

o-クロロ安息香酸分解菌の単離および性質について

○(株)荏原総合研究所 山下茂樹

荏原インフィルコ(株)中村峯也

1.はじめに

有機塩素化合物は除草剤、殺虫剤、潤滑剤、絶縁剤、洗浄剤および冷媒などとして広く利用されており、人間生活に欠かせない物質となっている。ところが、これらの物質の中には毒性、発癌性および催奇性などの有害な性質を持つものが少なくない。しかも、微生物分解を受け難いために自然環境中での残留性が高い場合が多い。これらの物質の中には実際に環境汚染や人体の障害を引き起こし、その使用が制限または禁止された物もある。近年、地下水汚染の原因となっているトリクロロエチレンなども有機塩素化合物の一種である。以上の様な状況において、有機塩素化合物の効率的な除去技術の開発は今後の水処理技術における重要な課題の一つと言える。

本研究では有機塩素化合物の一種であるオルト-クロロ安息香酸(o-CBa)分解菌の探索および性質の把握に関する実験結果について報告する。

2. 方法

2-1 o-CBa分解菌の集積培養および単離

集積培養用の培地には、基礎培地(1リットルのイオン交換水中に K_2HPO_4 , 4.3g; KH_2PO_4 , 3.4g; $(NH_4)_2SO_4$, 2.0g; $MgCl_2$, 0.16g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.001g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0006g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.026gそして $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.002gを含む。pHは7.0)にo-CBaを0.5g/lとなるように添加した液体培地を用いた。この培地100mlに、全国各地から採取した土壌あるいは活性汚泥等を約1g添加し、28℃で振とう培養した。これを約1週間ごとに植え継ぎしてo-CBa分解菌を集積培養した。分解菌の集積が認められた培養液を希釈し、同じ組成の寒天平板培地に塗抹し、28℃で培養後、出現したコロニーを分離した。このコロニーをさらに植え継いで菌の純化操作を行った。

2-2 休止菌体の調製

各種の有機物を含む基礎培地に菌体を接種し、28℃で振とう培養し、対数増殖期の菌体を回収後、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2度洗浄した。得られた休止菌体は-20℃で凍結保存し、適時解凍して使用した。

2-3 酸素消費量の測定

休止菌体を1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、溶存酸素計(飯島電子(株)社製、溶存酸素ユニットGU-BM8508)を用いて3~5分間内性呼吸量を測定後、各種基質を添加して基質酸化による酸素消費量を測定した。

2-4 粗酵素液の調製

休止菌体を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で懸濁し、超音波破碎処理の後、遠心分離機で沈澱物を除き上澄液を粗酵素液とした。

2-5 カテコール酸化酵素活性の測定

Catechol-1,2-oxygenase活性の測定はHegemanら(1966)の方法に従った。一方、Catechol-2,3-oxygenase活性の測定はNozakiら(1963)の方法に従った。

2-6 蛋白質含量の測定

菌体を0.2NNaOH、1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に懸濁して溶解し、液中の蛋白質濃度を比色定量(BIO-RAD製、PROTEIN ASSAY)した。

2-7 その他の分析

o-CBa濃度は培養液に濃塩酸を加えて酸性とした後、酢酸エチルで3回抽出、濃縮した。この液中のo-CBa濃度をガスクロマトグラフ(株)日立製作所製 G3000型 検出機:FID カラム:OV-1701 Bonded γ -シリカカラム)で測定した。培養液上清の波長230nmにおける吸光度を用いた測定も行った。

塩素イオン濃度はイオンクロマトグラフ(DIONEX社製 2010i型 カラム:HPLC-AS4A)を用いて測定した。

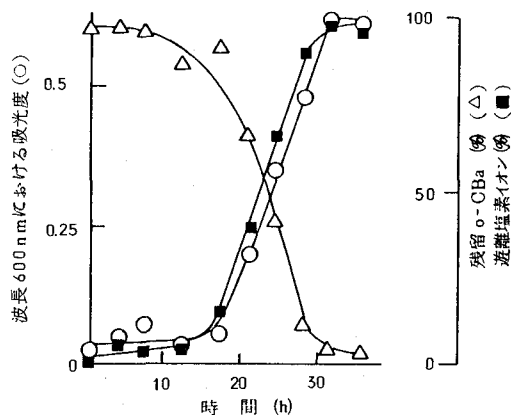


図-1 120-17株の増殖とo-CBa分解
および塩素イオンの遊離

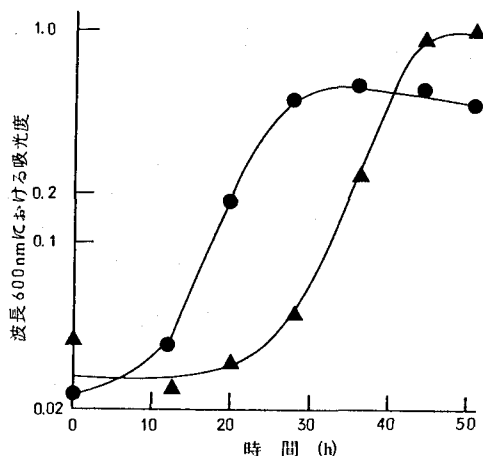


図-2 異なるo-CBa濃度における120-17株の増殖

●: 0.5 (g/L) ▲: 1.0 (g/L)

3 結果および考察

3-1 o-CBa分解菌の集積培養および単離

上記の手順に従って約300の菌株を得た。そして各菌株に対してo-CBaを唯一の炭素およびエネルギー源とする培地における増殖能を試験した結果、高い増殖能を有するo-CBa分解菌が1株得られた。この菌株を120-17株と命名した。

3-2 120-17株のo-CBaによる増殖

図-1に0.5g/lのo-CBaを唯一の炭素およびエネルギー源とする培地における120-17株の増殖(培地の波長600nmにおける吸光度で示す)と培地中のo-CBaの残存率および塩素イオンの増加率(添加したo-CBaがすべて分解した際に遊離する塩素イオン濃度を100%とする)を示す。120-17株は約10時間の誘導期の後に増殖を開始し、30時間後には増殖を停止した。また、培地中のo-CBaは菌体の増殖につれて減少し30時間後には約96%が消失した。そして、その際消失したo-CBa量に相当する塩素イオンの増加が認められた。

120-17株の増殖に与えるo-CBa濃度の影響について検討した結果を図-2に示す。o-CBa濃度が1g/lの場合は、0.5g/lの場合と比較して誘導期が延びたが増殖可能であり、菌体濃度は2倍になった。2g/l以上では、培養を始めてから3日間は増殖が認められなかった。

3-3 120-17株の各種有機塩素化合物および芳香族化合物に対する資化性

表-1に120-17株の各種有機塩素化合物および芳香族化合物に対する資化性に関する検査結果を示す。120-17株はo-CBaの他にm-CBa, オルト-フルオロ安息香酸(o-FBa), フェノール, サリチル酸および安息香酸を唯一の炭素およびエネルギー源として増殖した。

一方、クロロフェノール類およびパラ-クロロ安息香酸等に対しては資化性を示さなかった。

表-1 各種の基質に対する120-17株の増殖

基 質	増 殖
o-クロロ安息香酸	++
m-クロロ安息香酸	+
p-クロロ安息香酸	-
o-フルオロ安息香酸	+
o-ブロモ安息香酸	-
o-クロロフェノール	-
m-クロロフェノール	-
p-クロロフェノール	-
フェノール	++
サリチル酸	+
安息香酸	+++

+++顕著な増殖 ++普通の増殖
+微弱な増殖 -増殖不能

表-2 120-17株休止菌体による諸種の芳香族化合物に対する酸素消費(nmol-O₂/mg-cell protein/min)

基 質	酸素消費
o-クロロ安息香酸	59
m-クロロ安息香酸	10
p-クロロ安息香酸	ND*
o-フルオロ安息香酸	99
o-ブロモ安息香酸	15
o-クロロフェノール	ND
m-クロロフェノール	ND
p-クロロフェノール	ND
フェノール	ND
サリチル酸	ND
安息香酸	164
カテコール	2135
モノクロロ酢酸	ND

*ND:検出限界以下

3-4 120-17株の休止菌体による各種有機塩素化合物および芳香族化合物に対する酸素消費量

表-2に示す様にo-CBaに増殖した120-17株の休止菌体は、o-CBaの他にm-CBa、o-FBa、オルトブロモ安息香酸および安息香酸に対して酸素消費が認められた。また、表-3に示す様に安息香酸に増殖した休止菌体もo-CBaに対して酸素消費を示した。しかし、コハク酸に増殖した菌体はo-CBaに対して酸素消費を示さなかった。このことから、120-17株のo-CBa酸化酵素は誘導酵素であることがわかる。

3-5 120-17株粗酵素液によるカテコール酸化酵素活性

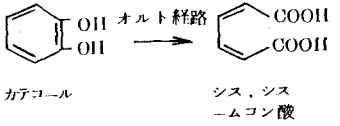
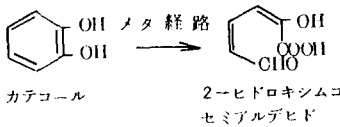
表-4に酵素活性の測定結果を示した。o-CBaに増殖した120-17株はCatechol-1,2-oxygenase活性を示し、Catechol-2,3-oxygenase活性は示さなかった。すなわち、120-17株はカテコールをオルト開裂経路で分解した。この結果から、o-CBaの分解もオルト開裂経路を経ている可能性が高いと考えられる。

表-3 各種の基質に増殖した120-17株休止菌体による酸素消費量(nmol-O₂/mg-protein/min)

分析基質	増 殖 基 質		
	o-クロロ安息香酸	安息香酸	コハク酸
o-クロロ安息香酸	59	105	ND*
o-フルオロ安息香酸	97	143	ND
安息香酸	162	646	ND

*ND:検出限界以下

表-4 カテコール環開裂と120-17株のカテコール酸化酵素活性

環 開 裂 経 路		酵素活性
 カテコール → シス、シス-ムコン酸		+
 カテコール → 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド		-

+: 酵素活性有り - : 酵素活性なし

本研究は建設省大型プロジェクト“バイオフォーカスWT”の一環として、土木研究所との共同研究として行われた。