

一酸化二窒素 (N₂O) を発生しない好氣的脱窒菌の特性解析と排水処理への活用

竹中 慎治

(神戸大学農学部 生物機能化学科)

研究の目的

排水中に含まれるNH₄⁺やNO₃⁻などの窒素化合物は、河川、湖沼や閉鎖海域における富栄養化の原因物質であり、これらの効率的な除去技術の開発は緊急を要する課題である。従来の生物学的窒素除去法では、硝化と脱窒を別々に行うため、少なくとも3種の微生物と2つの処理槽が必要である。申請者は、NH₄⁺やNO₃⁻を同時に除去する微生物、*Klebsiella pneumoniae* F-5-2を自然界から分離することができた。本菌は好気条件下において、培地中の鉄イオンとモリブデン酸イオンの濃度を制御することにより高い硝化・脱窒能を示し、CO₂の100倍以上の温室効果をもたらすN₂Oを発生しなかった。本研究では、本菌の硝化・脱窒機構を解明すると共に、効率的な窒素除去・脱窒の条件を設定することを目的とした。

方法

1. 硝化・脱窒に関与する酵素遺伝子群の解析

既報の硝酸還元酵素関連遺伝子の保存領域をもとにデザインしたプライマーを用いてF-5-2株のtotal DNAを鋳型としてPCRを行い、得られた増幅DNA断片をハイブリダイゼーション用のプローブとした。得られたプローブを用いて構築したF-5-2株の遺伝子ライブラリーから陽性株を選択した。

2. 硝化・脱窒に与える炭素源、無機塩類等の影響試験

- i) 培養条件：前報に従い、0.1% (w/v) NH₄NO₃培地を調製後、F-5-2株を培養した。
- ii) 生育と窒素化合物の定量：生育（濁度、OD₆₆₀）と培地中に残存するNO₃⁻（サリチル酸を用いたニトロ化反応法）、NO₂⁻（ジアゾカップリング法）およびNH₄⁺（インドフェノールブルー法）を定量した。
- iii) NH₄NO₃の除去に与えるリン酸塩濃度の影響：各種濃度（0～128 mM）のリン酸塩を含むNH₄NO₃培地を調製し、F-5-2株を植菌後、経時的に本菌の生育と培地中に残存する窒素化合物を定量した。
- iv) NH₄NO₃の除去に与える炭素源の影響：NH₄NO₃培地に含まれるD-グルコースのかわりに、唯一の炭素源として糖類（8種類）、有機酸（4種類）、アミノ酸（7種類）、天然培養基（3種類）を含む培地をそれぞれ調製した。本菌を植菌後、経時的に本菌

の生育と培地中に残存する窒素化合物を定量した。

結果

1. 硝化・脱窒に関する酵素遺伝子群の解析

PCRにより得られた増幅 DNA 断片の塩基配列を解析したところ *Salmonella typhimurium* 由来の硝酸還元酵素遺伝子と高い相同性を示した。標識 PCR 産物をプローブとして F-5-2 株のゲノムライブラリー（約 8,000 株）についてコロニーハイブリダイゼーションを行い、3つのポジティブクローン（p68D7、p24A12、p6E12）を得た。得られた DNA 断片の塩基配列（約 12 kb）を決定し、6つの ORF（open reading frame）を見出した。これらは、既報の硝酸還元関連遺伝子群とアミノ酸レベルで高い類似性を示した（Table 1）。

Table 1. Comparison of Primary Amino Acid Sequences Deduced from ORF 1 to 6.

| ORF | Predicted function | Homology | | | |
|-----|------------------------------------|-------------------------|---------|-------------------------------|---------------|
| | | Amino acid identity (%) | Protein | Source | Accession No. |
| 1 | Nitrate reductase (small subunit) | 66 | NasC | <i>Klebsiella oxytoca</i> | L27431 |
| 2 | Nitrite reductase | 89 | NasB | <i>Klebsiella oxytoca</i> | L06800 |
| 3 | Nitrate reductase (large subunit) | 79 | NasA | <i>Klebsiella oxytoca</i> | L06800 |
| 4 | Nitrate/Nitrite response regulator | 93 | NarL | <i>Salmonella typhimurium</i> | AE008778 |
| 5 | Nitrate/Nitrite sensor protein | 80 | NarX | <i>Salmonella typhimurium</i> | AE008778 |
| 6 | Nitrite extrusion protein | - ^a | NarK | <i>Salmonella typhimurium</i> | AE008778 |

^a 現在解析中

2. 硝化・脱窒に与える炭素源、無機塩類等の影響試験

NH_4^+ および NO_3^- の同時除去に与えるリン酸塩濃度の影響を調べたところ、64 mM以上のリン酸塩を含む試験培地において両イオンの効率的な除去が見られた。さらに、両イオンの除去に与える炭素源の影響について調べたところ、サッカロース、ラクトース、D-マンノース、マルトース、D-フルクトース等の糖類においてD-グルコースと同等の除去効果が見られた（Table 2）。一方、L-アラビノース、D-ガラクトース、酢酸ナトリウムは、両イオンの同時除去を抑制するだけでなく、本菌の生育も不良であった。そこで、同時除去効果がみられた炭素源と除去を抑制する炭素源共存下で試験したところ、酢酸ナトリウムを含む培地のほとんどにおいて両イオンの同時除去に対して抑制が見られた。

Table 2. Effects of carbon sources on the removal of NO_3^- and NH_4^+ from 0.2% (w/v) (25 mM) NH_4NO_3 medium under aerobic conditions.

| Carbon source | Remaining (mM, after 60 h cultivation) | | | Growth (OD_{660}) |
|--------------------|----------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| | NO_3^- | NO_2^- | NH_4^+ | |
| D-Glucose | 0 | 0 | 0 | 13 |
| Lactose | 0 | 0 | 0 | 11 |
| L-Arabinose | 15.5 | 1.5 | 0.65 | 9.1 |
| D-Mannose | 0 | 0 | 0 | 13 |
| Maltose | 0.4 | 0 | 0 | 13 |
| D-Galactose | 16.8 | 1.0 | 4.25 | 8.7 |
| D-Fructose | 0 | 0 | 0 | 11 |
| Sodium acetate | 18 | 3.0 | 23 | 0.2 |
| DL-Malic acid | 7.5 | 1.4 | 0 | 3.1 |
| Disodium Succinate | 20 | 1.5 | 3.0 | 4.3 |

結論

本菌における硝化・脱窒に関する酵素遺伝子群の解析を目的とし、同遺伝子群のクローニングを試みた。今回、既報の硝酸還元関連遺伝子とアミノ酸レベルで高い類似性を示す6つのORFを見出した。今後、周辺領域の塩基配列の解析を進め、硝化・脱窒に関する酵素系の特性を解析し、見出したORFの機能を同定したい。

NH_4^+ および NO_3^- の同時除去に与える環境因子の影響を調べた。生育に伴い、培養液のpHは弱酸性側に傾き生育が抑制されたことから、効率的な除去には培地pHを中性付近に維持することが必要である。また、炭素源の影響試験から除去効果と良好な生育 ($\text{OD}_{660}=10$ 以上) の見られた糖類は、数ステップでフルクトース-6-リン酸をへて解糖系・TCAサイクルに至る単糖類 (D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース) およびD-グルコースを含む二糖類であった。本菌は従属栄養細菌であり、添加する金属塩類だけでなく、好気条件で旺盛に生育できる炭素源を選択することが、より効率的な硝化・脱窒につながるといえる。

文献

Kim, Y-J *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 996-1001 (2002).