写真処理廃液中に含まれる EDTA 鉄キレート分解菌株 A-1 の特性

宮崎英男,^{*,a} 鈴木誠治,^a 辻坊 裕,^b 今田勝美^c富士写真フイルム株式会社足柄研究所,^a 大阪薬科大学第一微生物学教室,^b 東京農業大学農学部^c

Characterization of a Bacterium (A-1) That Decomposes Ferric Chelate of EDTA in Photographic Processing Waste Solutions

Hideo Miyazaki,^{*,a} Seiji Suzuki,^a Hiroshi Tsujibo^b and Katsumi Imada^c^aAshigara Res. Labs., Fuji Photo Film Co., Ltd., 210 Nakanuma, Minamiashigara, 250-0193, Japan,^bLaboratory of Microbiology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara,Takatsuki, 569-1094, Japan and ^cFaculty of Agriculture, Tokyo University of

Agriculture, 1-1-1 Sakuraoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

(Received September 8, 1998; Accepted November 13, 1998)

A Ferric-EDTA(Fe-EDTA)-degrading bacterium, strain A-1 was characterized by its physiological properties. The rate of degradation of Fe-EDTA was measured by the titration method and ion chromatography. The former method has the advantage of allowing a greater number of sample measurements of samples at one time. The rate of degradation of Fe-EDTA was higher in a stationary culture than in a shaken one. The optimum pH for the degradation rate was approximately 8.2. Strain A-1 grew in the presence of various kinds of metal-EDTA chelates, but a Na salt, Mg and Ca chelates of EDTA inhibited the growth. Their MICs (minimal inhibitory concentration) were 0.0045, 0.03 and 0.006 %, respectively. These characteristics of strain A-1 have similarities to those of strain B-3, but were different from those of *Agrobacterium* sp. which were reported by Lauff previously (*Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3346 (1990)). All of the detail taxonomic characters indicate that the isolate strain A-1 belongs to a *Pseudomonas* sp.

Key words — EDTA, biodegradation, *Pseudomonas*, ferric-EDTA, chelatometric titration

緒 言

近年、合成洗剤に代表されるように、環境中に放出される確率の高い化学物質については、自然環境下において容易に分解されるように設計、開発がなされてきている。しかし、汎用されている化学物質の中には、それ自身の優れた性能や低コストを理由に、生分解性の乏しいものであっても使われ続けている例がある。EDTA はそれらの化学物質のうちの一つであるが、特に欧州においてはここ数年来その使用が懸念視されてきている。¹⁾ EDTA それ自身は食品添加物に指定されていることから明らかなように、毒性についてはほとんど問題はない。²⁾ ところが、分解されないまま環境中に滞留している間に強力なキレート剤として作用し、毒性の高い重金属類を溶出させ、食物連鎖を通じて動物に、ひいては人体に害を及ぼす、というのが懸念される主な理由である。スイスやドイツを初め、一部の国々では

EDTA を含めた難生分解性キレート剤が規制の対象となってきた。³⁾ 最近ではこの EDTA の環境モニタリングに必要な分析法^{4,5)} もいくつか報告され、かつ、環境中での挙動についての研究^{6,7)} も進められている。我国では本年 6 月に環境庁が「水環境保全に向けた取組みのための要調査項目リスト」を作成したが、EDTA はここに取り上げられた 300 種の化合物のうちのひとつとして、今後水環境中の存在状況実態調査等が予定されている。

一方、EDTA に代わる化合物の開発も欧、米及び日本の化学メーカー⁸⁾ によって進められつつある。しかし、医薬、食品、製紙そして写真工業に代表されるような種々の分野で、共通して幅広く適用できる安価な化合物は見出されてはいない。この 1 kg 数百円という安価で性能の良い EDTA を上記の懸念無しで使っていくためには、環境中に流出する前に速やかに分解する技術が必要とされる。現在写真工業においては、EDTA の鉄キレート体（以下 Fe-EDTA と記す。他の金属キレートについても同様に表記する）を、カラー写真の処理液中で画像形成後に不要となった銀の再ハロゲン化除去を行なうための漂白剤として多量に使用している。³⁾ この Fe-EDTA は大部分が回収、再使用され、また、それを

*To whom correspondence should be addressed: Ashigara Res. Labs., Fuji Photo Film Co., Ltd., 210 Nakanuma, Minamiashigara, 250-0193, Japan, Tel.: +81-465-73-7190; Fax: +81-465-73-7910; E-mail: miyazaki-h@ashiken.fujifilm.co.jp

含む写真処理廃液も主として焼却によって処理されている。しかし一方、この廃液中に約数百 ppm 含まれる Fe-EDTA を軽減させることは、今後の環境対策からも必要なことである。そこで我々は、最も低コストで有効と思われる生物処理に着目し、Fe-EDTA を効率良く分解する細菌の研究に着手した。

EDTA 分解菌についてはこれまで我々の研究を含め 2, 3 のものが知られているに過ぎない。⁹⁻¹²⁾ 本報では Fe-EDTA の分解に高性能が期待される A-1 菌の性状について述べる。なお、本論文の一部は第 19 回トキシコロジーシンポジウム(広島, 1993 年 11 月)で発表した。

実験方法

1. 試薬

試薬はすべて市販品を使用した。
Fe-EDTA (アンモニウム塩)-キレスト。
EDTA の金属錯体及び塩-同仁化学研究所。
ポリペプトン-極東製薬工業。
粉末酵母エキス S-和光純薬工業。
リン酸二水素カリウム無水物・リン酸水素ナトリウム無水物-国産化学。
キレート滴定試薬類-和光純薬工業。

2. 基本培地

本研究に用いた基本培地の組成を以下に示す。
ポリペプトン 0.5%
酵母エキス 0.1%
Fe-EDTA 0.01%
精製水

3. 供試細菌

著者らが神奈川県西部の土壌から分離した Fe-EDTA を分解するグラム陰性の好気性菌 A-1 菌¹²⁾を実験に用いた。

4. 菌株の培養

保存用斜面培地から採取した供試細菌の 1 白金耳を 200 ml のエルレンマイヤーフラスコ内の基本培地 100 ml に接種し、37℃にて一定期間静置または振盪培養した。

5. セライト吸着菌体の調製

200 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れた基本培地 80 ml に A-1 菌 1 白金耳を接種、37℃にて 7 日間静置培養した後、滅菌したセライト No. 545 (和光純薬工業) 1 g を加えた。これを 3 号ガラスフィルターにて減圧濾過、滅菌水 100 ml で 2 度洗浄した後実験に用いた。

6. 菌の増殖度の測定

菌の増殖度は菌懸濁液の波長 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) (日立 UV-2000 ダブルビーム分光光度計を使用) で

表した。

なお、Fe-EDTA 分解後に生じる沈殿(水酸化鉄と推定される)が菌の増殖度の測定に影響を与えるのを避けるために、濁度を測定する直前に菌懸濁液を 0.1 M 塩酸で前処理した。⁹⁾

7. Fe-EDTA 分解率の測定 7-1. イオンクロマトグラフィー——イオンクロマトグラフ DIONEX 2000 i を用い、先報¹¹⁾に記載したで測定した。

7-2. 滴定法——試料液 100 ml に EDTA 2 ナトリウム塩 (EDTA・2 Na) を 10 mg 添加後、pH 5.4 のヘキサミン緩衝液 (ヘキサミン 40 g, 濃塩酸 10 ml, 精製水 100 ml) 4 ml, キシレノールオレンジ指示薬 (0.1% 水溶液) 2 滴を加え、0.005 M 硫酸亜鉛標準液で滴定し、黄色から赤紫色に変色する点を終点とした。この時 0.005 M 硫酸亜鉛 1 ml は EDTA・2 Na 1.68 mg に対応する。

8. 分類学的検討 種々の生化学的、生理学的テスト及び DNA 塩基組成のグアニン (G) + シトシン (C) 含量測定は既報¹³⁾に準じて行なった。

結果及び考察

1. 分解率の測定

EDTA が生分解された割合 (分解率) は、これまでイオンクロマトグラフィーにより求めていた。しかし、イオンクロマトグラフィーは装置が高価であり、かつ短時間測定には不向きであるという欠点がある。そこで、より簡便に分解率を求める手段として、滴定法に着目した。すなわち EDTA は鉄との錯

Table 1. Degradation of Fe-EDTA by Strain A-1 with Shaking or Stationary Culture

Culture medium	Cultivation method	Cultivation period(d)	pH	OD ₆₀₀	Degradation rate(%)
Basal medium	Shaking	3	7.2	1.85	27
		6	7.6	2.67	31
Basal medium	Stationary	3	7.2	0.52	46
		6	7.5	0.60	74

Cultural conditions: To 10 ml of medium in a 50 ml Erlenmeyer flask, strain A-1 was inoculated with one loop, and cultured at 37℃ for 3 to 6 d.

Table 2. Degradation of Fe-EDTA by Strain A-1 with Shaking Culture

Culture medium	Cultivation method	Cultivation period(d)	pH	OD ₆₀₀	Degradation rate(%)
I	Shaking	3	8.3	12.80	49
		6	9.0	13.90	54
II	Shaking	3	8.5	15.15	43
		6	8.9	15.35	47

I: polypeptone 3.0%, yeast extracts 0.2%, Fe-EDTA: 0.01%. II: polypeptone 3.0%, yeast extracts 0.2%, Fe-EDTA: 0.03%. Cultural conditions: To 10 ml of medium in a 50 ml Erlenmeyer flask, strain A-1 was inoculated with one loop, and cultured at 37℃ for 3 to 6 d.

Table 3. Reliability of Titration Method and Optimum pH for the Degradation of Fe-EDTA by Strain A-1

Initial pH	Final pH	Added EDTA·2Na(mg)	0.005 M ZnSO ₄ (ml)	Residual EDTA·2Na(mg)	Degradation(%)	
					a.	b.
5.8	5.8	10	3.3	5.54	45	47.8
6.5	6.5	10	3.0	5.04	50	51.8
7.2	7.3	10	2.7	4.54	55	53.4
8.2	8.0	10	2.4	4.03	60	59.4
8.7	8.5	10	2.7	4.54	55	56.9
9.2	8.8	10	3.5	5.88	41	52.2

a: measured by a titration method. b: measured by ion chromatography. Cultural conditions: 100 ml of basal medium dissolved in 1/30 M phosphate buffer solution (pH 5.8—9.2). Stationary culture was carried out at 37°C for 10 d.

安定度定数 $\log K$ が 25.0¹⁴⁾であり、他のアミノポリカルボン酸系キレート剤と比較し錯安定度が格段に高い。したがって Fe-EDTA の分解産物はより安定度定数の低い鉄錯体になると考えられる。¹⁵⁾ そこで、検体に EDTA·2 Na を一定量加えることにより、分解産物と鉄との錯体より鉄を奪い、残った EDTA·2 Na をキレート滴定して分解率を求めることを試みた。方法は実験方法の 7-2 に示した (Table 3 に示す検液 (検液の調製は後述) について本滴定法とイオンクロマトグラフィーで Fe-EDTA の分解率を決定し、両方法を比較した)。

その結果、本滴定法で求めた値とイオンクロマトグラフィーで求めた値とは良く一致していた (Table 3)。本滴定法は、簡便性という点で有利であり、多数の検体を測定する必要があるスクリーニング試験等に有効であることが判った。

2. 培養条件の検討

2-1. 静置、振盪における差異 A-1 菌を基本培地で静置及び振盪培養し、それぞれの条件下での Fe-EDTA 分解を調べた。

Table 1 に示したごとく振盪培養では静置培養と比較して OD₆₀₀ は高いにもかかわらず、Fe-EDTA 分解率は低く、振盪時間を延長しても分解率が上昇なかった。静置下では菌の増殖が少なくにもかかわらず Fe-EDTA の分解率は高く、しかも培養時間の経過とともに分解率は上昇した。19 日目では 97% に達した (データは示していない)。

さらに培地の栄養源量を増やし、また Fe-EDTA 量を変化させ、Fe-EDTA の分解率を調べた。培養は振盪培養で行なった。Table 2 (培地組成は脚注参照) に示したように増殖は著しく高くなり、pH も上昇した。Fe-EDTA の分解率も 30% 台から 50% 前後まで増加したが、この増加はコメタボリズムによるものと考えられる。しかし、本条件下でも分解率は 54% までであり、静置培養の 74% にはおよばなかった。この理由としては、i) 振盪培養下でのより好気的な条件で生成する分解物が Fe-EDTA の生分解過程を阻害する、ii) 菌の著しい増殖に伴う代謝物あ

るいは pH 上昇が阻害的に働く、iii) 静置培養では菌が表面のみで増殖し、その際優先的に利用可能な新たな培地成分が枯渇するので Fe-EDTA を資化するようになり分解率が上昇するが、振盪培養では常に栄養分が補給されるので Fe-EDTA の分解が抑制される、等が考えられる。

本結果から判断すると、将来目標となる EDTA 分解菌の実用においては振盪培養より静置培養の方が有利と考えられる。

2-2. 至適 pH A-1 菌の Fe-EDTA 分解反応を行なう際の初期の至適 pH 値を求めた。本実験では将来の実用化のことも考え、セライト吸着菌体を調製し、これを使用して基本培地中の Fe-EDTA 分解を調べた。Lauff らが報告している *Agrobacterium* sp.⁹⁾ では培養時の初期 pH を 7.4 より 6.2 に設定した方が分解率は高く、pH 8.2 以上になると分解が止まると報告されている。しかし至適 pH そのものについての報告はない。今回の実験結果を Table 3 に示した。

セライト吸着菌体を用いた分解の初期の至適 pH は 8.2 であった。ここで Table 1 の同条件での結果 (初期 pH 5.8, 6 日目の分解率 74%) と比較して、今回の実験では分解率が 45% と低かったのは、菌担持の操作時や担持菌体の洗浄時における菌体量のロス等によるものと考えられる。

3. 各種金属キレートの存在下における増殖挙動

EDTA は種々の金属と錯体を形成する。それらの金属キレート及び EDTA·2 Na の A-1 菌の増殖への影響を調べた。結果を Table 4 に示す。

Table に示したごとく、Fe-, Cu-, Zn-, Pb-, Mn- 及び Ni-EDTA は増殖を抑制しなかった。しかし EDTA·2 Na, Mg- 及び Ca-EDTA は増殖阻害作用を示した。これらの阻害作用は EDTA のフリー体、すなわち錯体を形成していない EDTA のためであると考えられる。EDTA のフリー体は 0.01% 以上の濃度で、ある種の菌の増殖に影響を与えることが報告されている。¹⁶⁾ 本実験での阻害効果は、アルカリ及びアルカリ土類金属では EDTA との安定度定

Table 4. The Growth of Strain A-1 in the Presence of Various EDTA Metal Chelates or Salts

Me	Before Incubation		After Incubation	
	pH	OD ₆₀₀	pH	OD ₆₀₀
Na	6.1	0	6.1	0
Fe(III)	6.1	0	8.0	0.800
Mg(II)	6.1	0	6.1	0
Ca(II)	6.1	0	8.1	0.488
Cu(II)	6.1	0	7.3	0.680
Zn(II)	6.1	0	7.7	0.808
Pb(II)	6.1	0	8.1	1.000
Mn(II)	6.1	0	8.3	0.960
Ni(II)	6.1	0	7.8	1.100

All growth media contained 0.5% polypeptone, 0.1% yeast extracts and 0.01% Me-EDTA in 1/30 M phosphate buffer (pH 5.8). Incubation was carried out at 37°C for 16 days in a stationary culture.

数が小さい(log *K*: Na 1.66, Mg 8.69, Ca 10.96)¹⁴⁾ので, EDTA·2 Na, Mg- 及び Ca-EDTA ではフリー体が溶液中で生成し, 菌の増殖が抑えられたと考えられる. 言い換えれば安定度定数の大きい錯体ほど上記のフリー体の存在比が小さく, 菌の増殖に影響しなかったと考えられる.

一方, Table 4 に示したように増殖が起これば pH は上昇している. pH 上昇の主要因は菌の代謝で発生したアンモニアと考えられる.(このアンモニアの増加はイオンクロマトグラフィーで確認している. 例えば Fe-EDTA 存在下では, 生成したアンモニアの量は分解した Fe-EDTA の 6.85 倍当量であった.) アンモニアは EDTA 非存在下でも生成する. 今回観察したアンモニアが EDTA 由来のものか培地由来のものかは判別していない. 今後窒素の同位体を用いる方法¹⁷⁾などでアンモニアの由来物質を明らかにしたい.

増殖を阻害する EDTA·2 Na, Mg- 及び Ca-EDTA の最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた. 培地は Table 4 に記載したものと同様の組成を使用し, 48 時間培養で調べた (今回は重金属の混入を避けるため超純水を使用した. 超純水は Yamato Auto Still model WA-72 で処理後, Organo Puric model-R にて調製した). その結果, EDTA·2 Na, Mg- 及び Ca-EDTA の MIC はそれぞれ 0.0045, 0.03, 0.006% であった. いずれも以前に B-3 菌について求めた MIC (同順に 0.0045, 0.04, 0.0063) と近似している.¹⁸⁾

一方, 先述した *Agrobacterium* sp. は Fe-EDTA 以外ではすべての EDTA-金属キレートで増殖が阻害されており,⁹⁾ 今回見出した EDTA-金属キレート存在下でも増殖が可能という本菌の特性については興味を持たれる.

Table 5. Taxonomical Characteristics of Strain A-1

Characters	Strain A-1
Gram strain	— ^{a)}
Soluble pigment	Yellow
Spore formation	—
Motility	+ ^{a)}
Flagella	Polar
Oxidase	+
Catalase	+
O/F test	O ^{b)}
Temperature range for growth (°C)	7.6—40.5
Optimum temperature range for growth (°C)	13.5—31.0
pH range for growth	6—9
NaCl conc. for growth (%)	0—9
Melanin formation	—
Production of soluble pigment	—
Production of H ₂ S	—
Coagulation of milk	—
Peptonization of milk	+
Nitrate reduction	+
Fluorescence	—
Voges-proskauer reaction	—
Indole production	—
Hydrolysis of Aesculin	+
Alginate	—
Casein	+
Chitin	—
DNA	+
Gelatin	+
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	+
Starch	+
Tributyrin	—
Tween 40	+
Tween 60	+
Tween 80	+
Utilization of carbohydrate (1.0%)	
Glucose	O
Sucrose	O
Maltose	O
Starch	O
Lactose	N ^{b)}
Galactose	O
Levulose	O
Arabinose	O
Rhamnose	O
Xylose	O
Mannose	O
Glycerol	O
Inositol	O
Sorbitol	O
Mannitol	O

^{a)} +, positive; —, negative. ^{b)} O, oxidation; N, no action on carbohydrate.

4. A-1 菌の分類学的検討

本菌株は Table 5 に示したように、好気性のグラム陰性桿菌で極鞭毛を有すること、pH 2.0 では生育しないこと、DNA 塩基組成の GC 含量が 68.4% であることなどから *Pseudomonas* 属に属する菌であると見なされる。*Pseudomonas* 属の Fe-EDTA 分解菌としては本件が文献上初めてのものである。この A-1 菌の新規性等について、微生物分類学で最近特に発展してきた 16 S rRNA に基づく分類法などを用いて今後明らかにしたい。

まとめ

Fe-EDTA を分解する A-1 菌の培養に伴う諸性状について検討した。まず Fe-EDTA の分解率測定方法を検討した結果、多検体の測定には従来のイオンクロマトグラフィーより滴定法が有効であった。菌の Fe-EDTA の分解率は振盪培養より静置培養の方が高く、至適 pH は 8.2 であることが判った。A-1 菌は EDTA の種々の金属キレート存在下で増殖したが、Na 塩、Mg 及び Ca キレート存在下では増殖が抑制された。この三化合物の MIC はそれぞれ 0.0045, 0.03 及び 0.006% であった。これらの性状は既報の B-3 菌と類似¹⁸⁾していたが、*Agrobacterium* sp. とは異なっていた。⁹⁾ 本菌は好気性のグラム陰性桿菌で極鞭毛を有し、pH 2.0 では生育しない。DNA 塩基組成の GC 含量が 68.4% であるなどの性質から *Pseudomonas* 属に属する菌であると見なされる。

謝 辞 本研究を行うにあたりご助言を頂きました東京水産大学水産学部今田千秋助教授に深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Frimmel F.H., Grentz R., Kordik E., Dietz F., *Vom Wasser*, **72**, 175—184 (1989).
- 2) Imada K., *Foodchemicals*, **4**, 59—64 (1986).
- 3) German Chemical Society-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance (ed.), "Ethylenediaminetetraacetic acid/Tetrasodium ethylenediaminetetraacetate," BUA Report 168, S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1997.
- 4) Nowack B., Kari F.G., Hilger S.U., Sigg L., *Anal. Chem.*, **68**, 561—566 (1996).
- 5) Kasahara K., *Bunseki*, **254**, 147 (1996).
- 6) Xue H., Sigg L., Kari F.G., *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 59—68 (1995).
- 7) Kari F.G., Hilger S., Canonica S., *Environ. Sci. Technol.*, **29**, 1008—1017 (1995).
- 8) Yamamoto H., *J. Soc. Photo. Sci. Technol. Japan*, **60**, 5—11 (1997).
- 9) Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breittfeller J.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3346—3353 (1990).
- 10) Nortemann B., *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 671—676 (1992).
- 11) Miyazaki H., Suzuki S., Takahashi A., Imada K., *J. Soc. Photogr. Sci. Technol. Japan*, **58**, 104—108 (1994).
- 12) Miyazaki H., Suzuki S., Imada K., *Environ. Sci.*, **10**, 257—262 (1997).
- 13) Tsujibo H., Yoshida Y., Imada C., Okami Y., Miyamoto K., Inamori Y., *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2127—2131 (1991).
- 14) Martell A.E., Smith R.M., "Critical Stability Constants," Vol. 1, Plenum Press, New York, 1974.
- 15) Laurent S., "IVL Report, Effect of Complex Formers on the Aquatic Environment, NTA, EDTA and DTPA," Inst. Water and Air Conservation Research (IVL), Stockholm, Pub. B921, 1988.
- 16) Verschuere K., "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals", Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1972.
- 17) Belly R.T., Lauff J.J., Goodhue C.T., *Appl. Microbiol.*, **29**, 787—794 (1975).
- 18) Miyazaki H., Suzuki S., Imada K., *Environ. Sci.*, **11**, 341—347 (1998).