

4種のPCB分解菌によるPCB異性体分解の特徴とジベンゾフランの分解

惣田 昱夫, 古市 徹*, 石井 一英*, 中宮 邦近*
(環境工学部, *北海道大学大学院工学研究科)

Original

The characteristics of degradation of PCB by 4 strains and their degradation of dibenzofurans

Ikuo SOUTA, Tohru FURUICHI*, Kazuei ISHII*, Kunitika NAKAMIYA*
(Environmental Engineering Division, *Graduate School of Engineering, Hokkaido University)

Summary

Important factors for purifying incinerated ash and polluted soil, which contain high concentrations of dioxins due to bioremediation technology, are the properties and abilities of the dioxin-degrading microorganism. Therefore, the degradation characteristics of isomers of Kanechlor 400 (KC-400) that mainly contained congener of 4 strains of PCB degrading bacteria were examined. The decomposition of dibenzofuran (DBF) was also examined.

All 4 strains degraded the dichloride and trichloride biphenyl of KC-400 to around 70-90%. Tetrachloride and hexachloride were degraded to between 40 and 70%. SN-4997 and SN-49910 strains could degrade 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl (coplanar-PCB), which was very toxic and DBF (10ppm). These findings demonstrate that SN-4997 and SN-49910 had the same derivative ability as *A. eutrophus* H850, which is a well-known PCB degradation bacterium; therefore they would be useful to degrade dioxins and dibenzofurans in polluted soils.

Key words : PCB degrading microorganism, PCB (polychlorinated biphenyl), Degradation characteristics of isomers of Kanechlor 400, Dibenzofuran

1. はじめに

微生物を用いた広域的有害化学物質汚染の修復技術として期待されている技術にバイオレメディエーション (Bioremediation) がある。この技術は、処理費用が安価であること、比較的安全であることから将来の処理技術として注目を集めている。この技術を、環境化学物質の汚染、特にダイオキシン等難分解性有機塩素系化学物質の分解除去に適用するためには、その汚染化学物質がより毒性の低い代謝物に分解されることが必要条件となる。そのためには分解菌の持つ分解能力だけでなく、化学物質の構造の違いによる分解特性、分解代謝物の種類が問題となる。また汚染土壌における他の多くの菌類との共生作用に関する基礎的データが必要となる。

そこで、本実験では、バイオレメディエーション技術を用いて Polychlorinated biphenyl (PCB) 及びダイオキシン類の汚染土壌を浄化するための基礎的データの中で、構造と分解特性を調べるため、4種類のPCB分解菌¹⁾による各種異性体が含有

されるKC-400を用いて、その分解能や分解に関する特徴を調べた。PCBには209の異性体がありKC-400には92の異性体が含有されている²⁾。この中にはダイオキシン類似の毒性を持つ代表的コプラナPCB(Co-PCB)である3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl (3,4,3',4'-TCB)も含まれている。また、それらの菌株が毒性の強いダイオキシン類を分解する可能性を調べるため、ダイオキシン類の骨格を持ったジベンゾフラン(DBF)を使用して分解試験を行った。DBFの性状や毒性等については表1に示した³⁾。

2. 実験材料及び実験方法

2. 1 使用分解菌及び化学物質の選定

使用した菌株は、PCB分解菌として分離した11菌株のうちから選んだ4菌株¹⁾(菌種属等については表2に示した)を用いた。また、実験に使用したKC-400は鐘淵化学(株)製、DBFは(財)廃棄物研究財団から購入した。PCB異性体の同定及び定量用の標準試薬は環境ホルモン分析用BP-WD(Wellington Laboratories)を用いた。

表1 ジベンゾフランの性状

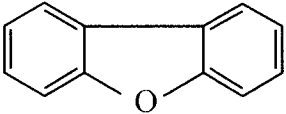
構造	
分子量	168.19
性状	比重 1.0886(20℃) 融点 83～84℃ 沸点 287～288℃
可溶性	水に不溶、多くの有機溶媒に可溶
用途	染料中間体、殺菌剤、有機薬品などの合成原料
毒性	LD ₅₀ (トリ (アカツムギ)、経口) 102mg/kg 以上
分解性	悪い (×)

表2 使用した菌株の種類と特徴

菌株名	種類	有機溶媒特性 (LogPOW)
SN-4997	<i>Pseudomonas putida</i>	3.0
SN-4998	<i>P. pseudomallei</i>	2.4
SN-49910	<i>Proteus</i> sp.	3.9
SN-49911	<i>Aeromonas</i> sp.	3.9

2. 2 菌の培養条件

4 菌株を 50ml の培養フラスコに 25ml の LB 培地に入れ、25℃、96 時間培養した。

2. 3 PCB分解試験

生育させた 4 種類の菌を生理食塩水で洗浄後 10000rpm、10min で遠心させ沈殿した菌体を 25ml の PAS 培地²⁾ の入った 50ml の培養フラスコに入れ、KC-400 および DBF を最終濃度が 10ppm となるよう調整し、25℃、72 時間 100rpm で振とう培養した。培養後、10000rpm、10 分間遠心分離し、上清液と沈殿物に分離した。上清液は等量の n-ヘキサンを分液ロートに入れ、5 分間振とうさせ静置した後、n-ヘキサン層を分離、回収した (3 回繰り返した)。また沈殿物は純水を 10ml 入れた後超音波で破碎した。この破碎菌体に硫酸と硝酸を適量入れ溶解させた。この試料に 10ml の n-ヘキサンを加え、5 分間振とうさせた。静置後 n-ヘキサン層を抽出した (3 回繰り返した)。両抽出液を合量した後、エバポレーターで濃縮し 1ml に定容した。前記と同条件で回収率試験も行った。

2. 4 分析条件

DB-1 (30m、0.25um J&W Science Co.) 付き GC-16A ECD-GC (島津製) を用いて PCB の定量を行った。カラム温度は 200℃、試料はスプリットレスで注入した。PCB の異性体の同定には HP-5400GC/MS (H.P 製) を用いた。分析条件は前報¹⁾ のとおり行った。DBF の定量は FID-GC を用いた。試料はスプリットレスで注入した。カラム昇温条件は 40℃で 2 分間保持後、10℃/min で 200℃とした。

3 結果及び考察

3. 1 PCB異性体の分解

KC-400 の各異性体の同定結果及び 4 菌株による分解率を表 3 に、分解時のクロマトグラムを図 1 に示した。各異性体の同定は標準試料及び文献¹⁰⁾ により行った。本試験の回収率は 87~92% の範囲であった。KC-400 の分解率は SN-4997、SN-49911、SN-49910 の 3 菌株がそれぞれ 61.4%、60.9%、58.4%、SN-4998 は 41.3% であった。SN-4998 株の分解率は他に比べ低かった。

各菌株の KC-400 中の各異性体間の分解能を調べた。SN-49910 を除いた SN-4998 を除く 3 菌株は 2~3 塩素数を持つピーク 6 までの分解率が 80% 以上と高かった。特に SN-4997 は塩素数 2~4 を含むピーク 15 まで 80% 以上の高分解率であった。ピーク 16 以降では分解率は 0~50% の分解率となったが、同じ 4 塩化物、5 塩化物でもその分解率は異なり、2,3,6,2',4',5'-Hexachlorinated biphenyl (2,3,6,2',4',5'-HCB)、2,4,5,3',4'-Pentachlorinated biphenyl (2,4,5,3',4'-PCB) を含有するピーク 32 では全く分解しなかった。SN-49911 もほぼ SN-4997 と同傾向の分解を示したが、3,4,3',4'-TCB、2,3,6,3',4'-PCB を含有するピーク 30 は全く分解しなかった。SN-4998 は他の 3 株に比べやや分解率も悪く、ピーク 30 以降の異性体は全く分解しなかった。SN-49910 は全異性体に渡り分解率が高く、他の 3 株と異なった分解傾向を示した。

PCB に付いた塩素数と分解率の違いを比較検討し、その結果を表 4 に示した。表には PCB の高分解菌として知られている *Alcaligenes eutrophus* H850¹⁾ の Aroclors1242 (KC-400 とほぼ同じ製品) の分解率も参考に示した。2~3 塩化物では SN-4997、SN-49911 の両株は 90% を上回り、H850 と同程度の分解率を示した。また、PCB が高塩化するに従い分解率も悪くなっているが、H850 と同程度の分解率であった。SN-49910 は塩化数に関係なく 50~60% の分解率を示したが、SN-4998 は 2~3 塩化物で高い分解率を、4 塩化以上ではかなり低

表3 4菌株によるKC-400における各異性体の分解

Peak number	Congener identification	Degradation %			
		SN-4997	SN-4998	SN-49910	SN-49911
1	2,3-, 2,5-	100	100	60	100
2	2,5,2'-	100	100	63	100
3	2,6,4'-- , 2,3,2'-	100	88	59	75
4	2,5,3'-	100	89	78	100
5	2,5,4'-	90	81	71	97
6	2,4,4'-	90	78	69	92
7	3,4,2'-, 2,5,2',6'-	86	55	59	91
8	2,3,4-, 2,4,2',6-	87	68	74	86
9	2,3,6,2'-	100	87	33	89
10	2,3,2',6'-	100	71	43	100
11	2,4,2',5'-	80	47	59	83
12	2,5,2',5'-	78	33	59	57
13	2,4,2',5'-	80	55	60	90
14	2,4,2',4'-	82	62	64	80
15	2,3,2',5'-	90	37	63	79
16	3,4,4'-, 2,3,2',4'-	74	48	67	78
17	2,3,4,2'-, 2,3,6,4'-, 2,6,3',4'-	48	35	67	52
18	2,3,2',3'-	65	48	74	65
19	2,4,5,4'-	44	33	68	56
20	2,5,3',4'-	43	13	70	52
21	2,3,4,4'-, 2,3,6,2',5'-	48	18	64	55
22	2,3,6,2',4'-	54	51	59	59
23	2,3,4,4'-, 2,3,3',4'-	45	5	65	30
24	2,3,6,2',3'-, 2,3,5,2',5'-	56	28	54	44
25	2,3,5,2',4'-, 2,4,5,2',5'-	31	0	50	50
26	2,4,5,2',4'-	50	20	63	50
27	2,4,5,2',3'-2,3,5,6,2',6'-	36	29	58	26
28	2,3,4,2',5'-	26	12	60	32
29	2,3,4,2',4'-	17	14	57	29
* 30	3,4,3',4'-, 2,3,6,3',4'-	14	0	29	0
31	2,3,4,2',4'-	40	0	10	20
32	2,3,6,2',4',5'-, 2,4,5,3',4'-	0	0	58	21
33	2,3,4,3',4'-, 2,3,4,2',3',6'-	9	0	55	9
34	2,3,4,2',4',5'-	23	0	42	23
Total degradation % of 34 peaks		61.4	41.3	58.4	60.9

* はCo-PCBを示す。

表4 KC-400における各塩素数の分解率

	2-3塩素化	4塩素化	5塩素化	6塩素化
SN-4997	92	68	32	15
SN-4998	79	42	14	10
SN-49910	67	63	51	52
SN-49911	91	71	33	19
*H850	91	69	38	13

*はArclor1242ピーク34を除いた値

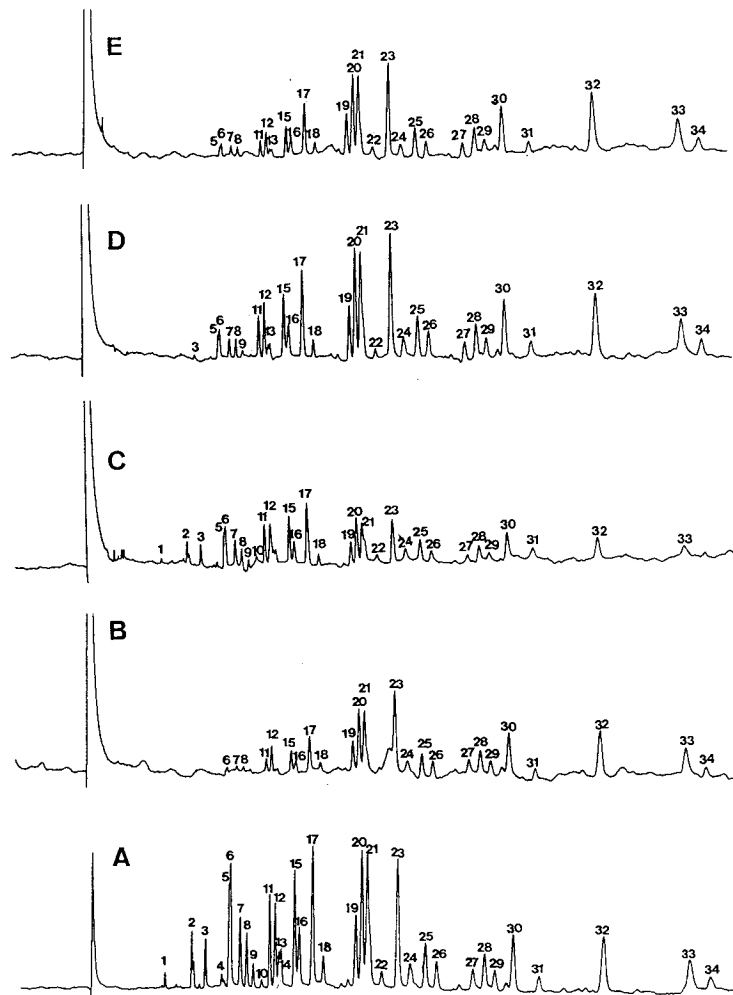


図1 4菌株によるKC-400の微生物分解のECD-GCクロマトグラム
A:KC-400(標準試薬),B:SN-49911,C:SN-49910,D:SN-4998,E:SN-4997

表5 SN-4997およびによるPCB異性体の分解能

KC-400 peak	PCB congener identification	Degradation(%)	
		SN- 4997	*H850
3	2,6,4'-, 2,3,2'-	100	70
7	2,5,2',6'-,3,4,2'-	86	
9	2,3,6,2'-	100	55
10	2,3,2',6'-	100	75
17	2,3,4,2'-, 2,3,6,4'-, 2,6,3',4'-	48	55
6	2,4,4'-	90	
18	2,3,2',3'-	65	65
19	2,4,5,4'-	44	0
21	2,4,3',4'-, 2,3,6,2',5'-	48	40
23	2,3,3',4'-, 2,3,4,4'-	45	35

* は文献から作成

い分解率という、特徴的分解パターンを示した。
また、PCBの微生物分解では2,6及び4,4位に塩素があると比較的分解が遅いと報告されている⁴⁾。そこでH850のAroclors1242における3-4塩化PCBで2,6及び4,4位にあり、分解率が75%以下の異性体を抽出し、SN-4997と分解と比較した。その結果を表5に示した。表に示したように比較

対照となった2,6及び4,4位の異性体は9つである。表のように各異性体の分解率もピーク17を除きSN-4997の方が上回っていた。以上の結果からみて3-4塩化PCBの2,6及び4,4位異性体の分解力は、SN-4997の方がH850よりやや高いものと推察される。

3. 2 分解菌によるPCB分解プロファイル

図2に各種分解菌による PCB 分解プロファイルを示した。また図には、これまで分離された代表的 PCB 分解菌類の分解プロファイルを図示した。現在では PCB の分解プロファイルは 2,3 位及び 3,4 位、そしてこの両方を持った 3 つの分解プロファイルが知られている⁶⁻⁷⁾。今回使用した 4 株の分解プロファイルは、図示したように分解率の高い SN-4997 と SN-49911 がほぼ同様の分解プロファイルを示したが、他の 2 菌株の分解能力はそれほど高くない。分解力の高かった SN-4997 と H850 及び LB400 と比較すると、2,3 あるいは 3,4 位の低塩化異性体ではほぼ同じ分解能を持つこと、2,3 位のみではやや分解力が上回るが、3,4 位の高塩化異性体ではやや分解力が劣ることが解る。

ダイオキシン同様に強い毒性を持つ 3,4,3',4'-TCB はピーク 30 に 14%を含まれている。4 株のうち高い分解率を示した株は SN-49910 で、29%であった。次いで SN-4995 が 14%であった。H850 株では 25%であった。これまでの報告では、微生物による分解は化学物質の毒性や構造、塩素数の違いにより異なることが指摘されている⁸⁾。本データも、前後の 4 塩化異性体の分解率からみて、塩素数だけでなく毒性の強さも微生物分解にマイナスの影響を与えている可能性が推測される。

以上の結果から、H850 及び LB400 と SN-4997 は PCB 分解力は同程度であると推察され、SN-4997 の PCB 分解酵素も H850 同様に 3,4 ジオキシゲナーゼ系と 2,3 ジオキシゲナーゼ系の両方を持っているものと推測される。また、各種異性体の分解力が強い SN-4997 は PCB の微生物処理に利用できるのではないかと考えている。

3. 3 ジベンゾフランの分解

PCB 分解菌 4 菌株を用いて DBF の分解を行った。その結果は表 6 に示した。DBF の分解率は、SN-49910 の 65%が最も高く、次いで、SN-4997 が 58.6%であった。この結果からみて SN-4997 及び SN-49910 が DBF の分解を行う上で有能な菌株であると思われる。中でも有機溶媒耐性を持っている SN-4997 は有機溶媒で抽出した各種有害物をそのまま培地に入れ分解できる可能性を持っている。

今後、この有利な点を生かした SN-4997 による化学物質の処理法や分解の特徴について検討する予定である。

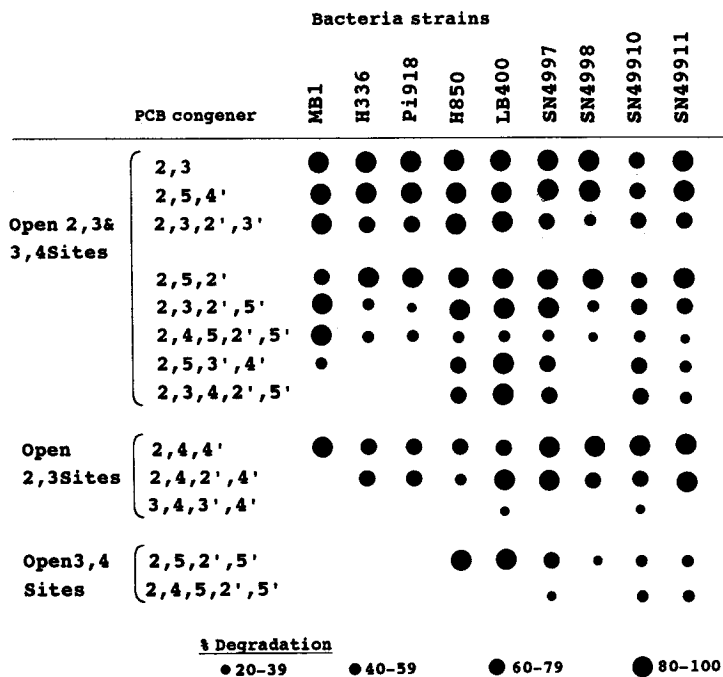


図2 諸種PCB分解菌によるPCB成分の分解プロファイル

表 6 4 種菌種によるジベンゾフランの分解(%)

SN-4997	58.6
SN-4998	38.4
SN-49910	65.0
SN-49911	45.0

4. まとめ

各種菌株の PCB の分解及び各種異性体間の分解の特徴を調べるため、4 種類の PCB 分解菌を用いて KC-400 の分解パターン等の特徴を調べた。また DBF の分解も併せて調べた。その結果は以下のとおりであった。

- 1) PCB 分解菌 4 株による KC-400 の各異性体ごとの分解率を調べたところ、4 菌株とも三塩化物及び四塩化物を含むピーク 5 までの分解率は 70-90%と高い値であった。また、四塩化物では、各菌株によりその分解能は異なっていたが、SN-4997 及び SN-49910 は他の菌株に比べ高い分解率であった。
- 2) 比較的分解困難とされる 2,6 及び 4,4'位にある 9 つの異性体は KC-400 の主要 34 異性体の 31%を占める。これら 9 異性体の SN-4997 による分解率は 41%であった。
- 3) H850 及び LB400 の分解酵素は 3,4 ジオキシゲナーゼ系と 2,3 ジオキシゲナーゼ系の両方

が知られている。SN-4997 及び SN-49911 は両菌株と同様の分解傾向を示すことから本菌株の PCB 分解は同酵素によるのではないかと推察された。

- 4) 四塩化物以上では、各菌株によりその分解率が異なっていたが、菌株により同じ四塩化物でも分解能が違うことが解った。
- 5) コプラナ PCB (3,4,3',4'-TCB) を含むピークの分解率は、SN-49910 が 29%、SN-4997 が 14%と低かった。
- 6) DBF の分解率は SN-49910 が 65%、SN-4997 が 58.6%と比較的分解率が高かった。

本研究は平成 10 年度厚生省科学研究費の補助により行った。

参考文献

- 1) Ikuo Souta, Toshiro Sakurai and Michio Hayashi: Isolation of a Pseudomonas Strain Resistant to Organic Solvents and Capable of Degrading Coplanar Polychlorinated Biphenyls, *Biocontrol Science*, 3,57-62 (1998)
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課編：外因性内分泌化学物質分析マニュアル、底質試料中の PCB の測定分析方法、2.1-21-24 (1998)
- 3) 環境庁化学物質研究会編：環境化学物質要覧、丸善株式会社、233 (1988)
- 4) Furukawa, K., Matumura, F., and Tonomura, K. *Alcaligenes and Acinetobacter strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. Agric. Biol. Chem.*, 42, 543-548 (1978).
- 5) Donna L. Bedard, Robert E. Wagner, Michael J. Brennan : Extensive degradation of Aroclors and Environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850, *Appl. Environ. Microbiol.*53, 1094-1102 (1987)
- 6) 古川謙介：PCB の微生物分解、*BIO INDUSTRY*, 10, 497-507 (1993)
- 7) Daniel A. Abramowicz: Aerobic and Anaerobic biodegradation of PCBs: A review, *Biotechnology*, 241-251 (1990)
- 8) 古川謙介、陶山明子：難分解性有機ハロゲン化合物の微生物分解、*化学と生物*, 38,390-397 (2000)