



微生物ならみんなができる脱窒!¹⁾

龍田 典子

脱窒とは、硝酸態窒素がガス状窒素となって大気中へ放出される微生物の行う還元反応で、地球上の窒素循環の重要な過程のひとつである。このため、脱窒反応の生化学的メカニズムや脱窒菌の生理・生態に関しては、古くから研究がなされてきた。脱窒は、農業分野においては、施肥した窒素肥料の損失につながるが、その一方で、農耕地への過剰な窒素肥料投入による地下水系への硝酸態窒素汚染の低減に応用しようとする研究もなされている。また廃水処理分野では、生物学的窒素除去に広く利用されており、脱窒槽で活躍する脱窒菌について多数の研究がある。従来、脱窒は細菌のみが行うと考えられていたが、近年、さまざまな微生物で脱窒能が認められている。本稿では、この脱窒を担う立役者達についての新たな知見と最近の研究動向について紹介したい。

脱窒は硝酸や亜硝酸から、一酸化窒素 (NO) や亜酸化窒素 (N₂O)、窒素ガス (N₂) などの気体を生成する一連の還元反応である。硝酸から窒素ガスまでの還元過程には4つのステップ (NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂) があり、それぞれに特異的な還元酵素が関与している。この酵素遺伝子 (群) はさまざまな細菌種で認められるが、硝酸から亜硝酸への還元酵素のみを有する大腸菌などの菌種は、脱窒菌には含まれない。あくまで、ガス状の窒素 (化合物) を大気中に放出できる微生物を総称して脱窒菌という。代表的なものとして *Pseudomonas* 属や *Alcaligenes* 属などがあげられる。従来、細菌だけがこの脱窒反応を担うと思われていたが、Zumft の総説²⁾ では多くの細菌群の記述に加え、古細菌の脱窒についても触れられており、Shounらは *Fusarium oxysporum* の脱窒能の発見を端緒として、多数の糸状菌や酵母にも同様の脱窒活性を見いだしている³⁾。植物に共生し窒素固定を行う根粒菌も脱窒遺伝子を持ち、根粒内部の低酸素状態では脱窒能を有している⁴⁾。つまり脱窒は、古細菌、細菌、放線菌 (原核生物) から酵母菌、糸状菌 (真核生物) まで幅広い微生物群に認められる能力である。さらに、好気条件下で脱窒を行う微生物もあり、教科書的には「嫌気的条件下での細菌による反応」であるが、実際にはさまざまな環境下で多種多様な微生物によって起こる反応である。もはや脱窒とは微生物にとって特別な能力ではなく、発酵や呼吸と並んで普遍的なエネルギー獲得様式なのかもしれない。

近年、分子生物学的な検出および定量法の進歩に伴って、環境中の脱窒菌の群集構造解析や定量に関する研究が盛んに行われている。脱窒菌をめぐる研究増加の背景には、脱窒菌が温室効果ガスである N₂O の放出に関与す

ることがあげられる。脱窒菌には N₂ ガスとして放出する完全脱窒タイプと N₂O として放出するタイプの微生物とがある。脱窒は好気的環境である畑地土壌でもみられ、嫌気的環境である水田に比べ、N₂O の発生が多いとされる。ここでは、N₂O 放出タイプの脱窒細菌とともに糸状菌が深く関与しているのではないかと推定されている⁵⁾。

脱窒能を持つ細菌は少なくとも50属130種以上知られており、広範囲の分類群に属するため、脱窒菌の群集構造解析や定量には16S rRNAなどの種特異的な配列を利用した解析は適応できない。そこで多くの場合、これらの解析には亜硝酸還元酵素 (Nir) 遺伝子配列を基に作製されたPCRプライマーやプローブが用いられる。検出された脱窒菌を遺伝子レベルで解析すると既知の細菌種には属さないものも多い。これは、環境中には未分離の脱窒菌が多数存在することを意味する⁶⁾。またMPN (most probable number : 最確数) 法*による算出では、農耕地土壌の表層には10⁴ ~ 10⁶ 個/g soil程度の脱窒菌が存在するとみられてきた。しかし、quantitative competitive PCR法を用いた解析では10⁸ ~ 10⁹ copies/g soilの脱窒菌遺伝子が検出されており⁶⁾、その存在量についても、これまでの知見を見直す必要があるだろう。

さまざまな環境下での窒素サイクルのより詳細な解明に向け、脱窒量とそれに関与する微生物との関係を明らかにできれば良いが、脱窒に関与する微生物は多岐にわたり、脱窒する条件もさまざまなため、網羅的な研究はまだまだ難しく、なかなか一筋縄ではいかない様相である。しかし、分子生物学的手法の導入によって新たに蓄積された知見を整理することにより、その解明に少しずつ近づくと考えられる。窒素循環は我々生物にとって重要なサイクルである。今後も脱窒菌の研究発展に大いに期待したい。

* MPN法: 試料の段階的な希釈液を種菌として、それぞれ培養し、濁りや色の変化、ガスの産生などによって細菌の増殖を判定する。増殖の認められたサンプルのパターンに統計処理を施し、試料中の生菌数を推定する方法である。精度は高くないが、希釈平板法では計数できない硝化細菌や脱窒菌などの計数に広く利用されている。

- 1) 鮫島ら: 日本土壤微生物学会大会講演要旨集, p.59 (2009).
- 2) Zumft, W. G.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 533 (1997).
- 3) Hayatsu, M. et al.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **54**, 33 (2008).
- 4) Samejima-S., R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2526 (2006).
- 5) Henry, S. et al.: *J. Microbiol. Methods*, **59**, 327 (2004).
- 6) Qiu, X. Y. et al.: *J. Microbiol. Methods*, **59**, 199 (2004).