

(56) 耐塩性ビフェニル類分解菌の 単離とビフェニル分解経路の推定

張 俗喆^{1*}・宮森 侑司¹・高田 和紀¹・裴 一相²・丁 権²・菊池 慎太郎¹

¹ 室蘭工業大学工学研究科応用理化学系専攻 (〒050-8585 北海道室蘭市水元町 27-1)

² 韓国ソウル特別市保健環境研究院 (韓国ソウル特別市瑞草区良才洞 202-3)

*E-mail: ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

活性汚泥から、高濃度の塩化ナトリウムや硝酸塩が存在する条件下でもビフェニル分解能を発現する 4 種類の耐塩性ビフェニル分解菌を単離し、それぞれの 16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性から、3 菌株 (SK-1 株, SK-3 株, SK-4 株) を *Rhodococcus* 属細菌と同定し、また 1 菌株 (SK-2 株) を *Aquamicrobium* 属細菌と同定した。単離菌株はいずれもビフェニルを 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸を経て安息香酸やカテコールにまで分解した。さらに単離菌のいずれも広範囲の芳香族化合物分解能を有し、特に SK-1 株及び SK-2 株は置換塩素原子数 (付加塩素原子数) が 4 から 6 のポリ塩化ビフェニル (PCB) の分解能を有していた。

Key Words: biphenyl, polychlorinated biphenyl, biphenyl-degrading mechanism, *Rhodococcus* genus, *Aquamicrobium* genus

1. はじめに

化学工業の発展に伴って数多くの有機物質が合成されてきたが、これらの中には生物によって分解されにくい難生分解性物質も多い。さらに難生分解性物質が環境中に蓄積された結果、生物に毒性を発現して生態系などの環境系を破壊する原因物質としても作用している現状にある。

多環芳香族炭化水素であるビフェニル並びにビフェニルを合成原料とするポリ塩化ビフェニル (PCB) は典型的な難生分解性合成有機物質であり、環境に残留するこれらの物質が生物に対して強い毒性を有することが明らかにされて以来¹⁾、それらの使用や排出などが厳しく制限されるに至った^{2, 3)}。

しかしビフェニルや PCB は今日もなお環境中に残留しており、これらの処理には専用施設建設などの高コストを要する。このような観点からすれば、微生物活性を利用して残留ビフェニルや PCB を低コストで簡便に処理するバイオレメディエーション法が有効と考えられる⁴⁻⁶⁾。たとえば Ahmed らは排水から 2 種類の好気性 PCB 分解菌 (いずれも *Achromobacter* 属) を単離し、これらはいずれも 1 塩素原子あるいは 2 塩素原子が付加した PCB 類 (以下、1 塩素原子置換 PCB あるいは 2 塩素原子置換 PCB という) を分解するが、置換塩素原子数が増加するに従って分解性が低下すると報告した⁷⁾。その後、

同様の分解傾向が *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707⁸⁾、*Burkholderia* sp. LB400^{9, 10)}、*Pseudomonas* sp. KKS102¹¹⁾ さらに *Rhodococcus* sp. RHA1¹²⁾ などでも報告され、現在は好気性細菌は付加塩素原子数 (置換塩素原子数) の少ない PCB を分解し、嫌気性細菌は逆に置換塩素数の多い PCB を分解する傾向にあると理解されている^{1, 3)}。

さらに好気性の PCB 分解菌あるいはビフェニル分解菌は、それぞれ、PCB 分解と同時にビフェニルも分解し、あるいはビフェニル分解と同時に PCB も分解する共代謝も報告されていることから⁴⁾、ビフェニルや PCB による汚染の浄化には共代謝能を有する微生物を用いるバイオレメディエーション法が有効と考えられる。

他方、PCB 汚染に関する東南アジア諸国の合同調査によって調査参加国の沿岸域土壌、すなわち高塩化ナトリウム含有土壌における PCB 汚染の深刻な現状が明らかとなった¹⁴⁾。さらにこれらの汚染区では高濃度塩化ナトリウムに加えて高濃度硝酸塩も混在し¹⁴⁾、これらの高濃度塩類によって土壌微生物の増殖が阻害されてバイオレメディエーション法の適用が困難とも報告されている^{2, 2-25)}。事実、このような条件下でのバイオレメディエーションに関する研究も少ない¹⁵⁾。

以上から本稿では、高濃度塩分 (1.0%~2.5%(w/v)) や高濃度硝酸塩 (100 mg/L~500 mg/L) が存在する条件下においてもビフェニルや PCB を分解する微生物の単離と分解経路について研究したので、その結果を以下に論

述する。

2. 実験方法

(1) ビフェニル分解菌の単離と同定

唯一炭素栄養源として最終濃度 50 mg/L のビフェニルを含む無機塩培地 (minimum salts medium, 以下 MSM 液体培地と省略, 表-1) に, 韓国ソウル特別市 Gayang 下水処理場から採取した活性汚泥を加え, 28°C で振盪培養した。なお活性汚泥を採取した下水処理場に流入する排水にはソウル市内の飲食店から排出されるキムチ (Kimchi) のような塩類含有生ゴミが多量に含まれおり, そのため排水の塩化ナトリウム濃度は 0.5~1.0% (w/v) と高濃度であった¹⁶⁾。

活性汚泥量が十分 (MLSS: 4500 mg/L) に増加した後, 湿重量 5 g の汚泥を新鮮な 50 mg/L ビフェニル含有 MSM 液体培地に植え継いで振盪培養し, さらにその培養液の一部を 100 mg/L ビフェニル含有 MSM 液体培地に植え継いで好氣的に集積培養し, 高濃度ビフェニル存在下でも増殖し得る細菌群を得た。

次いでこの細菌群をトリポリリン酸ナトリウム (5 mg/L) 容液で希釈し, 窒素栄養源として酵母エキス (0.5 g/L), 及び炭素栄養源としてビフェニル (20 mg/L) を含む MSM 寒天平板培地 (寒天: 1.5% (w/v)) 表面に塗布し, 28°C で培養した。

培養後に出現するコロニーの形状 (滑面あるいは粗面, 周縁部の明瞭性など) や呈色などが異なるコロニーをそれぞれ釣菌し, 100 mg/L ビフェニル含有 MSM 液体培地に植え継いで振盪培養し, 増殖と並びに培養後に残存するビフェニル濃度の低下が認められた微生物をビフェニル分解菌として単離した。

表-1 MSM 培地の成分

成分	濃度 (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
NaH ₂ PO ₄	0.2
NaCl	0.05
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.05
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0083
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0014
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00117
ZnCl ₂	0.001
pH 7.2	

なお, 単離したビフェニル分解菌が細菌類であることはグラム染色性, 並びに細胞のサイズを倒立顕微鏡 (Diaphot TMD300, (株) Nikon) で観察して確認した。また単離菌の同定は Chang ら¹⁷⁾ の実験方法に従い,

それぞれのビフェニル分解菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した後, DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のデータベースから BLAST 解析をもとにホモロジー検索を行い, またそれらの結果から ClustalW を用いて多重整列し, Neighbor-Joining 法を用いて系統樹を推定した。系統樹のクレードの信頼性はブートストラップ検定法 (1000 反復) によって算定した。なお, 単離した 4 菌株 (SK-1 株, SK-2 株, SK-3 株及び SK-4 株) の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を DDBJ に登録した (SK-1 株: AB612122, SK-2 株: AB612121, SK-3 株: AB612123, SK-4 株: AB612124)。

(2) 単離菌株によるビフェニルの分解と増殖

100 mg/L ビフェニル含有 MSM 液体培地 100 mL に, 単離した 4 種類のビフェニル分解細菌のそれぞれを接種して, 28°C で対数増殖期後期まで好気条件下で振盪培養した。所定の時間培養した後, 遠心分離 (8,000×g, 5 min, 4°C) して集菌し, 適当量の 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) で菌体を洗浄した。その後, 洗浄菌体を適量の MSM 培地に懸濁して波長 600 nm における比濁度 (以下, O.D.₆₀₀ と省略) が 0.02~0.03 になるように調整し, ビフェニル分解実験に供した。

分解実験は乾熱滅菌した 50 mL 容バイアル瓶に 100 mg/L~1500 mg/L のビフェニルを含む MSM 液体培地 9.9 mL を分注し, これに上記のように調製した菌懸濁液 0.1 mL を加えて密栓して 28°C で振盪した。なお同一濃度のビフェニルについて 3 連の実験を行った。

所定の時間後に, 10% (w/v) リン酸によって培養液の pH を 3 に調整し, 酢酸エチルによって残存ビフェニルを攪拌して抽出した。その後, 酢酸エチル層を回収し, 高速液体クロマトグラフ分析装置 (HPLC L-6200, 日立) に供してビフェニル濃度を測定した。HPLC 分析カラムは Shim-pack VP-ODS ((株) 島津ジーエルシー) を用いた。

培養過程におけるビフェニル分解菌の増殖は 経時的な O.D.₆₀₀ 変化から測定した。

(3) 単離菌株によるビフェニル分解物の同定

前記の「(2) 単離菌株によるビフェニルの分解と増殖」と同様に, 所定の培養時間後に残存するビフェニルを酢酸エチルで抽出し, 窒素ガス噴射下に酢酸エチルを留去した。残留物をアセトニトリル 50 µL に溶解させた後, さらに 50 µL の TMS 化剤 (BSTFA, (株) 東京化成工業) を添加して 60°C で 1 時間加温し, ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS, (株) 島津製作所 GCMS-QP2010 型) に供した。カラムは Rxi-5ms ((株) 島津ジーエルシー) を用いた。

(4) 単離菌株の増殖とビフェニル分解に及ぼす塩化ナトリウムあるいは硝酸塩の影響

「(2) 単離菌株によるビフェニルの分解と増殖」に記載したビフェニル-MSM 液体培地に、最終濃度が 10 g/L, 25 g/L, あるいは 35 g/L となるように塩化ナトリウム(以下, NaCl と表記)を添加し、好気条件下で高濃度 NaCl 存在下における 4 種類のビフェニル分解菌の増殖とビフェニル分解能について検討した。

また、「(2) 単離菌株によるビフェニルの分解と増殖」に記載したビフェニル-MSM 液体培地に、最終濃度が 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, あるいは 500 mg/L となるように硝酸カリウムを添加し、高濃度硝酸塩存在下における 4 種類のビフェニル分解菌の増殖とビフェニル分解能について検討した。

なお同一濃度の NaCl あるいは硝酸塩についてそれぞれ 2 連ずつの実験を行った。

(5) 単離菌株による種々の芳香族化合物の分解

単離した 4 種類のビフェニル分解菌によるビフェニル並びに PCB 以外の芳香族化合物、すなわち安息香酸、カテコール、ニトロベンゼン、アニリン、フェノール、4-クロロフェノール、トルエン、ジフェニルアミン、ナフタレン、あるいは 1,3,5-トリフェニルベンゼンの分解能について以下のように検討した。

すなわち、100 mg/L-ビフェニル含有 MSM 液体培地で予め増殖させた 4 種類のビフェニル分解菌の懸濁液 (O.D.₆₀₀ 約 2.0) を調製し、これを別に調製した 1 mM 上記芳香族化合物の 50 mM リン酸バッファー (pH 7.2) 溶液に加えて好気的に 28°C で振盪した。なお単離菌懸濁液を添加しない系を対照とした。

72 時間後に反応液に塩酸を添加して酸性化した後、反応液と等量の酢酸エチルを添加して攪拌し、芳香族化合物を抽出した後、遠心分離 (2,000×g, 5 min) して上層 (酢酸エチル層) を分取して GC-MS 分析に供した。なお、実験は 2 連で行った。

(6) 単離菌株による PCB の分解

SK-1 株あるいは SK-2 株のコロニーを、100 mg/L-ビフェニル含有 MSM 液体培地に釣菌接種し、28°C で対数増殖期後期まで好気的に振盪培養し、さらに培養液の一部を 300 mg/L-ビフェニル含有 MSM 液体培地に接種して振盪培養した。SK-1 株あるいは SK-2 株が対数増殖期後期に達したときにそれぞれの培養液を遠心分離 (8,000×g, 4°C, 5 min) して集菌し、菌体を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) で洗浄した。洗浄菌体を適量の MSM 液体培地に懸濁して O.D.₆₀₀ が 0.02~0.03 になるように調整し、以下の PCB 分解実験に供した。

PCB 分解反応は 50 mL 容バイアル瓶を反応容器とし、

これに 100 mg/L のビフェニル及び 0.6 mg/L の PCB (Congener calibration set, C-CSQ-SET, AccuStandard 社, 米国) を含む MSM 液体培地と洗浄菌体懸濁液を入れた後、密栓して容器中の気相を酸素で置換して 28°C で 3 日間振盪培養した。

3 日間の培養終了後に培養液と等量の *n*-hexane (PCB 分析用, (株) 関東化学) を加えて 30 秒間超音波発生機 ((株) イワキ, USC-100Z38S 型) で処理した後、内部標準物質として所定量の Defining Solution (AccuStandard 社, 米国) を加えて遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 20min) し、沈殿部 (菌体) と上清液 (液体培地) に分画した。

沈殿部 (菌体) を別の容器に分取し、これに最終濃度として 1 規定の KOH 溶液を含むエタノール (以下, KOH/ethanol と表記) を加えて密栓し、室温で 16 時間保存した。なお、この操作は菌体表面に非特異的に付着している PCB の遊離を目的とする。その後、KOH/ethanol-菌体懸濁液に *n*-hexane 及び超純水を加えて分液ロートで遊離した PCB を抽出した。抽出は 3 回繰り返した。

他方、上清液 (液体培地) を別の容器に分取し、これに等量の *n*-hexane を加えて攪拌し、液中に残存する PCB を抽出した。抽出は 3 回行った。すべての抽出液を集めて密栓容器に入れて冷蔵庫内 (4°C) で保存した。

次いで、菌体から遊離した PCB の *n*-ヘキサン抽出液と、上清液に残存する PCB の *n*-ヘキサン抽出液の両者を混合し、これに濃硫酸 (PCB 分析用, (株) 関東化学) を加え攪拌洗浄した。洗浄は *n*-ヘキサン層が無色透明になるまで繰り返した。なお硫酸は、溶液に超純水と *n*-hexane の混合液 (10:1 (v/v)) を加えて除去した。また水分は溶液に無水硫酸ナトリウムを添加して除去した。

このように処理した *n*-ヘキサン層に Nonane 10 µL を加えてエバポレータで 1~2 mL にまで濃縮した後、ガラス製 4 層クリーンアップカートリッジ (ジーエルサイエンス (株): 10%硝酸銀シリカ (3 g), 22%硫酸シリカ (6 g), 44%硫酸シリカ (4.5 g), 2%水酸化カリウムシリカ (3 g) から構成される) でろ過した。

ろ液の *n*-hexane を窒素ガス噴射下に留去して残留物を nonane 20 µL に溶解し、Kamei らの方法¹⁸⁾ に従って高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC-HRMS, Thermo Trace GC Ultra, (株) Thermo Electron, Bremen, ドイツ) で残存 PCB 濃度を測定した。これらの実験は 2 連で行った。

3. 結果及び考察

(1) 単離菌の同定

前述のように活性汚泥から単離した 4 種の菌株を、以下においては SK-1 株, SK-2 株, SK-3 株, あるいは SK-4 株と呼んで区別する。

これら単離菌株のそれぞれの 16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性について BLAST 検索を行ったところ、SK-1 株は *Rhodococcus erythropolis* LG12 (EU852376) 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列と 100% 一致し、また SK-3 株あるいは SK-4 株はそれぞれ *Rhodococcus zopfii* (AF191343) 株あるいは *Rhodococcus ruber* TOY7 (FJ554666 or X80625) 株の塩基配列と 100% 一致した。これらの結果を図-1 にまとめた。

Rhodococcus 属細菌は土壌や海洋など広範に、かつ普遍的に存在する微生物であるが、*Rhodococcus erythropolis* TA421 株や *Rhodococcus ruber* Z56 株、さらに *Rhodococcus jostii* RHA1 株や *Rhodococcus globerulus* P6 (X77779) 株などの菌株は PCB 分解能を有することが知られている^{1, 2, 19)}。したがって今回の単離菌株 SK-1 株 (*Rhodococcus erythropolis* 株あるいはその近縁種)、SK-3 株 (*Rhodococcus zopfii* 株)、並びに SK-4 株 (*Rhodococcus ruber* 株) は、ビフェニルの分解能に加えて PCB 分解能を有する可能性が示唆された。

他方、SK-2 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は、*Aquamicrobium defluvii* DSM11603 (Y15403) 株のそれと 100% 一致した。しかし *Aquamicrobium* 属細菌の PCB 分解能については現在まで報告されていない。

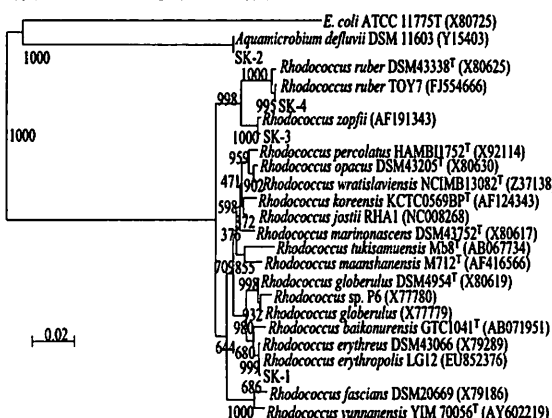


図-1 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく単離菌株の分類学的系統樹

(2) SK-2 株あるいは SK-3 株によるビフェニル分解と増殖

SK-2 株 (*Aquamicrobium* 属) あるいは SK-3 株 (*Rhodococcus* 属) によるビフェニル分解と増殖の例を図-2 (A) 及び (B) に示した。

SK-2 株は初期濃度 100 mg/L のビフェニルを 24 時間以内に、600 mg/L のビフェニルを 96 時間以内に完全に分解した。また SK-2 株の最大増殖量は初期ビフェニル濃度に相関した。なお初期ビフェニル濃度が 1,000 mg/L の場合、120 時間の培養後にも約 300 mg/L のビフェニルが培地中に残存した (図-2 (A))。

SK-3 株は、初期濃度 100 mg/L から 400 mg/L の範囲のビフェニルを 120 時間以内に完全に分解し、また SK-2 株と同様に最大増殖量は初期ビフェニル濃度に相関した。なお初期ビフェニル濃度 1,500 mg/L の場合、120 時間の培養後にも約 740 mg/L のビフェニルが培地中に残存した (図-2 (B))。

なおデータは示さないが、SK-1 株及び SK-4 株もビフェニル分解能力を有し、唯一炭素栄養源として増殖した。

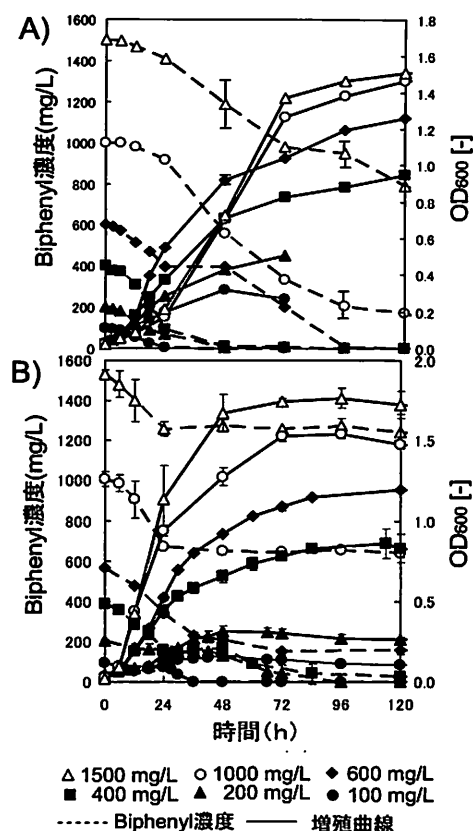


図-2 SK-2 株 (図-2 (A)) あるいは SK-3 株 (図-2 (B)) によるビフェニル分解と増殖

(3) 単離菌株によるビフェニル代謝中間物の同定と分解経路の推定

既に報告されているビフェニルの微生物分解は、ビフェニルにヒドロキシル基を導入して 2,3-ジヒドロキシビフェニルを生成する反応を初発反応とし⁴⁾、その後 2,3-ジヒドロキシビフェニルをメタ開裂して 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸に分解する経路や、さらに安息香酸やカテコールにまで分解する反応も報告されている¹⁹⁾。

以上から SK-1 株、SK-2 株、SK-3 株、あるいは SK-4 株のビフェニル代謝中間物を GC-MS で追跡し、これらの菌株によるビフェニル分解経路を推定した。

図-3 に SK-2 株によるビフェニル分解反応の経時的代謝中間物のガスクロマトグラムを示した。保持時間 11.5 分付近に見られるビフェニルのピーク面積が反応時間の経過とともに減少し、同時に図中に①から⑤で示した代謝中間物のピーク面積が増加した。

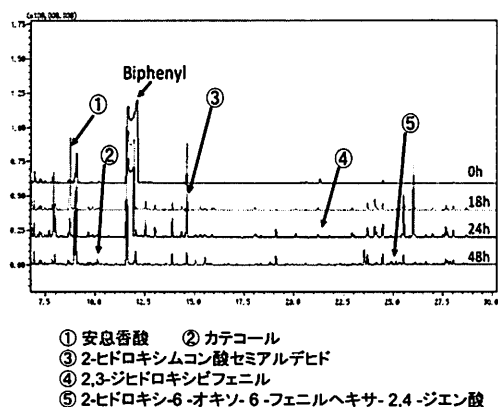


図-3 SK-2 株によるビフェニルの経時分解
濃度 100 mg/L でのビフェニル分解実験のガスクロマトグラムとその分解産物のピーク

なおデータは示さないが、図-3におけるそれぞれのピークの保持時間に対応する物質の質量スペクトルを解析したところ、ピーク①は安息香酸、②はカテコール、④は2,3-ジヒドロキシビフェニルと同定された。

またピーク③の質量分析を図4 (A) に示した。最大質量が 286 (最大 $m/z=286$) の分子イオンはカテコールがメタ開裂した 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド、あるいはオルト開裂したシス-ムコン酸セミアルデヒドの TMS 誘導体であると推定された。

以上から SK-2 株細胞中におけるカテコールメタ開裂酵素 (カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ) 活性を Nozaki らの方法²⁰⁾ に従って測定したところ、この酵素活性が検出され、 $m/z=286$ のピークを 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドと同定した。

図4 (B) に示したピーク⑤の最大分子イオン質量は

362 であり、ベースピークの分子イオン質量は 245 であった。この結果は Furukawa ら²¹⁾ がビフェニル分解菌

Pseudomonas paucimobilis Q1 を用いて報告したビフェニル代謝中間物 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸に一致した。

さらにデータは示さないが、SK-1 株、SK-3 株、及び SK-4 株においても、SK-2 株と同じビフェニル代謝中間物が同定されたことから、いずれの単離菌株もビフェニルを 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸を経て2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドに代謝すると推定された。以上の推定された分解経路を図-5にまとめた。

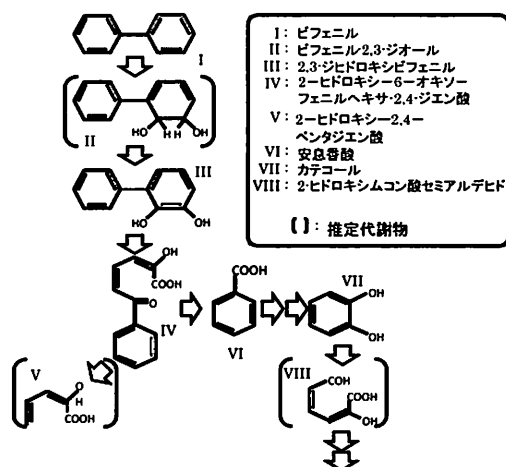


図-5 単離菌株によるビフェニル推定分解経路

(4) 単離菌株の増殖とビフェニル分解に及ぼす塩化ナトリウムあるいは硝酸塩の影響

前述のように本研究の最終目的は、海浜沿岸地域などの高濃度塩化ナトリウム存在するビフェニル汚染環境に SK-1 株、SK-2 株、SK-3 株及び SK-4 株を適用し、バイオレメディエーション法でビフェニル汚染を除去することにある。さらに実際のビフェニル汚染環境では高濃度塩化ナトリウムに加えて他の汚染原因物質が混在する場合も多い。特に硝酸塩の混在は土壌微生物の増殖を阻害

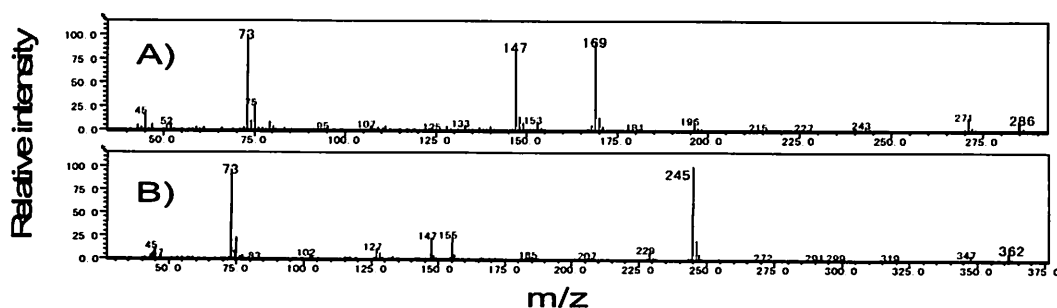


図-4 ビフェニル分解実験における代謝産物③ (A) 及び⑤ (B) の質量スペクトル

し、その結果、微生物によるビフェニル分解を阻害すると報告されている²²⁻²⁵⁾。

以上からすれば、高濃度の塩化ナトリウムあるいは硝酸塩が単離菌株のビフェニル分解活性や増殖に及ぼす影響について検討する必要がある。

図-6 に塩化ナトリウムが SK-3 株のビフェニル分解に及ぼす影響を示した。対照系(塩化ナトリウム濃度は 0.05 g/L、すなわち MSM 培地に含まれる濃度)では 24 時間でビフェニルが完全に分解されて培地から消失した。

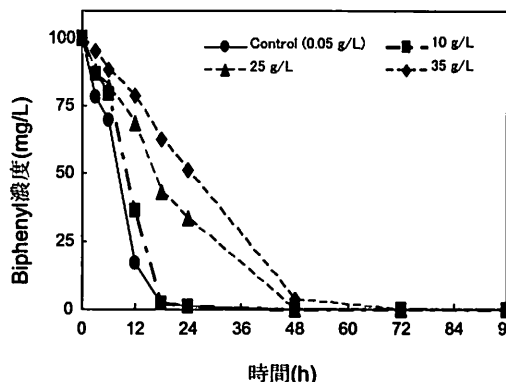


図-6 塩化ナトリウムが SK-3 株のビフェニル 分解に及ぼす影響

他方、ビフェニルの完全分解に要する時間は遅延するものの、塩化ナトリウム濃度が 35 g/L に上昇してもビフェニルは分解された。またデータとしては示さないが SK-4 株も SK-3 株と同様の傾向を示した。

一方、SK-2 株は 25 g/L の塩化ナトリウムが存在してもビフェニルを分解したが、35 g/L の濃度ではビフェニル分解活性が認められなかった(図-7)。またデータとしては示さないが SK-1 株も SK-2 株と同様の傾向を示した。

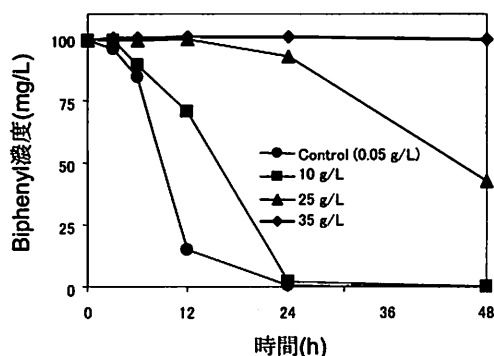


図-7 塩化ナトリウムが SK-2 株のビフェニル分解に及ぼす影響

以上の結果は、単離菌株はいずれも塩化ナトリウム濃度

25 g/L 付近を閾値とする耐塩性ビフェニル分解菌であることを示すものである。

他方、高濃度の硝酸塩が単離菌株のビフェニル分解活性に及ぼす影響について検討したところ、SK-1 株、SK-2 株、SK-3 株及び SK-4 株のいずれの単離菌株のビフェニル分解活性も硝酸塩濃度 200 mg/L までの濃度範囲ではほとんど影響されなかった。特に SK-3 株は硝酸塩濃度 500 mg/L の条件下においても良好に増殖し、またビフェニルを完全に分解した(図-8)。

以上の結果は、単離菌株のいずれも耐硝酸塩性ビフェニル分解菌であることを示すものであり、さらに前述の結果と併せて単離菌が他の塩類にも耐性を示す耐塩性ビフェニル分解菌であることを示唆するものである。

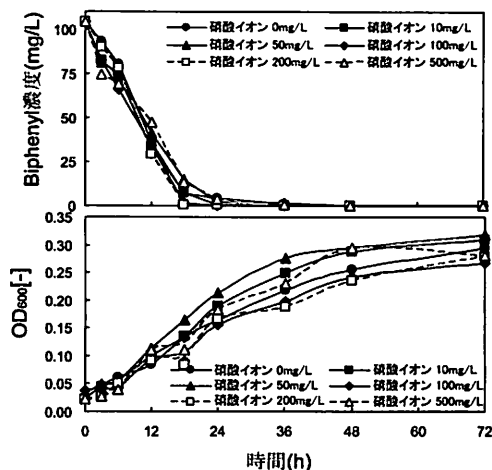


図-8 硝酸塩が SK-3 株のビフェニル 分解と増殖に及ぼす影響

(5) 単離菌株による種々の芳香族化合物の分解

表 2 に単離菌株によるビフェニル及び PCB 以外の芳香族化合物の分解について示した。なお、各物質の分

表-2 各種芳香族化合物の分解

物質名	SK-1	SK-2	SK-3	SK-4
	残存率 (%) *	残存率 (%) *	残存率 (%) *	残存率 (%) *
安息香酸	0	0	0	0
カテコール	0	0	0	0
フェノール	0	80	0	0
トルエン	10	10	100	100
4-クロロフェノール	50	62	100	100
アニリン	87	87	100	100
ニトロベンゼン	80	92	86	93
ナフタレン	94	100	71	77
ジフェニルアミン	100	100	80	78
1,3,5-トリフェニルベンゼン	100	100	100	100

*残存率 (100×(分解後に残る濃度/初期濃度))

反応時間: 3 日。

解性は残存率 (%) として示した。SK-1 株は安息香酸、カテコール、並びにフェノールを完全に分解した (残存率 0%)。また 4クロロフェノール、アニリン及びトルエンを、それぞれ、対初期濃度の 50%, 87%, 10% (いずれも w/w) にまで分解し、またニトロベンゼン及びナフタレンを対初期濃度の 80%, 83%, 及び 94% にまで分解した。なおジフェニルアミンと 1,3,5-トリフェニルベンゼンの分解活性は認められなかった (残存率 100%)。

さらに SK-3 株は安息香酸、カテコール、及びフェノールのいずれも完全に分解し、さらにナフタレン、ジフェニルアミン、及びニトロベンゼンを対初期濃度の 71%, 80%, 86% にまで分解した。しかし 4クロロフェノール、アニリン、トルエン、1,3,5-トリフェニルベンゼンを分解しなかった。

SK-4 株は安息香酸、カテコール、及びフェノールを完全に分解し、ナフタレン、ジフェニルアミン、並びにニトロベンゼンを対初期濃度の 77%, 78%, 並びに 93% にまで分解したが、4クロロフェノール、アニリン、トルエン、及び 1,3,5-トリフェニルベンゼンを分解しなかった。

以上の結果はいずれの単離菌株も多様な芳香族化合物分解能を有することを示すものである。

特に SK-1 株及び SK-2 株は、PCB に類似の化学構造を有する 4クロロフェノールの分解活性を有していたので、次にこれらの単離菌株による PCB 分解について検討した。

(6) 単離菌株による PCB の分解

前述のように、置換された塩素原子数 (分子に付加する塩素原子数) が少ない PCB ほど好気微生物による分解が容易であり、特に 4 塩素原子以下の塩素で置換された PCB が最も分解されやすいと報告されている⁴⁾。

表-3 はビフェニル存在下において SK-1 株並びに SK-2 株による PCB 分解についてまとめた結果であるが、SK-1 株は置換塩素原子数が 6 以下の PCB を良好に分解した。これは SK-1 株が代表的 PCB 分解菌である *Rhodococcus* 属と同属であることによると推定される。

他方、*Aquamicrobium* 属に属する SK-2 株は置換塩素原子数 6 以下の PCB 分子種を分解するものの、その分解能は SK-1 株のそれに比較して低く、特にオルト位に塩素原子が付加した PCB の分解率が低値であった。また置換塩素原子数 7 の PCB では分解できない PCB 分子種が急激に増加し、さらに塩素置換数 8 以上の PCB ではいずれの分子種も全く分解しなかった。以上の結果は、SK-2 株が新規の *Aquamicrobium* 属 PCB 分解菌であることを示唆するものである。

PCB 分解率に多少の違いは見られたものの、SK-1 株及び SK-2 株ともに高塩 (2.5% (w/v) NaCl) 環境下においても同様の分解傾向を示した (データ省略)。

高耐塩性 PCB 分解菌に関しては海洋微生物である *Pseudomonas* CH07 株がおおよそ 1.75% (w/v) の NaCl 存在下で置換塩素原子数 4 の PCB を最大 40% まで分解したと報告^{2,6)} されている。また、*Bacillus* 属細菌が 0.5 g/L の NaCl 存在下で 60 日間後最大 91% の PCB を分解したと報告^{2,7)} されているが、いずれも 2.0% (w/v) 未満の NaCl 存在下での分解である。

表-3 SK-1 株あるいは SK-2 株による PCB 分解

物質名	SK-1 残存率 (%)	SK-2	物質名	SK-1 残存率 (%)	SK-2
2-Mo-PCB	60	90	2,4,5-Te-PCB	548	797
3-Mo-PCB	35.6	NA	2,2,3,4-Pe-PCB	ND	ND
4-Mo-PCB	34	68.6	2,2,3,4-S-Pe-PCB	ND	ND
2,2-Di-PCB	85.8	65.3	2,3,4,6-Pe-PCB	75	88
2,3-Di-PCB	66.3	65.2	2,2,4,5-Pe-PCB	88	88.3
2,5-Di-PCB	76.4	NA	2,2,3,4,5-Hx-PCB	78.8	66
2,4-Di-PCB	80	78.7	2,2,3,4,5,6-Hx-PCB	ND	78.1
2,2,6-Ti-PCB	75.5	84.5	2,2,3,4,5,6-Hx-PCB	78	81.3
2,4,6-Ti-PCB	78	84.2	2,2,4,4,5,5-Hx-PCB	81.5	68.2
2,2,3-Ti-PCB	84.1	63	2,2,3,3,5,6-Hp-PCB	69.5	83
2,2,5-Ti-PCB	60	NA	2,2,3,4,5,6-Hp-PCB	73	83
2,3,4-Ti-PCB	77	83.8	2,2,3,4,5,6-Hp-PCB	84	ND
2,3,4-Ti-PCB	43	62.2	2,2,3,4,5,6-Hp-PCB	ND	ND
2,2,3,5-Te-PCB	69	NA	2,2,3,4,5,6-Hp-PCB	ND	ND
2,2,5,5-Te-PCB	71	63	2,2,3,4,4,5,5-Hp-PCB	ND	ND
2,3,3,4-Te-PCB	52	75	2,2,3,3,4,4,5,5-OC-PCB	ND	ND
2,3,4,4-Te-PCB	64	77	2,2,3,3,4,5,5,6-OC-PCB	ND	ND
2,3,4,5-Te-PCB	65.5	52	2,2,3,4,4,5,5,6-OC-PCB	ND	NA
2,3,4,6-Te-PCB	43	44	2,2,3,3,4,4,5,5,6-No-PCB	ND	ND

* 残存率 (100 × (分解後に残る濃度/初期濃度))

ND: 非分解 (分解率 5% 以下)。NA: 未分析試料 (試料損失)。* 二つ試料の平均値 (二つ試料の偏差は 5% 以内)。初期 PCB 濃度: 0.6 mg/L。培養時間: 3 日。

4. まとめ

以上述べたように、活性汚泥から単離した 4 株のビフェニル分解細菌はいずれも耐塩性のビフェニル分解菌であり、ビフェニルや PCB をはじめとする広範囲の芳香族化合物の分解能を有することから、これらの物質で汚染された土壌のバイオレメディエーション的浄化に利用することが期待される。特に今回単離した SK-1 株と SK-2 株は高濃度の NaCl 及び硝酸塩に汚染された沿岸域汚染土壌の浄化に有効であると考えられる。本研究は以下のようにまとめられる。

- (1) 活性汚泥から 4 株の細菌 (SK-1 株, SK-2 株, SK-3 株, SK-4 株) を単離し、それぞれの 16S rRNA 遺伝子塩基配列から SK-1 株, SK-3 株及び SK-4 株は *Rhodococcus* 属に分類され、SK-2 株は *Aquamicrobium* 属に分類されることを明らかにした。
- (2) これらの単離菌株はいずれもビフェニルを唯一炭素源として増殖し、増殖に伴って培地中のビフェニル濃度が減少したことから、ビフェニル

分解菌であることが示された。

- (3) これら単離菌株のビフェニル代謝中間物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) によって同定し、単離菌株がビフェニルを 2,3-ジヒドロキシビフェニル及び 2-ヒドロキシ-6-オキソ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸を経て安息香酸やカテコールにまで分解することを明らかにした。
- (4) これらの単離菌株はいずれも高濃度の塩化ナトリウムあるいは硝酸塩が存在する条件下でもビフェニルを分解する耐塩性ビフェニル分解菌であることを明らかにした。
- (5) これらの単離菌株はいずれも幅広範囲の芳香族化合物を分解することを明らかにした。
- (6) ビフェニル存在下において SK-1 株 (*Rhodococcus* 属) 及び SK-2 株 (*Aquamicrobium* 属) は PCB 分解能を有し、また塩素原子数の多い高塩素原子置換 PCB をも分解することを明らかにした。

謝辞

PCB 分析及び PCB 残留物の処理に多大な協力を頂いた韓国ソウル特別市保健環境研究院の Min-Young Kim 院長に心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 国際化学物質安全性カード (<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss0106c.html>)
- 2) 宮田秀明: PCB, 環境技術, Vol. 21, pp. 319-327, 1992.
- 3) 外務省 (<http://www.mofa.go.jp/mofij/gakokankyo/oyakubopshi.html>)
- 4) Furukawa K. and Fujiwara H.: Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 105, pp. 433-449, 2008.
- 5) Kim S. and Picardal F.W.: A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates, *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 185, pp. 225-229, 2000.
- 6) Kim S. and Picardal F.: Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, pp. 1953-1955, 2001.
- 7) Ahmed M. and Focht D.D.: Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Archaeobacter*, *Can. J. Microbiol.*, Vol. 19, pp. 47-52, 1973.
- 8) Furukawa K. and Miyazaki T.: Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *J. Bacteriol.*, Vol. 166, pp. 392-398, 1986.
- 9) Bopp L.H.: Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400, *J. Ind. Microbiol.*, Vol. 1, pp.

23-29, 1986.

- 10) Erickson B.D. and Mondello F.J.: Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400, *J. Bacteriol.*, Vol. 174, pp. 2903-2912, 1992.
- 11) Kimbara K., Hashimoto T., Fukuda M., Koana T., Takagi M., Oishi M., Yano K.: Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102, *J. Bacteriol.*, Vol. 171, pp. 2740-2747, 1989.
- 12) Seto M., Kimbara K., Shimura M., Hatta T., Fukuda M., Yano K.: A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 3353-3358, 1995.
- 13) Furukawa K., Tomizuka N., Kamibayashi A.: Effect of chlorine substitution on bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 38, pp. 301-310, 1979.
- 14) 京都府保険医協会週刊医療情報インデックス (http://www.healthnet.jp/syukan/pages/2008/06/sf000006_2.htm)
- 15) Kolar A.B., Hršak D., Fingler S., Četković H., Petrić I., Kolić N.U.: PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments, *Int. Biodeterior. & Biodegradation*, Vol. 60, pp. 16-24, 2007.
- 16) Kim P.J., Chang K.W., Min K.H.: Evaluation of the stability of compost made from food wastes by the fermenting tank, *J. KOWREC*, Vol. 3, pp. 35-42, 1995.
- 17) Chang Y.C., Hatsu M., Jung K., Yoo Y.S., Takamizawa K.: Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 89, 489-491, 2000.
- 18) Kamei I., Sonoki S., Haraguchi K., Kondo R.: Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 73, pp. 932-940, 2006.
- 19) Higson F.K.: Microbial degradation of biphenyl and its derivatives, *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol. 37, pp. 135-164, 1992.
- 20) Nozaki M., Kagamitama H., Hayaishi O.: Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties. *Biochem. Z.*, Vol. 338, pp. 582-590, 1963.
- 21) Furukawa K., Simon J.R., Chakrabarty A.M.: Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene, and salicylate catabolism in *Pseudomonas paucimobilis*, *J. Bacteriol.*, Vol. 154, pp. 1356-1362, 1983.
- 22) 鶴木啓二, 長沢徹明, 井上京, 山本忠男: 農業流域河川における融雪期の窒素流出挙動, 水文・水資源学会, Vol. 14, pp. 452-460, 2001.

- 23) 井川怜欧, 嶋田純, 徳永朋祥, 後藤純治: 富山湾
周辺河川水の水文学特性と湾への窒素負荷量の予
察, *日本水文学会誌*, Vol. 37, pp. 55-66, 2007.
- 24) Davidova I., Hicks M.S., Fedorak P.M., Suflita J.M.: The
influence of nitrate on microbial processes in oil industry
production waters, *J. Ind. Microbiol. & Biotech.*, Vol. 27,
pp. 80-86, 2001.
- 25) Russo R.C.: Ammonia, nitrite and nitrate. In: Rand G.M.
and Petrocelli S.R. Editors, *Fundamentals of aquatic
toxicology*, Hemisphere publishing corporation,
Washington, DC, pp. 455-471, 1985.
- 26) Jaysankar De., Sarkar A., Ramaiah N.: Aerobic degradation
of highly chlorinated PCBs by a marine bacterium,
Pseudomonas CH07, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.
22, pp.1321-1327, 2006.
- 27) Abdughafurovich R.B., Andreevich K.A., Adrian L.,
Tashpulatovich Y.K.: Biodegradation of tritium labeled
polychlorinated biphenyls (PCBs) by local salt tolerant
mesophylic *Bacillus* strains, *J. Environ. Protect.*, Vol. 1, pp.
420-425, 2010.

(2011. 5. 30 受付)

Isolation of salt and nitrate-tolerant biphenyl-degrading bacteria and their biphenyl degradation pathway

Young-Cheol CHANG¹, Yuji MIYAMORI¹, Kazunori TAKADA¹, Il-Sang BAE²,
Kweon JUNG², and Kikuchi SHINTARO¹

¹Division of Applied Sciences, College of Environmental Technology,
Muroran Institute of Technology

²Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

Four biphenyl degrading-bacteria, which have capability of degrading biphenyl in the presence of high concentrations of NaCl or nitrate, were isolated from activated sludge. Among the four isolated strains three strains (SK-1, SK-3, and SK-4) were identified as *Rhodococcus* genus and the other strain (SK-2) was identified as *Aquamicrobium* genus by 16S rRNA gene sequence. The all isolated strains could transform biphenyl to benzoic acid and catechol via 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid and were able to degrade a broad spectrum of aromatic compounds. Moreover, among the four strains, SK-1 and SK-2, showed degrading capability of high-chlorinated polychlorinated biphenyl (PCB) congeners (from four to six chlorines per biphenyl molecule).