

河川底質からのフタル酸エステル分解菌の分離・同定

朝 日 教 智 榊 原 靖

岡 村 祐里子 岩 崎 一 弘*

Isolation and Identification of a Phthalate Esters degrading Bacterium from a River Sediment

Kiyotoshi Asahi Yasushi Sakakibara

Yuriko Okamura Kazuhiro Iwasaki*

過去にフタル酸エステルの検出事例のあった市内河川で新たに底質を採取し、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) 分解微生物の培養を試みた。結果、中流域付近の底質試料より、DEHP のほか数種類のフタル酸エステルに分解能を有する微生物の分離株が得られ、その DNA 系統解析から *Rhodococcus* 属に分類される分解菌であることが判明した。

はじめに

名古屋市西部を流れる荒子川は、中流域の土壌・地下水汚染サイトから揮発性有機化合物による汚染を受け、最下流の環境基準点（荒子川ポンプ所）で 1,2-ジクロロエタンの水質環境基準不適合が続いている。

これとは別に、市が過去に実施した化学物質の環境実態調査において、当河川の下流域底質でフタル酸エステル的一种フタル酸ジ 2-エチルヘキシル

(DEHP) が検出されており、平成 4 年度には調査時の濃度が 135mg/kg に達していた (Fig.1)¹⁾。

現在、揮発性有機化合物の汚染は、現場に生息する分解微生物の能力を利用した浄化を検討している段階であるが、他の汚染物質に関しても分解微生物の培養を手掛けている。今回は、このフタル酸エステルについて、分解微生物を分離・同定した結果を報告する。

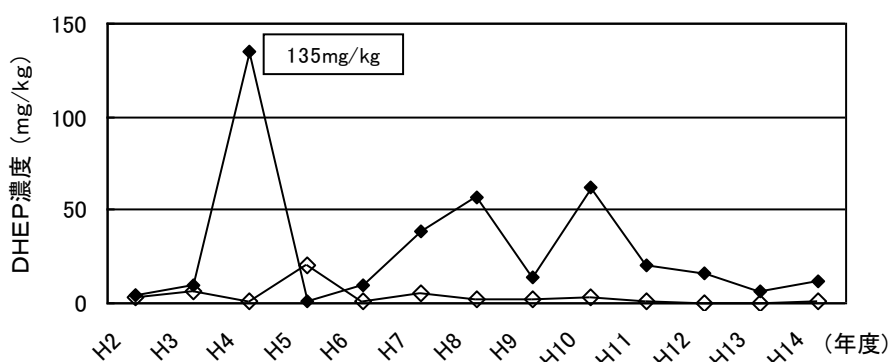


Fig.1 底質中のDEHPの経年変化

荒子川下流域(◆), 名古屋港(◇)

*独立行政法人 国立環境研究所

実験方法

1. 底質試料

荒子川河口域 2 地点（荒子川ポンプ所）、汚染サイト近傍 4 地点（北中島橋）、中間 6 地点（中島橋ほか）の計 12 地点で採取した底質を試料とした（Fig.2）.

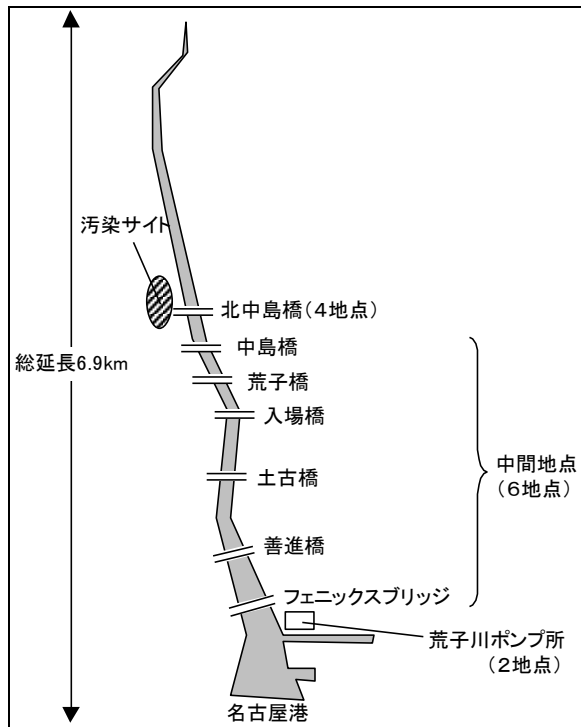


Fig.2 荒子川における底質採取地点

2. 集積培養および菌株の分離

集積培養及び菌株の分離は、既報に示した通りである^{2, 3)}.

3. 分離株によるフタル酸エステルの分解

DEHP の分解実験ならびに測定方法についても、既報²⁾と同じである。なお、後述する他のフタル酸エステル 11 種類は DEHP に準じて実験を行った。

4. DNA 系統解析による菌の同定

菌の同定は、16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析によった。

DNA 抽出：PrepMan Method

(Applied Biosystems)

PCR：MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial
Identification PCR Kit

(Applied Biosystems)

サイクルシーケンス：

MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial
Identification Sequencing Kit

(Applied Biosystems)

シーケンス：ABI PRISM 3100 DNA Sequencer

(Applied Biosystems)

塩基配列の相同性検索および系統樹の作製：

MicroSeq Microbial Identification
System Software V1.4.1

およびデータベース

Micro Bacterial 500 Library v.0023

(Applied Biosystems)

結果および考察

1. DEHP 分解微生物の分離

集積培養開始から 2 ヶ月経過し第 3 次集積の段階になると、培地中に不溶性の懸濁物を生成する系が 12 底質試料中 3 試料に現れた（Fig.3）.

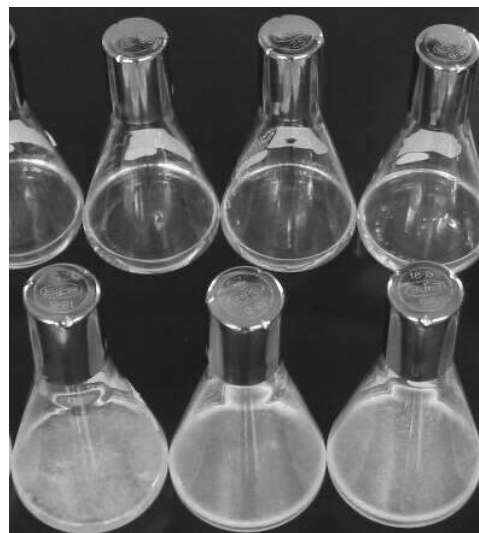


Fig.3 第 3 次集積培養系

手前：懸濁物生成系（白濁）、奥：非生成系（透明）

特に汚染サイト近傍の底質試料には懸濁の著しいものがあり、この培養液を平板培地に塗布し、生じたコロニーから 4 菌株（RM, RP, RS, RW）を得た。

これら分離株は 200mg/L の DEHP 存在下で 72 時間培養後、DEHP 残存量を測定して分解の有無を判断した。結果は 4 株とも培地中に懸濁物を生成することなく、DEHP もほとんど減少していなかったため、分解菌の可能性は低いと思われた。

そこで再度コロニーを釣菌する操作を繰り返し、先の平板培地で生育の遅かった微小なコロニーより新たな菌株(RG)を得た。この株を同様の分解実験に供したところ、懸濁物の生成と DEHP の減少が認められ、同株が分解菌と推定された (Table 2)。

Table 2 分離株およびDEHP分解能

底質採取地点		第3次集積 (外観)	分離株	DEHP 残存率 (%)*
中 流 域	北中島橋 S1	懸濁有り	RM	95
	北中島橋 S2	透明	RS	88
	北中島橋 R1	懸濁著しく有り →	RP	90
	北中島橋 R2	透明	RW	82
中 間 地 点	中島橋	透明	RG	0
	荒子橋	懸濁やや有り		
	入場橋	透明		
	土古橋	やや透明		
	善進橋	透明		
	フェニックスブリッジ	透明		
河 口 域	荒子川ポンプ所 A1	やや透明		
	荒子川ポンプ所 A2	透明		

*DEHP添加濃度
(200mg/L)
72時間培養

この RG 株は Table 3 に示すような性状をもったグラム陽性桿菌で、寒天培地上では赤橙色のコロニーを形成した。Fig.4 には RG 株の電子顕微鏡写真を示す。

Table 3 RG株の形態・生理学的性状

性状	RG株
形態	不規則桿菌
グラム染色	陽性
芽胞の有無	無
運動性	無
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	-
酸産生(グルコース)	-
ガス産生(グルコース)	-
O/F試験	-

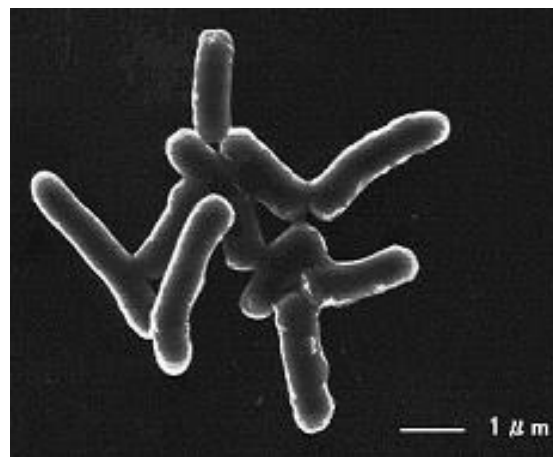


Fig.4 RG株の電子顕微鏡写真

2. RG株のフタル酸エステル分解特性

Fig.5 には、分離した RG 株による DEHP の分解を示した。DEHP の添加濃度が 100mg/L の場合は 24 時間以内に、500mg/L の場合は 48 時間以内に分解が完了した。

Fig.6 は、DEHP 分解における温度および pH の影響を示しており、RG 株は 30℃付近で最も分解活性が高く、pH では中性域よりやや高めで分解しやすい傾向が認められた。

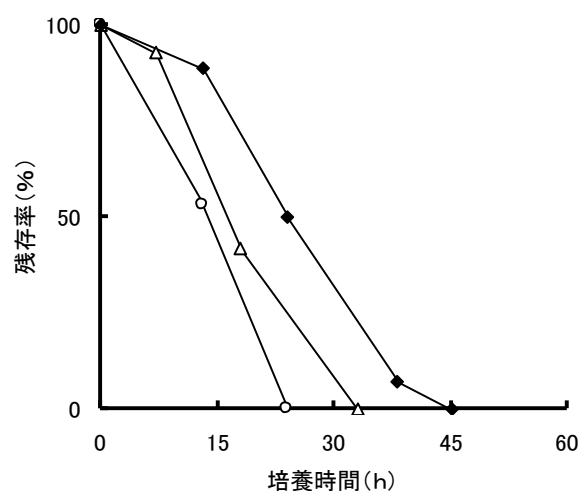


Fig.5 分離したRG株によるDEHPの分解
DEHP 添加濃度 100mg/L(○), 200mg/L(△)
500mg/L(◆)

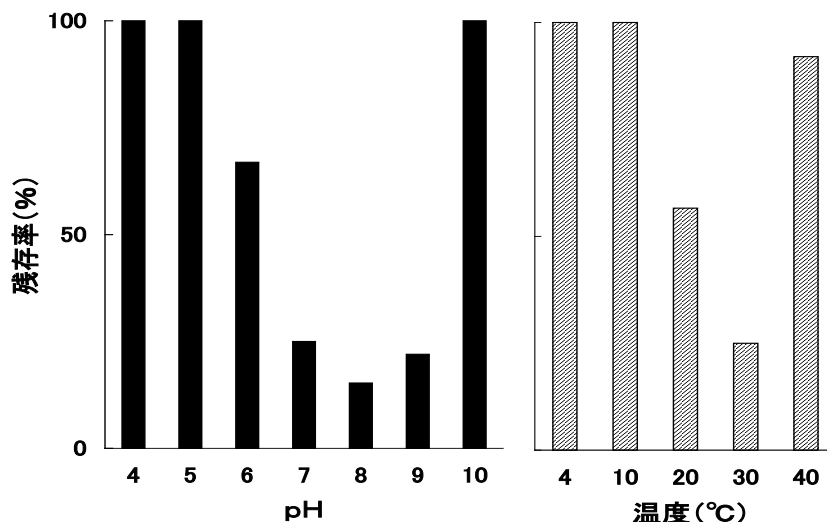


Fig.6 DEHP分解における温度・pHの影響
DEHP 添加濃度 200mg/L, 24 時間培養

また、DEHP 以外のフタル酸エステルの分解性についても検討した。フタル酸ジメチル(DMP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジプロピル(DPrP)、フタル酸ジイソプロピル(DIPrP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ジイソブチル(DIBP)、フタル酸ジペンチル(DPP)、フタル酸ジヘキシル(DHP)、フタル酸ジヘプチル(DHpP)、DEHP、フタル酸ジオクチル(DOP)、フタル酸ジノニル(DNP)の 12 種類のフタル酸エステルを用いて、各々の分解を比較した (Fig.7)。

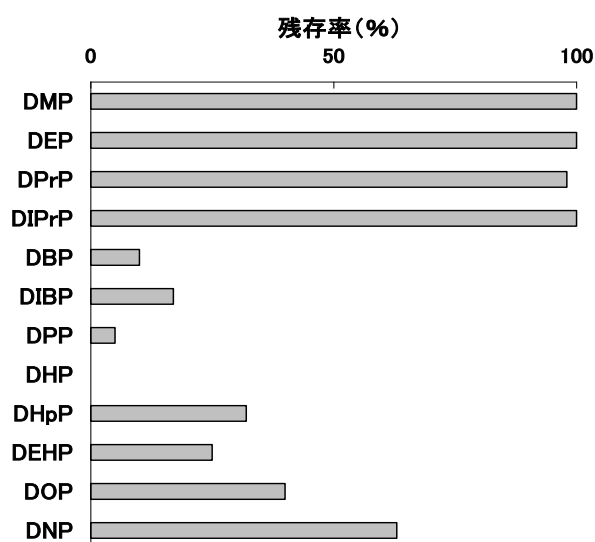


Fig.7 RG株によるフタル酸エステルの分解
フタル酸エステル各添加濃度 200mg/L
24 時間培養

24 時間培養後、DEHP を除き 50%以上分解できたのは DBP、DIBP、DPP、DHP、DHpP、DOP で、炭素数 C4～C8 のアルキル側鎖をもつフタル酸エステルであった。中でも DHP など C4～C6 側鎖をもつエステルは DEHP よりも容易に分解した。それに対し、C3 以下側鎖のエステルはほとんど分解できなかった。このエステルの側鎖部の構造による分解の違いは、これまでに分離したフタル酸エステル分解菌でも認められており²⁾、同様の報告もなされている⁴⁾。このことから推察して、今回得られた RG 株は C4 以上の側鎖から成るフタル酸エステルに分解能を有していると考えられた。また、分解菌の集積過程では、側鎖構造が直鎖でない分枝鎖 (2-エチルヘキシル) のフタル酸エステルを用いている。この直鎖・分枝鎖間でも分解性の異なることが知られているが⁴⁾、本菌株の場合、それに該当する DBP と DIBP 間や DOP と DEHP 間でも大きな違いは認められなかった。

3. DNA 系統解析による RG 株の同定

フタル酸エステル分解菌 RG 株は、先の形態観察や生理学的試験などからグラム陽性桿菌まで判明している。そこで、より詳細な同定をするために、16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、RG 株は *Rhodococcus* 属に分類され、*Rhodococcus zopfii* の 16S rDNA に対して最も高い相同性 (相同率 94.40%) を示した (Fig.8)⁵⁾。

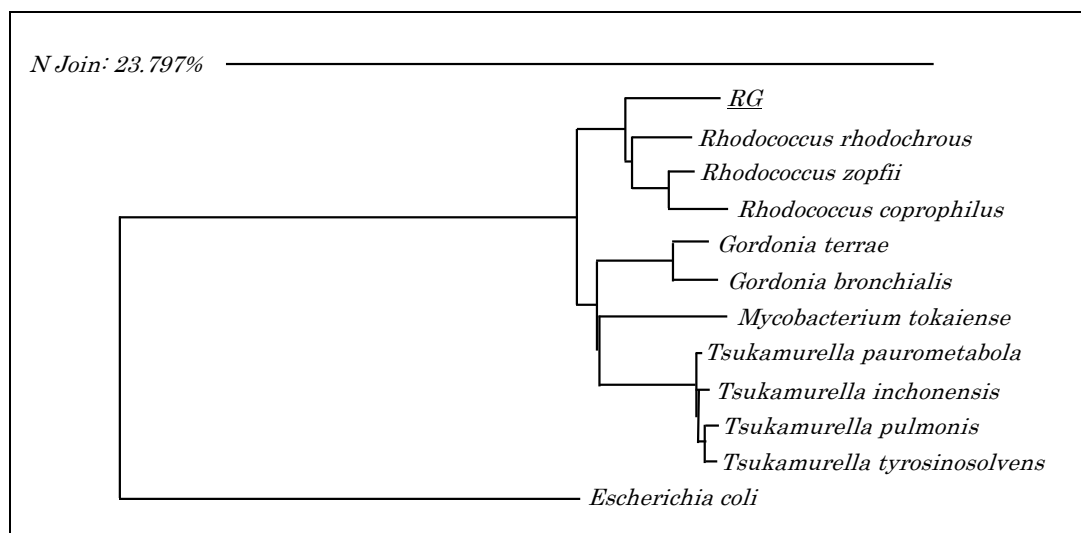


Fig.8 RG株の16S rDNAに基づく系統樹

サイト近傍の底質試料は、内部の酸化還元電位が－400mV 前後の嫌気状態にあったが、現場流域の河川水の溶存酸素濃度は、通常 5mg/L 程度である。このため、好気条件下で生育する分解菌 RG 株に関しては、底質の表層あるいは河川水中に存在する微生物を分離した可能性が考えられた。

文 献

- 1) 名古屋市公害対策局：平成 3 年版公害の現況（資料編），名古屋市環境保全局：平成 4～7 年版公害の現況（資料編），名古屋市環境保全局：平成 8～11 年版名古屋市環境白書（資料編），名古屋市環境局：平成 12～15 年版名古屋市環境白書（資料編）
- 2) 朝日教智, 榊原 靖: 名古屋市環境科学研究所報, **33**, 61-63 (2003)
- 3) 朝日教智, 榊原 靖: 名古屋市環境科学研究所報, **34**, 39-40 (2004)
- 4) 倉根隆一郎：フタル酸エステルの微生物分解, バイオサイエンスとバイオインダストリー, **46**, 5, 43-57 (1988)
- 5) Stoecker M. A., Herwig R. P., Staley J. T., Int. J. Syst. Bacteriol., **44**, 106-110 (1994)