

多摩川およびその流域のいくつかの試水における
塩素化フェノールの分解とその分解菌に関する
生態学的研究

1 9 9 0 年

瀬 戸 昌 之

東京農工大学農学部助教授

多摩川およびその流域のいくつかの試水における
塩素化フェノールの分解とその分解菌に関する
生態学的研究

Ecological Studies on the Degradation of
Chlorophenols and the Chlorophenol-Degraders
in the Water Samples from the River
Tamagawa and its Basin.

1990年

瀬戸昌之, 東京農工大学

Masayuki Seto, Tokyo Univ. of A & T

とうきゅう環境浄化財団

Tokyu Foundation for Better Environment

目 次

1. はじめに	1
2. 多摩川における塩素化フェノールの分解菌の分布と 塩素化フェノールの分解様式	2
3. いくつかの環境試水における2,4-dichlorophenolの分解	13
4. いくつかの環境試水における2,4-dichlorophenolの分解菌の サヴァイヴァルと分解能の発現	22
5. 細菌のサヴァイヴァルを支配する要因としての原生動物の影響	35
6. おわりに	42
7. 謝 辞	42
8. 引用文献	43

1. はじめに

農業や工業化学物質などの、様々な人工化学物質 (xenobiotics) が環境に放出されている。これらは物理化学的および生物的過程を経て分解される。このうち、無機化までの完全な分解は微生物の存在する系でのみ認められることから、微生物による代謝が主要な分解過程であると考えられている。

しかしながら、環境におけるこれらの分解速度が、人工化学物質の放出速度を下回ることもあると考えられる。なぜなら、例えば、除草剤 CNP (*p*-nitrophenyl 2,4,6-trichlorophenylether) は水道水から微量ながら検出され、同時に、不純物として生成される毒性の強い四塩化ダイオキシンの混入も懸念されているからである。このように、我々は様々な人工化学物質が含まれる環境の中で生活している。

人工化学物質は極めて低濃度であっても食物連鎖を経て動物体内に高濃度に蓄積され、個体群に致命的な打撃を与えることがある (Woodwell *et al.*, 1967; 山根1978)。この現象は脂溶性が高く、かつ、難分解性の人工化学物質について著しい (瀬戸、1978; Tinsley, 1979)。さらに、1 l の溶液には濃度がわずかに 1ppt であっても、例えば分子量 1,000 の物質の分子数は数千億個含まれる。この莫大な数の分子が生物に及ぼす慢性的影響については不明のままである。

環境試料に添加された特定の人工化学物質の分解の様子に関する研究は多いが、分解菌の生態に関する研究は極めて少ない。そのため、分解の様子という結果のみが明らかになってきたが、その原因である分解菌の情報が欠如し、いわゆる因果

関係が不明のままである。

例えば、環境試料に添加された人工化学物質の分解の様子は、多くの場合、長時間にわたって分解が認められない誘導期 (lag period) を経て、その後急激に分解される。この誘導期の原因は、酵素誘導に必要な時間 (Torstensson *et al.*, 1975)、突然変異菌の出現 (Schmidt *et al.*, 1983)、基質に対する選り好み (Kuiper & Hanstveit, 1984)、栄養塩類の欠如 (Lewis *et al.*, 1986)、その他 (Wiggins *et al.*, 1987) に帰せられてきた。これらを検討し、この誘導期は低密度の分解菌が高密度に増殖するまでに必要な時間であることを示唆した (Wiggins *et al.*, 1987) のはごく最近のことであった。

さらに驚くべきことに、環境における特定の人工化学物質の分解菌の分布すらほとんど明らかにされていない。

本研究では、除草剤の基本骨格であり、かつ難分解性であるとされている 2,4-dichlorophenol (DCP) を人工化学物質のモデル化合物として選び、多摩川、地下水、湖沼等の環境試水における DCP の分解菌の密度を調べ、かつ試水に添加した DCP の分解との関係を調べた。また、DCP と関連するその他の塩素化フェノールの分解と分解菌についても同様の検討をした。さらに、DCP の分解菌の環境試水におけるサヴァイヴァルと、これを支配する要因について生態学的な視点から検討した。

2. 多摩川における塩素化フェノールの分解菌の分布と塩素化フェノールの分解様式

Abstract

Distribution of phenol or chlorophenol-degrader *in situ* of the water in the river Tamagawa was studied by a most-probable-number(MPN)method. The MPN(cell/ml)in the present study indicates the number of micro-organism which can degrade more than half of $1\mu\text{g}$ carbon/ml of each phenol or chlorophenol in a mineral salts medium containing $0.02\mu\text{g}$ carbon/ml of yeast extract within 5 weeks aerobically at 25°C .

The density of the degrader of 2,4-dichlorophenol(DCP), for example, was as low as $0.93\sim 15$ cell/ml, compared to the density of heterotrophic microbes of $4.3\times 10^4\sim 2.4\times 10^5$ cell/ml. Because of this low density, the apparent lag period of 6 days was observed preceding the rapid degradation of $1\mu\text{g}$ DCP-carbon/ml. This lag period was the time for the degrader to increase its density to $10^4\sim 10^5$ cell/ml. The repeated application of DCP showed much shorter lag period because of the high density of the degrader.

No distinct changes in the MPNs were observed among the various seasons. While, when the stream flows down, the distinct increases were observed in the MPNs of phenol(PHE)-degrader, *m*-chlorophenol(M-CP)-degrader, *p*-chlorophenol(P-CP)-degrader, and heterotrophs. At upper stream, the MPNs of PHE-degrader were in the range of $2.3\times 10^{-1}\sim 1.4\times 10^2$, *o*-chlorophenol(O-CP)-degrader $0.043\sim 0.43$, M-CP-degrader $0.15\sim 0.75$, P-CP-degrader $0.4\sim 4.3$, 2,4-dichlorophenol(DCP)-degrader $0.043\sim 0.43$, 2,4,5-trichlorophenol(TCP)-degrader $0.009\sim 1.9$, and heterotrophs $2.3\times 10^2\sim 4.6\times 10^4$. At lower stream, the MPNs of PHE-degrader were in the range of $2.3\times 10^4\sim 2.4\times 10^5$, O-CP-degrader $0.023\sim 4.3$, M-CP $4.3\sim 93$, P-CP $23\sim 930$, DCP $0.68\sim 15$, TCP $0.009\sim 0.53$, and heterotrophs $1.5\times 10^3\sim 2.0\times 10^6$. TCP-degrader which degraded $1\mu\text{g}$ TCP-C/ml in the medium for MPN method failed to degrade $1\mu\text{g}$ TCP-C/ml in the river water without any amendments, suggesting the existence of an ecological limiting factor(s) which control the expression of the ability of the degrader.

2.1 はじめに

多摩川の上流から下流の試水における、いくつかの塩素化フェノールやフェノールの分解菌密度の分布と季節変化を調べ、さらに、添加した塩素化フェノール等の分解について二、三の考察を行なった。

2.2 材料と方法

試水は関東地方の北西から東京湾へ流下する多摩川の4つの定点 (St-1, 2, 3および4) から得た。St-1は多摩川の最上流部の支流の1つ、山梨県の火打石谷、である。この谷の集水域には人家や道路はなく、人為の影響はほとんど無いと考えられる。St-2は小河内ダムの麦山定点である。St-3は汚濁の進んだ中河原、そして、最下流のSt-4は海水が混入する登戸である。

添加した塩素化フェノール等の分解実験は、St-3の試水について行なった。表流水500mlを殺菌フラスコに採水し、1時間以内に各々の塩素化フェノールとフェノールの分解菌密度の測定、および、この試水に添加した塩素化フェノール等の濃度の経時変化の測定を開始した。

各々の塩素化フェノール等の分解菌密度の分布や季節変化は4つの定点の現場で測定操作を行なった。

各々の塩素化フェノール等の分解菌密度の測定は最確数 (most probable number, 以下、MPN)法によった。すなわち、試水を殺菌したリン酸バッファー溶液で適宜10倍希釈し、その1mlを、各々の塩素化フェノール等が炭素量 (C量) で1.1 $\mu\text{g/ml}$ 含まれる、試験管中の無機培地10mlに投入し、毎週かく押しながら所定の期間培養した。各々の希釈段階につき3本の試験管を用い、所定の培養期間後に、各々の試験管中の残留

塩素化フェノール等の濃度を測定した。各々の塩素化フェノール等が半分以下に減少した試験管を陽性、90%以上残留していた試験管を陰性として、コード表 (Fenchel & Hemmingsen, 1974) に照合してMPNを求めた。なお、試水の分解菌密度が1 cell/ml以下と予想されたときは、試水10mlあるいは100mlを、各々の塩素化フェノール等が11 $\mu\text{g C/ml}$ あるいは101 $\mu\text{g C/ml}$ 含まれる、試験管中の10倍あるいは100倍高濃度の無機培地1mlに各々、投入し、他は同様の操作を行なった。なお、無機培地の代わりに、ろ過殺菌した河川水等を用いて、培地の違いがMPNに及ぼす影響についても検討した。ろ過殺菌は、0.22 μm の孔径のメンブランフィルター (Millex-GV, Millipore Corp.) で行なった。

無機培地 (MS medium) の組成は以下のとおりである。

Na_2HPO_4 , 298 ; KH_2PO_4 , 122 ; NH_4NO_3 , 160 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.6 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14.8 ; Na_2SiO_3 , 3.7 ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.98 ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.42 (以上、単位は $\mu\text{g/ml}$) , H_3BO_4 , 620 ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 540 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 12.4 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.4 ; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.0 (以上、単位は ng/ml)。なお、これには生長因子として粉末酵母エキス (Difco) を塩素化フェノール等の炭素量で2%になるように添加した。この培地のpHは7.2であった。

すべての培養は25°C、暗所で好氣的に行なわれた。従って、MPNは、特にことわらない限り、1 $\mu\text{g C/ml}$ の塩素化フェノールあるいはフェノールを、3~5週間以内に、0.02 $\mu\text{g C/ml}$ の粉末酵母エキスを含む無機培地中で、25°C、好氣的に分解できる分解菌数を示すことになる。

また、稀釈に用いたリン酸バッファー溶液の組成は上記のそれである。

従属栄養微生物数の密度測定もMPN法によった。基質として塩素化フェノール等のかわりに、グルコース、グルタメートおよびグリセリンを各々5 μ g、および、粉末酵母エキス10 μ g C/mlを用い、培養7~10日目に白濁している試験管を陽性としてコード表に照合した以外は上記と同様である。

DCPおよびその他の塩素化フェノールとフェ

ノールの濃度は、これらを添加した試水の一部を適宜無菌的に採水し、0.45 μ mの孔径のメンブランフィルター (Millex-HV, Millipore Corp.) でろ過し、その20~100 μ lを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。このときの使用機器、カラム、および、測定条件をTable 1に示した。

全有機炭素 (TOC) は過硫酸カリウムによる湿式燃焼法 (瀬戸・丹下、1980) で定量した。

Table 2.1. HPLC analysis for chlorophenol or phenol

Instruments	Yanaco L-4000W (Yanagimoto Co., Ltd.) Shodex M-315 (Showa Denko K.K.)
Column	Shodex RS pak DS-613 & DS-613 (p) (Showa Denko K.K.)
Column temperature	50-60°C
Eluent	Water: Methanol (4.5:5.5, v/v), pH 11.2 (Na ₂ HPO ₄ -NaOH buffer)
Flow rate	1.0 ml/min.
Sample size	20-100 μ l
Detection wavelength	254nm
Recorder & Integrator	Chromatocorder 12 (System Instruments Co., Ltd.)

2.3 結 果

中河原の多摩川試水における塩素化フェノールの分解菌数の密度は極めて低かった。例えば、DCPの分解菌のMPNは、1987および1988年の7回の測定で、最小の0.93から最大の15cell/mlの範囲にあり、平均値は5.4cell/mlであった。これに対して、従属栄養微生物のMPNは、5回の測定で、最小4.3 $\times 10^4$ から最大2.4 $\times 10^5$ cell/ml、

平均値1.8 $\times 10^5$ cell/mlであった。すなわち、従属栄養微生物の数万個の中にDCP分解菌がわずかに1個存在することになる。

試水にDCPを添加すると、DCPは添加後6日間の誘導期 (lag phase) の後、急激に分解され、8日目に消滅した (Fig. 2.1)。いっぽう、DCPの分解菌数は4日間の誘導期の後、急激に増加し、8日目に9 $\times 10^5$ cell/mlになった。DCPを添加し

ないと、分解菌数はあまり変化しなかった。これらのことから、分解菌は添加したDCPを資化してその数を増加させたと考えられる。DCP添加後4日目の3cell/mlの分解菌数が8日目の 9×10^5 cell/mlまで対数増殖したとすれば、比増殖速度は1日当り3.2、あるいは、1時間当り0.13となり、1回分裂して分解菌数が2倍になる世代時間は5.2時間となる。

次に、DCPの分解菌のMPNのみならず、他の塩素化フェノール等の分解菌のMPNも調べた。

Table2.2に示したように、1988年10月13日の試水の各々の塩素化フェノールの分解菌数も従属栄養微生物数に較べて極めて低かった。いっぽう、フェノール分解菌数は多く、従属栄養微生物の5個の中で約1個存在することになる。このことは、自然水界ではフェノールの分解菌数は多いが、この分子に塩素原子が1つでも結合すると、これを分解できる菌は極めて限られることを意味する。

この試水にDCPを添加すると、Fig.2.1とほぼ同様にDCPは分解され、7~9日目に消滅した。いっぽう、DCPの分解菌数は7日目に 10^5 cell/ml以上になり、13日目に 2.3×10^3 cell/mlになった。

Table2.2は、また、試水にDCPしか添加していないにもかかわらず、PCPとTCPの分解菌数がDCPを添加していない試水より増加したことを示す。DCPを添加しなくとも増加があったのは、試水の溶存有機炭素 ($10 \mu\text{g/ml}$) を基質として利用したためと考えられる。ただし、OCPの分解菌はいずれも減少した。

多摩川の上流から下流への4つの定点について、フェノールと塩素化フェノールの分解菌密度の分布と季節変化を調べた (Table2.3)。

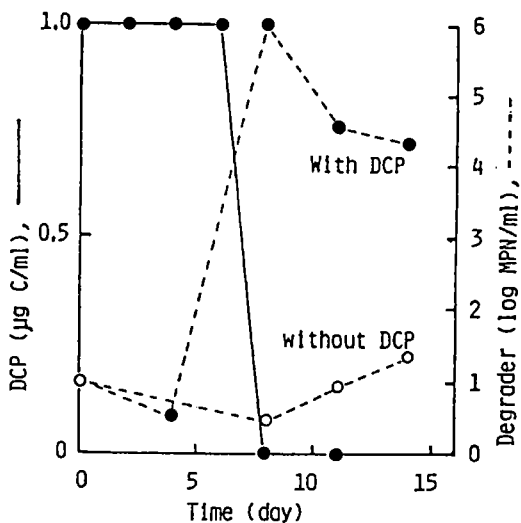


Fig.2.1. Degradation of DCP and growth of DCP-degrader with or without DCP in water sampled on Nov. 16th, 1987 from the river Tamagawa.

流下にともなって、全有機炭素 (TOC) 濃度は増加し、有機汚濁が進行していた。なお、最下流のSt-4のTOC濃度が必ずしも高くないのは、海水の混入による希釈や沈殿のためと思われる。従属栄養微生物の密度は、小河内ダムのSt-2で最小、St-4で最大となった。フェノール (以下、PHE) の分解菌密度は、流下にともなって増加し、従属栄養微生物の10細胞のうち約1細胞がPHEの分解能を有すると思われた。

各々の5種類の塩素化フェノールの分解菌密度は極めて低い。流下にともなって各々の密度は増加するようであるが、この傾向はパラクロロフェノール (以下、P-CP) とメタクロロフェノール (以下、M-CP) の分解菌以外ははっきりしなかった。St-1では従属栄養微生物の 10^4 細胞のうち、約1細胞が各々の塩素化フェノールの分解

Table 2.2. MPN(cell/ml) of *o*-chlorophenol(O-CP), *m*-chlorophenol(M-CP), *p*-chlorophenol(P-CP), 2,4-dichlorophenol(DCP) or 2,4,5-trichlorophenol(TCP)-degrader before or after the 13-day-incubation with 1 μ g C/ml of DCP or without DCP in water sampled on Oct.13th, 1988 from the river Tamagawa.

Incubation	Degrader	HTR ¹⁾	PHE ²⁾	O-CP	M-CP	P-CP	DCP	TCP
	Before		4.3×10^4	9.3×10^3	0.23	2.3	4.6×10	1.5
After	with DCP	2.3×10^5	9.3×10^4	0.1 >	100 >	9.3×10^3	2.3×10^3	2.4
	without DCP	9.0×10^5	9.3×10^4	0.1 >	9.0	2.4×10^2	2.4×10	0.1 >

1) Heterotrophic microbe

2) Phenol-degrader

Table 2.3. Distributions and seasonal changes of MPNs of phenol or chlorophenol-degrader, which degraded 1 μ g phenol or chlorophenol-C/ml in MS medium within 5 weeks, in the water of the river Tamagawa.

Sampling Date	Site	Water temp. (°C)	TOC (μ g/ml)	Heterotrophs (cells/ml)	PHE ¹⁾	O-CP ²⁾	M-CP ³⁾	P-CP ⁴⁾	DCP ⁵⁾	TCP ⁶⁾
					(cells/ml)					
Nov. 26th 1987	St-1	5.9	1.2	1.5×10^3	—	0.23	0.23	0.93	0.23	0.23
	St-2	15.0	0.43	2.3×10^2	9.3×10	0.23	0.23	0.93	0.43	0.23
	St-3	13.1	6.6	2.4×10^5	—	0.23	46	—	0.93	0.23
	St-4	12.4	6.9	1.5×10^5	—	0.23	15	110	0.93	0.23
Feb. 28th 1988	St-1	2.8	1.9	4.5×10^3	9.3×10	0.043	0.21	0.93	0.23	0.15
	St-2	7.8	—	6.1×10^2	1.4×10^2	0.14	0.15	0.43	0.04	—
Feb. 29th 1988	St-3	9.7	17.3	1.5×10^5	1.1×10^5	0.023	4.3	23	1.5	0.09
	St-4	8.4	3.3	2.0×10^5	4.3×10^4	0.68	4.3	150	0.68	0.009
May. 25th 1988	St-1	9.8	2.4	4.3×10^3	9.0×10	0.23	—	0.9	0.39	—
	St-2	14.2	2.4	4.6×10^3	9.3×10	0.23	0.3	0.4	0.09	1.9
May. 26th 1988	St-3	23.4	14.1	2.3×10^5	2.3×10^4	0.93	15	240	2.4	0.29
	St-4	19.1	10.7	9.3×10^5	2.4×10^5	0.93	93	430	2.3	0.53
Aug. 29th 1988	St-1	15.8	—	4.6×10^4	9.0×10	0.43	0.75	4.3	0.24	0.093
	St-2	22.7	—	1.1×10^3	2.3×10	—	—	0.43	0.043	0.009
Aug. 30th 1988	St-3	21.0	14.0	2.4×10^5	4.3×10^4	1.6	9.3	93	4.3	0.004
	St-4	23.8	14.1	1.5×10^6	9.3×10^4	4.3	9.3	930	15	0.21

1) phenol, 2) *o*-chlorophenol, 3) *m*-chlorophenol, 4) *p*-chlorophenol, 5) 2,4-dichlorophenol, 6) 2,4,5-trichlorophenol

能を有すると思われた。また、St-4では従属栄養微生物の 10^8 細胞のうち、P-CPとM-CPの分解菌を除いて、約1細胞が各々の塩素化フェノールの分解能を有すると思われた。

なお、これらの結果は、採水の季節を問わず認められ、季節の違いによる何らかの変化や傾向は認められなかった。

試水の分解菌密度の高低と塩素化フェノールやフェノールの顕著な分解開始までの時間の長短は

対応するであろうか？

St-3から、1989年3月28日に採水した試水における塩素化フェノール等の分解菌密度は以下のものであった。このときのMPNの培養にはMS培地を用い、培養期間は3週間であった。また、()内は添加した各々の初期の塩素化フェノール等の濃度 ($1 \mu\text{g C/ml}$) を5%以下に減少できる分解菌数を示す。

PHEの分解菌密度 (MPN/ml) は 2.3×10^3

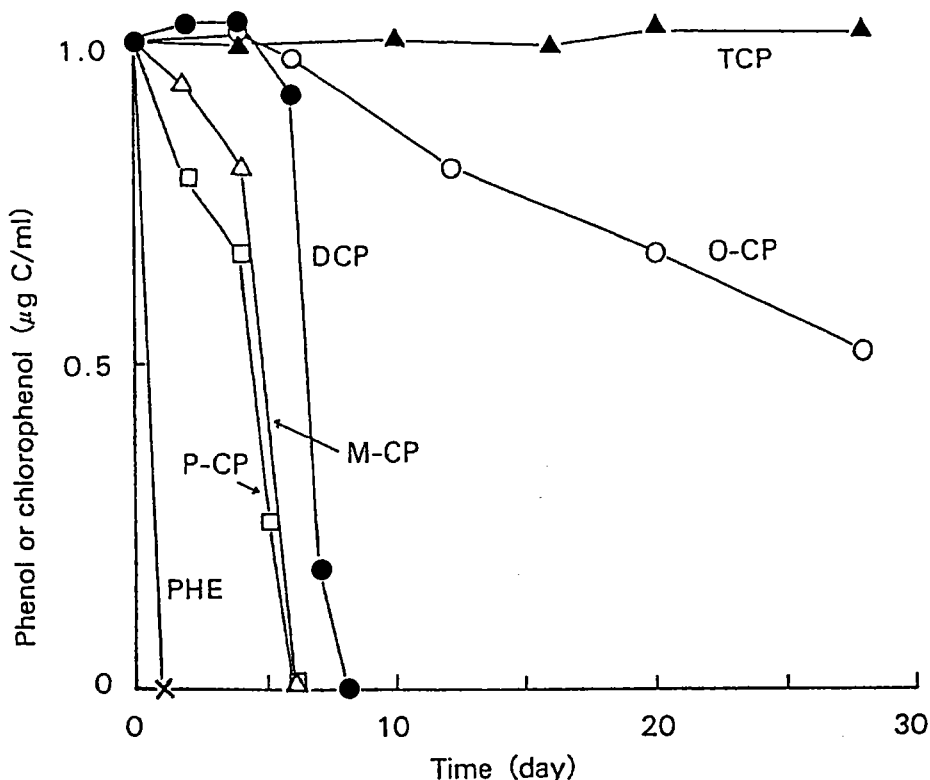


Fig.2.2. Aerobic degradations of phenol and chlorophenols at 25°C in water sampled on Mar. 28th, 1989 from the river Tamagawa. Abbreviations are the same with those in Table 2.3.

(2.3×10^3)、オルソクロロフェノール（以下、O-CP）のそれは0.23(0.23)、M-CPのそれは24(9.3)、P-CPのそれは150(93)、DCPのそれは21(9.3)、そして、TCPのそれは0.09(0.04)であった。また、従属栄養微生物密度 (MPN/ml) は 2.1×10^4 であった。

この試水100mlに、各々の塩素化フェノール等を $1 \mu\text{g C/ml}$ になるように別々に添加し、好氣的に培養し、残存する塩素化フェノール等の濃度の経時変化を調べた (Fig.2.2)。初期の分解菌密度の高低と、塩素化フェノール等の顕著な分解開始時間や分解終了までの時間の長短は、TCPを除いて、よく一致した。

とくに興味ある事実は、この試水にTCPの分解菌が存在したにもかかわらず、TCPは分解されなかった点である。すなわち、MS培地中で、3週間で、 $1 \mu\text{g TCP-C/ml}$ を5%以下に減少できる分解菌数は0.04cell/ml、50%以下に減少できる分解菌数も含めると0.09cell/ml、存在しながら、これらの分解能は河川水中では、4週間、発現しなかったことになる。

同様の結果は、DCPを添加あるいは無添加で13日間培養した試水 (Table.2.2) でも得られた。すなわち、DCPを分解した後の試水とDCP無添加の2つの試水を100ml容殺菌ガラス容器に分注し、塩素化フェノール等を $1 \mu\text{g C/ml}$ になるよう別々に添加し、その後の分解の様子を調べた (Fig. 2)。分解菌密度の高低と塩素化フェノール等の顕著な分解開始時間の長短は、TCPを除いて、よく一致した。後期のO-CP、M-CPおよびP-CPの各々の分解速度は、DCPを分解した後の試水ではDCP無しの試水より低くなった。

TCPはDCPを分解した後の試水でも3週間以

上残存した。この試水には培養開始時に2.4cell/mlのTCP分解菌がMPN法で検出されていた。このことは無機培地中で $1 \mu\text{g C/ml}$ のTCPを3週間以内に消費し尽す分解菌が存在していたことを意味する。しかるに、フラスコ中の試水で $1 \mu\text{g C/ml}$ のTCPが3週間以上残存したことは、この分解菌は無機培地中では増殖して分解能力を発現するが試水では増殖できないこと、あるいは分解能力を発現しないことを示す。この試水の培養終了時ではこのMPN法でもTCPの分解菌は検出されなかった。

データは示していないが、殺菌した試水では塩素化フェノール等の濃度変化は、8週間の培養では、4%以内であった。また、1989年10月19日のSt-3の試水を1, 10, 100倍希釈したときのDCP分解菌のMPNの陽性コードは3-0-0であった。このことは試水1mlにDCP分解菌が2.3個存在したことを意味する。このときの培養期間は3週間であった。培養期間が8週間であっても、陽性コードは同じ3-0-0であった。なお、培養期間が1週間では、陽性の試験管は存在しなかった。MPNの試験管中の従属栄養微生物の密度は、陽性、陰性にかかわらず、8週間目で $5.8 \times 10^5 / \text{ml}$ であった。これらのことは、塩素化フェノール等の分解菌のMPNの培養期間は3週間以上であれば十分であること、また、培養期間が8週間のように長期間であっても、例えば、 $5.8 \times 10^5 / \text{ml}$ の従属栄養微生物の一部がこの期間に変異して分解菌に転じることは無いことを示唆する。

培地の違いが、DCP分解菌のMPNに及ぼす影響について調べた (Table 2.4)。培地が異なっても、試水が同じであれば、MPNはほぼ同様の値を示した。易分解性の有機物を代謝しながら人

工化学物質を共役代謝 (co-metabolism) する分解菌の存在 (Horvath, 1972 ; Schmidt & Alexander, 1985)を想定して、粉末酵母エキス $10 \mu\text{g C/ml}$ を含む無機培地 (Table 1のenriched MS medium) も用いたが、必ずしも、MPNは大きくなかった。また、ろ過殺菌した河川水では、栄養塩類の欠乏が予想されたが、必ずしも、MPNは小さくなかった。

以上は、 $1 \mu\text{g C/ml}$ の塩素化フェノールあるいはフェノールを分解できる菌数であり、分解の様子であった。自然環境中の人工化学物質の濃度が通常極めて低く、その分解の様子やカイネテックスが高濃度基質を用いる大部分の微生物学実験から得られたそれらと大きく異なる場合があること (Alexander, 1984; Hoover *et al*, 1986)を考慮

して、 $0.1 \mu\text{g C/ml}$ 以下のDCPの分解菌数と分解の様子を二、三検討した (Table 2.5と Fig. 2.4)。

Table 2.5は 0.01 から $1 \mu\text{g C/ml}$ のDCPを分解できる菌数はほぼ同じであることを示す。DCPの濃度が高くなるとこれを分解できる菌数が減少するのはDCPの殺菌作用のためであろう。低濃度のDCPの分解の様子 (Fig. 2.4)は、初期の誘導期とその後の急激な分解を示し、高濃度のそれらと同様であった。ただし、分解の後期にDCPが 1 ng/ml 程度残存し続け、極く低濃度のDCPは分解されにくいことを示唆した。また、DCP添加後15日目の分解菌数は、 0.01 、 0.03 および $0.10 \mu\text{g C/ml}$ の添加試水で、各々、 1.1×10^5 、および 2.4×10^4 および $2.4 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ に増加し

Table 2.4. MPNs (cell/ml) of DCP-degrader which degraded $1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ in various media within 5 weeks. Water samples are from four sites of the river Tamagawa.

Sampling		Medium for MPN			
Date	Site	MS ¹⁾	Enriched MS ²⁾	D-MS ³⁾	Filtrated water sample ⁴⁾
Aug. 29th	St-1	0.24	0.24	0.24	—
1988	St-2	0.043	0.43	0.043	0.093
Aug. 30th	St-3	4.3	0.9	1.5	0.43
1988	St-4	15	15	24	15

¹⁾ MS medium

²⁾ MS medium enriched with $10 \mu\text{g}$ yeast extract-C/ml

³⁾ MS medium whose phosphate buffer and ammonium nitrate were diluted 1000 and 50 times, respectively

⁴⁾ Filter-sterilized-sample of the river water of each site

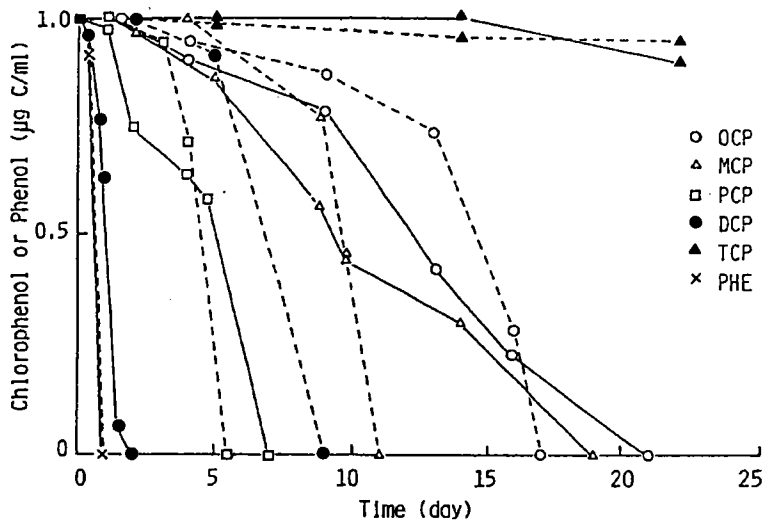


Fig. 2.3. Degradation of chlorophenol or phenol in water after the 13-day-incubation with 1 $\mu\text{g C/ml}$ of DCP (—) or without DCP (-----).

Abbreviations are the same with those in Table 2.

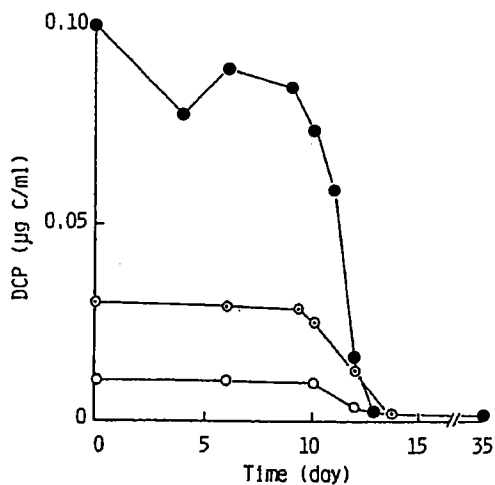


Fig. 2.4. Degradation of DCP at low concentration in water sampled on Feb. 6th, 1988 from the river Tamagawa.

Table 2.5. MPNs (cell/ml) of DCP-degrader estimated by using various concentrations ($\mu\text{g C/ml}$) of DCP

Concentration	0.01	0.03	0.1	1	3	10
MPN	4.6 ¹⁾	4.3 ¹⁾	4.3 ²⁾	4.3 ²⁾	0.93 ²⁾	0.43 ²⁾

¹⁾ in water sampled on Feb. 16th, 1988

²⁾ in water sampled on Dec. 24th, 1987

ていた。

2.4 考 察

多摩川の試水における塩素化フェノールの分解菌密度は極めて低く、例えば、DCP分解菌のそれは5.4cell/ml程度であった。また、塩素化フェノールの分解の多くは初期の誘導期とその後の急激な分解の二相を示した。この誘導期は分解菌密度の低さで説明できる。すなわち、分解菌が細菌で占められ、その1個の重量を0.2pgとする(瀬戸ら、1988)と、5 cell/mlは1 pg/mlになる。これが、例えば、1 $\mu\text{g/ml}$ の人工化学物質を活発に分解したとしても、分解菌の重量の10万倍に相当する人工化学物質の減少は検出されにくく、みかけの誘導期 (apparent lag period) を示すことになる。分解菌が増殖して $10^4 \sim 10^5$ cell/mlになると、その重量は0.002~0.02 $\mu\text{g/ml}$ になり、はじめて、例えば、1 $\mu\text{g/ml}$ の人工化学物質の急激な分解として検出されることになる。このように初期の誘導期は、分解菌が増殖して人工化学物質量に近い量になるまでの所要時間であった (Wiggins *et al*, 1987)。

この一見あたりまえの結論に到達するまでに案外時間がかかっている。初期の誘導期は酵素誘導に必要な時間 (Torstensson *et al*, 1975)、突然変異菌の出現 (Schmidt *et al*, 1983)、基質に対する選り好み (Kuiper & Hanstveit, 1984) 等々により説明できるとした説をめぐって賛否の議論がなされてきた (Wiggins *et al*, 1987)。このような回り道の原因は自然環境の場における人工化学物質の分解を扱いながら、その分解の様子 (機能) のみを研究して、分解に関与する菌の分布 (構造の一部) すら明らかにしなかったことにある。

事実、本研究を開始する際、多数の文献を調べたが、塩素化フェノールの分解に関する文献は極めて多いにもかかわらず、分解菌に関する文献は殆んど見つからなかった。

本研究のように、特定の人工化学物質の分解菌の分布や季節変化を、人為の影響を様々に受けている特定の河川で調べた例はない。多摩川のSt-1は塩素化フェノール等の暴露を受けたことはほとんどないと思われるが、分解菌はわずかながら存在した。しかし、その密度は、季節を問わず、驚くべき高い再現性を示した。このことは分解菌は従属栄養微生物の一定の割合で生産されていることを示唆する。St-2, 3, 4でも、この高い再現性は認められたが、従属栄養微生物に占める分解菌の割合は、St-1のそれより、減少する傾向にあった。

多数の微生物が共存する自然の試料を用いて、分解菌のように特定の機能を有する少数の菌を測定する方法はMPN法に限られよう。本研究のMPNは、塩素化フェノール等を無機培地中で分解できる菌数を示す。しかしながら、この方法には検討の余地がある。たとえば、本MPN法で得られた分解菌数は、自然界で分解に関与している菌数と必ずしも一致しない。事実、本MPN法でTCPの分解菌が検出されたが、試水ではTCPの分解が認められなかった。このことは、そのままの河川水では、栄養塩類や生長因子が欠乏していることや、阻害物質等の制限要因の存在等を意味する。すなわち、多摩川はTCPの分解のポテンシャルを有するが、その能力は何らかの要因によって制限されていることになる。この要因を、解明し、人為時に制御することは興味ある生態学的事業であろう。このためには、分解のポテンシャルを最大に引き出すMPN用の培地の検討と

現実の分解能の比較検討が不可欠である。また、ろ過殺菌した河川水を培地としたDCPのMPN (Table 2.4) は他の培地を用いたMPNより必ずしも小さくなかった。このことは、MS無機培地で分解能を発現する菌は実際の河川水でも同様に分解能を発現したことを示唆する。ただし、ろ過殺菌した河川水には生長因子として粉末酵母エキスを添加し、MPNの稀釈にリン酸バッファーを用いたので、実際の河川水でこれらが制御要因になっているかどうかは検討を要する。

Table 2.2に示すように、試水にDCPしか添加していないにもかかわらず、P-CPとTCPの分解菌数がDCPを添加していない試水より増加した。このことは、増殖したDCP分解菌の中には同時にP-CPやTCP分解能も有する菌が含まれるのか、DCP分解能を有しないPCPやTCP分解菌が増加したのか不明である。オルトとパラ位の塩素を含むDCPの分解菌がパラ位の塩素のみを含むPCPを分解することは考えられるが、そうであるなら何故オルト位の塩素のみを含むO-CPを分解できるDCPの分解菌がいないのであろうか？

Table 2.2はまた、一種類の人工化学物質で汚染した自然の環境の場が、その物質の分解菌を増殖させて浄化能力を高めるが、同時に、他の物質の分解菌も増加させてその浄化能力を高めることがあることを示す。このことは、逆に、ある物質の分解菌の存在等を生物指標としても、その環境の場がその物質で汚染したことを必ずしも意味しない。

DCPのような塩素化フェノールは難分解性物質であると言われる。確かに、多摩川の試水ではDCPの分解に約1週間かかる。多摩川は1～2日で流下するから、混入したDCPは未分解のまま、各種の用水に混入するか、そのまま東京湾に送り

込まれるであろう。しかしながら、分解菌が増殖した後のDCPの分解は、難分解性とはいわれないフェノールとほぼ同様に、すみやかであった (Fig. 2.2)。また、データは示してしないが、試水にフェノールをくり返し添加すると分解が1時止まる現象もあった。これらのことは、化合物の分解の難易性はその化合物のおかれた環境あるいは場との相互作用で変化するものであり、化合物そのものの性質では無いことを意味する。

添加した塩素化フェノール等の分解様式も、分解菌の分布 (Table 2.3) と同様に、高い再現性を示した (Fig. 2.2と Fig. 2.3)。人為や天候の影響を直接受ける河川ですら、分解菌密度や分解様式はこのように高い再現性を示すから、他の環境水等とのこれらのデータの比較検討は可能であり早急になされるべきと思われる。このような基礎データの蓄積は、環境における人工化学物質の合理的な管理に不可欠であろう。

塩素化フェノール等はHPLCで分析するとき、液相のpHを高くして、アニオン状態にすると、分離と感度が大きく向上する (Orazio & Kapila, 1983)。しかしながら、シリカゲルを固相とした多くのカラムは高いpHの液相中では早く劣化する。本研究に用いたポリスチレン系の疎水性硬質ゲルを固相としたカラム (Table 2.1) は高pH中で長時間安定である。この利点のため、例えば10ngC/mlのDCPを、試水を濃縮・抽出などの操作をすることなく、定量分析できた。また、分析時間も約4分と迅速であった。この利点は、また、多数の試料の分析を必要とする本研究のMPNの測定には不可欠であった。なお、HPLC分析には昭和電工(株)の特殊化学品事業部の御教示と援助をいただいた。

3. いくつかの環境試水における2,4-dichlorophenolの分解

Abstract

The density of 2,4-dichlorophenol(DCP) degrader estimated by a most-probable-number(MPN)method and the degradation of spiked DCP were studied in water samples from various aquatic environments. The initial densities of DCP-degrader, which can degrade 1 or 0.1 $\mu\text{g DCP-C/ml}$ in mineral medium, were below 15 cell/ml. Because of these low densities, the lag periods were observed preceding the rapid degradation of 1 or 0.1 $\mu\text{g DCP-C/ml}$. These lag periods were the times for the degrader to increase the density to an order of 10^4-10^5 or 10^3-10^4 cell/ml, respectively. However, the initial densities of DCP-degrader, which can degrade 0.01 $\mu\text{g DCP-C/ml}$, were in an order of 10^2-10^3 cell/ml of the water samples from the pond Mizudori-no-ike and the river Minami-asa-kawa. The degradation of 0.01 $\mu\text{g DCP-C/ml}$ in these samples did not show the apparent lag period, and were slow and linear to the incubation time, suggesting the degradation of DCP by a co-metabolism.

In the water sample from the spring Masugata-no-ike, the degradation of 0.1 $\mu\text{g DCP-C/ml}$ was not observed for 42-day incubation, although DCP-degraders had increased to 10^4 cell/ml at 35-day incubation. When both nitrogen and phosphorus were added to the water sample, the rapid degradation of DCP was observed. These results suggested that the sufficient increase in the density of DCP-degraders was a prerequisite condition for the degradation of DCP, but ecological factors such as mineral nutrients might limit the expression of the ability of DCP-degraders even when their densities were high.

3.1 はじめに

多摩川とその流域の試水における2,4-dichlorophenol (DCP) の分解菌密度と添加したDCPの分解の様子を調べた。添加したDCPの顕著な分解開始時と分解菌密度との間には密接な関係が認められた。しかしながら、分解菌密度の増加がありながら、DCPの分解が認められないことがあり、その理由を生態学的制限要因との関連で二、三の考察を行なった。

3.2 材料と方法

試水は関東地方の地下水、湖沼等、及び多摩川

から得た。表流水を殺菌フラスコに500ml採水し、遅くとも4時間以内に、研究室に持ち帰り、2,4-dichlorophenol (以下DCP) の分解菌密度の測定、及び試水に添加したDCPの分解の測定を開始した。

DCP分解菌密度の測定は、最確数(most probable number, 以下MPN)法によった。すなわち、試水を、殺菌したリン酸バッファーで適宜10倍稀釈し、その1mlを、例えば1 $\mu\text{g C/ml}$ のDCPの分解菌密度を測定するときは、1.1 $\mu\text{g C/ml}$ のDCPが含まれる試験管中の無機培地10ml

に投入し、毎週攪拌しながら5週間培養した。各々の稀釈段階につき3本の試験管を用い、培養5週間目に、各々の試験管中の残留DCP濃度を測定した。本MPN法の詳細は2.2に述べた通りである。

DCP濃度は、これを投入した500mlの試水の一部を適宜無菌的に取り出し、0.45 μm の孔径のメンブランフィルター (Millex-HV, Millipore Corp.) でろ過し、その10~100 μl を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。

3.3 結果

いくつかの環境試水におけるこの密度の測定例をTable3.1に示した。Table3.1は、DCP分解菌密度は試水によって数千倍異なるが、最高でも15 cell/mlを超えないことを示す。また、この高密度は必ずしも汚濁の程度とは相関しないようである。なぜなら、生活廃水等で汚濁の激しい野川、神田川、そして手賀沼のこの密度は高いとは認められないからである。活性汚泥の懸濁液のそれも高くはなかった。いっぽう、貧栄養湖の本栖湖や八王子市の地下水のこの密度は極めて低かった。なお、採水時の試水中のDCP濃度は検出下限 (1 ng C/ml) 以下と思われた。

これらのいくつかの試水に、DCPを1 $\mu\text{g C/ml}$ になるように添加し、DCPの分解菌密度とDCPの分解の経時変化を調べた(Figs. 3.1, 3.2 & 3.3)。DCPを添加すると、いずれの試水でも、初期の低密度の分解菌は増殖し、本栖湖のそれを除いて、 10^5 cell/mlのオーダーになった。いっぽう、DCPは、本栖湖のそれを除いて、ほぼ完全に分解された。DCPの急激な分解が認められるときの分解菌密度は 10^4 ~ 10^5 cell/mlのオーダーにあった。

本栖湖の試水で、添加したDCPが分解されなかったのは、分解菌密度があまり増加せず、 10^2 cell/mlの低いオーダーにあったためであろう。なお、この試水ではDCPは70日目でも約半分が残存した。

活性汚泥の懸濁液で、分解菌密度が低いにもかかわらず、初期のDCP濃度の急激な減少があったのは、高密度の汚泥の吸着によるみかけの分解であると考えられる。しかしながら、高圧滅菌した活性汚泥懸濁液中の吸着によると考えられるDCP減少率は30%以内であったので、この吸着は生きた細胞で活発であることも考えられる。この点の詳細な検討は、DCPのみかけの分解と真の分解の評価に不可欠であると思われる。

なお、初期のDCPの分解菌密度はDCPが添加されないと、長期間変化せず、低いままに維持された (Fig. 3.1)。

以上はDCPを1 $\mu\text{g C/ml}$ になるように添加した場合であるが、0.1 $\mu\text{g C/ml}$ になるように添加した場合は以下ようになった (Figs. 3.4, 3.5 & 3.6)。また、火打石谷と本栖湖の試水では、栄養塩類、あるいは粉末酵母エキスの添加の影響も調べた。いずれの試水でも、初期の低密度の分解菌は増殖し、 10^2 ~ 10^5 cell/mlのオーダーになった。

いっぽう、DCPは八王子の地下水、粉末酵母エキスを添加した本栖湖の試水を除いて、ほぼ完全に分解された。DCPの急激な分解が認められるときの分解菌密度は、 10^3 ~ 10^4 cell/mlのオーダーにあった。

Figs. 3.1, 3.2 & 3.3 に示したように、1 $\mu\text{g C/ml}$ のDCPの急激な分解が認められたときの分解菌の密度は 10^4 ~ 10^5 cell/mlであったのに対して、

Table 3.1. Densities of DCP-degrader, which can degrade $1 \mu\text{g DCP-C/ml}$, in water samples from several aquatic environments estimated by a most-probable-number(MPN)method. For the MPN method, a serial 10-fold dilution of the water sample was inoculated into a mineral medium supplied with $1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ and $0.02 \mu\text{g yeast extract-C/ml}$, and was incubated aerobically for 5 weeks in the dark at 25°C .

Aquatic environment	Location	Sampling date	Density (cell/ml)
River Tamagawa	Hiuchi-ishidani	15th, Jun. 1988	0.23
<i>ibid</i>	Hamura	19th, Oct. 1987	0.23
<i>ibid</i>	Kawasaki	30th, Aug. 1988	15
River Nogawa	Kokuryo	18th, Aug. 1987	0.1 >
River Arakawa	Kitasenu	20th, Aug. 1987	7.9
River Ayase	Ayase	20th, Aug. 1987	3.3
River Kandagawa	Shimo-ochiai	22nd, Aug. 1987	0.2
Spring Masugata-no-ike	Kokubunji	6th, Jun. 1988	0.07
<i>ibid</i>	<i>ibid</i>	28th, Oct. 1988	0.04
Pond Mizudori-no-ike	Tachikawa	1st, Oct. 1987	0.7
<i>ibid</i>	<i>ibid</i>	10th, Oct. 1988	0.24
Swamp Teganuma	Abiko	14th, Jan. 1988	4
Lake Motosuko	Yamanashi pref.	15th, Jun. 1988	0.009
Ground water	Hachioji	26th, Nov. 1988	0.004
<i>ibid</i>	Fuchu	31st, Jan. 1989	0.01 >
Suspension of activated sludge	Minamitama	11th, Dec. 1987	9.3

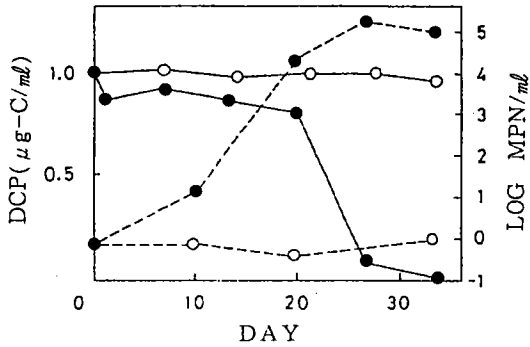


Fig.3.1. Degradation of $1\mu\text{g DCP-C/ml}$ (solid lines) and growth of DCP-degraders (dashed lines) in the water sample from the pond Mizudori-no-ike collected on 1st October 1987. Symbols \bullet , in non-autoclaved water with DCP; \circ , in autoclaved water with DCP (a solid line) or in non-autoclaved water without DCP (a dashed line).

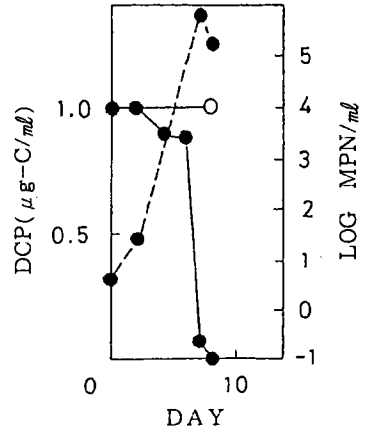


Fig.3.2. Degradation of $1\mu\text{g DCP-C/ml}$ and growth of DCP-degraders in the water sample from the swamp Tega-numa collected on 14th January 1988. Culture conditions and symbols are the same as in Fig. 1.

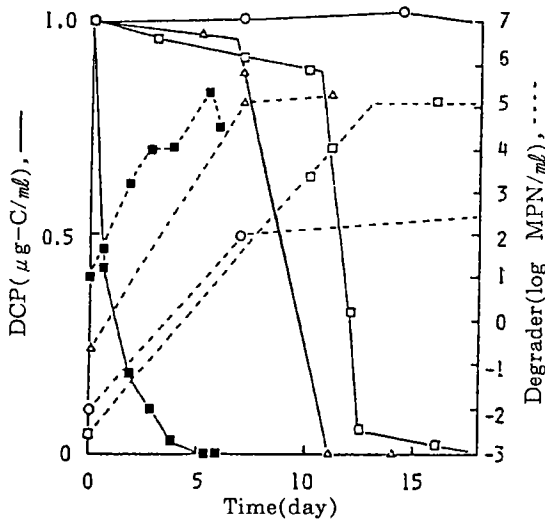


Fig. 3. 3. Degradation of $1\mu\text{g DCP-C/ml}$ and the growth of $1\mu\text{g DCP-C/ml}$ - degrader in water sample from the lake Motosu-ko (\circ), the valley Hiuchi-ishi-dani (\triangle), the ground water at Hachioji (\square), or the suspension of activated sludge at Minamitama (\blacksquare).

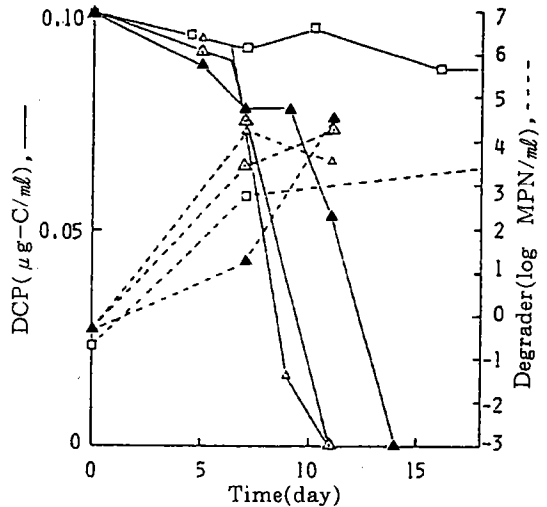


Fig.3. 4. Degradation of $0.1\mu\text{g DCP-C/ml}$ and the growth of $0.1\mu\text{g DCP-C/ml}$ - degrader in water sample from the valley Hiuchi-ishi-dani (\triangle), or the ground water at Hachioji (\square). The sample (\triangle) from the valley was amended with NH_4NO_3 and Na_2HPO_4 to a final concentrations of 0.2mM and 0.02mM , respectively. The sample (\blacktriangle) from the valley was amended with yeast extracts to a final concentration of $10\mu\text{g C/ml}$.

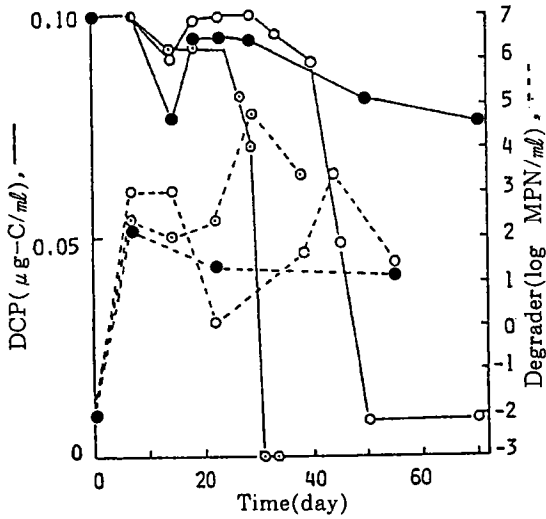


Fig. 3.5. Degradation of $0.1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ and the growth of $0.1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ -degrader in water sample from the lake Motosu-ko. The sample (○) was amended with nutritional minerals and the sample (●) with yeast extracts as in Fig.2.

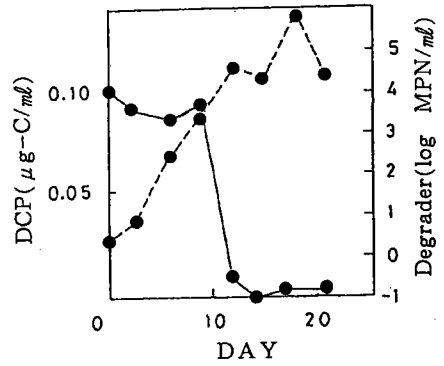


Fig. 3.6. Degradation of $0.1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ (a solid line) and growth of DCP-degraders (a dashed line) in the water sample from the lake Sayama-ko collected on 15th March 1988.

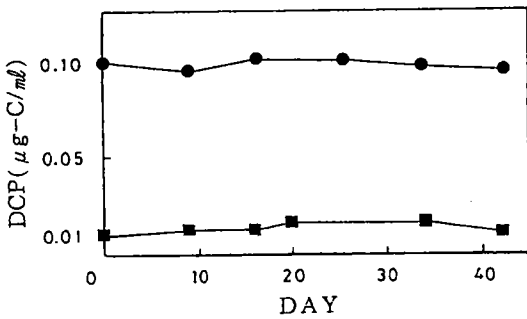


Fig.3.7. Degradation of 0.1 or $0.01 \mu\text{g DCP-C/ml}$ in the water sample from the spring Masugata-no-ike collected on 12th March 1988. Symbols: ●, $0.1 \mu\text{g DCP-C/ml}$; ■, $0.01 \mu\text{g DCP-C/ml}$.

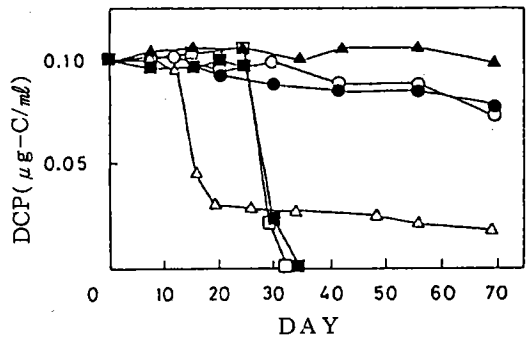


Fig.3.8. Degradation of DCP and effect of amendment with various nutrients in the water sample from the spring Masugata-no-ike collected on 26th April 1988. The initial concentrations of the amended nutrients were as follows: $16 \mu\text{g of NH}_4\text{NO}_3/\text{ml}$, $2.8 \mu\text{g of Na}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$, $10 \mu\text{g yeast extract-C/ml}$. Symbols: ●, non-amended; ○, NH_4NO_3 ; ▲, Na_2HPO_4 ; □, NH_4NO_3 and Na_2HPO_4 ; △, yeast extract; ■, MS medium.

Table 3. 2. The MPN of DCP-degraders at the initial and 35-day incubation in the water sample from the spring Masugata-no-ike.

DCP ($\mu\text{gC/ml}$)	0.01		0.1	
Incubation period (day)	0	35	0	35
MPN (cell/ml)	1.5	4.6×10^4	3.6	0.9×10^4

Figs. 3. 4, 3. 5 & 3. 6 に示したように、1 オーダー低い $0.1 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の急激な分解が認められたときの分解菌の密度はやはり 1 オーダー低い $10^3 \sim 10^4 \text{ cell/ml}$ であったことに注目された。

DCP の分解は認められないが、分解菌の増殖は認められる現象は真姿の池の湧水についても認められた (Fig. 3. 7 と Table 3. 2)。

この湧水に、栄養塩類や粉末酵母エキスを添加すると DCP の分解が認められた (Fig. 3. 8)。これらの結果は、栄養塩類などは分解菌の増殖ではなく、分解能の発現に必要であることを示唆する。

以上は Table 3. 2 を除いて、1 あるいは $0.1 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の分解の様子であるが、DCP の濃度がさらに下がると分解のモードは異なるように思われる。すなわち、 $0.01 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の分解は、添加の初期から認められ、ほぼ直線であった (Fig. 3. 9)。これは、1 あるいは $0.1 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の分解が、長時間にわたってほとんど分解が認められない誘導期 (lag phase) を経て、その後急激に分解される様子とは異なる。また、 $0.03 \mu\text{g C/ml}$ の分解は、これらの中間のモードであった。

さて、1 あるいは $0.1 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の分解

に誘導期が認められたのは、これらの比較的高濃度の DCP を分解できる菌の密度が初期には低かった (Tables 3. 1 & 3. 3) ためと考えられた。いっぽう、 $0.01 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の分解が添加の初期から認められたのは、比較的低濃度の DCP を分解できる菌の密度が初期から高かったことが予想される。Table 3. 3 は、この予想を支持した。

また、 $1 \mu\text{g C/ml}$ の DCP の急激な分解が認められたときの分解菌濃度は、 $10^4 \sim 10^5 \text{ cell/ml}$ であり、 $0.1 \mu\text{g C/ml}$ のそれは、 $10^3 \sim 10^4 \text{ cell/ml}$ であったことを考えると、 $0.01 \mu\text{g C/ml}$ のそれは $10^2 \sim 10^3 \text{ cell/ml}$ であると予想される。しかしながら、分解菌密度は初期に $10^2 \sim 10^3 \text{ cell/ml}$ のオーダーにあり、後期には 10^5 cell/ml のオーダーあるいはそれ以上であった (Table 3. 3) にもかかわらず、DCP の分解のモードはゆるやかな経時変化を示す傾きの小さな直線に近かった (Fig. 3. 9)。

このことは共役代謝 (co-metabolism) する菌の存在 (Horvath, 1972) を示唆しているようだ。すなわち、DCP 以外の溶存有機物から増殖等のためのエネルギーや炭素源を得て、DCP は分解するが、DCP からはエネルギー等を得ない菌の存在である。とくに DCP の濃度が低いとき

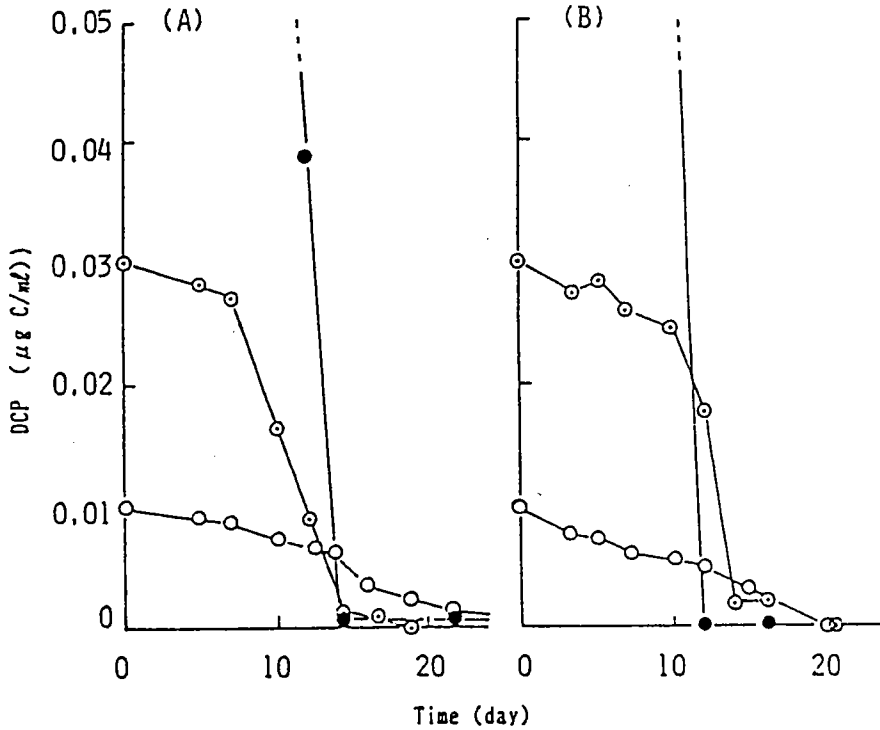


Fig.3.9. Degradation of 0.10(●), 0.03(⊙) or 0.01(○) $\mu\text{g DCP-C/ml}$ in water from the pond Mizudori-no-ike(A) or the river Minami-asakawa (B).

に、これを共役代謝する分解菌が水鳥の池や南浅川の試水に多数存在した (Table 3.3) から、DCPの分解は直ちに検出された (Fig.3.9) し、その分解に必要なエネルギー等は、DCP以外の溶存有機物から得られるから、DCPの分解のモードは傾きのゆるやかな直線性を示したと考えられる。なお、多摩川中流域 (中河原) の試水では、 $1 \mu\text{g C/ml}$ のDCPを分解できる菌の密度と $0.01 \mu\text{g C/ml}$ のそれとの間に差は無かった。これらのことは、分解菌の組成が試水によって大きく異なることを示唆する。それ故、人工化学物質を唯一の炭素源かつエネルギー源とする菌数と共役代謝する菌数を識別できるMPN法用の培地の検討も含めて、分解に関わる菌の組成が明らかにさ

れることが今後の課題のひとつである。

なお、水鳥の池の試水にリンなどの栄養塩類を添加しなくとも、DCPの分解は認められた (Fig.3.1)。しかしながら、この試水ではリンは検出されなかった (Table 3.4)。このことは、分解菌の働きを制限するリンの濃度はきわめて低く、検出下限以下のリン濃度でも分解菌はリンを利用できることを示唆する。

3.4 考 察

本研究で、低濃度のDCPの分解菌密度を種々の環境試水について調べた。このような測定例は驚くべきことに世界に類例を見ないのである。

本研究の環境試水に投入した1あるいは $0.1 \mu\text{g C/ml}$ レベルのDCPの分解と、分解菌の増殖の姿

Table 3.3. Density of DCP – degrader, which can degrade 0.1 or 0.01 $\mu\text{gDCP} - \text{C}/\text{ml}$. in water sample estimated by the MPN method. To each sample, DCP was spiked to a final concentration of 0.1 or 0.01 $\mu\text{gC}/\text{ml}$ and the code for the MPN method was obtained by using the same concentration of DCP of the spiked sample.

Water sample from	Incubation time(day)	MPN/ ml which can degrade	
		0.1 $\mu\text{gDCP} - \text{C}/\text{ml}$	0.01 $\mu\text{gDCP} - \text{C}/\text{ml}$
Mizudori-no-ike	0	7.5	230 \leq
	24	2.3×10^3	1.1×10^5
Minami-asakawa	0	9.3	1600
	15	4.3×10^3	$2.3 \times 10^5 <$

Table 3.4. Water quality of the water samples from aquatic environments.

	The pond Mizudori-no-ike	The lake Tega-numa	The spring Masugata-no-ike
TOC ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	15.6	20.0	2.7
$\text{NH}_4\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	0.2	3.1	N.D.*
$\text{NO}_3\text{-N}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	0.02	1.6	8.2
Total P ($\mu\text{g}\cdot\text{P} \cdot \text{ml}^{-1}$)	N.D.*	1.2	N.D.*
Reactive P ($\mu\text{g}\cdot\text{P} \cdot \text{ml}^{-1}$)	N.D.*	0.8	N.D.*
Total heterotrophic microbes ($\text{cells} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2.4×10^4	2.4×10^6	45

* Not detected. The limits of detection were 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$ and 0.003 $\mu\text{g}\text{P} \cdot \text{ml}^{-1}$

は、人工化学物質の急激な分解の前に認められる誘導期は低密度の分解菌が高密度に増殖するまでに必要な時間であるとするWiggins *et al* (1987)の示唆を支持した。さらに、この急激な分解が認められるときの、人工化学物質の濃度と分解菌密度との比例関係についても、言及できた。

しかしながら、Wiggins *et al* (1987)の示唆は、さらに低濃度の例えば0.01 $\mu\text{g C/ml}$ レベルのDCPの分解には必ずしも当てはまらないようである。多くの人工化学物質の環境中の濃度は一般に極めて低いことを考慮すると、この観察は重要である。

環境試水中の人工化学物質の分解は、栄養塩類の添加によって促進されるとする報告 (Lewis *et al*, 1986) がある。そして、この分解の促進は、栄養塩類の添加による分解菌の活発な増殖に帰せ

られている。しかしながら、栄養塩類の添加がなくとも、全ての試水で分解菌は増殖した。それにもかかわらず分解が認められないことがあった。これらのことは栄養塩類は分解菌の増殖ではなく、分解能の発現に必要であることを示唆する。

DCPなどの分解がおこらなくとも、必ずしも分解菌の不在を意味しない。また、分解菌の増殖があっても、必ずしも、その物質の分解を意味しない。これらは分解菌が様々な生態学的要因によってその働らきを制限されていることを意味する。したがって、分解菌数の測定のためのMPN法の培地の検討が不可欠である。また、人工化学物質の濃度と分解菌の密度、そして、栄養塩類の濃度などの環境要因の三者の生態学的な諸関係を明らかにすることも今後の課題である。

4. いくつかの環境試水における2,4-dichlorophenolの分解菌のサヴァイヴァルと分解能の発現

Abstract

First supply of DCP (2,4-dichlorophenol) to a final concentration of $1 \mu\text{g C/ml}$ increased the density of native DCP-degraders from 0.04 cell/ml to 9.3×10^4 cell/ml in oligotrophic water sample from the spring Masugata-no-ike or from 0.23 cell/ml to 9.3×10^4 cell/ml in eutrophic water from the river Minami-asakawa when the added DCP disappeared at 9th and 5th day, respectively. Thereafter, the densities fluctuated in an order of $10^3 \sim 10^4$ cell/ml for the spring and 10^4 cell/ml for the river during 60-day-incubation in the dark. While, an amendment of organic substrates of glucose, glutamate and glycerol decreased the density to an order of 10 cell/ml. The rapid disappearance of DCP of the second supply was observed only when the density was high, *i.e.*, in an order of 10^4 cell/ml. When the density was low, *i.e.*, in an order of 10 cell/ml, for example, 80% of the second supply of DCP were still found after 12-day-incubation, suggesting the change in the metabolic activity and/or species composition of the degraders from those at the time of sampling.

During the long term (*c.a.* 100–400 days) incubation, the densities in both samples were in the order of $10 \sim 10^3$ cell/ml. Second supply of DCP did not increase the density of DCP-degraders in the spring water of 172 or 374-day-incubation, but did increase in the river water of 181 or 406-day-incubation. The degradation of DCP of second supply was linear and 27 or 41 days was needed, respectively, for the complete degradation of DCP in the spring water of 172 or 374-day-incubation, while, the degradation of DCP was completed within 2 days in the river water of 181 or 406-day-incubation. The density described above, as measured by a MPN (most probable number) method, indicate the microbial numbers per ml which can degrade and assimilate more than half of $1 \mu\text{g DCP-C/ml}$ aerobically within 5 weeks in the mineral salts (MS) medium. However, instead of MS medium for MPN method, if the MS medium was enriched with phenol, yeast extract, glucose, glutamate and glycerol to final concentrations of 5, 2, 1, 1, $1 \mu\text{g C/ml}$, respectively, two orders higher density was detected in the spring water of 374-day-incubation, but not in the river water of 406-day-incubation. These results suggest that, after a long term incubation, the DCP-degrader in the spring water was dominated by the degrader of co-metabolism, but not in the river water.

Five water samples without any treatments from aquatic environments were spiked with

DCP to a final concentration of 0.1 $\mu\text{g C/ml}$. In the two of the samples, lake Motosu-ko and ground water at Fuchu, degradations of DCP were not observed during 32-day-aerobic incubation at 25°C in the dark. Inoculation of DCP-degrader, *Pseudomonas* sp. DP-4, into these samples degraded DCP completely at 28 and 9 days after the inoculation, respectively. In other two samples, lake Sagami-ko and swamp Tega-numa, degradations of DCP were completed within 8-11 days, irrespective of the inoculation of DP-4. In the sample of pond Mizudori-no-ike, inoculation of DP-4 enhanced the initial degradation of DCP, but the degradations at 32 days were almost the same with the sample without inoculation. In this water sample, the inoculated DP-4 decreased rapidly from 4×10^6 cell/ml to the orders of 10^2 or 10^3 cell/ml. It was discussed that the failure of enhancement of the DCP degradation by the inoculated DP-4 in the pond Mizudori-no-ike for example, was attributable to the presence of substance(s) which inhibit, not the survival but, the expression of DCP-degrading ability of DP-4.

4.1 はじめに

培養した微生物を環境に導入し、人工化学物質の分解を促進させようとする試みがある。ここでは、遺伝子操作によって分解能の強い微生物の造出に大きな期待がよせられている (Omen & Hollaender, 1984)。

いっぽう、培養した微生物が環境で分解能を発現するためには、多くの生態学的制限要因を克服しなければならないことも指摘されている (Alexander, 1984)。事実、培養菌の環境試料への導入は必ずしも分解を促進させていない (たとえば、MacRae & Alexander, 1965 ; Anderson *et al*, 1970 ; Goldstein *et al*, 1985)。

人工化学物質の1つ、2,4-dichlorophenol (以下、DCP)、の分解菌は自然界にわずかながら存在し、DCPの添加に伴って増殖し、DCPを分解する。このとき増殖した分解菌は、DCPを分解した後、どのようにサヴァイヴァルし、また、DCPの分解能力はどのように発現す

るであろうか？さらに、著者らにより集積培養を経て単離し、培養した分解菌は他の土着の菌が混在する環境試水に接種したとき、どのようにサヴァイヴァルし分解能力を発現するであろうか？

本研究はこれらの問題に対していくつかの情報を得ることを意図し、比較的長期間の分解菌のサヴァイヴァル等を調べた。

4.2 材料と方法

試水は汚濁の程度が異なる7カ所から得た。真姿の池湧水は環境庁名水百選の1つであり、八王子市の南浅川は生活排水等で激しく汚濁していた。これらの他の5カ所の試水と全有機炭素等はTable 4.1のとうりである。各々の表流水500mlを殺菌フラスコに採水し、4時間以内に試水中のDCPの分解菌密度の測定、および、試水へのDCPの添加とその分解の測定を開始した。

これらの試水のDCPの分解菌密度は最確数 (most probable number, 以下MPN) 法によった。本MPNは、炭素量で0.1あるいは1 μg

Table 4.1. Total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC) in five environmental water samples

Water sample	TOC ($\mu\text{g/ml}$)	DOC ($\mu\text{g/ml}$)
Ground water (Fuchu)	1.1	0.9
Lake Motosu-ko	1.4	1.4
Lake Sagami-ko	2.2	1.9
Pond Mizudori-no-ike	13	13
Swamp Tega-numa	27	10

C/mlのDCPを、3～5週間以内に、0.02 $\mu\text{g C/ml}$ の粉末酵母エキスを生長因子として含むMS無機培地中で、好氣的に分解できる菌数を示す。本MPN法の詳細は2.2に述べた通りである。

試水は目的に応じ、そのまま、あるいは、孔径0.22 μm の2種類のメンブランフィルター (Sterivex-GV, あるいは、Sterivex-GS, Millipore) で土着の菌を除去した。

GV-フィルターの材質はポリビニリデンフロライド、GS-フィルターはセルロースアセテートであり、GSよりGVフィルターはタンパクの吸着が少ないとされている。

試水に添加したDCPの濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した (Table 2.1)。

DCP分解菌の単離は集積培養によった。すなわち、汚水、活性汚泥そして土壌等を含む培養器とDCPを含むMS無機培地を用いて連続培養した。このとき、DCPの濃度は1 $\mu\text{g C/ml}$ から、約3カ月の間に50 $\mu\text{g C/ml}$ まで段階的に高め、培養液の回転率も1時間当たり0.01から0.1まで高めた。培養器中で50 $\mu\text{g C/ml}$ のDCPの80%以上が分解されるようになったとき、この1部を50 $\mu\text{g C/}$

mlのDCPを含む寒天培地に移し、発生したいくつかのコロニーを単離し、保存した。この単離株のうち、DCPを10 $\mu\text{g C/ml}$ 含むMS無機培地でDCPを唯一の炭素源かつエネルギー源として増殖する1株を選んでDP-4とした。また、フェノール等の有機物が添加されたときのみDCPを分解する1株をDP-2とした。これらの菌学的性質を駒形(1984)その他の成書に準じて調べた。DP-4はグラム陰性の桿菌で、極鞭毛、運動性、カタラーゼおよび硝酸還元能を有し、オキシダーゼおよびOFテストによるグルコースからの酸の生成能を欠き、GC含量は61.6%、そして、キノン型はQ-8であった。DP-2はグラム陽性の多形性桿菌で、キノン型はMK-8 (H2)、そして、ペプチドグリカンがmeso-A 2 pm (メソージアミノピメリン酸)を含む。これらの性質を、Bergey's manual of determinative bacteriology等と照合し、各々、*Pseudomonas sp.* DP-4および*Corynebacterium sp.* DP-2とした。なお、これらの菌学的性質は当研究室の荒田治彦氏と飯田啓介氏に負うた。

湧水と河川の試水に、DP-4あるいはDP-2

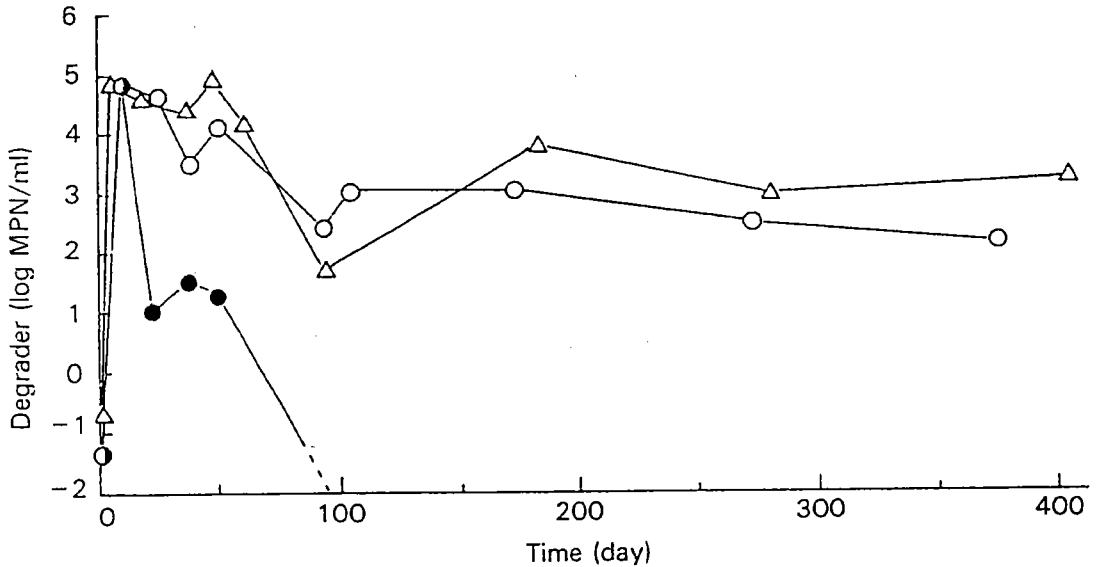


Fig.4.1. Fate in the densities of native DCP-degraders in water samples from the spring Masugata-no-ike (○) or the river Minami-asakawa (△) after the addition of DCP to a final concentration of $1\mu\text{g C/ml}$. The fate was also shown in water from the spring (●) which was amended every 4 or 5 days with glucose, glutamate and glycerol to a final concentration of $1\mu\text{g C/ml}$ of each after 10 days. The MS medium was used for the MPN method.

に粉末酵母エキス、グルコース、グルタメートおよびグリセリンを、各々、40、20、20および $20\mu\text{g C/ml}$ を含む試験管中の 10ml で3回前培養し、その 2ml を試水 100ml に接種した。試水中のこれらの菌数は試水を適宜希釈し、混釈法により発生したコロニー数をCFU (colony forming unit) として求めた。このとき、肉エキス $100\mu\text{g/ml}$ 、ペプトン $200\mu\text{g/ml}$ および寒天 8mg/ml を含むMS無機培地に、DP-4にはDCP $20\mu\text{g C/ml}$ を、DP-2にはDCP $10\mu\text{g C/ml}$ とフェノール $100\mu\text{g C/ml}$ を加えた培地を用いて、3日間培養した。なお、この条件では、DP-4あるいはDP-2を含まない試水を100倍希釈するとコロニーはほとんど発生しなかった。そこでこの方法はDP-4

あるいはDP-2が $10^3/\text{ml}$ 以上の試水に適用した。

D-MS無機培地は、MS無機培地 (2.2) のリン酸バッファーを1,000分の1、硝酸アンモニウムを50分の1、その他を10分の1に希釈した培地である。

全ての培養は 25°C 、暗所で、好氣的に行なわれた。

4.3 結 果

湧水と河川の試水における採水時の従属栄養細菌の密度は、各々、 $1.0 \times 10^2 \text{ cell/ml}$ と $6.5 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ であった。これに対して、MS培地を用いて検出されたDCP分解菌の密度は、各々、 0.04 cell/ml と 0.23 cell/ml であった。これらの試水にDCPを $1\mu\text{g C/ml}$ になるように添加すると、

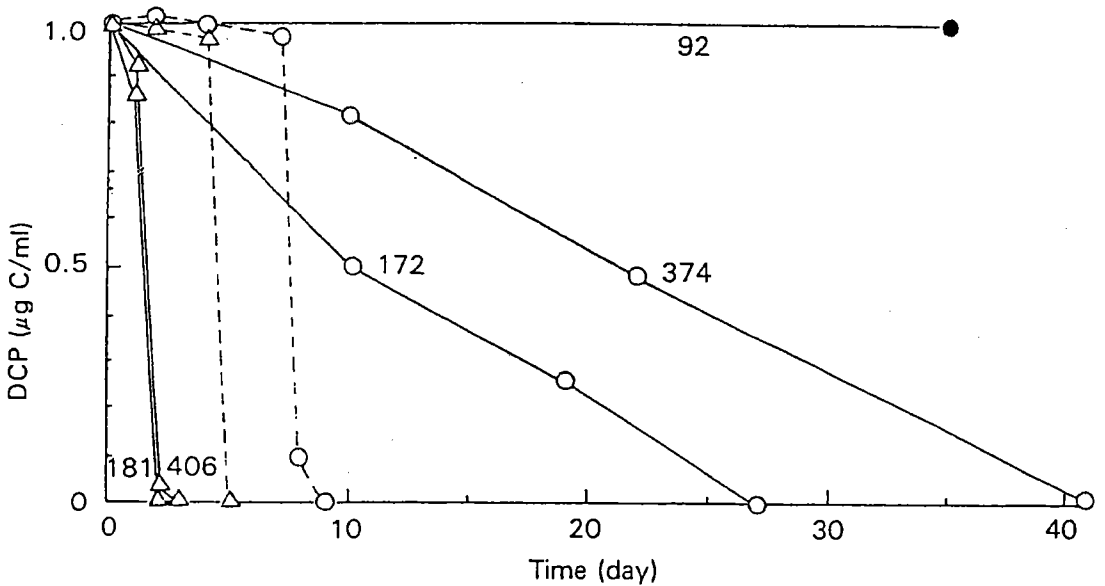


Fig.4.2. Change in DCP concentration of the first supply (-----) or the second supply (——) in the spring (O) or in the river (Δ). Numbers in the figure are the incubation days of the culture to which second supplies of DCP were done. There was no change in DCP concentration of the second supply in the spring (●) which was amended with organic substrates as in Fig.4.1.

DCPの濃度の減少とともに、分解菌の密度は増加して、両試水とも10日目以内に最大値は 9.3×10^4 cell/mlとなった (Fig.4.1) なお、DCPを添加しなければ分解菌の密度は変化しなかった。

DCP添加により増大した分解菌の密度は、10~60日間にわたって、湧水で $10^3 \sim 10^4$ cell/ml、河川水で、 10^4 cell/mlのオーダーに維持された。

これらの試水をさらに培養すると、DCP分解菌の密度は減少して92日目では、湧水で 10^2 cell/ml、河川水で 10 cell/mlのオーダーになった。これらの密度は、その後長期にわたって、湧水で $10^2 \sim 10^3$ cell/ml、河川水で 10^3 cell/mlのオーダーに維持された。

なお、DCPの添加により分解菌の密度が最大値を示した湧水に、グルコース、グルタメート、

そして、グリセロールを各々、 $1 \mu\text{g C/ml}$ になるように4~5日毎に添加すると、分解菌の密度は激しく減少し、22日目では最大値の $1/10,000$ になり、92日目では検出されなかった。

いっぽう、 $1 \mu\text{g C/ml}$ の添加DCPの分解は、1回目の添加ではDCPが検出されなくなるまでに、湧水で9日間、河川水で5日間を要した。2回目のDCP添加が60日目以後に、行なわれると、DCPが検出されなくなるまでに要する時間は、湧水では培養期間が長くなるにつれて長くなり、最大41日を要したが、河川水では培養期間にかかわらずわずか2日間であった。これらに関するいくつかの測定例のうち、培養開始期、中期、そして、後期の試水の例のみ、Fig 4.2に示した。

なお、採水直後、すなわち、培養開始期の1回

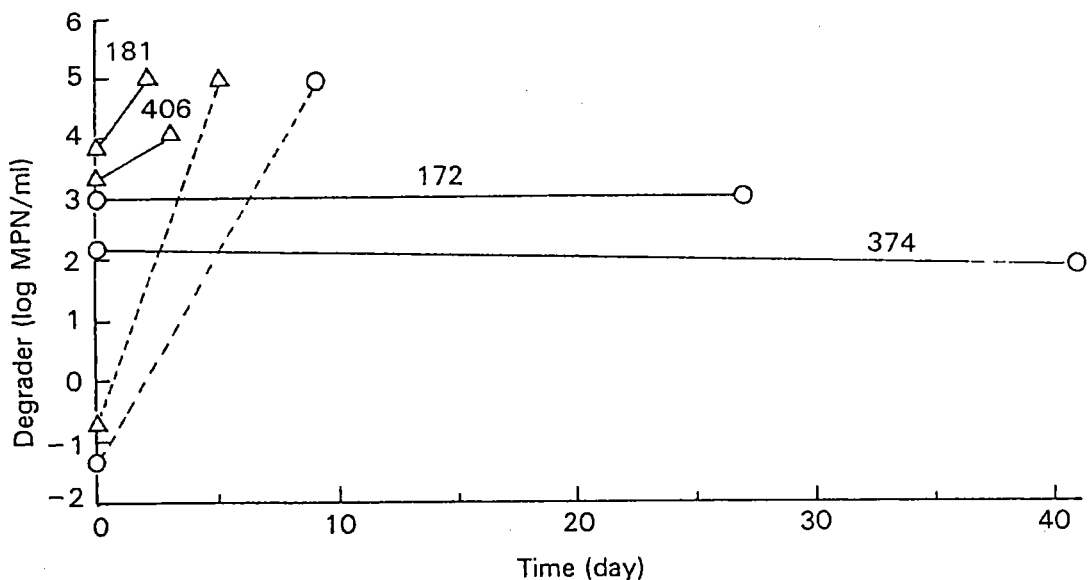


Fig. 4.3. Changes in the densities of DCP-degraders before and after the DCP degradation of first supply (-----) or second supply (—), Numbers in the figure are the same with those in Fig. 2. The MS medium was used for the MPN method.

目の添加DCPの分解に湧水で7日間、河川水で4日間のみかけの誘導期(apparent lag period)が認められた。これは、初期の極めて低い分解菌密度 (Fig. 4. 1) が増大して $1 \mu\text{g C/ml}$ のDCPの分解が検出されるために必要な、分解菌密度($10^1 \sim 10^5 \text{ cell/ml}$)に到達するために要した時間であると思われた。

また、グルコース等を4~5日毎に添加した湧水では92日目では分解菌は検出されなかった。この試水では、2回目の添加DCPは35日間にわたって分解されなかった (Fig. 4. 2)

さて、湧水における培養中期(172日目)と後期(374日目)における2回目の添加DCPの分解は、極めてゆるやかであった点で、河川水における分解と大きく異なった (Fig. 4. 2)。この理由は湧水における分解菌密度($10^2 \sim 10^3 \text{ cell/ml}$)が河川水における密度(10 cell/ml)より低かったこと

(Fig. 4. 1)には必ずしも帰せられない。なぜなら、92日目の湧水における分解菌密度は河川水における密度より高かった (Fig. 4. 1) にもかかわらず、図には示していないが、湧水におけるDCPの分解はやはりゆるやかであったからである。これらのことは、両試水の分解菌は異なった生理化学的性質をもち、分解菌密度だけではDCPの分解の速度や様式がさまざまであることを示唆する。

また、両試水の分解菌の2回目の添加DCPに対する反応は大きく異なった (Fig. 4. 3)。すなわち、培養の中期と後期の湧水の分解菌密度はDCPが分解し消失しても増加しなかった。また、DCPの分解は直線的であった (Fig. 4. 2)。これらは湧水の分解菌はDCPを分解するが同化はしない共役代謝(co-metabolism)する菌 (Horvath, 1972) で占められていたことを示唆する。このとき、分解菌は、DCP以外の水中の溶存有機物をエネルギー

Table 4.2. Relationship between MPN of DCP-degrader and media used for MPN method in the water samples from the spring and the river

Water samples		MPNs	
(Incubation time, day)	Media for MPN	Before DCP degradation	After DCP degradation
Spring (374)	MS	2.1×10^2	9.3×10^1
	D-MS	4.6×10^2	2.1×10^2
	E-MS	1.5×10^4	7.5×10^2
	F-SW	7.5×10^3	2.9×10^2
River (406)	MS	2.3×10^3	1.5×10^4
	D-MS	2.9×10^3	9.3×10^4
	E-MS	7.5×10^2	3.9×10^5
	F-SW	4.3×10^3	2.3×10^5

ギー源として利用したと思われる。この溶存有機物は空気から供給され得る(Geller, 1983)。

上記の分解菌密度は無機 (MS) 培地中でDCPの分解能を発現する細胞のMPNであった。このMS培地に、さらに、フェノールやグルコース等の有機物を添加したE-MS培地中でDCPの分解能を発現するMPNは、湧水では、MS培地のそれより、2オーダーも高く検出された (Table 4.2)。

このことは、培養後期 (374日目)の湧水には共役代謝する分解菌が高密度に存在したことを意味する。この高密度のために、DCPの分解にはみかけの誘導期が無く、共役代謝に必要な有機物は空気等からゆっくりと供給されるために、極めてゆるやかなDCPの分解を呈したのであろう。

また、DCPの同化菌が優先していたと思われる河川水では、有機物を含んだE-MS培地はMPNの検出にはむしろ阻害的であった。

さらに、用いたMPN用の培地の種類にかかわらず、2回目の添加DCPの分解後に、MPNは湧水では減少し、河川水では増加を示した (Table 4.2)。このことも、培養後期の湧水ではDCPの

共役代謝菌が、そして、河川水ではDCPの同化菌が優先した分解菌であったことに関係しているのであろう。

培養した分解菌DP-4を接種することによって、試水中のDCPの分解を促進することができた (Fig.4.4)。

湧水あるいは河川水にDCPを $1\mu\text{g C/ml}$ になるように添加し、かつ、DP-4を $2.5 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ になるように接種すると、DCPは2日以内に消滅した。DP-4を接種しないと、このDCPは湧水では9~11日間、河川水では4~5日間残存した。また、試水について、孔径 $0.22\mu\text{m}$ のフィルター (Sterivex-GS, Millipore)によるろ過の有無、および、接種用のDP-4の前培養用培地について $10\mu\text{g C/ml}$ のDCPの有無にかかわらず、DP-4による分解促進には差がなかった。

同様の実験をDP-2を用いて行なったが、DCPの分解促進は認められなかった。これは、DP-2が比較的多量の補助基質の存在下でのみDCPを分解するので、これらの試水では補助基質の量や質が不十分であったためであらう。

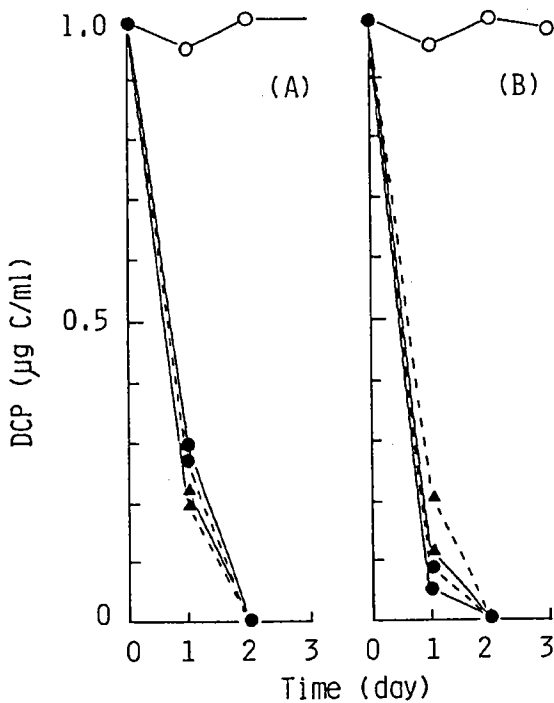


Fig.4.4. Degradation of DCP with (closed symbols) or without (open symbol) *Pseudomonas* sp. DP-4 inoculated to a final density of 2.5×10^6 cell/ml in water from the spring (A) or the river (B) with (—) or without (---) the native population. The inoculated DP-4 was precultured with (●) or without (▲) DCP.

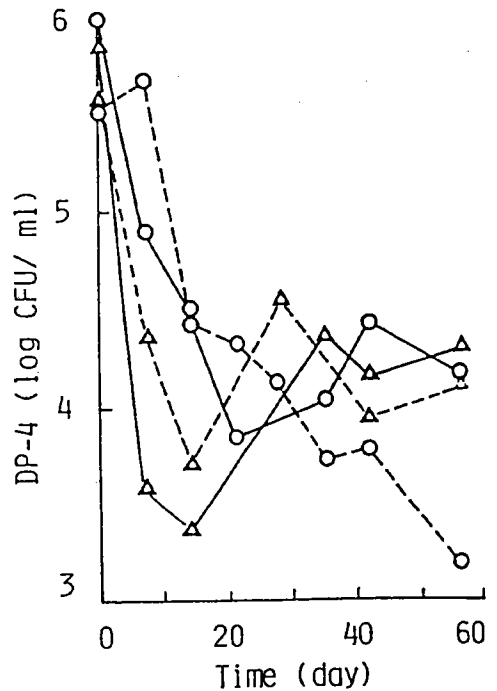


Fig.4.5. Survival of inoculated DCP-degraders (*Pseudomonas* sp. DP-4, —; *Corynebacterium* sp. DP-2, ----) in water from the spring (○) or the river (Δ).

湧水あるいは河川水に接種されたDP-4あるいはDP-2の密度は、10~20日間に、接種時の密度の約100分の1に減少した (Fig. 4.5)。

さらに、他の5カ所の試水についても、土着のDCP分解菌や培養した分解菌によるDCPの分解を調べた。なお、DCPの濃度は $0.1 \mu\text{g C/ml}$ になるように添加した。

採水したそのままの試水におけるDCPの濃度の経時変化を調べた (Fig. 4.6)。地下水と本栖湖 (山梨県) の試水では、DP-4を接種しないと

1カ月以上にわたってDCPの分解が認められない。これに対して、DP-4を接種すると分解が促進された。また、水鳥の池 (立川市) では、DP-4の接種は初期の分解は促進するが32日目の分解は接種しないときと同じになった。さらに、相模湖 (神奈川県) と手賀沼では、接種の効果は認められず、いずれも比較的早く分解した。

たとえば、水鳥の池では、接種した 4×10^6 cell/mlのDP-4は初期に激しく減少した (Fig. 4.7)。接種したDP-4の密度が 2×10^4 cell/mlの

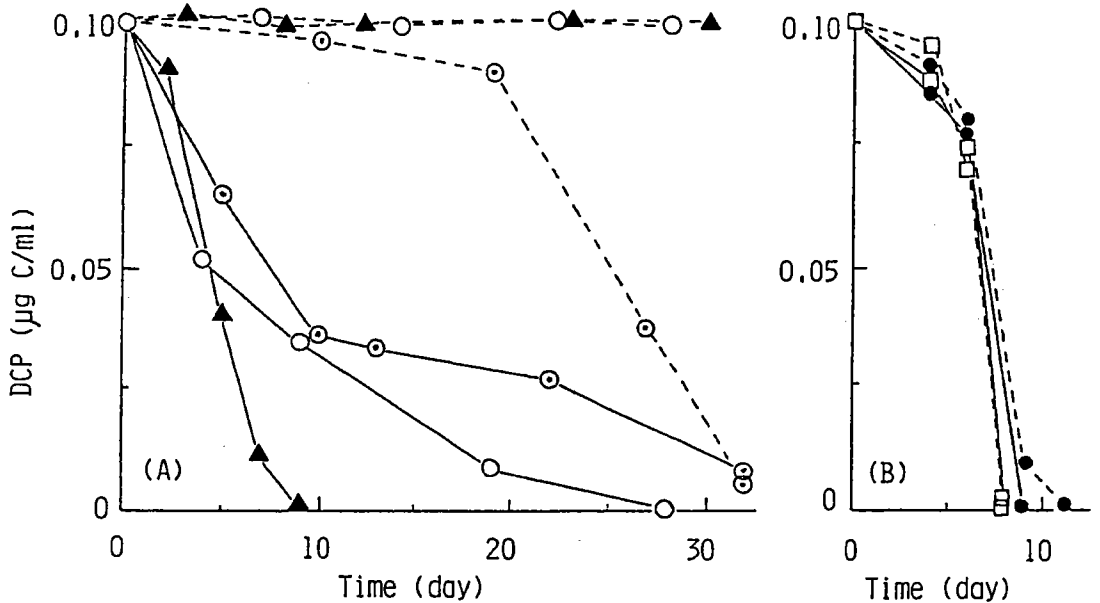


Fig.4.6. Degradation of DCP in various water samples with (—) or without (---) inoculation of DP-4 to a final density of 4×10^6 cell/ml.

(A) Lake Motosu-ko (○), Ground water (Fuchu) (▲), Pond Mizudori-no-ike (◉)
 (B) Lake Sagami-ko (□), Swamp Tega-numa (●)

ように低いときも、この密度は激しく減少した。なお、図には示していないが、低い密度の接種はDCPの分解を何ら促進させなかった。

分解菌密度の減少は、土着の微生物群集を除去すると、認められなかった。さらに、接種密度が低いと、DP-4は増殖して 10^4 cell/mlのオーダーで長期間維持された。

土着の微生物群集を除去すると、DP-4の密度は高く維持されるが、DCPの分解は必ずしも早くならなかった (Fig.4.8)。すなわち、たとえば、水鳥の池では、試水をGS-フィルターで濾過すればDCPの分解はきわめて早くなったが、GV-フィルターで濾過すればDCPの分解は土着の微生物が存在するときとくらべて大きな差は無かった。同様の現象は本栖湖の試水でも認められ

た。手賀沼の試水ではGSとGV-フィルターの差はDCPの分解に有意な差を与えずDCPの分解は、土着の微生物群集が存在するときより、初期にはやや早い但最终的にはほとんど同じであった。図には示していないが、相模湖の試水でも手賀沼のそれと同様であった。

なお、 4×10^6 cell/mlのDP-4は、MS培地では $0.1 \mu\text{g C/ml}$ のDCPをわずか2~3日で分解した。

これらの現象は、試水にDP-4によるDCPの分解を阻害する物質の存在を示唆する。とくに、本栖湖と水鳥の池の試水にはGS-フィルターには吸着されるが、GV-フィルターには吸着されない阻害物質の存在が考えられる。たとえば、水鳥の池のこの物質は、YC-500のフィルターを通

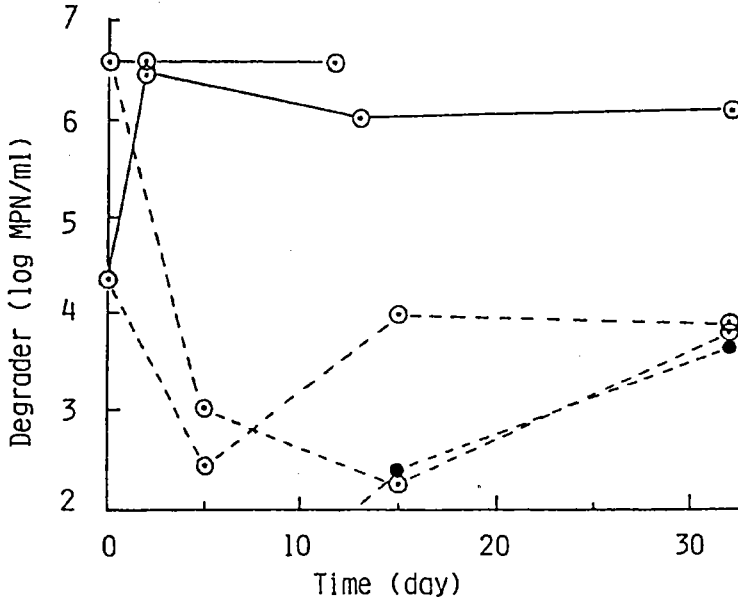


Fig.4.7. Changes in the density of inoculated DP-4 (○) or native DCP-degrader (●) in the DCP-spiked water sample from the pond Mizudori-no-ike with (—) or without (---) elimination of native microbial community by GV-filter.

過するから分子量は500以下の低分子であり、陽イオン交換樹脂につかまるからプラスの荷電をもつと推測される (Fig. 4. 9)。なお、この物質は、DP-4のDCP分解能は阻害するが、DP-4のサヴァイヴァルや増殖は阻害しないと考えられる。

4.4 考 察

土壌や水界に農業などの人工化学物質をくり返し添加すると、その物質の分解が早くなる。これは、その物質の分解菌の密度が高くなることによる (例えば、Wiggins et al, 1987; Fig. 2. 3)。しかしながら、この分解の早まりがどの程度の期間維持されるかに関する研究 (例えば、Spain & Van Veld, 1983) はあるが、その物質の分解菌の密度がどの程度の期間維持されるかに関する研究は少ない。とくに、本研究のように1年以上にわたる測定例はほとんど見当たらない。

Fig. 4. 1に示したように、DCPの1回の添加

で増加した分解菌密度が有機物等のエネルギーを意図的に添加しなくとも1年以上にわたって $10^2 \sim 10^3 \text{ cell/ml}$ に維持されたのは、細菌等の維持代謝のためのエネルギー要求量がきわめて小さい (瀬戸, 1988) からであろう。いっぽう、グルコース等の易分解性の有機物を4~5日毎に添加することは、維持代謝を中心に成立していた微生物群集に攪乱を与え、かつ、構成種の回転率を高めるから、増加した分解菌はすみやかに減少したのであろう。

本研究の河川水は生活排水で汚濁が激しかったが、DCP分解菌の密度は長期にわたって維持できた。これは大量の易分解性の汚濁物質が培養初期にはほとんど消費されたためとするなら、野外のように連続して有機物が供給される水界における分解菌の密度は、本研究の結果とは異なって、すみやかに減少するかも知れない。

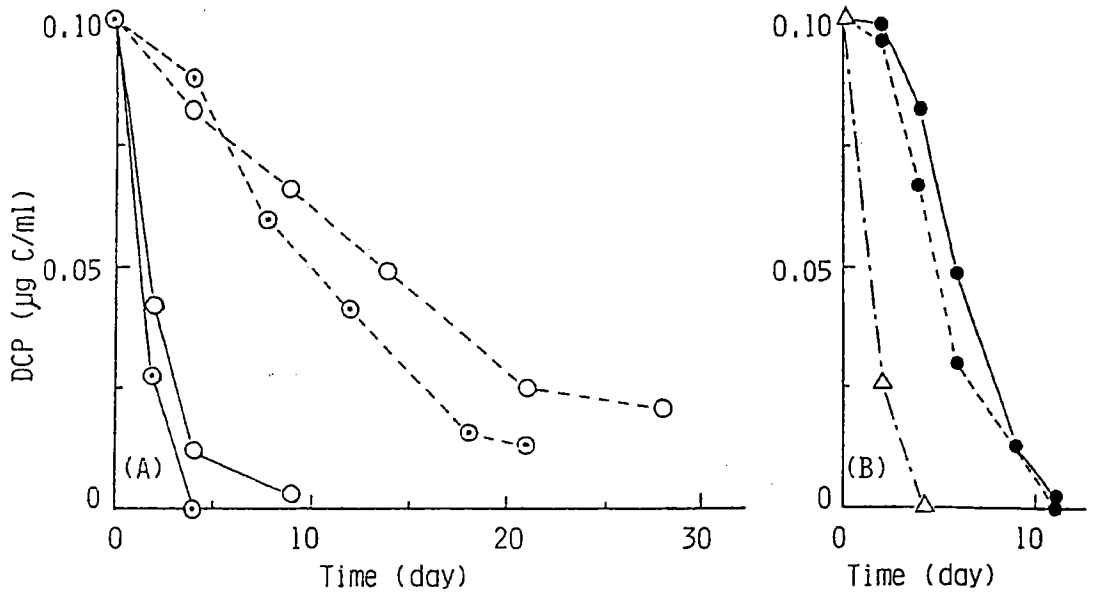


Fig.4.8. Degradation of DCP by DP-4, inoculated to a final density of 4×10^6 cell/ml, in various water samples whose native microbial community were eliminated by GS-filter (—), GV-filter (---), or sterilized by autoclaving (- · - · -).

(A) Lake Motosu-ko (O), Pond Mizudori-no-ike (⊙)

(B) Swamp Tege-numa (●), MS medium (Δ)

さて、湧水の1回目の添加DCPが消滅したとき、分解菌は増殖してその最大密度は 9.3×10^4 cell/mlとなった。これは $1 \mu\text{g C/ml}$ のDCPを含むMS培地を用いて測定した密度であるが、MS培地かわりに、湧水のろ過殺菌水を用いて測定した密度、あるいは、MS培地にさらに、共役代謝のエネルギー源として、 $10 \mu\text{g C/ml}$ の粉末酵母エキスを加えた培地を用いて測定した密度も全て同じであった。

このことは、湧水の1回目の添加DCPが消滅したとき、MS培地で測定した分解菌の密度は、湧水で実際に分解能力を発現していた分解菌の密度であり、かつ、この分解菌はDCPの同化菌であって、共役代謝する菌 (Horvath, 1972)では、なかったことを示唆する。しかしながら、例えば、

培養開始後374日目の湧水について同様の比較を行なうと、用いる培地によってMPNは大きく異なった (Table.4.2)。すなわち、湧水では1回目の添加DCPで増殖した分解菌は、DCPを唯一の炭素源として同化するDCPの同化菌であったのに対して、374日目の分解菌は、フェノール等の有機物をエネルギー源としてDCPを分解するDCPの共役代謝菌で優占していたことになる。いっぽう、河川水では406日目でもDCPの同化菌が優占しており、共役代謝菌は少なかったと考えられた。

湧水におけるDCPの同化菌から共役代謝への変化は、種の交替によるのか、同じ種が代謝様式を変化させたのか不明である。さらに、この点を明らかにすることも含めて、特定の機能を有する

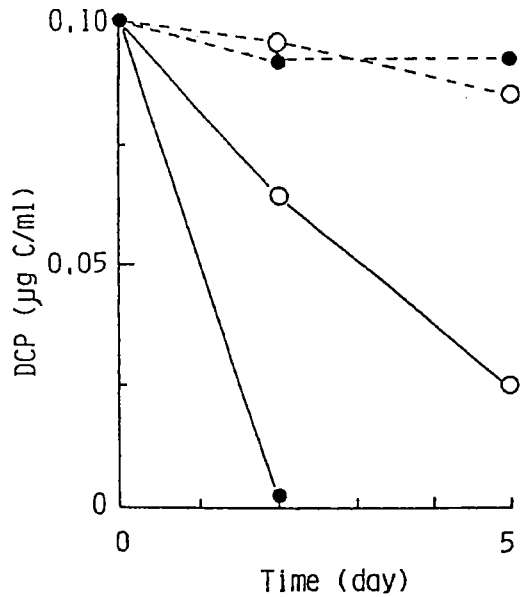


Fig.4.9. Degradation of DCP by DP-4, inoculated to a final density of 4×10^6 cell/ml, in the water sample from the pond Mizudori-no-ike whose native microbial community was eliminated by GV-filter. Furthermore, the water sample was treated with (●—●) or without (○—○) the ultra-filtration by YC-500, or passed through cation (●—) or anion (○—) exchange resin.

微生物の長期的なサヴァイヴァルや、その機能の発現を理解することは、これらを人為的に支配するために不可欠であると思われる。このとき、特定の機能群の密度を検出するために用いられるMPN用の培地の検討も重要であろう。

遺伝子操作により造出されるであろう微生物等の環境への導入が計画されている (Omen & Hollaender, 1984)。同時に、このような遺伝子操作生物による生物災害 (biohazard) などのリスクの事前評価も活発である (Tiedje *et al.*, 1989)。これらに共通して重要なものは培養され導入された遺伝子操作生物の環境におけるサヴァイヴァルと機能の発現に関する情報である。これらの情報は遺伝子操作生物についてはほとんど無いとされている。しかしながら、これらの情報は、従来の

品種改良生物の導入、帰化生物や病原菌の侵入等については比較的豊富である。そして、生物は数10億年の間に、形質転換、接合、形質導入などの方法で変化しつつ現在に到り、ヒトは、これらと同じ方法で遺伝子操作生物を造出しつつあるから、自然界で出現する生物と人工的に造出する生物との間に質的な差は無いと思われる。したがって、従来の品種改良生物や本研究のような土着菌のサヴァイヴァルや機能の発現等に関する情報は、そのまま遺伝子操作生物のこれらに関する情報として資することができると思われる。

本研究ではDP-4の接種による促進効果は試水によって異なった。この促進は貧栄養湖の本栖湖や地下水で顕著であったが、家庭下水による汚濁の激しい南浅川でも接種の促進効果は顕著で

あった。

DP-4を接種しなくとも、たとえば、水鳥の池ではDCPの分解菌が増加した。これは土着の分解菌、1 cell/ml程度がDCPを分解しながら増殖したと考えられる。本MPN法ではDP-4と土着の分解菌を区別できない。したがって、土着の微生物群集が存在する試水で15日以後に検出された分解菌は土着の分解菌であって、DP-4はほとんど消滅していたことも考えられる。

DP-4はMS培地でDCPをわずか2~3日で完全分解した(Fig. 4.7)。水鳥の池でDP-4がDCPの完全分解に1カ月以上を要した原因として、栄養塩類の欠乏は考えにくい。なぜなら、土着の微生物群集を除くとDP-4はすみやかに増殖したからである(Fig. 4.6)。このことはDP-

4の分解能を土着の微生物群集が阻害していたことを示唆する。しかしながら、群集の除去に用いたフィルターの種類が異なると、DP-4によるDCPの分解は異なった(Fig. 4.7)。このことは、試水にGV-フィルターには吸着されないが、GS-フィルターには吸着される阻害物質の存在を示唆する。この物質は分子量500以下で、プラスの荷電をもつと推測した。同様の阻害物質は中栄養湖でも認められている(Klein & Alexander, 1986)が、詳しいことは今後の課題である。

人工化学物質の分解菌を接種して分解を促進するためには、微生物群集の成り立ち、生活様式、生態学的ニッチなどに関する情報が不可欠である。自然環境におけるこれらの情報はきわめて少ない。

5. 細菌のサヴァイヴァルを支配する要因としての原生動物の影響

Abstract

In a monoxenic batch culture of *Pseudomonas* sp. (bacterium) and *Tetrahymena thermophila* (ciliate), the changes of population density of *Pseudomonas* sp. ingested by *T. thermophila* were studied with special reference to the effect of organic substrate as an auxiliary energy for *T. thermophila*. The population density of *Pseudomonas* sp., after the ingestion, culminated to an order of 10^6 cells per ml irrespective of the initial densities of *Pseudomonas* sp. and *T. thermophila*. This culminated density of *Pseudomonas* sp., except for the bacterium at low initial density, exhibited a further two logarithmic decrease, i.e., to an order of 10^4 cells per ml, when organic substrate was added into the culture. The results may indicate that organic substrates as auxiliary energy for the ciliate are important for controlling the survival and the elimination of both native and introduced bacteria in natural environment.

5.1 はじめに

特定の機能を有する微生物の自然界におけるサヴァイヴァル(生存)の実態とこれを支配する要因を明らかにすることが環境保全の面から益々重要になってきた。何故なら、この特定の機能を有する微生物には、すでに自然界に存在する微生物のみならず、遺伝子操作を受けたいわゆるスーパーバクテリア等の自然環境への導入が想定されている微生物も含まれるからである(Omen & Hollaendr, 1984; 瀬戸, 1986; Liang et al, 1982; Sinclair & Alexander, 1984)。そして、このような微生物のサヴァイヴァルを支配する主要な要因として原生動物の捕食作用が指摘されている(Habte & Alexander, 1975; Alexander, 1981)。

しかしながら、実験室における、例えば特定の細菌と繊毛虫の二者回分培養(monoxenic batch culture)では、繊毛虫の摂食作用によって初期の高密度の細菌は $10^5 \sim 10^7$ 細胞/mlに減少して定常状態に到り(Seto & Tazaki, 1971; Alexander,

1981)、上述のような細菌密度の激しい増加または消滅は認められない。二者連続培養では細菌密度は振動する(Van den Ende, 1973; Curds & Bazin, 1977)が、やはり $10^5 \sim 10^7$ 細胞/mlの範囲で長期間維持され、細胞密度の激しい増減は認められない。

以上のように、環境試料中では認められる例えば、細菌密度の激しい変動が実験室の二者培養では認められないのは、二者培養が環境試料中における細菌密度の消長をシミュレートするモデルとして不十分であることを意味する。Mallory et al(1983)は、*Salmonella typhimurium*(細菌) - *Tetrahymena thermophilus*(繊毛虫)の二者培養に*T. thermophilus*のエネルギー源として第二の細菌*Enterobacter agglomerans*を加えることによって*S. typhimurium*の密度がわずかに10細胞/mlにまで減少することを認めた。このことは、第二の細菌の存在を考慮することにより、実験室の二者培養でも環境試料中における細胞密度の消長をシミュレートできることを示唆す

る。

さて、環境試料中には原生動物のエネルギー源として種々の有機物も存在する。本研究では、*Pseudomonas* sp.(細菌)–*Tetrahymena thermophila*(繊毛虫)の二者培養に*T.thermophila*のエネルギー源として加えた有機物が*Pseudomonas* sp.の密度に及ぼす影響を調べた。

5.2 材料と方法

供試細菌は著者の一人、瀬戸、によって、オルトクロロフェノールを基質とした集積培養から単離された。このとき、接種源として道路近くの土壌、活性汚泥および汚水を用いた。この細菌は、オルトクロロフェノールを唯一の炭素源かつエネルギー源として生育できる。菌学的性質はグラム陰性の桿菌で、極鞭毛と運動性を有し、カタラーゼとオキシダーゼ活性は陽性、O-Fテスト(グルコース)では糖から酸を生成せず、通性嫌気性である。これらの性質を、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.)を考慮した Konda & Tezuka (1979) のスキームに照し合わせ、*Pseudomonas* 属の一種と判断し、*Pseudomonas* sp. OM-1とした。

細菌はグルタメートおよび粉末酵母エキスが炭素量で、各々、300および6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含まれる無機培地で好氣的に培養し、遠心分離 (5, 500g, 15 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間)で集菌し、MS無機培地のリン酸緩衝液に懸濁した。

繊毛虫*Tetrahymena thermophila*は茨城大学の菅井博士の好意により分譲された。この繊毛虫をPPYEG培地で、マグネチックスターラーでゆるやかに攪拌しながら、培養した。対数増殖後期の培養液からリン酸緩衝液と孔径8 μm のメンブランフィルター (Millipore Corp.)を用いて

繊毛虫を洗浄および収集し、300ml三角フラスコ中のリン酸緩衝液100mlに懸濁した。

PPYEG培地の組成(mg/ ℓ)は以下のとおりである；プロテオースペプトンNo.3 (Difco)300, 粉末酵母エキス(オリエンタル)150, グルコース150, Na_2HPO_4 298, KH_2PO_4 122。

上述のリン酸緩衝液中の繊毛虫の懸濁液には、調整後24時間目に、上述の細菌の懸濁液を、調整後直ちに、所定の細菌密度になるように添加し、培養開始時とした。培養液はマグネチックスターラーでゆるやかに攪拌しながら、経時的に細菌と繊毛虫の数を計測した。

細菌数はリン酸緩衝液で適宜稀釈し、1/50に稀釈した普通寒天培地(栄研)に寒天粉末を1%になるように加えて混濁培養し、3日後に発生したコロニー数とした。繊毛虫数はリン酸緩衝液で適宜稀釈し、その1mlを約100滴のアリコートに分け、実体顕微鏡で数えた。細菌と繊毛虫の1細胞当りの重量、および、添加した有機物量は湿式酸化法(瀬戸、1978)で計測し、有機炭素量として表現した。また、培養温度は全て25 $^{\circ}\text{C}$ であった。

5.3 結果

繊毛虫(*Tetrahymena thermophila*)の懸濁液に細菌(*Pseudomonas* sp. OM-1)を所定の密度になるように添加し、その後の細菌密度の経時変化を調べた(Fig.5.1, (A))。細菌の初期密度が高い(3.0×10^8 および 2.1×10^7 細胞/ml)とき細胞密度は減少し、初期密度が低い(8.1×10^4 細胞/ml)とき逆に増加し、いずれも培養後、16時間目に約 10^6 細胞/mlに収束した。繊毛虫が存在しないとき、細菌密度は変化しなかった。いっぽう、繊毛虫密度の増加は、細菌の初期密度が 3.0×10^8 細胞/mlのときのみ顕著であり、これ以外では顕

著な変化はなかった (Fig. 5.1(B))。

以上のことから、この繊毛虫は約 10^6 細胞/mlより低密度の細菌は摂食できない閾値を有するようである。

また、細菌の初期密度が 3.0×10^8 細胞/ml、繊毛虫のそれが 1.2×10^4 細胞/mlのとき、培養後16時間目に、細菌密度は 4.8×10^5 細胞/ml、繊毛虫のそれは、Fig. 5.1より推定して、 5.0×10^4 細胞/mlとなった。

以上のことから、この繊毛虫は、初期密度の99%以上に相当する約 3.3×10^8 細胞/mlの細菌を摂食により除去し、新たに 3.8×10^4 細胞/mlの繊毛虫を生産したと考えられる。このことは、また、繊毛虫の1細胞を生産するのに細菌の7,900細胞を必要とすることになる。

さらに、洗浄した細菌あるいは繊毛虫の懸濁液中の有機炭素量および各々の密度から、細菌と繊毛虫の1細胞当りの重量は炭素量で、各々、0.198 pgと794pgとなった。繊毛虫の1細胞の生産に要する細菌の細胞数から、摂食された細菌体に対する繊毛虫体への変換効率は、炭素量で0.51と計算された。

なお、繊毛虫が 10^6 細胞/ml以下の細菌を摂食できない閾値は、図には示していないが、繊毛虫の初期密度を高め (5×10^4 細胞/ml) ても、あるいは、低め (2×10^3 細胞/ml) ても同じであった。

この閾値は有機物PPYEGを加えることにより変化した (Fig 5.2)。すなわち、プロテオースペプトン、粉末酵母エキス、グルコースを重量比で各々2:1:1、かつ、全有機炭素量で $96 \mu\text{g/ml}$ になるようにこの二者培養系に添加すると、培養後16時間目の細菌の最低密度は、添加しなかったときのそれよりさらに20分の1以下に減少して2×

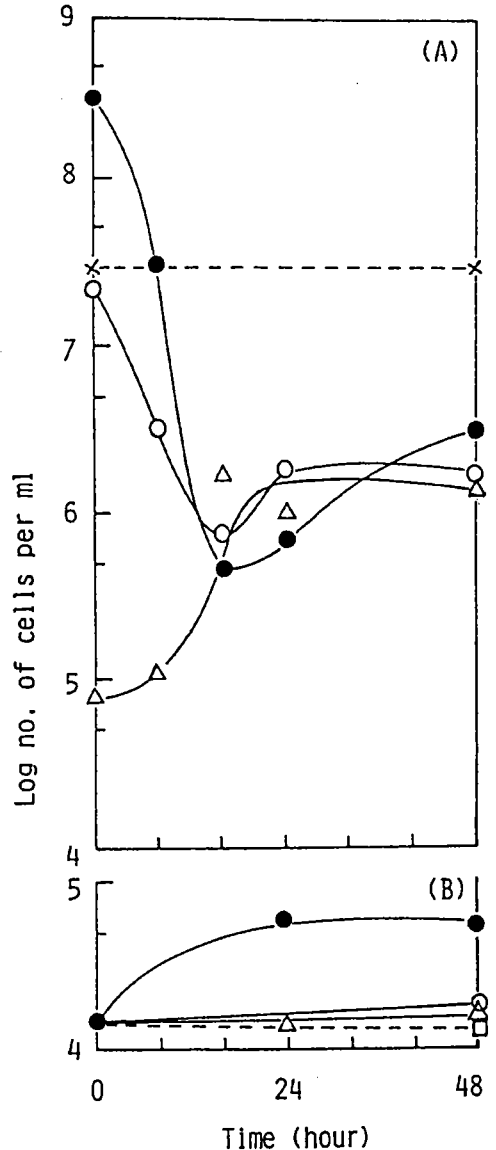


Fig. 5.1. (A) Density changes of *Pseudomonas* sp. at various initial densities in the presence (—●—, —○—, —△—) or absence (---x---) of *T. thermophila*. (B) Density changes of *T. thermophila* in the presence (—●—, —○—, —△—) or absence (---□---) of *Pseudomonas* sp. Symbols (●, ○, △) coincide with those in (A).

10⁴細胞/mlになった。これは初期密度の99.9%以上に相当する細菌が摂食により除去されたことになる。

また、培養後16時間目から細菌密度の急激な増加が認められたが、これは利用可能な有機物の減少に伴う繊毛虫の捕食活動の減少、一方、残存する有機物や繊毛虫の代謝産物の蓄積に伴う細菌の急激な増殖などが原因であろう。さて、Fig.5.1に示したように、1.2×10⁴細胞/mlの繊毛虫が5.0×10⁴細胞/mlに増加するために3.0×10⁸細胞/ml、すなわち、炭素量で59.4 μg/mlの細菌が必要であった。これに対して、Fig.5.2に示したように、1.2×10⁴細胞/mlの繊毛虫が、わずか2.0×10⁴細胞/mlに増加するために、炭素量で98 μg/mlのPPYEGが必要であった。このことは繊毛虫密度の増加にはPPYEGよりも細菌の方が効果的であることを示唆する。

細菌の初期密度が低い(8.1×10⁴細胞/ml)とき、PPYEGは繊毛虫が細菌の密度を培養のごく初期にのみ低く保つことには効果を示したが、既述の閾値の低下には効果を示さなかった(Fig.5.3)。なお、データは示していないが、繊毛虫が存在しなくとも、初期の8.1×10⁴細胞/mlの細菌は増加して10⁸細胞/mlに増加した。

また、PPYEGを10倍あるいは100倍添加しても、既述の閾値の低下には効果を示さなかったが、細菌密度を低いままに保つ傾向は認められた(Fig.5.4)。

さらに、Fig.5.5に示したように、少量のPPYEG(96 μg/ml)でもこれをくり返し添加するとやはり細菌密度を低いままに保つ傾向を認めた。

5.4 考 察

本実験では、二者培養における繊毛虫の第2の

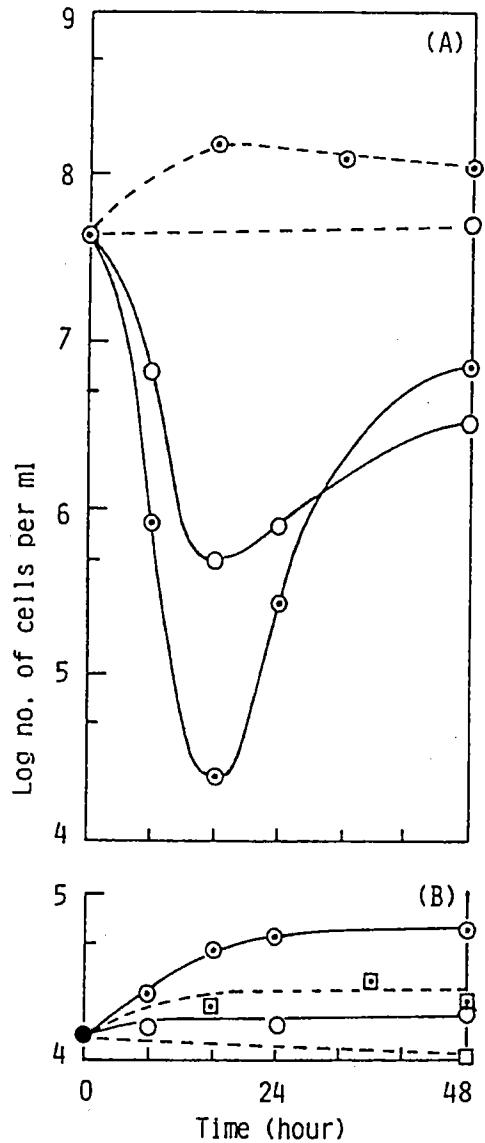


Fig.5.2. (A) Density changes of *Pseudomonas* sp. with (●) or without (○) PPYEG (96 μg per ml) in the presence (—) or absence (----) of *T. thermophila*.

(B) Density changes of *T. thermophila* with (●, □) or without (○, □) PPYEG (96 μg per ml) in the presence (—) or absence (----) of *Pseudomonas* sp. Symbols (●, ○) coincide with those in (A).

エネルギー源として有機物を加えることにより、問題としている細菌の減少を認めた。

以上のように、二者培養に繊毛虫の第2のエネルギー源として他の細菌や有機物を考慮したモデルは、細菌などの微生物の自然環境におけるサヴァイバルの実態の解明とその人為的制御を探る手段として有効であると思われる。このような観点から、本研究の第2のエネルギー源として有機物を考慮したモデルの提案は世界で初めてであろう。また、本研究で用いた *Pseudomonas* sp. OM-1 は環境汚染物質であるオルトクロロフェノールを唯一の炭素源として分解しかつ資化する。このような環境浄化機能を有する微生物の自然環境におけるサヴァイバルや消長を明らかにすることは、遺伝子操作を受けた微生物の自然環境における人為的制御とともに、今後益々重要になる。

本研究にはいくつかの実験上の制約や不備があった。

例えば、PPYEGは繊毛虫にのみ資化されるのではなく、細菌にも資化される。従って、PPYEGの添加による細菌密度の減少の促進と閾値の低下はPPYEGによる繊毛虫の摂食速度の増加が細菌の増殖速度のそれを上回った結果と解釈すべきである。このことは、細菌には資化されず、繊毛虫にのみ資化される有機物の添加は細菌密度の減少をさらに促進し、閾値をさらに低下させることを示唆する。残念ながら、いくつかの予備実験において、このような条件を満足させる有機物を探り当てることはできなかった。

また、Fig. 5.1 & 5.3で、細菌の初期密度が低い (8.1×10^4 細胞/ml) とき、有機物を添加して

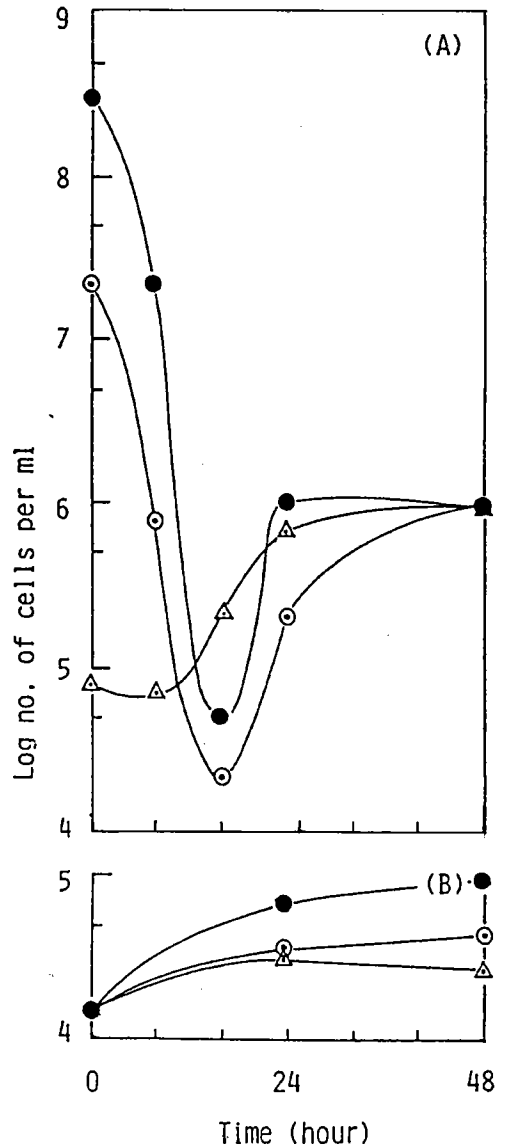


Fig. 5.3. (A) Density changes of *Pseudomonas* sp. at various initial densities with PPYEG (96 µg per ml) in the presence of *T. thermophila*. (B) Density changes of *T. thermophila*.

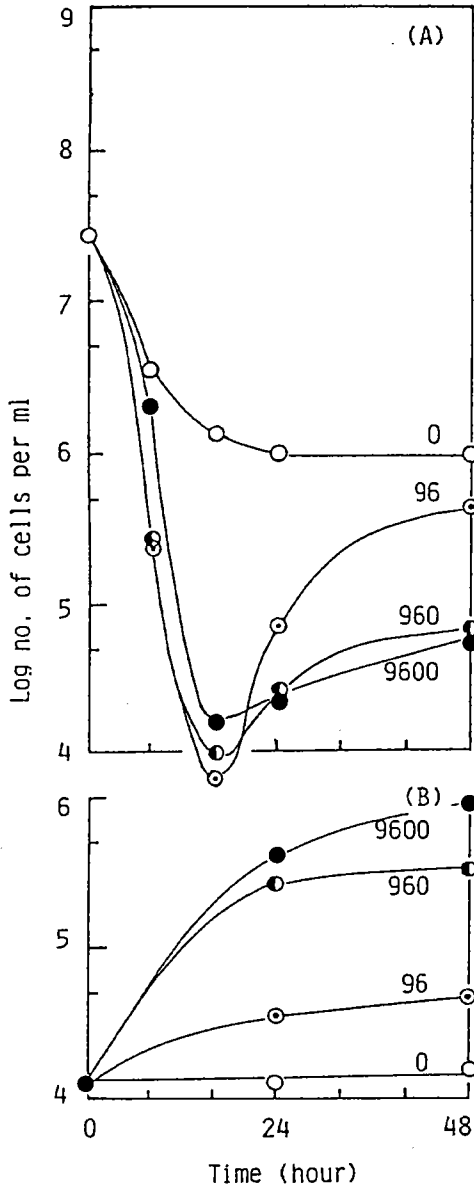


Fig.5.4. (A) Density changes of *Pseudomonas* sp. with various initial concentrations of PPYEG in the presence of *T. thermophila*. The numbers in the figure are the concentrations (μg per ml) of PPYEG. (B) Density changes of *T. thermophila*.

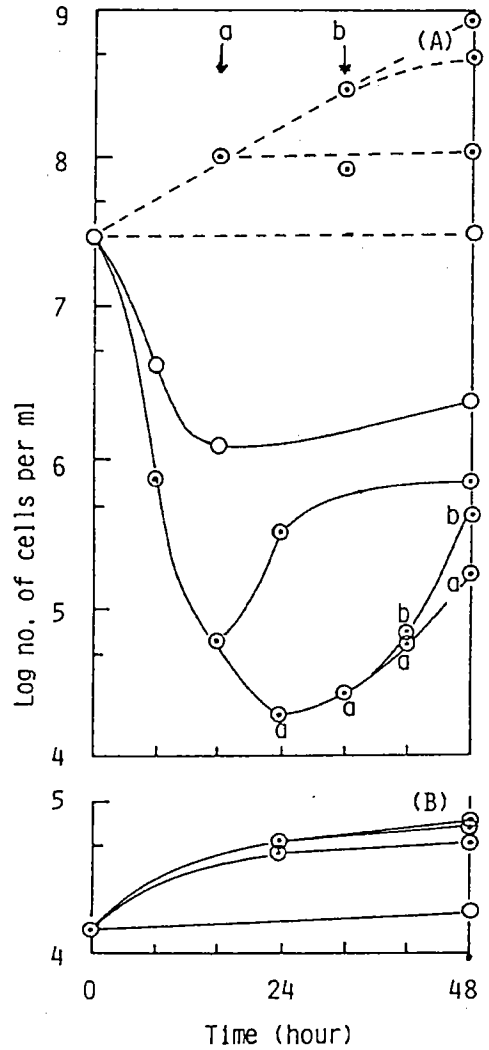


Fig.5.5. (A) Density changes of *Pseudomonas* sp. with (⊙) or without (○) PPYEG ($96\mu\text{g}$ per ml) in the presence (—) or absence (-----) of *T. thermophila*. At arrow a, PPYEG was again added into the culture to a final concentration of $96\mu\text{g}$ per ml. In this culture, the density change of *Pseudomonas* sp. was shown by writing a at the symbol. At arrow b, PPYEG was further added into the culture that had received PPYEG at arrow a. In this culture, the density change was shown by writing b. (B) Density changes of *T. thermophila*.

度が 10^6 細胞/*ml*に増加したのはリン酸緩衝液に含まれていた、あるいは、空気中から溶けこんだ微量の有機物の資化 (Geller, 1983 ; Seto & Alexander, 1985) が原因であろう。わずか0.2 pgの細菌が 10^6 細胞/*ml*に増加するのにわずか1 μ g/*ml*の有機物汚染で十分である。この有機物汚染を除去することは実際上大変困難である。

さらに、Fig. 5.4で、PPYEGの添加量を高めても閾値のさらなる低下は認められなかった。本実験ではPPYEGの大量添加が細菌の完全除去を引起すか否かを第一の目的にしたが、逆に、繊毛虫の閾値の低下を引起すPPYEGの最少量を明らかにすることも必要であった。また、添加する有機物の質の問題も今後検討されねばなるまい。なぜなら、自然界の水の溶存有機物は炭素量で0.5~50mg/ ℓ 程度 (Seto *et al.*, 1988) であり、その組成も多様であるからである。

PPYEGの連続添加は細菌密度を低く維持するのに効果があった (Fig. 5.5)。本実験は回分培養で行なったが、有機物が連続添加される連続培養での細菌と繊毛虫の密度変化の解明も自然環境中の特定の機能を有する微生物のサヴァイヴァルの理解に重要であろう。

繊毛虫を含めて原生動物の食性については不明な点が多い。例えば本研究に用いた*Tetrahymena thermophila*はPPYEGを唯一の炭素源かつエネルギー源として増殖できるが、このような食性の原生動物が自然界にどのように分布し、生活しているかは殆ど調べられていない。この点を明らかにすることは例えば有機汚濁の激しい汚水中における特定の機能を有する細菌等のサヴァイヴァルを理解し、生物相の制御 (Sudo & Aiba, 1971) のためにも不可欠であろう。

6. おわりに

人工化学物質の分解に関する研究は比較的多い。しかしながら、その大部分は生理化学的な過程の研究に集中している。したがって、人工化学物質の環境における消長についてはほとんど明らかにされていない。自然環境における特定の化学物質の濃度、分解菌の分布、分解を支配する生態

学的環境要因の影響などに関する情報はきわめてわずかである。そのために、数万におよぶ人工化学物質が常時使われているにもかかわらず、環境における合理的な管理ができていない。今後は、とくに生態学的なレベルによる研究がもっと進められるべきである。

7. 謝 辞

本研究は多くの人々によって実施された。研究に直接かかわった人の氏名を記して謝意を表する。

中野伸一、池島 耕、牧野純一、エルニ・マルタニ、鶴井文葉、宮田知幸の各氏。

最後になったが、(財)とうきゅう環境浄化財団と、事務局の方々にはたいへんお世話になった。厚くお礼申し上げます。

8. 引用文献

- Alexander, M. (1984) : Ecological constraints on genetic engineering, pp.151-168. In G.S. Omen & A.Hollaender(ed), Genetic control of environmental pollutants, Plenum Press, N.Y.& London.
- Alexander, M.(1989) : Microbial ecology in a world under environmental stress, pp.3-9. In T. Hattori *et al*(ed.), Recent advances in microbial ecology, Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Anderson, J.P.E., E.P. Lichtenstein & W. F. Whittingham (1970), Effect of *Mucor alternans* on the persistence of DDT and Dieldrin in culture and in soil, J. Econ. Entomol., 63, 1595-1599.
- Curds, C.R. & M.J.Bazin(1977):Protozoan predation in batch and continuous culture. *Advances in Aquatic Microbiology*, 1: 115-176
- Fenchel, T., and B.B.Hemmingsen (1974) : *Manual of microbiology*. Akademisk Forlag Studentlitteratur.
(手塚泰彦訳, 1976, 微生物生態学入門, 講談社)
- Geller, A. (1983) : Growth of bacteria in inorganic medium at different levels of airborne organic substances. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 1258-1262.
- Goldstein, R.M., L.M. Mallory & M. Alexander (1985): Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:977-983.
- Habte, M. & M. Alexander(1975) : Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Appl. Microbiol.*, 29 : 159-164.
- Hoover, D. G., G. E. Borgonovi, S. H. Jones & M. Alexander (1986) : Anomalies in mineralization of low concentrations of organic compounds in lake water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 226-232.
- Horvath, R.S. (1972) : Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.*, 36 : 146-155.
- Klein, T.M. & M. Alexander (1986), Bacterial inhibitors in lake water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 114-118.
- Konda, T. & Y. Tezuka(1979) : Bacterial flora in the water and sediment of Lake Motosu-Ko, an oligotrophic lake in centr-

- al Japan. Jap. J. Ecol., 29:209-220.
- Kuiper, J. & A.O. Hanstveit (1984): Fate and effects of 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol in marine plankton communities in experimental enclosures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 8, 15-33
- Lewis, D.L., H.P. Kollig, & R.E. Hodson (1986): Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 598-603.
- Liang, L.N., J.L. Sinclair, L.M. Mallory & M. Alexander (1982): Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 708-714.
- MacRae, I.C. & M. Alexander (1965), Microbial degradation of selected herbicides in soil, *J. Agr. Food Chem.*, 13, 72-76.
- Mallory, L.M., C.S. Yuk, L.N. Liang & M. Alexander (1983): Alternative prey: A mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1073-1079.
- Menzel, D., W., and N. Corwin (1965): The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 280-282.
- Murphy J., and J.P. Riley (1962): A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta.*, 27: 31-36.
- Omen, G. S. & A. Hollaender (1984): Genetic control of environmental pollutants. pp. 413. Plenum Press, N. Y. & London.
- Orazio, C. E. & S. Kapila (1983): High-performance liquid chromatographic determination of phenols as phenolates in a complex mixture. *J. Chromatogr.*, 262, 434-440.
- 佐藤 匡 (1981): 農薬と土壤の微生物, pp. 389-419, 土壤微生物研究会編, 土の微生物, 博友社
- Schmidt, E., M. Hellwig & H. J. Knackmuss (1983): Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1038-1044.
- Seto, M. & T. Tazaki (1971), Carbon dynamics in the food chain system of glucose-*Escherichia coli*-*Tetrahymena vorax*, *Jap. J. Ecol.*, 21, 179-188.
- 瀬戸昌之 (1978): 食物連鎖と物質の濃縮.

- pp.206-217, 田崎忠良編著, 環境植物学, 朝倉書店.
- 瀬戸昌之 (1978): 湿式酸化-赤外線ガス分析計による全有機物炭素の高感度迅速定量法。分析化学, 27: 660-663.
- Seto, M. & M. Alexander (1985): Effect of bacterial density and substrate concentration on yield coefficients. Appl. Environ. Microbiol., 50: 1132-1136.
- 瀬戸昌之 (1986): 環境浄化のためのニューバイオテクノロジーとその生態学的制約, 人間と環境, 12: 27-32.
- Seto, M., M. Yamamoto, S. Nishida & I. Tange (1988): Heterotrophic utilization of dissolved organic carbon and its implication in the oxygen consumption of various limnetic waters. Rolling Land Research, No.6: 294-303.
- 瀬戸昌之, 岩元真史 (1988): 細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の飢餓条件における呼吸速度とサヴァイヴァル, 人間と環境, 14, 11-19.
- Sinclair, J. L. & Alexander (1984): Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. Appl. Environ. Microbiol., 48: 410-415.
- Solorzano, L. (1969): Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. Limnol. Oceanogr., 14: 799-801.
- Spain, J. C., P. H. Pritchard, and A. W. Bourquin (1980): Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and fresh water environments. Appl. Environ. Microbiol., 40: C., 726-734.
- Spain, J. C. & P. A. Van Veld (1983): Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: Effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. Appl. Environ. Microbiol., 45: 428-435.
- Spain, J. C., P. A. Van Veld, C. A. Monti, P. A. Pritchard, and C. R. Cripe (1984): Comparison of *p*-nitrophenol biodegradation in field and laboratory test systems. Appl. Environ. Microbiol., 48: 944-950.
- Sudo, R. & S. Aiba (1971): Food habit of Vorticellidae isolated from activated sludge. Jap. J. Ecol., 21: 140-146.
- Swindoll, C., M., C. M. Aelion, and F. K. Pfaender (1988): Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities.

Appl. Environ. Microbiol., 54: 212-217.

-796.

Tinsley, I.J. (1979): Chemical concepts in pollutant behavior. John Wiley & Sons (山県 登訳, 1980, 環境汚染の化学, 産業図書).

Tiedje, J. M. *et al* (1989): The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations (辛島ら訳, 1989, 環境情報科学, 18, 64-68)

Torstensson, N. T. L., J. Stark & Goransson (1975): The effect of repeated applications of 2,4-D and MCPA on their breakdown in soil. Weed Research, 15, 159-164.

Van den Ende, P (1973): Predator-prey interactions in continuous culture, Science, 181: 562-564.

Ventullo, R., M., and R. J. Larson. (1986): Adaptation of aquatic microbial communities to quaternary ammonium compounds. Appl. Environ. Microbiol., 51: 356-361.

Wiggins, B., A., S. H. Jones, and M. Alexander. (1987): Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 53: 791

Wood, E., D., F. A. Armstrong, and F. A. Richards, (1967): Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. J. Mar. Biol. ASS. U. K., 47: 23-31.

Woodwell, G. M., C. F. Wurster & P.A. Isaacson (1967): DDT residues in an east coast estuary: A case of biological concentration of a persistent insecticide. Science, 156, 821-824.

山県 登 (1978): 生物濃縮-環境科学特論-, 産業図書.

なお, 本研究は以下の学術雑誌に発表した。

瀬戸昌之, 鶴井文葉, 宮田知幸 (1988): 繊毛虫による細菌の除去: *Pseudomonas* sp. - *Tetrahymena thermophila* の二者培養に及ぼす有機物添加の影響, 人間と環境, 14, 23-30.

瀬戸昌之, 池島 耕, 中野伸一 (1989): 多摩川の試水における塩素化フェノールの分解菌密度と塩素化フェノールの分解に関する二, 三の考察, 人間と環境, 14, 12-19.

瀬戸昌之, 中野伸一, エルニ・マルタニ, 牧野純一 (1989), いくつかの環境試水における低濃度の2,4-dichlorophenolの分解菌密度とその

分解の微生物学的考察, 生態化学, 9, 8-15.

瀬戸昌之, 中野伸一, 牧野純一 (1990), 多摩川における塩素化フェノールの分解菌密度の分布と季節変化, および, 添加した塩素化フェノールの分解様式の考察, 人間と環境, 15, 16-22.

瀬戸昌之, 鶴井文葉, 牧野純一 (1990), DCP (2,4-dichlorophenol) を添加した湧水と河川水におけるDCP分解菌のサヴァイヴァルとDCP分解におよぼす長期間培養の影響, 人間と環境, 16, 11-17.

Nakano, S. & M. Seto (1990), Some ecological factors in the degradation of 2,4-dichlorophenol in waters from aquatic environments, Jpn. J. Limnol., 51, 155-161.

瀬戸昌之, 牧野純一 (1990), いくつかの環境試水に接種した2,4-ジクロロフェノール (DCP) の分解菌 (DP-4) によるDCPの分解促進の試み, 人間と環境, 16, 70-76.