

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26550004
研究課題名(和文) アナモックス安定同位体システムティックスの構築

研究課題名(英文) Isotope fractionations during anammox

研究代表者

木庭 啓介 (Keisuke, Koba)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90311745

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)：排水処理で最近注目されている嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)という反応は自然生態系でも窒素を浄化していると考えられています。しかし、どれだけの浄化能があるのかを判定するのはきわめて困難です。本研究では、窒素と酸素の安定同位体の比率を用いて、窒素浄化の主なプロセスである脱窒とアナモックスのそれぞれの寄与を求めようという将来の研究において不可欠なアナモックスによる同位体比の変動(同位体分別)を求めることを目標としました。本研究ではまだ世界で報告されていない酸素の同位体分別を求めることができました。現在そのデータ解析を詳細に行い、国際学術学会誌に報告する準備を進めています。

研究成果の概要(英文)：Anammox is the important process not only for wastewater treatments but also for the removal of excess nitrogen from the natural environment. It is necessary to use isotopic fractionation factor during anammox to determine the relative contribution of anammox in the total nitrogen removal in the natural ecosystem, but only one report exists on this factor. We determined nitrogen and oxygen isotopic fractionation factors during anammox, which were totally different from the ones for denitrification. We now prepare the manuscript for the submission to the international scientific journals to publish this new finding.

研究分野：同位体生態学

キーワード：窒素循環 アナモックス 同位体分別

1. 研究開始当初の背景

窒素は、生命に不可欠な多量必須元素であり、たとえばアミノ酸や核酸の合成に利用される。また、多様な酸化数を持つため、生物の様々な酸化還元反応において重要な元素でもある。この窒素は窒素固定や降水によって生態系に供給され、流出またはガス態として失われる。生態系の多くで窒素の生物への利用可能性は低く、たとえば陸上生態系ではその一次生産が窒素の利用可能性によって制限されていると考えられている (Vitousek and Howarth, 1991)。そこで、生態系内での窒素の蓄積、ひいては窒素利用可能性の高低を理解することが重要であり、窒素のインプットそして窒素のアウトプットがどれだけの規模であり、どのような環境要因に制御されているかを理解することにより、その理解に近づくことが出来るということによって様々な研究がこれまで行われてきた。

特に生態系内の窒素が大気中に除去される過程は、窒素循環の中で重要でありながら、その実際がほとんどわかっていないプロセスである (Groffman et al. 2006)。この窒素除去プロセスは、低酸素環境において従属栄養微生物による硝酸呼吸によるものであり、一般に脱窒と呼ばれている。脱窒は 1860 年代に発見されて以降、1990 年代半ばまでほぼ唯一のガス態窒素消失経路として知られてきた。しかし 1995 年に、亜硝酸イオンを用いた嫌気性アンモニア酸化 (anaerobic ammonia oxidation with nitrite, アナモックス) の存在が確認され、2002 年に海洋堆積物でアナモックスが発見され (Thamdrup and Dalsgaard, 2002)、そしてアナモックス活性による窒素ガス損失が自然環境においてもしばしば脱窒と匹敵することがある (Dalsgaard et al. 2003) ことが示された。この発見以降、自然生態系におけるガス態窒素損失におけるアナモックスの重要性に関する研究、さらに、アナモックスを用いることで有機物投入コストが抑えられることから排水処理における研究が盛んに進められるようになってきている。

アナモックスは、アンモニウムが嫌気条件下で亜硝酸により酸化され、窒素ガスが生成する嫌気性アンモニア酸化の略称である。この時微量の硝酸も生成するとされている。

また、16S rRNA 配列の解析により、アナモックス反応を担う菌が Planctomyces 門に属することが明らかとなり (Strous et al. 1999)、アナモックス菌の全ゲノム解析も行われ、アナモックス反応のメカニズムが推定されている (Strous et al. 2006)。そしてこれまでに *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia*, *Scalindua*, *Anammoximicrobium* の 6 属が報告されている。

アナモックスは排水処理施設で発見されたが、2003 年に黒海 (Kuyper et al. 2003) とコスタリカ海 (Dalsgaard et al. 2003) でその活性が認められた。しかも北海の堆積

物では、 ^{15}N トレーサーを用いた堆積物の培養により窒素ガス生成の内 67% をアナモックスが占めることが報告され (Thamdrup and Dalsgaard, 2002)、自然環境中でもアナモックスが窒素除去に重要な役割をもつことが示された。しかし、アラビア海ではアナモックスではなく脱窒が優勢であるという報告もなされており (Ward et al. 2009)、アナモックス反応 (独立栄養的、基質はアンモニウムイオンと亜硝酸イオン) と脱窒反応 (一般に従属栄養的、基質は硝酸イオンまたは亜硝酸イオン) のどちらがガス態窒素生成過程として重要であるか、その制御要因は何か、という点が重要な研究課題となっている。さらに近年では陸上生態系でのアナモックス反応が泥炭土壌 (Hu et al. 2011) や水田 (Zhu et al. 2011) で観測されており、脱窒との関係性がこちらでも大きく注目されている。

アナモックス菌の存在、アナモックス反応の確認については、バイオマーカーの利用 (Kuypers et al. 2003)、機能遺伝子 (Nunoura et al. 2013)、 ^{15}N トレーサーによる $^{29}\text{N}_2$ 生成速度測定 (Amano et al. 2009) などの方法がある。しかしこれらは菌の存在の可能性を議論できるのみ、または活性のポテンシャルを議論できるのみであり、現実の生態系においてアナモックス反応が生じているかどうかについての情報を提供できるとは言い難い。そこで、他の窒素代謝と同様アナモックス反応についても基質であるアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、そして生成物である硝酸イオンの窒素 (酸素) 安定同位体自然存在比による研究が進められてきた (たとえば Prokopenko et al. 2006, 2013, Kroeger and Charette, 2008)。たとえば硝酸イオンの窒素 (^{15}N)、酸素 (^{18}O) 安定同位体自然存在比を用いることで、ある生態系で、脱窒が生じていたかどうかについて、窒素循環系を攪乱することなく、現場での活性の情報を得ることが出来る。しかし、アナモックス反応を窒素化合物の ^{15}N や ^{18}O を用いて議論している研究において、同位体比の変動を解析するのに不可欠な同位体分別 (^{14}N と ^{15}N , ^{16}O と ^{18}O の間の反応速度の比率) がほとんどわかっていないため、解析は定性的なものに留まっていた。脱窒における窒素安定同位体分別係数 (同位体分別の大きさを表したもので 15 と表すこととする) は、脱窒菌の純粋培養及び実環境での測定から、約 40 例報告されている (Houlton and Bai, 2009)。その一方で、アナモックスの安定同位体分別係数は、*Kuenenia stuttgartiensis* (純度 98% 以上) を用いて算出された、 15 について一例あるのみである (Brunner et al. 2013)。

2. 研究の目的

アナモックス反応の分別係数の知見を収集することが、今後の ^{15}N と ^{18}O をもちいた現場アナモックス活性の有無、ならびにアナモックスと脱窒の相対的な重要性を議論

してゆく上で必須の課題となっている。本研究では、先行研究とは異なるアナモックス菌 (*Candidatus Jettenia*) の優占する活性汚泥を用いて、アナモックス反応の窒素安定同位体分別係数 (15) を算出することを目的とする。さらに、より詳細な解析を可能にすべく、世界初となるアナモックス反応における酸素安定同位体分別係数 (18) の算出も試みる。具体的には、亜硝酸イオン、アンモニウムイオンそして硝酸イオンの濃度と ^{15}N ・ ^{18}O の経時的变化を世界屈指の同位体比測定環境を用いて追跡し国内外の共同研究者とともに機能遺伝子コピー数測定、モデリングによる検証を行い、アナモックス同位体システムマティクスを明らかにする。

3. 研究の方法

アナモックス活性を持つ活性汚泥を農工大工学研究院寺田研究室のバイオリアクターより提供していただき、本研究の研究材料とした。次世代シーケンサーを用いて調べたところ、測定に供したバイオリアクター底部の活性汚泥は Planctomycetes 門が高割合で存在していることが確認できている。

活性汚泥は酸素に触れないように農工大府中キャンパスへ持ち帰り、嫌気チャンパー内にて菌体の洗浄などを行った後、前もって曝気して溶存酸素濃度を下げておいた無機培地へ移し、培養実験に供した。

培養中、定期的に液体培地を 10mL 程度採取し、濾過、その後 pH 調整や亜硝酸除去 (Granger and Sigman, 2009) などを施し、サンプルを冷凍保存した。亜硝酸イオン濃度についてはナフチルエチレンジアミン法をもちいた予備的濃度測定を行い、培養の進行状況並びにサンプリング時間の決定に利用した。

後日、濾過液体培地中のアンモニウム濃度はインドフェノール法、亜硝酸イオン濃度はナフチルエチレンジアミン法、硝酸イオン濃度は硝酸イオンをカドミウムによる亜硝酸イオンへの還元を施した後、ナフチルエチレンジアミン法を用いて定量した。定量にはオートアナライザーを用いた。

硝酸イオンの ^{15}N 、 ^{18}O 測定は脱窒菌法 (Casciotti et al. 2002)、亜硝酸イオンの ^{15}N 、 ^{18}O 測定はアザイド法 (McIlvin and Altabet, 2005)、アンモニウムイオンの ^{15}N 測定はまず Diffusion 法 (Holmes et al. 1998) と湿式酸化 (Koba et al. 2012) を組み合わせたのち、脱窒菌法にて測定した。

^{15}N 、 ^{18}O 測定には、パーミアンドトラップガスクロマトグラフィー連続連続フロー型安定同位体比質量分析計 (20/20, Sercon 社) を、Casciotti and McIlvin (2012) に従い多検体測定用に改造したものを使用した。

4. 研究成果

予想されたとおり、 ^{14}N が ^{15}N よりも選択的に消費される通常同位体分別が生じている

ために、液体培地中に残存しているアンモニウムイオンの ^{15}N は濃度減少とともに徐々に上昇していた。このデータを Brunner et al. (2013) と同様に Rayleigh 蒸留式を用いて窒素安定同位体分別係数 15 を計算した。カーブフィッティングの結果、アナモックス反応におけるアンモニウムイオン消費の 15 は 26.5% となった。この結果は唯一の先行研究である Brunner et al. (2013) で報告されている 23.5 - 29.1% という 15 と一致するものであった。

亜硝酸イオンについては予想通り、亜硝酸イオンの消費にともない、 ^{15}N は上昇していた。しかし、実際には亜硝酸イオンについては、亜硝酸イオンから N_2 ガスにゆくアナモックス反応と同時に亜硝酸イオンから硝酸イオンへ酸化される亜硝酸酸化の両方が同時に生じている。また、亜硝酸イオンと硝酸イオンの ^{15}N を比較すると、常に硝酸イオンの ^{15}N が約 40% 程度高かった。硝酸イオンが亜硝酸イオンから生成していることを考慮に入れば、この高い硝酸イオンの ^{15}N は亜硝酸酸化により硝酸イオンが生成されるときに逆同位体分別、つまり ^{15}N が先に反応していることを示唆している。実際、先行研究 (Brunner et al. 2013)、そして亜硝酸酸化細菌による好氣的亜硝酸酸化において (Casciotti 2009)、逆同位体分別が報告されている。そこで Brunner et al. (2013) と同様に Rayleigh 蒸留式を式変形し、実データをプロットすることにより、亜硝酸イオンのアナモックスによる消費における 15 は 22.7%、亜硝酸酸化における 15 は -42.4% と算出された。Brunner et al. (2013) での数値と比較すると、アナモックス反応による亜硝酸の消費についてはほぼ同等の 15 であったが、亜硝酸酸化についてはより強い逆同位体分別が計測されていた。この理由については菌叢の違い、活性の違い、pH など環境要因の違いなど様々な要因が考えられるものの、現在までの結果ではまだこの点を議論するに十分なデータが得られていない。今後、濃度を変化させるなどの培養条件の変化を与えることで 15 の決定要因についての研究を進めてゆく必要がある。

本研究では活性汚泥を用いたアナモックス反応における安定同位体分別の決定を実現できた。アンモニウムイオンの消費、亜硝酸イオンの消費、硝酸イオンの生成のそれぞれにおいて、 15 と 18 を求めることが出来たこと、さらに亜硝酸酸化においては窒素も酸素も逆同位体分別を生じることが世界で始めて明らかになった。この結果を基に現在論文化に着手し、上記に挙げた水と亜硝酸イオン、硝酸イオンの間での酸素原子の交換についての追実験で得られたデータの解釈を現在進めている。今後、海外共同研究者との亜硝酸同位体値の再確認、そしてほぼ収集が終了している菌叢解析と実リアクターサンプルについてのデータを組み込んだ形で、

Water Research または Environmental Science and Technology といったインパクトの強い国際学術雑誌への投稿を，早急に行う予定である。

<引用文献>

Vitousek and Howarth, 1991, Biogeochem.
Groffman et al., 2006, Ecol. Appl.
Thamdrup and Dalsgaard, 2002, AEM
Dalssgard et al., 2003, Nature
Strous et al., 1999, Nature
Strous et al., 2006, Nature
Kuyper et al., 2003, Nature
Ward et al., 2009, Nature
Hu et al., 2011, AEM
Zhu et al., 2011, The ISME J
Nunoura et al., 2013, Environm. Microbiol.
Amano et al., 2009, Microb. Environm.
Prokopenko et al., 2006, EPSL
Prokopenko et al., 2013, Nature
Kroeger and Charette, 2008, Limnol. Oceanogr.
Houlton and Bai, 2009, PNAS
Brunner et al., 2013, PNAS
Granger and Sigman, 2009, RCM
Casciotti et al., 2002, Anal. Chem.
McIlvin and Altabet, 2005, Anal. Chem.
Holmes et al., 1998, Mar. Chem.
Koba et al., 2012, In "Earth, Life and Isotopes"
Casciotti and McIlvin, 2012, Anal. Chem.
Casciotti, 2009, Geochem. Cosmochim. Acta.

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 2 件)

布浦拓郎, 木庭啓介, 海洋における地球温暖化物質と海洋微生物の関わり, 生物の科学遺伝, 68(6), 2014, 480-481, 査読無

布浦拓郎, 木庭啓介, 海洋中の一酸化二窒素とアンモニア酸化, 生物の科学遺伝, 68(6), 2014, 504-508, 査読無

[学会発表](計 1 件)

古田島翔徳, 木庭啓介他, アナモックスの優先する活性汚泥における同位体分別, 日本地球惑星合同大会, 2015年5月26日, 幕張メッセ(千葉県幕張市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~keikoba/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木庭 啓介 (Koba Keisuke)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 90311745

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

寺田 昭彦

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 30434327