

環境ホルモン(フタル酸エステル類)の生分解と処理プロセスの構築

永井 沙樹、重松 亨、森村 茂、○木田 建次

(熊本大学 工学部 物質生命化学科)

1.はじめに

フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として広く用いられている化学物質である。しかし、多くのフタル酸エステルには内分泌攪乱化学物質の疑いが持たれており、また、環境中から検出されることからその有害性が大きな問題となっている。

本研究では、環境省の SPEED'98¹⁾において、優先してリスク評価に取り組むべき物質とされるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)およびフタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)を標的化合物に選択した。これらのフタル酸エステルを分解する微生物の探索と分解機構の解明を目的とし、DEHP 資化性を有する E1 株および DCHP 資化性を有する C1 株を活性汚泥から単離し、16S rDNA の塩基配列に基づく系統分類を行なった。

2.フタル酸エステル分解細菌の濃縮

下水処理場の活性汚泥を実容積約 3 l の好気性処理装置 (Fig. 1 参照) に添加し、30 °C、通気量 1 vvm の条件下で DEHP 1 g/l を含む合成廃水 (Table 1 参照) を 1.2 l/d の流量で連続供給することにより DEHP 分解細菌の濃縮を行なった。また、同様にして、DCHP を 1 g/l 含む合成廃水を 1.2 l/d の流量で別の好気性処理装置に供給することにより、DCHP 分解細菌の濃縮を行なった。

DEHP 含有合成廃水を供給している好気性処理装置の槽内液から、また DCHP 含有合成廃水を供給している槽内液から、それぞれのフタル酸エステル分解細菌の単離を試みた。

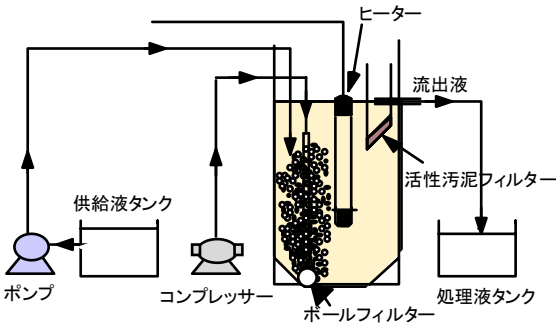


Fig. 1 好気性処理装置

3.フタル酸エステル分解細菌の単離

それぞれの好気性処理槽内液からフタル酸寒天培地とフタル酸エステル液体培地での培養を繰り返すことにより、DEHP を単一の炭素源として生育を示す E1 株、DCHP を単一の炭素源として生育を示す C1 株を単離した。

なお、用いた培地は Table 1 に示した合成廃水のうちフタル酸エステル濃度を 500 mg/l としたものである。pH は 7.6 であり、寒天濃度は 1.5% となるように加えた。

4.フタル酸エステル分解細菌の同定

(1)E1 株

形態観察および 16SrDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った結果、E1 株は *Rhodococcus* 属に分類され、最近縁種は *Rhodococcus zopfii* (相同性 99%)であった。

DEHP 500 mg/l を含む無機塩培地 10 ml を用いて E1 株を 3 日間振盪培養し、培養液中の DEHP の直接分析および有機態炭素(TOC)濃度を測定したところ、DEHP はほぼ完全に無機化されていることが判明した。

(2)C1 株

形態観察および 16SrDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った結果、C1 株は *Arthrobacter* 属に分類され、最近縁種は *Arthrobacter keyseri*(相同性 99%)であった。

DCHP 500 mg/l を含む無機塩培地 10 ml を用いて C1 株を 3 日間振盪培養し、培養液中の DCHP および TOC 濃度を測定したところ、DCHP はほぼ完全に無機化されていることが判明した。

Table 1 活性汚泥供給液

フタル酸エステル	1.0	g/l
K ₂ HPO ₄	3.48	g/l
KH ₂ PO ₄	0.435	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	g/l
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.2	g/l
FeCl ₃	0.02	g/l
NaCl	0.1	g/l
CaCl ₂	0.1	g/l
Trace element solution ¹⁾	0.3	ml/l
Vitamin solution ²⁾	1.0	ml/l

¹⁾Biotin 2.0 mg, Folic acid 2.0 mg, Pyridoxine-HCl 10.0 mg, Thiamine-HCl 5.0 mg, Riboflavin 5.0 mg, Vitamin B12 0.1 mg, Nicotinic acid 5.0 mg, DL-calcium pantothenate 5.0 mg, p-Aminobenzoic acid 5.0 mg, Lipoic acid 5.0 mg, Water 1.0*

²⁾FeCl₃ 1.35 g, MnCl₂・4H₂O 0.10 g, CoCl₂・6H₂O 0.024 g, CaCl₂・2H₂O 0.10 g, ZnCl₂ 0.10 g, CuCl₂・2H₂O 0.025 g, H₃BO₃ 0.01 g, Na₂MoO₄・2H₂O 0.024 g, NaCl 1.0 g, NiCl₂・6H₂O 0.12 g, Na₂SeO₃・5H₂O 0.026 g, Nitrolic acid (NTA) 12.8 g, Water 1.0*

5. 単離株の各種フタル酸エステルの分解能

内分泌攪乱化学物質の疑いのあるフタル酸エステルに対して、E1 株と C1 株の分解能を評価した。フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジブチル(DBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、フタル酸ジ-n-プロピル(DnPP)の 6 種類を使用した。これらのフタル酸エステルを 10 ml の無機塩培地に 500 mg/l となるように添加し、3 日間の回分培養を行なった。分解は培養液の直接分析により、無機化は TOC 分析により、それぞれ評価した。

その結果、E1 株は DCHP 以外の 5 種類のフタル酸エステルについては分解および無機化の進行が良好であった。

C1 株は単離する際に用いた DCHP、BBP、DEP、DnPP については分解および無機化の進行が良好であったが、DEHP は分解しなかった。また、DBP は分解は進行したが、無機化の進行は良好でなかった(Table 2 参照)。

Table 2 単離株の各種フタル酸エステルの分解能

	<i>Rhodococcus</i> sp. E1	<i>Arthrobacter</i> sp. C1
BBP	++	++
DBP	++	+
DCHP	—	++
DEHP	++	—
DEP	++	++
DnPP	++	++

++: 分解および無機化の進行が良好なもの
+: 分解の進行は良好だが無機化が進行していないもの
—: 分解および無機化が進行していないもの

6. フタル酸エステル分解機構

一般にフタル酸エステルの分解機構は、Fig. 2 に示したようにエステル結合が段階的に加水分解された後、フタル酸になりその後完全酸化されると言われている。

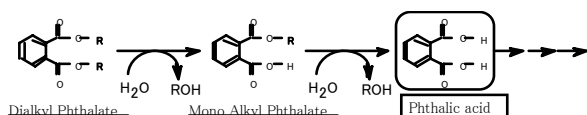


Fig. 2 フタル酸エステルの一般的な分解機構²⁾

そこで E1 株と C1 株について、フタル酸資化能があるかを調べた。その結果、E1 株ではフタル酸の分解は見られなかったが、C1 株ではフタル酸の

分解が確認された。E1 株はフタル酸資化能を示さなかったが、既知の *Rhodococcus* 属の DEHP 分解菌の中にもフタル酸資化能の弱いものが報告されている³⁾。また、C1 株の最近縁種である *Arthrobacter keyseri* はフタル酸資化能が確認されている⁴⁾。

実験結果から、C1 株はフタル酸の一般的な分解機構を持っている可能性が、また、E1 株は別の分解機構を持っている可能性が示唆される。

今後は E1 株および C1 株の混合培養により、環境省の SPEED'98 で「優先してリスク評価に取り組む物質」とされたフタル酸エステル類の同時分解の可能性を検討し、現実的なプロセスを構築していく。

7. まとめ

- ・ 活性汚泥から 2 種類のフタル酸エステル分解細菌 E1 株 C1 株を単離した。
- ・ DEHP を資化する E1 株は *Rhodococcus* 属に分類された。
- ・ DCHP を資化する C1 株は *Arthrobacter* 属に分類された。
- ・ C1 株はフタル酸の資化能を有するが、E1 株はフタル酸資化能を持たない。

本研究の一部は、新事業創出促進研究開発事業（産学連携枠）「バイオアッセイを用いた新規な環境リスク評価技術の開発と環境保全への応用技術開発」（平成 12-13 年度）により実施された。

8. 参考文献

- 1) 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 (1998)
- 2) Staples, C. A. *et al.* Chemosphere, 35, 667-749 (1997)
- 3) 微生物の分離法, R&D プランニング., 663-673 (1986)
- 4) Eaton R. W., J. Bacteriol., 183, 3689-703 (2001)