

平成 22 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19510087

研究課題名（和文）好塩好アルカリ性細菌を利用した汽水域生腐泥の利活用に関する研究

研究課題名（英文）Studies of the utilization of the sludge dredged from brackish-water region by halo-alkaliphilic bacteria

研究代表者

大島 朗伸 (OSHIMA AKINOBU)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70152113

研究成果の概要（和文）：島根県中海を含め、全国 4 カ所で採取した試料から、好塩好アルカリ性細菌のコロニー約 7,200 コロニーを分離した。さらに有機物分解能の高い 127 コロニーを二次選択した。これらはいずれも *Bacillus* 属に属する細菌であった。中海から採取した生腐泥に酸化カルシウムを添加してアルカリ性 pH にした後、選択した菌株を添加・培養し有機物分解試験を行った。その結果、腐泥からのリンの溶出は激減すると共に、30 日間の培養で最大 20% の有機炭素量の減少が確認された。

研究成果の概要（英文）：About 7,200 colonies of halo-alkaliphilic bacteria were isolated from the samples collected from 4 sources including Lake Nakaumi in Shimane Prefecture. 127 colonies with high decomposition ability of organic compounds were selected by second screening. All bacteria isolated belong to the genus *Bacillus*. After alkalinized the sludge by the addition of CaO, selected strains were added to the sludge and decomposition of organic compound were examined. As a result of the incubation, we found that elution of phosphate was decreased sharply and about 20% of organic carbon was decreased.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：好アルカリ性細菌，腐泥，有機物分解，環境修復

1. 研究開始当初の背景

腐泥、いわゆるヘドロは河川、湖沼、港湾及びその他の流水停滞部に見られる超軟弱状態の細粒質粒子群が主要構成物となっている泥状堆積物である。豊かな水産資源を持つ汽水域でのヘドロの蓄積による生態系の

破壊は大きな問題となっており、環境回復のために湖底への空気供給、湖底に堆積したヘドロの上への覆砂工事、ヘドロの浚渫などさまざまな対応がなされている。しかし、湖底への空気の供給はヘドロの拡散をもたらす可能性もあること、また覆砂工事においては、

用いられる砂の採取による新たな環境破壊も懸念されること、さらに浚渫では、得られたヘドロの処分地の確保が年々困難となりつつあることなど、いずれの方法も将来的には問題を抱えている。これらの点を踏まえるとヘドロを除去し、そのヘドロを再資源化することにより有効利用する手法が最も優れていると考えられる。しかしながら、ヘドロの再資源化、すなわちヘドロの加熱処理などによる減容化及び、農業や都市緑化事業への有効利用には下記の様な問題点がある。

(1)ヘドロを乾燥後、造粒・焼成後、吸着剤などとして活用する方法はコストが高くなる可能性がある。

(2)湖底から除去したヘドロをそのまま利用する場合、ヘドロ中に含まれる硫化物が大気によって酸化され、生成する強酸性物質により土壌が酸性化し、酸性硫酸塩土壌が形成される場合があること。

(3)降雨などにより、ヘドロ中に含まれるリン酸態リンが溶出し、湖沼等の閉鎖性水域の富栄養化を招く可能性があること。

(4)汽水域生ヘドロに含まれている塩が塩害を引き起こす可能性があること。

現在、浚渫されたヘドロの酸化に伴う強酸性状態を改善するためには石灰資材の施用が多く行われている。石灰資材の施用は、原材料である石灰石が資源の少ない我が国においても良質なものが大量に埋蔵されている地下資源であるため、比較的 low コストで調達することができる。また、この方法はヘドロの強酸性状態の改善と共に、石灰資材をアルカリ性 pH になるまで添加することにより、ヘドロ中に含まれるリン酸態リンの不溶化を図ることが出来る点で優れた方法と考えられる。一方、ヘドロに含まれている塩の効果的な除去方法は知る限り開発されていない。このため、ヘドロが蓄積した汽水域環境修復のための新たな取り組みが求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、石灰資材を添加してアルカリ性 pH にしたヘドロ中に含まれている有機物質を、極限環境微生物の一種である好塩好アルカリ性細菌を利用して分解した後、湖底の覆砂材料として再び湖底に戻すことにより、汽水域環境の修復を目指す手法の開発である。この手法を用いれば、浚渫汚泥の廃棄場所の確保、覆砂資材の採取による環境破壊、酸性硫酸塩土壌の形成、ヘドロ中に含まれる塩化ナトリウムなどによる塩害などの問題は生じることはない。本研究の特筆すべき点は、ヘドロに石灰資材を添加した後、高い塩濃度及びアルカリ性 pH 環境を好んで生育する微生物を利用してアルカリ性 pH を呈するヘドロ中の有機物の効率的な分解を行っ

た後、採取した湖底への覆砂材料として再びヘドロを利用する点にある。本法によるヘドロ処理は、生産物中に残存する塩分を除去する必要がなく、リン酸態リンも不溶性の形となっているため、水質汚濁の可能性は低いものと考えられる。また使用する菌株も自然界から分離するため、環境に対する影響は低い。

本研究の最終目標は好塩好アルカリ性細菌によって有機物分解処理を行ったヘドロを用いた覆砂処理及び、その後の経過観察において良好な環境回復がなされることの確認であるが、好塩好アルカリ性細菌による有機物分解に必要な条件・期間等が明確ではないため、本研究では高い有機物質分解活性を示す好塩好アルカリ性細菌の単離及びこれらの菌を用いたヘドロ中の有機物質分解試験を行った。

3. 研究の方法

(1) 好塩性好アルカリ性細菌の一次スクリーニング

好アルカリ性細菌は通常の土壌中から培地 pH をアルカリ性に調整した培地を用いることにより比較的容易に分離可能である。しかし、本研究では 3% 程度の NaCl を含むヘドロに含まれる有機物質を効率良く分解する微生物を分離する必要があるため、有用な菌が分離できるか否かが本研究の成否左右する重要なポイントとなる。そこで汽水域（島根県：中海・宍道湖）及び海洋（兵庫県：瀬戸内海沿岸，熊本県：有明海沿岸，福島県：太平洋沿岸）で試料を採取し、菌のスクリーニングを行った。一次スクリーニング用培地には、1% 肉エキス，1% Peptone，3% NaCl，1% Na_2CO_3 ，1.5% Agar を使用した。

(2) 好塩性好アルカリ性細菌の二次スクリーニング

一次スクリーニングで選択された菌株を用い、デンプン質及びタンパク質分解能を示す菌のスクリーニングを行った。プロテアーゼ生産菌選択培地には、1% スキムミルク，0.5% Polypepton，0.5% Yeast extract，0.5% K_2HPO_4 ，3% NaCl，1% Na_2CO_3 ，0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，1.5% Agar を使用し、アミラーゼ生産菌選択培地には 1% 可溶性デンプン，0.5% Polypepton，0.5% Yeast extract，0.5% K_2HPO_4 ，3% NaCl，1% Na_2CO_3 ，0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，1.5% Agar を用いた。

(3) 選択された細菌の基本的性質の検討

二次選択を行って得られた菌の中でも、特にプロテアーゼ活性，アミラーゼ活性の高い菌株を選択し、アルカリ pH での増殖能力，各酵素の性質について検討した。プロテアーゼ活性は 1%(w/v) の Azocasein (Sigma) を基質とし、50°C，30 分酵素反応を行い、335nm の吸光度の増加を測定した。アミラーゼ活性

は 1%可溶性デンプンを基質とし、50℃、30分酵素反応を行い、生成する還元糖をDNS法で測定する方法と、5 mM PNPG を基質とし、50℃、30分の酵素反応で生成するニトロフェノール量を測定する方法で行った。

(4) 16S-rDNA塩基配列による分子系統分類

定法に基づき二次スクリーニングで選択された菌株の代表的な数株の16S-rDNAの塩基配列を決定し、選択された代表的菌株の帰属分類群を推定した。

(5) 汽水域から採取したヘドロの組成分析

中海及び宍道湖の湖底よりヘドロを採取し、pH、等を測定すると共に、CHNSコーダーを用いてヘドロ中に含まれる全炭素、水素、窒素及びイオウ含有量を測定した。

(6) 酸化カルシウムの最適添加量の決定

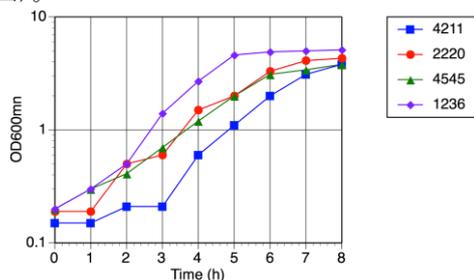
採集したヘドロへ酸化カルシウムを添加し、好アルカリ性細菌の生育に適したpH 10.5程度になるための必要量を求める。また、酸化カルシウムを添加した後のヘドロ中に含まれる可溶性リンの定量を行い、リン酸の溶出が抑制されていることを確認した。

(7) 選択した菌を利用した腐泥中の有機物分解実験

酸化カルシウムを添加した腐泥へ、選択した菌株を接種し、好気的条件下で培養を行い腐泥中の有機物等の含有量の変動をCHNSコーダーで分析した。

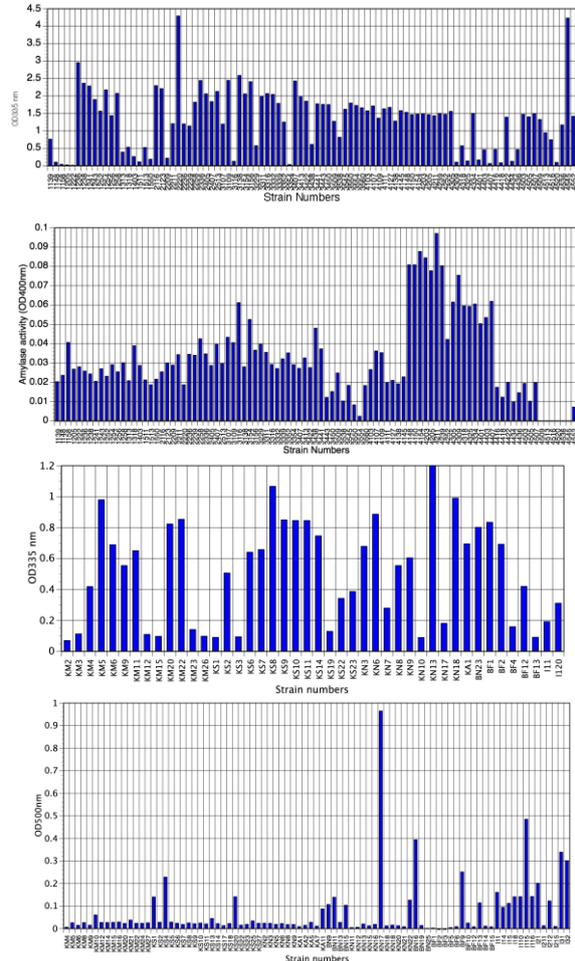
4. 研究成果

島根県の中海の湖底から採取した腐泥、熊本県の住吉、網田、長浜及び松島マリンステーション付近の海岸で採取した土壌、兵庫県の神戸大学海事科学部付近の海岸及び沖合で採取した土壌、福島県の塩屋岬及び八崎の海岸で採集した土壌を分離源として用い、一次スクリーニングを行った。その結果、約7,200個のコロニーを分離することができた。その後、これらのコロニーの二次スクリーニングを行いデンプン質及びタンパク質分解能を示す菌を得た。この二次スクリーニングによって553株を選別することが出来た。これらの株のうち、プロテアーゼのみの生産菌が317株、アミラーゼのみの生産菌が109株、両者を共に生産する菌は127株であった。いずれの株も3%NaClを含むアルカリ性pHの培地環境で良好な増殖能力を示す事から腐泥中の有機物分解の目的には十分使用可能であると考えられた(下図)。

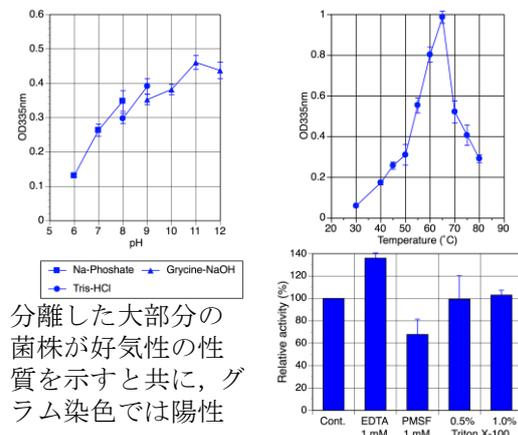


中海湖底の腐泥から分離された各種菌株の示すプロテアーゼ活性及び、アミラーゼ活性を下図に示す。

下図上から順に中海から分離した菌のプロテアーゼ活性、同アミラーゼ活性、熊本・兵庫・福島で分離した菌のプロテアーゼ活性、同アミラーゼ活性



また、これらの菌が菌体外に生産する酵素はアルカリ性pHで高い活性を示す好アルカリ性酵素であった。16S-rDNA解析の結果*Bacillus cohnii*と類縁と思われる4545株のプロテアーゼは下図に示すように、活性の至適pHはpH11にあり、最適温度は65℃に持ち、種々の薬剤に対して高い耐性を示す酵素であった。

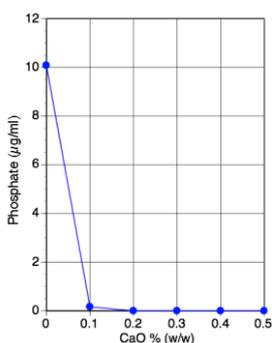


分離した大部分の菌株が好気性の性質を示すと共に、グラム染色では陽性

を示し、また芽胞染色によって芽胞の確認をすることができたことから、多くの菌株が *Bacillus* 属に属する菌であると予想された。このことは数種の株の16S-rDNAの塩基配列からも確認された。

汽水域腐泥中に含まれている有機物質をアルカリ性pH環境下で分解した後、湖底の覆砂材として用い、環境修復を目指す手法の開発のため、汽水域から採取した腐泥の組成分析、酸化カルシウムの腐泥への最適添加量の決定及び、選択した菌を利用した腐泥中の有機物分解実験を行った。

中海湖底から採取した腐泥のpHは採取直後では約pH8.0と弱アルカリ性を示していたが、大気中に曝すと徐々に酸性化し、pH3.0付近まで低下するのが観察された。CHNSコーダーを用いて腐泥中に含まれる全炭素全窒素を測定したところ、平均で炭素量として3.5%、窒素量としては0.4%程度含まれていることが明らかとなった。この値は、微生物を用いた生分解が行われている下水汚泥等と比較するとかなり低い値であった。また、腐泥中に含まれる可溶性リン酸は約10µg/mlであった。採集した腐泥をpH10.5付近のアルカリ性pHにするために必要な酸化カルシウム添加量を測定したところ、約0.1% (w/w) であった。この酸化カルシウムの添加による腐泥のアルカリ性化により、腐泥中の可溶性リンの溶出は右図のようにほぼ完全に抑制された。

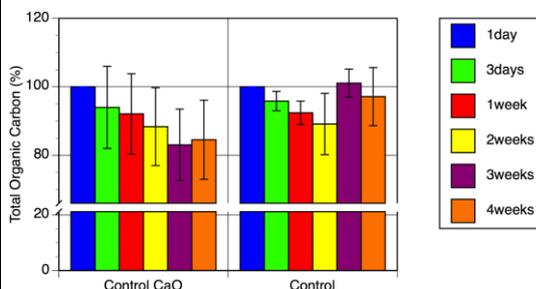


そこで、アルカリ性化した腐泥中に、選択した数種類の好塩好アルカリ性細菌を培養後添加し、菌の増殖測定を試みた。

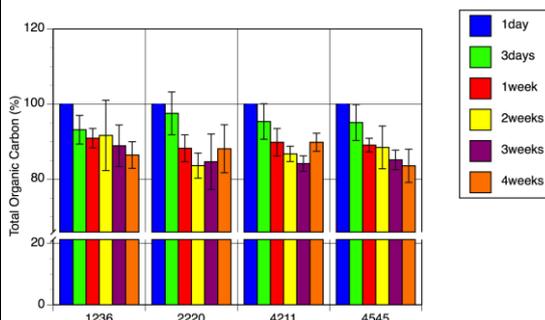
固相培養（水分含量の少ない腐泥を用いた菌の培養）では、腐泥中に含まれる水分を乾燥により低減した後に菌を接種し、酸化カルシウム添加腐泥中での微生物の増殖測定を微生物熱量計を用い、細菌の増殖に伴う発熱を測定することによって試みた。水分濃度の調節及び通気性の維持のために木材チップを添加するなどして培養を行ったが、含水量が多く、微小な温度変化を測定することはできなかった。また、乾燥に伴う腐泥中の塩分濃度の増加及び通気性に問題があり、菌の増殖には不適であると考えられたため、続いて水分濃度を上げ、腐泥中での菌の培養を試みた。

前培養した4株の好アルカリ性細菌をスターターとして腐泥中に添加後、巡回培養を行い、腐泥中に含まれる有機物濃度の変化を追跡した。対照としては、腐泥のみで培養を行ったもの及び、腐泥に酸化カルシウムのみを

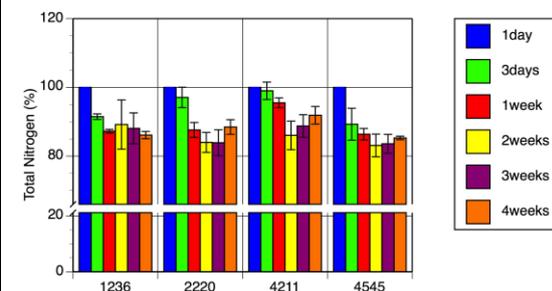
添加して培養を行ったものを用いた。なお、本研究では、有機炭素量を有機物濃度の指標とした。有機物分解試験の結果、全ての試料において有機炭素の減少が確認できた。腐泥のみで培養した試料は1ヶ月間の培養で有機炭素の減少が約3%、腐泥に酸化カルシウムを添加した試料では、約16%それぞれ減少していることが確認できた（下図）。



これに対し、腐泥に酸化カルシウムを添加し、好アルカリ性細菌を添加した試料では、有機炭素の約15~20%程度の減少が確認された。しかしながら、この値は酸化カルシウムのみを添加した試料で得られた結果と大きな差は観察されなかった（下図）。

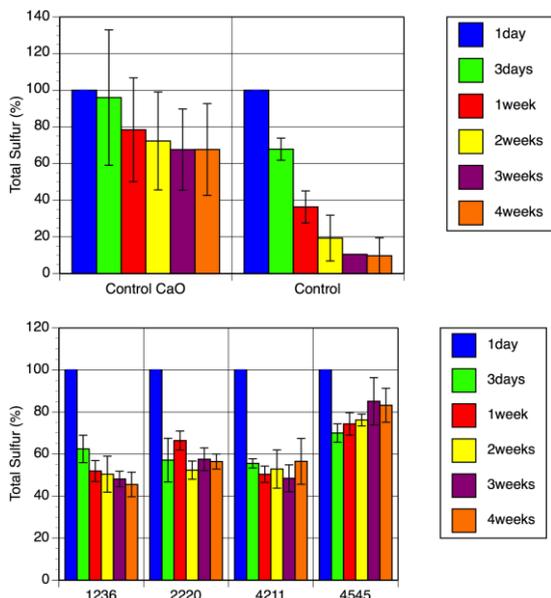


また、有機物には窒素を含んでいるものもあり、有機炭素量との相関関係を検討するため、窒素濃度の追跡も行った。全窒素量は有機炭素とほぼ同じ割合で変化していた（下図）。



一方、腐泥には硫化物が多く含まれていることが知られているが、このような腐泥が嫌気状態におかれた場合、微生物の作用により硫化水素が発生する可能性が考えられる。このため、採取した腐泥中に含まれる硫黄濃度の測定と、培養に伴う濃度変化の検証を行った。全硫黄量は、すべての試料で1日目から3日目の間で急激な減少が観察された。3日目以降は、酸化カルシウムを添加・培養した

試料では、腐泥のみの試料よりも硫黄の減少量が少なかった（下図）。



有機物分解試験を行った腐泥を埋め立てなどに使用する場合重要な問題になるのが有害物質特に重金属の溶出である。そこで腐泥からの溶出成分を ICP 発光分析によって分析した。その結果、酸化カルシウムを添加した試料からは砒素、カドミウム、鉛などの重金属の溶出は検出限界以下の値を示し、観察されなかった。しかし、腐泥のみの試料では鉄、亜鉛、マンガンの溶出が確認され、酸化カルシウムを添加した試料では、これらの金属の溶出が抑制されていることが確認された。

これらの結果から、汽水域生腐泥中に含まれる有機物の分解に、腐泥をアルカリ性化した後に、好塩好アルカリ性細菌を添加して好氣的条件下で培養する手法は、一定の効果を示すことが明らかとなった。しかしながら、菌未添加のアルカリ性腐泥もある程度の有機物濃度の減少を示した。これは、元々腐泥中に生息あるいは胞子の形で生存していた、微生物が行った分解作用によるものであると考えられる。腐泥中に含まれる有機物の種類についての検討し、これらの分解活性の高い菌をさらに選択することにより、分解能力はさらに高まるのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 13 件）

- ① Fukuda N, Ishida A, Nagata S, Sasaki H, & Oshima A, Degradation of organic compounds in sludge dredged from brackish-water region by halo-alkaliphilic bacteria II, *Proceedings of the 46th Conference on the Biology of*

Halophilic Microorganisms, Japan (in press) (2010) 査読無

- ② Oshima A, Munetoh M, Ishida A, Sasaki H, & Nagata S, Ectoine Synthesis and Proline Uptake are Involved in Osmoadaptation of an Alkaliphilic *Bacillus* sp. U-21 *Advances in Medicine and Biology*. Volume 4 (in press) (2010) 査読有
- ③ Tang J C, Taniguchi H, Chu H, Zhou Q and Nagata S, Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes, *Lett. Appl. Microbiol.*, **48**:38-43 (2009) 査読有
- ④ Fukuda N, Ishida A, Nagata S, Sasaki H, & Oshima A, Degradation of organic compounds in sludge dredged from brackish-water region by halo-alkaliphilic bacteria, *Proceedings of the 45th Conference on the Biology of Halophilic Microorganisms*, Japan 21-23(2009) 査読無
- ⑤ Tang J. C., Xiao Y., Oshima A., Kawai H., and Nagata S., Disposal of seaweed wakame (*Undaria pinnatifida*) in composting process by marine bacterium *Halomonas* sp. AW4, *International Journal of Biotechnology* **72**:73-85 (2008) 査読有
- ⑥ Nagata S, Wang Y Q, Oshima A, Zhang L, Miyake H, Sasaki H, and Ishida A, Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnology and Bioengineering* **99**:941-948 (2008) 査読有
- ⑦ Oshima A, Ishida A, Nagata S, & Sasaki H, Isolation of alkaliphilic bacteria from seashore and brackish water region. *Proceedings of the 44th Conference on the Biology of Halophilic Microorganisms*, Japan 21-23 (2008) 査読無
- ⑧ Sasaki H, Takagi A, Oshima A, Ishida A, & Nagata S, Comparison of the function of L- and D-proline as compatible solute in *Escherichia coli* K-12 under high osmolarity. *Annals of Microbiology* **57**:265-268 (2007) 査読有
- ⑨ Tang, J. C, Wei J H, Maeda K, Kawai H, Zhou Q, Hosoi-Tanabe S and Nagata S. Degradation of seaweed Wakame (*Undaria pinnatifida*) by composting process with inoculation of *Bacillus* sp. HR6. *Biocontrol Science*, **12**:47-54 (2007) 査読有
- ⑩ Zhu D, Niu L, Wang C X and Nagata S, Isolation and characterization of moderately halophilic bacterium *Halomonas ventosae* DL7 synthesizing ectoine as compatible solute, *Annales of Microbiology*, **57**:401-406 (2007) 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 福田直登 好塩好アルカリ性細菌を用いた汽水域生腐泥中の有機物分解について II 好塩微生物研究会 第 45 回大会 2009 年 12 月 13 日 帝塚山大学
- ② 福田直登 好塩好アルカリ性細菌を用いた汽

- 水域生腐泥の処理について 日本植物学会
第73回大会 2009年9月19日山形大学
- ③福田直登 好塩好アルカリ性細菌を用いた汽水域生腐泥中の有機物分解について 好塩微生物研究会 第45回大会 2008年12月13日 帝塚山大学
- ④福田直登 好アルカリ性細菌を用いた汽水域生腐泥の利用について 極限環境微生物学会 2008年11月4日 立教大学
- ⑤福田直登 海浜及び汽水域から分離した好アルカリ性細菌を用いた汽水域生腐泥の利活用について 日本植物学会第72回大会 2008年9月26日 高知大学
- ⑥大島朗伸 海浜及び汽水域からの高い有機物分解活性を示す好アルカリ性細菌の分離について 日本植物学会中国四国支部大会 2008年5月17日 広島大学
- ⑦Oshima A, Isolation and utilization of extremophiles from the sediment of brackish-water regions International Symposium Restoration and Management of Wetlands 2008年3月2日 島根大学
- ⑧大島朗伸 海浜及び汽水域からの好アルカリ性細菌の分離について 好塩微生物研究会 第44回大会 2007年12月15日 熊本大学
- ⑨大島朗伸 中海底質より分離した好アルカリ性細菌 No.4545 株の菌体外プロテアーゼについて 日本植物学会中国四国支部大会 2007年5月15日 鳥取大学

[図書] (計1件)

Nagata S. Nova Science Publishers, Diamino Amino Acid, (2008) 139-154

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 朗伸 (OSHIMA AKINOBU)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：70152113

(2) 研究分担者

石田 昭夫 (ISHIDA AKIO)
熊本大学・自然科学研究科・教授
研究者番号：40040117
(平成17年 研究分担者)

永田 進一 (NAGATA SHINICHI)
神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授
研究者番号：10108847

佐々木 秀明 (SASAKI HIDEAKI)
いわき明星大学・科学技術学部・助教
研究者番号：30405998

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：