

洗剤用蛍光増白剤の分解菌に関する研究

片山 倫子

(昭和60年9月30日受理)

Studies on Decomposing Bacteria of Detergent Fluorescent Whitening Agents

Michiko KATAYAMA

(Received September 30, 1985)

緒 言

合成洗剤や電気洗濯機の普及に伴い洗剤の使用量が増大したことから、洗剤を含む生活排水による環境汚染が問題となっているが、洗剤中の有機成分である蛍光増白剤についてはその複雑な化学構造にもかかわらず、生分解性についてはあまり検討されていない。

そこで著者は、洗剤中の蛍光増白剤の、物質としての生分解性を検討するために、活性汚泥による生分解、紫外線による光分解、土壌に対する吸着および土壌微生物による生分解等に着眼し、研究をおこなったところ、界面活性剤に比較すると蛍光増白剤は著しく生分解性が悪い物質であることがわかった¹⁾。しかしながら難分解性の物質に対する集積培養法の一つである土壌環流法^{2),3)}を試みたところ、蛍光増白剤についても土壌中の微生物による化学的変化が測定できた^{4),5)}。

本研究ではこれらの結果をもとに環流土壌から蛍光増白剤の分解菌を分離し、分解菌の同定を試みた。

実験方法

1). 蛍光増白剤

前報^{4),5)}で用いたトリアジニルスチルベン系蛍光増白剤(FWA-2)を用いた。図1に構造式を示した。

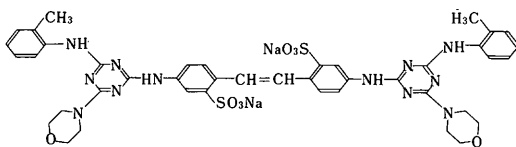


図1 蛍光増白剤(FWA-2)

2). 使用菌株

前報⁶⁾に準じ、FWA-2を唯一の炭素源とした培地上に生育する菌株を、環流土壌からソフトアガー法によって分離した。得られたFWA-2資化性菌の中から、F2-2-①と命名した菌株を使用した。

3). 菌の増殖曲線の測定

菌の増殖曲線の測定は、大缶製作所製のBio Scannerを使っておこなった。

4). FWA-2の生分解実験

実験に用いた基礎培養基の組成は、合成洗剤の生分解度試験方法(JIS K 3363)の基礎培養基に準じ、水1ℓ、塩化アンモニウム3.0g、リン酸ナトリウム1.0g、硫酸マグネシウム0.25g、塩化カリウム0.25g、硫酸第一鉄0.002g、酵母エキス0.3gとした。

基礎培養基(50ml)を含む振とう培養フラスコ(500ml)にFWA-2水溶液の濃度が20ppmになるように蛍光増白剤FWA-2を添加した。

培養は暗室にて30℃で、恒温振とう培養をおこなった。一定期間の培養の後にサンプルを採取し、遠心分離(9,000r.p.m.:30分間)の後に、上澄液を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)にかけ分析した。分析方法は、前報⁵⁾と同様におこなった。

5). 分解菌の同定

F2-2-①株について常法によりグラム染色および、位相差顕微鏡観察をおこなったところ、F2-2-①株はグラム陰性の桿菌であることが判明したので、グラム陰性の

桿菌について行なわれている簡便な同定システム（ベクトン社のミニテック（Ⅲ）非発酵菌同定システム）によって同定をおこなった。

実験結果および考察

FWA-2の資化性菌であるF2-2-①株についてFWA-2水溶液および生分解実験に用いた基礎培養基による増殖曲線を測定したところ図2に示した曲線が得られた。

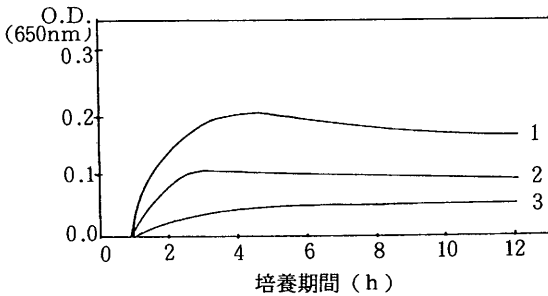


図2 F2-2-①株の増殖曲線（40℃，暗室中）
 1：FWA-2（20ppm）+基礎培養基
 2：基礎培養期のみ
 3：FWA-2（20ppm）のみ

F2-2-①株はFWA-2を添加することにより増殖するが、一般細菌に比べるとあまりよい生育ではなかった。

次にFWA-2の生分解実験をおこなった。結果を表1に示した。

表1 F2-2-①株によるFWA-2（λmax:345nm）のピーク面積変化（%）：検出波長345nm

培養期間 (日)	ピーク A	ピーク B	ピーク C
7	95.1	76.8	35.4
15	95.4	77.9	39.5
30	88.5	63.9	20.4
70	1.9	0.6	0.0

これはFWA-2のHPLC分析により生じるピークについて、培養日数とピーク面積の関係を示したものである。前報⁵⁾で報告したことであるが、FWA-2はO-トルイジン：モルホリンが、1：3のピークAと2：2のピークB、3：1のピークCが生じ、Rt はそれぞれ

6.64分、11.42分、25.0分であった。この時の検出条件は、ODS-SSC-372カラム、アセトニトリル：メタノール：0.05Mリン酸二アンモニウム/30：10：60を溶離液とし、検出液長345nm、AUFS 0.02、温度40℃であった。FWA-2水溶液の極大吸収波長の一つである345nmを検出波長としてピーク面積変化をしらべたところ、主ピークであるBは培養開始後30日までは培養液中に6～7割溶けた状態であるが、70日になると上澄液中にはほとんど溶けていないようである。3つのピークの中ではピークCが30日までに2～3割に減り、ピークAは他の2つのピークよりも減り方が少なかったが、70日にはほとんどなくなっていた。

これらの結果は、生分解実験の開始時に培養液中に溶かしてあったFWA-2が何らかの理由で、上澄液から減少したことを示している。この原因としては、培養中にF2-2-①株によりFWA-2が分解して、345nmに吸収をもたない新しい別の物質に変化するか、培養開始時には溶解していたFWA-2が培養中に不溶性になり沈殿する場合等が考えられる。そこで表1に示した各サンプルについてFWA-2の3つのピークA、B、C以外の新しいピークが出現しているかどうかをしらべるために、検出波長を変えたHPLC分析を試みた。

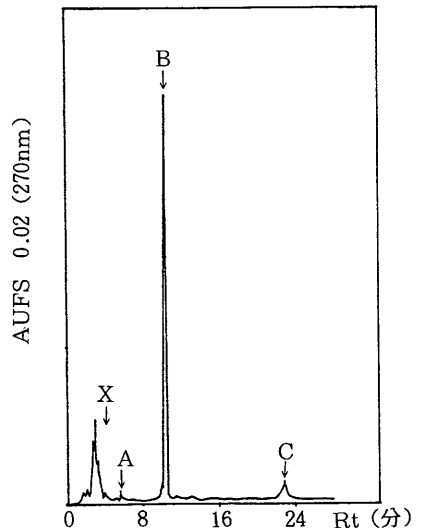


図3 F2-2-①株によるFWA-2水溶液のHPLC変化 培養日数（15日間）

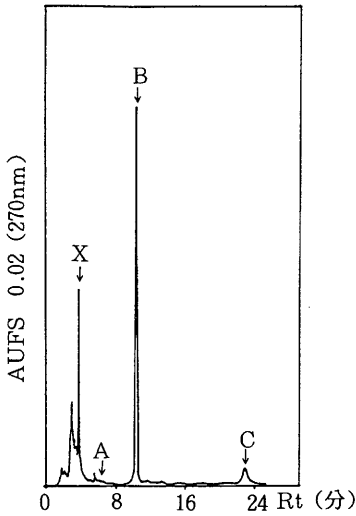


図4 F2-2-①株によるFWA-2水溶液のHPLC変化 培養日数(30日間)

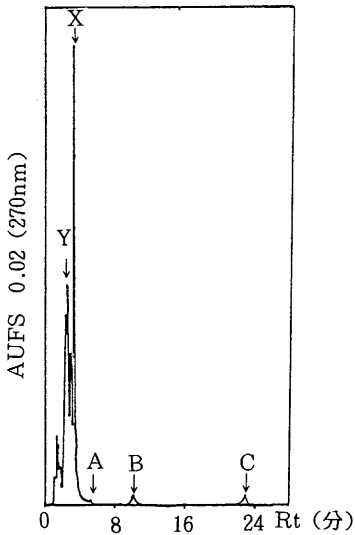


図5 F2-2-①株によるFWA-2水溶液のHPLC変化 培養日数(70日間)

図3, 4, 5はそれぞれ培養日数が15, 30, 70日のサンプルを検出波長270nmにより分析して得た結果である。15日と30日のピークBについてはピーク高はほとんど差がないが、培養日数が30日から70日へと増加すると、ピークBは著しく小さくなる。また3つのピーク以外にRtの小さいピークX, ピークYなどの新しいピークが出現し、急に成長していることがわかる。さらにピークX, ピークYについて検出波長を240nm~315nmまで変化させて得たHPLCのピーク高から、それぞれのスペクトルを描いたところ図6のスペクトルが得られた。これは前報⁴⁾に示したFWA-2のスペクトルとは全くこととなったものである。これらのことは培養日数が70日になると、FWA-2とは別の新しい物質が培養液中に溶けてくることを示している。これらの新しい生成物については更に検討を続けている。

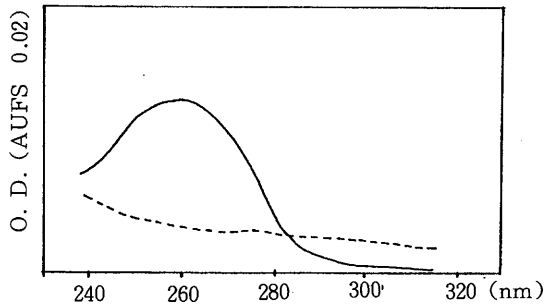


図6 HPLCのピーク高から求めた新しいピーク(X, Y)のスペクトル

— ピーク X (Rt: 4.41分)
 - - - ピーク Y (Rt: 4.03分)

また遠心分離後の沈殿物をしらべたところ、菌体以外の結晶がみられた。そこで沈殿物を集めてエタノールに溶解させたところ、蛍光を発する溶液となった。これをHPLC分析したところFWA-2の3つのピークA, B, Cが観察され、ピークBについてみると、70日培養のサンプルでは沈殿していたのは開始時の約1割と推定された。更に、0.1%のFWA-2を含有する寒天平板培地上につくったF2-2-①株コロニーには、周辺に多量のFWAが結晶として析出する現象が、培養開始後1週間ほどで観察されることから、表1にみられる初期の減少は、FWA-2の菌体に対する吸着によるものと考えられる。図7は、FWA-2培地に生育したF2-2-①株の透過型電子顕微鏡写真であるが、菌体の周囲に結晶がついている様子がわかる。

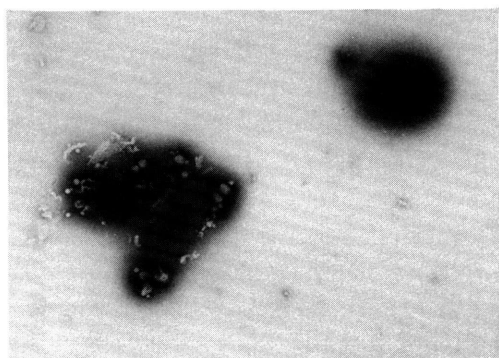


図7 F2-2-①株の透過型電子顕微鏡写真
(0.1%FWA-2入り 寒天平板培地にて培養)

次にF2-2-①株の同定を試みた。ミニテックのディスクによる同定試験では、オキシダーゼ (+), マッコンキー寒天 (+), 嫌気ブドウ糖 (-), 好気ブドウ糖 (+), マルトース (+), 白糖 (+), キシロース (+), アルギニン (+), リジン (-), オルニチン (-), 尿素 (+), ONPG (+), インドール (-), 硝酸塩還元 (-), 窒素ガス (+), 澱粉 (-), フェニルアラニン (+), クエン酸塩 (-), エスクリン (+), マンニトール (+), 運動性 (-) の結果から、ミニテックコードブックによるとF2-2-①株は、99.99%の確率で *Achromobacter species Vd-2* であると判定された。 *Achromobacter* については、最近は分類表⁷⁾からはずれており、 *Alcaligenes* とともに分類学上ではまだ明確にされていない部分が多い。更に詳細な検討により、F2-2-①株についても明らかにしていきたい。

要 約

難分解性の物質である蛍光増白剤 (ビススチルベン型 FWA-2) の資化性菌F2-2-①株による生分解実験の結果、70日間の培養により上澄液中のFWA-2が検出されなくなった。上澄液のHPLCによる分析から分解生成物と推定される新しいピークが確認されると同時に、菌体に対する吸着も生じることがわかった。ミニテックによるF2-2-①株の同定試験からは99.99%の確率で *Achromobacter species Vd-2* と判定された。

本研究は昭和59年度東京家政大学特別研究費によっておこなったものである。

引用文献

- 1) 片山倫子ほか: 家政誌, **33**, 124 (1982)
- 2) 阿部幸子, 藤田万里子, 片山倫子: 家政誌, **31**, 736 (1980)
- 3) 阿部幸子, 藤田万里子, 片山倫子: 家政誌, **33**, 527 (1982)
- 4) 片山倫子: 農化, **58**, 449 (1984)
- 5) 片山倫子: 農化, **58**, 457 (1984)
- 6) 片山倫子ほか: 日本農芸化学会, 昭和59年度大会講演要旨集 p, 51.
- 7) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume I), Williams & Wilkins., (1984年) P.363