

静岡県折戸湾内より単離された海産性細菌の高濃度ホルムアルデヒド条件における馴化に関する研究

石井 洋^{*1}・前田 孝史^{*2}・井上 亮一^{*3}・齋藤 寛^{*1}

Study on acclimatization of a marine gram-negative aerobic bacterium
in the high concentrations of formaldehyde

Hiroshi ISHII, Takafumi MAEDA, Ryoichi INOUE and Hiroshi SAITO

Abstract

Formaldehyde is a toxic chemical that has recently been discharged as an effluent from industrial wastewater into the marine environment. High concentration of formaldehyde in the marine environment could possibly have detrimental effect on the lives of many aquatic organisms, since formaldehyde is known to cause damage to DNA and mutations in microorganisms and mammalian cells. Therefore, it's necessary to develop an effective method for removal of the formaldehyde from wastewater. In the present work, we focused on the isolation of bacterial strains and characterization of their adaptability to high concentrations of formaldehyde.

We investigated the formaldehyde acclimatization mechanisms in the SMM-7 strains, which were isolated from seawater in the mouth of the Tomoe River. Effects of high concentrations of formaldehyde on the bacteria were determined through following two steps: 1) the strain was cultured in nutrient broth medium with different concentrations of formaldehyde up to 300 ppm, 2) the cultured bacteria grown in the formaldehyde concentration of 300 ppm was further cultured in a series of higher concentrations of formaldehyde (500 ppm, 750 ppm, 1,000 ppm). The bacterial strains were noticed to acclimate to up to 750 ppm of formaldehyde. These results indicated that SMM-7 pre-adapted to formaldehyde was able to grow in more high formaldehyde concentration.

1. はじめに

ホルムアルデヒドは常温常圧下で無色透明の気体で存在し、窒息性の刺激臭を示す。また、水に対して非常に溶けやすく、きわめて弱い酸性を示す物質である。一般には約37%前後の水溶液に調製されたホルムアルデヒドをホルマリンと呼び、標本保存用の試薬として用いられることでよく知られている。ホルムアルデヒドは反応性が高く、他の分子と容易に結合することから、様々な用途で合成原料として利用されている。特に国内では、合成樹脂（ポリアセタール樹脂やメラミン系樹脂など）、いわゆるプラスチックなどの重要な工業製品の材料として使われている。また、ホルムアルデヒドは分子構造が単純で比較的簡単にメタノール触媒酸化法を用いて合成ができることから、工業

的に大量生産が可能である。そのため市場では低価格で流通し、樹脂の原料以外に様々な用途で利用されている。このように工業的製法の確立と合成樹脂工業の発達により、世界のホルムアルデヒドの生産量と需要の拡大が急激に進み、2000年における世界のホルムアルデヒドの生産量は約797万tにも達した（IARC 2006）。日本国内においてもホルムアルデヒドの生産量は毎年40万t以上にも達している。このような現状の中、用途の豊富さと反応性の高さからホルムアルデヒドは国内外問わず、その危険性について問題視されてきた。そのため社会的な関心も高く、樹脂製食器からの溶出問題やシックハウス症候群の原因物質の可能性、さらには食品中のホルムアルデヒドの調査では、生や乾燥のシイタケ、キュウリ、そしてタラ、ヤリイカ等からも検出され有害物質として広く認識されるようになった（Liteplo and Meek, 2003, 大森ら, 1977）。2004年度のPRTR

2011年7月27日受付 2011年12月14日受理

*1 東海大学海洋学部 (School of Marine Science and Technology, Tokai University)

*2 東海大学大学院海洋学研究科海洋生物科学専攻 (Master's Course of Marine Bioscience, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokai University)

*3 東海大学大学院海洋学研究科修士 (Graduate student, Tokai University)

(Pollutant Release and Transfer Register) のデータによれば、1年間に1万6千tが環境中へ排出されたと見積もられている(環境省, 2005)。そのほとんどが自動車や工場などの排気ガスにより大気中に排出され、化学的な作用を受け分解するとされるが、一部のホルムアルデヒドは、雨水に溶解したのち、土壌や河川などに沈着し、産業排水や家庭排水など同様の経路で、最後には海水に流入すると考えられている。河川や沿岸海域においては、1975年及び1995年に環境省が水質の調査を行ったが、ホルムアルデヒドは検出されなかった。しかし、同省のEUSES (European Union System for the Evaluation of Substances) モデルを用いた計算の結果では、環境中のホルムアルデヒドの分布は大気中の分布量について、水域が高いパーセンテージの値を示している。さらに環境省の1999年の調査における公共用水域・淡水でのホルムアルデヒドの検出状況は、最大濃度で $12\mu\text{g/L}$ を示している(環境省, 1999)。ホルムアルデヒドは揮発性有機化合物として分類されるが、水への溶解度が大きい水溶液中からの揮発性は低い。そのため一度環境水域に溶解したホルムアルデヒドは他の領域に移動しにくいと考えられる。つまり沿岸域の海水中に溶解しているホルムアルデヒドは、その動態として水生生物への取り込みまたは吸着などの可能性も十分に考えられ、海洋生態系に影響を与えることが懸念される。

沿岸海域の水産業では、ホルムアルデヒドの殺菌作用を利用し、魚網や船底に付着する生物の駆除、また、水産養殖では養殖魚に付く寄生虫や鰻虫などの駆除などに用いられている(IPCS, 1989)。日本では、1981年に水産庁よりホルムアルデヒドの使用に関する通達を数回発行しており、水産用医薬品以外の薬剤とし規制の対象物とされた。しかし、実際は2003年4月にトラフグの養殖において、鰻に付く寄生虫ヘテロボツリウム(*Heterobothrium okamotoi*)の駆除で使用されていたことが表面化しており、その規制は弱く、ホルムアルデヒドは使用され続けたと考えられる。使用方法としては、養殖の生簀とは別の水槽で薬浴されたのち、未処理のまま海に投棄されていた。その後、薬事法の改正により海洋でのホルムアルデヒドの使用は法的に禁止された。また、ホルムアルデヒドの使用を禁止した国は日本のみではなく、他の国においても法律により規制されている。しかし、一部の国では、ホルムアルデヒドの使用は法律による明確な規制がなく、それらの国の中には日本に水産物を数多く輸出している。このことは、水産資源を多く利用する我々にとって、ホルムアルデヒドの使用目的または、対処方法について早急に考えていかなければならない。

ほとんどの生物は、生体内の代謝において低濃度のホルムアルデヒドを生成する(Handler *et al.*, 1941; Case and Benevenga, 1977)。したがって生体内で毒性を示すホルムアルデヒドを除去するためには、ホルムアルデヒド分解機能が作用しなければならない。細菌から大型の生物の生体

内には、ホルムアルデヒド分解酵素を合成する機能が存在している(Haslam *et al.*, 2002)。特にホルムアルデヒドの分解経路が高度に発達した細菌類には、ホルムアルデヒドを唯一の炭素源として利用する C_1 化合物資化性細菌がよく知られている(Mateles and Battat, 1974)。そこで本研究では、静岡県清水区の折戸湾沿岸域の4ヶ所より海水を採取し、その海水中に生存する細菌類の中で、ホルムアルデヒドに耐性または分解能を示す細菌を単離し、さらに高濃度のホルムアルデヒド条件下における単離細菌の動態についての調査を行った。

2. 材料と実験方法

2-1 海水試料

海水試料の採水は巴川河口(A地点)、三保マリーナ(B地点)、貯木場(C地点)、大橋川河口(D地点)の4地点で行った(Fig. 1)。各地点での採水に関しては、表層水(深さ: 約0.5–1 m以内)をポリエチレンテレフタレート製の容器に数回、海水にて洗浄した後に空気が入らないように密封し、暗黒条件、低温下(氷中または保冷剤を使用)で速やかにクーラーボックスにて搬送した。それぞれの採取した試水はゴミ等をあらかじめピンセットで取り除き、約0.5–1 Lをろ紙(No. 2, ADVANTEC)によりろ過した。回収したろ液は、温度の上昇と太陽照射を避けるため、暗黒下で静置し4℃で保存した。

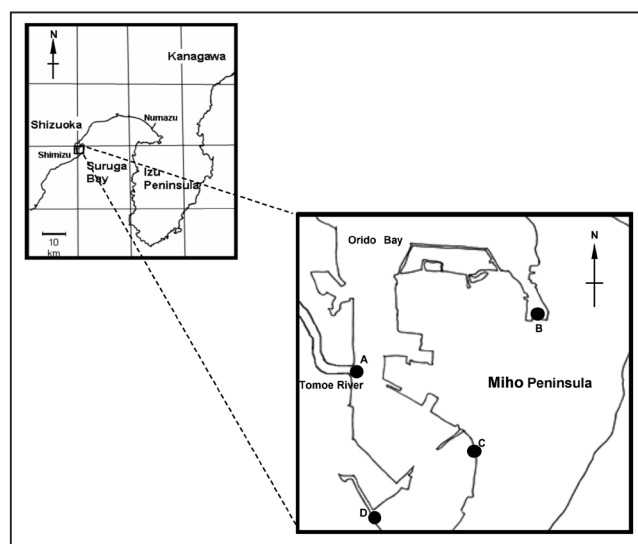


Fig. 1 Location of the sampling areas in the Orido Bay.

- A: The Mouth of the Tomoe River.
- B: Miho Marina.
- C: Lumberyard.
- D: The Mouth of the Ohashi River.

2-2 採取した海水試料中のホルムアルデヒド分解菌の探索

採集した4地点の海水100mLを予めオートクレーブ(121℃, 1.2気圧, 20分間, SS-235, TOMY)により滅菌

したものと同様に滅菌していないものを4本ずつ用意した。各々を滅菌済みの綿栓付き三角フラスコ(200mL)に添加した。さらにホルムアルデヒドの濃度(37%ホルムアルデヒド水溶液)を用いて濃度計算し、1ppmホルムアルデヒドには1Lの水溶液中に1 μ Lのホルムアルデヒドが含まれるようにした)が10ppmになるように添加し調製した。ホルムアルデヒドが調製された海水試料は、25 $^{\circ}$ C、暗黒条件に設定したインキュベーター(CF-305, TOMY)内で振とう機(NR-3, TAITEC)により振とうした(140r.p.m, 旋回)。ホルムアルデヒド濃度の経時的な変化の確認は、Nash-ホルムアルデヒド法(Nash, 1953)により行った。一定時間毎に採取した試料(約5mL)は、ミリポアフィルター(0.45 μ m)でろ過した後、ろ液の試料と同量のアセチルアセトン溶液(150g 酢酸アンモニウム, 3mL 酢酸, 2mL アセチルアセトン, 蒸留水で1Lにしたもの)を混合し、60 $^{\circ}$ Cで10分間加温した後、氷水で冷却した。得られた反応液は波長415nmの吸光度を測定し、その測定値をA₄₁₅とした。

2-3 顕著なホルムアルデヒドの減少を有した海水試料からの細菌の分離

2-2の実験結果(Fig. 2)より、海水試料中のホルムアルデヒド濃度に経時的な変化が顕著に現れたA地点(巴川河口)試料についてのみ、細菌の分離作業を試みた。平板分離培養法により一定期間培養して、それぞれ独立した細菌のコロニーを形成させたのち、分離作業を行った。まず、ホルムアルデヒドの減少が観察された試料は、10⁻¹倍から10⁻⁸倍になるように滅菌した海水で段階的に希釈し、その希釈液100 μ Lを有機栄養寒天培地(5.0g Tryptone, 1.0g Yeast extract, 30g NaCl, 1% agarを1Lの蒸留水に溶解した)に接種した。コンラージ棒で寒天培地の表面全体に塗布した後、インキュベーター内で25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で静置培養した。一定期間(2-7日間)培養した後、形成したコロニーのうち、形態(形状、大きさ、色)の違う孤立したコロニーを滅菌済み爪楊枝で全て釣菌し、新しい寒天培地に接種し単一株の単離を行った。

2-4 単離した株のホルムアルデヒド分解能の検討

単離された細菌のホルムアルデヒドに対する分解能の有無について検討した。また単離された9株(SMM-1~9)の維持は、有機栄養培地を用いて培養を行った。実験使用時には、予め前培養としてM9培地(6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 0.5g NaCl, 1g NH₄Clと2mLの1M MgSO₄·7H₂O, 0.1mLの1M CaCl₂·2H₂O, 10mLの20%(w/v)グルコースに蒸留水を加えて1Lとしたものである(pH7.4))を用いて2, 3回の継代を繰り返し行い馴化させた。細菌懸濁液の採取は、対数増殖期の後期に達した菌体を用いた。綿栓付きの三角フラスコ(200mL)に100mLのM9培地を添加し、さらにホルムアルデヒドが50ppmになるように

37%ホルムアルデヒド水溶液を培地に添加し濃度を調製した。そして9株(SMM-1~9)の細菌懸濁液を2~3mL添加した。培養は暗黒条件で25 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーター内で振とう機によりおこなった。ホルムアルデヒド濃度の経時的な変化は、一定時間毎にクリーンベンチ内で無菌的に採取した試料をミリポアフィルター(0.45 μ m)でろ過した後、ろ液の試料をNash-ホルムアルデヒド法(Nash, 1953)により分光光度計(U-3210, HITACHI)を用いて測定し、吸収波長415nmの値より算出した。

2-5 SMM-7株の細菌数と細菌懸濁液の濁度との関係

本研究で単離された細菌SMM-7株の細菌数と細菌懸濁液の濁度との相関について検討した。予め有機栄養培地を用いてインキュベーター内で暗黒条件、25 $^{\circ}$ Cで振とう培養したSMM-7株の懸濁液約5mLを滅菌済みの綿栓付き200mL三角フラスコ内に添加し、有機栄養培地を95mL加えた。培養は暗黒条件で25 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーター内にて振とう培養(140r.p.m)で行った。SMM-7株の懸濁液の採取は、一定時間毎にクリーンベンチ内でマイクロピペットにより無菌的な操作で行った。生菌数の測定は、以下の方法により行った。採取した細菌懸濁液の一部を10⁻¹倍から10⁻⁸倍になるように滅菌した有機栄養培地で段階的に希釈し、その希釈液100 μ Lを有機栄養寒天培地に接種した。コンラージ棒で寒天培地の表面全体に塗布した後、インキュベーター内で25 $^{\circ}$ C、暗黒条件下で静置培養した。一定期間(48時間)培養した後、形成したコロニーの数を計測し、細菌懸濁液1mL中の細菌数に換算した。また、その細菌懸濁液の残りを分光光度計により、波長550nmの吸光度を測定した。この測定値を細菌の濁度A₅₅₀とした。

2-6 SMM-7株のホルムアルデヒドの適応能について

特に高いホルムアルデヒドの分解能を示したSMM-7株(table 1)を用いて、有機栄養培地中におけるホルムアルデヒドの適応能について検討した。50, 100, 200, 300, 500ppmホルムアルデヒド濃度の有機栄養培地は37%ホルムアルデヒド水溶液をそれぞれの濃度になるように添加し調整した。予め有機栄養培地で前培養を行い馴化させたSMM-7株を各濃度に調整した有機栄養培地とホルムアルデヒドを添加していない有機栄養培地に一定の濁度(A₅₅₀=0.05)になるようにそれぞれ接種した。SMM-7株の増殖曲線は、最初に菌体を接種した時間を0時間とし、一定時間毎に3~5mLの細菌懸濁液を採取し、その細菌懸濁液の細菌濁度を測定し、作成した。その細菌濁度は波長550nmの吸光度を測定し、その測定値をA₅₅₀とした。

2-7 SMM-7株における300ppmホルムアルデヒドへの馴化

SMM-7株は2-6の実験結果(Fig. 4)より、300ppmホルムアルデヒドの存在下で増殖が可能であることから、

300ppm ホルムアルデヒドの条件下で SMM-7 株の継代を 4 回繰り返し行い、各増殖曲線の時間経過に伴う細菌増殖の変化について検討した。SMM-7 株の前培養は、ホルムアルデヒドを無添加の条件下でインキュベーター内（暗黒条件、25℃）にて振とう機（140r.p.m）を用いて行った。前培養後の SMM-7 株を、300ppm ホルムアルデヒドの条件になるように調整した新たな有機栄養培地に一定の濁度（ $A_{550}=0.05$ ）になるように接種した。培養条件はインキュベーター内（暗黒条件、25℃）にて振とう機（140r.p.m）を用いて行った。また細菌の増殖の観察は、採取した時間毎の細菌濁度の測定により行った。細菌の増殖が対数増殖期後期に達したことを確認したら、また新たに300ppm ホルムアルデヒドに調整した有機栄養培地に接種し継代を連続的に行った。この SMM-7 株の継代の実験操作をあと 3 回行い、細菌の増殖を経時的に観察しながら、この菌株の増殖曲線を連続的に 4 回作成するように順次実験を行った。SMM-7 株の細菌濁度は、波長550nm の吸光度を測定し、その測定値を A_{550} とした。

2-8 300ppm ホルムアルデヒドに馴化した SMM-7 株の高濃度ホルムアルデヒドの適応能について

2-7の実験結果（Fig. 5）と同様の方法で300ppm ホルムアルデヒドの条件下で馴化させた SMM-7 株を用いて、高濃度ホルムアルデヒド条件下における菌株の適応能について検討した。予め前培養として300ppm ホルムアルデヒドに調整した培地で 4 回継代培養を繰り返し、SMM-7 株（2-7と同様の方法）の馴化を行った。また実験に用いる有機栄養培地には300, 500, 750, 1,000ppm ホルムアルデヒドの濃度になるように37%ホルムアルデヒド水溶液を添加し調整したものとホルムアルデヒドを添加しないもの（0 ppm）を準備した。300ppm ホルムアルデヒド条件下で馴化した SMM-7 株の細菌懸濁液を、それぞれの培地に一定の濁度（ $A_{550}=0.05$ ）になるように接種し、実験を開始した。培養条件はインキュベーター内（暗黒条件、25℃）にて振とう機（140r.p.m）を用いて行った。また細菌の増殖の観察は、採取した時間毎の細菌濁度の測定により行った。その細菌濁度は波長550nm の吸光度を測定し、その測定値を A_{550} とした。

2-8 500ppm ホルムアルデヒドに馴化した SMM-7 株の高濃度ホルムアルデヒド条件下への馴化

2-6の実験では500ppm ホルムアルデヒドの条件下において SMM-7 株の増殖は見られなかった（Fig. 4）。しかし2-8の結果では、300ppm ホルムアルデヒド濃度の条件で馴化させることにより、500ppm ホルムアルデヒドの条件においても増殖が可能であったことから、500ppm 以上のホルムアルデヒド濃度条件についても高濃度での馴化による増殖について検討した。2-8の実験と同様の方法で300ppm から500ppm ホルムアルデヒドの条件へ馴化させ

た SMM-7 株を用いて、有機栄養培地中における高濃度ホルムアルデヒドの適応能について検討した。予め500ppm ホルムアルデヒドに調整した培地で 4 回継代を繰り返し前培養した SMM-7 株を用いて、500ppm ホルムアルデヒドに調整した培地に一定の濁度（ $A_{550}=0.05$ ）になるように接種した。そして対数増殖期に達した SMM-7 株を750ppm さらには1,000ppm ホルムアルデヒドに調整した有機栄養培地に続けて継代し、その増殖曲線を観察した。新たな培地への細菌の接種は、細菌の増殖が対数増殖期後期に達したときに行った。細菌濁度は波長550nm の吸光度を測定し、その測定値を A_{550} とした。

3. 結果と考察

毎年、国に届出が行われている排出量以外にホルムアルデヒドは、家庭排水や建築事業、病院等の医療業などから排出され、その一部が下水道あるいは公共用水域へ流出し、結果的に大量のホルムアルデヒドが環境へ排出されている。そこで本実験では、主に工場や家庭からの廃液などによるホルムアルデヒドの流出先として考えられる静岡県清水区内の折戸湾沿岸域の 4 地点から採取した表層水についてホルムアルデヒド分解の生物学的な要因の有無について調査した（Fig. 1）。その結果、4 地点のこれらの試料にホルムアルデヒドを添加した場合、すべての試料で顕著にホルムアルデヒドの減少が確認された。特に A 地点（巴川河口）と B 地点（大橋川河口）の汽水域で採取した試料において 1 日経過で約95%のホルムアルデヒドの急激な減少が観察された（Fig. 2）。他の 2 試料においても、1 日目では約50%減少し、2 日目にはどの試料も99%以上のホルムアルデヒドの減少が観察された。また、すべての試料において滅菌処理を行った場合には、添加したホルムアルデヒドの濃度に変化が見られず、その濃度は 6 日間一定であった。（Fig. 2）。この結果は、折戸湾の採水地点の海域には、生物学的な要因でホルムアルデヒドの減少に関与している微生物が存在することが示唆されるとともに、採水地点の全てで急激な減少が観察されたことから、試料中に存在する細菌のホルムアルデヒドに対する分解活性が非常に高いことが示された（Fig. 2）。PRTR（環境省、2004）における全国の沿岸域のホルムアルデヒドの排出量のデータでは、特に都市部や中心部にホルムアルデヒドの分布が高い数値を示しており、産業排水、家庭排水の影響によるものだと考えられる。折戸湾においてもおそらくパルプ・紙・紙加工製造業、化学工業などが多く存在するため、様々な経路を経て海域に流入し、同様の傾向が見られたと考えられる。水に対する溶解度や反応性の高いホルムアルデヒドは、常に自然の自浄作用を受けていると考えられ、即座に浮遊物や汚泥などに吸着したり、他の物質と反応して化学的に変化したり、海水中に生息する微生物による取り込みや分解作用などを受けると考えられる。このこと

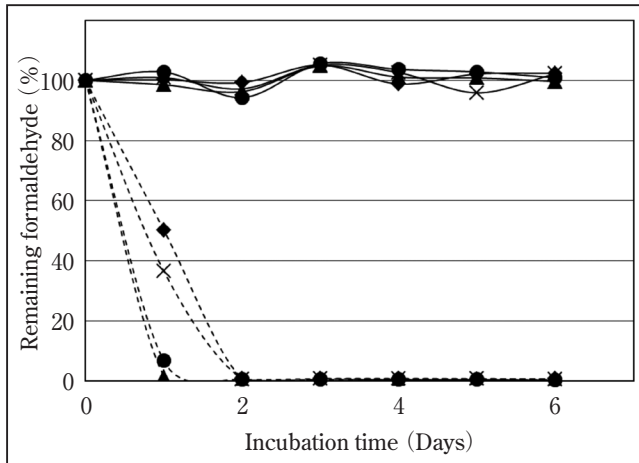


Fig. 2 Biodegradation of 10ppm formaldehyde in seawater samples under aerobic shaking-dark incubation conditions at 25°C.

Symbols of sampling locations:

- the Mouth of the Ohashi,
- ▲ the Mouth of the Tomoe River,
- ◆ Lumberyard,
- × Miho marina.

Solid lines are sterilized samples.

Broken lines are non-sterilized samples.

は、本実験の各試料におけるホルムアルデヒドの減少傾向や、単離した9株の細菌のうち6株で顕著なホルムアルデヒドの減少が観察されたことから示唆される。次に、ホルムアルデヒドの減少が顕著に観察されたA地点の海水試料よりホルムアルデヒドの減少に関与している細菌の分離を行った。その結果、寒天培地に形成したコロニーの色、または形状などの違いから、9株の細菌を単離することができた。これら9株をホルムアルデヒド濃度が50ppmになるように調整した培地で培養すると、単離された9株の中で6株（SMM-2, 3, 4, 5, 7, 8株）で、培地中のホルムアルデヒドの減少が観察された（Table 1）。特に、SMM-7株は、実験開始から3日目の測定では、ほとんどのホルムアルデヒドが減少したことが確認された（Table 1）。通常、ホルムアルデヒドは濃度が低い溶液でも曝露すると細胞原形質のタンパク質を不可逆的に凝固させ、細胞機能を低下、そして死滅させる作用があるため、生物に対しては有害な物質として認識されている。しかし、動植物の生体内では、代謝過程で副産物としてホルムアルデヒドが生成されるために、分解除去するホルムアルデヒド分解酵素が関与する反応系が存在する（Haslam *et al.*, 2002）。細菌類においても、同様にホルムアルデヒド分解酵素が働く細胞内代謝が多く報告されており（Mateles and Battat, 1974; Gutheil *et al.*, 1997; Barber and Donohue, 1998）、現在、微生物が関与したホルムアルデヒドを分解や資化に関する研究、または高濃度のホルムアルデヒドに対して耐性を示す細菌に関して多数の研究が報告されている（Kaulfers and Marquardt, 1991; Azachi *et al.*, 1996）。さらには、ホルムア

Table 1 The residual quantity in the concentration of 50ppm formaldehyde with each of nine bacterial strains isolated from sample of the mouth of the Tomoe River.

SMM Strain No.	Time (days)		
	0	3	6
1	100 (%)	85.5 (%)	92.5 (%)
2	100	65.5	1.0
3	100	19.1	0.6
4	100	81.4	1.5
5	100	71.1	29.3
6	100	74.6	73.3
7	100	0.0	1.1
8	100	73.8	10.0
9	100	78.0	75.7

ルデヒドを唯一の炭素源として利用するメチロトロフ細菌も報告されている（Hanson and Hanson, 1996）。高濃度のホルムアルデヒド耐性菌として単離されている *Escherichia coli* VU3695と *Serratia marcescens* は、それぞれ500ppmと200ppmホルムアルデヒドで増殖が可能であることが確認されている（Kaulfers and Marquardt, 1991; Azachi *et al.*, 1996）。また、海水中からもホルムアルデヒドに耐性を示す細菌が単離されており、最大で400ppmホルムアルデヒド存在下で分解が可能であることが報告されているが（Yamazaki, *et al.*, 2001）、海水域のようなNaCl濃度が高い条件でのホルムアルデヒドの耐性や分解能を示す微生物の報告は非常に少ない。オーストラリアやヨーロッパそして日本では、水産養殖においてホルムアルデヒドは、国際癌研究機関（IARC, 1995）や米国環境保護庁（EPA）などの評価から発がん性物質の可能性があると分類されているため使用が禁止されているが、アメリカやカナダなどその他の国では認可され、様々な養殖魚や養殖エビなどの寄生虫駆除に用いられている（Jung, *et al.*, 2001）。2003年、九州天草地方の真珠養殖場の海域でアコヤガイが大量斃死する事件が相次いで起こり、その一因としてトラフグ養殖における寄生虫の駆除にホルムアルデヒドが使用されたことが挙げられている。アコヤガイに対するホルムアルデヒドの影響に関しては、秋山・齋藤（2001）によって50ppm以上で急性毒性を示すことが報告されている。また、その他の淡水性の養殖魚介類などでも比較的低濃度のホルムアルデヒドで影響が出ている（Takayanagi, *et al.*, 2000; IPCS, 1989）。

そこで本研究では海水域である巴川河口域から単離した細菌の中から特に50ppmホルムアルデヒドに対して細菌増殖に影響がなく、短時間で減少が観察されたSMM-7株を用いて細菌の濁度と細菌数との関係を調べた（Fig. 3）。吸光度は波長550nmで測定を行い細菌濁度とし、生菌数は有機栄養寒天培地に形成したコロニー数より1mLあたりの細菌数に換算したものをを用いた。その結果、SMM-7株において細菌数とA₅₅₀の間に比例関係が認められたた

め、細菌数の測定は濁度法で行った (Fig. 3)。

次に SMM-7 株の 50ppm ホルムアルデヒドの条件での減少結果からさらに高い濃度のホルムアルデヒドに対する影響について検討した。SMM-7 株はホルムアルデヒドが添加されると低濃度 (50ppm) においても対数増殖期に入る前に、8 時間以上の誘導期が存在し、それはホルムアルデヒドの濃度に依存して誘導期の期間が増加することが示唆された (Fig. 4)。増殖可能なホルムアルデヒドの限界濃度は 300ppm であり、500ppm においては実験終了時まで細菌の増殖は観察できなかった。また、全てのホルムアルデヒド濃度条件下で、誘導期後には細菌増殖の急激な上昇が観察された。これは、誘導期間中に SMM-7 株が環境に対する安定化を行うための代謝が細菌内で急激に起こったと考えられる。次に増殖可能な 300ppm ホルムアルデヒドの条件下において繰り返し培養を行った (Fig. 5)。その結果、SMM-7 株は新たな 300ppm ホルムアルデヒドで培養を行うに従い、誘導期の期間が短縮され、1 回目では、Fig. 4 の結果と同様に 36 時間、2 回目では 9 時間、3 回目では 6 時間弱の誘導期ののちにそれぞれの細菌増殖が観察されたが、4 回目の培養では、ほとんど誘導期は観察されなかった (Fig. 5)。これは SMM-7 株が高い濃度のホルムアルデヒドに対して徐々に馴化したためであると考えられる。次に事前に 300ppm ホルムアルデヒドで馴化させた SMM-7 株を通常の増殖限界濃度よりも高い濃度での培養を試みた (Fig. 6)。培養の 1 回目の 300ppm ホルムアルデヒドの条件下では、コントロールであるホルムアルデヒドを添加しない (0 ppm) 場合に近い増殖速度で増殖し、さらには通常 SMM-7 株の増殖が観察されない 500ppm の条件においても短い誘導期の後に急激な増殖が観察された。

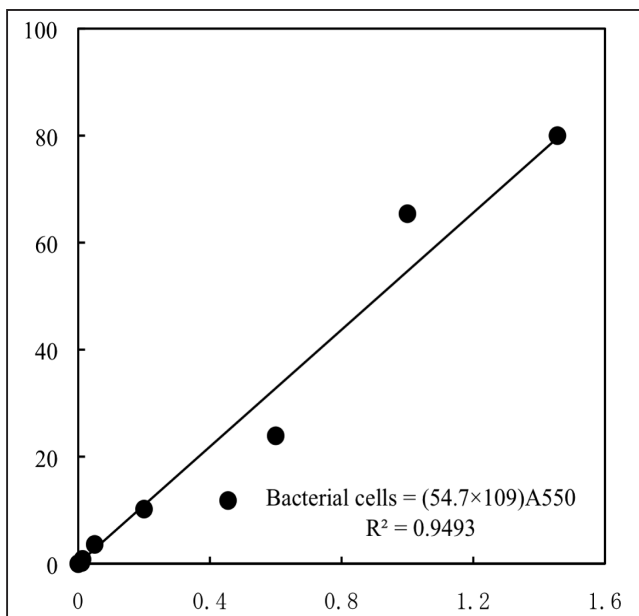


Fig. 3 Relationship between bacterial number of SMM-7 strain and absorbance at 550nm.

ホルムアルデヒドの濃度を 750ppm から 1,000ppm に高くした場合は、84 時間後においても増殖は見られなかった (Fig. 6)。さらに、SMM-7 株を事前に 500ppm ホルムアルデヒドで馴化させた後、500ppm から 750ppm、そして 1,000ppm まで徐々に濃度を上げて実験を行った。その結果、500ppm から続く 750ppm に高くした場合は、約 6 時間の誘導期が観察されたが、その後細菌の増殖が観察された。1,000ppm ホルムアルデヒドの条件下では細菌が増殖することはなかった (Fig. 7)。以上の結果から、SMM-7 株は高濃度のホルムアルデヒドに対して馴化させること

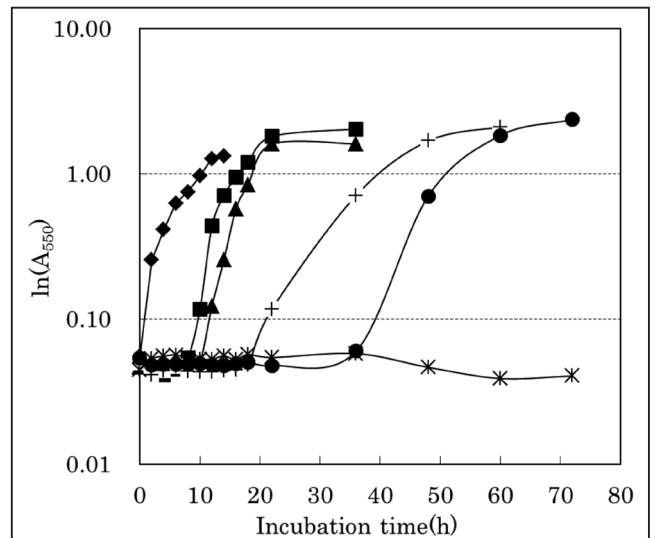


Fig. 4 Growth curves of SMM-7 strain exposed to 0-500ppm formaldehyde.

Symbols of formaldehyde concentrations: 0ppm (◆), 50ppm (■), 100ppm (▲), 200ppm (+), 300ppm (●), and 500ppm (*).

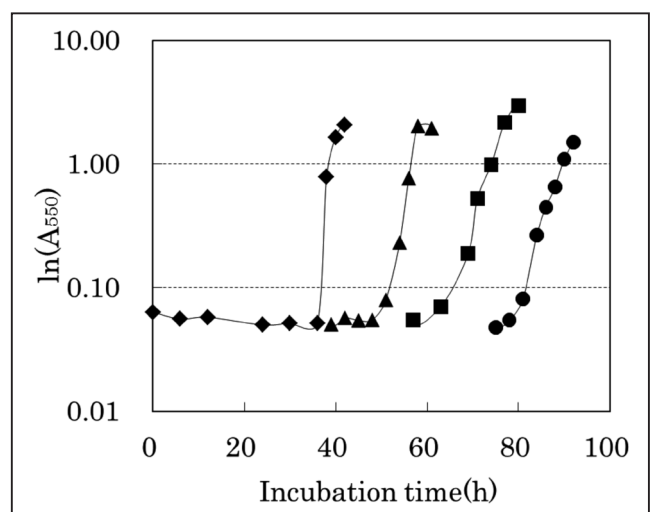


Fig. 5 Growth curves of SMM-7 strain that was repeatedly exposed to 300ppm formaldehyde in four times.

Symbols: The culture of 300ppm formaldehyde concentrations are 1st (◆), 2nd (▲), 3rd (■), and 4th (●).

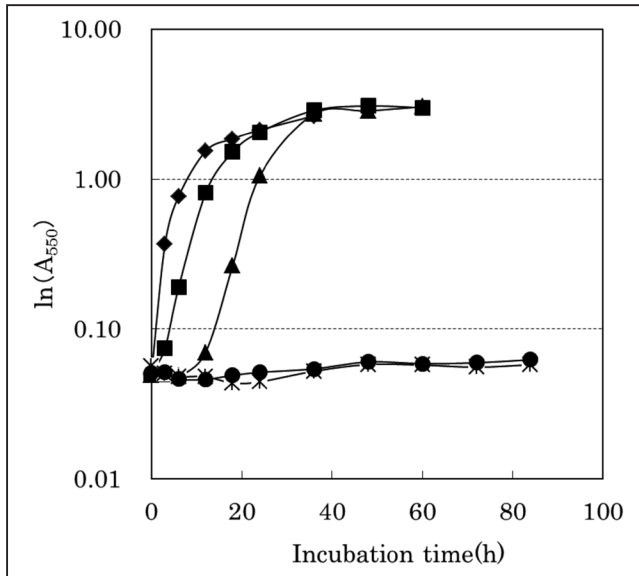


Fig. 6 Growth curves of SMM-7 strain exposed to 0-1000ppm formaldehyde.
The pre-culture of SMM-7 was exposed to 300ppm formaldehyde.
Symbols of formaldehyde concentrations: 0ppm (◆), 300ppm (■), 500ppm (▲), 750ppm (*), and 1000ppm (●).

によって、生育が可能な限界濃度以上の条件でも増殖することが明らかになった。

本実験では、巴川河口域から単離した細菌 9 株の中から、特に SMM-7 株が 50ppm ホルムアルデヒドの条件下で顕著な分解が観察された。さらに SMM-7 株は高濃度のホルムアルデヒドに順次馴化させることによって最大 750ppm までの高い濃度条件下においても増殖が可能になった。このことから、50ppm ホルムアルデヒドと同様に高濃度での分解能が確認できれば、産業排水や家庭排水などに含まれる高い濃度のホルムアルデヒドの浄化システムへ導入の可能性も考えられる。また、海水域からホルムアルデヒドの除去を目的とした細菌類の単離や分解に関する報告例は少なく、SMM-7 株の海水域でのホルムアルデヒド除去システムの導入への可能性が期待された。

謝辞

本研究の遂行ならびに本稿の作成にあたり、東海大学海洋学部水産学科卒、現在、長野県警の小池学氏と東海大学海洋学部非常勤講師マハパトラ ケダーナッシュ氏にご協力して頂き、心から感謝いたします。

また当時、東海大学海洋学部清水教養教育センターに在職されていた中山隆雄先生、小林幸夫先生には懇切丁寧にご教示を賜り深く感謝致します。

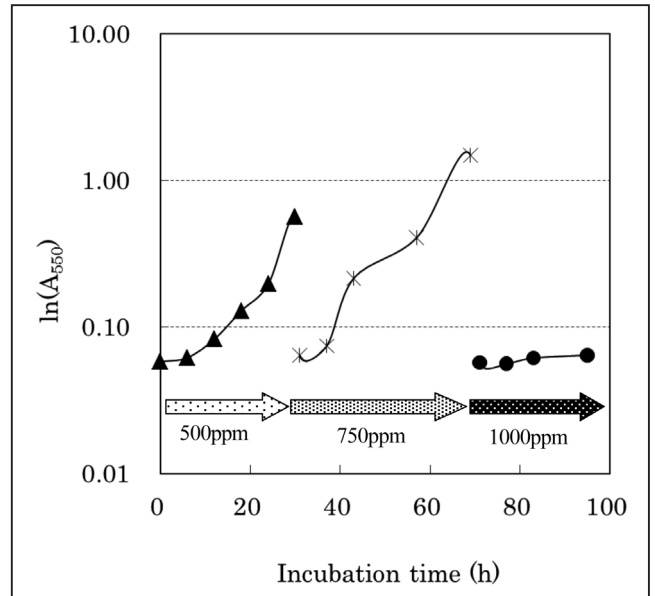


Fig. 7 Growth curves of SMM-7 strain that was repeatedly exposed to formaldehyde in a stepwise series of 500-1000ppm. The pre-culture of SMM-7 was exposed to 500ppm formaldehyde.
Symbols of formaldehyde concentrations: 500ppm (▲), 750ppm (*), and 1000ppm (●).

引用文献

- 秋山信彦・齋藤寛 (2001): アコヤガイ, *Pinctada fucata martensii* に対するホルマリンの影響, 東海大学紀要海洋学部, 52, 9-28.
- Azachi, M., Y. Henis, R. Shapira and A. Oren (1996): The role of the outer membrane in formaldehyde tolerance in *Escherichia coli* VU3695 and *Halomonas* sp. MAC. Microbiology, 142, 1249-1254.
- Barber, R. D. and T. J. Donohue (1998): Function of a glutathione-dependent formaldehyde in *Rhodobacter sphaeoides* formaldehyde oxidation and assimilation. Biochem., 37, 530-537.
- Case, G. L. and N. J. Benevenga (1977): Significance of formate as an intermediate in the oxidation of the methionine, S-methyl-L-cysteine and sarcosine methyl carbons to CO₂ in the rat. J. Nutr., 107, 1665-1676.
- Gutheil, W. G., E. Kasimoglu and P. C. Nicholson (1997): Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia coli* and *Hemophilus influenza*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 238, 693-696.
- Handler, P., M. L. C. Bernheim and J. R. Klein (1941): The oxidative demethylation of sarcosine to glycine. J. Biol. Chem., 138, 211-218.
- Hanson R. S. and T. E. Hanson (1996): Methanotrophic bacteria. MicroBiol. Rev., 439-471.
- Hanzawa, N., S. Kanai, A. Kastuta, Y. Nakagawa and K. Yamasato (1995): 16S rDNA-based phylogenetic analysis of

- marine flavobacteria. J. Mar. Biotechnol., 3, 111-114.
- Haslam, R., S. Rust, K. Pallett, D. Cole and J. Coleman (2002): Cloning and characterization of S-formylglutathione hydrolase from *Arbidopsis thaliana*: a pathway for formaldehyde detoxification. Plant Physiol. Biochem., 40, 281-288.
- IARC (1995): IARC Monographs on the Evaluation of Risks to humans, Vol. 62, Wood Dust and Formaldehyde.
- IARC (2006): IARC Monographs on the Evaluation of Risks to humans, Vol. 88, Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1989): Formaldehyde, Environmental Health Criteria, 89, p.219 World Health Organization, Geneva.
- Jung, S. H., J. W. Kim, I. G. Jeon, and Y. H. Lee (2001): Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*), and seawater. Aquaculture, 194, 253-262.
- 環境省 (1999): 平成11年度 水質汚濁に係る環境基準 人の健康の保護に関する環境基準—要調査項目等 存在状況調査結果, 東京, 1-6.
- 環境省 (2004): 2004年度 PRTR (環境汚染物質排出・移動登録) 集計データ, 東京.
- 環境省 (2005): 2005年度化学物質ファクトシート, 東京, 525pp.
- Liteplo, R.G. and M. E. Meek (2003): Inhaled formal-dehyde: exposure estimation, hazard characterization, and exposure-response analysis. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev., 6, 85-114.
- Kaulfers, P. M. and A. Marquardt (1991): Demonstration of formaldehyde dehydrogenase activity in formaldehyde-resistant *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol. Lett., 79, 335-338.
- Mateles, R. I. and E. Battat (1974): Continuous culture used for media optimization. Appl. Microbio., 28, 901-905.
- Nash, T. (1953): The colrimetric estimation of formal-dehyde by means of the hantzsch reaction. Biochem. J., 55 (3), 416-421.
- 大森光明・福井弥生・山田正三 (1977): ホルムアルデヒド—その衛生化学—, 化学32, 184-189.
- Saitou, N. and M. Nei (1987): The neighbor-joining method: a new method for Reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4, 406-425.
- Takayanagi, K., T. Sakami, M. Shiraishi, and H. Yokoyama (2000): Acute toxicity of formaldehyde to the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Wat. Res., 34, 93-98.
- Tompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibsons (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680.
- Yamazaki, T., W. Tsugawa, and K. Sode (2001): Biodegradation of formaldehyde by a formaldehyde-resistant bacterium isolated from seawater. Appl. Biochem. Biotechnol., 91-93, 213-217.

要 旨

産業や家庭排水などから海水域に流入する汚染物質の一つであるホルムアルデヒド (FAD) は、ヒトやその他の生物に対して強い毒性を示す物質であり、海洋生物への影響が懸念されている。本研究では、静岡県清水区折戸湾沿岸域の4点から採水した後、10ppmFADを添加し、その濃度の減少の有無について調査した。その結果、巴川河口海水においてFADの急激な減少が観察された。その海水から希釈法により9株の細菌を分離し、その中でもSMM-7株は50ppmFADに対して3日間で完全に減少した。続いて、SMM-7株の高濃度FADに対する影響を調査したところ、300ppmFADの条件まで増殖が観察された。また、300ppmFADで株を繰り返し培養し馴化をすることで、続けて増殖不可能だった500ppmFADでも増殖が観察された。さらに、同様の方法により500ppmFADで馴化した後、750ppmFADで適応させることが出来た。以上のことからSMM-7株は低濃度での増殖と顕著な分解が観察され、さらに順次馴化させることにより、高濃度のホルムアルデヒドで適応し増殖可能なことが確認された。