

温室効果ガス排出量削減に寄与できる

新型硝化菌の集積手法の開発

芝浦工業大学 工学部

李沁潼

1. はじめに

現在、人為由来の窒素化合物の排出量は年間 18Tg を及んでおり、これらの窒素負荷は水圏富栄養化を招き、アオコの頻発や水源地の異臭被害など複合的な問題を引き起こしている。アンモニアをはじめとする窒素を生活排水から除去するために、最も経済的で有効なのは硝化処理と呼ばれる微生物処理である。一方、硝化処理の副産物として強力な温室効果ガス（GHG）である N_2O が放出されており、日本の年間下水を処理する際にはおおよそ 1.10×10^6 kg の N_2O （ 2.9×10^8 kg の CO_2 に相当）の排出が見積もられている（Mitsuhashi et al., 2014 等に基づいて計算）。さらに、処理水質を維持するためのエアレーション（曝気）は、処理施設全体の約 1/3 と大量な電力を消費しており、それに起因する CO_2 は凡そ 1.7×10^9 kg と試算されている。気候変動対策の一環として GHG 排出総量削減義務制度がすでに導入されている中、下水処理場を含む事業所における N_2O 排出抑制対策及び省エネ化が急務とされている。

こうした背景の中、下水処理施設を特化した N_2O 排出抑制技術の開発は、 N_2O 放出量をモニタリングしながら処理方式ごとの運転条件の検討等が行われ、化学及び工学的視野からの実態把握や基礎情報の整備が進んだものの、大きな削減効果が期待できる対策が未だ確立されていない。一方、硝化を担う微生物について、2015年に発見されたコマモックス菌（van Kessel et al., 2015）によって再定義されている。この新型硝化菌（コマモックス菌）は、溶存酸素やアンモニアに対する親和性（Lawson et al., 2018; Roots et al., 2019 など）が従来の硝化菌（eg.アンモニア酸化細菌、AOB）に比べて高く、そして N_2O の放出（Han et al., 2021 など）が低い傾向にあるため、GHG 発生抑制型処理手法の開発に应用性が高いと考えられる。そこで本研究は、GHG 発生抑制型硝化処理の構築を目指し、新型硝化菌であるコマモックス菌の優占に有利な集積培養手法を探索することを目的とした。

2. 研究方法

コマモックス菌と従来の硝化菌の競合メカニズムに影響を与える要因として、アンモニウム以外の窒素源(尿素等)の基質依存性が挙げられている（Vilardi et al., 2024）。最近、コマモックス菌の単離株はグアニジン唯一窒素源として生存可能なことが報告され、さらにコマモックス菌はごく一部の下水処理場にしか検出できない理由としては下水中のグアニジン濃度に依存するものではないかと示唆された（Palatinszky et al., 2024）。混合培養系を用いた場合、グアニジンの添加は最初の馴養段階においてコマモックス菌の優占に有利であるかはまだ分かっていないため、本研究では、グアニジンの添加が担体中のコマモックス菌の相対組成及び菌叢全体に与える影響を解明する。具体的に、以下の方法を用いる。

- ・ 実験装置と運転条件

300 mL 三角フラスコに PVA スポンジ製の微生物担体 20 mL、活性汚泥 50 mL、液体培地である窒素濃度 4.2 mg/L(Guanidine-N : NH₄⁺-N=1 : 1)の無機合成排水を供給して回分運転を行った(グアニジン添加系列 a)。また NH₄⁺-N=4.2 mg/L の対照系列 b を設けた。運転は 25°C、120 rpm、暗所の条件下で 10 週間行い、1 週間ごとに培地の入れ替えを行った。

・水質分析

試水を一週間に 3~4 回採取し、0.45 μm 孔径のシリンジフィルターでろ過してアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素、尿素態窒素の測定に用いた。なお、アンモニア態窒素はインドフェノール青法、亜硝酸態窒素はエチレンジアミン法、硝酸態窒素はイオンクロマトグラフィー (SHIMADZU Nexera™ IC)、尿素態窒素はジアセチルモノオキシム法で測定した。

・機能微生物の定量と菌叢解析

微生物担体を週 3 粒採取し、DNA 抽出まで-20°Cで保管した。DNA 抽出は DNeasy Power Biofilm Kit (Qiagen)を用いて行った。機能遺伝子 (Archaeal *amoA*, bacterial *amoA*, comammox *amoA*) は qPCR (ABI7500, Applied Biosystem) を用いて定量した。また、comammox *amoA* 及び 16S rRNA V3-V4 領域を対象にアンプリコンシーケンシング (MiSeq, Illumina) を行った。

3. 結果と考察

実験開始から 10 週間にわたるグアニジン添加系列(a)およびコントロール系列(b)の水質の経日変化を図 1 に示す。実験開始 1 週目では、両系列ともアンモニア態窒素濃度は約 70 mg/L から約 50 mg/L まで減少したが、亜硝酸および硝酸の生成は確認されなかった。2 週目以降、コントロール系列(b)ではアンモニア態窒素の減少に伴い亜硝酸の生成が確認され、部分硝化 (アンモニアから亜硝酸への酸化) が進行したことが示唆された。一方、グアニジン添加系列(a)では 10 週間を通してアンモニア態窒素の減少が認められたものの、亜硝酸および硝酸の生成は確認されなかった。このことから、グアニジン添加系列(a)では、硝化によって生成した亜硝酸あるいは硝酸が担体内の他の微生物に速やかに利用され、系内に蓄積しなかった可能性が考えられる。一方で、硝化反応自体が十分に進行せず、添加したアンモニアが微生物同化など別の代謝経路で消費された可能性も否定できない。

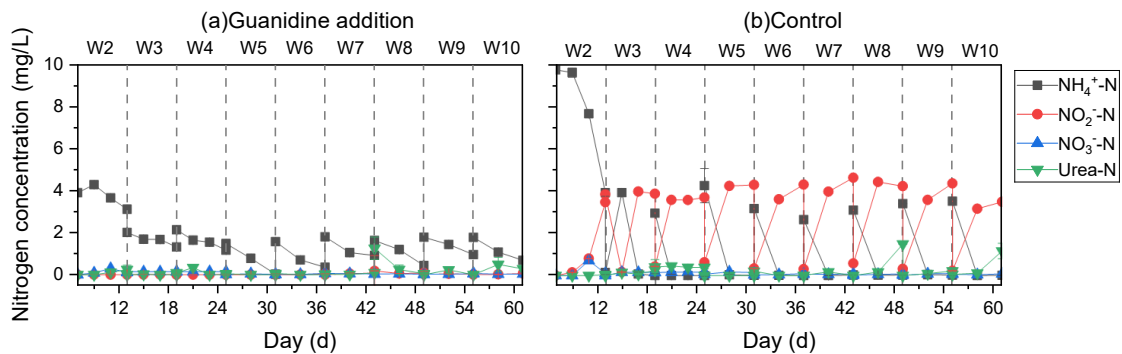


図 1. 水質の経日変化

担体内の機能微生物を対象とした機能遺伝子の qPCR 定量結果を図 2 左に示す。2 週目以降はいずれの系列においても、AOB 由来 *amoA* 遺伝子が AOA および comammox *amoA* 遺伝子より高いコピー数で検出され、AOB が主要なアンモニア酸化微生物であることが示された。コントロール系列(b)では AOB 由

来 *amoA* 遺伝子が終始 10^9 copies/g carrier 以上検出されたのに対し、グアニジン添加系列(a)では 10^7 copies/g carrier 未満にとどまったことから、アンモニアを唯一の窒素源とした場合と比較して、グアニジンの存在が AOB の増殖を抑制した可能性が示唆された。一方、*comammox amoA* 遺伝子量は両系列とも 10 週間を通して顕著な増加は認められなかった。これは、*comammox* の増殖速度が AOB などの従来型硝化菌より遅いことに起因すると考えられる。

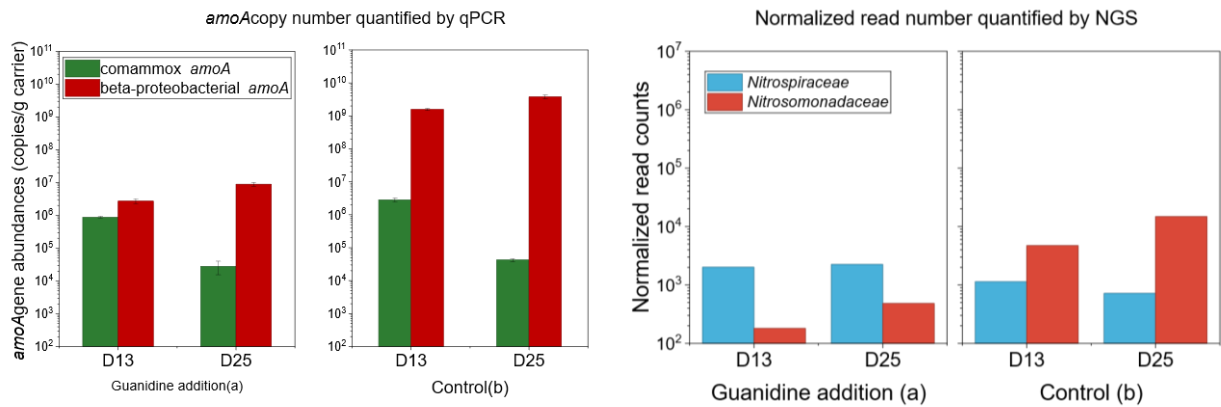


図 2. *Comammox amoA* と *beta-proteobacterial amoA* の qPCR 定量結果 (左)、16S rRNA(V3-V4 領域)のアンプリコンシーケンシングによる *Nitrosomonadaceae* 科と *Nitrospiraceae* 科のリード数 (右)

16S rRNA 遺伝子 (V3-V4 領域) のアンプリコンシーケンシング解析においても (図 2 右)、両系列における *Nitrosomonadaceae* 科に分類された総リード数の推移は、qPCR で得られた AOB 由来 *amoA* 遺伝子の増殖挙動と概ね一致していた。一方、*Nitrospiraceae* 科と *Nitrosomonadaceae* 科の相対比は両系列で異なり、グアニジン添加系列(a)ではコントロール系列(b)とは逆の傾向を示した。このことから、グアニジン添加は *Nitrospiraceae* 科と *Nitrosomonadaceae* 科の相対比に影響を及ぼす要因の一つであることが示唆された。

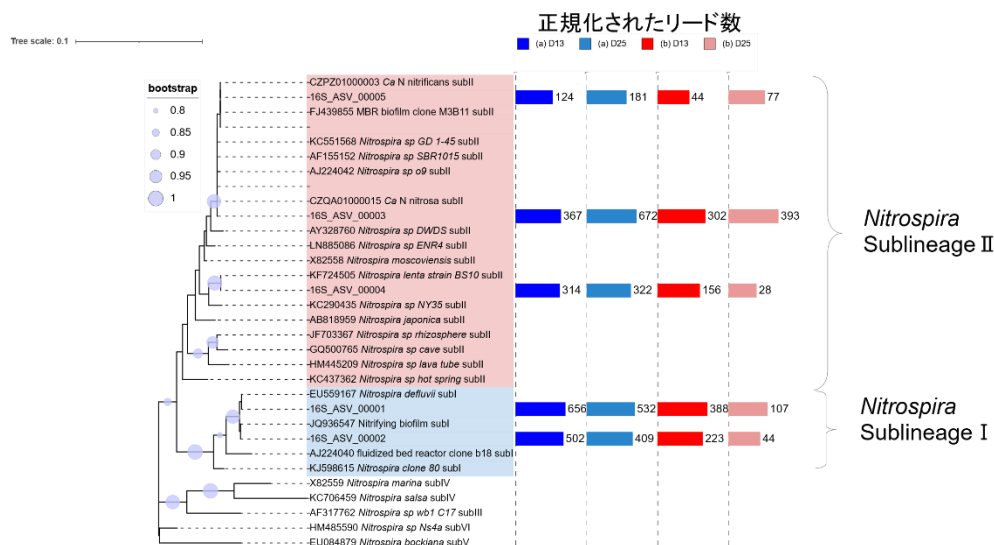


図 3. *Nitrospiraceae* 科に属する主要 ASV の系統樹 (424bp の 16S rRNA fragment により作成)

Nitrospiraceae 科に分類されたリードについて系統解析を行った結果 (図 3)、両系列とも *Nitrospiraceae* sublineage I (亜硝酸酸化のみを担う strict NOB) および *Nitrospiraceae* sublineage II (一部に

comammox を含む) が検出された。また、グアニジン添加系列(a)ではコントロール系列(b)と比較して *Nitrospiraceae* 科のリード数が全体的に多い傾向が認められた。このことから、グアニジン添加は *Nitrospiraceae* 科の増殖に有利である可能性が示唆された。

16S rRNA 遺伝子配列のみでは、*Nitrospiraceae* 科に属する strict NOB と comammox *Nitrospira* を区別できないため、comammox *amoA* 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンシングも実施した。その結果 (図 4)、両系列とも *Candidatus Nitrospira nitrosa* に近縁な comammox *amoA* 配列が検出された。一方、機能遺伝子のアンプリコンシーケンシングは定量性に乏しいため、系列間で存在量を比較することはできなかった。グアニジンを基質とした場合の増殖速度はアンモニウムを基質とした場合よりも低いことが単離株を用いた生理活性実験で検証されており (Palatinszky et al., 2024)、また既存の comammox の単離は数年に渡った集積培養が必要であった (van Kessel et al., 2015) ことから、今後は連続運転を長期間に行い、各種硝化菌の長期変化挙動を解析していく必要があると考えられる。

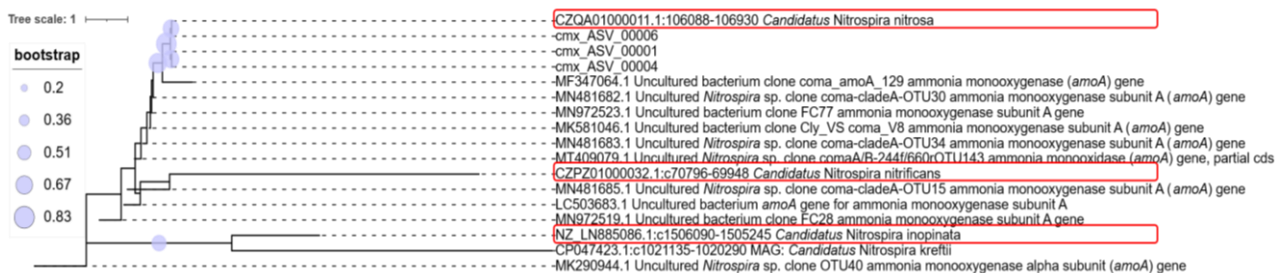


図 4. 検出された comammox *amoA* ASV の系統樹 (322bp の *amoA* fragment により作成)

4. まとめ(総括と展望)

本研究では、グアニジン添加系列において AOB の増殖が抑制された一方で、*Nitrospiraceae* 科の相対存在量が高まる傾向が認められた。また、comammox *amoA* 遺伝子の増加は確認されなかったものの、アンプリコンシーケンシングにより *Candidatus Nitrospira nitrosa* に近縁な comammox が検出された。近年、*N. inopinata* はグアニジンを唯一のエネルギー源、電子供与体および窒素源として利用し、グアニジナーゼおよび APC トランスポーターを介してグアニジンを分解・利用できることが報告されている (Palatinszky et al., 2024)。一方で、その増殖速度はアンモニアを基質とした場合よりも著しく遅く、さらにグアニジン利用関連遺伝子はグアニジン応答性リボスイッチによって制御されることが示されている (Palatinszky et al., 2024)。これらの知見を踏まえると、本研究の 10 週間の培養期間では comammox の顕著な増殖には至らなかったものの、グアニジン存在下において *Nitrospiraceae* 科がグアニジンを利用、あるいは利用可能な状態を維持していた可能性が考えられる。一方、本研究ではグアニジン添加系列において亜硝酸および硝酸の蓄積が認められなかったことから、グアニジン由来窒素の利用実態や硝化活性については本研究のみでは明らかにできず、今後はグアニジナーゼ遺伝子の発現解析やメタトランスクリプトーム解析、グアニジン濃度の経時変化の測定などを組み合わせることで、グアニジン代謝と comammox の生理応答との関係を詳細に検証する必要がある。また、comammox の増殖は特にグアニジン添加条件では緩慢であることから、今後は長期連続培養を実施し、comammox の長期的集積特性について検証していく予定である。

本研究の成果は日本水環境学会第 60 回年会（東京多摩大会）において発表した。今後はさらなる検証実験を加え、応用微生物学の国際ジャーナルへ投稿する予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに深く謝意を示します。

参考文献

1. Matsushashi, M., Tsushima, I., Fukatani, W., & Yokota, T. (2014). *Damage to sewage systems caused by the Great East Japan Earthquake, and governmental policy. Soils and Foundations*, 54(4), 902-909.
2. van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lückner, S. (2015). *Complete nitrification by a single microorganism. Nature*, 528(7583), 555–559.
3. Lawson, C. E., & Lückner, S. (2018). *Complete ammonia oxidation: an important control on nitrification in engineered ecosystems. Current opinion in biotechnology*, 50, 158-165.
4. Roots, P., Wang, Y., Rosenthal, A. F., Griffin, J. S., Sabba, F., Petrovich, M., Yang, F., Kozak, J. A., Zhang, H., & Wells, G. F. (2019). *Comammox Nitrospira are the dominant ammonia oxidizers in a mainstream low dissolved oxygen nitrification reactor. Water Research*, 157, 396–405.
5. Han, P., Wu, D., Sun, D., Zhao, M., Wang, M., Wen, T., Zhang, J., Hou, L., Liu, M., Klümper, U., Zheng, Y., Dong, H. P., Liang, X., & Yin, G. (2021). *N₂O and NO_y production by the comammox bacterium Nitrospira inopinata in comparison with canonical ammonia oxidizers. Water Research*, 190, 116728.
6. Vilardi, K. J., Johnston, J., Dai, Z., Cotto, I., Tuttle, E., Patterson, A., Stubbins, A., Pieper, K. J., & Pinto, A. J. (2024). *Nitrogen source influences the interactions of comammox bacteria with aerobic nitrifiers. Microbiology Spectrum*, 12(5), e03181-23.
7. Palatinszky, M., Herbold, C. W., Sedlacek, C. J., Pühringer, D., Kitzinger, K., Giguere, A. T., Wasmund, K., Nielsen, P. H., Ducholm, M. K. D., Jehmlich, N., Gruseck, R., Legin, A., Kostan, J., Krasnici, N., Schreiner, C., Palmetzhofer, J., Hofmann, T., Zumstein, M., Djinočić-Carugo, K., Daims, H., & Wagner, M. (2024). *Growth of complete ammonia oxidizers on guanidine. Nature*, 633(8030), 646–653.