

# プロピレングリコール分解菌の探索と分解能評価

長岡技術科学大学大学院 非会員 ○五十川大和  
正会員 渡利高大 幡本将史 山口隆司

## 1. はじめに

プロピレングリコール (PG) は、2つのヒドロキシ基を有する脂肪族吸湿性アルコールの一種であり、グリコール類に分類される有機化合物である。米国食品医薬品局により一般に安全と認められる物質として承認されており、保存料や医薬品、自動車産業の不凍液など多様な産業で使用されている。これに伴い、PGの市場規模は拡大しているもののPGを含有する廃水や廃棄物の増加を引き起こし、環境汚染が懸念されている。

既往の研究において、PGは従属栄養性細菌によって分解可能であることが確認されている<sup>1)</sup>。しかしながら、一般的にPGの分解速度は遅く、分解は40-80%程度にとどまると報告されており<sup>1)</sup>、その分解特性や関与する微生物の挙動については明らかにされていない。そこで本研究では、PG分解機序を明らかにすることを目的として、環境サンプルからの分解菌の探索、PG存在下の微生物の増殖挙動とその群集構造の変化を調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 分解菌の探索

PG分解菌の探索に用いた土壌は、長岡技術科学大学の敷地内から採取し、土壌3gを50mLのMSM培地に懸濁し、24日間の培養を行った。新鮮な基質を供給するため、定期的に培養液の10%を新しい培地に入れ50mLに調製することで植え継いだ。基質としてPGが唯一の炭素源となるように添加し、微生物をPGに馴化させるため、徐々にPG濃度を上げ、最終的な濃度は1500 mg-COD L<sup>-1</sup>とした。培養は、振とう機を用いて150 rpm、25℃で運転した。

### 2.2 分解能評価

連続培養によって集積した菌群を対象に分解能評価を行った。前培養は、LB培地で振とう培養して洗浄操作を行った後、得られた懸濁液を植種源とした。分解実験はPGを含む100mLのMSM培地を使用し、

OD<sub>600</sub> = 0.05-0.1 になるように調製した。PG濃度は、500 mg-COD L<sup>-1</sup>、1500 mg-COD L<sup>-1</sup>、3000 mg-COD L<sup>-1</sup>の系をそれぞれ用意し、コントロールとして植種なしの条件でも実験を行った。サンプルは24時間にわたり定期的に採取し、pH、OD<sub>600</sub>、溶解性COD (sCOD) を分析した。

### 2.3 微生物群集構造解析

解析に供するサンプルは、分解能実験の前後でそれぞれ採取した。DNA抽出はDNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN) を用いた。得られたDNA抽出物に対して、16S rRNA 遺伝子を対象としたUniv515F-806Rのプライマーセットを用いてPCRによる増幅を行った。増幅産物はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後、iSeq100 (Illumina) により塩基配列を取得し、Qiime2により解析した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 分解能評価

図1に各系のOD<sub>600</sub>の経時変化を示す。各系における培養期間中の最大値は、3000、1500、500mg-COD L<sup>-1</sup>でそれぞれ、1.005、0.823、0.414を示した。このことより、本実験で使用した微生物群集がPGを炭素源として増殖できる能力を有していることが示唆された。また、PG濃度が高いほどOD<sub>600</sub>が高い値を示しており、濃度が高くなることで利用可能な炭素源が増加したことに起因していると考えられる。

図2に各系のsCODの経時変化を示す。24時間後における各系の値は、3000、1500、500mg-COD L<sup>-1</sup>でそれぞれ853、177、67 mg L<sup>-1</sup>を示した。植種なしのコントロール条件では、500 mg L<sup>-1</sup>前後で推移し続けた。除去率は、3000、1500、500 mg-COD L<sup>-1</sup>でそれぞれ70、88、89%であった。PGは有機酸に変換されたのち、水と二酸化炭素に変化されるといった2段階の反応を経て分解が進行すると推定されている<sup>2)</sup>。本実験ではPG濃度が500 mg-COD L<sup>-1</sup>において、89%

の sCOD を除去しており、PG とその中間代謝物の大部分を 24 時間以内に分解した。このことより、PG の有機酸への変換に加え、生成された有機酸も速やかに利用されたことが示唆された。

### 3.2 微生物群集構造解析

図 3 に実験前後の各系で検出された上位 10 種の細菌の相対存在割合を示す。すべてのサンプルで *Pseudomonas* 属と *Delftia* 属が大部分の割合を占めていた。*Pseudomonas* 属は、多彩で強力な物質分解能を有しており、既往の研究において PG 分解に寄与することが報告されている<sup>2)</sup>。*Delftia* 属は有機物や環境汚染物質の分解に関与し、フェノール類などの芳香族化合物や難分解性物質であるポリエチレン (PE) の生分解に関与することが示唆されている<sup>3)</sup>。このことから、*Pseudomonas* 属及び *Delftia* 属が PG 分解に必要なアルコール脱水酵素又はジオール脱水酵素等を有しており、PG の分解に関与した可能性が示唆された。また、PG 濃度が 500 mg-COD L<sup>-1</sup> の系において、*Delftia* 属が 10%を超える相対存在割合を示していることから、低 PG 濃度において効果的に PG を分解できることが示唆された。

*Stenotrophomonas* 属はポリプロピレングリコールの分解菌であり、PG に対して高い基質特異性を示す酵素の産生が報告されている<sup>4)</sup>。さらに、*Comamonas* 属は PE 分解に関与し<sup>3)</sup>、*Flavobacterium* 属は *Pseudomonas* 属との共生によるポリエチレングリコールの分解促進が報告されている<sup>5)</sup>。これらの検出された菌群はいずれも、ジオール脱水酵素やアルコール脱水酵素等の関連酵素群を保持又は利用していると考えられる。したがって、集積培養によって PG 酸化に特異的な微生物群集が構築されたことが示唆された。

### 4. おわりに

本研究では、環境中から PG 分解菌を集積し、分解実験を実施した。その結果、PG 濃度 500 mg-COD L<sup>-1</sup> において 24 時間以内に 89%の sCOD を除去し、PG 分解に *Pseudomonas* 属及び *Delftia* 属が関与していることが示唆された。今後は、代謝物の詳細な解析を行い、さらなる分解機序の解明を行うと共に環境負荷低減型バイオリアクターの構築を目指す。

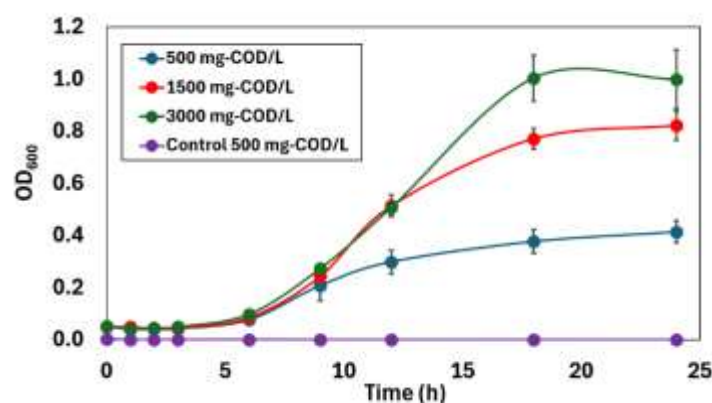


図 1 OD<sub>600</sub> の経時変化

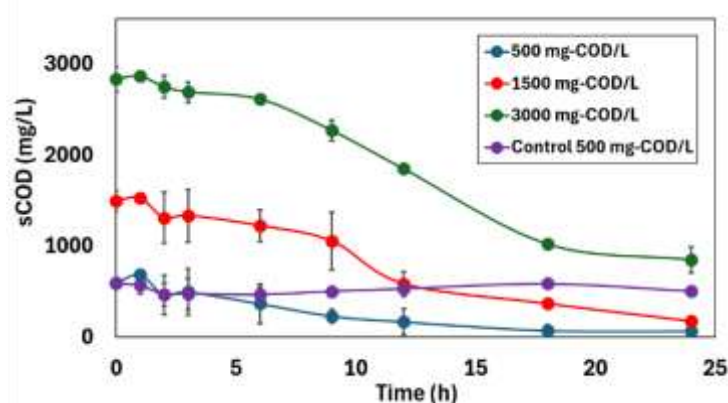


図 2 sCOD の経時変化

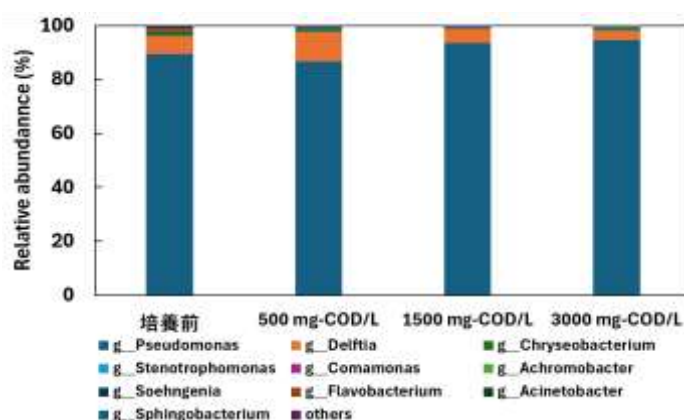


図 3 培養前後の微生物群集構造

### 参考文献

- 1) Udaykumar R et al. Water, Air, and Soil Pollution, 231, Article 286 (2020).
- 2) Toscano G et al. Environmental Science and Pollution Research, 21 (15), 9028–9035 (2014).
- 3) Peixoto J et al. J. Hazard. Mater, 324, 634–644 (2017).
- 4) Tachibana S et al. FEMS Microbiology letter, 218, 345–349 (2003).
- 5) Kawai E et al. Arch Microbiol, 146, 125–129 (1986).