

アメフラシ腸内細菌を用いた海水中のフェノール除去

小林史尚^{1,2)}, 鈴木信雄³⁾, 中村嘉利²⁾

¹⁾〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学自然計測応用研究センター, エコテクノロジー研究部門;

²⁾〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科, 物質工学専攻;

³⁾〒920-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設
Fumihisa KOBAYASHI^{1,2)}, Nobuo SUZUKI³⁾, and Yoshitoshi NAKAMURA²⁾:

Removal of phenol in seawater using an intestinal bacterium of *Aplysia kurodai*

フェノール類は、農場やゴルフ場において農薬として用いられており、その廃水が川から海へ流れ込むことによる海洋汚染が問題となっている^{1,2)}。また、タンカー座礁事故などフェノール類の海洋汚染は深刻な状況となっている。瀬戸内海や富山湾といった閉鎖海域においては、海流による拡散が少ないため、フェノール類の蓄積が著しくその処理方法が模索されている。海水中のフェノール類など汚濁物質の処理に海洋生物の腸内細菌など海洋細菌の応用が提案されている。しかしながら、海洋生物の腸内細菌の研究はまだ歴史は浅く不明な点が多く、スクリーニング法に関してもまだ確立されたとは言い難い³⁾。著者らは、これまで海洋生物の腸内に成育する細菌の単離と同定を行ってきた^{4,5)}。本研究では、これまでの著者らの知見を生かし、アメフラシの腸内容物から単離された EBR03 株を用いて海水中に含まれるフェノールの分解実験を行い、海水からのフェノール除去法を検討した。

アメフラシを MS222 (Aldrich) で麻酔し、腸内容物を採取した。この腸内容物約 1 mL を改変 ALLEN 海水⁶⁾ (NaCl 15 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 3.58 g/L, MgCl₂ · 6H₂O 2.72 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.6 g/L, KCl 0.39 g/L, NaHCO₃ 0.1 g/L) 9 mL に攪拌溶解した。この溶液を 0.5 g/L フェノールを含む改変 ALLEN 海水寒天培地 (寒天濃度 20 g/L) に 200 μL ずつ塗抹し、15°C で 4 から 5 日間放置した。薬品は全て和光純薬工業製のものを用いた。数十枚の寒天培地の中で、一枚の寒天培地から数個のコロニーが認められ、その 1 つを EBR03 と命名した。

最初に EBR03 株のフェノール耐性を検討した。300 mL 容量の三角フラスコを用いて 100 mg/L のフェノールを含む改変 ALLEN 海水 100 mL に植菌し、回転数 100 rpm のロータリーバイオシェーカー (Fine, SNC-170) を用いて 30°C、約 200 時間培養した。菌体濃度は波長 610 nm の菌体光学密度として分光光度計 (島津製作所製 UV-1200) を用いて測定した。

Figure 1 に EBR03 株の菌体増殖曲線を示す。培養開始とともに菌体は増殖し、

100 時間後には菌体光学密度 0.01 で一定となった。この結果はフェノールを含まない結果とほぼ変わらなかったため EBR03 株はフェノール耐性を持つことがわかった。

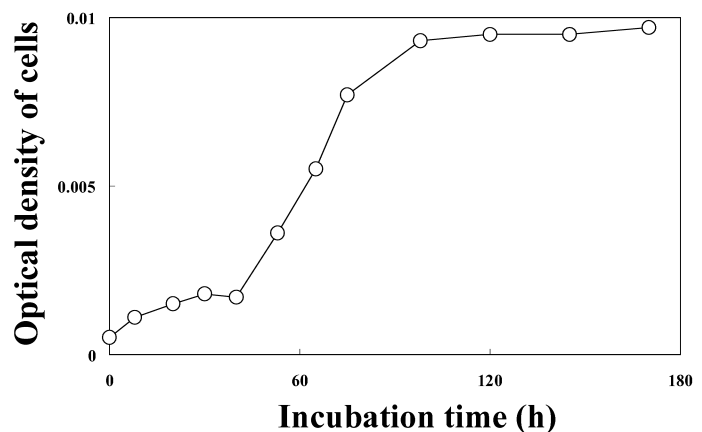


Figure 1 Cell growth of EBR03 strain in seawater containing phenol.

次に、EBR03 株の海水に含まれるフェノール除去について実験的に検討した。除去実験は耐性実験と同じく 100 mg/L のフェノールを含む改変 ALLEN 海水を用いて行った。フェノール除去率は、Wakosil Agri-9 を充填したカラムが付属している高速液体クロマトグラフィー（島津製作所製 LC-10A）を用いてフェノール濃度を測定し初期濃度との比から推算した。測定に用いたキャリアーは 0.01 % EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 3.7) とアセトニトリルを 55 対 45 の比で混合した溶液である。キャリアーの流速は 1 mL/min であり、サンプル 10 μ L をカラムに注入し、波長 210 nm における吸光度から絶対検量線法によって求めた。Figure 2 にフェノール除去率の経時変化を示す。フェノール除去率は約 100 時間で 1 に達し、海水中の 100 mg/L のフェノールをほぼ完全に除去することができた。

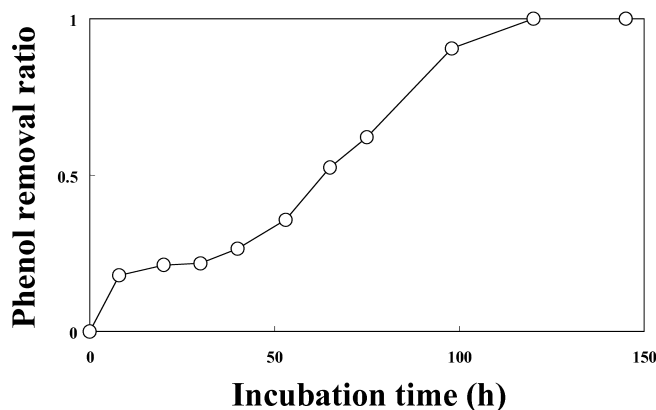


Figure 2 Removal of phenol in seawater using EBR03 strain.

以上の結果から、EBR03 株を用いた海水中のフェノール処理は、活性炭処理などの他の物理・化学的処理に比べ処理時間が長いという欠点があるものの、低コスト・低環境負荷でフェノール (100 mg/L) をほぼ完全に分解処理できることがわかった。

引用文献

- 1) Schwedt, G.: The essential guide to environmental chemistry, John Willey & Sons (1996)
- 2) Colborn, T., Saal, F.S., Soto, A.M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in sildlife and humans, *Environmental Health Perspectives*, 101: 378-384 (1993)
- 3) 杉田治男, 出口吉昭: 海産動物の腸内細菌相, *海洋科学*, 211: 51-57 (1988)
- 4) 小林史尚, 岩井尚子, 鈴木信雄, 中村嘉利: クロシタナシウミウシの腸から単離された海洋細菌の同定, *金沢大学自然計測応用研究センター臨海実験施設研究概要・年次報告*, 3:18-19 (2005)
- 5) 小林史尚, 鈴木信雄, 中村嘉利: 16S rDNA 解析による新規海洋細菌の同定, *金沢大学自然計測応用研究センター臨海実験施設研究概要・年次報告*, 4: 22-23 (2006)
- 6) 鈴木信雄, 矢澤一良, 渡部和郎, 赤堀結花里, 石川千夏, 近藤聖, 高田清克: エイコサペンタンエン酸産生菌 SCRC-2738 の大量培養条件の検討, *日本水産学会誌*, 58: 323-328 (1992)

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（若手研究 (B) No. 17710060、代表：小林史尚）の援助により行われた。ここに記して謝意を表します。