

# DM 培地の炭素源が好気性脱窒細菌の分離培養に及ぼす影響

長岡工業高等専門学校 学生会員 ○山本和佳奈 非会員 上村光輝正 会員 川上周司  
香川高等専門学校 正会員 荒木信夫

## 1. 背景と目的

従来から化石燃料の使用や、農業・工業に由来する窒素化合物は自然界に放出され、これらの蓄積に伴う富栄養化、さらには健康被害などが報告され、解決すべき環境課題となっている。この問題を改善するために、窒素除去では主に生物処理反応が用いられ、好気条件下での独立栄養性細菌による硝化反応と嫌気条件下における従属栄養性細菌による脱窒反応がその処理を担ってきた。一方で、好気条件下で進行する好気性脱窒反応と呼ばれる現象が確認され、その反応を担う好気性脱窒細菌を用いた排水処理技術の進展がめざましい。好気性脱窒細菌の窒素代謝経路は様々であり、従属栄養性硝化と好気性脱窒反応を同時に行う細菌、従属栄養性硝化と亜硝酸、亜酸化窒素等で反応を停止する不完全な好気性脱窒反応を行う細菌、好気性脱窒のみを行う細菌が確認されている<sup>1)</sup>。また、好気性脱窒細菌は、リンと窒素の同時除去が可能な株や、難分解性有機汚染物質を分解できる株なども報告されており、その数々の利点を生かした研究が近年数多く行われている。

我々の研究グループは、都市下水を処理する回分式の好気嫌気法を用いた処理場の汚泥から複数種の好気性脱窒細菌の存在を分子生物学的手法を用いた解析から確認している<sup>2)</sup>。それら細菌群は既法により好気性脱窒細菌と判明している菌株と近縁ではあったものの、複合微生物系であることから個々の細菌の生態学的特徴まではわからなかった。そこで本研究では、DO が 5mg/L と高い環境下で好気性脱窒反応を確認した汚泥から好気性脱窒細菌の分離培養を試み、DM 培地の炭素源が好気性脱窒細菌の分離培養に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 好気性脱窒細菌の分離培養

培養に用いた汚泥は、新潟県刈羽村にある農業集落排水処理施設(回分式活性汚泥法)の活性汚泥を用いた。汚泥はまず、液体の DM 培地により DO を 5mg/L に制御した曝気装置で 12 時間培養したのち、培養液を 1/10000 に希釈したものを DM 培地を寒天で固化した寒天培養に植菌した。30℃で 24 時間培養したところ、寒天培地上にコロニーが形成されたため、そのコロニーを釣菌し、再度液体の DM 培地で 30℃で 24 時間培養した。培養に用いた DM 培地は、炭素源を酢酸ナトリウムおよびコハク酸ナトリウムとし、培地の組成は Table1 のとおりとした。液体培地の場合はそのまま利用し、寒天培地の場合は Agarose を 1.5%の濃度で加えて固化させ、さらに pH 指示薬である BTB を 10mg/L 加えたものを使用した。

Table 1 各培地の組成

	g/L		g/L
酢酸ナトリウム		コハク酸ナトリウム	
Sodium acetate	4.7	Sodium succinate	4.7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.54	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.54
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
NH <sub>4</sub> Cl	0.3	NH <sub>4</sub> Cl	0.3
KNO <sub>3</sub>	0.6	KNO <sub>3</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1
Trace Element Solution	2.0 mL	Trace Element Solution	2.0 mL

## 2. 2rRNA 遺伝子配列の決定と細菌種の特定

液体培地で培養したコロニーを用いてコロニーPCR を行い rRNA 遺伝子を増幅した。PCR は PremixExTaq (TaKaRabio) を用い、反応組成は付属のプロトコルに準拠した。PCR に用いたプライマーは EUB338-UNIV907r ペアを用いた。電気泳動で rRNA 遺伝子の増幅を確認後、増幅産物を FastGene™Gel/PCRExtractionKit (NIPPONGeneticsCo.,Ltd.) を用いて精製し、UNIV907r を混合し、TaKaRabio 社のプレミックスシーケンス解析により塩基配列を決定した。決定した塩基配列データは NCBI の NucleotideBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)により細菌種の特定を行った。コロニーは全部で 24 個採取し、同様の手順で細菌種を特定した。

## 3. 結果および考察

寒天培地で培養した結果、培地は pH 指示薬である BTB により薄黄緑色から青に変色し、目視できるコロニーが形成された(Fig. 1)。これは、培地上の細菌が脱窒反応を行ったことで pH が上昇したと考え、好気性脱窒細菌が培養されていると判断した。

さらにコロニーを釣菌し培養した懸濁液を PCR に供したところ、全てのコ

ロニーから rRNA 遺伝子の増幅を確認した。コハク酸を炭素源とする培地にて確認できた 24 個のコロニーの細菌種の特定を行ったがその全てが *Acinetobacter* 属に近縁であった。*Acinetobacter* 属は、好気性脱窒細菌として報告されており<sup>3,4)</sup>、また前実験の群集構造解析<sup>2)</sup>でもその存在が確認されている細菌種であった。しかし、前実験では *Pseudomonas* 属、*Paracoccus* 属が優占しており、これら細菌群を分離することはできなかった。したがって本研究で用いた寒天培地では細菌種の選択性が高く多様な好気性脱窒細菌を培養するには不十分である可能性が示唆された。

今後は酢酸ナトリウムを炭素源とする培地から釣菌したコロニーの細菌種の特定を行い、分離した細菌を用いて好気性脱窒培養試験を行うことで好気性脱窒能を確認する予定である。

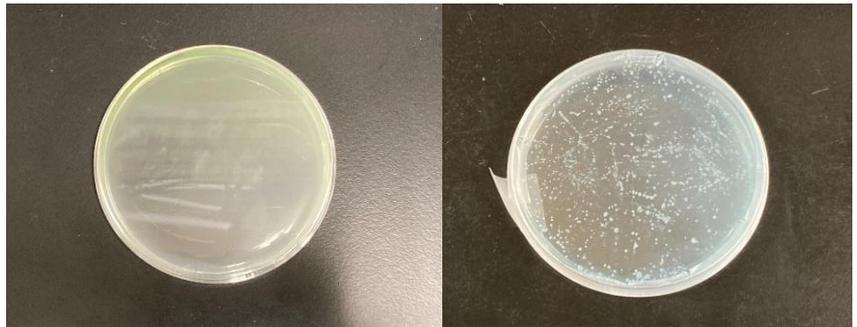


Fig.1 DM 寒天培地に植種した際の様子。右:植種直後。左:培養 24 時間後。培地全体が青色に変化し、pH の上昇が確認できた。

## 参考文献

- 1) Qiao, Z, Sun, R., Wu, Y., Hu,S.,Liu, X, ChanJ. andMi, X.: Characteristics and metabolic pathway of the bacteria for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in aquatic ecosystems. *Environ. Res.*, Vol. 191, 110069, 2020.
- 2) 上村光輝, 川上周司, 押木守, 青木仁孝, 土田勝範, 渡利高大, 荒木信夫.: 異なる溶存酸素条件が複合微生物系における好気性脱窒細菌群に与える影響, 土木学会論文集 (G), 2023.
- 3) Shuo Yao, Jinren Ni: Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2, *Bioresource Technology*, Volume 139, Pages 80-86, 2013.
- 4) Lin Xia, Xiaomin Li, Wenhong Fan, Jianlong Wang: Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge, *Bioresource Technology*, Volume 301, 122749, 2020.