

難分解性 Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate の微生物分解

環境生物化学研究室 上戸 潤

指導教官 山田 良平、解良 芳夫、高橋 祥司

緒言

Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) は、難燃剤、潤滑油添加剤などの用途において使用されている、代表的な含塩素有機リン酸トリエステル類であり、様々な毒性を有していることから、その使用に伴う環境への浸出が懸念されている。しかしながら、TDCPP は物理化学的に非常に安定であり、微生物により分解されるという報告も得られていない。

当研究室では、昨年度、TDCPP を唯一のリン源とした完全合成培地を用いて TDCPP 分解能を有する微生物のスクリーニングを行い、TDCPP を消失させる集積培養液 No. 45D が得られている。

そこで本研究では、No. 45D の有する能力および No. 45D 中の微生物について解析を行った。

結果および考察

1 塩化物イオン遊離の観察

これまでの研究では、TDCPP 分解により生成される代謝産物は一切明らかとなっていない。従って、その分解産物として想定される塩化物イオン濃度の測定を行った。その結果、TDCPP の消失後に塩化物イオンの遊離が観察され、TDCPP が微生物により分解され、その代謝産物として塩化物イオンが生成されることが明らかとなった (Fig. 1)。

2 無機リン酸塩存在下における TDCPP 分解

No. 45D は TDCPP を唯一のリン源として利用しているため、TDCPP よりも利用しやすいリン源と考えられるリン酸二水素ナトリウムの存在下で、その分解が妨げられるかを解析した。その結果、無機リン酸の存在により TDCPP 分解が若干抑制されることが明らかとなった (Fig. 2.A)。また、200 μM のリン酸二水素ナトリウム存在下において塩化物イオン遊離量が著しく増加したため、無機リン酸の存在が塩化物イオン遊離量を増加させることが明らかとなった (Fig. 2.B)。

また、これらの結果から、No. 45D 中には TDCPP 分解微生物と塩化物イオン遊離を行う微生物が別々に存在し、十分なリン源を確保可能な無機リン酸塩存在下でのみ塩化物イオン遊離を行う微生物が十分に生育した可能性が示唆された。

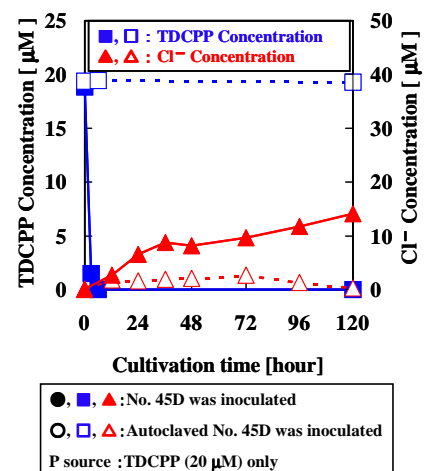


Fig. 1 Chloride ion release after TDCPP removal.

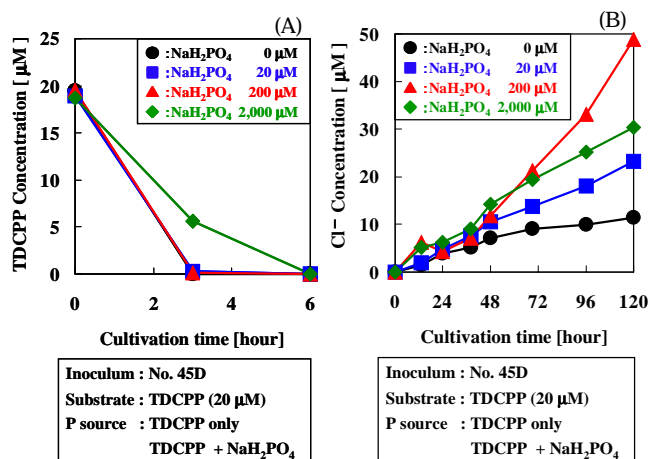


Fig. 2 Effect of NaH_2PO_4 on the TDCPP removal and chloride ion release.
(A) Degradation of TDCPP
(B) Release of chloride ion

3 1,3-dichloro-2-propanol 分解能力の観察

No.45D が TDCPP の代謝産物として生成される可能性のある 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP) を分解する能力を有しているか、その分解により生成されると考えられる塩化物イオン濃度を測定することで解析した。その結果、No.45D は 1,3-DCP 分解能を有しており、培地中の無機リン酸塩濃度がその能力に多大な影響を及ぼすことが示唆された (Fig. 3)。

また、リン酸二水素ナトリウム濃度と塩化物イオン遊離量との関係が 2 の結果と類似していることから、TDCPP の代謝産物として 1,3-DCP が生成されている可能性が示唆された (Fig. 4)。

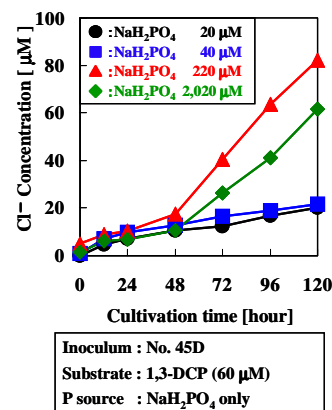


Fig. 3 1,3-DCP degradation by No. 45D

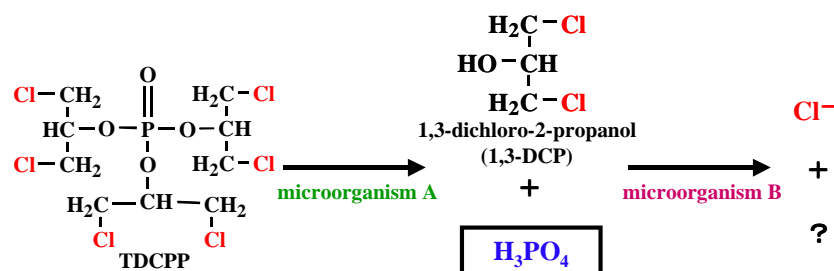


Fig. 4 Putative degradation pathway of TDCPP

4 抗生物質を用いた微生物の大分類の推定

No. 45D 中に存在する微生物が、原核生物と真核生物のどちらに属する生物なのか、抗生物質を用いて調べた結果、No. 45D 中に存在する微生物は原核生物であることが示唆された (Fig. 5)。

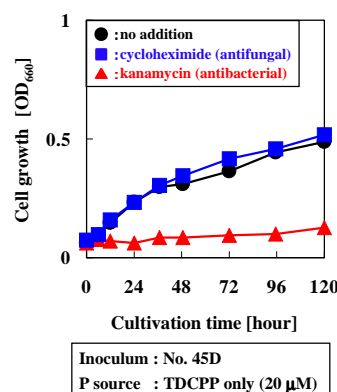


Fig. 5 Effect of antibiotics on the Cell growth.

5 遺伝子学的手法を用いた微生物群集の解析

No. 45D 中には数種の微生物からなる微生物群集が構成されている可能性があり、培養時間の経過および無機リン酸塩の存在により、その構造に変化があらわれると考えられる。以上のことから、16S ribosomal DNA (16S rDNA) と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) を利用して、微生物群集構造の解析を行った。

その結果、No. 45D には複数種の微生物が存在し、培養条件および培養時間の経過により、その微生物群集構造に変化が生じることが明らかとなった (Fig. 6)。また、無機リン酸塩存在下におけるバンドパターンの経時変化は 2 における考察を裏付ける結果となり、No. 45D には TDCPP 分解微生物と 1,3-DCP 分解微生物が別々に存在し、無機リン酸塩存在下でのみ 1,3-DCP 分解微生物が十分に生育した可能性が強く示唆された。

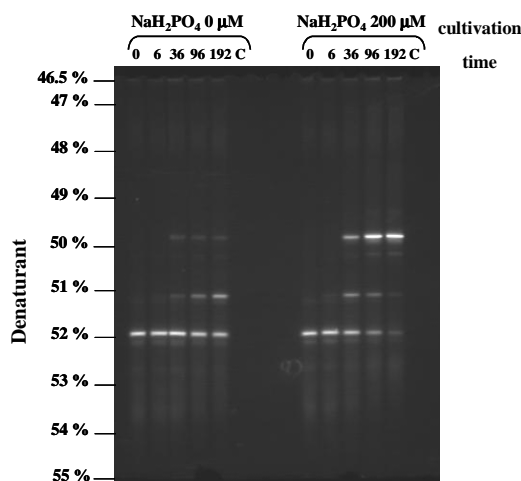


Fig. 6 DGGE analysis of bacterial population in No. 45D.

One microgram of PCR-amplified DNA was electrophoresed at 60V, 16 hours with a 45-55 % linear gradient of denaturant.

Control is the product of PCR performed with non-template, and 2 µl of this was electrophoresed.