

グラム陰性桿菌によるトリクロサンの生分解

日大生産工 (院) ○齋藤 さや

日大生産工 小森谷 友絵, 吉野 悟, 坂本 恵一

1. 緒言

トリクロサン(5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol: 以下 TCS) 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. TCS 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広く用いられている. 生活排水中の TCS は廃水处理により 94~95% が分解除去されているが, 河川中に 9 ng/L 残存している. TCS は優れた抗菌剤であるが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.

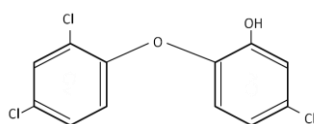


Fig. 1 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

TCSの危険性は2000年にForanらによって指摘されて以来注目を集めており¹⁾, 日本では化学物質審査規制法第三種監視化学物質に指定されている. また, 2002年にはMargarethaらにより人体母乳からTCSが検出されたことが報告されている²⁾.

TCSの生分解性に関しては, 白色腐朽菌由来の酵素による分解除去法³⁾や土壌細菌による分解除去法⁴⁾が研究されている. また, 有酸素状態における活性汚泥法ではTCSがメチル化され, methyl-triclosanを生成することが報告されている. methyl-triclosanは日光により分解され, ダイオキシンを生成することが知られている⁵⁾.

本研究ではTCSをメチル化することなく分解する菌を新規に発見することを目的とした.

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, 千葉県成東市古川医院付近用水路)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 (10 ppmのTCSを唯一の炭素源として含む貧栄養培地) に入れ, 37 °C 200 rpmで一週間培養した. その後, 培養液100 µLをPAS寒天培地塗布し, 得られたコロニーを釣菌しPAS寒天培地に単離した.

2.2 菌の同定

16S rDNAのV5領域をターゲットとしてPCRを行った. なお使用プライマーは27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3')と1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'), アニリング温度は65 °Cとした. ゲル電気泳動により目的部位の増幅を確認後, シークエンス解析により菌を同定した.

2.3 菌による TCS 生分解

単離した菌を PAS 培地を用いて 37 °C, 200 rpm で 120 時間培養した. 菌を PAS 培地に加えた時間を 0 hour とし, 24 時間ごとに培養液 1.5 mL を採取した. これを遠心分離し得られた上澄み液 1.0 mL をバイアルに移しサンプルとした. サンプルは Compact LC 1120 (Agilent Technologies)を用いて TCS 濃度を測定した. なおカラムは ODS 100Z, カラムオーブン(Shimadzu GTO-6A)は 30 °C に設定し, 60%-アセトニトリル(0.1% -TAF)水溶液を移動相として流速 1.0 mL/min で 25 分間測定した. なお, 検出器は UV(Agilent Technologies 1200 Series)を用い, 測定波長は 214 nm とした.

Biodegradation of Triclosan by Gram-Negative Bacillus

Saya SAITO, Tomoe KOMORIYA, Satoru YOSHINO and Keiichi SAKAMOTO

2.4 菌体の TCS 吸着量測定

採取した PAS 培地を遠心分離した後、得られた沈殿に 1.5 mL のメタノールを加えボルテックスミキサーで混合した。その後、再度遠心分離し、上澄み中に含まれる TCS(Adsorbed TCS)として HPCL で測定した。

3. 結果および考察

3.1 TCS 耐性菌の集積培養および菌の同定

水サンプルおよび土壌サンプルを PAS 培地で一週間培養したのち、培養液 100 μ L を PAS 寒天培地に塗布した結果、5 種類の形態の異なるコロニーが得られた。これらの菌の 16S rDNA を遺伝子解析した結果 1 種類が *Burkholderia* 属、2 種類が *Achromobacter* 属、1 種類の菌が *Stenotrophomonas* 属であることが分かった。*Burkholderia* 属、*Achromobacter* 属、および *Stenotrophomonas* 属はブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌または呼ばれ、薬剤耐性化しやすいことが知られている。

3.2 培地中の TCS 濃度測定

得られた菌を PAS 培地に加え、24 時間ごとに培地中の TCS 濃度を測定した(Fig. 2)。その結果 *Burkholderia* 2、*Achromobacter* 1、*Achromobacter* 2 および *Stenotrophomonas* は 0 hour~24 hour で TCS 濃度が減少傾向を見せた。このことにより、これらの菌が水質浄化に有用であることが分かる。

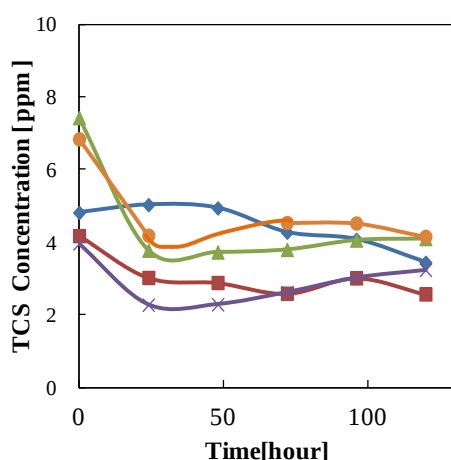


Fig. 2 Time course of TCS concentration

— *Burkholderia* 1 — *Burkholderia* 2
— *Acromobacter* 1 — *Acromobacter* 2
— *Stenotrophomonas*

また、0 hour のサンプルから検出された TCS は 4~7 ppm であった。このことから TCS が菌に吸着したことが考えられる。そこで 0 hour に採取された菌体にメタノールを加え、菌体に吸着した TCS を抽出した(Fig. 3)。Adsorbed TCS および比較として菌を入れる前の PAS 培地、0 hour の TCS 濃度を HPLC で測定し、比較した(Fig.3)。この結果 *Burkholderia* 1 からは約 6 ppm、*Acromobacter* 1 からは約 2 ppm の TCS が検出された。TCS は菌体に吸着することがわかった。

4. 結言

今回単離した *Burkholderia* 2、*Achromobacter* 1、*Achromobacter* 2 および *Stenotrophomonas* は TCS を吸着し、さらに TCS を吸収することがわかった。

5. 参考文献

- 1) Foran *et al.*, Marine Environmental Research 50 (2000) 153-156,
- 2) Margaretha *et al.*, 46(2002)1485-1489
- 3) Hubert Cabana *et al.*, Chemospher 67 (2007) 770-778
- 4) Allegheny College *et al.*, FEMS Microbiology Letter 204 (2001) 45-48
- 5) Xijuan Chan *et al.*, Chemosphere 84 (2011) 452-456

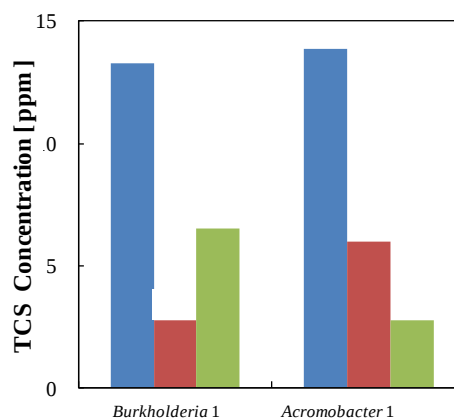


Fig. 3 Adsorption of TCS on bacteria

■ PAS Medium ■ 0 hour ■ Adsorbed TCS