

B-8 新奇微生物による染料の脱色と 芳香族アミンの分解

○島田 洋輔¹・湯本 将大²・須藤 翼²・伊藤 司^{1*}

¹群馬大学大学院工学研究科社会環境デザイン工学専攻（〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1）

²群馬大学工学部社会環境デザイン工学科（〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1）

*E-mail: tito@gunma-u.ac.jp

1. 研究背景

染料などの着色剤は、繊維染色、食品、化粧品、印刷など多様な用途に使用されている。染料の多くは難分解性であるため、染色整理業の染色廃水が河川に放流されると難分解性の着色汚染を引き起こす¹⁾。また、染料にはそれ自身あるいは代謝により発がん性などの毒性を示すものも多く、その影響も懸念される²⁾。これまで伊藤らは染色工場汚泥を用いた染料や染色廃水の脱色を報告してきた³⁾。汚染物質の分解微生物を獲得する場合、汚染サイトから土壌等を採取して集積培養等により獲得することが常套手段であるため、染色工場から採取した汚泥自体は脱色効果を示した³⁾。しかしながら、染色工場汚泥から脱色微生物の純粋培養株を得ることは困難であった。

そこで本研究では、増殖が速く純粋分離が容易な微生物の方が染色廃水処理に利用しやすいと考え（微生物の準備や運搬の観点から）、いわゆる汚染サイトではなく、ヒトの皮膚（手）を脱色微生物獲得の対象とした。まず、アゾ染料のコンゴーレッドとアントラキノン染料のアリザリンレッドを用いた脱色実験で分離株をスクリーニングした。続いて、その他の染料に対する脱色能力を試験した。さらに、脱色能力のある分離株を用いて、様々な染料が混在する実際の染色工場廃水の脱色を試みた。一方、微生物がアゾ化合物を代謝して有害な芳香族アミンを生成する可能性があるため⁴⁾、分離株の芳香族アミン分解能力についても調査した。

2. 実験方法

2.1 人の手の微生物の分離とDNA解析

約30人の高校生にLB寒天培地に触れてもらい、常温で1週間培養した。発生したコロニーを再度LB培地で培養することを繰り返し、45株の純菌を得た。これらの純粋分離株からDNA抽出し、16S rRNA遺伝子をPCR増幅後、塩基配列を解読した。その後、相同性検索と系統解析により種を推定した。

2.2 人の手の微生物による染料の脱色実験

脱色実験は、M9培地10 mlに染料を20 mg/Lになるように添加したものを原液とし、これに微生物を0.1～0.2 g(湿重量)程

度加え密閉した後38℃で培養した。アゾ染料については窒素ガスと硫化ナトリウムにより嫌気条件とし、アントラキノン染料は好気条件で培養を行った²⁾。

調査対象の染料として、アゾ染料からコンゴーレッド・アシッドレッド114・アシッドオレンジ7を、アントラキノン染料からアリザリンレッドS・スクレアファストレッド・カルミン酸を選択した。

2.3 微生物の染料吸着量

脱色実験の過程において、染料はまず微生物へ吸着された後に、吸着した染料を分解し脱色していくという様子が確認された。これまでは染料の分解が終了し、微生物が通常時の色に戻った状態をもって脱色終了としてきた。しかし、培地中の染料が全て微生物に吸着された時点で液相は脱色されている。そのため、前述の脱色実験を、添加する菌の量を変化させたくて液相が透明になるまで実施し、吸光度の変化量から各菌量での染料吸着量を測定するとともに、吸着に要する時間を測定し、吸着速度を評価した。

2.4 染色工場廃水の脱色

染色廃水には足利市の染色工場にて廃水処理される前の原水を採水した。コンゴーレッド脱色微生物として24株を、アリザリンレッド脱色微生物として37株を使用し、脱色条件は実験方法2.2の脱色実験と同様とした。

2.5 底泥による染料の分解と矢場川の河川調査

実際に染色廃水による色濁汚染が問題となっている矢場川（群馬県と栃木県の県境付近を流れる）を対象に、染色廃水による河川水質への影響、染色廃水の河川底泥への影響を調査した。調査は2011年12月の染色工場の稼働日と非稼働日に行った。採水箇所は9か所で川の upstream、染色廃水流出地点の周辺、工場の下流から河川水および底泥を採取した。採水した河川水の濁度・色度・SSなどを測定し、底泥はコンゴーレッド、アリザリンレッドを加えたM9培地に入れ、実験方法2.2の脱色実験のように嫌気条件と好気条件で培養を行い、脱色能力を評価した。

2.6 芳香族アミン(アニリン)分解能力

アゾ染料の脱色では、分解の過程で芳香族アミンが発生する可能性がある。芳香族アミンの一部からは発がん性が認め

られており、現在は日本では規制されていないものの、欧州や中国、韓国においては既に法規制が行われている。そこで、人の手から分離した微生物が芳香族アミンを分解可能か、芳香族アミンとして最も単純な構造のアニリンを用いて分解実験を行った。実験には50 mg/Lのアニリン溶液10 mlを用い、それ以外は実験方法2.2の脱色実験と同様にアゾ染料脱色微生物を添加し、嫌気条件と好気条件で1週間38℃で培養を行った。アニリンはガスクロマトグラフィーを用いて分析をした。

3. 結果および考察

3.1 人の手からの染料脱色微生物の分離とDNA解析

人の手から得られた微生物45株のうち、後の実験で20株で脱色能力が確認された。その中で、DNA解析を行った17株のDNA解析結果を表1に示す。Bacillusが12株、Micrococcusが4株、Brevibacillusが1株であった。

脱色によるコンゴレー드의吸光度の変化を図1に、脱色の様子を図2に示す。45株中10株からアゾ染料のコンゴレード、15株からアントラキノン染料のアリザリンレッドに対する脱色効果が確認された。コンゴレードに対しては24株と31株が、アリザリンレッドに対しては19株と37株が特に優れた脱色効果を示した(表1)。

DNA解析の結果と照らし合わせると、Micrococcusは4株全てがコンゴレードに対して脱色効果を示しており、コンゴレードに対して特に高い脱色効果を示した24株と31株もMicrococcusに近縁であった。一方で、Bacillus・Brevibacillusはほとんどがアリザリンレッドに対して脱色効果を示しており、アリザリンレッドに対して特に脱色効果の高い19株と37株はともにBacillusであった。このことから、アゾ染料への脱色能力が優れているのはMicrococcus属の微生物であり、アントラキノン染料への脱色能力が優れているのはBacillus属の微生物ではないかと推測できた。

表 1. 人の手からの分離株の染料脱色能力と DNA 解析結果				
株	コンゴレー ド	アリザリン レッド	近縁種	相同性 (%)
6	—	(+)	Bacillus subtilis	99
7	—	+0.02	Bacillus subtilis	99
13	—	(+)	Bacillus subtilis	99
18	(+)	(+)	Bacillus subtilis	99
19	—	+0.02	Bacillus subtilis	100
20	+0.01	(+)	Bacillus subtilis	98
21	—	(+)	Bacillus subtilis	97
22	+0.01	—	Bacillus thuringiensis	99
24	+0.03	(+)	Micrococcus luteus	99
28	—	+0.02	Bacillus subtilis	99
29	+0.02	(+)	Bacillus subtilis	95
31	+0.03	—	Micrococcus luteus	98
32	—	(+)	Brevibacillus parabrevis	99
37	—	+0.03	Bacillus subtilis	99
39	+0.03	—	Micrococcus luteus	100
41	—	(+)	Bacillus subtilis	97
43	(+)	(+)	Micrococcus luteus	99

+は完全な脱色であり、数字は脱色速度(mg-染料/day)、
(+)は不完全ながら脱色、—は脱色しなかったことを表す。

また、24株と31株を用いて他のアゾ化合物のアシッドオレンジ7とアシッドレッド114の脱色実験を行った結果、全ての組み合わせで脱色が起きることを確認した。19株と37株を用いて他のアントラキノン化合物のヌクレアファストレッドとカルミン酸の脱色実験を行った結果、ヌクレアファストレッドは両方の微生物株で脱色が確認できたが、カルミン酸はどちらの微生物株でも脱色できなかった。カルミン酸を脱色できない理由は不明であるが、カルミン酸は今回使用したアントラキノン染料3種の中で最も分子量の大きい染料であることや、他の染料と比較して親水性が低いことが関係していると予想された。

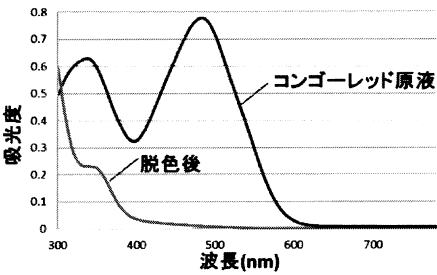


図 1. 24 株を用いた染料脱色による吸光度の変化
脱色終了時の上澄み液を測定。ピーク波長の
吸光度が 98 %以上減少した。

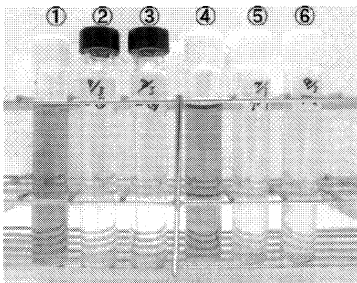


図 2. 24 株と 37 株による染料脱色後の様子
①～③がコンゴレード、④～⑥がアリザリンレッド。
①と④は微生物を加えていない原液。

3.2 微生物の染料吸着量

24株を用いてコンゴレードの吸着量を測定した結果、24株1 gあたり13 mgの染料を吸着可能で、吸着に要する時間は1時間以内であった。これを人の手の微生物による染料の脱色実験での結果に対応させると吸着速度は2.6 mg-染料/hとなり、微生物反応による脱色速度のおよそ2000倍の速度を示した。吸着終了時には染料は微生物に吸着され液体中には残らないため、染色廃水を吸着のみにより脱色する場合は、十分な量の染料脱色微生物を用意することで極めて速く行うことができるといえる。

3.3 染色工場廃水の脱色

染色廃水の脱色後の吸光度の変化を図3に示す。24株・37株ともに吸光度は70 %前後減少し、液相の脱色が進行して

いた。だが微生物に吸着した廃水は24株(アゾ染料脱色微生物)でのみ分解され、37株は廃水の色に染まったままだった。この結果から、この廃水にはアゾ系染料が多く含まれており、河川の着色汚染対策にはアゾ染料の処理が重要であることが推測された。また、24株は様々な染料が混在する実染色廃水に対して一定の脱色効果を示すことがわかった。

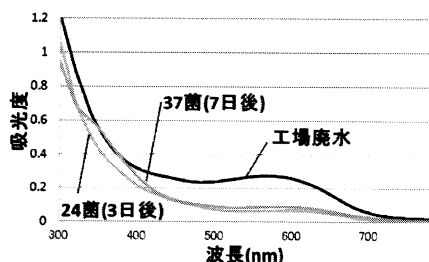


図3. 染色工場廃水の脱色による吸光度の変化

3.4 底泥による染料の脱色と矢場川の河川調査

採水した河川水の各地点での色度を比較すると、工場からの排水は色度88と非常に高い値を示した。また上流では河川水の色度は2前後だったのに対して、廃水が排出された直後の地点である地点6では、工場非稼働日で色度6、稼働日で色度21であった。

底泥の脱色実験の結果を表2に示す。アリザリンレッドは河川全域の底泥を用いてわずかに脱色が確認されたのみであったが、コンゴーレッドに対しては染色工場の下流の全地点の底泥で高い脱色能力が確認された。染色工場廃水の影響を受けている河川底泥だけがアゾ染料に対して高い脱色効果を示したということは、この地点の底泥は日常的にアゾ系染料に曝露されている可能性が高い。このことから矢場川に流れこむ染色工場廃水にはアゾ系染料が多く含まれていることが推測される。

表2. 矢場川の各地点の底泥による染料の脱色能力

脱色対象染料	底泥採取地点							
	1	2	3	4	5	6	7	9
コンゴーレッド	(+)	(+)	—	(+)		25	25	(+)
アリザリンレッド	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)

数字は完全に脱色したときの脱色速度($\mu\text{g} \cdot \text{染料}/\text{day}$)、
(+)は不完全な脱色、—は脱色しなかったことを表している。
地点は数字順に上流から下流の順であり、5番に染色工場がある。

3.5 アニリン(芳香族アミン)分解能力

アゾ染料脱色微生物である24株を用いてアニリンの分解を試みたところ、初期濃度では50 mg/Lであったアニリンが、嫌気条件においては22 mg/Lに、好気条件においては19 mg/Lにまで減少していることが確認された(図4)。好気条件のほうがやや分解能力が高いものの大きな差はなく、アゾ染料の脱

色に適した嫌気条件においても十分なアニリン分解能力が示された。

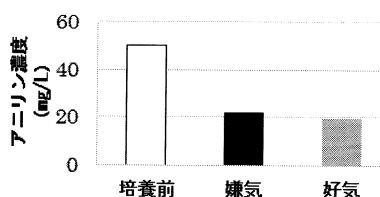


図4. アゾ染料脱色微生物(24株)によるアニリンの分解

4. 結論

本研究では染色工場排水処理とは全く関係がないヒト(高校生)の手から分離培養した新奇な微生物により染料を脱色することに成功した。これらは培養も容易であり、脱色微生物の準備などの労力を大幅に軽減できることが期待される。これらの脱色微生物は主に *Micrococcus* または *Bacillus* と近縁であり、*Micrococcus* はアゾ染料に、*Bacillus* はアントラキノン染料に対して高い脱色能力を発揮するというように、微生物種によって脱色できる染料のタイプが異なる傾向が認められた。

また、*Micrococcus* に近縁な24株によって、実際の染色工場廃水の脱色に成功した。これにより単一染料だけでなく、様々な染料が混在する廃水も脱色可能であることが判明した。一方、工場の廃水にはアゾ染料が多く含まれていることが推測できた。廃水が流れ込んでいる河川の底泥を用いた脱色実験においても、この河川にはアゾ染料を含有する廃水が流れている可能性が高いという結果が示されており、この推測を補強している。

アゾ染料の脱色では、発がん性などの有害性を示す芳香族アミンが生成される可能性が懸念される。しかしながら、本研究ではアゾ染料の脱色に用いた微生物が芳香族アミンの一種であるアニリンの分解能力を持つことを示したことから、仮に脱色時に芳香族アミンが生成されたとしても、分解され無害化できる可能性が高いと思われる。

参考文献

- 1) van der Zee FP, Villaverde S. (2005) Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - a short review of bioreactor studies. *Water Res*, 39(8): 1425-1440.
- 2) Chung KT. (1983) The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat Res*, 114: 269-281.
- 3) 伊藤司, 武関公世, 湯本将大. (2011) 難分解性着色物質の生物学的脱色促進条件に関する検討. *土木学会論文集G (環境)*, 67(7): III661-III668.
- 4) Platzek T, Lang C, Grohmann G, Gi US, Baltes W. (1999) Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Hum Exp Toxicol*, 18(9): 552-9.