



# 微生物によるアンモニウムおよび硝酸塩の効率的除去に関する研究

周, 琦

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Date of Publication)

2012-11-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3916

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003916>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

微生物によるアンモニウム  
および硝酸塩の効率的除去に関する研究

平成 19 年 1 月

神戸大学大学院自然科学研究科

周 琦

# 目 次

序論	1
第 1 章 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を同時に除去する微生物の検索	
第 1 節 序	4
第 2 節 培地の設定および窒素化合物の定量法	4
第 3 節 微生物の検索	7
第 4 節 高濃度の窒素化合物を除去する微生物の選抜	10
第 5 節 要約と考察	14
第 2 章 効率的な $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える培養条件の影響	
第 1 節 序	16
第 2 節 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響	16
第 3 節 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える通気量の影響	21
第 4 節 培養における全窒素量の変化	24
第 5 節 要約と考察	28
第 3 章 効率的な $\text{NH}_4^+$ の除去に与える培養条件の影響	
第 1 節 序	30
第 2 節 $\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンの影響	30
第 3 節 $\text{NH}_4^+$ の除去に通気量の影響	35
第 4 節 培養における全窒素量の変化	38
第 5 節 要約と考察	40
第 4 章 効率的な $\text{NO}_3^-$ の除去に与える培養条件の影響	
第 1 節 序	41
第 2 節 $\text{NO}_3^-$ の除去に与える金属イオンの影響	41
第 3 節 $\text{NO}_3^-$ の除去に与える通気量の影響	46
第 4 節 培養における全窒素量の変化	49
第 5 節 要約と考察	51

第 5 章	$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の代謝過程、脱窒機構の解析	
第 1 節	序	52
第 2 節	硝酸および亜硝酸の代謝に関与する酵素系の解析	52
第 3 節	アンモニアの同化に関与する酵素系の解析	59
第 4 節	硝酸、亜硝酸の代謝とアンモニウムの同化に関与する 酵素活性に与える $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の割合の影響	65
第 5 節	脱窒機構の解析	66
第 6 節	要約と考察	75
第 6 章	$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える有機物の影響	
第 1 節	序	77
第 2 節	$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響	77
第 3 節	$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響	81
第 4 節	D-グルコースの存在下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える 炭素源の影響	89
第 5 節	3種類の炭素源の共存下における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去	95
第 6 節	要約と考察	101
第 7 章	耐熱性微生物による $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去	
第 1 節	序	103
第 2 節	$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響	103
第 3 節	培養における全窒素量の変化	105
第 4 節	脱窒機構の解析	107
第 6 節	要約と考察	109
総括		110
要旨		113
Summary (英文要旨)		115
参考文献		117



## 序論

近年、産業の発展に伴い、環境汚染は地球規模へと拡大してきている。汚染物質は多種多様であり、その量も多量で汚染範囲も広がっている。環境浄化を物理的、化学的手法のみで行うことはエネルギーやコスト面から見ても有利とは言い難い。一方、生物、特に微生物は汚染物質を炭素源、窒素源、エネルギー源として利用・分解して増殖することができるので、微生物を利用して環境浄化を行う方法がより効率的であると考えられる。微生物の分解能は生体反応を基盤としているので、物理的、化学的手法と比較して、温和な反応条件で汚染物質の処理を行うことが可能である。また、微生物を利用した環境浄化は、複雑な装置を必要とせず、副産物も少なく省エネルギーでできるので、物理的、化学的手法と比較してきわめて有利である。

現在、直面している環境問題の一つは工業排水や生活排水などから流入した窒素、リン、有機物の蓄積による河川、湖沼の富栄養化である。富栄養化は湖沼などの閉鎖水域で有機物や塩類の濃度が増加していく現象であるが、人間活動の増大にともない近年では急激に進行している。富栄養化状態になると植物プランクトンが異常繁殖し、赤潮やアオコが発生する。そのため水中の溶存酸素が不足し、魚類や藻類は死に至り、水は悪臭を放つようになる。近年、霞ヶ浦、琵琶湖などの湖沼、東京湾、伊勢湾等の内湾、瀬戸内海などでは、赤潮やアオコの発生による被害が多発している。富栄養化を防止するためには、特に窒素とリンを除去することが必要である<sup>1)</sup>。

排水処理施設で行われている窒素の除去法には、イオン交換法、逆浸透膜を用いたろ過法、アンモニア・ストリッピング法などの物理化学的処理法、微生物を利用した硝化・脱窒素プロセスなどの生物学的処理法が挙げられるが<sup>2-3)</sup>、物理化学的処理法は高コストを要するため、微生物の硝化、脱窒素能を利用した生物学的処理法が最も広く利用されている。

微生物を用いた硝化・脱窒法は、硝化菌（アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌）と脱窒菌の作用により、排水中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  を  $\text{N}_2$  として除去する方法である。本法において、硝化菌により  $\text{NH}_4^+$  は  $\text{NO}_2^-$  をへて  $\text{NO}_3^-$  に酸化され、生成した  $\text{NO}_3^-$  は脱窒菌により  $\text{N}_2$  として大気中に還元される (Fig. 0-1)<sup>4-6)</sup>。硝化過程は一般に、好気条件で増殖する化学合成独立栄養菌によってなされ、脱窒過程は嫌気条件で増殖する脱窒菌によって行われる。したがって、現在行われている硝化脱窒素プロセスは物理化学的処理法と比較して低コストで行える反面、少なくとも2つの処理槽が必要であり、また、硝化細菌の増殖速度が遅く、排水の処理に時間がかかることから、これらの問題を改善する新たな技術の開発が求められている。

最近、 $\text{NH}_4^+$ を $\text{NO}_2^-$ や $\text{NO}_3^-$ に酸化する好気性の従属栄養菌の存在が報告された。また、好気条件で脱窒作用を示す微生物も見いだされた<sup>6-14)</sup>。これらの微生物を排水処理に応用することができれば1つの処理槽で硝化・脱窒を行うことが可能である。しかし、これらの微生物の硝化能や脱窒能は、従来の微生物に比べて劣り、また、高濃度の窒素化合物には増殖しないことなどが報告されている<sup>13-15)</sup>。

硝酸アンモニウム（硝安、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ）は、希土類酸化物の生産過程で副産物として生成する。生成した $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を含む工業排水は、一般に、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 以外の物質をほとんど含まない。最近、瀬戸内海などの閉鎖海域内の富栄養化対策として、窒素、リンに対する新たな排水基準が設定され、これらの排水基準を達成するため、中でも、窒素除去法の確立は緊急の課題となっている。そこで本研究では、微生物を活用した $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 排水中の効率的な窒素除去法の開発を目的とした。

すでに本研究室では、現在の硝化・脱窒プロセスを、時間とコストの両面でさらに効率的なものとするために、1つの培養槽内で排水中の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を同時に利用して除去できる *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 株が土壌から分離され、その培養条件等を報告された<sup>16-17)</sup>。F-5-2 株は土壌から分離されたので、このような性質を示す菌株は自然界に広く存在すると考えられる。そこで本研究では、まず保存菌株を用いて、これらの中に F-5-2 株のような性質を示す菌株が存在するかを調べた。得られた株を用いて、種種の培養条件を検討し、高濃度の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 培地における、 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去の培養条件を検討した。また、外気温の上昇する夏期においても利用可能な $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を同時除去できる耐熱性菌を用いて $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去試験を行った。

本論文は、序論、1章から7章、総括により構成される。第1章では、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を同時に除去する微生物の検索について述べる。第2章では、最も効率的に両イオンを除去できる中温菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689 株を用いた、効率的な $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える培養条件の影響を述べる。また、本菌を用いた培養中の全窒素の変化について記述する。第3章では、 $\text{NH}_4^+$ を唯一の窒素源とする培地を設定し、NBRC 12689 株を用いて、高濃度の $\text{NH}_4^+$ の除去に与える培養条件の影響を述べる。第4章では、 $\text{NO}_3^-$ を唯一の窒素源とする培地において、NBRC 12689 株を用いて、 $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去するための培養条件の設定を述べる。第5章では、NBRC 12689 株を用いて、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の代謝過程に関与する酵素を解析する。また、NBRC 12689 株による脱窒機構について述べる。第6章では、本菌を処理施設で応用するために必要な基礎的データを取得するため、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩、炭素源などの影響を述べる。第7章では同研究室分離した耐熱性菌 *Bacillus licheniformis* T-7-2 株を用いた培養条件や脱窒機構について述べる。さらに、以上の結果を総括において総合的に考察する。

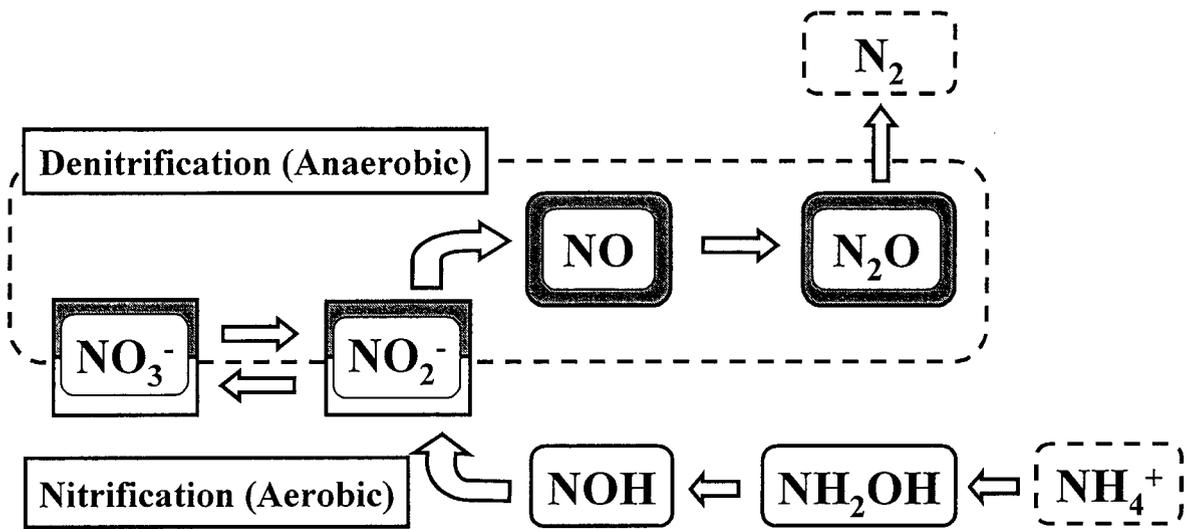


Fig. 0-1. Circulation of nitrogen compounds

## 第1章 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を同時に除去する微生物の検索

### 第1節 序

排水中に含まれる $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を効率的に除去する場合、これらの窒素源を同時に利用する微生物が得られれば、それらは極めて有効に使用することができる。そこで本章では、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を唯一の窒素源、D-グルコースを唯一の炭素源およびエネルギー源とする培地を設定し、脱窒素が報告されている保存菌株を中心に、合計18株を用いて $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を好気条件下で同時に除去する微生物を検索することを目的とする。また、 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を同時に除去することが認められた菌株を用いて、好気条件下において最も効率的に両イオンを除去する菌株を選抜する。

### 第2節 培地の設定および窒素化合物の定量法

#### <方法>

#### 1. 使用菌株

脱窒素が報告されている菌株を中心に、*Pseudomonas* 属の6菌株、*Proteus* 属の1菌株、*Bacillus* 属の3菌株、*Enterobacter* 属の2菌株、*Klebsiella* 属の2菌株、*Alcaligenes* 属の1菌株、*Achromobacter* 属の1菌株、*Serratia* 属の1菌株、*Paracoccus* 属の1菌株、合計18種類の保存菌株 (Table 1-1) を用いた。保存菌株は、(独)製品評価技術基盤機構 (木更津、千葉) から購入した。

#### 2. 菌株の保存培地

菌株の保存培地として肉汁寒天培地を (Table 1-2) 用いた。ポリペプトンは日本製薬 (東京) 製、寒天、肉エキスは和光純薬 (大阪) 製を用いた。培地を調製した後、オートクレーブにて殺菌した (121°C、13分)。各菌株をそれぞれの肉汁寒天の斜面培地に植菌した後、30°Cで1-2日間培養した。増殖した菌株を、窒素化合物を含む検定培地に植菌した。

#### 3. 0.1% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を唯一の窒素源とする検定培地

Table 1-3 に本研究で用いる basal medium を示す。実際の実験に用いる培地は、basal medium に炭素源、窒素源、金属塩を加えて調製した。Table 1-4 に代表的な培地である 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地の組成を示す。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除く、他の培地成分を調製した後、オートクレーブにて殺菌した (121°C、13分)。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 溶液はこ

れとは別に、濾過除菌装置を用いて除菌し、冷却後両者を混合した。

**4. 0.25% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl を唯一の窒素源とする検定培地**

Table 1-4 に示す培地において、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> の代わりに 2.5 g の NH<sub>4</sub>Cl を唯一の窒素源として加えた。また、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> は 80 pM を加えた。NH<sub>4</sub>Cl を除く、他の培地成分を調製した後、オートクレーブにて殺菌した (121°C、13 分)。NH<sub>4</sub>Cl 溶液はこれとは別に、濾過除菌装置を用いて除菌し、冷却後両者を混合した。

**5. 0.1% (w/v) NaNO<sub>3</sub> を唯一の窒素源とする検定培地**

Table 1-4 に示す培地において、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> の代わりに 1.0 g の NaNO<sub>3</sub> を加えた。また、MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> は 80 nM を加えた。NaNO<sub>3</sub> を除く、他の培地成分を調製した後、オートクレーブにて殺菌した (121°C、13 分)。NaNO<sub>3</sub> 溶液はこれとは別に、濾過除菌装置を用いて除菌し、冷却後両者を混合した。

**Table 1-1. Microorganisms tested**

	<i>P. putida</i> NBRC 3738
	<i>P. fluorescens</i> NBRC 15833
<b><i>Pseudomonas</i></b>	<i>P. aeruginosa</i> NBRC 3080
	<i>P. aeruginosa</i> NBRC 12689
	<i>P. aeruginosa</i> NBRC 13130
	<i>P. aeruginosa</i> NBRC 13738
<b><i>Proteus</i></b>	<i>P. vulgaris</i> NBRC 3851
	<i>B. circulans</i> NBRC 13626
<b><i>Bacillus</i></b>	<i>B. licheniformis</i> strain TK
	<i>B. licheniformis</i> NBRC 12200
	<i>E. aerogenes</i> NBRC 13534
<b><i>Enterobacter</i></b>	<i>E. cloacae</i> NBRC 13535
	<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3318
<b><i>Klebsiella</i></b>	<i>K. planticola</i> NBRC 3317
<b><i>Alcaligenes</i></b>	<i>A. faecalis</i> NBRC 13111
<b><i>Achromobacter</i></b>	<i>A. denitrificans</i> NBRC 15125
<b><i>Serratia</i></b>	<i>S. marcescens</i> NBRC 3736
<b><i>Paracoccus</i></b>	<i>P. denitrificans</i> NBRC 13301

**Table 1-2. Nutrient agar medium**

Meat extract	10	g
Polypepton	10	g
NaCl	5.0	g
Agar	15	g
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH	7.2-7.4	

**Table 1-3. basal medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
NaCl	0.50	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.20	g
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH	7.1	

**Table 1-4. 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	30	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	g
NaCl	0.50	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.20	g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	28	mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.20	ng
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH	7.1	

## 6. $\text{NO}_3^-$ と $\text{NO}_2^-$ の定量法

$\text{NO}_3^-$ はサリチル酸を用いたニトロ化反応法によって測定した<sup>18)</sup>。すなわち、0-3 mMの $\text{NO}_3^-$ を含む0.1 mlの水溶液に、0.2 mlの2% (w/v) サリチル酸-濃硫酸溶液を加えた後、3.7 mlの10% (w/v) 水酸ナトリウム溶液を加え、410 nmにおける吸光度を測定した。

$\text{NO}_2^-$ は、ジアゾカップリング反応により生成する色素を定量することによって測定した<sup>19)</sup>。0-0.6 mMの $\text{NO}_2^-$ を含む0.15 mlの水溶液に、水0.35 ml、0.1 M potassium-sodium phosphate buffer (pH 7.1) 0.5 mlを加えた後、0.5 mlの1% (w/v) スルファニルアミド-9% (w/v) HCl溶液および0.02% (w/v) *N*-ナフチルエチレンジアミン・2HCl溶液を加えた。室温にて10分間放置した後、540 nmにおける吸光度を測定した。

## 7. $\text{NH}_4^+$ の定量法

$\text{NH}_4^+$ は、インドフェノールブルー法<sup>20)</sup>により定量した。すなわち、0.010~0.30 mMの $\text{NH}_4^+$ を含む1 mlの水溶液に6% (w/v) フェノール-0.02% (w/v) ニトロプルシドナトリウム溶液0.4 mlを加えた後、0.6 mlのアンチホルミン溶液を加えた。室温に45分間放置して発色させた後、635 nmにおける吸光度を測定した。

## 第3節 微生物の検索

### <方法>

#### 1. 0.1% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地を用いた菌株の検索

本章2節で述べた方法により0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地 (Table 1-4) を調製した。調製した培地に Table 1-1 に示す18種の菌株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpmで振とう培養するとともに、経時的に0.7 mlの培養液をサンプリングした後、その濁度 (660 nm) と培地中に残存する $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ を定量した。

#### 2. 0.25% (w/v) $\text{NH}_4\text{Cl}$ 培地を用いた菌株の検索

本章2節で述べた方法により0.25% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製した。同培地に Table 1-1 に示す18種類の保存菌株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpmで振とう培養した。経時的に0.7 mlの培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ を定量した。

### 3. 0.1% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地を用いた菌株の検索

本章 2 節で述べた方法により 0.1% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地を調製した。同培地に Table 1-1 に示す 18 種類の保存菌株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で 140 rpm で振とう培養した。経時的に培養液を 0.7 ml のサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。

#### <結果>

#### 1. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時に除去する菌株の検索

Table 1-5 に、0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を用いた場合の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去率を示す。試験した 18 株のうち、*P. fluorescens* NBRC 15833、*P. aeruginosa* の 4 株、*P. denitrificans* NBRC 13301、*E. cloacae* NBRC 13535、*K. pneumoniae* NBRC 3318 の計 8 株は両イオンを良好に除去した。しかし、*P. denitrificans* NBRC 13301 と *E. cloacae* NBRC 13535 は、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を一時的に蓄積した。一方、*A. faecalis* NBRC 13111 と *A. denitrificans* NBRC 15125 は D-グルコースを利用しないため、D-グルコースの代わりに、2% (w/v) クエン酸を含む培地を用いて試験した結果、両株とも、増殖とともに、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>のみを良好に除去した。

#### 2. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を除去する菌株の検索

Table 1-5 に、0.25% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl を用いた場合の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去率を示す。試験した 18 株のうち、*P. fluorescens* NBRC 15833、*P. aeruginosa* の 4 株、*P. denitrificans* NBRC 13301、*E. cloacae* NBRC 13535、*K. pneumoniae* NBRC 3318、*S. marcescens* NBRC 3736 の計 9 株は NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を良好に除去した。一方、*A. faecalis* NBRC 13111 と *A. denitrificans* NBRC 15125 は D-グルコースを利用しないため、D-グルコースの代わりに、2% (w/v) クエン酸を含む培地を用いて試験した結果、両株とも、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を良好に除去した。*B. licheniformis* strain TK の増殖は不良であり、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>も 80% 残存した。また、6.7 mM の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も蓄積した。

#### 3. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を除去する菌株の検索

Table 1-5 に、0.1% (w/v) NaNO<sub>3</sub> を用いた場合の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去率を示す。試験した 18 株のうち、*P. putida* NBRC 3738、*P. fluorescens* NBRC 15833、*P. aeruginosa* の 4 株、*P. denitrificans* NBRC 13301、*E. cloacae* NBRC 13535、*E. aerogenes* NBRC 13534、*K. pneumoniae* NBRC 3318、*K. planticola* NBRC 3317 の計 11 株は NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を良好に除去した。*A. denitrificans* NBRC 15125 は、D-グルコースの代わりに 2% (w/v) クエン酸を含む培地において NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を良好に除去した。

**Table 1-5. Utilization of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by stock cultures**

Strain	Nitrogen source						
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> <sup>a</sup> (1 mg/ml)		NH <sub>4</sub> Cl <sup>b</sup> (2.5 mg/ml)		NaNO <sub>3</sub> <sup>c</sup> (1 mg/ml)		
	Growth (OD <sub>660</sub> )	Remaining		Growth (OD <sub>660</sub> )	Remaining		
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
<i>P. putida</i> NBRC 3738	3.2	1%	88%	9.2	20%	4.0	5%
<i>P. fluorescens</i> NBRC 15833	5.1	2	4	9.8	4	3.5	10
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 3080	3.5	0	0	8.9	6	1.7	0
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 12689	3.9	0	0	9.3	1	1.7	0
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 13130	3.2	0	0	8.5	3	1.7	0
<i>P. aeruginosa</i> NBRC 13738	3.6	0	8	9.3	1	1.8	10
<i>P. vulgaris</i> NBRC 3851	0.2	100	92	0.8	84	0.2	86
<i>B. circulans</i> NBRC 13626	0.2	100	95	0.5	91	0.2	93
<i>B. licheniformis</i> strain TK	2.2	0	68	1.5	80	2.0	67
<i>B. licheniformis</i> NBRC 12200	5.5	0	42	2.6	78	1.2	63
<i>E. aerogenes</i> NBRC 13534	3.7	31	0	7.0	43	2.3	3
<i>E. cloacae</i> NBRC 13535	5.6	0	0	11.8	4	2.9	5
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3318	7.1	0	0	11.9	2	2.6	3
<i>K. planticola</i> NBRC 3317	5.2	0	50	6.2	42	3.5	3
<i>A. faecalis</i> NBRC 13111 <sup>d</sup>	1.9	0	82	4.7	6	0.0	100
<i>A. denitrificans</i> NBRC 15125 <sup>d</sup>	1.9	0	79	3.1	12	0.4	16
<i>S. marcescens</i> NBRC 3736	3.1	0	67	10.3	8	0.2	86
<i>P. denitrificans</i> NBRC 13301	17.5	0	8	13.8	11	23.5	4

<sup>a</sup> In presence of 30 mg/ml D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 0.8 pM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

<sup>b</sup> In presence of 30 mg/ml D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 80 pM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

<sup>c</sup> In presence of 30 mg/ml D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

<sup>d</sup> *tri*-Sodium citrate dihydrate (20 mg/ml) was added, instead of 30 mg/ml of D-glucose.

## 第4節 高濃度の窒素化合物を除去する微生物の選抜

### <方法>

#### 1. 高濃度の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除去する菌株の選抜

本章3節において得た  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去する8株の中から、最も効率的に両イオンを除去する株の選抜を行った。そのため、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の濃度は0.1% ずつ増加させ、D-グルコースの濃度も増加し、高濃度の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製した。この培地に8株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管を用いて140 rpm で振とう培養した。経時的に0.7 ml の培養液をサンプリングし、その濁度と残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

#### 2. 高濃度の $\text{NH}_4^+$ を除去する菌株の選抜

本章3節において得た  $\text{NH}_4^+$  を除去する11株の中から、最も効率的に  $\text{NH}_4^+$  を除去する株の選抜を行った。そのため、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  の濃度は0.05% ずつ増加させ、D-グルコースの濃度も増加し、高濃度の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製した。この培地に11株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管を用いて140 rpm で振とう培養した。経時的に0.7 ml の培養液をサンプリングし、その濁度と残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

#### 3. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える培地の pH の影響

0.4% (w/v) 以上の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いた場合には、培養液が酸性になるため、菌株の増殖が抑制されると思われる。そこで培養液の pH を補正して培養することを試みた。すなわち、0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製し、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌した後、30℃において試験管で140 rpm で振とう培養した。経時的に培養液をサンプリングする際、2N の NaOH 溶液を用いて、培養液の pH を補正した。

#### 4. 高濃度の $\text{NO}_3^-$ を除去する菌株の選抜

本章3節において得た  $\text{NO}_3^-$  を除去する12株の中から、最も効率的に  $\text{NO}_3^-$  を除去する株の選抜を行った。そのため、 $\text{NaNO}_3$  の濃度は0.1% ずつ増加させ、D-グルコースの濃度も増加し、高濃度の  $\text{NaNO}_3$  培地を調製した。この培地に12株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管を用いて140 rpm で振とう培養した。経時的に0.7 ml の培養液をサンプリングし、その濁度と残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

## <結果>

### 1. 高濃度の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除去する菌株の選抜

各濃度の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を含む培地において、試験した 8 株のうち、*P. aeruginosa* の 4 株が効率的に両イオンを除去した。この条件下では、4 株とも最高で 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を完全に除去することができた。また、亜硝酸の蓄積はほとんど見られなかった。中でも、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が最も良好に増殖し、両イオンを完全に除去した。Fig. 1-1 に本菌を用いた 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地における両イオンの除去を示す。

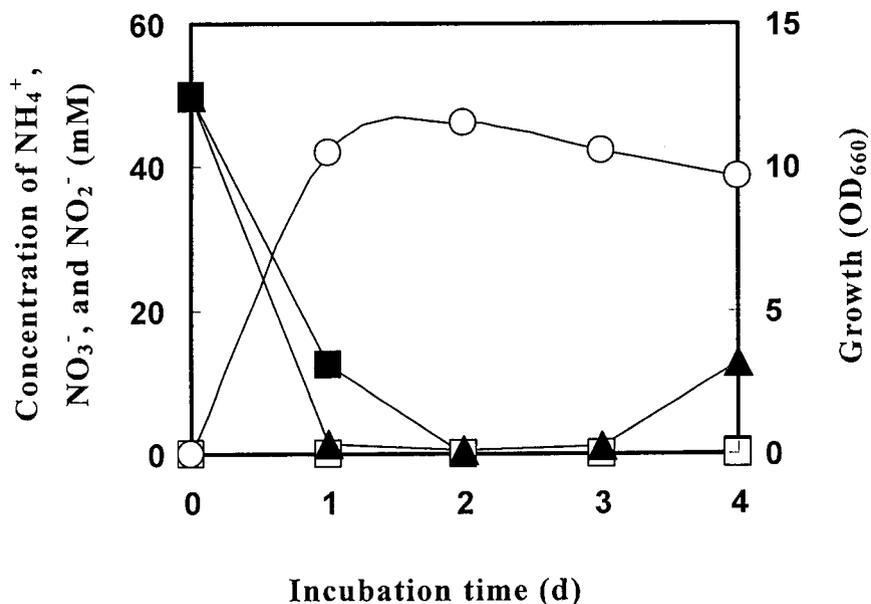


Fig. 1-1. Removal of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ), and  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ) were measured.

### 2. 高濃度の $\text{NH}_4\text{Cl}$ を除去する菌株の選抜

0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を含む培地において、試験した 9 株のうち、*P. aeruginosa* の 4 株が最も良好に  $\text{NH}_4^+$  を除去したが、完全に除去することはできなかった。Fig. 1-2 に *P. aeruginosa* NBRC 12689 を用いて行った試験結果を示す。培養液の pH は

最終的には 4.3 を示した。

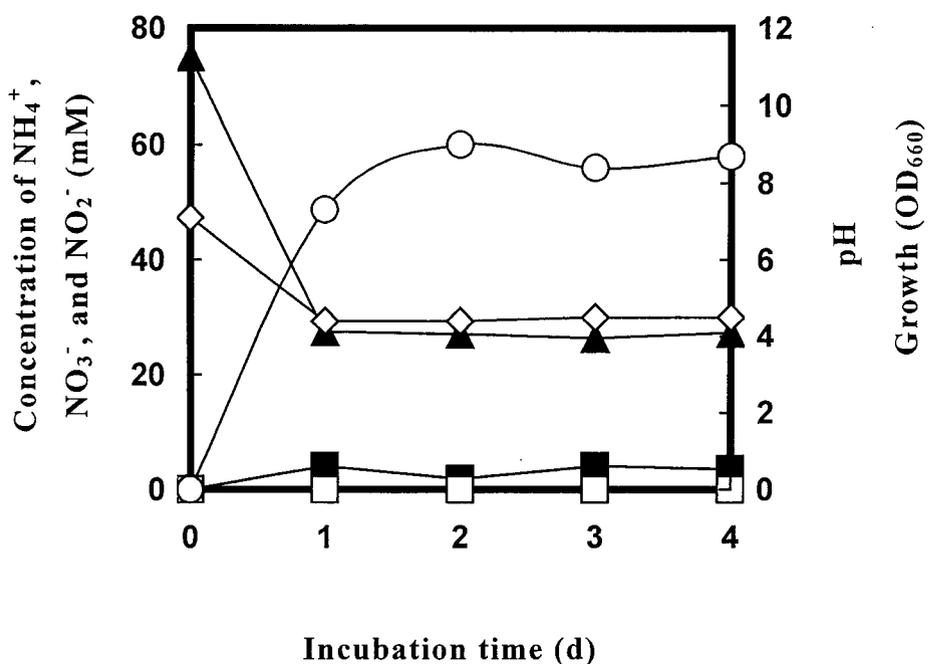
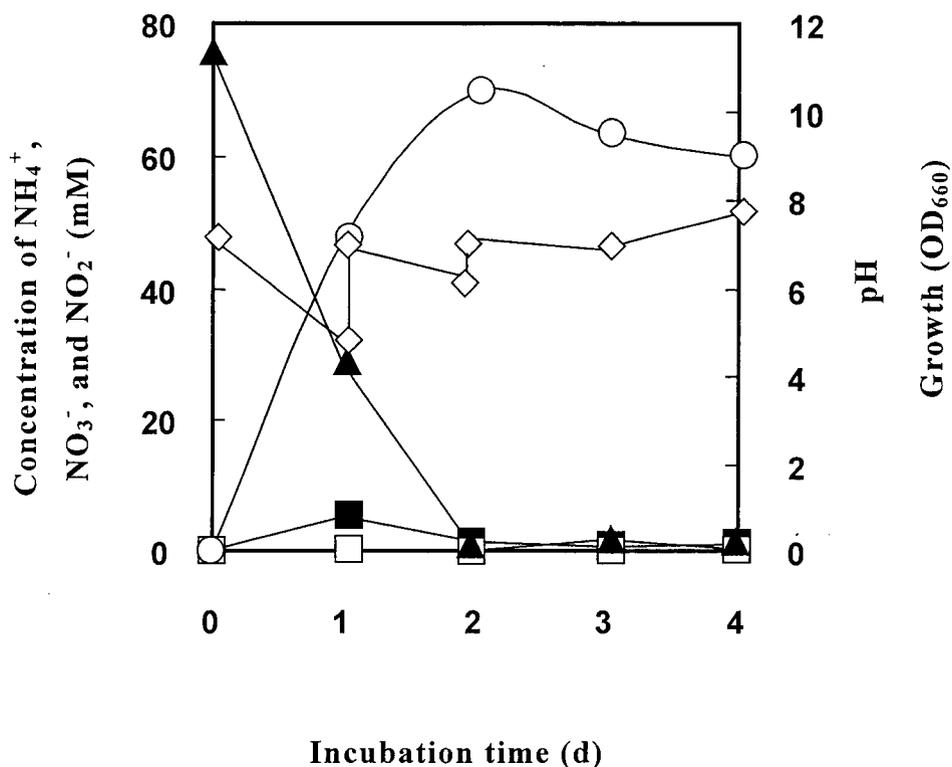


Fig. 1-2. Removal of  $\text{NH}_4^+$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■),  $\text{NO}_2^-$  (□), and pH (◇) were measured.

### 3. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える培地の pH の影響

培地の pH を中性付近まで補正することにより、試験した *P. aeruginosa* NBRC 12689 株は 0.3% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を完全に除去することができた (Fig. 1-3)。この時、硝酸と亜硝酸の蓄積は見られなかった。



**Fig. 1-3. Removal of  $\text{NH}_4^+$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 under controlling pH of the culture.**

The strain was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■),  $\text{NO}_2^-$  (□), and pH (◇) were measured.

### 3. 高濃度の $\text{NO}_3^-$ を除去する菌株の選抜

各濃度の  $\text{NaNO}_3$  と 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  を含む培地において、試験した 8 株のうち、*P. aeruginosa* の 4 株が効率的に  $\text{NO}_3^-$  を除去した。この条件下では、4 株とも最高で 1.8% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を良好に除去することができた。また、亜硝酸の蓄積はほとんど見られなかった。中でも、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が最も良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  を完全に除去した。Fig. 1-3 に本菌を用いた 1.8% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地における  $\text{NO}_3^-$  の除去結果を示す。

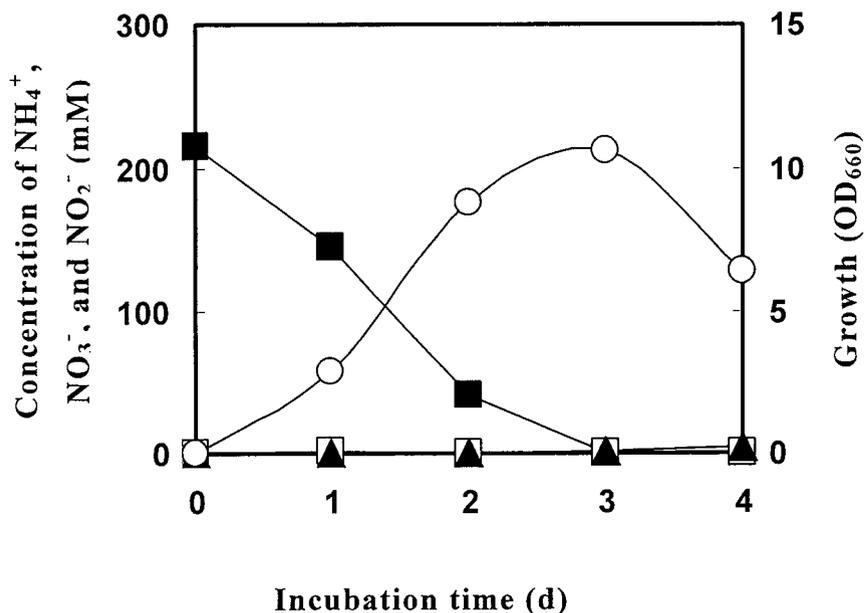


Fig. 1-3. Removal of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

## 第 5 節 要約と考察

### <要約>

本章では 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、0.25% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl、0.1% (w/v) NaNO<sub>3</sub> をそれぞれ唯一の窒素源、D-グルコースを唯一の炭素源およびエネルギー源とする培地を設定し、好気条件下で脱窒素が報告されている菌株を中心に 18 株を用いて検索を行った。*P. fluorescens* NBRC 15833、*P. denitrificans* NBRC 13301、*E. cloacae* NBRC 13535、*K. pneumoniae* NBRC 3318、4 種の *P. aeruginosa* 株の合計 8 株は、3 種類の培地においていずれも窒素化合物を良好に除去することができた。さらにこれらの 8 株を用いて、高濃度の窒素化合物の除去について調べたところ、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が最も良好に増殖し、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時に除去した。また、本菌株は、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が単独に存在する場合でも、これらの窒素化合物を除去し

た。

### <考察>

試験した 18 株のうち、8 株が  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去したことから、このような性質を有する菌株は自然界にかなり多数生息することが予想される。本章における実験では、本研究室で既に報告した両窒素源を同時に除去する *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 株に用いた培地を使用している<sup>16-17)</sup>。同培地には  $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{MoO}_4^{2-}$  が含まれており、このような金属イオンを含む培地を適切に調製することにより、さらに多数の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去する菌株が得られると思われる。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の同時除去に与える金属イオンの影響については、第 2 章で記述する。

$\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去する 8 株のうち、*E. cloacae* NBRC 13535 を除く 7 株は脱窒作用を持つことが報告されており<sup>16,21,31)</sup>、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の同時除去と脱窒作用との相関性予想される。この点については今後詳しく検討する予定である。

*E. cloacae* 属の菌株は脱窒作用を持つことが報告されていないのに<sup>22)</sup>、*E. cloacae* NBRC 13535 は好気条件下で  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去したことにより、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を含む排水の処理において、脱窒菌だけでなく、 $\text{NO}_3^-$  を代謝できる微生物も使用できると考えられる。

*A. faecalis* NBRC 13111 は、D-グルコースを含む培地では増殖できなかったが、D-グルコースの代わりに、クエン酸を唯一の炭素源およびエネルギー源として添加すると、本菌は増殖し、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  だけを良好に除去した。*A. faecalis* の菌株は好気条件下で脱窒能力を持っており<sup>23-24)</sup>、硝酸還元酵素が存在していないことが報告されている<sup>23)</sup>。したがって、*A. faecalis* NBRC 13111 が  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の同時除去しなかったことは合理的に説明できる。

$\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去する前記の 8 株は、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  が単独に存在する場合でも、効率的に除去することができるので、これらの株は、両窒素源が単独で含まれている排水の処理にも使用できることが予想される。

## 第2章 効率的な $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える培養条件の影響

### 第1節 序

第1章において、試験した18株のうち、*P. aeruginosa* NBRC 12689株が好気条件下で0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を最も効率的に同時除去することがわかった。本実験に用いた培地には、0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  が含まれており、第2章では、NBRC 12689株を用いて、培地からさらに高濃度の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を完全に除去する条件を見いだすことを目的として実験を行う。すなわち、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  の除去に与える金属イオンの濃度および培養振動数の影響等を調べることにより、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  除去の効率的な培養条件を検討する。また、培養中の全窒素の変化も調べる。

以上の培養条件を検討することにより、フラスコ等を用いた大量培養が可能になることが期待できる。

### 第2節 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響

#### <方法>

#### 1. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響

Table 2-1 に示す 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製した。終濃度が 0.1 mM になるように各種の金属塩を無菌的に加えた。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°Cにおいて試験管で 140 rpm で振とう培養し、経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した金属イオンは  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  であった。

#### 2. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{Fe}^{2+}$ の影響

各種濃度の  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  および 5% (w/v) D-グルコースを添加した 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製し、これに、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°Cにおいて試験管で 140 rpm で振とう培養した。経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は 0、0.02、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.3 mM であった。

#### 3. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{MoO}_4^{2-}$ の影響

各種濃度の  $\text{MoO}_4^{2-}$  を含む 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製し、それぞれに 0.1 mM

Fe<sup>2+</sup>および5% (w/v) D-グルコースを添加した。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpmで振とう培養した。経時的に0.7 mlの培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存するNH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。検討したMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度は0、8 pM、80 pM、80 nM、0.8 μMであった。

**Table 2-1. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	50	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4.0	g
NaCl	0.5	g
Metal salt	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.8	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH		7.1

## <結果>

### 1. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の同時除去に与える金属イオンの影響

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の同時除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、0.1 mM Fe<sup>2+</sup>とFe<sup>3+</sup>を添加した時にのみ、本菌は0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>培地中のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去した。一方、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>とMn<sup>2+</sup>などの金属イオンは、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>培地中のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>のみの除去を促進することがわかった。また、Co<sup>2+</sup>を添加すると、本菌の増殖を抑制され、培地中のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>もあまり利用されなかった(Fig. 2-1)。

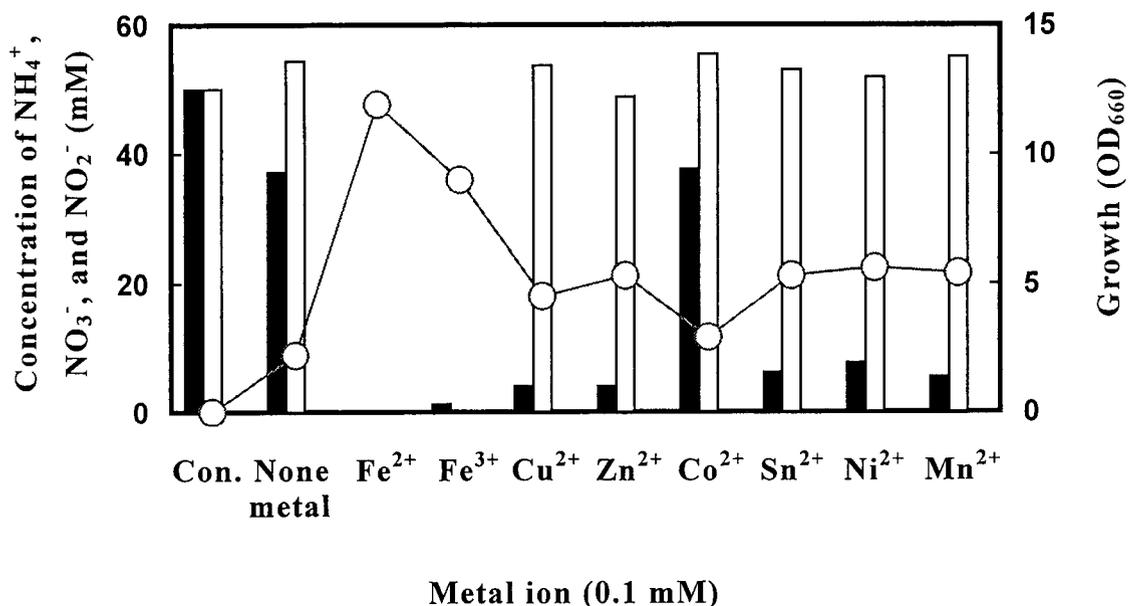


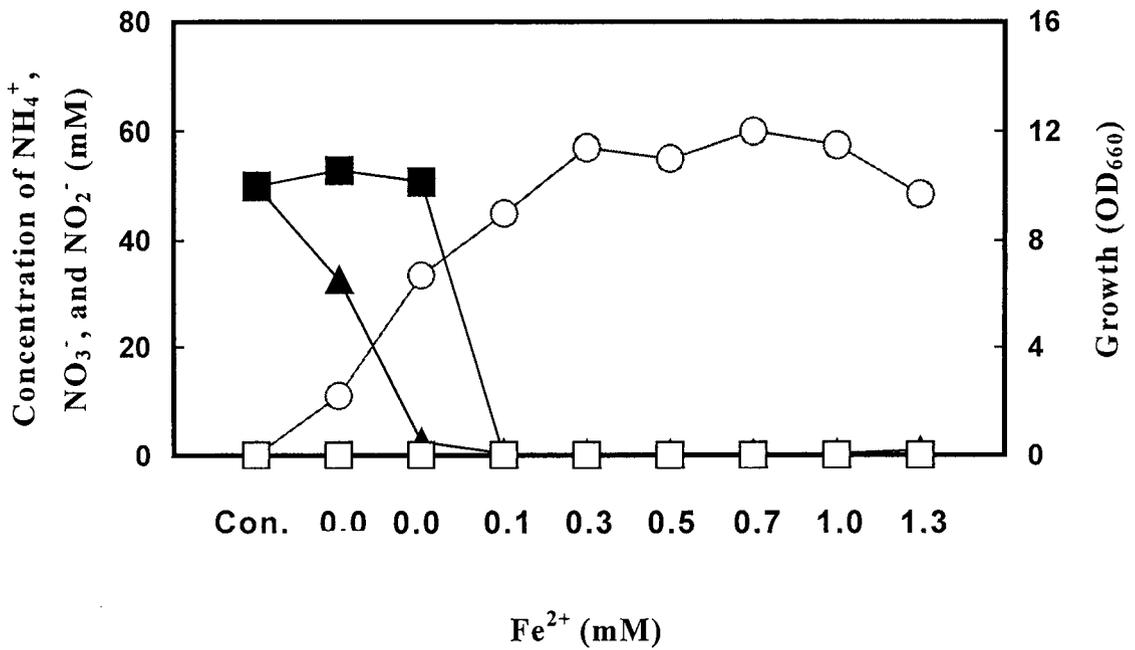
Fig. 2-1. Effect of metal ions on the removal of 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 0.1 mM metal ion and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (black bar),  $\text{NO}_3^-$  (white bar), and  $\text{NO}_2^-$  (hatched bar) were measured.

## 2. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{Fe}^{2+}$ 濃度の影響

0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を用いた場合、 $\text{Fe}^{2+}$ を添加しないと、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖は抑制され、 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の除去効率も悪かった。0.02 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を添加すると  $\text{NH}_4^+$ は良好に除去されたが、 $\text{NO}_3^-$ はほとんど除去されていなかった。0.1 ~ 1.3 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を添加すると、本菌の増殖とともに、培地中の  $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ も完全に除去された。また、いずれの場合でも  $\text{NO}_2^-$ の蓄積は見られなかった (Fig. 2-2)。

さらに高濃度の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を用いて、本菌の増殖と  $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_3^-$ の除去に与える  $\text{Fe}^{2+}$ 濃度の影響を調べた。その結果、本菌は 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ の存在下において 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した (Fig. 2-3)。



**Fig. 2-2. Effect of concentrations of Fe<sup>2+</sup> on the removal of 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.1-1.3 mM Fe<sup>2+</sup>, and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

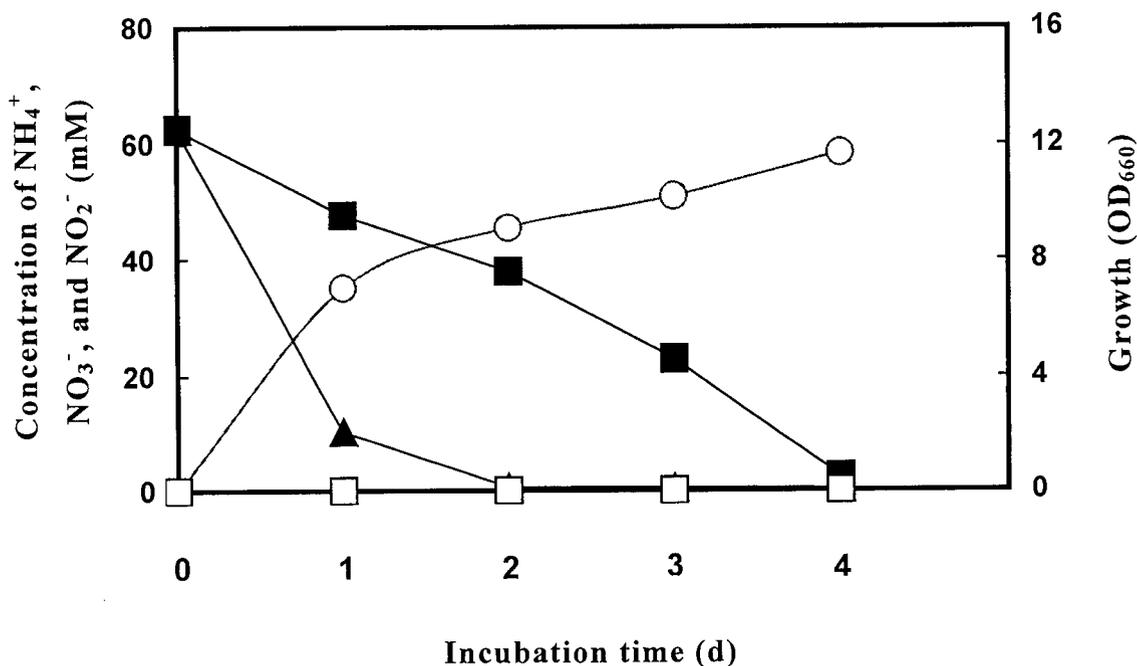


Fig. 2-3. Utilization of 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689

The strain was incubated d at 30°C for 4 with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■),  $\text{NO}_2^-$  (□) were measured.

### 3. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{MoO}_4^{2-}$ の影響

5% (w/v) D-グルコースと 0.5mM  $\text{Fe}^{2+}$ を含む 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地に各濃度の  $\text{MoO}_4^{2-}$ を添加した場合、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖、 $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_3^-$ の除去率はほぼ同じであり、本菌はこれらの条件において両イオンを完全に除去した。また、亜硝酸は、 $\text{MoO}_4^{2-}$ の各濃度においてほとんど蓄積しなかった (Fig. 2-4)。

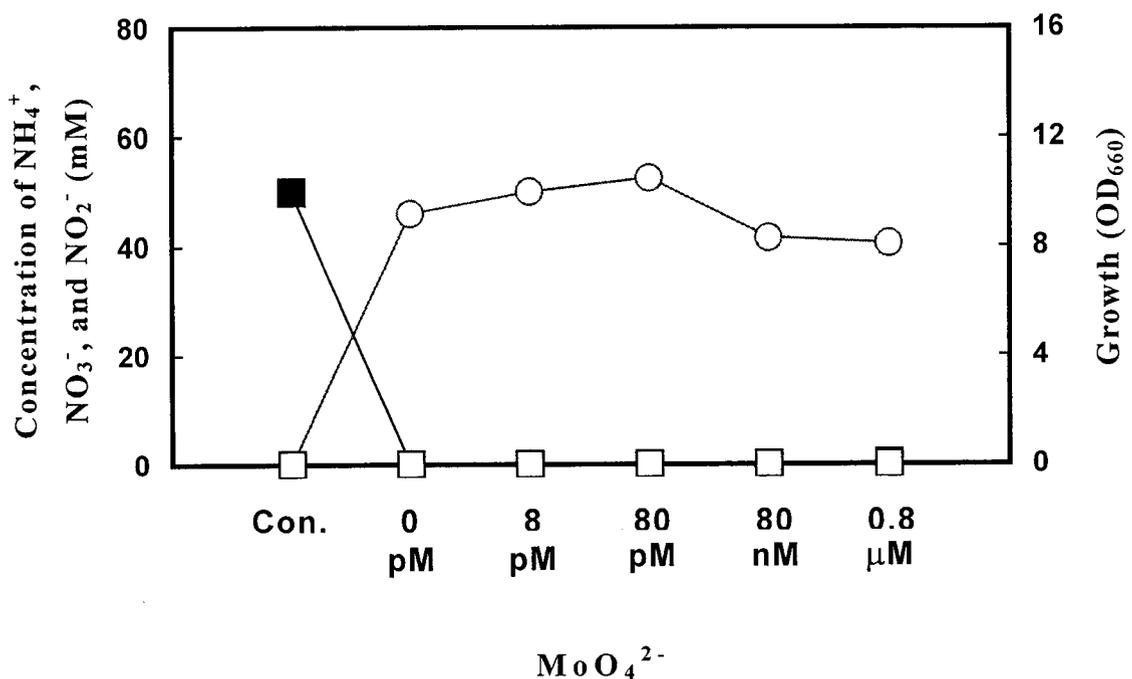


Fig. 2-4. Effect of concentrations of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> on the removal of 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 0.1 mM Fe<sup>2+</sup> in the presence of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

### 第3節 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の同時除去に与える通気量の影響

#### <方法>

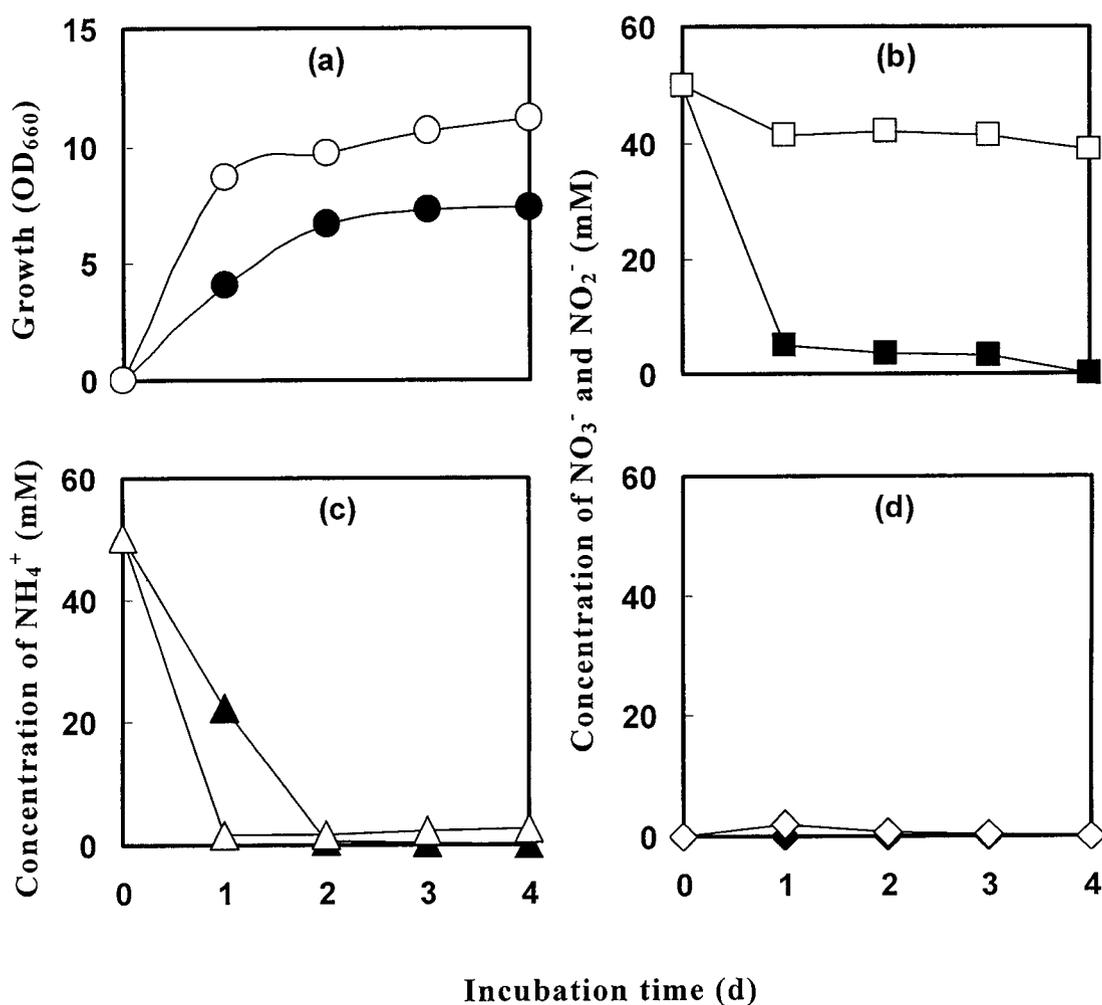
Table 2-2 に示す 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°Cにおいて試験管 (5 ml/tube) で 140 rpm で振とう培養した。培養開始 2 日後、培養液全量を 70 ml の培地を含む 500 ml のフラスコに移し、30°C で振とう培養した。経時的に 5 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を定量した。検討した振動数は 100 rpm および 140 rpm であった。

**Table 2-2. 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	15.0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	50.0	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4.0	g
NaCl	0.5	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.8	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH		7.1

#### < 結果 >

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いた場合の結果を Fig. 2-5 に示す。振動数 140 rpm の場合には、培養開始 1 日後、97% の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を除去した。菌の増殖および NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の除去は、振動数 100 rpm の時より良好であった (Fig. 2-4-(a),(c))。しかし、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 20% しか除去されなかった (Fig. 2-4-(b))。また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の蓄積も見られた (Fig. 2-4-(d))。一方、振動数 100 rpm で培養すると本菌は良好に増殖し、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> および NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を同時に完全除去することができた (Fig. 2-4-(a),(c),(b))。また、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の蓄積は見られなかった (Fig. 2-4-(d))。



**Fig. 2-4. Effect of shaking speeds on the removal of 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking at 100 or 140 rpm in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ .

(a) cell growth: ○, 140; and ●, 100 rpm.

(b)  $\text{NO}_3^-$ : □, 140; and ■, 100 rpm.

(c)  $\text{NH}_4^+$ : △, 140; and ▲, 100 rpm.

(d)  $\text{NO}_2^-$ : ◇, 140; and ◆, 100 rpm.

## 第4節 培養における全窒素量の変化

### <方法>

#### 1. 0.5% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地中の全窒素量の変化

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地にて好気条件下 (振動数 100 rpm) で本章 3 節で述べた方法により培養した。

全窒素量はケルダール法によりアンモニア態窒素に変換し、蒸留器 (柴田科学株式会社、東京) を用いて、蒸留により得られたアンモニア態ガスを 10% (w/v) ホウ酸溶液に吸収させた後、1/500 N HCl 溶液で滴定を行い、アンモニア態窒素を定量した<sup>25)</sup>。

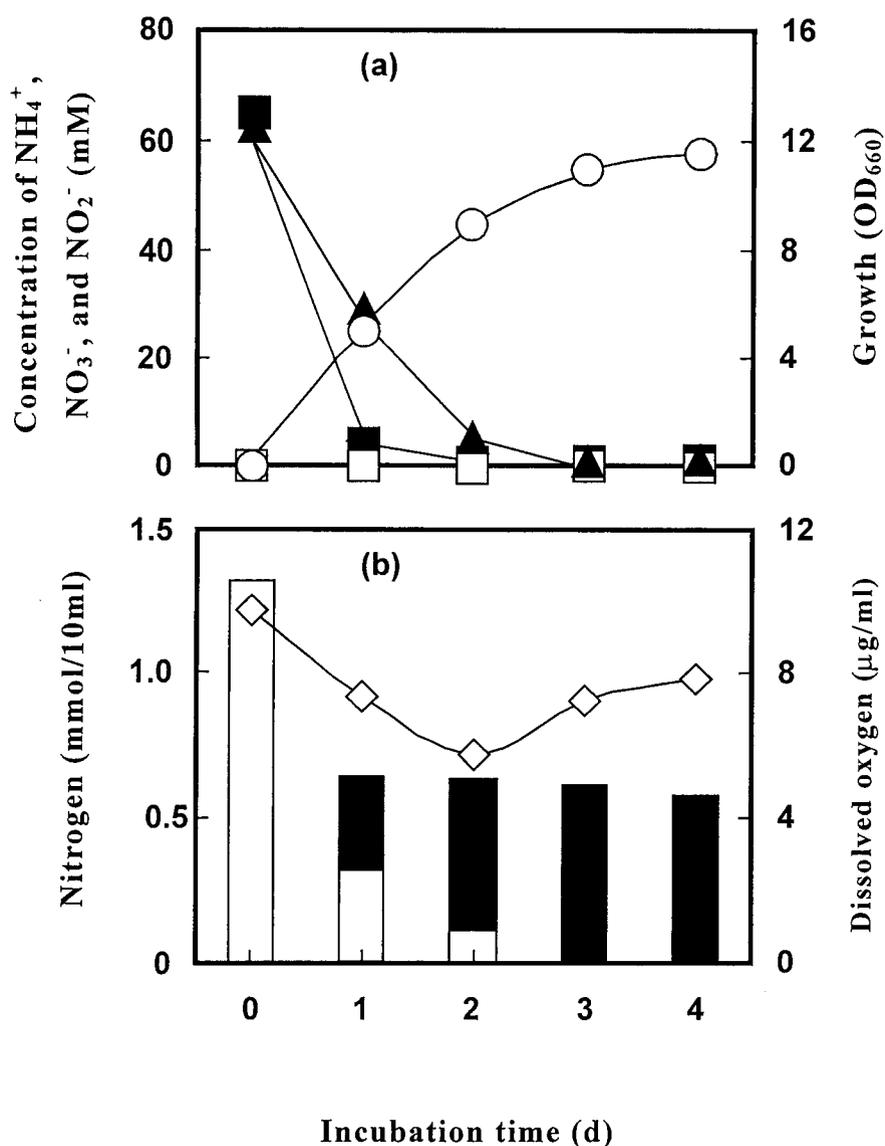
#### 2. 全窒素量の変化に与える $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の濃度の影響

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、アンモニア態窒素濃度と硝酸態窒素濃度の合計が 50 mM になるように設定した  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の各比率 (0:4、1:3、2:2、3:1、4:0) の培地を用いて、好気条件下 (振動数 100 rpm) で本章 3 節で述べた方法により培養した。経時的にサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  と全窒素量を定量した。

### <結果>

#### 1. 0.5% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地中の全窒素量の変化

本菌の増殖および培地中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  濃度の変化を Fig. 2-5-(a) に示す。また、Fig. 2-5-(b) に培養液中の全窒素量の変化を示す。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  は、培養開始 4 日後に培地から完全に除去された。この時、培地中の窒素化合物は消失していた。菌体中には、培養開始時に加えた全窒素量の 41% が存在していた。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  をほぼ完全に除去された時点で、培養液に溶存している酸素量は、培養の全期間を通じて最も低いことがわかった。

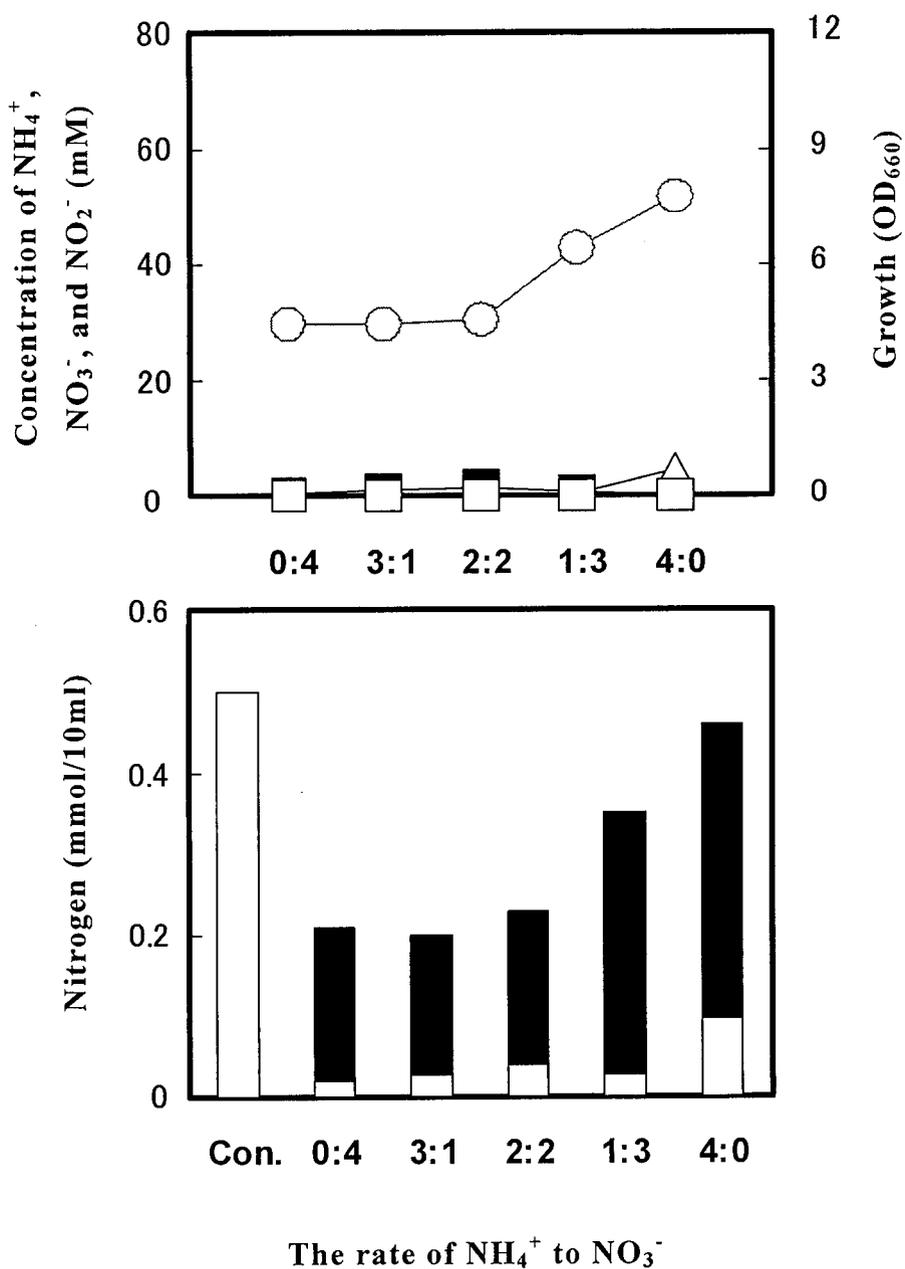


**Fig. 2-5. Utilization of 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 (a) and total nitrogen (b) in the culture.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (100 rpm) in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ),  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ), dissolved oxygen ( $\diamond$ ), and total nitrogen in the cells (black bar) and in the cultural supernatant (white bar) were measured.

## 2. 全窒素量の変化に与える $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ 濃度の影響

本菌の増殖および各培地中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  濃度の変化を Fig. 2-6-(a)に示す。また、Fig. 2-6-(b)に各培養液中の全窒素量の変化を示す。培養開始 4 日後に  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を各培地から良好に除去された。 $\text{NH}_4^+$  の濃度の増加につれて、本菌の増殖も促進されており、培養液中の残存する全窒素量も増加した。



**Fig. 2-6. Utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 (a) and total nitrogen (b) in the culture.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (100 rpm) in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 50 mM  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  (the ratio of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_3^-$  was 0:4, 3:1, 2:2, 1:3, or 4:0) in the presence of 5% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\text{O}$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ),  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ), and total nitrogen in the cells (black bar) and in the cultural supernatant (white bar) were measured.

## 第 5 節 要約と考察

### < 要約 >

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ を含む培地において、最高で 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を完全に除去することができた。また、 $\text{NO}_2^-$ の蓄積はほとんど見られなかった。本菌を用いて、0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、金属イオンを含まない培地では、菌の増殖は抑制され、両イオンも余り消費されなかった。 $\text{Fe}^{2+}$ と  $\text{Fe}^{3+}$ を添加する時だけ、本菌は良好に増殖し、培地中の両イオンを同時に除去できた。 $\text{MoO}_4^{2-}$ は両イオンの除去に余り影響を与えなかった。0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地中に 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を含む時、本菌は、培養開始 4 日後  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、500 ml フラスコで培養を行ったところ、振動数 140 rpm では 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を完全に除去することができなかったが、振動数を 100 rpm に減少することにより除去することができた。

培養過程における全窒素量の変化を測定したところ、0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ が完全に除去された時、培養上清中には窒素化合物は存在していなかった。この時、菌体中には始めに加えた全窒素量の 41%が存在していた。

### < 考察 >

培地中に  $\text{Fe}^{2+}$ が存在しない時、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を余り除去しなかった。植物や微生物において、 $\text{NH}_4^+$ や  $\text{NO}_3^-$ の代謝には鉄、モリブデンを含む各種の酵素（硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素、グルタミン酸シンテターゼ等）が関与することが報告されており<sup>26-30)</sup>、本菌が鉄を要求することは合理的に説明できる。モリブデンは本菌の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ の除去に余り影響を与えなかった。これは必要とされるモリブデンの量は鉄に比べて微量であり、培地に用いた各種の試薬中に含まれるモリブデンで必要な量は満たされているものと考えられる。 $\text{Fe}^{2+}$ と  $\text{Fe}^{3+}$ は本菌の  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ の除去にほぼ同じ効果を示した。 $\text{Fe}^{3+}$ は培養中に赤色沈殿を生じるなど添加する金属塩としては扱いにくい。一方、 $\text{Fe}^{2+}$ は徐除に酸化されて  $\text{Fe}^{3+}$ に変換されていくと思われるが、2~3 週間は安定であるので、今回の実験には  $\text{Fe}^{2+}$ を用いた。

0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地を用いて場合、振動数を 140 rpm に設定した時、*P. aeruginosa* NBRC 12689 の増殖を促進したが、培養開始時に加えた  $\text{NO}_3^-$ の 80%が残存した。一方、振動数を 100 rpm を設定した時、本菌は良好に増殖し、培地中の  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ も完全に除去した。*P. aeruginosa* の菌株は嫌気条件下で脱窒できるこ

とが報告された<sup>32)</sup>。また、anammox 菌株以外の微生物において、嫌気条件下で  $\text{NH}_4^+$  の代謝には、かなり難しいことが知られており<sup>33-35)</sup>、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去するために、振動数と培養容器を適当に設定することが必要だと考えられる。

詳しい脱窒機構の解析については、第5章で  $^{15}\text{N-NH}_4^+$ 、 $^{15}\text{N-NO}_3^-$  を用いた実験により記述する。

### 第3章 効率的な $\text{NH}_4^+$ の除去に与える培養条件の影響

#### 第1節 序

第1章において、試験した18株のうち、*P. aeruginosa* NBRC 12689株が好気条件下で0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ を除去することがわかった。本実験に用いた培地には、0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ が含まれており、第3章では、NBRC 12689株を用いて、培地からさらに高濃度の  $\text{NH}_4^+$ を完全に除去する条件を見いだすことを目的として実験を行う。すなわち、 $\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンおよび培養振動数などの影響等を調べることにより、 $\text{NH}_4^+$ 除去の効率的な培養条件を検討する。また、培養中に全窒素の変化も調べる。

$\text{NH}_4^+$ を唯一の窒素源とする培地は  $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_3^-$ を窒素源とする培地とは異なっており、従って、 $\text{NH}_4^+$ を除去する培養条件も異なることが予想される。本章ではこれらの点を中心に検討することとする。

#### 第2節 $\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンの影響

##### <方法>

##### 1. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンの影響

Table 3-1 に示す 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製した。終濃度が 0.1 mM になるように各種の金属塩を無菌的に加えた。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°Cにおいて試験管で 140 rpm で振とう培養し、経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した金属イオンは  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ であった。

培地の pH は、2N NaOH 溶液を用いて中性付近になるように補正した。

##### 2. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える $\text{Fe}^{2+}$ 濃度の影響

各種濃度の  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  および 5% (w/v) D-グルコースを添加した 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製し、これに、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°Cにおいて試験管で 140 rpm で振とう培養した。経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は 0、0.02、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.3 mM であった。

培地の pH は 2N NaOH 溶液を用いて中性付近になるように補正した。

### 3. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える $\text{MoO}_4^{2-}$ の影響

各種濃度の  $\text{MoO}_4^{2-}$ を含む 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を調製し、それぞれに 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ および 5% (w/v) D-グルコースを添加した。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°Cにおいて試験管で 140 rpm で振とう培養し、経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ を定量した。検討した  $\text{MoO}_4^{2-}$ 濃度は 0、8 pM、80 pM、80 nM、0.8  $\mu\text{M}$ であった。

培地の pH は 2N NaOH 溶液を用いて中性付近になるように補正した。

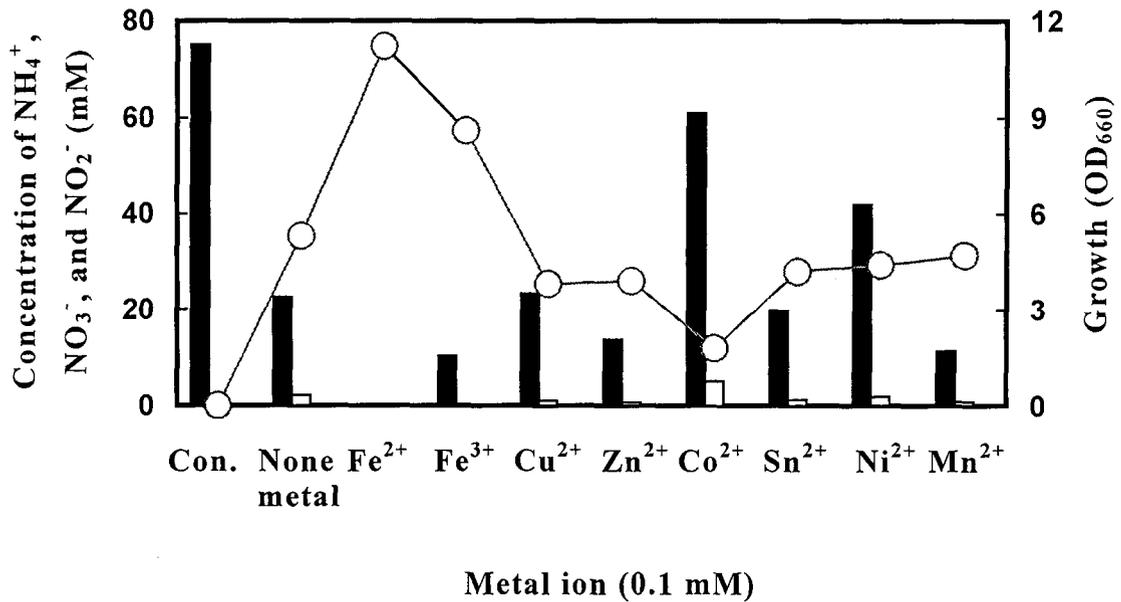
Table 3-1.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  medium

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.0	g
D-Glucose	50	g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	4	g
NaCl	0.50	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	g
Metal salt	0.1	mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.8	nM
$\text{H}_2\text{O}$	1,000	ml
pH	7.1	

#### <結果>

##### 1. $\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンの影響

$\text{NH}_4^+$ の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を添加する時にのみ、本菌は 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地中の  $\text{NH}_4^+$ を良好に除去した。一方、 $\text{Co}^{2+}$ を添加した培地では、本菌の増殖も抑制され、 $\text{NH}_4^+$ の除去効率も悪かった (Fig. 3-1)。



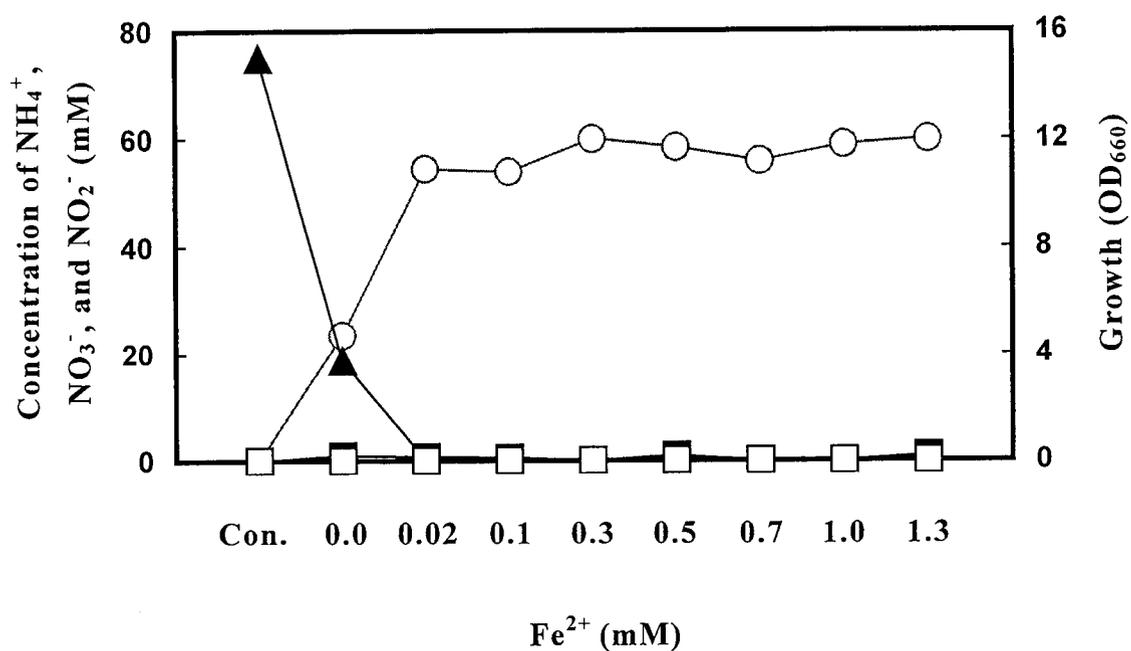
**Fig. 3-1. Effect of metal ions on the removal of 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 5% (w/v) D-glucose, and 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.1 mM metal ion and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (black bar), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (white bar), and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (hatched bar) were measured.

## 2. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去に与える Fe<sup>2+</sup>の影響

0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地を用いた場合、Fe<sup>2+</sup>を添加しない時、本菌の増殖は不十分であるが、0.02~1.3 mM Fe<sup>2+</sup>を添加すると、本菌の増殖は促進されるとともに、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>も完全に除去された (Fig. 3-2)。

さらに高濃度の NH<sub>4</sub>Cl を用いた場合、本菌の増殖と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える Fe<sup>2+</sup>濃度の影響を調べた。その結果、本菌は 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>を含む 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地から NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を完全に除去した (Fig. 3-3)。



**Fig. 3-2. Effect of concentrations of Fe<sup>2+</sup> on the removal of 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 5% (w/v) D-glucose, and 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.1-1.3 mM Fe<sup>2+</sup> and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

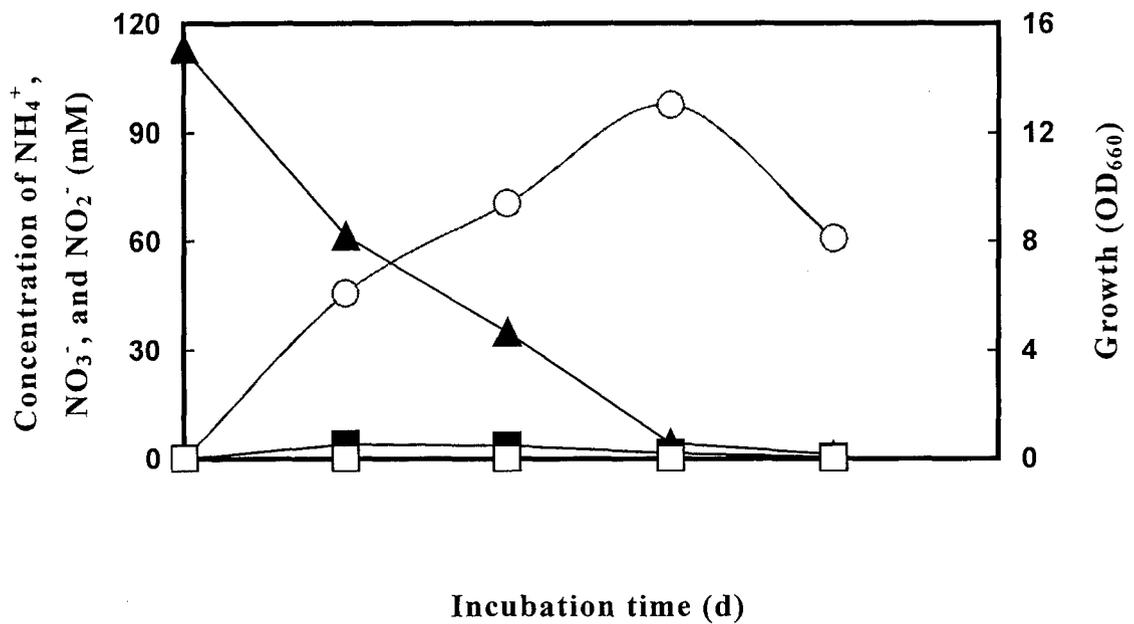


Fig. 3-3. Utilization of 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689

The strain was incubated for 4 d at 30°C with shaking (140 rpm) in the medium (5 ml/tube) containing 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 8% (w/v) D-glucose, 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, and 0.5 mM Fe<sup>2+</sup> and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

### 3. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去に与える MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の影響

5% (w/v) D-グルコースと 0.5mM Fe<sup>2+</sup>を含む 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地に各濃度の MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を添加した場合、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去率はほぼ同じであり、本菌はこれらの条件において NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を良好に除去することがわかった (Fig. 2-4)。

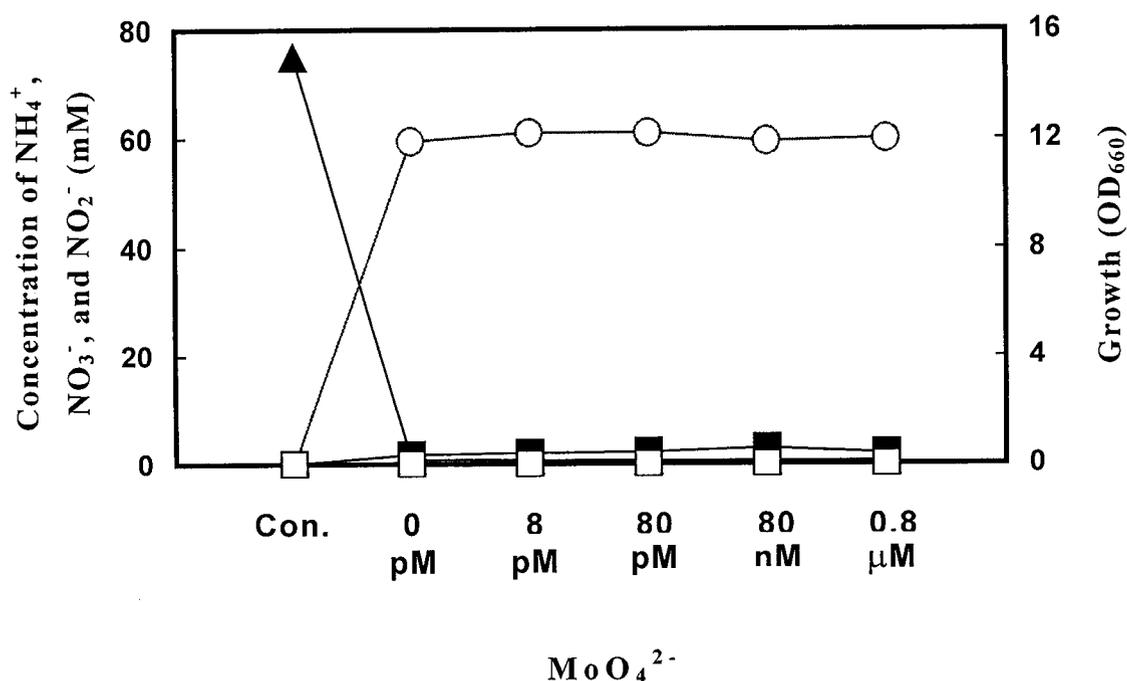


Fig. 3-4. Effect of concentrations of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> on the removal of 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the medium (5 ml/tube) containing 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 8% (w/v) D-glucose, and 0.1 mM Fe<sup>2+</sup> in the presence of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

### 第3節 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去に与える通気量の影響

#### <方法>

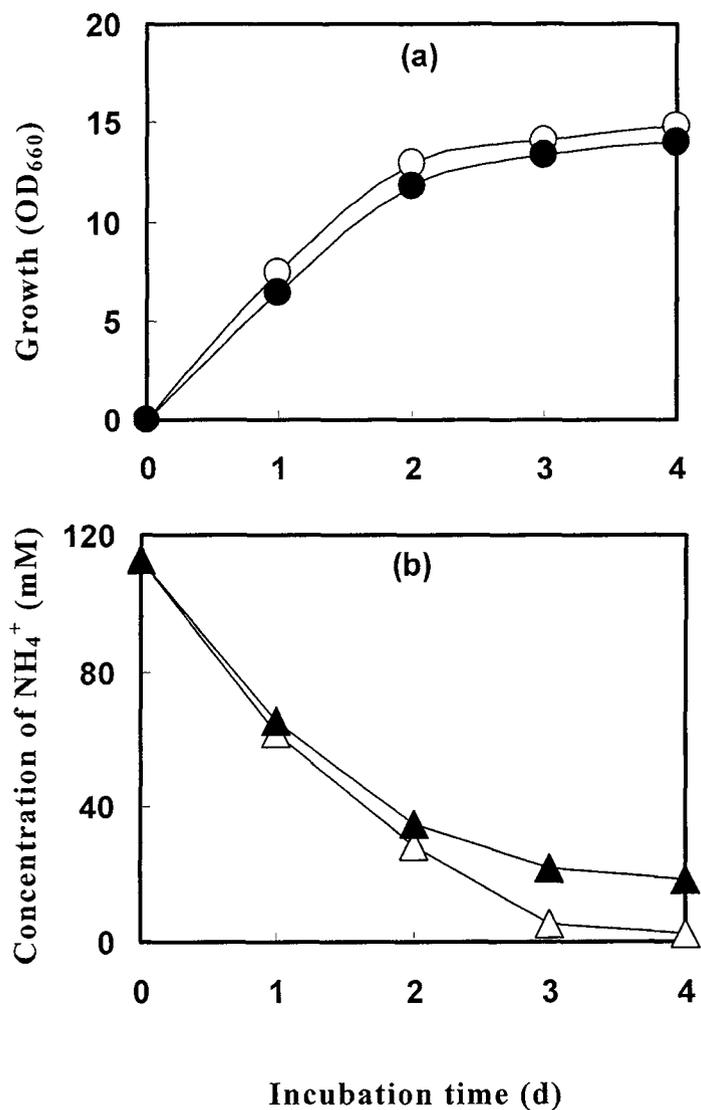
前培養において、Table 3-2 に示す 0.25% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°C において試験管 (5 ml/tube) で 140 rpm で振とう培養した。培養開始 2 日後、培養液の全量を 70 ml の 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地を含む 500 ml のフラスコに移し、30°C で振とう培養した。経時的に 5 ml の培養液をサンプリングした際に、2 N の NaOH 溶液を用いて、培地の pH を中性付近になるように補正した。その濁度と培地中に残存する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を定量した。検討した振動数は 100 rpm および 140 rpm であった。

Table 3-2. 0.25% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl medium

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	15.0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	30.0	g
NH <sub>4</sub> Cl	2.5	g
NaCl	0.5	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.8	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH		7.1

<結果>

振動数 100 rpm の場合には、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を完全に除去できなかった。一方、振動数 140 rpm で培養すると本菌は良好に増殖し (Fig. 3-5-(a))、培養開始 4 日後 98% の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を除去した (Fig. 3-5-(b))。いずれの場合にも NO<sub>3</sub><sup>-</sup>および NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の蓄積は見られなかった。



**Fig. 3-5. Effect of shaking speeds on the removal of 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking at 100 or 140 rpm in the medium (70 ml/500-ml flask) containing 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 8% (w/v) D-glucose, 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

(a) cell growth: ○, 140; and ●, 100 rpm.

(b) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: △, 140; and ▲, 100 rpm.

## 第 4 節 培養における全窒素量の変化

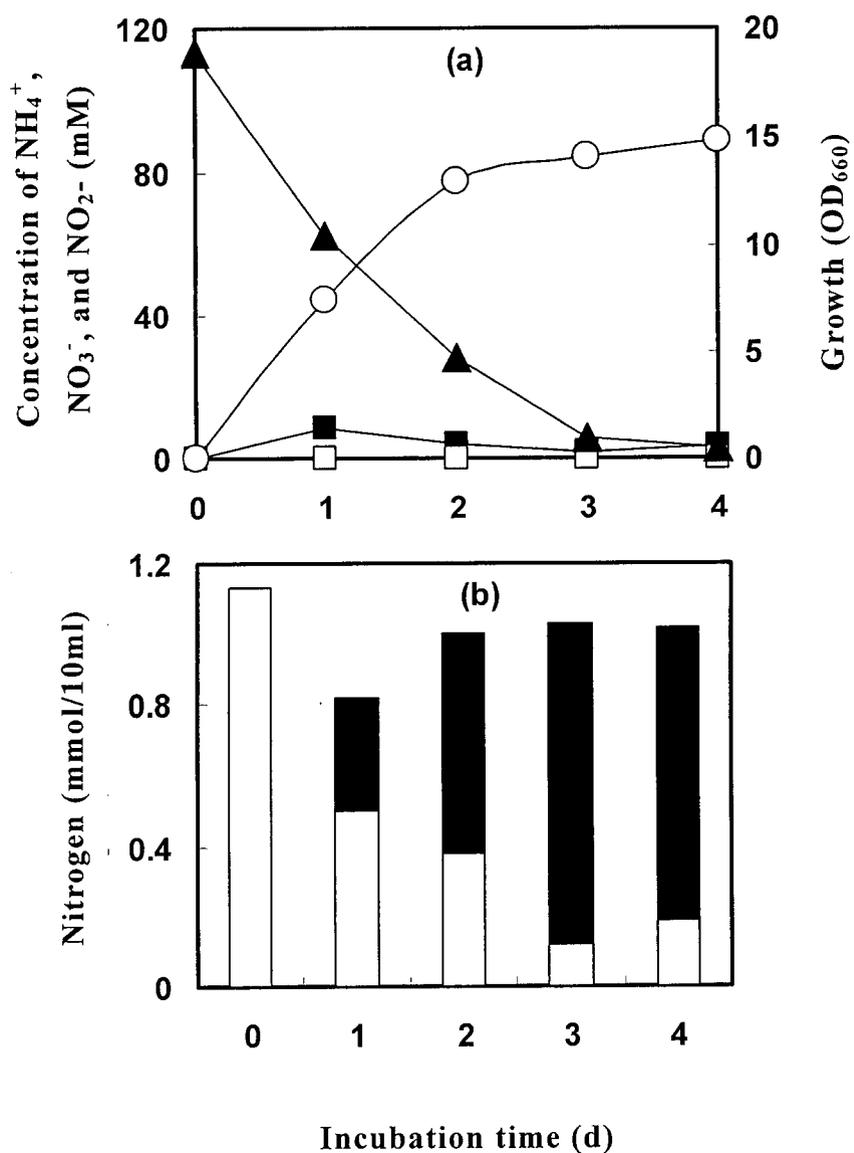
### <方法>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地にて好気条件下 (振動数 140 rpm) で本章 4 節で述べた方法により培養した。

全窒素は第 2 章 4 節で述べた方法により定量した。

### <結果>

本菌の増殖および培地中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  濃度の変化を Fig. 3-6-(a) に示す。また、Fig. 3-6-(b) に培養液中の全窒素量の変化を示す。 $\text{NH}_4^+$  は、培養開始 4 日後に始めに加えた量の 98% が除去された。この時、培養上清に存在する窒素化合物の量は、始めに加えた全窒素量の 17% であった。菌体中の全窒素量は培養が進むに連れて次第に増加し、培養開始 4 日後には始めに加えた全窒素量の 73% が存在していた。培養開始 1 日後の培地中には  $\text{NO}_3^-$  がわずかに蓄積していた。



**Fig. 3-6. Utilization of 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 (a) and total nitrogen (b) in the culture.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■),  $\text{NO}_2^-$  (□), and total nitrogen in the cells (black bar) and in the cultural supernatant (white bar) were measured.

## 第 6 節 要約と考察

### <要約>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、金属イオンを含まない 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地では、菌の増殖は不十分で、 $\text{NH}_4^+$  も 33% 残存した。 $\text{Fe}^{2+}$  を添加すると、本菌の増殖は促進され、培地中の  $\text{NH}_4^+$  を完全に除去することができた。 $\text{MoO}_4^{2-}$  は  $\text{NH}_4^+$  の除去に余り影響を与えなかった。0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地が 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$  を含む時、本菌は、培養開始 4 日後  $\text{NH}_4^+$  を完全に除去した。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、500 ml フラスコで培養を行ったところ、振動数 140 rpm の時 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を完全に除去した。

培養過程における全窒素量の変化を測定したところ、0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  が完全に除去された時、培養上清中に存在する窒素化合物は始めに加えた全窒素量の 17% であり、菌体中には 73% が存在していた。

### <考察>

培地中に  $\text{Fe}^{2+}$  が十分存在しない時、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖は不十分で、 $\text{NH}_4^+$  も完全に除去できなかった。しかし、 $\text{Fe}^{2+}$  の濃度が増加するに連れて、高濃度の  $\text{NH}_4^+$  を除去することがわかった。第 2 章で考察したように、 $\text{NH}_4^+$  代謝には鉄を含む各種の酵素（グルタミン酸シンテターゼ等）が関与することが報告されているので<sup>26-30</sup>、本菌の  $\text{NH}_4^+$  の代謝にも  $\text{Fe}^{2+}$  が必要であると考察した。

本菌は、500 ml のフラスコを用いて培養した時、振動数 140 rpm の時、0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を完全に除去した (Fig 3-4)。この結果は、 $\text{NH}_4^+$  の除去には酸素が十分供給されることが必要であることを示している。

Fig. 3-6 において、培養開始 1 日後、培養液中の全窒素量は減少した。この時、培養上清中には  $\text{NO}_3^-$  がわずかであるが蓄積しており、この  $\text{NO}_3^-$  は培地中の  $\text{NH}_4^+$  に由来すると思われる。すなわち、培養開始 1 日後、本菌には  $\text{NO}_3^-$  などケルダール法では検出できない窒素成分が蓄積したと考察した。

## 第4章 効率的な NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える培養条件の影響

### 第1節 序

第1章において、試験した18株のうち、*P. aeruginosa* NBRC 12689株は1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>培地中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去することがわかった。第1章の実験に用いた培地には、0.1 mM Fe<sup>2+</sup>、80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が含まれており、第4章では、本菌を用いて、培地からさらに高濃度のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去する条件を見いだすことを目的として実験を行う。すなわち、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属イオンおよび培養振動数の影響等を調べることにより、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>除去の効率的な培養条件を検討する。また、培養中の全窒素の変化も調べる。

### 第2節 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属イオンの影響

#### <方法>

#### 1. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属イオンの影響

Table 4-1 に示す1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>培地を調製した。終濃度が0.1 mM になるように各種の金属塩を無菌的に加えた。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpm で振とう培養した。経時的に0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存するNH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。検討した金属イオンはFe<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>であった。

#### 2. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与えるFe<sup>2+</sup>の影響

各種濃度のFe<sup>2+</sup>、80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>および5% (w/v) D-グルコースを添加した1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpm で振とう培養した。経時的に0.7 ml の培養液の濁度と培地中に残存するNH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。検討したFe<sup>2+</sup>濃度は0、0.02、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.3 mM であった。

#### 3. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与えるMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の影響

各種濃度のMoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>培地を調製し、それぞれに0.1 mM Fe<sup>2+</sup>および5% (w/v) D-グルコースを添加した。これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30℃において試験管で140 rpm で振とう培養し、経時的に0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存するNH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。検討した MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>濃度は 0、8 pM、80 pM、80 nM、0.8 μM であった。

Table 4-1. NaNO<sub>3</sub> medium

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
NaNO <sub>3</sub>	18	g
D-Glucose	50	g
NaCl	0.50	g
Metal salt	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	80	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH	7.1	

<結果>

1. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属イオンの影響

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、0.1 mM Fe<sup>2+</sup>を添加した時のみ、本菌は 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を良好に除去した (Fig. 4-1)。

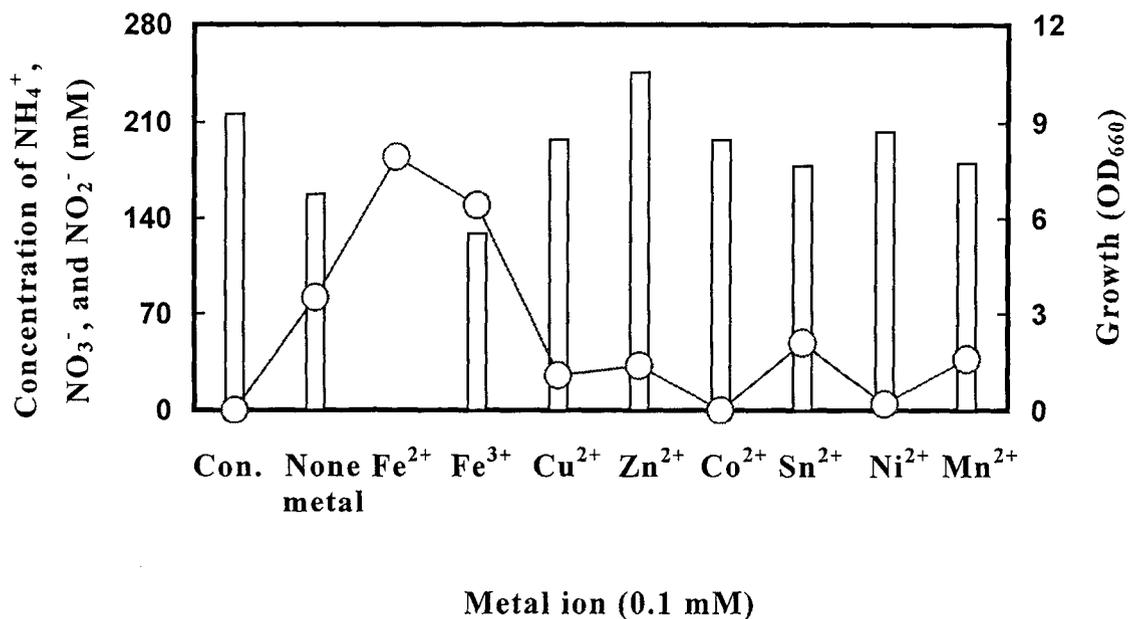


Fig. 4-1. Effect of metal ions on the removal of 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.1 mM metal ion and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (black bar), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (white bar), and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (hatched bar) were measured.

## 2. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える Fe<sup>2+</sup>濃度の影響

1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地を用いた場合、Fe<sup>2+</sup>を添加しない時、0.1~1.3 mM Fe<sup>2+</sup>を添加すると、本菌の増殖を増殖するとともに、培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も完全に除去された (Fig. 4-2)。

さらに高濃度の NaNO<sub>3</sub>を用いた場合、本菌の増殖と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える Fe<sup>2+</sup>濃度の影響を調べた。その結果、本菌は 0.3~1.3 mM Fe<sup>2+</sup>を添加すると NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は完全に除去した。Fig. 4-3 に本菌を用いて 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>を含む 2.0% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地から NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去結果を示す。

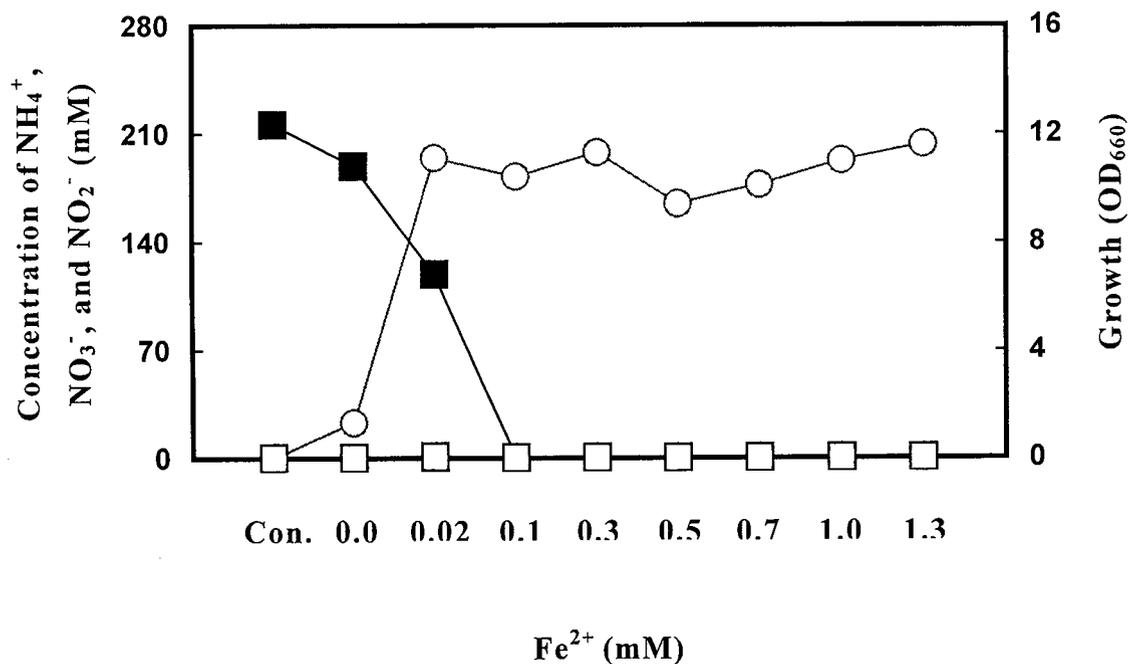
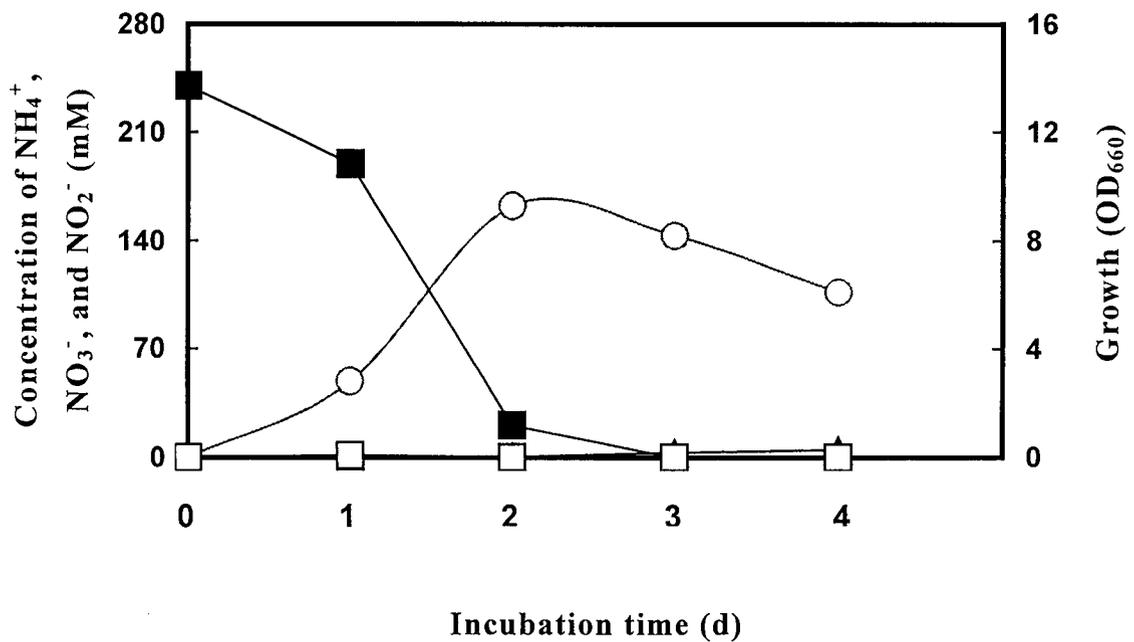


Fig. 4-2. Effect of concentrations of Fe<sup>2+</sup> on the removal of 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.

The strain was incubated for 4 d at 30°C with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.1-1.3 mM Fe<sup>2+</sup> and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

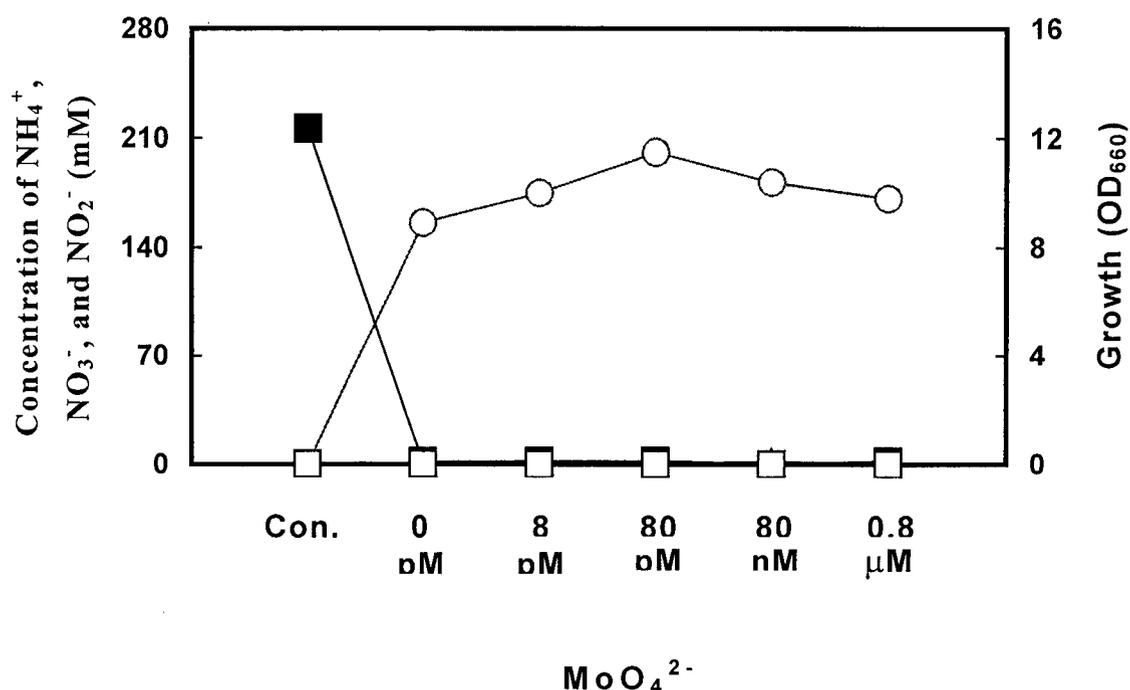


**Fig. 4-3. Utilization of 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The strain was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ),  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ) were measured.

### 3. $\text{NO}_3^-$ の除去に与える $\text{MoO}_4^{2-}$ の影響

5% (w/v) D-グルコースと 0.5mM  $\text{Fe}^{2+}$ を含む 1.8% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地に各濃度の  $\text{MoO}_4^{2-}$ を添加した場合、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖、 $\text{NO}_3^-$ の除去率はほぼ同じであり、本菌はこれらの条件下において  $\text{NO}_3^-$ を良好に除去することがわかった (Fig. 4-4)。



**Fig. 4-4. Effect of concentrations of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> on the removal of 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking (140 rpm) in the basal medium (5 ml/tube) containing 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 0.5 mM Fe<sup>2+</sup> in the presence of MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) were measured.

### 第 3 節 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える通気量の影響

#### <方法>

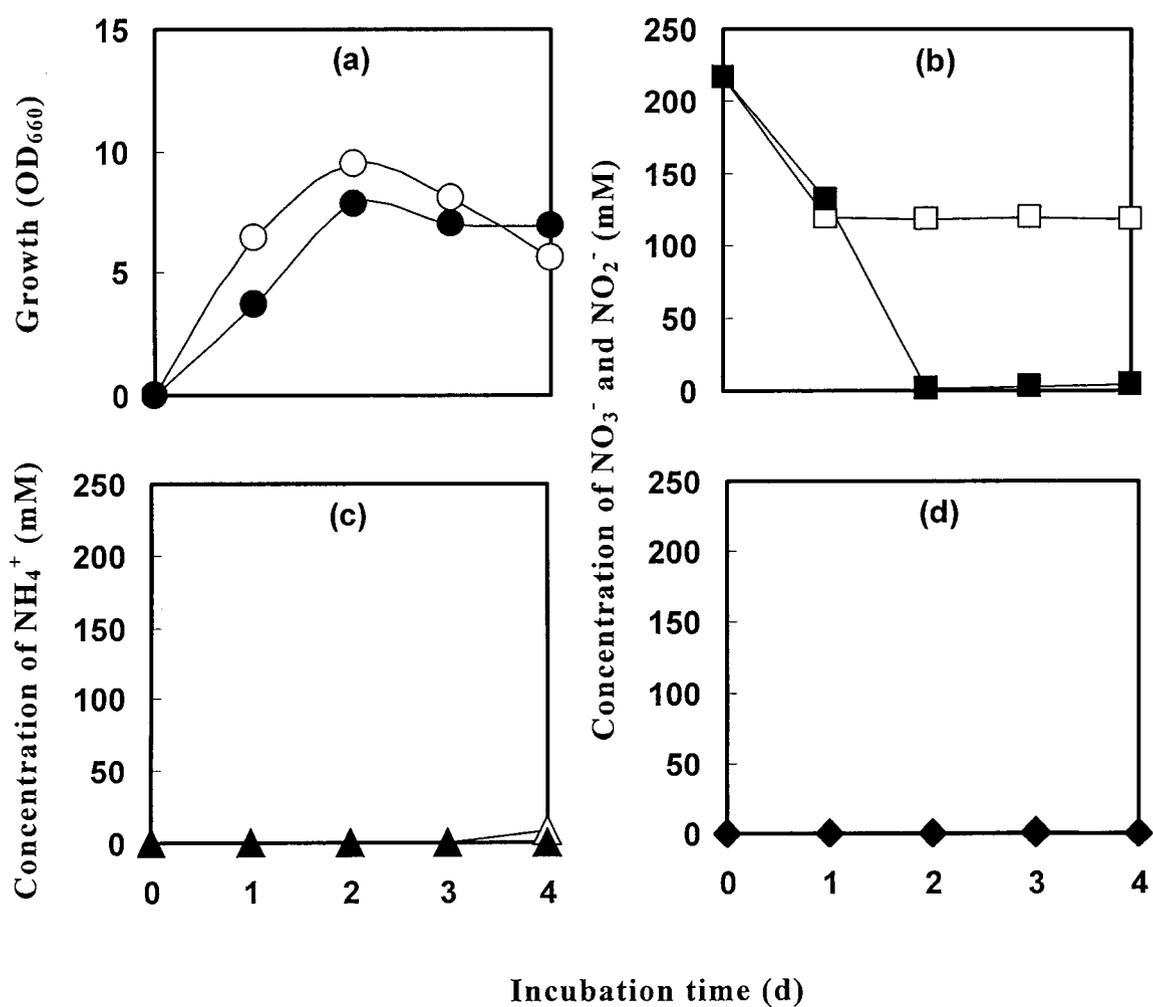
Table 4-2 に示す 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°Cにおいて試験管 (5 ml/tube) で 140 rpm で振とう培養した。培養開始 2 日後、培養液全量を 70 ml の培地を含む 500 ml のフラスコに移し、30°C で振とう培養した。経時的に 5 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量した。検討した振動数は 100 rpm および 140 rpm であった。

**Table 4-2. 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	50	g
NaNO <sub>3</sub>	18	g
NaCl	0.50	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.20	g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	80	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH	7.1	

< 結果 >

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いた試験結果を Fig. 4-5 に示す。振動数 140 rpm の時、培養開始 1 日後 45% の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を除去した。本菌の増殖は、振動数 100 rpm の時より良好であった (Fig. 4-5-(a))。しかし、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 20% しか除去されなかった (Fig. 4-5-(b))。また、0.5 mM の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を蓄積した。一方、振動数 100 rpm で培養すると本菌は良好に増殖し (Fig. 4-5-(a))、培養開始 1 日後 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を完全に除去することができた (Fig. 4-5-(b))。また、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> および NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の蓄積は見られなかった (Fig. 4-5-(c),(d))。



**Fig. 4-5. Effect of shaking speeds on the removal of 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689.**

The strain was incubated at 30°C for 4 d with shaking at 100 or 140 rpm in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

(a) cell growth: ○, 140; and ●, 100 rpm.

(b) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: □, 140; and ■, 100 rpm.

(c) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: △, 140; and ▲, 100 rpm.

(d) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: ◇, 140; and ◆, 100 rpm.

#### 第 4 節 培養における全窒素量の変化

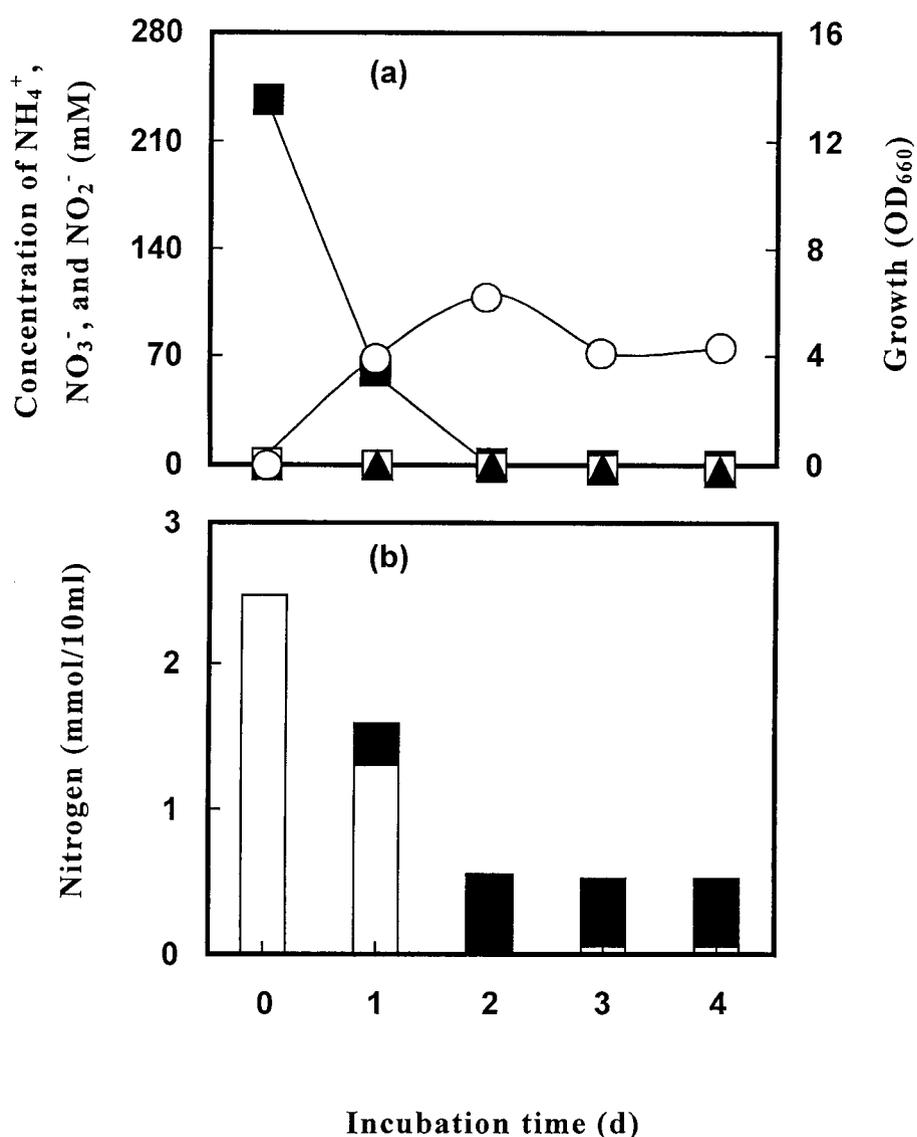
##### <方法>

2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地を用いて、好気条件下 (振動数 100 rpm) で本章 3 節で述べた方法により *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を培養した。

全窒素は第 2 章 4 節で述べた方法により定量した。

##### <結果>

本菌の増殖および培地中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  濃度の変化を Fig. 4-6-(a) に示す。また、Fig. 4-6-(b) に培養液中の全窒素量の変化を示す。 $\text{NO}_3^-$  は、培養開始 3 日後に培地から完全に除去された。この時、培養上清中の窒素化合物は始めに加えた全窒素量の 1.4% であり、菌体中の全窒素量は培養が進むにつれて次第に増加し、培養開始 3 日後には始めに加えた全窒素量の 23% が存在していた。



**Fig. 4-6. Utilization of 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 (a) and total Nitrogen (b) in the culture.**

The strain was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 4 d with shaking (100 rpm) in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 5% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\text{O}$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ),  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ), and total nitrogen in the cells (black bar) and in the cultural supernatant (white bar) were measured.

## 第5節 要約と考察

### <要約>

0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ を含む  $\text{NaNO}_3$  培地において、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は最高で 1.8% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を完全に除去することができた。本菌を用いて、 $\text{NO}_3^-$ の除去に与える金属イオンと振動数の影響を調べ、本菌の  $\text{NO}_3^-$  除去の最適条件を設定した。500 ml 容のフラスコを用い、振動数 100 rpm で、培地中に 5% (w/v) D-グルコース、0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ 、80 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ を含む時、本菌は、培養開始 3 日後 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地中の  $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。

2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を含む培地において、培養過程における全窒素量の変化を測定したところ、培養開始 3 日後、培養上清中の窒素化合物は始めに加えた全窒素量の 1.4% であり、菌体中の全窒素量は 23% であった。

### <考察>

培養条件の検討により、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は最高で 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を処理し、 $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。この時  $\text{NO}_3^-$ の窒素原子としての濃度は 3,200 ppm である。本菌が  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を処理する場合は最高で 0.5% (w/v) (窒素原子として 1,700 ppm)、 $\text{NH}_4^+$ を処理する場合は 0.6% (w/v) (窒素原子として 1,500 ppm) であり、本菌は  $\text{NO}_3^-$ を処理する場合は極めて高濃度まで使用できることを示している<sup>32,36)</sup>。

本菌は、 $\text{NaNO}_3$  を窒素源とする培地において培養開始 3 日後に、培地に加えた全窒素量の約 76% を除去することがわかった (Fig 4-6)。除去された全窒素は  $\text{N}_2$  として脱窒されたと思われる。すなわち、培養液中から窒素化合物が大量に除去されるため、高濃度の  $\text{NaNO}_3$  も処理できると考えられる。

脱窒機構の解析については、第 5 章で  $^{15}\text{N}\text{-NO}_3$  を利用して記述する。

## 第5章 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の代謝過程、脱窒機構の解析

### 第1節 序

4章までに、*P. aeruginosa* NBRC 12689株は好気条件下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を利用し、全窒素の減少を伴って両窒素源を培地から完全に除去することを述べた。これらの結果は、本菌が両窒素化合物を代謝することを示している。

そこで、本章では、硝酸の代謝およびアンモニア同化に関与する酵素の活性を調べることにより、本菌における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に関与する酵素を解析する。また、 $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $^{15}\text{NaNO}_3$ を窒素源として培養し、本菌における脱窒機構を解析する。

### 第2節 硝酸および亜硝酸の代謝に関与する酵素系の解析

#### <方法>

#### 1. 菌体の取得および粗酵素液の調製

Table 5-1 に示す 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°Cにおいて試験管 (5 ml/tube) で 140 rpm で振とう培養した。培養開始 2 日後、培養液全量を 70 ml の 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地培地を含む 500 ml のフラスコに移し、30°C で振とう培養した。振動数は 100 rpm、140 rpm および振とうしない静置培養 (窒素置換) であった。経時的に 10 ml の培養液をサンプリングし、その濁度を定量した後、遠心分離 (10,000×g、10 分) し、得られた上清中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。遠心分離にて菌体を回収し、0.8% (w/v) NaCl 溶液で 2 回洗浄した後、菌体 1 g あたり 50 mM K-Na Phosphate buffer (pH 7.1) 10 ml を加えて懸濁し、KUBOTA INSONATOR 201M (クボタ商事、東京) を用いて 180 W で 5 分間超音波処理した。超音波処理した溶液を遠心分離 (10,000×g、10 分) し、得られた上清を粗酵素液とした。

同様な方法により 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地および 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地から得られた菌体をを用いて粗酵素液を調製した。

**Table 5-1. Media consisting of three nitrogen sources**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	50-80	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.0	g
NH <sub>4</sub> Cl	5.0	g
NaNO <sub>3</sub>	20.0	g
NaCl	0.5	g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.8-80	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH		7.1

## 2. 呼吸型硝酸還元酵素活性の測定法

呼吸型硝酸還元酵素は、還元型メチルビオロゲンを電子供与体、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を電子受容体として酵素反応を行い、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の還元により生じたNO<sub>2</sub><sup>-</sup>を測定することにより、定量した<sup>37)</sup>。Table 5-2 に示す反応液をゴム栓付きの試験管(12×120 mm)に取り、同反応液にN<sub>2</sub>ガスを通気した後、30℃で1分間プレインキュベートした。用時調製した50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-100 mM NaHCO<sub>3</sub>溶液0.2 mlを加え、反応を開始した。5分後ゴム栓を取り外し、反応液を攪拌することによってメチルビオロゲンを空気酸化して反応を止めた。反応液中に生成したNO<sub>2</sub><sup>-</sup>を第1章2節に述べた方法で定量した。NaNO<sub>3</sub>溶液の代わりに0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)を添加したものを対照とした。酵素1 unitは、30℃において1分間に1 μmolのNO<sub>2</sub><sup>-</sup>を生成する酵素量と定義した。比活性はタンパク質1 mg当たりの酵素活性で示した。タンパク質はLowryの方法によって定量した<sup>38)</sup>。標準タンパク質はウシ血清アルブミンを使用した。

**Table 5-2. Reaction mixture for the assay of respiratory nitrate reductase**

0.5 M	Na phosphate buffer (pH 7.5)	0.1 ml
0.2 M	NaNO <sub>3</sub> solution	0.1 ml
1 mM	Metyl viologen solution	0.1 ml
50 mM	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> in 100 mM NaHCO <sub>3</sub>	0.2 ml
	Enzyme solution	0.1 ml
	H <sub>2</sub> O	0.4 ml
	Total	1.0 ml

### 3. 同化型硝酸還元酵素活性の測定法

同化型硝酸還元酵素は NAD(P)H (オリエンタル酵母、東京) を電子供与体、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を電子受容体として酵素反応を行い、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の還元により生じた NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を測定することにより、定量した<sup>39)</sup>。Table 5-3 に示す反応液を試験管に取り、30℃でインキュベートし、5 分間反応した後、25% (w/v) ZnSO<sub>4</sub> と 1 M NaOH 溶液 0.1 ml ずつを加え、反応を止めた。遠心分離 (12,000×g、10 分) により得た上清を用いて、生成した NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を第 1 章 2 節に述べた方法で定量した。NaNO<sub>3</sub> 溶液の代わりに 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) を添加したものを対照とした。酵素 1 unit は、30℃において 1 分間に 1 μmol の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を生成する酵素量と定義した。比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。

**Table 5-3. Reaction mixture for the assay of assimilatory nitrate reductase**

0.5 M	Na phosphate buffer (pH 7.5)	0.2 ml
0.2 mM	FAD solution	0.1 ml
67 mM	NaNO <sub>3</sub> solution	0.1 ml
1 mM	NAD(P)H solution	0.1 ml
	Enzyme solution	0.1 ml
	H <sub>2</sub> O	0.4 ml
	Total	1.0 ml

#### 4. 呼吸型亜硝酸還元酵素活性の測定法

呼吸型亜硝酸還元酵素は、還元型メチルビオロゲン、または、PMS (Phenazine methosulfate) を電子供与体、 $\text{NO}_2^-$ を電子受容体として酵素反応を行い、 $\text{NO}_2^-$ の還元により減少した $\text{NO}_2^-$ を測定することにより、定量した<sup>40-41)</sup>。メチルビオロゲンを電子供与体とする時、Table 5-4 に示す反応液をゴム栓付きの試験管 (12×120 mm) に取り、同反応液に  $\text{N}_2$  ガスを通気した後、30°C で 1 分間プレインキュベートした。用時調製した 50 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -100 mM  $\text{NaHCO}_3$  溶液 0.1 ml を加え、反応を開始した。5 分後ゴム栓を取り外し、反応液を攪拌することによってメチルビオロゲンを空気酸化して反応を止めた。反応液中に残存する  $\text{NO}_2^-$  を第 1 章 2 節に述べた方法で定量した。酵素液の代わりに 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) を添加したものを対照とした。酵素 1 unit は、30°C において 1 分間に 1 mol の  $\text{NO}_2^-$  を減少する酵素量と定義した。比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。

PMS を電子供与体とする時、Table 5-5 に示す反応液をゴム栓付きの試験管 (12×120 mm) に取り、同反応液に  $\text{N}_2$  ガスを通気した後、30°C で 5 分間を反応した後、残存した  $\text{NO}_2^-$  を定量した。酵素液の代わりに 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) を添加したものを対照とした。酵素 1 unit は、30°C において 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の  $\text{NO}_2^-$  を減少する酵素量と定義した。比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。

**Table 5-4. Reaction mixture for the assay of respiratory nitrite reductase**

0.5 M	Na phosphate buffer (pH 7.5)	0.05 ml
25 mM	$\text{NaNO}_2$ solution	0.1 ml
1 mM	Metyl viologen solution	0.1 ml
50 mM	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 100 mM $\text{NaHCO}_3$	0.1 ml
	Enzyme solution	0.1 ml
	$\text{H}_2\text{O}$	0.55 ml
	Total	1.0 ml

**Table 5-5. Reaction mixture for the assay of respiratory nitrite reductase (PMS)**

0.5 M	Na phosphate buffer (pH 7.5)	0.1 ml
25 mM	NaNO <sub>2</sub> solution	0.3 ml
333 μM	Phenazine methosulfate solution	0.1 ml
5 mM	NADH solution	0.34 ml
	Enzyme solution	0.1 ml
	H <sub>2</sub> O	0.16 ml
	Total	1.0 ml

### 5. 同化型亜硝酸還元酵素活性の測定法

同化型硝酸亜還元酵素は NADH を電子供与体、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を電子受容体として酵素反応を行い、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の還元により減少した NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を測定することにより、定量した<sup>42)</sup>。Table 5-6 に示す反応液を試験管に取り、30℃でインキュベートし、5 分間反応した後、残存した NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を第 1 章 2 節に述べた方法で定量した。酵素液の代わりに 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) を添加したものを対照とした。酵素 1 unit は、30℃において 1 分間に 1 μmol の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を減少する酵素量と定義した。比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。

**Table 5-6. Reaction mixture for the assay of assimilation nitrite reductase**

0.5 M	Na phosphate buffer (pH 7.5)	0.2 ml
25 mM	NaNO <sub>2</sub> solution	0.05 ml
1 mM	NADH solution	0.15 ml
	Enzyme solution	0.05 ml
	H <sub>2</sub> O	0.55 ml
	Total	1.0 ml

<結果>

1. 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地で培養して得た菌体中の硝酸および亜硝酸還元酵素の活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 100 rpm で培養した時にのみ、0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去した (Table 5-7)。振動数 140 rpm で培養した時、呼吸型、同化型の両方において、硝酸および亜硝酸還元酵素活性は 100 rpm の時より低かった。また、振動数 140 rpm で培養した時、培地中の  $\text{NO}_3^-$  は 80% 残存した。一方、静置培養 (窒素置換) から得られた菌体中の呼吸型硝酸還元酵素、同化型硝酸還元酵素、PMS を電子供与体とした呼吸型亜硝酸還元酵素の活性は、振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の酵素活性と比べて極めて高かった。また、静置培養では  $\text{NO}_3^-$  を良好に除去した。

静置培養で得た菌体中の、PMS を電子供与体とした呼吸型亜硝酸還元酵素活性は、メチルビオロゲンを電子供与体とした場合の活性に比べて極めて高かった。しかし、振とう培養した場合には、メチルビオロゲンを電子供与体とした呼吸型亜硝酸還元酵素活性の方が、PMS を用いた場合より、高かった。

**Table 5-7. Utilization of 0.5% (w/v) of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of nitrate and nitrite reductase**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	1.5	9.3	10.9
Remaining of $\text{NH}_4^+$ (%)	74	0	17
Remaining of $\text{NO}_3^-$ (%)	5	0	80
Specific activity of nitrate reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0.33	0.08	0.04
Assimilatory (NADH)	0.015	0.008	0.004
Assimilatory (NADPH)	0.014	0.002	0.002
Specific activity of nitrite reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0.11	0.10	0.07
Respiratory (PMS)	1.1	0.02	0.02
Assimilatory (NADH)	0.01	0.02	0.01

2. 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地で培養して得た菌体中の硝酸および亜硝酸還元酵素の活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 140 rpm で培養した場合のみ、0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup> を完全に除去した (Table 5-8)。本菌は振動数の増加につれて、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> の除去率を高くなった。いずれの振動数においても、硝酸および亜硝酸還元酵素の活性はほとんど見られなかった。

**Table 5-8. Utilization of 0.6% (w/v) of NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of nitrate and nitrite reductase**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth (OD <sub>660</sub> )	0.4	10.4	15.4
Remaining of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	80	20	0
Remaining of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	0	0	0
Specific activity of nitrate reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0.007	0.002	0.002
Assimilatory (NADH)	0	0	0
Assimilatory (NADPH)	0	0	0
Specific activity of nitrite reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0	0	0
Respiratory (PMS)	0	0	0
Assimilatory (NADH)	0	0	0

3. 2.0% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地で培養して得た菌体中の硝酸および亜硝酸還元酵素の活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 100 rpm で培養した場合のみ、2.0% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を完全に除去した (Table 5-9)。また、振動数 140 rpm で培養した時、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 20% を残存した。振動数 140 rpm で培養した時、呼吸型、同化型の両方において、硝酸および亜硝酸還元酵素の活性は 100 rpm の時より低かった。静置培養した時、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 63% を残存し、得られた菌体中の呼吸型硝酸還元酵素

の活性は振とう培養（100 および 140 rpm）して得た菌体中の酵素活性と比べて極めて低かったが、呼吸および同化型亜硝酸還元酵素の活性は振とう培養した時より高かった。静置培養で得た菌体中の、PMS を電子供与体とした呼吸型亜硝酸還元酵素活性は、メチルビオロゲンを電子供与体とした場合の活性に比べて極めて高かった。

**Table 5-9. Utilization of 2.0% (w/v) of NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of nitrate and nitrite reductase**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth (OD <sub>660</sub> )	1.1	6.4	11.5
Remaining of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	0	0	0
Remaining of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	63	0	20
Specific activity of nitrate reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0.06	0.29	0.16
Assimilatory (NADH)	0.015	0.022	0.007
Assimilatory (NADPH)	0.01	0.006	0.005
Specific activity of nitrite reductase (unites/mg)			
Respiratory (metyl viologen)	0.67	0.03	0.01
Respiratory (PMS)	4.7	0.06	0.01
Assimilatory (NADH)	1.9	0.04	0.03

### 第 3 節 アンモニアの同化に関する酵素系の解析

#### <方法>

#### 1. 菌体の取得および粗酵素液の調製

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、アンモニアの同化に関する酵素系を解析した。各窒素化合物を含む培地の調製および菌体の取得の方法は本章 2 節で述べた方法によって行った。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の菌体を 1 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM

EDTA、10  $\mu$ M 2-ketoglutaric acid を含む 20 mM potassium-sodium phosphate buffer (pH 7.0) に懸濁し、本章 2 節で述べた方法により菌体を破碎した。これを遠心分離し、上清をグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) を含む粗酵素液とした。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の菌体を 2 mM 2-メルカプトエタノール、10 mM  $Mg^{2+}$  を含む 10 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.0) に懸濁し、本章 2 節で述べた方法により菌体を破碎した。これを遠心分離し、上清をグルタミンシンテターゼ (GS) を含む粗酵素液とした。

## 2. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の測定法

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) におけるアミノ化反応は、NADPH の酸化に伴う 340 nm における吸光度の減少により測定した<sup>43)</sup>。Table 5-10 に示す反応液を用い、30°C で反応を行った。0.1 ml の酵素液を添加することにより反応を開始し、2 分後に 340 nm における吸光度を測定した。2-ケトグルタル酸 (ナカライテスク) 溶液の代わりに 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を添加したものを対照とした。

酵素 1 unit は、30°C において 1 分間に 1  $\mu$ mol の NADPH を酸化する酵素量と定義した。また、比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。タンパク質は Lowry の方法によって定量した<sup>38)</sup>。

**Table 5-10. Reaction mixture for the assay of aminating activity**

100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)	1.3 ml
1.0 M $NH_4Cl$ solution	0.20 ml
2.0 mM NADPH solution	0.20 ml
100 mM 2-Ketoglutarate solution	0.20 ml
Enzyme solution	0.10 ml
Total	2.0 ml

グルタミン酸デヒドロゲナーゼの脱アミノ化反応は、 $NADP^+$  (オリエンタル酵母) の還元に伴う 340 nm における吸光度の増加により測定した。Table 5-11 に示す反応液を用い、30°C で反応を行った。0.1 ml の酵素液を添加することにより反応を開始し、2 分後に 340 nm における吸光度を測定した。L-グルタミン酸溶液の代わりに 100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) を添加したものを対照とした。

酵素 1 unit は、30°C で 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の  $\text{NADP}^+$  を還元する酵素量と定義した。

**Table 5-11. Reaction mixture for deaminating activity assay**

100 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0)	0.70 ml
40 mM L-Glutamate solution	1.0 ml
10 mM $\text{NADP}^+$ solution	0.20 ml
Enzyme solution	0.10 ml
Total	2.0 ml

## 2. グルタミンシンテターゼ活性の測定法

### ① $\gamma$ -glutamyltransferase 活性

本酵素の  $\gamma$ -glutamyltransferase 活性は、反応性産物である  $\gamma$ -glutamylhydroxamate を定量することにより、測定した<sup>44)</sup>。Table 5-12 に示す反応液を用い、37°C で反応を行った。0.8 ml の反応液に 0.1 ml の酵素液を添加して 5 分間インクベートした後、0.1 ml の 200 mM の L-グルタミン溶液を添加することにより反応を開始した。30 分間反応させた後、2 ml の stop mixture (Table 6-4) を添加して反応を止め、遠心分離 (12,000 $\times$ g、2 分) し、得られた上清の 540 nm における吸光度を測定した。ADP と  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  溶液を除いたものを対照とした。

酵素 1 unit は、30°C で 1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  の  $\gamma$ -glutamylhydroxamate を生成する酵素量と定義した。また、比活性はタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性で示した。

**Table 5-12. Reaction mixture for  $\gamma$ -glutamyltransferase assay activity assay**

135 mM Imidazole-HCl buffer (pH 7.0)	} 0.8 ml
18 mM $\text{NH}_2\text{OH}$ solution	
0.27 mM $\text{MnCl}_2$ solution	
25 mM $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ solution	
0.36 mM ADP solution	
200 mM L-Glutamine solution	0.1 ml
Enzyme solution	0.1 ml
Total	1.0 ml

**Table 5-13. Stop mixture for  $\gamma$ -glutamyltransferase activity assay**

203.5 mM FeCl <sub>3</sub> solution	
122.4 mM Trichloroacetate solution	
252.0 mM HCl solution	
Total	2.0 ml

### ② synthetase 活性

本酵素の synthetase 活性は  $\gamma$ -glutamyltransferase 活性測定法同様、反応性産物である  $\gamma$ -glutamylhydroxamate を定量することにより測定した<sup>26)</sup>。Table 5-14 に示す反応液を用い、37°C で反応を行った。0.8 ml の反応液に 0.1 ml の酵素液を添加して 5 分間インキュベートした後、0.12 ml の 200 mM の ATP (pH 7.0 に調整) を添加することにより反応を開始した。30 分間反応させた後、2 ml の stop mixture (Table 6-4) を添加して反応を止め、遠心分離 (12,000×g、2 分) し、得られた上清の 540 nm における吸光度を測定した。ATP を除いたものを対照とした。

**Table 5-14. Reaction mixture for synthetase activity assay**

184 mM NH <sub>2</sub> OH solution	0.20 ml
220 mM MgCl <sub>2</sub> solution	0.20 ml
656 mM L-Glutamate solution	0.20 ml
368 mM Imidazole-HCl buffer (pH 7.0)	0.20 ml
200 mM ATP solution (pH 7.0)	0.12 ml
Enzyme solution	0.10 ml
Total	1.02 ml

### < 結果 >

#### 1. 0.5% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地で培養して得た菌体中の GDH および GS 活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 100 rpm で培養した時のみ、0.5% (w/v)

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去した (Table 5-15)。振動数 140 rpm で培養した時、GS の活性は 100 rpm の時より低かったが、GDH の活性は振動数 100 rpm で培養して得た菌体中の酵素活性とほぼ同じであった。また、振動数 140 rpm で培養した時、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>は 17% 残存した。一方、静置培養 (窒素置換) から得られた菌体中の GDH の活性は、振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の酵素活性と比べて極めて低かった。また、静置培養では本菌の増殖は不十分であり、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>も 74% を残存した。

**Table 5-15. Utilization of 0.5% (w/v) of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of GDH and GS**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth (OD <sub>660</sub> )	1.5	9.3	10.9
Remaining of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	74	0	17
Remaining of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	5	0	80
Specific activity of enzyme (unites/mg)			
GDH	0.02	0.18	0.14
GS	0.12	0.23	0.14

## 2. 0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地で培養して得た菌体中の GDH および GS 活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 140 rpm で培養した時にのみ、0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl 培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を完全に除去した (Table 5-16)。振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の GDH の活性は振動数の増加につれて増加し、本菌の増殖と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去率も振動数の増加につれて増加した。一方、静置培養 (窒素置換) から得られた菌体中の GDH および GS の活性は、振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の酵素活性と比べて極めて低かった。また、静置培養では本菌の増殖は不十分であり、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>も 80% を残存した。

**Table 5-16. Utilization of 0.6% (w/v) of NH<sub>4</sub>Cl by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of GDH and GS**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth (OD <sub>660</sub> )	0.4	10.4	15.4
Remaining of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	80	20	0
Remaining of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	0	0	0
Specific activity of enzyme (unites/mg)			
GDH	0.077	0.40	0.62
GS	0.050	0.22	0.10

### 3. 2.0% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地で培養して得た菌体中の GDH および GS 活性

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は振動数 100 rpm で培養した時にのみ、2.0% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去した (Table 5-17)。振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の GS の活性は振動数の増加につれて増加し、本菌の増殖も振動数の増加につれて増加した。一方、静置培養 (窒素置換) から得られた菌体中の GS の活性は、振とう培養 (100 および 140 rpm) して得た菌体中の酵素活性と比べて低かった。また、静置培養では本菌の増殖は不十分であり、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も 63% を残存した。

本実験で使用した培地には NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が含まれていないにもかかわらず、GS の活性は NH<sub>4</sub>Cl 培地で得られた GS 活性より高かった (Table 5-16)。また、いずれの培養条件下で得た菌体中の GDH の活性は GS の活性と比べて極めて低かった。

**Table 5-17. Utilization of 2.0% (w/v) of NaNO<sub>3</sub> by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of GDH and GS**

	Shaking speed (rpm)		
	0	100	140
Growth (OD <sub>660</sub> )	1.1	6.4	11.5
Remaining of NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (%)	0	0	0
Remaining of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	63	0	20
Specific activity of enzyme (unites/mg)			
GDH	0.01	0.01	0.016
GS	0.23	0.67	0.77

#### 第 4 節 硝酸、亜硝酸の代謝とアンモニウムの同化に関する酵素活性に与える NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の割合の影響

##### <方法>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、アンモニア態窒素濃度と硝酸態窒素濃度の合計が 50 mM になるように設定した NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の各比率 (0:4、1:3、2:2、3:1、4:0) の培地を用いて、2 章 3 節で述べた方法により振動数 100 rpm で振とう培養した。経時的にサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と呼吸型硝酸還元酵素、同化型硝酸還元酵素、呼吸型亜硝酸還元酵素、同化型亜硝酸還元酵素、GDH、GS の活性を定量した。

##### <結果>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は、いずれの培地においても、培養開始 4 日後に NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を培地から良好に除去した。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の濃度の割合が増加につれて、本菌の増殖が促進されており、培養液中に残存した全窒素量も増加した (Table 5-18)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含まない培地では、呼吸型、同化型の両方において、硝酸および亜硝酸還元酵素の活性はほとんど見いだされなかった。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を含まない培地で得た菌体中の GDH の活性はほとんど見られなかった。また、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の比率を 2:2 を設定した培地で得た菌体中の GDH の活性は、他の培地で得た菌体中の

GDHの活性と比べて高かった。一方、50 mMの $\text{NO}_3^-$ のみを含む培地で得た菌体中のGSの活性は、50 mMの $\text{NH}_4^+$ のみを含む培地で得た菌体より極めて高かった。

**Table 5-18. Utilization of nitrogen compounds with various ratios of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_3^-$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and the activities of Nr, Nir, GDH, and GS**

	The ratio of $\text{NH}_4^+$ to $\text{NO}_3^-$				
	0:4	1:3	2:2	3:1	4:0
Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	4.5	4.5	4.6	6.2	7.3
Remaining of $\text{NH}_4^+$ (%)	0	1	1	1	9
Remaining of $\text{NO}_3^-$ (%)	1	3	3	2	0
Total nitrogen in the cultures (%)	42	40	46	70	92
Specific activity of enzyme (unites/mg)					
GDH	0.017	0.19	0.40	0.39	0.33
GS	0.18	0.31	0.097	0.092	0.030
Specific activity of nitrate reductase (unites/mg)					
Respiratory (metyl viologen)	0.16	0.19	0.11	0.10	0.005
Assimilatory (NADH)	0.004	0.001	0.008	0.001	0
Assimilatory (NADPH)	0.004	0.002	0.002	0	0
Specific activity of nitrite reductase (unites/mg)					
Respiratory (metyl viologen)	0.10	0.12	0.11	0.040	0
Respiratory (PMS)	0.02	0.024	0.025	0.005	0
Assimilatory (NADH)	0.09	0.02	0.03	0.004	0

## 第5節 脱窒機構の解析

### <方法>

#### 1. 培養方法と窒素関連ガス ( $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ ) の発生

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製した後、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°Cにおいて試験管 (5 ml/tube) で前培養 (140 rpm) した。培養開始2日

後、0.2 ml の前培養液を 25 ml の 0.1% (w/v)  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  (98 atom %, Sigma-Aldrich, St. Louise, USA) 培地に加え、30°Cにおいてバイアル瓶 (1.5 ml/13 ml vial) で振とう培養 (0 rpm、70 rpm、140 rpm) した。経時的にバイアル瓶 (13 ml) 中に蓄積の窒素ガスを GC-MS により分析した。また、濁度および培養液中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

同様な方法により、0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (99 atom %)、0.1% (w/v)  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (98 atom %)、0.1% (w/v)  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  (98 atom %) (以上、Sigma-Aldrich) 培地から発生した窒素ガス培養液の濁度および  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

## 2. 窒素関連ガスの分析

$\text{N}_2$  と  $\text{N}_2\text{O}$  の GC-MS 分析は、日立 G-3000 ガスクロマトグラフ (日立、東京) を連結した日立 M-2500 二重収束質量分析計 (日立) を用いて行った。カラムは PoraPLOT-Q (0.25 mm × 25 m、ジーエルサイエンス、東京) を使用した。また、イオン化は EI 法で行い、イオン化電圧は 70 eV であった。

$^{15}\text{N}_2$  (巴商会、東京) および  $\text{N}_2\text{O}$  (ジーエルサイエンス) の標品を用いて両ガス定量のための検量線を作成した。

### <結果>

#### 1. $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ を窒素源とした培養液における脱窒

Fig. 5-1 に示すように、0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  培地において、培養開始 15 時間以内に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株は培地中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去した。蓄積したガスを GC-MS で分析した結果、培養過程において、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$  と  $^{15}\text{N}_2$  の蓄積が見られた。いずれの振動数においても、 $^{14}\text{N}_2\text{O}$  は蓄積しなかった。また、 $^{14}\text{N}_2$  は、本測定法では定量することはできなかった。一方、培養開始 15 時間後、振動数 0 rpm の場合、初めに加えた全窒素量の 41% の  $^{15}\text{N}_2$  が蓄積するとともに、13% の  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  も蓄積した。しかし、振動数 70 rpm と 140 rpm の場合は、培養途中では  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  を蓄積したが、培養開始 15 時間後では蓄積していなかった。この時、はじめに加えた全窒素量のそれぞれ、52%、38% の  $^{15}\text{N}_2$  のみが蓄積されていることが見いだされた。

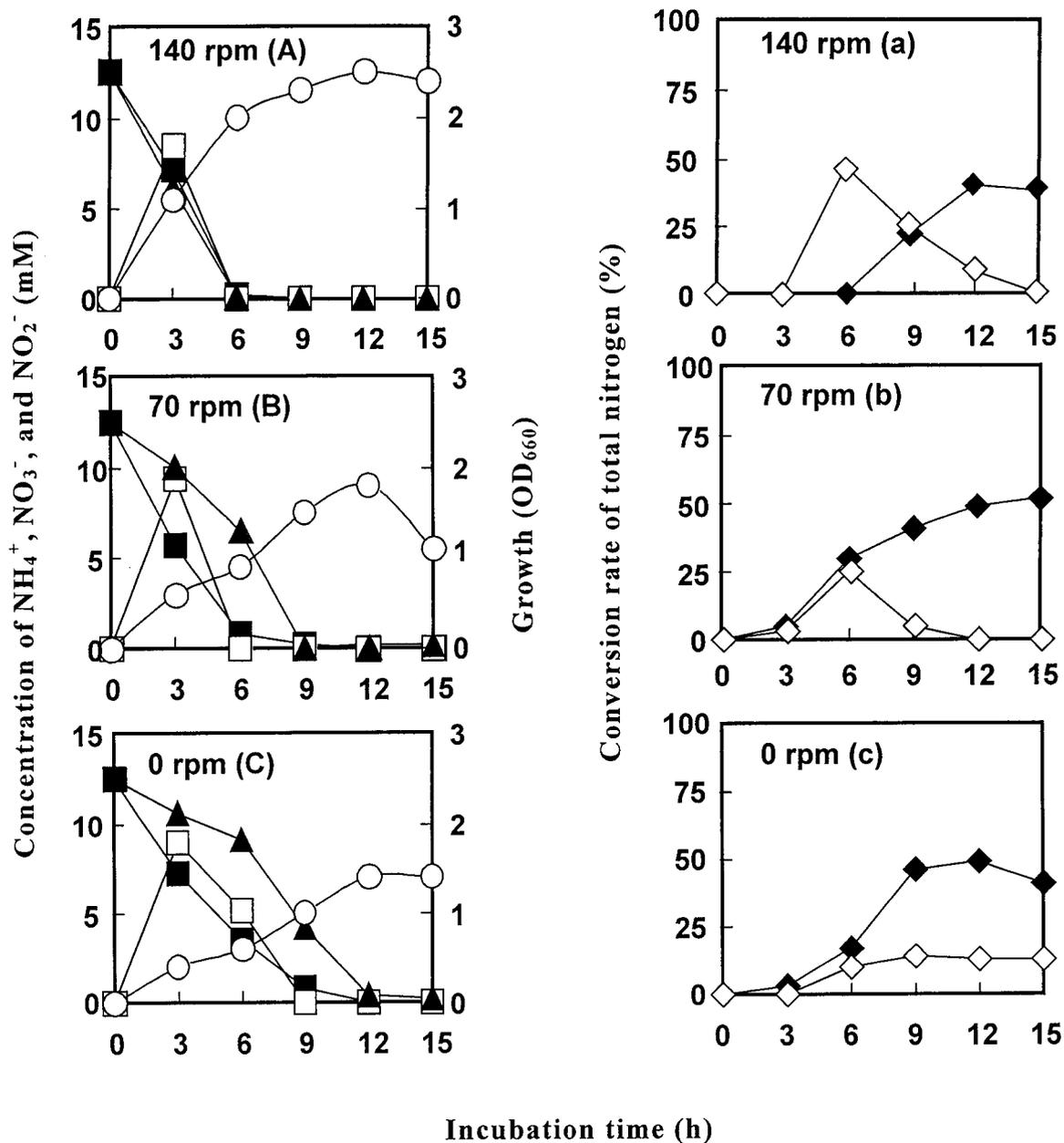


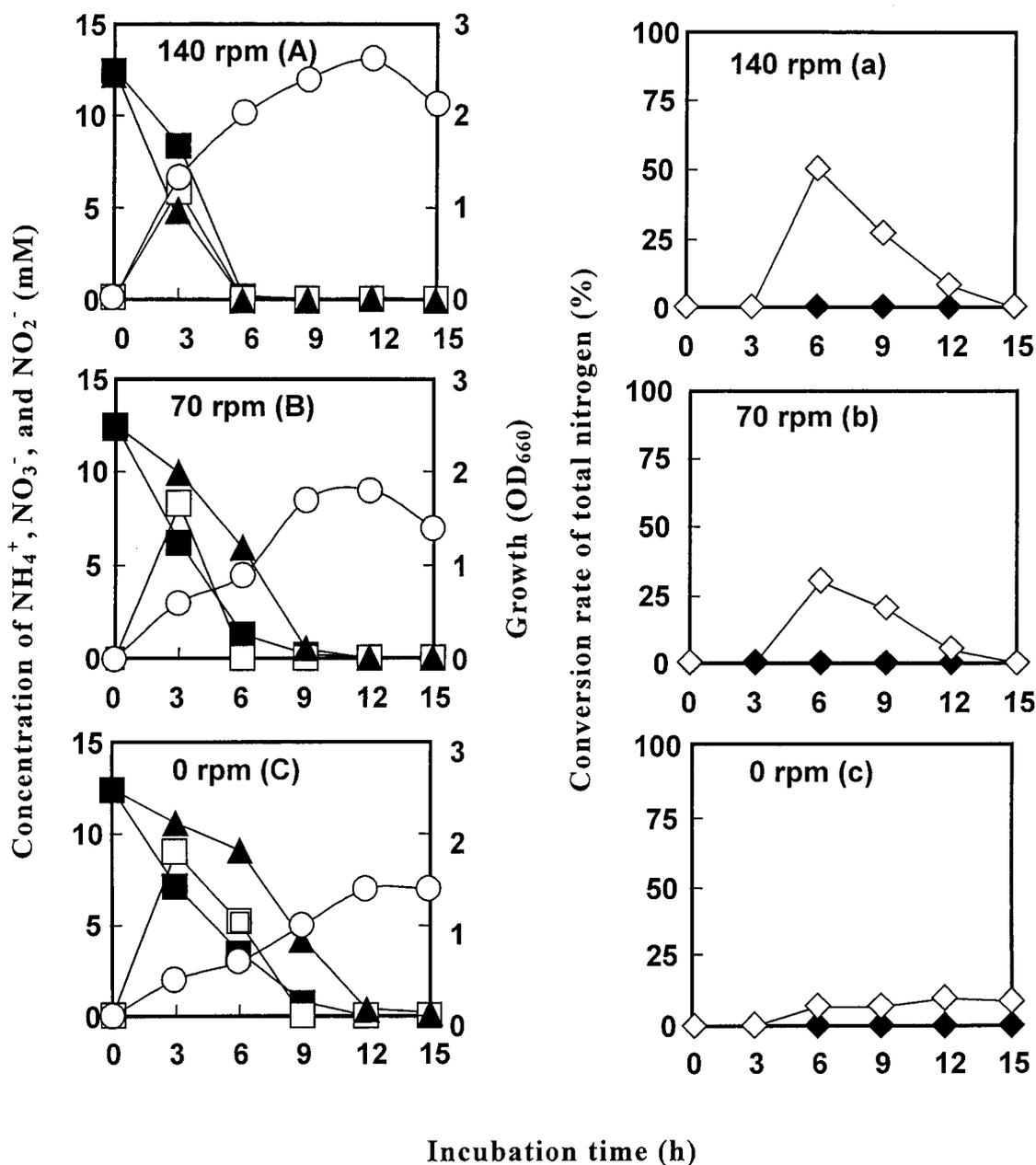
Fig. 5-1. Utilization of 0.1% (w/v) of  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and generation of nitrogen gases.

(A), (B), and (C): the bacterium was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 15 h with shaking in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ , 1% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ), and  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ) were measured.

(a), (b), and (c): generation of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ( $\diamond$ ) and  $^{15}\text{N}_2$  ( $\blacklozenge$ ).

## 2. $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ を窒素源とした培養液における脱窒

Fig. 5-2 に示すように、0.1% (w/v)  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地において、培養開始 15 時間以内に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株は、培地中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去した。蓄積したガスを GC-MS で分析した結果、いずれの振動数においても、 $^{15}\text{N}_2$  と  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  は蓄積しないことが認められた。また、培養開始 15 時間後、静置培養 (振動数 0 rpm) で少量の  $^{14}\text{N}_2\text{O}$  が蓄積していたが、振動数 70 rpm と 140 rpm では、培養開始 6~12 時間後において、 $^{14}\text{N}_2\text{O}$  の蓄積が見られたにもかかわらず、15 時間後では消失した。



**Fig. 5-2. Utilization of 0.1% (w/v) of  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and generation of nitrogen gases**

(A), (B), and (C): The bacterium was incubated at 30°C for 15 h with shaking in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\text{O}$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ), and  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ) were measured.

(a), (b), and (c): Generation of  $^{14}\text{N}_2\text{O}$  ( $\diamond$ ) and  $^{15}\text{N}_2$  ( $\blacklozenge$ ).

### 3. $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ を窒素源とした培養液における脱窒

Fig. 5-3 に示すように、0.1% (w/v)  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  培地において、培養開始 15 時間以内に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株は培地中の  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去した。蓄積したガスを GC-MS で分析した結果、 $^{15}\text{NO}_3^-$  の減少に伴って、 $^{15}\text{N}_2$  と  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  の蓄積が認められた。しかし、培養開始 15 時間後、振動数 70 rpm と 140 rpm の時、 $^{15}\text{N}_2$  の蓄積とともに、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$  も蓄積していた。一方、静置培養では、培養開始 15 時間後、 $^{15}\text{N}_2$  のみ蓄積していた。

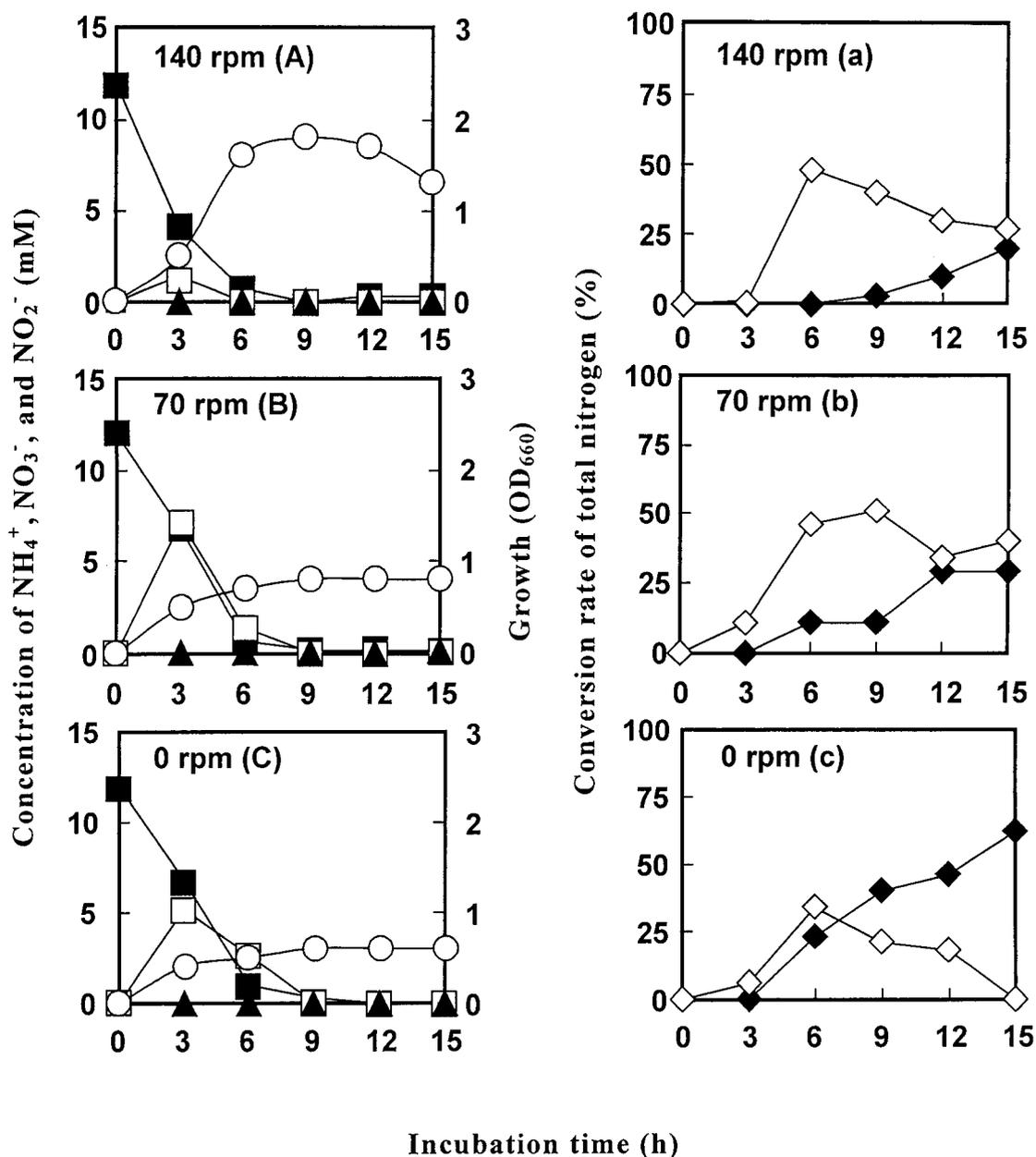


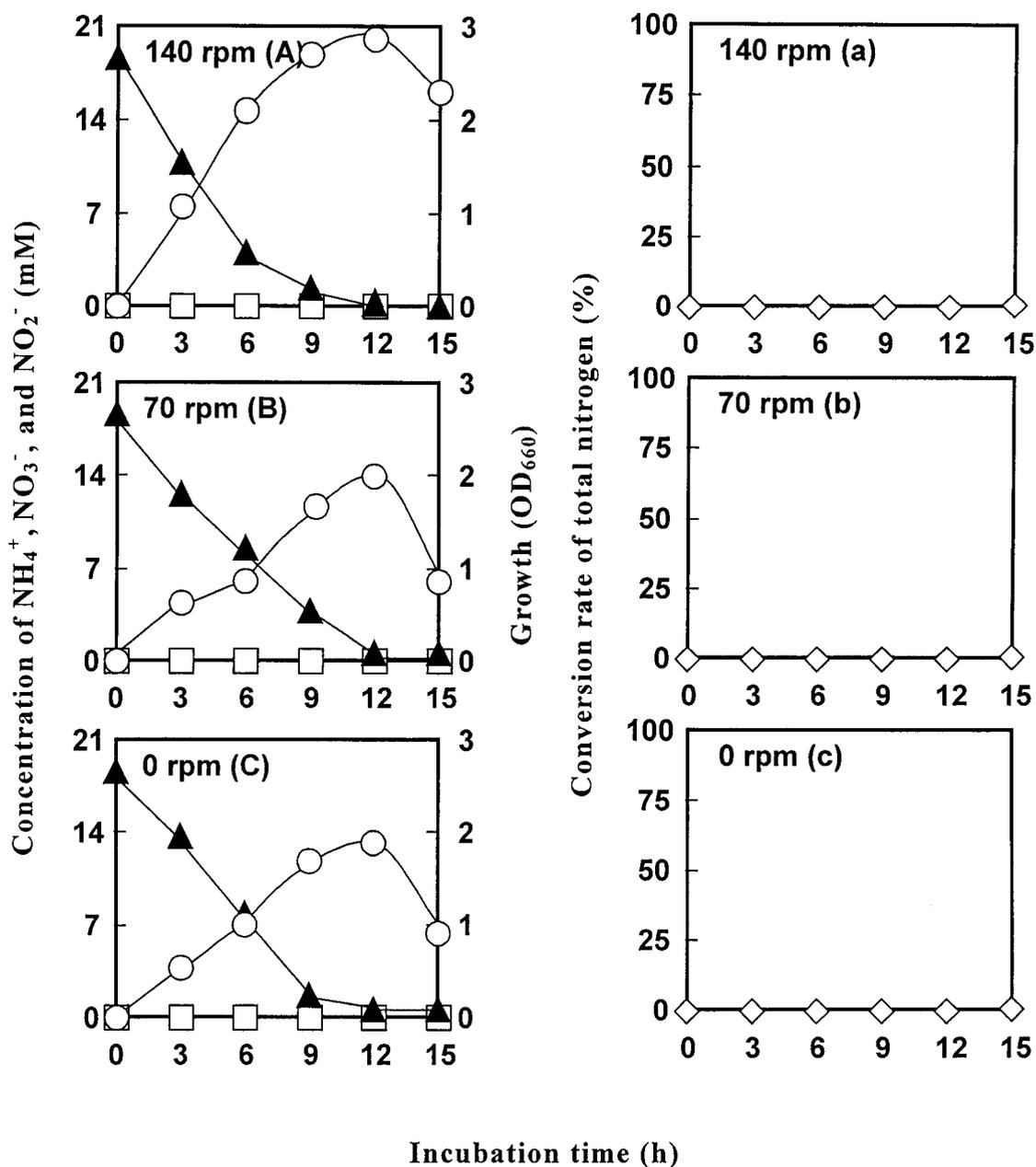
Fig. 5-3. Utilization of 0.1% (w/v) of  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and generation of nitrogen gases

(A), (B), and (C): The bacterium was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 15 h with shaking in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\blacksquare$ ), and  $\text{NO}_2^-$  ( $\square$ ) were measured.

(a), (b), and (c): Generation of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  ( $\diamond$ ) and  $^{15}\text{N}_2$  ( $\blacklozenge$ ).

#### 4. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を窒素源とした培養液における脱窒

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源として使用した場合、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は培養開始 15 時間以内に培地中の  $\text{NH}_4^+$  を完全に除去した (Fig. 5-4)。しかし、培養のすべての期間において、 $^{15}\text{N}_2$  と  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  の発生は見いだされなかった。



**Fig. 5-4. Utilization of 0.1% (w/v) of  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  by *P. aeruginosa* NBRC 12689 and generation of nitrogen gases**

(A), (B), and (C): The bacterium was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 15 h with shaking in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■), and  $\text{NO}_2^-$  (□) were measured.

(a), (b), and (c): Generation of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  (◇) and  $^{15}\text{N}_2$  (◆).

## 第 5 節 要約と考察

### <要約>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を種々の培養条件で培養したとき、 $\text{NO}_3^-$ を含まない培地では、呼吸型、同化型の両方において、硝酸および亜硝酸還元酵素の活性はほとんど見られなかった。しかし、 $\text{NH}_4^+$ を含まない培地を使用した時、GDH はほとんど見られなかったが、GS は高い活性を示した。振動数の影響を調べたところ、0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を用いた場合、本菌は振動数 100 rpm で培地中の両イオンを完全に除去し、得られた菌体中の呼吸型、同化型硝酸還元酵素、呼吸型、同化型亜硝酸還元酵素、GDH、GS 活性は、140 rpm で振とう培養した時得られた菌体中の酵素の活性より高かった。一方、静置培養した時、呼吸型、同化型硝酸還元酵素、PMS を電子供与体とした亜硝酸呼吸型還元酵素は、振とう培養（振動数 100 および 140 rpm）して得た菌体中の酵素活性と比べて極めて高かった。

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.1% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を窒素源とした時、本菌は、これらの窒素源の減少に伴って  $\text{N}_2$  と  $\text{N}_2\text{O}$  を蓄積した。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を用いた時、振動数 70 と 140 rpm いずれの場合も、最終的には  $\text{N}_2\text{O}$  の蓄積は見られなかった。しかし、 $\text{NaNO}_3$  を用いた時、培養開始 15 時間においても  $\text{N}_2\text{O}$  の蓄積が認められた。

### <考察>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は、唯一の窒素源をして  $\text{NaNO}_3$  を含む培地で培養した時、 $\text{NH}_4^+$ が存在しないにもかかわらず、高い GS 活性を示した。この値は、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を唯一の窒素源とする培養液で培養して得た菌体中の GS 活性より高かった。微生物を含む生物は一般に、GDH と GS により  $\text{NH}_4^+$ を同化する<sup>45-46)</sup>。アンモニア同化において、高濃度の  $\text{NH}_4^+$ が存在する場合は主として、GDH が関与し、低濃度の  $\text{NH}_4^+$ が存在する場合は、GS が関与することが報告されている<sup>45-46)</sup>。本研究において、 $\text{NaNO}_3$  を唯一の窒素源とする培地で培養した場合は、 $\text{NO}_3^-$ が  $\text{NH}_4^+$ を経て窒素源として同化される<sup>47-48)</sup>。この時、 $\text{NO}_3^-$ から還元される  $\text{NH}_4^+$ は、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を唯一の窒素源とする培養液中の  $\text{NH}_4^+$ より低濃度であることが予想される。したがって、 $\text{NaNO}_3$  を唯一の窒素源とする培地で培養して得た菌体中には、高い GS 活性が存在すると考察した。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$  を窒素源とした場合、培養液および菌体中に残存する全窒素量は初めに添加した窒素量の半分以下であった。この結果から、本菌の培養過程において脱窒が生じていることが予想された。実際、培養過程中的菌体から得た細胞中に呼吸型硝酸還元酵素および呼吸型

亜硝酸還元酵素活性を見いだすことができた<sup>49-53)</sup>。また、GC-MS 分析により本菌が、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$  を代謝する過程で  $\text{N}_2$  と  $\text{N}_2\text{O}$  を生成することを証明した。

$\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  を窒素源として用いた場合、 $^{15}\text{N}_2$  と  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  を蓄積し、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を窒素源として用いた場合、 $^{15}\text{N}_2$  と  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  を蓄積しなかったため、これらのガスは  $\text{NO}_3^-$  に由来することがわかった。

本菌を用いて、 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  培地で振とう培養した時（振動数 70 と 140 rpm）、培養開始 6-12 時間後において、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$  の生成が見られたにもかかわらず、15 時間後では消失し、 $^{15}\text{N}_2$  のみ蓄積した。一方、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  培地で振とう培養した時（振動数 70 と 140 rpm）、培養開始 15 時間後  $\text{N}_2$  の蓄積とともに、 $\text{N}_2\text{O}$  が蓄積していた。この結果から、 $\text{NO}_3^-$  の代謝において、 $\text{NH}_4^+$  が共存する条件下では、本菌の増殖が促進されるため、 $\text{N}_2\text{O}$  の生成が抑制されたと考えられた。Fig. 6-1-(A, a) は  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去された時点で、 $\text{N}_2\text{O}$  が発生したことを示す。この時の培養液に溶存している酸素量は、培養の全期間を通じて最も低いことがわかった (Fig. 2-5)。すなわち、振とう培養しているにもかかわらず、培養液は嫌気状態になっていることが予想される。このような条件下では脱窒が容易に生じ、いったん生成した  $\text{N}_2\text{O}$  は急速に  $\text{N}_2$  に変換される。以上の結果より、培地中の  $\text{NH}_4^+$  は、 $\text{N}_2\text{O}$  を  $\text{N}_2$  に変換する過程において、有利な環境を提供すると考察した。言い換えれば、地球温暖化をもたらす  $\text{N}_2\text{O}$  の生成が、 $\text{NO}_3^-$  培地に  $\text{NH}_4^+$  を添加することによって避けることができると言える。

今後、溶存酸素量等を容易に測定できるジャーファメンターを用いて、本菌による脱窒過程を詳しく解析する予定である。

## 第 6 章 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える有機物の影響

### 第 1 節 序

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は好気条件下において培地中の  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度と振動数を調節することにより、最高で 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を完全に除去する。同培地において培養上清中には窒素化合物は存在していなかった。菌体中には始めに加えた全窒素量の 41% が存在していた。残りは窒素ガスとして大気中に還元されることが示された。本菌は従属栄養細菌であるため、本菌の炭素源の利用性を調べることは排水処理へ応用するための最適処理条件を設定する上で重要である。そこで本章では、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  の同時除去だけでなく、 $\text{NH}_4^+$ 、または  $\text{NO}_3^-$  のみを含む培地における両イオンの除去に与える糖、有機酸、アミノ酸、リン酸塩等の影響を調べることにした。

D-グルコースを炭素源、エネルギー源として培地に添加した場合、本菌は良好に増殖し、両イオンを効率的に除去するが、実際の廃液の中には D-グルコース以外の炭素源が存在する。そこで、D-グルコースの存在下で、共存する物質の両イオンの除去について試験する。

### 第 2 節 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響

#### < 方法 >

各種濃度のリン酸塩を含む 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  および 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  (Table 6-1、N としての濃度を 25 mM に調製) 培地をそれぞれ調製し、これに *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌した後、30°C にて 140 rpm で振とう培養し、経時的に培養液の濁度 ( $\text{OD}_{660}$ ) と培地中に残存する  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NH}_4^+$  を定量した。検討したリン酸塩濃度は 0 mM、16 mM、32 mM、48 mM、64 mM、128 mM、192 mM であった。

Table 6-1. Culture conditions

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	g
D-Glucose	30	g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0	g
NH <sub>4</sub> Cl	1.3	g
NaNO <sub>3</sub>	2.1	g
NaCl	0.5	g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.8	nM
H <sub>2</sub> O	1,000	ml
pH		7.1

< 結果 >

1. 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地における NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与えるリン酸塩濃度の影響

0~192 mM の合計 6 種類のリン酸塩濃度を用いて検討を行った結果、リン酸塩を添加しないと、培地の pH は弱酸性側に傾き、本菌は増殖不良となった。また、培地中には多量の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が残存していた (Table 6-2)。一方、32~192 mM のリン酸塩を含む 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地では、本菌は良好に増殖し、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も完全に除去された。

**Table 6-2. Effect of concentrations of phosphate on the removal of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  from 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

リン酸塩	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining		Accumulating $\text{NO}_2^-$	pH
		$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$		
0 mM	0.4	98%	86%	0.0 mM	4.9
16	2.4	73	9	0.1	5.1
32	4.6	0.8	0	0.0	5.6
48	4.7	0.8	0	0.0	5.7
64	4.0	0.0	0	0.0	6.0
128	4.3	0.0	0	0.0	6.0
192	5.0	0.0	0	0.0	5.9

## 2. 0.13% (w/v) $\text{NH}_4\text{Cl}$ 培地における $\text{NH}_4^+$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響

Table 6-3 に示すように、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地を用いた場合、リン酸塩を添加しない時、本菌の増殖は極めて悪く、培地中の  $\text{NH}_4^+$  もほとんど利用されなかった。一方、32~192 mM のリン酸塩を添加すると、本菌は良好に増殖し、ほとんどの  $\text{NH}_4^+$  も除去されていた。

**Table 6-3. Effect of concentrations of phosphate on the removal of  $\text{NH}_4^+$  from 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

リン酸塩	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NH}_4^+$	Accumulating		pH
			$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	
0 mM	0.3	88%	0 mM	0 mM	5.1
16	2.5	47	0	0	5.5
32	4.3	7.6	0	0	5.7
48	4.2	0	0	0	5.9
64	4.5	0	0	0	5.9
128	4.4	0	0	0	6.0
192	4.6	0	0.1	0	5.9

### 3. 0.21% (w/v) $\text{NaNO}_3$ 培地における $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響

0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地を用いて、リン酸塩の影響を調べたところ、リン酸塩を添加しない時、本菌の増殖は悪くて、培地中に  $\text{NO}_3^-$  も残存していた (Table 6-4)。一方、16~192 mM のリン酸塩を添加すると、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  を良好に除去されていた。

**Table 6-4. Effect of concentration of phosphate on the removal of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  from 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

リン酸塩	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NO}_3^-$	Accumulating		pH
			$\text{NO}_2^-$	$\text{NH}_4^+$	
0 mM	0.4	80%	0 mM	0 mM	5.1
16	4.1	1.2	0	0	5.5
32	4.3	0	0	0	5.7
48	4.4	0	0	0	5.9
64	4.1	0	0	0	5.9
128	4.5	0	0	0	6.0
192	4.7	0	0.1	0	5.9

### 第3節 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

#### <方法>

#### 1. 0.1% (w/v) $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地に含まれる D-グルコースのかわりに、唯一の炭素源として3% (w/v) の糖 (ラクトース-水和物、L-アラビノース、D-マンノース、サッカロース、マルトース-水和物、D-ガラクトース、D-フルクトース、D-リボース)、有機酸 (酢酸ナトリウム三水和物、DL-リンゴ酸二ナトリウム  $n$  水和物、クエン酸三ナトリウム二水和物、コハク酸二ナトリウム、アジピン酸、 $n$ -酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、グリセリン酸、マロン酸、マレイン酸、乳酸ナトリウム溶液、フマル酸、グルコン酸、フタル酸、DL-2-アミノ- $n$ -酪酸)、アミノ酸 (グリシン、L-メチオニン、L-ヒスチジン塩酸塩、L-リジン塩酸塩、L-フェニルアラニン、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アルギニン塩酸)、または、1% (w/v) の天然培養基 (ポリペプトン、酵母エキス、肉エキス) を含む培地をそれぞれ調製した。各培地に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°C で 140 rpm で振とう

培養した。培養液を経時的にサンプリングした後、培養液の濁度 ( $OD_{660}$ ) と培地中に残存する  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$  および  $NH_4^+$  を定量した。

## 2. 0.13% (w/v) $NH_4Cl$ 培地における $NH_4^+$ の除去に与える炭素源の影響

0.1% (w/v)  $NH_4NO_3$  培地を用いた場合と同様な方法で、0.13% (w/v)  $NH_4Cl$  培地に含まれる D-グルコースのかわりに、唯一の炭素源として3%の糖、有機酸、アミノ酸、または、1% (w/v) の天然培養基を含む培地をそれぞれ調製した。各培地に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°C で 140 rpm で振とう培養した。培養液を経時的にサンプリングした後、培養液の濁度 ( $OD_{660}$ ) と培地中に残存する  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$  および  $NH_4^+$  を定量した。

## 3. 0.21% (w/v) $NaNO_3$ 培地における $NO_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

0.1% (w/v)  $NH_4NO_3$  培地を用いた時の炭素源の検討と同様な方法で、0.21% (w/v)  $NaNO_3$  培地に含まれる D-グルコースのかわりに、唯一の炭素源として3%の糖類、有機酸、アミノ酸、または、1% (w/v) の天然培養基を含む培地をそれぞれ調製した。各培地に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株をそれぞれ植菌し、30°C で 140 rpm で振とう培養した。培養液を経時的にサンプリングした後、培養液の濁度 ( $OD_{660}$ ) と培地中に残存する  $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$  および  $NH_4^+$  を定量した。

### <結果>

#### 1. 0.1% (w/v) $NH_4NO_3$ 培地における $NH_4^+$ および $NO_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

合計 34 種類の炭素源を用いて、0.1% (w/v)  $NH_4NO_3$  培地中の  $NH_4^+$  および  $NO_3^-$  の同時除去を試験した結果を Table 6-5 に示す。試験した D-グルコースを除く 8 種の糖を含む培地すべてにおいて、本菌の増殖は不良であり、 $NH_4^+$  および  $NO_3^-$  もほとんど除去されなかった。

一方、試験した 15 種の有機酸の中では、クエン酸塩、コハク塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩を含む培地において、本菌は良好に増殖し、培地中の  $NH_4^+$  および  $NO_3^-$  も良好に除去した。また、DL-リンゴ酸塩を含む培地では、本菌の増殖はやや不良で、培地中に  $NH_4^+$  および  $NO_3^-$  が残存し、 $NO_2^-$  の蓄積 (約 3 mM) も見られた。

試験した 7 種のアミノ酸を含む培地では、両イオンの効率的な除去は見られなかった。特に  $NH_4^+$  は脱アミノ反応によるアミノ基の遊離によって増加した。L-グルタミン酸塩を含む培地では、 $NO_3^-$  はほぼ完全に除去された。

試験した3種類の天然培養基の中で、ポリペプトンおよび酵母エキスを含む培地では、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$ をほぼ完全に除去した。しかし、肉エキスを含む培地では、本菌の増殖は不十分であり、41%の $\text{NO}_3^-$ が残存していた。また、天然培養基由来の $\text{NH}_4^+$ が遊離したために培地中に残存する $\text{NH}_4^+$ 量は増加した。

**Table 6-5. Effect of carbon sources on the removal of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> from 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 3% (w/v) sugar, organic acid, or amino acid or 1% (w/v) nutrient medium, and then cell growth, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were measured.

	Carbon source	Growth (OD <sub>660</sub> )	Remaining		Accumulating
			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>Sugar (3%)</b>	D-Glucose	3.0	0%	0%	0 mM
	Lactose monohydrate	0.1	100	99	0
	L-Arabinose	0.0	96	94	0
	D-Mannose	0.1	81	90	0.16
	Saccharose	0.0	100	100	0
	Maltose monohydrate	0.1	100	100	0
	D-Galactose	0.1	87	100	0
	D-Fructose	0.3	100	78	1.1
	D-Dibose	0.6	100	78	0
<b>Organic acid (3%)</b>	Sodium acetate trihydrate	0.1	99	95	0
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate	1.2	22	17	3.0
	<i>tri</i> -Sodium citrate dihydrate	2.1	0.8	1.6	0
	Succinic acid disodium salt	1.4	0.0	4.8	0
	Adipic acid	0.2	82	51	0
	Sodium <i>n</i> -butyrate	0.2	94	97	0
	Sodium propionate	0.3	86	95	0
	Glyceric acid	1.0	0.8	1.6	0
	Malonic acid	0.7	66	15	0.4
	Maleric	0.2	70	43	0
	Sodium lactate	2.8	0.0	0.0	0
	Fumaric acid	1.9	0.8	0.8	0
	Gluconic acid	3.0	0.8	8.8	0
	Phthalic acid	0.2	87	50	0
	DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.3	80	52	0
<b>Amino acid (3%)</b>	Glycine	0.3	95	27	0
	L-Methionine	0.4	14	6.4	0
	L-Histidine monohydrochloride	0.9	19	1540	5.1
	L-Lysine hydrochloride	0.1	92	117	1.2
	L-Phenylalanine	0.0	97	100	0
	Sodium L-glutamate	4.3	3.2	511	0
	L-Arginine monohydrochloride	0.7	45	1906	3.7
<b>Nutrient medium (1%)</b>	Polypepton	5.3	0.8	538	0.1
	Yeast extract	4.7	3.2	339	0
	Meat extract	2.1	41	248	9

## 2. 0.13% (w/v) $\text{NH}_4\text{Cl}$ 培地における $\text{NH}_4^+$ の除去に与える炭素源の影響

合計 34 種類の炭素源を用いて、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  の除去を試験した結果を Table 6-6 に示す。試験した D-グルコースと D-フルクトースを除く 6 種の糖を含む培地すべてにおいて、本菌の増殖は不良であり、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  もほとんど除去されなかった。

一方、試験した 15 種有機酸の中でクエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩を含む培地において、本菌は良好に増殖し、培地中の  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  も良好に除去した。また、DL-リンゴ酸塩を含む培地では、本菌の増殖はやや不良で、培地中に  $\text{NH}_4^+$  が残存した。

試験した 7 種のアミノ酸を含む培地では、両イオンの効率的な除去は見られなかった。特に  $\text{NH}_4^+$  は脱アミノ反応によるアミノ基の遊離によって増加した。

試験した 3 種の天然培養基を含む培地すべてにおいて、本菌は良好に増殖したが、天然培養基由来の  $\text{NH}_4^+$  が遊離したために培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$  量は増加した。

**Table 6-6. Effect of carbon sources on the removal of  $\text{NH}_4^+$  from 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 3% (w/v) sugar, organic acid, or amino acid or 1% (w/v) nutrient medium, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

	Carbon source	Growth (OD <sub>660</sub> )	Remaining $\text{NH}_4^+$	Accumulating	
				$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$
<b>Sugar (3%)</b>	D-Glucose	4.7	0%	0 mM	0 mM
	Lactose monohydrate	0.1	98	0	0
	L-Arabinose	0.1	99	0	0
	D-Mannose	0.1	94	0	0
	Saccharose	0.1	98	0	0
	Maltose monohydrate	0.2	96	0	0
	D-Galactose	0.1	92	0	0
	D-Fructose	3.4	0	0	0
	D-Dibose	0.7	82	0	0
<b>Organic acid (3%)</b>	Sodium acetate trihydrate	0.1	99	0	0
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate	2.1	10	0	0
	<i>tri</i> -Sodium citrate dihydrate	2.8	2.8	0	0
	Succinic acid disodium salt	2.8	4.8	0	0
	Adipic acid	0.2	72	0	0
	Sodium <i>n</i> -butyrate	0.3	98	0	0
	Sodium propionate	0.3	93	0	0
	Glyceric acid	2.4	0	0	0
	Malonic acid	0.8	31	0	0
	Maleric	0.1	53	0	0
	Sodium lactate	3.2	0.4	0	0
	Fumaric acid	2.3	0.4	0	0
	Gluconic acid	3.7	3.2	0	0
	Phthalic acid	0.2	80	0	0
DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.3	76	0	0	
<b>Amino acid (3%)</b>	Glycine	0.1	37	0	0
	L-Methionine	0.1	24	0	0
	L-Histidine monohydrochloride	4.2	1026	0	0
	L-Lysine hydrochloride	0.5	124	0	0
	L-Phenylalanine	0.0	99	0	0
	Sodium L-glutamate	4.2	334	0	0
	L-Arginine monohydrochloride	1.6	988	0	0
<b>Nutrient medium (1%)</b>	Polypepton	5.5	422	0	0
	Yeast extract	5.2	373	0	0
	Meat extract	2.8	263	0	0

### 3. 0.21% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地における NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える炭素源の影響

合計 34 種類の炭素源を用いて、0.21% (w/v) NaNO<sub>3</sub> 培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去を試験した結果を Table 6-7 に示す。試験した D-グルコースを除く 8 種の糖を含む培地すべてにおいて、本菌の増殖は不良であり、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>もほとんど除去されなかった。

一方、試験した 15 種の有機酸の中でクエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩を含む培地において、本菌は良好に増殖し、培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も良好に除去し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の蓄積も見られなかった。また、DL-リンゴ酸塩とアジピン酸を含む培地では、本菌の増殖はやや不良で、培地中に NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が残存し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の蓄積も見られた。

試験した 7 種のアミノ酸の中で L-ヒスチジン塩酸塩と L-グルタミン酸塩を含む培地において、本菌は良好に増殖し、培地中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup>も良好に除去した。しかし、アミノ酸由来の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>遊離のために NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の蓄積は見られた。

試験した 3 種類の天然培養基の中で、ポリペプトンおよび酵母エキスを含む培地では、本菌は良好に増殖し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>をほぼ完全に除去した。しかし、肉エキスを含む培地では、本菌の増殖は不十分であり、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が残存していた。また、天然培養基由来の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が遊離したために培地中に NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の蓄積は見られた。

**Table 6-7. Effect of carbon sources on the removal of  $\text{NO}_3^-$  from 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 3% or 1% (w/v) sugar, organic acid, or amino acid or 1% (w/v) nutrient medium, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

	Carbon source	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NO}_3^-$	Accumulating	
				$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^-$
<b>Sugar (3%)</b>	D-Glucose	3.6	0%	0.1 mM	0 mM
	Lactose monohydrate	0.1	100	0	0
	L-Arabinose	0.0	92	0	0
	D-Mannose	0.0	100	0.3	0.1
	Saccharose	0.2	100	0.3	0
	Maltose monohydrate	0.0	100	0.4	0
	D-Galactose	0.0	100	0.4	0
	D-Fructose	0.2	100	0.1	2.3
	D-Dibose	0.5	84	0.1	0
<b>Organic acid (3%)</b>	Sodium acetate trihydrate	0.1	100	0.2	0
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate	1.2	12	1.8	3.5
	<i>tri</i> -Sodium citrate dihydrate	2.7	0	0.9	0
	Succinic acid disodium salt	1.5	0	1.7	0
	Adipic acid	1.9	66	0.2	0.7
	Sodium <i>n</i> -butyrate	0.5	92	0.3	0
	Sodium propionate	0.4	92	0	0
	Glyceric acid	3.0	0.4	0	0
	Malonic acid	0.6	54	0.4	0.7
	Maleric	0.1	78	0	0
	Sodium lactate	2.8	0.4	0	0
	Fumaric acid	1.5	0.4	0	0
	Gluconic acid	3.1	0	0	0
	Phthalic acid	0.4	89	0	0
	DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.3	84	2.4	0
<b>Amino acid (3%)</b>	Glycine	0.0	94	2.8	0
	L-Methionine	0.0	21	0.3	0
	L-Histidine monohydrochloride	3.3	27	47	6.5
	L-Lysine hydrochloride	0.0	91	1.5	0
	L-Phenylalanine	0.0	100	0	0
	Sodium L-glutamate	4.6	0.4	12	0
	L-Arginine monohydrochloride	0.5	68	52	8.5
<b>Nutrien medium (1%)</b>	Polypepton	5.3	1.2	20	0
	Yeast extract	2.9	3.6	8.6	0
	Meat extract	1.7	69	6.3	11

## 第4節 D-グルコースの存在下で $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

### <方法>

第3節では、D-グルコースの代わりに唯一の炭素源として合計34種類の炭素源（糖、有機酸、アミノ酸、天然培養基）を添加した培地にて *P. aeruginosa* NBRC 12689株における  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  の除去効果を検討した。試験した基質のうち28種の培地において同菌の増殖および両イオンの除去効率が低下した。そこで、3% (w/v) D-グルコースを含む0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地に、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の除去低下をもたらした28種類の炭素源を1% (w/v) となるように添加した各培地を調製した(5 ml)。各培地に本菌を植菌し、30°Cで140 rpmで振とう培養した。培養液を経時的にサンプリングした後、培養液の濁度 ( $\text{OD}_{660}$ ) と培地中の  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  を定量した。

### <結果>

#### 1. D-グルコースの存在下で $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

合計28種類の炭素源を用いて、D-グルコースの共存下で0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  の同時除去を試験した結果をTable 6-8に示す。試験した8種の糖を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。

一方、D-グルコースの共存下で試験した9種の有機酸の中では、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩を含む培地すべてにおいて、本菌の増殖は抑制され、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  もほとんど除去されなかった。

試験した7種のアミノ酸を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。しかし、L-ヒスチジン塩酸塩、L-リジン塩酸塩、L-アルギニン塩を含む培地では、アミノ酸由来の  $\text{NH}_4^+$  遊離のために残存  $\text{NH}_4^+$  量は増加した。

試験した3種類の天然培養基を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。

**Table 6-8. Effect of two kinds of carbon sources on the removal of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  from 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 1% (w/v) sugar, organic acid, amino acid, or nutrient medium, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

	3% (w/v) D-Glucose + 1% (w/v) other carbon source	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining		Accumulating
			$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^-$
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose	3.0	0%	0%	0 mM
<b>Sugar (1%)</b>	Lactose monohydrate	3.1	2.4	0	0
	L-Arabinose	2.0	1.6	0	0
	D-Mannose	2.8	0	0	0
	Saccharose	3.2	1.0	0	0
	Maltose monohydrate	3.4	7.2	0	0
	D-Galactose	3.0	5.6	0	0
	D-Fructose	2.0	2.4	0	0
	D-Dibose	2.4	6.2	0	0
<b>Organic acid (1%)</b>	Sodium acetate trihydrate	0.7	85	80	0.1
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate	5.4	19	0	0
	Adipic acid	2.7	6.4	0	0
	Sodium <i>n</i> -butyrate	0.1	90	87	0.1
	Sodium propionate	0.1	75	88	0
	Malonic acid	3.6	16	0	0
	Maleric	3.6	4.8	0	0
	Phthalic acid	2.7	12.8	0.8	0
DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.1	98.4	80	0	
<b>Amino acid (1%)</b>	Glycine	9.2	0.8	764	0
	L-Methionine	2.7	1.6	0.8	0
	L-Histidine monohydrochloride	12.6	0.8	373	0
	L-Lysine hydrochloride	12.8	0.8	1458	0
	L-Phenylalanine	6.4	0.8	0	0
	Sodium L-glutamate	9.3	0.8	1.5	0
	L-Arginine monohydrochloride	11.8	0.8	782	0
<b>Nutrient medium (1%)</b>	Polypepton	11.4	0	1.3	0
	Yeast extract	10.4	3.2	1.4	0
	Meat extract	6.9	0.8	2.3	0

## 2. D-グルコースの存在下で $\text{NH}_4\text{Cl}$ 培地における $\text{NH}_4^+$ の除去に与える炭素源の影響

合計 28 種類の炭素源を用いて、D-グルコースの存在下で 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地中の  $\text{NH}_4^+$  の除去を試験した結果を Table 6-9 に示す。試験した 8 種の糖を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NH}_4^+$  も良好に除去された。

一方、D-グルコースの存在下で試験した 9 種の有機酸の中では、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩を含む培地すべてにおいて、本菌はの増殖は抑制され、 $\text{NH}_4^+$  もほとんど除去されなかった。

試験した 7 種のアミノ酸を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖したが、アミノ酸由来の  $\text{NH}_4^+$  遊離のために残存  $\text{NH}_4^+$  量は増加した。

試験した 3 種類の天然培養基を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NH}_4^+$  もほとんど除去された。

**Table 6-9. Effect of two kinds of carbon sources on the removal of  $\text{NH}_4^+$  from 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 1% (w/v) sugar, organic acid, amino acid, or nutrient medium, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

3% (w/v) D-Glucose + 1% (w/v) other carbon source		Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NH}_4^+$	Accumulating	
				$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose	4.7	0%	0 mM	0 mM
<b>Sugar (1%)</b>	Lactose monohydrate	4.4	0	0	0
	L-Arabinose	4.6	2.3	0	0
	D-Mannose	4.1	1.2	0	0
	Saccharose	4.6	0	0	0
	Maltose monohydrate	4.2	0	0	0
	D-Galactose	3.7	0	0	0
	D-Fructose	3.4	0.4	0	0
	D-Dibose	3.2	0.9	0	0
<b>Organi acid (1%)</b>	Sodium acetate trihydrate	0.4	75	0	0
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate	4.5	0.4	0	0
	Adipic acid	3.4	0	0	0
	Sodium <i>n</i> -butyrate	0.1	96	0	0
	Sodium propionate	0.1	97	0	0
	Malonic acid	4.0	0	0	0
	Maleric	4.1	1.6	0	0
	Phthalic acid	2.7	0	0	0
DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.1	79	0	0	
<b>Amino acid (1%)</b>	Glycine	10.0	346	0	0
	L-Methionine	4.1	0.4	0	0
	L-Histidine	12.0	125	0	0
	L-Lysine hydrochloride	13.0	267	0	0
	L-Phenylalanine	8.9	65	0	0
	Sodium L-glutamate	11.0	155	0	0
L-Arginine monohydrochloride	11.0	526	0	0	
<b>Nutrien medium (1%)</b>	Polypepton	13.0	0.5	0	0
	Yeast extract	14.0	0.8	0	0
	Meat extract	9.4	0.7	0	0

### 3. D-グルコースの存在下で $\text{NaNO}_3$ 培地における $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

合計 28 種類の炭素源を用いて、D-グルコースの存在下で 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地中の  $\text{NO}_3^-$  の除去を試験した結果を Table 6-10 に示す。試験した 8 種の糖を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。

一方、D-グルコースの存在下で試験した 9 種の有機酸の中では、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩を含む培地すべてにおいて、本菌の増殖は抑制され、 $\text{NO}_3^-$  もほとんど除去されなかった。

試験した 7 種のアミノ酸を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。しかし、L-メチオニンを除く、他の 6 種のアミノ酸を含む培地では、アミノ酸由来の  $\text{NH}_4^+$  遊離のために残存  $\text{NH}_4^+$  量は増加した。

試験した 3 種類の天然培養基を含む培地すべてにおいて、D-グルコースの存在下で、本菌は良好に増殖し、 $\text{NO}_3^-$  も良好に除去された。

**Table 6-8. Effect of two kinds of carbon sources on the removal of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  from 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 1% (w/v) sugar, organic acid, amino acid, or nutrient medium, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

		3% (w/v) D-Glucose + 1% (w/v) other carbon source	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NO}_3^-$	Accumulating $\text{NH}_4^+$ $\text{NO}_2^-$	
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose		3.6	0%	0.1 mM	0 mM
<b>Sugar (1%)</b>	Lactose monohydrate		2.7	2.4	0.1	0
	L-Arabinose		2.9	0.4	0.2	0
	D-Mannose		3.8	2.8	0.3	0
	Saccharose		3.4	1.4	0.3	0
	Maltose monohydrate		2.7	2.8	0.1	0
	D-Galactose		2.8	1.2	0.2	0
	D-Fructose		2.0	4.8	0.2	0
	D-Dibose		3.3	7.6	0.3	0
<b>Organic acid (1%)</b>	Sodium acetate trihydrate		0.8	70	0	0
	Disodium DL-malate <i>n</i> -hydrate		6.9	3.2	0.2	0
	Adipic acid		3.7	4.4	0	0
	Sodium <i>n</i> -butyrate		0.1	86	0	0
	Sodium propionate		0.1	92	0	0
	Malonic acid		3.3	7.6	0.1	0
	Maleric		3.7	2.0	0	0
	Phthalic acid		3.5	5.6	0	0
	DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid		0.3	100	1.1	0
<b>Amino acid (1%)</b>	Glycine		8.8	0.4	87	0
	L-Methionine		4.1	0	0.1	0
	L-Histidine monohydrochloride		13.0	0	31	0
	L-Lysine hydrochloride		12.0	0.4	67	0
	L-Phenylalanine		9.5	0.8	16	0
	Sodium L-glutamate		7.8	0	39	0
	L-Arginine monohydrochloride		11.2	0.8	131	0
<b>Nutrient medium (1%)</b>	Polypepton		11	0.4	0.4	0
	Yeast extract		10	0	0.2	0
	Meat extract		7.3	0	0.3	0

## 第5節 3種類の炭素源の共存下における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去

### <方法>

3% (w/v) D-グルコースを含む 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地にそれぞれ、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、または DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩を添加すると、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株の増殖および  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  の除去は抑制された。そこで、3% (w/v) D-グルコースの共存下で、良好な炭素源 ( $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  の除去を促進した炭素源：クエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、オキサール酢酸塩、天然培養基) を加えた 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地を調製し、これに  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NH}_4^+$  の除去を抑制した炭素源 (酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩) をそれぞれ 0.5% (w/v) となるように添加した。各培地に *P. aeruginosa* NBRC 12689 株を植菌し、30°C で 140 rpm で振とう培養した。培養液を経時的にサンプリングした後、培養液の濁度 ( $\text{OD}_{660}$ ) と  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NH}_4^+$  を定量した。

### <結果>

#### 1. 3種類の炭素源の共存下で $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地における $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与える抑制炭素源の影響

試験した 40 種類の培地のうち、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の除去を促進した炭素源 (グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩)、両イオンの同時除去を抑制した炭素源 (酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩) を含む 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地すべてにおいて、本菌は増殖せずに、培地中の  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  もほとんど除去されなかった。しかし、酵母エキスが存在すると、抑制した上記の 4 種炭素源が共存しても両イオンの除去に対する抑制は見られず、両イオンはほぼ完全に除去された (Table 6-11)。

一方、クエン酸塩、コハク酸塩、オキサール酢酸塩を含む培地では、抑制した炭素源 (酢酸塩、プロピオン酸塩) が存在しても両イオンの除去に対する抑制は見られず、両イオンはほぼ完全に除去された (Table 6-11)。

**Table 6-11. Effect of three kinds of carbon sources on the removal of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  from 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 0.5% (w/v) of repressive carbon source and 0.5% (w/v) stimulatory carbon source, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

	3% (w/v) D-Glucose + other carbon source	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining		Accumulating
			$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_2^-$
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose	3.0	0%	0%	0 mM
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	4.9	0	2.4	0.0
<b>tri-Sodium</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.6	23	3.2	0.19
<b>citrate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	2.0	1.6	2.4	0.02
<b>dihydrate</b>	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	83	85	0.01
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	6.4	0	0.8	0.0
<b>Succinic acid</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.7	46	59	2.96
<b>disodium</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	1.5	6.4	0.8	0.02
<b>salt</b>	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	90	76	0.02
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	4.0	0	1.6	0.0
<b>Oxaloacetate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.0	93	78	0.01
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	1.7	5	0.6	0.01
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	90	70	0.01
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	7.6	0	3.2	0.0
<b>Polypepton</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	6.8	0	1.6	0.0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	6.6	0	0.8	0.0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	4.4	0.8	162	0.02
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	6.4	0	0.8	0.0
<b>Yeast extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	6.8	0	0.8	0.0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	4.4	0	1.6	0.0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	5.4	0	3.2	0.0
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	5.4	0	2.4	0.0
<b>Meat extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	1.5	56	98	0.75
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	5.9	0	0.8	0.0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	8.4	0	2.4	0.0

## 2. 3種類の炭素源の共存下でNH<sub>4</sub>Cl培地におけるNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去に与える炭素源の影響

試験した40種類の培地のうち、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去を促進した炭素源(D-フルクトース、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩)、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去を抑制した炭素源(酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩)を含む0.13% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl培地すべてにおいて、本菌は増殖せずに、培地中のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>もほとんど除去されなかった。しかし、酵母エキスが存在すると、抑制した上記の4種炭素源が共存してもNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の除去に対する抑制は見られず、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>はほぼ完全に除去された (Table 6-12)。

一方、クエン酸塩、コハク酸塩、オキサリ酢酸塩を含む培地では、抑制した炭素源(酢酸塩、プロピオン酸塩)が存在してもNH<sub>4</sub><sup>+</sup>除去に対する抑制は見られず、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>はほぼ完全に除去された (Table 6-12)。

**Table 6-12. Effect of three kinds of carbon sources on the removal of  $\text{NH}_4^+$  from 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.13% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  in the presence of 0.5% (w/v) of repressive carbon source and 0.5% (w/v) stimulatory carbon source, and then cell growth,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{NO}_2^-$  were measured.

	3% (w/v) D-Glucose + other carbon source	Growth ( $\text{OD}_{660}$ )	Remaining $\text{NH}_4^+$	Accumulating $\text{NO}_3^-$ $\text{NO}_2^-$	
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose	4.7	0 mM	0 mM	0 mM
<b>+0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	4.4	0	0	0
<b>tri-Sodium</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	1.8	0	0	0
<b>citrate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	2.3	0	0	0
<b>dihydrate</b>	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	82	0	0
<b>+0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	3.4	0	0	0
<b>Succinic acid</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	1.2	62	0	0
<b>disodium</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	2.5	0	0	0
<b>salt</b>	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	79	0	0
<b>+0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	3.4	0	0	0
<b>Oxaloacetate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.0	81	0	0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	3.0	0	0	0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.6	32	0	0
<b>+0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	7.6	0.8	0	0
<b>Polypepton</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	2.9	100	0	0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	7.0	1.6	0	0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	3.2	110	0	0
<b>+0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	7.6	0	0	0
<b>Yeast extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	6.0	0.8	0	0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	5.7	0	0	0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	7.3	2.4	0	0
<b>+ 0.5% (w/v)</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	6.9	6.9	0	0
<b>Meat extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	1.2	90	0	0
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	6.8	4	0	0
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	6.5	2.4	0	0

### 3. 3種類の炭素源の共存下で $\text{NaNO}_3$ 培地における $\text{NO}_3^-$ の除去に与える炭素源の影響

試験した 40 種類の培地のうち、 $\text{NO}_3^-$  の除去を促進した炭素源（グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩）、両イオンの同時除去を抑制した炭素源（酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩）を含む 0.21% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  培地すべてにおいて、本菌は増殖せずに、培地中の  $\text{NO}_3^-$  もほとんど除去されなかった。しかし、酵母エキスが存在すると、抑制した上記の 4 種炭素源が共存しても  $\text{NO}_3^-$  の除去に対する抑制は見られず、 $\text{NO}_3^-$  はほぼ完全に除去された (Table 6-13)。

一方、クエン酸塩、コハク酸塩、オキサリ酢酸塩を含む培地では、抑制した炭素源（酢酸塩、プロピオン酸塩）が存在しても  $\text{NO}_3^-$  の除去に対する抑制は見られず、 $\text{NO}_3^-$  はほぼ完全に除去された (Table 6-13)。

**Table 6-13. Effect of three kinds of carbon sources on the removal of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> from 0.21% (w/v) NaNO<sub>3</sub> medium by *P. aeruginosa* NBRC 12689**

The bacterium was incubated at 30°C for 3 d with shaking at 140 rpm (5 ml/tube) in the basal medium containing 0.21% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 3% (w/v) D-glucose, 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>, and 0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.5% (w/v) of repressive carbon source and 0.5% (w/v) stimulatory carbon source, and then cell growth, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were measured.

	3% (w/v) D-Glucose + other carbon source	Growth (OD <sub>660</sub> )	Remaining NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Accumulating	
				NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>Control</b>	Only 3% (w/v) D-glucose	3.6	0%	0	0 mM
<b>+ 0.5% (w/v) tri-Sodium citrate dihydrate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	4.9	0.0	0.1	0.00
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.0	72	0.0	0.04
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	1.4	15	0.1	0.03
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	72	0.2	0.01
<b>+ 0.5% (w/v) Succinic acid disodium salt</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	4.7	5.6	0.0	0.00
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.0	65	0.0	0.32
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	2.4	1.6	0.2	0.01
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	85	0.2	0.01
<b>+ 0.5% (w/v) Oxaloacetate</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	2.5	0.0	0.0	0.0
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	0.0	82	0.0	0.01
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	1.9	2.0	0.0	0.02
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.0	94	0.1	0.01
<b>+ 0.5% (w/v) Polypepton</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	7.5	0.0	0.0	0.00
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	5.2	1.6	0.0	0.02
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	4.7	0.0	0.1	0.03
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	2.7	0.8	6.5	0.03
<b>+ 0.5% (w/v) Yeast extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	6.3	0.0	0.0	0.00
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	4.6	0.0	0.0	0.02
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	4.8	1.6	0.1	0.02
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	4.3	0.8	0.3	0.02
<b>+ 0.5% (w/v) Meat extract</b>	+ 0.5% (w/v) Sodium acetate trihydrate	6.1	0.0	0.1	0.0
	+ 0.5% (w/v) Sodium <i>n</i> -butyrate	1.5	70	0.3	0.03
	+ 0.5% (w/v) Sodium propionate	3.2	0.0	0.2	0.03
	+ 0.5% (w/v) DL-2-Amino- <i>n</i> -butyric acid	4.1	0.0	0.3	0.02

## 第 6 節 要約と考察

### <要約>

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響を調べたところ、32 mM 以上のリン酸塩を含む試験培地において両イオンの効率的な除去が見られた。さらに、両イオンの除去に与える炭素源の影響について調べたところ、クエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩等の有機酸において D-グルコースと同等の除去効果が見られた。一方、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩は、D-グルコースと共存する時でも、本菌の増殖を抑制しており、両イオンの同時除去も抑制された。そこで、同時除去効果が見られた炭素源、抑制する炭素源、D-グルコースと共存下で試験したところ、酵母エキスを含むすべての培地において、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に対して抑制が見られなかった。また、クエン、コハク酸塩、オキサロ酢酸塩と抑制した炭素源（酢酸塩、プロピオン酸塩）と共存する時、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ を良好に除去することができた。

### <考察>

*P. aeruginosa* 属の細菌は糖代謝経路として、Enter-Doudoroff pathway によりグルコースをグルコース-6-リン酸から 6-ホスホ-D-グルコースを経て、ピルビン酸にまで代謝する<sup>54-55)</sup>。*P. aeruginosa* NBRC 12689 において、 $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去を抑制した 8 種の糖は、同代謝経路にすぐ合流できない。グルコースを代謝する Enter-Doudoroff pathway および TCA cycle は中枢代謝と呼ばれ、代謝前駆体の合成や他の物質代謝経路の形成を担っている。したがって、本菌にとって TCA cycle を正常に機能させる条件を設定することが $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の効率的な除去につながると思われる。

本菌は、3% (w/v) D-グルコースを含む 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地において両イオンを同時に除去するとともに培養 3 日間以内に増殖が  $\text{OD}_{660}=3$  まで達する。しかし、D-グルコースと共存する時でも、酢酸塩は本菌増殖と両イオンの除去を抑制した。酢酸代謝には TCA cycle 中の中間体（クエン酸、コハク酸、オキサロ酢酸）が必要で、glyoxylate cycle として知られている TCA cycle の一変型が必要となる<sup>56)</sup>。一方、プロピオン酸塩の代謝には、プロピオニル CoA を経てスクシニル CoA となり TCA cycle に入る<sup>57)</sup>。したがって、酢酸、または、プロピオン酸共存下では、酢酸とプロピオン酸代謝のためにエネルギーおよび TCA cycle 中の中間体を振り分けなければならない、増殖だけでなく $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去効率が下がったと考

えられる。

D-グルコースを含む培地にアミノ酸が存在すると  $\text{NO}_3^-$  は除去されるが、 $\text{NH}_4^+$  は増加した。一方、天然培養基であるポリペプトン、酵母エキス、肉エキスは、 $\text{NH}_4^+$  を増加させずに  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を除去した。排水処理の現場ではこれらの天然培養基に類似した物質も存在するので、本菌のこのような性質は、排水処理において有効に働くと考えられる。

## 第7章 耐熱性微生物による $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の同時除去

### 第1節 序

6章までに中温菌を用いて、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を利用、除去することについて述べてきた。しかし、日本の夏期では外気温がかなり高温になるため、高温条件下でも十分増殖して  $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去できる耐熱性微生物が得られれば、その実用性は高いと言える。このような菌株は、熱帯地方においても利用できる。

耐熱性菌は好熱性菌と異なり、中温および高温の両方において増殖できる菌株である。

我々の研究室では、0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を除去できる耐熱性 *Bacillus licheniformis* T-7-2 株を分離した。そこで本章では、耐熱性菌 *B. licheniformis* T-7-2 を用いた培養条件や脱窒機構について述べる。

### 第2節 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響

#### <方法>

#### 1. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響

Table 7-1 に示す 0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製した。終濃度が 0.1 mM になるように各種の金属塩を無菌的に加えた。これに *B. licheniformis* T-7-2 株をそれぞれ植菌し、30°C と 50°C において試験管で 140 rpm で振とう培養した。経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した金属イオンは  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  であった。

#### 2. $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{Fe}^{2+}$ の影響

各種濃度の  $\text{Fe}^{2+}$ 、0.8 pM  $\text{MoO}_4^{2-}$ 、5% (w/v) D-グルコースを添加した 0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を調製し、これに、*B. licheniformis* T-7-2 株をそれぞれ植菌し、50°C において試験管で 140 rpm で振とう培養した。経時的に 0.7 ml の培養液をサンプリングした後、その濁度と培地中に残存する  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。検討した  $\text{Fe}^{2+}$  濃度は 0、0.01、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mM であった。

Table 7-1.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.0	g
D-Dlucose	50	g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2.0	g
NaCl	0.5	g
Metal ion	0.1	mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0	ng
$\text{H}_2\text{O}$	1,000	ml
pH		7.1

<結果>

1.  $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響

$\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、 $\text{Mn}^{2+}$ を添加した時、*B. licheniformis* T-7-2株は $30^\circ\text{C}$ と $50^\circ\text{C}$ において良好に増殖したが、 $\text{NO}_2^-$ を蓄積した。 $0.1\text{ mM Fe}^{2+}$ を添加した時、*B. licheniformis* T-7-2株は $30^\circ\text{C}$ と $50^\circ\text{C}$ において良好に増殖し、 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ も最も効率的に除去した。一方、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ を添加すると、本菌の増殖を抑制され、培地中の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ もあまり利用されなかった。

2.  $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の同時除去に与える $\text{Fe}^{2+}$ の影響

$0.2\%$  (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 培地を用いた場合、 $\text{Fe}^{2+}$ を添加しないと、*B. licheniformis* T-7-2株の増殖は抑制され、 $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の除去効率も悪かった。 $0.5\text{ mM Fe}^{2+}$ を添加すると、本菌の増殖とともに、培地中の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ も完全に除去された (Fig. 7-1)。

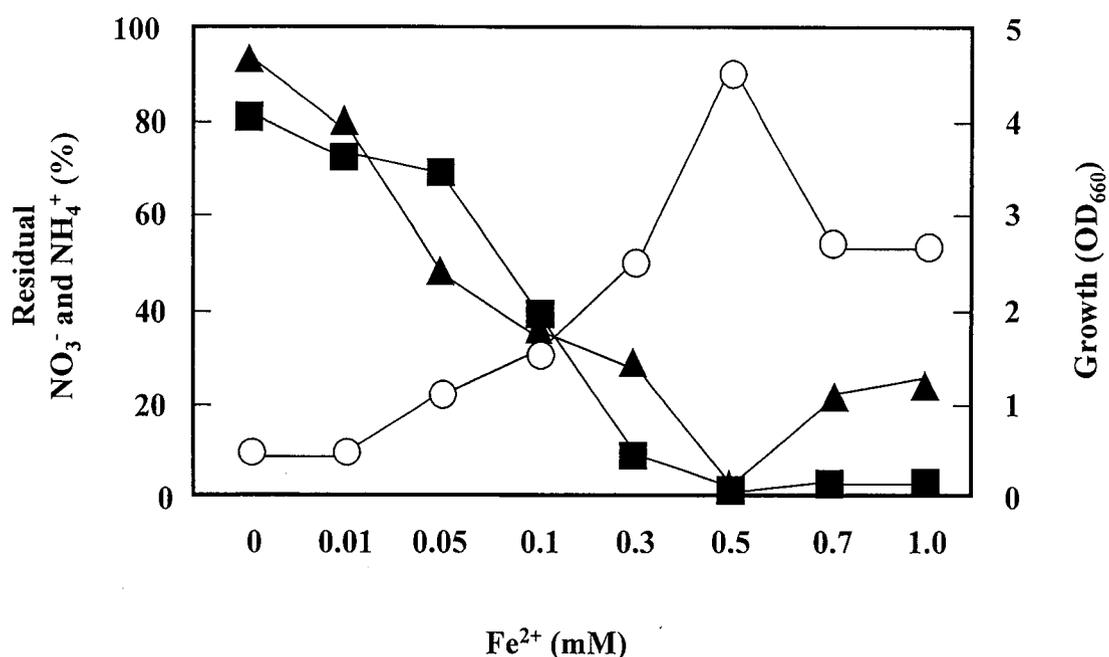


Fig. 7-1. Effect of concentrations of Fe<sup>2+</sup> on the removal of 0.2% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> by *B. licheniformis* T-7-2.

The bacterium was incubated at 50°C for 72 h with shaking (140 rpm) in the basal medium (7 ml/tube) containing 0.2% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5% (w/v) D-glucose, and 0.8 pM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in the presence of 0.0-1.0 mM Fe<sup>2+</sup>, and then cell growth (○), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (▲), and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■), were measured.

### 第3節 培養における全窒素量の変化

#### <方法>

*B. licheniformis* T-7-2 株を用いて、0.1% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地にて 30°C と 50°C の両温度で、好気条件 (振動数 140 rpm) で行った (2章3節参照)。

全窒素は第2章4節で述べた方法により定量した。

## < 結果 >

本菌の増殖および培地中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 濃度の変化を Fig. 7-2-(A、C) に示す。また、Fig. 7-2-(B、D)に培養液中の全窒素量の変化を示す。いずれの温度でも、培養開始4日後に  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ は培地から完全に除去された。また、 $\text{NO}_2^-$ の蓄積は見られなかった。30℃で振とう培養した時、培養上清に存在する窒素化合物の量は、始めに加えた全窒素量の44%であった。菌体中には、培養開始時に加えた全窒素量の25%が存在していた。一方、50℃で振とう培養した時、培養上清に存在する窒素化合物の量は、始めに加えた全窒素量の24%であった。菌体中には、培養開始時に加えた全窒素量の20%が存在していた。

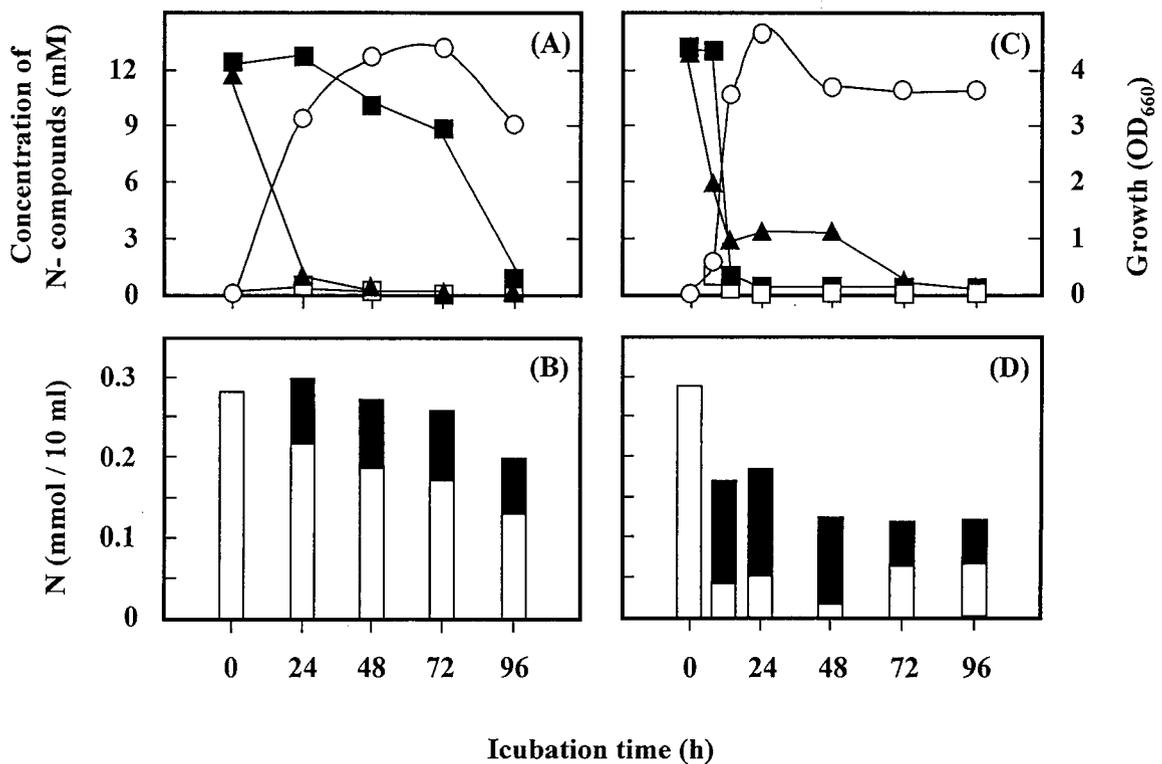


Fig. 7-2. Utilization of 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  by *B. licheniformis* T-7-2 at 30°C (A) and 50°C (C) and total nitrogen in the culture at 30°C (B) and 50°C (D).

The bacterium was incubated at 30°C and 50°C for 96 h with shaking (140 rpm) in the basal medium (70 ml/500-ml flask) containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 pM  $\text{MoO}_4^{2-}$  and then cell growth (○),  $\text{NH}_4^+$  (▲),  $\text{NO}_3^-$  (■),  $\text{NO}_2^-$  (□), and total nitrogen in the cells (black bar) and in the cultural supernatant (white bar) were measured.

#### 第4節 脱窒機構の解析

##### <方法>

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  培地を調製した後、これに *B. licheniformis* T-7-2 株を植菌し、50°Cで試験管 (7 ml/tube) で前培養 (140 rpm) した。培養開始 2 日後、0.2 ml

の前培養液を 25 ml の 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  培地に移し、本培養液を調製し、50°C でバイアル瓶 (1.0 ml/10 ml vial) で振とう培養 (140 rpm) した。経時的にバイアル瓶中に蓄積の窒素ガスを GC-MS により分析した。また、濁度および培養液中の  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  を定量した。

<結果>

Fig. 7-3 に示すように、0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  培地において、培養開始 20 時間以内に *B. licheniformis* T-7-2 株は良好に増殖し、培地中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を良好に除去した。GC-MS で分析した結果、 $\text{NO}_2^-$  を蓄積した時に  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  の蓄積を見られた。培養開始 13 時間後、 $\text{NO}_2^-$  の蓄積量が減少した。

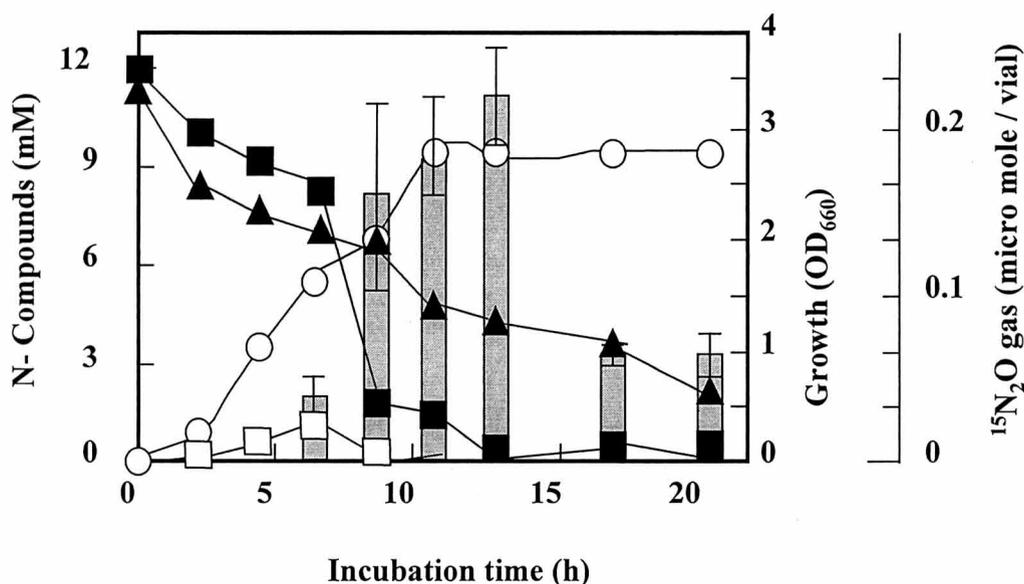


Fig. 7-3. Utilization of 0.1% (w/v) of  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  by *B. licheniformis* T-7-2 and generation of nitrogen gases.

The bacterium was incubated at 50°C for 20 h with shaking (140 rpm) in the basal medium containing 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ , 3% (w/v) D-glucose, 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , and 0.8 pM  $\text{MoO}_4^{2-}$ , and then cell growth ( $\circ$ ),  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $\square$ ),  $\text{NO}_2^-$  ( $\diamond$ ), and generation of  $\text{N}_2\text{O}$  (hatched bar) were measured.

## 第5節 要約と考察

### <要約>

耐熱性菌 *B. licheniformis* T-7-2 株は、0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$  を添加すると、30°C と 50°C で良好に増殖するとともに、0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地から  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を除去した。

30°C と 50°C で培養した時の培養液中の  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NH}_4^+$ 、また、全窒素量の変化を調べたところ、30°C で振とう培養した時、培養上清に存在する窒素化合物の量は、始めに加えた全窒素量の 44% であった。菌体中には、培養開始時に加えた全窒素量の 25% が存在していた。一方、50°C で振とう培養した時、培養上清に存在する窒素化合物の量は、始めに加えた全窒素量の 24% であった。菌体中には、培養開始時に加えた全窒素量の 20% が存在していた。

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  を窒素源としてゴム栓をしたバイアル瓶で本菌を培養した時、 $\text{NO}_2^-$  の蓄積に伴って  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  は生成した。

### <考察>

植物や微生物では硝化および脱窒に関与する酵素系の中で異化型硝酸還元酵素 (Mo, Fe/S クラスター)、異化型硝酸還元酵素 (ヘム *cd*)、一酸化窒素還元酵素 (ヘム *c*)、同化型亜硝酸還元酵素 (非ヘム Fe) は活性発現に鉄イオンまたはモリブデンを必要とする<sup>26-30)</sup>。耐熱性菌 *B. licheniformis* T-7-2 株においても  $\text{Fe}^{2+}$  濃度を検討することにより、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を培地から完全に除去できたことから、本菌の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  の代謝にも  $\text{Fe}^{2+}$  が必要であると考察した。一方、 $\text{Mn}^{2+}$  は *B. licheniformis* 属の菌体中のグルタミンシンテターゼ活性を促進することが報告されている<sup>28)</sup>。したがって、*B. licheniformis* T-7-2 株が  $\text{Mn}^{2+}$  を添加すると、本菌の増殖を促進したことは合理的に説明できる。

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  を窒素源としてゴム栓をしたバイアル瓶で本菌を培養した時、 $\text{NO}_2^-$  の蓄積に伴って  $\text{N}_2\text{O}$  は生成し、また、0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地で培養する過程に全窒素を減少したことから、本菌は脱窒能力を持っていると考えられる。

*B. licheniformis* の菌株は好気条件下で脱窒作用を示すことは報告されていない<sup>57)</sup>。しかし、*B. licheniformis* T-7-2 株は好気条件下で  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去したことにより、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を含む排水の処理において、他の脱窒菌においても、嫌気条件下だけでなく、好気条件下でも使用できると考えられる。

## 総括

本論文では、現在の硝化脱窒素プロセスを、時間とコストの両面でさらに効率的なものとするために、1つの培養層内で排水中の  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  を同時に除去できる微生物を検索することを目的として研究を行い、次のような成果を得ることができた。

脱窒素が報告されている菌株を中心に *Pseudomonas* 属の6種類の菌株、*Proteus* 属の1種類の菌株、*Bacillus* 属の3種類の菌株、*Enterobacter* 属の2種類の菌株、*Klebsiella* 属の2種類の菌株、*Alcaligenes* 属の1種類の菌株、*Achromobacter* 属の1種類の菌株、*Serratia* 属の1種類の菌株、*Paracoccus* 属の1種類の菌株、合計18種類の保存菌株を用いて実験を行った。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$  それぞれを唯一の窒素源、D-グルコースを唯一の炭素源とする培地における、それぞれの窒素化合物を減少させる菌株の検索を振とう培養で行い、*P. fluorescens*、4種の *P. aeruginosa*、*P. denitrificans*、*E. cloacae*、*K. pneumoniae* の合計8株を見いだした。

これらの8株を用いた実験により、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  培地および  $\text{NaNO}_3$  培地において *P. aeruginosa* の4株が効率的にそれぞれの窒素化合物を除去することがわかった。中でも、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が最優良株であった。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株を用いて、最適培養条件を設定することによりさらに多量かつ高濃度の窒素化合物を完全に除去することができた。すなわち、最高で0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (窒素原子として1,700 ppmに相当)、0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (窒素原子として1,500 ppmに相当)、2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  (窒素原子として3,200 ppmに相当) を培地から完全に除去することが達成できた。

0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を窒素源とした場合、培養が進行するにつれて培地中の窒素化合物は消失し、最終的には菌体中に始めに加えた全窒素の41%が存在していた。2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を窒素源として培養した場合、最終的に培地中に残存する窒素量は始めに加えた全窒素の1.4%であり、菌体中には始めに加えた全窒素量の23%が存在していた。

植物や微生物において、 $\text{NH}_4^+$  および  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$  への変換過程に関与する酵素には鉄が含まれているから<sup>26-30)</sup>、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$  培地において、これらを完全に除去するには  $\text{Fe}^{2+}$  を必要とすることは合理的に説明できる。

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は、唯一の窒素源として  $\text{NaNO}_3$  を含む培地で培養した時、 $\text{NH}_4^+$  が存在しないにもかかわらず、高いGS活性を示した。この値は、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を唯一の窒素源とする培養液で培養して得た菌体中のGS活性より高かった。微生物を含む生物は一般に、GDHとGSにより  $\text{NH}_4^+$  を同化する<sup>45-46)</sup>。アンモニア同化において、高濃度の  $\text{NH}_4^+$  が存在する場合は主として、GDHが関与し、低濃度の

$\text{NH}_4^+$ が存在する場合は、GS が関与することが報告されている<sup>45-46)</sup>。本研究において、 $\text{NaNO}_3$ を唯一の窒素源とする培地で培養した場合は、 $\text{NO}_3^-$ が $\text{NH}_4^+$ を経て窒素源として同化される<sup>47-48)</sup>。この時、 $\text{NO}_3^-$ から還元される $\text{NH}_4^+$ は、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ を唯一の窒素源とする培養液中の $\text{NH}_4^+$ より低濃度であることが予想される。したがって、 $\text{NaNO}_3$ を唯一の窒素源とする培地で培養して得た菌体中には、高いGS活性が存在すると言える。

*P. aeruginosa* NBRC 12689株を用いて、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ を窒素源とした場合、培養液および菌体中に残存する全窒素量は初めに添加した窒素量の半分以下であった。この結果から、本菌の培養過程において脱窒が生じていることが予想された。実際、培養過程中的菌体から得た細胞中に呼吸型硝酸還元酵素および呼吸型亜硝酸還元酵素活性を見いだすことができた<sup>49-53)</sup>。また、GC-MS分析により本菌が、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ を代謝する過程で $\text{N}_2$ と $\text{N}_2\text{O}$ を生成することを証明した。

$\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ を窒素源として用いた場合、 $^{15}\text{N}_2$ と $^{15}\text{N}_2\text{O}$ を蓄積し、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を窒素源として用いた場合、 $^{15}\text{N}_2$ と $^{15}\text{N}_2\text{O}$ を蓄積しなかったため、これらのガスは $\text{NO}_3^-$ に由来することがわかった。

本菌を用いて、 $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 培地で振とう培養した時（振動数70と140rpm）、培養開始6~12時間後において、 $^{15}\text{N}_2\text{O}$ の生成が見られたにもかかわらず、15時間後では消失し、 $^{15}\text{N}_2$ のみ蓄積した。一方、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ 培地で振とう培養した時（振動数70と140rpm）、培養開始15時間後 $\text{N}_2$ の蓄積とともに、 $\text{N}_2\text{O}$ が蓄積していた。この結果から、 $\text{NO}_3^-$ の代謝において、 $\text{NH}_4^+$ が共存する条件下では、本菌の増殖が促進されるため、 $\text{N}_2\text{O}$ の生成が抑制されたと考えられた。Fig. 6-1-(A, a)は $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ を完全に除去された時点で、 $\text{N}_2\text{O}$ が発生したことを示す。この時の培養液に溶存している酸素量は、培養の全期間を通じて最も低いことがわかった（Fig. 2-5）。すなわち、振とう培養しているにもかかわらず、培養液は嫌気状態になっていることが予想される。このような条件では脱窒が容易に生じ、いったん生成した $\text{N}_2\text{O}$ は急速に $\text{N}_2$ に変換される。以上の結果より、培地中の $\text{NH}_4^+$ は、 $\text{N}_2\text{O}$ を $\text{N}_2$ に変換する過程において、有利な環境を提供すると考察した。言い換えれば、地球温暖化をもたらす $\text{N}_2\text{O}$ の生成が、 $\text{NO}_3^-$ 培地に $\text{NH}_4^+$ を添加することによって避けることができると言える。

$\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響を検討したところ、32 mM以上のリン酸塩を含む試験培地において両イオンの効率的な除去が見られた。さらに、両イオンの除去に与える炭素源の影響について調べた。試験した炭素源のうち、クエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩等の有機酸においてD-グルコースと同等の除去効果が見られた。

一方、Enter-Doudoroff pathwayに容易に合流しないやTCA cycle中の代謝中間体をその酸化に必要とするなどの原因で酢酸塩、*n*-酪酸ナトリウム塩、プロピオン酸

塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩は両イオンの除去を抑制した。しかし、酵母エキスとD-グルコースを含む培地においてNH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に対して抑制が見られなかった。また、D-グルコースを含む培地において、TCA cycle の中間体クエン酸塩、コハク酸塩、オキサロ酢酸塩と抑制した炭素源（酢酸塩、プロピオン酸塩）と共存する時、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を良好に除去することができた。よって、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株にとり円滑にTCA cycle が回転していることが、良好な増殖とNH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>のより効率的な除去につながると結論した。

また、外気温の上昇する夏期また、熱帯地方においても利用可能なNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時除去できる耐熱性菌 *B. licheniformis* T-7-2 株を用いて、最適培養条件を設定することにより中温の30℃だけでなく、高温側の50℃でもNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去することができた。すなわち、0.5 mM Fe<sup>2+</sup>を0.2% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地に添加すると、本菌は30℃と50℃で増殖とともに、培地中のNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>も完全に除去された。

0.1% (w/v) NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub> を窒素源としてゴム栓をしたバイアル瓶で本菌を培養した時、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の蓄積に伴ってN<sub>2</sub>Oは生成し、また、0.2% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 培地で培養する過程に全窒素を減少したことから、T-7-2 株は脱窒能力を持っていると考えられる。

*B. licheniformis* の菌株は好気条件下で脱窒作用を示すことは報告されてない<sup>57)</sup>。しかし、*B. licheniformis* T-7-2 株は好気条件下でNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時に除去したことにより、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を含む排水の処理において、他の脱窒菌においても、嫌気条件下だけでなく、好気条件下でも使用できると考えられる。

本研究で検索して得た *P. aeruginosa* NBRC 12689 株は、高濃度のNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl およびNaNO<sub>3</sub>を利用してこれらを効率的に培地から除去することがわかった。本菌を用いることにより、単一槽で窒素化合物の除去を行うことが可能である。また、*B. licheniformis* T-7-2 株は中温だけでなく、高温条件下でも十分増殖してNH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時に除去した。したがって、本菌の夏期または熱帯地方における利用価値は高いと言える。

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に関与する酵素・遺伝子系を制御する機構は、複雑であることが予想される。特に本菌のように、両イオンを同時に代謝する場合、どちらのイオンが窒素同化に寄与するかの問題を解決する必要がある。今後の課題としては、それぞれの培養条件における本菌の窒素同化および脱窒に関与する各酵素の発現状況を明らかにするとともに、これらの発現を制御する機構を遺伝子レベルで解析することである。これらの知見をもとにして、さらに高いNO<sub>3</sub><sup>-</sup>とNH<sub>4</sub><sup>+</sup>の同時除去能を示す菌株の創製や両イオンの処理方法の開発が期待できる。

## 要旨

脱窒素が報告されている菌株を中心に *Pseudomonas* 属の 6 種類の菌株、*Proteus* 属の 1 種類の菌株、*Bacillus* 属の 3 種類の菌株、*Enterobacter* 属の 2 種類の菌株、*Klebsiella* 属の 2 種類の菌株、*Alcaligenes* 属の 1 種類の菌株、*Achromobacter* 属の 1 種類の菌株、*Serratia* 属の 1 種類の菌株、*Paracoccus* 属の 1 種類の菌株、合計 18 種類の保存菌株を用いて実験を行った。NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NaNO<sub>3</sub> それぞれを唯一の窒素源、グルコースを唯一の炭素源とする培地における、それぞれの窒素化合物を減少させる菌株の検索を振とう培養で行った結果、*P. fluorescens* NBRC 15833、*P. denitrificans* NBRC 13301、*E. cloacae* NBRC 13535、*K. pneumoniae* NBRC 3318、4 種の *P. aeruginosa* 株の合計 8 株は、3 種類の培地においていずれも窒素化合物を良好に除去することができた。さらにこれらの 8 株を用いて、高濃度の窒素化合物の除去について調べたところ、*P. aeruginosa* NBRC 12689 株が最も良好に増殖し、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>および NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を同時に除去した。また、本菌株は、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>が単独に存在する場合でも、これらの窒素化合物を除去した。以後の実験では主として、本菌を用いた。(第 1 章)

*P. aeruginosa* NBRC 12689 株は 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>、0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む培地において、最高で 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を完全に除去することができた。本菌を用いて、0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、金属イオンを含まない培地では、菌の増殖は抑制され、両イオンも余り消費されなかった。Fe<sup>2+</sup>または Fe<sup>3+</sup>を添加する時のみ、本菌は良好に増殖し、培地中の両イオンを同時に除去できた。0.5% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (窒素原子として 1,700 ppm に相当) 培地中に 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>を含む時、本菌は、振動数 100 rpm で振とう培養開始 4 日後、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を完全に除去した。この時、培養上清中には窒素化合物は存在していなかった。菌体中には始めに加えた全窒素量の 41%が存在していた。(第 2 章)

12689 株は 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>、0.8 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む培地において、最高で 0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl を完全に除去することができた。本菌を用いて、0.4% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl の除去に与える金属イオンの影響を調べたところ、金属イオンを含まない培地では、菌の増殖は不十分で、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>も 33%残存した。Fe<sup>2+</sup>を添加すると、本菌の増殖は促進され、培地中の NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を完全に除去することができた。0.6% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl (窒素原子として 1,500 ppm に相当) 培地が 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>を含む時、本菌は、振動数 140 rpm で振とう培養開始 4 日後 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を完全に除去した。この時、培養上清中に存在する窒素化合物は始めに加えた全窒素量の 17%であり、菌体中には 73%が存在していた。(第 3 章)

12689 株は 0.1 mM Fe<sup>2+</sup>、80 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む培地において、最高で 1.8% (w/v) NaNO<sub>3</sub> を完全に除去することができた。本菌を用いて、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の除去に与える金属

イオンの影響を調べたところ、金属イオンを含まない培地では、菌の増殖は不十分で、 $\text{NO}_3^-$ も 84% 残存した。 $\text{Fe}^{2+}$ を添加すると、本菌の増殖は促進され、培地中の  $\text{NO}_3^-$ を完全に除去することができた。2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  (窒素原子として 3,200 ppm に相当) 培地が 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を含む時、本菌は、振動数 100 rpm で振とう培養開始 3 日後  $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。この時、培養上清中に存在する窒素化合物は始めに加えた全窒素量の 1.4% であり、菌体中には 23% が存在していた。(第 4 章)

本菌は  $\text{NO}_3^-$ を含まない培地では硝酸および亜硝酸還元酵素の活性はあまり見られなかった。 $\text{NH}_4^+$ を含まない培地で、GDH 活性はあまり見られなかったが、GS 活性は極めて高かった。静置培養した時、呼吸型、同化型硝酸還元酵素、また、PMS を電子供与体としての亜硝酸呼吸型還元酵素は最も高い活性を示した。(第 5 章)

0.1% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、0.1% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  を窒素源としてゴム栓をしたバイアル瓶で 12689 株を培養した時、これらの窒素源の減少に伴って  $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  が発生した。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地を用いた場合、振動数 70 と 140 rpm の時、培養開始 15 時間後、 $\text{N}_2$ のみ蓄積していた。一方、 $\text{NaNO}_3$  培地では、培養開始 15 時間後、 $\text{N}_2$ のみならず、 $\text{CO}_2$  の 100 倍の温室効果をもたらす  $\text{N}_2\text{O}$  も蓄積した。 $\text{NH}_4^+$ が存在する時、 $\text{N}_2\text{O}$  の発生を抑制することは、本菌を排水処理に使用する場合、重要な特性であると言える。(第 5 章)

12689 株を用いて  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ の除去に与えるリン酸塩濃度の影響を調べたところ、32 mM 以上のリン酸塩を含む培地において両イオンの効率的な除去が見られた。さらに、両イオンの除去に与える炭素源の影響について調べたところ、クエン酸塩、コハク酸塩、グリセリン酸塩、乳酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩等の有機酸において D-グルコースと同等の除去効果が見られた。一方、酢酸塩、*n*-酪酸塩、プロピオン酸塩、DL-2-アミノ-*n*-酪酸塩は、D-グルコースと共存する時でも、本菌の増殖を抑制しており、両イオンの同時除去も抑制された。そこで、同時除去効果が見られた炭素源、抑制する炭素源、D-グルコースの 3 種炭素源の共存下で試験したところ、酵母エキスを含むすべての培地において、 $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_3^-$ の除去に対して抑制が見られなかった。また、TCA cycle の中間体クエン酸塩、コハク酸塩、オキサロ酢酸塩と抑制した炭素源 (酢酸塩、プロピオン酸塩) と共存する時、 $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_3^-$ を良好に除去することができた。(第 6 章)

外気温の上昇する夏期、また熱帯地方においても利用可能な  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ を同時除去できる耐熱性菌 *B. licheniformis* T-7-2 株を用いて、最適培養条件を設定することにより 30°C だけでなく、50°C でも  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ を完全に除去することができた。すなわち、0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ を 0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  培地に添加すると、本菌は 30°C と 50°C で増殖するとともに、培地中の  $\text{NH}_4^+$ と  $\text{NO}_3^-$ を完全に除去した。この時、培養液中に残存した全窒素量はそれぞれ 69% と 44% であった。(第 7 章)

## Summary

I attempted to isolate heterotrophic microorganisms that utilized both  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  as nitrogen sources in a medium containing  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  from 18 stock cultures, which have been reported to denitrify and metabolize  $\text{NO}_3^-$ . I found that 8 strains among the 18 bacteria examined could utilize  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  simultaneously in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  with shaking. Among the 8 strains, the species of *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *P. denitrificans* were reported to have a denitrifying activity under anaerobic conditions. Of the 8 strains screened, *P. aeruginosa* NBRC 12689 utilized  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  most rapidly.

*P. aeruginosa* NBRC 12689 could utilize 0.4% (w/v) of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.4% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and 1.8% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  in the presence of 0.1 mM  $\text{Fe}^{2+}$ . Among the metal ions tested,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  were essential for utilizing  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{NaNO}_3$  media. When  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  were omitted, most  $\text{NO}_3^-$  remained without being utilized in the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{NaNO}_3$  media.  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  promoted the utilization of  $\text{NH}_4^+$  in the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  media.  $\text{Co}^{2+}$  repressed the utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the three media tested.

I further examined the effect of  $\text{Fe}^{2+}$  concentrations between 0 and 1.3 mM on the cell growth of *P. aeruginosa* NBRC 12689 and its utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and  $\text{NaNO}_3$  media. The cell growth and utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were promoted greatest at the concentration of 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ . It could utilize the  $\text{NH}_4^+$  and/or  $\text{NO}_3^-$  completely from the culture originally containing 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , or 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  in the presence of 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{MoO}_4^{2-}$  did not significantly affect the cell growth of *P. aeruginosa* NBRC 12689 and its utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ .

When *P. aeruginosa* NBRC 12689 utilized both  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  completely from the 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium, 41% of total nitrogen originally provided was observed in the cells, but not in the cultural supernatant. On the other hand, total nitrogen in the culture of  $\text{NaNO}_3$  medium was decreased to 21% of that originally provided on 2 d of incubation, and was not observed in the cultural supernatant.

Nitrate and nitrite reductases did not show any activity in the absence of  $\text{NO}_3^-$ . Glutamate dehydrogenase (GDH) was not observed in its cells from the medium without  $\text{NH}_4^+$ . However, glutamine synthetase (GS) showed high activity in the cells obtained from the same culture. Respiratory and assimilatory nitrate reductases and respiratory nitrite reductase using PMS as an electron donor showed higher activity in the cells obtained without shaking than in those with shaking.

When *P. aeruginosa* NBRC 12689 was incubated in a vial containing the 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  or 0.1% (w/v)  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  medium,  $^{15}\text{N}_2$  and  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  were generated with the consumption of nitrogen sources.  $^{15}\text{N}_2$  alone was accumulated at the shaking speeds of 70 and 140 rpm on 15 h of incubation in the  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  medium, but not  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ , although the production of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  was observed between 6 and 12 h of incubation. In the  $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$  medium, the bacterium accumulated marked amount of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  in addition to  $^{15}\text{N}_2$  on 15 h of incubation with shaking at 70 and 140 rpm. I also used  $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$  and  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  as nitrogen sources and found that no nitrogenous gases were evolved from  $^{15}\text{NH}_4^+$ .

I examined the effect of phosphate concentrations between 0 and 192 mM on the cell growth of *P. aeruginosa* NBRC 12689 and its utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  in the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and  $\text{NaNO}_3$  media. The cell growth and utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were promoted greatly at the concentration of 32-192 mM.

I examined the effect of 34 carbon and nitrogen sources on the cell growth of the bacterium and its utilization of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . Among them, citrate, succinate, glycerate, lactate, fumarate, and gluconate promoted the cell growth and utilization of  $\text{NH}_4^+$  and/or  $\text{NO}_3^-$ . On the other hand, acetate, *n*-butyrate, propionate, DL-2-amino-*n*-butyrate repressed its cell growth in the presence of D-glucose. However, when yeast extract was added to the medium containing these repressing substrates, the bacterium could grow and utilize  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  effectively.

*B. licheniformis* T-7-2 grew well in the 0.2% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  medium and utilized  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  at both 30 and 50°C in the presence of 0.5 mM  $\text{Fe}^{2+}$ . The total nitrogen in the culture and cells was decreased to 69% and 44%, respectively, of those originally provided. In the 0.1% (w/v)  $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  medium, the strain generated  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ .

*P. aeruginosa* NBRC 12689 could grow in the medium containing not only 0.5% (w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , but also 0.6% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 2.0% (w/v)  $\text{NaNO}_3$  and remove  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  completely within 4 d with shaking. Our experimental data showed that the bacterium would be available for one unit of a reactor for treating wastewaters containing  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  alone at high concentrations, in addition to both  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . On the other hand, *B. licheniformis* T-7-2 could grow and utilize  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  simultaneously at both 30 and 50°C. Thus the bacterium will be useful, when it is operated in the summer season and tropical areas.

## 参考文献

- 1) Foglar, L., Briški, F., Sipos, L., and Vuković, M., High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture. *Bioresour. Technol.*, **96**, 879-888 (2005).
- 2) 中村和憲, 微生物の環境保存への理解. In“環境と微生物”, 産業図書, 東京, pp. 61-69 (1998).
- 3) 若松盈, 汚染物への対策-処理と処分. In“環境講座 環境を考える”, eds. 大学等廃棄物処理施設協議会環境教育部会, 科学新聞社, 東京, pp. 145-147 (1999).
- 4) Bock, E., Koops, HP., and Harm, H., Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In“the Prokaryotes”, eds. Balows, A., Truper, HG., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, KH., Springer-Verlag, New York, pp. 414-430 (1992).
- 5) Zumft, WG., Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533-616 (1997).
- 6) Robertson, L.A. and Kuenen, J.G., Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.*, **139**, 351-354 (1984).
- 7) Kuenen, J.G. and Robertson, L.A., Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**, 109-117 (1994).
- 8) Daum, M., Zimmer, W., Papen, H., Kloos, K., Nawrath, K., and Bothe, H., Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Curr. Microbiol.*, **37**, 281-288 (1998).
- 9) Frette, L., Gejlsbjerg, B., and Westermann, P., Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiol. Ecology*, **24**, 363-370 (1997).
- 10) Joo, HS., Hirai, M., and Shoda, M., Nitrification and denitrification in high-strength ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 773-778 (2005).
- 11) Lukow, T., and Diekmann, H., Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 1157-1159 (1997).
- 12) Wehrfritz, JM., Reilly, A., Spiro, S., and Richardson, DJ., Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. *FEBS Lett.*, **335**, 246-250 (1984).
- 13) Robertson, L.A. and Kuenen, J.G., Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **57**, 139-152 (1990).
- 14) Yamada, T., Somiya, I., and Tsuno, H., Screening of aerobic denitrifying bacteria

- and their physiological characteristics. *Gesuido Kyoukaishi.*, **30**, 118-130 (1992).
- 15) Till, B.A., Weathers, L.J., and Alvarez, P.J.J., Fe(0)-Supported autotrophic denitrification. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 634-639 (1998).
  - 16) Kim, Y-J., Yoshizawa, M., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K., Isolation and culture conditions of a *Klebsiella pneumoniae* strain that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously with controlled iron and molybdate ion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 996-1001 (2002).
  - 17) Kim, Y-J., Yoshizawa, M., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K., Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 584-588 (2002).
  - 18) Bhandari, B., and Simlot, MW., Rapid micro-method for deamination of nitrate in presence of nitrite for biochemical studies. *Ind. J. Exp. Biol.*, **24**, 323-325 (1986)
  - 19) Aoki, K., Shinke, R., and Nishira, H., Isolation and identification of respiratory nitrate reductase-producing bacteria from soil and production of the enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 817-822 (1981).
  - 20) Weatherburn, MW., Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, **39**, 971-974 (1967).
  - 21) Palleroni, N.J., Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237<sup>AL</sup> (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121), In "The Proteobacteria (the Gammaproteobacteria): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2B", eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T., pp. 323-379. Springer, New York (2005).
  - 22) Grimont, P.A.D. and Grimont, F., Genus XII. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960b, 72<sup>AL</sup> (Nom. Cons. Opin. 28, Jud. Comm. 1963, 38), In "The Proteobacteria (the Gammaproteobacteria): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2B", eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T., pp. 661-669 (2005).
  - 23) Van Niel, E.W.J., Braber, K.J., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G., Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie van Leeuwenhoek*, **62**, 231-237 (1992).
  - 24) Busse, H.-J. and Auling, G., Genus I. *Alcaligenes* Gastellani and Chalmers 1919, 936<sup>AL</sup>. In "The Proteobacteria (the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2C", eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T., Springer, New York, pp. 653-658 (2005).
  - 25) Ballentine, R., Determination of total nitrogen and ammonia. In "Methods in enzymology, Vol. 3", eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press, New

- York, pp. 984-995 (1957).
- 26) Ørskov, I., Genus V. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105<sup>AL</sup>. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1", eds. Krieg, N. R., and Holt, J. G., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 461-464 (1984).
  - 27) Garneer, C. D., Model systems for the nitrate reductases. In "Nitrogen assimilation of plants", eds. Hewitt, E. J. and Cutting, C. V., Academic Press, New York, pp. 187-197 (1979).
  - 28) Leonard, C. G., Housewright, R. D., and Thorne, C. B., Effect of metal ions on the optical specificity of glutamine synthetase and glutamyl transferase of *Bacillus licheniformis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **62**, 432-434 (1962).
  - 29) Imperial, J., Ugalde, R. A., Shan, V. K., and Brill, W. J. Mol- mutants of *Klebsiella pneumoniae* requiring high levels of molybdate for nitrogenase activity. *J. Bacteriol.*, **163**, 1285-1287 (1985).
  - 30) Ugalde, R. A., Imperial, J., Shah, V. K., and Brill, W. J. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: effect of sulfur source. *J. Bacteriol.*, **164**, 1081-1087 (1985).
  - 31) Carlson, C. A. and Ingraham, J. L., Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1247-1253 (1983).
  - 32) Williams, D.R., Rowe, J.J., Romero, P., and Eagon, R.G., Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*: some parameters of growth and active transport. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 257-263 (1978).
  - 33) Mulder, A., Van De Graaf, A.A., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G., Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecology*, **16**, 177-184 (1995).
  - 34) Kuypers, M. M., Slikers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B. B., Kuenen, J. G., Sinninghe Damste, J. S., Strous, M., and Jetten, M.S., Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, **422**, 608-611 (2003).
  - 35) van Dongen, U., Jetten, M. S., and van Loosdrecht, M. C., The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci. Technol.*, **44**, 153-160 (2001).
  - 36) Thomsen, J.K., Geest, T., and Cox, R.P., Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 536-541 (1994).
  - 37) Lowe, R. H., and Evans, H. J., Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **85**, 377-389 (1964).

- 38) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 39) Guerrero, M. G., and Gutierrez M., Purification and properties of the NAD(P)H : nitrate reductase of the yeast *Rhodotorula alutinis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **482**, 272-285 (1977).
- 40) Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K., and Beppu T., Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* strain S-6. *J. Biochem.*, **89**, 453-461 (1981).
- 41) Lam, Y., and Nicholas, D. J. D., A nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from *Micrococcus denitrificans*. *Biochem. Biophys. Acta*, **180**, 459-472 (1969).
- 42) Vega, J. M., Guerrero, M. G., Leadbetter, E., and Losada, M., Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, **133**, 701-708 (1973).
- 43) Koike, K., Hakamada, Y., Yoshimatsu, T., Kobayashi, T., and Ito, S., NADP-specific glutamate dehydrogenase from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-635 purification and enzymic properties. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1764-1767 (1996).
- 44) Bhatnagar, L., Zeikus, J. G., and Aubert, J. -P., Purification and characterization of glutamine synthetase from the archaebacterium *Methanobacterium ivanovi*. *J. Bacteriol.*, **165**, 638-643 (1996).
- 45) Janssen, D.B., op den Camp, H. J. M., Leenen, P. J. M., and van der Drift, C., The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 197-203 (1980).
- 46) Arp, D. J., and Stein, L. Y., Metabolism of Inorganic N Compounds by Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 471-495 (2003).
- 47) Stewart, V., Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microb. Rev.*, **52**, 190-232 (1988).
- 48) Lin, J. T., Goldman, B. S., and Stewart, V., Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5al. *J. Bacteriol.*, **175**, 2370-2378 (1993).
- 49) Zumft, W. G., Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**, 533-516 (1997)
- 50) Bedzyk, L., Wang, T., and Ye, R. W., The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. Strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.*, **181**, 2802-2806 (1999).

- 51) Carlson, C., Ferguson, L. P., and Ingraham, J. L., Properties of dissimilatory nitrate reductase purified from the denitrifier *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **151**, 162–171 (1982).
- 52) Craske, A., and Ferguson, S. J., The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 429–436 (1986).
- 53) Blümle, S., and Zumft, W. G., Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 102–108. (1991).
- 54) NG, F. M. –W., and Dawes, E. A., Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem. J.*, **132**, 129-140 (1973).
- 55) 安形高志, 6. 糖質代謝. In “細胞機能と代謝マップ — I. 細胞の代謝・物質の動態”, eds. 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, pp. 42-44 (1997).
- 56) R. Y. スタニエ, J. L. イングラム, M. L. ウィーリス, P. R. ペインター, 微生物学(上) 原書第5版, 培風館, 東京, pp. 79-84 (1989).
- 57) Konohana, T., Aoki, K., Nanmori, T., and Yasuda, T., Simultaneous uptake of ammonium and nitrate salts by an aerobic culture of *Bacillus licheniformis* No. 40-2. *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 210-211 (2000).

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました青木健次教授、杉本幸裕教授、杵本敏男教授に心から感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました青木健次教授、終始適切な御指導をいただきました竹中慎治助手、有益な御助言をいただきました村上周一郎助教授に心より感謝の意を表します。

また、自然科学研究科生命機構科学専攻生物機構科学講座の皆様、ならびに農学部生物機能化学科微生物機能化学講座の皆様には、現場においてともに研究できましたことを心より感謝いたします。