# 窒素固定微生物集積培養系に対するヒューミンの効果

名古屋大学 学生会員 ○三下純平
名古屋大学　正会員　　粟田貴宣
名古屋大学　正会員　　片山新太

## 1．はじめに

現代の農業の高い生産性は，窒素肥料によって支えられている．現行のアンモニア生成技術は，莫大なエネルギーを必要とするハーバーボッシュ法により行われる．一方で，微生物には窒素ガスからアンモニアを生成する種が存在しており，この微生物学的プロセスはハーバーボッシュ法と比較すると非常に少ないエネルギーのみで進行する．微生物学的な窒素固定技術の確立は省エネルギー型の循環社会形成には必要不可欠である．生物学的窒素固定は

$$N_2+8H^++8e^-+16ATP\rightarrow 2NH_3+H_2+16ATP+16P_i$$

で表される生物学的な還元反応で，必要な電子をマンニトールなどの糖から利用するが，生成されるアンモニア濃度は低く，さらなるプロセス促進技術開発が必須である．そこで，本研究では，細胞外電子伝達物質としてヒューミンを使用し，ヒューミンからの電子供与によって窒素固定能力の増加が可能かどうか検証すること，ヒューミンによる窒素固定能力の促進効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした．

## 2．実験方法

(1) 窒素固定微生物の集積

第 0 世代は，植種源を 150 mL，Ashby 培地(マンニトール:20 g/L, $K_2HPO_4$:0.2 g/L, $MgSO_4\cdot 7H_2O$:0.2 g/L, NaCl:0.2 g/L $K_2SO_4$:0.1 g/L, $CaCO_3$:5.0 g/L)を 250 mL ずつ，600 mL のバイアルに入れ，ヘッドスペースを窒素で置換したものを 30°C で 7 週間培養した．これを 2 本作製し，G0a，G0b と呼称した．

第 1 世代は，50 mL バイアルに Ashby 培地を 20 mL ずつ入れ，ヘッドスペースを窒素で置換したのち，第 0 世代の培養物(バイオマス)を植種した．植種量は，1 mL，2 mL，5 mL の 3 種類を用意し，G0a 由来のもの(G1a1，G1a2，G1a5 と呼称する)と G0b 由来のもの(G1b1，G1b2，G1b5 と呼称する)の計 6 本作製し，30°C で 4 週間培養した．

第 2 世代からは，前世代からの植種量は 2 mL とした．第 3 世代からは，0.3 g のヒューミンを含む系および含まない系に植継を行った．培養時間は，第 2～6 世代は 30°C で 4 週間，第 7 世代からは 30°C で 2 週間培養した．培養後，アセチレン還元活性により各世代の微生物の窒素固定能力を評価した．窒素固定に関与する酵素であるニトロゲナーゼは，アセチレンをエチレンへ還元する能力を持っていることから窒素固定活性評価に用いられる．培養に使用したバイアルは気相が窒素であり，アセチレンの還元を阻害する可能性が高いため，あらかじめ気相を He で置換した 10 mL バイアルへ各条件の培養バイアルの内容物を 2 mL，培地を 2 mL 添加し，ヘッドスペースにアセチレンを 200 μL 添加して活性試験を行った．アセチレンを添加した日を 0 日目として，0，2，7 日目にエチレンとアセチレンの濃度を GC-FID で測定した．

(2) ヒューミンの電子伝達効果検証試験

第 1 世代のバイオマスを用いて，ヒューミンが微生物の窒素固定能力を促進するか否かの検証およびヒューミンによる微生物の窒素固定能力の促進効果のメカニズムの検証を行った．培養バイアルには Ashby 培地を 20 mL 添加し，ヘッドスペースを窒素

で置換した 50 mL バイアルを使用した．添加する還元剤とヒューミンの濃度はそれぞれ培地 1 L に対して 0.3 g，15 g とした．添加する第 1 世代のバイオマスは G1a2 と G1b2 を使用し，添加する量は 2 mL とした．第 1 世代のバイオマス，ヒューミン，還元剤の有無により条件を表-1 に示すように分け，反復数は 3 回とし，30℃ で 2 週間の培養を行った．窒素固定能力はアセチレン還元活性を測定して評価した．

表-1 ヒューミンの電子伝達効果検証試験の条件

| | ヒューミン | 第 1 世代のバイオマス | 還元剤 |
|---|---|---|---|
| 条件 1 | ○ | ○ | ○ |
| 条件 2 | ○ | × | ○ |
| 条件 3 | ○ | ○ | × |
| 条件 4 | × | ○ | × |
| 条件 5 | ○ | × | × |
| 条件 6 | × | × | × |

## 3．結果と考察

(1) 集積した微生物の窒素固定能力

第 11 世代のアセチレン還元活性試験の結果(7 日目のエチレンの生成量)を図-1 に示す．ヒューミンを添加して培養した系と，そうでない系でアセチレン還元活性(窒素固定能)に差がみられた．

(2) ヒューミンの電子伝達効果検証試験

アセチレン還元活性試験の結果(7 日目のエチレンの生成量)を図-2 に示す．条件 2，5，6 については，活性試験中一度もエチレンは検出されなかった．条件 4 と条件 6 の比較から，第 1 世代から植え継ぎしたバイオマスが窒素固定能力を有していることがわかる．また，条件 5 と条件 6 の比較から，ヒューミンそのものは窒素固定能力を有していないことがわかる．条件 3 と条件 4 を比較することで，ヒューミンが窒素固定能力へ与える効果を検証できる．条件 3 の方が，条件 4 よりも生成されたエチレンの量が多いことから，ヒューミンはアセチレン還元活性を高めた，すなわち微生物の窒素固定能力を高めたといえる．また，還元剤を加えた条件 1 の方が条件 3 よりエチレン生成量が少ないことから，還元剤が阻害剤として働いたと考えられる．今回使用したシステイン塩酸塩はアミノ基を有しており，窒素が含まれている．条件 1 では微生物がこの窒素を優先的に利用したことで，見かけ上のアセチレン還元量が減少したと考えられる．本来は，還元剤による酸化還元電位低下効果で，より多くのエチレンが生成されるはずである．よって今回の実験では還元剤の酸化還元電位低下効果と窒素利用による阻害効果か同時に起きたと考えられるため，還元剤としての効果を正確に検証できなかった．

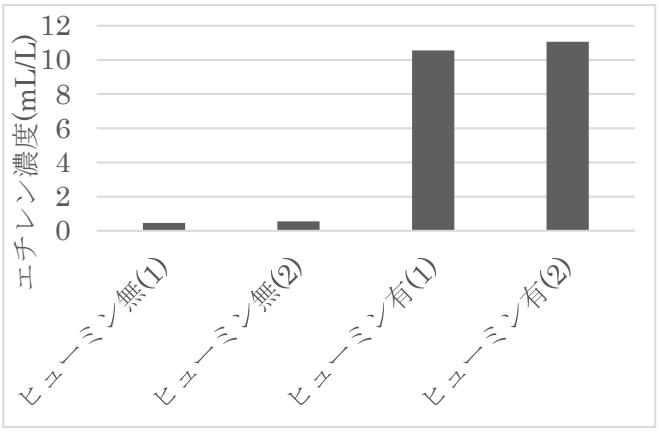


図-1 第 11 世代のアセチレン還元活性試験の結果

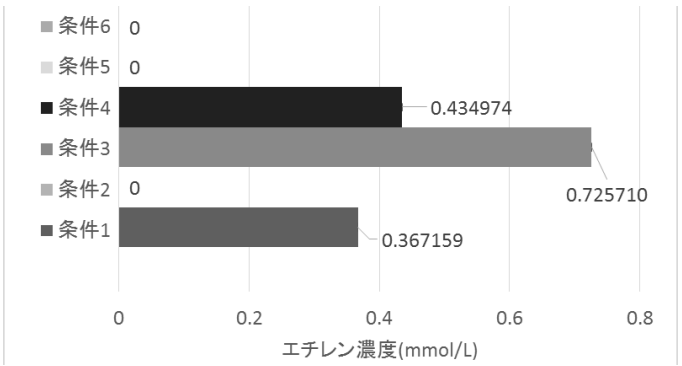


図-2 ヒューミンの電子伝達効果検証試験の結果

## 4．おわりに

本研究では，ヒューミンを使用して微生物の窒素固定能力を促進することを目的とし，微生物群の窒素固定能力は，ヒューミンによって促進されることを明らかにした．一方で，ヒューミンが電子伝達を用いて窒素固定能力の促進に至ったか，還元剤として働いたかを明らかにすることは今回の条件からは困難であることが明らかとなった．窒素固定能に対して阻害しない還元剤を選定する必要がある．