

Measurement of tributyltin concentration in the seawater of the seacoast of Noto Peninsula and attempt to biodegrade tributyltin using marine bacteria

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9651

能登半島沿岸の海水中のトリブチルスズ濃度測定と 海洋細菌によるトリブチルスズの浄化の試み

鈴木 信雄¹・小林 史尚²・又多 政博¹・服部 淳彦³・伊藤 靖⁴・大嶋 雄治⁴

Measurement of tributyltin concentration in the seawater of the seacoast of Noto Peninsula and attempt to biodegrade tributyltin using marine bacteria

Nobuo SUZUKI · Fumihisa KOBAYASHI · Masahiro MATADA
Atsuhiko HATTORI · Sei ITO · Yuji OSHIMA

Abstract

Tributyltin (TBT) has been extensively used in antifouling paints on ships and fishnets. This causes widespread contamination of the marine environment. However, there is little information about contamination of TBT in the Japan Sea. In the present study, the TBT concentration in seawater of the seacoast of Noto Peninsula was analyzed. We found that the TBT levels in seawater at several locations of the seacoast of Noto Peninsula were temporarily high (29-41 ng/L) on December 6, 2006, but decreased to undetectable levels on May 9, 2007. TBT was also detected in the oysters that inhabit the coastal waters of Noto Peninsula. Therefore, we think that TBT contamination has spread to the seacoast in Noto Peninsula. In addition, biodegradation of TBT using a marine bacterium was examined. As a result, four strains of TBT-resistant bacteria (SK-1, SK-2, SK-3, and SK-4) were isolated from the sediment in Tsukumo Bay of Noto Peninsula. Strains SK-2 (*Pseudoalteromonas sp.*) and SK-3 (*Pseudoalteromonas sp.*) were shown to possibly degrade TBT when these bacteria were cultured in a seawater medium containing TBT (10 mg/L), peptone (0.1 %), and yeast extract (0.05 %). Plans are underway to examine in detail the biodegradation process of TBT by these marine bacteria and determine their culture conditions.

Key words: Tributyltin, Noto Peninsula, Seawater, Oyster, Marine bacterium, Biodegradation

1. はじめに

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。また多量に使用していたときに海底に堆積した TBT が徐々に溶出しているという例が日本でも報告されており (1, 2), 日本近海においても TBT により確実に汚染されている。

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たり (3, 4), 免疫系にも毒性を示す (5, 6)。さらに Suzuki et al. (7) 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。この物質は、生物濃縮によりイルカ等の哺乳類の肝臓に高濃度 (110 - 11,340 ng/g-wet) で蓄積されており (8), さらにアメリカではヒトの血液中に 10^{-8} M の TBT が検出されたという報告があり (9), 世界規模で問題になっている汚染物質である。今後日本海でも問題になる可能性が非常に高い。しかし日本海側の TBT の研究は少なく、汚染状況を把握できていない。

¹ 金沢大学環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

² 金沢大学大学院自然科学研究科 物質工学専攻

³ 東京医科歯科大学 教養部生物学教室

⁴ 九州大学大学院農学研究院 海洋生命化学講座

そこで本研究では、日本海における TBT 汚染の現状を把握するため、海水及びカキに含まれる TBT の含量を測定し、さらに 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。

2. 実験材料及び方法

2-1. 調査地点及び時期

2006 年 12 月 6 日に能登半島の①富来（とぎ）、②曾々木（そそぎ）、③蛸島（たこじま）、④小木（おぎ）、⑤根木（ねき）の 5ヶ所（Fig. 1 参照）で分析用の海水を採取した。海水は水深約 30 cm の層から 1 L のガラス瓶に直接採取し、実験室へ持ち帰り、4 °C で保管した。なおガラス瓶は、洗剤、水、1 M 塩酸を含むメタノール、水、アセトンの順で洗浄した瓶を用いた。

2007 年 2 月 6 日に③蛸島及び⑤根木で海岸の岩に付着したカキを採取した。採取したカキは、分析するまで -20 °C で保管した。

2007 年 5 月 9 日に②曾々木、③蛸島、⑤根木の 3ヶ所で前述と同様の方法により再度海水を採取し、TBT を分析した。

2-2. 海水及びカキに含まれる TBT の分析

海水中の TBT の分析は、(株) テクノスルガ・ラボに委託した。環境省が推薦している公定法により測定した。以下にその概要を示す。

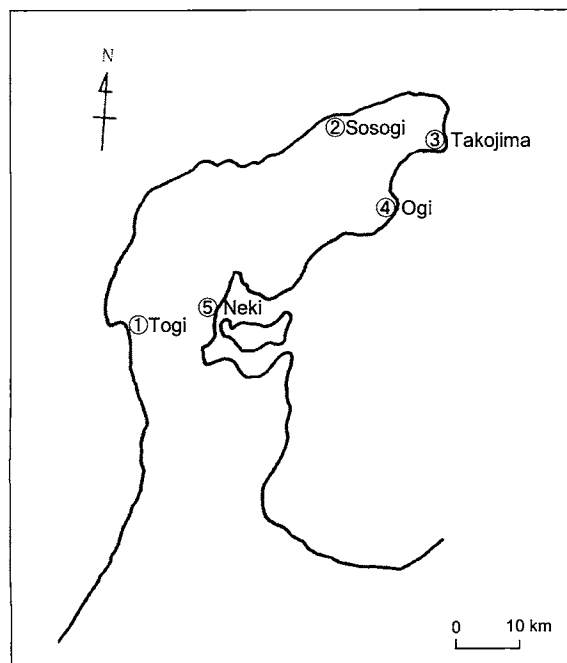


Figure 1 Sampling location of seawater and oysters in Noto Peninsula.

水質試料は同位体標識した有機スズ化合物をサロゲート物質として添加後、塩酸酸性下へキサンで抽出して脱水・濃縮後、臭化プロピルマグネシウムでプロピル化した。次に、プロピル化体を有機溶媒で抽出し、フロリジルカラムでクリーンアップ後、濃縮して GC-MS-SIM 法で定量した。なお、GC は Agilent 社 (6890N 型)、MS は Micromass 社 (Quattro micro™ 型) を使用した。

一方カキの分析は、Inoue et al. (10) の方法で行った。へキサンで抽出後、エチル化・アルカリ分解し、フロリジルでクリーンアップを行った。TBT 濃度は GC-MS (Agilent; HP5973 & HP6890) により測定した。

2-3. 海底の砂泥の採取及び海洋細菌の培養

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 (11)。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 (TBT 入りの海水に 1.5 % の寒天を加えた培地) 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。

2-4. 海洋細菌の同定方法

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。その詳細を以下に示す。

単離された菌体をペプトン 1 %、酵母エキス 0.5 %の海水培地に植菌し、30 °Cで振とう培養 (24 時間) した。ゲノム DNA の抽出は、PepMan Method (Applied Biosystems) を使用した。抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR により 16S rDNA の 5'末端側約 500 bp の領域を増幅した。その後、増幅された DNA をシーケンスし、16S rDNA 部分塩基配列を得た。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 を使い、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。

3. 実験結果

3-1. 海水及びカキに含まれる TBT の分析

実験結果を Table 1 に示す。2006 年 12 月 6 日に能登半島の沿岸部で海水を採取し、その海水に含まれる TBT 濃度を測定した結果、富来では 29 ng/L、曾々木では 41 ng/L、蛸島では 35 ng/L、小木では 35 ng/L、根木では 29 ng/L であった。しかし、2007 年 5 月 9 日にサンプリングした場合は、曾々木、蛸島及び根木で採取した海水中の TBT は検出限界以下 (<2 ng/L) だった。

一方カキは、日本海側では採取できず、富山湾側の蛸島

と根木のカキを用いて TBT の分析を行った。その結果、蛸島では 17-36 ng/g-wet の TBT が検出され、根木では 3 個体中 1 個体において TBT が検出された (2.7 ng/g-wet)。

3-2. 海洋細菌の単離

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。

これらの菌体濃度の測定結果を Table 2 に示す。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 及び SK-3 株が高く、SK-1 株は低い値を示した。

そこで、TBT の分解率の高い SK-2 及び SK-3 株の同定を行った。

3-3. 海洋細菌の同定

菌体から DNA を抽出し、PCR 法により 16S rDNA 断片を増幅し、シーケンスした結果、SK-2 及び SK-3 株は別種の細菌であることがわかった。

さらに近隣接合法により、系統解析を行った結果、両種は *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 (Figs. 2, 3)。

Table 1 TBT concentrations of seawater (ng/L) and oysters (ng/g-wet) in the seacoast of Noto Peninsula.

	Seawater		Oysters		
	Dec. 6, 2006	May 9, 2007	No.1	No.2	No.3
Togi	29	-	-	-	-
Sosogi	41	N.D.	-	-	-
Takojima	35	N.D.	17	23	36
Ogi	35	-	-	-	-
Neki	29	N.D.	N.D.	2.7	N.D.

N.D.: Not detectable

Table 2 Growth and TBT degradation (%) in TBT-resistant marine bacteria.

	Optical density (A_{610nm})	TBT degradation (%)
SK-1	0.758	15
SK-2	0.750	55
SK-3	0.692	55.5
SK-4	0.742	25

TBT degradation (%) = 100 - (TBT conc. in experimental medium / TBT conc. in control medium x 100)

4. 考察

TBT は、船底や漁網への貝類や海藻類の付着防御の目的で、1960年代半ばから広範囲かつ大量に使用されてきた。しかし、TBTには内分泌攪乱作用(3, 4, 7)や毒性があり(5, 6)、日本では製造が禁止もしくは制限され、有機スズ系漁網防汚剤及び漁船防汚剤の全面使用禁止がなされている(12)。一方、現在でもTBTを規制していない国が多数あり、規制している国でも25m以上の大型船舶にはTBTの使用が認められ、海水へのTBTの流出と汚染は依然として続いている。

本研究において、2006年12月6日にサンプリングした海水中にTBTが検出され、能登半島の先端に近い場所の方が高い値を示した。さらにカキの分析において、根木では3個体中1個体しか検出できなかったのに対し、能登半島の先端に近い蛸島の方では、3個体全てにおいて検出され、根木よりも高い値を示した(Table 1)。また、2007年5月9日にサンプリングした場合は、曾々木、蛸島及び根木で採取した海水中のTBTは検出限界以下(<2 ng/L)だったことから、今回のTBTの汚染は、局所的で一時的なものだと考えられる。この汚染を究明するために、今後継続的な調査が必要である。

本研究において、TBT耐性を持ち、TBT分解能を有する可能性の高い菌株(SK-2及びSK-3株)を海水の砂泥から単離することができた(Table 2)。SK-2株において、相同性が最も高い菌は、*Pseudoalteromonas carrageenovora*

(ATCC 12662)(98%)であり、相同性は96.8%だったが系統解析の結果では*Pseudoalteromonas translucida*(KMM520)が最も近かった(Fig. 2)。またSK-3株においても、相同性が最も高い菌は、*Pseudoalteromonas carrageenovora*(ATCC 12662)(98%)であり、系統解析の結果では*Pseudoalteromonas translucida*(KMM520)が最も近かったが、相同性は96.6%だった(Fig. 3)。今回は、500bpのみの解析なので、SK-2及びSK-3株が*Pseudoalteromonas carrageenovora*と*Pseudoalteromonas translucida*のどちらに近縁かは判断できない。しかし500bpという非常に短い断片の解析でも一致する菌株が見つからず、系統解析のブートストラップ値から判断すると、SK-2及びSK-3株は*Pseudoalteromonas carrageenovora*と*Pseudoalteromonas translucida*とは別種の新種の海洋細菌である可能性が高い。

TBTを分解する細菌に関しては、淡水産の報告が多く(13, 14, 15)、海洋細菌の報告は少ない。さらに最近報告された海洋細菌では、TBTを完全に分解するには3週間かかり、細菌によりTBTを浄化する技術は確立されているとは言い難い(2)。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(Table 2)。今後詳細な培養条件の検討やTBTの分解過程を調べ、SK-2あるいはSK-3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。

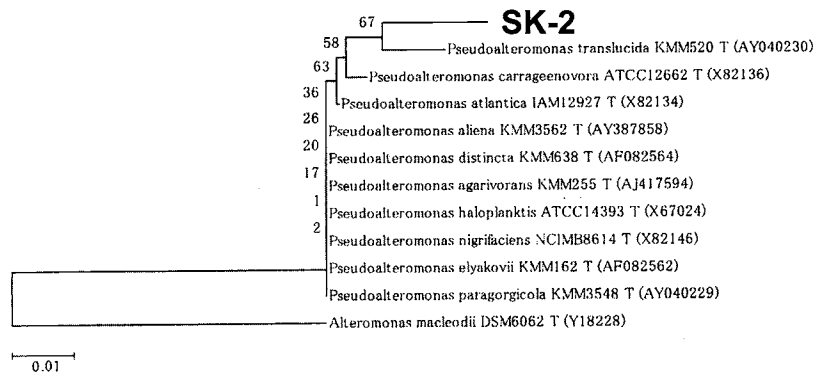


Figure 2 Phylogenetic analysis of 16S rDNA in a marine bacterium (SK-2).

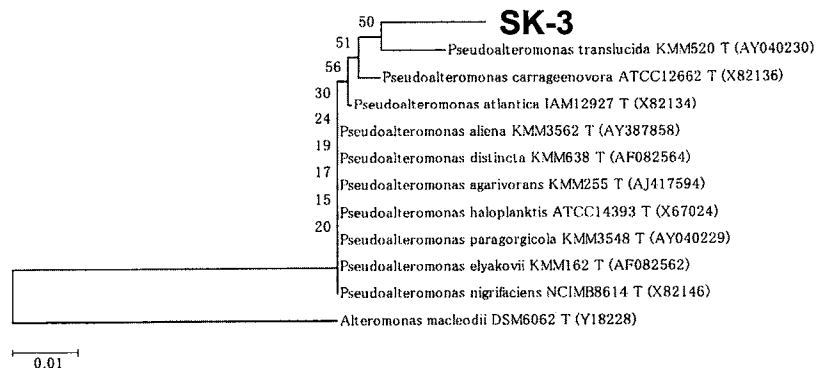


Figure 3 Phylogenetic analysis of 16S rDNA in a marine bacterium (SK-3).

5. 引用文献

- (1) 井上 英, 大嶋雄治, 今田信良, 本城凡夫. 2002. 北部九州とその周辺水域におけるトリブチルスズ汚染. 環境毒性学会誌, 5: 43-50.
- (2) 濱田 (佐藤) 奈保子, 水石和子, 渡邊悦生. 2004. トリブチルスズ化合物の海洋微生物による分解. 海洋と生物, 26: 148-153.
- (3) Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., Honjo, T. 2003. Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 141-144.
- (4) Santos, M.M., Vieira, N., Reis-Henriques, M.A., Santos, A.M., Gomez-Ariza, J.L., Giraldez, I., ten Hallers-Tjabbes, C.C. 2004. Imposex and butyltin contamination off the Oporto coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredge material. *Environment International*, 30: 793-798.
- (5) Rice, C.D., Banes, M.M., Ardel, T.C. 1995. Immunotoxicity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following acute exposure to tributyltin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28: 464-470.
- (6) Fent, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 26: 1-117.
- (7) Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T., Hattori, A. 2006. Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts. *Life Sciences*, 78: 2533-2541.
- (8) Kannan, K., Senthilkumar, K., Loganathan, B.G., Takahashi, S., Odell, D.K., Tanabe, S. 1997. Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the U.S. Atlantic and Gulf coasts. *Environmental Science and Technology*, 31: 296-301.
- (9) Kannan, K., Senthilkumar, K., Giesy, J.P. 1999. Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environmental Science and Technology*, 33: 1776-1779.
- (10) Inoue, S., Oshima, Y., Nagai, K., Yamamoto, T., Go, J., Kai, N., Honjo, T. 2004. Effect of maternal exposure to tributyltin on reproduction of the pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 1276-1281.
- (11) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N., Nakamura, Y. 2007. Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59: 252-254.
- (12) 山田 久, 角埜 彰. 2003. 非有機スズ系代替船底防汚塗料の開発状況と水生生物に対する有害性評価. 水研センター研報, 6: 56-72.
- (13) Barug, D. 1981. Microbial degradation of bis (tributyltin) oxide. *Chemosphere*, 10: 1145-1154.
- (14) Kawai, S., Kurokawa, Y., Harino, H., Fukushima, M. 1998. Degradation of tributyltin by a bacterial strain isolated from polluted river water. *Environmental Pollution*, 102: 259-263.
- (15) Suehiro, F., Kobayashi, T., Nonaka, L., Tuyen, B.C., Suzuki, S. 2006. Degradation of tributyltin in microcosm using Mekong river sediment. *Microbial Ecology*, 52: 19-25.