

研究ノート

# ポリビニルアルコール分解 細菌の純粹分離とその性質

藤田正憲\*

## 1. はじめに

各種化合物の分解能を有する微生物は広く自然界に分布し、その分解速度も一様でない。分解速度の遅い化合物は一般に難分解性物質と呼ばれ、通常の生物学的処理法では除去されないため、汚染制御の上で大きな問題となっている。橋本研究室では、長年難分解性物質とくにポリビニルアルコール (PVA) 処理に関する研究を行い、成果を上げてきた。その概要は橋本・尾崎<sup>1)</sup>により、本誌で解説されている。本研究の延長として PVA 分解細菌を純粹分離し、これの育種を通じて難分解性物質処理の効率化を旨とするようになった。研究室には PVA 馴養活性汚泥を凍結乾燥保存しているため、当初は簡単に PVA 分解細菌を分離できると考えていたが、筆者の勉強不足により思わぬ落とし穴にはまり、長期間を費してしまった。ここでは失敗談も含め、純粹分離法ならびに分離細菌の性質について述べる。

## 2. PVA 鹼化細菌の出現

まず市販の平均重合度 1700 の完全鹼化型 PVA を唯一の炭素源とする合成培地 (PVA と無機塩からなる) に、凍結乾燥保存された PVA 馴養活性汚泥を植種し、集積培養を始めた。5~6 回新しい培地へ植え継ぎ、PVA 分解細菌を濃縮した。この中から PVA 分解速度の速い細菌を分離するため、0.5~1 日ごとに 10 回程度植え継いだ後、これを PVA 寒天平板に希釈・塗抹し、コロニーを形成せしめた。分離された細菌による市販 PVA の分解を調べた所、培養初期に急速な PVA の減少を示した。

\*藤田正憲 (Masanori FUJITA), 大阪大学, 工学部, 環境工学科, 橋本研究室, 助教授, 工学博士, 水質管理工学

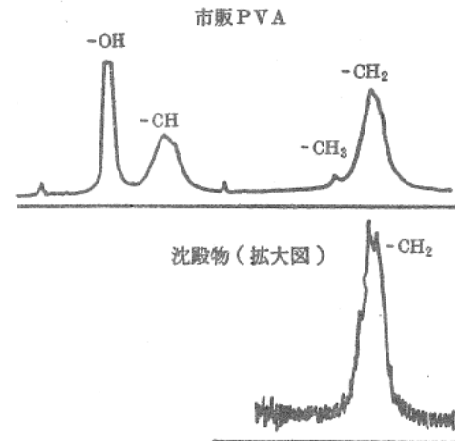


図1 市販完全鹼化 PVA と沈殿物の NMR 解析の比較

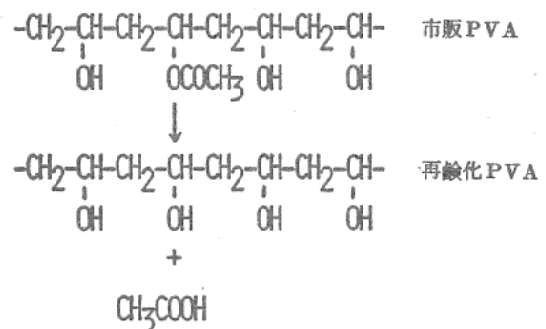


図2 PVA 鹼化細菌による市販 PVA の鹼化

しかし、培養日数を長くしても常に PVA が残存し、しかも培養液中に多量のフロック状白色沈殿が生じた。沈殿物 PVA と上澄液 PVA を定量し培養液中の PVA 収支を取ると、両者の和が初期 PVA 濃度に一致した。ここで、PVA はヨード・でんぷん反応を応用した比色法で定量した<sup>2)</sup>。沈殿物は不溶化した PVA と推測されたので、NMR で解析した所、図-1 に示すように市販 PVA 中の残存アセチル基が消失している以外はすべて一致した。市販 PVA はポリ酢酸ビニルを鹼化して作られ、鹼化度により完全鹼化と部分鹼化に分けられている。しかし

完全鹼化 PVA でも鹼化度は98~99%であり、水への溶解度は高いが、100%鹼化すればPVAは水にほとんど不溶となり、ヨード・でんぷん法では検出できない。従って本菌は図-2に示すようにPVA中に残存するアセチル基を分解し、生じた酢酸を利用すると共に、PVAを不溶化により除去していることが明らかとなった。本菌の比増殖速度はPVA分解菌のそれより大きいことが後に判明し、そのため集積培養液中に優先種として出現したと考えられる。

### 3. PVA分解菌の純粋分離とその性質

先の失敗を基に、以後の実験では市販PVAを常法により二度再鹼化し、NMRでアセチル基が存在しない事を確かめた標品を使用した。再び凍結乾燥保存されたPVA馴養活性汚泥を植菌し、PVAが90%以上除去されてから次の新しい培地へ植え継いだ。これを数回繰り返した後、再鹼化PVA寒天及び普通寒天(肉エキス、ペプトン含有)平板上にコロニーを出現せしめた。しかし、両平板上のどのコロニーもPVAを分解せず、液体培養から液体培養に植え継いだ時にのみPVA分解を示した。そこで培養液中にどの程度のPVA分解菌が存在するかを調べるため、 $10^0 \sim 10^8$ の各段階に希釈し、PVA液体培地に植菌すると共にPVA寒天及び普通寒天平板に塗抹した。次いで平板上に出現した全コロニーをPVA液体培地に植菌した。直接液体培地に植菌した場合 $10^7$ 希釈までPVA分解を示したが、PVA寒天平板上のコロニーでは $10^4$ 希釈まで、普通寒天平板上では $10^2$ 希釈までしかPVA分解を示さなかった。PVA分解を示した平板は、いずれもコロニーが一面に増殖していた。以上からPVA分解菌は培養液中には多数存在するが、寒天平板上には単一コロニーとして出現できず、他の菌が平板上に一面に増殖している時にのみ出現しうる事が示された。

酒沢ら<sup>8)</sup>は、PVAは二種のPseudomonas属細菌の共生で分解され、しかもPVA分解活性を持つ菌は他の菌が混在すれば普通寒天平板上で、単一コロニーを作ることができないので、本菌の分離には最確数測定法を用いるのが

良いと報告した。ここで彼らは酵母エキスあるいはビタミンとアミノ酸混合液をPVA培地に添加して使用している。本研究では、これまで酵母エキス等を加えないPVA合成培地のみを使ってきたので、培地組成は変えずに共生説を確かめることにした。そこで先のPVA寒天平板に出現した優先種(329株、単独ではPVAを分解せず)を共生の相手と仮定し、PVA培養液を0.45 $\mu$ mメンブレンフィルター2枚で濾過した濾液と共にPVA液体培地に植菌した所、PVA分解を示し共生説を裏づけた。しかし今一つ共生説に納得しかなかったため、これまでの経緯から次の仮説を立てた。即ち

- (1) PVA分解菌は単独でPVAを分解できる。
- (2) 市販寒天中の不純物により増殖を阻害されるためコロニーを形成しない。
- (3) 増殖促進因子を要求する。

そこでPVA合成培地に酵母エキスを0.1%添加し、市販の寒天を蒸留水で2週間以上洗浄することにした。本培地上にPVA培養液を希釈・塗抹した所、いままでとはまったく異なったコロニーが1~2週間後に出現した。本コロニーはPVAのみの培地には増殖しないが、酵母エキス添加PVA培地で完全にPVAを分解した。さらに先のメンブレンフィルター濾液からの培養液を酵母エキス添加PVA寒天平板に希釈・塗抹すると、1~2週間後に先と同一のコロニーが出現した。出現したコロニーを純化し、同調培養後、電子顕微鏡で単一菌(227株)と確認した。以上の分離操作をまとめると図3のようになる。227株はPVA単独培地ではPVAを分解しないが、酵母エキスを添加するかあるいは329株と共存すればPVAを分解することができる。図4に227株による培養経過を示す。PVAはほぼ5日間で分解されるがPVA由来のTOC(全有機性炭素)の減少はゆるやかで、何んらかの代謝産物が培地中に蓄積されていることを示唆している。一方227株を329株の共存下でPVA分解させると、分解時間が少し長いことを除けば、酵母エキス添加の時と同じであり、329株が酵母エキス中に含まれる増殖促進因子と同様の物質を出している

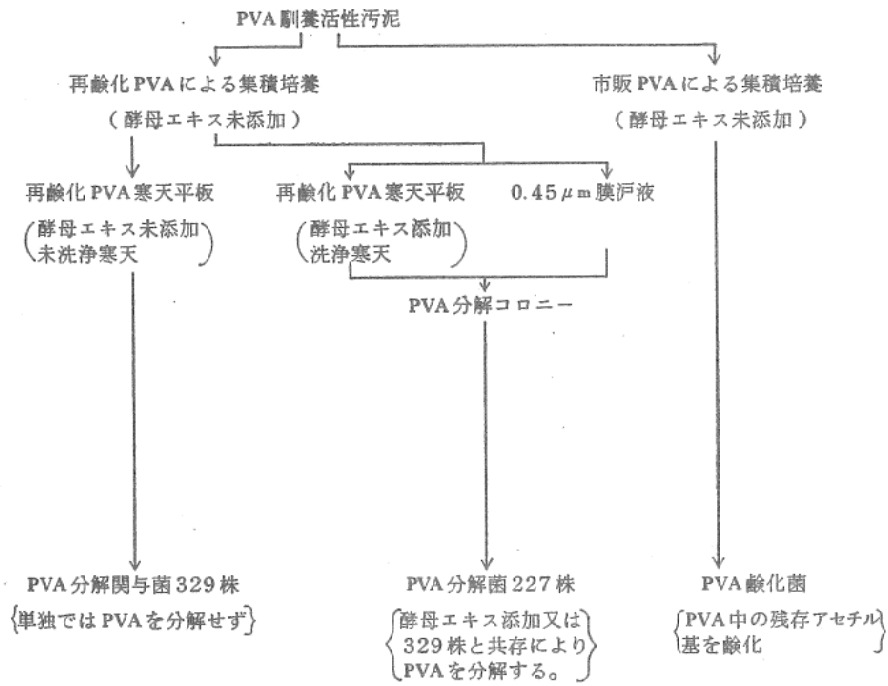


図3 PVA分解細菌の分離操作一覧

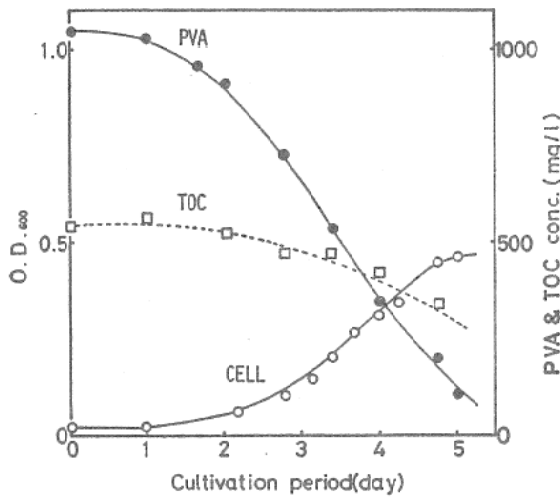


図4 PVA分解菌227株によるPVA分解  
培地：酵母エキス添加 PVA合成培地

ことが推測された。培養中227株の生菌数を調べた所、329株に比べ10~20倍程度多く、しかも、トリプトン・酵母エキス寒天平板上では両コロニーが同一平板上に出現した。ただし329株は1~2日で出現するのに対し、227株は1週間程度必要であった。以上のようにいくつかの点で酒沢ら<sup>2)</sup>の分離した菌と異なった性質を持つ新しいPVA分解菌の純粋分離に成功した。

PVA分解菌227株(写真1)はグラム陰性の桿菌で、運動性を有し、ビタミンB<sub>1</sub>を要求す

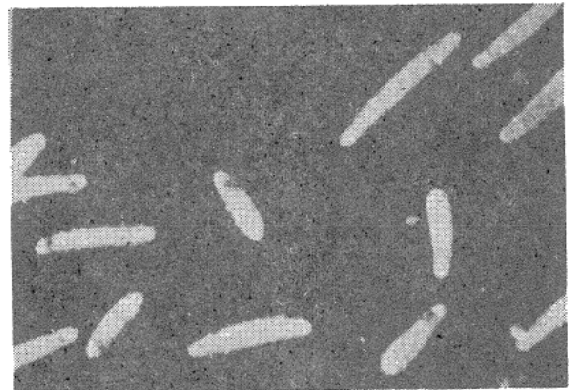


写真1 PVA分解細菌227株

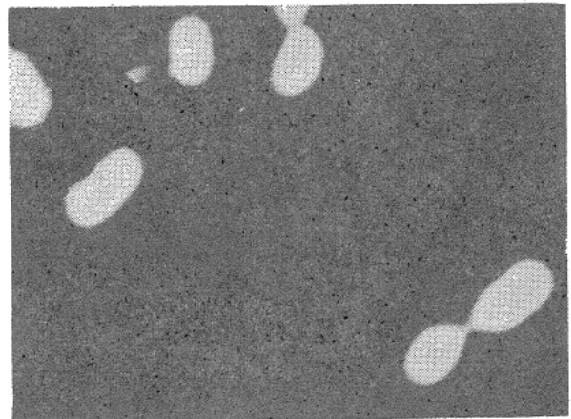


写真2 PVA分解関与細菌329株

る。分類学的諸性質から *Pseudomonas vesicularis* に近縁種と考えている。しかもPVAを唯一の炭素源とした場合チロシン(またはフ

ェニルアラニン), イソロイシンおよびシスチンを要求し, 酵母エキス添加の場合とほぼ同じ速度で PVA を分解した<sup>4)</sup>. 一方 329 株 (グラム陰性の桿菌, 写真 2) は *Flavobacterium* 属細菌であることが明らかとなった.

#### 4. おわりに

PVA 分解細菌の分離操作において, 当初気付かなかった問題, PVA の残存アセチル基, 寒天による阻害, 栄養あるいは増殖促進因子の要求性などが, 分離期間を長びかせた. 中でも市販の寒天ではコロニーを形成しにくいこと, 混合培養では PVA のみの培地でも分解性を示すが純粋菌になると栄養あるいは増殖促進因子を要求することが分離上の最大の落とし穴となった. また, PVA のような高分子化合物の場合, 常に代謝中間体が他の細菌の基質となるため, 分解菌を単一の純粋菌として分離することがむずかしいことも経験した.

今後, 本菌の PVA 分解における三種のアミノ酸の役割や 329 株の役割を明らかにすると共に PVA 分解酵素や PVA 分解に関与するプラスミドの有無などについても調べ, 本菌の分子育種への第一歩を踏み出す予定である.

終りに臨み, 研究全体について詳細な御指導をいただき, 本稿執筆をお勧めいただいた大阪大学工学部橋本奨教授に深謝致します. また, 電子顕微鏡観察は大阪大学工学部高田信男助教授の, NMR の解析は同柳田祥三助教授の御助力によることを記して, 感謝致します.

#### 文 献

- 1) 橋本・尾崎: 本誌, 31 (3) P. 51—54 (1979).
- 2) Finley, J.H.: *Analyt. Chem.*, 33 (13) P. 1925—1927 (1961).
- 3) Sakazawa, C., Shimao, M., Taniguchi, Y., Kato, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 (1) P. 261—267 (1981).
- 4) Hashimoto, S., Fujita, M.: *J. Ferment. Tech.*, 63 (5) P. 471—474 (1985).

