

生分解プラスチック・ポリ-β-ヒドロキシ乳酸 (PHB) 資化性脱窒菌の分離と諸性質

熊本大学工学部 学生会員 中井 玄一郎
 熊本大学工学部 正会員 川越 保徳
 熊本大学工学部 非会員 藤本 綾
 熊本大学工学部 正会員 古川 憲治

1. 研究背景

農業排水や過剰施肥に起因する硝酸性窒素による地下水汚染が問題となっている。小規模で運営している農家、畜産農家にとって窒素除去設備を設置するにはコストがかかりその維持も容易ではない。そのため初期および維持コストが安価、かつ維持管理が容易である窒素除去技術が求められている。現在、生物学的脱窒技術の課題としては、メタノールなどの炭素源にかかるコストや2次汚染、さらには安定処理のための適切な維持管理があげられる。

そこで我々の研究室では、生分解性プラスチックの一つであるポリ-β-ヒドロキシ乳酸 (PHB, 図1) を脱窒細菌の炭素源として利用する新規な窒素除去技術の開発を検討している。固体状の PHB を炭素源として用いることが可能になれば、液状炭素源の場合に問題となる二次汚染を低減でき、かつ長期間に渡る炭素源供給が可能のため維持管理が容易な処理プロセスを構築できる。また、使用済みの PHB 廃棄物を再利用できればコストの削減も期待できる。本研究では、PHB を炭素源として利用し、硝酸態窒素を還元除去可能な PHB 資化性脱窒菌を分離し、生育条件等について基礎検討を行い知見を得たので報告する。

2. 実験装置および方法

2. 1 PHB 資化性脱窒菌の分離・同定

低濃度の硝酸性窒素除去を目的として構築された PHB 充填土壌カラム (図2) から、土壌試料を採取し、GILTAY 寒天平板培地に接種し培養した。図中Aは低濃度の硝酸性窒素水溶液、BはPHBである。得られたコロニーについて平板培地での分離、培養操作を繰り返し、最終的に単一コロニーを得た。本細菌について、API20NE キット (日本 biomerieux) での生化学試験と 16S rDNA の配列解析を実施し、同定を行った。

2. 2 回分実験方法

300ml 容の三角フラスコに GILTAY 培地を入れ 200ml になるように調製し、単離細菌を接種した後、Ar ガスで曝気して嫌気状態とした。pH、温度、利用可能炭素源等の生育条件を検討した。測定項目はpH、菌体濃度、硝酸性窒素 (NO₃-N)濃度、亜硝酸性窒素濃度 (NO₂-N)、全有機炭素 (TOC)とした。

2. 3 分析方法

菌体濃度は OD₆₆₀ として測定した。NO₃-N はブルシン・スルファニル法、NO₂-N はスルファニルアミド法、全有機炭素は全有機炭素計でそれぞれ分析した。

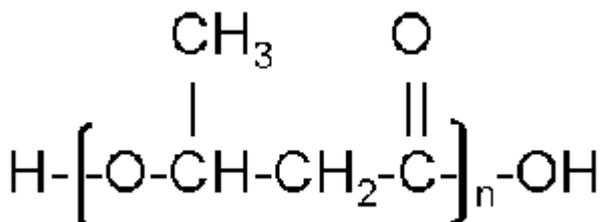


図1. PHB構造式

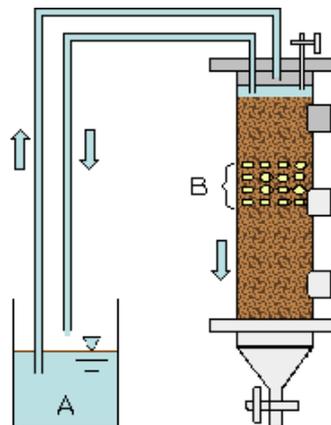


図2. PHB 充填土壌カラム

3. 結果

3.1 PHB 資化性脱窒細菌の分離・同定

2. 1の方法により単一細菌のコロニーを得た。本細菌について、細菌学的諸性質に関する試験と 16S rDNA 配列による相同性解析を行った結果、*Ralstonia* 属、中でも *Ralstonia thomasii* に類似の細菌であることが明らかとなった。

3.2 分離細菌の生育及び脱窒能に及ぼす温度の影響

図3から明らかなように 30℃下での生育で最も良好に生育し、55℃では生育が認められなかった。しかし、20℃の低温下、および 40℃の高温下でも比較的良好な生育を示した点は特徴的である。また、図4に示すように、生育速度が速かった 30℃下において、窒素除去速度も最も高かった。

3.3 分離細菌の生育及び脱窒能に及ぼす初期 pH の影響

図5から明らかなように、本分離細菌は初期 pH が 5.0 から 7.0 の間で良好な生育を示し、初期 pH が 3.5、および 10 では生育が認められなかった。また、図6に示すように初期 pH 7.0 の条件において、最も高い窒素除去速度が得られた。

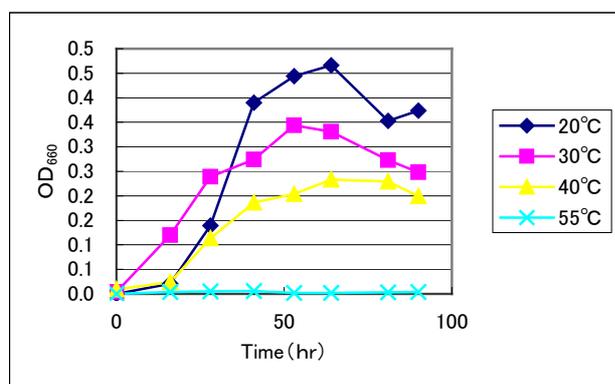


図3. 細菌の生育に及ぼす温度の影響

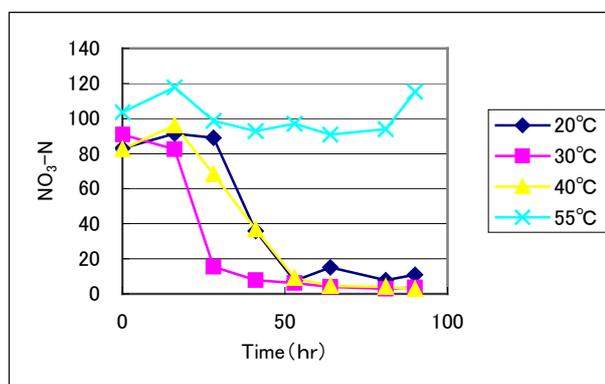


図4. 脱窒速度に及ぼす温度の影響

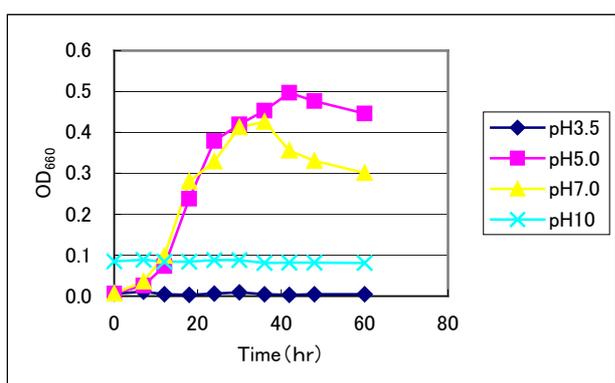


図5. 細菌の生育に及ぼす pH の影響

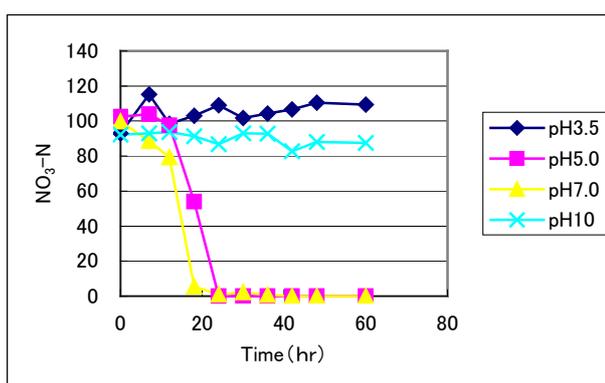


図6. 脱窒速度に及ぼす pH の影響

4. まとめ

1. PHB 資化性脱窒菌の分離に成功し、*Ralstonia thomasii* に類似の細菌であることが明らかとなった。
2. 本分離細菌の至適生育条件は温度 20~30℃、初期 pH 7.0 であることが分かった。
3. 本分離細菌による窒素除去速度は、温度 30℃、初期 pH 7.0 で最も高いことが分かった。