

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310062

研究課題名(和文) 植生回復を実現する第三世代バイオレメディエーション基盤技術

研究課題名(英文) New bioremediation system for hydrocarbon contaminated soil using plants and microorganisms.

研究代表者

久保 幹 (Kubo, Motoki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60249795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：石油分解菌の生育や活性を維持することにより、土壤中の石油分解効率が向上する。本研究では、これまでの無機塩で石油分解菌の生育・活性維持から、有機物を用いた新しい手法を考案した。この手法を使うことにより、これまで1週間の生育・活性維持から4週間まで延長することが可能となり、バイオレメディエーションの効率が著しく向上した。

一方、石油汚染浄化を確実にするためには、植生回復を実現する土壤にまで回復させる必要がある。本研究では、石油汚染10mg/kg以下でも植物生長に影響を及ぼすことを明らかにし、植物と微生物を用いた微量の石油を分解除去する第三世代バイオレメディエーションシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Hydrocarbon bioremediation efficiency is improved by maintaining growth and activity of hydrocarbon degrading microorganisms. In this study, new efficient bioremediation system using organic materials instead of inorganic materials was constructed. The bacterial growth and activity were extended 1week to 4 weeks using the new system, subsequently the bioremediation efficiency was drastically improved.

On the other hand, plant growth requires complete removal of the hydrocarbon in the soil. Small amount of hydrocarbon contamination in the soil (less than 10mg/kg) influences the plant growth. In this study, third generation of bioremediation system was constructed with plants and microorganisms for degradation of small amount of hydrocarbon from the soil.

研究分野：環境微生物学、環境科学

キーワード：バイオレメディエーション 石油分解菌 植生回復 炭化水素 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

効率の良い石油分解菌の分離・同定が行われ、飛躍的に石油汚染土壌の効率が改善された。しかしながら、当該微生物の生育の維持が十分にコントロールできないため、バイオレメディエーションの更なる効率の向上が足踏みしている現状であった。

一方、石油汚染土壌浄化の目安は、概ね 1,000 mg/kg 以下ということで浄化処理がされていたが、植生に影響を与えるかどうか明らかになっていなかった。また植生を回復する土壌状況も明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

石油分解菌の生育と活性を維持する環境条件を明らかにすること、また植生を維持できる環境条件を明らかにすること、さらにはこれらの条件を勘案し、植生回復を実現する第三世代バイオレメディエーションシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

石油分解菌の生育を向上させるバイオマスを探索し、土壌中の菌数とバイオマスの量比を解析し、最適条件を明らかにした。また、科の異なる複数の植物を用い、土壌中の石油濃度と植物生育の関係を詳細に調べた。最終的に、石油分解菌、バイオマス資材、そして植物を組み合わせた条件を作成し、油分量を指標として石油分解を解析し、最適条件を確定した。

4. 研究成果

(1) 石油分解菌の生育・活性を向上させるバイオマスの量比を明らかにした。

全炭素 20,000 mg/kg、全窒素 1,000 mg/kg、C/N 比 : 10 ~ 20。

(2) 土壌中の石油成分が 100 mg/kg 以下でも植生に影響を及ぼすことを明らかにした。

(3) 石油分解菌、バイオマス、および植物を用い、植生回復を行う新規(第三世代)バイオレメディエーションシステムを構築した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. A new proposal for a soil fertility index (SOFIX) for organic agriculture and development of a SOFIX database for agricultural fields, D. Adhikari, T. Kai, M. Mukai, K. S Araki, and M. Kubo, Current topics in biotechnology, *in press* 査読有
2. 清酒・勝馬米、久保幹、大学時報、100-101, No. 360, (2015). 査読有
3. Evaluation of soil fertility for plant growth based on bacterial biomass and material circulation in soil environment, M. Kubo, S. Horii, T. Matsuno, M. Mukai, and D. Adhikari, Recent Development in Biotechnology,

(巻) 1, 147-160, 2014. 査読有

4. 沖縄県内の粘土質土壌を用いた油汚染土壌のバイオパイル工法、門倉伸行、佐々木静郎、村上順也、仲村紳、金城和哉、村田均、川口博史、久保幹、向真樹、Dinesh Adhikari、環境浄化技術、13 巻、35-42、(2014). 査読無
5. Analysis of nitrification in agricultural soil and improvement of nitrogen circulation with autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, T. Matsuno, S. Horii, T. Sato, Y. Matsumiya, and M. Kubo, Applied Biochemistry and Biotechnology, 169, 795-809, (2013). 査読有
6. Distribution of Hydrocarbon Degrading Bacteria in the Soil Environment and their Contribution to Bioremediation, Y. Fukuhara, S. Horii, T. Matsuno, Y. Matsumiya, M. Mukai, and M. Kubo, Applied Biochemistry and Biotechnology, 170, 329-339, (2013). 査読有 DOI:10.1007/s12010-013-0170-x.
7. Isolation and identification of phytate degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil, S. Horii, T. Matsuno, J. Tagomori, M. Mukai, D. Adhikari, and M. Kubo, The Journal of General and Applied Microbiology, 59, 353-360 (2013). 査読有
8. 有機農業における新たな土壌診断の可能性(土壌肥沃度指標:SOFIX)、久保幹、野菜情報、(独)農畜産推進機構、111 巻、2-3 (2013). 査読有
9. 有機農業のための畑の診断指標 SOFIX、久保幹、現代農業、10 月号、252-255、(2013). 査読有
10. 地力と国力、久保幹、AFC Forum、10 月号、2、(2013). 査読有
11. 農地窒素循環の見える化 - 物質循環系を考えた土づくり -、松野敏英、堀井幸江、福原優樹、松宮芳樹、久保幹、土づくりとエコ農業、6・7月号、50-55、(2012). 査読有
12. Soybean as a nitrogen supplier. Y. Matsumiya, S. Horii, T. Matsuno, and M. Kubo, In Teck, Edited by James E. Board, 49-60, (2012). 査読有
13. Analysis of peptide uptake and location of root hair-promoting peptide accumulation in plant roots. J. Peptide Science, Y. Matsumiya, R. Taniguchi, and M. Kubo, **18**, 177-182, (2012). 査読有
14. Further stabilization of Leu155 mutant thermolysins by mutation of an autodegradation site, Y. Matsumiya, N. Murata, K. Inouye,

and M. Kubo, Applied Biochemistry and Biotechnology, **166**, 735-743, (2012).査読有

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 「嫌気・好気環境下での石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける菌叢解析」(酒井晴奈, 向真樹, アディカリディネッシュ, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
2. 「石油分解菌 *Gordonia* 属および *Rhodococcus* 属における *alk* 遺伝子系統解析」(堀口悠, 向真樹, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
3. 「TC, TN および C/N 比の調整による土壌中の硝化活性への影響」(ジンショウミン, Dinesh Adhikari, 向真樹, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 28 日)
4. 「環境中の炭素分布とアルカンヒドロキシラーゼ(*alk*) 遺伝子との関係解析」(植田雄仁, 向真樹, ADHIKARI Dinesh, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 27 日)
5. 「石油分解菌によるワックス分解能の解明」(松浦太一, 向真樹, ADHIKARI Dinesh, 荒木希和子, 久保幹, 日本農芸化学会, 2015 年度大会, 岡山県岡山大学, 2015 年 3 月 27 日)
6. 「アルカンヒドロキシラーゼ保持菌株の分布と役割」(松浦太一, Dinesh Adhikari, 向真樹, 荒木希和子, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 11 日)
7. 「土壌環境中の炭化水素汚染が植物に及ぼす影響の解析」(樋口空生, 堀伸行, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 向真樹, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 10 日)
8. 「バイオレメディエーションに及ぼす植生の影響解析」(堀伸行, Dinesh Adhikari, 荒木希和子, 向真樹, 久保幹, 日本生物工学会, 2014 年度大会, 北海道・札幌コンベンションセンター, 2014 年 9 月 10 日)
9. A new organic agricultural system based on soil fertile index (SOFIX). M. Kubo, et al., The 1st Joint Seminar New Core to Core Program A. Advanced Research Networks on “Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas (World-Class Research Hub of Tropical Microbial Resources and Their Utilization)”, Bangkok Thailand, August 10th-11th, 2014.
10. Microbial diversities in the chemical and organic agricultural soils. M. Kubo, et al., The 1st Satellite Seminar of New Core to Core Program “Establishment of an international Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas (World-Class Research Hub of Tropical Microbial Resources and Their Utilization)”, Malang Indonesia, August 8th, 2014.
11. Motoki Kubo, “A New Agricultural System with Biomass Based on Environmental Material Circulation”, Illinois College, IL, USA, March 28, 2014
12. 「有機資材を用いた石油分解菌の長期維持によるバイオレメディエーションの効率化」(中辻貴広, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
13. 「*Rhodococcus* 属細菌におけるアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子と長鎖シクロアルカン分解との関係解析」(川越大樹, 久保田謙三, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
14. 「Analysis of nitrogen fixing bacteria in agricultural soil」(Chalee Kongwichian, Masaki Mukai, Dinesh Adhikari, Motoki Kubo, 日本農芸化学会, 2014 年度大会, 東京都・明治大学生田キャンパス, 2014 年 3 月 28 日)
15. What is the Excellent Soil for Plant Growth? Improvement of Soil Environment for Efficient Agriculture-, M.Kubo as a keynote speaker in International Interdisciplinary Studies Seminar (IISS) Malang Indonesia, October 28, 2013.
16. アスファルテン分解系状菌の分離及び分解能の評価」(大槻祐人, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹)『日本生物工学会』2013 年度大会, 広島県広島国際会議場, 2013 年 9 月 20 日
17. 「石油分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 のバイオレメディエーション中における挙動解析」(堀口悠, 大槻祐人, Dinesh Adhikari, 向真樹, 久保幹)『日本生物工学会』

- 2013 年度大会、広島県広島国際会議場、2013 年 9 月 20 日
18. 「Existence of *nifH*, *amoA* and *bpB* genes carrying bacteria in agricultural soils」(M. Kubo, et al.) 『日本生物工学会』2013 年度大会、広島県広島国際会議場、2013 年 9 月 20 日
 19. 「Isolation and identification of phytate degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil」(Dinesh Adhikari , Sachie Horii, Masaki Mukai, M. Kubo) 『日本生物工学会』2013 年度大会、広島県広島国際会議場、2013 年 9 月 20 日
 20. 農地土壌における土壌肥沃度(全炭素量、全窒素量、C/N 比)の解析と、硝化活性の促進」(向真樹、松野敏英、Dinesh Adhikari 、久保幹) 『日本生物工学会』2013 年度大会、広島県広島国際会議場、2013 年 9 月 20 日
 21. 「*Rhodococcus* 属細菌における炭化水素分解能とアルカンヒドロキシラーゼ (*alkB*) 遺伝子の関係解析」(藤原幹大、松野敏英、福原優樹、堀井幸江、松宮芳樹、久保幹) 『日本生物工学会』2012 年度大会、兵庫県・神戸国際会議場 2012 年 10 月 24 日)
 22. 「土壌環境中における *alkB* 遺伝子を有する石油分解菌の分布解析」(福原優樹、松野敏英、堀井幸江、松宮芳樹、久保幹) 『日本生物工学会』2012 年度大会、兵庫県・神戸国際会議場 2012 年 10 月 24 日)
 23. 「バイオレメディエーションにおける炭化水素分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 及び *Gordonia terrae* NDKY76A の土壌細菌に及ぼす環境影響評価」(松宮芳樹、門倉伸行、佐々木静郎、福原優樹、堀井幸江、松野敏英、久保幹) 『日本生物工学会』2012 年度大会、兵庫県・神戸国際会議場 2012 年 10 月 24 日)
 24. 農地土壌における独立栄養性アンモニア酸化細菌と硝化の関係解析」(松野敏英、堀井幸江、福原優樹、松宮芳樹、久保幹) 『日本生物工学会』2012 年度大会、兵庫県・神戸国際会議場 2012 年 10 月 24 日)
 25. 「土壌肥沃度診断に基づく農地土壌のリン循環の解析」(堀井幸江、松野敏英、福原優樹、松宮芳樹、久保幹) 『日本生物工学会』2012 年度大会、兵庫県・神戸国際会議場 2012 年 10 月 24 日)
 26. A New Approach for an Organic Agriculture Based on Material Circulation by Environmental Microorganism. M. Kubo, Y. Matsumiya, S. Sanpa, T. Matsuno, S.

Horii, S. Yano, N. Rattanakit-Chandet, W. Pathom-Aree, .S. Bovonsombu, A. Plikomol., T. Tachiki, M. Wakayama, 3rd MEXT-ARDA Project Concluding Joint Seminar and JSPS-NRCT Asian Core Program Joint Seminar, Bangkok Convention Center, Central World, Thailand, August 26, 2012.

〔図書〕(計 7 件)

1. 生命科学 2 生物個体から生体系へ、生命科学編集委員会編、久保幹、コロナ社、134 頁 (2013)。
2. バイオテクノロジー 第 2 版、久保幹、新川英典、竹口昌之、蓮実文彦、大学教育出版、246 頁 (2013)。
3. 遺伝子とタンパク質のバイオサイエンス、杉山政則、久保幹、熊谷孝則、共立出版、152 頁 (2013)。
4. 環境微生物学、久保幹、森崎久雄、久保田謙三、今中忠行、化学同人、2-178 (2012)。
5. 生命科学 1 生物個体から分子へ、生命科学編集委員会編、コロナ社、1-205、(2012)。
6. 環境微生物の分析・評価(分担執筆) 極限環境生物の産業展開、久保幹、シーエムシー出版、14-21、(2012)。
7. ひらく、ひらく「バイオの世界」、日本生物工学会編、化学同人、2-162、92-93 (2012)(分担執筆)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称:『水浄化処理装置及び水浄化処理方法』
 発明者:久保幹、向真樹、Dinesh Adhikari
 権利者:学校法人立命館、ワコール
 種類:特許
 番号:特願 2014-214802
 出願年月日:平成 26 年 10 月 21 日
 国内外の別:国内

名称:『植物の生育を促進する新規軽量人工土壌』
 発明者:久保幹、堀井幸江、足立弘充、野中純一、西川邦之
 権利者:学校法人立命館、(株)ソフト 99 コーポレーション、アイオン(株)
 種類:特許
 番号:特願 2013-13039
 出願年月日:2013 年 1 月 28 日
 国内外の別:国内

6. 研究組織
 (1)研究代表者

久保 幹(KUBO MOTOKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：60249795

(2)研究分担者

森崎 久雄(MORISAKI HISAO)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：50125671