

II-176

放線菌 *Nocardia amarae* の炭化水素依存特性に関する基礎的検討

大阪大学 正員 岩堀恵祐 正員 藤田正憲 岩崎大介

1. はじめに

演者ら¹⁾は、先に、放線菌 *Nocardia amarae* が、炭素数12から20までの直鎖状炭化水素（正ⁿ-パラフィン）をよく資化し、特に炭素数18のⁿ-オクタデカンでは基質特異性を、さらに炭素数16のⁿ-ヘキサデカンでは特異的な菌塊形成能を持つことを報告した。このような正ⁿ-パラフィンの曝気槽内での存在・挙動は、今後の大きな検討課題であるが、*N. amarae* の異常増殖を誘発する可能性も極めて高いので、その濃度に対する依存特性を明らかにする必要がある。ここでは、ⁿ-ヘキサデカン並びにⁿ-オクタデカンを炭素源として、各種初発濃度における *N. amarae* の依存特性を回分培養実験で種々検討したので、その概要を報告する。

2. 実験材料並びに方法

○ 供試微生物： 堺ら²⁾がⁿ-オクタデカンより分離し、*N. amarae* と同定した菌株を分与され、MS寒天培地（ⁿ-オクタデカン・プロピオン酸ソーダ主体）で継代保存したものを実験に供した。

○ 供試培地： *N. amarae* の前培養にはMS培地（MS寒天培地から寒天を除いたもの）を、また回分培養には表1の正ⁿ-パラフィン培地（PHC培地）をそれぞれ用いた。但し、各培地のTOC濃度は100 mg/ℓ、300 mg/ℓ、500 mg/ℓ 並びに1000 mg/ℓ に調製し、その濃度に比例した栄養塩を添加して、実験を行った。なお、各炭素数に応じて、ⁿ-ヘキサデカンを炭素源とした培地をPHC(16)培地、ⁿ-オクタデカンの場合をPHC(18)培地と、以後それぞれ略した。

○ 実験方法： 300 ml容の三角フラスコにMS培地100 mlを投入し、*N. amarae* を1白金餌植菌後、28℃、120 rpmで3～4日間振盪培養したものを前培養液とした。次に、300 ml容の三角フラスコに各PHC培地を100 ml投入し、*N. amarae* の初発濃度が約5 mg/ℓ となるように前培養液を植菌して、同様の振盪培養を行った。同一培地について三角フラスコを数本用意し、適宜、培養液の菌体濃度、pHを測定した。また、2本の三角フラスコには、前培養液を添加せず、培地由来の乾燥重量を実験開始時に求めて、菌体濃度を補正した。なお、菌体濃度はろ紙法（1μmのミクロンフィルター）で、pHはpH計でそれぞれ測定した。

3. 実験成績並びに考察

PHC(16)培地並びにPHC(18)培地における菌体濃度の経日変化を図1、図2にそれぞれ示した。また、培養期間中、顕著なpHの変化は認められなかったため、脂肪酸等の蓄積が生じなかったものと考えられる。

○ *N. amarae* の増殖と炭化水素依存特性： 各培地・各初発濃度とも菌体の増殖が認められ、培養開始1～2日までは対数増殖期であるので、その期間の比増殖速度（ μ ）を算出し、初発TOC濃度と μ 値の関係を図3に示した。各培地とも、初発TOC濃度の低下に伴って、 μ 値は減少した。また、PHC(18)培地では、初発TOC濃度が低くなるほど、長いlag phaseが生じたが、PHC(16)培地では認められなかった。さらに、各培地とも、培養初期に *N. amarae* が培養液上層の正ⁿ-パラフィンと水の界面に集積され、時間経過とともに菌塊を形成して底部に沈降したが、培養期間が短かったため、ⁿ-ヘキサデカンでの特異的な円盤状の菌塊は形成されなかった。一方、菌塊形成能の高い炭化水素資化細菌は、利用可能な基質の大部分が生物学的乳化剤由来の油滴であり、その菌塊への取り込みが細菌の増殖速度を決定する³⁾といわれている。この考えは、菌塊の形成と油滴の取り込みがⁿ-ヘキサデカンとⁿ-オクタデカンでは異なることを示唆しており、今後の重要な課題である。

○ 動力学的検討： 微生物の比増殖速度（ μ ）と基質濃度（ ℓ ）の関係は、最大比増殖速度恒数を μ_{max} （1/日）、飽和恒数を K_m （mg/ℓ）とすると、一般に次のMonod型のミカエリス・メンテン式が成立する。

表1 正ⁿ-パラフィン培地の組成

組 成		濃 度
炭 素 源	ヘキサデカン	1.53 ml/ℓ
	オクタデカン	1.18 ml/ℓ
栄 養 塩	酵母エキス	1.0 g/ℓ
	NaCl	0.303 g/ℓ
	KCl	0.14 g/ℓ
	CaCl ₂	0.18 g/ℓ
	NH ₄ Cl	0.35 g/ℓ
	MgSO ₄	0.2 g/ℓ
TOC濃度 pH		1000 mg/ℓ 7.4

注) pHはM/15のリン酸バッファーで調整し、栄養塩は各炭素源にそれぞれ添加した。

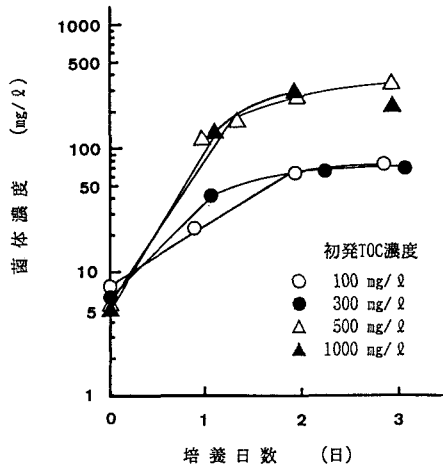


図1 PHC(16)培地における菌体濃度の経日変化

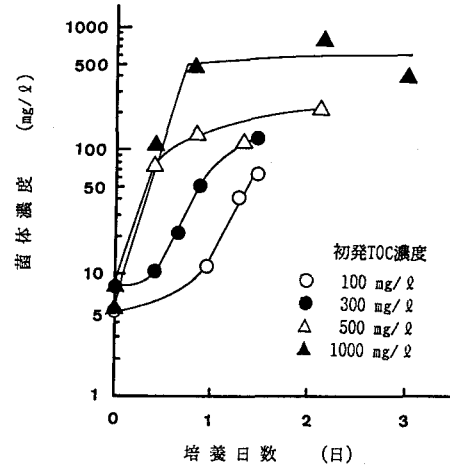


図2 PHC(18)培地における菌体濃度の経日変化

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot l_0}{K_m + l_0} \quad (1)$$

今、初発TOC濃度を l_0 (mg/L)、TOC除去率を β (%) とすると、式(1)は次式のように整理できる。

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot l_0}{\frac{K_m}{1 - \beta} + l_0} \quad (2)$$

ここで、除去率 β が一定であれば、 $K_m/(1 - \beta)$ も一定で、これを修正飽和恒数 K_m' とおくと、 μ と l_0 の関係はMonod型で表される。そこで、先の実験成績から、Hofstee型の逆数変換プロットを行うと、図4のような高い相関関係を示したので、初発TOC濃度にかかわらず、 β は一定であることが示唆された。また、 $\mu_{\max}$ 値は、PHC(16)培地で2.27 (1/日)、PHC(18)培地で5.79 (1/日)、 K_m' 値は、PHC(16)培地で49.5 mg/L、PHC(18)培地で98.2 mg/Lの各値が算出された。培養方法、炭素源などが異なるので、一概に比較はできないが、この $\mu_{\max}$ 値は、放線菌、糸状性細菌に関する既往文献値とほぼ同程度であり、また活性汚泥細菌のそれよりは低い値を示している。また、*N. amarae* はバクテリア・バクテリアを資化しても、活性汚泥細菌よりも高い μ 値を得ることができないと考えられる。さらに、除去率により異なるが、 K_m' は K_m よりも数倍高い値であり、特異的に資化できる正パラフィンといえども、グルコース、酢酸などを炭素源とした活性汚泥細菌の K_m 値よりも大きな値を示し、基質親和性が低いといえる。

4. まとめ

N. amarae は、100 mg/L の低TOC濃度でもバクテリア並びにバクテリアをよく資化できた。しかし、バクテリアでは、初発濃度が低くなるとLag phaseが現れたが、バクテリアでは全く認められなかった。*N. amarae* の比増殖速度と初発TOC濃度には、Monod型の式が成立し、その $\mu_{\max}$ 値はバクテリアで2.27 (1/日)、バクテリアで5.79 (1/日)、また K_m' 値は前者で49.5 mg/L、後者で98.2 mg/Lであった。

〈参考文献〉 1) 藤田ら：衛生工学研究論文集、27、75 (1991) 2) 堺ら：下水道協会誌、25 (294)、35 (1988) 3) Kulkarni, K. et al.: Chem. Eng. Commun., 45, 19 (1986)

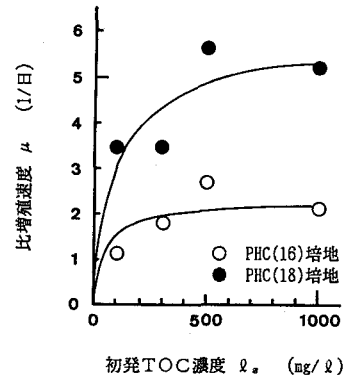


図3 比増殖速度 μ と初発TOC濃度 l_0 の関係 (μ は対数増殖期の値)

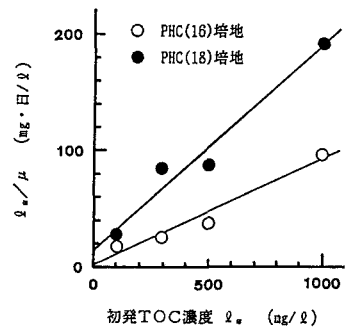


図4 Hofstee型逆数変換プロット