

II - 587

脱窒酵素活性の発現特性に関する基礎的研究

京都大学 正 員 津野 洋
 京都大学 正 員 宗宮 功
 京都大学 山下洋正
 アカ工業 正 員 山田登志夫

1. はじめに 近年、好気性条件下でも脱窒を行う菌の存在が報告されており、脱窒機能に及ぼす酸素の影響について再検討を迫られている。また、これらの菌を用いて硝化と脱窒を一つの好気性反応槽で同時に行わせる、新しい水処理法の開発も検討されている。本研究では、好気性で脱窒能を有する菌と従来の脱窒菌（嫌気性での脱窒菌）が酸素に対して脱窒機能発現で異なった挙動を示すことについて、抽出粗酵素および完全細胞を対象にして検討し、そのメカニズムの解明を試みた。

2. 実験方法 し尿処理場の生物反応槽より分離され凍結保存されている脱窒菌（表-1に示す）を好気性条件下で前培養して増殖させた後、遠心分離により菌体を捕集した。この菌体を硝酸塩液体培地を用いて、溶存酸素濃度を任意の値に設定しうる反応容器中で、①前培養より引き続いて好気性条件下、②前培養とは異なり嫌気性条件下、③嫌気性条件下（②）を経て再び好気性条件下、のそれぞれ異なった条件下で回分式培養実験を行い、細胞全体としての異化的硝酸塩還元機能の発現特性の把握を試みた。次に、各条件下で培養した菌体を超音波破砕法により破壊し、破砕液を遠心分離で分画して粗酵素標品を得た。これを用いた酵素反応実験を、コハク酸塩を電子供与体として好気性および嫌気性条件下で行った。酵素活性の指標としては、1gSSの菌体より抽出した粗酵素標品が、1hrに1mgNの硝酸性窒素を亜硝酸性窒素に還元する時、その酵素活性量を1mgN/gSS・hrと表して用いた。これにより異化的硝酸塩還元酵素の活性発現特性の把握を試みた。これらの実験結果を通して、細菌の脱窒機能発現を調節する機構の解明を試みた。

3. 実験結果および考察

A. 細胞全体としての異化的硝酸塩還元機能の発現特性

嫌気性条件下での回分式培養実験における各態窒素濃度の経時変化（図-1）より、菌株No.1,3,8とも酸化態窒素を還元していることが確かめられた。また、好気性条件下での回分式培養実験における硝酸性窒素濃度の経時変化（図-2）より、菌株No.3は硝酸塩を還元せず、菌株No.1とNo.8は硝酸塩を還元したことが分かる。

さらに菌株No.1とNo.8について、溶解性総窒素（SN）の減少量から $\text{NO}_x\text{-N}$ の減少量を差し引いたものと菌体（gSS）の増加量との関係を図-3に示す。ここで、菌体の組成

表-1 処理槽中の汚泥より分離された菌株

汚泥採取 処理場・菌株No	属あるいは菌群
広島 1	<i>Bacillus</i>
3	<i>Moraxella-Acinetobacter</i>
岡山 8	<i>Pseudomonas</i>

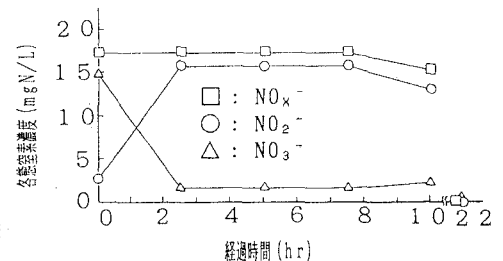


図-1 嫌気性条件下での回分式培養実験の結果（菌株No. 1の例）
 （菌株No. 3, 8も同様）

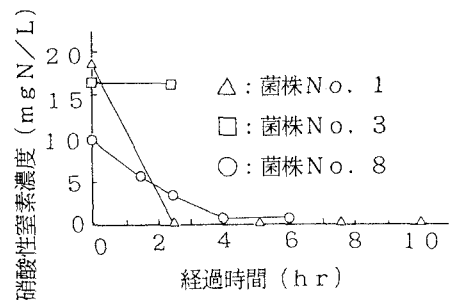


図-2 好気性条件下での回分式培養実験の結果

を $C_5H_7O_2N$ と仮定すると菌体が1g増加するには約0.124gの窒素が必要で、図の破線はこの関係を表している。一方、本実験では細胞合成の窒素源としてポリペプトンと硝酸塩が利用可能で、この両方を同化すると仮定した場合（図の白プロット）と、硝酸塩を同化しないと仮定した場合（図の黒プロット）について、それぞれ菌体増加量と同化による溶解性窒素減少量との関係を図にプロットしてある。図より、菌株No.1は硝酸塩を同化的に還元し、菌株No.8は硝酸塩を異化的に還元したと仮定する方がそれぞれ理論式により適合している。これらの結果より、菌株No.1、3は嫌気性条件下でのみ、菌株No.8は好気性条件下においても異化的に硝酸塩を還元する細菌であることがそれぞれ確認された。

B. 異化的硝酸塩還元酵素の活性発現特性

嫌気性での脱窒菌株No.1の酵素反応結果（図-4上図、菌株No.3の酵素についても同様の結果であった）の左図より、好気性条件下で培養され、嫌気性条件下を一度も経ていない菌体にも硝酸塩還元酵素が存在しており、その酵素は嫌気性条件下でのみ反応することが分かる。また右図より、菌体が嫌気性条件下を経ることによって初めて、その抽出酵素が好気性条件下でも反応するようになることが分かる。つまり酵素活性が発現するためには嫌気性条件が不可欠であり、一度嫌気性条件下を経て発現した活性は好気性条件下でも持続すると考えられる。また、好気性での脱窒菌株No.8の酵素反応の結果（図-4下図）より、嫌気性条件下を経ていない菌体でも酵素活性が既に発現していることが分かる。これは菌株No.8が好気性条件下で硝酸塩を異化的に還元できる事と合致する。

これらA, Bの実験結果より、嫌気性での脱窒菌について、①一度嫌気性条件下を経ると酵素活性が発現する、②その菌を再び好気性条件下に置くと硝酸塩還元酵素自体は作動可能である（酵素反応実験より）が、硝酸塩は還元されない（完全細胞での実験より）、ことが分かる。従って、好気性条件下では、何らかの機構

によって嫌気性での脱窒菌の脱窒機能が抑制されていると推論できる。そして、その可能性の一つとして細胞壁や細胞膜を通して硝酸塩を摂取する段階での抑制機構が考えられる。つまり好気性条件下では硝酸塩が膜透過できないために酵素が硝酸塩と反応できないという仮説である。これは超音波破碎によって細胞膜を破壊すると活性が観察されるようになった、本研究での実験結果と合致する。

4. 結語 本研究では脱窒菌の異化的硝酸塩還元特性を完全細胞レベルと酵素レベルとで検討することによって脱窒機能発現の調節機構の解明を試み、以下の知見が得られた。

(I) 嫌気性での脱窒菌においては、①嫌気性条件によって酵素が活性化される機構、②硝酸塩の膜透過段階での抑制機構、の2種類の脱窒機能発現の調節機構が考えられる。

(II) 好気性での脱窒菌においてはこのどちらの調節機構も働かず、この調節機構の違いによって、好気性条件下で脱窒を行う菌と行わない菌とが区別されるのではないかと考えられる。

○：溶解性窒素減少量と菌体増殖量との関係（菌株1）
△：溶解性窒素減少量と菌体増殖量との関係（菌株8）
●：（溶解性窒素減少量－酸化態窒素減少量）と菌体増殖量との関係（菌株1）
▲：（溶解性窒素減少量－酸化態窒素減少量）と菌体増殖量との関係（菌株8）

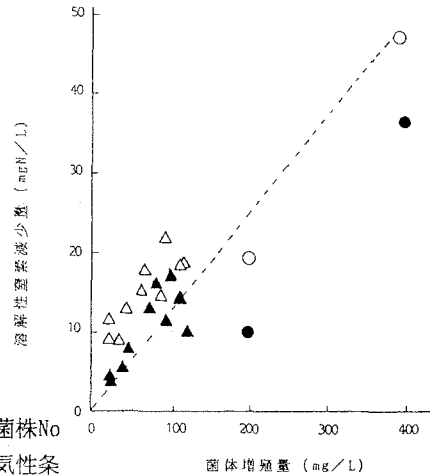


図-3 溶解性窒素の減少量と菌体増殖量との関係について

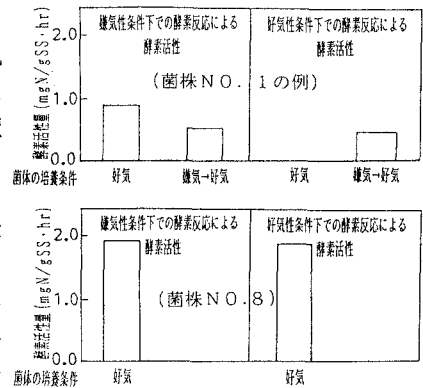


図-4 酵素反応実験の結果