混合液の微生物分解のバイオプロセス工学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小森, 正樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16510

氏　　名	小　森　正　樹
生　年　月　日	
本　　籍	石川県
学 位 の 種 類	博士(工学)
学 位 記 番 号	博乙第247号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	混合液の微生物分解のバイオプロセス工学的研究
論文審査委員(主査)	澤田　達郎(工学部・教授)
論文審査委員(副査)	瀧本　　昭(工学部・教授)　林　　良茂(工学部・教授) 清水　宣明(工学部・教授)　中村　嘉利(工学部・教授)

学 位 論 文 要 旨

Summary

The growth-inhibitory and lethal effects of zinc ion and copper ion on a phenol-degrading microorganism, *Acinetobacter calcoaceticus* AII strain, was examined by measuring optical density of cells, total cell number, viable cell number and macromolecule contents per cell in a batch culture. The effects of heavy metal ion concentrations on the specific growth rate and the specific change rate of viable cell number were clarified, suggesting that the inhibitory effect of copper ion was stronger than that of zinc ion and the copper ion caused not only the growth-inhibition but also the death of cells. The immobilized cell culture using alginate calcium gel beads as a carrier of cells was more effective for degrading phenol in the presence of a higher concentration of heavy metal ion rather than the conventional liquid culture. The repeated batch culture using immobilized cells could degrade 100 mg/ℓ phenol containing 30 mg/ℓ of zinc ion for 10 batch cultures and therefore provided the attention toward the applications in the effective degradation of phenol in the presence of heavy metal ion.

要旨

製鉄工場や化学工場などから排出されるフェノールは水に可溶な毒性の強い難分解性有機物であり、十分に処理されないままの放出は河川などの水質汚濁の原因になる。フェノールは微生物にとって有毒であるが、数種の微生物は唯一の炭素源やエネルギー源としてフェノールを利用することができる[3]。フェノールを含む排水を迅速かつ高効率で分解するためには、最も速い比増殖速度で生育できるフェノール分解菌を用いた培養が多種類の菌から成る活性汚泥等の混合培養よりも効果的と思われる。大腸菌や酵母などの微生物の培養では培地中に重金属イオンが存在すると菌の増殖と基質の分解が著しく阻害されることが知られている。フェノールの微生物分解の研究は従来から非常に数多く行われてきたが、菌の増殖を阻害する重金属イオンが存在したときのフェノールの微生物分解に関する報告はほとんどない。重金属イオン存在下のフェノールの微生物分解における菌の増殖阻害とフェノール分解の低下などの実験的究明はフェノール排水の工業的処理のための重要な研究である。また、固定化培養は増殖の阻害作用を軽減化して高濃度の菌によってフェノールの処理効率を増加させるので、固定化培養による重金属イオン存在下のフェノール分解は効果的な方法として期待される。　本論文では、フェノールの微生物分解における菌の増殖とフェノールの分解に及ぼす重金属イオンの影響と固定化培養による効果を実験的に研究した。菌の増殖阻害と死滅に及ぼす重金属イオンの影響を生化学的に明らかにするために DNA、RNA、タンパク質などの菌体内必須物質の合成阻害または分解などについて検討した。さらに、重金属イオン存在下におけるフェノールを迅速かつ高効率で分解するために固定化菌による反復回分培養を行った。　実験は *Acinetobacter calcoaceticus* AH 株（グラム陰性桿菌、非運動性、約2μm）をフェノール分解菌として用いた。　固定

化方法は0.05 gの微生物を3 g/Lのアルギン酸ナトリウム溶液(1 L)に懸濁し、混合液を穏やかに攪拌されている0.1 mol/Lの$CaCl_2$溶液に滴下した。菌が固定化されたアルギン酸カルシウムゲルビーズの実径は約4 mmであり、ゲルビーズ1個当たりの微生物量は約1.67×10^{-6}gであった。また、培養方法は0.1 g/L フェノール、1.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$、0.02 g/LKH_2PO_4、0.2 g/L $MgSO_4\cdot7H_2O$、1.0 g/L $CaCl_2$を含む培地1 Lで培養した。種々の濃度の$ZnSO_4$や$CuSO_4$を添加することによって培地中の亜鉛イオン(Zn^{2+})や銅イオン(Cu^{2+})などの重金属イオンの濃度を調製した。培地に添加された固定化ゲルビーズの全容積は50 mLであった。培養は2 L容三角フラスコを用いて100 rpmの回転数の下で37℃、pH 7.8で行った。サンプル液(2～3mL)を一時間毎に培養液から抜き取り、菌体光学密度、菌数、高分子含有量、フェノール濃度などの測定に用いた。分析は固定化ゲルビーズ中の菌の濃度は10 mLのリン酸緩衝液(3 g/L KH_2PO_4と7 g/L K_2HPO_4から成る)中で溶解した後に測定した。菌体光学密度は波長660 nmによる吸光度で測定した。総菌数はサンプル液を菌数計数器に注入して顕微鏡にて直接計測し、生菌数は寒天重層法によって計測した。菌体内の高分子含有量は5 mLのサンプル液を0.5 Nの過塩素酸で処理した後、DNAはBurtonの方法、RNAはMejbaumの方法、タンパク質はLowryの方法によって定量した。フェノール濃度は高速液体クロマトグラフィーにて測定した。(1) 液体培養の微生物増殖に及ぼす重金属イオンの阻害効果については、重金属イオン存在下のフェノールの分解における菌の増殖と基質の分解の動的挙動を実験的に検討した。Fig. 1(a), (b)は種々の濃度の亜鉛イオン(Zn^{2+})と銅イオン(Cu^{2+})を添加した場合の菌体光学密度とフェノール濃度の経時変化を示す。Fig. 1(a)からわかるように亜鉛イオン濃度が20 mg/Lまでは菌体光学密度が一定値に達するまでの時間がフェノールが完全に分解されるまでの時間にほぼ一致し、それぞれの時間

が亜鉛イオン濃度の増加とともに増加したことからフェノール分解菌に対する亜鉛イオンの増殖阻害効果が明らかになった。25 mg/L のように高濃度の亜鉛イオンの場合には、菌の増殖と基質の分解は観察されなかった。

Fig. 1(b)に示したように銅イオンを添加した場合には亜鉛イオンを添加した場合よりも強い増殖阻害効果が著しくなり、銅イオン濃度が 0.5 mg/L のように低濃度でも菌の増殖と基質の分解は全く起らなかった。また、重金属イオン濃度の増加とともに最大菌体光学密度が小さくなったので、重金属イオンの添加により生菌数が低下するといえる。以上のことから、フェノール分解菌の増殖は亜鉛イオンや銅イオンなどの重金属イオンの添加により阻害されることと銅イオンの阻害効果は亜鉛イオンよりも非常に大きいことがわかった。

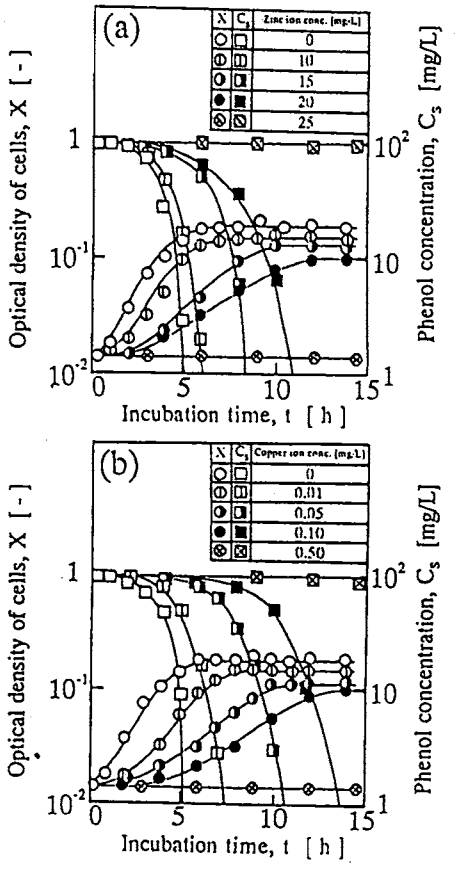

Fig. 1 Time courses of optical density of cells, X, and phenol concentration, C_s, in the microbial degradation of phenol with a heavy metal ion

a: zinc ion, b: copper ion

重金属イオン濃度が高い場合のフェノールの微生物分解における菌体光学密度、フェノール濃度、総菌数と生菌数の経時変化をから亜鉛イオンを 30 mg/L 添加した場合、亜鉛イオンの阻害作用により菌体光学密度、フェノール濃度、総菌数と生菌数は変化せず、培養時間 10 h 後も一定値を保ったままであった。総菌数と生菌数の値がほぼ等しくなったことから、亜鉛イオンの添加によって菌の増殖は停止しても菌は死滅しな

い。一方銅イオン 0.5mg/L 添加した場合、総菌数は一定値のまま生菌数のみが急激に減少した。この結果、銅イオンを添加すると菌が完全に死滅することがわかった。

菌体内高分子含有量の経時変化では重金属イオン添加前の菌はすべて生菌であり、生菌率は 1 であり、亜鉛イオンを添加した場合には生菌率と菌 1 個当りの DNA、RNA、タンパク質の含有量はほぼ一定であったことから、亜鉛イオンを添加しても生菌率や菌体内高分子の含有量はほとんど変化しないことがわかった。銅イオンを添加した場合には生菌率は培養開始直後から急激に減少した。菌 1 個当たりの DNA とタンパク質の含有量は銅イオンを添加しても変化しなかったが、RNA の含有量は銅イオン添加時から徐々に減少した。以上の結果、菌の死滅によって DNA とタンパク質の含有量は変化しないが、RNA の含有量は減少することがわかった。対数増殖期の菌に重金属イオンを添加した時の単位生菌数当りの生菌数変化速度 $\mu a\{=(1/Na)(dNa/dt)\}$ を重金属イオン濃度に対して求めた結果、μa が正の値の時には増殖は阻害されるが生菌数は増加し、μa が負の値の時には増殖が阻害されるだけでなく菌の死滅によって生菌数が減少することが分かった。亜鉛イオンを添加した場合には μa の値は亜鉛イオン濃度の増加ともに減少し、25 mg/L の亜鉛イオン濃度で 0 になった。25 mg/L 以上の亜鉛イオン濃度でも μa の値が負にならなかったことから、亜鉛イオンは菌の増殖を停止するが、菌を死滅させることはないと言える。銅イオンを添加した場合には μa の値は銅イオン濃度の増加とともに急激に減少し、0.3 mg/L の銅イオン濃度で 0 に達した後、0.3 mg/L 以上の銅イオン濃度では負の値になった。これは銅イオン濃度の増加とともに菌の増殖阻害のみが起こる場合から菌の死滅が起こる場合に移行することを示している。亜鉛イオンの場合には菌の増殖阻害だけであったが、銅イオンの場合には菌の増殖阻害だけでなく菌の死滅が観察されたので、菌の増殖阻害や死滅に及ぼす重金属

イオン濃度の影響は重金属イオンの種類によって著しく変化すると思われた。

液体培養と固定化培養の比較では、菌の増殖阻害や死滅に及ぼす重金属イオン濃度の影響のある 25 mg/L の亜鉛イオンと 0.3 mg/L の銅イオンの存在下のフェノールの微生物分解では、液体培養では亜鉛イオンおよび銅イオンの含有ともに菌の増殖と基質の分解は重金属イオンによる阻害作用によって全く起らなかった。固定化培養では菌体光学密度は重金属イオンの存在下で基質の分解とともに増加して最終的に一定値に達した。固定化培養では重金属イオンがゲルビーズに吸着したりカルシウムイオンと置換するために、ゲルビーズ内部の菌が重金属イオンの阻害作用を受けることなくフェノールを分解したと思われる。以上の結果、固定化培養は液体培養に比べて重金属イオン存在下のフェノール分解に有効な培養方法とわかった。

比増殖速度に及ぼす亜鉛イオン濃度と銅イオン濃度の影響での検討では、液体培養の比増殖速度は亜鉛イオンの増加とともに急激に減少して 25 mg/L で 0 になったので、液体培養では 25 mg/L 以上の亜鉛イオンを含むフェノールは分解されなかった。固定化培養の比増殖速度は亜鉛イオン濃度の増加とともに徐々に減少して 50 mg/L の亜鉛イオン濃度のとき約 0.25 h^{-1} になったことから、固定化培養は 50 mg/L 以上の亜鉛イオンを含むフェノールでも分解されることがわかった。銅イオンの場合には液体培養の比増殖速度は銅イオン濃度の増加とともに急激に減少して 0.3 mg/L で 0 となったので、液体培養では 0.3 mg/L 以上の銅イオン濃度を含むフェノールは分解されなかった。固定化培養では 0.5 mg/L の銅イオンを含むフェノールでも分解された。低濃度の亜鉛イオンや銅イオンの存在下のフェノールは液体培養でも分解されたが、固定化培養の比増殖速度は液体培養に比べて非常に大きくなったので、固定化培養は比較的高い濃度の重金属イオン存在下のフェノールを迅速に分解するための有効な培養と言える。

Fig. 2 は 30 mg/L の亜鉛イオン存在下でフェノールを固定化菌によって反復回分培養を行った時の菌体光学密度とフェノール濃度の経時変化を示す。反復回分培養は初期濃度 100 mg/L のフェノールが完全に消費された後に培養液のみを抜き取って同量の新鮮培地に入れ換えることによって行われた。固定化菌を用いた回分培養が 10 回くり返して実験され、フェノールがほぼ完全に分解されることが確められた。菌体光学密度の増加とフェノールの分解が比較的迅速に行われた固定化菌による反復回分培養の結果から、固定化菌を用いた反復回分培養は重金属イオン存在下のフェノール分解に効果的であることを本研究は示した。また、固定化法の処理機構がフェノールと重金属におけるビーズ内の拡散の違いによるものであることをつきとめ、これらの検討の結果から固定化法によるフェノール排水の連続処理の実用化に関する設計、開発、操作、制御の基礎的データやモデル式を提供した。

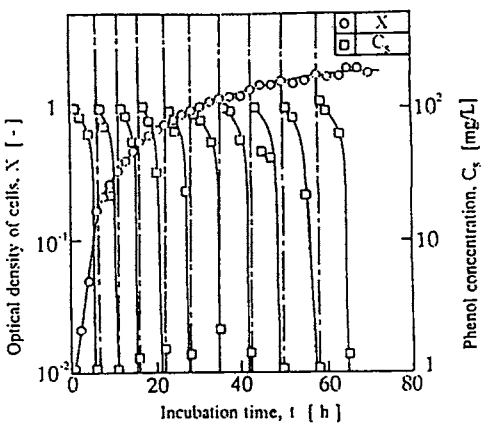

Fig. 2. Microbial degradation of phenol in the presence of 30mg/ℓ of zinc ion by the repeated batch culture using immobilized cells

学位論文審査結果の要旨

平成 13 年 12 月 12 日に第 1 回学位論文審査委員会を行い，平成 14 年 1 月 29 日に口頭発表と第 2 回学位論文審査委員会を開催し，以下の通り判定した。

研究歴と学力：申請者は，昭和 44 年 3 月に金沢大学工学部工業化学科を卒業後，石川県保健環境センターで大気汚染の浄化の研究や水質保全に関わる調査研究などに従事してきた。また，平成 10 年 4 月から平成 12 年 3 月までは金沢大学大学院自然研究科地球環境科学専攻に在籍している。長期間の研究歴を通して発表された学術論文や学会発表および口頭試問にもとづいた評価を行い，博士課程修了者と同等以上の学力を有すると判定した。

論文内容：本論文は，混合液の微生物分解を迅速かつ高効率で行うための培養方法の確立に関する工学的研究である。微生物に及ぼす重金属イオンなどの阻害物質の増殖阻害と死滅の影響が総菌数，生菌数と細胞内の高分子含有量の測定によって明らかにされた。菌の抗体としてアルギン酸カルシウムのゲルビーズを用いた固定化培養は従来までの液体培養よりも高濃度の重金属イオン存在下の基質を効率よく分解でき，固定化培養は阻害物質を含む混合液の微生物分解のために効果的とわかった。固定化ゲルビーズ内の菌の増殖や基質の分解の動的挙動を表わす数式モデルを提出し，その妥当性を種々の微生物分解の実験結果から立証した。

以上のように，本論文は混合液の微生物分解の高効率化のための培養方法に関する新展開として多くの有用な知見を得た研究成果であり，博士（工学）論文に値すると判定した。