

硝酸イオンを吸収する微生物の探索 Screening the bacteria that ingest nitrate ion

太田 光昭^{*} 村上周一郎^{*} 登尾浩助^{*}

1. 背景と目的

一酸化二窒素は二酸化炭素の 200~300 倍もの温室効果をもち、年々増加傾向にある (Takaya *et al.* 2003)。増加の原因には化石燃料の燃焼の他、下水処理場や農耕地での脱窒反応が挙げられる。脱窒反応は硝酸イオン (NO_3^-) を窒素ガスにまで還元する嫌氣的反応であるが、下水処理場や農耕地のような好気条件下では抑制され、中間体の一酸化二窒素が放出される傾向にある。農耕地から放出される一酸化二窒素は全人為的発生量の 52% (IPCC, 2001) を占めているため、地球温暖化に取り組む上で農耕地から発生する含窒素環境ガスを抑制することは重要である。その手段として、好気条件下でも脱窒が抑制されない好氣的脱窒菌、または NO_3^- が脱窒菌に利用される前に吸収する微生物を農耕地に散布、増殖させ、含窒素環境ガスを放出していた脱窒菌の作用を抑えることが必要である。この目的を達成するために適した菌株を分離することを試みた。

2. 実験方法

2-1. 土壌微生物の分離と特性

目的微生物の分離は、畑地の根圏土壌から調製した土壌懸濁液を 0.1% の硝酸アンモニウム (NH_4NO_3)、2% のグルコース (Glc)、さらに各種微量金属塩を含む液体培地にて 30°C、130 rpm で振盪培養することにより行った。良好に NO_3^- 、アンモニウムイオン (NH_4^+) を除去し、なおかつ生育量の低い菌株については、培養上清および菌体を回収し、ケルダール分解に供した後に、試料に含まれる全窒素量を定量した。

2-2. 分離菌株の同定

シングルコロニーから調製した菌体懸濁液を鋳型として、16S rRNA 遺伝子 (約 1.5 kb) を PCR 法により増幅した。増幅した DNA 断片の塩基配列を決定し、類似性の高い配列をデータベースで検索することによって目的微生物を同定した。

3. 結果

3-1. 分離菌株の特製

77 種の土壌試料を用い、3 mL の液体培地で好氣的に培養した結果、分離した菌株の中で 4 菌株が良好に NH_4^+ 、および NO_3^- を除去することができた。また、これら 4 菌株は他の菌株に比べ増殖量が低く、目的にかなう菌株であると考え、神奈川県黒川市の畑地から採取した菌株を K、兵庫県西宮市の畑地から採取した菌株をそれぞれ N-I、N-II、N-III と命名した。4 菌株のうち最も良好に NH_4^+ 、および NO_3^- を除去できた N-III の経時的結果を図 1 に示す。 NH_4^+ 、および NO_3^- は培養開始 20 時間までにほとんど除去され、増殖量を示

* 明治大学農学部 School of Agriculture, Meiji University

キーワード：一酸化二窒素、微生物の分離、分離菌株の同定

す濁度は約 6 となった。他の菌株についても、完全に窒素化合物を除去するために要する時間は異なるが、ほぼ N-III の結果と同様の結果を示した。

4 菌株が除去した NH_4^+ 、および NO_3^- の 55-75% は菌体内に移行し、残りの窒素は他の含窒素化合物に変換され培養上清中に残存していた (表 1)。以上の結果から、今回得られた菌株は、好気条件下で脱窒を行わず、効率的に硝酸アンモニウムを取り込み、他の窒素化合物に変換できる菌株であると結論した。

3-2. 分離菌株の同定

いずれの菌株の配列も、*Enterobacter cloacae* およびその類縁菌の配列に極めて類似しており (表 2)、その高い類似性から K、N-I、N-II は、*E. cloacae* であると同定した。一方 N-III の配列は、*E. cloacae* isolate 766 と *Klebsiella pneumoniae* strain TCCC1 の同配列とそれぞれ 98.2%、98.1% の類似性を示し、特定の微生物種に対して有意な類似性が見られなかった。この結果は本菌が新種である可能性が高いことを示唆している。

4. 考察

数回にわたるスクリーニングにおいて、様々な性情を示す微生物が得られたが、最終的に NO_3^- をほぼ完全に除去できた微生物は、分離に用いた土壌の産地にかかわらずいずれも *E. cloacae* およびその類縁菌であった。このことは、*E. cloacae* は今回設定した条件下で、迅速に NO_3^- を除去できる特性を有していると考えられる。また取り込んだ NH_4^+ および NO_3^- は、分離菌株によって他の含窒素化合物に変換された。今後は、この化合物の構造を明らかにし、これが脱窒作用に寄与するか否かを調べる必要がある。

5. 引用文献

N. Takaya, M. Antonia B., 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.

IPCC (2001) *Climate Change 2001, The Scientific Basis*, p248~253, Cambridge University Press.

6. 謝辞

この研究の一部は文部科学省平成 21 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成を受けて行った。

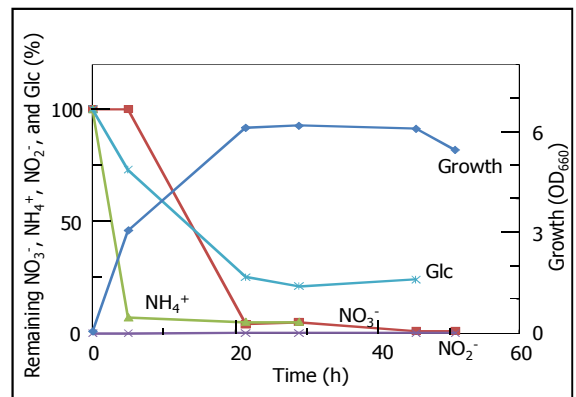


図 1. N-III の増殖量と NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 、Glc の経時的変化

表 1. 培養上清と菌体中の窒素量

Strain	Initial (mmol)		Final (mmol)		Remaining rate (%)
	Sup.	Cells	Sup.	Cells	
K	1.24	0	0.60	0.79	112
N-I	1.24	0	0.57	0.75	106
N-II	1.24	0	0.33	1.02	109
N-III	1.24	0	0.59	0.73	106
<i>Paracoccus</i> ¹⁾					
<i>denitrificans</i>	1.24	0	1.00	0.48	119
<i>Pseudomonas</i> ¹⁾					
<i>stutzeri</i>	1.24	0	1.08	0.41	121

1) These strains were used as positive controls of aerobic denitrifying bacteria reported previously

表 2. 分離菌株の同定結果

Isolate	Homologous strains	Identity (%)
K	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 766	99.0
	<i>Enterobacter cloacae</i> strain B5	98.4
N-I	<i>Enterobacter cloacae</i> strain FR	99.1
	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 766	98.6
N-II	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 766	98.6
	<i>Enterobacter cloacae</i> strain B5	98.0
N-III	<i>Enterobacter cloacae</i> isolate 766	98.2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain TCCC1	98.1