

4-クロロビフェニルを4-クロロ安息香酸へと分解する 微生物のスクリーニングと分離株の特徴

飛田修作 久田美子 堤 充紀 佐藤章夫*

Screening and Characterization of Microorganisms for the Ability to
Degrade 4-Chlorobiphenyl to 4-Chlorobenzoic acid

Shusaku TOBITA, Yoshiko HISADA, Mitsutoshi TSUTSUMI and Akio SATO

今日数多くの有機塩素化合物が環境汚染物質として知られている。有機塩素系農業による環境汚染は最も歴史の古いものであるが、最近では新たに有機塩素系溶剤による地下水汚染が各地で問題となっている。長年にわたって有機塩素化合物による環境汚染が引き起こされてきた原因は、化学工業の出発点となるアルカリの生産工程から大量の塩素ガスが副成し、この塩素ガスを使って多種多様な有機塩素化合物が安価に大量生産されてきたこと、そして環境中に放出された有機塩素化合物の残留性、蓄積性が極めて高いことにある。その結果として、生態系の破壊や人体に対する様々な毒性等の問題が指摘され続けてきた。一般に環境中の有機化合物は、光分解や微生物分解などを受けて変化していくものであるが、有機塩素化合物の高い残留性はおもに微生物分解を受けにくいことによる。元来、天然の有機塩素化合物の数は極く限られており、大方の微生物は有機塩素化合物を分解してこれを利用するのに適した酵素系を持ち合わせていない。しかし中には特定の有機塩素化合物を分解する微生物も発見されており、また微生物が環境の変化に順応してそのような能力を獲得する例も報告されている。

我々は環境汚染物質の微生物分解に興味をもち、有機塩素化合物のうち最も難分解性なものの一つに数えられているPCBの微生物分解について検討することにした。その第一歩としてPCBコンジェナーのうち最も塩素数の少ない4-chlorobiphenyl (4CB) をモデル化合物に選び、これを4-chlorobenzoic acid (4CBA) へと分解する微生物をスクリーニングし、このような微生物の自然界における分布、さらに塩素含量の多いPCBコンジェナーに対する分解能力などを調べることにした。本報ではスクリーニングの結果を中心にこれまでに得られた知見を報告する。

材料および方法

1. 集積培養と菌の分離

1987年11月に畑、水田、一般家庭の庭などから採取した46試料を微生物の分離源として用いた。培地は0.001%のL-アスコルビン酸を含むPAS培地^{1,2)}を用いた。基質のビフェニル (BP) および4-クロロビフェニル (4CB) はいずれも和光純薬製の特級試薬をめのう製乳鉢で粉末にしたものを用い、カネクロール200 (KC-200, 和光純薬製) は油状のまま用いた。培養はすべて30℃で行い、振とう培養は200rpmで行った。集積培養はPAS培地20ml, 粉末BP 10 mgに土壌試料200 mgを加え、7日間振とう培養後、上澄を1ml取り再度集積培養を繰り返した。このあとPAS寒天培地¹⁾を用いて菌の分離を行った。

2. 4CB分解能のスクリーニング

PAS培地20 ml, 粉末4CB10 mgに分離株を植菌して4~11日間培養し、分解生成物の4-クロロ安息香酸 (4CBA) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。4CBAの分析はマイレクス (ミリボア社製0.45 μ m) を用いた培養液の濾液をHPLCに直接注入して行った。

3. resting cellsによる4CBの分解

resting cellsの調製はPAS培地と粉末BPに分離株を植菌して3~4日間振とう培養後、培養液を冷却遠心 (4℃, 10,000rpm, 10分間) にかけて、菌体を0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.5) で2回洗ったのち同じ緩衝液に懸濁させて濁度がOD1.0になるように調製した。菌数の計

*山梨医科大学保健学I

数にはPAS寒天培地を用いた。4CBの分解は resting cell suspensionに粉末4CBを加えて6~13日間振とう培養し、生成した4CBAをHPLCで定量して分解率を求めた。

4. resting cells によるKC-200の分解

resting cell suspension 20 mlにKC-200を15 mg加えて24時間振とう培養後、濃塩酸を加えてpH 1とし、酢酸エチル10mlで抽出した。酢酸エチル層を減圧濃縮し、残渣にビストリメチルシリルアセトアミド0.5mlを加えて70℃で30分放置後GC-MS分析に供した。

5. 分析条件

HPLCによる4CBAの分析条件は次のとおりである。カラム：Shim-pack CLC-ODS(M) 4.6mm (内径)×25 cm, 溶離液：メタノール-水-酢酸(60:40:1), 検出器：UV (254nm)。培養液の濁度は600nmで測定し、黄色の吸光度はマイレクス汙液について400nmで測定した。KC-200のGC-MS分析はGC部にヒューレット・パッカード社製5890A, MS部は日本電子製JMS-DX303およびJMA-DA5000データ処理システムを使用した。GCの分析条件は次のとおりである。カラム：DB-17 (50%フェニルメチルシリコン), 0.25mm(内径)×30m, 膜厚0.25 μm (J&W社製), カラム温度(昇温)：50~140℃ (25℃/min) つぎに140~250℃ (5℃/min), 注入口温度：280℃, 注入法：スプリットレス。MSの分析はEI法でイオン化電流300 μA, イオン化電圧70V, スキャンレンジ50~500M/Z, スキャン速度0.1秒の条件で行った。

結果と考察

1. 分離株の4CB分解能

集積培養によりピフェニルを唯一の炭素源として増殖できる微生物を46試料から65株分離した。これらの分離株の4CB分解能は4日間の培養後に分解生成物である4CBAをHPLCで定量することにより極めて簡単にスクリーニングすることができた。こうして46試料中72%にあたる33試料から4CB分解菌が62株分離されたが、この結果は4CB分解菌が自然界に広く分布していることを示唆する。

4CB分解能のスクリーニングの過程で黄色を呈した培養液からは例外なく4CBAが検出され、しかも呈色の度合いが強いものほど4CBAの生成量が多かった。Fig. 1に分離株TH1171について培養中の黄色の濃度、濁度、4CBA生成量の変化を示した。黄色の濃度が急速に強まる時期は対数増殖期にあたる。培養液中に生じた黄色物質は、その吸光度の経時変化が遮光した場合と遮光しない場合とで大きな差がある(未発表)ことから、光分解を受けやすい中間代謝物であると推定され、その化学構造

を検討中である。また4CBAは死滅期以降も増え続け、4CBAがそれ以上の分解を受けないことを示している。

4CBを4CBAへと分解する微生物の分離はこれまでに

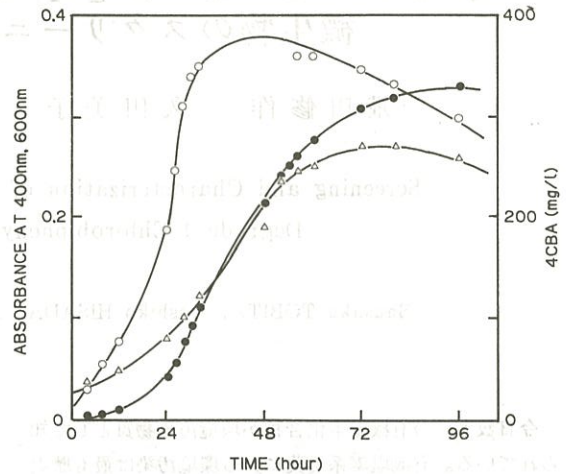


Fig.1. Production of yellow compound and 4CBA along with growth of strain TH1171 on 4CB.

△-△, growth (OD at 600nm); ○-○, yellow compound (OD at 400nm); ●-●, 4CBA.

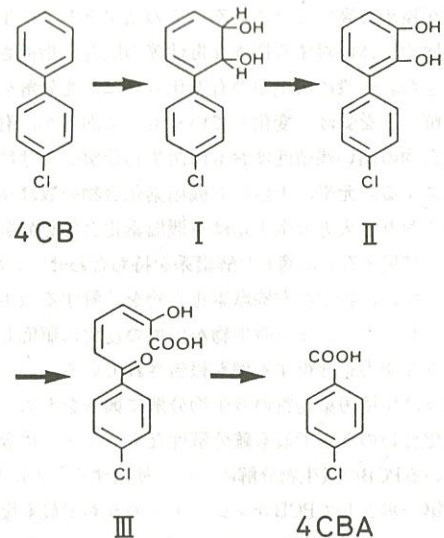


Fig.2. Proposed major pathway for the bacterial degradation of 4CB⁸⁾. I, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; II, 2,3-dihydroxy-4'-chlorobiphenyl; III, 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid.

いくつか報告されており^{3~8)}、今日それらに共通する分解過程はFig.2に示したものが主たるルートであるとされている⁸⁾。中間代謝物であると推定される黄色物質がFig.2のIIIである可能性が強いが、IIIから4CBAに至る過程の詳細はまだ解明されていない。

4CB分解能を定量的に評価する目的で分離株のresting cell suspensionを調製し、4CBAの生成量の変化を見たのがFig.3である。4株ともcell suspensionはOD1.0に調製したが、1mlあたりの菌数はTH1022が 1.7×10^7 、TH1024が 1.8×10^7 、TH1171が 3.4×10^7 、TH2162が 6.5×10^8 であり、菌数が最も少ないTH1022と最も多いTH2162とでは菌数に40倍近くのひらきがある。培養2日目ではTH2162の分解率は68%に達し、この時点では他の3株より3.6~6.8倍も分解速度が速かった。しかし6日目には他の3株とも分解率が80%台にまで上昇してTH2162との差がなくなった。ここで菌1個あたりの4CB分解量(pg/個)を計算するとTH1024の場合、培養2日目、6日目、13日目の値は、3.9、22、26となり、またTH2162の場合は0.5、0.6、0.7となって13日間の培養期間を通じてTH1024の方が分解能が高いことになる。このように菌数の明らかなresting cell suspensionを用いて一定時間培養し、生成した4CBAを定量すると菌数あたりの4CB分解量が計算でき、分離株の4CB分解能を定量的に評価することができた。

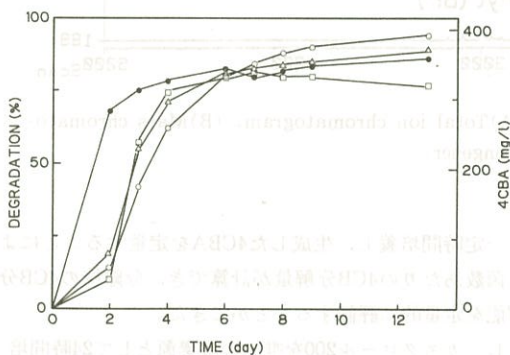


Fig. 3. Time course of degradation of 4CB and production of 4CBA by four isolated strains. 4CB (500mg/l) was incubated with resting cells of TH 1022 (Δ - Δ), TH 1024 (\circ - \circ), TH 1171 (\square - \square) and TH 2162 (\bullet - \bullet), separately. Resting cells were adjusted as described in the text.

resting cellsによる4CB分解は4CBと菌体とが接触する条件が不可欠であり、培地中に溶けている4CBが菌体に吸着するか、または不溶の4CBの固体表面に菌体が吸着することから分解が開始される。4CBの水への溶解度は極めて小さく、 $0.96 \mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは $0.82 \mu\text{g}/\text{ml}$ ともいわれ⁹⁾、溶解度は高々1ppmである。分解能を調べる実験のこれまでの報告例では、培地中での溶解度を高める目

的でPCBをアセトン溶液として加えたり、エマルジョン化¹⁰⁾したりで加えるのが通例であった。しかし我々の経験では4CBを粉末の状態に加えても分解速度が予想以上に速い。

2. 分離株TH1171のKC-200分解能

Fig.4の上段に基質に用いたKC-200のキャピラリーGC-MSによる全イオンクロマトグラム(TIC)を、また下段にそのマスクロマトグラムを示した。マスクロマトグラムから用いたKC-200は塩素数1個から6個までのPCBコンジェナーを含有することが明らかで、その組成は予期に反してジクロロビフェニルが主成分ともいえず、またビフェニルをも含有していた。このTICの内、1000~2600スキャンの領域を拡大したものをFig.5の下段に示した。Fig.5の上段には基質のKC-200を分離株TH1171のresting cell suspensionに加えて24時間培養したのちのTICの対応する領域を示した。ただしトリメチルシリル化処理により分解産物はトリメチルシリル誘導体となっており、またイオン強度は下段の培養前に対して上段の培養後の方が1.5倍拡大されている。この領域にはKC-200のビフェニルからジクロロビフェニルまでのPCBコンジェナーのピークが現れているが、個々のピークはマススペクトル、さらに相対保持時間の文献値¹¹⁾から下段の図中に示したとおりの帰属ができる。これを上段の培養後のものと比較すると、ビフェニル、2-, 3-, および4-モノクロロビフェニルがほぼ完全に消失し、ジクロロビフェニルでは2,6-, 2,2'-, 2,4-, 2,5-, 2,3'-, 2,4'-, 2,3-の各異性体が一部消失していることがわかる。このうち2,2'-, 2,3'-, 2,4'-ジクロロビフェニルが一部にせよ消失したことはTH1171株がクロロフェニル基を分解することを示しており注目される。一方、上段の培養後のクロマトグラムにはトリメチルシリル化されたモノクロ安息香酸の強いピークとジクロロ安息香酸の弱いピークが現れていて、モノクロロビフェニルとジクロロビフェニルが分解されたことを裏づけている。

2600スキャン以上の領域に現れるKC-200のピークは培養前後でほとんど変化がなく(クロマトグラム省略)、トリクロロ以上のPCBコンジェナーが分解された形跡は見当たらない。しかし、これはわずか24時間の培養の結果であるから、TH1171株にトリクロロ以上のPCBコンジェナーを分解する能力がないことを意味するものではなく、培養時間を延長した場合や基質の組成いかんではそのような能力を発揮する可能性を否定するものではない。

ま と め

4-クロロビフェニル(4CB)を4-クロロ安息香酸

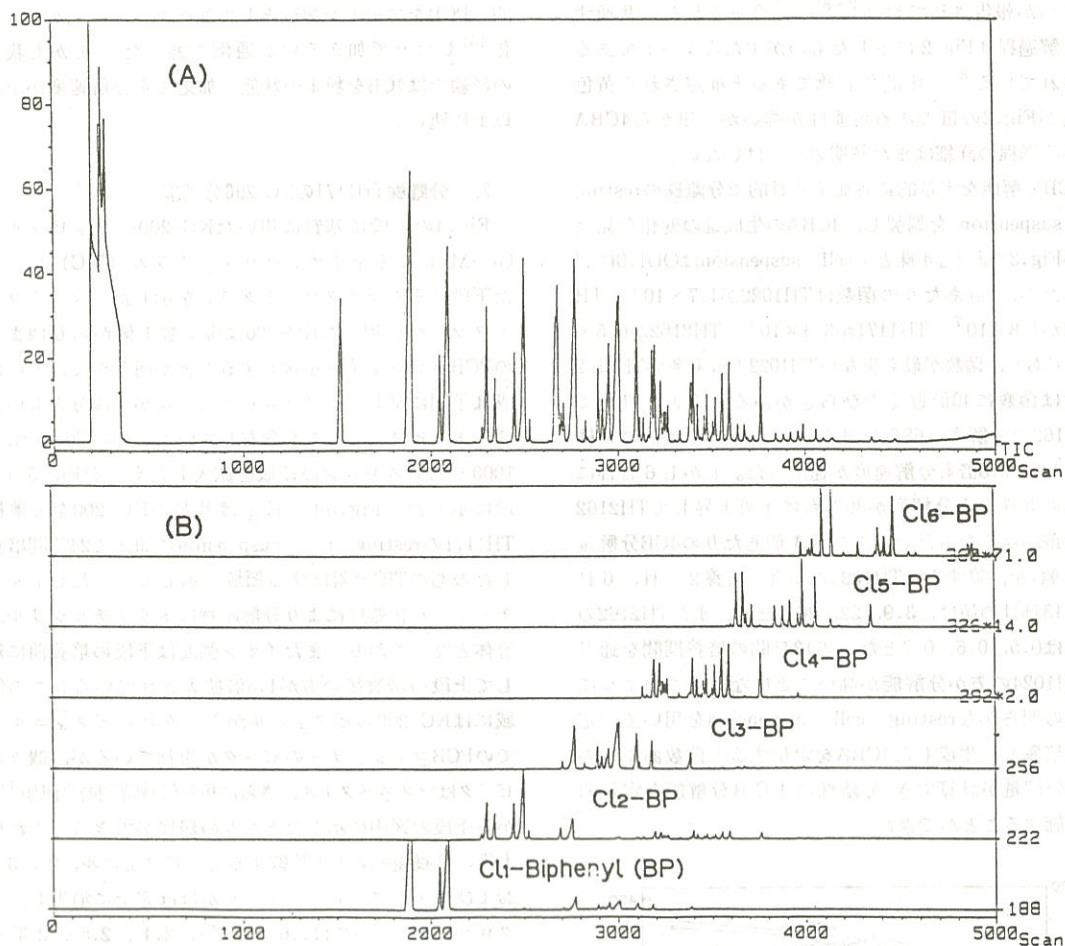


Fig.4. Total ion and mass chromatograms of KC-200. (A) Total ion chromatogram. (B) Mass chromatogram, monitored by M/Z of the molecular ion for each congener.

(4CBA)へと分解する微生物(4CB分解菌)を土壌試料からスクリーニングして以下の結果を得た。

1. 集積培養によりビフェニルを唯一の炭素源として増殖できる微生物を46試料から65株分離した。これらの分離株の4CB分解能の有無は4CBを基質として4日間培養し、生成した4CBAを高速液体クロマトグラフィーで定量することにより極めて簡単にスクリーニングすることができた。46試料中72%にあたる33試料から4CB分解菌が62株分離されたが、この結果は4CB分解菌が自然界に広く分布していることを示唆する。

2. 4CB分解能のスクリーニングの過程で黄色を呈した培養液からは例外なく4CBAが検出され、しかも呈色の度合いが強いものほど4CBAの生成量が多かった。培養液中に生じた黄色物質は4CBから4CBAへの分解過程における光分解を受けやすい中間代謝物であると推定され、その化学構造を検討中である。

3. 菌数の明らかなresting cell suspensionを用い

て一定時間培養し、生成した4CBAを定量することにより菌数あたりの4CB分解量が計算でき、分離株の4CB分解能を定量的に評価することができた。

4. カネクロール200を唯一の炭素源として24時間培養したところ、TH1171株はジクロロビフェニルのうち2,6-, 2,2'-, 2,4-, 2,5-, 2,3'-, 2,4'-, 2,3-の各異性体を分解した。なかでも2,2'-, 2,3'-, 2,4'-ジクロロビフェニルの分解はTH1171株がクロロフェニル基を分解することを示しており、培養時間を延長した場合や基質の組成いかんではトリクロロ以上のPCBコンジェナーを分解する可能性が示唆された。

終わりに臨み、GC-MSを測定された山梨医科大学GC-MS測定室の北沢靖江嬢に感謝します。なお本報の要旨は日本化学会第57秋季年会(1988年9月、仙台市)において発表した。

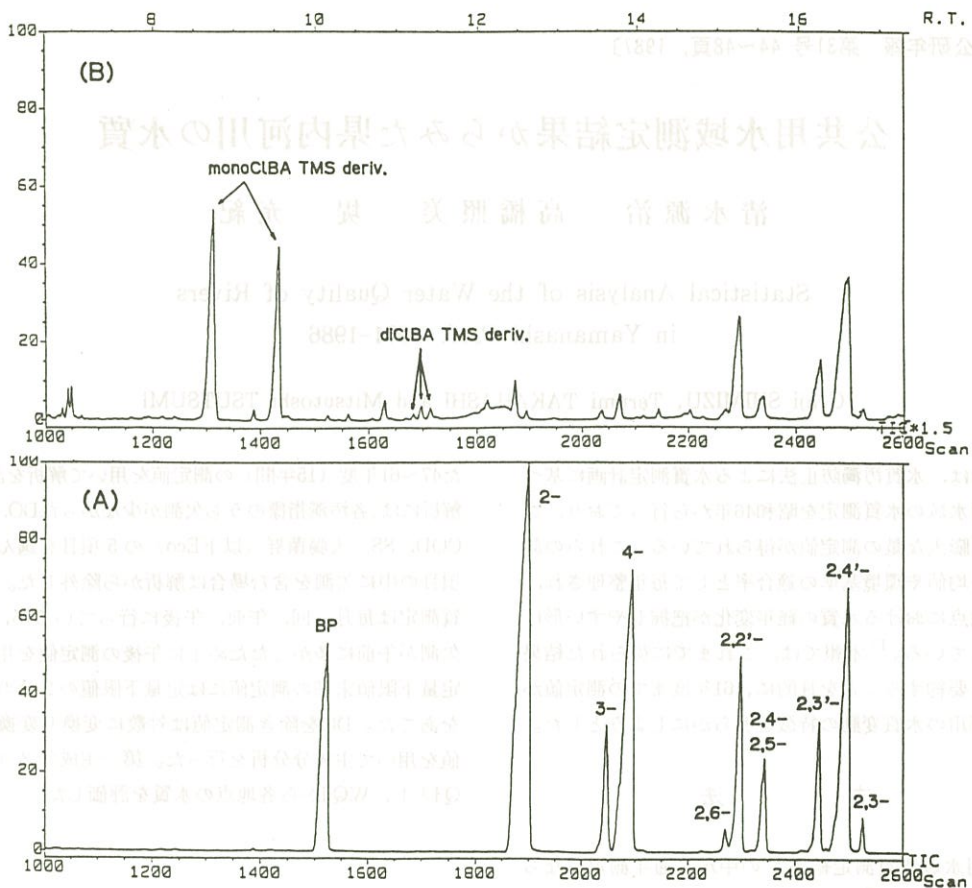


Fig.5. Biodegradation of KC-200 by strain TH 1171 and their metabolic products. (A) Part of TIC on GC-MS of KC-200. Biphenyl (BP), monochlorobiphenyl and dichlorobiphenyl congeners are included. (B) TIC after 24 hour incubation with resting cells. Intensity is 1.5 times that of (A). mono and diClBA TMS deriv. : trimethylsilyl derivatives of mono and dichlorobenzoic acids.

文 献

- 1) 古川謙介：微生物の分離法（山里一英ら編），pp. 667~675, R&Dプランニング（1987）
- 2) Bedard D.L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 761~768 (1986)
- 3) Ahmed M. and Focht D.D. : *Can. J. Microbiol.*, 19, 47~52 (1973)
- 4) Ohmori T. et al. : *Agr. Biol. Chem.*, 37, 1599~1605 (1973)
- 5) Furukawa K. and Matsumura F. : *J. Agric. Food Chem.*, 24, 251~256 (1976)
- 6) Furukawa K. et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 301~310 (1979)
- 7) Sylvestre M. and Fauteux J. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28, 61~72 (1982)
- 8) Masse R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 947~951 (1984)
- 9) Thomas J.M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 290~296 (1986)
- 10) Liu D. : *Water Research*, 14, 1467~1475 (1980)
- 11) Mullin M.D. et al. : *Environ. Sci. Technol.*, 18, 468~476 (1984)