

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-bacterium

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

Abstract : Bisphenol 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, motile, Gram-negative bacterium, and the nucleotide sequence of 16S rRNA gene was close to that of *Labrenzia aggregata*.

Key Words : Bisphenol A, Biodegradation, Coastal 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見聞がない。

BPA分解細菌については, 排水処理汚泥からMV 1株⁵⁾, 工業地域土壌から *Sphingomonas* sp. WH 1株⁹⁾, 畑土壌か

ら *Sphingomonas* sp. AO 1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, 滅菌した葉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ち帰り, 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, 緩やかに攪拌後, 5分間静置した。ピペットで上清を吸引除去後, 30-40°C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; MgSO₄ · 7H₂O, 4.93g; CaCl₂ · 2H₂O, 1.47g; KCl, 0.75g; KNO₃, 0.25g; NH₄Cl, 0.25g; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.03g; Na₂HPO₄ · 12H₂O, 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; MgSO₄ · 7H₂O, 4.93g; CaCl₂ · 2H₂O, 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°C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攪拌し, 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) ならびに吸光度法で測定した。HPLCは, LiChrosorb NH₂-10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 (高津) を用いて25°C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0.25 μm, 0.25mm × 30m, J&W Scientific) を用い, 開始より36分間で140°Cから320°Cへ昇温し, その後5分間320°Cに保った。移動相はヘリウムガスを流量1ml/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°C, 試料注入温度は300°Cで行った。吸光度法では, 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。

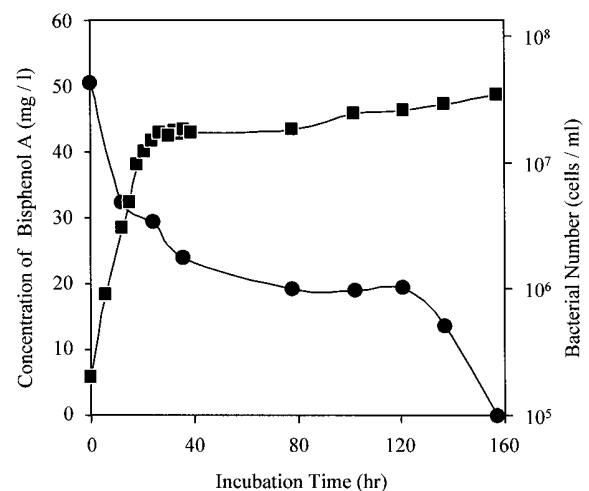


Fig. 1. Concentration of bisphenol A (●) and bacterial cell number (■) in the silica gel-AA medium inoculated with coastal sediments.

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、梶野川河口において、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。

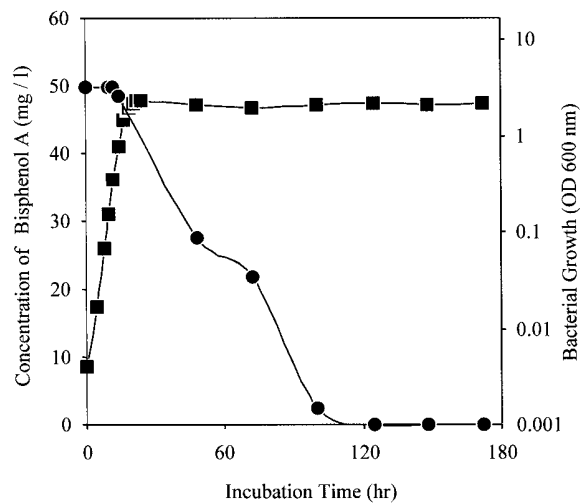


Fig. 2. Concentration of bisphenol A (●) and bacterial growth (■) in the silica gel-PPES- II medium inoculated with the strain YY-1.

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	<i>Shpingomonas</i> 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-Caprato	—	ND
Adipate	—	—
DL-Malate	+	—
Citrate	+	—
Phenyl acetate	—	—

+, positive; ±, weak; —, 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寒天平板培地に塗抹し、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PPES-II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 bisphenol 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）。

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MV 1株⁵⁾以外は全て *Sphingomonas*属の細菌である。つまり、*Sphingomonas* sp. WH 1株⁹⁾、*Sphingomonas* sp. AO 1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. AO 1株 (No. AB191723) で

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 Kashima petrochemical 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 AO 1. *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)