

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：56301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00606

研究課題名(和文) 環境を汚染するスルホン化合物の微生物分解の促進に関する新規な方法の提案

研究課題名(英文) Enhanced biodegradation of sulfonated compounds that pollute the environment

研究代表者

早瀬 伸樹 (HAYASE, Nobuki)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：00311100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スルファニル酸を分解する2株の微生物を分離した。624S株はスルファニル酸を分解し亜硫酸イオンを培養液中に放出した。一方、624L株はスルファニル酸を利用できなかった。624S株と624L株を混合培養すると亜硫酸は蓄積せず、スルファニル酸の分解が促進された。624S株は亜硫酸を酸化する能力を持たず、624L株は亜硫酸を酸化する能力を有していた。更に、亜硫酸を酸化するマンガンを追加すると、624S株によるスルファニル酸の分解速度を向上させることができた。これらの結果から、624L株やマンガンにより亜硫酸を酸化除去することにより、スルファニル酸の分解を促進できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難分解性で発がん性及び毒性の懸念されるスルホン化芳香族アミン化合物や環境中に多量に放出されているアルキルベンゼンスルホン酸等のスルホン化化合物を分解すると亜硫酸イオンが副生する。この亜硫酸イオンは微生物等の増殖阻害活性を有することより、この亜硫酸イオンを硫酸イオンに酸化除去し、スルホン化化合物の微生物分解を促進し、環境汚染を改善することに学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Two strains, *Afipia* sp. 624S and *Diaphorobacter* sp. 624L, were isolated from the enrichment culture with sulfanilic acid. Strain 624S had the ability to utilize sulfanilic acid as the only carbon source. Strain 624S degraded sulfanilic acid and released a small amount of sulfite ion. On the other hand, strain 624L did not utilize sulfanilic acid. In addition, a co-culture of strains 624S and 624L resulted in an enhanced degradation of sulfanilic acid, and no sulfite was accumulated. Strain 624S exhibited no oxidation of sulfite; however, strain 624L totally oxidized sulfite. Furthermore, when manganese (Mn) having the ability to oxidize sulfite was added to the medium, the degradation rate of sulfanilic acid was increased in comparison with non-addition control. These results indicate that the sulfite oxidation might stimulate the degradation of sulfanilic acid by strain 624S, that is, the syntrophic interaction between strains 624S and 624L based on the oxidation of sulfite.

研究分野：応用微生物学

キーワード：スルファニル酸 スルホン化芳香族アミン化合物 亜硫酸 微生物分解

1. 研究開始当初の背景

スルホン酸基が導入されたアゾ染料は染色性に優れているため、多くのアゾ染料にはスルホン化芳香族アミン化合物が原料として使用されている。また、合成洗剤にはアルキルベンゼンスルホン酸が広く使用されている。これらの化合物は、直接下水や環境中に放出される可能性が高く、生態系への影響が強く懸念される。

2. 研究の目的

水溶性アゾ染料の多くは、水への溶解性を改善し、染色性を向上させるため、染料分子にスルホン酸基が導入されている。そして、排水処理施設や環境水中に流出した染料は、比較的容易に還元的にアゾ結合が開裂し、発ガン性が懸念されているスルホン化芳香族アミン化合物に分解される。これら化合物は、速やかに微生物分解を受け無毒化されれば問題は無いが、分解にとともに有毒な亜硫酸イオンが生成し、分解微生物の増殖を阻害するため、環境中に蓄積する。そこで、亜硫酸イオン酸化活性を持つ微生物や亜硫酸イオン酸化触媒として機能する金属等とスルホン化芳香族アミン化合物を分解する微生物を組み合わせ、亜硫酸イオンを除去しながら毒性の高いスルホン化芳香族アミン化合物の無毒化を試みる。本研究では、代表的なスルホン化芳香族アミン化合物であるスルファニル酸をモデルとして使用した。

3. 研究の方法

(1) スルファニル酸分解微生物の分離

スルファニル酸を単一炭素源とした集積培養液をL寒天培地へ塗布し、30℃で培養を行った。寒天培地上に形成したコロニーをさらにL寒天培地に数回植え継ぐことにより、スルファニル酸分解に関連する2株の微生物(624S株、624L株)の分離を行った。

(2) 624S株及び624L株によるスルファニル酸の分解

624S株及び624L株の懸濁液を、スルファニル酸を単一炭素源とする液体培地に植菌し、30℃で振とう培養を行った。1日ごとにサンプリングを行い、各サンプル液の600nmにおける吸光度を計測し、菌体濃度を測定した。また、培養上清のHPLC分析を行うことによりスルファニル酸濃度を測定した。亜硫酸イオン濃度については、5,5'-ジチオビスを用いた比色法により測定した。

(3) 624S株及び624L株への亜硫酸イオンの影響

L液体培地に亜硫酸ナトリウムを0, 1, 2.5, 5mMで添加した亜硫酸イオン含有L培地へ624S株、624L株をそれぞれ単独で植菌し、30℃で振とう培養を行った。624S株は3日間、624L株は9.5時間培養を行いながら菌体濃度を測定し、増殖への亜硫酸イオンの影響を検討した。

(4) 624L株による亜硫酸イオンの除去

624S株及び624L株による亜硫酸イオンの除去能力を調べるため、亜硫酸ナトリウム5mMを添加した50mM トリス-HCl 緩衝液(pH7.5)に624S株及び624L株の菌体を懸濁させ、30℃で振とうした。定期的にサンプリングし、上清中の亜硫酸イオン濃度と硫酸イオン濃度を、イオンクロマトグラフィーを用いて測定した。

(5) Mnイオン添加による亜硫酸酸化及びスルファニル酸分解の促進

亜硫酸酸化触媒として、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ を、スルファニル酸ナトリウム二水和物を単一炭素源としたスルファニル酸液体培地に添加した。この培地に624S株を植菌し、30℃で振とう培養を行いながら、スルファニル酸濃度、亜硫酸イオン濃度及び硫酸イオン濃度を測定し、Mnイオンの亜硫酸酸化及びスルファニル酸分解の促進を検討した。

4. 研究成果

(1) スルファニル酸分解に関する微生物の分離

スルファニル酸を単一炭素源とした集積培養液をL寒天培地に植菌したところ、約2~3日で大きなコロニーを形成する624L株、約1週間をかけて小さなコロニーを形成する624S株の2種類の微生物を分離することができた。16SrRNAの塩基配列の解析の結果より、624S株は*Afiplia*属、624L株は*Diaphorobacter*属の微生物であることが明らかになった。

(2) 624S株及び624L株によるスルファニル酸の分解

スルファニル酸を単一炭素源とする液体培地において、624L株の単独培養では菌体の増殖は観察されず、スルファニル酸の分解も確認できなかった。一方、624S株の単独培養においては菌体の増殖が観察され、スルファニル酸も7日間で約60%分解された(Fig. 1)。両菌株を混合培養した場合には、624S株の単独培養と比較して菌体の顕著な増殖が観察され、スルファニル酸はほぼ完全に分解される結果となった(Fig. 2)。また、624S株の単独培養では、スルファニル酸の分解が進むにつれて、亜硫酸イオンが蓄積したが、624S株と624L株の混合培養では、624S株の単独培養と比較してスルファニル酸分解が進んでいるにもかかわらず、亜硫酸イオンの蓄積がほとんど見られないという結果になった。これらの結果から、624S株のスルファニル酸の分解により亜硫酸イオンが生成、蓄積し、624S株のスルファニル酸分解が阻害されている可能性が考えられた。また、624S株と624L株の混合培養では亜硫酸イオンが蓄積していないことから、624S株と624L株の混合培養を行った場合のスルファニル酸分解促進は、624L株が亜硫酸イオンを除去し、624S株の増殖阻害を解除することによるものと推測された。

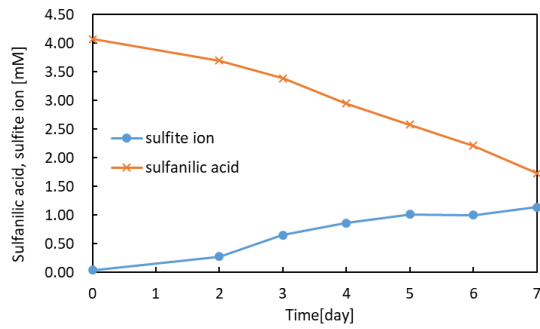


Fig. 1 624S 株によるスルファニル酸の分解及び亜硫酸の生成

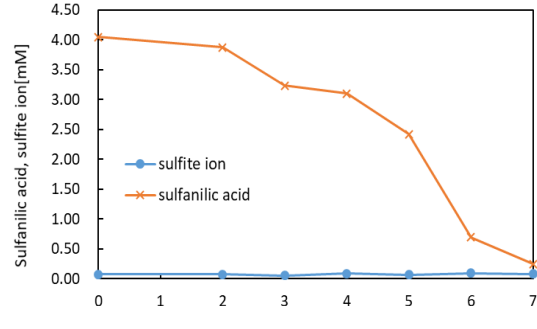


Fig. 2 624S 株と 624L 株の混合培養によるスルファニル酸の分解及び亜硫酸の生成

(3) 624S 株及び 624L 株への亜硫酸イオンの影響

スルファニル酸分解には亜硫酸イオンの存在が関与している可能性が明らかになったため、単離菌株に対する亜硫酸イオンによる増殖阻害について検討した。624L 株は亜硫酸イオンの濃度に関係なく菌体の増殖が観察された (Fig. 3)。一方、624S 株は亜硫酸イオンの濃度が 2.5mM 以上で菌体増殖が阻害されるという結果になった (Fig. 4)。本結果より、624S 株は亜硫酸イオンにより増殖が阻害されること、624L 株は亜硫酸イオンに耐性があることを確認することができた。

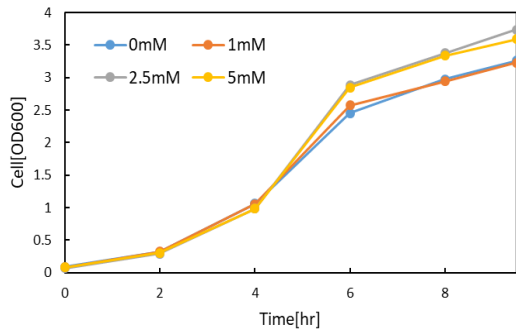


Fig.3 624L 株への増殖に対する亜硫酸イオンの影響

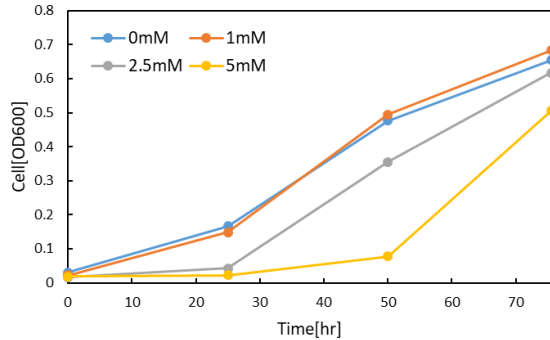


Fig.4 624S 株への増殖に対する亜硫酸イオンの影響

(4) 624S 株及び 624L 株による亜硫酸イオンの除去

亜硫酸イオン添加溶液中での亜硫酸イオンと硫酸イオン濃度変化を Fig.5 に示した。624S 株とブランクにおいては、少量の亜硫酸イオンの減少と硫酸イオンの生成が見られたが、24 時間後でも亜硫酸イオンが大きく減少することはなかった。一方 624L 株では、亜硫酸イオンは徐々に減少していき、24 時間後にはほとんど残存していなかった。また、硫酸イオンは亜硫酸イオン減少に対応して生成していた。

以上の結果から、624L 株は亜硫酸イオンの酸化能力を有していると考えられた。

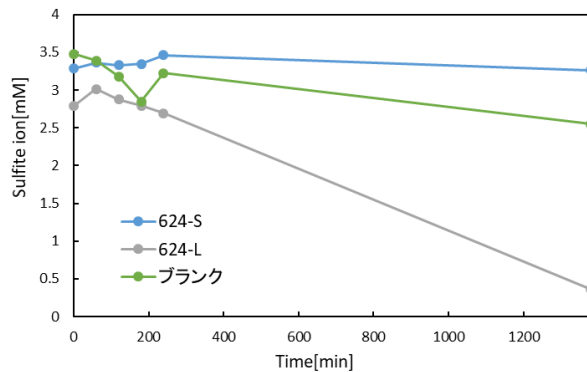


Fig.5 624S 株及び 624L 株による亜硫酸イオンの減少

(5) Mn²⁺イオン添加による亜硫酸酸化促進

これまでの研究により、624L 株の亜硫酸イオン酸化による 624S 株のスルファニル酸分解促進が確認できた。次に、亜硫酸酸化触媒として Mn²⁺イオンを添加し、624S 株によるスルファニル酸の分解促進効果についても検討した。スルファニル酸分解量は、Mn²⁺が存在する条件下では Mn²⁺

を添加していない場合に比べて増加した (Fig. 6)。硫酸イオンの生成についても Mn^{2+} が存在する条件において、多く生成する結果となった (Fig. 6)。また、亜硫酸イオンは Mn^{2+} 存在下では、スルファニル酸分解量が多く、亜硫酸イオンが蓄積しているにもかかわらず、亜硫酸イオンの蓄積量が低く抑えられており (Fig. 6)、 Mn^{2+} には亜硫酸イオンの酸化を促進する効果があると考えられた。更に、 Mn^{2+} 存在下においては、624S 株単独においてもスルファニル酸は 7 日間でほぼ完全に分解され (Fig. 6)、この結果は 624S 株と 624L 株の共培養における分解量とほぼ同じ分解速度である。よって、624S 株によるスルファニル酸分解において、 Mn^{2+} の添加は 624L 株との共培養と同等の効果を示す可能性があると考えられた。

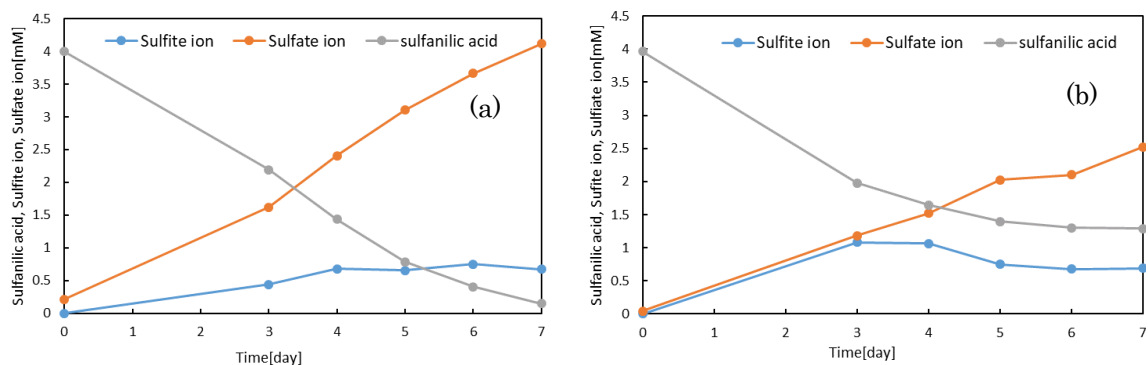


Fig. 6 スルファニル酸分解試験における Mn^{2+} イオンの効果 (a) Mn^{2+} 添加 (b) Mn^{2+} 無添加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東山明広、喜多晃久、中川克彦、早瀬伸樹
2. 発表標題 スルファニル酸分解微生物への亜硫酸イオンの影響
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植松大翔、喜多晃久、中川克彦、早瀬伸樹
2. 発表標題 微生物によるスルホン化芳香族アミン化合物分解への金属イオンの影響
3. 学会等名 第25回高専シンポジウム in Kurume
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東山明広、喜多晃久、中川克彦、早瀬伸樹
2. 発表標題 スルファニル酸分解微生物への亜硫酸イオンの影響
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早瀬伸樹、近藤美咲、喜多晃久、中川克彦
2. 発表標題 亜硫酸イオンの酸化によるスルホン化芳香族化合物の微生物分解促進
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤美咲, 牛尾一利, 中川克彦, 早瀬伸樹
2. 発表標題 亜硫酸イオン除去によるスルファニル酸の微生物分解促進
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 美咲 (KONDO Misaki)		
研究協力者	東山 明広 (HIGASHIYAMA Akihiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------