

ベンゼン分解菌 DN11 株の簡易培養方法の検討と MALDI-BioTyper による検定

大成建設(株) 技術センター 正会員 ○高畑 陽 伊藤 雅子
(一社) トロピカルテクノプラス 廣瀬 美奈

1. 目的

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を受けている *Azoarcus* sp. DN11 株¹⁾は、好気環境から硝酸還元環境までの幅広い酸化還元領域でベンゼンを分解可能であり、実汚染地下水に導入した場合の浄化効果を確認している²⁾。一方、DN11 株を大型ファーメンターで培養する方法は高額であるため、浄化コストを下げるためには、DN11 株を安価で確実に培養する方法が必要である。

本報では、DN11 株を現場でも簡単に培養できる簡易培養方法と、培養状況を迅速に診断可能なシステム(MALDI-BioTyper³⁾)を用いる品質管理方法について検討した結果について報告する。

2. 試験方法

2.1 DN11 株の簡易培養方法

DN11 株の簡易培養は、紫外線滅菌処理済みの市販の 20L 精製水を用いて実施した。クリーンベンチ内で、精製水容器から約 2L の精製水を排出し、1/5LBN 培地(LB broth 4g/L+硝酸ナトリウム 1g/L)を用いて培養した DN11 株の純粋培養液(概ね 1×10^8 cells/mL) 1L と、滅菌処理済みの 4×LBN 培地(LB broth 80g/L+硝酸ナトリウム 20g/L) 1L を注入・密栓後に、25°C で 3 日間培養した。培養後に波長 660nm における濁度および MALDI-BioTyper によるマッチング検索を行った。尚、簡易培養は 20L の市販精製水容器(キュービテナー)を 10 本作成し、純粋培養した培地(20L を 3 本作成)と比較した。

2.2 MALDI-BioTyper による細菌種のマッチング検索

MALDI-BioTyper は、微生物に含有しているタンパク質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF-MS ultrafleXtreme, Bruker Daltonics 社)で測定し、タンパク質の固有のマスパターンを多数の菌種が登録されているデータベースとマッチングさせることで、迅速かつ正確に細菌種を同定するシステムである。同定結果のスコア値が 2.0 以上であれば種レベルで一致するとされている。

培養液 1.4ml を 13,000rpm で 2 分間遠心分離後の沈殿物に 300μL の超純水と 900μL のエタノールを加えて攪拌し、13,000rpm で 2 分間遠心分離後に上清を完全除去した。次に、ペレットの量に応じて 15~30μL のギ酸と等量のアセトニトリルを加え攪拌し、13,000rpm で 2 分間遠心分離後、上清 1μL をスチールターゲットプレートに分注して乾燥させ、その上に ACC マトリックス溶液(Bruker 社)を 1μL 添加して乾燥させた。キャリブレーションスタンダードは、Bruker Bacterial Test Standard (Bruker 社)を用いた。

2.3 大量培養後のベンゼン分解能

簡易培養した容器のうち 9 本(180L)は、ディスク型遠心分離装置により集菌した。残りの 1 本は引き続き室温で培養し、10 日後に MALDI-BioTyper によるマッチング検索を行った。遠心分離装置により回収した約 2.5L の菌液を 0.02M リン酸バッファーにより洗浄・濃縮して、約 1L の菌体懸濁液として 4°C で保管した。

菌体懸濁液のベンゼンの分解能を確認するため、50mL のガラスバイアル瓶に BSM 培地¹⁾を 50mL 分注し、滅菌処理後に気相部を窒素パージしてテフロンコーティングを施したブチルゴム栓で密栓した。続いて、ベンゼン濃縮液を適量加えて、約 1mg/L のベンゼンを単一の炭素源とする微好気培地を作成した。本培地に、冷蔵保存して 3 日目および 21 日目の DN11 株菌体懸濁液を終濃度が約 1×10^5 cells/mL になるように植菌し、培養液中のベンゼン濃度を GC-MS を用いて測定した。比較対照として、純粋培養した DN11 株を培養完了直後に植菌した条件、DN11 株を植菌しない条件についても同様の培地を用いて検討した。

キーワード ベンゼン, DN11 株, バイオオーグメンテーション, 大量培養, MALDI-BioTyper
連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設(株) 技術センター TEL 045-814-7226

3. 試験結果

3.1 DN11 株の簡易培養後における細菌種のマッチング検索

簡易培養した 10 本の市販精製水容器 (20L) と純粋培養した 3 本の 20L 容器から培養 3 日後の培地をそれぞれ採取して、濁度と MALDI-BioTyper によるデータベースとのマッチングを行った結果を表-1 に示す。濁度の結果から、簡易培養および純粋培養における培養液中の全菌数の平均値は、それぞれ 7.6×10^7 cells/mL、 6.9×10^7 cells/mL となり、菌数は同様に増加していた。MALDI-BioTyper によるマッチング検索の結果、3 日間簡易培養した培地中のタンパク質パターンがデータベースに登録されているトルエン分解菌「*Aromatoleum toluvorans* Td21 MP」とスコア平均値で 2.0 以上の一致を示し、培養液中の細菌が種レベルで優占していることを確認した。*Aromatoleum* 属⁴⁾は DN11 株が分類されている *Azoarcus* 属と系統学的位置づけが近く、トルエン分解能を持つ脱窒菌である点も一致している。また、3 日間純粋培養した培地中において優占した細菌も *Aromatoleum toluvorans* Td21 MP と判定されたことから、簡易培養で優占化した細菌は DN11 株と考えられた。一方、10 日間簡易培養した培地中のタンパク質パターンは 3 日間培養時と同様に *Aromatoleum* 属の細菌として同定されたが、スコアは約 1.5 まで低下したことから、*Aromatoleum* 属 (DN11 株) 以外の細菌が増殖 (コンタミネーション) して、DN11 株の比率が低下していると推察された。

表-1 20L 培養後の濁度および MALDI-BioTyper によるデータベースとのマッチング結果

測定試料	測定試料数	濁度 (660nm) の平均値	MALDI-BioTyperによるデータベースとのマッチング		
			同定細菌 (Best Match)	Scoreの平均値	Scoreの標準偏差
20L簡易培養(3日後)	10	0.0932	<i>Aromatoleum toluvorans</i> Td21 MPB	2.048	0.051
20L純粋培養(3日後)	3	0.0808	<i>Aromatoleum toluvorans</i> Td21 MPB	2.052	0.025
20L簡易培養(10日後)	1	未測定	<i>Aromatoleum pretroleum</i> ToN1 MPB	1.542	-

3.2 大量培養後のベンゼン分解能

3 日間簡易培養後に集菌して冷蔵保管した DN11 株を微好気培地に植菌して 1 週間で減少したベンゼン量からベンゼン分解率を決定した (表-2)。純粋培養した DN11 株が 90% 以上の分解能力を有していたのに対して、3 日保管では 60%、21 日保管では 6% まで分解能が低下しており、冷蔵保管中に DN11 株のベンゼン分解能力が低下する傾向が示された。この原因として、菌体懸濁液が 5×10^{10} cells/mL と高濃度であったため DN11 株が死滅し易く、DN11 株以外の雑菌の増殖が時間と共に生じやすくなる保存環境であったためと推測された。

表-2 微好気培地による DN11 株の分解試験結果

植菌した DN11 株	簡易培養・集菌後の DN11 株		純粋培養した DN11 株	DN11 株無添加
	3日保管後	21日保管後		
7日後のベンゼン分解率 (%)	60.4%	6.3%	93.7%	0.4%

4. まとめ

本試験の結果、市販の精製水を用いても、純粋培養とほぼ同様の優占度で DN11 株を大量培養できることが示された。一方、培養した菌体を集菌・濃縮して冷蔵保管した場合にはベンゼン分解能力が時間と共に低下した。今後は、簡易培養した菌体を浄化サイトで迅速に地盤中に供給する方法について検討する予定である。

参考文献

- 1) Kasai Y. et al, Applied and Environmental Microbiology, 72:3586-3592, 2006.
- 2) Kasai Y. et al, Environmental Science and Technology, 41:6222-6227, 2007.
- 3) Sogawa K. et al, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400:1905-1911, 2011.
- 4) Trautwein K et al, Applied and Environmental Microbiology, 74:2267-74, 2008.