

アナモックス細菌の窒素・酸素同位体分別測定に成功

～窒素循環解明の鍵となるアナモックス細菌の窒素除去への寄与推定が可能に～

ポイント

- ・ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の反応では、重い ^{15}N が先に反応する逆同位体分別 ($\varepsilon < 0$) を示した。
- ・ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ の反応では、菌種間で窒素同位体分別 $^{15}\varepsilon$ が大きく異なる。
- ・ 未解明であったアナモックス細菌の窒素循環への寄与解明に大きく前進。

概要

北海道大学大学院工学研究院の岡部 聡教授、同大学院工学院博士後期課程の小林香苗氏らの研究グループは、海洋性の“*Ca. Scalindua japonica*”を含む3種の嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）細菌の集積培養系を確立し、アナモックス反応 ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) における窒素・酸素同位体分別 ($^{15}\varepsilon$ ・ ^{18}E) を求めることに世界で初めて成功しました。

環境保全や生物地球化学的物質循環を明らかにするためには、窒素循環の解明が極めて重要です。現在、海水中の硝酸や亜硝酸の窒素・酸素同位体比は窒素循環の流れを追跡する要素（トレーサー）として広く用いられており、環境中（特に海洋）の窒素循環を明らかにする際に用いることで、生物学的反応の相対的寄与を定量的に把握することができます。この寄与推定に必要な不可欠な硝化や脱窒反応の窒素・酸素同位体分別に関しては、すでに多くのデータが集積されています。

しかし、アナモックス細菌は幅広い水圏環境で検出され、特に海洋窒素循環に大きく寄与していると考えられていますが、増殖速度が非常に遅く培養が困難です。そのため、これまでに淡水性の窒素同位体分別が唯一報告されているだけで、海洋性アナモックス細菌を含め多様なアナモックス細菌の窒素・酸素同位体分別に関する情報は皆無でした。

研究グループは、3種のアナモックス細菌（海洋性の“*Ca. Scalindua japonica*”, 淡水性の“*Ca. Brocadia sinica*”及び“*Ca. Jettenia caeni*”）の $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の反応における窒素・酸素同位体分別 ($^{15}\varepsilon$ ・ ^{18}E) を求め、細菌間の比較を行いました。その結果、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の反応では重い ^{15}N が先に反応する逆同位体分別 ($\varepsilon < 0$) を示し、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ の反応では菌種間で窒素同位体分別 $^{15}\varepsilon$ が大きく異なることがわかりました。

この研究成果により、窒素循環をベースとしたより精度の高い海洋生態系モデルや地球温暖化予測モデルの構築が可能となり、今後、環境中におけるアナモックス細菌の窒素循環への寄与解明に向けた大きな手掛かりになることが期待されます。

なお、本研究成果は、2019年5月28日（火）公開の *The ISME Journal* (Springer Nature) 誌に掲載されました。

【背景】

アナモックス細菌は、海洋や沿岸域などの幅広い水圏環境で検出され、脱窒反応とともに窒素除去へ大きく寄与していると考えられています。実環境中の窒素化合物の濃度と、物質の起源やプロセスの情報を保持している安定同位体比 (δ) を測定し、窒素循環モデルと組み合わせることによって、各細菌の窒素除去への寄与が推定されています。

この推定には、窒素循環に関わる各細菌の固有の同位体分別 ϵ (反応における安定同位体比 (δ) の変化量) が不可欠です。脱窒細菌やアンモニア酸化細菌に関しては、すでに多くのデータが集積され、菌種間の比較がなされていますが、アナモックス細菌は難培養性細菌であり、淡水性の“*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*”の窒素同位体分別 ($^{15}\epsilon$) が唯一報告されているだけで、海洋性アナモックス細菌を含め他の多様なアナモックス細菌の窒素同位体分別 ($^{15}\epsilon$) に関する情報はありません。さらに、酸素同位体分別 ($^{18}\epsilon$) に関しては全く解析されていません。しかし、海洋の窒素循環 (図 1) を解明するためには、アナモックス反応の窒素・酸素同位体分別 ($^{15}\epsilon$, $^{18}\epsilon$) の測定が必要不可欠です。

そこで、本研究では 3 種のアナモックス細菌 (海洋性の“*Ca. Scalindua japonica*”, 淡水性の“*Ca. Brocadia sinica*”及び“*Ca. Jettenia caeni*”) の $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$, $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の反応における窒素同位体分別 ($^{15}\epsilon$) と、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の見かけの酸素同位体分別 ^{18}E (亜硝酸酸化の酸素同位体分別と水の取り込みの酸素同位体分別の和) を求め、細菌間の比較を試みました (図 2)。

【研究手法】

研究グループは、各アナモックス細菌を膜分離型連続培養リアクター (MBR) を用い、高度に集積培養しました (>90%)。また、MBR 流入水と流出水の水質をモニタリングし、定常状態であることを確認した後、流入水と流出水をそれぞれ一日おきに 4 回サンプリングしました。その後、MBR 流入水と流出水中の亜硝酸、硝酸、アンモニウムイオンを、それぞれアザイド法、脱窒菌法、ディフュージョン法で前処理を行い、窒素及び酸素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$) を同位体比質量分析計 (GC-IRMS, EA-IRMS) で分析しました。

この測定結果を基に、実測した化学量論係数を用いて窒素同位体分別 $^{15}\epsilon$ ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$), $^{15}\epsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$), $^{15}\epsilon$ ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) 及び $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の見かけの酸素同位体分別 ^{18}E を算出しました。

【研究成果】

$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ の反応では、全てのアナモックス細菌において世界でも数例しかない、重い ^{15}N が先に反応する逆同位体分別 ($\epsilon < 0$) を示すことが明らかになりました。見かけの酸素同位体分別 (^{18}E) に関しても、逆同位体分別が見られました。また、 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$ の反応では、3 種とも類似した $^{15}\epsilon$ の値 (30.9 ~ 32.7%) であり、同じ酵素を介して反応が進みます。しかし、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ の反応では、*nirS* 酵素を持つ“*Ca. Scalindua japonica*”は 19.9%, *nirK* 酵素を持つ“*Ca. Jettenia caeni*”は 29.5%と高い値を示しました。*nirK* と *nirS* 酵素の両方を保有していない“*Ca. Brocadia sinica*”は 5.9%であり、他の菌種と比較して大幅に小さい値を示しました (図 3)。

これらの結果より、反応に関与する酵素の違いにより窒素同位体分別 ($^{15}\epsilon$) が変化することが示唆されました。

【今後への期待】

今回求められたアナモックス細菌の窒素・酸素同位体分別を既存の窒素循環モデルに適用することで、実環境中でのアナモックス細菌の窒素除去への寄与を推定することが可能となるため、環境中でのアナモックス細菌の窒素循環への寄与解明に向けた大きな手掛かりになることが期待されます（図4）。

また、窒素循環をベースとしたより精度の高い海洋生態系モデルや生物地球化学的物質循環モデルの構築を促し、持続的窒素循環を可能とする対策技術の選定・開発に繋がることが期待されます。

論文情報

論文名 Dual nitrogen and oxygen isotope fractionation during anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria（嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）反応の窒素・酸素同位体分別の解析）
著者名 小林香苗¹，眞壁明子²，矢野 翠³，押木 守⁴，金田一智規⁵，Karen L. Casciotti⁶，岡部 聡⁷（¹北海道大学大学院工学院，²海洋研究開発機構，³京都大学，⁴長岡工業高等専門学校，⁵広島大学，⁶スタンフォード大学，⁷北海道大学大学院工学研究院）
雑誌名 The ISME Journal（Springer Nature）（微生物生態学の専門誌）
DOI 10.1038/s41396-019-0440-x
公表日 2019年5月28日（火）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学大学院工学研究院 教授 岡部 聡（おかべさとし）
TEL 011-706-6266 メール sokabe@eng.hokudai.ac.jp
URL <http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/index.html>

配信元

北海道大学総務企画部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

【参考図】

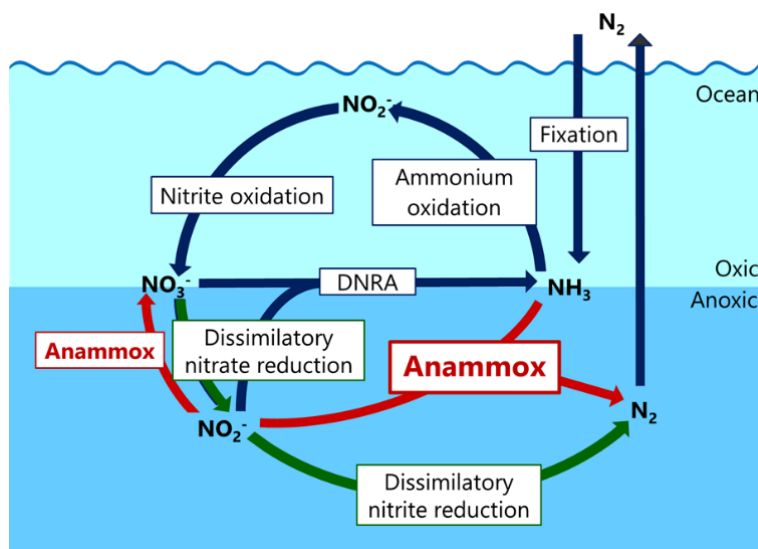
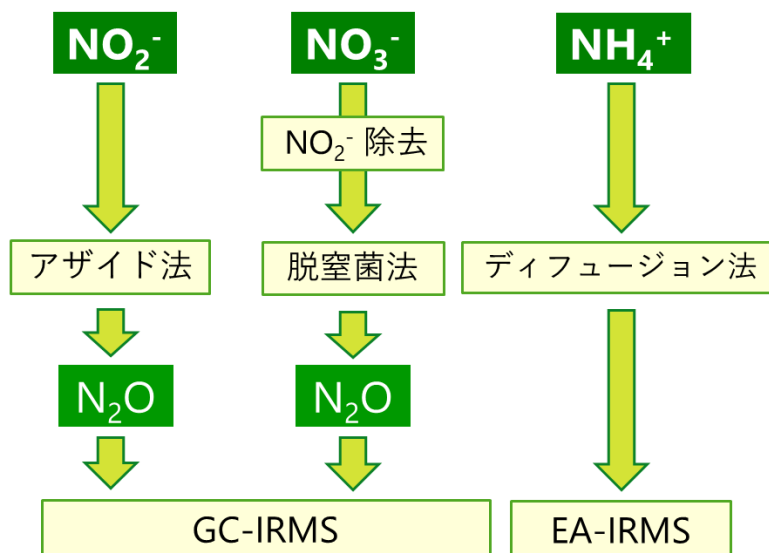
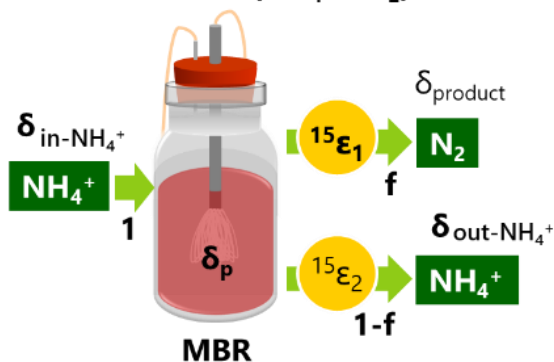


図1. 海洋の窒素循環プロセス。



◆ 窒素同位体分別(NH₄⁺→N₂)

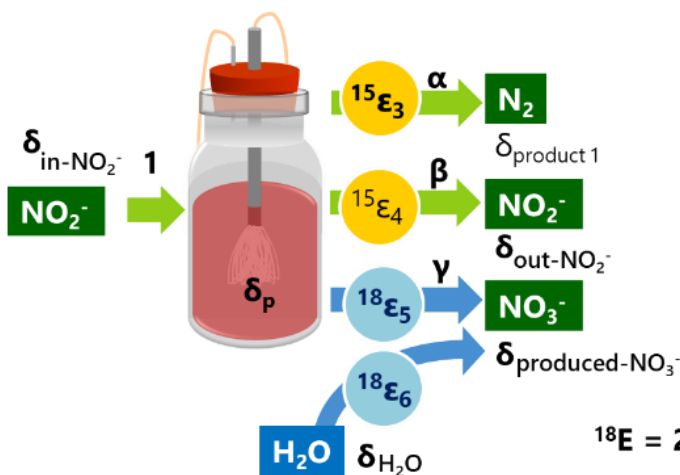


$$^{15}\epsilon_1 = (\delta_{\text{out-NH}_4^+} - \delta_{\text{in-NH}_4^+}) / f$$

$$f = (C_{\text{in-NH}_4^+} - C_{\text{out-NH}_4^+}) / C_{\text{in-NH}_4^+}$$

δ_p: 中間生成物の同位体比
 残留NH₄⁺ なので、¹⁵ε₂ = 0

◆ 酸素同位体分別 (NO₂⁻還元と酸化反応)



$$\alpha = (C_{\text{in-NH}_4^+} - C_{\text{out-NH}_4^+}) / C_{\text{in-NO}_2^-}$$

$$\beta = C_{\text{out-NO}_2^-} / C_{\text{in-NO}_2^-}$$

$$\gamma = 1 - \alpha - \beta$$

$$^{15}\epsilon_3 = (\delta_{\text{out-NO}_2^-} - \delta_{\text{in-NO}_2^-} - \gamma\epsilon_5) / \alpha$$

$$^{15}\epsilon_4 = 0$$

$$^{15}\epsilon_5 = \delta_{\text{out-NO}_2^-} - \delta_{\text{produced-NO}_3^-}$$

$$^{18}\epsilon = 2/3\delta_{\text{out-NO}_2^-} + 1/3\delta_{\text{H}_2\text{O}} - \delta_{\text{produced-NO}_3^-}$$

● 安定同位体比 (δ)

$$\delta^{15}\text{N}_A = \left(\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_A}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000\text{‰}$$

● 同位体分別

同位体の反応速度の差により化合物中のδ値が変化する現象

● 同位体分別係数 (ε)

分別によるδ値の変化量

$$\text{基本式 } \epsilon = \left(\frac{\delta_{\text{反応物}} - \delta_{\text{生成物}}}{f} \right)$$

$$f = \left(\frac{C_{\text{反応物}} - C_{\text{生成物}}}{C_{\text{反応物}}} \right)$$

図2. 窒素同位体分析フローと連続培養系を用いた窒素・酸素同位体分別係数(ε)の算定法。

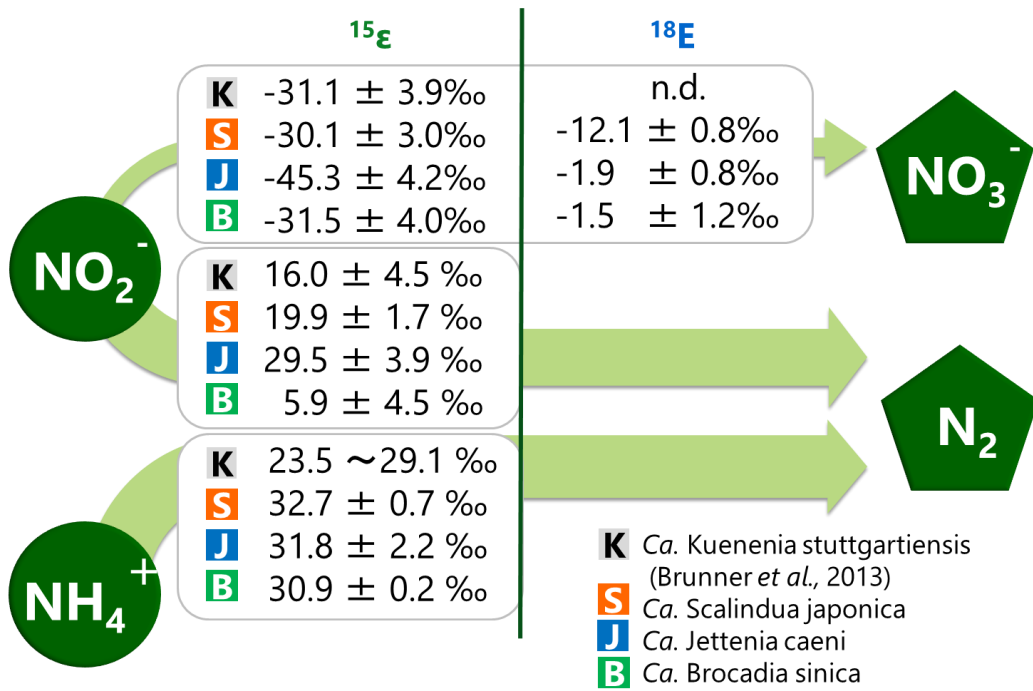


図 3. 本研究で求められた 3 種のアナモックス細菌の窒素・酸素同位体分別係数 (¹⁵ε, ¹⁸ε)。見かけの酸素同位体分別 ¹⁸E は、今回世界で初めて求められた。

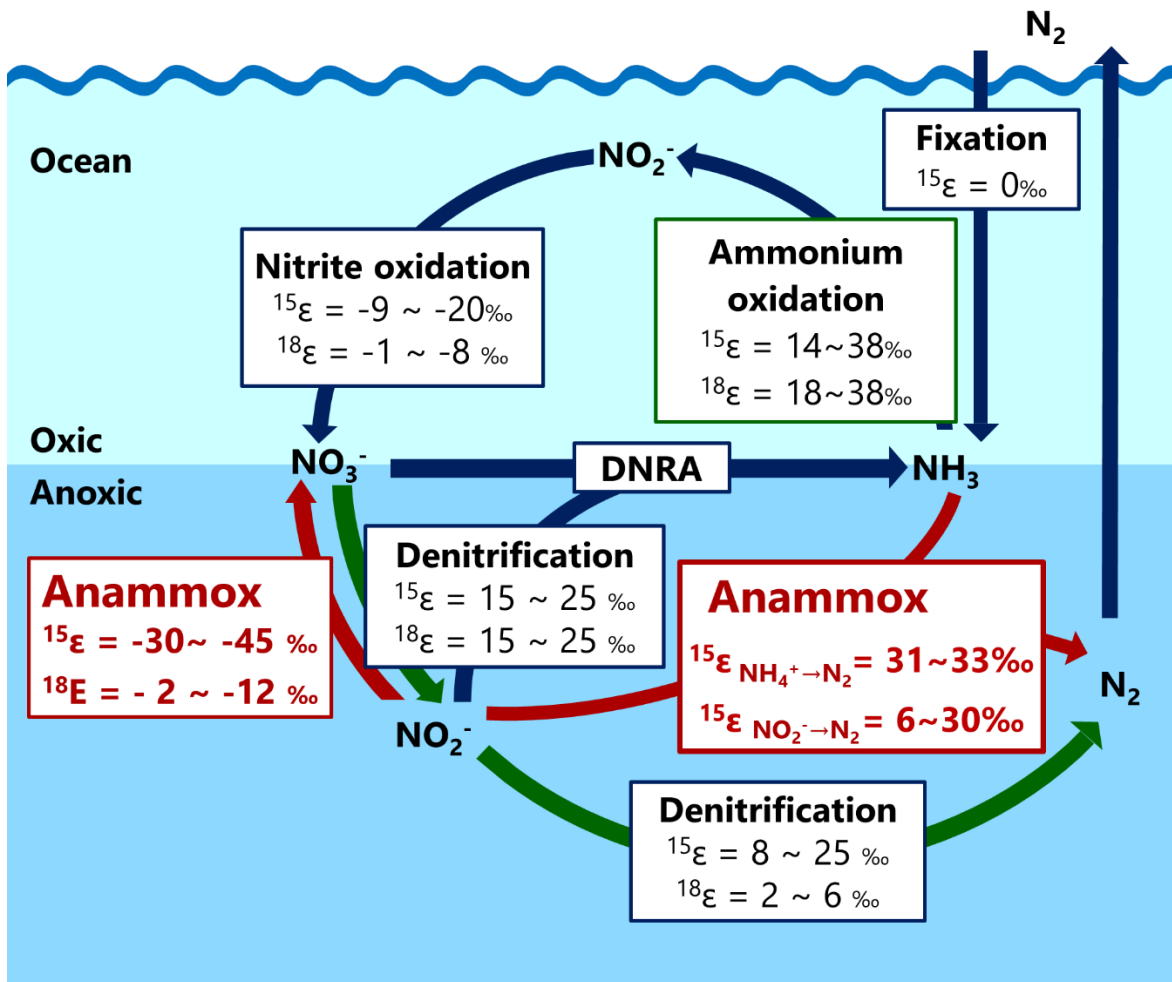


図 4. 本研究でアナモックス反応の窒素・酸素同位体分別 (¹⁵ε, ¹⁸ε) を解析したことで、窒素循環へのアナモックス細菌の寄与を明らかにすることが可能となった。