

助成年度：平成3年度

[所属] 東京工業大学 生命理工学部

[役職] 助教授

[氏名] 福森 義宏 (他計2名)

[課題]

新しい硝化脱窒細菌の分離とその廃水処理への有効利用に関する 基礎的研究

[内容]

(I) 研究目的

(1) 生態学的に硝化細菌や脱窒細菌が生息していると思われる湖沼および下水処理場から有機的硝化脱窒細菌を分離する。

(2) 有機的硝化脱窒細菌の硝化機構及び脱窒機構を分子レベルで解明する。

(II) 研究結果

(1) 有機的硝化脱窒細菌の分離。

試料として(1)木崎湖(長野県大町市)底土(2)深見池(長野県下伊那郡)嫌気水層(3)東京都北多摩2号下水処理場活性汚泥の3サンプルを用いた。従属栄養脱窒細菌分離用培地を調製し、各試料を接種した後、ダラム管を入れた試験管を用いて2週間20°Cで培養した。生育が観察された試験管のうち脱窒によると思われる気泡の見られるものについて、希釈法により単離を試みた。その結果、木崎湖から5株、深見池から7株、下水処理場から3株それぞれ分離することに成功した。次にこれらの分離株を用いて生育実験を行ったところ、分離された15株は3つのグループに分けることができた。グループIはアンモニアを必要とするがチオ硫酸塩を必要としない脱窒細菌類、グループIIはアンモニア塩を必要とし、さらにチオ硫酸塩が無いと長いlag phaseが生じるような脱窒細菌類、グループIIIはアンモニア塩の有無により全く生育速度に変化がない脱窒細菌類である。今回分離した脱窒細菌のうちグループIに属する細菌群は硝酸イオンが存在しなくてもアンモニア塩が存在すれば脱窒を行なうことから本細菌群の中に有機的硝化脱窒を行なう細菌が存在すると思われることから、硝化細菌用培地を用いてその生育を検討した。

(2) 有機的硝化脱窒細菌による脱窒及び硝化の機構解明。

好氣的条件下で有機物をエネルギー源とし硝化と脱窒を同時に行うことができる細菌として唯一分離されている *Thiosphaera pantotropha* の生育に及ぼす窒素源及び酸素の影響と脱窒反応に関与する酵素系の一つである亜硝酸還元酵素の精製を試みた。その結果、本細菌は好氣的条件下では窒素源としてアンモニアを添加しても、また硝酸塩を添加してもその生育には差が見られなかった。一方、嫌氣的条件下では硝酸塩が存在するときのみ速く生育し、アンモニア塩ではその生育が大変遅かった。一般に脱窒細菌は嫌気性細菌であり酸素が存在すると脱窒に関与する酵素系の発現が抑制されることが知られている。したがって本細菌が好氣的条件下でも脱窒を行うかどうかを分子レベルで明らかにするためには好氣的条件下で培養した菌体に脱窒反応に関与する硝酸還元酵素や亜硝酸還元酵素が発現しているかどうかを調べるのが重要であることから、硝酸塩存在下、嫌氣的に培養した菌体から亜硝酸還元酵素を精製することを試みた。

菌体を超音波破碎(250w, 10分)し、得られた可溶性画分から亜硝酸還元酵素をイオン交換クロマトグラフィ及びゲルろ過を行うことにより精製した。得られた最終精製標品はチトクロム cd_1 型の亜硝酸還元酵素

とこの分光学的性質が似ておりヘム c とヘム d₁ の存在もピリジンフェロヘモクロムスペクトルから確認された。チトクロム cd₁ は多くの脱窒細菌の呼吸鎖電子伝達系において亜硝酸塩還元酵素として機能している重要な酵素であり、本酵素が *T. pantotroph* に存在することは本細菌の脱窒反応がこれまで分離されている多くの脱窒細菌と類似のものであることを示唆するものである。

一般に脱窒反応は酵素存在下では行われないと考えられている。そこで、本細菌の場合について検討したところ、好氣的条件下でも硝酸塩が存在すればチトクロム cd₁ が発現していることが無細胞抽出液の〔(還元型) - (酸化型)〕差スペクトルから示唆され、また少量ではあるがチトクロム cd₁ の部分精製にも成功した。従って本細菌が好氣的条件下でも脱窒反応を行なうことができるのは脱窒酵素系よりもその発現系が一般の脱窒細菌とは異なることが示唆された。