

含塩素有機リン酸トリエステル分解微生物単離の検討

環境生物化学研究室 廣川和也

指導教官 山田良平、解良芳夫、高橋祥司

1. 研究の背景と目的

有機リン酸トリエステル類はその物理化学的な性質からプラスチック製品の難燃性可塑剤や衣類の難燃化剤、あるいは農薬や工業機械の潤滑油添加剤といった幅広い分野で使用されてきた。その一方で生体に対する神経毒性、細胞毒性、発ガン性といった様々な毒性を持つことが明らかにされている。

プラスチック製品などの廃棄により、有機リン酸トリエステル類は環境中に溶出し、埋立処分地の浸出水から高濃度で検出されている。また、工場排水や家庭排水などからも検出され、これらの侵入経路を通じた有機リン酸トリエステル類による環境汚染が危惧されている。

その中でも、塩素を含む含塩素有機リン酸トリエステルである Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) は、毒性が強く、難分解性であり、これまで微生物分解に関する報告はない。

そこで本研究では、含塩素有機リン酸トリエステル類を分解する微生物を単離することを目的とした。

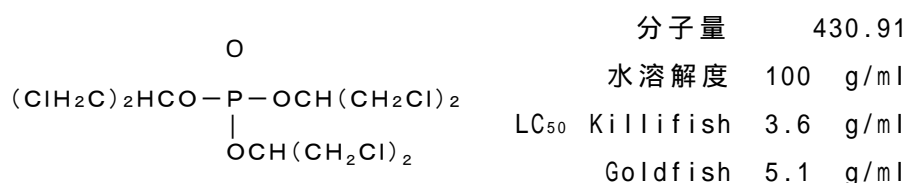


図 1 Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate の構造

2. TDCPP 分解微生物のスクリーニング

長岡市およびその近郊の産業廃棄物埋立処分場排水、家庭雑排水、農業排水などの野外試料を採取し、TDCPP を唯一の炭素源とした完全合成培地に接種した。集積培養を行い、3 回の植え継ぎで生育の観察された培養液を平板培地に塗布し、分解菌の単離操作を行った。単離した菌株を用いて、TDCPP を唯一の炭素源とした完全合成培地に再度接種し、有意な生育のみられた 8 つの菌株を選抜した。それらの菌株を TDCPP 初期濃度 120 μM とした完全合成培地で培養し、ガスクロマトグラフィー分析によって TDCPP 濃度を解析したところ、菌株 No.18 で最も高い TDCPP 減少率がみられた。このことから菌株 No.18 の TDCPP 分解について詳細に解析した。

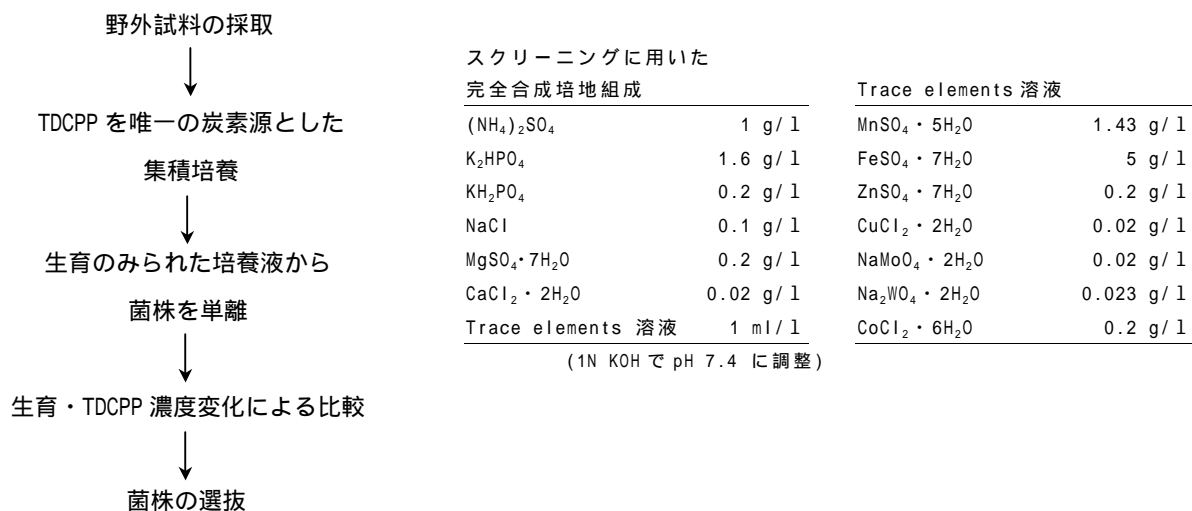


図 2 スクリーニング操作手順と完全合成培地組成

表 1 スクリーニング結果

野外試料番号	集積培養	平板培地による 単離操作	TDCPPの有無による 生育差の比較	GC-FPD分析による TDCPP減少率 (%)
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	1.5
8	+	-	-	-
9	+	+	-	-
10	+	+	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	+	+	-
14	+	+	+	7.6
15	-	-	-	-
17	+	+	+	11.7
18	+	+	+	17.9
19	+	+	-	-
20	-	-	-	-
21	+	-	-	-
23	+	-	-	-
24	+	-	-	-
27	+	+	+	13.6
28	+	-	-	-
29	+	-	-	-
30	-	-	-	-

から の実験を行った。それぞれの実験において有意な生育のみられた試料や菌株を次の実験に用いた。有意な生育のみられた試料を (+)、生育のみられなかった試料を (-) で示す。TDCPP 減少率は、初期 TDCPP 濃度 120 μM の完全合成培地を用いて 10 日間培養し、その減少量から求めた。

3 . 単離した菌株による TDCPP 減少

菌株 No.18 での培養液中の TDCPP 濃度および塩化物イオン濃度を経日的に測定した。その結果、培養初期に TDCPP 減少および塩化物イオンの遊離がみられた。菌を添加しない培地および滅菌した菌を添加した培地を用いて同様の実験を行ったがこれらの変化はみられなかった。このことから培養液中の

変化は菌株 No.18 によるものであることが示唆された。しかし検出された、塩化物イオン濃度は、TDCPP 減少量から推測される値よりもおよそ 10 倍高い濃度で検出され、化学量論的な一致が認められなかった。そこで、塩化物イオン濃度の測定方法の改良を検討したが、その関係を明らかにすることはできなかった。

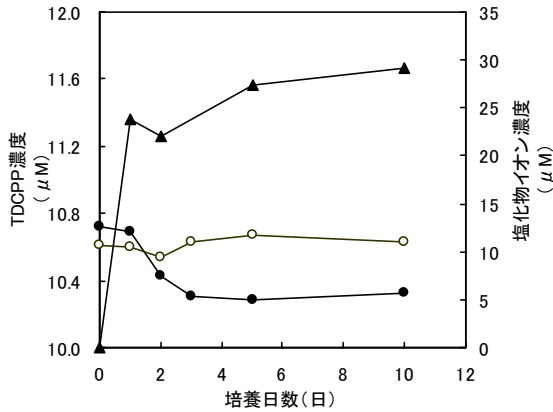


図 3 菌株 No.18 における TDCPP 濃度と塩化物イオン濃度の変化
培養液中の TDCPP 濃度 (●)、塩化物濃度 (▲)、を測定した。菌を添加しない培地 (○)、滅菌した菌を添加した培地では TDCPP 減少および塩化物イオンの遊離は確認されなかった。

4 . 単離菌株の同定

これまでの実験では菌株 No.18 の TDCPP 減少率が低いため、その向上を検討する必要があると考えた。そこで、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列から菌株の同定を行い、その特性を知ること、TDCPP 減少向上のための知見を得ることができると考えた。相同性検索を行った結果、菌株 No.18 は多剤耐性細菌として知られている *Acinetobacter* 属であることが示唆された。

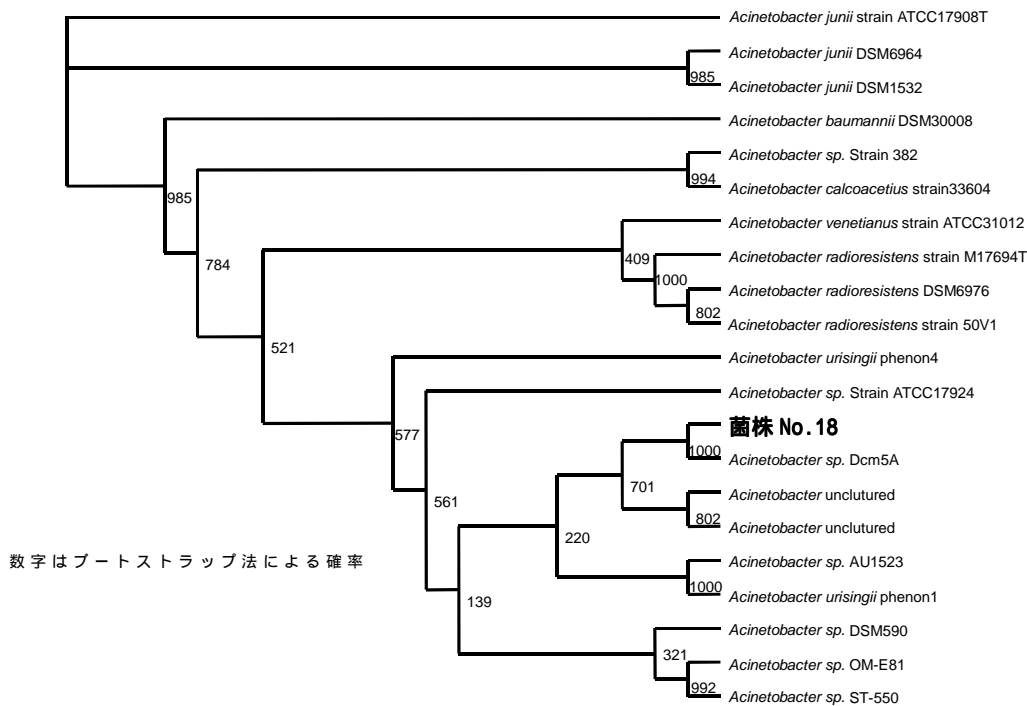


図 4 菌株 No.18 系統樹

5. 培地条件の TDCPP 減少への影響

予備検討のから、菌株 No. 18 はグルコースを炭素源として利用できず、エタノールを資化する菌であることが明らかとなった。このことからエタノールを添加し、生育を盛んにすることで TDCPP 減少の向上が期待されると考えた。生育に最適なエタノール濃度 3.6% (v/v) で培養を行ったところ、TDCPP 減少がみられなくなった。このことから、エタノール添加によって菌の生育を盛んにしても TDCPP 減少の向上は期待できず、逆に TDCPP 減少を抑制することが明らかになった。

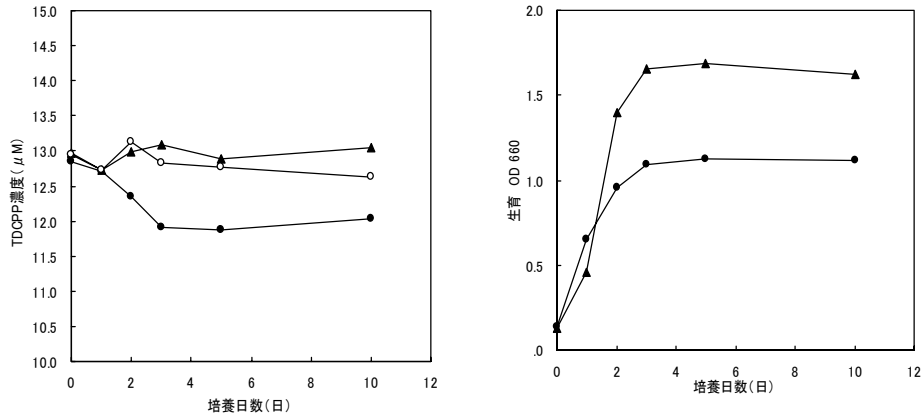


図 5 培養液中のエタノール濃度の違いによる TDCPP 減少率 (左グラフ) および生育 (右グラフ)、エタノール濃度 0.1% (○)、エタノール濃度 3.6% (●) および菌未添加培地 (△) での TDCPP 濃度変化および生育の変化を示す。

続いて、炭素源およびリン源の影響について検討した。菌株の特性から、リン源を制限した培地では、TDCPP をリン源として資化するのではないかと考えた。エタノール 3.6% (v/v) を炭素源として、炭素源・リン源の有無を組み合わせた 4 種類の培地を作製し、TDCPP 減少率の比較を行った。その結果、リン源の有無に関わらず、炭素源を制限した場合にのみ、TDCPP 減少が認められた。このことから、TDCPP 減少にはエタノール添加の影響が大きいことが示唆された。今後さらに培養条件を検討し、TDCPP 減少率を向上させ、本菌株が TDCPP 分解微生物であるか究明する必要がある。

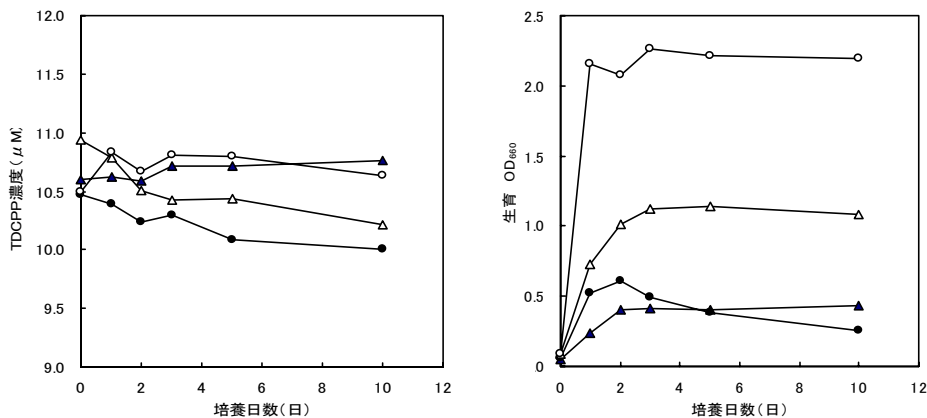


図 6 培養液中の炭素源・リン源の有無が与える TDCPP 減少率 (左グラフ) および生育 (右グラフ) への影響。炭素源およびリン源制限培地 (○)、炭素源およびリン源添加培地 (●)、リン源制限培地 (△) および炭素源制限培地 (▲) での TDCPP 濃度変化および生育の変化を示す。