

銅添加培養された活性汚泥微生物が産出する タンパクの銅吸着能力評価

東北大学大学院 学生員 安附太郎
東北大学 正会員 ○熊谷幸博
東北大学大学院 正会員 大村達夫

1.はじめに

重金属は発電所・各種工場など様々な産業活動や家庭排水・一般廃棄物等から環境中に流出している。過去における高濃度の重金属汚染と異なり、現在では水質基準前後の希薄濃度での重金属汚染が問題となっている。そこで、本研究では希薄濃度における重金属汚染防止技術の開発を最終目的とした。

既往の研究により下水処理場の活性汚泥フロックが重金属を吸着することが知られている¹⁾。それらの重金属は主に活性汚泥微生物中のタンパクと結合している。そこで、今回の実験では活性汚泥微生物から抽出したタンパクの分子量分画を行い、分画されたタンパクごとの重金属吸着能力を評価した。この際、重金属を添加した培地で培養した微生物は重金属吸着能が増強されるという報告²⁾に基づき、培地に添加した銅濃度とタンパクの銅吸着能力の関係を調べた。

2.実験方法

2-1.タンパクの抽出

仙台市内の下水処理場より採取した返送汚泥 (MLSS 5800mg/l)を遠心分離後 (1000×g, 10min, 4℃), 上清を普通ブイヨン培地に加え好気培養した (24h, 20℃)。この際、培地の銅濃度がそれぞれ0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5mMになるよう塩化銅を加えた。培養後、遠心分離(3000×g, 15min, 4℃)を行い、50mMのTris-HClでペレットの洗浄を行った。凍結融解処理後 (-80℃/30℃), 超音波処理 (50W, 2 min)により細菌細胞を破碎し、Tris-HClを加え遠心分離(20000×g, 90min, 0℃)を行った。遠心分離後のペレットにTris-HCl 10ml, ノルマルブタノール10mlを加え、超音波処理 (50W, 1min)を行った。その後、遠心分離 (20000×g, 10min, 4℃)を行い、水層を回収し、これを抽出タンパクとした。

2-2.抽出タンパクによる銅吸着処理

タンパクと銅の吸着は、抽出タンパクに塩化銅溶液を銅濃度2.5mMになるように混合し、pH 7.0に調整後、スターラーで20分間攪拌することで行った。また、50mM のTris-HClと塩化銅溶液のみを混合したものをcontrolとした。

2-3.タンパクの分離と銅吸着能の評価

2-2の混合液を0.45 μmのフィルターで濾過し、その濾過液をサイズエクスクルーションクロマトグラフィーにより分画した。バッファーは50mMのTris-HCl (pH 7.2)を使用し、分画後の溶出液 (以下フラクション) を2mlずつ回収した。分画したタンパク濃度の定量はDC Protein kit (Bio-Rad) により行った。この際、標準物質として牛血清アルブミンを用いた。

銅濃度の測定はICPにより行った。この際、前処理としてUSEPAに採用される方法により有機物の分解を行った。

3.結果と考察

3-1.タンパクの分子量分画の結果

銅吸着処理後のタンパクの分子量分画の一例として、培養時銅濃度0mMの結果を図1に示した。他の銅濃度で培養したものについても同様の傾向が得られた。また、それぞれの培養銅濃度ごとのフラクションのタンパク濃度を表1に示した。図1と表1から、汚泥中の微生物が産出するタンパクの主要な構成成分はフラクション1番とフラクション6番に含まれると考え、フラクション1に含まれるタンパクをProtein1 (MW>70KDa), 6番に含まれるタンパクをProtein2 (MW 10KDa)として、以後の考察において銅吸着能力を比較した。

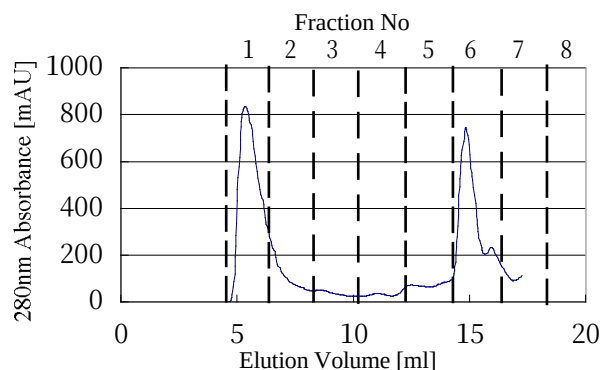


図1. 培養時銅濃度0mMにおける分子量分画の結果

Key Words : copper, activated sludge, heavy metals, chromatography, copper-binding proteins

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL022-217-7483 FAX022-217-7482

3-2.control との銅吸着量の比較

表2にProtein1 画分位置とProtein2 画分位置における銅濃度の比較を示した。表2から分かるように、タンパクと銅の混合液はcontrolに比べて、Protein1画分位置では最低で約6倍、最高で約80倍、Protein2画分位置では最低で約3倍、最高で約600倍の銅吸着量を示している。よって、銅はタンパクによって吸着されていることが確認された。

3-3.Protein1, Protein2 の銅吸着能力の比較

それぞれの培養時銅濃度におけるProtein1とProtein2の銅吸着能力の比較を表3と表4に示した。吸着能力は単位タンパクあたりの銅吸着量である mg(Cu)/g(protein)と mol (Cu)/mol(protein)で評価した。表3から、Protein1では培養時の銅濃度が0.50mM以上では明らかに銅吸着能力が増強され、銅無添加で培養して抽出したタンパクに比べて銅吸着能力が最大で約100倍に増加した。これは培地に添加した銅が、微生物の自己防衛機能を発現させ、微生物が銅吸着能力の高いタンパクを産出したためと考えられる。

一方、表4 から Protein2 においては培養時の銅濃度が0.25mM以上で明らかに銅吸着能力が増強され、最大で約150倍に銅吸着能力が増加した。これは Protein2 においてもProtein1の場合と同様に、銅吸着能力の高いタンパクが産出されたためと考えられる。

3-4.最適な培養銅濃度の決定

活性汚泥に対する塩化銅と硝酸鉛の毒性や細菌に対する硝酸鉛の阻害濃度の報告³⁾から、活性汚泥中の微生物に明らかな阻害を与える塩化銅の濃度は0.14mMと求められる。一方、今回の実験においては、銅吸着能力の高いタンパクが培養銅濃度0.25mM以上で産出され、培養銅濃度0.10mM以下では産出されなかった。このことより、汚泥中の微生物はその生体に明らかに阻害を与える重金属の存在下において、自己防衛機能により、重金属から身を守るためのタンパクを産出すると考えられる。汚泥中の微生物は0.25mM以上の銅を培地に添加することで、銅吸着能力の高いタンパクを産出したが、銅吸着能力の高い2つのタンパクを同時に産出させるには0.50mM以上の培養銅濃度が必要であった。したがって活性汚泥微生物の産出するタンパクの銅吸着能力を増強させるために最適な培養時の銅濃度は0.50mMであると判断した。

4.まとめ

培養時に最も効果的な塩化銅濃度は0.50mMであり、その際の銅吸着能力は銅を添加しないものに比べて、約150倍の能力を示した。今後は、より詳細な重金属とタンパクの吸着機構を明らかにするとともに、重金属吸着タンパクの同定等を行って行く予定である。

5.参考文献

- 1) Lawson, P. S., Sterritt, R. M., Lester, J. N. Adsorption and Complexation Mechanisms of Heavy Metal Uptake in Activated Sludge. *J. Chem. Tech., Biotechnol.* 1984, 34B, 253-262.
- 2) Chang, D., Fukushima, K., Ghosh, S. Stimulation of activated sludge cultures for enhanced heavy metal removal. *Water Environ. Reserch.* 1995, 67, 822-827.
- 3) Konopka, A., Zakharova, T., Quantification of bacterial lead resistance via activity assays. *Journal of Microbiological Methods.* 1999, 37, 17-22.

表1. 吸着処理前の各フラクションにおけるタンパク濃度

フラクション番号	培養時銅濃度 (mM)						
	0.00	0.01	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50 2.50
1 (Protein1)	443.9	217.8	147.8	209.1	213.3	228.9	165.8 137.9
2	169.5	250.0	131.9	122.4	115.4	112.5	140.2 96.0
3	69.3	84.5	90.6	97.6	75.1	87.3	82.2 61.1
4	55.3	80.5	100.7	68.5	59.9	82.4	79.5 74.3
5	51.7	84.0	84.3	108.4	113.7	88.9	75.0 82.4
6 (Protein2)	96.5	128.8	145.4	113.8	128.8	137.7	123.1 88.0
7	135.6	121.8	123.3	91.7	123.6	86.1	83.9 59.7
8	43.4	80.5	42.9	52.3	56.5	59.6	45.3 48.6
9	56.3	6.6	26.1	10.9	92.8	80.8	32.3 45.4

表2. Protein1, Protein2画分位置における銅濃度の比較

培養時銅濃度 (mM)	Protein1画分位置の銅濃度 (mg/l)	Protein2画分位置の銅濃度 (mg/l)
control	0.05	0.06
0.00	0.41	0.47
0.01	0.60	0.18
0.10	0.33	0.17
0.25	0.38	40.00
0.50	2.70	21.50
1.00	0.77	18.90
1.50	4.20	0.34
2.50	1.10	6.67

表3. 吸着処理後のProtein1 銅吸着能

培養銅濃度 (mM)	タンパク濃度 (mg/l)	吸着した銅濃度 (mg/l)	銅吸着能力 (mg/g)* (mol/mol)**
0.00	408.8	0.41	1.0 1.1
0.01	215.4	0.60	2.8 3.1
0.10	153.3	0.33	2.2 2.4
0.25	194.0	0.38	2.0 2.2
0.50	40.6	2.70	66.5 73.3
1.00	75.6	0.77	10.2 11.2
1.50	41.4	4.20	101.4 111.8
2.50	61.1	1.10	18.0 19.8

*単位タンパク(g)あたりに吸着された銅質量(mg)

**単位タンパク(mol)あたりの銅吸着量(mol)

表4. 吸着処理後のProtein2 の銅吸着能

培養銅濃度 (mM)	タンパク濃度 (mg/l)	吸着した銅濃度 (mg/l)	銅吸着能力 (mg/g)* (mol/mol)**
0.00	139.3	0.47	3.4 0.5
0.01	123.2	0.18	1.5 0.2
0.10	143.6	0.17	1.2 0.2
0.25	128.4	40.00	311.5 49.1
0.50	44.9	21.50	479.3 75.5
1.00	91.2	18.90	207.2 32.6
1.50	73.9	0.34	4.6 0.7
2.50	34.0	6.67	196.2 30.9

*単位タンパク(g)あたりに吸着された銅質量(mg)

**単位タンパク(mol)あたりの銅吸着量(mol)