

抗菌性薬剤トリクロサン分解菌の探索

日大生産工 (院) ○齋藤 さや
日大生産工 坂本 恵一, 神野 英毅, 小森谷 友絵

1. 緒言

トリクロサン(5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol) は Fig. 1 のような構造を持つ非イオン性の無色透明な化学物質である。トリクロサンはグラム陰性および陽性菌に対して抗菌性があり、歯磨き粉や薬用石鹸などのパーソナルケア製品に多く用いられている。生活排水中のトリクロサンは廃水処理により 94～95%が分解除去されているが、9 ng/L 程度で検出されると報告されている¹⁾。トリクロサンは魚類の心筋や筋肉を収縮させる作用があり、環境ホルモンとして問題視されている。

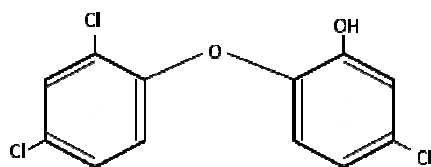


Fig. 1 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

本研究は微生物による除去を目的とし、トリクロサン非感受性菌の単離、同定を行った。

2. 実験手順

2.1 トリクロサン耐性菌の集積培養および菌の単離

トリクロサン非感受性菌を集積培養すべく、廃水施設や一般環境中(新川、千葉用水総合管理所、千葉県八千代市八千代台北子供の森公園)から水サンプルおよび土壌サンプルを採集した。このサンプルをPAS培地(Table 3)に入れ、30 °C, 200 rpmで一週間培養した。その後、培養液100 μLをPAS寒天培地に撒いた。その後得られたコロニーをPAS寒天培地に単離した。

Table 1 Composition of PA solution

Components	Volume
K ₂ HPO ₄	28.4 g
KH ₂ PO ₄	11.0 g
NH ₄ Cl	18.8 g
Triclosan	0.005 g
Distilled water	500 mL

Table 2 Composition of S solution

Components	Volume
MgSO ₄	9.75 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2.50 g
FeSO ₄ ·H ₂ O	0.50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15 g
L-ascorbic acid	0.50 g
Distilled water	500 mL

Table 3 Composition of PAS culture medium

Components	Volume
PA solution	3.875 mL
S solution	0.50 mL
Sterile distilled water	45.5 mL

2.2 菌の同定

100 μL の滅菌水に単離した菌を分散させ、100 °C で 10 分間加熱した。その後、遠心分離 (13200rpm, 15min) し、得られた上清を Template DNA とした。PCR 反応溶液は 2×PCR buffer for KOD FX・2 mM dNTPs・

Isolation of Triclosan Degrading Bacteria for Wastewater Treatment

Saya SAITO, Keiichi SAKAMOTO, Hideki KOHNO and Tomoe KOMORIYA

Primer F・Primer R・TemplateDNA・KOD FX Neo (TOYOBO) を用いてトータル 50 μ L となるように調整した。なお、PCR のターゲット部位は 18S rDNA および 16S rDNA とし、プライマーは 18S rDNA は ITS 1F と ITS 1R を、16S rDNA は 27F と 1429R を用いた⁴⁾。PCR の温度の条件は、94 $^{\circ}$ C で 120 秒 1 セット・94 $^{\circ}$ C で 15 秒、65 $^{\circ}$ C で 30 秒、68 $^{\circ}$ C で 60 秒を 35 セット・68 $^{\circ}$ C で 420 秒 1 セットを行った。得られた PCR 産物を 1.5 % アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、バンドが一本になっていることを確認し、Wizard® SV and PCR Clean-UP System (Promega) を用いて精製した。その後 PCR 産物を鋳型とし、Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いてシーケンス反応を行った。

3. 結果および考察

3.1 トリクロサン分解菌の集積培養および菌の単離

PAS 培地にて、各サンプル中に存在するトリクロサン非感受性菌を集積培養した結果、新川および千葉用水総合管理所にはトリクロサン非感受性菌が得られなかった。子供の森公園から採集した土壌サンプルからは 10 種類の微生物が得られた。PAS 培地は貧栄養状態かつトリクロサンを唯一の炭素源としているため、得られた微生物はトリクロサン非感受性菌であることが考えられる。

3.2 菌の同定

一般に、トリクロサンは糸状真菌類に対しては活性が低いことが知られている。そこで本研究では 18S rDNA を目的部位として PCR を行った。得られた PCR 産物を 1.5% - アガロースゲルを用いて電気泳動した。結果、目的部とする 400~500 bp に単一バンドが検出されなかった(Fig.2)。そこで、ターゲット部位を 16S rDNA に変更し PCR 増幅をした。結果目的部位である 1500 bp 付近にバンドが検出された (F i g . 3) 。

これにより No. 4, 5, 10 の微生物は Bacteria であることが分かる。また DNA シーケンス解析をした結果、No. 5, 7 の菌は *Burkholderia* 属の菌であることが分かった。

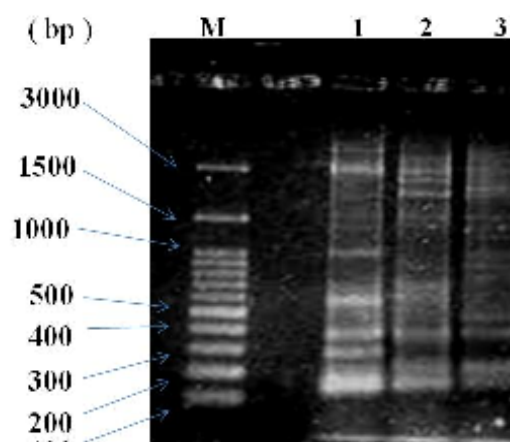


Fig. 2 18S rDNA 電気泳動結果

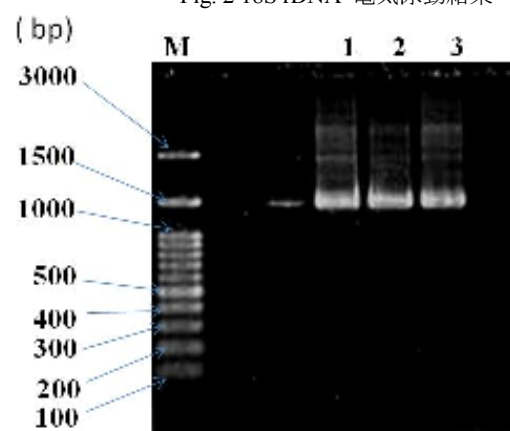


Fig. 3 16S rDNA 電気泳動結果

M : マーカール Lane 1 : No. 4 の菌
Lane 2 : No. 5 の菌 Lane 3 : No. 10 の菌

Burkholderia 属はグラム陰性菌である。中でも *Burkholderia cepacia* は病原性は低いが免疫力が低下した人に日和見感染を引き起こすほか、多剤耐性化しやすく、多くの抗菌剤に対して耐性があることが知られている。よって、この菌はトリクロサン分解能を持つことが期待される。

5. 参考文献

- 1) 環境省, 化学物質の環境リスク評価第 7 巻, 2009
- 2) C.M. Foran *et al.*, Marine Environmental Research, 50, 153-156, 2000
- 3) Margaretha *et al.*, Chemosphere, 46, 1485-1489, 2002
- 4) 厚生労働省, 第十五改正日本薬局方, 1580, 2008