多環芳香族炭化水素の微生物処理

峯木 茂¹⁾, 杉田 和俊²⁾, 後藤 純雄³⁾,
渡辺 征夫³⁾, 溝口 次夫³⁾,
石井 忠浩⁴⁾, 飯田 貢¹⁾

¹⁾東京理科大学理工学部応用生物科学科 (〒278 野田市山崎2641)

²⁾(財)日本品質保証機構 (〒140 品川区東大井1-8-12)

³⁾国立公衆衛生院 (〒108 港区白金台4-6-1)

⁴⁾東京理科大学理学部応用化学科 (〒162 新宿区神楽坂1-3)

[平成 6 年 8 月 8 日受理]

Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Shigeru MINEKI¹⁾, Kazutoshi SUGITA²⁾, Sumio GOTO³⁾, Ikuo WATANABE³⁾
Tsuguo MIZOGUCHI³⁾, Tadahiro ISHII⁴⁾ and Mitsugi IIDA¹⁾

¹⁾Department of Applied Biological Science, Science University of Tokyo (2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278)

²⁾Japan Quality Assurance Organization (1-8-12 Higashi-ohi, Shinagawa-ku, Tokyo 140)

³⁾National Institute of Public Health (4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108)

⁴⁾Department of Applied Chemistry, Science University of Tokyo (1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

[Received August, 8, 1994]

Summary

Strain H2-5, a gram positive and rod bacterium which was capable of degrading pyrene, was isolated from soil. The bacterium was positive for acid-fast staining. The optimum growth temperature was 34.3°C, and the upper limit temperature for the growth was around 45°C. At low concentration (1.3 $\mu\text{g/ml}$) of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), H2-5 cells (45 μg dry weight/ml) grown on TSB degraded 90% of pyrene in 12 hr, and degraded 60% of Benzo (a) pyrene (BaP), 25% of Benz (a) anthracene (BaA), and 8% of Benzo (ghi) perylene (BghiP) in 3 days. At high concentration (26.7 $\mu\text{g/ml}$) of PAHs, H2-5 cells (226 μg dry weight/ml) grown on TSB degraded more than 80% of pyrene and BaP, 40% of BaA, and 30% of BghiP in 11 days. Mixture of cells (5.4 μg dry weight/ml) grown on pyrene-enriched culture, from which H2-5 was isolated, degraded pyrene more rapidly at early reaction stage, but less effectively at later stage, than the isolated H2-5 (226 μg dry weight/ml) grown on TSB, and both degraded 90% of pyrene in 11 days.

Key words: Pyrene-assimilating bacterium, Benzo (a) pyrene degradation, Benz (a) anthracene, Benzo (ghi) perylene, Polycyclic aromatic hydrocarbons,

1. はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、マイコトキシン、ニトロソアミンなどと並んで重要な環境発癌関連物質群を構成しており、化石燃料など各種有機物の不完全燃焼から容易に生成するため環境中に広く分布し、エネルギー消費の拡大に伴ってその環境濃度が増加していると考えられる。この不完全燃焼から生成した PAH 類は大気中へ放出され、それらを含む大気浮遊粉塵の多くは地表に落下して土壤を汚染している¹⁻²⁾。従って、汚染箇所の修復・改善 (remediation) は環境発癌対策上極めて重要である。

微生物による PAH の分解に関しては、ここ数年飛躍的に研究成果が蓄積しているが、それらは主にナフタレン、ビフェニール、アントラセン、およびフェナントレンに関してであって、4 環以上の芳香環を含む PAH の微生物分解に関する研究は極めて不十分である。即ち、ビレンを資化する細菌としては、Heitkamp ら³⁾や Boldrin ら⁴⁾の *Mycobacterium* sp. や、Walter ら⁵⁾の *Rhodococcus* sp. などの報告があるだけであり、また、ベンゾ(a)ビレンの酸化分解に関しては Gibson ら⁶⁾の *Beijerinckia* sp. や、Bumpus ら⁷⁾の *Phanerochaete chrysosporium* などの報告があるにすぎない。

本研究は、環境発癌関連物質の環境中での挙動および処理対策に関する研究の一環として、土壤からビレンを資化する微生物を分離し、その生育条件や各種 PAH 類の分解性を検討したものである。

2. 方法

2. 1 使用培地

無機液体培地：Kiyohara ら⁸⁾の培地を参考として、0.1% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% KH_2PO_4 、0.15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% NH_4Cl 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% NaCl 、0.0015% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.001% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH7.0 に調製した。

TSB 液体培地：Tryptic Soy Broth (Difco) 30g を蒸留水 1l に溶解して調製した。

平板 (寒天) 培地：それぞれの培地に寒天を 1.5% 加えた。

ビレン塗布培地：ビレンを *n*-ヘキサン / アセトン = 1 : 1⁹⁾ に溶解し (20mg/ml)、その 0.5ml を無機平板培地に塗布後、30℃ のふ卵器に一晩入れて有機溶媒を蒸発させてから使用した。

2. 2 微生物の分離

土壌試料 1g を滅菌水 9ml に加え、十分攪拌後希釈し、上澄み 0.1ml を無機液体培地 10ml とビレン (0.4mg を N,N-ジメチルホルムアミド (DMFA) 0.02ml に溶解し

て添加) の入った L 字試験管 (φ18mm × 120mm) に添加して 30℃、100rpm でインキュベートした。活性は、365nm の紫外線下のビレンの蛍光が消失することを指標に検出した。活性の見られた培養液はさらに 2 回ビレンで集積培養をくりかえした後、培養液を適宜希釈し、その 0.1ml をビレン塗布培地に広げて 30℃ で培養した。ビレンを溶かしてクリアゾーンを作るコロニーを滅菌水に懸濁し、同様な操作を繰り返し、さらに TSB 平板培地を用いて単一コロニーを得た。

2. 3 微生物の培養

得られた単一コロニー (H2-5 株) を TSB 液体培地 10ml の入った L 字試験管で前培養し (30℃, 100rpm), 0.2ml を植え継いで同条件下に本培養を行い、生育が定常期 (5 days) になったところで集菌・洗浄し (9,000 × g), 以下の実験に供した。また、集積培養菌 (H2-5 株分離以前の混合菌: H2 菌) を無機液体培地にて、ビレン (1.0mg / 0.05ml DMFA) を添加して培養し、定常期 (10days) で集菌・洗浄して用いた。なお、生育測定は 660nm の吸光度を測定することによって行った。

2. 4 微生物による PAH の処理

4 本の L 字試験管にそれぞれ 15ml の無機液体培地を入れ、ビレン、ベンツ (a) アントラセン (BaA)、ベンゾ(a)ピレン (BaP)、およびベンゾ(ghi)ペリレン (BghiP) の各 DMFA 溶液を別々に一定量添加した。2. 3 で得た菌体を一定量の無機液体培地に懸濁し、それぞれに 0.3ml 加え、30℃, 70rpm で振盪した。経時的に、0.5ml を試料バイアルに抜き取り、PAH 分析まで -20℃ で保存した。なお、加えた菌体量は洗浄後の菌体を 100℃ で 12 時間乾燥し、乾燥菌体重量として表した。

2. 5 PAH 濃度の測定

処理後の保存試料 (それぞれ別々の PAH を含む) から 0.05ml を採取し、アセトニトリルで 10^2 - 10^3 倍に希釈し、日立 850 型分光蛍光光度計を用いて各 PAH の最適励起波長および蛍光波長 (ビレン: Ex. 339nm, Em. 373nm; BaA: 292nm, 412nm; BaP: 370nm, 406nm; BghiP: 370nm, 406nm) を選んで蛍光光度を測定し、PAH 添加直後からの相対濃度を求めた。

3. 結果・考察

3. 1 ビレン資化性微生物の分離

1993 年 7 月に都内および野田市の土壌約 20 試料をサンプリングしてビレン分解活性を検索した結果、東京都港区白金台 (国立公衆衛生院近辺) の土壌の一つに比較的高活性の高い試料を見いだした。本試料から上記の方法により単一コロニーを取得し、これを分離菌 H2-5 株とし

た。H2-5株はピレン添加時の量の溶媒 (DMFA) だけではほとんど生育せず、ピレンを唯一の炭素源として生育できるピレン資化性菌と考えられる。H2-5株の位相差顕微鏡写真を Fig. 1に、また、ピレン塗布培地での本菌株によるクリアゾーンの形成を Fig. 2に示した。

Fig. 1 Phase-contrast photomicrograph of H2-5. H2-5 was cultivated on mineral salts agar medium with pyrene at 30°C for 2 weeks. Bar in the figure shows 10 μ m.

Fig. 2 Utilization of pyrene by H2-5 on mineral salts agar plate. After the plate was coated a solution of pyrene, H2-5 was inoculated and then incubated for 3 weeks.

3. 2 H2-5株の性質

本菌株はグラム陽性桿菌で、抗酸性染色陽性であり、いわゆる acid-fast bacteria であった。TSB 寒天培地で黄色の小コロニーを形成し、植菌後新たなコロニーの確認には30°Cで4-5日を要した。ピレン塗布培地では1週間が必要であった。ピレン資化性菌として報告のある Heitkamp ら³⁾の *Mycobacterium* sp. はその資化に少量のペプトン、酵母エキス、および糖を必要とするので本菌株とは異なっている。一方、Boldrin ら⁴⁾の *Mycobacterium* sp. strain BB1 や、Walter ら⁵⁾の *Rhodococcus* sp. UW1は

ピレンを唯一の炭素源として資化するので本菌株と類似している。

3. 3 H2-5株の生育に及ぼす温度の影響

H2-5株をTSB培地で振盪温度勾配培養装置 (アドバンテック東洋 TN-3型, L字試験管 (φ16mm×180mm) 培養) を用い、種々の温度 (16.7-61.7°C, 30rpm) で7日間培養して生育に対する温度の影響を検討した。得られた結果のうち、代表的な生育曲線を Fig. 3に示したが、最適温度は34.3°Cであり5日で定常期に達した。低温側の16.7°Cでは、非常に速度は遅いが菌の生育がみられた。一方、高温側の41.1°Cでは、菌は植菌後わずかに生育したのち減少したが、46.6°C以上では植菌後減少するのみであった。

Fig. 3 Growth of H2-5 on TSB at various temperatures. H2-5 was cultivated in L-shaped test tube with 30 rpm on a temperature gradient incubator.

3. 4 H2-5株による低濃度 PAH の分解

Fig. 4は分離菌H2-5株をTSB液体培地で培養後、菌体濃度45 μ g/mlで各種PAH (1.3 μ g/ml培地) を分解させたときの経時変化を残存率で表したものである。ピレンは速やかに分解された (12hrで約90%) が、BaPは3日で約60%の分解であった。また、BaAとBgHiPは3日でそれぞれ約25%と約8%分解されたのみであり、H2-5株はBaPを比較的分解しやすく、BaAおよびBgHiPは分解しにくいことが分かった。これは本菌がピレン資化性菌であり、BaPが他の2種のPAHに比べて、構造上ピレンに類似しているためと思われ、H2-5株のPAH分解酵素 (酸化酵素など) の基質特異性を反映しているものと考えられる。

3. 5 H2-5株による高濃度 PAH の分解

H2-5株は高濃度 (200 $\mu\text{g/ml}$ 培地) のピレンにも生育するので、他の PAH に対してもかなり高濃度でも分解すると考えられた。そこで、PAH (26.7 $\mu\text{g/ml}$ 培地) を菌体濃度 226 $\mu\text{g/ml}$ で分解を行った。結果を Fig. 5 に

示したが、基質の添加量が多く、基質が多量に析出したため反応初期はデータの振れがみられた。ピレンの場合、その後徐々に分解され、反応 11 日目で 80% 以上が分解された。その他の PAH も反応 2 日目までは良好に分解され、BaP は 11 日目にはピレンと同様に 80% 以上が分解さ

Fig. 4 Rate of degradation of four PAHs by H2-5 grown on TSB. After each PAH was added to the mineral medium at the concentration of 1.3 $\mu\text{g/ml}$, H2-5 cells (45 μg dry weight/ml) were inoculated and then incubated at 30°C for 4 days.

Fig. 5 Degradation of high concentration of PAHs by H2-5 grown on TSB. After each PAH was added to the mineral medium at the concentration of 26.7 $\mu\text{g/ml}$, H2-5 cells (226 μg dry weight/ml) were inoculated and then incubated at 30°C for 11 days.

れた。しかし、BaA に対してはその後の速度が急激に低下し、約40%の分解となり、また、BghiP に対しては2日目以後の伸びは見られず約30%の分解に留まった。3. 4項で得られた結果と傾向は似ているが、多量に析出した基質と菌との接触、吸着の問題や、基質濃度が高く反応時間も長いために起こるであろう菌の増殖の問題などが異なると考えられるので、これらの結果を単純には比較できない。

3. 6 H2菌によるピレンの分解

活性汚泥による有機物の分解にみられるように、直接分解に与る菌以外の共存菌・混在菌がその作用を助けたり、妨害したりすることがある。また、H2-5株による環境修復 (bioremediation) を考えた場合、フィールドでの混在菌の作用の問題が生じるが、それを考える上での一つのモデルとして、ピレン-無機液体培地で集積培養したH2-5株分離前の混合菌であるH2菌 (菌体濃度 $5.4 \mu\text{g/ml}$) を用いてピレンの分解を行い、H2-5株で得られた結果 (3. 5項) と比較した。Fig. 6に示したように、反応初期の分解は菌体濃度がかなり低いにもかかわらずH2-5株よりも速かった。その後は徐々に速度が鈍り、11日目ではH2-5株と同様の分解率を示すに留まった。また、後期の分解速度は、むしろ純粋分離されたH2-5株の方が高くなった。このような高濃度の系では分解に長時間を要するため、H2-5株の活性の誘導が生じ、反

応後期で同様な分解率を示したということも考えられる。H2菌はピレンで培養されたため、反応初期は分解活性が誘導強化されていたと考えられるが、反応後期の分解速度低下とともに今後の検討が必要である。

要 約

土壌よりピレンを資化するグラム陽性桿菌H2-5株を単離し、土壌中にPAH類を分解する微生物が存在する事を示した。本菌は抗酸性染色陽性で、生育の最適温度は 34.3°C 、上限温度は 45°C 付近であった。TSB培地で生育したH2-5株は菌体 (乾燥重量) 濃度 $45 \mu\text{g/ml}$ で低濃度 ($1.3 \mu\text{g/ml}$) のピレンを12時間の処理で90%分解し、同濃度のBaP, BaA, およびBghiPを3日間の処理で、それぞれ60%, 25%, および8%分解した。また、高濃度 ($26.7 \mu\text{g/ml}$) のPAHでは、TSB培地で生育したH2-5株は菌体濃度 $226 \mu\text{g/ml}$ でピレンを11日の処理で80%以上分解し、BaP, BaA, およびBghiPを同様の処理で、それぞれ80%以上, 40%, および30%分解した。ピレン-無機液体培地で生育した、混在菌を含むH2菌 (菌体濃度 $5.4 \mu\text{g/ml}$) による高濃度のピレンの処理では、上記TSB培地で生育したH2-5株に比べ、初期の分解速度は高かったが、後期では遅くなり、11日目の分解率に差はみられなかった。

文 献

- 1) 松下秀鶴, 加藤幸彦, 久松由東: 大気汚染学会誌, **15**, 348-352 (1980)
- 2) 西村哲治, 後藤純雄, 加藤幸彦, 奥貫正美, 松下秀鶴: 大気汚染学会誌, **19**, 228-238 (1984)
- 3) Heitkamp, M. A., Franklin, W., and Cerniglia, C. E.: Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2549-2555 (1988)
- 4) Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C.: Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1927-1930 (1993)
- 5) Walter, U., Beyer, M., Klein, J., and Rehm, H. J.: Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 671-676 (1991)
- 6) Gibson, D. T., Mahadevan, V., Jerina, D. M., Yagi, H., and Yeh, H. J. C.: Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, **189**, 295-297 (1975)
- 7) Bunpus, J. A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S. D.: Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, **228**, 1434-1436 (1985)

Fig. 6 Degradation of high concentration of pyrene by H2 grown on pyrene and H2-5 grown on TSB. After pyrene ($26.7 \mu\text{g/ml}$) was added to the mineral medium, H2 cells ($5.4 \mu\text{g dry weight/ml}$) or H2-5 cells ($226 \mu\text{g dry weight/ml}$) were inoculated and then incubated at 30°C for 11 days.

- 8) Kiyohara, H., Nagao, K., and Yano, K.: Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 454-457 (1982)
- 9) Heitkamp, M. A. and Cerniglia, C. E.: Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1612-1614 (1988)