

地域に根ざした環境保全に関する研究 —脱色細菌による染色排水処理システム—

愛媛県立新居浜工業高等学校 環境化学科 井原 進一

1 序論

(1) はじめに

本校環境化学部は、産学官共同で設立された「脱色研究会」に平成22年度から参加している。本研究会は、愛媛県下の試験研究機関や地元の水処理会社、染色会社そして大学などが協力して、それぞれの得意分野で染色廃水を脱色する方法を考案している。本会が設立されるに至った理由は、愛媛県今治市を流れる複数の河川の水の色が原因であった。今治市はタオルの生産量日本一を誇っており、



写真1 着色された河川

そのタオルを染める染色会社から排出される染色廃水により、河川の水が著しく濁っており、着色した廃水を脱色することが大きな目的であった。初めてこの様子（写真1）を見たとき、「なんとかして透明な水に戻したい」と強く感じた。そして日々の部活動で細菌を実験対象にしていることもあり、「細菌なら、染色廃水を脱色するのではないか」と考えた。さらに将来的には廃水処理施設や染色工場において、細菌を用いて効率よく脱色できるシステムを構築することを目的とした研究を担当することにした。まずは、細菌を分離することから始め、細菌を約80株ライブラリー化することができた。このライブラリー化した細菌を用いて、アゾ染料を脱色する細菌を見つけることにした。

今回は、染色廃水における細菌を利用した脱色の可能性を探るべく実施した研究と、その実用化に向けての考察について報告をする。

(2) 染料と染料の脱色について

染料は天然染料と化学染料の2つに分けられており、化学染料のうち、60～70%がアゾ染料というグループに属するものである。

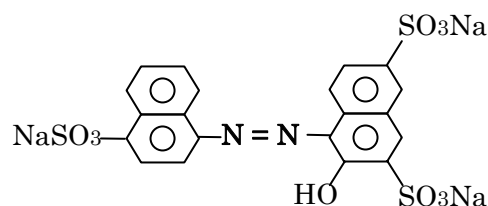


図1 赤色2号の構造式

アゾ染料とは、アゾ基(-N=N-)を構造中に持つ染料である。アゾ染料の脱色は、構造中に存在するアゾ基が染料を発色させる重要な部分で、このアゾ基を切断すれば脱色するというメカニズムである。食品添加物である赤色2号の構造式を参考として図1に示した。廃水の着色については、水質汚濁防止法での規制はないため、河川にそのまま流されている。それにより、河川的美観を損ねるだけでなく、光合成の阻害による生態系への影響も大きいと考えられる。そのため現在では、下水道設備を設置し地下を通し、色が着いたまま海へと排出されている場合が多いと聞いた。しかし、この方法では、本当の意味での廃水処理とは言えない。

2 染色工場汎用染料脱色細菌 KIT-56 の分離とその諸性質

(1) 実験の方法と結果

ア 細菌の分離

平成 22 年 9 月から 11 月までの期間で、80 株の細菌をサンプリングした。

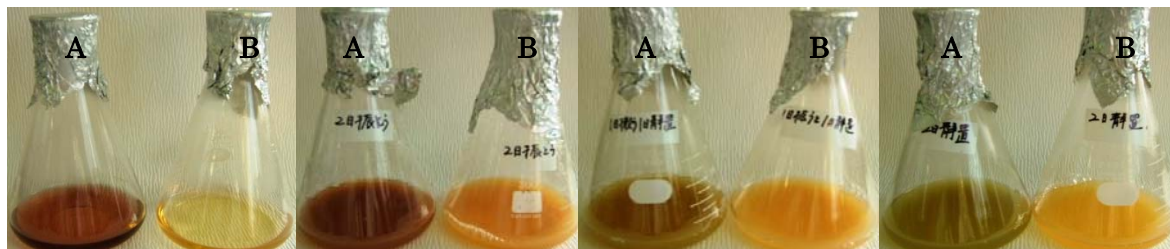
イ 染色工場汎用染料脱色細菌の選定（スクリーニング）結果

保存している約 80 株の細菌について、染料混合液（染色会社で汎用される 20 種類の反応染料の混合液）を 0.01% 添加した YM 液体培地で 1 日間振とう培養した後さらに 1 日静置培養した結果、明らかに染料の色が低下した菌株を 1 株得た。本菌株は、香川県高松市屋島の山林でサンプリングした土壌より分離した好気性の細菌であった。本菌株を、細菌ライブラリーナンバーにちなみ「KIT-56 株」と命名した。本菌株は、コロニーが橙色に着色しており、グラム陰性の球菌であった。簡易同定の結果、*Chryseobacterium daecheonense* との相同性の強い遺伝子を持つことが分かった。しかしながら、当菌株のアゾ染料脱色についての報告はない。

ウ 諸性質の解析

(ア) 培養条件と脱色効率との関係

アゾ染料の脱色には多くの場合、アゾレダクターゼ（アゾ基還元酵素）が関係していることが分かっている。また、アゾレダクターゼは、好气的条件下よりも嫌气的条件下の方が働きやすいとされている。よって、本菌株が示す脱色活性の条件を調査するために、2 日間振とう培養、1 日振とう培養後 1 日静置培養、2 日静置培養に分けて、脱色状況にどのような変化が現れるかを調査した。



対照区（植菌せず） 2 日間振とう培養 1 日振とう後 1 日静置培養 2 日静置培養

写真 2 「KIT-56 株」の培養条件別脱色状況

写真 2 は、それぞれの条件下で培養した直後の脱色状況である。A は染料を添加した培地で、B は染料無添加である。2 日間振とう培養した培養液は、見た目では染料の色が脱色されていないように見える。一方、2 日間静置培養および 1 日振とう培養後 1 日静置培養の培養液は、脱色が進んでいるように見えた。すなわち、「KIT-56 株」の汎用染料に対する脱色機構は、アゾレダクターゼが関与している可能性が高いことを示唆している。しかしながら、脱色は完全でない様子で、変色したというべきである。脱色できない染料も 20 種類のうちにあるのだろうと考えた。

(イ) 染料 20 種類ごとの脱色結果

前述の結果を受けて、20 種類の染料それぞれを 0.01%添加した YM 液体培地 (5mL) での「KIT-56 株」による脱色状況を確認した。その結果、興味深い結果を得ることができた。まず、表 1 は今回使用した染料で、「KIT-56 株」による脱色状況と染料の構造的な分類である。この染料別の「KIT-56 株」の脱色活性を確認したところ、染料 No.3、7、11、12、13、19 に関しては、沈殿した菌体に染料が着色していた。菌体に吸着することによる脱色も視野に入れて今後の研究を進

表 1 脱色状況と染料の構造式別分類

No.	脱色状況	構造的な分類	No.	脱色状況	構造的な分類
1	+++	A	11	+	A
2	+	A	12	+	A
3	+++	B	13	+	C - ②
4	+++	A	14	—	A
5	—	C - ①	15	+	A
6	+	A	16	+++	C - ③
7	+++	B	17	+	C - ③
8	+++	A	18	—	C - ②
9	+++	A	19	++	A
10	+	A	20	+++	C - ④

分類) A: アゾ系反応染料の混合物、B: アントラキノン系反応染料、C-①: フタロシアニン系反応染料、C-②: 反応染料の混合物、C-③: ホルマザン系反応染料、C-④: 配合品

めていかなければならない。表 1 をみると、No. 14 を除いては、脱色の強弱はあるものの、アゾ染料ならほぼ完全に脱色できていることが分かった。また、今回は 2 種類しか検査できていないが、アントラキノン系反応染料も完全に脱色できていた。しかし、その脱色は菌体への吸着であった。アントラキノン系反応染料と本菌株の細胞膜などとの親和性が高く、吸着力が高いことも予想された。また、ホルマザン系反応染料、特に No. 16 も脱色活性が高かった。この辺も今後考察すべき結果となった。ちなみに、ここでは報告していないが、これまでに類似細菌を数種類発見しているが、本菌株 KIT-56 株は、その中でも最もアゾ染料の脱色に有効な細菌であることが分かった。

(ウ) Remazol Violet 5R 90%の脱色条件

KIT-56 株を液体培養し、アルギン酸ナトリウムを担体として培養液を固定化した。それをカラムにつめて、その中に 0.01%の本染料水溶液を充填し、脱色試験を実施した。今回使用した染料はアゾ染料で、脱色活性が強く現れ、かつ色合いが鮮やかで視覚的に判断しやすい No.9 (Remazol Violet 5R 90%) を選択した。37°Cで 3 日目には完全に脱色された。カラム内の脱色された液を取り出すと、少し培養液の匂いがした。また、培地の色も若干残っていた。しかし菌体はほとんどないのか濁りがほとんどなかった。これと同じように再度できるか否かを調べるために、更に染料溶液を充填し、37°Cで反応させた。2 回目の脱色試験では 6 日間かかった。また、3 回目では 9 日間かかった。回数を重ねるごとに 3 日ずつ脱色時間が延びることが分かった。また、実用化の際に必要な脱色効率と環境負荷を最低限に抑えるために、脱色に必要な最小培養液濃度を特定するための実験を実施した。培養液・精製水・染料溶液 (最終濃度 0.01%No. 9) を添加して脱色に関する培養液量の依存度を調査した。その結果、培養液濃度 40%以上あれば 37°C、3 日間静置すれば脱色することが分かった。このことから、前述のカラム内の培養液濃度は 40%以上になっていることが予想された。

(エ) 脱色酵素の局在

「KIT-56 株」の培養液で脱色することは実験結果から分かったが、脱色酵素は菌体内と菌体外のどこにあるのかを調べるために、培養液を遠心分離器で培地と菌体に分離した。サンプルは、培養上清、菌体、菌体超音波破砕物を用いて、それぞれの条件下で実施した。また、脱色酵素であるアゾレダクターゼは、アゾ基を切断する際に水素供与体である補酵素を必要とすることが知られている。よって、この酵素の補酵素として知られている NADH と NADPH を添加したサンプルを含む、サンプル組成によって 3 日間の脱色状況の観察を実施した。その結果、3 日間の観察中にはどのサンプルも脱色することがなかった。よって、本菌株は培養液自体（培地と菌体）でないと脱色が進まない菌株であるということが分かった。

(オ) 補酵素と脱色の関係

「KIT-56 株」は、培養液と菌体が共存する条件下でのみ脱色する特性があることが実験により分かったので、その条件で補酵素を添加することによって脱色効率が上昇するかどうかを調査する実験を実施した。その結果、NADH と NADPH とともに「KIT-56 株」の脱色に対し、脱色促進の影響は認められなかった。かえって、脱色途中では、添加しない方が効率よく脱色が進むことが分かった。

(2) 結果のまとめと考察

アゾ染料の脱色に深く関わるアゾレダクターゼは、一般的に嫌氣的条件化でアゾ基の切断を行なう酵素であると知られている。実際に、*Actinobacillus* sp. B-11 株や *Aeromonas* sp. B-5 株のアゾ染料脱色活性はアゾレダクターゼによるもので双方とも静置培養した時にアゾ染料脱色活性が急激に高まることが報告されている。KIT-56 株も同じ性質であったことからアゾレダクターゼによる脱色機構を備えていると考えられる。

そこで、酸素の依存性を調査するために、染色工場での汎用染料 20 種類を最終濃度 0.01% になるように YM 液体培地に添加し、本菌株を接種した。2 日間振とう培養 (150rpm) した条件では脱色活性は見られなかった。しかし、2 日間静置培養したものや 1 日振とうした後 1 日静置した条件では脱色が見られた。脱色が見られるといっても、染料を添加していない培地と比較すると、若干緑色をしている。よって、20 種類の染料のうち、脱色しきれないものもあると考え、染料別の脱色活性の実験を行なった。その結果、アゾ染料であればほぼ脱色することが分かった。よって、アゾ染料だけを処理するのであれば、本菌株が十分活躍できる可能性が高まった。

これらの結果より、実用化する際に必要な効率などを検討するための基本的な性質を調査した。まず、固定化に耐えうるかどうかを調査するための簡単な実験を実施した。授業の「実習」で学習する方法であるアルギン酸ナトリウムによる包括法で調査したところ、時間がかかるものの脱色されることが分かった。しかし、繰り返しゲルビーズを使用すると、脱色の時間が使用回数に比例して倍増することも分かった。このことから、より効率の良い方法を見出すために、最小培養液濃度の決定や脱色酵素の局在の決定そして補酵素の脱色への影響などの実験を実施した。これらの結果より、本菌株の脱色作用は、菌体と培養液が共存し、その液体が脱色しようとするアゾ染料廃水の 40%を占めた際に、アゾレダクターゼの典型的補酵素を添加することなく、通性嫌氣的条件下にて、37°Cで 60 時間

以内に脱色することが分かった。

3 終論

現在、染色工場で広く使用されている廃水処理装置は、染料の脱色を目的とせず、BOD や COD 等を低下させるための活性汚泥法によるものである。現在、愛媛県工業試験センターが開発した「えひめ AI」を培養槽で培養し、曝気槽で好氣的処理をして沈殿槽で汚泥を沈殿しているが、染料の脱色には至っていない。そこで、私たちは次のような染色廃水処理装置を提案した（図 2）。複数に分かれている曝気槽の先頭または中間に静置槽を設置することで、KIT-56 株がアゾ染料を脱色する際に好ましい通性嫌気状態を作り出し、脱色をスムーズに進める。また曝気槽の後半部分では、「KIT-56 株」の培養液成分などの有機成分などを完全分解し、BOD や COD 等を低下させる。その後、汚泥を沈殿槽で沈殿し、無色化した上澄みを河川に放流するというものである。

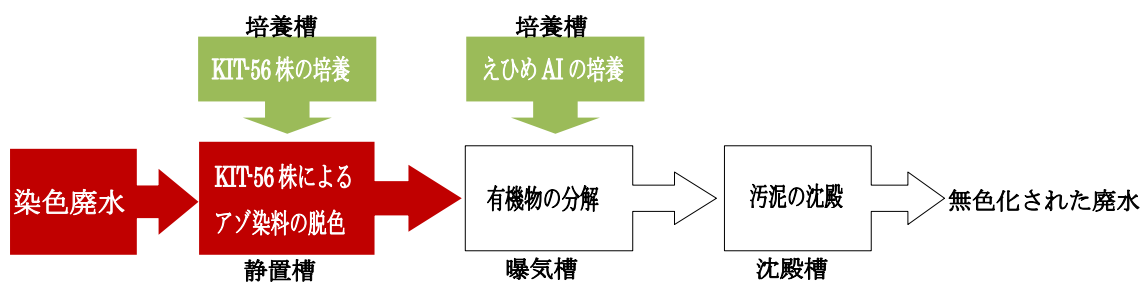


図 2 私たちの提案する染色廃水処理装置

私たちが提案する方法は、現在使用されている装置を改造しなければならないという問題点もある。なぜなら、「KIT-56 株」が通性嫌氣的条件下でのみ脱色をするためである。もし、「KIT-56 株」が好氣的条件下でも脱色がスムーズに進む性質が備わっていれば、同じ曝気槽で、脱色と有機物の低分子化が並行して進められ、装置を改造しなくてもよい。装置を改造しなくても使用できる微生物の調査も今後の課題となると考えている。

問題点を解決するために染色工場や廃水処理業者そして県の試験研究機関の協力を得ながら今治市内の染色工場で実証実験装置を製作して、実排水での実証実験を開始した。