

難分解性 Tris(2-chloroethyl)phosphate 分解菌の単離と特徴解析

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

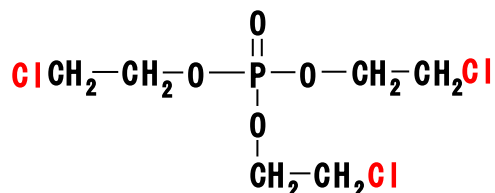
1. はじめに

有機リン酸トリエステル類は、電気製品の難燃剤やプラスチックの可塑剤など、幅広く利用されている。また、油圧系の油圧液、潤滑剤など PCB の代替品としても広く利用されてきた。有機リン酸トリエステル類は、工場廃水や河川水、海水など様々な場所から検出され、中でも廃棄物埋立処分地浸出水において高濃度に検出されている。その一方で、発癌性や神経毒性、催奇形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。

様々な環境中の微生物による有機リン酸トリエステル分解の報告がなされている中、塩素を含む有機リン酸トリエステルである Tris(2-chloroethyl)phosphate (以下、TCEP) や Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (以下、TDCPP)については、微生物によっては分解されないと報告されている。さらに、TCEP は水溶解度が高いため、浸出水への溶出による環境中への流出・蓄積が考えられる。そこで本研究室では、TCEP を分解する微生物の探索を行ってきた。

これまでに、長岡市周辺の有機リン酸トリエステル類に暴露されている可能性のある場所から採取した 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 試料を合わせた計 49 試料についてスクリーニングを行った結果、13 試料について生育と TCEP の消失が確認された。さらに、集積培養菌群 No.45-DE、No.67-E は優れた TCEP 及び TDCPP の分解能力を持つことが明らかとなり、昨年度 本研究室の遠藤によって 様々な培養条件下における集積培養菌群 No.45-DE による TCEP 分解の解析がなされた。

そこで本研究では、TCEP 分解能力を有する微生物を単離し、解析することを目的とした。しかしながら、集積培養菌群 No.67-E について TCEP 分解挙動の解析が不十分であったため、集積培養菌群 No.67-E による TCEP 分解挙動の解析も行った。



2. 集積培養菌群 No.67-E による TCEP の分解

集積培養菌群 No.45-DE と No.67-E による TCEP の分解を比較した結果、No.67-E は No.45-DE より速く TCEP を消失させることが明らかとなった。また、TCEP の消失後、微生物の生育と Cl^- の遊離が見られたことから、微生物による TCEP の分解が裏付けられた。

このような TCEP 分解微生物は廃水処理などへの応用が期待できるが、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 分解及び Cl^- 濃度変化への影響をみた。

TCEP の消失は 添加した NaH_2PO_4 濃度には影響されず、6 時間で完全に消失した (Fig.3)。また、 NaH_2PO_4 を $200 \mu\text{M}$ 添加した時、最も Cl^- 濃度が高くなった。No.67-E 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。

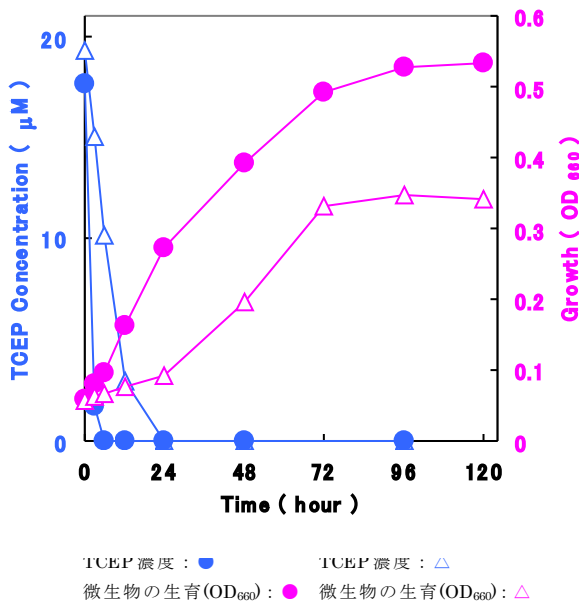


Fig.2 集積培養菌群による TCEP の消失および微生物の生育

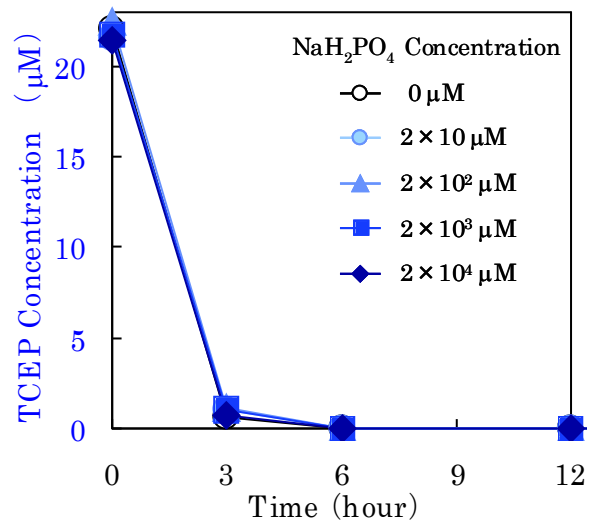


Fig.3 NaH_2PO_4 を添加した際の TCEP 分解

3. TCEP 分解菌の単離

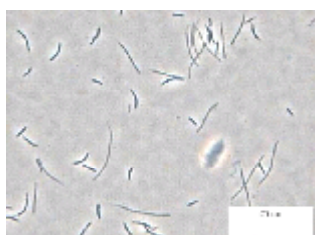
集積培養菌群 No.45-DE、No.67-E の顕微鏡観察から No.45-DE、No.67-E には複数の微生物が存在することは明らかである (Fig.4)。そこで これら集積培養菌群から TCEP 分解微生物の単離を試みた。

TCEP を唯一のリン源となるように調製した Medium A プレートと Medium A 液体培地で培養を繰り返すことにより単離を行なった。

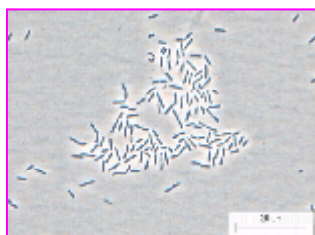
その結果、No.45-DE からは No.45-2 と No.45-3 という長桿状の菌株を得ることができた。これら 2 株の 16S rRNA 遺伝子配列は 100 % 一致し、本研究室の川島によって単離された TDCPP 分解菌株 TDK1 の 16S rRNA 遺伝子配列とも 100 % 一致した。さらに、その配列を日本 DNA データバンク (DDBJ) を利用して相同性検索を行った結果、*Sphingomonas trueperi* LMG2142 株をはじめとする 多く *Sphingomonas* 属の微生物と高い相同性を示した。

集積培養菌群 No.67-E からは No.67-1、No.67-2、No.67-3 という短桿状の 3 株を得ることができた。これら 3 株の 16S rRNA 遺伝子配列は 100 % 一致し、3 株は同一種の菌株であることが示唆された。さらに、その配列は、*Sphingomonas* sp. 3Y をはじめとする多くの *Sphingomonas*、*Sphingobium* 属の微生物と高い相同性を示した。

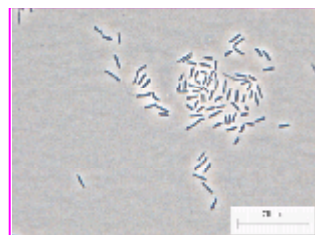
単離された 5 株の 16S rRNA 遺伝子配列中は *Sphingomonas* 属に特有な配列が見られ、さらに、相同性の高かった菌株がいずれも *Sphingomonas* 属であった。*Sphingomonas* 属は近年、*Sphingomonas*、*Sphingobium*、*Novosphingobium*、*Sphingopyxis* という 4 属に分割され、再分類されてきているため、それら 4 属に属する菌株と単離菌株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹を作製した (Fig.5)。その結果、単離菌株 No.45-1、No.45-2 は *Sphingomonas* 属、単離菌株 No.67-1、No.67-2、No.67-3 は *Sphingobium* 属に属する菌株であることが示唆された。



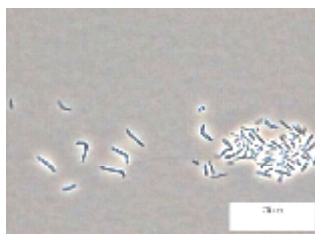
Mixed culture
No.45-DE



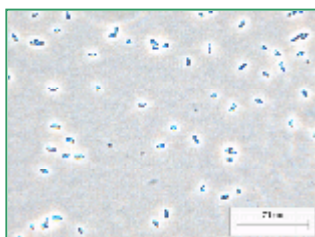
Isolated strain 45-2



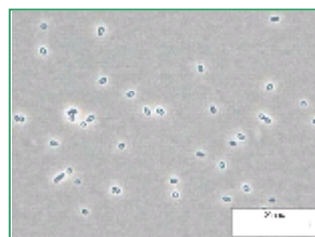
Isolated strain 45-3



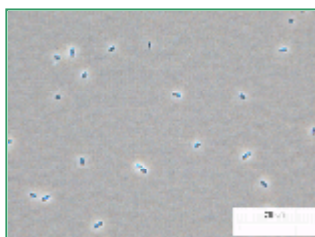
Mixed culture
No.67-E



Isolated strain 67-1



Isolated strain 67-2



Isolated strain 67-3

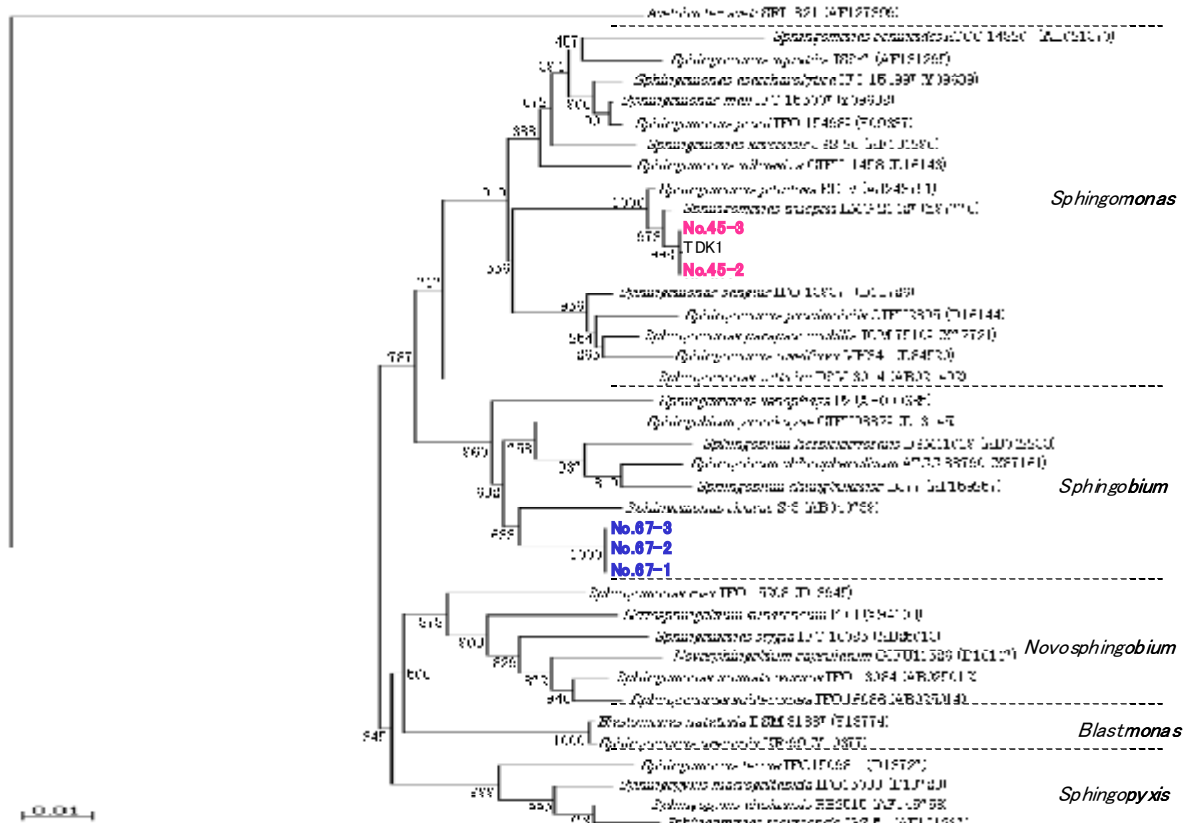


Fig.5 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹

4. まとめ

集積培養菌群 No.67-E による TCEP の分解は 集積培養菌群 No.45-DE よりも速い。

集積培養菌群 No.67-E は リン源として TCEP よりも利用しやすいと考えられる NaH_2PO_4 共存下においても TCEP を分解する。

集積培養菌群 No.45-DE から 2 株の TCEP 分解菌株を得、これら菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、この 2 株は *Sphingomonas* 属であることが示唆された。

集積培養菌群 No.67-E から 3 株の TCEP 分解菌株を得、これら菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、この 3 株は *Sphingobium* 属であることが示唆された。