ 比、 H_2S の $^{34}S/^{32}S$ 比) はその発生源の特定や全球収支の見積もりに重要な役

割を果たしている。代表者らはさらに「同位体比」を「アイソトポマー比」（ここでは、分子内の異なる元素・同位体およびその分子内分布の組み合わせを総称し、従来の同位体比も含めた概念）に拡張し、環境中の N_2O 、 CH_4 、 H_2S の循環解析のためのアイソトポマー計測を実現してきた。その結果、「アイソトポマー比」が種々の発生源、生成・消滅過

程に対して特徴的な値を示し、従来の「同位体比」と全く異なる観点から発生源情報や収支モデルに対する制約条件を付与できることを明らかにしてきた。

これまでの研究で、微生物が関与する環境中 N_2O 、 CH_4 、 H_2S のアイソトポマー比の観測値は時空間的に大きな幅をもつことが明らかになってきた。しかし、微生物代謝過程で生成する N_2O 、 CH_4 、 H_2S のアイソトポマー比を実験的に計測した例は非常に限られており、また、数少ない微生物の純粋培養実験で報告されているアイソトポマー比を用いても、この観測値のもつ大きな幅を十分には説明できないことが浮き彫りにされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、アイソトポマー比を用いた環境中 N_2O 、 CH_4 、 H_2S の循環解析を発展させるために、(1)単一微生物種の純粋培養実験、(2)複数種(共存・競合)培養実験、および(3)環境試料の室内培養実験および観測を行い、微生物ガス代謝とアイソトポマー比の関係を定量化することを目指した研究を目的とした。

3. 研究の方法

(1)単一微生物種の純粋培養実験

①硝化菌・脱窒菌

微生物による主要な N_2O 生成過程には硝化と脱窒がある。前者ではアンモニア(NH_3)酸化菌によって NH_3 が亜硝酸塩(NO_2^-)に酸化される過程で N_2O が副生成物として発生し、後者は硝酸塩が脱窒菌によって窒素(N_2)へ還元される過程で N_2O が中間生成物として発生する。本研究では、海洋に広く分布するアンモニア酸化菌 *Nitrosococcus oceanus* および土壌・水生堆積物などで一般的な脱窒菌に属し N_2O 還元酵素をもたない *Pseudomonas aureofaciens* を選び、それぞれ種々の条件下で純粋培養を行って生成する N_2O のアイソトポマー比を調べた。

②元素硫黄還元菌

元素硫黄還元菌については、これまで同位体分別係数の報告がなされていない。そこで元素硫黄還元菌の培養実験を行い、硫黄同位体分別係数を決定した。

(2)複数種(共存・競合)培養実験

①下水処理過程・家畜排泄物堆肥化過程

人間や家畜の排泄物には多量の有機態・無機態炭素・窒素が含まれるため、富栄養化などの環境影響を低減する目的で微生物を利用した処理が行われる。これは種々の微生物が共存した系に豊富な栄養を与えた培養系とみなすことができる。本研究では、下水処理場の各処理工程における水試料の採取、および牛糞堆肥化過程で発生する気体試料の

経時的採取を行い、 N_2O および CH_4 のアイソトポマー比を調べた。

②水素発生型発酵細菌と水素利用型 CH_4 生成菌の共培養

微生物は嫌気的環境下で水素利用型(CO_2 還元型) CH_4 生成と酢酸発酵型 CH_4 生成を行う。これら2つの CH_4 生成に伴う炭素同位体分別係数が、モデル構築上最も重要な要素である。これまで、主として純粋培養実験によって菌種、成長段階、生育温度等に依存した分別係数が求められてきた。培養実験によって見積もられた CO_2 還元型 CH_4 生成に伴う炭素同位体分別は、広範囲にわたる数値が得られており、その理由の一つとして、それら同位体分別が基質である H_2 の濃度に依存していることが推測されている。本研究では、地下帯水層中から採取した CO_2 還元型 CH_4 生成菌を非共生培養および共生培養を利用して異なる水素濃度で培養し、 H_2 濃度の高い場合と低い場合における炭素同位体分別の違いを調べた。さらに、ほとんど研究例のない CH_4 の水素同位体分別の水素濃度依存性を検証した。

(3)環境試料の室内培養実験および観測

①河川水試料

都市河川(多摩川)の複数地点で採取した水試料と堆積物を室温で培養し、 N_2O の濃度・アイソトポマー比とその時間変化を調べた。

②降水および渓流水

和歌山県の急峻なスギ人工林において、森林がどれだけ有効に降水硝酸を浄化しているか(利用しているか)について、降水と渓流水の硝酸窒素酸素安定同位体比の比較から検討を行った。

③地下水試料

森林源頭部の地下水中に含まれる N_2O について硝酸の窒素酸素安定同位体比並びに N_2O の窒素酸素安定同位体比、そしてアイソトポマー比を用いた解析を行った。

④湖水試料

共生系での硫黄代謝による硫黄同位体分別を決定するため、2007-2009年に長野県深見池の観測と湖水試料の培養および遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1)単一微生物種の純粋培養実験

①硝化菌・脱窒菌

アンモニア酸化菌(*N. oceanus*)が生成する N_2O の(平均)窒素同位体比($\delta^{15}N^{bulk}$)と分子内 ^{15}N 分布(SP)は、酸素濃度に依存することが明らかになった。酸素が低濃度の条件では、 NH_3 から生成した NO_2^- から N_2O が生成し、高濃度の条件では NO_2^- の前駆物質であるヒドロキシルアミン(NH_2OH)から生成したもの

と考えられ、それぞれの過程の寄与率推定において SP 値が有効な指標となることがわかった。

脱窒菌(*P. aureofaciens*)が生成する N_2O の SP 値はこれまでに報告されている他の菌とくらべて約 5%低い値を示し、脱窒過程の寄与率の推定においては菌種による SP 値の変動幅を考慮する必要があることが明らかになった。さらに、基質 (NO_3^-) の窒素同位体比が高いほど SP 値が低くなる傾向がみられ、基質への依存性についての詳細な研究の必要性が示された。

②元素硫黄還元菌

これまで同位体分別係数の報告がなされていない元素硫黄還元菌の培養実験を行い、硫黄同位体分別係数を初めて求める事に成功した。4 属 4 種の異なる硫黄還元菌はいずれも $\pm 2\%$ 以内の小さな同位体効果を示す事が明らかになった。これは硫酸還元による同位体効果よりも有意に小さいため、硫化水素の生成過程を区別する事に利用可能である。分別が小さい原因として基質硫黄と生成した硫化水素の間に同位体交換が起きていると考えられた。この無機過程を差し引いて代謝そのものによる分別を見積もるため、鉄に富む培地を用いて生成した硫化水素を系から隔離する実験を行ったところ、予想通り同位体効果は -4% まで大きくなったがなお硫酸還元との区別はつく事が分かった。

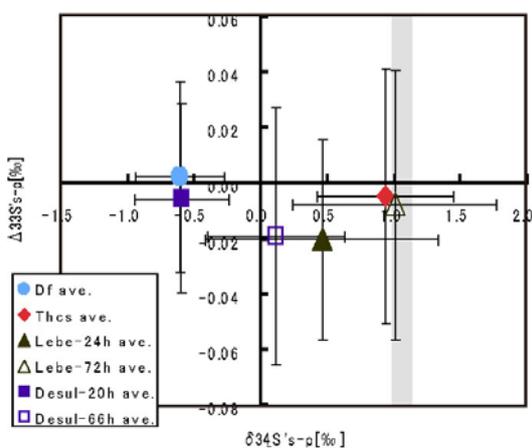


図 1. 硫黄還元菌の培養実験により実測された同位体効果。基質硫黄で標準化した生成する硫化水素の同位体組成。

(2)複数種 (共存・競合) 培養実験

①下水処理過程・堆肥化

下水処理場の活性汚泥を用いた処理工程においては、生成する N_2O アイソトポマー比が溶存酸素濃度や基質 (無機態窒素) 濃度に依存して大きく変動すること、嫌気的条件下では N_2O の消費も起きていることが明らかになった。酸素、基質などの濃度情報を総合して推定される反応過程との比較から、純粋培

養系で得られる微生物過程のアイソトポマー比の特徴が、複数種培養系においても同様に発現されることが示唆された。 CH_4 については、好気的条件下で消費 (酸化) されること、その際同位体分別の大きさは純粋培養系で得られた値の範囲内にあることが明らかになった。また嫌気的条件下では生成も起きていることがわかった。

牛糞堆肥化試験では、円錐状に積み上げた堆肥を攪拌・混合 (切返し) した直後に顕著な N_2O 放出が認められ、SP 値は純粋培養系で NO_2^- から N_2O が生成するときの値に近い値を示した。このことは、遺伝子解析により堆肥の表層付近には硝化菌 *Nitrosomonas europaea* と類似の NH_3 酸化菌の存在が認められたことおよび NO_2^- の蓄積も見られたことと整合的であり、この複雑系においても純粋培養系の SP の特徴が発現されることを示唆した。

②水素発生型発酵細菌と CO_2 還元型 CH_4 生成菌の共培養

地下帯水層から得た試料を用いて、 CO_2 還元型 CH_4 生成菌の非共生培養系および水素発生型発酵細菌との共生培養系を構築することが出来た。その結果、系内の水素濃度を高い場合 (非共生培養系) と低い場合 (共生培養系)、に制御し、それぞれについて炭素・水素同位体分別を決定することが出来た。

共生培養下では、 H_2 は発酵細菌によって生成されるとすぐに CH_4 生成菌によって消費され、共生培養系内の H_2 濃度は検出下限値以下に保たれた。この共生培養下での炭素同位体分別係数は高くなり、一方非共生培養系では低くなった。この結果は、従来から推測されている炭素同位体分別の水素濃度依存性と傾向が一致し、炭素同位体分別に H_2 濃度が影響していることが確かめられた。さらにこのことから、地下深部環境中で観測される CO_2 還元 CH_4 生成時の大きい炭素同位体分別は、微生物共生関係による低 H_2 濃度下のメタン生成が起因していることが明らかになった。

一方、水素同位体分別は共生培養系では小さく、非共生培養系では大きくなった。前述したように、共生培養系では、 H_2 は発酵細菌によって生成されるとすぐに CH_4 生成菌によって消費される。この結果は、Burke(1993)によって提唱された「実験室と実環境中の CH_4 の水素同位体分別係数の相違は、 H_2 濃度の違いによるものである」という仮説を支持し、本研究ではこの仮説を共生培養実験によって世界で初めて実証した。

(3)環境試料の室内培養実験

①河川水試料

河川水の場合と比べて、水と堆積物を

培養した場合、 N_2O の生成速度は最大 100 万倍に増大した。河口に近づくほど溶存 N_2O 濃度および N_2O 生成速度が高い傾向が見られ、下水処理場などから供給される無機態窒素が堆積物中の微生物により N_2O に変換されていると考えられた。生成する N_2O の SP 値は、培養実験で得られた硝化 (NH_2OH 酸化) と脱窒 (NO_2^- 還元) の値の間に概ね分布したが、河口付近では非常に高い SP 値が得られ、 N_2O の消費 (還元) も同時に起きていることが示唆された、

②降水および渓流水

和歌山県の急峻なスギ人工林において、森林がどれだけ有効に降水硝酸を浄化しているか (利用しているか) について、降水と渓流水の硝酸窒素酸素安定同位体比の比較から検討を行った。林齢が上がるに従って硝酸の酸素同位体比は上昇し (図 2)、これは高い酸素同位体比を持つ降水硝酸が高い割合で含まれていることを示している。

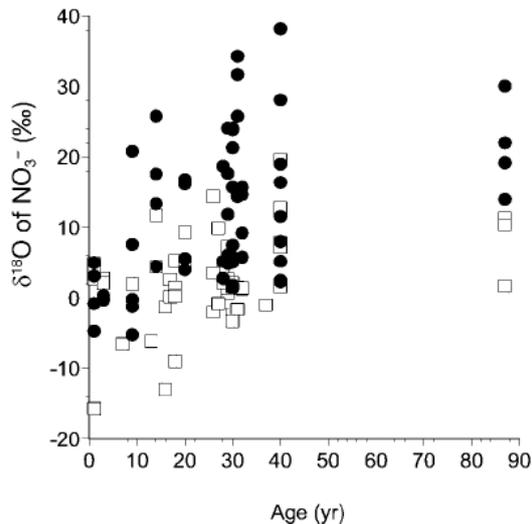


図 2. 林齢と渓流水中硝酸の酸素同位体比の関係。黒丸は採取 3 日前に降雨のあった場合、□は無かった場合。

この発見は意外ではあったが、林齢の高い森林から流出する硝酸濃度が極端に低いことから、急峻な日本の森林では物理的に降水硝酸が利用されずに渓流水へと入り込む割合が高いことを考慮すれば理解可能である。この結果は、これまで北米の比較的傾斜の緩やかなところで行われてきた渓流水硝酸ダイナミクスの解析に、物理的な流出を積極的に加味する必要性を示したものである。

③地下水試料

森林源頭部の地下水に含まれる N_2O について硝酸の窒素酸素安定同位体比並びに N_2O の窒素酸素安定同位体比、そしてアイソトポマー比を用いた解析を行った。これまで

行われてきた測定 (N_2O の窒素酸素安定同位体比測定) では、硝化、脱窒、還元バランスを議論することはできなかったが、本研究では、アイソトポマーそして、硝酸と N_2O の窒素同位体比の変動幅をあわせて解析することによって、半定量的ではあるが初めて野外での N_2O について硝化、脱窒、還元バランスを明らかにすることができた (図 3)。本地下水では N_2O の多くが脱窒によって生成されているが、硝化の寄与も無視できず、さらに生成された N_2O の 90%以上が N_2 まで還元されていることが示された。

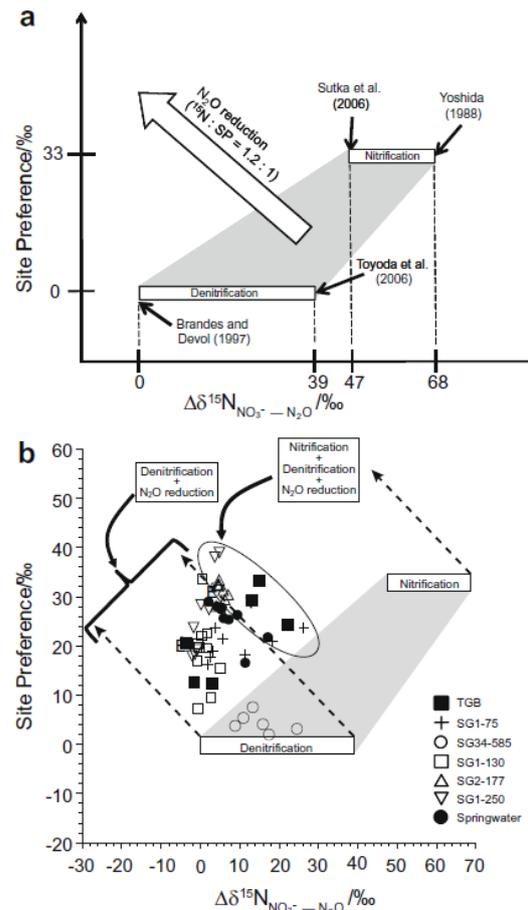


図 3. 森林地下水中の N_2O について、(a) 硝酸と N_2O の同位体比・アイソトポマー比を用いた解析手順、(b) 実データを用いた解析。

④湖水試料

共生系での硫黄代謝による硫黄同位体分別を存在度の低い ^{33}S 、 ^{36}S を含めた 4 種同位体に拡張して決定するため、2007-2009 年の 8 シーズンに渡って長野県深見池の観測と湖水試料の培養および遺伝子解析を行った。その結果、夏の成層期には無酸素の深層に嫌氣的な光合成硫黄酸化と硫酸還元が共生し硫黄の酸化および還元の循環がある事が分かった (図 4)。さらにこの共生系が単独の硫酸還元と異なる特徴的な ^{33}S 、 ^{36}S 組成を示

す場合があることを突き止めた。今後これを堆積物に適用することで、過去の嫌氣的光合成活動を検知できる可能性がある。

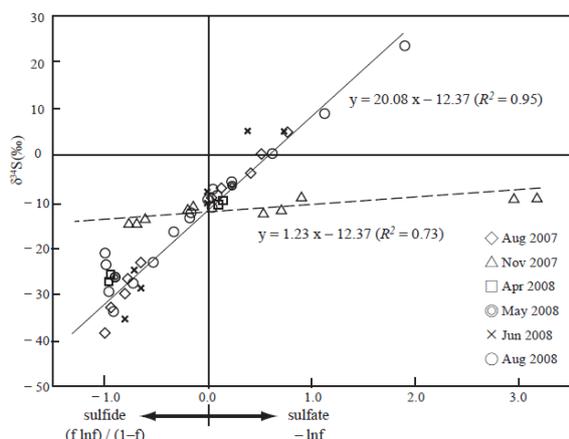


図4. 湖水硫酸・硫化水素の同位体組成と硫酸の消費率との関係。天然の硫酸還元・光合成硫酸化共生系による同位体分別が直線の傾きから求まる。

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 12 件)

- ① Maeda, K., S. Toyoda, and N. Yoshida (7 番目、他 4 名), The source of nitrous oxide emission from cattle manure composting process revealed by isotopomer analysis of and *amoA* abundance in beta-proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria., *Applied and Environmental Microbiology*, **76** (5), 1555-1562, doi: 10.1128/AEM.01394-09, 2010, 査読有.
- ② Tobari, Y., K. Koba, S. Toyoda (7 番目), and N. Yoshida (9 番目、他 5 名), Contribution of atmospheric nitrate to stream-water nitrate in Japanese coniferous forests revealed by oxygen isotope ratio of nitrate, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**, 1-6, doi: 10.1002/rcm.4498, 2010, 査読有.
- ③ Kimura, H., K. Mori, H. Nashimoto, S. Hattori, K. Yamada, K. Koba, N. Yoshida, and K. Kato, Biomass production and energy source of thermophiles in a Japanese alkaline geothermal pool, *Environmental Microbiology*, **12**(2), 480-489, doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02089.x, 2010, 査読有.
- ④ Kimura, H., H. Nashimoto, M. Shimizu, S. Hattori, K. Yamada, K. Koba, N. Yoshida, and K. Kato, Microbial methane production in deep aquifer associated with the accretionary prism in Southwest Japan, *The ISME Journal*, **4**, 531-541, 2010, 査読有.

⑤ Toyoda, S., H. Iwai, K. Koba, and N. Yoshida, Isotopomeric analysis of N₂O dissolved in a river in the Tokyo metropolitan area, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23**, 809-821, doi: 10.1002/rcm.3945, 2009, 査読有.

⑥ Koba, K., S. Toyoda (4 番目), N. Yoshida (12 番目、他 10 名), Biogeochemistry of nitrous oxide in groundwater in a forested ecosystem elucidated by nitrous oxide isotopomer measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 3115-3133, 2009, 査読有.

⑦ Abe, O., N. Yoshida (7 番目、他 5 名), A 6.5-year continuous record of sea surface salinity and seawater isotopic composition at Harbor of Ishigaki Island, southwest Japan, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **45**(3), 247-258, 2009, 査読有.

⑧ Farias, L., N. Yoshida (7 番目、他 5 名), Denitrification and nitrous oxide cycling within the upper oxycline of the oxygen minimum zone off the eastern tropical South Pacific, *Limnology and Oceanography*, **54**(1), 132-144, 2009, 査読有.

⑨ Ueno, Y., S. Ono, D. Rumble, and S. Maruyama, Quadruple sulfur isotope analysis of ca. 3.5 Ga Dresser Formation: new evidence for microbial sulfate reduction in the Early Archean, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 5675-5691, 2008, 査読有.

⑩ Yamagishi, H., S. Toyoda (4 番目), N. Yoshida (5 番目), K. Koba (7 番目、他 4 名), Y. Yamanaka, Role of nitrification and denitrification on the nitrous oxide in the eastern tropical North Pacific and Gulf of California, *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, **112**, G02015, 2007, 査読有.

⑪ Li, X., H. Masuda, K. Koba, and H. Zeng, Nitrogen Isotope Study on Nitrate-Contaminated Groundwater in the Sichuan Basin, China. *Water, Air and Soil Pollution*, **178**, 145-156, 2007, 査読有.

⑫ Arai H, N. Tokuchi, and K. Koba, Possible mechanisms leading to a delay in carbon stock recovery after land use change, *Soil Science Society of America Journal*, **71**, 1636-1638, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 15 件)

① 木庭啓介、自然安定同位体比を用いた一酸化二窒素生成プロセスの解析、微生物生態学会、2009年11月21日、西条

② 豊田 栄、木庭啓介、山田桂太、吉田尚弘 (他 6 名)、アイトポマー比を用いた農耕土壌起源 N₂O のキャラクター化、第 15 回大気化学討論会、2009年10月21日、つくば

- ③ Wu, C., K. Yamada, S. Toyoda, N. Yoshida, R. Kono, and K. Murayama, Investigation of methane emission during sewage water treatment in Japan through carbon isotope ratio, 日本地球化学会第 56 回年会、2009 年 9 月 17 日、西条
- ④ Lombard, L., K. Yamada, S. Hattori, Y. Sasaki, A. Makabe, K. Koba, and N. Yoshida, Characterizing the methane cycle in lake system using isotopic signature in Lake-Kizaki, Japan, 日本地球化学会第 56 回年会、2009 年 9 月 16 日、西条
- ⑤ Nakagawa, M., Y. Ueno, and N. Yoshida, Quadruple Sulfur Isotope Analysis of Sulfur Cycle in a Stratified Lake, Goldschmidt Conference, June 23, 2009, Davos, Switzerland
- ⑥ 下島涼介、豊田栄、吉田尚弘、前田高輝、長田隆、家畜排泄物堆肥化における N₂O 生成機構の安定同位体解析、日本地球惑星科学連合大会、2009 年 5 月 20 日、千葉
- ⑦ Hattori, S., H. Kimura, H. Nashimoto, K. Koba, K. Yamada, M. Shimizu, H. Watanabe, M. Yoh, and N. Yoshida. Carbon and hydrogen isotope fractionation by methane production in co-culture between fermenters and hydrogenotrophic methanogens. 日本地球惑星科学連合大会、2009 年 5 月 20 日、千葉
- ⑧ Hattori, S., H. Kimura, H. Nashimoto, K. Koba, K. Yamada, M. Shimizu, H. Watanabe, M. Yoh, and N. Yoshida. Stable isotope and microbial analyses of methane-producing process in a geothermal aquifer associated with the subsurface of the accretionary prism, Japan, EGU General Assembly, April 21, 2009, Vienna.
- ⑨ Toyoda, S., K. Koba, K. Yamada, N. Yoshida (他 8 名), Isotopomeric analysis of N₂O emitted from temperate agricultural soils, the Fourth International Symposium on Isotopomers, October 4-8, 2008, Tokyo.
- ⑩ Nakagawa, M., Y. Ueno and N. Yoshida, Biological fractionations of quadruple sulfur isotopes in a stratified lake, the Fourth International Symposium on Isotopomers, October 4-8, 2008, Tokyo.
- ⑪ 服部祥平、山田桂大、豊田栄、鈴木有理、藤井彩子、吉田尚弘、河野里名、村山康樹、下水高度処理過程における溶存態メタンの安定同位体を用いた解析 日本地球化学会第 55 回年会、2008 年 9 月 17 日、東京
- ⑫ Ueno, Y., M. Nakagawa, and N. Yoshida Biological fractionations of quadruple sulfur isotopes in a stratified lake, Goldschmidt Conference, July 14, 2008, Vancouver, Canada.
- ⑬ 多田敦志、上野雄一郎、高井研、吉田尚弘、培養実験による硫黄還元菌の四種硫黄同位体分別効果の決定、日本地球化学会第 53 回年会、2007 年 9 月 20 日、岡山

⑭ 矢野翠、豊田栄、木庭啓介、吉田尚弘 (他 5 名)、施肥された農耕土壌から放出される N₂O のアイソトポマー比、日本地球化学会第 53 回年会、2007 年 9 月 19 日、岡山

⑮ 深澤真、豊田栄、前田高輝、長田隆、白石誠、吉田尚弘、牛ふん堆肥化過程で発生する N₂O のアイソトポマー比、日本地球化学会第 53 回年会、2007 年 9 月 19 日、岡山

〔図書〕 (計 2 件)

① 編集委員:田村守他、執筆者:吉田尚弘他、酸素ダイナミクス研究会編、からだと酸素の事典、地球の酸素環境の歴史、朝倉書店、2009 年、13P(2P~14P)

② 編集委員:田村守他、執筆者:吉田尚弘他、酸素ダイナミクス研究会編、からだと酸素の事典、地球温暖化と酸素環境の未来、朝倉書店、2009 年、5P(56P~60P)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nylab.chemenv.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA NAOHIRO)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・教授

研究者番号：60174942

(2) 研究分担者

豊田 栄 (TOYODA SAKAE)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教

研究者番号：30313357

山田 桂太 (YAMADA KEITA)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教

研究者番号：70323780

上野 雄一郎 (UENO YUUCHIRO)

東京工業大学・グローバルエッジ研究院・テニユ・トラック助教

研究者番号：90422542

木庭 啓介 (KOBAYASHI KEISUKE)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授

研究者番号：90311745

(3) 連携研究者

なし