

多様な好気性脱窒細菌を分離培養するための培地の検討

長岡工業高等専門学校 非会員 ○ 関口未来莉 長岡工業高等専門学校 正会員 川上周司

1.研究背景

下水処理場は日々、様々な排水による河川などの水質変化や公衆衛生の悪化を防ぐため、下水の処理を行っている。その処理の方法として日本で主要になっているのは活性汚泥法などの生物処理であり、これによって下水の二次処理や高度処理が、多くの下水処理場で実施されている。中でも、高度処理の一部で行われている脱窒は、農業・工業の活動等に由来する、窒素化合物が富栄養化などを引き起こす恐れがあるため、従属栄養性細菌を利用することで窒素除去を行う工程である。この工程は極めて重要な部分ではあるが、他の高度処理の工程である硝化等は好気環境下であるのに対し、脱窒は嫌気性の環境下での反応であるため、費用や効率の面ではデメリットな一面を持っていると言える。

そのような中で、近年、好気性脱窒という好気環境下での脱窒が確認され¹⁾、好気性脱窒細菌という微生物の反応により行われている反応だということが明らかになった。これにより、従来の高度処理のように好気・嫌気の2つの環境を維持しなくても、好気環境下のみで高度処理を完結させることができる可能性が出てきた。もちろん、好気性脱窒菌に関する研究も進んでおり、好気性脱窒細菌の窒素の代謝経路については、不完全な脱窒を行うものやリンの除去も窒素と同時に行うものなど、様々な特徴のある細菌が数多く報告されている。しかし、各菌株の特徴についての研究は進んでいる印象を受けるものの、それ以外の部分である好気性脱窒細菌自体の生態は未だにほとんど分かっておらず、下水処理などの実地に活かせるような情報についてはまだ不明な点が多い。そこで、先行研究²⁾では、コハク酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、グルコース、メタノールと、炭素源を変更することで、*Pseudomonas* 属、*Paracoccus* 属などの複数の好気性脱窒細菌の分離培養を行うことを目的とした。その結果として、コハク酸ナトリウムと酢酸ナトリウムに関しては好気性脱窒細菌を分離することに成功したが、*Acinetobacter* 属のものが多く、目標としていた *Pseudomonas* 属、*Paracoccus* 属については分離することができなかった。これより、本研究では、コハク酸ナトリウムの DM 培地を利用し、塩分濃度、pH、アンモニア濃度などのより細かい条件を操作することで、活性汚泥からこれら好気性脱窒細菌の複数の菌株について分離培養を行い、その培地より生息環境の特徴や条件などに付いて調べることを目標とした。

2.実験方法

2.1 活性汚泥サンプルと培地

実験に使用した活性汚泥のサンプルは、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)より採取した。汚泥は採取後に冷蔵保管し、その後、実験室で DO を 5 mg/L に制御した曝気装置で DM 培地を用いて 24 時間培養した。DM 培地の組成は、蒸留水 1L 当たり、炭素源とするコハク酸ナトリウム 4.7g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.54g, KH_2PO_4 1.5g, NH_4Cl 0.3g, KNO_3 0.6g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, Trace Element Solution 1.0mL(表 1)とし、120℃で 20 分間オートクレーブ滅菌して実験に使用した。

2.2 分離と同定

2.1 より得られた培養液を 1/100 に希釈し、BTB を使用した寒天培養 (以下、BTB 寒天培地とする) に植菌、30℃で 24 時間培養した。その後、BTB 寒天培地上に、青色の変色(図 1) とコロニー形成が確認されたため、その部分から釣菌し、再度、DM 培地で 30℃, 24 時間培養した。培養に用いた DM 培地は 2.1 の組成と同一である。また、BTB 寒天培地は 2.1 の DM 培地に寒天を 1.5%の濃度、pH 指示薬である BTB を 10

mg/L で添加し、オートクレーブしたものを使用した。その後、釣菌し、DM 培地で培養した細菌を用いて PCR を行い、rRNA 遺伝子を増幅した。PCR は Premix Ex Taq (TaKaRa bio) 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 遺伝子を増幅を確認した。

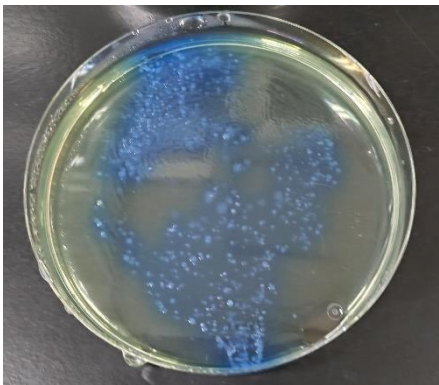


図 1 BTB 寒天培地の変色の様子

表 1 DM 培地の組成

	g/L
コハク酸ナトリウム	4.7
Na ₂ HPO ₄ ・7H ₂ O	1.54
KH ₂ PO ₄	1.5
NH ₄ Cl	0.3
KNO ₃	0.6
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.1
Trace Element Solution	1.0mL

3.結果および考察

今回の実験は、第一段階として、先行研究²⁾の再現実験を行った。途中経過ではあるが、結果としては、BTB を用いた寒天培地が青く変色したことが確認できたことにより、大腸菌などの乳糖を分解する細菌でなく、代謝などによってアルカリ性物質を生成する脱窒素細菌の可能性をもった細菌を活性汚泥サンプルから採取することができた。このことから、炭素源がコハク酸ナトリウムである DM 培地によって、好気性脱窒細菌の培養自体はできるという先行研究の内容について、再確認ができたとともに、条件を変えることにより、複数の好気性脱窒細菌を分離するという目標についての可能性も継続された。

今後の実験手順としては、先行研究に準拠し、増幅産物を FastGene™ Gel / PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co. Ltd.) を用いて精製、UNIV907r を混合、TaKaRa bio 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、そのデータを使い、NCBI の Nucleotide BLAST で細菌種の特定制を行う。その後、好気性脱窒細菌が特定できた場合は、好気性脱窒培養試験を行い、その細菌の好気性脱窒細菌としての有効性について確認する。また細菌の有効性の可否について確認できたの後、塩分濃度、PH、アンモニア濃度などの条件を検討して、再度同じように実験を行い、それぞれの場合で変化を比較、確認して、培地の適切な条件を検討とする。

参考文献

1) Yang, Jixian, Liang Feng, Shanshan Pi, Di Cui, Fang Ma, He-ping Zhao, Ang Li, A critical review of aerobic denitrification: Insights into the intracellular electron transfer, *Science of The Total Environment*, Volume 731, 2020,

2) 山本和佳奈, 上村光輝, 川上周司, 荒木信夫, **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, 第 42 回土木学会関東支部新潟会要旨集, 2025.