

「環境低負荷型の社会システム」  
平成 8 年度採択研究代表者

矢木 修身

( 国立環境研究所 総合研究官 )

## 「微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究」

### 1. 研究実施の概要

微生物を活用してトリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン (PCE)、トリクロロエタン (TCA)、PCB、有機及び無機水銀化合物等で汚染した土壌を修復するバイオレメディエーション技術の確立を目的として研究を実施した。分解微生物の探索を行い、分解能を有する新たな種々の微生物を発見すると共に、組換え技術を用いて機能を強化した微生物を創生した。これらの微生物の分解機構及び分解酵素遺伝子を解析すると共に、分解微生物の生態系への影響を調べ、バイオレメディエーション技術が有効であることを明らかにした。今後は、本技術の実用化を目指しパイロットスケールでの浄化効果を検討する。

### 2. 研究実施内容

世界各地で問題となっている TCE、PCE、TCA 及び PCB 等の有機塩素化合物並びに水銀等の重金属による土壌汚染を、微生物を用いて修復するバイオレメディエーション技術の実用に際しての重要な課題である、微生物の修復機能の向上化と修復技術の安全性評価手法の開発研究を行った。これらの問題を解決するため

(1) 分解能強化微生物の開発 (2) 土壌中における微生物の挙動解析 (3) 微生物センサー機能を活用する有害物質モニタリング手法の開発 (4) 分子生態学的手法を用いる生態影響評価システムの開発 (5) 土壌・地下水シミュレータおよび現場における修復技術の適応性の 5 課題について検討した。

#### (1) 分解能強化微生物の開発

TCE、PCE、TCA、トリクロロ酢酸、PCB 及び水銀化合物を分解する各種の微生物を単離・同定すると共に分解機構及び分解酵素の諸性質を調べた。好氣的 TCA 分解菌 *Mycobacterium sp.* TA27 株は、エタン、プロパン及びブタノールを炭素源として増殖し、種々の有機塩素化合物を分解でき、特にブタノールで培養したときに高い TCE 分解活性を示した。分解酵素は、ヒドロキシラーゼとリダクターゼからなるマルチコンポーネントの新しい種類の酵素であった。嫌氣的 PCE 分解菌 Y51 株は、16SrRNA 解析より *Desulfotobacterium* 属類縁菌と考えられた。本菌は、100mg/l の PCE を数時間で完全にジクロロエチレンに分解でき

た。好氣的トリクロロ酢酸分解菌 S S - 1 株は、*Pseudomonas* 属の細菌であり、100mg/lのトリクロロ酢酸を9日間でほぼ完全に分解した。水俣湾海水及び底質より45株の水銀耐性細菌を分離した。特に強い水銀耐性を示したM - 1株は、塩化第二水銀、塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、酢酸フェニール水銀、パラクロロ安息香酸水銀、およびフルオレッセイン酢酸水銀等の各種の水銀化合物を分解できた。水銀還元酵素及びその遺伝学的特性を調べた結果、従来の菌とN末端において相違が認められた。自然界には有害物質を分解できる多くの未知の微生物が存在していることが示唆された。

(2) 土壌中における微生物の挙動解析

汚染環境中に導入された微生物の安全性の評価項目として、環境中における生残・増殖性は重要である。それゆえ、培養を必要とせずかつ短期間で検出が可能な導入微生物の検出法を検討した。T C E分解能を有するメタン資化性菌 *Methylocystis* sp. M (M株) のメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子の特異的な部分をPCR法で増幅し、M株を特異的に検出する手法を開発した。PCR法は地下水中のフミン物質により妨害され感度が低下するため、フィルター洗浄法を開発することにより、反応液中に5細胞までの検出が可能となった。従来の計数法では1ヶ月を要したものが数時間で計数が可能となった。また土壌中のM株の検出法を目的として抗体を用いる検出法を試みた結果、 $10^3$  cells/ml以上の濃度で検出が可能となった。さらに、*Mycobacterium* sp. T A 27株についても、16SrRNA遺伝子の特異的な部分を検索し、PCR法による検出が可能となった。PCR法を活用する計数法により微生物の挙動解析が可能となった。

(3) 微生物センサー機能を活用する有害物質モニタリング手法の開発

バイオレメディエーションによる有害代謝生産物の生成の有無を明らかにするため、運動性を有する微生物のセンサー機能に着目し、迅速高感度毒性試験法の開発を試みた。*Pseudomonas aeruginosa* P A O 1株は、T C E、P C E、クロロホルムを忌避物質として認識すること、さらにこれらの物質に対する閾値は、0.15、3、10mMであることが判明した。また、緑色蛍光を発する大腸菌を用いて、化学物質に対する細菌の挙動を簡便に計測できる蛍光プレートリーダ法を開発した。運動性細菌を活用する迅速簡便有害性試験法を確立することができた。

(4) 分子生態学的手法を用いる生態影響評価システムの開発

バイオレメディエーション技術の土壌生態系への影響を評価するため、微生物生態系に着目し、生態系の保全に關与する微生物のポピュレーションダイナミクスによる生態系影響評価法を検討した。アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、メタノール資化性菌、メタン酸化細菌、タンパク質分解細菌、脱窒菌を簡便で再現性よく計数できるマイクロプレートMPN法を開発した。本手法を用いてT C

Eの微生物相への影響を調べた。T C Eが100mg/l以上で微生物相への影響が認められたが、T C Eの除去により微生物相は元の状態に戻ることが確認された。

(5) 土壌・地下水シミュレータおよび現場における修復技術の適応性の評価

ステンレス製カラムからなるモデル土壌・地下水系を作成し、T C E 汚染地下水を通水し、M株の浄化能を調べた。M株は、メタン、酸素、窒素、リン添加により土壌・地下水中で増殖できること、M株の添加量の増大に伴い、T C Eの除去率が向上すること、メタン濃度が浄化能に大きく関与していることが明らかとなった。大型土壌シミュレータを用いて、水不飽和帯土壌におけるM株のT C E除去効果を調べた。T C E 1 mg/lの汚染土壌へM株を添加すると、数時間で浄化されることが判明した。M株の有効性が確認された。

水銀還元酵素遺伝子群(merオペロン)を組み込んだ組換え細菌*Pseudomonas putida*を用いて、バイオリクターによる土壌スラリー中からの水銀除去条件を検討した。チオール及び塩化ナトリウムの添加により70%の水銀が除去された。塩化ナトリウム溶液を用いる繰り返し洗浄により、90%以上の除去が可能となった。組換え微生物を用いる汚染土壌の浄化の有効性が確認された。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

O.Yagi, A.Hashimoto, K.Iwasaki and M.Nakajima, Aerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane by *Mycobacterium* spp. isolated from soil, Appl. Environ. Microbiol., Vol.66, No.10, 4693-4696 (1999)

S.Saeki, S.Mukai, K.Iwasaki and O.Yagi, Production of trichloroacetic acid, trichloroethanol and dichloroacetic acid from trichloroethylene degradation by *Methylocystis* sp.strain M, Biocatalysis and Biotransformation, Vol.17, 347-357 (1999)

A.Hashimoto, K.Iwasaki, N.Nakasugi and O.Yagi, Degradation of trichloroethylene by *Mycobacterium* sp.TA27, Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, 89-94 (1999)

T.Ohashi, S.Imano, K.Iwasaki and O.Yagi, Biodegradation of spilled oil of Nakhodka Accident in Japan, 1997, In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds, 233-238 (1999)

S.Imano, T.Ohashi, K.Iwasaki and O.Yagi, Degradation of trichloroethylene by a propane-oxidizing bacterium *Mycobacterium* sp.TCE28, Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, 95-100 (1999)

K.Kubota, M.Hashimoto, H.Gohda, K.Iwasaki and O.Yagi, Degradation of trichloroethylene in soil column by *Methylocystis* sp. M, Engineered Approaches for In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, 101-106 (1999)

M.Tsuda, H-M.Tan, A.Nishi and K.Furukawa, Mobile catabolic genes in bacteria, J.

Biosci.and Bioeng., Vol.87, No.4, 401-410 (1999)

K.Furukawa, J.Hirose, N.Nakamura and A.Suyama, Development of strains for the efficient degradation of chlorinated environmental pollutants, Environmental Biotechnology Book Series Vol.5 (1999)

K.Furukawa, Natural gene diversity and DNA shuffling, Evolution and Redesign (1999)

J.Kato, T.Nakamura, A.Kuroda and H.Ohtake, Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*, Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol.63, 155-161 (1999)

K.Nakamura, I.Murase and Y.Takizawa, A new mass screening method for methylmercury poisoning using mercury-volatilizingbacteria from Minamata Bay, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.44, 100-104 (1999)