

VII-158

※放線菌による環境汚染物質の除去に及ぼすフミン酸の影響

*** 京都大学大学院工学研究科 学生員 胡 俊杰 日本工営 西川 貴政
正会員 寺島 泰 正会員 越川 博元

1. はじめに

近年、放線菌が土壤中の難分解性有機物の分解に重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究では、放線菌の機能解明や実際の土壌処理に用いるための基礎として、数種の *Streptomyces* 属放線菌を用いて土壤中の難分解性物質であるフミン酸の除去について検討するとともに、フミン酸の存在が対象放線菌の生産する菌体外ペルオキシダーゼ活性や、対象放線菌による環境汚染物質である2,4-ジクロロフェノール（2,4-DCP）の除去に及ぼす影響についても調べた。

2. 実験方法

対象菌種を *S. chromofuscus* A11、*S. viridosporus* T7A、*S. setonii* 75Vi2、とし、以下の3つの実験を行った。実験に用いた液体培地の基本組成を表1に示す。なお、本研究では、Aldrich Chemical Co.製フミン酸を使用した。また以前の研究成果¹⁾に基づいて、すべての実験は30℃、pH 7.0で行った。

(1) 対象菌種によるフミン酸の除去

滅菌した液体培地にフミン酸濃度を150mg/Lになるように添加し、これを実験培地とした。次に実験培地を200mLの三角フラスコに40mLずつ分注し、それぞれの菌を植菌した後、振とう条件下で16日間にわたって除去実験を行った。サンプリングは植菌後0、4、7、10、13、16日に行い、各時間のフミン酸濃度、またグルコース濃度、T-N、MLSSを測定した。

(2) 対象菌種の生産する菌体外ペルオキシダーゼ活性に及ぼすフミン酸の影響

表1に示した液体培地を用い、10日間で各対象菌種を培養した。その培養液を限外濾過で濃縮・透析し、菌体外酵素液を得た。それを用いて、フミン酸濃度を0、25、50、100、200、300mg/Lの七段階に変化させて添加し、表2に示した反応液を用いて菌体外ペルオキシダーゼの活性を測定した。

(3) 対象菌種による2,4-DCPの除去に及ぼすフミン酸の影響

表1に示した液体培地にフミン酸濃度を0、25mg/Lの二段階に変化させて添加し、また2,4-DCP濃度を30mg/Lになるように添加し、これを実験培地とした。実験1と同じ条件で除去実験を行い、サンプリングし、各時間のフミン酸濃度、2,4-DCP濃度、また菌体外ペルオキシダーゼ活性を測定した。なお、コントロール実験として、同じ実験培地を用いて植菌せず同様な操作を行った。

3. 結果と考察

(1) 対象菌種によるフミン酸の除去

一例として、振盪条件下での *S. setonii* 75Vi2 におけるフミン酸及び関連指標の経日変化を図1に示す。図1より、フミン

表1 使用した実験培地の基本組成

Glucose	1.50g/L
L-Asparagine-acid	0.76g/L
Na ₂ HPO ₄	4.00g/L
KH ₂ PO ₄	1.00g/L
NaCl	0.20g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20g/L
CaCl ₂	0.0380g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0011g/L
CuSO ₄	0.0042g/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0015g/L
MnSO ₄ · 4~5H ₂ O	0.0147g/L

表2 ペルオキシダーゼ活性測定反応液の組成

HEPPS buffer(pH 8.0)	50mM
4-Aminoantipyrine	100mM
2,4-dichlorophenol	5mM
Hydrogen peroxide	5mM
※final volume : 500 μL	

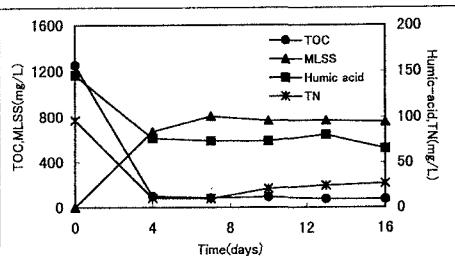


図1 *S. setonii* 75Vi2によるフミン酸の除去

* キーワード：放線菌、フミン酸、菌体外ペルオキシダーゼ、2,4-DCP

** 連絡先：〒606-8501 京都市左京区吉田本町 京都大学大学院環境工学専攻(Tel,Fax:075-753-5171)

酸濃度の減少はグルコース濃度の減少や菌体量の増加等と共に進行し、菌体量がピークに達した7日目からフミン酸濃度もグルコース濃度もほぼ一定になることが分かり、フミン酸の除去は共役代謝であると推測される。なお、他の二種類菌については図示していないが、ほぼ同じ傾向が見られた。

一方、対象菌種によるフミン酸の除去は、菌体への吸着と分解とに大別されると考えられる。そこで、予備実験で得られた菌体への吸着量を差し引いて算出結果、それぞれの菌におけるフミン酸の分解率は87%、49%、38%であることがわかった。

(2) 対象菌種の生産する菌体外ペルオキシダーゼ活性に及ぼすフミン酸の影響

対象菌種が生産する菌体外ペルオキシダーゼは放線菌による2,4-DCP除去に関与することが推察されたため、フミン酸によるこの酵素の活性への影響を調べた。異なる濃度のフミン酸共存時における各対象菌種の菌体外ペルオキシダーゼ相対活性を表3に示す。表3より、菌種により

Humic-acid (mg/L)	Peroxidase activity remaining(%)		
	<i>S.chromofuscus</i> A11	<i>S.viridosporus</i> T7A	<i>S.setonii</i> 75Vi2
0	100.00	100.00	100.00
25	103.01	92.29	101.06
50	104.08	73.78	85.89
100	93.27	79.43	89.06
150	95.81	54.76	68.88
200	86.24	56.04	82.00
300	88.72	50.90	53.63
R*2	0.8267	0.8074	0.7210

影響を受ける程度は異なるものの、フミン酸濃度の増加に伴って、菌体外ペルオキシダーゼ活性が比例的に徐々に低下することが明らかとなった。その原因としては、フミン酸中に含まれる金属イオンによる酵素への阻害作用やフミン酸と酵素の結合によるものであると推測される。一方、地下帯水層中に存在するフミン酸の濃度はTOC換算で10mg/L (25mg/L フミン酸と相当) 以下と報告されており、地下水中含むフミン酸による放線菌の菌体外ペルオキシダーゼ活性への影響は軽微であると推察される。

(3) 対象菌種による2,4-DCPの除去に及ぼすフミン酸の影響

一例として、2,4-DCP存在下での*S.chromofuscus* A11の菌体外ペルオキシダーゼ活性の経日変化、また2,4-DCP濃度の経日変化を図2、図3に示す。図2より、フミン酸濃度が存在する場合、酵素活性は高くなる傾向がある。実験2により、フミン酸濃度が25mg/Lの場合、酵素活性は大きな変化が見られなかったため、フミン酸の存在により、菌体外ペルオキシダーゼの総生産量が増加していると推察される。一方、図3に示したようにフミン酸濃度に関わらず2,4-DCP除去率は殆ど変化がないことが分かった。その原因としては、菌体外ペルオキシダーゼ活性上昇により予想された除去率の増加がフミン酸による吸着作用により相殺されていると考えられる。なお、他の二種類菌については図示していないが、*S.setonii* 75Vi2の菌体外酵素活性はフミン酸により有意な影響を受けていない以外、ほぼ同じ傾向が見られた。

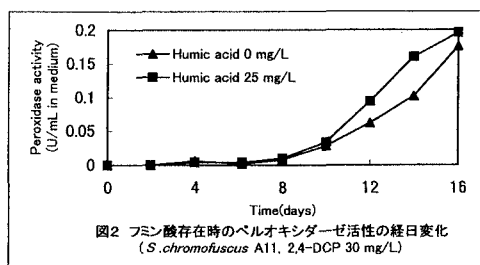


図2 フミン酸存在時のペルオキシダーゼ活性の経日変化 (*S. chromofuscus* A11, 2,4-DCP 30 mg/L)

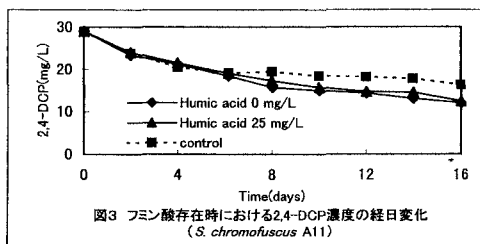


図3 フミン酸存在時における2,4-DCP濃度の経日変化 (*S. chromofuscus* A11)

4. まとめ

以上の結果より、高濃度フミン酸を含む環境中において、対象放線菌によりある程度のフミン酸を分解可能であり、フミン酸の吸着作用による環境汚染物質処理能力の低下をある程度抑制することが可能であると明らかとなり、土壌処理に応用することが期待できる。しかし、実際に利用するためには、今後さらに検討を進める必要がある。なお、本研究で用いた *Streptomyces* 属放線菌は、米国アイダホ州立大学の DON L. CRAWFORD 教授より分譲いただきました。記して深謝いたします。

参考文献 1) 胡ほか(1998); 環境衛生工学研究 Vol.12, No.3, pp226~229