

## (34) 2種の *Streptomyces* 属放線菌の増殖に対する影響因子 と 2,4-ジクロロフェノールの除去特性について

Factors Influencing the Growth of Two Species of Actinomycete *Streptomyces*  
and Their Characteristics of Removing 2,4-Dichlorophenol

胡 俊杰\*, 寺島 泰\*, 磯辺 良介\*\*, 西川 貴政\*\*\*, 大河内 由美子\*, 越川 博元\*

Junjie HU\*, Yutaka TERASHIMA\*, Ryosuke ISOBE\*\*, Takamasa NISHIKAWA\*\*\*, Yumiko OHKOUCHI\*, Hiromoto KOSHIKAWA\*

**ABSTRACT;** Several environmental factors influencing the growth of two kinds of Actinomycetes (*S.chromofuscus* A11, *S.setonii* 75Vi2), and their ability of removing 2,4-dichlorophenol(2,4-DCP) were investigated in batch cultures. The characterization of extracellular peroxidases produced by the objective fungi was also investigated. Optimal pH, temperature and nutritional conditions for the growth of each fungi and the basic feature of extracellular peroxidases were obtained. And it was concluded that 2,4-DCP hindered growth of fungi and it could be removed by the objective fungi. The extracellular peroxidase produced by *S.chromofuscus* A11 may contribute to the removal of 2,4-DCP.

**KEYWORDS;** Actinomycete *Streptomyces*, Growth, Extracellular peroxidase, 2,4-Dichlorophenol, Removal

### 1.はじめに

放線菌のうち *Streptomyces* 属放線菌は、抗生物質や酵素の供給源などとして近年特に注目を集めてきたが、生態系においては土壤中の難分解性有機物を分解し利用しつつ<sup>1)</sup>、自然界の物質循環の重要な役割も担っており、また木材に含まれ、一般的な細菌にとっては難分解性物質であるリグニンを分解する<sup>2-5)</sup>とも報告されている。このため、*Streptomyces* 属放線菌を難分解性とされる環境汚染物質の分解に利用することが期待されている。

*Streptomyces* 属放線菌による環境汚染物質の除去に関する研究は、日本では殆ど見られないものの、アメリカ、EU 等において徐々に行われつつあり、フェナントレンやバクマリック酸などの酸化代謝<sup>6-7)</sup>、アゾ染料の無機化<sup>8)</sup>、高分子有機塩素化合物の脱塩素化<sup>9)</sup>など幾つかの環境汚染物質の分解例が報告されている。しかしながら、これらの報告は必ずしも環境浄化を意識したものではない。

このような状況を背景として、本研究では廃水処理や地下水・土壤汚染の浄化など環境工学的に応用するための基礎として、2種の *Streptomyces* 属放線菌に着目し、増殖の影響因子及び環境汚染物質としての 2,4-ジクロロフェノールの除去特性について基礎的に検討を加えた。

### 2.実験方法

#### 2.1 2種の *Streptomyces* 属放線菌の増殖に及ぼす影響因子

##### (1)対象放線菌の培養

本研究では供試菌体として、*S.chromofuscus* A11、*S.setonii* 75Vi2 の *Streptomyces* 属放線菌 2 種類を用いた。これらの菌は、2%(W/V)酵母エキス寒天斜面培地(ISP.MED.2)に植菌し、37°Cで4日間培養した後、4°C下で保存した。各種の実験は、白金耳で採取した保存菌の胞子を 5mL の滅菌水に懸濁させて胞子懸濁液を作成し、これを所定の培地に植菌した。

##### (2)対象放線菌の増殖に対する影響因子に関する実験

###### 1)増殖に及ぼす pH、温度の影響

実験に用いた液体培地の組成を Table 1 に示す。200mL の三角フラスコに液体培地を 40mL ずつ分注・植菌後、振盪または静置条件下で培養した。pH 及び温度による増殖への影響に関する実験は、それぞれの 5

\* 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻(Department of Environmental Engineering, Kyoto University)

\*\* 国際協力事業団 (Japan International Cooperation Agency)

\*\*\* (株)日本工営 (Nippon Koei CO., LTD)

日後の MLSS を測定することにより行った。なお、pH 影響の実験では温度が 37℃の条件で pH を 4.0～10.0 に調整し、温度影響の実験では温度を 23℃、30℃、37℃、44℃の 4 段階に設定した。

### 2) 増殖に及ぼす基質組成の影響

炭素源の影響に関する実験では、炭素源として酵母エキス以外に、グルコース、可溶性でんぷん、カルボキシメチルセルロース (CMC) も設定した。その際、窒素源として硫酸アンモニウムを基質に加えた。8 日後の MLSS を測定し、また 2 日ごとに TOC、NH<sub>4</sub>-N も測定した。

菌類は通常窒素源として無機窒素化合物を利用するが、一部の菌類はアミノ酸や有機酸が与えられた場合にはこれらをよく利用して生育することも指摘されている<sup>10)</sup>。そのため、本研究では有機態及び無機態の数種の窒素化合物を用いて、対象放線菌における窒素源の影響についての実験を行った。実験ではグルコースを炭素源とし、L-アスパラギン酸、硫酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムを窒素源とし、8 日後の MLSS を測定し、また 2 日ごとにグルコース濃度、窒素濃度を測定することで実験を試みた。

### 3) 対象放線菌の代謝活性に及ぼす汚染物質の影響

対象放線菌の代謝活性に対する難分解性汚染物質の影響を研究するための手法の一つとして、代謝熱測定法を取り上げ、以下の実験を行った。なお、汚染物質として、初段階の一例としてジニトロフェノール (DNP) を取り上げた。DNP は染料の中間体として広く使用されているニトロ化合物であり、変異原性及び発ガン性を示し、自然界では分解されにくいとされている。その化学構造式を Fig.1 に示す。代謝熱測定はバイオサーモアナライザー (BTA)<sup>11)</sup> (Fig.2) を用いて行った。まず、グルコースを炭素源、L-アスパラギン酸を窒素源とした液体培地を滅菌した後、DNP を初期濃度がそれぞれ 10mg/L、20mg/L、40mg/L、80mg/L、160mg/L になるように加え、これを実験培地とした。この実験培地を 5mL ずつあらかじめ滅菌しておいた 25mL バイアル瓶に入れ、それぞれの菌を植菌した後、BTA に設置し 8 日間にわたって対象放線菌の代謝熱を測定した。

| Table1 Composition of the basic medium |           |
|----------------------------------------|-----------|
| Yeast Extract                          | 1.50g/L   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 4.00g/L   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1.00g/L   |
| NaCl                                   | 0.20g/L   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 0.20g/L   |
| CaCl <sub>2</sub>                      | 0.0380g/L |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 0.0011g/L |
| CuSO <sub>4</sub>                      | 0.0042g/L |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O   | 0.0015g/L |
| MnSO <sub>4</sub> ·4-5H <sub>2</sub> O | 0.0147g/L |

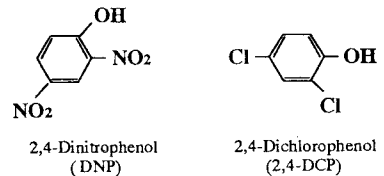
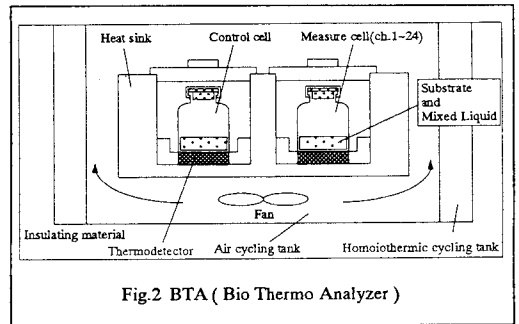


Fig.1 The chemical structures of DNP and 2,4-DCP



## 2.2 対象放線菌による環境汚染物質の除去と酵素化学的検討に関する実験

### (1) 対象放線菌による 2,4-ジクロロフェノールの除去に関する実験

2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) はフェノキシ系除草剤の 2,4-D が好氣的生分解を受けたときの中間代謝産物の一つであり、殺菌作用をも有し、自然環境において難分解性とされている。その化学構造式を Fig.1 に示す。寒天を含まない ISP.MED.2 液体培地に白金耳を用いて植菌後、30℃、150rpm の条件で 2 日間前培養したものを種菌として実験に供した。この種菌を 200μL ずつ 200mL の三角フラスコに入った滅菌済みの後述する培地 40mL に植菌し、30℃で静置培養した。2 日間培養した後 2,4-DCP を 10mg/L になるように加えた。その後、一定時間ごとに 1mL ずつ試料液を採取し、12000rpm で 15 分間遠心分離を行い、上澄み液中の物質に対して 2,4-CP の測定を行った。2,4-DCP が揮発性を有するため、対照として植菌を行わない培地を用いて同様の実験を行った。なお、本実験では、Table 1 に示す基礎培地のうち、酵母エキスの代わりに 1.5g/L のグルコースと 0.76mg/L の L-アスパラギン酸を入れ、実験培地とした。

### (2) 対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼの基本的特性と 2,4-DCP の除去との関係に関する実験

#### 1) 酵素の濃縮と脱塩

対象放線菌を Table 1 に示した基礎培地で培養した培養液 (約 500mL) を濃縮し、これを菌体外粗酵素液として実験に供した。まず、1L の三角フラスコ中に 200mL ずつ培地を分注し、植菌後、30℃で静置培養し

た。4 日目に菌を孔径 0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過後、濾液を 4℃下で限外濾過 (ADVANTEC UHP-76K、分画分子量 10000) により濃縮した。その後、50mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0) バッファーを濃縮液に添加し、濃縮液の 1000~10000 倍量(v/v)になるように数回にわたり限外濾過を繰り返すことで濃縮液の脱塩を行った。脱塩後の濃縮液は 4℃下で保存した。この濃縮液を菌体外ペルオキシダーゼの粗酵素液として用いることとし、その酵素活性は P.S.Sichak らが提示した方法<sup>12)</sup> (以下 SICHAK 法とする) により測定した。その反応液の組成を Table 2 に示す。なお、菌体外ペルオキシダーゼ活性は、1 分間における波長 470nm の吸光度 1 の増加を 1U と定義し、また粗酵素液 1mL 中のペルオキシダーゼ活性量を比活性 (U/mL) と定義した。

| Table2 Assay mixture of the peroxidase activity |             |
|-------------------------------------------------|-------------|
| Phosphate buffer(pH 7.0)                        | 100mM       |
| L-DOPA                                          | 1mM         |
| Hydrogen peroxide                               | 4mM         |
| Enzyme preparation                              | 100 $\mu$ L |
| ※final volume : 1.0mL                           |             |

## 2) 菌体外ペルオキシダーゼの基本的特性に関する実験

### a. 活性染色によるアイソザイムの確認

アイソザイムとは同一触媒反応を行うが、分子量や構造などが異なる酵素のことである。7.5%のポリアクリルアミドゲルを分離ゲルとして用い、前述の方法で濃縮した酵素液の電気泳動実験を 4℃下で行った。泳動の終了した分離ゲルを 50mM HEPES バッファー、50mM 4-アミノアンチピリン、10mM L-DOPA を含む反応液中で、22℃で 10 分間ゆっくりと振盪した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を最終濃度が 4mM となるように添加し、再び 22℃でゆっくり振盪した。反応液が赤くなった時点で新たな反応液中に移して同様の操作を行い、赤色のスポットが観察された時点でエタノール 50%溶液に浸して反応を終了させた。なお、酵素液とグリセロール 50%含有泳動バッファーを 9:1 の比で混合したものをサンプルとして使用し、酵素液のゲルへのアプライ量は 10 $\mu$ L、30 $\mu$ L の 2 段階とした。

### b. 温度、pH の影響、熱安定性

活性に対する反応温度の影響実験では、酵素反応を 10~70℃の各温度に設定したウォーターバス中で行った。また熱安定性実験では、ウォーターバスにより設定した 30~80℃の各温度で酵素液を 30 分間保温して熱処理をした。熱処理後直ちに氷上に戻し、残存活性を測定した。一方活性に対する pH の影響実験では、反応液の pH を 4~10 に調整し、それぞれの pH における酵素活性を測定した。いずれの実験においても、菌体外ペルオキシダーゼ活性の測定には、SICHAK 法を用いて行った。

### c. 金属イオンの影響

本実験では、日本の上部浅層地下水中の各イオン濃度<sup>13)</sup>を参考し、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Sn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>等金属イオンを 100 $\mu$ M 濃度になるように反応液に添加し、菌体外ペルオキシダーゼ活性に対する影響について検討した。

なお、以上すべての実験に用いた酵素液の比活性は、*S. chromofuscus* A11 では 0.37~0.48U/mL、*S. setonii* 75Vi2 では 0.34~0.50U/mL と変動があったものの、各影響実験の酵素比活性は一定になるように設定した。

## 3) 2,4-DCP の除去に及ぼす菌体外ペルオキシダーゼの影響に関する実験

### a. 対象放線菌を用いた 2,4-DCP の除去に関する実験

対象放線菌の前培養、植菌、静置培養、サンプリングは 2.2 の(1)と同様の方法で行い、2,4-DCP と菌体外ペルオキシダーゼ活性を測定した。なお、2,4-DCP の添加は植菌の直前に行った。また、本実験では Table 1 に示す組成の培地を用い、2,4-DCP 濃度はそれぞれ 0mg/L、10mg/L、30mg/L となるように添加した。

### b. 酵素を用いた 2,4-DCP の除去に関する実験

30mg/L の 2,4-DCP 溶液を含む 50mM リン酸カリウムバッファーに前述した粗酵素液、2.5mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し、菌体外酵素のみによる 2,4-DCP 除去実験の供試液とした。酵素濃度は *S. chromofuscus* A11 のでは 0~0.18U/mL、*S. setonii* 75Vi2 のでは 0~0.13 U/mL の間に变化させた。一定時間ごとに供試液をサンプリングし、2,4-DCP 濃度を測定した。

## 2.3 分析方法

DNP と 2,4-DCP の測定は高速液体クロマトグラフィ (YANACO L-5000) を用いた。使用カラムは YANAPAC ODS-A、カラム温度は 35℃に設定した。溶離液の組成はメタノール: Milli-Q 水: 酢酸=600: 400: 1、流速は 1.5mL/min、測定波長は 210nm とした。一方、MLSS の測定は下水試験方法<sup>14)</sup>により行った。また、試料液中 TOC は全有機体炭素計 (島津、TOC-5000) により、グルコースは分光光度計 (島津、UV2500PC) によるアンスロン法より、T-N はガスクロマトグラフィ (島津、GC-4C) により、各種の無機態窒素濃度はイオンクロマト (DIONEX 2000i) とオートアナライザー (TECHNICON) によりそれぞれ測定した。

### 3.実験結果と考察

#### 3.1 2種の *Streptomyces* 属放線菌の増殖に対する影響因子

##### (1) 増殖に及ぼす pH、温度の影響

振とう培養条件下でおこなった実験 (Fig.3) においては、*S. chromofuscus* A11 は、pH4~9、温度 23℃~44℃の広い範囲で増殖が可能であり、pH6.0、23℃の条件が増殖に最適であった。また、*S. setonii* 75Vi2 は、pH4~9、温度 30℃~44℃の広い範囲で増殖が可能であり、pH6.5、30℃の条件が増殖に最適であった。静置培養条件下の実験結果については図示していないが、ほぼ同じ結果を得た。なお、Fig.3 の MLSS 値はサンプル平均値を示しているが、その変動幅はほぼ平均値±15mg/L 以内であった。これらの結果より、対象放線菌はいずれも中性付近、30℃前後で比較的良好に増殖することが明らかになり、また pH が 4~9、温度が 30℃~44℃の範囲内で変化しても増殖できることから、環境条件が一定ではない実際の汚染処理を行う場合においてもこれらの菌を利用できる可能性が高いと考えられる。

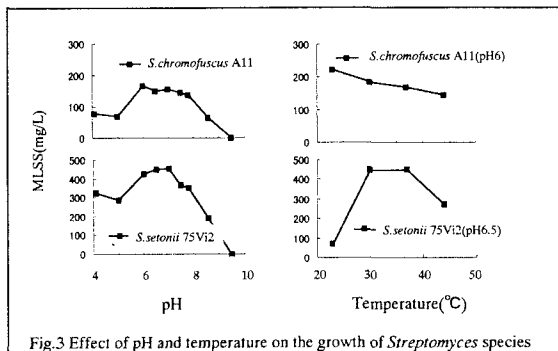


Fig.3 Effect of pH and temperature on the growth of *Streptomyces* species

##### (2) 増殖に及ぼす基質組成の影響

振とう培養条件下での *S. chromofuscus* A11、*S. setonii* 75Vi2 の各炭素源における TOC の経日変化をそれぞれ Fig.4、Fig.5 に示す。なお、Fig.4~5 の TOC 値はサンプル平均値を示しているが、その変動幅はほぼ平均値±13mg/L 以内であった。これらの図から、酵母エキスが炭素源として利用されやすいことがわかった。また、グルコースも利用できることがわかった。一方、構造がやや複雑である可溶性でんぷんは利用されにくく、さらに非重複性フェニールプロパン単位で構成されるリグニンを分解する能力をもつとされる *S. setonii* 75Vi2 に対して、より簡単な構造で構成されるカルボキシメチルセルロースが炭素源としてあまり利用されないとの結果を得た。これはリグニン分解菌である *P. chrysosporium* がリグニンを単独の炭素源に利用できない<sup>15)</sup> ことと同じく、対象放線菌にとってカルボキシメチルセルロースのような難分解性物質は、唯一の炭素源として利用しにくいからであると推察される。図示していないが静置培養条件下で得た実験結果をも考慮すると、炭素源として利用しやすいものから順に、酵母エキス>グルコース>可溶性でんぷん、カルボキシメチルセルロースとの傾向が見られた。

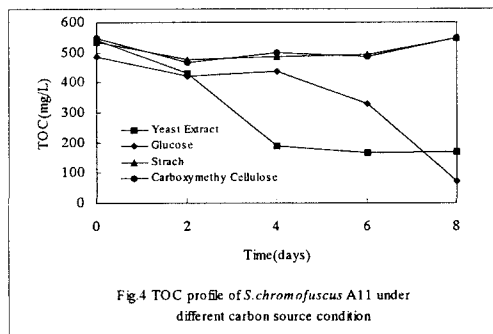


Fig.4 TOC profile of *S. chromofuscus* A11 under different carbon source condition

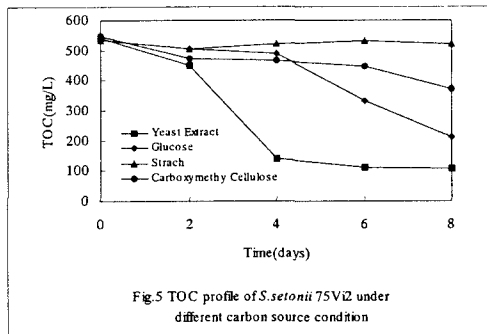
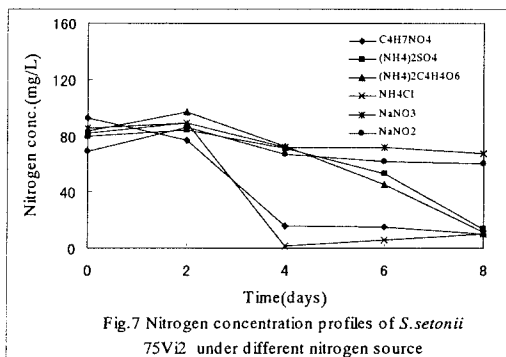
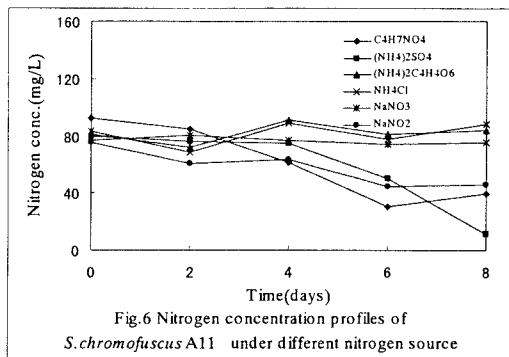


Fig.5 TOC profile of *S. setonii* 75Vi2 under different carbon source condition

各炭素源における窒素濃度の経日変化をそれぞれ Fig.6、Fig.7 に、8日後の MLSS 測定結果を Table 3 に示す。なお、Fig.6~7 の窒素濃度値はサンプル平均値を示しているが、その変動幅はほぼ平均値±2.5 範囲以内であった。それらをあわせてみると、*S. chromofuscus* A11 は、L-アスパラギン酸、硫酸アンモニウムを窒素源として利用しやすい傾向が見られ、また亜硝酸ナトリウムもわずかではあるが利用できることがわかった。一方、*S. setonii* 75Vi2 は実験に用いた窒素化合物のうち、硝酸性窒素や亜硝酸性窒素以外の窒素源をよく利用できるが、それらの中でも硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムのような無機態窒素化合物より L-アスパラギン酸、酒石酸アンモニウムのような有機態窒素化合物の方を利用しやすい傾向が認められた。また Table 3 から、硝酸性窒素や亜硝酸性窒素もある程度利用できることがわかった。



対象放線菌に共通して、アミノ酸の一種であるL-アスパラギン酸を含む培地で培養した菌体は他の培地の場合よりはるかに増殖していたことから、L-アスパラギン酸は窒素源としてだけではなく、炭素源としても利用されている可能性も考えられる。

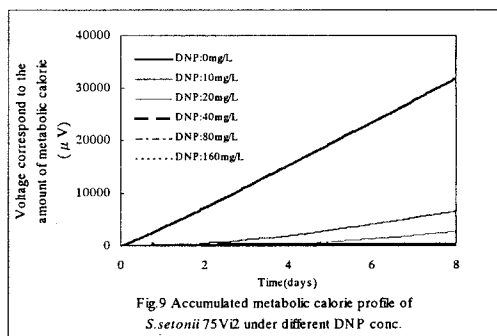
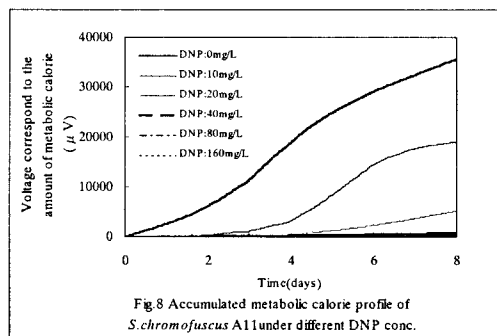
### (3)対象放線菌の代謝活性に及ぼすDNPの影響

DNP存在下での*S.chromofuscus* A11、*S.setonii* 75Vi2の累積代謝熱変化をFig.8、Fig.9に示す。

菌により程度は異なるものの、2種の対象放線菌ともDNP濃度が20mg/L以上になると、菌の活性の指標である累積代謝熱量が大幅に低下し、菌体増殖に対するDNPの阻害影響が認められ、DNP濃度の増大に伴って阻害の程度が高くなることが明らかとなった。また、DNPが存在すると菌の増殖に遅れが生じることもわかった。前述したように*S.setonii* 75Vi2はリグニン分解能力を持っていることから、DNPのようなリグニンと比較して簡単な構造を持つ芳香族化合物を分解できると思われるが、実際には*S.chromofuscus* A11よりも大きな生育阻害を受けていた。その阻害機構については未だ不明点が多いが、原因の一つとして、ニトロ基をもつDNPが微生物細胞の分裂を抑制した結果ではないかと考えられる<sup>16)</sup>。これらの結果により、微生物代謝熱の測定は代謝阻害を評価するうえで有効と考えられる。

Table3 Effect of the presence of different nitrogen sources on the growth of *Streptomyces* species

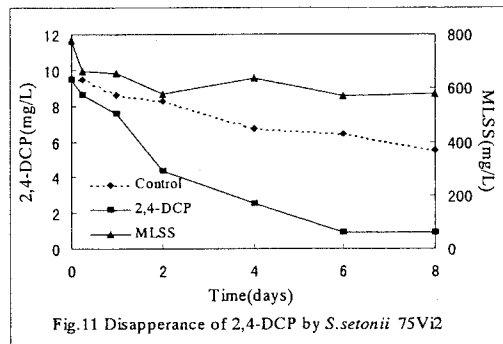
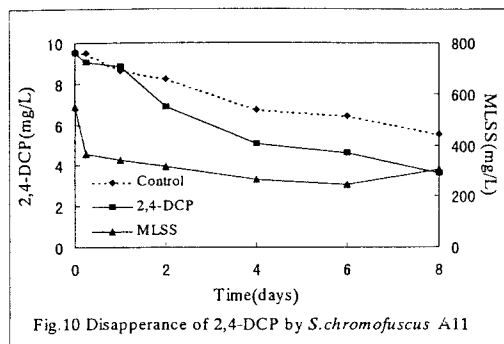
| Nitrogen sources                                                             | MLSS(mg/L)                |                        |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|
|                                                                              | <i>S.chromofuscus</i> A11 | <i>S.setonii</i> 75Vi2 |
| L-Asparagine-acid                                                            | 604                       | 1568                   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                              | 375                       | 538                    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | 0                         | 615                    |
| NH <sub>4</sub> Cl                                                           | 0                         | 465                    |
| NaNO <sub>3</sub>                                                            | 0                         | 137                    |
| NaNO <sub>2</sub>                                                            | 45                        | 115                    |



## 3.2 対象放線菌による環境汚染物質の除去と酵素化学的考察

### (1)対象放線菌による2,4-DCPの除去特性

*S.chromofuscus* A11、*S.setonii* 75Vi2を用いた実験における2,4-DCP濃度、MLSSの経日変化をFig.10、Fig.11に示す。なお、Fig.10～11の2,4-DCP濃度値はサンプル平均値を示しているが、その変動幅はほぼ平均値±0.20mg/L以内であった。菌により程度は異なるものの、2種の対象放線菌とも2,4-DCP濃度が時間と共に減少し、対照系と比べてそれぞれ約20%、60%の減少率が得られた。また、MLSSも減少していた。



さらに、ここではデータを示していないが予備実験では 2,4-DCP の菌体への吸着は 4 時間以内で終了することを確認している。従って、2 日目以降の 2,4-DCP 濃度の減少分は対象放線菌による分解されたものに相当すると考えられ、対象放線菌は 2,4-DCP を分解可能であることが明らかとなった。

## (2)対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼの基本的特性と 2,4-DCP の除去との関係

### 1)対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼの基本的特性

#### a.活性染色によるアイソザイムの確認

実験結果を Fig.12 に示す。いずれのスポットがアブライ量に比例して大きくなり、またスポットの色が濃くなっていることから、これらのスポットは対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼの反応によるものであると言える。さらに分子量の小さいものほどそのスポットは下方に現れることから、*S.setonii* 75Vi2 のペルオキシダーゼより *S.chromofuscus* A11 のその分子量が大きいこともわかった。なお、本実験のゲル濃度では酵素がうまく分離されなかったため、染色前半において二つのスポットであったが、染色が進むうちに拡散し一つのスポットに見えるようになったものである。従って、2 種の対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼには、少なくともそれぞれ 2 つのアイソザイムが存在することがわかった。

#### b.温度、pH の影響、熱安定性

各対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼが最大触媒作用を示す最適温度と最適 pH、また 30 分間の熱処理を行っても 80%以上の活性が残存する熱処理温度を Table 4 に示す。これらの結果から、*S.chromofuscus* A11 では中性～弱アルカリ性の比較的に広い範囲で高い活性を保持できることが分かった。一方、*S.setonii* 75Vi2 では、比較的高温でも高い活性が維持でき、また熱安定性も高いことが分かった。

#### c.金属イオンの影響

地下水中には Table 5 に示す化学成分が主に含まれる<sup>13)</sup>。本研究では対象放線菌を土壌・地下水汚染浄化に適用することを念頭に置き、陰イオンとして  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  を取り上げ、金属イオンの  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、重金属イオンの  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  について、これらのイオン存在下における菌体外ペルオキシダーゼ活性の変化を調べた。その結果を Fig.13、Fig.14 に示す。下記に示す金属イオンを除く各金属については 80%～90%の活性が保持され、また

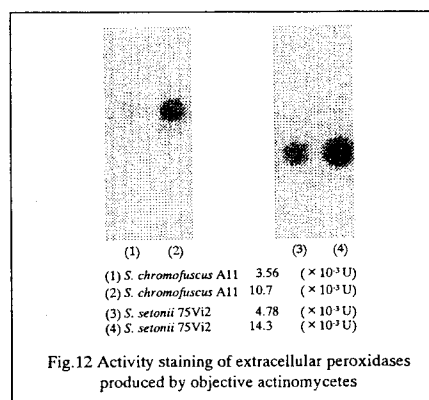


Fig.12 Activity staining of extracellular peroxidases produced by objective actinomycetes

Table4 Optimum temperature, pH and stable temperature for extracellular peroxidase activity

| Item                   | Actinomycetes                          |                        |
|------------------------|----------------------------------------|------------------------|
|                        | <i>S.chromofuscus</i> A11              | <i>S.setonii</i> 75Vi2 |
| Optimum temperature    | 35°C                                   | 40-50°C                |
| Optimum pH             | 8.0                                    | 8.5                    |
| Stable temperature for | 50°C                                   | 50°C                   |
| Thermal treatment      | (Remaining enzyme activity : over 80%) |                        |

Table5 The chemical compositions in groundwater

|                                             |                                                                                                  |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Positive ion                                | $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ ,                             |
| Negative ion                                | $\text{HCO}_3^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{SO}_4^{2-}$                                            |
| Trace composition and molecular composition | $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ ,                    |
| Dissolved gas                               | $\text{F}^-$ , $\text{SiO}_2$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{Fe}$ , $\text{Mn}$ , $\text{Al}$        |
|                                             | $\text{N}_2$ , $\text{O}_2$ , $\text{CO}_2$ , $\text{CH}_4$ , $\text{H}_2\text{S}$ , $\text{Ar}$ |

陰イオンについては、有意な影響がないことが分かった。一方、各対象放線菌において  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  を添加した系と *S.setonii* 75Vi2 の  $\text{Co}^{2+}$  を添加した系については、酵素活性が大幅に減少した。これは、これらの金属イオンが酵素のアミノ酸残基の側鎖と結合する、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と酵素の結合を妨げている、あるいはコンフォーメーションの変化が起こっているなどの可能性があると考えられる。

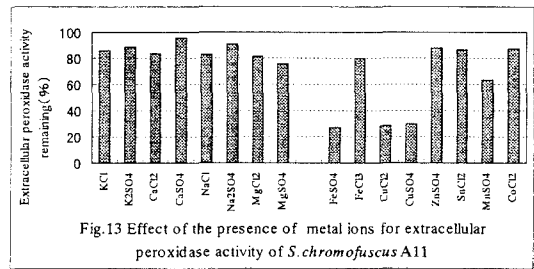


Fig.13 Effect of the presence of metal ions for extracellular peroxidase activity of *S. chromofuscus* A11

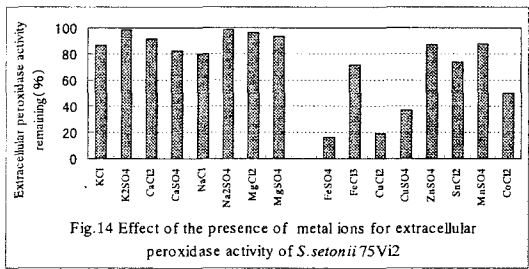


Fig.14 Effect of the presence of metal ions for extracellular peroxidase activity of *S. setonii* 75Vi2

2)2,4-DCPの除去に及ぼす菌体外ペルオキシダーゼの影響  
本実験において、揮発分を除いた2,4-DCP濃度の減少は、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対象放線菌における2,4-DCPの除去率を算出した。その結果及び菌体外ペルオキシダーゼ活性の経日変化を Fig.15、Fig.16 に示す。また、酵素実験において、実験開始2時間後の2,4-DCP除去率と添加した菌体外酵素の濃度との関係を Fig.17 に示す。  
Fig.15 より、30mg/Lの2,4-DCPを添加した場合、*S. chromofuscus* A11において、2,4-DCPが除去されているのは、ペルオキシダーゼ活性が上昇している6日目以降となっている。実験終了時、約20%の除去率が

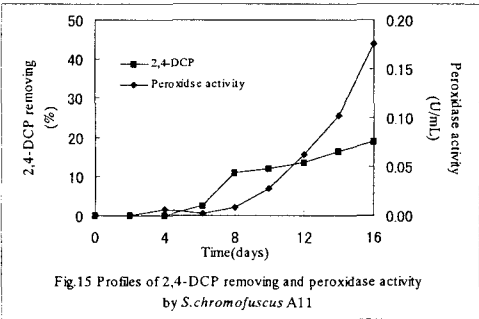


Fig.15 Profiles of 2,4-DCP removing and peroxidase activity by *S. chromofuscus* A11

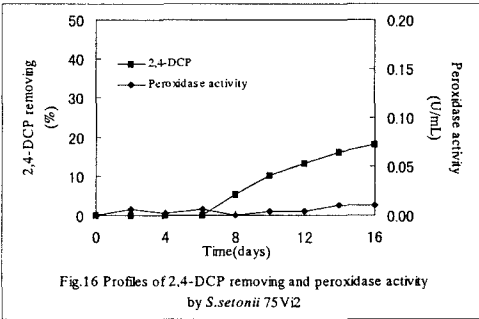


Fig.16 Profiles of 2,4-DCP removing and peroxidase activity by *S. setonii* 75Vi2

得られた。また、Fig.17より、酵素を含まない反応系では2,4-DCPはあまり除去されなかったが、酵素を添加すると2,4-DCP除去率が増加し始め、酵素活性が高いほど除去率が大きくなることが分かった。以上の結果から、*S. chromofuscus* A11の菌体外ペルオキシダーゼが2,4-DCPの除去に関与している可能性があると考えられる。

一方、Fig.16より、*S. setonii* 75Vi2では、*S. chromofuscus* A11と比較するとペルオキシダーゼ活性がかなり低くなっているにも関わらず、菌の増殖と共に除去率が徐々に増加し、最終的に同程度の約20%の2,4-DCP除去率が得られた。しかし、Fig.17より、*S. chromofuscus* A11と同程度の活性の酵素を添加しても2,4-DCP除去率の顕著な増加は見られなく、酵素活性と2,4-DCPの除去率との相関性はあまりないことが分かった。従って、2,4-DCPの除去には菌体外ペルオキシダーゼ以外の酵素あるいは何らかの除去機構（特に還元）が関与している可能性があると考えられる。

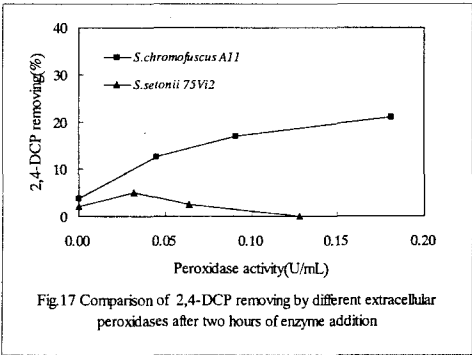


Fig.17 Comparison of 2,4-DCP removing by different extracellular peroxidases after two hours of enzyme addition

実験終了時における MLSS 量を Table 6 に示す。2,4-DCP 濃度が高くなるほど MLSS 量が低くなる傾向が見られた。また、ここでは図示していないが、2,4-DCP を 10mg/L になるように添加した場合、*S. chromofuscus* A11、*S. setonii* 75Vi2 にによる 2,4-DCP の減少率はそれぞれ約 30%、50%であり、30mg/L の 2,4-DCP を添加した場合より高い減少率が得られた。以上より、対象放線菌は 2,4-DCP により生育阻害を受けていることが分かった。ただし、前述した DNP の阻害作用と比較すると、受けた影響が相対的に小さいことが示された。

Table6 Effect of the presence of 2,4-DCP on the growth of *Streptomyces* species

| 2,4-DCP<br>(mg/L) | MLSS(mg/L)                 |                         |
|-------------------|----------------------------|-------------------------|
|                   | <i>S. chromofuscus</i> A11 | <i>S. setonii</i> 75Vi2 |
| 0                 | 577                        | 595                     |
| 10                | 362                        | 464                     |
| 30                | 287                        | 303                     |

#### 4. 結論

本研究では、2 種の *Streptomyces* 属放線菌、*S. chromofuscus* A11、*S. setonii* 75Vi2 の増殖に対する影響因子及び 2,4-DCP の除去特性について実験的な検討を行った。得られた主な結果を以下に列挙する。

- 1) 培養温度と pH の影響については、*S. chromofuscus* A11 は、pH4~9、温度 23℃~44℃の広い範囲で増殖が可能であり、pH6.0、23℃の条件が増殖に最適であった。また、*S. setonii* 75Vi2 は、pH4~9、温度 30℃~44℃の広い範囲で増殖が可能であり、pH6.5、30℃の条件が増殖に最適であった。
- 2) 炭素源の利用のしやすさに関しては、対象放線菌に共通して、酵母エキス>グルコース>可溶性でんぷん、カルボキシメチルセルロースとの傾向が見られた。一方、窒素源の利用については、無機態窒素化合物より有機態窒素化合物の方が利用しやすい傾向が見られた。
- 3) 環境汚染物質の一例としての DNP の影響評価については、代謝熱測定による方法が有効であり、この方法により、両対象放線菌でも DNP による菌体増殖に対する阻害影響が認められ、DNP 濃度の増大に伴って阻害程度が高くなることが明らかとなった。
- 4) 2 種の対象放線菌の菌体外ペルオキシダーゼには、少なくともそれぞれ 2 つのアイソザイムが存在することがわかった。また、酵素活性に関する最適温度、最適 pH、熱安定性も明らかにした。さらに、金属イオンの影響を検討したところ、本研究に取り上げた金属イオンの多くは対象酵素の活性に及ぼす影響が小さかったが、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  イオン存在下においては、酵素活性が大幅に低下することもわかった。
- 5) 対象放線菌は 2,4-DCP により生育阻害を受けるものの、ある程度増殖すると 2,4-DCP を分解する可能性があることが明らかとなった。しかし、その除去機構については、菌によって違う可能性があるかと推察された。

本研究に用いた 2 種の *Streptomyces* 属放線菌は、それらの特性から廃水処理や土壤汚染浄化への応用が期待される。しかしながら、それらによる種々の環境汚染物質の除去機構は複雑であり、対象物質によって分解機構は異なると考えられ、未解明な点が非常に多い。今後、実際に利用するためには、環境汚染物質分解機構、分解生成物、影響因子をはじめ、多成分系への適用や装置化などについてさらに検討する必要がある、また、遺伝子レベルでの代謝機構の解明なども期待される。

#### 謝辞

本研究で用いた 2 種の *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) 日本放線菌協会：放線菌図鑑 朝倉書店、1997
- 2) Don L. Crawford: Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1041~1045, 1978
- 3) Don L. Crawford, A. L. Pometto, and R. L. Crawford: Ligin degradation by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric ligin degradation intermediate. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 898~904, 1983
- 4) Thomas M. Petty and Don L. Crawford: Enhancement of ligin degradation in *Streptomyces* spp. By protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 439~440, 1984

- 5) Anthony L. Pometto and Don L. Crawford: Effects of pH on ligin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52、246~250、1986
- 6) John B. Sutherland, Don L. Crawford and Anthony L. Pometto : Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*, *Arch Microbiol* 154、160~266、1990
- 7) John B. Sutherland, Don L. Crawford and Anthony L. Pometto : Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*, *Can.J. Microbiol* 29、1253~1257、1983
- 8) Andrzej Paszczynski, Maria B. Pasti-grigsby, Stefan Goszczynski, Ronald L. Crawford and Don L. Crawford : Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 11、3598~3604、1989
- 9) Weichang Zhou, Bruno Winter and Wolfgang Zimmermann : Dechlorination of high-molecular-mass compounds in spent sulphite bleach effluents by free and immobilized cells of *streptomycetes*, *Appl Microbiol Biotechnol* 39、418~423、1988
- 10) 友枝幹夫：微生物の性状と機能 弘学出版、1990
- 11) 上田充、林信州、寺島泰、尾崎博明：固定有機物の嫌気性分解における微生物活性の熱的測定 土木学会第51回年次学術講演会概要集（第7部）、252~253、1996
- 12) Sichak, P. S and A. L. Dounce : Analysis of peroxidatic mode of action of catalase, *Arch. Biochem. Biophys.* 219、286~295、1986
- 13) 岩田進午、喜田大三：土の環境圏 フジテクノシステム、1997
- 14) (社)日本下水道協会：下水試験方法 1984
- 15) 志水一充：木質バイオマスの利用技術 文永堂、1991
- 16) 石館基：環境変異原性物質検出法の現状とその評価 水質汚濁研究、4、127~136、1981