

B-20 広範囲の脱窒性フェノール分解細菌 を捉えるための平板培養条件の検討

○末岡 一男^{1*}・伊藤 公夫²・三木 理²・小貫 元治³・佐藤 弘泰¹・味埜 俊^{1,3}

1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 環境棟)

2) 新日本製鐵 (株) 先端技術研究所 (〒293-8511 千葉県富津市新富 20-1)

3) サステイナビリティ学連携研究機構 (IR3S) (〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 環境棟)

* Email: kk47754@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

約99%以上の微生物が従来の実験手法では分離培養できないと見積もられている^{1,2)}。そのような事実から、培養技術も従来のものから徐々に改善が進み、近年、培養技術に関する新しい手法が数例報告されるようになった^{3,4,5)}。多くの研究がCulturability (生育可能な菌数/全菌数)を向上することを目的としており、その中で平板培養法に使用する固形剤と基質濃度に注目した報告が数例ある。

前者の例として、平板培養法の固形剤として寒天よりもگرانガムを用いた場合に、Culturabilityの向上や新規微生物を分離できる確率の向上が得られるという報告がある^{6,7,8)}。後者の例として、低濃度の有機物を含む培地で培養することで、これまで分離されていなかった海洋細菌群が分離されたという報告もある⁹⁾。

このような背景を踏まえて、本研究では、平板培養法に使用する固形剤の種類と基質濃度に注目して、広範囲の脱窒性フェノール分解細菌を捉えるための平板培養条件を検討した。培養条件は硝酸塩を含む培地を嫌気培養して、脱窒反応を起こさせる培養を行った。固形剤には、カラギーナン、گرانガム、2種類の寒天を用いた。一方、基質濃度には、フェノールを唯一の炭素源として、低濃度、中濃度、高濃度の3段階を用いた。これらの条件を組み合わせ、Viable countとコロニーの形態的特徴に関して、良い結果を得られる培養条件を検討した。

2. 実験方法

(1) 活性汚泥サンプルの採取

2006年9月27日、2006年12月26日に人工安水処理硝化脱窒プラントの脱窒槽から活性汚泥を採取した。本プラントでは、フェノールとチオシアン酸塩を唯一の有機物源とする海水含有の人工排水を処理しており、脱窒

槽で殆ど全てのフェノールとチオシアン酸塩が分解されることが確認されている。脱窒槽のpHは7.8前後、水温は23℃前後であった。

(2) 培地成分と培地作成手順

Mineral 培地として、Table. 1. に示す培地を使用した。この培地にフェノールを10, 100, 500 (mg liter⁻¹)、NaNO₃を100 (mg liter⁻¹)となるように添加した。また、Vitamin solution は DSMZ の 461 番を 0.5% (vol/vol)、Trace element solution は DSMZ の 141 番を 1.0% (vol/vol) となるように添加した。

Table. 1. Medium used in this study

Na ₂ HPO ₄	2.44	g
KH ₂ PO ₄	1.52	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.50	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20	g
CaCl · 2 H ₂ O	0.05	g
Distilled water	1000.00	ml

以下、平板培地の作成手順を説明する。Table. 1. の培地を作成し、pHを6.9 (2006年9月27日サンプル) または7.25 (2006年12月26日サンプル) に調整した。固形剤を1.5% (wt/vol) となるように添加して、121℃で15分間オートクレーブ処理を行った。オートクレーブ処理終了後、培地をウォーターバスで65℃に保持した。0.20-μm-pore-size cellulose acetate filter (ADVANTEC) で濾過滅菌した、65℃に保持されたフェノール溶液、NaNO₃ 溶液、Vitamin solution、Trace element solution を前述の最終濃度となるように添加した。添加後、速やかに混合して、シャーレに分注した。作成した培地は、常温に冷却後、使用まで嫌気ジャー (三菱ガス

化学(株))に1晩以上保存した。

(3) 固形剤

培地を固化する固形剤は、カラギーナン (Carageenan: Reserch Organics 社)、ゲランガム (Gellan gum: Wako 社)、寒天 A (Agar Noble: Difco 社)、寒天 B (Bacto Agar: Difco 社) の4種類を用いた。

(4) 培養条件

活性汚泥サンプルを 0.85% NaCl solution を用いて 10^2 – 10^7 の範囲で段階希釈を行った。希釈したサンプルを、シャーレ1枚に対して2006年9月27日のサンプルは200 ul、2006年12月26日のサンプルは100 ul 添加した。プラスチック製のスプレダーでサンプルを塗布した。塗布後、AnaeroPack 試薬(三菱ガス化学(株))と嫌気ジャーを用いて、暗所にて18–23℃で約18週間培養した。1つの希釈段階に対して、3枚のシャーレを作成した。

(5) コロニーカウントと Viable count の計算方法

コロニーカウントする時期は、コロニーの生育状況から判断して、18週間のうち5点でカウントを行った。コロニーカウント方法は、Davis らの手法に従った¹⁰⁾。また、Viable count は活性汚泥1 ml に対するCFUの値を計算して表記した。

3. 結果

(1) Viable count の増加特性

培地の Viable count の経時的変化を Fig. 1. に示す。また、培養18週間後の Viable count をまとめたものを Fig. 2. に示す。2006年9月27日のサンプルよりも、2006年12月26日のサンプルの方が、Viable count が若干低くなる傾向が全体的に見られた。

まず、Fig. 1. では、殆どの培地において、培養8–12週間後には Viable count がプラトー付近まで達したことが確認された。しかし、一部の培地においては、培養12–18週間後に再び増加を示すものや、18週間後でも緩やかな増加を示しているものが確認された。次に、Fig. 2. では、フェノール濃度が500, 100, 10 (mg/L) と低濃度になるにつれて、Viable count が増加する傾向が確認された。

さらに、固形剤毎では、寒天 A と寒天 B に対して、カラギーナンとゲランガムの方が Viable count が高い傾向が確認された。特に、18週間後のカラギーナンとゲランガムの Viable count を比較した場合、フェノール濃度が100, 500 (mg/L) ではカラギーナンがゲランガムを上回り、一方、フェノール濃度が10 (mg/L) ではその逆となった。

(2) 生育したコロニーの形態的特徴

以下、4種類の固形剤ごとに、生育したコロニーの形態的特徴を記述していく。

カラギーナンに関しては、コロニーの形態的特徴の多様性が最も高かった。コロニーの形は円形やハローのある円形が多く、色は透明色、白色、クリーム色、黄色、

肌色のコロニーが多かった。他の固形剤と比べて、黄色いムコイド状のコロニーが特に多く、全体的に大きなコロニーが多かった。

一方、ゲランガムに関しては、コロニーの形態的特徴の多様性が2番目に高かった。コロニーの形は円形やハローのある円形が多く、色は透明色、白色、クリーム色、黄色のコロニーが多かった。また、カラギーナン程ではないが、黄色いムコイド状のコロニーがあった。

最後に、寒天 A と寒天 B に関しては、コロニーの形態的特徴の多様性が最も低かった。異なるコロニー形態を示すものが3、4種類程度であり、コロニーの形は円形が殆どで、コロニーの色は殆どが茶色か黄色であった。ムコイド状のコロニーは確認されなかった。

以上をまとめると、4種類の固形剤では、コロニーの形は円形やハローのある円形が多く、茶色、透明色、白色、クリーム色、黄色、肌色のコロニーがそれぞれ確認された。カラギーナンとゲランガムは、寒天 A と寒天 B に比べて、コロニーの形態的特徴の多様性が高かった。

4. 考察

一つの培養条件でより多様な脱窒性フェノール分解細菌を得ることを目指すのであれば、コロニー数が多く、かつ、その形態が多様であるような条件を採用するのが望ましい。そのように考えると、おおむね次のようにまとめることができる。

- ① フェノールは低濃度にする (10 又は 100mg/L)
- ② 固形剤はカラギーナン又はゲランガムを用いる
- ③ 培養期間は、8–12 週間とする

また、高濃度のフェノールに対して耐性のある細菌を得ようとするならば、基質濃度については①のようにするのではなく、むしろ高濃度のフェノールを用いた方がよいであろう。

なお、本研究では硝酸を電子受容体とし嫌気ジャーを用いて脱窒性のフェノール分解細菌の培養を試みた。しかし、分離した細菌が本当に脱窒をしながらフェノールを分解するのかどうかは、あらためて確認する必要があるだろう。

また、サンプルを採取したプラントで処理している排水は海水含有であったが、培地成分は海水含有でない点も、生育してきたコロニーの種類に影響を与えている可能性が考えられた。海水含有培地を使用しなかった理由は、海水含有培地を使用するとゲランガムのみオートクレープ処理終了直後に、固化するためであった。

ところで、カラギーナンは透明性が高くコロニーの確認が容易であり、また、前述のようにすぐれた結果を与えるものであった。カラギーナンを平板培養に用いた研究は1977年においてすでに発表されている¹⁰⁾。にもかかわらず、なぜもっと普及しないのか疑問であるが、その

理由はよくわからない。培地の pH に影響を与えること、また、血液培地を作成する場合にカラギーナンの固化温度が 60℃程度と高いために、添加する血液に対する影響が問題点として知られている¹⁰⁾。しかし、もっと利用されてもよいのではないかと感じられた。

5. まとめ

広範囲な脱窒性フェノール分解細菌を捉えるための平板培養条件を検討した。脱窒条件とするために、硝酸を電子受容体として嫌気ジャーを用いて培養した。また、種々のフェノール濃度で様々な固形剤を用いて検討した。結果、フェノール濃度 10 または 100mg/L、固形剤はカラギーナン又はゲランガムが良いとの結果が得られた。また、培養期間は 8-12 週間が必要であるとの結果であった。

参考文献

- 1) Hugenholtz, P., *et al.* 1998. *J. Bacteriol.* 180(18):4765-4774.
- 2) Amann, R. I., *et al.* 1995. *Microbiol. Rev.* 59(1):143-169.
- 3) Kaerberlein, T., *et al.* 2002. *Science* 296(5570):1127-1129.
- 4) 青井義輝ら. 2007. 第23回日本微生物生態学会講演要旨集. p. 20.
- 5) 大村直也ら. 2003. 平成15年度生物工学フォーラム. p. 5.
- 6) Janssen, P. H., *et al.* 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5):2391-2396.
- 7) Tamaki, H., *et al.* 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4):2162-2169.
- 8) Kamagata, Y., and Tamaki, H. 2005. *Microbes Environ.* 20(2):85-91.
- 9) Connon, S. A. and Giovannoni, S. J. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8):3878-3885.
- 10) Lines, A. D. 1977. *Appl. Environ. Microbiol.* 34(6):637-639.
- 11) Davis, K. E. R., *et al.* 2005. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2):826-834.

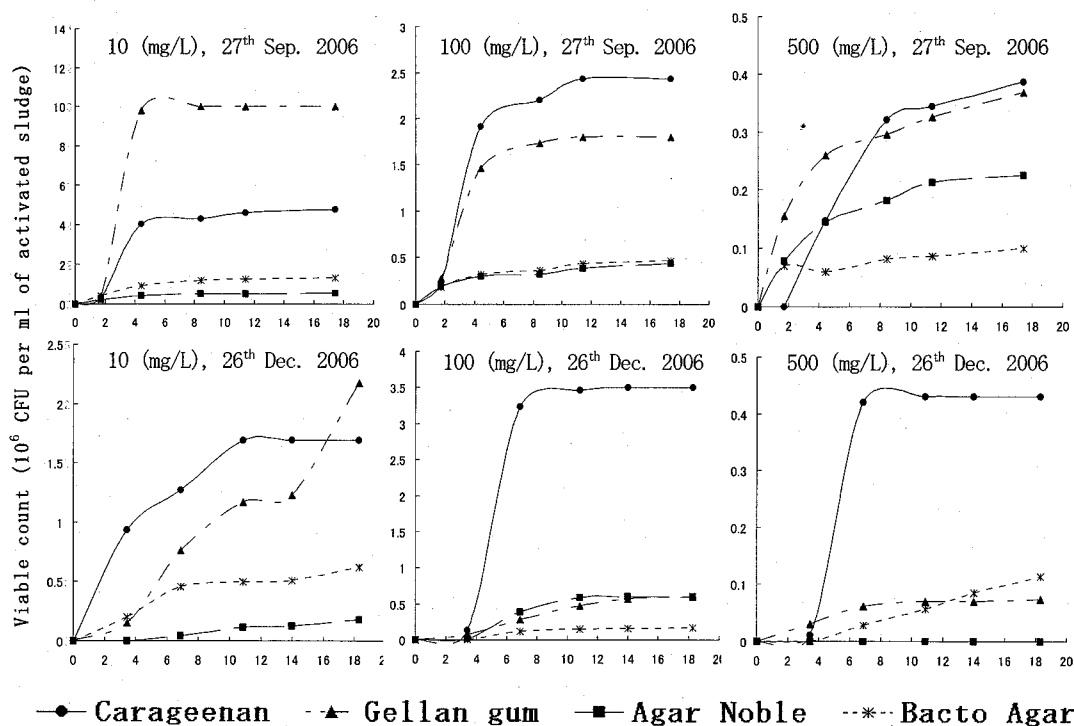


Fig. 1. Increases in viable counts on different media with increasing incubation times. Each point included three replicate plates. For clarity, the standard errors are not shown; the mean standard error of all the points was 24.3% of the values plotted. Phenol concentrations and sample date are shown at the top of figures.

Fig. 2. Viable count at different phenol concentrations and different gelling agents after about 18 weeks of incubation.

