

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 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：26630420

研究課題名(和文) ガス透過膜デバイスによる亜酸化窒素還元細菌の集積化・単離

研究課題名(英文) Enrichment and isolation of nitrous oxide reducing bacteria by a gas-permeable membrane 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)：亜酸化窒素(N₂O)を窒素ガスに変換可能な高効率N₂O還元細菌の獲得を目指し、ガス透過膜を用いた集積培養デバイスを開発した。このデバイスを用いた長期培養により、近年新たに報告されたnosZ clade II型のN₂O還元細菌の優占を確認した。特に、Rhodocyclaceae科に属するDechloromonas属が優占種であることを明らかにした。集積したバイオマスからこの優占種と相同性の高い細菌種Dechloromonas sp.の単離に成功した。この細菌種は従来のnosZ clade I型のN₂O還元細菌よりN₂Oを効率的に窒素ガスに変換可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：A novel enrichment device by a gas-permeable membrane was developed to acquire highly-effective nitrous oxide (N₂O)-reducing bacteria able to reduce N₂O, highly-potent greenhouse gas, into nitrogen gas. Long-term operation of the enrichment device revealed that selective enrichment of nosZ clade II type N₂O-reducing bacteria, newly discovered N₂O reducers, is feasible by the device. Especially, species in the genus Dechloromonas of the family Rhodocyclaceae was found predominant in the device. Furthermore, the enriched species in the device was successfully and effectively isolated. The isolated species is phylogenetically analogous to the predominant species enriched in the device. Biokinetic analysis illuminated that the isolated Dechloromonas species, belonging to nosZ clade II type, has higher affinity for N₂O than the previously found N₂O reducing bacteria harboring nosZ clade I.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：N₂O還元細菌 亜酸化窒素(N₂O) ガス透過膜 細菌 単離 動力学的解析 集積化 nosZ

1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 (N_2O) は二酸化炭素の約 300 倍の高い温室効果を示し、21 世紀に入りフロンに替わるオゾン層破壊物質として知られている^[1]。この N_2O の生成量の約 7 割は微生物反応によるもので、畑地などの土壌環境のみならず、排水処理システムのような環境浄化プロセスにおいてもその排出量は無視できなくなってきている。特に排水処理プロセスは、近年の省エネ化に対する要求も高まっている一方で、省エネ化に伴う酸素供給量の削減は、 N_2O の生成を増大させてしまうことが報告されており^[2]、排水処理プロセスの省エネ化と温室効果ガス削減はトレードオフが生じている。

そこで、本研究では N_2O を窒素ガスに還元することが可能な N_2O 還元細菌に着目した。この細菌群は、 N_2O 還元酵素をコードする *nosZ* 遺伝子を有することが知られている。近年では、これまで注目されていなかった新たな細菌群が N_2O 削減の役割を担う可能性が報告されている^{[3], [4]}。しかしながら、新しい細菌群の多くは環境中で存在が確認されているものの、いまだに分離・培養されていない種類が多い。 N_2O の削減に向けたこれらの細菌群の利用可能性はいまだにわかっておらず、工学的応用に向けた裾野を広げる必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、高効率な N_2O 還元性能を有する細菌群の分離・培養を目的とした。この目的の達成のために、以下の点について検討を行った。

- (1) N_2O 還元細菌の連続集積培養が可能な新規デバイスの開発および N_2O 還元細菌の集積化
- (2) 集積化バイオマスの細菌群集構造解析
- (3) 集積化された細菌の分離培養
- (4) 分離された N_2O 還元細菌の動力学的解析

3. 研究の方法

- (1) N_2O 還元細菌の連続集積培養が可能な新規デバイスの開発および N_2O 還元細菌の集積化

中空糸状のガス透過膜を用いて、 N_2O をバブルレスで輸送し、ガス透過膜外側に付着している細菌群に精緻に電子受容体 (N_2O) と電子供与体 (有機物) を供給できる集積培養デバイスを開発した (図 1)。まず、中空糸ガス透過膜内部に N_2O と N_2 の混合ガスを連続的に供給し、ガス透過膜の表面積あたりの N_2O 透過速度を算出した。この見積もりにより、ターゲットとする細菌群が増殖するのに十分な N_2O 供給量を決定した。

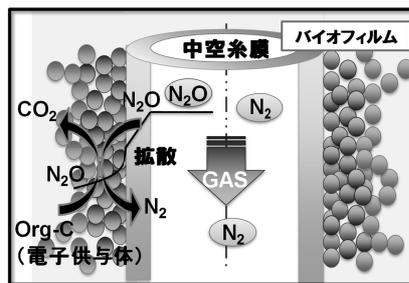


図 1. 中空糸ガス透過膜の概念図

デバイス内に中空糸ガス透過膜を導入し、 $N_2O:N_2$ 混合ガスを連続的に供給した。膜外部には滅菌・嫌気状態にした有機性培地を水理学的滞留時間 7 時間にて連続供給した。 N_2O の供給により選択的培養ができていのかどうか判断するため、電子受容体として硝酸塩 (NO_3^-) を供給するデバイスも同時に運転した (表 1)。種汚泥として生活排水処理施設の活性汚泥を培養初日に接種し、その後約 6 ヶ月間連続培養を行った。

培養期間中、定期的にデバイス内のバイオマスをサンプリングし、DNA を抽出した。抽出 DNA を用いてリアルタイム定量 PCR により、 N_2O 還元酵素をコードする *nosZ* 機能遺伝子 (*nosZ* clade I, clade II) を定量し、 N_2O 還元細菌の集積度を評価した。

表 1 集積培養装置の培養系

培養装置名	電子供与体	電子受容体	ターゲット
N_2O 供給系 1	酢酸ナトリウム	N_2O	N_2O 還元細菌
N_2O 供給系 2	複合有機物	N_2O	N_2O 還元細菌
NO_3^- 供給系	複合有機物	NO_3^-	対照系

(2) 細菌の群集構造解析

次世代シーケンシング技術を用いてデバイス内の細菌群を網羅的に解析し、時系列

的な変遷を追跡し、優占種を特定した。16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたプライマーを用いてシーケンシングを行い、約 40,000 reads/sample の配列情報を得た。得られた配列から信頼度の低い配列とキメラ配列を取り除き、解析ソフト QIIME を用いて系統学的分類と多様性解析を行った。

(3) 集積化された細菌の分離培養

集積された細菌のより詳しい生理生態の解明を目指し、細菌の単離を試みた。単離操作は集積培養 1 ヶ月後と運転終了時に実施した。寒天培地上にバイオマスを塗布し、5 %-N₂O 雰囲気嫌気条件下で 1-2 週間培養し、コロニーの形成を行った。寒天培地上に形成したコロニーをピックアップし、液体培地にて再培養し単離菌株を獲得した。得られた単離菌株は 16S rRNA の遺伝子解析により、系統学的分類を決定し、また PCR 法により脱窒機能遺伝子の有無を確認した。

(4) 分離された N₂O 還元細菌の動力学的解析

得られた単離菌株の N₂O 還元活性の定量的な比較を行うため、マイクロレスピレーションシステム (Unisense 社) を用いて、N₂O 還元活性試験を行った。このシステムを用いることにより高感度、高精度に溶存態 N₂O と O₂ の消費をモニタリングすることが可能である。前培養した単離菌株を希釈し、測定用チャンバーに封入、酢酸塩を炭素源として添加した。そこに N₂O と O₂ 電極を挿入し、30°C 環境下で O₂ と N₂O の消費をモニタリングし、2 つの濃度の減衰を追跡した。得られたデータから N₂O 消費速度を算出し、Michaelis-Menten 式にフィッティングすることで、細菌種ごとの最大 N₂O 消費速度 V_m と N₂O に対する半飽和定数 K_m を算出した。

4. 研究成果

(1) N₂O 還元細菌の連続集積培養が可能な新規デバイスの開発および N₂O 還元細菌の集積化

ガス透過膜からデバイス内のバルク液に溶存する N₂O の透過速度を測定したところ、供給圧力に対して線形的に透過速度を制御

できることが明らかとなった。よって、N₂O 還元細菌の生育に十分な電子供与体の供給量を設定し、連続運転を開始した。

培養開始 10 日前後から有機物の消費が確認され、流入する溶存態有機炭素のうち、76% が従属栄養的な N₂O 還元反応とともに消費していることが示唆された。

培養期間中の N₂O 還元細菌の存在を *nosZ* 機能遺伝子の定量により評価した。表 1 に示す N₂O 供給系 1, 2 においては、*nosZ* clade II の割合が種汚泥と比較して約 22 倍増加した。一方で、NO₃⁻ 供給系では *nosZ* clade I の優占化が確認された。この結果より、培養に用いる電子受容体によって異なるグループの N₂O 還元細菌が培養されることが明らかになった。特に、これまで *nosZ* clade I の機能遺伝子を有する種が N₂O 還元反応を担っていると考えられてきたが、*nosZ* clade II と呼ばれる新しい分類の N₂O 還元細菌が報告され^{[3][4]}、環境中で N₂O 還元反応を担っている可能性が示唆されている^[5]。*nosZ* clade II を有する N₂O 還元細菌の詳しい生理生態の全貌は明らかになっていないものの、開発した新規デバイスをを用いることで、*nosZ* clade II の N₂O 還元細菌を選択的に集積培養できることを示した。

(2) 細菌群集構造解析

各集積培養デバイス内で培養されたバイオマス中でどのような細菌種が優占化したのか、次世代シーケンシング技術により明らかにした。細菌群集の多様性は、どの集積培養系でも大きく減少したことが分かり、連続培養によって集積化が達成されたことを示した。表 1 に示す N₂O 供給系 1, 2 において、共通して β -proteobacteria 綱の Rhodocyclaceae 科が優占した一方、NO₃⁻ 供給系では γ -proteobacteria 綱が優占しており、大きく異なる細菌群集構造が形成された。種レベルの解析により、N₂O 供給系において Rhodocyclaceae 科 *Dechloromonas* 属の OTU が、デバイス中のバイオマスに棲息する最大の優占種となった。この OTU は、種汚泥中の存在率が 0.34%であったが、培養期間中に最大 52%まで存在率が上昇した。

(3) 集積化された細菌の分離培養

デバイス中で集積培養されたバイオマスから優占種の単離を試みた。単離サンプルとして種汚泥、N₂O 供給系 1、N₂O 供給系 2、NO₃⁻供給系のバイオマスをそれぞれ使用し、合計で 219 株の細菌を単離した。N₂O 供給系から Rhodocyclaceae 科に属する *Dechloromonas* sp. と *Azospira* sp. が特異的、かつ優占的に単離され、他のバイオマスからは単離できなかった。また、これらの単離菌株は N₂O 還元能力を示した。

これらの単離菌株の系統解析を行ったところ、(2)の解析で優占種と判定した OTU と系統学的類似性が 98%以上であり、デバイス内で優占化した細菌種を単離できていることが示唆された。また、これらの単離菌株が脱窒に関する機能遺伝子を有しているかを PCR 法により確認したところ、*nirS* 型の亜硝酸還元酵素と *nosZ* clade II 型の N₂O 還元酵素をコードする機能遺伝子を有していることが明らかとなった。つまり、ガス透過膜を用いた新規デバイスを用いた集積培養により、*nosZ* clade II 型の N₂O 還元能を有する種の単離効率が向上し、効率的な分離培養が可能になった。

(4) 分離された N₂O 還元細菌の動力的解析

N₂O 供給系から単離された細菌種がどのような N₂O 還元ポテンシャルを有しているのか、特に、*nosZ* clade II に属する 3 菌株に対してマイクロレスピレーションシステムを用いて動力的パラメータを求めた。N₂O 還元活性のパラメータは代表的な *nosZ* clade I 型の脱窒細菌である、*Pseudomonas stutzeri* や *Paracoccus denitrificans* で報告されている^[6]。N₂O への親和性を評価する K_m 値に注目すると、これら clade I の種が 35.5 - 60 μM であるのに対し^[6]、本研究で単離した clade II 型の単離菌株は 1桁低い 1.5-2 μM であることが分かった。この結果は、実環境で観測される数 μM 程度の低濃度の N₂O に対しても、単離菌株は高い還元ポテンシャルを有することを示唆しており、N₂O を巡る競合に *nosZ* clade II 型

が有利であることを示した。

本研究の総括として、ガス透過膜を用いた集積培養デバイスにより N₂O 還元細菌の集積に成功した。本研究で提案した N₂O を電子受容体として効率的に供給する新しい集積方法は、近年になって注目を集めている *nosZ* clade II 型の N₂O 還元細菌を優占化できることを実証した。さらに、デバイス内で優占・獲得された clade II 型の N₂O 還元細菌は、N₂O に対して高い親和性を有していることが明らかとなり、実環境中で N₂O 還元反応のキープレイヤーとなっている可能性を示した。

<引用文献>

- [1] Ravishankara *et al.* (2009) *Science*, 326(5949) 123-125
- [2] Okabe *et al.* (2011) *Water Res.*, 45(19) 6461-6470
- [3] Sanford *et al.* (2012) *PNAS*, 109(48), 19709-14.
- [4] Jones *et al.* (2013) *ISME J.*, 7(2), 417-426
- [5] Jones *et al.* (2014) *Nature Clim. Change*, 4(9), 801-805.
- [6] Yoon *et al.* (2016) *Appl. Environ. Microbiol.*, in press

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 1 件)

Song, K., Suenaga, T., Harper, W.F., Jr., Hori, T., Riya, S., Hosomi, M. and Terada, A. (2015) Effects of aeration and internal recycle flow on nitrous oxide emissions from a modified Ludzak-Ettinger process fed with glycerol. *Environmental Science and Pollution Research* 22(24), 19562-19570. DOI: 10.1007/s11356-015-5129-8 (査読有)

[学会発表](計 10 件)

末永俊和, 中川洋佑, 堀知行, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, 集積培養により活性汚泥から獲得された亜酸化窒素還元細菌の生理活性, 第 50 回日本水環境学会年会, アクティ徳島(徳島県徳島市) 2016.3.16-18.

末永俊和, 堀知行, 中川洋佑, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, 亜酸化窒素還元細菌をターゲットとする集積培養装置から

単離された *Dechloromonas* sp. と *Azospira* sp. の亜酸化窒素還元活性, 第30回日本微生物生態学会, 亀城プラザ (茨城県土浦市) 2015.10.17-20.

末永俊和, 中川洋佑, 堀知行, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, ガス透過膜を用いた新規培養装置から単離された高活性 N_2O 還元細菌の活性評価, 環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会, 東京大学 (東京都文京区) 2015. 6.29-30.

Suenaga, T., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., A gas-permeable membrane biofilm reactor enriches highly active N_2O -reducing bacteria for isolation, 4th International Conference of Nitrification (Edmonton, Canada) 2015. 6.28-7.1.

志村芙美, 堀知行, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, 安定同位体プロービングと次世代シーケンサーの併用による亜酸化窒素還元細菌の高感度同定, 第49回日本水環境学会年会, 金沢大学 (石川県金沢市) 2015. 3.16-18.

末永俊和, 堀知行, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, ガス透過膜を用いた新規培養装置による高活性 N_2O 還元細菌の集積培養と分離培養, 第49回日本水環境学会年会, 金沢大学 (石川県金沢市) 2015. 3.16-18.

末永俊和, 堀知行, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦, 基質対向拡散型培養装置による N_2O 還元細菌集積系の細菌叢変遷と N_2O 還元活性, 2014 環境微生物系学会合同大会, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) 2014. 10.22-24.

Shimura, F., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., Identification of nitrous oxide-reducing bacteria in activated sludge by ^{13}C -acetate probing combined with high-throughput sequencing, International Symposium on Microbial Ecology 15 (Seoul, South Korea) 2014. 8.24-29.

Shimura, F., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., Identification of active nitrous oxide reducers in activated sludge by rRNA-based stable isotope probing combined with next

generation sequencing, Water and Environment Technology Conference 2014, 早稲田大学 (東京都新宿区) 2014. 6.28-29.

Suenaga, T., Hori, T., Hosomi, M., Terada, A., Enrichment and isolation of N_2O reducing bacteria by a gas-permeable membrane biofilm reactor, Water and Environment Technology Conference 2014, 早稲田大学 (東京都新宿区) 2014. 6.28-29.

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