

糸状菌を用いた微量有害化学物質の処理に関する研究

広島大学大学院	学生会員	○野崎	晴太
酒類総合研究所	正会員	渡部	貴志
酒類総合研究所	非会員	家藤	治幸
広島大学大学院	正会員	金田一	智規
広島大学大学院	正会員	尾崎	則篤
広島大学大学院	正会員	大橋	品良

1. はじめに

通常の排水処理では分解が困難な生物難分解性物質の中には、内分泌攪乱性物質のように人体に直接悪影響を与えるものがある。一方、(独)酒類総合研究所では、特異的な基質を効率的に処理する能力をもつ酵母や糸状菌等の真核微生物を用いた排水処理の研究を行っている。以前我々は麹菌 *Aspergillus awamori* IFO4033 (NBRC4033) 株が内分泌攪乱性物質であるビスフェノール A の除去に有用であることを示した¹⁾。そこで本研究では、*A. awamori* IFO4033 株が 17 β -エストラジオールなどその他の内分泌攪乱性物質に対しても、効率的に除去することができるのであれば応用する幅が広がると考え、その除去能力を調べた。

2. 実験方法

(1) 使用培地

無機塩を中心とした最小培地をモデル排水として用いた(表 1)。これをオートクレーブ滅菌し、対象物質である 17 β -エストラジオール、p-t-ブチルフェノール、p-n-ノニルフェノールをそれぞれ 25mg/l となるようにシリレンジ滅菌で添加した。また、菌体への吸着試験に用いる *A. awamori* IFO4033 の菌体を得るため、前培養には富栄養の YM 培地を用いた(表 2)。

(2) バッチ培養試験

孢子形成した寒天培地プレートから界面活性剤を用い、孢子懸濁液を作成した。200ml 容三角フラスコに最小培地 50ml を加え、*A. awamori* IFO4033 株の孢子数が 1×10^6 cells/ml となるように無菌的に接種した。30℃、130rpm にて振とう処理を行い、経時的にサンプリングし、対象物質の残存量を測定した。

(3) 対象物質の分析方法

SHIMADZU の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。試料を 2ml ずつ採り、10,000rpm、5min 遠心処理後にフィルター濾過し、サンプルカップに 100 μ l

表 1 最小培地の成分

Formula per liter	
硝酸ナトリウム	6g
塩化カリウム	0.52g
リン酸二水素カリウム	1.52g
硫酸マグネシウム七水和物	0.52g
グルコース	10g
酵母エキス	0.5g
ビタミン混合液	1ml
微量元素	1ml

表 2 YM 培地の成分

Formula per liter	
酵母エキス	3g
麦芽エキス	3g
ペプトン	5g
グルコース	10g

採り、HPLC 用試料とした。分析における各物質のピーク値は 17 β -エストラジオールでは約 5.7 分前後、p-t-ブチルフェノールでは 10.0 分前後、p-n-ノニルフェノールでは 5.1 分前後に検出された。

(4) 菌体を用いた吸着試験

A. awamori IFO4033 株を YM 培地で 48h 振とう培養した。菌体を回収・洗浄後、湿潤菌体 0.5g を 200ml 容三角フラスコに最小培地 50ml を加えたものに接種し、30℃、130rpm で 2h 振とう処理した。処理水を 10,000rpm で 5min 遠心分離を行い、HPLC で各試料の残存量を測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 対象物質の除去能

実際の排水処理では排水中の有機物を資化し、増殖を伴う処理が行われる。このため、孢子から増殖する過程での対象物質の除去能を調べた。以下に各物質の試験結果を示す。

3.1.1 17 β -エストラジオール除去能

孢子添加直後に 17 β -エストラジオールがほぼすべて除去されていた(図 1)。なお、blank 試験の減少量が微量

であるため、ガラスへの吸着や揮発等は微量であると考えられた。これらのことから、まず胞子壁面に吸着していることが考えられた。

3.1.2 p-t-ブチルフェノール除去能

胞子添加直後に p-t-ブチルフェノール濃度がわずかに減少した。その後胞子の発芽、増殖とともに除去して 72h 時点で約 80%が除去された (図 2)。また、blank 試験でも減少が微量であるため、*A. awamori* IFO4033 株により有意に除去されていることを示し、また胞子への吸着とは異なり生分解等が関与している可能性が考えられた。

3.1.3 p-n-ノニルフェノール除去能

胞子添加直後は p-n-ノニルフェノールは除去されなかったが、24h に全て除去された (図 3)。blank 試験では減少が微量であるため、*A. awamori* IFO4033 株により有意に除去されていることを示し、吸着とは異なる除去機構が関与している可能性が考えられた。

3.2 菌体への吸着能

除去機構には大きく分けて吸着と生分解が主に挙げられる。ここでは、吸着について調べるため、湿潤菌体を用いて対象物質の吸着試験を行った。以下に各物質の試験結果を示す (図 4)。

3.2.1 17β-エストラジオール吸着試験

17β-エストラジオールは速やかに約 80%が除去されていた。前節の試験と同様の結果であり、主要な除去機構に菌体への吸着が考えられた。

3.2.2 p-t-ブチルフェノール吸着試験

濃度の減少は約 10%とわずかであり、*A. awamori* IFO4033 株の菌体に p-t-ブチルフェノールはほとんど吸着しなかった。前節の結果と合致し、除去機構は吸着ではなく生分解等の他の機構が主要なものであると考えられた。

3.2.3 p-n-ノニルフェノール吸着試験

濃度の減少は約 4%とわずかであり、*A. awamori* IFO4033 株の菌体に p-n-ノニルフェノールほとんど吸着しておらず、生分解等の他の機構が主要なものであると考えられた。

4. まとめ

本研究では糸状菌 *A. awamori* IFO4033 株を用いて内分泌攪乱物質の 1 種である 17β-エストラジオール、p-t-ブチルフェノール、p-n-ノニルフェノールについて除去可能であることを明らかにした。今後は生分解等の最適条件、また、吸着剤として菌体を用いる条件検討を行う。

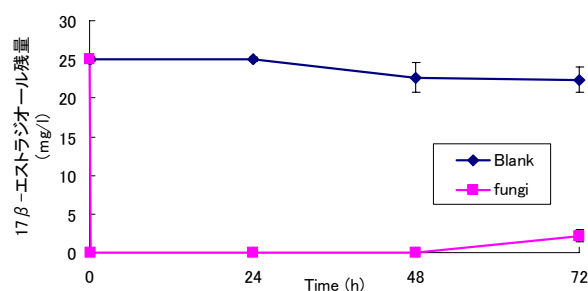


図 1 17β-エストラジオール除去試験結果

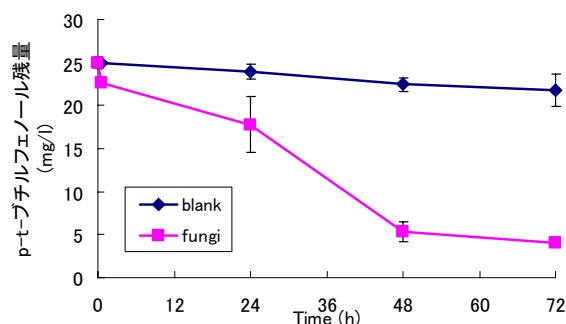


図 2 p-t-ブチルフェノール除去試験結果

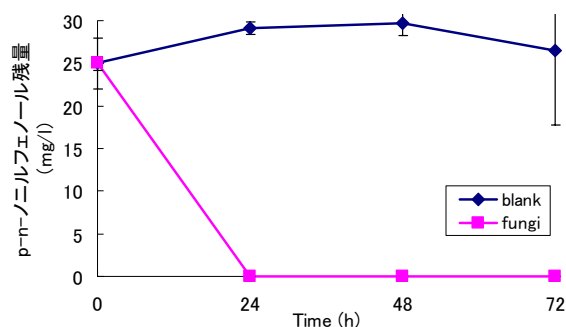


図 3 p-n-ノニルフェノール除去試験結果

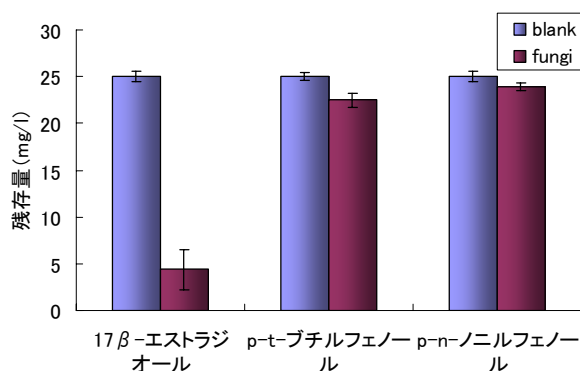


図 4 菌体への吸着試験結果

参考文献

¹⁾野崎ら, 2009, 第 43 回日本水環境学会年会, p.260.