



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	グラム陽性菌 <i>Lactobacillus Plantarum</i> および <i>Micrococcus Luteus</i> による重金属イオンのバイオソープシオン
Author(s)	関, 秀司; Seki, Hideshi; 野口, 綾 他
Citation	化学工学論文集, 32(4), 352-355 https://doi.org/10.1252/kakoronbunshu.32.352
Issue Date	2006
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/44074
Rights	出版社版あり http://www.jstage.jst.go.jp/browse/kakoronbunshu/-char/ja
Type	journal article
File Information	2006a.pdf



グラム陽性菌 *Lactobacillus Plantarum* および *Micrococcus*
Luteus による重金属イオンのバイオソープション[†]

関 秀司^{††}・野口 綾*・鈴木 翼・猪上 徳雄

北海道大学大学院水産科学研究院 海洋応用生命科学部門,
041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

キーワード：バイオソープション, カドミウム, 鉛, グラム陽性菌

加熱殺菌したグラム陽性菌 *Lactobacillus plantarum* および *Micrococcus luteus* によるカドミウムおよび鉛イオンの吸着分離を行った。菌体に存在する酸性基の解離反応と金属イオン結合反応を考慮した吸着モデルを適用した結果、これらの菌体への2価金属イオンの吸着（バイオソープション）は、菌体に存在するカルボキシル基とリン酸基へのモノデンテート型結合によるものであることが示された。*L. plantarum* の金属イオン結合サイト数は *M. luteus* の約1.5倍であったが、*M. luteus* の金属イオン結合定数は *L. plantarum* の2-5倍であった。

* 東京工業大学総合理工学研究科 化学環境学専攻,
226-8503 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

† 第14回化学工学・粉体工学研究発表会（札幌，2005年1月）にて一部発表

Biosorption of Heavy Metals onto Gram-Positive Bacteria, *Lactobacillus Plantarum*
and *Micrococcus Luteus*

Hideshi SEKI, Aya NOGUCHI*, Akira SUZUKI and Norio INOUE

Division of Marine Life Science, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido 041-8611, Japan

Key words: Biosorption, Cadmium, Lead, Gram-Positive Bacteria

Biosorption characteristics of cadmium and lead ions onto steam-sterilized Gram-positive bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Micrococcus luteus*, were determined. A metal-binding model considering the acid-dissociation and metal-binding reactions of acidic sites on/in the bacteria was applied to explain the experimental results. The results showed that the biosorption of bivalent metal ions onto these bacteria was due to monodentate binding to two different types of acidic sites: carboxylic and phosphatic. *L. plantarum* had 1.5-fold more metal binding sites than *M. luteus*, but the metal-binding constants of *M. luteus* were 2 - 5-fold larger than those of *L. plantarum*.

* Department of Environmental Chemistry & Engineering, Interdisciplinary Graduate School of Science & Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 226-8503, Japan

緒 言

環境水中の希薄な有害金属が高濃度に生物濃縮されることからわかるように、多くの生物素材が金属イオンに対して強い吸着能力を有している。有害金属を含む廃水・廃棄物の処理や有害金属で汚染された水環境の修復において、安価な生物素材を用いた吸着操作（バイオソープション）は有望な手段であり、微生物などの生物素材を用いた有害金属の吸着分離に関する研究が行われている（Seki and Suzuki, 2002）。微生物はサイズが小さいため実用化に難点があるが、安価な素材を安定に供給できるという利点がある。また、吸着速度が非常に速いことから、吸着操作後に泡沫分離によって微生物を回収するバイオソープティブ・フローテーションによる実用化が検討されている（Kefala *et al.*, 1999; Aldrich and Feng, 2000; Zouboulis *et al.*, 2003）。

細菌は細胞壁構造の違いによりグラム陽性菌とグラム陰性菌に分類され、グラム陽性菌に特有の細胞壁成分であるテイコ酸にはリン酸基が存在する。菌体の金属イオン結合サイトは菌体に存在する酸性基であることから、グラム陽性菌はグラム陰性菌に比べ高い金属吸着能力を有することが期待される。本研究では2種類のグラム陽性菌 *Lactobacillus plan-tarum* および *Micrococcus luteus* を用いて、水産軟体動物の内臓や沿岸海域の底泥への高濃度蓄積が問題となっているカドミウムと鉛の吸着分離について検討した。菌体の酸性基の数と解離定数を電位差滴定により決定した後に、pH と金属初期濃度を変化させた吸着実験により各金属イオンの結合定数を決定した。

1. 実 験

1.1 菌体試料

北海道大学水産科学研究科水圏食糧科学講座から分譲された乳酸桿菌属 *Lactobacillus plan-tarum* (JCM1149) およびマイクロコッカス属 *Micrococcus luteus* (IFO3333) を 30°C で定常期に達するまで振盪培養した。遠心分離した菌体をオートクレーブで加熱殺菌 (120°C, 20 min) し、蒸留水で 3 回洗浄した後に凍結乾燥シケーター中に保存した。

1.2 菌体の電位差滴定

窒素雰囲気下において乾燥菌体 0.5 g を含む懸濁液をマグネティックスターラーで攪拌し、NaOH 溶液を加えて約 pH 10 とした後に全容を 0.5 dm³ とした。所定量の容量分析用 HNO₃ 溶液を添加し、pH が 10 分間変化しなくなった時点の pH を平衡 pH として測定した。菌体懸濁液の pH が約 pH 3 となるまでこの操作を繰り返した。滴定は 30°C 恒温水槽中で行い、イオン強度は 0.05 mol·dm⁻³ (NaNO₃) とした。すべての実験に和光純薬工業 (株) の特級試薬を用いた。

1.3 カドミウムおよび鉛吸着実験

乾燥菌体 0.05 g を含む懸濁液をマグネティックスターラーで攪拌し、所定量の Cd(NO₃)₂ または Pb(NO₃)₂ 溶液を加え、HNO₃ または NaOH 溶液により所定の pH に調節した後に全容を 0.5 dm³ とした。吸着平衡に達した後に菌体を遠心分離し (3000 rpm, 20 分)、液相の pH と金属濃度を測定した。金属濃度は原子吸光光度計 (A-1800 形, (株) 日立製作所) を用いて測定し、金属吸着量は初期濃度と平衡濃度の差から算出した。吸着実験は 30°C 恒温水槽中で行い、イオン強度は 0.05 mol·dm⁻³ (NaNO₃) とした。

Pb(NO₃)₂ 初期濃度は 0.5×10⁻⁴, 1.0×10⁻⁴ および 2.0×10⁻⁴ mol·dm⁻³ とし, Cd(NO₃)₂ 初期濃度は 0.2×10⁻⁴ および 0.4×10⁻⁴ mol·dm⁻³ とした.

2. 結果と考察

2.1 菌体の酸性基数と解離定数の決定

電位差滴定の結果から次式を用いて算出した菌体乾量基準の水素イオン吸着量 X_H [mol·g⁻¹]と平衡 pH の関係を **Figure 1** に示す.

$$X_H = \frac{m_H - (K_W / C_{Hi} - K_W / C_H)V - (C_H - C_{Hi})V}{w} \quad (1)$$

ここに, C_{Hi} [mol·dm⁻³]は滴定開始前の水素イオン初期濃度, C_H [mol·dm⁻³]は HNO₃ を添加した後の水素イオン平衡濃度, K_W [mol²·dm⁻⁶]は水のイオン積, m_H [mol]は添加した HNO₃ 量, V [dm³]は全液量, w [g]は菌体乾燥重量である. 菌体の主な水素イオン結合サイトはカルボキシル基, リン酸基およびアミノ基であり, 菌体の水素イオン吸着量は次式で表される.

$$X_H = \frac{N_A K_A C_H}{1 + K_A C_H} + \frac{N_C K_C C_H}{1 + K_C C_H} + \frac{N_P K_P C_H}{1 + K_P C_H} \quad (2)$$

ここに, K [dm³·mol⁻¹]は水素イオン結合定数, N [mol·g⁻¹]は菌体乾量基準の水素イオン結合サイト数であり, 添字 A, C および P はそれぞれアミノ基, カルボキシル基およびリン酸基を表す.

Figure 1 に示した実験結果と Eq.(2)から算出した水素イオン吸着量の残差平方和が最小となる K と N の値を **Table 1** に示した.

Figure 1 の実線は **Table 1** の値を用いて Eq.(2)から算出した推算値であり, 実験値と推算値の間に相関係数 0.99 の一致が得られた.

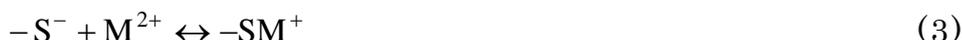
L. plan-tarum と *M. luteus* の水素イオン結合定数はほぼ同じ値で

あったが，金属イオン結合サイトである負電荷サイト数（カルボキシル基数とリン酸基数の和）は *L. plan-tarum* が *M. luteus* の約 1.5 倍であった．

2.2 菌体へのカドミウムおよび鉛の吸着

菌体の鉛吸着量と平衡 pH の関係を **Figures 2 と 3** に，カドミウム吸着量と平衡 pH の関係を **Figures 4 と 5** に示す．カルボキシル基が解離しはじめる約 pH 4 から pH の上昇とともに吸着量が増加した．カルボキシル基の解離度は pH 5-6 でほぼ一定となるが，pH 6 以上ではリン酸基が解離するため吸着量が増加し続けたと考えられる．*L. plan-tarum* の負電荷サイト数は *M. luteus* の約 1.5 倍であるが，同じ初期濃度での *L. plan-tarum* の金属吸着量は *M. luteus* より低い値であった．

われわれは微生物への 2 価金属イオンの吸着反応が酸性基と金属イオンのモノデンテート（1:1）結合であることを報告している（Seki *et al.*, 1998）．



ここに， $-S^-$ は解離した酸性基， M^{2+} は 2 価金属イオンを表す．本研究で用いたグラム陽性菌も同様であると仮定すると，酸性基と金属イオンの結合定数 K_M [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$] は次式で表される．

$$K_M = \frac{\theta}{\alpha(1-\theta)C_M} \quad (4)$$

ここに， C_M [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$] は金属イオンの平衡濃度， α [-] は酸性基の解離度， θ [-] は金属イオンによる酸性基の被覆率である．菌体乾量基準の金属イオン吸着量 X_M [$\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$] はカルボキシル基とリン酸基の金属イオン結合量の和で表される．

$$X_M = N_C \frac{K_{MC}C_M}{1 + K_C C_H + K_{MC}C_M} + N_P \frac{K_{MP}C_M}{1 + K_P C_H + K_{MP}C_M} \quad (5)$$

Figures 2-5 に示した実験結果と Eq.(5)から算出した金属イオン吸着量の残差平方和が最小となる K_M の値を **Table 2** に示した。ただし、 K と N には **Table 1** に示した値を用いた。金属イオンの初期濃度を C_{Mi} [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]とすると平衡濃度は次式で表される。

$$C_M = C_{Mi} - \frac{wX_M}{V} \quad (6)$$

Figures 2-5 に示した実線は、**Tables 1** と **2** の値を用いて Eqs. (5) と (6)から算出した推算値である。実験値と推算値は相関係数 0.96-0.99 で一致した。図中の点線は 2 価金属イオンの吸着反応を次式のバイデンテート結合と仮定して解析した結果である。



バイデンテート結合では飽和吸着量がモノデンテート結合の 1/2 になるため、これらの推算値の差は吸着量の増加とともに大きくなる。吸着量が少ないカドミウム吸着系では推算値にほとんど差がないが、吸着量の多い鉛吸着系においてモノデンテート結合による推算値と実験値がよく一致したことから、本研究で用いた微生物への 2 価金属イオンの吸着反応がモノデンテート結合であることがわかる。

比較のために、われわれが報告した 2 種類のグラム陰性菌へのカドミウムおよび鉛イオンの結合定数を **Table 2** に示した (Seki *et al.* 1998)。本研究で用いたグラム陽性菌の金属イオン結合定数がグラム陰性菌に比べて大きいこと、また *M. luteus* の金属イオン結合定数は *L. plan-tarum* の 2-5 倍であることがわかった。結果は示さないが、 HNO_3 溶液による脱着実験の結果も Eqs. (5)と(6)による推算値とよく一致した。

結 言

2 種類 の グラム 陽 性 菌 *Lactobacillus plan-tarum* および *Micrococcus luteus* によるカドミウムおよび鉛イオンの吸着分離を試み，実験結果の解析から以下の知見を得た．

1. 2 価金属イオンは菌体に存在するカルボキシル基とリン酸基にモノデンテート（1:1）結合することが明らかとなった．
2. 本研究で用いたグラム陽性菌の金属イオン結合定数はグラム陰性菌より大きく，*M. luteus* の金属イオン結合定数は *L. plan-tarum* の 2-5 倍であった．

Nomenclature

C_H	= equilibrium concentration of hydrogen ion	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
C_{Hi}	= initial concentration of hydrogen ion	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
C_M	= equilibrium concentration of metal ion	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
C_{Mi}	= initial concentration of metal ion	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
K	= hydrogen ion binding constant	$[\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}]$
K_M	= metal binding constant	$[\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}]$
K_W	= ion product of water	$[\text{mol}^2 \cdot \text{dm}^{-6}]$
m_H	= added amount of HNO_3	$[\text{mol}]$
N	= number of sites	$[\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}]$
V	= liquid volume	$[\text{dm}^3]$
w	= cell dry weight	$[\text{g}]$
X_H	= adsorption amount of hydrogen ion	$[\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}]$
X_M	= adsorption amount of metal ion	$[\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}]$
α	= degree of dissociation	$[-]$
θ	= fractional coverage	$[-]$

<Subscript>

A	= amino group
C	= carboxylic group
P	= phosphatic group

Literature Cited

- Aldrich, C. and D. Feng; "Removal of Heavy Metals from Wastewater Effluents by Biosorptive Flotation," *Mineral Eng.*, **13**, 1129-1138 (2000)
- Kefala, M. I., A. I. Zouboulis and K. A. Matis; "Biosorption of Cadmium Ions by *Actinomyces* and Separation by Flotation," *Environ. Pollut.*, **104**, 283-293 (1999)
- Seki, H., A. Suzuki and S. Mitsueda; "Biosorption of Heavy Metal Ions on *Rhodobacter Sphaeroides* and *Alcaligenes eutrophus* H16," *J. Colloid Interface Sci.*, **197**, 185-190 (1998)
- Seki, H. and A. Suzuki; "Biosorption," *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, A. T. Hubbard ed., pp. 792-801, Marcel Dekker, New York, USA (2002)
- Zouboulis, A. I., K. A. Matis, N. K. Lazaridis and P. N. Golyshin; "The Use of Biosurfactants in Flotation: Application for the Removal of Metal Ions," *Min. Eng.*, **16**, 1231-1236 (2003)

Figure Captions

- Fig. 1 pH dependence of H^+ adsorption onto *M. luteus* (circles) and *L. plantarum* (triangles). Cell concentration, $1.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; ionic strength, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (NaNO_3). Solid curves were calculated from Eq. (2)
- Fig. 2 pH dependence of Pb adsorption onto *M. luteus* at 30°C . Cell concentration, $0.1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; ionic strength, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (NaNO_3). Solid curves were calculated from Eqs. (5) and (6). Dotted curves were calculated with bidentate binding model
- Fig. 3 pH dependence of Pb adsorption onto *L. plantarum* at 30°C . Cell concentration, $0.1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; ionic strength, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (NaNO_3). Solid curves were calculated from Eqs. (5) and (6). Dotted curves were calculated with bidentate binding model
- Fig. 4 pH dependence of Cd adsorption onto *M. luteus* at 30°C . Cell concentration, $0.1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; ionic strength, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (NaNO_3). Solid curves were calculated from Eqs. (5) and (6). Dotted curves were calculated with bidentate binding model
- Fig. 5 pH dependence of Cd adsorption onto *L. plantarum* at 30°C . Cell concentration, $0.1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$; ionic strength, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (NaNO_3). Solid curves were calculated from Eqs. (5) and (6). Dotted curves were calculated with bidentate binding model

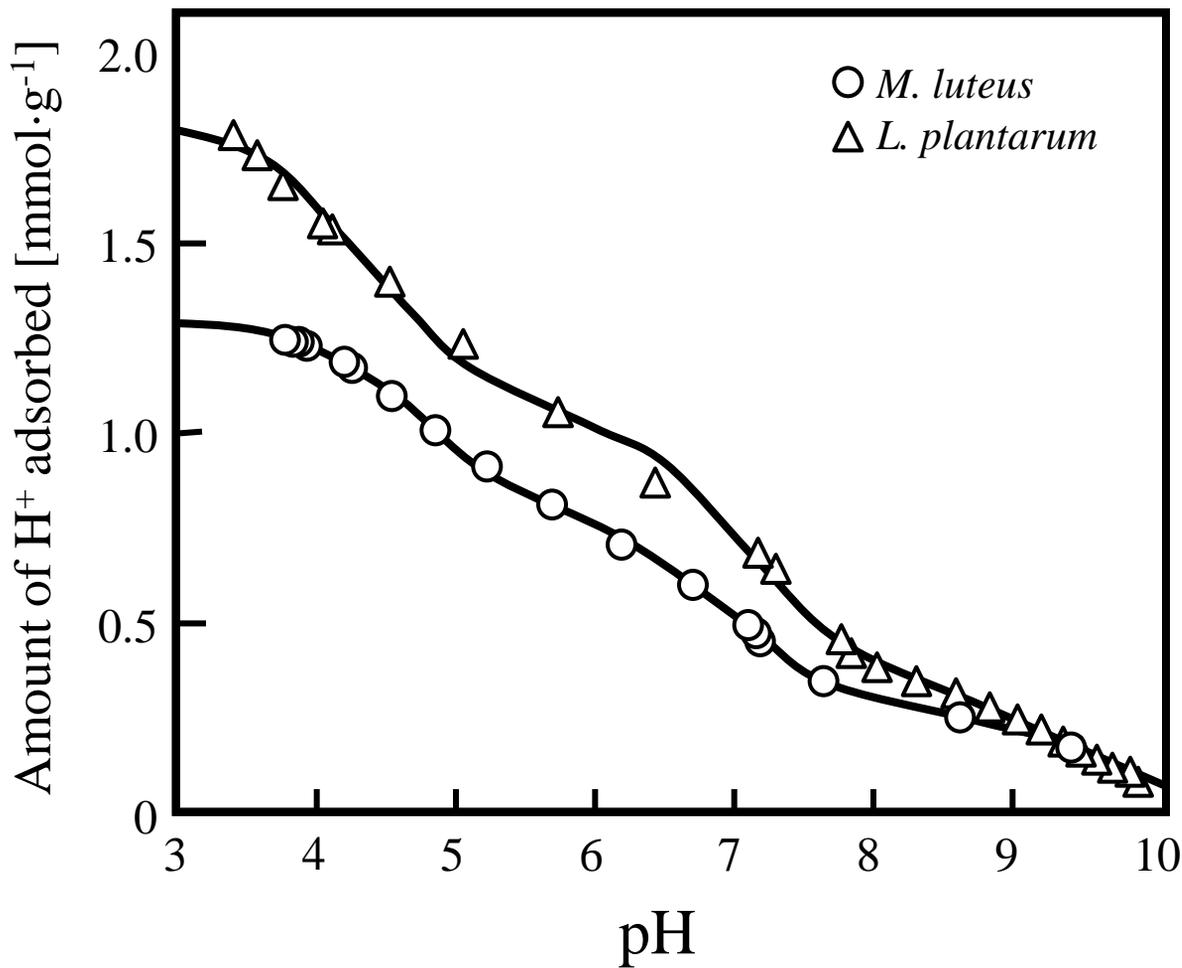


Fig. 1. Seki et al.

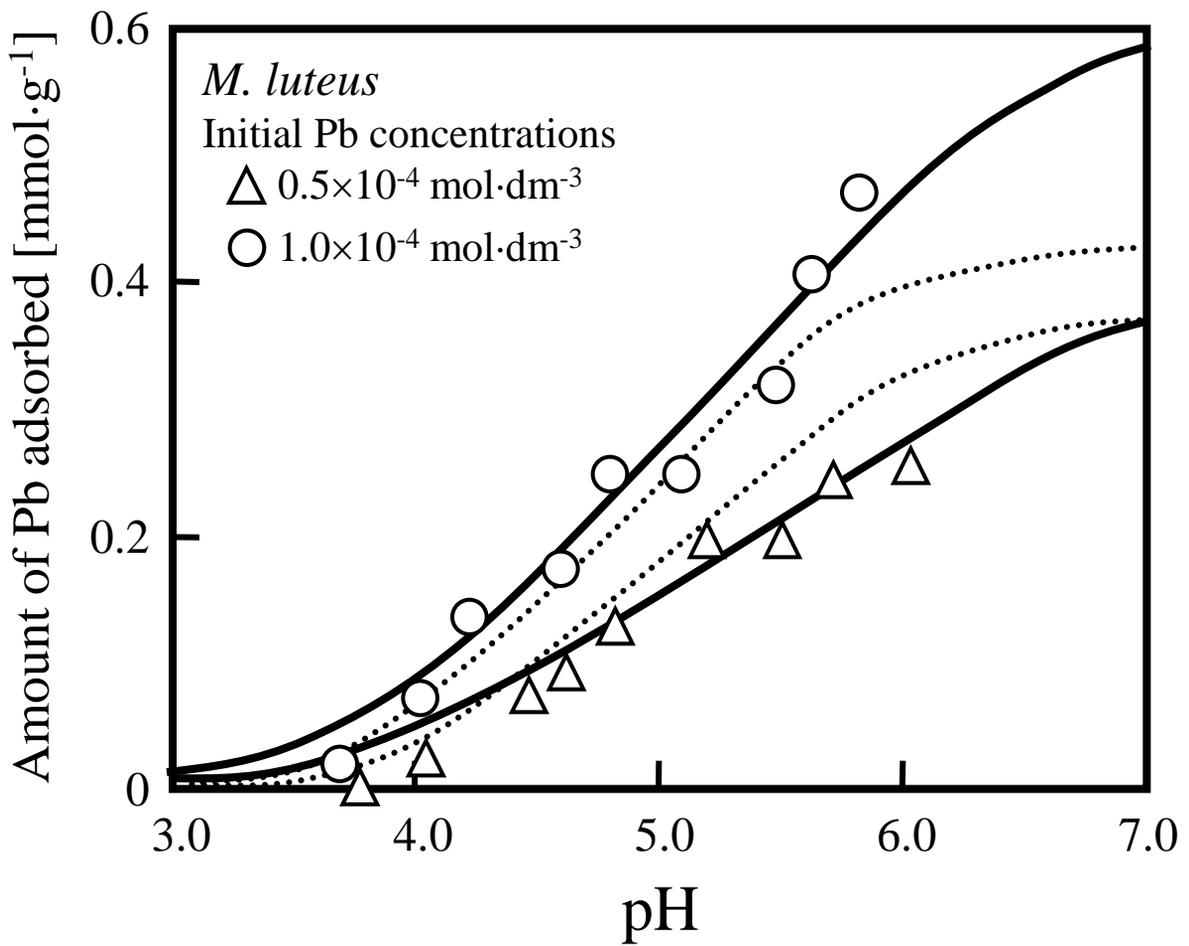


Fig. 2. Seki et al.

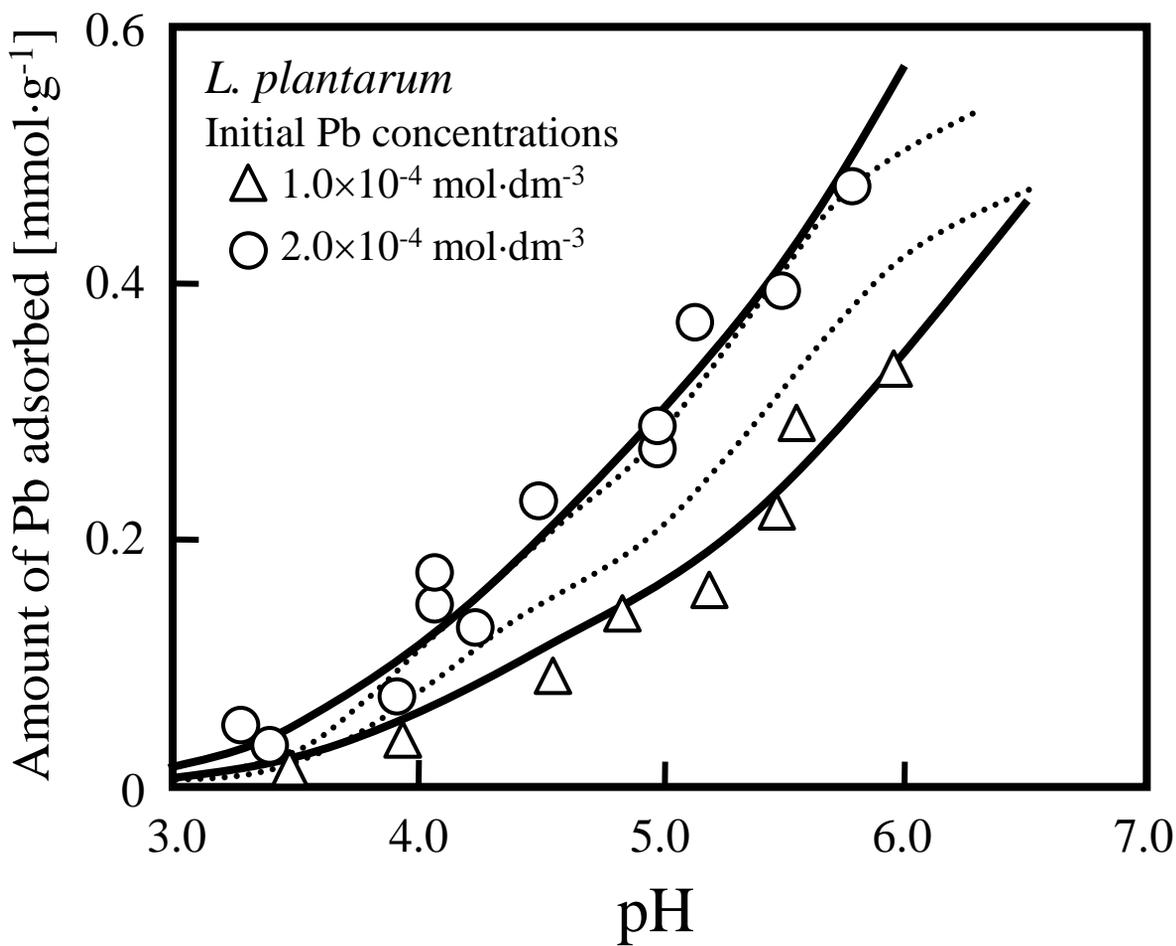


Fig. 3. Seki et al.

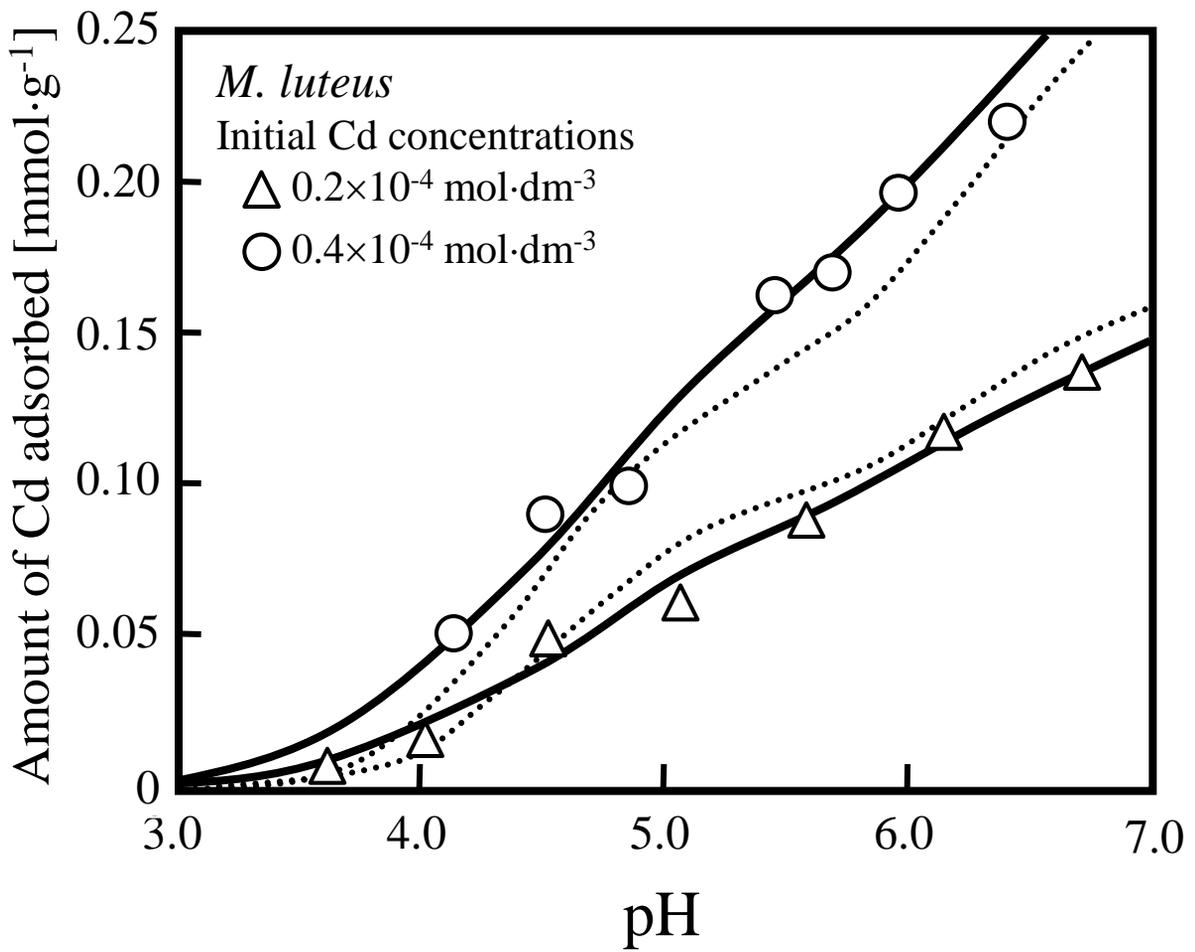


Fig. 4. Seki et al.

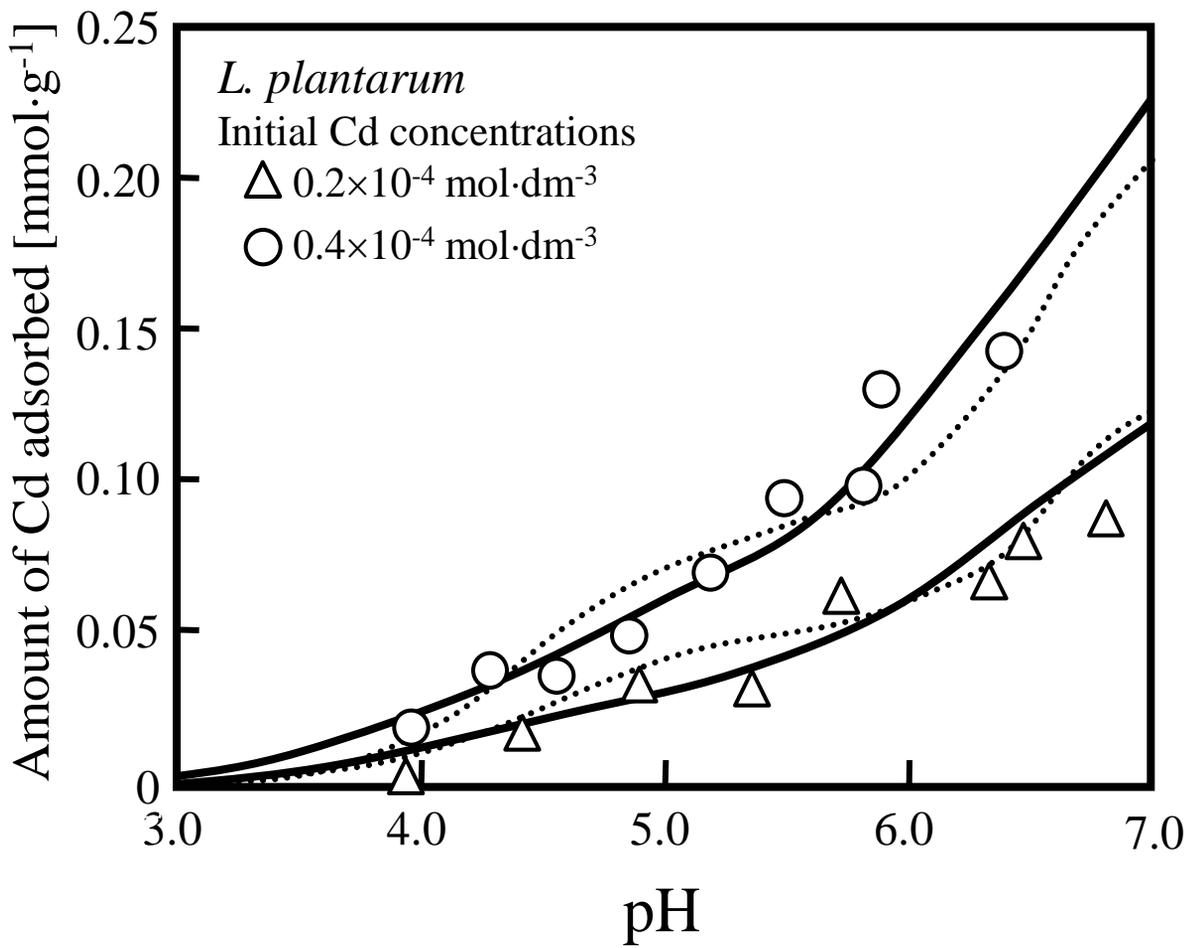


Fig. 5. Seki et al.

Table 1 Hydrogen ion binding constants and number of sites

	$\log K$	$N [\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}]$
<i>M. luteus</i>		
Carboxylic	4.78	0.503×10^{-3}
Phosphatic	6.96	0.484×10^{-3}
Amino	9.64	0.239×10^{-3}
<i>L. plantarum</i>		
Carboxylic	4.39	0.738×10^{-3}
Phosphatic	7.08	0.689×10^{-3}
Amino	9.39	0.302×10^{-3}

Table 2 Metal binding constants

	$\log K_M\text{-Pb}$	$\log K_M\text{-Cd}$
Gram-positive bacteria		
<i>M. luteus</i>		
Carboxylic	4.16	4.21
Phosphatic	5.32	5.02
<i>L. plantarum</i>		
Carboxylic	3.46	3.44
Phosphatic	5.01	4.67
Gram-negative bacteria *		
<i>R. sphaeroides</i>		
Carboxylic	3.00	2.58
Phosphatic	4.82	3.85
<i>A. eutrophus</i>		
Carboxylic	2.92	2.03
Phosphatic	5.13	3.65

* Seki *et al.* (1998)