

堆肥から単離した新規脱窒細菌の同定および異なる電子受容体における生育特性の解明

東北学院大学工学部 学生会員 ○佐藤聡太
東北学院大学工学部 大坪和香子
有限会社日本ライフセンター 上田英代
有限会社日本ライフセンター 上田裕一
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

地球温暖化の主要因である温室効果ガスとして二酸化炭素(CO₂)メタン(CH₄)および亜酸化窒素(N₂O)が知られるが、N₂Oは、温室効果ガス総排出量に占める割合はCO₂やCH₄よりも低い一方で、地球温暖化指数は310(等量のCO₂を1とした場合の換算値)と高く、将来にわたって懸念される温室効果ガスである。さらに、N₂Oは極めて安定な物質であるため対流圏では消失せず、成層圏に到達し触媒的にオゾン層を破壊するため、オゾン層破壊物質としても問題となっている。

このような背景から、本研究では効果的なN₂O発生削減方法の開発を最終的な目的として、特に微生物のN₂O還元能を利用して廃水処理におけるN₂O発生を抑制する手法について検討した。工業廃水や畜産廃水に含まれる窒素成分を除去する硝化・脱窒処理には、一槽式の間欠曝気硝化・脱窒反応槽が用いられることが多い。これは、好気条件と嫌気条件を同一の反応槽で交互に形成することで、硝化・脱窒の一連の反応を行うシステムである。しかし、本システムの大きな問題点は、好気状態から嫌気状態へと移り変わる際に、反応槽内に残った溶存酸素が、脱窒細菌の保有する亜酸化窒素還元酵素(N₂OR)を阻害し、N₂への還元反応の停滞がN₂O発生を引き起こすことである。そこで我々は、反応槽からのN₂O発生を抑制するためには、微好気(微量酸素が存在する)環境下においても高いN₂O還元能力を有する脱窒細菌の導入(バイオオーグメンテーション)が有効だと考え、*Pseudomonas stutzeri* TR2株をはじめ

とするN₂O還元型好気脱窒細菌の探索および培養実験を行ってきた。

本研究では、好気条件下において脱窒が起こる環境である堆肥山に着目し、先行研究において成熟堆肥試料から単離した脱窒細菌ライブラリから数菌株を選択し、その種および機能の同定を行った。さらにN₂O発生ポテンシャルの高い中温期堆肥からの新規脱窒細菌を単離し、成熟堆肥由来の脱窒細菌との違いを明らかにする研究を行った。

2. 実験方法

2-1. 成熟堆肥から単離した新規脱窒細菌の同定

先行研究において成熟堆肥から単離した脱窒細菌100菌株のうち、数菌株を選択し、1/5LB培地で一晚培養後にゲノムDNAを抽出した。各ゲノムDNAを鋳型とした16S rRNAおよびN₂O還元酵素遺伝子*nosZ*のPCR増幅を行い、増幅産物のクローニングおよびシーケンス解析により塩基配列を決定した。得られた配列をGenBankデータベースを用いてBLAST相同検索によって照合し、細菌種および分類群を同定した。

2-2. 成熟堆肥より単離された*Pusillimonas sp.S-14*株の脱窒条件における生育特性の評価

10mMの硝酸、亜硝酸、またはN₂O(10%)を電子受容体として添加したDM培地(100mlあたりの組成:コハク酸ナトリウム0.472g、KH₂PO₄0.15g、Na₂HPO₄0.042g、NH₄Cl0.06g、カザミノ酸0.5g、Trace Element Solution0.2ml、200mM MgSO₄)を調製した。成熟堆肥由来の脱窒細菌株および*P. stutzeri* TR2株を植菌し、自動OD測定装置(アドバンテッ

キーワード: 微生物 N₂O 脱窒

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

ク社)を用いて、30°Cで72時間培養した際に測定した培養液の660 nmにおける濁度(OD)を測定し、増殖曲線を得た。各培養条件から得られた増殖曲線の対数増殖が開始するまでの時間、対数増殖期における増殖速度及び、最大到達濁度を比較することで、本菌株の硝酸、亜硝酸およびN₂Oを電子受容体とした場合の生育特性を調べた。

2-3. 中温期堆肥由来脱窒細菌の単離と種の同定

平成25年夏に沖縄県今帰仁村の日本ライフセンターにおいて作製した堆肥山から採取した中温期(50°C)の堆肥試料から、脱窒細菌を以下の方法で単離した。中温期堆肥(2g)を0.9% NaCl溶液(約20ml)に懸濁し、段階希釈したもの(10倍~10万倍)をBTB培地(100mlあたりの組成:L-asparagine水和物0.1g、KH₂PO₄0.1g、FeCl₂·4H₂O0.005g、CaCl₂·2H₂O0.02g、MgSO₄·7H₂O0.1g、1M KNO₃1ml、BTB(1% in ethanol)、0.1ml、Agar2g)に植菌し、30°Cにおいて数日間培養し、青く変色したコロニーを単離した。単離した各菌株から、上述(2-1.)のようにゲノムDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の配列決定による細菌種の同定を行った。

3. 実験結果と考察

3-1. 成熟堆肥から単離した新規脱窒細菌の同定

成熟堆肥由来の脱窒細菌 S-14 株は、*Pusillimonas* 属に近縁であった。*Pusillimonas* 属の脱窒能に関する研究は少なく、堆肥から単離された例も本研究が最初である。また、S-14 株は水環境細菌 *Achromobacter xylosoxidans* に近縁な *nosZ* 遺伝子を保有していた。

3-2. *Pusillimonas* sp. S-14 株の生育特性

S-14 株は、10 mM の硝酸または亜硝酸を電子受容体として与えた場合の微好気条件における増殖が良好であり、既知の N₂O 還元型好気脱窒細菌 *P. stutzeri* TR2 株と比較すると、明らかに脱窒による増殖収率(最大到達 OD)が高く、優れた脱窒細菌であることが知られた (Fig. 3-1)。さらに、S-14 株は TR2 株と同様に、N₂O を唯一の電子受容体として与えた条件においても増殖可能であり、その増殖速度および最大到達 OD は、亜硝酸を電子受容体とする TR2 株の増殖に匹敵していた (Fig. 3-2)。以上の結果から、S-14 株は、微好気条件下で TR2 株よりも優れた脱窒能および N₂O 還元能力を有することが知られた。

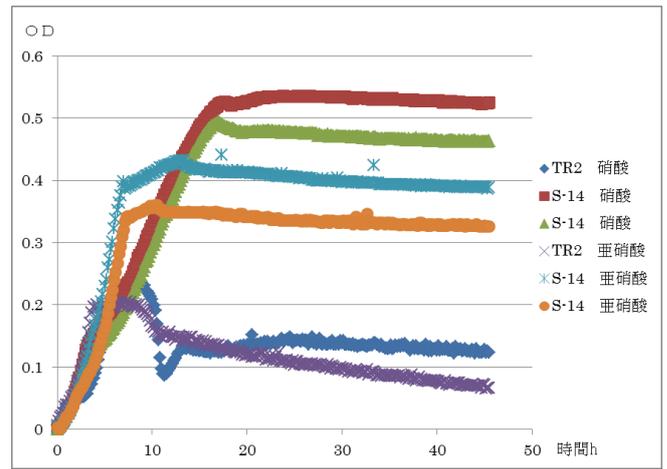


Fig. 3-1. S-14 電子受容体別生育曲線 1

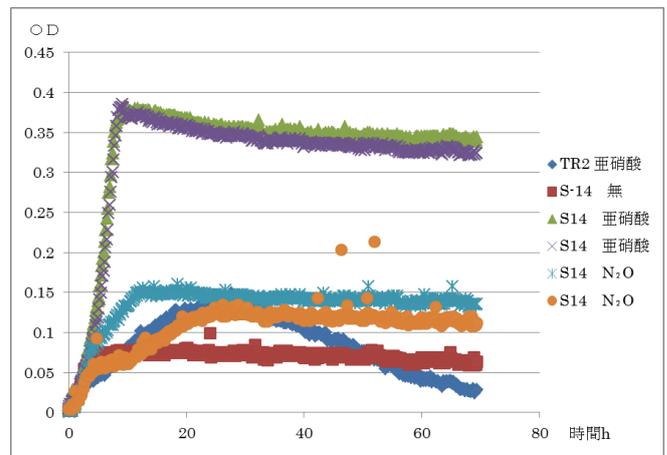


Fig. 3-2. S-14 電子受容体別生育曲線 2

3-3. 中温期堆肥由来脱窒細菌の単離と種の同定

中温期堆肥から新規に単離した脱窒細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定したところ、その全てが、*Bacillus* 属に近縁であった。本細菌は嫌気条件下では生育せず、好気脱窒条件において良好に生育した。

4. おわりに

本研究では、新規の脱窒細菌を同定し、その性質を明らかにした。N₂O 発生ポテンシャルの低い成熟堆肥から単離された *Pusillimonas* sp.S-14 株は、微好気条件下において既知の *P. stutzeri* TR2 株よりも優れた N₂O 還元型好気脱窒細菌であることが知られ、N₂O 発生抑制技術への応用の可能性が示唆された。

一方、N₂O 発生ポテンシャルの高い中温期堆肥から単離した *Bacillus* 属細菌株は、酸素供給量の多い堆肥に適応した好氣的脱窒細菌であった。本細菌が既知の *Bacillus* 属脱窒細菌と同様に N₂O 還元能力を持たない場合、中温期堆肥からの N₂O 発生の要因になっていることが考えられ、本細菌の抑制による堆肥からの N₂O 発生抑制技術の開発が期待できる。