

N₂O 除去細菌のハイスループット識別・分離手法の開発

北海道大学大学院工学研究院 石井 聡

1. はじめに

一酸化二窒素（亜酸化窒素；N₂O）は二酸化炭素（CO₂）の約 300 倍の温室効果を持つと言われており、その排出量は近年急増している。畜産廃棄物や農耕地、化学工場、焼却施設、廃水処理施設などが主な N₂O 排出源と見積もられている。N₂O は硝化（NH₄⁺ → NO₂⁻ → NO₃⁻）や脱窒（NH₄⁺ → NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂）等の微生物呼吸の産物あるいは副産物として生成される。N₂O の発生を低減するためには、これらの N₂O 生成プロセスを抑制するか、発生した N₂O を除去することが有効である。脱窒の一部である N₂O 還元反応（N₂O + 2H⁺ + 2e⁻ → N₂ + H₂O）を利用することで N₂O 除去を行うことができる¹。

本研究の最終目標は、窒素含有廃水の処理過程から N₂O 発生を低減させることである。我々は、従来の硝化脱窒法に代わる新規処理システムとして嫌気性アンモニア酸化（Anaerobic ammonium oxidation; anammox）反応を利用して、廃水窒素を処理することを考えている。Anammox 反応は、以下の化学式（NH₄⁺ + NO₂⁻ → N₂ + 2H₂O）で表される微生物呼吸である。廃水中に含まれる窒素はアンモニア態が多いので、Anammox 反応を利用するためにはアンモニア態窒素を亜硝酸態窒素に変換する必要がある。部分硝化（Partial nitrification; PN）は硝化の一部であり、アンモニア酸化反応（NH₄⁺ → NO₂⁻）を担うが、副産物として N₂O が発生する。PN-anammox 反応からの N₂O 発生量は、硝化脱窒反応からの N₂O 発生量と比べると少ないが、今後の地球温暖化防止の観点から、さらなる N₂O 発生低減化が望まれる。

以上の背景より、本研究では、まず①PN 反応における N₂O 発生の由来（硝化 vs. 脱窒）を特定し、次いで②N₂O 発生低減化に向けて N₂O 除去微生物を同定し、そして③ハイスループット識別・分離を行うことを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 廃水処理リアクター

図1に示すようなバッチ式リアクター（sequencing batch reactor: SBR）を構築した。リアクター内に活性汚泥に由来する好気性PNグラニュール（図2）を入れ、下部からの曝気により攪拌した。基質として用いた人工下水には 600 mg N/L の NH_4^+ と 200 mg TOC/L の酢酸が含まれている。好気性PNグラニュールの特性およびリアクター運転条件の詳細は Song et al. (2013)² に記した。

2-2. 化学分析

各種イオン (NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^-) はイオンクロマトグラフィー (DX-100、ダイオネクス) で測定した。酢酸濃度は全炭素濃度として TOC 分析装置

(TOC-5000A、島津製作所) で求めた。

N_2O 発生量はガスモニタリング装置

(INNOVA 1442 photoacoustic field gas-monitor, Air Tech Instruments) で測定した。 N_2 発生量は、N のマスバランスから計算した。

2-3. 同位体分析

発生した N_2O の分子内同位体比 (N_2O isotopomer) をガスクロマトグラフィーおよび質量分析装置 (MAT252 system, Thermo Fisher Scientific) で測定した^{3,4}。 N_2O は $\text{N}=\text{N}=\text{O}$ という非対称の構造を取っている。中央および末端の N 原子をそれぞれ N^a および N^b と呼ぶ。 N^a および N^b における $\delta^{15}\text{N}$ を式(1)より求め、その差 (Site preference; *SP*) を式(3)により計算することによって、 N_2O が硝化由来か脱窒由来かを推定することができる⁵。

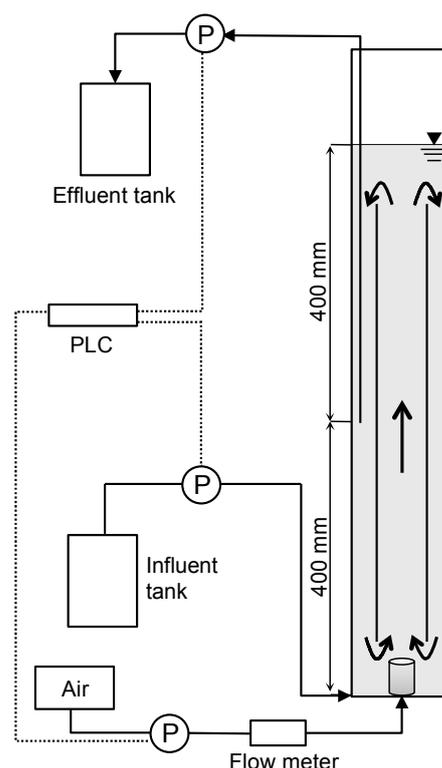


図1. 本研究に用いた SBR の概略図



図2. 本研究に用いた好気性PNグラニュールの写真。バーは10mmを示す。

$$\delta^{15}\text{N} = [(\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{reference}}) - 1] \times 1000 (\text{‰}) \quad (1)$$

$$\text{R} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \quad (2)$$

$$\text{SP} = \delta^{15}\text{N}^a - \delta^{15}\text{N}^b \quad (3)$$

2-4. 微生物群集構造解析

好気性 PN グラニユール内の微生物群集構造を解析するため、グラニユールから DNA を採取し、16S rRNA 遺伝子を対象としたクローンライブラリ解析を Ishii et al. (2011) ¹ の方法に従って行った。

2-5. 遺伝子発現解析

好気性 PN グラニユール内の硝化および脱窒関連遺伝子の発現を解析した。グラニユールを経時的に採取し、ただちに RNA 抽出した。硝化および脱窒関連遺伝子 (表 1) を対象とした定量的 PCR を行うとともに、一酸化窒素還元酵素遺伝子 (*norB*) の配列を次世代シーケンサーで解読した。

表 1. 本研究で用いた PCR プライマー

Target	Primer name	Primer Sequence (5'-->3')	Reference
16S rRNA (total bacteria)	Eub338	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Fierer et al. (2005) ⁶
	Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	
<i>amoA</i>	amoA1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe et al. (1997) ⁷
	amoA2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
<i>nirS</i>	m-cd3AF	AACGYSAAGGARACSSG	Kandeler et al. (2006) ⁸
	m-R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA	
<i>nirK</i> from <i>Nitrosomonas</i> spp.	nirK_166F	GTWCCSGGTCCGGTYGTRCG	Cantera and Stein (2007) ⁹
	nirK_665R	TCRTTGGGWCCRGCRITGAC	
<i>norB</i>	norB2	GACAARHWVTAYTGGTGGT	Casciotti and Ward (2005) ¹⁰
	norB6	TGCAKSARRCCCCABACBCC	
<i>nosZ</i>	nosZ_F	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG	Kloos et al. (2001) ¹¹
	nosZ_1622R	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	Throback et al. (2004) ¹²

2-6. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting

N₂O 還元細菌をハイスループットに採取するため、N₂O 還元条件で増殖する細菌を細胞分裂阻害剤の使用により伸張させ、非伸張細胞と Flow cytometer (JSAN) 解析によって識別することを試みた。識別後の伸張細胞は Fluorescence activated cell sorting (FACS) により、一細胞ずつ分取し、培地で培養した。実験条件の設定のため、まずは大腸菌を用いて条件を検討した。

3. 結果と考察

3-1. 廃水処理リアクターからの N_2O 発生

本研究で用いた廃水処理リアクターはPN反応を行うことを目的としている。図3に示すように、SBR サイクル (4 h) において、 NH_4^+ が酸化され、 NO_2^- が生成していることがわかる。4 h 後には $NH_4^+ : NO_2^-$ はほぼ 1:1 となるため、後段に Anammox 反応につなげる事が可能になる。

N_2O は SBR サイクル初期 (0-20 min) に発生したのち減少し、その後再び増加した。SBR サイクル初期には N_2 発生も多く見られたが、SBR サイクル後半ではほとんど見られなかった。SBR サイクル初期には亜硝酸の減少も見られることから、亜硝酸を基質とする脱窒 ($NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$) が起こっていると考えられる。図には示していないが、SBR サイクル初期には酢酸 (TOC) が減少し、20 分ほどで枯渇する。酢酸は脱窒の電子供与体として働くので、酢酸の減少は脱窒によって起こったと考えられる。

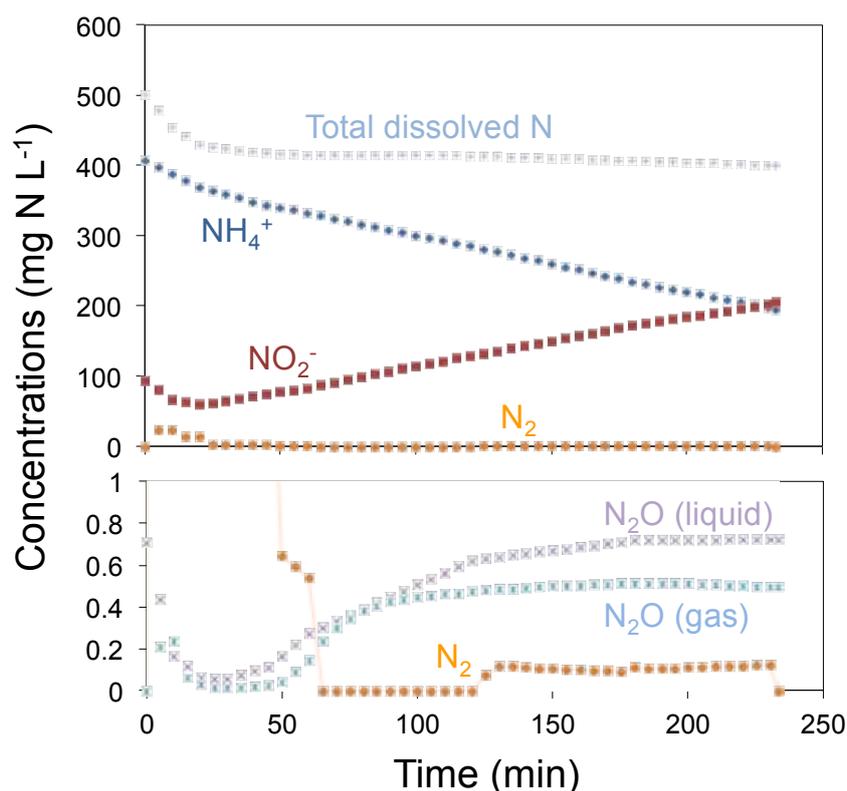


図3. 廃水処理リアクターにおける NH_4^+ 、 NO_2^- 、 N_2O および N_2 濃度の経時変化

3-2. 廃水処理リアクターから発生した N_2O の起源

廃水処理リアクターから発生した N_2O について、同位体分析を行ったところ、

N₂O 発生量に関わらず、*SP* 値は 5~11% と安定していることが明らかになった (図 4)。脱窒に起因する N₂O の *SP* 値は 0%、硝化に起因する N₂O の *SP* 値は 33% と報告されている⁵⁾ので、今回の結果から計算すると、廃水処理リアクターから発生した N₂O の 2~3 割は硝化起源で、残りの 7~8 割は脱窒起源であると推定された。

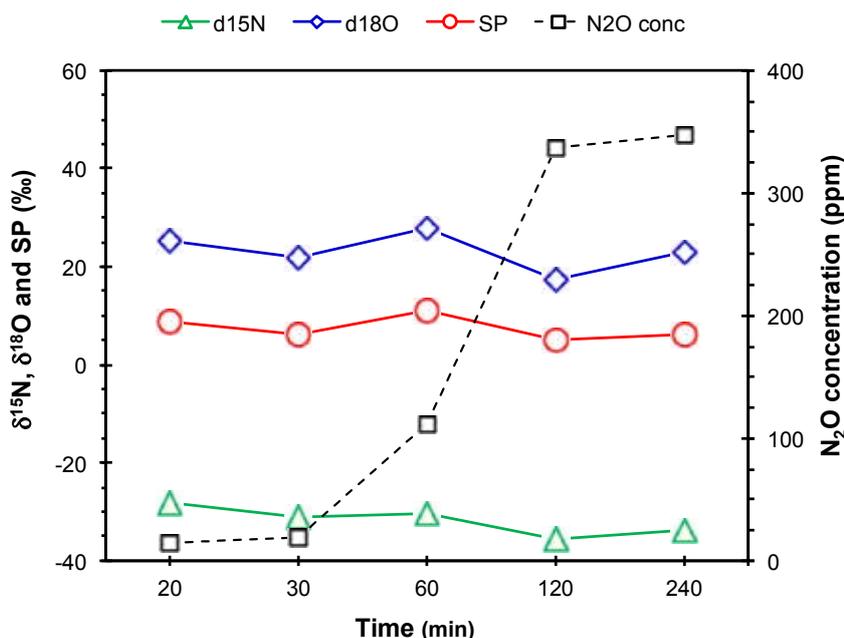


図 4. 廃水処理リアクターから発生した N₂O の同位体分析結果

3-3. 好気性 PN グラニュール内の微生物群集構造

次いで、好気性 PN グラニュール内の微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子を対象としたクローンライブラリ解析によって明らかにした (図 5)。その結果、好気性 PN グラニュールを構成する微生物の多くは *Rhodocyclales* 目と *Pseudomonadales* 目に属する細菌であることが明らかになった。両者ともよく知られた脱窒細菌である。一方で、PN 反応を担うアンモニア酸化細菌 (AOB) として *Nitrosomonadales* 目に属する細菌が検出された。この AOB は系統学的に *Nitrosomonas eutropha* という高濃度の NH₄⁺ が存在する環境で優占する種に近縁であった (図 6)。

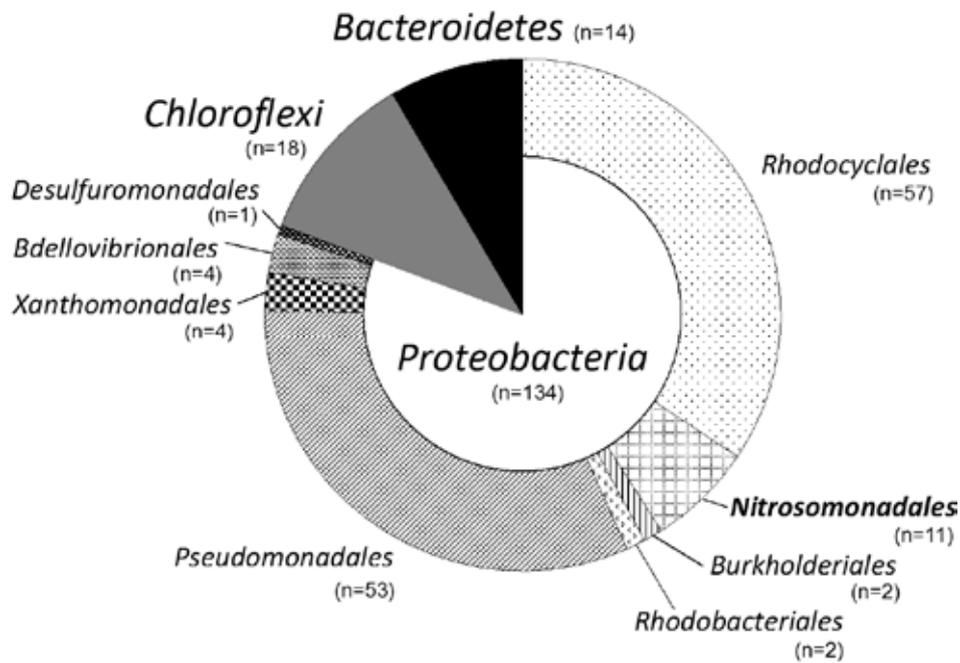


図5. 好気性 PN グラニュールにおける微生物群集構造

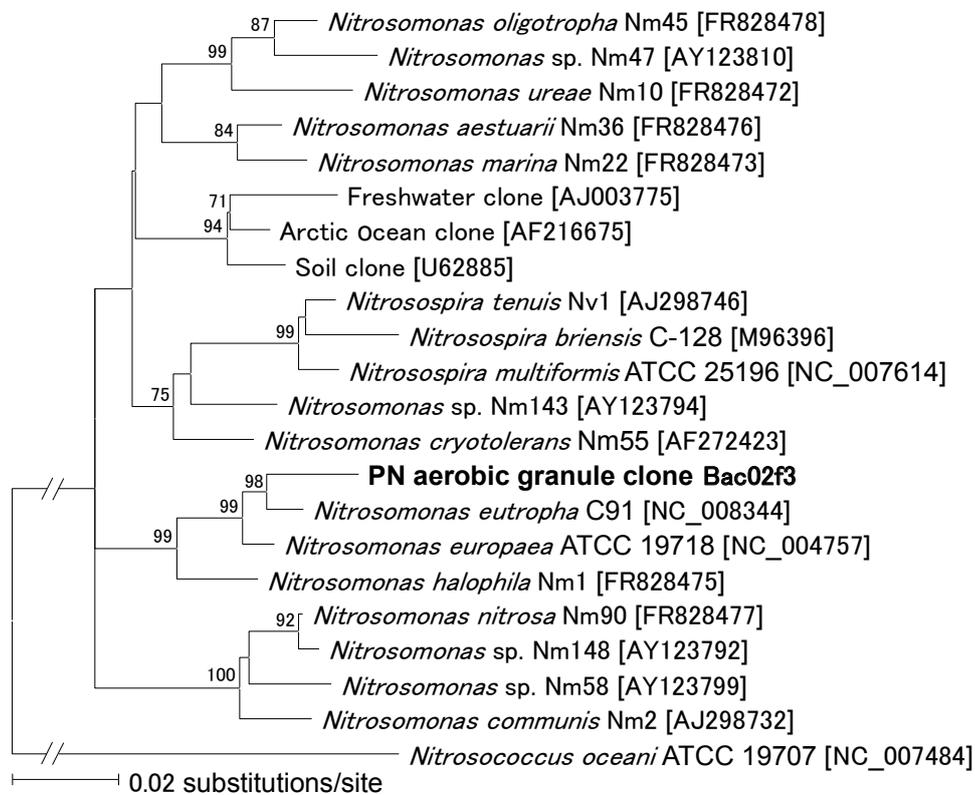


図6. 好気性 PN グラニュールから検出された AOB の系統学的位置

3-4. 好気性 PN グラニュールにおける硝化・脱窒遺伝子の発現解析

N₂O 同位体分析によって、廃水処理リアクターから発生する N₂O の多くは脱窒由来であることが明らかになった。また、群集構造解析から、好気性 PN グラニュール内には *Rhodocyclales* 目と *Pseudomonadales* 目に属する脱窒細菌が存在することが明らかになった。では、実際にどの脱窒細菌が N₂O 生成、N₂O 除去に関与しているのであろうか？この疑問に答えるために、我々は遺伝子発現解析を行った。NO 還元酵素 (=N₂O 生成酵素) の遺伝子を網羅的に解析した結果、SBR サイクルの前半と後半では異なる脱窒細菌が働いていることが明らかになった (図 7)。前半に活発に働いていた脱窒細菌は *Rhodocyclales* に近い細菌であることがわかった。前半は N₂O 還元も起こっていることから、*Rhodocyclales* 脱窒細菌は N₂O 還元除去にも関与していると推察された。以上の結果より、N₂O 還元細菌として *Rhodocyclales* 脱窒細菌を分離することを以降の実験目標とした。

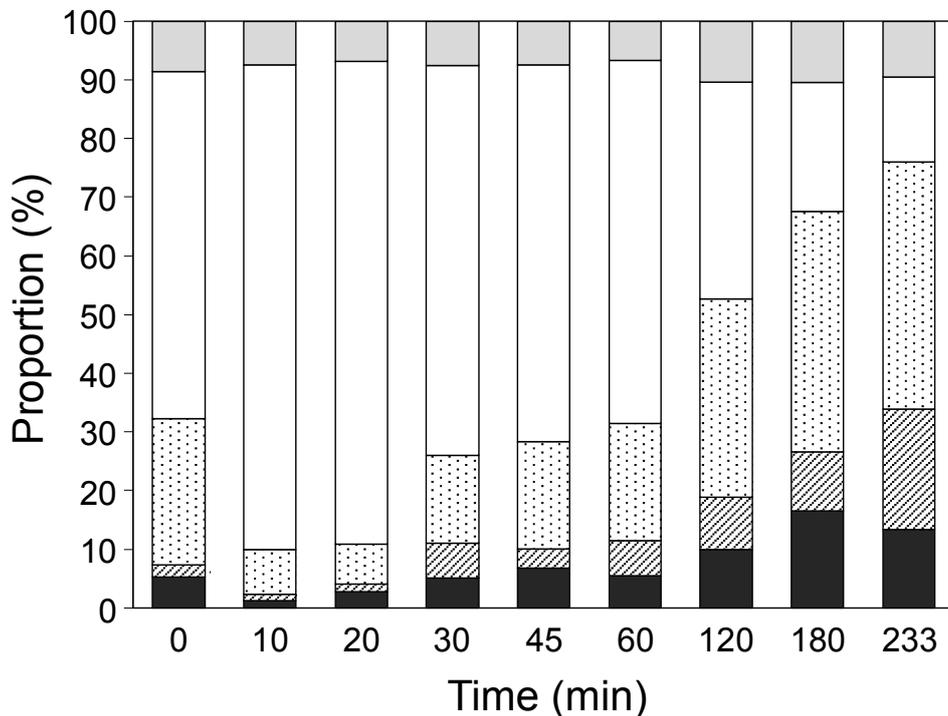


図 7. NO 還元酵素遺伝子配列の発現割合の経時的变化。
白抜きのは棒グラフは *Rhodocyclales* 脱窒細菌の割合を示す。

3-5. FACS 分取条件の検討

Flow cytometry によって伸張細胞と非伸張細胞を区別できることを確認した (図8)。しかしながら、FACS によって一細胞ずつ培地に分取したところ (図9)、非伸張細胞に比べて伸張細胞の回収率 (=培地で増殖したウェル数/分取したウェル数) は極めて低かった。この理由として、細胞分裂阻害剤の添加がその後の細胞増殖に影響した可能性が考えられた。

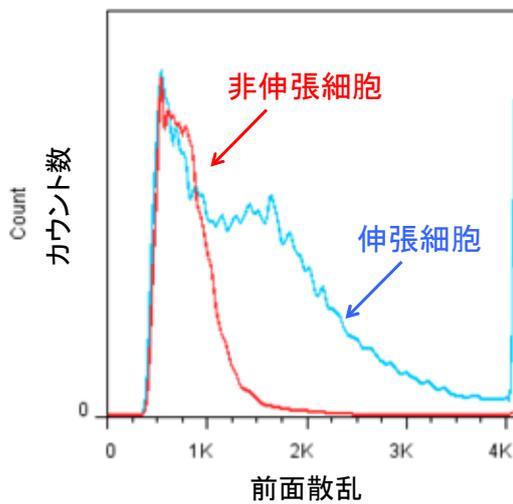


図8. Flow cytometry による伸張細胞と非伸張細胞の区別

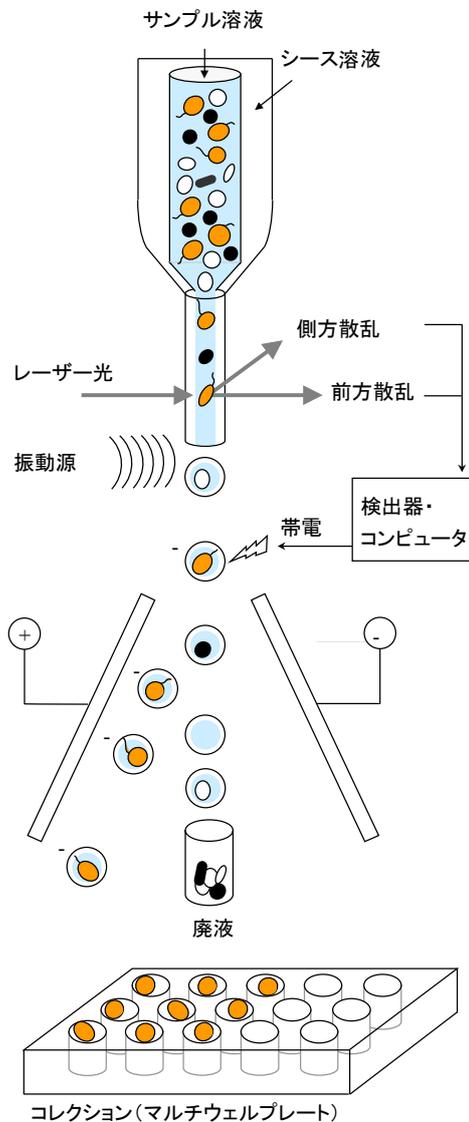


図9. FACS による一細胞分離

4. 結論

- ① PN 反応を利用した廃水処理リアクターから発生する N_2O は主に脱窒に起因することが明らかになった。
- ② N_2O 除去に関与しているのは *Rhodocyclales* に属する脱窒細菌であると示唆された。
- ③ FACS を用いて N_2O 除去細菌の分離に向けて実験条件の検討を行ったが、

細胞分裂阻害剤の影響により細胞の回収が困難であるとの結論に至った。今後は細胞分裂阻害剤の種類や濃度を検討して、N₂O 除去細菌のハイスループット分離を成功させたいと考えている。

謝辞

本研究は、北海道大学大学院工学研究院の岡部聡教授、佐藤久准教授、宋延軍氏、平野麗子氏、Lashita Rathnayake 氏、ならびに東京工業大学大学院総合理工学研究科の吉田尚弘教授、豊田栄准教授、Tumendelger Azzaya 氏の協力を得て行われた。

本研究は、公益財団法人 JFE21 世紀財団 2012 年度技術研究助成により行われた。記して感謝の意を表す。

参考文献

1. Ishii S, Ohno H, Tsuboi M, Otsuka S, Senoo K (2011). Identification and isolation of active N₂O reducers in rice paddy soil. *ISME J.* **5**:1936-1945.
2. Song Y, Ishii S, Rathnayake L, Ito T, Satoh H, Okabe S (2013). Development and characterization of the partial nitrification aerobic granules in a sequencing batch airlift reactor. *Bioresour Technol* **139**: 285-291.
3. Toyoda S, Yoshida N (1999). Determination of nitrogen isotopomers of nitrous oxide on a modified isotope ratio mass spectrometer. *Anal Chem* **71**: 4711-4718.
4. Toyoda S, Suzuki Y, Hattori S, Yamada K, Fujii A, Yoshida N *et al* (2011). Isotopomer analysis of production and consumption mechanisms of N₂O and CH₄ in an advanced wastewater treatment system. *Environ Sci Technol* **45**: 917-922.
5. Sutka RL, Ostrom NE, Ostrom PH, Breznak JA, Gandhi H, Pitt AJ *et al* (2006). Distinguishing nitrous oxide production from nitrification and denitrification on the basis of isotopomer abundances. *Appl Environ Microbiol* **72**: 638-644.
6. Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117-4120.
7. Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4704-4712.
8. Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, Bru D, Philippot L (2006). Abundance of

- narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5957-5962.
9. Cantera JLL, Stein LY (2007). Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria. *Environ Microbiol* **9**: 765-776.
 10. Casciotti KL, Ward BB (2005). Phylogenetic analysis of nitric oxide reductase gene homologues from aerobic ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **52**: 197-205.
 11. Kloos K, Mergel A, Rösch C, Bothe H (2001). Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Funct Plant Biol* **28**: 991-998.
 12. Throbäck IN, Enwall K, Jarvis Å, Hallin S (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 401-417.