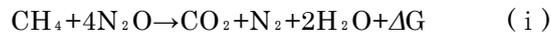


メタンと亜酸化窒素を同時除去する微生物の発見

広島大学	非会員	○蒲原宏実
広島大学	正会員	大橋晶良
広島大学	正会員	金田一智規

1. はじめに

人間活動で生じる温室効果ガスによって、2100年までに平均気温が0.3-4.8℃上昇、平均海面水位が0.26-0.82m上昇すると予測されている(IPCC第5次報告書, 2013)。下水処理工程では二酸化炭素以外にもメタンや亜酸化窒素が大量に発生する事が知られている。これらのガスの温室効果は二酸化炭素に比べて非常に大きく(メタンは二酸化炭素の21倍、亜酸化窒素は310倍)、排出されたガスのほとんどが未処理で大気中に放散されている。一方、酸素が存在しない嫌気的環境下でメタン酸化を行う新規微生物グループの存在が近年報告されている(Ettwig *et al.*, 2009)。一方、亜酸化窒素を電子受容体とし、メタン酸化を行う微生物の存在は現在報告されていない。そのような微生物が存在すると仮定した場合、下記の反応が得られると推測される。



式(i)において $\Delta G = -1235 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ となり熱力学的に十分起こりうる反応である。もしこのような反応を行う微生物が存在するのであれば、微生物学的には新発見であり、工学的には大変利用価値がある。本研究では、メタンと亜酸化窒素を溶存させた培地を用い、上記反応を行う微生物の処理実験および集積培養を試みた。

2. 実験方法

2.1 培養方法

リアクター運転は2台行ったため、区別のため培養I、IIとする。培養は、体積70 mlのバイオカラム内に不織布(2 cm×10 cm×1枚)を設置したup flowリアクターを用いた(Fig.1)。培養Iは、先行研究でメタンと亜酸化窒素の同時処理が確認されたリアクターから保持汚泥を引き継ぎ、運転した。引き継ぐ際に土壌サンプル等の追加は行わなかった。培養IIは、植種源に水田と蓮根畑の土壌を用い、10倍量の水道水で泥を希釈し、不織布を浸して絞ることで植種した。リアクター運転は30℃の恒温で行い、HRTは7時間とした。無機基質培地にリン酸バッファーを添加しpHを7に調整した後、メタン82%と亜酸化窒素18%の混合ガスで1時間バブリングしたものを基質として用いた。基質にはメタン1 mmol・L⁻¹、亜酸化窒素4 mmol・L⁻¹を溶存させた。

2.2 測定方法

流入口(inf.)と流出口(eff.)に設置したガスパック中のガス濃度をガスクロマトグラフィーで測定し、ヘンリーの法則から溶存ガス濃度を求めた。流入ガスはinf.に取り付けたガスパック中のガス組成、流出ガス量はeff.で発生したガス量及び流量からリアクター内の基質収支を算出した。

2.3 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物解析

培養Iに関して、培養48日目のバイオマスをリアクターから回収した。得られたサンプルに対してDNA抽出した後、PCR増幅を行った。プライマーセットはバクテリアを対象とするUniv27f・Univ1492rを用いた。PCR産物は精製後TOPO TA Cloning kit for sequencing (Invitrogen)を用いてクローニングを行った。

3. 実験結果

3.1 培養結果

リアクター内でメタンと亜酸化窒素の同時処理を確認することができた(Fig. 3)。これが微生物の代謝によるも

キーワード 嫌気メタン酸化 脱窒 *Ignavibacteria*

連絡先 〒739-8527 東広島市鏡山1-4-1 広島大学大学院工学研究科 A2-441 環境保全工学研究室

TEL : 082-424-5718

のであれば、微生物の増殖とともにリアクター内の処理速度は指数関数的に増加するはずである。しかしながら、処理速度は一定であり、微生物の増殖は確認されなかった。この原因が窒素源不足と考え酵母を添加したが、反応に変化はなかった。さらに窒素源の枯渇に原因があるとして塩化アンモニウムを添加したところ、リアクター内の反応が止まった。その後、塩化アンモニウムの添加を停止したが再び反応することはなかった (Fig. 4)。これが塩化アンモニウム添加によるものであるとは考えにくかった。反応産物である二酸化炭素の発生量の経時変化に着目すると、発生量が増加しピークを迎えた後、減少していた。反応の停止は、塩化アンモニウムの添加ではなく、リアクター内に存在していた土壌由来の有機物が枯渇したためだと考えた。この仮説を確認するため、水田土壌を植種源とした新規リアクターを立ち上げた。新規に立ち上げたリアクター内でメタンと亜酸化窒素の同時処理は再び確認され、培養 37 日目からはガスの発生も確認された。しかしながら、培養 150 日目にリアクター内でガスの発生なくなり、培養 I と同様に反応がみられなくなった。そこで、オートクレーブをかけて滅菌処理した水田土壌サンプルをリアクター内の不織布に塗布した。土壌サンプルを塗布して 1 日経過後、リアクター内でガスの発生が確認された (Fig. 4)。このことから、リアクター内でこれまで起こっていた反応の大半は、植種の際に持ち込まれた有機物由来の反応であったことが示唆された。

3. 2 微生物解析結果

16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析を行った結果、*Chlorobi* 門は 93 クローン中 41 クローン (44%) を占めていた。そこで、*Chlorobi* 門に関する系統樹を作成した (Fig.2)。最も検出頻度が高かったクローンは 93 クローン中 26 クローン (28 %) を占めていた。このクローンと最も近縁な既知種は、*Ignavibacteria* であった。しかしながら、遺伝子配列の相同性は 88% と非常に低く、リアクター内に新種の微生物が培養されたことが示唆された。先行研究の結果、*Chlorobi* 門は *Rhodocyclales* に次いで多く検出されており再現性のある結果といえる (山本ら 2011)。また、培養 I で優占化した *Ignavibacteria* の至適温度は 45°C という報告がある (Lino *et al.*, 2010)。更に、*Ignavibacteria* は亜酸化窒素還元酵素である *nosZ* を有すると報告されている (Liu *et al.*, 2012)。培養 II において、培養温度を 30°C から 45°C に上げたところ、リアクター内での亜酸化窒素の消費量が増加した。これは、*Ignavibacteria* による脱窒反応が活発化したためと考えられる。したがって、培養 II についても *Ignavibacteria* が培養されていたことが示唆された。

4. 結論

リアクター内でメタンと亜酸化窒素の同時除去は確認された。また、優占化していたクローンは既知種とかけ離れており、これまでに報告のない特性を持つ可能性がある。リアクター内で確認された反応は、優占化したクローンによる亜酸化窒素の脱窒と土壌由来の有機物の分解であった可能性が高い。

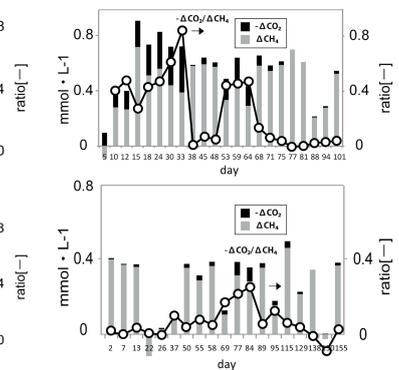
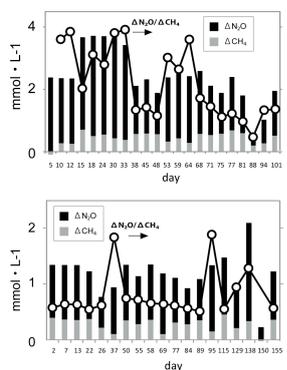
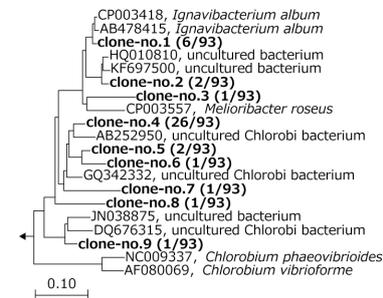
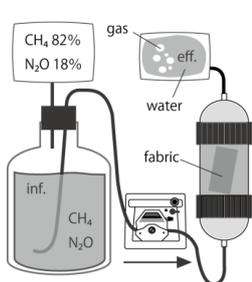


Fig. 1 リアクター図

Fig. 2 Chlorobi 門に関する系統樹

Fig. 3 CH₄ と N₂O 消費

Fig. 4 炭素収支

5. 参考文献

山本ら, 2011. 広島大学大学院工学研究科修士論文
 Lino *et al.*, 2010. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 1376-1382
 Liu *et al.*, 2012. *Frontiers in Microbiology*. 3, 185