

# 県内未利用資源を活用した脱窒に関する研究

溝添 暁子\*1・里岡 嘉宏\*1・甲斐 由美\*2・中田 一則\*1

The Research on the Denitrification which Utilized Prefecture Unused Resources

Akiko MIZOZOE , Yoshihiro SATOOKA , Yumi KAI and Kazunori NAKATA

前報において、県内未利用資源について脱窒効果試験を行った結果、竹粉が高い脱窒効果を示した。また、その効果は竹粉由来の微生物群によるものであることを種々の試験により明らかにした。本研究では、引き続き竹粉由来の微生物について生化学的性状の詳細な検討および遺伝子解析による同定を行った。

キーワード：脱窒、竹、微生物

## 1 はじめに

県内には、木炭、竹炭のようにその特性が解析され、すでに利用されているものもあるが、杉、竹等そのものの機能性はほとんど研究されていない。中でも竹は、全国的に放置竹林が問題になっており、県内にも多数存在する。しかし、竹は、成長が早いことから注目される資源でもあり、その有効利用が求められている。一方、農業の過剰施肥、家畜排泄物の不適正な処理により硝酸態窒素等が土壌、地下水を汚染し問題となっている。

本研究では、県内未利用資源である竹資源を活用した脱窒資材等を開発することにより、土壌および地下水の汚染防止、ならびに林産業における竹資源の用途拡大による付加価値の向上、需要の増加に寄与することを目的として、宮崎県総合農業試験場および宮崎県林業技術センターと共同で研究を実施している。

## 2 実験方法

### 2-1 竹粉試料

県林業技術センターにて、伐採、乾燥、破碎処理し、さらに県総合農業試験場において、乾燥されたものを竹粉試料とした。伐採後の乾燥時間、破碎処理法、竹粉乾燥時間は、毎回一定条件とし、

月に一度定期的に行い、提供を受けた。

### 2-2 脱窒菌のスクリーニング

#### 2-2-1 分離培養

これまでの試験において脱窒能の高かった竹粉の硝酸除去試験の処理液を使用し、また、様々な培地（表1）を用いて脱窒菌の分離培養を行った。表1の培地を作成し、処理液を液体培地に添加、あるいは寒天培地に塗布し、発生したコロニーを採取し、それぞれ純粋培養を行った。

表1 培養に使用した培地

名称	組成
KN03-N	KN03 + 普通寒天培地
KN03-G	KN03 + Giltay培地
N-B-N	KN03 + Nutrient-Bloth + 普通寒天培地
N-B-G	KN03 + Nutrient-Bloth + Giltay培地
ク+石-N	KN03 + クエン酸 + CaCO <sub>3</sub> + 普通寒天培地
ク+石-G	KN03 + クエン酸 + CaCO <sub>3</sub> + Giltay培地

#### 2-2-2 分離菌による硝酸除去（脱窒）試験

分離した菌を用いて、硝酸除去試験をそれぞれ行い、脱窒能を確認した。硝酸カリウム溶液（1,000mg/l）50mlにサンプルを1g浸漬させ、経時的にイオンクロマトグラフ（ダイオネクス社製：DX-500）で硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度を測定した。

#### 2-2-3 分離菌の生化学的性状確認試験

純粋培養した菌それぞれについて、Catalase、Oxidase、TSI試験（乳糖・白糖分解/ブドウ糖分

\*1 資源環境部

\*2 非常勤職員（現：衛生環境研究所）

表2 分離菌の生化学的性状確認試験結果

No.	分離培地	Catalase	Oxidase	T S I *		S I M		
				乳糖・白糖分解	ブドウ糖分解・ガス産生	運動性	H2S 産生	IND
1	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
2	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
3	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
4	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
5	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
6	N-B-N	+	+	NC	NC	+	-	-
7	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
8	N-B-N	+	+	NC	NC	-	-	-
9	KN03-N	+	-	A	AG	-	-	-
10	KN03-N	+	-	A	AG	-	-	+

No.	硝酸還元塩	クエン酸塩	マロン酸塩		イオンクロマト測定*	
			24H	48H	KN03	KN02
1	+	-	-	-	1	2
2	+	-	-	-	1	2
3	+	-	-	-	2	2
4	+	+	-	-	1	3
5	+	+	-	-	1	3
6	+	-	-	-	1	2
7	+	+	-	-	1	3
8	+	-	-	-	1	3
9	+	+	+	+	1	3<
10	+	+	+	+	1	3<

\* AG=酸性（黄色）及びガス産生、A=酸性（黄色）、NC=変化なし、ALK=アルカリ性（赤色）

\* イオンクロマト測定：KN03、KN02 が発生→消滅に要した日数。

解・ガス産生)、SIM試験(運動性/H2S産生/IND)、硝酸塩還元、クエン酸塩利用性およびマロン酸塩利用性(24H/48H)についての試験を行った。

Catalase試験については、カタラーゼテスト(スライドガラス法)を用い、Oxidase試験は、市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用濾紙(日水製薬(株)製)を用いて判別した。また、TSI寒天培地、SIM寒天培地、シモンズクエン酸ナトリウム培地、マロン酸塩培地を用い、それぞれの性状を調査した。また、別個にインドール反応試験を行い、硝酸塩還元試験には、処理液にα-ナフチルアミン溶液とスルファニル酸溶液を添加し、その赤変により判別を行った。

## 2-3 分解菌の同定

### 2-3-1 DNAの抽出

純粋分離した分解菌株から、InstaGene DNAPurification Matrix (BIO-RAD社製)を用い、プロトコールに従ってDNAを抽出した。得られた抽出物をDNA試料とし、後述のPCR用鋳型とした。

### 2-3-2 PCRおよびシーケンス

純粋分離した微生物の同定を行うために、菌体から抽出したDNAを鋳型としたPCR(Primer 5F、531Rを使用)によって16S rDNAを増幅し、塩基配列を解析した。PCR、シーケンス反応及び微生物の同定には、Microseq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing kit (PE Applied Biosystems社)、ABI Pri

sm 310 Genetic Analyzerにより解析した。また、微生物の同定には、同社製の解析ソフトMicroSeq Analysis Softwareを使用した。また、あわせてMicroSeq 16S rDNA Sequence Databasesおよびインターネット上データベースによる検索を行った。

### 3 結果および考察

#### 3-1 分離培養および生化学的性状確認試験結果

分離培養試験において、発生したコロニーを採取し、普通寒天培地で継体培養し、純粋培養を行った。その後、単離した菌についてそれぞれ硝酸除去試験を行い、脱窒能を示した菌株を脱窒菌とし、生化学的性状確認試験に用いた。最終的には、135菌株を得ることができた。その中の高い脱窒能を示した10菌株についての結果を表2に示す。

得られた菌株のコロニーの性状は、視覚的には似通ったものであった。しかし、表2に示すように『9』『10』のTSI結果およびマロン酸塩利用性が他と異なることから、『1』～『8』とは、違う種であることが推測された。

#### 3-2 シーケンス結果

表2中の6株の同定結果を表3に示す。表2と表3のNo.は、それぞれ対応している。

表3 同定結果

No.	シーケンス結果 (500bp)
1	<i>Klebsiella. sp</i>
2	<i>Ochrobacterium. sp</i>
3	<i>Ochrobacterium. sp</i>
4	<i>Achromobacter. sp</i>
5	<i>Klebsiella. sp</i>
9	<i>Pseudomonas. sp</i>

今回の上位10菌株以外の有用菌において、*Enterobacter. sp.*、*Bacillus. sp.*なども検出されたが、ほとんどは*Klebsiella. sp.*、*Ochrobacterium. sp.*であった。有用菌については、順次遺伝子解析を行っているが、この2種が全体に占める割合として高くなることが推測された。

### 4 まとめ

(1) 竹粉の硝酸除去試験処理液から、様々な培

地を使用して脱窒菌の分離を試みた結果、135株の菌株が得られた。

- (2) 硝酸除去試験における上位10菌株の生化学的性状確認試験の結果、TSIおよびマロン酸塩利用性の項目に差異が見られたことから、少なくとも2種以上の菌であることが推測された。
- (3) 得られた菌株について、遺伝子解析による同定試験を行った結果、*Klebsiella. sp*および*Ochrobacterium. sp*が多く検出された。