

Chlorella sp.によるCBZの還元分解に関する基礎的研究 Basic research on reductive decomposition of CBZ by *Chlorella* sp.

○神林慶太¹, 齋藤利晃², 小沼晋²*Keita Kanbayashi¹, Toshiaki Saito², Susumu Konuma²

Abstract: It is known that pharmaceuticals derived from human activities exist in environmental water. In this study, we thought that microalgae known to have reducibility to organic substances could be reductively decomposed, although pharmaceuticals cannot be removed by oxidation treatment with activated sludge. We investigated whether carbamazepine (CBZ) can be reductively decomposed by *Chlorella* sp. after culturing under conditions that allow it to be reduced. In addition, the effect of CBZ on *Chlorella* sp. was investigated. As a result, CBZ was not decomposed, but it was suggested that the excess reducing power due to the lack of nutrients enlarged the cells and improved the photosynthetic ability.

1. 研究背景および目的

近年, 我々ヒトや家畜, ペット等が服用した医薬品類が下水処理施設で分解除去されずに放流され, 環境水中から検出されている. これらは水生生物の生理活性に直接影響を及ぼす可能性があり, 生態系のかく乱や薬剤耐性を持った生物の出現などが懸念されている. このため, 下水処理施設において医薬品類の分解除去能を高めることが求められている. しかしながら, 未分解の医薬品類はその性質上, 活性汚泥による酸化分解が困難であることが考えられる. 一方, 微細藻類は水中有機物に対する還元作用を有することが報告されており^[1], 微細藻類による未分解医薬品類の還元処理または活性汚泥による酸化分解が可能な易分解有機物への変換能力を有する可能性があると考えた. 本研究は, 未分解医薬品としてカルバマゼピン (以下CBZ) を選定し, 微細藻類によるCBZの還元分解性および生理的な応答を調査した.

2. 実験方法

供試藻類に *Chlorella* sp. MK201^[2]を, 培地にMC⁺を用いた. 継代培養は30°Cの恒温槽内で白色蛍光灯にて約50 μmol m⁻² s⁻¹の光を与え, 暗期を作らずに無希釈の培地を用いて静置し2週間毎に植え継いだ. 試験の前培養として1/100濃度に調整した培地を用い, CO₂の供給のため実験室内大気を0.25 μmのフィルターに通し曝気した. またマグネチックスターラーにより攪拌した. 前培養は対数増殖期を保持できる3~4日間行い, これをろ過し藻類を捕集したのち, 試験培地と同組成の培地にろ物を展開し, これの細胞密度を検鏡計測し, 試験培地に250×10³ cells/mLとなるように接種した.

試験培地はN欠乏, P欠乏 (以下N欠, P欠) およ

び無欠の3種類かつCBZ添加・無添加の合計6系列用意した. (Table 1.) N欠およびP欠はそれぞれ窒素源およびりん源を欠乏させた1/100濃度培地, 無欠は前培養同様1/100濃度培地である. CBZはDMSOへ10 mg/mLに溶解させた標準液を10 mg/Lとなるよう添加した.

Table 1. Test series

Series name (abbreviation)	CBZ	Nitrogen source	Phosphorus source
Standard addition (SA)	○	○	○
Standard additive-free (SF)	×	○	○
Nitrogen deficiency addition (NA)	○	×	○
Nitrogen deficiency additive-free (NF)	×	×	○
Phosphorus deficiency addition (PA)	○	○	×
Phosphorus deficiency additive-free (PF)	×	○	×

試験開始時および終了時に培養液のろ液を採取し, ろ液:ジクロロメタン=1:1で液-液抽出後, 内部標準物質としてフルオランテン-d10を添加し, 誘導体化剤としてBSTFAを加え, 70°C, 3時間加熱してGC/MS分析を行った. また, 試験開始時および終了時にOD₆₈₀, 細胞密度, 細胞粒径およびクロロフィル蛍光を測定した.

3. 結果及び考察

細胞増殖率およびOD₆₈₀をFig 1.に, 試験終了時の細胞粒径をFig 2.に, OD₆₈₀あたりの面積増加率および体積増加率をFig 3.に示す. なお, これらはTable 1.中のNF, PFを除いた予備実験にて得られたデータを示す.

Fig 1.より, CBZの添加により細胞増殖率は微減, OD₆₈₀は微増した. 細胞密度とOD₆₈₀は一般に線形関係であるため, 一見相反するよう見受けられるが, 一

定のばらつきを有するため、ばらつきの範囲内であると考えられる。また、CBZの有無よりも栄養塩の欠乏が細胞増殖に与える影響は大きいと考えられる。

Fig 2より、CBZの有無は細胞粒径に変化は見られなかった。一方、栄養塩欠乏系では明らかに細胞粒径が大きくなった。ここで、細胞増加率および細胞粒径より、投影面積増加率および体積増加率を算出し、これをOD₆₈₀で除して光の吸収量あたりの投影面積および体積の増加率を示したものがFig 3である。OD₆₈₀あたりの投影面積増加率は概ね横ばいであったことに対し、体積増加率は栄養塩欠乏系で大きくなっていることがわかる。この結果からは、栄養塩欠乏系では1光量子から得られるエネルギーを体積増加に利用する効率が上がっていることが示唆される。

Fig 4はクロロフィル蛍光測定による結果を示す。qPは光化学的消光すなわち光合成系II下流側の活性を表し、Fv'/Fm'は明順応時最大量子収率すなわち明順応時における光合成系IIの総量を表し、ΦIIはqPとFv'/Fm'の積であり実効量子収率すなわち明順応時に利用できる光合成系IIの量を表している。なお、N欠乏系に関するデータは欠損している。まず、SAとSFでは、ΦIIがSAで大きく下がっている。これに寄与しているのはqPである。このことから、CBZの存在によって光合成系II下流側の電子伝達系に異常が生じたと考えられる。また、SF、PFからP欠乏によって光合成系IIそのものの活性が落ちていると考えられる。PA、PFの比較では、ΦIIは低下してはいるがSA、SFのΦIIの低下率よりも小さくなっている。また、qPに至っては増加している。これらのことから、P欠乏によって光合成系自体に異常が生じたものの、影響を受けなかった光合成系は、取り入れた光エネルギーの利用効率が向上していることが示唆され、予備実験で得られた結果を支持することになった。

GC/MSによるCBZの分析結果(Table 2.)については、初期濃度Coを10 mg/Lに設定しているにもかかわらず大きくばらついた。これは操作上考えられないことであり、さらにSAに至ってはCBZが増加するような結果となったことから、分析の蓋然性が低いと考えられるため、前処理を含む分析方法を見直す必要がある。しかしながら、比較的Coの値に近いNAおよび

Table 2. CBZ concentration

Series name	CBZ conc.[mg/L]		Ct/Co
	Co	Ct	
SA	9.8	12.6	129%
NA	13.3	13.6	102%
PA	13.5	11.8	88%

PAのCtを比較すると、NAはCBZの分解はされず、PAではわずかにされる可能性が示唆された。

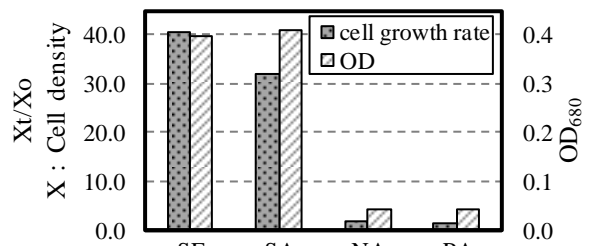


Fig 1. cell growth rate and OD

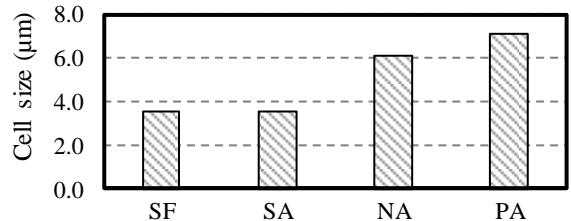


Fig 2. cell size

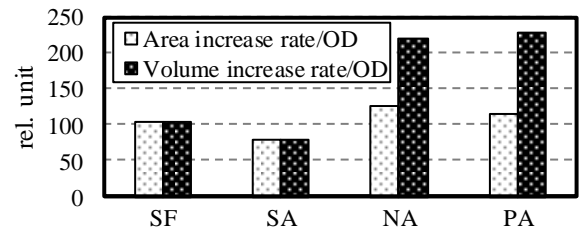


Fig 3. Area and volume increase rate/OD

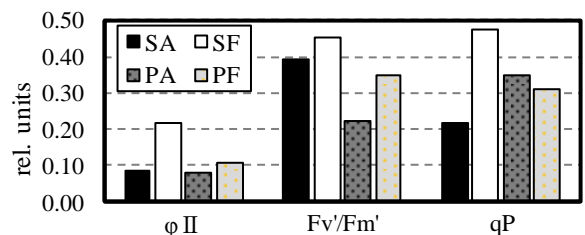


Fig 4. Each index of chlorophyll fluorescence

4. 総括

本研究では、藻類の還元力に着目してCBZの還元分解性および生理的応答を調査した。CBZの分析法を確立することが急務であるが、P欠乏においてわずかに分解されることが示唆された。また、当初の予想に反し栄養塩欠乏系では細胞増殖が抑制されたことにより生じた余剰還元力の利用先が、CBZの分解よりも細胞を大きくさせる炭酸同化の方向へ向くことが示唆された。今後は、CBZの還元分解に効果的な条件を明らかにする予定である。

5. 参考文献

- [1] 伊藤賢一他:「小型LEDフォトバイオリアクターを用いた微細藻類によるケトンの不斉還元」, 生体触媒化学シンポジウム講演要旨集, Vol.19, pp.54, 2017
- [2] 村上仁一, 特開 2000 78966(2000)