

淡水産植物コカナダモの微生物分解

米虫節夫*, 藤田藤樹夫*, 横山裕彰**, 山縣 敬*

Microbial Degradation of *Elodea nuttalli*Sadao KOMEMUSHI*, Tokio FUJITA*, Hiroaki YOKOYAMA**
and Kei YAMAGATA*

Synopsis

The microbial degradation of the water plant *Elodea nuttalli* (Planch.) St. John, collected at Lake Biwa, was studied. The dry weight of the plant was about 5.6% of the fresh weight. A number of microbes able to break down the plant were isolated from soil samples: seven strains of Gram-negative cocci, 12 strains of Gram-negative rod bacteria, one strain of Gram-positive coccus, five strains of Gram-positive rod bacteria, and 21 strains of filamentous moulds.

The plant was ground with a paste and the microbes were added. The contributions of the microbes to the degradation of the plant were evaluated by the analysis of variance (ANOVA). The largest factor contributing to degradation was the Gram-negative bacteria; the second largest factor was the interaction of Gram-positive and -negative, followed by the moulds as the third largest. The maximum degradation value was 66% (95% confidence limits, 57.2-75.4%) when the plant was treated with a mixture of certain strains of microbes for 20 h degradation treatment. A model of the degradation process is proposed.

I 緒 言

近年、琵琶湖を始め全国の河川、湖沼などに大量の藻類や水性植物が繁殖し、それらが堆積腐敗することにより、水質の悪化や特異な臭いなどの公害が発生している。また、各種の廃棄物による環境汚染の進行が著しく、我々の健康な生活が脅かされるに至っている。亀岡らは淡水産植物による河川の汚濁物質の除去について研究し、それらの植物が植物本来の成分ではないフタル酸エステル、各種の農薬類や重金属類などを吸収する性質があり、水質浄化に有効であることを示している¹⁻⁶⁾。一方、このような環境問題を含め、新しいエネルギー源の開発利用が急がれているが、太陽エネルギーの有効利用は其中でも大きな位置を占めている。太陽エネルギーの

有効利用の一方法として、光合成生物を利用する方法があり、それらの光合成能を利用した高分子化合物の合成⁷⁾やバイオマスとしての利用、さらに、光エネルギーを水素エネルギーとして回収する方法⁸⁾などが研究されている。

河川、湖沼などに大量に発生する藻類や水性植物をバイオマスとして利用したり、亀岡らのいう農薬や、重金属類を水性植物に吸着させ回収する方法の確立などは地球上の有限の資源の有効利用を考える上で重要な課題である。本報では、その第一歩としてそれら植物の主成分であるセルロース性の物質の微生物による分解について検討した。

* 農芸化学科応用微生物学研究室 (Lab. of Applied Microbiology, Dept. of Agricultural Chemistry, Kinki Univ., Higashiosaka, 577, Japan)

** エッセックス日本興研開発本部 (Research & Development Division, Essex Nippon K.K., Awajima-cho 1-2-6, Higashiku, Osaka, 541, Japan)

II 実験材料および実験方法

1. 供試植物

本研究には、固着性の淡水産水性植物の一種であるトチカガミ科のコカナダモ (*Elodea nuttalli* (Planch.) St. John) を用いた。この植物はアメリカ北東部原産で、日本には昭和初期に生理実験材料として輸入されたものが天然水域に逸出した帰化植物で、1961年琵琶湖の北部において再発見された。繁殖力が大変強く2mにも及ぶ茎の一部がきれて流されても、そこで根を下ろし繁殖するため、現在では、琵琶湖はもちろん、稚鮎の放流に伴って関東以西の本州、四国、九州の至る所で普通に見られるようになっている。雌雄異株であるが日本に帰化しているのは雄株のみと報告されている^{9,10)}。

供試試料植物の採取は、亀岡らが採取したのと同じ琵琶湖北部のマキノ町周辺の湖岸近くの水路で行った (Fig. 1)。根の部分はできるだけ取らないように、また付着した泥やゴミなどを取り込まないように植物体を採取し、湖水を用いて若干の洗浄を行い、軽く水切りしたものを大型のポリ容器に入れて実験

室に持ち帰った。水道水により2～3回くり返し洗浄を行った後、十分な水切りをし、同じポリ容器に入れ5℃の恒温室に保存した。この保存により約1ヶ月は、採取時とほぼ同じ状態を保っており、3ヶ月間は、実験に使用できた。

2. 供試土壌試料

供試植物を分解する微生物を検索するため、近畿圏を中心に全国から土壌試料41点を集めた。供試植物の分解実験を行う際には、採取した土壌試料と水道水を1:9の重量比で混和した土壌懸濁液として用いた。

3. 気泡塔型培養槽

用いた気泡塔型培養槽の概略図をFig. 2に示す。内径65 mmφのガラス管 (全長335 mm) の底部にガラスフィルターを取り付け、その下をロート状に絞る。また、管の途中4ヶ所に外径10 mmφのガラス管を取り付け、培養液や空気の流入、流出に用いた。培養液量は、サンプリングに伴う培養液量の減少を考慮し、原則として600 mlで行い、通気量は1.0 vvmとした。試料のサンプリングは、カラム上部からピ

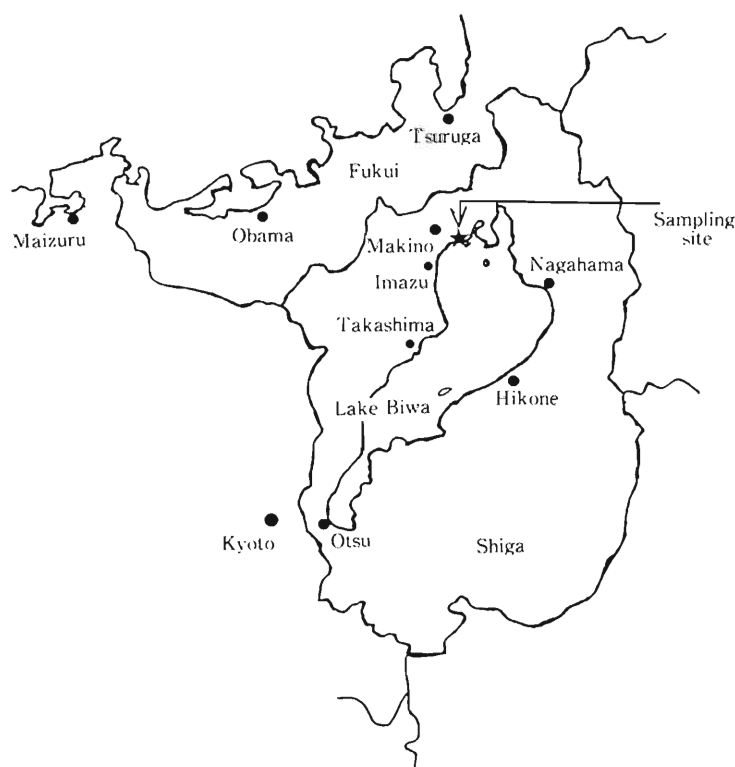


Fig. 1. Sampling site of *Elodea nuttalli*

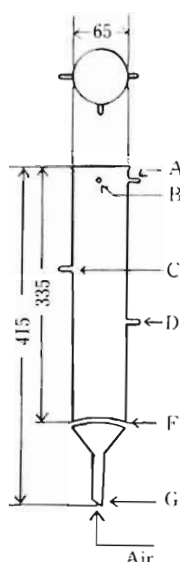


Fig. 2. Diagram of air-bubbling type of reactor used.

A, B. Air outlet pipes; C, D. outlet pipe for medium; F. glass filter; G. air inlet pipe. Values show lengths (in millimeters).

ベットを用いて一定量採取した。培養温度は30°Cに設定したが、温度コントロールは、10 lの恒温水槽中の温水を培養槽内部に取り付けた内径8 mmφのU字型金属パイプの中に通すことにより行った。この方法で培養槽内を30°Cに保つには、10 l恒温水槽の水を32°Cに設定する必要がある。

消泡は、シリコン油、オリーブ油、綿実油などいづれも有効であったが、消泡剤自体が微生物に利用される可能性を少なくする目的で主としてシリコン油を用いた。使用量は、培養液600 mlに対して1～5 mlで十分であり、通常2 mlの添加を適時に行った。

4. 植物固形物最終沈澱量の測定

10 ml メスシリンダーに植物体を分解中のサンプル10.0 mlを注入し、24時間静置後の残存植物固形物の沈澱量を植物固形物最終沈澱量とした。

5. 粘度の測定

粘度は、30°Cの恒温水槽中で、オストワルドの粘度計を用いて測定した。培養液は3000 rpm、20分間の遠心分離を行い、その上澄み液を粘度測定用の供試液とした。粘度の表示は蒸留水を1.00としたときの相対粘度で示した。

6. 微生物分離用培地

細菌類の分離にTBZ添加代肉汁寒天培地

(Meat extract 10 g, NaCl 5 g, Thiabendazol 50 ppm, Agar 15 g, Dist. water 1000 ml, pH 7.0±0.1)を、糸状菌類にはChloramphenicol添加YM寒天培地(Yeast extract 3 g, Meat extract 3 g, Peptone 5 g, Glucose 10 g, Chloramphenicol 50 ppm, Agar 15 g, Dist. water 1000 ml)を用いて行った。

III 結果と考察

1. コカナダモ

採取したコカナダモ試料の茎部分の乾燥重量、水分含有率を測定した。

供試植物(湿重量50 g)の乾燥重量は2.80±0.0702 g (n=3: mean±SD)であり、乾物含有率約5.6%、水分含有率約94.4%であった。水分含有率が約95%という高い値であるため、本植物の分解や有効利用法の検討には、水分を含んだままの状態での処理の方が、乾燥に伴う作業やエネルギーを節約でき合目的的であると思われる。亀岡らの分析によれば、琵琶湖で採取したコカナダモは植物本来の成分ではない化学物質や各種の金属成分を他の多くの植物類よりも多量に含有すると報告しているが、植物体の主成分はやはりセルロースを主体としたものといえる。

水洗した植物体を秤量後、乳鉢でペースト状に破碎したものを蒸留水で希釈し、そのpH値を測定した。原液(×1倍)はpH値8.0、×2倍7.4、×5倍6.8、×10倍6.4、×15倍6.4、×50倍6.4となり、×10倍以上の希釈ではpH値はほとんど変化せず、この時使用した蒸留水と同じpH値を示した。また、上記の希釈した植物破碎試料10 mlに、土壌懸濁液1 mlを加え、28°Cで静置培養し、試料液の色調と植物の固形分の状態を観察したところ、×10、×15倍のものは、他の希釈試料と比較して、肉眼的にも判断できる程の大きい変化を示したので、以後の実験では、植物破碎液の×10、または×15倍希釈のものを使用した。

2. 気泡塔型培養槽による植物体の分解

18 mmφ試験管及び300 ml三角フラスコ、500 ml肩付きフラスコを用いた往復振盪培養により植物体の分解実験を行ったが、振幅5.0 cm、120往復/分程度の振盪では、培養液の底部に植物の固形物が沈澱してしまい、十分に攪拌することができず、本分解実験には適していなかった。そこでFig. 2に示す構造の気泡塔型培養槽を用いて植物体の分解を試みた。

培養液として15倍希釈液を用い、これに栄養源を補給する目的で硫酸アンモニウムを0.1%添加し、

壤試料懸濁液 6 ml を加えて培養を行った。

2～3日間の培養で、培養液の色に変化が現われ始め、顕微鏡による観察でも、細菌群の増殖が認められた。1週間の培養で培養液の色は青緑色から完全な黄土色に変化した。

培養液の最適 pH 値を得る目的で、培養液の初期 pH 値を 5.0, 7.0, 8.0 に調整し経時変化を見た。96 時間培養後、植物固形物の最終沈澱量は Fig. 3 に示すように、全ての条件で、初期量の約 1/2 に減少した。また、培養液の pH 値は培養開始後一度低くなったが、48 時間頃を最低にしてほぼ一定または少し上昇した (Fig. 4)。培養液の粘度変化は、48 時間までは低下傾向を示したが、その後増大して初期 pH 値 5.0, 8.0 のものでは最終的には、初期の粘度より大きくなった (Fig. 5)。培養液中の細胞数は、Fig. 6 に

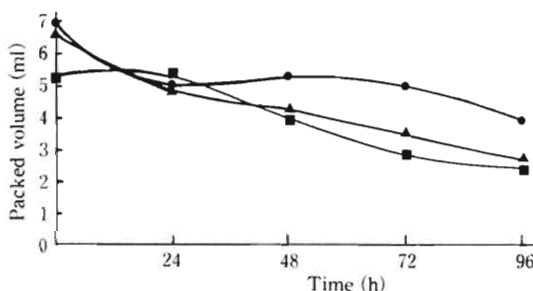


Fig. 3. Changes with degradation time of packed (sedimented) volume of *E. nuttalli* during microbial degradation in a batch-type reaction.

The sample volume was 10.0 ml and the sedimentation period was 24 h.

The starting pH was 8.0 (●), 7.0 (▲), or 5.0 (■).

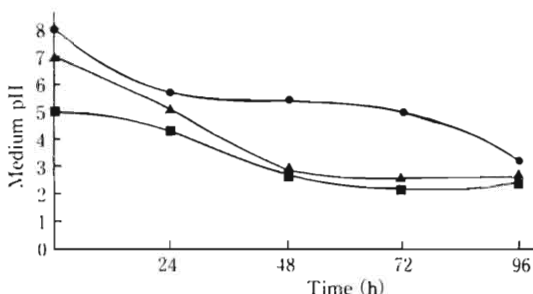


Fig. 4. Changes with time in pH of medium (reaction broth) during microbial degradation in a batch-type reaction.

The starting pH was 8.0 (●), 7.0 (▲), or 5.0 (■).

示すように培養開始とともに一度低下したが、12 時間目頃より増加し 24～72 時間目では 10^9 cells/ml に近い菌数を示した。その後徐々に低下したが、顕微鏡観察では、細菌が減少する傾向に相反して糸状菌の登場が認められ、植物体の細胞壁の急激な減少が認められた。

培養液の pH 経過、粘度変化、植物固形物の崩壊などの経過から考えると、酸及び、高粘度物質等の産出も示唆されるが、単に植物細胞の崩壊に伴う細胞質の流出に伴う変化である可能性もある。また、粘度変化は糸状菌の発育に起因するものとも考えられる。いずれにしても、以上の結果から推測できることは、植物の分解は細菌による第一段階の分解と、それに続く糸状菌による第二段階の分解という二段階反応であるということができる。

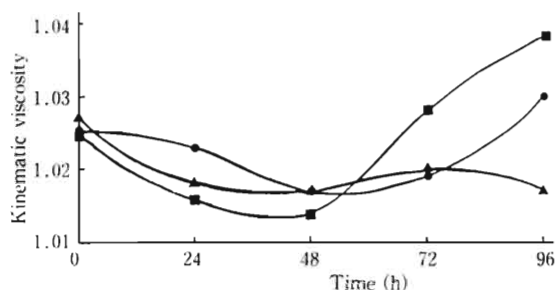


Fig. 5. Changes with time in kinematic viscosity of medium during microbial degradation in a batch-type reaction.

Kinematic viscosity is expressed as the viscosity relative to that of distilled water. The starting pH was 8.0 (●), 7.0 (▲), or 5.0 (■).

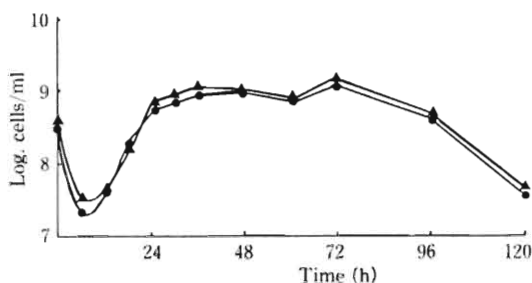


Fig. 6. Changes with time in number of microbial cells during degradation in a batch-type reaction.

The starting pH was 8.0 (●), or 7.0 (▲).

3. 土壌試料のスクリーニング

500 ml 容の坂口フラスコ中に10倍希釈植物液100 ml を注入し、各地から集めた土壌試料の懸濁液を加え、30°C、11日間振盪培養(5 cm, 120 strokes/min.)を行った。肉眼観察で色調変化の著しいものを植物体分解の有望サンプルとみなし、土壌試料41種類から17種類をスクリーニングした。

さらに1次スクリーニングで得た17種の土壌について、20倍希釈植物液を用いた2次スクリーニングを行った。方法は1次スクリーニングと同じ方法で3日間培養し、顕微鏡下で植物の分解を観察して優劣順位をつけた。分解能の高いものは、培養液が緑色から褐色に変化しており、培養液の色からも大略の判断はできた。優劣判定に従い、上位3位までの土壌試料(3サンプル)、4位から6位までのを混合した土壌試料(1サンプル)、7位以下をすべて混合した土壌試料(1サンプル)、及び、17種すべてを混合した土壌試料(1サンプル)を選定した。

再度この6種の土壌検体の植物体分解能を比較検討したが、上位3種の土壌試料による分解能は他のものよりも有意に大きかった。

4. 植物体分解に関する微生物の分離

植物体分解に関する微生物を細菌群と糸状菌群に分けて分離した。細菌群の分離は、10 ml の肉汁培地を入れた試験管に上述の6種の土壌試料を各1 ml ずつ添加し、27°C、2日間前培養したものをThiabendazol 添加肉汁寒天培地を用いて10倍段階希釈法を用いて混釈培養し、形成した集落から25株を分離した。得られた細菌はグラム染色と検鏡による形態学的観測結果から4グループに分類した。すなわち、グラム陽性球菌1株、グラム陽性桿菌5株、グラム陰性球菌7株、グラム陰性桿菌12株である。

糸状菌の分離は、細菌の分離用に前培養したものをさらに2日間(計4日間)培養し、Chloramphenicol 添加のYM培地を用いて混釈培養し、21株を分離した。

先の土壌試料を、80°C、10分の加熱処理後、上記培地で培養し、耐熱性の細菌を4株得た。また、同様の処理に対して5株の糸状菌が得られた。前者は細菌の形成する耐熱性芽胞と考えられるが、後者は糸状菌の分生子が菌塊をつくっていたためではなかろうか。いずれにせよ若干の耐熱性微生物も上記の土壌試料には含まれていると思われる。

5. 分離菌による植物分解能の検討

土壌試料による実験から植物の分解は、細菌と糸状菌類の両者により行われているらしいことが予想

されたので、得られた分離菌を用いて、両者の関係を検討した。熱風乾燥機で乾燥した植物体を乳鉢と乳棒で粉末状にし、その0.500 g を100 ml 容三角フラスコに入れた。グラム陽性菌(GP) 6株、グラム陰性菌(GN) 19株、糸状菌(F) 21株をそれぞれ28°C、20時間振盪培養して得られた培養液を1 ml ずつ混合し、反応混液(植物体と菌との混合液)を作った。

得られた反応混液をGP, GN, Fで示し、その各々をL₈直交配列表に従った実験条件で上記の三角フラスコに添加し、全体を80 ml にし、30°C、5日間培養した。実験の割付をTable 1-1に示す。通気は、市販の観賞魚用エアープンプを用い、直径15 mm のバブルストーンから発泡させることにより行った。培養後、培養液を濾過し、固形分を秤量し残量を得た。初期添加量の0.5 g との差を分解能のデータ(y)とした。

得られた値を分析し、Table 1-2の分散分析表が得られた。1列、2列、4列に割り付けた因子の2因子相互作用の現われる列も考慮し、得られた平方和の全平方和に対する寄与率及び、その寄与率の大きなものからの累積寄与率を示した。これは、割り付けた因子及び考えている2因子相互作用の各々の

Table 1. Degradation of *Elodea nuttalli* by Gram-positive or -negative bacteria or filamentous moulds.

(1) L₈-type Orthogonal Array
[8 Set of Experimental Conditions]

No	Factor								Data
	GP	F	GN						y
	1	2	3	4	5	6	7		(×1000 g)
1	1	1	1	1	1	1	1		333
2	1	1	1	2	2	2	2		261
3	1	2	2	1	1	2	2		319
4	1	2	2	2	2	1	1		238
5	2	1	2	1	2	1	2		298
6	2	1	2	2	1	2	1		298
7	2	2	1	1	2	2	1		291
8	2	2	1	2	1	1	2		241

Levels: 1, with addition of microorganism (in 1 ml of broth)

2, without addition of microorganism (1 ml of distilled water was added)

GP, Gram-positive bacteria

GN, Gram-negative bacteria

F, filamentous moulds

(2) Analysis of Variance

Factor	S.S. ($\times 10^6$)	d.f.	Contribution	
			Ratio (%)	Accumulation (%)
1 GP	66.125	1	0.77	
2 F	1275.125	1	14.91	90.62
3 [GP \times F]	91.125	1	1.07	
4 GN	5151.125	1	60.21	60.21
5 [GP \times GN]	1326.125	1	15.50	75.71
6 [GN \times F]	435.125	1	5.09	95.71
7 Error	210.125	1	2.45	
Total	8554.875	7	100.00	

s.s., Sum of squares; d.f., degree of freedom.

(3) Analysis of Variance (pooled)

Factor	S.S. ($\times 10^6$)	d.f.	m.s. ($\times 10^6$)	F Ratio
1 GP	66.125	1	66.125	—
2 F	1275.125	1	1275.125	8.466
4 GN	5151.125	1	5151.125	34.198*
5 [GP \times GN]	1326.125	1	1326.125	8.804+
6 [GN \times F]	435.125	1	435.125	2.889
Error	301.250	2	150.625	
Total	8554.875	7	100.00	

F(1, 2; 0.05) = 18.5; F(1, 2; 0.10) = 8.53

s.s., Sum of squares; d.f., degree of freedom; m.s., mean square.

自由度が1であり、検定を行うには少ないが、田口らの寄与率的な検討は可能なためである^{11,12)}。

6. 分散分析による分解能の検討

割り付けた因子 GP, GN, F の内、最も植物分解に効果の大きいのは、グラム陰性菌 GN であり、次が糸状菌 F で、グラム陽性菌 GP の分解能はきわめて小さかった。しかし、2 因子相互作用としての GP \times GN は、F とほぼ同等の分解能があり、細菌類の中では各々の菌が単独で作用するよりも、多くの種類の細菌が互いに協力して、より速く植物体を分解するように働いているのではないかとと思われる。また寄与率はかなり減少するが、2 因子相互作用 GN \times F の存在も考えられる。以上の分解能を総合すると全体として約96%の累積寄与を示している。

分解能の小さい2因子相互作用 GP \times F を誤差項にプーリングして分散分析表を作り直すと Table 1

-3 が得られる。検定の結果グラム陰性菌の効果は有意水準5%で有意であり、2因子相互作用 GP \times GN は、10%有意となった。データの構造式を次式で示す。

$$y = \mu + gp + gn + f + (gp \cdot gn) + (gn \cdot f) + \epsilon$$

ここに、 μ は一般平均、gp, gn はそれぞれグラム陽性菌、グラム陰性菌による分解、f は糸状菌による分解、(gp \cdot gn), (gn \cdot f) はそれぞれの2因子相互作用、 ϵ は誤差項を示す。得られたデータの構造式を用いて、3種類の微生物群をすべて添加したときの分解量を推定すると、点推定値は0.331、95%信頼度における信頼区間の幅は ± 0.0457 であり、信頼区間は0.2855~0.3770となる。約1日(20時間)の処理で約66%の固形物が分解されたことになる¹²⁾。

7. 供試植物固形分の分解様式の検討

土壌試料を用いた実験においてはまず細菌類の増殖が起こり pH 値と粘度を低下させたが、培養2~3日頃から糸状菌の発育が顕著になり粘度が上昇するとともに植物固形物の最終沈澱量の減少が続き、最終的には初発量の50%以下になって、pH 値も3.0近くまで低下した。一方、培養の始めから細菌と糸状菌とを添加しておくことにより、上の過程はただちにスムーズに進行したと考えられる。このように考えると、土壌試料のときに得られている結果と、分散分析の結果とはよく一致していると言える。両者を併せて分解様式のモデルを考えると、供試植物であるコカナダモの固形分の分解は、グラム陰性菌とグラム陽性菌との細菌類によってまず分解の端緒が開け、次に糸状菌によりさらに分解されるという2段階分解の図式が妥当であることを示している。この分解形式は、セルロースの分解^{13,14)}において観察されているような exo- β -1,4-glucanase 及び endo- β -1,4-glucanase によってまずセルロースの結晶性部分が分解され、次いで β -glucosidase によりそれらが glucose になるという3酵素の協同作業による2段階分解に良く似ており、供試植物の固形分の主成分がセルロースであることから推定して、この系でもこれらの酵素による分解が行われているものと考えられるが、それらの詳細な検討は今後に残された問題である。

IV 要 約

近年、琵琶湖をはじめ全国の河川、湖沼には大量の淡水産藻類が繁殖している。太陽エネルギーの有効利用という点からみて、それらの藻類をバイオマ

ス源として活用することはたいへん有効であるが、その目的を達成するための第一段階として、植物体の分解が必要である。本報ではコカナダモを供試植物体とし、その微生物分解について検討し、以下の結果を得た。

1) コカナダモの乾燥重量率は、約5.6%、水分含有率は約94.4%であった。

2) 土壌試料からグラム陽性球菌1株、グラム陽性桿菌5株、グラム陰性球菌7株、グラム陰性桿菌12株、糸状菌21株を分離した。

3) 分離した菌株を、グラム陰性細菌、グラム陽性細菌、糸状菌のグループにまとめ、3者の植物体固形物分解について分散分析法による解析を行った。

4) 分散分析の結果から得られた最適条件における植物体分解率は、20時間の処理で、点推定値約66% (95%信頼区間: 57.2~75.4%) であった。

5) 気泡塔型培養槽を用いた土壌試料による分解実験及び分離菌を用いた分散分析による結果から判断して、供試植物体コカナダモの分解は、細菌類による第1段階の分解と糸状菌による第2段階の分解との2段階の過程をとるものといえる。

謝 辞

本研究で使用した供試植物コカナダモの採取ならびにその取扱についていろいろとお教え頂いた近畿大学理工学部応用化学科の亀岡弘教授と、その研究室の諸氏に心から御礼申し上げます。本研究の一部は近畿大学農学部農芸化学科応用微生物学研究室の専攻学生、土井恭三、稲村純一、竹田隆之、竹田登史之君らが担当した。また、本報をまとめるに当たり吉本剛、池田昌代、吉村佐紀恵君らにいろいろお世話になった。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 亀岡弘・貴志秀人・分部雅治：近畿大学公害研究所研究報告，7，37-42，(1979)
- 2) 亀岡弘・尾本祐司・岡崎雄交：同誌，10，31-34，(1982)
- 3) 亀岡弘・山本博昭・宮沢三雄：同誌，12，45-49，(1984)，13，25-30，(1985)
- 4) 亀岡弘・栗山博之：同誌，13，31-36，(1985)
- 5) 亀岡弘・栗山博之・西井基夫：同誌，14，25-32，(1986)
- 6) 亀岡弘・栗山博之・西井基夫・宮沢三雄：同誌，15，51-54，(1987)
- 7) Bassham J.A. : "Advances in Enzymology". 25, 39-117. (1963)
- 8) Pietro A.S. et. al. eds: Proceedings of the Workshop on Bio-Solar Conversion, 柴田和雄・宮地重遠監訳：生物による太陽エネルギー変換，東京大学出版会，東京，(1976)
- 9) 奥山春季・小山鉄夫監修：週間朝日百科「世界の植物」，102，2400-2403，(1977)
- 10) 大滝末男・石戸忠：日本水性植物図鑑，190-191，北隆館，東京，(1980)
- 11) 田口玄一：新版実験計画法，79-85，丸善，東京，(1962)
- 12) 安藤貞一・朝尾正：実験計画法演習，27-31，日科技連出版社，東京，(1968)
- 13) 西沢一俊：セルラーゼ，63-201，南江堂，東京，(1974)
- 14) 当山清善：未利用資源の微生物利用，(岩井重久編：微生物による環境制御・管理技術マニュアル，355-362，環境技術研究会，大阪，(1983) (昭和63年11月29日受理)