

底泥由来有用細菌コンソーシアムの分離培養—最適培地の検討—

千葉工業大学 生命科学科 学員 ○柏木良太
 千葉工業大学 生命科学科 正員 村上和仁

1. 背景・目的

世界各地の閉鎖性水域で窒素・リン等の栄養塩の過剰流入を原因とする富栄養化が進行している。さらに、陸域から特定・非特定汚染源由来の有害物質が流入し、水域を汚染している。このような有害物質汚染対策の1つとして有用細菌を活用したバイオレメディエーションが挙げられる。特にゲノム編集等の遺伝子操作に頼らない、汚染サイトから分離した有用細菌群の活用が期待されている。本研究では、基礎的知見の集積を目的として、底泥由来細菌群（細菌コンソーシアム）の分離培養のための最適培地の検討と増殖特性の評価解析を試みた。

2. バイオレメディエーション

バイオレメディエーションとは微生物等を利用して、土壌や地下水の汚染を修復・浄化する技術である。安全性評価を十分に踏まえつつ実施することにより低コストで汚染を処理できる、多様な汚染物質への適用可能性を有するという特徴があり、これからの利用拡大が期待されている。

3. 実験方法

3.1 供試細菌コンソーシアム

海水域および淡水域の表層水と底泥を採取し、それぞれの底泥を超音波処理して細菌を剥離浮遊させた後底泥ごとフラスコに移し、各地点の表層水を添加して 30℃、暗所、150rpm で振とう培養して、細菌懸濁液を得た。

3.2 培養条件

50mL ねじ口試験管に培地を 50mL 注ぎ、30℃、暗所、110rpm の条件下で振とう培養を行った。培地の溶媒として純水、Hale の人工海水（表 1）、環境水（海水・淡水）の 6 種類を用い、これに対して、PGY 培地（表 2）の各成分の組み合わせを変えて、それぞれ添加した。添加した成分の組み合わせを表 3 に示す。また、環境水に関しては、オートクレーブ処理をしたものと濾過滅菌処理をしたものを用いて実験を行った。

3.3 増殖特性評価

濁度計測および生菌数計測から評価を行った。濁度（OD650）はデジタル濁度計を用いて 0、12、24、36、48、60 時間経過後に測定した。生菌数は微生物検査用フィルム培地 Medi・Ca（一般生菌数測定用）を用いて、培養開始から 0、12、36 時間経過後の生菌数を計測した。フィルム培地への滴下の際、純水を用いた 10 倍希釈法によって培養液 1mL 中の生菌数を計測した。その後、それぞれの培地における増殖特性を比増殖速度（ μ ）、最大個体数（ N_{max} ）から評価した。

4. 結果および考察

4.1 淡水域由来細菌コンソーシアムの増殖特性

オートクレーブ処理をした環境水（淡水）の各添加成分における濁度の経時変化を図 1、生菌数の経時変化を図 2 に示す。図 1 および図 2 より、最大比増殖速度（ μ ）は GY 培地における 0 時間経過後から 12 時間経過後にて求めた 0.45/hrs、最大個体数（ N_{max} ）は PGY 培地における 36 時間経過後の 6.5×10^8 CFU/mL となった。

4.2 海水域由来細菌コンソーシアムの増殖特性

オートクレーブ処理をした環境水（海水）の各添加成分における濁度の経時変化を図 3、生菌数の経時変化を図 4 に示す。図 3 および図 4 より、最大比増殖速度（ μ ）は PGY 添加における 0 時間経過後から 12 時間経過後にて求めた 0.53/hrs、最大個体数（ N_{max} ）も同様に PGY 添加条件下における 36 時間経過後の 4.8×10^7 CFU/mL となった。

表 1 Hale の人工海水成分表

	(g/L)
塩化ナトリウム(NaCl)	23.990
塩化カリウム(KCl)	0.720
塩化カルシウム(CaCl)	1.135
塩化マグネシウム(MgCl)	5.102
塩化ストロンチウム(SrCl)	0.011
硫酸ナトリウム(Na ₂ SO ₄)	4.012
過ホウ酸(H ₃ BO ₂)	0.027
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	0.197
臭化ナトリウム(NaBr)	0.085

表 2 PGY 培地成分表

	(g/L)
ポリペプトン	0.500
D-グルコース(C ₆ H ₁₂ O ₆)	0.125
酵母エキス	0.250

表 3 培地成分の組み合わせ

P	G	Y	P…ポリペプトン
PG	GY	YP	G…グルコース
PGY	なし		Y…酵母エキス

キーワード：バイオレメディエーション 有用細菌コンソーシアム 分離培養 最適培地 増殖特性

連絡先：〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 千葉工業大学 生命科学科 TEL：047-478-0455 FAX：047-478-0455

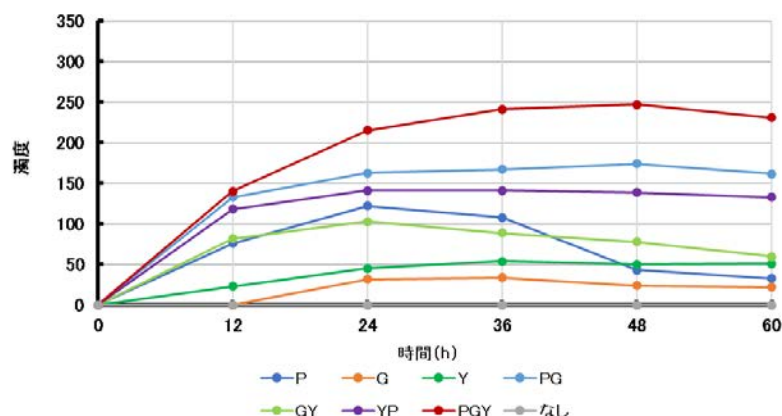


図1 各培地における濁度の経時変化
(環境水 (淡水)・オートクレーブ処理)

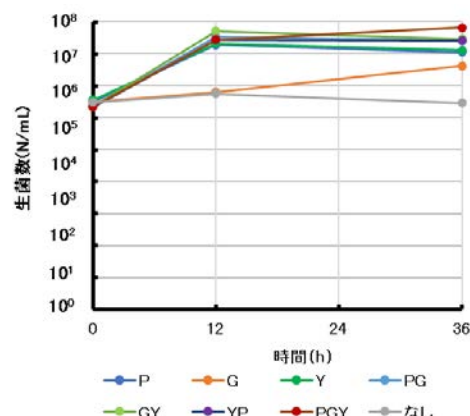


図2 各培地における生菌数の経時変化
(環境水 (淡水)・オートクレーブ処理)

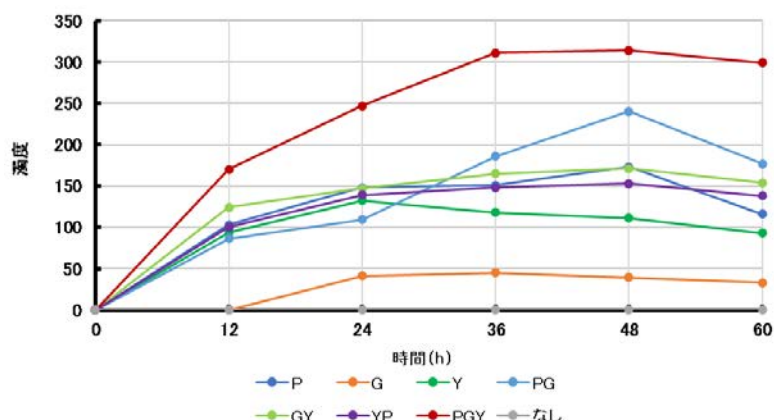


図3 各培地における濁度の経時変化
(環境水 (海水)・オートクレーブ処理)

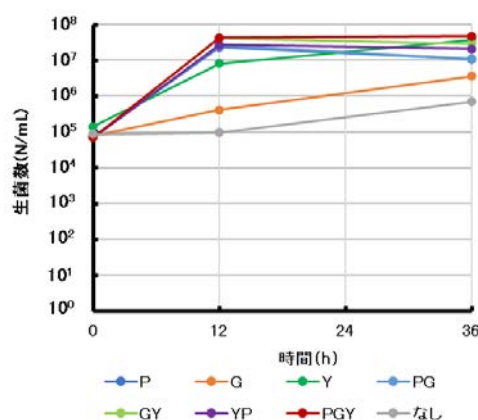


図4 各培地における生菌数の経時変化
(環境水 (海水)・オートクレーブ処理)

4.3 最適培地の検討

オートクレーブ処理をした環境水 (淡水) における比増殖速度 (μ) は GY 培地、個体数 (N) は PGY 培地にて最大となった。また、オートクレーブ処理をした環境水 (海水) における比増殖速度 (μ) は PGY 培地、個体数 (N) も PGY 培地にて最大となった。以上の増殖特性より、淡水域由来細菌コンソーシアムおよび海水域由来細菌コンソーシアムの培養における最適培地は、オートクレーブ処理をした環境水を溶媒とした 1/4PGY 培地であると考えられた。

5. まとめ

- 1) 淡水域および海水域のいずれにおいても底泥由来細菌コンソーシアムの分離培養に成功した。
- 2) 組成の異なる各種培地にて増殖特性を検討した結果、オートクレーブ処理をした環境水 (表層水) を溶媒とした 1/4PGY 培地で最大比増殖速度 (μ) および最大個体数 (N_{max}) が得られた。
- 3) 淡水域由来の細菌コンソーシアムの最大比増殖速度 (μ) は GY 培地における 0.45/hrs、最大個体数 (N_{max}) は PGY 培地における 6.5×10^8 CFU/mL であった。
- 4) 海水域由来の細菌コンソーシアムの最大比増殖速度 (μ) は PGY 培地における 0.53/hrs、最大個体数 (N_{max}) も同様に PGY 培地における 4.8×10^7 CFU/mL であった。
- 5) 今後、NGS を用いたメタゲノム解析による細菌コンソーシアムの菌叢解析を行うと同時に、有害物質分解能について、分解速度、分解率、半減期等から検討を行う予定である。

参考文献

- 1) 稲森悠平、村上和仁、角田美奈子、佐藤瑠佳、栗原康：遺伝子組換え細菌と親株細菌の相互作用に関する研究、日本水処理生物学会誌、Vol.29、No.1、pp.39-49 (1993)
- 2) 川崎達也、稲森悠平、松村正利、村上和仁：沿岸域より分離した重油分解菌の特性と混合培養系における挙動解析、第 35 回日本水環境学会年会講演要旨集 (2001)
- 3) 村上和仁：Gene Biomanipulation を想定したマイクロコズムにおける導入遺伝子の挙動解析、環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会要旨集 (2013)