

海水中難分解性有機物の分解微生物の探索に関する研究

伊藤 禎彦*・村上 仁士**・細井 由彦***・板東 広之****

1. 結 言

現在、海水の直接浄化のためには、主として隙間生物膜法が注目され、研究開発が進められている（たとえば通産省，1991）。浄化対象物質は濁質，窒素，リン，有機物などであるが，これまでの研究結果からは，特に有機物に対する除去効果が低い点が特徴であることが明らかになってきた（小田ら，1992）。ところで，海域には，河川域で生物分解作用を受けた後の有機物が流入すること，また海水中に生息する生物による長時間の分解作用を受けた後の有機物が残存していることから，海水中有機物は，本来，生物分解作用を受け難い有機物で構成されていると考える必要がある（服部ら，1982）。

本研究は，この海水中に存在する生物難分解性の有機物に着目し，これを積極的に分解・除去する方法を開発しようとするものである。すなわち，海水中難分解性有機物を分解する能力を有する細菌を見出した上で，これを工学的に活用することにより，分解・除去が可能な有機物の範囲を格段に広げを試みる。

本研究では，まず，海水中有機物が，実際に生物難分解性であることを実証することを試みた。次いで，難分解性有機物の分解性に優れた細菌の探索を行うとともにその菌名を同定した。さらに，得られた有用菌の工学的利用性について検討するため，細菌を包括固定化した上で海水中有機物の分解性を調べた。

2. 環境水中の同化可能有機炭素 (AOC) の測定

(1) AOC 測定方法の確立

同化可能有機炭素 (Assimilable Organic Carbon; AOC) とは，水中に存在する有機物のうち，生物が容易に利用 (同化) する量を表す指標である。この指標は水道の給配水系統で発生する細菌の再増殖に関する研究の中で，細菌の栄養源となる有機物質の濃度を測定するために開発された (McFeters, G. A., 1992; van der Kooij ら，1982)。本研究では，まずこの測定法を確立し

た。

AOC 濃度は，試料水を培地として，ある特定の細菌を純培養したときの最大増殖量によって決定される。AOC 濃度は，次式で求められる。

$$AOC(\mu\text{g-C/l}) = \frac{N_{\text{max}}(\text{CFU/ml}) \times 1000}{Y(\text{CFU}/\mu\text{g-C})} \dots (1)$$

ここに， N_{max} ；1 ml 当りの最大コロニー数 (Colony Forming Unit/ml, CFU/ml)， Y ；特定基質 (酢酸あるいはグルコース) に対する収率である。

測定に用いる細菌は，van der Kooij らの方法にしたがって，多種類の有機化合物を低濃度でも基質として利用することができる，*Pseudomonas fluorescens* を用いる。*P. fluorescens* は，徳島県内の海岸より探索し，単離，同定した (稲木，1992)。また，収率 Y の決定には酢酸ナトリウムを用いる。

収率を求める手順は，まず *P. fluorescens* を低栄養状態に慣らすために，炭素量 (酢酸-C) が 1 mg-C/l 程度の液体培地で前培養する。次に，表-1 に示す炭素化合物利用培地 (長谷川ら，1975) 中に有機物 (酢酸-C が，一定の濃度範囲 ($0 \sim 50 \mu\text{g-C/l}$)) を加えた培地を作製し，この培地中に前培養した *P. fluorescens* を接種し 15°C ，暗所で静置して培養する。この間，*P. fluorescens* の増殖量を測定し，その最大増殖量を求めて炭素量との関係を図-1 のように得る。表-2 に人工海水の組成を示す。

この関係より *P. fluorescens* の酢酸ナトリウムに対する収率を次のように得た。

$$Y = 8.03 \times 10^6 (\text{CFU}/\mu\text{g-C}) \dots \dots \dots (2)$$

(2) 環境水の AOC 測定結果

小松海岸沿岸水ならびに吉野川，徳島市内の新町川水系 (新町川，田宮川) の河川水および徳島市下水処理場

表-1 炭素化合物利用培地の組成

NH_4NO_3	1.0 g
KH_2PO_4	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.2 g
人工海水	1000 ml
pH	7.2

* 正 会 員 工 博 徳島大学講師 工学部建設工学科
** 正 会 員 工 博 徳島大学教授 工学部建設工学科
*** 正 会 員 工 博 鳥取大学教授 工学部社会開発システム工学科
**** 学生会員 徳島大学大学院 工学研究科建設工学専攻

表-2 人工海水の組成

NaCl	23.476 g
MgCl ₂	4.981 g
Na ₂ SO ₄	3.917 g
CaCl ₂	1.102 g
KCl	0.664 g
NaHCO ₃	0.192 g
蒸留水	1000 ml

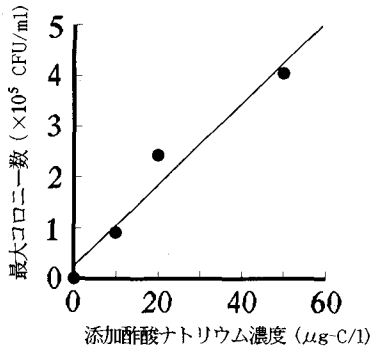
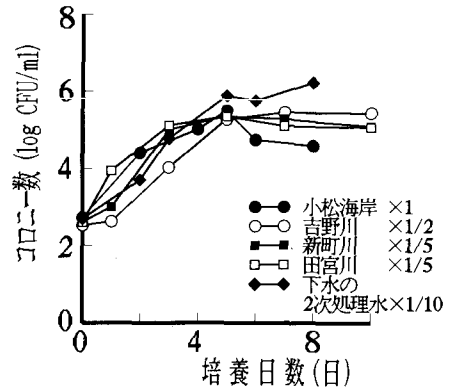
図-1 添加酢酸ナトリウム濃度と *P. fluorescens* の最大増殖量との関係図-2 環境水中での *P. fluorescens* の増殖曲線

表-3 環境水の AOC 濃度

	最大コロニー数 N_{max} (CFU/ml)	AOC ($\mu\text{g acetate-C/l}$)
小松海岸	3.12×10^5	39
吉野川	2.85×10^5	71
新町川	2.24×10^5	140
田宮川	2.26×10^5	140
下水の2次処理水	1.65×10^6	2060

表-4 溶存態有機炭素 (DOC) に占める AOC の割合

	DOC (mg/l)	AOC/DOC $\times 100\%$
小松海岸	2.2	1.7
吉野川	2.2	3.2
新町川	2.3	6.0
田宮川	4.1	3.4
下水の2次処理水	23.3	8.8

の2次処理水について AOC を測定した。AOC 測定に当たり、試料は孔径 $1.0 \mu\text{m}$ のグラスファイバーフィルターでろ過し、また河川水、下水の2次処理水については、市販の純水で希釈して実験を行った。希釈倍率は、吉野川 $\times 1/2$ 、新町川、田宮川、 $\times 1/5$ 、2次処理水 $\times 1/10$ である。

試料水を三角フラスコに 200 ml 入れ、水中の細菌を不活化させるため、 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 、30 分間加熱処理する。冷却後、各試料水に低栄養状態で前培養した *P. fluorescens* を接種し、 15°C 、暗所で静置して培養する。この間、*P. fluorescens* の増殖量を測定する。図-2 に試料水中での *P. fluorescens* の増殖を示す。

各試料水中での *P. fluorescens* の最大コロニー数をもとに、式(1)より各試料水の AOC 濃度を求めた。AOC の値は、試料水中の有機物を酢酸ナトリウムとみなし、その炭素量 ($\mu\text{g acetate-C/l}$) で表される。表-3 に各試料水中での *P. fluorescens* の最大コロニー数と AOC 濃度を示す。また表-4 に、溶存態有機炭素 (DOC) に占める AOC の割合 (AOC/DOC) を示す。

表-3 より、市街地を流れ生活排水や工場排水が流入する新町川水系の新町川、田宮川、および下水の2次処理水に含まれる同化可能有機炭素は、140、140、2060 $\mu\text{g acetate-C/l}$ であったのに対し、海域である小松海岸沿岸水の AOC 濃度は、39 $\mu\text{g acetate-C/l}$ であり、河川水に含まれている同化可能有機炭素の量に比べてかなり小

さいことがわかった。

また表-4 より、各試料水の DOC に占める AOC の割合 (AOC/DOC) を比較しても、新町川、田宮川および下水の2次処理水は、それぞれ、6.0%、3.4%、8.8% であったのに対して、小松海岸沿岸水の割合は 1.7% と小さい。すなわち、海水中の有機物は他の環境水のそれに比べて生物によって分解され難いものの割合が高いことが推察できた。

3. 有用細菌の探索

(1) 細菌の馴致

a) 実験方法

有機物の分解性に優れた細菌の探索に当たり、はじめに徳島県内の海岸構造物より採取した付着細菌を濃縮海水中で長期間培養を行い、この間に有用な細菌群を蓄積させることを試みた。濃縮海水は、小松海岸沿岸水を XAD

-2 イオン交換樹脂に通水した後、その吸着成分をジエチルエーテルで抽出し、エバポレータで乾固した残渣を蒸留水に再溶解して作製した。容量 20 ml の L 型試験管に、炭素化合物利用培地、および炭素源として濃縮海水を TOC 濃度約 100 mg/l となるように添加し、これに付着細菌を接種して振とう培養した。なお、培養期間中有機物濃度 (TOC) の変化を測定した。

b) 馴致の結果

培養期間中有機物濃度の変化を図-3 に示す。培養初期の段階では、1 ヶ月以上の期間で緩やかに有機物を分解していることがわかる。そこで、培養開始から 50 日を経過した時点で再び、濃縮海水を TOC 約 100 mg/l となるように加えたところ、わずか数日間で 90 % 以上の有機物を分解した。この結果は、海水中有機物が高濃度に存在する環境下での長期間の培養によって、難分解性有機物に対する分解能力を有する細菌を選択的に培養、あるいは新たに分解能力を有する細菌を育種できたことを示すものである。

(2) 単離菌の分解テスト

次に、この蓄積された細菌群の中から、特に優れた海水中有機物分解能力を有する細菌を探索するため、細菌を個々に単離し、その単離菌の海水中有機物分解テストを行った。

a) 細菌の単離

炭素源として濃縮海水を添加した炭素化合物利用寒天培地に、L 型試験管で蓄積された培養菌液を添加し、平板上にコロニーを形成させる。このコロニーが十分に成長した時点で、形成されたコロニーの形、色などにより細菌のグループ分けを行い、それぞれのコロニーを白金耳でかきとり、寒天平板培地に画線培養する。この操作を数回繰り返すことによって菌体の単離を行った。

b) 菌体の洗浄と濃縮

寒天培地上に形成された各グループの細菌のコロニーを白金耳でかきとり、pH 7.2, 67 mM のリン酸緩衝液に入れ、3000 回転、5 分間遠心分離し菌体の濃縮と菌体に

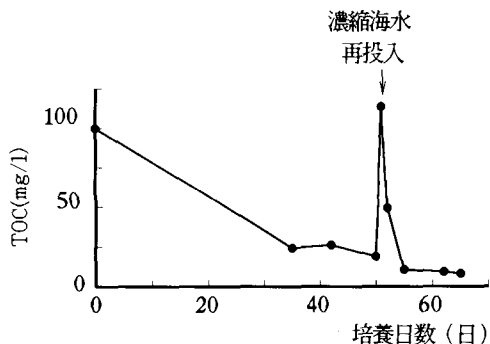


図-3 難分解性有機物の分解細菌の集積培養における有機物濃度の変化

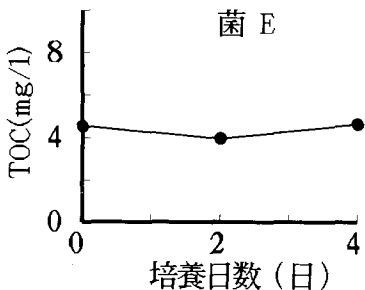
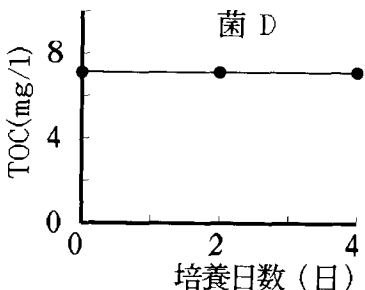
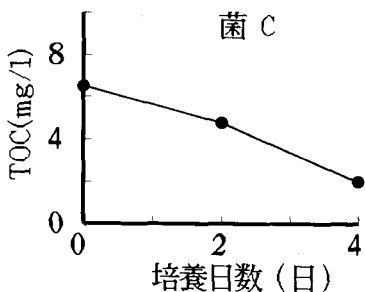
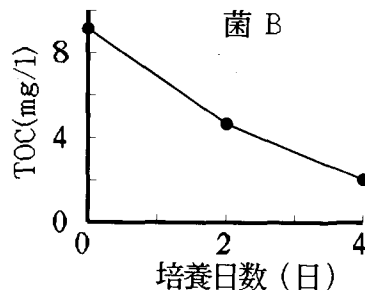
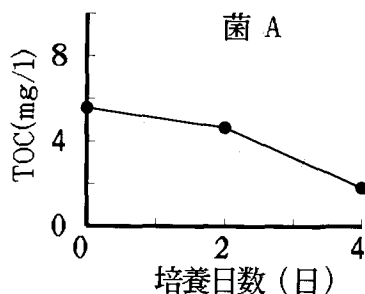


図-4 単離菌による海水中有機物の分解テスト

表-5 同定試験結果

試験項目	判 定		
	菌 A	菌 B	菌 C
グラム染色	—	—	—
オキシダーゼ	+	+	+
マッコンキー寒天培地	+	—	+
嫌気ブドウ糖	+	+	+
好気ブドウ糖	+	+	+
マルトース	+	+	+
白糖	+	+	+
キシロース	+	+	—
嫌気アルギニン	—	—	—
嫌気リジン	—	—	—
嫌気オルチニン	—	—	—
嫌気尿素	—	—	—
ONPG	+	+	+
インドール	—	—	—
硝酸塩還元	—	—	+
窒素ガス	+	—	—
デンプン	—	—	—
フェニルアラニン	—	—	—
クエン酸塩	—	—	+

表-6 固定化細菌による有機物分解実験結果

	初期	2日後	除去率 (%)
TOC (mg/l)	16.3	13.0	20.3

した。固定化剤には、ポリビニルアルコール (PVA) を用いた。PVA は、人工臓器 (人工血管など) にも用いられている物質である (田村ら, 1982)。

(1) 実験方法

a) 濃縮菌液の作製

1/10 Anderson 液体培地に、純培養した *Pseudomonas paucimobilis* を接種し、振とう培養を行った。接種した菌液は、数日間で飽和量まで増殖する。菌体の濃縮は、3000 回転、5 分間遠心分離し、菌体を沈澱させることによって行った。得られた濃縮菌体は、さらに培地成分の洗浄を目的として、pH 7.2, 67 mM リン酸緩衝液を加え、ピペッティングにより菌体を再浮上させ、遠心分離を繰り返して洗浄操作を行った。その結果 1 ml 当り 1.1×10^{10} の濃縮菌液を得た。

b) 細菌の固定化

PVA による細菌の固定化手順を以下に示す。

- 1) 市販の PVA (重合度 2000, 鹼化度 99.5 % 以上) を蒸留水に 15 % になるように入れる。
- 2) オートクレーブで 1.2 気圧, 120°C, 1 時間加熱, 溶解する。
- 3) 室温まで冷却後、濃縮菌体を混ぜる。
- 4) 任意の形状に成型する。(直径 45 mm, 円盤型)
- 5) -20°C で 24 時間置く。
- 6) 5°C で 24 時間置き、徐々に解凍する。
- 7) ゲル化した固定細菌を十分に水洗いした後、実験に供する。

c) 分解実験

実験は、容量 300 ml の三角フラスコに、水洗後の固定化細菌と炭素化合物利用培地に濃縮海水を加えた液 200 ml を入れ、振とう条件下で有機物分解能を調べた。

(2) 実験結果

結果を表-6 に示す。濃縮海水中の有機物が、2 日間で 20.3 % 除去されており、PVA 中に包括固定化された細菌によっても有機物分解を行わせることができた。分解速度を単離菌と PVA 固定化細菌を比較してみると図-4 の結果から単離菌では、 6.1×10^{-10} mg/菌体・day、それに対して固定化細菌では、 1.1×10^{-11} mg/菌体・day と 1 菌体当りの分解速度は 1/56 にすぎないことがわかった。この原因として、固定化細菌が PVA 中に基質を効率的に取り込めていないことが考えられる。

付着している培地成分の洗浄を行った。この結果、各グループとも 1 ml 当り、 $1.5 \times 10^6 \sim 5.7 \times 10^6$ の濃縮菌液を得た。

c) 分解テスト結果

容量 20 ml の L 型試験管に、小松海岸沿岸水を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで除菌ろ過して入れた後、各グループの菌液を接種し、15 回/分で振とうしつつ分解実験を行った。結果の例を図-4 に示す。

図-4 より、菌 D、菌 E のように分解能力を示さないものもあったのに対し、菌 A、菌 B、菌 C のように優れた分解能力を有する細菌を見い出すことができた。菌 A、菌 B、菌 C のそれぞれの有機物除去率は、67 %, 77 %, 69 % と他の細菌と比較して大きな有機物分解能力を示した。

d) 細菌の同定

以上のように、優れた分解能力を示した 3 種類の菌株について、同定試験を行った。同定試験システムとしては、米国 BBL 社製ミニテック TM を用いた。同定試験の結果を表-5 に示す。

この結果、菌 A は、*Flavobacterium multivorum*, 菌 B は、*Pseudomonas paucimobilis*, 菌 C は、*Vibrio fluvialis* であることがわかった。

4. 固定化細菌による浄化効果

次に、有用菌の工学的利用性について検討するため、特に優れた有機物分解能力を有する菌 B、*Pseudomonas paucimobilis* を包括固定化し、その分解能について検討

5. 結 論

本研究で得られた成果を要約する。

1) 海水、河川水などの環境水の AOC を測定した結果、海水中の AOC は、他の環境水のそれに比べ低く、また AOC/DOC の割合も小さいことから海水中の有機物は、河川水などに比べ生物的に分解され難いもので構成されていると推察できた。

2) 濃縮した海水中で現地の海岸構造物より採取した付着細菌を長期間培養した結果、有機物の分解性に優れた細菌群を蓄積することができ、その中でも特に優れた分解能を有する細菌として、*Flavobacterium multivorum*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Vibrio fluvialis* の3種類の細菌を単離、同定した。

3) 海水中の有機物分解に有用であった細菌の工学的利用性について検討するために、*Pseudomonas pacimobilis* を PVA を用いて包括固定化し、海水中有機物の分解性について実験的検討を行った結果、海水浄化に利用できる可能性を示し得た。

謝辞：本研究を進行するにあたり、ご協力いただいた

稲木義治氏(徳島県庁)に謝意を表する。また本研究は、鉄鋼業環境保全開発基金ならびに文部省科学研究費試験研究(B)(代表者：日本大学助教授、前野賀彦)の補助を受けた。ここに記して謝意を表する。

参 考 文 献

- 稲木義治 (1992): 海水中難分解性有機物の分解微生物の探索に関する研究, 徳島大学卒業論文, 45 p.
- 通商産業省工業技術院中国工業技術試験所 (1991): 海洋環境改善に関する技術開発の動向調査報告書, 185 p.
- 小田一紀・貫上佳則・重松孝昌・大屋博史・綱 潔之・倉田克彦 (1992): 礫間生物膜の海水浄化効果と現地へのその応用に関する研究, 海岸工学論文集, 第39巻(2), pp. 991-995.
- 田村康一・水野 浩・中村達雄・加藤弘文・清水慶彦・寺松 孝・南部昌生(1982): 第四回バイオマテリアル学会大会論文集, pp. 249-250.
- 長谷川武治 (1975): 微生物の分類と同定(下), 学会出版センター, pp. 133-134.
- 服部明彦 (1982): 海洋学講座第7巻海洋生化学, 東京大学出版会, pp. 141-173.
- McFeters, G. A. 編, 金子光美監訳 (1992): 飲料水の微生物学, 技報堂出版, pp. 55-78.
- Dirk van der Kooij, A. Visser and W. A. M. Hijnen (1982): Determining the Concentration of Easily Assimilable Organic Carbon in Drinking Water, Journal of the American Water Works Association, pp. 540-545.