

難分解性 Tris(2-chloroethyl) phosphate の微生物分解

環境生物化学研究室 遠藤 祐介
指導教官 山田 良平
解良 芳夫
高橋 祥司

1. はじめに

有機リン酸トリエステル類は、プラスチックの可塑剤、難燃化剤、殺虫剤や殺菌剤等に広く使用されてきた。最近の研究では、神経毒性、発ガン性、変異原性などが報告されている。また、製造・加工、使用及び廃棄の各段階において環境中への侵入が考えられ、実際に様々な水域から検出されており、埋立処分された廃棄物からの浸出水への溶出が懸念されている。

有機リン酸トリエステルの、環境中の微生物による分解が報告される中、Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) や Tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP)等の含塩素有機リン酸トリエステルは、微生物分解が報告されておらず、さらに、TCEP は水溶解度がいため、浸出水への溶出による、環境中への蓄積が考えられる。そこで本研究室では TCEP を分解する微生物を探索することを目的として研究を行ってきた。

これまでに、長岡市周辺の有機リン酸トリエステル類に曝露されている可能性のある場所から採取された 46 試料と、TDCPP を唯一のリン源として集積培養を行って得られた 3 試料をあわせた計 49 試料についてスクリーニングを行った結果、13 試料において生育と TCEP の消失が確認された。

そこで本研究では、様々な培養条件における TCEP の微生物分解に関する知見を得ることを目的に分解挙動の解析を試みた。

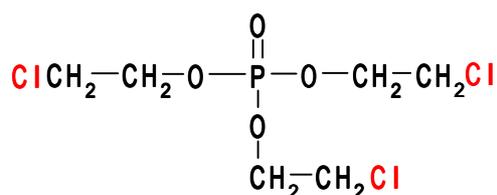


Fig. 1 TCEP の構造

2. TCEP 消失に伴う微生物の生育と Cl⁻ の遊離

TCEP は微生物によってリン酸と 3 分子の 2 - クロロエタノールに加水分解され、微生物は生育のために必要なリン酸を確保し、利用することが考えられるので、生育の見られた微生物は、TCEP 分解能を有していると考えられる。さらにこの 2 - クロロエタノールが完全に分解されたとすると、最終的に Cl⁻ が遊離してくることも予想される。そこで TCEP 消失に伴う微生物の生育と、チオシアン酸水銀法による Cl⁻ の定量によ

り TCEP の分解を裏付けることにした。この時、植種には集積培養菌群 No.45-DE を用いた。

TCEP を添加した培地では TCEP の消失後、著しい生育が確認され、さらに Cl^- の遊離もみられた。それに対して TCEP 無添加の培地では微生物の生育はみられず、 Cl^- の遊離もみられなかった。これらの結果から、この微生物が TCEP を分解することによって生育のために必要なリン源を確保し、利用していることが示唆された。

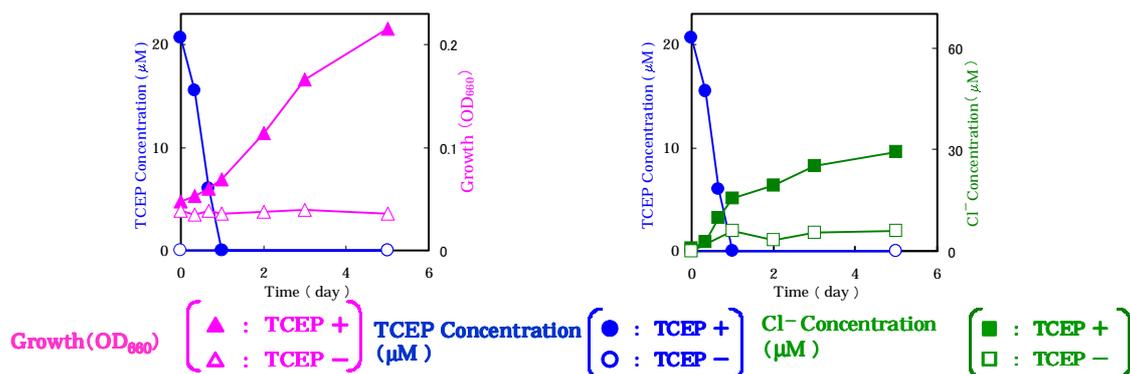


Fig. 2 TCEP 添加の有無による微生物の生育と Cl^- 濃度変化の違い

3. 無機リン酸塩 (NaH_2PO_4) の添加が TCEP 分解・微生物の生育へ及ぼす影響

この TCEP 分解能を有する微生物は廃水処理などへの応用が期待出来るが、その際、リン源となる物質が TCEP のみであるということはまず考えられず、他のリン源が存在する環境では、微生物にとって TCEP よりも利用しやすいものをリン源として優先的に用いることも考えられるため、TCEP を分解するとは限らない。そこで培地中に TCEP とともに、 NaH_2PO_4 を添加し、TCEP 分解および微生物の生育への影響をみた。

添加した NaH_2PO_4 、いずれの濃度においても TCEP は 2~3 日で完全に消失した (Fig.3)。また、微生物の生育は、培地中の NaH_2PO_4 濃度が高くなるに従って良くなった。No.45-DE は TCEP よりも利用しやすいと考えられる NaH_2PO_4 の共存下においても TCEP を分解するという有益な結果を得ることが出来た。

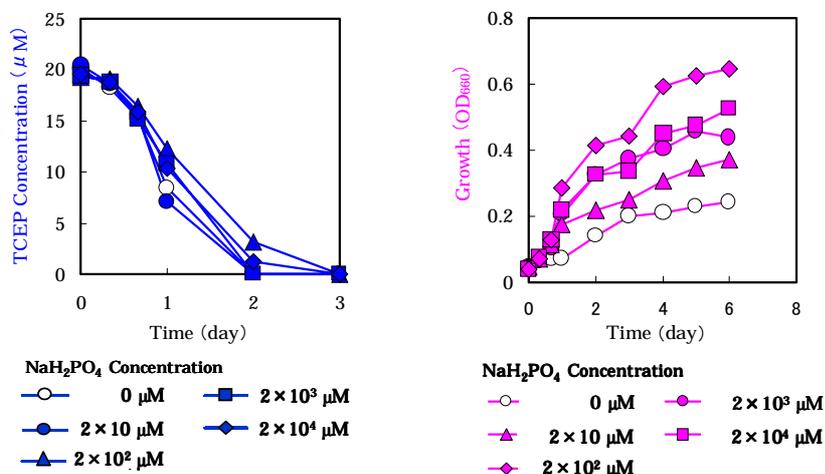


Fig. 3 NaH_2PO_4 の添加が TCEP 分解・微生物の生育へ及ぼす影響

4. TCEP および TDCPP 分解能の評価

集積培養菌群 No.45-DE が TCEP と類似構造である TDCPP に対する分解能を持つ可能性を考えて、TDCPP を唯一のリン源としてその分解能を調べ、さらに TCEP 分解能との比較も行った。

その結果、No.45-DE は TCEP・TDCPP 両方に対する分解能を持っていることが明らかになった。さらに TCEP 分解能を持つ 13 試料について TDCPP 分解能の評価を行ったところ、No.45-DE を含む計 5 試料で TCEP・TDCPP 両方に対する分解能を確認した。中でも分解速度の速い No.45-DE と No.67-E について特徴付けを行ったところ、No.67-E は No.45-DE よりも TCEP 分解速度は速いが、Cl⁻ 遊離量をみると TCEP を最終段階にまで分解する能力は No.45-DE の方が優れていることが分かった。これらのことから、TDCPP 分解能の有無、分解速度の違いなど、試料によって特徴が異なることが明らかになった。

Table 1 集積培養菌群 13 試料に対する TCEP・TDCPP 分解能評価

試料 No.	完全消失に要する日数	
	TCEP	TDCPP
13-E	7日	—
31-E	5日	—
★ 45-E	3日	3日
50-E	5日	—
51-E	5日	—
52-E	4日	—
★ 61-E	7日	3日
63-E	4日	—
★ 67-E	1日	1日
72-E	6日	—
13-DE	5日	—
★ 45-DE	1日	1日
★ 50-DE	4日	4日

Table 2 No.45-DE と No.67-E の TCEP・TDCPP 分解能の比較

リン源:TCEP			
	完全消失に要する時間 (hour)	OD ₆₆₀ 最大値	Cl ⁻ 濃度最大値 (μM)
No.67-E	6	0.533	27/60
No.45-DE	24	0.348	40/60

リン源:TDCPP			
	完全消失に要する時間 (hour)	OD ₆₆₀ 最大値	Cl ⁻ 濃度最大値 (μM)
No.67-E	6	0.479	35/120
No.45-DE	6	0.379	40/120

5. TCEP 分解能を持つ培養液中に存在する微生物の形状観察

TCEP 分解能を持つ集積培養菌群の培養液中にどのような形状の微生物が存在するのか、また、およそ何種類の微生物によって構成されているのかを視覚的に確認し、試料ごとに特徴付けするために、No.45-DE を含む、計 13 試料の集積培養菌群について光学顕微鏡によってその様子を観察した。

その結果、No.45-DE の培養液には形状の異なる微生物が 2 種類観察された(図 6-1)。さらに、各集積培養菌群にはそれぞれ 2 ~ 4 種類の微生物が存在していること、試料によって存在する微生物の構成が異なっていることが確認された。存在している微生物の種類は、単球菌、双球菌、短桿菌、長桿菌、スピロヘータ状、鞭毛を持っていると思われる菌など、様々であった。さらにこれらの微生物が運動性を持っていることが確認された。

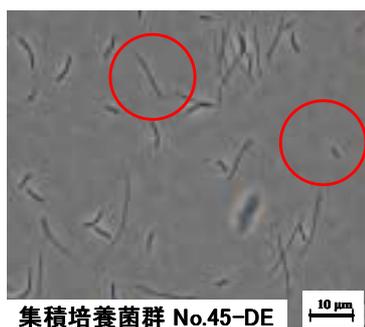


Fig. 4 No.45-DE の顕微鏡写真



Fig. 5 No.45-DE の顕微鏡写真

6. 集積培養菌群 No.45-DE の菌叢解析

顕微鏡観察やプレートによる培養から、集積培養菌群 No.45-DE には少なくとも 2 種類の微生物が存在することが明らかになった。しかし、形状や色などの視覚的な違いによる推測であり、実際、何種類の微生物が存在しているかは明らかではない。そこで実際、No.45-DE 中に何種類の微生物が存在するか培養時間の経過による菌叢の変化はあるのかを遺伝子の観点から解析することにした。

まず No.45-DE を培養し、培養開始直後、TCEP が消失した時点、 Cl^- の遊離が定常期に達した時点で菌体回収し、バクテリア 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) 上の V3 可変領域を含む 240 bp の GC クランプ付きプライマーを用いて PCR を行った。その後、得られた 16S rDNA の塩基配列に基づいて変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) を行い、菌叢を解析した。

アガロース電気泳動による PCR 産物の確認を行ったところ、約 240 bp 付近に単一のバンドがみられ、目的の 16S rDNA 部分断片のみが増幅されたことを確認した。

DGGE の結果、培養 0 時間目、24 時間目、96 時間目、全てのレーンにおいて、変性剤 50% ~ 60% の間に 1 本のマイナーバンドを含む計 3 本のバンドが確認された。このことから、集積培養菌群 No.45-DE には 2 種類もしくは 3 種類の微生物が存在する可能性が示唆された。また、3 本のバンドは培養時間に関わらず、全て同じ位置に確認されたことから、培養時間の経過による菌叢の変化は無いことが示唆された。

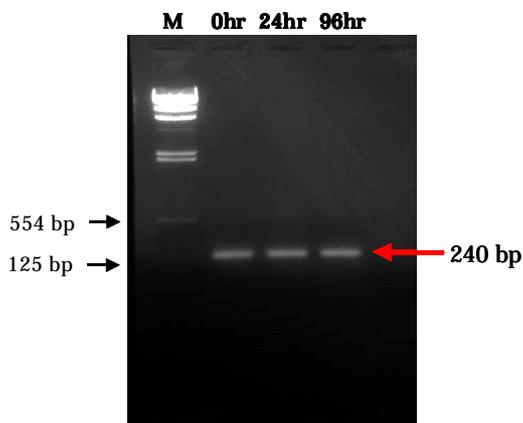


Fig. 6 アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の確認

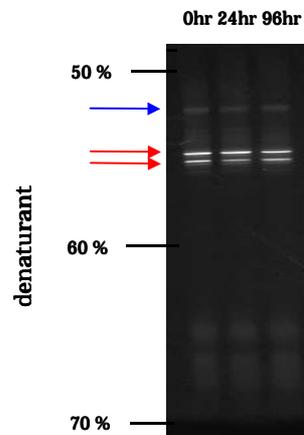


Fig. 7 DGGE による No.45-DE の菌叢解析