

博士論文

廃水処理場で発生する温室効果ガスである N_2O 発生
抑止に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻 酵素学研究室

平成 21 年博士課程進学 松岡真生

指導教員 若木高善

目次

略語	1
要旨	3
序章 廃水処理場で発生する温室効果ガス N_2O の抑止にむけて	7
本文	8
図表	21
参考文献	28
第 1 章 養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥からの N_2O 抑止に寄与する有用脱窒菌の単離と、その単離株の系統学的解析	33
序	34
材料	35
単離戦略	37
方法	38
結果	44
考察	48
図表	50
参考文献	61
第 2 章 単離株の N_2O 還元能解析並びに脱窒能解析	63
序	64
材料	64
方法	64
結果	69
考察	74
図表	77
参考文献	90

第3章 活性汚泥へのバイオオーギュメンテーションによる単離株の N ₂ O抑止効果の検証	92
序	93
材料	93
方法	93
結果	101
考察	107
図表	109
参考文献	122
第4章 単離株の脱窒遺伝子解析	123
序	124
材料	127
ゲノム解読の手法	128
方法	128
結果	133
考察	137
図表	139
参考文献	156
第5章 単離株の系統分類学的研究	160
序	161
材料と方法	161
結果と考察	170
図表	177
参考文献	193
総括	195
謝辞	197

略語

NO_3^- : Nitrate (硝酸)

NO_2^- : Nitrite (亜硝酸)

NO : Nitric oxide (一酸化窒素)

N_2O : Nitrous oxide (亜酸化窒素)

N_2 : Dinitrogen (窒素)

Nar : Nitrate reductase (硝酸還元酵素)

Nir : Nitrite reductase (亜硝酸還元酵素)

Nor : Nitric oxide reductase (一酸化窒素還元酵素)

N_2Or : Nitrous oxide reductase (亜酸化窒素還元酵素)

nar : Membrane-bound dissimilatory nitrate reductase gene

nap : Periplasmic dissimilatory nitrate reductase gene

nir(K) : Copper nitrite reductase gene

nir(S) : Cytochrome *cd*₁ nitrite reductase gene

nor : Nitric oxide reductase gene

nos : Nitrous oxide reductase gene

ANR : Anaerobic regulation of arginine deaminase and nitrate reduction

DNR : Dissimilative nitrate respiration regulator

FNR : Fumarate and nitrate reductase regulator

CFC : Chlorofluorocarbon (クロロフルオロカーボン)

DO : Dissolved oxygen (溶存酸素)

COD : Chemical oxygen demand (化学的酸素供給量)

BOD : Biochemical oxygen demand (生物化学的酸素要求量)

Anammox : Anaerobic ammonium oxidation (嫌気的アンモニア酸化)

HRT : Hydraulic retention time (水理学的滞留時間)

SRT : Sludge retention time (汚泥滞留時間)

MLSS: Mixed liquor suspended solid (活性汚泥浮遊物質)

MBR : Membrane Bio-reactor (回分式膜分離型反応槽)

PM 培地 : Pig manure 培地

GC-MS : ガスクロマトグラフ質量分析計

LB : Luria-Bertani

DW : Distilled water

IPTG : Isopropyl beta-D-thiogalactoside

NJ 法 : Neighbour-joining 法 (近隣結合法)

ML 法 : Maximum likelihood 法 (最尤法)

HPLC : High-performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

PBS : Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

TEM : Transmission electron microscopy (透過型電子顕微鏡)

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏名 松岡 真生
指導教員名 若木 高善

論文題目 廃水処理場で発生する温室効果ガスである N_2O 発生抑止に関する研究

序論

窒素サイクルは、炭素サイクルと同様に地球環境において重要な物質循環系である。この窒素サイクルを形成する過程の中に、脱窒が存在する。脱窒とは、硝酸や亜硝酸を還元し、亜酸化窒素 (N_2O) や二原子窒素 (N_2) のようなガス状窒素化合物に変換する生物的反応であり、窒素固定や硝化と共に窒素サイクルを維持する上で重要な位置を占めている。脱窒の中間産物である N_2O は、温室効果ガスとしての能力が極めて高く、オゾン層破壊の最大要因とも言われている。廃水処理場では、主に微生物の活性汚泥を用いた硝化脱窒法により窒素処理を行っているが、近年、廃水処理場における窒素除去過程から N_2O の発生が報告されている。脱窒工程由来の N_2O の発生は、亜酸化窒素還元酵素 (N_2O_r) が酸素によって阻害されることや、亜硝酸の蓄積、低いC/N比であること (電子供与体基質の不足) などが原因であると考えられている。特に養豚糞尿廃水処理場では、廃水が高濃度のアンモニアを含んでいるために大量の N_2O が放出されていることが報告されており、早急に対策を講じる必要性に迫られている。

この問題の解決策として、養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥から N_2O 抑止効果をもたらす有用脱窒菌を単離し、 N_2O 発生抑止を目的としたバイオオーギュメンテ

ーションに利用するという手法が考えられた。現場での巨大なスケールでのバイオオーギュメンテーションを成功させるには、外部から添加する微生物が内在している微生物群との生存競争に駆逐されずに定着できるかが大きな鍵を握るとされるが、活性汚泥内の微生物を用いればその問題をクリアできるのではないかと考えた。

1. 養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥からの微生物の単離

N₂O発生抑止効果をもたらす有用脱窒菌を単離する条件として、硝化脱窒槽の環境に適応でき、その環境下で脱窒の最終過程であるN₂OからN₂への強い還元能力を示すことが大切であると考え、以下のような手法をとった。まず、硝化脱窒槽の環境に似たPM (Pig Manure) 培地を用い、気相をN₂Oで置換した条件で5回集積培養を行った。そして、この1次スクリーニングにより得られたサンプルをPMゲランガムプレートに塗布し、気相をN₂Oに置換して2次スクリーニングを行った。その結果、5株の微生物の単離 (M-01株、M-07株、M-08株、M-11株、M-13株) に成功した。これらの単離株は、N₂Oで呼吸することにより生育する可能性が非常に高いと考えられる。16S rRNA遺伝子に基づく系統学的解析から、M-01株とM-11株が*Gammaproteobacteria*綱の*Pseudomonas*属、M-07株が*Betaproteobacteria*綱の*Advenella*属、M-13株が*Alphaproteobacteria*綱の*Paracoccus*属に属していた。また、M-08株は*Gammaproteobacteria*綱の*Pseudomonadaceae*科の新属である可能性が示唆された。

2. 単離株のN₂O還元能・脱窒特性の解析

PM培地を用いて単離株のN₂O還元能と脱窒特性を調べ、廃水処理のN₂O発生抑止に有用な微生物を探した。まず、気相をN₂Oに置換した条件における培養では、5株のうちM-07株以外は、強いN₂O還元能を有することが判明した。次に、脱窒基質や気相の条件を変えて脱窒特性を調べた。M-13株は硝酸・亜硝酸からの脱窒能を有していたが、亜硝酸からの脱窒の際に大量のN₂Oが放出された。M-07株・M-08株・M-11株は亜硝酸からの脱窒能は有していたが、硝酸からは脱窒を行わなかった。M-07株とM-08株は亜硝酸からの脱窒でN₂Oの放出が観察されたが、M-11株は全くN₂Oを放出しなかった。残りのM-01株は、N₂O還元能は強いものの、硝酸及び亜硝酸からの脱窒能が非常に弱いという変わった特徴を有していた。そのうえ、どの条件下においてもN₂Oの放出は観察されなかった。

酸素によるN₂Oの不活性化が廃水処理場でのN₂O発生要因であることを受けて、N₂O還元に対する酸素の影響をみたところ、M-01株とM-11株が他の単離株に比べ、N₂O還元に対する酸素耐性があることが分かった。さらに、脱窒基質として亜硝酸とN₂Oが共存下にある培養では、M-01株とM-11株は亜硝酸よりもN₂Oを優

先的に消費した。特に、M-11 株に関しては、亜硝酸脱窒がおきているところに N₂O を添加すると、亜硝酸からの脱窒が阻害され N₂O 還元が優先されるという、今までにない現象が観察された。この、亜硝酸よりも N₂O を優先的に利用する脱窒特性は、廃水処理場の N₂O 発生抑止に重要な役割を示すのではないかと考えた。

以上の結果を踏まえ、M-01 株と M-11 株は N₂O 発生抑止を目的としたバイオオーギュメンテーションに利用する有用脱窒菌に適していると判断した。

3. 活性汚泥へのバイオオーギュメンテーションによる N₂O 発生抑止効果の検証

まず、試験管レベルで、単離株をバイオオーギュメンテーションに利用し、N₂O 発生抑止効果の検証を行った。脱窒基質として亜硝酸を用いた。その結果、M-01 株と M-11 株で高い N₂O 発生抑止効果が認められた。それ以外の単離株では N₂O 発生抑止効果が確認されなかった。

続いて、廃水処理場への添加を想定し、嫌気的な脱窒槽の運転に倣ったメスシリンダーでの連続培養において、長期間で M-01 株と M-11 株の N₂O 発生抑止効果を検証した。脱窒基質として亜硝酸を用いた。両株とも長期にわたって高い N₂O 発生抑止効果が実証された。さらに、M-01 株と M-11 株の 16S rRNA 遺伝子の特異的に増幅するプライマーを作成し、連続培養中の動向をモニタリングしたところ、M-11 株は培養終盤で占有率が少し低下したのに対し、M-01 株は培養を通して生残性を維持していた。つまり M-01 株の方がより廃水環境に適応できることを表しており、長期に渡って廃水処理場で N₂O 発生抑止に貢献できる可能性が示唆された。

4. 単離株の脱窒遺伝子構造

ゲノムウォーキング法により、M-01 株と M-11 株の脱窒酵素の触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子の同定と塩基配列全長を決定し、そして脱窒遺伝子構造を部分的に決定した。両株とも、亜硝酸還元酵素 (Nir) 遺伝子 *nirS*、一酸化窒素還元酵素 (Nor) 遺伝子 *norCB*、亜酸化窒素還元酵素 (N₂Or) 遺伝子 *nosZ* を 1 種類ずつ有しており、アミノ酸配列に基づいた分子系統樹では両株の NirS・NosZ とともに *Pseudomonas* 属の NirS・NosZ と同一のクラスターを形成していた。また、両株とも一般的な脱窒細菌に見られるような *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) を有していた。

同時並行して M-08 株も脱窒遺伝子構造の解析を進めたところ、この菌は、*nirS* と *nosZ* を 2 種類ずつ持っていることが判明した。これら 2 種類の NirS と NosZ は、それぞれお互いに 52%、76% のアミノ酸配列同一性を示していた。また、2 種類の *nosZ* の近傍にはいずれも *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) が形成されていることが分かり、両方とも *nosZ* が機能的に働くであろうと予想された。現時点

で、複数の *nosZ* が機能的に働くという報告は今までされていない。一方、*nirS* に関しては、1つの大きな *nir* クラスター（約 20 kbp）の中に *nirS* が2つ存在した。このクラスター内で Nir に関わる他のコンポーネントは1種類ずつしか持ち合わせていないことを考えれば、この事実は非常に奇異である。この2種類の *nirS* がどう働くのか、興味深い。

5. 単離株の系統分類学的研究

M-07 株は、*Alcaligenaceae* 科の *Advenella mimigardefordensis* と 97.3%の 16S rRNA 遺伝子塩基配列同一性を示し、既知種との DNA-DNA 相同値が 10%以下であることや GC 含量の違いなどから M-07 株を type strain とした *Advenella* 属の新種として提案した。また、M-08 株は、*Pseudomonadaceae* 科の *Pseudomonas caeni* と 93.6%の 16S rRNA 遺伝子塩基配列同一性を示し、*Pseudomonas* 属とは異なるクラスターに位置していることやイソプレノイドキノン組成の違いなどから、M-08 株を type strain とした *Pseudomonadaceae* 科の新属新種として提案した。

6. 総括

N₂Oによる集積培養という手法を用いて活性汚泥から単離したM-01 株とM-11 株は、ラボスケールでN₂O発生抑止効果をもたらすことが判明し、廃水処理のN₂O発生抑止に大きな期待が持てる結果となった。

近年、亜硝酸型硝化脱窒処理といった新たな処理方法が考案されている。これは、硝化工程で廃水中のアンモニアからの硝化を亜硝酸の状態までにとどめ、蓄積した亜硝酸から脱窒工程で窒素除去を行う方法で、省エネルギーかつ低コストといった利点が挙げられる。特に、この方法は、養豚糞尿廃水のような、高濃度のアンモニアを含む廃水や低いC/N比の廃水を処理するのには好都合である。一方、N₂O発生が増大するという欠点も存在する。しかし、M-01 株とM-11 株の、N₂O還元 of 酸素耐性が高く亜硝酸よりもN₂Oを優先的に利用する脱窒特性を利用すれば、この問題もクリアできる可能性がある。実際の廃水処理場でのバイオオーギュメンテーションによるN₂O発生抑止の成功例がないことから、本実験結果は地球環境の保全に向けたN₂O発生抑止への大きな一歩となるであろう。

序章

廃水処理場で発生する温室効果ガス N_2O の抑止にむけて

窒素サイクルと環境問題

自然界において、窒素は 2 原子窒素（窒素ガス）をはじめとして、窒素酸化物やアンモニア等の無機窒素化合物から、タンパク質や核酸などの有機窒素化合物まで様々な形態をとり存在している。これらの窒素化合物は生物により代謝され、絶えずその形態を変えて地球を循環している。この循環サイクルは窒素サイクルと呼ばれている[1] (Fig. 1)。窒素サイクルは、大きく、窒素からアンモニアに変換する窒素固定、アンモニアから硝酸や亜硝酸に変換する硝化、そして、硝酸や亜硝酸を還元して亜酸化窒素 (N_2O) や 2 原子窒素 (N_2) のようなガス状窒素化合物に変換させる脱窒とで構成されている。この窒素サイクルは炭素サイクルと同様に地球環境において重要な物質循環系となっている。

地球上での窒素循環には、生物の代謝によるもの以外にも、ハーバー・ボッシュ法による人工的な窒素固定も大きく関与する。この方法により生産されたアンモニアは、化学合成肥料やその他の工業材料として用いられている。工業的な窒素固定が盛んになる以前は、地球上の生物的、及び非生物的な窒素固定量と、固定された窒素が脱窒により分子状窒素として大気中に戻る量とは、ほぼバランスがとれていたと思われる。しかし、現在では、人間が介入したことによりそのバランスは崩れ、地球環境に多大な影響を与えている。具体的には、河川、湖沼の硝酸、亜硝酸による汚染、湖沼や海洋の富栄養化による藻類の異常繁殖や赤潮の発生、大都会や工業地帯における窒素酸化物 (NO_x) や光化学スモッグの発生等である。最近では、温室効果ガスである N_2O の大気中濃度の増加も深刻な問題となってきている。

微生物の脱窒と硝化

微生物の無機窒素化合物代謝は、主に 2 つに分けられる。1 つは、微生物が自身を構成するアミノ酸などの基本的物質をアンモニアから合成する同化作用で

ある。もう 1 つは、無機的な窒素化合物を分解してエネルギーを獲得する異化作用である。異化作用の代表的な例として、脱窒や硝化がある。まず、脱窒とは、微生物の作用により硝酸 (NO_3^-) や亜硝酸 (NO_2^-) が一酸化窒素 (NO)、亜酸化窒素 (N_2O)、窒素 (N_2) ガスへと順次還元され、ガス状窒素化合物が大気中に放出される現象である (Fig. 1)。分子状酸素を最終電子受容体として、電子伝達反応に共役してATPを合成する好気呼吸 (酸素呼吸) の代わりに、嫌気条件下において硝酸や亜硝酸などの窒素酸化物を電子受容体としてエネルギーを獲得するものである。このような脱窒能を有する微生物にとって、脱窒は嫌気呼吸という重要な生理的意義を有している。次に硝化であるが、この反応は、好氣的にアンモニアからヒドロキシルアミンを経て亜硝酸へ、または亜硝酸を硝酸にまで酸化する反応である (Fig. 1)。アンモニアから亜硝酸への反応を行うのが、化学合成独立栄養細菌である*Nitrosomonas*、*Nitrosobacter*、*Nitrospira*属のようなアンモニア酸化細菌であり、亜硝酸から硝酸への反応を行うのが、同じく化学合成独立栄養細菌である*Nitrobacter*、*Nitrospira*属等の亜硝酸酸化細菌である[2, 3]。それぞれ無機窒素化合物を酸化することでATPと還元力を得て、炭酸を固定する。また硝化は、*Pseudomonas*属や*Alcaligenes*属などの従属栄養細菌にも見られるが、その生理的意義はまだわかっていない。近年、*Nitrosomonas europaea*の全ゲノムが解読された結果、脱窒反応を担う酵素である亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase) や一酸化窒素還元酵素 (Nitric oxide reductase) を有することが分かった[4]。これは、硝化細菌が同時に脱窒をも行うという興味深い事実であり、環境中での窒素化合物異化に関する更なる研究の進展が期待される。

最近、従来の硝化脱窒という窒素化合物の異化代謝経路とは別の全く新しい微生物反応が発見された。それはAnammox (anaerobic ammonium oxidation) と呼ばれているものである[5] (Fig. 1)。現在、Anammox細菌は、*Brocadia anammoxidans*、*Kuenenia stuttgartiensis*、*Scalindua sorokinii*と、少なくとも3種が

存在すると考えられており、アナモキシソームと呼ばれる細胞内小器官で、アンモニウムイオンと亜硝酸から嫌氣的に窒素ガスを生成するという反応を行う。2006年、*Kuenenia stuttgartiensis*において環境ゲノム工学を用いて全ゲノムが解読され、さらには2011年にアナモックスの分子機構の一端が明らかになった。まず、亜硝酸からnitrite reductaseによりNOを生成し、アンモニアとNOが直接の基質となり、ヒドラジン (N_2H_4) 合成酵素によってヒドラジン (N_2H_4) を形成し最終的にヒドラジンから窒素ガスへと変換されることが判明し、アナモックス反応にヒドラジン (N_2H_4) 合成酵素が重要な役割を担うことがわかった[6-8]。Anammox細菌は環境中で窒素の自然浄化に大きく貢献しているのではないかと考えられ、今後、更なる反応機構の詳細の解明が期待される。

以上のように、微生物は多種多様な窒素代謝能を有しているが、これは窒素化合物が微生物にとって生きていく上で重要な物質であることを示している。

脱窒構成成分とその特徴

脱窒過程は以下の4つの金属酵素で構成されている (Fig. 2)。

A. 硝酸還元酵素 (Nitrate reductase; Nar)

硝酸を亜硝酸に還元する Nar には、同化型 Nar および異化型 Nar (膜結合型 Nar とペリプラズム型 Nar) が存在する。これらのうち、シトクロム *b* から電子を受け取って硝酸を還元する膜結合型 Nar は多くの細菌で知られており、2量体と3量体の2つのタイプがある[9]。いずれのタイプの Nar もモリブデン co-factor (MoCo) を活性中心に持っており、Fe-S クラスタが含まれている。一方、ペリプラズム型 Nar では、*Desulfobacterium desulfuricans* のペリプラズム型 Nar で X 線構造解析がなされている[10]。

B. 亜硝酸還元酵素 (Nitrite reductase; Nir)

亜硝酸還元酵素には大きく分けて、亜硝酸をアンモニアに還元する同化型 Nir と亜硝酸を NO に還元する異化型 Nir の 2 種類がある。この酵素反応の生成物である NO から窒素ガスまでは、基質、生成物がいずれも気体であり、Nir は脱窒の重要な酵素といえる。

異化型 Nir に関して、構造や配位金属から、2 種類に分けられ、*nirK* 遺伝子にコードされる銅含有型 Nir、*nirS* 遺伝子にコードされるヘム (*c*, *d_I*) を活性中心に持つ Nir が存在する。[9, 11, 12]。

銅含有型 Nir は脱窒細菌 *Alcaligenes xylosoxidans* から最初に見出された (青色 Ax-Nir) [13]。最初の X 線結晶構造解析は、*Achromobacter cycloclastes* から単離された Nir (緑色 Ac-Nir) [11-13] であり、現在では青色と緑色の Nir の両方の構造が明らかになっている [11, 12, 14]。青色 Nir の電子供与体はシトクロム *c551* で、緑色 Nir の電子供与体はシュードアズリンとされている。基本構造は青色 Nir も緑色 Nir も同じで、反応中心のアミノ酸残基も全て保存されている。Nir の色の違いは、2 つの銅 (II) の幾何構造の違いが原因になっている。銅含有型 Nir は 3 量体からなり、サブユニットは 2 つの 8 本の β 構造が束になった円筒構造と 3 つの α 構造で構成されている。また、Type I、Type II の 2 種類の銅 (II) を補因子として持つ。Type I 銅が電子供与体から電子を受け取り、サブユニットの境界に結合し触媒の中心となる Type II 銅に電子を渡すことが示されている。Type I 銅は、2 つの His 残基の窒素電子と Cys と Met 残基の硫黄電子が 1 つずつ配位した 4 面体構造で、Type II 銅は、3 つの His 残基の窒素原子と水分子が結合した 4 面体構造である。Type II 銅の His 残基のうちの 1 つは隣のサブユニットのものである。2 つの銅は 12.6 Å 離れているが、その間は Type I 銅の Cys と Type II 銅の His が架橋している。また、ほとんどの脱窒細菌の異化型 Nir はペリプラズムに存在する可溶性酵素であるが、膜結合型の Nir を持つ脱窒細菌も数種知ら

れている[15, 16]。

ヘム (c , d_1) を活性中心に持つNirは 2 量体であり、*Thiosphaera pantotropha* (Tp-Nir) [17, 18]と、*Pseudomonas aeruginosa* (Pa-Nir) [19]由来のもので立体構造が明らかにされている。ヘム型Nirは銅型Nirとは異なり、亜硝酸の 1 電子還元反応だけでなく、呼吸鎖のシトクロム c 酸化酵素のように、酸素分子の 4 電子還元反応も触媒する。ヘム c は銅型NirのType I 銅と同様に電子の授受部位として、ヘム d_1 はType II 銅と同様に基質の還元反応部位として機能している。銅型Nirとヘム型Nirに共通する特徴は、電子を受け取る部位と基質を還元する部位が異なっているが、これら 2 つの部位が相互に密接に連係しながら触媒反応を行っている点である。

C. 一酸化窒素還元酵素 (Nitric oxide reductase; Nor)

NO reductaseは 2 分子のNOを 2 つの電子を用いて還元し N_2O を生成するが、シトクロムオキシダーゼと共通の祖先を持つとされ、heme-copper oxidase superfamilyに分類される[20]。一酸化窒素還元酵素には、原核生物における 2 種類のNorと真核生物におけるP450norの 3 種類が存在する。

まず、原核生物のNorであるが、450 アミノ酸からなるshort-chain Nor (scNor) と 760 アミノ酸からなるlong-chain Nor (lcNor) の 2 つに分けられ、電子供与体の違いが関係している。scNorはcytochrome c から、lcNorはquinolから電子をもらい、cNorとqNorとも呼ばれている。scNorは 20kDaのNorCと 40~50kDaの膜 12 回貫通サブユニットであるNorBで構成される膜タンパク質の複合体である。脱窒菌からの最初の報告は、*Alcaligenes faecalis*の膜結合型Nor活性で、現在までに*Pseudomonas stutzeri*、*Paracoccus denitrificans*、*Paracoccus halodenitrificans*などのNorが研究されてきた[9, 21]。2010 年に、*Pseudomonas aeruginosa*由来のNorの立体構造が解明され、今までの化学的・生化学的・物理学的手法で予測されてき

たNor反応の分子機構の裏付けがとれ、そして、活性中心の構造の詳細が分かった[22]。実際に、この酵素の反応では、電子供与体であるシトクロム*c*から酵素中の小さなサブユニットの持つヘム*c*で電子を受け取り、その電子がヘム*c*から大きなサブユニットの持つ低スピンヘム*b*、さらに高スピンヘム*b*₃へ伝達され、高スピンヘム*b*₃-非ヘム鉄複核中心でNOがN₂Oに還元されることが明らかとなった。

一方、lcNor は最初に *R. eutropha* から発見された。このタンパク質の電子供与体はユビキノン、もしくは、メナキノンである。この Nor タンパクは 84.5kD で 14 回膜貫通型であるとわかった。NorB との膜貫通回数の 2 回の差は、N 末端の延長と親水性ドメインによるものである[20]。

次に、真核生物で唯一発見されている P450nor についてであるが、この酵素はカビ不完全菌 *Fusarium oxysporum* の可溶性 P450 が硝酸塩あるいは亜硝酸塩で特異的に誘導されることをきっかけとして、*F. oxysporum* が強い脱窒能を持つことが初めて発見された。P450nor のターンオーバーは 30000/min を超え、最も早いものでも数千/min、通常は~数十/min である P450 の中でも極めて高速である。また、NAD(P)H からの電子伝達に P450 還元酵素等の介在を必要としないことなど、P450 としての画期的な特異的な性質を有している。カビの脱窒は最初 *F. oxysporum* より発見されたが、その後その他の多くのカビからも脱窒能が見出され、*F. oxysporum* と近縁のカビ不完全菌 *Cylindrocarpon tonkinense* からは、2 種類の P450nor が単離された[23]。

D. 亜酸化窒素還元酵素 (Nitrous oxide reductase; N₂Or)

N₂Orは脱窒の最終過程を触媒し、N₂Oを 2 電子還元し、窒素ガスを生成する。この酵素は、head-to-tailのホモダイマーで、2 つの複合銅中心Cu_A、Cu_Zを持つ。N₂O reductaseは、分光学的、磁氣的に 3 つのformをとることが分かっている[9]。

form I (紫) は、嫌気条件下で精製すると得られ、高い活性を持つ[24, 25]。form II (ピンク) は、好気条件下で精製すると得られ、form I に比べて低い活性を持つ[26]。form III (青) は、form I、II の還元型である[27]。また、 N_2O が酸素に対して非常に不安定であることも以前から知られていたが、そのメカニズムについては長い間疑問であった。というのも、それまで、*Pseudomonas nautica* や *Paracoccus denitrificans*、*Achromobacter cycloclastes* において、空気存在下で単離された N_2O で X線結晶構造解析されてきた[28-30]が、還元型の N_2O でないと触媒活性を示さないこともあり、基質結合様式や還元機構に関しては全く分かっていなかった。しかし、2011 年に、酸素非存在下で処理された *Pseudomonas stutzeri* 由来の N_2O (form I) の立体構造が解明され、触媒中心である Cu_Z の構造や基質結合様式、還元機構の詳細が明らかとなった[31]。 Cu_A に関しては、2 つの銅イオンがシステインチオラートによって架橋された構造を有し、外部から電子の授受を行うことは、以前から知られていたが、 Cu_Z が 4 つの銅イオンと 2 つの無機硫黄原子からなる $[4Cu:2S]$ クラスタを形成しており、 N_2O が Cu_Z の Cu_A に近接した側面に結合することが新しく分かった。そして、 Cu_A から電子が直接 N_2O へ伝達され、 N_2O が Cu_Z 表面上に存在する結合ポケットに入ることで活性化される。また、酸素存在下では、酸素により Cu_Z 構造が $[4Cu:2S]$ から $[4Cu:S]$ へと不可逆的に変化し、そのために活性を失うことも明らかとなった。

亜酸化窒素 (N_2O)

脱窒の中間産物である N_2O は、 CO_2 と比較して約 300 倍の温室効果を持つと言われており、地球温暖化への寄与度は CO_2 (60%)、 CH_4 (20%) に続いて、全体の 6% である[32]。さらに、 N_2O はクロロフルオロカーボン (CFC) に代わってオゾン層破壊の最大要因物質となっていることが最近判明した[33]。1987 年のモントリオール議定書により、CFC を初めとしたオゾン層破壊ガスの排出が規制され

たなかで N_2O は規制対象外であったことと、人間の窒素利用の増加とあいまって、大気中濃度も加速度的に高まってきている[34]。また、 N_2O は半減期が約 120 年と化学的に非常に安定な物質であるため、一度大気中に放出されるとほとんど分解されずに成層圏に達してしまうことも、問題を大きくしている。 N_2O は、土壌・海・湖といった自然源だけでなく、農業肥料・家畜糞尿やまた廃水処理などの産業プロセスからも、地球上あらゆるところで放出されている。基本的には、微生物による窒素化合物の分解によって放出されることは知られている。人為的原因による N_2O 排出量が高まっており、現在、農業が最大の人為的 N_2O 排出源となっている[32]。特に、家畜糞尿によるところが大きい[35]。廃水処理場から発生する N_2O は人為的原因の中では 3%程度を占め、廃水処理で生じる全温室効果ガスの中で N_2O の占める割合は 26%と非常に高い[36]。 N_2O の大気中濃度の増加に関しては、窒素サイクルのバランスが崩れたことによる、よりマクロな影響であると言えよう。

廃水処理場における脱窒素プロセスとその問題点

平成 13 年 12 月に策定された第 5 次総量規制により、廃水の規制対象項目に COD だけでなく窒素やリンが付け加えられたため、脱窒素処理の重要性は増してきている。廃水処理場での脱窒素処理には、大きく分けて生物学的処理と物理化学的処理の 2 つがあるが、物理化学的処理に関しては、適する廃水が限定的で除去対象も狭いなどあまり広く普及していないため、ここでは、広く普及されている生物学的処理に絞って説明する。

生物学的処理は、主に、アンモニア化、硝化、脱窒の 3 つで成り立っている。特に硝化脱窒のプロセスが重要で、様々な技術が開発されている。現在ほとんどの下水処理場で用いられている技術は、活性汚泥法 (Fig. 3) である。下水を入れた槽に空気を吹き込むと、細菌や微小動物がフロック状に自然繁殖する。

このフロック状の微小生物集合体が活性汚泥である。この活性汚泥中の微生物代謝を用いて、窒素除去を行う (Fig. 4)。廃水が脱窒条件下で添加され、廃水中に含まれる硝酸や亜硝酸が脱窒により N_2O や N_2 へと還元され、続いて廃水中に残存したアンモニアが硝化条件 (通気条件) により亜硝酸、さらには硝酸へと酸化される。この硝化脱窒を交互に繰り返すことによって窒素除去を行う。

また、装置の運転方法で代表的なものに、回分式間歇曝気法 (Fig. 5A) と硝化液循環活性汚泥法 (Fig. 5B) がある。回分式間歇曝気法は、単一の反応槽で硝化 (曝気) 工程と脱窒 (静置) 工程を交互に繰り返すことで窒素除去を行う方法である。この方法の利点は、反応槽に割くスペースを削減でき、初期設備投資が少なく済むことである。一方、硝化液循環活性汚泥法は、反応槽を硝化槽と脱窒槽の 2 槽に分けて窒素処理を行う方法で、高負荷の廃水を処理できる上に、槽が 2 槽に分かれているため負荷の変化などによる影響を抑えられる、といった利点がある。

しかし、廃水処理において、ある大きな問題点が指摘されている。それは、温室効果ガスである N_2O の放出である。原因は様々であるが、まず、 N_2O が酸素に対して不安定であることが 1 つの大きな原因である。特に、間歇曝気法だと、1 つの槽で短時間の間に好気、嫌気を繰り返すために、活性汚泥中の脱窒菌の N_2O が失活したままとなり、温室効果ガスである N_2O が大量に環境中に放出されてしまうのではないかと懸念されている。それを検証するために、*Alcaligenes faecalis* において、間歇曝気と同様の条件で培養する事で、 N_2O の発生が示されている [37]。その後も、ラボスケールの模擬プラントなどでも盛んに N_2O が測定されており、それぞれ発生が確認されている [38, 39]。また、脱窒による N_2O 放出が、酸素の影響だけでなく、亜硝酸の蓄積 (亜硝酸からの脱窒) や低 C/N 比、低 pH がしばしば原因となると言われている [36, 40-44]。さらに、当初予想された嫌気条件での N_2O 発生だけではなく、硝化を行う好気条件下で N_2O が発生している

例も多い。この現象の理由として、好気条件下において、硝化脱窒菌が硝化と脱窒を同時に行うことが挙げられる[45]。好気条件下であるために、脱窒が起きても N_2O が酸素により失活しやすいと考えられる。廃水処理による N_2O 発生量は運転条件や処理する廃水の種類によって様々であるが、条件によっては全窒素投入量に対し約90%以上が N_2O として放出することもある[36] (Table 1)。

さらに、上記の窒素除去法に加え、ANAMMOXプロセス[46]や亜硝酸型硝化脱窒処理[47]といった新たな処理方法も考案されている。ANAMMOXプロセスはAnammox反応を用いた廃水処理であり、亜硝酸型硝化脱窒処理は、硝化工程で廃水中のアンモニアからの硝化を亜硝酸の状態までにとどめ、亜硝酸から脱窒工程で窒素除去を行う技術である。どちらの処理法も、酸素量や電子供与体の量が少なくて済む (ANAMMOXプロセスは電子供与体の必要がない)、活性汚泥や二酸化炭素の発生量も少なくて済む、といったコスト面での利点が挙げられる。特に、亜硝酸型硝化脱窒処理は、高濃度のアンモニアを含む廃水や低いC/N比である廃水を処理するのには好都合である。その反面、 N_2O が発生しやすいという欠点も存在する[48]。

温室効果ガス N_2O の放出は、廃水処理場での脱窒素プロセスにおける大きな課題といえよう。

養豚糞尿処理の実態と養豚糞尿廃水処理における脱窒素プロセスの課題

家畜糞尿は、豊富な有機物やリンやアンモニア・硝酸などの窒素を含んでおり、これまで農産物や飼料作物の肥料として多く利用されてきた。一方、近年「野積み・素掘り」といった家畜糞尿の不適切な管理が目立つようになってきており、この行為が汚水の河川への流出や地下水への浸透の原因となり、結果として、有機物の水質汚濁、アンモニウム・硝酸・リンによる飲料水の汚染や富栄養化といった環境問題へと発展する可能性が指摘された。また、環境問題

に対する国民の意識が高まる中で、家畜糞尿を直接肥料として用いることも、やはり上記の理由で環境問題に影響を及ぼすと考えられた。家畜糞尿の中でも、養豚業が盛んであること・養豚はどの畜種よりも畜産物（乳、肉、卵）量に対する糞尿量の比が大きいことが原因で、養豚糞尿量の割合が非常に大きく、養豚農家にとって養豚糞尿処理は悩みの種でもある。

実際に、他の畜産糞尿処理は堆肥化のみであるのに対し、養豚糞尿処理は堆肥化と活性汚泥を用いた污水处理（浄化槽）で行われている。それは、豚は、尿量が糞量の 2 倍もあり、堆肥化だけで処理することができないためであり、むしろ污水处理（浄化槽）の重要性が非常に高い。現在、窒素による水質汚濁や飲料水の汚染という問題に対処するため、畜産農業施設の規制値が窒素に関して設けられており、今後さらに厳しくなることが予想される。豚尿には非常にアンモニアが多く含まれているため、窒素除去を考慮した污水处理を行うことが一層重要になってきている。さらに、高濃度のアンモニアが含まれているがゆえに養豚糞尿廃水を処理する際に温室効果ガスである N_2O が大量に放出されていることが報告されており[35]、早急に N_2O 発生抑止対策を講じなければならない。

以上のことから、養豚糞尿廃水処理を行ううえで、環境面という点から窒素除去プロセスのウェイトが非常に大きくなってきている。

バイオオーギュメンテーションによる、養豚糞尿廃水処理場で放出される N_2O の発生抑止

養豚糞尿廃水処理場での N_2O 発生抑止の問題に対処する方法の 1 つに、 N_2O 発生抑止効果をもたらす有用脱窒菌を廃水処理場の硝化脱窒槽に添加し定着させることで N_2O 発生抑止に努める方法がある。このような、有用な微生物自体を汚染現場に導入する手法をバイオオーギュメンテーションという。しかし、ここ

で問題となるのが、一般的に硝化脱窒槽の活性汚泥は様々な種類の微生物が共存する複雑系であるということである。純粋培養系では大きな力を発揮することが明らかになっていても、複雑培養系となると話は別で、他の菌群に駆逐されるなどの理由で添加効果を示さないという可能性がある。実際に、活性汚泥においてバイオオーギュメンテーションの試みは数多くされているものの、現場での成功例はわずかであることからその困難さが伺える[49, 50, 51]。窒素除去過程におけるバイオオーギュメンテーションの成功例としては、硝化菌であり好気脱窒菌でもある*Pseudomonas stutzeri* YZN-001株を用いた窒素廃水（主にアンモニア）の浄化[52]や、亜硝酸酸化細菌の添加による、養豚糞尿堆肥から発生する N_2O の発生抑止[53]がある。しかし、バイオオーギュメンテーションによる、廃水処理過程から発生する N_2O 発生抑止に関する報告は今までされていない。

バイオオーギュメンテーションにおいて鍵となるのは、添加する微生物が、培養系の中で定着できるかどうか、また、その微生物群の中においてメインで働くことができるかどうかである。そこで、養豚糞尿廃水処理の硝化脱窒槽内の活性汚泥に存在する有用脱窒菌を用いてバイオオーギュメンテーションを行えば、添加する微生物が元々硝化脱窒槽の環境に適応しているので、上記の問題をクリアできるのではないかと考えた。バイオオーギュメンテーションで N_2O 抑止効果をもたらすためには、当然、添加する微生物が純粋培養系において優秀な脱窒能を有することが必須である。脱窒の最終過程である N_2O から N_2 への還元的能力が強い、また、脱窒プロセスにおいて硝酸や亜硝酸よりも N_2O を優先的に利用するような能力を有する微生物が、 N_2O 抑止に大きく貢献できるのではないかと考えた。本研究では、養豚糞尿廃水処理の硝化脱窒槽内の活性汚泥から、上記のような N_2O 発生抑止効果をもたらす有用脱窒菌の単離を目指した。最終的には、そのような単離株を用いたバイオオーギュメンテーションにより、養豚糞尿廃水処理の硝化脱窒槽で発生する N_2O を抑止することを目標としている。

Table 1 – N₂O emission (% of load) in lab-scale and full-scale WWTPs.

Reference	N ₂ O emission (% of N-load)	Type of WWTP	Sample frequency	Remarks
Full-scale				
Czepiel et al. (1995)	0.035% ^a	Activated sludge (11,000 p.e.)	Weekly grab sample (vented chamber) during 15 weeks	
Wicht and Beier (1995)	0-14.6% (0.6% average)	25 activated sludge plants	Single grab samples per WWTP	N ₂ O emission increased with increasing nitrogen load
Sümer et al. (1995)	0.001%	Activated sludge plant (60,000 p.e.)	2-weekly grab samples over 1 year	N ₂ O emission increased with nitrite + nitrate concentrations
Sommer et al. (1998)	0.02%	Activated sludge plant (60,000 p.e.)	1 or 2-weekly grab samples during 1.5 years	
Kimochi et al. (1998)	0.01-0.08%	Activated sludge plant (1000 p.e.)	On-line measurements during 4 aeration cycles (2 h)	N ₂ O emission decreased with proportionally shorter aeration periods
Kampschreur et al. (2008b)	2.3% ^b	Nitrification - anammox sludge water treatment	On-line measurements during 4 days	N ₂ O emission increased with decrease in oxygen concentration (aerated stage) and increase of nitrite concentration (anoxic stage)
Kampschreur et al. (2008b)	4%	Nitrification stage (nitrogen removal stage) of activated sludge plant (620,000 p.e.)	3 grab samples during one day	
Lab-scale				
Hanaki et al. (1992)	0-8%	Continuous and batch tests denitrifying activated sludge - artificial wastewater	Grab samples	N ₂ O emission increased with decrease of COD/N and increasing nitrite concentration
Zheng et al. (1994)	2.3-16%	Continuous nitrifying activated sludge-artificial wastewater	Daily grab samples	N ₂ O emission increased with decreasing oxygen concentration and SRT
Schulthess et al. (1994)	0-6%	Batch test (10 h) denitrifying activated sludge - real wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission increased with increasing oxygen concentration
Osada et al. (1995)	1-35%	Continuous oxic-anoxic SBR activated sludge - real high-strength wastewater (>50 days)	Grab samples	N ₂ O emission higher with longer aeration period in one SBR cycle, probably linked to increased nitrite levels
Thoern and Soerensson (1996)	1.2%	Batch tests denitrifying activated sludge - real wastewater	Grab samples	N ₂ O emission increased with decrease of pH
van Benthum et al. (1998)	5-95%	Continuous oxic-anoxic SBR activated sludge - artificial wastewater (380 days)	Grab samples	N ₂ O emission decreased over time - increased N ₂ O emission possibly a start-up phenomenon
Chung and Chung (2000)	0.005-0.5%	Batch tests denitrifying activated sludge - artificial wastewater	Grab samples	N ₂ O emission increased with decrease of COD/N
Park et al. (2000)	0.2-4.5%	Continuous nitrifying and denitrifying activated sludge - real wastewater	Grab samples	N ₂ O emission decreased upon methanol addition for higher COD/N ratio
Itokawa et al. (2001)	0.5->20%	Continuous oxic-anoxic SBR activated sludge - artificial high-strength wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission increased with decrease of COD/N
Burgess et al. (2002a)	0.08-1.17%	Continuous nitrifying activated sludge - artificial wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission increased with increasing ammonia shock loads and nitrite concentration
Noda et al. (2003)	0.2-1.5%	Continuous activated sludge - real wastewater (50 days)	Weekly grab samples	N ₂ O emission increased with decreasing oxygen concentration and decreasing SRT
Zeng et al. (2003b)	90%	Continuous anaerobic-anoxic SBR activated sludge - artificial wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission increased with increasing nitrite concentration - N ₂ O might be major product of denitrification by GAO ^c
Lemaire et al. (2006)	>50%	Continuous oxic-anoxic SBR activated sludge - artificial wastewater	On-line measurement	High N ₂ O emission (during oxic stage) was hypothesized to be caused by low diversity of population due to single carbon source

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Reference	N ₂ O emission (% of N-load)	Type of WWTP	Sample frequency	Remarks
Tsuneda et al. (2005)	0.2-0.5%	Continuous nitrifying activated sludge - artificial wastewater (30-300 days)	Daily grab samples	N ₂ O emission ratio increased with increasing salt concentration
Tsuneda et al. (2005)	0.005-0.02%	Continuous denitrifying activated sludge - artificial wastewater (30-300 days)	Daily grab samples	N ₂ O emission independent of salt concentration
Tsuneda et al. (2005)	0.7-13%	Continuous oxic-anoxic activated sludge - artificial wastewater (30-300 days)	Daily grab samples	N ₂ O emission increased with increasing salt concentration
Tallec et al. (2006a)	0.1-0.4% ^d	Batch test (5 h) nitrifying activated sludge - real wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission is largest at 1.0 mg O ₂ /L and lower above and below this oxygen concentration - emission increases with nitrite concentration
Tallec et al. (2006b)	0.2-1% (0.4% average)	Batch test (1 day) nitrifying biofilter - real wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission ratio increased with decreasing oxygen concentration ^e
Tallec et al. (2006b)	0.1-1.3% (0.2% average)	Batch test (1 day) denitrifying biofilter - real wastewater + methanol	On-line measurement	N ₂ O emission ratio increased with decreasing methanol addition
Tallec et al. (2008)	0.4%	Batch test (5 h) nitrifying activated sludge - real wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission is largest at 0.3 mg O ₂ /L and lower above and below this oxygen concentration
Kampschreur et al. (2008a)	2.8%	Continuous nitrifying SBR activated sludge - artificial wastewater	On-line measurement	N ₂ O emission increased with decreasing oxygen and increasing nitrite concentration

a Based on the assumption of 100 g protein/person/day and 0.16 gN/gprotein (FAO-statistics, see also IPCC, 2006), the value of 3.2 gN₂O/person/year is converted into a ratio. This study is the base for IPCC calculations.

b Sum of load based N₂O emission of nitrification reactor (1.7%) and anammox reactor (0.6%).

c GAO, glycogen accumulating organisms.

d Ratio is expressed per N-ammonia converted instead of N-load, because nitrate is present in the wastewater which is not converted here.

e The overall N₂O emission decreased with decreasing oxygen concentration because of the lower ammonia oxidation rate due to oxygen limitation.

Table 1. ラボスケールの模擬プラントや実際の廃水処理場における、全窒素投入量に対するN₂O発生量の割合[36]

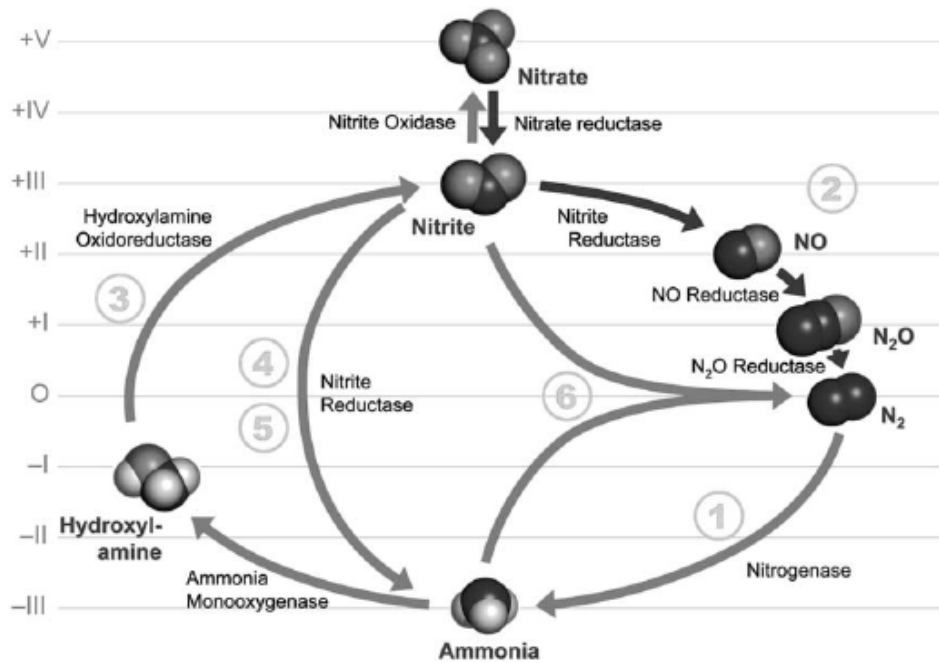


Fig. 1. The biological nitrogen cycle [1].

左の数字は各窒素サイクル構成分子の窒素原子の酸化数である。

① 窒素固定 ② 脱窒 ③ 硝化

④⑤ 硝酸同化・アンモニア醗酵 ⑥ アナモックス

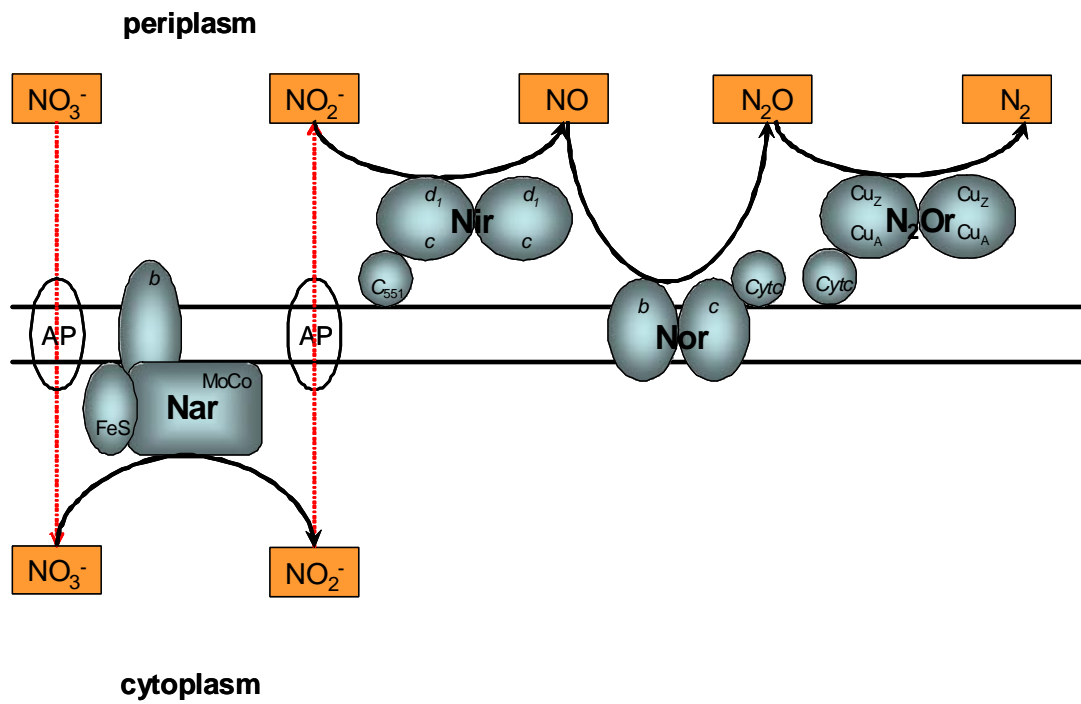


Fig. 2. 細菌の脱窒機構

(詳細は序章の『脱窒構成成分とその特徴』を参照)

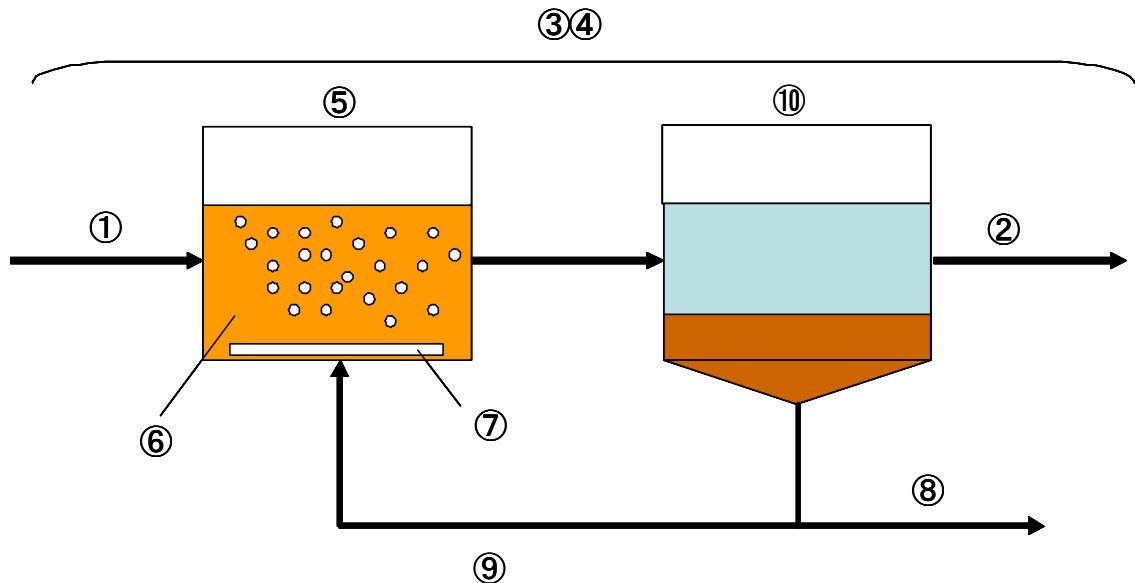


Fig. 3. 活性汚泥法と廃水処理用語

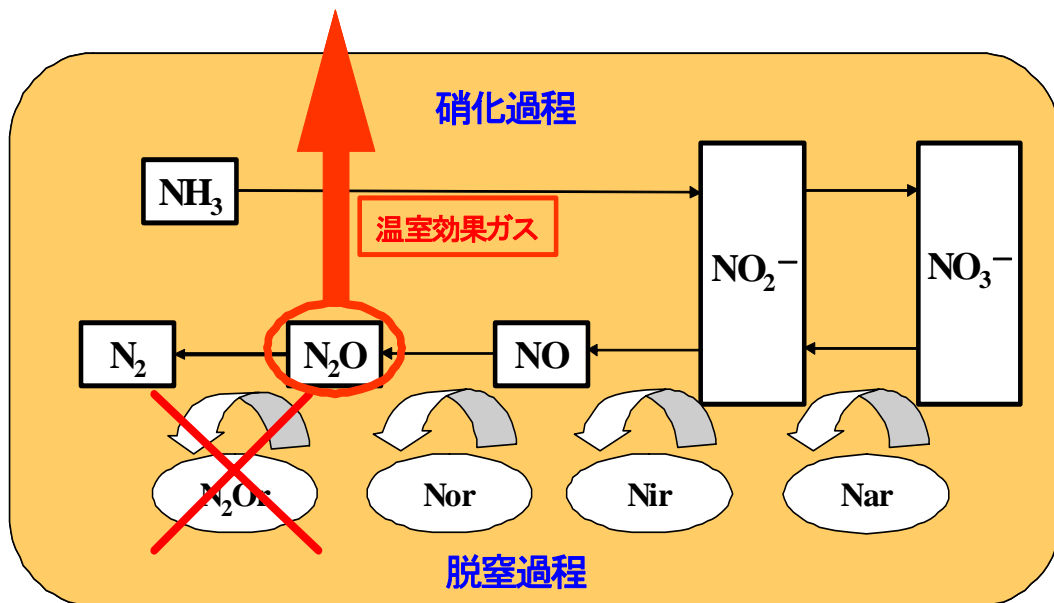
- ① 原水：浄化処理対象の廃水。
- ② 処理水：反応槽で浄化され排出された溶液。
- ③ 水理的滞留時間（HRT: Hydraulic Retention Time）：汚水が処理施設に滞留する時間。曝気槽の容積を1日あたりに流出する汚水量で割った値。
- ④ 汚泥滞留時間（SRT: Sludge Retention Time）：処理施設内の活性汚泥が余剰汚泥として系外に引き抜かれるまでの平均滞留時間。処理施設内の活性汚泥量を1日あたりに引き抜く余剰汚泥量で割った値。
- ⑤ 曝気槽（Aeration tank）：活性汚泥と汚水を混合し、曝気して反応させる槽。曝気槽が浄化の中心的な役割を果たしている。
- ⑥ 活性汚泥浮遊物質（MLSS: Mixed liquor suspended solid）：曝気槽の活性汚泥量。
- ⑦ 曝気（Aeration）：空気を送り込むこと。実際は、曝気槽の中に下部からブロワーで通気したり攪拌したりする。
- ⑧ 余剰汚泥（Excess sludge）：発生した余分な汚泥。活性汚泥は、微生物の増殖や分解されない浮遊物質の増加によって増加し、これが曝気槽への酸素

不足につながるため余剰汚泥として引き抜く。

⑨ 返送汚泥管：活性汚泥を沈殿槽から曝気槽へ戻す時に用いる管。

⑩ 沈殿槽：汚水をいったん溜めて、固形分を沈殿させるための槽。

その他の廃水処理用語：溶存酸素（DO: Dissolved Oxygen）、酸化還元電位（ORP: Oxidation-reduction potential）、化学的酸素要求量（COD: Chemical oxygen demand）、生物化学的酸素要求量（BOD: Biochemical oxygen demand）



N_2O 放出要因：酸素、亜硝酸蓄積、低いC/N比など

Fig. 4. 廃水処理における窒素除去過程

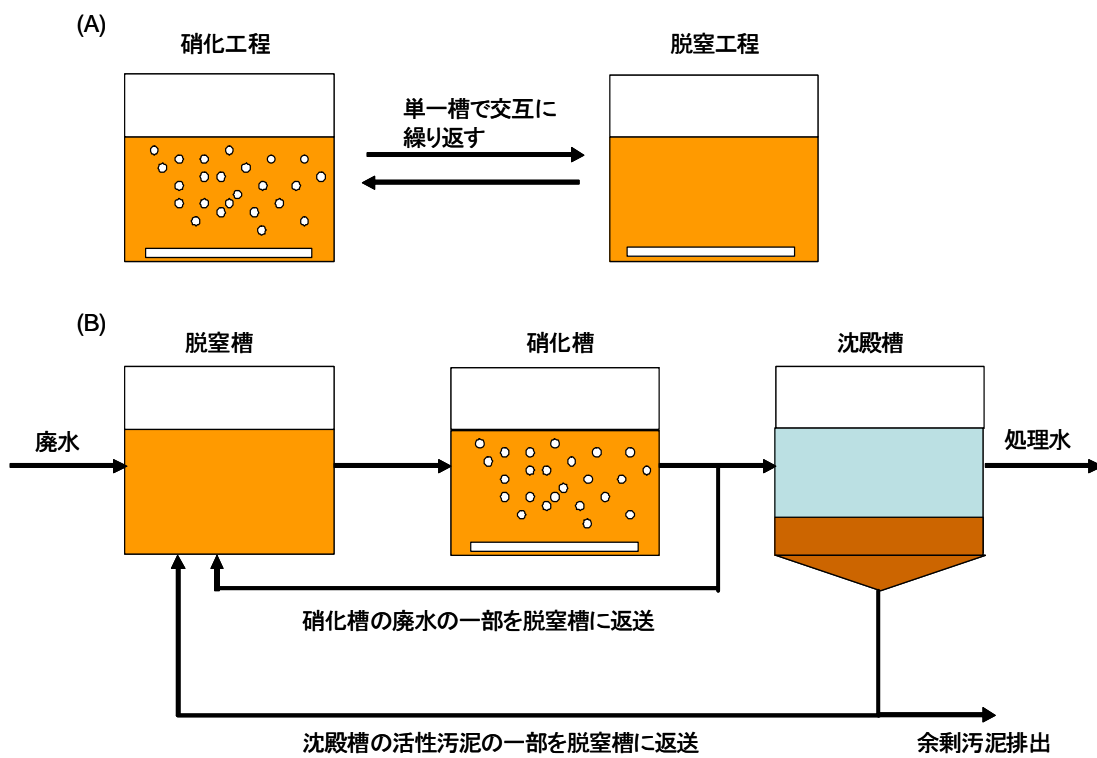


Fig. 5. 回分式間歇曝気法(A)と硝化液循環活性汚泥法(B)

参考文献

『ふん尿処理対策ブック』 監修者 羽賀清典

高木恒輝 (2006) 東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻
修士論文

1. **Einsle, O., and P. M. Kroneck.** 2004. Structural basis of denitrification. *Biol. Chem.* **385**:875-83.
2. **Olson, T. C., and A. B. Hooper.** 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: An extracytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiology Letters* **19**:47-50.
3. **Takahashi, R., N. Kondo, et al.** 1992. Pure isolation of a new chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium on gellan gum plate. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74**:52-54.
4. **Chain, P., et al.** 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **185**:2759-73.
5. **Strous, M., et al.** 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**:446-9.
6. **Strous, M., et al.** 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**:790-4.
7. **Kuenen, J. G., et al.** 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* **6**:320-6.
8. **Kartal, B. et al.** 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**:127-30.
9. **Zumft, W. G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:533-616.
10. **Dias, J. M., M. E. Than, et al.** 1999. Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9Å solved by MAD methods. *Structure Fold Des.* **7**:65-79.
11. **Averill, B. A.** 1996. Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chem. Rev.* **96**:2951-64.

12. **Suzuki, S., K. Kataoka, et al.** 1999. Structure-function relationships of copper-containing nitrite reductases. *Coordination Chemistry Reviews* **190-192**:245-65.
13. **Iwasaki, H., and T. Matsubara.** 1972. Nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *J. Biochem.* **71**:645.
14. **Boulanger, M. J., and M. E. Murphy.** 2002. Crystal structure of the soluble domain of the major anaerobically induced outer membrane protein (AniA) from pathogenic *Neisseria*: a new class of copper-containing nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* **315**:1111-27.
15. **Hoehn, G. T., and V. L. Clark.** 1992. Isolation and nucleotide sequence of the gene (*aniA*) encoding the major anaerobically induced outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **60**:4695-703.
16. **Hoehn, G. T., and V. L. Clark.** 1992. The major anaerobically induced outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*, Pan 1, is a lipoprotein. *Infect Immun.* **60**:4704-8.
17. **Fulop, V., J. W. Moir, et al.** 1995. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell* **81**:369-77.
18. **Williams, P. A, V. Fulop, et al.** 1997. Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* **389**:406-12.
19. **Nurizzo, D., F. Cutruzzola, et al.** 1998. Conformational changes occurring upon reduction and NO binding in nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **37**:13987-96.
20. **Zumft, W. G.** 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *J. Inorg Biochem* **99**:194-215.
21. **Sakurai, N., and T. Sakurai.** 1997. Isolation and characterization of nirtic oxide reductase from *Paracoccus halodenitrificans*. *Biochemistry* **36**:13809-15.
22. **Hino, T., Y. Matsumoto, et al.** 2010. Structual basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**:1666-70.
23. **Shoun, H., D. H. Kim, et al.** 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* **73**:277-81.
24. **Riester, J., W. G. Zumft, et al.** 1989. Nitrous oxide reductase from *Pseudomonas*

- stutzeri* - redox properties and spectroscopic characterization of different forms of the multicopper enzyme. Eur. J. Biochem. **178**:751-62.
25. **Fujita, K., J. M. Chan, et al.** 2007. Anaerobic purification, characterization and preliminary mechanistic study of recombinant nitrous oxide reductase from *Achromobacter cycloclastes*. J. Inorg. Biochem. **101**:1836-44.
 26. **Zumft, W. G., and P. M. H. Kroneck.** 2006. Respiration transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. Adv. Microb. Physiol. **52**:107-227.
 27. **Ghosh, S. et al.** 2006. Activation of N₂O reduction by the fully reduced μ_4 -sulfide bridged tetranuclear Cu_Z cluster in nitrous oxide reductase. J. Am. Chem. Soc. **125**:15708-9.
 28. **Brown, K., et al.** 2000. Revisiting the catalytic Cu_Z cluster of nitrous oxide (N₂O) reductase. Evidence of a bridging inorganic sulfur. J. Biol. Chem. **275**:41133-6.
 29. **Haltia, T., et al.** 2003. Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution. Biochem. J. **369**:77-88.
 30. **Paraskevopoulos, K., et al.** 2006. Insight into catalysis of nitrous oxide reductase from high-resolution structures of resting and inhibitor-bound enzyme from *Achromobacter cycloclastes*. J. Mol. Biol. **362**:55-65.
 31. **Pompwski, A., W. G. Zumft, et al.** 2011. N₂O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase. Nature **477**:234-7.
 32. **IPCC, 2001.** Climate Change 2001: The Scientific Basis. Cambridge University, Cambridge.
 33. **Ravishankara, A. R., J. S. Daniel, and R. W. Portmann.** 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. Science **326**:123-125.
 34. **Forster, P., V. Ramaswamy, et al.** 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing, p. 129-234. In S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tingor, and H. L. Miller (ed.), Climate change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

35. **Takahashi, J.** 2006. Emission of GHG from livestock production in Japan. International Congress Series **1293**:13-20.
36. **Kampschreur, M. J., H. Temmink, et al.** 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. Water Res. **43**:4093-4103.
37. **Otte, S., et al.** 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. **62**:2421-6.
38. **Park, K. Y., et al.** 2000. Emission and control of nitrous oxide from a biological wastewater treatment system with intermittent aeration. J. Biosci. Bioeng **90**:247-52.
39. **Itokawa, H., K. Hanaki, et al.** 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. Water Res. **35**:657-64.
40. **Hanaki, K., H. Zheng, et al.** 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. Water. Sci. Technol. **26**:1027-1036.
41. **Schulthess, R. V., D. Wild, et al.** 1994. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. Water. Sci. Technol. **30**:123-132.
42. **Schulthess, R. V., M. Kuehni, et al.** 1995. Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. Water Res. **29**:215-226.
43. **Thörn, M. and F. Sörensson.** 1996. Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. Water Res. **30**:1543-1547.
44. **Gejlsbjerg, B., L. Frette, et al.** 1998. Dynamics of N₂O production from activated sludge. Water Res. **32**:2113-2121.
45. **Kim, S. W., M. Miyahara, et al.** 2010. Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria. Bioresour. Technol. **101**:3958-63.
46. **Schmidt, I., O. Sliemers, et al.** 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiol. Rev. **27**:481-92.
47. **Peng, Y., and G. Zhu.** 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. Appl. Microbiol. Biotechnol. **73**:15-26.

48. **Chuang, H. P., et al.** 2007. Effective partial nitrification to nitrite by down-flow hanging sponge reactor under limited oxygen condition. *Water Res.* **41**:295-302.
49. **Bouchez, T., et al.** 2000. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* **2**:179-90.
50. **Boon, N., et al.** 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1511-20.
51. **El Fantroussi, S., and S. N. Agathos.** 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:268-275.
52. **Zhang, J., and P. Wu.** 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.* **102**:9866-9.
53. **Fukumoto, Y., and K. Suzuki, et al.** 2006. Reduction of nitrous oxide emission from pig manure composting by addition of nitrite-oxidizing bacteria. *Environmental Science and Technology* **40**:6787-91.

第1章

養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥からの N_2O 抑止に寄与する
有用脱窒菌の単離と、その単離株の系統学的解析

第1節 序

廃水処理場の硝化脱窒槽において、微生物を用いた硝化脱窒法により窒素除去を行っている。しかし、脱窒の中間産物である N_2O は CO_2 の300倍もの温室効果を持ち、その処理過程の中での放出が指摘されている。脱窒過程における N_2O 放出の主要原因として、酸素や亜硝酸の蓄積、低C/N比、低pHが挙げられる[1-6]。特に、脱窒の最終ステップに関与する酵素である N_2O 還元酵素が酸素によって容易に失活するために、完全な嫌気状態になっていない所ではしばしば N_2O 放出が指摘されている[7]。さらに、養豚糞尿廃水では高濃度のアンモニアを含むため、廃水処理の際に N_2O が大量に放出されていると報告されており、早急な解決が求められている[8-11]。

この問題の解決策として、養豚糞尿廃水処理場の硝化脱窒槽内の活性汚泥から、 N_2O 抑制効果をもたらす有用脱窒菌を単離し、 N_2O 発生抑制を目的としたバイオオーギュメンテーションに利用するという手法を用いた。有用脱窒菌の条件として、廃水処理場の環境に適応でき、その環境下で N_2O 還元能が強いことであると考えた。実際に、このような脱窒菌が活性汚泥から単離されれば、硝化脱窒槽の環境での適応力・生存力に優れている可能性が非常に高く、廃水処理への応用に大きく期待が持てる。さらには、目的の脱窒菌が、このような環境で N_2O を発生しないだけでなく硝酸や亜硝酸よりも N_2O を優先的に消費する能力を持ち合わせていれば、硝化脱窒槽内で活性汚泥が産出する N_2O を消費することで N_2O 抑制に大きく貢献できるのではないかと予想される。本章では、このような N_2O 抑制効果をもたらす有用脱窒菌の単離を試みた。

第2節 材料

2-1 S養豚場の廃水処理施設

愛知県にあるS養豚場の廃水処理施設は、畜産廃棄物の処理を目的とした畜産処理システム（Fig. 1-1）の一部である。このシステムの処理過程は以下の通りである。豚舎より排出された糞尿がピットに貯蔵される。この糞尿はピット内において嫌気発酵を受け、有機酸・糖などの炭水化物や、タンパク質・アミノ酸などの有機体窒素に分解され、その一部はアンモニアまで分解される。嫌気発酵を受けた糞尿がスクリーンプレスによって固液分離され、固形物は堆肥化のための原料に用いられ、液体は搾汁液として貯蔵される。搾汁液はメタン発酵槽（50℃）に供給され、そこで搾汁液内の炭水化物はメタンガスに変換され、有機体窒素はアンモニアまで分解される。発生したメタンガスはメタンガス発電機によって電力に変換される。作られた電力はシステム全体の電力として供給される。そのため、外部電力を使用することなく自立した運転を行うことができる。高濃度のアンモニアを含んだメタン発酵後の消化液（原水）は、硝化脱窒槽で硝化脱窒処理を受ける。ここでは間歇曝気式硝化脱窒法を用いている（容積 224 m³）が、将来的には2槽式による亜硝酸型硝化脱窒処理の採用も検討されている。MLSS濃度は約 10,000~15,000 mg/Lと高く維持されている。また、原水には脱窒に必要なBOD（有機物）が少ないため、適宜搾汁液が貯蔵槽から硝化脱窒槽へ供給される。この搾汁液や原水に含まれる主なBOD源は、嫌気発酵によって生じた有機酸であり、その中でも大部分が酢酸である。他にはプロピオン酸や酪酸が存在する。硝化脱窒処理された後、膜分離によって固液分離され、処理水として放流される。この養豚糞尿廃水処理システムにおける窒素バイオマスとBODの変化はTable 1-1に示した。また、1日の窒素投入量のうちN₂Oとして発生した割合は約0.5%であった。

2-2 回分式膜分離反応槽 (Membrane Bio-Reactor, MBR)

回分式膜分離型反応槽 MBR (Fig. 1-2) は、S 養豚場に併設されている廃水処理施設の硝化脱窒槽を基にして造られたもので、研究室にて、養豚糞尿廃水のメタン発酵後の消化液を間歇曝気法により硝化脱窒処理を行なう装置である。MBR の運転状況に関して、以下に記す。

ベンチスケールの MBR は 20 °C で恒温されている。その槽内は密閉型であり容積 50 L のうち原水・汚泥の混合液の液量を 30 L として運転している。(原水の説明は最後に記載した。)

単一槽内で硝化工程 6 時間・脱窒工程 6 時間、1 日 2 サイクルを繰り返し連続して行い、硝化工程は曝気を 10 L/min の速度で連続して通気するのに対し、脱窒工程は硝化と同様の速度で 1 時間に 1 分間、ガス循環攪拌を行っている。このガス循環攪拌は汚泥の沈降を防ぐためである。原水の添加時間は脱窒工程の 56 分後に 160 ml/min の速度で 3 分間、計 0.5 L 添加している。これに対して、処理水の引き抜きは硝化工程の 5 時間 25 分後に 14 ml/min の速度で 35 分間、計 0.5 L を平膜 (0.1 μm) に通して吸引濾過し、水理学的滞留時間 HRT を 30 日に維持している。汚泥濃度は 10,000 mg/L に調整する為、7 日間ごとに 5 L の活性汚泥を引き抜き、汚泥滞留時間 SRT を約 45 日に維持している。定常運転時の pH は 7.8~8.3 の間で変動している。

最後に原水に関して説明を記す。原水とは、メタン発酵後の消化液であり、主にアンモニアが多く含まれている。このアンモニアの濃度は季節により変動するので塩化アンモニウムを添加してアンモニア態窒素を 3500~4500 mg/L に調整している。さらに、必要に応じて酢酸を原水に加えて BOD/N 比が 3.2 以上となるように調整した。

2-3 MBR 処理水

MBR 処理水は、MBR により硝化脱窒処理された後の処理水で、MBR 内で膜によって固液分離を行い、活性汚泥・不溶性固形物を取り除かれたものである。MBR において、硝化工程と脱窒工程の 2 工程で窒素除去が行われるが、硝化工程の MBR 処理水は硝酸や亜硝酸を多く含んでおり、実験で用いるには不都合が生じるため、脱窒工程中に引き出した MBR 処理水を実験に用いた。

2-4 活性汚泥

活性汚泥は、MBR 内で硝化脱窒処理を行っている汚泥を用いた。この汚泥は、S 養豚場の養豚糞尿由来のものである。

2-5 養豚糞尿搾汁液

養豚糞尿搾汁液は愛知県の S 養豚場に併設された廃水処理システムの搾汁液貯蓄槽より採取した。これは養豚糞尿がピットに貯蔵され、嫌気条件下で発酵を受けたもので、スクリーンプレスにより固液分離した状態のものである。その搾汁液を 12,000 rpm、15 分間遠心を行い、上清を 1 μm フィルターで濾過したものを実験に使用した。

第 3 節 単離戦略

N_2O 抑止効果をもたらす有用脱窒菌の単離のアプローチの手段として、 N_2O による集積培養という方法を用いた。

まず、将来的に廃水処理への応用を考えた時に、目的の脱窒菌が硝化脱窒槽の環境に適応できることがまず大事であると考え、養豚糞尿廃水処理場の硝化脱窒槽内の活性汚泥から目的脱窒菌の単離、そして、単離の際に用いる培地に

は硝化脱窒槽の環境になるだけ近いものをと考えた。単離培地には、先ほど述べた硝化脱窒処理された後の処理水である MBR 処理水と養豚糞尿搾汁液で構成されている Pig manure (PM) 培地を用いた。硝化脱窒槽では、脱窒に必要な電子供与体である有機物が不足しているために、電子供与体として養豚糞尿搾汁液を硝化脱窒槽に添加しており、これに倣ったかたちである。つまり、PM 培地は硝化脱窒槽の環境に似ていると言える。

次に、硝化脱窒槽の環境下で N_2O 還元能が強いことも条件であると考え、気相部を全て N_2O に置換した N_2O 集積培養を行った。これにより、目的の脱窒菌を単離できるのではないかと考えた。硝酸や亜硝酸よりも優先的に N_2O を消費するような脱窒菌、さらには N_2O だけを消費するような脱窒菌が優先的に単離できるように N_2O による集積培養を行った。

第4節 方法

4-1 Pig manure (PM) 培地の作製

PM 培地 (Table 1-2) は、養豚糞尿搾汁液－MBR 処理水 (20:80, v/v) の混合物に Trace element solution を 0.1%加えたものを使用した。Trace element solution の組成は Table 1-3 に示した。pH は 7.0 に調整した。PM 培地作製後、10,000 rpm、15 分間遠心を行い、上清を 0.45 μm フィルターで通した。培地成分が変化することを避けるため、オートクレーブは行わなかった。フィルター滅菌した PM 培地を実験に使用した。

4-2 N_2O による集積培養

全容 27 ml の L 字試験管に PM 培地 9 ml を分注した。つまり、液相部 9 ml、気相部 18 ml となる。この後、活性汚泥を培地の 1%分、すなわち、90 μl を培地に直

接種菌した。接種後、8号ブチルゴム栓により密栓し、気相部を N_2O ガスで充分置換した。このような条件下で、30 °C、150 rpmで振とう培養を行った。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングした。ガス成分の分析は、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP5000/QP5050A: Shimadzu) によって行われた。測定条件は、Table 1-4 に示す。具体的には、 N_2O 、 N_2 、 O_2 量を測定した。また同時に、濁度の測定も行った。濁度の測定に関しては、miniphoto518R型式の簡易ODモニター（タイテック）を用いて、660 nmの吸光度を測定した。以後、濁度の測定はこのように行った。

培養中、 N_2O 量の減少、 N_2 量の増加、それに伴う濁度の上昇が観察された。 N_2 の生成、濁度の上昇が止まった後、培養液 9 mlの 1%分、つまり、90 μ lを新しいPM培地 (Table 1-2) に接種を行った。先ほどと同じ方法で気相を N_2O ガスで置換して2回目の N_2O による集積培養を行った。

このような方法で、 N_2O による集積培養を5回行った。また、 N_2O 集積培養によりスクリーニングされてきた微生物が、主に発酵によりエネルギーを獲得して生育したり、または嫌気条件下でも増殖する微生物ではないということを証明するために、5回目の N_2O 集積培養の際に、並列させて、気相部を N_2O ガスでなくArガスで置換して同じ方法で培養を行った。

5回目の集積培養の、 N_2O 還元が止まった培養開始 36 時間後の培養液を用いて、2次スクリーニングへと進んだ。

4-3 2次スクリーニングによる単離

先ほどのPM培地に、支持体として Gellan Gum (Wako) を1%加えたゲランガムプレート (Table 1-5) を単離培地に用いた。プレートの作製方法として、Gellan Gumを加えていないPM液体培地を作製し、10,000 rpm、15分間遠心を行った。この上清液に Gellan Gum を1%加えた。そして、オートクレーブを行

い、PMプレート培地を作製した。

1章4節4-2で行った5回目のN₂O集積培養の培養開始36時間後の培養液を、オートクレーブしたMBR処理水で10⁵倍、10⁶倍、10⁷倍に希釈を行った。この3種類の希釈サンプル100 µlをそれぞれPMプレート培地に塗布した。その後、これらのPMプレート培地をアネロパック角型ジャーの中に入れて密閉し、この容器の気相をN₂Oガスで充分置換した。容器の気相が常にN₂Oで満たされるように注意しながら、室温で培養を行った。

PMプレート培地に植菌してから1週間後、10⁵倍希釈のサンプルを塗布したプレートからコロニーが形成されていた。このPMプレート培地から適当にコロニーを摘み、Luria-Bertani (LB) 寒天培地 (1.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1.0% Sodium Chloride, 1.5% Bacto agar, pH 7.2) に画線植菌を行った。好気条件の下、30 °Cで1週間培養を行った結果、5株の微生物の単離に成功した。

さらに、この5株の微生物がN₂Oで呼吸を行う事により生育できるかを確認するため、コロニー1つずつを摘んでLBプレート培地に再植菌し、アネロパック角型ジャーの中に入れ容器の気相をN₂Oガスで充分置換して、室温で1週間培養を行った。1週間後には、5株全てにおいて単一コロニーが形成されており、N₂Oで呼吸を行うことが確認された。最後に、この5種類のプレートを4 °Cに保存した。

4-4 単離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列の決定と系統樹作成

まず、全ての単離株において、Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて、ゲノムDNAを調整した。このゲノムDNA (100 ng/µl) をtemplateにし、2種類の細菌用の16S rDNAプライマー (27f, 1492r) を用いて16S rDNAを増幅させた。ポリメラーゼには、Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) を用いた。PCR反応の条件は以下の通りである。また、PCR装置には、Takara PCR

Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を利用した。用いたプライマー配列は以下の通りである。

PCR 条件

- ① 95 °C 2 min
- ② 95 °C 40 sec
- ③ 50 °C 30 sec
- ④ 72 °C 2 min
- ⑤ 72 °C 7 min
- ②～④ x 30 cycles

細菌の 16S rDNA 特異的プライマー

27f (position 8-27) ; 5'-agagtttgatcctggctcag-3'

1492r (position 1510-1492) ; 5'-ggttacctgttacgactt-3'

増幅したPCR産物をEtBr入り 2.0%アガロースゲル電気泳動 (Mupid- α ; Mupid) し、Electronic U.V. Transilluminator (TOYOBO) で増幅の確認を行った。その後、ゲルから約 1500 bp付近に存在するバンドを切り出し、PCR産物の精製を行った。PCR産物の精製には、Gel extraction KitであるLaboPassTMGEL (COSMO) を使用した。操作は全て室温で行った。

次に、Ligation-high (TOYOBO) を用いて、PCR産物とベクターであるpT7Blue-2 T-Vector (Novagen[®]) のライゲーションを、16 °C、3 時間のインキュベーションにより行った。ライゲーション反応後、*Escherichia coli* DH5 α への形質転換を行った。サンプルを*E. coli* DH5 α のコンピテントセルに加え、氷上で 20 分、42 °C で 45 秒ヒートショックした後、5 分氷上に放置した。そして、SOC培地を 150 μ l

添加し、37 °Cで1時間静置培養した。その後、0.1 M IPTG 20 µlと 20 mg/ml X-gal 50 µlを添加して、LBプレート培地（50 µg/ml Ampicillin）に植菌した。植菌後、37 °Cで約15時間静置培養を行った。コロニーが形成された後、白いコロニーを選択して、試験管に分注したLB培地（50 µg/ml Ampicillin）2 mlに植菌し、37 °Cで15時間振とう培養を行い、その後プラスミドDNAの精製を行った。精製には、Plasmid DNA Purification KitであるLaboPass™ Plasmid Mini (COSMO)を使用した。操作は全て室温で行った。

そのプラスミドDNAをtemplateにして、GenomeLab™ DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いて、Sequence PCRを行った。Sequence PCRで用いたプライマーは以下に記す。Sequence PCRの反応条件はKitのprotocolに従った。得られたPCR産物をエタノール沈殿し、SLSに溶かし、DNAシーケンサーCEQ2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) でSequenceを行った。これにより、単離株の16S rRNA遺伝子の配列を決定した。

Sequence PCR で用いたプライマー

- 細菌の16S rDNA 特異的プライマー
341f ; 5'-cctacgggaggcagcag-3'
1115r ; 5'-agggttgcgctcgttg-3'
- vector である pT7Blue-2 T-vector 特異的プライマー
5'-actgcagacgcgttacgtatcgg-3'
5'-ggttttcccagtcacgacg-3'

NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) を用いて、得られた16S rDNA配列全長との相同性検索を行った。得られた情報から系統樹に加える既知種を選別した。そして、単離株の配列、近縁既知種の配列、アウトグループとなる

種の配列をFASTA形式で 1 つのテキストファイルにまとめ、プログラムClustal X[12]を用いて配列のアラインメントを行った。木村 2 変数法距離[13]を用いて近隣結合法 (NJ法) [14]で系統樹を作成した。系統樹のトポロジー評価にはブートストラップ法を用い、再抽出値を 1000 回とした。また、PhyML[15]を用いて最尤法 (ML法) [16]を行い、NJ法により作成した系統樹のトポロジー評価と一致するか確認した。

第5節 結果

N₂O集積培養

目的の脱窒菌を単離するために5回のN₂O集積培養を行った。その5回目のN₂O集積培養の結果を、Fig. 1-3に示した。この図は、気相・濁度の経時変化を追ったものである。5回目の集積培養開始から6時間位までは、N₂O量の減少は観察されるが、N₂量の増加はほとんど観察されなかった。これは、N₂Oの水中溶解度が高いからによる（ヘンリ定数：0.024 M/atm）[17]。6時間後からN₂O量の減少、N₂量の増加、そして、それに伴う濁度の上昇が観察された。この現象はN₂OによるN₂O還元であると考えられる。また、5回目のN₂O集積培養の際に、並列して気相をArで置換して培養を行った系においては、濁度の上昇が確認されなかった（not data shown）。これは、先ほど述べたように、発酵によって生育する微生物や嫌気条件下でも増殖する微生物の存在を否定する根拠となる。以上のことから、N₂O集積培養により、N₂Oで呼吸することにより生育する微生物が集積されていることが示唆された。

この5回目の集積培養の、N₂O還元が止まった培養開始36時間後の培養液を用いて、2次スクリーニングによる目的の微生物の単離を行うことにした。

2次スクリーニングによる単離

5回のN₂Oによる集積培養の培養液を、ゲランガムを支持体としたPMプレート培地に塗布して、気相がN₂Oの条件で培養をおこなった。ゲランガムプレートを用いたのは、ゲランガムプレートの方が寒天プレートに比べて難培養微生物が生育できるという報告がされていたからである[18]。その結果、コロニーが形成された。これは、先ほどと同じくN₂Oで呼吸することにより生育する微生物の存在を示している。

次に、一般に人工培地として利用されている LB 培地を用いて単離を試みた。PM 培地は廃水処理施設・装置に由来する資材（廃水）を必要とするため常に手に入るわけではなく、先のことを考えれば人工培地で培養できる必要があった。LB 培地は PM 培地と組成が異なるため、非常に生育の鈍い微生物も存在した。しかし、最終的に 5 株の微生物の単離に成功した。

最後に、5 株の単離株を LB 培地にて気相が N₂O の条件で培養を行ったが、これは、これら微生物が N₂O で呼吸を行うことにより生育できるかの確認のためである。結果として、5 株とも生育したので、N₂O で呼吸することにより生育する微生物である可能性が極めて高いことが示された。この 5 株を、M-01 株・M-07 株・M-08 株・M-11 株・M-13 株と名付けた。

16S rRNA 遺伝子塩基配列による単離株の系統学的解析

5 株の単離株全てにおいて 16S rDNA を基に遺伝系統学的解析を行った。16S rDNA 配列を決定後、BLAST から得られた近縁種の 16S rDNA 配列とともにアラインメントを行い、系統樹を作成し、その系統学的位置を調べた。M-01 株、M-11 株に関しては Fig. 1-4 に、M-07 株に関しては Fig. 1-5 に、M-08 株に関しては Fig. 1-6 に、そして、M-13 株に関しては Fig. 1-7 に示した。

まず、M-01 株、M-11 株についてであるが、この 2 株は *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonadaceae* 科 *Pseudomonas* 属に属しており、2 株の間は近縁な関係にあることが分かる (Fig. 1-4)。系統樹を見ると、M-01 株は *Pseudomonas pertucinogena* NBRC 14163^T 並びに *Pseudomonas xiamenensis* C10-2^T と最も近縁な関係にあった。BLAST 検索の結果、16S rDNA 配列の相同値が 97% 以上のものを列挙すると、*Pseudomonas pertucinogena* NBRC 14163^T (98.7%)、*Pseudomonas xiamenensis* C10-2^T (98.4%)、*Pseudomonas bauzanensis* DSM 22258^T (97.7%) であった。また、M-11 株は *Pseudomonas xiamenensis* C10-2^T 並びに *Pseudomonas*

bauzanensis DSM 22258^Tと最も近縁な関係にあり、BLAST検索では、*Pseudomonas xiamenensis* C10-2^T (98.6%)、*Pseudomonas bauzanensis* DSM 22258^T (98.5%)、*Pseudomonas litoralis* KCTC 23093^T (97.6%)、*Pseudomonas pertucinogena* NBRC 14163^T (97.4%) であった。ちなみに、M-01 株とM-11 株との間には、97.7%の相同性があった。

次に、M-07 株についてであるが、系統樹では *Betaproteobacteria* 綱の *Alcaligenaceae* 科 *Advenella* 属に属する 3 種の type strain とクラスターを形成しているが、そのブートストラップ値は 1000 と非常に信頼性があるため、*Advenella* 属に属していることが示唆された (Fig. 1-5)。また、*Advenella* 属に属する 3 種の type strain である *Advenella mimigardefordensis* LMG 22922^T、*Advenella kashmirensis* LMG 22695^T、*Advenella incenata* LMG 22250^T と、それぞれ 97.3%、96.9%、96.5% の相同値であった。

M-08 株であるが、Fig. 1-6 を見ると、*Pseudomonas caeni* とクラスターを形成しており、近縁な関係にある。Blast 検索においても *Pseudomonas caeni* が最も相同性の高い種であるのだが、その相同値は 93.6% と低いものだった。*Pseudomonas caeni* 以外の *Pseudomonas* 属は同じクラスターを形成しており、そのクラスターには *Pseudomonadaceae* 科に属する *Azomonas* 属、*Azorhizophilus* 属、*Azotobacter* 属も含まれている。また、このクラスターの信頼性に関しても、ブートストラップ値が 740 と比較的高い値であり、信頼できるといえる。このクラスターと M-08 株との相同性は 90.9~93.0% であった。この値は、一般的に言われている、*Pseudomonas* 属に属する種の間での相同値の範囲である 93.7~99.9% [19, 20] を完全に下回るものであった。そして、M-08 株は、*Pseudomonadaceae* 科に属する *Cellvibrio* 属とも完全に別クラスターであり、*Cellvibrio* 属との相同性は 90.0% 以下であった。以上の結果から、M-08 株は *Pseudomonadaceae* 科の新属である可能性が示唆された。

最後に、M-13 株に関してであるが、Fig. 1-7 の系統樹から *Alphaproteobacteria* 綱の *Rhodobacteraceae* 科 *Paracoccus* 属であると判断できる。また、*Paracoccus denitrificans* PD1222 と最も近縁な関係にあり、その相同値は 99.8% と非常に高かった。ちなみに *Paracoccus denitrificans* は好気脱窒菌として有名である。

第6節 考察

養豚糞尿廃水処理場で放出される温室効果ガス N_2O 発生抑止策として、バイオオーギュメンテーションという手法に注目した。実際に、汚染現場へのバイオオーギュメンテーションの適用による成功例は少ない。特に、 N_2O に関する成功例は報告されていない。現場でのバイオオーギュメンテーションの成功を考えた際に大きな鍵を握るのは、バイオオーギュメンテーションのために外部から添加する微生物が内在している微生物群との生存競争に駆逐されないで定着できるかどうか、また、その環境下でその微生物の持つ汚染物質除去能が発揮されるかどうか、である。そこで、養豚糞尿廃水処理場の硝化脱窒槽内の活性汚泥から有用脱窒菌を単離することにした。元々が内在している微生物であり硝化脱窒槽の環境への適応性は十分にあるので、上記の問題をクリアできるのではないかと考えた。実際に、内在している微生物を現場でのバイオオーギュメンテーションに利用し成功した例が報告されている [21, 22]。

活性汚泥から廃水処理場環境下で N_2O 還元能が強い脱窒菌の単離を目指して、廃水処理場の環境に似たPM培地を用いて N_2O 集積培養を行い、結果として5株の単離に成功した。しかし、この方法には大きな問題がある。それは、酸素や亜硝酸という N_2O を放出しやすい原因となるファクターを考慮に入れてないことである。これらのファクターも廃水処理環境には存在するものであり、これらによって本来持っている N_2O 還元能が発揮できないという脱窒菌は多く存在するであろう。次章で、5株の単離株の N_2O 還元能や脱窒特性を調べ、酸素や亜硝酸存在下においてもその本来の N_2O 還元能を発揮できるのかも含めて、バイオオーギュメンテーションに利用できる目的の脱窒菌がその5株の中に存在するのか、検証していく。

また、その5株の単離株の中で、16S rDNA塩基配列による系統学的解析から

M-08 株は新属の可能性が高かったので、微生物の分類・同定に関する実験を行い、新属を提案する方向に進めた（第5章）。そして、近縁種との 16S rDNA 配列の相同値と系統学的位置から、M-01 株と M-11 株が *Pseudomonas* 属の新種、M-07 株が *Advenella* 属の新種である可能性が示唆されたので、これらの単離株に対しては、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、新種の可能性について評価した（第5章）。

項目	I 豚糞尿	II 搾汁液	III メタン発酵槽 (原水)	IV 硝化脱窒槽	V 処理水
pH ^a	7.17	7.38	8.31	7.44	6.95
Alkalinity (mg / L)	-	-	16800	2460	350
BOD	-	40560	3010	666	39.4
S-BOD	-	23840	1215	3	5.7
Org-N	1708	1809	896	-	114
NH ₄ -N	4323	4211	3976	40.7	60.2
NO ₃ -N	-	-	-	303	219
NO ₂ -N	-	-	-	1.9	3
T-N	10354	10231	8848	345.6	456.2
BOD / N	-	3.964	0.340	1.927 ^b	0.086
SS	18510	-	10347	14820	70
VSS	15190	-	7170	9127	-
VSS / SS (%)	82	76	69	61	-

^a以外の単位は全てmg / L

^bは搾汁液添加条件

※備考: 原水中の銅含有量は 49 ppm

※Org-N (Organic Nitrogen)、S-BOD (Soluble BOD)、SS (Suspended Solid)、VSS (Volatile Suspended Solid)

Table 1-1. 養豚糞尿廃水処理システムにおける窒素バイオマスと BOD の変化

MBR-treated water	800 ml
Pig manure extraction	200 ml
Trace element solution	1000 μ l
pH	7.0

Table 1-2. PM 培地

MgSO ₄ ·7H ₂ O	200.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	10.0 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4.0 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g
H ₃ BO ₄	0.1 g
Na ₂ SeO ₃	0.2 g
Citric acid	10.0 g
Distilled water	1000 ml

Table 1-3. Trace element solution の組成

装置	QP5050A (Shimadzu)
カラム	CP-PoraPLOT Q (Varian)
長さ	27.5 m
内径	0.32 mm
外径	0.45 mm
膜厚	10 μ m
カラム温度	50 $^{\circ}$ C
インジェクター温度	50 $^{\circ}$ C
検出器温度	50 $^{\circ}$ C
キャリアガス	He (99.9999%)
流速	118 ml/min
線速度	100 cm/min

Table 1-4. GC-MS 測定条件

MBR-treated water	800 ml
Pig manure extraction	200 ml
Trace element solution (Table 1-3)	1000 μ l
Gellan Gum	10 g
pH	7.0

Table 1-5. PM ゲランガムプレート

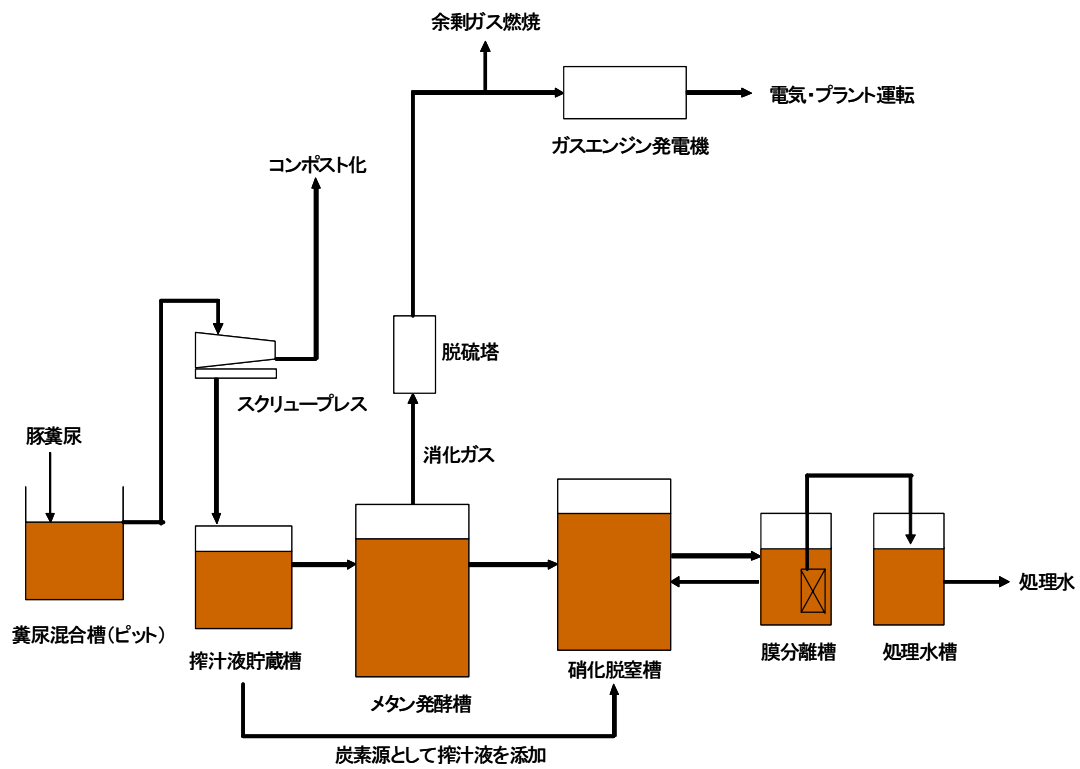


Fig. 1-1. 愛知県にある S 養豚場の畜産糞尿処理システムの模式図

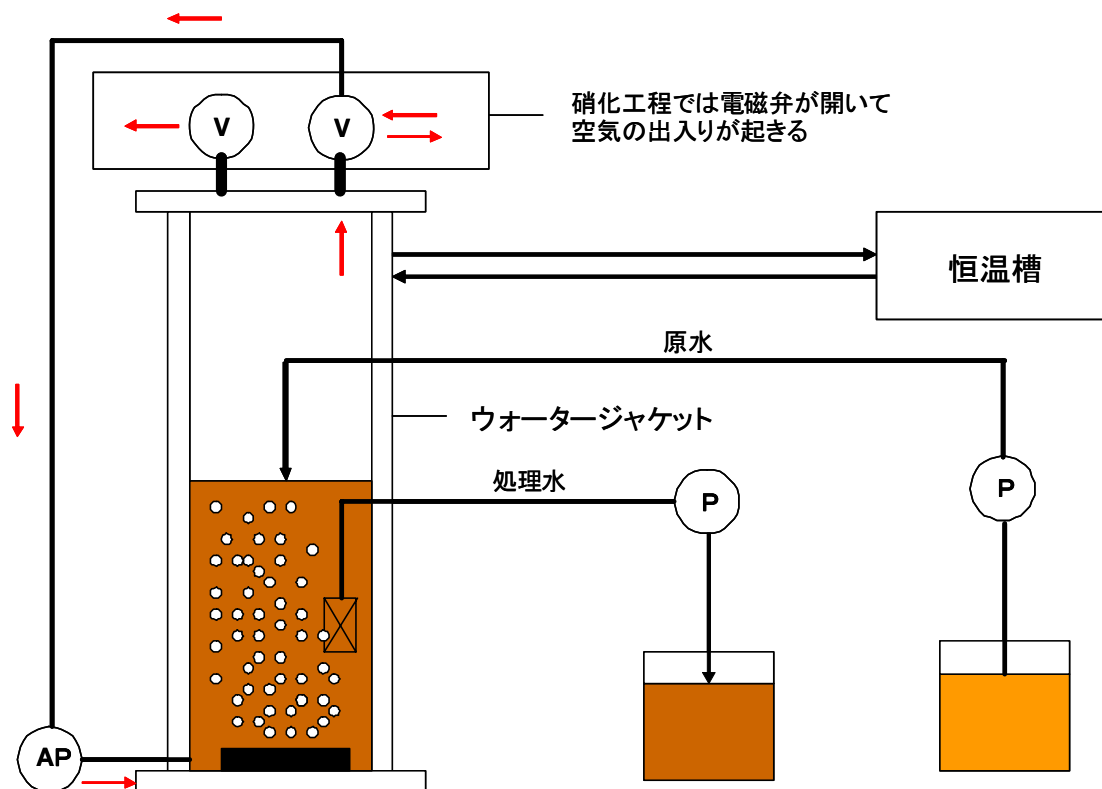


Fig. 1-2. 回分式膜分離型反応槽 MBR の模式図

硝化工程では、電磁弁 (V) が開いて外界との空気の出入りが起き、エアープンプ (AP) によって 10 L min^{-1} の速度で曝気される。脱窒工程では、電磁弁が閉じて密閉系となる。ただし、60 分に 1 分の間隔で、気相部のガスがエアープンプによって 10 L min^{-1} の速度でガス循環攪拌される。原水の添加は送液ポンプ (P) で行い、処理水の吸引は孔径 $0.1 \text{ }\mu\text{m}$ の平膜を通じて吸引濾過する。反応槽の液温は恒温槽の水がウォータージャケット内を循環することによって維持される。

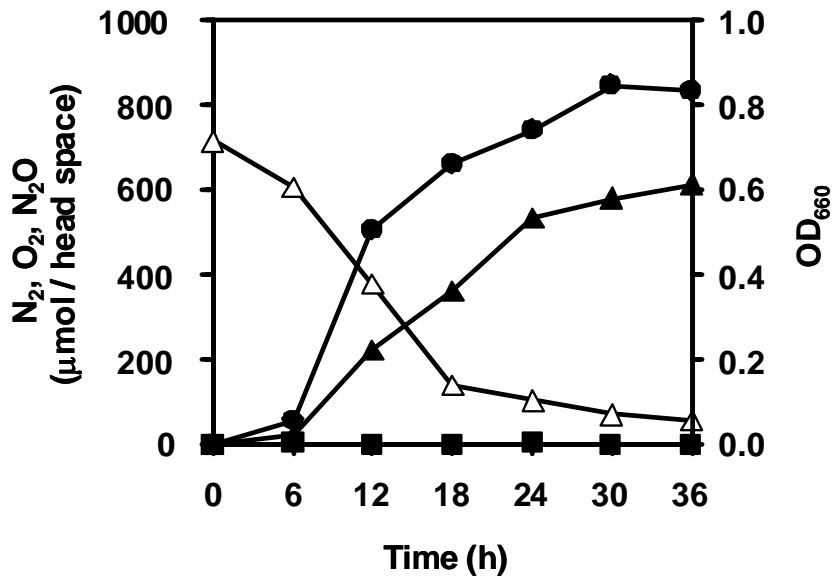


Fig. 1-3. 5回目のN₂O集積培養の結果 (N₂O消費、N₂生成、濁度上昇の様子)

Symbols: △, N₂O; ▲, N₂; ●, OD₆₆₀; ■, O₂.

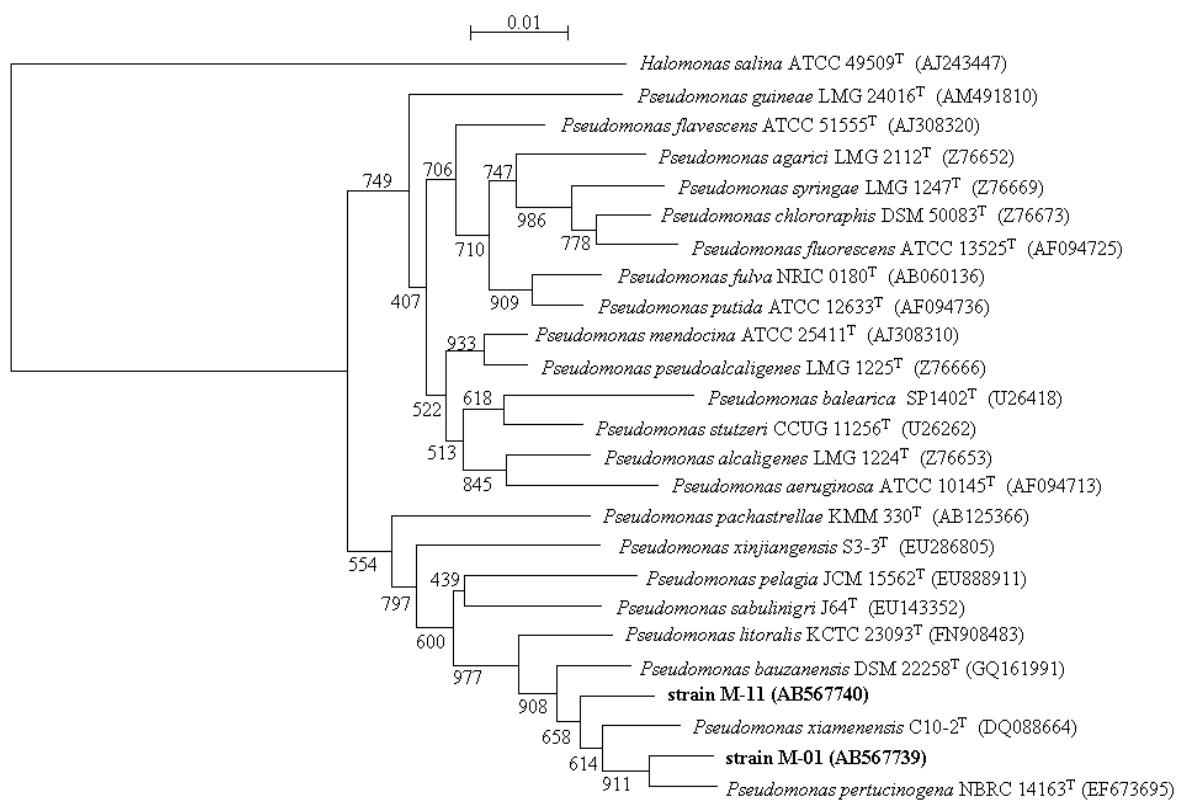


Fig. 1-4. 単離株 M-01 株・M-11 株と、両株と最も近縁属である *Pseudomonas* 属に属する type strain との、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹 (Neighbour-joining 法)

Halomonas salina ATCC 49509^T をアウトグループに用いた。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

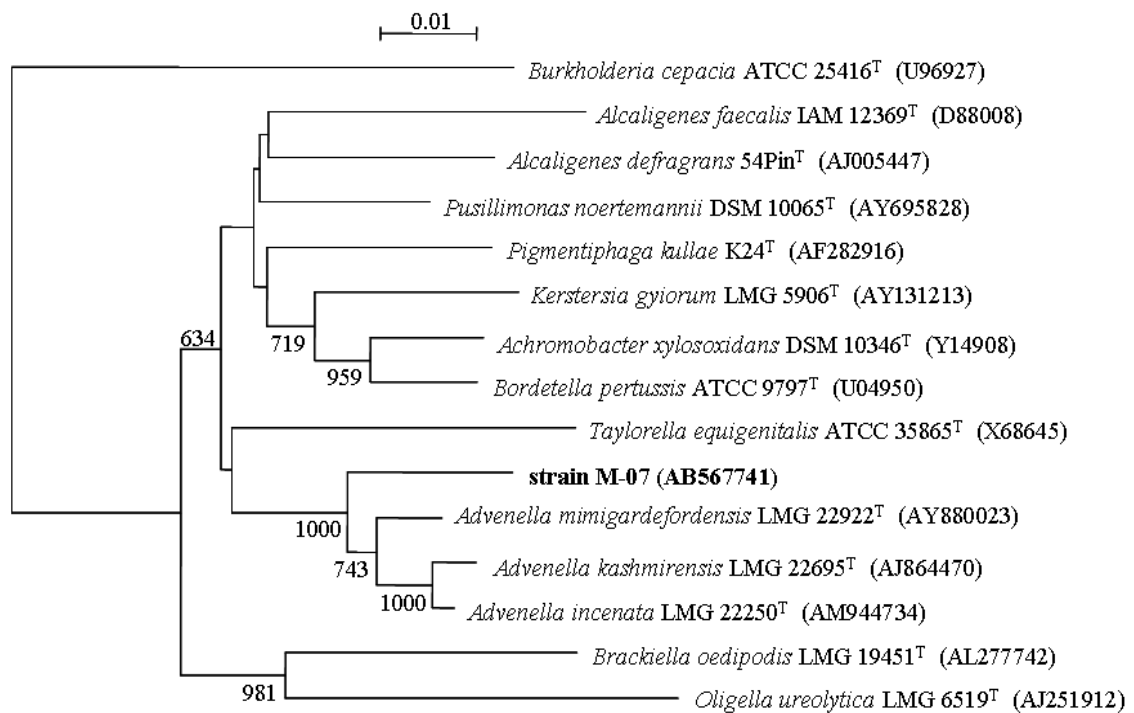


Fig. 1-5. 単離株 M-07 株と、M-07 株と最も近縁属である *Advenella* 属を含めた *Alcaligenaceae* 科に属する type strain との、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹 (Neighbour-joining 法)

Burkholderia cepacia ATCC 25416^Tをアウトグループに用いた。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

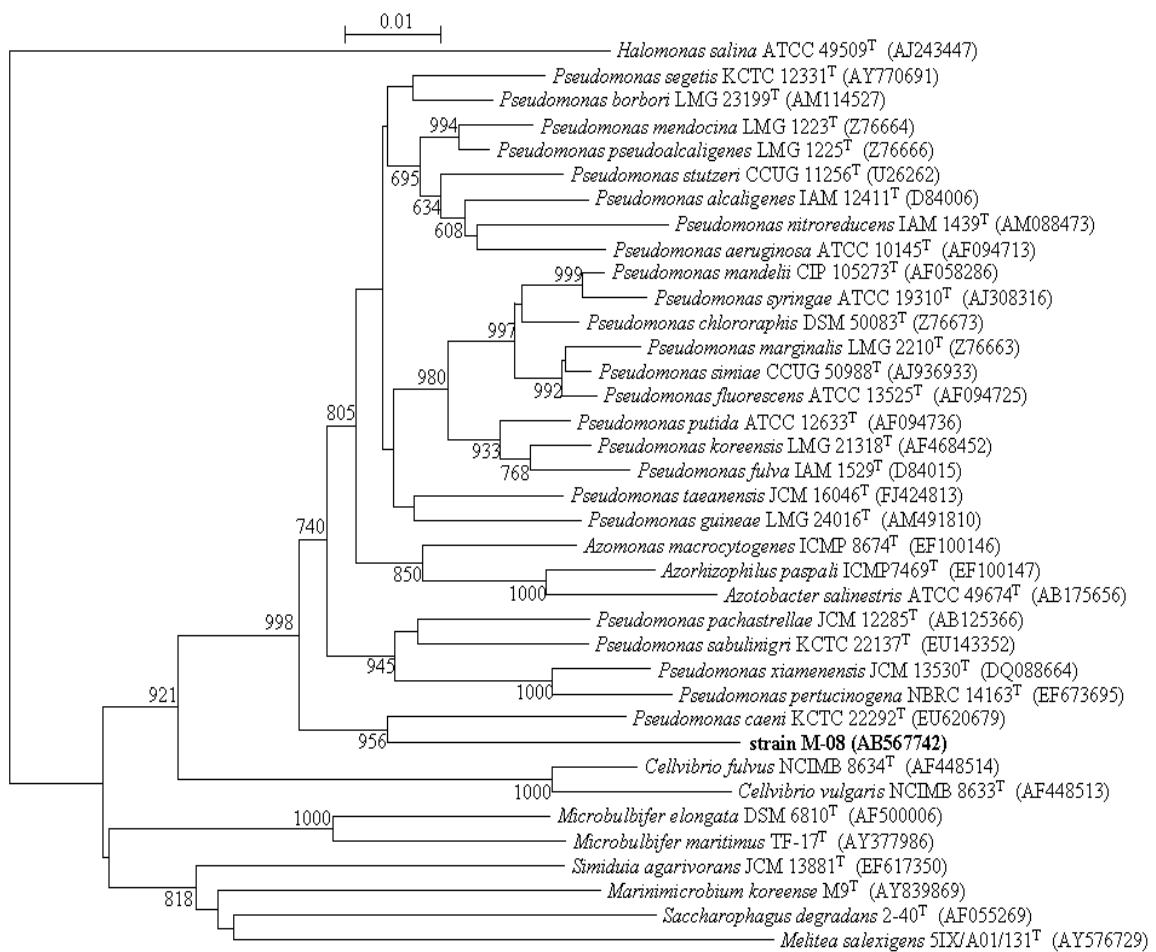


Fig. 1-6. 単離株 M-08 株と、M-08 株と近縁な関係にある *Gammaproteobacteria* 綱に属する type strain との、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹 (Neighbour-joining 法)

Halomonas salina ATCC 49509^T をアウトグループに用いた。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

※ *Pseudomonas* 属・*Cellvibrio* 属・*Azomonas* 属・*Azorhizophilus* 属・*Azotobacter* 属は、*Pseudomonadaceae* 科に属している。*Microbulbifer* 属・*Simidiua* 属・*Marinimicrobium* 属・*Saccharophagus* 属・*Melitea* 属は、*Alteromonadaceae* 科に属している。

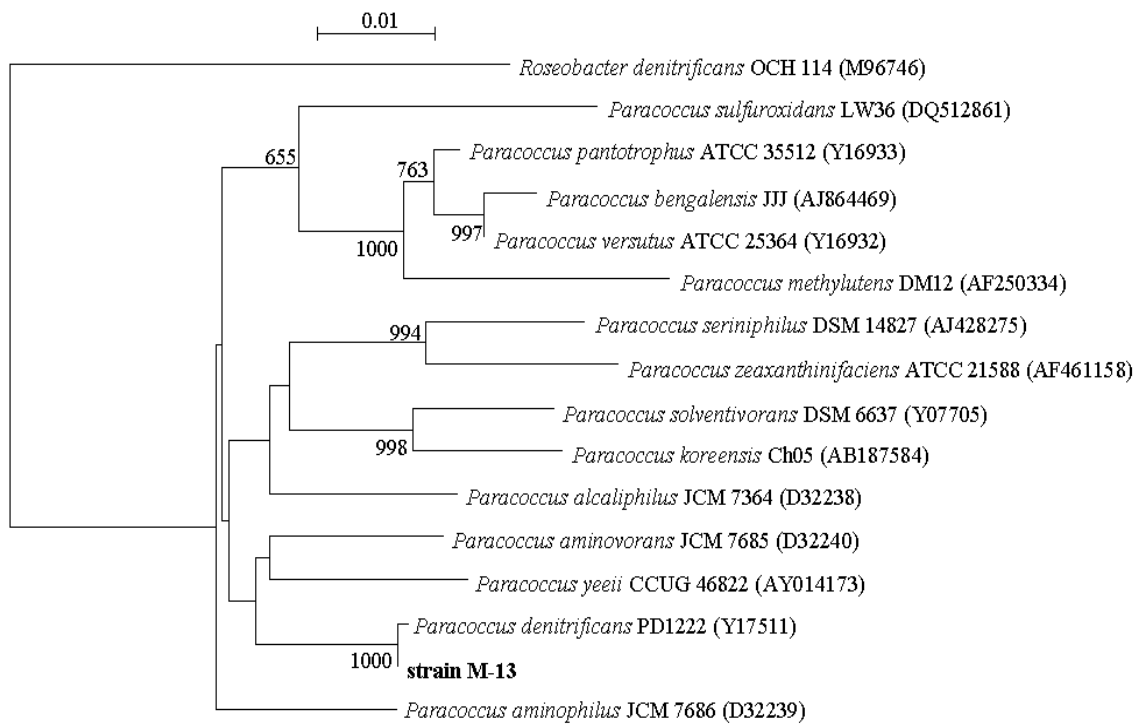


Fig. 1-7. 単離株 M-13 株と、M-13 株と最も近縁属である *Paracoccus* 属の type strain との、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹 (Neighbour-joining 法) *Roseobacter denitrificans* OCH 114^Tをアウトグループに用いた。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

参考文献

1. **Hanaki, K., H. Zheng, et al.** 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. *Water. Sci. Technol.* **26**:1027-1036.
2. **Schulthess, R. V., D. Wild, et al.** 1994. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. *Water. Sci. Technol.* **30**:123-132.
3. **Schulthess, R. V., M. Kuehni, et al.** 1995. Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. *Water Res.* **29**:215-226.
4. **Thörn, M. and F. Sörensson.** 1996. Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. *Water Res.* **30**:1543-1547.
5. **Gejlsbjerg, B., L. Frette, et al.** 1998. Dynamics of N₂O production from activated sludge. *Water Res.* **32**:2113-2121.
6. **Kampschreur, M. J., H. Temmink, et al.** 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res.* **43**:4093-4103.
7. **Otte, S., N. G. Grobber, et al.** 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2421-2426.
8. **Bernet, N., N. Delgenes, et al.** 1996. Denitrification by anaerobic sludge in piggery wastewater. *Environ. Technol.* **17**:293-300.
9. **Fukumoto, Y., and T. Osada.** 2003. Patterns and quantities of NH₃, N₂O and CH₄ emissions during swine manure composting without forced aeration - effect of compost pile scale. *Bioresour. Technol.* **89**:109-114.
10. **Joo, H. S., M. Hirai, et al.** 2006. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Res.* **40**:3029-3036.
11. **Takahashi, J.** 2006. Emission of GHG from livestock production in Japan. *International Congress Series.* **1293**:13-20.
12. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876-4882.
13. **Kimura, M.** 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* Cambridge:

Cambridge University Press.

14. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
15. **Guindon, S. and Gascuel, O.** 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**:696-704
16. **Felsenstein, J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.
17. **Dean, J. A.** 1992. Lange's Handbook of Chemistry. McGraw-Hill, Inc., New York.
18. **Tamaki, H., Y. Sekiguchi, et al.** 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2162-2169.
19. **Moore, E. R. B., Mau, M., et al.** 1996. The determination and comparison of the 16S rDNA gene sequence of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural generic relationships. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**:478-492.
20. **Anzai, Y., Kim, H., et al.** 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1563-1589.
21. **Andreoni, V., G. Baggi, et al.** 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by a specialized organism and by indigenous soil microflora: bioaugmentation and self-remediability for soil restoration. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**:86-92.
22. **Watanabe, K., M. Teramoto, et al.** 2002. Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. *Environ. Microbiol.* **4**:577-583.

第 2 章

単離株の N_2O 還元能解析並びに脱窒能解析

第1節 序

第1章で、養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥から、 N_2O で呼吸する5株の単離株を獲得した。廃水処理環境下で強い N_2O 還元能を有することをバイオオーギュメンテーションに用いる微生物の条件としているため、廃水処理場の硝化脱窒槽に近い環境であるPM培地においてこれらの単離株が強い N_2O 還元能を有していること、そして、単離株それ自体が N_2O を放出しないことが重要である。

廃水処理における N_2O 放出の大きなファクターとして、酸素、亜硝酸の蓄積、低C/N比が挙げられる[1-9]。低C/N比に関しては外部からのC源添加により N_2O 放出を軽減させることは可能であるが、酸素や亜硝酸の蓄積に関しては対処が難しい。本章では、PM培地を用いて単離株の N_2O 還元能と脱窒特性を調べ、特に酸素や亜硝酸の存在下における能力に注意しながら、廃水処理の N_2O 抑止に有用な単離株を探索した。

各々の単離株の N_2O 還元や脱窒の特徴を知ることは、これらの単離株の廃水処理への添加を目指す上で、非常に重要なステップとなると考えられる。

第2節 材料

第1章で単離された5株の単離株、M-01株、M-07株、M-08株、M-11株、M-13株を用いた。また、好気脱窒菌である *Pseudomonas stutzeri* TR2株も用いた。

第3節 方法

3-1 N_2O 還元能解析

5株の単離株において、 N_2O 還元能解析を行った。種培養培地、前培養培地、

本培養培地は、PM培地を用いた。今回の実験で、Trace element solutionの有無で、PM培地における好気条件での生育やN₂O還元能、脱窒特性にほとんど差異が見られなかったため、以後PM培地にはTrace element solutionを入れないこととした。それを除いてはTable 1-2の組成で作製した。また、最初は、1章4節4-1で記しているように、0.45 μmフィルターによるフィルター滅菌を行ったPM培地を用いていたが、植菌を行っていないPM培地を振とう培養すると、原因は分からないが、菌が増殖することがたびたびあった。そのため、以後PM培地はオートクレーブによる滅菌処理を行った。

まず、PM培地5 mlの入った全容20 mlの試験管に、LBプレート上の単離株を白金耳で少量掻き取りそれぞれ植菌し、好気条件下で30 °C、180 rpmで種培養を行った。培養開始48時間後に、PM培地5 mlの入った全容20 mlの試験管に、種培養液50 μlを植菌し、好気条件下で30 °C、180 rpmで前培養を行った。培養途中で、随時濁度の測定を行った。培養開始して24時間後には、どの単離株も定常期に入っていたので、以後、前培養を行う際には培養時間を24時間とした。単離株のPM培地での種培養、前培養は以後もこの方法で行った。

前培養の菌体を10,000 x g、5分の遠心により回収し、オートクレーブ滅菌したMBR処理水で2回洗い、最後にMBR処理水で懸濁してOD₆₆₀が0.8となるように調整した。その菌液のうち90 μlを、PM培地9 ml入った全容27 mlのL字試験管に植菌した。植菌後、8号ブチルゴム栓により密栓し、気相部をN₂Oガスで充分置換した。その際、N₂Oは非常に溶解しやすいので[10]、十分に気液平衡させるためにL字試験管をゆっくり横に振りながら10分間N₂Oガスを気相部purgeした。気相部がN₂Oで満たされた条件下で、30 °C、150 rpmで振とう培養を行った。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングし、N₂O、N₂、O₂量をガスクロマトグラフ質量分析計により測定した。3回培養を行った。

3-2 脱窒能解析

5株の単離株において脱窒能解析を行った。種培養、前培養、本培養への植菌は、 N_2O 還元能解析(2章3節3-1を参照)と同じ方法で行った。本培養培地は、PM培地(pH 7.0)に脱窒基質として安定同位体ラベルした硝酸ナトリウム $^{15}\text{NaNO}_3$ (昭光通商株式会社)と亜硝酸ナトリウム $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (SIサイエンス株式会社)10 mMを加えた培地の2種類を用いた。PM培地9 mlを全容27 mlのL字試験管に分注し前培養液を植菌した。植菌後、嫌気条件(気相部が100% Ar)と微好気条件(気相部が10% O_2 + 90% Ar)の2条件下において、30 °C、150 rpmで振とう培養した。嫌気条件は、8号ブチルゴム栓により密栓し、気相部をArガスで充分置換した培養系である。また、微好気条件は、内部にある程度の量の酸素が存在している状態で密栓をして下界と気相の交換が行われない条件を意味し、内部の酸素が減少し嫌気に近づいていく培養系を指す。この微好気条件に関しては、気相部をArガスで充分置換した後8号ブチルゴム栓により密閉し、L字試験管の気相部の10%の量、つまりArガス1.8 ml分の量をL字試験管の気相部からシリンジで抜き取り、代わりに、用意した O_2 ガス1.8 mlをシリンジで注入した。つまり、培養開始時の気相部の組成は、10% O_2 + 90% Arとなる。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングし、ガス成分の分析、特に $^{15}\text{N}_2$ 量・ $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 量・ O_2 量をガスクロマトグラフ質量分析計により測定した。また、同時に濁度の測定も行った。少なくとも3回培養を行った。

硝酸からの脱窒を行わなかった菌株に関しては、硝酸が利用されているかを確認するために、培養終了時に硝酸の定量を行った。また、M-01株に関しては、硝酸からの脱窒、亜硝酸からの脱窒どちらにおいても、気相部のガスのサンプリングと同時に硝酸と亜硝酸の定量も行った。硝酸の定量に関してはイオンクロマトグラフ(メトロームコンパクトIC861:メトローム社)を用いた。亜硝酸の定量(<100 μM)は、反応液100 μl あたり25% HClを含む1% sulfanilic acidを

50 μ l と 0.02% *N*-1-naphthylethylenediamine-2H₂O (SIGMA) を 50 μ l 加えて 30 分間室温で放置し、540 nm の吸光度を Microplate Spectrophotometer (BIO-RAD) で測定した。

3-3 N₂O還元能に対する酸素の影響

5 株の単離株と *Pseudomonas stutzeri* TR2 株において行った。種培養、前培養、本培養への植菌は、N₂O還元能解析 (2 章 3 節 3-1 を参照) と同じ方法で行った。本培養培地は、PM培地 (pH 7.0) を用いた。PM培地 9 ml を全容 27 ml のL字試験管に分注し前培養液を植菌した。植菌後、8 号ブチルゴム栓により密閉し気相部をArガスで充分置換した後、L字試験管の気相部の組成が 10% O₂ + 10% N₂O + 80% Arとなるように調整して、30 °C、150 rpmで振とう培養した。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングし、ガス成分の分析、特にN₂量・N₂O量・O₂量の測定を行った。少なくとも3回培養を行った。

3-4 外部からのN₂Oの抑止能の検討

亜硝酸脱窒の際にN₂Oを全く放出しないM-01 株とM-11 株において、外部からのN₂Oの抑止能の可能性を検討した。N₂O抑止能を有するということは、脱窒中にN₂Oを放出しないだけでなく、活性汚泥中の脱窒菌が脱窒中に放出するN₂Oを還元することもできるということである。それを考慮して、両株が亜硝酸脱窒をしている最中に外部からN₂Oを添加するという実験系を組んだ。種培養、前培養、本培養への植菌は、N₂O還元能解析 (2 章 3 節 3-1 を参照) と同じ方法で行った。本培養培地は、PM培地 (pH 7.0) に安定同位体ラベルした亜硝酸ナトリウムNa¹⁵NO₂ 10 mMを加えた培地を用いた。PM培地 9 ml を全容 27 ml のL字試験管に分注し前培養液を植菌した。植菌後、8 号ブチルゴム栓により密閉し気相部をArガスで充分置換して、嫌気条件下で 30 °C、150 rpmで振とう培養した。M-01

株に関しては、培養開始 5 時間後に、気相部の 10%分の量にあたる 1.8 mlの N_2O ガス ($^{14}N_2O$) をシリンジにより気相部に注入した。また、M-11 株に関しては、培養開始 3 時間後または 5 時間後に、同様のことを行った。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングし、ガス成分の分析、特に $^{14}N_2O$ 量・ $^{14}N_2O$ 還元由来の $^{14}N_2$ 量・亜硝酸脱窒由来の $^{15}N_2O$ 量と $^{15}N_2$ 量・ O_2 量の測定を行った。少なくとも 3 回培養を行った。

第4節 結果

N₂O還元能解析

N₂O集積培養の際に、培養開始して6時間の間は、N₂O量の減少は観察されるが、N₂量の増加がほとんど観察されないという現象が起きたが、これはN₂Oの水中溶解度が高いからによる(1章Fig. 1-3)。そこで、単離株のN₂O還元能実験の際には、これをできるだけ避けN₂O量の減少を全てN₂O還元によるものとみなせるように、気相部をN₂Oガスで置換する際にL字試験管をゆっくり横に振りながら10分間気相部にN₂Oガスをpurgeし続けることで、十分に気液平衡化させた。単離株のN₂O還元能解析結果はFig. 2-1に示した。実際に、培養開始からN₂O量の減少(Fig. 2-1A)がN₂量の増加(Fig. 2-1B)につながっているため、N₂O量の減少をN₂O還元によるものとみなすことができる。Fig. 2-1を見ると、M-01株(●)・M-08株(□)・M-11株(▲)のN₂O還元は、培養開始して6時間以内には開始していた。特に、M-08株(□)とM-11株(▲)は、N₂O還元活性が高かった。一方で、M-13株(△)は、培養開始して6時間まではN₂O還元活性をほとんど示さなかったが、それ以降は、M-01株(●)と同じ程度のN₂O還元活性を示した。M-07株(○)は、培養期間中ずっとN₂O還元活性が低かった。

脱窒能解析

単離株の脱窒特性をまとめた表をTable 2-1に示した。

M-01株について。亜硝酸からの脱窒特性をFig. 2-2に、硝酸からの脱窒特性をFig. 2-3に示した。M-01株は高いN₂O還元活性を示したが(Fig. 2-1、●)、硝酸・亜硝酸からの脱窒活性は非常に弱かった(Fig. 2-2A, Fig. 2-2C, Fig. 2-3A, Fig. 2-3C)。理論上では、添加した硝酸・亜硝酸がすべて脱窒に使われた場合は45 μmolのN₂が発生する。嫌気条件下における亜硝酸からの脱窒においては、M-01

株は培養 24 時間後に 0.08 μmol の N_2 発生、120 時間後に 0.35 μmol の N_2 発生と、120 時間たっても、添加した亜硝酸の 1%も脱窒しなかった (Fig. 2-2A、▲)。また、脱窒の際に N_2O の発生は見られなかった (Fig. 2-2A、△)。亜硝酸脱窒の際の亜硝酸の動向 (Fig. 2-4B、●) を見ると、培養を通してほとんど減らずに培地中に残っていることが分かった。一方、嫌気条件下における硝酸からの脱窒においては、約 10 時間位経ってから脱窒を開始し、培養 24 時間後に 0.5 μmol の N_2 発生、120 時間後に 2.3 μmol の N_2 発生と、120 時間たっても、添加した硝酸の 5%くらいしか脱窒しなかった (Fig. 2-3A、▲)。硝酸脱窒の際も N_2O の発生は見られなかった (Fig. 2-3A、△)。硝酸脱窒の際の硝酸 (Fig. 2-4A、■)・亜硝酸 (Fig. 2-4A、●) の動向を見ると、約 24 時間位ですべての硝酸が亜硝酸へと還元され、それ以降は亜硝酸が培地中に残ったままであることが分かった。また、硝酸から亜硝酸への還元途中、ある程度亜硝酸が培地中に蓄積したタイミングで脱窒を開始することも分かった (Fig. 2-4A、▲)。また、微好気条件下においても、硝酸・亜硝酸からの脱窒活性は弱く、120 時間後の硝酸・亜硝酸から N_2 への脱窒率は、それぞれ 15、5%と低かった (Fig. 2-3Cの▲、Fig. 2-2Cの▲)。また、脱窒の際に N_2O の発生は見られなかった (Fig. 2-3Cの△、Fig. 2-2Cの△)。

M-07 株について。亜硝酸からの脱窒特性をFig. 2-5 に示した。硝酸からの脱窒は行わなかった。また、硝酸から亜硝酸への還元も示さなかった。嫌気条件下においても微好気条件下においても、添加した亜硝酸は最終的にはほぼすべて N_2 へと脱窒された (Fig. 2-5Aの▲、Fig. 2-5Cの▲)。また、嫌気条件下においては培養を通して N_2O をほとんど放出しなかったが (Fig. 2-5A、△)、微好気条件下においては大量の N_2O が放出された (Table 2-1、Fig. 2-5Cの△)。一時的に気相部に蓄積された N_2O 量は、培養のたびに量は異なるものの、最大で、添加した亜硝酸の量の 33~65%に達した。

M-08 株について。亜硝酸からの脱窒特性をFig. 2-6 に示した。硝酸からの脱窒

は行わなかった。また、硝酸から亜硝酸への還元も示さなかった。嫌気条件下においても微好気条件下においても、添加した亜硝酸は最終的にはほぼすべて N_2 へと脱窒された (Fig. 2-6Aの▲、Fig. 2-6Cの▲)。また、嫌気条件下においても微好気条件下においても培養最中に N_2O を放出した (Table 2-1、Fig. 2-6Aの△、Fig. 2-6Cの△)。特に、嫌気条件下においては大量の N_2O が生成され (Fig. 2-6A、△)、一時的に気相部に蓄積された N_2O 量は、最大で、添加した亜硝酸の量の 29~34% に達した。また、微好気条件下では、最大で、添加した亜硝酸の量の 1~11% であった。

M-11 株について。亜硝酸からの脱窒特性を Fig. 2-7 に示した。硝酸からの脱窒は行わなかった。また、硝酸から亜硝酸への還元も示さなかった。嫌気条件下においても微好気条件下においても、添加した亜硝酸は最終的にはほぼすべて N_2 へと脱窒され (Fig. 2-7Aの▲、Fig. 2-7Cの▲)、さらに、どちらの条件下においても培養最中に N_2O を放出することはなかった (Fig. 2-7Aの△、Fig. 2-7Cの△)。

M-13 株について。亜硝酸からの脱窒特性を Fig. 2-8 に、硝酸からの脱窒特性を Fig. 2-9 に示した。嫌気条件下においても微好気条件下においても、添加した硝酸・亜硝酸は最終的にはほぼすべて N_2 へと脱窒された (Fig. 2-8Aの▲、Fig. 2-8Cの▲、Fig. 2-9Aの▲、Fig. 2-9Cの▲)。また、亜硝酸脱窒の際、嫌気条件下・微好気条件下どちらにおいても培養最中に大量の N_2O が放出され (Table 2-1、Fig. 2-8Aの△、Fig. 2-8Cの△)、一時的に気相部に蓄積された N_2O 量は、最大で、嫌気条件下では添加した亜硝酸の量の 42~59% に達し、微好気条件下では 39~64% に達した。一方、硝酸脱窒の際は、嫌気条件下・微好気条件下どちらにおいても N_2O を放出することはなかった (Table 2-1、Fig. 2-9Aの△、Fig. 2-9Cの△)。

N_2O 還元能に対する酸素の影響

単離株 5 株と *Pseudomonas stutzeri* TR2 において、気相部を 80% (v/v) Ar / 10%

(v/v) O₂ / 10% (v/v) N₂Oとした密閉系の培養における、酸素消費 (○) とN₂O還元 (N₂O : ▲、N₂ : ●)の様子をFig. 2-10に示した。また、それぞれの菌株における、N₂O還元によるN₂生成が始まった時の、気相部の酸素濃度をTable 2-2に示した。TR2株は、微好気条件下でもN₂Oを放出しない好気脱窒菌であり、N₂O_rが酸素耐性である[11]。さらに、廃水処理場に似たような環境下でも、その脱窒特性を維持し、かつ強い亜硝酸脱窒能を示すため、廃水処理場のN₂O抑止の可能性を持つ菌株として報告されている[11, 12]。M-01株 (Fig. 2-10A) とM-11株 (Fig. 2-10D) が、他の菌株に比べ気相部の酸素濃度の高い時にN₂O還元を開始した (Table 2-2、M-01株 : 1.30 ± 0.13 mM、M-11株 : 1.43 ± 0.16 mM)。これは、TR2株 (Fig. 2-10F) よりもN₂O還元開始時の酸素濃度が高く、また、酸素消費の激しい時間帯であった。両者の菌株がN₂O還元と酸素消費を同時に行っているのが観察され、N₂O還元が終わる頃も酸素消費がまだ見られた (Fig. 2-10A、Fig. 2-10D)。一方、M-07株は、酸素消費がとまり気相部の酸素が底をついてからN₂O還元を開始した。N₂O還元開始時の気相部の酸素濃度は最も低かった (Table 2-2、Fig. 2-10B)。M-08株とM-13株は、酸素消費をしている途中でN₂O還元を開始したが、M-01株やM-11株に比べては開始時の気相部の酸素濃度は低かった (Table 2-2、Fig. 2-10C、Fig. 2-10E)。そのうえ、M-01株やM-11株と違い、N₂O還元の途中で酸素消費がほぼとまっていた。

また、10%のN₂Oを消費するのに、M-01株・M-11株・M-13株・TR2株は2~3.5時間だったのに対して、M-07株は8~10時間、M-08株は4.5~6時間と、N₂O還元活性は低かった。

N₂O抑止能の検証

M-01株に関しては、培養5時間後に、亜硝酸からの脱窒によるN₂ (○)の生成が確認されたので、そのタイミングでN₂Oを外部から添加した (Fig. 2-11A)。すると、亜硝酸よりも、外部から添加したN₂O (Fig. 2-11A、▲)を優先的に消

費することが分かった。もともとM-01株は、亜硝酸脱窒能は非常に弱い、 N_2O 還元能が強いという特徴であり、その特徴を示す結果となった。

M-11株に関しては、培養3時間後に、亜硝酸からの脱窒による N_2 (○)の生成が確認されたので、そのタイミングで N_2O (▲)を外部から添加した (Fig. 2-11C)。もともとM-11株は強い亜硝酸脱窒能を示すにもかかわらず (Fig. 2-11B)、 N_2O を外部から添加したことによって亜硝酸からの脱窒が阻害されるような形となり N_2O が優先的に消費される結果となった。 N_2O 還元中は亜硝酸脱窒がほとんど行われず (Fig. 2-11C、○)、 N_2O 還元が終わるとたちまち強い亜硝酸脱窒能を示した。同じような形で培養5時間後に外部から N_2O を添加しても、結果は全く同じであった (Fig. 2-11D)。また、 N_2O を添加した際に $^{15}\text{N}_2\text{O}$ が少量検知された (not data shown) が、 N_2O 還元による $^{14}\text{N}_2\text{O}$ 量の減少に比例してこの $^{15}\text{N}_2\text{O}$ 量も減少していき、 $^{14}\text{N}_2\text{O}$ がなくなる頃には $^{15}\text{N}_2\text{O}$ が検知されなかったことから、この $^{15}\text{N}_2\text{O}$ は外部から添加した N_2O 由来であり、亜硝酸脱窒由来のものではない。

第5節 考察

N₂O還元能解析の結果から、N₂O集積培養と同じ条件下ではM-07株以外の4株が高いN₂O還元能を示した (Fig. 2-1)。しかしながら、その4株のうちM-08株とM-13株は亜硝酸脱窒の際に大量のN₂Oを放出した (Fig. 2-6、Fig. 2-8)。また、M-07株に関しても、嫌気条件下ではN₂Oを放出しなかったものの、酸素存在下では大量のN₂Oを放出した (Fig. 2-5)。これは、廃水処理において酸素や亜硝酸がN₂Oを放出させるファクターであることを裏付けている。酸素や亜硝酸は廃水処理環境において普遍的に存在するものであり、これら3株は酸素や亜硝酸によって本来持っているN₂O還元能が発揮できずに自らが大量にN₂Oを放出してしまうため、バイオオーギュメンテーションに用いる微生物としてはふさわしくない。

しかし、5株の単離株の中で、M-01株とM-11株は酸素や亜硝酸存在下においてもN₂Oを放出せずに高いN₂O還元能を発揮した。M-01株は、硝酸・亜硝酸からの脱窒能は弱いものの、N₂O還元能が強いという特徴を有し (Fig. 2-1、Fig. 2-2、Fig. 2-3、Fig. 2-4)、M-11株は、強い亜硝酸脱窒能とN₂O還元能を有していた (Fig. 2-1、Fig. 2-7)。M-01株は硝酸から亜硝酸への還元能を有していたが (Fig. 2-4A)、M-11株は有していなかった。このM-11株の脱窒特性に近い脱窒菌として *Pseudomonas stutzeri* TR2 が存在する。このTR2株は水田から単離されたものであるが、酸素や亜硝酸存在下においても、N₂Oを放出しないうえに、強い亜硝酸脱窒能を有している [11, 12]。さらに、TR2株は、廃水処理に似た環境においてもこの脱窒特性を維持しているため、廃水処理場のN₂O抑止に有効である可能性を秘めた細菌である [12]。それゆえに、廃水処理環境で生息しTR2株と似た脱窒特性を有するM-11株も、廃水処理のN₂O抑止に貢献する可能性がある。一方、M-01株の脱窒特性はほとんど例を見ない特徴であり、この亜硝酸よりもN₂Oを

好む特徴から、廃水中の亜硝酸よりも活性汚泥の放出する N_2O を真っ先に消費するのではないかと予想され、 N_2O 抑止能を有する可能性が示唆された。

また、酸素と N_2O 共存下での培養実験では、M-01株とM-11株は、他の単離株やTR2株よりも高い酸素濃度、酸素呼吸が盛んなタイミングで N_2O 還元を開始し、かつ、高い N_2O 還元活性を示した (Fig. 2-10、Table 2-2)。このことから、両株が N_2O 還元の高い酸素耐性を有していることが伺える。この特性が、しばしば廃水処理で N_2O 放出が指摘されている、嫌気が不完全である環境下[2, 3]において、 N_2O 抑止に貢献する可能性が大いにある。この N_2O 還元の酸素耐性の原因が、酵素レベルなのか、それとも遺伝子の発現レベルなのか、非常に興味深い。

最後に、亜硝酸と N_2O 共存下での培養実験で、M-01株とM-11株において亜硝酸よりも N_2O を優先的に消費することが確認できた (Fig. 2-11)。M-01株に関しては、その脱窒特性を表す結果となった。しかし、強い亜硝酸脱窒能を有するM-11株に関しては、 N_2O の添加と同時に亜硝酸脱窒がとまり N_2O 還元が優先される、という今までに報告されたことのない現象が観察された。この現象はエネルギー獲得面でも非常に興味深い。それは、脱窒でのエネルギー獲得においてどのステップにおいても獲得できるATPが同じなかで、M-11株は最終ステップ ($N_2O \rightarrow N_2$) によるエネルギー獲得を選択するということである。この現象を解明すべく、まずは N_2O 添加後の各脱窒遺伝子の発現量の変化をみていくことを考えている。

以上から、M-01株とM-11株は廃水処理の N_2O 発生抑止を目的としたバイオオオギュメンテーションに用いる微生物にふさわしいと考えた。近年効率的な窒素除去法として注目され、そして、養豚糞尿廃水のような、高濃度の NH_4^+ の存在する廃水や低いC/N比である廃水の処理に適しているとされる亜硝酸型硝化脱窒処理[13, 14]は、処理過程において亜硝酸が蓄積するがゆえに大量の N_2O が放出されることが大きな問題であったが (序章を参照)、M-01株とM-11株はこ

の問題を解決する可能性が高い。次章では、M-01 株とM-11 株を実際に活性汚泥とのバイオオーギュメンテーションに利用しN₂O抑止効果をもたらすのか検証した。

Strain	脱窒活性		硝酸脱窒の際のN ₂ O放出		亜硝酸脱窒の際のN ₂ O放出 ^a	
	硝酸	亜硝酸	微好気条件	嫌気条件	微好気条件	嫌気条件
M-01	VW	VW	-	-	-	-
M-07	-	+			++	-
M-08	-	+			+	++
M-11	-	+			-	-
M-13	+	+	-	-	++	++

Table 2-1. 単離株の脱窒特性

微好気条件は培養開始時の気相部が 90% (v/v) Ar / 10% (v/v) O₂で構成されており、嫌気条件は 100% (v/v) Arで構成されている。培養は少なくとも 3 回行った。

^a + : 最終的に完全に脱窒 VW : 非常に弱い脱窒活性 (ほとんど脱窒しない)

- : 全く脱窒しない

^b ++ : 大量のN₂Oの放出 (一時的に気相部に蓄積したN₂O量が、最大で、添加した硝酸・亜硝酸の20%以上)

+ : N₂Oの放出 (一時的に気相部に蓄積したN₂O量が、最大で、添加した硝酸・亜硝酸の0.1~20%)

- : ほとんどN₂Oを放出しない (一時的に気相部に蓄積したN₂O量が、最大で、添加した硝酸・亜硝酸の0.1%以下)

Strain	N ₂ O還元開始時の気相部の酸素濃度 [mM]
M-01	1.30 ± 0.13
M-07	0.353 ± 0.027
M-08	1.02 ± 0.20
M-11	1.43 ± 0.16
M-13	0.758 ± 0.019
TR2	0.764 ± 0.118

Table 2-2. 気相部が80% (v/v) Ar / 10% (v/v) O₂ / 10% (v/v) N₂O で構成された密閉系での培養における、N₂O還元開始時の気相部の酸素濃度 (N₂O還元能に対する酸素の影響に関する実験)

少なくとも3回以上培養を行い、平均値と標準偏差を示した。

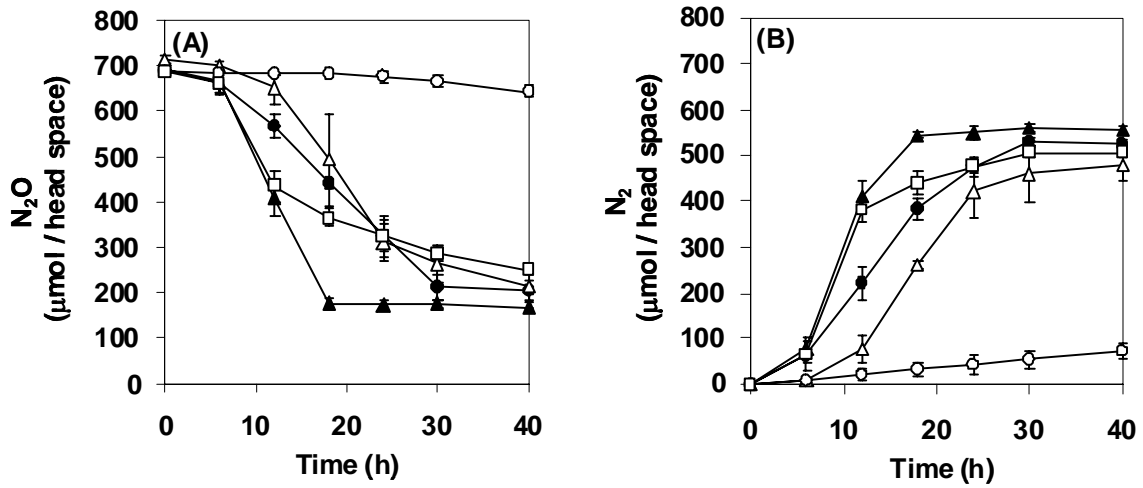


Fig. 2-1. PM培地における単離株のN₂O還元能

(A)気相部のN₂O量の変化 (B)気相部のN₂量の変化

● : M-01株 ○ : M-07株 □ : M-08株 ▲ : M-11株 △ : M-13株

1回の培養につき3連で行い、計3回培養を行った。それぞれの点に標準偏差を示した。

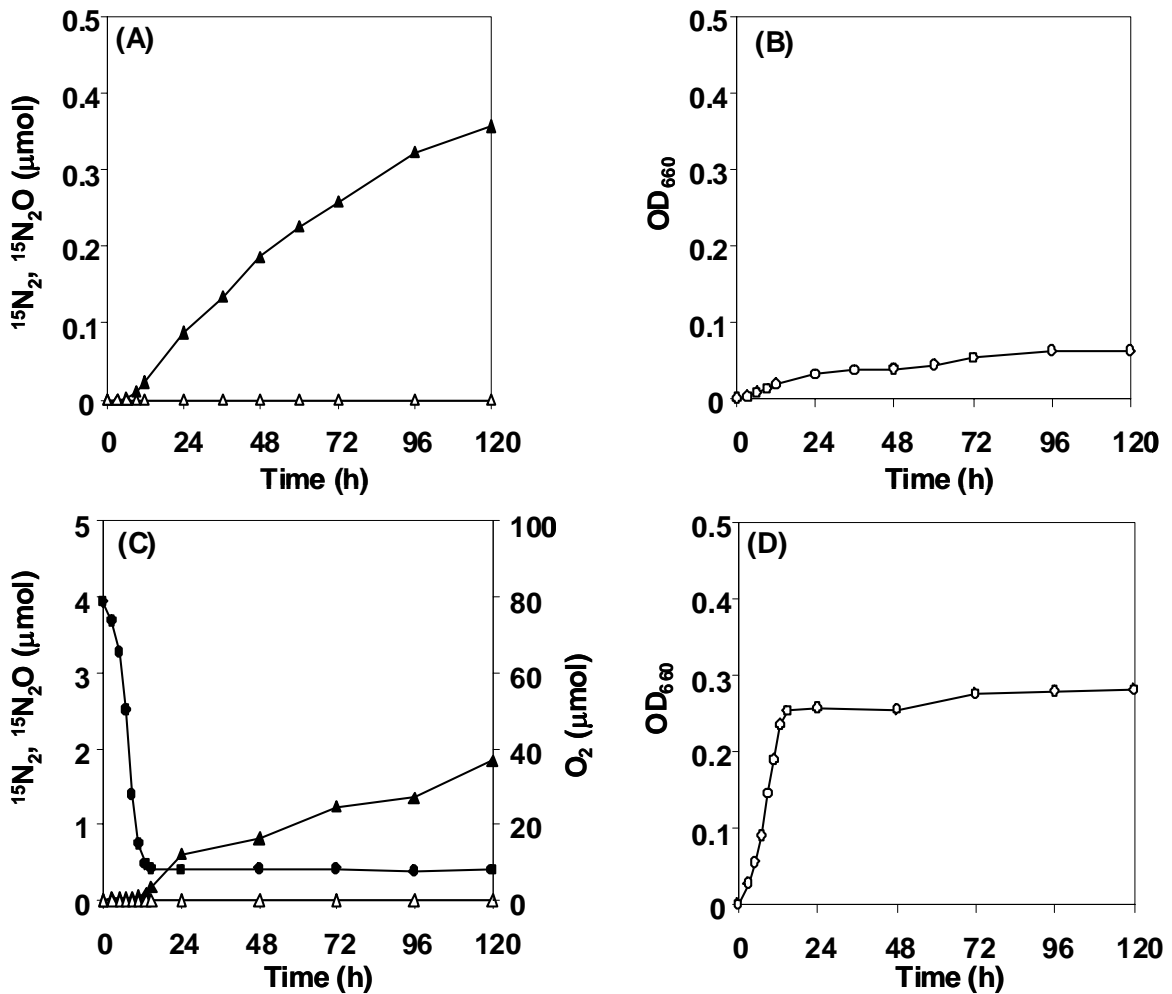


Fig. 2-2. M-01 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における亜硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったので図に示さなかった。

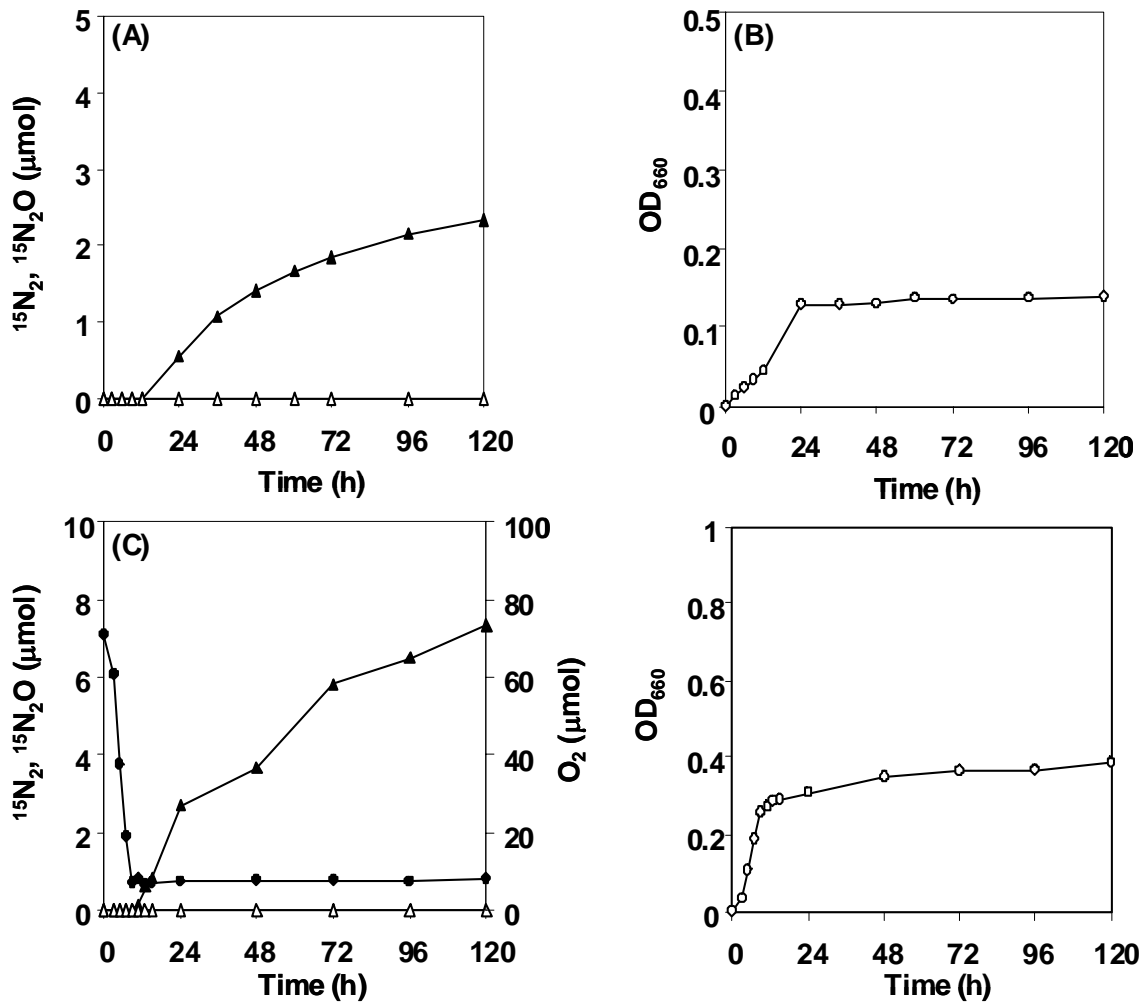


Fig. 2-3. M-01 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2$ ・ $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ・ O_2 の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

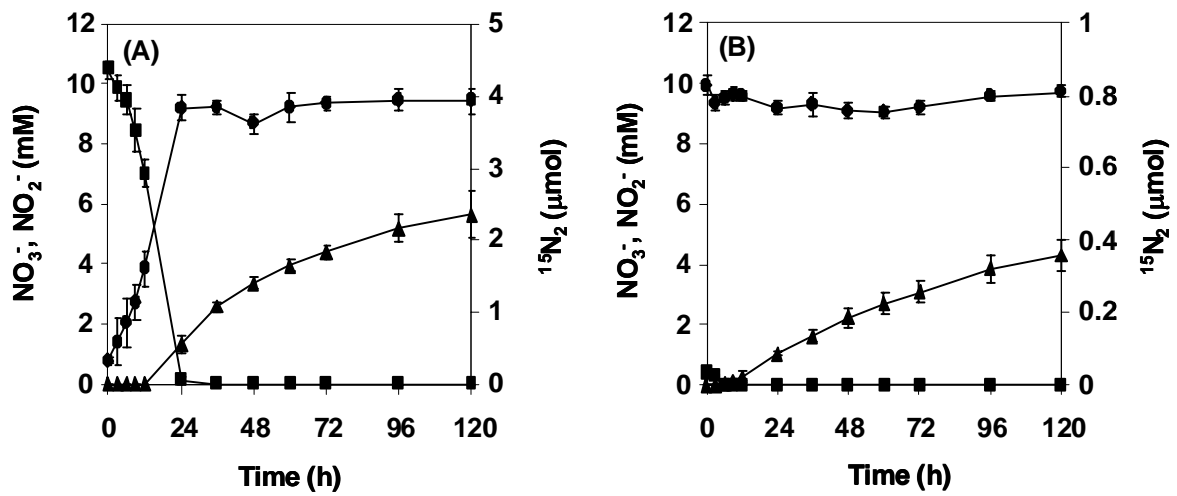


Fig. 2-4. 嫌気条件下におけるM-01株の硝酸(A)・亜硝酸(B)脱窒の際の N_2 生成と硝酸・亜硝酸の動向

● : NO_2^- ■ : NO_3^- ▲ : $^{15}\text{N}_2$

1回の培養につき3連で行い、計3回培養を行った。それぞれの点に標準偏差を示した。培養を通して N_2O の放出は見られなかった。

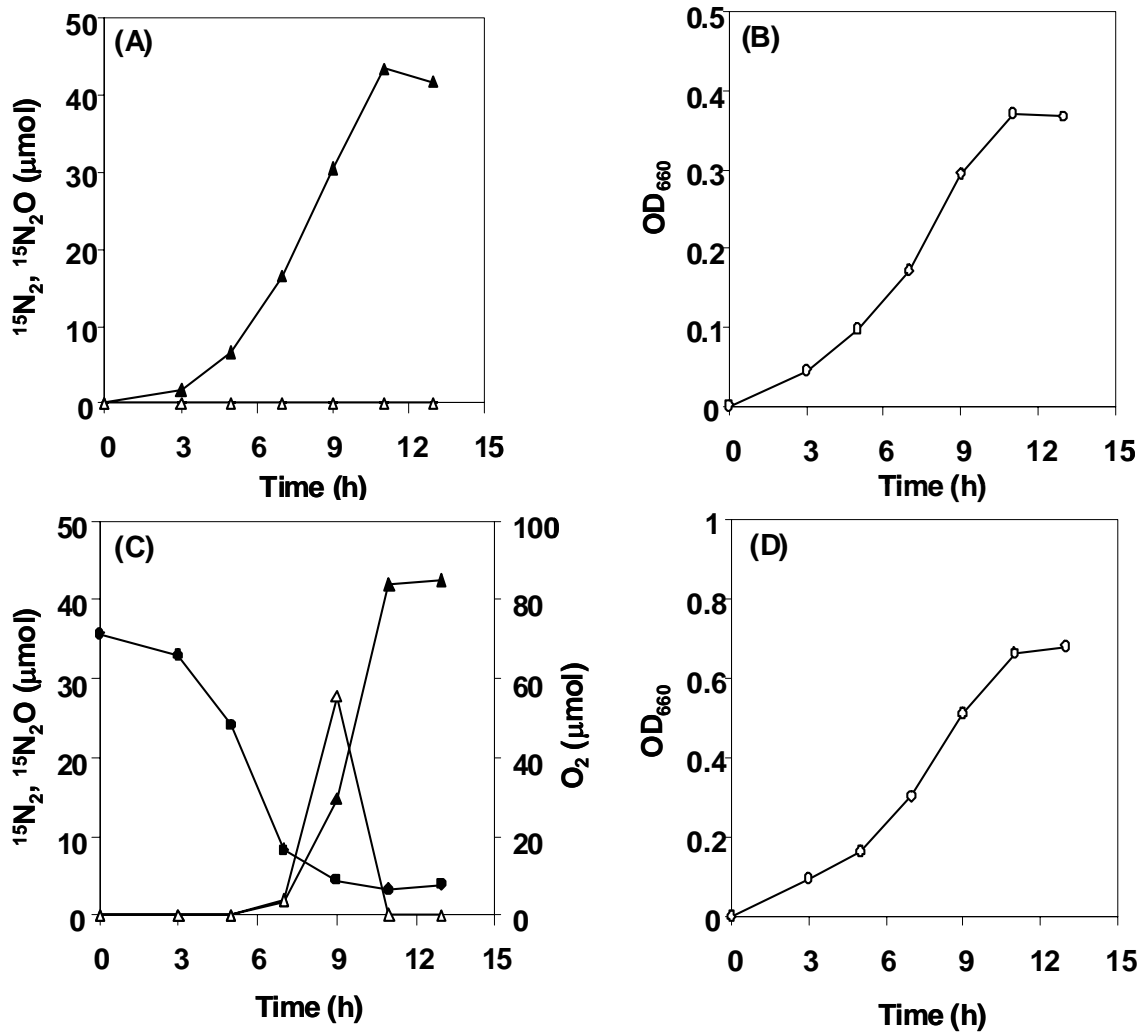


Fig. 2-5. M-07 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における亜硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

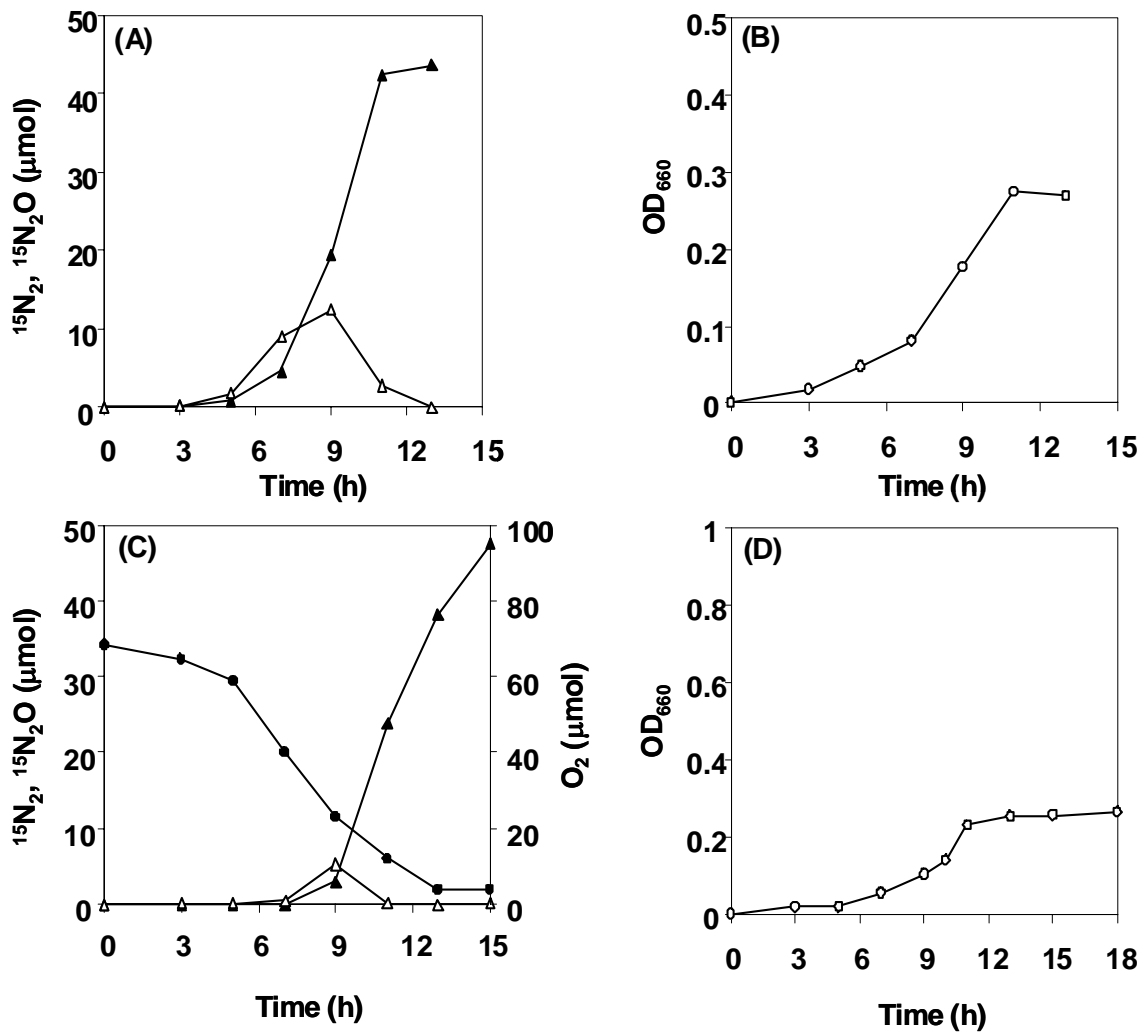


Fig. 2-6. M-08 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における亜硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

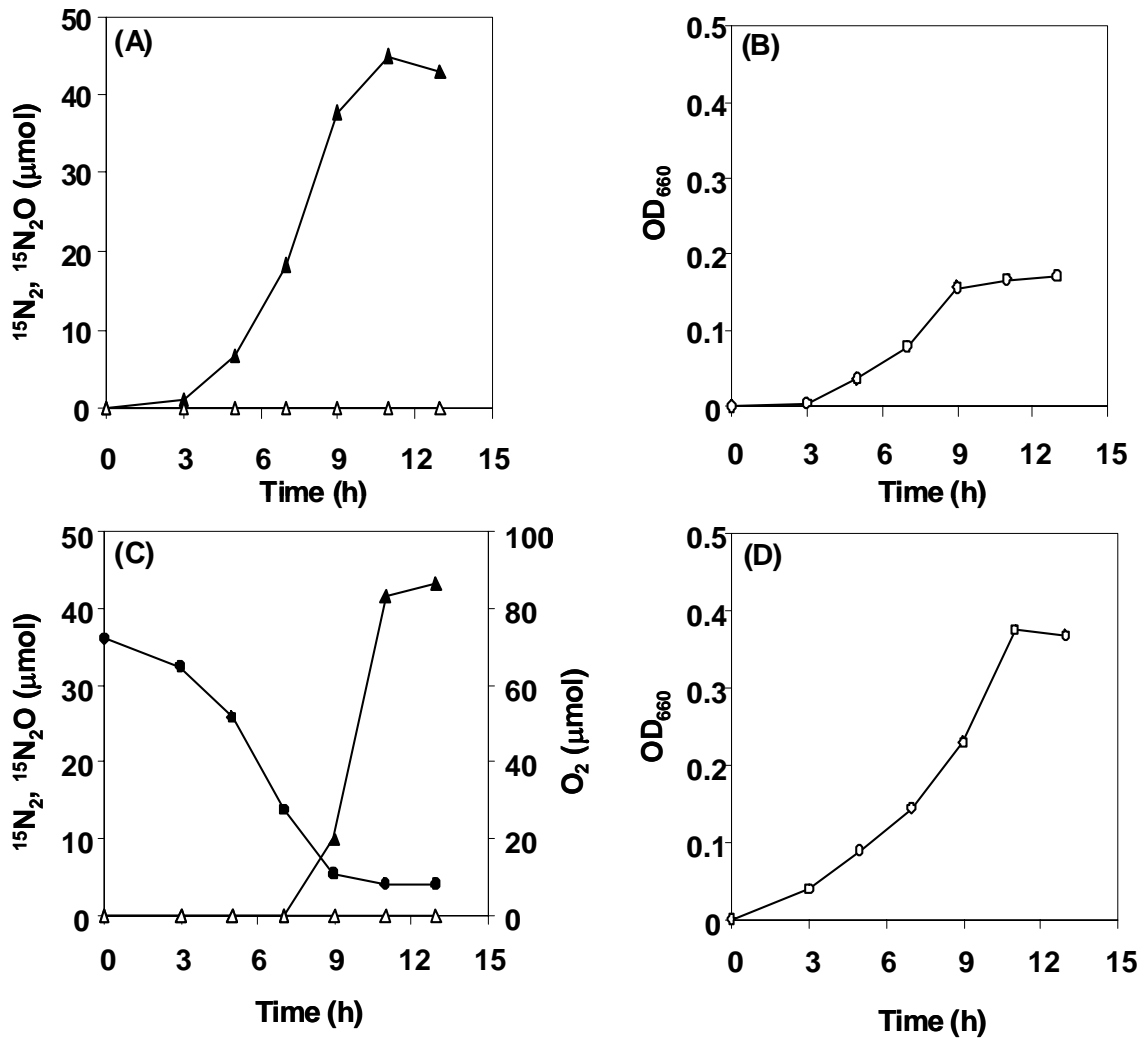


Fig. 2-7. M-11 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における亜硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

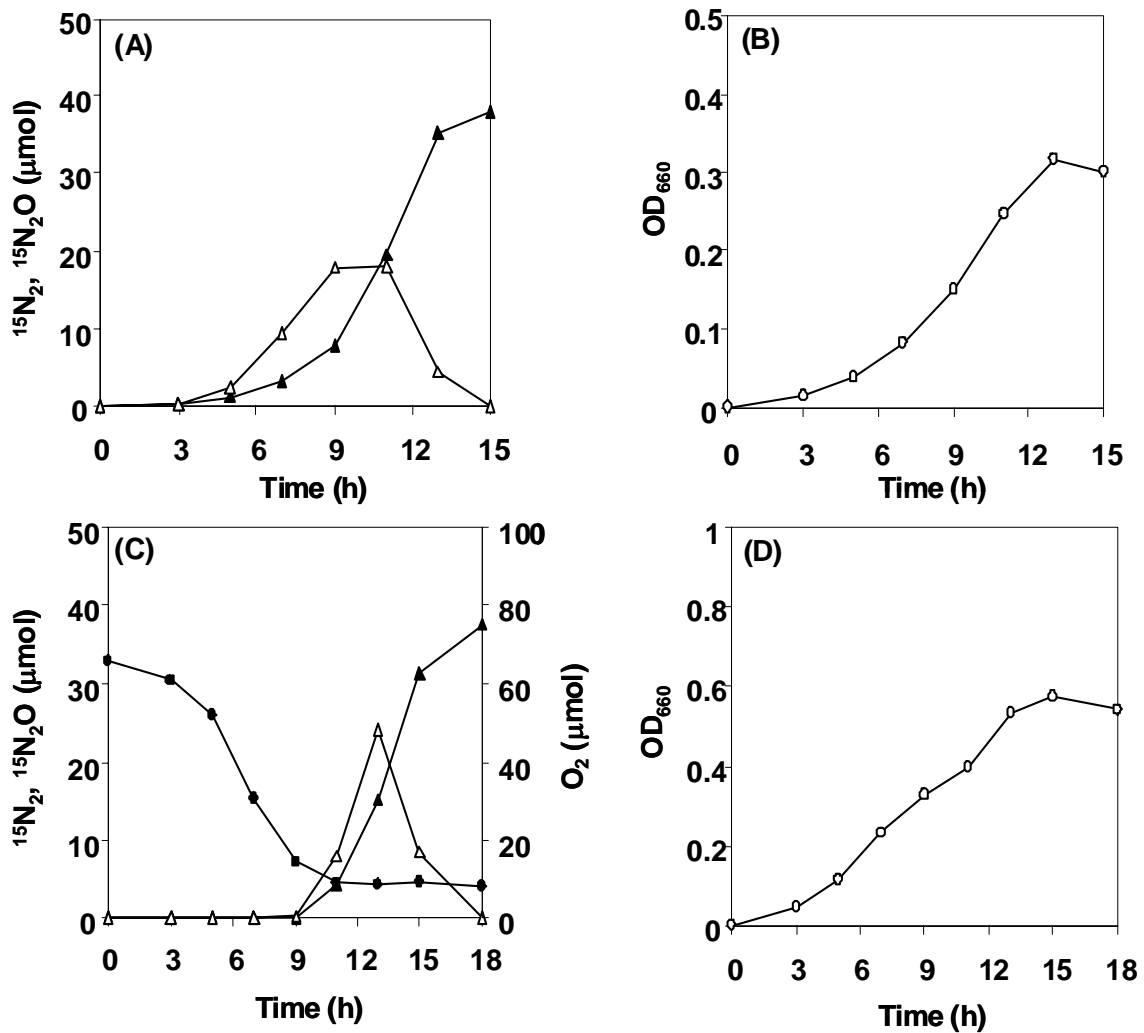


Fig. 2-8. M-13 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における亜硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

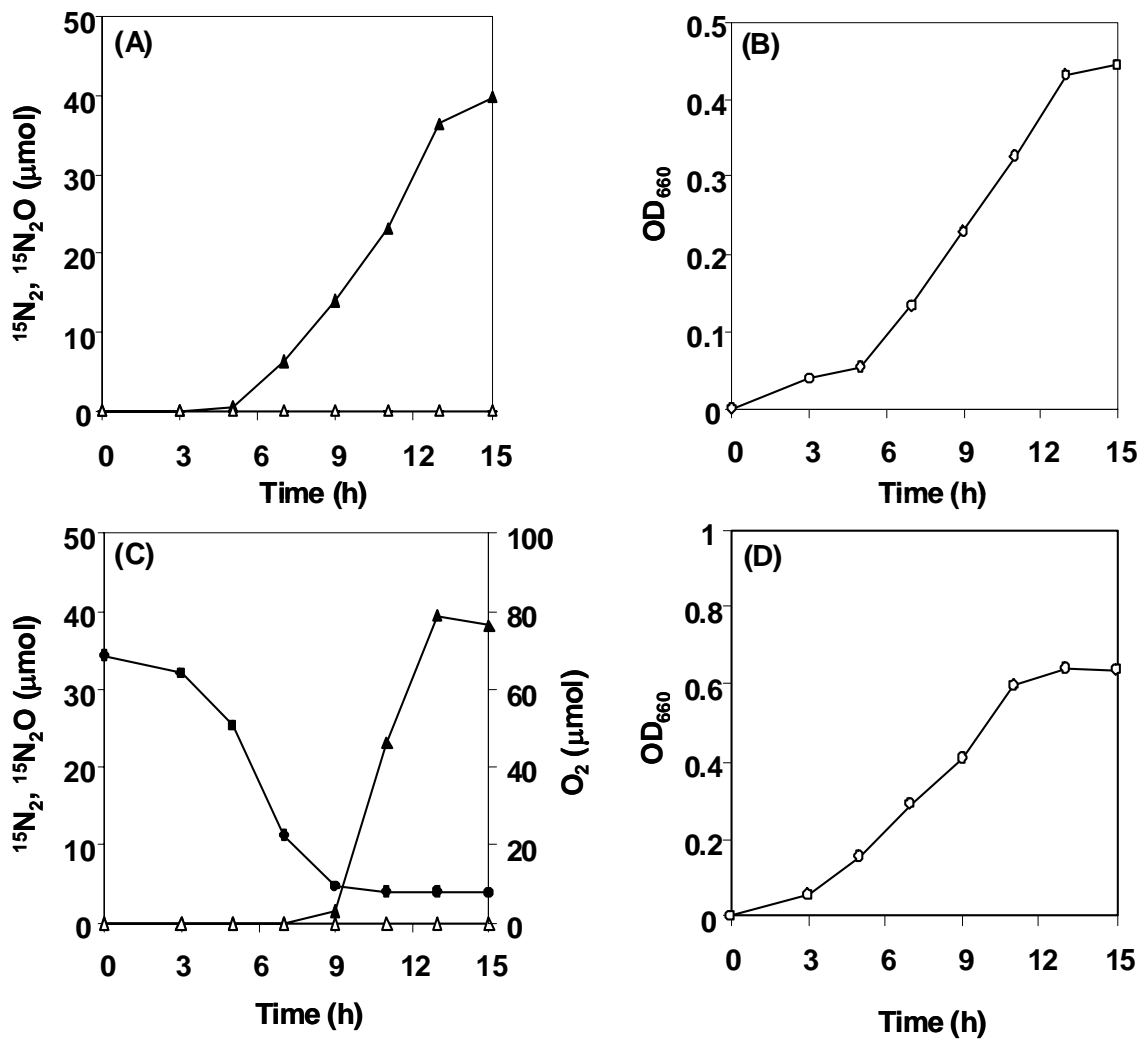


Fig. 2-9. M-13 株の嫌気条件下(A, B)と微好気条件下(C, D)における硝酸脱窒能

▲ : $^{15}\text{N}_2$ △ : $^{15}\text{N}_2\text{O}$ ● : O_2 ○ : OD_{660}

A, Cは気相部の $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{O}_2$ の動向を表した図で、B, Dは濁度 OD_{660} の経時変化を表した図である。嫌気条件下では O_2 がほとんど存在しなかったため図に示さなかった。

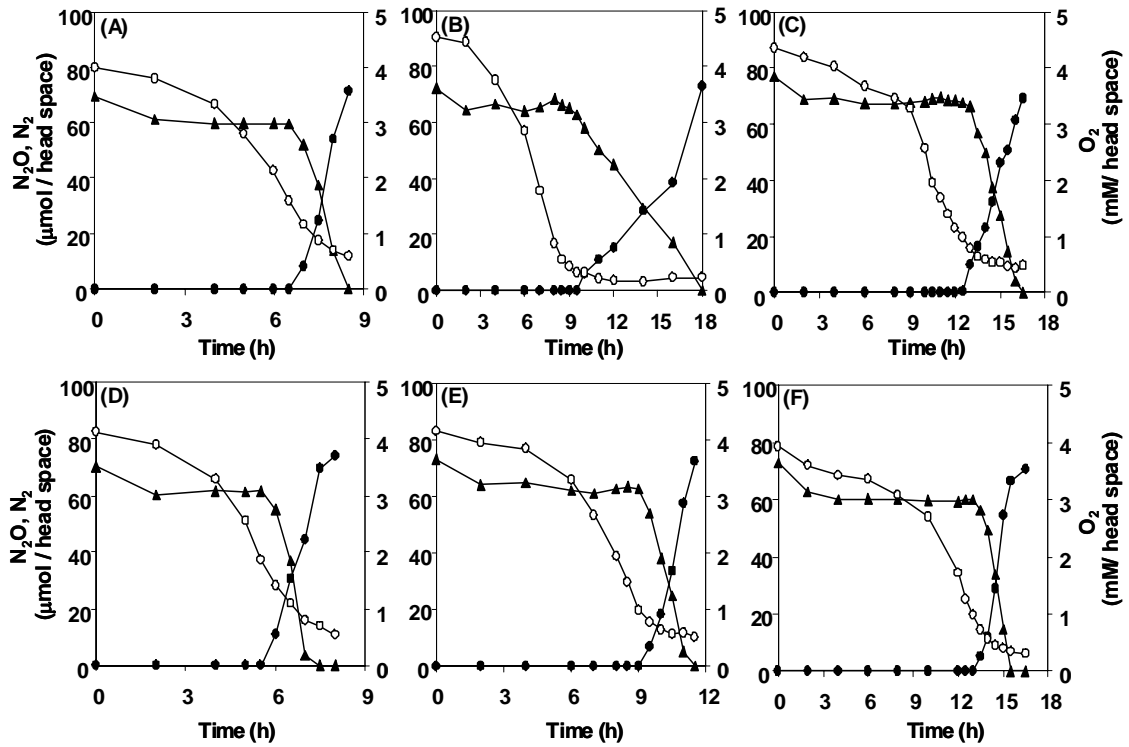


Fig. 2-10. N_2O 還元に対する酸素の影響

▲ : N_2O ● : N_2 ○ : O_2

気相部の $N_2 \cdot N_2O \cdot O_2$ の動向を表している。気相部の組成が80% (v/v) Ar / 10% (v/v) O_2 / 10% (v/v) N_2O となるように調整してから密閉系で培養を行った。少なくとも3回以上培養を行った。(A) M-01株 (B) M-07株 (C) M-08株 (D) M-11株 (E) M-13株 (F) *Pseudomonas stutzeri* TR2株

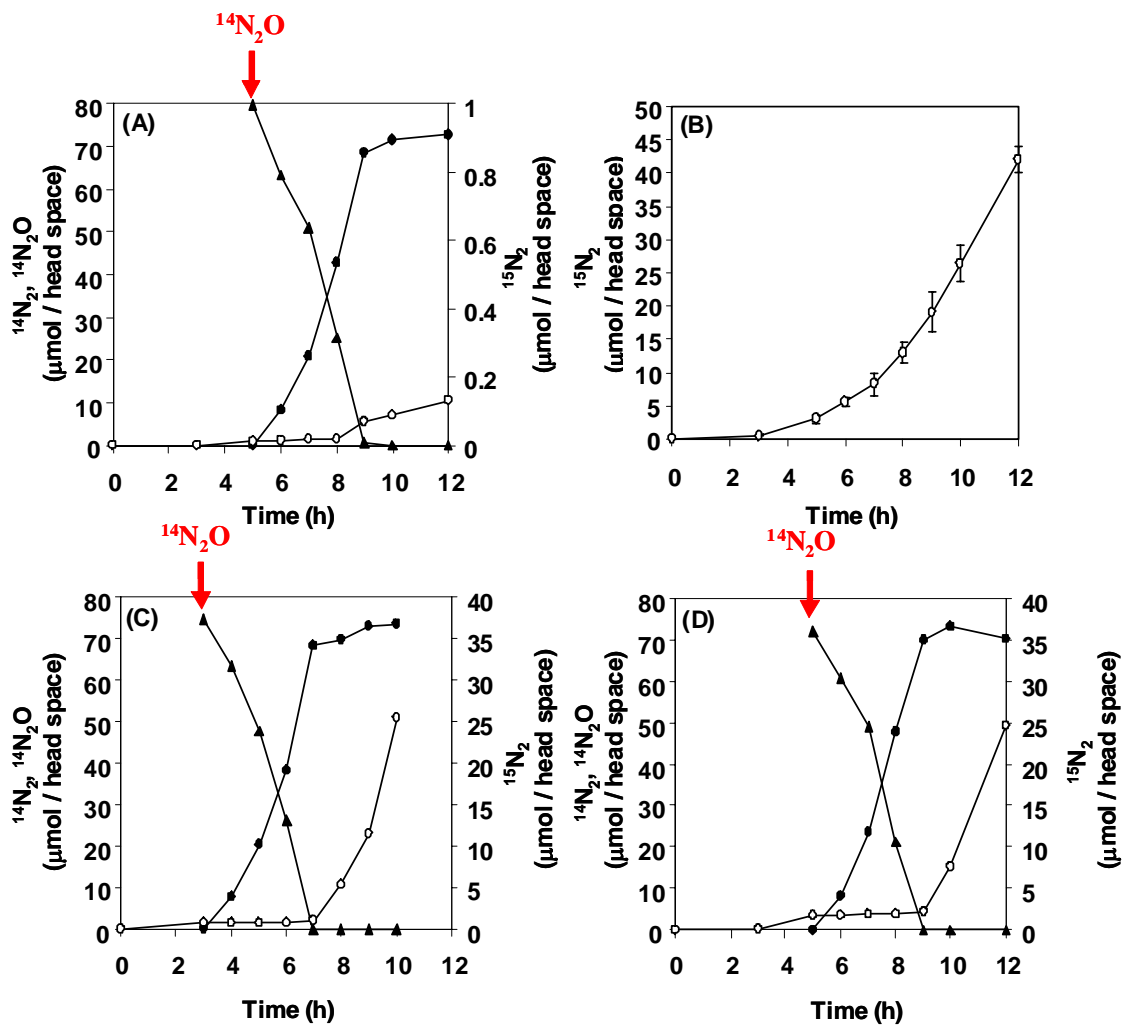


Fig. 2-11. M-01 株(A)・M-11 株(C, D)の N_2O 抑止能の検討

▲ : $^{14}\text{N}_2\text{O}$ ● : $^{14}\text{N}_2$ ○ : $^{15}\text{N}_2$

亜硝酸脱窒を行っているところに外部から N_2O を添加し、M-01 株とM-11 株の外部からの N_2O 還元能力をみた。 $^{14}\text{N}_2$ は N_2O 還元由来、 $^{15}\text{N}_2$ は亜硝酸脱窒由来でできる。

(A) 培養 5 時間後に気相部の 10%の N_2O 量を添加した。この時、M-01 株は亜硝酸からの脱窒を開始していた。

(C, D) 培養 3 時間後(C)と 5 時間後(D)に気相部の 10%の N_2O 量を添加した。培養 3 時間後には、M-11 株は亜硝酸からの脱窒を開始していた。

(B) M-11 株の亜硝酸からの脱窒による N_2 生成の様子。 N_2O は添加していない。

参考文献

1. **Kampschreur, M. J., H. Temmink, et al.** 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res.* **43**:4093-4103.
2. **Otte, S., et al.** 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2421-6.
3. **Park, K. Y., et al.** 2000. Emission and control of nitrous oxide from a biological wastewater treatment system with intermittent aeration. *J. Biosci. Bioeng* **90**:247-52.
4. **Itokawa, H., K. Hanaki, et al.** 2001. Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition. *Water Res.* **35**:657-64.
5. **Hanaki, K., H. Zheng, et al.** 1992. Production of nitrous oxide gas during denitrification of wastewater. *Water. Sci. Technol.* **26**:1027-1036.
6. **Schulthess, R. V., D. Wild, et al.** 1994. Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. *Water. Sci. Technol.* **30**:123-132.
7. **Schulthess, R. V., M. Kuehni, et al.** 1995. Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. *Water Res.* **29**:215-226.
8. **Thörn, M. and F. Sörensson.** 1996. Variation of nitrous oxide formation in the denitrification basin in a wastewater treatment plant with nitrogen removal. *Water Res.* **30**:1543-1547.
9. **Gejlsbjerg, B., L. Frette, et al.** 1998. Dynamics of N₂O production from activated sludge. *Water Res.* **32**:2113-2121.
10. **Dean, J. A.** 1992. *Lange's Handbook of Chemistry.* McGraw-Hill, Inc., New York.
11. **Takaya, N., M. A. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, and H. Shoun.** 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl Environ Microbiol* **69**:3152-3157.
12. **Miyahara, M., S. W. Kim, S. Fushinobu, K. Takaki, T. Yamada, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, and H. Shoun.** 2010. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:4619-4625.

13. **Peng, Y., and G. Zhu.** 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:15-26.
14. **Hwang, S., K. Jang, et al.** 2006. Factors affecting nitrous oxide production: a comparison of biological nitrogen removal processes with partial and complete nitrification. *Biodegradation* **17**:19-29.

第3章

活性汚泥へのバイオオーギュメンテーションによる 単離株のN₂O抑止効果の検証

第1節 序

第1章により、 N_2O 集積培養によって単離された単離株が様々な脱窒能力を有していることが確認された。中には、もともとの N_2O 還元能は強いものの、しばしば N_2O を放出しやすいといわれる酸素や亜硝酸の存在下ではその能力が発揮されず脱窒により N_2O を大量に放出してしまう単離株もあった。その中であって、M-01株とM-11株は N_2O 還元能が強い上に、酸素や亜硝酸存在下でも脱窒により N_2O を放出しなかった。実際に、他の単離株に比べても N_2O 還元能に酸素耐性があることも分かった。さらに、M-01株とM-11株は亜硝酸よりも N_2O を電子受容体として好む特性を有することが判明し、本研究の目的に適した性質を持つ有用脱窒菌と言えた。

本章では、実際に5株の単離株を実験室スケールでのモデル培養系においてバイオオーギュメンテーションに利用し、単離株、特にM-01株とM-11株が N_2O 抑止効果をもたらすか検証を行った。

第2節 材料

第1章で単離された5株の単離株、M-01株、M-07株、M-08株、M-11株、M-13株を用いた。また、MBR内で硝化脱窒処理を行っている活性汚泥を用いた。

第3節 方法

3-1 試験管レベルでのバイオオーギュメンテーション

バイオオーギュメンテーションには、PM培地 (pH 7.0) に脱窒基質として安

定同位体ラベルした亜硝酸ナトリウム $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (SIサイエンス株式会社) 10 mMを加えた培地を用いた。PM培地はオートクレーブにより滅菌処理を行った。今までの実験では、本培養培地で用いるPM培地は養豚糞尿搾汁液とMBR処理水の比を 1:4 に混合したもの {これからはこの培地をPM(1:4)と表記する} であったが、今回の実験では、このPM(1:4)培地と、養豚糞尿搾汁液とMBR処理水の比を 1:19 に混合したPM(1:19)培地の 2 種類を用いた。単離株の種培養、前培養は、 N_2O 還元能解析 (2 章 3 節 3-1 を参照) の時と同じ方法で行った。この際に用いた培地も、 N_2O 還元能解析の時と同じくPM(1:4)を用いた。

PM 培地 9 ml を全容 27 ml の L 字試験管に分注した。そして、培養開始時の活性汚泥の培地中の濃度が 500 mg/l、単離株の濃度が 50 mg/l となるように、活性汚泥と単離株を植菌した。この際、活性汚泥と単離株は MBR 処理水で 2 回菌体洗浄してから植菌した。

微好気条件 (気相部が 10% O_2 + 90% Ar) と嫌気条件 (気相部が 100%Ar) の 2 条件下でバイオオーギュメンテーション実験を行い、微好気条件下では本培養培地にPM(1:4)を用い、嫌気条件下ではPM(1:19)を用いた。微好気条件下におけるバイオオーギュメンテーション実験は 5 株の単離株において行い、嫌気条件下での実験はM-01 株とM-11 株について行った。植菌後、8 号ブチルゴム栓により密閉し、嫌気条件に関しては気相部をArガスで十分置換し、微好気条件に関しては、気相部をArガスで充分置換した後、L字試験管の気相部の組成が 10% O_2 + 90% Arとなるように調整して、30 °C、150 rpmで振とう培養した。培養途中で定期的に気相のガスをサンプリングし、ガス成分の分析、特に N_2 量・ N_2O 量・ O_2 量の測定を行い、単離株添加による N_2O 抑止効果の検証を行った。単離株それぞれにおいて少なくとも 3 回は実験を行った。同時に、単離株を添加していない活性汚泥のみの系に関しても、 N_2O 放出量の比較のために並列して実験を行った。

3-2 メスシリンダーを用いた連続培養でのM-01 株・M-11 株のN₂O抑止効果の検証（単離株初期添加）

嫌氣的である廃水処理場の脱窒槽の運転条件に倣い、Fig. 3-1 のような脱窒槽模擬実験装置を作った。運転条件に関しても簡単にFig. 3-1 に記載している。亜硝酸型硝化でNO₂⁻が蓄積した脱窒槽をイメージし、初期条件として、電子供与体として用いられる養豚糞尿搾汁液とMBR処理水を 1:19 で混合したPM(1:19)培地 800 mlにNa¹⁴NO₂を 1.12 g加えたもの（廃水中の濃度は 20 mMとなる）を廃水として用いた。この人工廃水は、今までと違い滅菌処理を行わなかった。活性汚泥のみ（コントロール）の系、活性汚泥にM-01 株を添加した系、活性汚泥にM-11 株を添加した系の 3 つの系を用意した。活性汚泥の廃水中の初期濃度を 1,000 mg/lに設定し、単離株の廃水中の初期濃度が 10 mg/l（つまり活性汚泥の 1%量）となるように添加をした。この添加するM-01 株とM-11 株は、N₂O還元能解析（2章3節3-1を参照）の時と同じく、PM(1:4)培地で種培養・前培養を行い、MBR処理水で洗って懸濁し、廃水に添加した。廃水の添加・引き抜きは 12 時間おきに行った。12 時間おきに 0.6 L/minの流速で 5 分間曝気を行い、曝気中に廃水 80 mlを引き抜き、添加人工廃水 80 ml（組成：養豚糞尿搾汁液 40 ml + MBR処理水 40 ml + Na¹⁴NO₂ 1.12 g）を加えた。曝気を行っていない時間帯はマグネティックスターラーで 500 rpmの速度で攪拌をした。また、実際の廃水処理場では開放系であるので、それに倣い、気相部に 0.1 L/minの流速で空気を送り込んだ。それにより上層部は好氣的になってはいるが、底が深いために底の方は嫌氣的になっている。Fig. 3-1 の赤い矢印の流れで廃水中に放出されるN₂Oが sampling bagに流れていく。そのsampling bagに蓄積されたN₂O量を 12 時間ごとにガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-QP5000/QP5050A：Shimadzu）で測定し、コントロールと比較してM-01 株とM-11 株の添加によりN₂Oの放出が抑止さ

れているのかを検証した。ただし、曝気中はsampling bagを外しているため、その間のN₂O量は測定していない。廃水添加直前の廃水のNO₂濃度も測定した。NO₂濃度の測定方法は2章3-2に記されてある。また、この廃水処理の間のM-01株・M-11株の動向（生残性）もモニタリングした。生残性に関する実験の詳細は3章3節3-4、3-5に記した。このM-01株・M-11株のN₂O抑止効果の検証実験は2回行った。

3-3 メスシリンダー連続培養でのM-01株のN₂O抑止効果の検証（途中添加）

3章3-2の実験で、N₂O抑止効果があり、かつ生残性も保たれたM-01株について、今度は、現場に実際に添加するときの状況を想定して、メスシリンダーでの連続培養で安定した廃水処理が行われているところでM-01株を途中添加し、N₂O抑止能ならびに生残性を検証した。3章3-2の実験の問題点を踏まえ、常時安定した廃水処理環境となるように、3章3-2で設定した運転条件に微調整を加えた（Fig. 3-2）。3章3-2の運転条件と変更した点は、養豚糞尿搾汁液を40 mlから30 mlに減らしたことと、亜硝酸の添加量を減らした（終濃度が20 mMから15 mM）ことである。

活性汚泥の廃水中の濃度が1000 mg/lとなるように添加した系を2本準備し、並列して1週間廃水処理を行った後、曝気中に片方のメスシリンダーにM-01株を廃水中の濃度が10 mg/lとなるように添加した。この際のM-01株の種培養はPM培地、前培養は人工培地であるDM培地（Table 3-1）を用いた。前培養は60時間行った。M-01株の添加後1週間廃水処理を行い、M-01株のN₂O抑止能を検証した。廃水処理の基本的な運転・操作は3章3-2に記されたとおりである。12時間ごとにN₂O量・廃水添加直前の廃水のNO₂濃度の測定を行った。また、M-01株の生残性に関する実験も行った。このM-01株の途中添加によるN₂O抑止効果の検証実験は2回行った。

3-4 M-01 株と M-11 株の 16S rDNA 特異的プライマーの作成

M-01 株と M-11 株の廃水処理環境下での生残性をみるために、両株の 16S rDNA 特異的プライマーを構築した。16S rDNA の可変領域[1]に着目してプライマーを作成した。M-01 株と M-11 株は 16S rDNA 塩基配列による系統学的解析から非常に近縁な関係にあることが分かっている (Fig. 1-4)。両株ともバイオオーギュメンテーションに用いる活性汚泥に存在している菌株であるので、M-01 株の 16S rDNA 特異的プライマーで M-11 株の 16S rDNA が増幅しないこと、また、M-11 株の 16S rDNA 特異的プライマーで M-01 株の 16S rDNA が増幅しないことに注意して、プライマーを作成した。また、それらのプライマーによって増幅される PCR 産物が 200~300 bp となるようにも注意した。M-01 株、M-11 株、*Pseudomonas* 属に属する type strain の 16S rDNA 配列を比較して (Fig. 3-3、Fig. 3-4)、以下のようなプライマー配列にした。

strain M-01 specific primer

forward primer (position 437-457) : cttgcggttaatacctgcaag (Tm = 63.3 °C)

reverse primer (position 643-626) : accgtactctagcccagc (Tm=59.4 °C)

strain M-11 specific primer

forward primer (position 198-219) : ggaccttgcgctatcagatgag (Tm=66.9 °C)

reverse primer (position 462-442) : cgtcaggatattagcctggcg (Tm=67.5 °C)

M-01 株の reverse primer と M-11 株の forward primer に関しては、その部位の他の *Pseudomonas* 属の配列との差がほとんどないが、特異性のある配列が見つからなかったことともう片側のプライマー配列が非常に特異性のあることから、適切な PCR 条件にすれば特異的に増幅できるのではないかと考え、上記のよう

な配列にした。その際に forward primer と reverse primer の T_m 値がだいたい同じ値になるようには気をつけた。

次に、作成した特異的プライマーを用いて特異的に 16S rDNAを増幅するようなPCR条件を探索した。M-01 株の特異的プライマーを用い、M-01 株・M-11 株のゲノムDNA・活性汚泥のゲノムDNA (50 ng/μl) をそれぞれtemplateとしてPCRを行った。また、M-11 株の特異的プライマーを用いても同様のことを行った。ポリメラーゼには、Ex Taq™ (TaKaRa) を用いた。PCR反応溶液はprotocolに従って調整した。PCR反応の条件は下記に記した。アニーリング温度も下記のように多くの条件を設定した。また、PCR装置には、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を利用した。

PCR 条件

- ① 94 °C 2 min
- ② 94 °C 30 sec
- ③ X °C 1 min
- ④ 72 °C 45 sec
- ②~④ x 30 cycles

※ strain M-01 specific primer の場合、X = 50.0, 52.0, 54.4, 56.8, 59.2, 61.6, 64.0 °C
strain M-11 specific primer の場合、X = 53.0, 55.0, 57.4, 59.8, 62.2, 64.6, 67.0 °C

3-5 メスシリンダー連続培養での M-01 株・M-11 株の生残性実験

定量 PCR を利用して、M-01 (M-11) 株の 16S rDNA コピー数と真正細菌の 16S rDNA コピー数を調べることにより、廃水処理での M-01 株と M-11 株の生残性をみた。

まず、サンプリングは廃水添加・引き抜きで曝気を行っている時に行った。1 ml採取し、遠心により菌体を回収した。Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて、ゲノムDNAを調整した。

次に、M-01 株・M-11 株・真正細菌の 16S rDNA コピー数を定量するためのスタンダードを作成した。M-01 株とM-11 株のゲノムDNA (100 ng/μl) をtemplateにし、2 種類の細菌用の 16S rDNAプライマー (27f, 1492r) [2]を用いて 16S rDNAを増幅させた。ポリメラーゼには、Easy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) を用いた。PCR装置には、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を利用した。プライマー配列は、1 章 4 節 4-4 に記されてある。増幅したPCR産物をEtBr入り 2.0%アガロースゲル電気泳動 (Mupid-α ; Mupid) し、Electronic U.V. Transilluminator (TOYOBO) で増幅確認後、ゲルから約 1500 bp 付近に存在するバンドを切り出し、PCR産物の精製を行った。PCR産物の精製には、Gel extraction KitであるLaboPass[™]GEL (COSMO) を使用した。操作は全て室温で行った。NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (Technologies) によりDNA濃度の測定を行った。このDNA溶液をEASY Dilution (for Real Time PCR) (TaKaRa) で 1 ng/μlとなるようにまず希釈し、それから同じくEASY Dilutionで 10 倍ずつ希釈し、定量PCR用スタンダードとした (1 ~ 1.0 × 10⁻⁸ ng/μl)。

定量PCRを行う際の反応・蛍光試薬にはSYBR[®]Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いた。PCR装置・蛍光測定にはLightcycler[®]ST300 システム (Roche) を用い、制御および解析にはLightcycler Software Version 3.5 (Roche) を用いた。反応液の組成はprotocolに従った。DNA template量は 50 ngとした。ただし、定量PCR用スタンダードに関しては、DNA溶液 2 μlをtemplateとした。PCR反応は 3 ステップで行い、次頁に示した反応サイクルで行った。用いたプライマーも次頁に記した。スタンダードの相関関係Rの絶対値が 0.99 以上であったときのデータを解析に用いた。また、有効な 3 回以上の計測データを解析に用い

た。

定量 PCR 条件

① 95 °C 10 sec

② 95 °C 5 sec

③ X °C 20 sec

④ 72 °C 15 sec

②~④ x Y cycles

M-01・M-11 株の 16S rDNA コピー数測定の場合、X = 60, Y = 40

真正細菌の 16S rDNA コピー数測定の場合、X = 50, Y = 30

用いたプライマー

M-01 株の 16S rDNA コピー数測定の場合

Forward primer : cttgcgggtaataacctgcaag

Reverse primer : accgtactctagcccagc

M-11 株の 16S rDNA コピー数測定の場合

Forward primer : ggaccttgcgctatcagatgag

Reverse primer : cgtcaggatattagcctggcg

真正細菌の 16S rDNA コピー数測定の場合

EUB 338f : atccctacgggaggcagc

EUB 907r : ccgtcaattcmtrtagtt (m = a or c)

第4節 結果

試験管レベルでのバイオオーギュメンテーション

まずは、試験管レベルで活性汚泥とのバイオオーギュメンテーションを行い、単離株、特にM-01株とM-11株に N_2O 抑止効果があるかどうか検証した。5株の単離株全て亜硝酸から脱窒を行うのと、亜硝酸型硝化脱窒処理の脱窒槽での添加をイメージして、脱窒基質に亜硝酸を用いた。

このバイオオーギュメンテーション実験では、培養開始時に、培地中の活性汚泥の濃度が500 mg/l、単離株の濃度が50 mg/lとなるように調整した。MBR内の活性汚泥は10,000 mg/lであるので、それと比較すると、汚泥濃度が非常に低く設定されている。これは、実際に10,000 mg/lの活性汚泥で実験を行ったときに、活性汚泥からあまり N_2O を出さず、添加効果を検証するのが困難であったからである。添加効果を検証するためには、活性汚泥が N_2O を放出しやすい条件にする必要がある。活性汚泥濃度を低く設定すれば、菌体当たりの亜硝酸の負荷が増加し、活性汚泥が N_2O を放出しやすくなると考え、活性汚泥濃度を500 mg/lに設定した。

最初に、微好気条件下（気相部が10% + 90% Ar）でPM(1:4)培地を用いたバイオオーギュメンテーション実験を行った。その結果をFig. 3-5に示した。Aは、コントロールである活性汚泥のみを培養した結果で、B~Fはそれぞれ、M-01株、M-11株、M-07株、M-08株、M-13株を添加した結果を示している。M-07株・M-08株・M-13株を添加した系に関しては実験ごとに N_2O 放出量にかなりのばらつきがありerror barをつけるのが難しかったため、1回の結果を図示した。

M-01株 (Fig. 3-5B)、M-11株 (Fig. 3-5C) を添加した系は、コントロールに比べても N_2O 放出量 (●) がかなり抑えられているのが分かる。特に、気相部の酸素量 (▲) が培養開始時の半分以下 (5%以下) になって脱窒が本格的に始ま

っている時間帯において、活性汚泥は N_2O を放出しているのに対して (Fig. 3-5A の培養開始 6~11 時間)、M-01 株やM-11 株を添加した系では、ほぼ全くと言っていいほど N_2O を放出しなかった (Fig. 3-5Bの培養開始 3~10 時間後、Fig. 3-5Cの培養開始 3~9 時間後)。特に、 N_2O 還元能は強いが亜硝酸からの脱窒能が非常に弱いという特徴を有するM-01 株は、培養開始直後からコントロールに比べて N_2O 放出が抑えられていた (Fig. 3-5Bの培養開始 1~2 時間後)。逆に、M-07 株 (Fig. 3-5D)、M-08 株 (Fig. 3-5E)、M-13 株 (Fig. 3-5F) を添加した系では、全ての培養においてコントロールの系よりも N_2O 放出量 (●) の増加が確認された。特に、気相部の酸素量 (▲) が $20 \mu\text{mol}$ 以下 (2.5%以下) になり、脱窒が活発化している時の N_2O 放出量の増加は顕著であった (M-07 株 : 培養開始 4~6 時間後、M-08 株 : 培養開始 4~5 時間後、M-13 株 : 培養開始 5~6 時間)。以上の結果から、この条件下でM-01 株とM-11 株が N_2O 抑止効果を有していることが分かった。

N_2O 抑止効果を有していたM-01 株とM-11 株が、今度は、違う条件下において N_2O 抑止効果をもたらすかを検証した。嫌気条件下においてバイオオーギュメンテーション実験を行った。この条件下でPM(1:4)培地を用いると、活性汚泥から N_2O が放出されず添加効果を検証するのが困難であった。おそらくC/N比が高いからであろうと考え、養豚糞尿搾汁液の割合を下げたPM(1:19)培地を用いることにした。M-01 株とM-11 株の添加効果を表した図がFig. 3-6 である。M-01 株 (Fig. 3-6B)、M-11 株 (Fig. 3-6C) どちらも、添加するとコントロール (Fig. 3-6A) に比べて N_2O 放出量 (●) が抑えられることが分かった。

以上から、M-01 株とM-11 株は、試験管レベルのバイオオーギュメンテーション実験で N_2O 抑止効果があることが分かった。

M-01 株・M-11 株の 16S rDNA 特異的プライマーの特異性の確認

作成した特異的プライマーを用いて特異的に 16S rDNA を増幅するかどうかを確認、また特異的に増幅するような PCR 条件を探索した。まず、M-01 株の 16S rDNA 特異的プライマーを用いた PCR 結果を Fig. 3-7 に示した。アニーリング温度を 50 °C から 64 °C の間で振ったのであるが、M-01 株のゲノム DNA を template とした時はどのアニーリング温度でも 30 サイクルで増幅したのに対し、M-01 株と非常に近縁な関係にある M-11 株のゲノム DNA を template とした時はどのアニーリング温度でも 30 サイクルでは増幅しなかった。このことから、M-01 株の 16S rDNA 特異的プライマーは、アニーリング温度が 50 °C から 64 °C の間ならば特異的に増幅することが確認でき、M-01 株の 16S rDNA 特異的プライマーにより増幅できる包摂度は非常に狭いことが分かった。また、活性汚泥のゲノム DNA を template としても 30 サイクルでは増幅しなかった。活性汚泥には M-01 株が存在するため、増幅する可能性も十分考えられたが、結果としては 30 サイクルでは増幅しなかったのは、プライマーの増幅できる包摂度の狭さによるものであろう。M-11 株の 16S rDNA 特異的プライマーを用いた PCR 結果も、また M-01 株の場合と全く同じ結果となり、53 °C から 67 °C の間ならば特異的に増幅することが確認できた (Fig. 3-8)。以後、M-01 株・M-11 株の生残性実験ではこれらの 16S rDNA 特異的プライマーを用いることにし、その際に PCR のアニーリング温度は 60 °C とした。

メスシリンダー連続培養でのM-01 株・M-11 株のN₂O抑止効果の検証（初期添加）

活性汚泥濃度 10,000 mg/lでメスシリンダーでの廃水処理を運転することが困難であったため、濃度を 1,000 mg/lに下げたこととした。そして、添加効果を検証しやすくするために、活性汚泥がN₂Oを放出しやすい条件に運転を設定した。1 回目の培養における、N₂O放出量をモニタリングした結果をFig. 3-9 に、

廃水中のNO₂⁻濃度の動向をFig. 3-10 に示した。また、2 回目の培養における、N₂O 放出量をモニタリングした結果をFig. 3-11 に、廃水中のNO₂⁻濃度の動向をFig. 3-12 に示した。1 回目も 2 回目も、初めは、活性汚泥の系・活性汚泥にM-01 株を添加した系・活性汚泥にM-11 株を添加した系の 3 つの系ともN₂O放出量に差はなかったが、時間がたつにつれてM-01 株、M-11 株の添加効果が表れているのがわかる。特に、廃水中の亜硝酸の蓄積が減少に転じ亜硝酸脱窒が活発に行われている時間帯（培養開始約 48 時間後）では、活性汚泥の系では盛んにN₂Oが放出されているが、M-01 株やM-11 株を添加した系ではほとんどN₂Oが放出されなかった。廃水中に存在した硝酸は微量であったため無視するとして、添加した亜硝酸からのN₂O放出率は、1 回目の培養では、活性汚泥の系で 16.0%、M-01 株を添加した系で 1.59%、M-11 株を添加した系で 1.30%であり、2 回目の培養では、活性汚泥の系で 11.5%、M-01 株を添加した系で 2.46%、M-11 株を添加した系で 1.86%であった。実際の廃水処理場では亜硝酸の蓄積量は多くても数 mMであり、本実験のような大量の亜硝酸蓄積量（数十mM）はあまり現実的な環境とは言えないが、このようなN₂Oが大量に放出されやすい環境下でM-01 株とM-11 株は強いN₂O抑止能を示した。

次に、2 回目のメスシリンダーでの連続培養実験で、M-01 株と M-11 株の 16S rDNA を特異的に増幅するプライマーを用いて添加した M-01 株と M-11 株の廃水中の動向をモニタリングした結果を Fig. 3-13A に示した。真正細菌に関してはどの時間帯においても 16S rDNA コピー数一定であった（●・▲）。培養初期は M-01 株（○）も M-11 株（△）も真正細菌のなかでの占有率が上昇傾向にあるが、その後、M-11 株に関しては若干の減少傾向にあるが、M-01 株に関しては占有率をキープしていた。

以上の結果から、両者とも廃水処理環境に適応でき、その環境下でN₂O抑止能を發揮した。特に、M-01 株に関しては、最後まで生残性をキープしていたこと

から、M-11 株よりも廃水環境に適応できている可能性が示唆された。そこで、より実際の廃水処理環境に近づけるように運転条件を修正し、安定した廃水処理環境でM-01 株を添加してN₂O抑止効果を検証することにした。具体的には、亜硝酸の蓄積ができるだけないようにすること、本実験では活性汚泥濃度が上昇傾向にあった (not data shown) ので濃度を一定に保たせること、その中でも添加効果をみれるように長期的に安定してN₂Oを放出し続けることに注意した。

メスシリンダー連続培養でのM-01 株のN₂O抑止効果の検証 (途中添加)

活性汚泥濃度が 1000 mg/lとなるように添加した系を 2 本準備し、並列して 1 週間廃水処理を行い、1 週間後に片方のメスシリンダーにM-01 株を廃水中の濃度が 10 mg/lとなるように添加しN₂O抑止効果とM-01 株の生残性を検証した。今までと違い前培養にDM培地を用いたのは、実際の廃水処理場に添加する際に大量の菌株が必要になることが予想されるが、自然培地であるPM培地での大量培養は現実的に難しく、人工培地で培養できる必要性があるからである。DM培地でもM-01 株が生育できることは確認されている。M-01 株のN₂O抑止効果検証実験の 1 回目の結果をFig. 3-14 に、2 回目の結果をFig. 3-15 に示した。本実験は 2 週間培養を行ったが、2 回とも活性汚泥濃度は培養期間を通して約 1,000 mg/lに保たれ、また、添加した亜硝酸はすべて処理されており (Fig. 3-14B、Fig. 3-15B)、望んでいた適切かつ安定な廃水処理環境を構築できた。

安定した廃水処理環境のなかでM-01 株を添加した結果、2 回とも添加直後からM-01 株の添加によりN₂O放出量が抑えられた (Fig. 3-14A、Fig. 3-15A)。1 回目の培養において、M-01 株を添加する前の 1 週間間の添加した亜硝酸からのN₂O放出率は、活性汚泥の系で 2.90%、M-01 株途中添加の系で 2.98%であったが、M-01 株を添加後の 1 週間のN₂O放出率は、活性汚泥の系で 4.64%であるのに対し、M-01 株途中添加の系では 2.85%であった。2 回目の培養では、M-01 株を添

加する前 1 週間の N_2O 放出率は、活性汚泥の系で 3.06%、M-01 株途中添加の系で 2.90%であったが、M-01 株を添加後の 1 週間の N_2O 放出率は、活性汚泥の系で 3.62%であるのに対し、M-01 株途中添加の系では 1.60%であった。また、生残性実験から、2 回ともM-01 株はこの環境下で添加時から占有率を維持しており (Fig. 3-14C・白三角、Fig. 3-15C・白三角)、廃水処理環境に適応していることがわかった。

第5節 考察

まず、試験管レベルでのバイオオーギュメンテーション実験でM-01株とM-11株は N_2O 抑止効果があり、逆に、他の単離株3株は N_2O 抑止効果がないどころか N_2O 発生を増強する結果となった。2章の脱窒能解析で、M-01株とM-11株は亜硝酸よりも N_2O を優先的に消費し、他の3株は亜硝酸脱窒の際に大量の N_2O を放出するということが分かっていたが、本実験結果はその単離株の特徴を如実に反映する結果となった。また、微好気条件下と嫌気条件下での活性汚泥の N_2O 放出量を比べると、嫌気条件下での実験で用いた培地は低C/N比の培地で N_2O がしやすい条件であるにもかかわらず、圧倒的に微好気条件下の N_2O 放出量が多かった。それゆえに、活性汚泥の N_2O 放出は酸素によるところが大きいことが示唆され、M-01株とM-11株は、活性汚泥が N_2O を大量に放出しやすいとされる酸素存在下で[3, 4]、強い N_2O 抑止能を示すと考えられる。これは、両株が N_2O 還元の高い酸素耐性を有していることと関係があると考えられる。M-01株とM-11株の N_2O 抑止効果を確認できたが、実際の廃水処理場でのバイオオーギュメンテーションの成功を考えた際に、内在している微生物群との生存競争に駆逐されないで定着でき、長期にわたって N_2O 抑止をもたらすことが大きな鍵である。そこで、 N_2O 抑止だけでなく生残性という面にも注目して、培養スケールをメスシリンダーレベルに拡大して、廃水処理を行った。

メスシリンダーの連続培養実験では今までの実験と違い、用いる廃水は全く滅菌処理を行わず、より実際の廃水処理環境に近づけた。その環境下でM-01株とM-11株は自らの能力を発揮し N_2O 抑止効果をもたらした。特に、大量の亜硝酸蓄積量の存在下かつ盛んに亜硝酸脱窒が行われているという非常に N_2O が放出されやすいと言われている環境下で、非常に強く N_2O 放出を抑えたことは、 N_2O 放出の問題がしばしば指摘されている亜硝酸型硝化脱窒処理の N_2O 抑止に

大きな期待がもてるであろう[5, 6]。さらに、生残性の面においてM-01株は培養を通して落ちることはなかった。それが持続的なN₂O抑止につながっていると考えられる。逆に、M-11株は培養最後のほうで生残性が落ちたが、それでも、培養期間を通してN₂O抑止をもたらしたうえに、M-01株よりもトータルではN₂O抑止能が強かった。これは、M-01株よりも元々のN₂O還元能が強いことと、生残性は落ちているがそれでもなおM-11株の存在量が多いことが挙げられる。また、コントロールの系でも、活性汚泥内のM-01株の存在量が培養を通して増加傾向にあり、M-11株も培養後期は減少したものの、トータルでは存在量が増加した (Fig. 3-13B)。この廃水処理環境は、両株、特にM-01株が生息しやすい環境であったと言える。M-11株の方がN₂O抑止は強かったが、長期にわたってN₂O抑止効果をもたらすということを考えた場合に、生残性の優れたM-01株の方が良いのではないかと考え、実際の廃水処理場での添加を想定した検証実験ではM-01株を用いることにした。

実際の廃水処理場での添加を想定し、添加した亜硝酸が速やかに処理されている適正な廃水処理環境でのM-01株の添加実験においても、M-01株のN₂O抑止能と生残力が示された。安定した廃水処理環境にもかかわらずN₂O放出量が日によってばらつきがあるのは、自然培地を用いているうえに滅菌処理もしていない生の廃水を用いており廃水組成が日ごとに異なるからであると考えられる。しかし、全ての日においてコントロールに比べてM-01株を添加した系でN₂O放出量が下回っているので、明らかにM-01株によりN₂O抑止されていると言えよう。この実験系においても、コントロールにおいて活性汚泥に含まれるM-01株の存在量が初期に比べて多少増加していた (Fig. 3-14C、Fig. 3-15C) ので、M-01株が生息しやすい廃水環境であったものと思われる。以上の結果から、廃水処理場のN₂O抑止にM-01株は貢献できると考えられる。

Sodium succinate	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.15%
Na ₂ HPO ₄	0.042%
NH ₄ Cl	0.06%
Peptone	1.5%
Trace element solution (Table 1-3)	0.1 %

Table 3-1. DM 培地

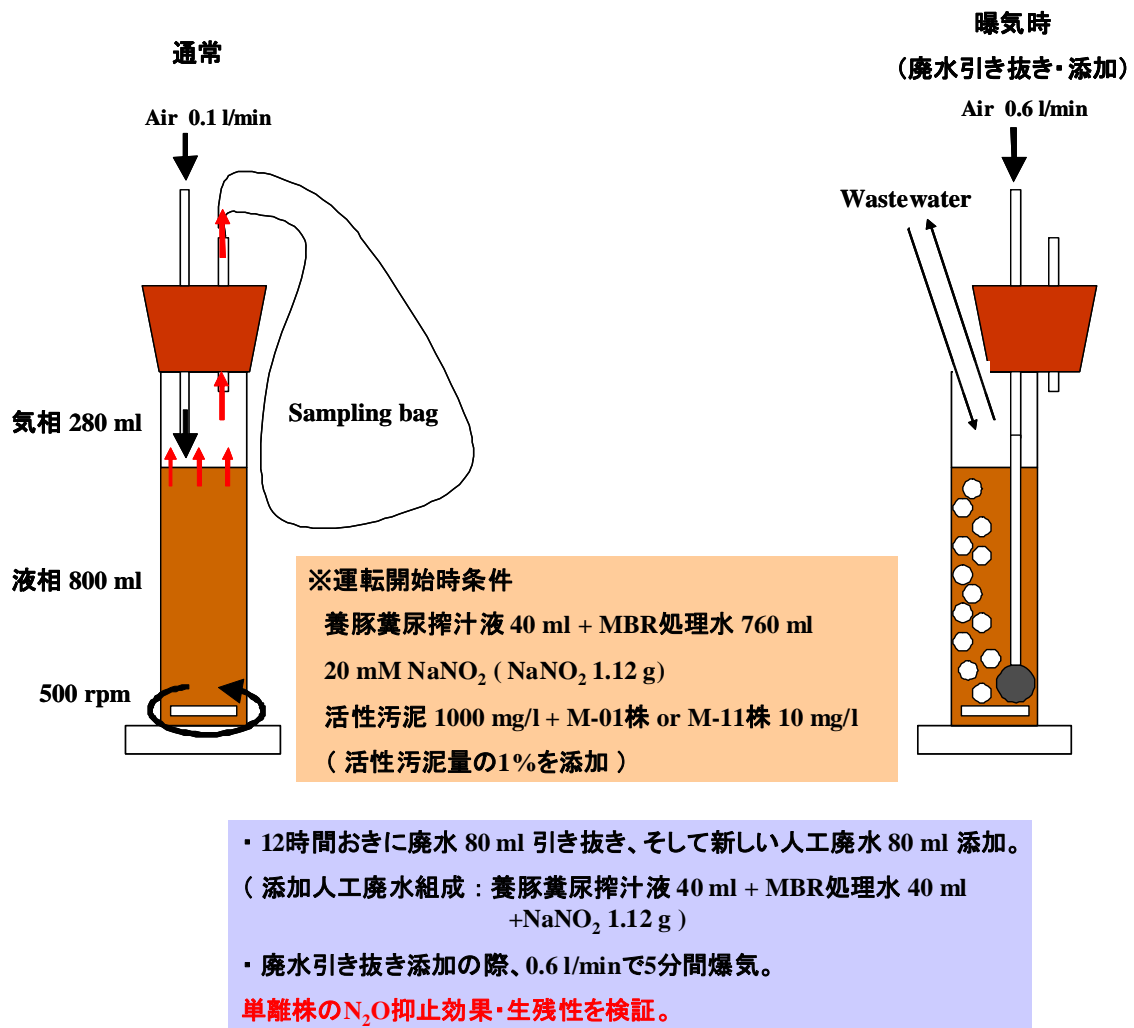
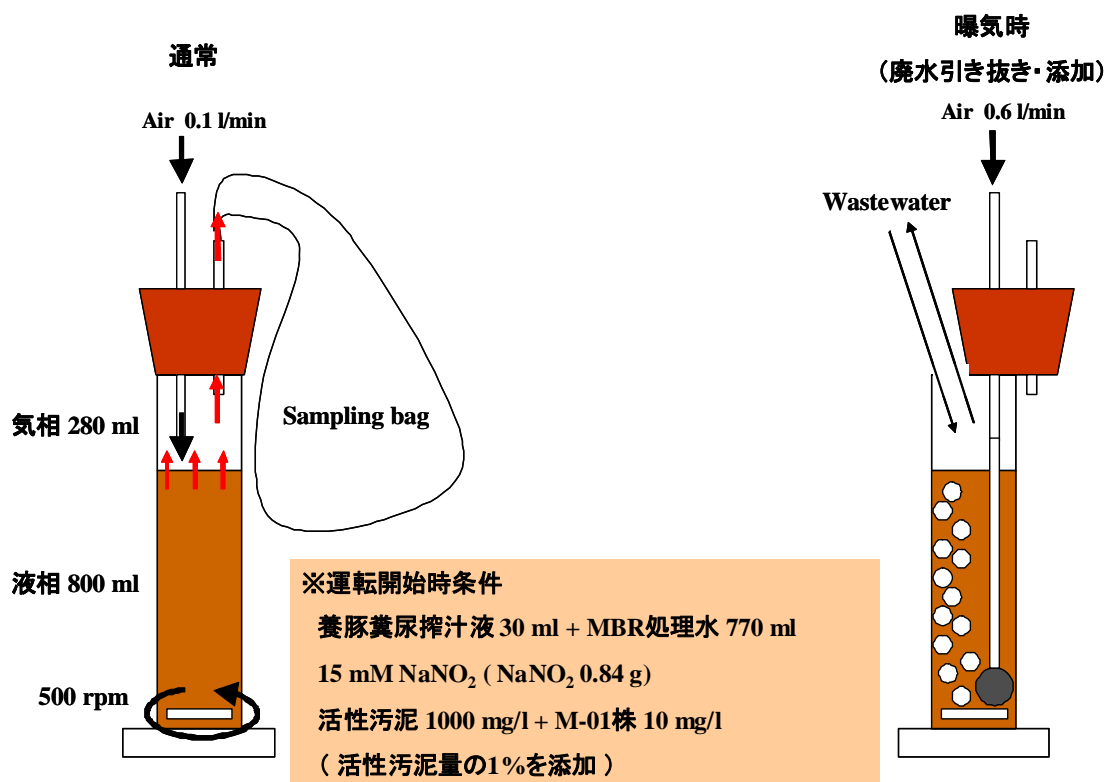


Fig. 3-1. 3 章 3 節 3-2 の実験における脱窒槽模擬実験装置・運転条件



- ・ 12時間おきに廃水 80 ml 引き抜き、そして新しい人工廃水 80 ml 添加。
 (添加工人廃水組成 : 養豚糞尿搾汁液 30 ml + MBR処理水 50 ml
 +NaNO₂ 0.84 g)
 - ・ 廃水引き抜き添加の際、0.6 l/minで5分間曝気。
- 単離株のN₂O抑止効果・生残性を検証。**

Fig. 3-2. 3 章 3 節 3-3 での脱窒槽模擬実験装置・運転条件

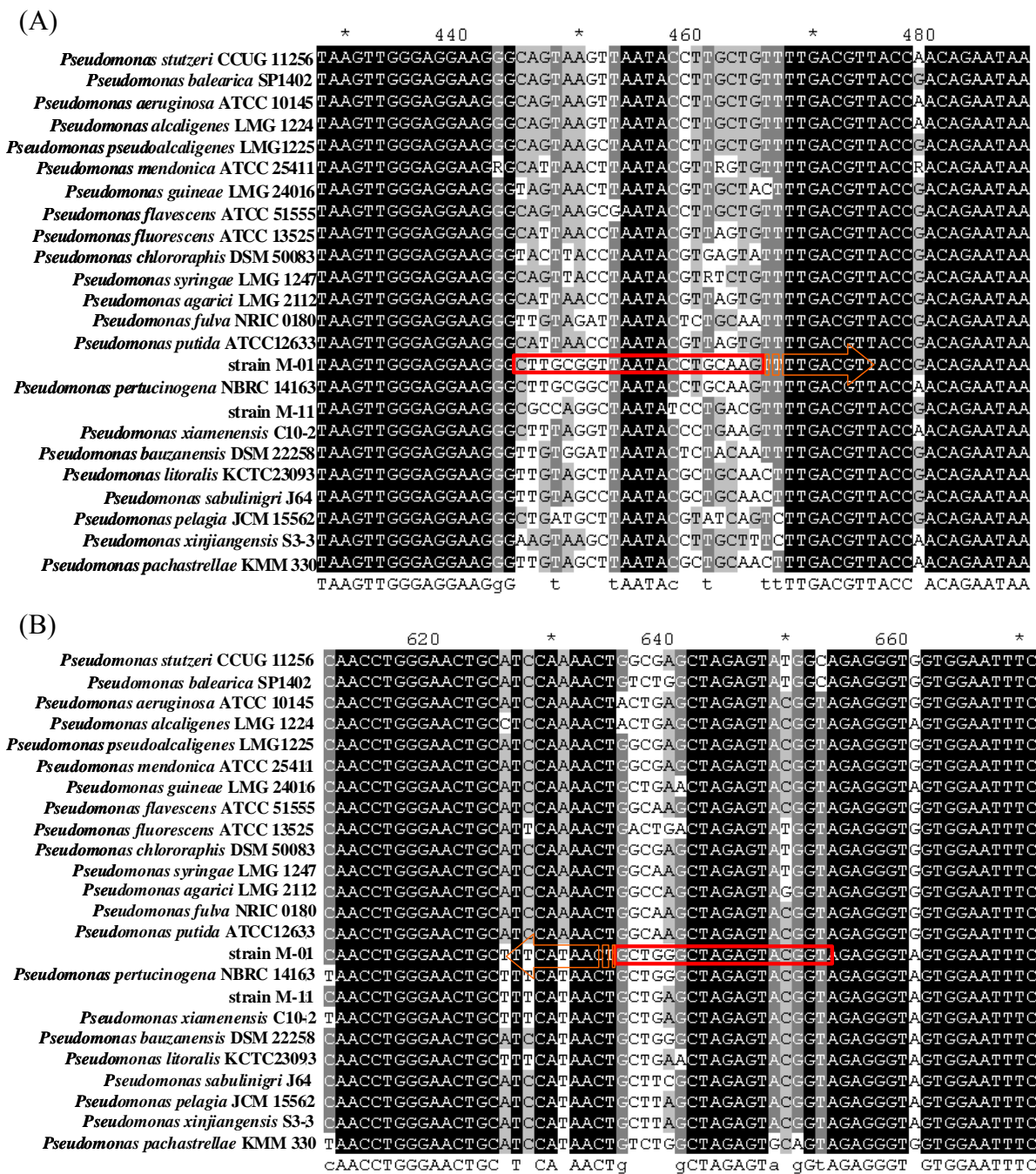


Fig. 3-3. M-01 株の 16S rDNA 特異的プライマーの構築

(A) Forward primer の作成 (B) Reverse primer の作成

M-01 株と M-11 株と Fig. 1-4 の系統樹にある *Pseudomonas* 属の type strain の 16S rDNA 配列のアライメントを行い、プライマーとした領域付近の配列のアライメントを図示した。プライマー配列は、赤四角で囲まれた部分である。Reverse primer 配列はこれと相補的な配列である。

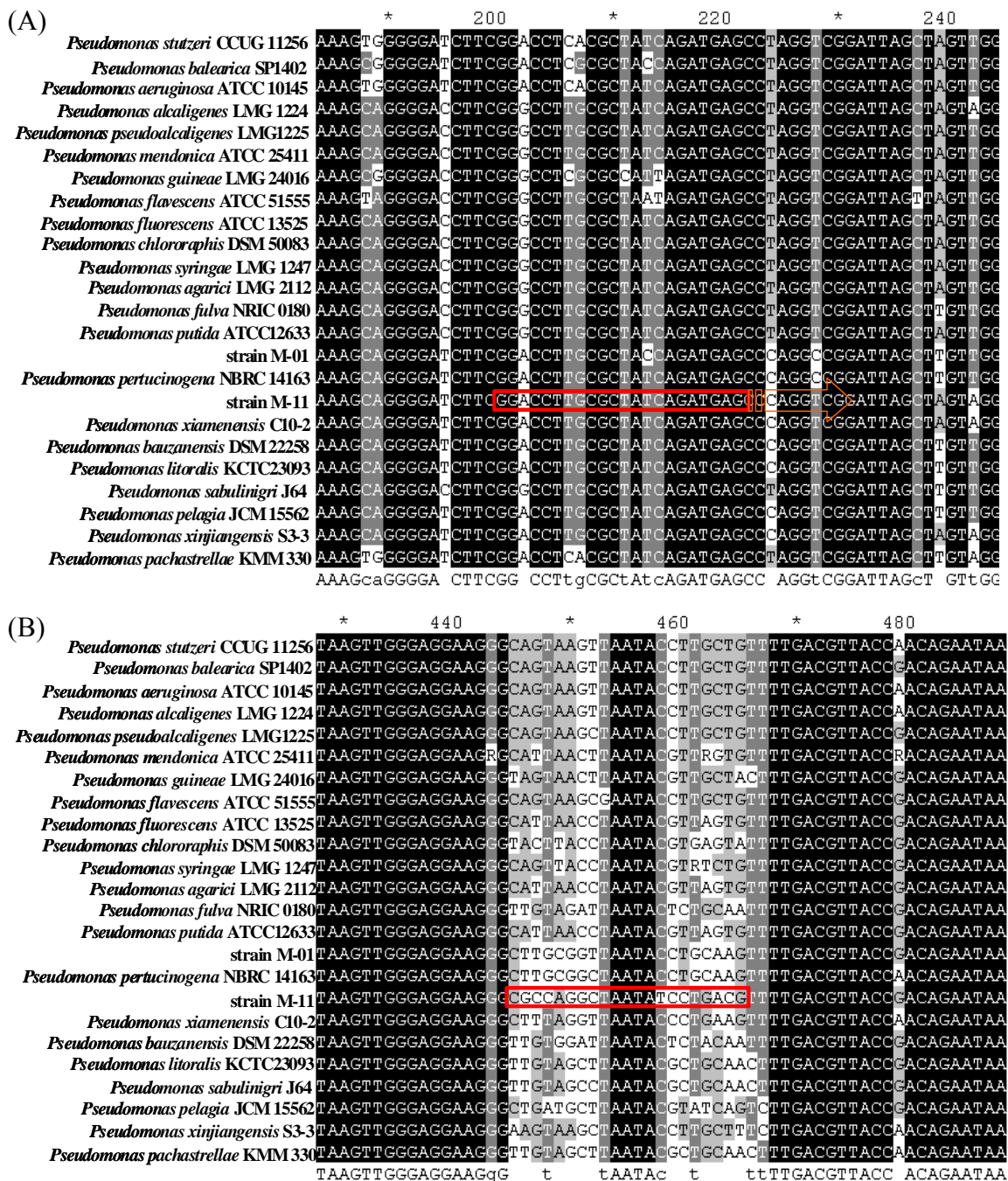


Fig. 3-4. M-11 株の 16S rDNA 特異的プライマーの構築

(A) Forward primer の作成 (B) Reverse primer の作成

M-01 株と M-11 株と Fig. 1-4 の系統樹にある *Pseudomonas* 属の type strain の 16S rDNA 配列のアライメントを行い、プライマーとした領域付近の配列のアライメントを図示した。プライマー配列は、赤四角で囲まれた部分である。Reverse primer 配列はこれと相補的な配列である。

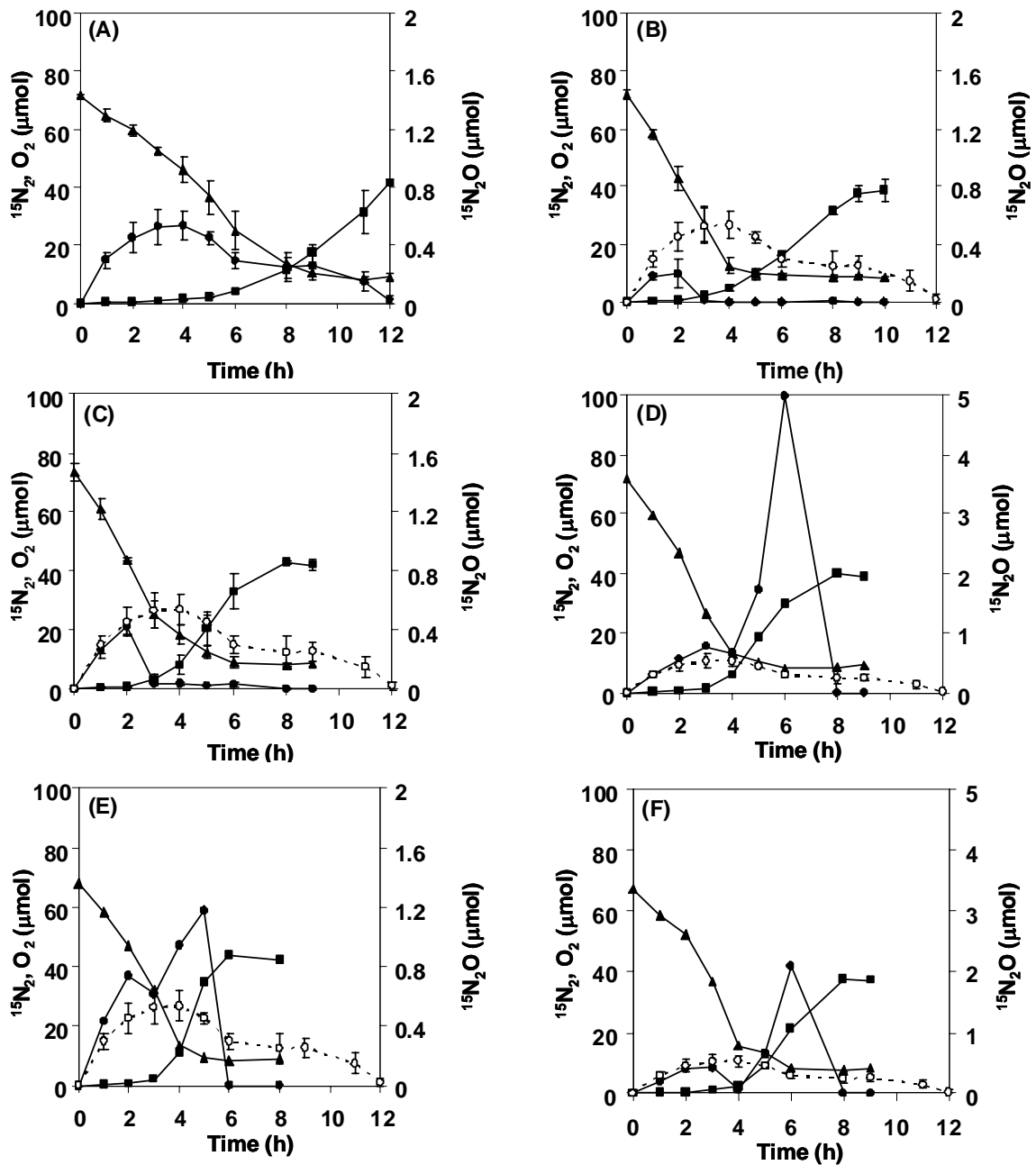


Fig. 3-5. 試験管レベルでのバイオオーギュメンテーション結果（微好気条件）

(A) 活性汚泥のみ (B) 活性汚泥 + M-01 株 (C) 活性汚泥 + M-11 株

(D) 活性汚泥 + M-07 株 (E) 活性汚泥 + M-08 株 (F) 活性汚泥 + M-13 株

● : N_2O ■ : N_2 ▲ : O_2

○ : 活性汚泥のみの系での N_2O （単離株添加の際の N_2O 放出量との比較のために載せた）

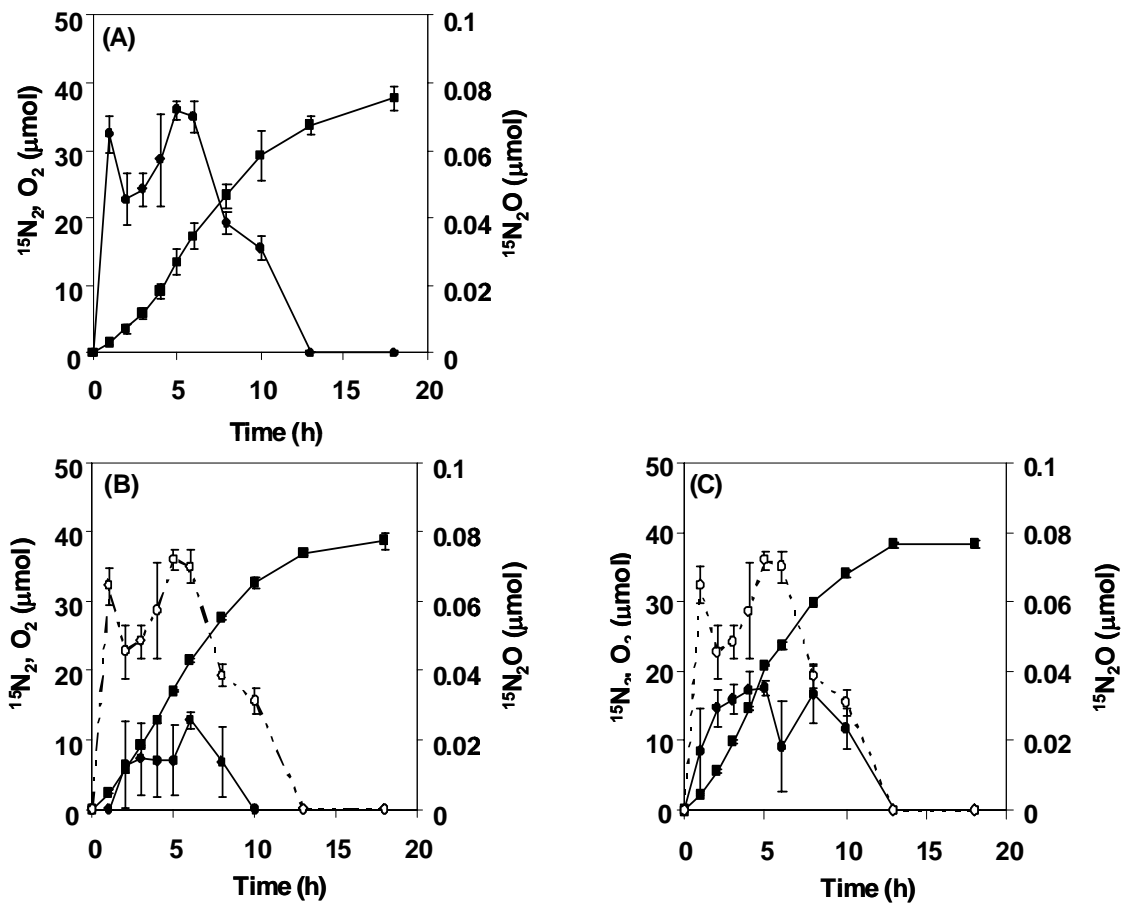


Fig. 3-6. 試験管レベルでのバイオオーギュメンテーション結果（嫌気条件）

(A) 活性汚泥のみ (B) 活性汚泥 + M-01 株 (C) 活性汚泥 + M-11 株

● : N_2O ■ : N_2 ▲ : O_2

○ : 活性汚泥のみの系での N_2O （単離株添加の際の N_2O 放出量との比較）

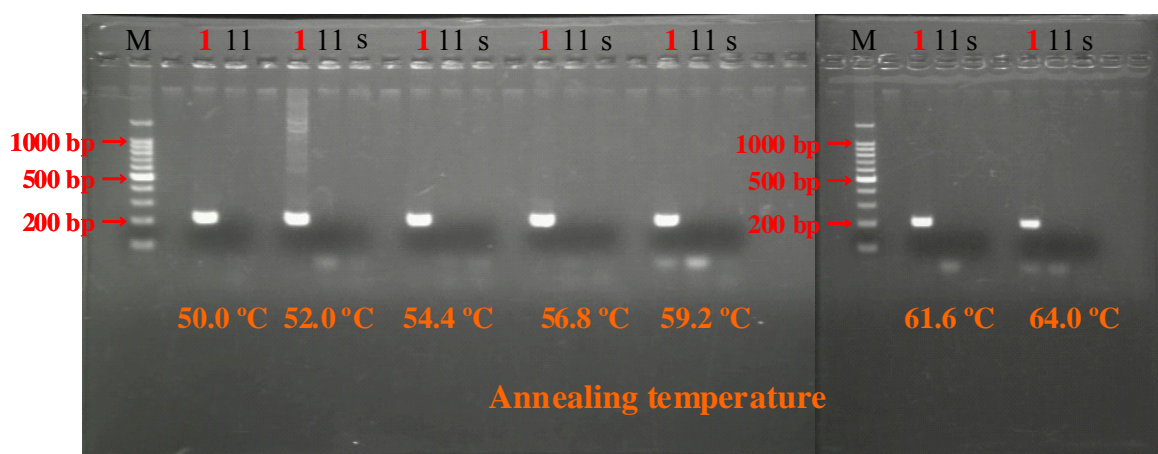


Fig. 3-7 M-01 株の 16S rDNA 特異的なプライマーの特異性の確認

(M : マーカー、1 : M-01 株のゲノム DNA を template としたもの、11 : M-11 株のゲノム DNA を template としたもの、s : 活性汚泥のゲノム DNA を template としたもの)



Fig. 3-8 M-11 株の 16S rDNA 特異的なプライマーの特異性の確認

(M : マーカー、1 : M-01 株のゲノム DNA を template としたもの、11 : M-11 株のゲノム DNA を template としたもの、s : 活性汚泥のゲノム DNA を template としたもの)

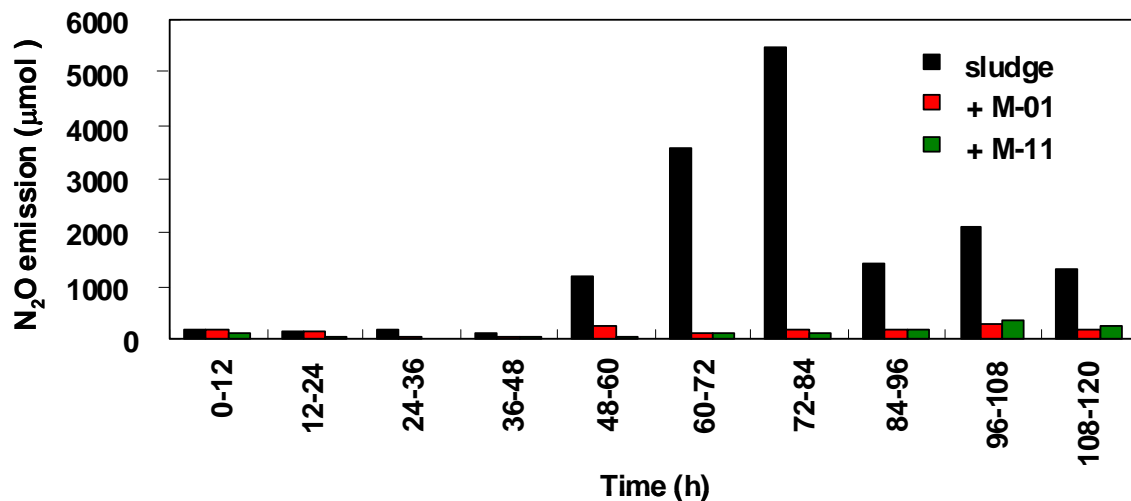


Fig. 3-9 1回目のメスシリンダーでの連続培養結果 (N₂O放出量)

■ : 活性汚泥 1000 mg/l の系 ■ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-01 株 10 mg/l

■ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-11 株 10 mg/l

※亜硝酸からのN₂O放出率: 活性汚泥の系 16.0%、M-01 株添加系 1.59%

M-11 株添加系 1.30%

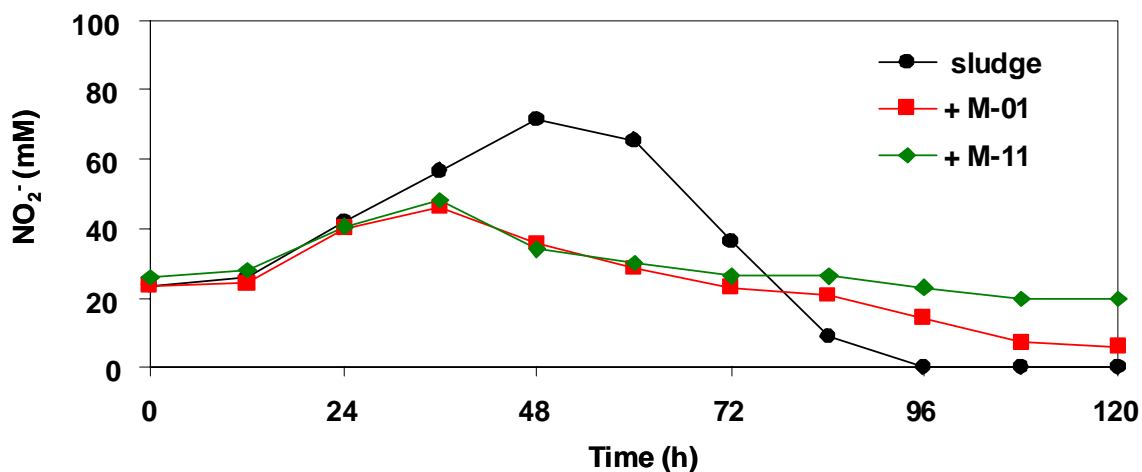


Fig. 3-10 1回目のメスシリンダーでの連続培養結果 (NO₂⁻濃度)

NO₂⁻濃度は培養開始直後を除いて廃水添加直前のNO₂⁻濃度である。

● : 活性汚泥 1000 mg/l の系 ■ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-01 株 10 mg/l

◆ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-11 株 10 mg/l

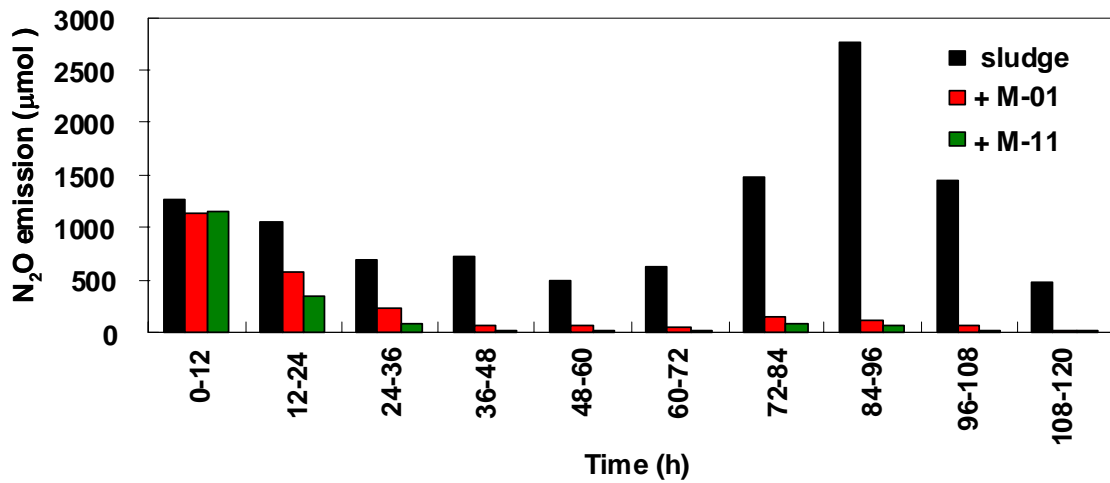


Fig. 3-11 2回目のメスシリンダーでの連続培養結果 (N₂O放出量)

- : 活性汚泥 1000 mg/l の系 ■ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-01 株 10 mg/l
- : 活性汚泥 1000 mg/l + M-11 株 10 mg/l

※亜硝酸からのN₂O放出率：活性汚泥の系 11.5%、M-01 株添加系 2.46%

M-11 株添加系 1.86%

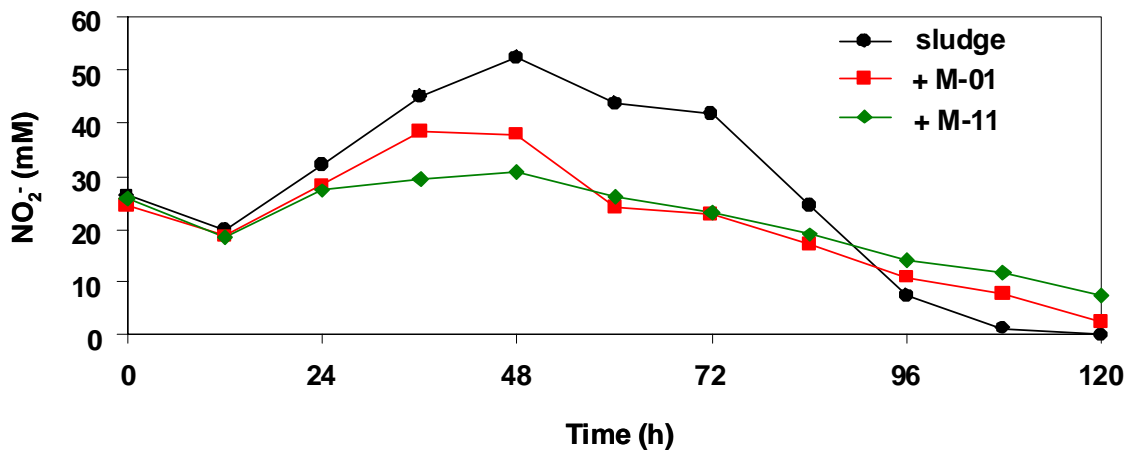


Fig. 3-12 2回目のメスシリンダーでの連続培養結果 (NO₂⁻濃度)

NO₂⁻濃度は培養開始直後を除いて廃水添加直前のNO₂⁻濃度である。

- : 活性汚泥 1000 mg/l の系 ■ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-01 株 10 mg/l
- ◆ : 活性汚泥 1000 mg/l + M-11 株 10 mg/l

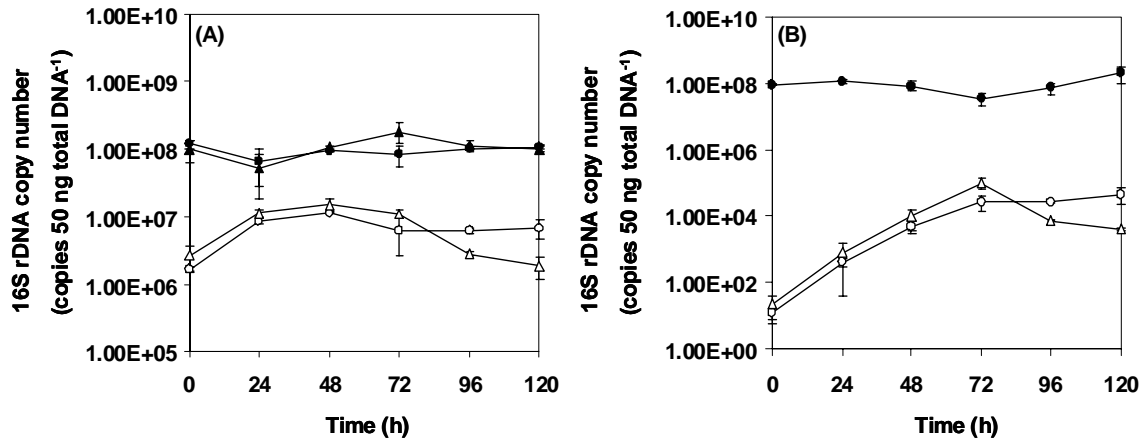


Fig. 3-13 2回目のメスシリンダーでの連続培養結果（生残性）
 少なくとも3回以上測定し、それぞれの点に標準偏差を示した。

(A) 活性汚泥に M-01 株または M-11 株を添加した系

M-01 株を添加した系 ● : 真正細菌の 16S rDNA コピー数

○ : M-01 株の 16S rDNA コピー数

M-11 株を添加した系 ▲ : 真正細菌の 16S rDNA コピー数

△ : M-11 株の 16S rDNA コピー数

(B) 活性汚泥のみの系

● : 真正細菌の 16S rDNA コピー数

○ : M-01 株の 16S rDNA コピー数

△ : M-11 株の 16S rDNA コピー数

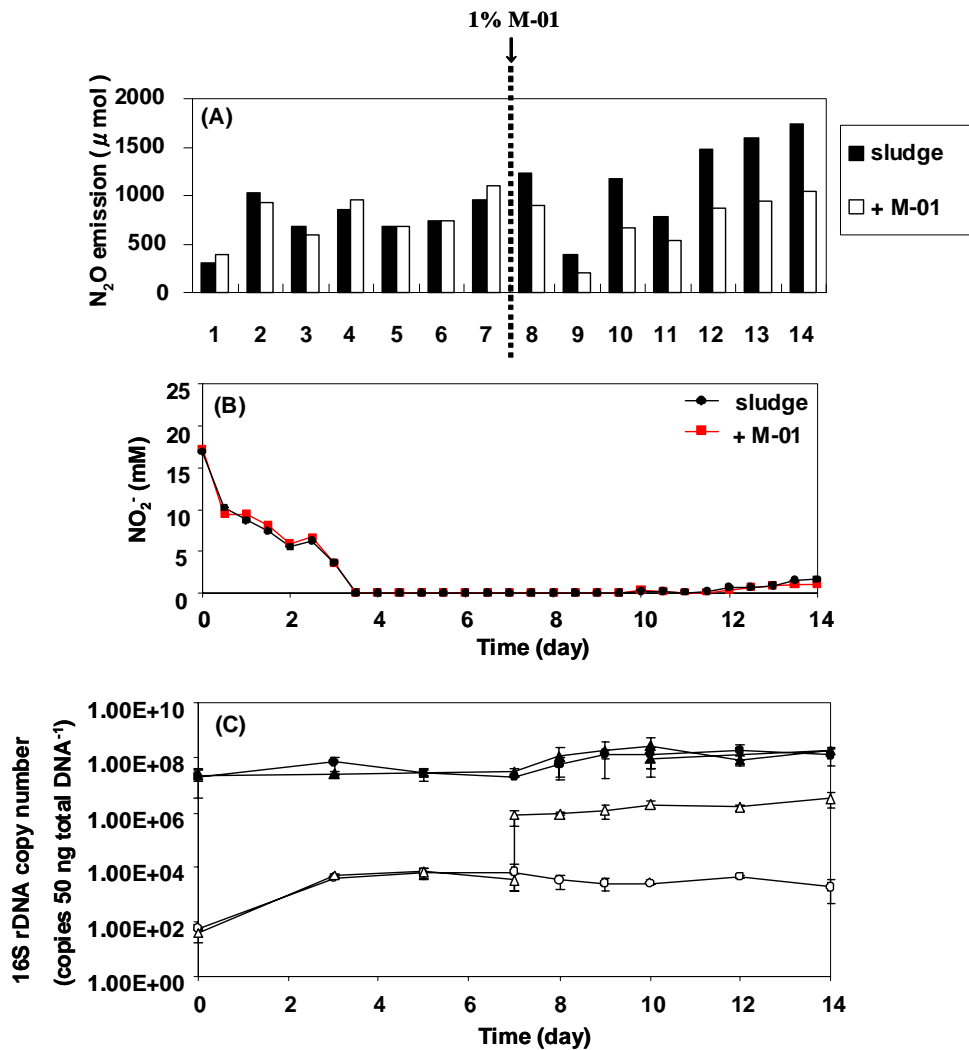


Fig. 3-14 メスシリンダー連続培養による M-01 株のN₂O抑止効果の検証 1 回目 (途中添加) (A) N₂O放出量 (B) NO₂⁻濃度 (C) M-01 株の生残性

(A) ■ : 活性汚泥の系 □ : 1 週間後に M-01 株を途中添加した系

(B) ● : 活性汚泥の系 ■ : M-01 株途中添加の系

※NO₂⁻濃度は培養開始直後を除いて廃水添加直前のNO₂⁻濃度である。

(C) 活性汚泥の系 (16S rDNA コピー数) ● : 真正細菌 ○ : M-01 株

M-01 株途中添加の系 (16S rDNA コピー数) ▲ : 真正細菌 △ : M-01 株

※少なくとも 3 回以上測定し、それぞれの点に標準偏差を示した。

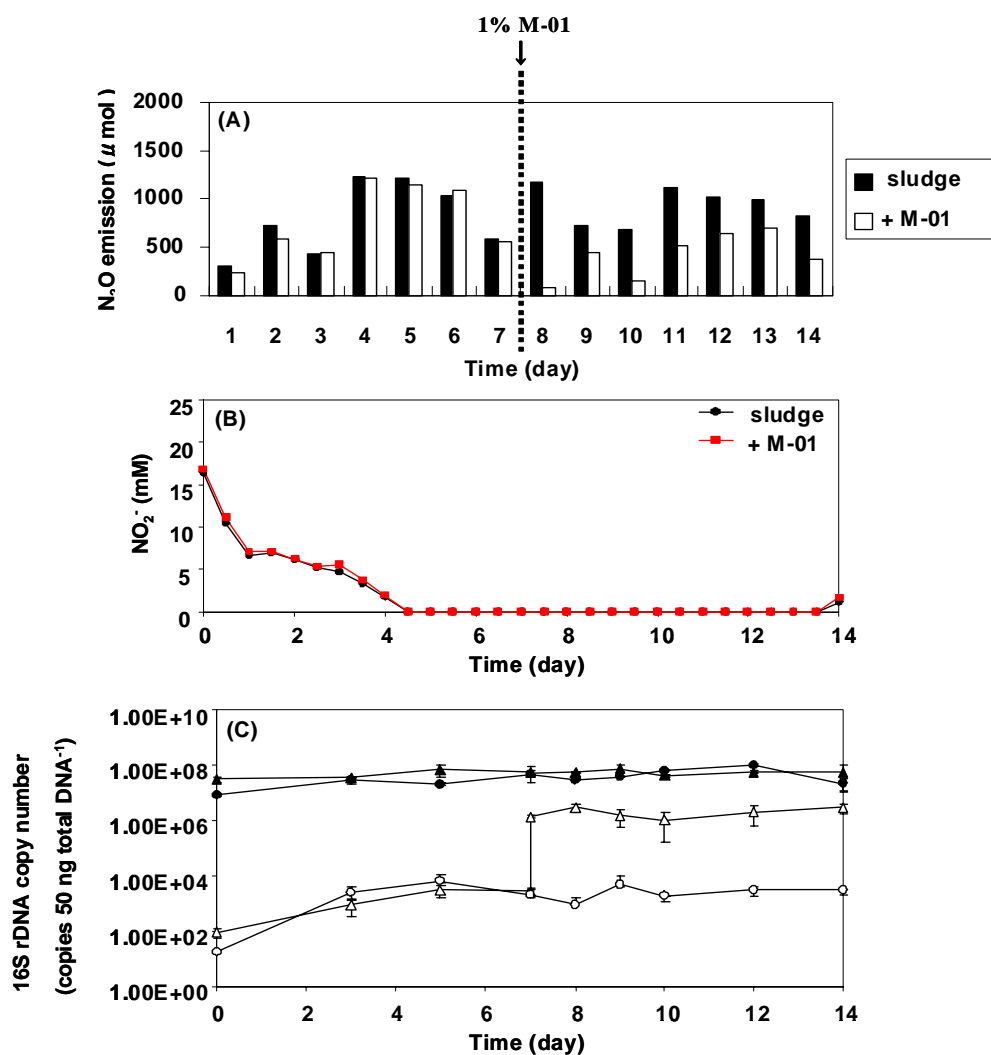


Fig. 3-15 メスシリンダー連続培養による M-01 株のN₂O抑止効果の検証 2 回目

(途中添加) (A) N₂O放出量 (B) NO₂⁻濃度 (C) M-01 株の生残性

(A) ■ : 活性汚泥の系 □ : M-01 株途中添加の系

(B) ● : 活性汚泥の系 ■ : M-01 株途中添加の系

※NO₂⁻濃度は培養開始直後を除いて廃水添加直前のNO₂⁻濃度である。

(C) 活性汚泥の系 (16S rDNA コピー数) ● : 真正細菌 ○ : M-01 株

M-01 株途中添加の系 (16S rDNA コピー数) ▲ : 真正細菌 △ : M-01 株

※少なくとも 3 回以上測定し、それぞれの点に標準偏差を示した。

参考文献

23. **Neefs, J. M., Y. Van de Peer, et al.** 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21**:3025-49.
24. **Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
25. **Otte, S., et al.** 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2421-6.
26. **Park, K. Y., et al.** 2000. Emission and control of nitrous oxide from a biological wastewater treatment system with intermittent aeration. *J. Biosci. Bioeng* **90**:247-52.
27. **Peng, Y., and G. Zhu.** 2006. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**:15-26.
28. **Hwang, S., K. Jang, et al.** 2006. Factors affecting nitrous oxide production: a comparison of biological nitrogen removal processes with partial and complete nitrification. *Biodegradation* **17**:19-29.

第4章

単離株の脱窒遺伝子解析

第1節 序

M-01 株とM-11 株は、廃水処理場のN₂O抑止に貢献する可能性が高いことがラボスケールのバイオオーギュメンテーション実験により分かったが、それは、N₂O還元の高い酸素耐性と、脱窒の際に亜硝酸よりもN₂Oを電子受容体として好むという特性がN₂O抑止につながっていると考えた。この脱窒特性のメカニズムを解明すべく、まずは、両株のこの特性の根幹となっている脱窒遺伝子の同定と脱窒遺伝子群の構造の解析を行った。さらに、新属の可能性の高いM-08 株も、新属ゆえに新規性があるかもしれないと考え、同時に行った。M-01 株とM-11 株は*Pseudomonas*属であるが、*Pseudomonas*属では、硝酸還元に関しては膜結合型硝酸還元酵素Narとペリプラズム型硝酸還元酵素Napの2種類を持っているという報告があり[1]、また、亜硝酸還元に関しては2種類あるうちのcytochrome *cd₁*タイプ亜硝酸還元酵素NirS [2]、NO還元に関しては2種類あるうちのcytochrome *c*から電子を受け取るcNor [3]が担っていることが知られている。このデータを踏まえて実験を進めた。

序章で脱窒に関わる酵素の説明を記したが、ここでは脱窒遺伝子群の構造に関して詳細を以下に述べる。

膜結合型硝酸還元酵素に関わる遺伝子群 (*nar*)

膜結合型硝酸還元酵素の触媒サブユニットをコードする遺伝子は *narG* [4]で、[4Fe-4S]クラスターを含むサブユニットをコードする遺伝子 *narH* [5]と cytochrome *b* サブユニットをコードする遺伝子 *narI* [5]とでオペロンを形成する[6] (Table 4-1)。また、このオペロンに *narJ* [5][7]が含まれていることが多い。この *narJ* は硝酸還元酵素のサブユニットのアセンブリに必要なタンパク質をコードする遺伝子である。菌株によって *nar* オペロンの構造は異なるが、基本的に

は *narGHJI* という並びである (Fig. 4-1)。

ペリプラズム型硝酸還元酵素に関わる遺伝子群 (*nap*)

ペリプラズム型硝酸還元酵素は *napA* と *napB* にコードされており、*napA* は [4Fe-4S]クラスターを含みモリブデン co-factor を活性中心を持った触媒サブユニットをコードする遺伝子で、*napB* は cytochrome *c* をコードする遺伝子である [6][8][9]。*napC* は膜結合型テトラヘム *c* 型 cytochrome をコードする遺伝子で、膜に存在する quinol から NapAB に電子を伝達する役割を担う [6]。*napABC* は *nap* オペロンに必ず存在する。そして、*napD* は *napABC* のすぐ上流に存在し、NapA のアセンブリに関わるタンパク質をコードする遺伝子である [6][8][9]。他の *nap* 遺伝子 (*napKEF*、*napGH*) に関しては機能が分かっていない部分が多いが、詳しくは Table 4-1 に示した。知られている脱窒菌の *nap* オペロンの構造を Fig. 4-2 に示した。

cytochrome *cd*₁タイプ亜硝酸還元酵素に関わる遺伝子群

cytochrome *cd*₁タイプ亜硝酸還元酵素は *nirS* にコードされている [6][9]。*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 では *nirS* のすぐ下流に *nirM* が存在するが (Fig. 4-3)、この遺伝子は NirS への電子供与体として働く cytochrome *c*₅₅₁ をコードしている [10]。*Pseudomonas stutzeri* ZoBell ATCC 14405 では *nirS* と *nirM* の間に *nirT* と *nirB* が存在する (Fig. 4-3) [6]。*nirT* は *napC* と同じく膜結合型テトラヘム *c* 型 cytochrome をコードする遺伝子で [11]、*nirB* は cytochrome *c*₅₅₂ をコードする遺伝子である [11]。どちらも電子伝達に関わるとされるが、詳しい機能は分かっていない。*nirM* の下流には *nirC* が存在する。これは *c* 型 cytochrome をコードしており、NirS の成熟に関わるシグナルではないかとされる [6][11]。*nirFDLGHJE* は cytochrome *cd*₁ タイプ亜硝酸還元酵素のヘム *d*₁ の生合成に関わる遺伝子群である [12][13]。*Pseudomonas*

aeruginosa PAO1 ではこの遺伝子群が *nirS* の下流に 1 ヶ所に集まっているが[13]、*Pseudomonas stutzeri* ZoBell ATCC 14405 では *nirS* の上流と下流に *nirJE* と *nirFDLGH* とで分かれている (Fig. 4-3) [14][15]。

cytochrome *c* から電子を受け取る一酸化窒素還元酵素 (cNor) に関わる遺伝子群

cytochrome *c* から電子を受け取る一酸化窒素還元酵素は *norC* と *norB* にコードされている[16]。 *norC* は膜貫通型 cytochrome *c* サブユニットをコードしており、その遺伝子産物である NorC は外部の cytochrome *c* から電子を受け取る役割を担っている[16][17]。また、 *norB* の上流に位置している。 *norB* は 12 回膜貫通領域をもった cytochrome *b* 触媒サブユニットをコードしている[16][17]。その遺伝子産物である NorB は NorC から電子を受け取る。一般的に *norCB* は *norQ* [17][18] と *norD* [16][17] とでクラスターを組んでいることが多い (Fig. 4-4)。また、 *norCBQD* の上流または下流に *norE* [18] や *norF* [18] が存在することもある。

亜酸化窒素還元酵素に関わる遺伝子群

nos 遺伝子は、 *nosR* と *nosZ* と *nosDFYL* の 3 つの転写ユニットで構成されている (Fig. 4-5) [6]。 *nosZ* は触媒サブユニットを構成し[19][20]、 *nosR* は *nosZ* の転写に必要な制御タンパク質だとされている[19][21]。 *nosDFYL* は NosZ への銅の加工・輸送・挿入に関わるタンパク質をコードしている[9][19][20]。また、 *nosDFYL* の下流に *nosX* が存在することもある (Fig. 4-5)。この *nosX* も銅の輸送・挿入に関わるタンパク質をコードしているのではないかと予想されている[22]。

脱窒転写制御

脱窒遺伝子の転写制御は、一般に、ANR、DNR などの FNR (Fumarate and Nitrate

reductase regulation) ファミリーに属する転写因子によって行われている [23-25]。その代表的なものとして、*fnr* の遺伝子産物である FNR がある。この FNR は大腸菌の *narGHJI* の転写誘導因子として有名で、嫌気条件下で活性化される[6]。この際に、活性型 FNR はプロモーター領域に存在する FNR box (TTGAT…ATCAA) に結合する[24][26]。多くの脱窒細菌で FNR に似た転写制御因子が見つかっており、FNR box と類似の配列がプロモーターに存在していることが確認されている。*P. aeruginosa* では ANR や DNR [27][28]、*P. stutzeri* では DndR [29]、*Paracoccus denitrificans* では NNR [30]、といった構造的にも機能的にも FNR に非常に類似した転写制御因子が見つかっている。これらは主に *nir* や *nor* の転写制御に関わっている[28-31]。*nir* や *nor* の転写制御は NO により誘導されるのが一般的だが、これらの転写制御因子が NO に応答することが要因であるという報告もされている[28-32]。また、大腸菌や *Pseudomonas stutzeri* の *nar* オペロンの活性化は、FNR 以外にも転写因子 NarL と応答調節因子 NarX による 2 成分制御系によって調節されており、この制御系は多くの細菌に見出されている[25]。*nar* の転写は、嫌気条件下や硝酸・亜硝酸により活性化される[33][34]。*nos* に関しては、*P. stutzeri* や *P. fluorescens* では転写活性化に嫌気条件と窒素酸化物が必要とされている[33][34]。特に、*P. stutzeri* では NO によって転写が活性化され、DnrD に依存しているとされている[32]。

第6節 材料

1 章 4 節 4-4 で調整した M-01 株・M-08 株・M-11 株のゲノム DNA を用いた。

第7節 ゲノム解読の手法

脱窒遺伝子群の構造を知るために、まず脱窒遺伝子増幅用のuniversal primerを用いて脱窒遺伝子の一部を増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定してから、その配列からスタートして、ゲノムDNAの上流または下流へウォーキングを行うことにした。このゲノムウォーキングにGenomeWalker™ Universal Kit (Clontech)を用いた。GenomeWalker™ Universal Kitの方法はFig. 4-6 に示している。ゲノムDNAを、平滑にカットできる4種類制限酵素 (*Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I) で消化し、GenomeWalker Adaptorとライゲーションさせる。次に、PCRで用いる遺伝子特異的プライマー、つまり既知配列の部位にアニールするGSP1 (outer primer)、GSP2 (nested primer) を作成した。この際に、GSP2は、既知配列から上流に向かってウォーキングする場合はGSP1よりも上流側に、下流に向かっていく場合はGSP1よりも下流側に作成した。そして、AP1とGSP1で1次PCRを行い、そのPCR産物をtemplateにしてAP2とGSP2で2次nested PCRを行った。このPCR産物を電気泳動で流し、single bandになっていて適当なサイズのものをクローニングし、塩基配列を決定した。この操作を繰り返すことで脱窒遺伝子群の構造を決定した。詳細はGenomeWalker™ Universal Kit User Manual (Clontech)に述べられている。

第4節 方法

4-1 触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子 (*narG* or *napA*、*nirS*、*cnorB*、*nosZ*) の増幅

触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子の存在を確認するため、M-01株・M-08株・M-11株のゲノムDNAから脱窒遺伝子を増幅させた。硝酸還元酵素Nar

には2種類のタイプ、膜結合型Nar (dNar) とペリプラズム型Nar (Nap) が存在するため、各々をコードする遺伝子*narG*、*napA*の存在を確認した。また、亜硝酸還元酵素Nirに関しても、cytochrome *cd₁*タイプNirSと銅含有タイプNirKの2種類が存在するが、*Pseudomonas*属で知られているNirはNirSであるため、それをコードする遺伝子*nirS*の存在を確認した。さらに、一酸化窒素還元酵素Norに関しても、cytochrome cから電子を受け取るcNorとquinolから電子を受け取るqNorの2種類が存在するが、*Pseudomonas*属で知られているNorはcNorであるため、それをコードする遺伝子*cnorB*の存在を確認した。ただし、M-08株とM-11株は硝酸還元能がないため、これに関わる遺伝子の増幅は行わなかった。ゲノムDNA (100 ng/μl) をtemplateにし、ポリメラーゼにEasy-A High-Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) を用いて、16S rDNAを増幅させた。各々の脱窒遺伝子で用いたプライマー配列はTable 4-2 に示した。PCR条件は以下に記した。PCR装置には、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を利用した。増幅したPCR産物をEtBr入り 2.0%アガロースゲル電気泳動 (Mupid-α ; Mupid) し、Electronic U.V. Transilluminator (TOYOBO) で増幅の確認を行った。

PCR 条件

napA、*nirS*、*nosZ* の場合

- ① 95 °C 2 min
- ② 95 °C 40 sec
- ③ X °C 30 sec
- ④ 72 °C 1 min
- ⑤ 72 °C 7 min
- ②~④ x Y cycles

(*napA* の場合、X=55, Y=35、*nirS* の場合、X=58, Y=40、*nosZ* の場合、X=60, Y=30)

narG、*norB* の場合 (タッチダウン PCR)

① 95 °C 2 min

② 95 °C 40 sec

③ *narG* の場合 59 → 55 °C *norB* の場合 57 → 52.5 °C 30 sec

④ 72 °C 1 min

⑤ 95 °C 40 sec

⑥ 55 °C 30 sec

⑦ 72 °C 1 min

⑧ 72 °C 7 min

②～④ 1 サイクルごとに 0.5 °C ずつアニーリング温度を下げた。*narG* の場合は計 9 サイクルで *norB* の場合は計 10 サイクル。

⑤～⑦ x 30 cycles

4-2 増幅した脱窒遺伝子の塩基配列決定

目的のサイズにバンドが存在していることを確認後、ゲルからバンドを切り出し、PCR 産物を精製した。それから、脱窒遺伝子の塩基配列決定までの操作は、1 章 4 節 4-4 に記された通りである。

4-3 ゲノムウォーキングによる脱窒遺伝子群の構造決定

GenomeWalkerTM Universal Kit (Clontech)を用いて、4-2 で決定した塩基配列を基にゲノムウォーキングしていき、触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子の全長の塩基配列、さらには脱窒遺伝子群の全体構造を決定した。

まず、1.5-ml容エッペンチューブに、100 ng/μlのゲノムDNA (M-01 株 or M-08 株 or M-11 株) 25 μl、10 units/ μl のRestriction enzyme (*Dra* I or *EcoR* V or *Pvu* II or *Stu* I) 8 μl、10 X Restriction enzyme buffer 10 μl、Deionized H₂O 57 μlを加

え、37 °Cで2時間インキュベーションした。その後、ボルテックスで5秒間攪拌して再び37 °Cで18時間インキュベーションを行った。0.8%アガロースゲル電気泳動により制限酵素で消化されていることを確認した。電気泳動確認後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 100 µlを加えボルテックスで攪拌し、室温で10分間、14,000 rpmで遠心を行った。遠心後、最上部の水層を注意深く抽出し、新しいチューブに移した。水層にクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) 100 µlを加えボルテックスで攪拌し、室温で10分間、14,000 rpmで遠心を行った。遠心後、最上部の水層を注意深く抽出し、新しいチューブに移した。3M 酢酸ナトリウム 10 µl (0.1 倍量) と95%エタノール 200 µl (2 倍量) とグリコーゲン 20 µgを加えてボルテックスで十分に攪拌してから4 °Cで15分間、14,000 rpmで遠心した。上清を注意深く取り除き、80%エタノール 100 µlを加えた。14,000 rpm、10分間遠心を行い、上清を取り除いた。沈殿物を10分程度空気乾燥し、残存エタノールを蒸発させた。そして、T₁₀E_{0.1} buffer (10 mM Tris-HCl buffer, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) 20 µlで沈殿物を溶解した。

T₁₀E_{0.1} bufferで溶解したDNA溶液 4 µlに6 units/µl のT4 DNA Ligase 0.5 µl、10 X Ligation buffer 1.6 µl、25 µM GenomeWalker Adaptor 1.9 µlを加え、16 °CでオーバーナイトさせることによりAdaptorとのライゲーション反応を行った。その後、70 °C、5分のインキュベーションで反応をストップさせた。そして、T₁₀E₁ buffer (10 mM Tris-HCl buffer, 1 mM EDTA, pH 7.5) 72 µlを加え、DNAライブラリーを完成させた。

次に、既知配列の部位にアニールするGSP1 (outer primer)、GSP2 (nested primer) を作成した。この際に、GSP2は、既知配列から上流に向かってウォーキングする場合はGSP1よりも上流側に、下流に向かっていく場合はGSP1よりも下流側に作成した。そして、AP1とGSP1で1次PCRを行った。DNAライブラリー1 µlをtemplateにし、ポリメラーゼには、Adventage[®] 2 Polymerase Mix (Clontech) を

用いた。PCR反応溶液の調整はprotocolに従った。PCR反応の条件は以下の通りである。また、PCR装置には、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (Takara) を利用した。

PCR 条件

① 94 °C 25 sec

② 72 °C 3 min

③ 94 °C 25 sec

④ 67 °C 3 min

⑤ 67 °C 7 min

①～② x 7 cycles ③～④ x 32 cycles

PCR 産物を 0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた。PCR で増幅していたものを 2 次 PCR にかけた。1 次 PCR を 50 倍希釈したものを template にして、プライマー AP2 と GSP2 を用いた。操作は字本的には 1 次 PCR と同じであったが、反応条件に関しては、前頁の①～②を 5 cycles、③～④を 20 cycles とした。そして、PCR 産物を 0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた。シングルバンドになっているもので適当なサイズになっているバンドをゲルから切り出し、PCR 産物を精製、それからクローニングを行い、塩基配列を決定した。PCR 産物の精製以降の操作は 1 章 4 節 4-4 に詳しく記されている。

この操作により得られた塩基配列を基に再び GSP1、GSP2 を作成して 2 回の PCR を行う、という形で操作を繰り返すことで、脱窒遺伝子群の構造を決定した。

最後に、NirS と NosZ のアミノ酸配列に基づいた系統樹を作成した。プログラム Clustal X [35]を用いて配列のアラインメントを行い、近隣結合法 (NJ 法) [36] で系統樹を作成した。系統樹のトポロジー評価にはブートストラップ法を用い、再抽出値を 1000 回とした。

第5節 結果

触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子の増幅とクローニング

*nirS*プライマーと*nosZ*プライマーを用いてPCRを行ったところ、M-01株・M-08株・M-11株とも、予想されているサイズ (*nirS*は430 bp、*nosZ*は450 bp) にバンドが増幅していた (Fig. 4-7A, C)。このバンドを切り出し、PCR産物を精製、クローニングを行い、塩基配列を読んだところ、M-01株とM-11株は*nirS*と*nosZ*を1種類ずつ持っているのに対し、M-08株は*nirS*と*nosZ*を2種類ずつ持っていることが分かった。*cnorB*プライマーを用いてのPCRに関してはM-01株とM-08株のゲノムからどれも複数のバンドが増幅したが (Fig. 4-7B)、予想されている約400 bpのところにバンドが存在していたので (Fig. 4-7Bの赤枠)、このバンドを切り出しクローニングをして塩基配列を読んだところ、両株とも確かに*cnorB*を1つずつ持っていることが分かった。M-11株は現在解析中である。M-01株はNO₃⁻からNO₂⁻への還元を行うため硝酸還元に関わる遺伝子を同定しようと、*narG*、*napA*の増幅を試みたが、これまで設計したプライマーでは、いずれもM-01株のゲノムから増幅されず、硝酸還元遺伝子の同定には至らなかった。

ゲノムウォーキングによる脱窒遺伝子群の構造決定

Fig. 4-8は、ゲノムウォーキングの例、*nosZ*プライマーによりM-01株の*nosZ*の部分配列を決定後、それを基にして上流方向へのゲノムウォーキングした際の1st PCRと2nd PCRの結果を示したものである。2nd PCRでシングルバンドになっていて適当なサイズのもの、ここでは*Stu* Iのサンプル由来のものをクローニングし塩基配列決定した。このような流れで脱窒遺伝子群の構造決定を行った。

M-01株の脱窒遺伝子構造を Fig. 4-9、M-08株の脱窒遺伝子構造を Fig. 4-10、

M-11 株の脱窒遺伝子構造を Fig. 4-11 に示した。

M-01 株に関してであるが、*nos* は、一般的な脱窒細菌に見られるような *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) を有しており (Fig. 4-5、Fig. 4-9)、*nos* クラスターの下流には *tatA* といわれるトランスロケーションに関わる遺伝子が存在した。また、*nos* クラスターの上流には多くの脱窒細菌のプロモーター領域に見られる TTGAT…ATCAA という FNR box が存在した。*nir* に関しては、一般的な脱窒細菌では大きな *nir* クラスターを形成しているのに反し (Fig. 4-3)、*nirS* が単独で存在し、*nirS* の前後の遺伝子は脱窒とは関係のない遺伝子であり、しばしば脱窒細菌の *nir* クラスターの *nirS* 近辺に存在する、NirS への電子伝達に関わる遺伝子 (*nirM*、*nirT*、*nirB*) を現時点で発見するに至っていない (Fig. 4-9)。*nirS* の上流には、FNR box (TTGAC…ATCAA) をはさんで逆向きに *nirQ* (または *norQ*) と *norCBD* がクラスターを形成していた (Fig. 4-9)。*nor* は一般的な脱窒細菌に見られる *norCBD* のクラスターを形成していた (Fig. 4-4、Fig. 4-9)。さらにゲノム解読を進める予定である。

M-08 株の *nosZ* は 2 種類存在するが、2 種類の *nosZ* の近傍にはいずれも *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) が形成されていることが分かった (Fig. 4-10)。いずれも上流には FNR box が存在した。*nirS* も 2 種類存在するが、いずれも 1 つの大きな *nir* クラスター (約 20kbp) の中に存在した、各々の *nirS* の上流には FNR box が存在した。また、このクラスター内で *nirS* 以外の Nir に関わる他のコンポーネントは 1 種類ずつしか持ち合わせていなかった (Fig. 4-10)。Nor に関しては一般的な脱窒細菌に見られる *norCBD* のクラスターを形成していた (Fig. 4-10)。

M-11 株の *nos* に関しても、M-01 株・M-08 株と同じく一般的な脱窒細菌に見られるような *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) を有していた (Fig. 4-11)。*nir*、*nor* に関しては現在配列を解読中である。

分子系統樹

アミノ酸配列に基づいた NirS（全長）の分子系統樹を Fig. 4-12 に、NosZ（全長）の分子系統樹を Fig. 4-13 に示した。また、単離株と各脱窒菌との間の NirS のアミノ酸配列同一性を Table 4-3 に、NosZ のアミノ酸配列同一性を Table 4-4 に示した。

M-01 株と M-11 株の NirS は *Gammaproteobacteria* 綱、特に *Pseudomonas* 属の NirS と同一のクラスターを形成していた (Fig. 4-12)。そのなかで、M-01 株と M-11 株の NirS は非常に近縁な関係にあり (Fig. 4-12)、92%の高いアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。また、既知脱窒菌のなかでは、両株の NirS は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 の NirS と最も近縁な関係にあり、M-01 株は 75%、M-11 株は 77%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。M-08 株の NirS は 2 種類存在するが、Fig. 4-10 の *nirS1* 遺伝子の産物を M-08 I、*nirS2* 遺伝子の産物を M-08 II と名付けた。M-08 I の NirS は M-01 株・M-11 株と同じく *Gammaproteobacteria* 綱、特に *Pseudomonas* 属の NirS と同一のクラスターを形成していた (Fig. 4-12)。そのなかで、M-11 株の NirS と非常に近縁な関係にあり (Fig. 4-12)、78%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。また、既知脱窒菌のなかでは、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 の NirS と最も近縁な関係にあり、74%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。M-08 II の NirS は *Gammaproteobacteria* 綱のクラスターとは離れた *Pseudomonas stutzeri* A1501 の NirS とクラスターを形成しており (Fig. 4-12)、82%の高いアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。M-08 I の NirS とは 52%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-3)。

M-01 株と M-11 株の NosZ、並びに 2 種類の M-08 株の NosZ (M-08 I、M-08 II と名付けた) は全て *Gammaproteobacteria* 綱、特に *Pseudomonas* 属の NosZ と同一のクラスターを形成していた (Fig. 4-13)。M-01 株と M-11 株の NosZ は非

常に近縁な関係にあり (Fig. 4-13)、91%の高いアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-4)。また、2種類の M-08 株の NosZ (M-08 I、M-08 II) は 70%のアミノ酸配列同一性を示した (Table 4-4)。これらの単離株の NosZ は、既知脱窒菌のなかでは、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 や *Pseudomonas stutzeri* A1501 と近縁な関係にあった (Fig. 4-13)。

考察

N₂O抑止をもたらす要因となった脱窒特性の根幹を明らかにすべく、M-01 株とM-11 株の脱窒遺伝子の同定と脱窒遺伝子群の構造の解析を行った。まず、両株の*nosZ*の近傍にはいずれも、一般的な脱窒細菌に見られるような*nos*クラスター (*nosRZDFYL*) が形成されていることが分かり (Fig. 4-9、Fig. 4-11)、*nosZ*が機能的に働くことが予想された。また、両株のNosZの高いアミノ酸配列同一性 (91%) は、両株のN₂O還元の高い酸素耐性と関係があるかもしれない。両株のN₂O還元に関わる脱窒遺伝子群の構造と触媒サブユニットをコードする遺伝子*nosZ*全長の解読が完了したので、これを基に、両株のN₂O還元の高い酸素耐性の原因が、酵素レベルなのか遺伝子の発現レベルなのか、解析していく予定である。M-01 株の*nir*に関してであるが、脱窒細菌の*nir*クラスターの*nirS*近傍に存在する、NirSへの電子伝達に関わる遺伝子やヘム*d*₁の生合成に関わる遺伝子が、M-01 株の*nirS*近傍には存在しなかった。M-01 株のこれらの遺伝子やM-11 株の*nir*、*nor*を含め、今後更なる解析を進め、N₂O抑止をもたらす要因となった亜硝酸よりもN₂Oを優先的に利用する脱窒特性の根本を明らかにしようと考えている。

新属の可能性の高いM-08 株は、*nirS*と*nosZ*を 2 種類ずつ持っていることが判明した。まず、*nosZ*に関してであるが、これら 2 種類のNosZのアミノ酸配列同一性は 70%であることから異種であることが分かる。さらに、2 種類の*nosZ*の近傍にはいずれも*nos*クラスター (*nosRZDFYL*) が形成されていることが分かり、両方とも*nosZ*が機能的に働くであろうと予想された。現在、*nosZ*を 2 種類持っていることが分かっている菌株は*Sulfurimonas denitrificans* DSM1251 だけである [37, 38]。 *S. denitrificans* DSM1251 では、ゲノム解読によりこのことが判明した。*S. denitrificans* DSM1251 の片方の*nosZ*の近傍には*nos*クラスターが形成されており*nosZ*が機能的に働くことが示唆されたが、もう片方の*nosZ*の近傍には*nos*クラ

スターが形成されていないため、機能が現時点では分からない[38]。複数の*nosZ*が機能的に働くという報告は今までなされていないので、今後、発現解析によりM-08株の2種類の*nosZ*の機能の解明に取り組む予定である。次に*nirS*に関してであるが、1つの大きな*nir*クラスター（約20kbp）の中に*nirS*が2種類存在した。現在ゲノム解読された菌株の中に、*nirS*を複数持つといわれているものは *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 と *Dechloromonas aromatica* RCB だけで、2株とも*nirS*を2種類持っているが、M-08株とは違い、それぞれの*nirS*近傍に*nir*クラスターが形成されていた[38]（※）。M-08株の*nir*クラスター内でNirに関わる他のコンポーネント（例えば、NirSへの電子伝達に関わる遺伝子やヘム*d*₁の生合成に関わる遺伝子）は1種類ずつ持ち合わせていないことを考えれば、この事実は非常に奇異である。これらのM-08株の*nirS*がどう働くか興味深い。ちなみに、*Thauera*属の菌株で、機能の異なる2種類の*nirS*が存在することがすでに報告されている[39]。

（※）論文[38]では、*nirS*を *M. magneticum* AMB-1 が3種類、*D. aromatica* RCB が2種類、*Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 が2種類持っており、論文に基づくと *M. magneticum* AMB-1 と *T. denitrificans* ATCC 25259 が1つの*nir*クラスター内に2種類の*nirS*が存在することになっていたが、Blast検索を行ったところ実際は両株とも片方が*nirS*ではなく*nirN*であった。*nirN*と*nirS*の相同性が高いことが要因であろう（Table. 4-1）。

Category of affected process	Gene	Encoding gene product, function, or observation
Membrane-bound nitrate reduction	<i>narG</i>	Large α subunit containing a molybdopterin cofactor catalytic subunit
	<i>narH</i>	Small soluble β subunit containing four [4Fe-4S] clusters
	<i>narI</i>	γ subunit containing two <i>b</i> -type hemes cytochrome
	<i>narJ</i>	Protein necessary for nitrate reductase assembly
Periplasmic nitrate reduction	<i>napA</i>	Large subunit containing a molybdopterin cofactor catalytic subunit and a [4Fe-4S] cluster
	<i>napB</i>	Small subunit containing a diheme cytochrome <i>c</i>
	<i>napC</i>	Membrane-anchored <i>c</i> -type tetra-haem cytochrome, which is probably involved in the electron transfer from the membranous quinols to the periplasmic nitrate reductase complex (NapAB)
	<i>napD</i>	Cytoplasmic protein involving the posttranslational assembly of a functional molybdopolypeptide of NapA
	<i>napE, napK</i>	Small transmembrane proteins with unknown function
	<i>napF</i>	Soluble protein with four [4Fe-4S] clusters suggesting a role in the assembly of the iron-sulfur center of NapA
Nitrite reduction (NirS)	<i>nirS</i>	Cytochrome <i>cd₁</i> nitrite reductase
	<i>nirT</i>	Putative membrane-anchored tetraheme <i>c</i> -type cytochrome
	<i>nirB</i>	Cytochrome <i>c₅₅₂</i>
	<i>nirM</i>	Cytochrome <i>c₅₅₁</i>
	<i>nirC</i>	<i>c</i> -type cytochrome with a signal for membrane translocation
	<i>nirN</i>	Affects anaerobic growth and in vivo nitrite reduction; similarity to NirS
	<i>nirQ</i>	Gene product affects catalytic function of NirS and NorCB
	<i>nirD, nirE, nirF, nirG, nirH, nirJ, nirL</i>	Protein involving heme D ₁ biosynthesis
	NO reduction (cNor)	<i>norB</i>
<i>norC</i>		Cytochrome <i>c</i> subunit of NO reductase
<i>norD</i>		Affects viability under denitrifying conditions
<i>norE</i>		Membrane protein; homologous with COXIII
<i>norF</i>		Affect NO and nitrite reduction
<i>norQ</i>		Affect NirS and NorCB function; homology of NirQ
N ₂ O reduction		<i>nosD</i>
	<i>nosF</i>	ATP/GTP-binding protein involved in Cu insertion into NosZ
	<i>nosL</i>	Part of <i>nos</i> gene cluster; putative outer membrane lipoprotein
	<i>nosR</i>	Membrane-bound regulator required for transcription of <i>nosZ</i>
	<i>nosX</i>	Affect nitrous oxide reduction in <i>S. meliloti</i>
	<i>nosY</i>	Inner membrane protein involved in Cu processing for NosZ
	<i>nosZ</i>	Nitrous oxide reductase
	Regulation	<i>anr</i>
<i>dnr, fnrD</i>		<i>P. aeruginosa</i> FNR-like regulators; affect the expression of <i>nirS</i> and <i>norCB</i>
<i>fnrP</i>		<i>Paracoccus</i> FNR-like regulator; affects the expression of <i>narGH</i>
<i>narL</i>		Nitrate-responsive transcription factor of <i>Pseudomonas</i> of a NarXL two component system
<i>mnr, mnrR</i>		<i>Paracoccus</i> and <i>Rhodobacter</i> FNR-like regulators; affect <i>nirS</i> and <i>norCB</i> expression

Table 4-1. 脱窒遺伝子とその機能[6, 9]

Target gene	Amplicon size (bp)	Primer name	Sequence (5'→3')
<i>nosZ</i>	450	nosZ-F[2]	CGYTGTTCMTCGACAGCCAG
		nosZ1622-R[2]	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG
<i>cnorB</i>	390	cnorB2F[3]	GACAAGNNNTACTGGTGGT
		cnorB6R[3]	GAANCCCCANACNCCNGC
<i>nirS</i>	430	cd3aF[2]	G TSAACG TSAAGGARACSGG
		R3cd[2]	GASTTCGGRTGSGTCTTGA
<i>narG</i>	650	1960F[40]	TAYGTSGGCCARGARAA
		2659R[40]	TTYTCRTACCABGTBGC
<i>napA</i>	410	V67F[40]	TAYTTYT N H S N A A R A T H A T G T A Y G G
		V67R[40]	DATNGGRTGCATYTCNGCCATRTT

Table 4-2. Primers used for the amplification of denitrifying genes

% Amino acid sequence identity	M-01	M-11	M-08 I	M-08 II
M-01		92	75	54
M-11	92		78	53
M-08 I	75	78		52
M-08 II	54	53	52	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	75	77	74	53
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	52	53	52	82
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	62	62	59	48
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	64	63	64	55

Table 4-3. 単離株と各脱窒菌間の NirS のアミノ酸配列同一度

% Amino acid sequence identity	M-01	M-11	M-08 I	M-08 II
M-01		91	78	70
M-11	91		80	68
M-08 I	78	80		70
M-08 II	70	68	70	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	80	81	80	70
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	81	80	75	69
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	56	56	59	54
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	50	50	50	48

Table 4-4. 単離株と各脱窒菌間の NosZ のアミノ酸配列同一度

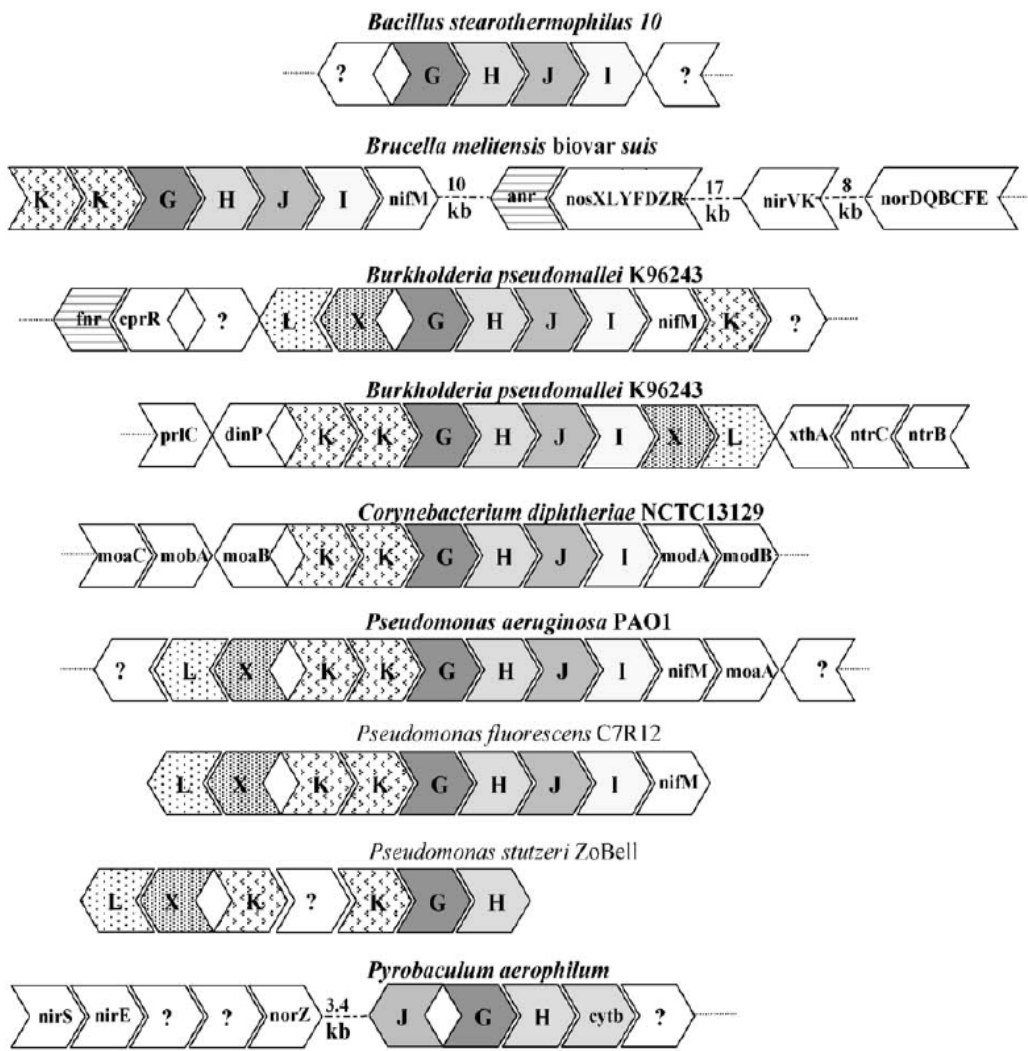


Fig. 4-1. *nar* オペロンの構造[6]

矢印は転写方向を示す。

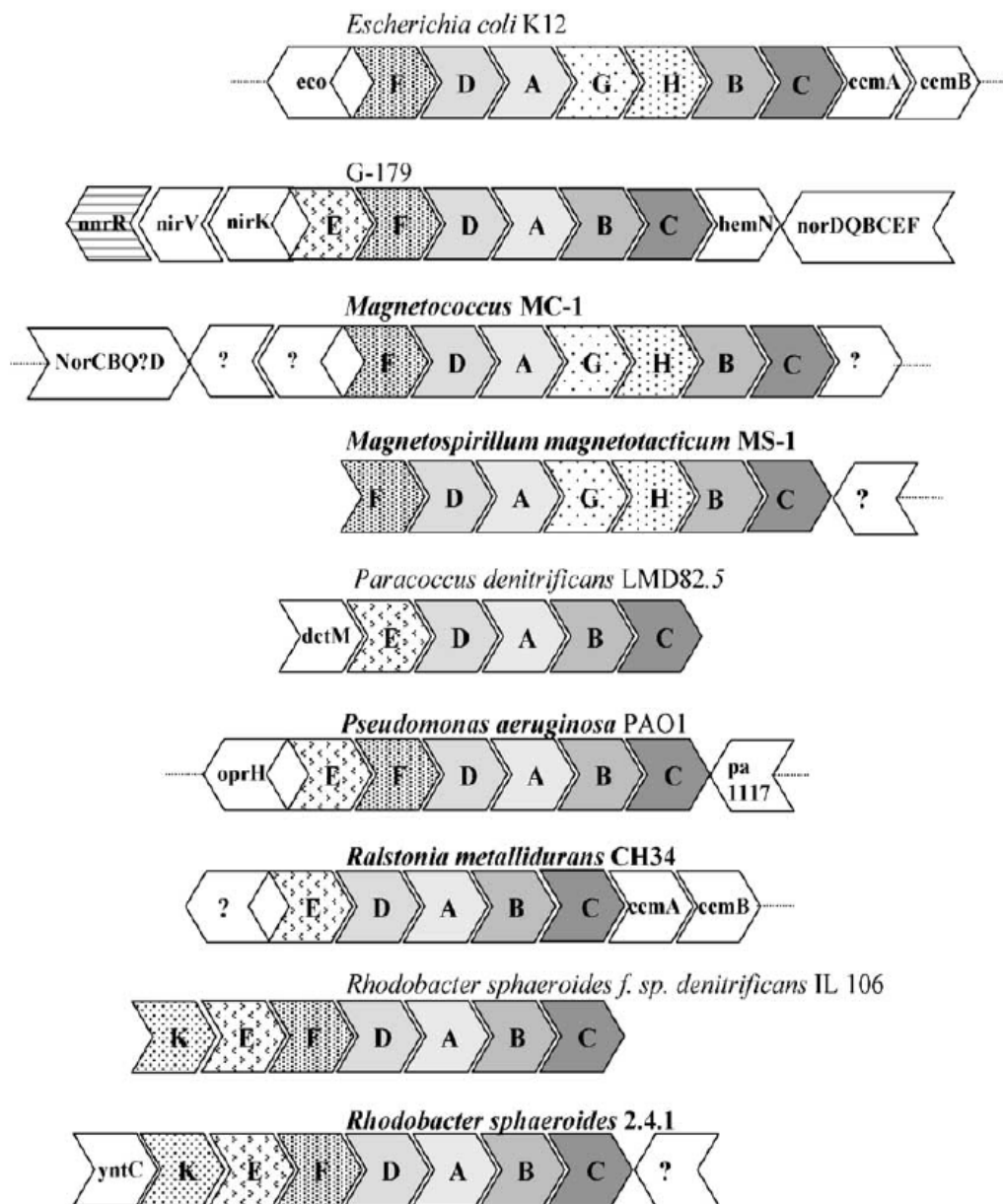


Fig. 4-2. *nap* オペロンの構造[6]

矢印は転写方向を示す。

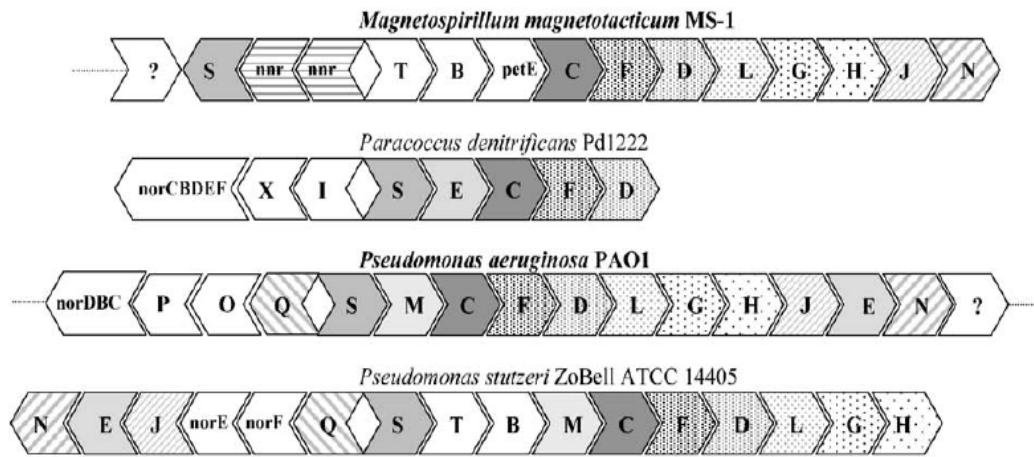


Fig. 4-3. *nir* オペロンの構造[6]

矢印は転写方向を示す。

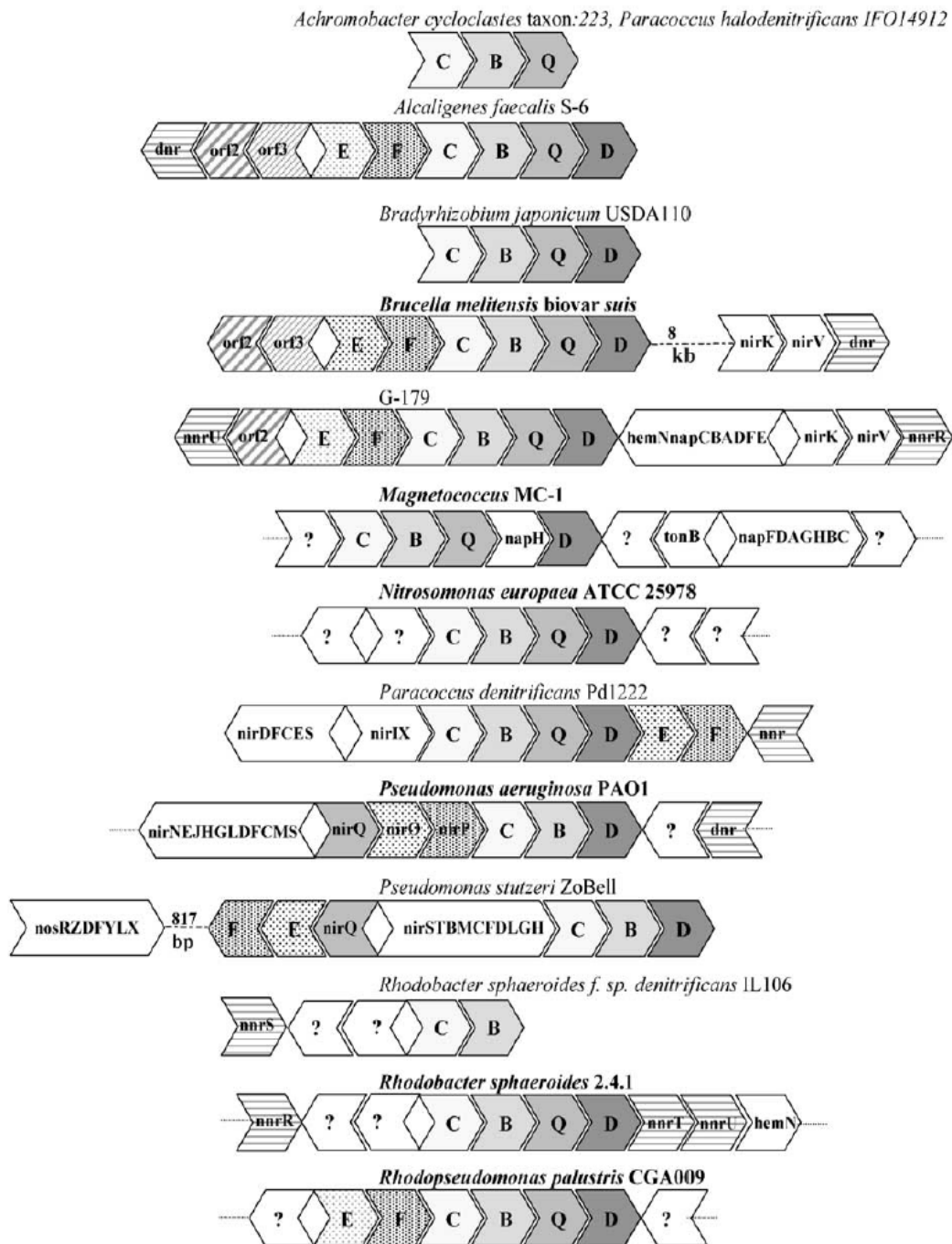


Fig. 4-4. *nor* オペロンの構造[6]

矢印は転写方向を示す。

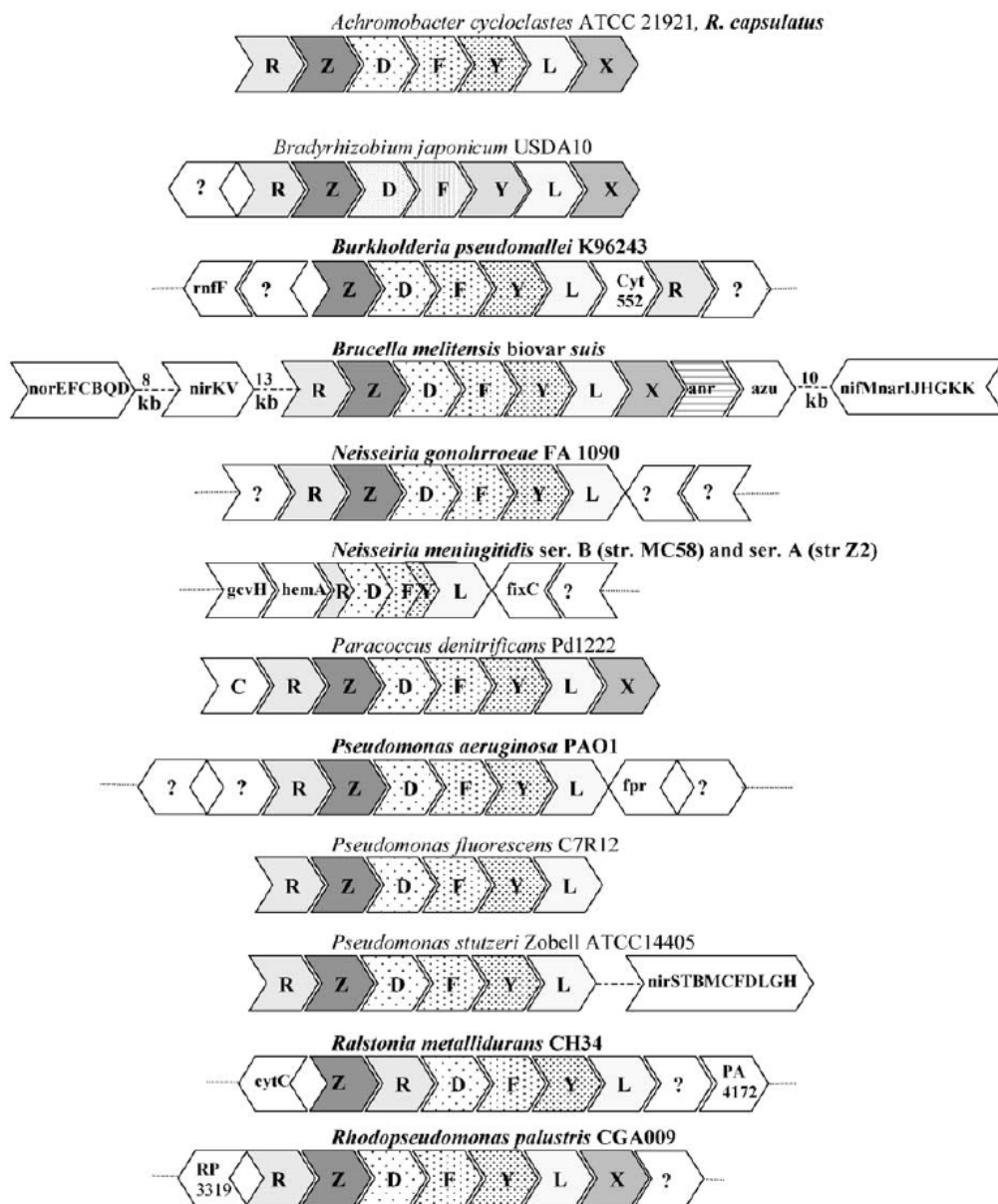
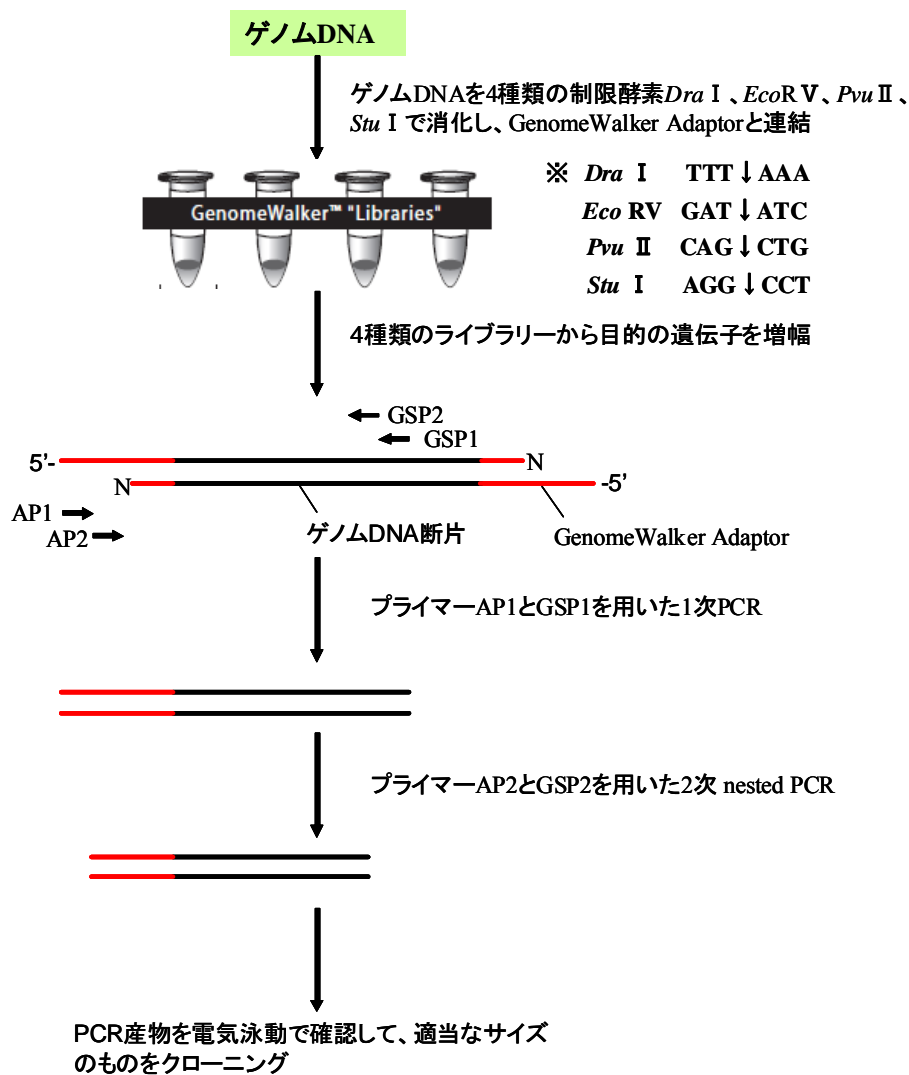


Fig. 4-5. *nos* オペロンの構造[6]

矢印は転写方向を示す。



Structure of the GenomeWalker™ adaptor and adaptor primers

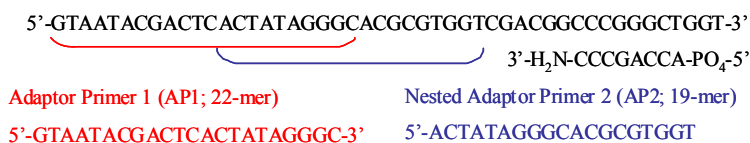


Fig. 4-6. Flow chart of the GenomeWalker™ protocol

GenomeWalker™ Universal Kit User Manual (TaKaRa)を参照した。

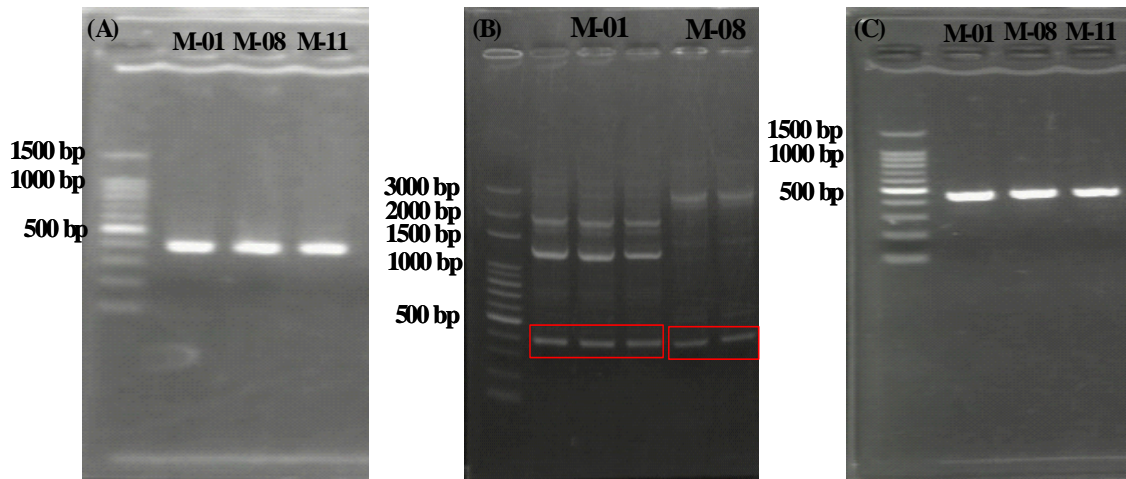


Fig. 4-7. *nirS* (A), *cnorB* (B), and *nosZ* (C)の増幅

(A, C) 左のレーンからマーカー、M-01 株のゲノム由来、M-08 株のゲノム由来、M-11 株のゲノム由来となっている。

(B) 左のレーンがマーカー、その右の 3 レーンが M-01 株のゲノム由来、さらにその右の 2 レーンが M-08 株のゲノム由来となっている。

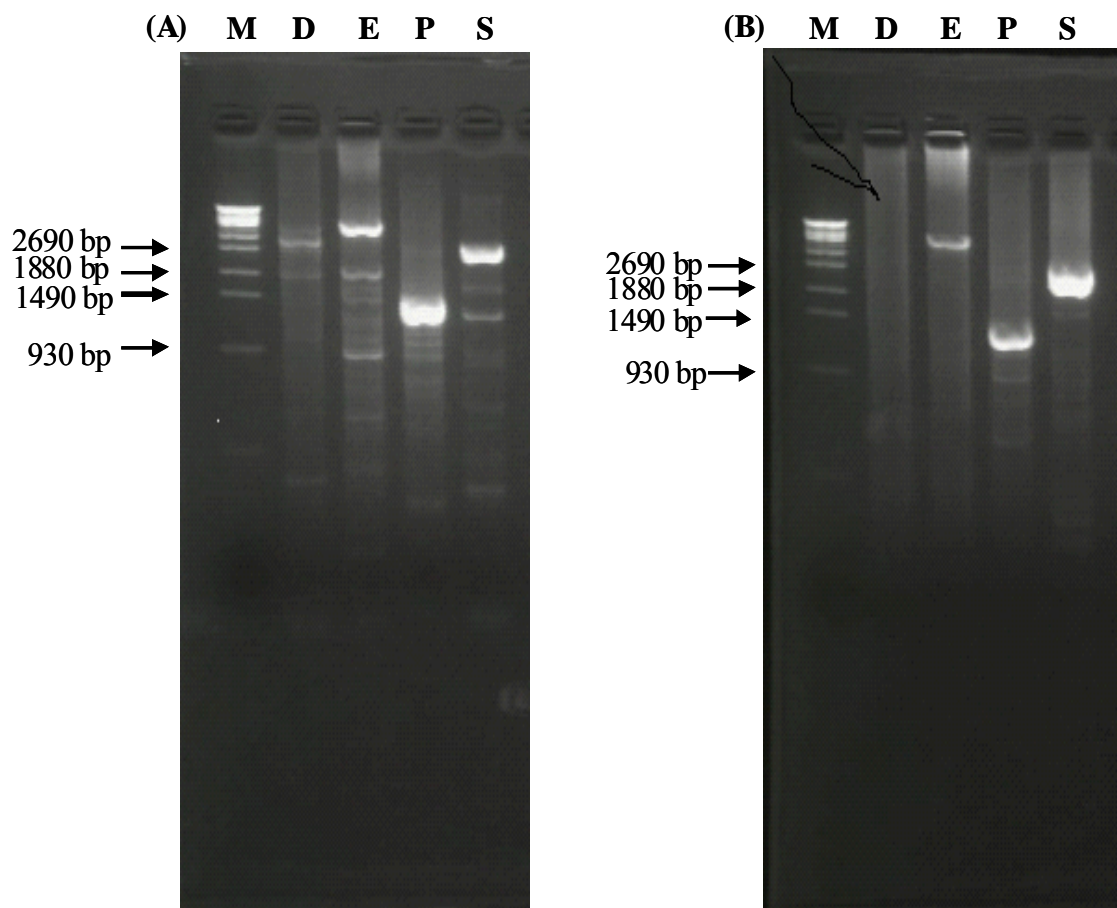


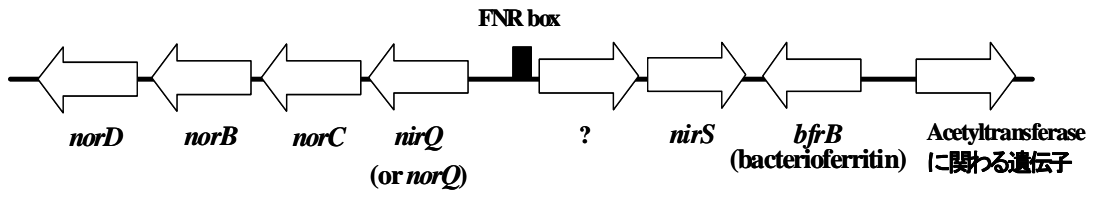
Fig. 4-8. ゲノムウォーキングの際の 1st PCR (A)と 2nd PCR (B)の結果

例：M-01 株の *nosZ* の上流方向へのゲノムウォーキング

M：マーカー、D, E, P, S は *Dra* I、*EcoRV*、*Pvu* II、*Stu* I で消化した DNA 溶液を template にしたもの。

最終的に、*Stu* I のライブラリーから増幅したもの（約 2.0 kb）をクローニングした。

***nir-nor* cluster**



***nos* cluster**

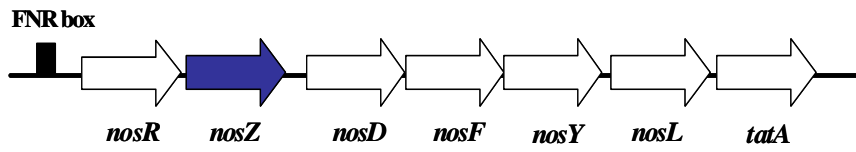
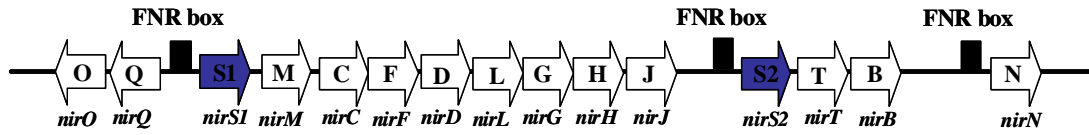
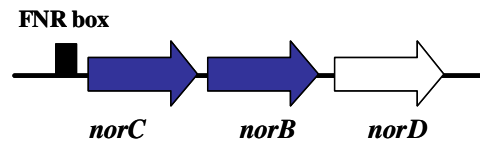


Fig. 4-9. M-01 株の脱窒遺伝子構造

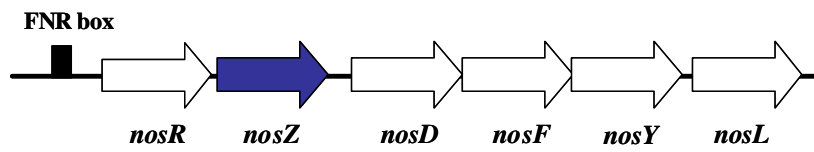
nir cluster



nor cluster



nos cluster I



nos cluster II

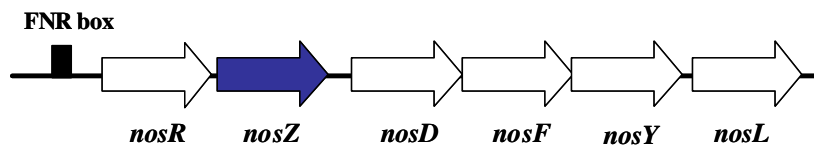


Fig. 4-10. M-08 株の脱窒遺伝子構造

***nos* cluster**

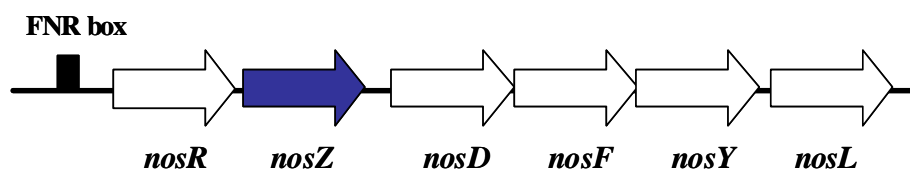


Fig. 4-11. M-11 株の脱窒遺伝子構造

nir cluster、*nor* cluster に関しては現在解析中である。

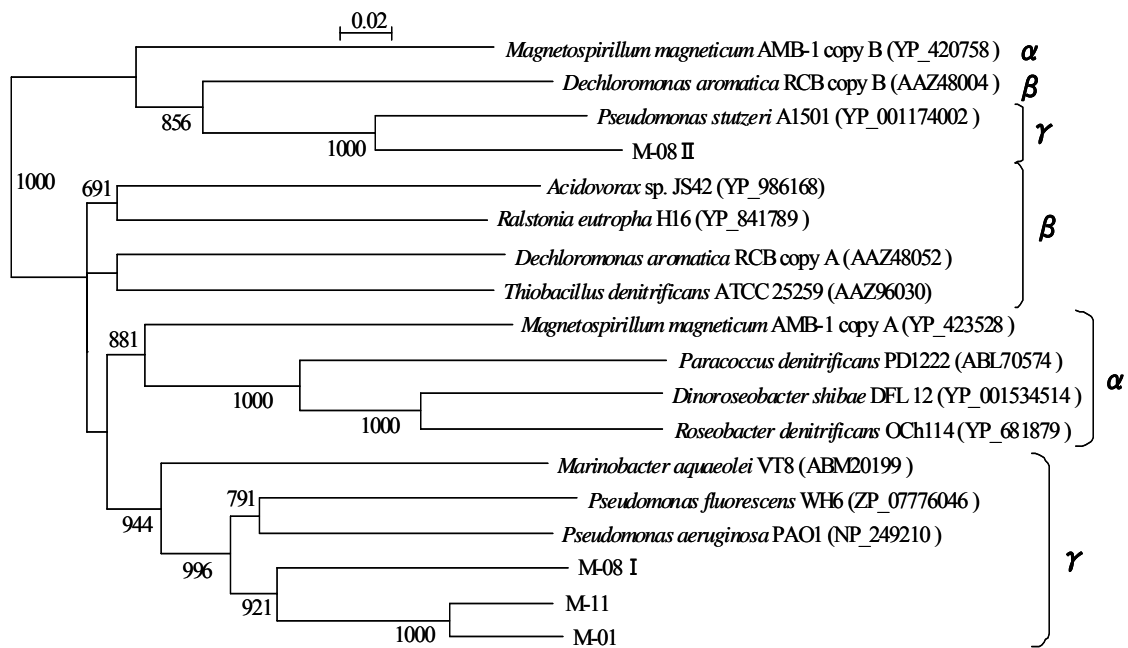


Fig. 4-12. シトクロム cd_1 型亜硝酸還元酵素 (NirS) の系統樹

α は *Alphaproteobacteria* 綱に属する細菌、 β は *Betaproteobacteria* 綱に属する細菌、 γ は *Gammaproteobacteria* 綱に属する細菌を意味する。カッコ内はアクセッション番号を意味する。M-08 I は M-08 株の Fig. 4-10 の *nirS1* 遺伝子の産物と M-08 II は *nirS2* 遺伝子の産物を指す。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

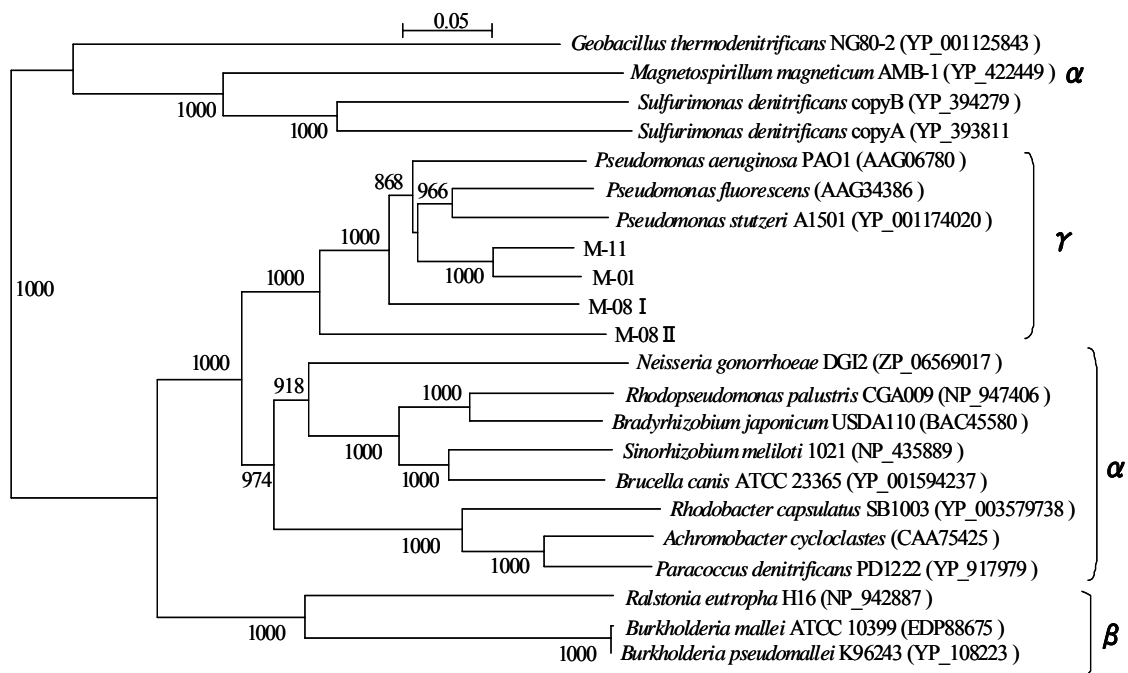


Fig. 4-13. 亜酸化窒素還元酵素 (NosZ) の系統樹

α は *Alphaproteobacteria* 綱に属する細菌、 β は *Betaproteobacteria* 綱に属する細菌、 γ は *Gammaproteobacteria* 綱に属する細菌を意味する。カッコ内はアクセッション番号を意味する。M-08 I と M-08 II は M-08 株の 2 種類の *nosZ* 遺伝子の産物を指す。ブートストラップ値が 600 以下の値は示していない。

参考文献

54. **Roussel-Delif, L., S. Tarnawski, et al.** 2005. Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate-dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microbial Ecology* **49**:63-72.
55. **Throbäck, I. N., K. Enwall, et al.** 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecology* **49**:401-17.
56. **Braker, G., and J. M. Tiedje.** 2003. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3476-83.
57. **Philippot, L., A. Clay-Josserand, et al.** 1997. Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequencing of its corresponding genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1350**:272-6.
58. **Berks, B. C., M. D. Page, et al.** 1995. Sequencing analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Mol. Microbiol.* **15**:319-31.
59. **Philippot, L.** 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**:355-76.
60. **Blasco, F., and J. Pommier, et al.** 1992. Involvement of the *narJ* or *narW* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**:221-30.
61. **Berks, B. C., D. J. Richardson, et al.** 1995. The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* **309**:983-92.
62. **Zumft, W. G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:533-616.
63. **Arai, H., Y. Sambongi, et al.** 1990. Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome *c*-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **261**:196-8.
64. **Jüngst, A., S. Wakabayashi, et al.** 1991. The *nirSTBM* region coding for cytochrome *cd*₁-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a

- cluster of mono-, di-, and tetraheme proteins. FEBS Lett. **279**:205-9.
65. **de Boer, A. P. N., W. N. M. Reijnders, et al.** 1994. Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. Antonie Leeuwenhoek **66**:111-27.
 66. **Kawasaki, S., H. Arai, et al.** 1997. Gene cluster of dissimilatory nitrite reductase (*nir*) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme *d*₁ biosynthesis. J. Bacteriol. **179**:235-42.
 67. **Glockner, A. B., and W. G. Zumft.** 1996. Sequence analysis of an internal 9.72-kb segment from 30-kb denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. Biochem. Biophys. Acta **1277**:6-12.
 68. **Palmedo, G., P. Seither, et al.** 1995. Resolution of the *nirD* locus for heme *d*₁ synthesis of cytochrome *cd*₁ (respiratory nitrite reductase) from *Pseudomonas stutzeri*. Eur. J. Biochem. **232**:737-46.
 69. **Arai, H., Y. Igarashi, et al.** 1995. The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta **1261**:279-84.
 70. **Bartnikas, T. B., I. E. Tosques, et al.** 1997. Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. J. Bacteriol. **179**:3534-40.
 71. **de Boer, A. P. N., J. van der Oost, et al.** 1996. Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. Eur. J. Biochem. **242**:592-600.
 72. **Hoeren, F. U., B. C. Berks, et al.** 1993. Sequence and expression of the gene encoding the respiratory nitrous-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*: new and conserved structural and regulatory motifs. Eur. J. Biochem. **218**:49-57.
 73. **Halloway, P., W. McCormick, et al.** 1996. Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **178**:1505-14.
 74. **Cuypers, H., A. Viebrock-Sambale, et al.** 1992. NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. J. Bacteriol. **174**:5332-9.
 75. **Saunders, N. F. W., J. J. Hornberg, et al.** 2000. The NosX and NirX proteins of *Paracoccus denitrificans* are functional homologues: their role in maturation of

- nitrous oxide reductase. J. Bacteriol. **182**:5211-7.
76. **Ferguson, S. J.** 1994. Denitrification and its control. Antonie Van Leeuwenhoek **66**:89-110.
 77. **Spiro, S., and J. R. Guest.** 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. **6**:399-428.
 78. **Stewart, V., et al.** 1989. Structure of genes *narL* and *narX* of the *nar* (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **171**:2229-34.
 79. **Eiglmeier, K., N. Honoré, et al.** 1989. Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters. Mol. Microbiol. **3**:869-78.
 80. **Sawers, R. G.** 1991. Identification and molecular characterization of a transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibiting structural and functional similarity to the FNR protein of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **5**:1469-81.
 81. **Arai, H., Y. Igarashi, et al.** 1995. Expression of *nir* and *nor* genes of denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator; DNR, in addition to ANR. FEBS Lett. **371**:73-76.
 82. **Vollack, K. U., E. Hartig, et al.** 1999. Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Mol. Microbiol. **31**:1681-94.
 83. **Spanning, R. J. V., A. P. D. Boer, et al.** 1995. Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. FEBS Lett. **27**:151-4.
 84. **Ye, R. W., D. Haas, et al.** 1995. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr; an analog of Fnr. J. Bacteriol. **177**:3606-9.
 85. **Vollack, K. U., and W. G. Zumft.** 2001. Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in *Pseudomonas stutzeri*. J. Bacteriol. **183**:2516-26.
 86. **Hartig, E., U. Schiek, et al.** 1999. Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**:3658-65.
 87. **Philippot, L., P. Mirleau, et al.** 2001. Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor*, and

- nos* genes. Biochim. Biophys. Acta **1517**:436-40.
88. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **25**:4876-4882.
 89. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**:406-425.
 90. **Jones, C. M., B. Stres, et al.** 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Mol. Biol. Evol. **25**:1955-66.
 91. **Sievert, S. M., K. M. Scott, et al.** 2008. Genome of the epsilonproteobacterial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. Appl. Environ. Microbiol. **74**:1145-56.
 92. **Etchebehere, C., and J. Tiedje.** 2005. Presence of two different active *nirS* nitrite reductase genes in a denitrifying *Thauera* sp. from a high-nitrate-removal-rate reactor. Appl. Environ. Microbiol. **71**:5642-5.
 93. **Smith, C. J., D. B. Nedwell, et al.** 2007. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol. **73**:3612-22.

第 5 章

単離株の系統分類学的研究

第1節 序

第1章で、単離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定した。その配列を基に系統学的解析を行った。その配列の近縁の既知種との相同性、並びに、その配列を基にした系統学的位置から、M-01 株、M-11 株は *Pseudomonas* 属の新種、M-07 株は *Advenella* 属の新種、M-08 株は *Pseudomonadaceae* 科の新属である可能性が示唆された。そこで、新属の可能性のある M-08 株に関して、微生物の分類・同定を行い、新種の可能性のある M-01 株・M-07 株・M-11 株に関しては、さらに、DNA-DNA ハイブリダーゼーションを行い、新種の可能性について評価した。

第2節 材料と方法

2-1 DNA の調整[1]

菌体を Trypticase soy broth 寒天培地 (1.7% Pancreatic digest of casein, 0.3% Papaic digest of soybean, 0.5% Sodium chloride, 0.25% Dipotassium phosphate, 0.25% Dextrose, 1.5% Bacto agar, pH 7.3) で培養した。対数増殖期の後期にあるプレート上の菌体を 0.85% NaCl 溶液に懸濁しながらスプレッダーでかき集め、その懸濁液を 50-ml 容ファルコンチューブ (IWAKI) にいれて遠心して集菌した。そして、菌体を saline-EDTA (Table 5-1) によく懸濁して再度遠心して集菌した。その菌体を -80 °C のフリーザーに入れて凍結させた。

凍結した菌体に菌体の 5 倍量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を加え、さらに lysozyme を 1 mg/ml となるように加えた。よく混和して 37 °C で 30 分間反応させた。次に全体量の 0.1 倍量の Tris-SDS buffer (Table 5-1) を加えて激しく振とうし、60 °C で 5 分間インキュベーションし溶菌させた。5 分で溶菌しなかつ

た場合は完全に溶菌するまで 60 °C で反応させた。この菌液に全体の 0.5 倍量の Tris-phenol を加え 2 分間激しく振り氷水で冷却し、さらに chloroform を Tris-phenol と等量加えて 2 分間激しく振った。この後、10,000 x g で 10 分間遠心し、中間層の沈殿物を巻き上げないように注意深く上清を新しい 50-ml 容ファルコンチューブに移した。以上のフェノール・クロロホルム処理を中間層の沈殿物が出なくなるまで繰り返した。その後、上清に chloroform を等量加えて 2 分間激しく振り、10,000 x g で 10 分間遠心した。

クロロホルム処理が終わった上清に、-20 °C で冷却した 2 倍量の 99.5% ethanol を、壁面を伝わらせながら加え、ガラス棒でかき混ぜながら、沈殿してくる DNA をガラス棒に巻き取った。壁面を利用して DNA に付着している液を除き、80% ethanol、ether の順で DNA をすすいだ。その後、2-ml 容ポリプロピレンチューブにガラス棒ごと挿入し、0.1×SSC buffer (Table 5-1) を 1 ml 加え、一晚冷蔵庫でゆっくり溶解させた。

DNA溶液からガラス棒を取り除き、10 mg/mlのRNase A溶液 (Table 5-1, Sigma) 50 µlと 400 U/mlのRNase T₁溶液 (Table 5-1, Roche) 50 µlを加え、37 °Cで 60 分間反応させた。次に、4 mg/mlのProteinase K溶液 (Table 5-1, Sigma) 50 µl加え、37 °Cで 60 分間反応させた。プロテアーゼ処理後、先ほどと同じようにフェノール・クロロホルム処理によりタンパク質除去を行った。中間層の変性物が出なくなった後はクロロホルム処理を行った。その後も先ほどと同じように-20 °Cで冷却した 2 倍量の 99.5% ethanolを加え、ガラス棒でかき混ぜながら、沈殿してくる DNAをガラス棒に巻き取った。そして、80% ethanol、etherの順でDNAをすすいだ後、1.5-ml容ポリプロピレンチューブにガラス棒ごと挿入し、滅菌水を 100 µl 加え、一晚冷蔵庫でゆっくり溶解させた。

DNA溶液をNanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotomer (Technologies) によりDNA濃

度の測定を行った。そして、 OD_{260}/OD_{280} の値が 1.75 以上であるサンプルをGC 含量測定やDNA-DNAハイブリダイゼーション実験に用いた。

2-2 菌体脂肪酸分析

分析は MIDI 法に従った[2]。Reagent 1 (アルカリけん化液)、Reagent 2 (メチル化試薬)、Reagent 3 (抽出用溶媒)、Reagent 4 (洗浄液) を調製した。試薬の組成は Table 5-2 に示している。Trypticase soy broth 寒天培地に菌株を 30 °C、2 日間培養し、菌体をスクリーキャップ付試験管の底に塗付した。これに Reagent 1 を 1 ml 加え、キャップをしっかりと締めてボルテックスで約 10 秒間混合し、沸騰水に 5 分間保った。5 分経過したらボルテックスで約 10 秒間混合し、さらに沸騰水で 25 分間処理した。計 30 分間のアルカリけん化処理後、水道水で急冷した。そして、Reagent 2 を 2 ml 加え、キャップをしっかりと締めてボルテックスで約 10 秒間混合し、80 °C で 10 分間保った後、水道水で急冷した。その後、Reagent 3 を 1.25 ml 加え 10 分間回転振とう機でゆっくりと転倒混和後、下層である水層をパスツールピペットで取り除いた。最後に、Reagent 4 を 3 ml 加え 5 分間回転振とう機でゆっくりと転倒混和した。2,000 rpm で 3 分間遠心した後、上層の 2/3 をサンプルチューブに移し、これをガスクロマトグラフィー用の分析試料とした。分析には ChemStation (Agilent Technology) を用い、Sherlock によってデータを解析した。

2-3 キノン分析[3]

凍結乾燥菌体 300 mg をよく粉砕して 50-ml 容三角フラスコに入れた。それに chloroform-methanol (2:1, v/v) を約 30 ml 加えて、アルミホイルできつく蓋を閉

め、さらにその上からサランラップとアルミホイルで二重に全体を覆い、一晩暗室にてスターラーで一晩ゆっくり攪拌し、菌体成分を抽出した。抽出液を濾過し、50-ml 容ナス型フラスコに集めた。この際、ろ紙上の菌体を 10 ml の chloroform-methanol で 1 回すすいだ。この後、ロータリーエバポレーターで 35 °C に温めながら濃縮乾固した。ナス型フラスコ内の残渣に acetone を 4.5 ml 加え抽出し、その抽出液を 10-ml 容ナス型フラスコに移してロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。それから、200 μ l の ethyl alcohol で溶解した。

次に、蛍光剤入りシリカゲルTLC (Merck, Kiesel-gel 60F254, 20×20 cm) に抽出物を全量アプライし、なるべく遮光しながらhexane-diethyl ether (85:15, v/v) で約 1 時間展開した。対象として、市販のユビキノンと、メナキノンマーカであるビタミンK₁を用いた。展開後、プレートを十分風乾してから紫外線ランプ (254 nm) のもとでキノンのスポットを確認した。スポットを鉛筆でマークし、スパーテルでシリカゲルを削り取った。これを小三角フラスコに移しacetone を 4.5 ml加えた後、アルミホイルできつく蓋を閉め、さらにその上からサランラップとアルミホイルで二重に全体を覆い、一晩暗室にてスターラーで一晩ゆっくり攪拌した。その抽出液を遠心分離し、上清の約 8 割をガラスチューブに移した。窒素ガスを用いて濃縮乾固し、150 μ lの 99.5% ethanolで溶解させた。これを分析試料とし、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した。測定条件は、Table 5-3 に示す。また標準試料も高速液体クロマトグラフィーにかけ、その溶出時間から分析試料のキノンを決定した。

2-4 GC 含量測定[4, 5]

DNA量が 5 μ gとなるようにDNA溶液を分取しポリプロピレンチューブに移した。そして、全量が 10 μ lになるように滅菌水で調整した。調整したDNA溶液 10

μlを沸騰水に10分間保った後、直ちに氷冷して熱変性させた。これにヌクレアーゼP1溶液（Yamasa、ヌクレアーゼP1 0.1 mg/mlの40 mM CH₃COONa + 2 mM ZnSO₄緩衝液、pH 5.3）を10 μl加え、蓋を閉めてから軽く弾いて混ぜて数秒間遠心した。その後、ヒートブロックで50 °C、1時間反応させて、DNAをヌクレオチドにした。次に、アルカリフォスファターゼ溶液（Sigma、アルカリフォスファターゼ 2.4 units/mlの0.1 M Tris-HCl緩衝液、pH 8.1）を10 μl加え、蓋を閉めてから軽く弾いて混ぜて数秒間遠心した。そして、37 °C、6時間以上反応させ、ヌクレオシドにした。このヌクレオシド試料をHPLC分析に供した。測定条件は、Table 5-4に示す。まずは、ATGC等モル混合標準液（ヤマサ）をHPLCにかけた。この試料の4つのヌクレオシドのピークが等面積になるように補正值を算出した。次に分析試料をHPLCにかけ、先ほどの補正值を用いてGC含量を算出した。

2-5 DNA-DNA ハイブリダイゼーション

16S rDNAの相同値が97%以下は別種と判断してよい（つまり、DNA-DNAハイブリダイゼーションを行わなくても構わない）という原則に従い[6]、単離株と近縁既知種の間で、DNA-DNAハイブリダイゼーションを行った。M-07株に関しては、*Advenella mimigardefordensis* LMG 22922^T[7]、*Advenella kashmirensis* LMG 22695^T[8]、*Advenella incenata* LMG 22250^T[9]とM-07株との4株の間でDNA-DNAハイブリダイゼーションを行った。M-01株とM-11株に関しては、現在解析中であるが、*Pseudomonas xiamenensis* JCM 13530^T[10]、*Pseudomonas pertucinogena* JCM 11590^T[11]、*Pseudomonas bauzanensis* DSM 22258^T[12]、*Pseudomonas litoralis* KCTC 23093^T[13]とM-01株、M-11株を含めた6株の間で行っている。Negative controlに関しては、M-01株とM-11株の際は*Advenella incenata* LMG 22250^Tを用い、M-07株の際には*Pseudomonas xiamenensis* JCM 13530^Tを用い

た。

まず、マイクロプレートへのDNAの固定を行った。必要量のDNAを 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにTE buffer (Table 5-5) で希釈し、1.5-ml容ポリプロピレンチューブにとった。これを沸騰水中に 10 分間置いた後、直ちに氷水中で置いて急冷した。熱変性させたDNA溶液を 0.1 M MgCl_2 を含んだ 1×PBS溶液 (Table 5-5) で 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100 μl ずつ分注した。96 ウェルマイクロプレートはフルオロNuncプレート (マキシソープタイプ・ヌンク)を使用した。1 標識DNAに対して、1 株あたり 5 ウェルにDNAを固定した。分注したプレートを 28 °Cで 3 時間以上放置した。マイクロプレートをひっくり返して分注した溶液を捨て、水切りをした。そして、45 °Cで一晩乾燥させた。

次に、フォトビオチン標識 DNA の作成を行った。必要量の DNA を滅菌水で 1 mg/ml の濃度に希釈して、1.5-ml 容ポリプロピレンチューブに入れた。1 mg/ml の DNA 溶液 10 μl は 40 ウェル分に相当する。フォトビオチン溶液 (Vector, SP-1000)を等量加えて混合した。チューブを氷上に置き、低圧水銀ランプ(300W)照射下約 10 cm のところでチューブのふたを開けたまま 20 分間放置し、DNA にビオチンを標識した。この後、0.1 M Tris-HCl (pH 9.0) を 180 μl 加え、さらに 1-butanol を 200 μl 加えてよく攪拌し、16,000 x g で 10 秒間室温にて遠心した。上層の 1-butanol を取り除き、過剰のフォトビオチンを取り除いた。そして、遮光して凍結保存した。

次に、ハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション液 (Table 5-5) を 200 μl ずつ DNA プレートの各ウェルに分注し、37 °C で 30 分間置いた。その間に、標識したプローブ DNA 溶液を沸騰水中で 5 分間加熱後、直ちに氷冷し、超音波バスで 30 秒間処理した。処理した標識 DNA 溶液をハイブリダイゼーション液 (Table 5-5) に加えて良く混合した。10 ウェル分の標識 DNA 溶液に

対してハイブリダイゼーション液 10 ml という割合にした。この後、DNA プレートの前ハイブリダイゼーション液を捨て水切りを行い、標識 DNA を含むハイブリダイゼーション液を 100 μ l ずつウェルに分注した。プレートシール (MS-30010、住友ベークライト) を貼って密封した。ハイブリダイゼーション温度を次の式に従って計算し ($T_m - 45 = 69.3 + [G + C (\text{mol}\%)] \times 0.41 - 45$)、その結果、M-01 株と M-11 株に関するものは 50 $^{\circ}\text{C}$ で、M-07 株に関するものは 46 $^{\circ}\text{C}$ でハイブリダイゼーションを 3 時間以上行った。反応後、ハイブリダイゼーション液を捨て、各ウェルを 300 μ l の 1 \times SSC buffer で 3 回洗浄した。液を捨てる際はしっかり水切りを行った。

最後に、蛍光法によるハイブリッド DNA の定量を行った。Streptoavidin-酵素溶液 (Table 5-5) を 100 μ l ずつウェルに分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間置いた。その後、液を捨て、各ウェルを 300 μ l の 1 \times SSC buffer で 3 回洗浄した。液を捨てる際はしっかり水切りを行った。各ウェルに蛍光基質 (4MUF) 溶液 (Table 5-5) を 100 μ l ずつ分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応を始めた。15 分ごとに蛍光マイクロプレートリーダー (励起波長 360 nm、測定波長 450 nm) で各ウェルの蛍光強度を測定した。

相同性の計算をするにあたって、5 ウェルの測定値のうち、最大値と最小値を除いた 3 つの平均値より求めた。ネガティブコントロールをバックグラウンドとして差し引き、プローブに用いた株の DNA 同士をハイブリダイゼーションした際の値を 100%として相同性を計算した。計算式は以下に示す。

$$\text{DNA 相同性 (\%)} = 100 \times (\text{X}-\text{N}) / (\text{P}-\text{N})$$

X : 調べたい菌株 DNA の蛍光強度

P : プローブに用いた菌株 DNA の蛍光強度

N : ネガティブコントロールの蛍光強度

2-6 他の生理・生化学試験

(1) 細胞形態・鞭毛の観察

透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy) で細胞形態と鞭毛の観察を行った。使用したTEMはJEM1011 (JEOL) で、2%酢酸ウラン溶液にてネガティブ染色を行った。また、運動性に関しては、位相差顕微鏡 (Axioskop 2 plus; ZEISS) で確認した。

(2) オキシダーゼ活性試験

つまようじで菌体をかきとり、シトクロム c オキシダーゼ試験紙 (日水製薬) につけて、変色 (テトラメチル-p-フェニレンジアミンの酸化) をみた。

(3)カタラーゼ活性試験

スライドグラス上につまようじで菌体を塗布し、これに 3% H₂O₂溶液を添加して、泡の発生の有無を確認した。

(4) 生育温度域・生育 pH 域・生育 NaCl 濃度域試験

基礎培地に LB 寒天培地を用いた。生育温度域試験では、4~50℃の生育状態を見た。生育 pH 域試験では、pH 5~11の生育状態を見た。生育 NaCl 濃度域試験では、LB 培地に NaCl を適量加え、NaCl 濃度 0~15%での生育状態を見た。ただし、LB 培地自体に NaCl が 1%含まれているので、NaCl 0%の LB 培地は、Bacto Tryptone (Difco) と Bacto Yeast Extract (Difco) を混合させて作製した。

(5) APIZYM (bioMérieux)、API20NE (bioMérieux)、GN2 Microplate (Biolog) による試験

3つの同定キット (APIZYM、API20NE、GN2 Microplate) を用いた。全てキットのマニュアル通りに行った。APIZYM に関しては、チューブに菌液を加えた後、30℃で培養し、酵素試験 19 項目の判定を行った。API20NE に関しては、

同じくチューブに菌液を加えた後 30 °C で培養し、生化学的性状試験 8 項目と同化試験 12 項目の判定を行った。GN2 Microplate に関しては、ウェルに菌液を分注した後 30 °C で培養し、95 種類の炭素源資化の判定を行った。

(6) 色素産生試験[14]

King A 培地 (Table 5-6) に植菌して、37 °C で 24 時間培養し、さらに室温で 6 日間培養を行い、pyocyanin (青色) および pyorubin (赤色) の産生を確認した。また、King B 培地 (Table 5-6) に植菌して、37 °C で 24 時間培養し、さらに室温で 2~3 日間培養を行い、pyoverdin (蛍光性黄緑色) の産生を確認した。

(7) Starch 分解・カゼイン分解・DNA 分解試験

Starch 分解試験は、LB 培地に終濃度が 1% (w/v) となるように soluble starch を加えた寒天培地を作製し、菌株を植菌した。培養後、寒天培地に Lugol のヨウ素液 (Table 5-6) を滴下し、色の変化をみた。カゼイン分解試験は、2% (w/v) スキムミルク溶液と 2×LB 寒天培地を作製しそれぞれ滅菌後、等量混合した。菌株を植菌後、カゼイン分解による透明帯の有無をみた。DNA 分解試験は、DNA 寒天培地 (日本製薬) を作製し、菌株を植菌して DNA 分解による変色をみた。

(8) 亜硝酸脱窒試験

M-07 株と *Advenella* 属の type strain だけ行った。LB 液体培地に脱窒基質として安定同位体ラベルした亜硝酸ナトリウム $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (SIサイエンス株式会社) 10 mM を加えた培地を用い、この培地 9 ml を全容 27 ml の L 字試験管に分注し菌株を植菌した。植菌後、気相部を Ar ガス (鈴木商館) で充分置換した嫌気条件下において、30 °C、150 rpm で振とう培養した。培養途中で定期的に気相部のガスをサンプリングし、 $^{15}\text{N}_2 \cdot ^{15}\text{N}_2\text{O}$ の発生を確認した。

第3節 結果と考察

M-07 株の分類学的位置・新種 *Advenella faeciporci* の提案

Betaproteobacteria 綱の *Advenella* 属に属する M-07 株と、近縁既知種の基準株 *Advenella mimigardefordensis* LMG 22922^T、*Advenella kashmirensis* LMG 22695^T、*Advenella incenata* LMG 22250^T との、計 4 株との間で DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。その結果、M-07 株と、*A. mimigardefordensis* LMG 22922^T、*A. kashmirensis* LMG 22695^T、*A. incenata* LMG 22250^T との DNA 相同値はそれぞれ、7.2%、1.1%、5.3% と、10% 未満の低い DNA 相同値となったため、M-07 株は、これらの既知種とは別種であると判断し、*Advenella* 属の新種に属することが示唆された。

さらに、同定試験を進め、M-07 株が近縁既知種 3 種と生理学的・生化学的特徴で異なる点を Table 5-8 に列挙した。まず、大きく異なる点は GC 含量である。M-07 株の GC 含量は 49.5% であったが、これは *Advenella* 属の既知種の GC 含量 (53.5~58.0%) [7-9][15] に比べて 5% も低い値であった。他に、亜硝酸脱窒能を持っていることと、酸性ホスファターゼ活性とウレアーゼ活性を示さないことも他の 3 種と異なる。さらに、炭素源資化能に関しても大きく異なった。具体的には、glycogen、Tween 80、L-arabinose、D-galactose、 α -D-glucose、D-mannose、formic acid、D-galactonic acid lactone、D-galacturonic acid、D-gluconic acid、D-glucuronic acid、malonic acid、quinic acid、L-asparagine、L-aspartic acid、L-phenylalanine、gluconate は、既知種では資化能を有していたのに対して、M-07 株は資化能を有していなかった。

また、菌体脂肪酸組成の比較した表を Table 5-7 に示した。M-07 株と既知種 3 種との間で、基本的に脂肪酸構成は類似していた。しかし、M-07 株は、主要脂肪酸が C_{16:0}、summed feature 3、C_{17:0} cyclo、summed feature 2 であるのに対し、既

知種 3 種はC_{18:1ω7c}、summed feature 3、C_{16:0}であり、既知種に比べてC_{18:1ω7c}が 8.1%と少なかった。

顕微鏡観察では、M-07 株は、直径が 1.5–2 μm の球菌であり、運動性を示さないことが分かった。また、LB 寒天培地上では白色のコロニーを形成した。

以上の結果から、M-07 株を *Advenella* 属の新種であると同定し、本株を基準株とする *Advenella faeciporci* を提案した。以下に、*Advenella faeciporci* の性状を記載した。

Description of *Advenella faeciporci* sp. nov.

Advenella faeciporci (fa.e.ci.por'ci. L. n. *faex faecis*, faeces; L. gen. n. *porci*, of swine, pig; N.L. gen. n. *faeciporci*, from pig faeces, associated with the isolation origin).

Cells are Gram-negative, non-motile, and coccid-shaped (1.5–2 μm in length). Colonies grown on LB agar plates are white, circular, flat, entire, and rough. The temperature range for growth is 10–45 °C (optimum 25–35 °C). The pH range for growth is 5–11 (optimum 7–9). Growth occurs in the range of 0–4% NaCl. Capable of denitrifying nitrite but incapable of reducing nitrate. Positive for oxidase and catalase but negative for the Gram reaction, amylase, casein hydrolysis, DNase, indole production, acidification of glucose, arginine dihydrolase, urease, and gelatinase, aesculin hydrolysis, and β-galactosidase. In the API 20NE tests, the type strain can assimilate adipic acid, malic acid, citric acid, and phenylacetic acid. According to the Biolog GN2 system, the type strain can assimilate methylpyruvate, monomethyl succinate, acetic acid, *cis*-aconitic acid, citric acid, α-hydroxybutyric acid, β-hydroxybutyric acid, itaconic acid, α-ketobutyric acid, α-ketoglutaric acid, α-ketovaleric acid, D,L-lactic acid, propionic acid, sebacic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, succinamic acid, glucuronamide, alaninamide, D-alanine, L-alanine, L-alanyl-glycine, L-glutamic acid,

L-leucine, L-ornithine, L-proline, and L-threonine. DNA G + C content of the type strain is 49.5 mol%. The major fatty acids are C_{16:0} (33.3%), summed feature 3 (comprising C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH) (20.5%), C_{17:0} cyclo (16.8%), summed feature 2 (comprising C_{14:0} 3-OH and/or iso-C_{16:1} I) (9.3%), and C_{18:1}ω7c (8.1%). The major isoprenoid quinone is Q-8.

The type strain, M-07^T (=JCM 17746^T=KCTC 23732^T), was isolated from nitrifying-denitrifying activated sludge collected from a laboratory scale bioreactor treating piggery wastewater.

M-01 株と M-11 株の分類学的位置

M-01 株と M-11 株は *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属に属しているが、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行っていないため、現時点では *Pseudomonas* 属の新種かどうかは判断できない。

M-01 株と M-11 株の菌体脂肪酸の主要成分はどちらも C_{18:1}ω7c、C_{16:0}、C_{17:0} cyclo であった。 *Pseudomonas xiamenensis* JCM 13530^T とは C_{19:0} cyclo ω8c で、 *Pseudomonas pertucinogena* DSM 18268^T とは C_{18:1} ω7c と C_{19:0} cyclo ω8c で、 *Pseudomonas litoralis* 2SM5^T とは C_{17:0} cyclo と summed feature 3 で、量に違いが見られた。 *Pseudomonas bauzanensis* BZ93^T とは脂肪酸構成にかなりの違いが見られた。 *Pseudomonas pertucinogena* DSM 18268^T と *Pseudomonas bauzanensis* BZ93^T に関しては培養時間 3 日と長めであることが脂肪酸構成の違いを生み出しているのかもしれない。

M-01 株・M-11 株と近縁既知種 4 種との生理学的・生化学的特徴で異なる点を Table 5-10 に列挙した。M-01 株が他の 5 株と明らかに異なる点は bromosuccinic acid を資化できないことである。M-11 株が他の 5 株と異なる特徴は存在しなかつ

ったが、最も近縁である既知種 *Pseudomonas xiamenensis* と *Pseudomonas bauzanensis* とは、 α -ketobutyric acid と citric acid を資化できない点が異なった。もう少し生理学的・生化学的特徴に関しては調べる必要がある。

顕微鏡観察では、M-01 株は $0.5\text{-}1.0\ \mu\text{m}\times 1.0\text{-}2.0\ \mu\text{m}$ の桿菌で 1 本の鞭毛を持っており、運動性を示す、そして、M-11 株は $0.7\text{-}1.0\ \mu\text{m}\times 0.8\text{-}1.5\ \mu\text{m}$ の球菌または桿菌で 1 本の鞭毛を持っており、運動性を示すことが分かった。どちらの株も LB 寒天培地上では白色のコロニーを形成した。

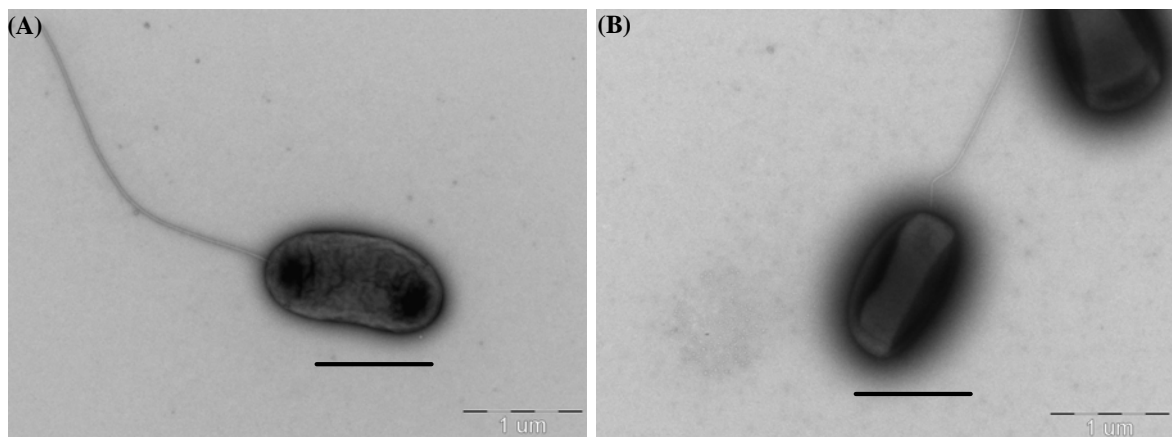


Fig. 5-1. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による M-01 株と M-11 株の細胞形態と鞭毛の様子 (Bar, $1.0\ \mu\text{m}$)

M-08 株の分類学的位置・新属 *Aenigmabacter yayoiensis* の提案

M-08 株は、16S rDNA 配列による系統学的解析から、*Gammaproteobacteria* 綱 *Pseudomonadaceae* 科に属していた。しかし、既知種との低い相同値 (93.6%以下) と系統学的位置から、*Pseudomonadaceae* 科の新属であることが示唆された。さ

らに、M-08株は、キノンQ-8を持っていることが分かったが、これは*Pseudomonas*属や*Azomonas*属で一般的であるQ-9 [16]とは異なった。このキノンの結果は、M-08株が*Pseudomonadaceae*科の新属であることの強い証拠となる。*Cellvibrio*属に関してはキノンの報告は今までされていない。

M-08株と*Pseudomonadaceae*科に属する既知種との生理学的・生化学的特徴の比較をTable 5-12に示した。ただし、*Azomonas*属、*Azotobacter*属、*Azorhizophilus*属の生理学的・生化学的特徴の報告はほとんどされていないため、表に記載しなかった。*Pseudomonas*属と大きく異なる点は、キノン以外に、gelatinとaesculinを加水分解できること、5%のNaClでは生育できないこと、ほとんどの炭素源を資化できないこと（特にAPI20NEにある炭素源は全て資化できない）であった。*Cellvibrio*属と大きく異なる点は、starchを加水分解できないこと、糖類（L-arabinose、N-acetylglucosamine、D-maltose）を資化できないこと、GC含量であった。

M-08株のGC含量は、58.1%であったが、この値はほとんどの*Pseudomonas*属で報告されているGC含量の範囲である[17]。M-08株の菌体脂肪酸の主要成分はC_{18:1}ω7c、C_{16:0}、summed feature 3であったが（Table 5-11）、これは今まで報告されている*Pseudomonas*属と*Cellvibrio*属の菌体脂肪酸の主要成分とほぼ同じであった（Table 5-12）。また、*Pseudomonas*属に特有である脂肪酸であるC_{10:0} 3-OH and C_{12:0} 3-OH [16]はM-08株にも見られた。*Azomonas*属、*Azotobacter*属、*Azorhizophilus*属の菌体脂肪酸分析の報告はされていなかった。

顕微鏡観察では、M-08株は0.5-0.8 μm×1.1-1.7 μmの桿菌で1本の鞭毛を持っており、運動性を示すことが分かった。LB寒天培地上では白色のコロニーを形成した。

以上の結果から、M-08株を*Pseudomonadaceae*科の新属であると同定し、本株を基準株とする*Aenigmabacter yayoiensis*を提案した。以下に、*Aenigmabacter* 並

びに *Aenigmabacter yayoiensis* の性状を記載した。

Description of *Aenigmabacter* gen. nov.

Aenigmabacter (ae.nig.ma.bac'ter. N.L. n. *aenigma* mystery; N.L. masc. n. *bacter* rod; N.L. masc. n. *Aenigmabacter* a mysterious rod).

Each cell is Gram-negative, aerobic, rod-shaped, 0.5-0.8 μm wide and 1.1-1.7 μm long, and uses a single polar flagellum for motility. Oxidase- and catalase-positive. The DNA G + C content is 58.1 mol%. Major fatty acids are C_{18:1 ω 7c}, C_{16:0}, and summed feature 3. The isoprenoid quinone is Q-8. The type species is *Aenigmabacter yayoiensis*.

Description of *Aenigmabacter yayoiensis* sp. nov.

Aenigmabacter yayoiensis (ya.yo.i.en'sis. N.L. fem. adj. *yayoiensis* of Yayoi, in Japan, where the type strain was isolated).

The description is the same as for the genus. In addition, the species displays the following properties. Colonies grown on LB agar plates are white, punctiform, convex, entire, and smooth. The cells produce no pyocyanin or fluorescent pigment on King A or King B medium. The temperature range for growth is 10-40 °C (optimum 30-35 °C). Growth does not occur at 4 °C and 42 °C. The pH range for growth is 6.0-11.0 (optimum 7.0-8.0). Growth occurs in the range of 0-4 % NaCl. Capable of denitrifying nitrite but not reducing nitrate. Negative for amylase, casein hydrolysis, and DNase. In the API ZYM system, the type strain is positive for alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and negative for lipase (C14), cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, acid phosphatase, α -galactosidase, β -galactosidase,

β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase, and α -fucosidase. In the API 20NE tests, the type strain is positive for aesculin hydrolysis and gelatin hydrolysis and negative for indole production, acidification of glucose, arginine dihydrolase, urease, and assimilation of glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, *N*-acetylglucosamine, D-maltose, gluconate, capric acid, adipic acid, malic acid, citric acid, and phenylacetic acid. According to the Biolog GN2 system, the type strain can assimilate Tween 80, methypyruvate, mono-methyl succinate, acetic acid, α -hydroxybutyric acid, α -ketobutyric acid, α -ketoglutaric acid, D,L-lactic acid, malonic acid, propionic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, D-alanine, and L-alanine.

The type strain, M-08^T (=JCM 17747^T=KCTC 23731^T), was isolated from nitrifying-denitrifying activated sludge collected from a laboratory scale bioreactor treating piggery wastewater.

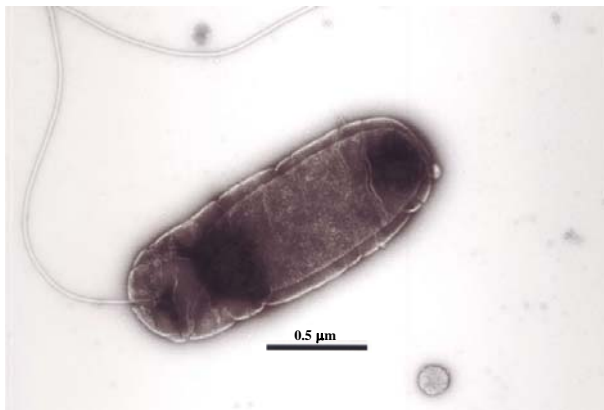


Fig. 5-2. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による M-08 株の細胞形態と鞭毛の様子 (Bar, 0.5 μ m)

Table 5-1. DNA 抽出に用いた試薬

試薬	組成
Saline-EDTA	0.15 M NaCl 0.1 M EDTA pH 8.0
Tris-SDS buffer	1 M Tris-HCl (pH 8.0) SDS 10% (wt/vol)
1×SSC buffer	150 mM NaCl 15 mM trisodium citrate pH 7.5
RNase A solution	RNase A (10 mg/ml) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 15 mM NaCl ※溶解後、100 °C、15 分間の加熱処理で RNase を失活させた。
RNase T ₁ solution	RNase T ₁ (400 units/ml) 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
Proteinase K solution	Proteinase K 4 mg/ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

Table 5-2. 菌体脂肪酸分析に用いた試薬

試薬	組成
Reagent 1	Sodium hydroxide 45 g Methanol (HPLC grade) 150 ml Deionized distilled water 150 ml
Reagent 2	6 N Hydrochloric acid 325 ml Methanol (HPLC grade) 275 ml
Reagent 3	Methyl tert-butyl ether (HPLC grade) 200 ml Hexane (HPLC grade) 200 ml
Reagent 4	Sodium hydroxide 10.8 g Deionized water 900 ml

Table 5-3. キノン分析の際の HPLC 条件

機器	: High performance liquid chromatography C-R6A (Shimadzu)
カラム	: Cosmosil 5C18 column (4.6×250 mm) (Nacalai Tesque)
カラム温度	: 40 °C
移動相	: Methanol-isopropanol (2:1, v/v)
流速	: 1.0 ml/min
検出波長	: 275 nm

Table 5-4. GC 含量測定の際の HPLC 条件

機器	: High performance liquid chromatography C-R6A (Shimadzu)
カラム	: Cosmosil 5C18column (4.6×250 mm) (Nacalai Tesque)
カラム温度	: 40 °C
移動相	: 0.2 M NH ₄ H ₂ PO ₄ - CH ₃ CN (40:1, v/v)
流速	: 1.0 ml/min
検出波長	: 270 nm

Table 5-5. DNA-DNA ハイブリダイゼーションに用いた試薬

試薬	組成
20×SSC (pH 7.5)	3 M NaCl 0.3 M Trisodium citrate
TE buffer (pH 8.0)	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
20×PBS	2.74 M NaCl 27 mM KCl 0.2 M Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 36 mM KH ₂ PO ₄
Pre-hybridization solution (For 10 ml)	20×SSC 1.0 ml 50×Denhardt 1.0 ml Denaturated salmon DNA* (10 mg/ml) 0.1 ml Formamide 5 ml Distilled water 2.9 ml *プレハイブリダイゼーション液に加える直前に、沸騰水に5分間置き、直ちに氷水中に置いて急冷してDNAを熱変性させる。
Hybridization solution (For 10 ml)	Pre-hybridization solution 10.0 ml Dextran sulfate 0.25 g
Streptoavidin-酵素溶液 (For 10 ml)	Streptoavidin-β-D-galactosidase conjugate (1 U/μl) 10 μl BSA (fraction V) 0.05 g 1×PBS 10 ml
蛍光基質溶液 (For 10 ml)	4-Methylumbelliferyl- β-D-galactopyranosid solution† 100 μl 1 M MgCl ₂ 10 μl 1×PBS 10 ml †Dimethylformamide に 10 mg/ml の濃度になるように溶解した。

Table 5-6. その他の同定実験で用いた培地や試薬

培地・試薬	組成
King A medium (pH 7.2)	Peptone 2% MgCl ₂ 0.14% (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% Agar 1.5%
King B medium (pH 7.2)	Proteose peptone 2% K ₂ HPO ₄ 0.15% MgSO ₄ 0.15% Agar 1.5%
Lugol's iodine solution	I ₂ 5% KI 10% ※使用時は5倍に希釈
DNA agar plate	Peptone 1.5% Soy peptone 0.5% NaCl 0.5% DNA 0.2% Toluidine Blue O 0.01% Agar 1.5%

Table 5-7. M-07 株と *Advenella* 属の既知種 3 種との菌体脂肪酸組成の比較

Strains: 1, strain M-07 (data from this study); 2, *Advenella incenata* LMG 22250^T [9]; 3, *Advenella kashmirensis* LMG 22695^T [8]; 4, *Advenella mimigardefordensis* LMG 22922^T [7]. -, not detected or <1% of the total fatty acid content.

Fatty acid	1	2	3	4
Saturated fatty acids				
C _{12:0}	2.9	4.6	3.1	4.5
C _{16:0}	33.3	21.7	21.7	18.2
C _{17:0}	1.2	-	-	-
C _{18:0}	-	1.2	1.9	2.1
Unsaturated fatty acids				
C _{18:1} ω7c	8.1	24.6	28.3	26.5
Hydroxy fatty acids				
C _{16:0} 3-OH	-	1.2	-	3.3
Cyclopropane acids				
C _{17:0} cyclo	16.8	9.2	3.5	4.8
C _{19:0} cyclo ω8c	1.4	4.0	1.3	2.6
Summed feature 2*	9.3	12.9	10.1	13.3
Summed feature 3†	20.5	21.3	28.0	23.3

*Summed feature 2 comprised C_{14:0} 3-OH and/or iso-C_{16:1} I, an unidentified fatty acid with an equivalent chain length of 10.928 or 12:0 ALDE, or any combination of these fatty acids.

†Summed feature 3 comprised C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH.

Table 5-8. M-07株と *Advenella* 属の既知種3種との生理学的・生化学的特徴の比較

Strains: 1, strain M-07^T; 2, *A. incenata* LMG 22250^T; 3, *A. kashmirensis* LMG 22695^T; 4, *A. mimigardefordensis* LMG 22922^T. Data are from this study. +, Positive; -, negative.

Characteristic	1	2	3	4
Reduction of nitrate to nitrite (API 20NE)	-	-	+	-
Denitrification from nitrite	+	-	-	-
Urease (API 20NE)	-	+	+	+
Enzymatic activities (API ZYM)				
Cystine arylamidase	-	+	-	-
Acid phosphatase	-	+	+	+
Assimilation of (Biolog GN2)				
Glycogen, Tween 80, D-galactose, α -D-glucose, D-mannose, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucuronic acid, malonic acid, quinic acid, L-asparagine, L-aspartic acid, L-phenylalanine	-	+	+	+
L-Fucose, γ -aminobutyric acid	-	-	+	+
α -Ketoglutaric acid	+	+	-	+
α -Ketovaleric acid	+	-	-	+
Glycyl-L-aspartic acid, glycyl-L-glutamic acid	-	-	+	-
L-Serine, D-saccharic acid, hydroxy L-proline	-	+	+	-
L-Threonine	+	+	-	-
Glycerol, glucose 6-phosphate, γ -hydroxybutyric acid	-	+	-	+
Assimilation of (API 20NE)				
L-Arabinose, gluconate	-	+	+	+
Phenylacetic acid	+	-	-	-
DNA G + C content (mol%)	49.5	54.2	55.1	55.1

In the API ZYM test, all species were positive for alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, but negative for lipase (C14), trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, and α -fucosidase. In the API 20NE test, all species were positive for assimilation of adipic acid, malic acid, and citric acid, but negative for indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, aesculin hydrolysis, gelatin hydrolysis, β -galactosidase, and the assimilation of D-mannose, D-mannitol, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-maltose, and capric acid. In the Biolog GN2 test, all species were positive for methylpyruvate, monomethyl succinate, acetic acid, *cis*-aconitic acid, citric acid, α -hydroxybutyric acid, β -hydroxybutyric acid, itaconic acid, α -ketobutyric acid, D,L-lactic acid, propionic acid, sebacic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, succinamic acid, glucuronamide, alaninamide, D-alanine, L-alanine, L-alanyl-glycine, L-glutamic acid, L-leucine, L-ornithine, and L-proline, but negative for α -cyclodextrin, dextrin, Tween 40, *N*-acetyl-D-galactosamine, *N*-acetyl-D-glucosamine, adonitol, L-arabinose, D-arabitol, cellobiose, L-erythritol, D-fructose, gentiobiose, *myo*-inositol, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-mannitol, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-psicose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, turanose, xylitol, D-glucosaminic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid, L-histidine, L-pyroglutamic acid, D-serine, D,L-carnitine, urocanic acid, inosine, uridine, thymidine, phenylethylamine, putrescine, 2-aminoethanol, 2,3-butanediol, D,L- α -glycerol phosphate, and glucose-1-phosphate.

Table 5-9. M-01 株・M-11 株と *Pseudomonas* 属の近縁既知種との菌体脂肪酸組成の比較

Strains: 1, strain M-01 (data from this study); 2, strain M-11 (data from this study); 3, *Pseudomonas pertucinogena* DSM 18268^T [18]; 4, *Pseudomonas xiamenensis* JCM 13530^T (data from this study); 5, *Pseudomonas bauzanensis* BZ93^T [12]; 6, *Pseudomonas litoralis* 2SM5^T [13]. -, not detected or <1% of the total fatty acid content.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6
Saturated fatty acids						
C _{12:0}	7.7	7.2	4.5	8.3	-	7.9
C _{14:0}	1.5	-	-	-	-	-
C _{15:0}	-	-	2.4	-	-	-
C _{16:0}	19.9	21.9	11.4	17.3	9.9	18.5
C _{17:0}	-	-	2.4	-	-	-
C _{18:0}	-	-	-	-	-	1.2
Unsaturated fatty acids						
C _{16:1} ω5c	-	-	1.5	-	-	-
C _{18:1} ω5c	-	-	1.3	-	-	-
C _{18:1} ω7c	25.5	25.6	8.8	22.8	54.8	32.6*
Branched fatty acids						
iso-C _{17:0}	1.3	-	3.7	-	-	-
Hydroxy fatty acids						
C _{10:0} 3-OH	2.1	1.3	2.0	2.8	-	3.0
C _{12:0} 3-OH	3.1	3.0	2.8	2.6	-	4.2
Cyclopropane acids						
C _{17:0} cyclo	15.8	18.9	26.4	16.7	7.4	8.9
C _{19:0} cyclo ω8c	8.6	8.6	23.1	21.1	-	1.8
Summed feature 3†	8.9	9.9	2.4	3.1	10.3	18.1**

*Values of $C_{16:1\omega7c}/C_{16:1\omega6c}$.

†Summed feature 3 comprised $C_{16:1\omega7c}$ and/or iso- $C_{15:0}$ 2-OH.

**Values of $C_{18:1\omega7c}/C_{18:1\omega6c}$.

Table 5-10. M-01株・M-11株と*Pseudomonas*属の近縁既知種との生理学的・生化学的特徴の比較

Strains: 1, strain M-01^T (data from this study); 2, strain M-11^T (data from this study); 3, *Pseudomonas pertucinogena* JCM 11590^T (data from this study); 4, *Pseudomonas xiamenensis* JCM 13530^T (data from this study); 5, *Pseudomonas bauzanensis* BZ93^T [12]; 6, *Pseudomonas litoralis* 2SM5^T [13]. +, Positive; -, negative; d, strain-dependent; ND, no data available.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Growth at 40 °C	+	+	+	+	-	-
Growth at pH 9	+	+	-	+	-	ND
Tolerance of 8% NaCl	+	+	-	+	+	+
Tolerance of 10% NaCl	-	+	-	-	+	+
Reduction of nitrate to nitrite (API 20 NE)	+	-	-	+	-	-
Enzymatic activities (API ZYM)						
Alkaline phosphatase	-	+	-	-	+	-
Esterase (C4), Acid phosphatase	+	+	+	+	+	-
Lipase (C14), Valine arylamidase	+	+	+	+	w	-
Cystine arylamidase, Trypsin, α-chymotrypsin	+	+	+	+	-	-
Assimilation of (API 20NE)						
Capric acid	-	+	-	+	+	+
Adipic acid	-	+	+	-	+	+
Malic acid	+	+	+	+	+	-
Citric acid	-	-	-	+	+	-
Assimilation of (Biolog GN2)						
L-Arabinose, α-ketovaleric acid	-	-	-	+	ND	-
Acetic acid	+	+	-	+	ND	+
α-Hydroxybutyric acid, <i>cis</i> -aconitic acid, quinic	-	+	-	+	ND	-

acid, D-serine						
β -Hydroxybutyric acid	-	-	+	+	ND	-
Itaconic acid	-	+	-	-	+	-
γ -Hydroxybutyric acid	+	-	+	-	-	-
α -Ketobutyric acid	-	-	+	+	+	-
D,L-Lactic acid	-	+	-	+	ND	+
Succinamic acid	-	+	+	-	ND	w
Alaninamide	-	+	+	-	ND	d
L-Glutamic acid	-	+	+	-	ND	+
L-Proline	-	-	-	+	ND	w
L-Erythritol, D-Galacturonic acid	-	-	-	-	-	w
D-Glucuronic acid, L-leucine	-	-	-	-	ND	w
Bromosuccinic acid	-	+	+	+	ND	+
L-Serine	-	-	-	+	w	-
γ -Aminobutyric acid	-	-	+	-	ND	-

In the API ZYM test, all species were positive for esterase lipase (C8), leucine arylamidase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, but negative for α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, and α -fucosidase. In the API 20NE test, all species were negative for indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, urease, aesculin hydrolysis, gelatin hydrolysis, β -galactosidase, and the assimilation of L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, *N*-acetyl-D-glucosamine, D-maltose, gluconate, and phenylacetic acid. In the Biolog GN2 test, all species were positive for Tween 40, Tween 80, methylpyruvate, but negative for α -cyclodextrin, glycogen, *N*-acetyl-D-glucosamine, cellobiose, α -D-lactose, D-mannitol, β -methyl-D-glucoside, D-galactonic acid lactone, D-glucosaminic acid, L-asparagine, glycyl-L-glutamic acid, L-phenylalanine, L-threonine, phenylethylamine, putrescine, D,L- α -glycerol phosphate, and glucose-1-phosphate.

Table 5-11. M-08株の菌体脂肪酸組成

Data are from this study. Values are percentages of total fatty acids (>1 %).

Fatty acid	Strain M-08^T
Saturated fatty acids	
C _{12:0}	8.0
C _{14:0}	2.8
C _{16:0}	23.0
Unsaturated fatty acids	
C _{18:1} ω7c	35.0
Branched fatty acids	
iso-C _{14:0}	1.4
iso-C _{15:0}	1.3
Hydroxy fatty acids	
C _{10:0} 3-OH	4.1
C _{12:0} 3-OH	2.7
Summed feature 3*	16.3

*Summed feature 3 comprised C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH.

Table 5-12. M-08 株と *Pseudomonadaceae* 科に属する既知種との生理学的・生化学的特徴の比較 (表は次頁)

Species: 1, *Aenigmabacter yayoiensis* gen. nov., sp. nov. (strain M-08^T; data from this study); 2, *Pseudomonas caeni* [19]; 3, *Pseudomonas pertucinogena* (data from this study and [10][11][18]); 4, *Pseudomonas sabulinigri* [18]; 5, *Pseudomonas pachastrellae* [18][20]; 6, *Pseudomonas aeruginosa* [19][21]; 7, *Pseudomonas stutzeri* [19][21]; 8, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [19][22]; 9, *Pseudomonas mendonica* [19][22]; 10, *Pseudomonas taenensis* [23]; 11, *Pseudomonas borbori* [24]; 12, *Pseudomonas putida* [19][21][25]; 13, *Pseudomonas fluorescens* [19][21][25]; 14, *Pseudomonas chlororaphis* [25]; 15, *Cellvibrio fulvus* [26]; 16, *Cellvibrio vulgaris* [26]. +, Positive; -, negative; d, strain-dependent; ND, no data available. All species were positive for motility via one or several polar flagella, oxidase, and catalase, but negative for Gram staining, indole production, and urease.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Pyocyanin production	-	ND	-	-	-	+	-	-	-	-	ND	-	-	ND	ND	ND
Fluorescein production	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Nitrate reduction	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Denitrification from nitrate	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	ND	-	-	ND	-	-
Growth at 4 °C	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	d (-)
Growth at 42 °C	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance to 5 % NaCl	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	-	-
Acidification of glucose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	ND	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Hydrolysis of																
Gelatin	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Starch	-	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	-	+	+
Aesculin	+	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	-	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
Assimilation as carbon source																
Glucose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND
L-Arabinose	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
D-Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d (-)
N-acetylglucosamine	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Maltose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+

Gluconate	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Capric acid	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	d (+)	+	+	+	-	-
Adipic acid	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malic acid	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	d (+)	+	+	+	-	-
Citric acid	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d (-)	+	+	+	-	-
DNA G + C content (mol%)	58.1	50.1- 51.1	60	58.1	61.1- 61.5	66.6	62.5- 64.3	61.9- 63.7	62.3- 63.5	57.6	60.7	61.5- 62.3	59.5- 61.1	62.5- 63.9	44.6	44.9
Isoprenoid quinone	Q-8	ND	Q-9	ND	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	Q-9	ND	Q-9	Q-9	Q-9	ND	ND
Main fatty acids*	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

*A, C_{16:0}, C_{18:1}ω7c, and summed feature 3; B, C_{16:0}, C_{17:0} cyclo, and C_{19:0} cyclo ω8c .

参考文献

1. **Saito, H., and K. Miura.** 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**:619-629.
2. **MIDI** 2005. *Sherlock Microbial Identification System Operating Manual*, version 6.0. Newark, DE: MIDI Inc.
3. **Xie, C. H., and A. Yokota.** 2003. Phylogenetic analysis of *Lampropedia hyalina* based on the 16S rRNA gene sequence. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**:345–349.
4. **Mesbah, M., U. Premachandran, et al.** 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:159-167.
5. **Tamaoka, J., and K. Komagata.** 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:125-128.
6. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1984. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **44**:846-9.
7. **Wübbeler, J. H., T. Lütke-Eversloh, et al.** 2006. *Tetrathiobacter mimigardefordensis* sp. nov., isolated from compost, a betaproteobacterium capable of utilizing the organic disulfide 3, 3'-dithiodipropionic acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1305-1310.
8. **Ghosh, W., A. Bagchi, et al.** 2005. *Tetrathiobacter kashmirensis* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1779-1787.
9. **Coenye, T., E. Vanlaere, et al.** 2005. *Advenella incenata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Alcaligenaceae*, isolated from various clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:251-256.
10. **Lai, Q. and Z. Shao.** 2008. *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:1911-15.
11. **Kawai, Y., and E. Yabuuchi.** 1975. *Pseudomonas pertucinogena* sp. nov., an organism previously misidentified as *Bordetella pertussis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**:317-23.
12. **Zhang, D. C., H. C. Liu, et al.** 2011. *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:2333-7.
13. **Pascual, J., T. Lucena, et al.** 2011. *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Published ahead of print.

14. King, E. O., M. K. Ward, et al. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301–307.
15. Gibello, A., A. I. Vela, et al. 2009. Reclassification of the members of the genus *Tetrathlobacter* Ghosh et al. 2005 to the genus *Advenella* Coenye et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1914-1918.
16. Oyaizu, H., and K. Komagata. 1983. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**:17-40.
17. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
18. Kim, K. H., S. W. Roh, et al. 2009. *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:38-41.
19. Xiao, Y. P., W. Hui, et al. 2009. *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:2594-8.
20. Romanenko, L. A., M. Uchino, et al. 2005. *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:919–24.
21. Clark, L. L., J. J. Dajcs, et al. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:709-714.
22. Park, Y. D., H. Yi, et al. 2006. *Pseudomonas segetis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2593–5.
23. Lee, D. H., S. R. Moon, et al. 2010. *Pseudomonas taeanensis* sp. nov., isolated from a crude oil-contaminated seashore. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2719-23.
24. Vanparys, B., K. Heylen, et al. 2006. *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borbori* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1875-81.
25. Burr, S. E., S. Gobeli, et al. 2010. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* subsp. nov., isolated from freshwater fish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2753-7.
26. Mergaert, J., D. Lednická, et al. 2003. Taxonomic study of *Cellvibrio* strains and description of *Cellvibrio ostraviensis* sp. nov., *Cellvibrio fibrivorans* sp. nov. and *Cellvibrio gandavensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:465-71.

総括

本研究では、養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥から、 N_2O 抑止効果をもたらす有用脱窒菌を単離しバイオオーギュメンテーションに利用することで、養豚糞尿廃水処理場での N_2O 発生を抑止することを目的とした。現場での巨大なスケールでのバイオオーギュメンテーションを成功させる際に大きな鍵を握るのは、まず、バイオオーギュメンテーションのために外部から添加する微生物が内在している微生物群との生存競争に駆逐されないで定着できることであった。そして、廃水処理場の脱窒工程における N_2O 発生要因として N_2O の酸素による阻害、亜硝酸の蓄積、低いC/N比であること（電子供与体不足）が挙げられるが、そのような N_2O 発生要因が存在する環境下でもその微生物の持つ N_2O 抑止能がいかに発揮されることであった。

それを踏まえ、廃水処理場の環境に似たPM培地を用いた N_2O 集積培養により活性汚泥からスクリーニングを行ったところ、有用脱窒菌M-01株とM-11株の単離に成功した。両株は N_2O 還元酸素耐性が強く、亜硝酸からの脱窒で N_2O を全く放出しなかった。つまり、両株は、亜硝酸や酸素といった N_2O 発生要因が存在する環境下でも強い N_2O 還元能を有しており、この能力が廃水処理場の N_2O 抑止をもたらすのではないかと考えた。ちなみに、M-01株は、亜硝酸からの脱窒能が非常に弱い N_2O 還元能は強いという珍しい脱窒特性を、M-11株は、亜硝酸脱窒能、 N_2O 還元能ともに強いという脱窒特性を、有していた。さらに、脱窒基質として亜硝酸と N_2O が共存下にある培養では、両株は亜硝酸よりも N_2O を優先的に消費した。M-01株は脱窒特性からその結果が想像できるが、M-11株に関しては、亜硝酸脱窒がおきているところに N_2O を添加すると、亜硝酸からの脱窒が阻害され N_2O 還元が優先されるという、今までにない現象が観察された。この、亜硝酸よりも N_2O を優先的に利用する脱窒特性が廃水処理場の N_2O 発生抑止に

重要な役割を示すのではないかと考えた。

これらM-01 株とM-11 株を試験管レベルで活性汚泥とのバイオオーギュメンテーションに利用したところ、高い N_2O 抑止効果が認められた。さらに、廃水処理場への添加を想定し、嫌気的な脱窒槽の運転を模倣したメスシリンダーでの連続運転においても、両株は高い N_2O 抑止効果が実証された、廃水処理の N_2O 発生抑止に大きな期待が持てる結果となった。特に、M-01 株は、培養を通して生残性を維持していたことから、長期に渡って廃水処理場で N_2O 抑止に貢献できる可能性を秘めていた。近年、亜硝酸型硝化脱窒処理といった新たな処理方法が考案されている。これは硝化工程で廃水中のアンモニアからの硝化を亜硝酸にとどめ、蓄積した亜硝酸から脱窒工程で窒素除去を行う方法で、省エネルギーかつ低コストといった利点が挙げられる。特に、この方法は、養豚糞尿のような、高濃度のアンモニアを含む廃水や低いC/N比の廃水进行处理するには好都合である。一方、処理過程において亜硝酸が蓄積するがゆえに N_2O 発生が増大することが大きな問題であった。しかし、M-01 株とM-11 株の、 N_2O 還元酸素耐性が高く、亜硝酸よりも N_2O を優先的に利用する脱窒特性を利用すれば、この問題もクリアできる可能性がある。実際の廃水処理場でのバイオオーギュメンテーションによる N_2O 発生抑止の成功例がないことから、本実験結果は地球環境の保全に向けた N_2O 発生抑止への大きな一歩となるであろう。

謝辞

常に適切なお鞭撻とご助言を下さり、懇切なるご指導を賜りました東京大学農学部生命科学研究科応用生命工学専攻 祥雲弘文名誉教授に心から御礼申し上げます。研究に対する姿勢を教えて頂いたことが現在の研究生活に大きく活きております。

研究の随所において、有益なお助言を賜りました同専攻 若木高善教授に心から御礼申し上げます。自分勝手な行動が多々ありながらも、常に温かい目で見守っていただき本当に感謝しております。

研究室の円滑な運営にご尽力下さり、また大部屋ゼミでは有益なお助言を賜りました同専攻 伏信進矢准教授に心から御礼申し上げます。私の研究を全力でサポートして下さったこと、深く感謝しております。

系統分類学的研究を行うにあたり、丁寧なお指導を賜りました同専攻 横田明准教授、並びに、安善榮博士、朴相和博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、活性汚泥を提供して下さいました荏原製作所 渡辺昭氏に御礼申し上げます。

常に研究室の雑務を笑顔でこなし、研究室生活を楽しいものにして頂きました、同専攻酵素学研究室秘書 藤本海音氏、濱田倫子氏、黒木成子氏に深く感謝いたします。

指導して下さいました酵素学研究室の諸先輩方に深く感謝いたします。特に、学部 4 年時から実験操作などを一から教えて下さり、忙しい中でも面倒を見て下さいました宮原盛雄氏、周勝敏博士に深く感謝いたします。また、多くのアドバイスを下さり、私の無知な質問にも真摯に答えて頂きました金尚完博士に心より感謝申し上げます。

学部 4 年時からの 2 年間隣の席で親しくして頂き、公私にわたって楽しい学

生生活にして頂きました、黒瀬太造氏に感謝いたします。

研究室生活を楽しく有意義なものにして下さった、同期、後輩方に深く感謝いたします。個性溢れる愉快な方が多く、共に楽しい時間を過ごすことができたことを嬉しく思っております。

最後に、私の学生生活を常に支え続け、暖かく見守って下さった両親、兄弟に心から感謝いたします。