

固定化菌による重金属イオン存在下の フェノールの微生物分解

中村 嘉利, 沢田 達郎, 小森 正樹*

金沢大学工学部 (〒920-8667 石川県金沢市小立野2-40)

*石川県保健環境センター (〒920-1154 石川県金沢市太陽ヶ丘1-11)

[平成11年2月18日受理]

Microbial Degradation of Phenol in the Presence of Heavy Metal Ion by Immobilized Bacterial Cells

Yoshitoshi NAKAMURA, Tatsuro SAWADA and Masaaki KOMORI*

Faculty of Engineering, Kanazawa University
(2-40 Kodatsuno, Kanazawa, Ishikawa 920-8667)

*Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
(1-11 Taiyougaoka, Kanazawa, Ishikawa 920-1154)

[Received February 18, 1999]

Summary

The growth-inhibitory and lethal effects of zinc ion and copper ion on a phenol-degrading microorganism, *Acinetobacter calcoaceticus* AH 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.

Key words: immobilized cell culture, phenol degradation, zinc ion, copper ion, heavy metal ion

1. はじめに

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^{1,2)}。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^{4,5)}。フェノールの微生物分解の研究⁶⁻¹¹⁾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^{12,13)}。

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。

2. 実験方法

2.1 菌株

本研究では、藤田正憲大阪大学教授から提供された *Acinetobacter calcoaceticus* AH株（グラム陰性桿菌、非運動性、約2 μm）^{6,7)}をフェノール分解菌として用いた。

2.2 固定化方法

0.05gの微生物を3g/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CaCl₂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1.67×10⁻⁶gであった。

2.3 培養方法

菌は0.1g/l フェノール、1.0g/l (NH₄)₂SO₄、0.02g/l KH₂PO₄、0.2g/l MgSO₄·7H₂O、1.0g/l CaCl₂を含む培地1 lで培養した。種々の濃度のZnSO₄やCuSO₄を添加することによって培地中の亜鉛イオン（Zn²⁺）や銅イオン（Cu²⁺）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50mlであった。培養は2 l容三角フラスコを用いて100rpmの回転数の下で37℃、pH7.8で行った。サンプル液（2～3 ml）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。

2.4 分析方法

固定化ゲルビーズ中の菌の濃度は10mlのリン酸緩衝液（3g/l KH₂PO₄と7g/l K₂HPO₄から成る）中で溶解した後に測定した。菌体光学密度は吸光度計（島津製UV-120）を用いて波長660nmで測定した。総菌数はサンプル液を菌数計数器（C.A. Hauser & Son社のPetroff-Hausser & Helber Counting Chamber）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0.5Nの過塩素酸で処理した後、DNAはBurtonの方法¹⁴⁾、RNAはMejbaumの方法¹⁵⁾、タンパク質はLowryの方法¹⁶⁾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。

3. 結果と考察

3.1 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

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（Zn²⁺）と銅イオン（Cu²⁺）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20mg/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はほぼ一致し、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。25mg/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0.5mg/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. 2は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示す。Fig. 2 (a)のように亜鉛イオンを30mg/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10h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

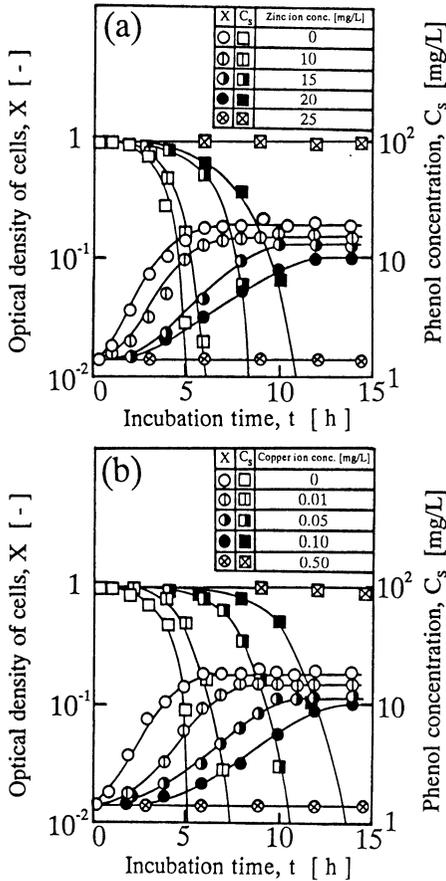


Fig. 1 Time courses of optical density of cells, X , and phenol concentration, C_s , in the microbial degradation of phenol with a heavy metal ion
a: zinc ion, b: copper ion

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。Fig. 2 (b)のように銅イオンを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。

Fig. 3 (a), (b)はそれぞれ30mg/lの亜鉛イオンと0.5 mg/lの銅イオンを添加した場合のフェノールの微生物分解における生菌率（生菌数/総菌数）と菌体内高分子含有量の経時変化を示す。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であった。Fig. 3 (a)に示すように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。Fig. 3 (b)に示すように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、培養時間3.5hで

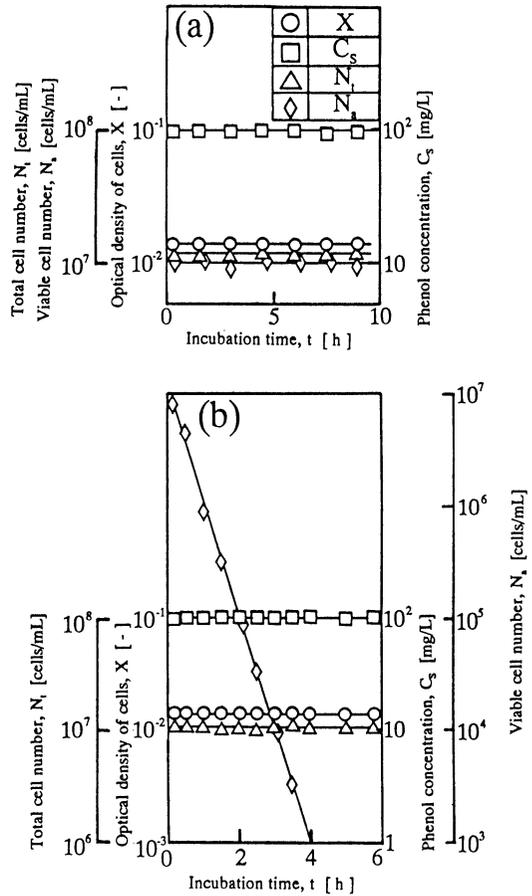


Fig. 2 Time courses of optical density of cells, X , phenol concentration, C_s , total cell number, N_t , and viable cell number, N_a , in the microbial degradation of phenol with a high concentration of heavy metal ion
a: 30mg/l of zinc ion, b: 0.5mg/l of copper ion

ほぼ0.001に達した。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の 9×10^{-11} mg/cellから徐々に減少して培養時間3.5hで 7×10^{-11} mg/cellになった。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。

Fig. 4は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 $\mu_a = |(1/N_a)(dN_a/dt)|$ を重金属イオン濃度に対してプロットしている。 μ_a が正の値の時には増殖は阻害されるが生菌数は増加し、 μ_a 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を示す。亜鉛イオンを添加

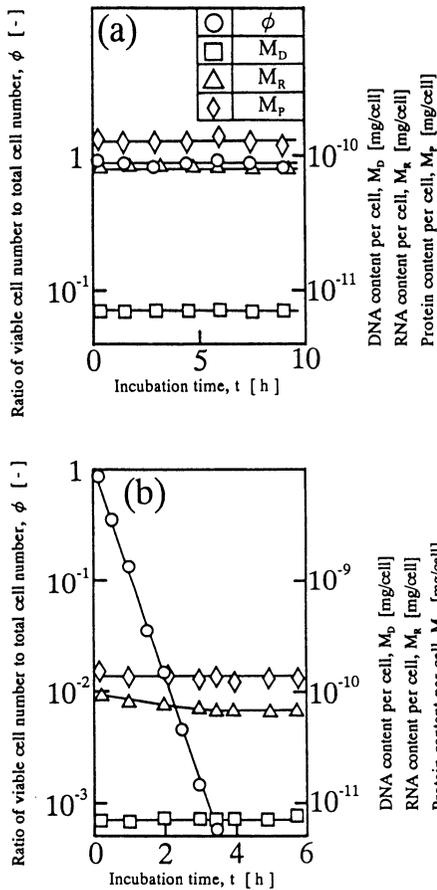


Fig. 3 Time courses of ratio of viable cell number to total cell number, ϕ , DNA content per cell, M_D , RNA content per cell, M_R , protein content per cell, M_P , in the microbial degradation of phenol with a high concentration of heavy metal ion
 a: 30mg/l of zinc ion, b: 0.5mg/l of copper ion

した場合には μ_a の値は亜鉛イオン濃度の増加とともに減少し、25mg/l の亜鉛イオン濃度で0 になった。25mg/l 以上の亜鉛イオン濃度でも μ_a 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 μ_a の値は銅イオン濃度の増加とともに急激に減少し、0.3mg/l の銅イオン濃度で0 に達した後、0.3mg/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

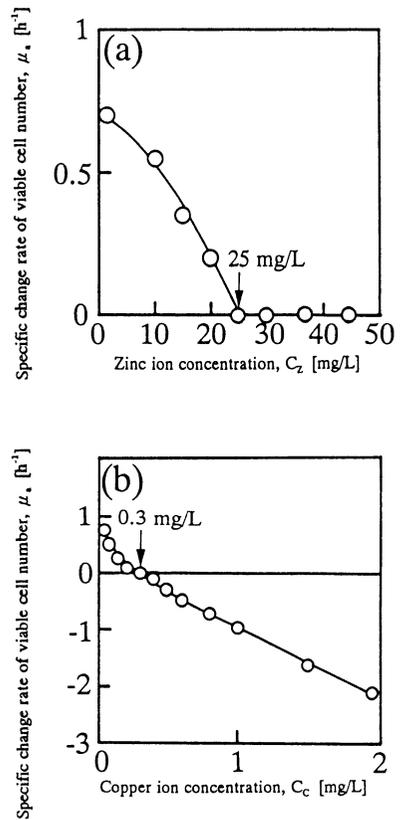


Fig. 4 Effect of heavy metal ion concentration on specific change rate of viable cell number, μ_a
 a: zinc ion, b: copper ion

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る。

3. 2 液体培養と固定化培養の比較

Fig. 5 (a), (b) はそれぞれ25mg/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における菌体光学密度とフェノール濃度の経時変化を示す。液体培養では亜鉛イオンおよび銅イオンの含有と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¹⁷⁾、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

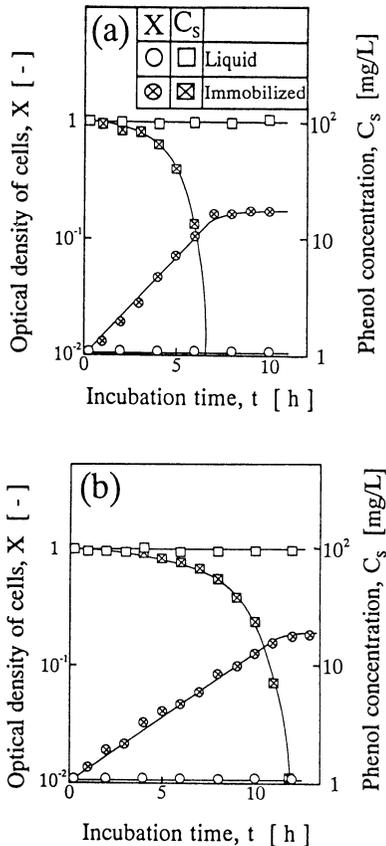


Fig. 5 Comparison between the liquid culture and the immobilized cell culture in the microbial degradation of phenol with a heavy metal ion
a: 30mg/l of zinc ion, b: 0.5mg/l of copper ion

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。

Fig. 6 (a), (b)はそれぞれ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を示す。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25mg/lで0になったので、液体培養では25mg/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50mg/lの亜鉛イオン濃度のとき約0.25h⁻¹になったことから、固定化培養は50mg/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0.3mg/lで0となったので、液体培養では0.3mg/l以上の銅イオン濃度を含む

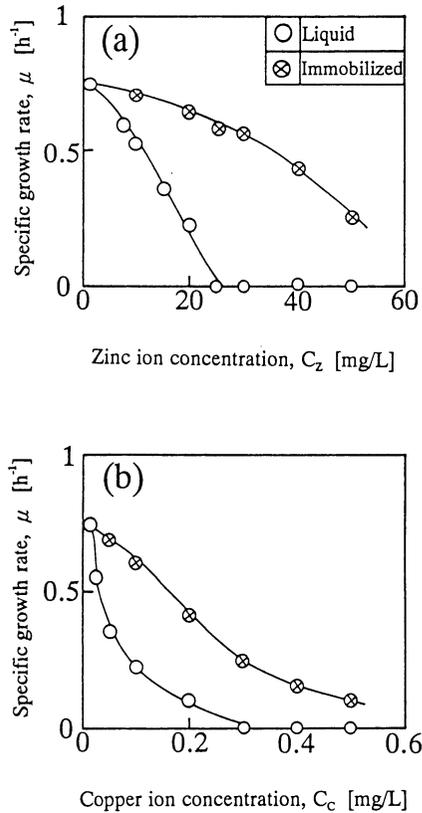


Fig. 6 Comparison between the liquid culture and the immobilized cell culture in the effect of heavy metal ion concentration on specific growth rate, μ
a: zinc ion, b: copper ion

フェノールは分解されなかった。固定化培養では0.5mg/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。

3. 3 固定化菌を用いた反復回分培養によるフェノールの分解

Fig. 7は30mg/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100mg/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回繰り返して実験され、フェノールがほぼ完全に分解され

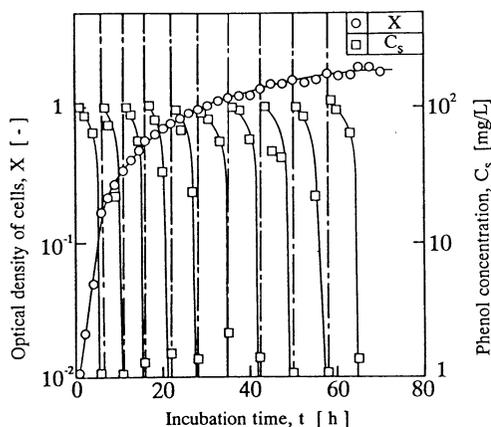


Fig. 7 Microbial degradation of phenol in the presence of 30mg/l of zinc ion by the repeated batch culture using immobilized cells

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、重金属イオン存在下のフェノールの連続的分解の可能性が示唆された。

4. まとめ

液体培養と固定化培養を用いて重金属イオン存在下のフェノールの微生物分解を行い、重金属イオンの阻害作用と菌の固定化培養の有効性を実験的に検討した。

(1) 液体培養において、菌の増殖と基質の分解に及ぼす重金属イオンの影響は著しく、亜鉛イオンは菌の増殖を停止するのに対して銅イオンは菌の増殖の阻害と菌の死滅も引き起こした。

(2) 液体培養は25mg/lの亜鉛イオンまたは0.3mg/lの銅イオンを含むフェノールを全く分解できなかったが、固定化培養は50mg/lの亜鉛イオンまたは0.5mg/lの銅イオンを含むフェノールも分解できた。

(3) 菌の死滅によって菌体内のDNAやタンパク質の含有量は変化しなかったが、RNAの含有量は減少した。

(4) 固定化培養の比増殖速度は液体培養と比べて非常に高く、固定化培養では重金属イオン存在下におけるフェノールが迅速かつ高効率で分解された。

(5) 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り、フェノール排水の工業的処理のための基礎的データを提供した。

要約

フェノール分解微生物、*Acinetobacter calcoaceticus* AH株に及ぼす亜鉛イオンと銅イオンの増殖阻害と死滅の影

響が回分培養において菌体光学密度、総菌数、生菌数と細胞1個当たりの高分子含有量を測定することによって検討された。比増殖速度や生菌数変化速度に及ぼす重金属イオン濃度の影響が明らかにされ、銅イオンの阻害効果は亜鉛イオンよりも非常に強いことと銅イオンは菌の増殖阻害だけでなく菌の死滅も引き起こすことがわかった。菌の担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フェノールを迅速かつ高効率で分解できた。固定化菌を用いた反復回分培養は10回の回分培養の間30mg/lの亜鉛イオンを含む100mg/lのフェノールを逐次的に分解でき、重金属イオン存在下のフェノールの効果的処理への適用を可能とした。

文献

- 1) 公害防止技術と法規編集委員会：公害技術と法規 [水質編]，pp243-300，丸善，東京（1987）
- 2) 大木道則，大沢利昭，田中元治，千原秀昭：化学辞典，pp1201，東京化学同人，東京（1994）
- 3) 土木学会衛生工学委員会：環境微生物工学研究法，pp263-266，技報堂出版，東京（1993）
- 4) 高麗寛紀，武市一孝，岡崎光雄，江夏敏郎，芝崎勲：有機金属化合物の抗菌性，*醗酵工学会誌*，**50**，34-40（1972）
- 5) 丁子哲治，沢田達郎，久野 滋：微生物に及ぼす有機ならびに重金属化合物の増殖阻害および死滅に関する影響の解析，*化学工学論文集*，**6**，79-86（1980）
- 6) 橋本 奨，藤田正憲：活性汚泥より分離した3種のフェノール分解菌の同定とその性質について，*下水道協会誌*，**24**，27-33（1987）
- 7) 橋本 奨，岩堀恵祐，岩上昭夫：*Acinetobacter calcoaceticus* AH株のフェノール分解活性，*醗酵工学会誌*，**70**，267-271（1992）
- 8) Yang, R.D. and Humphrey, A.E.: Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**，1211-1235（1975）
- 9) Jung, J., Sanji, B., Godbole, S., and Sofer, S.: Biodegradation of phenol. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **56**，73-76（1993）
- 10) Yanase, H., Zuzan, K., Kita, K., Sogabe, S. and Kato, N.: Degradation of phenols by thermophilic and halophilic bacteria isolated from a marine brine sample. *J. Ferment. Bioeng.*, **74**，297-300（1992）
- 11) 平山けい子，飛田修作，平山公明：*Rhodotorula* 属酵母によるフェノールおよびモノクロロフェノールの分解，*水処理技術*，**33**，551-555（1992）
- 12) 戸田 清：固定化とは，*水質汚濁研究*，**9**，680-683

- (1986)
- 13) 橋本 奨：生物処理技術と微生物固定化技術の問題点，水質汚濁研究，**9**，684-689 (1986)
- 14) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical. J.*, **62**, 315-323 (1956)
- 15) Mejbaum, W.: Über die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesondere in derivaten der adenylsaure. *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117-120 (1939)
- 16) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 17) Jang, L.K., Lopez, S.L., Eastman, S.L. and Pryfogle, P.: Recovery of copper and cobalt by biopolymer gels. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 266-273 (1991)