

山梨大学工学部 正会員 片山けい子

1.はじめに アンチモン、ヒ素、ビスマス、ホウ素、カドミウム、コバルト、鉛、水銀、ニッケル、銀、テルル、亜鉛といった金属あるいは半金属イオン耐性を有する微生物の耐性機構に関しては、その耐性がアラスミドにより支配されていることが遺伝学的に明らかにされている。また、重金属イオン耐性性能の獲得ないし脱落の機構についての検討もおこなわれてきている¹⁾。本研究は、重金属耐性菌の酵素の構造が、非耐性菌の酵素の構造と比較して、どのような差異があり、重金属イオン耐性という機能を発現しているかを明らかにすることを目的としている。酵素としては、乳糖の加水分解を触媒する β -galactosidase(以下 β -Gase)をとりあげた。今回は、銅イオンを添加したスキムミルク水と人工下水として培養した活性汚泥中の β -Gaseの基礎的な性質について、2,3検討した結果を報告する。

2.実験方法 スキムミルク水と人工下水として培養した活性汚泥(以下 Normal AS)と、スキムミルク水に $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液を添加した培養液と人工下水として培養した活性汚泥(以下 Cu^{2+} AS)を実験に用いた。培養液の組成をTable 1に示した。銅イオン耐性菌数は1ℓ中にスキムミルク500mg、粉末寒天15gを含む培地に、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液を、0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mMとなるよう適量添加し、

Table 1 Composition of skim milk solution and skim milk solution containing copper ion

Constituent	Concentration (mg/l)
BOD	711.0
COD	552.3
Total-N	52.3
Total-P	9.9
Copper ion	0.15 (mM)

ガラスビーズでフロックを破壊した活性汚泥を接種したのち、シャーレ内で平板培養して、20℃ 48時間、37℃ 24時間培養後に生育してきたコロニー数を計数した。 β -Gase活性は、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranosideを基質とする方法で測定した²⁾。至適pHは、Tris/malate

Table 2 Colonies of copper ion tolerant bacteria on the skim milk-agar media containing various concentrations of copper ion (colonies/plate)

		Copper ion concentration (mM)				
		0	0.05	0.1	0.5	1.0
Normal AS	20°C	150(100)	80(53)	70(47)	60(40)	60(40)
	37°C	240(100)	110(46)	85(35)	95(40)	70(29)
Cu^{2+} AS	20°C	80(100)	70(88)	60(75)	50(63)	50(63)
	37°C	140(100)	125(89)	130(93)	100(71)	95(68)

Parenthesized number reveals colonies as % of colonies formed on the media in the absence of copper ion.

NaOH緩衝液を用い、pH 5.5～8.5の範囲で β -Gase活性の測定をおこない、求めた K_m 値および最大速度 V_{max} は、Hanesの7°ロットにより算出した⁴⁾。

3.結果および考察 培地中の銅イオン濃度を0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mMと変化させて寒天平板上に出現したコロニー数とTable 2に示した。Normal ASと Cu^{2+} ASとでは、接種した活性汚泥濃度が若干異なり、銅イオン濃度0mMで出現するコロニー数が一致しなかったため、比較を容易にするため、かきこ内に各汚泥の銅イオン濃度0mMの場合に出現したコロニー数を100%として算出した各銅イオン濃度におけるコロニー数の%を示した。また、20℃での培養は、37℃の培養より、生育したコロニー数は少なく、37℃で出現したコロニー数を100%とすれば、20℃では再汚泥とも、37℃の約50～60%であった。Normal ASは銅イオンに馴養されていないが、培地中に銅イオンが1.0mM存在しても、銅イオン0mMと比較して、20℃で40%、37℃で約30%のコロニーの生育が認められた。一方、 Cu^{2+} ASは、通常の培養においてばう気槽内に添加した銅イオン濃度は0.15mMであったが、寒天平板上では銅イオン1.0mMの場合、銅イオン0mMと比較して、20℃で約60%、37℃で約70%のコロニーが出現した。寒天を用いた培地に現われるコロニー数が、ばう気槽内に存在する活性汚泥細菌数とどの程度反映するか、また、銅イオンと寒天の間に何らかの作用が存在するか否かなど問題は残るが、銅イオン1.0mM(銅イオン64mg/l)を含む寒天平板上でも、両汚泥とも、特に Cu^{2+} ASにおいて銅イオン耐性菌の生育が多数

観察された。

Normal AS および Cu^{2+} AS の β -Gase の至適 pH を, Tris/malate NaOH 緩衝液, pH 5.5 ~ 8.5 を用いて測定した結果を Fig. 1 に示した。Normal AS では, pH 7.2 付近に至適 pH が存在するが, Cu^{2+} AS では, pH 5.5 ~ 8.5 間の活性は, ほとんど同一レベルにあり, 至適 pH 域は明らかでなかった。

Fig. 2 は, Normal AS および Cu^{2+} AS の β -Gase に対するナトリウムイオンの効果について示したものである。Normal AS の β -Gase に対しては, ナトリウムイオンは activator として作用するが, Cu^{2+} AS の β -Gase に対してはナトリウムイオンの activator としての効果は認められなかった。また, Cu^{2+} AS の β -Gase 活性レベルは, Normal AS の β -Gase と比較してかなり低レベルであった。

Normal AS および Cu^{2+} AS の β -Gase 活性を, 基質濃度を変えて初速度を測定し, Hanes プロットに基いて K_m 値 および最大速度 V_{max} の算出をおこない, Table 3 に要約した。 K_m 値は, Normal AS で $1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, Cu^{2+} AS で $1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ と, ほぼ一致しており, 基質との親和性にはほとんど差がないことが推察される。最大速度 V_{max} は, Normal AS の β -Gase が 0.21, Cu^{2+} AS の β -Gase が 0.04 $\mu\text{mole nitrophenol/ ss } 10\text{mg/min}$ と約 5 倍の違いがあった。

以上, Normal AS と Cu^{2+} AS の β -Gase の性質を比較すると, Normal AS の β -Gase は pH 7.2 付近に至適 pH 域があり, ナトリウムイオンが activator であったが, Cu^{2+} AS の β -Gase には, 至適 pH は観察されず, ナトリウムイオンの activator としての効果はみられなかった。また両汚泥の β -Gase の K_m 値は, ほぼ等しかったが, 最大速度に約 5 倍の相違があった。よって, Normal AS と, Cu^{2+} AS の β -Gase は質的に異なる β -Gase であることが推察された。

4. まとめ Normal AS および Cu^{2+} AS とともに, 銅イオン耐性菌が多数存在した。また, 両汚泥の β -Gase には, 質的相違があることが推察された。今後, 両汚泥の β -Gase の精製を試み, 分子量, アミノ酸組成, サルコニット構造および免疫学的諸性質を検討し, 銅イオン耐性ないし銅イオンによる阻害の本質を解明したい。

おわりに, 本研究の一部は, 昭和 55 年度文部省科学研究費 (奨励研究 A) の補助を受けて行ったものであることを記し, 深謝申し上げます。

<参考文献>

- 1) L. H. Bopp et al., 1983, J. Bacteriol., vol. 155, No. 3, 1105-1109 など他多数
- 2) 有村春明ら, 1984, 日本農芸化学会昭和 59 年度大会講演要旨集, p 95
- 3) 片山てい子, 1984, 水質汚濁研究, vol. 7, No. 2, in press
- 4) C. S. Hanes, 1932, Biochem. J., vol. 26, 1406-1421

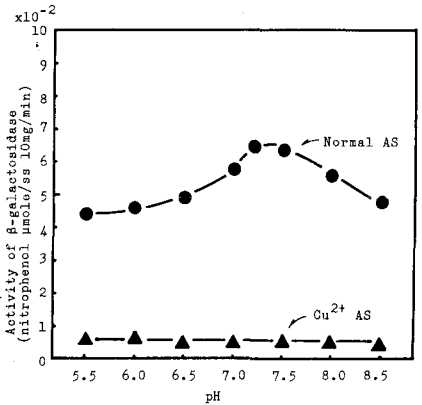


Fig. 1 Optimum pH for β -galactosidase

Table 3 Parameters of β -galactosidase reaction velocity

β -galactosidase	K_m a)	V_{max} b)
Normal AS	1.6×10^{-3}	0.21
Cu^{2+} AS	1.3×10^{-3}	0.04

a) M b) nitrophenol μmole produced per min per 10 mg of activated sludge

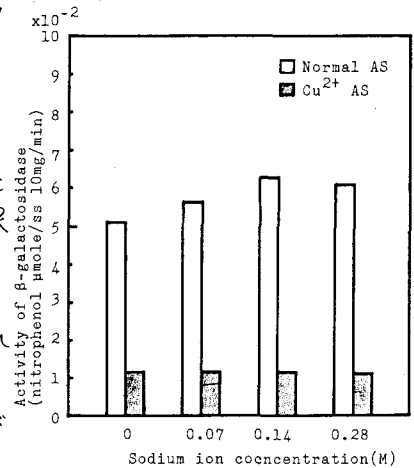


Fig. 2 Effect of sodium ion on the activity of β -galactosidase