

静岡県伊豆半島沿岸海水より単離された真正細菌のホルムアルデヒド分解能に関する研究

石井 洋*1・吉田宏亮*2・井上亮一*3・山田芳弘*4・齋藤 寛*5・岡田喜裕*5

Formaldehyde degradation capability of the aerobic bacteria isolated from the Izu Peninsula, Shizuoka

Hiroshi ISHII, Kosuke YOSHIDA, Ryoichi INOUE, Yoshihiro YAMADA,
Hiroshi SAITO and Yoshihiro OKADA

Abstract

Formaldehyde is a highly toxic chemical for all organisms, and it has recently been found as effluent from industrial waste water to marine environment. The aims of this study were to investigate the effect of 10ppm formaldehyde on the microbial communities isolated from five coastal sea water samples, collected from the Izu Peninsula, Japan. Rapid decrease of formaldehyde concentration was only observed in a raw sample at the Kifu area of Numazu city, but no decrease of this boiled sample. Six bacterial strains were isolated from the Kifu area by using spread plate method. Effects of concentrations of 10ppm formaldehyde on each pure-cultured bacterial strain were investigated in batch cultures. During the first 3 days, ca. 95% (v/v) of formaldehyde was rapidly decreased by three bacterial strains (BR-41, ZB-51, and T1+1). When the formaldehyde was used as sole carbon source in the M9 medium, these strains were not able to grow in the absence of glucose. However in the presence of glucose, 10ppm formaldehyde did not inhibit the growth of the strain BR-41. And rapid decrease of formaldehyde concentration was observed, indicating that the tolerance to 10ppm formaldehyde of strain BR-41 was occurred in M 9 medium. Furthermore, in case of addition the trace metals to M 9 medium including 10ppm formaldehyde concentration, the strain BR-41 was able to grow well and the 90% (v/v) of formaldehyde was decreased of within 12h of the incubation. The formaldehyde-resistant strain BR-41 was classified to the family Alteromonadaceae by 16S rRNA gene sequence analysis.

Keywords: Formaldehyde, Biodegradation, Aerobic bacterium

1. はじめに

ホルムアルデヒドは刺激臭のある窒息性の無色の気体であり、水に非常に溶けやすく、きわめて弱い酸性を示す物質である。一般には35~37%の水溶液に調製されたホルムアルデヒドとして扱われ、標本保存用の試薬として用い

られることがよく知られている。ホルムアルデヒドは、ヒトの健康に悪影響を与えることがあり、その揮発性の高さから眼や鼻、呼吸器などに刺激を与え涙が流出したり、吸引すると口内の粘膜が刺激され炎症を起こしたりする。さらに皮膚に付着すると皮膚の硬化が起こり、ひび割れが生じるなどの有害性を示す。また住宅内で発生する化学物質などが原因で起こるシックハウス症候群が近年問題になっ

2007年1月24日受理

*1 東海大学海洋学部清水教養教育センター・非常勤講師 (General Education Program Center, Shimizu Campus)

*2 東海大学大学院連合大学院地球環境科学研究科地球環境科学専攻 (Doctor's Course of Earth and Environmental Science, Earth and Environmental Science, Tokai University)

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

*4 ヤマダユニア株式会社 (YAMADA YUNIA Co., Ltd.)

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

ており、その化学物質のうち接着剤、塗料、防腐剤などに原材料として添加されているホルムアルデヒドが、主な原因物質として挙げられている (Liteplo and Meek, 2003)。このようなことから厚生労働省では室内のホルムアルデヒド濃度の基準値を $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ としている。さらに、国際癌研究機関 (IARC) の評価では、ヒトに対して“恐らく発がん性があるとする物質”に分類されており (IARC, 1995)、米国環境保護庁 (EPA) でもホルムアルデヒドを発がん性物質であろうと分類している。また、ホルムアルデヒドは、遺伝障害性 (Grafström, 1990, Grafström *et al.*, 1993) が認められている物質でもある。このようなことから、ホルムアルデヒドは直接または、食物連鎖によって人体にも影響を与える可能性があるとして示唆されている。

ホルムアルデヒドは、他の分子と容易に結合し反応性に富むことから合成樹脂、いわゆるプラスチックなどの重要な工業物質の材料として使われている。また、分子構造が単純なことから、比較的簡単に合成ができ、工業的に大量生産が可能なことから市場では低価格で流通し、様々な用途で利用される極めて重要な工業原料である。国内のホルムアルデヒドの生産高は、毎年100万t以上にも達する (Mitsui *et al.*, 2005)。2004年度の PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) のデータによれば、1年間に1万6千tが環境中に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。一部のホルムアルデヒドは、雨水に溶解し、土壌や河川などに沈着する。その後、産業排水や家庭排水などに含まれるホルムアルデヒドと同様に、最終的には海水中に流れ出すと考えられている。水域においては、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 Chemicals) 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、水質では30%以上の値を示している。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 $12\mu\text{g}/\text{l}$ を示している (環境省, 1999)。これは同じ年のホルムアルデヒドの総生産量が126万tに達していることから、排出量の増加がその検出濃度上昇の1つの原因になったと考えられる。また、本研究室においても、2003年から2005年の2年間で、特に西日本沿岸域を中心に海水中に含まれるホルムアルデヒドの濃度を調査してきた (岡田, 2005)。その結果、長崎県島原市新田町沿岸と熊本県熊本市新港海浜公園沿岸の海水からはホルムアルデヒドが未検出であったが、熊本県天草諸島沿岸域の海水からは、 $1.0\text{mg}/\text{l}$ 前後の高濃度のホルムアルデヒドが検出されている (岡田, 2005)。最も高い検出濃度を示したところでは、 $1.7\text{mg}/\text{l}$ に達した (岡田, 2005)。これら海水中のホルムアルデヒド検出濃度は、沿岸域による排出量の違い、または、沿岸

域全体の濃度水準の上昇が考えられ、ホルムアルデヒドによる環境の悪化が徐々に進行していると推測される。ホルムアルデヒドは、前述したように高い反応性を持つため、海水に溶解したのち浮遊物質や懸濁粒子などに吸着または化学反応し、別の物質に変化しやすく、単独の物質として検出されにくい。また、本研究室の調査においても、海水中に放出されたホルムアルデヒドは、浮遊物質や低泥などへ吸着と脱離が繰り返し起こる可能性を示唆している (岡田, 2005)。さらに沿岸域の海水中に溶解しているホルムアルデヒドの動態として、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、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、養殖では養殖魚に付く寄生虫や鰓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、規制の対象物とされていた。しかし、実際は2003年4月にトラフグの養殖において、鰓に付く寄生虫の駆除で使用されていたことが表面化しており、その規制はなく、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.*, 1940; Case and Benevenga, 1977)。ゆえに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、C1化合物資化性微生物がよく知られている (Mateles and Battat, 1974)。そこで本研究では、伊豆半島沿岸域より海水の採水を行い、その海水中に生存する細菌類の中で、ホルムアルデヒドの分解能を有する細菌を単離し、その特性について調査した。

2. 材料と実験方法

2.1 海水試料

海水試料の採水地点を Fig. 1 に示す。各地点での採水

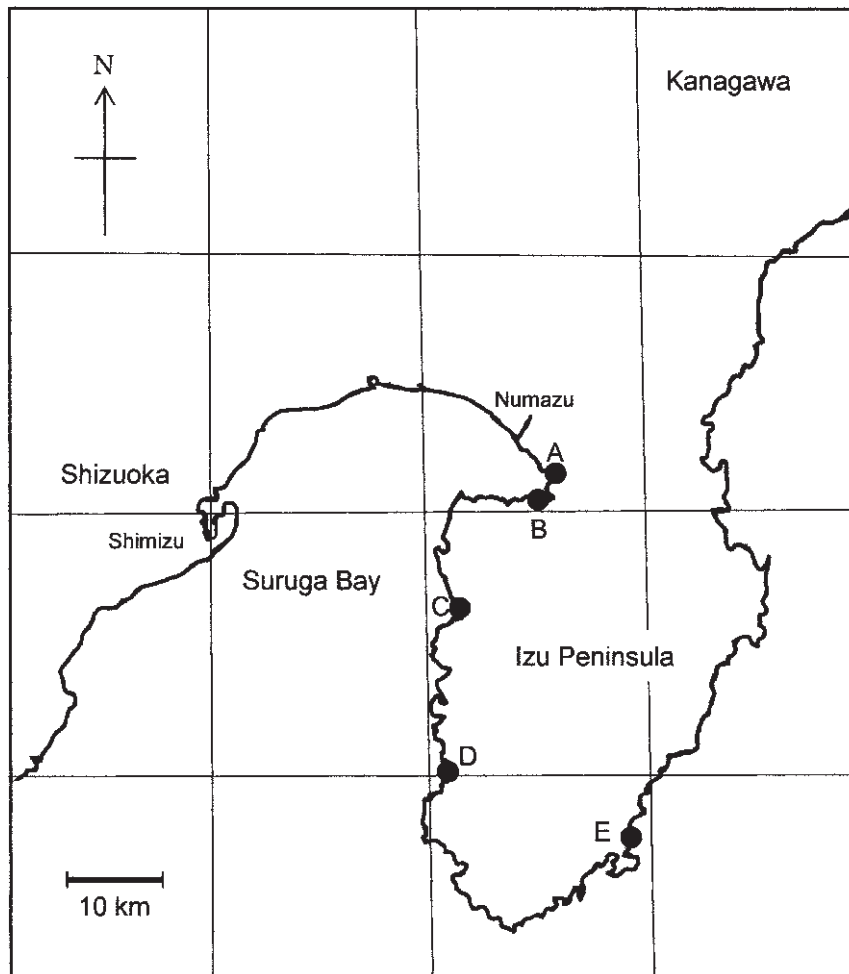


Fig. 1 Location of the sampling area in the Izu Peninsula.

A: Awasima, Izunagaoka Town, B: Kifu, Numazu City,
 C: Toi port, Toi Town, D: Matsuzaki port, Matsuzaki Town,
 E: Ishikiguchi, Izushimoda City.

に関しては、表層水（約0.5-1m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、低温下で搬送した。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0.5~1l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、暗黒下で静置し保存した。

2.2 海水試料へのホルムアルデヒドの添加

採集した各地点での海水100mlを予めオートクレーブ（121°C, 1.2気圧, 20分間, SS-235, TOMY）滅菌したものと滅菌していないものを用意し、各々を滅菌済みの綿栓付きの200ml三角フラスコに添加した。さらにホルムアルデヒドの濃度が10ppmになるように添加し調製した。調製した海水試料は、25°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、140r.p.m（旋回）で振とうした。ホルムアルデヒ

ド濃度の経時的な変化の確認はパックテスト（WA-FOR, KYORITSU CHEMICAL-CHECK Lab., Corp.）により行った。

2.3 ホルムアルデヒド分解能を有する真正細菌の分離

2-2の実験結果より、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定量的に希釈し、その希釈液100 μ lを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°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吊り上げ、新しい寒天培

地に接種し単一株の単離を行った。

2.4 単離株のホルムアルデヒド分解能

各海水試料より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6株(ZB-53, BR-41, T1+1, BR-522, BR-521, ZB-51)の維持は、有機栄養培地(5.0g Tryptone, 1.0g Yeast extract, 30g NaClを1lの蒸留水に溶解した)を用いて純粋培養により行った。実験使用時には、予め前培養としてM9最少培地を用いて2, 3回の植え継ぎを繰り返し行い馴化させた。細胞懸濁液の採取は、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10ppmになるように培地の濃度を調製した。そして各々の菌体の細胞懸濁液を、一定の濁度($A_{660}=0.05$)になるように接種した。細胞濁度の測定は、菌体を接種した時間を0時間とし、一定時間毎に3から5mlの細胞懸濁液を採取し、分光光度計(U-3210, HITACHI)により、吸収波長660nmの値を測定した。この測定値を細胞の濁度とし、 A_{660} とした。本実験に用いたM9培地は、6gNa₂HPO₄, 3gKH₂PO₄, 0.5gNaCl, 1gNH₄Clと2mlの1MMgSO₄・7H₂O, 0.1mlの1MCaCl₂・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)。

ホルムアルデヒド濃度の経時的な変化は、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°Cで10分間加熱した後、氷水で冷却した。得られた反応液は吸収波長415nmの値を測定し、その測定値を A_{415} とした。

2.5 単離株(BR-41, ZB-51, T1+1)の炭素源の有無によるホルムアルデヒドの分解

ホルムアルデヒドの分解能が特に顕著に観察された3株(BR-41, ZB-51, T1+1)を用いて、培養液中に炭素源としてグルコースを添加、または無添加の条件で、ホルムアルデヒドの減少と各菌体数を測定し、ホルムアルデヒドの菌体増殖に与える影響について検討した。予め前培養を行って馴化させた各菌体を、グルコースが添加されたM9培地と、添加されていないM9培地に一定の濁度になるように接種した。培地中のホルムアルデヒドの検出はNash-ホルムアルデヒド法により行い、細胞濁度は吸収波長660nmの値を測定し、その測定値を A_{660} とした。

2.6 BR-41株における培地成分の違いによるホルムアルデヒドの分解

BR-41株を用いて、培養液に各種微量元素を添加し、ホルムアルデヒドの減少と菌体の増殖に与える影響につい

て検討した。微量元素は、FeCl₃, FeSO₄・7H₂O, Na₂WO₄・2H₂O, をそれぞれ 3.7×10^{-3} mM, 3.6×10^{-3} mM, 3.0×10^{-3} mMになるように調製し、微量金属混合溶液(4.4g Na₂EDTA・2H₂O, 11.7mM FeCl₃・6H₂O, 0.0427 mM CoSO₄・7H₂O, 0.0730mM ZnSO₄・7H₂O, 0.910mM MnCl₂・4H₂O, 0.0280mM CuSO₄・5H₂O, 0.0289mM Na₂MoO₄・2H₂Oを1lの蒸留水に溶解)はM9培地に1ml/lの濃度で調製した。予め前培養を行い馴化したBR-41株を、調製された各M9培地に一定の濁度になるように接種した。培地中のホルムアルデヒドの検出はNash-ホルムアルデヒド法により行い、細胞濁度は吸収波長660nmの値を測定し、その測定値を A_{660} とした。

2.7 分解菌の同定

ホルムアルデヒドに対して分解能を示したBR-41株の同定に関しては、株式会社エヌシーアイエムビー・ジャパン(NCIMB Japan CO., LTD)に依頼し、次の方法で行われた。バクテリアの分子識別法としてバクテリア間の類似性や系統的な位置付けの検討に利用される16S rRNA遺伝子(16S rDNA)による分類法を用いてバクテリアの同定が行われた。Puregene Kit (Gentra Systems, Menneapolis, MN, U.S.A.)を使用し、BR-41株からDNAの抽出が行われ、次にBR-41株の16S rRNAはPCR法(Hanzawa *et al.*, 1995)により増幅し、塩基配列の決定を行なわれた。遺伝子解析ソフトウェア CLUSTAL W (Tompson *et al.*, 1994)を用いて進化距離を算出し、近隣結合法(Saitou and Nei, 1987)により系統樹が作成された。系統樹における樹型の系統的信頼度は、ブーツストラップ法($\times 1000$)による検定で行われた。

3. 結果と考察

本実験では、主に家庭からの廃液などによるホルムアルデヒドの流出が考えられている伊豆半島沿岸域の5箇所から採集した海水試料について生物学的な要因の有無について調査した(Fig. 1)。その結果、5箇所のうちB地点(沼津木負)で唯一ホルムアルデヒドの減少が顕著に現れた(Table 1)。また、B地点の海水試料を、滅菌と滅菌しない場合でホルムアルデヒド濃度の減少をバックテストにより検討したところ、滅菌しない場合では96時間後のホルムアルデヒド濃度が1.0ppmを示し、さらに288時間後の測定では0.30ppmの低濃度まで減少した(Table 2)。一方、滅菌した場合のホルムアルデヒド濃度は、288時間後においても2.0ppm以上残存しており、滅菌しない場合と比較して、顕著な濃度の減少は観察されなかった(Table 2)。これは、他の海水試料の結果と比較しても、B地点の海水試料のみに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た。次に、B地点の海水試料中に現存するホルムアルデヒドの減

Table 1 Biodegradation of formaldehyde under aerobic conditions in seawater samples with pack test.

A: Awasima, Izunagaoka Town, B: Kifu, Numazu City,
 C: Toi port, Toi Town, D: Matsuzaki port, Matsuzaki Town,
 E: Ishikiguchi, Izushimoda City.

St.	TotalHours (h)	Formaldehyde concentration (ppm)
A	288	2.0<
B	288	0.3
C	288	2.0<
D	288	10
E	288	2.0<

Table 2 Biodegradation of formaldehyde under aerobic conditions in seawater (Kifu, Numazu City) with pack test.

Hours	Boiled Seawater	Non-boiled Seawater
	Formaldehyde concentration (ppm)	
0	10	10
48	2.0<	2.0<
96	2.0<	1.0
144	2.0<	0.75
288	2.0<	0.30

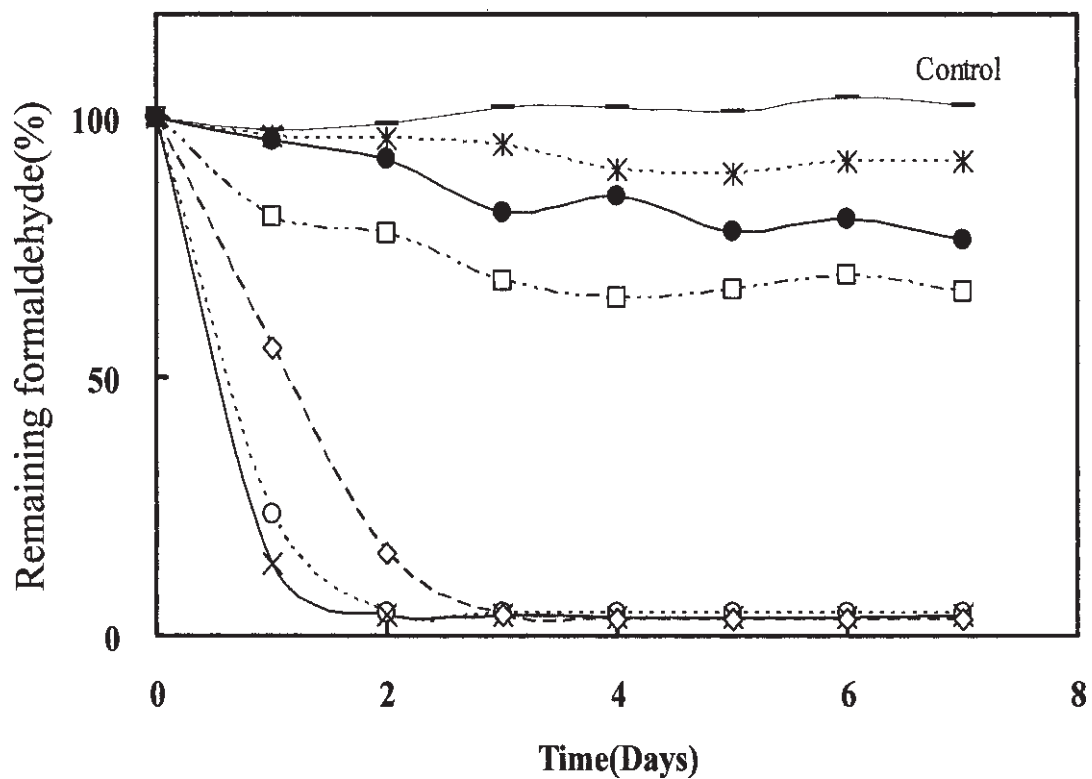


Fig. 2 Degradation process in presence of 10ppm formaldehyde in sterilized seawater, Formaldehyde concentration in the culture medium with ZB-53 (x), BR-41 (o), T1-1 (◇), BR-522 (□), BR-521 (●), BR-51 (*), and control (-) are shown.

少に関与している細菌の分離を行った。その結果、寒天上に形成したコロニーの色、または形状などの違いから、6種類の細菌をそれぞれ単独で単離することができた。それら単離株において純粋培養を行い、個々の株において10 ppmホルムアルデヒドの減少について検討した (Fig. 2)。単離された6株の中で3株 (T1+1, BR-41, ZB-53株)

について、ホルムアルデヒドの減少が観察された。特に、BR-41とZB-53の2株は、実験開始直後から急激な減少が観察され、2日目には約95%のホルムアルデヒドの減少が確認された (Fig. 2)。動植物の生体内では、代謝過程でホルムアルデヒドが生成され、生体に有害なホルムアルデヒドを分解するために、ホルムアルデヒド分解酵素が

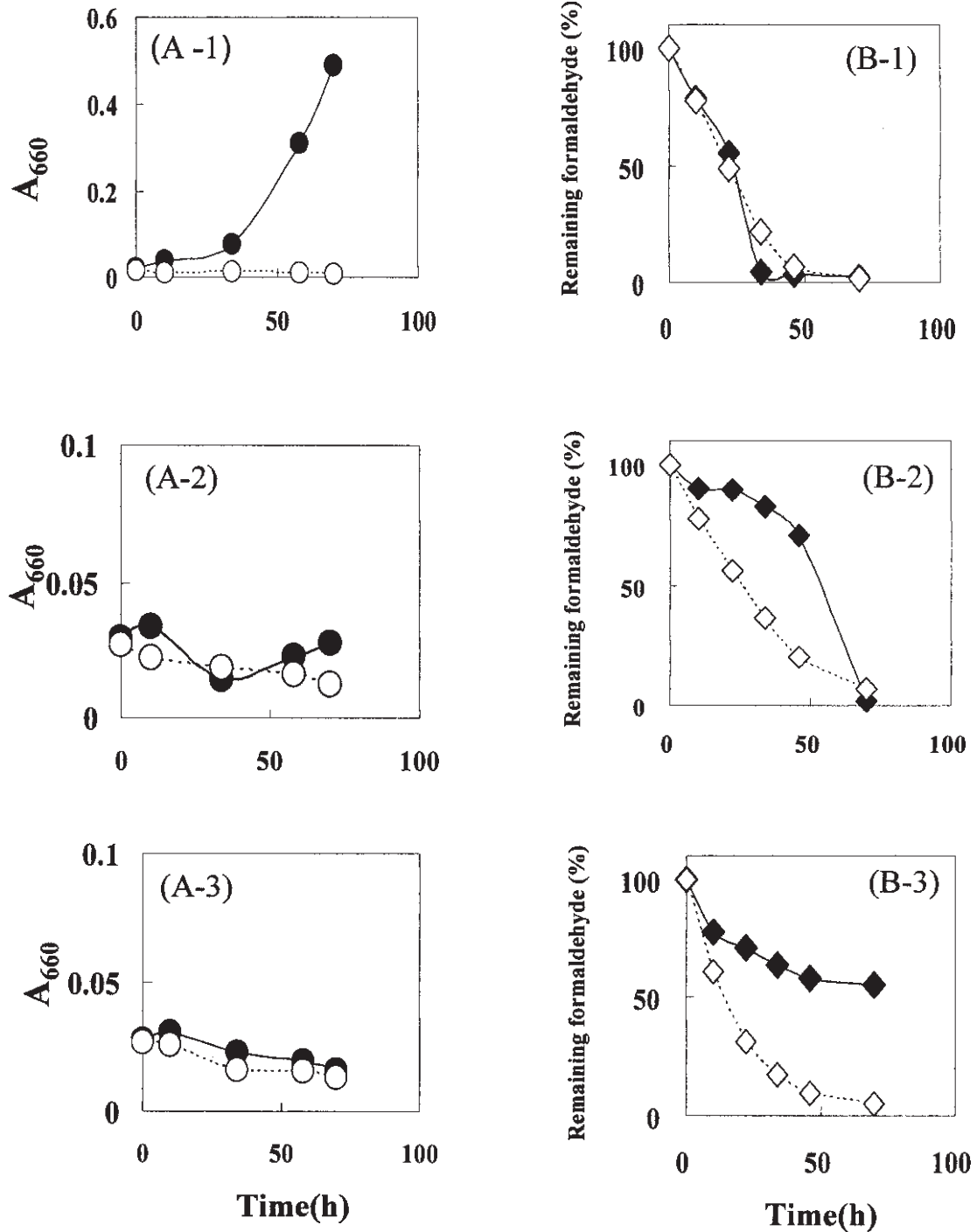


Fig. 3 Cell growth (A) and formaldehyde degradation (B) of the isolated species in the M9 media with (● or ◆), or without (○ or ◇) addition of glucose.

(A) Growth of BR-41 (1), ZB-51 (2), and T1+1 (3) are shown.

(B) The change of formaldehyde remaining percentage in the M9 media.

合成され作用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いる (Mateles and Battat, 1974). また、ホルムア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). そこで、ホルムアルデヒド

の減少が確認された3株について、炭素源として利用している可能性について検討するため、グルコースの有無の条件で実験を行った。T1+1株とZB-53株については、M9培地中の炭素源であるグルコースの有無にかかわらず、ホルムアルデヒドの経時的な減少にともなう細胞の増殖は確認できなかった (Fig. 3). 一方、BR-41株においては、

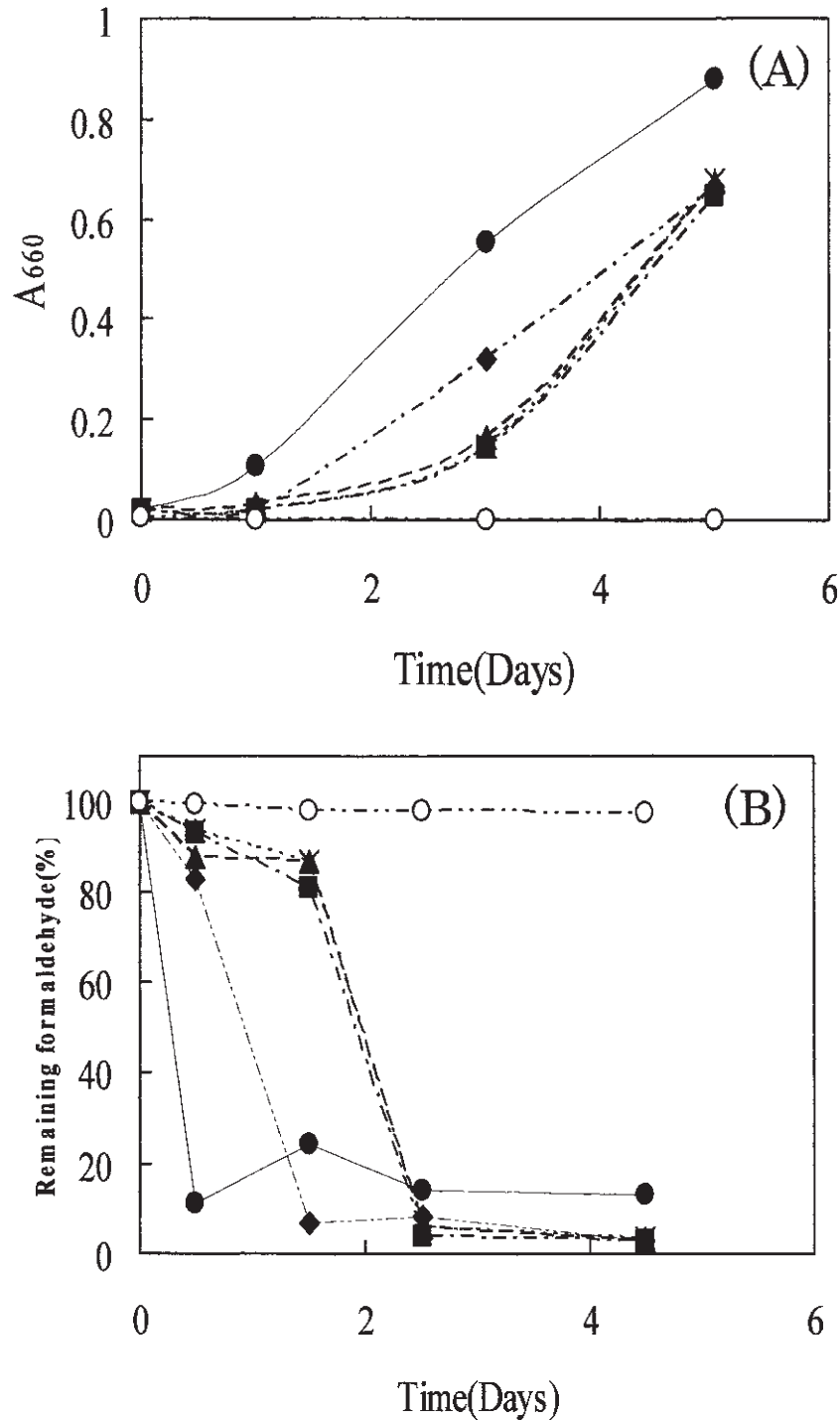


Fig. 4 Effect of different composition of the M9 medium on BR-41 strain growth curves (A) and the degradation of formaldehyde (B). Symbols: M9 medium with addition of FFe⁺³ (■), Fe⁺² (▲), Na₂WO₄ (*), trace mixtures (●), or control (◆) (without addition). Open circle (○) symbols are free-cells medium.

グルコースの存在下のみで、ホルムアルデヒドの減少と細胞の増殖が観察された (Fig. 3)。しかし、BR-41 株においてもグルコースの無添加条件では増殖せず、ホルムアルデヒドを唯一の炭素源としての利用については確認できなかった。

生体内でのホルムアルデヒドの分解において、ホルムアルデヒド分解酵素の作用に補酵素の関与が示唆されており (Johnson *et al.*, 1993; Waters *et al.*, 2003)、いくつかの微量元素が、この作用に補酵素的な役割を示す可能性が考えられる。今回使用した M9 培地には、細菌の生育可能な構成成分の添加に限られており、ホルムアルデヒド分解に関与している他の培地成分の必要性が考えられる。そこで、本実験では Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na_2WO_4 、微量元素混合液を M9 培地にそれぞれを添加し、BR-41 株の増殖と、ホルムアルデヒドの減少を観察した。また、これらの4種類の金属物質においては、BR-41 株を接種しない条件でホルムアルデヒドに対して吸着または分解作用が起こらないことを確認して使用した。その結果、特に微量元素混合溶液を添加した M9 培地において、12時間以内に約 90% のホルムアルデヒドの減少が観察された (Fig. 4)。さらに増殖については、M9 培地のみで培養した場合と比較して急激な増殖が観察された (Fig. 4)。これは、微量元素混合溶液中の金属がホルムアルデヒドの分解過程、もしくは BR-41 株の生育に必要な必須元素が存在し、ホルムアルデヒドを炭素源として利用している可能性が示唆された。

PRTR のデータによると、全国の沿岸域のホルムアルデヒドの排出量は、特に都市部を中心にホルムアルデヒドの

分布が高く、産業排水、家庭排水の影響によるものだと考えられる (環境省, 2004)。しかし、毎年、ホルムアルデヒドの各沿岸域の濃度は比較的低い濃度で安定している。水域におけるホルムアルデヒドの低濃度の主な原因としては、その大部分が海水中で起こる自浄作用により消失していると考えられる。その作用には、ホルムアルデヒドの水に対する溶解度と反応性の高さなどから、海水中で即座に浮遊物に吸着したり、他の物質と反応したりして変化する化学的な作用と、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による生物学的な作用が挙げられる。このことは、本実験の都市部や他の高濃度ホルムアルデヒドが検出される沿岸域と比較して、非常に検出濃度が低い伊豆半島沿岸域から採取した海水中に、ホルムアルデヒドを分解する細菌が検出された結果と一致する (Fig. 2)。ホルムアルデヒドの自浄作用には、細菌類が生物学的な要因として深く関与し、広く分布していると考えられる。本実験では、特に BR-41 株が微量元素の存在下でホルムアルデヒドの分解に関与している可能性が示唆された。このことから BR-41 株を 16S rRNA の遺伝子解析により同定を行った。その結果、系統樹上では Alteromonadaceae 科に属することが判明したが、それ以下の属名と種小名の同定までは至らなかった (Fig. 5)。最も近隣に位置したのが *Alteromonas macleodii* であり (Fig. 5)、現在、これらの属ではホルムアルデヒドの分解に関与している細菌は報告されていないことから、さらに属と種小名の同定が必要であると考えられる。

今後、より高濃度のホルムアルデヒドを分解できる細菌

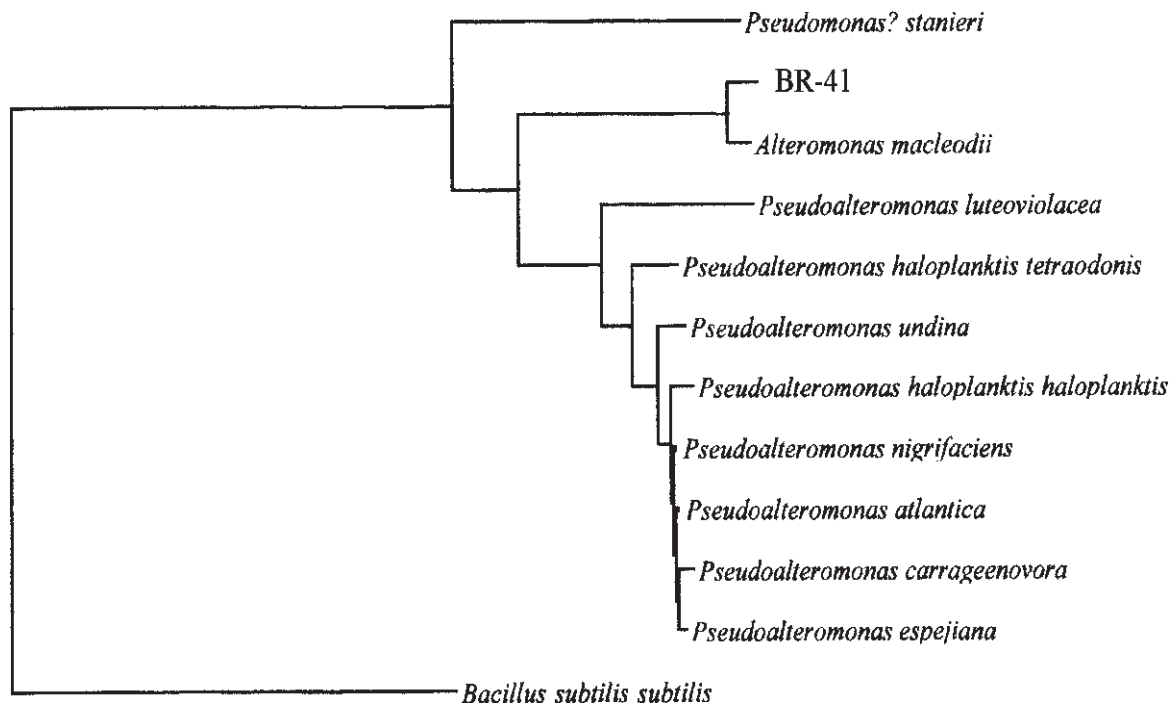


Fig. 5 A phylogenetic 16S rRNA-based tree showing relationships between the strain BR-41 and selected members of the *Pseudoalteromonas* species.

の検索や、単離された細菌の高濃度ホルムアルデヒドへの適応能の強化が行えれば、それら細菌を用いたホルムアルデヒドの浄化が可能になるであろう。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本稿の作成にあたり、当時、東海大学大学院海洋研究科生物科学専攻在籍、現在、東西化学産業株式会社技術開発部名古屋技術課の岡田裕樹氏にご協力して頂き、心から感謝いたします。

また東海大学海洋学部清水教養教育センター 中山隆雄教授、小林幸夫教授には懇切丁寧にご教示を賜り深く感謝致します。

参考文献

- 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.
- Grafström, R.C (1990): In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **238**, 175-184.
- Grafström, R. C., I. C. Hsu and C. C. Harris (1990): Mutagenicity of formaldehyde in Chinese hamster lung fibroblasts: synergy with ionizing radiation and N-nitroso-N-methylurea. *Chem. Biol. Interact.*, **86**, 41-49.
- 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.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1989): Formaldehyde, *Environmental Health Criteria*, **89**, p.219 World Health Organization, Geneva.
- Johnson, J. L., K. V. Rajagopalan, S. Mukund and M. W. W. Adams (1993): Identification of molybdopterin as the organic component of the tungsten cofactor in four enzymes from hyperthermophilic archaea. *J. Biol. Chem.*, **268**, 4848-1852.
- 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 formaldehyde: exposure estimation, hazard characterization, and exposure-response analysis. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, **6**, 85-114.
- Mitsui R., M. Omori, H. Kitazawa and M. Tanaka (2005): Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic analysis related to C1 Metabolism. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**(1), 18-22.
- Mateles, R. I. and E. Battat (1974): Continuous culture used for media optimization. *Appl. Microbio.*, **28**, 901-905.
- Nash T. (1953): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55** (3), 416-421.
- 岡田裕樹 (2005): 海洋におけるホルムアルデヒド問題に関する研究. 東海大学大学院 海洋学研究科 海洋生物科学専攻 修士論文.
- Saitou, N. and M. Nei (1987): The neighbor-joining method: a new method for Reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- 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.
- Waters, t. R. A. J. O'Hair, and A. G. Wedd (2003): Catalytic gas phase oxidation of methanol to formaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3384-3396.
- WHO (1989): Environmental health criteria for formaldehyde. pp.11-96, In "Environmental Health Criteria" No. 89, ed by WHO, Geneva.

要 旨

ホルムアルデヒド (FA) は、生体に高い毒性を示す物質であり、日本沿岸海域では、産業排水などからの流出により海洋生物への影響が懸念されている。本研究では、伊豆半島沿岸域より採取した5種類の海水に10ppm FAを添加し、海水中の微生物に対する影響を調査した。その結果、木負地区サンプルにおいてFAの減少が観察された。その海水から希釈法により6株の細菌を分離し、各株を10ppm FAに調製した培地中に接種し、その影響の有無を観察した。その結果、3株 (BR-41, ZB-51, T1+1) においてFAは3日間に約95%の減少が観察された。しかし、唯一の炭素源としてFAのみを添加した場合には、各株とも細胞増殖は観察されなかった。一方、他の炭素源としてグルコースを加えた場合、BR-41株は、10ppm FAに対して耐性を示し、細胞増殖が観察された。さらに、BR-41株は微量金属元素を添加した場合には、速い細胞増殖に伴うFAの急激な減少が観察され、12時間以内に90%が減少した。BR-41株については16S rRNA遺伝子による解析を行った。その結果、Alteromonadaceae科に属することが推定された。

キーワード：ホルムアルデヒド，生物学的分解，好気性細菌