

Title	Nocardia amaraeの各種脂肪酸並びに炭化水素利用に関する研究
Author(s)	藤田, 正憲; 岩堀, 恵祐; 谷垣, 文規 他
Citation	衛生工学研究論文集. 1991, 27, p. 75-85
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2870
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

(8) *Nocardia amarae* の各種脂肪酸並びに炭化水素利用に関する研究

STUDIES ON THE UTILIZATION OF VARIOUS FATTY ACIDS AND HYDROCARBONS
OF *NOCARDIA AMARAE* FROM FOAMING ACTIVATED SLUDGE

藤田 正 憲*・岩 堀 恵 祐*・谷 垣 文 規**
Masanori FUJITA*, Keisuke IWAHORI*, Fuminori TANIGAKI**
岩 崎 大 介*・橋 本 奨***
Daisuke IWASAKI*, Susumu HASHIMOTO***

ABSTRACT ; Batch-cultivation experiments were carried out in order to investigate the utilization of various fatty acids and hydrocarbons for *Nocardia amarae* from foaming activated sludge. The optimum ultrasonic wave time was determined to be 2 minutes for the measurement of vial cell count and OD₆₀₀. It was shown that both low-class fatty acids (C2~C5) and paraffinic hydrocarbons (C12~C20) were utilized by *N. amarae*, and that the highest specific growth rate was obtained in case of octadecane (C18), which was 5.20 (1/day). It was observed that the different flocs of *N. amarae* were formed in accordance with the medium compositions, in particular that the floc in case of hexadecane was the disk type and about 5 mm in diameter, which was formed at the hexadecane-solution interface. As the above-mentioned results, the capability of applying the octadecane and/or hexadecane medium to the colony counting method was suggested.

KEYWORDS ; Foaming activated sludge, *Nocardia amarae*, Fatty acid, Hydrocarbon

1. 緒 言

近年、曝気槽における異常発泡と最終沈殿池での活性汚泥浮上・スカム生成による放流水質の悪化、スカム腐敗による悪臭発生などの新たな活性汚泥処理障害に端を発し、その主たる原因微生物である *Nocardia amarae* と *Rhodococcus rhodochrus* の形態学的特徴、生理学的特性、細胞壁中の高級脂肪酸生成、菌体定量方法、薬剤耐性および下水処理場における分布などに関する種々の調査・研究成果が多数報告されている^{1) -10)}。しかし、基質に対する活性汚泥微生物との競合関係など、曝気槽内における放線菌の増殖機作と基質除去特性は十分に解明されているとは言い難く、したがって、障害の防止方法も対症療法的にならざるを得ない。

N. amarae の増殖には、ペプトン・プロピオン酸ソーダ主体のMS培地が一般的によく用いられているが、Lechevalierら¹¹⁾ は、スカム生成活性汚泥からの本菌の分離用培地として YCZ (Yeast extract-Czapeks)、PDA (Potato-Dextrose Agar) の各培地が有効であったと報告し、Dhaliwal¹²⁾ はブドウ糖に嫌気性消化液あるいは生下水の遠沈上澄液を添加した培地でも *N. amarae* の増殖を確認している。また、古賀ら¹³⁾ は、ペプトン・酵母エキス培地よりも、これに酢酸、プロピオン酸を添加した培地の方が *N. amarae* は大きなコロニーを作ることを報告し、さらに、*N. amarae* は炭化水素のような疎水性基質および芳香族基質も分解でき

* 大阪大学工学部環境工学科 (Dep. of Environ. Eng., Osaka Univ.), ** 大阪府 (Osaka Prefectural Government), *** 福井工業大学建設工学科 (Dep. of Const. Eng., Fukui Inst. of Technol.)

る¹⁴⁾といわれている。このように、*N. amarae* は極めて広範囲な基質資化能を持つ微生物のため、その増殖と基質利用をより系統だつて解明し、活性汚泥共存下での基質利用と増殖の挙動を明らかにできれば、本菌によるスカム発生防止の一助となると考えられる。

本研究では、スカム原因微生物である*N. amarae* の下水道施設内での増殖原因の解明を行うため、これまでの報告で利用性が高いといわれている脂肪酸と炭化水素に注目し、炭素数1から16までの各種脂肪酸と炭素数6から20までの各種直鎖状炭化水素（正パラフィン）を基質とした時の増殖と基質利用特性を、スカムより純粋分離された*N. amarae* の回分培養実験より検討した。

2. 実験材料並びに方法

2.1 実験材料

(1) 微生物： 塚ら⁹⁾がスカムより分離し、*N. amarae* と同定した菌株を同氏から分与され、MS培地（Table 1）で継代保存したものを使用した。

(2) 培地： *N. amarae* の前培養はMS培地を、また基質利用性についてはTable 2の培地をそれぞれ用いた。脂肪酸を炭素源とした培地（FA培地）では、蟻酸からパルミチン酸までを用い、その炭素数に応じて、FA(1)からFA(16)と略した。同様に、炭化水素を炭素源とした培地培地（PHC培地）では、炭素数に応じて、PHC(6)からPHC(20)と略した。

2.2 実験方法

(1) *N. amarae* の定量法： 300 mℓ容の三角フラスコにMS培地を100 mℓ投入し、*N. amarae* を1白金餌植菌した後、28℃、120 rpmで回転振盪した。この培養液50 mℓを100 mℓ容ビーカーに投入し、0.5分、1.0分、2.0分、3.0分および5.0分の超音波処理（275 μA）を行った。その処理液を10倍希釈法（BOD希釈水使用）でそれぞれ希釈し、その0.1 mℓを各希釈段階ごとに3枚のMS寒天培地に塗抹した後、28～30℃で培養しながら1日1回肉眼でコロニーを計数して、生菌数測定に及ぼす超音波処理時間の影響を検討した。また同時に、超音波処理した試料の吸光度（OD₆₀₀）を測定するとともに、その試料を光学顕微鏡で観察した。別に、*N. amarae* 培養液50 mℓを菌体濃度の測定に供し、残りを最適超音波時間で処理した後、そのOD₆₀₀を測定し、相関を求めた。

(2) 基質利用性： 300 mℓ容の三角フラスコに供試培地を100 mℓ投入し、MS培地で前培養した*N. amarae* を初発濃度が約3～5 mg/ℓになるように植菌してから、28℃、120 rpmで回転振盪した。同一培地の実験では、三角フラスコを8～10本用意し、1日1本の三角フラスコ内培養液のpH、溶解性TOC濃度、OD₆₀₀をそれぞれ測定した。また、2本の三角フラスコには*N. amarae* を植菌せず、実験開始および終了時に同一条件で超音波処理を行ってからOD₆₀₀を測定して、培養液のOD₆₀₀を補正した。なお、FA(10)、FA(16)および各PHCは不溶物であるので、OD₆₀₀を測定せず、直接ろ紙法による乾燥重量を求め、溶解性TOC濃度は測定しなかった。この場合にも、先と同様の2本の三角フラスコを用意し、実験開始および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。

2.3 分析方法

OD₆₀₀の測定条件は、先に決定した最適超音波処理時間を採用し、さらにOD₆₀₀と菌体濃度の関係から、OD₆₀₀を菌体濃度に換算して表現した。ここで、菌体濃度の測定はろ紙法（1 μmのミリポアフィルター）で行った。また、pHはpH計で、TOCは培養ろ液（遠心上澄液；10000 rpm、20分）をTOC計でそれぞれ測定した。

Table 1 Composition of MS medium

Peptone	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Glucose	1.0	g
Sodium propionate	4.5	g
Deionized water	1.0	ℓ
TOC	5400	mg/ℓ
pH ^{a)}	7.5	

a) Adjustment was carried out by 5N NaOH.

Table 2 Compositions of medium for various carbon sources

Carbon source				Abbreviation
Fatty acid				
Sodium formate	5.67	g		F A (1)
Sodium acetate	3.42	g		F A (2)
Sodium propionate	2.67	g		F A (3)
Butyric acid	1.91	ml		F A (4)
Valeric acid	1.81	ml		F A (5)
Sodium hexanoate	1.92	g		F A (6)
Sodium caprylate	1.73	g		F A (8)
Sodium caprate	1.62	g		F A (10)
Sodium palmitate	1.45	g		F A (16)
Paraffinic hydrocarbon				
Hexane	1.81	ml		P H C (6)
Octane	1.70	ml		P H C (8)
Decane	1.62	ml		P H C (10)
Dodecane	1.58	ml		P H C (12)
Tetradecane	1.55	ml		P H C (14)
Hexadecane	1.53	ml		P H C (16)
Octadecane	1.18	g		P H C (18)
Eicosane	1.18	g		P H C (20)
Yeast extract	0.1	g		
N a C l	0.303	g		
K C l	0.14	g		These components were added to various carbon sources, respectively.
C a C l ₂	0.18	g		
M g S O ₄	0.2	g		
N H ₄ C l	0.35	g		
Deionized water	1.0	l		
T O C 1000 mg/l				
p H ^{a)} 7.5				

a) Adjustment of pH was carried out by phosphate buffer, i.e. Na₂HPO₄ (M/15) : K₂HPO₄ (M/15) = 4:1. Numeral in parenthesis was expressed as carbon number in each medium.

3. 実験成績並びに考察

3.1 菌体濃度測定に及ぼす超音波処理時間の影響

経時的に採取した *N. amarae* 培養液 (菌体濃度; 352 mg/l) に0.5分、1.0分、2.0分、3.0分および5.0分の超音波処理をそれぞれ行ってから、MS寒天培地で生菌数を測定したところ、*N. amarae* のコロニーは培養3日目から肉眼で観察でき、6日目以降は、超音波処理時間にかかわらず一定の生菌数を示した。活性汚泥共存下での *N. amarae* の生菌数測定^{1)、7)、8)} では、超音波処理した混合液を4~7日間培養し、実体顕微鏡でコロニー数を計数しているが、純粋菌を用いた本研究では、コロニーが明確で、肉眼でも十分に計数できたので、以後の生菌数測定は、培養6日で肉眼による観察を採用した。但し、超音波処理時間により、OD₆₀₀ と生菌数に差が認められ、最適超音波処理時間の存在が示唆された。そこで、培養6日目の生菌数とOD₆₀₀ に及ぼす超音波処理時間の影響を調べたところ、Fig. 1のようになった。本図より、超音波処理時間が2.0分の場合に生菌数とOD₆₀₀ が最も高くなることがわかった。さらに、超音波処理後の培養液を光学顕微鏡で観察したところ、超音波処理時間2.0分以上の培養液では、菌塊がほぼ完全に破碎され、菌糸が分離していることが観察された。*N. amarae* は強固な菌塊を形成しながら増殖するので、この菌塊を破碎・分散して、生菌数やOD₆₀₀ 測定を行う必要があるが、超音波処理時間が長くなると菌体を破碎し、その測定精度が低下する。したがって、本実験の処理条件では、超音波処理時間2.0分で生菌数とOD₆₀₀ の値が最も高くなり、かつその相関も極めて高かったので、以後の菌体濃度測定では、この条件を採用した。ここで、菌体濃度と2.0分間超音波処理した培養液のOD₆₀₀ の関係および生菌数とOD₆₀₀ の関係は、OD₆₀₀ をX、

菌体濃度を Y (mg/ℓ)、生菌数を Z ($\text{N}/\text{m}\ell$) とすると、 $Y=420.7 \cdot X$ 、 $Z=(6.25 \times 10^7) \cdot X$ で示された。これより、FA 培地では OD_{600} の値からこの関係式を用いて菌体濃度を推定した。

3.2 各種培地における *N. amarae* の増殖

各種脂肪酸および炭化水素培地を用いた回分培養実験における菌体濃度、溶解性 TOC 濃度および pH の経日変化を Fig. 2 ~ Fig. 5 にそれぞれ示した。また、Table 2 の脂肪酸および炭化水素の代わりに、肉エキス 1.0 g、ペプトン 1.5 g を加えた合成下水と MS 培地についても、参考のため、Fig. 6、Fig. 7 にそれぞれ示した。なお、不溶物を炭素源とした場合、対照とした三角フラスコ中の乾燥重量が実験期間中に変化しなかったため、炭素源の蒸発はなかったと判断した。

FA (16) および PHC (6) の各培地では、菌体増殖が全く認められず、TOC 成分も除去されなかった。しかし、菌体増殖の認められた培地では、培養開始 2 ~ 3 日目までは *N. amarae* が対数増殖で増えていることがわかる。そこで、その期間の比増殖速度 μ を算出して Table 3 に一括表示した。本表から、FA (2) ~ FA (5) までの各培地、MS 培地および PHC (16)、PHC (18) の各培地では、*N. amarae* の菌体増殖能が高く、また PHC (12)、PHC (14) および PHC (20) の各培地の μ 値は、合成下水のそれとほぼ同じ値を示していることがわかる。

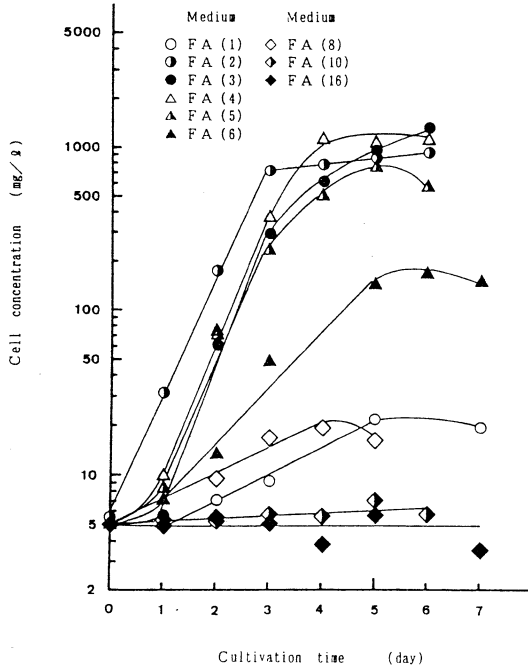


Fig. 2 Time-series variations of *N. amarae* cell concentration in case of FA medium

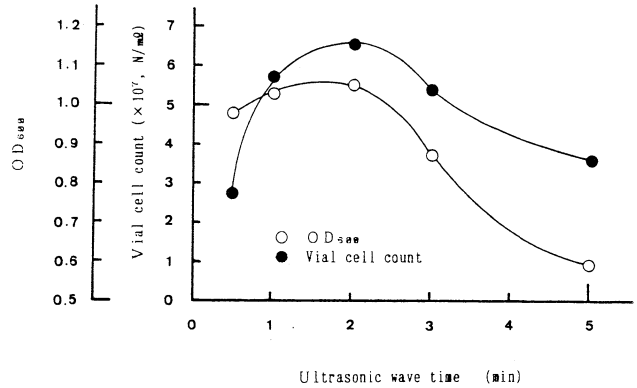


Fig. 1 Effects of ultrasonic wave time affecting both vial cell count and OD_{600} (cell concentration; $352 \text{ mg}/\ell$)

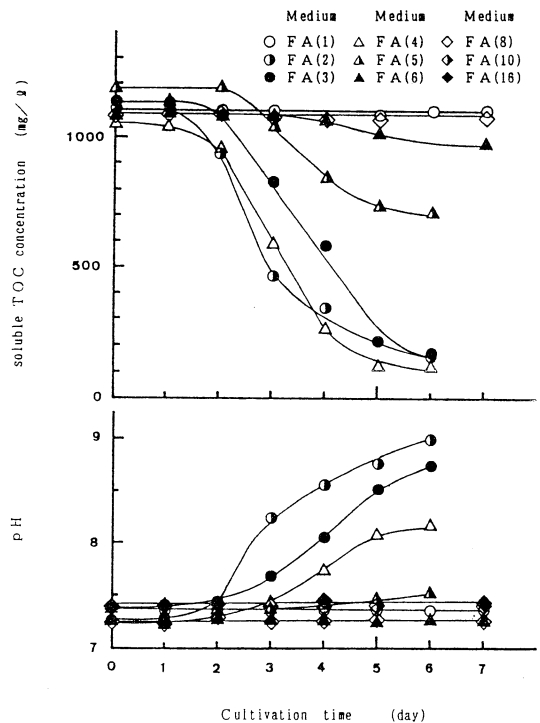


Fig. 3 Time-series variations of soluble TOC concentration and pH in case of FA medium

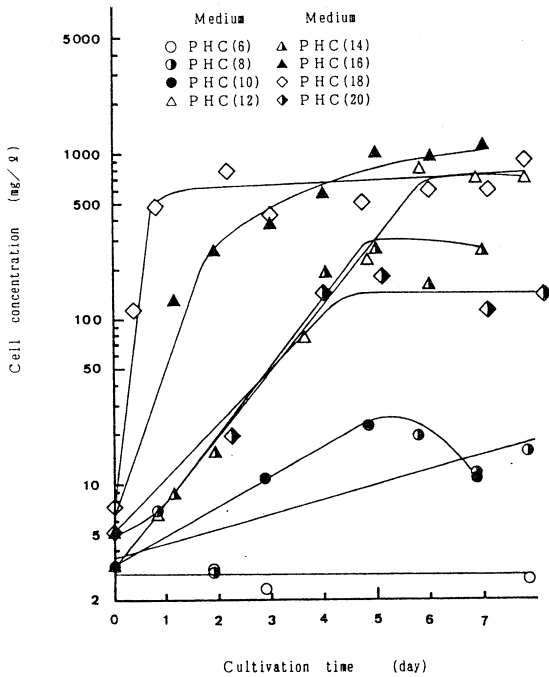


Fig. 4 Time-serial variations of *N. amarae* cell concentration in case of PHC medium

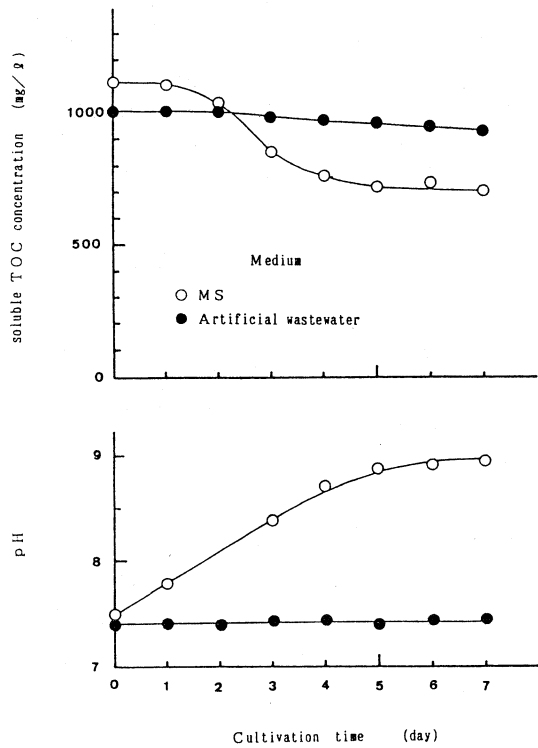


Fig. 6 Time-serial variations of *N. amarae* cell concentration in case of MS medium and Artificial wastewater

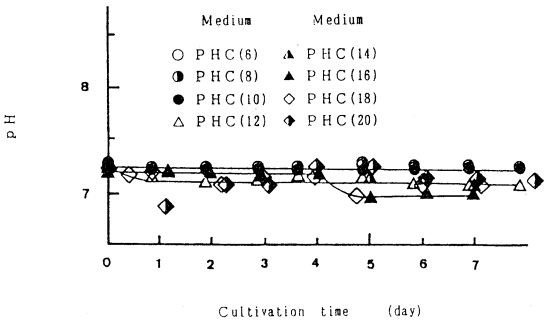


Fig. 5 Time-serial variations of pH in case of PHC medium

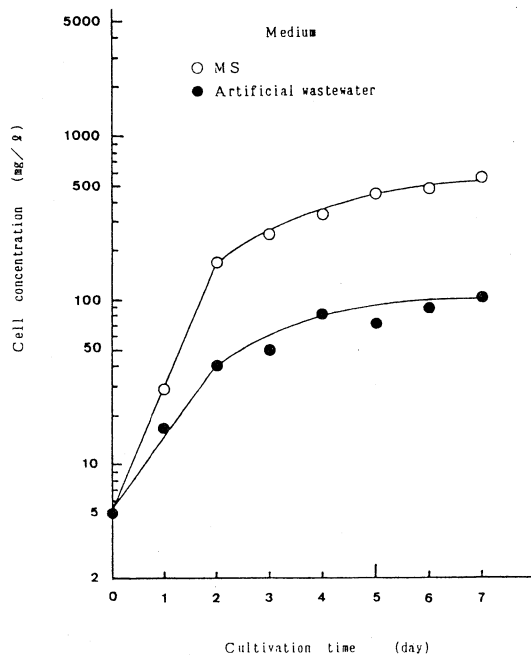


Fig. 7 Time-serial variations of soluble TOC concentration and pH in case of MS medium and Artificial wastewater

Table 3 Calculation results of specific growth rate during logarithmic growth phase and kinetic parameters

Medium	Specific growth rate μ during logarithmic growth phase (1/day)	Kinetic parameters	
		Yield Coeff. Y (mg SS/mg TOC)	Decay Coeff. b (1/day)
FA (1)	0.37	—	—
FA (2)	1.63	1.09	0.045
FA (3)	1.96	1.12	0.040
FA (4)	1.82	1.00	0.045
FA (5)	1.69	0.96	0.045
FA (6)	0.77	0.98	0.040
FA (8)	0.36	—	—
FA (10)	0.04	—	—
FA (16)	0.0	—	—
PHC (6)	0.0	—	—
PHC (8)	0.20	—	—
PHC (10)	0.41	—	—
PHC (12)	0.92	—	—
PHC (14)	0.95	—	—
PHC (16)	2.07	—	—
PHC (18)	5.20	—	—
PHC (20)	0.83	—	—
《 Reference 》			
MS	1.76	1.90	0.069
Artificial wastewater	0.97	1.61	0.079

次に、FA培地並びにPHC培地における炭素数と μ 値の関係をFig. 8に示した。本図より、各種脂肪酸を炭素源としたFA培地では、*N. amarae* は酢酸から吉草酸までの低級脂肪酸を利用し、炭素数10個（カプリン酸）以上の脂肪酸をほとんど利用できないことがわかる。Gordonら¹⁵⁾は、*N. amarae* の生理試験から、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムといった低級脂肪酸の資化能を報告しており、本研究では、この2種の脂肪酸以外にも酪酸、吉草酸を資化できることを確認できた。これは、低級脂肪酸が遊離酸、塩またはエステルとして広く自然界に分布しているので、元来、土壌由来微生物である*N. amarae* にその資化能が

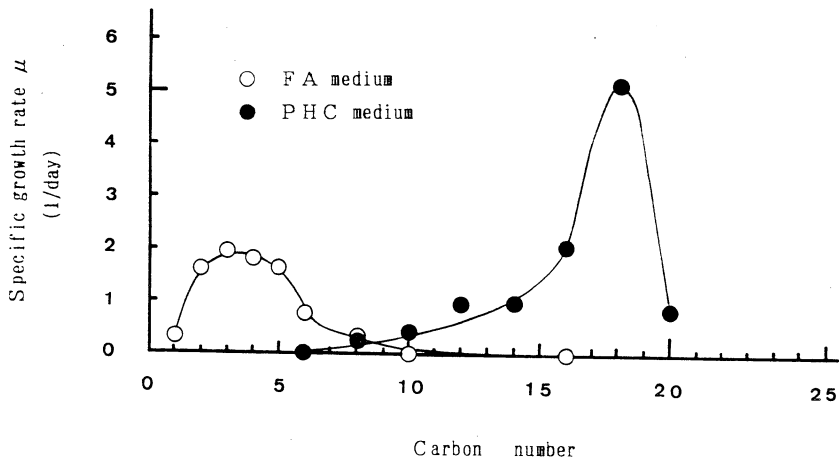


Fig. 8 Relationship between carbon number in medium and specific growth rate μ during logarithmic growth phase

備わっているものと推察できる。また、各種正パラフィン炭素源としたPHC培地では、炭素数6のヘキサンを *N. amarae* は全く利用しなかったが、炭素数の増加に伴い、 μ 値は増加し、オクタデカンの場合には最高の μ 値が得られた。FA培地の場合には、*N. amarae* はC₂~C₅までの低級脂肪酸に対して基質特異性を示したが、PHC培地では、C₁₀以上の正パラフィンを資化でき、しかもC₁₈のオクタデカンに対して特異的な基質資化能があるといえる。このような微生物分解に関する基質特異性は、正パラフィンと同じ直鎖構造を持つLASでも広く知られており¹⁶⁾、*N. amarae* の基質資化能もこれと同じようなものであると思われる。この知見から考えると、末端あるいは両端のメチル基が酸化を受け (monoterminal あるいは diterminal oxidation)、アルコール、アルデヒドを経て脂肪酸に酸化され易い正パラフィンがC₁₀以上のもので、特にオクタデカンには特異的であったと推察できるが、その酸化機構を解明するには至っていない。また、オクタデカン、エイコサンの融点はそれぞれ28.0℃、36.6℃であるので、実験期間中、前者は液体、後者は固体の各状態を呈していた。本実験で得られた*N. amarae* のオクタデカン資化能は、このような物理的性質と培養温度が深く関与したものと考えられ、今後の検討課題である。一般に、固体よりも液体の方が、接触の機会を考えても、資化されやすいはずであるが、エイコサンの場合の μ 値がドデカン、テトラデカンの場合とほぼ同じ値を示したことから、*N. amarae* のC₂₀に対する基質親和性が、固形物にもかかわらず、高いことが推察でき、極めて興味深いことである。なお、炭素数21以上のPHC培地での μ 値は、実験を行っていないが、固体であることやFig. 8の傾向から、かなり低くなると予想される。

次に、各種培地および培養方法における*N. amarae* の増殖特性に関する既往文献を整理してTable 4に一括表示した。培養方法が様々であり、また本研究のような視点から、各種の炭素源に対する*N. amarae* の増殖特性を検討していないので比較しにくいだが、フルクトース・ペプトン主体の合成下水でのケモスタット実験から得られた μ 値は2.09 (1/日)で、既往研究での最大値であった。しかし、これよりもPHC(18)の μ

Table 4 Past studies on growth characteristics of *N. amarae*

Medium		Cultivation			Specific growth rate μ (1/day)	Remark	Ref.
		Method	Condition				
Name	Main components			Temp. (°C)	Initial pH		
		—	—	7.2	0.72		7)
MS	Peptone & Sodium propionate	Static	20	7.2	0.51		1)
		Static	30	7.2	0.65		
		Continuous shaking	25	7.5	1.85		
		Semi-continuous shaking	25	7.5	0.80		10)
		Static	25	7.5	1.20		
		Static	25~35	6~8	1.9~3.0	a)	8)
MS'	Medium except sodium propionate from MS	—	25	7~8	1.1~1.2		3)
Artificial wastewater	Glucose & Sodium glutamate	Static	20	—	0.65		1)
	Fructose & Peptone	Chemostat	—	—	2.09±0.18	b)	14)
Actual wastewater	—	Continuous	18~26	—	0.18~0.31	c)	17)

a) Calculating μ of logarithmic growth phase in batch culture

b) Maximum specific growth rate constant of Monod eq. in addition to DO limitation

c) Calculation from viable cell counts of activated sludge and *N. amarae*, operating SRTs and mass balance in steady state

の方が2.5倍以上高いことは注目される。

一方、*N. amarae* の増殖が確認された培養液のpHは、MS培地、FA(2)～FA(4)の各培地で急激に上昇した。MS培地でのpH上昇は堺¹⁰⁾も報告しているが、これは脂肪酸の資化分解によるものである。また、PHC培地では、pHはほとんど変化しなかったかPHC(16)のようにわずかに減少した。このようなヘキサデカン炭素源とした培地でのpH減少はこれまで報告されていないが、ヘキサデカンのmonoterminalあるいはditerminal oxidationによる脂肪酸の生成によるものと考えられる。

3.3 各種培地における*N. amarae*の菌塊形成能

回分培養の実験期間中、*N. amarae* が培地組成により異なる増殖形態を示すことが観察された。その代表例として、MS培地、合成下水、FA(3)、PHC(16)とPHC(18)の各培地における菌塊形成状況をPhoto. 1～Photo. 5にそれぞれ示した。

MS培地、合成下水では、直径約1mm程度の菌塊を形成しながら増殖したが、FA培地では、大きな菌塊は形成されずに分散増殖した。また、PHC(16)培地では、培養初期に*N. amarae* が培養液上層のヘキサデカン界面に集積され、培養時間の経過とともに直径5mm程度の円盤状の菌塊が十数個形成され、培養終了時には三角フラスコ底部に沈降するものも認められた。この菌塊は非常に粘性が強く、*N. amarae* とヘキサデカンが凝集したものと推察される。しかし、オクタデカンの場合には、ヘキサデカンほど大きな菌塊は形成されず、MS培地、合成下水と同程度の直径であり、その他のPHC培地では約0.5mm程度の小さな菌塊を形成しながら増殖することが観察された。

以上のように、培地組成により*N. amarae* の菌塊形成能が異なり、特にヘキサデカン炭素源とした場合には、特異的な菌塊を形成することが明らかとなった。ヘキサデカンは、純水と比べると、その粘性が約3倍、その酸素溶解度が約10倍である¹⁸⁾こと並びに*N. amarae* は好気性微生物であることから、他の炭素源よりもヘキサデカン界面に集積しやすいと推察できる。しかし、培地により生成する疎水性ミコール酸や代謝産物も変わると考えられるので、今後の重要な課題であると考えている。

3.4 *N. amarae*のTOC除去と動力学式パラメーターY、bの決定

TOC測定が可能であった各培地における培養終了時の除去率は、FA(2)、FA(3)、FA(4)の各培地で約86%、FA(5)培地で39.1%、MS培地で36.8%であり、合成下水、FA(1)、FA(6)、FA(8)の各培地で10%以下の低い値であった。

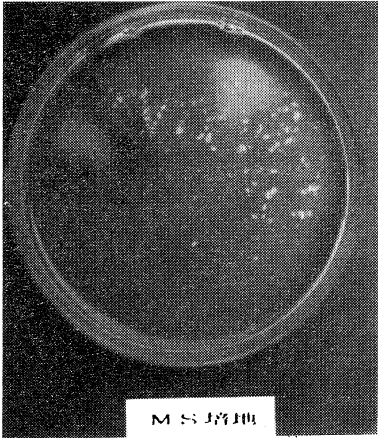
MS培地では、全炭素成分に対するプロピオン酸ソーダ由来の炭素成分の割合が約31%であるので、FA(3)の除去率が良いことから考えると、MS培地中で除去されたTOC成分の多くがプロピオン酸由来であると推測される。また、合成下水の場合には、先に述べたように菌体増殖能が低く、培養終了時の菌体濃度が100mg/ℓ程度であり、*N. amarae*にはペプチド分解性がないという報告¹⁹⁾からも明らかのように、肉エキス・ペプトンを資化できなかった。一方、PHC培地でのTOC成分は測定できなかったが、先に述べた菌体増殖と実験中の炭化水素界面の観察から、*N. amarae*が正パラフィンを摂取・増殖していると推察される。

ここで、*N. amarae*の菌体濃度を S_N (mg/ℓ)、除去された溶解性TOC濃度を L_r (mg/ℓ)として、FA(2)～FA(6)の各培地での*N. amarae*の回分培養における菌体増殖とTOC除去の関係から、次式より収率係数Y、自己分解係数bを求めた。

$$\frac{1}{S_N} \cdot \frac{dS_N}{dt} = Y \cdot \frac{1}{S_N} \cdot \frac{dL_r}{dt} - b \quad (1)$$

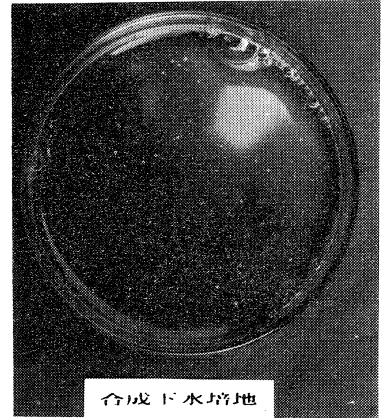
但し、Y：収率係数(mg菌体/mgTOC)、b：自己分解係数(1/日)

各種培地の実験成績から、Yおよびbの各値を算出し、 μ 値とともにTable 3に一括表示した。自己分解係数bは、培地組成にかかわらず、しかも活性汚泥微生物に関するそれとほぼ同一の値が得られた。また、収率係数Yは、FA(2)～FA(6)の各培地で炭素数に関係なく、約1.0の値が得られ、MS培地およびTOC除去率の低かった合成下水ではFA培地よりも高い値を示した。このY値は活性汚泥微生物のそれよりも大



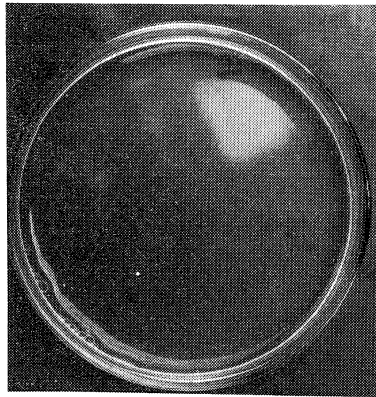
MS 培地

Photo. 1 Photography in case of MS medium



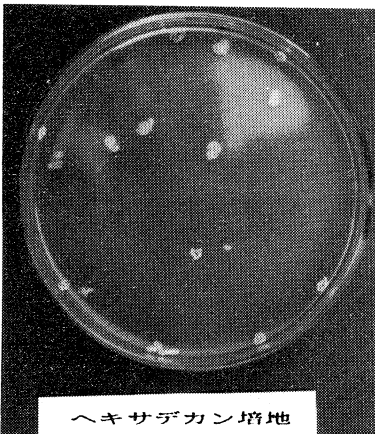
合成下水培地

Photo. 2 Photography in case of Artificial wastewater



プロピオン酸ナトリウム培地

Photo. 3 Photography in case of FA(3) medium



ヘキサデカン培地

Photo. 4 Photography in case of PHC(16) medium



オクタデカン培地

Photo. 5 Photography in case of PHC(18) medium

きな値であるので、N. amarae は、摂取された基質を細胞合成に利用する割合が、活性汚泥微生物よりも高い微生物であることが示唆された。

以上のことから、N. amarae は、オクタデカンに対する比増殖速度が極めて高く、さらにヘキサデカンに対して特異的な円盤状の菌塊を形成することが明らかとなった。現在、活性汚泥中におけるN. amarae の定量方法は、MS培地による生菌数測定が主流である。しかし、培地上に一般細菌も出現し、本菌を覆うために、正確な菌体量を計数しているとは言い難い。このため、抗菌剤含有培地で検討した事例も報告されている⁷⁾が、まだ改善の余地が残されている。したがって、N. amarae が極めて利用しやすいオクタデカンと特異な菌塊形成能を示すヘキサデカンを炭素源とした培地を用いれば、培地上に一般細菌も出現せず、N. amarae の増殖が速く、しかも特異的なコロニーを形成するはずであるので、N. amarae の生菌数測定の培地として有効であると考えられる。現在、このような観点から、活性汚泥中におけるN. amarae のコロニー計数法について種々検討しているところである。

4. 要約

本研究では、スカム原因微生物であるN. amarae の増殖と基質利用に関する基礎的知見を得るため、N. amarae 純粋菌の菌体定量法並びに各種培地での回分培養実験による増殖速度について検討した。本研究で得られた知見は次の通りである。

- (1) MS培地を用いたN. amarae の生菌数測定に必要な培養日数は6日であり、生菌数およびOD₆₀₀測定における最適超音波処理時間は2分であった。
- (2) N. amarae は、酢酸から吉草酸までの低級脂肪酸、ドデカンからエイコサンまでの正パラフィンを酸化でき、さらにオクタデカンを極めて良く利用した。その時の比増殖速度は5.20 (1/日) が得られた。
- (3) 培地組成によりN. amarae の菌塊形成能が異なり、特にヘキサデカンを炭素源とした場合には、直径5mm程度の円盤状の菌塊が形成された。
- (4) オクタデカンおよびヘキサデカンを炭素源とした培地により、活性汚泥中におけるN. amarae のコロニー計数法への応用の可能性が示唆された。

謝辞

N. amarae の分与と種々ご指導いただいた日本下水道事業団業務部調査役 堺好雄 博士に深謝いたします。

[参考文献]

- 1) 堺好雄、森忠洋、飯田光晴、本多和彦、松本利通：放線菌 (*Nocardia* sp.) による活性汚泥浮上の原因と対策、下水道協会誌、19 (214)、56 (1982)
- 2) Goodfellow, M., Minnikin, D. E., Todd, C., Alderson, G., Minnikin, S. M., Collins, M. D.: Numerical and Chemical Classification of *Nocardia amarae*, Journal Gen. Microbiol., 128, 1283 (1982)
- 3) 森忠洋、堺好雄：下水処理場における活性汚泥浮上について、公害と対策、19 (6)、522 (1983)
- 4) 本多和彦、森忠洋、矢野郁也、堺好雄、松本利通：放線菌細胞壁中の強疎水性物質 (ミコール酸) の同定と汚泥浮上との関係について、下水道協会誌、21 (237)、31 (1984)
- 5) Lemmer, H., Kroppenstedt, R. M.: Chemotaxonomy and Physiology of Some Actinomycetes Isolated from Scumming Activated Sludge, System. Appl. Microbiol., 5, 124 (1984)
- 6) Lemmer, H.: The Ecology of Scum Causing Actinomycetes in Sewage Treatment Plants, Water Res., 20 (4), 531 (1986)
- 7) 笹井晋一、野村隆夫：放線菌 (*Nocardia amarae*) の基礎実験と薬剤による殺菌効果、第25回下水道研究発表会講演集、231 (1987)

- 8) 北川政美、外村雅生：放線菌の定量法と増殖特性に対する検討、第25回下水道研究発表会講演集、635 (1987)
- 9) 堺 好雄、森 忠洋、本多和彦、橋本 奨：活性汚泥法における放線菌障害とその制御に関する研究
(1) 一原因生物に関する分類学的研究一、下水道協会誌、25 (294)、35 (1988)
- 10) 堺 好雄：活性汚泥法における放線菌障害とその制御に関する研究、大阪大学学位論文(1988年12月)
- 11) Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A. : *Nocardia amarae* sp. nov., an Actinomycete Common in Foaming Activated Sludge, Int. J. Syst. Bacteriol., 24 (2), 278 (1974)
- 12) Dhaliwal, B. S. : *Nocardia amarae* and Activated Sludge Foaming, Journal WPCF, 51 (2), 344 ~350 (1979)
- 13) 古賀みな子、堺 好雄、森 忠洋：流入下水水質と障害微生物増殖の関係について、第26回下水道研究発表会講演集、421 (1988)
- 14) Baumann, M., Lemmer, H., Ries, H. : Scum Actinomycetes in Sewage Treatment Plants — Part 1 Growth Kinetics of *Nocardia amarae* in Chemostat Culture, Water Res., 22 (6), 755 (1988)
- 15) Gordon, R. E., Mihm, J. M. : A Comparative Study of Some Strains Received as Nocardiae, J. Bacteriol., 73, 15 (1957)
- 16) Swisher, R. D. : Surfactant Biodegradation, Surfactant Science Series, Marcel Dekker, Inc., New York (1970)
- 17) 鹿田圭二、福村 功、近藤和幸：分流式下水道における放線菌の挙動、第26回下水道研究発表会講演集、304 (1988)
- 18) Lu-Kwang Ju, Chester S. Ho : Oxygen Diffusion Coefficient and Solubility in n-Hexadecane, Biotech. & Bioeng., 34, 1221 (1989)
- 19) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2, Williams & Wilkins (1986)