

細胞生物学的研究手法を用いた 自然環境の調査方法の探索

Development of cell biological methods for natural environment investigation

李 天 舒

Abstract

This research aims to develop new teaching materials for Natural Sciences education customized for liberal arts students. To raise students' awareness of global environmental issues and encourage practical measures, it is necessary to understand the key factors that causing these issues and how they affect nature. Plants and microbes have great abilities to absorb industrial pollutants and degrade biomass for recycle, playing a central role in natural purification. However, the increasing consumption of natural resources and loss of biodiversity have severely disrupted the balance, resulting in excessive accumulation of harmful elements and substances that cannot be easily visualized or recognized in our environment. Therefore, this preliminary study attempts to design molecular and cell biological methods to help students detect and analyze pollutants and understand the importance of biodiversity, and furthermore, to provide scientific evidence and reasonable solutions for environmental issues.

The investigations focused on the soil and water organisms at the Musashi University campus and air pollution control in Tokyo Metropolitan area. In the soil samples collected at four different locations, a large number of microbes were detected using streak plate method, in which soil bacteria are isolated and cultured in agar plates to form visible colonies (in microbiology, a colony is defined as a group of bacteria originating from a single mother cell). Four sampling sites represent different ecological environments, where tall evergreen tree (A), grass (B) and shrubs at downstream (C) and upstream (D) of an artificial river (Susugi River) are nourished. Accordingly, the soil components and texture are also different as observed. Humic

substances are high molecular weight organic compounds in soil, which are formed during natural decomposition and transformation of biomass residues by the action of microorganisms. Humic acids, one of the three categories of humic substances, contribute to soil fertility and help trapping heavy metal ions from waters. In this report, acid-base extraction method was employed to isolate humic acids from soil samples, and the adsorption capacity of humic acids was investigated by observing color changes of copper sulfate solution and bentonite (a natural clay) sediments.

To investigate the abundance of biomass in soil and water, protein quantitation was performed using an advanced Bradford method. This analysis requires the operation of micropipettes to deal with small volumes of reagents under 1 mL, and a high-throughput detection was achieved by using microplate reader, which can measure 96 samples at a time in 1 minute. Among four soil samples, the highest protein content was found in site D; while in the water samples, the downstream of Susugi River (C) showed a higher protein concentration than that of the upstream (D). However, in the colony counting result, water D sample contained much more bacteria than water C sample, suggesting that water flow might affect microorganism survival and organic matter accumulation.

In the air pollution investigation, 80 sites in Tokyo Metropolitan area were monitored and the concentration (ppm) of nitrogen dioxide (NO₂), an air pollutant, was measured by a colorimetric assay using Salzman's reagent. Although all the monitoring locations have passed the Air Quality Standards (under 0.020 ppm), the NO₂ concentration was found to be closely related to the traffic volume by comparing main streets with residential areas. It was also suggested that plants (leaves) may have a NO₂ absorption effect. In the future, repeated experiments are required to confirm statistical significance; and moreover, investigation on different types of plants and soil microorganisms may provide more useful evidence to address environmental problems.

Key words

Environmental study, Biodiversity, Molecular cell biology, Microbiology, Colorimetric analysis

【目的】

武蔵大学リベラルアーツアンドサイエンス教育センター・自然科学分野の総合教育の一環として、これまでは武蔵・環境フィールドワークやサイエンスラボ講座などの演習科目を通じて、自然・生物観察と環境汚染調査を行ってきた。本研究では、環境と生命の関係を分子・細胞スケールで深く理解し、環境問題の原因と対策を探究するために、新たな実験項目を設計・統合した。本調査結果は、武蔵大学の研究設備と研究機器を用いて、文系学生の実践可能な方法を初歩的に探索したものである。自然環境の調査対象は、武蔵大学構内の土壌、すすぎ川および東京都内の大気サンプルであった。

【研究背景と内容】

微生物である細菌は土壌、河川、空気、また極寒地や温泉など、環境の隅々まで存在している。土壌微生物は動植物の死骸を分解したり、土壌の栄養素を増やしたり、環境保全に重要な役割を果たしている。またヒトの消化管にもおよそ1000種類、100兆個の細菌（いわゆる腸内細菌）が生息している¹。乳酸菌や納豆菌など、ヒトの健康づくりに役立つ種類が存在する一方、ヒトに病気をさせる病原菌の種類も多くある。

細菌の検出には、培養法を用いて菌の数を増やし、菌の集落であるコロニー（colony）を目視で数える方法がある。他の微生物の混入（コンタミネーション）を防ぐために、クリーンブース（clean booth, Fig.1A）やクリーンベンチ（clean bench）内での無菌操作が必要である。まずは、検出対象となる細菌の生存と増殖に必要な栄養素を入れた寒天培地を調製する。試料（サンプル）を寒天培地につけ、画線培養法でサンプル中の細菌を単離する。そして、適当な環境（温度、酸素の有無など）に数日間培養することで、細菌のコロニーが形成し、コロニーの数をサンプル中の菌数として数える。さらにグラム染色法などの染色法で菌のある成分を染め、顕微鏡観察で菌の形態や特定成分の有無を確認できる。このような方法で細菌を検出、特定または分類する。

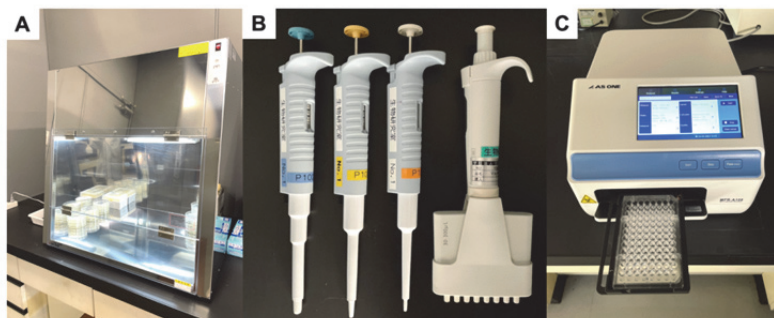


Fig. 1 Experimental equipment and instruments. (A) Clean booth; (B) P1000, P100, P10 and multichannel micropipettes; (C) 96-well plate and microplate reader

生物は、生命機能を担う核酸、タンパク質、脂質、糖質などの様々な有機高分子を合成し、それらの分子が秩序正しく配置・変化することによって生命が維持される。生体分子の検出では、環境中生物の有無や生物の代謝物を調べることができ、微量なサンプルを扱う場合が多い。正確的に微量な液体を操作するために、マイクロピペット（micropipette, Fig. 1B）を使用するのは一般的である。タンパク質や脂質などの生化学検査では、色素を含む試薬と試料を反応させ、吸光度から対象物質の濃度を算出する方法（いわゆる比色法）がよく用いられる。数多くのサンプルを同時に計測するため、96 ウェルプレートに数十、数百マイクロリットル（ μL ）の試料と試薬をウェルずつ入れて混合させ、その後にマイクロプレートリーダー（microplate reader, Fig. 1C）で吸光度を測定する。そして、標準物質の吸光度と濃度（既知）の関係に基づいて検量線を作成し、未知サンプル中の対象物質の濃度を求める。

自然科学研究室では、1993年から30年に渡って大気汚染の原因の一つである窒素酸化物（ NO_x ）の調査が行われてきた²。窒素酸化物は、燃料を高温で燃焼させる過程で発生し、火力発電所や工場、自動車などから排出される。特に高濃度の二酸化窒素（ NO_2 ）は、喉や気管、肺などの呼吸器系に対する障害が報告され、新型コロナウイルスなどによる呼吸器感染症を重症化するリスクもあることが明

らかにしてきた³。世界保健機関（WHO）によると、世界人口の約90%が汚染された大気の下で暮らし、年間約700万人が死亡しているとみられる⁴。武蔵大学で実施した調査結果により、東京都内の窒素酸化物濃度は、この30年間徐々に減少しているが、交通量の多い地域では住宅街や公園と比べてNO_x濃度が高いことがわかる。植物は、地球温暖化に寄与する二酸化炭素を消費するほか、窒素酸化物などの大気汚染物質を吸収する浄化力も持つ。植物と環境の関係をより一層理解できるように、植物の自然浄化作用をデータで示す実験項目を設計した。

【研究機器と試薬】

クリーンブース（アズワン）、マイクロピペット（ニチリョー）、標準寒天培地（日水製薬）、M17寒天培地（Biokar diagnostics）、MRS寒天培地（Biokar diagnostics）、マイクロプレートリーダー（MRP-A 100, アズワン）、Pierce™ 660nm Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）、サルツマン試薬（大気汚染測定運動東京連絡会より提供）、スポイト式比色計（ARC-N4型、アグネ技術センター）

【実験方法】

1、腐植物質の調査

植物、微生物と土壌成分の関係を調べるために、大学構内4箇所の土壌をサンプリングした（Fig. 2）。地点Aでは9号館入り口付近に常緑高木である白樺の植えている土壌、地点Bでは9号館西側の草地、地点Cではすすぎ川下流の一ノ橋付近の土壌、地点Dではすすぎ川上流の中ノ島の土壌を採取した。腐植物質を同定する、また土壌中好気性と通気性の微生物を調査対象とするために、緑葉や小石などが混入しないように注意を払って、地表から深さ5 cm以内の土をサンプリングした。

各地点の生態系と微気候によって、腐植物質の成分と割合が変わり、土壌の色合いと湿度が異なる。腐植物質は、アルカリにも酸にも溶ける褐色のフルボ酸、アルカリに溶ける酸には不溶である暗褐色のフミン酸（腐植酸とも呼ばれる）、またはアルカリにも酸にも不溶である黒色のヒューミンに大別されている。まずは、

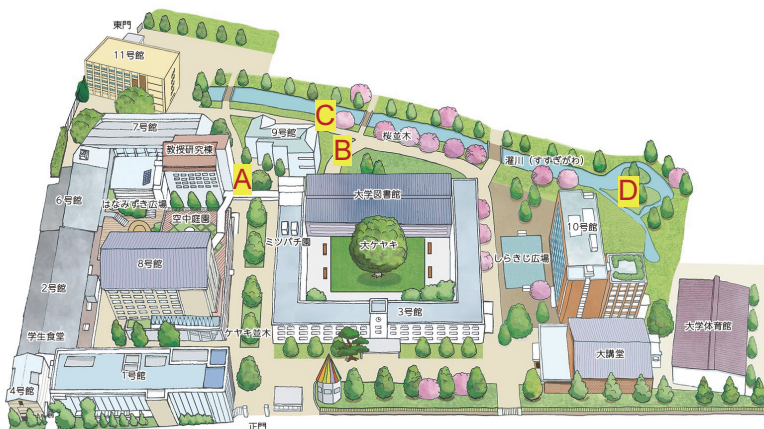


Fig. 2 Sampling points within the Ekoda campus of Musashi University

酸性・アルカリ性水溶液への溶解度の違いを利用してフミン酸の抽出と単離実験を行った⁵。具体的には、土のサンプルに 1 M水酸化ナトリウム水溶液（アルカリ性）を加えて、鉱物粒子とヒューミンを沈降させ、卓上型遠心分離機でフミン酸とフルボ酸を含んだ上澄みを分離した。この上澄みに濃塩酸を添加することでフミン酸を析出させた。次は、フミン酸と粘土鉱物および重金属との反応性を検証するために、単離したフミン酸を 0.1 M水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、吸着剤のベントナイト（0.2 g）を加えた⁵。遠心分離でフミン酸を吸着したベントナイトを沈降させ、色の変化を観察する。重金属の除去の実証実験では、フミン酸沈殿物に 0.1 M硫酸銅（II）水溶液を加え、水中の銅イオンがフミン酸と結合するにつれて、硫酸銅（II）水溶液の青色が薄まる変化を観察する。色合いの変化でフミン酸を検出し、変化の度合いはフミン酸の含有量と相関する。

2、土壌と水中タンパク質の定量

生体成分であるタンパク質は、環境中の微生物や未分解の生物の死骸から検出できる。各地点で採取された土 10g を精製水 20 mL に分散し、強く振とうして水溶性有機物を抽出する。1 時間以上静置してから、上澄みを原液とし、タンパク

質定量キット Pierce™ 660 を用いて試料中タンパク質の濃度を求めた。具体的に、原液 100 μ L と試薬 100 μ L を 96 ウェルプレートに入れ、マイクロプレートリーダーで 10 秒間振とうさせ、室温で 5 分間インキュベーションした後、波長 630 nm での吸光度を測定した。同じような操作で、1000, 750, 500, 250, 125 μ g/mL のウシ血清アルブミン (BSA) 標準液の吸光度を測定し、検量線を作成した。検量線の回帰式に基づいてサンプルの吸光度からタンパク質濃度を算出した。

すすぎ川水のサンプリングは、C と D 付近の 2 箇所で行った。D 地点はすすぎ川の上流であるため、水速が下流の C 地点より速い。採取した水を原液とし、土の測定と同様の方法でタンパク質の定量と項目 3 である微生物の検出を行った。

3、環境中微生物の検出

土壌微生物の検出には、項目 2 で抽出した原液 (1 体積) に対して、99 倍または 9999 倍体積の精製水を入れ、100 倍または 10000 倍希釈液を調製した。土壌中細菌の数が多いため、培養法で単離・計数できるように希釈倍数を試した。水中細菌の検出では、項目 2 と同じ原液を用いた。

微生物の増殖に適した培地を選択するために、MRS 寒天培地、M17 寒天培地および標準寒天培地を用意した。粉末培地を入れた耐熱ねじ口瓶に精製水を入れ、寒天が完全に溶解する (透明な溶液になる) まで加熱、攪拌し続ける。次からの操作はクリーンブース内で行う。液体培地が室温に冷める前に、100 mm シャーレに 10 mL ずつ分注し、一晚静置する。シャーレをひっくり返し、さらに 3 日間置く。植菌する時に、200 μ L の菌液または試料をシャーレの中央部に滴下し、アルコールランプで滅菌したコンラージ棒で菌液を均一に塗布する。菌液が寒天培地に吸収されたら、コントロール群 (without treatment, w.o.) にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、実験群に薬剤を 200 μ L 添加し、クリーンブースの暗所に 28 $^{\circ}$ C 前後の室温で 3 ~ 5 日間培養した。薬剤添加群では、抗生物質ペニシリンーストレプトマイシン溶液 (1% PS) または界面活性剤 Tween 20 (1 vol%) を使用して細菌の増殖に対する影響を調べた。

4、大気汚染調査

2023年6月に実施した調査では、カプセル簡易法を用いて、学内外80箇所の大気をサンプリングし、実験室でNO₂濃度の測定を行った。具体的には、NO₂吸収剤を入れたカプセル瓶を各地点に24時間置き、その後蓋を閉めて研究室に持ち込んだ。サルツマン発色液をカプセルに入れてNO₂と反応させ、各反応液の電流値をスポイト式簡易比色計で測定した。NO₂の含量が多いほど発色が強く、電流値も高くなる。NO₂標準液で得た換算表に基づいて各サンプル中のNO₂濃度(ppm)を求めた。植物の大気浄化効果を確認するために、高木落葉植物と低木常緑植物の葉数枚をカプセルと一緒に置き、NO₂吸収量の変化を比較した。

【結果と考察】

1、2023年夏に実施した土壤微生物と腐植物質の調査

図3に示したように、草地B地点の土は、樹木周辺A、C、D地点の土より黒に近い濃く色と、粒度が低いのが観察され、柔らかい手触りでした。ベントナイトでの吸着実験(図3の3列目左)では、遠心分離処理した後の上澄みの色を比較したところ、土壤Cのフミン酸の含有量が最も少なかった。また、硫酸銅(II)水溶液の色変化(図3の3列目右)を観察したところ、土壤Cの銅イオン除去効果が最も小さく、ほかの土壤サンプルよりフミン酸の含有量が少ないことを示した。ただし、照明の強さやカメラの設定などで観察の結果が左右されることもあると考えられ、今後は比色分析法を用いた定量方法を開発する必要がある。

図3の4列目では、MRS寒天培地で培養した表層土壤微生物の増殖の結果を示す。MRS培地は乳酸菌の増殖に最適化した酸性(pH5.7)の培地であるため、選択的に酸性に耐えない微生物が淘汰された。細菌以外に糸状菌であるカビの増殖も観察された。この実験では、すべての土壤サンプルに好酸性微生物が存在することを確認した。しかし、原液のままに植菌したため、菌数は多すぎになってしまい、コロニーが区別できなかった。また、寒天培地は透明なゼリー状から黄土色の固体へ変化した。この現象は大量の微生物が増殖して代謝物を放出することで培地を変色させたと考えられる。したがって、培養法における土壤微生物の種

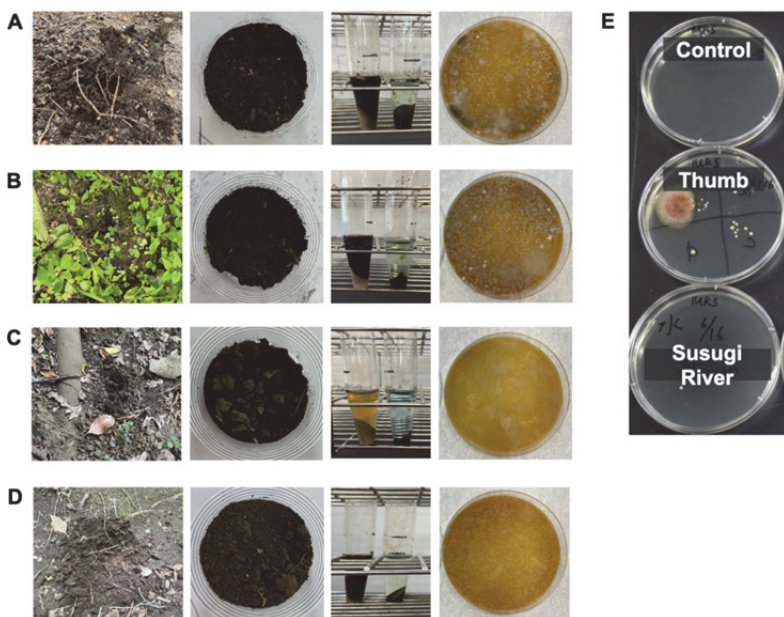


Fig. 3 Detection of humic acid and microorganisms in the soil samples collected at A, B, C and D points. The pictures from left to right indicate the sampling sites, soil samples, humic acid adsorption by bentonite and color changes of copper (II) sulfate aqueous solution, and microorganism growth in MRS agar plates at each sampling point. (E) shows the control group without inoculation, as well as microorganisms detected on human thumbs and in Susugi River.

類と菌数を比較するためには、試料（土壌抽出液）を希釈する必要がある。

図3Eの対照群では、クリーンブースの使用で雑菌の混入（コンタミネーション）を防ぐことができたことを示している。

2、2023年秋に実施した土壌微生物の調査

一般生菌を検出するために標準寒天培地（pH 7.1±0.1）を用いた。図4に示したように、100倍希釈した土壌抽出液を接種したシャーレには、細菌の単離ができなかったり、コロニーが融合したりすることが観察された。それに対して、10000

倍希釈したものをを用いた場合は、すべてのサンプルにコロニーの形成と単離が確認できた。抗生物質ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (PS) を添加した区画では、100 倍希釈した土 D を除いたサンプルには、土壤細菌の増殖が完全に抑制された。また、10000 倍希釈液中の菌数を計測した結果、土壤サンプルでは B 地点 (草地) が最も多い、次いで A 地点 (常緑高木)、D 地点 (すすぎ川上流の島)、C 地点 (すすぎ川沿い) の順となった。水サンプルでは、すすぎ川上流 (水 D) が下流 (水 C) より多くの細菌が検出された。

非イオン型界面活性剤 Tween 20 は細胞膜の透過性に干渉し、グラム陰性菌の増殖が抑制されると想定したが、この実験では土壤と水中の細菌に増殖作用が見られ、バイオフィームも形成させた。Su *et al.* によると、低濃度の Tween 20 はルイス酸-塩基相互作用と静電気力を変化させ、接着力を増加させることで、鉱物表面上の好酸性菌の早期付着とバイオフィーム形成に関与した⁶。一方、気液界面の尿路病原性大腸菌によるバイオフィームの形成は、Tween 20 で抑制されたことも報告された⁷。したがって、Tween 20 の作用はバイオフィームが形成する界面の物理化学的特性によるものであることが示唆されている。抗菌または増菌効果は微生物の種類によって異なるが⁸、本実験では、1 vol% の Tween 20 が標準寒天培地の界面で土壤細菌のバイオフィームの形成を促進することを示した。Tween 20 は、化学構造類似性がある Tween 80 (寒天培地添加物) と同じように、脂肪酸の供給源として微生物の増殖を助け、界面活性剤の作用により膜透過性を増加することで培地中ほかの栄養分の取り込みを促進させた可能性が高いと考察した。

Jiang *et al.* の報告により、Tween 20 はセレウス菌 (土壤細菌の一つ) の膜貫通タンパク質の機能と構造を制御することで、多環芳香族炭化水素 (PAH) であるフルオランテンの膜貫通輸送を促進する効果があることが判明された⁹。環境中に存在する PAH は、主として石油、石炭などの化石燃料の不完全燃焼による産物であり、発がん性を有することが知られている。界面活性剤の作用で土壤細菌の PAH 吸収能力を向上させることが可能であれば、汚染物質の固定・除去への応用が期待できるであろう。

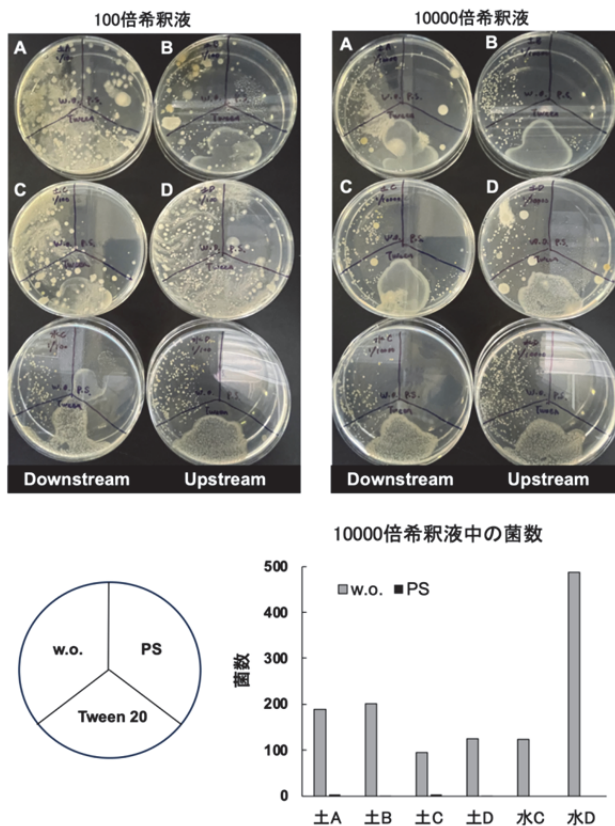


Fig. 4 Detection of microorganisms in the soil samples collected at A, B, C and D points, as well as in the water samples collected at the downstream (water C) and upstream (water D) of Susugi River using standard agar plate culture method. After spreading 100-fold and 10000-fold diluted sample solutions all over the plates, 200 μ L of antibiotics Penicillin-Streptomycin (1% PS) or 200 μ L of detergent Tween 20 (1 v/v%) were added in the designated areas of each plate as shown on the bottom left. W.o. indicates the control groups without treatment of drugs. After 4 days incubation at room temperature, bacterial colonies were observed. The colony number was counted to represent the bacteria number in each sample. Colonies were indistinguishable in Tween 20-treated samples due to biofilm formation.

3、環境中タンパク質含量の測定

BSA 標準溶液の吸光度を基づいて、Microsoft Excel ソフトウェアで検量線の回帰式(1)を求めた。

$$y = 0.8604 x + 0.1475 \quad (R^2 = 0.9997) \quad (1)$$

x は BSA を標準物質としたタンパク質の濃度 (mg/mL) ; y は波長 630 nm での吸光度である。決定係数 R^2 は >0.95 となったため、線形回帰式の適合性が高いと判断した。

回帰式(1)を用いて、土壌および水サンプルの吸光度から、溶液中のタンパク質の濃度を算出した (図 5)。土壌サンプルの場合は、抽出液中の濃度からタンパク質の質量に換算した。土壌重量の割合で表すと、A から D までの各地点のタンパク質は、それぞれ土壌の 0.10%, 0.02%, 0.13%, 0.20% を占めた。

タンパク質は熱やイオンの影響を受けやすく、環境中での安定性が低いである。また、微生物の働きによって分解され、炭素、窒素、硫黄などを環境に還元する。この実験で使用した Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent は、Bradford (Coomassie) タンパク質量法の原理にしたがったものであるため、フリーのアミノ酸や短いペプチド鎖では色素の結合による発色は起こらず、分子量 3,000

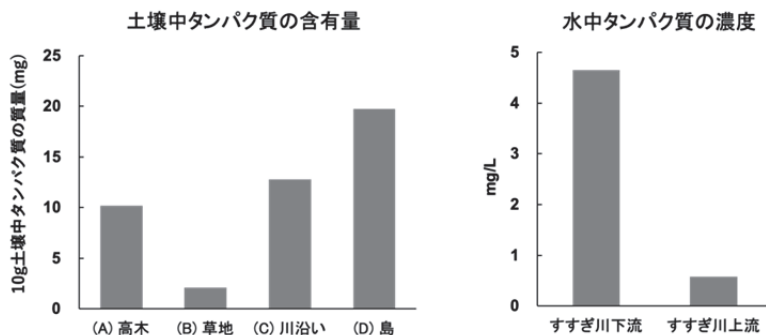


Fig. 5 Quantitation of protein concentrations in the soil (left) and Susugi River (right).

Da 以上のタンパク質が検出対象となる¹⁰。すなわち、環境中に遊離した水溶性タンパク質がほとんど検出できる。したがって、図5で示したデータは、生物の代謝物および残骸に由来するタンパク質を意味している。

土壌サンプルの中では、すすぎ川上流にある中ノ島の土壌 D にタンパク質の含有量が最も多かった。次いで川沿い C と白樫の土壌 A、最後は草地 B の順にタンパク質の含有量が減少した。水のサンプルでは、すすぎ川下流（C 地点）と比較したところ、すすぎ川上流（D 地点）にタンパク質の濃度が少なかった。上流では浄化された地下水が流されて水速が早いことに対し、下流では水の流動性がかなり低くなるため、微生物と有機物の堆積が起りやすいと考えられる。しかし、図4の菌数のデータと対照したところ、上流にはより多い細菌が検出された。タンパク質は生きている微生物にも死骸や代謝物にも検出できるので、下流では上流より多くの生物の残骸が蓄積したと考察している。今回の実験のサンプル数が1だけとなったため、各実験群の間に統計的有意差があるかどうかについて検討すべき課題が残っている。今後の計画としては、サンプル数を増やし、生きた細菌に由来するタンパク質の抽出方法を設計する。例えば、遠心分離法などで生きている細菌を単離し、細胞溶解剤を加えることで細菌のタンパク質を完全に抽出することが可能であろうと考える。また、抽出時間を短くにし、タンパク質分解を抑えることも定量の正確さに重要である。

4、2023年夏に実施した大気汚染調査

自動車排気ガスの影響を検討するために、80地点を道路、大学構内と住宅街に分類し、平均NO₂濃度を求めた。図6Aに示したように、サルツマン試薬はNO₂と反応すると発色し、NO₂吸収量が多いほど発色が強くなる。スポイト式簡易比色計（電流）で発色の度合いを測定し、大気汚染測定運動東京連絡会に提供された電流値（ μ A）とNO₂濃度（ppm）の換算表に基づいて、NO₂濃度を算出した（図6B）。交通量の多いエリアではNO₂濃度が高いことがわかった。いずれの地点の値は旧環境基準値の0.020 ppm以下であったため、すべての観測地点で大気が汚れていないことが判明された。

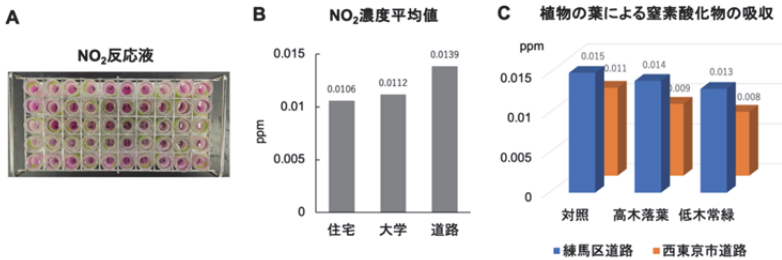


Fig. 6 Detection and quantitation of air pollutant nitrogen dioxide (NO₂) using colorimetric method (A). The average concentrations of NO₂ were compared among high and low traffic areas and university campus (B). NO₂ absorption effect by the leaves of deciduous tall trees and evergreen shrubs in high traffic areas (C).

植物の大気浄化効果を図6Cに示している。生葉をカプセルと一緒に置いたところ、カプセルのNO₂吸収量が減り、植物の種類によってNO₂除去力が異なることが示唆された。ただし、サンプル数は1だけであったため、統計的有意差検定は実行できなかった。今後はサンプル数を増やしてデータの再現性を確認し、植物の種類ごとのNO₂除去力を評価する方法を検討する予定である。

【おわりに】

本研究は2023年度からの新たな探索となり、武蔵大学の研究設備を活かすために分子細胞生物学実験方法の簡略化を図った。初歩的な結果として、教育上の実施可能な調査項目と実験プロトコルが検証された。しかし、十分に厳密でない部分があり、一部のプロトコルを改善する必要がある。特にタンパク質の定量について、生体外と生体内に分けた考察は環境科学的に重要であると考えられる。また、土壤腐植物質の調査では、目視で判定しにくい色変化の度合いを明確に示すため、比色定量法の開発が有用である。さらに、さまざまな生態環境における微生物の機能を理解するため、土壤微生物の種類と代謝物を調べる課題も残っている。今後は、顕微鏡を用いた微生物の形態観察やグラム染色を用いた細菌の分類を検討できるような実験内容を設計する。

【謝辞】

本研究は、2023年度「武蔵大学学長裁量経費<教育分野>」の助成を受けて実施した。研究計画の立ち上げと遂行にあたり、武蔵大学リベラルアーツアンドサイエンス教育センター 薬袋 佳孝 特任教授に貴重なご助言をいただいた。大気汚染調査と NO₂ 測定は、武蔵大学リベラルアーツアンドサイエンス教育センター 堀越 正美 非常勤講師、教務課職員（実験助手）東泉 恵美 氏、石川 元美 氏および 2023 年度サイエンスラボ講座（生物学）A の受講生の皆様によって実施された。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

【参考文献】

- 1、安藤朗, 別冊・医学のあゆみ「腸内細菌と臨床医学」医歯薬出版, 2018.
- 2、丸橋玉樹, 「武蔵大学周辺の NO₂ 濃度分布と樹林の大気汚染緩和効果」, 武蔵大学人文学会雑誌 28 巻 4 号 p.57-68, 1996.
- 3、Mele M, Magazzino C, Schneider N, Strezov V. NO₂ levels as a contributing factor to COVID-19 deaths: The first empirical estimate of threshold values. *Environ Res.* 2021;194:110663. doi: 10.1016/j.envres.2020.110663.
- 4、World Health Organization, 9 out of 10 people worldwide breathe polluted air, but more countries are taking action. 2018 May.
- 5、薬袋佳孝, 「土と水の環境化学：フミン酸と金属イオンの相互作用」, 現代化学 7(292) p.47-51, 1995.
- 6、Su G, Li S, Deng X, Hu L, Praburaman L, He Z, Zhong H, Sun W. Low concentration of Tween-20 enhanced the adhesion and biofilm formation of *Acidianus manzaensis* YN-25 on chalcopyrite surface. *Chemosphere.* 2021;284:131403. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131403.
- 7、Wu C, Lim JY, Fuller GG, Cegelski L. Disruption of *Escherichia coli* amyloid-integrated biofilm formation at the air-liquid interface by a polysorbate surfactant. *Langmuir.* 2013;29(3):920-6. doi: 10.1021/la304710k.
- 8、Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL. Effects of Tween 80 on

Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Front Microbiol.* **2016**;7:1878. doi: 10.3389/fmicb.2016.01878.

- 9、Jiang R, Wu X, Xiao Y, Kong D, Li Y, Wang H. Tween 20 regulate the function and structure of transmembrane proteins of Bacillus cereus: Promoting transmembrane transport of fluoranthene. *J Hazard Mater.* **2021**;403:123707. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123707.
- 10、Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, Haney P, Bell PA. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem.* **2009**;385(2):342-5. doi: 10.1016/j.ab.2008.11.024.