# 平成15年度 卒業論文

# フタル酸エステル分解菌の単離と 分解能に関する試験

共同実験者名

柴崎 杉山 堀内

担当講師

福田 輝明

東京バイオテクノロジー専門学校 バイオテクノロジー学科 DNAコース

# 要旨

フタル酸エステル類はプラスチックに柔軟性を与え、加工しやすくするために添加する可塑剤として工業的に広く使われている。しかし、この物質は成長の抑制、精巣の萎縮など人体にとって不可逆的な影響を与える危険性があり、環境への放出と、人体への影響が懸念されている物質である。またこの物質は環境ホルモンの疑いももたれている。そこで我々は、現在分離されているフタル酸エステル類分解菌とは異なり、より高い分解能を持つ菌株を環境中より単離し、分解能を調べ、分解能の高い菌株について同定することを目的とした。

本研究では、フタル酸エステル類の中でも環境庁の平成 14 年内分泌撹乱化学物質問題検討会において優先してリスク評価に取り組むべき物質として指定されており、分解菌が発見されていないフタル酸ジ·n·ブチルを対象とした。さまざまな場所から採取した土壌を生理食塩水に懸濁し、炭素源をフタル酸ジ·n·ブチルのみにした三種類の培地(アルブミン培地・土壌抽出培地・ビタミン培地)に塗抹し、28℃で3週間培養した。得られたコロニーを単離し、フタル酸ジ·n·ブチル入りの培地と入ってない培地で選択した。選択したコロニーの分解能を HPLC によって調べ、顕微鏡観察、グラム染色、細胞壁分析によって同定をおこなった。

比較的高い分解能を示した 12 菌株のうち細胞壁のペプチドグリカンのジアミノピメリン酸 (DAP)異性体分析の結果、5 菌株は meso-DAP を含有し、3 菌株は不明であった。残りの4 菌株は LL-DAP を含有し、気菌糸の形態的特徴からストレプトマイセス属であると推定された。得られた菌株のうちの2 菌株でフタル酸ジ-n-ブチル分解能の測定を行ったところ4時間で50%分解した。

キーワード

フタル酸ジ-n-ブチル、微生物分解、放線菌

## Summary

Phthalic acid makes a plastic soft, and in order to make it easy to process it, it is used industrially. However, this has the danger of having influence bad for human bodies, such as control of growth, and withering of a spermary. It is worried about discharge by environment, and the influence on a human body. Moreover, this substance has doubt of environmental hormones. It aimed decomposing phthalic acid ester by high capability, and extracting an undiscovered bacteria from the ground.

It aimed at it is specified as a substance which has bad influence on a human body the Millennium project of the Japanese government, and phthalic acid in which the bacteria to decompose is unusually. It resoluted soil taken from various places to a physiology salt solution. This was applied to three kinds of culture media containing Di-n-butyl Phthalate. It cultivated for three weeks at 28 degrees. The obtained colony was separated. We chose it by the culture media containing Di-n-butyl Phthalate and the culture medium except carbon. The obtained colony was separated and the culture medium containing phthalic acid was compared with the culture medium which is not contained. And HPLC analysed the activity of the obtained colony, and it identified by microscope observation, Gram's stain, and cell wall analysis.

There were 12 kinds of bacteria decomposed efficiently. Five bacteria were meso DAP, and any three bacteria were unknown, and four bacteria were LL-DAP. It was presumed from the feature that it was storeptomyces genus. The bacteria decomposed Di-n-butyl Phthalate to 50% in 4 hour.

Keyword

Di-n-butyl Phthalate microbioaldegration Actinomycetes

目次

表紙 1ページ

要旨 2~3ページ

目次 4ページ

序章 5~6ページ

材料・方法 7~12ページ

結果 13~14ページ

考察 15ページ

図・表 16~21ページ

謝辞 22ページ

参考文献 23ページ

序章

私達の身の回りにはさまざまな化学物質が大気、水、土壌などに溶出し、存在 している。それらの化学物質には人体や野生動物への健康影響を及ぼしている可 能性があると考えられている物質もある。1960年から1970年代頃にかけて、こ れまでの医学、生物学、毒性学では説明が困難な現象が人や野生生物に見られる ようになってきた。例えば、1930年代に初めてつくられた合成エストロジェン (DES:ジエチルスチルベステロール)が、米国などにおいて 1940年から 1960年代 に流産の防止等の目的で医療面で多用された結果、胎児期に暴露された女性の生 殖器の遅発性のがん等が発生したことが確認されており、世界各国で観察された 野生生物の生殖行動や、生殖器の異常が、1.1.1-trichloro-2.2-bis(4-chlorophenyl) ethane(DDT)をはじめとする有機塩素系化合物等によるものではないかという指 摘が 1970 年代以降に相次いでなされたことなどがある。具体例としてはアメリ カのアポプカ湖でのワニの雄の生殖器の縮小による子ワニの数の減少が DDT 等 の有機塩素系農薬が原因と推定されており、イギリスでは魚の雌雄同体の多数発 生はノニルフェノールが、世界各国でのイルカやアザラシの大量死はポリ塩化ビ フェニル(PCB)、DDT が原因ではないかと推定されている。このような内分泌系 (ホルモン)に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響をおこす外因性 の化学物質のことを内分泌撹乱物質(環境ホルモン)と呼ぶ。

日本でも、東京都多摩川で異常に小さい精巣を持つコイが 1997 年に見つかっており、海域においてもオスの魚のメス化が報告されている。また、有機スズ化合物が原因だと考えられる巻貝の一種のイボニシのインポセックス(メスが成長するにつれてオスの生殖器ができる現象)については 1990 年代初頭の調査によって日本全国いたるところに発生していることが明らかにされている。また日本人の健康な若者の精子も正常ではないという報告もある。精液量、精子数、正常形態率、生存率は世界保健機構(WHO)の基準値を上回っていたが、運動率が大きく下回る結果であった。このようなことから日本でも環境への関心が高まり 1998年に本格的に調査研究に着手し、2000 年からは試験研究が加速的に推進され、内分泌撹乱作用が疑われている物質のうち優先してリスク評価に取り組むべき物質について有害性評価を行い、あわせてこれらの物質の環境中挙動を調査するするとともに、一方で国際共同研究などを行う目的である政府ミレニアムプロジェクトの一環として約 40 物質についてリスク評価が行なわれている。

われわれはその優先物質の中から、内分泌撹乱作用が認められているものの、 人体に有害であるかが確認されておらず、追試験を行なっている段階のフタル酸 ジ-n-ブチルに着目した。

フタル酸ジ・n・ブチル(Di-n-butyl Phthalate)はフタル酸エステルの一種であり、アルコールと無水フタル酸から合成される化合物である。フタル酸ジ・n・ブチルはプラスチックの可塑剤、ラッカー、接着剤、レザー、印刷インキ、安全ガラス、セロハン、染料、殺虫剤の製造、香料の溶剤、繊維物潤滑剤として工業的に広く用いられており、われわれの身の回りの至るところに存在し、密接にかかわっている物質である。年間で 48 万トンが生産されおり、プラスチックの可塑剤とし

て最も広く用いられている。可塑剤とはプラスチックなどに柔軟性、弾力性を与えたり、加工しやすくするために添加する物質のことであるが、プラスチックと化学的に結合しているわけでなくプラスチック分子間に可塑剤分子が入りこむことによって柔軟性をあたえているので、その結果プラスチック製品から溶け出してしまうことから大気・水・土壌に溶出しやすく、体内に取り込まれル危険性が高くなっている。

現在のところ人体への影響は証明されていないが、動物実験ではラットで精子数の減少が報告されている。またきわめて高濃度に投与することによって、げっ歯類で肝臓に腫瘍を引き起こす報告が米国でなされている。フタル酸ジ·n·ブチルは比較的良分解性の物質ではあるといえる。しかし、2000年8月3日のNHK朝のニュースによれば、東京都衛生局の調査で家庭内の空気がフタル酸エステル類(フタル酸ジ·n·ブチル等)で汚染されている実態が明らかになったという報告がされている。また、フタル酸エステル類のフタル酸ジ·2·エチルヘキシルは多量に暴露されることにより、胎児や早産児、新生児の発達や生殖機能に障害を受ける恐れがあるという報告もされている。このため欧米では多くの国で、3歳以下の子供用玩具へのフタル酸エステルの使用を法律で禁止しており、日本でも使用を制限するように呼びかけている。危険性を避ける根本的な解決は使用を制限することであるが、日常生活と密接にかかわっているためそれをすべて取り除くとなると、それはまさに革命を起こすに等しいほど難しい。

フタル酸ジ·n·ブチルの環境リスクをゼロに近づけるためには法律面で規制するとともに、技術面を考える必要がある。技術面には物理的、化学的および微生物学的方法があり、燃焼、分解、固定などにより無毒化させることが論理的に説明されているが、残念ながら実用化には至っていない。現在、研究室レベルではフタル酸ジ·n·ブチルを分解する菌が数種類発見されているが、特許などの関係上、開示されている情報に乏しいばかりかその実用化には時間がかかると考えられる。そこで今回我々は土壌中から現在発見されている菌とは異なるであろう高い分解能を有する菌を探索することとした。これにより環境中にあるフタル酸ジ・n·ブチルをより効率よく分解する方法の実用化に向けての研究を進めていくことができると考えられる。

#### 2材料と方法

(1) 試薬・材料・器具

フタル酸ジ·n-ブチル

リン酸水素ニカリウム

硫酸マグネシウム

硫酸第Ⅲ鉄

卵アルブミン

寒天

リン酸水素ニナトリウム

塩化カリウム

硫酸第Ⅱ鉄

炭酸カルシウム

シクロヘキシミド

チアミン塩酸

リボフラビン

ピリドキシン塩酸

イノシトール

パントテンカルシウム

パラ-アミノベンゼン酸

メタノール

ヘキサン

TLCプレート

ニンヒドリンスプレー

塩酸

展開溶媒

畑の土

滅菌シャーレ (φ90×50mm)

乾熱滅菌機

振とう培養機

遠心機

HPLC

電子上皿天秤

オートクレーブ

マイクロピペット

メスピペット

白金耳

チップ

マイクロチューブ

(東京化成工業株式会社 LotNo.FJL01)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.CEP1652)

(国産化学株式会社 LotNo.D117573)

(国産化学株式会社 LotNo.F115084)

(シグマケミカルカンパニー LotNo.76F-8040)

(岩井化学薬品株式会 LotNo.130313)

(国産化学株式会社 LotNo.G117304)

(国産化学株式会社 LotNo.B117029)

(国産化学株式会社 LotNo.F117225)

(国産化学株式会社 LotNo.J115056)

(和光純葉株式会社 LotNo.LDP0683)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.203-00851)

(和光純葉工業葉株式会社 LotNo.180·00171)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.165·05401)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.092-00282)

(和光純薬工業株式会社 LotNo.031·14161)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.015-02332)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.ASJ6181)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.DWN6422)

(フナコシ株式会社 LotNo.371001)

(東京化成工業株式会社 LotNo.FIJ01)

(和光純葉工業株式会社 LotNo.PKJ5606)

( メタノール: 水: 6N 塩酸: ピリジン = 80:26:4:10)

(千葉県木更津市の根菜類畑の土壌)

(株式会社イチ·オプティカ LotNo.030926)

(Yamato LotNo.SH62)

(ダイテック株式会社 LotNo.NR-30)

(HITACHI himac LotNo.CF15R)

(HITATCHI

(ザルトリウス株式会社 LotNo.BP211D)

(HIYAMA HA-300M)

ふた付き試験管ヘアードライTLC 展開槽濾漏斗フランダー薬を包ささでで<l>でででででででででででででででででででで<

# (2)使用培地

①アルブミン培地

Table 1 中の組成で培地をオートクレーブにかけ滅菌後に、シクロヘキシミド 50 pp m、フタル酸  $\overline{y}$  · n · ブチル 0.1% を加え作製した。

②土壤抽出培地

Table 1 中の組成で培地をオートクレーブにかけ滅菌後に、シクロヘキシミド 50ppm、フタル酸ジ-n-ブチル 0.1%を加え作製した。

③ビタミン培地

Table 1 中の組成で培地をオートクレーブにかけ滅菌後に、シクロヘキシミド 50ppm、フタル酸ジ-n-ブチル 0.1%、B-ビタミンを加え作製した。

#### 試験1 土壌細菌の単離

(1) 目的

採取してきた土壌を希釈培養し、出てきたコロニーを肉眼で分け、さらに 培養する。

(2) 試験区

Table 2 の土壌 15 区を試験区とした。1 区あたりアルブミン培地、土壌抽出培地、ビタミン培地にそれぞれディッシュ 5 枚ずつ培養した。

(3) 方法

採取してきた土壌 1g を 0.85%NaCl 溶液 9ml に懸濁させ、静置させ上清を取り、100 倍希釈し、 $100 \mu$ l 各培地に塗抹し、3 週間 28% で培養した。発現したコロニーを肉眼により、色や形態、大きさ等をもとに選別し継代培養した。

#### 試験 2 高分解能菌株の選択

(1) 目的

単離した菌株を、フタル酸ジ·n·ブチル添加培地と無添加培地を用いてレプリカ法を行い、培養後のコロニーの様子からより分解能が高いと思われる菌株を選択する。

#### (2) 試験区

- ・培地の種類
  - ① アルブミン培地 ②土壌抽出培地 ③ビタミン培地 計3区
- · フタル酸ジ·n·ブチル
  - ① 添加 ②無添加 計 2 区

培地の種類とフタル酸ジ-n-ブチルを組み合わせた合計 6 区。1 区あたりディッシュ 1 枚に培養した。

(3) 方法

フタル酸ジ·n·ブチルが 0.1%添加されたアルブミン、ビタミン、土壌培地とフタル酸ジ·n·ブチルが全く入ってない各培地を用意し、試験 1 で単離、継代培養した菌株を塗末した。これらを 28 度で 2 週間培養し、培養後のコロニーの様子を比較し、より分解能が高いと思われる菌を選択した。

#### 試験 3 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分解能測定①

(1) 目的

試験 2 で活性が見られた菌株をフタル酸ジ-n-ブチルを加えた液体アルブミン培地に 4 菌株を 1 つのグループとして加え振とう培養し、フタル酸ジ-n-ブチルの残量を HPLC で測定して分解能の高い菌株を選択する。

(2) 試験区

試験2で活性が見られた菌株37グループ、及び菌無添加を対照区とし、計38区を試験区とした。

#### (3) 方法

液体アルブミン培地を三角フラスコに  $10\,\mathrm{ml}$  分注し、フタル酸ジ· $\mathrm{n}$ -ブチル  $24\,\mu\,\mathrm{l}$  加え、活性が見られた菌株を 4 菌株ずつ加えた。3 週間振とう培養後、ヘキサン  $1\,\mathrm{ml}$  加え転倒混和し、 $2000\,\mathrm{rpm}$  で 5 分遠心して上清をろ過したものを Table 3 のように、充填剤は  $1\,\mathrm{mertsil}$  ODS·3、カラム  $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$  を動相はメタノール:水  $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$  を動相はメタノール:水  $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$  の条件で HPLC によりフタル酸ジ· $1\,\mathrm{mem}$   $1\,\mathrm{mem}$  が発量を測定した。

## 試験 4 HPLCによる分解能測定②

#### (1) 目的

試験3で活性が見られた菌株のグループを1菌株ずつに分け、フタル酸ジ-n-ブチルを加えた液体アルブミン培地で振とう培養しフタル酸ジ-n-ブチルの残量をHPLCで測定し、分解能の高い菌株を選択する。

#### (2) 試験区

試験3で活性が見られた菌株のグループ9つ計36菌株、及び菌無添加を対照区とし、合計37区を試験区とした。1区あたり1試験管で培養した。

#### (3) 方法

液体アルブミン培地を三角フラスコに  $10\,\mathrm{ml}$  分注し、フタル酸ジ $\cdot\mathrm{n}$ ・ブチル  $24\,\mu\,\mathrm{l}$  加え、試験 3 で活性が見られた菌株のグループ 9 つを 1 菌株ずつに分けて加えた。 3 週間振とう培養後、ヘキサン  $1\,\mathrm{ml}$  加え転倒混和し、  $2000\,\mathrm{rpm}$  で 5 分遠心して上清をろ過したものを試験 3 と同様の条件で  $\mathrm{HPLC}$  によりフタル酸ジ $\cdot\mathrm{n}$ ・ブチル残量を測定した。

#### 試験 5 グラム染色

#### (1) 目的

試験 4 で得られた分解能が優れている 12 菌株をグラム染色し、グラム陰性かグラム陽性を確認する。

#### (2) 試験区

試験 4 で得られた分解能が優れている 12 菌株を試験区とした。1 区あたり 1 スライドグラスで顕鏡した。

#### (3) 方法

スライドグラスに水を滴下、培養中の培地から微量の菌を火炎滅菌した白金時で混ぜ広げて薄い層とし、バーナーで乾燥させた。次にクリスタルバイオレット液を滴下して1分間染色し、その後流水で洗い、ろ紙で水を吸収した。次にルゴール液を滴下して1分間染色し、水洗、乾燥させた。次に純アルコールの入ったビーカーに入れ色素が軽く残る程度まで洗浄した。次にサフラニン液を滴下して30秒間染色し、水洗、乾燥させ、顕鏡した。

試験 6 薄層クロマトグラフィーによる diaminopimelic acid(DAP)の異性体分析

(1) 目的

試験 4 で活性が見られた菌株の菌株培養液を調製し薄層クロマトグラフィーを用いて分離を行い、検査薬による発色の違いから、微生物の細胞壁内含有物質の違いを LL-DAP と meso-DAP に分類した。

(2) 試験区

試験4で活性が見られた12菌株を試験区とした。6区あたり1薄相板で検査した。

(3) 方法

菌株をキャップ付き試験管にいれ、6N 塩酸を 1m1 加え懸濁し、100℃で 16 時間加水分解させた。反応後冷まし、湿らせたろ紙でろ過し、試料 10  $\mu1$  を薄層クロマトグラフィーにヘアードライヤーで乾かしながらスポットし、展開溶媒を入れた展開槽に上から 2cm に来るまで展開した。プレートはドラフト内で十分乾燥させた後、ニンヒドリンスプレーを均一にかけ、溶媒が蒸発したところで、120℃で 10 分保持し、発色を確認した。

# 試験 7 顕微鏡による形態観察

(1) 目的

試験6において肉眼で明らかに違いのわかる2菌株を顕微鏡で形態を観察する。

(2) 試験区

試験6において肉眼で明らかに違いのわかる2菌株を試験区とした。1区あたり1スライドグラスで顕鏡した。

(3) 方法

顕微鏡を用いて150倍で基生菌糸や気菌糸の形態を観察した。

## 試験 8 HPLCによる分解能測定③

(1) 目的

6点の時間で培養した場合のフタル酸ジ-n-ブチルの残量を HPLCで定量し、 最適分解時間を調べる。

- (2) 試験区
  - 菌株の種類
    - ①LL-DAP ②meso-DAP 計 2区
  - · 培養時間
  - ① 0 時間 ② 1 時間 ③ 2 時間 ④ 4 時間 ⑤ 6 時間 計 5 区 菌株の種類と培養時間を組み合わせた合計 10 区。1 区あたり 3 フラスコで 培養した。

# (3) 方法

液体アルブミン培地を三角フラスコに  $10\,\mathrm{ml}$  分注し、フタル酸ジ· $\mathrm{n}$ -ブチル  $24\,\mu\,\mathrm{l}$  加え、試験  $5\,\mathrm{c}$  LL·DAP と  $\mathrm{meso}$ -DAP の反応が強く出たサンプル中、 肉眼で明らかに違いのわかる 2 菌株を 0、1、2、4、6 時間振とう培養した。 ヘキサン  $1\,\mathrm{ml}$  を加え、 転倒混和して  $2000\,\mathrm{rpm}$  で 5 分遠心し、上清をろ過したものを試験 3 と同様の条件で HPLC によりフタル酸ジ· $\mathrm{n}$ -ブチル残量を測定した。

#### 3 結果

# 試験 1

計測不能のコロニー数から 16 菌株を選択し、以後の実験に用いた。(データ 省略)

## 試験2 高分解能菌株の選択

3 種類の培地で分離したフタル酸ジ-n-ブチル分解能をもつ菌株の出現率をTable4に示した。

ビタミン培地で単離したコロニー数が最も多かったが、出現率はアルブミン 培地が最も高くなった。

採取場所ごとのフタル酸ジ-n-ブチル分解能をもつ菌株の出現率についてTable 5に示した。

採取場所によって単離されたコロニー数に差が生じたが、場所ごとの特徴に は傾向が見られなかった。

#### 試験 3 HPLCによる分解能測定①

Fig. 1 に示した。対照区のフタル酸ジ-n-ブチル残量を 100%とした場合の数値である。

明らかに分解能を有すると考えられるグループが 21 グループ確認された。 更にこの中で選択を進めるためにフタル酸ジ-n-ブチル残量を 10%程度を目安とし、試験管番号 1、5、9、10、19、27、29、30、34、36 を分解能が高い菌株が含まれていると判断し、この先のサンプルとした。

#### 試験 4 HPLCによる分解能測定②

Fig.2 に示した。

分解能が高いと考えられる菌株が 20 確認されたが、これらの中で特にフタル酸ジ-n-ブチルの残量率が少なかった菌株番号 1、4、8、12、19、20、24、25、30、31、32、33 を分解能が優れている 12 種類をサンプルとした。

#### 試験 5 グラム染色

12 菌株全てグラム陽性を示した。(データ省略)

# 試験 6 薄層クロマトグラフィーによる DAP の異性体分析

Fig.3 に示した。

LL-DAP を含有する菌株が 4 菌株、meso-DAP を含有する菌株が 5 菌株確認された。残りの 3 つは複数回 TLC を試みたが確認できなかった。LL-DAP とmeso-DAP の反応が強く出たサンプルの中で肉眼で明らかに違いのわかる 2 菌株の酵素活性を調べた。

# 試験 7 顕微鏡による形態観察

Fig.5 に示した。

Fig.2 における菌株 No32、25 ともに気菌糸は直鎖状で分枝していた。

# 試験 8 HPLCによる分解能測定③

Fig.4 に示した。

両菌株とも、4 時間までは酷似した挙動を示したが、その後 No32 菌株が No25 を上回り、結果的に No32 がより高い分解能を示した。

## 4 考察

・3種類の培地ごとの分解能が有用なコロニーの割合について

一般的に放線菌の分離に適しているのはビタミン培地であり、かつこれまでの研究で(1)(8)有害物質を分解する菌株は放線菌に多く見られることから、フタル酸ジ·n·ブチルの資化性をもつ菌株が 3 種類の培地中最も多く確認された。しかし、より高い分解能をもつ割合は、アルブミン培地の方が高かった。このことから本試験においてはアルブミン培地が有用な分解能をもつ菌株の分離に適していたと言える。

・土壌採取地ごとの分解能が有用なコロニーの割合について

資化性を有したコロニー数では土壌採取地の違いで異なる傾向が見られた。また分解能が有用なコロニー数では1ヶ所の土壌採取地で多くコロニーを得られたものの、他土壌採取地では数値に統一性がなく様々な土壌採取地で単離された。このことから本試験においては、土壌採取地と分解能が有用な菌株の分布に関連性は見られなかったと言える。

・分解能が有用であると考えられる菌株の同定について

Fig.3の薄層クロマトグラフィーによる DAP の異性体分析結果から選択した 2 菌株について、Fig.4 の菌株 No32 は顕鏡した結果、気菌糸が確認され DAP の異性体分析の結果 LL-DAP であったためストレプトマイセス属であると推定される。一方菌株 No25 は meso-DAP であるため、この時点で推定される属が多数ある。本試験では行っていないが、絞り込むにはさらに他の方法で同定を進める必要がある。

・本試験のフタル酸ジ-n-ブチル分解能試験について

Fig.5 ではフタル酸ジ・n-ブチルを約 50%まで分解する時間が約 4 時間、一方参考として藤井ら(8)の研究ではフタル酸エステルの一種であるフタル酸ジエチルヘキシルを同じ約 50%まで分解する時間は約 24 時間となる。分解対象物質が異なり、論文が公開されていないため培地、培養温度、菌体量など不明な点が多く単純に比較はできないが本試験により単離した菌株はより強い分解能を持つ可能性があると考えられる。

フタル酸ジ·n-ブチルが 4 時間で 50%まで分解された点と、本試験において段階的に選択されたという点を踏まえると Fig.4 の菌はフタル酸ジ·n-ブチルを分解するのに有用であると考えられる。

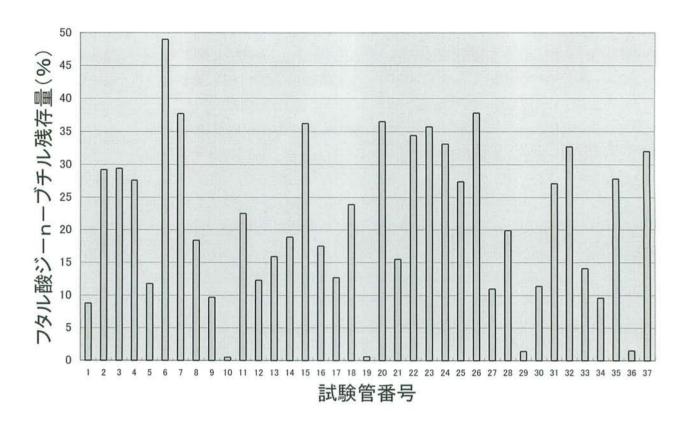


Fig.1 分離菌株 4 菌株が分解したフタル酸ジ-n-ブチルの残量率

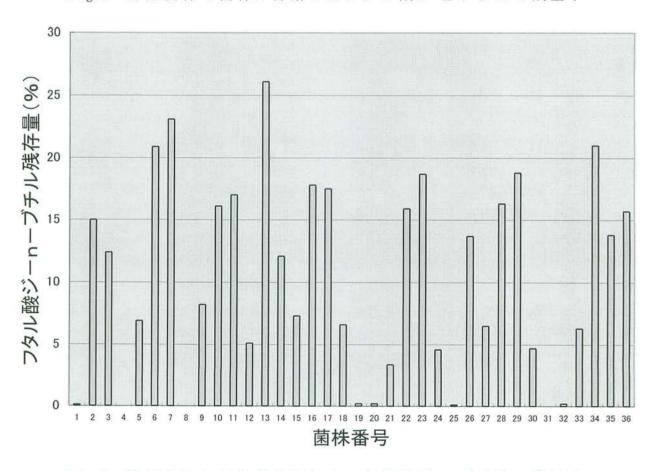
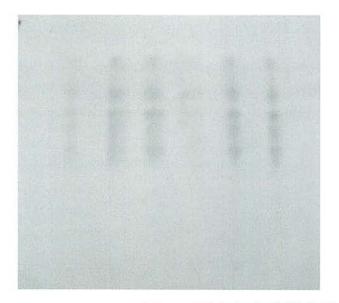


Fig.2 選択された菌株が分解したフタル酸ジ·n-ブチルの残量率



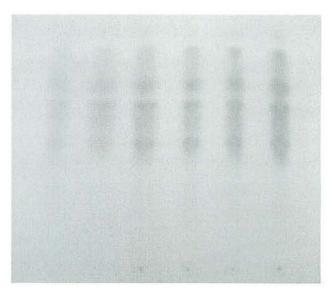
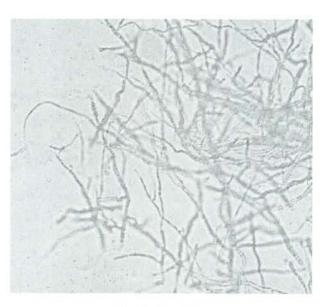
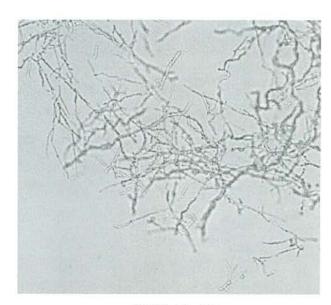


Fig.3 TLCによる細胞壁のアミノ酸分析の写真



菌株 No25



菌株 No32

Fig.4 顕鏡による写真 (×150)

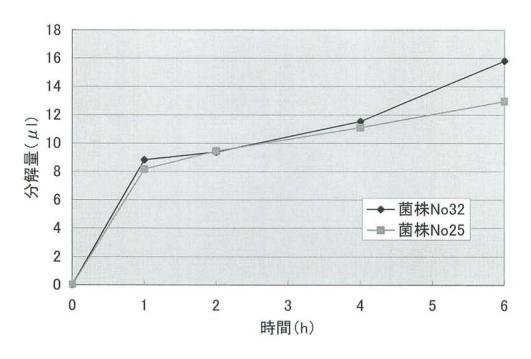


Fig.5 分離菌 No.25 と No.32 の経時変化による分解量

Table 1 使用培地組成

	Table 1 天	用坦旭旭双	
アルブミン	培 地	ビタミン培地	I
$K_{2}HPO_{4}$	$0.5\mathrm{g}$	$Na_2HPO_4$	$0.5\mathrm{g}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g	KC1	1.7g
$Fe_2(SO_4)_3$	0.01g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$0.05\mathrm{g}$
卵アルブミン	0.25g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001g
寒天	$15\mathrm{g}$	寒天	18g
蒸留水	1000ml	蒸留水	1000ml
pН	6.8	B-ビタミン	₩ 2
		pН	7.2
土壤抽出培地			
$K_2HPO_4$	0.5g		
土壤抽出液	100 1		
<b>※</b> 1	100ml		
寒天	15g		
蒸留水	900ml		
рН	6.8		

	1L の水に畑の土壌(千葉県)
<b>※</b> 1	400g を懸濁させ、オートク
/N I	レーブに1時間かけ、ろ過し
	た液を土壌抽出液とした。

<b>※</b> 2	thiamine-HCl	$0.5~\mathrm{mg}$	
	riboflavin	$0.5~\mathrm{mg}$	
	pyridoxin-HCl	$0.5~\mathrm{mg}$	
	inositol	$0.5~\mathrm{mg}$	
	Ca-pantothenate	$0.5~\mathrm{mg}$	
	P-aminobenzoic	0.5 mg	
	acid	U.O mg	

# Table2 土壌採取地

- ①東京都葛飾区マンションの花壇の土壌
- ②千葉県船橋市杉山家の庭の土
- ③千葉県習志野市堀内家の土壌
- ④東京都大田区吞川緑地土壌
- ⑤東京都大田区東京バイオ隣接駐車場土壌
- ⑥東京都大田区池家の土壌
- ⑦千葉県習志野市津田沼駅前土壌
- ⑧ 東京都大田区多摩川土手土壌
- ⑨東京都港区品川駅京浜東北のホームの土壌
- ⑩栃木県河内郡上三川町森林土壌
- ⑪東京都大田区京浜蒲田駅前土壌
- ⑫東京都大田区東京バイオ喫煙所の土壌
- ③東京都大田区呑川緑地側の土壌
- (4) 東京都大田区城南鉄鋼所前土壌
- 15東京都大田区北糀谷鉄鋼所前土壌

# Table 3 HPLC 分析条件

充填剤; Inertsil ODS-3(イナートシル GLSCIENCE 社製)

カラム: 4.6mmID×150mm

移動相;メタノール:水=8:2

流速; 1.0ml/min 検出; UV260nm

圧力; 300kg/cm 以下

資料; フタル酸ジ·n·ブチル

注入量; 5μ1 Renge; 0.1

Atten; 2

Table 4 培地の種類ごとにとれた分解能が有用なコロニーの割合

	資化性を有した コロニー数	分解能が有用な コロニー数	資化性を有した中で 分解能が有用な コロニーの割合(%)
アルブミン培地	30	4	13.3
ビタミン培地	86	6	6.9
土壤培地	44	2	4.5

Table5 土壌採取地ごとにとれた分解能が有用なコロニーの割合

	資化性を有した コロニー数	分解能が有用な コロニー数	資化性を有した中で 分解能が有用な コロニーの割合(%)
1 ※	5	1	20.0
2	10	1	10.0
3	28	0	0.0
4	13	1	7.7
5	1	0	0.0
6	16	0	0.0
7	8	1	12.5
8	6	2	33.3
9	3	0	0.0
10	6	0	0.0
11	11	5	45.5
12	12	0	0.0
13	2	0	0.0
14	2	1	50.0
15	26	0	0.0

※ Table2 の採取地番号による

#### 謝辞

本卒業研究にて多忙な中、大変多くの方々にご指導していただきました。実験の構成方法、助言などをしていただいた福田輝明先生、初瀬玲先生、亀谷七七子先生、森宮乾先生、実験機器や試薬を提供していただいた石川勝先生、川添要一先生に深く感謝いたします。また、本来担当ではないにもかかわらず小室真保先生には様々なご指導をしていただき、厚く御礼申し上げます。

# 参考文献

- Jung-Hoon Yoon, Young-Gyun Cho, Seok-Sung Kang, Seung Bum Kim, Sung Taik Lee and Yong-Ha Park. Rhodococcus koreensis sp.nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium. International journer of systematic and Evolutionary Microbiology (2000), 50,1193-1201
- 2) Kurane.R Microbial degration of phthalate esters. Microbiol Sci (1986) Mar;3(3):92-5
- 3) WangJ, LiuP, QianY. Microbioal degration of di-n-butylphthalate. Chemosphere (1995) Nov; 31(9):4051-6
- 4) Sevela K, Gajduskova V. Phthalic acid esters and the human body. Cas Lek Cesk (1996) Nov 6;135(21):679.82
- Wang Y, Fan Y, Gu JD. Microbial degradation of the endocrine disrupting chemicals phthalic acid and dimethyl phthalate ester under aerobic conditions. Bull Environ Contam Toxicol. (2003) Oct; 71(4):810-8.
- 6) Yuan SY, Liu C, Liao CS, Chang BV.Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. Chemosphere. (2002) Dec; 49(10):1295-9.
- 7) Stanley T Systematic Bacteriology Volume 4 WILLIAMS & WILKINS(1989):2336-2337, 2346-2347, 2454-2455
- 8) <a href="http://www.life.sojo-u.ac.jp/environ/research.html">http://www.life.sojo-u.ac.jp/environ/research.html</a>
- 9) 宮坂澄石. 土壌微生物入門. 東京:共立全書. 142
- 10) 安藤昭一. 微生物実験マニュアル. 東京:技報堂出版. (1992):11-54
- 11) 日本放線菌学会. 放線菌図鑑. 東京:浅倉書店. (1997):125-155
- 12) 根井外喜男. 微生物の保存法. 東京: 財団法人東京大学出版会. (1988): 225-238