水産研究・教育機構 機関リポジトリ
FRA Japan Fisheries Research and Education Agency Institutional Repository

海浜堆積物におけるビスフェノールAの分解と分解細菌の分離

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): bisphneol A; biodegradation; costal sediments; Labrenzia sp. YY-1 作成者: 前田, 俊道, 山崎, 剛, 山下, 智典, 古下, 学, 原田, 和樹, 芝, 恒男 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011887

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Journal of National Fisheries University 56 (4) 371－376 (2008)

海浜堆積物におけるビスフェノールAの分解と分解細菌の分離

前田俊道†，山崎　剛，山下智典，古下　学，原田和樹，芝　恒男

Degradation of bisphenol A in coastal sediments and isolation of a degrading-bacterum

Toshimichi Maeda†, Tsuyoshi Yamasaki, Tomonori Yamashita, Manabu Furushita, Kazuki Harada and Tsuneo Shiba

Abstract : Bisphneol A [BPA; 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane] is an endocrine-disruptor. The degradation of BPA was studied on coastal sediments, and a BPA-degrading bacterium was isolated. BPA was degraded during 1 week incubation by bacterial population in the coastal sediment. The most probable numbers (MPN) of BPA-degrading bacteria ranged from <0.3 to 2.3 cells/g wet of coastal sediments. A BPA-degrading bacterium, strain YY-1, was isolated from coastal sediments. Although the bacterium did not utilize BPA as the sole carbon source, YY-1 degraded BPA for 1 week in addition of peptone and yeast extract, or sterilized coastal sediments. The strain YY-1 was an aerobic, short rod shape, motive, Gram-negative bacterium, and the nucleotide sequence of 16S rRNA gene was close to that of *Labrenzia aggregata*.

Key Words : Bisphneol A, Biodegradation, Costal sediments, *Labrenzia* sp. YY-1

緒　言

ビスフェノールA [BPA; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane] は内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）作用が疑われる物質として，環境省（旧環境庁）の「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」[1] にリストアップされた。BPAは主にポリカーボネート樹脂とエポキシ樹脂の原料として使用されるほか，様々な樹脂の添加剤などにも使用されており，2003年の国内需要は約43万tである[2]。淡水や海水環境中のBPA量の調査は公的機関等で盛んに行われており，低濃度ながらも，これらの環境から高頻度で検出されている[2]。BPAの生物分解については，化学工場の排水処理汚泥や処理水[3,4,5]，河川水[6,7] 等の淡水環境では多く調べられているが，海水環境については僅かに海水での報告[8] があるのみで，海浜堆積物についての生物分解は知見がない。

BPA分解細菌については，排水処理汚泥からMV1株[5]，工業地域土壌から*Sphingomonas* sp. WH1株[9]，畑土壌から*Sphingomonas* sp. AO1株[10,11]，河川水から*S. paucimobilis* FJ-4株[12] 等が分離されているが，いずれも淡水や陸上環境からの分離であり，海水環境からは*Sphingomonas* sp. BP-7株一株が報告[8] されているのみである。そこで本研究では，海浜堆積物中のBPAの消長を調べる目的で，海浜堆積物を接種した培地でのBPAの分解ならびにBPA分解細菌群の分布を調べ，さらに海浜堆積物からBPA分解細菌の分離を試みた。

材料と方法

海浜堆積物

下関市，防府市，山口市の海浜から干潮時に，滅菌した薬さじを用いて表面から約1cmの深さで海浜堆積物を採取し，滅菌した容器に入れて研究室に持帰り，その日のうちに実験に用いた。

2007年12月21日受付．Received Desember 21, 2007.

水産大学校食品科学科（Department of Food Science and Technology, National Fisheries University）

† 別刷り請求先（corresponding author）：toshima@fish-u.ac.jp

培地調製と培養条件

シリカゲル（Cosmosil C18 OPN，ナカライテスク）10gに，500mg/lのBPAトルエン溶液100mlとヘキサン500mlを加え，緩やかに撹拌後，5分間静置した。ピペットで上清を吸引除去後，30-40℃で乾燥して，BPAを吸着させたシリカゲルを調整した。なお，この上清からは，BPAは検出されなかった。また，BPAは和光純薬工業の試薬を用いた。このBPAを吸着させたシリカゲル10gを1LのAA培地（NaCl, 17.53g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.93g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.47g; KCl, 0.75g; KNO_3, 0.25g; NH_4Cl, 0.25g; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.03g; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.07g; 0.03%ビタミンB12溶液, 1.0ml; クエン酸鉄, 0.10g; COMB微量金属溶液[13], 0.1ml; Tris, 1.20g; pH7.5）に加え，BPAを50mg/l含むシリカゲルAA培地を調製した。また，BPAを吸着させたシリカゲル10gを1Lのペプトンを含むPPES-Ⅱ培地［NaCl, 17.53g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4.93g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.47g; KCl, 0.75g; クエン酸鉄，0.10g; ポリペプトン（日本製薬），2.00g; プロテオースペプトン（Difco），1.00g; フィトンペプトン（BBL），1.00g; 酵母抽出物（Difco），1.00g; pH7.5］に加えてシリカゲルPPES-Ⅱ培地を調製した。培養は，30℃で振とうした。細菌増殖は濁度（OD 600nm）で測定し，細菌細胞数は1μg/mlのDAPI（4'6-diamidino-2-phenylindole）溶液で染色後[14]，落射蛍光顕微鏡BH-2型（オリンパス）で計数した。

培養液からのBPAの抽出

5分間の静置により，培養液を培養上清とシリカゲル画分に分けて，各々からBPAを抽出した。培養上清については等量のクロロホルムを加えて撹拌し，遠心分離（2,500×g，5分間）して，クロロホルム層を回収して培養上清抽出画分とした。シリカゲルについては，約0.01g取出して乾燥後精秤し，1mlのジエチルエーテルで3回抽出して蒸発乾固後，乾燥シリカゲル0.01gに対して1.0mlのクロロホルムに溶解してシリカゲル抽出画分とした。なお，これらの抽出方法でシリカゲルAA培地からの抽出効率は，90%以上であることを予め確認している（データは示していない）。

BPA量の測定

BPA量は，高速液体クロマトグラフ法（HPLC），ガスクロマトグラフ/質量分析法（GC/MS）ならびに吸光光度法で測定した。HPLCは，LiChrosorb NH_2-10カラム（4.6×250mm，GLサイエンス），880-PUポンプ（日本分光）を用い，移動相はヘキサン：プロパノール（4：1）で流速2.0ml/min，検出は277nmでSPD-10A検出器（島津）を用いて25℃で行い，BPA標準試薬の分析と比較して，試料中のBPAを定量した。GC/MSの試料はBSTFA（GLサイエンス）でトリメチルシリル化し，GC/MS装置Saturn2000型（バリアン）を用いて分析した。カラムはDB-5 ms（膜厚0.25μm，0.25mm×30m，J&W Scientific）を用い，開始より36分間で140℃から320℃へ昇温し，その後5分間320℃に保った。移動相はヘリウムガスを流量1 ml/minで用いた。電子衝撃イオン化法で，イオン化電圧は70eV，イオントラップの温度は150℃，試料注入温度は300℃で行った。吸光光度法では，分光光度計ラムダ11型（パーキンエルマー）で277nmの吸光度を測定した。

細菌の一般性状試験と16S rRNA遺伝子塩基配列決定

細胞形態と運動性は，顕微鏡を用いて観察した。グラム試験はKOH法[15]で，オキシダーゼ試験はチトクロームオキシダーゼ試験紙（ニッスイ）を用い，カタラーゼ試験は3%過酸化水素水を用いて行った。他の一般性状試験は，API20NE（日本ビオメリュー）を用いて判定した。16S rRNA遺伝子は，ほぼ全長（約1,405bp）を前報の方法[16]でPCR増幅し，ABI PRISM Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit（ABI）で反応後，DNAシーケンサーABI310型（ABI社）を用いて，その塩基配列を決定した。

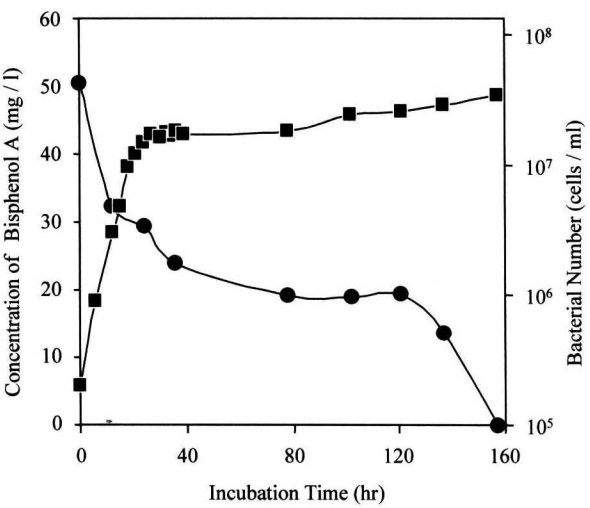

Fig. 1. Concentration of bisphenol A (●) and bacterial cell number (■) in the silica gel-AA medium inoculated with coastal sediments.

Table 1. Absorbance at 277 nm in the extracts from the culture of coastal sediments, measured by spectrophotometry

Incubation time (hr)	Silica gel	Supernatant
0	0.291	0.202
157	0.054	0.000

Table 2. The most probable number (MPN) of bisphenol A-degrading bacteria in coastal sediments

Coastal sediment from	MPN (cells /g wet)
Yume Town	2.3
Chofu Port	0.4
Estuary of Koyagawa River	0.9
Ohogibasi Bridge	2.3
Daidou Fishing Port	<0.3
Ohmi Fishing Port	<0.3
Aio-higashi	0.4
Estuary of Fushino River	2.3
Shuho-oohasi Bridge	<0.3
Shira-tsuchi Beach	0.9

結果および考察

海浜堆積物の細菌群集によるBPAの分解

下関市長府の扇橋下から採取した海浜堆積物を，10%（w/v）の割合で，BPAを50mg/l含むシリカゲルAA培地に接種して培養した。その時の細菌数とHPLC分析によるBPA濃度の経時変化をFig. 1 に示す。細菌の増殖に伴いBPAは減少し，157時間後にはBPAは検出されなかった。この時の吸光度をTable 1 に示す。シリカゲル抽出画分，培養上清抽出画分ともに277nmの芳香環の吸光値が減少したことから，BPAの芳香環が開裂していることが示唆された。

BPA分解細菌の分布

下関市，防府市，山口市の各地点の海浜堆積物を10%，1%，0.1%（w/v）の割合で，各々3本ずつのシリカゲルAA培地に接種して21日間培養した。HPLC分析でBPA量が70%以下に減少した培養を陽性として，最確数（MPN）法でBPA分解細菌数を求めた。その結果をTable 2 に示す。ゆめタウン，長府扇橋，椹野川河口において，湿重量1gの海浜堆積物中にBPA分解細菌が2.3細胞存在した。また，白土海水浴場のような海浜堆積物中にもBPA分解細菌が0.9細胞/g wet存在した。調べた10地点のうち7地点からBPA分解細菌が検出されたことより，BPA分解細菌は，海浜堆積物中に広く分布することが示唆された。

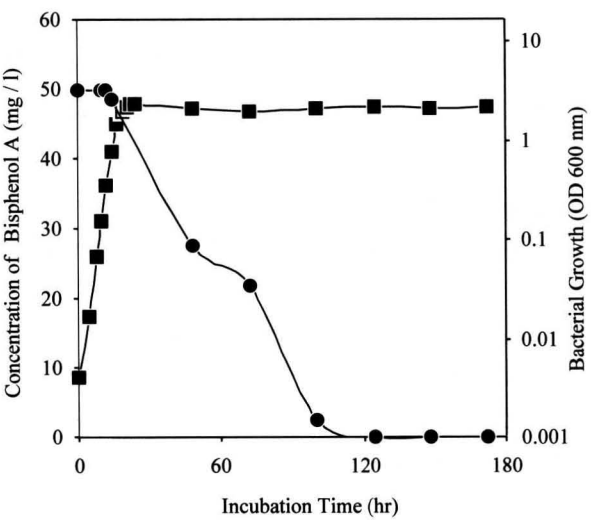

Fig. 2. Concentration of bisphenol A (●) and bacterial growth (■) in the silica gel-PPES-Ⅱ medium inoculated with the strain YY-1.

Table 3. Spectrophotometry (277 nm) and GC/MS detections of bisphenol A in the extracts of YY-1 culture

Incubation time (hr)	Spectrophotometry (277 nm)		GC/MS (x 1,000 intensity)	
	Silica gel	Supernatant	Silica gel	Supernatant
0	0.284	0.309	329	449
192	0.095	0.000	25	8

Table 4. Characteristics of the strain YY-1 and *Shpingomonas* sp. BP-7

	Strain YY-1	*Shpingomonas* sp. BP-7*
Shape	Rod	Rod
Gram	−	−
Motility	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	±
Nitrate reductase	−	−
Indole test	−	−
Acid production from glucose	−	−
Arginine dihydrolase	−	−
Urease	+	−
Esculin hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	−	−
β-Galactosidase	+	+
Utilization of:		
Glucose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Mannose	+	−
D-Mannitol	−	−
N-Acetyl-D-glucosamine	+	−
Maltose	+	−
Gluconate	+	−
N-Caprate	−	ND
Adipate	−	−
DL-Malate	+	−
Citrate	+	−
Phenyl acetate	−	−

+, positive; ±, week; −, negative; ND, no data

* The data was referred from Sakai *et al.*[8].

BPA分解細菌の分離とその分解特性

2001年8月に下関市永田川河口域で採集した海浜堆積物について，BPAを50mg/l含むシリカゲルAA培地を用いて1ヶ月間培養し，その培養液を新しい培地に1％（v/v）接種して2週間培養後HPLCで分析したところ，BPAは検出されなかった。その培養液をPPES-Ⅱ寒天平板培地に塗沫し，細菌集落を各々シリカゲルPPES-Ⅱ培地に接種した結果，1細菌株のみでBPAの減少が見られたので，PPES-Ⅱ寒天平板培地で3回画線して純粋分離し，YY-1株と名づけた。

BPAを50mg/l含むシリカゲルPPESⅡ培地での，YY-1株によるBPA減少をHPLCで測定した結果を，Fig. 2に示す。YY-1株は，24時間で定常増殖期にはいった。BPAは20時間後から減少し始め，120時間後には検出されなかった。培養開始時と192時間後の吸光度とGC/MS測定結果をTable 3にまとめた。GC/MSでも192時間後にはシリカゲル抽出画分および培養上清抽出画分ともにBPAは僅かにしか検出されなかった。また，芳香環の277nmの吸光値も減少が見られたことから，BPAの芳香環が開裂していると考えられる。一方，BPAのみを炭素源とするシリカゲルAA

Table 5. Disappearance of bisphneol A in the costal sediments inoculated the strain YY-1 after 1 week incubation

Sediment source	Sediment was	Inoculum of YY-1 (OD 600nm)	Disappearance of bisphenol A (%)	Bacterial cell number after the incubation (cells/ml)
Ohogibashi Bridge	Sterilized	ND*	0.0	2.8×10^4
		1.0	12.8	5.1×10^6
		2.0	14.8	4.8×10^6
		3.0	25.5	4.9×10^6
		3.5	45.3	6.9×10^6
Yoshimo Bay	Sterilized	ND*	0.0	3.9×10^4
		1.0	8.3	1.8×10^5
		2.0	11.0	8.7×10^5
		3.0	26.7	1.4×10^6
		3.5	46.2	2.5×10^6
	Not sterilized	ND*	0.0	1.7×10^6
		1.0	17.1	2.1×10^6
		2.0	17.0	2.0×10^6
		3.0	30.1	2.1×10^6
		3.5	47.4	3.4×10^6

* ND: Inoculation was not done.

培地ではBPAの減少は見られなかった（データは示していない）。

YY-1株の一般性状と16S rRNA遺伝子解析

YY-1株の一般性状をTable 4にまとめた。YY-1株は，好気性で，運動性があり，オキシダーゼ，カタラーゼ陽性のグラム陰性の短桿菌であった。最近初めて海水から分離されたBPA分解細菌*Sphingomonas* sp. BP-7株[8]とは，一般性状において有機物の利用能に相違があった（Table 4）。また，YY-1株の16S rRNA遺伝子の塩基配列（1,405bp）は，*Labrenzia aggregata*（GenBank accession No. D88520）と99.7%の相同性を示しYY-1株は*Labrenzia*属に属すると考えられた。

これまでに報告されているBPA分解細菌は，排水処理汚泥から分離された未同定のMV1株[5]以外は全て*Sphingomonas*属の細菌である。つまり，*Sphingomonas* sp. WH1株[9]，*Sphingomonas* sp. AO1株[10,11]，*S. paucimobilis* FJ-4株[12]，*Sphingomonas* sp. BP-7株[8]である。これらの内で16S rRNA遺伝子配列が登録されているものと，YY-1株との相同性は，*Sphingomonas* sp. BP-7株（No.AB276370）で89.1%，*Sphingomonas* sp. AO1株（No.AB191723）で87.7%と相同性が低く，YY-1株は新規のBPA分解細菌であると考えられる。

YY-1株を接種した海浜堆積物でのBPA分解

扇橋下ならびに吉母湾から採取した海浜堆積物を蒸気滅菌して，その湿重量2gを，50mg/lのBPAを含むシリカゲルAA培地20mlに入れ，様々な濃度のYY-1株懸濁液0.2mlを接種した。30℃で一週間振とう培養後，BPAの減少ならびに細菌数を調べた。なお，吉母湾の海浜堆積物については，蒸気滅菌していない海浜堆積物についても同様の実験を行った。Table 5に示すように，海浜堆積物の採集場所ならびに蒸気滅菌の有無に関係なく，YY-1株の接種量が多いほど，BPAの減少率が大きかった。しかしながら，滅菌した扇橋下の堆積物と吉母湾堆積物について比較したところ，一週間培養後の細菌数とBPA減少率には明確な関係は見られなかった。このことから，YY-1株の増殖はBPA分解に対して直接に関係していないことが示唆された。また，滅菌していない吉母湾堆積物は，滅菌した堆積物と比較して，BPA減少率の差が殆ど見られなかったことから，BPA分解に関して，YY-1株と海浜堆積物中の微生物との相互作用は無いことが示唆された。

文　献

1）環境省：外因性内分泌攪乱物質問題への環境省の対応方針—環境ホルモン戦略計画SPEED'98（2000）

2）中西準子，宮本健一，川崎　一：ビスフェノールA．新エネルギー・産業技術総合開発機構，産業技術総合研究所化学物質リスク管理研究センター（編），詳細リスク評価書シリーズ6，丸善株式会社，東京（2005）

3）Dorn PB, Chou CS, Gentempo JJ: Degradation of bisphenol-A in natural waters. *Chemosphere*, **16**, 1501-1507 (1987)

4）Matsui S, Okawa Y, Ota R : Experience of 16 years operation and maintenance of the Fukashiba industrial wastewater plant of the Kashima petrochemical complex-II biodegradability of 37 organic 32 substances and 28 process waters. *Water Sci Technol*, **20**, 201-210 (1988)

5）Lobos JH, Leib TK, Su TM : Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gram-negative aerobic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 1823-1831 (1992)

6）陳昌淑，徳弘健郎，池道彦，古川憲治，藤田正憲：河川水マイクロコズムによるBPAの分解．日本水環境学会誌，**19**，878-884（1996）

7）大谷仁己，藤波洋征，斎藤武夫：BPA分解菌の河川水からの分離．群馬県衛生環境研究所年報，**32**，92-98（2000）

8）Sakai K, Yamanaka H, Moriyoshi K, Ohmoto T, Ohe T : Biodegradation of bisphenol A and related compounds by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 51-57 (2007)

9）Ronen Z, Abeliovich A : Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 2372-2377 (2000)

10）Sasaki M, Maki J, Oshiman K, Matsumura Y, Tsuchido T : Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegradation*, **16**, 449-459 (2005)

11）Oshiman K, Tsutsumi Y, Nishida T, Matsumura Y : Isolation and characterization of a novel bacterium, *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO 1, that degrades bisphenol A. *Biodegradation*, **18**, 247-255 (2007)

12）Ike M, Jin CS, Fujita M : Isolation and characterization of novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. *Jpn J Water Biol*, **31**, 203-212 (1995)

13）Shiba T : *Roseobacter litoralis* gen. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Syst Appl Microbiol*, **14**, 140-145 (1991)

14）Porter KG, Feig YS : The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr*, **25**, 943-948 (1980)

15）Powers EM : Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 3756-3758 (1995)

16）Maeda T, Sasaki M, You M, Ohsugi S, Mitsutani A, Furushita M, Shiba T : 5'-Nuclease PCR assay of gliding bacteria that kill *Skeletonema costatum* in seawater. *Microbes Environ*, **18**, 188-195 (2003)