

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20681008

研究課題名（和文）嫌気ベンゼン分解促進因子の生理生態学的アプローチによる解明と汚染浄化手法への展開

研究課題名（英文） Investigation of factors to enhance anaerobic benzene degradation by ecophysiological approach and application towards remediation of polluted sites

研究代表者

栗栖 太 (KURISU FUTOSHI)

東京大学・大学院工学系研究科 ・ 准教授

研究者番号：30312979

研究成果の概要（和文）：

土壌地下水におけるベンゼン汚染の低コスト・低エネルギー消費型の浄化手法として、嫌気微生物による浄化手法開発のための研究を行った。まず、定量 PCR 法と蛍光遺伝子プローブ法によるベンゼン分解微生物 Hasda-A の検出・定量手法を開発した。ベンゼン分解の促進に関する検討を行い、ベンゼンの分解は常に Hasda-A の増減と連動していることを明らかにした。実汚染地下水での分解や、クロロエチレン類との同時分解が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

As a low cost and low energy consumption treatment method for benzene pollution in soil and groundwater, anaerobic benzene degradation was studied to develop remediation process. Detection and quantification method were developed for benzene degrading bacteria Hasda-A by quantitative PCR and Fluorescent in situ hybridization. Enhancement of benzene degradation was tested and the benzene degradation was always coincided with Hasda-A growth. Degradation in groundwater from contaminated sites and simultaneous degradation with chlorinated ethylenes were also demonstrated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：環境微生物工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：土壌汚染浄化、ベンゼン、安定同位体プローブ法、同位体トレーサー法

## 1. 研究開始当初の背景

ベンゼンによる地下水・土壌汚染は日本、そして世界において深刻である。環境省による土壌・地下水汚染の実態調査でも、ベンゼンはクロロエチレン類と並び、各地で環境基準を超過している最も重要な物質群の1つ

である。現状でベンゼンの汚染は、揚水曝気法などの物理的処理を中心に行なわれている。しかしながら、ベンゼンの環境基準は地下水で0.01mg/Lと非常に厳しく、物理的な処理法では、環境基準の濃度まで低減させることは大変難しい。こうした低濃度広範囲の

汚染には一般に、微生物を用いたバイオレメディエーションが有効である。

ベンゼンは、好気的な分解は比較的容易に進むため、酸素や栄養塩類を地中に送り込んで、揮発させると同時に微生物分解も促進する手法などが開発されている。反面嫌気的な条件下では、ベンゼンは一般に安定であって分解が進みにくいことが知られており、浄化技術の開発は進んでいない。嫌気的な条件下で分解が可能となれば、地中への酸素供給が必要となる好気的な処理に比べ、低コスト・低エネルギーでの浄化が可能となる。またベンゼンの嫌気的な分解が、すでに嫌気的なバイオレメディエーション技術が実用化されているクロロエチレン類との組み合わせが可能となれば、現在問題となっている土壌・地下水汚染を一気に解決する技術となりうる。

研究代表者は、当時の共同研究者である矢木修身（現・日本大学教授）とともに、嫌気的、特にメタン生成条件下でのベンゼン分解微生物群集を確立することに成功した。さらにベンゼン分解に関与する微生物種の特性を安定同位体プローブ法により行ない、*Syntrophobacterales* 目に類するとみられる新規な微生物種であることを突き止めた。

## 2. 研究の目的

ベンゼンによる土壌・地下水汚染の嫌気バイオレメディエーション技術の確立を目指し、ベンゼン分解微生物およびその分解活性の活性化条件を明らかにすることを目標とした。そのために、これまでに確立したベンゼン分解集積微生物系を用い、ベンゼン分解活性を制御し向上させるために必要な知見の獲得を、*Syntrophobacterales* 目類縁の微生物の挙動を中心に解明することにより行った。さらに、クロロエチレン類の嫌気バイオレメディエーション技術との両立が可能かどうか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ベンゼン分解微生物の検出・定量手法の確立

*Syntrophobacterales* 目類縁のベンゼン分解微生物 Uncultured Clone Hasda-A に特異的なプライマー、プローブの設計には、遺伝子解析プログラム ARB を用いた。また、定量 PCR 法には QPrimer 法によるリアルタイム PCR をもちいた。

### (2) ベンゼン分解促進に関する検討

いずれの実験も、以下 3.(4)に示す集積培養系を用いて検討を行った。ベンゼンが完全に

分解された時は、再度ベンゼンを添加した。ベンゼン・メタンは GC-FID でバイアル内のヘッドスペースの濃度を測定し、バイアル内物質量を求めた。培養系からの DNA 抽出には、ISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン)を用いた。全細菌の 16S rDNA の遺伝子数は、インターカレーター法による Real time PCR で定量した。Hasda-A の 16S rDNA の遺伝子数は、QPimer 法による Real time PCR で定量した。

ベンゼンの推定初発代謝産物を投与する試験では、トルエン( $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、フェノール( $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、安息香酸( $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )を個別に投与した系を作製した。フェノール、安息香酸を HPLC で、気相の  $\text{CO}_2\cdot\text{CH}_4$  を同位体ごとに GC-MS で測定した。

共存物質の影響を見る試験では、ベンゼン分解培養系にクロトン酸、安息香酸、フマル酸を添加し、ベンゼンの分解速度の相違を観察した。クロトン酸、フマル酸は、それぞれ  $0.1\text{mol}$  に  $2\sim 5\text{M}$  NaOH を加え pH を 7 付近に調整した後、 $100\text{mL}$  とした  $1\text{M}$  水溶液を作製・使用した。安息香酸、酢酸は、それぞれの Na 塩  $0.1\text{mol}$  を安息香酸、酢酸を用いて pH7 付近に調整し milliQ 水を加え  $100\text{ml}$  とした。

### (3) 汚染浄化への展開に向けた検討

ベンゼン汚染地より採取した地下水を用い、3.(4)の集積培養系と混合して試験を行った。 $\text{Na}_2\text{S}, \text{L-cystein}$  を終濃度  $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  となるように添加した後、地下水  $18\text{mL}$  に対し集積培養系  $2\text{mL}$  を投与し、培養系容量が  $20\text{mL}$  となるように混合した。

クロロエチレンとベンゼンの同時分解においては、3.(4)のベンゼン分解培養系(土浦、新芝川培養系)  $10\text{mL}$  と TCE 脱塩素培養系(土浦市蓮田土壌より研究室で集積を行ったもの)  $1\text{mL}$  を、嫌気グローブボックス内で混合し、混合培養系を作成した。また、対照系として土浦培養系  $10\text{mL}$  をオートクレーブにより  $121^\circ\text{C}$ 、 $15$  分で 2 回滅菌した滅菌土壌系を用意した。土浦+脱塩素培養系、新芝川+脱塩素培養系、滅菌土壌のそれぞれについて、液相濃度でベンゼン  $10\text{mg/L}$ 、TCE  $1\text{mg/L}$  となるように添加し、 $25^\circ\text{C}$  で暗所にて静置培養した。

### (4) 本研究で用いた培養系について

本研究で用いた培養系は、茨城県土浦市の蓮田土壌、山口県岩国市の蓮田土壌、埼玉県の新芝川の河川底泥を採取し、ベンゼン分解集積系として集積したものである。土壌  $10\text{g}$ 、嫌気滅菌水  $20\text{mL}$  を全容  $72\text{ml}$  のバイアル瓶

に入れ、 $N_2:CO_2=8:2$ の混合気体で気相を置換後、還元剤である  $Na_2S$ 、 $L$ -Cystein をそれぞれ終濃度  $0.3g \cdot L^{-1}$  となるように添加し、ベンゼンを  $0.1mg \cdot L^{-1}$  から  $100mg \cdot L^{-1}$  の範囲で添加して  $25^\circ C$  で培養を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ベンゼン分解微生物の検出・定量手法の確立

##### ① 定量 PCR 法

これまでの研究により、安定同位体プローブ法(DNA-SIP 法)によりベンゼン分解微生物と推定された Uncultured Clone Hasda-A は  $\delta$ -Proteobacteria 綱に属し Uncultured Clone ZZ14C7[AY214193]と 98%の相同性を持つことがわかっている。ARB の 16S rRNA 1400bp のデータベースに挿入すると、これらの配列のみで1つのクラスタをつくり、*Syntrophobacterales* 目に類縁であった。これらの配列を標的とした Primer を設計した結果、BD204 f (CTCTgTCTCAAgTTgCCgCTTA) 及び BD436r (TACgTTTCgTCCCTTCAAACA) を得た (Fig.1)。このプライマーを用い、QP-PCR 法により定量的 PCR 法による定量手法を開発した。

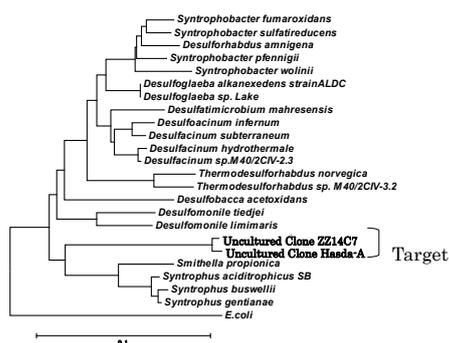


Fig.1 Hasda-A の系統的位置

##### ② FISH 法

ベンゼン分解微生物を検出定量するもう 1 つの方法として、FISH 法は定量性の面で優れている。また、Hasda-A がベンゼン分解微生物であることの多面的な検証も必要であり、そのためには FISH 法を応用した MAR-FISH 法により検証することが考えられる。そこで、Hasda-A を FISH 法で検出する手法の開発を行い、ベンゼン分解微生物系での検出を試みた。

Hasda-A に特異的な 16S rRNA 塩基配列領域として、定量 PCR 法で用いたプライマーと同一箇所を選定し、rRNA 標的プローブ BD437 を作成した。Hasda-A は培養菌株が入手できないことから、プローブの特異性を検証するため、大腸菌に clone Hasda-A を導入

してハイブリダイズ試験を行った (Clone-FISH 法)。その結果、1 塩基異なる配列を持つプローブとの特異性を保つにはホルムアミド濃度 30%が最適であることが示され、FISH 法により Hasda-A を検出する手法を確立することができた。

集積培養系中の Hasda-A の検出を行うために、土壌粒子が多い試料における前処理の検討を行った。超音波処理では土壌粒子が細分化し分離が難しくなることから、超音波処理よりも Vortex 処理の方が適していることが示された。

以上の検討に基づき、集積培養系中の Hasda-A を FISH 法で検出することに成功した (Fig.2)。

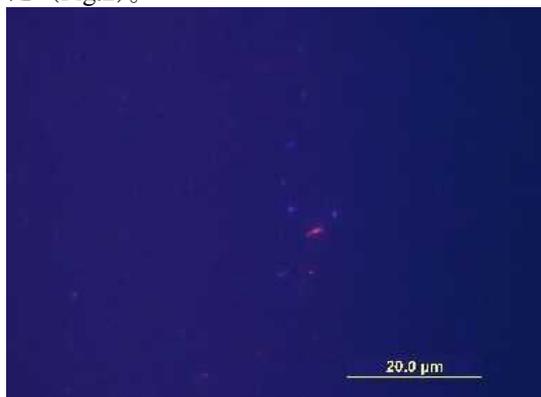


Fig. 2 プローブ BD437 により検出された Hasda-A(Cy-3 標識：赤色)

##### (2) ベンゼン分解促進に関する検討

###### ① 温度の影響

土浦蓮田土壌から得られた集積系を用いて、培養温度が分解活性に及ぼす影響を調査した。Fig. 3 にバイアル内のベンゼン量の推移を示す。25°C、28°C、31°Cでの培養系では大きな差異は見られなかったものの、25°Cに比べ 28°Cと 31°Cのほうが若干ベンゼンの分解活性が高かった。一方、34°Cの培養系では、30 日目以降、ベンゼンの分解速度が減少した。また、37°Cの培養系では、12 日目以降ベンゼンの分解が見られなくなった。このことから、ベンゼン分解微生物群の分解活性は、34°C付近から低下すると考えられる。

Hasda-A の 16S rDNA の遺伝子数は、37°Cの培養系を除き、実験開始時から 48 日目までの間に大きな変化は見られなかった。37°Cの培養系では 48 日目に試験開始時の 1/10 程度に減少しており、ベンゼン分解停止後に自己分解により減少したと考えられる。また、新芝川底泥から集積した培養系についても、土浦蓮田土壌の培養系と同様、37°Cでは分解が見られず、31°Cでの分解が 25°Cの分解よりも早いという結果が得られた。この結果は、

Hasda-A 遺伝子数の維持にベンゼン分解が必要であることを示しており、Hasda-A 遺伝子がベンゼン分解微生物由来であることを強く示唆している (Fig.4)。

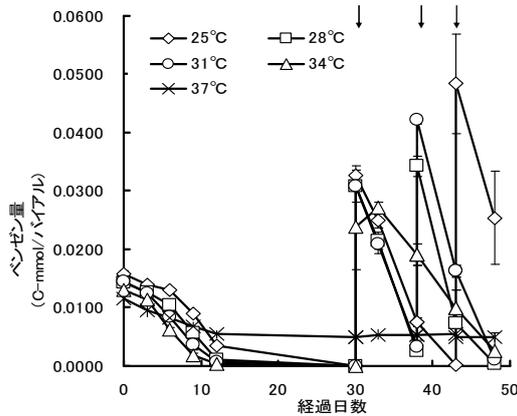


Fig.3 培養温度の影響試験:ベンゼン濃度変化

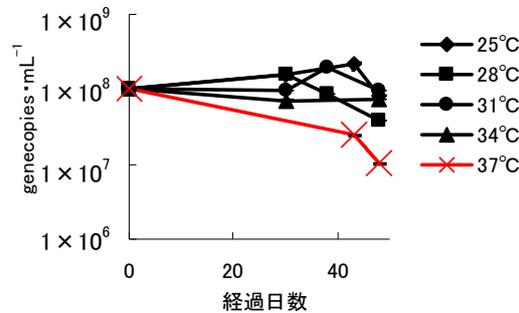


Fig. 4 培養温度の影響試験: Hasda-A 遺伝子数変化

## ② 分解経路の推定

ベンゼンの代謝経路を推定するため、ベンゼンの初発代謝産物として考える、トルエン、フェノール、安息香酸の  $^{13}\text{C}$  標識化合物をベンゼンと共に投与し、培養系によるベンゼン分解に与える影響を調べ、ベンゼンや各推定初発代謝産物の分解特性と代謝産物の測定を行った。

ベンゼン分解速度は、ベンゼンのみ、ベンゼン+トルエン、ベンゼン+安息香酸では、それぞれ  $15.8, 14.2, 15.5 \mu\text{M}\cdot\text{day}^{-1}$  と同程度であったが、ベンゼン+フェノールでは  $10.8\mu\text{M}\cdot\text{day}^{-1}$  と、若干の低下が見られた (Fig. 5)。フェノールの存在がベンゼン分解の阻害となったことから、フェノールのベンゼン分解微生物群への毒性か、ベンゼンからフェノールへの変換における反応物阻害が考えられた。

すべての試験系において、分解された化合物の炭素のほぼ全量がメタンと二酸化炭素に変換された。全化合物のベンゼン環由来炭素はほぼ 1:1 の割合でメタンと二酸化炭素へ、安息香酸のカルボキシル基由来炭素は二酸化炭素へと分解された。この炭素の転換比は、

Benzoyl-CoA の嫌気分解において確認されている転換比と合致した (Table 1)。これにより、ベンゼンやトルエン、フェノール、安息香酸の分解は Benzoyl-CoA を経由し下流は既知の経路で分解していると考えられた。

ベンゼンのみを投与した系、トルエン、フェノール、安息香酸を同時に投与した系のいずれにおいても Hasda-A の増加が見られ、増加量に差異はなかった (Fig.6)。トルエン、フェノール、安息香酸の分解においては、Hasda-A の増減への寄与は小さいと考えられる。一方で、ベンゼン、トルエン、フェノール、安息香酸のいずれも投与しなかった系において、Hasda-A の減少が見られた。このことより、Hasda-A のベンゼン分解への関与が改めて示されたとともに、フェノール、トルエン、安息香酸の分解は、この集積系の中では Hasda-A 以外の菌が主に行っている可能性が示された。

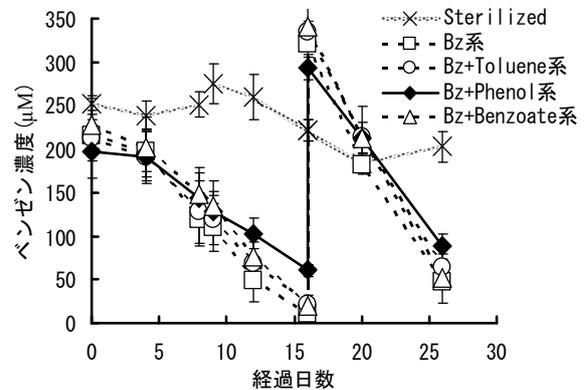


Fig. 5 ベンゼン分解初発代謝産物添加によるベンゼン分解への影響

Table 1 ベンゼン及び単環芳香族化合物分解の物質収支

投与芳香族化合物(略号: X)	$\text{CH}_4/\text{X}$		$\text{CO}_2/\text{X}$	
	$(\mu\text{mol-}^{13}\text{C}/\mu\text{mol-}^{13}\text{C})$			
$^{13}\text{C}_6$ ベンゼン (Bz)	0.41	$\pm 0.05$	0.49	$\pm 0.07$
[Ring] $^{13}\text{C}_6$ トルエン (T)	0.41	$\pm 0.07$	0.42	$\pm 0.06$
[Ring] $^{13}\text{C}_6$ フェノール (Ph)	0.40	$\pm 0.05$	0.55	$\pm 0.03$
[Ring] $^{13}\text{C}_6$ 安息香酸 (Ba)	0.52	$\pm 0.03$	0.55	$\pm 0.13$
[Carboxyl] $^{13}\text{C}_1$ 安息香酸 (Ba)	0.09	$\pm 0.10$	1.00	$\pm 0.10$

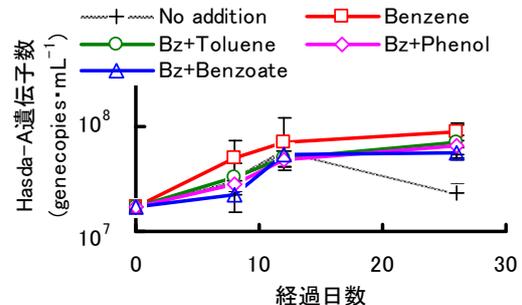


Fig. 6 推定初発代謝産物の分解における Hasda-A 菌数の変化

### ③ 共存物質

芳香族の中心代謝産物として考えられている安息香酸、安息香酸の嫌気分解の代謝産物であるクロトン酸、嫌気発酵で非常に重要な物質であるフマル酸について、ベンゼン分解へ及ぼす影響を調べた。Fig.7に示すように、これら有機酸を添加していない系で最もベンゼン分解が進んでいることが観察された。

クロトン酸は投与後 2~5 日の間に不検出となった。クロトン酸を投与した量から想定されるメタン生成量と、メタン生成量の実測値のバランス、メタンの生成速度を観察すると、17~20 日目にはメタンへと完全に分解されていると考えられた。クロトン酸 2~5 日の間に速やかに酢酸まで分解され、その後酢酸として蓄積し、メタン生成に用いられていた可能性が考えられた。

フマル酸は、実験開始後、2 日目までには不検出であり、8 日目に再添加したのちも、11 日目には不検出となった。フマル酸は 19~22 日にはメタンへと変換されていると考えられたが、ベンゼン濃度は、フマル酸の全てがメタンへと分解された 22 日前後までほぼ横ばいであり、ベンゼン分解に大幅な遅延が見られた。このことより、フマル酸自体、もしくはその代謝産物がベンゼン分解に対して阻害を与えていたことが明らかとなった。

安息香酸は、実験開始後 11 日目から分解が始まり、23 日目には検出限界と同程度の値であった。ベンゼン濃度は、クロトン酸と同じような推移を示し、ベンゼン分解に若干の遅延が認められた。

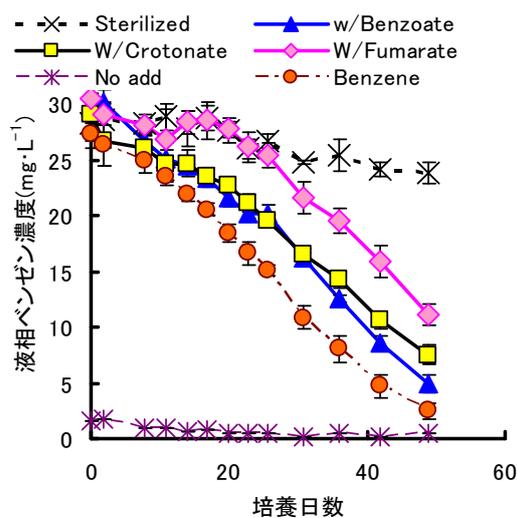


Fig. 7 ベンゼンの推定代謝産物共存下におけるベンゼン分解

### (3) 汚染浄化への展開に向けた検討

#### ① ベンゼン分解

ベンゼン汚染地下水にベンゼン分解集積系 (BDC とする) を投与した系において、ベンゼンは減少し、15 日程度の処理により、環境基準値の  $0.01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  を下回った (Fig.8)。ベンゼンの再投与後も分解は継続的に生じ、バイアルあたり  $20\mu\text{mol}\text{-C}(5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$  程度のベンゼンを投与しても分解は継続したことから、実汚染地下水の浄化にも有効であることが示された。

この分解において初期には、分解されたベンゼンよりも少量のメタンしか生じなかったが、ベンゼンを再投与し、培養を継続すると、ベンゼン分解に伴ってメタンが生成した。ベンゼン分解後での硫酸イオン濃度に減少が認められたことから、初期には硫酸還元反応によるベンゼン分解が生じたこと、ベンゼン分解が進むにつれ硫酸イオンが枯渇し、メタン生成ベンゼン分解へと移行したことが示された。メタン生成条件と硫酸還元条件でのベンゼン分解反応機構が似ていることも示唆されており、本研究で得られた培養系が、メタン生成条件でも硫酸イオンを利用して、ベンゼン汚染地下水を処理できる可能性が示された。

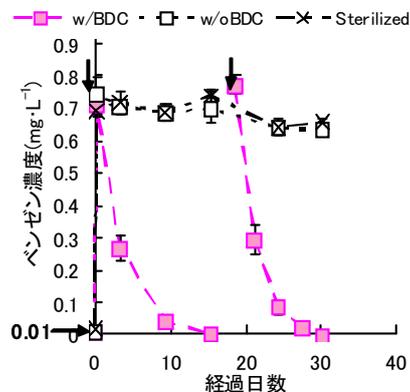


Fig. 8 ベンゼン分解集積培養系による実汚染地下水におけるベンゼンの分解

#### ② クロロエチレン類との同時分解

ベンゼン分解培養系と脱塩素系を混合した培養系では、土浦培養系+脱塩素系 (Fig.9)、新芝川培養系+脱塩素系ともにベンゼン濃度と TCE 濃度は減少した。TCE の脱塩素化反応の生成物である cis-1,2-DCE と VC は、測定期間中ほとんど観測されず、TCE はエチレンへと速やかに分解されていると考えられた。また、混合培養系において、実験開始から TCE が検出された 10 日後までの間、ベンゼン濃度と TCE 濃度は同時に減少しており、

これらの分解が同時に起きていることが示された。この同時分解現象は、ベンゼン分解培養系として土浦培養系、新芝川培養系を用いた双方の培養系で起きており、もとの土壤に依らず、ベンゼン分解能を有していれば同時分解が起こり得ることが示唆された。また、ベンゼンの減少速度に着目すると、混合培養系においてベンゼンの分解速度は実験開始から TCE 濃度が検出限界 (0.005mg/L) 以下になった後も大きな変化はなく、ベンゼンの減少速度は共存 TCE 濃度に依らなかった。さらに、ベンゼン、TCE を同時に添加した混合培養系での減少速度 (ベンゼン 約 0.4mg/(L・day)、TCE 約 0.15 mg/(L・day)) は、混合前の培養系の減少速度 (ベンゼン約 0.3mg/(L・day)、TCE 約 0.1mg/(L・day)) と大きな差はなかった。このことから、混合培養系でのベンゼン分解と TCE 脱塩素化は、双方に影響を与えることなく進行したことが示された。

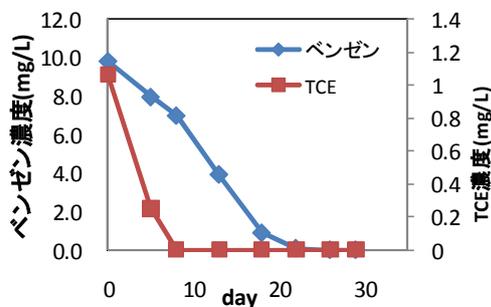


Fig. 9 ベンゼンとトリクロロエチレンの同時分解

#### 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 1 件)

- ① Sakai N, Kurisu F, Yagi O, Nakajima F, Yamamoto K, Identification of putative benzene-degrading bacteria in methanogenic enrichment cultures, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, 108, 2009, 501-507.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Futoshi Kurisu, Hiroki Masumoto, Ikuro Kasuga, Hiroaki Furumai Methanogenic benzene degradation pathways examined by stable isotope tracers 13th International Symposium on Microbial Ecology, PS.07.057 2010 年 8 月 28 日～9 月 1 日 シアトル (米国)

- ② 對馬 育夫, 舛本 弘毅, 春日 郁朗, 栗栖 太, 古米 弘明, メタン生成ベンゼン分解集積培養系における微生物群集構造および機能解析, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010/3/17, 福岡大学

- ③ 舛本 弘毅, 栗栖 太, 對馬 育夫, 春日 郁朗, 古米 弘明, メタン生成嫌気集積培養系におけるベンゼン分解経路の同位体トレーサーを用いた検討, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010/3/17, 福岡大学

- ④ 舛本弘毅, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明, 嫌気集積培養系によるベンゼンからのメタン生成の同位体トレーサーを用いた確認, 第 25 回日本微生物生態学会, 2009/11/21, 広島大学

- ⑤ 舛本弘毅, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明, 複数土壌からの嫌気ベンゼン分解微生物群の集積と分解活性に及ぼす温度の影響, 第 43 回日本水環境学会, 2009/3/17, 山口大学

[図書] (計 1 件)

- ① Kurisu F, Bioremediation of Groundwater and Soil in Urban Areas. In: Takizawa S. (ed.) *Groundwater Management in Asian Policy Cities - Technology and Policy for Sustainability*, Springer, p.207-221, 2008.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗栖 太 (KURISU FUTOSHI)

研究者番号 : 30312979