

II-574

スカム原因微生物 *Nocardia amarae* の細胞表面性質の変化

大阪大学工学部 学生員 ○徳富孝明 正員 岩堀恵祐 正員 藤田正憲

1. はじめに

下水処理場で広く採用されている活性汚泥法では、曝気槽、最終沈殿池での異常発泡、スカムが処理障害として問題となっている。この異常発泡やスカムは、*Nocardia amarae* や *Rhodococcus* spp. などの放線菌が気泡表面に付着して泡が安定化されることに起因するといわれ、気液界面への微生物の付着現象としてスカムを捉え、細胞表面の水への親和性が付着現象にかかわっていると考えられる。そこで本研究では、細胞表面性質の測定方法の一つで、液体炭化水素への吸着現象を利用して疎水性を測る BATH 法¹⁾ (Bacterial Adherence To Hydrocarbons)を用い、*N.amarae* の細胞表面の性質と、細胞壁成分であるミコール酸(超長鎖脂肪酸)の変化を検討した。

2. 実験材料並びに方法

○ 供試菌株: 下水処理場より分離し、*N.amarae* と同定された菌株を継代培養し、MS 液体培地(ペプトン、プロピオン酸ソーダ主体)で 150rpm、28℃で 3 日間、6 日間、20 日間回転振盪培養したものと、同じ条件で 6 日間回転振盪培養後、培地成分を取り除き 3 時間飢餓状態にしたもの、6 日間の回転振盪培養後に培地中の溶存酸素を窒素ガスで置換して嫌気状態にしたものを実験に供した。

○ BATH 法による疎水性の測定: *N.amarae* 培養液を 2 回遠心洗浄(3000rpm×10min)し、超音波破碎した(275μA、2 分)。この検液の OD₈₀₀ を、イオン交換水で 1.0 に調製し、試験管に 6ml ずつ分注して *n*-Hexadecane 0.5ml を加え、28℃で 10 分間静置した。その後、2 分間十分に攪拌し 28℃で 15 分間静置した。水層の上にあるヘキサデカンの乳化層を取り除き、水層の吸光度を測定した。ここで、調製混合液の OD を A_i、攪拌後の水層 OD を A_j とするとき、菌体の疎水性 H は、 $H=(1-A_j/A_i) \times 100$ で表される。

○ ミコール酸の抽出、分析: ミコール酸の抽出は Yano ら²⁾の方法で、GC 分析は HP-5890A を用い、ガラスカラム(60 cm×φ2mm)、充填剤 1% OV-1 (100/120mesh)、カラム温度 250~320℃(昇温 4℃/min)、キャリアーガス He で、MASS 分析は JEOL JMS-DX30HF を用い、Injection Temp. 330℃、Separator Temp. 340℃、イオン化電圧 20eV、加速電圧 3.0kV で行った。

3. 実験結果並びに考察

○ BATH 法による細胞表面性質の変化: *N.amarae* の増殖と、BATH 法による疎水性の変化を図-1 に示した。これより、培養 3 日目(対数増殖期)には疎水性は高いが、培養 6~8 日(定常期)までに疎水性は失われ、それ以降(内生呼吸期)はあまり変化しないことが

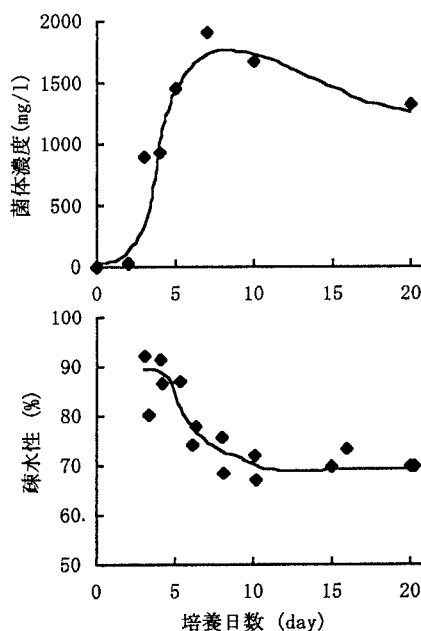


図-1 増殖曲線と疎水性の変化

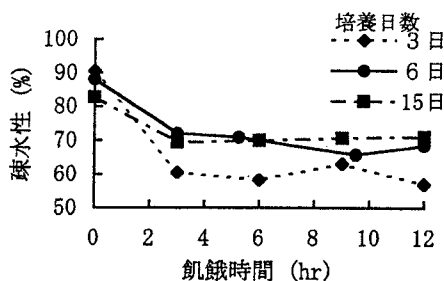


図-2 飢餓状態での疎水性の変化

わかる。従って、*N.amarae* は対数増殖期に脂質などの疎水性物質を多く作り、ブロックの形成、壁面・界面への付着が起こりやすいことが示唆された。なお、このことから *N.amarae* の培養において、培養初期にブロックが形成され、それから培養液が懸濁してくるという経験を説明できる。

培地成分を取り除いた飢餓状態における疎水性の変化を図-2に示した。これより、前培養の日数にかかわらず、飢餓状態になると疎水性は失われることがわかる。培地成分を取り除いて3時間後の測定時には既に疎水性が失われており、*N.amarae* が水中に分散しやすくなっている。従って、栄養状態が悪い時には *N.amarae* は気液界面に付着しにくくなっており、飢餓状態はスカムの誘発因子ではないと考えられる。また、嫌気状態においては疎水性の変化は見られなかったため、嫌気状態もスカムの誘発因子ではないと考えられる。

○ GC/MS による *N.amarae* 細胞壁中のミコール酸の分析： 培養3日目のミコール酸 TMS メチルエステルのガスクロマトグラムを図-3に示した。これより、総炭素数 46~56 のミコール酸が検出され、炭素数 54 が最も多く存在しているのがわかる。培養日数 6 日、20 日でも、本図と同様の結果が得られたので、培養 phase によるミコール酸組成の変化は小さく、ほぼ一定の組成のミコール酸が作られていると言える。また、飢餓状態でのミコール酸の組成を図-4に示した。これより、飢餓状態ではミコール酸の炭素鎖長が短く変化することがわかり、栄養状態の変化が細胞壁の成分変化を引き起こし、その結果として疎水性も変化するものと考えられる。

4. 要 約

スカム原因微生物 *N.amarae* は増殖期に界面に付着しやすく、飢餓状態では水中に分散しやすくなること、嫌気状態では変化しないことがわかった。また、放線菌特有の細胞壁成分であるミコール酸の組成は培養日数によっては余り変化しないが、飢餓状態になると炭素鎖長が短くなり、細胞表面の組成の変化は短時間に起こることが示唆された。

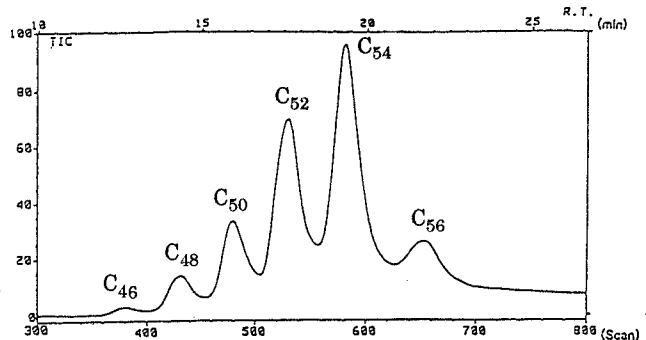


図-3 *N.amarae* のミコール酸メチルエステルのガスクロマトグラム（培養3日目）

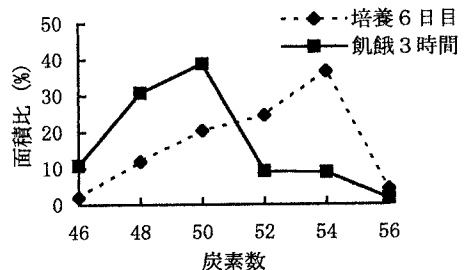


図-4 飢餓状態でのミコール酸組成

参考文献：1) M.Rosenberg, D.Gutnick and E.Rosenberg : Adherence of Bacteria to Hydrocarbons : A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33 (1980)

2) Ikuya Yano, Katuhiro Kageyama, Yoshimi Ohno, Masamiki Masui, Emi Kusunose, Masamichi Kusunose and Norimi Akimori : Separation of Mycolic Acids in *Nocardia* and Related Taxa by Gas Chromatography Mass Spectrometry, Biomed. Mass Spectrom., 5, 14-24 (1978)