

VII-197

水域の底泥による脱窒とN₂Oの生成に及ぼす真菌類の影響

九州大学工学部 正 大石京子、フェロー 楠田哲也

1. はじめに

これまで脱窒は細菌固有の機能であると考えられていたが、最近では糸状菌や酵母などの真核生物（カビ類）にも同様の機能があることが認められている。しかもカビ類の脱窒は、特殊な菌によるものではなく、*Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Talaromyces* 等多くの属や種に脱窒能が認められており、カビ脱窒は普遍的現象であると考えられている。同時にカビ脱窒の電子伝達経路が明らかになるにつれ、細菌の脱窒経路と大きく異なることが明らかになってきた。細菌の脱窒系は最終産物がN₂であり、NO還元酵素としてチトクロムb及びcが関与しているのに対し、カビ脱窒系の最大の特徴としてN₂O還元酵素が欠落するため、その最終産物がN₂Oであること、NO還元酵素としてチトクロムP-450が関与すること、さらに、硝酸塩や亜硝酸塩以外の窒素化合物も脱窒の基質とすること等が知られている。また、カビ脱窒菌の中には硝酸塩還元酵素が欠落しているものも多い。一般に水域の底泥は酸素濃度が低く、カビ類の生育には望ましい条件ではないが、有機物の負荷が大きい水域ではカビの現存量も比較的多い。さらに細菌類及びカビ類の両者とも脱窒は嫌気呼吸ではあるが、カビ類の脱窒は、細菌類のそれと異なり嫌気培養よりむしろ微好気条件下での培養に効果が認められていることや、底泥の極く表層部の間隙水でN₂Oの濃度が高いことから、極く表面の底泥を対象としてカビの脱窒によるN₂O生成の関与について検討した。

2. 実験試料および実験方法

感潮域において極く表面の底泥を採取し、1500xGで10分間遠心分離したものを供試底泥とした。これは90%以上が砂分の砂質であった。細菌類とカビ類の検出には、それぞれ標準寒天培地とポテト・デキストロース寒天培地を使用した。細菌類とカビ類の増殖阻害剤として、それぞれクロラムフェニコールとシクロヘキシミドを使用した。70mlのバイアルに底泥3g(乾燥質量換算)、NO₂-N又はNO₃-Nを1mg、フマル酸ナトリウムをC換算で2mgを取り、これを2グループに分けてそれぞれのバイアル内をアセチレン又は窒素ガスで置換した。これを30℃で培養し、定期的にヘッドスペースのN₂Oの濃度をECD付きガスクロマトグラフで測定した。この方法で、バイアルにクロラムフェニコールとシクロヘキシミドのどちらか一方、クロラムフェニコールとシクロヘキシミドの両方をそれぞれ添加した場合、さらにそれらをpH=4.2およびpH=7.6に調整した場合に生成されるN₂Oの濃度を測定した。

3. 実験結果と考察

図1、2、3に、pH=7.6とpH=4.2における細菌・カビ混合系、細菌系、カビ系のそれぞれの脱窒過程を示した。クロラムフェニコールとシクロヘキシミドの両方を添加し、ヘッドスペースをアセチレンで置換した系ではN₂Oの生成が認められなかったため、本実験での脱窒は細菌類およびカビ類によると考えられる。実験終了後、アセチレンでN₂Oの還元阻害をした系で残りの基質（NO₂-N+NO₃-N）と生成したN₂O-Nによる窒素の回収率は94%以上であった。図1～3から基質の種類やpHに関わらず、カビ類の脱窒速度は細菌のそれに比べて極めて小さく、水域における脱窒は主に細菌類が関与していると考えられる。図3よりNO₂-Nを基質としたカビ類の脱窒速度はpH=7.6とpH=4.2において差はなかった。しかし、NO₃-Nを基質とした場合はNO₂-Nの場合に比べて脱窒速度は小さく、特にpH=7.6ではNO₃-Nは殆ど脱窒に利用されなかった。一般にカビ脱窒菌は硝酸塩還元酵素を欠いた種が多いと言われており、通常的环境条件下の水域の底泥でもカビ脱窒菌は主にNO₂-Nを基質としており、酸性条件下において、NO₃-Nを利用できる酵素の誘導がなされるものと考えられる。また図3よりNO₂-Nを基質としたカビ脱窒速度にpHの影響が認められないことから、自然環境条件下におけるカビ類と細菌類の脱窒速度の差は脱窒機能を有するそれらの現存量の差と考えられる。カビ類は細菌類と異なり平板培養で計測できないことや一般細菌類にもカビ類にもそれらのすべてに脱窒能があるとは限らないため、現存量については特に検討し

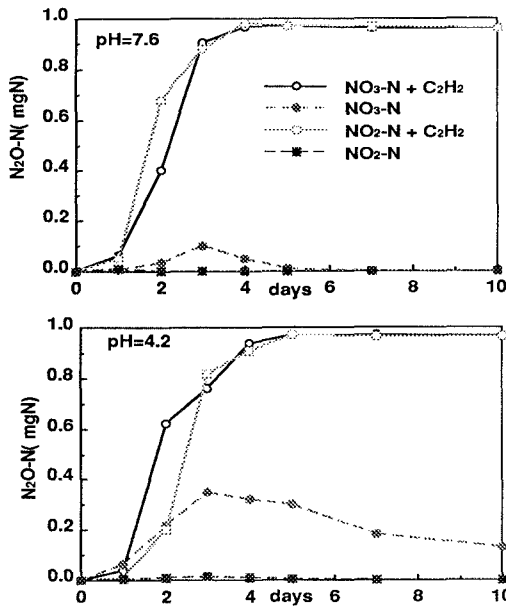


図1 細菌及び真菌混合系の脱窒による N_2O 生成に及ぼす基質とpHの影響

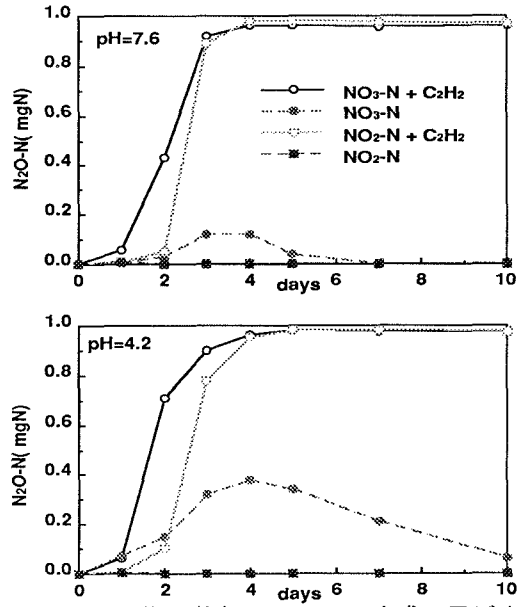


図2 細菌の脱窒による N_2O 生成に及ぼす基質とpHの影響

なかったが、細菌類がやはり優占種であった。

N_2O の消長をみると、カビ類の脱窒はアセチレンの有無によらず N_2O の生成速度は変わらないことから、その最終産物は N_2O であるといえる。さらにpH=7.6とpH=4.2の両方において、また基質が $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ のどちらの場合でもやはり最終産物は N_2O であった（図3参照）。一方、細菌類の脱窒はいずれの基質、pHでも中間産物として N_2O の生成が認められたが、最終産物は N_2 であった（図2参照）。 $\text{NO}_2\text{-N}$ を基質とした場合はpH=7.6とpH=4.2において N_2O の蓄積は認められなかった。しかし、 $\text{NO}_3\text{-N}$ を基質とした場合、一時的に N_2O が蓄積され、特に酸性条件下（pH=4）では N_2O の還元速度が低下して蓄積量が増加した。細菌類の脱窒系における、酸性条件下での $\text{NO}_2\text{-N}$ と $\text{NO}_3\text{-N}$ の還元過程と N_2O の生成メカニズムについては明確ではない。

以上のように、水域の底泥におけるカビ類による脱窒の寄与率は小さいが、基質やpHによらず最終産物は N_2O であり、自然環境条件下ではカビ類によって生成された N_2O は細菌類によって N_2 へと還元されていると考えられる。またカビ類の脱窒は主に $\text{NO}_2\text{-N}$ を基質としているが、pHが低い環境下では $\text{NO}_3\text{-N}$ を基質とした脱窒が促進されたことから、今後カビ類が優占種となる場合の脱窒による N_2O 生成量の把握は重要である。

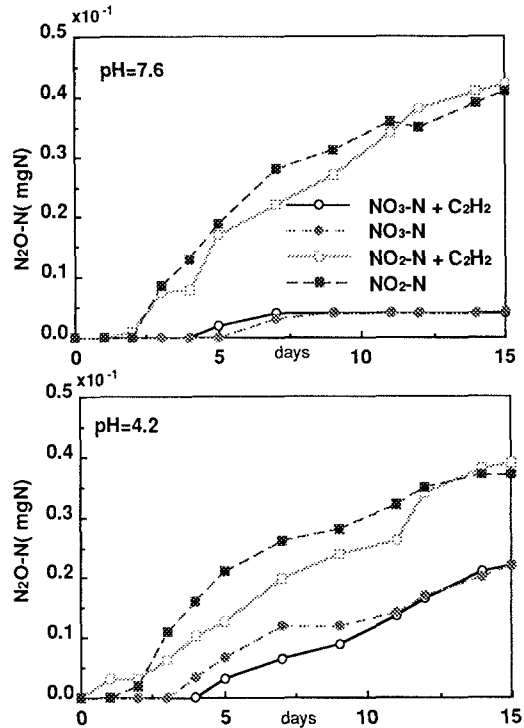


図3 真菌の脱窒による N_2O 生成に及ぼす基質とpHの影響