

耐酸素性亜酸化窒素還元酵素を保有する新規脱窒細菌の探索と生理特性の評価に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○高橋諒、東北学院大学 工学部 非会員 高橋正行、東北学院大学 工学部 非会員 大坪和香子、東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介、東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

1. はじめに

亜酸化窒素 (N_2O) は二酸化炭素の温室効果ガス約 310 倍の温室効果を持っており、地球温暖化の原因の一つとなっている。また、 N_2O は主要なオゾン層破壊物質であり世界的にその削減が求められている。

畜産家畜糞尿の廃棄物のコンポスト(堆肥)化や、排水処理における窒素除去プロセスでは、微量酸素の混入による脱窒反応の阻害等により、温室効果ガスの亜酸化窒素 (N_2O) が大量に発生することが問題となっている。

N_2O を効率的に還元、除去するためには、高い N_2O 還元的能力を有する微生物の利用が有効であると考えられる。

本研究では、このような微生物の獲得と応用化への基盤形成を目的とし、酸素存在下においても N_2O を発生させることなく脱窒を行う能力を有する新規の脱窒細菌をコンポストや活性汚泥より単離、培養することを目的とし、実験を行った。

2. 実験方法

2.1 BTB 培地を用いた脱窒細菌のスクリーニング

好気条件下でも完全脱窒をおこなう能力を有する菌を単離するために、ブロモフェノールブルー (BTB) を使用した。ブロモフェノールブルーは pH により変色し酸性は黄色、中性は緑色、アルカリ性は青色となる。Tsble.1 に示すような異なる炭素源、脱窒基質を添加し pH を 7.1~7.2 (緑色) に調整した。この培地に含まれる脱窒気質が脱窒細菌によって消費されるとアルカリ性 (青色) に傾くことを利用した。

今回は炭素源としてコハク酸もしくは、酢酸を使用し、脱窒基質として硝酸カリウム (KNO_3) もしくは、亜硝酸カリウムを (KNO_2) 使用した。

Tsble.1

BTB 培地	炭素源	脱窒基質
A	コハク酸	KNO_3
B	酢酸	KNO_3
C	コハク酸	KNO_2
D	酢酸	KNO_2

単離源として豚糞処理過程で発生する豚糞搾汁残渣および脱水余剰活性汚泥の混合物を原料としたコンポストを使用した。

コンポストを 0.9%NaCl で懸濁後、段階希釈を行いそれぞれの BTB 培地に塗布を行った。

また、Screening Medium 培地 (以下、SM 培地とする) にそれぞれ、コンポストと活性汚泥を入れ 28℃のインキュベータで 3 日間静置培養後、新しい SM 培地に植え継ぎ、再び 28℃のインキュベータで 3 日間静置培養を 3 回繰り返したのち、0.9%NaCl で懸濁、希釈を行ったもの (継代培養) をそれぞれ、BTB 培地 A に塗布した。

30℃のインキュベータで 3~5 日間培養し変色を確認された BTB 培地についてスクリーニングを行った。

2.2 単離した脱窒細菌の 16S rRNA 遺伝子による細菌種の同定および、亜酸化窒素還元酵素遺伝子 (*nosZ*) の同定。

2.1 でスクリーニングし青色への変色を確認されたプレートより DNA を抽出および 16S rRNA 遺伝子を標的としたプライマーセット (8F, 1492r) を行い、16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅し、シーケンス反応を行い、シーケンサーによって菌の同定を行った。

同定された菌より優勢的な菌株の亜酸化窒素還元酵素 (以下、*nosZ* とする) を標的としたプライマーセット、解析を行った。

2.3 *nosZ* の確認された菌株のガスクロマトグラフィーによる N_2O 発生の有無を解析

nosZ の確認された菌株を BTB 培地から LB 培地へ植え継ぎ、前々培養、前培養を行ったのち、 KNO_3 、 KNO_2 を加え N_2 置換を行った 1/5LB 培地に O_2 付加もしくは加えず植菌を行い一定値まで上がったガスクロマトグラフィーにかけ N_2O が発生しているかを解析した。

3. 実験結果と考察

3.1 BTB 培地を用いた脱窒細菌のスクリーニング

BTB 培地 A、C を用いた直接培養法では、培地の青色への変色と多数の青色単一コロニーが見られた。BTB 培地 B、D を用いた直接培養法では、カビが多く繁殖したため、スクリ

キーワード:コンポスト 亜酸化窒素 微生物 脱窒反応 スクリーニング

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室
TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070

ーニングは困難であった。

SM 培地での継代培養は他の培養方法と比較して希釈率を高めて塗布する必要があったが、直接培養法と同様に多数の青色単一コロニーが単離できた。

3.2 16S rRNA 遺伝子および N₂O 還元酵素遺伝子 (nosZ) の同定

16S rRNA 遺伝子配列を NCBI の BLAST 相同性検索を行い、最も近縁な細菌は Tsble.2 のようになった。

コハク酸を炭素源として与えた条件では、単離された細菌の多くが *Bordetella petrii* 種に近縁 (99%) だった。

また、*Bordetella petrii* 種と *Alcaligenes sp.* 種において nosZ の存在が確認された。

ない。しかし、毒性の強い亜硝酸を気質とした場合いや好気状態でも良好に生育することから他の菌種との組み合わせによって N₂O を効率的に還元、除去を行う可能性が考えられる。

5. 謝辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成を受けて行われたことを記し、感謝の意を表します。

Tsble.2

分離方法	培地		シーケンス結果
	炭素源	脱窒基質	菌名
直接	コハク酸	KNO ₃	<i>Bordetella petrii</i> (7/8)、 <i>Advenella</i> (1/8)
	酢酸		<i>Enterobacter</i> (2/5), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2/5), <i>Brevibacterium epidermidis</i> (1/5)
	コハク酸	KNO ₂	<i>Bordetella petrii</i> (5/5)
継代	コハク酸	KNO ₃	<i>Alcaligenes sp.</i> (9/9)

3.3 nosZ の確認された菌株のガスクロマトグラフィーによる N₂O 発生の有無を解析

Bordetella petrii 種と *Alcaligenes sp.* 種でそれぞれをガスクロマトグラフィーにかけて N₂O 発生の有無を解析した結果次のようなことが分かった。両種とも共通して脱窒基質の違いにかかわらず良好に生育した。

亜硝酸を気質とした場合の方が N₂O の発生は少なかった。

4. おわりに

本研究では、培養方法、炭素源の違いで生育する細菌種が違うことが明らかとなった。

今回、単離・解析した *Bordetella petrii* 種と *Alcaligenes sp.* 種は効率的な脱窒が行われてい

キーワード:コンポスト 亜酸化窒素 微生物 脱窒反応 スクリーニング

連絡先: 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1 東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室
TEL: 022-368-7493 FAX: 022-368-7070