

# 細菌による家庭用浄化槽内のセルロース分解

三 好 英 夫

(農学部 水族環境学研究室)

## Cellulolysis in a Night-soil Treatment Tank

Hideo MIYOSHI

Laboratory of Aquatic Environment, Faculty of Agriculture

**Abstract :** A relatively large number of aerobic cellulolytic bacteria were found in a small, extended aeration, night-soil treatment tank, and the two predominant strains capable of degrading cellulose were isolated from the contents of the tank. Both the strains were identified as members of the genus *Cellulomonas*. Then, one of the two strains was employed for further experiments : the organism grew well at pH 7 to 8 and 30°C ; active cellulolysis by the growing culture occurred at the above-described pH and temperature ; the addition of vitamins or amino acids into the growth media enhanced the cellulolytic activity of the organism.

Based on these findings, the possible role of aerobic cellulolytic bacteria in night-soil treatment tanks is discussed.

### 緒 言

家庭用浄化槽にはかなりの量のセルロースが投入されているが、その後のこれらのゆくえははっきりとは分かっていない。恐らく、これらのセルロースのかかなりの部分は、細菌の作用によって可溶化されているものと考えられるが、現状ではこのようなセルロース分解についての知見は極めて少ない。

そこでまず、セルロース分解反応の、主要な担い手であるセルロース分解細菌が、家庭用ばっ気型し尿浄化槽内にとどの程度分布しているかを調査した。次に浄化槽内より採取した試料より、セルロース分解活性を有する2菌株の好気性細菌を純粋分離し、その細菌学的性状を調べた。

更に *in vitro* で、純粋分離菌によるセルロース分解反応と、環境因子とのかかわり合いについて検討を加え、浄化槽内で進行しているセルロース分解反応の細菌学的な側面の究明を行った。

### 実 験 方 法

**培 地** Omeliansky<sup>1)</sup> によって報告された組成の培地を一部改変して使用した。即ち一般の培養には、水道水中に 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2%  $\text{CaCO}_3$ 、0.001%  $\text{NaCl}$  及びろ紙片を加えた培地 1 を使用した。分離用平板作製には、培地 1 の組成よりろ紙片を除き、0.5% セロビオース及び 1.2% 寒天を加えた培地 2 を使用した。

**浄化槽よりの計数試料** 高知県紙業試験場内に設置された実験用モデル浄化槽（東芝サミット M75 型、総容量 786l、槽内水深約 90cm）の、水面下約 50cm の所より中層試料を、水面下約 80cm の所より下層試料を採取した。

**セルロース分解細菌の生菌数測定** 採取試料は事情の許す限り速やかに実験室に搬入し、ブレンダーで 2 分間強くかくはん処理し、その一定量を取り滅菌水で一連の 10 倍稀釈系列を作り、これらの稀釈液を培地 1 にそれぞれ 5 本ずつ接種し、30°C で 3 週間ふ卵した後、ろ紙片の崩壊の有無を調べ、MPN 方式によって生菌数を推定した。

**セルロース分解細菌の増殖量測定** 培養液 10ml に対し、水で20倍に希釈したホルマリン 0.5 ml と濃塩酸 0.2ml を加え、混合後10分間静置し未分解のセルロース繊維を沈降させ、光路 10mm のセルを使用し 660m $\mu$  における吸光度を測定し増殖量とした。

**セルロース分解細菌の分離** 培地 1 でろ紙片の崩壊を確認した培養を滅菌水で希釈し、その一定量を培地 2 に接種し平板を作り、生じたコロニーのうちで独立したものを再び培地 1 に接種し、ろ紙片の崩壊を確認するとゆう一連の操作を数回繰り返して純粋分離を行った。

**細菌の形態及び生理的性状の調査** いずれも常法<sup>2)</sup>に従って行った。

**セルロース分解量測定** セルロース分解量は Lembeck ら<sup>3)</sup>の記載に従って、初期重量より残存重量を差引いて算出した。

**糖の定量** 糖はアンスロン法<sup>4)</sup>によって定量した。

**セルラーゼ活性の測定** セルラーゼ活性は Poincelot と Day の方法<sup>5)</sup>に準じて測定した。即ち、被検液にリマゾールブリリアントブルーR 処理セルロースを湿重量で 0.1% 加え、30°C で20時間しんとうし、遊離した色素の 595m $\mu$  における吸光度を求め、これをそのまま活性として表示した。なお、セルロースはりん酸膨潤させたものを用いた。また反応液中で雑菌の増殖が起ることを防ぐため、少量のチモールを添加して測定を行った。

## 結果と考察

### 浄化槽内の好気性セルロース分解細菌の消長

1973年5月から7月までの約3ヶ月間に、実験用モデル浄化槽の中層より中・高温期の試料を数回にわたって採取した。次いで1977年11月から1978年2月までの約3ヶ月間に、同じ浄化槽の中層及び下層より低温期の試料を数回にわたり採取した。

それぞれの試料中の好気性セルロース分解細菌の計数結果は、Fig. 1 及び 2 に示したとおりであって、多少の例外を別にすれば、両期間を通じて好気性セルロース分解細菌は  $10^5 \sim 10^7$  MPN/ml 程度検出され、高温期に全般的にやや高い計数値が得られたが、その消長には必ずしも支配的な温度の影響は認められなかった。ただ、中層試料に比して下層試料中に常に多数のセルロース分解細菌が検出されたが、この傾向は下層試料中にセルロース質などを含む固形物が多く、この固形物中

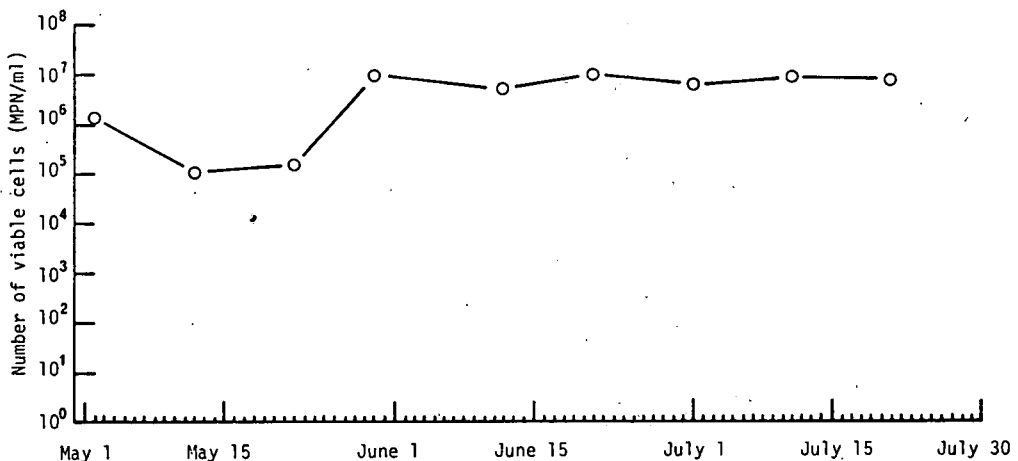


Fig. 1. Numbers of aerobic cellulolytic bacteria in a night-soil treatment tank for the period May to July 1973. o : middle layer sample.

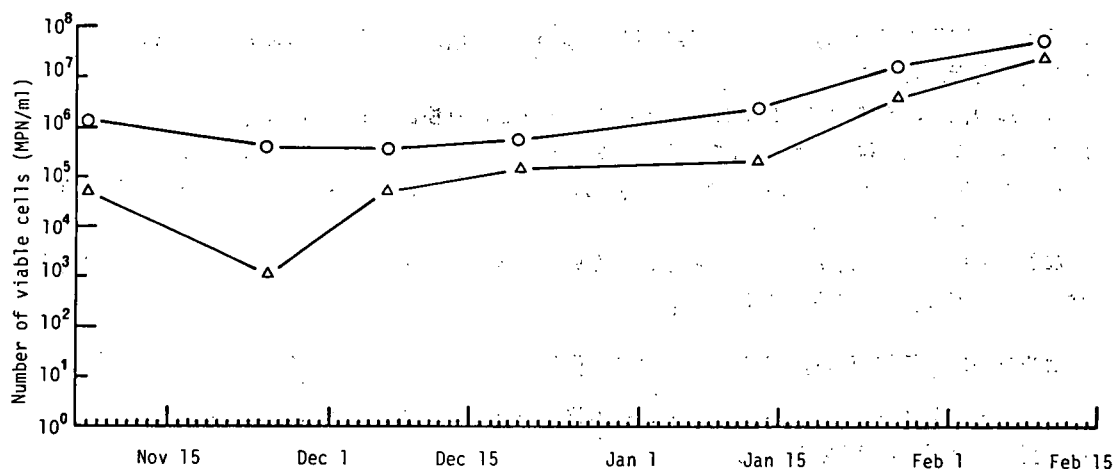


Fig. 2. Numbers of aerobic cellulolytic bacteria in a night-soil treatment tank for the period November 1977 to February 1978. △, middle layer sample; ○, bottom layer sample.

のセルロース質の表面或は内部に、セルロース分解細菌が付着し増殖していることを反映したためと解される。

いずれにしても、ここで得られたセルロース分解細菌の計数値のみから判断すれば、この種の浄化槽内では、セルロース質投入量の多いことを反映して、セルロース分解の可能な菌が、周年にわたって相当数分布しているものと考えられる。

#### 浄化槽より分離した好気性セルロース分解細菌の性状

1977年6月3日に採取した浄化槽内の汚泥より、セルロース分解活性を有する好気性細菌2菌株を純粋分離し、それぞれ菌株 Y<sub>1</sub> 及び Y<sub>2</sub> と名付け、その細菌学的性状を調査した。

結果は Table 1 に示したとおりであって、これらの菌株はいずれも運動性を有するグラム陽性

Table 1. Morphological, cultural, and biochemical properties of cellulolytic isolates from a night-soil treatment tank

Properties	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
<b>Morphological characteristics</b>		
Form	Irregular rod	Irregular rod
Size	1-7×0.2-0.7μ	1-7×0.2-0.8μ
Motility	+	+
Gram stain	+	+
<b>Cultural characteristics</b>		
Optimal growth temperature	30°C	30°C
Gelatin stab	+	+
Characteristic growth on agar slant	Yellow pigment	Yellow pigment
<b>Biochemical characteristics</b>		
Starch hydrolysis	+	+
Nitrate reduction	-	-
Catalase	+	+
Voges-Proskauer test	-	-
Methyl red test	-	-
Indol production	-	-

の桿菌で、現行の Bergey 8版の分類体系<sup>6)</sup>に従うと、両菌株とも *Cellulomonas* 属に分類するのが妥当と考えられる。

この類の菌は、今までにしばしば土壌とか下水中などより検出されており、Bergey の便覧の7版<sup>7)</sup>では、この属には10種が記載されていたが、8版では *C. flavigena* 1種にしぼられている。しかしここで分離した菌株  $Y_1$  と  $Y_2$  を、直ちに *C. flavigena* とするのが妥当か否かは更に検討が必要であろう。

なお、菌株  $Y_1$  と  $Y_2$  は、同一かあるいは極めて近縁の菌と考えられたので、このあとの室内実験は主として菌株  $Y_1$  を用いて行った。

### セルロース分解細菌の増殖とセルロース分解作用に及ぼす環境因子の影響

セルロース分解細菌菌株  $Y_1$  を用いて、その増殖及び増殖細胞レベルのセルロース分解活性に及ぼす温度と pH の影響を調査した。

温度について得られた結果は Fig.3 に示したとおりであって、その増殖及び増殖細胞レベルのセルロース分解活性は、30°C 前後が最適で、この温度を離れるにつれて高低いずれの側でも、増殖及びセルロース分解活性は小となった。特に 30°C 以上の高温域では、増殖並びにセルロース分解活性の急激な低下がみられた。しかし低温域ではかなり低い温度まで増殖がみられ、かつセルロ

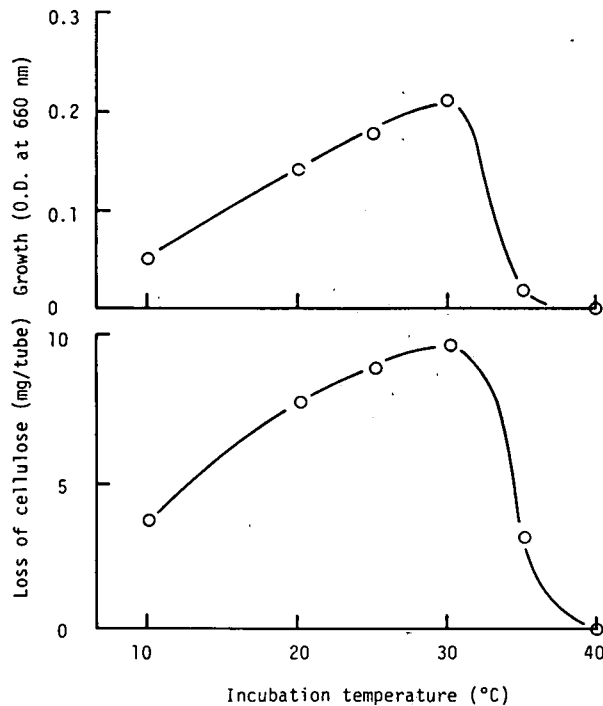


Fig. 3. Effect of temperature on the growth and the weight loss of cellulose of strain  $Y_1$ .

ース分解も相当活発に進行した。従って浄化槽内では厳冬期でもかなりの速度でセルロース分解が進行しているものと考えられる。

pH の影響を検討した結果は Fig.4 に示したとおりであって、増殖及び増殖細胞レベルでのセルロース分解反応は、初期 pH 7~8 が最適で、pH 5 以下あるいは pH 10 以上では増殖もセ

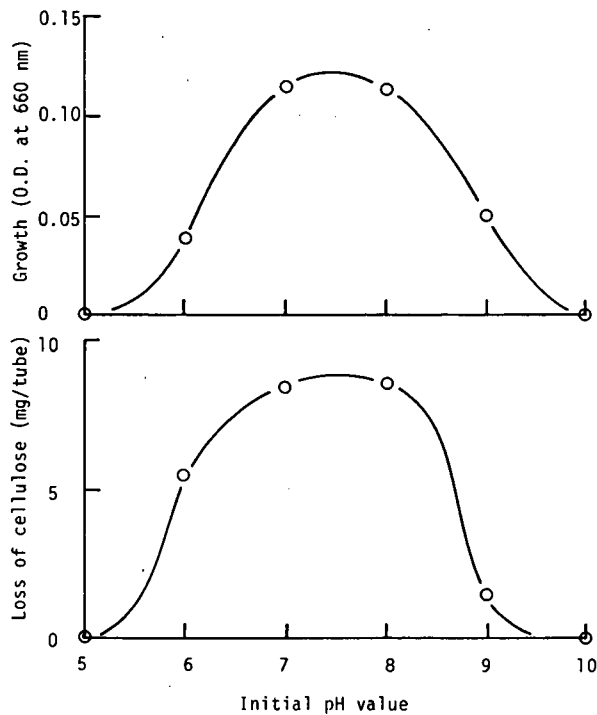


Fig. 4. Effect of pH on the growth and the weight loss of cellulose of strain Y<sub>1</sub>.

ルロース分解も共に起らなかった。

実際の浄化槽内の pH はほぼ中性で、これから大きく離れることは稀なため、槽内におけるセルロース分解反応が、pH によって大きく左右されることは少ないと考えてよからう。

以上2組の実験は、いずれも培地1を基礎として用いて行ったものであるが、実際の浄化槽内では、各種の有機物、特にビタミンとかアミノ酸などの微生物活性に影響力の大きい物質が、かなり高濃度に混在しているため、これらの物質の影響が増殖細胞レベルのセルロース分解にどのような影響を及ぼすかを次に検討した。

結果は Fig. 5 に示したとおりであって、増殖細胞レベルのセルロース分解速度は、無機塩・セ

Addition to Medium 1	Weight loss of cellulose (mg/tube)	
	10	20
None	~10	~10
Vitamin mixture*	~12	~12
Vitamin-free Casamino acids(Difco)	~15	~15
Peptone(Difco)	~18	~18

Fig. 5. Weight loss of cellulose by strain Y<sub>1</sub> in various nutritional environments.

\* The vitamin mixture contained (mg/l) : p-aminobenzoic acid, 1; biotin, 0.01; cobalamin, 0.01; choline.HCl, 1; folic acid, 0.01; niacin, 1; Ca-pantothenate, 1; pyridoxal, 1; riboflavin, 1; thiamine, 1.

ルロースのみを含む対照区（培地1）と比べて、10種ビタミン添加区、0.1%ビタミン不含カザミノ酸添加区、及び0.1%ペプトン添加区において、この順に後者程大となった。特にビタミンとアミノ酸の両群を多量に含むペプトン添加区では、対照区の約2倍近い速度でセルロース分解が進行した。このことから浄化槽内のこの種の有機物は、セルロース分解を促進していると推定される。

なお、分離菌の培養に雑菌が混入した場合に、セルロース分解細菌の増殖とセルロース分解反応が促進される現象がしばしば見出されたが、これは恐らく雑菌の代謝作用により、培地中にビタミンとかアミノ酸の供給が起ったためと解される。

#### セルロース分解細菌の増殖にともなう起る *in vitro* での変化

セルロース分解細菌菌株 Y<sub>1</sub> の増殖に付随して、培地内で起る各種の変化を調査した。

結果は Fig. 6 に示したとおりであって、生菌数は最初の3週間は増加し、その後は減少した。この間に、セルロース分解量は漸増し、糖量は生菌数の変動とほぼ対応して増減し、pH はゆるや

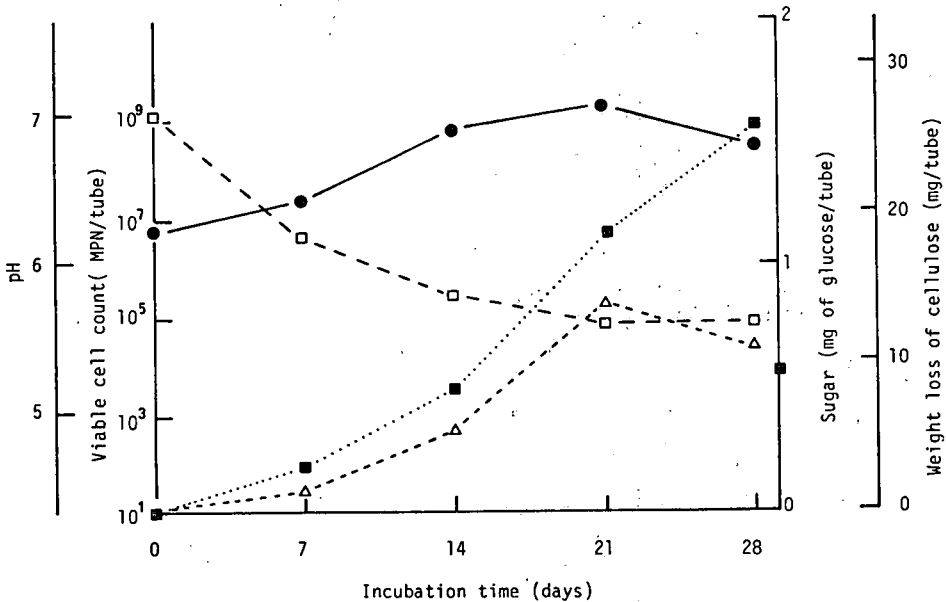


Fig. 6. Growth curve of strain Y<sub>1</sub> and weight loss of cellulose, accumulation of sugar, and variation of pH values in the course of the growth. □, pH; ●, cell count; ■, weight loss of cellulose; △, sugar.

かに酸性側に移行した。培地内で起ったこのような一連の変化から判断すると、セルロースは糖を経て有機酸へと分解されるものと推定される。この場合、強力な培地の緩衝能にもかかわらず、著明な pH 低下が起ったことから、可溶化したセルロースのかかなりの部分が有機酸にまで分解されたものと考えられる。

#### セルロース分解細菌の生産したセルラーゼの活性に及ぼす環境因子の影響

セルロース水解反応を触媒する酵素すなわちセルラーゼは、既往の研究<sup>9)</sup>から判断すれば、その主要部分は菌体外に分泌されるものと予想されるので、菌株 Y<sub>1</sub> の培養を遠心処理によって細胞部分と上透液に分け、それぞれについてセルラーゼ活性を測定しこの点を確かめた。

結果は Fig. 7 に示したとおりで、生産されたセルラーゼの大部分が菌体外に放出され、細胞結合性セルラーゼはごく一部分であった。

Sample	Dye absorbance (595 nm)		
	0.1	0.2	0.3
Whole culture	[Bar extending to approx. 0.28]		
Cell-free culture fluid	[Bar extending to approx. 0.32]		
Cells	[Bar extending to approx. 0.05]		

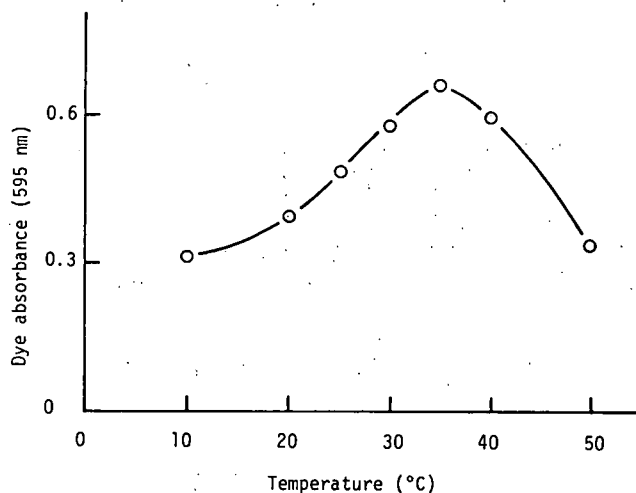
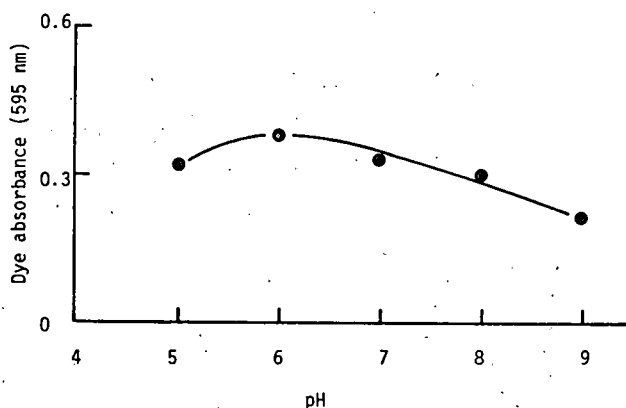
Fig. 7. Localization of cellulase activity in the culture of strain Y<sub>1</sub>.

そこで、遠心処理によって得られた上透液をそのまま粗酵素液として用い、セルラーゼ活性に及ぼす pH と温度の影響について検討した。

このうち、温度の影響は、Fig. 8 に示したとおりであって、かなり広い温度範囲で活性がみとめられ、35°C 附近に最適値を有していた。この菌株の増殖とか増殖細胞レベルのセルロース分解反応の最適温度が、いずれも 30°C 附近にあったことから、セルラーゼ活性はこれより若干高い温度に最適値を有していることになる。この事実、恐らく菌体内に 30°C より高い温度では活性が急減する主要な代謝系が存在していることを示唆しているものと解される。

セルラーゼ活性に及ぼす pH の影響は、Fig. 9 に示したとおりであって、この場合にも相当広い pH 域にわたって活性が認められ、最適値は pH 6.0 附近にあった。菌株 Y<sub>1</sub> の増殖及び増殖細胞レベルのセルロース分解活性の、最適 pH は 7~8 であったことから、酵素レベルのセルロース水解活性は、この値より酸性側に最適値を有していることになったが、その理由は明らかでない。ただ、このように増殖の最適 pH とセル

ラーゼ活性のそれとの間に開きがあり、後者がより酸性側にある現象は、Han と Srinivasan<sup>9)</sup> によって土壤中より分離された *Cellulomonas* でも認められている。

Fig. 8. Effect of temperature on the cellulase activity of cell-free culture fluid after the growth of strain Y<sub>1</sub>. The values recorded were not corrected for non-enzymatic changes.Fig. 9. Effect of pH on the cellulase activity of cell-free culture fluid after the growth of strain Y<sub>1</sub>. The values recorded were not corrected for non-enzymatic changes.

一般にセルロース分解細菌の培養が終期に近づき、大量のセルラーゼが蓄積された時点では、培地の pH が低下していることが多い事実と考え合せると、このような傾向ははなはだ興味深く感ぜられる。

この研究で得られた浄化槽内のセルロース分解細菌の計数結果、並びに単離セルロース分解細菌を用いて行った、増殖とセルロース分解活性に及ぼす pH と温度の影響調査の結果などから総合的に判断して、家庭用浄化槽内では周年にわたってかなり活発なセルロース分解が進行しているものと推定された。

従って、今まで殆んど注意を払われていなかった家庭用浄化槽内におけるセルロース分解反応について、今後は *in situ* でも検討を重ねることが必要と考えられる。

### 要 約

家庭用ばっ気型浄化槽内には、セルロース質投入量の多いことを反映して、好気性セルロース分解細菌が、高温期、低温期を問わずかなり多数分布していた。その優占種を単離し細菌学的性状を調べた結果、*Cellulomonas* 属に分類するのが妥当と考えられた。

単離菌の増殖並びに増殖細胞レベルのセルロース分解反応は、pH は 7~8、温度は 30°C で活発に起った。また増殖細胞レベルのセルロース分解活性は、ビタミンとかアミノ酸などの添加により促進された。

これらの知見をふまえて、家庭用浄化槽内におけるセルロース分解細菌の役割について考察した。

### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり種々御援助をいただいた高知県紙業試験場の西川弘場長、野村省三主任研究員に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Kadota, H., A study on the marine aerobic cellulose-decomposing bacteria. *Mem. Coll. Agri. Kyoto Univ.*, No. 74, 8 (1956).
- 2) Conn, H. J. (ed), "Manual of Microbiological Methods", McGraw-Hill, New York, (1957).
- 3) Lembeck, W. J., and Colmer, A. R., Effect of herbicides on cellulose decomposition by *Sporocytophaga myxococcoides*. *Appl. Microbiol.* 15, 300-303 (1967).
- 4) Scott, T. A., Jr., and Melvin, E. H., Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, 25, 1656-1661 (1953).
- 5) Poincelot, R. P. and Day, P. R., Simple dye release assay for determining cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiol.*, 23, 875-879 (1972).
- 6) Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. (ed), "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn, Williams and Wilkins, Baltimore (1974).
- 7) Bread, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R. (ed), "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edn, Williams and Wilkins, Baltimore (1957).
- 8) 西澤一俊, セルラーゼ, p. 90-103, 南江堂, 東京 (1974).
- 9) Han, Y. W. and Srinivasan, V. R., Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. *Appl. Microbiol.*, 16, 1140-1145 (1968).

(昭和53年6月13日受理)

(昭和53年12月7日発行)