

## 海底からのトリブチルスズ耐性細菌の単離

鈴木信雄<sup>1</sup>, 小林史尚<sup>2</sup>, 又多政博<sup>1</sup>, 伊藤 靖<sup>3</sup>, 大嶋雄治<sup>3</sup>, 服部淳彦<sup>4</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学環日本海域環境研究センター, 臨海実験施設;

<sup>2</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科

<sup>3</sup>〒920-1192 福岡市東区箱崎 九州大学大学院農学研究院

<sup>4</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台 東京医科歯科大学 教養部

N. Suzuki, F. Kobayashi, M. Matada, S. Ito, Y. Oshima, and A. Hattori

Isolation of tributyltin-resistant bacteria from the sediment in Tsukumo Bay of Noto Peninsula

トリブチルスズ (TBT) は、船・漁網に対する貝類や海藻類の付着を防ぐために日本でも大量に使用されてきた物質であり、主に防汚剤として船底塗料に入れて使われてきた。TBT には内分泌攪乱作用があり、貝類や魚のオス化を誘導し、免疫系にも毒性を示す。さらに Suzuki et al. (2006) は、低濃度 ( $10^{-8}$  M) の TBT がメジナとベラの骨芽細胞 (骨を作る細胞) の活性を抑制することを初めて証明した。したがって、低濃度の TBT でも日本海に生息する生物に影響を及ぼす可能性が高い。そこで本研究では、TBT を分解する海洋細菌を海底から単離し、微生物を利用した環境修復を目指す。

能登町小木の九十九湾の沿岸、水深 12 m の砂泥を採泥器 (大起理化工業 (株), DIK-190-A1 型) で採取した。最近、著者らはフェノール分解能を有する海洋細菌を単離した (Kobayashi et al., 2007)。本研究では、この方法を応用して、菌のスクリーニングには、TBT のみを栄養源とした培地を用いて実験した。即ち、ろ過滅菌した海水に 10 mg/L になるように TBT (塩化トリブチルスズ, 和光純薬工業 (株)) を添加し、その海水 50 ml に採取した砂泥 (1 g) を加えた。なお、TBT を海水に添加するときは、まず少量のアセトンで溶解し、その後ジメチルスルホキシドに溶かし、海水に添加した。

TBT 入りの海水で砂泥に含まれる細菌を 4 °C で 1 週間静地培養した後、TBT (10 mg/L) を含む寒天培地に塗抹し、さらに 1 週間培養 (15 °C) した。その後寒天培地から海洋細菌のコロニーを釣り上げ、TBT の浄化試験を行った。即ち、培地 (ペプトン 0.1%, 酵母エキス 0.05% 及び TBT (10 mg/L) を含む海水培地) にコロニーを懸濁して培養した。4 °C で 2 週間静地培養した後、菌体濃度は波長 610 nm の菌体光学密度として分光光度計 (島津製作所, UV-1200 型) を用いて測定した。菌体密度を測定後、遠心により菌体を除き、その上清中の TBT の濃度を (株) テクノスルガ・ラボに分析を依頼した。TBT は培養中にチューブに付着する可能性がある。そこで TBT の分解率は、菌を植菌していない培地 (コントロール培地) から回収された TBT の濃度に対する割合で算出した。

単離した菌体は、培地と等量のグリセロールを加え、一部は -80 °C で保管して、残りを (株) テクノスルガ・ラボに依頼し、16S Ribosomal RNA 遺伝子 (16S rDNA) の配列解析により菌体の同定を行った。PCR 産物の増幅及びサイクルシーケンスの一連の操作は MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用して実験を進めた。相同性検索には MicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1 を用い、データベースとしてはアポロン DB 細菌基準株データベース (株式会社テクノスルガ・ラボ) を使用して解析した。

TBT (10 mg/L) 入り海水で培養後、寒天培地で培養した結果、多数の TBT 耐性細菌のコロニーが検出できた。その中で大きなコロニーを 20 個釣り上げ、TBT (10 mg/L), ペプトン及び酵母エキスを含む海水培地に懸濁した。2 週間培養後、菌体の増殖が良い株を 4 種類選び、SK-1, SK-2, SK-3 及び SK-4 株と命名した。菌の増殖は、SK-1, SK-2, SK-4, SK-3 株の順だったが、TBT の分解率は SK-2 (55.5%) 及

び SK-3 株 (55%) が高く, SK-1 株は低い値 (15%) を示した. そこで, TBT の分解率の最も高かった SK-2 株の同定を行った.

菌体から DNA を抽出し, PCR 法により 16S rDNA 断片を増幅し, シークエンスした (Figure 1). さらに近隣接合法により, 系統解析を行った結果, *Pseudoalteromonas* 属に属することは判明したが, 菌の同定はできなかった. SK-2 株は, 新種の海洋細菌である可能性が高い.

SK-2 :

```
TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGC
GTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGI
GTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCT
TACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTGGCTCTCGCCTTTAGATTGGC
AAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTAG
GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCC
GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGGI
GAGTTAATACCTCACATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCCGGCTAACTC
TGCCAGCAGCCGCGGTAAT
```

### Figure 1 Partial sequence of 16S rDNA in SK-2 strain

本研究では, 低温で静地培養したにもかかわらず, 半分以上の TBT が減少していた. 今後詳細な培養条件の検討や TBT の分解過程を調べ, SK-2 株を用いた海洋細菌による浄化法を確立していく予定である.

#### 引用文献

- 1) Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T. and Hattori, A.: Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts, *Life Sci.*, 78: 2533-2541 (2006)
- 2) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N. and Nakamura, Y.: Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. *Int. Biodeterioration Biodegradation*, 59: 252-254 (2007)