

II-398 放線菌 *Rhodococcus* sp. の基質特異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 王 関

1. はじめに

演者ら¹⁾は、先に、各種脂肪酸と炭化水素（正パラフィン）を用いた *Nocardia amarae* の回分培養実験により、炭素数2から5までの低級脂肪酸に対して基質特異性を、また炭素数12から20までの炭化水素をよく利用し、特に炭素数18のオクタデカンでは特異的な基質利用能を、さらに炭素数16のヘキサデカンでは特異的な菌塊形成能をもつことを報告した。本研究では、*N. amarae* と同じ発泡原因微生物と報告されている *Rhodococcus* sp. を用いた同一基質・同様操作の回分培養実験から、その基質特異性を検討した。

2. 実験材料並びに方法

○ 供試菌株：MS寒天培地（*グルコース・プロピオン酸ソーダ*主体）で継代保存した *R. rhodochrous* ATCC13808、*R. erythropolis* ATCC4277を用いた。なお、約1500mg/ℓの活性汚泥に対して約750mg/ℓの菌株をそれぞれ混合し、合成下水（肉エキス・ペプトン主体）を添加・曝気したところ、両菌株とも、活性汚泥のみの場合とは異なる粘性の高い発泡が生じたことを確認している。

○ 供試培地：前報¹⁾と同様に、前培養にはMS培地（MS寒天培地から寒天を除いた培地）を、基質利用については表1の培地並びにMS培地をそれぞれ用いた。なお、MS培地の場合には、TOC濃度をFA培地やPHC培地と同じ1000mg/ℓに調製して用いた。

○ 実験方法：300ml容の三角フラスコに供試培地を100ml投入し、MS培地で前培養（2日間）した両菌株を初発菌体濃度5～10mg/ℓになるようにそれぞれ植菌してから、28℃で回転振盪（120rpm、振幅5mm）した。同一培地の実験では、三角フラスコを約10本用意し、適宜1本の三角フラスコ内培養液の菌体濃度を測定した。菌体濃度の測定は、1μmのミリポアフィルターによる紙法で行った。なお、2本の三角フラスコには、*Rhodococcus* sp. を植菌せず、実験開始並びに終了時に培地由来の乾燥重量を求めて、菌体濃度を補正した。また、実験終了時には、培養液のpHをpH計で測定した。

3. 実験成績並びに考察

FA培地における *R. rhodochrous* の菌体濃度の経時変化を代表例として図1に示した。その他の実験でも本図と同じような経時変化が得られた。そこで、対数増殖期における比増殖速度 μ を算出して表2に一括表示し、またFA培地並びにPHC培地における各培地の炭素数と μ 値の関係を、先に報告した *N. amarae* の μ 値とともに、図2に示した。なお、MS培地における *N. amarae* の μ 値は1.76（1/日）である。また、増殖が確認されたFA培地やMS培地でも、先の *N. amarae* で認められたようなpHの上昇はあまり起こらず、PHC培地でのpHはほとんど変化しなかった。

表1 各種脂肪酸並びに炭化水素を炭素源とした培地の組成

炭 素 源	添 加 量	培地名称	炭 素 源	添 加 量	培地名称
[脂 肪 酸]			[炭 化 水 素]		
・ 蟻酸ソーダ	5.67 g	FA (1)	・ オクタン	1.70 ml	PHC (8)
・ 酢酸ソーダ	3.42 g	FA (2)	・ デカン	1.62 ml	PHC (10)
・ プロピオン酸ソーダ	2.67 g	FA (3)	・ ドデカン	1.58 ml	PHC (12)
・ 酪 酸	1.91 ml	FA (4)	・ テトラデカン	1.55 ml	PHC (14)
・ 吉草酸	1.81 ml	FA (5)	・ ヘキサデカン	1.53 ml	PHC (16)
・ カプリオン酸ソーダ	1.92 g	FA (6)	・ オクタデカン	1.18 g	PHC (18)
・ カリル酸ソーダ	1.73 g	FA (8)	・ エイコサン	1.18 g	PHC (20)
・ カプリン酸ソーダ	1.62 g	FA (10)			
・ ラウリン酸ソーダ	1.54 g	FA (12)			

上記の炭素源に、酵母エキス 0.1 g、NaCl 0.303 g、KCl 0.14 g、CaCl₂ 0.18 g、MgSO₄ 0.2 g、NH₄Cl 0.35 gをそれぞれイオン交換水1ℓに添加して調製した（TOC 1000 mg/ℓ、pH 7.5）。なお、脂肪酸を炭素源とした培地をFA培地、炭化水素（正パラフィン）を炭素源とした培地をPHC培地とそれぞれ略し、括弧内の数字はその炭素数を表す。

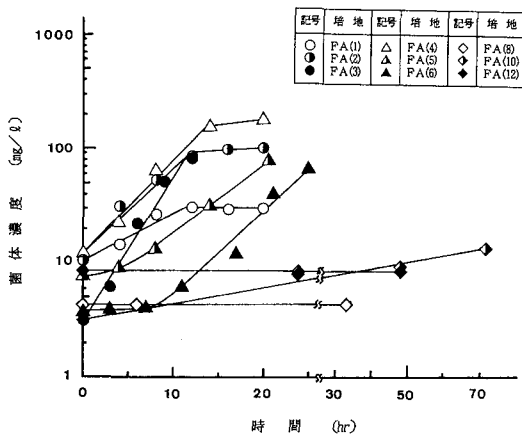


図1 F A培地における菌体濃度の経時変化
(*R. rhodochrous* の場合)

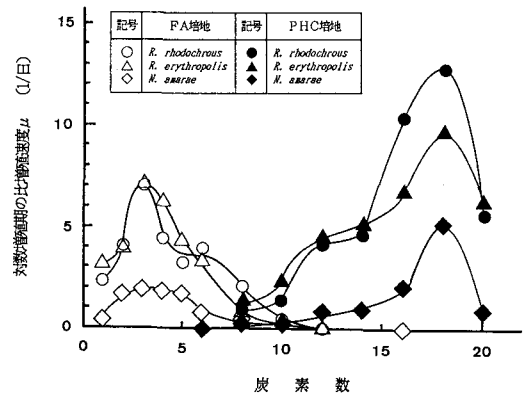


図2 炭素数と対数増殖期の μ 値の関係

表2 対数増殖期の比増殖速度 μ

培地	菌株	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
FA (1)		2.30	3.18
FA (2)		4.11	3.91
FA (3)		7.00	7.09
FA (4)		4.47	6.25
FA (5)		3.21	4.34
FA (6)		3.93	3.27
FA (8)		2.15	0.78
FA (10)		0.48	0.40
FA (12)		0.0	0.0
PHC (8)		0.87	1.52
PHC (10)		1.49	2.37
PHC (12)		4.18	4.65
PHC (14)		4.60	5.19
PHC (16)		10.40	6.73
PHC (18)		12.95	9.74
PHC (20)		5.75	6.34
MS		6.80	9.99

注) 単位は [1/日] である。

両菌株とも、F A培地では炭素数1～6の脂肪酸をよく利用するが、特に炭素数3のプロピオン酸では特異的な基質利用能を有し、炭素数10以上の脂肪酸を利用できないことが明らかとなった。また、P H C培地では、炭素数12～20の炭化水素を利用するが、特に炭素数18のオクタデカンの特異的に利用することがわかった。炭素数20のエイコサンの融点は36.6℃で、実験期間中、固体であったが、この μ 値は、両菌株とも、炭素数14のテトラデカンのそれよりも高い値が得られた。一般に、固体よりも液体の方が資化されやすいはずであるが、*Rhodococcus* sp.はC₂₀に対して高い基質親和性を有しており、極めて興味深い知見である。なお、炭素数7以下や炭素数21以上のP H C培地での μ 値は、図2の傾向から、かなり低い値を示すことが予想される。これらの基質利用能は、*N. amarae*でも認められることから、発泡原因微生物である放線菌は脂肪酸や炭化水素に対して特異的な基質利用能を有していると判断できる。次に、基質利用からみた*N. amarae*と*Rhodococcus* sp.を比較すると、両者は同じパターンで脂肪酸や炭化水素を利用するが、*Rhodococcus* sp.は、*N. amarae*よりも、F A培地で約2～11倍、P H C培地で約2～8倍の μ 値を示し、高い増殖能をもつ菌株であるといえる。また、*N. amarae*は炭素数2～5のF A培地で同程度の μ 値であったが、*Rhodococcus* sp.の場合には、プロピオン酸で特に高い値が得られた。これは、*N. amarae*よりも約4～5倍の μ 値がMS培地で得られたことから裏付けられる。さらに、活性汚泥及びその優占菌(TOC除去率50%以上の菌株)を用いた橋本ら²³⁾の報告では、前者の μ 値が13.8(1/日)、後者のそれが4.0～19.7(1/日)であり、特異的に利用できる脂肪酸や炭化水素では、*Rhodococcus* sp.は活性汚泥などと同程度の増殖能を有しているといえる。したがって、*Rhodococcus* sp.は、特定の基質と接触すれば、活性汚泥中で異常に増殖する可能性が高いと判断できる。

4. ま と め

各種脂肪酸及び炭化水素を用いた回分培養実験から、*Rhodococcus* sp.の2菌株は*N. amarae*と同様の基質特異性を示したが、*N. amarae*よりも高い増殖能を有することが明らかとなった。

- [参 考 文 献] 1) 藤田、岩堀、谷垣、岩崎、橋本：衛生工学研究論文集、27、75 (1991)
2) 橋本、岩堀、神谷、加藤：下水道協会誌論文集、28 (334)、33 (1991)