

土壌から分離した6価クロム還元酵母菌 (*Williopsis saturnus*) の最適培養条件と透析膜を利用した還元の検討

埼玉県立松山高等学校 生物部

1 はじめに

6価クロムは3価に比べ酸化力と強い毒性を持ち、腫瘍などの原因となる。工場からの廃液は、環境基本法で0.05ppm、また水質汚濁防止法で0.5ppm以下の基準値が定められている。6価クロムの安全な処理方法として、一般的には化学処理を行っているが、この方法では費用も高くなる。この問題点を解決する方法として、バイオレメディエーション(微生物や植物などの生物が持っている能力を用いての環境修復技術)という方法がある¹⁾。生物部では、2007年度に土壌から6価クロムを還元する微生物をスクリーニングし、酵母菌株C-10を得た²⁾。このC-10を業者に依頼し同定してもらったところ、この酵母菌は*Williopsis saturnus*であることが判明した。本研究ではこの酵母菌C-10 (*Williopsis saturnus*) の最適培養条件及び透析膜を利用した還元について実験を行い、C-10がバイオレメディエーションへの適応ができる還元能力の高い微生物かを検討した。

2 6価クロム濃度と菌濃度の測定

6価クロムの測定は、ジフェニルカルバジドと6価クロムとの反応により生じる1,5-ジフェニルカル

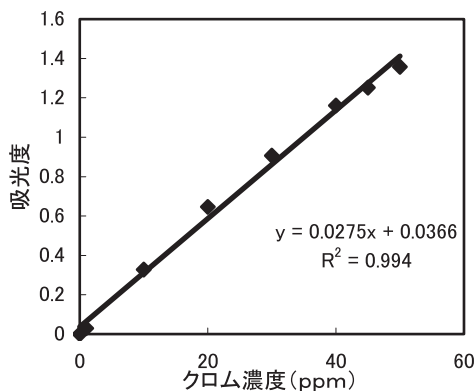


図1 検量線 高濃度用

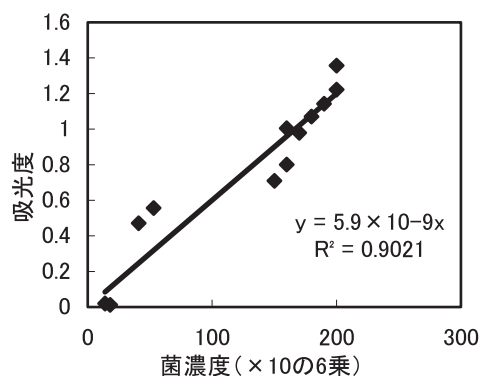


図2 菌濃度と吸光度の関係

バゾン(赤紫色)の吸光度を吸光度計で測定するジフェニルカルバジド比色法³⁾で行った(図1)。また、菌濃度の測定は酵母菌濃度と吸光度の関係をグラフにして、吸光度から菌濃度を測定した(図2)。

3 これまでの培地の検討

基本培地Ⅰ(スクロース1%、ハイポネックス0.1%)に有機窒素源の検討を加えたものを基本培地Ⅱとした。次に基本培地Ⅱの3つの成分の最適組み合わせ濃度の検討をしたものを基本培地Ⅲとした。検討の経過は以下の表1の通りである。

表1 これまでの培地の検討経過

培地	培地成分
基本培地Ⅰ	ハイポネックス 0.1% スクロース 1%
↓ 有機窒素源の検討	
基本培地Ⅱ	ハイポネックス 0.1% スクロース 1% 酵母エキス 0.02%
↓ 3成分の組合せ濃度の検討	
基本培地Ⅲ	ハイポネックス 0.1% スクロース 6% 酵母エキス 0.06%

4 研究内容

(1) 最適温度と最適pH

C-10の最適温度、pHを調べた。温度は15、27、35℃の区分で実験を行い、pHはpH4~10の範囲で実験した。また、データの平均は、全ての実験で1実験区分につき3回実験を行い、その平均を用いた。

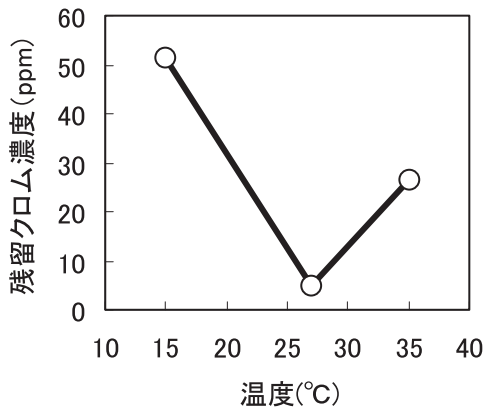


図3 C-10の最適温度

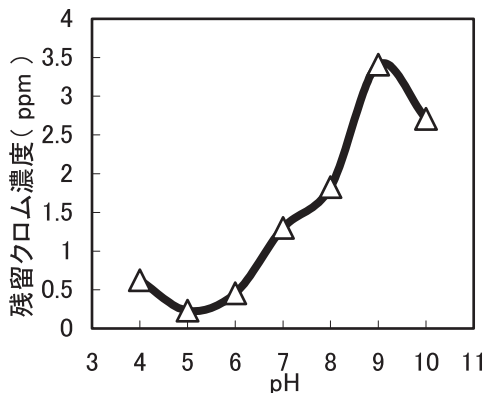


図4 C-10の最適pH

最適温度は27℃であった。しかし、地下水の温度に近い15℃では還元速度が極端に遅く、残留クロム濃度は51ppmであった(図3)。また、最適pHはpH5であり、酸性側で還元能力が高かった(図4)。

以後の実験では最適温度27℃、最適pH5の条件で実験した。

(2) 高濃度耐性実験

C-10がどのくらいのクロム濃度まで耐性があるか調べた。基本培地IIにクロム濃度が1600~100ppmになるように調整し、2週間培養した。また、実験終了後の培養液を寒天固形培地にまき、生えてきたコロニー数をカウントした。

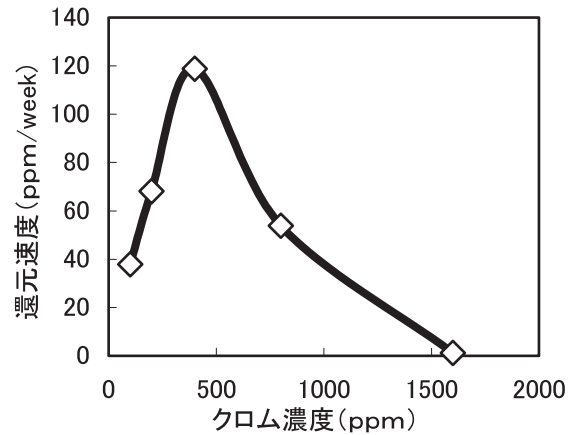


図5 クロム濃度と還元速度の関係

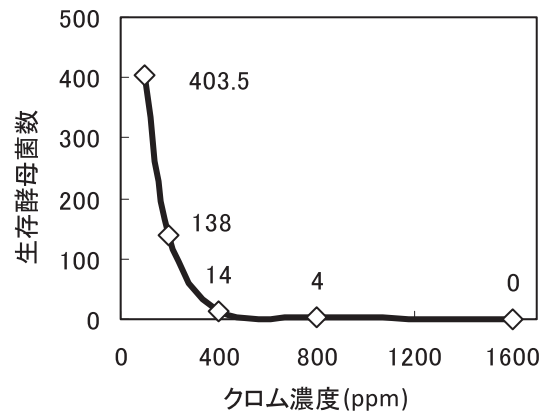


図6 C-10のクロム濃度に対する耐性

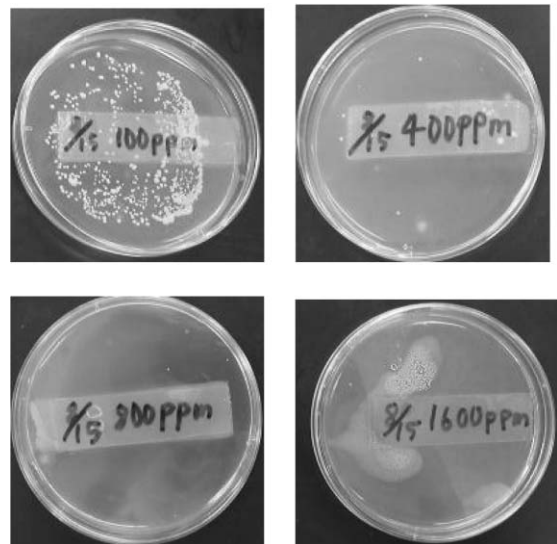


図7 コロニーに対するクロムの影響

C-10の高濃度での6価クロムの還元速度のピークは400ppmであった(図5)。また、酵母菌C-10は400ppmになると急激に生存できる酵母菌の数が減少する。しかし、最大800ppmの6価クロムにも生存でき、1600ppmでは生存できなかった(図6、図7)。

(3) 有機窒素源の検討

基本培地 I をcontとし、contに酵母エキス0.02%を加えたもの、contにペプトン0.02%を加えたもので実験した。

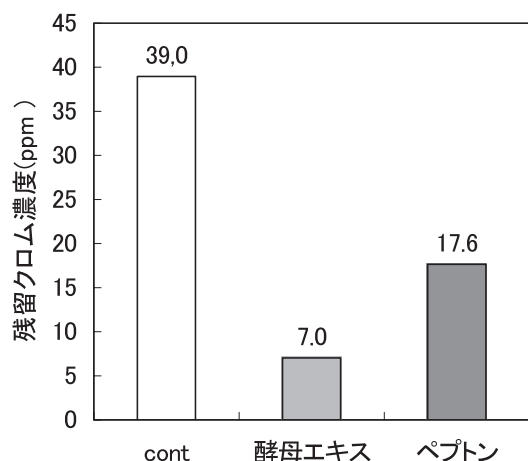


図8 6日後の有機窒素のクロム還元に対する効果

最適有機窒素源は基本培地 I に酵母エキス0.02%を加えたものが最も速く還元した (図8)。以後、この培地を基本培地 II とした。

(4) 6価クロムの酵母菌増殖に対する影響

6価クロムの存在がC-10の増殖にどのような影響をあたえるかを調べた。基本培地 II と6価クロムを含まない基本培地 II にC-10を加え、吸光度を測定した。

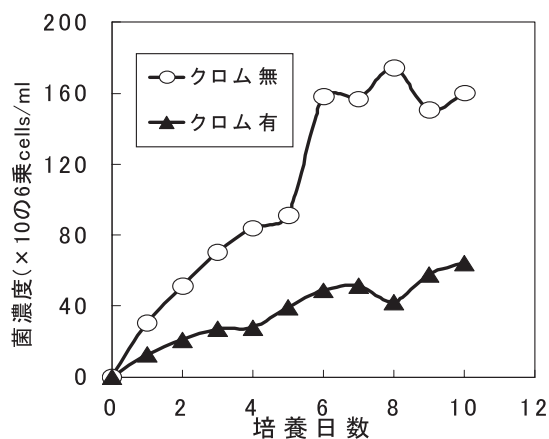


図9 基本培地 II における6価クロムの影響

6価クロムを含まない場合、6日頃から定常期に入り 1.6×10^8 cells/ml の濃度になった。しかし、6価クロムを含む場合、対数増殖期が無く、ゆるやかに増殖し10日に 6.5×10^7 cells/ml となった。6価クロムのC-10に対する増殖の抑制効果は、含まない場合の0.4倍であった (図9)。

(5) 基本培地 III の開発

6価クロムによるC-10の増殖の抑制を解決するため、更なる培地の改良を行った。6価クロムの含まない基本培地 II を用いて、栄養源の最適組み合わせ濃度をスクロース、酵母エキス、ハイポネックスの順に調べた。

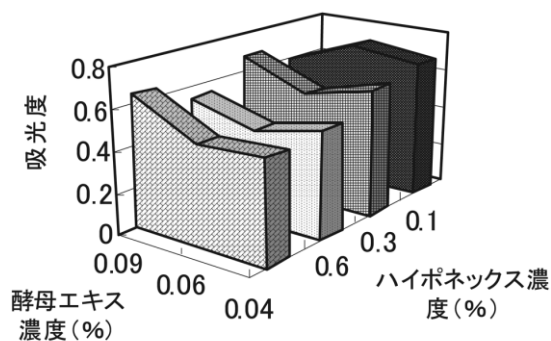


図10 酵母エキスとハイポネックスの濃度の組合せの検討 (スクロース濃度は全て6%)

最適組み合わせ濃度は、スクロース6%、酵母エキス0.06%、ハイポネックス0.1%となり、この時最もC-10が増殖した (図10)。この培地成分にニクロム酸カリウムをクロム濃度として100ppm加えたものを以後基本培地 III とし、酵母菌の増殖が速くなったことにより還元速度が大きくなるかを次の実験で調べた。

(6) 基本培地 II と III を用いた還元

C-10を基本培地 II と基本培地 III で培養し、6価クロムの還元速度を比較した。それぞれの培養液200mlと酵母菌液1mlを三角フラスコに入れ、残留クロム濃度と吸光度 (菌濃度) を6日間測定した。

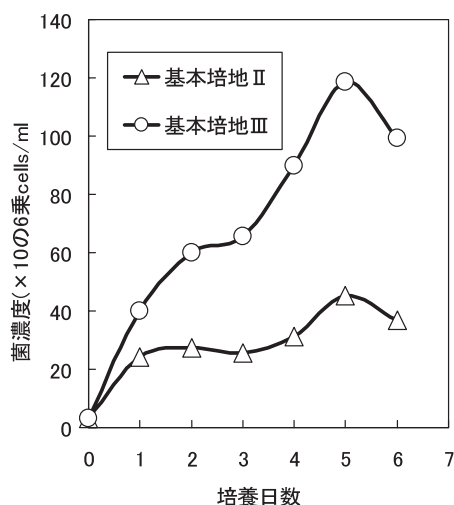


図11 基本培地 II と III の増殖曲線

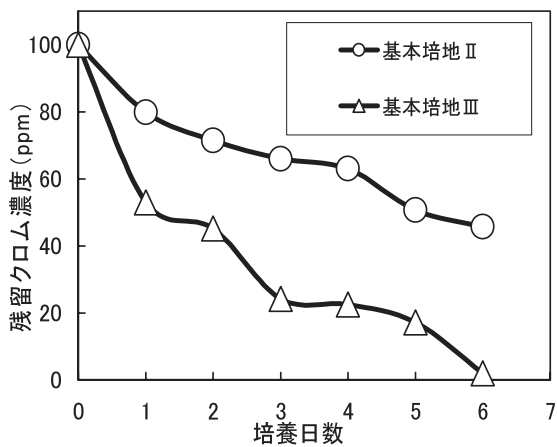


図12 基本培地ⅡとⅢの残留クロム濃度の経時変化

基本培地Ⅲは、5日後に基本培地Ⅱより菌濃度が2.6倍高くなった(図11)。培地の改良により酵母菌が著しく増殖したので、基本培地Ⅲでは6日後に残留クロム濃度が2ppmになった(図12)。

(7) 透析膜を使用した場合の還元

予備実験で透析膜内にC-10を入れた状態でも外液の6価クロムを還元できることが分かった。そこでこの透析膜内のC-10をそのまま再利用できないか、水酸化クロムの沈殿が膜内に残留し、3価クロムが回収できないかを検討した。基本培地Ⅱを用いて透析膜を使用したもの(1回目)、それを再利用したもの(2回目)、および再々利用したもの(3回目)を調べた。また、菌濃度を 10^8 cells/mlから 10^9 cells/mlにするとどうなるか調べた。

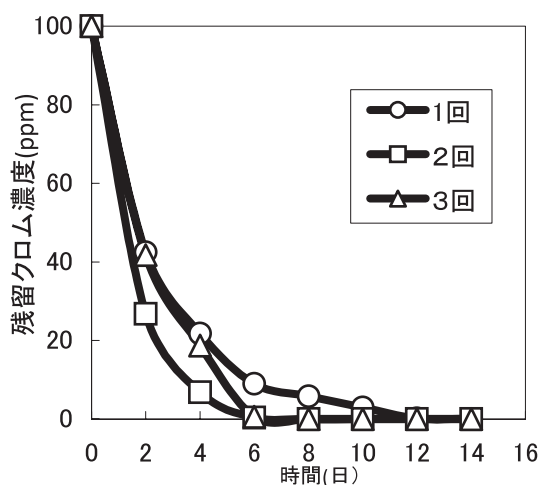


図13 透析膜の使用回数の効果

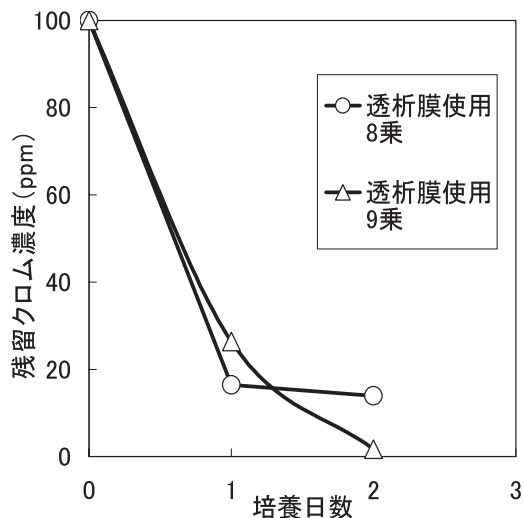


図14 透析膜を利用した場合の菌濃度の影響

透析膜内のC-10をそのまま再利用すると、初回の透析膜より速く6価クロムを還元できた。また、基本培地Ⅱを用いて、菌濃度 10^7 cells/mlで6価クロムを還元すると、6日間で0.5ppmにした(図13)のに対し、基本培地Ⅲを用いて菌濃度 10^9 cells/mlで6価クロムを還元すると、2日で1.7ppmまで下げることができた(図14)。したがって、基本培地Ⅱを基本培地Ⅲにすると菌濃度が2.6倍に増加するので、還元速度を約3倍に上げられることが明らかになった。

(8) 透析膜使用の利点と欠点

透析膜を用いる利点は、初回の使用では膜外に沈殿してしまうが、再利用すると水酸化クロムが膜内に沈殿し回収ができ、さらに酵母菌の純粋培養も可能である(図15)。しかし、高濃度の 10^9 cells/mlでは、(図16)に示したように二酸化炭素が発生し、膜内の圧力が高まり培養液が外に多く出てしまった。したがって、高濃度の酵母菌を用いると再利用ができないことがわかった。

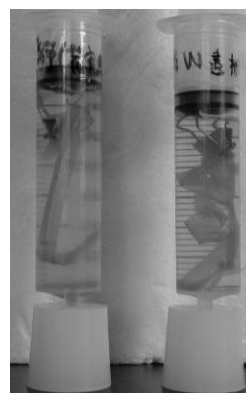


図15 水酸化クロム(Ⅲ)の沈殿
初回では、膜外に沈殿(左)再利用した場合、膜内に沈殿(右)

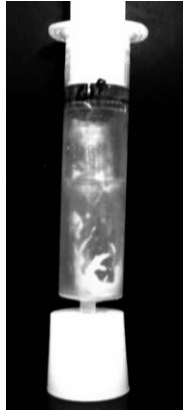


図16 高濃度 (10⁹cells/ml) ではCO₂が発生

5 結論

最適温度は27℃、最適pHは5であった。6価クロムに対する耐性は最大800ppmまでであった。透析膜を用いることで酵母菌C-10を膜内で純粋培養でき、再利用も可能である。また、還元によって生じた3価クロムも膜内に留まるので、これを回収することもできる。

さらに膜内の菌濃度を10⁹cells/mlにし、新たに開発した基本培地Ⅲを用いることで還元速度は49.2 ppm/dayとなり、基本培地Ⅱよりも約3倍の速にすることができた。

表2 酵母菌 *Williopsis saturnus* と参考文献の細菌との比較

研究者(所属)	耐性限界	還元能力	還元速度 (ppm/day)
松山高校生物部	800 ppm	100 → 1.7 ppm(2日)	49.2
松本ら ⁴⁾ (電力中央研究所)	52 ppm	10.4 → 0 ppm(14日)	0.74
住吉ら ⁵⁾ (九州大学大学院)	884 ppm	5 → 0.47 ppm(14日)	0.32
杉山ら ⁶⁾ (東京工科大学)	-	52.0 → 0.31ppm(3日)	17.2

この結果を他の文献と比較すると(表2)、杉山らの文献の特許登録されている放線菌ST13株の還元速度に比べて酵母菌C-10は約3倍速い。

以上の結果からC-10は高濃度に対する耐性と高い還元能力を兼ねそろえている酵母菌であることが分かった。したがって、酵母菌C-10はバイオレメディエーションに適用できる可能性がある微生物である。

参考文献

- (1) 矢木修身
第10回 バイオレメディエーション
http://eco.goo.ne.jp/business/csr/navi/011024_01.html
- (2) 松山高校生物部 (2007)
六価クロムを還元する細菌のスクリーニングと
その選別した細菌の能力
- (3) 東京都環境局
土壌中の重金属等簡易・迅速分析法
http://www2.kankyo.metro.tokyo.jp/chem/dojyo/file/SOP/13_%20HeavyMetals.pdf
- (4) 松本伯夫, 佐々木和裕, 大村直也 (2005)
電力中央研究所研究報告
電気による微生物の制御 (その8) クロム還元菌の取得ならびに電気化学的集積培養効果
http://criepi.denken.or.jp/jp/kenkikaku/cgi-bin/report_download.cgi?download_name=V04006&report_cde=V04006
- (5) 住吉康宏, 藤瀬有岐子, 河口定生 (2007)
環境中からの6価クロム[Cr(VI)]還元菌の単離および性質分析
<http://qnoken.ac.affrc.go.jp/yoshi/no70/70-071.pdf>
- (6) 杉山友康, 杉山博之 (2007)
六価クロム還元能を有する新規微生物及び
これを用いた環境浄化方法
<http://patent.astamuse.com/ja/published/JP/No/2007020540>

執筆者 3年 岡野 たいら 梅北 耕典
2年 尾上 貴宏 釜石 航平
栗島 誠堯 堀井 嵩斗
藤澤 秀之