

水産基盤整備調査報告書

干潟の有害物質浄化能力の調査

独立行政法人水産大学校・食品化学科
微生物研究室・芝恒男・前田俊道・古下学
平成12年～14年

緒 言

河川から干潟に運ばれる有害物質は、干潟を構成する砂粒子に沈着して分解されることが示唆され^{1,2)}、干潟は海を汚染から守るうえで重要な働きをしていると思われる。

フェノール関連化合物は界面活性剤や消毒薬として広く利用されているが、有害な働きを持つものが多い。排水されたこれら化合物は河川により運ばれて海に達するが、これらが干潟に沈着されて、そこで分解されれば海の汚染を未然に防ぐことが出来る。そこで本研究ではフェノール関連化合物のなかのビスフェノールA (BPA) に注目し、このBPAの干潟域での分解能を分解細菌の分布から明らかにし、これによって環境浄化における干潟の有効性を明らかにしたい。

調査方法

ビスフェノールA (BPA) 分解細菌の分離

BPAは水に不溶で、培養液に混合できないのでシリカゲルに吸着させて培地を作製した³⁾。すなわちシリカゲルCosmosil C18 OPN (ナカライテスク株式会社) 1 gに500 ppm BPAトルエン溶液10 mlを加えた後、ヘキサン50 mlを加え、緩やかに攪拌し、5分間静置した。その後、トルエン-ヘキサン溶液60 mlを取り除き、30℃～40℃で乾燥させた。この時除去したトルエン-ヘキサン溶液からは、BPAは検出されなかったため、BPAはすべてシリカに吸着していると考えられた。乾燥したシリカを表1に示す無機培地100 mlに加え、オートクレーブした。尚、BPAは和光純薬工業株式会社のものを用いた。

分解細菌の分離のため、海浜砂を採集し、これを調整した培地に10%濃度で接種し、30℃で振とう培養を行った。BPAの減少の見られた培養液から1白金耳とり、これをPPES-II³⁾寒天平板培地に塗布して、分解細菌を分離した。

BPAの分析

BPAの抽出においては、培養上清からは等量のクロロホルムを用いて抽出した。またシリ

カゲルからは、培養液中の乾燥させた約0.01gのシリカゲルをジエチルエーテルで3回抽出し、ロータリーエバポレーターで乾固させ、クロロホルム1mlを加え、このクロロホルム溶液をサンプルとした。なお、あらかじめBPAの抽出効率率は、3回の連続抽出で90%以上であることを確認している。

BPA量（ベンゼン環相当量）は、順相HPLCおよび吸光光度計法で調べた。ベンゼン環相当量は277 nmでの吸光値から求めた。

表. 1 BSA分解分離のための基礎培地

KNO ₃	0.25 g
NH ₄ Cl	0.20 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.03 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.07 g
COMB	0.10 ml
5%ferric citrate	0.20 ml
VB ₁₂ 溶液	1.00 ml
Tris	1.20 g
人工海水	1000 ml

COMB ; ZnSO₄·7H₂O, 0.125g; MnCl₂·4H₂O, 0.157g; H₃BO₃, 0.06g; CoCl₂·6H₂O, 0.37g; NiCl₂·6H₂O, 0.02g; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.04g; 25%HCl, 1.0ml; 蒸溜水, 1000ml

細菌数の計測

培養液中の細菌数は落射蛍光顕微鏡を用いた直接顕微鏡法により調べた。すなわち菌体をエチジウムブロマイド⁴⁾で染色し、フィルター上に集めて観察した。

BPA分解細菌の分布調査

図1に示す地点で、サンプリングを行った。各採集地点で、海浜砂を採取し、これを10%、1%、0.1%濃度で、先に示したシリカゲル無機培地(50 ppm BPA)に接種し、3段階3本立てのMPN法でBPA分解細菌数を求めた。培養は、30℃で21日間振とう培養した。尚、各試験管中のBPAが30%以上減少した管を陽性とした。

BPA分解細菌の分類調査

分離されたBPA分解細菌については、16S rDNAの解析およびグラム染色、オキシダーゼ、カタラーゼ活性、さらにはAPI20 NEによる生理性状検査を行った。

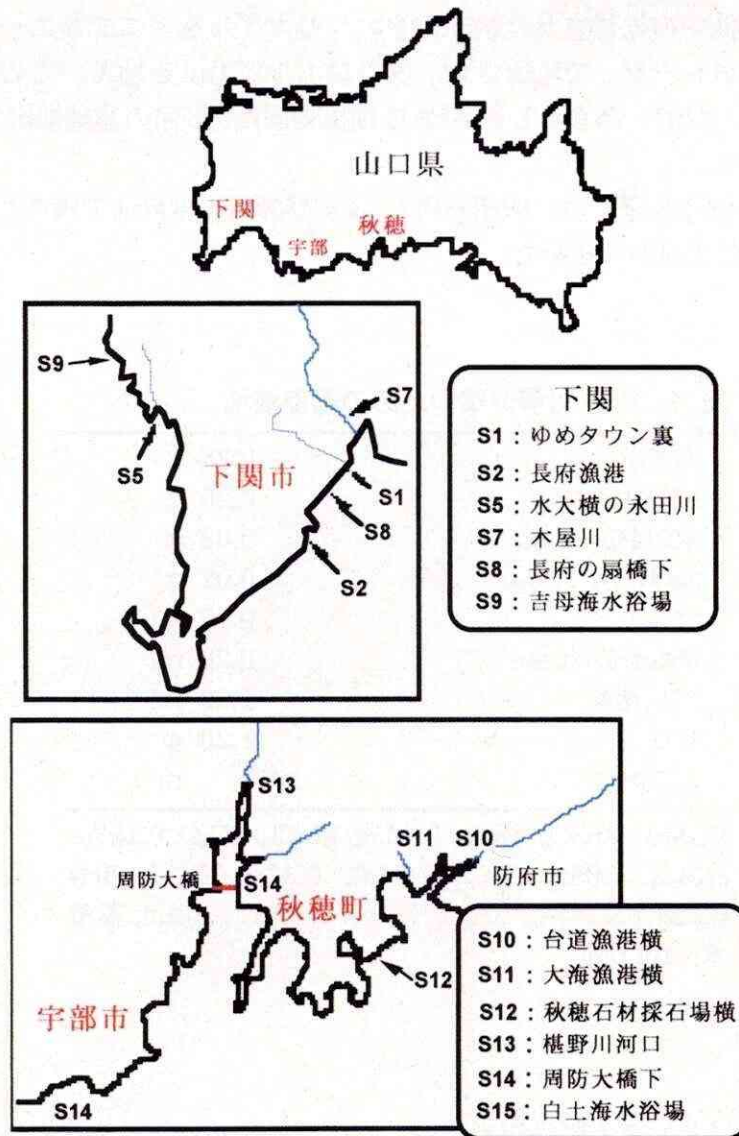


図1. 採集地点

ビスフェノールA分解細菌のリアルタイムPCRによる定量

16S rRNA 遺伝子の領域において分解能が見られた YY-1 株に特異的であると思われる 28 残基の蛍光プローブを設計した。また、この 3' および 5' 末端域において 17 残基および 15 残基のプライマーを設計した (図 2)。この PCR プライマーセットを用いて、108 残基の DNA 断片を増幅しながら、これと蛍光プローブとのハイブリダイゼーション (リアルタイム PCR) を行った。リアルタイム PCR の反応液組成を表 2 に示す。

PCR は ABI prism 7700 を使い、95°C、10 分のプレヒートを行い、95°C、15 秒と 60°C、1 分を 50 サイクル行った。

表2 リアルタイムPCR液の組成

10 x TaqMan bufferA	2.00 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2.80 μ l
BSA (4mg/ml)	2.00 μ l
dATP (10 mM)	0.40 μ l
dCTP (10 mM)	0.40 μ l
dGTP (10 mM)	0.40 μ l
dUTP (20 mM)	0.40 μ l
フォワードプライマー (100 pmol/ μ l)	0.06 μ l
リバースプライマー (100 pmol/ μ l)	0.06 μ l
DNAプローブ (11.2 pmol/ μ l)	0.35 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0.10 μ l
AmpliTaq Erase (1U/ μ l)	0.20 μ l
Template	2.00 μ l
滅菌ミリQ水を加え全量を 20 μ lとした	

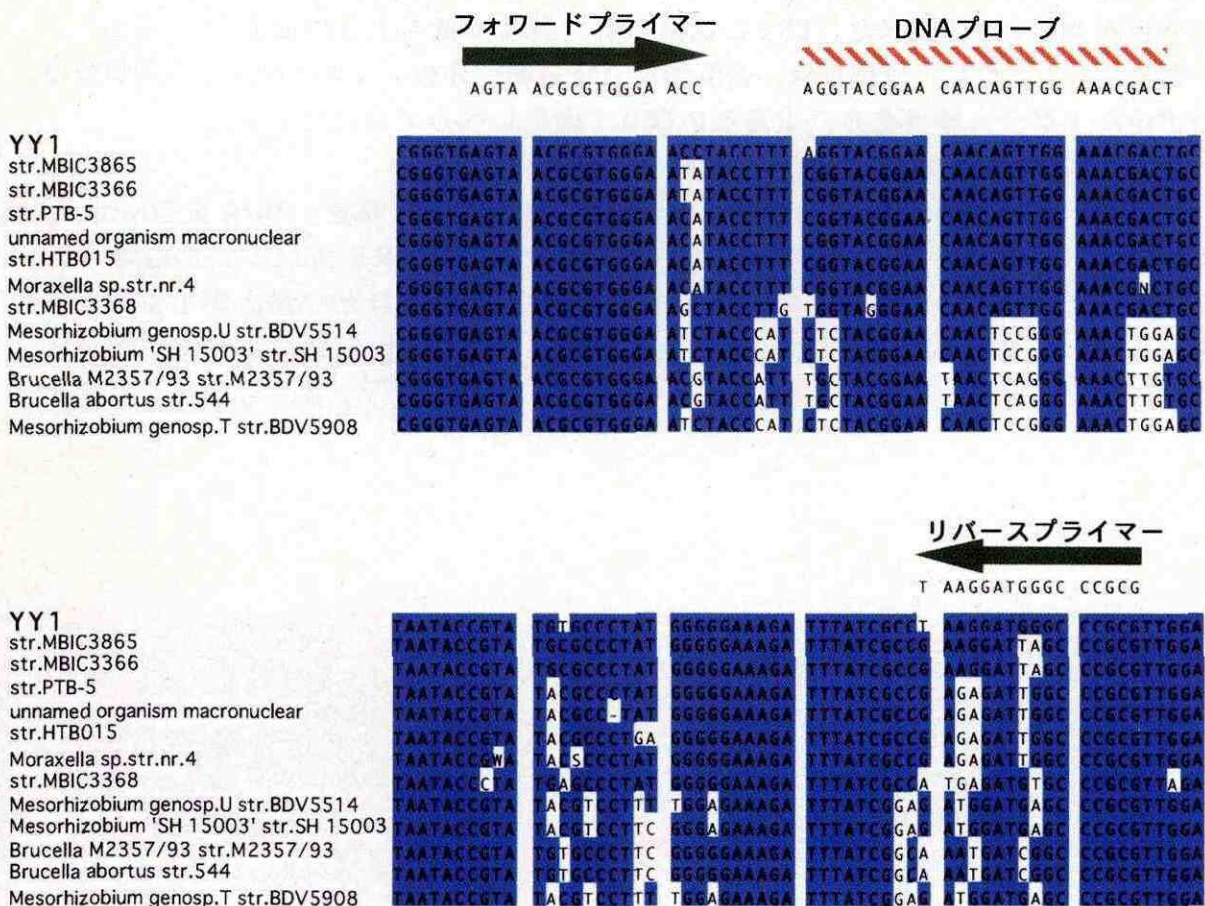


図2. プライマーおよびプローブ領域

DNA プローブ法による BPA 分解細菌の分布調査

5 g の干潟の砂を、DNA 抽出緩衝液 (100mM Tris-HCl, 100 mM sodium EDTA [pH8.0], 100 mM sodiumphosphate [pH8.0], 1.5 M NaCl, 1% CTAB), Protinase K 液, 20% SDS, クロロホルム等で順次処理して DNA を抽出し、これを電気泳動用ゲルを持ちいて精製した。この DNA を鋳型 DNA として用い、先に示した HPCR 法に準じて定量的 HPCR を行った。

調査結果

1. 現場細菌群集によるビスフェノール A の分解

図 3 は下関市内長府扇橋付近に広がる干潟から採取した細菌群集による BPA の好氣的分解過程を示している。図に示される様に 50 ppm 濃度で BPA を添加した海水に 1% 濃度で干潟の砂を接種したと、細菌数がおよそ 30 時間で 1 ml あたり 10^7 にまで増大し、かつ BPA が 150 時間余りでゼロにまで減少した。BPA がゼロにまで減少したのは、細菌群集によって完全分解されたことを示す。一方細菌数が 10^7 にまでしか増大しなかったことは、分解菌が BPA を資化していないことを示唆している。

2. ビスフェノール A 分解菌の分布

海浜にビスフェノール A 分解菌の存在が確認されたので、ビスフェノール A 分解菌の分布を MPN 法で調べた。図 1 に採集場所、表 3 に調査結果を示す。

表 3 に示すように、分解菌は、海浜環境に普遍的に分布するものの、その細菌数は、わずかに 1 グラム砂当たり、1 あるいは 0.1 細胞レベルであった。

3. ビスフェノール A 分解菌の単離

図 4 は下関市木屋川河口の干潟から分離した細菌 YY-1 株を、BPA を 50ppm 濃度で添加したペプトン培地に接種した時の増殖分解曲線を示している。この場合用いた培地にはペプトンが含まれているので、細菌は 10 時間ほどで濁度が 1 をこえるにまで増殖し、また BPA は図 1 に示したと同じように、2 段階からなる減少を経て、ゼロにまでに減少した。

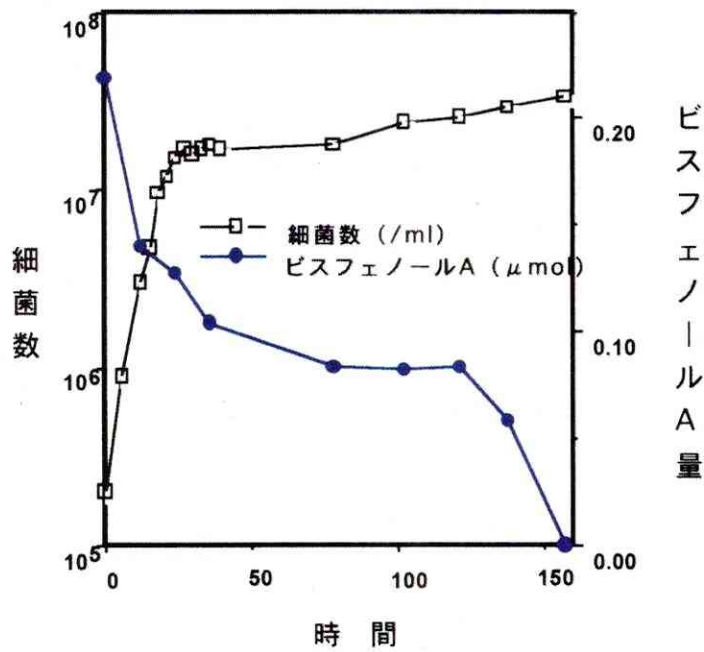


図3. 干潟細菌群衆によるビスフェノールAの分解

表3. ビスフェノールA分解菌の分布

採集地点	分解菌数 (細胞数/グラム)
ゆめタウン裏	2.3
長府港	0.4
木屋川	0.9
長府の扇橋下	2.3
台道漁港横	0.3以下
大海漁港横	0.3以下
秋穂石材採石場横	0.4
はしの川	2.3
周防大橋下	0.3以下
白土海水浴場	0.9

一方この菌を、同様に、有機物としてビスフェノールAのみを含む培地に接種したところ、分解および増殖のいずれも観察されなかった。したがって、本菌は、ビスフェノールAを完全分解、すなわちビスフェノールAのベンゼン環を開環するものの、ビスフェノールAを資化出来ない細菌であることがわかった。

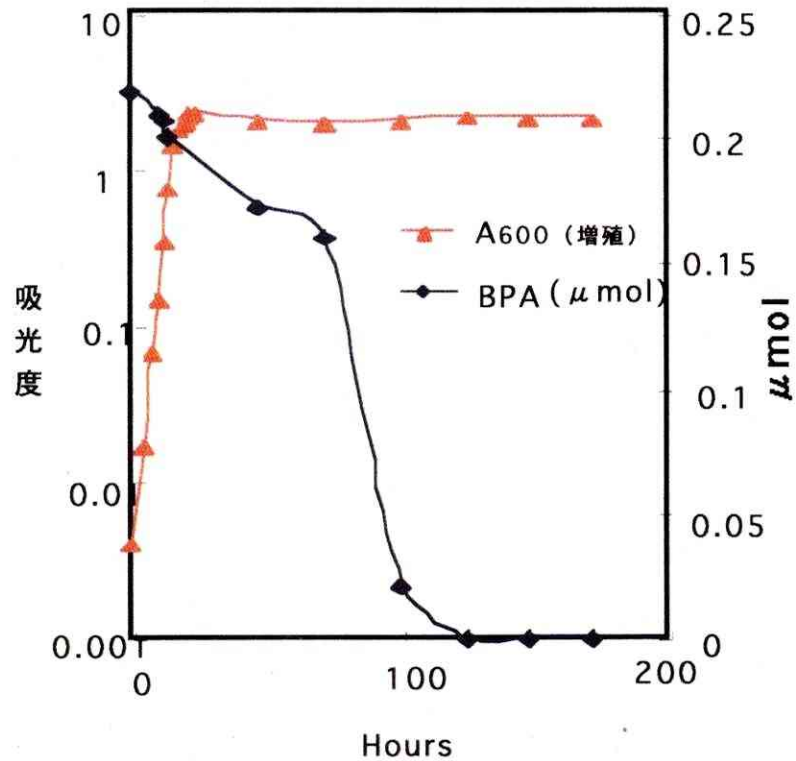


図4. YY-1株 増殖/BPA分解曲線

4. ビスフェノールA分解菌の分解に果たす海浜干潟の役割

海浜干潟にはビスフェノールA分解菌が普遍的に存在するものの、その分解菌はビスフェノールAを資化出来ない。このような場合、分解が促進されるには、分解菌の増殖がビスフェノールA以外の有機物によって支えられる必要があるが、このような働きを海浜砂中の有機物が果たしているものと考えられた。そこで、海浜砂に分解菌とビスフェノールAを接種して、ビスフェノールAが分解されるかについて調べた。その結果表4に示すように、1) 現場に分解菌がいなくても分解菌を接種すると分解が進むこと、2) この間に分解菌が増殖していることがわかった。これまでに分解菌をビスフェノールAを含んだ海水に接種しても、分解も細菌の増殖も起きないことを確認しているため、海浜砂の環境は、分解菌の増殖を助けるなかで、ビスフェノールAの分解無機化を促進する作用のあることが示された。

表4. ビスフェノールA分解に果す海浜砂の役割

砂の種類	細菌接種量 (ml)	分解量 (%)	菌数 (Log)
吉母 (オートクレーブ)	0.0	0	5.59
吉母 (オートクレーブ)	1.0	8.3	6.25
吉母 (オートクレーブ)	2.0	10.9	6.94
吉母 (オートクレーブ)	3.0	26.6	7.15
吉母 (オートクレーブ)	3.5	46.2	7.40
吉母	0.0	0	7.23
吉母	1.0	17.1	7.32
吉母	2.0	16.9	7.30
吉母	3.0	30.1	7.32
吉母	3.5	47.4	7.53
扇橋下 (オートクレーブ)	0.0	0	5.45
扇橋下 (オートクレーブ)	1.0	12.8	7.71
扇橋下 (オートクレーブ)	2.0	14.8	7.68
扇橋下 (オートクレーブ)	3.0	25.6	7.69
扇橋下 (オートクレーブ)	3.5	46.3	7.83

5. BPA 分解細菌の直接計数

MPN法で、BPA分解細菌数がおおよそ1グラムの干潟砂あたり、一桁の細菌数が得られたが、この値は、実験開始前に予想した細菌数から比べはるかに少ない。少ない理由として、BPA分解細菌に直接BPA資化能がないために実際よりも低い値が得られたと考えられる。そこで、再び干潟の砂を採取して、これよりDNAを抽出してDNAプローブ法によりBPA分解細菌数を調べることを試みた。

まず始めに分解菌YY-1株の遺伝学的性状を調べ、この細菌の系統的特性を調べたところ、図5に示すようにYY-1株は α プロテオバクテリアの *Stappia stelluata* に近縁であることがわかり、*Stappia sp.* YY-1株と呼ぶのが妥当だと判断された。

次にこの系統樹および塩基配列を基にDNAプローブ作成したところ、図6に示すように、特異的に *Stappia sp.* YY-1株検知するDNAプローブが得られた。

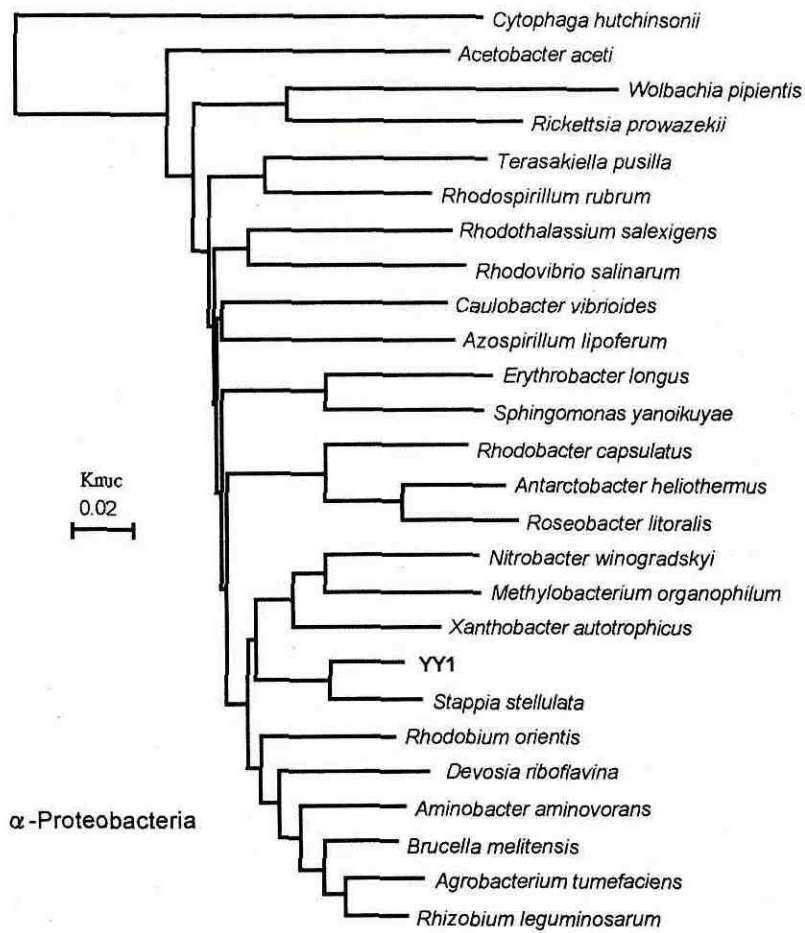


図5. YY-1株の系統学的位置

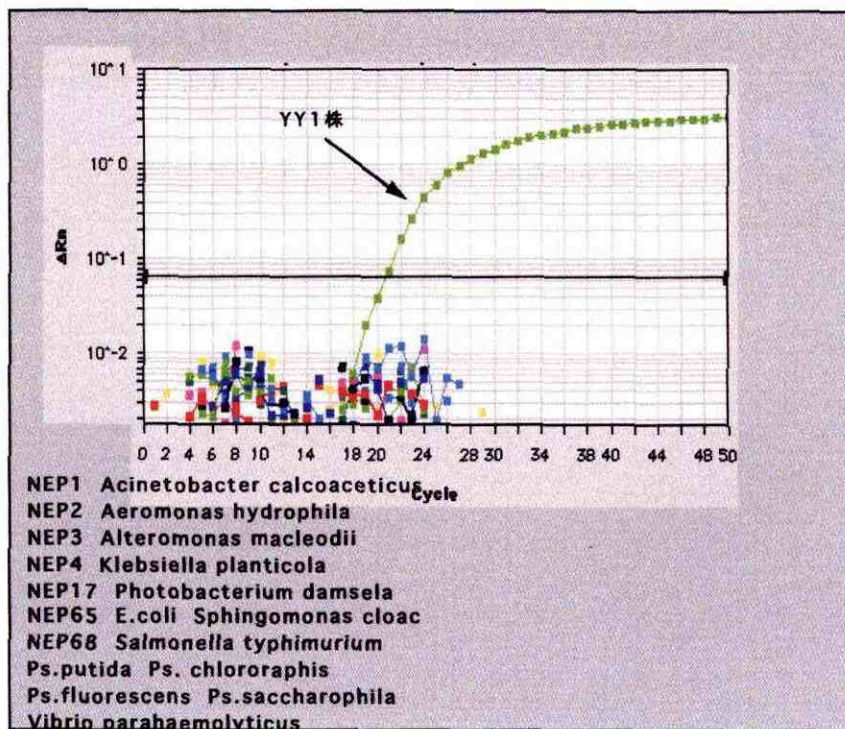


図6. DNAプローブの特異性

図で特異性が確認されたDNAプローブを用いて表5に示す干潟についてBPA分解細菌の分布を調べたところ、図7に示すように、干潟の砂1グラム当たり、 $10^3 \sim 10^4$ 細胞のBPA分解細菌が干潟に分布していることが分かった。特に人工砂浜の油谷YYビーチでも、自然の干潟および海浜に劣らないBPA分解細菌の分布が確認され、人工干潟も十分に環境浄化能を有することが示された。

表5. 干潟砂採集

場 所	状況	
木屋川干潟（浜田川河口）	どろ	
木屋川干潟（波打ち際）	海泥砂	
油谷湾干潟（波うち際）	海泥砂	
油谷町YYビーチ（人工砂浜）	砂	
水産大学校前棧橋先底泥砂	海泥砂	
水産大学校前海砂	砂	
永田川永田大橋付近	どろ	YY1 分離場所

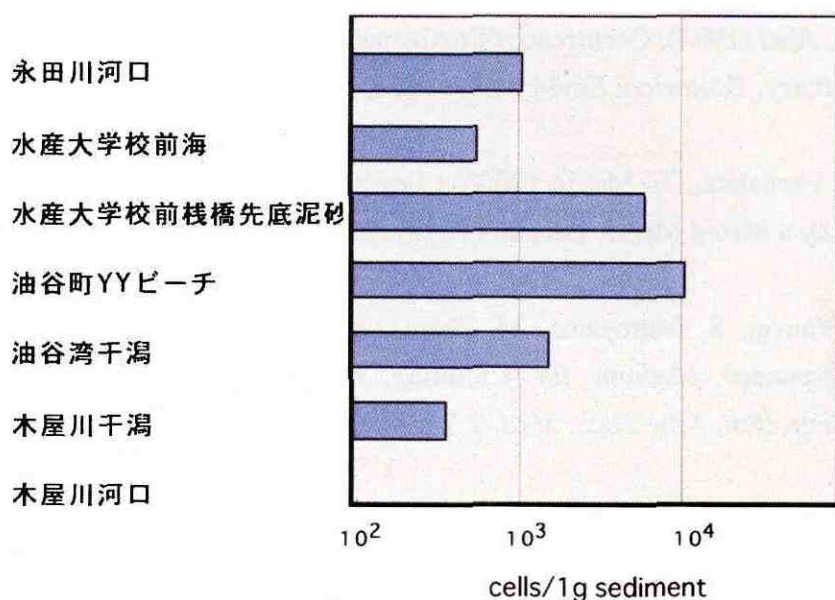


図7. DNAプローブ法で測定された干潟砂泥1g当たりのビスフェノール分解細菌数

考察および適用

河川から海に流れ込むフェノール関連有害物質は、その低い水溶性のために干潟を構成する砂粒子に吸着濃縮されやすい。この過程は、1) 海水環境に有害物質が流れ込むことを低減するとともに、2) 砂粒子上に有害物質が濃縮されてなんらかの生物過程を受けることを意味している。砂粒子上の有害物質が直接貝に摂取されれば、食物連鎖を経て人間への影響が心配されるし、一方細菌により分解されれば、干潟は有害物質の浄化場所として有効に機能していることになる。

そこで本研究ではフェノール関連化合物のなかのビスフェノール A (BPA) に注目し、この BPA の干潟域での分解能を分解細菌の分布から明らかにすることを試みた。その結果 1) 干潟細菌群衆は BPA を完全分解しうることを、2) 干潟中にある BPA 以外の有機物が細菌の増殖を助け、その結果 BPA の分解が促進されることを、3) 干潟や海浜砂には BPA を分解飽きる細菌が、砂 1 g 当たり 10,000 細胞もいることが分かり、これによって環境浄化における干潟の有効性が明らかになった。

干潟の有害物質浄化能が明らかになったので、今後も干潟の保全回復が望まれるのは言うまでもない。また干潟をさらに有効に利用するためには、無害な有機物を干潟に添加して有害物質分解細菌を選択的に増殖 (プレバイオチクス) させ、干潟の分解能を飛躍的に高める手法の開発も期待される。

引用文献

- 1) R. Kvestak, M. Ahel (1994): Occurrence of toxic metabolites from nonionic surfactants in the Krka River estuary. *Ecotoxicol Environ Saf* **28**: 25-34.
- 2) T. Shiba, M. Furushita, T. Maeda (2003): Degradation of Nonylphenol Polyethoxylate (NPEOpoly) by a Mixed Marine Bacterial Population. *Fisheries Science*, **68**, 609-612.
- 3) T. Shiba, Y. Yamaji, S. Murayama, M. Furushita, T. Maeda (2001): Development of a Silica-Gel Suspended Medium for Culturing Nonylphenol Polyethoxylate-Degrading Bacteria. *ITE lett. Batt. New Tech. Med*, **2** 75-78.
- 4) N. Taga (1968): Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. *Bull. Misaki Mar. Biol. Kyoto Univ.* **12**, 56-76.
- 5) T. Someya (1995): Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms*, **46**, 61-69.