

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12368

研究課題名(和文) 極小プラスチックに付着した有機汚染物質の微生物食物連鎖を介した生物増幅機構の解明

研究課題名(英文) Studies on involvement of microbial food chain in biomagnification of organic pollutants accumulating on the surface of nanoplastics

研究代表者

多羅尾 光徳 (Tarao, Mitsunori)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60282802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小プラスチック表面に形成されたバイオフィームに有機汚染物質が吸着することを明らかにした。また、バイオフィームが形成されたプラスチックは動物プランクトンによって摂食されやすいことを明らかにした。しかし、バイオフィームが形成されたプラスチックを摂食した動物プランクトンに有機汚染物質が蓄積するという明確な証拠は得られなかった。これは、動物プランクトン体内における微小プラスチックの滞留時間が1時間未満と短いためであった。さらに、細菌細胞表面の疎水性が低いほうが、多くの有機汚染物質を吸着する傾向が明らかとなり、細菌への有機汚染物質の吸着に細胞表面構造が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロプラスチックに吸着した有機汚染物質が、それを摂食した生物の体内に移行する事例が最近になって報告されている。しかし、マイクロプラスチックに形成されたバイオフィームが有機汚染物質の生物増幅に及ぼす影響を検証した例は報告されていない。本研究の学術的意義は、プラスチック表面のバイオフィームが有機汚染物質を吸着することを初めて明らかにしたこと、およびプラスチックを摂食した生物への有機汚染物質の移行にバイオフィームが及ぼす可能性を検討したことであり、プラスチックを介した有機汚染物質の生物への蓄積メカニズムを明らかにするうえで、新たな知見を提供し、今後の研究の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study elucidated that (i) biofilm on the microplastic surface adsorbs organic pollutants and (ii) zooplankton grazes more microplastics with biofilm than without biofilm. However, this study could not elucidate the accumulation of organic pollutants in the zooplankton (*Daphnia magna*), which grazed microplastics coated with biofilm. The reason is that the retention time of the microplastics in zooplankton's intestine is as low as less than one hour. Moreover, the lower the bacterial cell surface hydrophobicity is, the higher the cell adsorbs organic pollutants. This result suggests the involvement of cell surface structure in organic pollutant adsorption.

研究分野：環境微生物学

キーワード：マイクロプラスチック バイオフィーム 食物連鎖 微量有機汚染物質 生物濃縮 ポリ塩化ビフェニル 細胞表面疎水性 *Daphnia magna*

## 1. 研究開始当初の背景

生物増幅 biomagnification とは、食物連鎖を介して高次の栄養段階の生物体中に、汚染物質が高濃度に蓄積することである(水川・高田 2015)。環境中の汚染物質の濃度がきわめて低濃度の場合においても、高次の栄養段階の生物種には高濃度に蓄積しうるため、それら生物種に対して毒性を発揮することがある。また、環境中における汚染物質の移動や分布にも影響する。

水界環境における生物増幅については、生食連鎖を介する経路がよく知られている。すなわち、植物プランクトン→動物プランクトン→高次捕食者→…、とつながる食物連鎖系である。ところが近年、この生食連鎖を通じた生物増幅に、プラスチックが関与することが明らかとなりつつある。すなわち、水界に「ごみ」として存在するプラスチックが周囲からポリ塩化ビフェニル(以下、PCBs)や DDT などの有機汚染物質を吸着し、それを海鳥・魚類が誤って摂食し、それら生物種の体内に汚染物質が蓄積される(山下 2016)。特に、粒径が 5 mm 以下の微小プラスチックは、小型の魚類・稚魚や貝類など低次の栄養段階の生物に捕食されるため、汚染物質が高次の捕食者に、さらに高濃度に蓄積することが懸念されている。さらに、粒径が数十  $\mu\text{m}$  の極小プラスチック(ultramicroplastic, 以下 UMP)はミジンコなどの動物プランクトンが誤食することが知られており、UMP の物理的な影響により成長や繁殖が影響を受けることが報告されている(An *et al.*, 2021; Na *et al.*, 2021; Rosenkranz *et al.*, 2009)。しかし、UMP に吸着した有機汚染物質が動物プランクトンに生物増幅されるかは、いまだ明らかではない。

一方、水界環境における食物連鎖系には、生食連鎖以外の経路も存在する。すなわち、溶存有機物→細菌→原生動物→動物プランクトン→…、とつながる微生物食物連鎖である。この食物連鎖系を介した生態系における生元素のフローは、生食連鎖を介したフローに匹敵するか、それを上回ることが明らかとなっている。このことは、自然界には微生物食物連鎖を介した生物増幅の経路も存在することを予想させる。実際に、室内実験においては、細菌に吸着された汚染物質が捕食者である原生動物に生物増幅された例が、数は非常に少ないものの、報告されている(Hudson *et al.* 2005; 瀬戸・本間 1991; Vogel and Fisher 2009)。しかし、これら報告では細菌が単位バイオマスあたりに吸着する汚染物質質量に大きな変動があり、その理由が明らかとなっていないため、微生物食物連鎖が高次栄養段階の生物増幅にどの程度寄与しているかを数量的に評価するまでには至っていない。

また、微生物食物連鎖を介した生物増幅は、プラスチックを通じた食物連鎖との関わりも考慮する必要がある。海洋に浮遊・堆積しているプラスチックの表面には微生物膜(バイオフィーム)が形成されることが多く、“Plastisphere”とも呼ばれている(Reisser *et al.* 2013)。プラスチック表面にバイオフィームが形成されると、バイオフィームにも有機汚染物質が吸着することが予想される。そして、これを捕食する動物プランクトンや魚介類にバイオフィーム由来の有機汚染物質が生物増幅される可能性がある。しかし、これを検証した研究例は報告されていない。

## 2. 研究の目的

以上を踏まえて本研究では、有機汚染物質を吸着した UMP や、その表面に付着するバイオフィームに有機汚染物質が蓄積し、それらを摂食した動物プランクトンに有機汚染物質が生物増幅するとの仮説を立て、これを検証し、UMP を起点とした生物増幅における微生物食物連鎖の寄与を評価することを目的とした。具体的には以下の 4 つのサブ仮説を設定し、これらを検証することにより、上記の仮説の妥当性を検討した。

### サブ仮説 1: プラスチックに形成されたバイオフィームに有機汚染物質が吸着する

まず、バイオフィームが有機汚染物質を吸着するか検証するため、プラスチック表面に形成されたバイオフィームに有機汚染物質を曝露し、吸着量の差を評価した。さらに、有機汚染物質の濃度とバイオフィームへの吸着量の関係、およびバイオフィームへの吸着量とプラスチックへの吸着量を比較した。

### サブ仮説 2: バイオフィームの有無が動物プランクトンによる UMP の摂食量に影響する

動物プランクトンは、餌となる粒子を摂食する際、粒子表面を識別すると考えられている(Donaghay & Small, 1979; Huntley *et al.* 1983)。プラスチック表面にバイオフィームが形成されると、一部の海洋性カイアシ類がプラスチックを摂食するという例が報告されている(Vroom *et al.* 2017)。そこで、バイオフィームの存在が UMP の生物利用性を高めると考え、バイオフィーム有りまたは無しの UMP を動物プランクトンに曝露し、UMP の摂食数・速度を比較した。

### サブ仮説 3: バイオフィームの有無が動物プランクトンに蓄積する有機汚染物質質量に影響する

バイオフィームに吸着された有機汚染物質は、UMP 自体に吸着された汚染物質よりも生物利用性が高いと考えられる。そこで、有機汚染物質を吸着したバイオフィーム有り UMP を動物プランクトンに曝露し、動物プランクトンに蓄積される汚染物質質量を、バイオフィーム無し UMP に曝露した場合と比較した。

### サブ仮説 4: 細菌の表面疎水性と比表面積が細菌に蓄積される有機汚染物質質量と関連する

細菌が単位バイオマスあたりに吸着する有機汚染物質質量が異なる理由として細胞表面の疎水性が関与していると想定し、細菌表面疎水性と有機汚染物質吸着量との関連を検討した。また、細菌と有機汚染物質の接触機会が多いほうが生物濃縮されやすいと考え、細菌の比表面積(バイオマスあたりの表面積)と汚染物質吸着量との関連を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) プラスチックに形成されたバイオフィームへの有機汚染物質の吸着

モデル有機汚染物質には、フェノキシ系除草剤の基本骨格であり内分泌攪乱物質でもある 2,4-dichlorophenol (以下, DCP) を用いた。バイオフィーム形成能を有する細菌である *Pseudomonas aeruginosa* を培養した培地に、粒径 4 mm のポリプロピレン製ペレット (以下, PP) または粒径 4 mm のガラス製ビーズ (以下, GB) を加え、暗所 25°C で振とうしながら 3 日以上培養し、これらの粒子の表面にバイオフィームを形成させた。次に、これらバイオフィーム有りの PP 100 個または GB 50 個を、DCP を 0.1 mg C L<sup>-1</sup> 含む無機培地 20 mL に加え、さらに暗所 25°C にて 24 時間、静置培養した。培養期間中、PP または GB への DCP 吸着量を経時的に測定した。対照としてバイオフィーム無しの PP または GB への吸着量を測定した。また、DCP を 0.1~30 mg C L<sup>-1</sup> 含む無機培地にバイオフィーム有りまたは無しの GB を加え、培養 2 時間後の両者の DCP 吸着量の差からバイオフィームへの吸着量を求め、吸着等温線を作成した。さらに、DCP を 0.1~1 mg C L<sup>-1</sup> 含む無機培地にバイオフィーム有りまたは無しの PP を加え、培養 24 時間後のバイオフィームおよび PP への DCP 吸着量を求めた。なお、PP および GB への DCP 吸着量はこれらビーズの添加前後の培地中の溶存 DCP 濃度の差分から算出した。また、DCP 濃度は高速液体クロマトグラフィにて測定した。

#### (2) バイオフィームの有無が動物プランクトンによる UMP の摂食量に及ぼす影響

モデル動物プランクトンには、*Daphnia magna* (オオミジンコ。国立環境研究所環境リスク健康研究センター (NIES) より分譲) を用いた。バイオフィーム有りの UMP は、*Chlorella vulgaris* NIES-641 株を培養している無機培地に粒径 38~45 μm のポリエチレン製ビーズを懸濁し、明暗条件下 (550 lux, 12hr./12hr.), 15°C にて 20 日間培養して得た。

無機培地 150 mL に 6 日齢 (体長, 1.5~2.0 mm) または 12 日齢 (2.5~3.0 mm) の *D. magna* を 10 個体、バイオフィーム有りまたは無し UMP を 10 mg L<sup>-1</sup>, および *C. vulgaris* を 6.5×10<sup>9</sup> cells L<sup>-1</sup> となるようにそれぞれ添加し、明条件下 20°C にて 0.5~4 時間、培養した。培養期間中、経時的に *D. magna* を 1 個体ずつ採取し、*D. magna* 体内に存在する UMP 数を測定して UMP の摂食速度を求めた。さらに、*D. magna* 体内の UMP 数が変化しなくなった時点を、摂食と排出がつり合っている平衡状態とみなし、UMP を含まない無機培地に *D. magna* を移した。経時的に *D. magna* 体内の UMP 数を測定し、UMP の排出速度を求めた。平衡状態時の *D. magna* 体内 UMP 数と排出速度から、UMP の滞留時間を算出した。なお、*D. magna* 体内の MP 数は、*D. magna* 組織を濃硝酸で分解して残存した UMP 数を実体顕微鏡にて観察して求めた。

#### (3) バイオフィームの有無が動物プランクトンに蓄積する有機汚染物質に及ぼす影響

モデル有機汚染物質には PCBs を用いた。PCBs は海岸に漂着していたレジンペレットから抽出したものを、PCBs を添加した無機培地を含む 1 L 容ナシ型フラスコにバイオフィーム有りまたは無しの UMP を 50 μg L<sup>-1</sup> となるように添加し、ロータリーエバポレータで培地を回転混合して UMP に PCBs を吸着させた。続いて、*C. vulgaris* を 5.0×10<sup>8</sup> cells L<sup>-1</sup> となるように接種し、これを 300 mL 容の三角フラスコに 150 mL ずつ分注した。さらに *D. magna* を 10 個体、接種した。48 時間後、*D. magna* を UMP を含まない無機培地に移して腸管内の UMP を排出させた。凍結乾燥の後、高速溶媒抽出にて PCBs を抽出した。抽出液をシリカゲルクロマトグラフィで精製し、ECD 付ガスクロマトグラフィにて PCBs を同定・定量した。対照として UMP を含まない無機培地において *D. magna* を接種・培養したときの *D. magna* 中の PCBs も定量した。

#### (4) 細菌細胞の表面疎水性・比表面積と有機汚染物質蓄積量の関係

細菌の純粋分離株 12 種類の細胞表面疎水性 (cell surface hydrophobicity, 以下 CSH) を求めた。比濁度 0.85 の細菌培養液 3 mL にヘキサデカン 0.4 mL を加え、10 分間静置後に 1 分間かくはんし、さらに静置後、二相分離した水層の比濁度 (ODa) を測定した。ヘキサデカン添加前の比濁度を ODb とし、CSH を次式にしたがい算出した。

$$\text{CSH (\%)} = (\text{ODb} - \text{ODa}) / \text{ODb} \times 100$$

次に、CSH の異なる細菌株 6 種類を選抜し、これら細菌への有機汚染物質の吸着量を比較した。それぞれの細菌を無機培地に 1×10<sup>8</sup> cells L<sup>-1</sup> となるように接種した。ここに DCP を 1 mg C L<sup>-1</sup> となるように添加したのち、暗所 25°C にて 24 時間、静置培養した。その後、菌体から DCP を抽出し、菌体に吸着した DCP 量を測定した。さらに、菌体の有機態炭素量を TOC 計 (TOC-V<sub>E</sub>, 島津製作所) にて測定し、菌体湿重量の 10 % が炭素量と仮定し、次式にしたがい濃縮係数 (concentration factor, 以下 CF) を算出した。

$$\text{CF} = (\text{DCP 吸着量}[\mu\text{g C}] / \text{菌体有機態炭素量}[\text{g}] \times 0.1) / (\text{培地中 DCP 濃度}[\mu\text{g C mL}^{-1}])$$

また、細胞表面を 5 mol L<sup>-1</sup> の塩化リチウム水溶液で処理して S 層タンパク質を除去した菌体を用いて CSH および CF を求め、無処理の菌体のそれぞれの値と比較した。

さらに、それぞれの細菌株の平均細胞比表面積と CF の関係を調べるため、細胞表面積を求めた。DAPI 染色した細菌を蛍光顕微鏡で観察し、菌体の長さや幅を画像解析ソフト (Image-J) にて計測した。1 細胞あたりバイオマス (湿重量) を、総バイオマスを細胞数で除して求めた。細胞表面積を 1 細胞あたりバイオマスで除して平均比表面積を算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) プラスチックに形成されたバイオフィームへの有機汚染物質の吸着

PP および GB のいずれも、バイオフィーム有りのほうが DCP を多く吸着した(図1.  $p < 0.01$ , t-test). このことから、バイオフィームに DCP が吸着することが明らかとなった. また、DCP は 0.5 時間以内の短時間にバイオフィームに吸着した. DCP が  $0.1 \sim 30 \text{ mg C L}^{-1}$  の範囲では、DCP の濃度が高いほどバイオフィームへの吸着量が多かった. 吸着平衡時の DCP 濃度と DCP 吸着量の関係は Freundlich 式で最も相関が高く、 $y = 4.0 x^{0.72}$  ( $r^2 = 0.98$ ,  $p = 0.0041$ ) の関係が得られた. DCP が  $0.1 \sim 1 \text{ mg C L}^{-1}$  の範囲ではバイオフィームへの吸着量は PP への吸着量の  $0.057 \sim 0.32$  倍であった(表1). この倍率は DCP の初期濃度が低いほど高かった. これらのことから、プラスチックを誤食した生物への有機汚染物質の蓄積を考える際には、バイオフィームに吸着した有機汚染物質も蓄積する可能性を考慮する必要があることが示された.

表 1. PP への DCP 吸着量と吸着比

DCP 初期濃度 ( $\text{mg C mL}^{-1}$ )	DCP 吸着量 ( $\mu\text{g C vial}^{-1} \pm \text{SE}$ )		吸着比 (A-B)/A
	バイオフィーム有り	バイオフィーム無し	
	(A)	(B)	
0.1	$0.46 \pm 0.010$	$0.37 \pm 0.010$	0.19
0.3	$0.80 \pm 0.018$	$0.68 \pm 0.034$	0.16
1.0	$3.6 \pm 0.078$	$3.3 \pm 0.086$	0.06

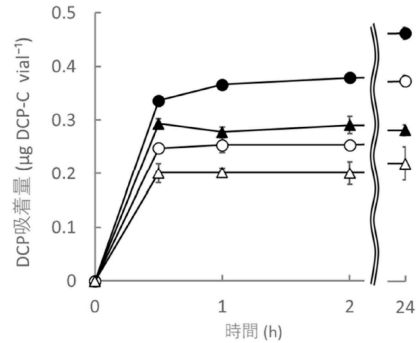
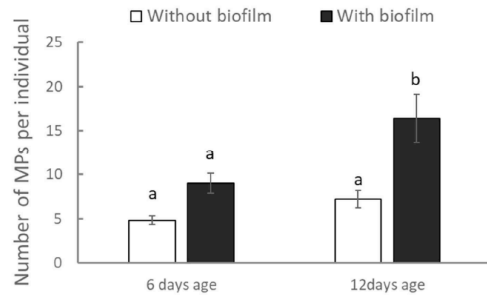


図 1. DCP  $0.1 \text{ mg C L}^{-1}$  の無機培地に添加したバイオフィーム有り(●, ▲)または無し(○, △)の PP(●, ○)または GB(▲, △)に吸着された DCP 量の経時変化 ( $n = 4$ , エラーバーは最大値と最小値を表す).

##### (2) バイオフィームの有無が動物プランクトンによる UMP の摂食量に及ぼす影響

培養 4 時間目の *D. magna* 体内の UMP 数は個体サイズの大きい 12 日齢において、バイオフィーム有り UMP のほうが多かった(図 2). また、*D. magna* 体内における UMP の滞留時間も、バイオフィーム有り UMP のほうが長かった(バイオフィーム有り, 0.66 時間; バイオフィーム無し, 0.54 時間.  $P < 0.01$ , t-test). これらのことから、UMP 表面がバイオフィームに覆われることにより、UMP の生物利用性が高まったと考えられた.

図 2. 日齢の異なる *D. magna* にバイオフィーム有りまたは無しの UMP を 4 時間曝露したときの 1 個体あたり UMP 数. エラーバーは標準誤差を示す ( $n = 5$ ). バー上の異なる文字は有意差のあることを示す ( $p < 0.05$ , Turkey-Kramer test).



##### (3) バイオフィームの有無が動物プランクトンに蓄積する有機汚染物質に及ぼす影響

UMP に曝露して培養した場合、*D. magna* が蓄積した PCBs 量は、バイオフィームの有無による違いは確認できなかった(図 3,  $p > 0.05$ ). この理由は、UMP に吸着された PCBs 量が、バイオフィームの有無に関わらず同じであったためであることと、UMP の *D. magna* 体内における UMP の滞留時間が 1 時間未満と短いためであると考えられる. 一方、UMP を曝露せずに培養した場合、*D. magna* が蓄積した PCBs 量は、UMP を曝露した場合よりも多かった(図 3,  $p < 0.05$ ). 特に、低塩素 PCBs の蓄積量が多かった ( $p < 0.05$ ).

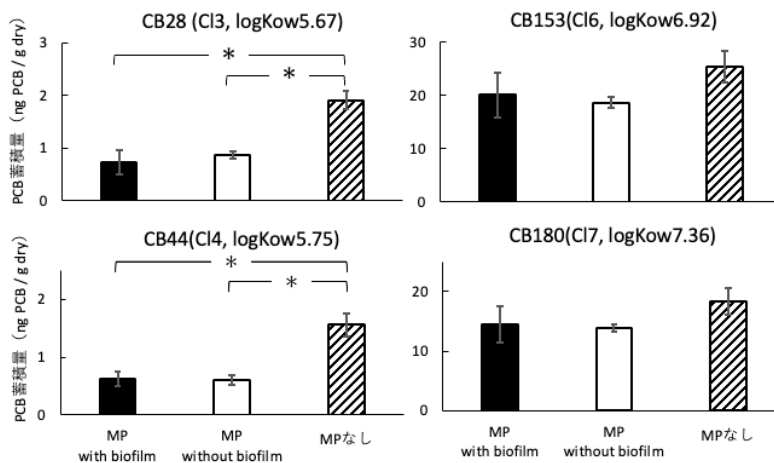


図 3. バイオフィーム有りまたは無しの UMP に曝露したまたは曝露されなかった *D. magna* に蓄積された PCBs 量. この図では 4 つの同族異性体の結果を示す. エラーバーは標準誤差を示す ( $n = 5$ ). バー上のアスタリスクは有意差のあることを示す ( $p < 0.05$ , Turkey-Kramer test).

PCBs の同族異性体ごとに *D. magna* への移行率(*D. magna* の蓄積量/暴露量)とオクタノール-水分配係数(log  $K_{ow}$ )の関係を検討した結果, UMP を曝露した場合, バイオフィルムの有無に関わらず, *D. magna* への移行率はどの異性体においても, UMP を曝露しなかった場合よりも低かった(図 4). この理由として, PCBs が UMP に吸着されるため, *C. vulgaris* に蓄積された PCBs 量および溶存態 PCBs 濃度が, UMP を曝露したときのほうが低かったためであると考えられる.

以上より, UMP 表面にバイオフィルムが形成されると *D. magna* による UMP 摂食量は増えるものの, UMP に吸着された PCBs の *D. magna* への移行は確認できなかった. しかし, 実際の水界環境では, 動物プランクトンのような低次栄養段階の生物は UMP を体内に蓄積したまま高次栄養段階に捕食される. また, UMP の摂食は動物プランクトンの生存・繁殖に影響を及ぼす. これらのことから, 生物への UMP の影響を明らかにする研究においては今後, UMP に形成されたバイオフィルムの影響を無視することはできないと考えられる.

#### (4) 細菌細胞表面の疎水性と有機汚染物質蓄積量の関係

今回用いた 13 種類の細菌株の CSH は 0~91.2% の広い範囲に分布した. 細菌の系統関係と CSH の間に明瞭な関係は認められなかった. CSH が異なる細菌 6 菌株(CSH の低い順から *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Achromobacter denitrificans*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Rhodococcus* sp. LM-1)を選抜し, CSH と CF の関係を調べた結果, 両者の間に有意な負の相関が認められた(図 4,  $p < 0.05$ ). このことから, 細菌への有機汚染物質の吸着には細胞表面構造が関与していることが示唆された.

グラム陽性菌と陰性菌から細菌株を 2 つずつ選抜し, 塩化リチウム処理による CSH の変化に対する CF の変化を調べた. その結果, 塩化リチウム処理により CSH の有意な低下が確認できたのは *Bacillus megaterium* のみであった( $p < 0.05$ , t-test). しかし, CF については, いずれの細菌株においても塩化リチウム処理の有りと無しの間で有意な差が認められなかった. さらに, 細胞比表面積と CF の間に明瞭な相関は認められなかった( $r^2 < 0.01$ ).

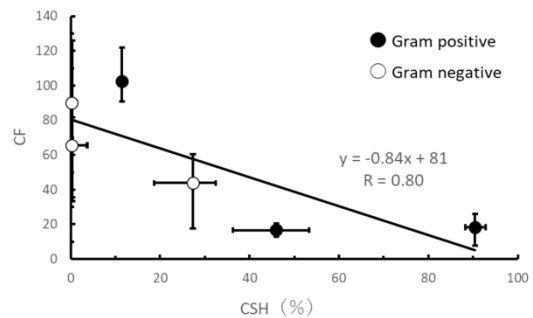


図 4. 6 種の細菌の CSH と CF の関係. ●と○はそれぞれグラム陽性菌と陰性菌を示す. シンボルの位置は平均値を, エラーバーは最大値と最小値の範囲を示す( $n = 3$ )

#### (5) 総括

本研究ではプラスチック表面に形成されたバイオフィルムに有機汚染物質が吸着することが明らかとなった. また, バイオフィルムが形成されたプラスチックは動物プランクトンに摂食されやすいことも明らかとなった. しかし, バイオフィルムが形成されたプラスチックを摂食した動物プランクトンに, 有機汚染物質が蓄積するという明確な証拠は得られなかった. これは, 動物プランクトン体内におけるバイオフィルムの滞留時間が短いためであることが考えられる. 魚介類においてはプラスチックの滞留時間が動物プランクトンよりも長いことから, プラスチックを直接, あるいは動物プランクトンを介して間接的に摂食した魚介類の有機汚染物質の蓄積に, バイオフィルムが影響するかを明らかにすることが今後の課題である.

さらに, 細菌細胞表面の疎水性が低いほうが有機汚染物質が蓄積しやすい傾向にあったことから, 細菌への有機汚染物質の吸着には細胞表面構造が関与していることが示唆された. 細胞表面における吸着の支配要因を解明することも, 今後の課題として残された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畑口智貴・多羅尾光徳
2. 発表標題 プラスチック表面に形成されたバイオフィルムへの2,4-dichlorophenolの吸着
3. 学会等名 日本微生物生態学会大34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中雄大・多羅尾光徳
2. 発表標題 細菌による2,4-dichlorophenolの生物濃縮と細胞表面の疎水性の関係
3. 学会等名 日本環境学会第47回研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多羅尾光徳・畑口智貴・水川薫子・高田秀重
2. 発表標題 Daphnia magna によるマイクロプラスチックおよび PCBs の生物利用性にバイオフィルムが及ぼす影響
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高田 秀重  (Takada Hideshige)  (70187970)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授    (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------