

「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

世界各地で問題となっているトリクロロエチレン (TCE)、テトラクロロエチレン、PCB等の有機塩素化合物及び水銀による土壌汚染を、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問題である、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。

上記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以下の成果を得た。(1)TCE分解細菌メチロシスティス属、ミコバクテリウム属細菌を土壌中より分離し、分解特性調べた。両株ともに50mg/lのTCEを分解できた。TCEの分解には酸素添加酵素が関与しており、分解酵素及び分解酵素遺伝子の解析を行った。また、ビフェニル及びトルエン資化性細菌の2種のシュードモナス属細菌の遺伝子を相互に置換することにより、TCE分解能が新たに発現する現象を見出した。さらに水俣湾より各種の有機水銀を分解できるバチルス属の細菌の分離に成功した。(2)TCE分解に関与する酵素遺伝子の構造を活用して、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法により、従来1ヶ月を有した分解細菌の計数期間を、数時間に短縮することが可能となった。(3)鞭毛を有する細菌のセンサー機能を活用して数分で有害物質の存在の有無を判定できるモニタリング手法を開発した。(4)TCE及び水銀分解細菌が土壌汚染の浄化に有効であることを明らかにした。今後これらの基礎研究を発展させ汚染現場の修復に活用できる技術の開発を目指していく。

2. 研究実施内容

本研究では、土壌・地下水汚染で大きな問題となっている有機塩素化合物および重金属の汚染に対し、バイオレメディエーション技術を用いて汚染を修復する際のブレイクスルーすべき以下の5つの課題について基盤的研究を実施した。

(1) 分解能強化微生物の開発

有機塩素化合物としてTCE、テトラクロロエチレン(PCE)、1,1,1-トリクロエタン(TCA)、PCBを、また重金属として水銀化合物を対象に分解菌の探索・分離ならびに分解酵素遺伝子の単離、機能解析を行った。土壤中より分離した*Mycobacterium* sp. TA27株は、高濃度のTCE(50mg/l)およびTCA(75mg/l)を分解できること、また種々のハロゲン化脂肪族炭化水素を分解できることが判明した。またビフェニル資化菌*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株はPCBを分解でき、分解能は、4個のサブユニットから構成されたビフェニルジオキシゲナーゼに由来していた。一方、トルエン分解細菌*Pseudomonas putida* Fl株のトルエン分解能は、4個のサブユニットから構成されたトルエンジオキシゲナーゼに由来しており、この両酵素のサブユニット遺伝子を相互に置換して種々のハイブリッドを構築し、この遺伝子をKF707株の染色体に導入した組換え株は、ビフェニル資化能を保持したまま、10ppm TCEを6時間で完全分解した。遺伝子をハイブリッドすることにより、両者にはない新たな形質の発現が確認された。

水俣湾海水等より45株の水銀耐性細菌を分離した。水俣湾には、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を分解できる微生物が多数生息していることが判明した。

(2) 土壤中における微生物の挙動解析

土壤中に導入された微生物の安全性を調べるためには、環境中における生残・増殖性を明らかにする必要がある。そこで、培養を必要とせずかつ短期間で検出が可能な微生物特有のDNA塩基配列を対象としてPCR法による検出法を検討した。TCE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(MMO)遺伝子の一部をPCRで増幅し、M株を特異的に検出する手法を開発した。検出感度を高めるための前処理、プライマー濃度、緩衝液組成、温度条件等について検討した結果、反応液当たり5細胞までの検出が可能となった。従来の計数で1ヶ月を要したものが数時間で計数が可能となった。

(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が懸念されているため、化学物質に対して集積、忌避するべん毛を有する微生物のセンサー機能に着目し、顕微鏡視野中での運動性を画像処理により解析する迅速高感度毒性試験法を開発した。すなわち、運動性を有する細菌*Pseudomonas aeruginosa* PAO1株を用い、重金属、有機溶媒、芳香族化合物について運動性阻害と増殖阻害との相関について調べた結果、それぞれに対し50%の阻害をもたらす化学物質の濃度を比較したところ、相関係数0.91の高い相関が認められ、微生物のセンサー機能を活用して化

学物質の有害性を迅速に評価することが可能であることが判明した。

(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、特にエネルギー代謝、窒素代謝に関する微生物相等に着目し、これらに関する微生物およびその遺伝子のポピュレーションダイナミックスによる生態系影響評価法を検討した。TCE汚染濃度の各種微生物に対する影響を調べた結果、糸状菌が最も顕著な影響を受けることが判明した。

(5) 土壌・地下水シミュレーターおよび現場における修復技術の適応性の評価

フラスコ・カラムレベルにおける微生物の有害物質分解能等に関する基礎データをふまえて、大型のシミュレータを用いて、汚染物質および浄化微生物の消長を明らかにすると共に、汚染現場の浄化に適応可能な技術の開発を試みた。通気・攪拌装置を有する水銀除去バイオリアクターを設計し、水銀還元酵素遺伝子群（merオペロン）を組み込んだ組換え *Pseudomonas* 属細菌を用いて水銀除去を行った。40ppm の塩化第二水銀を 24 時間で水中から完全に、また土壌スラリー中から 70% が除去され、微生物による水銀汚染の浄化の可能性が示された。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

○O. Yagi, H. Uchiyama and K. Iwasaki, Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Volatile Chlorinated Compounds by a Methane-Utilizing Bacterium, *Bioremediation Technologies*, Vol.3, 141-154, 1998

○Y. Okubo and O. Yagi, Current Status of Soil Pollution and Bioremediation in Japan, *Bioremediation Technologies*, Vol.3, 115-140, 1998

○矢木修身、岩崎一弘、揮発性有機塩素化合物分解微生物、*日本微生物生態学会誌* Vol.13 No.3, 165-170, 1998

他 9 件