

# バイオ脱硫菌による有機硫黄化合物の微生物分解

## Microbial degradation of organosulfur compounds by desulfurizing bacteria

バイオプロセス工学研究室

蛭川龍

指導教員 松井徹

1) 東京工科大学 応用生物学部

キーワード: バイオ脱硫菌, 有機硫黄化合物, 微生物分解

### 1. はじめに

有機硫黄化合物 (OSC) は、環境汚染に関係するものが多く、例えば、ジベンゾチオフェン (DBT) やベンゾチオフェン (BT) は石油に含まれる酸性雨の原因物質であり、松井研ではこのような OSC 分解菌 (バイオ脱硫菌) に関する研究を進めている。化学兵器イペリット (ジクロロエチルスルフィド) は使用禁止されている兵器であるが日本は第二次世界大戦後に中国に遺棄したことから処理義務が課されている。本研究ではイペリットの土壌浄化の可能性を知るためにモデル化合物 2-クロロエチルフェニルスルフィド (CEPS) 及び 2-クロロエチルエチルスルフィド (CEES) のバイオ脱硫菌による分解性について検討した。現在、BT 脱硫菌の分解の可能性が認められている

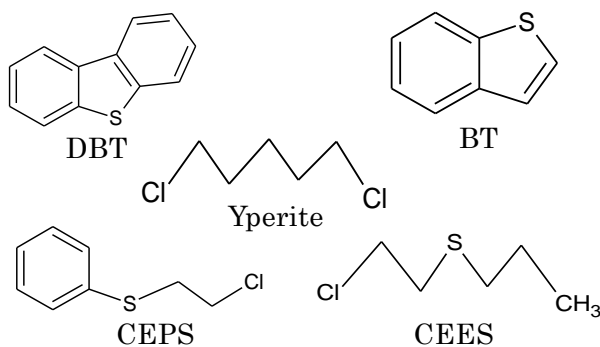


図 1 化合物の構造式

### 2. 実験材料および方法

使用菌株は研究室保存の菌株 5 株を使用した。

- ・ BT 脱硫菌 T09、T20 株
- ・ DBT 脱硫菌 KA2-5-1、TM414 株
- ・ アルカン資化性細菌 11B 株

培養方法は AG 培地を用いて 30°C で培養した。

AG 培地の組成は表 1 に示した。

表 1 AG 培地の組成

Glucose	0.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
NH <sub>4</sub> Cl	1g
NaCl	0.01g
MgCl <sub>2</sub> /6H <sub>2</sub> O	0.2g
Metal	10mL
Vitamin sol.	1mL
OSC (CEES or CEPS)	0.1g
D. W.	Up to 1L

AG 培地はグルコースを炭素源として含んでいるが、硫黄源はない。硫黄源として本研究のターゲットである CEES、CEPS を添加、培養することで分解できるかどうかを評価することができる。

#### ・分析方法

菌体量は 660nm の OD 測定を行った。分解代謝物の分析は固相抽出あるいは溶媒抽出によって培養液を抽出したのち、ガスクロマトグラフィーにより成分分析を行った。固相抽出は Oasis HLB カラム (Waters) を用いて、メタノールで溶出した。溶媒抽出は培養液を酸性条件下で酢酸エチルによって抽出した。ガスクロマトグラフィー分析は DB-5 カラムを用いて、80°C 4min、0min~10°C/min~250°C 4min、25min で分析を行った。使用菌株の系統解析は研究室にある 16SrRNA データを用いて、遺伝子解析ソフト MEGA5 を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。

### 3. 結果および考察

使用菌株の正確な分類を行うために 16SrRNA 配列データを用いて系統解析を行った。使用した菌株 T09、T20、KA2-5-1、TM414 株の系統樹を図 2 に示した。

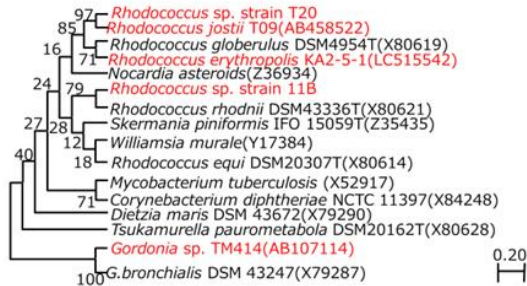


図 2 16SrRNA 配列による使用菌株の系統解析

脱硫細菌である T09、T20、KA2-5-1 株は *Rhodococcus* 属に属していて、TM414 株は *Gordonia* 属に属していた。11B 株はアルカン資化性細菌だが、脱硫細菌と同様 *Rhodococcus* 属に属していた。*Rhodococcus* 及び *Gordonia* 属細菌は石油系の水不溶性化合物分解菌として報告の多い細菌である。

次に先程の菌を用いて CEES と CEPS に対する生育を検討した。図 3 は各硫黄源を唯一の硫黄源として 1 週間培養後の OD 測定の結果を示した。

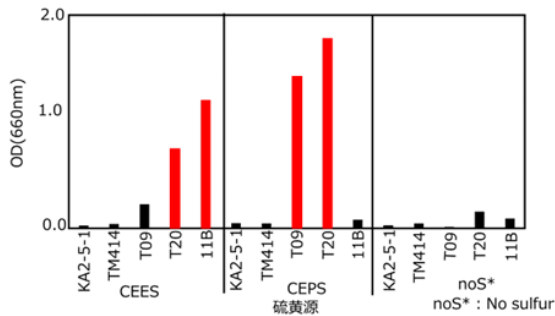


図 3 各 OSC を硫黄源とした場合の培養結果

CEES を唯一の硫黄源とした場合は、T20 と 11B 株が高い生育を示し、CEPS を唯一の硫黄源とした場合は T09 と T20 株が高い生育を示した。このことから T20 株と 11B 株は CEES を唯一の硫黄源として生育し、T09 株と T20 株は CEPS を唯一の硫黄源として生育したことが分かった。

T09 に CEPS を添加した培養液を固相抽出したサンプルのガスクロマトグラムを図 3 に示した。

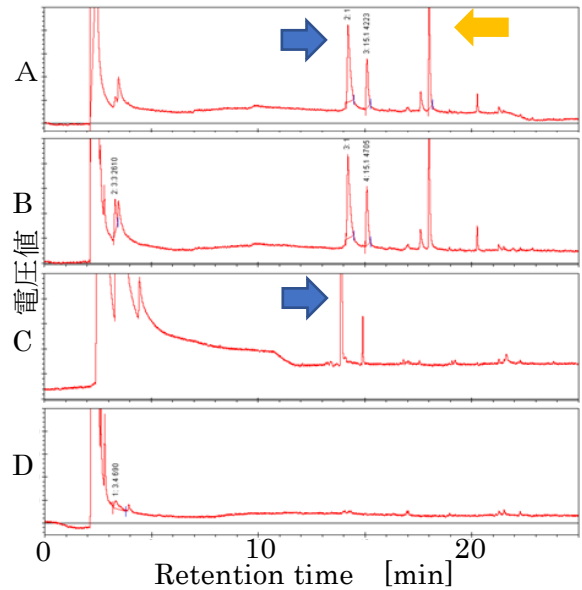


図 3 培養抽出液のガスクロマトグラム

A : T09+CEPS, B : T09+CEPS+TMSD  
C : No cell+CEPS, D : T09+MgSO<sub>4</sub>+TMSD  
TMSD; エステル誘導体化試薬

A の培養液の抽出物のサンプルと C の菌なしで基質のみを分析した場合を比較すると青い矢印、14.2min のピークは基質の CEPS と分かるが、黄色の矢印 18.0min のピークが C,D に確認されないことから CEPS の分解物であることが考えられる。カルボン酸の存在を確認する為にメチルエステル化試薬トリメチルシリルジアゾメタンを添加したがピークに変化はなかった。今後はこれらのピークについて GC-MS 分析で構造解析を行う予定である。

### 4. まとめと今後の予定

遺棄化学兵器の微生物分解を目的としてパイオ脱硫菌及びアルカン資化性菌を用いて検討した。T20 株と 11B 株は CEES を唯一の硫黄源として生育し、T09 株と T20 株は CEPS を唯一の硫黄源として生育した。今後は生育の認められた菌を用いて培養、抽出、分析を行い、分解代謝物の構造決定と分解経路の解明を行う予定である。